UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Contribuição ao conhecimento químico da espécie *Harpalyce Brasiliana* Benth

Marcela de Castro Nogueira Diniz Pontes

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, junho de 2014

MARCELA DE CASTRO NOGUEIRA DINIZ PONTES

“Contribuição ao conhecimento químico da espécie *Harpalyce brasiliana* benth”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica
Orientadora: Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo

Natal, RN
2014

Divisão de Serviços Técnicos

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN
Biblioteca Setorial do Instituto de Química

Pontes, Marcela de Castro Nogueira Diniz.

Contribuição ao conhecimento químico da espécie *Harpalyce Brasiliana* Benth / Marcela de Castro Nogueira Diniz Pontes. – Natal, RN, 2014.
202 f. : il.

Orientadora: Renata Mendonça Araújo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Harpalyce – Dissertação. 2. Raiz-de-cobra – Dissertação. 3. acilfloroglucinol – Dissertação. 4. Harpalicina II – Dissertação. 5. antiofídica – Dissertação. I. Araújo, Renata Mendonça. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UFRN/BSE- Instituto de Química CDU 547 (043.3)

Marcela de Castro Nogueira Diniz Pontes

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DA ESPÉCIE *Harpalyce Brasiliana* Benth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 26 de junho de 2014.

Comissão Examinadora:

Dra. Renata Mendonça Araújo – UFRN (orientadora)

Dr. Caio Lima Firme – UFRN

Dr. Massuo Jorge Kato – USP

Dr. Alejandro Eusebio Rojas Nuñez – CAPES

Este trabalho é dedicado à minha mãe Mariana, sempre um exemplo máximo de amor e honestidade,

Dedico também este trabalho ao amado Sebastião, que sempre me impulsionou com suas forças, para que eu pudesse alcançar as minhas...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Renata Mendonça Araújo, pela orientação ao longo dos trabalhos realizados, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, e pela confiança dada a mim para a realização deste documento;

Ao professor Caio Lima Firme pela disponibilização dos equipamentos do LAMMSA, pelas discussões e enorme auxílio no nos trabalhos de química teórica;

À professora Silvana Zucolotto pelos contatos iniciais na fitoquímica da UFRN e pela contribuição na melhoria deste trabalho; Ao professor Alejandro, pela participação na banca;

Ao professor Massuo Jorge Kato pelo aprendizado no longínquo período de iniciação científica e pela contribuição na finalização deste trabalho.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira pela disponibilização das aparelhagens do CENAUREMN-UFC e às amigas da UFC Nayara, Karisia e Patrícia que muitíssimo me ajudaram durante os experimentos cruciais desta dissertação.

À linda família que me aguentou e apoiou nos momentos de cansaço e estudo, Sebastião, Francisco e João. À dona Mariana, dr. Múcio, Bruno e Eduardo, pela base segura dada ao longo de toda a vida. À vovó Leda e ao vovô João pelo infinito apoio e carinho há tanto tempo;

Agradeço às queridas/os amigas/os de trabalho do LISCO, Nara, Gizely, Vanessa, Rusceli, Anne, Deusielly, Jannielly, Daniele, Sheeza, Lilian, Taiannie, Edson, e Sara, por todas as risadas e companheirismo e ajuda no laboratório e fora dele;

Aos amigos do LAMMSA Norberto e Amison, pela ajuda no manuseio dos cálculos teóricos e discussões no laboratório;

Ao colega Breno Soares, pelas colaborações e explicações envolvendo a química teórica;

Aos funcionários Ana Alice e Higino pela agilidade e disposição em realizar os trabalhos burocráticos necessários ao longo do curso;

Aos professores que ministraram as disciplinas que enriqueceram meu repertório intelectual e pessoal durante este período;

Agradeço à força maior que ajuda a reger o mundo da melhor forma possível;

Agradeço aos centros da UFRN, UFC e CENAUREMN-UFC pelo apoio com a infraestrutura e aos órgãos financiadores CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Sklodowska Curie (1867-1934)

“Se a educação sozinha não pode transformar a sociedade, tampouco sem ela a sociedade muda.”

Paulo Freire (1921-1997)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein (1879-1955)

“O oposto de um fato é mentira, mas o oposto de uma verdade profunda pode muito bem ser outra verdade profunda.”

Niels Bohr (1885-1962)

“Certamente Deus criou as mulheres para um melhor fim, que para trabalhar em vão toda sua vida.”

Nísia Floresta (1810-1885)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas dos pterocarpanos cabenegrinas AI e AII.....	19
Figura 2	Prancha botânica da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth.....	21
Figura 3	Exemplar de *Harpalyce brasiliana* em seu habitat natural, com destaque para sementes, flores e raiz.....	22
Figura 4	Produto comercial "Específico Pessoa".....	23
Figura 5	Estruturas 3 a 12 das substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth.....	24
Figura 6	Estruturas 13 a 17 das substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth.....	26
Figura 7	Estruturas 18 e 19 das substâncias isoladas do lenho do caule de *H. brasiliana* Benth.....	28
Figura 8	Estruturas 20 a 28 das substâncias isoladas das folhas de *Harpalyce brasiliana* Benth.....	30
Figura 9	Fluxograma dos procedimentos experimentais.....	38
Quadro 1	Substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth neste trabalho....	47
Figura10	Cromatograma da fração HBFE-H (21-23)(5)(4-11) obtido em CLAE.....	51
Figura 11	Cromatograma da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)(P5).....	56
Figura 12	Cromatograma da fração HBFE-CL(38-40)(47-60) -(263,80 nm).....	57
Figura 13	Estrutura molecular de HB1 com carbonos numerados.....	60
Figura 14	Espectro de RMN^{13}C da substância HB1 (C_5D_5N, 75 MHz).....	61
Figura 15	Espectro de RMN^{1}H da substância HB1 (C_5D_5N, 300MHz).....	61
Figura 16	Espectro expandido de RMN^{1}H da substância HB1 (C_5D_5N, 300MHz).....	62
Figura 17	Estrutura molecular de HB2 com carbonos numerados.....	65
Figura 18	Espectro de RMN^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) da substância HB2.....	66
Figura 19	Espectro de RMN^{1}H (500MHz, $CDCl_3$) de HB2.....	67
Figura 20	Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C– HSQC de HB2.....	68
Figura 21	Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^{1}H, ^{1}H-COSY de HB2.....	69
Figura 22	Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações ^{1}H, ^{13}C– HMBC de HB2.....	71
Figura 23	Estrutura de HB3 (harpalicina II).....	74
Figura 24	Espectro de RMN^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) da substância HB3.....	75
Figura 25	Espectro de RMN^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$), com expansões, da fração HBFE-Cl (36+37)(55-57).....	76
Figura 26	Espectro de RMN^{1}H expandido de HBFE-Cl (36+37)(55-57), (300 MHz, $CDCl_3$).....	77
Figura 27	Estrutura molecular de HB4 com carbonos numerados.....	81
Figura 28	Espectro de RMN^{13}C da substância HB4 (DMSO, 500 MHz).....	82
Figura 29	Espectro de RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de HB4 com expansões.....	83
Figura 30	Espectro de RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de HB4 expandido.....	84
Figura 31	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{13}C,^{1}H-HSQC expandido de HB4.....	85
Figura 32	Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^{1}H, ^{1}H- COSY de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz) de HB4.....	86

Figura 33 Espectro de correlação bidimensional $^{1}H,^{1}H$-NOESY (MeOD, 300 MHz)..... 87
Figura 34 Espectro de correlação bidimensional $^{1}H,^{1}H$- NOESY expandido (MeOD, 300 MHz) 88
Figura 35 Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HMBC de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz)..... 90
Figura 36 Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HMBC expandido de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz)..... 91
Figura 37 Fórmula estrutural de HB5..... 94
Figura 38 Espectro de RMN^{13}C da substância HB5 (C_5D_5N, 300 MHz)..... 94
Figura 39 Espectro expandido de RMN^{1}H da substância HB5 ($CDCl_3$, 300 MHz)..... 95
Figura 40 Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HSQC de HB5 ($CDCl_3$, 300 MHz)..... 96
Figura 41 Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HSQC expandido de HB5 ($CDCl_3$, 300 MHz)..... 99
Figura 42 Substância HB1, isolada de *Harpalyce brasiliana*..... 99
Figura 43 Gráfico 1, dados teóricos x experimentais de RMN^{13}C do estereoisômero 1..... 100
Figura 44 Gráfico 2, dados teóricos x experimentais de RMN^{13}C do estereoisômero 2..... 100
Figura 45 Gráfico 3, dados teóricos x experimentais de RMN^{13}C do estereoisômero 3 101
Figura 46 Gráfico 4, dados teóricos x experimentais de RMN^{13}C do estereoisômero 4..... 101
Figura 47 Gráfico 1a, dados teóricos x experimentais de RMN^{1}H do esteoisômero 1..... 102
Figura 48 Gráfico 2a, dados teóricos x experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 2..... 103
Figura 49 Gráfico 3a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 3..... 103
Figura 50 Gráfico 4a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 4..... 104
Figura 51 Estrutura do estereoisômero 3 de HB1 com destaque para as carbonos 2´e 3´..... 105
Figura 52 Estrutura do núcleo básico de floroglucinol..... 107
Figura 53 Equilíbrio entre as forma tautômeras do THB..... 108
Figura 54 Estruturas 55 e 56 de floroglucinóis variados..... 109
Figura 55 Estrutura básica de acilfloroglucinol..... 110
Figura 56 Estruturas 30 e 31 de acilfloroglucinóis..... 111
Figura 57 Estrutura da hiperforina..... 111
Figura 58 Estrutura do 2,4-diacetilfloroglucinol..... 112
Figura 59 Estruturas 35 a 38 de acilfloroglucinóis..... 113
Figura 60 Estruturas 39 e 40 de floroglucinóis terpenilados 115
Figura 61 Estruturas 41 e 42 de floroglucinóis prenilados..... 116
Figura 62 Valores médios de deslocamento dos átomos de carbono de prenila, em ppm..... 117
Figura 63 Estruturas 43 e 44 de floroglucinóis prenilados..... 118
Figura 64 Estrutura 45 de floroglucinol geranilado..... 119
Figura 65 Estrutura 46 de floroglucinol farnesilado..... 119

Figura 66 Valores médios de deslocamento dos átomos de carbono de geranila, em ppm..... 120
Figura 67 Estruturas 47 a 51 de floroglucinóis geranilados..... 120
Figura 68 Estruturas 52 a 54 de floroglucinóis glicosilados..... 122
Figura 69 Estruturas 55 e 56 de floroglucinóis glicosilados..... 123
Figura 70 Estruturas 57 a 59 de floroglucinóis halogenados..... 124
Figura 71 Estruturas 60 a 65 de floroglucinóis com anel pirano..... 125
Figura 72 Estruturas 66 a 69 de floroglucinóis com anel furano..... 128
Figura 73 Estruturas 70 a 73 de floroglucinóis ligados a anel α-pirona..... 129
Figura 74 Estrutura da tasmanona..... 131
Figura 75 Estruturas 75 e 76 de floroglucinóis oxidados..... 131
Figura 76 Estruturas 77 e 78 de floroglucinóis oxidados..... 132
Figura 77 Estrutura 81 de floroglucinol dimérico..... 134
Figura 78 Estrutura 82 de floroglucinol dimérico..... 135
Figura 79 Estruturas 83-85 de floroglucinóis diméricos com anel cromano..... 135
Figura 80 Estruturas 86 a 93 de floroglucinóis triméricos..... 136
Figura 81 Estruturas 94 e 95 de floroglucinóis tetraméricos 137
Figura 82 Estruturas 96 a 98 de floroglucinóis poliméricos..... 138
Figura 83 Estruturas 99 e 100 de florotaninos..... 140
Figura 84 Estrutura 101 de florotanino..... 140
Figura 85 Estruturas 102 e 103 de florotaninos 141
Figura 86 Rotas biossintéticas derivadas da glicose..... 143
Figura 87 Diferentes padrões de oxigenação em metabólitos secundários..... 144
Figura 88 Formação do acetil-coA..... 145
Figura 89 Formação do núcleo floroglucinol acilado 145
Figura 90 Ligação de prenila no núcleo THB de acilfloroglucinol..... 146
Figura 91 Formação de unidades doadoras de prenila e geranila..... 147
Figura 92 Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth: HB1, HB2 e HB5 (1ª parte)..... 148
Figura 93 Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie *Harpalyce brasiliana* HB1, HB2 e HB5 (2ª parte)..... 149
Figura 94 Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie *Harpalyce brasiliana* HB1, HB2 e HB5 (3ª parte)..... 150
Figura 95 Levantamento bibliográfico- estruturas 104 a 109 de floroglucinóis variados..... 152
Figura 96 Levantamento bibliográfico- estruturas 110 a 115 de floroglucinóis glicosilados..... 154
Figura 97 Levantamento bibliográfico- estruturas 116 a 124 de floroglucinóis prenilados..... 157
Figura 98 Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados..... 160
Figura 99 Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano 167

Figura 100 Levantamento bibliográfico- estruturas 174 a 179 de floroglucinóis com anel furano..... 176
Figura 101 Levantamento bibliográfico- estruturas 180 a 186 de floroglucinóis poliméricos..... 178
Figura 102 Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados..... 180
Figura AI Tela de edição das propriedades relevantes para o cálculo de HB1..... 199
Figura AII Arquivo de HB1-1, típico arquivo de saída do Gaussian..... 200
FiguraAIII Citações geradas ao fim do cálculo no Gaussian 9.0..... 202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados da partição realizada com HBFE..... 39
Tabela 2 Dados de eluição da coluna HBFE-H..... 39
Tabela 3 Dados de eluição da coluna HBFE-H (21-23) 40
Tabela 4 Dados de eluição da coluna HBFE-H (21-23)(5) 41
Tabela 5 Dados de eluição da coluna HBFE- Cl..... 42
Tabela 6 Dados de eluição da coluna HBFE-Cl (36+37) 43
Tabela 7 Dados de eluição da coluna HBFE-Cl (38-40) 44
Tabela 8 Rendimento das extrações etanólica de folhas e raízes de *H. brasiliana*..... 48
48
Tabela 9 Dados da partição realizada com HBFE..... 49
Tabela 10 Dados da separação cromatográfica de HBFE-H..... 50
Tabela 11 Dados da separação cromatográfica de HBFE-H (21-23)..... 50
Tabela 12 Dados da separação cromatográfica de HBFE-H (21-13)(5)..... 50
Tabela 13 Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-H (21-23) (5) (4-11) 51
Tabela 14 Dados da separação cromatográfica de HBFE-Cl..... 52
Tabela 15 Dados da separação cromatográfica de HBFE- Cl (36+37)..... 53
Tabela 16 Dados da separação cromatográfica de HBFE-Cl (38-40) 54
Tabela 17 Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40) (37-44) 55
Tabela 18 Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40) (37-44) (P5) 56
Tabela 19 Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40)(47-60) 57
Tabela 20 Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C e RMN ^{1}H da substância HB1 e comparação com a literatura..... 60
Tabela 21 Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^{1}H da substância HB2..... 63
Tabela 22 Comparação entre dados de RMN^{13}C e RMN^{1}H de HB1 e HB2..... 64
Tabela 23 Correlações observadas nos espectros de ^{1}H, ^{13}C-HMBC de HB2.... 70
Tabela 24 Dados de RMN$_1$H da substância HB3 ($CDCl_3$, 300 MHz) e Harpalicina II 73
Tabela 25 Dados de RMN$_1$H da substância HB3 ($CDCl_3$, 300 MHz) e Harpalicina II..... 74
79
Tabela 26 Comparação dos dados espectroscópicos de RMN^{13}C de C3´e C4´de HB4 e Harpalicina II..... 79
Tabela 27 Comparação entre os dados espectroscópicos de RMN^{13}C de HB4 e Harpalicina II..... 79
Tabela 28 Comparação entre dados de RMN^{1}H de HB4 e HB3 (Harpalicina II) 81
Tabela 29 Dados espectroscópicos de RMN^{13}C e ^{1}H para a substância HB5.... 93

Tabela 30 Comparação entre dados espectroscópicos de RMN^{13}C para C-6´e C-8´ carbonos de HB1, HB2 e HB5..... 97
Tabela 31 Comparação entre dados espectroscópicos de RMN^{1}H para H-6´ e H-8´ de HB1, HB2 e HB5 97
Tabela 32 Arquivos e posições dos substituintes em C2´e C3´de HB1..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS

1D- Unidimensional
2D- Bidimensional
CCD- Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN- Centro Nordestino da Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CGL/EM- Cromatografia Gás-Líquido acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência
CI_{50} = DL_{50}- Concentração Letal capaz de matar 50% da população
COSY- Correlation Spectroscopy
CPD- Composite Pulse Decoupling
DAD- Diode Array Detector
DEPT- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM- Espectrometria de Massa
ESY-TOF- Electrospray Ionization
HBBD- Hydrogen Broad-Band Decoupling
HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC- Heteronuclear Single Quantum Correlation
IE- Impacto Eletrônico
IV- Infravermelho
NOE- Nuclear Overhauser Effect
NOESY- Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PF- Ponto de fusão
PDA- Photo Diode Array
PPM- Parte por milhão
RMN ^{13}C- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^{1}H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SPE- Solid Phase Extraction
UV- Ultravioleta

RESUMO

Este trabalho apresenta a contribuição ao conhecimento químico da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth, uma planta da família Leguminoseae utilizada na região nordeste para tratar ferimentos decorrentes de picadas de serpentes peçonhentas. Nesta espécie há grande presença de flavonoides e pterocarpanos, responsáveis por muitos efeitos biológicos. Após partição e tratamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas, foi possível o isolamento e identificação das substâncias Harpalicina II, 1-hexanoil-2´,4,6-tri-hidroxi-3´metil-3´-(4-metil-3-pentenil)-benzopirano (HB1), 1-hexanoíl- 2',4,6-trihidroxi-3'metil-3'benzo-(3-hidroxi-4-metil-3-pentenil)- benzopirano (HB2), 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-benzopirano (HB5), todas previamente relatadas, além da substância 5,4´´di-hidroxi-3´,4´- metilenodioxi- 7,8:6´´,5´´-2´´,2´´- dimetilpirano-isoflavona (HB4), descrita pela primeira vez na literatura. A identificação das substâncias foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais. Foi realizado o levantamento de floroglucinóis entre os anos de 2008 a 2014 contendo dados de deslocamento químico de RMN^{13}C e atividades biológicas das estruturas listadas. Com os programas de química teórica disponíveis, foram realizadas otimização, cálculos de frequência vibracional, densidades de carga e deslocamento químico de RMN de uma das substâncias através do método B3LYP/ 6-311++g(d,p). A melhor correlação entre dados experimentais e teóricos de deslocamento químico foi de 0,998 para RMN^{13}C e 0,9912 para RMN^{1}H, ambas para a mesmo estereoisômero, possibilitando a confirmação da estrutura com conformação e estereoquímica mais estáveis.

Palavras-chave: Harpalyce, "raiz-de-cobra", acilfloroglucinol, Harpalicina II, antiofídica, cabenegrina.

ABSTRACT

This document presents the contribution to the knowledge of species *Harpalyce brasiliana* Benth, a plant from the Leguminoseae family used in the northeast region of Brazil by folk medicine to treat wounds caused by bites from venomous snakes. After partition and chromatographic treatment of the leaves ethanol extract, it was possible the isolation and identification of substances Harpalycin II, 1-hexanoyl-2',4,6-trihydroxy-3'-methyl-3'-(4-methyl-3-pentenyl)-benzopyran, 1-hexanoyl-2',4,6-trihydroxy-3'-methyl-3'-benzo- (3-hydroxi- 4 methyl-3-pentenyl)-benzopyran, 1-hexanoyl-(2´, 3´)-pyrane- 3´-methyl-6´- (hydroxyl- dimethyl-methane)-4,6- dihydroxy-benzopyran and the new substance 5,4´´di-hydroxy- 3´,4´- metilendioxy- 7,8:6´´,5´´-2´´,2´´- dimethylpirane-isoflavone. The identification of the substances was achieved by uni and bidimensional nuclear magnetic ressonance methods. It was prepared a review that includes all the phloroglucinols structures between the years 2008 and 2014, containing NMR^{13}C spectroscopic data and biological activities. With the available theoretical chemistry programs, optimization and calculus of vibracional frequencies and charge densities of one of the substances was performed using the method and basis set B3LYP/6-311++g (d,p). The best correlation between experimental and theoretical data was 0,998 for NMR^{13}C and 0,991 for NMR^{1}H, both corresponding to the same estereoisomer, making it possible to confirm the structure with most stable conformation and stereochemistry.

Keywords: Harpalyce, “snake´s root”, acylated phloroglucinol, Harpalicin II, antiophidian, cabenegrin.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... VIII
LISTA DE TABELAS.....XII
LISTA DE ABREVIATURAS..... XIV
RESUMO.....XV
ABSTRACT.....XVI

Capítulo 1. INTRODUÇÃO 18
1.1- OBJETIVOS 19
2 A ESPÉCIE *HARPALYCE BRASILIANA* BENTH 20
2.1 Levantamento bibliográfico das substâncias da espécie 23
2.1.1 Substâncias isoladas das raízes de *Harpalyce brasiliana* Benth 24
2.1.2 Substâncias isoladas do lenho do caule de *Harpalyce brasiliana* Benth..... 28
2.1.3 Substâncias isoladas das sementes de *Harpalyce brasiliana* Benth 28
2.1.4 Substâncias isoladas das folhas de *Harpalyce brasiliana* Benth 29
2.2- Sazonalidade da produção de metabólitos secundários 31
3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS 33
3.1 Métodos cromatográficos..... 34
3.1.1. Cromatografia de Adsorção 34
3.1.2. Cromatografia de Exclusão..... 34
3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..... 35
3.2 Métodos espectroscópicos..... 35
3.3 Tratamento do material vegetal..... 37
3.4 Análise fitoquímica 37
3.4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *Harpalyce brasiliana* 38
3.4.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H..... 39
3.4.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)..... 40
3.4.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)(5) 41
3.4.1.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)(5)(4-11) 41
3.4.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl..... 42
3.4.1.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (36+37) 43
3.4.1.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40) 43
3.4.1.2.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)..... 44
3.4.1.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44) (P5)..... 45

3.4.1.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(47-60)..... 45
3.5 Procedimentos de Química teórica..... 46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 47
4.1-Resultados dos procedimentos de extração e partição..... 48
4.2-Resultados dos procedimentos cromatográficos..... 49
4.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H..... 49
4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)..... 49
4.2.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23) (5)..... 50
4.2.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23) (5) (4-11). 51
4.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl..... 52
4.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)..... 53
4.2.2.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)..... 54
4.2.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)P5. 55
4.2.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(47-60)..... 56
4.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de HBFE..... 57
4.3.1. HB1..... 58
4.3.2. HB2..... 63
4.3.3 HB3..... 72
4.3.4 HB4..... 78
4.3.9 HB5..... 92
4.4 Resultados dos cálculos teóricos para a substância 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'metil-3'-(4-metil-3-pentenil)-benzopirano (HB1). 98
5. OS FLOROGLUCINÓIS E SEUS DERIVADOS..... 107
5.1- Identificação de derivados de floroglucinol..... 108
5.2- Subclassificação, atividades biológicas e identificação espectroscópica de derivados de floroglucinol..... 109
5.2.1 Derivados de floroglucinóis acilados..... 110
5.2.2 Derivados de floroglucinóis monoméricos terpenilados 114
5.2.2.1 Floroglucinóis prenilados 115
5.2.2.2 Floroglucinóis geranilados..... 119
5.2.3 Floroglucinóis glicosilados..... 122
5.2.4 Floroglucinóis halogenados 124
5.2.5 Floroglucinóis com anel pirano 125
5.2.6 Floroglucinóis com anel furano 127
5.2.7 Floroglucinóis ligados a anel α-pirona..... 129
5.2.8 Floroglucinóis oxidados..... 130

5.2.9 Derivados de floroglucinol diméricos, triméricos, tetraméricos e superiores 134
5.2.10 Florotaninos 139
5.3-Propostas de biossíntese dos floroglucinóis isolados 141
5.3.1 O metabolismo secundário 142
5.3.1.2 As rotas metabólicas e produção de derivados de floroglucinóis 144
5.3.2 Biossíntese de derivados do floroglucinol deste trabalho 148
5.4 LEVANTAMENTO DE FLOROGLUCINÓIS 151
6. CONCLUSÕES 188
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 189
APÊNDICE 198
Aspectos gerais das práticas na Química Teórica 198
Aspectos gerais dos programas de química teórica utilizados 199

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas, minerais e animais pela tradição popular está entre algumas das formas mais antigas de tratamentos de saúde praticados pelo homem. Registros numerosos das culturas mais antigas relatam o uso destes materiais de diversas formas, como na área medicinal, na alimentação, hábitos sociais e ritualísticos. (PINTO, 2002; VIEGAS JR, 2006).

A utilização de fontes naturais, predominantemente plantas, como medicamentos aumentou e se desenvolveu durante o século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos científicos sobre plantas (KINGHORN, 2001). Isso possibilitou o isolamento de princípios ativos de plantas já conhecidas como medicinais, e nesta época foram isoladas substâncias importantes como a salicilina, morfina, quinina e pilocarpina, algumas já sintetizadas e utilizadas atá os dias atuais (BUTLER, 2004).

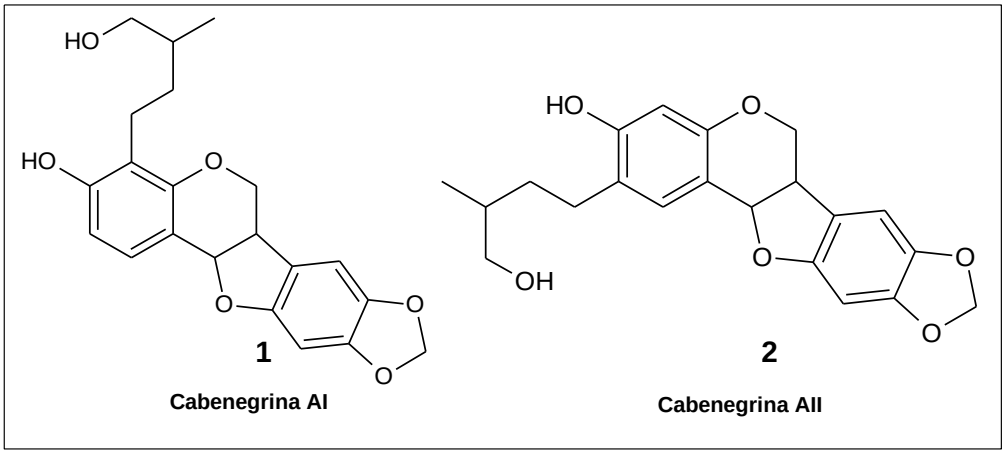
Quando consideramos a história brasileira, sabemos que os portugueses tinham a necessidade de utilizar remédios indígenas diante da escassez de medicamentos durante o período da colônia. Isso acabou promovendo a mescla das culturas medicinais indígenas, africanas e europeias (PINTO et al, 2002). Embora a prática fitoterápica seja tão antiga quanto a história da civilização (VIEGAS JR et al, 2006), foi apenas no século passado que o homem desenvolveu técnicas, teorias e aparelhos para estudar, entender mais profundamente e explorar as substâncias presentes nos diferentes tipos de espécies da fauna e flora.

Muitas plantas possuem substâncias decorrentes do seu metabolismo secundário, estando este metabolismo normalmente relacionado a alguma função de sobrevivência e sendo resultante de milhares de anos de adaptação da planta ao seu ambiente (PHILLIPPE; ANGENOT, 2005). Estes metabólitos secundários possuem características diversas que muitas vezes podem ser utilizadas pelos seres humanos para seu próprio benefício, como é o caso de algumas plantas que possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, dentre outras. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 65 a 80% da população de países subdesenvolvidos utiliza plantas medicinais para o tratamento de seus males (AKELERE, 1993).

Em um país como o Brasil, com grandes extensões de área rural, é comum o uso de plantas para diversos tratamentos de saúde. “Específico Pessoa” é um produto comercial utilizado para tratar envenenamentos por picadas de cobras e escorpiões nas regiões Norte e Nordeste do país, supostamente preparado a partir de uma mistura de espécies de plantas. A

partir dele foram isolados, em 1987, pterocarpanos possuidores de atividade antiofídica contra o veneno de *Bothrops atrox,* as cabenegrinas A-I e A-II. (figura 1). Essa descoberta promoveu grande interesse nas pesquisas com espécies regionais utilizadas com o mesmo fim, como *Bredemeyera floribunda* e *Harpalyce brasiliana* (ARAÚJO, 2008).

Figura 1- Estruturas dos pterocarpanos cabenegrinas AI e AII



Após investigação fitoquímica, *H. brasiliana* despontou como a possível fonte natural do "Específico Pessoa", pois foram isolados do extrato etanólico de suas raízes os pterocarpanos antiofídicos, cabenegrina A-I e A-II, além de vários outros flavonoides. O estudo fitoquímico de *H. brasiliana* revelou também a presença de floroglucinóis no extrato etanólico nas folhas, classe de compostos nunca encontrada na família Leguminoseae. Este fato estimulou a reinvestigação fitoquímica desta espécie, visando confirmar a presença de floroglucinóis em outros extratos de *H. brasiliana*, coletados em diferentes épocas.

Neste trabalho, três das substâncias isoladas pertencem à classe dos floroglucinóis, sendo que uma delas tem potencial atividade leishmanicida (ARAÚJO, 2008) e as outras, muito similares estruturalmente, não possuem ainda atividade biológica determinada. Por este motivo foi realizado também um capítulo (capítulo 5) relacionado a esta classe de metabólitos secundários, que inclui um levantamento de todas as estruturas entre 1978-2014, contendo dados de RMN^{13}C e atividades biológicas nas figuras.

1.1- OBJETIVOS

Ao trabalhar com a espécie escolhida, os objetivos deste trabalho foram reisolar algumas substâncias já conhecidas pelas atividades biológicas, como harpalicina II, além de

outras provavelmente bioativas, mas ainda sem comprovação experimental. Também foi a busca por novas substâncias oriundas das folhas da espécie, parte da planta menos utilizada, de acordo com a literatura estudada. Outro objetivo era incluir e discutir os dados biológicos de duas das substâncias isoladas, mas os testes não retornaram em tempo hábil.

Outros objetivos foram utilizar as técnicas de química teórica para comparação de dados e estabelecimento estrutural, e preparar um levantamento de estruturas de floroglucinóis prenilados e geranilados (para definição de prenilados e geranilados, consulte páginas 115 e 119), que poderia funcionar como ferramenta de consulta de dados de deslocamento químico de carbono para estas substâncias.

.

2 A ESPÉCIE *HARPALYCE BRASILIANA* BENTH

A espécie *Harpalyce brasiliana* Benth (figura 2) é uma planta cuja raiz é utilizada na medicina popular para tratamento de vítimas de acidentes com animais peçonhentos. A espécie pertence à família Leguminoseae (Fabaceae), que engloba 727 gêneros e se divide em três subfamílias: Mimosoideae (3.270 espécies), Caesalpinodeae (2.250 espécies) e Papillionoideae, ou Faboideae (13.800).

H. brasiliana integra a subfamília Papilionoideae, que engloba 180 gêneros, distribuídos em aproximadamente 13.8000 espécies no planeta. “Papilio” é uma palavra que significa “borboleta”, e a espécie é chamada assim provavelmente por causa do formato característico da flor. É considerada uma subfamília de grande importância econômica, pois inclui espécies ricas em carboidratos, muito utilizadas na alimentação, tais como a soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), alfafa (*Medicago sativa*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o amendoim (*Arachis hypogeae*) (RIBEIRO et al, 1999). As madeiras de espécies de *Dypterix*, *Hymenolobium* e *Dalbergia* são utilizadas na construção civil e marcenaria.

O gênero *Harpalyce* engloba cerca de 10 espécies, nativas de México, Cuba, Nicarágua e Brasil. Espécies como *H. maisiana* e *H. cubensis* tem ocorrência apenas em Cuba, sendo que se encontram em estado “vulnerável” e “quase ameaçada”, de acordo com a IUCN red list of threatened species. Outras espécies como *H. parvifolia*, *H. lepidota*, *H. formosa, H. hilariana, H. lanata e H. arborescens (ou H. hidalguensis ou H. retusa)* também fazem parte do gênero.

A espécie *H. brasiliana* é uma planta endêmica do Brasil, e se apresenta como pequena árvore ou arbusto, encontrado especialmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, mas também com ocorrências relatadas no Sudeste e Centro-Oeste brasileiros. Possui ramos alongados, folhas verde-escuras e flores alaranjadas. O fruto é do tipo vagem, com tamanho entre 5,0- 7,5 cm de comprimento e 1,2- 3,0 cm de largura.

Figura 2- Prancha botânica da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth

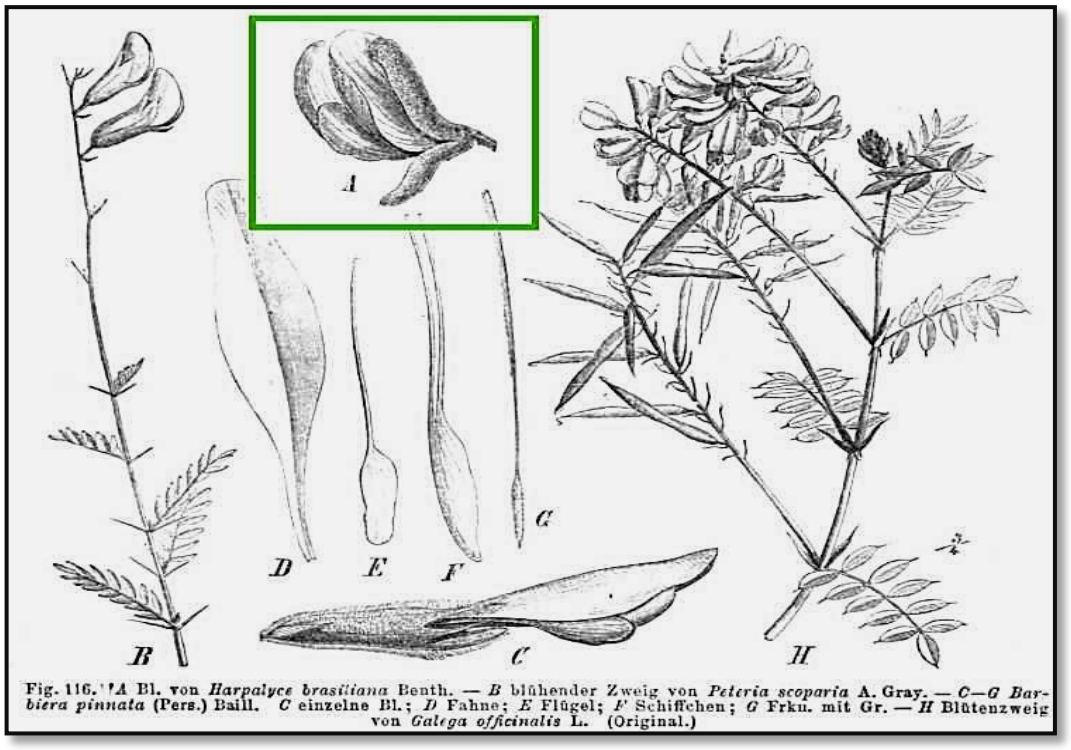


Fig. 116. *A* Bl. von *Harpalyce brasiliana* Benth. — *B* blühender Zweig von *Peteria scoparia* A. Gray. — *C—G Barbiera pinnata* (Pers.) Baill. *C* einzelne Bl.; *D* Fahne; *E* Flügel; *F* Schiffchen; *G* Frkn. mit Gr. — *H* Blütenzweig von *Galega officinalis* L. (Original.)

É popularmente conhecida nestas regiões como “raiz de cobra” ou “erva de cobra”, pelo fato de ser utilizada como tratamento para acidentes com serpentes, especialmente nos meios rurais. Nestes locais, nos casos de acidentes com picadas onde há liberação de peçonha, existe o hábito de preparar e ingerir uma solução hidroalcoólica com as raízes da planta, como tratamento imediato pós-incidente (ARAÚJO, 2008).

Figura 3- Exemplar de *Harpalyce brasiliana* em seu habitat natural, com destaque para sementes, flores e raiz (ARAÚJO, 2008)

Em 1982, Nakagawa e colaboradores pesquisaram o produto comercial “Específico Pessoa” (Figura 4), descrito como um extrato hidroalcoolico da raiz de uma planta sul americana e utilizado para tratamento de picadas de cobras, escorpiões e insetos. A partir do produto, foram isoladas as cabenegrinas AI e AII (Figura 1), substâncias da classe dos pterocarpanos, isoflavonóides que possuem dois anéis conjugados, um benzofurano e outro benzopirano e relatados como tendo variadas atividades biológicas. O nome cabenegrina vem da concepção inicial de que o produto era feito com a planta conhecida como “cabeça de negro”, mas além de existirem várias plantas conhecidas por este nome popular, evidências sugeriam cada vez mais que “raiz de cobra” era a planta responsável pelos efeitos observados após a ingestão do produto comercial (SILVA; MATOS E SILVEIRA, 1997).

Figura 4 - Produto comercial "Específico Pessoa"

Outras Leguminoseas também produzem pterocarpanos nas raízes, como as espécies mexicanas *Brongniartia podalyrioides* e *B. intermedi*, conhecidas como "ervas de cobra". No caso, edunol, um pterocarpano prenilado, foi isolado e mostrou redução da expectativa de mortalidade de ratos expostos ao veneno de *Bothrops atrox* (REYES-CHILPA, 1994). Este composto foi posteriormente foi isolado também das raízes e do lenho do caule da *H. brasiliana* e obtido por síntese orgânica, com produto demonstrando atividade antimiotóxica e antiproteolítica.

Embora tenha sido dada a sugestão de que "Específico Pessoa" seria preparado com *Harpalyce brasiliana*, não foi comprovado se a planta fazia parte da composição do produto. Independentemente disto, após as descobertas iniciais, as pesquisas de investigação de diversas espécies da flora local com uso antiofídico, incluindo *H. brasiliana* e *Bredemeyera floribunda*, foram estimuladas e iniciadas principalmente na UFC e em outros centros de pesquisa.

2.1 Levantamento bibliográfico das substâncias da espécie

Investigações fitoquímicas descrevem a partir de *H. brasiliana* o isolamento de muitas substâncias, como pterocarpanos, isoflavonas, chalconas, triterpenos, dentre outros. Embora inicialmente tenham sido estimulados os estudos com a raiz para encontrar as cabenegrinas A-I e A-II que haviam sido anteriormente isoladas do "Específico Pessoa", as pesquisas se

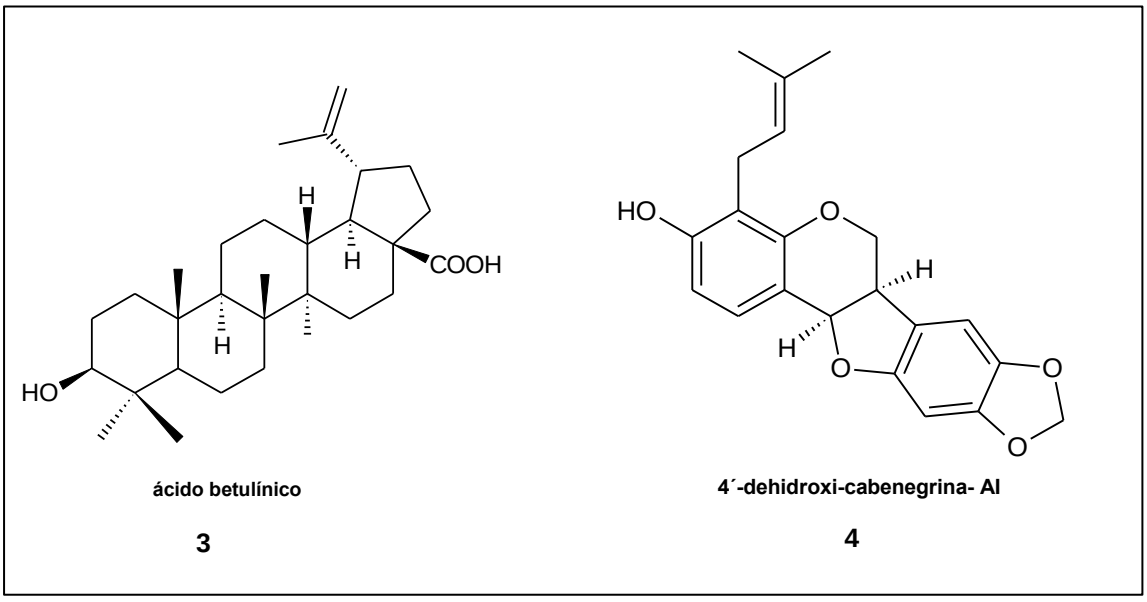
estenderam para o lenho do caule e folhas da espécie, nas quais foram encontrados derivados de floroglucinóis isoladas apenas por Araújo, 2008.

2.1.1 Substâncias isoladas das raízes de *Harpalyce brasiliana* Benth

O extrato etanólico da raiz de *H. brasiliana* foi considerado pouco tóxico através de ingestão oral, com a DL_{50}[1] de HBRE por via oral sendo maior que 2.000,0 mg/kg (ARAÚJO, 2008).

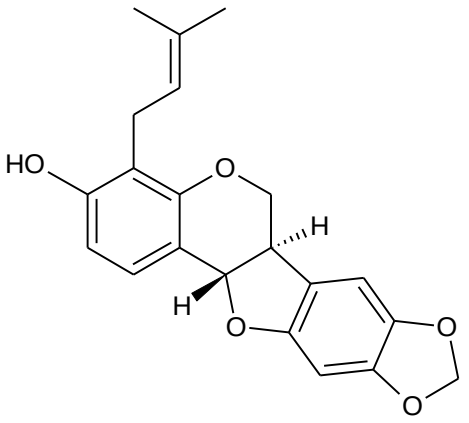
Conforme disposto na literatura, das raízes de *H. brasiliana* já foram isoladas as substâncias cujas estruturas estão presentes na figura 5, correspondentes ao triterpeno ácido betulínico (3), os pterocarpanos 4´-dehidroxi-cabenegrina-A-I (4), cabenegrina-AI e cabenegrina-AII (estruturas 1 e 2, figura 1), harpalicina I (5), leiocarpina (6), maackiaina (7), medicarpina (8). Também foram isolados o edunol (9), os derivados 2-geranil-3-hidroxi-8,9-metilenodioxi-pterocarpano (10), 5'-hidroxi-2',3'-desidro-cabenegrina A-II (11) e 2',3'-desidro-cabenegrina A-II (12), todos exibidos na página 9. O edunol possui atividades antiproteolítica e inibidora de PLA2 e já foi isolado de outras Leguminoseae anteriormente.

Figura 5- Estruturas 3 a 12 das substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth



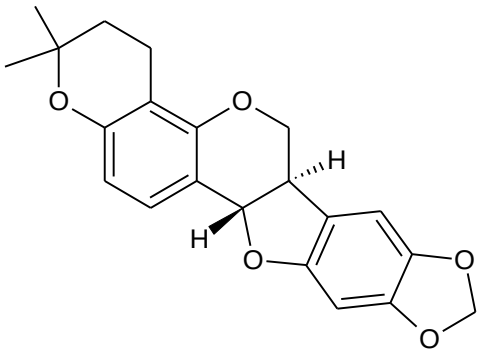
[1] Dose letal para 50% da população de organismos em um ensaio.

Figura 6- Estruturas 3 a 12 das substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth (continuação)



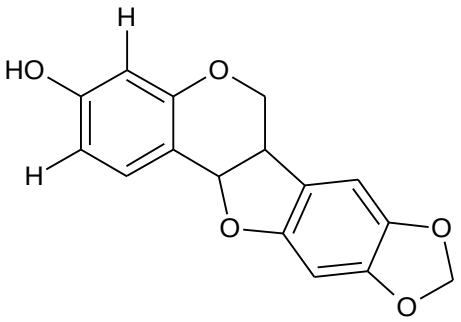
harpalicina-I

5



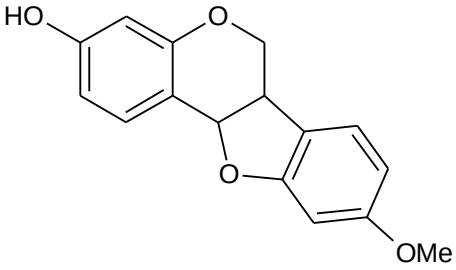
leiocarpina

6



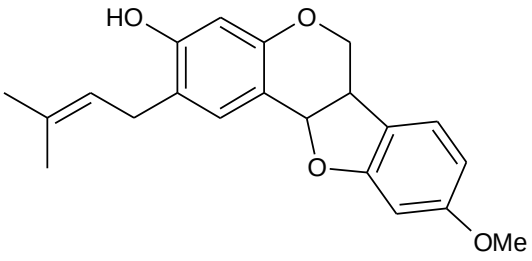
maackiaina

7



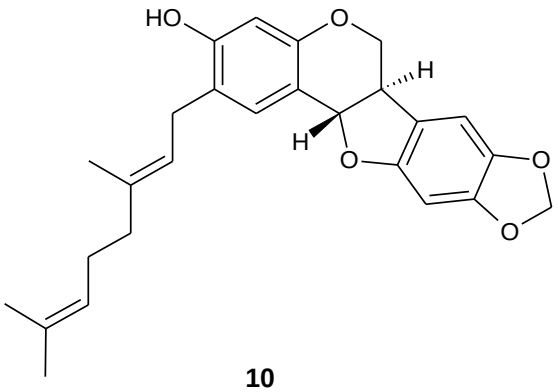
medicarpina

8



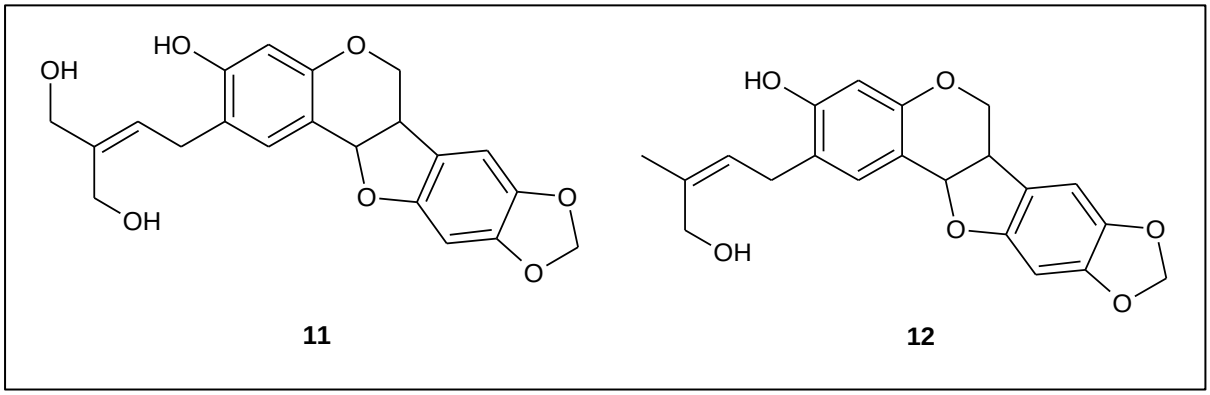
edunol

9



10

Figura 7- Estruturas 3 a 12 das substâncias isoladas de *H.brasiliana* Benth (continuação)



Além dos pterocarpanos, também foram isolados das raízes de *H. brasiliana* o flavonol quercetina (13) e a 7,3',4'-tri-hidroxi-6-(octa-2'',6''-di-enoil-3'',7''-di-metil)-flavanona (14), exibidos nesta página, e a chalcona 15, que possui atividade antifúngica, a isoflavona harpalicina II (16), e a isoliqueritigenina (17). Esta última substância é promissora contra certas linhagens de células tumorais, além de antioxidante e antiinflamatória (TAKAHASHI, 2004).

Figura 6- Estruturas 13 a 17 das substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth

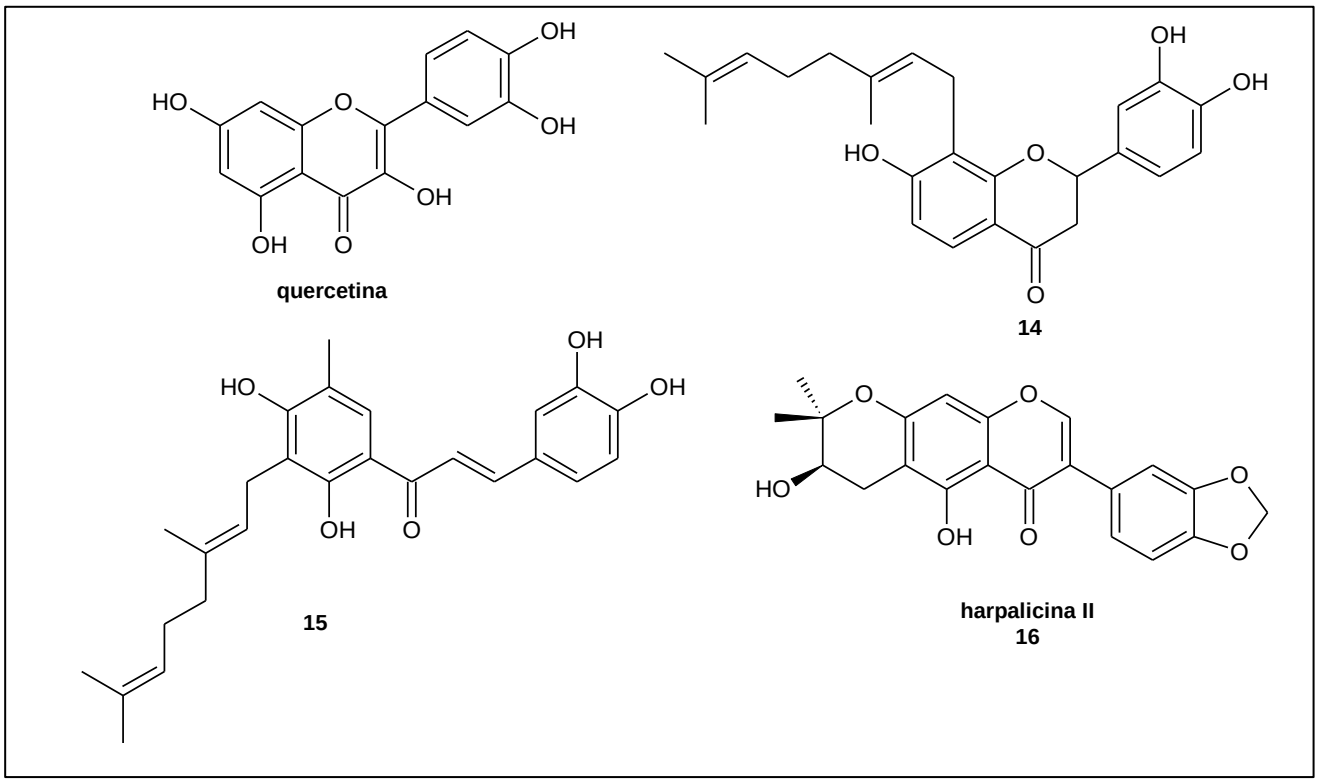
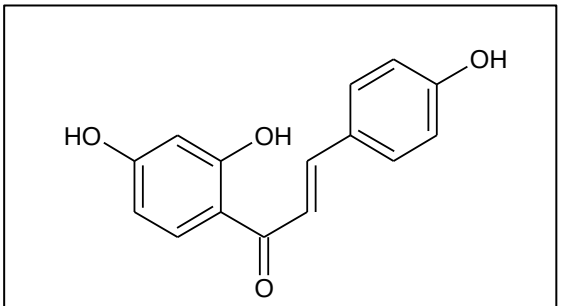


Figura 6- Estruturas 13 a 17 das substâncias isoladas de *H. brasiliana* Benth (continuação)

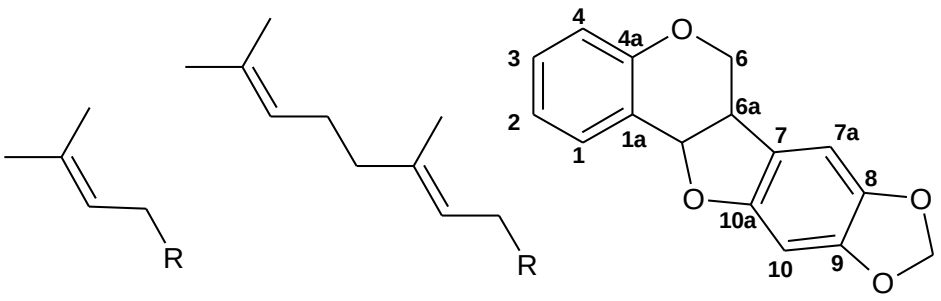


17
Isoliqueritigenina

Em Vieira et al (2008) há o relato da atividade antifúngica e anti radicais livres de 15, além da atividade tripanocida de 4´-dehidroxicabenegrina-AI (Estrutura 4) e também do pterocarpano 10.

Todas estas substâncias possuem atividades variadas, como citotóxica, antiofídica, antiviral e antimitótica, além da harpalicina I, 4´-dehidro-cabenegrina-A-I e leiocarpina apresentarem atividade contra determinadas linhas tumorais (MILITÃO et al, 2007). Sabe-se que a atividade antiofídica é derivada dos pterocarpanos prenilados que formam interações com sítios ativos de enzimas presentes no veneno de determinadas cobras, neutralizando-os. Um dos exemplos destas enzimas neutralizadas são as lipoxidases, que destróem tecido adiposo componente de membranas celulares. (XIMENES, 2012).

Quando se trata das atividades dos pterocarpanos, Militão (2007) afirma que a presença de substituinte metoxi em C-2 da estrutura básica abaixo, parece ser necessária para a atividade citotóxica. Mais adiante, afirma que pterocarpanos prenilados[2] nas posições C-2 ou C-4 são ativos nas propriedades antimitóticas , assim como a presença de hidroxila em C-3 parece não importar muito em relação a esta atividade biológica (ARAÚJO, 2008 e 2009) (MILITÃO et al, 2007).



substituinte prenila **substituinte geranila** **núcleo básico de pterocarpano**

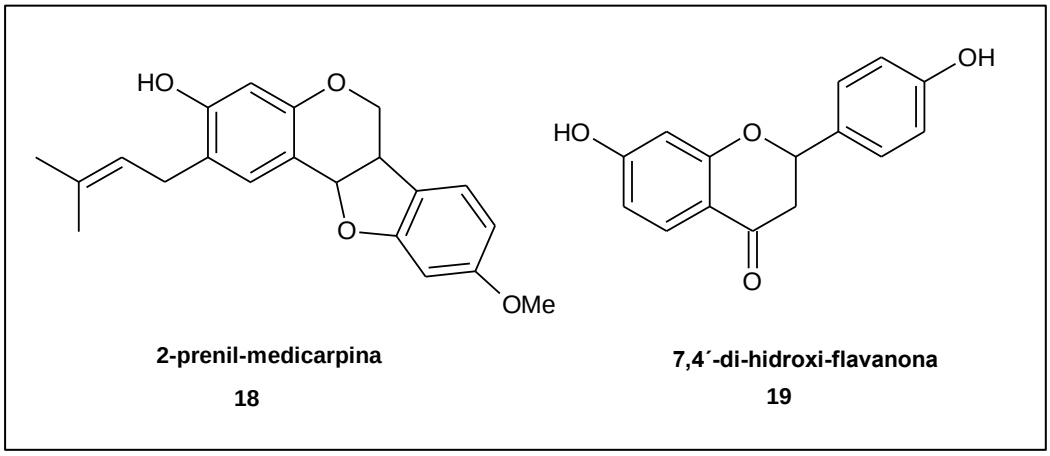
[2] Pterocarpanos ligados a substituintes prenila

Em relação à harpalicina II (16), Ximenes et al (2012) relata que esta substância inibe a atividade miotóxica e a formação de edemas, efeitos dos venenos de várias espécies de cobras. Esta atividade ocorre através da formação de ligações de hidrogênio entre a substância e sítios específicos das enzimas fosfolipases A_2 (PLA2). A ligação de hidrogênio deforma a geometria destas proteínas de tal forma que impede a ligação enzima-substrato, inutilizando-as para este fim.

2.1.2 Substâncias isoladas do lenho do caule de *Harpalyce brasiliana* Benth

Do lenho do caule já foram isoladas as substâncias 2-prenil-medicarpina (18), medicarpina (9), edunol (8), maackiaina (7) e 7,4´-dihidroxi-flavanona (19), (ARAÚJO, 2008), (AQUINO, ARAÚJO, SILVEIRA, 2009). A medicarpina é o isoflavonoide de maior ocorrência entre as Papilionoideae, constituindo também uma fitoalexina, classe de substâncias de defesa produzidas pela planta quando sob ataque de fungo ou bactéria patogênicos (BARBOSA, 2004).

Figura 7–Estruturas 18 e 19 das substâncias isoladas do lenho do caule de *H. brasiliana* Benth



2.1.3 Substâncias isoladas das sementes de *Harpalyce brasiliana* Benth

Para as sementes de *H. brasiliana* há poucos dados na literatura, como o relato da ocorrência dos alcalóides citisina, epibatifolina, anagirina, dentre outros. Neste mesmo estudo, são comparadas três espécies do gênero *Harpalyce* (*H. brasiliana, H. formosa e H. pringiei*),

sendo que todas demonstraram produzir alcalóides α-piridonas em diferentes quantidades e qualidades nas sementes (GREINWALD, 1996). O autor cita também a semelhança dos perfis de produção alcaloidal existente nos gêneros *Harpalyce* e *Brongnartia* com aqueles presentes em *Hovea, Lamprolobium, Plagiocarpos e Templetonia,* justificando a inclusão de *Harpalyce* na tribo Brongniarteae.

2.1.4 Substâncias isoladas das folhas de *Harpalyce brasiliana* Benth

Em relação às folhas de algumas espécies de *Harpalyce*, Greinwald (1996) relata a presença de alguns alcaloides em *H. formosa*, como epilupinina e de-hidro-epilupinina enquanto Militão et al (1994) relata atividade antimitótica para o extrato de folhas de *H. brasiliana.*

Em Araújo, (2008) é relatada a existência nas folhas de *H. brasiliana* dos flavonoides quercetina (estrutura 13), orientina (20), das isoflavonas 5,7-di-hidroxi-3',4'-metilenodioxi-isoflavona (estrutura 21) e harpalicina II (estrutura 16), que também possuem grande potencial de atividades biológicas, conforme vasta literatura disponível. Também foram isolados das folhas de *H. brasiliana* sete derivados de floroglucinol, 1-hexanoíl- 2',4,6-tri-hidroxi-3'metil-3'-(4-metil-3-pentenil)-benzopirano (22), 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'-metil- 3'-(3-hidroxi-4-metil-4-pentenil)-benzopirano (23), 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'-metil- 3'-(3-hidroxi-4-metil-4-pentenil)-benzopirano (24), 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]- 4,6-di-hidroxi-benzopirano (25) , 1-hexanoíl-[2',3']-furano-3'-metil-5'-(2-metil-propenil)-4,6-di-hidroxibenzopirano (26), 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'-metil-3'-(4-metil-4-hidroxi-3-pentenil)-benzopirano. (27) e 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'metil-3'-(4-metil-4-peróxido-2-pentenil)-Benzopirano (28). As estruturas 23 e 24 são epímeras. As estruturas dos floroglucinóis encontrados nas folhas estão resumidas na figura 8, que pode ser consultada na página 30.

Figura 8- Estruturas 20 a 28 de substâncias isoladas das folhas de *H. brasiliana* Benth

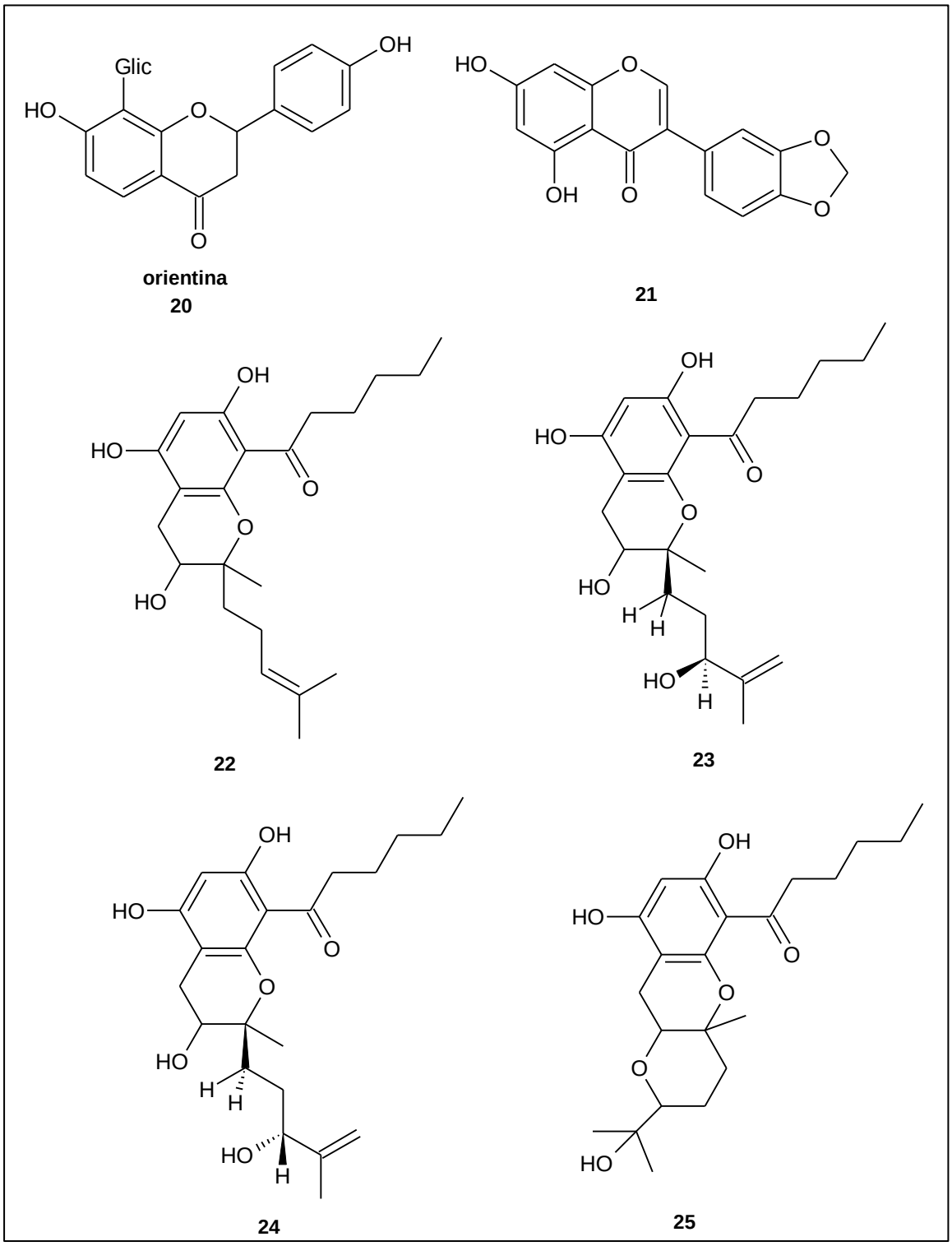
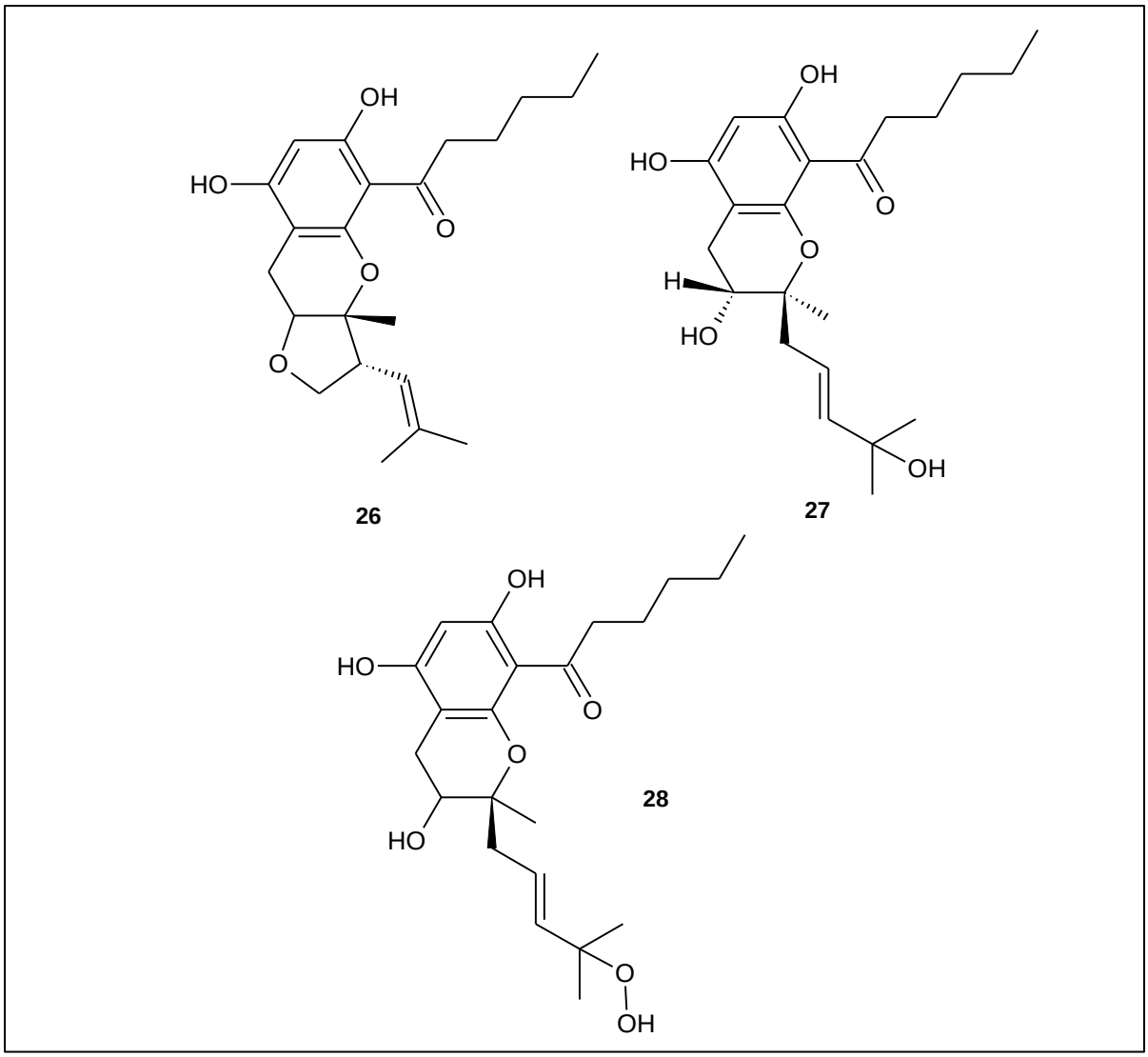


Figura 8- Estruturas 20 a 28 de substâncias isoladas das folhas de *H. brasiliana* Benth (continuação)



2.2- Sazonalidade da produção de metabólitos secundários

Um fator que deve ser considerado, quando da realização da pesquisa fitoquímica, é a variabilidade na produção de metabólitos pelos organismos, em diferentes épocas próprias de desenvolvimento da planta, ou épocas relacionadas a fatores externos. Os ciclos de produção de determinada substância podem ser anuais, trimestrais, mensais, até mesmo circadianos, além dos fatores geográficos influenciarem muito a produção. Fatores como carga genética, latitude, longitude, disponibilidade hídrica e de nutrientes, níveis de poluição, de radiação atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataques de herbívoros são cruciais para a determinação da produção biossintética da planta. Ainda que sejam espécies provenientes de

uma mesma área de coleta, os fatores de sazonalidade influenciam a produção dos metabólitos (GOBBO-NETTO e LOPES, 2007), (GOUVEA, 2010).

Plantas sob estado de estresse sofrem normalmente uma diminuição da fotossíntese e aumento de dissipação de energia, havendo assim a liberação de formas reativas de oxigênio como por exemplo, radicais livres (oxigênio atômico com um elétron desemparelhado na camada de valência), Isso se chama estresse oxidativo e efeitos climáticos de resfriamento ou aquecimento, assim como estresse hídrico, induzem a produção de substâncias protetoras que podem reagir e neutralizar essas formas reativas de oxigênio produzidas em. de corrência do stress.

Outro exemplo de variação nas produções se dá por conta de efeitos de substâncias alelopáticas, compostos muito pesquisados atualmente por sua importância na agricultura. São produzidos por determinadas plantas de forma a favorecer ou prejudicar outras espécies como ervas daninhas e competidores (AZCON-BIETO, 1996), (SILVA, 2004).

Mais um fator importante, que deve ser considerado durante avaliação e estabelecimento das substâncias produzidas pela planta, é a presença de fungos endofíticos, também produtores de substâncias variadas. Fungos endofíticos são microorganismos que habitam o interior das plantas, sem lhes causar danos aparentes, durante algum tempo do seu ciclo de vida (PETRINI, 1991). Fungos e bactérias presentes nas raízes de determinadas plantas e capazes de fixar o nitrogênio são muito estudados por sua importância na agricultura, diferentes dos endófitos de outras espécies de vegetais, para os quais o interesse científico despertou mais recentemente (SOUZA et al, 2004).

Embora os mecanismos das interações endófito/planta não estejam bem elucidados, nas situações simbióticas os microorganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários, normalmente vantajosos para a planta, por diminuir o ataque de insetos ou herbívoros, aumento da tolerância a estresses abióticos e controle de outros microorganismos. Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontradas bactérias e fungos endofíticos (CHAPLA, 2013). As substâncias produzidas por microorganismos deste tipo podem ser confundidas com aquelas provenientes da planta em si (ARAÚJO, 1996), (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996), (PEREIRA, 1993).

A investigação mais a fundo sobre a existência e identificação dos fungos endófitos que habitam a espécie e se eles seriam responsáveis por algumas das substâncias já isoladas da planta, se torna necessária para um estudo mais completo da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth.

Desta forma, a investigação contínua da espécie ao longo de algum tempo é necessária para a comprovação que determinada substância está de fato presente naquela planta, se é plausível prever futuramente a presença desta substância das outras coletas da mesma espécie. Para fins de produção e comercialização de produtos terapêuticos, é imprescindível o correto estabelecimento de todas as propriedades das substâncias da espécie utilizada, de forma que a identificação e quantificação sejam completas, sendo necessárias mais pesquisas a desenvolver na área.

Com as possibilidades de utilização para síntese, modificação estrutural e testes biológicos, as substâncias provenientes da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth são promissoras e devem ser continuadas as pesquisas com esta espécie, a fim de esclarecer todas as possibilidades em relação às variações sazonais e presença de fungos endofíticos. Considerando ainda a importância de ser uma espécie local cuja utilização na medicina popular coincide com os efeitos descritos cientificamente para os compostos. Os floroglucinóis isolados são promissores, além da substância inédita ser similar à harpalicina II, que é muito ativa biologicamente. Outros estudos com a espécie podem revelar resultados positivos como isolamento de mais substâncias, definições de produção sazonal, variabilidade na produção entre espécies selvagens e cultivadas, estudos de metabolômica, dentre outros.

