DANIARA CRISTINA FERNANDES

Estudo químico e atividade biológica de *Garcinia
xanthochymus* (Clusiaceae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2010

SÚMULA CURRICULAR

DANIARA CRISTINA FERNANDES

DADOS PESSOAIS

- ✓ Nascimento: 16/11/1981
- ✓ Nacionalidade: Brasileira
- ✓ Naturalidade: Jáu/SP
- ✓ Estado civil: Solteira
- ✓ Filiação: Wilson Fernandes
Marilda Aparecida Marquesan Fernandes
- ✓ Profissão: Química
- ✓ Endereço: Av. Sorocaba nº 2128, Vila Quitandinha, Araraquara-SP
- ✓ Telefone: (16) 9186 5788
- ✓ E-mail: daniaraf@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- ✓ Licenciatura em Química
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Período: 2003-2007
- ✓ Mestrado em Química
Área de Concentração: Química Orgânica
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

ESTÁGIOS REALIZADOS

✓ Iniciação à Pesquisa Científica

Título do projeto: Estudo químico e atividade antioxidante de *Pterogyne nitens* (Leguminosae)

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Orientação: Dulce Helena Siqueira Silva

Período: 2006-2007

Bolsa: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS E COMISSÕES

✓ Perfil químico e atividade biológica das folhas de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). 2009. 17º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Araraquara-SP.

✓ Obtenção e estudo do potencial de híbridos orgânico-inorgânicos para aplicações como filtros em protetores solares. 2009. 17º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Araraquara-SP.

✓ The leaves chemical profile and biological activity of *Garcinia xanthochymus*. 2009. 2º Brazilian Conference on Natural Products, São Pedro-SP.

✓ Perfil químico e atividade biológica das folhas de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). 2009. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE.

✓ Perfil cromatográfico por HPLC-DAD e atividade biológica dos extratos dos frutos de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). 2009. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE.

✓ Identificação de triterpenos e esteróides de *Pterogyne nitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae) utilizando cromatografia gasosa de alta resolução. 2008. XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas e III Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, Florianópolis-SC.

✓ Atividade sequestradora de radicais livres de extratos obtidos de *Pterogyne nitens* (Fabaceae). 2007. Simpósio Paulista de Farmacognosia, Araraquara-SP.

- ✓ Myeloperoxidase inhibitory flavonoids from fruits and leaves of *Pterogyne nitens* (Fabaceae). 2007. 48th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Portland-OR, EUA.
- ✓ Avaliação eletroquímica de flavonóides isolados de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) empregando voltametria cíclica. 2007. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Interaction of potential antimalarial guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens* (Leguminosae) with heme using spectrophotometry. 2007. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP.
- ✓ Myeloperoxidase inhibitory flavonoids from fruits and leaves of *Pterogyne nitens* (Fabaceae). 2007. 1st Brazilian Conference on Natural Products, São Pedro-SP.
- ✓ Study of interaction of potential antimalarial guanidine alkaloids and flavonoids from *Pterogyne nitens* (Leguminosae) with heme using spectrophotometry. 2007. 1st Brazilian Conference on Natural Products, São Pedro-SP.
- ✓ Alternativas às barreiras encontradas na aplicação de teorias pedagógicas no ensino de química. 2007. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP.
- ✓ *Pterogyne nitens* (FABACEAE) como fonte de produtos naturais bioativos. 2007. XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo, Assunción, Paraguai.
- ✓ Ação antioxidante e constituintes químicos de *Pterogyne nitens* (Leguminosae). 2006. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Bauru-SP.
- ✓ Atividade antiinflamatória e constituintes químicos das folhas de *Pterogyne nitens* (Leguminosae). 2006. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP.
- ✓ Busca de substâncias antioxidantes em *Pterogyne nitens* (Leguminosae) empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. 2006. II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, São Pedro-SP.
- ✓ O desenvolvimento de uma concepção científica através de metodologias alternativas. 2006. XIII Encontro Nacional do Ensino de Química, Campinas-SP.
- ✓ Três diferentes concepções geradas a partir de uma parceria Universidade-Escola Pública diferenciada. 2006. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP.

- ✓ Atividade antiinflamatória e constituintes químicos das folhas de *Pterogyne nitens* (Leguminosae). 2006. I Escola de Inverno da USP-RP.
- ✓ Estudo dos constituintes químicos de baixa polaridade de *Pterogyne nitens* (Leguminosae). 2005. XII Congresso de Iniciação científica da UNESP, Araraquara-SP.
- ✓ Espaços não-formais: motivação para a aprendizagem do ensino de física promovendo a educação científica. 2005. V Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências, Bauru-SP.
- ✓ Centro de Ciências de Araraquara: Plantão de Dúvidas. 2004. II Evento de Educação em Química, Araraquara-SP.
- ✓ Educação científica em espaços não-formais promovendo o ensino de química. 2004. XII Encontro Nacional do Ensino de Química, Goiânia-GO.
- ✓ Plantão de dúvidas como agente facilitador no processo ensino-aprendizagem em Química. 2004. XII Encontro Nacional do Ensino de Química, Goiânia-GO.
- ✓ Comissão organizadora do VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota-Fapesp, 2008, Araraquara-SP.
- ✓ Organização do III e IV Workshop do NuBBE, 2008 e 2009, Araraquara-SP.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- ✓ Regasini, L. O.; Vieira-Júnior, G. M.; Fernandes, D. C.; Bolzani, V. S.; Cavaleiro, A. J.; Silva, D. H. S. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v. 54, n. 3, p. 218-221, 2009.
- ✓ Regasini L. O.; Fernandes D. C.; Silva D. H. S.; Furlan M.; Barreiro E. J.L.; Young M. C. M.; Bolzani V. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**. v. 31, p. 802-806, 2008.
- ✓ Fernandes D. C.; Regasini L. O.; Velloso J.C. R.; Oliveira O. M.; Bolzani V.; Castro-Gamboa I.; Silva D. H. S. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne Nitens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 723-726, 2008.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

✓ Premiações:

- Auxílio-mérito pelo trabalho intitulado “Avaliação eletroquímica de flavonóides isolados de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) empregando voltametria cíclica” apresentado na 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Resumo completo selecionado pela PROEX entre os 40 melhores da UNESP. O trabalho intitulado como “*Pterogyne nitens* (FABACEAE) como fonte de produtos naturais Bioativos” foi selecionado para apresentação oral e premiado como melhor trabalho na categoria de Produtos naturais bioativos e suas aplicações, Reunião da AUGM, Assunción, Paraguai, 2007.
- Seleção entre os alunos do Instituto de Química/Araraquara/UNESP para cursar a disciplina intersemestral “Métodos Modernos de Caracterização Estrutural e Dinâmica de proteínas” oferecida pelo Instituto de Química da UNICAMP em janeiro de 2007.

Aos meus pais Wilson Fernandes e Marilda Ap. M. Fernandes que me auxiliaram a continuar com dedicação esta pesquisa, por toda compreensão, por terem lutado para eu chegar à universidade e por estarem sempre comigo...

As minhas irmãs e verdadeiras amigas Daniele G. Fernandes e Daniane M. Fernandes, por compartilharem solidariamente a alegria das vitórias e o dissabor dos insucessos...

Ao meu noivo Marco Aurélio Cebim, minha maior conquista e credor do meu amor, carinho e respeito...

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Foram longos momentos de desafios e provas, porém momentos de intenso aprendizado e prazer. Muitas pessoas se notabilizaram por suas relevantes e despretensiosas cooperações, por isso terão seus nomes merecidamente mencionados, como forma de perpetuar suas valiosas participações. Meu grato reconhecimento:

À Deus por estar ao meu lado mesmo quando eu estava longe e perdida...

À doce profª Dra. Dulce Helena Siqueira Silva que me proporcionou grandes oportunidades de aprendizado, me mostrando sempre as opções e me apoiando nas minhas decisões. Agradeço pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho e ainda, pelos ensinamentos, que com sua seriedade, tranquilidade e conhecimento, me guiaram para caminhos corretos e compensadores. Agradeço por ter despertado em mim o interesse pelo estudo das plantas. Muito obrigada...

Ao meu mestre Dr. Ian Castro-Gamboa, pesquisador obstinado e perfeccionista, o qual instigou minha paixão pela Química Orgânica e mesmo que distante, sua ousadia, motivação, alegria e capacidade intelectual me contagiam...

À profª Dra. Márcia Nasser e à profª Dra. Ângela R. Araújo, por sempre estarem dispostas a transmitir seus valiosos ensinamentos e por me incentivarem nesta longa caminhada. Meu estimado apreço pelo exemplo de docente, pesquisador e principalmente ao exemplo relacionado ao valor da vida...

Aos professores Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, Dr. Alberto Cavalheiro, Dr. Lúcia Xavier, Dr. Maysa Furlan, Dra. Isabele Rodrigues Nascimento e Dra. Lourdes C. dos Santos, pela convivência e pelo aprendizado durante meus seis anos no laboratório...

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito...

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização dos espectros de RMN, por seus valiosos conhecimentos e ensinamentos, pelos bons momentos de descontração, pela sua seriedade e disponibilidade em resolver meus “pepinos” e claro, por cuidar muito bem do Nerinho. Um cão é a única coisa na terra que nos ama mais do que ama a si mesmo...

Ao Dr. Alberto C. Alécio, pela amizade, compreensão, por seus ensinamentos, por estar sempre solícito quando é necessário, e principalmente pela humildade em lidar com as pessoas. Admiro pessoas como vc...

Aos professores Dr. Norberto Peporine (USP- Ribeirão Preto) e ao especialista em

Laboratório Dr. José Carlos Tomaz, pela realização dos espectros de massas, imprescindíveis para a elucidação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho...

Ao professor Antonio Gilberto Ferreira da Universidade Federal de São Carlos pelas medidas dinâmicas de RMN...

Ao prof^o Dr. Wagner Vilegas e em especial as doutorandas Juliana Severi e Juliana Rodrigues pela presteza na realização das medidas ópticas...

À prof^a Dra. Mary Rosa R. de Marchi e seu orientado Flavio Soares Silva pela disponibilidade do equipamento de CG-EM...

Aos Professores integrantes do Projeto Temático Biota/Bioprospecta-Fapesp e seus orientados pela realização dos ensaios farmacológicos. Em especial as alunas Tarsia, pelo ensaio quimiopreventivo; Mariana, pelo ensaio tripanocida e Luciana pelos ensaios antifúngicos...

Ao meu amigo, irmão e mestre Dr. Luis Octávio Regasini pelo seu esmero e dedicação na pesquisa e transmissão de conhecimentos científicos agregados a valores éticos (elementos fundamentais para uma boa qualificação profissional) e pelas oportunidades concedidas para meu aperfeiçoamento acadêmico, as quais têm me permitido acessar novos campos de estudo. “Espero corresponder às suas expectativas.”

Aos amigos Amanda, Marcos, Marília, Vanessa, Sheila, Carol, Welington, Aline, Néia, Mike, Ana, Juliana, Thais, Luciene, Andréinha, João Marcos, Sílvia, Lidiane, Marcos Marçal, Sara, Otávio, Luciana, Magela, Vânia, Vivi, Cristiano e Fernando, por terem me ensinado muito sobre suas experiências em Química de Produtos Naturais, durante o período de Graduação e Pós-Graduação, cujo aprendizado acelerou o amadurecimento da minha formação científica. “Sou grata pelas informações que produziram atalhos, e pelo apoio emocional que me fortaleceu durante a caminhada.”

À minha amiga Alessandra Cr. Dametto, minha parceira no estudo fitoquímico, nos grupos de sala de aula, nas confraternizações, nos congressos e como não se lembrar, das incansáveis organizações. Muito obrigada por fazer parte da minha história...

As minhas amigas inseparáveis Adriana, Sheila, Patrícia e Rosilene “O quarteto fantástico”, ou melhor, “As agregadas” e à Thayz, por me ajudarem sempre, me acolherem e me ouvirem. Por tudo que vivemos juntas desde a graduação até hoje, amigas verdadeiras que quero sempre em minha vida, mesmo longe...

Aos colegas da graduação Aroldo, Flavia, João Medeiros, Leandro, Mônica, Éderson, Fabrícia, Renata, Jeane, Paulo, Ademar e Jorge, por fazerem parte da minha vida até hoje...

À FAPESP pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto.

*“Primeiro aprenda a ser um artesão. Isso
não impedirá você de ser um gênio”.*

Eugène Delacroix

RESUMO

A espécie *Garcinia xanthochymus*, comumente conhecida como Gamboja, é uma árvore nativa da Índia com aproximadamente 8-10 metros, utilizada extensamente na medicina popular como antidiarréica. Este trabalho descreve o estudo químico e biológico das folhas e frutos de *G. xanthochymus*. Dentre as substâncias isoladas, podemos destacar 3 triterpenos obtidos do extrato hexânico das folhas: friedelina (**1**), lanosta-8,24-dien-3-ol (**2**) e lanosta-7,24-dien-3-ol (**3**), sendo as substâncias **2** e **3** relatadas pela primeira vez na literatura da espécie. A prospecção química da fase acetato de etila das folhas revelou uma abundante presença de biflavonóides, sendo as substâncias saharanflavona (**4**), I3, II8-biapigenina (**5**), GB1a (**6**), (+)-morelloflavona (**8**), GB2a (**11**), volkensiflavona (**12**), GB2 (**14**), xantochimusídeo (**15**) e fukugisídeo (**16**), caracterizadas pela ligação interflavonoídica do tipo 3→8'', e as substâncias podocarpusflavona (**7**) e amentoflavona (**9**), pela ligação do tipo 3'→8''. Merece destaque a substância **4**, isolada pela primeira vez de fontes naturais. A composição química de *G. xanthochymus* constituiu-se ainda das substâncias diidrokaempferol (**10**), ácido vanílico (**13**), cinco derivados de ácidos fenilpropanoídicos: ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**17**), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**18**), ácido 3-*p*-coumaroilquínico (**21**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**22**) e ácido 4-*p*-coumaroilquínico (**23**); e ainda a mistura binária das benzofenonas xantochimol (**19**) e cicloxantochimol (**20**). Todas as substâncias foram relatadas pela primeira vez nas folhas de *G. xanthochymus*, com exceção da substância **7** e as substâncias **10**, **13**, **17**, **18**, **21**, **22** e **23** ainda não haviam sido identificadas na espécie. Através da técnica CG-DIC foram identificados 15 triterpenos e/ou esteróides nos extratos de baixa polaridade e através das técnicas hifenadas, como CLAE-UV e CLAE-EM, foi possível localizar substâncias já isoladas e/ou isoladas em trabalhos anteriores. Os resultados observados para os ensaios antioxidantes utilizando-se o radical DPPH evidenciaram a importância dos grupos catecólicos como essenciais para uma excelente ação antioxidante. Em relação à atividade antifúngica os extratos etanólico e hexânico dos frutos de *G. xanthochymus* apresentaram resultados muito atrativos, com CIM de 1,95 µg/mL, oito vezes menor que o apresentado pelo padrão comercial fluconazol (CIM=16,0 µg/mL). A (+)-morelloflavona (**8**) mostrou elevada capacidade de indução da atividade da enzima quinona redutase, comparável ao da 4'-bromoflavona (padrão comercial), evidenciando o potencial quimiopreventivo de *G. xanthochymus*.

Palavras-chave: *Garcinia xanthochymus*. Biflavonóide. Bioprospecção.

ABSTRACT

The species *Garcinia xanthochymus*, known as Gamboja is a native Indian tree *ca.* 8-10 m high, which is extensively used as folk medicine for treating diarrhea and dysentery. This work describes the study of the chemical profile of *G. xanthochymus* leaves and fruits. Among the isolated substances three triterpenes were obtained from the hexane extract of the leaves: friedelin (**1**), lanosta-8,24-dien-3-ol (**2**) e lanosta-7,24-dien-3-ol (**3**), with compounds (**2**) and (**3**) described for the first time in the literature of this species. The chemical prospection of the ethyl acetate extract of the leaves revealed an abundant amount of biflavonoids, with compounds saharanflavone (**4**), I3,II8-biapigenin (**5**), GB1a (**6**), (+)-morelloflavone (**8**), GB2a (**11**), volkensiflavone (**12**), GB2 (**14**), xanthochymuside (**15**) and fukugiside (**16**) characterized by the interflavonoid 3→8'' bond, and compounds podocarpusflavone (**7**) and amentoflavone (**9**), by the interflavonoid 3'→8'' bond. Substance **4** was isolated for the first time from a natural source. The chemical composition of *G. xanthochymus* included additionally dihydrokaempferol (**10**), vanillic acid (**13**), and five phenylpropanoid acid derivatives: 3-*O*-caffeoylquinic acid (**17**), 5-*O*-caffeoylquinic acid (**18**), 3-*p*-coumaroylquinic acid (**21**), 4-*O*-caffeoylquinic acid (**22**) and 4-*p*-coumaroylquinic acid (**23**); as well a binary mixture of xanthochymol (**19**) and cycle-xanthochymol (**20**) benzophenones. All the compounds were reported for the first time in the leaves of *G. xanthochymus*, with the exception of compound **7**, and compounds **10**, **13**, **17**, **18**, **21**, **22** e **23**, which had not yet been identified in this species. By CG-FID technique fifteen triterpenes and/or steroids were identified in the low polarity extracts. Hyphenated techniques such as HPLC-UV and HPLC-MS were used to locate previously isolated compounds from different fractions and/or isolated substances from other works. The bioactivity evaluation of extracts, semipurified fractions and pure compounds from *G. xanthochymus* displayed attractive results. The free radical scavenging assay with DPPH radical confirmed the importance of the catechol group as essential for optimum antioxidant action. The ethanol and hexane extracts from the fruits of *G. xanthochymus* showed potent antifungal activity (MIC= 1.95 µg/mL), *ca.* eight times lower than the commercial standard fluconazole (MIC=16,0 µg/mL). Additionally, (+)-morelloflavone (**8**) showed strong induction of quinone reductase enzyme activity, comparable to the positive control 4'-bromoflavone, evidencing the chemopreventive potential of *G. xanthochymus*.

Keywords: *Garcinia xanthochymus*. Biflavonoid. Bioprospection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Foto de diferentes partes de *Garcinia xanthochymus*. 33
- Figura 2** - Algumas classes de substâncias isoladas da espécie de *Garcinia xanthochymus*. 33
- Figura 3** - Esquema geral da rota biossintética de flavonóides (ACC-acetil CoA-carboxilase, CS-chalcona sintetase e CI-chalcona isomerase). 37
- Figura 4** - Estrutura de biflavonóides tipo flavona-flavona. 37
- Figura 5** - Experimento de RMN ^1H para a ($\pm$)-morelloflavona (Li et al., 2002) em temperaturas variáveis. O sinal **1a** representa o conformero principal e **1b** o conformero minoritário. 40
- Figura 6** - Representação do equilíbrio entre as EROs e as defesas antioxidantes do nosso organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). 42
- Figura 7** - Fracionamento cromatográfico dos frutos de *Garcinia xanthochymus*. 52
- Figura 8** - Fracionamento cromatográfico das folhas de *Garcinia xanthochymus*. 53
- Figura 9** - Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus* em coluna de permeação em gel (LH-20, Sephadex[®]). 53
- Figura 10** - Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus* em coluna de fase normal (sílica-gel 60-230 μ). 54
- Figura 11** - Fracionamento cromatográfico da fração BuOH-FOL de *Garcinia xanthochymus*. 54
- Figura 12** - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração AcOEt-FOL-14, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (57:42,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 57
- Figura 13** - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações **(a)** AcOEt-FOL-15 e **(b)** AcOEt-FOL-16, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (75:24,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 58
- Figura 14** - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações **(a)** AcOEt-SIL-3 e **(b)** AcOEt-SIL-9, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (45:54,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 58
- Figura 15** - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações **(a)** AcOEt-SIL-4, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (60:39,5:0,5) e **(b)** AcOEt-SIL-5, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (50:49,5:0,5). 59
- Figura 16** - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração AcOEt-SIL-11, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (35:64,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 60

- Figura 17** - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração BuOH-FOL-6, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (20:79,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 61
- Figura 18** - Cromatoplaça da subfração AcOEt-FRU-7 com (a) revelação física em $\lambda=254$ nm e (b) revelação química com anisaldeído sulfúrico (c) Cromatograma analítico da subfração AcOEt-FRU-7, obtido em coluna ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m) eluída com fase móvel de MeOH:H₂O: HOAc (75:24,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm. 61
- Figura 19** - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV do extrato ETOH (a) e das frações AcOEt (b), BuOH (c) e HA (d) dos frutos (acima) e das folhas (abaixo) de *Garcinia xanthochymus* no modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m). 68
- Figura 20** - Espectro no UV de algumas substâncias isoladas da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus*. 68
- Figura 21** - Espectro de massas da substância 1 obtido por CG-EM (IE=+70 eV). 70
- Figura 22** - Espectro vibracional na região do IV da substância 1. 71
- Figura 23** - Proposta de fragmentação da substância 1. 71
- Figura 24** - Espectro vibracional na região do IV da substância 2. 73
- Figura 25** - Espectro de massas da substância 2 obtido por CG-EM (IE= + 70 eV). 73
- Figura 26** - Proposta de fragmentação da substância 2. 73
- Figura 27** - Estrutura da substância 4. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância 4 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m). 76
- Figura 28** - Espectro vibracional na região do IV da substância 4. 76
- Figura 29** - Espectro de massas de primeira-ordem da substância 4 obtido no modo negativo (ESI). 78
- Figura 30** - Estrutura da substância 5. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância 5 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m) 79
- Figura 31** - Espectro vibracional na região do IV da substância 5. 80
- Figura 32** - Espectro de massas de primeira-ordem da substância 5 obtido no modo negativo (ESI). 80

- Figura 33** - Estrutura da substância **8**. **(a)** Cromatograma analítico e **(b)** espectro de absorção da substância **8** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 82
- Figura 34** - Espectro vibracional na região do IV da substância **8**. 83
- Figura 35** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **8**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 5% para EM2 (ESI). 83
- Figura 36** - Proposta de fragmentação da substância **8**. 83
- Figura 37** - Curva de dicroísmo circular (DC) da substância **8**. 85
- Figura 38** - Estruturas do confômero principal (**8a**) e minoritário (**8b**) da morelloflavona. 85
- Figura 39** - Estrutura da substância **9**. **(a)** Cromatograma analítico e **(b)** espectro de absorção da substância **9** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 87
- Figura 40** - Espectro vibracional na região do IV da substância **9**. 88
- Figura 41** - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **9** obtido no modo negativo (ESI). 88
- Figura 42** - Estrutura da substância **10**. **(a)** Cromatograma analítico e **(b)** espectro de absorção da substância **10** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 90
- Figura 43** - Espectro vibracional na região do IV da substância **10**. 91
- Figura 44** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **10**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI). 91
- Figura 45** - Proposta de fragmentação da substância **10**. 92
- Figura 46** - Curva de dicroísmo circular (DC) da substância **10**. 93
- Figura 47** - Estrutura da substância **11**. **(a)** Cromatograma analítico e **(b)** espectro de absorção da substância **11** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 94
- Figura 48** - Espectro vibracional na região do IV da substância **11**. 94
- Figura 49** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **11**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 95
- Figura 50** - Proposta de fragmentação da substância **11**. 95

Figura 51 - Experimento de RMN ^1H com temperatura variável da substância 11 .	98
Figura 52 - Estrutura da substância 12 . (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância 12 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H ₂ O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).	99
Figura 53 - Espectro vibracional na região do IV da substância 12 .	100
Figura 54 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 12 , obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).	101
Figura 55 - Proposta de fragmentação da substância 12 .	101
Figura 56 - Curva de dicroísmo circular (DC) da substância 12 .	101
Figura 57 - Estrutura da substância 13 . (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância 13 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H ₂ O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).	102
Figura 58 - Espectro vibracional na região do IV da substância 13 .	103
Figura 59 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 13 , obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).	105
Figura 60 - Proposta de fragmentação da substância 13 .	105
Figura 61 - Estrutura da substância 14 . (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância 14 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H ₂ O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).	106
Figura 62 - Curva de dicroísmo circular (DC) das substâncias (a) 11 e (b) 14 .	108
Figura 63 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 14 , obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).	108
Figura 64 - Proposta de fragmentação da substância 14 .	109
Figura 65 - Estruturas das substâncias 17 e 18 . (a) Cromatogramas analíticos e (b) espectros de absorção das substâncias 17 e 18 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 35:75 (MeOH:H ₂ O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).	110
Figura 66 - Espectro vibracional na região do IV da substância 17 .	110
Figura 67 - Estrutura do ácido quínico. (a) conformação de maior estabilidade. (b) conformação de menor estabilidade evidenciando interação 1,3-diaxial entre a carboxila e a hidroxila em C5.	112

- Figura 68** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **17**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 114
- Figura 69** - Proposta de fragmentação da substância **17**. 114
- Figura 70** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **18**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 115
- Figura 71** - Proposta de fragmentação da substância **18**. 115
- Figura 72** - Cromatograma analítico de alguns constituintes majoritários obtido via CLAE-UV-DAD das subfrações **(a)** AcOEt-FRU-13 **(b)** e AcOEt-FRU-17, no modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 117
- Figura 73** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **24**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 117
- Figura 74** - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **25** obtido no modo negativo (ESI). 117
- Figura 75** - Proposta de fragmentação da substância **24**. 118
- Figura 76** - Proposta de fragmentação da substância **25**. 118
- Figura 77** - Estruturas das xantonas padrão utilizadas no processo de desreplicação das substâncias **24** e **25**. 119
- Figura 78** - **(a)** Espectro de absorção da substância **24**, da xantona **1** e cromatograma analítico da xantona **1** **(b)** Espectro de absorção da substância **25**, xantona **2** e cromatograma analítico da xantona **2**. Modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 120
- Figura 79** - Espectro de absorção no UV comparativo **(a)** da substância **11** e o pico 2 da fração AcOEt-FRU-17 e **(b)** da substância **14** e o pico 1 da fração AcOEt-FRU-17. 120
- Figura 80** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem dos picos 1 **(esquerda)** e 2 **(direita)** da subfração AcOEt-FRU-17, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 121
- Figura 81** - **(a)** Cromatograma analítico e **(b)** espectro de absorção da substância **6** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm). 121
- Figura 82** - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) da substância **6** (DMSO-*d*₆). 122
- Figura 83** - Espectro de massas **(a)** de primeira e **(b)** segunda-ordem da substância **6**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI). 123
- Figura 84** - Proposta de fragmentação da substância **6**. 123

Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 7 (DMSO- d_6).	124
Figura 86 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância 7 obtido no modo negativo (ESI).	124
Figura 87 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 15 (DMSO- d_6).	124
Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 16 (DMSO- d_6).	125
Figura 89 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 15 , obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).	125
Figura 90 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância 16 obtido no modo negativo (ESI).	126
Figura 91 - Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da subfração AcOEt-FRU-7 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático MeOH:H ₂ O:HOAc (75:24,5:0,5), suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm) e detecção em $\lambda=254$ nm.	128
Figura 92 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) das substâncias 19 e 20 (DMSO- d_6).	128
Figura 93 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da subfração AcOEt-FRU-7, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para EM2 (ESI).	129
Figura 94 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 22 , obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).	130
Figura 95 - Espectro de massas de primeira e segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI) da (a) substância 21 e da (b) substância 23 .	130
Figura 96 - Estruturas dos triterpenos e esteróides identificados nos extratos e frações de baixa polaridade de <i>Garcinia xanthochymus</i> .	131
Figura 97 - Perfil cromatográfico (CG-DIC) em SPB-5 (a) do HEX-FRU [38 $t_r=22,05$; 39 $t_r=23,38$; 35 $t_r=23,82$; 27 $t_r=24,43$ e 32 $t_r=26,84$] (b) da FR. HEX-FOL [39 $t_r=23,38$; 35 $t_r=23,75$; 27 $t_r=24,33$ e 32 $t_r=26,75$] (c) e do EXT-FOL [37 $t_r=20,41$ e 34 $t_r=24,82$], em presença de colesterol (padrão interno).	133
Figura 98 - Perfil cromatográfico (CG-DIC) em SPB-50 (a) do HEX-FRU [38 $t_r=17,29$; 39 $t_r=19,24$; 35 $t_r=22,97$; 27 $t_r=24,06$ e 32 $t_r=25,46$] (b) da FR. HEX-FOL [39 $t_r=19,11$; 35 $t_r=22,80$; 27 $t_r=23,31$ e 32 $t_r=25,35$] (c) e do EXT-FOL [37 $t_r=15,86$ e 34 $t_r=25,64$], em presença de colesterol (padrão interno).	133
Figura 99 - Gráfico da curva de concentração dos extratos e frações (a) das folhas e dos (b) frutos de <i>G. xanthochymus</i> versus a % de seqüestro de DPPH.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias isoladas de <i>Garcinia xanthochymus</i> e bioatividades relatadas nas referências citadas.	34
Tabela 2 - Intervalos de absorção no UV para diferentes tipos de flavonóides.	69
Tabela 3 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias 1 , 2 e 3 em CDCl_3 .	75
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 4 ($\text{DMSO}-d_6$).	78
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 5 ($\text{DMSO}-d_6$).	81
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 8 ($\text{DMSO}-d_6$).	86
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 9 ($\text{DMSO}-d_6$).	89
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 10 ($\text{DMSO}-d_6$).	93
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 11 ($\text{DMSO}-d_6$).	96
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 12 ($\text{DMSO}-d_6$).	102
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 13 ($\text{DMSO}-d_6$).	105
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 14 ($\text{DMSO}-d_6$).	107
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 17 ($\text{DMSO}-d_6$).	110
Tabela 14 - Fragmentos obtidos dos analitos isolados de <i>G. xanthochymus</i> a partir da análise por EM e EM2 obtido em modo negativo com energia de colisão de 15%.	113
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) das substâncias 19 e 20 ($\text{DMSO}-d_6$).	127
Tabela 16 - Fragmentos obtidos de benzofenonas isoladas de <i>G. xanthochymus</i> através de EM e EM2.	129
Tabela 17 - Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol.	132

