

TESE

**ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE**

*Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez)

DANIELA CARVALHO CRANCHI

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE  
*Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez)**

DANIELA CARVALHO CRANCHI

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR  
Dr MÁRIO GERALDO DE CARVALHO

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química Orgânica, área  
de Concentração em Fitoquímica

Itaguaí, Rio de Janeiro

Outubro, 1994

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE  
*Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez)**

Dr.Mário Geraldo de Carvalho

Dr.Ronoel da Silva Godoy

Dr.Heber dos Santos Abreu

Dr<sup>a</sup>.Leila Vilela Alegrio (Suplente)

*Leila Vilela Alegrio*  
*Heber dos Santos Abreu*  
*Mário Geraldo de Carvalho*

*Dedico esta tese à memória  
de Roberto Cranchi e  
a Sâmara Carvalho Pereira  
pela sua esperança  
no futuro.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Mário Geraldo de Carvalho pelo incentivo e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho e pela sua orientação que tornou possível a sua realização.

Ao professor Anselmo Alpande de Morais e Raimundo Braz Filho pelo incentivo que muito contribuíram na escolha pelo curso de Pós-Graduação em Química Orgânica - Fitoquímica.

A Áurea de Almeida Tatagiba pela sua grande amizade, incentivo, apoio e pelos espectros de RMN.

Ao professor Acácio Geraldo de Carvalho, do Instituto de Florestas da UFRRJ, a José Luiz da S. Maia e equipe da Divisão Ambiente da DURAFLORE / S.A. pelo fornecimento e classificação do material botânico.

Ao professor José Maria Barbosa Filho, da Universidade Federal da Paraíba, pelos espectros de massas.

A Carla Castellano, EMBRAPA-CNPQ-PR, pelos testes e avaliação do crescimento do fungo.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFRRJ, que muito têm se empenhado pela excelência deste, pela sua amizade e apoio.

A todos os alunos de Pós-Graduação em Química Orgânica e a Simone pela convivência e amizade que tornaram este curso uma experiência ainda mais enriquecedora.

Aos funcionários do curso de Pós-Graduação e Departamento de Química pela amizade, colaboração e apoio.

Aos amigos, que conviveram comigo no alojamento, pelos gestos de apoio e palavras de incentivo sempre presentes.

A Eduardo e Viviane pela amizade, orientação e digitação deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos por fazerem parte da minha jornada.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	10
2.1. Materiais e Métodos	10
2.2. <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i> e os constituintes isolados	11
2.2.1. Material Botânico	11
2.2.2. Substâncias Isoladas de <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i> (Martinez)	13
2.3. Isolamento dos Constituintes Químicos da Madeira de <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i> (Martinez)	14
2.3.1. Preparação dos extratos	14

2.3.2. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Extrato Hexânico	14
2.3.3. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Extrato Clorofórmico e Metanólico	15
2.3.4. Preparação dos derivados das substâncias isoladas.	19
2.3.4.1. Acetilação	19
2.3.4.2. Metilação	19
2.3.4.3. Hidrogenação	20
3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i> (Martinez)	21
3.1. Determinação estrutural das substâncias I e II	21
3.2. Determinação estrutural da substância III	30
3.3. Determinação estrutural das substâncias IV e V	36
3.4. Determinação estrutural das substâncias VI e VII	60
3.5. Determinação estrutural das substâncias VIII e IX	81
3.6. Determinação estrutural das substâncias X e XI	93
3.7. Determinação estrutural da substância XII	108
3.8. Identificação da substância XIII em mistura com XII	115
4. BIBLIOGRAFIAS	117



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Substâncias isoladas de <i>Pinus strobus L</i>	8
Tabela 2 : Grupo de frações recolhidas da coluna de fracionamento do extrato hexânico e os respectivos eluentes utilizados	16
Tabela 3 : Técnicas de purificação e resultados obtidos das análises dos grupos de frações reunidas	17
Tabela 4 : Dados das reações de acetilação	19
Tabela 5 : Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias I e II e comparados com modelo citado na literatura [26]	23
Tabela 6 : Identificação dos carbonos $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ , $\text{CH}$ e $\text{C}$ da substância III através de RMN $^{13}\text{C}$ (PND e DEPT, 50,3 MHz)	30
Tabela 7 : Comparação dos dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de III com dados do lariciresinol registrado na literatura [ 27	32
Tabela 8 : Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) obtidos dos espectros RMN $^1\text{D}$ e $2\text{D}$ de IV e de seu derivado acetilado	38

Tabela 9 : Atribuições dos deslocamentos químicos e dados obtidos das análises de 1D e 2D de $^1\text{H}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) das substâncias V, V-Ac e V-Me registrados em $\text{CDCl}_3$	42
Tabela 10 : Dados de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) da substância VI e seu derivado acetilado	62
Tabela 11 : Íons fragmentários correspondentes aos picos presentes no espectro de massas da mistura das substâncias VI e VII	63
Tabela 12 : Atribuições das frequências de absorção de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de VII e VII-Me.	66
Tabela 13 : Interpretação das bandas de absorção do espectro no infravermelho da mistura de VIII e IX	81
Tabela 14 : Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz, PND e DEPT, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de VIII comparados com modelos da literatura [35]	83
Tabela 15 : Fragmentos correspondentes aos picos mais intensos registrados no espectro de massas obtidos por impacto de elétrons da mistura de VIII e IX	84
Tabela 16 : Resultados das análises dos espectros obtidos com irradiação dupla e subtração de espectros da mistura das substâncias VIII e IX	85
Tabela 17 : Interpretação das bandas de absorção do espectro no infravermelho da mistura de X e XI	93
Tabela 18 : Frequências de absorção dos $^1\text{H}$ (200 MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) da mistura das substâncias X e XI	96
Tabela 19 : Dados espectrométricos de RMN $^1\text{H}$ (1D e 2D, 200 MHz), $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) e do produto de hidrogenação da mistura de X e XI	97
Tabela 20 : Número de $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$ , $\text{CH}$ e $\text{C}$ da substância XII obtido da análise do espectro de RNM $^{13}\text{C}$ (PND e DEPT, $\text{CDCl}_3$ )	108

- Tabela 21 : Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND e DEPT) da substância XII e comparação com modelos citados na literatura [40,41] 110
- Tabela 22 : Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de XII e XIII e comparação com modelos da literatura [39] 115

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) da substância I, em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	25
Figura 1.2 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) totalmente desacoplado da substância I em $\text{CDCl}_3$	26
Figura 1.3 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons sobre a substância 1	27
Figura 2.1 - Espectro no infravermelho da substância II em pastilha de KBr	28
Figura 2.2 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) da substância II, em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	29
Figura 3.1 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) da substância III, em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	33
Figura 3.2 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz, PND e DEPT), ( $\theta = 90^\circ$ e $135^\circ$ ) em $\text{CDCl}_3$ da substância III	34
Figura 3.3 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) da substância III em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	35
Figura 4.1 - Espectro no infravermelho da substância IV em pastilha de KBr	43
Figura 4.2 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) da substância IV, em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	44

- Figura 4.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  e TMS referência interna 45
- Figura 4.4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND e DEPT), ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  46
- Figura 4.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{JCH}$ )] da substância IV 47
- Figura 4<sub>Ac</sub>.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado acetilado da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 48
- Figura 4<sub>Ac</sub>.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  49
- Figura 5.1 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância V em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 50
- Figura 5.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado da substância V em  $\text{CDCl}_3$  51
- Figura 5.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância V em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 52
- Figura 5.4 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{JCH}$ )] da substância V em  $\text{CDCl}_3$  53
- Figura 5.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^n\text{JCH}$ ,  $n = 1,2,3$ )] da substância V em  $\text{CDCl}_3$  54
- Figura 5.6 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da substância V..... 55
- Figura 5<sub>Ac</sub>.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado acetilado da substância V em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 56
- Figura 5<sub>Ac</sub>.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância V 57
- Figura 5<sub>Me</sub> 1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado metilado da substância V em  $\text{CDCl}_3$  58

- Figura 5Me 2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros do derivado metilado da substância V 59
- Figura 6.1 - Espectro no infravermelho da substância VI 67
- Figura 6.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 68
- Figura 6.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 69
- Figura 6.4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  da substância VI 70
- Figura 6.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{JCH}$ )] da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  71
- Figura 6.6 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^n\text{JCH}$ ,  $n = 1,2,3$ )] da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  72
- Figura 6.7 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da substância VI ... 73
- Figura 6.8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros das substâncias VI e VII 74
- Figura 6Ac 1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado acetilado da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 75
- Figura 6Ac 2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  76
- Figura 6Ac 3 - Espectro no infravermelho do derivado acetilado da substância VI em pastilha de KBr 77
- Figura 7.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância VII em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 78
- Figura 7.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) de substância VII em  $\text{CDCl}_3$  79

- Figura 7Me.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros do derivado metilado da substância VII 80
- Figura 8.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da mistura das substâncias VIII e IX em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 86
- Figura 8.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da mistura das substâncias VIII e IX 87
- Figura 8.3 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) da mistura das substâncias VIII e IX 88
- Figura 9.1 - Espectro de infravermelho da mistura das substâncias VIII e IX em filme (NaCl) 89
- Figura 9.2 (a) - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da mistura das substâncias VIII e IX 90
- Figura 9.2 (b) - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da mistura das substâncias VIII e IX 91
- Figura 9.3 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da mistura das substâncias VIII e IX 92
- Figura 10.1 - Espectro no infravermelho da mistura de substâncias X e XI em filme (NaCl) 98
- Figura 10.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da mistura das substâncias X e XI, em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 99
- Figura 10.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da mistura das substâncias X e XI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna 100
- Figura 10.4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  da mistura das substâncias X e XI 101
- Figura 10.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{JCH}$ )] da mistura das substâncias X e XI 102

Figura 10.6 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY ( $^n\text{JCH}$ , $n = 1,2,3$ )] da mistura das substâncias X e XI .....	103
Figura 10.7 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da mistura das substâncias X e XI .....	104
Figura 11.1 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) do produto de hidrogenação de X e XI em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	105
Figura 11.2 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) do produto de hidrogenação de X e XI em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna ....	106
Figura 11.3 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$ e $135^\circ$ ) em $\text{CDCl}_3$ do produto de hidrogenação de X e XI ....	107
Figura 12.1 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$ e $135^\circ$ ) da substância XII em $\text{CDCl}_3$	111
Figura 12.2 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) a substância XII em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	112
Figura 12.3 - Espectro de RMN 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) da substância XII em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	113
Figura 12.4 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da substância XII	114
Figura 13.1 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 Mz) da mistura das substâncias XII e XIII em $\text{CDCl}_3$ e TMS como referência interna	116



## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Interpretação do espectro de massas da substância I	24
Esquema 2 - Interpretação do espectro de massas da substância V	40
Esquema 3 - Interpretação dos espectros de massas da substância VI	65

## RESUMO

Com objetivo de correlacionar a química dos metabólitos secundários da madeira de pinheiros tropicais com a susceptibilidade ao ataque da "vespa-da-madeira" (*Sirex noctilio* - Sericidae), exemplares de pinus cultivados no Brasil foram fornecidos pela equipe técnica da DURAFLOA S/A (Agudos - SP.) para serem estudadas.

O extrato hexânico e clorofórmico de *Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez) foi submetido a fracionamento cromatográfico e cristalização das frações e forneceram sitosterol, 3-O-acilsitosterol, lariciresinol, quatro flavonóides [4-hidroxi-7-metoxi-flavanona (pinostrobina), 6-metil-pinostrobina, 4-hidroxi-7-metoxi-flavona (tectocrisina), 6-metil-tectocrisina], quatro trans-estilbenos [3-metoxi-5-hidroxi-7,8 diidro estilbeno (éter metil-diidro-pinossilvina), 3,5-dimetoxi-7,8-dihidro estilbeno (éter dimetil diidro pinossilvina), 3-metoxi-5-hidroxi-estilbeno (eter metil pinossilvina) e 3,5-dimetoxi estilbeno (éter dimetil pinossilvina), e dois diterpenos (ácido isopimárico e ácido diidroabiético)

As estruturas das substâncias foram determinados através de análise dos dados de IV, RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT e NOE-DS) e 2D [ $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$  Heterocosy e  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ , n = 1, 2 e 3 - COLOC)] e E.M. das substâncias naturais e derivados.

## ABSTRACT

The correlation of the secondary metabolites from the tropical *Pinus* species by *Sirex noctilio* (Sericidae) "wood's wasp" motivated to investigate the substances from *Pinus strobus* var *chiapensis* that was supplied by technicians from DURAFLORES S/A (Agudos - SP - Brazil).

The hexanic extract of the wood of *P. strobus* var. *chiapensis* (Martinez) after chromatographic fractionation and recrystallisation afforded sitosterol, 3-O-acylsitosterol, lariciresinol, four flavonoids [4-hydroxy-7-methoxy-flavanone (pinostrobin), 6-methyl-pinostrobin, 4-hydroxy-7-methoxy-flavone (tectochysin) and 6-methyl-tectochrysin], four stilbenes [3-methoxy-5-hydroxystilbene (pinosylvin-monomethylether), 3-methoxy-5-hydroxystilbene (dihydropinosylvin-monomethylether), 3,5-dimethoxy-dihydro stilbene (dihydropinosylvin-dimethylether) and 3,5-dimethoxy-stilbene (pinosylvin dimethylether)] and two diterpenes (isopimaric acid and dehydroabietic acid).

The structures were determined based on IR, NMR and MS spectral data including two dimensional techniques and NOE experiments of the natural compounds as well as of the acetylated and methylated derivatives.

## 1. INTRODUÇÃO

A quimiotaxonomia propõe a utilização da composição química das espécies vegetais para se chegar a uma melhor compreensão do grau de parentesco e da evolução das espécies. Neste sentido, diversas classes de substâncias têm sido estudadas em Coniferae, dentre outras, as dos flavonóides, terpenos e alcalóides. Porém, é sobretudo do grupo dos polifenóis, dos flavonóides mais particularmente, que se tem o maior número de informações, e portanto são os que geralmente dão os melhores resultados.

Apesar de algumas famílias e subfamílias da ordem Coniferae não serem bem definidas com relação aos flavonóides, tem sido observado que as Pinales são bem caracterizadas pela total ausência de biflavonas e abundância de prodelfinidinas.

Os flavonóides são bastante ricos quanto à informações quimiosistemáticas; sendo que a caracterização para determinados gêneros da família pinaceae é melhor definida do que para outros. Por exemplo, o gênero *Abies* possui flavonóides que os caracterizam quanto a variação biogeográfica e/ou seccionamento botânico, porém o gênero *Picea* não apresenta tais relações. Enquanto certas espécies são remarcadas homogeneamente (*Abies pectinata*), outras mostram um claro polimorfismo dos flavonóides (*Picea excelsa*, *Pinus sylvestris*).

As duas proantocianidinas majoritárias encontradas em Coníferas são a procianidina (diidroxilada sobre a fenila lateral) e prodelfinidina (triidroxilada na fenila lateral) cuja relação de teores consiste num bom indicador quimiosistemático. De fato, é classificadamente reconhecido que a fenil-triidroxilação (prodelfinidina, miricetina) é sinônimo de primitividade fitoquímica, enquanto a presença de flavonóides menos hidroxilados (procianidinas, kaempferol) mostram ao contrário, um caráter evoluído. Neste sentido, os gêneros *Picea* e *Abies* representam dois pólos opostos, avançado e primitivo, enquanto *Pinus* ocupa uma posição particular devido a riqueza em prodelfinidinas. Com base na presença de flavonas e flavanonas, Erdtman (1955) confirmou a divisão clássica do gênero *Pinus* em *Haploxyton* e *Diploxyton* [1]. Outro exemplo de caracterização quimiosistemática está na constatação de que o subgênero *Haploxyton* é rico em estilbenos, diidroestilbenos, flavonas e flavanonas derivadas do floroglucinol e o grupo *strobi* possui flavonas e flavanonas derivadas do metil floroglucinol, enquanto o subgênero *Diploxyton* apresenta estilbenos e flavanonas, porém são desprovidos de diidroestilbenos e flavonas [2].

Há, porém, sensíveis diferenças dentro de cada subgênero ou grupo. Assim, na seção *Cembra*, o grupo *strobi* é fitoquimicamente mais primitivo do que os *Cembrae* e *Flexiles*. E no próprio grupo *strobi* as espécies *Pinus parviflora* e *Pinus pumila* são opostas, a primeira é rica em myricetina, enquanto a segunda é desprovido desta substância [1].

As correlações sistemáticas reveladas acima mostram apenas algumas informações citadas na literatura que foram adquiridas a partir do conhecimento fitoquímico das espécies vegetais. Em especial, os flavonóides fornecem importantes dados dentro da família *Pinaceae*, e podem ser muito informativos, principalmente a nível intra-específico. Também podem

fornecer subsídios para futuras áreas de pesquisa básica (biologia das populações, biogeografia quimiosistemática, genética das populações, bioquímica-ecológica, etc) e florestal (melhoramento genético, interação inseto-planta, alelopatia, etc.).

Como resultado do aumento da pressão social decorrente da conscientização ecológica, é urgente o desenvolvimento de uma política de conservação ambiental que preserve a biodiversidade dos diversos ecossistemas nacionais. Através de um manejo florestal adequado às condições de diversas regiões brasileiras e de um planejamento para o plantio de espécies de rápida renovação, com o objetivo de produzir matéria-prima para suprir as necessidades do mercado consumidor de madeira e derivados florestais, será possível resguardar as florestas nativas.

O gênero *Pinus* é constituído por espécies de crescimento rápido, boa rusticidade, alta qualidade de fibra de celulose. Possui diferentes espécies de alta adaptabilidade à diferentes regiões e, também, sua cultura possui manejo e tecnologia industrial conhecidos. Estes fatos tornam o conhecimento da composição química desse gênero de grande interesse florestal, ecológico e econômico. Em especial, a espécie *Pinus strobus* var. *chiapensis*, dentre outras (*P. taeda*, *P. caribea*, *P. oocarpa*, *P. kaesia*), são consideradas as mais adequadas em termos bioclimáticos para algumas áreas da região sudeste, sul de Goiás e Distrito Federal. Por isso estas espécies merecem um conhecimento fitoquímico mais aprofundado para, então, serem melhor aproveitadas economicamente [3].

Entre as inúmeras razões do estudo químico de plantas, a que tem recebido maior atenção é a descoberta de substâncias de importância farmacológica e industrial. Frequentemente, estes trabalhos são desenvolvidos com espécies nativas e nem sempre

abundantes. Neste sentido é bastante relevante o conhecimento da composição química das espécies de fácil cultivo.

É possível que, a longo prazo, o conhecimento da química de espécies industrializadas venha colaborar na resolução de problemas que afetam as culturas em grande escala. Como exemplo pode-se destacar os prejuízos constantes devido ao ataque de pragas como a "Vespa-da-madeira" (*Sirex noctilio*) nos cultivares de *Pinus* spp no sul do país. Foi verificado que árvores mais estressadas são mais atrativas para a "vespa" do que as sadias. Usa-se esta preferência dos insetos para elaborar armadilhas com a finalidade de estudar a fisiologia do inseto e, inclusive, fazer avaliação da suscetibilidade de diferentes espécies de *Pinus* ao ataque da praga [4,5].

Encontra-se, freqüentemente, na literatura trabalhos que correlacionam o ataque do inseto às substâncias voláteis produzidas pelos hospedeiros que podem atrair ou repelir diferentes espécies. O ataque de *Iphs granlicollis* (espécie de besouro) em *Pinus taeda* estressado é estimulado pela presença de terpenos voláteis que são encontrados no floema do hospedeiro. A mistura de germanicol, limoneno, metil chorreicol e mirceno estimulam o ataque de machos e o canfeno (Tabela 1), o das fêmeas [6].

Para as fêmeas da espécie *D. amatella* a mistura de  $\alpha$ -pineno, mirceno e limoneno (Tabela 1) são mais atrativos durante a ovoposição do que outras combinações de terpenos, inclusive de terebentina. A quantidade de terpenos atrativos aos insetos dependem das condições fisiológicas da planta [7].

O vôo disperso de Scolytideos (ex: *Syrex noctilio*) sempre ocorre na direção a determinado material da floresta que exala maiores concentrações de produtos de

degradação. Esta atração primária precede a atração secundária que ocorre em várias espécies devido aos ferormônios [8].

A composição química da terebentina (produtos de degradação) de *Pinus strobus* é responsável pela atração via olfato, sendo a pressão da resina e a composição do floema da árvore os fatores considerados importantes no estado fisiológico do hospedeiro, adequados ou não a ovoposição de *scolytideo*. Os monoterpenos são usados provavelmente pelos insetos para identificar as espécies hospedeiras, mas a ovoposição é feita preferencialmente no espécime com maior grau de umidade [9].

Em relação à "Vespa da madeira" (*Sirex noctilio*: Sericidae) torna-se relevante fazer um estudo para verificar quais dos metabólitos secundários produzidos pelas árvores estressadas que atraem os insetos. Todavia, também, deve-se levar em consideração que, apesar dos fatores como menor pressão de resina e alto grau de umidade serem favoráveis à ovoposição, pode haver ou não, o desenvolvimento das larvas dependendo da composição química do hospedeiro. Esta interferência química pode ocorrer diretamente, sobre as larvas, ou indiretamente, inibindo ou favorecendo a proliferação do fungo associado ao inseto (*Amlosterum areolatum*) que serve de alimento para as mesmas [4].

Entre os metabólitos secundários que interferem no desenvolvimento do fungo podem-se destacar os estilbenos [10,11]. Verificou-se que a presença de pinossilvina e seus éteres monometil em *Pinus sylvestris* é responsável não só pela indigestibilidade da madeira em relação a predadores potenciais como, também, pela sua resistência ao ataque de fungos e nematóides [2,12].



Um exemplo da importância do estudo de fitoalexinas para o melhoramento genético de plantas é a introdução de gens de videira, que biossintetizam estilbenos, com o objetivo de aumentar a resistência do tabaco a infestações por *Botrytis cinerea* [10].

A nível de bioquímica ecológica, pode-se citar o efeito alelopático exercido pela combinação de estilbenos e seus taninos provenientes da casca de *Engelman spruce* sobre a germinação e crescimento de algumas espécies de coníferas (*Picea engelmanni*, *Abies lasiocarpa*, *Tsuga mertensiana*, *Pinus contorta*) [14].

Em termos de utilização de substâncias naturais em farmacologia pode-se citar alguns exemplos a seguir :

Na agropecuária, a ingestão do extrato bruto (rico em diterpenos abiéticos e labdânicos) de *Pinus ponderosa* pelo gado em doses acima de 225 mg/Kg é tóxica, podendo levar à morte, e a administração do ácido isocupressico (isolado da mesma) em doses entre 99 e 152 mg/Kg possui efeito abortivo [15].

Certos diterpenos ácidos possuem atividades antiagregação de plaquetas e, entre estes estão os ácidos deidroabiético e pimárico [16]. É relatado, também, que extratos de agulhas de *Pinus thunbergii* são ricos em ácidos diterpênicos, sendo que o ácido deidroabiético possui atividade antitumoral [17].

O *Pinus parviflora* é uma fonte de lignanas que pode ser usada pela indústria farmacêutica como antitumoral e antiviral [18].

A administração de medicamentos contendo proantocianidinas obtidas da casca de *Pinus maritime* previne doenças causadas por radicais livres [19].

Entre as classes de substâncias abundantes em espécies de *Pinus* estão os flavonóides, sendo que alguns deles possuem atividade antitumoral e antiviral (inclusive anti-HIV) e antibiótica [20]. Outra classe comum neste gênero são os estilbenos, alguns destes possuem ação anticonvulsiva e antibiótica [21].

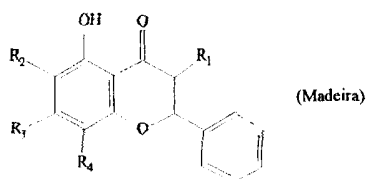
O gênero *Pinus* é de grande importância para a indústria florestal e revela suas potencialidades de uso na indústria farmacêutica, alimentícia, dentre outras, e isto justifica o intenso interesse de trabalhos sobre a composição química deste gênero [22,23,24,25].

O estudo químico de *P. strobus* var. *chiapensis* cultivada no Brasil é um trabalho que ainda não foi desenvolvido e está fornecendo informações sobre os metabólitos secundários mais abundantes procedentes da madeira desta espécie, que está entre as mais atacadas, com maior desenvolvimento das larvas da vespa da madeira. Este trabalho demonstra que esta espécie é uma rica fonte de flavonas, flavanonas e estilbenos.

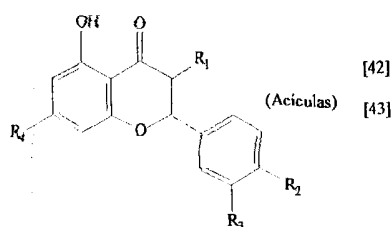
A Tabela 1 revela os trabalhos relacionados com o estudo químico de *Pinus strobus* L. cultivado fora do País. Nela faz-se a constatação das diferentes classes de substâncias presentes nesta espécie, e revela a diversidade química em termos de flavonóides e terpenos.

Tabela 1 : Substâncias isoladas de *Pinus strobus* L.

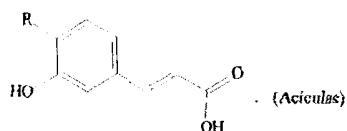
Estrutura Nome (parte da planta) Estrutura Nome (parte da planta) [Referência]



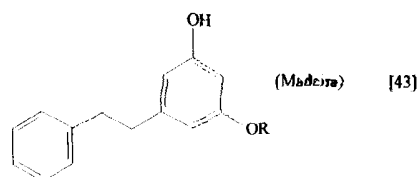
$R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$  : Pinocebrina  
 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$  : Crisina  
 $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OMe$  : Pinoestrobina  
 $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH; R_4 = Me$  : Criptostrobina  
 $R_1 = R_3 = OH; R_2 = H$  : Pinobonksina  
 $R_1 = R_4 = H; R_3 = OH; R_2 = Me$  : Strobopinina  
 $R_1 = R_3 = OH; R_4 = H, R_2 = Me$  : Strobobanksina



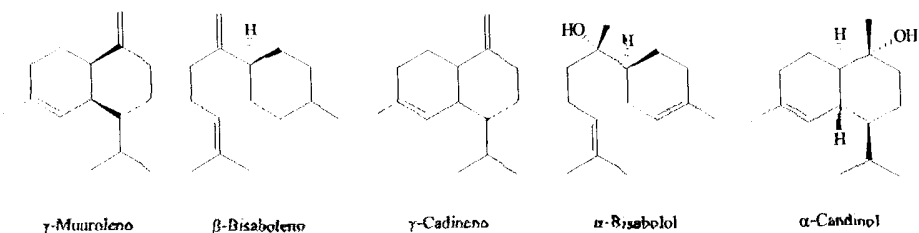
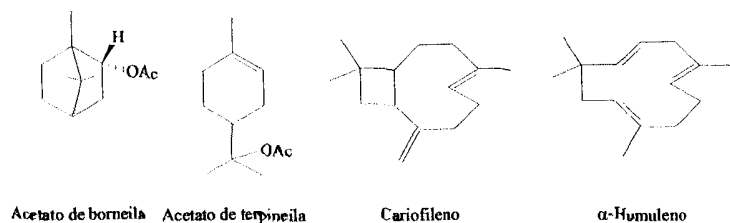
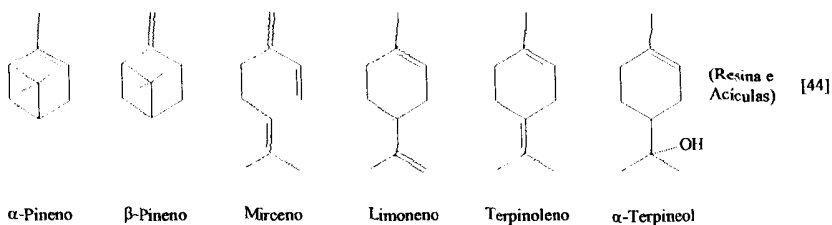
$R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = OMe$  : Tectocrisina  
 $R_1 = O-\beta-D\text{-glucopiranosil}, R_2 = R_4 = OH, R_3 = H$   
 : Kaempferol-3 $\beta$ -D-glic.  
 $R_2 = R_3 = R_4 = OH, R_1 = O-\beta-D\text{-glucopiranosil}$   
 : Quercetina-3 $\beta$ -D-glic  
 $R_2 = R_3 = R_4 = OH, R_1 = O-\alpha\text{-arabnofuranosil}$   
 : Quercetina-3 $\alpha$ -arabnofuranosil

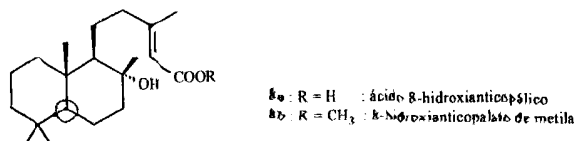
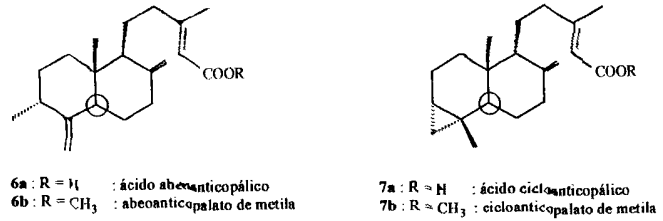
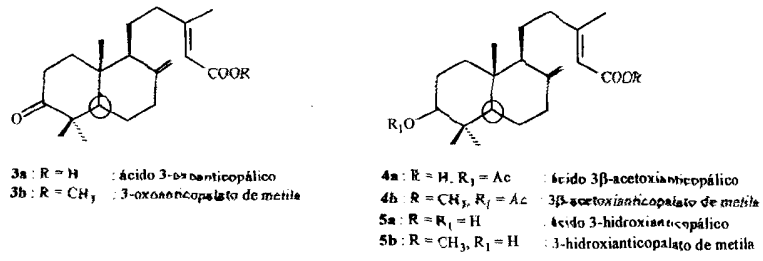
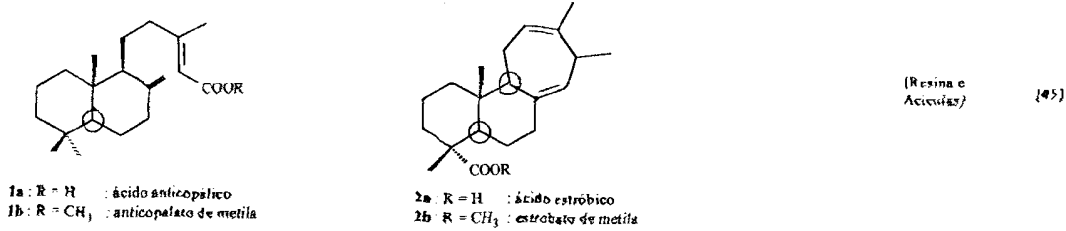
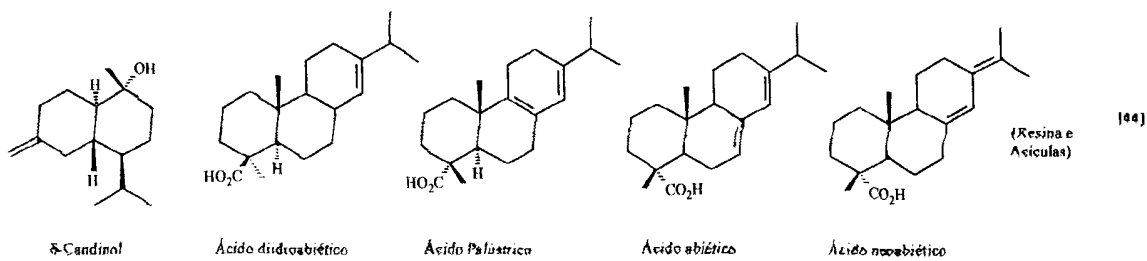


$R = H$  : ácido p-cumárico  
 $R = OH$  : ácido ferrúlico



$R = H$  : Pinosilvina  
 $R = Me$  : Pinosilvina-monometiléter  
 $\Delta^{7,8} R = Me$  : Dihidropinosilvina-monometiléter





## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Materiais e Métodos**

Os extratos foram preparados através de extração em aparelho de Soxhlet.

Os fracionamentos por cromatografia em coluna (C.C.) foram realizados utilizando-se sílica gel da Riedel ou da Merck. Para cromatografia em camada delgada preparativa (C.C.D.P.) foram utilizadas placas de sílica gel com 1,0 mm de espessura. E para cromatografia preparativa circular (cromatotron) utilizaram-se placas de sílica gel 60-PF254 com 10 % de gesso com 2,0 mm de espessura. As placas para cromatografia em camada delgada analítica foram preparadas com 0,5 mm de espessura da sílica gel Merck, 60 Å. As amostras e suas porções foram analisadas e comparadas em três sistemas diferentes de solventes além de espectros de I.V., RMN e pelo ponto de fusão. A revelação foi feita com irradiação U.V. à 254 nm e em cuba saturada de vapor de iodo.

Foram utilizados solventes da marca Merck, Grupo Química ou Rio Lab que foram destilados em coluna vigreux de 1,5 m de comprimento e, quando necessário, redestilado sob pressão reduzida. Os solventes ou sistemas de misturas dos mesmos (v/v), foram eliminados

dos extratos ou das frações por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo. As amostras e suas frações foram secas em pistola Abderhalden antes de serem analisadas em espectrômetro de I.V., RMN ou de massas.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de Koffler com microscópio e não foram corrigidos.

Os espectros de RMN foram registrados no espectrômetro AC-200 da Bruker existente na UFRRJ e, para isto, foram usadas soluções em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna. Os valores foram expressos em unidades ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas referentes aos picos de absorção foram obtidas por integração eletrônica.

Os espectros no I.V. foram registrados em pastilhas de KBr ou filme usando-se o aparelho Perkin Elmer 1420 da UFRRJ.

Os espectros de massas foram obtidos através de inserção direta em espectrômetro Hewlett-Packard, modelo 5987 A.

## 2.2 *Pinus strobus* var *chiapensis* e os constituintes isolados

### 2.2.1. Material Botânico.

Conhecido também como pinheiro-branco, o *Pinus strobus* L. pertence à família Pinaceae, sendo uma árvore que pode chegar a 50 m, possui folhas em feixes de cinco estróbilos oblongos.

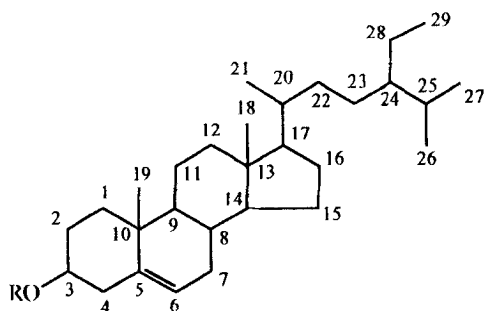
Esta espécie é cultivada nos Estados Unidos como planta ornamental, sua madeira é importante para a indústria naval, possuindo peso específico de  $0,460 \text{ g/cm}^3$  e fornece breu, terebentina e alcatrão. Seus sinônimos estrangeiros são: terpentin e Weymonth's Kiefer para os alemães; Brad para os romenos; Weymonth's pine para os ingleses; eastern White pine, Northern White pine, White pine para os americanos e piño para os espanhóis [13].

A principal área de ocorrência de *Pinus strobus* var. *chiapensis* Martinez está situada nos Estados de Oaxaca e Chiapas, sudeste do México e na Guatemala, em altitudes que variam entre 700 e 1.900 m. Algumas destas regiões têm um alto índice pluviométrico (de até 5.000 mm anuais). Em áreas com menor índice pluviométrico, esta espécie ocorre em vales mais úmidos, nas proximidades dos cursos de água.

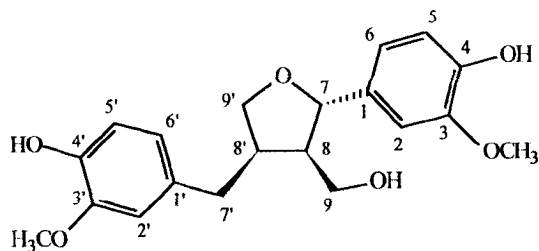
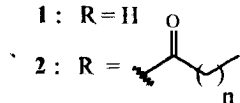
Existe um pequeno plantio em Agudos, S.P., sendo explorado comercialmente. Este tem apresentado um incremento médio anual de  $25 \text{ m}^3/\text{ha}$ . Há outras áreas de plantio em Viçosa e Sete Lagoas, M.G.. Esta espécie é recomendada para testes de adaptação, principalmente nas Serras: do Mar, da Cantareira, da Mantiqueira e da Bocaina, S.P., M.G. e R.G, Planalto do centro e leste de São Paulo, sul de Minas Gerais, sudoeste do Espírito Santo e vale superior e médio do Rio Paraíba, S.P., na Serra dos Órgãos, RJ e região serrana do Espírito Santo, nas Serras e chapados do Distrito Federal e Sul de Goiás, na Serra da Canastra, M.G. e Chapadões Contíguos [3].

O material botânico utilizado foi coletado em novembro de 1990 pela equipe da Duraflora S/A na Fazenda de Monte Alegre, Agudos - São Paulo. O talhão de onde foi coletado o material tinha 16 anos, com altura média de 5,5 m e 10 - 15 cm de diâmetro na altura do peito (D.A.P.)

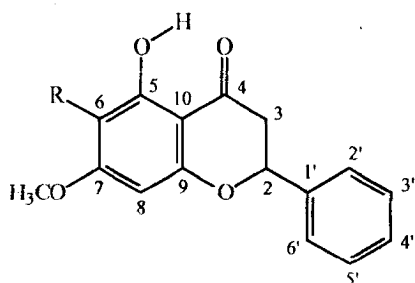
### 2.2.2. Substâncias Isoladas de *Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez).



1 : R = H

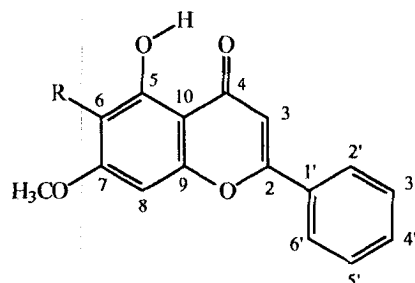


3



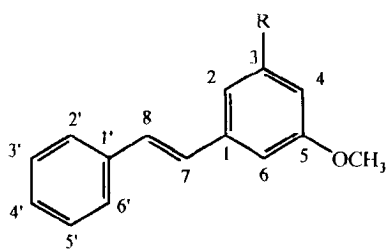
4 : R = H

5 : R = CH<sub>3</sub>



6 : R = H

7 : R = CH<sub>3</sub>

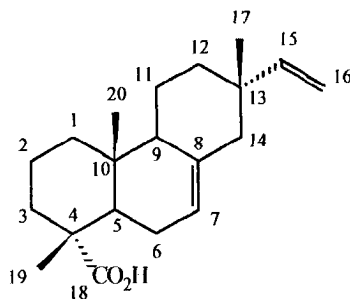


8 : R = OCH<sub>3</sub>

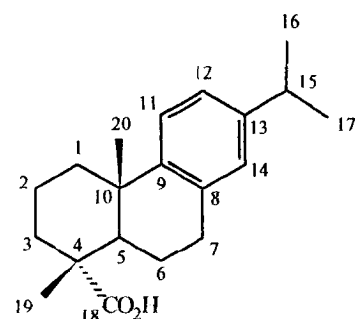
9 : R = OCH<sub>3</sub> ; 7,8 diidro

10 : R = OH

11 : R = OH ; 7,8 diidro



12



13



### **2.3. Isolamento dos Constituintes Químicos da Madeira de *Pinus strobus* var. *chiapensis* (Martinez).**

#### **2.3.1. Preparação dos Extratos**

Os pedaços do tronco, após descascados e secos à sombra, foram triturados em moinho de facas. O pó da madeira (434 g) foi submetido à extração em Soxhlet utilizando-se hexano, clorofórmio e metanol. Obteve-se 4,7 g de extrato hexânico, 2,5 g de extrato clorofórmico e 5,6 g de extrato metanólico.

#### **2.3.2 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Extrato Hexânico.**

Após análise em cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel (C.C.D.A.) o extrato hexânico foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel (80,0 g) utilizando como eluente diclorometano e mistura de metanol em polaridade crescente (Tabela 2). Através de análises comparativas em C.C.D.A. as frações semelhantes foram reunidas em grupos. Estas foram submetidas a outras técnicas de purificação como cromatografia em coluna ou camada preparativa de sílica gel normal ou circular (chromatotron) e/ou recristalização (Tabela 3).

### **2.3.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Extrato Clorofórmico e Metanólico.**

O extrato clorofórmico (2,5 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente misturas de diclorometano-metanol em polaridade crescente. Foram recolhidas 513 frações que estão sendo analisadas. Uma das frações recolhidas forneceu a substância III (20 mg) e outras frações revelaram uma grande quantidade de mistura de estilbenos.

O extrato metanólico será estudado posteriormente.

Os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de *P. strobilus* var. *chiapensis* (Martínez) foram analisados pela equipe da Embrapa-C.N.P.-Floresta-PR e os seus efeitos sobre a cultura do fungo *Amylostereum areolatum*. O extrato hexânico inibiu crescimento do fungo devido a presença de flavonóides e estilbenos identificados neste extrato; enquanto metanólico permitiu total desenvolvimento do fungo, inclusive apresentando toxina após 24 dias de cultura.

**Tabela 2** : Grupos de frações recolhidas da coluna de fracionamento do extrato hexânico e os respectivos eluentes utilizados.