3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho, as siglas utilizadas para a denominação das frações oriundas de uma coluna cromatográfica, e aquelas utilizadas para os solventes, serão organizadas da seguinte forma, por força das convenções na nomeação de frações e questões relativas à adaptação de texto:

Quando nos referirmos aos solventes utilizados nos experimentos, serão utilizadas as seguintes siglas: HEX (hexano), $CHCl_3$ (clorofórmio), AcOEt (acetato de etila), MeOH (metanol).

Quando nos referirmos aos nomes das frações das colunas cromatográficas, serão utilizadas as siglas: H (fração hexânica), Cl (fração clorolfórmica), Ac (fração de acetato de etila) e Aq (hidrometanólica). Como exemplos, temos HBFE-H e HBFE-Ac, respectivamente frações hexânica e acetato de etila, que serão detalhadas nas seções seguintes.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos da UFRN (LISCO- UFRN), as separações por CLAE, no CENAUREMN-UFC e os cálculos teóricos no LAMMSA-UFRN.

3.1 Métodos cromatográficos

Os experimentos visando o isolamento de substâncias da espécie, foram realizados através de métodos cromatográficos clássicos, como cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada e também cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.1.1. Cromatografia de Adsorção

Para a fase estacionária da cromatografia de adsorção foi empregado gel de sílica 60 (F μm 63-200) e de sílica 60 para cromatografia "flash" (F μm 40-63) da Merck. Itens como comprimento e diâmetro das colunas, assim como a quantidade de gel de sílica utilizada foram variáveis de acordo com as quantidades e tipos de amostras utilizadas. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob pressão média (cromatografia "flash") foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Para cromatografia de camada delgada (CCD), utilizou-se cromatoplacas de gel de sílica 60 sobre poliéster T-6145 da Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em variáveis proporções binárias. A revelação das substâncias nas cromatoplacas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366nm), realizada em aparelho artesanal, disponível no laboratório de isolamento e síntese de compostos orgânicos (LISCO-UFRN) e/ou por aspersão com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$) e ácido perclórico ($HClO_4$) em etanol (C_2H_6O), seguido de aquecimento em chapa a 100^oC por aproximadamente cinco minutos, ou ainda, por exposição a vapores de iodo.

3.1.2. Cromatografia de Exclusão

Os procedimentos para a cromatografia de exclusão foram realizados para a separação das frações mais polares da coluna inicial (que foram estocadas), utilizando como fase

estacionária o gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals e como fase móvel o solvente metanol grau P. A.da Merck.

3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a realização das separações através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizado o sistema Waters-1525, com bomba binária e detector UV-PDA Waters-2996 a 254 nm. As colunas utilizadas no sistema foram colunas XTerra® fase normal (4,6 x 250 mm, 5 μm) e XTerra® fase normal (10 x 250 mm, 10 μm), mantidas num forno termostático a 35°C. As amostras foram eluídas com a mistura binária Hex/AcOEt a 30% e fluxos de 0.9mL/min (coluna analítica) e 3,8 mL/min (coluna semi-preparativa) foram utilizados. Os solventes utilizados, grau HPLC, foram filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μm (Phenomenex) e degaseificados no sonicador a vácuo durante 10-15 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas com membranas de teflon com poros de 0,45 μm (Waters).

3.2 Métodos espectroscópicos

Para a determinação estrutural dos compostos encontrados foram utilizados métodos espectroscópicos uni e bidimensionais, hetero e homonucleares, tais como RMN^{1}H e RMN^{13}C, COSY, HSQC e HMBC.

Para a obtenção dos espectros de RMN, foram utilizados os espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou modelo Avance DRX-500, ambos localizados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). O espectrômetro Bruker Advance DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, foi operado nas freqüências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram aplicadas freqüências de 500,13 MHz (1H) e 125,75 MHz (13C), sob um campo magnético de 11,7 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais) e sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,5 mL de solvente deuterado, sendo utilizados os solventes clorofórmio ($CDCl_3$), metanol (CD_3OD), piridina (C_5D_5N) e DMSO

($(CD_3)_2SO$) adquiridos das companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich. O TMS foi utilizado como referência para os deslocamentos químicos (δ) em todos os espectros. Os deslocamentos foram expressos em partes por milhão (ppm) sendo exibidos nos espectros, pelos sinais dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (7,27 ppm), dimetil sulfóxido (2,50 ppm), metanol (3,31 ppm) e piridina (8,74, 7,58 e 7,22 ppm). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos dos solventes também foram exibidos: clorofórmio (77,23 ppm), dimetil sulfóxido (39,50 ppm), metanol (49,17 ppm) e piridina (150,35, 135,91, 123,87 ppm). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto), qui (quinteto), m (multipleto).

Nos experimentos de RMN^1H e RMN^{13}C unidimensionais, foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de 90^o de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C, respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65.356 pontos para a aquisição e 32.768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. A predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. O número de transientes variou de 8, para ^1H, a 16384, para ^{13}C, para os experimentos unidimensionais, e 2n (n=2) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: 1H (zg), 13CCPD (zgpg), 13C-DEPT 135° (dept135), gs-COSY (cosygp), gs-NOESY (noesygpph), gs-HSQC (hsqcgpph) e gs-HMBC (hmbclpndqf). A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135°, CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2, e 90°, somente CH, foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C, descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135 do espectro BB. Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY e NOESY) e heteronuclear (HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente

de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de *J* utilizados para os experimentos pertinentes foram $^{1}J_{H,C}$ = 145, $^{n}J_{H,C}$ =7, onde n ≥2.

3.3 Tratamento do material vegetal

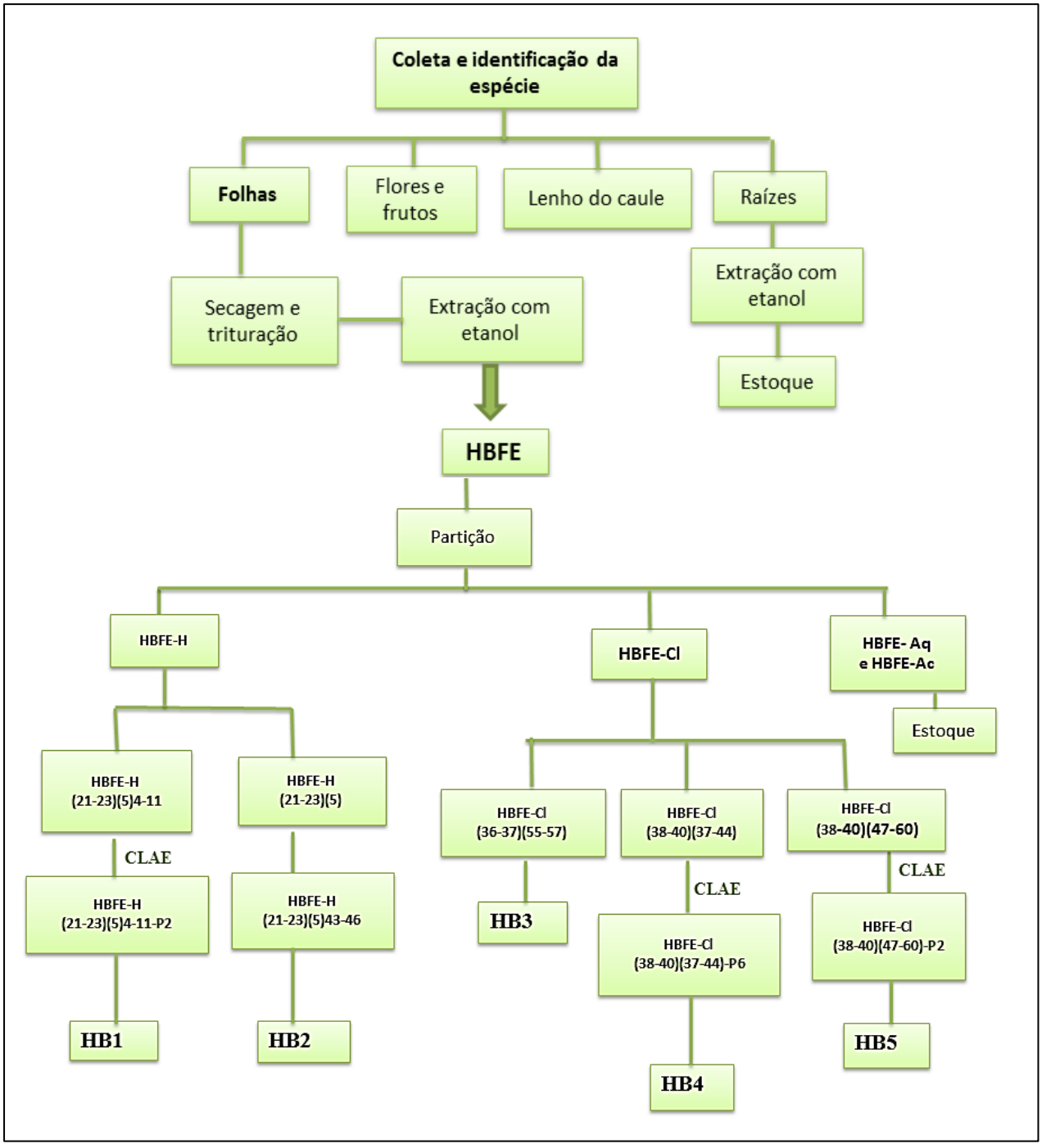
A espécie *Harpalyce brasiliana* Benth foi coletada no estado do Ceará (município de Barbalha), pelo professor Edilberto Rocha Silveira, e identificada no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. O responsável pela identificação foi o Prof. Edson de Paula Nunes, botânico do Herbário Prisco Bezerra, onde foi depositada a exsicata (voucher) da espécie, sob o número de registro 32525.

As partes de interesse da planta foram secas à temperatura ambiente e posteriormente trituradas em uma forrageira. O material foi então embalado e trazido para o laboratório, onde foi realizada a extração etanólica.

3.4 Análise fitoquímica

As folhas de *H. brasiliana* foram submetidas aos processos de secagem e moagem, descritas na seção 3.3. Em seguida, 890g deste material foram imersos em etanol por três dias (extração a frio) e o extrato evaporado sob pressão reduzida. O procedimento foi repetido duas vezes com o mesmo bagaço. No total, foram utilizados 9,0 litros de etanol, sendo então os três extratos reunidos e chamados de HBFE (*Harpalyce brasiliana* Extrato Etanólico), para dar sequência aos procedimentos de separação. Foi realizada também a extração etanólica de uma pequena quantidade das raízes da espécie, que foi nomeada HBRE e estocada para uso posterior. Os procedimentos podem ser visualizados no fluxograma da figura 9.

Figura 9- Fluxograma dos procedimentos experimentais



3.4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *Harpalyce brasiliana*

Uma alíquota do extrato foi utilizada para realizar a partição das substâncias presentes. Para tanto, 21,4 g do extrato etanólico foram dissolvidos em 25,0 ml de metanol e

acondicionados em um funil de separação de 500,0 ml. Então foram sucessivamente adicionados 3 x 100,0 ml de cada solvente (hexano, clorofórmio, acetato de etila), em ordem crescente de polaridade, sendo cada fração recolhida em um erlenmeyer separado. Cada fração resultante da partição foi seca sob pressão reduzida, fornecendo então as subfrações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e um resíduo hidrometanólico, respectivamente nomeadas como HBFE-H, HBFE-Cl, HBFE-Ac e HBFE-Aq. Os dados da partição podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1- Dados da partição realizada com HBFE

Fração da partição	**Massa resultante (g)**
HBFE-H	2,04
HBFE-Cl	9,10
HBFE-Ac	4,03
HBFE-Aq	2,26

As frações HBFE-H e HBFE-Cl foram posteriormente utilizadas em métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e em coluna (CC), rendendo diversas subfrações. Estas foram analisadas através de CCD para a escolha dos sistemas de solventes e das colunas cromatográficas adequadas nas separações posteriores. As frações mais polares como HBFE-Ac e HBFE-Aq foram apropriadamente estocadas.

3.4.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H

A partir de 2,037g da fração HBFE-H foi feita uma primeira coluna cromatográfica empacotada com 19,5 g de sílica comum e hexano, com altura de 7,5 cm e diâmetro de 2,5 cm. A eluição foi gradiente, com o sistema de solventes inicial sendo a mistura binária hexano/clorofórmio 20%, com polaridade crescente, até acetato de etila puro. A coluna rendeu 23 frações (Tabela 2), que foram reunidas de acordo com similaridades nas placas de CCD.

Tabela 2– Dados de eluição da coluna HBFE-H

Eluente	**Volume (ml)**	**Fração correspondente**
HEX/$CHCl_3$ 80:20	300,0	1-3

Tabela 2- continuação

HEX/$CHCl_3$ 50:50	100,0	4
HEX/$CHCl_3$ 40:60	50,0	5-10
HEX/$CHCl_3$ 30:70	300,0	10-20
AcOEt 100%	130,0	21-23

Oriundas desta coluna, as frações 21 a 23 foram reunidas para realizar uma separação cromatográfica com empacotamento e eluição semelhantes a esta coluna.

3.4.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)

Foram utilizados os 0,5629g da fração HBFE-H(21-23) para realizar uma separação em coluna aberta, cuja altura era 30 cm e diâmetro de 2 cm, tendo sido empacotada com sílica comum e hexano. A eluição foi gradiente, iniciando com a mistura binária hexano/acetato de etila a 20%, com polaridade crescente, até atingir 100% de acetato de etila. Foram então obtidas 13 frações, que foram reunidas (Tabela 3) conforme os aspectos das CCDs realizadas.

Tabela 3– Dados de eluição da coluna HBFE-H (21-23)

Eluente	Volume (ml)	Fração correspondente
HEX/ AcOEt 80:20	100,0	1-3
HEX/ AcOEt 70:30	150,0	4-6
HEX/ AcOEt 60:40	100,0	7-8
HEX/ AcOEt 40:60	100,0	9-10
AcOEt 100%	50,0	11
MeOH 100%	100,0	12-13

A fração 5 desta coluna, denominada HBFE-H (21-23)(5) foi então utilizada para realizar mais uma separação cromatográfica, devido à provável presença de floroglucinóis de interesse.

3.4.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)(5)

A fração denominada HBFE-H (21-23)(5), com 146,3 mg foi então utilizada para realizar mais uma separação cromatográfica, desta vez numa coluna com 21,01g de sílica flash, altura de 18 cm e diâmetro de 2 cm, empacotada com hexano. A eluição foi gradiente, iniciando com hexano/acetato 20% e polaridade crescente (Tabela 4).

Tabela 4– Dados de eluição da coluna HBFE-H (21-23)(5)

Eluente	Volume (ml)	Fração correspondente
HEX/AcOEt 80:20	75,0	1-3
HEX/AcOEt 70:30	150,0	4-27
HEX/AcOEt 60:40	75,0	28-34
HEX/AcOEt 50:50	150,0	35-47
AcOEt 100%	80,0	48-51
AcOEt/MeOH 50:50	50,0	52
MeOH 100%	50,0	53-54

A coluna rendeu 54 frações que, após análise em CCD, foram adequadamente reunidas.

As frações de número 4-11 foram observadas por CCD (com mistura de HEX/AcOEt a 40% como eluente), resultando na observação de manchas intensas vermelhas (após revelação com vanilina) e visíveis na luz UV (254 e 356nm). Posteriormente, foram reunidas e a resultante injetada em sistema CLAE. Os resultados podem ser verificados na seção 4.2.1.1.1.1.

3.4.1.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)(5)(4-11)

A fração HBFE-H (21-23)(5)(4-11), contendo 50,0 mg, inicialmente foi utilizada para estabelecer o método para o seu fracionamento em CLAE. Para tanto, 1,0 mg da amostra foi solubilizada em 1,0 ml da mistura hexano/acetato de etila 30% e então injetada no sistema, utilizando coluna analítica X-terra de sílica (diâmetro 1,0 cm), fluxo de 0,9 ml/min e loop de 20 µl. A eluição foi isocrática, com a proporção de solventes hexano/acetato de etila 30% e fluxo de 1,0 ml/min.

Após o estabelecimento dos métodos, para a etapa preparativa foi utilizada uma coluna semi-preparativa X-Terra de sílica comum (diâmetro de 4,5cm) com loop de 200µl e fluxo de 3,8 ml/min. A massa da amostra foi 36,9 mg e o procedimento cromatográfico resultou na coleta de três frações, correspondentes aos picos 1,2 e 3 do cromatograma mais a purga.

3.4.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl

A partir de 4,0134g da fração HBFE-Cl foi realizada uma coluna cromatográfica do tipo flash, com 51,86g de sílica flash com altura de 25 cm e diâmetro de 4 cm, empacotada com sílica flash e hexano. A eluição foi gradiente, iniciando com hexano puro e aumentando a polaridade da mistura binária através da adição crescente de acetato de etila (tabela 5).

Tabela 5- Dados de eluição da coluna HBFE-Cl

Eluente	Volume (ml)	Fração correspondente
HEX 100%	150,0	1-2
HEX/AcOEt 95:5	250,0	3-11
HEX/AcOEt 90:10	400,0	12-29
HEX/AcOEt 80:20	200,0	30-37
HEX/AcOEt 60:40	200,0	38-44
HEX/AcOEt 40:60	100,0	45-49
AcOEt 100%	100,0	50
AcOEt/ MeOH 50:50	100,0	51-52
MeOH 100 %	50,0	53-54

Após a análise das placas de CCD sob luz UV e após revelação com solução de vanilina em ácido perclórico, algumas frações foram reunidas, conforme podemos ver na tabela 5.

Após mais análises por CCD (com eluente $CHCl_3$ e MeOH 5%) em luz UV e sob revelação com vanilina, pudemos verificar que as frações 36–40 apresentavam as manchas avermelhadas características dos floroglucinóis. Uma análise mais minuciosa permitiu reunir as frações 36 a 37 e 38 a 40 para realizar posteriores separações cromatográficas. As frações 38 e 39 apresentaram um precipitado branco amorfo denominado **HB3** que, após retirada da

solução da amostra, secagem e a realização dos espectros de RMN, pôde ser identificado como a substância harpalicina II (estrutura 16).

3.4.1.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (36+37)

A fração HBFE-Cl (36+37), com 0,1097g foi submetida ao fracionamento cromatográfico em uma coluna preparada (empacotada) com 26,05 g de sílica flash e hexano, possuindo altura de 32 cm e diâmetro de 2 cm. A eluição foi gradiente, iniciando com o sistema hexano/acetato 5% e polaridade crescente até chegar a metanol puro (tabela 6)

Tabela 6- Dados de eluição da coluna HBFE-Cl (36+37)

Eluente	Volume (ml)	Fração correspondente
HEX/AcOEt 95:5	150,0	1-25
HEX/AcOEt 90:10	150,0	26-54
HEX/AcOEt 80:20	300,0	54-60
HEX/AcOEt 20:80	100,0	60-61
AcOEt/MeOH 50:50	50,0	62-63
MeOH 100%	50,0	64

As frações 55-57 foram analisadas por CCD, reunidas e seus espectros de RMN foram obtidos, confirmando que apenas uma substância estava presente.

3.4.1.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)

A reunião das frações 38-40 (após a retirada do precipitado de 38+39, descrita no item 3.4.1.2**)** rendeu 0,8808 g, que foram utilizados em uma nova separação cromatográfica. Desta vez, a coluna foi empacotada com 26,85g de sílica flash, tinha 2 cm de diâmetro e 32cm de altura. A eluição foi gradiente, iniciando com hexano puro e aumentando a polaridade com a adição crescente de acetato de etila (tabela 7).

Tabela 7– Dados de eluição da coluna HBFE-Cl (38-40)

Eluente	Volume (ml)	Fração correspondente
HEX 100%	100,0	1-7
HEX/AcOEt 90:10	300,0	8-17
HEX/AcOEt 85:15	400,0	18-28
HEX/AcOEt 80:20	200,0	29-33
HEX/AcOEt 75:25	100,0	34-38
HEX/AcOEt 50:50	150,0	39-49
AcOEt 100%	100,0	50-63
MeOH 100%	100,0	63-75

Após análise de CCD sob luz UV e revelação da cromatoplaca com solução ácida de vanilina, algumas frações foram reunidas. Após nova avaliação das placas de CCD, com presença de manchas avermelhadas intensas, foi constatado que tanto a fração (37-44), como a (47-60) possuíam floroglucinóis que poderiam ser interessantes, além de massa suficiente para uma separação posterior.

Assim, foi realizado para as duas amostras o posterior isolamento por CLAE, rendendo mais quatro compostos não inéditos e um inédito, com procedimentos descritos a seguir.

3.4.1.2.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)

Para o fracionamento cromatográfico das substâncias presentes nesta fração, foram solubilizados 105,0 mg da amostra em 10 ml da mistura de solventes HEX/AcOEt 30% e utilizada uma coluna semi-preparativa X-Terra de sílica comum (diâmetro de 4,5cm) com loop de 200µl, eluída sob um fluxo de 3,8 ml/min da mesma proporção de solventes. Foram coletadas 6 frações mais a purga.

A fração relacionada ao pico 6 da separação dos componentes de HBFE-Cl (38-40) (37-44) demonstrou conter uma substância inédita na literatura. A fração relacionada ao pico 5 de de HBFE-Cl (38-40)(37-44) foi posteriormente separada cromatograficamente por CLAE.

3.4.1.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44) (P5)

A fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)(P5) continha 36,9 mg e foi estabelecido o método para o seu fracionamento em CLAE. Para tanto, 1,0 mg da amostra foi solubilizada em 1,0 ml da mistura hexano/acetato de etila 70:30 e então recromatografada utilizando coluna analítica X-terra de sílica (diâmetro 1,0 cm) e loop de 20 µl. A eluição foi isocrática, com a proporção de solventes hexano/acetato de etila 30% e fluxo=1,0 ml/min.

Após este estabelecimento dos métodos, para a etapa preparativa foi utilizada uma coluna semi-preparativa X-Terra de sílica comum (diâmetro de 4,5cm) com loop de 200µl e fluxo de 3,8 ml/min. A massa da amostra foi 36,9 mg. O procedimento cromatográfico resultou na coleta de 3 frações, correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma mais a purga.

Após a análise dos espectros dos 3 picos do cromatograma, temos que o principal P2 corresponde à mesma substância nomeada **HB2**. Comparando os dados das outras substâncias isoladas de *H. brasiliana*, constatou-se que era de fato a 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-benzopirano. Os outros picos possuíam uma resolução baixa, além de quantidade insuficiente para novos procedimentos de cromatografia, sendo então estocados.

3.4.1.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(47-60)

A fração HBFE-Cl (38-40)(47-60) continha 95,0 mg e foi estabelecido o método para o seu fracionamento em CLAE. Para tanto, 1,0 mg da amostra foi solubilizado em 1,0 ml da mistura hexano/acetato de etila 70:30 e então novamente separada por CLAE, utilizando coluna analítica X-terra de sílica (diâmetro 1,0 cm) e loop de 20 µl. A eluição foi isocrática, com a proporção de solventes hexano/acetato de etila 30% e fluxo de 1,0 ml/min.

Após este estabelecimento dos métodos, para a etapa preparativa foi utilizada uma coluna semi-preparativa X-Terra de sílica comum (diâmetro de 4,5cm) com loop de 200µl e fluxo de 3,8 ml/min. O procedimento cromatográfico resultou na coleta de 3 frações, correspondentes aos picos 1,2 e 3 do cromatograma, mais a purga.

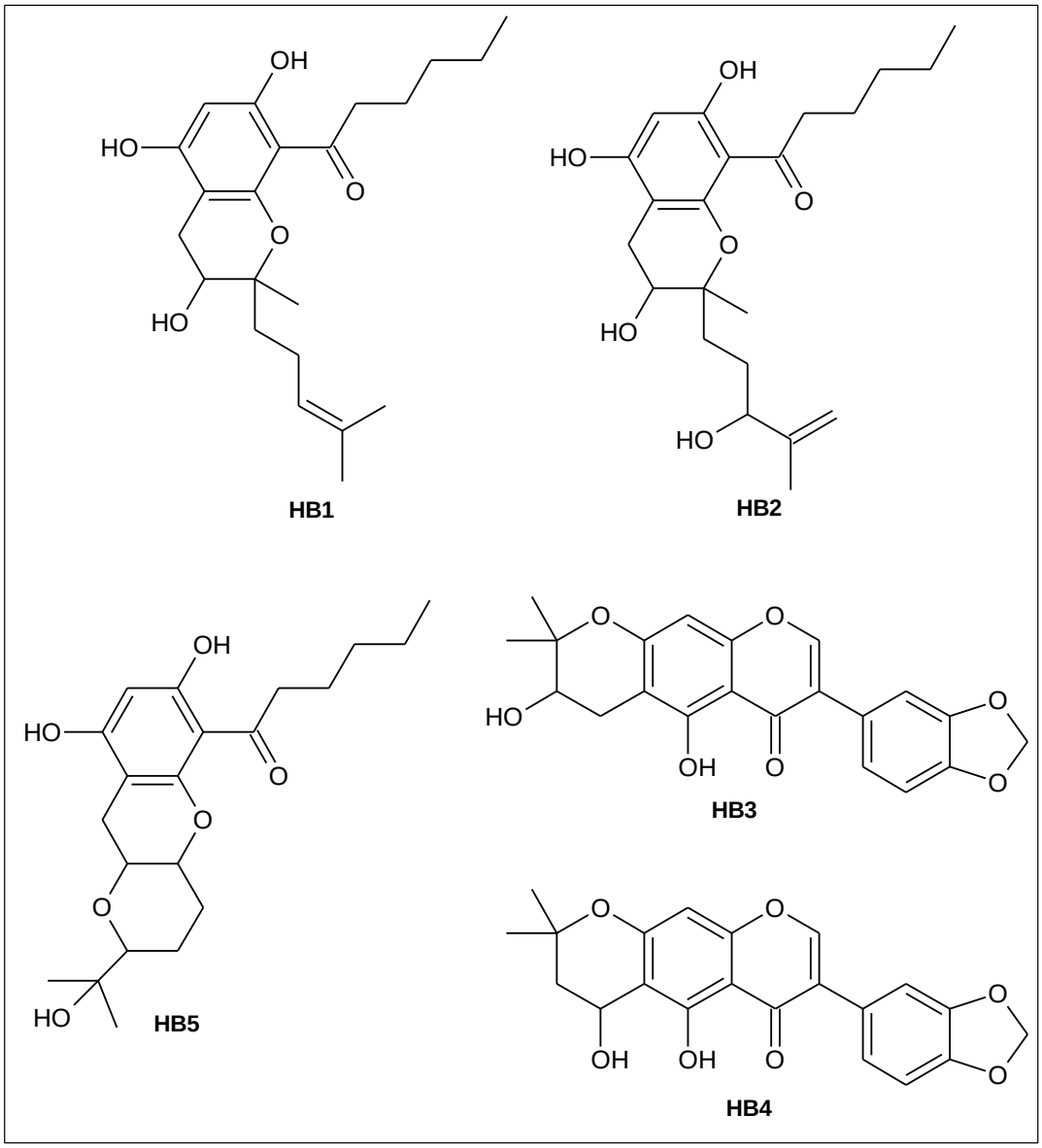
3.5 Procedimentos de Química teórica

Os cálculos foram realizados utilizando o sistema computacional em sistema operacional Linux, com conjunto de programas Gaussian, além do Chemcraft e AIM2000. O método e conjunto de bases utilizados foram b3lyp/6-311++ g (d, p). Para uma melhor descrição dos procedimentos gerais desta parte, consultar o apêndice da dissertação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do extrato etanólico das folhas de *Harpalyce brasiliana* Benth (nomeado como HBFE), foram isolados três derivados do floroglucinol, a isoflavona harpalicina II e uma substância inédita na literatura, a isoflavona HB4 (Quadro 1). De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, esta espécie é fonte prolífica de isoflavonoides, sendo esperado o isolamento desta classe. Já os floroglucinóis são substâncias incomuns na família Leguminoseae, sendo isolados apenas por Araújo (2008). O isolamento desta classe de compostos de *H. brasiliana* ratifica que estas substâncias fazem parte do metabolismo secundário desta espécie.

Quadro 1 - Substâncias isoladas de *Harpalyce brasiliana* Benth neste trabalho



4.1-Resultados dos procedimentos de extração e partição

Uma porção de 890,0 g de folhas de *H. brasiliana* foi utilizada para produzir o extrato etanólico, cujo rendimento foi de 6,0%. As raízes também foram utilizadas para uma extração eatnólica, que foi posteriormente estocada. Como neste trabalho não foram desenvolvidos métodos experimentais com este extrato, seu rendimento será incluído apenas a título de comparação entre os rendimentos dos extratos etanólicos de folhas e raízes. Estes podem ser visualizados na tabela 8.

Uma alíquota do extrato etanólico das folhas foi utilizada para realizar a partição com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol-água, com rendimento total igual a 81,5%, conforme podemos ver na tabela 9.

Tabela 8- Rendimento das extrações etanólica de folhas e raízes de *H. brasiliana*

Nome do Extrato	**Material vegetal (g)**	**Massa do extrato (g)**	**Rendimento (%)**
HBFE	890,0	53,1	6,0 %
HBRE	25,6	1,1	4,3 %

Tabela 9- Dados da partição realizada com HBFE

Fração da partição	**Massa resultante (g)**
HBFE-H	2,04
HBFE-Cl	9,10
HBFE-Ac	4,03
HBFE-Aq	2,26
Massa total: 17,4364g Massa inicial de extrato: 21,3991g Rendimento: 81,5%	

4.2-Resultados dos procedimentos cromatográficos

4.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H

A fase hexânica, resultante da partição, rendeu duas subtsâncias derivadas de floroglucinol, as substância HB1, oriunda de HBFE-H (21-23) (5)4-11 e HB2, oriunda de HBFE-H (21-23) (5) 43-46. Os procedimentos estão descritos no capítulo 3 e os resultados das colunas que forneceram as substâncias estão descritos a seguir.

A fração HBFE-H correspondente à fase hexânica da partição foi utilizada para realizar uma coluna filtrante. Os resultados estão exibidos na tabela 10.

Tabela10 – Dados da separação cromatográfica de HBFE-H

Fração	**Massa (mg)**
1-6	530,7
7-11	194,9
12-16	507,9
17-20	146,1
21-23	562,9
Massa total: 1,9425 g	
Rendimento: 95,36%	

Algumas subfrações possivelmente possuíam floroglucinóis, de acordo com a análise das placas de CCD, porém, a pequena massa foi limitante na escolha das mesmas. Foram utilizadas as frações 21 a 23 para realizar outra separação cromatográfica, cujos resultados estão descritos na seção seguinte.

4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23)

Da coluna anterior, foram reunidas e utilizadas as frações 21 a 23 para realizar uma separação cromatográfica com empacotamento e eluição semelhantes, cujo rendimento está exibido na tabela 11.

Tabela 11– Dados da separação cromatográfica de HBFE-H (21-23)

Fração	Massa (mg)
1-3	16,7
4	55,3
5	146,3
6-9	141,7
10-13	107,3
Massa total: 515,8 mg	
Rendimento: 91,63%	

A subfração mais promissora foi a de número 5, denominada HBFE-H (21-23) (5), escolhida de acordo com análise em CCD pelas manchas avermelhadas e Rf diferente das outras subfrações, sendo assim utilizada em outra separação cromatográfica, cujos resultados estão na próxima seção. .

4.2.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23) (5)

A subfração 5 da coluna HBFE-H (21-23) foi isolada em massa suficiente para realizar uma nova coluna, sendo que a placa de CCD indicava presença de floroglucinóis quase puros.

Tabela 12– Dados da separação cromatográfica de HBFE-H (21-13)(5)

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
1-3	1,8	23-33	8,3
4-11	63,6	34-42	14,0
12-14	2,4	43-46	11,3
15-22	3,9	47-54	34,1
Massa total: 139,4 mg			
Rendimento: 95,28%			

As subfrações de número 43-46 revelaram manchas visíveis na lâmpada UV (254 e 365 nm) e, após a revelação com vanilina e aquecimento, manchas avermelhadas intensas, com Rf exclusivo (único na placa de CCD), indicando a existência de apenas uma substância

relativa àquele Rf. A substância consistiu em um líquido amarelado e viscoso e foi enviada para a obtenção dos espectros de RMN^{13}C e RMN^{1}H no CENAUREMN-UFC, resultando na identificação da substância como a 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-enzopirano, denominada aqui de **HB2**.

4.2.1.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-H (21-23) (5) (4-11)

As subfrações de número 4-11 da coluna HBFE-H (21-23)(5) foram observadas por CCD (com mistura de HEX/AcOEt a 40% como eluente), resultando na observação de manchas visíveis na luz UV (254 e 356 nm) e após revelação com vanilina, manchas intensas avermelhadas, aparentemente puras, com a sugestão da presença de uma substância apenas. Assim, as mesmas foram reunidas, mas devido à pequena quantidade disponível, a separação de seus componentes foi realizada por sistema CLAE, cujo cromatograma e tabela de rendimentos estão dipostos a seguir.

Figura 10 - Cromatograma da fração HBFE-H (21-23) (5)(4-11) obtido em CLAE (265nm)

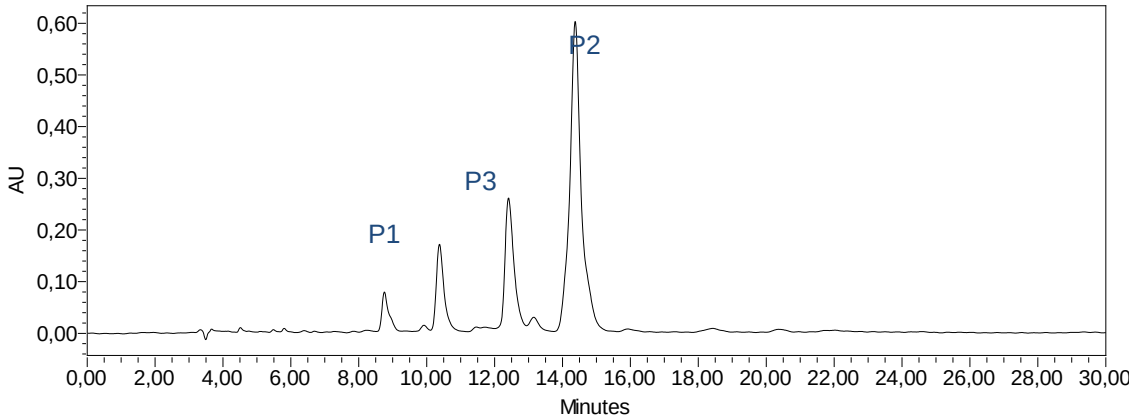


Tabela 13- Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-H (21-23) (5) (4-11), (254nm)

Fração	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)
P1	10,4	0,8
P2	14,5	7,3
P3	12,6	3,8
Purga		30,0
Massa total: 41,9 mg Rendimento: 83,8 %		

A subfração HBFE-H (21-23)(5)(4-11)-P2 foi avaliada por espectroscopia de RMN e identificada como 1-hexanoíl- 2',4,6-trihidroxi-3'metil-3'benzo-(3-hidroxi-4-metil-3-pentenil)- benzopirano, sendo denominada neste trabalho como **HB1**. A análise espectroscópica da substância pode ser consultada na seção 4.3.

4.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl

Através da literatura sabe-se que a fração clorofórmica resultante da partição do extrato etanólico de *Harpalyce brasiliana* normalmente reúne algumas das substâncias de interesse, como floroglucinóis e isoflavonas. Assim, além da quantidade de massa considerável para realizar uma coluna, esperava-se encontrar estas substâncias nesta fração. Portanto, a fração HBFE-Cl, utilizada para separação cromatográfica do tipo flash, resultou em 54 subfrações, com resultados descritos na tabela14.

Tabela 14– Dados da separação cromatográfica de HBFE-Cl

Fração	**Massa (mg)**	**Fração**	**Massa (mg)**
1-4	23,9	30-35	174,3
5-9	25,9	36+37	109,7
10-12	34,5	38-40	916,4
13-18	155,5	41-45	191,7
19-23	93,8	46-50	427,0
24-29	193,9	51-54	538,0
Massa total: 2,8507 g			
Rendimento:71,02%			

Após análise por CCD (com a mistura $CHCl_3$ e MeOH 5% como eluente) em luz UV e sob revelação com vanilina, as frações resultantes foram reunidas de acordo com similaridades visuais e verificadas nas placas de CCD, gerando 12 subfrações. Pudemos verificar que as frações 36–40 apresentavam as manchas avermelhadas características dos floroglucinóis. Uma análise mais minuciosa permitiu reunir as frações 36 a 37 e 38 a 40 para realizar posteriores separações cromatográficas. As frações 38 e 39 apresentaram um precipitado branco amorfo denominado **HB3** e que, após a realização dos espectros de RMN, pôde ser identificado como a substância Harpalicina II (estrutura 16).

4.2.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (36+37)

A fração HBFE-Cl (36+37) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em uma coluna flash, com posterior análise por CCD e reunião de algumas frações. Os resultados estão presentes na tabela 15.

Tabela 15– Dados da separação cromatográfica de HBFE- Cl (36+37)

Fração	**Massa (mg)**
1-5	10,2
6-20	8,6
21-37	14,3
38-43	5,3
44-54	9,4
55-57	13,3
58-61	11,2
62-64	23,7
Massa total: 96,0 mg Rendimento: 87,5%	

As frações 55-57 foram analisadas por CCD, reunidas e seus espectros de RMN foram obtidos, confirmando que apenas uma substância majoritária estava presente. Denominada aqui de **HB3**, após elucidação e comparação dos espectros pudemos concluir que a substância em questão era a Harpalicina II, também isolada neste trabalho a partir de outras duas frações de HBFE-Cl.

4.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)

A reunião das frações 38-40 (após a retirada do precipitado de 38+39) rendeu 0,8808g, que foram utilizados em uma nova separação cromatográfica. Após análise em CCD sob luz

UV e revelação da cromatoplaca com solução ácida de vanilina, algumas frações foram reunidas conforme tabela 16, que também exibe rendimento da coluna.

Tabela 16– Dados da separação cromatográfica de HBFE-Cl (38-40)

Fração	**Massa (mg)**	**Fração**	**Massa (mg)**
1-4	18,4	36	12,0
5-10	9,5	37-44	321,0
11-17	16,7	47-60	349,0
18-28	16,8	61-66	11,5
29-35	39,8	67-75	17,5
Massa total: 812,2 mg			
Rendimento: 92,2%			

Após a avaliação das placas de CCD, com presença de manchas avermelhadas intensas foi constatado que tanto a subfração (37-44), como a (47-60) possuíam floroglucinóis (Os Rfs eram diferentes em uma mesma mancha, indicando que mais de uma substância estava presente) que poderiam ser interessantes e também massa suficiente para uma separação posterior. Assim, foi realizado nas amostras HBFE-Cl (38-40)-37-44 e HBFE-Cl (38-40)-(47-60), o posterior isolamento por CLAE, rendendo mais dois compostos não inéditos e um inédito na literatura.

4.2.2.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)

Para o fracionamento cromatográfico das substâncias presentes nesta fração, foram coletadas seis frações mais a purga.

Tabela 17- Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40)(37-44)

Fração	**Tempo de retenção (min)**	**Massa (mg)**
P1	Até 9,4 (Mistura)	6,8
P2	9,5	1,0
P3	11,1	3,6
P4	11,6	0,5
P5	14,5	36,9
P6	15,8	9,9
PURGA		22,6
Massa total:81,3 mg		
Rendimento:77,4%		

A fração relacionada ao pico 6 da separação dos componentes de HBFE-Cl (38-40)(37-44) continha a substância inédita na literatura 5,4´´di-hidroxi- 3´,4´- metilenodioxi-7,8:6´´,5´´-2´´,2´´-dimetilpirano-isoflavona, nomeada neste trabalho como **HB4**. A fração relacionada ao pico 5 de de HBFE-Cl (38-40)(37-44) foi novamente separada cromatograficamente por CLAE.

4.2.2.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44)P5

Após o estabelecimento de métodos de separação em CLAE para a fração HBFE-Cl (38-40) (37-44) (P5), foi realizada a etapa preparativa, cujo procedimento cromatográfico resultou na coleta de três frações, correspondentes aos picos 1,2 e 3 do cromatograma, mais a purga, conforme cromatograma abaixo (Figura 11). Os dados relativos ao rendimento da coluna estão dispostos na tabela 18.

Figura 11 - Cromatograma da fração HBFE-Cl (38-40)(37-44) (P5) obtido em CLAE (265nm)

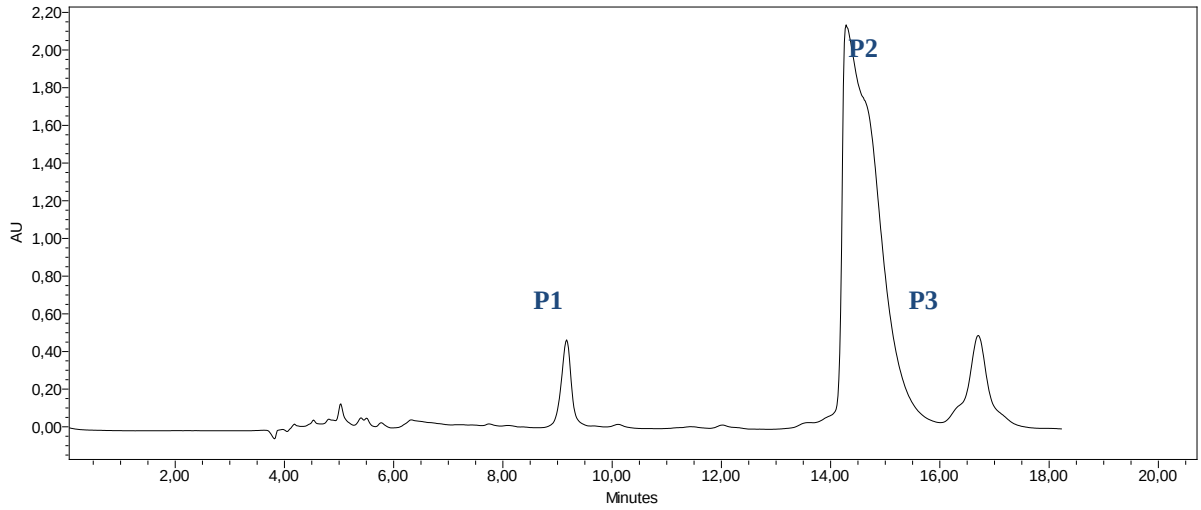


Tabela 18- Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40)(37-44) (P5)

Fração	**Tempo de retenção (min)**	**Massa (mg)**
P1	8,8	4,1
P2	14,2	8,3
P3	16,5	7,2
PURGA		10,3
Massa total: 29,9 mg		
Rendimento: 81,03 %		

Após a análise dos espectros dos três picos do cromatograma, temos que o principal, P2, corresponde à mesma substância nomeada **HB2**. Comparando os dados das outras substâncias isoladas *de H. brasiliana*, constatou-se que era de fato a 1-hexanoíl-[2’,3’]-pirano-3’-metil-6’-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-benzopirano. Os outros picos possuíam uma resolução baixa, além de quantidade insuficiente para novos procedimentos de cromatografia, sendo então estocados.

4.2.2.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração HBFE-Cl (38-40)(47-60)

Após o estabelecimento dos métodos de separação em CLAE para a fração HBFE-Cl (38-40)-(47-60), suas amostras foram injetadas, resultando na coleta de 3 frações, correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma mais a purga (Figura 12).

Figura 12– Cromatograma de CLAE da fração HBFE-CL(38-40)(47-60) - 263,80 nm

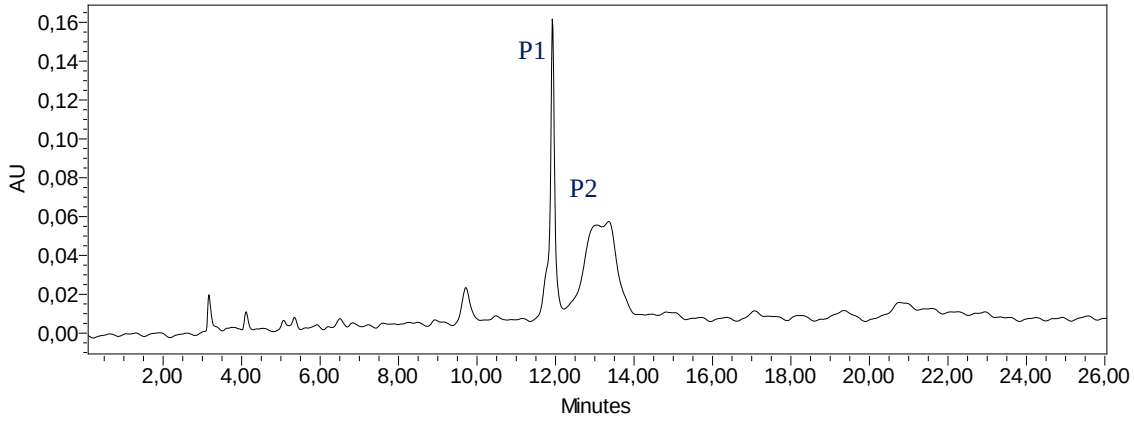


Tabela 19 - Dados cromatográficos do fracionamento de HBFE-Cl (38-40)(47-60)

Fração	**Tempo de retenção (min)**	**Massa (mg)**
P1	12	14,0
P2	13	8,3
PURGA		52,0
Massa total: 74,3mg		
Rendimento: 77 %		

Embora o pico P1 possua resolução boa, o espectro de RMN do mesmo não apresentou boa qualidade para elucidação estrutural. Após a análise dos cromatogramas e dos espectros de RMN obtidos, foi possível a identificação estrutural da substância relativa ao pico P2 do cromatograma, que é nomeada neste trabalho como **HB5** e cujo nome sistemático é 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-benzopirano. O perfil espectral se mostou muito semelhante aos perfis de HB1 e HB2.

4.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas de HBFE

A partir do extrato etanólico das folhas de *Harpalyce brasiliana* Benth, foram isolados três derivados de floroglucinol, a isoflavona Harpalicina II e uma substância inédita na literatura, a isoflavona HB4. A identificação das substâncias foi realizada através da análise de dados de ressonância magnética nuclear de carbono-13 e hidrogênio, uni e bidimensionais.

Em relação aos floroglucinóis isolados (HB1, HB2 e HB5), estes são identificados prontamente durante a avaliação de seus espectros de RMN^{1}H, pois além do núcleo THB, caracterizado pela presença de uma ou duas hidroxilas em posição orto ao carbono do grupo acila, temos um sinal característico de sistema quelado de hidrogênio de hidroxila com o oxigênio da carbonila cetônica vizinha. Este hidrogênio será identificado como um sinal em campo bem baixo, em torno de 11,0 -15,0 ppm. Ao avaliar o espectro de um derivado de floroglucinol, este padrão de sinal é logo reconhecido como presença de grupo acila ligado ao anel e vizinho à hidroxila.

4.3.1. HB1

Após sucessivos fracionamentos cromatográficos com sílica gel e posterior separação realizada em sistema de CLAE, a fração HBFE-H (21-23)-(5)-(4-11)P2 forneceu a substância HB1, que se apresentou como um óleo amarelo-esverdeado e foi identificada como sendo da classe dos floroglucinóis monoméricos. A substância já foi anteriormente isolada desta espécie, de acordo com a literatura disponível em Araújo (2008). A seguir estão disponíveis os espectros tirados da substância e a discussão dos sinais de deslocamentos químicos.

O espectro de RMN^{13}C (300 MHz, C_5D_5N, figura 14) apresentou 22 sinais, sendo um carbono de carbonila muito deslocado para campo baixo, o que indica a possibilidade de estar quelada[3] (δ_C 206.27 ppm). Dentre os outros sinais de carbono, seis correspondem a carbonos sp^2 aromáticos, δ 166,7 (C-6), 164,5 (C-4), 157,5 (C-2), 106,1 (C-1), 101,1 (C-3) e 96,5 (C-5) e dois olefínicos, com δ 132,0 (C-7´) e 125,3 (C-6´). Além destes, há dois sinais em região de carbono oxigenado δ 81,74 (C-3´), 66,83 (C-2´) e mais 11 sinais em região de carbono sp^3 δ 45,14 (C-8), 23,28 (C-9), 32,4 (C-10), 22,83 (C-11), 14,5 (C-12), 38,94 (C-4´), 22,83 (C-5´), 27,52 (C-1´), 26,13 (C-9´) e 19,14 (C-10´) e 18,04 (C8´).

Em todas as estruturas semelhantes a HB1 (HB2 e HB5), o carbono 8, por estar ligado diretamente ao carbono sp^2 (C-7) da carbonila quelada com o hidrogênio da hidroxila em C-6, possui sua livre rotação impedida, o que promove um maior acoplamento dos hidrogênios H-8 com seus vizinhos e entre si (geminal), gerando sinais do tipo multipleto, devido à proximidade dos valores. Se a rotação fosse livre, como é o caso das metilas, por exemplo, em

[3] No caso, a definição original de "quelada", utilizada na química inorgânica, não é o significado utilizado neste trabalho. Aqui, utilizaremos este termo para indicação de uma forte interação entre o H da hidroxila e o O de uma carbonila próxima; significação esta muito utilizada na área de produtos naturais.

vez de multipleto haveria apenas um tripleto, considerando que os dois hidrogênios de C-8 são equivalentes e acoplariam apenas com os dois hidrogênios de C-9. A rotação faz com que os sinais dos hidrogênios sejam iguais devido à distribuição dos valores dentro de uma média, que seria registrada no espectro como um valor para os dois e acoplando apenas com hidrogênios de carbonos vizinhos imediatos, se existirem.

No espectro de RMN^{1}H (Figura 15), foram encontrados sinais relacionados a um hidrogênio aromático (δ 6,5, H-5) e um olefínico (δ 5,28, H-6´), um de hidrogênio de carbono oxigenado 4,3 (H-2´) e mais 10 sinais em região de hidrogênio de carbono metilênico e metílico, δ 3,32 e 3,28 (2H-8), 1,86 (H-9), 1,48 (H-11), 1,39 (H-10), 0,9 (H-12), 2,19 e 2,2 (H-4´), 2,44 (H-5´), 3,45 e 3,13 (H-1´), 1,71 (H-9´) e 1,62 (H-10´). A presença de um sinal em 14,7 ppm indica a presença de uma hidroxila, que poderia estar quelada com a carbonila descrita acima nos sinais de RMN de carbono. Para maiores detalhes das informações dos sinais de hidrogênio, como multiplicidades e integrações, consultar tabela 20.

Tabela 20- Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H da substância HB1 e da literatura*

C	**RMN^{13}C δ_C (ppm) C_5D_5N, 75 MHz**	**RMN^{1}H δ_H (ppm) (int, mult., J (Hz)), C_5D_5N, 300 MHz**	**RMN^{13}C literatura δ_C (ppm) C_5D_5N, 125 MHz**
1	106,1	-	106,2
2	157, 5	-	157,6
3	101,1	-	101,2
4	164,5	-	164,5
5	96,5	6,5 (1H, s)	96,4
6	166,7	-	166,8
7	206,2	-	206,2
8	45,1	3,32 (m)	45,1
9	23,3	1,86 (2H, qui, J= 7,4)	25,4
10	32,4	1,39 (m)	32,4
11	22,8	1,48 (m)	23,4
12	14,5	0,9 (3H, t, J=3,5)	14,6
1´	27,5	3,45 (dd, J= 5,7 e 16,4) e 3,13 (dd, J= 8,2 e 16,4)	27,5

Tabela 20- Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H da substância HB1 e da literatura (cont.)

2´	66,3	4,3(1H, t, J=6,3)	66,4
3´	81,70	-	81,8
4´	38,9	2,19 (1H,m) e 2,2 (1H, m)	38,9
5´	22,83	2,44 (2H, t_{largo},J= 7,3)	22,92
6´	125,3	5,28 (t, J=7,0 Hz)	125,3
7´	132,0	-	132,0
8´	18,04	1,66 (s)	18,10
9´	26,13	1,71 (s)	26,10
10´	19,14	1,62 (s)	19,2
OH-C6	-	14,7 (s)	-
OH-C4	-	5,04 (s, largo)	-

***Araújo (2008)**

Figura 13– Estrutura molecular de HB1 com carbonos numerados

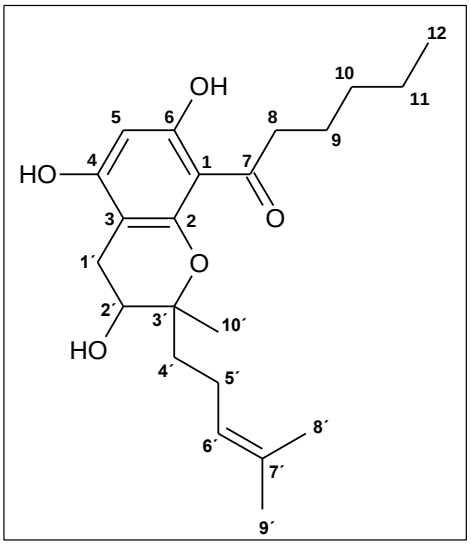


Figura 14- Espectro de RMN^{13}C da substância HB1 (C_5D_5N, 75 MHz)

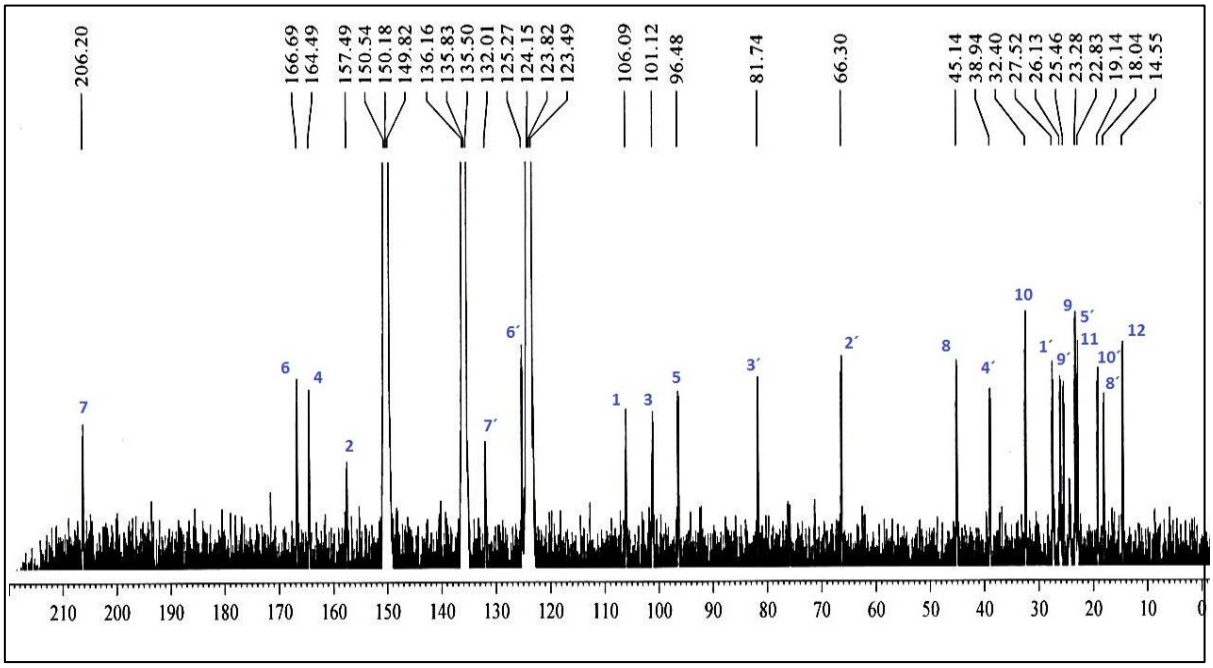


Figura 15- Espectro de RMN^{1}H da substância HB1 (C_5D_5N, 300MHz)

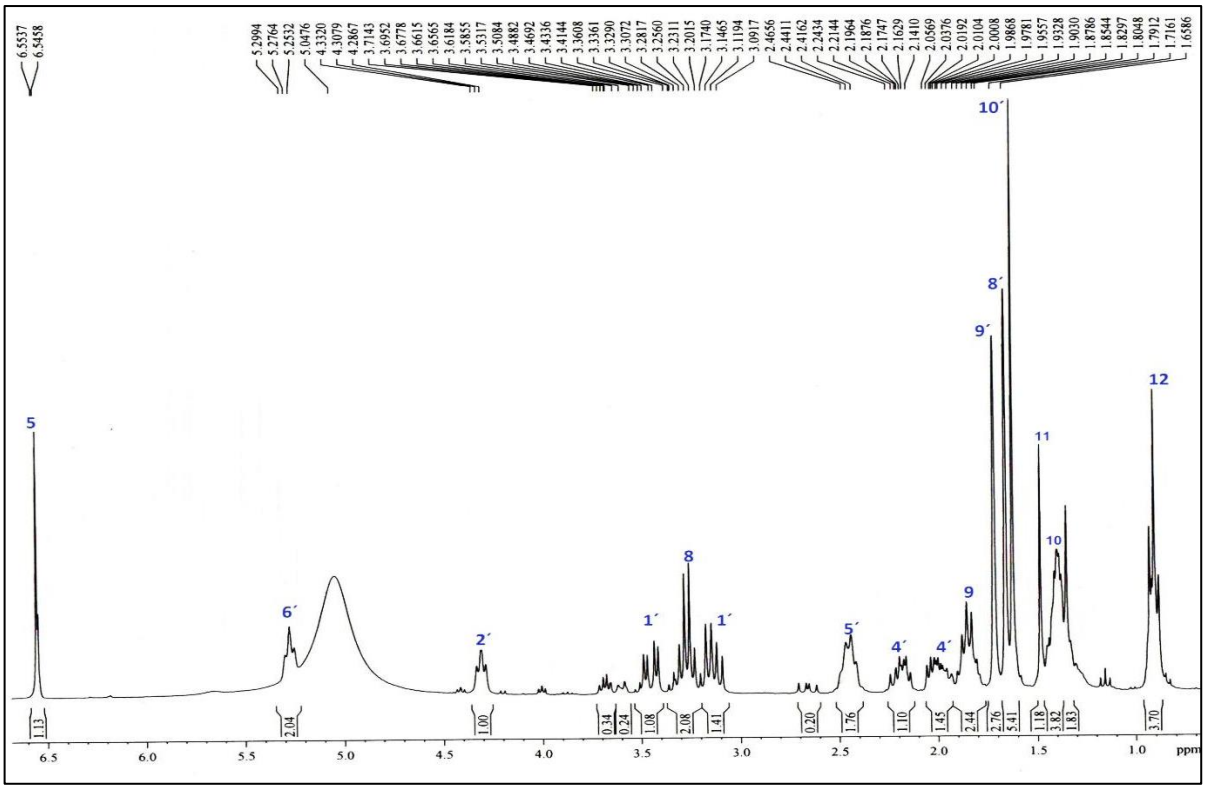
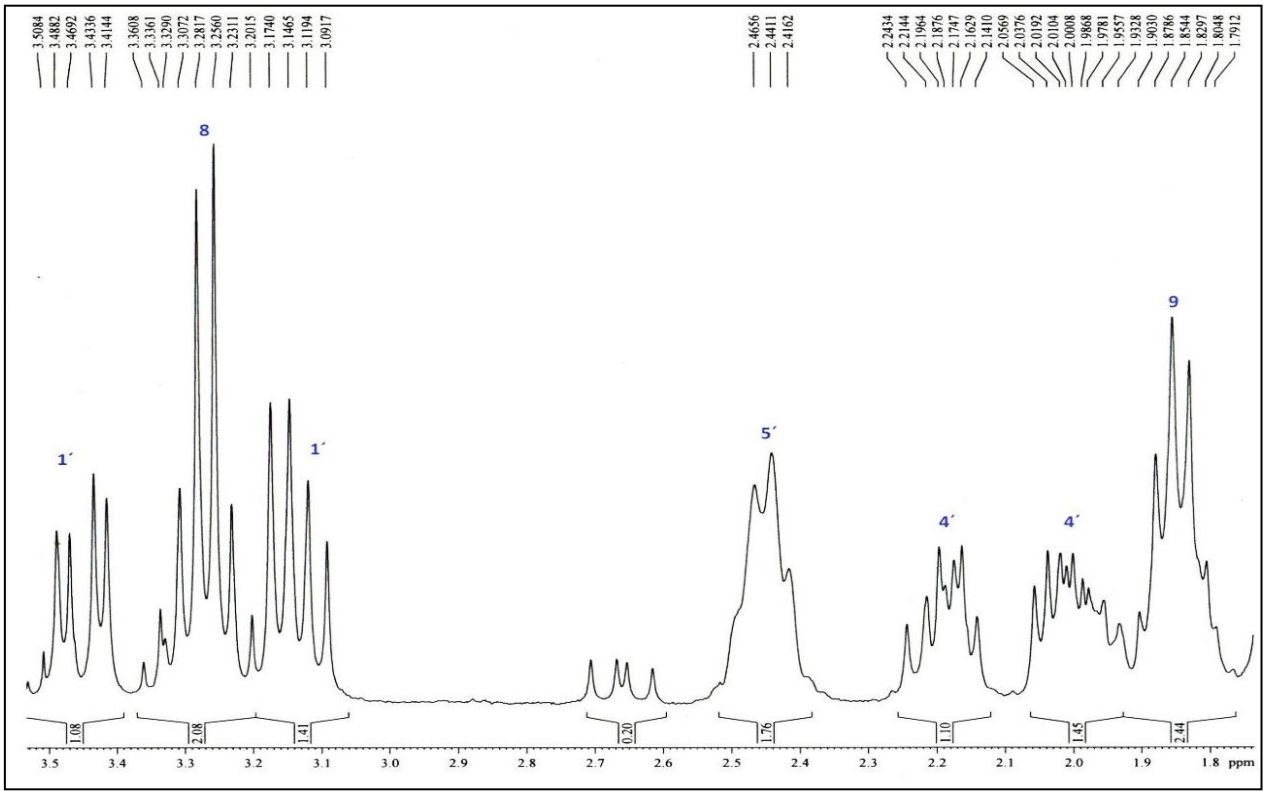


Figura 16- Espectro expandido de RMN^{1}H da substância HB1 (C_5D_5N, 300MHz)



Pela expansão notamos também que os sinais dos carbonos 4´ são multipletos, em vez de tripletos, indicando possível ligação de hidrogênio entre o oxigênio de OH-C2´e o H-4´, que impede a rotação livre e causa acoplamentos múltiplos, da mesma forma descrita acima para H-8.

Por comparação com os dados da literatura (ARAÚJO, 2008) e pela avaliação destes sinais chegamos a um núcleo aromático trioxigenado e com a presença de mais dois substituintes que possuem diversos grupamentos metilênicos (CH_2), entre eles um olefínico, além de algumas metilas. Ao comparar os perfis espectroscópicos de HB1 com HB2 e HB5 foi possível montar a estrutura dos substituintes do anel, sendo um fragmento com seis carbonos, onde estariam incluídas a carbonila e o outro, um grupo geranila, com dez carbonos e uma instauração. Nos três casos, a parte correspondente a geranila (C-1´ a C-10´) sofreu uma ciclização, formando um anel de seis membros (anel pirano), que inclui dois carbonos oxigenados.

Assim, concluímos que a substância isolada é a mesma descrita pela primeira vez em Araújo, 2008, com nomenclatura sistemática 1-hexanoíl-2’,4,6-tri-hidroxi-3’metil-3’-(4-metil-3-pentenil)- benzopirano e estrutura na figura 13.

4.3.2. HB2

A partir de sucessivos fracionamentos cromatográficos da amostra HBFE H (21-23)(5)43-46 utilizando sílica gel em sistema CLAE, foi possível isolar uma substância oleosa, de coloração amarelada e cujos sinais de RMN ^{1}H e ^{13}C tinham perfil espectral muito semelhante ao de HB1, com divergência em apenas poucos sinais. Os dados de deslocamentos químicos estão listados na tabela.

No espectro de RMN^{13}C (Figura 18) foram detectados 22 sinais, sendo um em campo baixo suficiente para ser relacionado a carbono carbonílico, δ 206,3 (C-7,). Também foram detectados no espectro oito sinais em região de carbono aromático, δ 166,7 (C-6), 164,5 (C-4), 157,63 (C-2), 106,12 (C-1), 101,2 (C-3) e 96,35 (C-5) e dois olefínicos, com δ= 150,5 (C7´) e 110,8 (C8´), três sinais em região de carbono sp^3 oxigenado δ=81,99 (C-3´), 66,5 (C-2´) e 76,2 (C-6´) e mais 10 sinais em região de carbono sp^3 não oxigenado, δ=45,1 (C-8), 25,2 (C-9), 32,3 (C-10) , 23,42 (C-11), 14,6 (C-12), 35,4 (C-4´), 30,2 (C-5´), 27,5 (C-1´), 18,4 (C-9´) e 19,3 (C-10´).

No espectro de RMN^{1}H (figura 19) foram encontrados sinais relacionados a um hidrogênio aromático, δ 6,52 (H-5), dois hidrogênios de carbono olefínico, δ5,27 e 4,97 (H-8´ e H-8´), dois relacionados a carbonos oxigenados 4,32 e 4,43 (H-2´e H-6´, respectivamente) e mais 10 sinais em região de hidrogênio de carbono sp^3 metilênicos e metílicos, δ3,3 e 3,25 (2H-8), 1,86 (H-9), 1,49 (H-10) , 1,36 (H-11), 0,9 (H-12), 2,5 e 2,25 (H-4´), 2,19 (H-5´), 3,45 e 3,15 (H-1´), 1,94 (H-9´) e 1,64 (H-10´). Para maiores detalhes das informações, como multiplicidade e integração, consultar tabela 21.

Tabela 21- Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H da substância HB2

C	**RMN^{13}C δc (ppm), C_5D_5N, 125 MHz**	**RMN^{1}H δ_H(ppm), (int, mult., J (Hz)), CDCl3, 500 MHz**	**RMN^{13}C literatura* δc (ppm), C_5D_5N, 125 MHz**
1	106,12	-	106,16
2	157,63	-	157,66
3	101,20	-	101,10
4	164,50	-	164,50
5	96,35	6,52 (s)	96,08
6	166,70	-	166,72

Tabela 21- Dados de RMN ^{13}C e ^{1}H da substância HB2 (cont.)

7	206,3	-	206,36
8	45,10	3,3 (m)	44,69
9	25,20	1,83 (td, J=2,4 e 5,2)	25,20
10	32,30	1,41 (qui, J= 7,9)	32,08
11	23,42	1,36 (m)	23,14
12	14,60	0,9 (t, J= 6,0)	14,30
1´	27,50	3,45 (m) e 3,15 (m)	27,19
2´	66,5	4,32 (dd, J- 6,0 e 7,2)	66,76
3´	81,99	-	82,02
4´	35,40	2,5 (m) e 2,25 (m)	35,05
5´	30,20	2,19	29,88
6´	76,20	4,43 (q, J= 6)	75,59
7´	150,50	-	150,23
8´	110,80	5,27 (d, J= 12,0) e 4,97 (d, J= 7,8)	110,52
9´	18,40	1, 94 (s)	18,11
10´	19,30	1,64 (s)	18,98
OH-C6		14,8 (s)	14,72
OH-C4		5,7 (s l)	

***Araújo, 2008**

Ao comparar os sinais com aqueles descritos para HB1, é notável a similaridade das duas estruturas, diferindo apenas em alguns sinais de deslocamento químico. Para HB2, os sinais em C6´e C8´ são os que mais mudaram, conforme podemos observar na tabela 22 abaixo.

Tabela 22- Comparação entre dados de RMN^{13}C e RMN^{1}H de HB1 e HB2

Dados Espectroscópicos	**δC (ppm)- C6´**	**δC (ppm) – C8´**
δ_C RMN^{13}C- HB1	125,3	18,04
δ_C RMN^{13}C- HB2	76,2	110,8
Dados Espectroscópicos	**δH (ppm)- C6´**	**δH (ppm) – C8´**
δ_H RMN^{1} H- HB1	5,28 (t, J=7,0 Hz)	1,66 (s)
δ_C RMN^{13}H- HB2	4,43 (q, J= 6)	5,27 (d, J= 12,0) e 4,97(d, J= 7,8)

Através da comparação dos sinais com aqueles obtidos para HB1, podemos notar que o C-6´ deixou de ser olefínico e passou a ser metínico e em região de carbono oxigenado. Além disto, o sinal com diferença mais gritante foi aquele relacionado à C8´, que passou de carbono metílico, com deslocamento em campo alto, para um carbono olefínico, muito mais deslocado para campo baixo (18,0 para 110,8 ppm).

Os padrões de acoplamento dos hidrogênios destes carbonos também mudaram, sugerindo fortemente que houve uma mudança de posição da instauração entre C6´e C7´. O singleto relacionado a hidrogênios metílicos, que era observado para H-8´ (1,66 ppm) em HB1 passou a ser visualizado em HB2 como dois dubletos (5,27 e 4,97 ppm) em campo mais baixo, característica de hidrogênios geminais que não são idênticos magneticamente, gerando assim um sinal para cada. Da mesma forma, o hidrogênio em C-6´ mudou de região olefínica em HB1 para região de hidrogênio de carbono oxigenado em HB2, concordando com a estrutura proposta para HB2, com uma hidroxila em C-6´e mudança da insaturação entre C6´-C7 para C7´-C8´.