Tabela 18 - Atividade antioxidante dos extratos e frações de <i>Garcinia xanthochymus</i> frente ao radical DPPH.	134
Tabela 19 - Atividade inibitória <i>in vitro</i> no ensaio de formação de β -Hematina para os extratos e frações de <i>Garcinia xanthochymus</i> .	136
Tabela 20 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos e frações de <i>G. xanthochymus</i> frente a fungos patogênicos humanos.	137
Tabela 21 - Atividade biológica dos constituintes isolados das folhas e frutos de <i>Garcinia xanthochymus</i> .	138
Tabela 22 - Atividade tripanocida dos extratos e frações de <i>G. xanthochymus</i> .	139
Tabela 23 - Avaliação da taxa de indução (IR) da atividade de QR em linhagem Hepa1c1c7 para 8 .	140

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H da substância 1	156
Anexo 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1	156
Anexo 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1	157
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1	157
Anexo 5. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1	158
Anexo 6. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1	158
Anexo 7. Espectro de DEPT 135° da substância 1	159
Anexo 8. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 1	159
Anexo 9. Espectro de DEPT 90° da substância 1	160
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H da substância 2	160
Anexo 11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1	161
Anexo 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 2	161
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2	162
Anexo 14. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2	162
Anexo 15. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2	163
Anexo 16. Espectro de DEPT 135° da substância 2	163
Anexo 17. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 2	164
Anexo 18. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 2	164
Anexo 19. Espectro de DEPT 90° da substância 2	165
Anexo 20. Espectro de RMN de ^1H da mistura 2 e 3	165
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura 2 e 3	166
Anexo 22. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura 2 e 3	166
Anexo 23. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura 2 e 3	167
Anexo 24. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura 2 e 3	167
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H da substância 4	168
Anexo 26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 4	168
Anexo 27. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 4	169
Anexo 28. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 4	169
Anexo 29. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 4	170
Anexo 30. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 4	170
Anexo 31. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 4	171
Anexo 32. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 4	171

Anexo 33. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 4 .	172
Anexo 34. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 4 .	172
Anexo 35. Espectro de HOMODEC da substância 4 .	173
Anexo 36. Espectro de NOESY 1D (irradiação em δ_{H} 6,25) da substância 4 .	173
Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H da substância 5 .	174
Anexo 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 5 .	174
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 .	175
Anexo 40. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 .	175
Anexo 41. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 .	176
Anexo 42. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 5 .	176
Anexo 43. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 5 .	177
Anexo 44. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 5 .	177
Anexo 45. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 5 .	178
Anexo 46. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 5 .	178
Anexo 47. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 5 .	179
Anexo 48. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	179
Anexo 49. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	180
Anexo 50. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	180
Anexo 51. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	181
Anexo 52. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	181
Anexo 53. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 5 .	182
Anexo 54. Espectro de RMN de ^1H da substância 8 .	182
Anexo 55. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 8 .	183
Anexo 56. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 8 .	183
Anexo 57. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 8 .	184
Anexo 58. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 8 .	184
Anexo 59. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 8 .	185
Anexo 60. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 8 .	185
Anexo 61. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 8 .	186
Anexo 62. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8 .	186
Anexo 63. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8 .	187
Anexo 64. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8 .	187
Anexo 65. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8 .	188
Anexo 66. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8 .	188

Anexo 67. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8	189
Anexo 68. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8	189
Anexo 69. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8	190
Anexo 70. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 8	190
Anexo 71. Espectro de RMN de ^1H da substância 9	191
Anexo 72. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 9	191
Anexo 73. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 9	192
Anexo 74. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9	192
Anexo 75. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 9	193
Anexo 76. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 9	193
Anexo 77. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 9	194
Anexo 78. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 9	194
Anexo 79. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 9	195
Anexo 80. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 9	195
Anexo 81. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 9	196
Anexo 82. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 9	196
Anexo 83. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 9	197
Anexo 84. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 9	197
Anexo 85. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 9	198
Anexo 86. Espectro de RMN de ^1H da substância 10	198
Anexo 87. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 10	199
Anexo 88. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 10	199
Anexo 89. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 10	200
Anexo 90. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 10	200
Anexo 91. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 10	201
Anexo 92. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 10	201
Anexo 93. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 10	202
Anexo 94. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 10	202
Anexo 95. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 10	203
Anexo 96. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 10	203
Anexo 97. Espectro de RMN de ^1H da substância 11	204
Anexo 98. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 11	204
Anexo 99. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 11	205
Anexo 100. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11	205

Anexo 101. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 11	206
Anexo 102. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 11	206
Anexo 103. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 11	207
Anexo 104. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 11	207
Anexo 105. Espectro de DEPT 135° da substância 11	208
Anexo 106. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 11	208
Anexo 107. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 11	209
Anexo 108. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 11	209
Anexo 109. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 11	210
Anexo 110. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 11	210
Anexo 111. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 11	211
Anexo 112. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 11	211
Anexo 113. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 11	212
Anexo 114. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 11	212
Anexo 115. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 11	213
Anexo 116. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	213
Anexo 117. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	214
Anexo 118. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	214
Anexo 119. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	215
Anexo 120. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	215
Anexo 121. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	216
Anexo 122. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	216
Anexo 123. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	217
Anexo 124. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	217
Anexo 125. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 11	218
Anexo 126. Espectro de RMN de ^1H da substância 12	218
Anexo 127. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 12	219
Anexo 128. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12	219
Anexo 129. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12	220
Anexo 130. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12	220
Anexo 131. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12	221
Anexo 132. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 12	221
Anexo 133. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 12	222
Anexo 134. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 12	222

Anexo 135. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	223
Anexo 136. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	223
Anexo 137. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	224
Anexo 138. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	224
Anexo 139. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	225
Anexo 140. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12 .	225
Anexo 141. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	226
Anexo 142. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	226
Anexo 143. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	227
Anexo 144. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	227
Anexo 145. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	228
Anexo 146. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12 .	228
Anexo 147. Espectro de RMN de ^1H da substância 13 .	229
Anexo 148. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 13 .	229
Anexo 149. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 13 .	230
Anexo 150. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 13 .	230
Anexo 151. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 13 .	231
Anexo 152. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 13 .	231
Anexo 153. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 13 .	232
Anexo 154. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 13 .	232
Anexo 155. Espectro de RMN de ^1H da substância 14 .	233
Anexo 156. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 14 .	233
Anexo 157. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 14 .	234
Anexo 158. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 .	234
Anexo 159. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 .	235
Anexo 160. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 .	235
Anexo 161. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 .	236
Anexo 162. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 14 .	236
Anexo 163. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 14 .	237
Anexo 164. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 14 .	237
Anexo 165. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 14 .	238
Anexo 166. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 14 .	238
Anexo 167. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 14 .	239
Anexo 168. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14 .	239

Anexo 169. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14	240
Anexo 170. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14	240
Anexo 171. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14	241
Anexo 172. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14	241
Anexo 173. Espectro de RMN de ^1H da substância 17	242
Anexo 174. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 17	242
Anexo 175. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 17	243
Anexo 176. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 17	243
Anexo 177. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 17	244
Anexo 178. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17	244
Anexo 179. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17	245
Anexo 180. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17	245
Anexo 181. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17	246
Anexo 182. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17	246
Anexo 183. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17	247
Anexo 184. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17	247
Anexo 185. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	248
Anexo 186. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	248
Anexo 187. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	249
Anexo 188. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	249
Anexo 189. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	250
Anexo 190. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17	250
Anexo 191. Espectro de RMN de ^1H da substância 18	251
Anexo 192. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 18	251
Anexo 193. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 18	252
Anexo 194. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 18	252
Anexo 195. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 18	253
Anexo 196. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 18	253
Anexo 197. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 18	254
Anexo 198. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 18	254
Anexo 199. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 18	255
Anexo 200. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 18	255
Anexo 201. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 18	256
Anexo 202. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 18	256

Anexo 203. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	257
Anexo 204. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	257
Anexo 205. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	258
Anexo 206. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	258
Anexo 207. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	259
Anexo 208. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	259
Anexo 209. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 18	260

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^T$ rotação óptica

λ comprimento de onda

δ_H deslocamento químico de hidrogênio

δ_C deslocamento químico de carbono

ACC enzima acetil CoA-carboxilase

ACQ ácido cafeoilquínico

AcOEt acetato de etila

AcOEt-FOL fração acetato de etila das folhas

AcOEt-FRU fração acetato de etila dos frutos

AcOEt-SIL fração acetato de etila submetida a CC-FN

ApCoQ ácido *p*- coumaroilquínico

BuOH-FOL fração *n*-butanólica das folhas

BuOH-FRU fração *n*-butanólica dos frutos

CC cromatografia em coluna

CCDC cromatografia em camada delgada comparativa

CC-FN cromatografia em coluna de fase normal

$CDCl_3$ clorofórmio deuterado

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-prep cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

CI chalcona isomerase

CI_{50} concentração inibitória mínima

CG cromatografia gasosa

CPG cromatografia de permeação em gel

CS chalcona sintetase

d dubleto

dd duplo dubleto

DAD detector com arranjo de diodos

DEPT *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*

DIC detector de ionização de chama

$DMSO-d_6$ dimetilsulfóxido deuterado

DPPH radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELL	extração líquido-líquido
EM	espectrometria de massa
EM2	espectrometria de massa de segunda-ordem
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>electrospray</i>
FR. HEX-FOL	fração hexânica das folhas
ETOH-FOL	extrato etanólico das folhas
ETOH-FRU	extrato etanólico dos frutos
gCOSY	<i>gradient Correlated Spectroscopy</i>
gHMBC	<i>gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
gHMQC	<i>gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
GSH	enzima glutationa peroxidase
GSSG	enzima glutationa redutase
GST	enzima glutationa <i>s</i> -transferase
<i>J</i>	constante de acoplamento
HA-FOL	fração hidroalcoólica das folhas
HA-FRU	fração hidroalcoólica dos frutos
HEX	hexano
HEX-FOL	extrato hexânico das folhas
HEX-FRU	extrato hexânico dos frutos
HOAc	ácido acético
HOMODEC	<i>homonuclear decoupling</i>
IV	infravermelho
IE	impacto eletrônico
<i>m</i>	multiplete
m	massa
m/z	relação massa/carga
MeOH	metanol
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NaOH	hidróxido de sódio
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

RMN de ^1H ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C ressonância magnética nuclear de carbono

s singleto

SPB-5 coluna capilar (5% fenil-metil-siloxano)

SPB-50 coluna capilar (50% fenil-metil-siloxano)

SNC Sistema Nervoso Central

SOD enzima superóxido dismutase

RR retenção relativa

ODS octadecilsilano

OMS Organização Mundial da Saúde

QR quinona redutase

t_r tempo de retenção

t tripleto

TMS tetrametilsilano

UV ultravioleta

UV-vis ultravioleta e visível

v volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 O ESTADO DA ARTE	30
1.2 A FAMÍLIA CLUSIACEAE	31
1.3 A ESPÉCIE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i>	32
1.4 BIFLAVONÓIDES	36
1.4.1 <i>Atropoisomerismo</i>	38
1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	39
1.6 BIFLAVONÓIDES COMO AGENTES ANTIOXIDANTES	41
1.7 AGENTES QUIMIOPREVENTIVOS	43
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	47
4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	48
4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	48
4.1.1 <i>Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)</i>	48
4.1.2 <i>Cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN)</i>	48
4.1.3 <i>Extração líquido-líquido (ELL)</i>	49
4.1.4 <i>Cromatografia de permeação em gel (CPG)</i>	49
4.1.5 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)</i>	49
4.1.6 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE-UV)</i>	49
4.1.7 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-UV-prep)</i>	50
4.1.8 <i>Cromatografia gasosa (CG)</i>	50
4.2 ESPECTROMETRIA	50
4.3 SOLVENTES	51
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	52
5.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	52
5.2 PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA PARA CLAE-DAD E UV	55
5.3 ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> (HEX-FOL)	55

5.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACOEt DAS FOLHAS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> (ACOEt-FOL)	56
5.5 ESTUDO QUÍMICO DA SUBFRAÇÃO ACOEt-FOL-14	56
5.6 ESTUDO QUÍMICO DAS SUBFRAÇÕES ACOEt-FOL-15 E 16	57
5.7 ESTUDO QUÍMICO DA SUBFRAÇÕES ACOEt-SIL-3 E 9	58
5.8 ESTUDO QUÍMICO DAS SUBFRAÇÕES ACOEt-SIL-4 E 5	59
5.9 ESTUDO QUÍMICO DA SUBFRAÇÃO ACOEt-SIL-11	59
5.10 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO BUOH DAS FOLHAS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> (BUOH-FOL)	60
5.11 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO ACOEt DOS FRUTOS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> (ACOEt -FRU)	61
5.12 IDENTIFICAÇÃO POR CLAE-DAD-EM DOS CONSTITUINTES DE FRAÇÕES SELECIONADAS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> -ANÁLISE POR DESREPLICAÇÃO	62
5.13 IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTERÓIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DE BAIXA POLARIDADE DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)	62
5.14 ENSAIOS ANTIOXIDANTES	63
5.14.1 Descoloração de β -caroteno	63
5.14.2 Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)	63
5.15 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA POLIMERIZAÇÃO DE HEME	63
5.16 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	64
5.17 ATIVIDADE TRIPANOCIDA	65
5.18 ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA	66
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1 ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE ABSORÇÃO	67
6.2 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS	69
6.2.1 Caracterização espectrométrica da substância 1	69
6.2.3 Caracterização espectrométrica da substância 3	74
6.2.4 Caracterização espectrométrica da substância 4	75
6.2.5 Caracterização espectrométrica da substância 5	79
6.2.6 Caracterização espectrométrica da substância 8	81
6.2.7 Caracterização espectrométrica da substância 9	87
6.2.8 Caracterização espectrométrica da substância 10	90

6.2.9 Caracterização espectrométrica da substância 11	93
6.2.10 Caracterização espectrométrica da substância 12	98
6.2.11 Caracterização espectrométrica da substância 13	102
6.2.12 Caracterização espectrométrica da substância 14	106
6.2.13 Caracterização espectrométrica das substâncias 17 e 18	109
6.3 A DESREPLICAÇÃO EM ESTUDOS DE BIOPROSPECÇÃO	115
6.3.1 Identificação por CLAE-UV-DAD-EM dos constituintes de <i>Garcinia xanthochymus</i>	116
6.4 IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTERÓIDES PRESENTES NOS EXTRATOS DE BAIXA POLARIDADE DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i> UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)	131
6.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>GARCINIA XANTHOCHYMUS</i>	134
6.5.1 Atividade antioxidante	134
6.5.2 Ensaio <i>in vitro</i> da polimerização de heme	135
6.5.3 Atividade antifúngica	137
6.5.4 Atividade tripanocida	138
6.5.5 Atividade quimiopreventiva	139
7 CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS	144
ANEXOS	155

1 INTRODUÇÃO

1.1 O estado da arte

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

Os trabalhos de isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal tiveram início entre os séculos XVIII e XIX. Com o aparecimento da química combinatória na década de 80 e as triagens em alta escala, que são os paradigmas tecnológicos de desenvolvimento da química medicinal moderna ou atual, os departamentos de produtos naturais das grandes empresas farmacêuticas foram eliminados ou transferidos para empresas menores (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007). No entanto, nestes últimos 10 anos, mudanças importantes vêm sendo observadas no rumo da pesquisa por fármacos novos devido aos avanços da biologia molecular, mapeamento genético, bioensaios automatizados e quimiogenômica. Esses eventos têm levado a indústria farmacêutica a repensar sua maneira de investimento na busca por fármacos de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A descoberta dos alcalóides morfina, cocaína e quinina, entre tantas substâncias isoladas de plantas e utilizadas como medicamentos até os dias atuais, não deixam dúvidas quanto à importância das plantas, principalmente, de uso tradicional (PINTO et al., 2002).

Com a descoberta dos antibióticos e antiolesterolêmicos a partir de microrganismos, dos benefícios divulgados pela Organização Mundial de Saúde na década de 70 sobre a eficácia da medicina chinesa e da descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), podofilotoxina e análogos (VP-16-213; Vepeside[®]), Teniposídeo (VM-26; Vulmon[®]) e taxol (plaxitaxel; taxol[®]) a procura pelos produtos naturais como modelos para agentes terapêuticos voltou a ser um tema recorrente da indústria farmacêutica (KIRBY, 1996).

Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003). No caso dos agentes antitumorais e antibióticos, por exemplo, esse percentual atingiu aproximadamente 60% e 75%, respectivamente (NEWMAN; CRAGG, 2007). As estatinas foram responsáveis por um

mercado de US\$ 19 bilhões em 2002 e a OMS estima que as vendas totais de ervas medicinais alcançaram um lucro de US\$ 400 milhões no Brasil em 2001 (SOYAMA, 2007), mostrando o forte impacto desses medicamentos no mercado mundial.

Diante destes dados, países como o Brasil, que detém grande parte da biodiversidade mundial, poderão usufruir deste patrimônio se esforços forem dirigidos para a pesquisa colaborativa na descoberta por fármacos potenciais desta biodiversidade (GREENWOOD; MUTABINGWA, 2002).

Nos últimos anos, o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do IQ-UNESP, Araraquara) vem concentrando esforços na busca por substâncias com atividades antitumoral, antifúngica, antimalárica e antioxidante, caracterizando uma pesquisa de bioprospecção multifocal. Várias espécies coletadas nos biomas do Estado de São Paulo foram selecionadas devido a alguma bioatividade apresentada na triagem preliminar, agregando valor à extratoteca, já bastante representativa com mais de 1800 extratos. Dentre as espécies selecionadas, *Garcinia xanthochymus* demonstrou especial interesse por conter substâncias fenólicas com potencial antitumoral e antioxidante. Além disso, ocorrem neste gênero substâncias da classe das xantonas, conhecidas por sua atividade antimalárica (CHANMAHASATHIEN et al., 2003a).

1.2 A família Clusiaceae

A família Clusiaceae compreende cerca de 50 gêneros e 1200 espécies de ocorrência exclusiva nas regiões tropicais. A maioria dos representantes desta família são árvores, arbustos ou ervas sendo raramente epífitas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Alguns gêneros e espécies são endêmicos de certas áreas, por exemplo, o gênero *Symphonia* L. e *Pentadesma* sabine são encontradas unicamente na África (SULTANBAWA, 1980). No Brasil, há 21 gêneros e 183 espécies distribuídas na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (CRUZ et al., 1998). Os gêneros são distribuídos em três subfamílias, destacando-se inúmeros com importância medicinal no Brasil, como *Hypericum* e *Vismia* (Hypericoideae), *Clusia*, *Calophyllum* e *Garcinia* (Calophylloideae) e *Kielmeyera* (Bonnetioideae). Destacam-se nesses gêneros importantes espécies econômicas para a produção de madeiras, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O estudo da constituição química dos troncos de várias espécies de Clusiaceae brasileiras mostrou, além dos triterpenóides comuns, xantonas como constituintes predominantes (GOTTLIEB; RAMAIAH; LAVIE, 1985).

A família Clusiaceae apresenta um número de xantonas comparáveis com as da família Gentianaceae e se destaca por apresentar mais da metade dessas xantonas substituídas por isoprenóides (SIMÕES et al., 2002; PANTHONG, et al., 2006; ZHONG; CHEN; YANG, 2008).

1.3 A espécie *Garcinia xanthochymus*

O gênero *Garcinia* pertence à família Clusiaceae, sinonímia de Guttiferae, e contém cerca de 200 espécies confinadas nos trópicos como árvores ou arbustos, raramente epífitas, das quais 21 espécies encontram-se na China (ZHONG; CHEN; YANG, 2008). No Brasil é nativa a espécie *Garcinia brasiliensis* conhecida como Bacupari, encontrada na Mata Atlântica e Amazônia, porém ocorrem outras espécies como *Garcinia gardneriana* e *Garcinia xanthochymus*.

A espécie *Garcinia xanthochymus* (**Figura 1**) comumente conhecida como Gamboja, é uma árvore nativa da Índia com aproximadamente 8-10 metros. As árvores possuem folhas verdes escuras e sua fruta é amarela com polpa succulenta ácida, possui diâmetro de 6-7 cm, duas sementes e é utilizada extensamente na medicina popular como antidiarréica. A Gamboja é usada como pigmento para aquarela e como corante amarelo de tecidos. O fruto acidificado é utilizado em geléias, conservas e vinagres (BAGGETT et al., 2005).

Revisão bibliográfica sobre o estudo fitoquímico das folhas, frutos, cascas e caules de *Garcinia xanthochymus* (**Tabela 1**) revelou a presença principalmente de benzofenonas, flavonóides, biflavonóides, triterpenos e xantonas (**Figura 2**), as quais possuem atividade analgésica, antibacteriana, antioxidante, antiviral e antitumoral.

Figura 1 - Foto de diferentes partes de *Garcinia xanthochymus*.

Benzofenonas

Biflavonoides

Flavonoides

Triterpenos

Derivados do floroglucinol

Xantonas

Figura 2 - Algumas classes de substâncias isoladas da espécie de *Garcinia xanthochymus*.

Tabela 1 - Substâncias isoladas de *Garcinia xanthochymus* e bioatividades relatadas nas referências citadas.

<i>Classe</i>	<i>Substância</i>	<i>bioatividade</i>	<i>órgão</i>	<i>Referência</i>
<i>benzofenona</i>	aristofenona A	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	cicloxantochimol	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	isoxantochimol	-	frutos	BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981; BAGGETT et al., 2005; KARANJGOAKAR, et al., 1973
	gambogenona	antitumoral, antioxidante	frutos	BAGGETT et al., 2005
	gutiferona E	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	gutiferona H	antitumoral, antioxidante	frutos	BAGGETT et al., 2005
	maclurina	-	frutos	BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981; TANDON et al., 1980; BAGGETT et al., 2005
	xantochimol	antimicrobial	frutos	KARANJGOAKAR et al., 1973; RAMA RAO; VENKATSWAMY; YEMUL, 1980
<i>biflavonóide</i>	agatisflavona	-	folhas	PARVEEN et al., 1994
	amentoflavona	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	I3,II8-biapigenina	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	(±)-fukugisídeo	-	frutos	KONOSHIMA et al., 1970; BAGGETT et al., 2005
	(±)-fukugetina	-	frutos	KONOSHIMA et al., 1970; BAGGETT et al., 2005
	7-O-metilamentoflavona	-	folhas	PARVEEN et al., 1994
	volkensiflavona	-	frutos	KONOSHIMA et al., 1970; BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981; BAGGETT et al., 2005
	xantochimusídeo	-	caules	KONOSHIMA et al., 1970
	GB1	-	frutos	BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981
	GB1a	-	frutos	KONOSHIMA et al., 1970; BASLAS; KUMAR, 1979
	GB2	-	caules	KONOSHIMA et al., 1970
	GB2a	-	caules	KONOSHIMA et al., 1970
<i>bis-xantona</i>	bigarcinenona A	antioxidante	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
<i>éster</i>	tereftalato de dimetila	-	folhas	SINGH et al., 1991
<i>flavonóide</i>	6-prenilapigenina	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
	vitexina	-	folhas	PARVEEN et al., 1994
<i>Derivado do floroglucinol</i>	garcinenona F	antioxidante	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
<i>Terpeno</i>	betulina	-	folhas	SINGH et al., 1991
	canofilol	-	folhas	SINGH et al., 1991
	friedelina	-	folhas	SINGH et al., 1991
	β-sitosterol	-	folhas	SINGH et al., 1991

<i>xantona</i>	alloathyriol	-	frutos	BAGGETT et al., 2005
	1,3,5,6-tetrahidroxi-4,7,8-triprenilxantona	Regenerativa de nervos	caule	CHANMAHASATHIEN et al., 2003a
	garcinexantona A	-	cascas	CHEN et al., 2008
	garcinexantona B	-	cascas	CHEN et al., 2008
	garcinexantona C	-	cascas	CHEN et al., 2008
	garcinexantona D	-	cascas	CHEN et al., 2008
	garcinexantona E	-	cascas	CHEN et al., 2008
	garcinixantona E	Regenerativa de nervos, antitumoral	caule	CHANMAHASATHIEN et al., 2003a; HAN et al., 2007
	12b-hidroxi-des-d-garcigerrina	Regenerativa de nervos	caule	CHANMAHASATHIEN et al., 2003b
	5-hidroxi-1,2-dimetoxixantona	-	cascas	ZHONG et al., 2008
	5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,5-dihidroxixantona	-	frutos	BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981
	1,4,5,6-tetrahidroxi-7-prenilxantona	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
	1,4,5,6-tetrahidroxi-7,8-diprenilxantona	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
	1,3,5,6-tetrahidroxi-4,7,8-triprenilxantona	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
	1,7-dihidroxixantona	-	frutos	BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981
	1,5-dihidroxi-3-metoxixantona	antioxidante	cascas	CHENG et al., 2008
	1,2-dihidroxi-5,6-dimetoxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,6-dihidroxi-4,5-dimetoxixantona	-	cascas	ZHONG et al., 2007
	2,5-dihidroxi-1-metoxixantona	antioxidante	cascas	CHENG et al., 2008
	1,2,5-trihidroxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,3,7-trihidroxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,4,5-trihidroxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,2,7-trihidroxi-4-(1,1-dimetilalil)xantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,5,6-trihidroxi-7,8-di(3-metil-2-butenil)-6',6'-dimetilpirano(2',3':3,4)xantona	-	cascas	ZHONG et al., 2007
	1,4,6-trihidroxi-5-metoxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,3,7-trihidroxi-5-metoxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,2,5-trihidroxi-6-metoxixantona	-	cascas	ZHONG; CHEN; YANG, 2008
	1,2,6-trihidroxi-5-metoxi-7-(3-metil-2-butenil)xantona	Regenerativa de nervos	caule	CHANMAHASATHIEN et al., 2003b

1,4,6-trihidroxi-5-metoxi-7-prenilxantona	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
1,2,5,6-tetrahidroxi-7-geranilxantona	antitumoral	cascas	HAN et al., 2007
1,4,5,6-tetrahidroxi-7,8-di(3-metil-2-butenil)xantona	Regenerativa de nervos	caule	CHANMAHASATHIEN et al., 2003b

1.4 Biflavonóides

Os flavonóides figuram entre as classes de substâncias químicas de maior ocorrência botânica, sendo contabilizados em números superiores a seis mil exemplares (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). São derivados de benzo- α -pirona com a maioria de seus representantes formados por 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental.

A biossíntese dos flavonóides (**Figura 3**) apresenta a singularidade de seus anéis aromáticos serem formados por rotas metabólicas distintas. Sua porção fenil-propanoídica (anel B + C₂,C₃,C₄) é derivada do ácido *p*-cumárico formado pela via do chiquimato. Por outro lado, o anel A é formado basicamente pela condensação de unidades de acetato, pela via dos policetídeos, que se inicia com a formação de malonil CoA a partir de acetil CoA mediante a enzima acetil CoA-carboxilase (ACC). A biossíntese geral dos flavonóides tem como intermediário central o tio-éster *p*-cumaril-CoA, que será alongado pela condensação de três unidades de malonil-CoA, catalisado pela enzima chalcona sintetase (CS). A ciclização resulta na formação do anel A e produz a chalcona, que em condições fisiológicas, tende espontaneamente à flavona racêmica.

É relatado também que a ciclização da chalcona é catalisada pela enzima chalcona isomerase (CI), que induz o fechamento estereoespecífico do anel (adição *syn* sobre a dupla ligação *E*) formando exclusivamente a 2-(*S*)-flavanona. Os outros tipos de flavonóides são formados por subseqüentes etapas de óxi-redução deste intermediário comum (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; XIE e DIXON, 2005).

Os biflavonóides se caracterizam pela união covalente das unidades monoméricas dos flavonóides (**Figura 4**). Essas unidades podem ser semelhantes ou possuírem diferentes tipos estruturais e se diferenciam de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades constituintes (SUZART et al., 2007).

As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros. Raramente ocorre alteração no padrão de oxigenação dos precursores, sendo garantida a oxigenação em 5, 7 e 4'. Adicionalmente, podem ocorrer

oxidações nas posições 6, 8 ou 3' e quando isso acontece é, normalmente proveniente da outra unidade ligada nessa posição via ligação C-O-C (SUZART et al., 2007).

Figura 3 - Esquema geral da rota biossintética de flavonóides (ACC-acetil CoA-carboxilase, CS-chalcona sintetase e CI-chalcona isomerase).

Figura 4 - Estrutura de biflavonóides tipo flavona-flavona.