Frações Recolhidas	Eluente CHCl <sub>3</sub>	Eluente MeOH
1-380	100	0
381-385	98	2
386-388	96	4
389-391	94	6
392-394	98	2
395-401	90	10
402-407	80	20
408-418	70	30
419-425	60	40
426-432	50	50
433-444	30	70
445	20	80
446-448	10	90
449	0	100

**Tabela 3** : Técnicas de purificação e resultados obtidos das análises dos grupos de frações reunidas.

Frações Reunidas	Método de Separação (Eluente, v/v)	Substâncias Isoladas Peso (mg)	P.F. (°C)
01-04	-	M.A.	
05-06	-	II (6,5)	óleo
07-08	C.C. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	M.H., M.A.A., M.E.A.	
09-17	C.C.D.P.(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 4:6)	II (6,0) V (8,4) VIII + IX (15,0) M.A.A., M.E.A.	óleo 96 óleo
18-20	crist.(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ) C.C. (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	V (impura) VIII + IX (impura) M.A.A., M.E.A.	
21-37	crist.(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) C.C.D.P.(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 4:6)	V (15,0) IV (35,3) VIII + IX (impura) M.A.A., M.A.E.	96 85
38-42	crist.(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> )	IV + V (115,5) VIII + IX (impura) M.A.A., M.A.E.	
43-49	C.C. (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH)	IV (15,0) IV + V (30,0) M.A.A., M.A.E.	85
50-64	C.C. (AcOET)	IV + V + M.A.A. + M.A.E.	
65-81	C.C. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	IV + VII + M.A.A. + M.A.E.	
82-88	C.C. (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH)	IV + VII (6,4) C.A.	
89-93	-	VII (impuro)	
94-99	C.C.D.P.(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 4:6)	VII (20,0) VI (25,0) X + XI (40,0)	165 154 óleo
14	crist.(CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> ) C.C.D.P. (circular)	VI(30,5) VI + VII(60,0) X + XI (50,5)	154 óleo
107-119	crist.(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH:C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> )	VI (115,5) X + XI (70,2)	154 óleo
120-186	crist.(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH:C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> )	VI (60,0) X + XI (103,7)	154 óleo

Tabela 3 (Continuação)

187-195	crist.(CH <sub>3</sub> OH)	I (8,0) X + XI (45,0)	óleo
196-223	crist.(CH <sub>3</sub> OH)	I (impuro) (10,5) X + XI (30,2)	óleo
224-314	C.C. (CHCl <sub>3</sub> )	I + flavonóides X + XI (impuro)	
315-339	crist.(CH <sub>3</sub> OH)	M.F.T. / KCl	
340-343	crist.(CH <sub>3</sub> OH)	XII (13,0) XII (impuro)	óleo
344-373		XII (impuro)	
374-379	C.C.D.P. (CHCl <sub>3</sub> )	M.E.D.	
380	C.C.,C.C.D.P. (CHCl <sub>3</sub> )	XII + XIII + composto não identificado	
381-394	C.C.D.P.	M.D.	
395-449	C.C.	M.A. de difícil separação: ácidos alifáticos e glicosídeos	

- M.H. ⇒ mistura de hidrocarbonetos
- M.A.A. ⇒ mistura de álcoois alifáticos
- M.A.E. ⇒ mistura de ésteres alifáticos
- C.A. ⇒ cetona alifática
- M.F.T. ⇒ mistura de flavonóides e terpenóides
- M.E.D. ⇒ mistura de esteróides e diterpenos
- M.D. ⇒ mistura de diterpenos
- C.C. ⇒ cromatografia em coluna
- C.C.D.P. ⇒ cromatografia em coluna delgada preparativa
- crist. ⇒ cristalização

## 2.3.4. Preparação dos derivados das substâncias isoladas

### 2.3.4.1. Acetilação

Dissolveu-se a quantidade (x) de amostra em solução de partes iguais de piridina e anidrido acético e a mistura foi submetida às condições descritas na Tabela 4. Após resfriamento da solução adicionou-se água gelada e fez-se extração com clorofórmio e lavagem com ácido clorídrico (10 %) para retirar a piridina. Após lavagem com água e secagem da fração clorofórmica com sulfato de sódio anidro, destilou-se o solvente sob vácuo e filtrou-se o produto em coluna de sílica gel para retirar impurezas. A amostra foi seca em pistola de Abderhalden e analisada através de métodos espectrométricos.

Tabela 4 : Dados das reações de acetilação.

Substâncias	Peso (mg)	Condições	Produto	Peso (mg)
IV	15,0	repouso (48 h)	IV - ac	13,5
V	15,0	refluxo (12 h)	V - ac	14,5
VI	10,0	repouso (48 h)	VI - ac	9,0
VII	15,0	refluxo (12 h)	VII - ac	15,5

### 2.3.4.2. Metilação

Dissolveu-se a quantidade (V = 8,4 mg e VII = 10,0 mg) em acetona anidra bidestilada. Adicionou-se 0,2 g de  $K_2CO_3$  anidro e 0,1 ml de sulfato de metila. Após refluxo

filtrou-se a mistura, adicionou-se 20 ml de clorofórmio e 10 ml de hidróxido de amônio (10%). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob vácuo. Após secagem do resíduo em pistola de Alberhalden, este foi filtrado em coluna de sílica gel com o objetivo de retirar impurezas e após evaporação do solvente, obtiveram-se os produtos metilados (V-Me = 7,5 mg e VI-Me = 8,0 mg).

#### **2.3.4.3. Hidrogenação**

Dissolveu-se 200 mg da mistura de estilbenos (IX + X) em 5,0 ml de etanol e adicionou-se 0,5 g de catalisador (Pd/C : 10 %) para cada grama de substrato. A mistura foi submetida a agitação durante 5 horas sob pressão de 50 psi com gás hidrogênio. Após filtração, o solvente foi retirado através de destilação à vácuo e o resíduo seco em pistola de Abderhalden. Obteve-se 150 mg do produto.

### 3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Pinus strobus*.var *chiapensis* (Martinez)

#### 3.1. Determinação estrutural das substâncias I e II

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância I (Figura 1) possui dois singletos em 0,63  $\delta$  e 0,99  $\delta$  e uma série de sinais múltiplos entre 0,73 - 0,92  $\delta$  correspondentes aos sinais dos grupos metilas de um esteróide. Os sinais em 3,52  $\delta$  (m, H-3) e 5,34  $\delta$  (t, H-6) representam, respectivamente, as frequências de absorção dos prótons carbinólico e olefínico. Estes sinais são compatíveis com as frequências de absorções de esteróides.

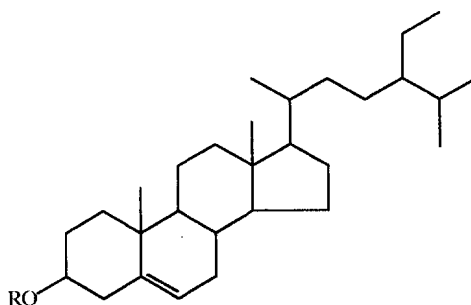
A comparação das frequências de absorção de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 1.1.) e RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 1.2.) da substância I com os dados do sitosterol registrados na literatura [26], permitiu identificar o componente da fração analisada (Tabela 5)

O espectro de massas da substância I (Figura 1.3) apresentou picos correspondentes a fragmentos compatíveis com a estrutura do sitosterol (Esquema 1)

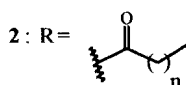


O espectro no infravermelho da substância II (Figura 2.1) apresentou bandas de absorção em  $3.450\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{OH}}$ ),  $21950$  e  $2.850\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{CH}}$ ),  $1.740\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster) e  $1.640\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ). A feição do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância II é semelhante a substância I, diferenciando apenas pela ausência do multiplete em  $3,5\ \delta$  e a presença do multiplete em  $4,6\ \delta$  e os sinais em  $2,25\ \delta$  (m) e  $0,62\ \delta$  (t). Estes dados aliados às informações do espectro no infravermelho permitem propor a estrutura do acilsterol para II, em mistura com um álcool alifático. O tripleto em  $4,03\ \delta$  no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e a banda de absorção em  $3400\text{ cm}^{-1}$  no espectro no infravermelho correspondem às absorções de um álcool alifático presente como impureza na amostra analisada.

A tabela 5 mostra as atribuições dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de II comparadas com as de I.

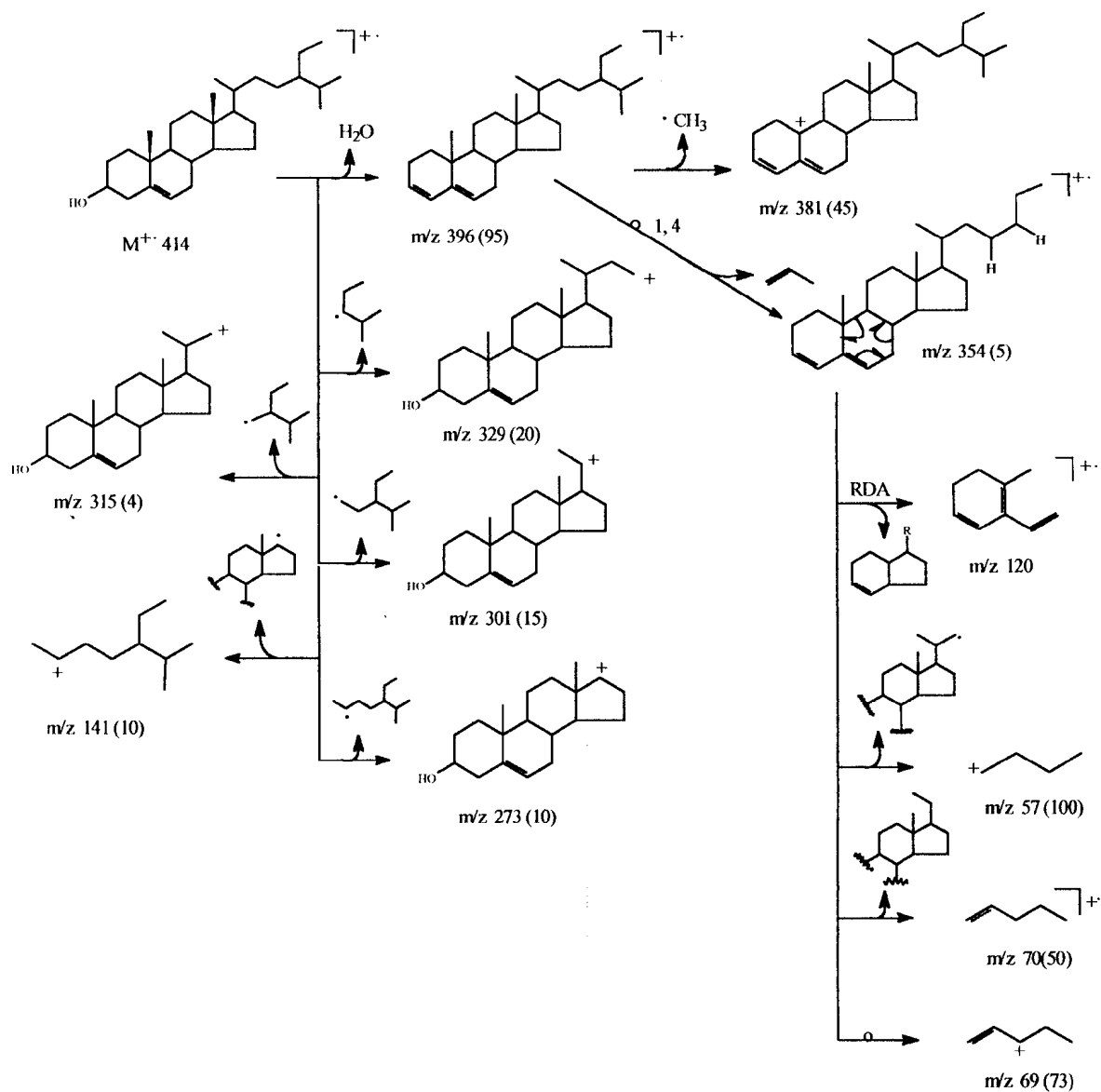


1 : R=H=Mo-1



**Tabela 5:** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias I e II e comparados com modelo citado na literatura [26]

C	I		2	Mod <sup>1</sup>
	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	$\delta\text{ H}$	$\delta\text{ C}$
1	37,3			37,2
2	31,7			31,6
3	71,8	3,47 (m)	4,6 (m)	71,8
4	42,3	2,4-2,2 (m)	2,4-2,1 (m)	42,3
5	140,7			140,7
6	121,7	5,33 (m)	5,33 (m)	121,7
7	31,9	2,2-2,0 (m)	2,4-2,1 (m)	31,9
8	31,9			31,9
9	50,1			50,1
10	36,2			36,5
11	21,1			21,1
12	39,8			39,8
13	42,3			42,3
14	56,8			56,8
15	24,3			24,3
16	28,2			28,2
17	56,0			56,0
18	11,9	0,65 (s)	0,62 (s)	11,9
19	19,4	0,99 (s)	0,99 (s)	19,4
20	36,2			36,2
21	18,8	0,85 (d)	0,7-1,0 (m)	18,8
22	33,9			33,9
23	26,1			26,0
24	45,8			45,8
25	29,1			29,1
26	19,8	0,80 (d)	0,7-1,0 (m)	19,8
27	19,0	0,79 (d)	0,7-1,0 (m)	19,0
28	23,1			23,0
29	12,0	0,82 (t)	0,7-1,0 (m)	12,0
C-1'	-			-
C-2'	-		2,25 (t)	-
$(\text{CH}_2)_n$	-		1,23 (m)	-
$\text{CH}_3$			0,62 (t)	



Esquema 1 - Interpretação do espectro de massas da substância I

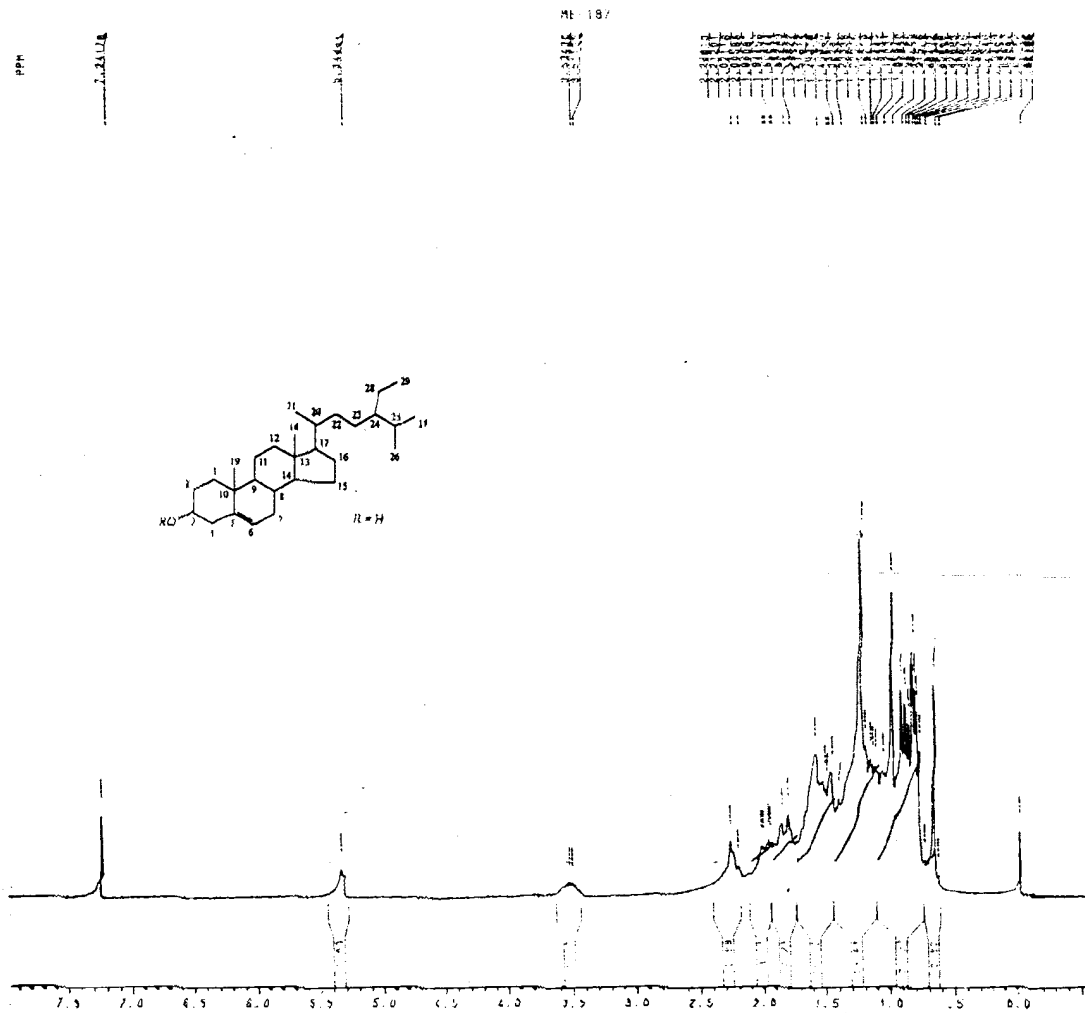


Figura 1.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância I, em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

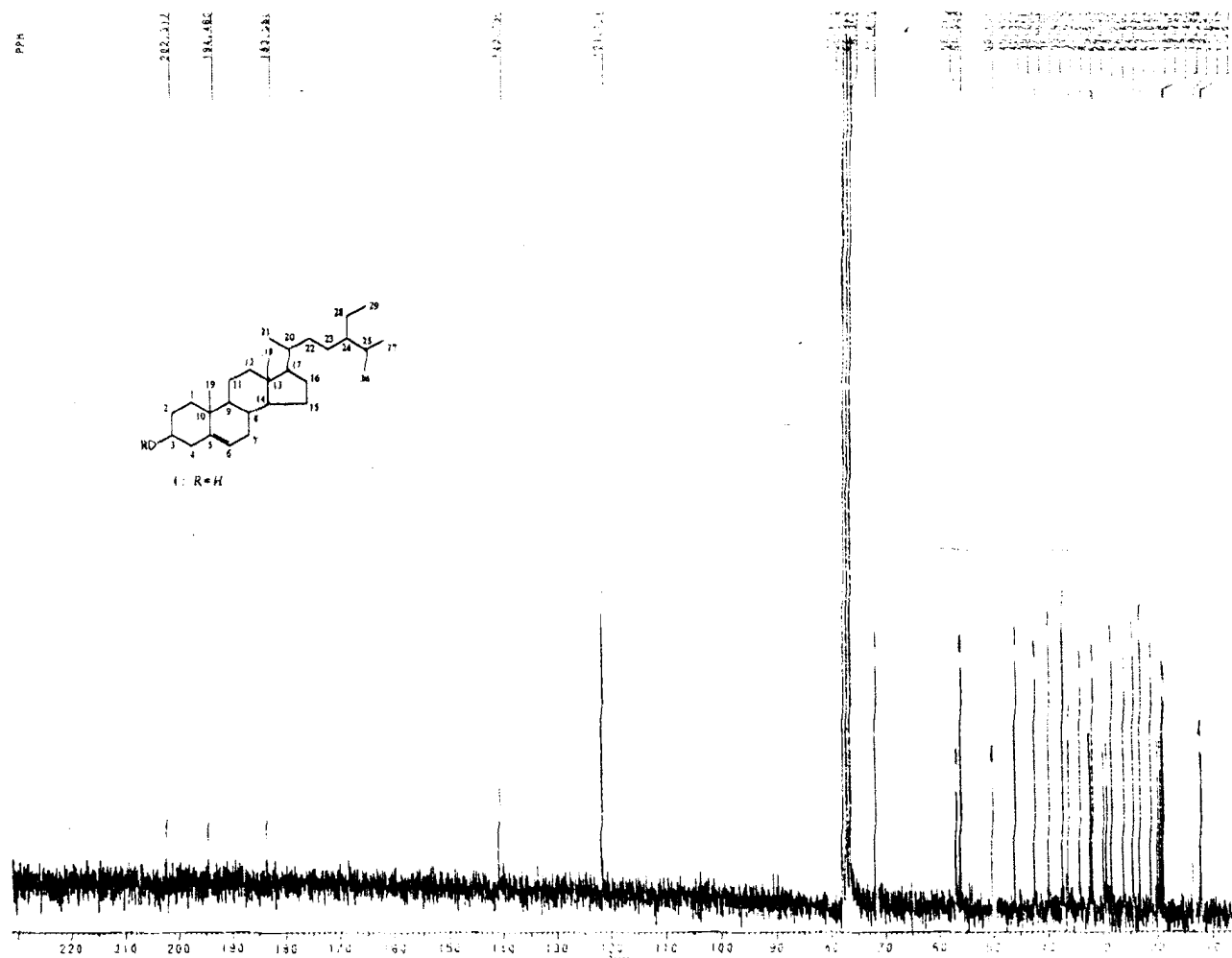


Figura 1.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado da substância I em  $\text{CDCl}_3$ .

File:CRIS6 Ident:165-163 Win 100PPM Acq: 9-JUN-1993 15:39:32 Cal:PFK906  
AutoSpecQ EI+ Magnet BpM:57 BpI:195008 TIC:6772062 Flags:HALL

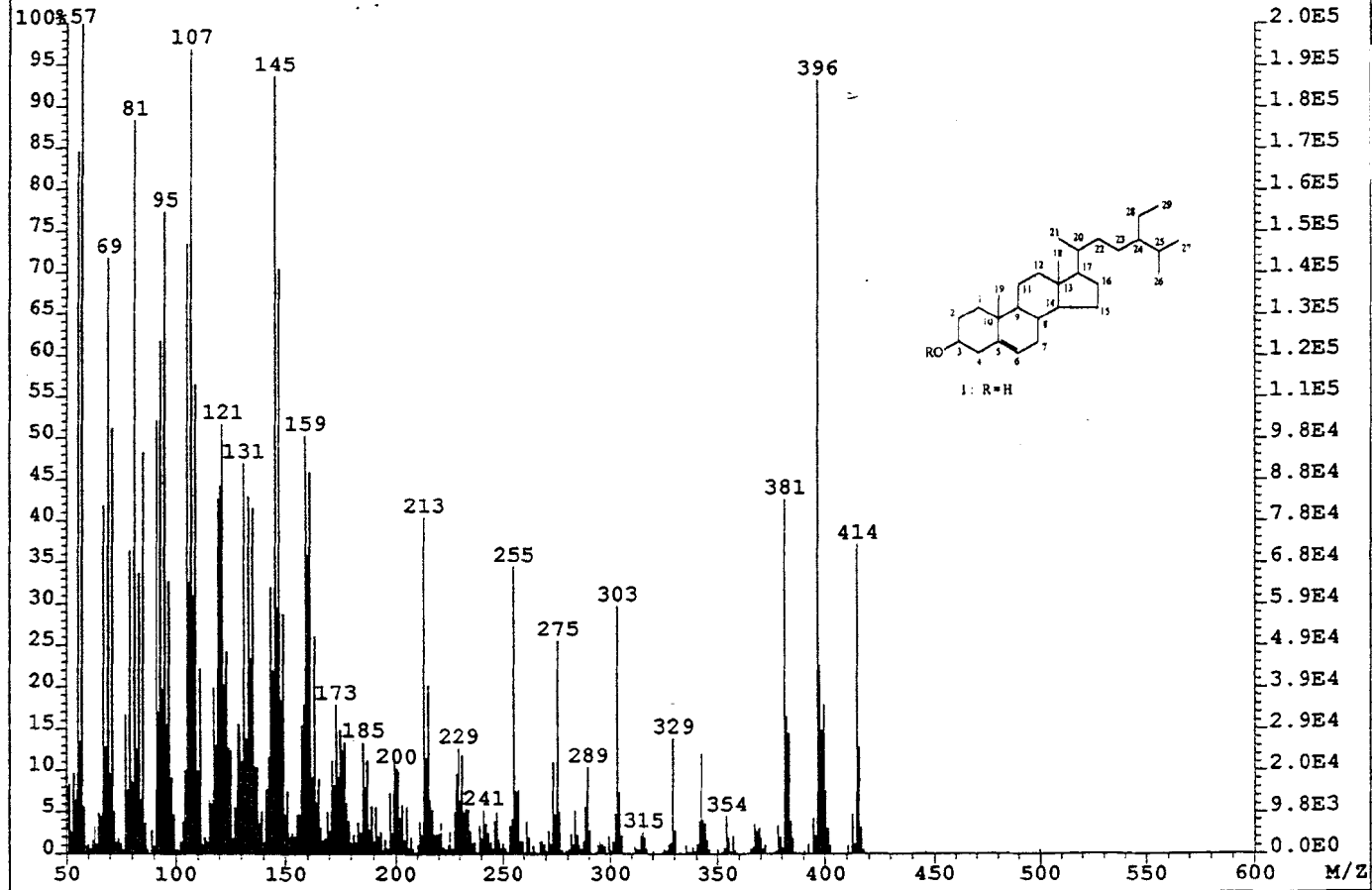


Figura 1.3 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da substância I.

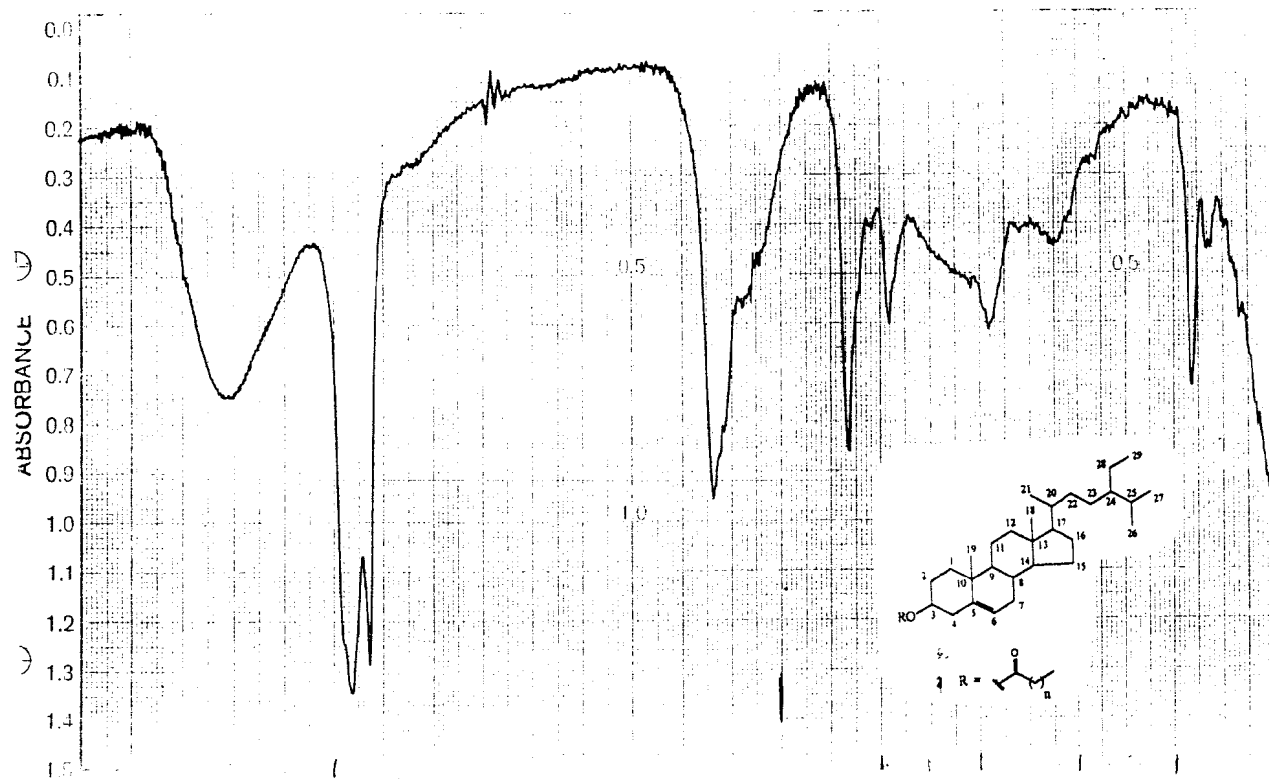


Figura 2.1 - Espectro de infravermelho da substância II em pastilha de KBr.

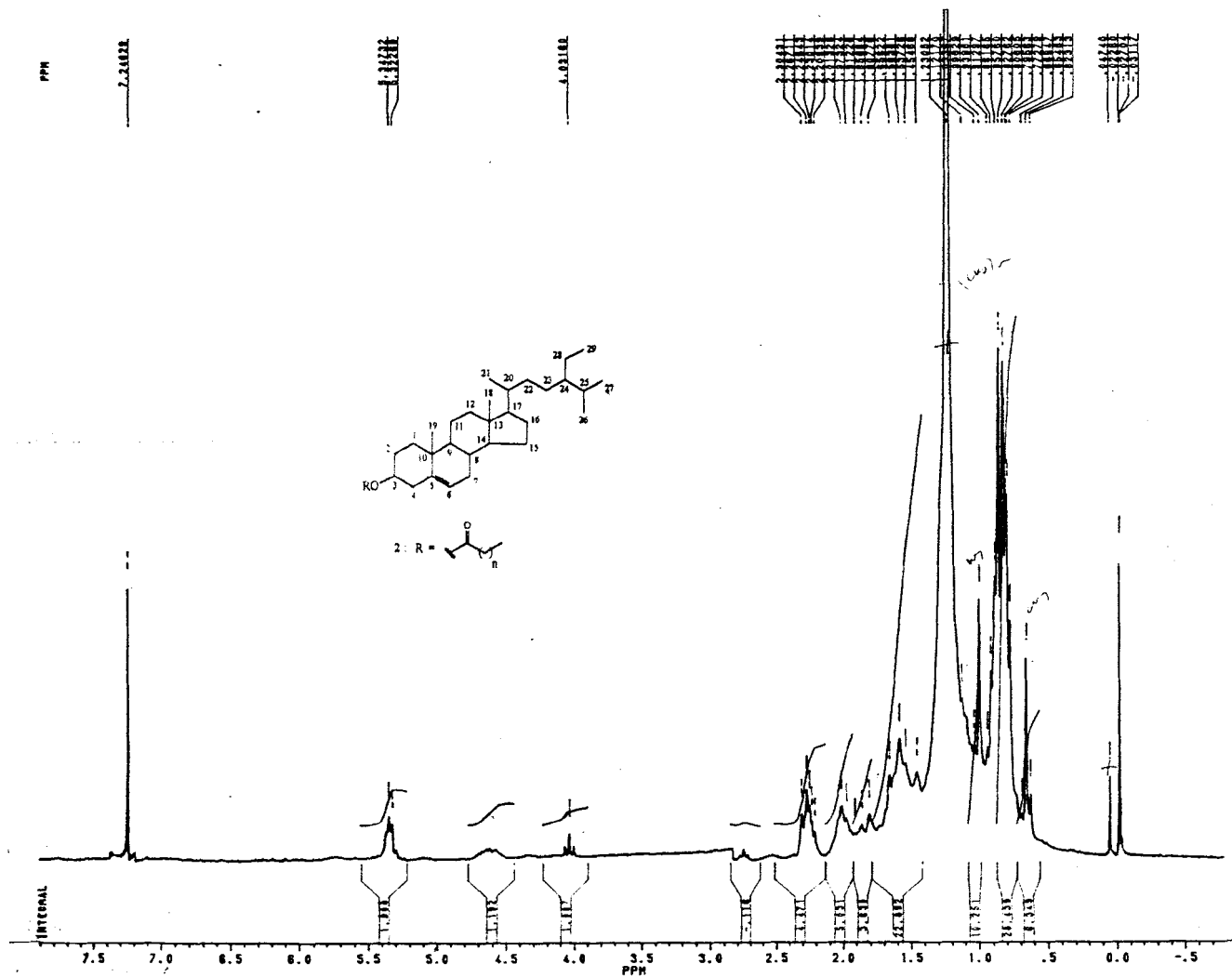


Figura 2.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância II, em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.



### 3.2. Determinação estrutural da substância III.

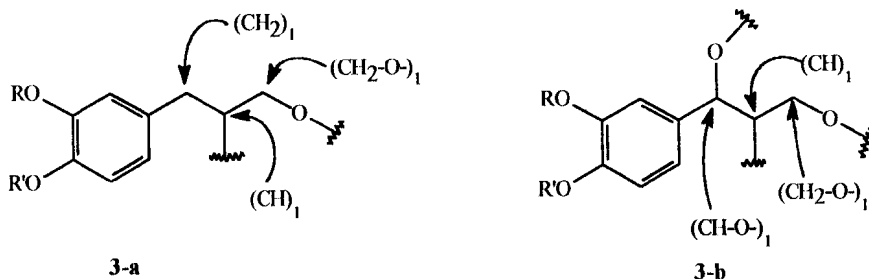
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT, Figura 3.2) apresenta sinais que permitiram identificar o número de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  e  $\text{C}$  da substância III (Tabela 6). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 3.1) mostra sinais correspondentes à presença de prótons metínicos, metilênicos carbinólicos, aromáticos e duas metoxilas.

Tabela 6 : Identificação dos carbonos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  e  $\text{C}$  da substância III através de RMN  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT, 50,3 MHz)

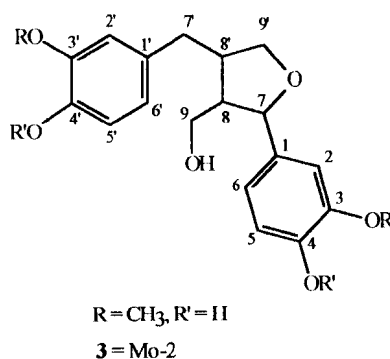
$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	$\text{CH}$	$\text{C}$
(55,9)2	72,7	121,2	146,6
	60,9	116,7	146,4
( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>	33,3	114,4	145,0
		114,1	143,9
	( $\text{CH}_2$ ) <sub>3</sub>	111,1	134,7
		108,2	131,5
		82,8	
		52,6	( $\text{C}$ ) <sub>6</sub>
		42,4	
		( $\text{CH}$ ) <sub>9</sub>	
( $\text{OCH}_3$ ) <sub>2</sub>	( $\text{CH}_2$ )( $\text{CH}_2\text{-O}$ ) <sub>2</sub>	( $\text{CH}$ ) <sub>2</sub> ( $\text{CHO}$ )	( $=\text{C-}$ ) <sub>6</sub> , ( $\text{C}$ ) <sub>6</sub>
	$\text{C}_6\text{C}_3 + \text{C}_6\text{C}_3 \Rightarrow$ lignóide		

Os dados da Tabela 6 permitiram chegar à fórmula molecular  $(\text{OCH}_3)_2(\text{CH}_2)_3(\text{CH})_9(\text{C})_6$ , que pode ser representada como  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}(\text{OCH}_3)_2$ . Esta fórmula molecular é compatível com a estrutura de duas unidades  $\text{C}_6\text{C}_3$  (lignóide). Levando em

consideração o número de carbonos metínicos e quaternários aromáticos e o número de carbonos metilênicos e metínicos carbinólicos foi possível propor as estruturas parciais 3a e 3b como constituintes de III.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um duplete (6,7 Hz) em 4,77  $\delta$  e o de RMN  $^{13}\text{C}$  um sinal em 80,8  $\delta$  que são compatíveis com as frequências do carbono metínico carbinólico benzílico com apenas um próton vizinho. O sinal de RMN  $^{13}\text{C}$  em 33,3  $\delta$  é coerente com um metileno benzílico e o sinal em 60,9, a um metileno de álcool primário. Estes dados permitiram completar a estrutura da substância 3.

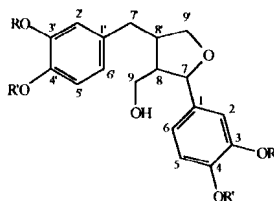


O espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) (Figura 3.3) mostra sinais de interação do próton H-7 (4,77  $\delta$ ) com o H-8 (2,42  $\delta$ ) que interage com os prótons carbinólicos H-9 (3,70  $\delta$ ) e o próton metínico H-8' (2,73  $\delta$ ). Os sinais em 5,45  $\delta$ , 5,65  $\delta$  e 1,67  $\delta$  podem ser atribuídos a frequências de absorção de dois prótons fenólicos e um próton de álcool, respectivamente.

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância III (Tabela 7) com os do lariciresinol (Mo-2) registrados na literatura [27] permitiu mostrar a identidade entre as duas substâncias.

**Tabela 7** : Comparação dos dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de III com dados do lariciresinol registrado na literatura [27].

3		Mo-2 Lariciresinol [27]			
C	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (m, J = Hz)	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (m, J = Hz)
1	134,7			134,7	
1'	131,5			131,5	
2	108,2	6,68 (m)		105,3	6,87 (d, J = 1,8)
2'	111,1	6,68(m)		110,0	6,87 (d, J = 1,8)
3	146,6			146,7	
3'	146,4			147,0	
4	145,0			145,1	
4'	143,9			146,0	
5	114,2	6,85 (m)		114,2	6,87 (dd, J = 8,1 e 1,8)
5'	114,4	6,85 (m)		115,0	6,87 (dd, J = 8,1 e 1,8)
6	116,7	6,85 (m)		118,8	6,80 (dd, J = 8,1 e 1,8)
6'	121,2	6,85 (m)		119,9	6,80 (dd, J = 8,1 e 1,8)
7	82,8	4,77 (d, J = 6,7)	H-8	82,7	4,77 (d, J = 6,7)
7'	33,3	2,53 (dd, J = 13 e 5) 2,93 (dd, J = 13 e 12,2)	H-8'	33,8	2,93 ( $J_{\text{gem}} = 13,5$ e $J_{\text{eq}} = 4,9$ )
8	52,7	2,42 (dd, J = 16 e 8)	H-7, H-9, H-8'	52,7	2,42 (m)
8'	42,4	2,70 (m)	H-7', H-9', H-8'	42,5	2,53 (m)
9	60,9	3,70 (m)	H-8	60,9	3,70-3,96 (m)
9'	72,7	3,80 (dd, J = 3 e 5,3) 4,04 (dd, J = 8)	H-8'	72,8	3,77 (dd, J = 8,6 e 5,9) 4,04 (dd, J = 8,6 e 6,5)
OCH <sub>3</sub>	55,9	3,87 (s)			3,83(s)
OCH <sub>3</sub>	55,9	3,88 (s)			3,84 (s)
OH-4		5,45 (s)			
OH-9		5,65 (s)			



R =  $\text{CH}_3$ , R' = H  
3 = Mo-2

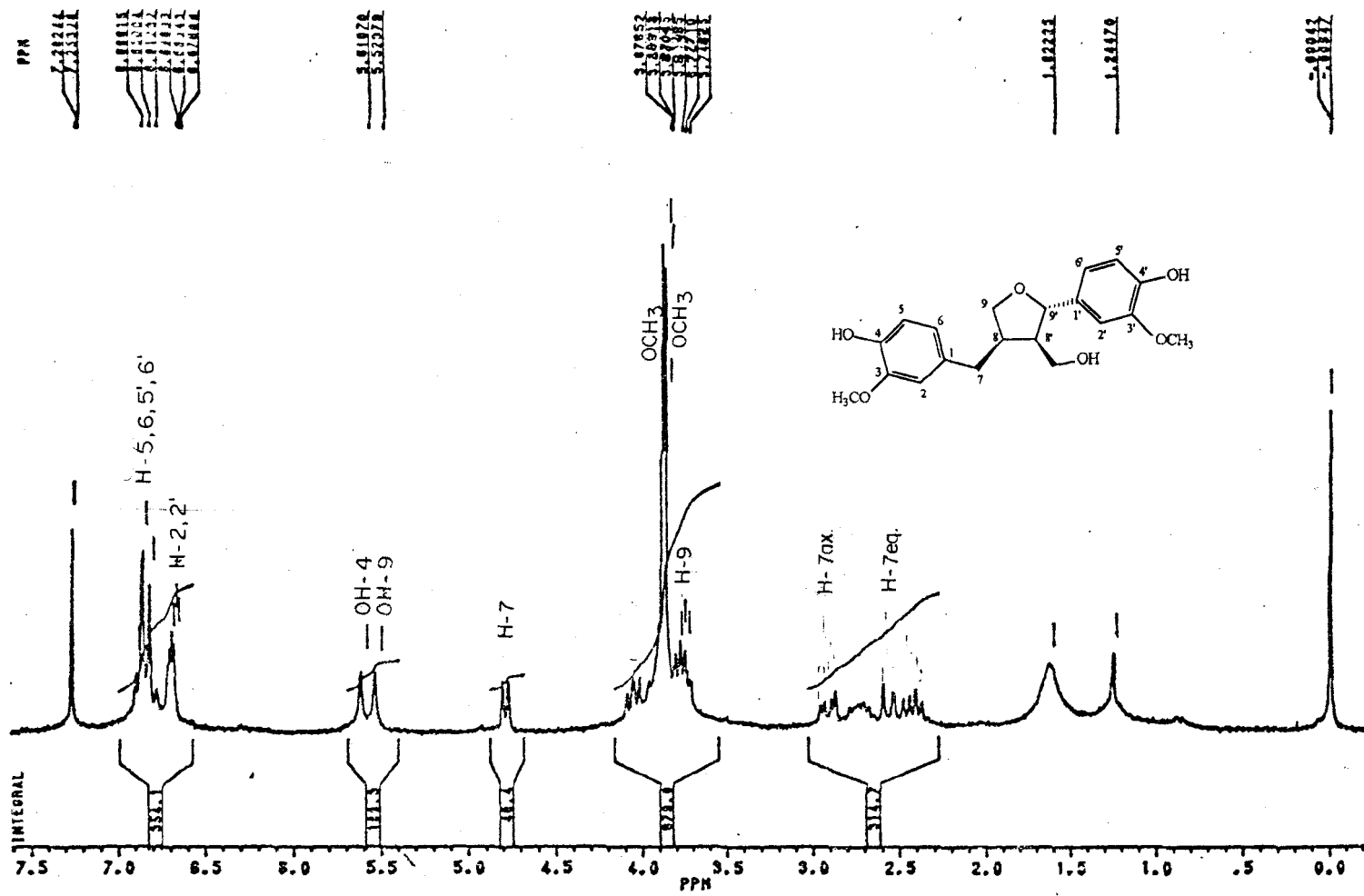


Figura 3.1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da substância III, em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

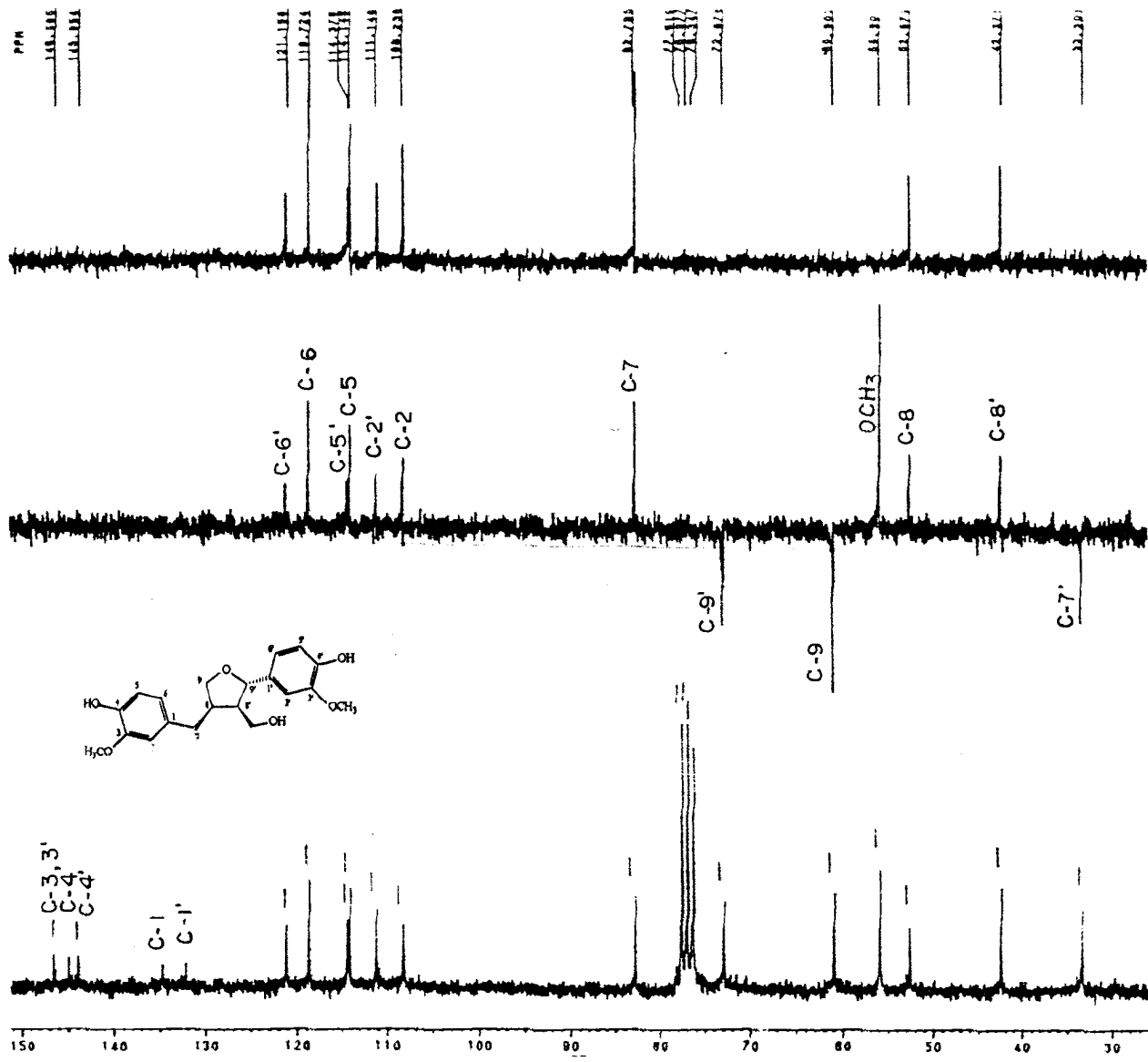


Figura 3.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND e DEPT), ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  da substância III.