Figura 17– Estrutura molecular de HB2 com carbonos numerados

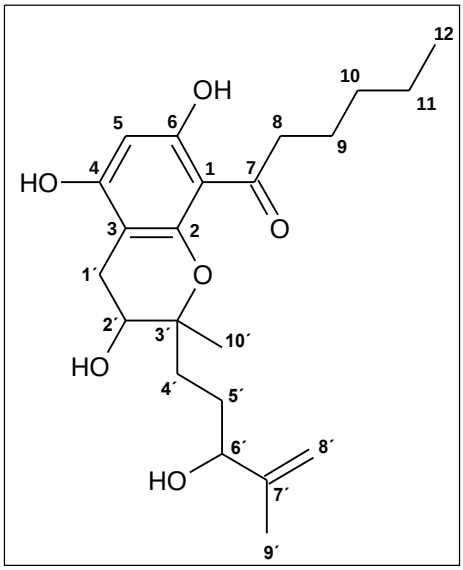


Figura 18 - Espectro de RMN^{13}C (125 MHz, C_5D_5N) da substância HB2

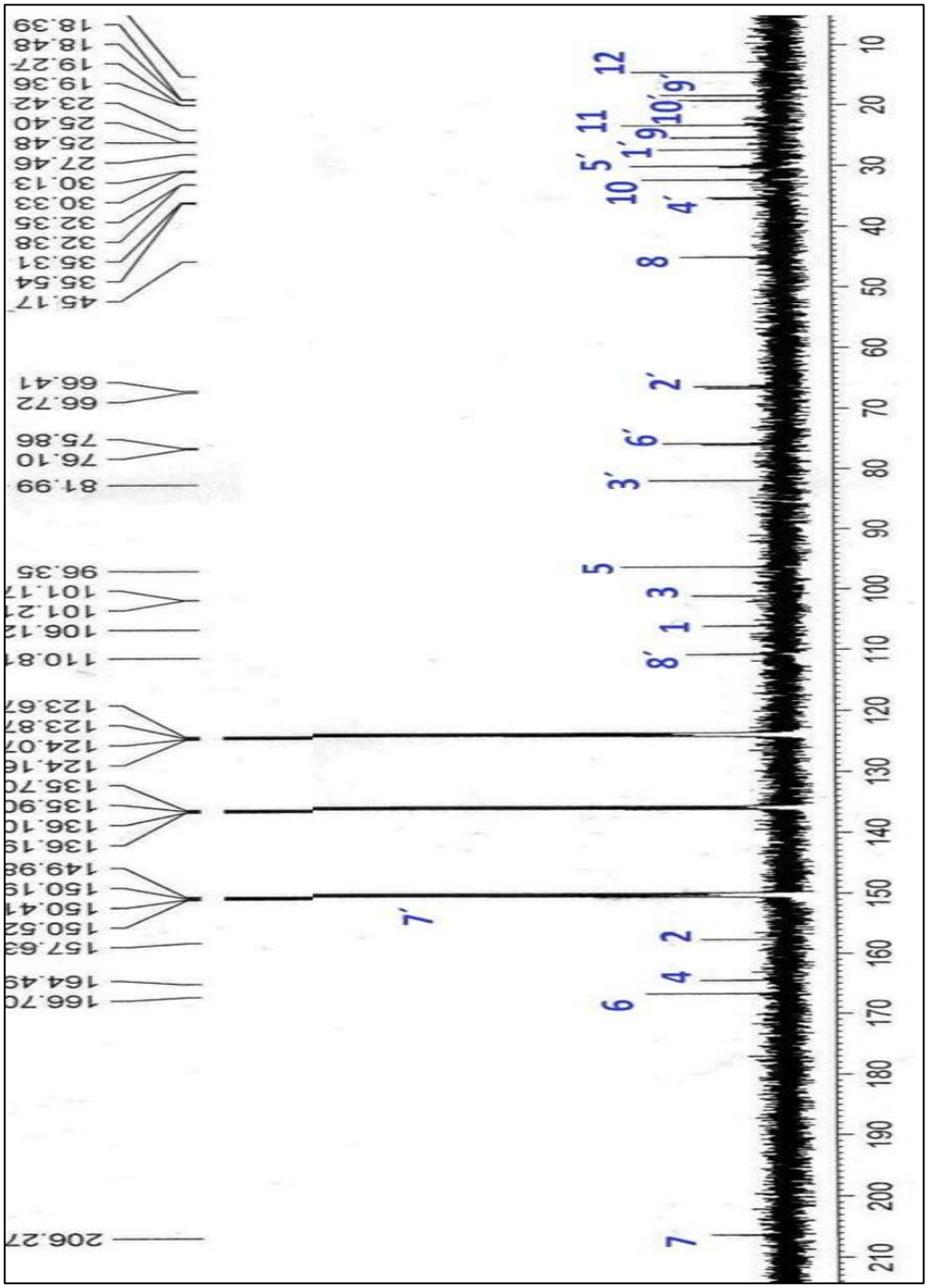
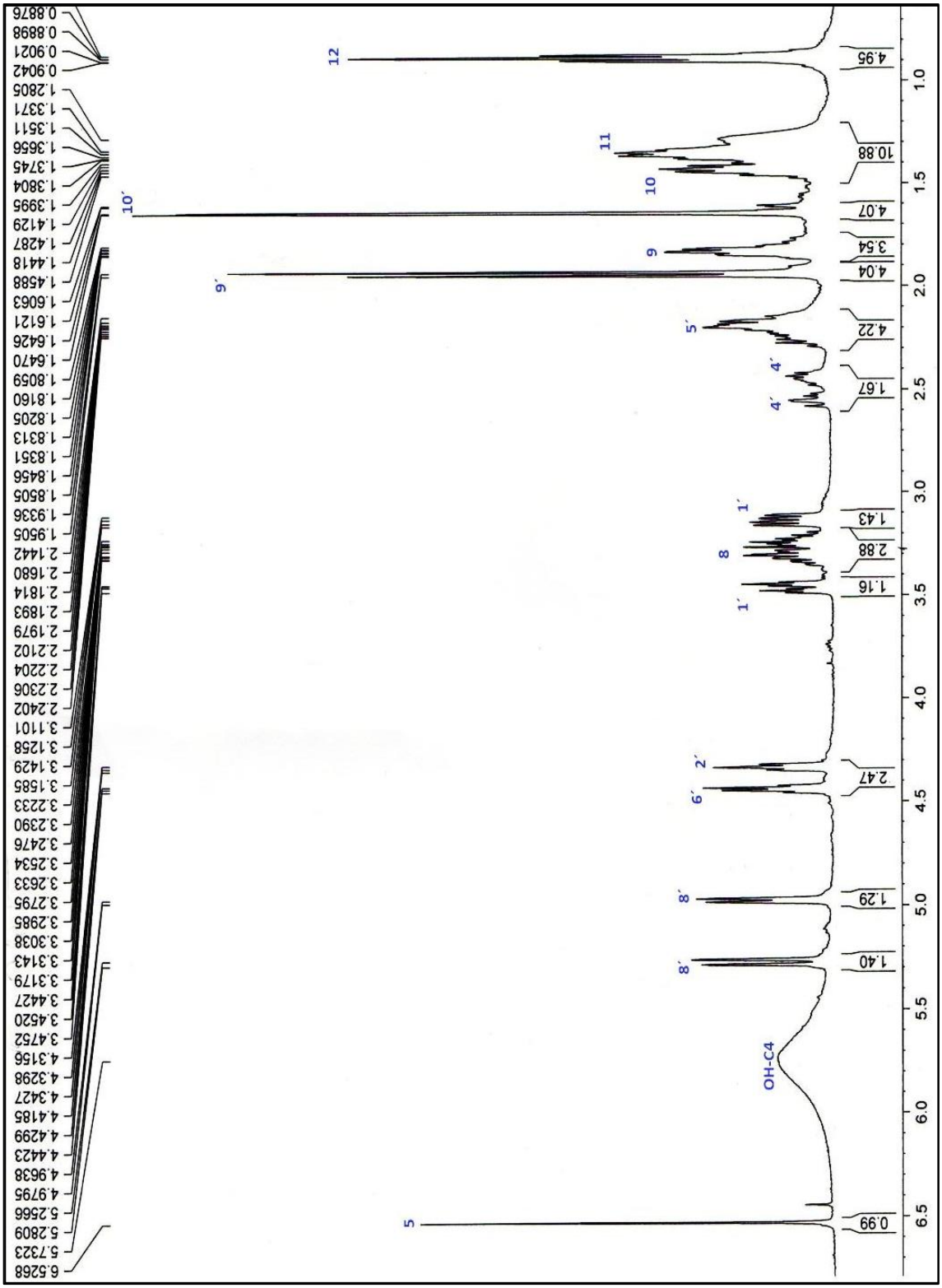


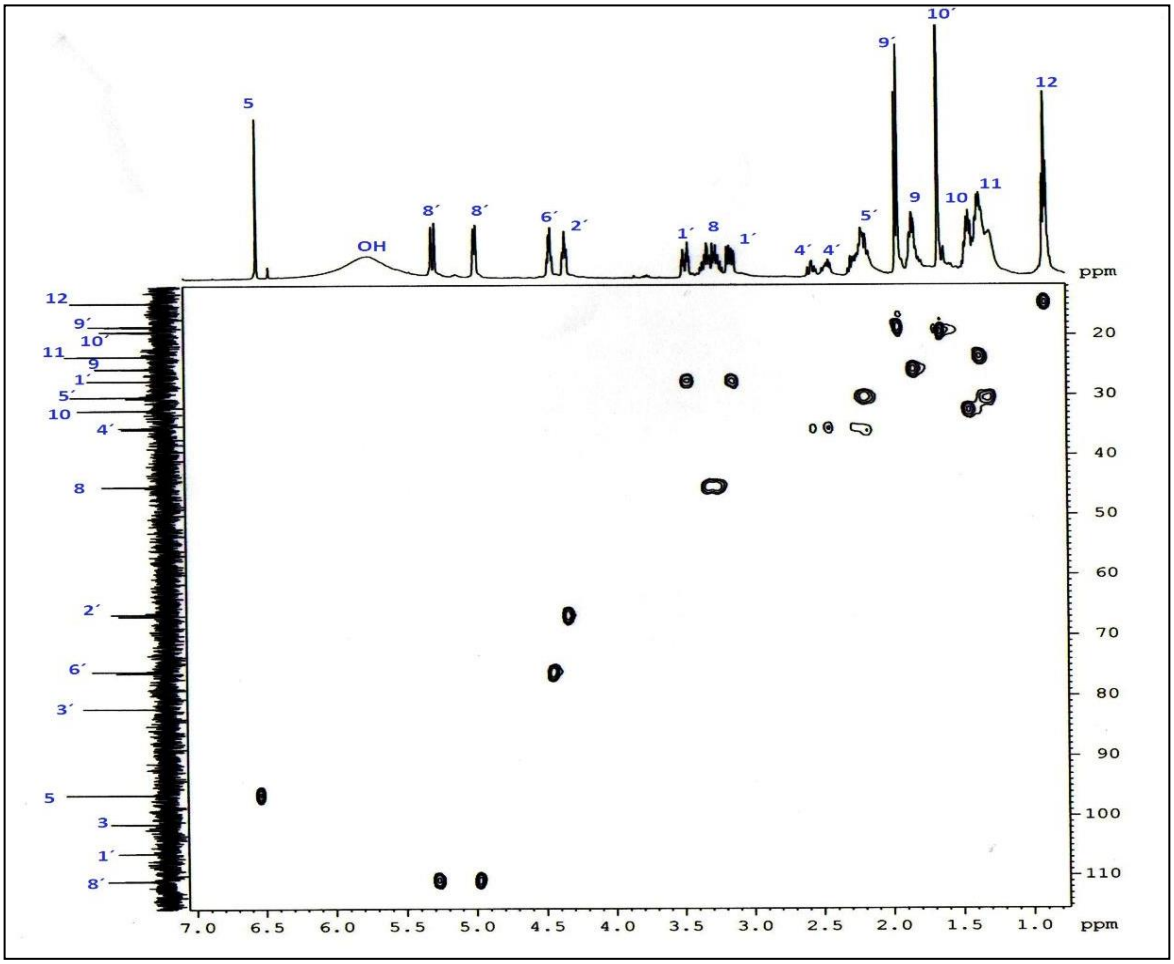
Figura 19 - Espectro de RMN^{1}H de HB2, (500 MHz, $CDCl_3$)



Pela análise do espectro bidimensional de correlação a uma ligação ^{1}H, ^{13}C- HSQC (Figura 20), podemos correlacionar cada sinal de hidrogênio ao carbono correspondente. Podemos deduzir os padrões de ligação entre os carbonos através das correlações, a maioria já estabelecida em HB1, conforme as multiplicidades e deslocamentos químicos.

Através do HSQC foram correlacionados os carbonos com seus respectivos hidrogênios. A presença de apenas um hidrogênio na área dos deslocamentos aromáticos, relacionado com um carbono em δ_C 96.35 ppm confirma que há um anel benzênico substituído em 5 posições. O deslocamento deste carbono, em campo mais alto do que o normal para um aromático, sugere uma proteção decorrente da presença de uma ou mais hidroxilas orto posicionadas. Já se sabe que existe uma hidroxila quelada com carbonila, sendo que esta não se situa no anel aromático, mas sim em um substituinte do anel. Nesta mesma figura, pode-se verificar a presença de um sinal alargado em aproximadamente δ_H 5.7 ppm, sem correlação com nenhum carbono, indicando a presença de outra hidroxila.

Figura 20- Espectro de RMN de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C– HSQC de HB2



No espectro bidimensional de correlação homonuclear, $^{1}H,^{1}H$-COSY (figura 21), podemos confirmar a vizinhança de cada hidrogênio já identificado na estrutura através das correlações de H-12 com H-11 (a), H-9 com H-10 (b), H5´com H6´(e), H-8 com H-9 (c) e os dois H-8´com H-9´ (d) e H2´com os dois sinais de H-1´ (f) e H-4´com H-5´ (g).

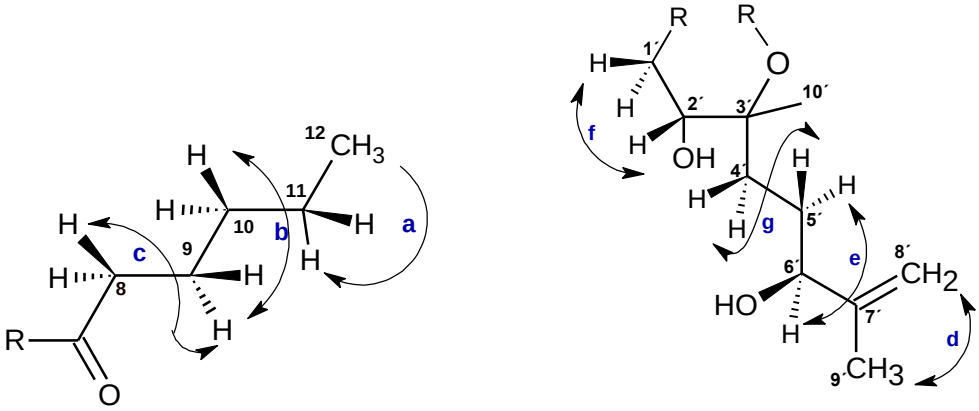
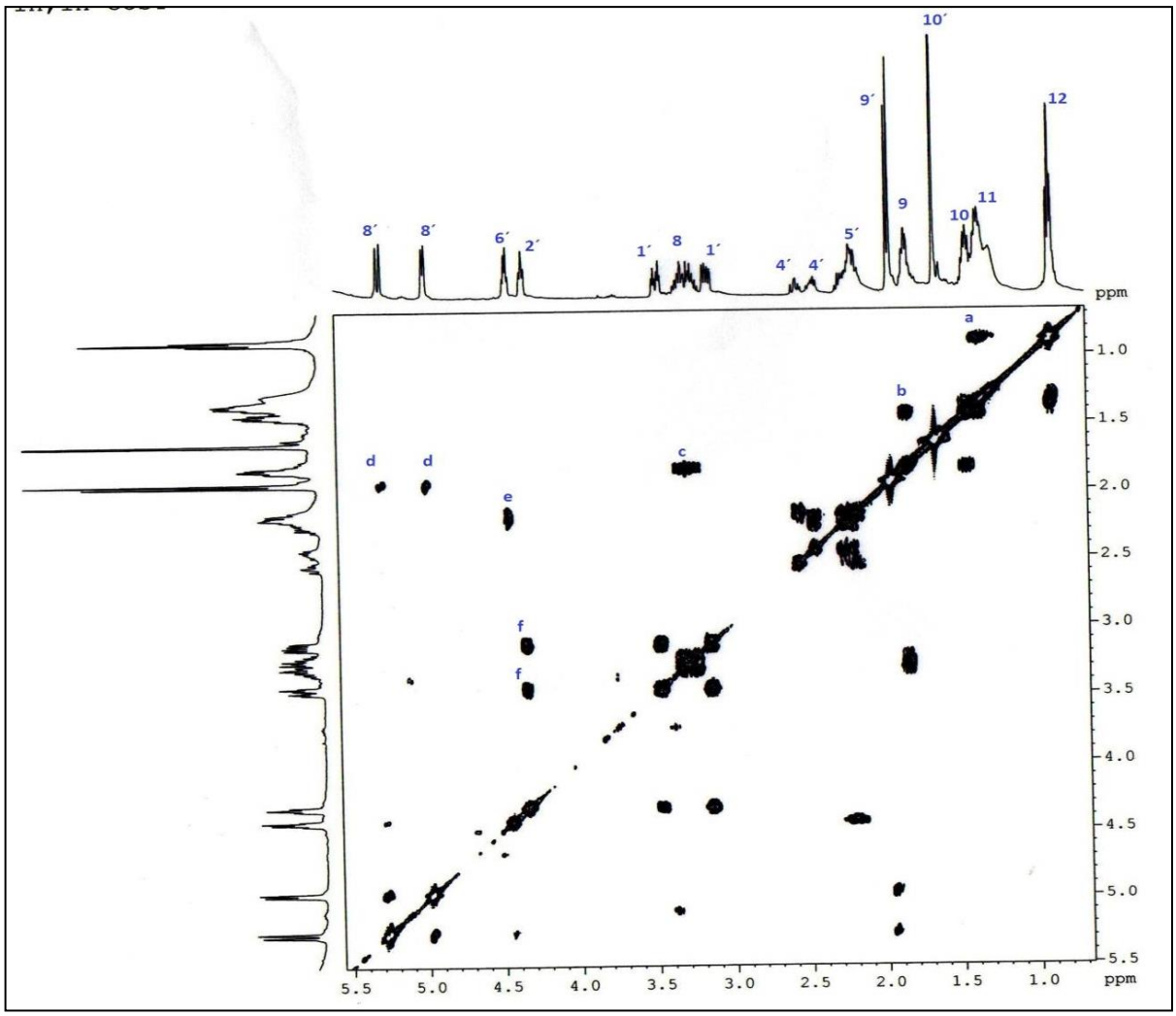


Figura 21- Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ^{1}H, ^{1}H- COSY de HB2



A avaliação do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações, ^{1}H, ^{13}C-HMBC (Figura 22) resultou na identificação inequívoca dos carbonos adjacentes através das correlações identificadas na figura. Foi possível montar as partes da estrutura ligadas ao anel aromático trioxigenado e encadear estes substituintes. As correlações verificadas no espectro estão dispostas na tabela 23 e na figura 22.

Tabela 23-Correlações observadas nos espectros de ^{1}H, ^{13}C-HMBC de HB2

Correlação	C	H	Correlação	C	H
a	11	8, 10 e 12	**g**	9´	8´, 6´e 2´
b	8	9	**h**	6´	8´, 5´e 9´
c	3	5 e 1´	**i**	3´	1´e 10´
d	2	1´	**j**	7	8 e 9
e	6	5	**k**	4	5 e 1´
f	4´	5´, 6´, e 10´	**l**	7´	9´

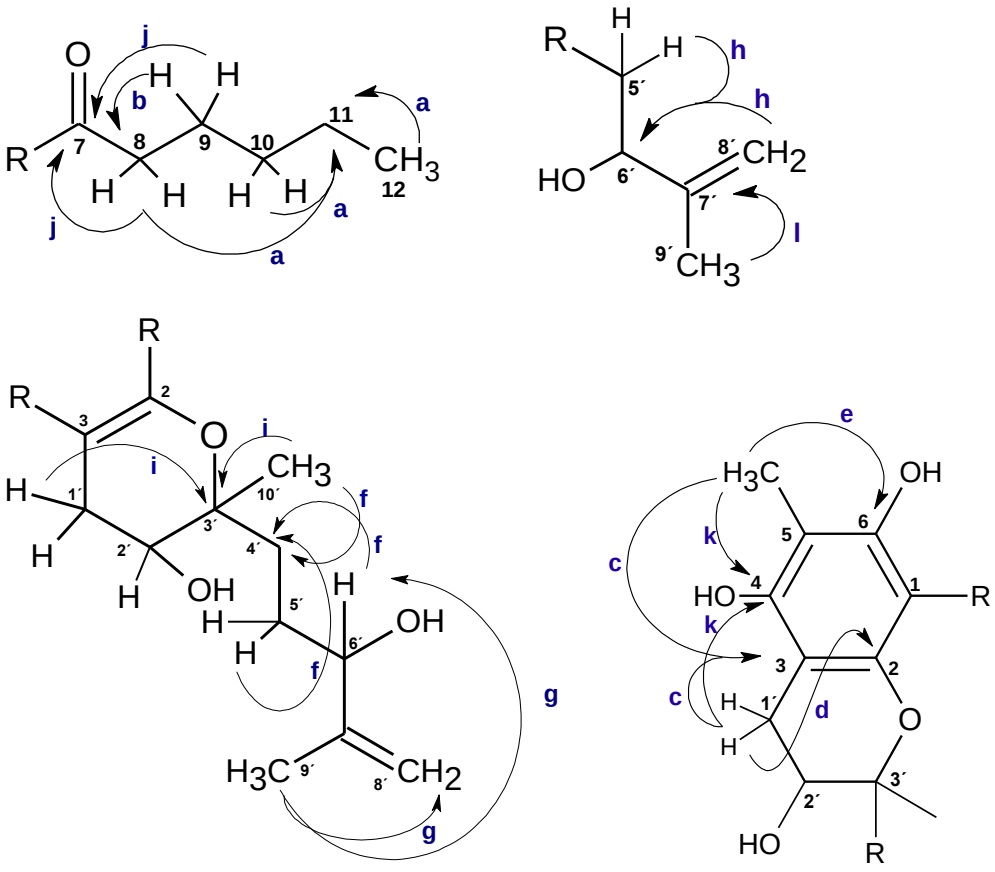
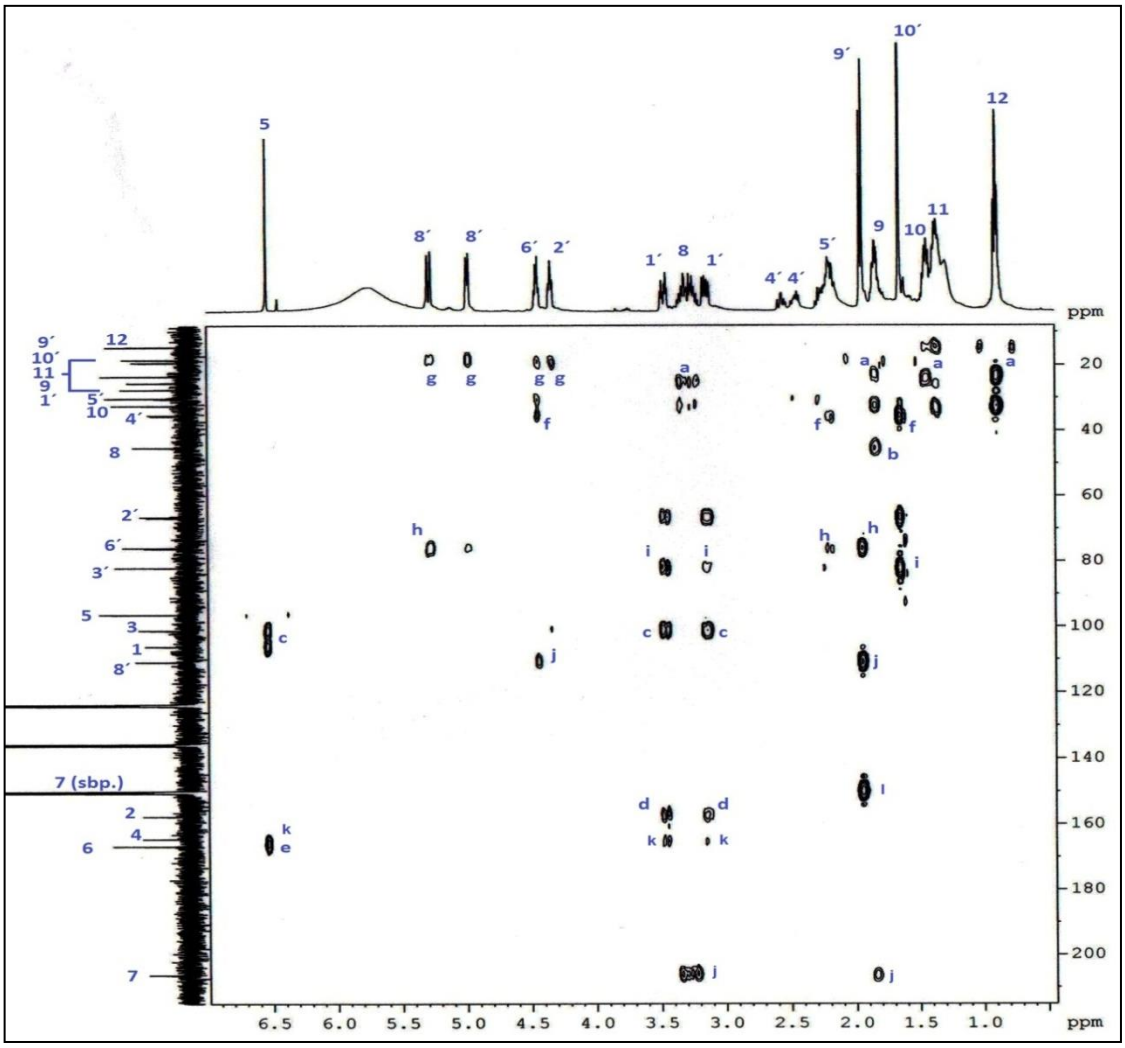


Figura 22 - Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações ^{1}H, ^{13}C– HMBC de HB2



A análise dos espectros uni e bidimensionais, além da revisão da literatura pertinente, nos levaram a reconhecer a substância 1-hexanoíl- 2',4,6-trihidroxi- 3'metil-3'-(3-hidroxi-4-metil-3-pentenil)- benzopirano, um derivado de floroglucinol que foi isolado pela primeira vez em Araújo, 2008, desta mesma espécie de vegetal.

Neste trabalho, a mesma substância foi isolada de duas outras frações provenientes de diferentes procedimentos cromatográficos, mais especificamente das frações HBFE-Cl (38-40)(37-44)P2 e HBFE-Cl (38-40)(37-44)P5-P2, cujos métodos estão descritos na parte experimental.

4.3.3 HB3

A partir de inúmeras etapas de purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se de sílica flash, a substância HB3 foi isolada a partir da fração HBFE-Cl (36+37)(55-57) e se apresentou como um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio, cujos sinais presentes nos espectros de RMN^{1}H (Figura 23) foram comparados com aqueles disponíveis na literatura para substâncias da espécie. Através desta comparação foi possível constatar que corresponde à Harpalicina II, da classe das isoflavonas, já anteriormente isolada desta espécie, conforme descrito em DA SILVA (1997).

A análise do espectro de RMN^{13}C (Figura 24, página75) permitiu identificar 21 sinais, sendo doze deles em região de aromático, com δ 121,68 (C-3), 104,24 (C-6), 94,18 (C-8), 104,21 (C-10), 124,46 (C-1´), 109,39 (C-2´), 108,15 (C-5´), 122,52 (C-6´) um em região de carbono olefínico δ 121,68 (C-3). Dentre os insaturados, seis são também oxigenados, δ 154,64 (C-2), 159,23 (C-5), 150,07 (C-7), 155,15 (C-9), 147,09 (C-3´), 147,09 (C-4´). Foram detectados também sinais de carbono oxigenado não insaturado δ 79,01 (C2´´), 66,83 (C-3´´), 101,14 (C7´´) e um sinal relativo a carbono carbonílico em δ 180,4 (C-4). Todos os deslocamentos neste texto estão em ppm.

Através dos sinais do espectro de hidrogênio (Figura 25), foi possível verificar a presença de sinais compatíveis com uma estrutura que possui um ou mais anéis aromáticos e/ou hidrogênios olefínicos, com sinais em δ 7,84 (H-2); 6,4 (H-8); 7,04 (H-2´); 6,8 (H-5´) e 6,94 (H-6´). Dentre os outros sinais de hidrogênio, um está relacionado a carbono oxigenado, δ= 3,9 (H-3´), três estão localizados em região de campo mais alto característica de hidrogênios metílicos, como os presentes em δ 2,8 e 3,0 (2H-4´´); 1,47 (H-5´´); 1,53 (H-6´´); um relaciona-se a carbono sp^{3} de grupo metilenodioxi (duplamente oxigenado), δ 6,01 (H-7´´) e por fim, mais dois sinais de hidroxila, sendo uma delas quelada com sistema carbonílico, δ 13,15 (OH-C-5) e 5,3 (OH-C-3). Para maiores detalhes das informações, como multiplicidade e integração, consultar tabela 25.

Tabela 24– Comparação entre os dados espectroscópicos de RMN^{13}C de HB3 e Harpalicina II (SILVA, 1997)

C	**HB3- RMN^{13}C δ_C(ppm), (acetona, 500 MHz)**	**Harpalicina II- RMN^{13}C δ_C (ppm), DMSO-d_6**
2	154,64	154,7
3	121,68	121,7
4	180,4	180,1
5	159,23	159,1
6	104,24	104,2
7	159,07	159,3
8	94,18	94,2
9	155,15	155,9
10	104,21	104,2
1´	124,46	124,5
2´	109,39	109,4
3´	147,09	147,1
4´	146,09	147,1
5´	108,15	108,2
6´	122,52	122,6
2´´	79,01	79,0
3´´	66,83	66,8
4´´	25,25	25,0
5´´	20,97	21,0
6´´	25,00	25,3
7´´	101,14	101,2

Tabela 25– Dados de RMN^{1}H da substância HB3 ($CDCl_3$, 300 MHz) e Harpalicina II (ARAÚJO, 2008)

H	**HB3** **H, δ_H(ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)**	**Harpalicina II** **H, δ_H(ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)**
2	7,84 (1H, s)	8,36 (1H, s)
8	6,40 (1H, s)	6,45 (1H,s)
2´	7,04 (1H, s)	7,13 (1H, d, J= 1,5 Hz)
5´	6,8 (1H, d, J= 8,0 Hz)	6,98 (1H, d, J=8,0 Hz)
6´	6,94 (1H, dd, J= 8,0 Hz)	7,05 (1H, dd, J=8,0 e 1,5 Hz)
3´´	3,9 (1H, m)	3,71 (1H, m)
4´´	2,8 (1H, dd, J= 6,0 e 17,0 Hz) e 3,0 (1H, dd, J= 5,0 e 17,0 Hz)	2,5 (1H, dd, J=7,0 e 17,0 Hz) e 2,81 (1H, d, J=5,0 e 17,0 Hz)
5´´	1,47 (3H, s)	1,25 (3H, s)
6´´	1,53 (3H, s)	1,32 (3H, s)
7´´	6,01 (2H, s)	6,06 (2H, s)
OH-C3	5,3 (s)	5,29 (1H, d, J= 4,0 Hz)
OH-C5	13,15 (1H, s)	13,22 (1H, s)

Figura 23- Estrutura de HB3 (harpalicina II)

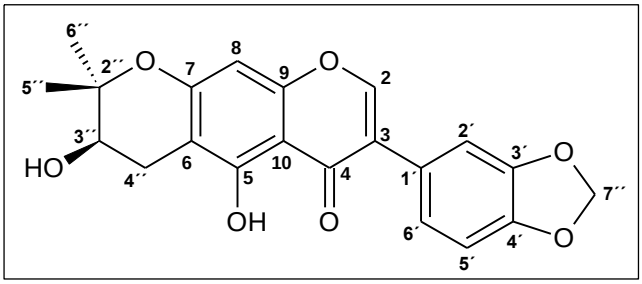


Figura 24 - Espectro de RMN^{13}C de HB3 (125 MHz, Piridina)

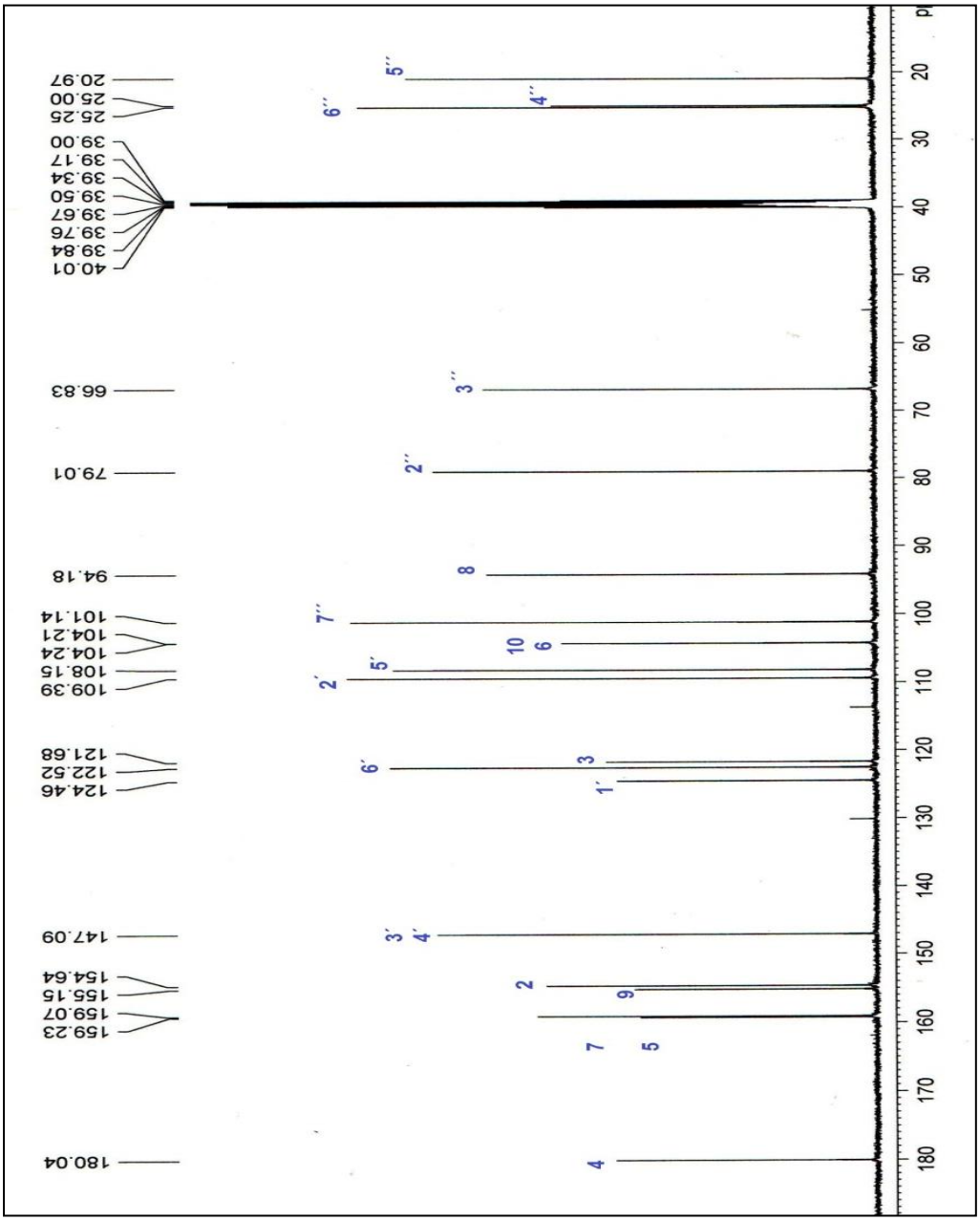


Figura 25 - Espectro de RMN^{1}H, com expansões, de HB3 (300 MHz, $CDCl_3$)

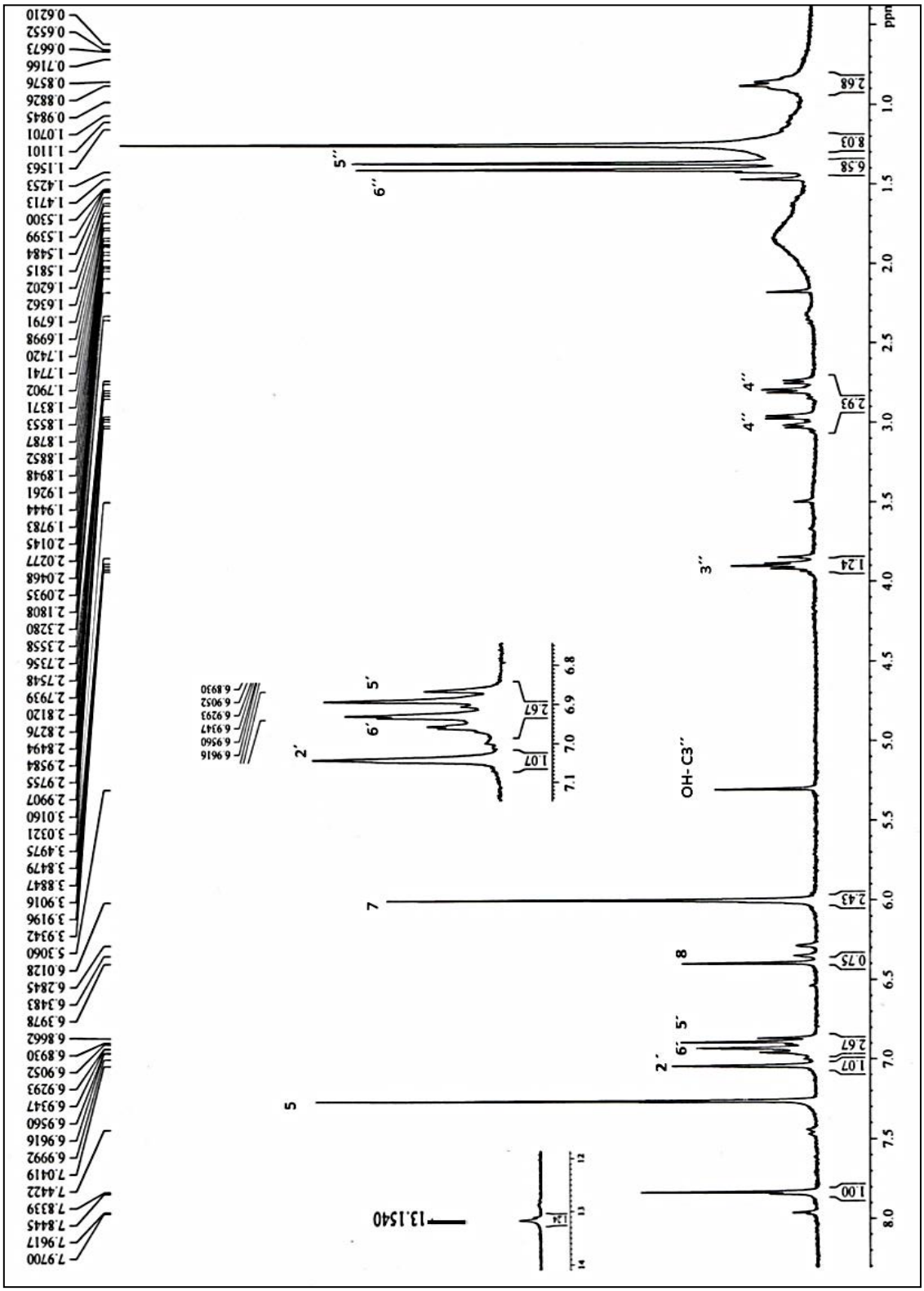
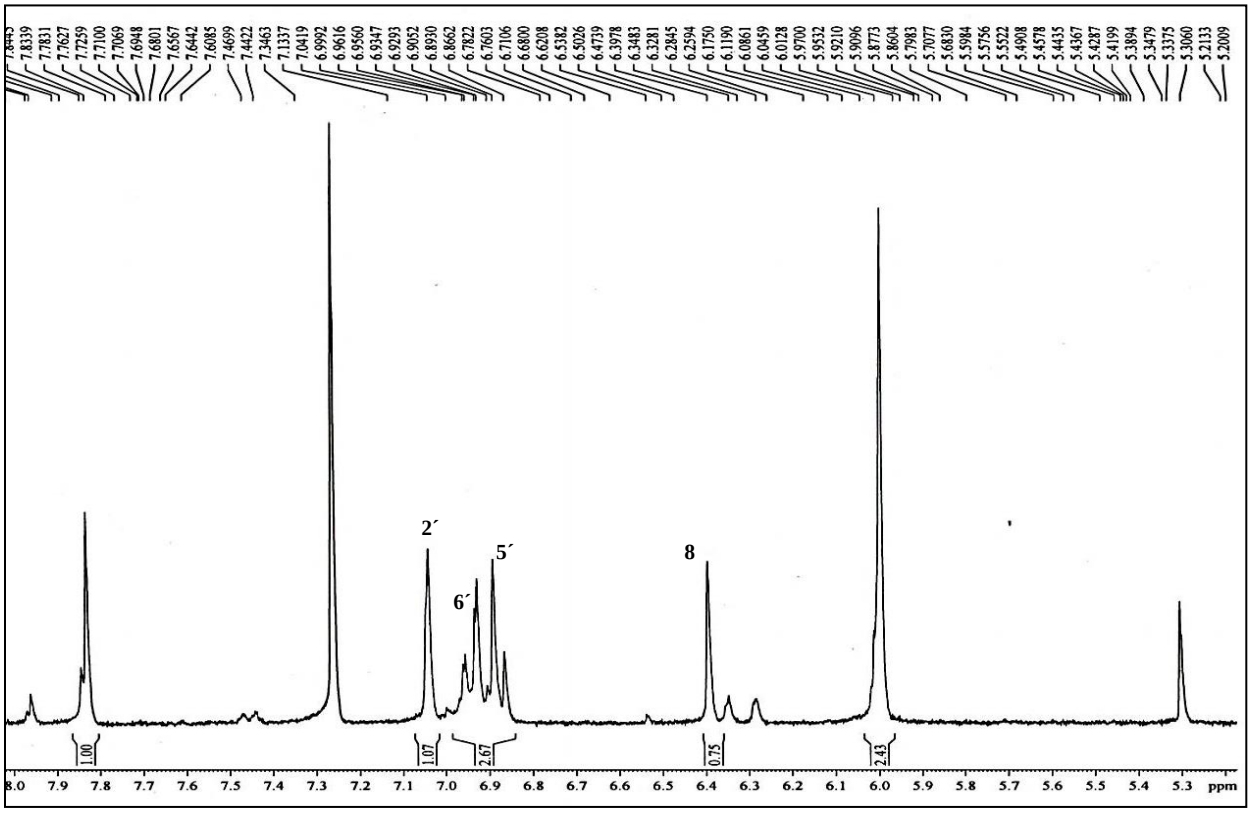


Figura 26 - Espectro de RMN^{1}H expandido de HB3 (300 MHz, $CHCl_3$).



A análise e comparação do espectro de RMN^{1}H da substância HB3, com os sinais da harpalicina II, possibilitaram a identificação da mesma. Embora a diferença de solventes utilizados tenha causado uma diferença também nos deslocamentos químicos previstos, o padrão de distribuição dos sinais de hidrogênio é o mesmo conforme espectros de RMN^1 H.

Assim, a estrutura foi confirmada como sendo a harpalicina II, uma isoflavona. também isolada de duas outras frações provenientes de diferentes procedimentos cromatográficos, respectivamente como um precipitado branco solúvel em clorofórmio em HBFE-Cl (38+39), e também em HBFE-Cl (38-40)(37-44)P4, cujos procedimentos estão descritos no capítulo 3, que trata dos métodos experimentais.

4.3.4 HB4

A fração HBFE-Cl foi submetida a diversas etapas de separação, através de cromatografia flash, e posteriormente em sistema CLAE. A partir da fração HBFE-Cl-(38-40)(37-44)-p6 foi isolada uma substância solúvel em metanol, inicialmente confundida com a Harpalicina II, também isolada neste trabalho. Entretanto, a análise detalhada dos espectros levou à conclusão que se trata de outra substância, com dados espectrais semelhantes a harpalicina II.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (figura 28) permitiu identificar 21 sinais estreitamente semelhantes aos sinais de RMN^{13}C da harpalicina II. Assim, temos um sinal em δ 180,3 ppm que foi atribuído a carbono de carbonila (C-4), doze sinais em região de aromático e/ou olefínico , com δ 121,87 (C-3), 105,29 (C-6), 91,55 (C-8), 105,29 (C-10), 124,27 (C-1´), 109,3 (C-2´), 108,3 (C-5´), 122,47 (C-6´) e 121,87 (C-3). Dentre os insaturados, seis são também oxigenados, δ 154,38 (C-2), 166,28 (C-5), 157,07 (C-7), 155,96 (C-9), 147,03 (C-3´), 146,99 (C-4´). Foram detectados também sinais de carbonos oxigenados não insaturados δ 88,54 (C-2´´), 69,91 (C-4´´), 100,99 (C-7´´), um sinal relativo a carbono carbonílico em δ 180,3 (C-4) e três sinais relativos a carbonos sp^3 metílicos, δ 25,68 (C-6´´) e 24,86 (C-5´´) e um metínico, δ 25,68 (C-3´´). Neste texto todos os deslocamentos estão em ppm, e os dados podem ser consultados na tabela 27.

A principal diferença do espectro em relação ao da harpalicina II é notada nos sinais de 3´´ e 4´´, e sugere que houve uma modificação da oxigenação dos dois carbonos. Para a substância HB4, a posição da hidroxila em C-3´´ de HB3, muda para C4´´. A análise dos valores de deslocamento químico dos carbonos pode evidenciar que a inversão de sinais sugere que o carbono 3´da harpalicina deixou de ser oxigenado em HB4, enquanto que para o carbono 4´ ocorre o contrário, passa a ter seu deslocamento em uma área de carbono oxigenado. Estes dados levaram a conclusão que os hidrogênios diastereotópicos estão em C-4´´, possuindo um sinal para cada. Nas tabelas 26 e 27 são comparados os dados de RMN ^{13}C para C3´´e C4´´ das duas substâncias, para melhor perceber a diferença entre seus substituintes.

Tabela 26- Comparação dos dados espectroscópicos de RMN^{13}C de C3´e C4´de HB4 e harpalicina II

Substância	**C3´´- δc (ppm)**	**C4´´- δc (ppm)**
harpalicina II	66,8	25,00
HB3	66,83	25,25
HB4	25,68	69,91

Tabela 27– Comparação entre os dados espectroscópicos de RMN^{13}C de HB4 e harpalicina II (SILVA, 1997)

C	**HB4- RMN^{13}C δ_C(ppm), (DMSO-d_6, 500 MHz)**	**Harpal. II- RMN^{13}C δ_C (ppm), DMSO-d_6**
2	154,38	154,7
3	121,87	121,7
4	180,03	180,1
5	166,28	159,1
6	105,29	104,2
7	157,37	159,3
8	91,55	94,2
9	155,96	155,9
10	105,29	104,2
1´	124,27	124,5
2´	109,3	109,4
3´	147,03	147,1
4´	146,99	147,1
5´	108,3	108,2
6´	122,47	122,6
2´´	88,54	79,0
3´´	25,68	66,8
4´´	69,91	25,00
5´´	24,86	21,07
6´´	25,68	25,3
7´´	100,99	101,2

Ao avaliar os sinais do espectro de hidrogênio, é notável a similaridade com o padrão dos sinais da harpalicina II. Foi observada a presença de sinais compatíveis com uma estrutura que também possui um ou mais anéis aromáticos e/ou hidrogênios olefínicos, com sinais em δ 7,84 (H-2); 6,37 (H-8); 7,05 (H-2´); 6,9 (H-5´) e 7,95 (H-6´). Dentre os outros sinais de hidrogênio, três estão localizados em região de campo mais alto, como em δ 3,1 e 3,2 (2H-3´´); 1,24 (H-5´´); 1,38 (H-6´´); um está relacionado a carbono sp^3 oxigenado, δ 4,79 (H-4´´), um relaciona-se a carbono sp3 de grupo metilenodioxi (duplamente oxigenado), δ 6,0 (H-7´´).e por fim, um sinal relacionado à hidroxila quelada com sistema carbonílico, δ 13,10 (OH-C-5). Para maiores detalhes das informações, como multiplicidade e integração, consultar tabela 28.

Assim como os sinais no espectro de RMN ^{13}C de C-4´´ e C-3´´ apareceram invertidos em relação àqueles dispostos em HB3 (harpalicina II), os sinais do espectro de hidrogênio também se apresentaram com uma mudança. O sinal relacionado com H-3´´ na harpalicina II era de um hidrogênio ligado a um carbono hidroxilado, desdobrado como multipleto em virtude das correlações com seus hidrogênios adjacentes. Agora, em HB4, o sinal de H-3´´foi deslocado para região de campo mais alto, o que indica que deixou de ser de carbono oxigenado. Além disto, em HB4 aparecem dois hidrogênios na integração de H-3´´, corroborando que a hidroxila antes presente deu lugar a um hidrogênio. Da mesma forma, H-4´´ da harpalicina estava aparecendo com integração de dois átomos e região de hidrogênio de carbono sp^3 em campo alto, agora em HB4 está com integração de apenas um hidrogênio e em região de hidrogênio pertencente a carbono oxigenado. Tudo isso corrobora para a proposta que a hidroxila presente em C-3´´ da harpalicina agora está presente em C-4´´ de HB4.

Tabela 28- Comparação entre dados de RMN^{1}H de HB4 e HB3 (Harpalicina II)

H	**HB4** **H, δ_H(ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)**	**Harpalicina II** **H, δ_H(ppm)(int., multip, $J_{H,H}$)**
2	7,84 (1H, s)	7,84 (1H, s)
8	6,37 (1H, s)	6,40 (1H, s)
2´	7,05(1H, d, J= 1,5 Hz)	7,04 (1H, s)
5´	6,9 (1H, d, J= 8,4 Hz)	6,8 (1H, d, J= 8 Hz)
6´	6,95 (1H, dd, J= 8,1 e 1,6 Hz)	6,94 (1H, dd, J= 8 Hz)
3´´	3,2 (1H, dd, J= 6 e 17 Hz) e 3,1 (1H, dd, J= 5 e 17 Hz)	3,9 (1H, m)
4´´	4,79 (1H, t,)	2,8 (1H, dd, J= 6 e 17 Hz) e 3,0 (1H, dd, J= 5 e 17 Hz)
5´´	1,24 (3H, s)	1,47 (3H, s)
6´´	1,38 (3H, s)	1,53 (3H, s)
7´´	6,0 (2H, s)	6,01 (2H, s)
OH-C3		5,3 (s)
OH-C5	13,10 (1H, s)	13,15 (1H, s)

Figura 27– Estrutura molecular de HB4 com carbonos numerados

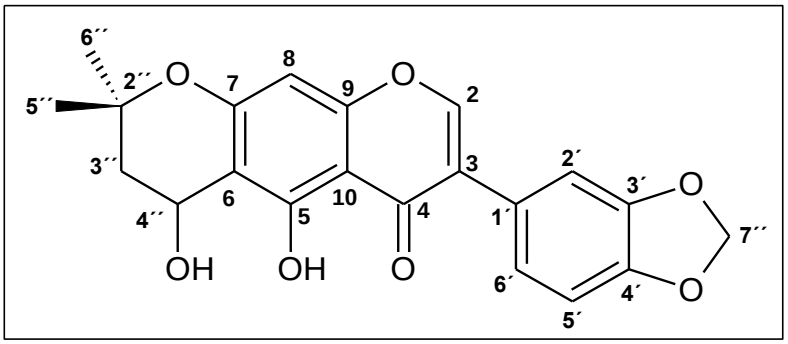


Figura 28 - Espectro de RMN^{13}C da substância HB4 (DMSO, 500 MHz)

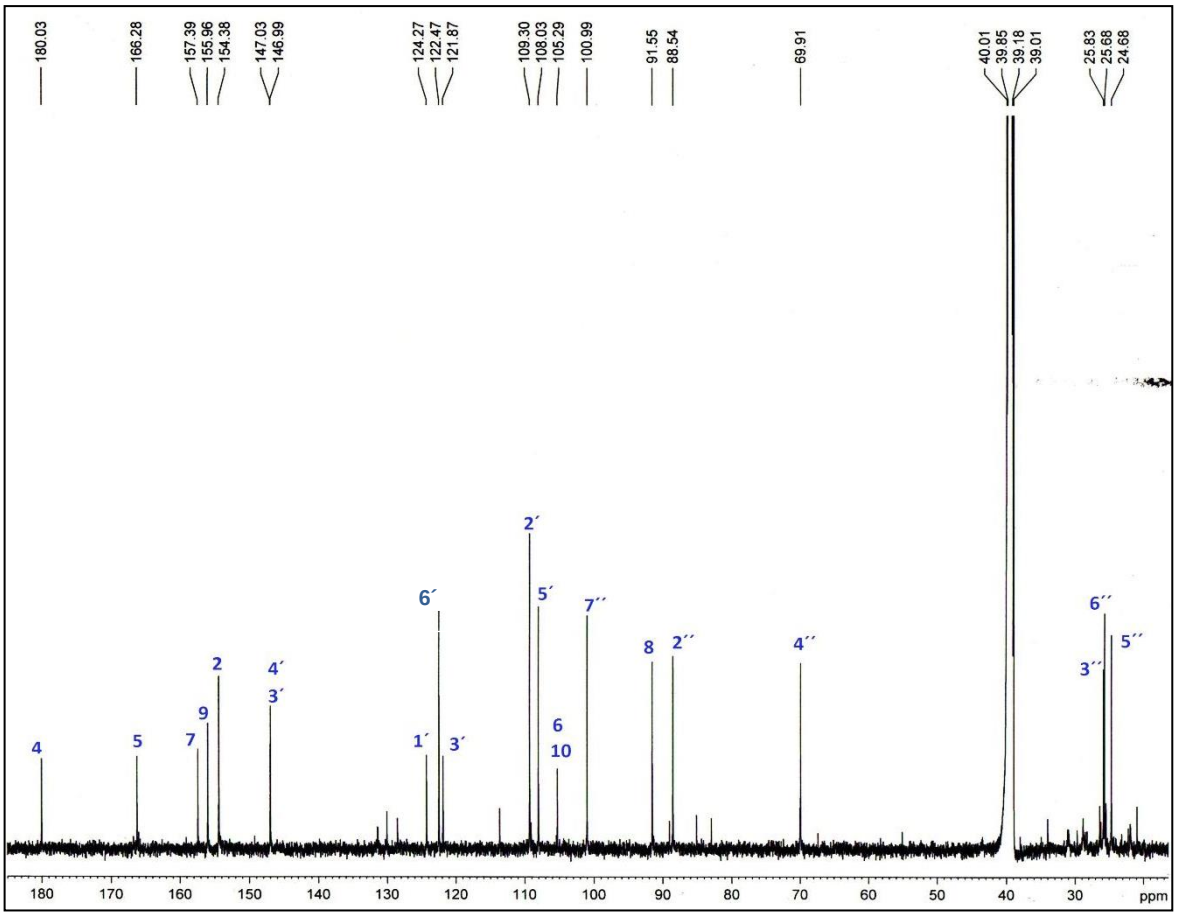


Figura 29– Espectro de RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de HB4 com expansões

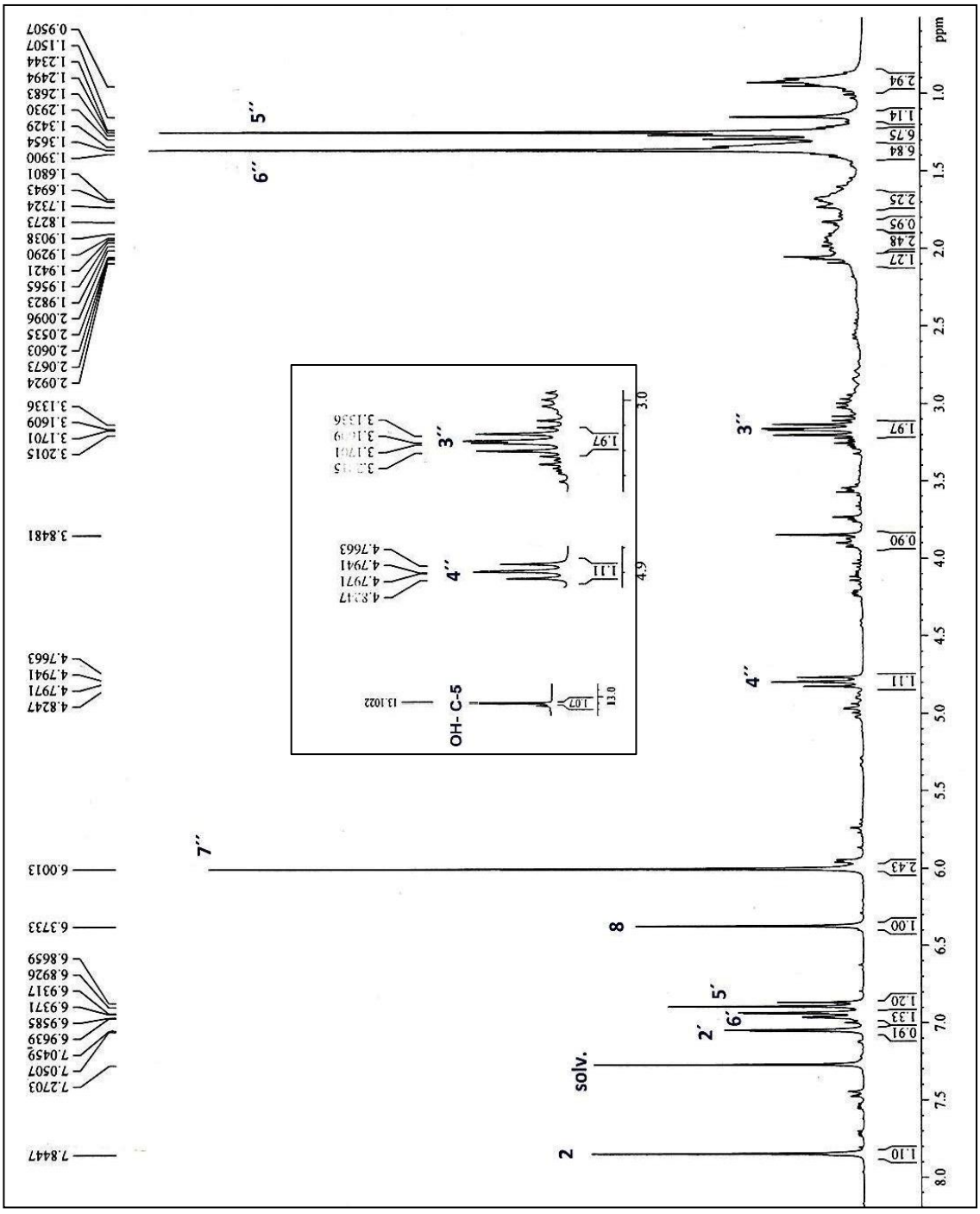
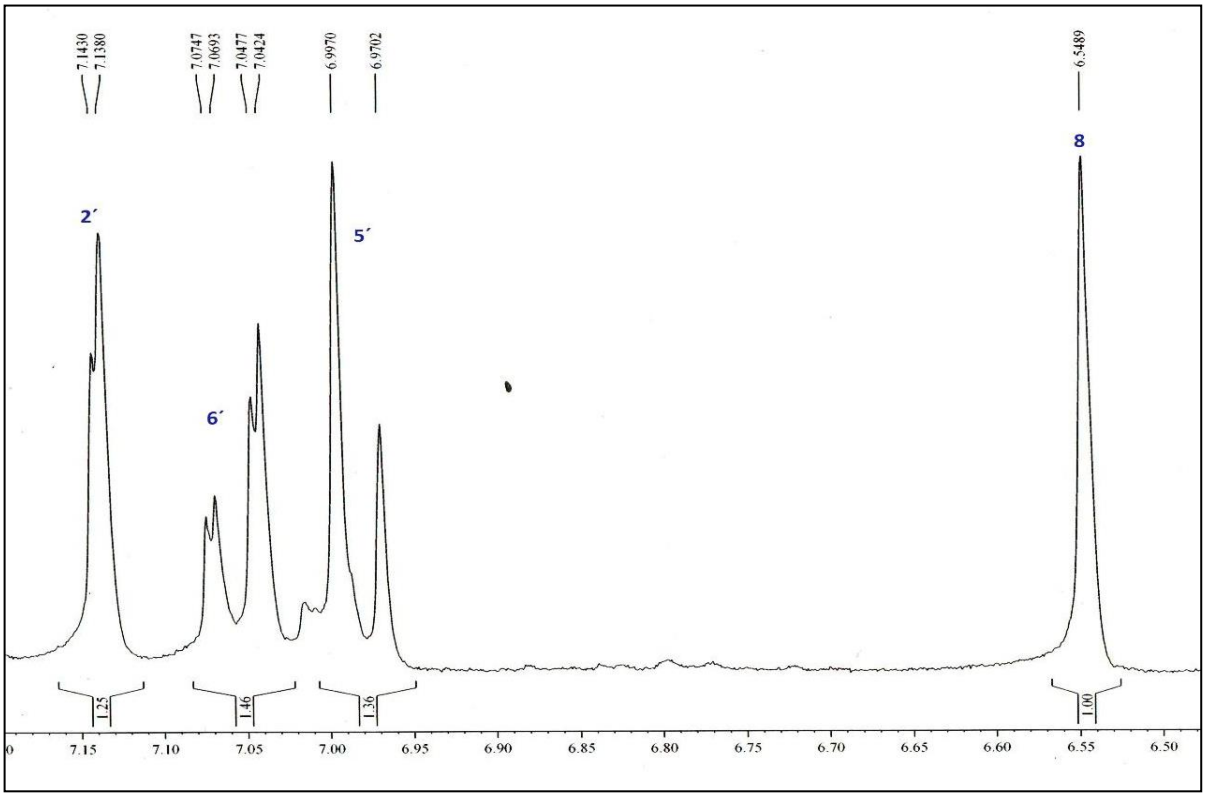
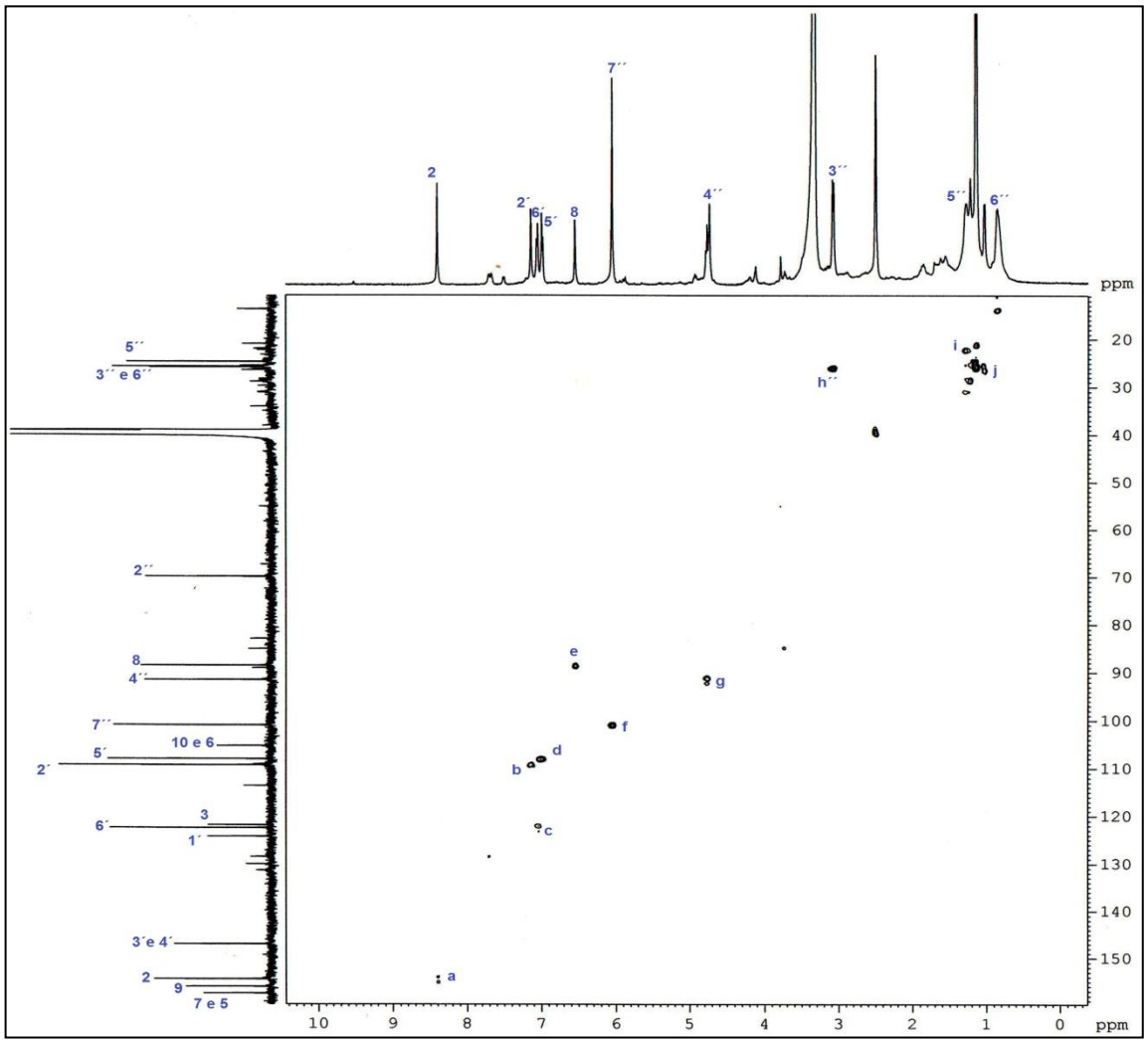


Figura 30 – Espectro de RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de HB4 expandido



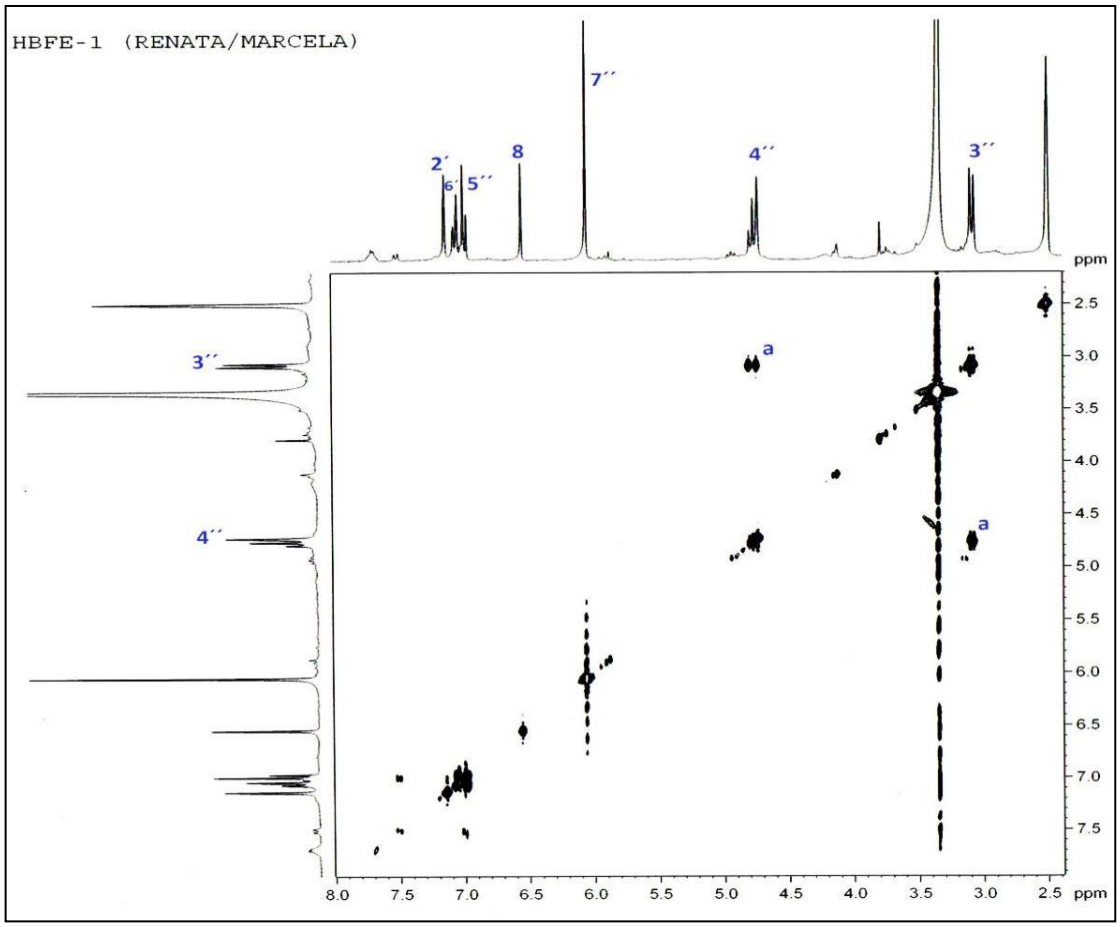
Após a avaliação dos espectros bidimensionais de correlação homo e heteronuclear, foi confirmada a estrutura em todas as suas partes. Na figura 31 , podemos ver o espectro bidimensional heteronuclear de correlação a uma ligação, ^{13}C, ^{1}H- HSQC, que mostra a ligação entre cada carbono e o(s) hidrogênio(s) ligados a ele. Neste espectro de HB4, podemos observar a correlação dos carbonos hidrogenados 2, 2´, 6´, 5´, 8, 7´´, 4´´, 3´´, 5´´, 6´´ com seus respectivos hidrogênios através das manchas nomeadas de a até j.

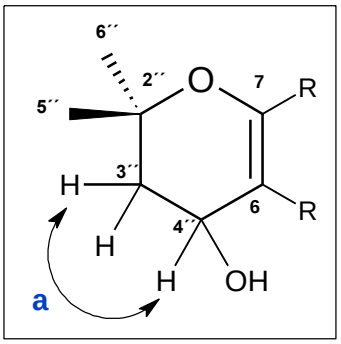
Figura 31– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}C,^{1}H$-HSQC expandido de HB4



A verificação dos acoplamentos entre átomos de hidrogênio de diferentes carbonos a múltiplas ligações (J^n) pode ser realizada através do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^{1}H,^{1}H$-COSY (fig.32), onde podemos ver principalmente o acoplamento de H-4´´ com os dois H-3´´, nomeado na figura com a letra a.

Figura 32– Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^{1}H, ^{1}H- COSY de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz)





A verificação dos sinais presentes no ^{1}H,^{1}H- COSY mostrou a relação entre os hidrogênios vizinhos H-3´´ e H-4´´, podendo confirmar o encadeamento dos respectivos carbonos adjacentes. Nos espectros observados para a harpalicina II, era possível visualizar também a correlação entre H-3´´ e OH-C3, fato que não ocorre em HB4, talvez em virtude da proximidade da hidroxila de C-4´´ com aquela presente em C-5. A formação de interações tipo ligação de hidrogênio entre o hidrogênio de uma com o oxigênio da outra, com trocas rápidas de próton, impossibilita tanto o acoplamento quanto a geração do sinal no espectro.

Esta é mais uma evidência a favor da mudança de posicionamento da hidroxila de C-3´´ na harpalicina para C-4´´em HB4.

Já o espectro ^{1}H, ^{1}H-NOESY (figura 33) também mostra a correlação entre os hidrogênios vizinhos que podem estar distante a múltiplas ligações, pois neste caso a interação se dá de forma espacial e não apenas por dipolaridade. Neste espectro podemos observar as correlações entre H-4´´ e H-5´´ (a) e entre H-2 e H-5´ (b). No espectro expandido (figura 34) podemos também ver os acoplamentos entre H-7´´ e H-2´ (a), H-2 com H-2´ (b), H-6´ (c) e H-5´ (d).