Estima-se que a quantidade de biflavonóides seja superior a duzentas substâncias, dispersas principalmente entre as plantas gimnospermas e angiospermas, das quais se destacam as famílias Clusiaceae, Ochnaceae e Anacardiaceae.

Os biflavonóides, quando comparados aos seus monômeros, frequentemente apresentam maior atividade, como por exemplo, em doenças espasmódicas (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

A biflavanona 7,7''-di-*O*-metiltetraidroamentoflavona isolada das folhas de *Rhus retinorrhoea* apresentou moderada atividade frente às cepas W2 e D6 de *P. falciparum* com valores de CI_{50} de 0,98 e 2,80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (AHMED et al., 2001). O fracionamento do extrato *n*-BuOH da raiz de *Wikstroemia indica* permitiu o isolamento de sikokianina B e sikokianina C com valores de CI_{50} de 0,54 e 0,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, frente à cepa cloroquina-resistente K1 de *P. falciparum* (NUNOME et al., 2004). Alguns biflavonóides apresentaram atividade antifúngica, como a amentoflavona, 6,6''-bigenquanina e 7,7''-dimetoxiagastisflavona que inibiu a produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* (GONCALEZ; FELICIO; PINTO, 2001). Atividades antivirais foram determinadas para os compostos amentoflavona, agatisflavona, rhusflavanona e robustaflavona, em ensaios frente aos vírus *Myxovirus influenzae* (gripe), *Herpes simplex* (LIN et al., 1999) e HIV (LIN et al., 1997). O potencial antineoplásico de alguns biflavonóides e análogos já foi avaliado com sucesso, em testes de citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais (CHEN; DUH; CHEN, 2005), (LIN; KUO; CHOU, 2000), (SILVA et al., 1995), (LIN; CHEN; LEE, 1989) e mediante ensaios de inibição da enzima DNA topoisomerase (GRYNBERG et al., 2002). As biflavonas 6→6''-begenquanina e 7,7''-*O*-dimetilagatisflavona isoladas de *Ouratea spectabilis* apresentaram atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino. O aumento da atividade dessa enzima está relacionado com a patogênese da maioria das complicações da diabetes, como cataratas, retinopatia, neuropatia (FELÍCIO et al., 1995).

1.4.1 Atropoisomerismo

O fenômeno conhecido como atropoisomerismo, denominação oriunda da palavra grega *atropos* (sem rotação), é atribuído a um tipo de estereoisomerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, produzindo uma barreira energética suficientemente elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros, chamados atropoisômeros (FRAGA, et

al., 2007). O atropoisomerismo ocorre quando os isômeros são separáveis com meia-vida de pelo menos 1000 s (16,7 min), não depende do valor da barreira energética de interconversão e é variável com a temperatura (CANUTO, 2007).

A complexidade dos espectros de um biflavonóide, em que se observa duplicação e pareamento de sinais, é explicada pela atropoisomeria e ocorre frequentemente em estruturas cujas unidades estão interligadas através dos carbonos C-3→C-8''.

Li et al. (2002) mostrou que um experimento de RMN ^1H com os biflavonóides ($\pm$)-morelloflavona, ($\pm$)-morelloflavona-7-sulfato e ($\pm$)-volkensiflavona-7-sulfato, isolados de *Rheedia acuminata*, realizado sob aquecimento de 80°C simplifica o espectro devido a alta energia da rotação, resultando assim, no desaparecimento das linhas espectrais duplicadas. À temperatura ambiente (25°C) foram observados sinais pareados referente à mistura de rotâmeros (**1a** e **1b**) em razão da lenta interconversão causada pela elevada barreira energética. Entretanto, em temperaturas superiores (80 °C) observa-se que os sinais duplos tendem a aproximar-se (alargamento dos picos), coalescem (pico único alargado) e por último obtem-se um sinal simples cuja absorção corresponde a uma frequência central às duas existentes anteriormente. Isto acontece porque o aquecimento acelera a velocidade de interconversão, fazendo com que seja superada mais facilmente a barreira energética, favorecendo a formação exclusiva de um dos confôrmeros (**Figura 5**).

1.5 Atividade antioxidante

Doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC) como Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson estão associadas em parte com os efeitos deletérios que o desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes, decorrente da produção descontrolada de radicais livres, pode provocar nos sistemas biológicos.

A geração de radicais livres ocorre normalmente durante o metabolismo. Em condições fisiológicas, de todo o oxigênio molecular captado nas mitocôndrias e processado na cadeia respiratória, só 1 a 5% escapam e formam oxirradicais. Porém, esta mínima porcentagem é suficiente para dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Vale notar que nem todas as espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete não possuem elétrons desemparelhados, e sua reatividade é atribuída ao fato de seus elétrons de valência estarem situados em orbitais mais distantes do núcleo, o que leva o

átomo a um estado químico altamente reativo, com características diradicalares (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

Figura 5 - Experimento de RMN ^1H para a ($\pm$)-morelloflavona (Li et al., 2002) em temperaturas variáveis. O sinal **1a** representa o confôrmero principal e **1b** o confôrmero minoritário.

A produção dessas espécies de maneira desordenada provoca danos oxidativos em macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, alterando suas propriedades, estruturas e as funções das membranas celulares e do material genético (POTTERAT, 1997).

Na tentativa de minimizar os efeitos danosos dos radicais livres, organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos de proteção antioxidante (**Figura 6**) que envolvem sistemas enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH) e sistemas antioxidantes compostos por micromoléculas como o ácido

ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e flavonóides, entre outros (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Embora o organismo tenha capacidade de prevenir reações indesejáveis e reparar moléculas e tecidos danificados, estes mecanismos de defesa não são suficientemente abrangentes para reparar todos os danos causados por tais reações, ocorrendo o acúmulo de substâncias prejudiciais ao nosso corpo. Esta situação de desequilíbrio entre a formação de espécie com poder oxidante e a sua destruição denomina-se *estresse oxidativo* e pode conduzir a um metabolismo anormal, disfunção celular, à perda de funções fisiológicas, a doenças e à morte.

Trabalhos sobre medicina preventiva mostram que as substâncias fenólicas são os antioxidantes naturais mais eficientes e enfatizam a importância da descoberta de novas substâncias que possam ser incluídas na dieta alimentar, visando à manutenção do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante corporal, evitando assim o *estresse oxidativo* (RICE-EVANS; MILEER; PAGANGA, 1996).

1.6 Biflavonóides como agentes antioxidantes

Os flavonóides/biflavonóides têm sido objeto de considerável interesse científico principalmente pela sua potencial ação antioxidante. De um modo geral, estes possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E em determinadas situações. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: estabilidade do radical flavonoil formado, reatividade como agente doador de H[•] e elétrons, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é a sua atividade como sequestrador de radicais livres.

Figura 6 - Representação do equilíbrio entre as EROs e as defesas antioxidantes do nosso organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Quanto maior o número de hidroxilas, maior atividade como agente doador de H radicalar e de elétrons (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; YANG et al., 2001). Flavonóides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa, por exemplo, a 5-hidroxi-flavona tem atividade abaixo dos limites de detecção. Entre os flavonóides diidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o grupo catecol (3', 4' -diidroxil) no anel B. Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a miricetina, quercetina, luteolina, e taxifolina possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathione, ácido úrico e bilirrubina (YANG et al., 2001).

A estabilidade do radical livre flavonoil formado depende da habilidade em deslocalizar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas em *orto* e a insaturação em C2-C3 são os principais fatores que auxiliam nessa deslocalização. Os flavonóides, devido ao seu caráter fracamente ácido e à extensa conjugação, encontram-se, em geral, parcialmente ionizados, o que aumenta a estabilidade do radical formado na posição C-4 e favorece a deslocalização do elétron desemparelhado do radical formado entre os anéis A, B e C.

A remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que esses catalisam as reações de Fenton (1) e de Haber-Weiss (2), produtoras de EROs. Para a atividade de quelação de metais é fundamental a presença de grupos *orto*-dioxigenados, onde o mais comum é o sistema 3', 4'-diidroxil, unidade catecol em B e/ou estruturas cetol com 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5-

hidroxi. A substituição de qualquer uma das hidroxilas envolvidas na quelação de metais reduz essa atividade devida ao impedimento estérico provocado.

Outro fator importante que influencia a atividade antioxidante é a sua interação com as biomembranas. A lipofilicidade do flavonóide indica a incorporação deste pela membrana, que é alvo da grande parte dos radicais livres. Assim deve haver uma concentração mínima do flavonóide por ácido graxo, de modo a assegurar a presença de suas moléculas próximas aos sítios preferências de ataque do radical (VAN ACKEL et al., 1996). Flavonóides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonóides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico pra a difusão dos radicais livres, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo.

Os biflavonóides apresentam significativa atividade antioxidante como a amentoflavona que é capaz de proteger membranas lipossômicas contra a degradação peroxidativa causada pelos raios UV (YAMAGUCHI et al., 2005). Recentemente, o biflavonóide morelloflavona mostrou-se ativo frente à inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (HUTADILOCK-TOWATANA; KONGKACHUAY; MAHABUSARAKAM, 2007) e alguns biflavonóides como amentoflavona e hinokiflavona mostraram efeitos de proteção em estudos de morte celular induzida por *estresse oxidativo* com H_2O_2 (KANG et al., 2005).

1.7 Agentes quimiopreventivos

A quimioprevenção pode ser entendida como o uso de substâncias químicas a fim de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (WATTENBERG, 1985). Muitas substâncias quimiopreventivas potenciais estão presentes na dieta como polifenóis, isoflavonas, curcumina, fenetil isoiocianato, sulforafano, licopeno, ácidos salicílicos, cafeína entre outras. Tais substâncias tem-se mostrado grande aliadas no tratamento dos

linfomas, dos tumores da infância e das neoplasias de células germinativas (KELLOFF et al., 2000; CHUANG et al., 2000).

Os elementos quimiopreventivos podem ser classificados em dois grupos de acordo com a etapa da carcinogênese química sobre a qual são eficazes. O primeiro grupo é composto por agentes bloqueadores, representados por compostos capazes de modular os processos de absorção intestinal, biotransformação e bioativação microssomal, excreção renal e interação com o material genético de substâncias cancerígenas. O segundo grupo de quimiopreventivos é composto por agentes supressores que interferem em alguns eventos celulares críticos à promoção e progressão da carcinogênese, prevenindo a evolução da malignização celular (WATTENBERG, 1985).

Algumas das estratégias para a proteção de células dos eventos iniciais da formação de tumores incluem a inibição de enzimas metabólicas responsáveis pela geração de espécies reativas (enzimas de fase I), ao passo que enzimas da fase II são estimuladas, promovendo a desativação de radicais e eletrófilos envolvidos nos processos celulares normais. Os agentes responsáveis por este acontecimento são denominados “indutores bifuncionais”, onde os carcinógenos poderiam induzir a uma proteção contra seu próprio efeito tóxico. Além destes, existem os “indutores monofuncionais”, que somente induzem enzimas de fase II seletivamente e ativam elementos de resposta antioxidante (CUENDET et al., 2006).

A redução de quinonas eletrofílicas pela quinona redutase se constitui numa via importante de detoxificação e o seu grau de atividade pode ser inferido através da indução em células da linhagem de hepatocarcinoma murino-Hepa 1c1c7. A indução de enzimas da fase II pode proteger os sistemas biológicos contra espécies químicas tóxicas e reativas, e estudos recentes demonstram que a elevação dessas enzimas, como a NADPH: quinona-redutase e GST (Glutathione *S*-transferase) estão correlacionadas com a proteção celular nos estágios iniciais e intermediários contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais (WATTENBERG, 1985; SONG et al., 1999; CUENDET et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A obtenção de substâncias bioativas a partir de fontes naturais sofreu interesse renovado nos últimos anos, apesar do avanço acentuado de tecnologias competitivas como a química combinatória, análise de proteoma e metaboloma e a engenharia molecular (ROUHI, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007). A obtenção de moléculas de esqueleto inédito ou com atividades biológicas marcantes e/ou novos mecanismos de ação age como força matriz para esforços intensos e contínuos em atividades de bioprospecção e justificam os grandes investimentos realizados em escala mundial na busca por protótipos moleculares para o desenvolvimento de fármacos (CORDELL, 2000; YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007).

O Brasil, com sua enorme biodiversidade apresenta motivos adicionais para intensificar essas atividades já que o conhecimento científico dos remanescentes da nossa flora podem despertar a consciência sobre as consequências da degradação dos nossos ecossistemas, com a perda de espécies desconhecidas ou não investigadas e consequentemente, de substâncias potencialmente úteis. Os projetos em andamento no NuBBE visando à conservação e uso sustentável da diversidade vegetal no Estado de São Paulo através de estudos sobre diversidade química e busca de drogas potenciais, incluem as atividades de bioprospecção e fazem parte da estratégia de exploração racional de nossa biodiversidade.

As substâncias presentes nos extratos vegetais pertencem a variadas classes de produtos naturais e podem apresentar atividades biológicas marcantes. A vasta gama de patologias decorrentes do *estresse oxidativo* permite uma abordagem que usa a detecção e avaliação das propriedades antioxidantes de extratos vegetais como etapa preliminar e indicativa de outros tipos de bioatividades. Assim, a detecção de atividade citotóxica seletiva para determinadas linhagens de células tumorais, por exemplo, através de mecanismos de apoptose e, no caso de plantas usadas por suas propriedades antiinflamatórias, os antioxidantes podem agir como redutores de *estresse oxidativo* que ocorre nas células sob ação dos mediadores químicos pró-inflamatórios.

Outras patologias associadas ao *estresse oxidativo*, como o câncer, podem ser evitados com o uso de agentes quimiopreventivos, ou seja, extratos vegetais, frações semipurificadas ou substâncias isoladas que associam as propriedades antioxidantes com efeitos biológicos de indução sobre enzimas destoxificantes do organismo, por exemplo, a

quinona redutase. Fica evidente, portanto, a complementariedade das informações obtidas na busca por substâncias naturais com atividade antioxidante, citotóxica e indutora de quinona redutase, justificando esta abordagem.

3 OBJETIVOS

(A) Isolamento e determinação estrutural de substâncias dos frutos e folhas de *Garcinia xanthochymus*;

(B) Avaliação do potencial de bioatividade dos extratos brutos, frações semipurificadas e substâncias isoladas empregando ensaios para atividade antioxidante, indutora de quinona redutase, antifúngica, antimalárica e tripanocida.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1 Métodos cromatográficos

4.1.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As cromatoplasmas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF254, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (m:v) sobre placas de vidro, obtendo-se 25 mm de espessura de adsorvente através da utilização de espalhador Quickfitt[®]. Após a preparação das cromatoplasmas, estas foram ativadas em estufa por 30 minutos.

Revelação das cromatoplasmas: cada cromatoplasma foi revelada por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

(A) Inspeção em luz ultravioleta: as cromatoplasmas foram expostas a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

(B) Solução de anisaldeído: aproximadamente 5,0 ml de solução de anisaldeído (0,5 ml de anisaldeído + 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado + 85,0 ml de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada a 8°C. Para a revelação de cromatoplasmas, borrifaram-se pequenas alíquotas e então, estas foram colocadas em estufas a 120°C.

(C) Solução de β -caroteno: Preparou-se uma solução de 0,02% de β -caroteno (Aldrich[®]) em metanol. Após a nebulização das cromatoplasmas, essas foram expostas ao ar e luz natural, por cerca de 6 horas, a fim de catalisar a oxidação do β -caroteno.

4.1.2 Cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN)

Para cromatografia em coluna de fase normal foi utilizado como fase estacionária sílica-gel 60-230 μ (Merck). O empacotamento da coluna se deu 24 horas antes do início da eluição.

4.1.3 Extração líquido-líquido (ELL)

As amostras submetidas à ELL foram seletivamente separadas entre dois solventes imiscíveis. Para obter a mistura binária, empregaram-se os seguintes solventes: AcOEt, *n*-BuOH e solução hidroalcoólica de MeOH:H₂O otimizadas na proporção 6:4.

4.1.4 Cromatografia de permeação em gel (CPG)

Buscou-se por meio dessa técnica a separação de substâncias através dos seus diferentes tamanhos moleculares, empregando LH-20 (Sephadex[®]) como suporte cromatográfico. Tal suporte foi mantido na fase eluente cerca de 48 horas antes do início da coluna para que o gel adquirisse porosidade homogênea.

4.1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Para o delineamento do perfil cromatográfico dos extratos, frações e sufrações empregou-se um cromatógrafo líquido Varian, Pro star 240[®], detector de arranjo de diodos UV-VIS modelo Pro star 330, injetor automático modelo 410, e aquisição de dados via computador tipo Pentium III 550 MHz, utilizando software *Star Chromatography Workstation*, versão 5.31, e PV 2000 (tratamento de dados espectrais de ultravioleta).

4.1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE-UV)

Utilizou-se um Cromatógrafo líquido Varian, modelo Pro star 230, injetor manual Rheodyne 7725, com detector UV-VIS modelo 310 e aquisição de dados via computador tipo Pentium II 300 MHz utilizando software Varian *Star Chromatography Workstation*, versão 5.31.

4.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-UV-prep)

Utilizou-se um Cromatógrafo líquido Varian, modelo Pro star SD1, injetor manual Rheodyne 7725, com detector UV-VIS modelo 320 e aquisição de dados via computador tipo Pentium III 550 MHz utilizando software Varian *Star Chromatography Workstation*, versão 5.31.

4.1.8 Cromatografia gasosa (CG)

Utilizou-se um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP-3800, com injetor ajustado a temperatura de 260°C e detector de ionização em chama a 310°C para SPB-5 (5% fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e 290°C para SPB-50 (50% fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O volume injetado foi 2 µL, a temperatura da coluna SPB-50 foi de 280°C (isoterma) e a temperatura da coluna SPB-5 foi inicialmente de 250°C, mantida por 12 min, seguido por um aumento de temperatura de 6°C.min⁻¹ até 280°C. As retenções relativas (RR) de triterpenos e esteróis foram comparados com as RR de padrões (CREVELIN et al., 2006) utilizando colesterol como padrão interno.

4.2 Espectrometria

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais. Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros Bruker AC 200[®], operando a 200 MHz na frequência do hidrogênio e a 50 MHz na frequência do carbono e/ou em espectrômetro Varian Inova 500[®], operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono. Os espectros dinâmicos de RMN foram feitos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFSCar), sob orientação do prof^o Antonio Gilberto Ferreira.

Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica (UNESP- Araraquara), sob supervisão do Prof^o Vagner Wilegas. Utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu FT-IR 8300.

As análises em CLAE-EM e CLAE-EM/EM foram realizadas na USP-RP em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo Class Vp 20 equipado com duas bombas de solvente (LC-20AD), detector por arranjo de diodos (SPD-M20A) e

sistema controlador (CBM-20A). Este cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica, MA), modelo UltroTOF-Q, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador por tempo de voo, operando nos modos negativo e positivo. As amostras foram injetadas utilizando-se um injetor Rheodyne, modelo 7125 equipado com um loop de 20 μL . Como calibração interna foi usada uma solução de NA-TFA a 10 mg.mL^{-1} .

Para os espectros de CG-EM utilizou-se um cromatógrafo da marca Shimadzu CG 17 A, EM DP5050A, IE: + 70 eV (fixo), coluna DB-1 (30m x 0,25 mm), filme 0,1 mm, injeção 1 mL (split 1:20), temperatura do injetor: 280°C, temperatura interface: 300°C, gás de arraste He e temperaturas programadas: 50°C (3 min), aquece a 2°C.min⁻¹ até chegar a 290°C, onde permanece por 20 min.

A rotação óptica ($[\alpha]_D$) foi obtida em um polarímetro Polamat A Carl Zeiss Jena na temperatura de 26°C.

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas em um cromatógrafo da marca Jasco, bomba modelo PU-2089, acoplado a um detector de dicroísmo circular (CD-2095) e injetor automático AS-2055. A coluna utilizada foi ODS da marca Phenomenex (25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm) com fase móvel de MeOH:H₂O:HOAc (55:44,5:0,5) e vazão de 1,0 mL/min.

Ambas as medidas ($[\alpha]_D$ e dicroísmo circular) foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da UNESP de Araraquara.

4.3 Solventes

Como solvente para o preparo de amostras (análises de RMN) foi utilizado DMSO-*d*₆ e CDCl₃ e, como referência interna TMS, para os experimentos de RMN de ¹³C e ¹H. Os solventes utilizados na extração foram destilados no laboratório e no processo final de isolamento os solventes foram da marca JT Baker[®].

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Coleta do material botânico e preparação dos extratos e frações

Os frutos e folhas de *Garcinia xanthochymus* foram coletados no Campus da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP)-Jaboticabal em maio de 2008, sendo identificados pelo Pro^º Antonio Baldo G. Martins. As folhas foram secas em estufa a 40°C e em seguida pulverizadas em moinho de facas. Já os frutos foram triturados com etanol a temperatura ambiente. Os produtos obtidos foram submetidos ao processo de extração por maceração em *n*-hexano (3x), com posterior remaceração em etanol (3x), fornecendo as soluções hexânica e etanólica. Essas soluções foram evaporadas a pressão reduzida e forneceram os extratos hexânicos (HEX) e etanólico (ETOH), respectivamente. O extrato etanólico foi solubilizado em uma mistura de água:metanol (6:4) e então submetido à extração líquido-líquido (ELL), empregando *n*-hexano, AcOEt e *n*-BuOH como contra-fase (**Figura 7** e **Figura 8**).

Todos os extratos e/ou frações oriundas da ELL foram analisados por ensaios em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), nebulizadas com solução de β -caroteno e anisaldeído. Estes também foram analisados via CLAE-UV-DAD, para obtenção do perfil cromatográfico de cada amostra.

Figura 7 - Fracionamento cromatográfico dos frutos de *Garcinia xanthochymus*.

Figura 8 - Fracionamento cromatográfico das folhas de *Garcinia xanthochymus*.

Figura 9 - Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus* em coluna de permeação em gel (LH-20, Sephadex®).

Figura 10 - Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus* em coluna de fase normal (sílica-gel 60-230 μ).

Figura 11 - Fracionamento cromatográfico da fração BuOH-FOL de *Garcinia xanthochymus*.

5.2 Pré-tratamento da amostra para CLAE-DAD e UV

Antes de serem injetados no cromatógrafo, os extratos e frações de *Garcinia xanthochymus* foram submetidos a um tratamento preliminar, etapa que envolve a eliminação de grande parte dos pigmentos e constituintes de baixa polaridade. A extração em fase sólida de fase reversa foi utilizada por ser a técnica de escolha em pré-tratamentos de amostras para análises em CLAE fase reversa. Dessa maneira, seguiu-se o seguinte procedimento:

1. Pesagem de 1,5g de ODS (40-63 μ m) e preparação de um cartucho com uma coluna de vidro (0,9 cm di).
2. Condicionamento do cartucho com 3,0 mL do eluente MeOH:H₂O (95:05).
3. Solubilização do extrato ou fração em 1,0 mL do eluente.
4. Aplicação do extrato na coluna e eluição da amostra com 5,0 mL do eluente.
5. Filtração da amostra em membrana Millipore[®] (0,2 μ m) e acondicionamento em frasco para injeção.

5.3 Estudo químico do extrato hexânico das folhas de *Garcinia xanthochymus* (HEX-FOL)

O extrato hexânico (HEX-FOL) foi submetido à cromatografia em coluna de fase normal (CC-FN), eluída no modo gradiente, utilizando misturas de HEX e AcOEt (**Figura 8**). Foram obtidas 45 frações, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio um (RMN de ¹H). Assim, conseguiu-se um perfil cromatográfico e espectrométrico das frações obtidas, o qual revelou a presença de ácidos graxos, triterpenos e esteróides. Diante da simplicidade (menor número de substâncias reveladas em anisaldeído sulfúrico) e da presença de poucas substâncias adsorvidas fortemente nas cromatoplasas (alta polaridade), optou-se primeiramente pela fração HEX-FOL-3 para prosseguir o fracionamento cromatográfico. A fração HEX-FOL-3 foi submetida à CC-FN (gradiente HEX e AcOEt), culminando no isolamento da substância **1** (friedelina) e da substância **2** (lanosterol), inédita na literatura para essa espécie. A subfração HEX-FOL-3-65 apresentou-se como uma mistura de dois esteróides: lanosterol e a substância **3** (lanosta-7,24-dien-3-ol), também não identificada na espécie em estudo.

5.4 Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt das folhas de *Garcinia xanthochymus* (AcOEt-FOL)

Diante dos resultados preliminares da ação antioxidante e antimalárica dos extratos e frações obtidos das folhas de *Garcinia xanthochymus* (**Tabela 18** e **Tabela 19**) optou-se inicialmente pelo estudo químico da fração AcOEt-FOL.

A fração AcOEt-FOL foi submetida à cromatografia de permeação em gel (CPG), empregando-se LH-20/Sephadex[®] e eluição isocrática com MeOH. Foram coletadas 45 subfrações, as quais foram analisadas por meio de CCDC, em placas de sílica gel eluídas com AcOEt:H₂O (100:27) acidificadas com 11% de ácido acético e 11% de ácido fórmico (BLADT, 1996) e revelação com solução de anisaldeído, possibilitando reuni-las em 16 subfrações (**Figura 9**).

Em virtude da grande quantidade da massa (24,6 g) e baseando-se em referências da literatura na busca de xantonas preniladas (ZHONG; CHEN; YANG, 2008; CHANMAHASATHIEN et al., 2003; CHEN et al., 2008) a fração AcOEt-FOL também foi submetida à CC-FN (sílica-gel 60-230 μ m), utilizando misturas de HEX, AcOEt e MeOH no modo gradiente. Após análise comparativa por CCDC em placas de sílica gel e fase móvel 9:1 (AcOEt: MeOH) foi possível reunir as frações coletadas em 11 subfrações (**Figura 10**).

Todas as subfrações (AcOEt-FOL-1 a 16 e AcOEt-SIL-1 a 11) tiveram seu perfil químico analisado por CLAE-DAD (ODS, Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m) e eluição gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100).

Com isso, foi possível caracterizar o número de substâncias presentes em cada subfração, bem como selecionar as subfrações AcOEt-FOL-14-16, AcOEt-SIL-3-5, AcOEt-SIL-9, AcOEt-SIL-11 para isolamento de seus constituintes químicos, baseando-se nas massas e perfil cromatográfico de cada matriz.

5.5 Estudo químico da subfração AcOEt-FOL-14

A otimização em CLAE para a subfração AcOEt-FOL-14 foi obtida com a fase móvel na composição de 57% metanol e 43% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 μ L (**Figura 12**). Quando submetida à CLAE-prep, com fluxo de 10 mL.min⁻¹, c=10 mg.mL⁻¹ e detecção em λ =254 nm, a subfração AcOEt-FOL-14 (483,9 mg), apresentou cinco

picos; o pico em $t_r=11,5$ min (Substância **4**), o pico em $t_r=19,0$ min (Substância **5**) e o pico em $t_r=27,0$ min (Substância **6**) apresentaram-se puros e com sinais característicos de flavonóides, evidenciados pelos dados de UV e RMN de ^1H .

Figura 12 - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração AcOEt-FOL-14, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (57:42,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

5.6 Estudo químico das subfrações AcOEt-FOL-15 e 16

As subfrações AcOEt-FOL-15 e 16 também foram submetidas a experimentos de otimização em CLAE-UV para posterior utilização e separação por CLAE-prep. A melhor condição para tal separação foi obtida com a fase móvel na composição de 75% metanol e 25% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-Hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6) com detecção em $\lambda=254$ nm, fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e volume injetado de $20 \mu\text{L}$ (**Figura 13a** e **Figura 13b**).

A subfração AcOEt-FOL-15 (61,2 mg) foi submetida à CLAE-prep, com fluxo de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $c= 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e detecção em $\lambda=254$ nm, sendo que quatro picos foram separados. O segundo pico (t_r em 4,0 min, Substância **7**) e o quarto pico de interesse (t_r em 7,7 min, Substância **8**) apresentaram-se puros e com sinais característicos de flavonóides, evidenciados pelos dados de UV e RMN de ^1H .

Nestas mesmas condições, a subfração AcOEt-FOL-16 (129,8 mg) apresentou dois picos, porém apenas o 2º caracterizava-se como uma substância pura (Substância **9**).

Figura 13 - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações (a) AcOEt-FOL-15 e (b) AcOEt-FOL-16, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (75:24,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

5.7 Estudo químico da subfrações AcOEt-SIL-3 e 9

As condições de separação das subfrações AcOEt-SIL-3 (m=30,3 mg) e AcOEt-SIL-9 (m=243,1 mg) foram otimizadas por CLAE-UV na condição de 45% metanol e 55% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 μ L. Quando submetida ao fracionamento em escala preparativa em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 21), fluxo de 10 mL.min⁻¹, c=10 mg.mL⁻¹ e detecção em $\lambda=254$ nm, a subfração AcOEt-SIL-3 (**Figura 14a**) permitiu o isolamento da substância **10** ($t_r=17,5$ min). A subfração AcOEt-SIL-9 (**Figura 14b**) apresentou dois picos, porém apenas o 2º caracterizava-se como uma substância pura (Substância **15**).