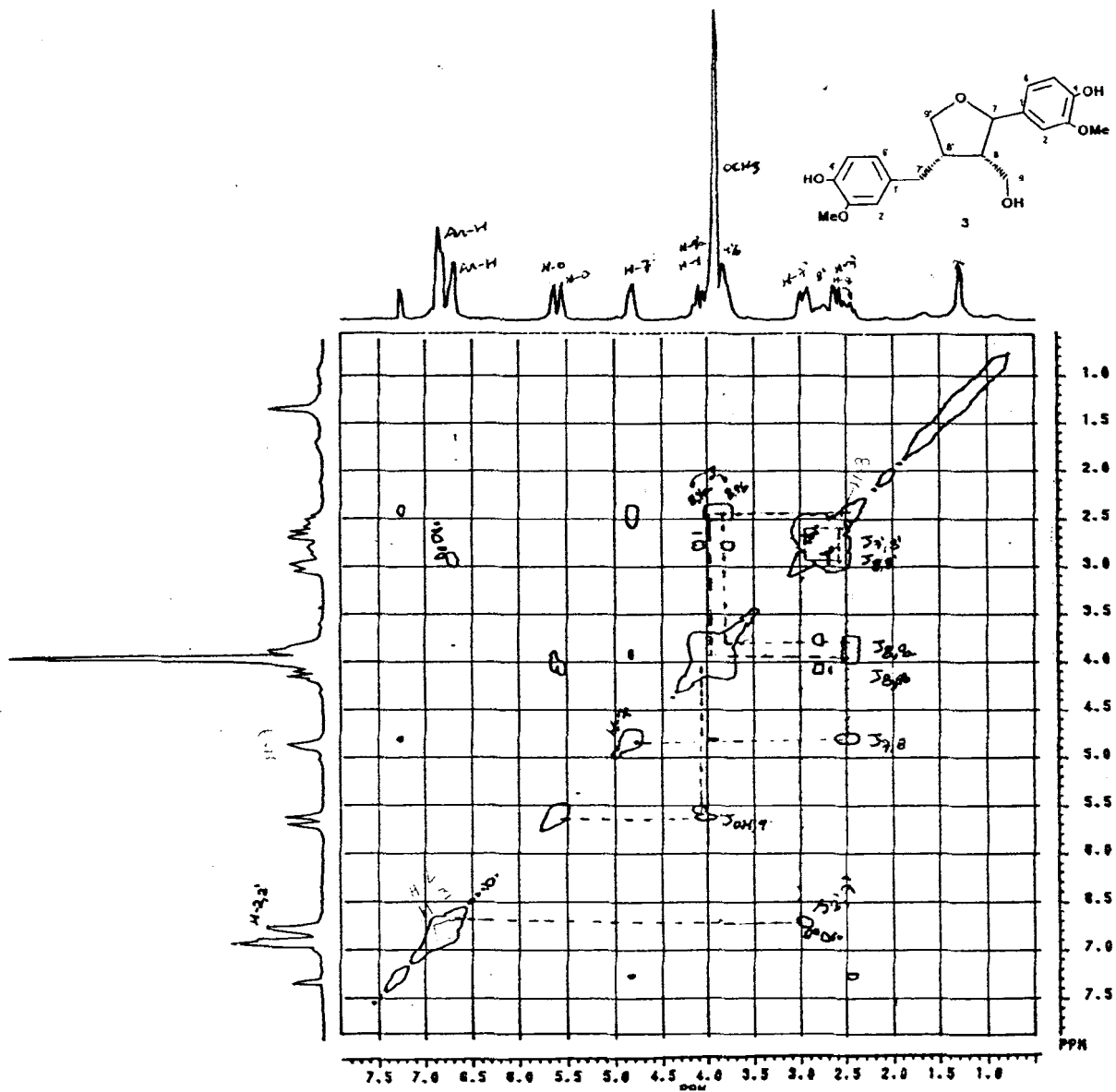
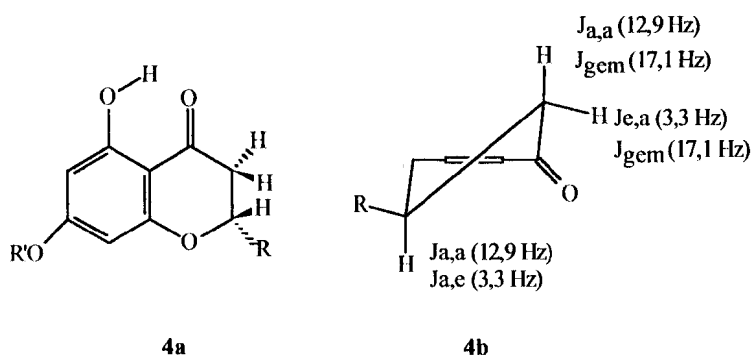


Figura 3.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância III em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

### 3.3. Determinação estrutural das substâncias IV e V

O espectro no infravermelho da substância IV (Figura 4.1) possui bandas de absorção em  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a estiramento de carbonila conjugada, bandas de sistema aromático em  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1520\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ) e banda  $750\text{ cm}^{-1}$  e  $690\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta = \text{CH}$ ) referentes a anel monossustituídos. A forte absorção em  $1160\text{ cm}^{-1}$  corresponde a  $\nu_{\text{C}-\text{O}}$  de álcool.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.2) possui sinal em  $12,0\ \delta$  (s, 1H) correspondente a um grupo hidroxila em ponte com a carbonila. O sinal em  $6,05\ \delta$  é característico de dois prótons aromáticos equivalentes e protegidos por efeito mesomérico do heteroátomo em orto do anel B. Os sinais em  $5,41\ \delta$  (dd,  $J_{\text{ax,ax}} = 12,9\text{ Hz}$ ,  $J_{\text{ax,eq}} = 3,3\text{ Hz}$ , 1H),  $3,02\ \delta$  (dd,  $J_{\text{ax,ax}} = 12,9\text{ Hz}$  e  $J_{\text{gem}} = 17,1\text{ Hz}$ , 1H) e  $2,79\ \delta$  (dd,  $J_{\text{eq,ax}} = 3,3\text{ Hz}$  e  $J_{\text{gem}} = 17,1\text{ Hz}$ , 1H) representam um sistema ABM que interagem entre si (Figura 4.3). Estes dados permitiram propor a estrutura parcial 4a e 4b para substância IV.





Os sinais em 7,38 (m, 5H) e 3,78 (s, 3H) representam os demais grupos que completam a estrutura do flavonóide 4 para substância IV. A tabela 8 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos dos prótons 1D (Figura 4.2) e 2D (Figura 4.3) e dos carbonos 1D (PND e DEPT, Figura 4.4) e 2D ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY, Figura 4.5) de IV e dos prótons (Figura 4Ac-1) e carbonos (Figura 4Ac-2) do seu derivado acetilado.

Estes dados permitiram definir a estrutura da substância IV como sendo a pinostrobina (4) isolada anteriormente de *Pinus strobus* L.[1,42,43].

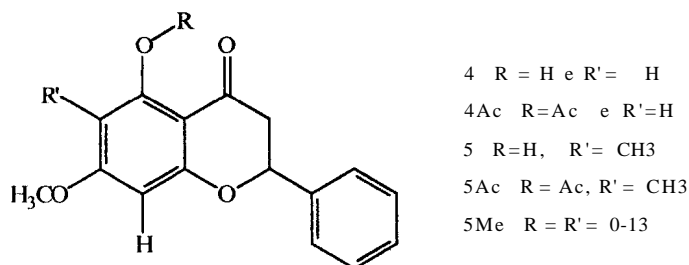


Tabela 8 : Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) obtidos dos espectros de RMN 1D e 2D de IV e seu derivado acetilado.

C	4				4-Ac	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J = Hz)	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	79,2 (CH)	5,41 (dd, $J_{\text{ax,ax}} = 12,9$ e $J_{\text{eq,ax}} = 3,3$ ; 1H)		HBeq,ax, H3ax,ax	79,5	5,44 (dd, $J_{\text{ax,ax}} = 13,3$ e $J_{\text{eq,ax}} = 2,6$ ; 1 H)
3	43,4 ( $\text{CH}_2$ )	3,02 (dd, $J_{\text{ax,ax}} = 12,9$ e $J_{\text{gem}} = 17,1$ ; 1H) 2,79 (dd, $J_{\text{gem}} = 17,1$ e $J_{\text{eq,ax}} = 3,3$ ; 1H)	H3-C3	H2, H3eq,ax H2, H3ax,ax	45,0	3,01 (dd, $J_{\text{ax,ax}} = 13,3$ e $J_{\text{gem}} = 17,7$ ; 1 H) 2,71 (dd, $J_{\text{gem}} = 17,7$ e $J_{\text{eq,ax}} = 2,6$ ; 1 H)
4	195,5 (C)	—			188,7	—
5	164,6 (C)	—			164,2	—
6	95,1 ( $\text{CH}_2$ )	6,05 (s, 1H)	H6-C6		99,5	6,27 (s, 1H)
7	167,5 (C)	—			165,5	—
8	94,2 ( $\text{CH}_2$ )	6,05 (s, 1H)	H8-C8		104,7	6,42 (s, 1H)
9	162,5 (C)	—			151,8	—
10	103,0 (C)	—			107,9	—
1'	138,0 (C)	—			138,3	—
2',6'	126,1 (CH)	7,42 (sl, 2H)	H2',6'-C2',6'		126,1	7,42 (sl, 2H)
3',4',5'	128,8 ( $\text{CH}_2$ )	7,42 (sl, 3H)	H3',4',5'-C3',4',5'		128,8	7,42 (sl, 2H)
OCH <sub>3</sub>	55,6 ( $\text{CH}_3$ )	3,79 (s, 3H)			55,8	3,82 (s, 3H)
	—	—			169,5	—
	—	—			21,1	2,36 (s, 3H)
OH	—	12,0 (s, 1H)	—	—	—	—

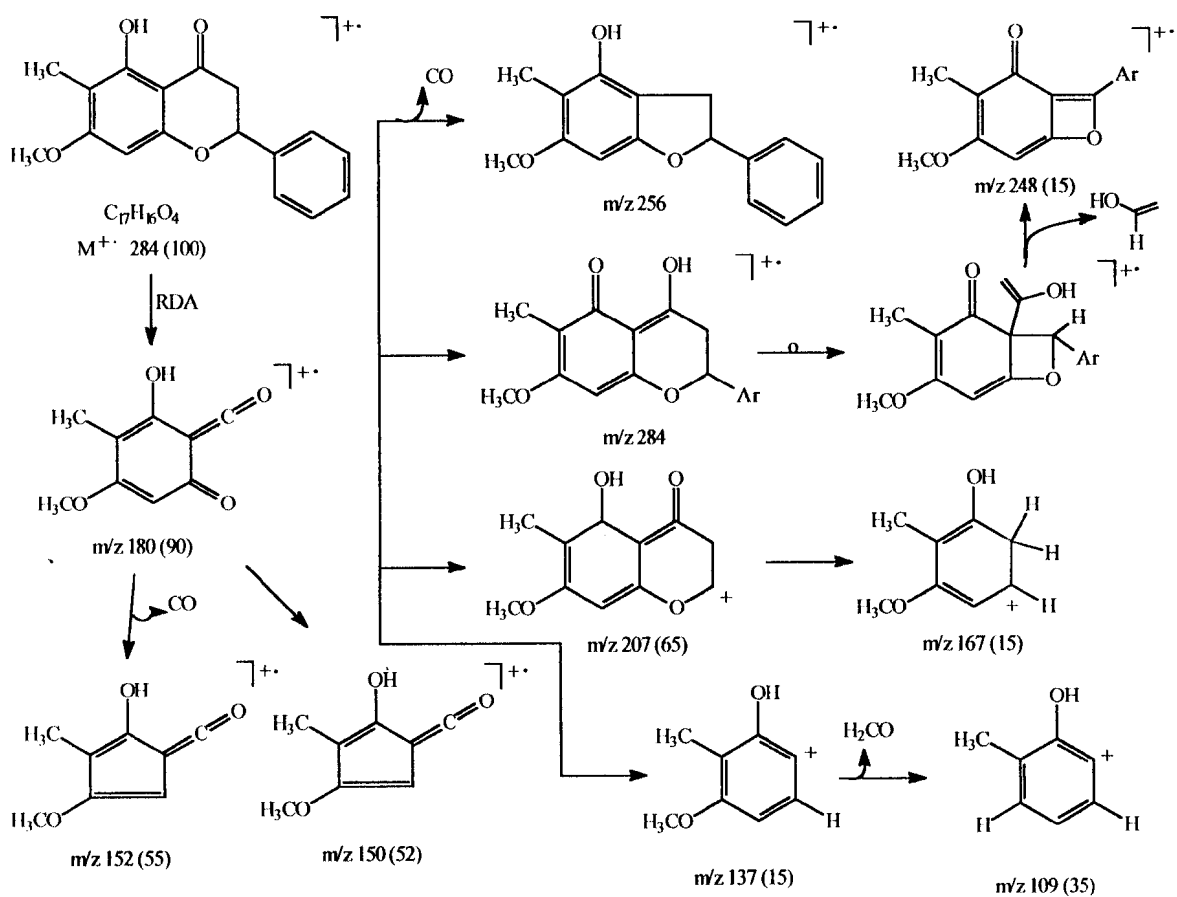
Foi isolada uma substância, cujo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5.1) é muito semelhante ao espectro da substância anterior (Figura 4.2). As diferenças observadas foram: a presença do sinal em 1,99  $\delta$  (s, 3H) e a integração do sinal em 6,07  $\delta$  (s, 1H) que no espectro da substância anterior correspondia a dois prótons. Esta diferença mostra que há um grupo metila ligado ao anel. A do flavonóide [28,42,43]. Esta dedução está de acordo com o

$M^{+}$  ( $m/z = 284$ ) revelado no espectro de massas que corresponde a 14u a mais que o peso molecular da substância IV.



Com o objetivo de definir a posição do grupo metila que poderia estar ligado ao C-6 ou ao C-8, foi preparado o éter metílico da substância V com sulfato de metila e obteve-se a substância V-Me. O uso de experiências com irradiação dupla nas duas metoxilas do produto V-Me e diferença de espectros (Figura 5 Me-1) revelou efeito NOE (8%) de apenas uma metoxila sobre o próton aromático do anel A (6,33  $\delta$  s, 1H). Isto permitiu concluir que o grupo CH<sub>3</sub> está ligado ao C-6, pois caso contrário, os dois grupos metoxila exerceriam efeito NOE sobre próton aromático (Tabela 9).

Esta dedução está de acordo com os demais íons fragmentários correspondentes aos picos revelados no espectro de massas obtido por impacto de elétrons (Figura 5.6, Esquema 2).



Esquema 2 : Interpretação do espectro de massas da substância V


A Tabela 9 mostra as atribuições das frequências dos prótons e  $^{13}\text{C}$  da substância V obtidos pela análise dos espectros 1D ( $^1\text{H}$ ; Figura 5.1 e  $^{13}\text{C}$ ; Figura 5.2) e 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY, Figura 5.3;  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY,  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ , Figura 5.3; e  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ; Figura 5.5) comparados com as frequências de próton de Vac (Figura 5Ac-1) e V-Me (Figura 5Me-1).

O sinal de acoplamento a três ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) (Figura 5.5) dos prótons da metila (1,99  $\delta$ , s) ligado ao C-6 com o sinal em 160,3 ppm e o sinal de acoplamento a duas ligações do H-8 (6,07  $\delta$  s) com o sinal em 161,0 ppm (C-9) permitiram definir as frequências de absorção de C-5 e C-9 (Tabela 9).

As atribuições dos dados espectrométricos da substância V foram feitas, também, através de comparação com modelos da literatura [28,29,30,31]. Esta análise permitiu definir a estrutura desta substância como a 6-metil-pinostricina registrada na literatura [28].

A literatura [1] revela a presença de metil-flavanonas em espécies de *Pinus*, entretanto esta substância ainda não foi encontrada em *Pinus strobus L.*

Tabela 9 - Atribuições dos deslocamentos químicos e dados obtidos das análises dos espectros 1D e 2D de  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) das substâncias V, V-Ac e V-Me, registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

C	5						5-Ac		5-Me	
	$\delta\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J=Hz) $^1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^1\text{H}_\text{x}^1\text{H}$ -COSY	NOE %	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	NOE %
2	79,3 (CH)	5,38 (dd, $J_{\text{ax}}=13$ , $J_{\text{eq}}=3$ )	—	—	H 3	—	5,46 (dd, $J_{\text{ax}}=13,6$ , $J_{\text{eq}}=2,8$ )	79,6	5,42 (dd, $J_{\text{ax}}=13$ , $J_{\text{eq}}=3$ )	—
3	43,4 (CH <sub>2</sub> )	3,08 (dd, $J_{\text{ax}}=13$ , $J_{\text{gem}}=17$ ) 2,75 (dd, $J_{\text{gem}}=17$ , $J_{\text{eq}}=3$ )	—	—	H 2	—	3,03 (dd, $J_{\text{ax}}=13,6$ , $J_{\text{gem}}=16,6$ ) 2,73 (dd, $J_{\text{gem}}=16,6$ , $J_{\text{eq}}=2,8$ )	45,2	3,02 (dd, $J_{\text{ax}}=13$ , $J_{\text{gem}}=17$ ) 2,80 (dd, $J_{\text{eq}}=3$ , $J_{\text{gem}}=17$ )	—
4	195,7 (C)	—	H 3 <sub>ax</sub>	—	—	—	—	189,0	—	—
5	160,3 (C)	—	—	CH <sub>3</sub>	—	OMe (5)	—	164,0	—	OMe (8)
6	106,0 (C)	—	CH <sub>3</sub>	H 8	—	—	—	107,3	—	—
7	165,7 (C)	—	—	CH <sub>3</sub> ; OCH <sub>3</sub>	—	—	—	166,5	—	—
8	90,7 (CH)	6,10 (s)	—	—	—	—	6,42	97,1	6,3 (s)	—
9	161,0 (C)	—	H 8	—	—	—	—	162,3	—	—
10	102,2 (C)	—	—	—	—	—	—	105,0	—	—
1'	138,5 (C)	—	—	—	—	—	—	138,6	—	—
2', 6'	126,0 (CH)	7,40 (m)	—	—	H 3', 5'	—	7,40 (m)	126,1	7,40 (m)	—
3', 5'	128,8 (CH)	7,40 (m)	—	—	H 2', 6', 4	—	7,40 (m)	128,8	7,40 (m)	—
4'	128,8 (CH)	7,40 (m)	—	—	H 3', 5'	—	7,40 (m)	128,8	7,40 (m)	—
CH <sub>3</sub>	6,8 (CH <sub>3</sub> )	1,99 (s)	—	—	—	—	1,99 (s)	8,1	2,04 (s)	—
OMe - 7	55,7 (CH <sub>3</sub> )	3,82 (s)	—	—	—	—	3,82 (s)	56,0	3,84 (s)	—
OH	—	12,00 (s)	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	173,0	—	—
OMe - 5	—	—	—	—	—	—	2,43 (s)	31,9	—	—
OMe - 5	—	—	—	—	—	—	—	—	3,82 (s)	—

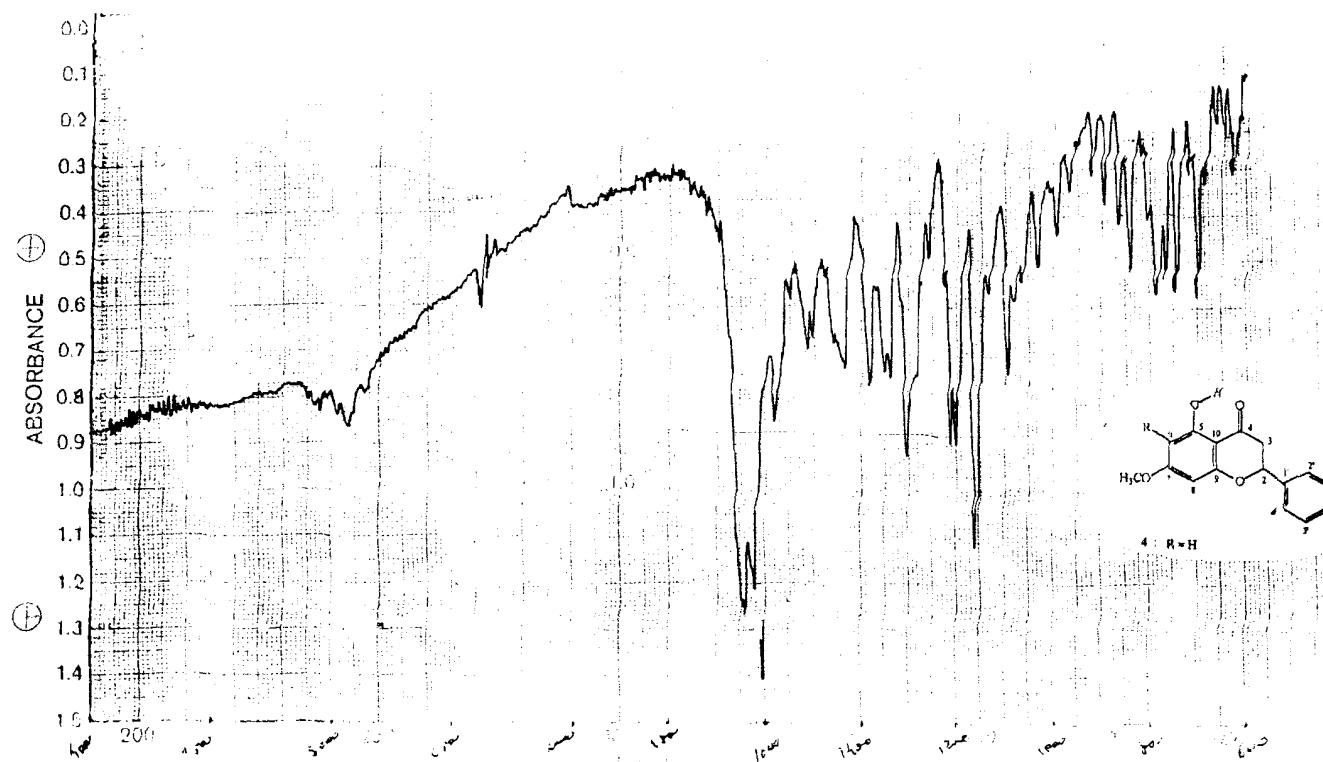


Figura 4.1 - Espectro de infravermelho da substância IV em pastilha de KBr

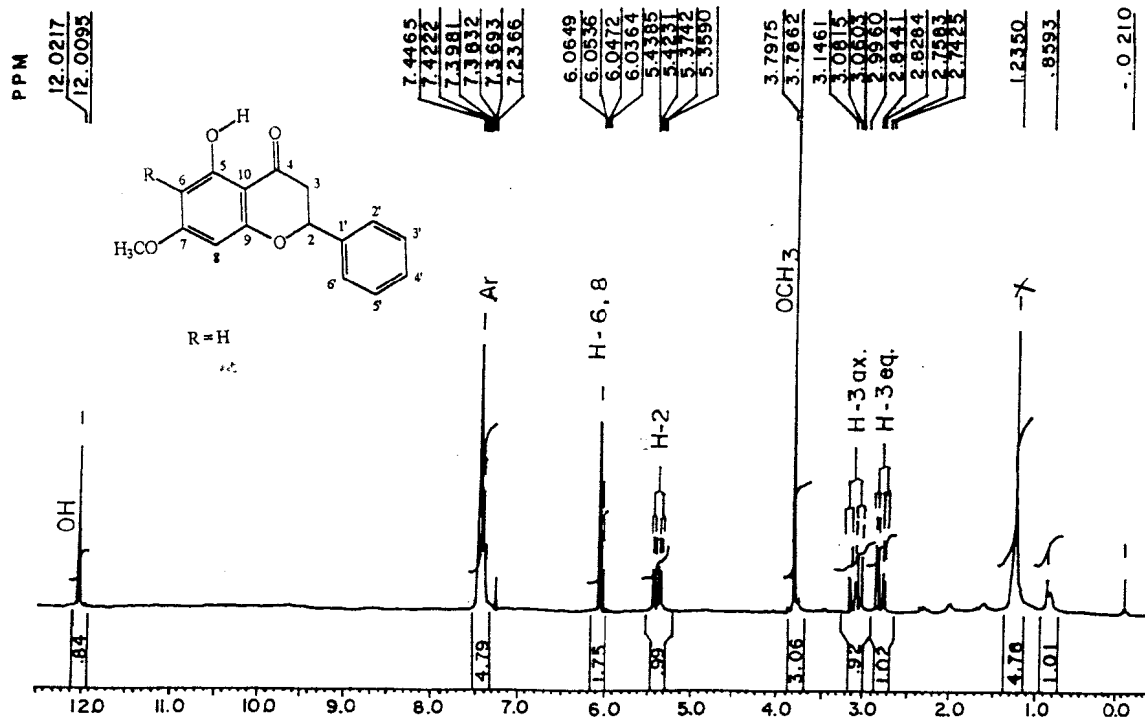


Figura 4.2 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da substância IV, em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

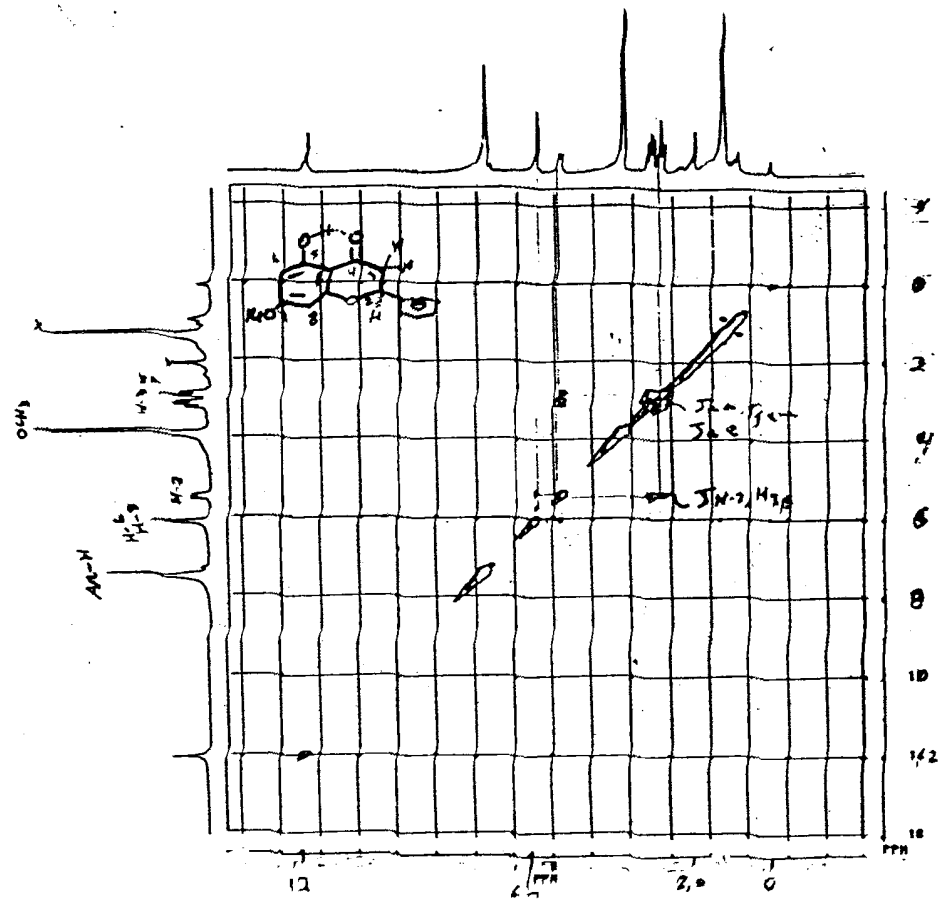


Figura 4.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  e TMS referência interna.



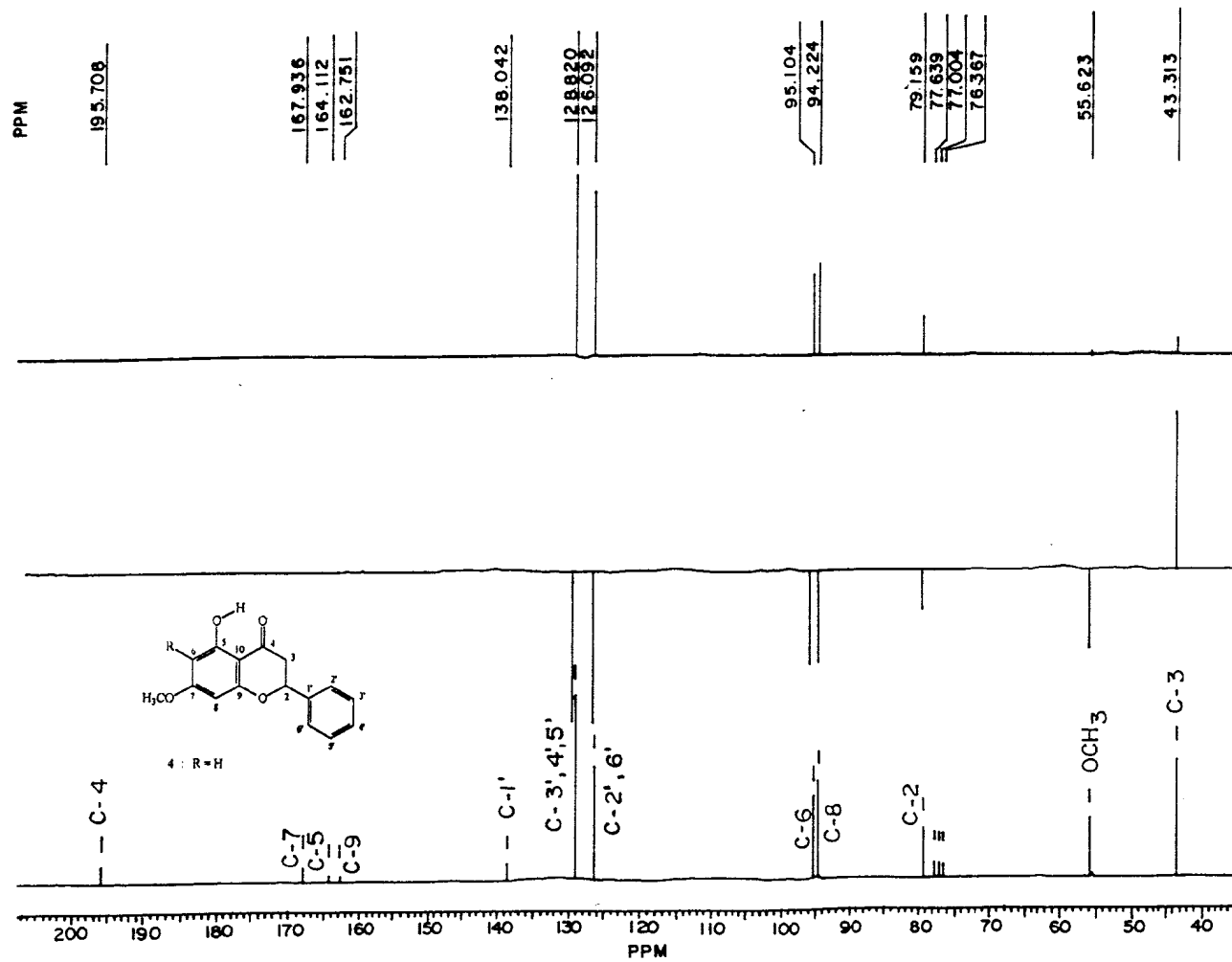


Figura 4.4 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,3 MHz, PND e DEPT), ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) da substância IV em CDCl<sub>3</sub>.

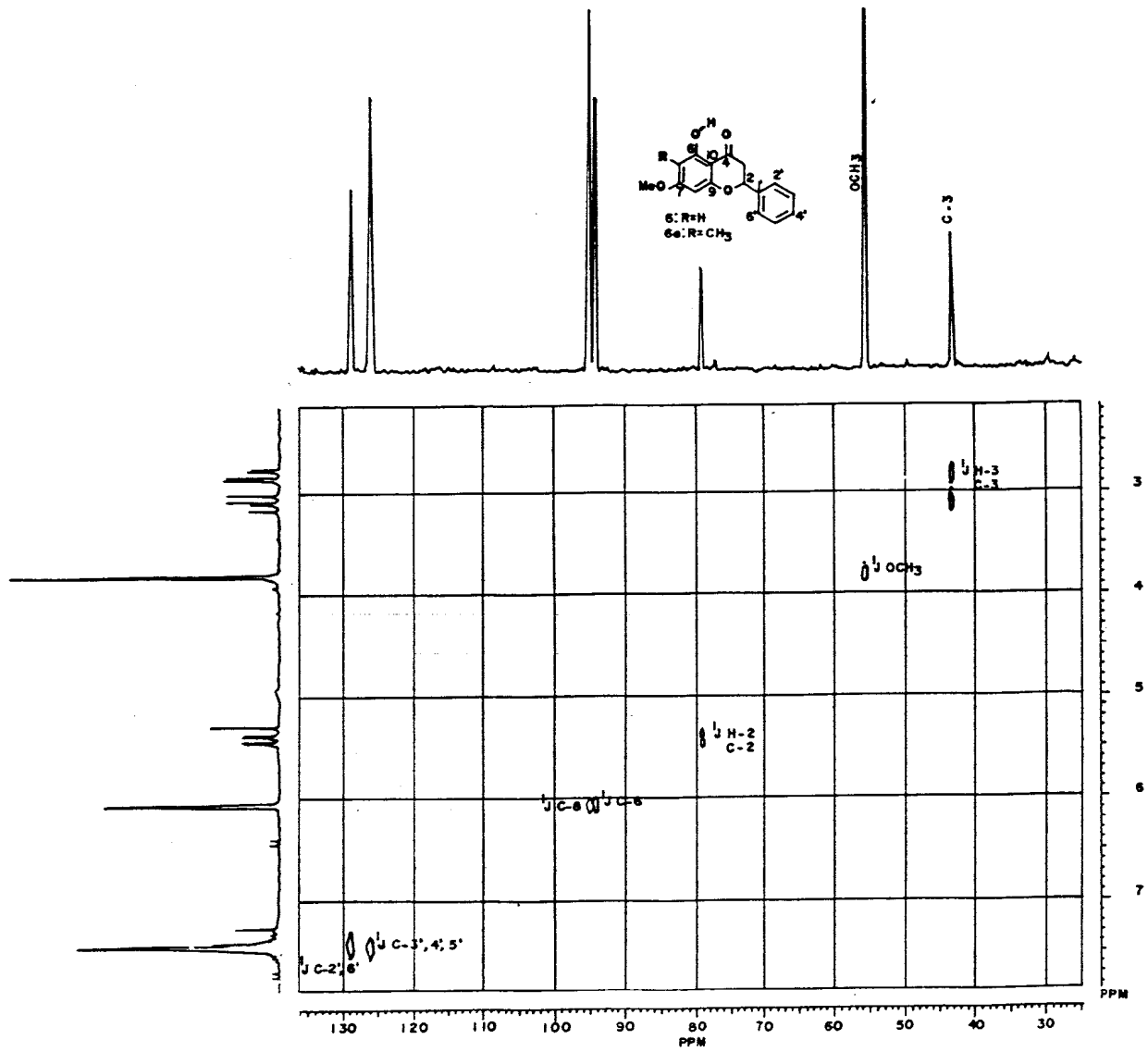


Figura 4.5 - Espectro de RMN 2D [<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C - COSY (<sup>1</sup>J<sub>CH</sub>)] da substância IV.

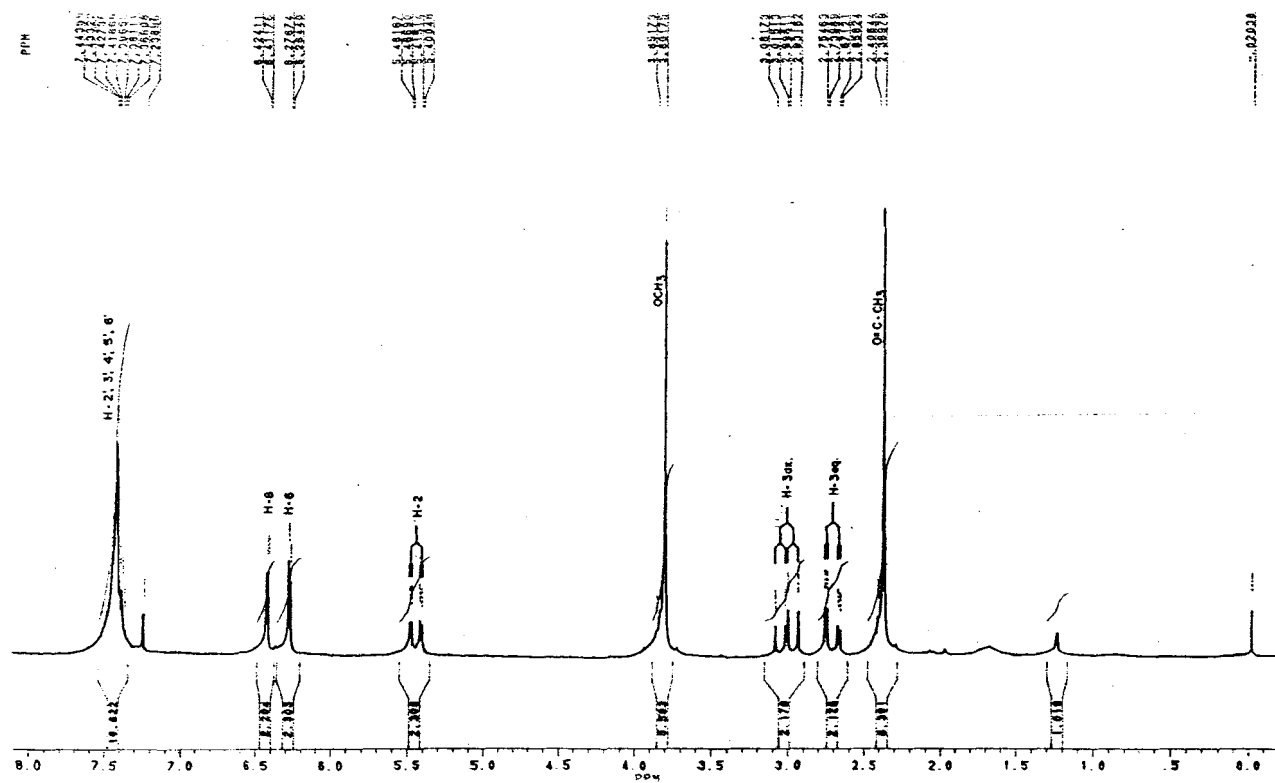


Figura 4Ac.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado acetilado da substância IV em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

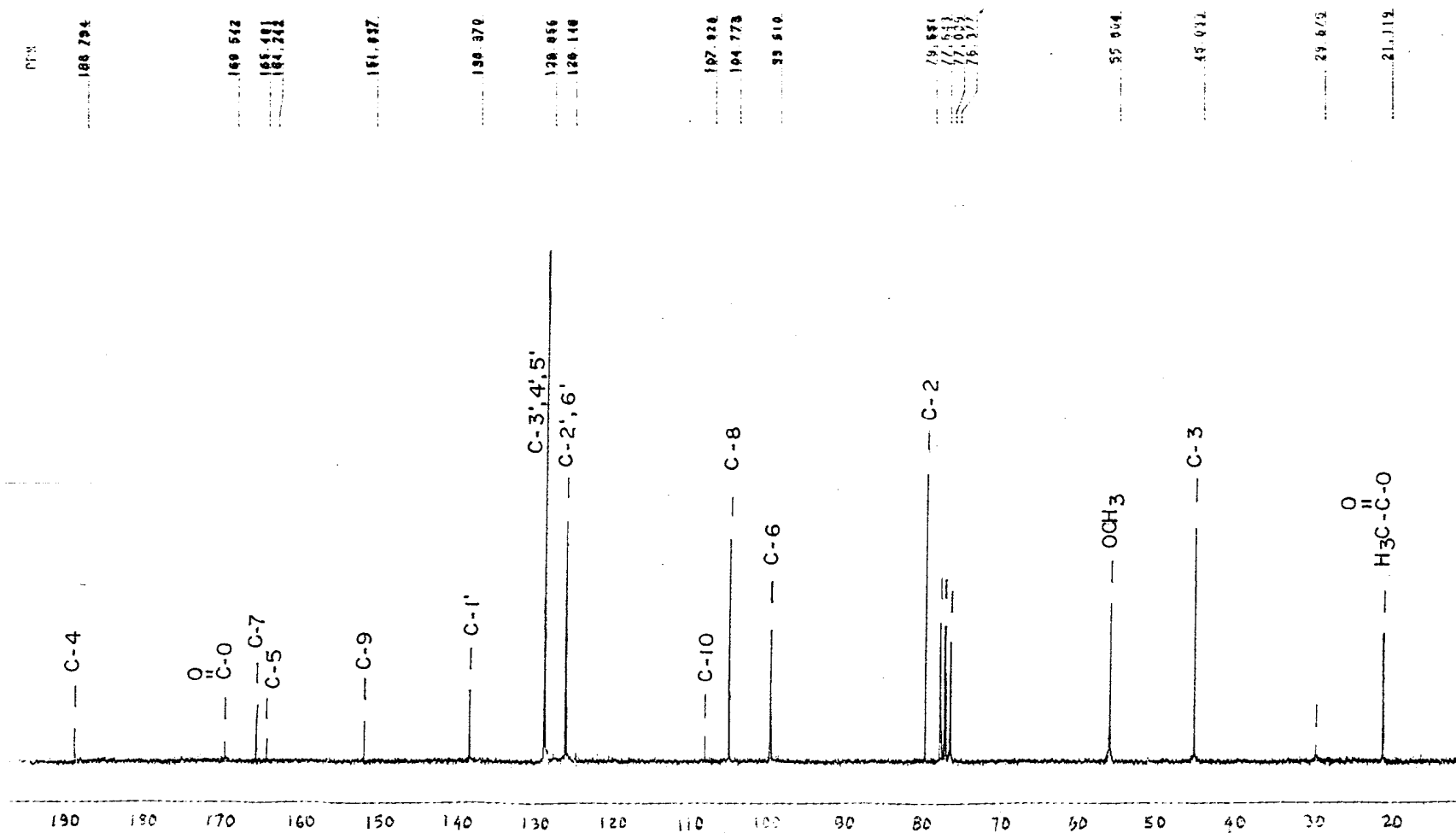


Figura 4Ac.2 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância IV em CDCl<sub>3</sub>.