Figura 33- Espectro de correlação bidimensional ^{1}H,^{1}H- NOESY (300 MHz MeOD) de HB5

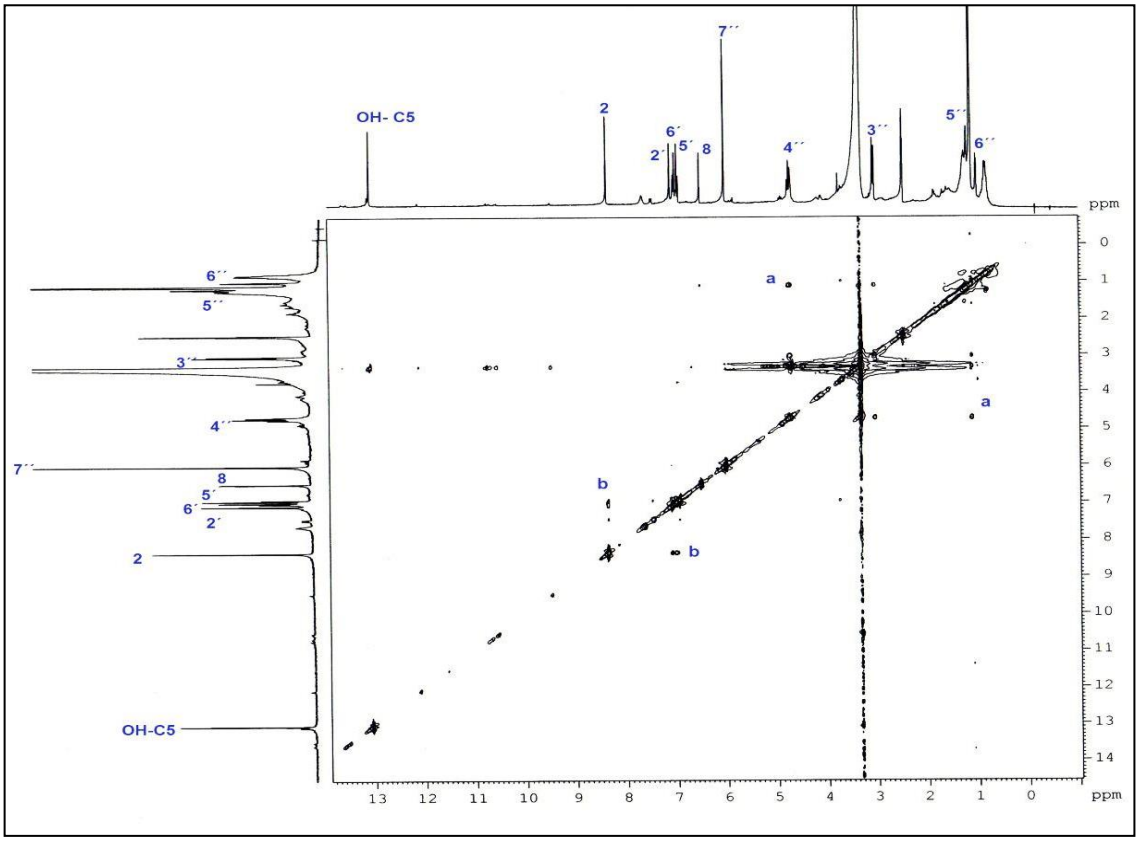
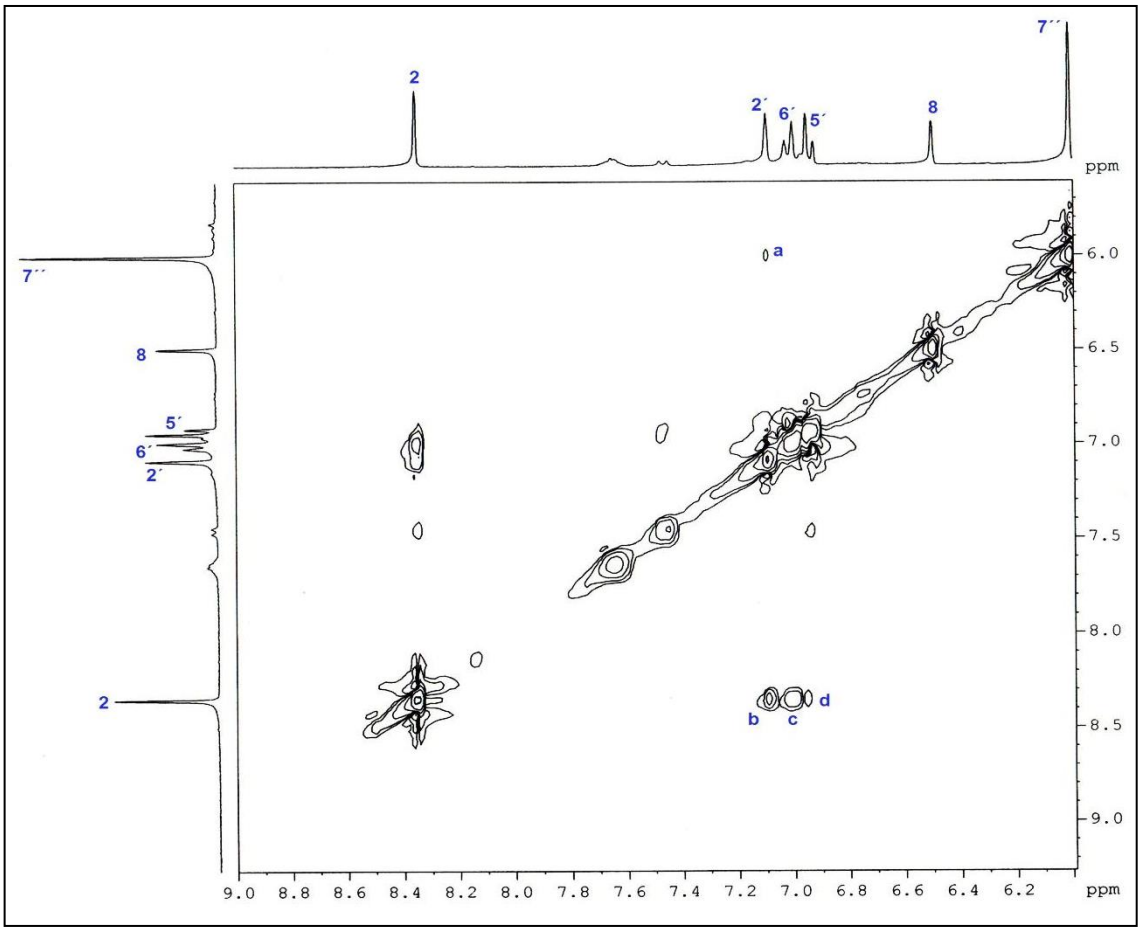


Figura 34- Espectro de correlação bidimensional $^{1}H,^{1}H$- NOESY expandido (300 MHz, MeOD) de HB4



Através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a múltiplas ligações, $^{13}C,^{1}H$-HMBC, podemos confirmar os acoplamentos entre duas, três quatro e cinco ligações entre os carbonos que corroboram para a definição final da estrutura proposta. Os acoplamentos verificados estão dispostos no espectro (Figura 33) e alguns podem ser verificados também nas figuras abaixo. No espectro expandido (Figura 34) podemos ver também o acoplamento do hidrogênio da hidroxila em C5 com os carbonos 7 e 9 (v e x). Abaixo estão algumas figuras que ilustram os acolamentos verificados nos espectros

Figura 34b - Acoplamentos verificados nos espectros bidimensionais

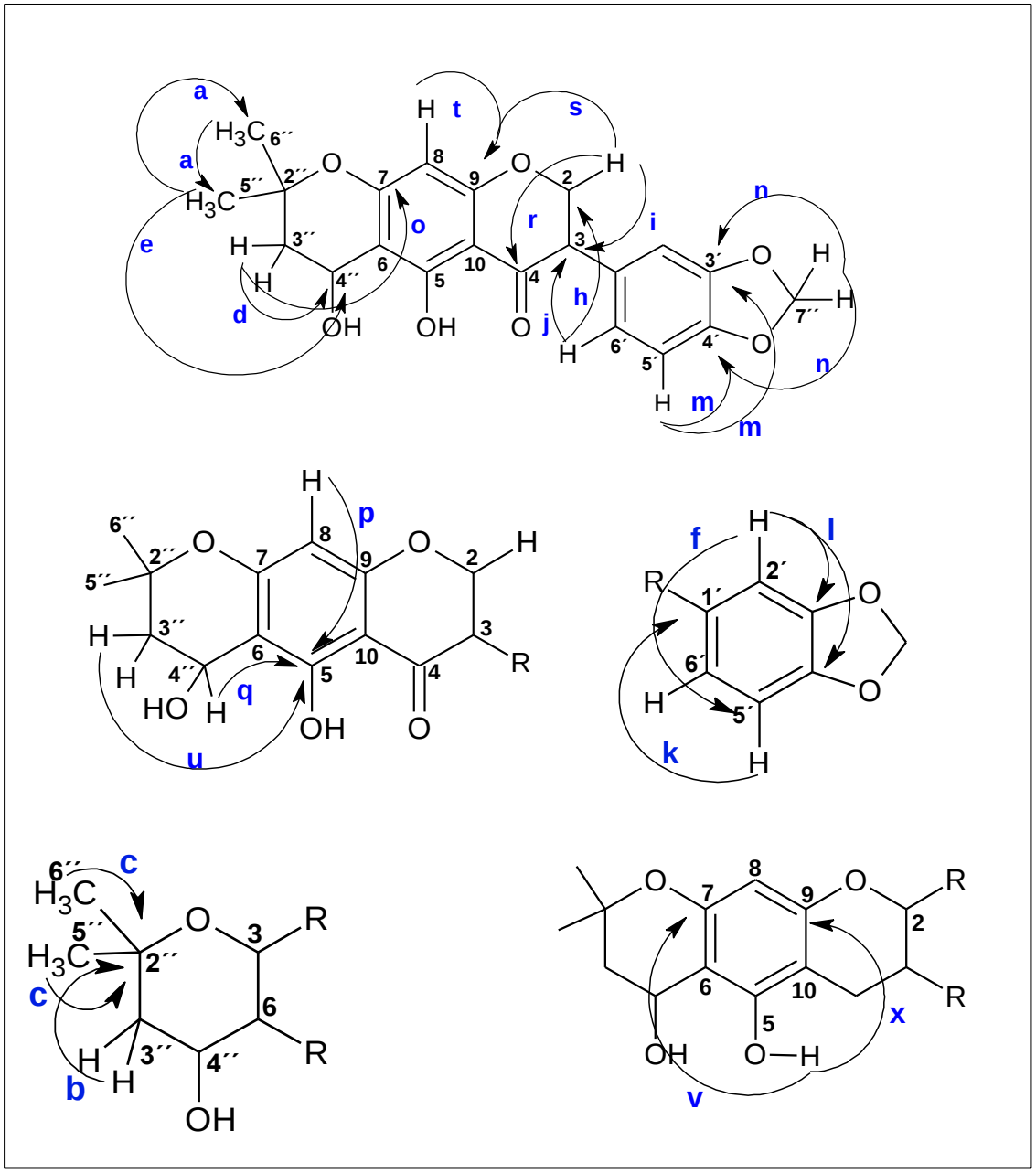


Figura 35– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HMBC de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz)

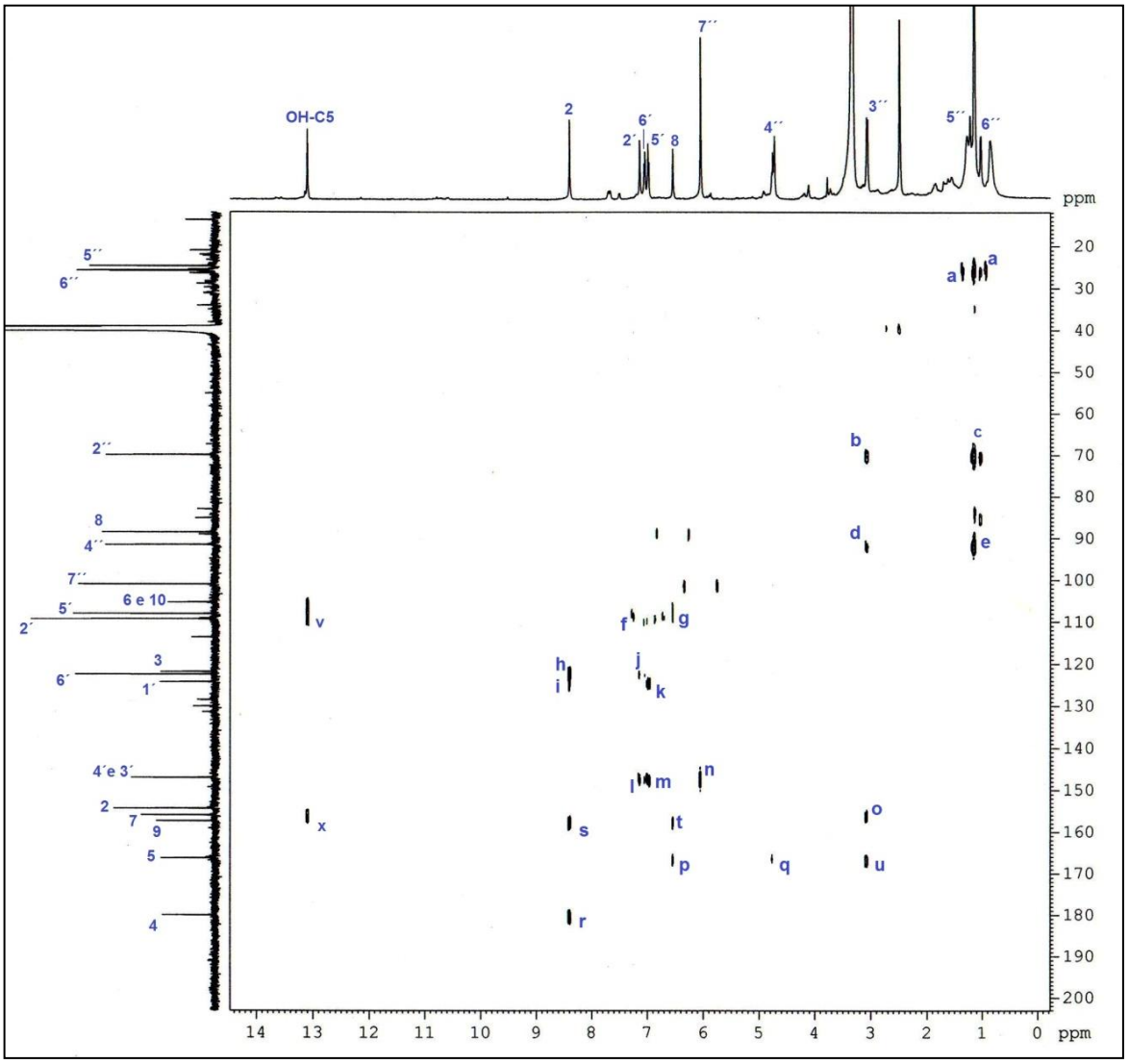
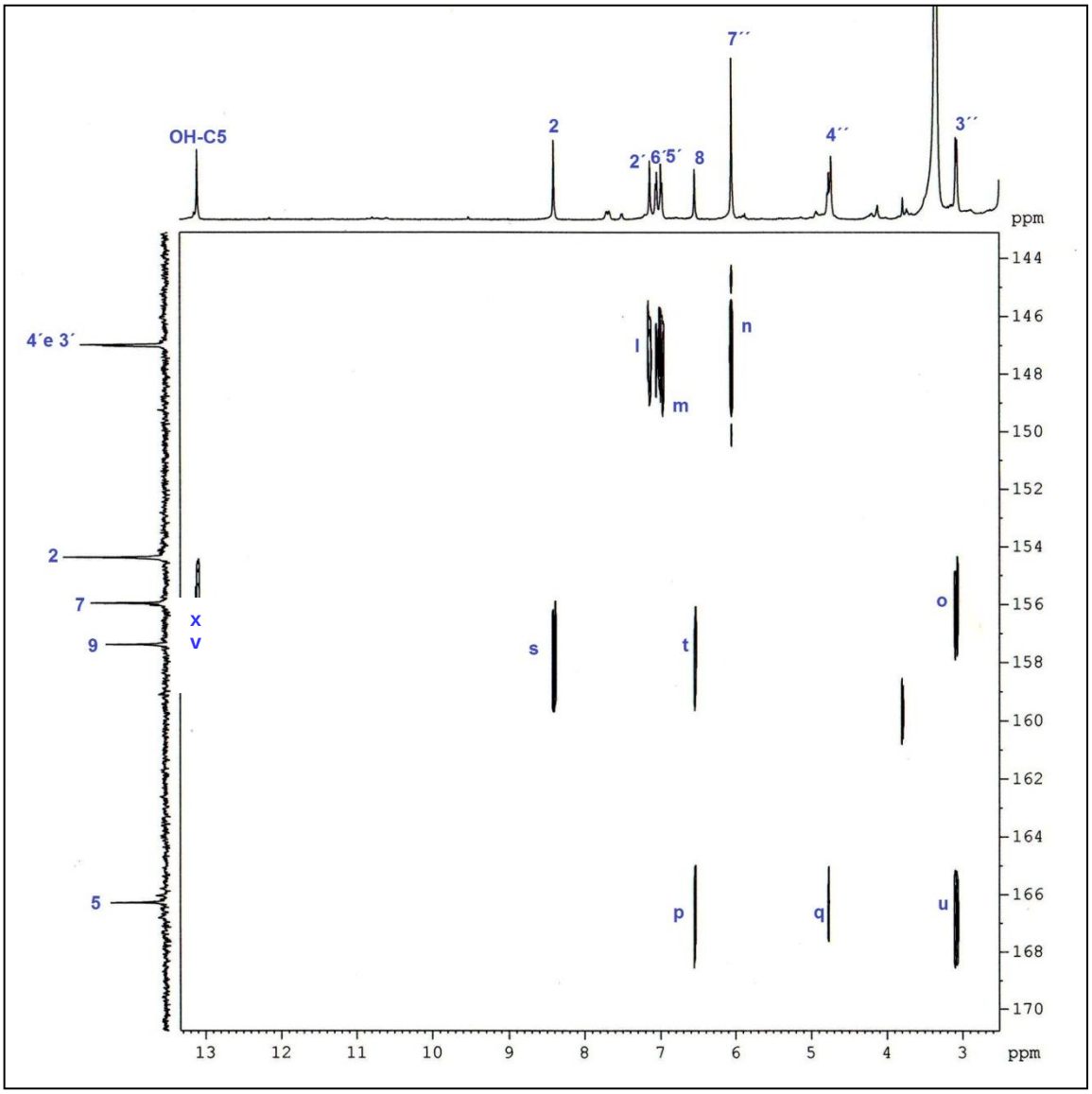


Figura 36– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HMBC expandido de HB4 ($CDCl_3$, 300 MHz)



Assim a análise dos espectros nos levou a montar a estrutura de uma nova substância com apenas uma pequena variação na substituição da hidroxila em 4´´ em relação à harpalicina. Após verificação no scifinder sobre a originalidade da molécula, foi constatado que de fato não há relatos na literatura para esta substância, cujo nome sistemático é 5,4´´di-hidroxi- 3´,4´- metilenodioxi- 7,8:6´´,5´´-2´´,2´´- dimetilpirano-isoflavona, inédita na literatura para qualquer espécie vegetal ou animal.

4.3.9 HB5

A fração HBFE-Cl- (38-40)(47-60), resultante de partição e tratamento cromatográfico do extrato etanólico, teve seus componentes separados por métodos cromatográficos clássicos com sílica flash e sistema CLAE. Os procedimentos estão descritos na seção experimental. Através dos cromatogramas gerados para a fração, verificamos a presença de dois picos, sendo que o segundo foi relacionado à substância HB5. Ao registrar os espectros de RMN^{13}C e RMN^{1}H da mesma, o perfil dos sinais foi muito semelhante aos das substâncias HB1 e HB2, indicando que a substância também é um derivado de floroglucinol substituído.

No espectro de RMN^{13}C (figura 38) também foram detectados 22 sinais, sendo um em campo baixo suficiente para ser relacionado à carbono carbonílico. Desta vez, havia apenas seis sinais em região de carbono aromático, δ 156,8 (C-6), 164,4 (C-4), 166,8 (C-2**),** 106,2 (C-1), 102,0 (C-3) e 96,75 (C-5). A presença de quatro sinais em regiões de carbono saturado oxigenado, com δ 71,34 (C7´), 75,9 (C-3´), 76,26 (C-2´) e 85,84 (C-6´) e mais 10 sinais em região de carbono sp_3 δ 45,14 (C-8), 26,21 (C8´), 25,82 (C-9), 32,46 (C-10), 23,31 (C-11), 14,5 (C-12), 37,25 (C-4´), 24,5 (C-5´), 24,3 (C-1´), 27,29 (C-9´) e 16,56 (C-10´). Os valores de deslocamentos químicos estão em ppm.

No espectro de RMN^{1}H foram encontrados sinais relacionados a um hidrogênio aromático, δ 6,54 (H-5), além de um sinal em campo bem baixo, relativo à hidroxila quelada, δ 14,61 (OH-C-6), observada da mesma forma em HB1 e HB2. Outra hidroxila aparece como um singleto largo localizado em δ 5,09 ppm (OH-C3 ou OH-C7´). Dois sinais posicionados em δ 3,59 (H-6´) e 3,69 (H-2´) revelam a presença de dois hidrogênios de carbono oxigenado enquanto os outros sinais são atribuídos à carbonos sp^{3}, como, δ3,15 (H-8), 1,8 (H-9), 1,4 (H-10) , 1,3 (H-11), 0,9 (H-12), 2,19 e 1,94 (2H-4´), 2,02 e 1,94 (2H-5´), 3,28 e 2,6 (H-1´), além dos hidrogênios metílicos em δ 1,49 (H-8´), 1,49 (H-9´) e 1,33 (H-10´). Para maiores detalhes das informações, como multiplicidade e integração, consultar tabela 29.

Tabela 29- Dados espectroscópicos de RMN^{13}C e ^{1}H para a substância HB5

C	**RMN^{13}C δc (ppm) C5D5N, 500Mhz**	**RMN^{1}H δH(ppm) (int, mult., J (Hz)), CDCl3, 500 MHz**
1	106,0	-
2	166,8	-
3	102,0	-
4	164,4	-
5	96,75	6,54 (s)-
6	156,8	-
7	-	-
8	45,14	3,15 (m)
9	25,82	1,8 (m)
10	32,46	1,4 (m)
11	23,31	1,3 (m)
12	14,5	0,9 (t)
1´	24,3	2,6 (dd, J= 15 e 6) e 3,28 (dd, J= 15 e 11,3)
2´	76,26	3,69 (dd, J= 11,2 e 6,1)
3´	75,9	-
4´	37,25	2,19 (m) e 1,94 (m)
5´	24,5	2,02 (m) e 1,94 (m)
6´	85,84	3,59 (s)
7´	71,34	-
8´	26,21	1,49 (s)
9´	27,29	1,49 (s)
10´	16,56	1,33 (s)
OH-C6	-	14,61 (s)
OH-C4	-	5,09 (s l)

Figura 37- Fórmula estrutural de HB5

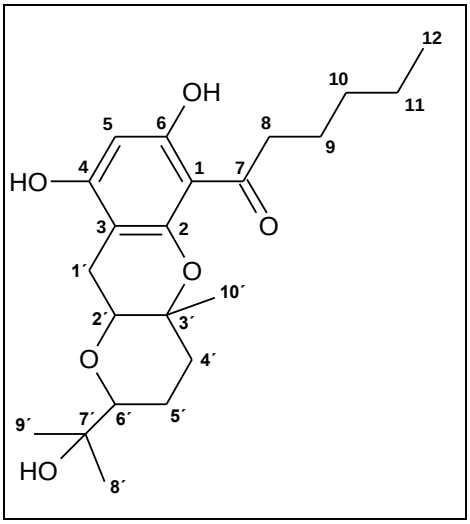


Figura 38- Espectro de RMN^{13}C da substância HB5 (300 MHz, C_5D_5N)

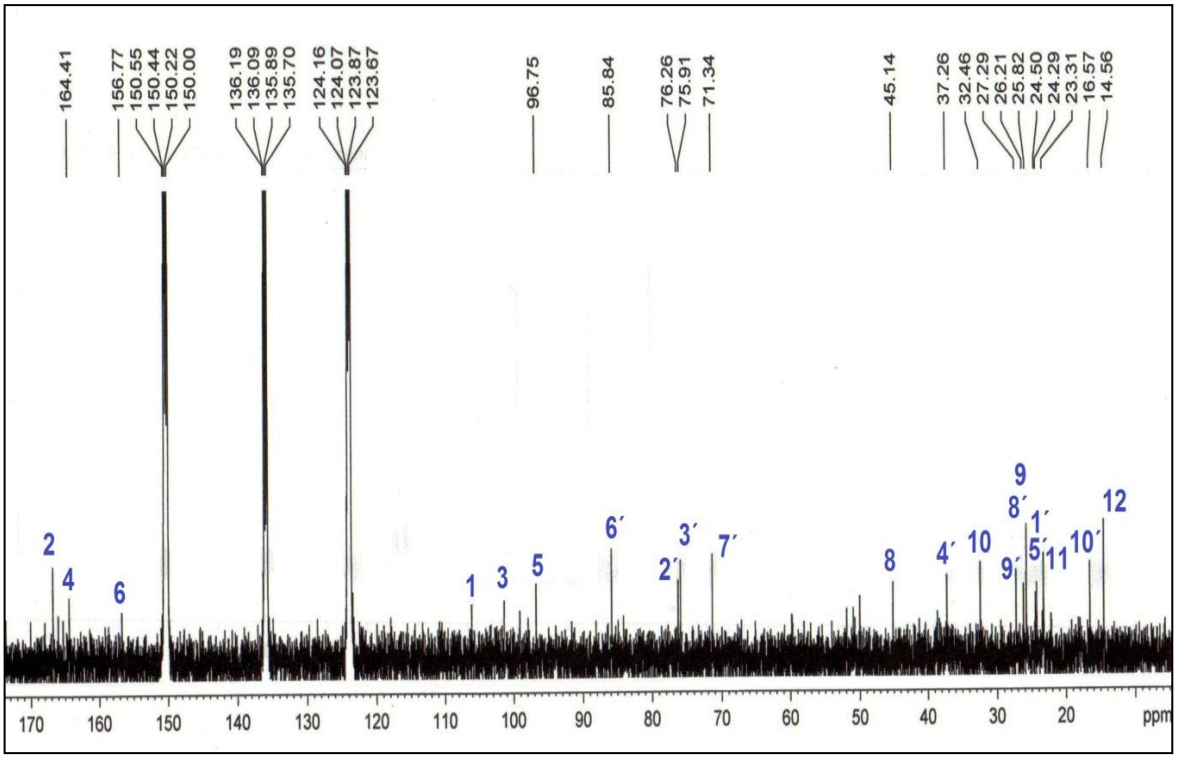
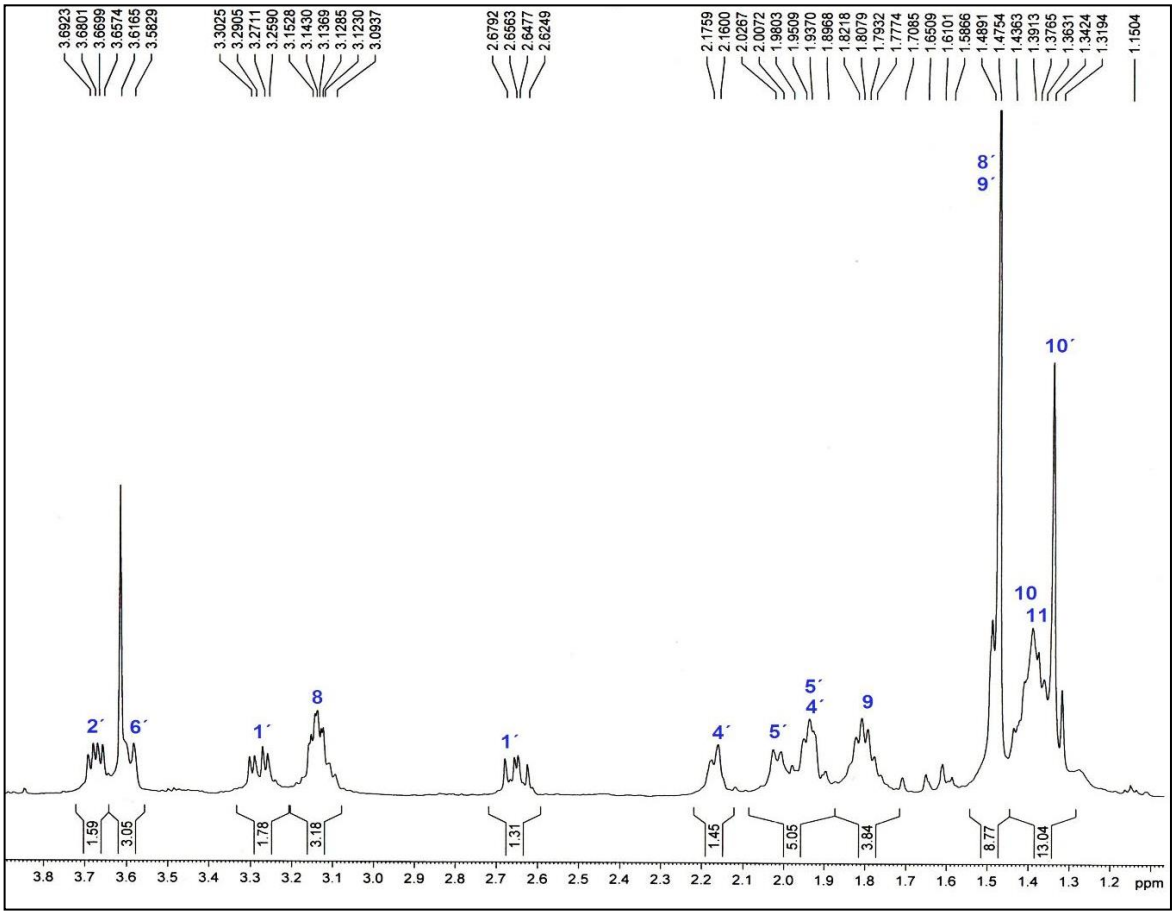


Figura 39- Espectro expandido de RMN^{1}H da substância HB5 (300 MHz, $CDCl_3$)



Através da verificação do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação $^{1}H,^{13}C$– HSQC (Figura 40) podemos associar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos, e para melhor visualização, há o espectro expandido (Figura 41). Para este espectro, as manchas representantes dos acoplamentos entre os hidrogênios na cor azul são relativas à CH_2 e as da cor preta serão relacionadas a grupos CH.

Figura 40– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HSQC de HB5 ($CDCl_3$, 300 MHz)

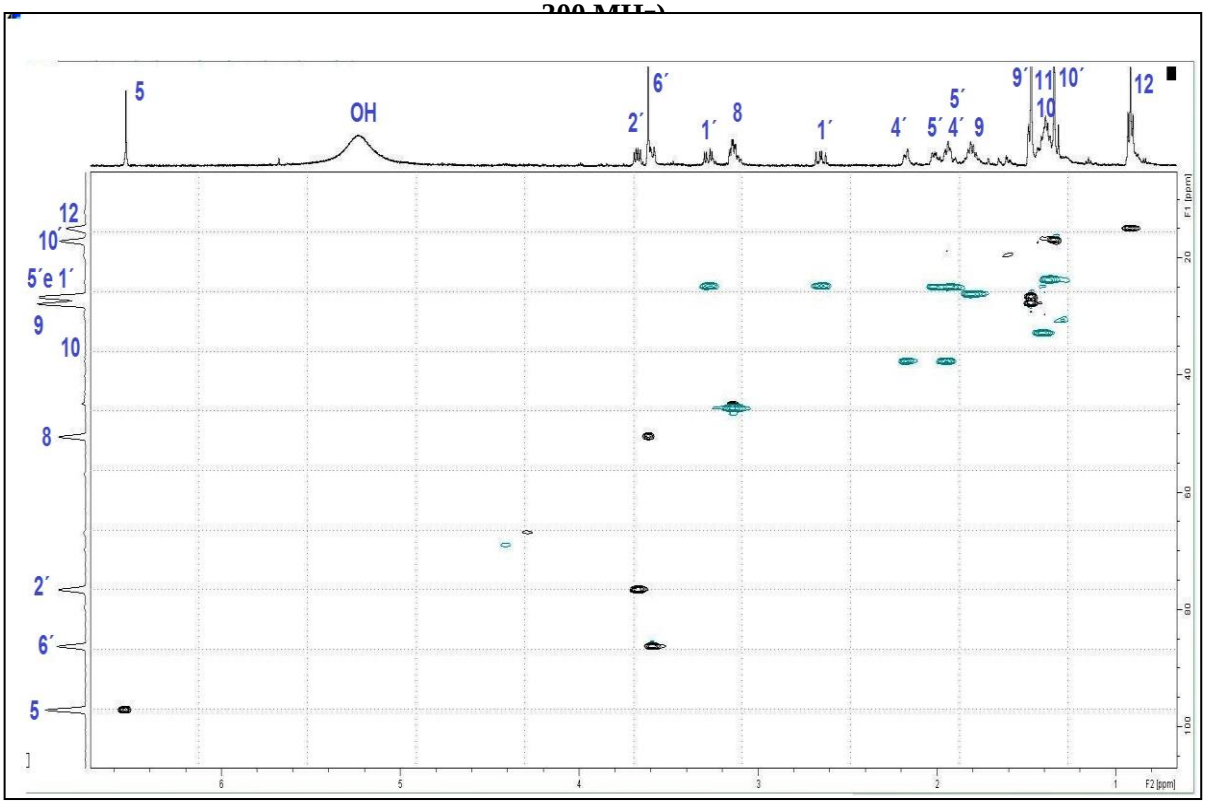
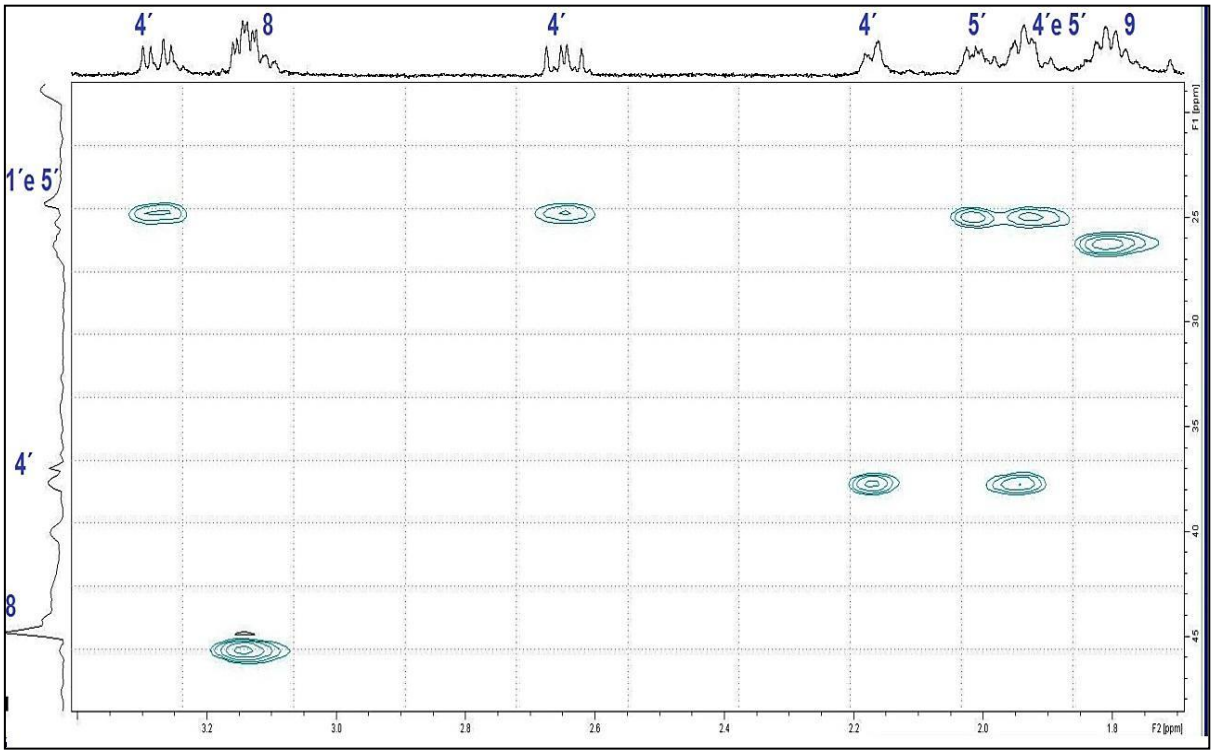


Figura 41 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{1}H, ^{13}C- HSQC expandido de HB5 ($CDCl_3$, 300 MHz)



Através da avaliação dos espectros, percebe-se que a substância é muito parecida com os floroglucinóis encontrados em HB1 e HB2. Entretanto, aqui houve uma mudança na estrutura de forma que é perceptível que o sinal do C olefínico em HB1 e oxigenado em HB2, ambos correspondentes à C-6´, muda para um novo sinal na região dos carbonos oxigenados (C6´- 85,84). Da mesma forma ocorre em C-7´ (71,34), que deixa de ser sp^2 em HB1 e HB2 para tornar-se sp^3 oxigenado em HB5. No espectro de RMN^{1}H, os padrões de acoplamento decorrentes das substituições também mudam. Nas tabelas 30 e 31 é possível verificar este fato.

Tabela 30- Comparação entre dados espectroscópicos de RMN^{13}C para C-6´e C-8´ carbonos de HB1, HB2 e HB5

Dados espectroscópicos	**δc (ppm)- C6´**	**δc (ppm) – C8´**
δ_C RMN^{13}C- HB1	125,3	18,04
δ_C RMN^{13}C- HB2	76,2	110,8
δ_C RMN^{13}C- HB5	85,84	26,21

Tabela 31- Comparação entre dados espectroscópicos de RMN^{1}H para H-6´ e H-8´ de HB1, HB2 e HB5

Dados espectroscópicos	**δ_H (ppm)- H- C6´**	**δ_H (ppm) H– C8´**
δ_H RMN^1 H- HB1	5,28 (t, J=7,0 Hz)	1,66 (s)
δ_C RMN^{13}H- HB2	4,43 (q, J= 6)	5,27 (d, J= 12,0) e 4,97(d, J= 7,8)
δ_H RMN^1 H- HB5	3,59 (s)	1,49 (s)

A ausência de dois sinais de carbonos insaturados presentes em HB1 (C-6´ e C-7´) e em HB2 (C-7´e C-8´) aliada ao fato de que o número total de carbonos é o mesmo, forneceram informações para a sugestão de que o grupo prenila existente nestas duas subtsâncias ciclizou e foi também hidroxilado. Esta conclusão é corroborada pela observação que há mais um carbono oxigenado, relacionado a C-6´ e que o sinal de carbono relativo à C-7´ também passou da região de campo baixo de insaturados para região de carbono oxigenado, mais especificamente em 71,9 ppm.

Assim, através da comparação dos dados espectroscópicos de HB5 com HB1 e HB2, além da revisão da literatura pertinente, chegamos à conclusão que a substância isolada é o

floroglucinol de nome sistemático 1-hexanoíl-[2',3']-pirano-3'-metil-6'-[hidroxi-dimetil-metano]-4,6-di-hidroxi-benzopirano, isolado pela primeira vez em Araújo (2008).

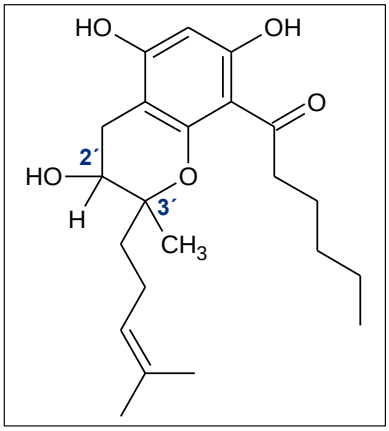
4.4 Resultados dos cálculos teóricos para a substância 1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'metil-3'-(4-metil-3-pentenil)-benzopirano (HB1).

Trabalhos envolvendo estudos teóricos com floroglucinóis acilados existem em pequeno número, em sua maioria relacionados com o composto base 1,3,5-trihidroxibenzeno (Figura 52). Esta classe de compostos possui atividades biológicas variadas, e os estudos teóricos podem fornecer informações importantes na investigação destas atividades, através da interação com enzimas e outras estruturas celulares. Em Mammino e Kabanda (2007), podemos ver o estudo sobre a influência da ligação intramolecular de hidrogênio com o oxigênio da acila sobre preferências conformacionais e energéticas. Neste trabalho, os autores concluem que há uma preferência para a ligação de hidrogênio se formar do mesmo lado que um segundo substituinte, quando presente, chegando a estes resultados através do conjunto de base 6-31 G (d,p). Os métodos semiemíricos AM1 e PM3 também foram investigados, mas se nostraram não completamente adequados.

Para o floroglucinol HB1 (1-hexanoíl-2',4,6-tri-hidroxi-3'metil-3'-(4-metil-3-pentenil)-benzopirano) (Figura 42) substância isolada de *Harpalyce brasiliana* Benth, teve início um trabalho de química teórica envolvendo a comparação entre os quatro estereoisômeros de uma determinada conformação, através dos dados de deslocamento químico de RMN^{1}H e RMN^{13}C calculados, que foram então comparados com os dados experimentais e investigados através da construção de um gráfico.

Após os primeiros cálculos realizados através do Gaussian (otimização da estrutura, frequências vibracionais e outros parâmetros energéticos), foi gerada uma figura através do programa Chemcraft contendo dados de interesse, como comprimentos de ligação, distâncias interatômicas, ângulos de ligação e diedros, grupos de ponto, graus de liberdade da molécula, dentre outros parâmetros importantes das estruturas otimizadas previamente.

Figura 42- Substância HB1, isolada de *Harpalyce brasiliana*



Para esta molécula, C2` e C3`são carbonos com quatro substituintes diferentes, sendo os dois pertencentes ao anel heterocíclico de seis membros. Além de uma hidroxila e um hidrogênio em C2´, há uma prenila e uma metila em C3´. Estes dois centros quirais possibilitam que os substituintes destes carbonos se arranjem de quatro formas diferentes. As respectivas possibilidades foram desenhadas em arquivos nomeados HB1-1, HB1-2, HB1-3 e HB1-4, com substituintes posicionados espacialmente conforme tabela 32 (Página 83).

Tabela 32- Arquivos e posições dos substituintes em C2´e C3´de HB1

Nome	**C2´ (posição no anel)**	**C3´ (posição no anel)**
HB1-1	H equatorial OH axial	CH3 equatorial R axial
HB1-2	H axial OH equatorial	CH3 equatorial R axial
HB1-3	H axial OH equatorial	CH3 axial R equatorial
HB1-4	H equatorial OH axial	CH3 axial R equatorial

Assim, para cada esteoisômero foram criados dois gráficos, cada um com uma equação de reta que cujo valor da segunda derivada indica a coerência entre os dados experimentais e teóricos. Os gráficos foram nomeados de HB1_est1_conf1 (estereoisômero 1), HB1_est2_conf1 (estereoisômero 2), HB1_est3_conf1 (estereoisômero 3) e

HB1_est4_conf1(estereisômero 4). Os gráficos estão dipostos nas figuras 43 a 46, dispostas a seguir.

Figura 43- Gráfico 1, dados teóricos x dados experimentais do estereoisômero 1

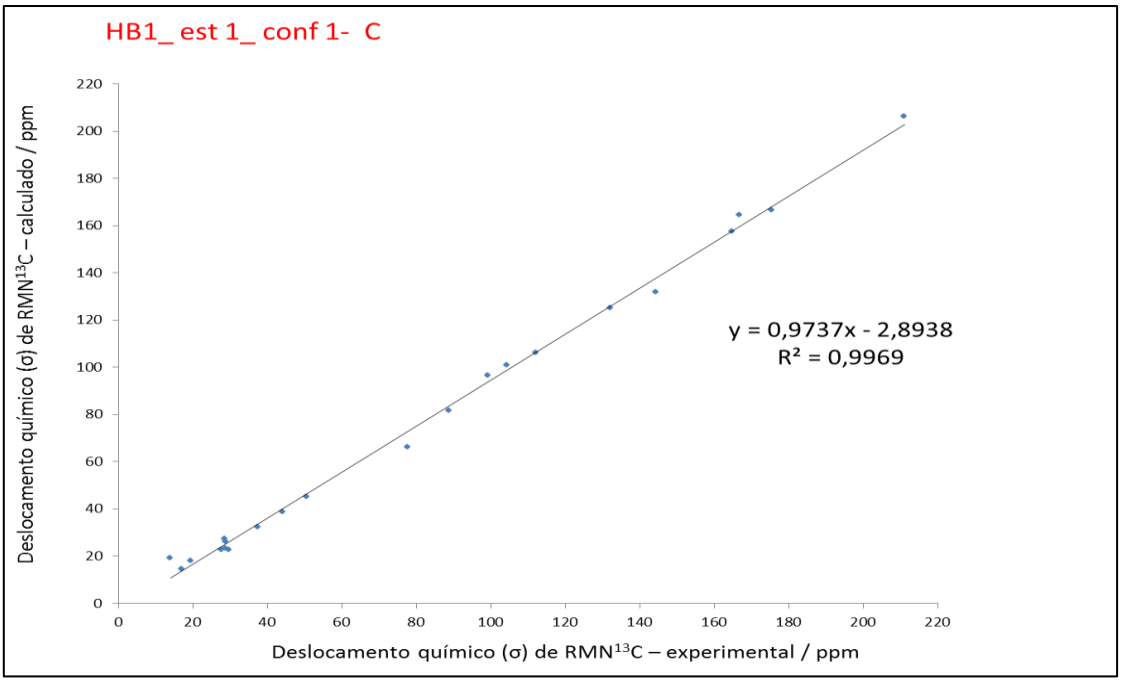


Figura 44- Gráfico 2, dados teóricos x dados experimentais do estereoisômero 2

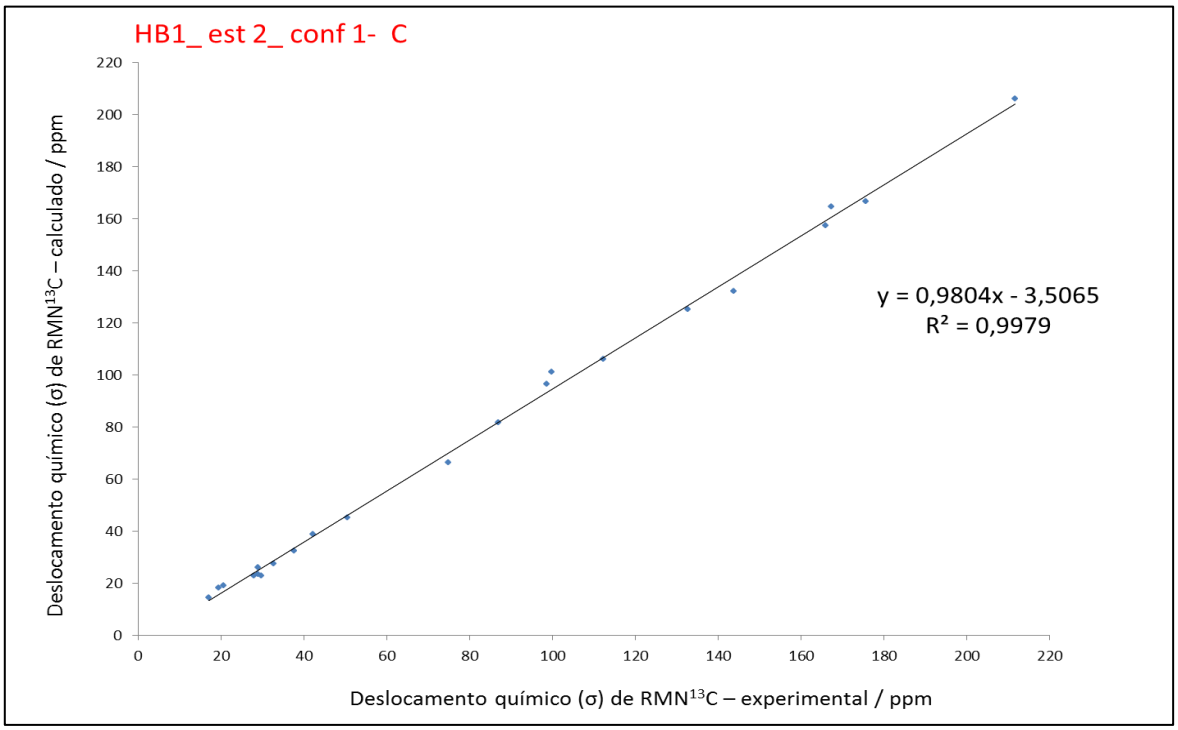


Figura 45- Gráfico 3, dados teóricos x dados experimentais do estereoisômero 3

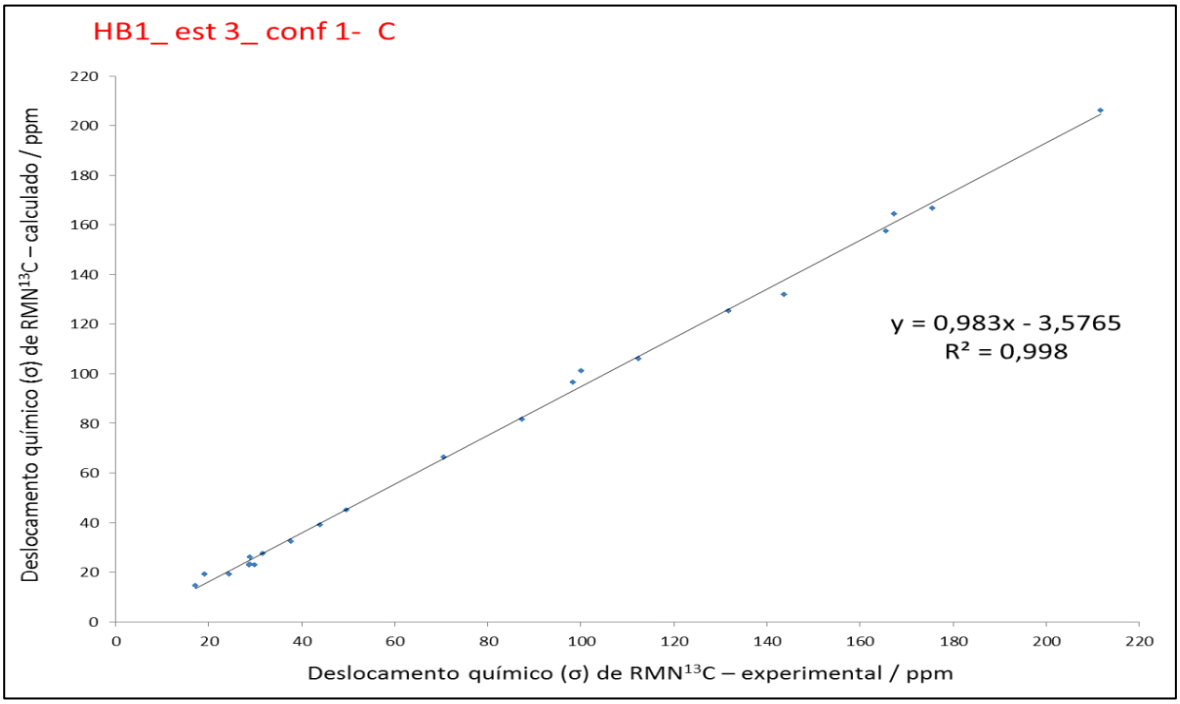
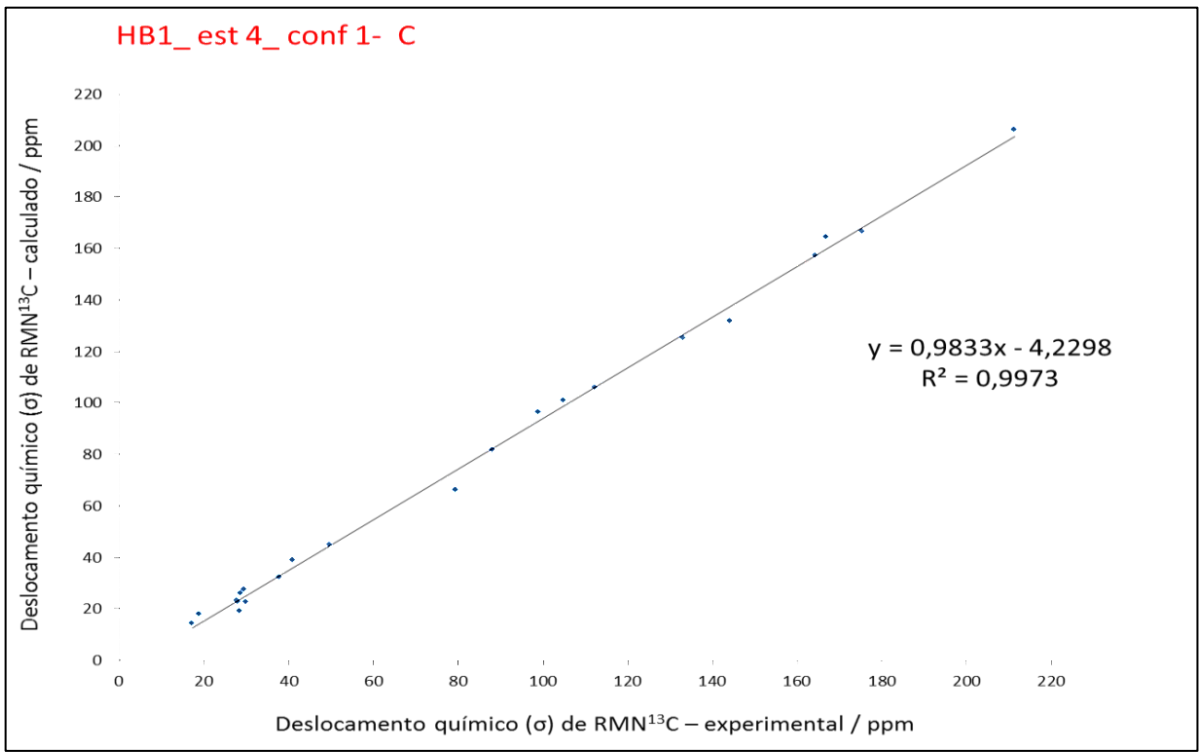


Figura 46- Gráfico 4, dados teóricos x dados experimentais do estereoisômero 4



Da mesma forma realizada para os dados de carbono, os gráficos de correlação entre dados de RMN^{1}H foram construídos, combinando dados de deslocamento químico experimentais e calculados (teóricos). Os nomes utilizados para os arquivos foram os mesmos dos gráficos de carbono: HB1_est1_conf1 (estereoisômero 1), HB1_est2_conf1 (estereoisômero 2), HB1_est3_conf1 (estereoisômero 3) e HB1_est4_conf1(estereisômero 4). Os gráficos estão dipostos nas figuras 47 a 50.

Figura 47- Gráfico 1a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 1

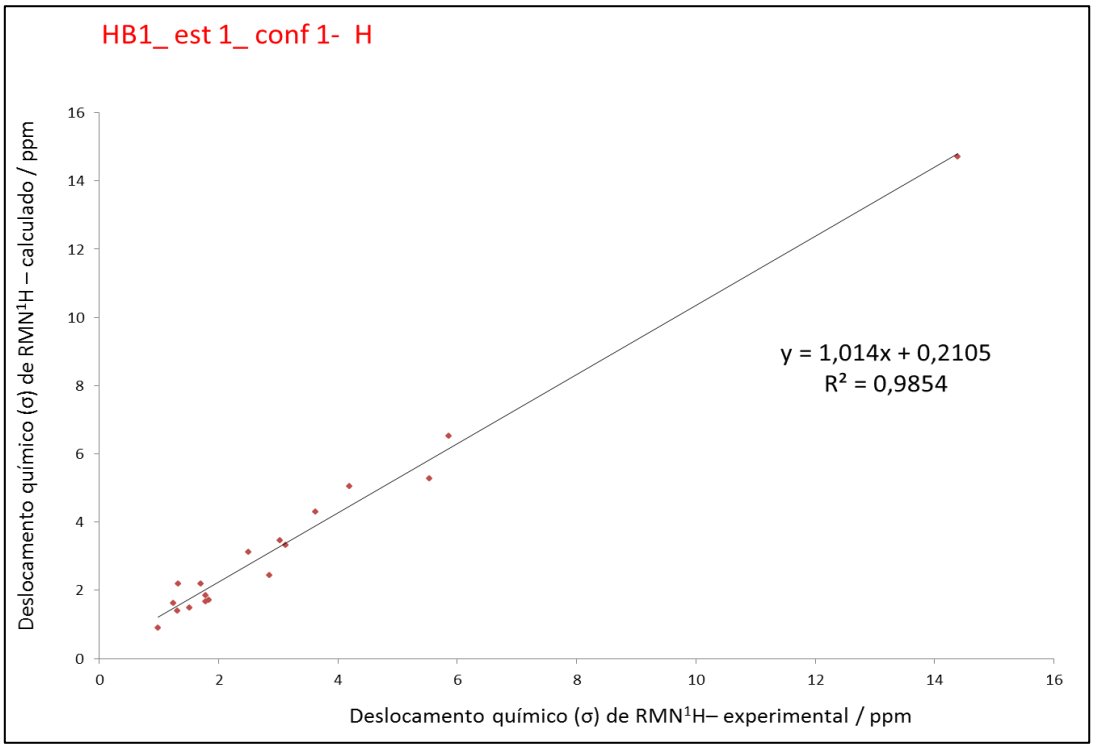


Figura 48- Gráfico 2a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 2

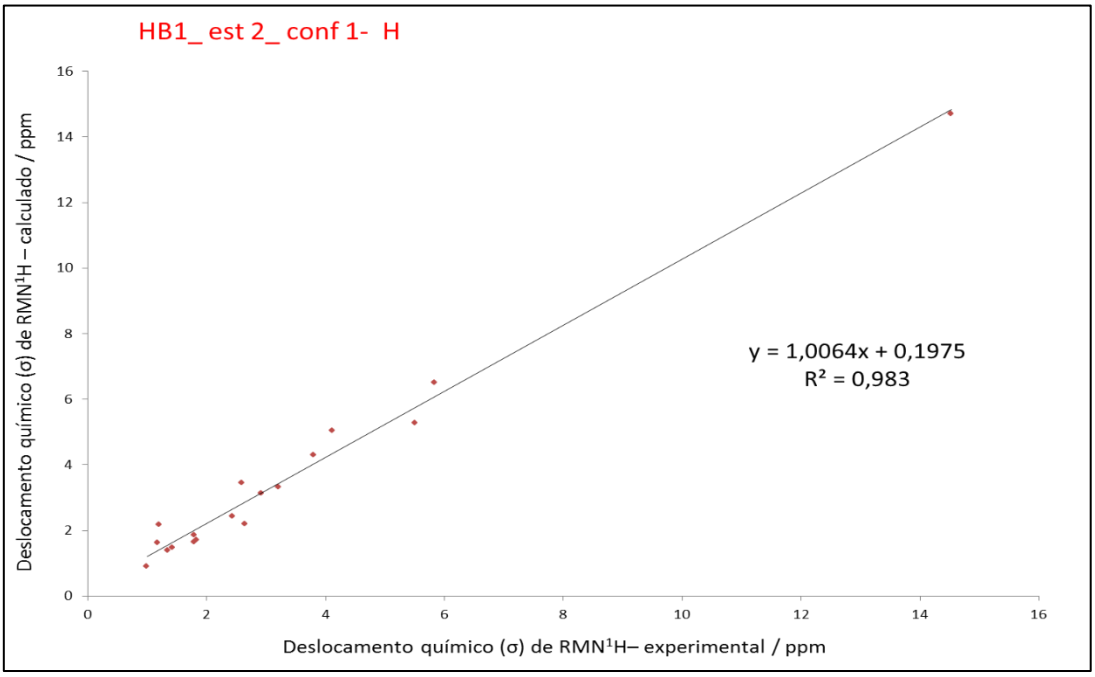


Figura 49- Gráfico 3a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 3

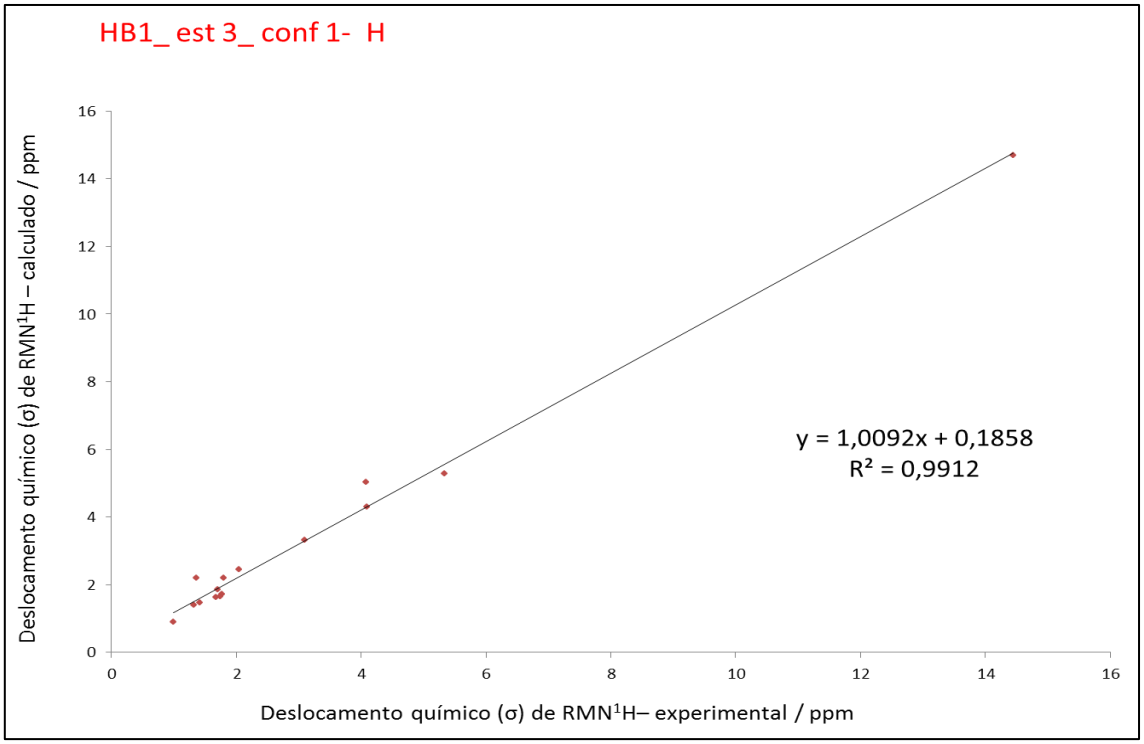
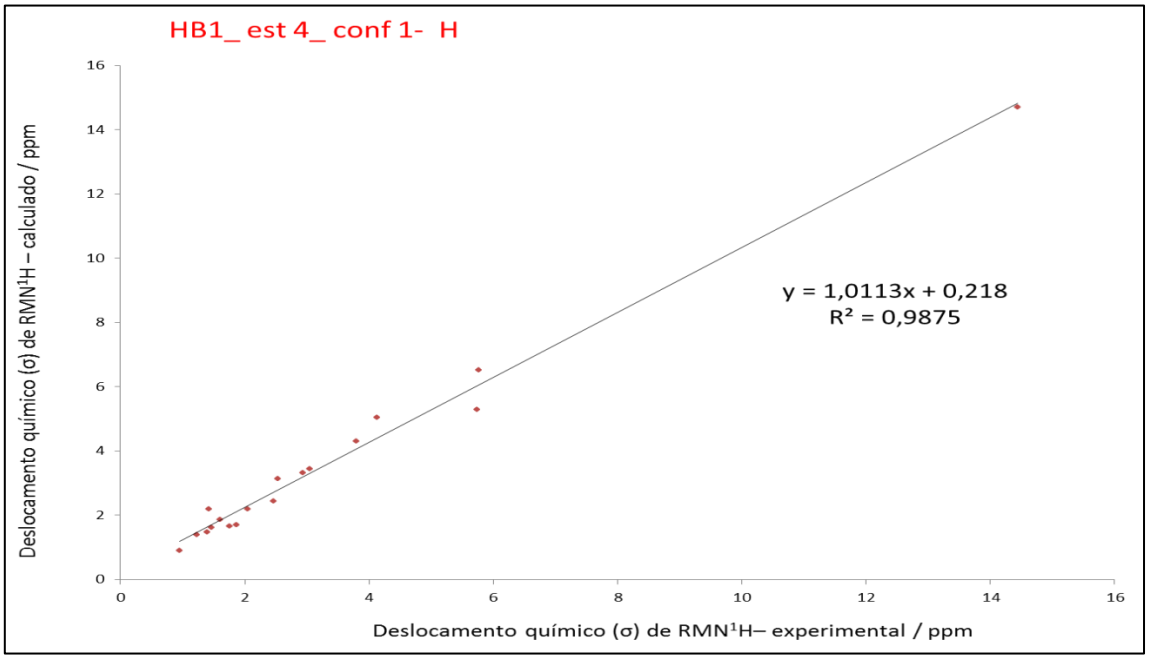
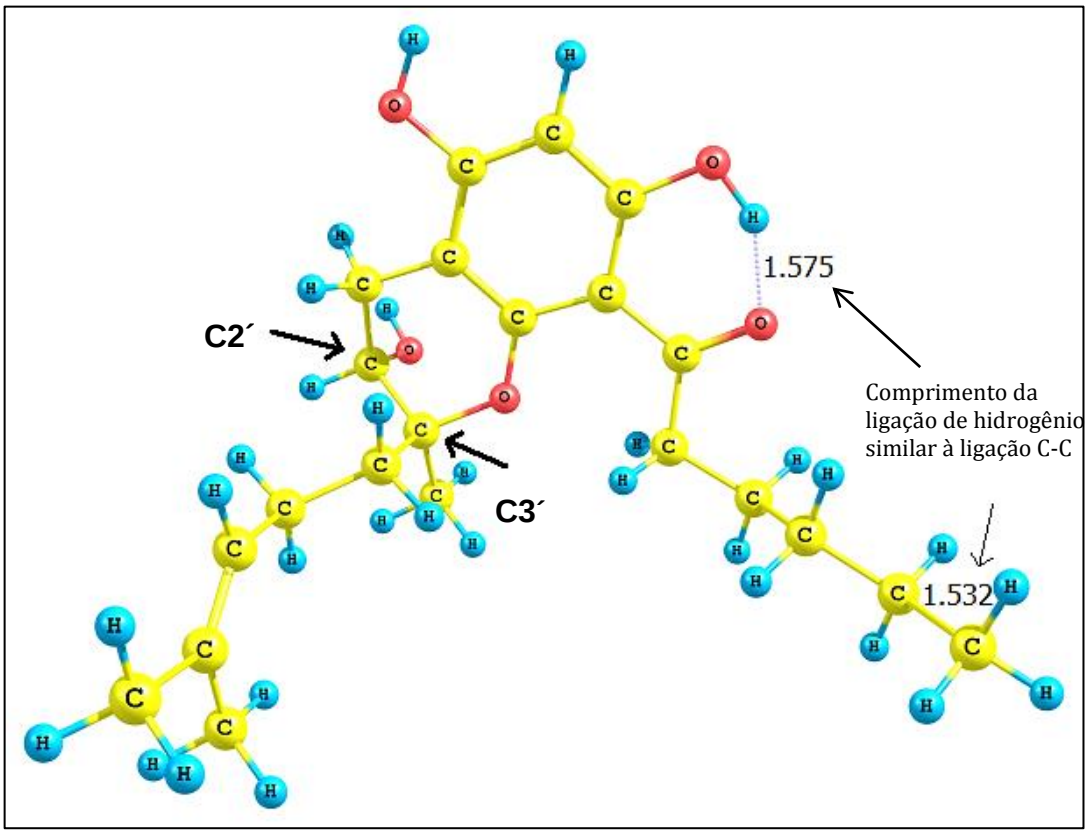


Figura 50- Gráfico 4a, dados teóricos x dados experimentais de RMN^{1}H do estereoisômero 4



Tanto para os carbonos quanto para os hidrogênios, os maiores valores da linearidade da reta do gráfico coincidiram no estereoisômero 3. Na estrutura teórica deste estereoisômero, os átomos possuem os valores mais próximos daqueles das substâncias isoladas no laboratório. Nestes casos, os valores da linearidade das retas foram 0,998 para os sinais de RMN^{13}C e 0,991 para os de RMN^{1}H. Este resultado indica que a provável estrutura obtida experimentalmente era equivalente ao estereoisômero 3, mostrada na figura 51.

Figura 51- Estrutura do estereoisômero 3 de HB1 com destaque para as carbonos 2´e 3´



Após a comparação dos gráficos já é quase possível definir qual o isômero foi provavelmente isolado experimentalmente. A conclusão final se dará após análise dos resultados obtidos nos cálculos teóricos também para constantes de acoplamento e para a conformação menos estável. Estes cálculos estão sendo realizados em sua etapa final.

Pela distribuição de Boltzmann, a maior parte das moléculas dentro de um bulk molecular estará na sua conformação, ou geometria, mais estável. Pelo fato de estar presente em maior número é que se associa o sinal gerado no experimento de RMN com esta geometria mais estável. Ao serem submetidos ao campo magnético e depois à radiofrequência, os núcleos que compõe este excesso populacional são os responsáveis por ressonar e emitir os sinais detectados no aparelho e transformados no espectro de RMN que são analisados.

Alguns fatores devem ser levados em consideração quando se analisa os deslocamentos químicos calculados teoricamente. Algumas diferenças nos valores de deslocamento químico para determinados átomos podem ocorrer, não apenas em função dos efeitos já conhecidos como desprotetores e protetores, quase sempre relacionados a

substituintes que exercem efeito indutivo, mesomérico ou anisotropia, mas sim em função de interações intermoleculares com outras moléculas da mesma substância.

Um exemplo é o caso da hidroxila vizinha a uma carbonila presente nos floroglucinóis acilados. A interação entre o oxigênio da carbonila e o hidrogênio da hidroxila faz com que o sinal de hidrogênio tenha seu deslocamento em campo muito baixo, ou seja, ele está muito desprotegido, por estar quelado (a definição de “quelado” está na página 58) com a carbonila. Entretanto, há a possibilidade de duas moléculas idênticas estarem posicionadas de forma que a hidroxila de uma esteja interagindo com carbonila da outra e vice versa. Essa possibilidade também pode causar uma mudança no sinal esperado no espectro, assim como outras formas de interação intra e intermolecular.

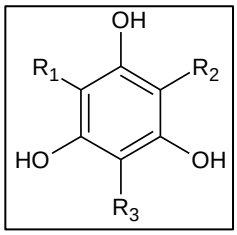
Quando o gráfico com os dados experimentais e teóricos é construído, ainda que o coeficiente da reta seja considerado bom, alguns pontos podem sair desta linearidade, por conta destes efeitos decorrentes das interações intra e/ou intermoleculares. Assim, todas as hipóteses devem ser verificadas para um resultado final mais exato e confiável.

Para uma finalização mais completa deste estudo teórico, devem ser calculados os valores de constantes de acoplamento para comparação com os dados experimentais através da construção de novos gráficos de correlação.

5. OS FLOROGLUCINÓIS E SEUS DERIVADOS

Derivados de floroglucinol são os derivados do núcleo tri-hidroxibenzeno (THB) (figura 10), que é o floroglucinol em si, também chamado de floroglucina.

Figura 52- Estrutura do núcleo básico de floroglucinol

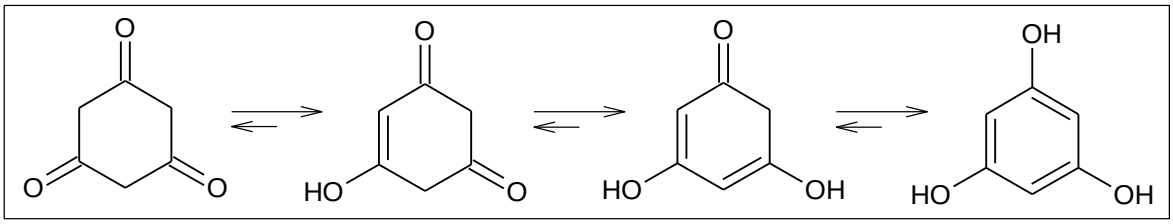


Floroglucinóis ocorrem principalmente na família Myrtaceae, porém há relatos da existência em muitas outras famílias, como Gutiferae, Euphorbiaceae, Aspidiaceae, Compositae, Rutaceae, Rosaceae, Clusiaceae, Lauraceae, Crassulaceae, Cannabinaceae e Fagaceae. A ocorrência em organismos marinhos e microorganismos também é relatada (SINGH e BHARATE, 2006).