Figura 14 - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações (a) AcOEt-SIL-3 e (b) AcOEt-SIL-9, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (45:54,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

5.8 Estudo químico das subfrações AcOEt-SIL-4 e 5

A subfração AcOEt-SIL-4 ($m=269,3$ mg) apresentou dois picos de interesse na condição cromatográfica de 60% metanol e 40% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume injetado de $20 \text{ }\mu\text{L}$ (**Figura 15a**). A posterior separação em CLAE-prep com fluxo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $c=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e detecção em $\lambda=254 \text{ nm}$ permitiu o isolamento da **substância 11** (pico em $t_r=11,2 \text{ min}$) e da substância **12** (pico em $t_r=14,5 \text{ min}$).

Já subfração AcOEt-SIL-5 ($m=87,4$) (**Figura 15b**) quando submetida à CLAE-UV-prep com a fase móvel de 50% metanol e 50% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 21), fluxo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $c=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e detecção em $\lambda=254 \text{ nm}$, permitiu o isolamento do ácido vanílico (pico em $t_r=5,1 \text{ min}$, Substância **13**), do biflavonóide GB2 (pico em $t_r=15,1 \text{ min}$, substância **14**) e da substância **8**, já isolada anteriormente da subfração AcOEt-FOL-15.

Figura 15 - Cromatogramas analíticos obtidos via CLAE-UV das subfrações (a) AcOEt-SIL-4, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (60:39,5:0,5) e (b) AcOEt-SIL-5, eluídas com MeOH:H₂O: HOAc (50:49,5:0,5).

5.9 Estudo químico da subfração AcOEt-SIL-11

A otimização em CLAE para a subfração AcOEt-SIL-11 foi obtida com a fase móvel na composição de 35% metanol e 65% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume injetado de $20 \text{ }\mu\text{L}$ (**Figura 16**). Quando submetida à CLAE-prep, com fluxo de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $c=10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e detecção em $\lambda=254 \text{ nm}$, a subfração AcOEt-SIL-11 (325,9 mg), apresentou cinco picos; o segundo pico em $t_r=5,5 \text{ min}$ (Substância **16**) apresentou-se com sinais característicos de

flavonóides glicosilados, evidenciados pelos dados de UV e RMN de ^1H . Já as substâncias **22** e **23** foram identificadas como derivadas de ácidos fenilpropanoídicos.

Figura 16 - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração AcOEt-SIL-11, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (35:64,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

5.10 Fracionamento cromatográfico e estudo químico da fração BuOH das folhas de *Garcinia xanthochymus* (BuOH-FOL)

A fase butanólica das folhas (BuOH-FOL) foi submetida à CPG (LH-20, Sephadex[®]), eluída isocraticamente em MeOH. Foram coletadas 26 frações, as quais foram analisadas e reunidas em 9 subfrações por meio de CCDC (**Figura 11**), em placas de sílica gel eluídas com H₂O:BuOH:HOAc (50:40:10) e revelação com solução de anisaldeído.

A análise das cromatoplas, dos cromatogramas obtidos via CLAE-DAD e dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio um (RMN de ^1H) possibilitou a escolha da subfração BuOH-FOL-6 para posterior estudo fitoquímico. A melhor condição cromatográfica foi de 20% metanol e 80% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 μL (**Figura 17**). Quando submetida à CLAE-prep, com fluxo de 10 mL.min⁻¹, c=10 mg.mL⁻¹ e detecção em $\lambda=254$ nm a subfração BuOH-FOL-6 (375,7 mg) apresentou três picos, sendo que o 1º pico ($t_r=5,5$ min) foi identificado como substância **17**, o 2º pico ($t_r=7,0$ min) como substância **18** e o 3º pico ($t_r=7,6$ min) como substância **21**.

Figura 17 - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV da subfração BuOH-FOL-6, eluída com MeOH:H₂O: HOAc (20:79,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

5.11 Fracionamento cromatográfico e estudo químico da fração AcOEt dos frutos de *Garcinia xanthochymus* (AcOEt -FRU)

Após análise das cromatoplasas em diversos tipos de eluentes e reveladores, a fração AcOEt-FRU foi selecionada para estudo fitoquímico por apresentar melhor resolução, um menor número de substâncias e maior massa.

Uma alíquota da fração AcOEt-FRU (4,0 g) foi dissolvida em 4 mL de MeOH e submetida a CC em LH-20/Sephadex[®]. Utilizando metanol como eluente, foram coletadas 37 frações de 25 mL, analisadas por CCDC, o que permitiu sua reunião em 18 subfrações.

Figura 18 - Cromatoplasa da subfração AcOEt-FRU-7 com (a) revelação física em $\lambda=254$ nm e (b) revelação química com anisaldeído sulfúrico (c) Cromatograma analítico da subfração AcOEt-FRU-7, obtido em coluna ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m) eluída com fase móvel de MeOH:H₂O: HOAc (75:24,5:0,5) e detecção em $\lambda=254$ nm.

A cromatoplasa da subfração AcOEt-FRU-7 (100 mg) revelou a presença de apenas uma mancha amarela em revelação com anisaldeído sulfúrico, pureza também exibida em

análise por CLAE-DAD (**Figura 18**). Porém quando submetida às análises espectroscópicas evidenciou-se a presença de uma mistura isomérica (Substâncias **19** e **20**).

5.12 Identificação por CLAE-DAD-EM dos constituintes de frações selecionadas de *Garcinia xanthochymus*-análise por desreplicação

Após o pré-tratamento de amostras para CLAE, conforme descrito no **item 5.2**, algumas subfrações (provenientes da fração AcOEt dos frutos) e/ou substâncias puras foram analisadas e identificadas por CLAE-DAD-EM. As condições cromatográficas foram: **AcOEt-FRU-13**, 30% metanol e 70% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 µL e para a subfração **AcOEt-FRU-17**, 40% metanol e 60% de água dopada com 0,5% de HOAc, em coluna Fenil-hexil (Phenomenex Luna 25,0 cm x 4,6), fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 µL.

Por apresentar pequena quantidade de massa e/ou impurezas, algumas amostras (Substâncias **6**, **7**, **15**, **16**, **21**, **22**, **23** e a subfração AcOEt-FRU-7) foram analisadas por EM, injeção direta (*sistema off*), a fim de aumentar a concentração para um mesmo volume injetado. Estas também foram comparadas e identificadas através dos tempos de retenção, bandas de absorção e dados de RMN obtidos da literatura.

5.13 Identificação de triterpenos e esteróides presentes nos extratos de baixa polaridade de *Garcinia xanthochymus* utilizando cromatografia gasosa (CG)

Em virtude do extrato hexânico das folhas (HEX-FOL), a fração hexânica das folhas (FR. HEX-FOL) e o extrato hexânico dos frutos (HEX-FRU) apresentarem um perfil em CCDC bastante complexo e de difícil separação, essas matrizes foram analisadas por CG, conforme metodologia e equipamentos descritos no **item 4.1.8**. O pré-tratamento consistiu em solubilizar 10 mg de cada amostra em clorofórmio (3 mL) e eluir as mesmas por uma coluna cromatográfica contendo celite:carvão ativo (1:1, 100 mg) + sílica gel (200 mg) e fase móvel 10 mL de clorofórmio. Após a evaporação à temperatura ambiente, o eluído foi então, solubilizado em *n*-hexano: AcOEt (7:3).

5.14 Ensaios antioxidantes

5.14.1 Descoloração de β -caroteno

Preparou-se uma solução de 0,02% de β -caroteno (Aldrich®) em metanol e após a nebulização das cromatoplacas, essas foram expostas ao ar e luz natural, por cerca de 6 horas, a fim de catalisar a oxidação do β -caroteno (SILVA et al., 2001).

5.14.2 Atividade sequestradora de radicais livres: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

O radical DPPH apresenta absorção máxima em 531 nm. Neste comprimento de onda avalia-se a absorbância na ausência e na presença das amostras-teste, sendo que na presença de agentes antioxidantes ocorre aumento da transmitância. A solução de DPPH (200 μ M) foi preparada em MeOH. Na placa de 96 poços foram adicionados: Amostra: 200 μ L de DPPH e 100 μ L de amostra em diversas diluições. Controle positivo: 200 μ L de DPPH e 100 μ L de antioxidante padrão. Controle negativo: 200 μ L de DPPH e 100 μ L de solvente. A placa foi mantida por 30 minutos no escuro. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado foi determinada através da diminuição da absorbância a 517 nm. (SON e LEWIS, 2002; PAULETTI et al., 2003).

Processamento dos dados:

Fórmula: % de sequestro do radical livre DPPH

$\% = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) \times 100}{\text{Absorbância do CONTROLE-DPPH}}$

5.15 Ensaio *in vitro* da polimerização de heme

O ensaio foi baseado na metodologia de Baelmans e colaboradores, com algumas modificações. Este teste consistiu na incubação em microtubos de 1,5 mL por 24 horas a 37°C das seguintes soluções: 50 μ L de extratos dissolvidos em DMSO (à concentração final

de 2,5 mg/mL), DMSO (50 µL) para os controles com 100 µL de heme (6,4 mM de heme dissolvida em 0,2 N NaOH, 4,16 mg em 1000 µL, que foi preparada 60 minutos antes da execução do ensaio, incubada a 37°C e protegida da luz), 200 µL de acetato de sódio 0,5 M e 50 µL de ácido acético. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes, com 400 µL de DMSO e 400 µL de metanol, e dissolvido em 1000 µL de NaOH 0,1 M. Aliquotas de 20 µL da β-hematina dissolvida foram transferidas para uma placa de 96 poços com 180 µL de NaOH 0,1 M, e as amostras foram lidas a 405 nm no leitor de microplacas. Quinina e cloroquina foram utilizadas como controle positivo. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da polimerização do heme e foram calculados pelo programa KC4 pelo emprego da fórmula a seguir. As análises foram feitas sempre em triplicata para o cálculo do desvio padrão.

$$\% \text{ inibição da formação de } \beta\text{-hematina} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) * 100 / A_{\text{controle}}$$

5.16 Atividade antifúngica

O teste incluiu os organismos *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012. Os testes foram realizados no Departamento de Análises Clínicas/Laboratório de Micologia Clínica, Araraquara-UNESP, sob supervisão da Dra. Maria José M. Giannini.

A atividade antifúngica foi realizada seguindo a metodologia de microdiluição e verificação de turbidez em leitor de microplacas descrita no documento M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com algumas modificações. As análises foram feitas em triplicatas e o meio utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina e ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 M (pH: 7,0) acrescido com 2% glicose.

As amostras foram preparadas em DMSO numa concentração de 250 µg/ml. A suspensão das células foram preparadas em uma solução 0,85% salina e inoculada numa placa de microtubos previamente preparada com as amostras diluídas numa concentração entre 250 µg/mL para 0,48 µg/mL. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24 h para a espécie *Candida* e 48 h para *Cryptococcus neoformans*.

O controle positivo utilizado foi o fluconazol dissolvido em DMSO. Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como a concentração mais baixa em que a densidade ótica (OD) foi reduzida a 90% do OD do poço controle do crescimento.

5.17 Atividade tripanocida

O teste colorimétrico do MTT foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos sob supervisão da Prof^a Regina M. B. Cicarelli no Departamento de Ciências Biológicas, Araraquara-UNESP. A forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* foi escolhida por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa em fluxo laminar.

Após diluições em DMSO, 3 µL de cada substância testada (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, respectivamente), foram adicionados a 95 µL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo $1,0 \times 10^7$ parasitos/ml na forma epimastigota de *T. cruzi* (fase log). Para os extratos e frações, as concentrações das substâncias foram extrapoladas até valores de 200, 300, 400 e 500 µg/mL. A placa foi incubada em câmara úmida por 72 horas. Então, adicionou-se 10 µL de solução MTT/PMS em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo de luz por 75 minutos a 28°C. Neste momento, ocorre a redução do sal tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, formazan, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. Após solubilização dos cristais de formazan e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, foi feita a leitura num espectrofotômetro a 595 nm (COTINGUIBA et al., 2009).

A porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\%C = [(G_c - G_p)/G_c] * 100$$

$$G_c = A_c - A_m, G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controle e G_p , o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações da substância. A_c corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência da substância) sem parasito; A_p , o valor da absorbância nos testes e A_{pm} , o valor da absorbância das diferentes concentrações da substância na ausência do parasito.

Foram realizados dois controles, um na ausência do parasito para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência desta, mas contendo parasitos.

5.18 Atividade quimiopreventiva

O ensaio da quinona redutase (QR) constitui um método simples para detecção e avaliação da indução da enzima quinona redutase (enzima de fase II), que destoxifica carcinógenos por produtos naturais, baseado na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma celular (KINGHORN et al., 2004). A quinona redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), a menadiol mediada por NADPH como doador de elétrons. O MTT é então reduzido não-enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação do sal azul de formazan (FAHEY et al., 2004). A linhagem derivada de hepatocarcinoma celular murino-Hepa 1c1c7 contém quantidades de QR induzíveis facilmente mensuráveis que fornece um sistema confiável para detecção de indutores de enzimas de fase II (CUENDET et al., 2006).

A atividade de QR foi determinada em placas de 96 poços com células ($1,5 \times 10^4$ células/cavidade) da linhagem de hepatocarcinoma murino-Hepa 1c1c7. A atividade específica foi definida como a concentração nanomolar de MTT formado por mg de proteína por minuto, monitorada em leitor de placas a 595 nm. A indução da QR foi calculada pela comparação da atividade específica de células tratadas com aquelas expostas apenas ao solvente, sendo gerado um gráfico dessas razões.

$$IQ = CI_{50}/CD$$

CD representa a concentração necessária para duplicar a indução de QR e o Índice de Quimioprevenção (IQ) é um valor gerado pela comparação de CD e CI_{50} (concentração para 50% de inibição da viabilidade celular).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise dos cromatogramas e espectros de absorção

Nas condições empregadas, os cromatogramas dos extratos e frações das folhas e frutos de *Garcinia xanthochymus* mostraram que nos frutos os metabólitos secundários são minoritários e/ou se encontram em menores concentrações, com exceção do pico em $t_r=45$ min (Substs. **19** e **20**, isoladas da fração AcOEt-FRU-7, **Figura 18**), que é majoritário no extrato ETOH e fração AcOEt dos frutos (**Figura 19a** e **Figura 19b-acima**). Similaridades nos tempos de retenção e nos espectros de UV foram encontradas para substâncias com $t_r=12,5$ e 28,0 min que estão presentes na fração BuOH das folhas e frutos. A substância com $t_r=12,5$ min também está presente na fração HA de ambos órgãos (**Figura 19c** e **Figura 19d-acima e abaixo**).

Nota-se também semelhanças entre o extrato ETOH e a fração AcOEt das folhas no que diz respeito à composição (bandas de absorção no UV) e tempos de retenção. Assim também para as frações BuOH e HA, que apresentam similaridades na região de menores tempos de retenção dos picos nos cromatogramas (relativo à composição da fase móvel com maior teor de água no gradiente exploratório), o que sugere um caráter mais polar das substâncias presentes nesta região do cromatograma.

Os picos majoritários da fração AcOEt-FOL (**Figura 19b-abaixo**) apresentam espectros de absorção no UV característicos de flavonóides (**Figura 20**). O espectro consiste de dois máximos de absorção, nos intervalos de comprimento de onda de 230-295 nm (banda II) e entre 300-560 nm (banda I). A posição precisa e as intensidades relativas desses máximos fornecem informações valiosas da natureza do flavonóide e de seu padrão de oxigenação (**Tabela 2**). Sendo assim, mudanças na substituição do anel A normalmente são evidenciadas por alteração na posição e/ou intensidade na banda II, enquanto alterações nos anéis B e C resultam em alterações na banda I (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MERKEN; BEECHER, 2000).

As substâncias **11** e **15** isoladas da fração AcOEt-SIL-4 e 9, respectivamente (**Figura 15a** e **Figura 14b**), apresentaram uma banda em 293 nm e outra banda pouco intensa em 332 nm, sugerindo a subclasse das flavanonas. A adição de uma unidade de açúcar, em C-3, C-5, C-7 ou C-4', causa um deslocamento hipsocrômico na banda II das flavanonas. Assim, pode-se sugerir a presença de uma unidade de açúcar na substância **15**. A

substância **9** apresentou duas bandas (banda II em 268 nm e a banda I em 337 nm) evidenciando a subclasse das flavonas. Já as substâncias **8** e **16** apresentaram bandas características de flavanonas para o anel A (banda II em 290 nm) e, para o anel B e C, apresentaram bandas características da subclasse das flavonas (banda I entre 310-350 nm), sugerindo a presença de duas subclasses distintas no esqueleto flavonoídico.

Figura 19 - Cromatograma analítico obtido via CLAE-UV do extrato ETOH (a) e das frações AcOEt (b), BuOH (c) e HA (d) dos frutos (acima) e das folhas (abaixo) de *Garcinia xanthochymus* no modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

Figura 20 - Espectro no UV de algumas substâncias isoladas da fração AcOEt-FOL de *Garcinia xanthochymus*.

Tabela 2 - Intervalos de absorção no UV para diferentes tipos de flavonóides.

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonóide
250-280	310-350	Flavona
250-280	330-360	Flavonol (3-OH substituído)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH livre)
245-275	310-330 (pouca intensa)	Isoflavona
275-295	300-330 (pouca intensa)	Flavanona e Diidroflavonol
230-270 (pouco intensa)	340-390	Chalcona
230-270 (pouco intensa)	380-430	Aurona
230-270	465-560	Antocianidina e Antocianina

6.2 Estudo químico das folhas

As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas através da análise de dados espectrométricos, especialmente RMN uni e bi dimensional (*g*HMBC, *g*HMQC, COSY, DEPT, NOESY e HOMODEC), além dos dados de UV, IV e EM e comparação com dados encontrados na literatura.

6.2.1 Caracterização espectrométrica da substância 1

A substância **1** foi isolada do extrato HEX-FOL, conforme procedimento experimental em **5.3**.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , IV e EM, permitiu caracterizar a substância **1** como um triterpeno pentacíclico pertencente à classe dos friedelanos.

O espectro de IV (**Figura 22**) apresentou sinal de estiramento de carbonila em 1698 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), uma banda em 2925 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação C-H

de grupos metílicos e metilênicos (ν_{C-H}) e bandas entre 1450 e 1550 cm^{-1} correspondentes a vibrações de deformação angular de C-H (δ_{C-H}) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

O espectro de massas obtido por CG-EM (IE=+70 eV) apresentou o íon molecular em m/z 426 e um fragmento em m/z 273, típicos de friedelanos saturados quando substituídos apenas nos anéis A ou E (**Figura 21**). Os fragmentos em m/z 55 e 69 podem ser resultantes da clivagem inicial, respectivamente, das ligações C2-C3 ou C4-C3, com posterior migração de um átomo de hidrogênio, conforme ilustrado na **Figura 23**, concomitante à clivagem das ligações C1-C10 ou C5-C10.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinal de carbono carbonílico em δ_{C} 213,2 e um sinal de um grupo metila em δ_{C} 6,8 protegido pelo efeito γ do oxigênio da carbonila (**Anexos 4 a 6**). Através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT foi possível contabilizar 30 carbonos, dos quais 8 são carbonos metílicos, 11 são carbonos metilênicos, 4 metínicos e 7 quaternários (**Anexos 7 a 9, Tabela 3**).

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais de absorção entre δ_{H} 1,36 a 2,43 referentes aos grupos metilênicos e metínicos; e na região entre δ_{H} 0,74 a 1,20, mostrou 8 sinais associados às 8 metilas da estrutura desta substância (**Anexos 1 a 3**).

A comparação dos dados espectrométricos de **1** com valores registrados na literatura permitiu identificar este triterpeno como 3-oxo-friedelano (friedelina) (GOTTIEB et al., 1985).

A friedelina foi isolada das folhas de *Garcinia xanthochymus* por Singh et al. em 1991. Este composto mostrou-se muito eficaz como agente antibacteriano. Há relatos que atribuem à friedelina atividade antiúlcera estomacal e contra gastrite (CORDEIRO; VILEGAS; LANCAS, 1999; RAMESH et al., 2002). A friedelina possui ainda efeito antiinflamatório quando administrada por via tópica, inclusive para inflamações oculares (DI STASI; GOMES; VILEGAS, 1999).

Figura 21 - Espectro de massas da substância **1** obtido por CG-EM (IE=+70 eV).

Figura 22 - Espectro vibracional na região do IV da substância 1.

Figura 23 - Proposta de fragmentação da substância 1.

6.2.2 Caracterização espectrométrica da substância 2

A substância **2** foi isolada do extrato HEX-FOL, conforme procedimento experimental em **5.3**.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , IV e EM, permitiu identificar a substância **2** como um esteróide.

O espectro na região do IV (**Figura 24**) apresentou uma banda larga de absorção em 3336 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$), bandas em 2935 e 2868 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos da ligação C-H dos grupos metilênicos e metínicos ($\nu_{\text{C-H}}$), uma banda em 1722 cm^{-1} referente à deformação axial de C=C ($\nu_{\text{C=C}}$), absorções em 1455 cm^{-1} correspondentes a deformação angular da ligação C-H ($\delta_{\text{C-H}}$). O espectro apresentou ainda uma banda em 1377 cm^{-1} referente à deformação angular da ligação O-H ($\delta_{\text{O-H}}$) e uma banda em 1091 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

O espectro de massas obtido por CG-EM (IE=+70 ev) (**Figura 25**) mostrou o íon molecular em m/z 426, o íon base em m/z 393, referente à perda de uma metila, e um fragmento intenso em m/z 411, referente à perda de uma molécula de água (**Figura 26**). É interessante notar que esqueletos de triterpenos com insaturação na posição C-12 (série ursano e oleano) e não substituídos, apresentam fragmentação típica denominada Retro-Diels-Alder, que ocorre no anel C, provocando a formação de um íon em m/z 218. O íon m/z 218 não foi detectado no espectro da substância **2**, sugerindo que a mesma não possui insaturação em C-12.

Figura 24 - Espectro vibracional na região do IV da substância 2.

Figura 25 - Espectro de massas da substância 2 obtido por CG-EM (IE= + 70 eV).

Figura 26 - Proposta de fragmentação da substância 2.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de prótons olefínicos (δ_{H} 5,02; *m*) e de prótons carbinólicos (δ_{H} 3,17; *dd*; $J=12,0$ e $J=4,5$ Hz). A região de δ_{H} 0,69 a 1,19 mostrou 8 sinais referentes às metilas da molécula, e entre δ_{H} 1,30 a 2,10, os sinais correspondentes aos grupos metilênicos e metínicos (**Anexos 10 a 12**).

Através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT, foi possível identificar 30 carbonos dos quais 8 são carbonos metílicos, 10 são carbonos metilênicos, 5 metínicos e 7 quaternários (**Anexos 16 a 19, Tabela 3**). Os sinais dos carbonos olefínicos no espectro de ^{13}C (**Anexos 13 a 15**) em δ_{C} 125,2 (C-24), δ_{C} 130,8 (C-25), δ_{C} 134,1 (C-8) e δ_{C} 133,6 (C-9), além do sinal de carbono carbinólico em δ_{C} 79,0 (C-3) e as observações citadas acima permitiram identificar a substância **2** como lanosta-8,24-dien-3-ol, conhecida como lanosterol (KNIGHT, 1973).

6.2.3 Caracterização espectrométrica da substância 3

A estrutura da substância **3** foi determinada em mistura, conforme procedimento experimental em **5.3**.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT desta fração foi possível identificar 58 carbonos dos quais 30 foram atribuídos ao lanosterol, cuja elucidação foi discutida acima (**Anexos 21 a 24**). Os sinais restantes foram atribuídos ao esteróide lanosta-7,24-dien-3-ol (**Tabela 3**), que co-ocorre com a substância **2** em grande parte dos vegetais. Os espectros de IV e massas apresentaram características análogas às da substância **2**, confirmando a presença dos isômeros de posição **2** e **3** na amostra.

Os sinais em δ_{C} 117,8 (C-7), δ_{C} 145,8 (C-8), δ_{C} 125,1 (C-24) e δ_{C} 130,9 (C-25) foram atribuídos aos carbonos olefínicos e o sinal em δ 79,3 foi atribuído ao carbono

hidroximetínico C-3. Estes dados, aliados à análise de RMN ^1H da mistura (**Anexo 20**) e comparação com dados da literatura, permitiram identificar **3** como lanosta-7,24-dien-3-ol (OLEA; ROQUE, 1990).

Tabela 3 - Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) das substâncias **1**, **2** e **3** em CDCl_3 .

Posição	δ_c (ppm) 1	δ_c (ppm) 2	δ_c (ppm) 3
1	22,3 <i>t</i>	35,3 <i>t</i>	37,2 <i>t</i>
2	41,5 <i>t</i>	27,7 <i>t</i>	27,6 <i>t</i>
3	213,2 <i>s</i>	79,0 <i>d</i>	79,3 <i>d</i>
4	58,3 <i>d</i>	38,9 <i>s</i>	38,9 <i>s</i>
5	42,2 <i>s</i>	50,9 <i>d</i>	50,7 <i>d</i>
6	41,3 <i>t</i>	18,9 <i>t</i>	23,9 <i>t</i>
7	18,3 <i>t</i>	27,9 <i>t</i>	117,8 <i>d</i>
8	53,1 <i>d</i>	134,1 <i>s</i>	145,9 <i>d</i>
9	37,5 <i>s</i>	133,6 <i>s</i>	48,9 <i>s</i>
10	59,5 <i>d</i>	37,3 <i>s</i>	35,1 <i>s</i>
11	35,7 <i>t</i>	21,5 <i>t</i>	22,1 <i>t</i>
12	30,5 <i>t</i>	28,1 <i>t</i>	34,9 <i>t</i>
13	39,7 <i>s</i>	44,1 <i>s</i>	43,6 <i>s</i>
14	38,3 <i>s</i>	50,0 <i>s</i>	51,3 <i>s</i>
15	32,5 <i>t</i>	30,9 <i>t</i>	33,8 <i>t</i>
16	36,0 <i>t</i>	29,8 <i>t</i>	28,4 <i>t</i>
17	30,0 <i>s</i>	49,7 <i>d</i>	53,2 <i>d</i>
18	42,9 <i>d</i>	15,6 <i>q</i>	13,1 <i>q</i>
19	35,4 <i>t</i>	20,1 <i>q</i>	18,1 <i>q</i>
20	28,2 <i>s</i>	35,4 <i>d</i>	35,8 <i>d</i>
21	32,8 <i>t</i>	18,9 <i>q</i>	18,6 <i>q</i>
22	39,3 <i>t</i>	35,9 <i>t</i>	36,1 <i>t</i>
23	6,8 <i>q</i>	24,8 <i>t</i>	25,4 <i>t</i>
24	14,6 <i>q</i>	125,2 <i>d</i>	125,1 <i>d</i>
25	17,9 <i>q</i>	130,8 <i>s</i>	130,9 <i>s</i>
26	20,3 <i>q</i>	17,7 <i>q</i>	26,6 <i>q</i>
27	18,6 <i>q</i>	25,7 <i>q</i>	*
28	32,1 <i>q</i>	24,5 <i>q</i>	*
29	31,8 <i>q</i>	28,1 <i>q</i>	27,7 <i>q</i>
30	35,0 <i>q</i>	15,5 <i>q</i>	14,7 <i>q</i>

*valores não observados

6.2.4 Caracterização espectrométrica da substância 4

A substância **4** foi isolada da subfração AcOEt-FOL-14, conforme procedimento experimental em 5.5.

O composto de fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ foi obtido como cristais amarelos e apresentou espectro de UV típico da subclasse das flavonas, com a banda II em 267 nm e a banda I em

343 nm (**Figura 27**). A fórmula molecular proposta foi obtida pela espectrometria de massas de alta resolução no modo negativo (ESI) (**Figura 29**), em que foi observado o pico referente ao íon molecular em m/z 553,0872 $[M - H]^-$.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 28**) mostrou uma banda vibracional larga em 3421 cm^{-1} correspondente à deformação axial da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) e uma banda em 2952 cm^{-1} referente à deformação axial C-H de aromáticos ($\nu_{\text{C-H}}$). Também mostrou uma banda em 1639 cm^{-1} referente à carbonila conjugada da molécula ($\nu_{\text{C=O}}$), bandas entre 1500 e 1602 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de C-C ($\nu_{\text{C-C}}$) do anel aromático, absorção em 1258 cm^{-1} associada a deformações axiais C-O ($\nu_{\text{C-O}}$), bandas referentes à deformação angular no plano de C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) entre 1072 e 1167 cm^{-1} e uma banda em 814 cm^{-1} relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

Figura 27 - Estrutura da substância **4**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **4** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m).

Figura 28 - Espectro vibracional na região do IV da substância **4**.