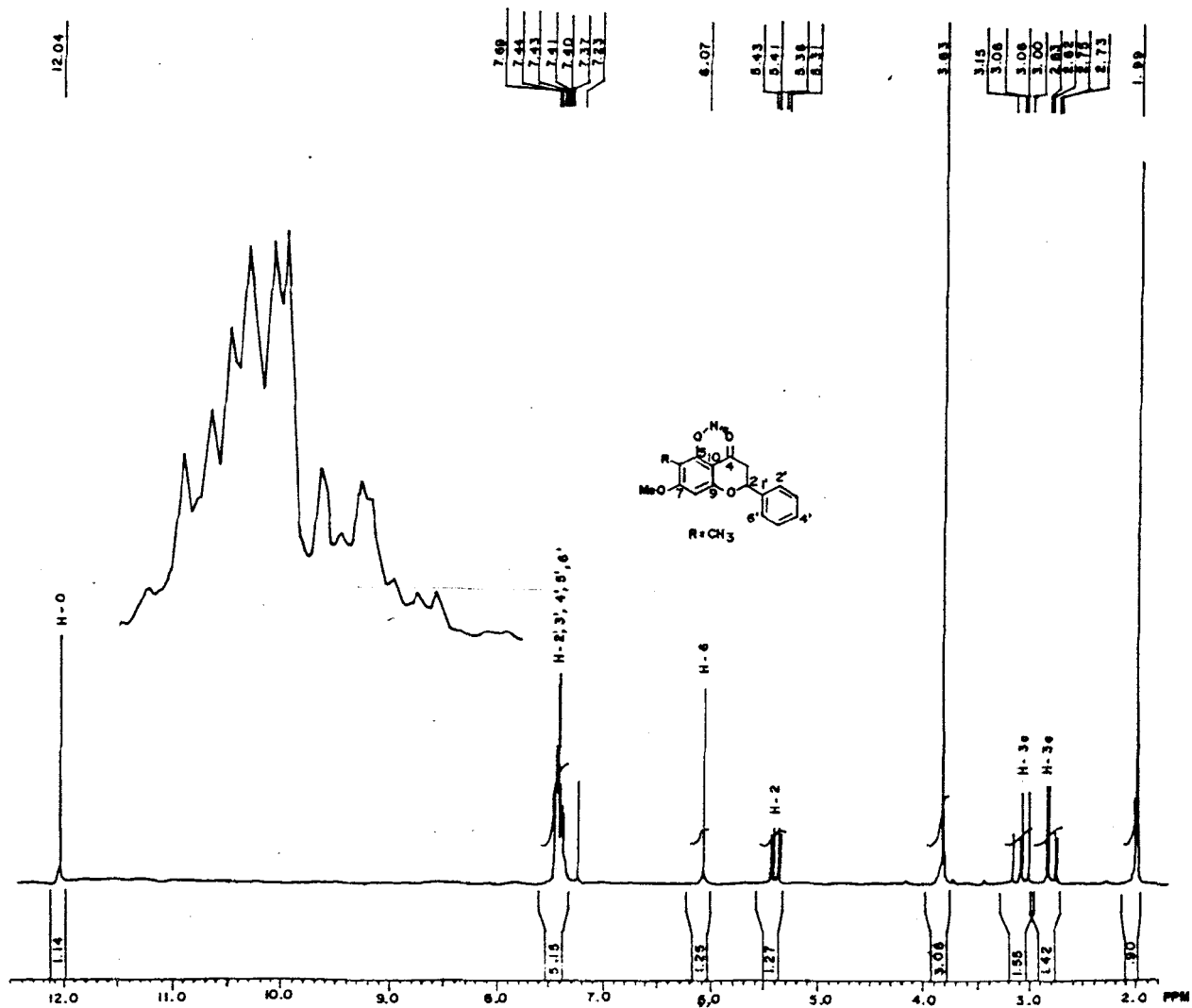


Figura 5.1 - Espectro RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da substância V em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

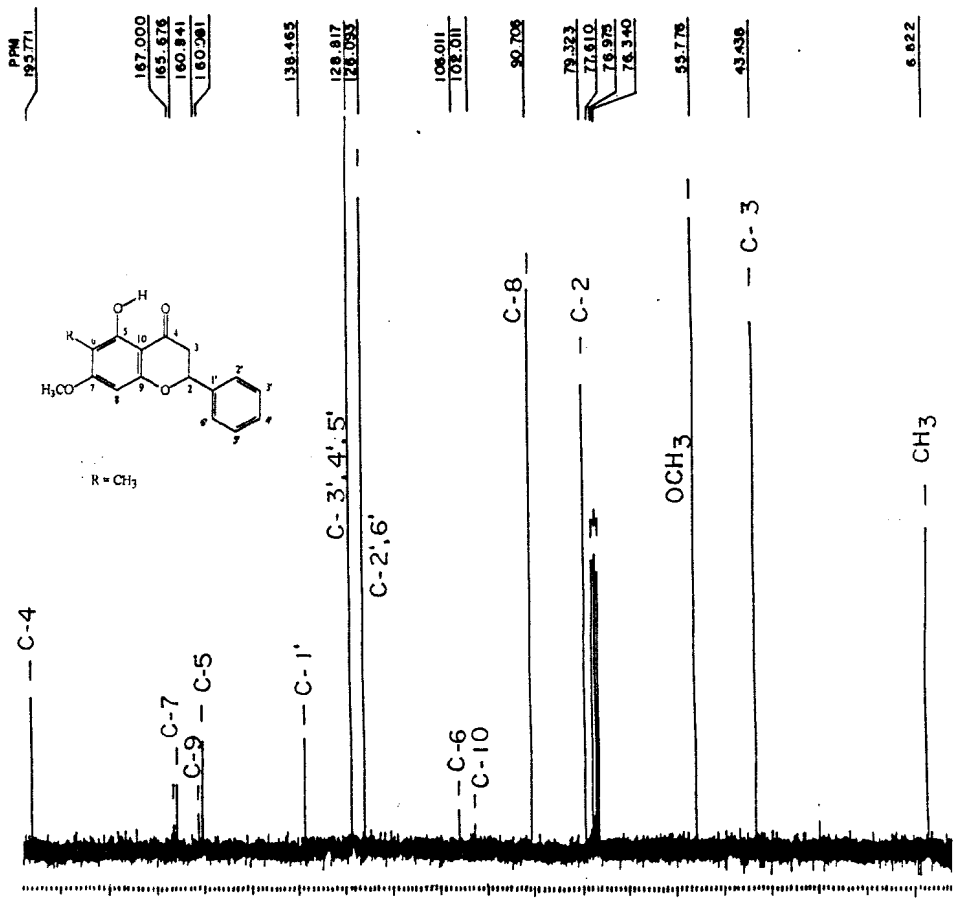


Figura 5.2 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,3 MHz) totalmente desacoplado da substância V em CDCl<sub>3</sub>.

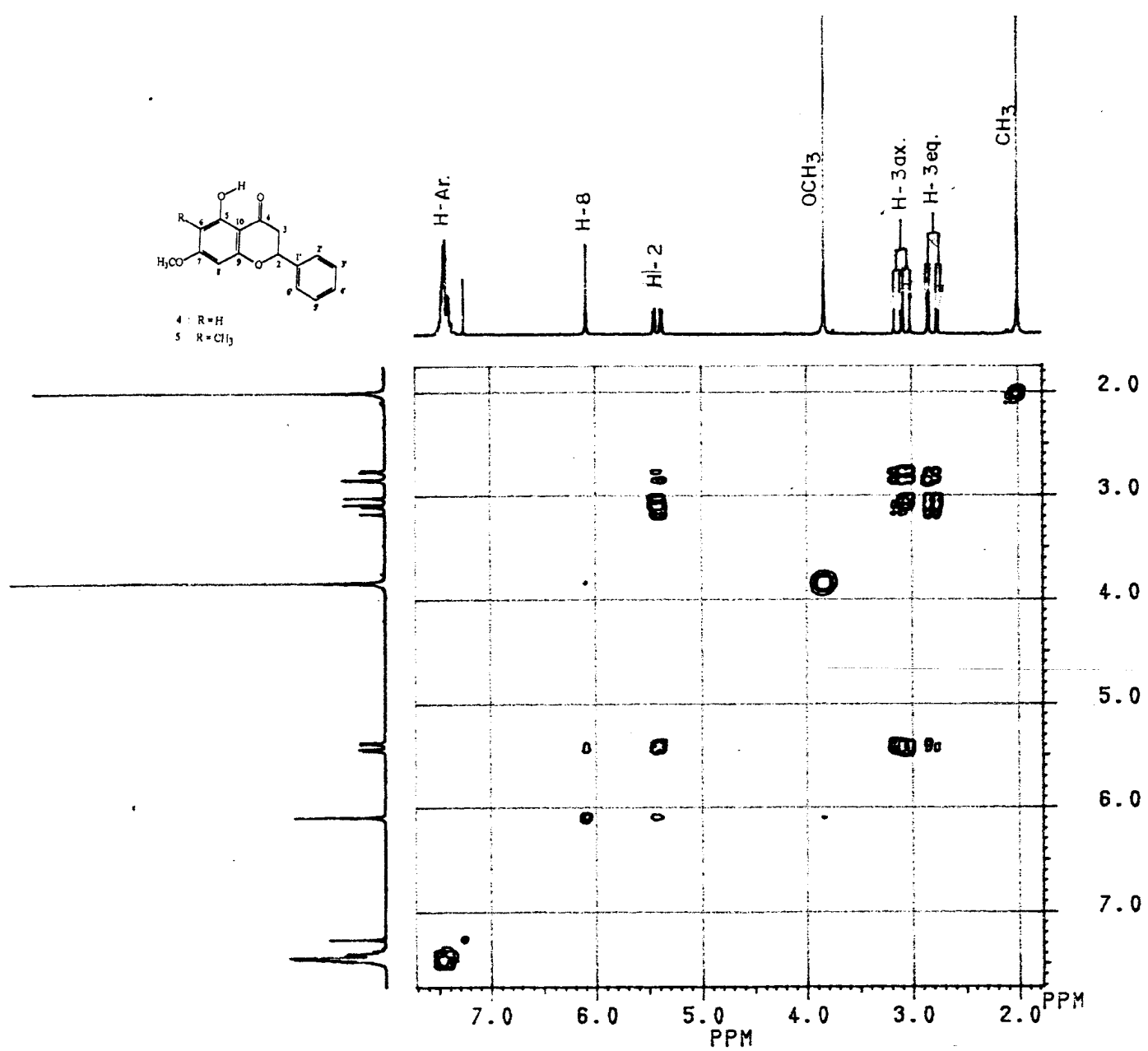


Figura 5.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância V em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

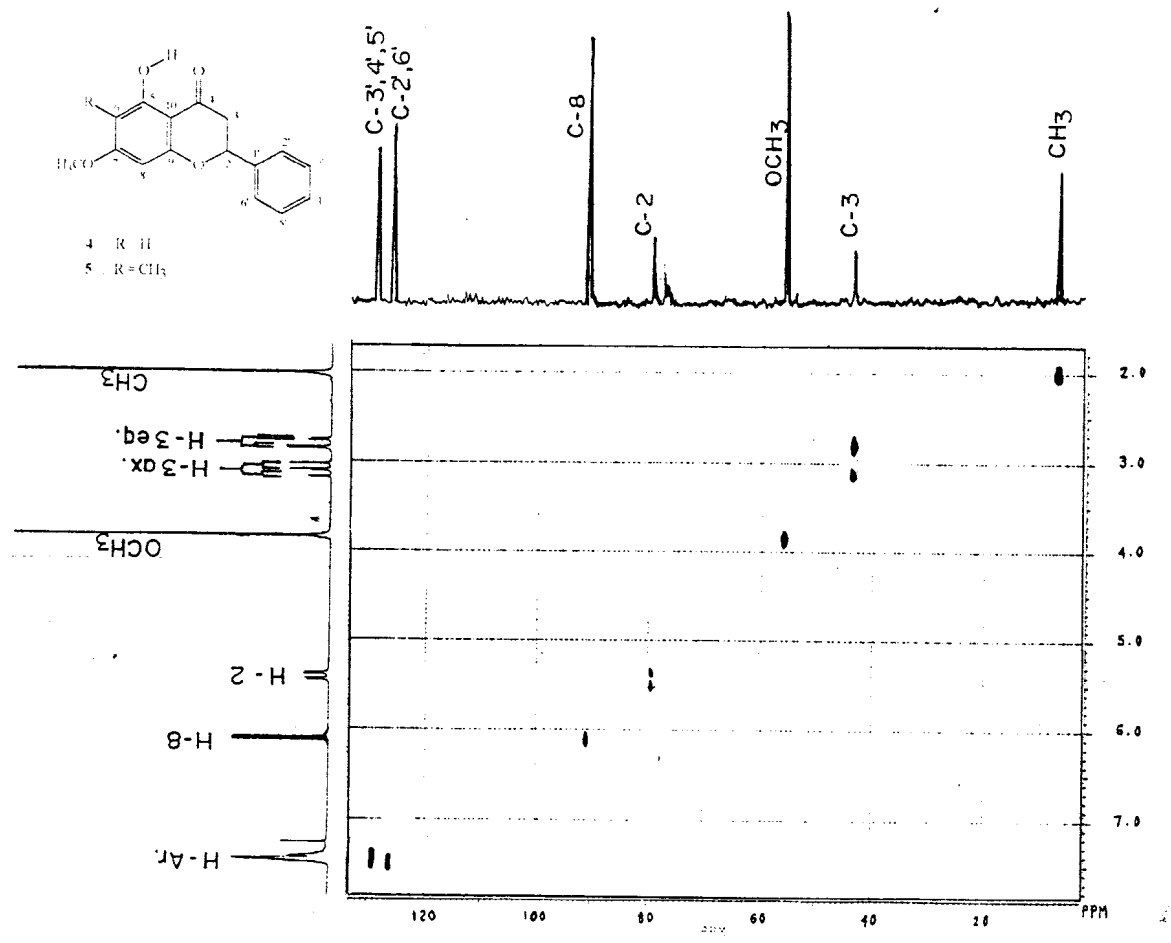


Figura 5.4 - Espectro de RMN 2D [<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C - COSY (<sup>1</sup>J<sub>CH</sub>)] da substância V em CDCl<sub>3</sub>.



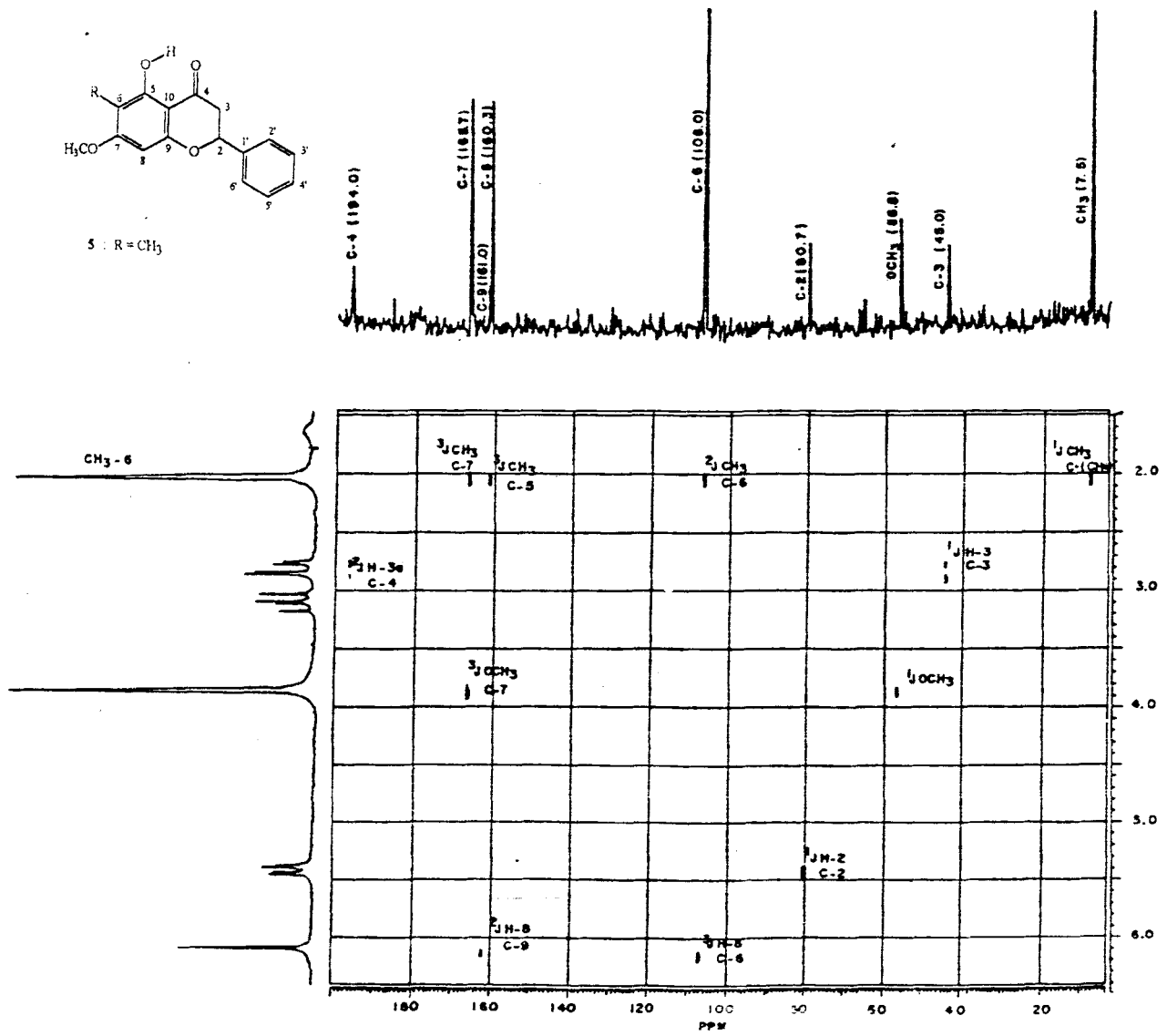


Figura 5.5 - Espectro de RMN 2D [<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C - COSY (<sup>n</sup>J<sub>CH</sub>, n = 1,2,3)] da substância V em CDCl<sub>3</sub>.

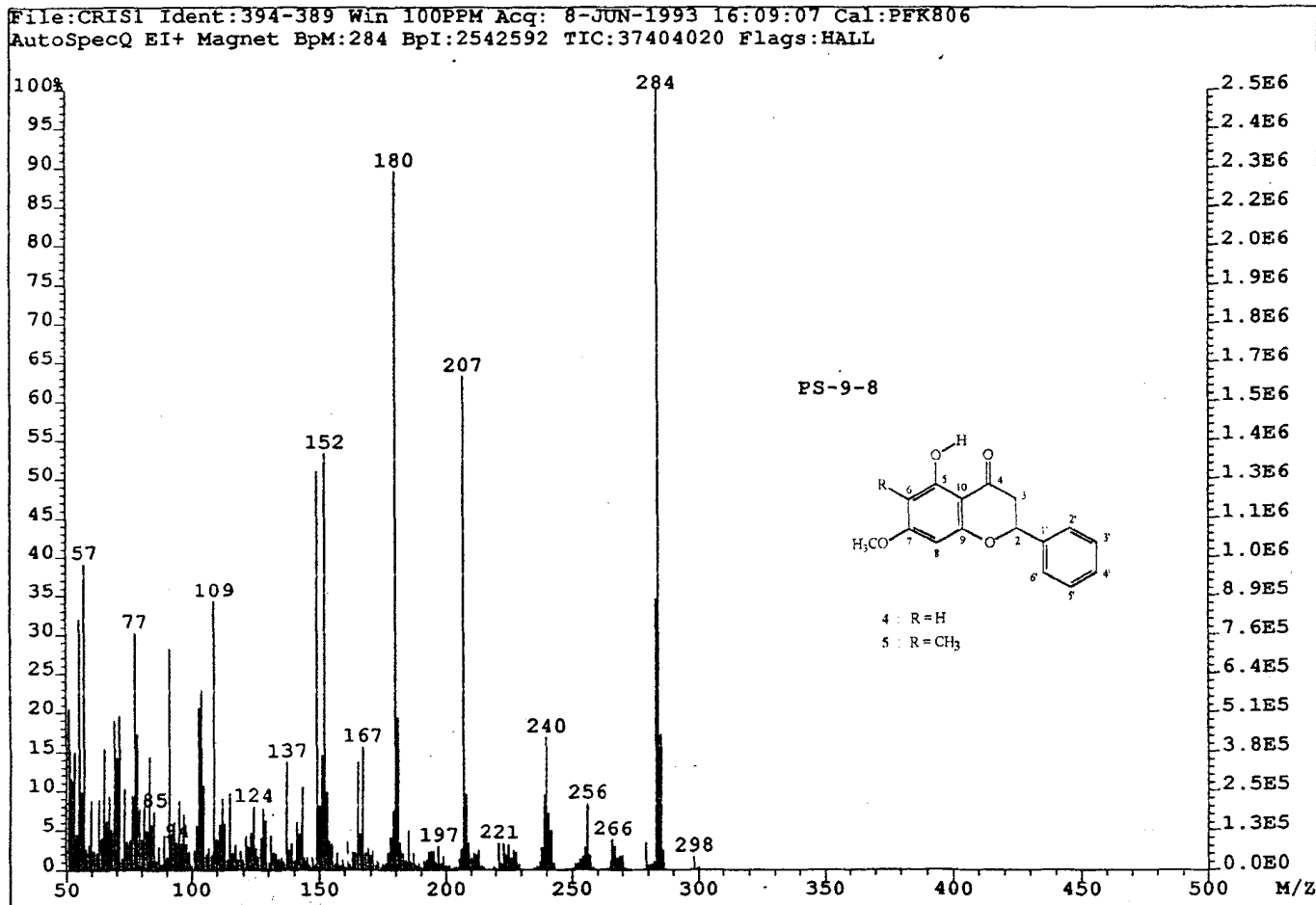


Figura 5.6 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da substância V.

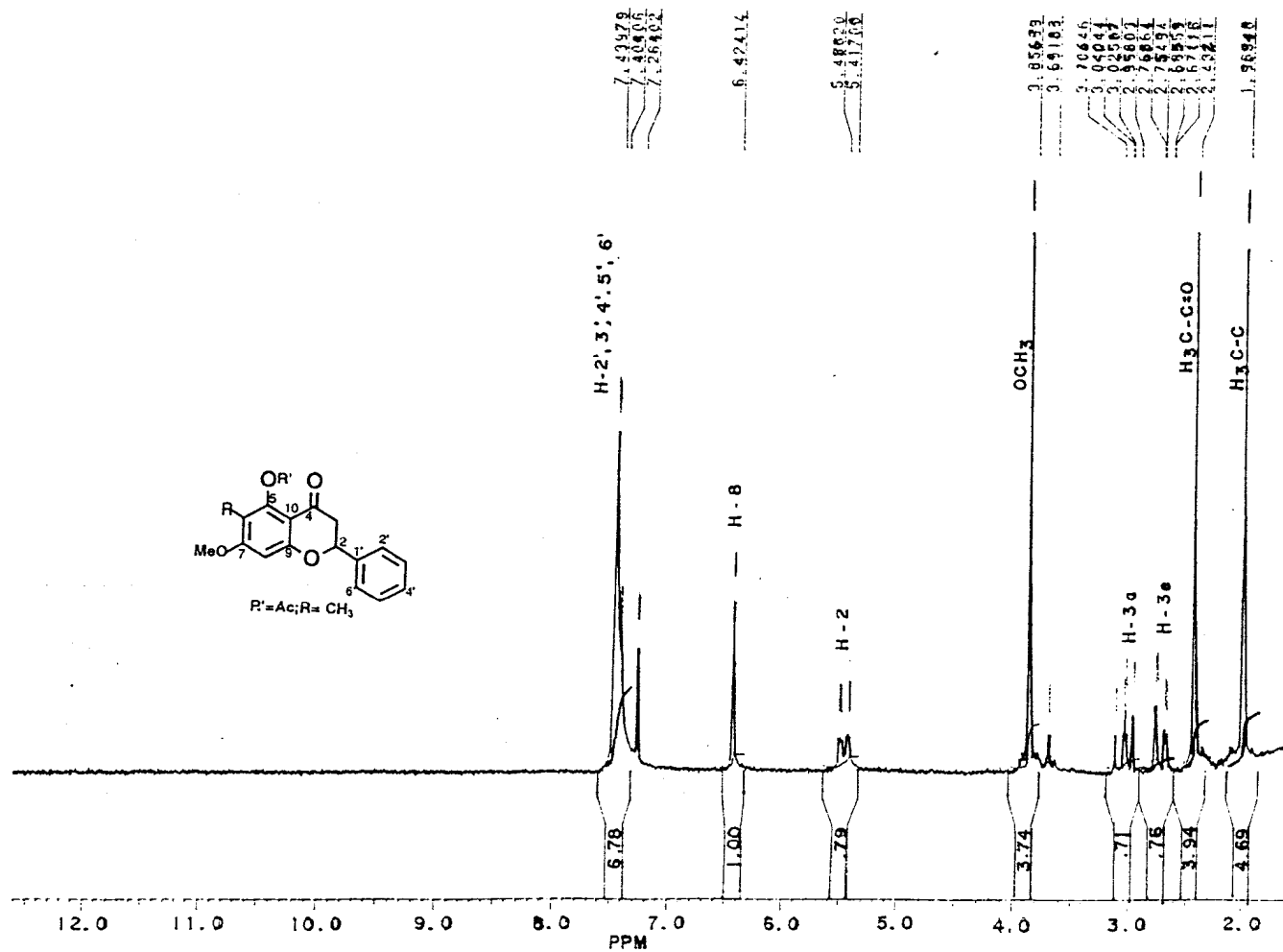


Figura 5Ac.1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) do derivado acetilado da substância V em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

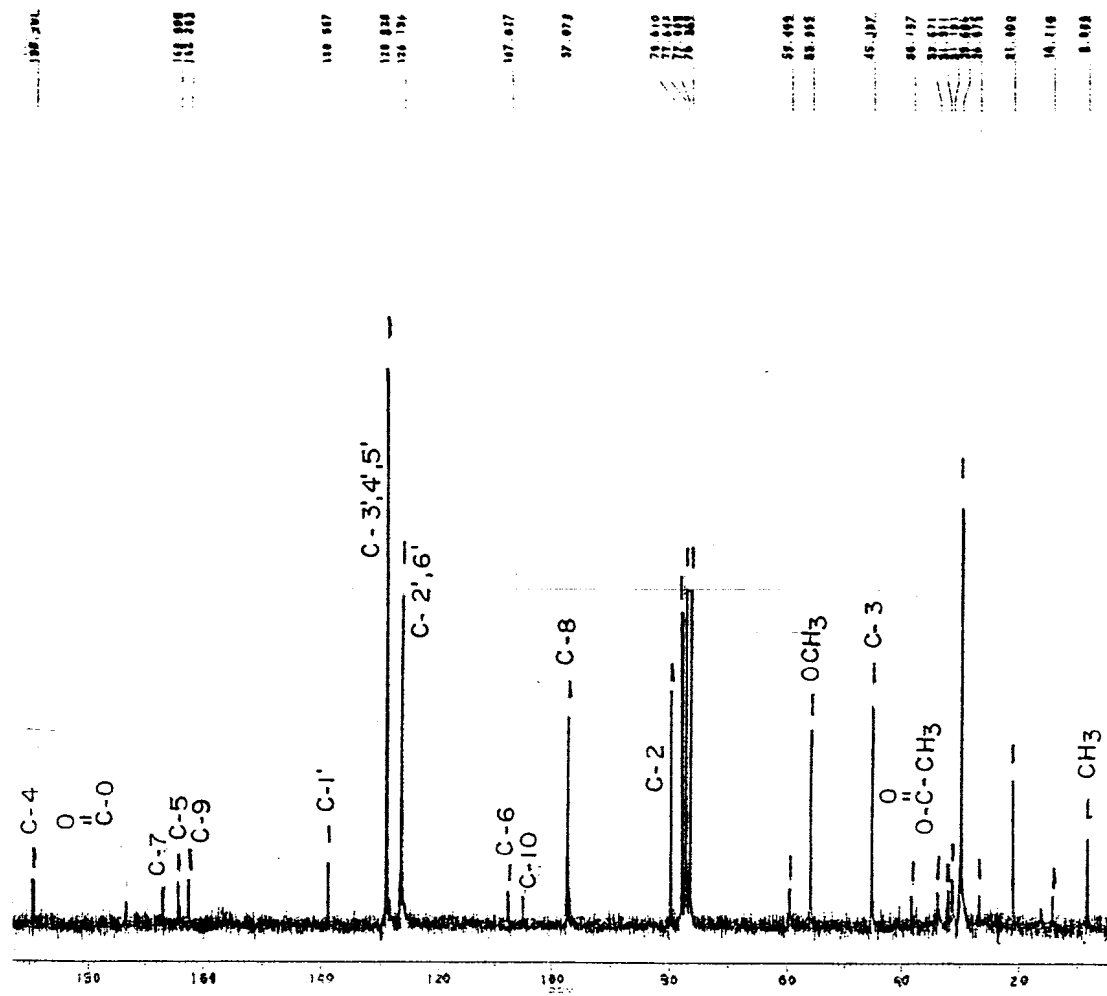


Figura 5<sub>Ac.2</sub> - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância V.

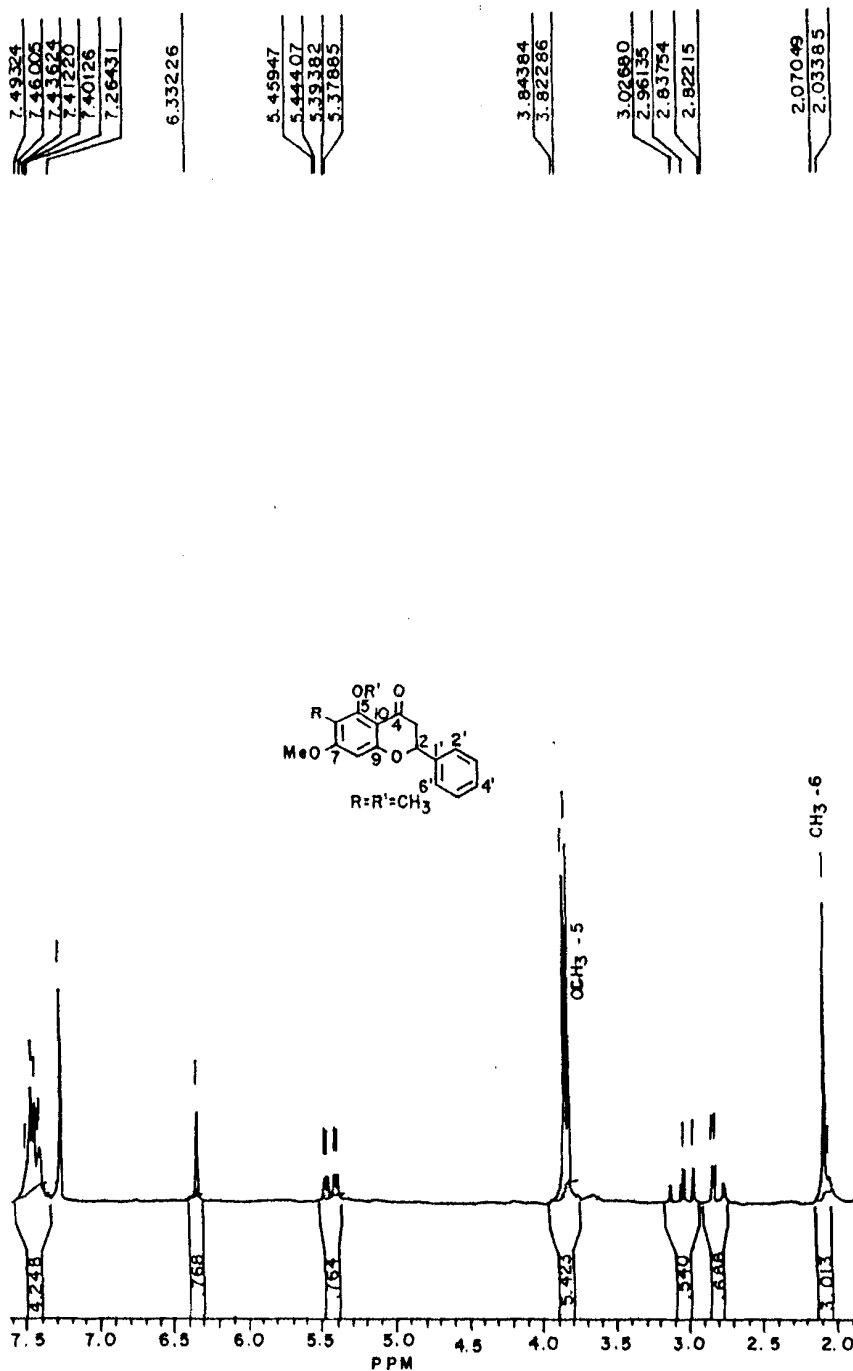


Figura 5<sub>Me</sub> 1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) do derivado acetilado da substância V em CDCl<sub>3</sub>.

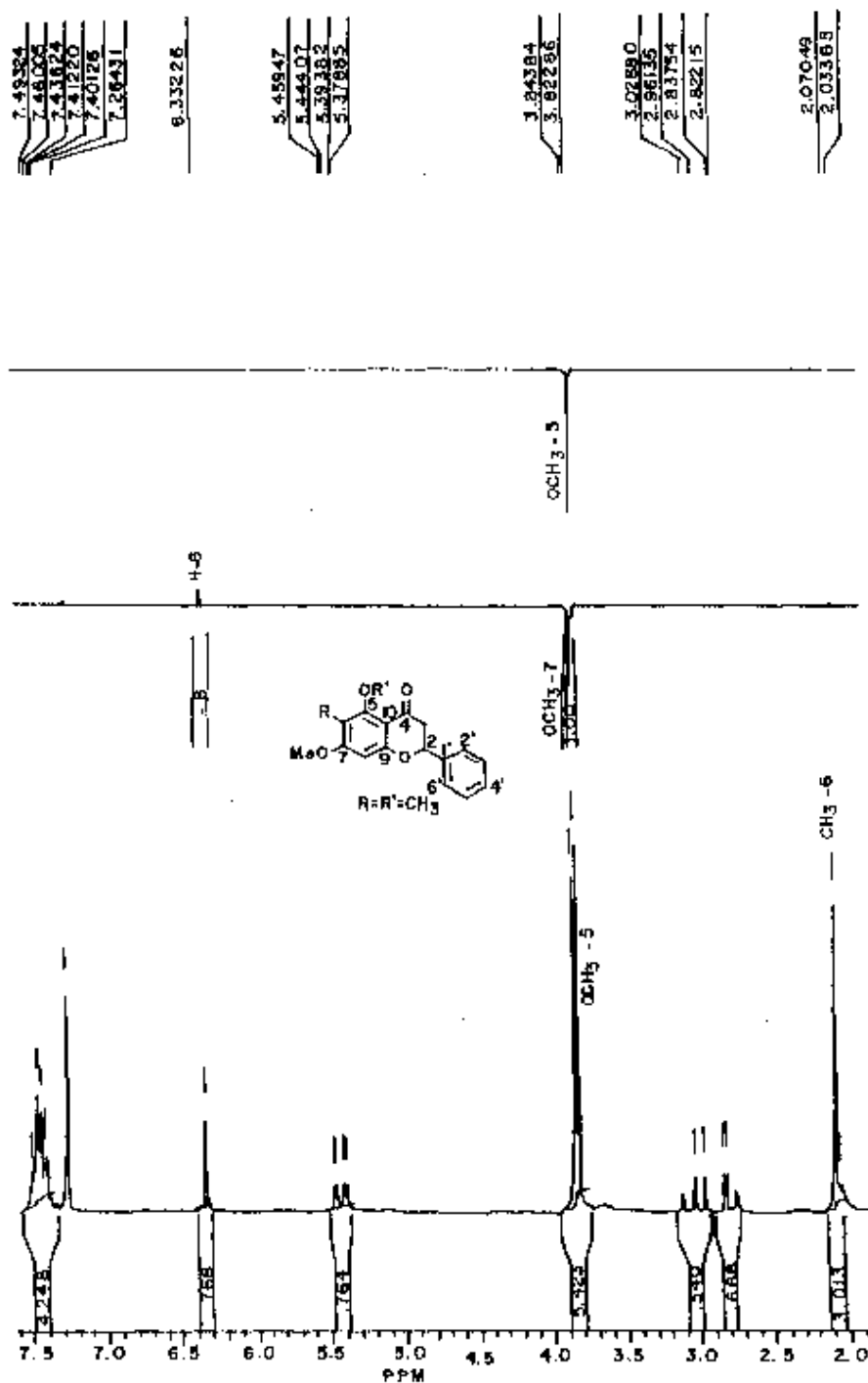


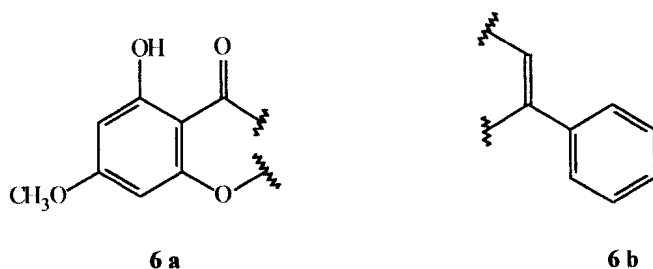
Figura 5Me-2 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros do derivado metilado da substância V.

### 3.4. Determinação estrutural das substâncias VI e VII

O espectro no infravermelho da substância VI (Figura 6.1) apresenta sinais que permitiram caracterizar a substância como aromática com carbonila conjugada e contendo grupo éter ou grupo com heteroátomo no anel.

A Figura 6.2 mostra sinais de absorção de prótons de hidroxila em ponte com carbonila (12,6  $\delta$ , s, 1H), dois sinais de prótons aromáticos em sistema conjugado (7,83  $\delta$ , 2H e 7,47  $\delta$ , m, 3H) que acoplam entre si (Figura 6.3) e quatro sinais simples em 6,38  $\delta$  (1H), 6,44  $\delta$  (1H), 6,59  $\delta$  (1H) e 3,83  $\delta$  (3H).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [PND e DEPT  $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ] Figura 6.4 possui sinais referentes a  $\text{CH}_3$  (55,7  $\delta$ ), CH (92,4  $\delta$ , 98,1  $\delta$ , 105,9  $\delta$ , 126,1  $\delta$ , 128,9  $\delta$  e 131,7  $\delta$ ) e seis sinais de carbono quaternário (131,1  $\delta$ , 157,6  $\delta$ , 162,1  $\delta$ , 163,9  $\delta$ , 165,6  $\delta$  e 182,4  $\delta$ ). Com o auxílio das informações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pôde-se propor as estruturas parciais 6a e 6b para substância VI.



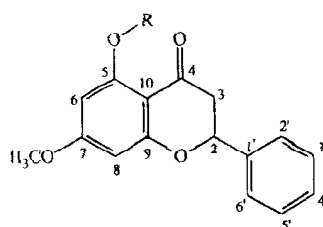
A unidade 6a está de acordo com as frequências dos carbonos e hidrogênios que acoplam através de uma ligação ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, Figura 6.5) que são: 92,7  $\delta$  (6,44  $\delta$ ) e 98,2  $\delta$  (6,31  $\delta$ ) e que estão localizados em ambiente químico protegido por mesomeria. O sinal do próton, em 6,6  $\delta$  que está ligado ao carbono que absorve em 105,9  $\delta$  é

característico de um próton  $\alpha$  de uma enona. Os demais sinais de interação a uma ligação revelados no espectro de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY -  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  (Figura VI-5) confirmam as atribuições dos carbonos e prótons aromáticos: 126,1  $\delta$  (7,83 2H), 129,8  $\delta$  e 131,7  $\delta$  (7,47  $\delta$  3H). Reunindo as unidades 6a e 6b chega-se a estrutura de uma flavona (6) cuja massa molecular (268u) é compatível com o sinal do íon molecular ( $\text{M}^+$ , 100%) revelado no espectro de massas da mistura (Figura 6.7, Esquema 3). A Tabela 10 mostra as atribuições das frequências de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância VI definidos a partir dos sinais dos espectros 1D ( $^1\text{H}$ , Figura 6.2;  $^{13}\text{C}$  Figura 6.4) e 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY, Figura 6.3; e  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY-  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ , Figura 6.5 e  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $n = 2,3$ , Figura 6.6) e seu derivado acetilado (Figura VI Ac-1 e VI Ao-2).