Biossinteticamente, estes compostos se formam através da via do acetato (Figura 86, pág.143), com muitas possibilidades de substituição dos hidrogênios do anel, normalmente com substituintes do tipo acila ou alquila. Estes, por sua vez, estarão suscetíveis à ciclizações e oxidações após a ligação no anel, podendo resultar em moléculas complexas, bicíclicas, tricíclicas, dentre outras (SCHMIDT et al, 2012). Esta variedade de estruturas equivale a potencial para o futuro desenvolvimento e otimização de atividades biológicas e descoberta de novos medicamentos.

Esta estrutura inicial, o THB, quando produzida no meio biológico, ou seja, em solução aquosa repleta de enzimas específicas, existe em um equilíbrio entre as formas tautômeras, o 1,3,5-tri-hidroxibenzeno e a 1,3,5-cicloexanotriona, e nas estruturas parciais dos equilíbrios estabelecidos na Figura 53. A estrutura que possui todas as hidroxilas oxidadas é altamente energética, e pouco provável de se formar e existir por muito tempo.

Figura 53- Equilíbrio entre as forma tautômeras do THB



Métodos sintéticos para produção de policetídeos também constam na literatura, como podemos ver em van Klink et al (2005), que relata a síntese de uma série de floroglucinóis acilados e tricetonas de fontes variadas, como os isolados de óleo de manuka (*Leptospermum scoparium*), de espécies da família Myristicaceae, de algas da ordem Dyctiotales, além de outros sintéticos ainda não relatados, sendo todos avaliados quanto às atividades contra bactérias resistentes a antibióticos.

As grandes variações estruturais promovem uma grande variação também nas atividades biológicas destas substâncias. Na literatura há relatos para floroglucinóis naturais e sintéticos que possuem efeitos que vão desde antihelmíntico (SOCOLSKY et al, 2012) passando por antimicrobial (MEYER et al, 1997) (DREWES e VAN VUUREN, 2008), antibacteriano (VAN KLINK et al, 2005), antioxidante (RUKACHAISIRIKUL et al, 2006), anti-angiogênico (SCHEMPP et al, 2005) antibiótica (JAYASURIA et al, 1991) até anti-HIV (NISHIZAWA et al, 1992)(GUPTA et al, 2010).

5.1- Identificação de derivados de floroglucinol

A determinação estrutural de floroglucinóis pode se revelar muito complexa, dada a variabilidade de estruturas presentes na literatura, ainda que dentro de uma mesma família. Uma das principais ferramentas na elucidação estrutural atualmente é, dentre outras, a ressonância magnética nuclear, técnica que fornece dados de deslocamento químico característicos para cada átomo em uma molécula orgânica. Assim, na determinação estrutural de floroglucinóis, o conhecimento dos sinais de RMN^{13}C, característicos para cada subclasse, possibilita uma identificação mais precisa e rápida de substâncias desconhecidas. Por esta razão, decidimos acrescentar no trabalho este capítulo, destinado à exposição e discussão sobre os sinais de RMN^{13}C de várias subclasses de floroglucinóis (Seção 5.2) e também o

levantamento com todas as estruturas relatadas para derivados de floroglucinol monoméricos prenilados e geranilados entre os anos 1978 e 2014, seção 5.4.

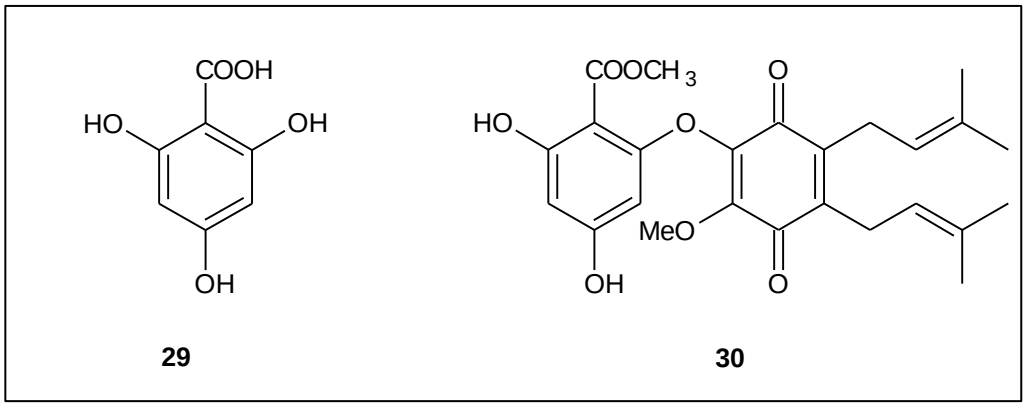
Outros métodos para identificação de floroglucinóis são as reações orgânicas envolvendo principalmente os grupamentos hidroxila presentes, como por exemplo, acetilação, mas, ainda assim, constituem um complemento às técnicas de elucidação estrutural desenvolvidas com o RMN.

5.2- Subclassificação, atividades biológicas e identificação espectroscópica de derivados de floroglucinol

Floroglucinóis podem ser monoméricos, diméricos, triméricos, tetraméricos ou superiores e florotaninos. Dentre os monoméricos, neste trabalho estão divididos em acilados, terpênicos, glicosilados, halogenados, terpenilados, policetídeos cíclicos e α-pirona substituídos.

Os floroglucinóis monoméricos também tem ocorrência de forma a não se classificar em nenhum das classes anteriores, são substituídos de formas diversas, como vemos nas estruturas a seguir, com os exemplos do ácido floroglucínico (29), isolado das cascas de cebola *Allium spp*, e a atrovirinona (30), um éster do ácido floroglucínico com uma unidade quinona ligada isolado de *Garcinia atrovirdis* (PERMANA et al, 2001).

Figura 54- Estruturas 55 e 56 de floroglucinóis variados



29 **30**

Quando se analisa o espectro de RMN^{13}C destas substâncias, deve-se ter em mente que os floroglucinóis apresentam sinais em áreas de deslocamento de aromáticos e aromáticos oxigenados, de acordo com sua estrutura básica (Figura 52). Entretanto, a presença dos

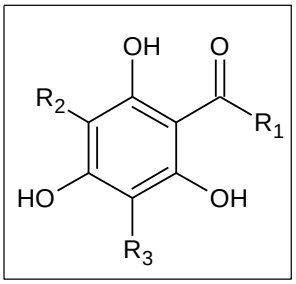
substituintes variados nos anéis causa muitos efeitos que serão responsáveis por diminuir ou aumentar a proteção do átomo em questão e consequentemente o valor de seu deslocamento no espectro.

5.2.1 Derivados de floroglucinóis acilados

Floroglucinóis acilados, também chamados acilfloroglucinóis, são metabólitos secundários predominantes no gênero *Hypericum* e possuem um grupamento acila conectado diretamente ao núcleo THB (figura 55), além de muito comumente também possuir subtituintes prenila e geranila (substituintes com 5 e 10 carbonos, respectivamente; consultar págins 117 e 120) (SCHMIDT et al, 2012).

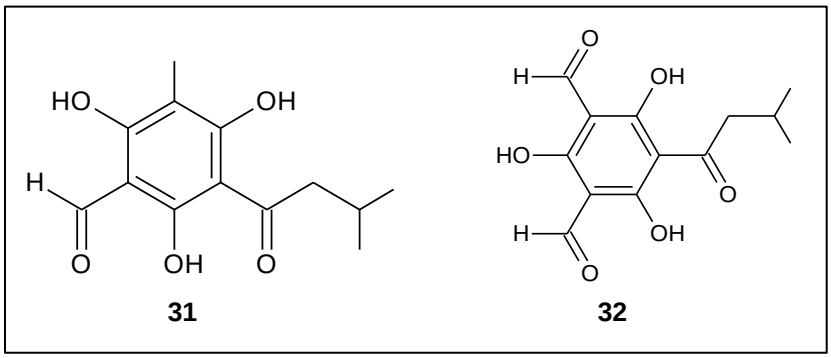
Os acilfloroglucinóis possuem propriedades antioxidantes, sendo propostos como substâncias principais para o tratamento de doenças degenerativas. Estes compostos tem um papel no sistema nervoso central como moduladores dos neurotransmissores associados com danos neuronais e depressão (VEROTTA, 2002).

Figura 55– Estrutura básica de acilfloroglucinol



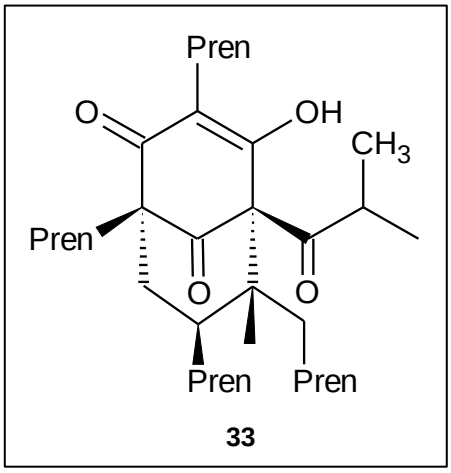
O floroglucinol mais comum pertencente a esta classe é o grandinol (31), isolado das folhas de *Eucalyptus grandis* e possuidor de atividades inibidora de germinação e antibacteriana. Acredita-se que esta substância, assim como a jensenona, (32), seja precursora de floroglucinóis mais complexos e biologicamente ativos como sideroxilonais, grandinal, euglobalos e macrocarpanos (SINGH e BHARATE, 2006).

Figura 56- Estruturas 30 e 31 de acilfloroglucinóis



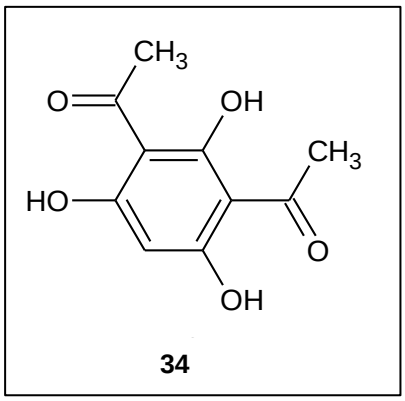
Outro acilfloroglucinol muito proeminente nas pesquisas é a hiperforina (33), que possui uma estrutura complexa contendo cinco substituintes prenila e dois anéis fundidos, além de atividade antiangiogênica promissora, com pesquisas demonstrando inclusive atividade in vivo (MARTINEZ-POVEDA, 2010). Outros efeitos de plantas Hypericum, como por exemplo ação antidepressiva, são relacionadas à presença da hiperforina nas espécies do gênero (NOR, 2006).

Figura 57- Estrutura da hiperforina



Dentre os acilfloroglucinois produzidos por microorganismos, podemos destacar o 2,4-diacetilfloroglucinol (34) isolado da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, com potente atividade antibacteriana (ISNANSETYO, 2003). Dentre aqueles provenientes de marinhos, da espécie de alga parda *Eisenia byciclis*, foram isolados florotaninos que possuem atividade inibitória da glicação e da enzima amilase (Okada et al, 2004) (Shibata et al, 2004).

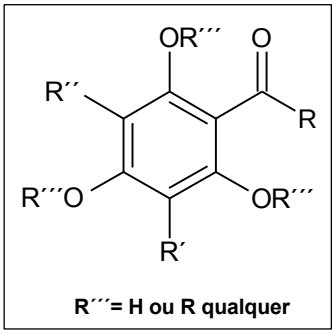
Figura 58- Estrutura do 2,4-diacetilfloroglucinol



Nos floroglucinóis acilados, a cadeia carbônica pertencente ao grupo acila pode ser curta, com 5 ou 6 átomos em média ou mais longa, com mais de 10 átomos de carbono.

Em relação aos sinais de RMN, serão relativos a um núcleo THB e um substituinte acila ligado ao anel benzênico. Serão notados no espectro de RMN^{13}C a presença de três carbonos oxigenados e aromáticos cujos sinais aparecem na faixa de 158,0 a 166,0 ppm, campo mais baixo do que os oxigenados sp^3 devido aos efeitos indutivo e anisotropia do anel aromático. Além destes, mais três sinais aparecerão, um decorrente do carbono aromático acilado (na faixa de 102,0 a 114,0 ppm) e outros dois dos carbonos aromáticos não-hidroxilados.

Figura 58b- Estrutura do acetilfloroglucinol totalmente substituído



Comumente estes três carbonos não oxigenados são protegidos pelo efeito doador de densidade eletrônica das hidroxilas vizinhas em orto, efeito comum a praticamente todos os floroglucinóis com anel THB não oxidado. Entretanto, como podem ser substituídos,

seus sinais são variados. O substituinte acila está quase sempre presente e tem sua formação geneticamente favorecida.

Os sinais para os carbonos oxigenados ficam em torno de 162,0 ppm, variando na faixa de 158,0-166,0 ppm, como podemos visualizar nas estruturas 36 e 37, dentre outras. Na figura 59, para a estrutura 35 há um sinal deslocado para campo alto, relativo ao carbono hidroxilado (153,9 ppm), cuja proteção é resultado de dois efeitos tipo gama protetor provenientes das hidroxilas em meta. Outro efeito que causa um deslocamento dos sinais dos carbonos oxigenados do anel central para campo mais alto do espectro é a ligação de substituintes diretamente no oxigênio da hidroxila, como podemos ver na estrutura 56. No caso, os valores fogem da faixa padrão, chegando a 151,2 ppm, em decorrência dos efeitos doadores da metila posicionada em orto e dos carbonos dos substituintes ligados ao oxigênio.

Figura 59- Estruturas 35 a 38 de acilfloroglucinóis

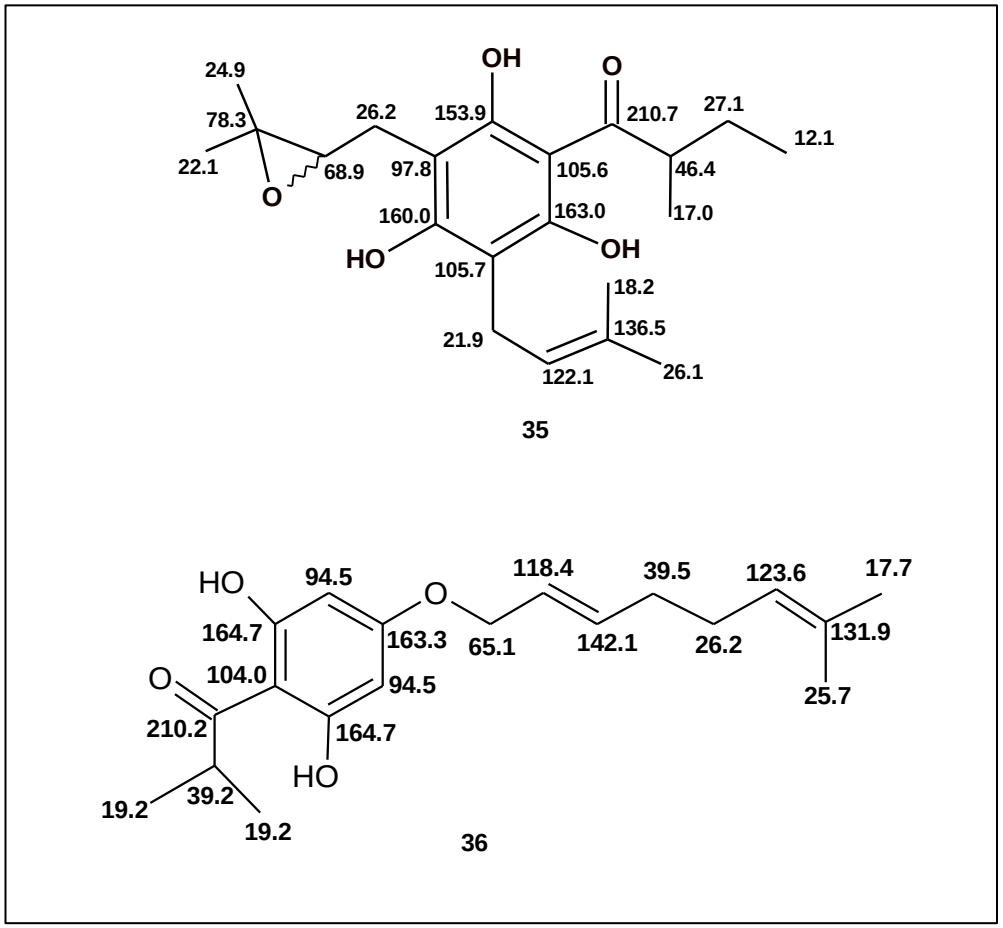
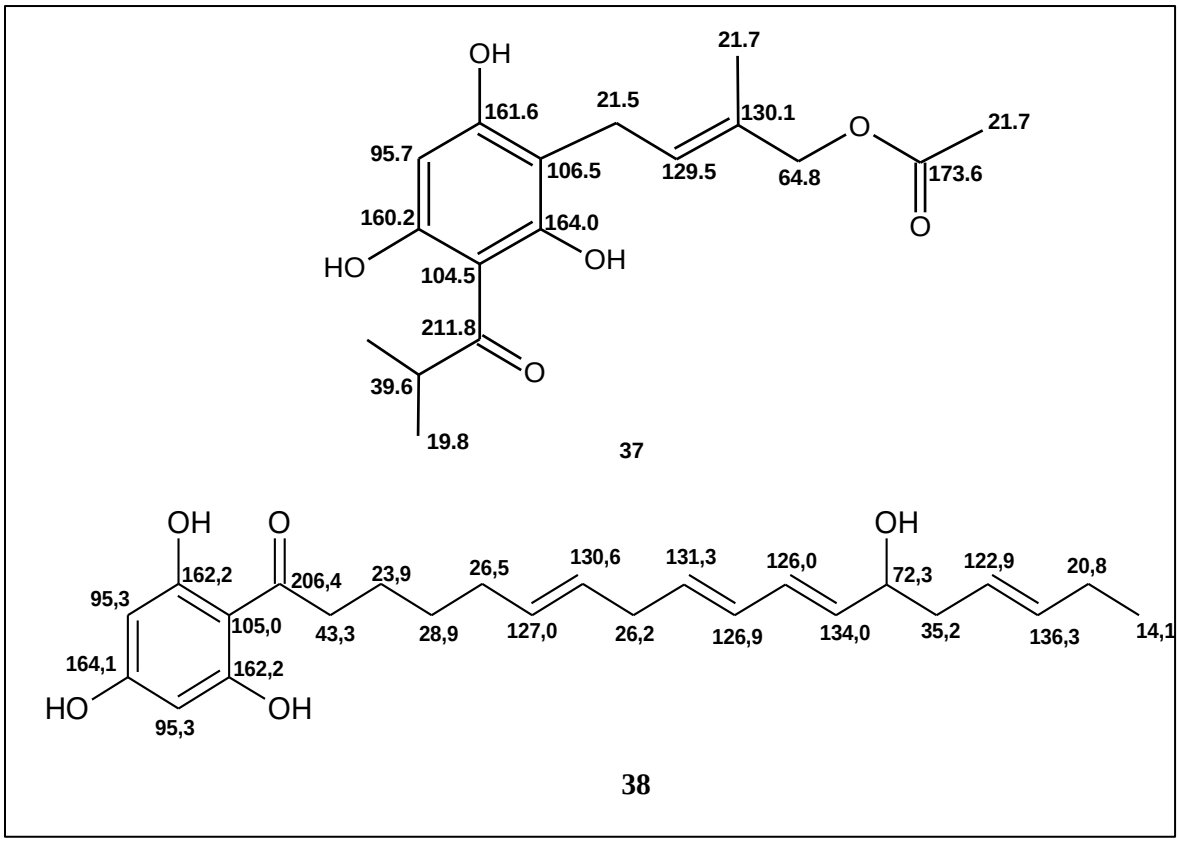


Figura 59- Estruturas 35 a 38 de acilfloroglucinóis (continuação)

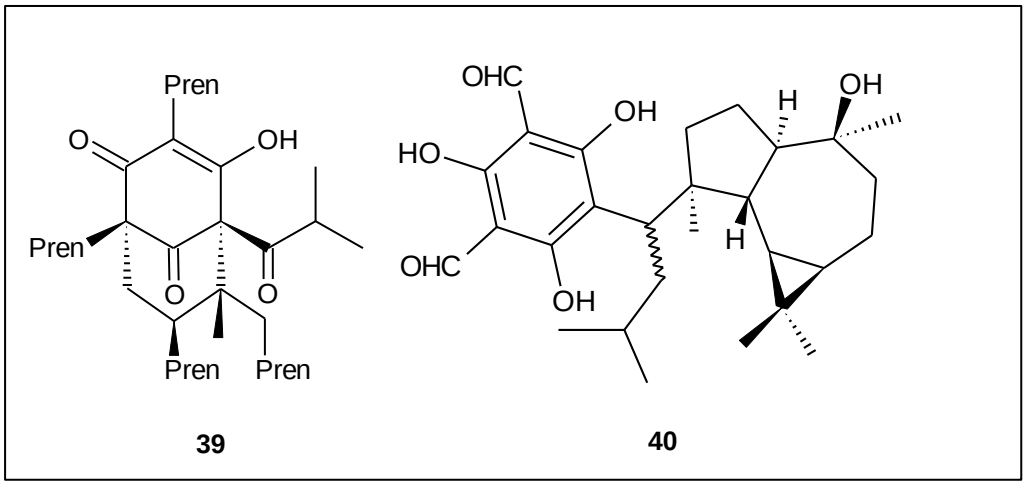


As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4

5.2.2 Derivados de floroglucinóis monoméricos terpenilados

Aqueles que possuem um ou mais substituintes do tipo terpeno são chamados de terpenilados ou terpênicos e existem basicamente dois tipos: os euglobais, cuja porção terpênica forma anéis cromano e que constituem o maior grupo encontrado no gênero *Eucalyptus* e os macrocarpanos, floroglucinóis terpenilados cujos substituintes não formam anéis cromano. Alguns daqueles provenientes de *Eucalyptus* são conhecidos pela atividade inibidora da aldose redutase, enzima chave para controle de complicações decorrentes de diabetes (YAMAKOSHI, 1992). A figura 60 mostra o euglobalo G1 (39), que possui atividade promissora anticâncer (TAKASAKI, 2000) e um macrocarpano (40) que possui atividade inibidora da enzima transcriptase reversa do vírus HIV (NISHIZAWA, 1992).

Figura 60- Estruturas 39 e 40 de floroglucinóis terpenilados



No caso da espécie *Harpalyce brasiliana* Benth, verificou-se que há um predomínio de floroglucinois acilados e prenilados dentre as substâncias encontradas nas folhas. A possibilidade de ocorrer ciclização da prenila com um oxigênio de hidroxila vicinal, leva à formação de anéis pirano ou furano conjugados com o núcleo aromático. Quase todas as substâncias isoladas neste trabalho são desta classe.

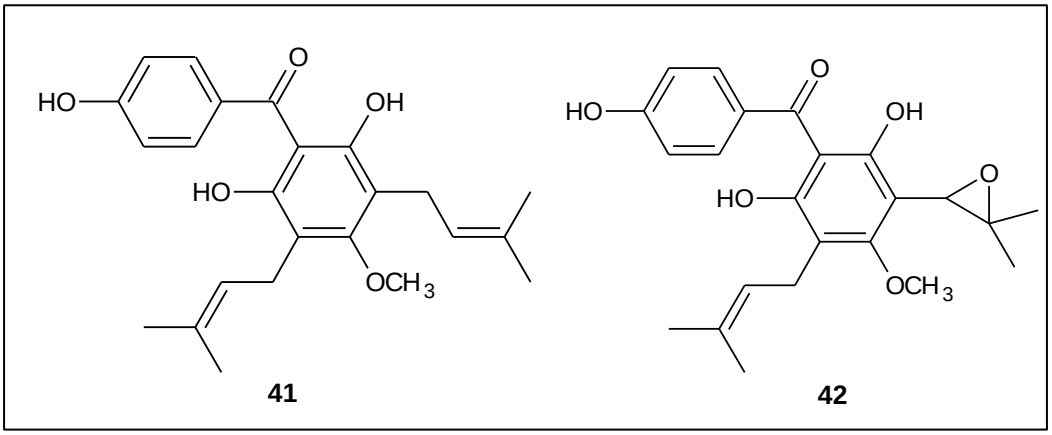
As duas principais subclasses são os prenilados e os geranilados, discutidos nas duas subseções a seguir.

5.2.2.1 Floroglucinóis prenilados

Derivados de floroglucinol prenilados são substâncias monoméricas, possuidoras de um ou mais substituintes do tipo prenila ligados ao anel THB. Eles também podem se posicionar de forma a ocorrer reações de ciclização com o núcleo e suas hidroxilas ou com outros substituintes.

Esta classe tem um grande número de ocorrências relatadas, sendo que para o gênero *Helychrisum spp* os acilfloroglucinóis prenilados são majoritários. Exemplos incluem as substâncias vismiafenona D (41) e G (42), isoladas de *Vismia cayennensis*, sendo que 41 possui potencial atividade inibitória de HIV (BOHLMANN E MAHANTA, 1980) e 42 possui sua porção prenila epoxidada (FULLER et al, 1999).

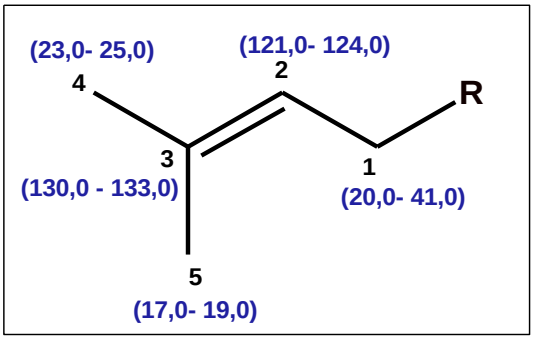
Figura 61- Estruturas 41 e 42 de floroglucinóis prenilados



Outros exemplos interessantes de prenilados são o sessilifloreno, isolado de *Melicope sessiliflora* e com relatos de atividade contra o vírus da herpes simples (CHAN et al, 1999) e o caespitato, isolado de *H. caespititium* e com relatos de atividade antibacteriana, citotóxica e contra infecções causadas por alguns tipos de bactérias e fungos (MATHEKGA et al, 2000).

Para os floroglucinóis prenilados, além dos sinais descritos na seção 5.2.1 (floroglucinóis acilados), desta vez também estarão presentes no espectro os cinco sinais característicos de carbonos do substituinte prenila. Composto de cinco carbonos, dois deles olefínicos, dois metílicos e um metínico, o substituinte prenila possui sinais dentro destas faixas, conforme podemos visualizar na figura 62. O carbono aromático no qual a prenila está ligada normalmente tem seu deslocamento aumentado para a faixa de 110,0 a 115, ppm, em média 114,5 ppm, como podemos ver nas estruturas 43 e 44 (Figura 63).

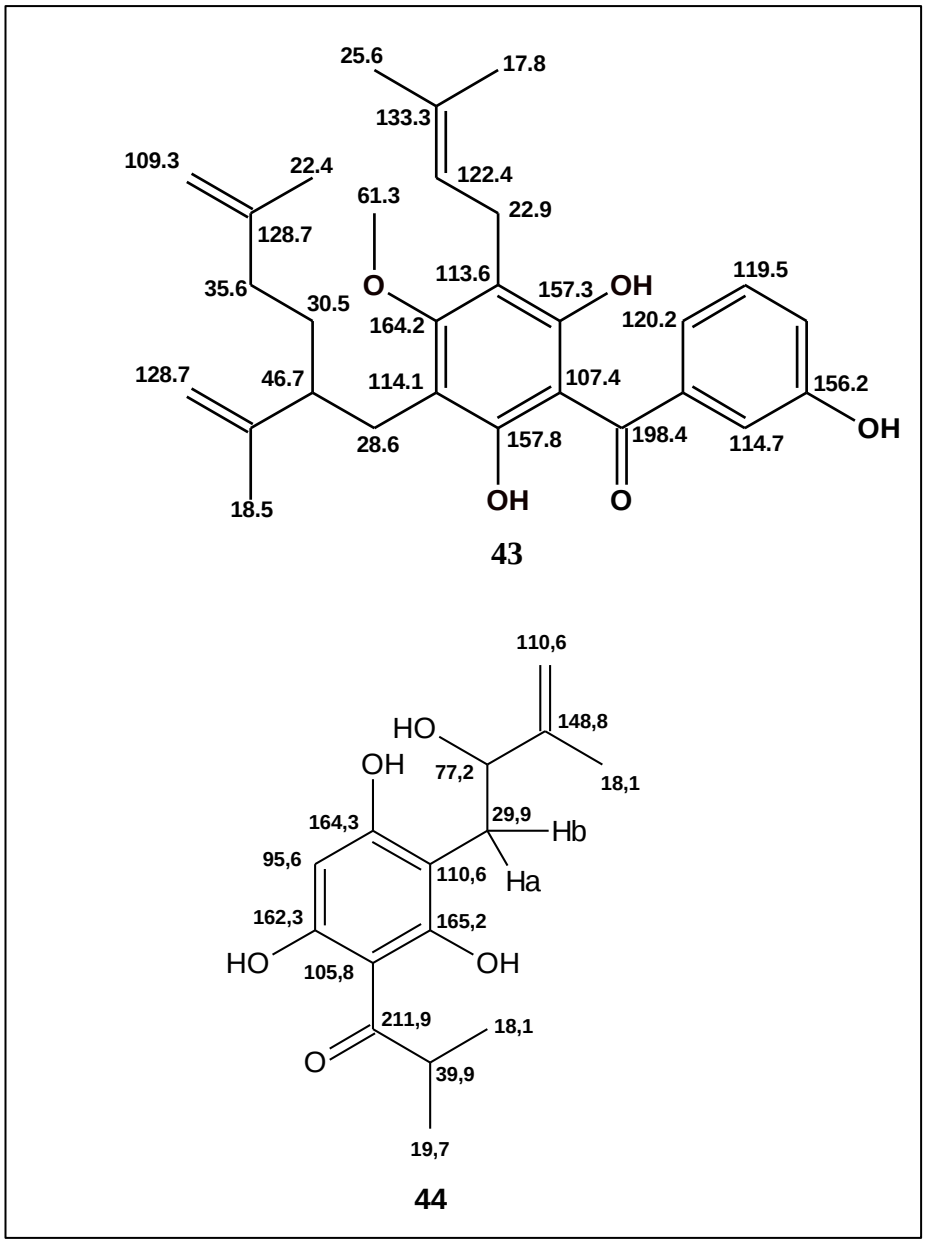
Figura 62- Valores médios de deslocamento dos átomos de carbono de prenila, em ppm.



Algumas mudanças estruturais concernentes à prenila podem mudar o padrão dos deslocamentos no espectro. Muitas vezes ocorre a ciclização deste substituinte, levando à formação de anéis com seis ou cinco membros que podem ser também heterocíclicos (quando cicliza com um dos oxigênios presentes no anel THB), como os anéis pirano e furano descritos na seção 5.2.5 e 5.2.6. Outra mudança estrutural é o deslocamento da insaturação dos carbonos 2-3 para 3-4 ou 3-5, causando o desaparecimento do sinal de uma das metilas e acrescentando um sinal na área de deslocamentos sp^3 do espectro, conforme ocorre na estrutura 43. Outra possibilidade a considerar é a quebra da insaturação e ligação de outra hidroxila na prenila, que causa a mudança dos valores dos deslocamentos de C-2´ e C-3´ para um carbono saturado e um oxigenado, como podemos ver na estrutura 44 e em algumas formas geraniladas, descritas na seção 5.2.2.2.

Uma das características do fragmento prenila é a diferença nos valores de deslocamento entre as duas metilas terminais. A metila que permanece na posição cis em relação aos hidrogênios do carbono 1 possui sinais em campo mais alto, ou seja, ela é mais protegida em relação àquela metila posicionada de forma trans. O efeito que promove a proteção adicional no carbono é a hiperconjugação com os elétrons ligantes δ_{C-H} dos hidrogênios em C1. Desta forma, o sinal cai de aproximadamente 25,5 para 17,5 ppm no espectro de carbono, enquanto que a metila em trans, que não sofre o efeito, fica em torno dos 25,5 ppm.

Figura 63- Estruturas 43 e 44 de floroglucinóis prenilados



As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.2.2 Floroglucinóis geranilados

Derivados de floroglucinol geranilados são substâncias monoméricas, possuidoras de um ou mais substituintes do tipo geranila ligados ao anel THB. Eles também podem se posicionar de forma a ocorrer reações de ciclização com o núcleo, suas hidroxilas ou com outros substituintes.

A seguir podemos ver um exemplo de derivado geranilado, a marupona (45), isolada de *Moronobea pulchra* e possuidora de atividade contra proteases de *Candida albican* (ZHANG et al, 2002). Também é exibido um derivado farnesilado (46), isolado de *Boronia ramosa*, sem dados de atividades biológicas. (AHSAN et al, 1994).

Figura 64- Estrutura 45 de floroglucinol geranilado

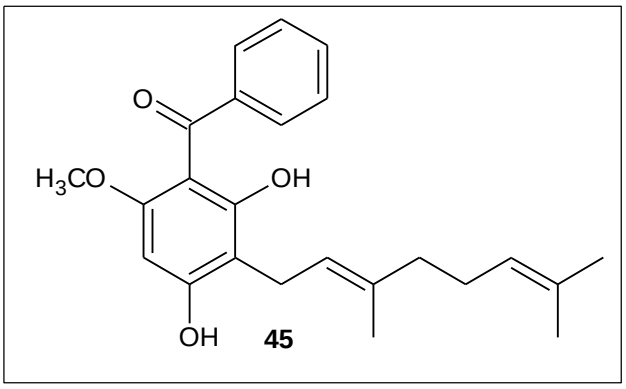
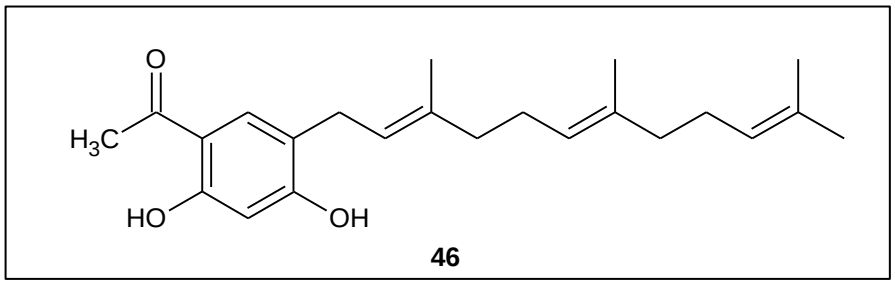
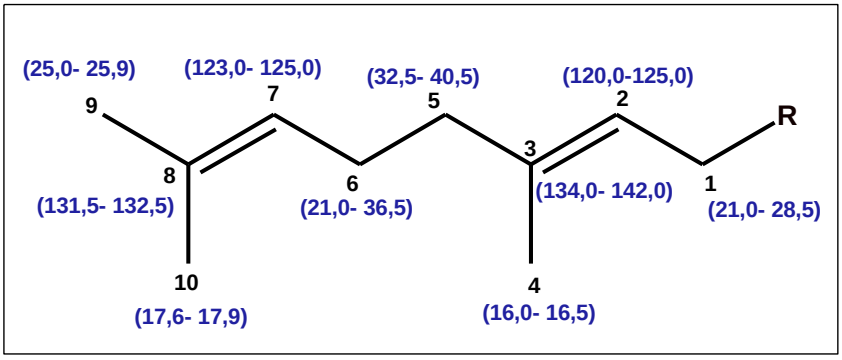


Figura 65- Estrutura 46 de floroglucinol farnesilado



Os floroglucinóis geranilados, também muito comuns nos produtos naturais, apresentam cinco sinais a mais no espectro de carbono em relação aos prenilados. A presença de mais dois sinais de carbonos metínicos na região de carbono sp^3, além de mais dois sinais em região de carbono insaturado e um em região de metílico irá ocorrer. Na figura 66 podemos visualizar os valores médios dos sinais em ppm.

Figura 66- Valores médios de deslocamento dos átomos de carbono de geranila, em ppm



Em alguns casos em que os sinais diferem destes característicos, as razões mais comuns são em decorrência de hidroxila ligada ao fragmento, normalmente acompanhado da quebra da insaturação, conforme estruturas 49 e 50 (Figura 67). Neste caso, devido ao efeito indutivo do oxigênio da hidroxila, o sinal do carbono antes insaturado C2, passa a aparecer na faixa de carbono oxigenado (aproximadamente 72,0-75,0 ppm), enquanto que aquele do carbono C3 pode aparecer em campo mais alto, na região de CH sp^3 (como na estrutura 50) ou, em caso da permanência da insaturação em C3-C4, pode ser notada em região de olefínico, conforme podemos ver nas estruturas 49 e 51.

Outro caso de variação nos sinais característicos de geranila é quando este fragmento está conectado diretamente a um oxigênio do anel THB. Neste caso, que podemos conferir nas estruturas 47 e 48, o sinal do carbono C1 será deslocado para região de carbono oxigenado.

Figura 67- Estruturas 47 a 51 de floroglucinóis geranilados

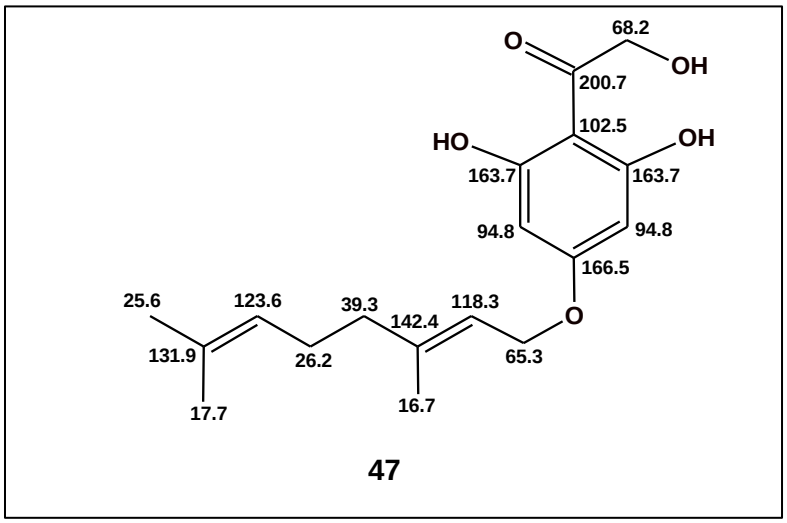
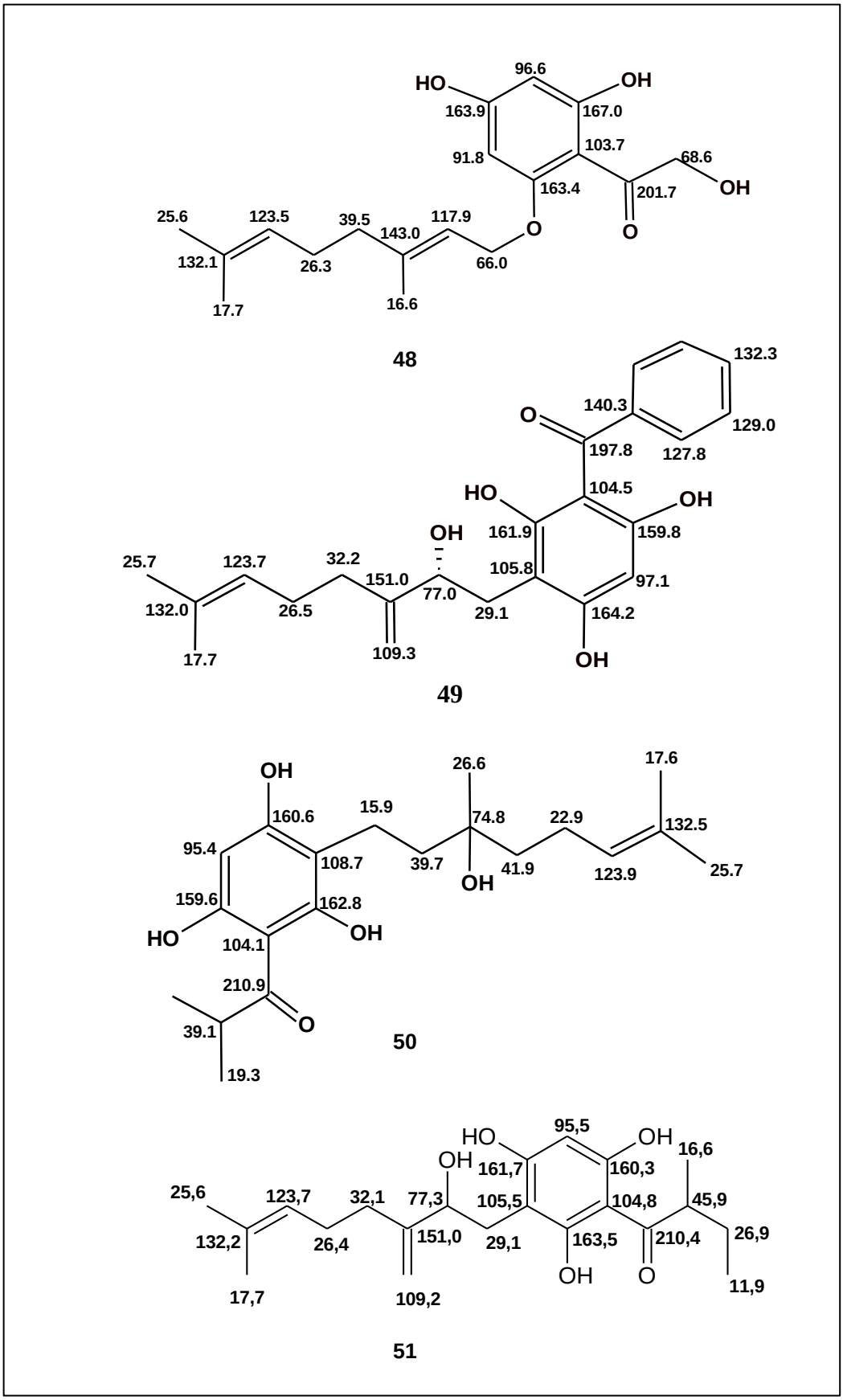


Figura 67- Estruturas 47 a 51de floroglucinóis geranilados (continuação)



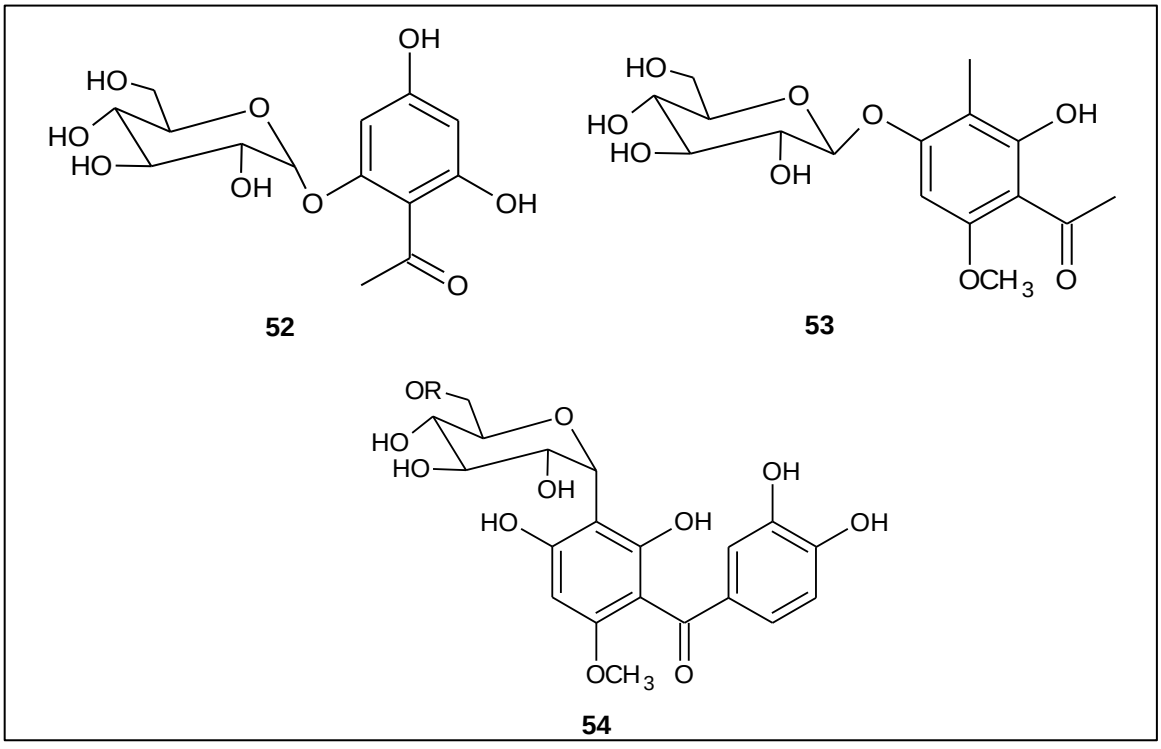
As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.3 Floroglucinóis glicosilados

Para os floroglucinóis ligados a um anel glicosídico, existem duas subclassificações, dependendo do átomo de ligação da glicose com o anel central. Assim temos os O-glicosilados e C-glicosilados, respectivamente com ligações através dos átomos de oxigênio e carbono da glicose. Estas substâncias são encontradas em muitas fontes naturais, como *Cannabis sativa, Sedum sediforme, Artemisia annua, Curcuma cocomosa, Cistus salvifolium, Prunus domestica, Rhododendrom ferrugineum, Garcinia mangostana,* dentre outras (SINGH e BHARATE, 2006).

Como exemplo, temos dois floroglucinóis O-glicosilados, as substâncias Mirciafenona A (52), que possui atividade anticolerética (SUKSAMARARN, 1997) e um floroglucinol (53) que possui atividade contra *Tuberculosis bacilii* (ZHANG, 1992). Também está sendo exibido um floroglucinol C-glicosilado (54), isolado de *Mangifera indica*.

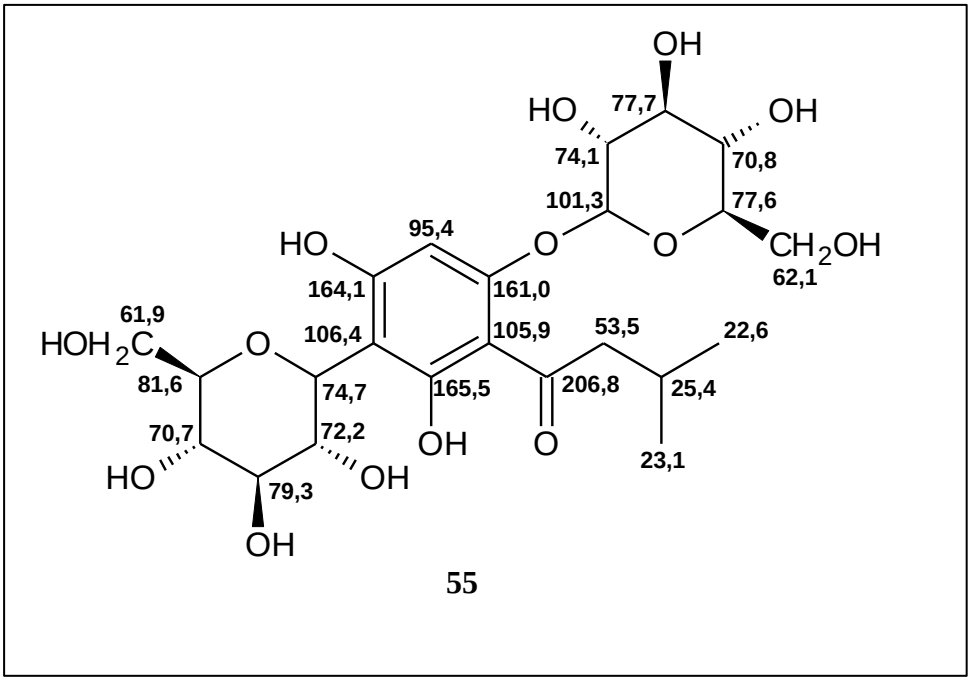
Figura 68- Estruturas 52 a 54 de floroglucinóis glicosilados



Dentro do levantamento realizado, foram verificados alguns floroglucinóis glicosilados, como as estruturas 55 e 56 (Figura 69), que possuem dois anéis de glicose cada.

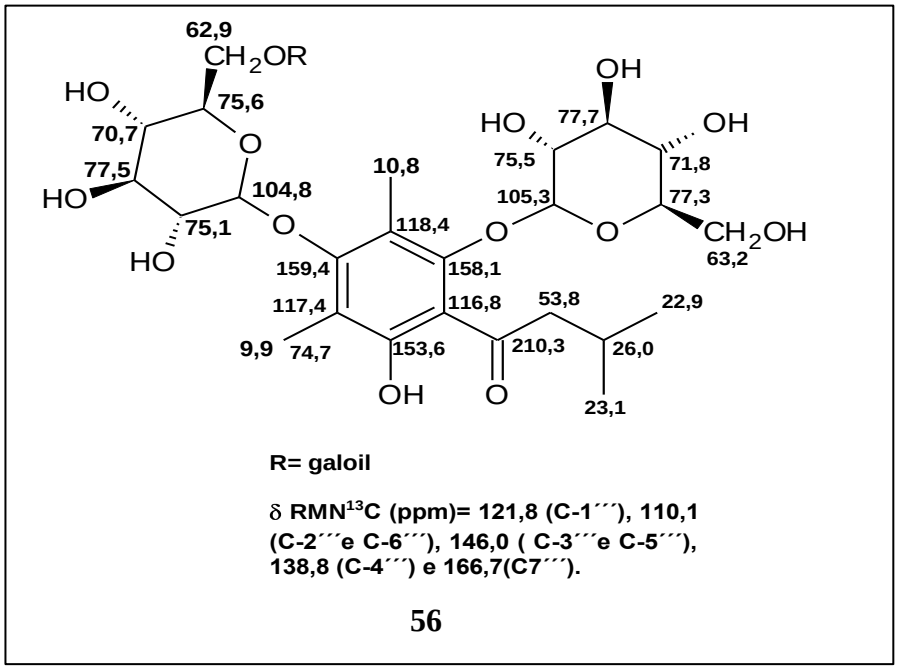
Para os glicosilados, podemos esperar, no espectro de carbono, além dos seis sinais referentes aos carbonos do anel THB, mais seis sinais na faixa de carbonos oxigenados, no caso entre 71,0 e 82,0 ppm, em média. Em alguns casos, como na estrutura 55, temos uma ligação O-glicosilada e uma C-glicosilada, respectivamente com ligações através dos átomos de oxigênio e carbono da glicose. Na estrutura 56 já temos duas ligações do tipo O-glicosilada, o que causa um sinal na faixa de 65,0 ppm e um a mais na área de carbonos oxigenados no espectro de carbono, em torno de 101,5 ppm.

Figura 69- Estruturas 55 e 56 de floroglucinóis glicosilados



55

Figura 69- Estruturas 55 e 56 de floroglucinóis glicosilados (continuação)



As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.4 Floroglucinóis halogenados

Em relação aos floroglucinóis halogenados, pode-se afirmar que ocorrem em organismos marinhos, com uma grande variedade de derivados bromo, iodo e cloro substituídos. (SINGH e BHARATE, 2006). Dois dos exemplos disponíveis na literatura são as substâncias (57) e (58), isoladas da espécie de anfíbio *Dyctiostelium discoideum* e com capacidade de induzir diferenciação morfogênica (MORRIS et al, 1987). Na sequência, temos um exemplo de floroglucinol halogenado e trimérico (59), isolado de *Vidalia obtusaloba* (WIEMER, 1991).

Figura 70- Estruturas 57 a 59 de floroglucinóis halogenados

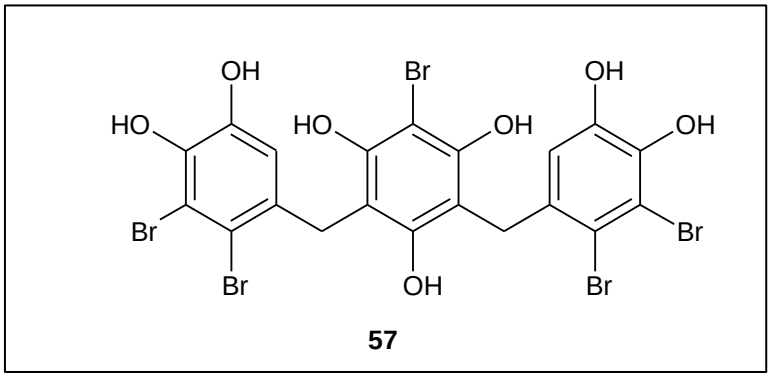
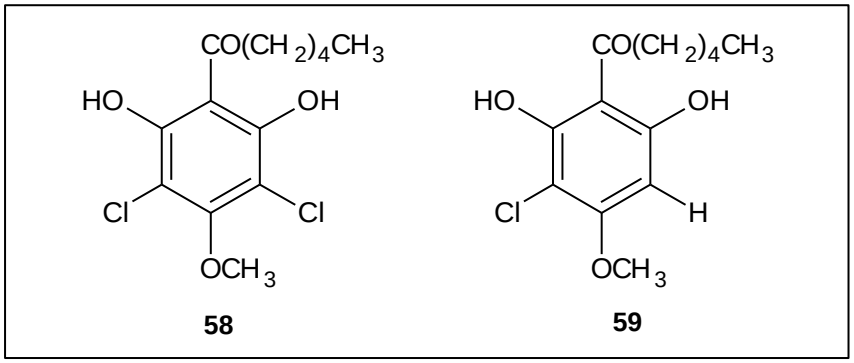


Figura 70- Estruturas 57 a 59 de floroglucinóis halogenados (continuação)



Os sinais de RMN esperados para as substâncias deste tipo possuirão sinais em campo bem baixo, acima de 4,5 ppm, em razão da desproteção eletrônica decorrente dos substituintes halogênios, que são muito eletronegativos.

5.2.5 Floroglucinóis com anel pirano

É muito comum a ocorrência de ciclização dos substituintes prenila e/ou geranila com uma hidroxila vizinha do anel THB. Nestes casos, podem se formar estruturas heterocíclicas, normalmente anéis pirano ou di-hidro pirano, que podem ser vistos respectivamente nas estruturas 62 e 64 e em 61 e 60. No caso da estrutura 65, um núcleo lactônico foi formado, com o sinal do C (160,2 ppm) aparecendo dentro da faixa de éster, que é mais campo alto do que uma cetona devido ao efeito de delocalização da dupla ligação dos oxigênios (conjugação), que diminui o caráter s das ligações, e consequentemente, diminui os efeitos de indução devido à eletronegatividade da insaturação.

Figura 71- Estruturas 60 a 65 de floroglucinóis com anel pirano

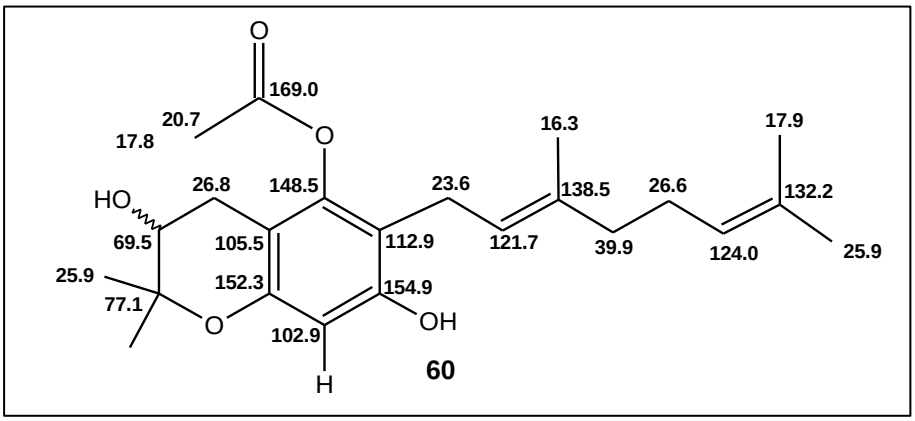


Figura 71- Estruturas 60 a 65 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)

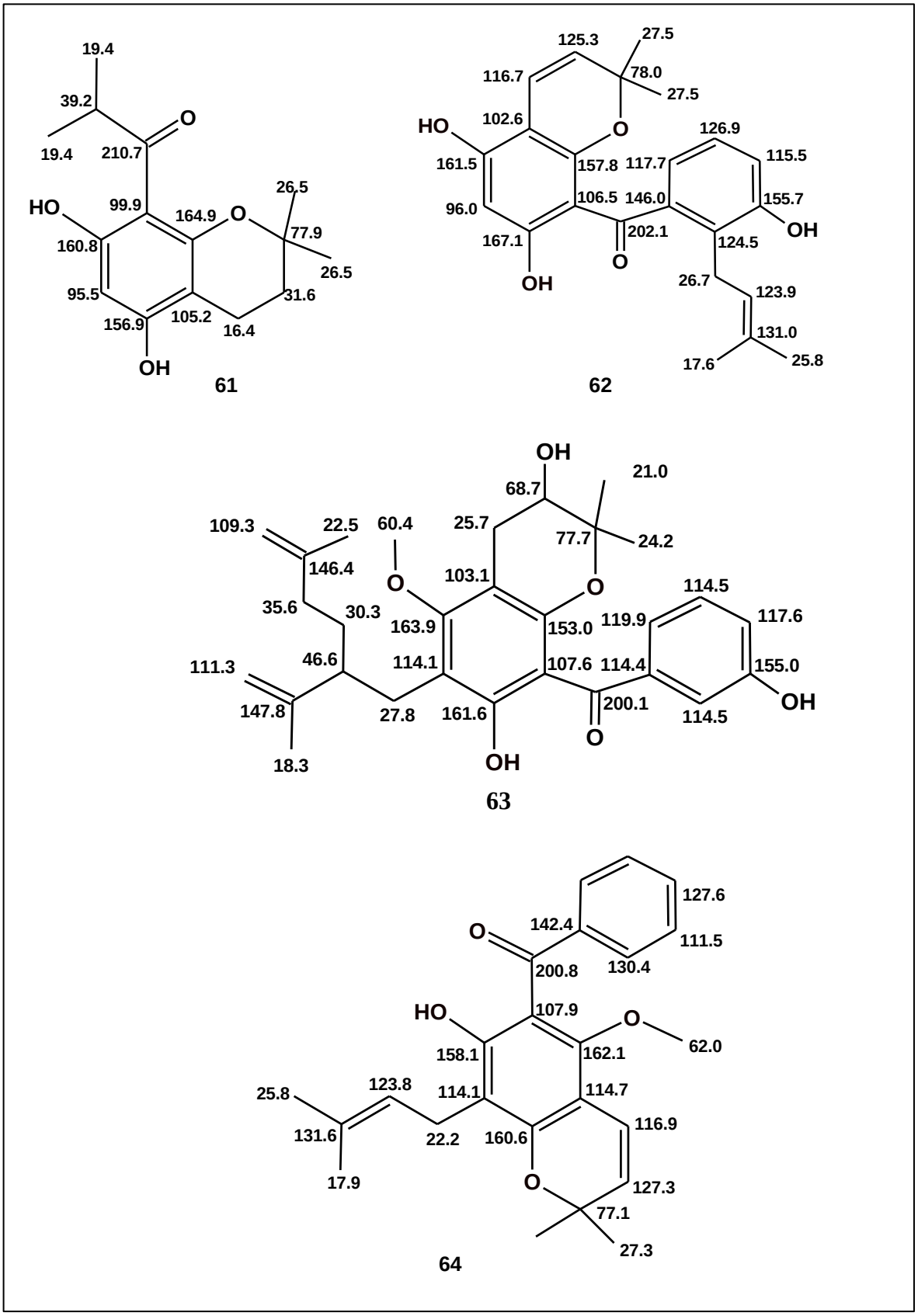
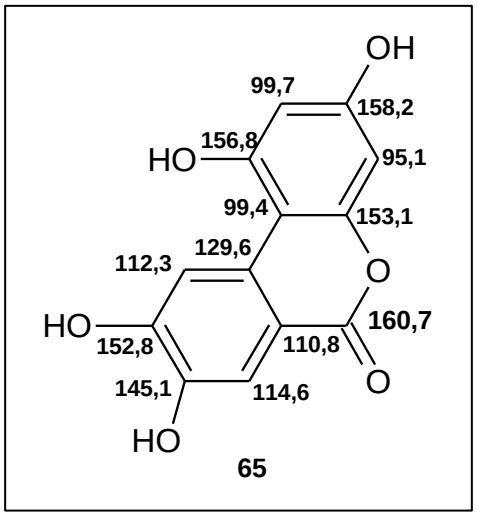


Figura 71- Estruturas 60 a 65 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.6 Floroglucinóis com anel furano

Além dos anéis pirano, algumas estruturas se apresentam com anéis furano, ou seja, anéis insaturados de cinco membros sendo um oxigênio. E também da mesma forma que anteriormente, existem os di-hidrofuranos, nos quais uma insaturação não está presente. Entretanto, os anéis de seis membros são mais estáveis que os de cinco membros, o que sugere que a formação dos anéis furano ocorre após rearranjos do fragmento em questão (prenila ou geranila), já ligado ao anel. Uma etapa de epoxidação ocorre e posteriormente há quebra do epóxido e rearranjo de ligações, formando o anel furano de cinco membros (DEWICK, 2002).

Os sinais característicos de anéis benzofuranos serão relacionados a quatro carbonos insaturados, sendo dois aromáticos, com sinais em 115,9; 154,4; 95,9 e 162,0 ppm na estrutura 66, onde a porção isopropílica ligada ao furano é formada pela porção da prenila que não ciclizou. Na estrutura 67, os sinais são em campo mais alto do os característicos porque são anéis di-hidrofuranos, sem a presença da insaturação. Seus sinais corresponderão a dois aromáticos (da porção conjugada com anel THB central), um oxigenado e um CH_2 sp^3, geralmente em torno de 28,0 ppm. Para este caso, duas exceções nas quais o sinal está em campo mais baixo, ou seja, com valor de deslocamento mais alto, se encontra nas estruturas

68 e 69. Nestes exemplos, o sinal sobe para 32,8 ppm, devido à ligação com oxigênio do carbono vizinho e por consequência, ao efeito indutivo resultante desta ligação.

Figura 72- Estruturas 66 a 69 de floroglucinóis com anel furano

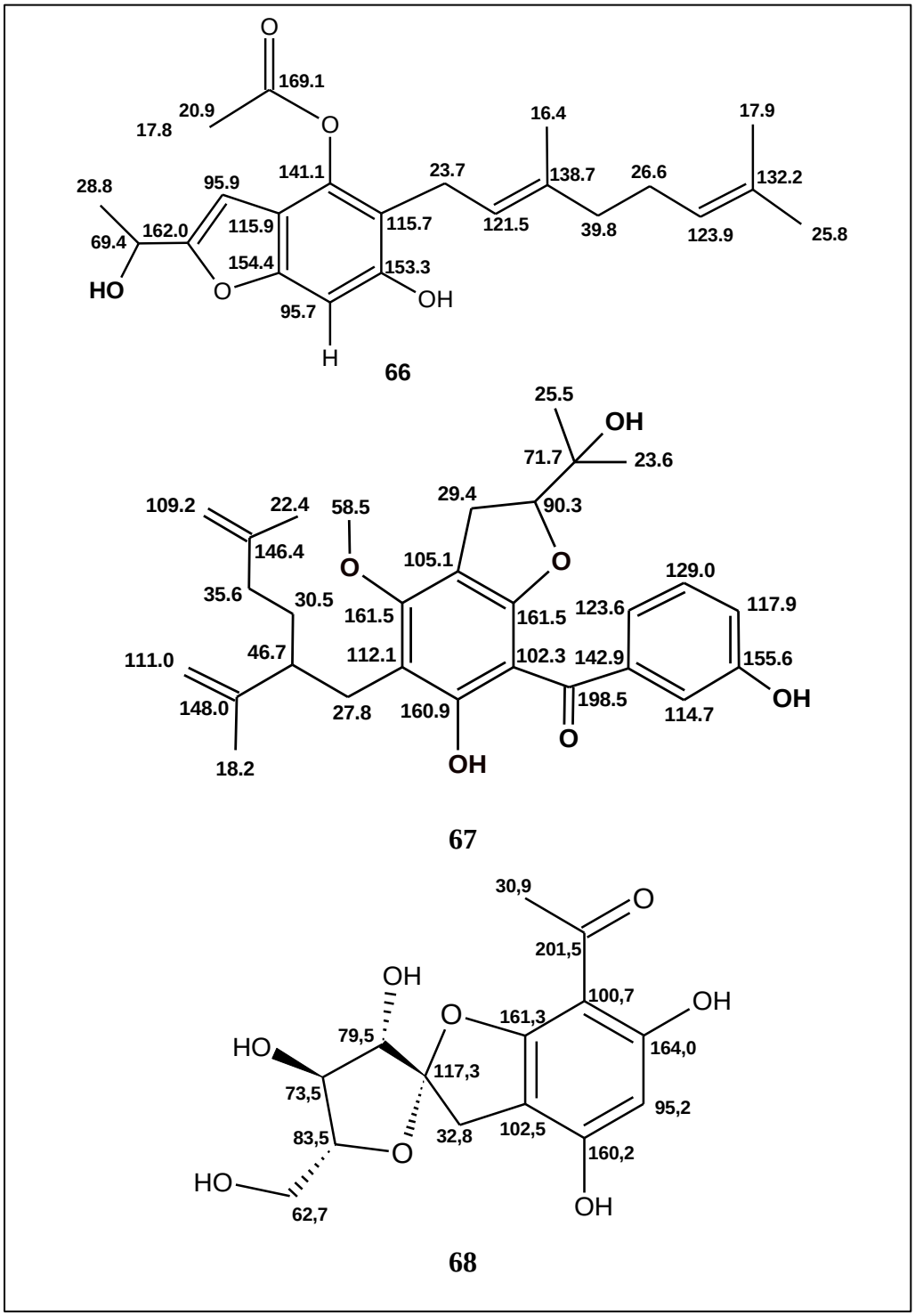
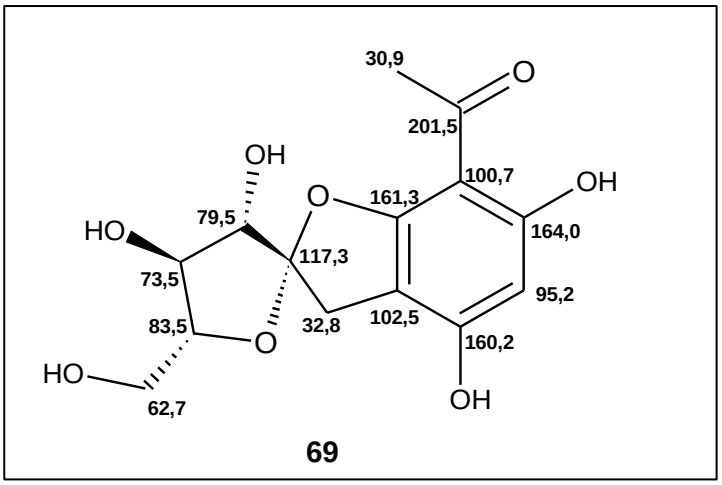


Figura 72- Estruturas 66 a 69 de floroglucinóis com anel furano (continuação)



As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.7 Floroglucinóis ligados a anel α-pirona

Os derivados de floroglucinóis que são ligados a anel α-pirona são relatados com grande ocorrência no gênero *Helichrysum*, sendo utilizados na medicina popular pelas suas propriedades antimicrobianas (HANSEL et al, 1980). Como exemplos temos três estruturas de substâncias isoladas de *Helichrysum decumbens* (70-72) que possuem atividade antibacteriana e antifúngica (TOMAS-BARBERAN et al, 1990) e plicatirpirona (73), que contém um esqueleto benzofurano e foi isolada de *Helichrysum plicatum*, com atividade antimicrobiana (HANSEL et al, 1980).

Figura 73- Estruturas 70 a 73 de floroglucinóis ligados a anel α-pirona

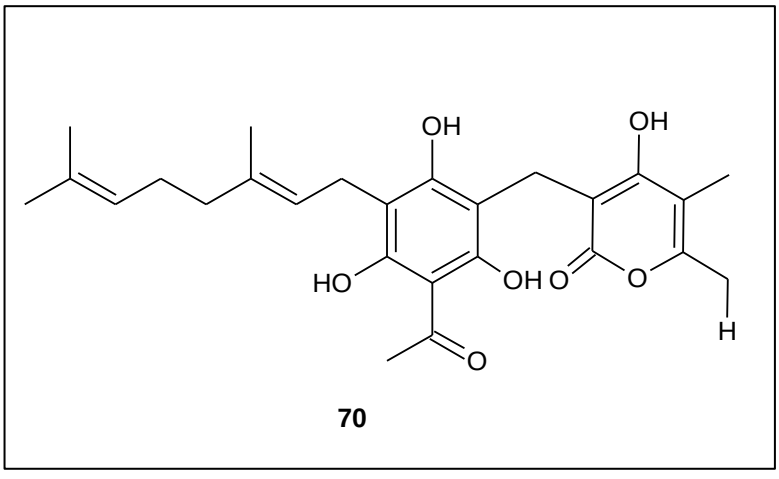
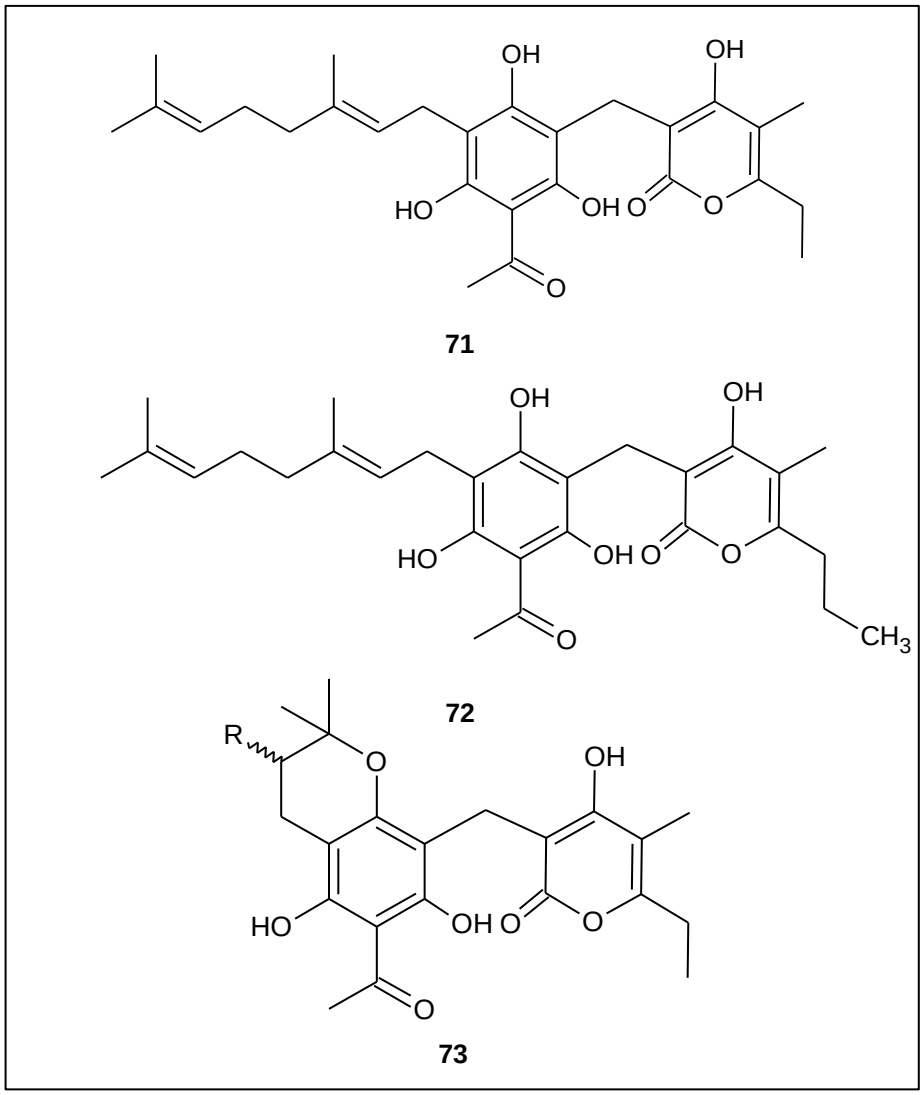


Figura 73- Estruturas 70 a 73 de floroglucinóis ligados a anel α-pirona (continuação)



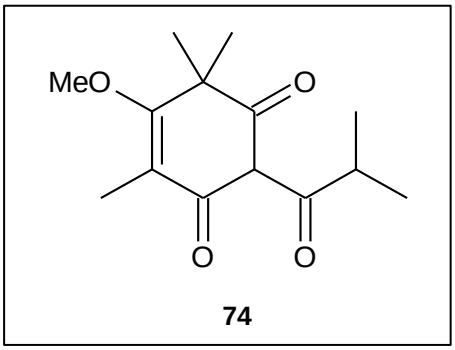
Os sinais de RMN para esta classe não diferem muito daqueles discutidos anteriormente, novamente com os seis sinais aromáticos e aromáticos oxigenados do núcleo THB. Desta vez, estarão presentes quatro sinais a mais na região dos aromáticos, sendo dois oxigenados e um protegido pela hidroxila orto. Um carbono de cetona também estará presente, na faixa de 195,0 a 215,0 ppm e normalmente há presença da metila gerando um sinal na região até 20,0 ppm.