O espectro de RMN de ^1H (**Anexos 25 e 26**) mostrou a presença de dois singletos em δ_{H} 12,82 (unidade I) e δ_{H} 13,04 (unidade II), correspondentes a hidroxilas quelatadas que estabelecem ligação de hidrogênio intramolecular com os oxigênios carbonílicos situados em C-4 e C-4'', respectivamente. Destaca-se a presença de dois dubletos em δ_{H} 7,34 (2H, H-2'/6', $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 6,68 (2H, H-3'/5', $J=8,5$ Hz) caracterizando a presença de um padrão de substituição *para*-hidroxilado no anel B da unidade I. Sinais de um anel aromático trissubstituído contendo dois carbonos oxigenados foram observados em δ_{H} 7,06 (*d*, H-2''', $J=2,0$ Hz), δ_{H} 6,75 (*d*, H-5''', $J=8,5$ Hz) e δ_{H} 7,10 (*dd*, H-6''', $J=2,0$ e 8,5 Hz) caracterizando o anel B da unidade II, fato também confirmado pelo espectro de gCOSY que mostrou a interação de H-2''' com H-6''', de H-5''' com H-6''' e de H-6''' com H-2''' e H-5''' (**Anexos 27 e 28**). Os dubletos em δ_{H} 6,26 e 6,51 ($J=2,0$ Hz) correspondentes a H-6 e H-8, respectivamente, demonstram a presença de apenas um par de hidrogênios em acoplamento *meta*, o que sugere a ligação interflavonoídica entre C3 da unidade I e C8'' da unidade II. Esse espectro exibiu ainda um singlete em δ_{H} 6,26 (sobreposto ao dublete em δ_{H} 6,26 correspondente à H-6), atribuído ao hidrogênio H-6'', e um singlete em δ_{H} 6,63 correspondente a H-3'', ambos atribuídos à unidade II do esqueleto flavonoídico.

O experimento de gHMBC (**Anexos 31 a 34**) mostrou a interação a longa distância de δ_{H} 6,26 (H-6'') com δ_{C} 99,4 (C-8'') e 104,5 (C-10'') confirmando que a ligação interflavonoídica ocorre em C-8''. Também mostrou a interação de δ_{H} 6,63 (H-3'') com δ_{C} 163,8; de δ_{H} 6,68 (H-3'/5') com δ_{C} 122,9; de δ_{H} 6,75 (H-5''') com δ_{C} 122,0 e 146,0; de δ_{H} 7,06 (H-2''') com δ_{C} 149,8 e de δ_{H} 7,34 (H-2'/6') com δ_{C} 129,2 e 159,9. Mostrou ainda interações J_2 e J_3 entre δ_{H} 12,82 e 13,04 com C-5, C-6 e C-10 de ambas as unidades, corroborando a proposta acima delineada (**Tabela 4**).

O experimento NOESY-1D (**Anexo 36**), com irradiação do singlete em δ_{H} 6,26, não mostrou efeito NOE com os hidrogênios presentes na molécula, confirmando a atribuição do respectivo sinal para H-6 e H-6''. Pela análise do espectro de HOMODEC (**Anexo 35**) não houve alteração na multiplicidade e/ou presença dos sinais de hidrogênios quando ocorreu a eliminação do sinal em δ_{H} 6,63, confirmando a atribuição deste singlete a H-6''.

A partir desses dados, a substância **4** foi caracterizada como saharanflavona, uma biflavona ainda não encontrada como produto natural, sintetizada anteriormente a partir da oxidação da morelloflavona (PELTER et al., 1971).

Figura 29 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **4** obtido no modo negativo (ESI).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **4** (DMSO- d_6).

Posição	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
2	-	*	-	-
3	-	*	-	-
4	-	*	-	-
5	-	161,4	-	-
6	6,26 (<i>d</i> ; 2,0)	98,4	*	*
7	-	*	-	-
8	6,51 (<i>d</i> ; 2,0)	93,9	*	*
9	-	*	-	-
10	-	103,1	-	-
1'	-	122,9	-	-
2' 6'	7,34 (<i>d</i> ; 8,5)	129,2	129,2; 159,9	H-3'
3' 5'	6,68 (<i>d</i> ; 8,5)	114,7	122,9	H-2'
4'	-	159,9	-	-
5-OH	12,82 (<i>s</i>)	-	98,4; 103,1; 161,4	-
2''	-	163,8	-	-
3''	6,63 (<i>s</i>)	102,3	163,8	-
4''	-	*	-	-
5''	-	161,0	-	-
6''	6,26 (<i>s</i>)	98,4	99,4; 104,5	-
7''	-	*	-	-
8''	-	99,4	-	-
9''	-	*	-	-
10''	-	104,5	-	-
1'''	-	122,0	-	-
2'''	7,06 (<i>d</i> ; 2,0)	112,8	149,8	H-6'''
3'''	-	149,8	-	-
4'''	-	146,0	-	-
5'''	6,75 (<i>d</i> ; 8,5)	114,8	122,0; 146,0	H-6'''
6'''	7,10 (<i>dd</i> ; 2,0 e 8,5)	118,3	*	H-2'''; H-5'''
5''-OH	13,04 (<i>s</i>)	-	98,4; 161,0	-

*valores não observados

Os valores de RMN de ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$.

6.2.5 Caracterização espectrométrica da substância 5

A substância **5** foi isolada da subfração AcOEt-FOL-14, conforme procedimento experimental em 5.5.

A substância **5** foi obtida como um sólido amarelo pálido amorfo com fórmula molecular $C_{30}H_{18}O_{10}$. O espectro no UV sugeriu a subclasse das flavonas, fato evidenciado pelas bandas em 268 nm (banda II, anel A) e 333 nm (banda I, anéis B e C). A análise por CLAE mostrou $t_r = 14,1$ min para **5**, sugerindo um esqueleto com menor polaridade que **4**, que apresentou $t_r = 9,6$ min (**Figura 31**).

A análise do espectro de IV (**Figura 31**) mostrou uma banda vibracional larga atribuída à hidroxila (ν_{O-H}) em 3445 cm^{-1} , bandas em 2920 e 2854 cm^{-1} , referentes à deformação axial C-H de aromáticos (ν_{C-H}) e uma banda em 1690 cm^{-1} referente à carbonila conjugada da molécula ($\nu_{C=O}$). Apresentou ainda, uma banda em 1458 cm^{-1} atribuída à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) do anel aromático e bandas referentes à deformação angular no plano de C-H (δ_{C-H}) entre 1062 e 1377 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

No espectro de massas no modo negativo (ESI) obtido para essa substância (**Figura 33**) foi observado o íon m/z 537 $[M-H]^-$ que confirma a estrutura proposta.

Figura 30 - Estrutura da substância **5**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **5** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m)

O espectro de RMN ^{13}C mostrou sinais para dois carbonos com deslocamento químico característico de carbonilas de flavonas (δ_c 181,7 e 180,4), sugerindo a presença de um núcleo flavonoídico na forma dimérica (**Anexos 39 a 41**).

Figura 31 - Espectro vibracional na região do IV da substância **5**.

Figura 32 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **5** obtido no modo negativo (ESI).

Os quatro dubletos ($J=9,0$ Hz) no espectro de ^1H em δ_H 7,34; 6,66 e δ_H 7,54; 6,76, cada um correspondendo a 2H, sugeriu a presença de um padrão de substituição *para*-hidroxilado em ambos os anéis B. A análise dos dados de *g*COSY e *g*HMBC permitiu sua atribuição aos H-2'/H-6'; H-3'/H-5' e H-2'''/H-6'''; H-3'''/H-5''', das unidades I e II respectivamente. Os dubletos em δ_H 6,23 e 6,49 ($J=2,0$ Hz) atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente, demonstraram a presença de apenas um par de hidrogênios em acoplamento *meta*, sugerindo a ligação interflavonoídica entre C3 da unidade I e C8'' da unidade II (**Anexos 37 e 38**).

Os espectros de *g*HMQC permitiram estabelecer a correlação direta entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos (**Anexos 44 a 47**). O experimento de *g*HMBC (**Tabela 5**) mostrou a interação a longa distância entre δ_H 7,34 (H-2') e δ_c 163,3 (C-2) mostrando e confirmando a atribuição dos sinais para o anel B; e ainda a interação de δ_H 6,21 (H-6'') e δ_c 98,9 (C-8''), confirmando a ligação interflavonoídica na posição C-8''.

Mostrou também interações J_2 e J_3 entre δ_H 12,81 e 13,12 com as posições C-5, C-6 e C-10 de ambas as unidades, corroborando a proposta apresentada (**Anexos 48 a 53**).

A partir dos resultados obtidos das análises espectroscópicas, concluiu-se que a substância **5** é o biflavonóide I3, II8-biapigenina, cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (BERGHÖFER; HÖLZL, 1987). Esse biflavonóide foi isolado dos frutos de *Garcinia xanthochymus* por Baggett et al. (2005).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **5** (DMSO- d_6).

Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
2	-	163,3	-	-
3	-	110,5	-	-
4	-	181,7	-	-
5	-	161,5	-	-
6	6,23 (d ; 2,0)	99,2	93,7; 102,8	-
7	-	164,5	-	-
8	6,49 (d ; 2,0)	93,7	99,2; 102,8; 157,3; 164,5	-
9	-	157,3	-	-
10	-	102,8	-	-
1'	-	122,9	-	-
2' 6'	7,34 (d ; 9,0)	129,6	129,6; 161,0; 163,3	H-3'
3' 5'	6,66 (d ; 9,0)	115,1	115,1; 122,9; 161,0	H-2'
4'	-	161,0	-	-
5-OH	12,81 (s)	-	99,2; 102,8; 161,5	-
2''	-	163,4	-	-
3''	6,70 (s)	102,7	103,8; 163,4	-
4''	-	180,4	-	-
5''	-	161,0	-	-
6''	6,21 (s)	98,9	98,9	-
7''	-	164,5	-	-
8''	-	98,9	-	-
9''	-	154,8	-	-
10''	-	103,8	-	-
1'''	-	121,1	-	-
2''' 6'''	7,54 (d ; 9,0)	127,9	127,9; 159,8; 163,4	H-3'''
3''' 5'''	6,76 (d ; 9,0)	115,8	115,8; 121,1; 159,8	H-2'''
4'''	-	159,8	-	-
5''-OH	13,12 (s)	-	98,9; 103,8; 161,0	-

6.2.6 Caracterização espectrométrica da substância **8**

A substância **8** foi isolada da subfração AcOEt-FOL-15, conforme procedimento experimental em **5.6**.

A substância de fórmula $C_{30}H_{20}O_{11}$ foi obtida como cristais amarelos e apresentou espectro de UV típico de flavona/flavanona, com a banda II em 289 nm e a banda I em 348 nm (**Figura 33**). A fórmula molecular de **8** foi obtida pelo espectro de massas no modo negativo (ESI) que apresentou íon molecular em m/z 555 $[M-H]^-$ e um único fragmento em m/z 429 $[M-H]^-$, justificado pela perda do floroglucinol (126 u) como mostrado na **Figura 35** e **Figura 36**.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 34**) apresentou bandas em 3733 e 3621 cm^{-1} correspondentes à deformação axial da ligação O-H (ν_{O-H}). O espectro também exibiu uma banda em 2956 cm^{-1} referente à deformação axial C-H de aromáticos (ν_{C-H}), uma banda em 1641 cm^{-1} referente à carbonila conjugada da molécula ($\nu_{C=O}$), bandas em 1509 e 1364 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) do anel aromático, absorção em 1263 cm^{-1} associada a deformações axiais C-O (ν_{C-O}) e ainda, uma banda em 821 cm^{-1} relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H (δ_{C-H}) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

Figura 33 - Estrutura da substância **8**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **8** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m).

Figura 34 - Espectro vibracional na região do IV da substância **8**.

Figura 35 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **8**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 5% para EM2 (ESI).

Figura 36 - Proposta de fragmentação da substância **8**.

O espectro de RMN de ^1H (**Anexos 54 e 55**) mostrou dois singletos largos em δ_{H} 13,05 e 12,24, provavelmente relacionados a hidrogênios de hidroxilas quelatadas, capaz de estabelecer uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4. Destacam-se os dubletos em δ_{H} 5,71 e 4,88 ($J=12,0$), atribuídos a H-2 e H-3, respectivamente, evidenciando a subclasse das flavanonas.

O espectro de RMN de ^1H apresentou ainda, dois dubletos em δ_{H} 7,13 ($J=8,5$ Hz; 2H) e δ_{H} 6,38 ($J=8,5$ Hz; 2H), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente, para a unidade I. O multiplete em δ_{H} 7,41 foi atribuído aos hidrogênios H-6''' e H-2''' e o dubleto δ_{H} 6,90 ($J=8,5$ Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio H-5'', para a unidade II. Este sistema foi confirmado por gHMBC através das correlações entre o sinal δ_{H} 7,41 e δ_{C} 113,4 (C-2'''), 119,6 (C-6'''), 146,2 (C-3'''), 150,0 (C-4''') e 164,0 (C-2''). A correlação a longa distância também foi útil para designar a união interflavonoídica tipo 3 $\rightarrow$ 8'', através da correlação do sinal em δ_{H} 4,88 (H-3) com δ_{C} 161,8 (C-7'') e 155,8 (C-9''). Também confirmou a posição dos anéis B pela correlação do sinal em δ_{H} 7,13 (H-2') com δ_{C} 81,0 (C-2) e δ_{H} 7,41 (H-6''') com δ_{C} 164,0 (C-2'') (**Anexos 62 a 70**).

Observou-se um singlete intenso em δ_{H} 5,97 atribuído a H-6 e H-8, um singlete em δ_{H} 6,23 correspondente ao H-6'' e um singlete em δ_{H} 6,56 associado ao H-3''. Através de todos os dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura (LI, 2002), pode-se definir a substância **8** como morelloflavona.

Este composto foi isolado de várias espécies de *Garcinia* (KONOSHIMA et al., 1969, 1970; MBWAMBO et al., 2006; VERDI et al., 2004) e a caracterização estrutural e análise conformacional proposta por Li et al. (2002) evidencia o efeito atropisomérico da morelloflavona, como discutido no **item 1.4.1**. No espectro de RMN ^1H da morelloflavona os sinais principais são acompanhados por sinais de menor intensidade, fato explicado pela restrição na rotação C-3 $\rightarrow$ C-8'', confirmando a interligação das unidades flavonoídicas através desses carbonos. As estruturas mais estáveis são definidas a partir da correlação espacial (NOESY-1D) entre H-3 e H-6''' do confômero principal, e entre H-2 e H-6''' do confômero minoritário, e mostra claramente que o confômero majoritário (**8a**) possui a unidade da flavona AICIIBII estendida sob o plano dos anéis AICI da unidade da flavanona. O confômero minoritário (**8b**) apresenta os anéis AICIIBII abaixo do plano dos anéis AICI da unidade da flavanona (**Figura 38**).

Os dados de RMN ^1H do confômero principal e minoritário estão apresentados na **Tabela 6**. Para o confômero minoritário foram listados apenas os dados de RMN ^1H , pois os sinais de carbonos foram de baixa intensidade.

A substância **8** apresentou $[\alpha]_D^{25} = +170,8$ ($c=1,0$ mg.mL $^{-1}$) em MeOH. A análise da curva de dicroísmo circular indicou efeito Cotton positivo para as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ em 345 e 285, respectivamente (**Figura 37**). Um efeito Cotton positivo sobre 285 nm para compostos semelhantes a **8**, indica uma configuração absoluta $2R$ (LI et al., 2002). Assim, fazendo uso da estereoquímica relativa inferida a partir do experimento de RMN, no qual os hidrogênios H-2 e H-3 apresentaram configuração *trans* ($J_{2,3} = 12,0$ Hz), pode-se concluir que a substância **8** apresenta configuração absoluta de $2R, 3S$.

Figura 37 - Curva de dicroísmo circular (DC) da substância **8**.

Figura 38 - Estruturas do confômero principal (**8a**) e minoritário (**8b**) da morelloflavona.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **8** (DMSO- d_6).

Posição	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))		δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
	(8a)	(8b)			
2	5,71 (<i>d</i> ; 12,0)	5,58 (<i>d</i> ; 12,0)	81,0	128,7	H-3
3	4,88 (<i>d</i> ; 12,0)	4,98 (<i>d</i> ; 12,0)	48,8	81,0; 101,1; 128,7; 155,8; 161,8; 196,0	H-2
4	-	-	196,0	-	-
5	-	-	164,0	-	-
6	5,97 (<i>s</i>)	5,97 (<i>s</i>)	96,0	101,1; 163,5	*
7	-	-	163,5	-	-
8	5,97 (<i>s</i>)	5,97 (<i>s</i>)	96,2	101,1; 163,5; 166,6	*
9	-	-	166,6	-	-
10	-	-	101,1	-	-
1'	-	-	128,7	-	-
2' 6'	7,13 (<i>d</i> ; 8,5)	7,08 (<i>d</i> ; 8,5)	128,8	81,0; 128,8; 158,0	H-3'
3' 5'	6,38 (<i>d</i> ; 8,5)	6,60 (<i>d</i> ; 8,5)	114,6	114,6; 128,7; 158,0	H-2'
4'	-	-	158,0	-	-
5-OH	12,24 (<i>s</i>)	12,19 (<i>s</i>)	-	96,0; 101,1; 164,0	-
2''	-	-	164,0	-	-
3''	6,56 (<i>s</i>)	6,61 (<i>s</i>)	102,2	103,6; 121,8; 164,0; 182,0	-
4''	-	-	182,0	-	-
5''	-	-	161,0	-	-
6''	6,23 (<i>s</i>)	6,06 (<i>s</i>)	99,0	100,7; 103,6; 161,8	-
7''	-	-	161,8	-	-
8''	-	-	100,7	-	-
9''	-	-	155,8	-	-
10''	-	-	103,6	-	-
1'''	-	-	121,8	-	-
2'''	7,41 (<i>m</i>)	7,24 (<i>m</i>)	113,4	119,6; 146,2; 150,0	H-6'''
3'''	-	-	146,2	-	-
4'''	-	-	150,0	-	-
5'''	6,90 (<i>d</i> ; 8,5)	6,50 (<i>d</i> ; 8,5)	116,2	121,8; 146,2	H-6'''
6'''	7,41 (<i>m</i>)	6,96 (<i>m</i>)	119,6	113,4; 150,0; 164,0	H-2'''; H-5'''
5''-OH	13,05 (<i>s</i>)	12,89 (<i>s</i>)	-	99,0; 103,6; 161,0	-

(8a) representa o conformero principal e a série (8b) o conformero minoritário.

*valores não observados

Os valores de RMN de ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$.

6.2.7 Caracterização espectrométrica da substância 9

Figura 39 - Estrutura da substância **9**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **9** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

A substância **9** foi isolada da subfração AcOEt-FOL-16, conforme procedimento experimental em **5.6**.

Os resultados observados no espectro de RMN de ¹³C e ¹H, UV, IV e massas permitiram caracterizar **9** como sendo uma substância pertencente à classe dos biflavonóides tipo flavona-flavona.

O composto de estrutura C₃₀H₁₈O₁₀ apresentou-se como um sólido amarelo amorfo e apresentou bandas de absorção no UV características de flavonas (268 e 337 nm). A fórmula molecular foi obtida pelo espectro de massas no modo negativo (ESI) que apresentou o pico íon molecular em *m/z* 537 [M-H]⁻ (**Figura 41**). O tempo de retenção da substância **9** foi de *t_r*=33,4 min (**Figura 39**) mostrando que, sob mesmas condições de análise, uma mudança de posição da ligação inter-flavonoídica, faz com que a molécula apresente propriedades como polaridade bastante diferenciadas. A união entre as unidades I e II do flavonóide em **9** é do tipo 3'→8'' e para **5**, ocorre tipo 3→8''. Essa diferença na posição das ligações de união das unidades (isomeria de posição) faz com que **9** apresente uma polaridade significativamente menor que **5** (*t_r*=14,1 min).

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 40**) mostrou uma banda larga em 3490 cm⁻¹ correspondente à deformação axial da ligação O-H (ν_{O-H}), evidenciando a presença de hidroxila, uma banda em 2970 cm⁻¹ referente à deformação axial C-H de aromáticos (ν_{C-H}), uma banda em 1648 cm⁻¹ referente à carbonila conjugada da molécula

(ν_{C-O}), bandas em 1485 cm^{-1} atribuída à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) do anel aromático e ainda, bandas referentes à deformação angular no plano de C-H (δ_{C-H}) em 1062 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

Figura 40 - Espectro vibracional na região do IV da substância **9**.

Figura 41 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **9** obtido no modo negativo (ESI).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Anexos 74 a 76**) destacaram-se os sinais em δ_{C} 163,9 e δ_{C} 102,4 atribuídos a C-2 e C-3, respectivamente, evidenciando a subclasse das flavonas e os sinais em δ_{C} 181,9 e δ_{C} 181,6 correspondentes aos carbonos carbonílicos C-4 e C-4'' das unidades I e II (**Tabela 7**).

O espectro de RMN de ^1H (**Anexos 71 a 73**) mostrou a presença de dois singletos em δ_{H} 12,98 (unidade II) e δ_{H} 13,10 (unidade I), correspondentes a hidroxilas quelatadas com ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico situado em C-4 e C-4''. Destaca-se a presença de dois dubletos em δ_{H} 7,58 (2H, H-2'''/6''', $J=9,0\text{ Hz}$) e δ_{H} 6,66 (2H, H-3'''/5''', $J=9,0\text{ Hz}$) correspondentes à unidade II. Sinais de um anel aromático trissubstituído contendo um carbono carbinólico foram observados em δ_{H} 8,05 (*d*, H-2', $J=2,0\text{ Hz}$), δ_{H} 7,06 (*d*, H-5', $J=9,0\text{ Hz}$) e δ_{H} 7,96 (*dd*, H-6', $J=2,0; 9,0\text{ Hz}$), juntamente com

os dubletos de um anel aromático tetrassubstituído em δ_{H} 6,16 (*d*, H-6, $J=2,0$ Hz) e δ_{H} 6,40 (*d*, H-8, $J=2,0$ Hz).

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **9** (DMSO- d_6).

Posição	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
2	-	163,9	-	-
3	6,74 (<i>s</i>)	102,4	103,6; 163,9	-
4	-	181,9	-	-
5	-	161,3	-	-
6	6,16 (<i>d</i> ; 2,0)	98,7	93,9; 103,6; 161,3; 165,2	-
7	-	165,2	-	-
8	6,40 (<i>d</i> ; 2,0)	93,9	98,7; 103,6; 157,3; 165,2	-
9	-	157,3	-	-
10	-	103,6	-	-
1'	-	121,4	-	-
2'	8,05 (<i>d</i> ; 2,0)	131,3	104,1; 127,4; 161,8	H-6'
3'	-	120,1	-	-
4'	-	161,8	-	-
5'	7,06 (<i>d</i> ; 9,0)	116,9	120,1	H-6'
6'	7,96 (<i>dd</i> ; 2,0 e 9,0)	127,4	131,3; 161,8; 163,9	H-2'; H-5';
5-OH	13,10 (<i>s</i>)	-	98,7; 103,6; 161,3	-
2''	-	163,4	-	-
3''	6,79 (<i>s</i>)	102,6	102,4; 121,4; 163,4	-
4''	-	181,6	-	-
5''	-	160,4	-	-
6''	6,28 (<i>s</i>)	99,4	104,1	-
7''	-	*	-	-
8''	-	104,1	-	-
9''	-	*	-	-
10''	-	102,4	-	-
1'''	-	121,4	-	-
2''' 6'''	7,58 (<i>d</i> ; 9,0)	128,1	128,1; 160,8; 163,4	H-3'''
3''' 5'''	6,66 (<i>d</i> ; 9,0)	115,6	121,4; 160,8	H-2'''
4'''	-	160,8	-	-
5''-OH	12,98 (<i>s</i>)	-	99,4; 102,4; 160,4	-

*valores não observados

A correlação a longa distância (**Anexos 82 a 85**) foi útil para designar a união inter-flavonoídica, tipo 3'→8'', através da correlação de δ_{H} 8,05 (H-2') com δ_{C} 104,1 (C-8''), assim como o experimento de $g\text{COSY}$ (**Anexos 77 e 78**) que mostrou interação entre δ_{H} 8,05 (H-2') e com δ_{H} 7,96 (H-6'); de δ_{H} 7,06 (H-5') e δ_{H} 7,96 (H-6') e de δ_{H} 7,96 (H-6') com δ_{H} 8,05 (H-2') e δ_{H} 7,06 (H-5').

A análise destas informações em conjunto com os dados da literatura (CARBONEZI et al., 2007), permitiu identificar a substância **9** como amentoflavona, um biflavonóide já isolado dos frutos de *Garcinia xanthochymus* por Baggett et al. (2005).

6.2.8 Caracterização espectrométrica da substância **10**

Figura 42 - Estrutura da substância **10**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **10** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

A substância **10** foi isolada da subfração AcOEt-SIL-3, conforme procedimento experimental em **5.7**.

A substância **10** obtida como pó amorfo de coloração amarelada apresentou fórmula molecular de C₁₅H₁₂O₆ correspondendo ao íon m/z 287 [M-H]⁻. Além do pico íon molecular m/z 287 [M-H]⁻, a substância **10** apresentou pico íon base de m/z 259, correspondendo à perda de CO [M-H-28]⁻ e m/z 243, correspondendo à perda de CO₂ [M-H-44]⁻ (**Figura 44** e **Figura 45**).

O espectro de UV apresentou uma única banda em 290 nm, podendo ser atribuída a uma flavanona ou diidroflavonol (**Figura 42**).

O espectro de absorção na região do IV de **10** apresentou bandas em 3733 e 3616 cm⁻¹ referentes à deformação axial da ligação O-H (ν_{O-H}), uma banda em 2995 cm⁻¹ referente à deformação axial C-H de aromáticos (ν_{C-H}), uma banda em 1678 cm⁻¹ referente à carbonila da molécula (ν_{C=O}) e bandas em 1631, 1509 e 1456 cm⁻¹ atribuídas à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) do anel aromático (**Figura 43**). Exibiu ainda, bandas com absorção em 1160 e 1083 cm⁻¹ associada a deformações axiais C-O (ν_{C-O}) e uma banda em 821 cm⁻¹

relacionada à deformação angular fora do plano das ligações C-H (δ_{C-H}) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

Figura 43 - Espectro vibracional na região do IV da substância **10**.

Figura 44 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **10**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com os dados acima, permitiram inferir que a substância **10** pertence à subclasse dos diidroflavonol ou flavanonol.

O espectro de RMN ^1H (Anexos **86** e **87**) apresentou um par de dubletos em δ_{H} 5,84 e 5,90, sugerindo um anel A 5, 7, 9, 10-tetrassubstituído e 5, 7, 9-trioxigenado. Os sinais integrando para 2H em δ_{H} 7,30 e 6,77 podem ser atribuídos aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', sugerindo padrão de substituição 1,4-dissubstituído para o anel B. O espectro ainda

mostrou dois dubletos em δ_H 5,03 (H-2, $J=11,5$ Hz) e 4,51 (H-3, $J=11,5$ Hz), sugerindo um acoplamento do tipo axial-axial e a proposta de que o anel B e o grupo hidroxila em C-3 mantêm uma relação *anti*.

Entre outras feições, o espectro de gHMQC (**Anexos 91 e 92**) mostrou a correlação entre o sinal em δ_H 5,03 e δ_C 82,0; e entre o sinal δ_H 4,51 e δ_C 71,0, associados aos C e H nas posições 2 e 3, respectivamente, confirmando a proposta estrutural de um diidroflavonol.

O espectro de gHMBC (**Anexos 93 a 96**) corrobora a proposição estrutural à medida que revela importantes acoplamentos a longa distância, entre eles, o acoplamento existente entre o hidrogênio H-2 (δ_H 5,03) e os carbonos C-3, C-1', C-2'/6' e C-4; entre H-3 (δ_H 4,51) e C-2; entre H-2'/6' (δ_H 7,30) e C-2 e C-4' e entre H-3'/5' (δ_H 6,77) e os carbonos C-1' e C-4' (**Tabela 8**).

A substância **10** apresentou $[\alpha]_D^{25} = +70,5$ ($c=1,0$ mg.mL⁻¹) em MeOH. A análise da curva de dicroísmo circular indicou efeito Cotton negativo para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em aproximadamente 290 nm e efeito Cotton positivo para as transições $n \rightarrow \pi^*$ em 330 nm. (**Figura 46**). Assim, a partir de dados de DC da literatura para os estereoisômeros do diidrokaempferol (LI et al., 2002) foi possível identificar a substância **10** como (2*R*,3*R*)-diidrokaempferol, um diidroflavonol ainda não identificado na espécie *G. xanthochymus*.

Figura 45 - Proposta de fragmentação da substância **10**.

Figura 46 - Curva de dicroísmo circular (DC) da substância **10**.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **10** (DMSO- d_6).

Posição	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
2	5,03 (<i>d</i> ; 11,5)	82,0	71,0; 127,4; 129,0; 197,0	H-3
3	4,51 (<i>d</i> ; 11,5)	71,0	82,0	H-2
4	-	197,0	-	-
5	-	162,0	-	-
6	5,84 (<i>d</i> ; 2,0)	94,0	96,3; 100,2; 162,0; 167,0	-
7	-	167,0	-	-
8	5,90 (<i>d</i> ; 2,0)	96,3	94,0; 100,2; 163,0; 167,0	-
9	-	163,0	-	-
10	-	100,2	-	-
1'	-	127,4	-	-
2' 6'	7,30 (<i>d</i> ; 8,0)	129,0	82,0; 129,0; 158,1	H-3'
3' 5'	6,77 (<i>d</i> ; 8,0)	115,0	115,0; 127,4; 158,1	H-2'
4'	-	158,1	-	-
5-OH	11,96 (<i>s</i>)	-	*	-

* valores não observados

Os valores de RMN de ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$.

6.2.9 Caracterização espectrométrica da substância **11**

A substância **11** foi isolada da subfração AcOEt-SIL-4, conforme procedimento experimental em **5.8**.

A substância **11** obtida como cristais amarelos apresentou espectro de UV típico de flavanonas, com uma única banda em 291 nm (**Figura 47**).