Os quatro carbonos quaternários carbinólicos tiveram suas frequências de absorção definidas com base nos sinais de interação heteronuclear a duas ligações entre C-9 (157,6  $\delta$ ) e H-8 (6,32  $\delta$ ), C-2 (163,9  $\delta$ ) e H-3 (6,59  $\delta$ ), C-5 (162,1  $\delta$ ) e HO (12,6  $\delta$ ) e a três ligações entre C-7 (165,6  $\delta$ ) e  $\text{H}_3\text{C-O}$  (3,83  $\delta$ ), (Figura 6.6). Os demais sinais de interação heteronuclear confirmam as atribuições dos carbonos quaternários e metínicos.


A presença de dois sinais de metoxila motivou o uso de irradiação dupla e subtração de espectros (Figura 6.8). Isto permitiu concluir que há duas substâncias na amostra analisada, uma com metoxila vizinha a dois prótons aromáticos e outra cuja metoxila está vizinha a somente um próton aromático. A estrutura da substância VI (6) corresponde a tectocrisina já isolada de *Pinus strobus* L. anteriormente [42,43].





6 - R - H  
6Ac - R = Ac

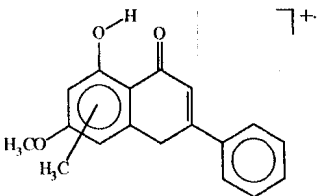
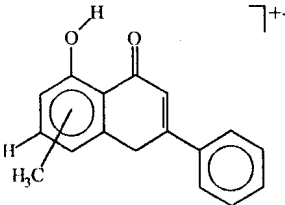
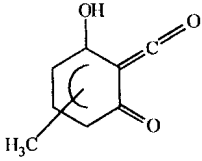
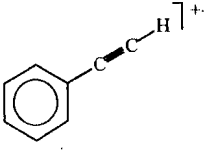

**Tabela 10** : Dados de de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) da substância VI e seu derivado acetilado.

C	4						4Ac	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (m, J = Hz; n° H)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY	NOE <sup>a</sup> (%)	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$
2	163,9 (CH)	-	-	-	-	-	163,4	-
3	105,8 (CH)	6,64 (s; 1H)	-	-	-	-	108,3	6,60 (s)
4	182,4 (C)	-	OH	-	-	-	176,4	-
5	162,1 (C)	-	-	-	-	-	158,3	-
6	98,2 (CH)	6,35 (s; 1H)	-	OH	H-8	(6)	98,9	6,60 (d, J = 2)
7	165,5 (C)	-	-	OMe	-	-	150,4	-
8	92,6 (CH)	6,35 (d, J = 2; 1H)	-	-	H-6	(4)	108,2	-
9	157,0 (C)	-	-	-	-	-	150,4	-
10	150,0 (C)	-	-	OH	-	-	111,1	-
1'	131,1 (C)	-	-	-	-	-	131,4	-
2',6'	126,1 (C)	7,8 (d, J = 8 2H)	H3',5'	-	H-3',5'	-	126,2	7,84 (m)
3',5'	128,8 (C)	7,5 (m, 2H)	H2',6',4'	-	H-2',6',4'	-	128,9	7,47 (m)
4'	131,8 (C)	7,5 (m, 1H)	H3',5'	H2',6'	H-2',6'	-	131,2	7,47 (m)
OMe	56,0 (CH <sub>3</sub> )	3,85 (s; 3H)	-	-	-	-	55,9	3,89 (s)
OH	-	12,7 (s, 1H)	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	169,7	-
	-	-	-	-	-	-	21,1	2,42 (s)

<sup>a</sup> irradiação na metoxila

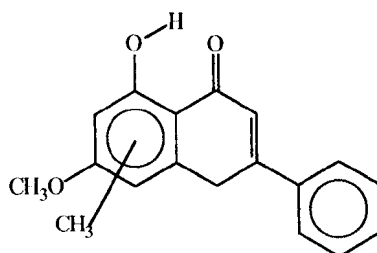
O espectro de massas (Figura 6.7) revela a mistura de duas substâncias uma com  $M^+$  268 e outra com  $M^+$  282. A Tabela 11 mostra os íons fragmentários correspondentes aos picos que confirmam a presença de metil-tectocriscina.

Tabela 11 : íons fragmentários correspondentes aos picos presentes no espectro de massas da mistura das substâncias VI e VII

m/z	Fragmentos	%
$M^+$ 282		10
252		2.4
150		3
102		9
77		15

A substância VII apresenta espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 7.1) muito semelhante ao espectro de VI (Figura 7.2); as únicas diferenças foram na presença do sinal em 2,1  $\delta$  (s, 3H) e na ausência de um singlete em 6,3  $\delta$ . Esta observação permite propor a estrutura 7a para substância VII que está de acordo com a frequência de absorção dos carbonos (Figura 7.2).

Esta substância é responsável pelos sinais adicionais nas Figuras 6.7 ( $M^+$  282) e figura 6.8 [2,1  $\delta$  (s) e NOE (5 %) sobre H-8].



7a

Para definir a posição da metila no anel A (posição 6 ou 8) foi preparado o éter metílico e, então, fizeram-se experiências de irradiação dupla nas frequências das duas metoxilas e posterior diferença de espectros. O efeito NOE (9 % sobre H-8) foi observado somente na irradiação de uma metoxila ( $OCH_3$ -7), revelando que a posição entre os dois grupos metoxila não possui próton aromático. Por isto o grupo metila deve ocupar a posição 6 (Figura VII-Me-1). A Tabela 12 mostra as frequências de absorção de  $^1H$  e  $^{13}C$  da substância VII e do seu derivado metilado.

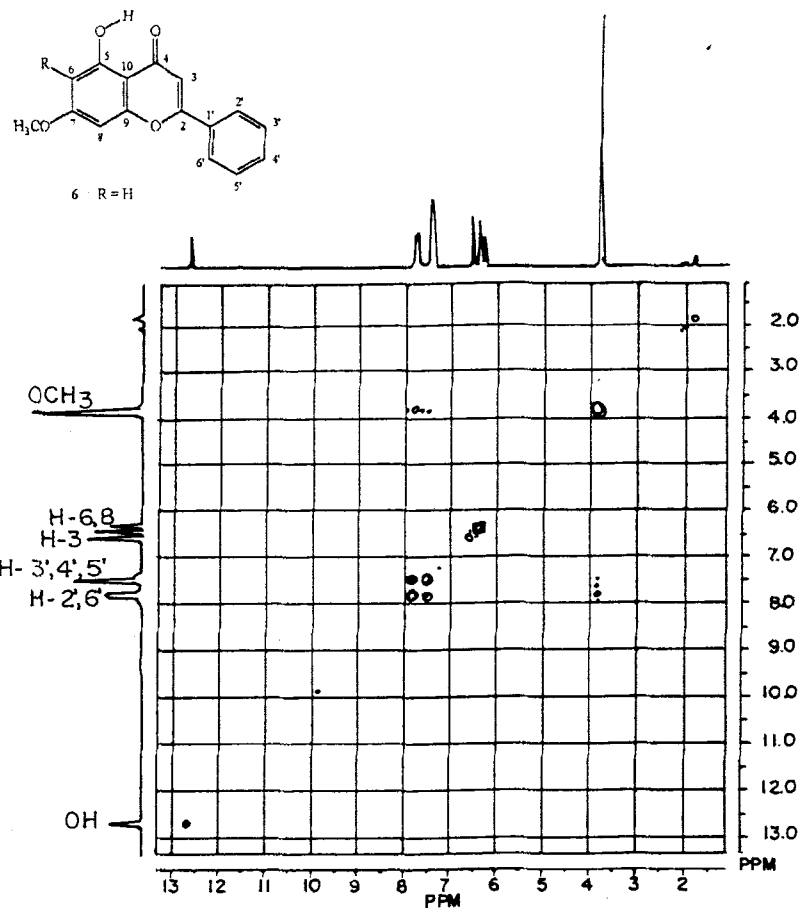


Figura 6.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

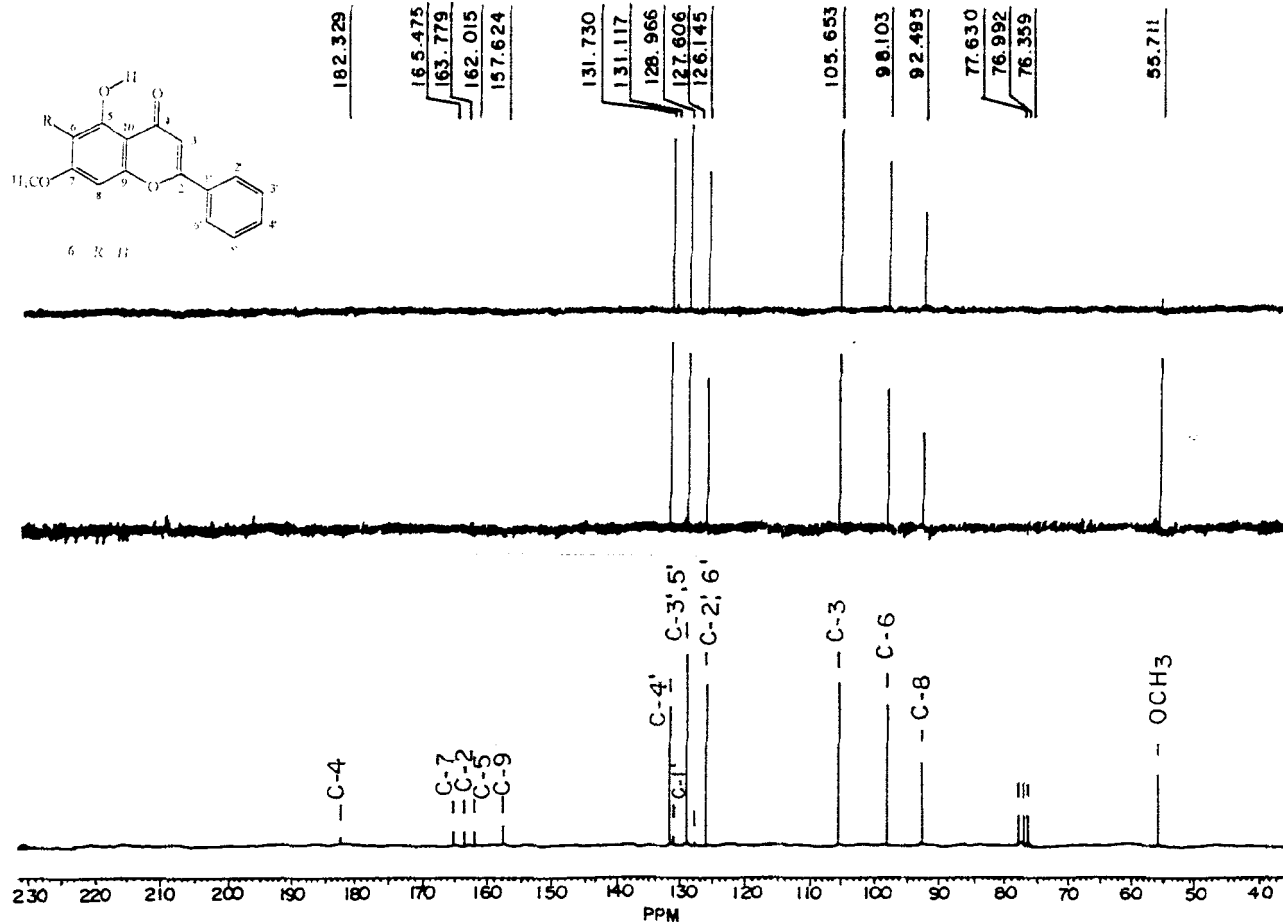
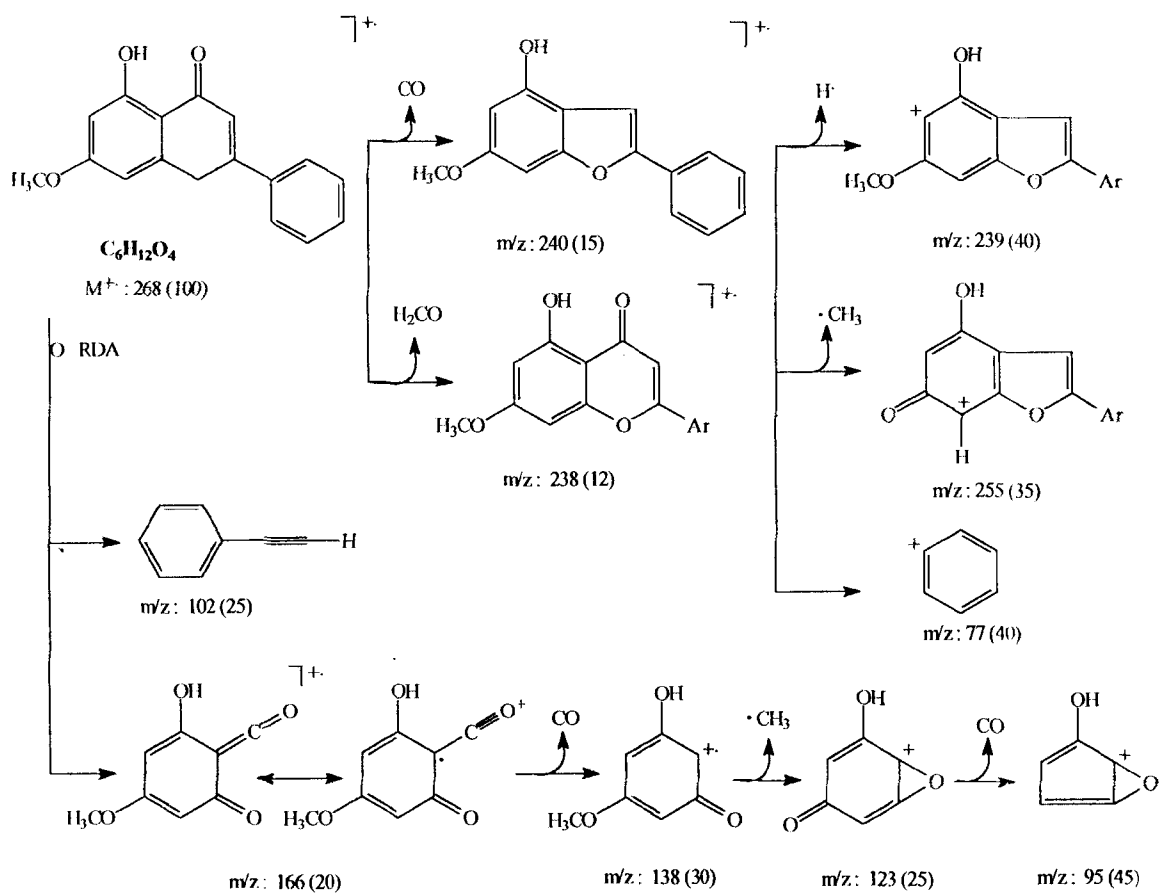
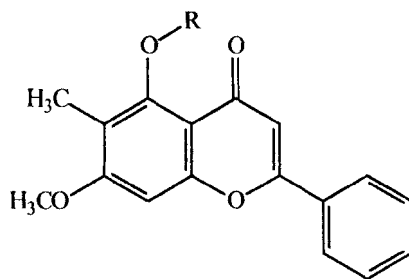


Figura 6.4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  da substância VI.



Esquema 3 : Interpretação do espectro de massas da substância VI.

Apesar de ser freqüente a presença de flavona em espécie de *Pinus*, não há registro na literatura dessa substância em *P. strobus* L..



7 - R - H  
7Me - R = Me

**Tabela 12** : Atribuições das frequências de absorção de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de VII e VII-Me

C	7		7-Me	
	$\delta$ C (m)	$\delta$ H	$\delta$ H	NOE (%) <sup>a</sup>
2	163,9 (C)	-	-	
3	105,8 (CH)	6,65 (s)	6,70 (s)	
4	182,4 (C)	-	-	
5	162,1 (C)	-	-	
6	105,9 (C)	-	-	
7	165,6 (C)	-	-	
8	89,4 (CH)	6,48 (s)	6,77 (s)	
9	157,0 (C)	-	-	
10	105,9 (C)	-	-	
1'	131,6 (C)	-	-	
2',6'	126,2 (CH)	7,8 (d, J = 6,0 Hz)	7,5 (m)	
3',5'	129,1 (CH)	7,5 (m)	7,5 (m)	
4'	138,8 (CH)	7,5 (m)	7,8 (m)	
OCH <sub>3</sub> -7	55,9 (CH <sub>3</sub> )	3,91 (s)	3,95 (s)	H-8(9)
CH <sub>3</sub>	7,3 (CH <sub>3</sub> )	2,11 (s)	2,97 (s)	
OH	-	12,8 (s)	-	
OCH <sub>3</sub> -5	-	-	3,88 (s)	b

a Irradiação na metoxila

b Ausência de NOE

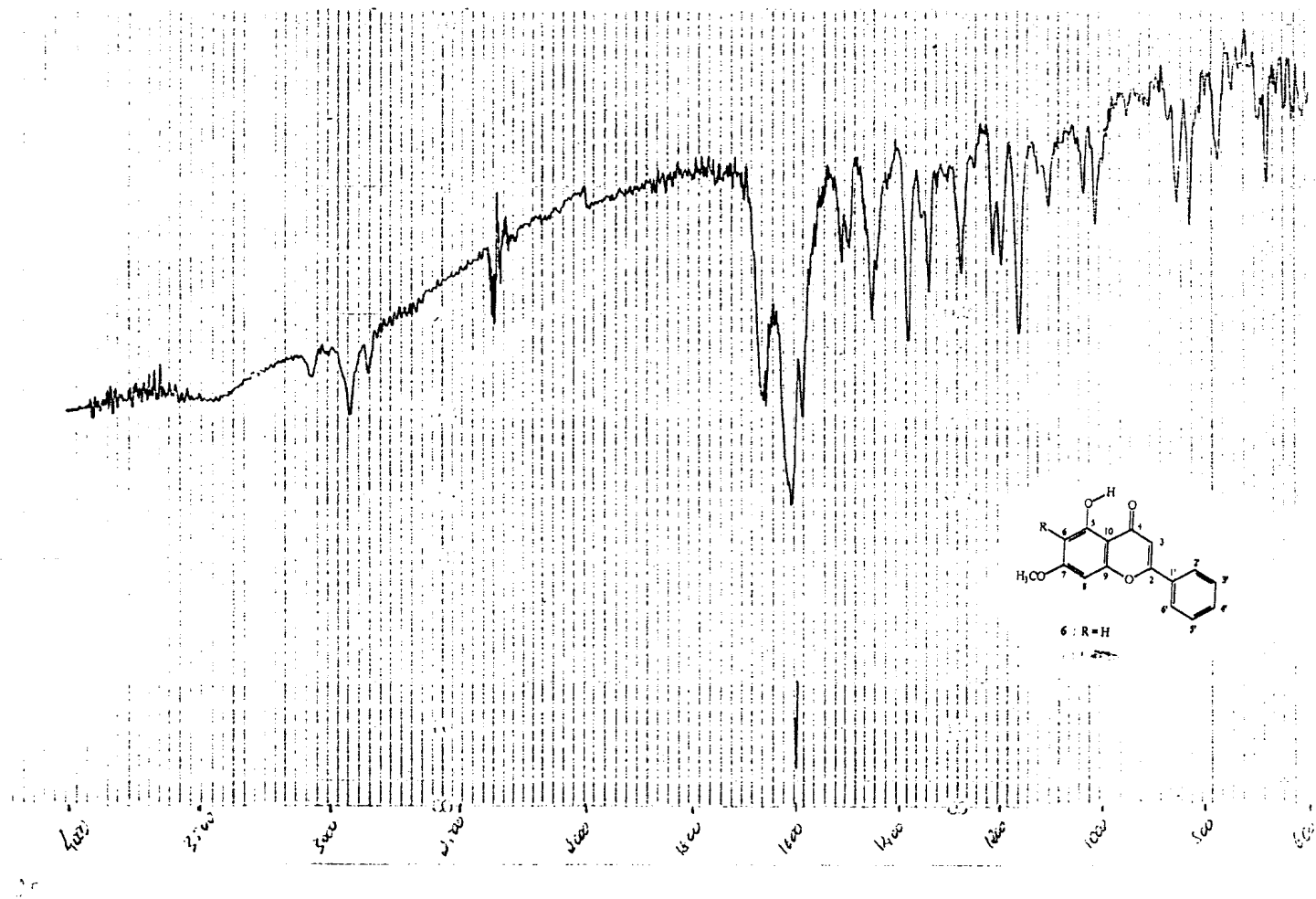


Figura 6.1 - Espectro de infravermelho da substância VI.



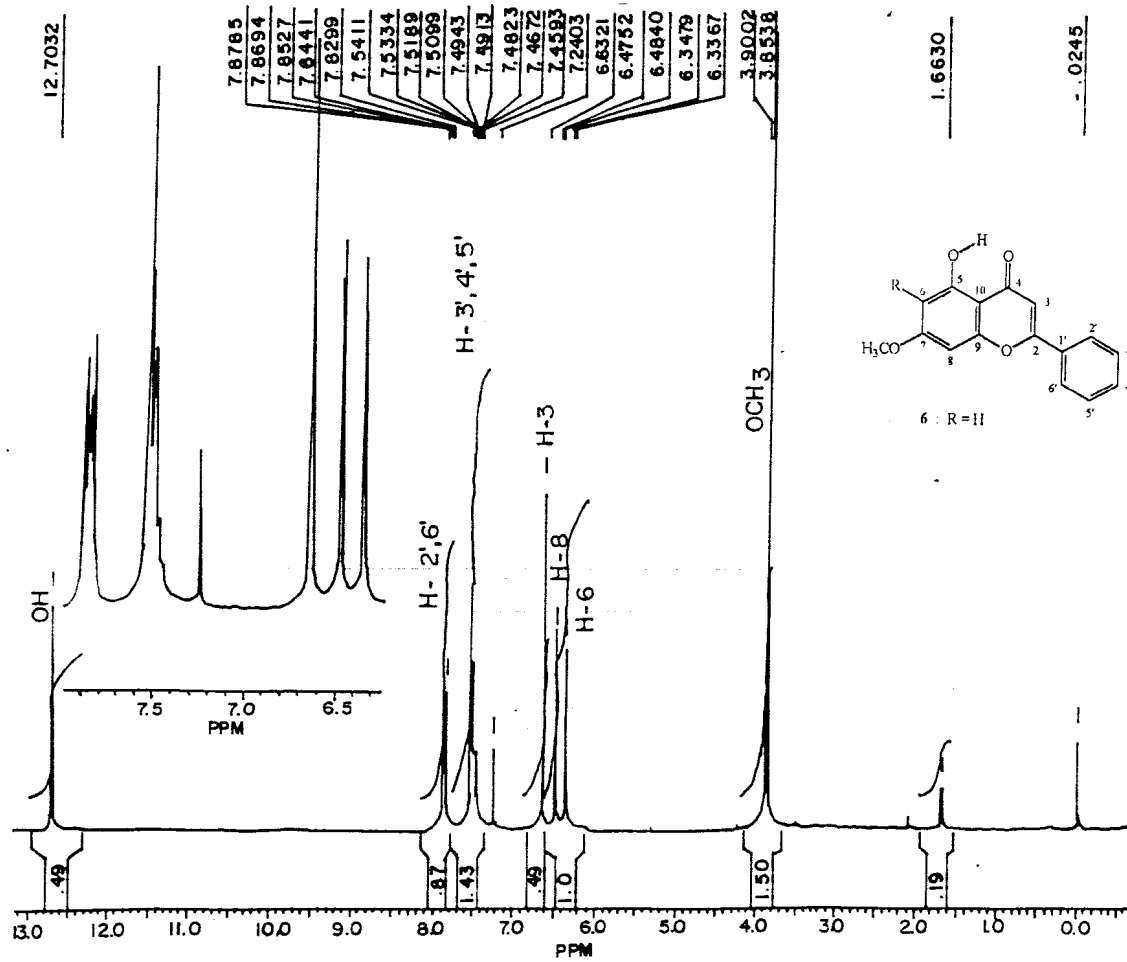


Figura 6.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

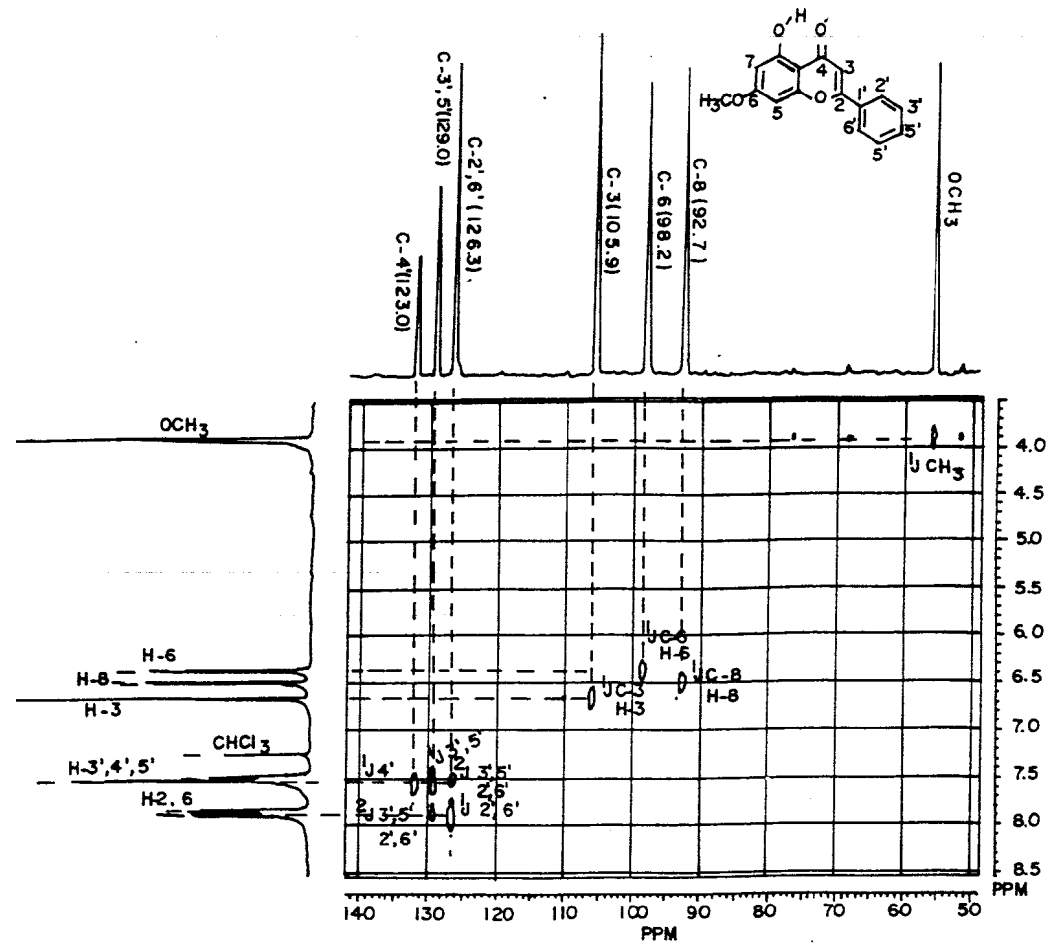


Figura 6.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$ )] da substância VI em  $\text{CDCl}_3$ .

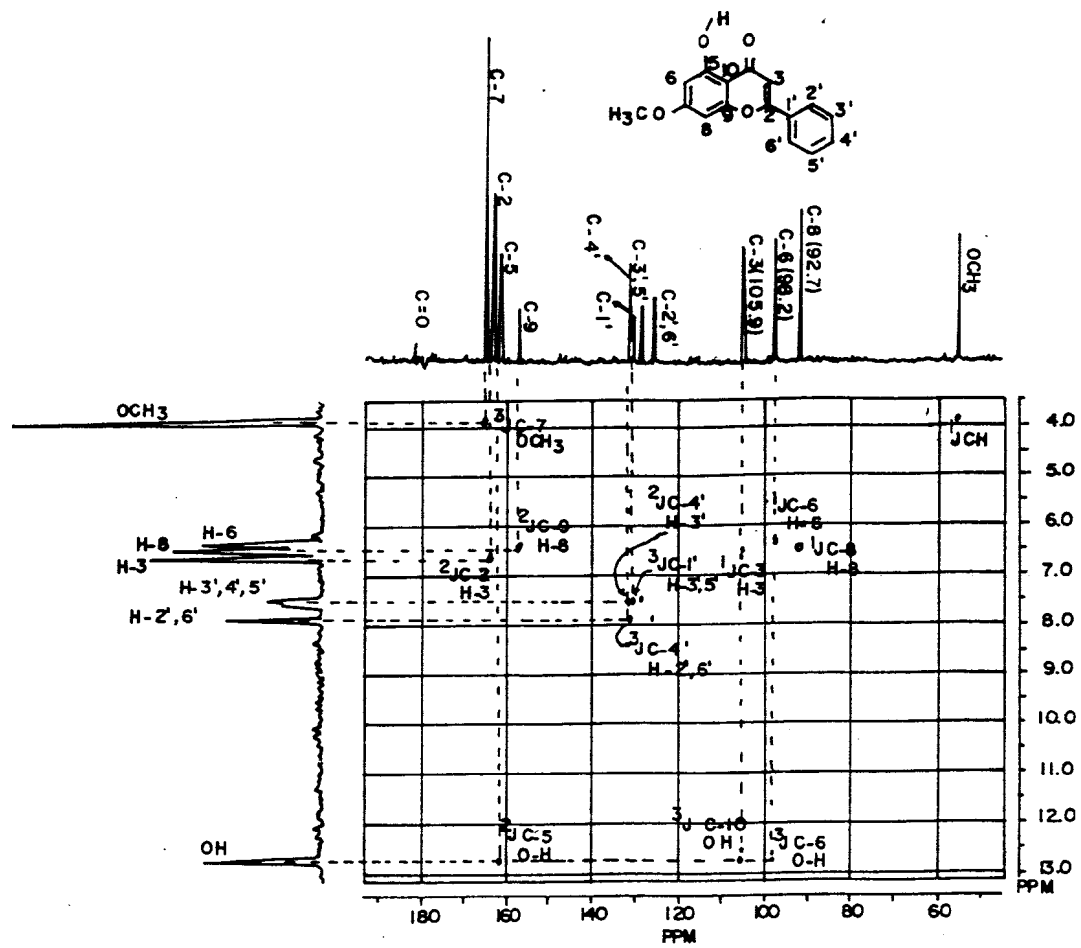


Figura 6.6 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $n = 1,2,3$ )] da substância VI em  $\text{CDCl}_3$ .

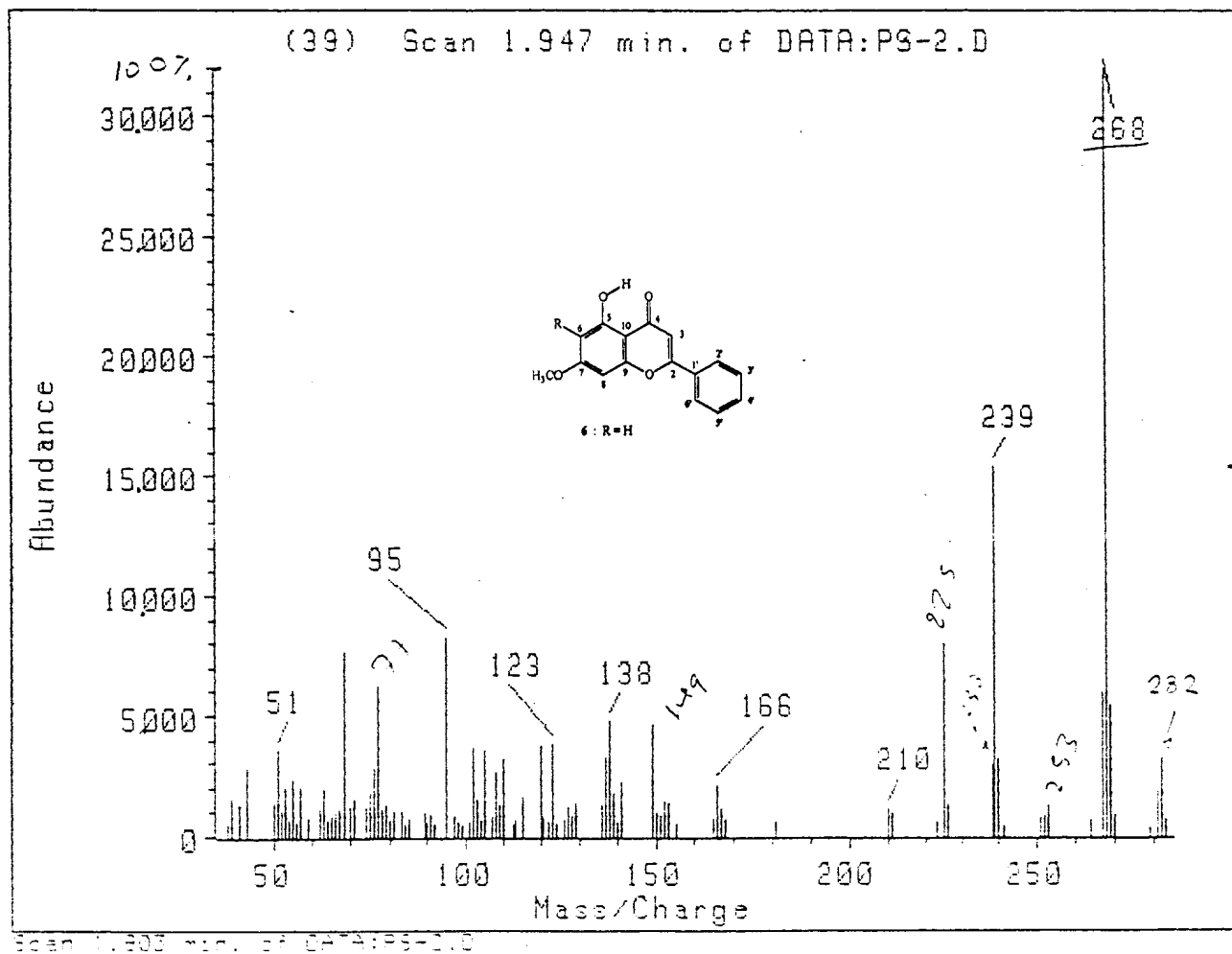


Figura 6.7 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da substância VI.

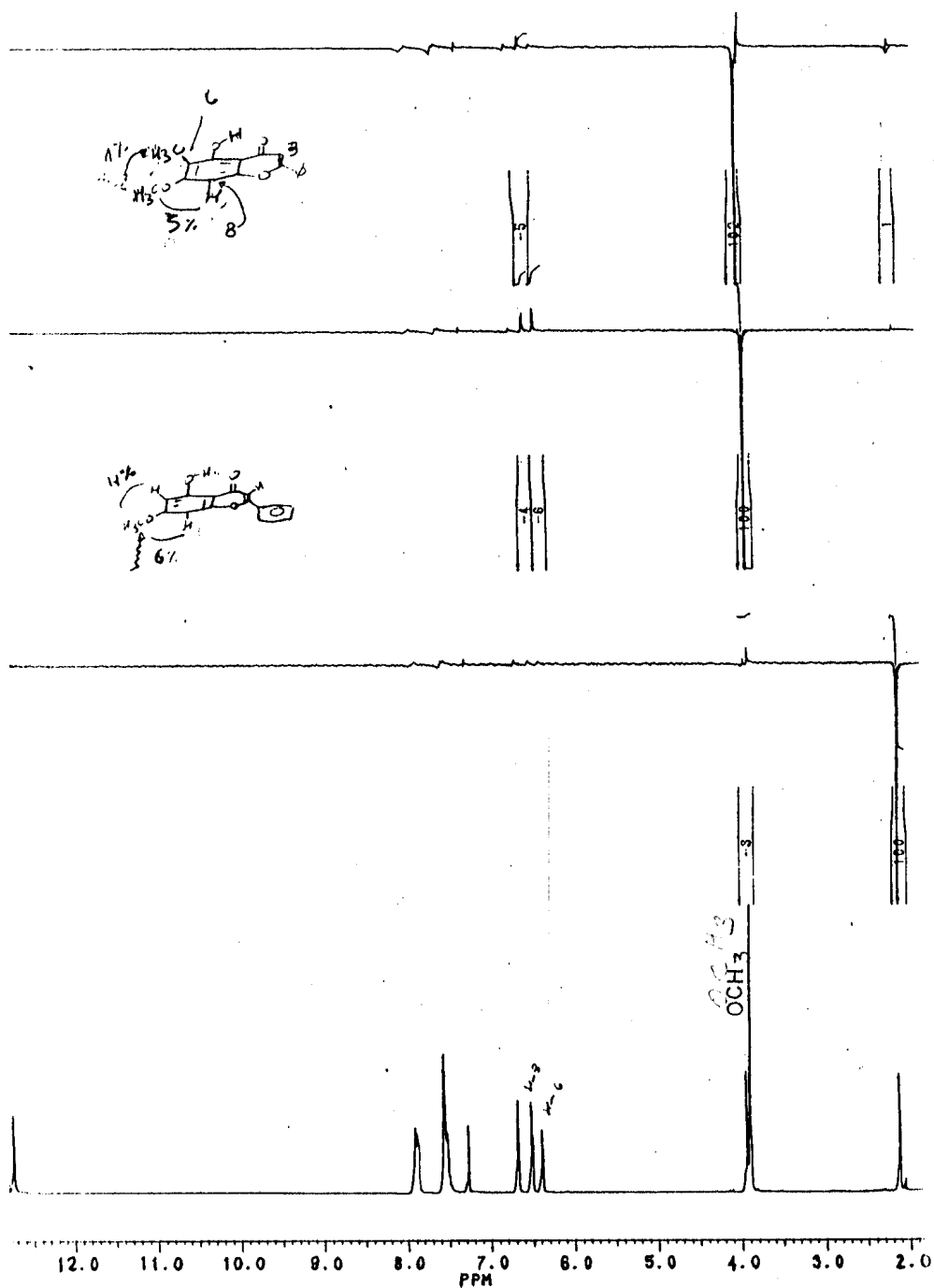


Figura 6.8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros das substâncias VI e VII.