5.2.8 Floroglucinóis oxidados

A subclasse dos floroglucinóis oxidados, ou, policetídeos cíclicos, ocorre amplamente em espécies do gênero *Eucalyptus*, e diferem entre si pela natureza da cadeia lateral, número

de grupos metila e nível de oxidação. A primeira substância desta classe, a tasmanona (74) foi isolada das espécies *Eucalyptus risdoni* e *E. linearis*, em 1914 por Robinson e Smith, que acreditaram se tratar de um fenol. Posteriormente, em 1956, Birch e Elliot identificaram como uma β-tricetona, e a partir de 1965, com o desenvolvimento dos métodos espectroscópicos, a estrutura foi finalmente elucidada. (SINGH E BHARATE, 2006).

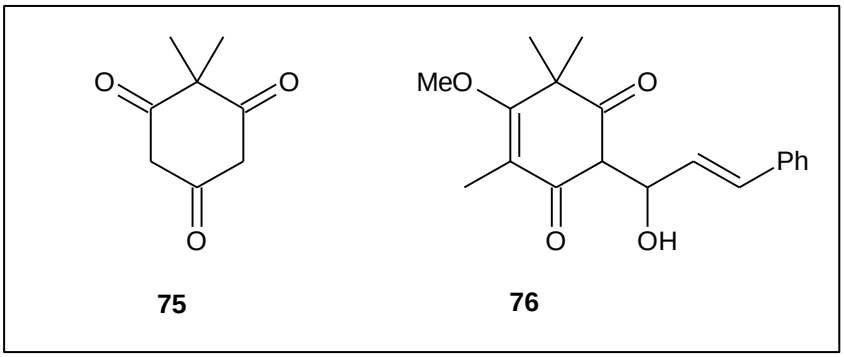
Figura 74- Estrutura da tasmanona



74

Outros exemplos de policetídeos cíclicos são o ácido filicínico (75), isolado de samambaias do gênero *Dryopteris* e possuidor de atividade anti-helmíntica e bactericida (LOUNASMAA 1973) e a desmodumotina C (76), isolada de *Desmos dumosus* e que apresenta, assim como seus análogos sintéticos, potente atividade *in vitro* contra replicação de células tumorais humanas (NAKAGAWA-GOTO et al, 2005).

Figura 75- Estruturas 75 e 76 de floroglucinóis oxidados

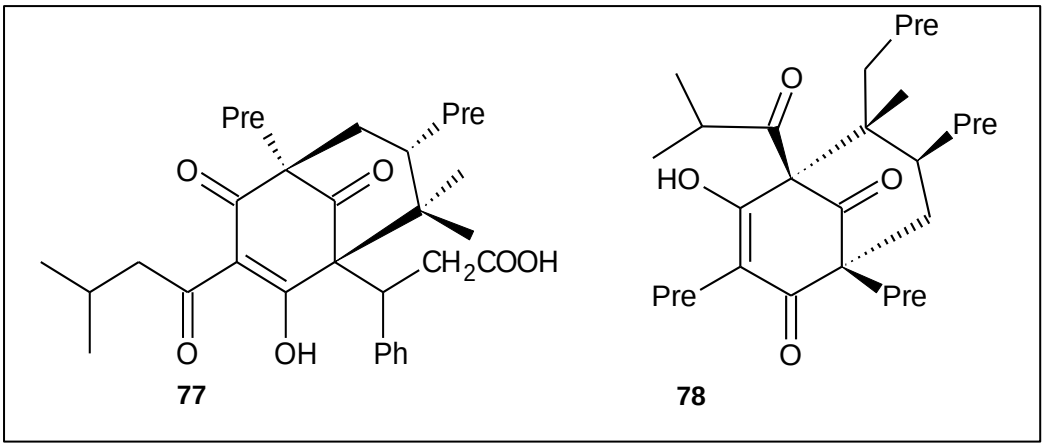


75 **76**

Policetídeos cíclicos também ocorrem na forma poliprenilada, como nos exemplos das substâncias laxifloranona (77), isolada de *Marila laxiflora* e que demonstrou atividade moderada *in vitro* contra os efeitos citopáticos da infecção causada pelo vírus HIV (BOKESH et al, 1999) e a hiperforina (78), isolada de *Hypericum perforatum* e já bastante pesquisada

pelo seu potencial biológico, creditada como a responsável pelos efeitos antidepressivos da espécie (CHATERJEE et al, 1998), além de possuir atividade supressora de enzimas relacionadas a produção de outras substâncias pró-inflamatórias (ALBERT et al, 2002).

Figura 76- Estruturas 77 e 78 de floroglucinóis oxidados



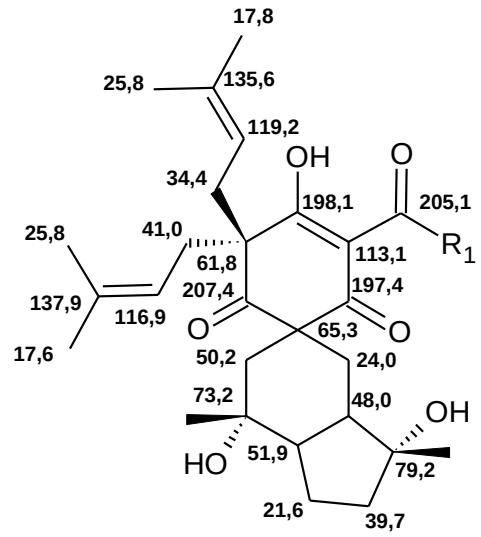
Em relação aos sinais de RMN, a formação de duplas ligações entre o anel e os oxigênios impossibilita a continuidade da aromaticidade, assim os sinais presentes nos espectros de RMN^{13}C e RMN^{1}H irão mudar muito, em especial para os carbonos 1 a 6, que constituem o anel.

Para esta classe de floroglucinol, os sinais de carbono 13 irão sair da faixa de carbonos aromáticos, e muitas vezes hidroxilados, para faixas variadas, dependendo da quantidade de grupamentos ceto presentes no anel (a quantidade de hidroxilas que foram oxidadas) e dos outros substituintes presentes, cada qual exercendo um efeito em cada carbono. De forma geral os valores dos carbonos oxigenados nestes casos giram em torno de 198,0 a 208,0 ppm, incluindo os carbonos cetônicos e hidroxilados.

A presença dos substituintes acila no anel, por efeitos de ressonância do par eletrônico das insaturações, desprotege a posição orto, resultando em aumento do valor do deslocamento químico do carbono ligado à hidroxila, cujo sinal aparece em campo mais baixo do que deveria para um carbono insaturado e oxigenado (que estaria em torno de 160,0 ppm).

Os principais sinais para os três carbonos oxigenados do anel destes floroglucinóis estão entre 195,5 e 208,8 ppm, tanto para os carbonos hidroxilados quanto para os oxidados, sendo entretanto sempre para este último grupo os valores mais altos de deslocamento. Os carbonos não oxigenados do anel, quando não substituídos ou quando ligados a carbono sp^{3}, possuem sinais na região de 61,0 a 65,0 ppm, em média.

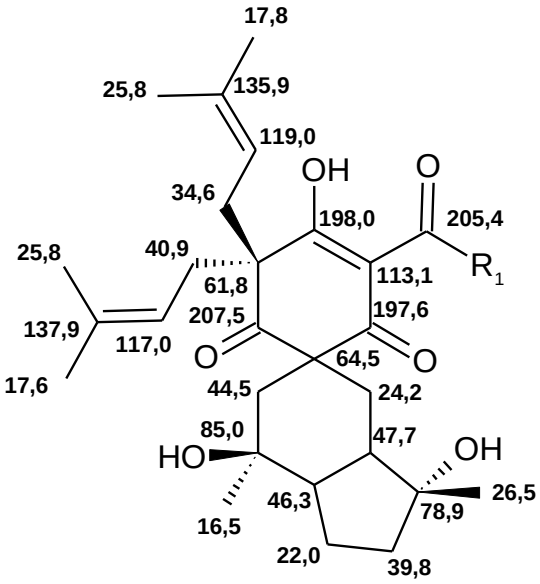
Figura 76- Estruturas 79 e 80 de floroglucinóis oxidados



R1= Isopropil

δ RMN^{13}C (ppm)= 34,1 (C-28); 17,9 (C-29); 21,0 (C-30)

79



R1= isopropil

δ RMN ^{13} C- 24,3 (C-28), 17,6 (C-29), 21,0 (C-30) ppm

80

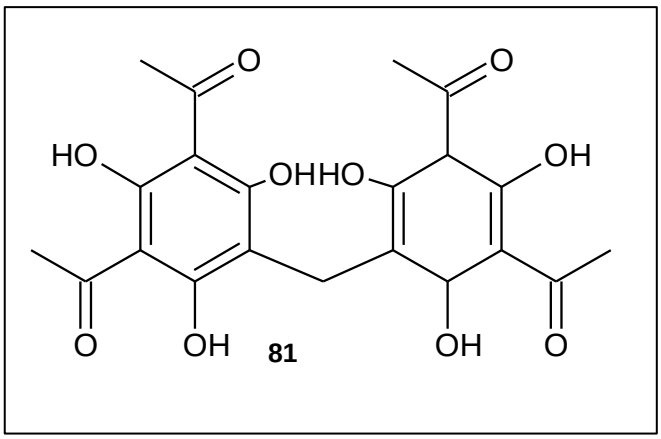
As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.9 Derivados de floroglucinol diméricos, triméricos, tetraméricos e superiores

Os floroglucinóis diméricos são aqueles cuja estrutura engloba duas unidades de floroglucinol, fundidas através de um carbono metilênico ou da formação de um anel cromano. Os substituintes do anel não são necessariamente idênticos aos do anel principal. Ocorrem principalmente no gênero *Aspidium* e *Dyopteris, Myrtus, Mallotus, Hypericum, Eucalyptus e Helichrysum.* Também foram encontrados em algumas espécies dos gêneros *Kunzea, Acronychia, Hagenia, Euphorbia, Agrimonia e Mellicope*, além de relatos de ocorrências em microorganismos.

Como exemplo, podemos visualizar a primeira substância desta classe (81), isolada da cultura de *Pseudomonas aurantiaca* e pertencente a um grupo de antibióticos que possui atividade antimalária e contra determinadas bactérias Gram-positivas (ESIPOV et al, 1975)(ARISAWA, 2003).

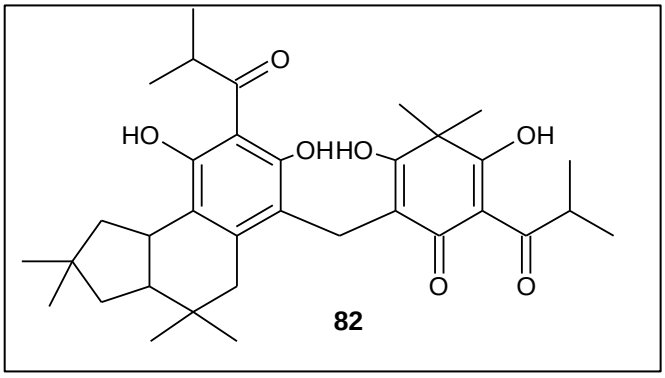
Figura 77- Estrutura 81 de floroglucinol dimérico



81

Outro exemplo com ligação metilênica entre os anéis da estrutura é o hiperbrasinol A (82), isolado de *Hypericum brasiliensis* e possuidor de propriedades antibacterianas (ROCHA et al, 1995).

Figura 78- Estrutura 82 de floroglucinol dimérico



Como exemplos de derivados diméricos contendo um anel cromano, podemos destacar os sideroxilonais 83-85, encontrados nas folhas e flores de algumas espécies de *Eucalyptus* e diferindo entre si apenas na estereoquímica dos carbonos 7, 10´e 7´. Esta classe possui uma vasta gama de propriedades biológicas, como propriedades antibacterianas e antifeeding (SATO et al, 1992)(ESCHLER E FOLEY, 1999)(WALLIS E FOLEY, 2005)(MC LEAN et al, 2005).

Figura 79- Estruturas 83-85 de floroglucinóis diméricos com anel cromano

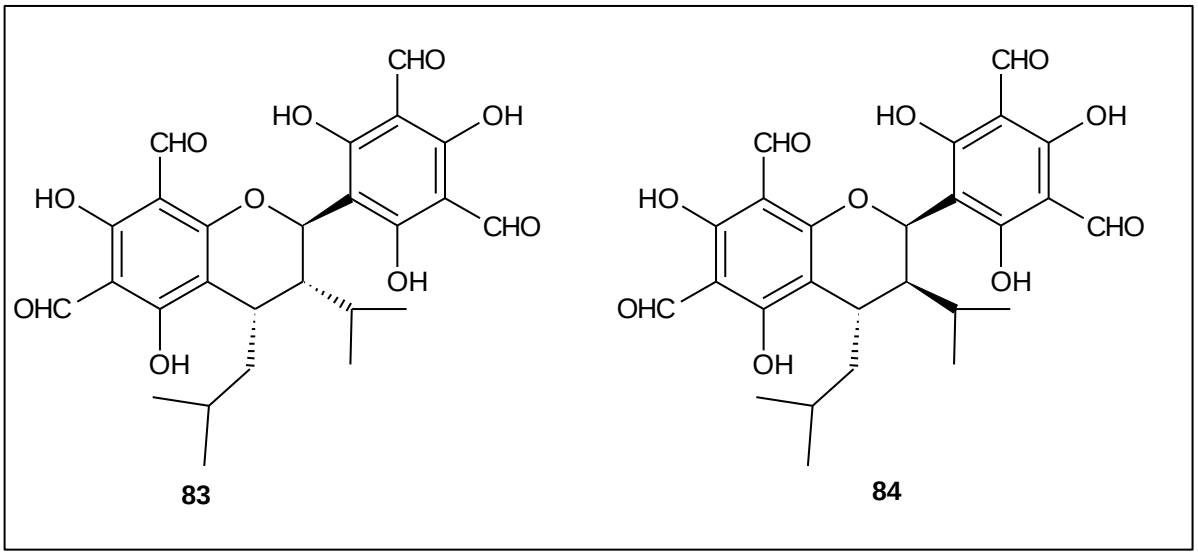
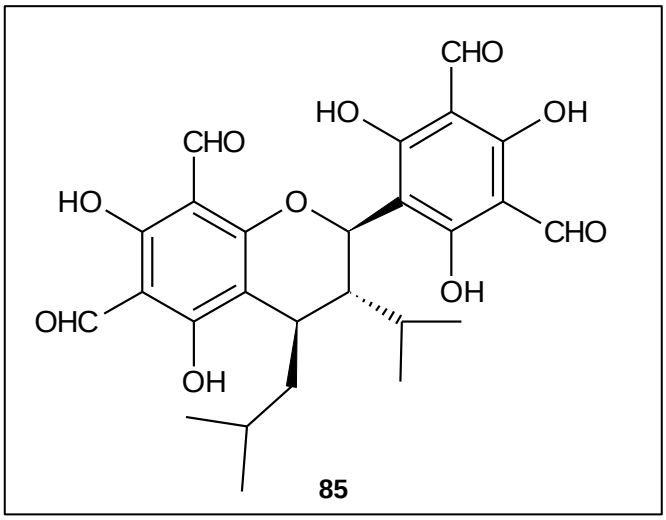


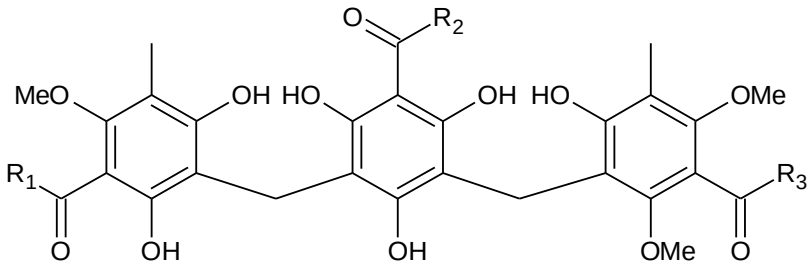
Figura 79- Estruturas 83-85 de floroglucinóis diméricos com anel cromano (continuação)



85

Os floroglucinóis triméricos possuem três unidade de floroglucinol, como é possível ver na figura 80, com os agrimóis A-G (86-92) isolados de *Agrimonia pilosa* QUE propriedades antimicrobiais e antimalária (TASO ET AL, 1988) (YAMAKI ET AL, 1989). Outro exemplo é a protocosina (93), isolada de flores fêmeas de *Hagenia abyssinica* e com atividades anti-helmíntica e citotóxica contra determinados adenocarcinomas (WOLDEMARIAM ET AL 1992) (LOUNASMAA, WIDEN E HUHTIKANGAS, 1974).

Figura 80- Estruturas 86 a 93 de floroglucinóis triméricos



86- $R_1=R_3= CH(CH_3)_2$, $R_2= CH(CH_3)CH_2CH_3$

87- $R_1=R_3=CH_2CH_2CH_3$, $R_2= CH(CH_3)CH_2CH_3$

88- $R_1= R_2= R_3= CH_2CH_2CH_3$

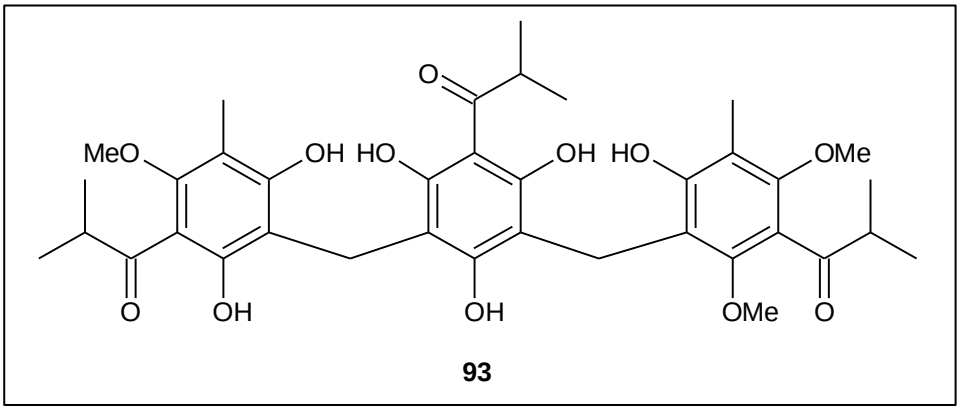
89- $R_1= CH(CH_3)_2$, $R_2=$ CH(CH3)CH2CH3, R3=CH3

90- $R_1= R_3= CH_3$, $R_2=$ CH(CH3)CH2CH3

91- $R_1=CH_3$, $R_2=R_3= CH_2CH_2CH_3$

92- $R_1=R_2=R_3=CH(CH_3)_2$

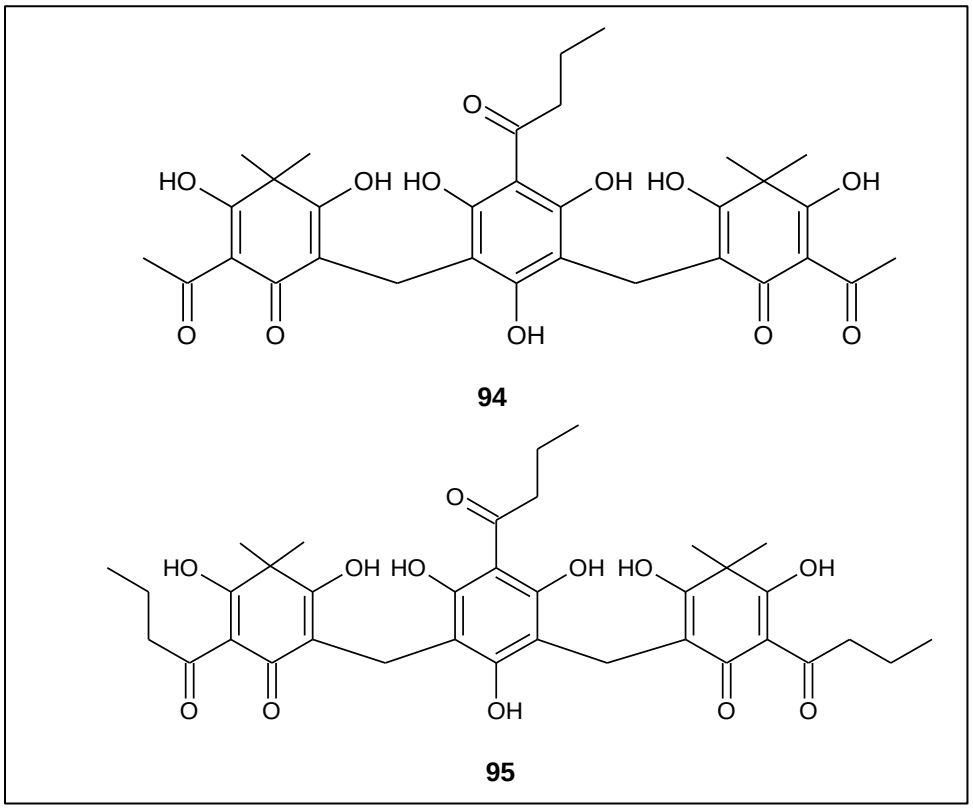
Figura 80- Estruturas 86 a 93 de floroglucinóis triméricos (continuação)



93

Para os floroglucinóis tetraméricos, temos a presença de mais de três unidades de floroglucinóis, unidos por ligação metilênica. Nesta classe existem poucas substâncias descritas na literatura, sendo três tetraméricos, um pentamérico e dois hexaméricos, todos isolados do gênero *Dryopteris* (ARAÚJO, 2008). Como exemplos, temos tetra-albaspidina, também chamada de driocrassina ou ABBA (94), isolada de D*ryopteris crassirhizoma* (NORO, OKUDO E SHIMADA, 1973) e a hexaalbaspidina BBBBB (95), isolada de *Dryopteris aitoniana* (EUW ET AL, 1985).

Figura 81- Estruturas 94 e 95 de floroglucinóis tetraméricos



94

95

Os sinais no espectro de RMN^{13}C também não irão diferir muito dos discutidos anteriormente, pois os núcleos são similares aos anteriores. Os mesmos efeitos discutidos até agora nas seções anteriores estarão operando sobre os carbonos pertencentes aos anéis, como o efeito indutivo doador eletrônico de hidroxilas nas posições orto, efeitos retiradores de densidade eletrônica como ressonância envolvendo grupamento acila, efeitos protetores e desprotetores de substituintes ligados respectivamente em posições gama e alfa ou beta e interações de hiperconjugação com elétrons sigma de átomos próximos.

O carbono metilênico que une os anéis THB possui geralmente sinais que variam na faixa de 15,5 a 18,5 ppm, como podemos ver nos exemplos abaixo, as estruturas 96 a 98.

Figura 82- Estruturas 96 a 98 de floroglucinóis poliméricos

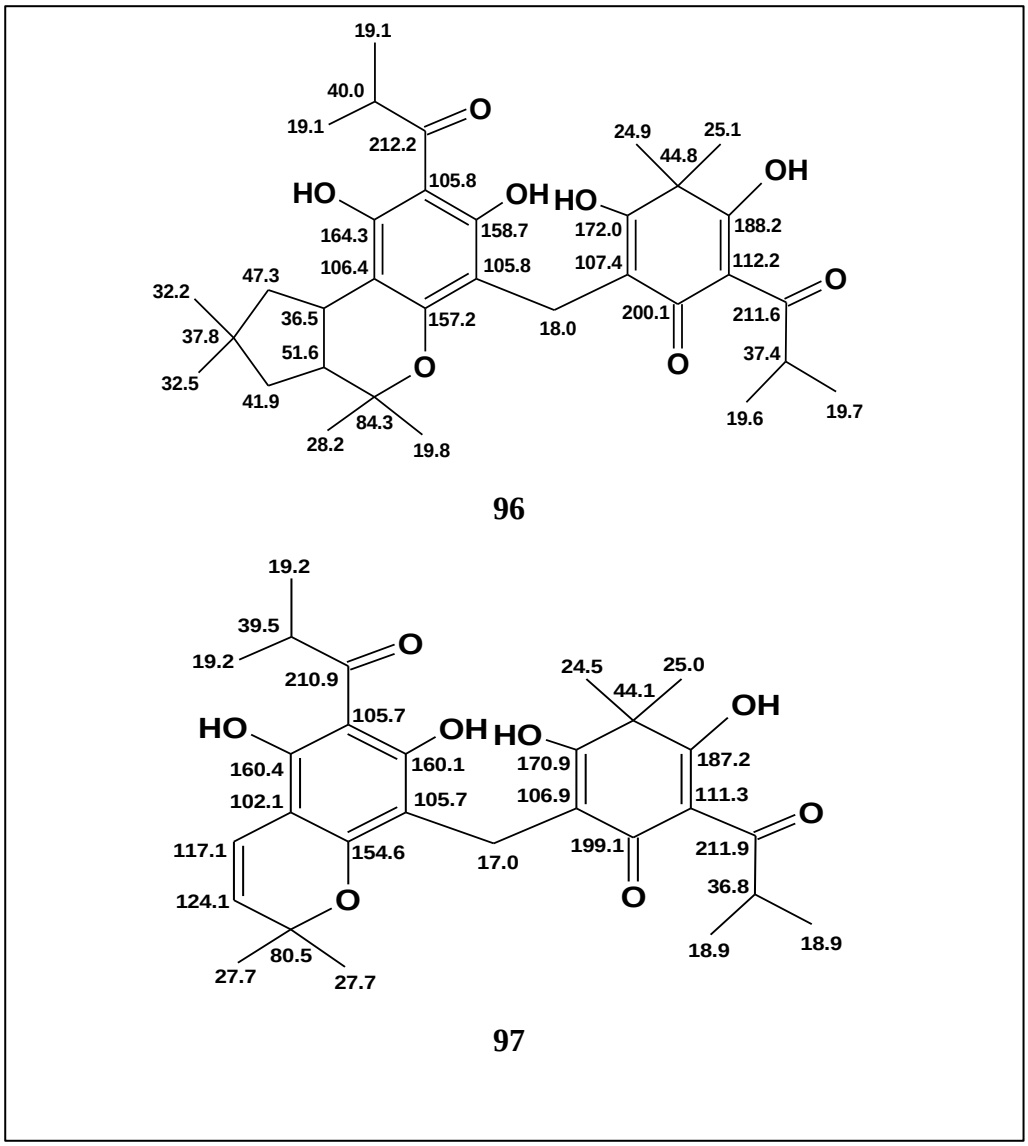
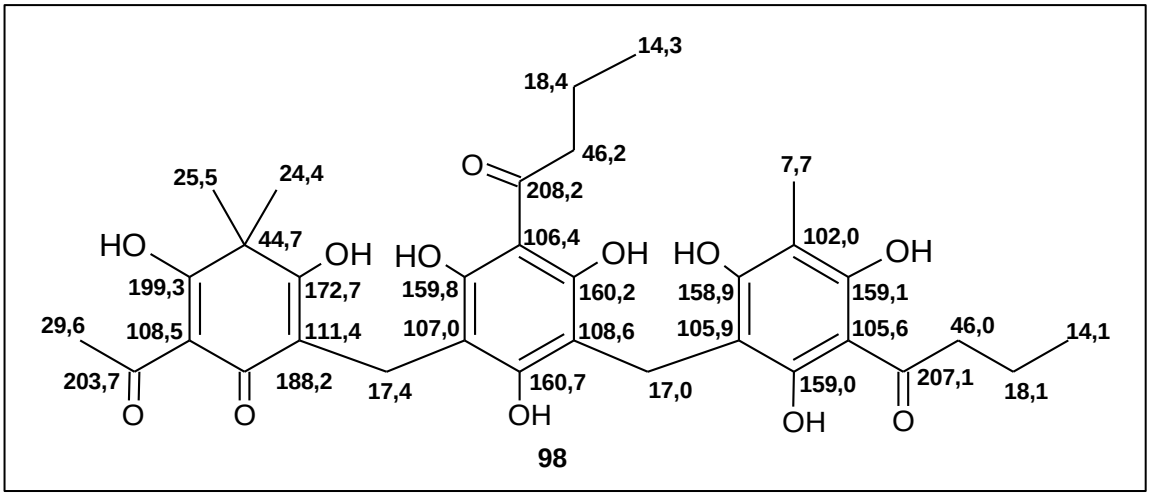


Figura 82- Estruturas 96 a 98 de floroglucinóis poliméricos (continuação)



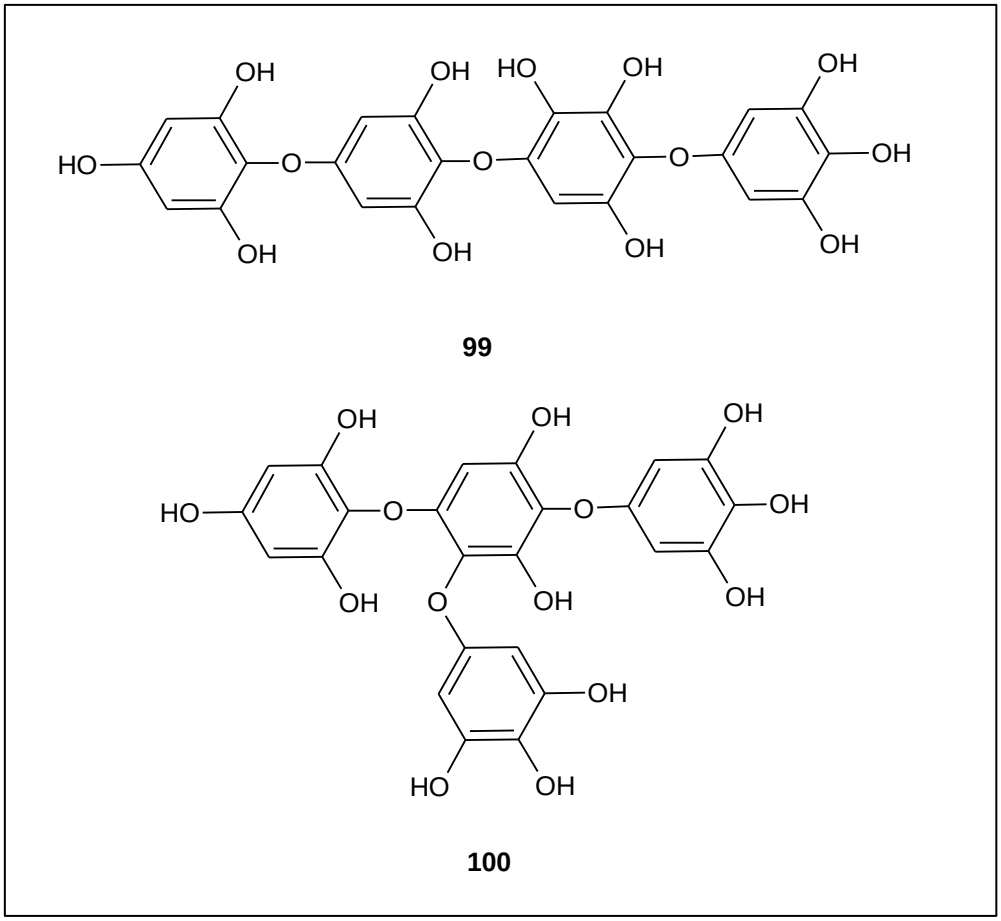
As estruturas exibidas com os sinais de RMN^{13}C fazem parte do levantamento bibliográfico de floroglucinóis, que pode ser consultado na seção 5.4.

5.2.10 Florotaninos

Os florotaninos são derivados de floroglucinóis com unidades ligadas entre si de forma aleatória e com ocorrências relatadas apenas em organismos marinhos, principalmente em algas pardas e vermelhas. Também podem ser isolados na forma de peracetatos a partir de extratos acetilados. São subdivididos em quatro classes, de acordo com o tipo de ligação entre as unidades de floroglucinol: com ligação éter, fenil, éter e fenil e benzodioxinas (ARAÚJO, 2008).

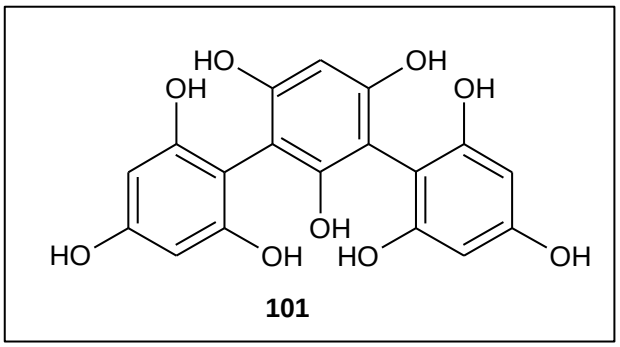
Para aqueles com ligação tipo éter, temos as subclasses dos fuhalóis e floretóis, com cadeias lineares ou não. Cada um tem um exemplo exibido a seguir com o hidroxitrifuhalol A (99), isolado de alga parda *Sargassum spinuligerum* (KEUSGEN E GLOMBITZA, 1995) e o trifuhalol C (100), isolado de *C. mascalocarpum* na forma de acetato (GLOMBITZA E LI, 1991).

Figura 83- Estruturas 99 e 100 de florotaninos



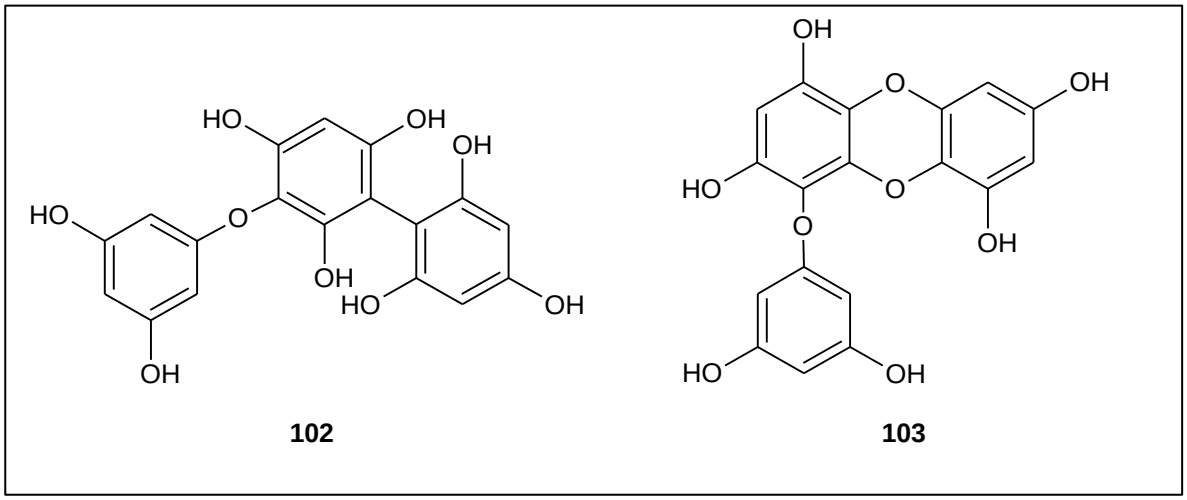
Como exemplos daqueles com ligação fenil, temos os fucóis, provenientes de algas pardas e também isolados como acetatos. A seguir podemos visualizar um trifucol (101) isolado de várias algas como *Analipus japonicus, Bifurcaria bifurcata, Fucus vesiculosus* e *Himanthalia elongata* (GLOMBITZA, ROSENER E KLOCH, 1973) (GLOMBITZA, ROSENER E MULLER, 1975).

Figura 84- Estrutura 101 de florotanino



Para os derivados com ligação éter e fenil, temos os fucofloretóis, exemplificados abaixo com a substância fucoflorofetol B (102), isolada de *Fucus vesiculosus* (GLOMBITZA et al, 1978).

Figura 85- Estruturas 102 e 103 de florotaninos



Como exemplos daqueles com ligação benzodioxina, temos os eckóis e carmalóis. A substância eckol (103) isolada de *Eisenia arbórea* (GLOMBITZA E GERSTBERGER, 1984) e posteriormente de *Eklonia stolonifera* (ARISAWA, 2003) mostrou atividade antioxidante, inibindo a geração de compostos oxigenados reativos (SANG et al, 2004)). Também há relatos para esta substância isolada de *Eisenia byciclis*, descrevendo a atividade inibitória de enzimas relacionadas a complicações decorrentes de diabetes (OKADA et al, 2004).

De forma geral, os efeitos bactericidas dos florotaninos são mais pronunciados do que aqueles das catequinas, sendo alguns deles eficientes contra bactérias MRSA e outras. Alguns dos compostos desta classe também apresentaram atividade algicida (NAGAYAMA et al, 2003).

5.3-Propostas de biossíntese dos floroglucinóis isolados

Cada organismo vivo possui um funcionamento de acordo com os processos que ocorrem em seu metabolismo, que é particular para cada espécie e resulta de anos e anos de adaptação ao ambiente em que o ser vive. Metabolismo é o conjunto de processos vitais, responsável pela sobrevivência da espécie e que envolve processos que visam primariamente ao aproveitamento de nutrientes para satisfação as exigências fundamentais da célula, como

energia (derivada de ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese de substâncias essenciais à sobrevivência (macromoléculas), dentre outros (SIMÕES et al, 2010). Nestes processos ocorrem reações e transformações variadas, como produção e degradação de substâncias como insulina, proteínas, gorduras, hormônios, enzimas, formação de sistemas tampão, liberação de íons, transporte de substâncias, dentre outras atividades essenciais para o funcionamento básico do organismo. Esse é o metabolismo primário, similar entre os seres vivos, que consiste no conjunto de produção e transformação de substâncias essenciais relacionadas com a boa sobrevivência da espécie em questão (NOR, 2006).

5.3.1 O metabolismo secundário

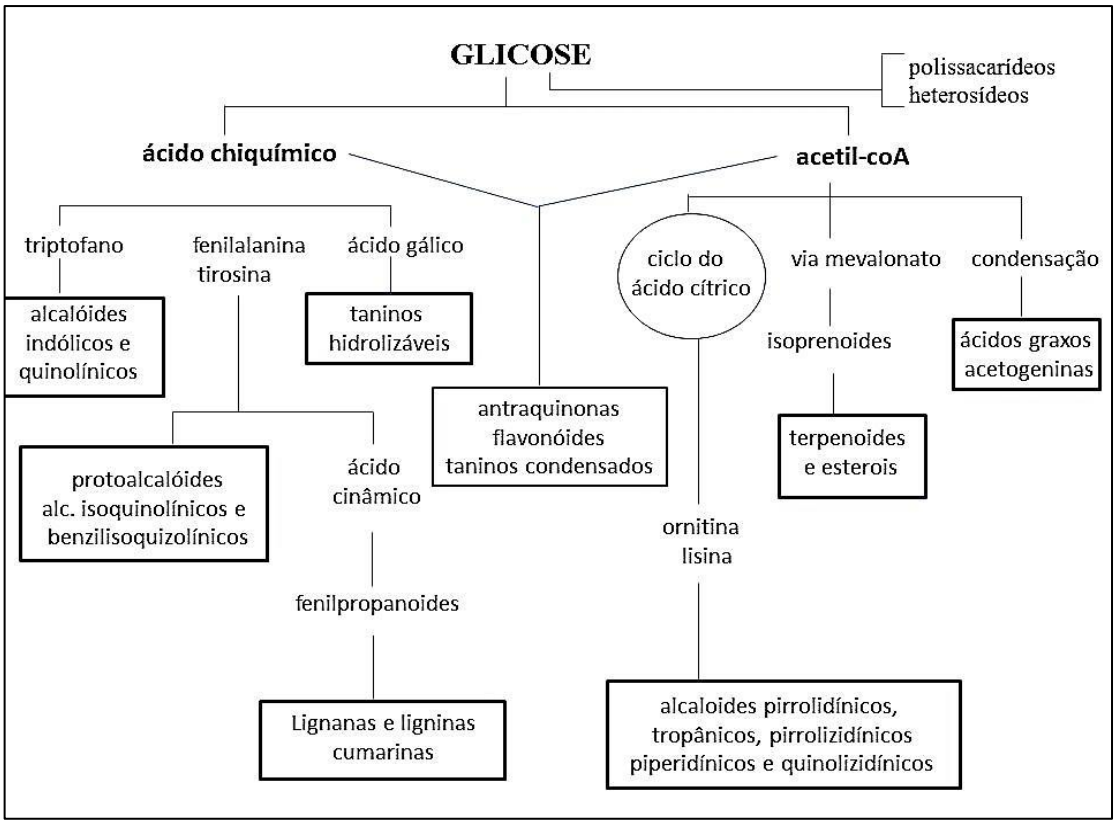
Quando se trata de vegetais, microorganismos e alguns animais, observa-se a existência de um grande aparato metabólito composto de enzimas, coenzimas e organelas que produzem, transformam e/ou acumulam muitas outras substâncias não relacionadas diretamente à sobrevivência. Não se sabe exatamente a função de cada uma delas em cada espécie, mas em geral considera-se que para plantas ou animais que possuem muitas limitações, como baixa capacidade de defesa ou movimentação, um dos métodos eficientes para sobreviver é através da produção destas substâncias. Substâncias que podem ser protetoras contra a radiação solar UV, repelentes para um predador, ou atraentes para o sexo oposto ou para seres que irão proteger o organismo, por exemplo, através de uma simbiose, ou espalhar suas sementes.

Assim, esses metabólitos produzidos a partir de rotas biossintéticas diversas e restritas a determinados organismos e espécies são chamados de metabólitos secundários. (ANIDO JR, 2008), (SIMÕES et al, 2010). O metabolismo secundário é aquele no qual ocorrem reações químicas que geram substâncias orgânicas de estruturas muito variadas, geralmente utilizando substâncias precursoras derivadas do metabolismo primário. Muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao seu meio, assim, estas vias de produção, embora divididas didaticamente, são na verdade estreitamente relacionadas, de forma que a falta de determinados produtos do metabolismo primário impossibilita a produção de determinados metabólitos secundários (VICKERY e VICKERY, 1981).

Através do metabolismo da glicose (Figura 86) são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. O ácido pirúvico derivado da quebra da glicose pode seguir a rota do ácido chiquímico, formando metabólitos aromáticos, como alcaloides

indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos ou pode ser oxidado continuamente formando acetil-coenzima A (acetil-coA) e posteriormente, seguir a via do ácido cítrico (gerando alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos), do mevalonato (gerando terpenoides e esteróis) ou da condensação de acetato (gerando acetogeninas).

Figura 86– Rotas biossintéticas derivadas da glicose



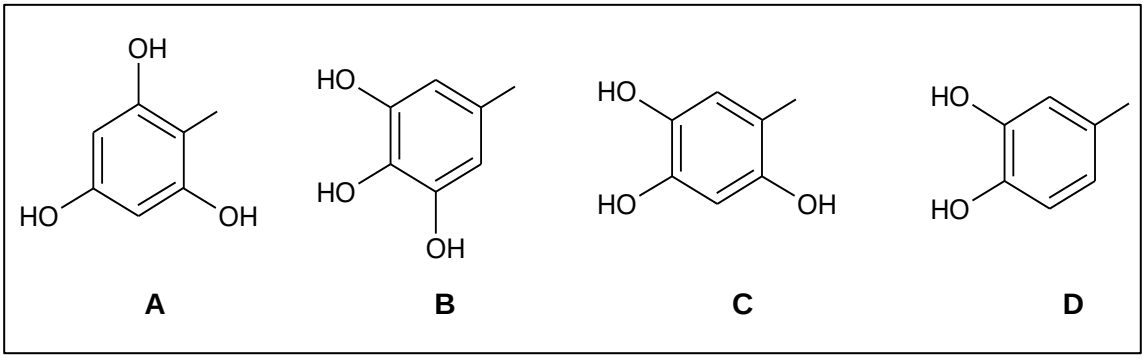
Quando uma unidade de ácido chiquímico se combina com uma ou mais unidades de acetato ou derivados, pode ocorrer a produção de substâncias como antraquinonas, flavonoides e taninos condensados, chamados de metabólitos de rota mista.

A produção das substâncias em todas estas rotas envolve etapas complexas de reações bioquímicas em meio aquoso contendo muitas enzimas especializadas e íons em solução. A maioria das rotas secundárias ocorre em alguns tecidos ou células especiais, diferenciadas, onde podem ser compartimentadas, além de ser ativadas durante alguns estágios específicos de crescimento e desenvolvimento do organismo (SIMÕES et al, 2010). Algumas classes de reações que ocorrem no mundo biológico são, por exemplo, alquilação, condensação aldólica,

oxidação, redução, acoplamento oxidativo e glicozilação, rearranjo de Claisen, transaminação, carboxilação, descarboxilação, dentre outros.

Considerando que a produção de metabólitos secundários normalmente está restrita a algumas espécies ou famílias, é possível analisar e muitas vezes prever o padrão de produção de vegetais através das substâncias já relatadas naquela família. Outro fator que auxilia na investigação da origem biossintética das substâncias isoladas é o padrão de oxigenação dos metabólitos (Figura 87) Para aqueles derivados da via policetídica (originada da via do acetato), o padrão de entrada de oxigênio é meta (A), ou seja, o anel é oxigenado em 1,3,5. Já os fenólicos obtidos pela via do chiquimato são característicos pelo padrão de substituição para em relação ao grupo da cadeia lateral. Se houver posterior hidroxilações, estas serão orto e para orientadas (B-D).

Figura 87– Diferentes padrões de oxigenação em metabólitos secundários



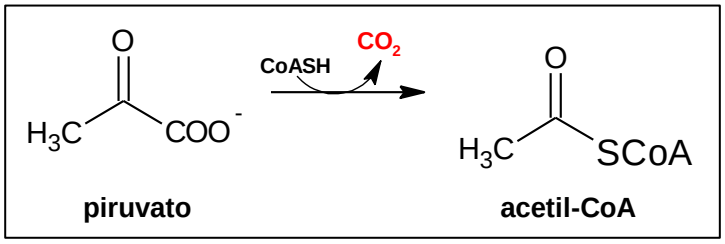
5.3.1.2 As rotas metabólicas e produção de derivados de floroglucinóis

O núcleo floroglucinol é gerado através de um mecanismo policetídico originado na via do acetato, onde o elemento inicial de formação da estrutura é um éster de coenzima A (acetil-coA). O acetil-CoA (Figura 88) constitui a origem da unidade básica de C2 de diversas substâncias naturais como aminoácidos alifáticos e seus derivados alcaloides, terpenoides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos (ARAÚJO 2008), (DEWIK, 2001), sendo derivado da descarboxilação oxidativa do piruvato,

Este processo ocorre na mitocôndria das células, através de um complexo enzimático que inclui três enzimas e cinco coenzimas (piruvato desidrogenase, driidrolipoil transacetilase, diidrolipoil transacetilase, tiamina pirofosfato, coenzima A, nicotinamida adenina dinucleotídeo ou NAD+, flavina adenina dinucleotídeo ou FAD+ e ácido lipóico).

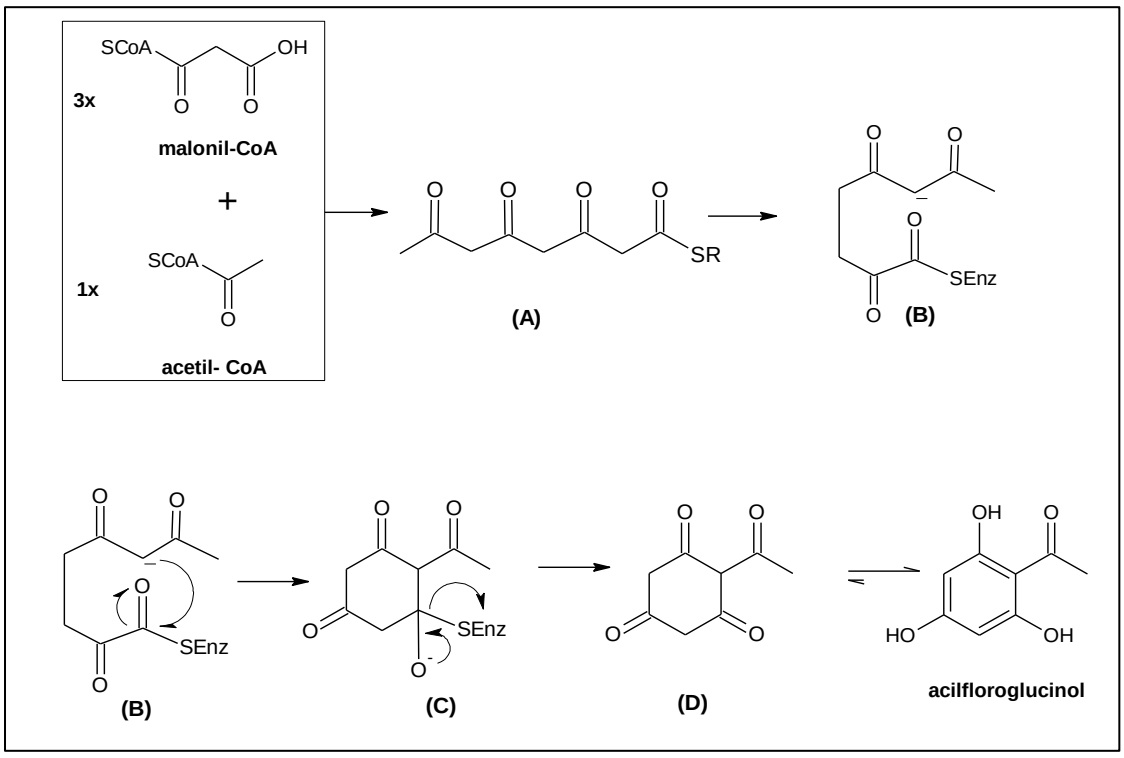
Após ocorrer a condensação do acetil-CoA com malonil-coA, ciclização e redução, o anel aromático resultante será substituído por prenilas ou geranilas o que contribui significativamente para a variedade estrutural desta classe de substâncias (BOUBAKIR et al, 2005), (SIMÕES et al, 2010).

Figura 88 – Formação do acetil-coA



Para a produção policetídica (Figura 89) o acetil-CoA inicia a cadeia carbônica e a extensão ocorre através do derivado malonil- SCoA, formado através de reação de carboxilação do acetil-SCoA mediada por biotina (LOBO; LOURENÇO, 2007). No meio biológico, esta condensação dos iniciadores (acetil-CoA) com os extensores (malonil-coA) é realizada através da mediação de enzimas chamadas policetídeo sintases (PKSs, em inglês), que são divididas em três tipos, sendo a do tipo III presente em plantas e bactérias. Este ciclo pode ocorrer várias vezes, aumentando a cadeia carbônica em dois carbonos por ciclo.

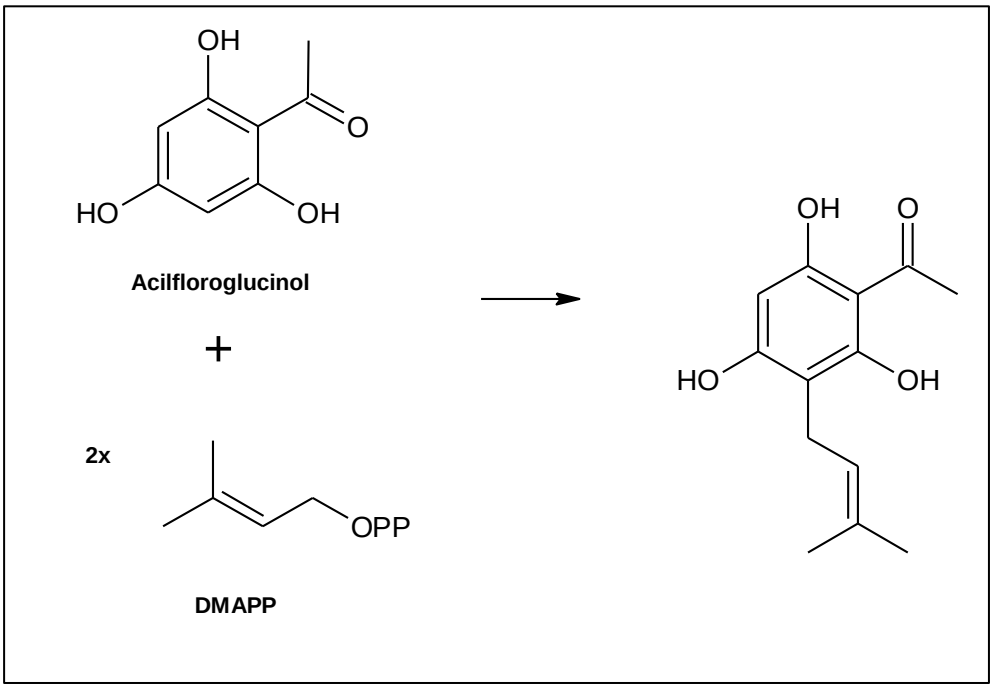
Figura 89– Formação do núcleo floroglucinol acilado



A condensação de três unidades de malonil-CoA com uma derivada do acetato forma um ácido β-policeto (A) cujo carbono C-6 sofre ionização e forma o ânion 2,5,7-tri-oxo-octanoico (B). Este sofre uma ciclização do tipo Claisen e forma o intermediário C que por eliminação do grupamento tiol regenera a carbonila originando a ciclohexatriona acilada (D). Esta entra em equilíbrio com a forma enólica, que possui um anel aromático, sendo assim energeticamente favorecida, resultando no acilfloroglucinol básico, que permanece com uma cadeia lateral acila que muitas vezes pode ser também reduzida. Enzimas e substâncias específicas como NADH promovem a redução que resulta no anel tri-hidroxilado. A forma enólica é aromática e mais estável, e a cadeia lateral normalmente mantém uma carbonila.

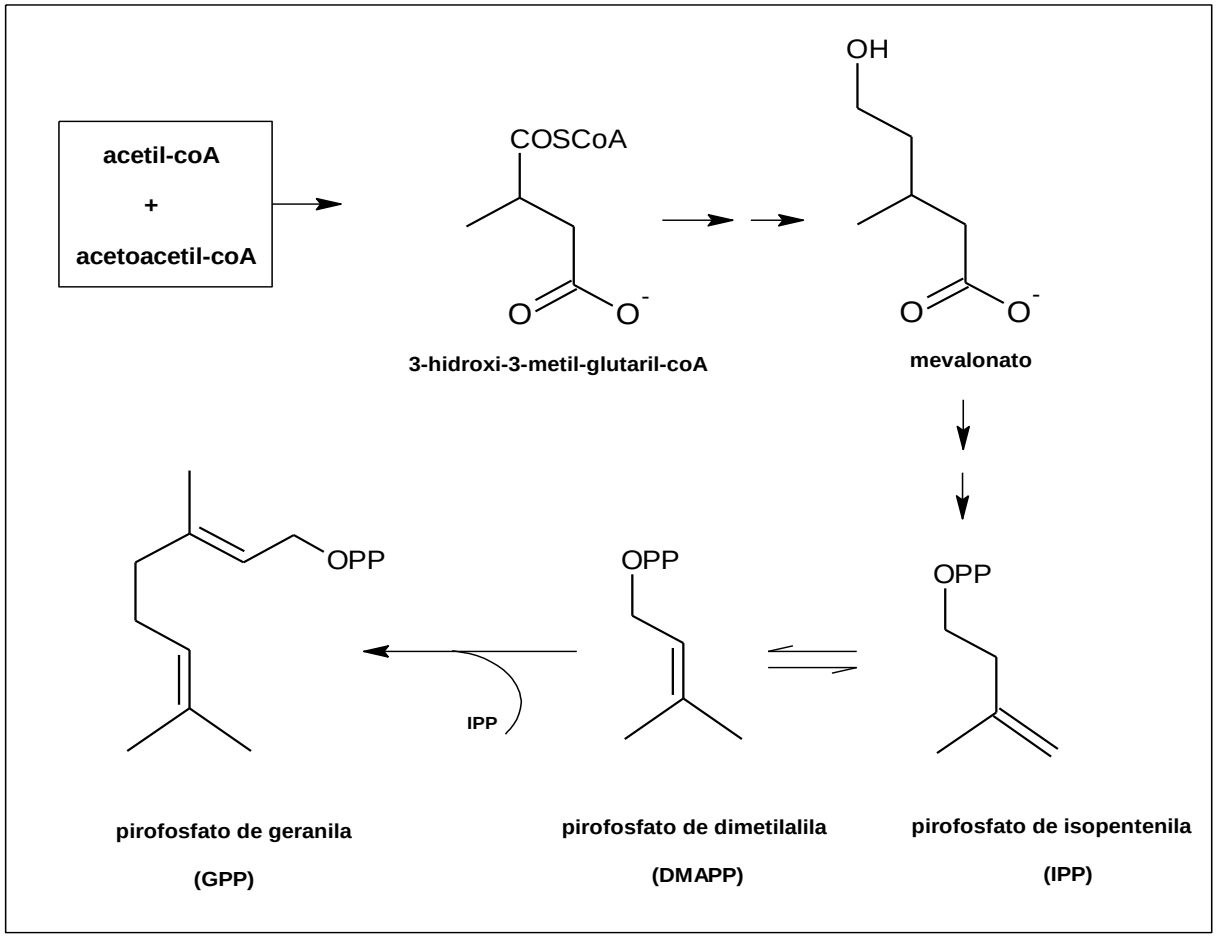
Após a etapa de ciclização e redução do policetídeo, a entrada dos substituintes geranila ou prenila ocorre através da transferência de pirofosfato de geranila (GPP) ou pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), mediada por enzimas chamadas preniltransferases, que promovem a entrada destes substituintes (Figura 90). Esta etapa pode ocorrer várias vezes, de forma a incluir mais prenilas no anel.

Figura 90- Ligação de prenila no núcleo THB de acilfloroglucinol



Os substituintes prenila e geranila são formados a partir da condensação de uma unidade de acetoacetil-coA com uma de acetil-coA. Após a condensação aldólica, posterior hidrólise e redução do produto, origina-se o mevalonato, que será convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), a unidade básica de formação de terpenos e esteroides. O IPP entra em equilíbrio com seu isômero dimetilalil-pirofosfato e a ocorrência de condensação das duas moléculas gera o geranil pirofosfato. Assim, a unidade geranila é formada após a união, mediada por enzimas, de duas destas unidades isômeras geradoras de prenila, conforme figura 91.

Figura 91- Formação de unidades doadoras de prenila e geranila

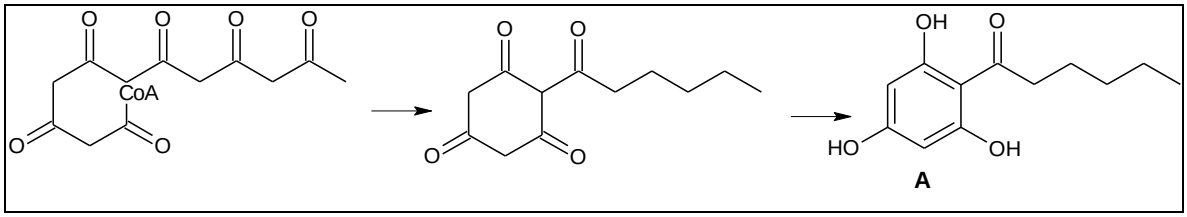


Muito comum, após a ligação da prenila ou geranila na estrutura principal, é a ocorrência de ciclização, que pode ocorrer de várias formas, sempre relacionadas à existência de enzimas específicas no meio celular.

5.3.2 Biossíntese de derivados do floroglucinol deste trabalho

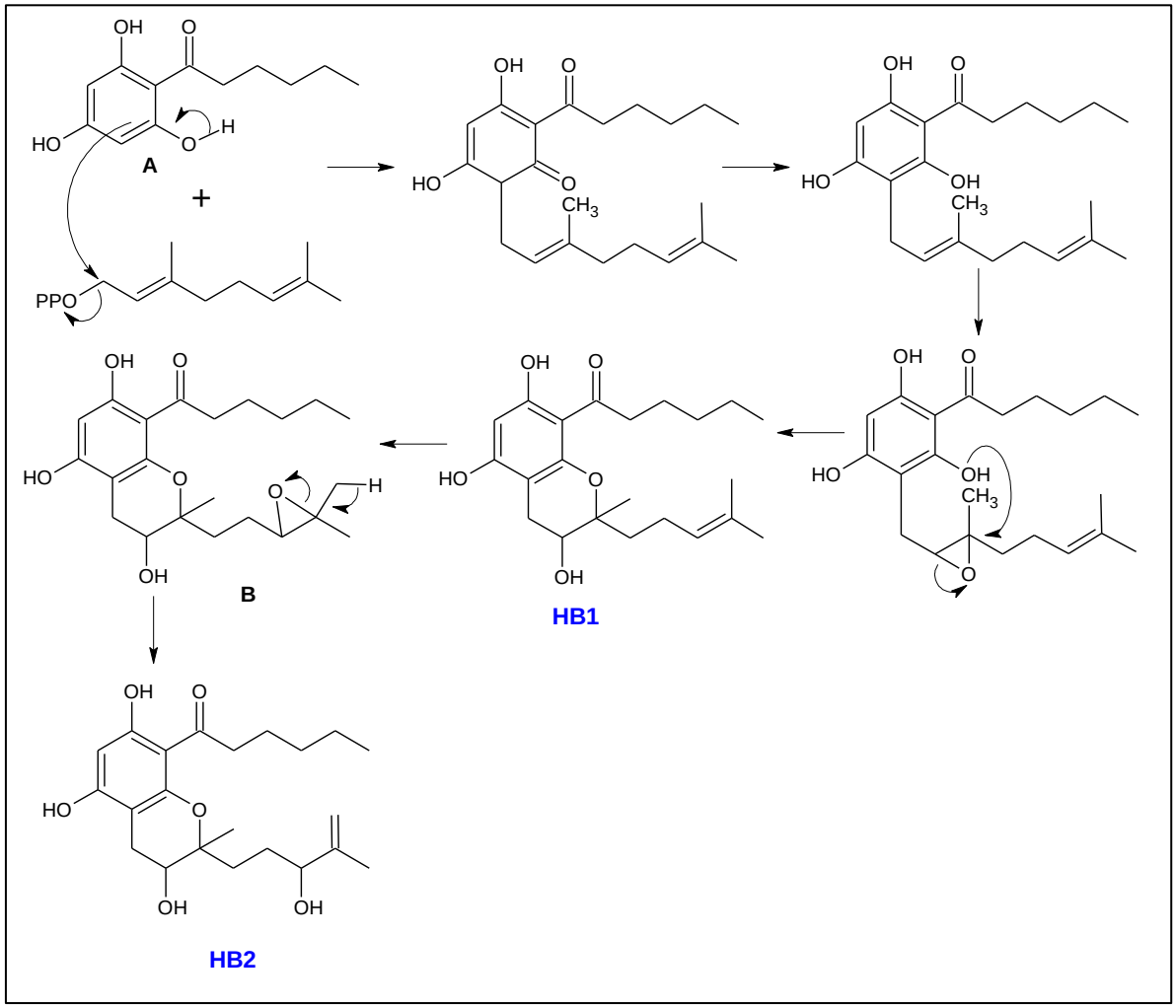
Para os floroglucinóis isolados de *H. brasiliana* neste trabalho, há inicialmente a ciclização de um policetídeo formado conforme descrito na figura 89, com a existência no anel aromático de uma cadeia lateral com seis unidades de carbono contendo um grupo cetônico. Posteriormente, ocorrerão passos sequenciais de redução da cadeia lateral e do anel, formando o núcleo floroglucinol com uma unidade hexanoíla ligada (estrutura A, figura 92).

Figura 92- Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie Harpalyce brasiliana HB1, HB2 e HB5 (1ª parte)



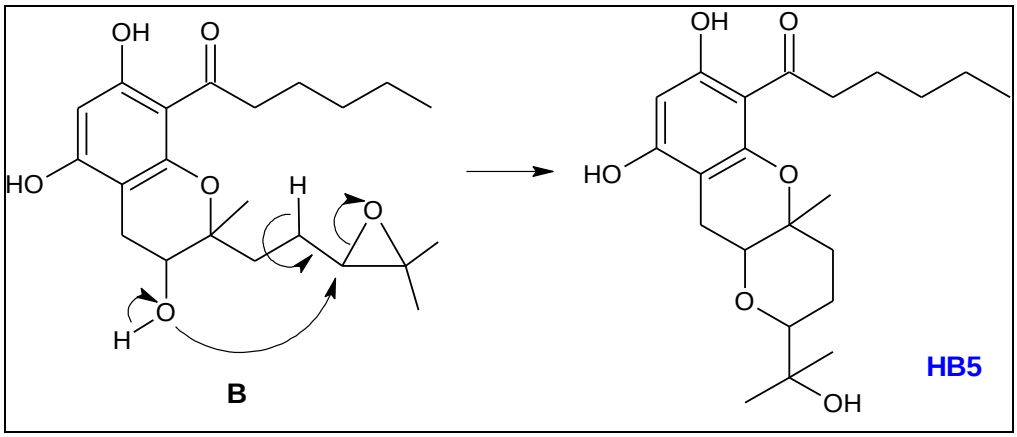
A inserção do grupamento geranila é mediada por enzimas específicas e ocorrerá em C-3, seguida da epoxidação da insaturação da unidade geranila. O epóxido abre, restando uma hidroxila em C-2´ e ocorre uma ciclização através do carbono metílico da geranila com a hidroxila fenólica presente em C-2. Esta ciclização forma o núcleo benzopirano presente nos três floroglucinóis deste trabalho (figura 93).

Figura 93- Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie Harpalyce brasiliana HB1, HB2 e HB5 (2ª parte)



Assim, a produção biossintética da substância isolada HB1 provavelmente segue esta descrição, mantendo assim sua dupla ligação em C6´-C7´. A partir de HB1 é gerada a estrutura B (figuras 93 e 94), precursora de HB2 e HB5. A substância HB2 possui uma estrutura similar a HB1, com adição de uma hidroxila e uma diferença na insaturação, que muda de posição após nova formação e quebra de sistema epóxido. Para esta substância, a insaturação permanece em C7´-C8´, com presença de uma hidroxila em C-6´. Para a substância HB5, ocorre mais uma ciclização, via nova formação/quebra do epóxido da dupla ligação da unidade geranila, entre a hidroxila presente em C-2´ e o carbono C6´, que permanece por fim ligado a uma hidroxila.

Figura 94- Biossíntese dos derivados do floroglucinol isolados da espécie Harpalyce brasiliana HB1, HB2 e HB5 (3ª parte)



Assim, estudos diversos de biossíntese envolvendo metabólitos, enzimas e outras proteínas, metabolômica, produção sob stress, diferenciação de produção sob cultivo e selvagem, dentre outros aspectos são muito importantes na manutenção de uma espécie dentro daquela família ou gênero. Não é tão incomum a mudança da espécie dentro destas classes, mostrando que a importância dos padrões de metabólitos secundários produzidos por uma planta é grande o suficiente até para promover a mudança de uma espécie para outra família ou gênero que se adeque melhor aos padrões de produção bioquímica.

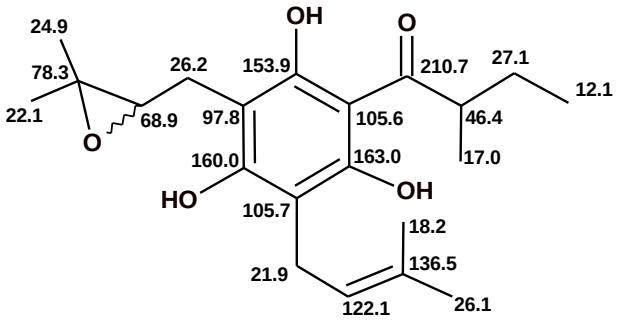
5.4 LEVANTAMENTO DE FLOROGLUCINÓIS

Existem na literatura levantamentos de derivados de floroglucinol, tanto completos com dados espectroscópicos, como é o caso de ARAÚJO (2009), quanto sem estes dados, como Singh e Bharate, 2006. Outros levantamentos incluem Penttila, 1970; Tada et al 1992; Singh e Etoh, 1997; Singh et al, 2000,; Verotta, 2002; Arisawa, 2003, Singh e Bharate, 2006 e Araújo, 2008. Porém, diante das contínuas pesquisas que foram realizadas após este período, houve a necessidade de complementação destes trabalhos.

Portanto, com a intenção de adquirir padrões para justificar dados de elucidação estrutural e contribuir com um banco de dados ainda não existente na literatura, apresentamos aqui um levantamento de dados de RMN^{13}C para floroglucinóis monméricos prenilados e geranilados. Foram compilados os anos de 2008 a 2014 e somados com a compilação bibliográfica disponível em Araújo, que engloba a produção entre 1978-2008, com sinais de deslocamento químico, ocorrência e atividade biológica.

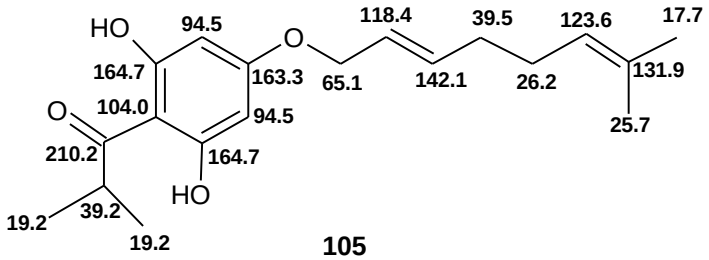
Para a organização deste levantamento, os floroglucinóis de número 104 a 201 foram listados na mesma ordem das classes descritas nas subseções 5.2.1 a 5.2.10. As figuras estão dispostas de forma que abaixo de cada estrutura há o nome da espécie produtora, sua atividade biológica (se houver), referência e dados técnicos de RMN. Algumas das estruturas já foram exibidas como exemplos ao longo das subseções da seção 5.2.