O espectro de absorção na região do IV de **11** (**Figura 48**) foi bastante similar ao espectro de **8**, com bandas correspondentes à deformação axial da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) em 3733 e 3621 cm^{-1} . Também exibiu uma banda em 2954 cm^{-1} referente à deformação axial C-H de aromáticos ($\nu_{\text{C-H}}$), uma banda em 1626 cm^{-1} referente à carbonila da molécula ($\nu_{\text{C=O}}$).

o), uma banda em 1515 cm^{-1} atribuída à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) do anel aromático, bandas com absorção em 1160 e 1078 cm^{-1} associada a deformações axiais C-O (ν_{C-O}) e ainda, uma banda em 811 cm^{-1} relacionada à deformação angular fora do plano das ligações C-H (δ_{C-H}) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994; JACKSON et al., 1966).

A fórmula molecular de $C_{30}H_{22}O_{11}$ foi obtida a partir do íon molecular m/z 557 $[M-H]^-$, através do espectro de massa obtido no modo negativo e ionização por ESI. O padrão de fragmentação de **11** (Figura 49 e Figura 50) sugeriu sua natureza dimérica, através do íon em m/z 431 $[M-H]^-$, referente à perda de floroglucinol (126 u) e o íon em m/z 295 $[M-H]^-$, referente à perda de 136 u por um mecanismo via Retro-Diels-Alder (RDA).

Figura 47 - Estrutura da substância **11**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **11** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m).

Figura 48 - Espectro vibracional na região do IV da substância **11**.

Figura 49 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **11**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 50 - Proposta de fragmentação da substância **11**.

A substância **11** também apresentou duplicação dos sinais no espectro de RMN à temperatura ambiente, devido ao efeito de atropoisomerismo, evidenciando uma ligação tipo C3→C8'' para o biflavonóide proposto (**Anexos 97 a 99**).

Devido à complexidade dos espectros, principalmente nas regiões de atribuições aromáticas entre δ_H 5,30 a 7,12, realizou-se um experimento dinâmico de RMN de 1H a 25°C, 45°C, 65°C e 90°C. Observou-se, que em 45°C os sinais duplos coalesceram (pico único alargado), a 65°C começaram a desaparecer os sinais do conformero minoritário e por último a 90°C, houve a predominância do conformero principal. O aquecimento acelerou a velocidade de interconversão, fazendo com que a barreira energética fosse superada mais facilmente e assim, favorecesse a formação exclusiva do conformero mais estável (**Figura 51**).

Tabela 9 - Dados de RMN de 1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **11** (DMSO- d_6).

Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))			δ_C (ppm) (25°C)	$gHMBC$ (25°C)
	11a (25°C)	11b (25°C)	11a (90°C)		
2	5,71 (<i>d</i> ; 12,0)	5,44 (<i>m</i>)	5,70 (<i>d</i> ; 12,0)	81,4	129,0
3	4,55 (<i>d</i> ; 12,0)	4,68 (<i>d</i> ; 12,0)	4,58 (<i>d</i> ; 12,0)	47,3	81,4; 101,3; 160,7; 164,4; 196,6
4	-	-	-	196,6	-
5	-	-	-	163,8	-
6	5,90 (<i>s</i>)	5,90 (<i>s</i>)	5,90 (<i>s</i>)	96,1	95,0; 101,2; 162,8
7	-	-	-	162,8	-
8	5,90 (<i>s</i>)	5,90 (<i>s</i>)	5,90 (<i>s</i>)	95,0	96,1; 101,2; 166,4
9	-	-	-	166,4	-
10	-	-	-	101,2	-
1'	-	-	-	129,8	-
2' 6'	7,12 (<i>m</i>)	7,12 (<i>m</i>)	7,09 (<i>d</i> ; 8,8)	129,0	81,4; 129,0; 157,7
3' 5'	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,63 (<i>d</i> ; 8,8)	114,8	*
4'	-	-	-	157,7	-
5-OH	12,16 (<i>s</i>)	12,18 (<i>s</i>)	12,17 (<i>s</i>)	-	96,1; 101,2; 163,8
2''	5,44 (<i>m</i>)	5,30 (<i>d</i> ; 12,0)	5,35 (<i>dd</i> ; 2,8 e 12,8)	78,5	129,0
3''	2,67 (<i>m</i>)	2,67 (<i>m</i>)	2,64 (<i>dd</i> ; 2,8 e 17,2)	43,2	78,5; 196,1
4''	2,93 (<i>m</i>)	2,93 (<i>m</i>)	3,01 (<i>dd</i> ; 12,8 e 17,2)	-	78,5; 196,1
5''	-	-	-	196,1	-
6''	-	-	-	162,0	-
7''	5,86 (<i>s</i>)	5,86 (<i>s</i>)	-	95,0	101,1; 101,3; 162,0
8''	-	-	-	164,4	-
9''	-	-	-	101,3	-
10''	-	-	-	160,7	-
1'''	-	-	-	101,1	-
2'''	-	-	-	129,0	-
3'''	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,84 (<i>d</i> ; 1,6)	113,5	*
4'''	-	-	-	145,3	-
5'''	-	-	-	145,7	-
6'''	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,59-6,87 (<i>m</i>)	6,72 (<i>d</i> ; 8,8)	115,3	*
7'''	7,12 (<i>m</i>)	7,12 (<i>m</i>)	7,11 (<i>dd</i> ; 1,6 e 8,8)	117,5	129,0
5''-OH	12,13 (<i>s</i>)	12,05 (<i>s</i>)	12,09 (<i>s</i>)	-	95,0; 101,1; 162,0

(**11a**) representa o conformero principal e a série (**11b**) o conformero minoritário.

* sinais sobrepostos

Com o desaparecimento das linhas espectrais duplicadas, os sinais espectrais foram atribuídos inequivocamente para a substância **11**, de maneira consistente com esqueleto

carbônico descrito acima. Os sinais de RMN ^1H do confômero principal foram listados na **Tabela 9**, assim como dados do experimento de RMN ^{13}C (**Anexos 100 a 104**) e gHMBC (**Anexos 116 a 125**). Para o confômero minoritário, só foram descritos os sinais de RMN ^1H , pois os sinais de RMN ^{13}C foram de baixa intensidade.

O espectro de RMN ^1H a 90°C mostrou dois singletos referentes a hidrogênios de hidroxilas quelatadas bastante desprotegidos em δ_{H} 12,09 e 12,17, capaz de estabelecer uma ligação intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4. O espectro mostrou ainda um sinal em δ_{H} 7,09 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz, H-2'/6') e um sinal em δ_{H} 6,63 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz, H-sinal 3'/5'), correspondendo à unidade I e δ_{H} 7,11 (1H, *dd*, $J=8,8$ Hz, H-6'''), δ_{H} 6,72 (1H, *d*, $J=8,8$ Hz, H-5''') e δ_{H} 6,84 (1H, *d*, $J=1,6$ Hz, H-2'''), correspondendo à unidade II.

Baseando-se nos espectros de gCOSY (**Anexos 108 a 111**), gHMQC (**Anexos 112 a 115**) e DEPT (**Anexos 105 a 107**), dois dubletos em δ_{H} 5,70 e 4,58 com constante igual a $J=12,0$ Hz foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente. Os sinais em δ_{H} 2,64 (*dd*, $J=17,2$ e 2,8) e 3,01 (*dd*, $J=17,2$ e 12,8) foram atribuídos ao carbono metilênico em δ_{C} 43,2 (C-3''), evidenciando a presença de hidrogênios geminais no anel B da unidade II da flavanona.

A correlação a longa distância foi útil para designar a união inter-flavonoídica, tipo 3 $\rightarrow$ 8'', através da correlação do sinal em δ_{H} 4,58 (H-3) e δ_{C} 101,3 (C-8''); 160,7 (C-9'') e 164,4 (C-7''). Também mostrou importantes correlações entre o sinal em δ_{H} 4,58 (H-3) com δ_{C} 81,4 (C-2) e 196,6 (C-4) e entre δ_{H} 2,64 e 3,01 e δ_{C} 78,5 (C-2'') e 196,1 (C-4''), confirmando a proposta do esqueleto flavanoídico.

A substância **11** apresentou $[\alpha]_D^{25} = +7,8$ ($c=1,0$ mg.mL $^{-1}$) em MeOH.

A partir dos experimentos espectrométricos, analisados em conjunto com os dados da literatura (COMPAGNONE, et al., 2008; KONOSHIMA et al., 1970), pode-se inferir que a substância **11** é o biflavonóide GB2a, uma biflavanona isolada dos frutos de *G. xanthochymus* por Konoshima et al. em 1970.

Figura 51 - Experimento de RMN ^1H com temperatura variável da substância **11**.

6.2.10 Caracterização espectrométrica da substância **12**

A substância **12** foi isolada da subfração AcOEt-SIL-4, conforme procedimento experimental em **5.8**.

A substância **12** obtida como cristais amarelos apresentou fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$, obtida pelo espectro de massas no modo negativo (ESI), no qual apresentou íon molecular em m/z 539 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e um único fragmento em m/z 413 $[\text{M}-\text{H}]^-$, justificado pela perda do floroglucinol (126 u), como mostrado nas **Figura 54** e **Figura 55**.

O espectro de absorção no UV apresentou bandas em 289 nm e 330 nm, características da subclasse flavona/flavanona. Pode-se notar também, um deslocamento hipsocrômico da banda I de **12** (330 nm) em relação à banda I de **8** (348 nm), sugerindo menor grau de oxigenação em **12** nos anéis B ou C (**Figura 52**).

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 53**) mostrou bandas correspondentes à deformação axial da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) em 3733, 3592 e 3621 cm^{-1} . O espectro também exibiu uma banda em 2927 cm^{-1} referente à deformação axial C-H de aromáticos ($\nu_{\text{C-H}}$), uma banda em 1645 cm^{-1} referente à carbonila conjugada da molécula ($\nu_{\text{C=O}}$), bandas em

1509 e 1452 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de C-C ($\nu_{\text{C-C}}$) do anel aromático, absorção em 1170 cm^{-1} associada a deformações axiais C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) e ainda, uma banda em 816 cm^{-1} relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

O espectro de RMN ^1H de **12** (Anexos 126 e 127) apresentou igual complexidade de **8** e **11**, fenômeno caracterizado pela união interflavonoídica tipo C3→C-8'' (atropoisomerismo). No entanto, a substância **12** apresentou padrão de substituição *para*-hidroxilado em ambos os anéis B, com um sinal em δ_{H} 7,11 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-2'/6') e um sinal em δ_{H} 6,36 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-3'/5'), correspondendo à unidade I e sinais em δ_{H} 7,92 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-2'''/6''') e δ_{H} 6,94 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz, H-3'''/5'''), associados à unidade II. Mostrou ainda, dois dubletos em δ_{H} 5,67 e 4,97 com constante de acoplamento de $J=12,0$ Hz, atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, evidenciando a subclasse das flavanonas.

O espectro de RMN ^{13}C (Anexos 128 a 131) mostrou sinais para dois carbonos com deslocamento químico característico de carbonilas de flavona (δ_{C} 181,6) e flavanona (δ_{C} 196,3), como também apresentou sinais em δ_{C} 47,3 e 80,8, confirmando o esqueleto flavanoídico proposto para a unidade I.

Figura 52 - Estrutura da substância **12**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **12** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).

Figura 53 - Espectro vibracional na região do IV da substância **12**.

O experimento de gHMBC (**Anexos 141 a 146**) foi útil para estabelecer a posição da ligação dimérica, através da correlação entre H-3 (δ_H 4,97) com C-8'' (δ_C 100,7) comprovando que a união das unidades ocorre tipo 3→8''. Também mostrou interação entre δ_H 13,01 com δ_C 95,1; 101,5 e 163,6 e δ_H 12,32 com δ_C 98,6; 103,0 e 160,5, sugerindo a presença de um núcleo flavonoídico na forma dimérica, oxigenado nas posições C-5 e C-5'' em ambas as unidades (**Tabela 10**).

A substância **12** apresentou $[\alpha]_D^{25} = +157,2$ ($c=1,0$ mg.mL⁻¹) em MeOH. A análise da curva de dicroísmo circular (**Figura 56**) mostrou semelhante efeito Cotton que **8** (positivo para as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ em 345 e 285 nm, respectivamente), chegando a conclusão de uma configuração absoluta de 2*R*, 3*S* para **12**.

Diante de todos esses dados e comparação com os existentes na literatura (HERBIN et al., 2007) pode-se identificar a substância **12** como (2*R*, 3*S*)-volkensiflavona, isolada de várias espécies de *Garcinia* (HERBIN et al., 1970; Konoshima et al., 1970; PELTER et al., 1971; VERDI et al., 2004).

Figura 54 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 12, obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).

Figura 55 - Proposta de fragmentação da substância 12.

Figura 56 - Curva de dicróismo circular (DC) da substância 12.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **12** ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	δ_{H} (ppm)		δ_{C} (ppm)	gHMBC	gCOSY
	(multiplicidade; J (Hz)) (12a)	(12b)			
2	5,67 (<i>d</i> ; 12,0)	5,55 (<i>d</i> ; 12,0)	80,8	128,4	H-3
3	4,97 (<i>d</i> ; 12,0)	4,99 (<i>d</i> ; 12,0)	47,3	80,8; 100,7; 196,3	H-2
4	-	-	196,3	-	-
5	-	-	163,6	-	-
6	5,96 (<i>s</i>)	5,96 (<i>s</i>)	95,1	101,5; 166,4	-
7	-	-	166,4	-	-
8	5,96 (<i>s</i>)	5,96 (<i>s</i>)	96,0	163,7	-
9	-	-	163,7	-	-
10	-	-	101,5	-	-
1'	-	-	128,4	-	-
2' 6'	7,11 (<i>d</i> ; 8,5)	7,10 (<i>d</i> ; 8,5)	128,7	80,8; 128,7; 157,2	H-3'
3' 5'	6,36 (<i>d</i> ; 8,5)	6,60 (<i>d</i> ; 8,5)	114,3	114,3; 128,4	H-2'
4'	-	-	157,2	-	-
5-OH	13,01 (<i>s</i>)	12,97 (<i>s</i>)	-	95,1; 101,5; 163,6	-
2''	-	-	163,9	-	-
3''	6,64 (<i>s</i>)	6,77 (<i>s</i>)	102,2	103,0; 121,1; 163,9	-
4''	-	-	181,6	-	-
5''	-	-	160,5	-	-
6''	6,22 (<i>s</i>)	6,05 (<i>s</i>)	98,6	100,7; 103,0; 160,9	-
7''	-	-	160,9	-	-
8''	-	-	100,7	-	-
9''	-	-	157,5	-	-
10''	-	-	103,0	-	-
1'''	-	-	121,1	-	-
2''' 6'''	7,92 (<i>d</i> ; 8,5)	7,61 (<i>d</i> ; 8,5)	128,8	128,8; 161,1; 163,9	H-3'''
3''' 5'''	6,94 (<i>d</i> ; 8,5)	6,61 (<i>d</i> ; 8,5)	115,9	121,1	H-2'''
4'''	-	-	161,1	-	-
5''-OH	12,32 (<i>s</i>)	12,28 (<i>s</i>)	-	98,6; 103,0; 160,5	-

(12a) representa o conformero principal e a série (12b) o conformero minoritário.

6.2.11 Caracterização espectrométrica da substância 13

Figura 57 - Estrutura da substância **13**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **13** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μm).

A substância **13** foi isolada da subfração AcOEt-SIL-5, conforme procedimento experimental em **5.8**.

A substância **13** apresentou bandas em 260 e 291 nm (**Figura 57**), evidenciando a presença de derivados do ácido protocatecuico (AO et al., 2009).

Os grupos funcionais presentes na estrutura da substância **13** foram caracterizados pelas frequências das bandas observadas no espectro de absorção na região do IV (**Figura 58**). O espectro mostrou uma banda em 3476 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H}}$), uma banda em 1666 cm^{-1} referente à carbonila conjugada da molécula anel ($\nu_{\text{C=O}}$), bandas em 1589 e 1501 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de C-C ($\nu_{\text{C-C}}$) do anel aromático, absorção em 1277 e 1202 cm^{-1} associada a deformações axiais C-O ($\nu_{\text{C-O}}$) e ainda uma banda em 821 cm^{-1} relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H ($\delta_{\text{C-H}}$) do anel (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

Figura 58 - Espectro vibracional na região do IV da substância **13**.

O espectro de massas de **13** (**Figura 59** e **Figura 60**) obtido no modo negativo (ESI) exibiu fragmentos de m/z 167 [M-H, pico íon molecular]⁻, m/z 152 [M-H-15, desmetilação]⁻, 123 [M-H-44, descarboxilação]⁻ e m/z 108 [M-H-15-44]⁻. A partir da composição elementar $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$, fornecida pelo pico íon molecular, foram sugeridos três análogos metilados do ácido protocatecuico: um éster (**a**) e dois éteres metílicos, sendo um alquilado na posição 3 (**b**) e outro na posição 4 (**c**).

Para definir a estrutura correta da molécula foram analisados, juntamente com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , dados de interação à longa distância.

O espectro de ^1H (**Anexos 147 e 148**) forneceu um duplete de $J=8,5$ Hz em δ_{H} 6,81 correspondente a H-5 (1H), um multiplete em δ_{H} 7,42 (2H), correspondente a H-2 e H-6 e um singlete em δ_{H} 3,79 (3H) relacionados a hidrogênios metoxílicos. Já o espectro de gHMQC (**Anexos 151 e 152**) mostrou a presença de um sinal em δ_{C} 168,0 (típico de carbonila), dois sinais em δ_{C} 147,2 e 151,0, característicos de carbonos aromáticos oxigenados e um sinal em δ_{C} 55,6, confirmando a presença da metoxila no esqueleto da molécula.

O espectro de gHMBC (**Anexos 153 e 154**) exibiu uma correlação entre o sinal em δ_{H} 7,42 e o sinal em δ_{C} 168,0, confirmando a posição da carbonila em C-1. Também mostrou a correlação de H-2 com os sinais em δ_{C} 123,4; 147,2; 151,0 e 168,0, de H-6 com os sinais δ_{C} 112,8; 151,0; 168,0 e de H-5 com os sinais δ_{C} 123,4; 147,2; 151,0 (**Tabela 11**).

O espectro de gHMBC mostrou ainda, o acoplamento entre os hidrogênios metílicos (δ_{H} 3,79) com o carbono aromático C-3 (δ_{C} 147,2), evidenciando a presença de um grupamento éter alquil-aril e justificando a proposta **(b)**. Além disso, no espectro de massas não foram observados picos em m/z 149 e m/z 135, característicos de moléculas que possuem grupos contendo hidrogênio na posição *orto* em relação ao grupo carboxílico. Este “efeito orto” ocorre, pois tais substituintes podem formar um estado de transição de seis átomos que facilita a eliminação de moléculas neutras como H_2O (18 u) ou CH_3OH (32 u).

Baseando-se nas informações espectrais e comparando-as com os dados da literatura (SCOTT, 1972; SOUZA FILHO et al., 2006) concluiu-se que a substância **13** é descrita pela proposta **(b)** e identificada como ácido vanílico.

Figura 59 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **13**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).

Figura 60 - Proposta de fragmentação da substância **13**.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **13** ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
1	-	*	-	-
2	7,42 (<i>m</i>)	112,8	123,4; 147,2; 151,0; 168,0	*
3	-	147,2	-	-
4	-	151,0	-	-
5	6,81 (<i>d</i> ; 8,5)	115,0	123,4; 147,2; 151,0	H-6
6	7,42 (<i>m</i>)	123,4	112,8; 151,0; 168,0	H-5
7	-	168,0	-	-
8	3,79 (<i>s</i>)	55,6	147,2	-

*valores não observados

Os valores de RMN de ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$.

6.2.12 Caracterização espectrométrica da substância 14

A substância **14** foi isolada da subfração AcOEt-SIL-5, conforme procedimento experimental em **5.8**.

A substância **14** foi isolada como cristais amarelos e apresentou fórmula molecular $C_{30}H_{22}O_{12}$, confirmada pela espectro de massas obtido no modo negativo (ESI), através do íon molecular m/z 573 $[M-H]^-$ e pelos fragmentos em m/z 447 $[M-H-126]^-$, m/z 429 $[M-H-126-H_2O]^-$ e m/z 419 $[M-H-126-CO]^-$ (**Figura 63** e **Figura 64**). Apresentou perfil espectral similar ao de **11** na região do IV e, em relação às bandas no UV apresentou características da subclasse das flavanonas (**Figura 61**). Salienta-se, o deslocamento batocrômico da banda II em relação a **11**, sugerindo hidroxila adicional em **14**, consistente também com a redução no tempo de retenção observado: $t_r=6,1$ min para **14** e $t_r=9,8$ min para **11**.

Figura 61 - Estrutura da substância **14**. (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **14** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m).

De uma maneira geral, os espectros de RMN das substâncias **11** e **14** apresentaram-se muito semelhantes. Basicamente, a diferença refere-se aos sinais em δ_H 4,13 ($J=12,0$ Hz) e 4,92 ($J=12,0$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3'' e H-2'', respectivamente (**Anexos 155** a **157**), o que elimina a possibilidade de hidrogênios geminais no anel C, como ocorre em **11**. Este fato também foi confirmado pelo espectro de RMN de ^{13}C (**Anexos 158** a **161**), que exibiu sinais em δ_C 82,7 (C-2'') e 71,9 (C-3''), típicos da subclasse dos diidroflavonois (**Tabela 12**).

A substância **14** apresentou $[\alpha]_D^{25} = +187,6$ ($c=1,0$ mg.mL⁻¹) em MeOH.

A partir dos dados espectrométricos, incluindo a análise das correlações nos mapas gHMQC (Anexos 165 a 167) e gHMBC (Anexos 168 a 172), associados à comparação com dados da literatura pode-se identificar **14** como o biflavonóide GB2, já isolado dos caules de *Garcinia xanthochymus* (KONOSHIMA et al., 1970).

GB2 apresentou efeito Cotton positivo para as transições $n \rightarrow \pi^*$ em 345 nm e efeito Cotton negativo para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em 285 nm (Figura 62). Há poucos relatos sobre a estereoquímica de biflavonóides do tipo GB, ora porque a magnitude do sinal da curva de

Tabela 12 - Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e RMN de ¹³C (125 MHz) da substância **14** (DMSO-*d*₆).

Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))			δ_C (ppm) (25°C)	gHMBC
	16a (25°C)	16b (25°C)	16a (90°C)		
2	5,66 (<i>m</i>)	5,35 (<i>d</i> ; 12,0)	5,62 (<i>d</i> ; 12,0)	81,2	129,4
3	4,45 (<i>d</i> ; 12)	4,65 (<i>d</i> ; 12,0)	4,53 (<i>d</i> ; 12,0)	47,2	81,2; 101,0; 160,1; 164,4; 196,5
4	-	-	-	196,5	-
5	-	-	-	164,4	-
6	5,88 (<i>s</i>)	5,88 (<i>s</i>)	5,90 (<i>d</i> ; 2,0)	96,0	95,3; 101,0; 166,3
7	-	-	-	166,3	-
8	5,88 (<i>s</i>)	5,88 (<i>s</i>)	5,90 (<i>d</i> ; 2,0)	95,3	101,0; 163,3
9	-	-	-	163,3	-
10	-	-	-	101,0	-
1'	-	-	-	129,4	-
2' 6'	7,10 (<i>m</i>)	7,10 (<i>m</i>)	7,10 (<i>d</i> ; 8,5)	128,8	81,2; 128,8; 157,7
3' 5'	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,74 (<i>d</i> ; 8,5)	115,3	*
4'	-	-	-	157,7	-
5-OH	12,17 (<i>s</i>)	12,19 (<i>s</i>)	12,09 (<i>s</i>)	-	96,0; 101,0; 164,4
2''	4,87 (<i>d</i> ; 12,0)	4,99 (<i>d</i> ; 12,0)	4,92 (<i>d</i> ; 12,0)	82,7	118,9; 128,0; 197,5
3''	3,95 (<i>m</i>)	4,19 (<i>m</i>)	4,13 (<i>d</i> ; 12,0)	71,9	82,7
4''	-	-	-	197,5	-
5''	-	-	-	162,7	-
6''	5,88 (<i>s</i>)	5,88 (<i>s</i>)	5,88 (<i>s</i>)	95,7	100,2
7''	-	-	-	164,4	-
8''	-	-	-	100,2	-
9''	-	-	-	160,1	-
10''	-	-	-	99,7	-
1'''	-	-	-	128,0	-
2'''	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,82 (<i>d</i> ; 1,6)	114,8	*
3'''	-	-	-	144,5	-
4'''	-	-	-	145,8	-
5'''	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,75 (<i>m</i>)	115,3	*
6'''	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,60-6,84 (<i>m</i>)	6,64 (<i>dd</i> ; 1,6 e 8,8)	118,9	*
5''-OH	11,82 (<i>s</i>)	12,79 (<i>s</i>)	11,62 (<i>s</i>)	-	95,7; 99,7; 162,7

(**16a**) representa o conformero principal e a série (**16b**) o conformero minoritário.

* sinais sobrepostos

dicroísmo é muito baixa, ora pelo efeito atropisomérico da ligação 3→8''. Ferrari e seus colaboradores (2003) fizeram uma revisão sobre a configuração absoluta dos biflavonóides GB1, GB2, GB4 e GB4a e propuseram os sinais dos efeitos Cottons de cada estereoisômero. Para GB2, a configuração absoluta de 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R* é caracterizada pelo efeito Cotton positivo em 345 nm e efeito Cotton negativo em 285 nm, semelhante à curva de DC mostrada por **14**. Conclui-se afinal, que a substância **14** é o biflavonóide (2*R*,3*S*,2''*R*, 3''*R*)-5,7,4',5'',7'',3'', 3''',4'''-octaidroxi-(3,8'')-biflavanona.

Em relação às biflavanonas (livres na posição C-3'') GB1a e GB2a, isoladas da fração AcOEt-FOL, a curva de DC foi similar a da substância **14** (**Figura 62**), porém, para uma atribuição completa e inequívoca dos sinais do efeito Cotton, serão necessários experimentos adicionais, visto que ainda não há relato sobre a configuração absoluta dos possíveis estereoisômeros.

Figura 62 - Curva de dicroísmo circular (DC) das substâncias (a) **11** e (b) **14**.

Figura 63 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **14**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 64 - Proposta de fragmentação da substância 14.

6.2.13 Caracterização espectrométrica das substâncias 17 e 18

As substâncias **17** e **18** foram isoladas da subfração BuOH-FOL-6, conforme procedimento experimental em **5.10**.

A substância **17** isolada como um sólido amarelo claro amorfo apresentou fórmula molecular de $C_{16}H_{18}O_9$ correspondendo à massa molecular de 354 g.mol^{-1} . Em análise por CLAE-UV-DAD a substância mostrou um caráter bastante polar, eluindo com $t_r = 4,4$ min com fase móvel de 75% de água. No espectro na região do UV (**Figura 65**) apresentou bandas com comprimentos de onda de absorção máxima em 329 nm e um ombro em 290 nm, típico de moléculas com unidades cafeoíla em sua estrutura (MAISUTHISAKUL et al., 2007).

A análise do espectro de absorção na região do IV (**Figura 66**) conduziu à identificação de alguns grupos funcionais como: hidroxila, devido a uma banda larga em 3374 cm^{-1} característica da deformação axial da ligação O-H (ν_{O-H}); carbonila conjugada, evidenciada por uma banda em 1698 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$); anel aromático, devido a bandas em 1500 e 1597 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de C-C (ν_{C-C}) e as bandas em 814 e 976 cm^{-1} relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H (δ_{C-H}), e ainda, carbonos oxigenados, reconhecidos através das absorções em 1263 e 1158 cm^{-1} associadas

Figura 65 - Estruturas das substâncias **17** e **18**. (a) Cromatogramas analíticos e (b) espectros de absorção das substâncias **17** e **18** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 35:75 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

Figura 66 - Espectro vibracional na região do IV da substância **17**.

Tabela 13 - Dados de RMN de ¹H (500 MHz) e RMN de ¹³C (125 MHz) da substância **17** (DMSO-*d*₆).