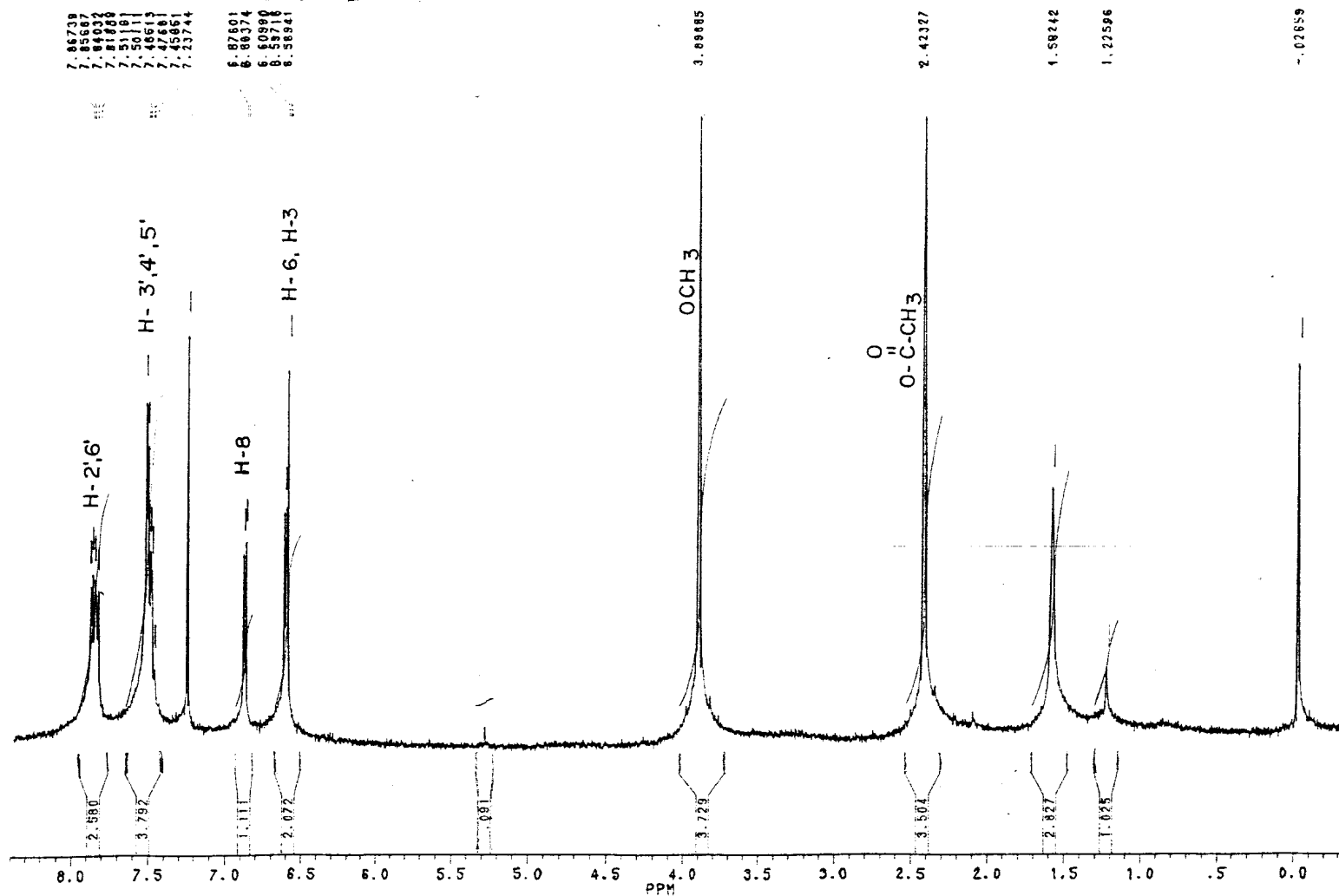


Figura 6Ac.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do derivado acetilado da substância VI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

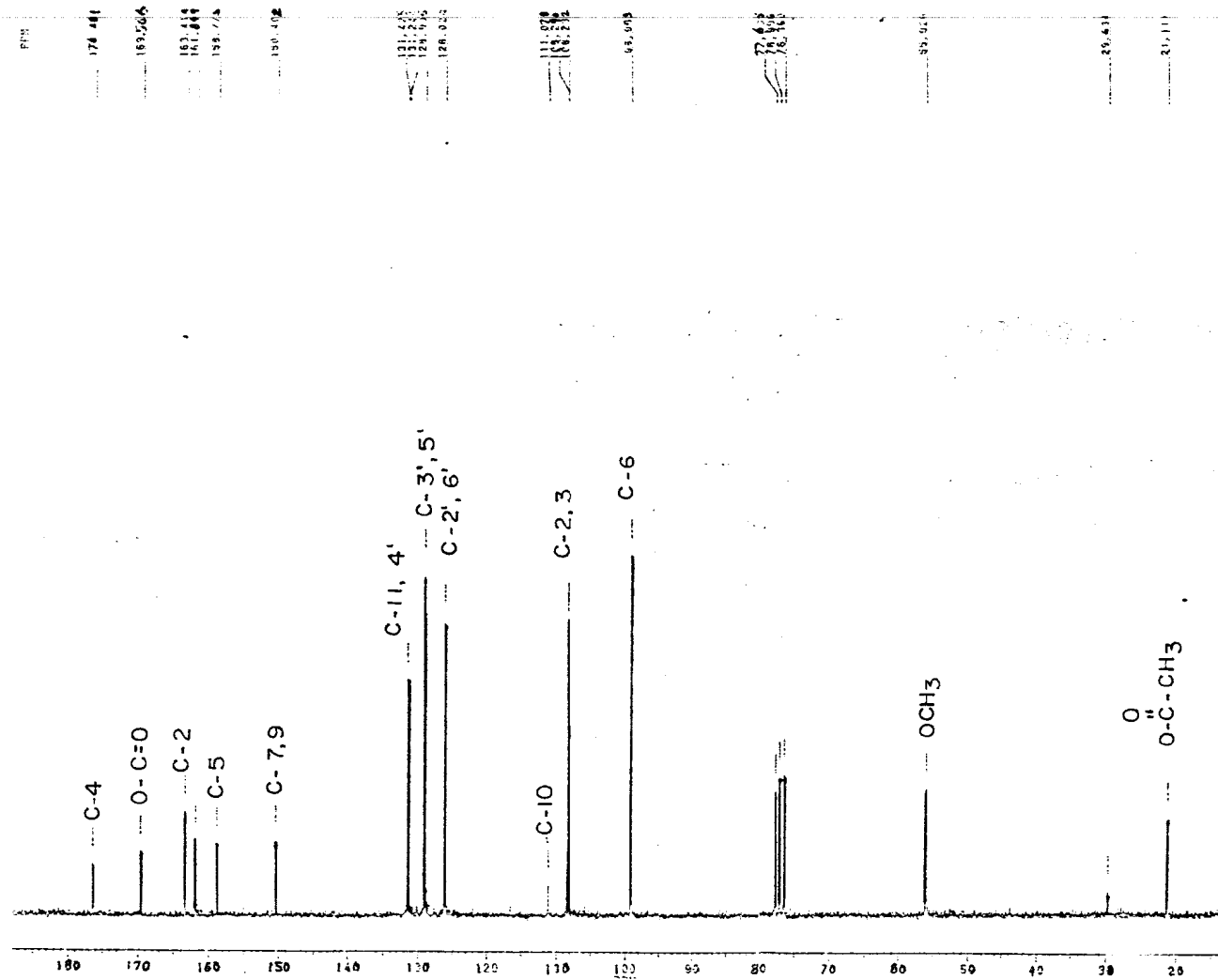


Figura 6Ac.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado do derivado acetilado da substância VI em  $\text{CDCl}_3$

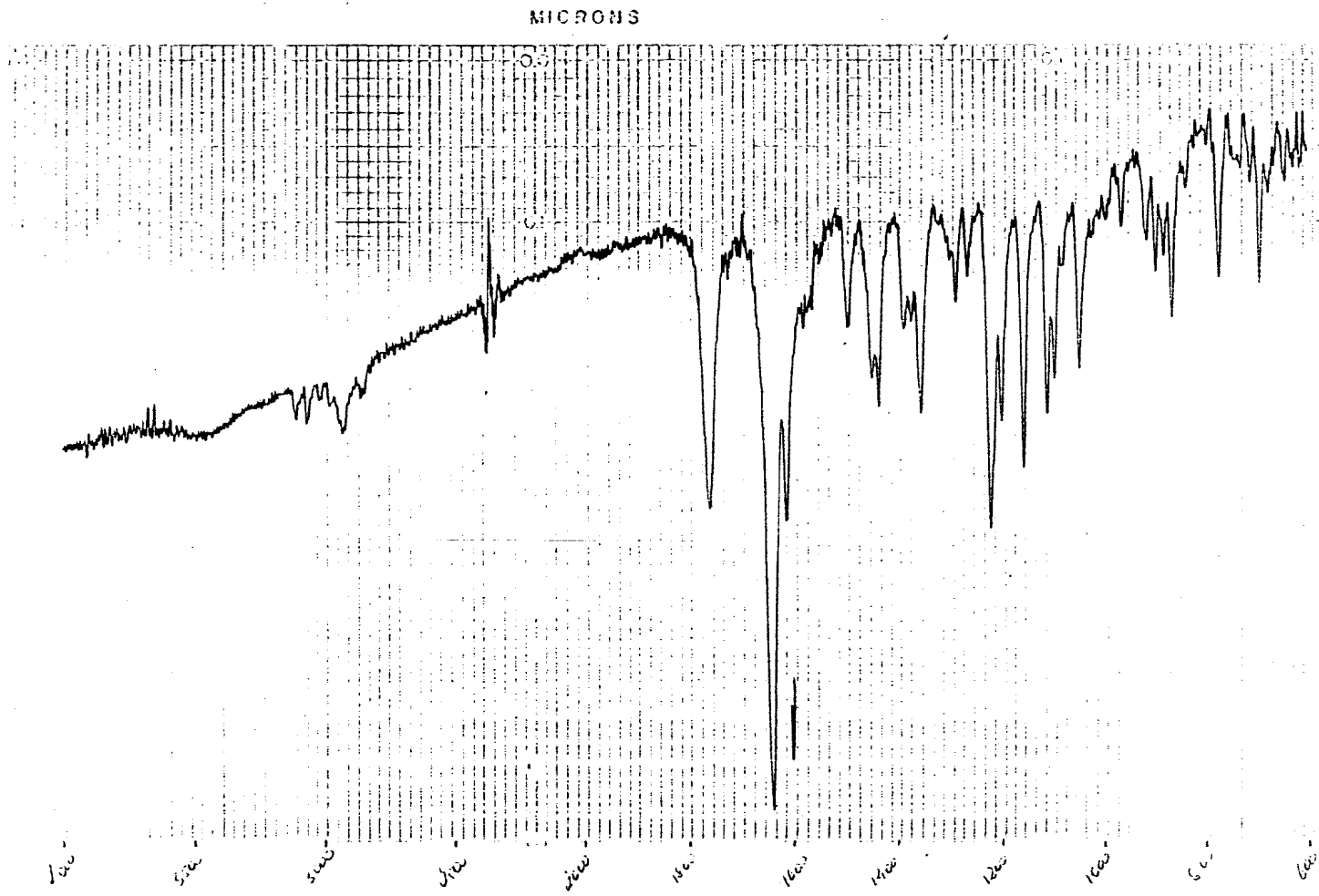


Figura 6Ac.3 - Espectro de infravermelho do derivado acetilado da substância VI em pastilha de KBr.



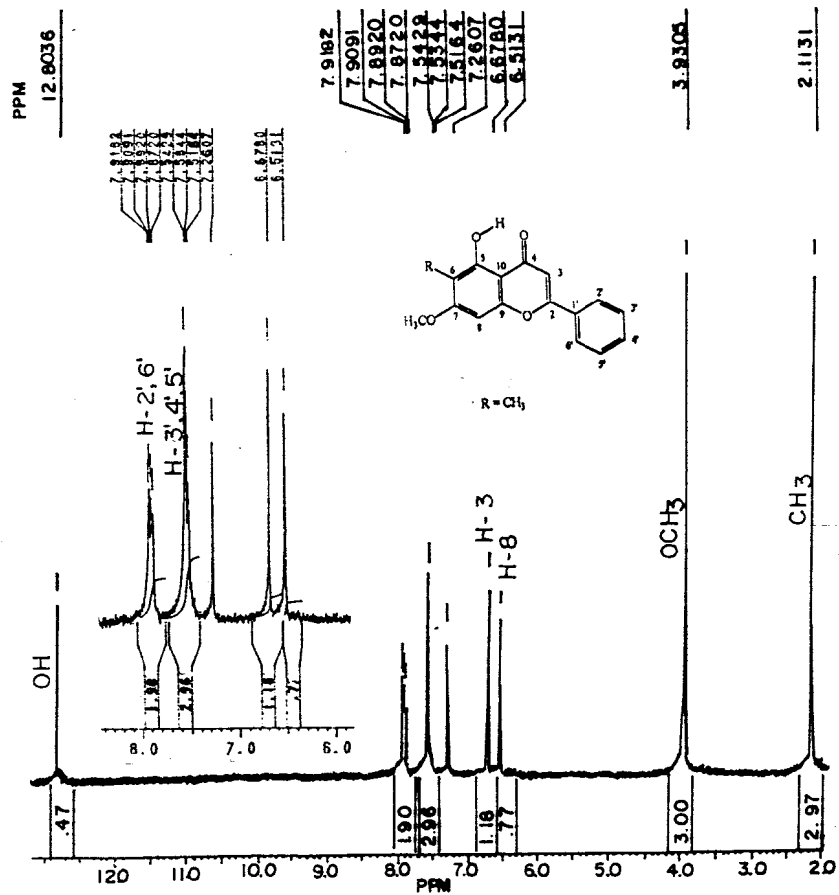


Figura 7.1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da substância VII em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

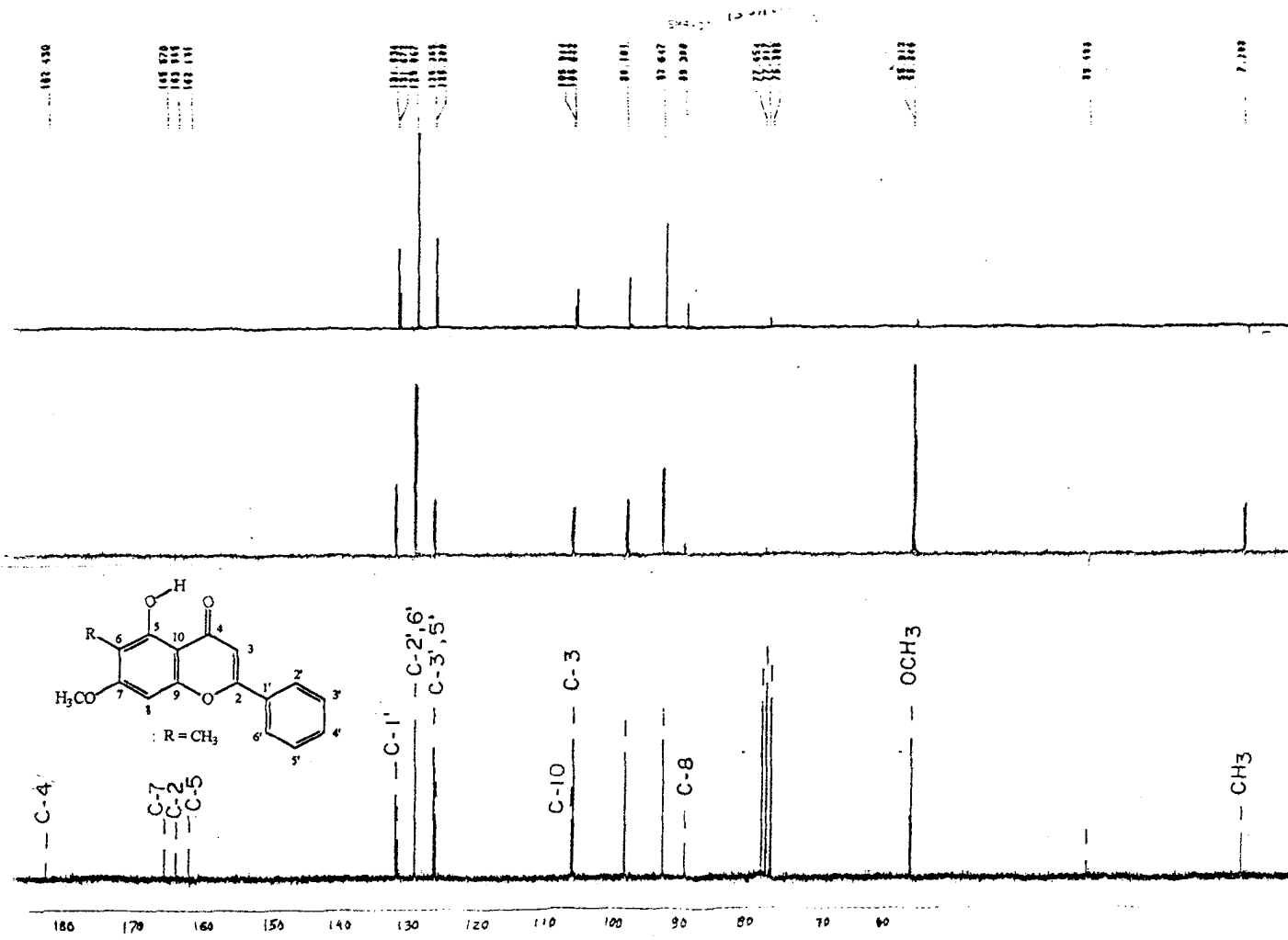


Figura 7.2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) de substância VII em  $\text{CDCl}_3$ .

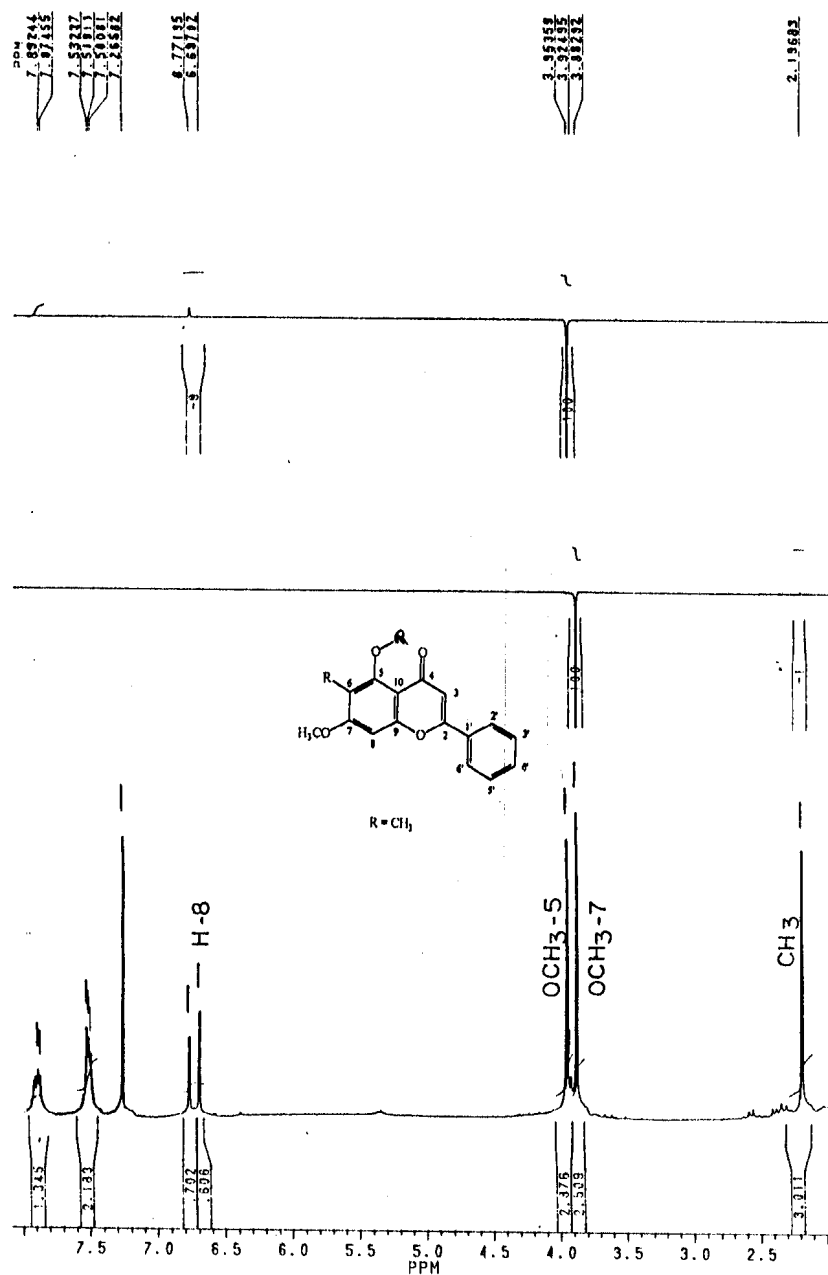


Figura 7Me.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros do derivado metilado da substância VII.

### 3.5 Determinação estrutural das substâncias VIII e IX

As frações que contêm estas substâncias possuem espectros no infravermelho (Figura IX-1) cujas bandas de absorção são interpretadas na Tabela abaixo:

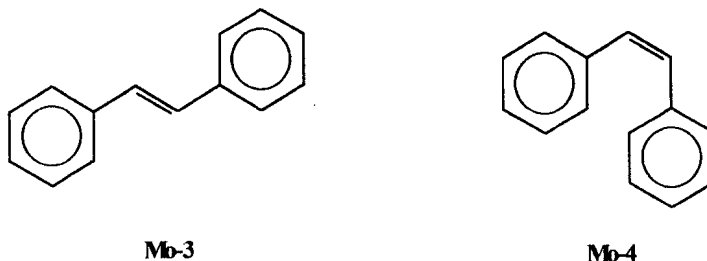
**Tabela 13** : Interpretação das bandas de absorção do espectro no infravermelho da mistura de VIII e IX

$\nu_{\max}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuições
3050 (F)	$\nu (=CH)$
2920 e 2840 (F)	$\nu (CH)$
1620 (F)	$\nu (C=C)$
1600 e 1450 (F)	$\nu (C=C)$
1210 e 1160	$\nu_{\text{as}} (=C-O-C)$
1070	$\nu_{\text{sim}} (=C-O-C)$
970	$\nu_{\text{CH}} (C=C, \text{ trans}, 1H \text{ isolado})$
750 e 700	$\nu_{\text{CH}} (5H, \text{ vizinhos})$

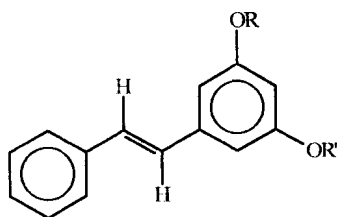
Os espectros de RMN  $^1H$  (1D e 2D, Figura 8.1 e 8.2) forneceram sinais compatíveis com uma mistura de estilbenos tendo como componente principal o estilbeno ( $\Delta^{7,8}$ ). A intensidade do sinal simples em 3,82  $\delta$  é compatível com o sistema *m*-dimetoxi (Tabela 14, Figura 8.1).

A comparação dos dados no I.V. e de RMN  $^1H$  (Figura 8.1 e 8.2, Tabela 14) da substância VIII com os dados de modelos da literatura (Mo-3 e Mo-4) [35] permitiu

identificar o trans estilbeno. A Tabela 14 mostra as atribuições de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 8.1) e compara com os valores citados nos modelos da literatura (Mo-3 e Mo-4).



Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância VIII (Figura 8.3) são compatíveis com a proposta do 3,5-dimetoxiestilbeno (8) (Tabela 14).



**VIII** - R = R' = CH<sub>3</sub>

**IX** - R = R' = CH<sub>3</sub>, 7,8 diidro

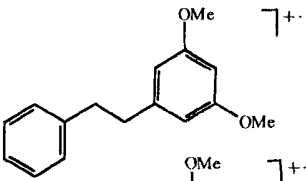
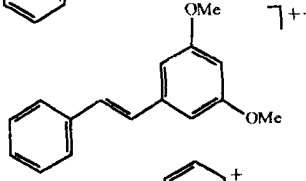
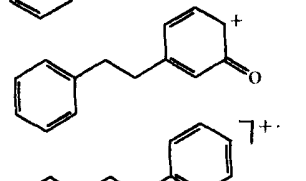
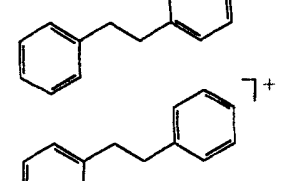
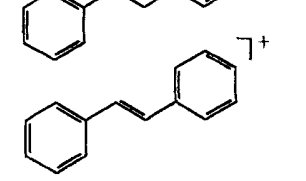
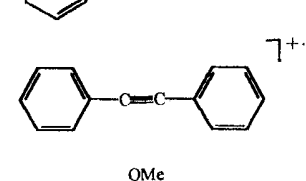
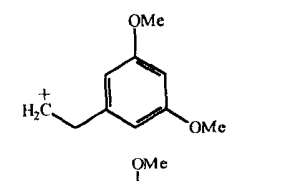
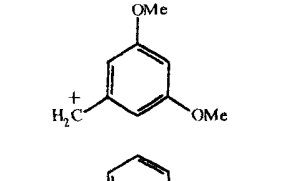
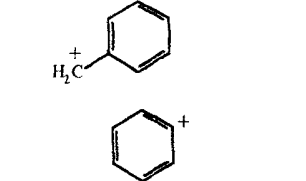
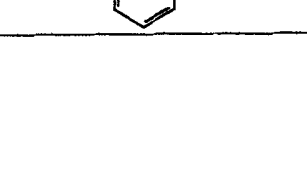

Os sinais menos intensos, 2,87  $\delta$  (m), 3,62 (s) e 3,63  $\delta$  (s) presentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e o valor de  $M^+$  242 presente no espectro de massas (Figura 9.3) são compatíveis com o diidroestilbeno (9) para a substância IX que se encontra na mistura. O valor  $M^+$  240 (100 %) corresponde a substância VIII, que está em maior porcentagem na mistura. A Tabela 15 mostra os íons fragmentários correspondentes aos picos  $m/z$  revelados no espectro de massas da mistura (9.3).

O uso de experiência com irradiação dupla e diferença de espectros (Figura 9.2) permitiu confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos dos prótons das substâncias VIII e IX. A Tabela 16 mostra os efeitos N.O.E. observados nas experiências citadas acima.

**Tabela 14** : Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, P.N.D. e DEPT,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de VIII comparados com modelos da literatura [35]

C	8		Mo-3[42]	Mo-4
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$		
1	136,7	-	-	-
2	104,6	6,63 (d, 2,4 Hz)	6,67 (d)	6,38 (m)
3	161,0	-	-	-
4	100,9	6,39 (t, 2,4 Hz)	6,41 (t)	6,38 (m)
5	161,0	-	-	-
6	104,6	6,63 (t, 2,4 Hz)	6,67 (d)	6,38 (m)
7	127,9	7,01 (d, 17 Hz)	7,04 (s)	5,57
8	125,7	7,08 (d, 17 Hz)	-	-
1'	139,5	-	-	-
2',6'	129,2	7,50 (dd, 8,0 e 1,2 Hz)	-	-
3',5'	128,4	7,40-7,20 (m)	7,35 (m)	7,23 (s)
4'	128,2	7,40-7,20 (m)	-	-
$\text{OCH}_3$	55,1	3,80 (s)	3,78 (s)	3,62 (s)

**Tabela 15** : Fragmentos correspondentes aos picos mais intensos registrados no espectro de massas obtido por impacto de elétrons da mistura de VIII e IX.

8		Fragmentos	9	
m/z	%		m/z	%
242 (M <sup>++</sup> )	30		—	—
—	—		240 (M <sup>+</sup> )	100
197	5		—	—
182	6		—	—
181	10		—	—
—	—		179	10
—	—		178	10
165	45		—	—
151	55		—	—
—	—		91	35
77	16		77	16

**Tabela 16** : Resultados das análises dos espectros obtidos com irradiação dupla e subtração de espectros da mistura das substâncias VIII e IX.

Exp	irradiado		NOE		%
	H	$\delta$ H	H	( $\delta$ H)	
1	2' e 6'	7,50	3'e 5'	7,3	(3)
			7	7,05	(11)
2	7,8	7,05	2'e 6'	7,50	(18)
			2,6	6,63	(20)
3	2,6	6,63	7	7,05	(17)
			OCH <sub>3</sub>	3,8	(8)
4	OCH <sub>3</sub>	3,80	H-2,6	6,63	(8)
			H-4	6,39	(7)
5,6	4	6,39	OCH <sub>3</sub>	3,80	(15)
					(4)
7	OCH <sub>3</sub>	3,60	H-4	6,39	(3)
				3,85	(5)
8	CH <sub>2</sub>	2,80	H-6'2'	6,24	(7)
			H-2,6	6,39	(5)



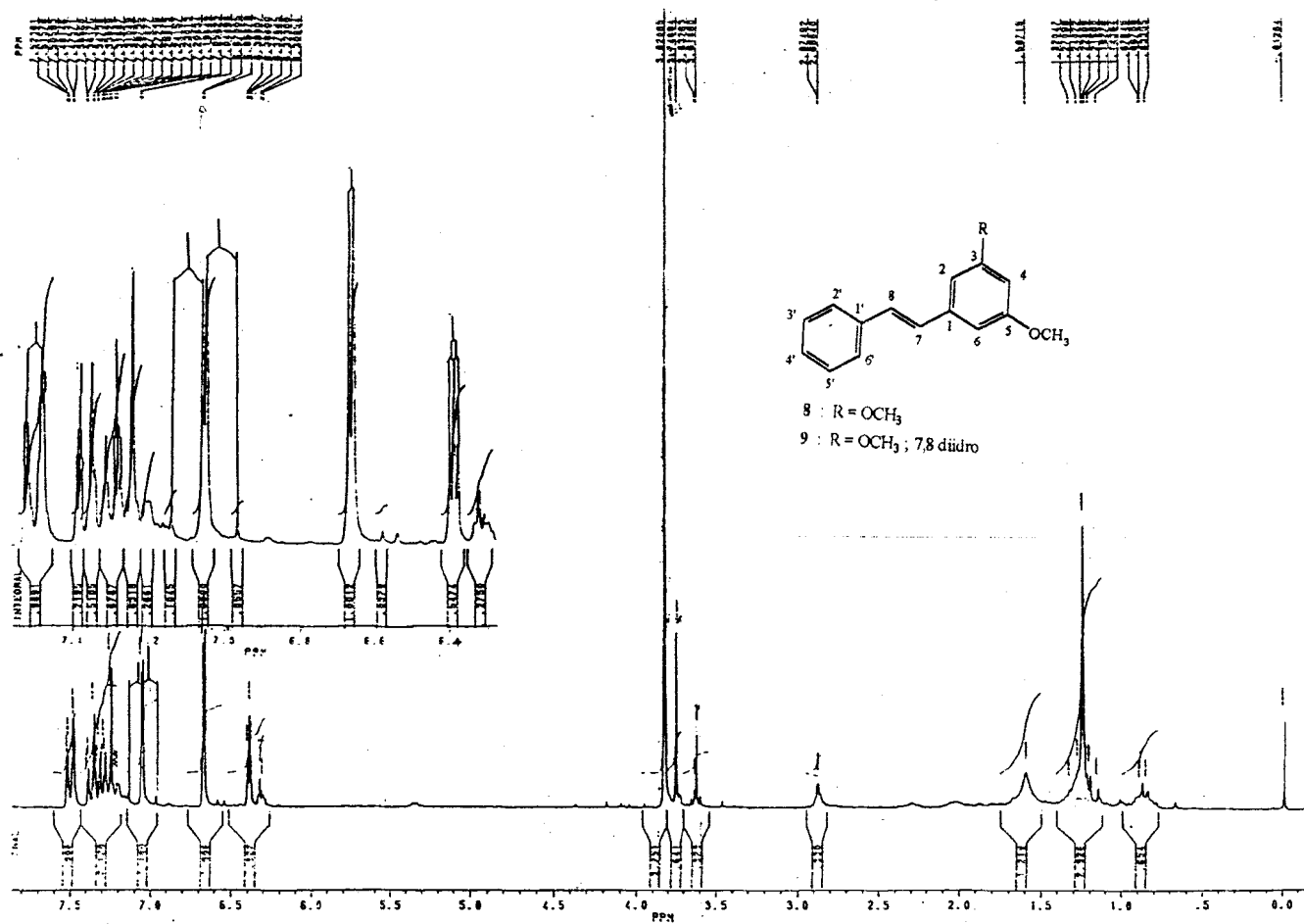


Figura 8.1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da mistura das substâncias VIII e IX em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

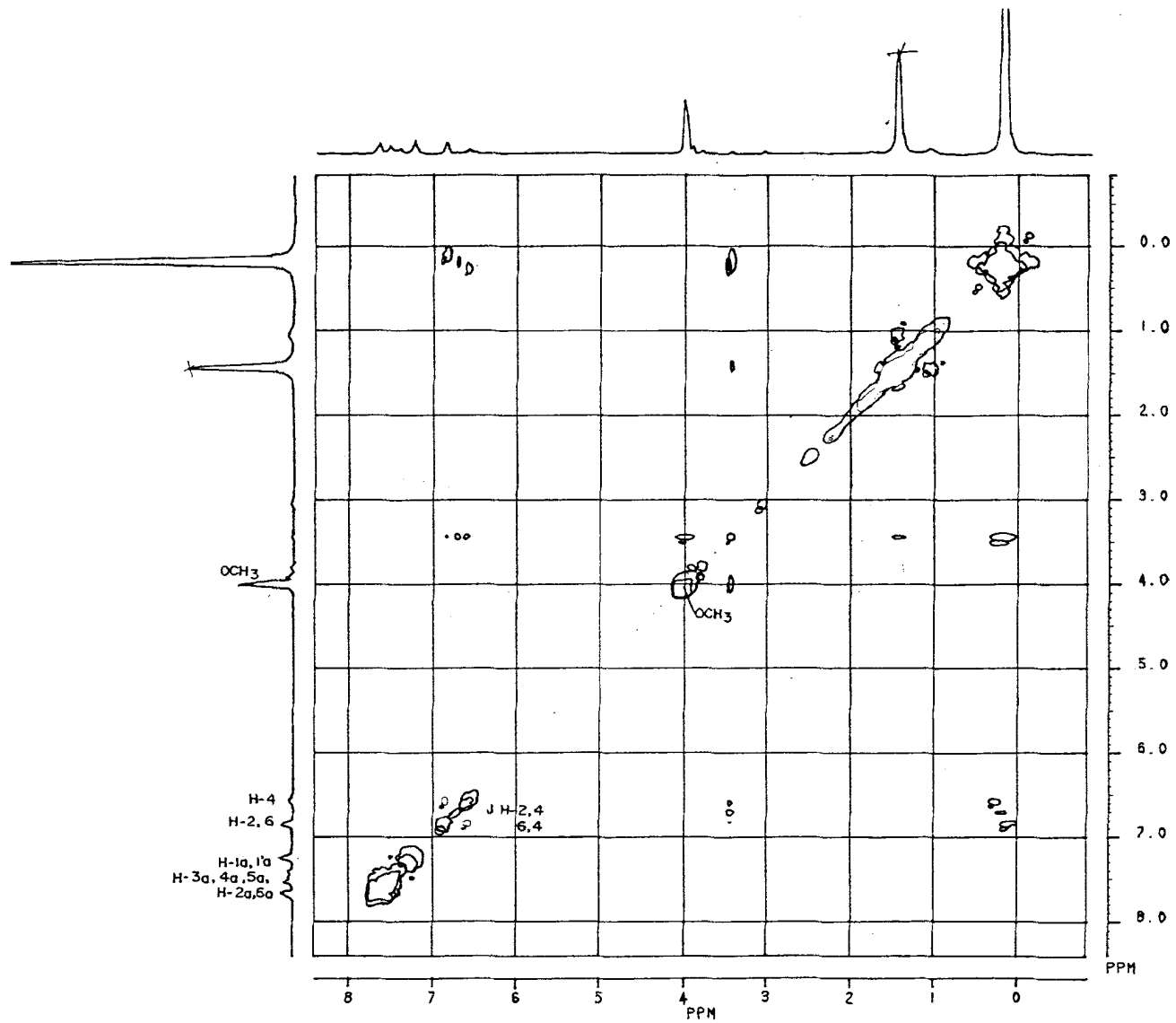


Figura 8.2 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H 2D (<sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H - COSY) da mistura das substâncias VIII e IX

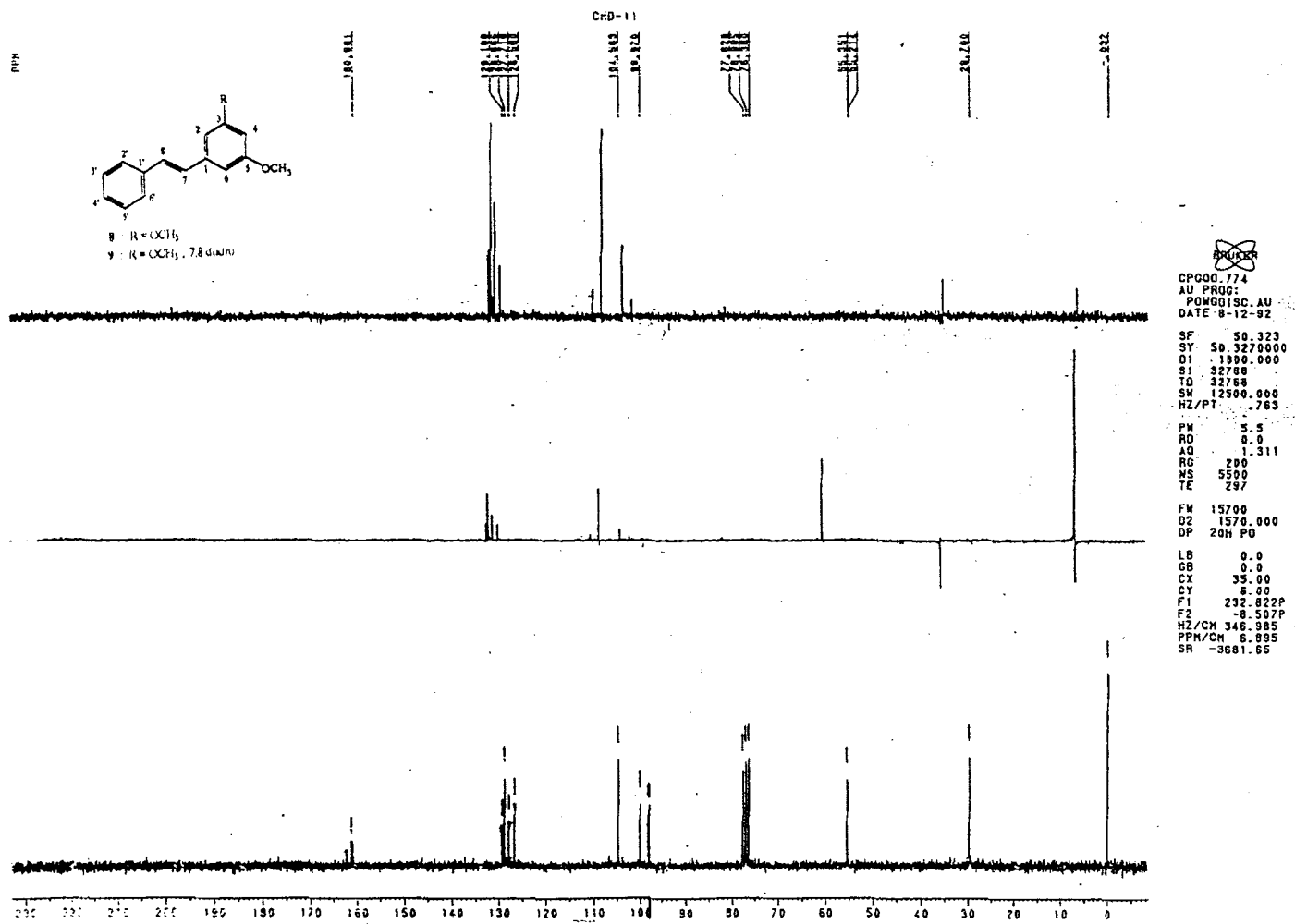


Figura 8.3 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT (θ = 90° e 135°) da mistura das substâncias VIII e IX.

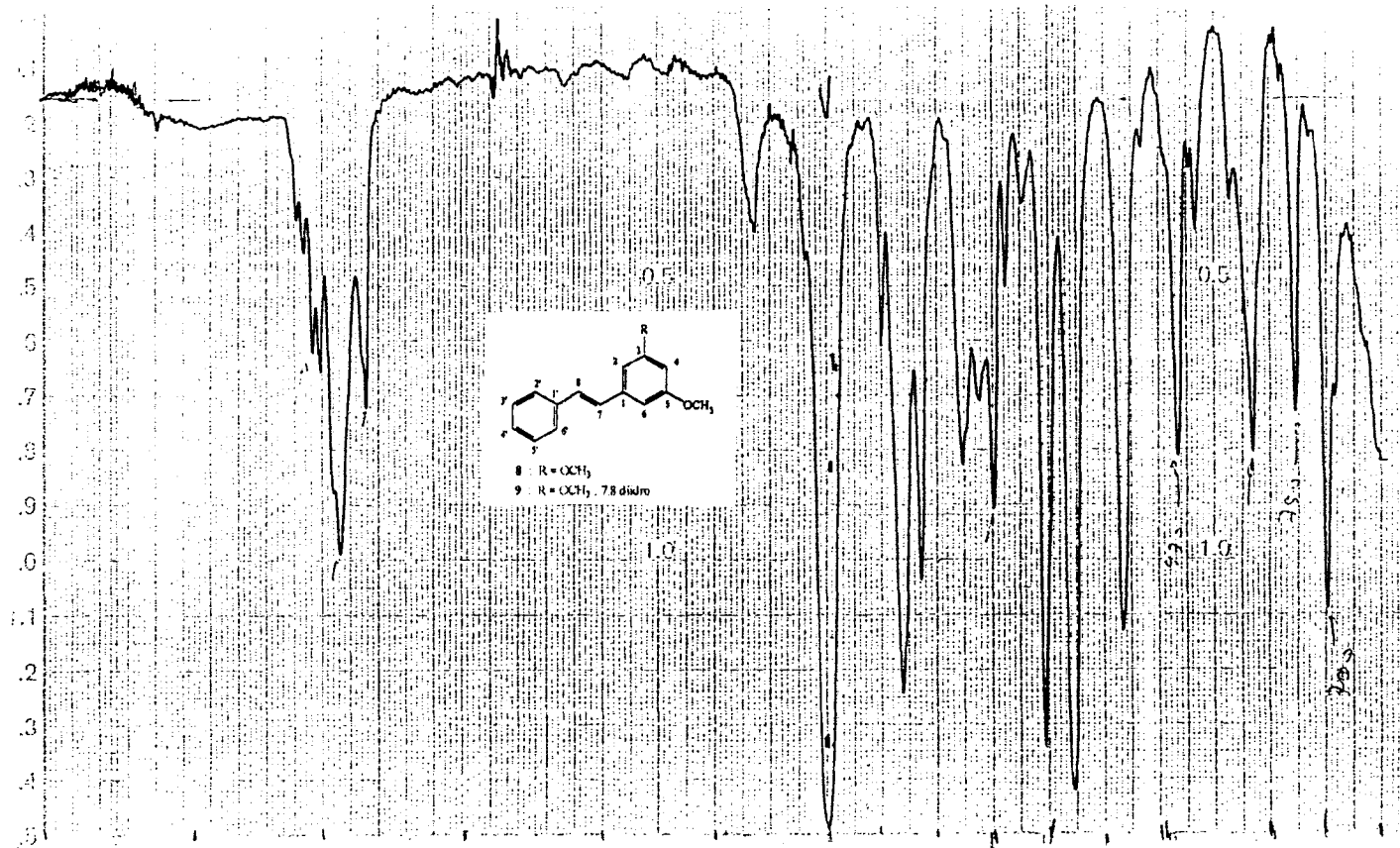


Figura 9.1 - Espectro de infravermelho da mistura das substâncias VIII e IX em filme (NaCl).

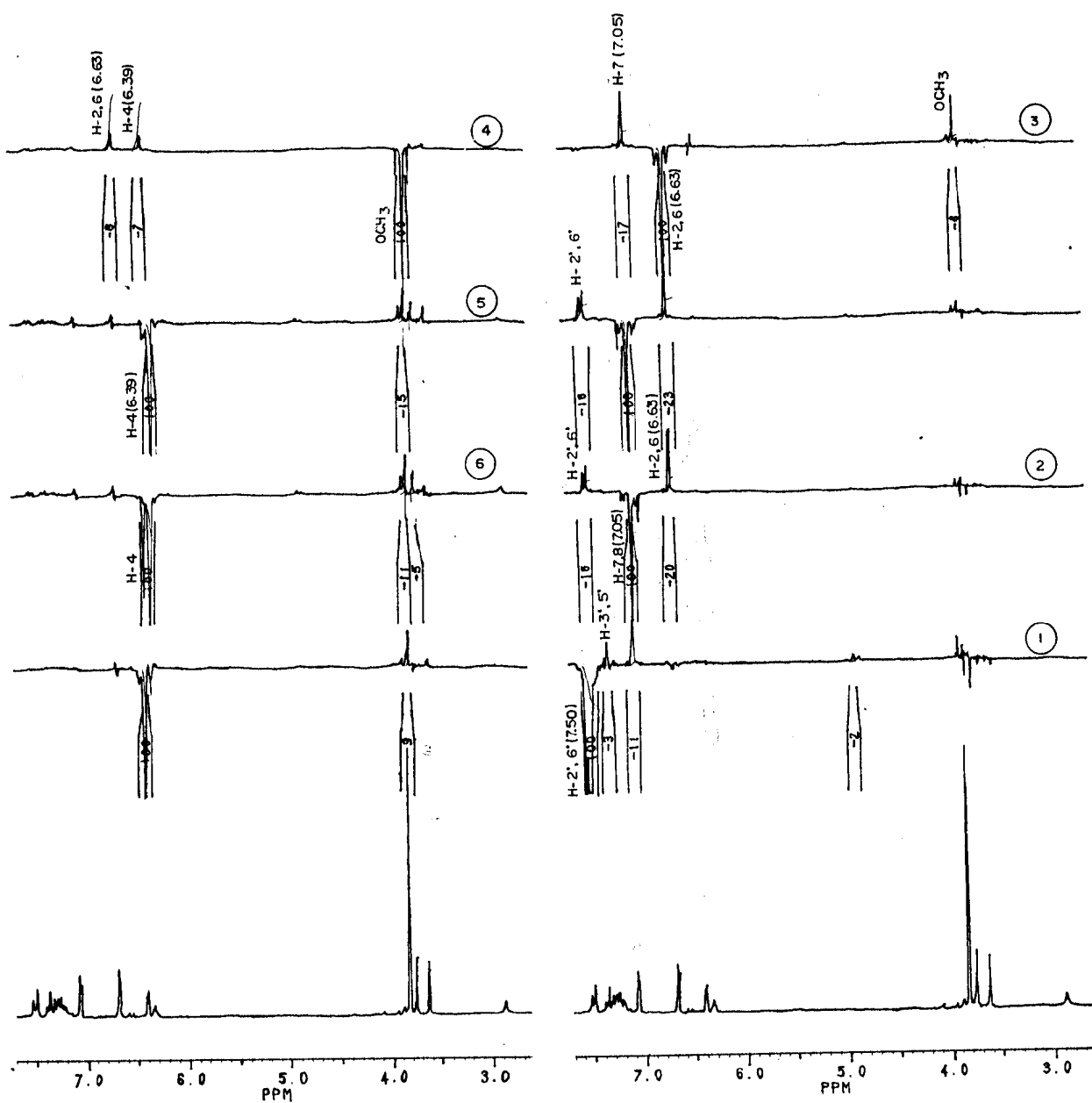


Figura 9.2 (a) - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da mistura da substâncias VIII e IX.