Figura 95- Levantamento bibliográfico- estruturas 104 a 109 de floroglucinóis variados

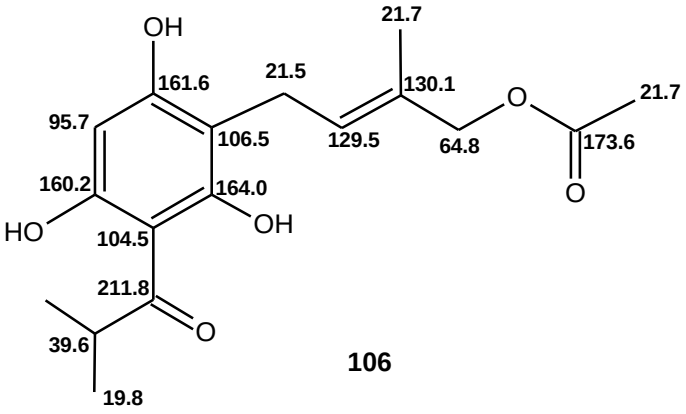


Hypericum foliosium
GIBBONS et al, 2005 (125 MHz, $CDCl_3$)
Propriedade antibacteriana

104



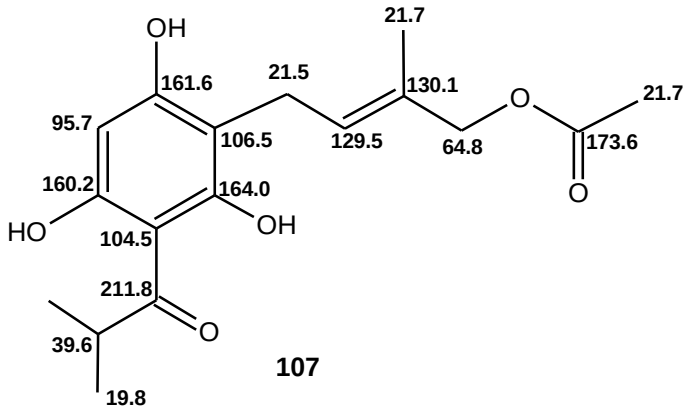
105



106

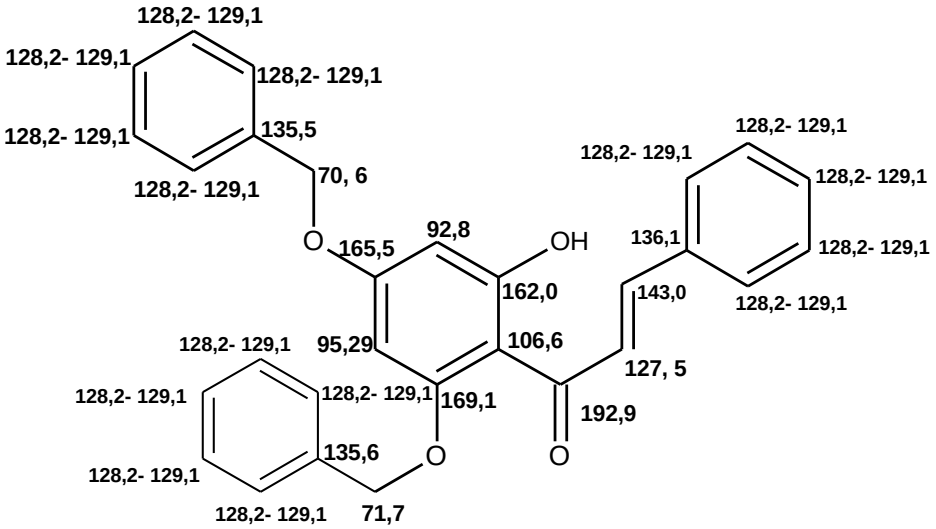
Hypericum jovis
ATHANASAS *et al.*, 2004
Propriedade antioxidante

Figura 95 Levantamento bibliográfico- estruturas 104 a 109 floroglucinóis variados (continuação)



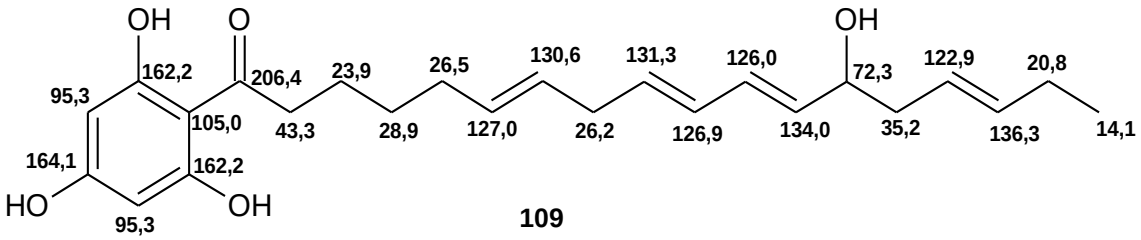
107

Helichrysum caespititium
MATHEKGA et al., 2000 (125 MHz, $CDCl_3$)
Propriedades antibacteriana e antifúngica



108

Helichrysum gymnocomum
DREWES, VAN VUUREN, 2008 (500 MHz, CDOD)
*sinais em revisão



109

Cystophora scalaris
LAIRD et al, 2010 (75,5 MHz, $CDCl_3$)

Figura 96 - Levantamento bibliográfico- estruturas 110 a 115 de floroglucinóis glicosilados

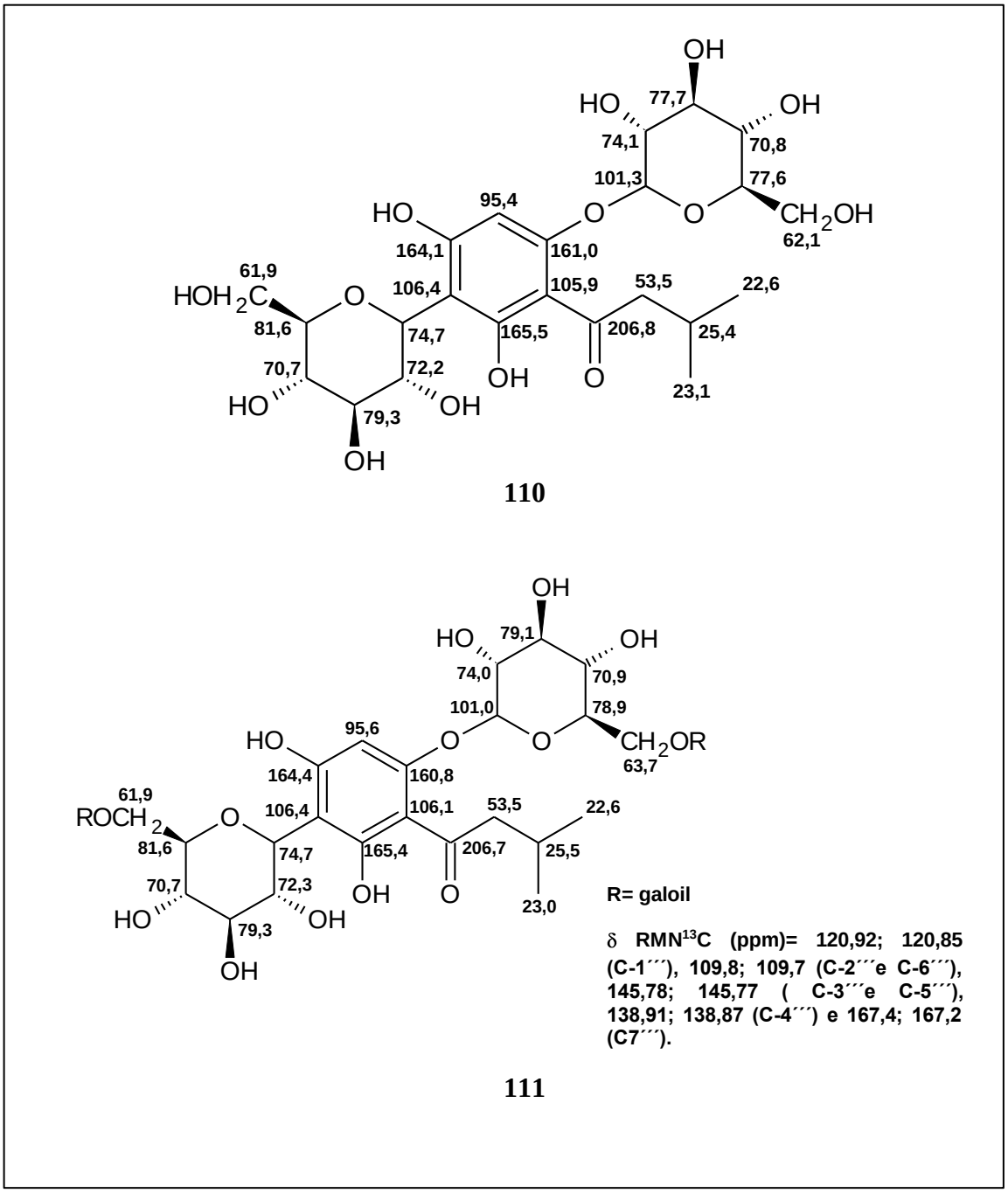
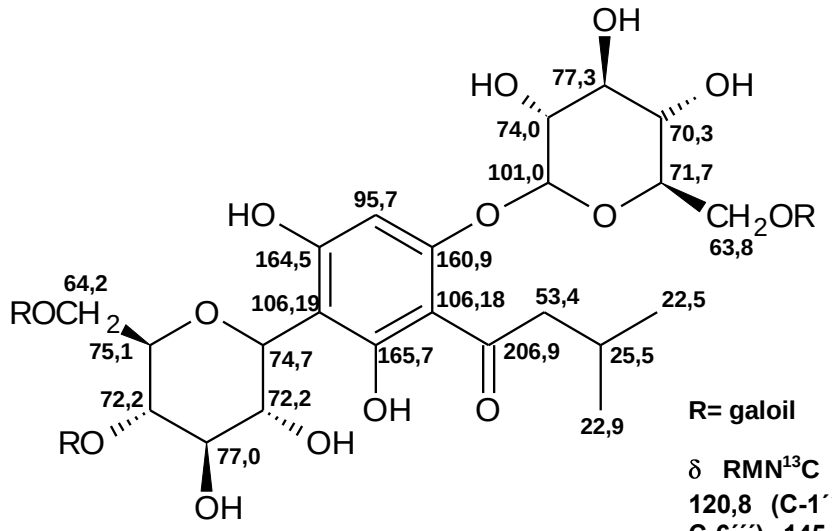


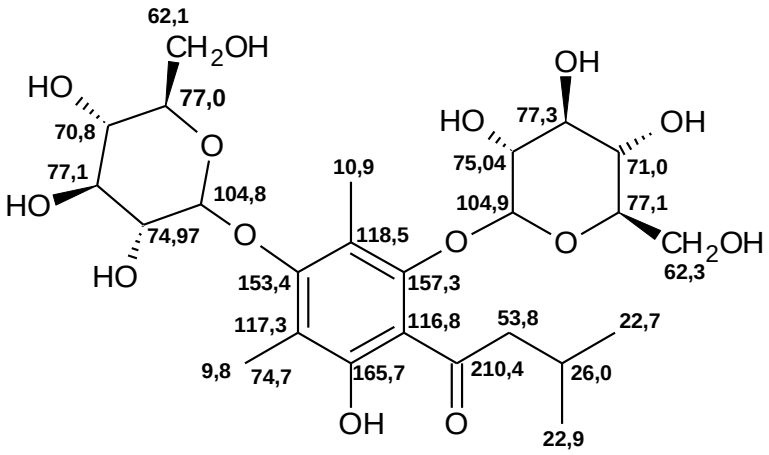
Figura 96- Levantamento bibliográfico- estruturas 109 a 115 de floroglucinóis glicosilados (continuação)



R= galoil

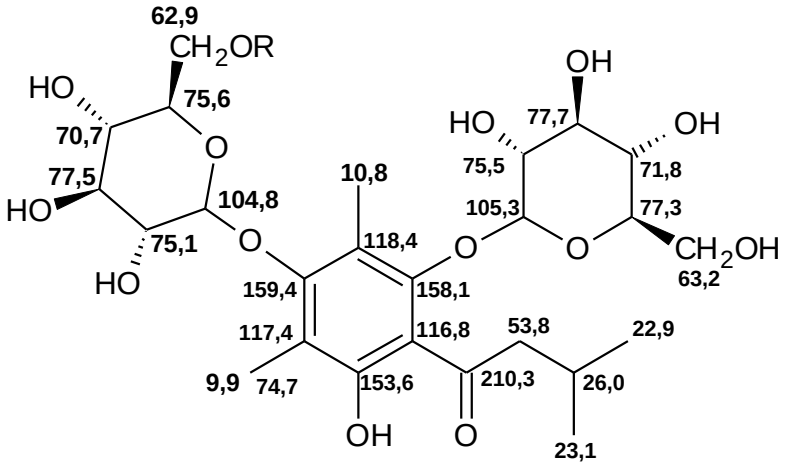
δ **RMN^{13}C (ppm)= 120,93; 120,86; 120,8 (C-1´´´), 110,1; 109,9 (C-2´´´e C-6´´´), 145,8; 145,7; 145,69 (C-3´´´e C-5´´´), 139,12; 138,9 (C-4´´´) e 167,3; 167,2; 166,8 (C7´´´).**

112



113

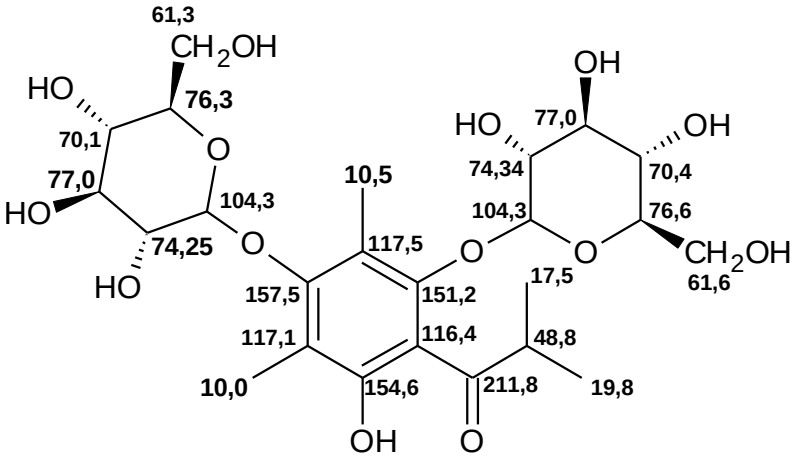
Figura 96- Levantamento bibliográfico- estruturas 109 a 115 de floroglucinóis glicosilados (continuação)



R= galoil

δ RMN^{13}C (ppm)= 121,8 (C-1´´´), 110,1 (C-2´´´e C-6´´´), 146,0 (C-3´´´e C-5´´´), 138,8 (C-4´´´) e 166,7(C7´´´).

114

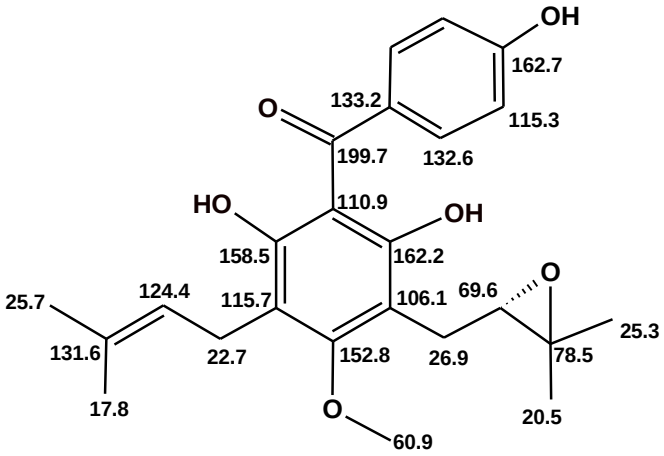


115

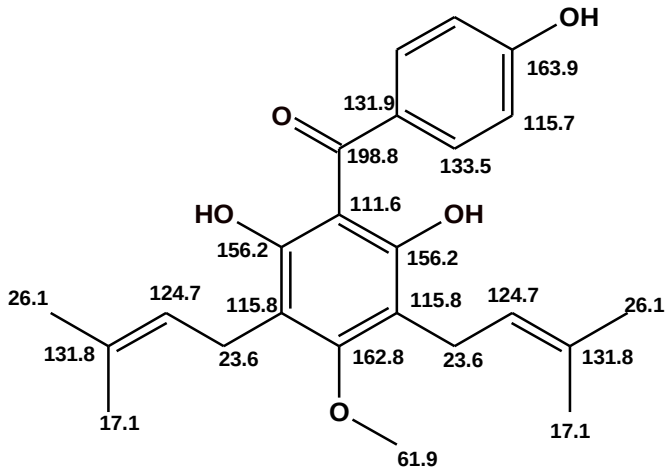
Kunzea ambigua

KASAJIMA et al, 2008 (125 MHz, Acetona-d_6+D_2O)

Figura 97- Levantamento bibliográfico- estruturas 116 a 124 de floroglucinóis prenilados



116

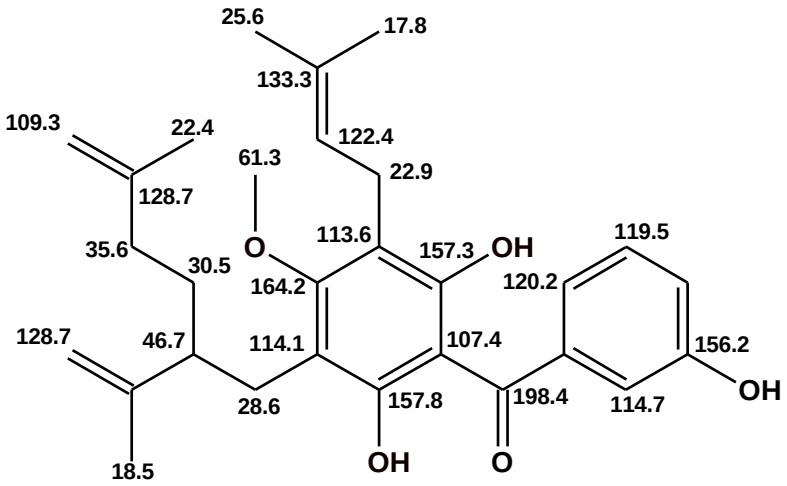


117

Vismia cayennensis

FULLER *et al.*, 1999 (CD_3OD, 125 MHz)

Figura 97- Levantamento bibliográfico- estruturas 116 a 124 de floroglucinóis prenilados (continuação)

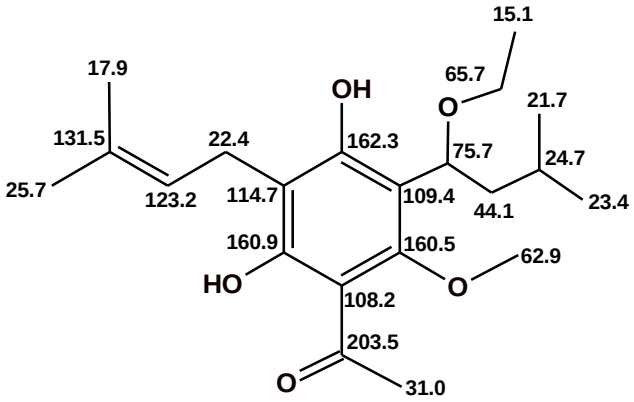


118

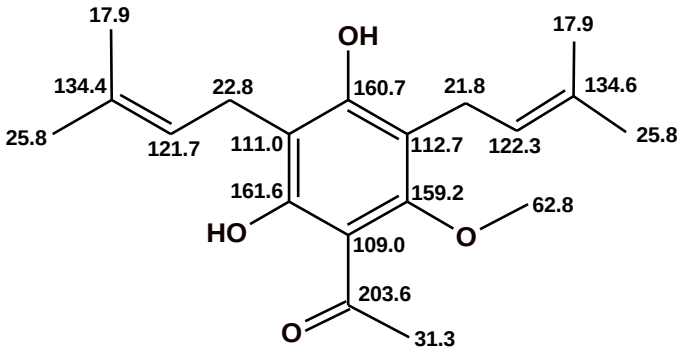
Tovomita brevistaminea

SEO *et al.*, 1999 ($CDCl_3$,125 MHz)

Atividade Citotóxica



119

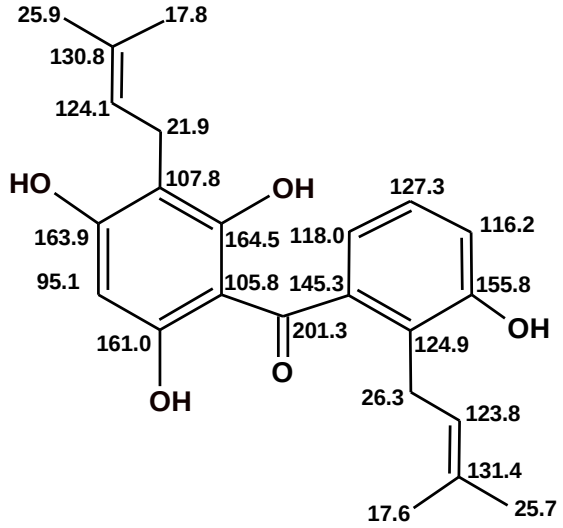


120

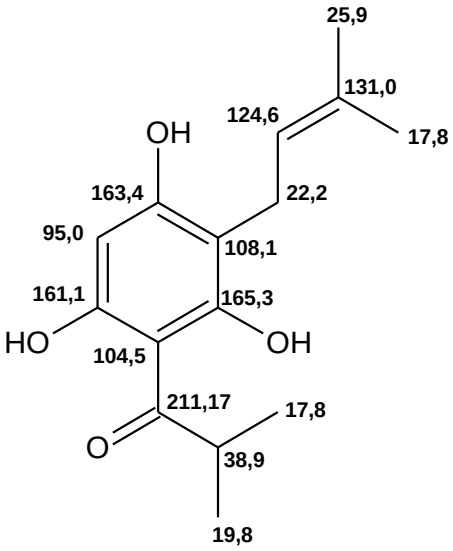
Acronychia pedunculata

SY e BROWN, 1999 ($CDCl_3$, 125 MHz)

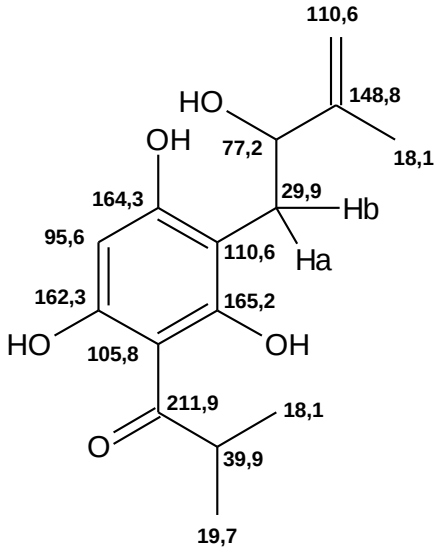
Figura 97- Levantamento bibliográfico- estruturas 116 a 124 de floroglucinóis prenilados (continuação)



121
Cudrania cochinchinensis
HOU *et al.*, 2001 $(CD_3)_2CO$, 125 MHz)



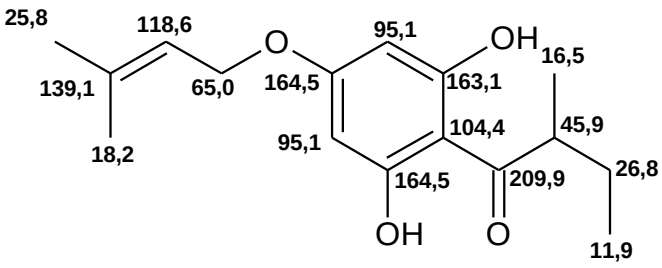
122



123

Helichrysum gymnocomum
DREWES, VAN VUUREN, 2008 (500 MHz, CDOD)

Figura 97- Levantamento bibliográfico- estruturas 116 a 124 de floroglucinóis prenilados (continuação)

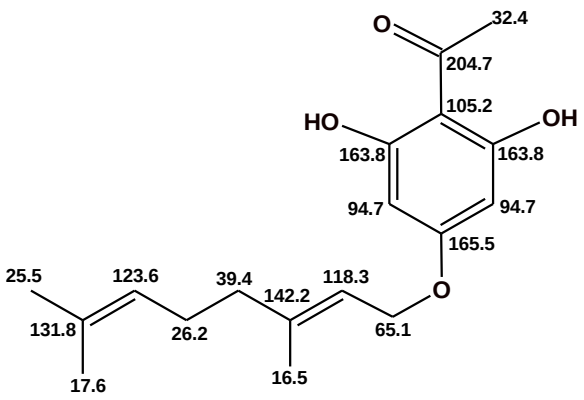


124

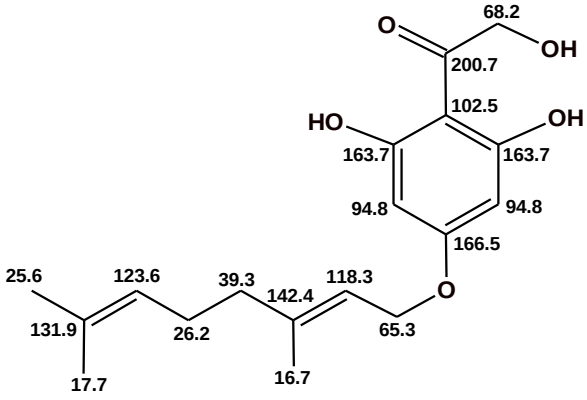
Hypericum empetrifolium

SCHMIDT *et al*, 2012 (150 MHz, $CDCl_3$)

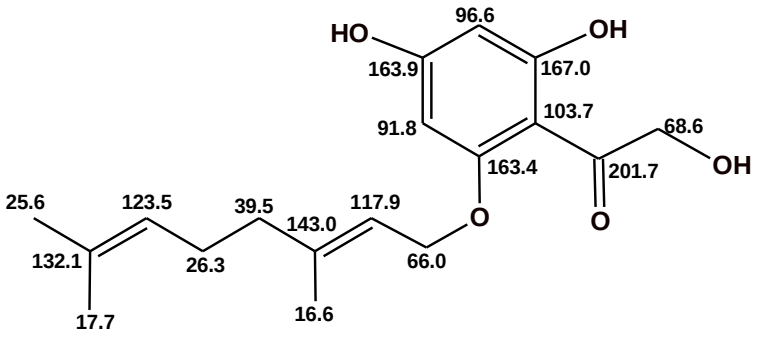
Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados



125

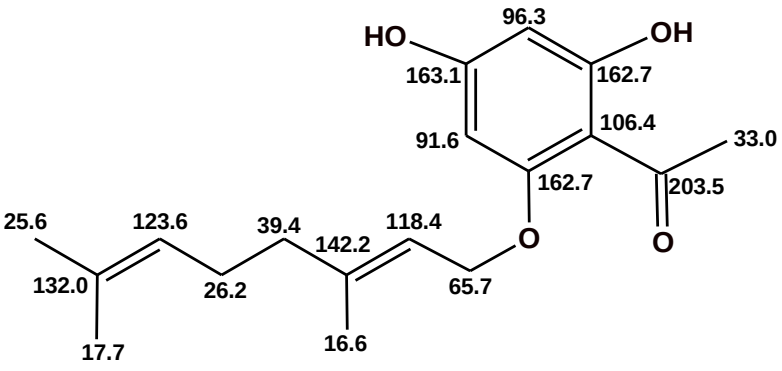


126

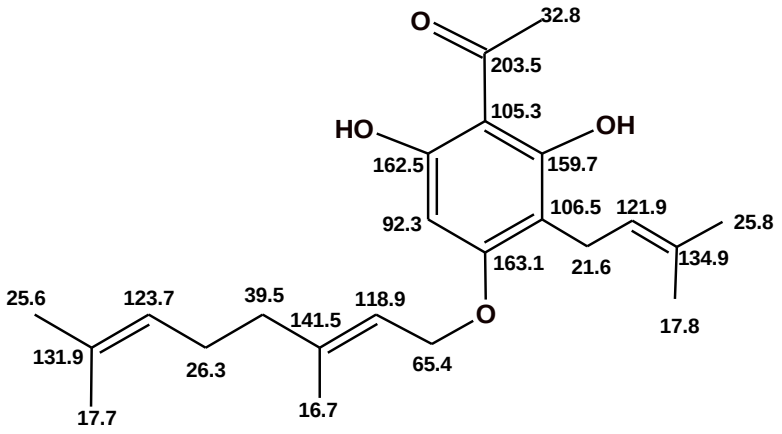


127

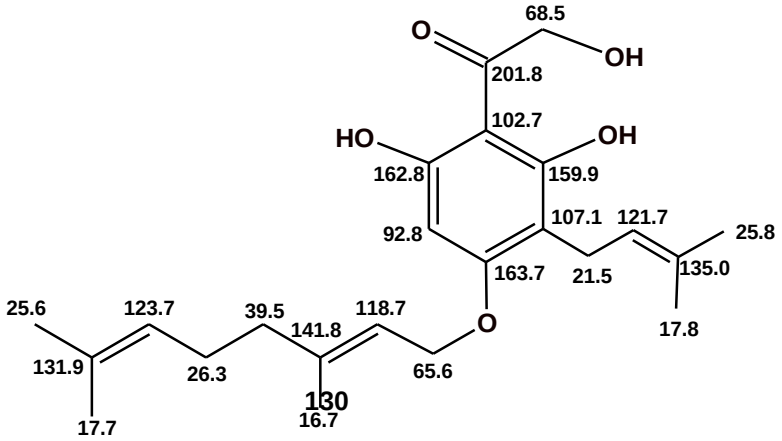
Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)



128



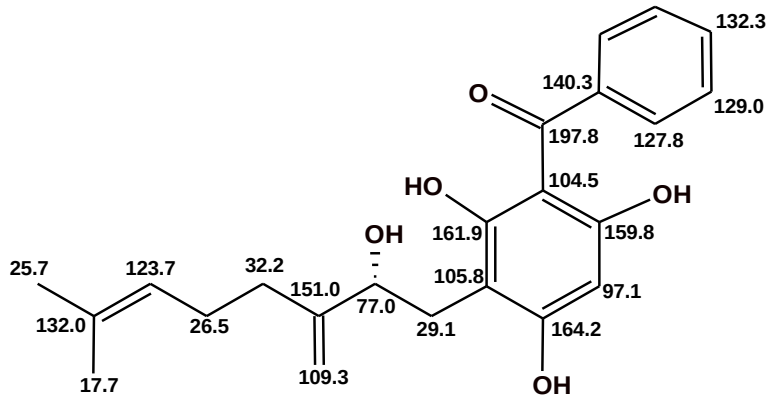
129



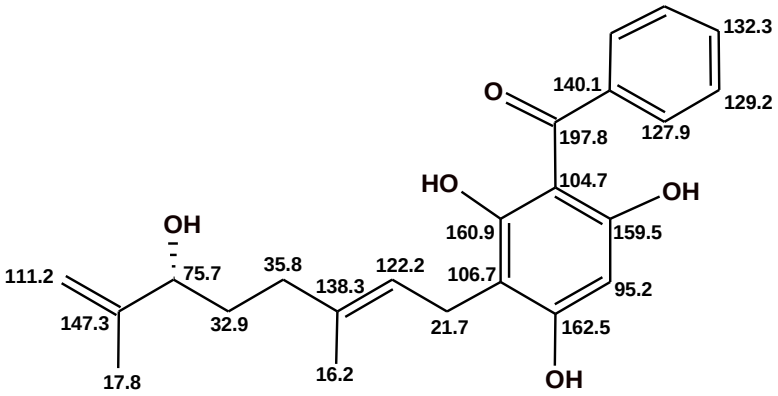
130

E*vodia merrillii*
LIN *et al.*, 1993 ($CDCl_3$, 75 MHz)

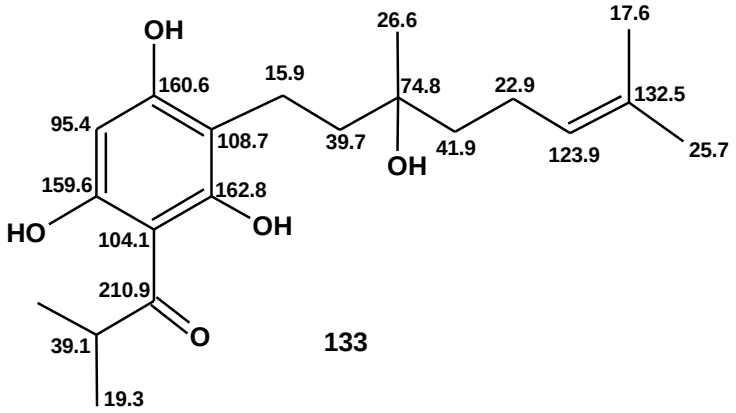
Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)



131

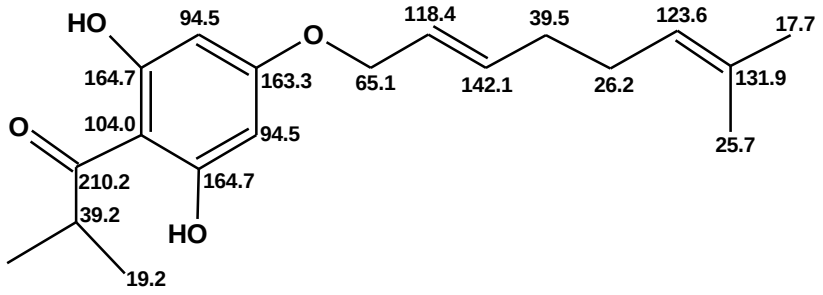


132
Tovomita langifolia
PECCHIO et al., 2006
($CDCl_3$, 75 MHz)

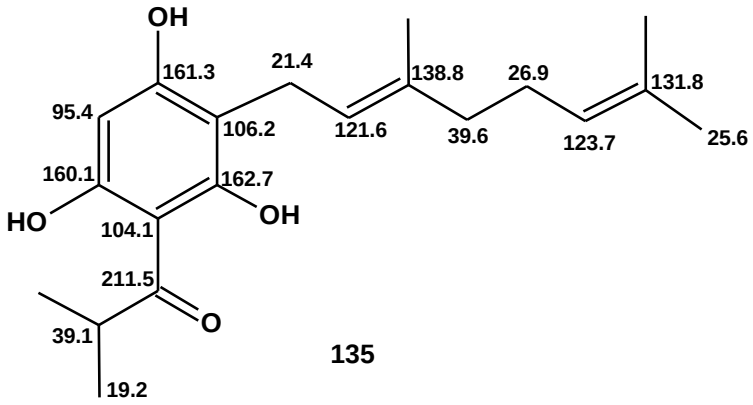


133

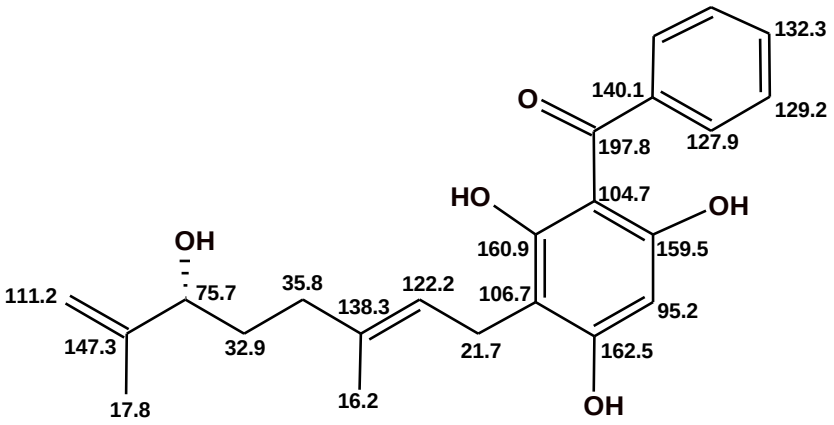
Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)



134
Hypericum jovis (55-58)
ATHANASAS *et al.*, 2004 ($CDCl_3$, 125 MHz

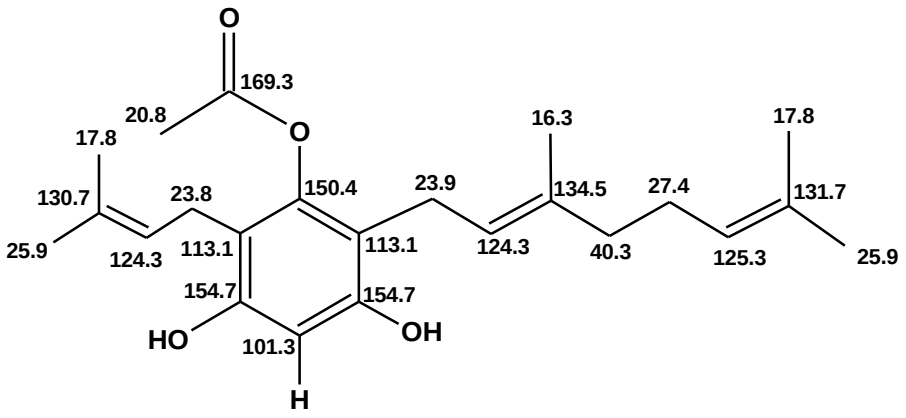


135

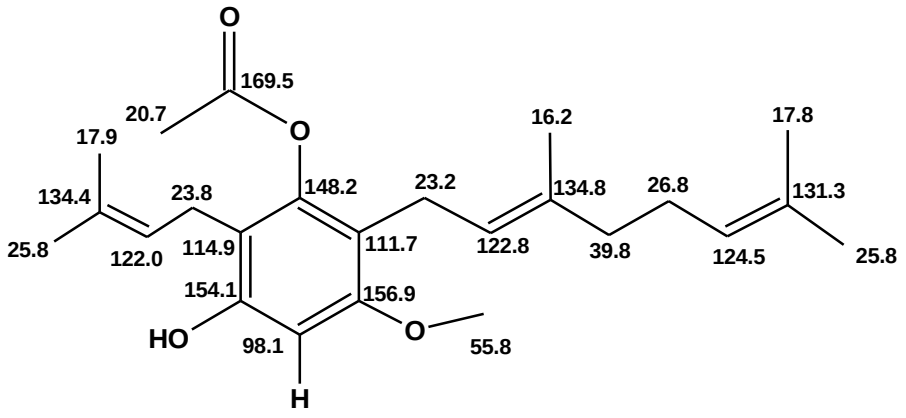


136
Hypericum styphelioides (56)
GAMIOTEA-TURRO *et al.*, 2004
Propriedade antioxidante

Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)

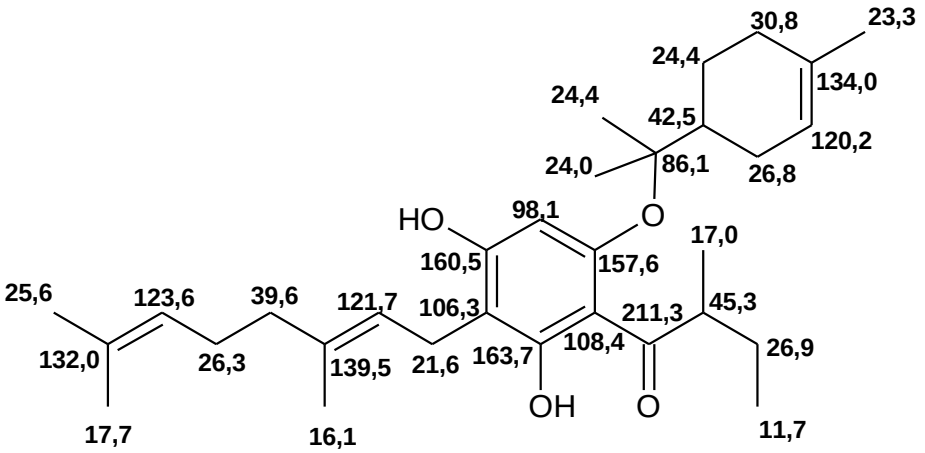


137



138

Bosistoa pentacocca
AUZI *et al.*, 1997 ($CDCl_3$,100 MHz



139

Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)

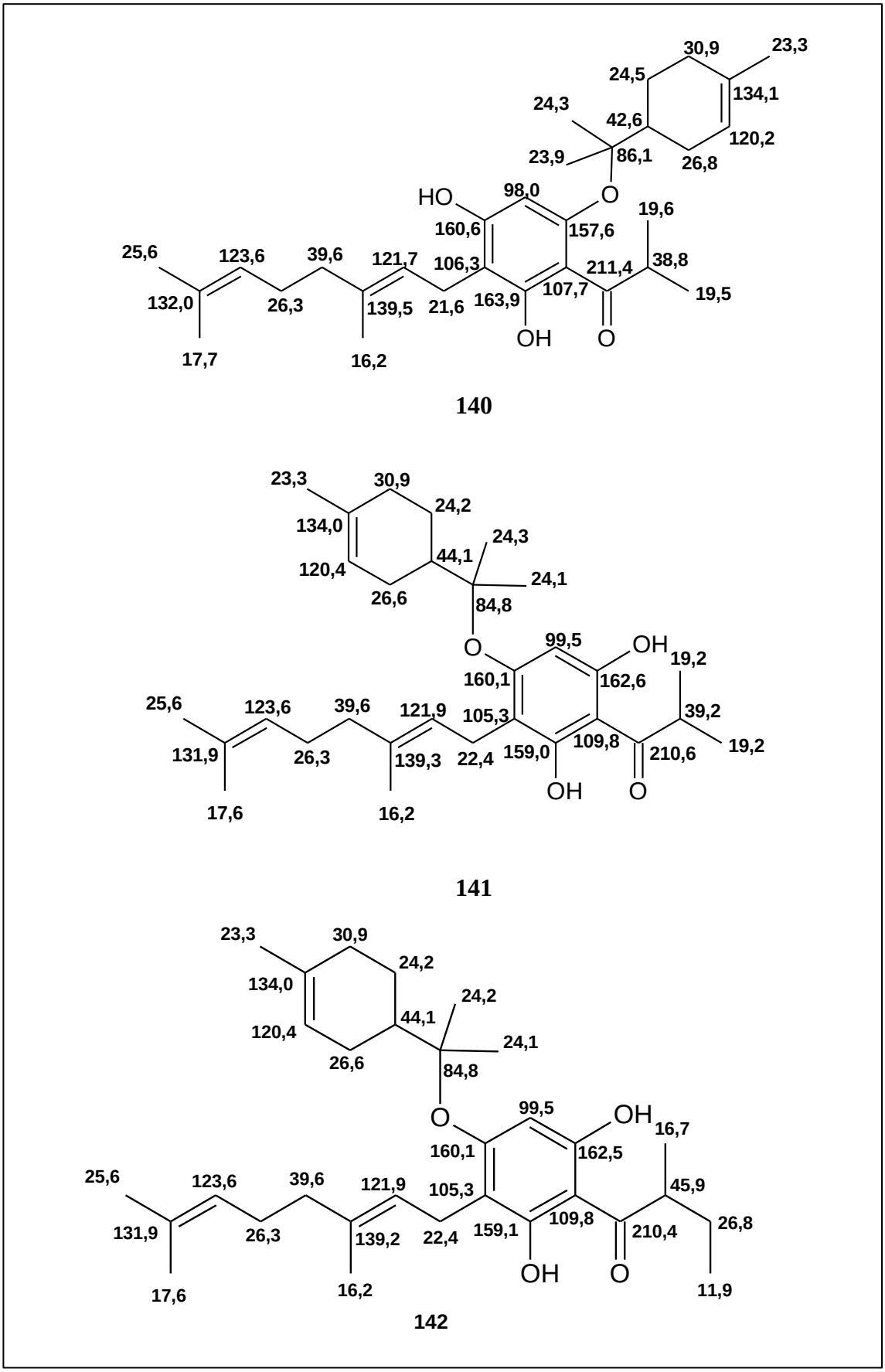


Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)

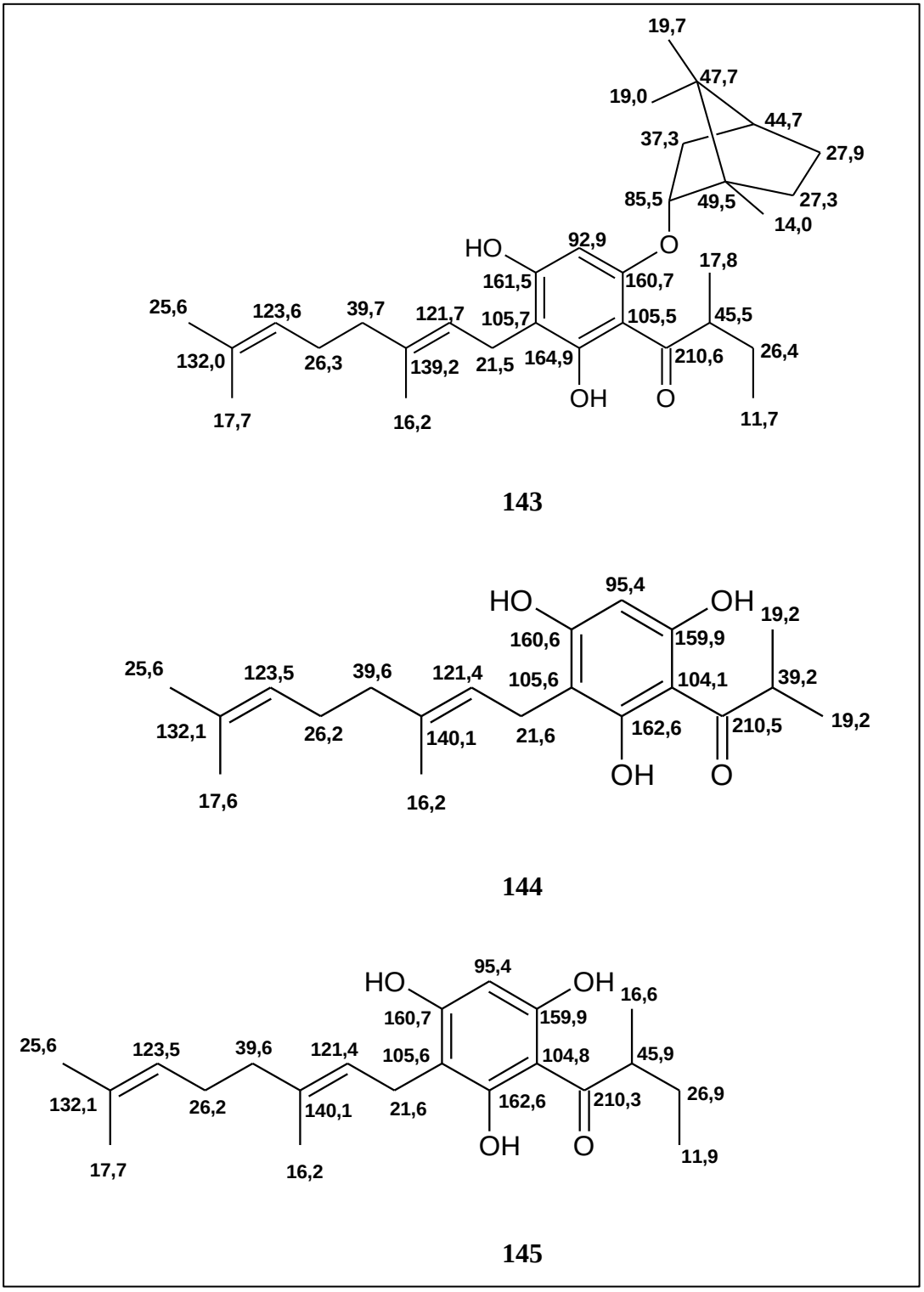
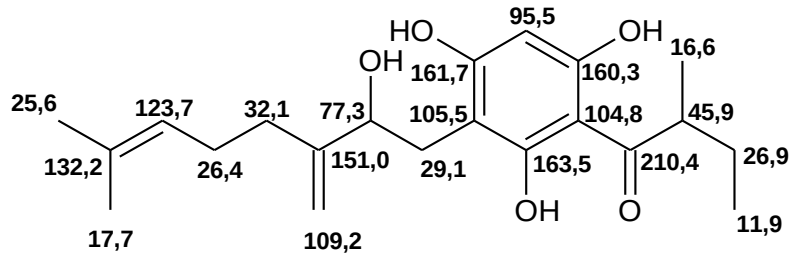
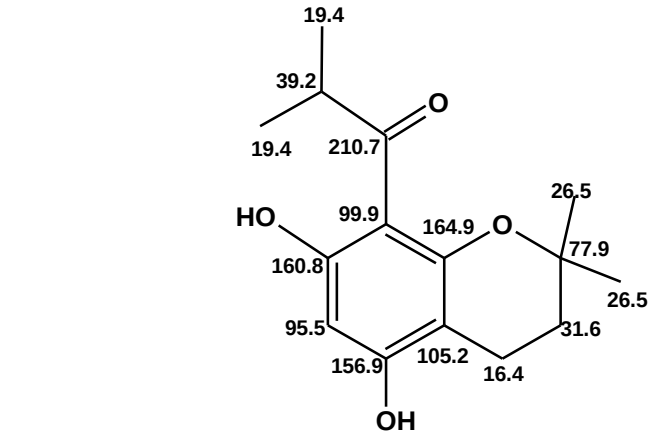


Figura 98- Levantamento bibliográfico- estruturas 125 a 146 de floroglucinóis geranilados (continuação)

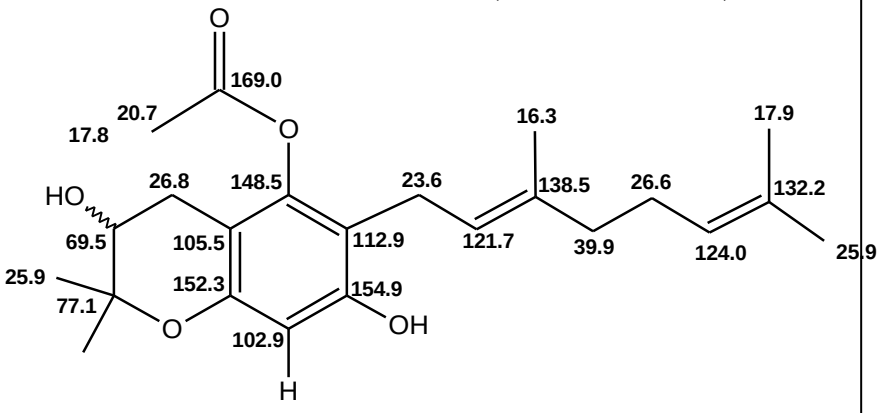


146
Hypericum empetrifolium
139-142, 145 e 147 com atividade anti-angiogênica
139 com atividade anti-migração celular
Schmidt *et al*, 2012 (150 MHz, CDCl3)

Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano

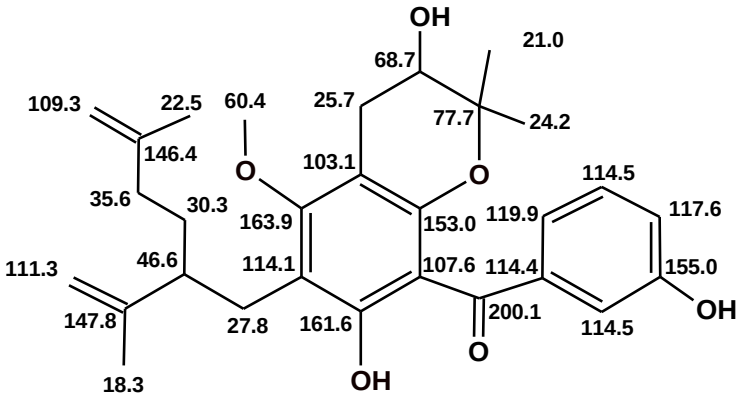


147
Helichrysum platypterum
JAKUPOVIC *et al.*, 1987 ($CDCl_3$, 100 MHz)

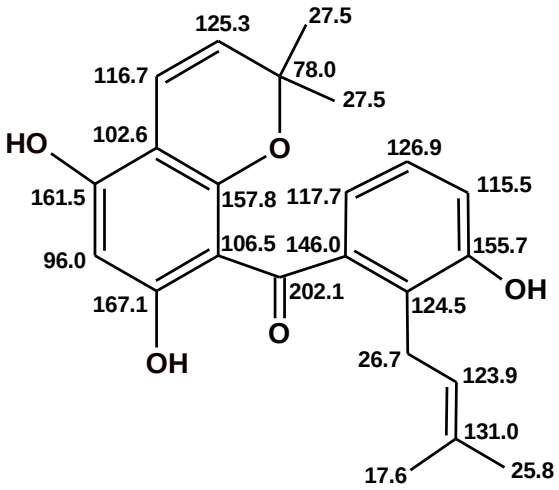


148
Bosistoa pentacoca
Auzi *et al.*, 1997 ($CDCl_3$, 100 MHz)

Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)

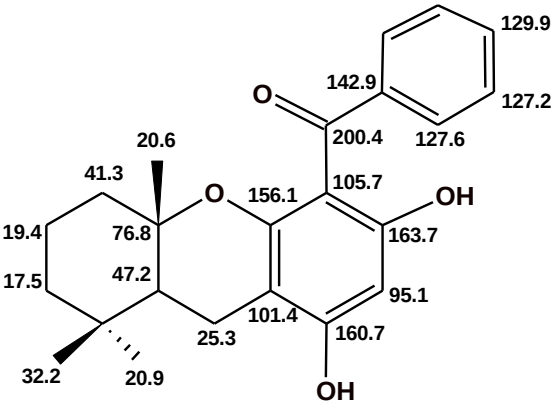


149
Tovomita brevistaminea
SEO *et al.*, 1999 ($CDCl_3$,125 MHz)
Atividade Citotóxica

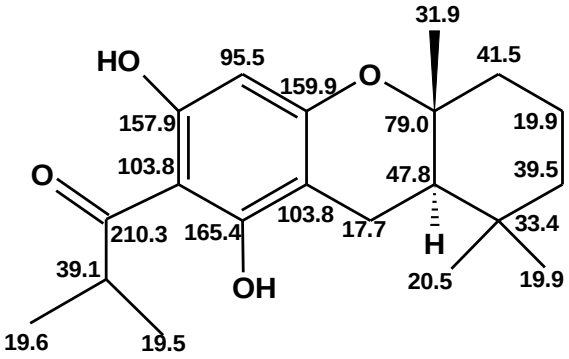


150
Cudrania cochinchinensis
HOU *et al.*, 2001 ($(CD_3)_2CO$, 125 MHz)

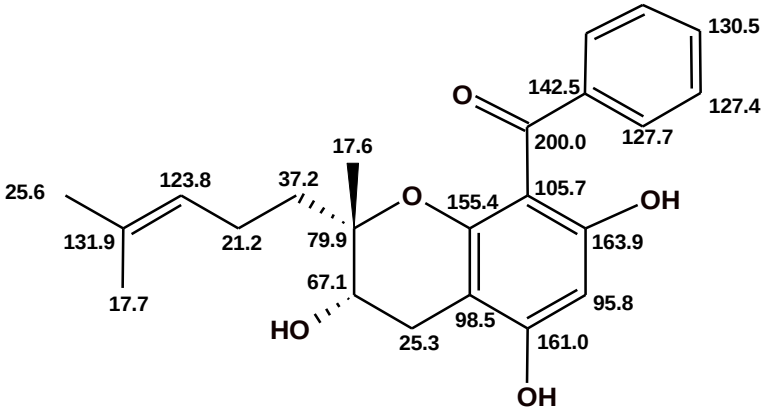
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



151



152



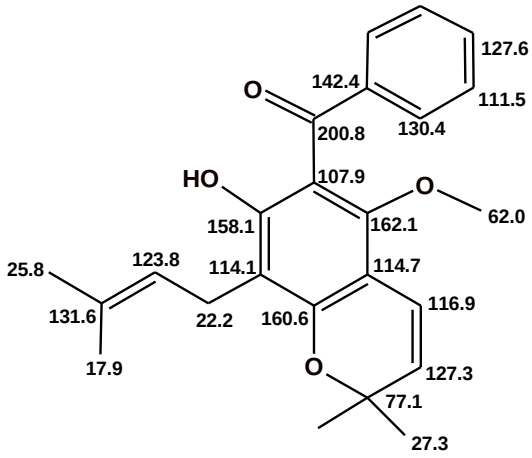
153

Tovomita langifolia

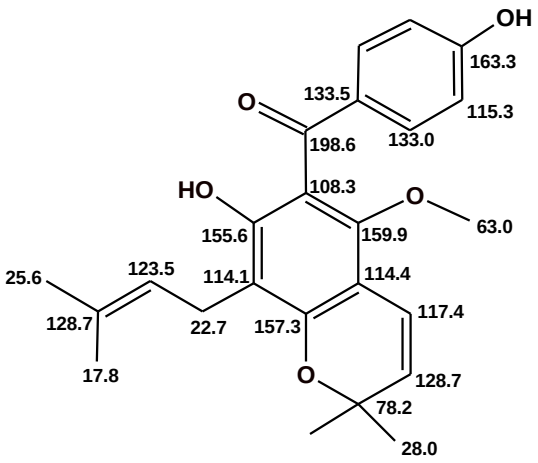
PECCHIO et al., 2006

($CDCl_3$, 75 MHz)

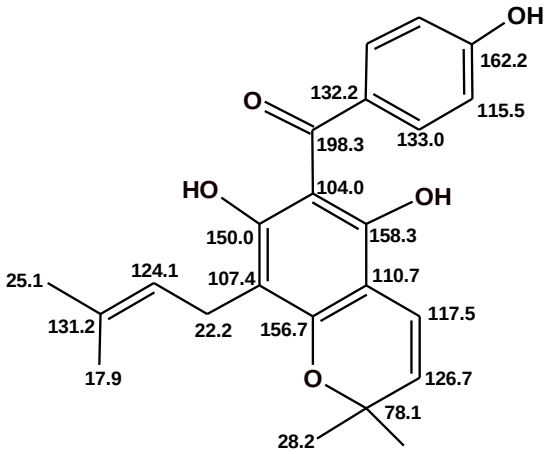
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



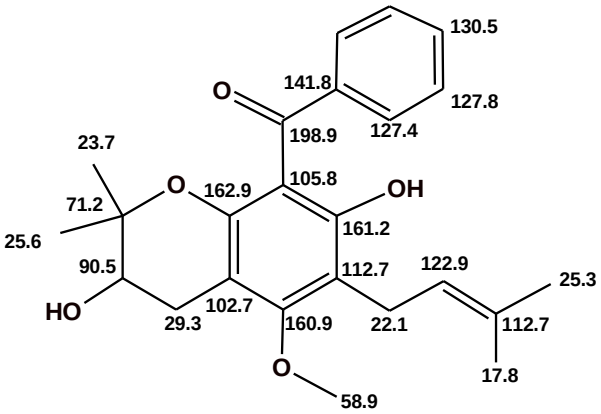
154



155
Garcinia myrtifolia
SPINO *et al.*, 1995 ($CDCl_3$, 90 MHz)

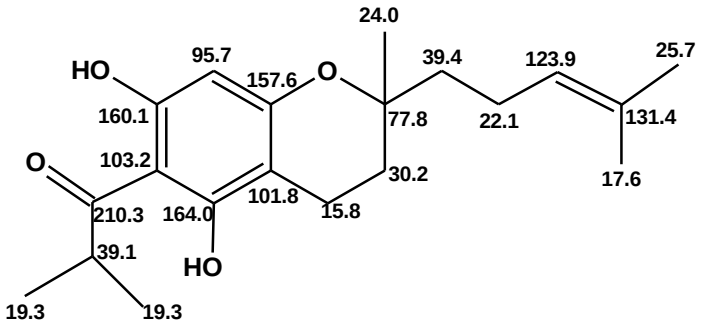


156
Vismia cayennensis
FULLER *et al.*, 1999 (CD_3OD, 125 MHz)



157
Garcinia pseudoguttifera
ALI *et al.*, 2000
(CD_3OD, 125 MHz)

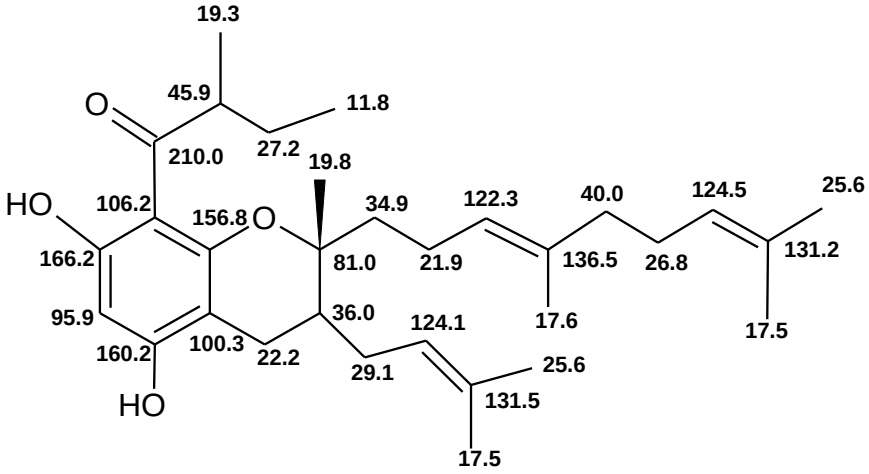
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



158

Hypericum jovis

ATHANASAS *et al.*, 2004 ($CDCl_3$, 125 MHz)



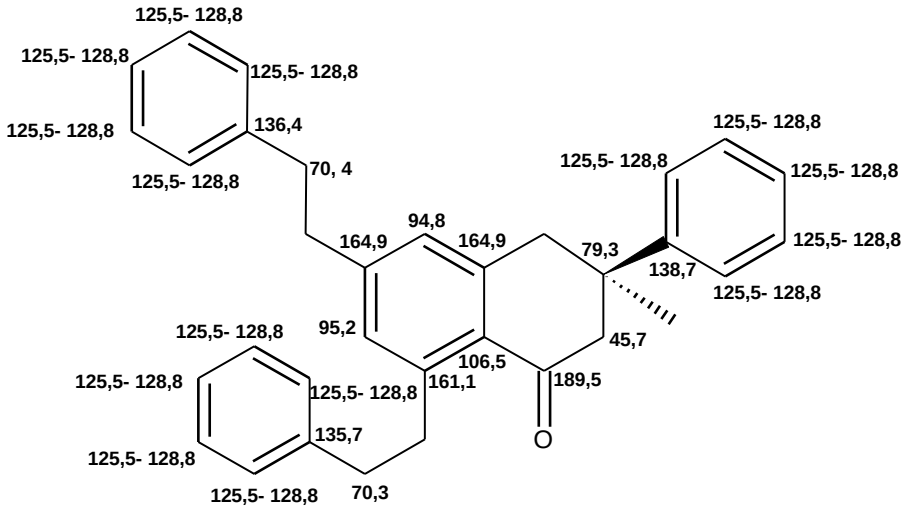
159

Hypericum prolificum

HENRY *et al.*, 2006 (C_6D_6, 100 MHz)

Atividade anticâncer

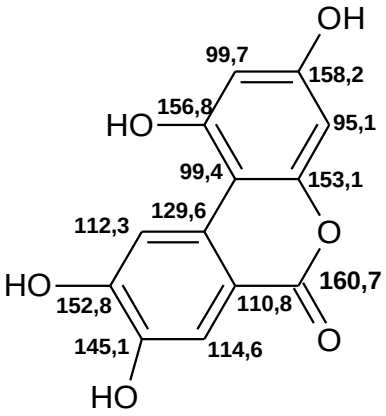
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



160

Helichrysum gymnocomum

Drewes e van Vuuren, 2008 (500 MHz, CDOD)*



161

Eucalyptus exserta F. Muell.