Posição	δ _H (ppm) (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	δ _C (ppm)	<i>g</i> HMBC	<i>g</i> COSY
1'	-	125,7	-	-
2'	7,00 (<i>d</i> ; 2,0)	114,5	121,0; 144,3; 148,9	H-6'
3'	-	145,5	-	-
4'	-	148,9	-	-
5'	6,75 (<i>d</i> ; 8,0)	115,7	145,5; 148,9	H-6'
6'	6,95 (<i>dd</i> ; 8,0 e 2,0)	121,0	114,5; 144,3; 148,9	H-2'; H-5'
7'	7,44 (<i>d</i> ; 16,0)	144,3	114,5; 125,7; 166,0	H-8'
8'	6,19 (<i>d</i> ; 16,0)	115,0	125,7; 166,0	H-7'
9'	-	166,0	-	-
1	-	72,9	-	-
2	1,97-2,01 (<i>m</i>)	35,1	39,0; 70,9	H-3
3	5,17 (<i>m</i>)	70,9	166,0	H-2; H-4
4	3,53 (<i>d</i> ; 4,0)	71,2	*	H-5; H-3
5	3,85 (<i>m</i>)	67,2	70,9; 72,9	H-6; H-4
6	1,83-1,91 (<i>m</i>)	39,0	67,2; 72,9	H-5
7	-	176,1	-	-

* sinal não observado

a deformações axiais C-O (ν_{C-O}) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

O espectro de RMN de 1H (**Anexos 173 a 176**) da substância **17** apresentou sinais característicos de substância aromática. Os sinais em δ_H 7,00 (*d*, 1H, 2,0 Hz), 6,95 (*dd*, 1H, 8,0 e 2,0 Hz) e 6,75 (*d*, 1H, 8,0 Hz) indicaram a presença de anel aromático 1,3,4-trissubstituído (**Tabela 13**). Foram observados ainda sinais em δ_H 7,44 (*d*, 1H, 16,0 Hz) e 6,19 (*d*, 1H, 16,0 Hz) que indicaram a presença de ligação dupla *trans*-disubstituída. A análise do conjunto destes sinais evidenciou a presença da porção do ácido cafeico. O espectro de RMN de 1H exibiu ainda os sinais em δ_H 5,17 e 3,85, característicos de hidrogênios oximetínicos.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo 177, Tabela 13**) confirmou a presença da unidade do ácido cafeico pelos sinais em δ_C 166,0; 148,9; 145,5; 144,3; 125,7; 121,0; 115,7 e 114,5. Foram observados sinais de carbonos carbinólicos em δ_C 72,9; 71,2; 70,9 e 67,2 e sinais de carbonos metilênicos em δ_C 35,1 e 39,0. O espectro mostrou ainda, sinal para carbono de carboxila em δ_C 176,1, sugerindo a estrutura do ácido quínico.

Os acoplamentos observados no mapa de correlação gHMBC (**Anexos 185 a 190**) entre os hidrogênios em δ_H 7,44 (H-7') e δ_H 6,19 (H-8') com o carbono em δ_C 166,0 (atribuída a carbonila de éster em C-9'), confirmaram o sistema carbonílico α , β -insaturado conjugado ao anel. A localização do ácido quínico na estrutura foi determinada pela existência de acoplamento a longa distância entre o sinal do hidrogênio em δ_H 5,17 (H-3) do ácido quínico e o sinal do carbono carboxílico do ácido cafeico em δ_C 166,0, indicando a esterificação do ácido cafeico pelo ácido quínico.

Essas observações, associadas aos dados da literatura, permitiram identificar a substância **17** como ácido 3-*O*-cafeoilquínico ou ácido clorogênico (3-ACQ).

A substância **18** apresentou um mesmo perfil espectral (**Anexos 191 a 209**), porém em análise por CLAE-UV-DAD (**Figura 65**) o tempo de retenção foi de 5,1 min, diferente de **17**, que mostrou tempo de retenção igual a 4,4 min, nas mesmas condições. Essa diferença nos levou a investigar a ocorrência de um possível isômero do ácido clorogênico.

Os derivados do ácido clorogênico são resultantes de esterificações de um ou mais tipos de ácidos *trans*-cinâmicos (cinâmico, cumárico, cafeico, ferúlico e dimetoxicinâmico) com as hidroxilas do ácido quínico, gerando uma série de isômeros de posição. Os derivados com esterificações nas posições 3, 4 e 5 são de ocorrência comum, ao contrário dos derivados com esterificação na posição 1, de ocorrência rara.

Pela análise dos espectros de RMN ^1H , nota-se uma grande similaridade estrutural entre **17** e **18**, com pequenas variações nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamento. A diferenciação se dá principalmente, pela estereoquímica dos substituintes, observadas a partir dos núcleos de H do ácido quínico. As hidroxilas do ácido quínico nas posições 1, 3 e 4 devem estar em posição α relativas ao plano do anel, enquanto a carboxila e hidroxila em C-5, devem estar em posição β (DEWICK, 2002). Assim, a conformação cadeira mais estável é aquela em que o grupo carboxílico ocupa a posição equatorial (**Figura 67a**), minimizando a interação do tipo 1,3-diaxial entre carboxila e hidroxila que ocorreria conforme ilustrado na **Figura 67b** (CORSE et al., 1966).

Figura 67 - Estrutura do ácido quínico. (a) conformação de maior estabilidade. (b) conformação de menor estabilidade evidenciando interação 1,3-diaxial entre a carboxila e a hidroxila em C5.

A atribuição dos hidrogênios H-2, H-3, H-4, H-5 e H6 é dificultada pelo fato dos sinais estarem sobrepostos em uma estreita região espectral e por possuírem constantes de acoplamento múltiplas (PAULI.; POETSCH; NAHRSTEDT, 1998). Porém, é possível contornar este problema levando em consideração a largura total dos multipletos e comparando-se os deslocamentos, com o ácido quínico não substituído. Desta forma, a largura total encontrada para o hidrogênio H-3 é de no máximo 15,0 Hz, enquanto que para o H-5 esta constante é de no máximo 25,0 Hz (GE et al., 2007).

Diante desta sistemática, a substância **17** apresentou um multipeto em δ_{H} 3,85 atribuído a H-5 (largura da constante de acoplamento de $J=17,5$ Hz) e um multipeto em δ_{H} 5,17 atribuído a H-3 (largura da constante de acoplamento de $J=14,5$ Hz) (**Anexo 174**). Como o sinal em δ_{H} 5,17 deslocou-se para região paramagnética do espectro em relação ao padrão ácido quínico não substituído (deslocamento em δ_{H} 4,00 para H-5 e δ_{H} 4,10 para H-3) e o sinal em δ_{H} 3,85 permaneceu inalterado, conclui-se que a esterificação ocorre pela hidroxila em C-3 do ácido quínico. Essas observações confirmaram a estrutura proposta para **17**, conforme discutido acima.

Já para a substância **18**, a largura da constante de acoplamento para o sinal em δ_H 3,85 foi de $J=7,0$ Hz (H-3) e o deslocamento permaneceu inalterado (**Anexo 192**). O sinal em δ_H 5,17 mostrou uma largura de $J=18,5$ Hz (H-5) e deslocou-se para região desprotegida do espectro, indicando que a esterificação do ácido cafeico ocorre pela hidroxila em C-5 do ácido quínico. Conclui-se que **18** é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico ou ácido isoclorogênico (5-ACQ).

Tabela 14 - Fragmentos obtidos dos analitos isolados de *G. xanthochymus* a partir da análise por EM e EM2 obtido em modo negativo com energia de colisão de 15%.

Compostos	EMI	EM2				
	(íon molecular)	Pico base	Fragmentos secundários			
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	intensidade*	<i>m/z</i>	intensidade*
3-ACQ	353,1	191,7	179,7	45	135,6	22
4-ACQ	353,1	173,0	191,0	49	179,0	38
5-ACQ	353,1	191,1	-	-	-	-
3- <i>Ap</i> CoQ	337,1	163,0	191,1	32	-	-
4- <i>Ap</i> CoQ	337,1	173,0	163,0	82	119,0	25

* abundância relativa do fragmento

Pela análise do espectro de massas obtido no modo negativo (ESI), observa-se que o padrão de fragmentação dos isômeros 3-ACQ e 5-ACQ é bastante similar (**Tabela 14**, **Figura 68-Figura 71**). A diferenciação foi possível a partir da fragmentação EM2, onde os fragmentos secundários em m/z 179,7 $[M-H]^-$ e m/z 135,6 $[M-H]^-$ foram identificados exclusivamente no espectro de massas do 3-ACQ (substância **17**), como relatado para tal composto por CLIFFORD et al. (2003) e GOBBO-NETO; LOPES (2008).

A facilidade da perda de uma unidade de um ácido *trans*-cinâmico (como o ácido cafeico) esterificada em uma posição específica do ácido quínico é influenciada principalmente pela sua proximidade espacial com carboxila ou hidroxila no C-1 do ácido quínico, fator que influencia o mecanismo e consequente perfil de fragmentação destes derivados. No caso do isômero 3-ACQ, um hidrogênio é abstraído da OH em C-1 e no caso do 5-ACQ, um hidrogênio da carboxila do ácido quínico é abstraído para a eliminação da porção cafeica. Estas diferenças na fragmentação ocasionam consideráveis diferenças na intensidade, e às vezes na natureza dos íons produtos nos espectros de segunda geração

EM2, o que possibilita a diferenciação entre os isômeros de posição (CLIFFORD et al., 2003, 2006).

Figura 68 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 17, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 69 - Proposta de fragmentação da substância 17.

Figura 70 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **18**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 71 - Proposta de fragmentação da substância **18**.

6.3 A desreplicação em estudos de bioprospecção

Desreplicação é uma estratégia de análise na procura de novos medicamentos, onde o foco é a identificação rápida de novas substâncias, frequentemente em mistura, ativas biologicamente, a partir de fontes naturais. O desenvolvimento da técnica começou com a necessidade de se priorizar a obtenção de substâncias inéditas com ou sem atividade biológica, uma vez que o trabalho fitoquímico pode ser muitas vezes dispendioso e levar geralmente a compostos já conhecidos. Estima-se um gasto de \$ 50.000 e um trabalho de 3 meses para isolar e identificar um composto como bioativo (CORDELL e SHIN, 1999).

A desreplicação utiliza várias técnicas de análise tais como a CLAE-UV-DAD, CG, CG-EM, CLAE-RMN e CLAE-EM ou uma combinação dessas. O equipamento de CLAE-EM consiste de um sistema *eletrospray* e um espectrômetro contendo um detector quadrupolar e consiste de duas fases distintas. A primeira etapa consiste na coleta e separação de dados (parâmetros cromatográficos, manipulação da amostra, testes biológicos) e a segunda consiste na análise de dados (RODRIGUES et al., 2006).

O uso da desreplicação nos mostra uma linha de pesquisa muito promissora, bastando lembrar a riqueza de nossa flora, para se ter uma idéia da abrangência que pode ser alcançada nos estudos de extratos de plantas e em curto espaço de tempo (CORDELL e SHIN, 1999).

6.3.1 Identificação por CLAE-UV-DAD-EM dos constituintes de *Garcinia xanthochymus*

A fração AcOEt-FRU de *Garcinia xanthochymus* apresentou um perfil químico bastante diversificado (um maior número de picos com diferentes bandas de absorção no UV), por isso a escolha de tal matriz para análise e identificação de seus metabólitos por CLAE-DAD-EM.

A análise conjunta de algumas subfrações (selecionadas com base em seus perfis cromatográficos, **Figura 72**) originárias da fração AcOEt-FRU por CPG, de substâncias purificadas durante esse trabalho e comparação com dados da literatura, permitiu a localização de substâncias já isoladas e/ou isoladas em trabalhos anteriores, assim como foi possível identificar classes diferentes daquelas já isoladas, tais como as xantonas.

Os fragmentogramas dos metabólitos presentes na subfração AcOEt-FRU-13 (**Figura 73** e **Figura 74**) mostrou padrão de fragmentação semelhante aos encontrados para algumas xantonas, isoladas em trabalhos anteriores de diversas espécies do gênero *Garcinia* (PANTHONG, et al., 2006; HARRISON, et al., 2005; IINUMA, et al., 1996; ZHOU, et al., 2008; MOREAU, et al., 2002; SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003).

O íon m/z 303 $[M-H]^-$, verificado no espectro de massas obtido no modo negativo (ESI) de **24**, pode ser atribuído a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_7$. A fragmentação de xantonas metoxiladas é caracterizada pela presença do fragmento $[M-H-15]^-$, referente à perda de uma metila, tal como é observado no EM de **24**. Os íons m/z 288 e m/z 273 correspondentes a $[M-H-15]^-$ e $[M-H-30]^-$, respectivamente, evidenciam a presença de um

Figura 72 - Cromatograma analítico de alguns constituintes majoritários obtido via CLAE-UV-DAD das subfrações (a) AcOEt-FRU-13 (b) e AcOEt-FRU-17, no modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

Figura 73 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 24, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 74 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância 25 obtido no modo negativo (ESI).

esqueleto xantônico triidroxilado e dimetoxilado, como relatado para xantonas isoladas em trabalhos anteriores (BASHIR et al., 1992; FUJITA et al., 1992; IKEYA et al., 1991). A unidade fundamental de uma xantona também poder ser caracterizada pela presença dos íons m/z 245 $[M-H-30-28]^-$ e m/z 217 $[M-H-30-56]^-$, referentes à perda de duas metilas com subsequente perda de CO (Figura 73 e Figura 75).

O íon molecular m/z 273 $[M-H]^-$ apresentado pela substância **25** sugere a fórmula $C_{14}H_{10}O_6$ e pode ser atribuído a esqueletos xantônicos triidroxilados e metoxilados. Esse fato também é confirmado pela presença do íon m/z 258 referente à perda de uma metila $[M-H-15]^-$ (**Figura 74** e **Figura 76**). Este tipo de xantona é muito comum e vários isômeros já foram isolados da espécie *G. xanthochymus* (BAGGETT et al., 2005; ZHONG; CHEN; YANG, 2008). É importante salientar que a identificação sugere apenas o esqueleto básico do metabólito secundário e que a posição dos substituintes só é realmente comprovada com o auxílio de técnicas de RMN mono e bidimensionais e/ou cuidadosa análise do perfil de fragmentação por EM1 e EM2 para as amostras e padrões.

A análise através de CLAE fase reversa confirmou essas informações através da comparação de espectros de UV e dos tempos de retenção obtidos para essas duas subfrações e amostra padrão (**Figura 77**). As substâncias **24** e **25** apresentaram $t_r=24,1$ min e $t_r=25,9$ min, respectivamente (**Figura 72**) semelhante aos tempos de retenção de amostras autênticas de xantonas [1,5,7-triidroxi-2,3-dimetoxixantona (xantona **1**), $t_r=24,0$ min; 1,3,7-triidroxi-5-metoxixantona (xantona **2**), $t_r=25,8$ min] analisadas nas mesmas condições por CLAE (**Figura 78**).

Figura 77 - Estruturas das xantonas padrão utilizadas no processo de desreplicação das substâncias **24** e **25**.

A subfração AcOEt-FRU-17 apresentou dois picos com tempos de retenção e bandas no UV semelhantes aos das substâncias **11** e **14** (**Figura 79**). No espectro de massas obtido no modo negativo observou-se sinais em m/z 573 $[M-H]^-$ e m/z 557 $[M-H]^-$, que foram atribuídos aos íons moleculares de GB2 (subst. **14**) e GB2a (subst. **11**), respectivamente. Os íons de segunda-ordem (EM2) m/z 431 $[M-H-126]^-$ e m/z 295 $[M-H-126-136]^-$ encontrados para o segundo pico e m/z 447 $[M-H-126]^-$, m/z 429 $[M-H-126-H_2O]^-$ e m/z 419 $[M-H-126-CO]^-$, para o primeiro pico, corroboram a proposta apresentada para essas duas substâncias (**Figura 80**).

Figura 78 - (a) Espectro de absorção da substância **24**, da xantona **1** e cromatograma analítico da xantona **1** (b) Espectro de absorção da substância **25**, xantona **2** e cromatograma analítico da xantona **2**. Modo gradiente em H₂O: MeOH (95:5) até MeOH (100) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5µm).

Figura 79 - Espectro de absorção no UV comparativo (a) da substância **11** e o pico 2 da fração AcOEt-FRU-17 e (b) da substância **14** e o pico 1 da fração AcOEt-FRU-17.

As substâncias **6**, **7**, **15** e **16** apresentaram espectro de absorção no UV, sinais de RMN ¹H e padrão de fragmentação característicos de biflavonóides e a subfração AcOEt-FRU-7 mostrou-se como uma mistura de benzofenonas (Substs. **19** e **20**). As substâncias **21**, **22** e **23** mostraram-se semelhantes, quando comparados com dados de UV e massas, aos derivados de ácidos fenilpropanoídicos já isolados e identificados na fração BUOH-FOL.

A substância **6**, isolada da subfração AcOEt-FOL-14 (procedimento experimental **5.5**), apresentou banda de absorção no UV em $\lambda=293$ nm atribuída à banda II de uma flavanona (**Figura 81**). O espectro de RMN ¹H apresentou sinais entre δ_H 2,65 e 5,70,

Figura 80 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem dos picos 1 (esquerda) e 2 (direita) da subfração AcOEt-FRU-17, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

atribuídos aos hidrogênios H-2, H-3, H-2'' e H-3'', sinais entre δ_H 5,82 e 5,94, atribuídos a hidrogênios do anel A e sinais entre δ_H 6,23 e 7,25 atribuídos a hidrogênios do anel B (**Figura 82**). Todavia, em virtude da pequena quantidade de massa e complexidade do espectro em função da existência de atropoisomerismo, não foi possível atribuir satisfatoriamente os sinais, assim como também não foi possível adquirir os espectros de ^{13}C e bidimensionais. Assim, a identificação foi realizada a partir da comparação dos íons precursores de **6** e de seus produtos de fragmentação com dados da literatura, pelo uso da EM. No modo de ionização negativa (ESI), o espectro exibiu íon molecular m/z 541 $[M-H]^-$ e fragmentos em m/z 415 $[M-H-126]^-$ e 295 $[M-H-126-120]^-$, correspondendo à perda de floroglucinol (126 u) e subsequente perda de 120 u por um mecanismo Retro-Diels-Alder (**Figuras 83 e 84**). Nota-se por fim, que a substância **6** é muito semelhante a **11**, diferindo apenas no padrão de substituição do anel B (livre de hidroxila na posição C-3'') podendo ser identificada com GB1a, um biflavonóide isolado dos frutos de *G. xanthochymus* (KONOSHIMA et al., 1970; BASLAS; KUMAR, 1979).

Figura 81 - (a) Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da substância **6** obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático 1:1 (MeOH:H₂O) e suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m).

Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **6** ($\text{DMSO}-d_6$).

Do mesmo modo a substância **7**, isolada da subfração AcOEt-FOL-15 (procedimento experimental **5.6**) foi identificada através dos dados de EM pelo íon em m/z 551 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (**Figura 86**), além da análise do espectro de RMN de ^1H , em que se nota uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento entre **7** e **9**, diferindo apenas no singlete em δ_{H} 3,67 integrando para três hidrogênios, que pode ser atribuído a presença de uma metila na estrutura de **7** (**Figura 85**). A partir dos dados da literatura para substâncias já isoladas de *G. xanthochymus*, pode-se identificar a substância **7** como 7-*O*-metilamentoflavona, um derivado metoxilado da amentoflavona isolado das folhas de *G. xanthochymus* (PARVEEN et al., 1994).

A substância **15**, isolada da subfração AcOEt-SIL-9 (procedimento experimental **5.7**), apresentou uma única banda de absorção no UV ($\lambda=293$ nm), sugerindo a subclasse das flavanonas. Já a substância **16**, isolada da subfração AcOEt-SIL-11 (procedimento experimental **5.9**), apresentou bandas de absorção características de flavanonas/flavonas, com a banda I em $\lambda=348$ nm e a banda II em $\lambda=289$ nm (**Figura 20**).

Figura 83 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância 6, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 84 - Proposta de fragmentação da substância 6.

Figura 85 – Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) da substância **7** (DMSO-*d*₆).

Figura 86 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **7** obtido no modo negativo (ESI).

Figura 87 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) da substância **15** (DMSO-*d*₆).

A complexidade dos espectros de RMN de ^1H e duplicação de sinais pode ser explicada pelo efeito atropisomérico de ambas as substâncias, indicando a presença de biflavonóides do tipo C3→C8''. Observa-se a presença de sinais em δ_{H} 12,03, relacionados a hidrogênios de hidroxilas quelatadas, capaz de estabelecer uma ligação intramolecular com o oxigênio carbonílico em C-4. O espectro também apresentou sinais entre δ_{H} 2,54 e 5,12, sugerindo a presença de uma unidade de açúcar ligada à aglicona (**Figura 87** e **Figura 88**). Esses dados permitiram a identificação das substâncias **15** e **16**, associados à análise por EM, que apresentou íon molecular de m/z 719 $[\text{M}-\text{H}]^-$ para a substância **15** (**Figura 89**) e m/z 717 $[\text{M}-\text{H}]^-$ para a substância **16** (**Figura 90**).

Figura 88 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **16** ($\text{DMSO}-d_6$).

Figura 89 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **15**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 10% para EM2 (ESI).

Através do espectro de segunda ordem obtido no modo negativo (ESI) de **15** (EM2) pode-se sugerir a presença de uma unidade de hexose no esqueleto flavonoídico, representada pelo íon m/z 557 $[M-H-162]^-$ e m/z 431 $[M-H-162-126]^-$. Aliados a esses dados e comparando o padrão de fragmentação com o apresentado pela substância **11**, pode-se inferir que a substância **15** é o biflavonóide xantochimusídeo, um derivado glicosilado do GB2a já isolado dos caules de *G. xanthochymus* (KONOSHIMA et al., 1970). Já a substância **16** não apresentou fragmentos secundários que caracterizassem a presença de uma unidade de açúcar, sugerindo a necessidade de energia de colisão maior que 15%. Todavia, o espectro de gHMBC mostrou a interação entre o hidrogênio anomérico em δ_H 5,12 ($J=7,5$ Hz) com o sinal em δ_C 160,8, sugerindo a presença da glicose em C-7''. Comparando esses dados com a literatura, pode-se identificar a substância **16** como fukugisídeo, um derivado glicosilado da morelloflavona isolado dos frutos de *G. xanthochymus* (KONOSHIMA et al., 1970; BAGGETT et al., 2005).

Figura 90 - Espectro de massas de primeira-ordem da substância **16** obtido no modo negativo (ESI).

A subfração AcOEt-FRU-7, obtida do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt-FRU (procedimento experimental **5.11**), apresentou duas bandas no UV em $\lambda=251$ e 356 nm, características de benzofenonas (**Figura 91**). O espectro de RMN de 1H (**Figura 92**) mostrou sinais entre δ_H 0,75 e 2,90 característicos de grupos metílicos, metilênicos e metínicos, e entre δ_H 4,47 e 4,91 característicos de hidrogênios olefínicos. Exibiu também sinais em δ_H 6,65 (d , $J=8,5$ Hz), δ_H 6,91 (m) e 7,18 (d , $J=2,5$ Hz) sugerindo a presença de um grupo aromático trissubstituído (**Tabela 15**). Esses dados são consistentes com os relatados para a classe das benzofenonas, porém a integração dos sinais de RMN de hidrogênio sugeriu que se tratava de uma mistura composta por dois isômeros, fato confirmado pela EM que apresentou um único sinal referente ao íon molecular em m/z 601

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) das substâncias **19** e **20** ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	xantochimol (19)	cicloxantochimol (20)
	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_{H} (ppm) (multiplicidade; J (Hz))
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	1,49 (<i>m</i>)	1,50 (<i>m</i>)
7	2,05 (<i>m</i>)	1,97 (<i>m</i>)
	2,25 (<i>d</i> ; 14,2)	2,13 (<i>d</i> ; 14,6)
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	7,18 (<i>d</i> ; 2,0)	7,16 (<i>d</i> ; 2,0)
13	-	-
14	-	-
15	6,65 (<i>d</i> ; 8,5)	6,64 (<i>d</i> ; 6,8)
16	6,91 (<i>m</i>)	6,91 (<i>m</i>)
17	2,58 (<i>m</i>)	2,33 (<i>m</i>)
	2,70 (<i>dd</i> ; 13,9 e 8,8)	2,49 (<i>m</i>)
18	4,90 (<i>m</i>)	4,88 (<i>m</i>)
19	-	-
20	1,73 (<i>s</i>)	1,60 (<i>s</i>)
21	1,69 (<i>s</i>)	1,52 (<i>s</i>)
22	1,16 (<i>s</i>)	1,05 (<i>s</i>)
23	1,00 (<i>s</i>)	0,91 (<i>s</i>)
24	2,03 (<i>m</i>)	2,04 (<i>m</i>)
	2,11 (<i>m</i>)	2,56 (<i>m</i>)
25	4,86 (<i>m</i>)	4,91 (<i>m</i>)
26	-	-
27	1,65 (<i>s</i>)	1,65 (<i>s</i>)
28	1,50 (<i>s</i>)	1,60 (<i>s</i>)
29	1,92 (<i>dd</i> ; 13,9 e 5,6)	1,01 (<i>d</i> ; 13,1)
	2,02 (<i>m</i>)	2,90 (<i>dd</i> ; 14,2 e 3,4)
30	2,55 (<i>m</i>)	1,24 (<i>m</i>)
31	-	-
32	4,47 (<i>m</i>)	0,75 (<i>s</i>)
33	1,61 (<i>s</i>)	1,17 (<i>s</i>)
34	1,46 (<i>m</i>)	1,47 (<i>m</i>)
35	1,85 (<i>m</i>)	4,91 (<i>m</i>)
36	-	-
37	4,63 (<i>d</i> ; 6,4)	1,64 (<i>s</i>)
38	1,58 (<i>s</i>)	1,61 (<i>s</i>)

[M-1] (**Figura 93**). Das benzofenonas isoladas de *G. xanthochymus* apenas cinco apresentaram massa molecular de 602 g.mol^{-1} (BAGGETT et al., 2005; BASLAS; KUMAR, 1979 e 1981; KARANJGOAKAR, et al., 1973; RAMA RAO; VENKATSWAMY; YEMUL, 1980) como mostra a **Tabela 16**. De acordo com os dados de RMN ^1H , padrão de

fragmentação de cada substância e sinais apresentados através da EM2 pela subfração AcOEt-FRU-7 (m/z 465, 409 e 273) pode-se inferir que a mesma constitui-se do xanthochimol e cicloxanthochimol, identificados como substâncias **19** e **20**, respectivamente.

Figura 91 - Cromatograma analítico e (b) espectro de absorção da subfração AcOEt-FRU-7 obtido via CLAE-UV-DAD no modo isocrático MeOH:H₂O:HOAc (75:24,5:0,5), suporte cromatográfico: ODS (Phenomenex, 25,0 cm x 4,6 mm x 5 μ m) e detecção em λ =254 nm.

Figura 92 - Espectro de RMN de ¹H (500 MHz) das substâncias **19** e **20** (DMSO-*d*₆).

Tabela 16 - Fragmentos obtidos de benzofenonas isoladas de *G. xanthochymus* através de EM e EM2.

Compostos	EM (íon molecular) <i>m/z</i>	EM2 (principais fragmentos)	
		<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
cicloxantochimol	601,4	465	-
isoxantochimol	601,4	433	203
Gutiferona E	601,4	449	177
Gutiferona H	601,4	*	*
xantochimol	601,4	409	273

* dados não encontrados na literatura

Figura 93 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da subfração AcOEt-FRU-7, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para EM2 (ESI).

As substâncias **21**, **22** e **23** (derivados de ácidos fenilpropanoídicos), isoladas da subfração BuOH-FOL-6 (procedimento experimental **5.10**) e da subfração AcOEt-SIL-11 (procedimento experimental **5.9**), apresentou pequena quantidade de massa, o que inviabilizou o processo de elucidação estrutural por técnicas convencionais de RMN mono e bidimensionais. Assim, a identificação foi realizada a partir da comparação dos íons precursores e de seus produtos de fragmentação (razão *m/z* e intensidade dos fragmentos em relação ao pico base, em porcentagem), de acordo com dados da literatura (CLIFFORD et al., 2003 e 2006). Como apresentado na tabela **14**, o ácido 4-cafeoilquínico (4-ACQ) apresenta pico base em *m/z* 173 [M-H]⁻, diferentemente dos isômeros 3-ACQ e 5-ACQ, que apresentam pico base em *m/z* 191 [M-1]. Comparando-se o espectro de primeira e segunda-ordem da substância **22** (**Figura 94**) com o padrão de fragmentação apresentado pelo 4-ACQ, pode-se identificar **22** como ácido 4-cafeoilquínico. De maneira análoga, as substâncias **21** e **23** foram identificadas como ácidos 3-*p*-coumaroilquínico (3-*Ap*CoQ) e 4-*p*-coumaroilquínico (4-*Ap*CoQ), respectivamente (**Figura 95**).

Figura 94 - Espectro de massas (a) de primeira e (b) segunda-ordem da substância **22**, obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI).

Figura 95 - Espectro de massas de primeira e segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 15% para EM2 (ESI) da (a) substância **21** e da (b) substância **23**.

6.4 Identificação de triterpenos e esteróides presentes nos extratos de baixa polaridade de *Garcinia xanthochymus* utilizando cromatografia gasosa (CG)

A bioatividade de extratos de baixa polaridade tem sido frequentemente associada a misturas complexas de triterpenóides e/ou esteróides, sem no entanto, uma análise mais aprofundada de identificação dos componentes da mistura. Isso acontece, em primeiro lugar, porque os procedimentos de fitoquímica tradicional, que incluem isolamento dos componentes de misturas de diversos componentes, incluindo isômeros, podem ser afanosos e relativamente caros. Em segundo lugar, devido à sua complexidade estrutural, a análise

Figura 96 - Estruturas dos triterpenos e esteróides identificados nos extratos e frações de baixa polaridade de *Garcinia xanthochymus*.

de triterpenos e esteróides por técnicas espectroscópicas, tem se mostrado difícil em muitos casos. A Cromatografia gasosa (CG) surgiu como uma das melhores técnicas analíticas

para caracterização rápida, simples e relativamente barata de compostos apolares de extratos de plantas (REGASINI et al., 2009).

Tabela 17 - Valores da retenção relativa das amostras com o colesterol.