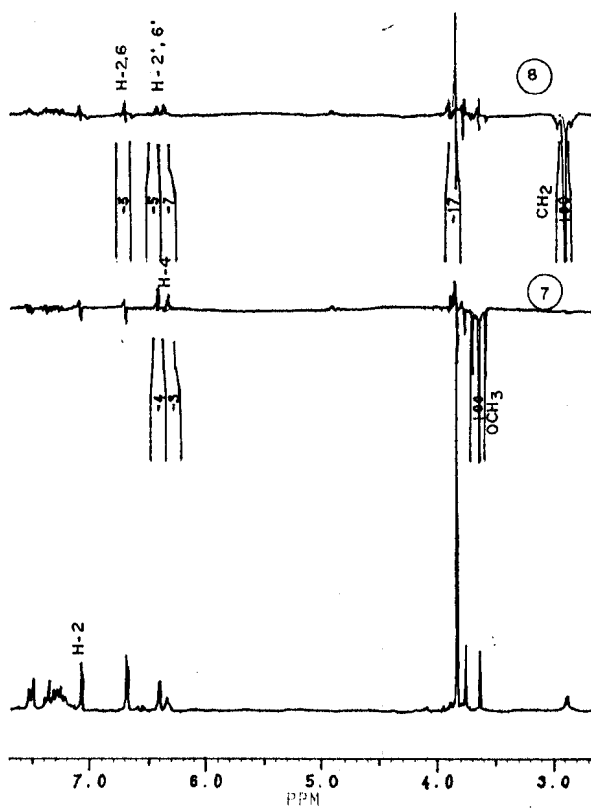


Figura 9.2 (b) - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da mistura das substâncias VIII e IX.

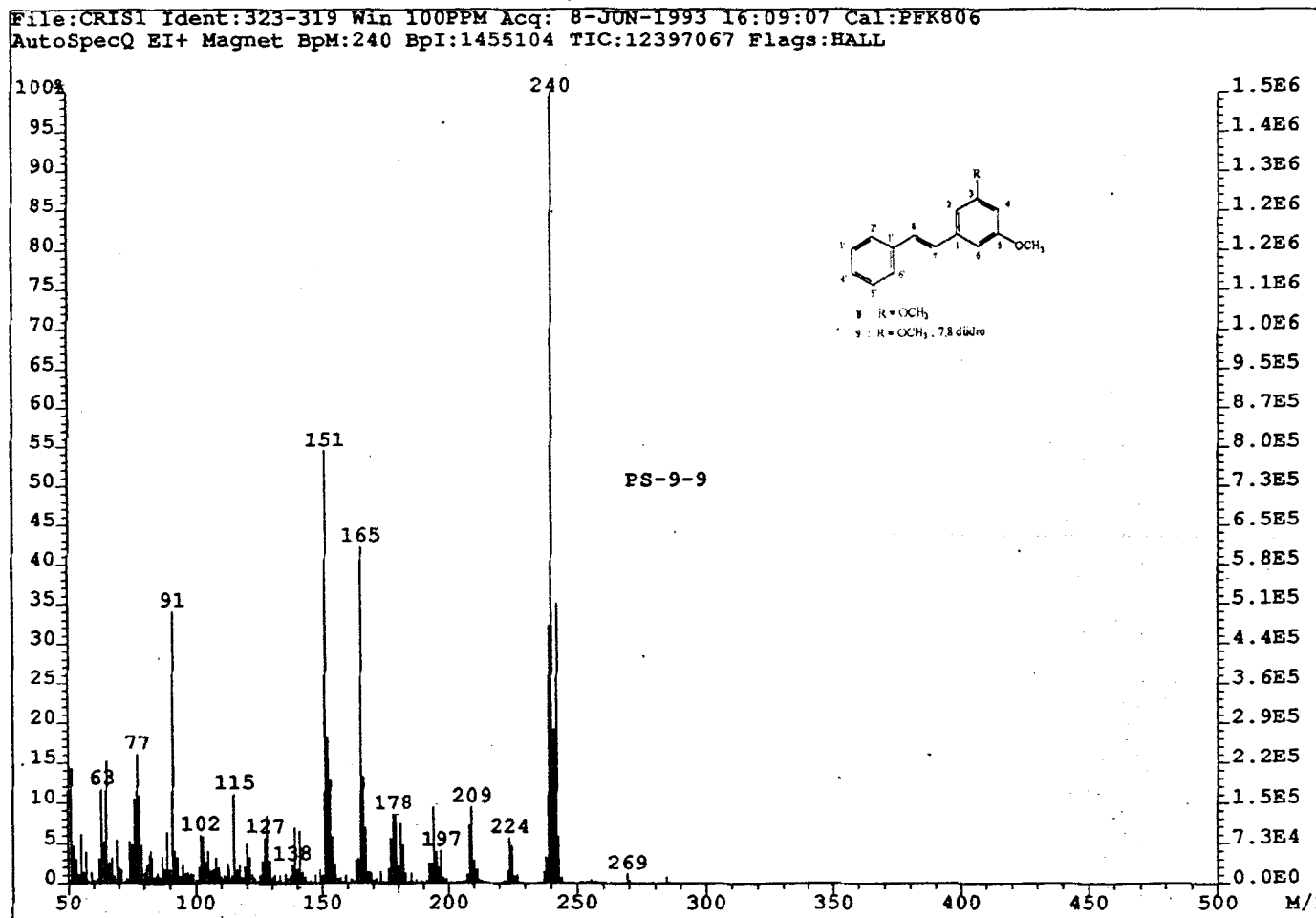


Figura 9.3 - Espectro de massas obtido por impacto de elétrons da mistura das substâncias VIII e IX.

### 3.6. Determinação estrutural das substâncias X e XI

A água mãe das frações reunidas de 90 a 186 apresentou material oleoso, cuja análise do espectro de infravermelho (Figura 10.1) possui banda de absorção interpretada na Tabela abaixo.

Tabela 17 : Interpretação das bandas de absorção do espectro de infravermelho da mistura de X e XI

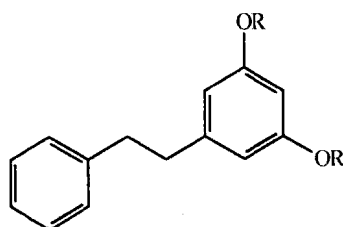
$\nu_{\max}^{\text{filme}} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Atribuições
3450	$\nu \text{ O H}$
3050	$\nu = \text{CH}$
2900 e 2860	$\nu \text{ C H}$
1600	$\nu \text{ C}=\text{C}$ (alceno)
1600, 1500 e 1450	$\nu \text{ C}=\text{C}$ (aromático)
1160	$\nu \text{ C-O}$ (fenol)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  possui um sinal múltiplo em 2,82  $\delta$  correspondente a frequência de prótons benzílicos, um singleto em 3,73  $\delta$  referente a grupo metoxila e os sinais de próton aromáticos em 6,24  $\delta$  (sl) e multiplete em 7,17-7,23  $\delta$ . As demais absorções de menor intensidade no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (1D, Figura 10.2) e os sinais de interação homonuclear presentes no espectro 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY, Figura 10.3) revelou a presença de mistura na fração analisada. Entre os sinais citados acima, só apresentam acoplamento os prótons aromáticos menos protegidos.

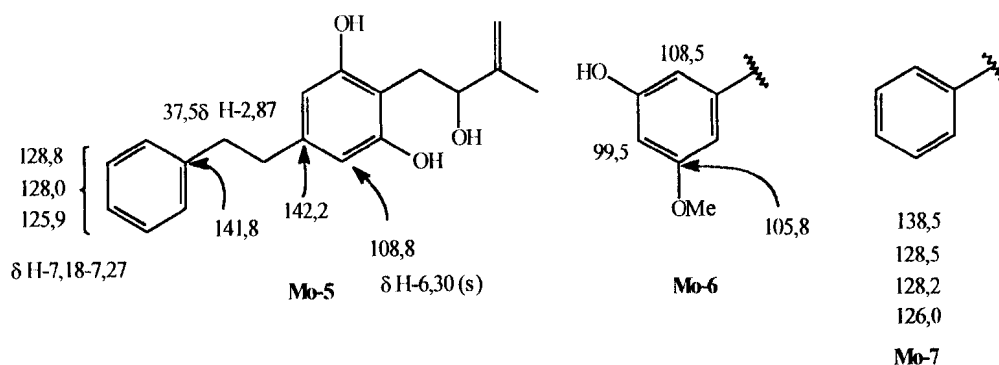


Os sinais de absorção dos prótons do componente em menor quantidade revelou interação entre os prótons aromáticos mais protegidos (6,37 $\delta$  com 6,63 $\delta$  e entre os prótons aromáticos menos protegidos (7,24  $\delta$  com 7,47  $\delta$ . O sinal em 7,01 (d) e 3,80 correspondem, respectivamente, à frequência de prótons olefínicos e metoxilícos (Figura 10.2, Tabela 18).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND e DEPT, Figura 10.4) confirmou a presença das substâncias X e XI na mistura como proposto acima. Os sinais mais intensos de  $\text{CH}_2$  (37,4  $\delta$  e 37,7  $\delta$  e  $\text{CH}$  (99,0  $\delta$  106,5  $\delta$  108,0  $\delta$  126,3  $\delta$  e 128,4  $\delta$  permitiram caracterizar as substâncias da mistura como sendo da classe dos estilbenos que possuem um anel dissubstituído (11 a).

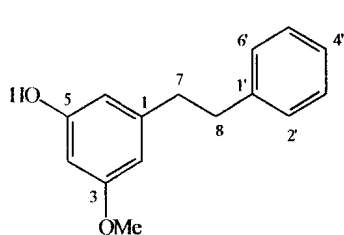


11-a

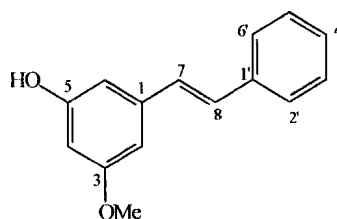


A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com modelo citado na literatura (Mo-5, Mo-6, Mo-7) [32,33,34,35,36] permitiu identificar os deslocamentos dos carbonos

quaternários e propor a estrutura de dois derivados da, pinossilvina como sendo o 3-metoxi-5-hidroxi-7,8-dihidroestilbeno (11). A Tabela 18 mostra as atribuições das frequências de absorção de próton e carbono destes componentes que foram interpretadas com o auxílio dos espectros bidimensionais 2D ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY,  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^n\text{J}_{\text{CH}}$   $n = 2$  e 3) (Figura 10.5 e Figura 10.6). as interações a duas ligações ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ ) garantem as atribuições feitas para o C-1 (H-7), C-4 (H-2 e H-6), C-5 (H-6) e C-1' (H-8, H-2' e H-6') e a três ligações ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) mostra as interações entre C-2 (H-7), C-3 (H-2 e  $\text{OCH}_3$ ), C-7 (H-2 e H-6), C-8 (H-2' e H-6'), C-2' (H-8) e C-6' (H-8). Os sinais e intensidades no espectro são compatíveis com as frequências de XI (Tabela 18).



11



10

**Tabela 18** : Freqüências de absorção dos  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) da mistura das substâncias X e XI.

C	10				11	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $^1\text{J}_{\text{CH}}$ )	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (m, Hz; $^1\text{J}_{\text{CH}}$ )
1	144,5 (C)	-	$\text{H}_7$	-	139,6	-
2	106,6 (CH)	6,2 (sl)	-	H-7	104,8	6,6 (d, J = 2)
3	160,0 (C)	-	-	H-2; OMe	160,7	-
4	99,0 (CH)	6,3 (sl)	$\text{H}_{2,6}$	-	98,0	6,4 (t, J = 2)
5	155,6 (C)	-	$\text{H}_6$	-	160,9	-
6	108,5 (CH)	6,2 (sl)	-	-	104,6	7,1 (t, J = 17)
7	37,9 (CH <sub>2</sub> )	2,8 (m)	-	H-2,6	128,7	7,2 (d, J = 17)
8	37,5 (CH <sub>2</sub> )	2,8 (m)	-	H-2',6'	129,0	-
1'	141,6 (C)	-	$\text{H}_{8,2',6'}$	-	136,9	-
2',6'	128,7 (CH)	7,3 (m)	-	H-8	128,7	7,5 (d, J = 8)
3',5'	128,3 (CH)	7,2 (m)	-	-	128,7	7,3 (m)
4'	125,9 (CH)	7,3 (m)	-	-	126,6	7,3 (m)
OCH <sub>3</sub>	55,3 (CH <sub>3</sub> )	3,7 (s)	-	-	55,3	3,8 (s)
OH	-	5,2 (sl)	-	-	-	5,2 (s)

Para confirmar as estruturas propostas e obter um espectro de RMN  $^1\text{H}$  mais simples (Figura 11.1) a mistura das substâncias X e XI foi submetida a hidrogenação e o produto analisado (Tabela 19) através dos dados de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11.1 e 11.2) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 11.3).

**Tabela 19** : Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  (1D e 2D, 200 MHz), e  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) e do produto de hidrogenação da mistura de X e XI

C	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY
1	144,5	-	-
2	106,7	6,24 (d, 2H)	H-4
3	161,7	-	-
4	99,0	6,31 (d, 2H)	H-2 e H-6
5	156,5	-	-
6	107,9	6,24 (s, 2H)	H-4
7	37,5	2,85 (m, 2H)	H-8
8	37,9	2,85 (m, 2H)	H-7
1'	141,6	-	-
2' e 6'	128,4	7,19 (m, 2H)	H-3' e H-5'
3' e 5'	128,3	7,23 (m, 2H)	H-2', H-6' e H-4'
4'	126,0	7,23 (m, 1H)	H-3' e H-5'
OCH <sub>3</sub>	55,2	3,73 (s, 3H)	-
OH	-	5,0 (sl, 1H)	-

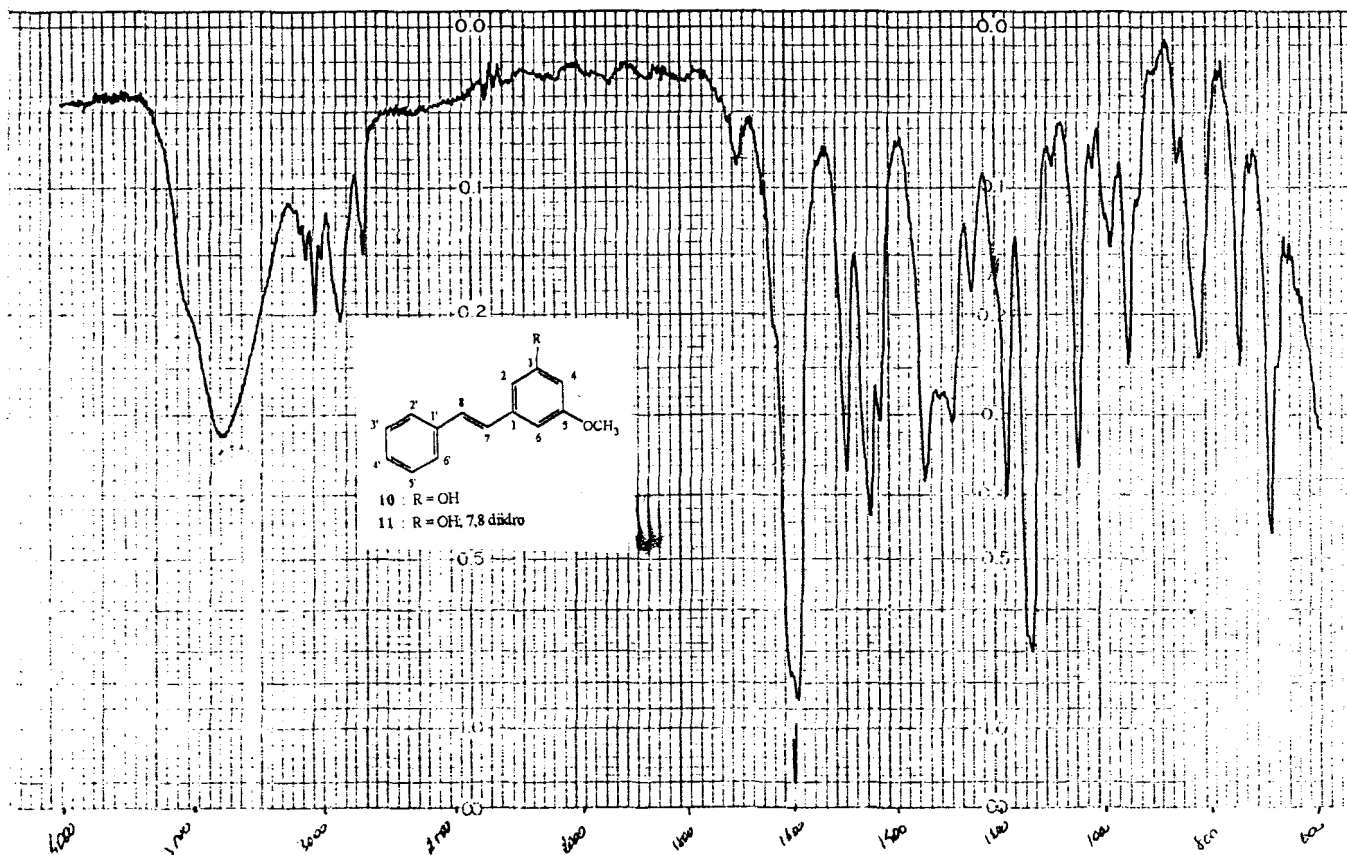


Figura 10.1 - Espectro de infravermelho da mistura de substâncias X e XI em filme (NaCl).

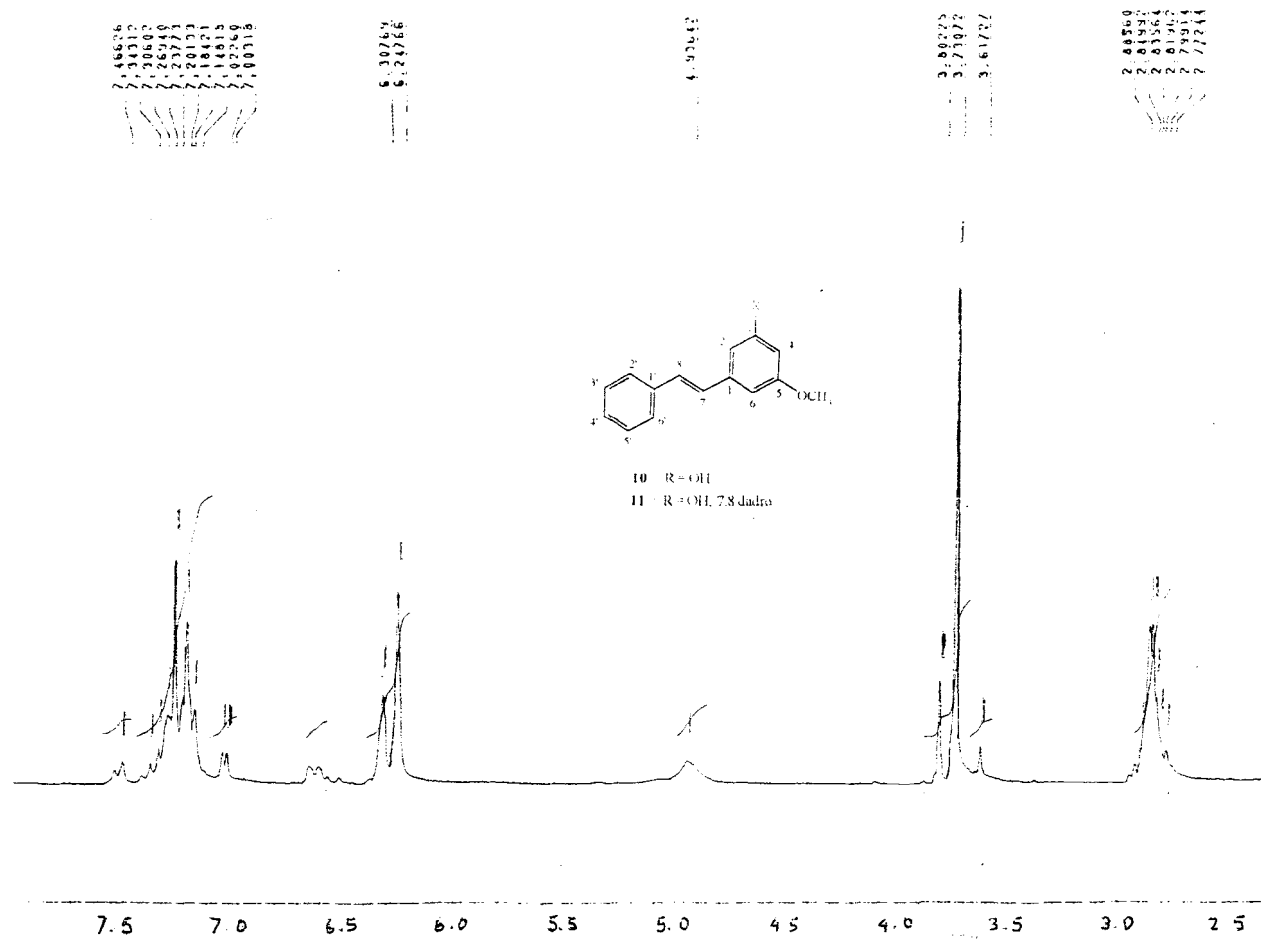


Figura 10.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) da mistura da substâncias X e XI, em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

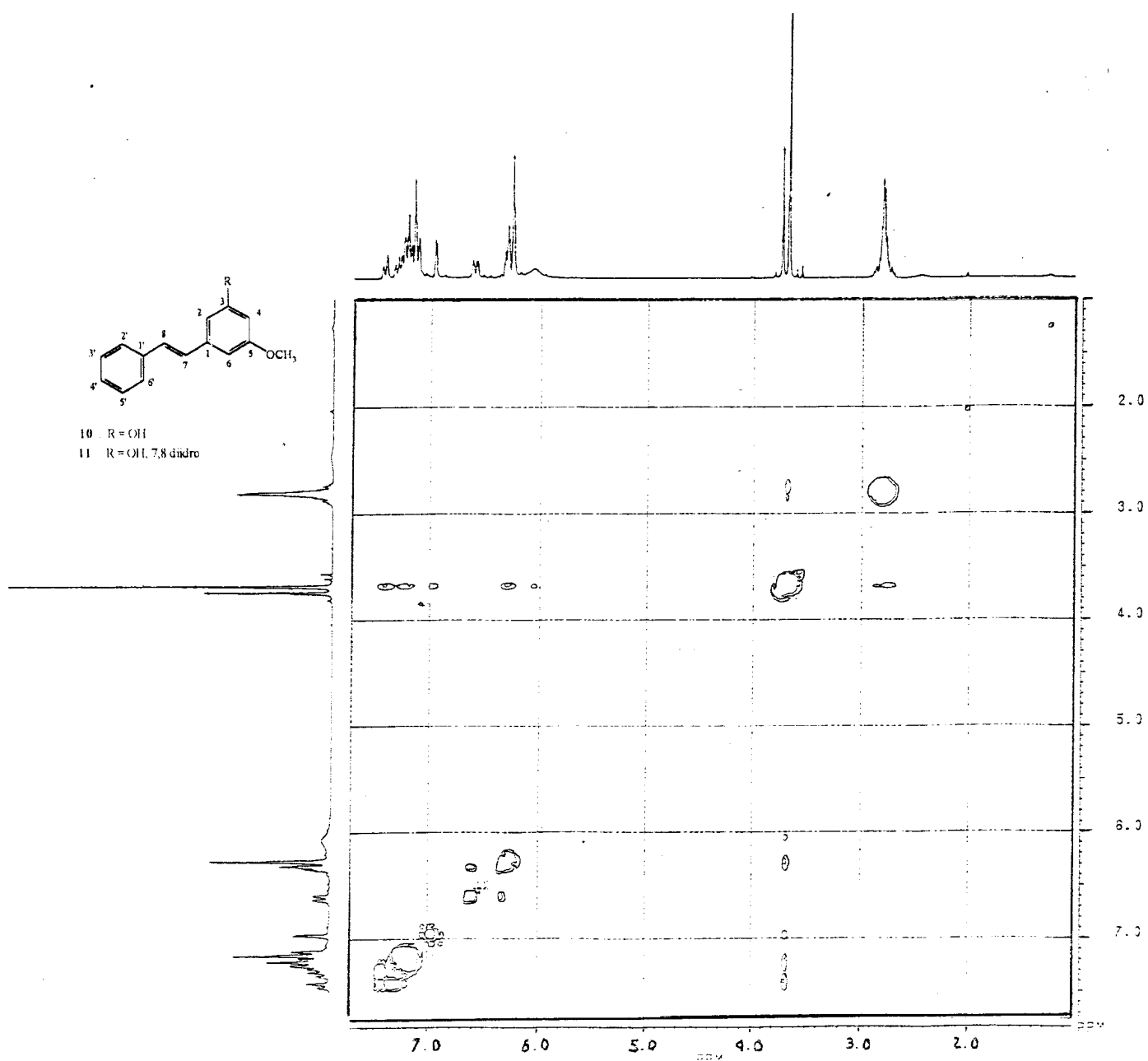


Figura 10.3 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da mistura das substâncias X e XI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

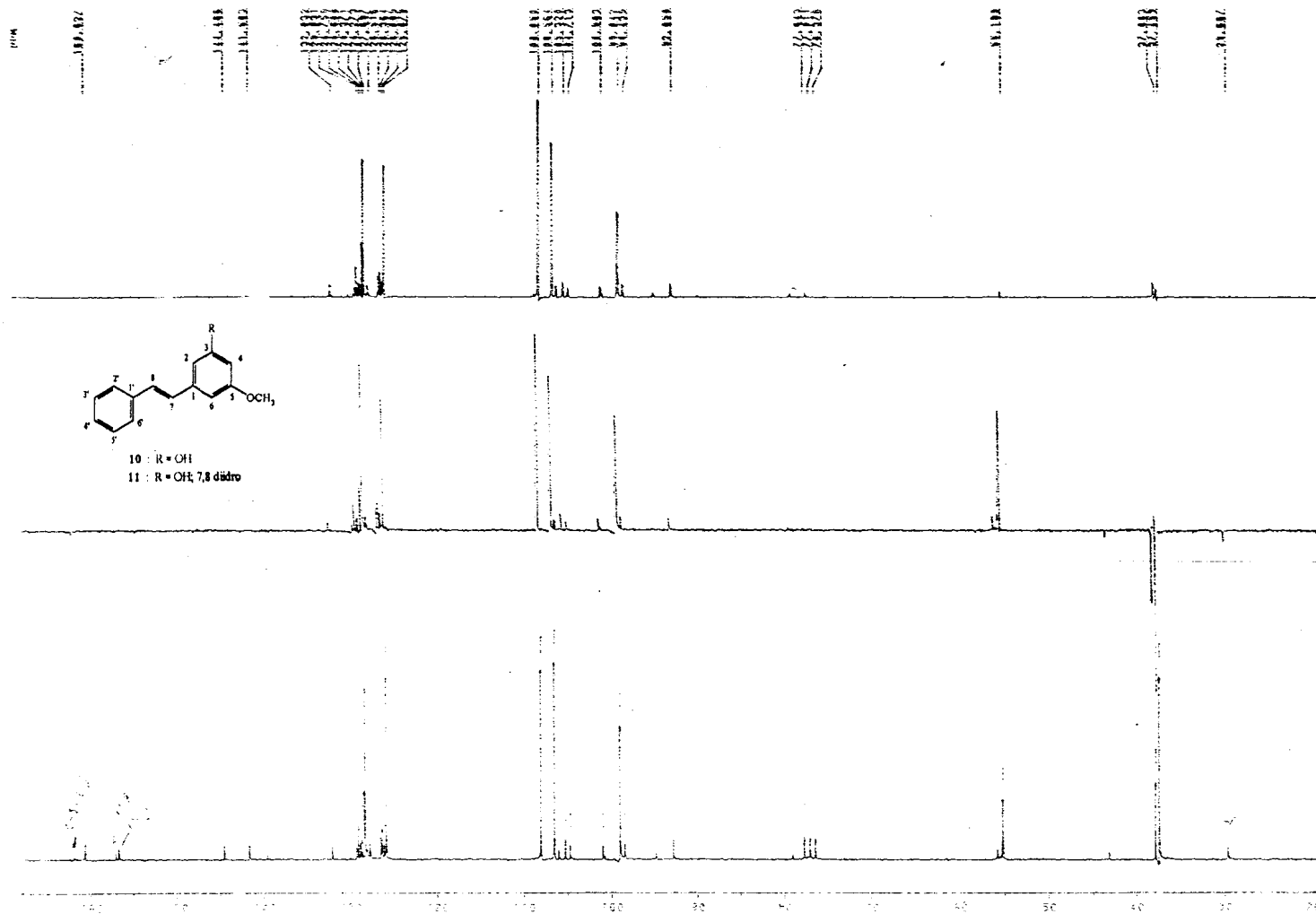


Figura 10.4 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  da mistura das substâncias X e XI.



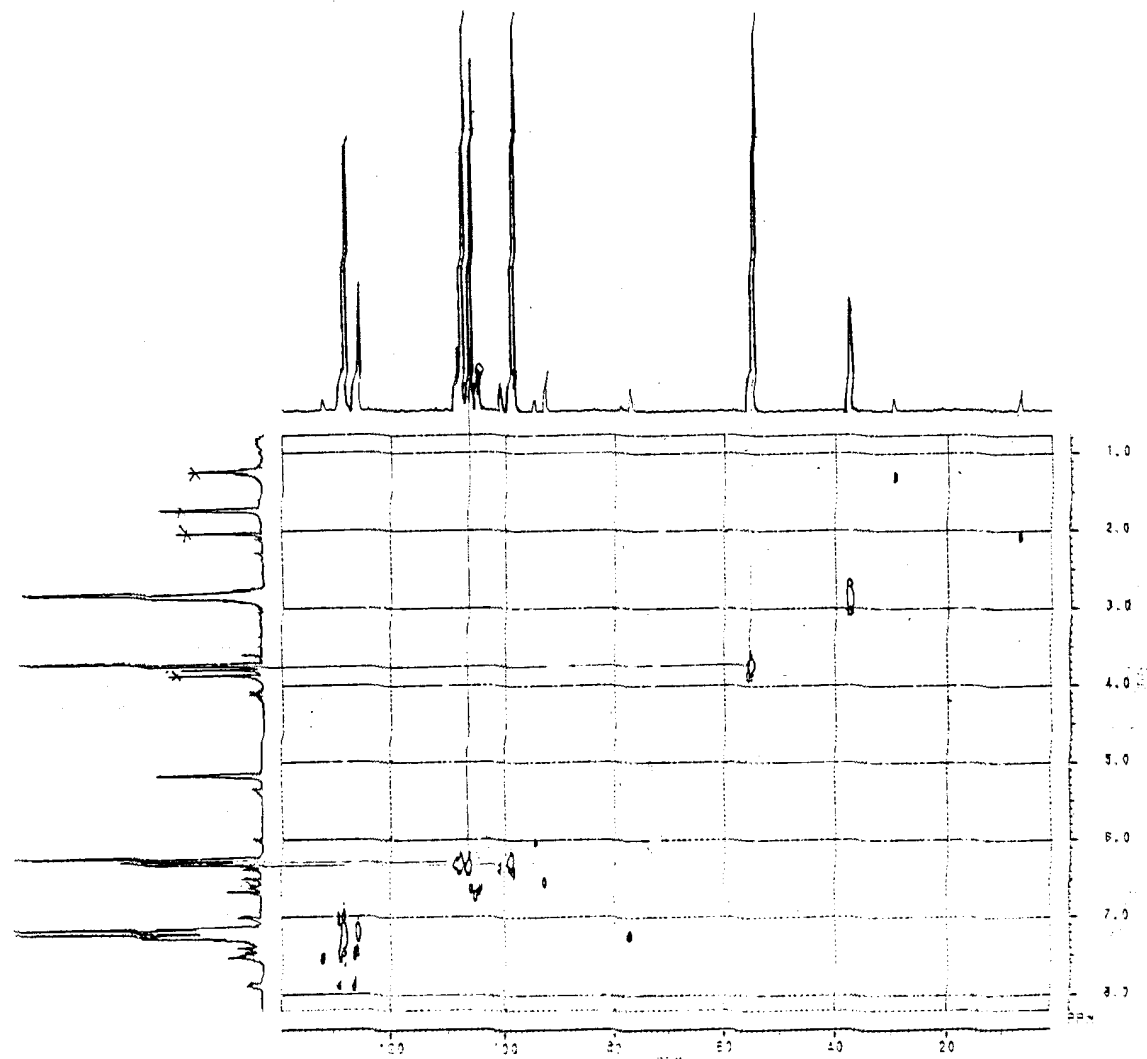


Figura 10.5 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^1J_{\text{CH}}$ )] da mistura das substâncias X e XI.

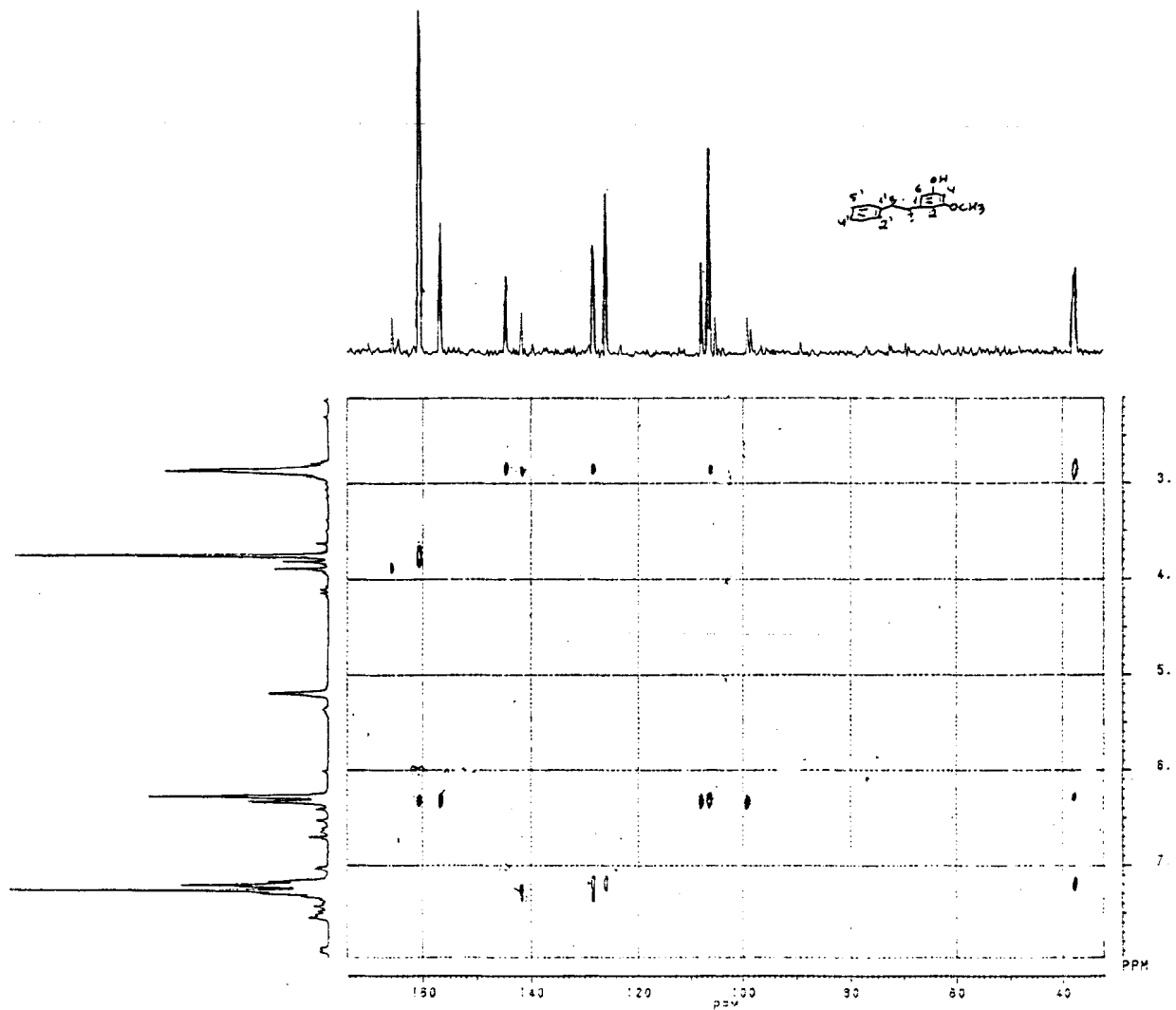


Figura 10.6 - Espectro de RMN 2D [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - COSY ( $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $n = 1,2,3$ )] da mistura das substâncias X e XI.

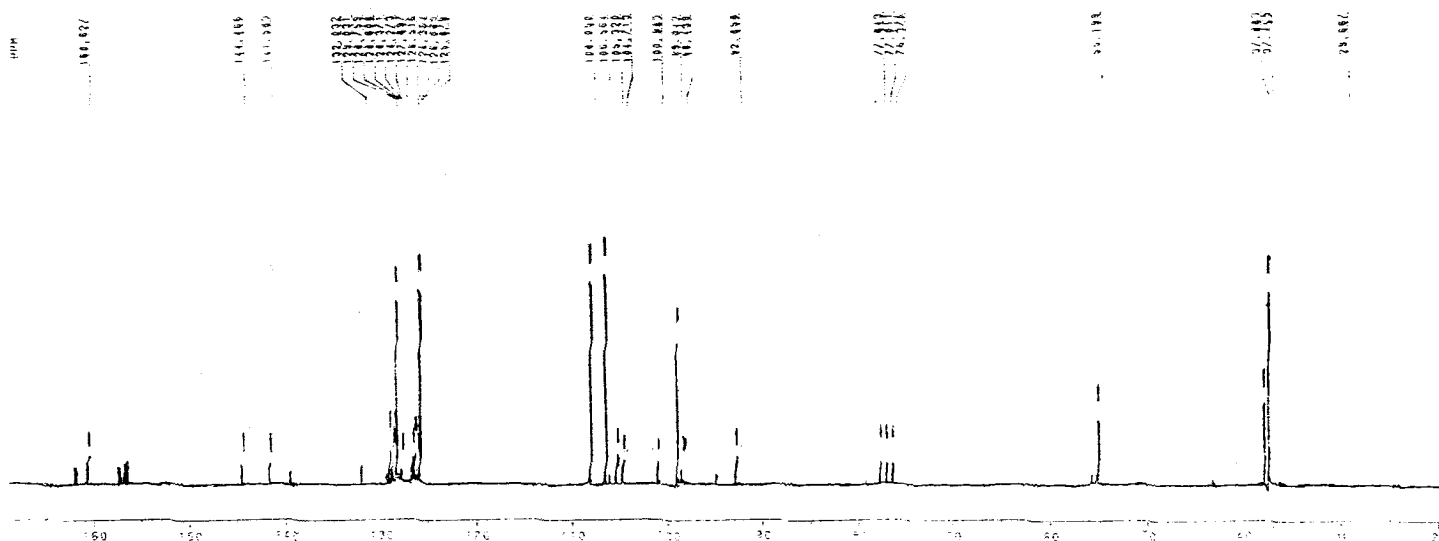


Figura 10.7 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado da mistura das substâncias X e XI.