Atividades moluscicida e nematocida

Li e Xu, 2012

Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)

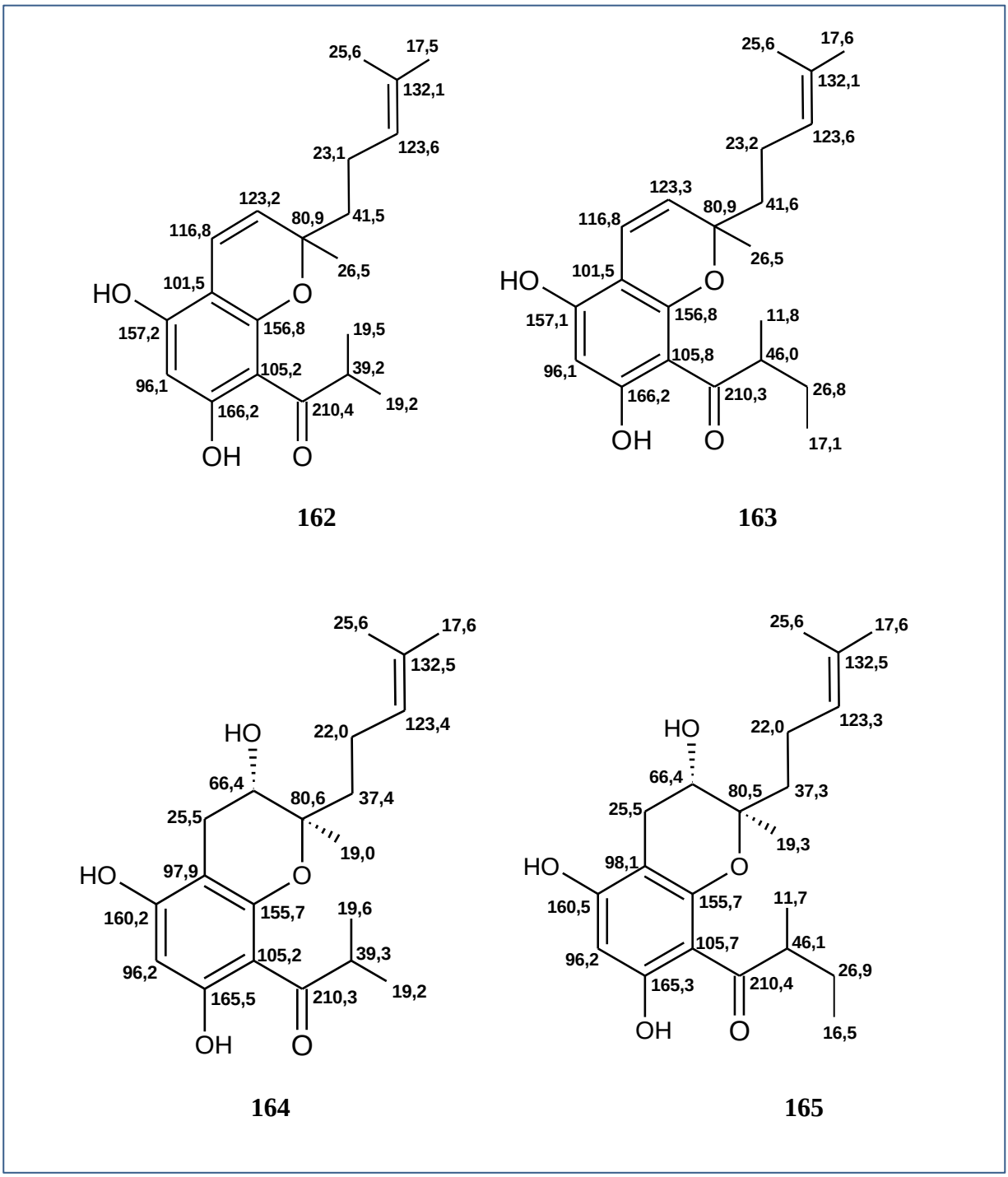
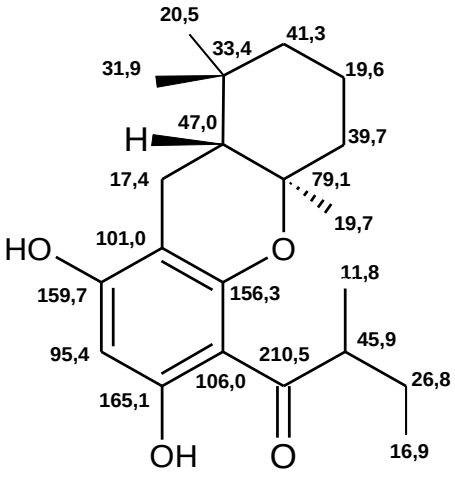
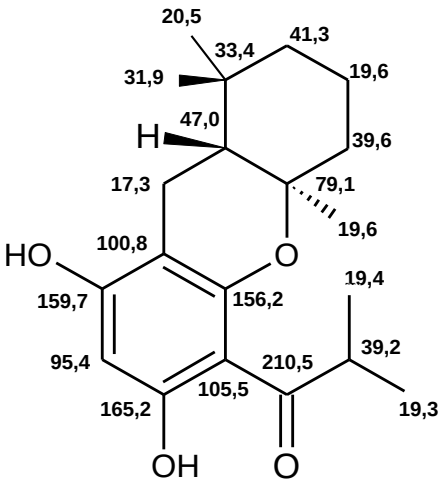


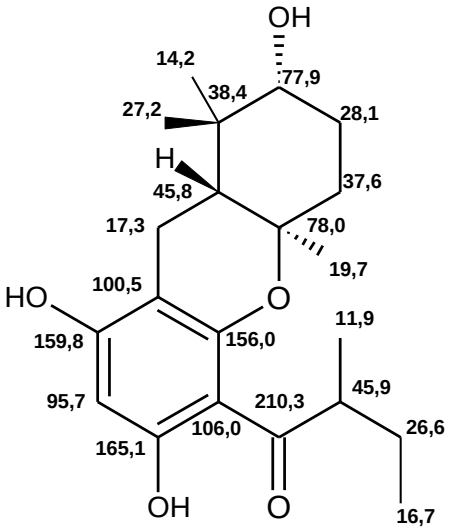
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



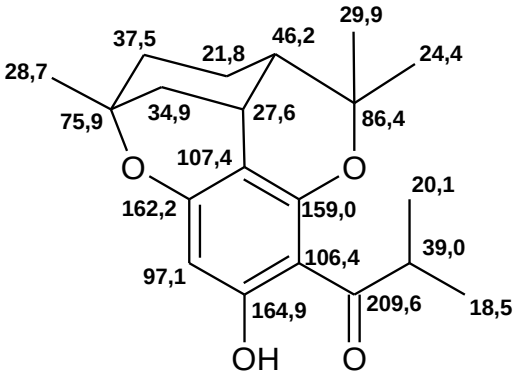
166



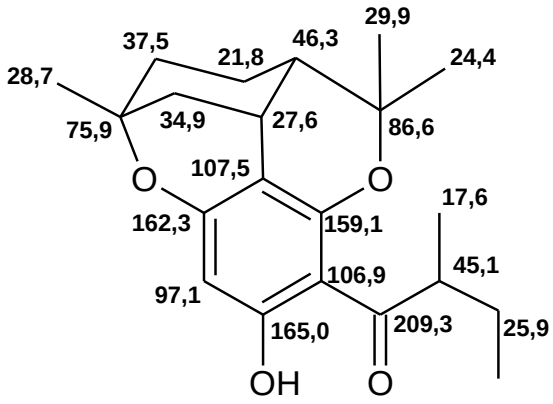
167



168

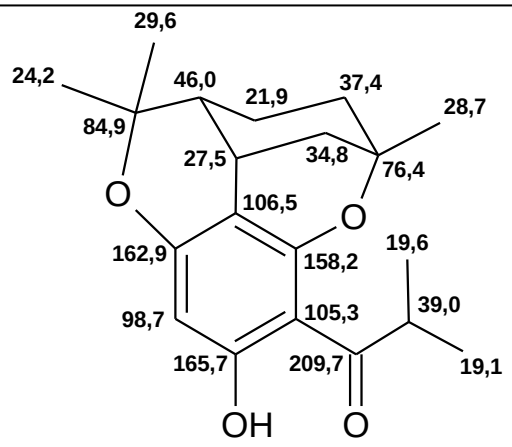


169

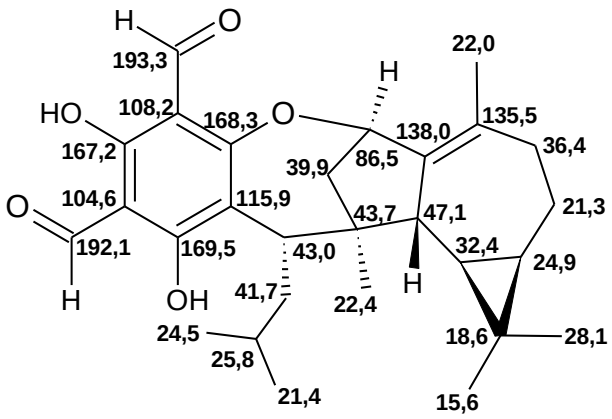


170

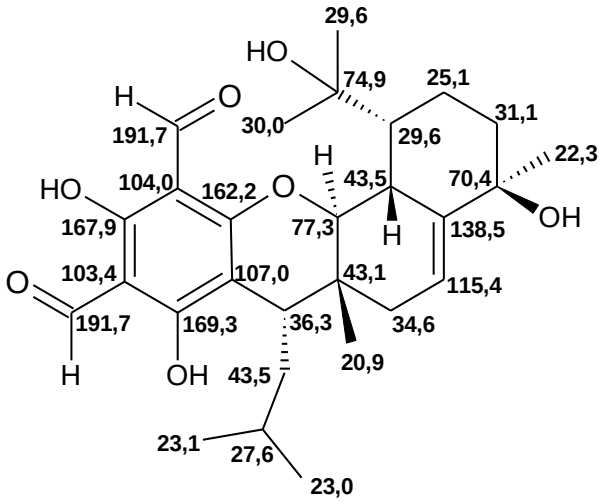
Figura 99- Levantamento bibliográfico- estruturas 147 a 173 de floroglucinóis com anel pirano (continuação)



171
Hypericum empetrifolium
Schmidt et al, 2012 (CDCl3, 150 MHz)



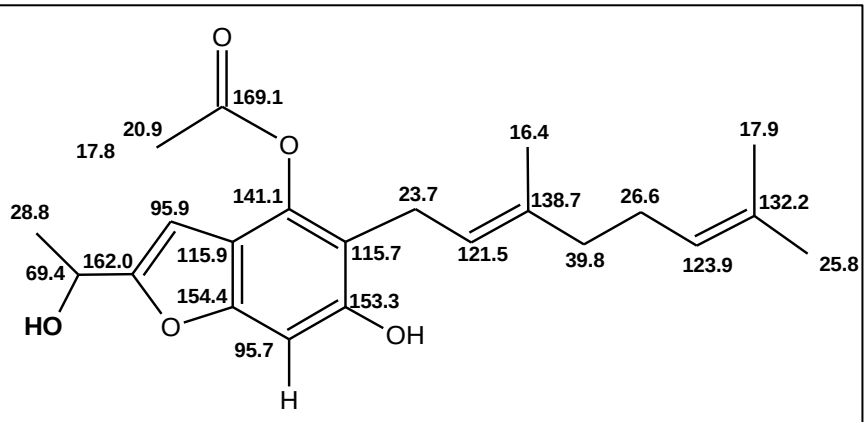
172



173

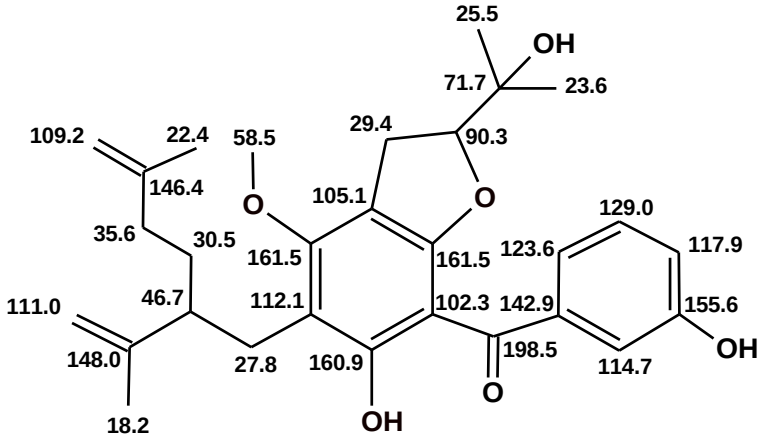
Wang et al, 2012
($CDCl_3$, 125 MHz e 100 MHz)

Figura 100- Levantamento bibliográfico- estruturas 174 a 179 de floroglucinóis com anel furano

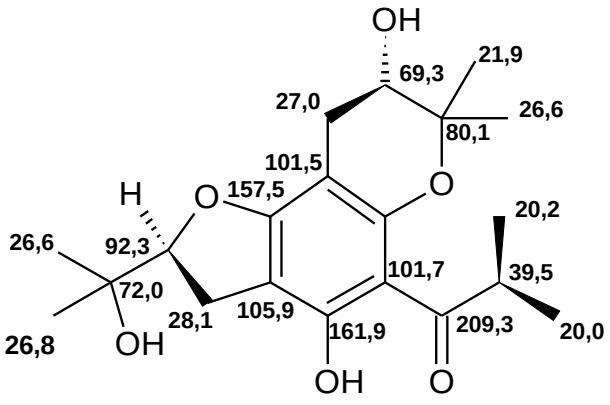


174

Bosistoa pentacoca
Auzi *et al.*, 1997 ($CDCl_3$, 100 MHz)

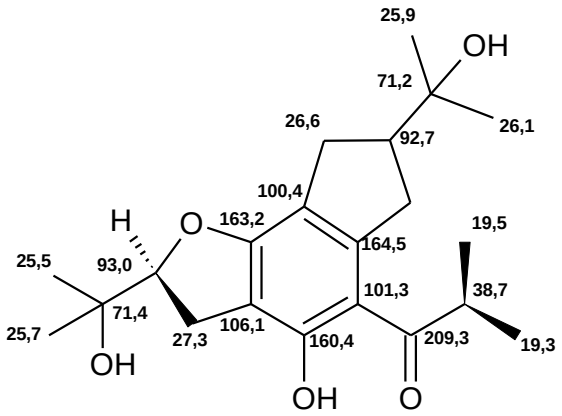


175
Tovomita brevistaminea
SEO *et al.*, 1999 ($CDCl_3$,125 MHz)
Atividade Citotóxica

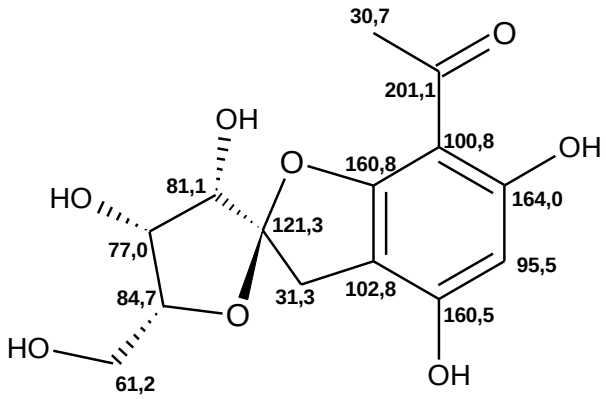


176

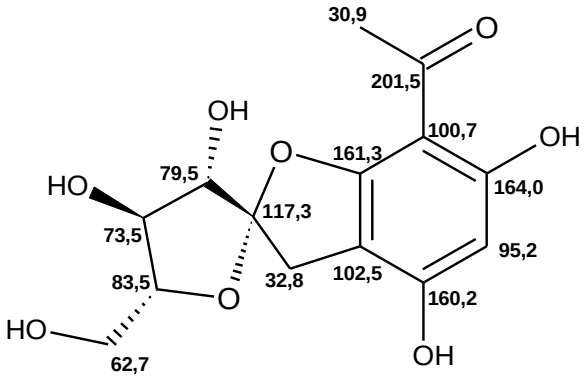
Figura 100- Levantamento bibliográfico- estruturas 174 a 179 de floroglucinóis com anel furano (continuação)



177
Garcinia subelíptica Merr
Lu et al, 2008 (100 MHz, Acetona-d_6)

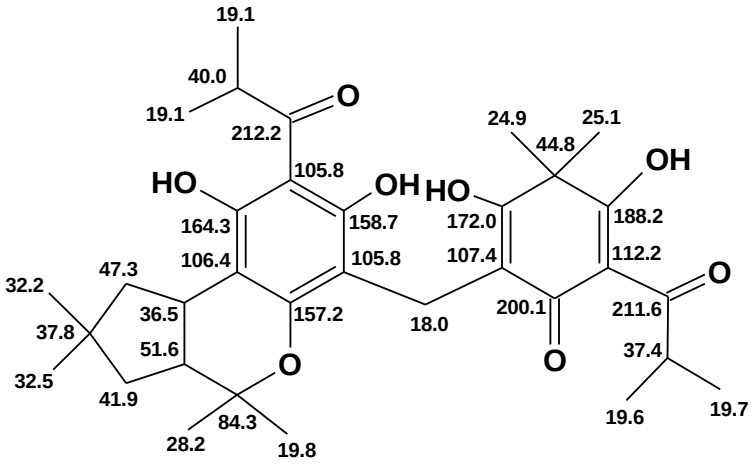


178

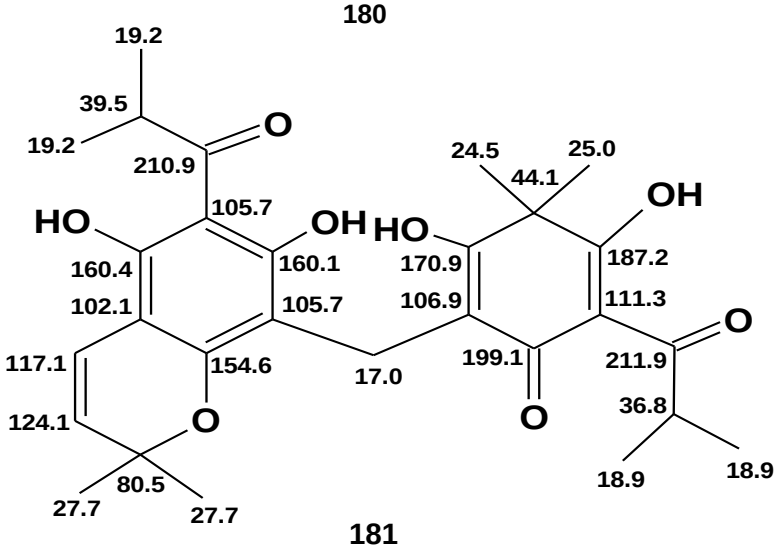


179
Upuna borneensis
ITO et al, 2012 (DMSO-d6, 400 MHz)

Figura 101- Levantamento bibliográfico- estruturas 180 a 186 de floroglucinóis poliméricos

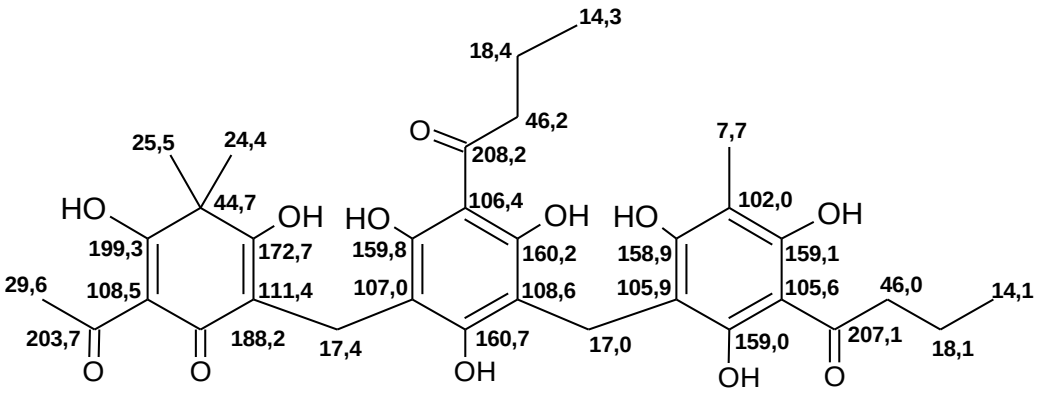


180



181

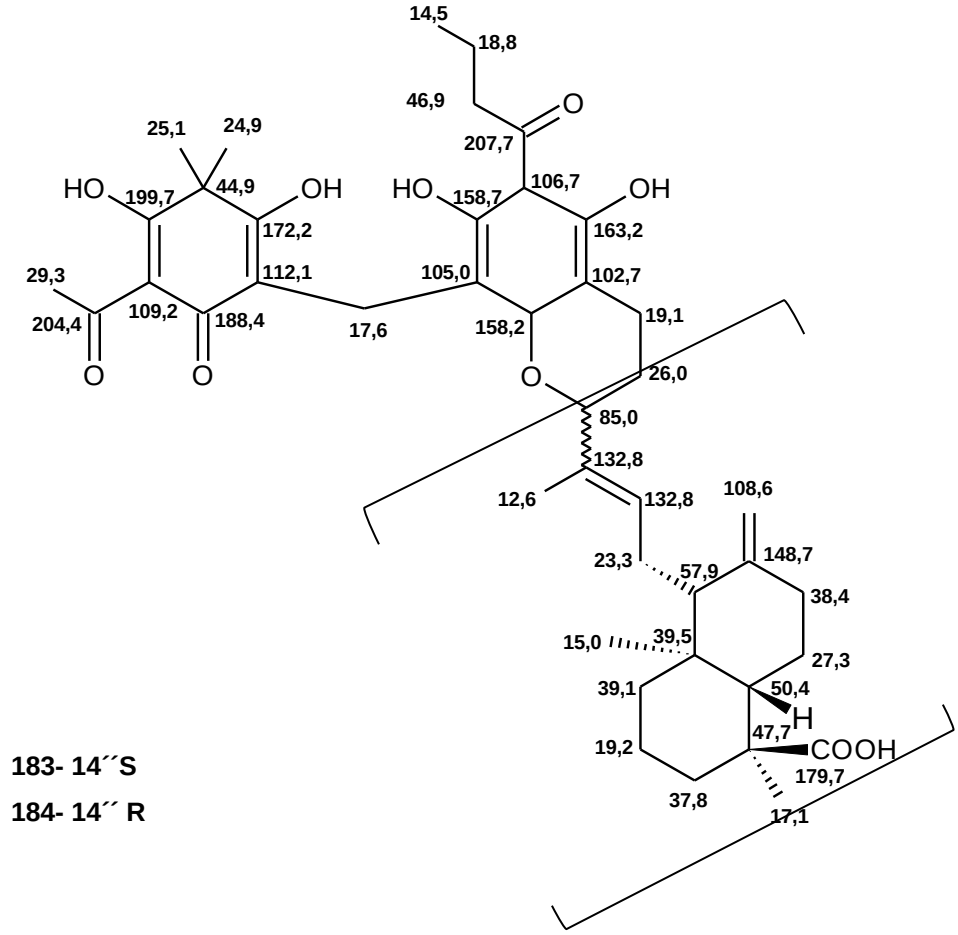
Hypericum brasiliense
ROCHA *et al.*, 1995 (125 MHz, DCl_3)
Atividade antibacteriana



182

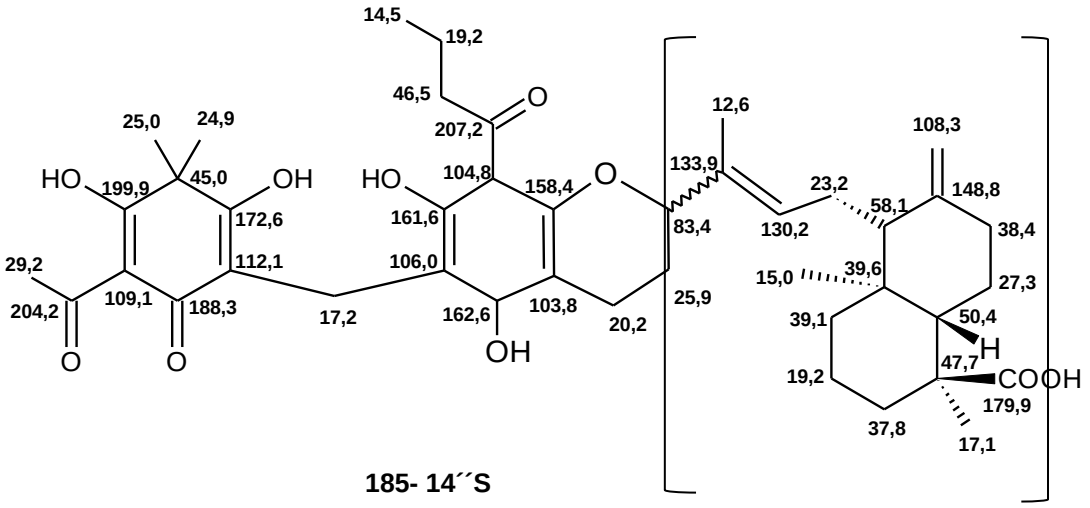
Dryopteris crassirhizoma
GAO et al, 2008 (125 MHz, CDCl3)

Figura 101- Levantamento bibliográfico- Estruturas 180 a 185 de floroglucinóis poliméricos (continuação)



183- 14´´S

184- 14´´ R

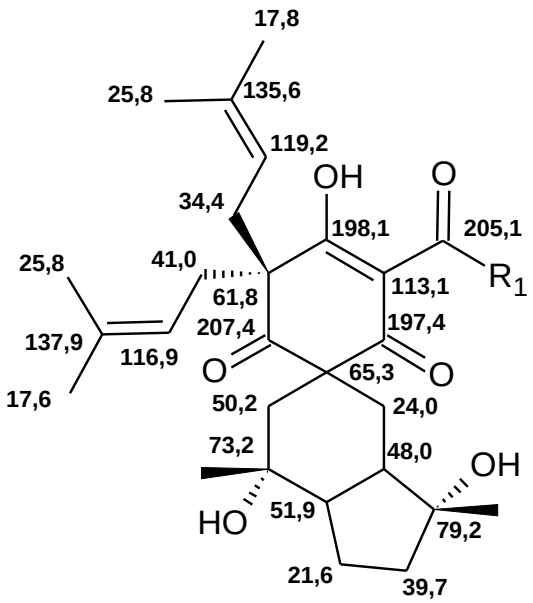


185- 14´´S

186- 14´´R

Dryopteris wallichiana
SOCOLSKY et al, 2012 (Acetona-d_6, 600 MHz)
Atividade nematocida moderada

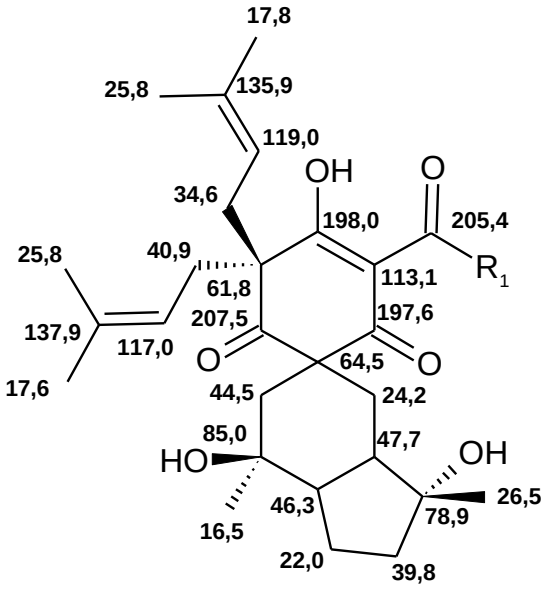
Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados



R1= Isopropil

δ **RMN^{13}C (ppm)= 34,1 (C-28); 17,9 (C-29); 21,0 (C-30)**

187

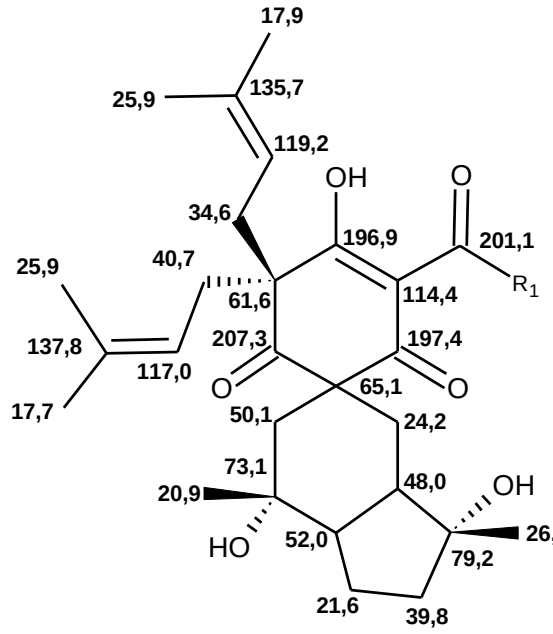


R1= isopropil

δ RMN ^{13} C- 24,3 (C-28), 17,6 (C-29), 21,0 (C-30) ppm

188

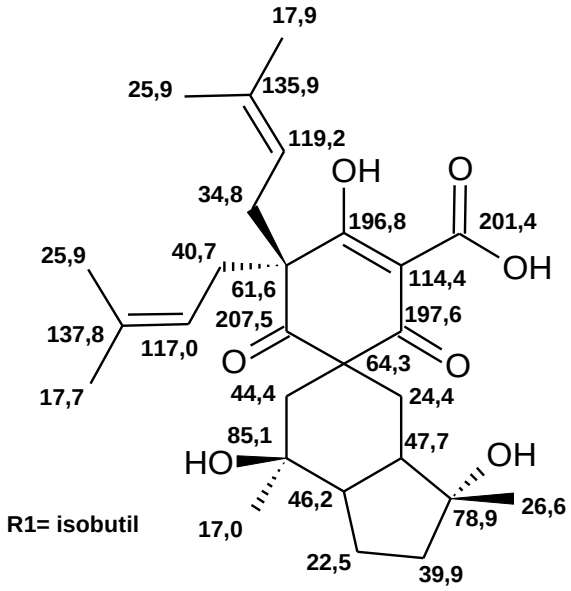
Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



R1= isobutil

δ RMN ^{13} C (ppm)- 46,1 (C-28), 25,5 (C-29), 22,4 (C-30), 22,8 (C-31)

189



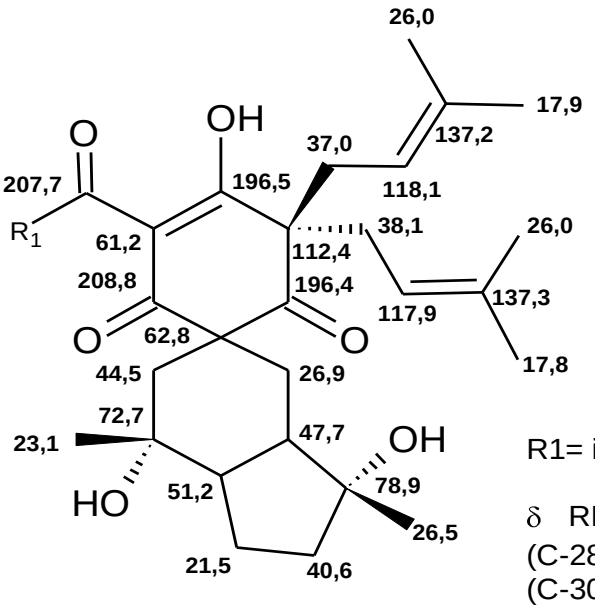
R1= isobutil

R1= isobutil

δ RMN ^{13} C (ppm)- 46,5 (C-28), 25,6 (C-29), 22,1 (C-30), 22,8 (C-31)

190

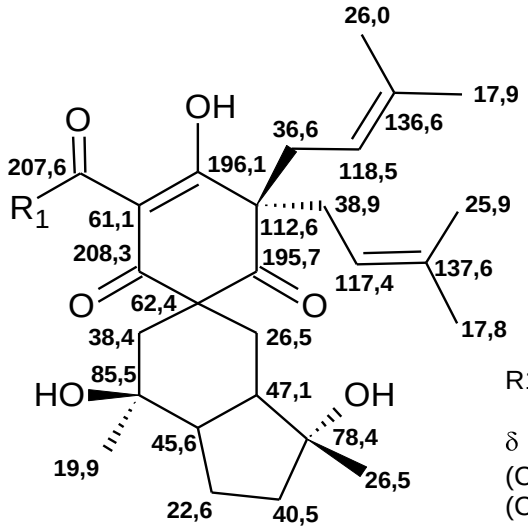
Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



R1= isopropil

δ RMN^{13}C (ppm)= 35,2 (C-28), 19,0 (C-29) e 19,5 (C-30)

191

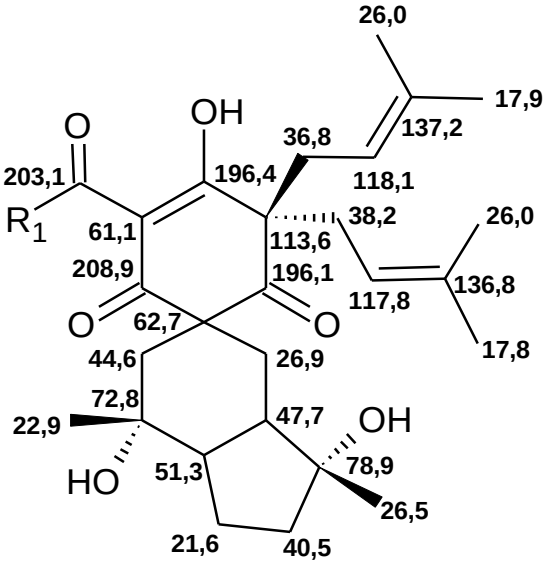


R1= isopropil

δ RMN^{13}C (ppm)= 35,1 (C-28), 18,8 (C-29) e 19,3 (C-30)

192

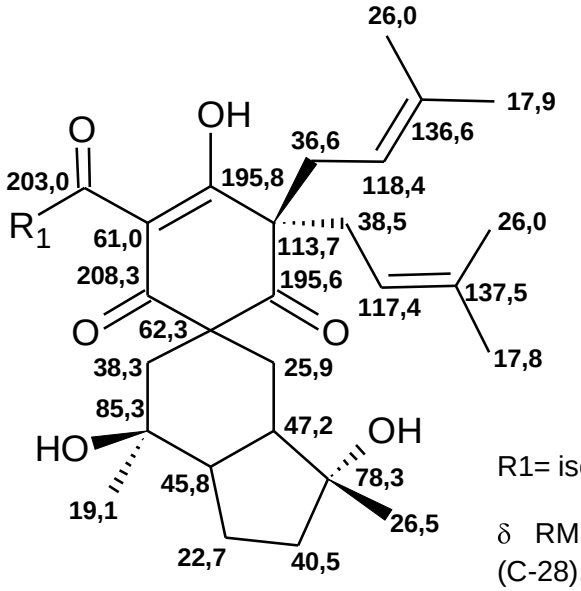
Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



R1= isobutil

δ RMN^{13}C (ppm)= 47,1 (C-28), 26,1 (C-29), 22,6 (C-30) e 22,7 (C-31)

193



R1= isobutil

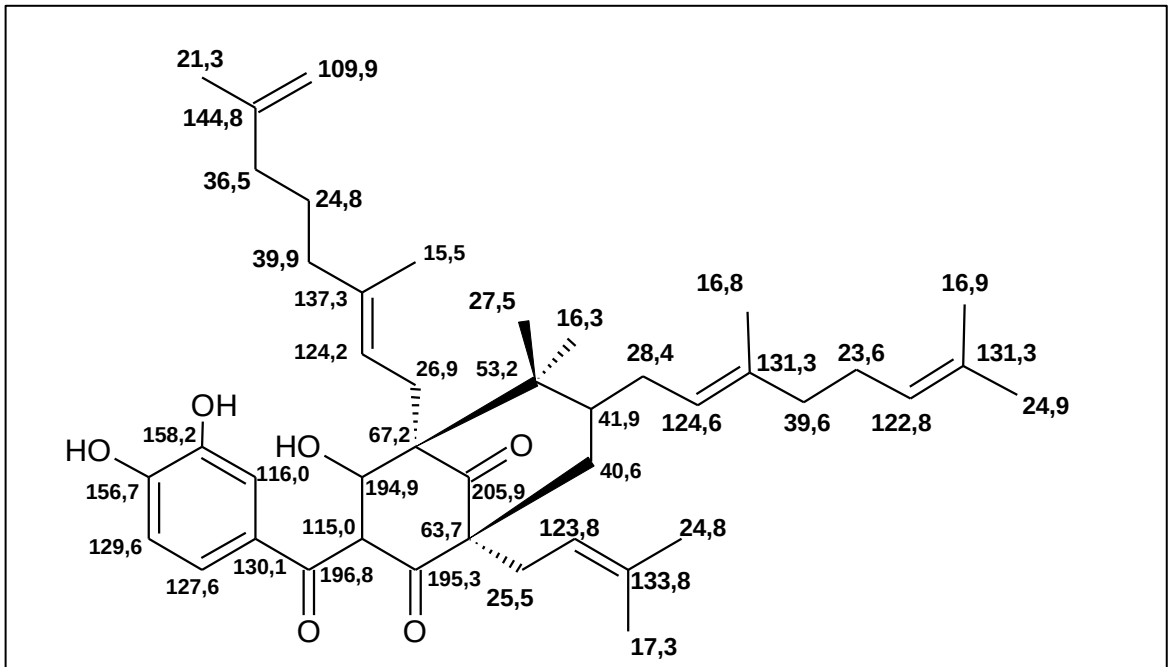
δ RMN^{13}C (ppm)= 46,9 (C-28), 25,6 (C-29), 22,5 (C-30) e 22,6 (C-31)

194

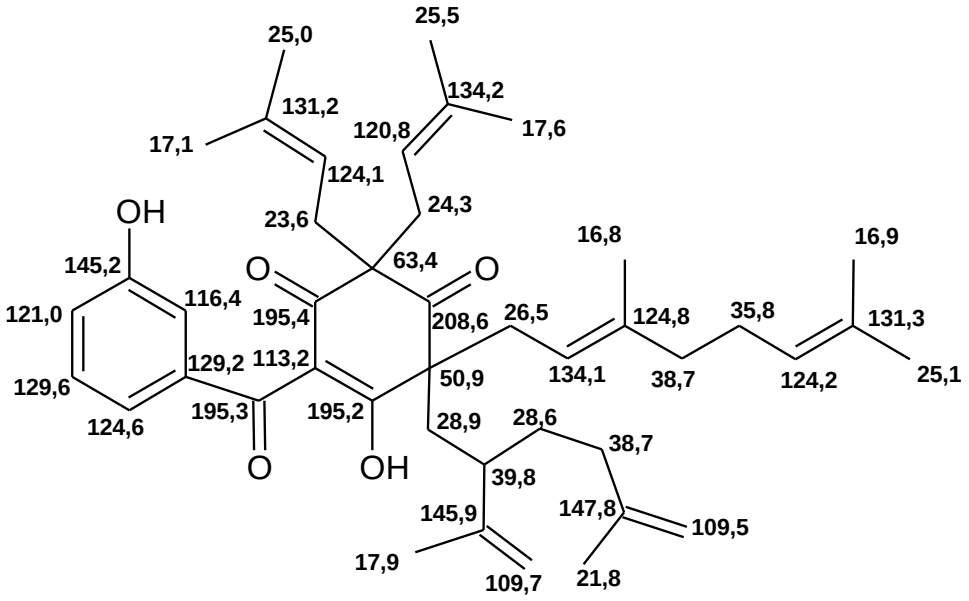
Hypericum ascyron

Tomoenona F (193) com atividade citotóxica contra celulas cancerígenas KB e MDR HASHIDA et al, 2008 (100 MHz, $CDCl_3$)

Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)

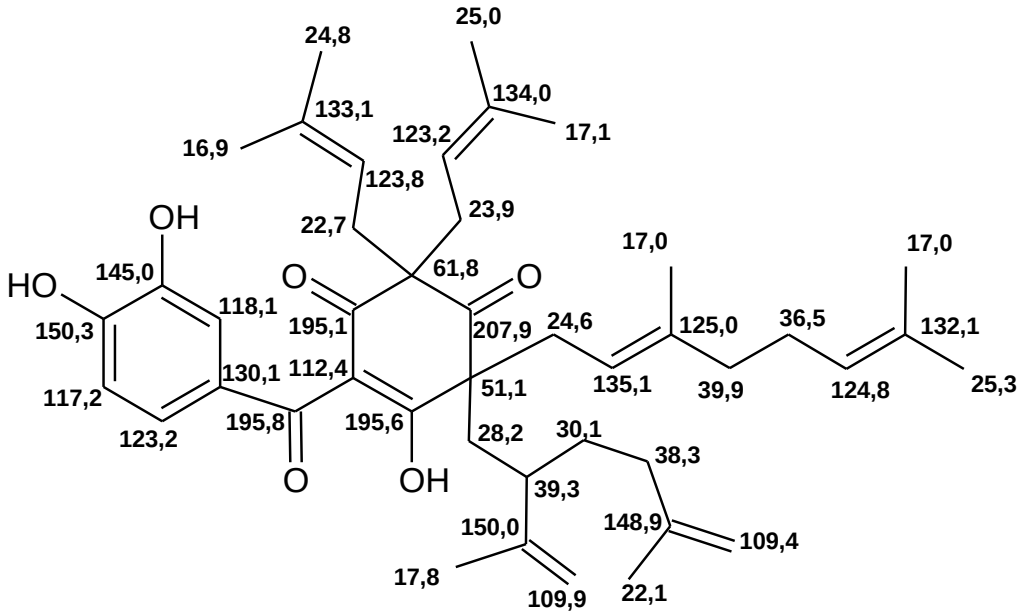


195



196

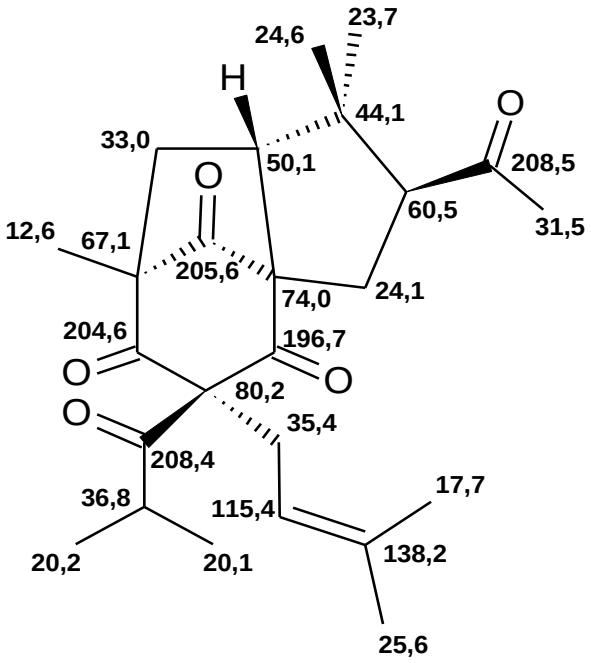
Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



197

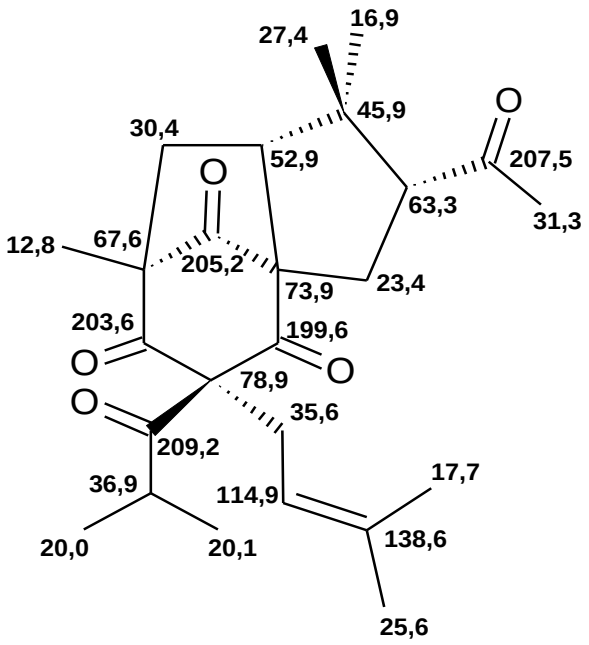
Garcinia semseii

Magadula et al, 2008 (300 MHz)

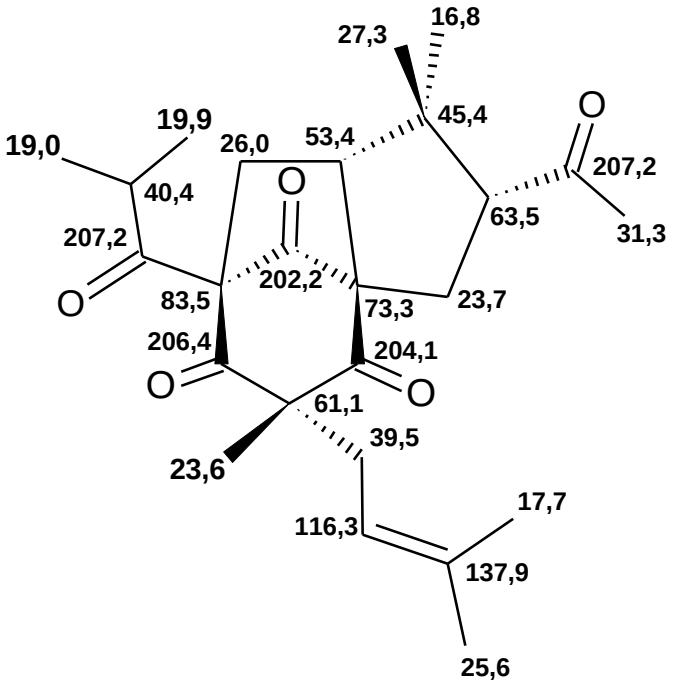


198

Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



199



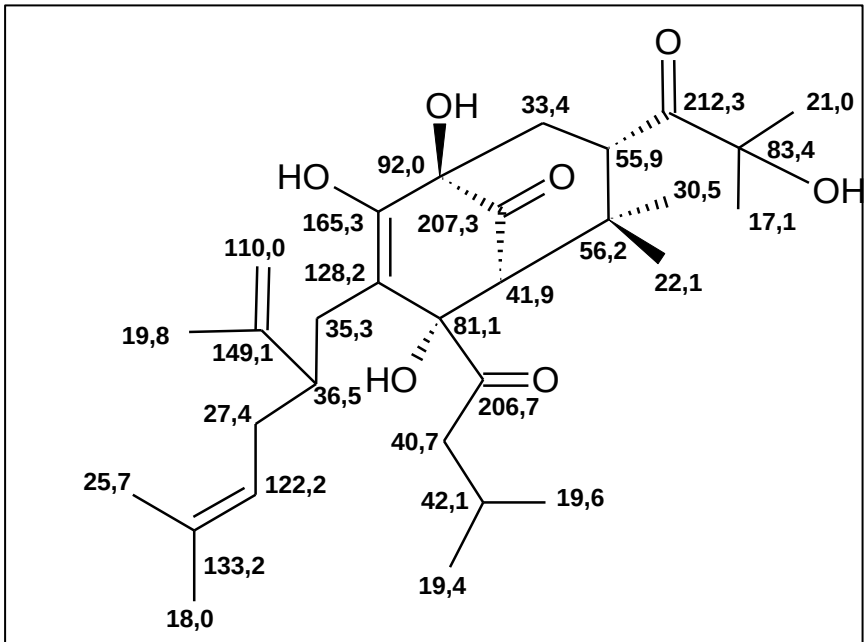
200

Hypericum sikokumontanum

199 e 200- atividade citotóxica contra células cancerígenas MDR

TANAKA et al, 2008 ($CDCl_3$, 150 MHz)

Figura 102- Levantamento bibliográfico- Estruturas 187 a 201 de floroglucinóis oxidados (continuação)



201

Garcinia subelíptica

LIN et al, 2012 (100 MHz, CD_3OD)

6. CONCLUSÕES

Os resultados da reinvestigação fitoquímica das folhas da *Harpalyce brasiliana* Benth foram positivos no que se refere ao isolamento e identificação das substâncias produzidas pela espécie.

O extrato etanólico das folhas forneceu quatro substâncias previamente relatadas e uma substância inédita na literatura, para esta e outras espécies. A agregação de conhecimento ao estudo da espécie pode abrir caminhos para novas pesquisas, tanto com isolamento de substâncias a partir de outras partes da planta, quanto com síntese orgânica, modificações estruturais e estudos teóricos das substâncias isoladas. Os resultados da verificação de atividades biológicas também são aguardados, mas pela literatura sabe-se que os floroglucinóis tem uma ampla gama de atividades, além das outras substâncias já relatadas como ativas biologicamente. O trabalho desenvolvido com a química teórica para uma das substâncias isoladas possibilitou a correlação entre dados teóricos e experimentais e estabelecimento da estrutura. Também realizado em conjunto com uma colega de laboratório um experimento de comparação dos perfis cromatográficos gerados em CLUE de extratos etanólicos realizados em diferentes épocas, para as possibilidades de pesquisa metabolômica da planta e sazonalidade de produção de metabólitos secundários.

O levantamento bibliográfico de floroglucinóis constitui uma ferramenta muito útil para a investigação da espécie em questão e de outras espécies produtoras desta classe de substância, dado que não há na literatura um levantamento com atividades biológicas e dados espectroscópicos exibidos na próprias estruturas. Além disto, o reconhecimento dos padrões de substituição em derivados de floroglucinol é uma excelente ferramenta para identificação mais rápida e precisa de novos compostos do tipo.

As pesquisas anteriores demonstraram que *Harpalyce brasiliana* Benth é uma espécie que produz diversos metabólitos secundários que possuem atividades interessantes para a utilização em futuros medicamentos ou precursores de substâncias bioativas. Devido a este fato, as pesquisas com a espécie devem ser fomentadas para um melhor conhecimento sobre a planta e utilização de suas substâncias. Há poucos relatos de pesquisas com outras partes, como flores e sementes, além da possibilidade do isolamento de outros metabólitos ainda desconhecidos das folhas, lenho do caule e raiz, além de reisolamento de substâncias para realização de mais testes biológicos.

Agradeçemos aos centros da UFRN, UFC e CENAUREMN-UFC pelo apoio com a infraestrutura e aos órgãos financiadores CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-AKELERE, O., Summary of who guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbalgram**, V. 28, 13-19, 1993.

-ARAÚJO, R. M., **Flavonóides e Floroglucinóis de *Harpalyce brasiliana* Benth:** Aspectos Químicos, Biológicos e Espectroscópicos. Tese de doutorado (Química orgânica), UFC, Fortaleza, CE, 2008.

-ARAÚJO R. M., PINHEIRO S. M., LIMA M. A., SILVEIRA E. R.. Complete NMR data assignments for novel pterocarpans from *Harpalyce brasiliana.* **Magnetic Ressonance in Chemistry**, V. 46 (9), 2008.

-ARAÚJO, R. M., LIMA, M. A. S., SILVEIRA, E. R., Pterocarpans and a novel flavanone from *Harpalyce brasiliana* roots. **Journal of Brazilian Chemical Society**, V. 20,(5), 935-938, 2009.

-ARAÚJO, W. L**., Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo, 1996.

-AZCON-BIETO, J.; TALON, M., **Fisiologia e Bioquímica Ambiental**, Madri, Interamericana, Mc-Graw-Hill, 1996

-BARREIRO, J. E. ; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, V. 32, (3), 679-688, 2009.

-BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, V. 39, 1863, 2001.

-BOUBAKIR, Z.; BEUERLE, T.; BENYE,L. BEERHUES, L., The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. **Phytochemistry,** V. 66, 51-57, 2005.

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

-BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, V. 67, 2141- 2153, 2004.

-CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Quimica,** V. 5, (3), 421-437, 2013. Data de publicação na Web: 11 de novembro de 2012.

-COSTA, P. R. R., Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, V. 1, (1), 58-66, 2009.

-COSTA, T. R., **Avaliação de atividade antiofídica do extrato vegetal de Anacardium humile: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. Dissertação de mestrado. USP, Ribeirão Preto, SP, 2010.

-CRAGG, G. M.; NEWMAN D. J.; SNADER, K. M., Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, V. 60, 52-60, 1997.

-CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M., Natural products as source of new drugs over the period of 1981 - 2002. **Journal of Natural Products**, V. 66, 1022–1037, 2003.

-DEWIK, P. M.; **Medicinal Natural Products: A byosinthetic approach**. 2a ed., ed.John Wiley and Sons; ISBN 0 471 49641 3 (pbk.), 2001.

-DEY A.; DE J. N., Phytopharmacology of Antiophidian Botanicals: a review. **International Journal of Pharmacology**, V.8,(2), 2012.

-DREWES, S. E.; VAN VUUREN, S. F. . Antimicrobial acylphloroglucinols and dibenzyloxy flavonoids from flowers of *Helichrysum gymnocomum*. **Phytochemistry**, V. 69, 1745–1749, 2008.

-FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; DE MORAES, V. L. G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**, V 30, 1211-18, 1992.

-M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, G. SCALMANI, V. BARONE, B. MENNUCCI, G. A. PETERSSON, H. NAKATSUJI, M. CARICATO, X. LI, H. P. HRATCHIAN, A. F.IZMAYLOV, J. BLOINO, G. ZHENG, J. L. SONNENBERG, M. HADA, M. EHARA, K. TOYOTA, R. FUKUDA, J. HASEGAWA, M. ISHIDA, T. NAKAJIMA, Y HONDA, O. KITAO, H. NAKAI, T. VREVEN, J. A. MONTGOMERY, JR., J. E. PERALTA, F. OGLIARO, M. BEARPARK, J. J. HEYD, E. BROTHERS, K. N. KUDIN, V. N. STAROVEROV, R. KOBAYASHI, J. NORMAND, K. RAGHAVACHARI, A. RENDELL, J. C. BURANT, S. S. IYENGAR, J. TOMASI, M. COSSI, N. REGA, J. M. MILLAM, M. KLENE, J. E. KNOX, J. B. CROSS, V. BAKKEN, C. ADAMO, J. JARAMILLO, R. GOMPERTS, R. E. STRATMANN, O. YAZYEV, A. J. AUSTIN, R. CAMMI, C. POMELLI, J. W. OCHTERSKI, R. L. MARTIN, K. MOROKUMA, V. G. ZAKRZEWSKI, G. A. VOTH, P. SALVADOR, J. J.

DANNENBERG, S. DAPPRICH, A. D. DANIELS, O. FARKAS, J. B. FORESMAN, J. V. ORTIZ, J. CIOSLOWSKI, AND D. J. FOX, **Gaussian 09, Revision A.01**, Gaussian, Inc., Wallingford Ct, 2009.

-GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência nos conteúdos de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, V. 30, (2), 374-381, 2007.

-GOUVEA, D. R., **Estudo da variação dos metabólitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicipholia* Mart, Vernoieae, Asteraceae).** Dissertação de mestrado- USP-Ribeirão Preto, SP, 2007.

-GREINWALD, R.; REYES-CHILPA, R.; ROSS, J. H.; WITTE, L; CZYGAN F.C., A survey of alkalois in the genera *Harpalyce* and *Brongniartia* (Fabaceae- Bronagniarteae). **Biochemical Systematics and Ecology**, V. 24, 749-755, 1996.

-GUPTA, Y. K.; PESHIN, S. S, Do herbal medicine have potential for managing snake bite envenomation?.**Toxicology International**, V. 19, (2): 89-99, 2012.

- ISNANSETYO, A.; CUI L.; HIRAMATSU, K.; KAMEI, I.; **International Journal of Antimicrobial Agents**, V. 22, 545, 2003.

- ITO, T.; ITO, H.; OYAMA, M.; TANAKA, T.; MURATA, J.; DARNAEDI, D.; IINUMA, M., Novel isolation of acetophenone derivatives with spiroketal-hexosefuranoside in *Upuna borneensis*. **Phytochemistry letters,** V. 5, 325-328, 2012.

-JAYASURIA, H.; MCCHESNEY, J. D.; SWANSON, S. M.;PEZZUTO, J. M., Antimicrobial and cytotoxic activity of rotterin-type compounds from *Hypericum drummondii*., **Journal of Natural Products**., V. 52, (2), 325-331, 1989.

- JAYASURIA, H.; CLARK, A. M.; MCCHESNEY, J. D., New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*, **Journal of Natural Products**., V. 54 (5), 1314-1320, 1991.

-JIMENEZ-GONZALEZ L.; HERNANDEZ-CERVANTES C.; ALVAREZ-CORRAL M.; MUÑOZ-DORADO M.; RODRIGUEZ-GARCIA I., Synthesis of pterocarpans. **Natural Products Com.**, V. 6, (4): 537-54, 2011.

-KINGHORN, A.D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, V. 53, 135-148, 2001.

-LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M.; Toxicology: then and now. **Clinical Biochemistry**, V. 39, 498-510, 2006.

-LAWS, B., **50 plantas que mudaram o rumo da história**, trad. Ivo Koritowsky, GMT editores Ltda., 2013.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., **Plantas medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo, Instituto Plantarum, 2002.

-LOURENÇO, A. H.; SAMPAIO, M. V.; FRANCA, S. V.; PEREIRA, S. C.; SOARES, P. S., Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 98, 213-6, 2005.

- LU, Y.-H. et al., DNA strand-scission by phloroglucinols and lignans from heartwood of *Garcinia subelliptica* Merr. and *Justicia* plants. **Phytochemistry**, V. 69, 225-233, 2008.

-MACHADO, M. I. L.; COSTA, O.; MATOS, F. J. A.; BRAZ FILHO, R.. Proceedings 18th Annual Meeting of Brazilian Chemical Society, Caxambu, MG, Brazil, ON-204, 1995.

-MAHADESWARASWAMY Y. H.; DEVARAIA S.; KUMAR M. S.; GOUTHAN Y. N.; KEMPARAJU K., Inhibition of local effects of Indian Daboia/*Vipera russelli* venom by the methanolic extract of grape (Vitis vinifera L.*)* seeds. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, V. 46 (2), 154-160, 2009.

-MAMMINO, L.; KABANDA, M. M., Model structures for the study of caylated phlorolgucinols and computational study of caespitate molecule, **Journal of Molecular Structure:theochem**, V. 80, 39-52, 2007.

-MARONI B. C.; STASI L. C. DI; MACHADO, S. R., **Plantas Medicinais do Cerrado de Botucatu: Um Guia Ilustrado**. Ed. UNESP, 2006.

-MATOS, F. J. DE A. (ORG.); SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO M. I L.; CRAVEIRO, A. A., **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza, Ed. UFC, 2ª ed, 2004.

- MATOS, F. J. DE A. (ORG.); LORENZI, H.; DOS SANTOS, M. E. O.; SILVA, M. G. DE V.; SOUZA, M. P., **Plantas tóxicas- estudo de fitotoxicologia Química de Plnatas Brasileiras.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2011.

-MILITÃO, G. C. G.; PINHEIRO, S. M.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; MORAES,. M. O; COSTA-LOTUFO, L. V.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; Bioassay guided fractionation of pterocarpans from roots of *Harpalyce brasiliana* Benth **Bioorganic& Medical Chemistry**, V. 15, p.6687, 2007.

-MONTEIRO, H. S. A, Toxicidade aguda oral de *Bredemeyera floribunda* Willd. e *Harpalyce brasiliana* Benth. em camundongos. SBFTE-UFC–Fortaleza, CE, 2007.

-MOURA V. M. DE; MOURÃO R. H. V.; Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, V. 1, (3), 2012.

-NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, K.; DARKO, L. L.; VICK, J. A., Structures of cabenegrins A-I and A-II. **Tetrahedron Letters**, V.23, p.3855, 1982.

- NAKANISHI, K; BARTON, D. H. R., METH-COHN O. A brief history of natural products chemistry. **Comp. Nat. Prod. Chem.**, Prefácio, V. 1-8, 21-38, Elsevier, 1999.

-NISHIJIMA C. M.; RODRIGUES C. M.; SILVA M. A.; LOPES-FERREIRA M.; VILEGAS W.; HIRUMA-LIMA C. A., Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, V. 14, (3), 1072-80, 2009.

- NOR, C. **Análise química e taxonômica de espécies de Hypericum e avaliação da atividade antiangiogênica**. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

-OKADA, Y.; ISHIMARO, A., SUZUKI, R.; OKUYAMA, T., A new phloroglucinol derivative from the brown algae *Eisenia byciclis*: Potential for the effective treatment of diabetic complications, *Journal of Natural Products, V.* 67, (1), 103–105, 2004.

- PENTTILA A.; SUNDMAN, J.; **Journal of Pharmacology**, V. 22, 393, 1970.

-PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O., Endophytic fungi of Stylosanthes: a first report. **Mycologia**, V. 85: 362-364, 1993.

-PEREIRA B. M. R.; DAROS M. R.; PARENTE J. P.; MATOS F. J. A.; Bredemeyeroside D, a novel triterpenoid saponin from Bredemeyera floribunda: a potent snake venom antidote activity on mice. **Phytotherapy Research**, V. 10, 666-669, 1996.

-PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. S.. **Microbial Ecology of Leaves**. New York. Springer Verlag. p.179-197, 1991.

-PHILIPE, G.; ANGENOT, L.; Recent developments in the field of arrow and dart poison. **Journal of Ethnofarmacology**, V. 100, 85-91 , 2005.

-PINTO, A. C., **Química Nova**, 18, 608, 1995.

-PINTO, A. C.; Silva, D. H. S.; BOLZANI, V DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A., Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, V. 25, supl. 1, 45-61, 2002.

-REYES-CHILPA R.; GOMEZ-GARIBAY F.; QUIJANO L.; MAGOS-GUERRERO G. A.; RIOS T., Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol, a pterocarpan from

Brongniartia podalyrioides (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, V.42, (3), 199-203, 1994.

-RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B.. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 31(12), 905-909, 1996.

- RUKACHAISIRIKUL, V.; NAKLUE, W., PHONGPAICHIT, S., HUTADILOK, N. T., MANEENOON, K., Phloroglucinols, depsidones and xanthones from the twigs of *Garcinia parvifolia,* **Tetrahedron,** V. 62, 8578-8585, 2006.

-RUPPELT, B.M.; PEREIRA E. F.; GONÇALVES L. C.; PEREIRA N. A.; Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom- Analgesic and anti-inflammatory activities, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86, Supll.2: 203-5, 1992.

-SCHMIDT, S.; JURGENLIEMK, G.; SKALTSA, H.; HEILMANN, J. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. **Phytochemistry**, V. 77, 218–225, 2012.

-SHIBATA, T.; KAWAGUCHI, S.; HAMA, Y.; YAMAGUCHI, K.; NAKAMURA, T., Local and chemical distribution of phlorotanins in brown algae. **Journal of Applied Phycology**, 16 (4), 291-296, 2004.

-SILVA, G. L. DA; MATOS, F. J. DE A.; SILVEIRA, E. R.; 4´- Dehydroxycabenegrina from roots of *Harpalyce brasiliana*. **Phythochemistry,** V. 46, (6), 1059-1062, 1997.

- SILVA, G. L. DA; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. DE A.; BRAZ-FILHO, R. A new isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliana*; **Journal of Brazilian Chemical Society**, V. 10, (6), 438-442, 1999.

-SILVA A. J. DA; COELHO A. L.; SIMAS A. B.; MORAES R. A.; PINHEIRO D. A.; FERNANDES F. F. ARRUDA E. Z.; COSTA P. R.; MELO P. A., Synthesys and pharmacologycal evaluation of prenylated and benzylated pterocarpans against snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, V. 14 (2): 431-5, 2004.

- SINGH, I., P.; BHARATE S. P.; Phloroglucinol compounds of natural origin. **Natural Products Report**, V. 23, 558–591, 2006.

- SINGH I., P.; ETOH, H.; TAKASAKI M.; KONOSHIMA T**., Recent Advances in Phytochemistry**, V. 1, (51), 2000.

- SINGH I., P.; ETOH, H., **Natural Products Science**., V. 3, (1), 1997.

-SILVA, G. L.; ABREU M. F. J.; SILVEIRA, E. R., 4'-Dehydroxycabenegrin A-I from roots of *Harpalyce brasiliana*. **Phytochemistry**, V. 46, 1059-1062, 1997.

-SILVA, P. C. DE S. C., **Efeitos da variação sazonal na produção de compostos ativos em *Tithonia diversifolia H*emsl Gray, utilizando ensaio com microorganismos.** Dissertação de mestrado, ESALQ-USP- Piracicaba, SP, 2004.

-SIMÕES C. M. O.; SCHENKEL H P.; GOSMANN G.; MELLO J. C. P. de; MENTZ L. A.; PETROVICK P R (org), **FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS, Ed. UFSC, 2010.

-SOARES A. M.; JANUÁRIO A. H.; LOURENÇO M. V.; PEREIRA A. M. S.; PEREIRA P. S., Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the future**,V. 29, (11), 2004.

-SOARES, B. A., FIRME, C., L.; MACIEL, M., A., M.; KAISER, C., R.; SCHILLING, E.; BORTOLUZZI, A., J., Experimental and NMR theoretical Methodoly applied to geometric analysis of the bioactive clerodane trans-dehydrocrotonin, **Journal of Brazilian Chemical Society**., V. 25, (4), 2014.

- SOCOLSKY, C.; DOMINGUEZ, L.; ASAKAWA Y., BARDON, A.; Unusual terpenylated acylphloroglucinols from *Dryopteris wallichiana*, **Phytochemistry**, 80, 115-122, 2012.

- SOUZA, A. Q. L. DE; SOUZA, A. D. L. DE; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. DE M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, V. 34 (2), 185-195, 2004.

- TADA M., CHIBA, K.; YOSHII T., **Natural products as antiviral agents**, p. 239, ed. C. K. Chu and H. G. Cutler, New York, 1992.

- TAKAHASHI T, TAKASUKA N, IIGO M, BABA M, NISHINO H, TSUDA H, OKUYAMA T. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin e2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. **Cancer Science**, V. 95, (5):448-53, 2004.

- TEMKIN, O.; The Papyrus Ebers by B. Ebbell. **The University Of Chicago Press**; V.28 (1), 126-131, 1938.

- USHANANDINI S.; NAGARAJU S.; HARISH KUMAR K.; VEDAYATHI M.; MACHIAK D. K.; KEMPARAJU K.; VISHWANATH B. S.; GOWDA T. V.; GIRISH K. S., The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (Leguminoseae) seed extract. **Phytotherapy Research**, V. 20, (10): 851-8, 2006.

-VERONESE E. L.; ESMERALDINO L. E.; TROMBONE A. P.; SANTANA A. E.; BECHARA G. H.; KETELLHUT I.; CINTRA A. C.; GIGLIO J. R.; SAMPAIO S. V. , Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, V. 12 (1-2),123-30, 2005.

- VEROTTA L., **Phytochemistry Review**, V. 1, 389, 2002.

- VICKERY, VICKERY, 1981.

-VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, V. 29, (2), 326-337, 2006

-VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L. S.; SANTANA, J. M; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; PINHEIRO, S. M.; ARAUJO, R. M. LIMA, M. A. DE S., SILVEIRA, E.R.. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic And Medicinal Chemistry**, V. 16, 1676-1682, 2008.

-XIMENES, R. M., **Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas frente aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos**. Dissertação de mestrado (Farmacologia), UFC, Fortaleza, 2009.

-XIMENES, R. M.; NORÕES, T. B. S.; ALVES, R. S.; SOUSA, D. F.; JORGE, A. R. C. L.; SANTOS, J. V. A.; ARAUJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; MATOS, F. J. A., Toxicidade aguda oral de *Bredemeyera floribunda Willd*. e *Harpalyce brasiliana* Benth. em camundongos. Sbfte-UFC –Fortaleza, 2007.

-XIMENES, R. M.; RABELLO, M. M.; ARAUJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; FAGUNDES, F. H. R.; DIZ-FILHO, E. B. S.; BUZZO, S. C.; SOARES, V. C. G.; TOYAMA, D. DE O.; GAETA, H. H.; HERNANDES, M. Z. MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H., Inhibition of neurotoxic secretory phospholipases A2, enzymaticedematogenic and myotoxic activities by harpalicina II, na isoflavone isolated from Harpalyce brasiliana Benth. **Evidence-based C. and A. M.,** V. 2012.

-WANG, J. ZHAI, W-Z; ZOU, Y.; ZHU, J.-J.; XIONG J.; ZHAO, Y.; YANG, G-X.; FAN, H.; HAMANN, M. T.; XIA, G.; HU, J-F. Eucalyptals D and E, new cytotoxic Pfloroglucinols from the fruits of *Eucalyptus globulus* and assignment of absolute configuration. **Tetrahedron Letters**, V. 53, 2654-2658, 2012.

-ZHAI L.; CHEN M.; BLOM J.; THEANDER T.G.; CHRISTENSEN S.B.; KHARAZMI A., The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V. 43, 793-803, 1999.

Figura 2- Disponível em http://luirig.altervista.org/naturaitaliana/viewpics.php?title=Harpalyce+brasiliana, Acessada em 20/09/2013, 02/02/2014

Figura 4- Disponível em http://boavista-l-roraima.zeebukbrasil.com/especifico-pessoa-legitimo-100-ml-viii-129476-compravenda, Acessada em 26/02/2013, 02/02/2014

APÊNDICE

Aspectos gerais das práticas na Química Teórica

A química teórica constitui atualmente uma ferramenta de grande utilização em várias áreas de pesquisa química, pois através dela, pode-se simular o comportamento da matéria em escala atômica dentro uma gama de sistemas. Ocorrido principalmente no século XX e continuando no século XXI, o grande avanço das teorias quânticas aliado ao rápido desenvolvimento das tecnologias eletrônicas possibilitou a geração de programas de química computacional que não existiam antes da década de 1980.

Retornando ao início do século XX, haviam muitos físicos trabalhando nas questões relacionadas aos mistérios do comportamento não-clássico da matéria, como Werner Heisenberg, Albert Einstein, Paul Dirac, Niels Bohr, dentre outros. Erwin Schrödinger (1887-1961), físico austríaco cuja participação nas etapas iniciais no desenvolvimento da mecânica quântica também foi crucial, elaborou uma equação que descreve a dinâmica de sistemas quânticos, cuja solução para o átomo de hidrogênio é uma função de onda que só pode ser obtida dentro de um conjunto restrito de regras postuladas da mecânica quântica. Para sistemas com mais de um elétron, a resolução da equação é mais complexa, necessitando de tratamentos mais elaborados.

Para tanto, duas aproximações são utilizadas nos estudos de modelagem molecular; a aproximação clássica (inclui métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular) e a aproximação quântica (que inclui métodos ab initio e semi-empíricos). A escolha de qual aproximação utilizar depende de aspectos como quais propriedades se deseja avaliar, a capacidade computacional disponível e precisão dos cálculos realizados.

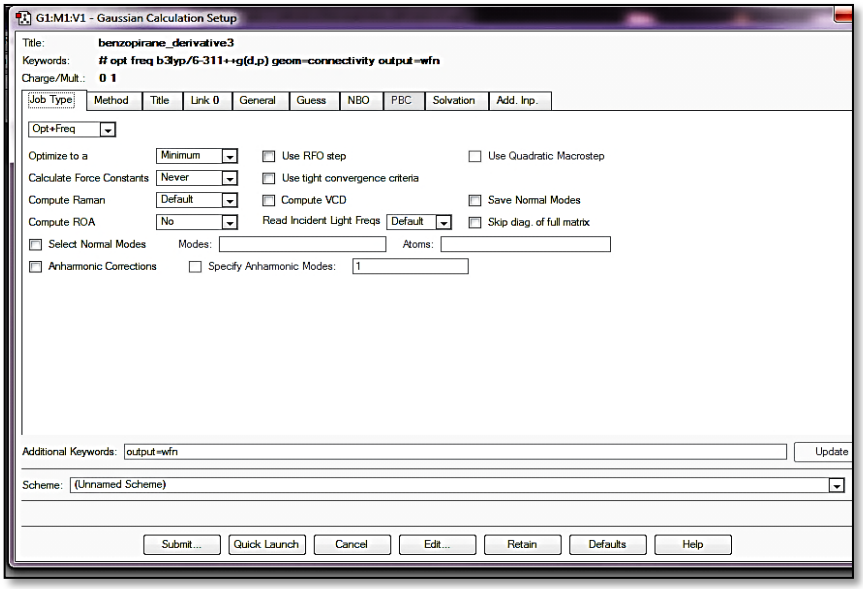
Através da química teórica é possível, por exemplo, investigar a estereoquímica de um produto de síntese orgânica ou de um metabólito isolado de espécie vegetal ou animal. Para tal substância, podemos prever como seriam os deslocamentos químicos de seu átomos em um espectro de RMN, para cada possibilidade de a geometria estrutural, se houver mais de uma. Cálculos com confôrmeros ou esteoisômeros, por exemplo, servem para avaliar qual a estrutura mais provável de ter sido obtida experimentalmente, através de um gráfico construído pela relação dos dados obtidos experimental e teoricamente. A comparação das linearidades nos gráficos construídos para cada estrutura definirá qual delas é de fato aquela obtida experimentalmente.

Um exemplo de investigação conformacional em moléculas orgânicas de produtos naturais pode ser verificado em Soares et al (2014), trabalho que descreve a aplicação da metodologia teórica à análise geométrica do clerodano *trans*-Dehidrocrotonina. Neste relato, foram utilizados dados de difração de raio-X, de ressonância magnética nuclear (RMN) e teóricos para completa caracterização da estrutura. A correlação dos dados experimentais com teóricos foi boa, sendo que a segunda derivada da equação da reta igualou valores de até 0,998 e 0,991 para os valores de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio, respectivamente.

Aspectos gerais dos programas de química teórica utilizados

Gaussian é um conjunto de programas ou aplicativos criado por várias equipes ao longo dos anos e programado para realizar diferentes tipos de cálculos e previsões com base em diferentes teorias. Com o programa Gaussview, um arquivo de saída (que será do tipo .gjf) é gerado quando o usuário realiza a construção tridimensional da molécula. Neste ponto, é necessário editar determinadas propriedades (figura 88) que serão relevantes para o tipo de cálculo que será realizado, como a escolha do método e conjunto de base, o título do arquivo de saída, efeitos de solvatação, observações pertinentes, dentre outros.

Figura AI - Tela de edição das propriedades relevantes para o cálculo de HB1



Após serem escolhidos todos os parâmetros importantes que fornecerão as melhores condições para o cálculo em termos de precisão e tempo de uso do computador, uma linha de comando que inclui o arquivo de saída gerado anteriormente no Gaussview é digitada no terminal do programa Gaussian. O programa então calcula os parâmetros de interesse (como pontos críticos e densidade eletrônica) a partir das informações de cada átomo, que estão contidas na molécula desenhada, de acordo com a teoria selecionada anteriormente. O arquivo de saída contendo dados como o nome do arquivo, o método escolhido e o conjunto de base gerado, será do tipo .log ou .out e pode ser lido como um arquivo de texto num bloco de notas (figura 89) ou aberto em programas como Chemcraft e AIM2000 para visualização dos resultados e geração dos gráficos moleculares.

Figura AII Arquivo de HB1-1, típico arquivo de saída do Gaussian

```
%mem=4GB
%nprocshared=2
# opt freq b3lyp/6-311++g(d,p) geom=connectivity output=wfn

benzopirane_derivative

0 1
 C                  0.33608800    3.66318600   -0.50636300
 C                 -0.87735000    3.60945500   -1.18781900
 C                 -1.59123400    2.40972800   -1.21407800
 C                 -1.10638700    1.26540200   -0.58297800
 C                  0.11919200    1.36089700    0.10228400
 C                  0.85664600    2.55023300    0.16241200
 O                  0.51006000    0.24091500    0.77370300
 C                  2.16339600    2.62262700    0.91689500
 C                  1.91324000    0.10818700    1.17417700
 C                  2.32040000    1.43210100    1.86784100
 O                  1.08193400    4.80979800   -0.45224800
 H                  0.62454200    5.52109100   -0.91225200
 H                 -1.25786300    4.48584900   -1.70535500
```

Este arquivo de saída se refere à matriz formada pelas posições de todos os átomos da molécula em um plano cartesiano. Cada variação de posição dos átomos em uma molécula irá mudar as interações entre eles e, portanto, a energia potencial da mesma. Em outros tempos, isso teria que ser calculado à mão, como fez Lewis ao calcular a carga formal de vários átomos. Entretanto, hoje em dia, é possível dar a tarefa ao programa, que calcula as energias da molécula a cada otimização que faz, repetindo o processo muitas vezes para uma otimização máxima da estutura, até a curva de energia potencial permanecer vários pontos no mínimo. Neste ponto, a estrutura é considerada otimizada. Depois disto, pode-se calcular também as frequências vibracionais das ligações para posteriormente comparar com os valores experimentais da análise por infravermelho. Dados de densidade de cargas obtidos

podem ser usados assim para calcular dados topológicos no AIM2000, visualizar possíveis interações que ocorrem entre os átomos da molécula, além de visualizar os dados de energia (em cal/mol) de cada possibilidade estrutural da mesma. Baseado em cinco parâmetros topológicos, podemos quantificar e qualificar interações.:

1- Dados de densidade de carga do ponto crítico (ρ);

2- Valor e sinal do laplaciano de densidade de carga ($\nabla^2\rho$);

3- Proporção entre os valores (Eigenvalues) da matriz Hessiana da densidade de carga (λ_1/λ_3);

4- Proporção entre densidade de energia cinética e densidade de carga (G_b/ρ_b)

5- Densidade de energia total no ponto crítico de ligação (H_b)

Um aspecto interessante do programa Gaussian é que ele gera uma pequena citação ou provérbio ao fim de cada cálculo, como os dois exemplos que podemos ver na figura AIII, provenientes dos cálculos deste trabalho.

Figura AIII Citações geradas ao fim do cálculo no Gaussian 9.0

"There is nothing noble in being superior to some other man. true nobility is being superior to your former self.

"Hindu"

"He who loves to read, and knows how to reflect, has laid by a perpetual feast for his old age.

Uncle Esek,
"Scribner's Monthly", Sept. 1880

In the fight between you and the world, back the world

Franz Kafka

The real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes but in having new eyes.

Marcel Proust

Standing in the middle of the road is very dangerous; you get knocked down by the traffic from both sides.

Margaret Thatcher

A química teórica constitui uma ferramenta de grandes possibilidades de utilização na área dos produtos naturais, como é o caso da DFT (Teoria do funcional da densidade, em inglês), que funciona bem com sistemas contendo muitas ligações de hidrogênio e calcula razoavelmente bem valores teóricos envolvendo interações eletrônicas. Exemplos destes cálculos são os valores de deslocamento químicos e constantes de acoplamento, por exemplo, dentre muitos outros parâmetros importantes na análise energética e estrutural das moléculas de produtos naturais. A análise de produtos com atividades biológicas pode auxiliar muito a estabelecer conexões entre estrutura-atividade de moléculas, pois calcula os valores esperados teoricamente dos deslocamentos químicos de cada átomo individual.

Neste caso, pode-se arriscar a dizer que seria muito proveitoso para todos nós da Ciência se houvesse um avanço na tecnologia da RMN, para produzir uma geração de sistemas que analisam todos os átomos individualmente, mesmo aqueles considerados equivalentes magnética e quimicamente. No caso dos valores teóricos para estes átomos, nem sempre são tão equivalentes, porém as máquinas de RMN atuais lêem a maioria dos sinais emitidos pelos átomos como uma média, a não ser em casos específicos, como hidrogênios diastereotópicos, por exemplo.

A análise por RMN é uma das ferramentas mais utilizadas pelos químicos de produtos aturais para desvendar as misteriosas estruturas produzidas pela natureza, e a química teórica pode ser um grande mecanismo de conhecimento mais profundo das moléculas.