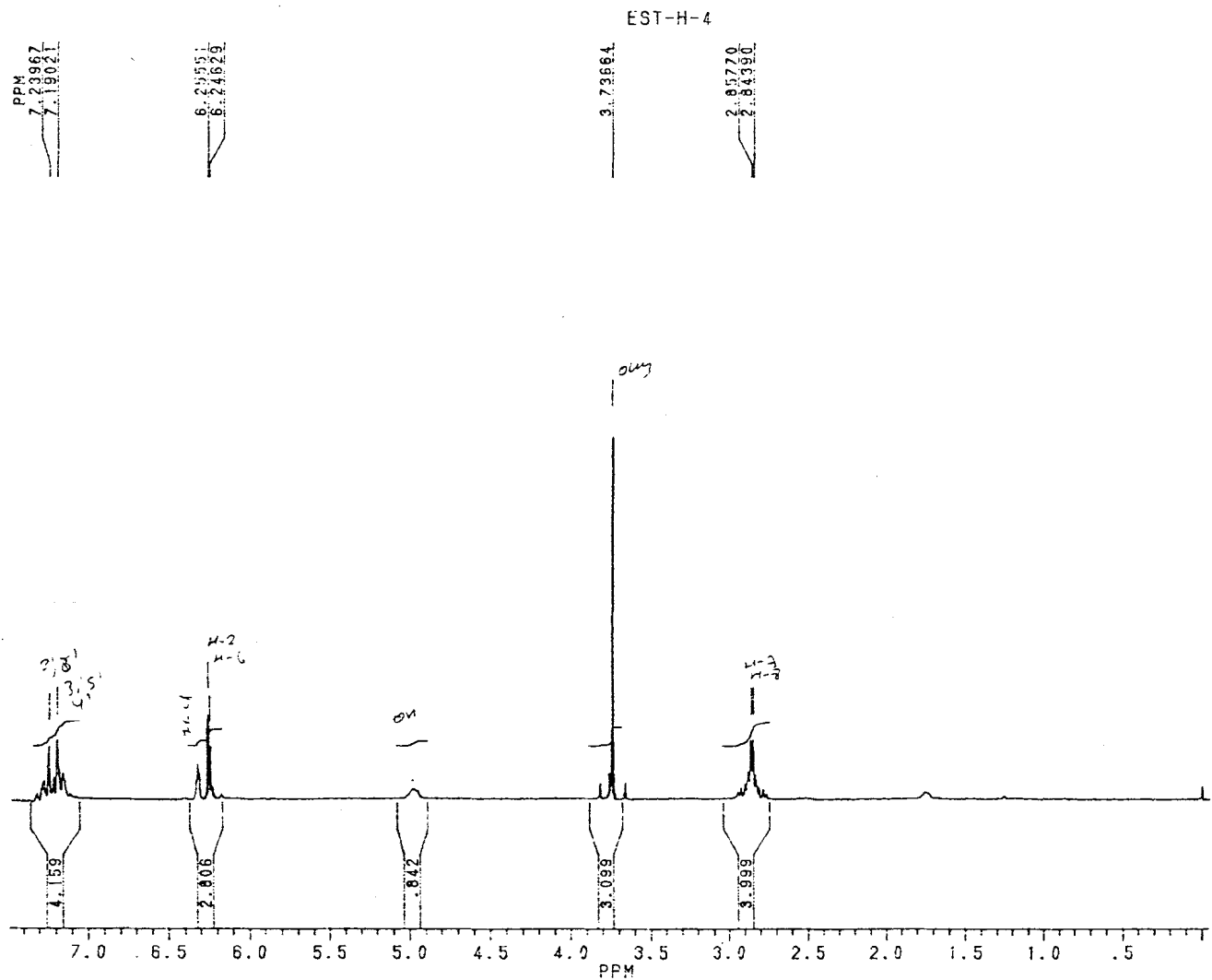


Figura 11.1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) do produto de hidrogenação de X e XI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

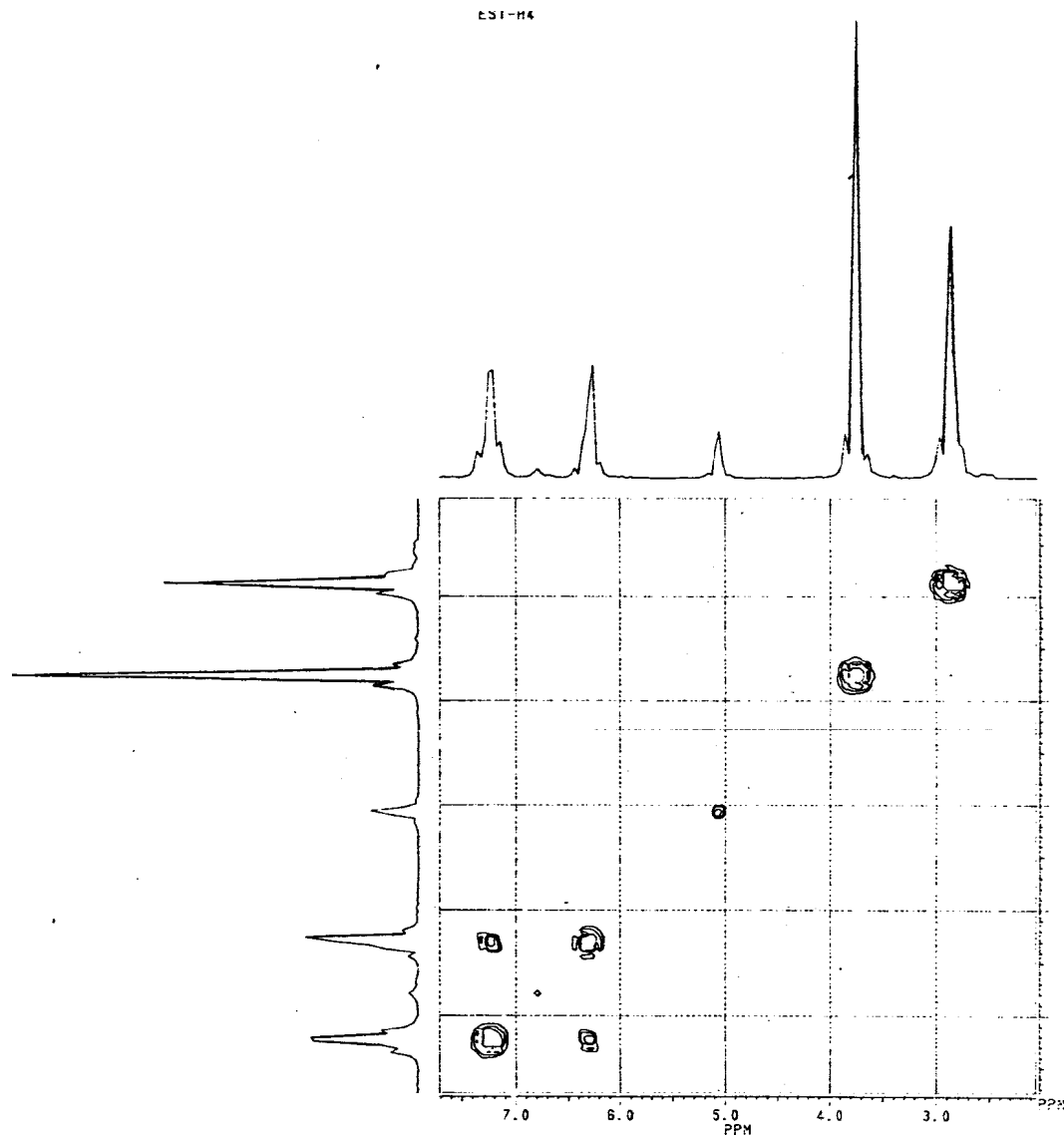


Figura 11.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) do produto de hidrogenação de X e XI em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

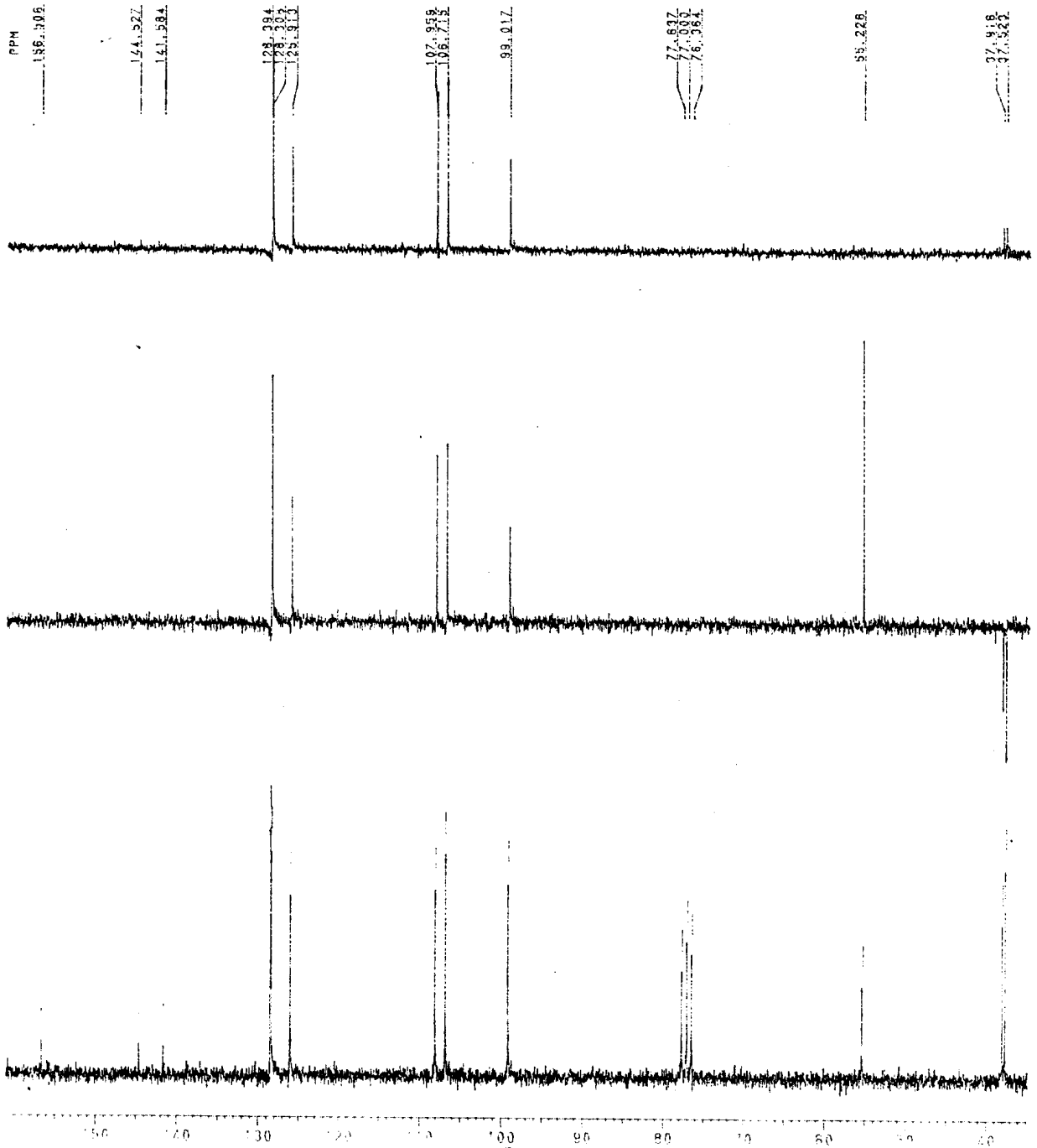


Figura 11.3 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) em  $\text{CDCl}_3$  do produto de hidrogenação de X e XI

### 3.7. Determinação estrutural da substância XII

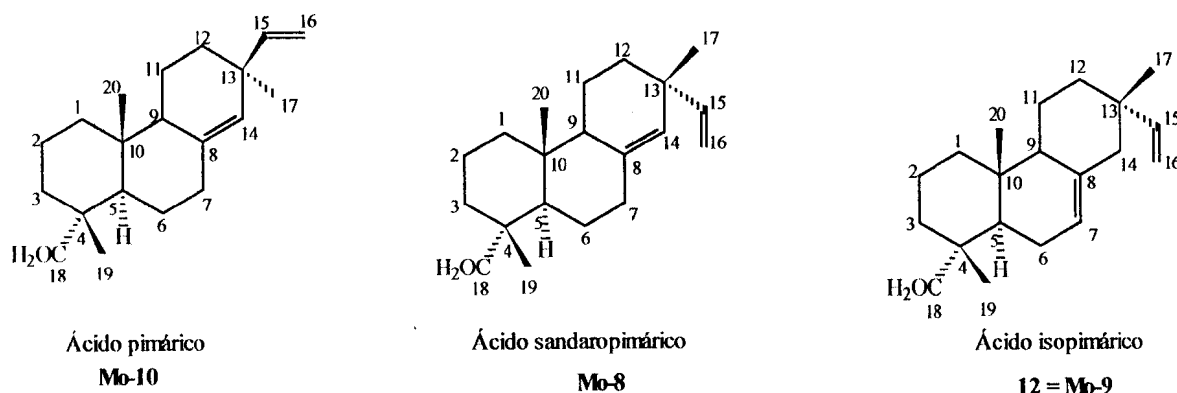
A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND e DEPT, Figura XII-1) permitiu identificar o n° de C, CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  e deduzir sua fórmula molecular parcial,  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}$  (Tabela 20). Levando em consideração que o valor  $\delta\text{C} = 183,9$  corresponde a frequência de absorção de carboxila, pode-se ampliar a fórmula molecular para  $\text{C}_{10}\text{H}_{30}\text{O}_2$ . Esta fórmula molecular e o n° de metilas reveladas no espectro de DEPT (Figura 12.1) e de próton (Figura 12.2) permitiram classificar esta substância como um diterpeno.

**Tabela 20** : Número de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , CH e C da substância XII obtido da análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (PND e DEPT,  $\text{CDCl}_3$ )

$\text{CH}_3$	$\text{CH}_2$	CH	C
15,3	109,2	150,3	184,1
17,1	46,0	51,1	31,8
21,4	38,7	120,9	35,1
	36,9	44,9	135,9
	31,0		41,2
	25,1		
	20,0		
	17,9		
$(\text{CH}_3)_3$	$(\text{CH}_2)_8$	$(\text{CH})_4$	$(\text{C}_4)(\text{CO}_2\text{H})$

O grupo vinila identificado através dos sinais de  $\delta\text{C}$ : 109,2 ( $\text{CH}_2$ ) e 150,5 (CH) (Figura 12.1) e os sinais de  $\delta\text{H}$  do sistema ABX : 5,78  $\delta$  (dd, 17,0 e 9,6, 1H), 4,90  $\delta$  (dd, 17,0 e 1,2, 1H) e 4,89  $\delta$  (dd, 10,0 e 1,2, 1H) (Figura 12.2 e 12.3) permitiram concluir que

este diterpeno pertence a classe dos pimaranos (Mo-6 e Mo-7). Os sinais de 135,9  $\delta$  (C) e 120,9 (CH) (Figura 12.1) e de : 5,30  $\delta$  (d (1), 1H) correspondem a uma dupla trissubstituída em uma posição que gera acoplamento com os prótons vizinhos conforme sinal presente no espectro 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY, Figura 12.3).



A comparação dos deslocamentos da substância XII com os valores dos ácidos isopimarico (Mo-9), pimarico (Mo-10) e sandaropimarico (Mo-8) registrados na literatura (Tabela 21) permitiu propor para a substância XII a estrutura do ácido isopimarico [37-41].

A configuração das metilas  $\text{H}_3\text{C}$ -20 e  $\text{H}_3\text{C}$ -19 são 1,3 diaxial. Esta proposta é baseada no espectro obtido por subtração de espectros após irradiação na frequência do  $\text{H}_3\text{C}$ -20 onde revela 8 % de efeito NOE sobre  $\text{H}_3\text{C}$ -19 (1,25  $\delta$ ). O efeito NOE sobre os prótons vinílicos (0,90  $\delta$ , 2, 4 %) confirmam a frequência de absorção de 0,86 ppm para os prótons da metila 17. A ausência de efeito NOE sobre o próton H-7 justifica a posição de  $\text{H}_3\text{C}$ -17 em  $\beta$  (figura 12.4).

Na estrutura XII o C-10 (Mo-9) sofre um efeito  $\gamma$  protetor da dupla, 35,5  $\delta$  ( $\Delta\delta\text{C} = 2,6$  ppm) o que não acontece com o Mo-8 que possui dupla com valor em 38,1  $\delta$ . O valor



35,1 para XII está mais próximo do valor de Mo-9 (ácido isopimárico) do que a do ácido pimárico (Mo-10) representada acima e atribuir os valores das frequências de absorção dos carbonos. Este diterpeno já foi identificado na espécie *P. strobus* L. e em outras espécies do gênero [37-41].

**Tabela 21** : Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz, PND, DEPT) da substância XII e comparação com modelos citados na literatura [40,41].

C	Mo-9	Mo-8	12		
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}$ (m)	$\delta\text{H}$	( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY)
1	39,5	38,6	38,7 (CH <sub>2</sub> )		
2	17,9	18,5	17,9 (CH <sub>2</sub> )		
3	37,2	37,5	36,9 (CH <sub>2</sub> )		
4	46,4	47,6	46,2 (C)		
5	45,4	49,1	44,9 (CH)		
6	26,7	25,5	25,1 (CH <sub>2</sub> )		H-7
7	121,5	35,8	120,9 (CH)	5,36 (m)	H-6
8	136,0	138,5	135,9 (C)		
9	52,4	51,9	51,9 (CH)		
10	35,5	38,1	35,1 (C)	1,25 (s)	
11	20,5	19,5	20,0 (CH <sub>2</sub> )		
12	36,0	36,0	36,0 (CH <sub>2</sub> )		
13	37,0	39,0	36,8 (C)		
14	46,5	128,2	46,0 (CH <sub>2</sub> )		
15	150,7	147,8	150,5 (CH)	5,78 (dd, $J_{\text{trans}} = 17,0$ e $J_{\text{cis}} = 10,0$ )	H-16
16	109,7	113,3	109,2 (CH <sub>2</sub> )	4,96 (dd, $J_{\text{trans}} = 17,0$ e $J_{\text{gem}} = 1,2$ ) 4,89 (dd, $J_{\text{cis}} = 10,0$ e $J_{\text{gem}} = 1,2$ )	H-15
17	21,9	29,9	21,4 (CH <sub>3</sub> )	0,90 (s)	
18	183,9	185,7	184,1 (C)		
19	17,3	17,6	17,1 (CH <sub>3</sub> )	1,23	
20	15,7	15,4	15,3 (CH <sub>3</sub> )	0,86	

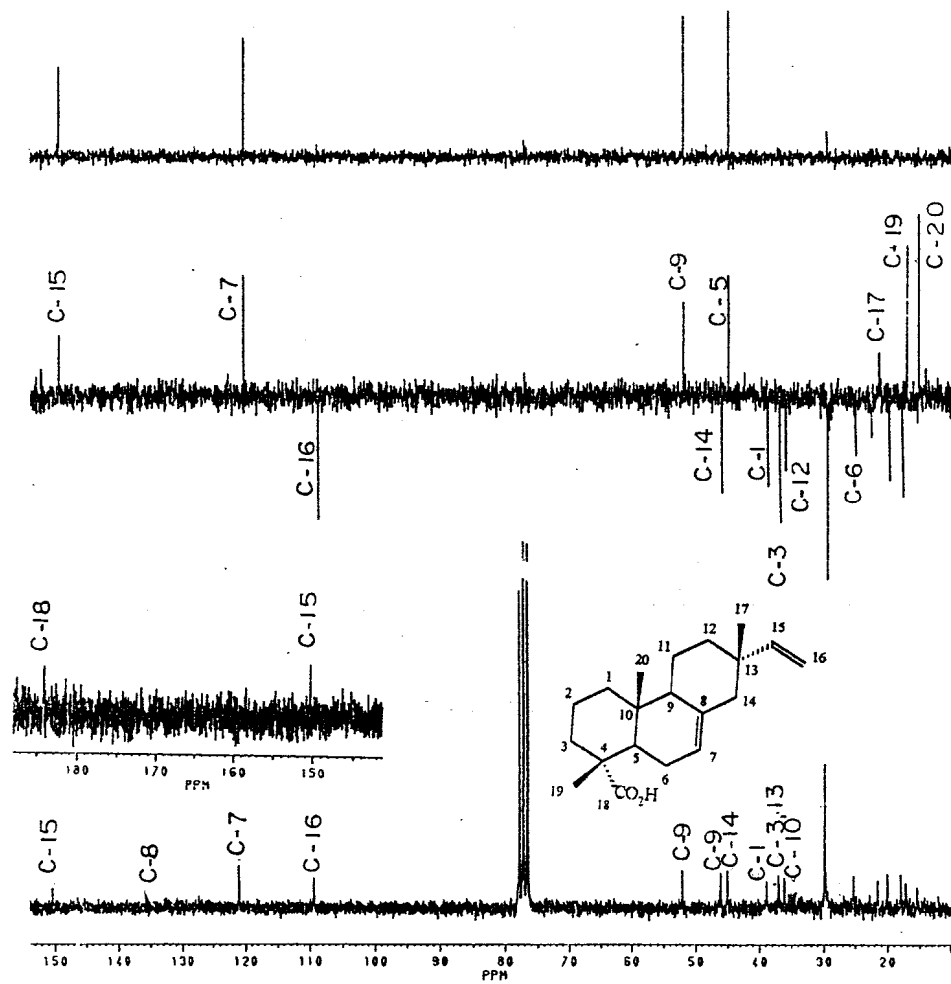


Figura 12.1 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (50,3 MHz) totalmente desacoplado e DEPT ( $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$ ) da substância XII em  $\text{CDCl}_3$ .

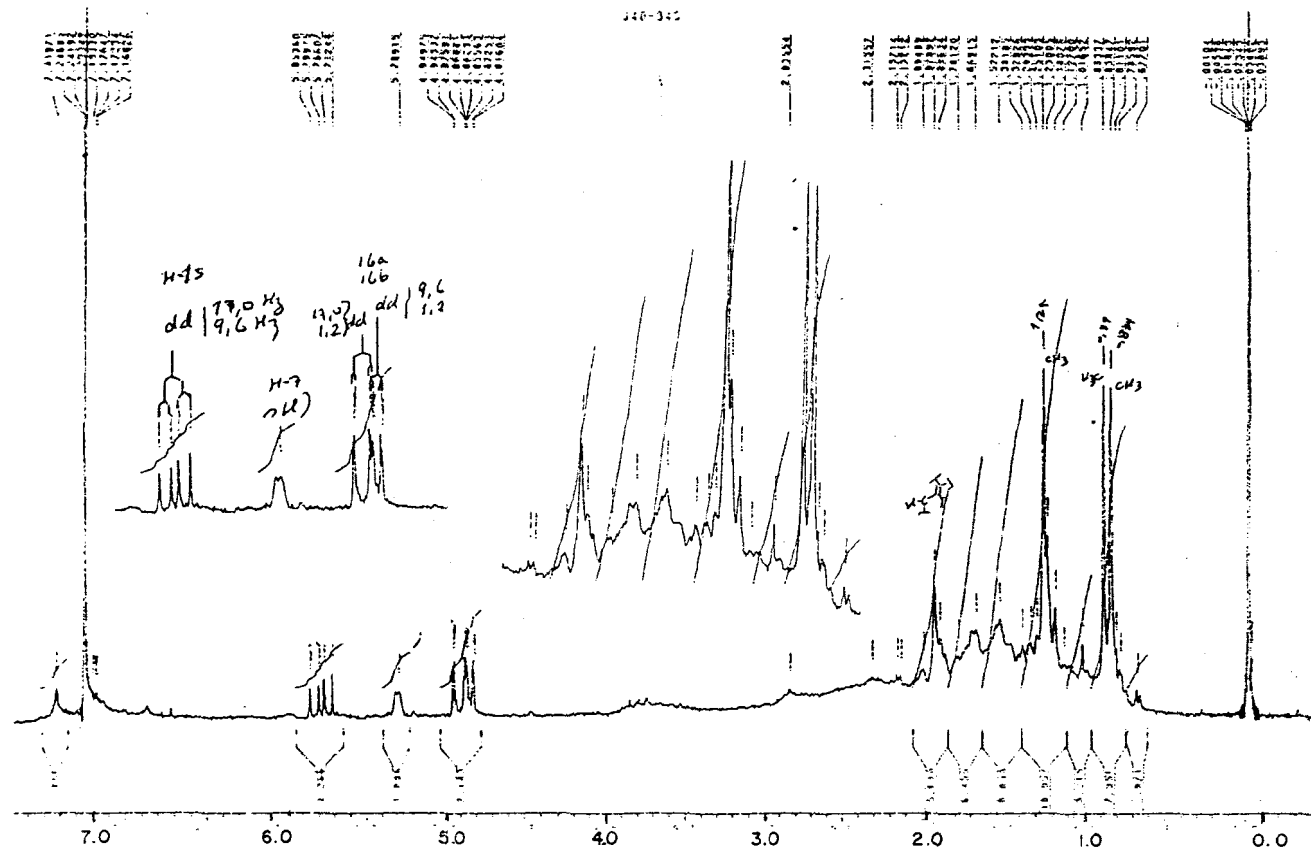


Figura 12.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) a substância XII em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

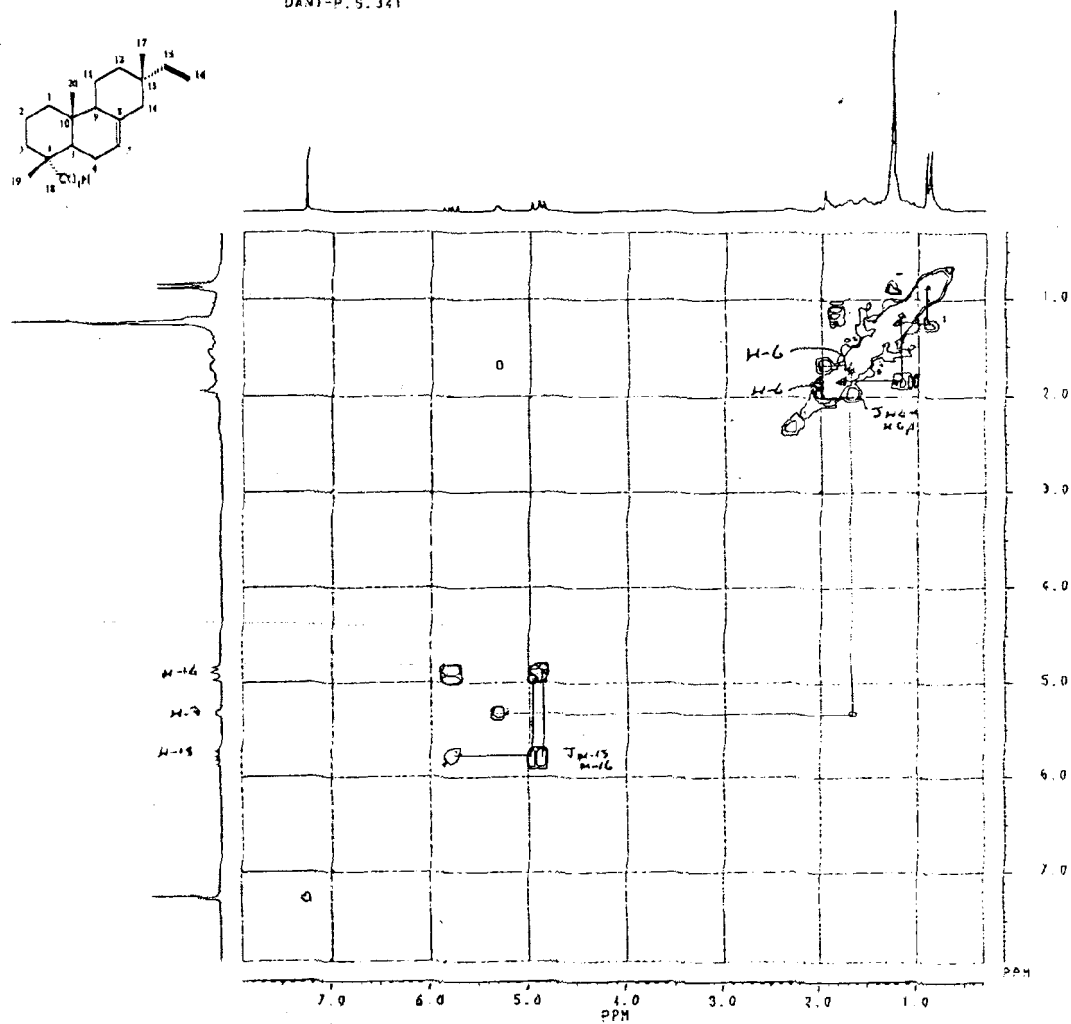


Figura 12.3 - Espectro de RMN 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY) da substância XII em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

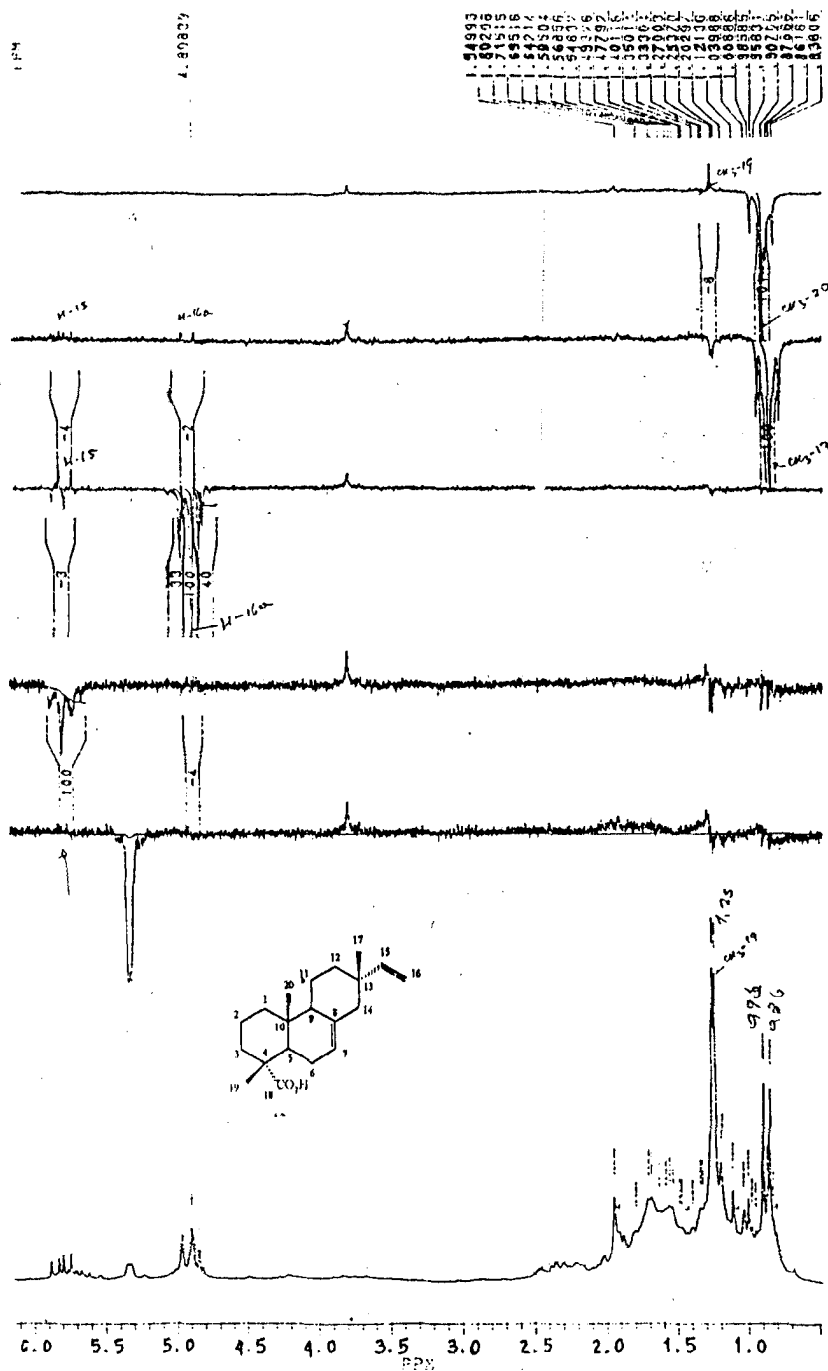
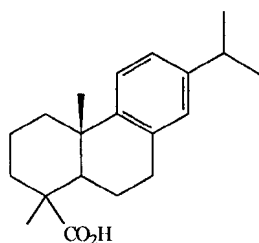


Figura 12.4 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) obtido por irradiação dupla e diferença de espectros da substância XII.

### 3.8. Identificação da substância XIII na mistura com XII

A substância XIII foi identificada no extrato hexânico como componente da mistura das frações mais polares.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13.1) apresenta sinais de frequência de absorção da substância XII e sinais adicionais que foram interpretados e comparados (Tabela 22) com os valores de ácido dehidroabiético (Mo-11) isolado de *Pinus taeda* [39].



13 = Mo-11

**Tabela 22** : Dados de RMN  $^1\text{H}$  (200,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de XII e XIII e comparação com modelos da literatura [39].

H	12	13	Mo-10
5	-	-	1,48 (1H, dd, J = 12,5 e 2,0 Hz)
7 $\alpha$	5,36 (dd)	2,80 (m)	2,24 (1H, m)
7 $\beta$	5,36 (dd)	2,80 (m)	2,87 (1H, ddd, J = 16,3, 7,1 e 2,0 Hz)
11	1,2-1,79 (m)	7,15 (d, J = 8,0 Hz)	7,15 (1H, d, J = 8,0 e 2,0 Hz)
12	1,2-1,79 (m)	7,00 (dd, J = 8,0 e 2,0 Hz)	6,98 (1H, dd, J = 8,2 e 2,0 Hz)
14	-	6,90 (d, J = 2,0 Hz)	6,87 (1H, d, J = 2,0 Hz)
15	5,78 (dd)	2,75 (m)	2,81 (1H, d, 6,8 Hz)
16	4,89 (dd) e 4,96 (dd)	1,20 (s)	1,21 (6H, d, 6,8 Hz)
17	0,84	1,20 (s)	1,21 (6H, d, 6,8 Hz)
19	1,23	1,25 (s)	1,27 (3H, s)
20	0,87	1,23 (s)	1,20 (3H, s)

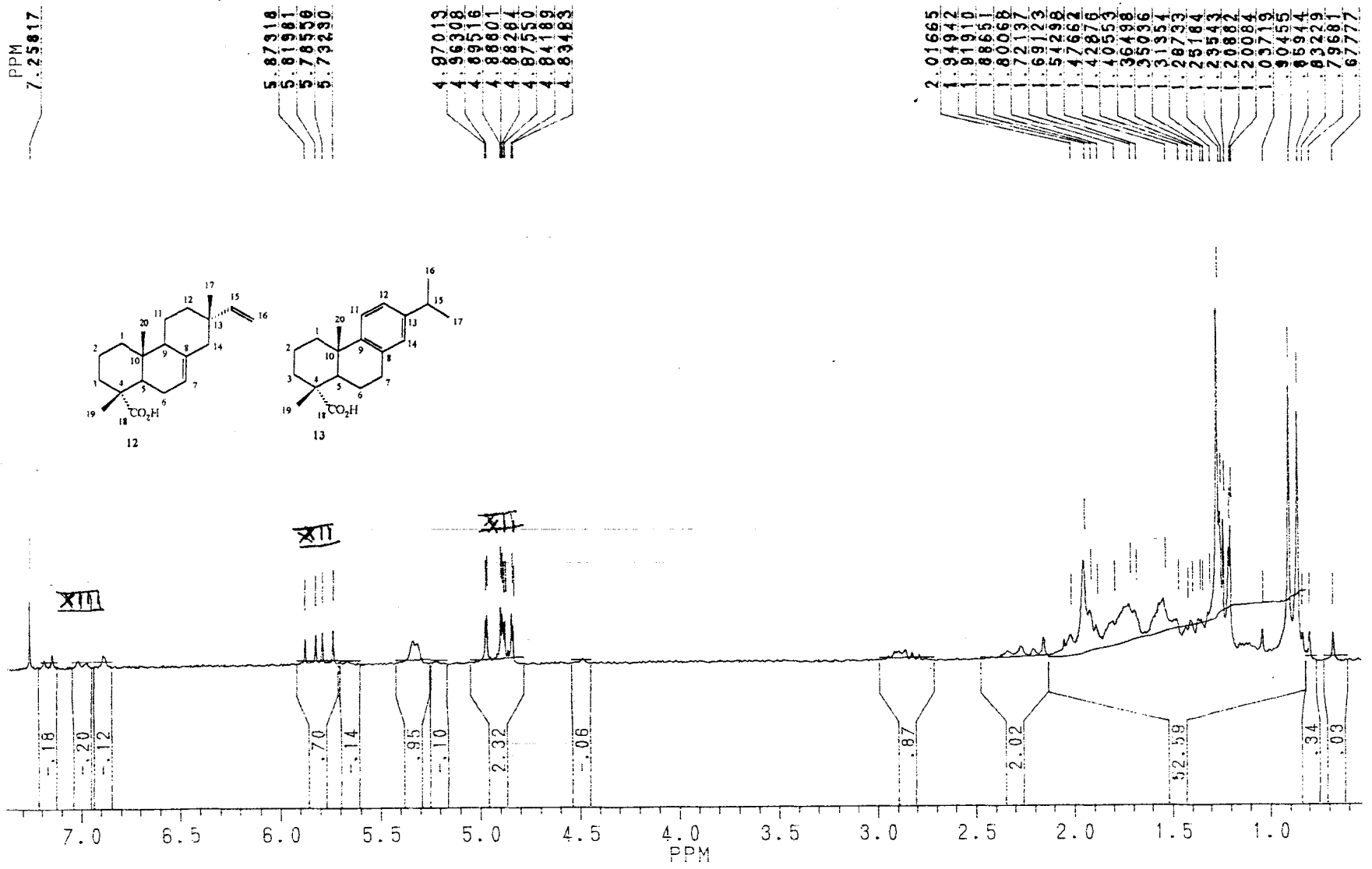


Figura 13.1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) da mistura das substâncias XII e XIII em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.

#### 4. BIBLIOGRAFIAS

- 1 - Lebreton, P.; Sartre, J.; Can. J. For. Res. (1983), **13**, 145-154.
- 2 - Lindsted, G.; Acta Chemica Scandinavica, (1951), **5**, 129-138.
- 3 - Golfari, L.; Caser, R.L.; Moura, V.P.G.; "Zoneamento Ecológico Esquemático para Reflorestamento no Brasil", PRODEPEF - PNDU / FAO / IBDF / BRA-4, série técnica, (1978), **11**.
- 4 - Carvalho, A.G.; "Bioecologia de *Sirex noctilio* F., (Hymenoptera; Siricidae) em Povoamento de *Pinus taeda* L.", Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba-PR, (1992)
- 5 - Equipe técnica da DURAFLORES S/A., "Susceptibilidade de toras de pinheiros tropicais ao ataque da "vespa da madeira" - *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae)", (1992), Diretoria Florestal Botucatu.
- 6 - Werner, R.A.; J. Insect. Physiol., (1972), **18**, 423-437.
- 7 - Hanula, J.L.; Berisford, C.W.; DeBarr, G.L.; J.Chem. Ecol., (1985), **11**, 7.
- 8 - Harbone, J.B.; "Introdução a La Bioquímica Ecológica", (1985), Editorial Alhambra S/A., Espanha.



- 9 - Dyer, L.J.; Seabrook, W.D.; J. Chem. Ecol., (1978), **4**,/2/, 199-210.
- 10 - Hain, R.; Reif, H. J.; Krause, E.; Langebarteles, R; Kindl, H; Jorman, B; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P.H.; Stocker, R.H.; Stenzel, K; Nature, London: Macmillan Magazines Ltd., (1993), **361** /6408/, 153-156.
- 11 - Suga, T.; Ohta, S.; Munesa, R.; Ide, N.; Korokawa, M.; Shimizu, M.; Ol, S.; Phytochemistry, (1993), **33**, /6/, 1395-1401.
- 12 - Loman, A.A.; Snowdon, L.R.; Bachelor, F.W.; Canadian J. of Chem., (1970), **48**, 1554-1557.
- 13 - Correa, M.P., "Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas", Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, vol. V Ed.. Ministério da Agricultura - Instituto de Desenvolvimento Florestal - 1984.
- 14 - Taylor, R.J.; Shaw, D.C.; Can. J. Bot.; (1983), **61** /1/, 279-289.
- 15 - Gardner, D.R.; Molyneux, R.J.; James, L.F.; Panter, K.E.; Stegelmeir, B.L.; Journal. of Agriculture . and Food Chemistry.; (1994), **42** /3/, 756-761.
- 16 - Cheung, H.T.A.; Smal, M.A.; Arzneimittel - Forschung/Drug Research, (1994), **44** /1/, 17-25.
- 17 - Yano, S.; Furuno, T.; Mokugai Gakkaishi, (1994), **40**, /1/, 72-77.
- 18 - Sakagami, H.; Ohara, T.; Kohda, K.; Kawazoe, Y.; Quimical and Phamaceutical Bulletin, (1991), **39**, /4/, 950-955.
- 19 - Marquelier, J.; "Societe Civile d'Investigations Pharmacologique d'Aquitaine", (1987)
- 20 - Chang-Qui Hu; Ke Chen; Qlan Shi; Kilkuskie, R.E.; Yung-Chi Cheng; Kuo-Hsiung Lee; Journal of Natural Products, (1994), **57** /1/, 42-51.

- 21 - Fisher, H.T.; Schultz, P.T.; Magnetic Resonance in Chemistry, (1991), **29**.
- 22 - Mistcher, L.A.; Rao, G.S.R.; Khanna, I.; Vrysoglu, T.; Drake, S.; Phytochemistry, (1983), **22** /2/, 573-576.
- 23 - Solod Kii, F.T.; Agronat, A.L.; Leningrad. Lesotekh. Akad; (1969), **119**, 33-35.
- 24 - Pizz, A.; Holz Roh-Werkst, (1982), **40** /8/, 293-301.
- 25 - Akhila, A.; Nigam, M.C.; Indian Perfum; (1983), **27** /3-4/, 174-196.
- 26 - Kojima, H.; Phytochemistry; (1990), **29** /7/, 2351-2355.
- 27 - Subbaraju, G.V.; Pillei, K.R.; Indian J.Chem.; (1989), **28B**, 558.
- 28 - Agrawal, P.K.; "Carbon-13-NMR of Flavonoids- Central Inst. of Medicinal and Aromatic Plants", Lucknow, India Elsevier, N.Y.; (1989), 101.
- 29 - Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B.; "The Systematic Identification of Flavonoids". Springer-Verlag, Univ. of texas at Austin; (1970).
- 30 - Harbone, J.B.; "The Flavonoids, Advances in research since," (1980), Chapman and Hall, (1987), 475.
- 31 - Agrawal, P.K.; Rastogi, R.P.; "<sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of Flavonoids Heterocycles"; (1981), **16** /12/, 2181.
- 32 - Gaydon, O.H.; Bianchin, J.P.; Bul. Soc. Chin.(France), Part II; (1978), 43.
- 33 - Koniska, T.; Iwagal, K.; Kigosawa, S.; Fujiwara, Y.; Phytochemistry; (1989), **28** /12/, 3543.
- 34 - Lin, M.; Li, J. B.; Li, S. Z.; Yu, D. Q.; Liang, X. T.; Phytochemistry; (1992), **31** /2/, 633-38.

- 35 - Rowe, W.; Bower, C.L.; Wagner, E.R.; Phytochemistry; (1969), **8**, 235-241.
- 36 - Willians, D.H.; Fleming, I.; Spectr. Methods in Org. Chem. 3<sup>rd</sup>.
- 37 - Gupta, D.; Singh, J.; Phytochemistry, (1990), **29** /6/, 1945-1950.
- 38 - Chamy, M.C.; Pivvano, M.; Gambaro, V.; Garbarino, J.A.; Nicoletti, H.;  
Phytochemistry; (1987), **26** /6/, 1763-1765.
- 39 - Carvalho, M.G.; Lopes, M.J.S.; Rujaneck, V.M.; Carvalho, A.G.; Resumos, SBQ-PN-048, (1991).
- 40 - Wentert, E.; Buckwaltwer, B.L.; J.A.C.S., (1972), **94**, 4367.
- 41 - Pascual, Tereza, J. de; Vrones, J. G.; Sanches Marcos, I.; Fernandez Ferreras, J.;  
Lithgow Bertolloni, A.M.; Basabe Barcola; Phytochemistry; (1987), **26** /5/, 1481.
- 42 - Strack, D.; Heilemann, J.; Mömkein, M.; Wray, V.; Phytochemistry; (1988), **27** /11/,  
3517-3521.
- 43 - Lindstedt, G.; Misiorny, A.; Acta Chemica Scandinavica, (1951), **5**, 121-128.
- 44 - Olusegum, E.; Z Pflanzenphysiol, (1980), **99** /33/, 235-239.
- 45 - Zinkel, D.F.; Maggee, T.V.; Phytochemistry; 1987, **26** /3/, 769-774.