<i>Compostos</i>	<i>HEX-FOL</i>		<i>FR. HEX-FOL</i>		<i>HEX-FRU</i>		<i>SPB-5</i>	<i>SPB-50</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>		
(26) α -Amirina	1,36	-	1,37	-	-	-	1,38	2,02
(27) β -Amirina	-	-	1,31	1,78	1,31	1,82	1,32	1,80
(28) Lupeol	-	-	1,39	-	1,39	-	1,39	2,16
(29) Taraxerol	-	-	-	1,74	-	-	1,29	1,75
(30) Acetato de α -amirina	1,55	-	-	-	-	-	1,57	2,25
(31) Acetato de β -amirina	-	-	-	1,93	-	1,92	1,49	1,93
Acetato de lupeol	-	-	-	-	-	-	1,58	2,27
Acetato de bauerenila	-	-	-	-	-	-	-	2,54
(32) Acetato de taraxerol	1,46	-	1,44	1,93	1,44	1,92	1,46	1,93
Acetato de friedelanoíla	-	-	-	-	-	-	1,82	2,95
(1) Friedelina	-	2,76	-	-	-	-	1,58	2,78
(33) Lupenona	1,36	-	-	-	-	-	1,34	2,01
(34) α -Amirenona	1,36	1,95	-	-	-	-	1,34	1,94
(35) β -Amirenona	1,28	-	1,28	1,74	1,28	1,73	1,28	1,73
(36) Germanicona	-	-	1,26	-	1,26	-	1,26	1,66
(37) Campesterol	1,12	1,21	-	-	1,13	-	1,13	1,23
(38) Estigmasterol	1,18	-	1,19	-	1,19	1,30	1,18	1,30
(39) β -Sitosterol	-	-	1,26	1,48	1,26	1,45	1,26	1,48
Estigmas-4en-3-ona	-	-	-	-	-	-	-	-
Colesterol	1	1	1	1	1	1	1,00	1,00

“a” significa que a análise foi realizada em SBP-5 e “b” realizada em SPB-50.

Diante deste contexto, o extrato hexânico das folhas (HEX-FOL), a fração hexânica das folhas (FR. HEX-FOL) e o extrato hexânico dos frutos (HEX-FRU) foram analisados por cromatografia gasosa (CG) em comparação às retenções relativas (RR) de triterpenos e esteróis padrões relatadas por Crevelin (2006). A **Tabela 17** e as **Figura 96** **Figura 98** apresentam a composição química de cada amostra, realizadas nas duas colunas capilares especificadas no item **4.1.8**.

A exatidão do método é maior quando ocorre reprodutibilidade entre as colunas capilares e, para maior confiabilidade do método, define-se que o erro não pode ultrapassar duas casas decimais. Assim, pode-se inferir que a β -amirina, acetato de taraxerol, β -amirenona e β -sitosterol estão presentes na FR. HEX-FOL e HEX-FRU com maior

confiabilidade. Também para α -amirenona e campesterol, presentes no HEX-FOL, e estigmasterol, detectado somente no HEX-FRU, os dados apresentam alta confiabilidade.

Com menor reprodutibilidade, pode-se dizer que estão presentes no HEX-FOL a α -amirina, acetato de α -amirina, acetato de taraxerol, friedelina, lupenona, β -amirenona e estigmasterol. Adicionalmente, foram também detectados na FR. HEX-FOL, a α -amirina, lupeol, germanicona e estigmasterol, e no HEX-FRU, o lupeol, acetato de β -amirina, germanicona e campesterol.

Estes resultados mostram claramente que os extratos e frações de baixa polaridade de dois diferentes órgãos de *Garcinia xanthochymus* apresentam grande similaridade em seus perfis químicos, corroborando ainda mais a importância da desreplicação, etapa crucial, que imprime maior agilidade a estudos de bioprospecção.

Figura 97 - Perfil cromatográfico (CG-DIC) em SPB-5 (a) do HEX-FRU [38 t_r =22,05; 39 t_r =23,38; 35 t_r =23,82; 27 t_r =24,43 e 32 t_r =26,84] (b) da FR. HEX-FOL [39 t_r =23,38; 35 t_r =23,75; 27 t_r =24,33 e 32 t_r =26,75] (c) e do EXT-FOL [37 t_r =20,41 e 34 t_r =24,82], em presença de colesterol (padrão interno).

Figura 98 - Perfil cromatográfico (CG-DIC) em SPB-50 (a) do HEX-FRU [38 t_r =17,29; 39 t_r =19,24; 35 t_r =22,97; 27 t_r =24,06 e 32 t_r =25,46] (b) da FR. HEX-FOL [39 t_r =19,11; 35 t_r =22,80; 27 t_r =23,31 e 32 t_r =25,35] (c) e do EXT-FOL [37 t_r =15,86 e 34 t_r =25,64], em presença de colesterol (padrão interno).

6.5 Atividade biológica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *Garcinia xanthochymus*

6.5.1 Atividade antioxidante

As folhas de *G. xanthochymus* apresentaram melhores resultados de CI_{50} quando comparadas com os frutos da mesma espécie. Segundo a tabela abaixo, o Extrato Bruto Etanólico das folhas (ETOH-FOL) mostrou-se bastante ativo com valor de $CI_{50}=12 \mu\text{g/mL}$. Após o fracionamento por ELL, destacaram-se as frações AcOEt-FOL e BuOH-FOL, com CI_{50} de $11 \mu\text{g/mL}$ e $18 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, próximos ou menores aos apresentados pelos controles positivos Trolox[®] ($CI_{50}=10 \mu\text{g/mL}$) e quercetina ($CI_{50}=17 \mu\text{g/mL}$).

Os resultados observados no gráfico (**Figura 99**) e na **Tabela 18** corroboram a importância de substâncias com unidades fenólicas e/ou núcleos catecólicos (presentes em sua maioria em extratos polares) em antioxidantes em potencial.

Tabela 18 - Atividade antioxidante dos extratos e frações de *Garcinia xanthochymus* frente ao radical DPPH.

Extratos e frações de <i>Garcinia xanthochymus</i>		CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Folhas	ETOH-FOL	12
	HEX-FOL	n*
	FR. HEX-FOL	n*
	AcOEt-FOL	11
	BuOH-FOL	18
	HA-FOL	19
Frutos	ETOH-FRU	n*
	HEX-FRU	n*
	AcOEt-FRU	n*
	BuOH-FRU	n*
	HA-FRU	n*
Trolox [®]		10
Quercetina		17

n*: não apresentaram atividade significativa.

As substâncias **5**, **8**, **10-20** foram avaliadas a fim de verificar se alguma delas seria a responsável pela forte atividade antioxidante apresentada nos extratos e/ou frações de *G. xanthochymus* (**Tabela 21**).

As substâncias **8** e **16** apresentaram os melhores resultados com valores de CI_{50} iguais

a 8 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 99 - Gráfico da curva de concentração dos extratos e frações (a) das folhas e dos (b) frutos de *G. xanthochymus* versus a % de sequestro de DPPH.

As substâncias **11**, **14**, **15**, **17-20** apresentaram valores igualmente promissores, com valores de CI_{50} entre 9 e 12 $\mu\text{g/mL}$. As menores atividades foram observadas para as substâncias **5**, **10**, **12** e **13**, com valores de CI_{50} maior que 100 $\mu\text{g/mL}$, consideradas inativas por comparação com as outras substâncias citadas acima.

Como discutido no **item 1.6** a combinação de substituição 3',4'-diidroxil no anel B, com insaturação em C-2-C-3 e uma função carbonila em C-4, são requisitos estruturais que contribuem de maneira destacada para estabilização do radical flavonoídico, formado após a doação de hidrogênio radicalar pelas substâncias antioxidantes em potencial (FURUNO; AKASAKO; SUGIHARA, 2002). Os resultados encontrados estão de acordo com tais observações, pois: **5**, **10** e **12** são biflavonas monoidroxiladas no anel B; **13** é um monoaromático (menor número de estruturas mesoméricas); **11**, **14** e **15** são biflavonóides com grupos catecólicos em B, porém saturadas em C-2 e C-3; e **8** e **16** são biflavonas (com insaturação em C-2-C-3) com um núcleo catecólico no anel B, corroborando as diferenças de potencial sequestrador de radicais livres observados para as substâncias fenólicas de *G. xanthochymus*.

6.5.2 Ensaio *in vitro* da polimerização de heme

A malária é considerada uma doença infecto-parasitária grave, transmitida por protozoários do gênero *Plasmodium*, aflige mais de 500 milhões de pessoas causando, pelo menos, 1 milhão de óbitos anuais, tendo como agravantes a resistência crescente do

parasita à quimioterapia e a falta de uma vacina eficaz. No Brasil, a região amazônica concentra mais de 99% da transmissão da malária, representando um dos maiores problemas de saúde pública, vindo figurar entre as grandes epidemias que assolam o país. (KRETTLI et al., 2001; ALECRIM, 2000; ALSHAWSH et al., 2007)

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos. No caso da malária um destes alvos é a polimerização de heme (ROSENTHAL, 2003). No vacúolo digestivo ácido, o *Plasmodium* degrada 75% da hemoglobina do hospedeiro e utiliza os seus aminoácidos para a síntese de proteínas. Nesse processo, heme tóxica é liberada, armazenando-se na forma de um polímero inerte chamado hemozoína ou pigmento malárico, onde o grupo propionato do heme liga-se ao Fe^{3+} do outro heme. Sendo assim, substâncias capazes de inibir a síntese de hemozoína podem servir de modelos para a terapia da malária.

Ensaio empregando os extratos e frações das folhas de *Garcinia xanthochymus* evidenciaram uma forte interação com o grupo heme, com valores de inibição da polimerização do heme de $91 \pm 1,5$ % a 2.5 mg/mL. Após a partição do extrato bruto, a fração AcOEt-FOL mostrou a maior atividade, com inibição de $84 \pm 0,7$ % a 2.5 mg/mL, sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade antimalárica nesta fração. Os frutos apresentaram valores moderados de inibição da formação do polímero hemozoína, com valores de $62 \pm 2,5$ % a 2.5 mg/mL para o ETOH-FRU, e $71 \pm 3,5$ % a 2.5 mg/mL para a AcOEt-FRU (Tabela 19).

Tabela 19 - Atividade inibitória *in vitro* no ensaio de formação de β -Hematina para os extratos e frações de *Garcinia xanthochymus*.

Extratos e frações de <i>Garcinia xanthochymus</i>		% inibição (2,5 mg/mL)
Folhas	ETOH-FOL	91
	HEX-FOL	53
	FR. HEX-FOL	47
	AcOEt-FOL	84
	BuOH-FOL	n*
	HA-FOL	n*
Frutos	ETOH-FRU	62
	HEX-FRU	23
	AcOEt-FRU	71
	BuOH-FRU	5
	HA-FRU	10
Quinina		88
Cloroquina		82

n*: não apresentaram atividade significativa.

6.5.3 Atividade antifúngica

Os resultados dos ensaios antifúngicos das amostras provenientes de folhas de *G. xanthochymus* evidenciaram uma moderada atividade do HEX-FOL frente aos fungos patogênicos humanos *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* usando o método de microdiluição e verificação da inibição em leitor automático de microplacas (HOLETZ, 2002). Já as FR. HEX-FOL e AcOEt-FOL apresentaram uma maior atividade frente aos fungos *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, respectivamente, com valor de CIM igual a 31,3 µg/mL, valor próximo ao padrão comercial fluconazol (CIM=16 µg/mL). Em relação aos frutos de *Garcinia xanthochymus*, os resultados foram bastante promissores. Frente ao fungo *Candida krusei* os ETOH-FRU e HEX-FRU apresentaram CIM de 1,95 µg/mL, resultado 8 vezes menor que o apresentado pelo padrão comercial fluconazol (CIM=16 µg/mL). O HEX-FRU também foi bastante ativo frente ao fungo *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*, com CIM de 3,9 e 31,3 µg/mL, respectivamente (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Atividade antifúngica *in vitro* dos extratos e frações de *G. xanthochymus* frente a fungos patogênicos humanos.

		CIM (µg/mL)			
<i>Extratos e frações de Garcinia xanthochymus</i>		<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Folhas	ETOH-FOL	62,5	125	250,0	62,5
	HEX-FOL	62,5	62,5	250,0	62,5
	FR. HEX-FOL	125	31,3	250,0	125,0
	AcOEt-FOL	31,3	250	250,0	62,5
	BuOH-FOL	125	125	250,0	125,0
	HA-FOL	250	250	250,0	250,0
Frutos	ETOH-FRU	1,95	>250,0	62,5	>250,0
	HEX-FRU	1,95	3,9	31,3	>250,0
	AcOEt-FRU	7,8	>250,0	125,0	>250,0
	BuOH-FRU	>250,0	>250,0	>250,0	>250,0
	HA-FRU	>250,0	>250,0	>250,0	250,0
Fluconazol		16,0			

As substâncias isoladas da fração AcOEt-FOL de *G. xanthochymus* (Substs. **5**, **8**, **10**, **11**, **14-16**) apresentaram atividade antifúngica fraca (CIM de 62,5 µg/mL), resultados coerentes com o apresentado pela fração AcOEt-FOL, que apresentou fraca atividade frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* (CIM de 62,5 µg/mL) e moderada atividade

frente ao fungo *Candida krusei* (CIM de 31,3 µg/mL). As substâncias **17** e **18** não apresentaram atividade fungitóxica, também concordante com a fração de origem BuOH-FOL. A mistura de substâncias majoritárias nos frutos de *G. xanthochymus* (Substs. **19** e **20**) parece não ser a responsável pela forte atividade antifúngica apresentada pelo ETOH-FRU (CIM de 1,95 µg/mL), pois apresentou valor de CIM maior que 250 µg/mL (**Tabela 21**), sugerindo a presença de outros metabólitos minoritários mais ativos.

Tabela 21 - Atividade biológica dos constituintes isolados das folhas e frutos de *Garcinia xanthochymus*.

Substâncias	antioxidante	antifúngica				tripanocida
	CI ₅₀ (µg/mL)	<i>Candida krusei</i> CIM (µg/mL)	<i>Candida parapsilosis</i> CIM (µg/mL)	<i>Candida albicans</i> CIM (µg/mL)	<i>Cryptococcus neoformans</i> CIM (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
1	-	-	-	-	-	n*
2	-	>250	>250	>250	>250	n*
3	-	>250	>250	>250	>250	n*
4	-	-	-	-	-	n*
5	n*	-	-	125	62,5	n*
6	-	-	-	-	-	n*
7	-	-	-	-	-	n*
8	8	62,5	250	125	62,5	n*
9	-	-	-	>250	250	n*
10	n*	-	-	62,5	62,5	n*
11	11	62,5	125	125	62,5	n*
12	n*	> 250	-	-	250	n*
13	n*	-	-	125	250	75,6
14	9	250	62,5	125	62,5	n*
15	11	62,5	125	125	250	n*
16	6	-	-	62,5	250	n*
17	12	125	250	125	62,5	n*
18	12	125	250	125	62,5	n*
19 e 20	9	>250	>250	>250	>250	36,9
Benzonidazol						
Fluconazol	17			16		9,7
Quercetina						

n*: não apresentaram atividade significativa.

6.5.4 Atividade tripanocida

A atividade tripanocida foi mais pronunciada nas amostras provenientes dos frutos do que as folhas de *G. xanthochymus* com CI₅₀ de 21,2 µg/mL para o HEX-FRU. Este resultado, quando comparado com a droga usada atualmente contra a Doença de Chagas, o

benzonidazol (CI_{50} de 9,7 $\mu\text{g/mL}$), incentiva o estudo na busca de micromoléculas antiparasitárias nesta matriz para servirem de modelos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da Doença de Chagas (**Tabela 22**).

Conforme dados da tabela 20, somente a substância **13** e a mistura de **19** e **20** exibiram dados de CI_{50} , com valores de 75,6 $\mu\text{g/mL}$ e 36,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A baixa atividade antiparasitária dos biflavonóides em questão está de acordo com as publicações anteriores (MBWAMBO, et al., 2006; WENIGER, et al., 2006). Diversos tipos estruturais de biflavonóides já foram testados frente aos parasitas *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Plasmodium falciparum* e em quase todos os casos, biflavonóides do tipo 3 $\rightarrow$ 8'' apresentaram-se inativos.

Tabela 22 - Atividade tripanocida dos extratos e frações de *G. xanthochymus*.

Extratos e frações de <i>Garcinia xanthochymus</i>		CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Folhas	ETOH-FOL	> 100
	HEX-FOL	> 100
	FR. HEX-FOL	> 100
	AcOEt-FOL	> 100
	BuOH-FOL	50,2
	HA-FOL	> 100
Frutos	ETOH-FRU	90,2
	HEX-FRU	21,2
	AcOEt-FRU	160,2
	BuOH-FRU	n*
	HA-FRU	n*
	Benzonidazol	9,7

n*: não apresentaram atividade significativa.

6.5.5 Atividade quimiopreventiva

O experimento para avaliação do potencial de quimioprevenção(**item 5.18**), através da indução da enzima quinonaredutase (QR) empregando-se a linhagem celular hep-1c1c7 em teste espectrofotométrico realizado com os extratos e frações de *G. xanthochymus*, indicaram potencial quimiopreventivo moderado. Porém, a (+)-morelloflavona (Subs. **8**) mostrou-se com uma elevada capacidade de indução da atividade da enzima QR, como é observado na **Tabela 23**. Há uma duplicação da atividade indutora, sugerindo que substâncias com estruturas semelhantes a da 4'-bromoflavona (4'-BF, padrão comercial) podem ser protótipos para agentes quimiopreventivos, contribuindo para inibir a instalação de eventos iniciais associados à etiologia do câncer.

Tabela 23 - Avaliação da taxa de indução (IR) da atividade de QR em linhagem Hepa1c1c7 para **8**.

	IR	CI₅₀ (μM)	CD (μM)	IQ
Morelloflavone	2,15 ± 0,5	84,2 ± 4,5	28,7 ± 1,4	2,93 ± 2,1
4'-BF	3,0 ± 0,6	> 166	0,01*	>17,000*

7 CONCLUSÕES

O estudo químico e biológico das folhas e frutos da espécie *Garcinia xanthochymus*, através do isolamento e/ou identificação de 25 substâncias, demonstrou coerência com relatos encontrados na literatura no que concerne a química da família Clusiaceae.

Dentre as substâncias isoladas, podemos destacar 3 triterpenos obtidos do extrato hexânico das folhas: friedelina (**1**), lanosta-8,24-dien-3-ol (**2**) e lanosta-7,24-dien-3-ol (**3**), sendo que as substâncias **2** e **3** foram relatadas pela primeira vez na literatura da espécie. A prospecção química da fase acetato de etila das folhas revelou uma abundante presença de biflavonóides, sendo as substâncias saharanflavona (**4**), I3,II8-biapigenina (**5**), GB1a (**6**), (+) morelloflavona (**8**), GB2a (**11**), volkensiflavona (**12**), GB2 (**14**), xantochimusídeo (**15**) e fukugisídeo (**16**), caracterizadas pela ligação interflavonoídica do tipo 3→8'', e as substâncias podocarpusflavona (**7**) e amentoflavona (**9**), pela ligação do tipo 3'→8''. Merece destaque a substância **4**, isolada pela primeira vez de fontes naturais. Este biflavonóide foi sintetizado por Pelter et al. em 1970 e depois só obtido novamente de forma sintética. A composição química de *G. xanthochymus* constituiu-se ainda das substâncias diidrokaempferol (**10**), ácido vanílico (**13**), cinco derivados de ácidos fenilpropanoídicos: ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**17**), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**18**), ácido 3-*p*-coumaroilquínico (**21**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**22**) e ácido 4-*p*-coumaroilquínico (**23**); e ainda a mistura binária das benzofenonas xantochimol (**19**) e cicloxantochimol (**20**). Todas as substâncias foram relatadas pela primeira vez nas folhas de *G. xanthochymus*, com exceção da substância **7**, isolada anteriormente por PARVEEN et al. (1994) e as substâncias **10**, **13**, **17**, **18**, **21**, **22** e **23**, ainda não identificadas na espécie.

No estudo biológico realizado com os extratos, frações e substâncias puras isoladas dos frutos e folhas de *G. xanthochymus*, foram avaliados o potencial antioxidante, antimalárico, antifúngico, tripanocida e quimiopreventivo em testes *in vitro* espectrofotométricos e/ou enzimáticos. Os resultados observados para o ensaio de sequestro de radicais livres utilizando o radical DPPH evidenciaram a importância dos grupos catecólicos como essenciais para uma ação antioxidante potencializada. Os biflavonóides comportaram-se como potentes sequestradores de radical livre com CI₅₀ compreendidos entre 6 e 12 µg/mL, configurando-se como promissores modelos para aplicação no desenvolvimento de novos protótipos antioxidantes. A fração AcOEt-FOL evidenciou uma forte interação com o grupo heme, com inibição de 84 ± 1% a 2.5 mg/mL,

sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade antimalárica nesta fração. Em relação à atividade antifúngica, a fração HEX-FOL e a fração AcOEt-FOL mostraram-se moderadamente ativas frente aos fungos patogênicos humanos *Candida parapsilosis* e *C. krusei*, enquanto os extratos ETOH-FRU e HEX-FRU dos frutos de *Garcinia xanthochymus* apresentaram resultados muito atrativos, com CIM de 1,95 µg/mL, cerca de oito vezes menor que o apresentado pelo padrão comercial fluconazol (CIM=16,0 µg/mL). Também a atividade tripanocida foi mais pronunciada nas amostras provenientes dos frutos do que das folhas de *G. xanthochymus* com CI₅₀ de 21,2 µg/mL para o HEX-FRU, o que incentiva seu estudo na busca de micromoléculas antiparasitárias ou de protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento da Doença de Chagas. A (+)-morelloflavona (**8**) mostrou elevada capacidade de indução da atividade da enzima quinona-redutase, confirmando o potencial quimiopreventivo atrativo de flavonóides, em especial de flavonas e seus derivados, incluindo biflavonóides com pelo menos uma unidade de flavona, como apresentado na estrutura da substância **8**. Esses resultados indicam *G. xanthochymus* como uma fonte rica de substâncias quimiopreventivas que sejam potencialmente úteis para inibir a instalação dos eventos iniciais associados à etiologia do câncer.

De maneira global, os resultados de bioatividade dos extratos, frações semipurificadas e substâncias isoladas de *G. xanthochymus* confirmaram a importância de estudos de bioprospecção planejados e conduzidos de maneira adequada, mostrando-se indispensáveis para as etapas desenvolvidas neste trabalho. Dessa forma, foi possível a obtenção de um conjunto de dados de alto valor agregado, a partir do qual podem ser selecionadas frações ou substâncias puras para estudos mais aprofundados, incluindo o preparo de derivados, visando a potencialização de bioatividade ou ajuste de propriedades farmacocinéticas e/ou toxicológicas durante o processo de desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos.

A técnica CG-DIC mostrou-se eficiente e rápida na detecção de esteróides e triterpenos em misturas complexas. Foram identificados 15 compostos lipofílicos sem a necessidade de etapas demoradas e caras que são características do processo em escala preparativa. A utilização das técnicas hifenadas CLAE-UV e CLAE-EM foi imprescindível não somente para obter dados espectrométricos das substâncias isoladas, mas também para localizar substâncias já isoladas neste estudo e/ou isoladas em trabalhos anteriores, evitando-se a replicação de resultados. Fica evidente o grande potencial dessas técnicas na localização e identificação de substâncias de interesse em matrizes complexas, como

extratos vegetais, que são fundamentais para atender à crescente demanda, decorrente da intensificação das atividades de bioprospecção, que se configuram como um dos principais focos das pesquisas realizadas pelo NuBBE.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. S. et al. A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 599-602, 2001.

ALECRIM, M. das G. C. Tratamento da malária com artesunate (retocaps) em crianças da Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 163-168, 2000.

ALSHAWSH, M. A. et al. Assessment of antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 453-456, 2007.

AO, C. et al. Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. fil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 349-358, 2009.

BAELMANS, R. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal Ethnopharmacol**, v. 73, p. 271-275, 2000.

BAGGETT, S. et al. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASHIR, A. et al. Isoflavones and xanthones from *Polygala virgata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 309-311, 1992.

BASLAS, R. K.; KUMAR, P. Chemical examination of the fruits of *Garcinia xanthochymus*. **Current Science**, v. 48, n. 18, p. 814-815, 1979.

BASLAS, R. K.; KUMAR, P. Isolation and characterization of biflavanone and xanthones in the fruits of *Garcinia xanthochymus*. **Acta Ciencia Indica**, v. 7, n. 1, p. 31-34, 1981.

BERGHÖFER, R.; HÖLZL, J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*. 1. Isolation of I3,II8-biapigenin. **Planta Medica**, v. 53, n. 2, p. 216-217, 1987.

BLADT, W. **A plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd ed. Berlin: Springer, 1996.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência & Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CANUTO, K. M. **Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (química-agronomia-farmacologia) de *Amburana cearensis* A. C. Smith**. 2007. 303 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Departamento de Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CAO, G. H.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CARBONEZI, C. A. et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 319-324, 2007.

CHANMAHASATHIEN, W. et al. Prenylated xanthenes from *Garcinia xanthochymus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1332-1334, 2003a.

CHANMAHASATHIEN, W. et al. Prenylated xanthenes with NGF-potentiating activity from *Garcinia xanthochymus*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 981-986, 2003b.

CHEN, J. J.; DUH, C. Y.; CHEN, J. F. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 659-665, 2005.

CHEN, Y. et al. Structure elucidation and NMR spectral assignment of five new xanthenes from the bark of *Garcinia xanthochymus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 1180-1184, 2008.

CHENG, W. et al. Study on the antioxidant constituents from the barks of *Garcinia xanthochymus*. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, v. 20, n. 5, p. 836-838, 2008.

CHUANG, S. E. et al. Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 2, p. 331-335, 2000.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N. et al. Characterization by LC-MSn of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1957-1969, 2006.

COMPAGNONE, R. S. et al. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2008.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 523-526, 1999.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytotherapy**, v. 55, n. 6, p. 463-480, 2000.

CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 1089-1094, 1999.

CORSE, J. et al. Conformation analyses of D-(-)-quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance. **Phytochemistry**, v. 5, n. 4, p. 767-776, 1966.

COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.

CREVELIN, E. J. et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 8, p. 827-830, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. New York: Elsevier, 2000. Cap. 24, p. 1308-1311.

CRUZ, F. G. et al. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1363-1366, 1998.

- CUENDET, M. et al. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 460-463, 2006.
- DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. Cap. 4, p. 121-131.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Guttiferales medicinais. In: _____. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. Cap. 14, p. 259-261.
- DI STASI, L. C.; GOMES, J. C.; VILEGAS, W. Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchientia salutaris* var. *martiana* (Violaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 890-893, 1999.
- FAHEY, J. W. et al. The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQO1. **Methods Enzymol**, v. 382, p. 243-258, 2004.
- FELICIO, J. D. et al. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 217-220, 1995.
- FERRARI, J. et al. Isolation and on-line LC/CD analysis of 3,8 "-linked biflavonoids from *Gnidia involucre*. **Helvética Chimica Acta**, v. 86, n. 8, p. 2768-2778, 2003.
- FRAGA, C. A. M. et al. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007.
- FUJITA, T. et al. Xanthones from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3997-4000, 1992.
- FURUNO, K.; AKASAKO, T.; SUGIHARA, N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 19-23, 2002.
- GE, F. et al. Isolation of chlorogenic acids and their derivatives from *Stemona japonica* by preparative HPLC and evaluation of their anti-AIV (H5N1) activity *in vitro*. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 3, p. 213-218, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.

GONCALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1453-1456, 2001.

GOTTLIEB, H. E.; RAMAIAH, P. A.; LAVIE, D. C-13 NMR signal assignment of friedelin and 3-alpha-hydroxyfriedelan-2-one. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 616-620, 1985.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 670-672, 2002.

GRYNBERG, N. F. et al. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea species*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 819-822, 2002.

HAN, Q. B. et al. Cytotoxic prenylated phenolic compounds from the twig bark of *Garcinia xanthochymus*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 4, p. 940-946, 2007.

HARBORNE, J. H.; WILLIAEM, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARRISON, L. J. et al. Xanthonenes and benzophenones from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1718-1723, 2005.

HERBIN, G. A. et al. Extractives from Guttiferae. 15. Biflavonoids of *Garcinia-volkensii* (Guttiferae). **Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 221-226, 1970.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUTADILOK-TOWATANA, N.; KONGKACHUAY, S.; MAHABUSARAKAM, W. Inhibition of human lipoprotein oxidation by morelloflavone and camboginol from *Garcinia dulcis*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 7, p. 655-652, 2007.

- IINUMA, M. J. et al. Five new xanthones from *Garcinia dulcis*. **Journal Natural Product**, v. 59, n. 5, p. 472-475, 1996.
- IKEYA, Y. et al. Two Xanthones from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2061-2065, 1991.
- JACKSON, B. et al. Isolation of a new series of biflavanones from heartwood of *Garcinia buchananii*. **Tetrahedron Letters**, n. 9, p. 787-792, 1967.
- KANG, S. S. et al. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 15, p. 3588-3591, 2005.
- KARANJGOAKAR, C. G. et al. Constitution of xanthochymol and isoxanthochymol **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 4977-4980, 1973.
- KELLOFF, G. J. et al. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 467-471, 2000.
- KIRBY, G. C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 605-609, 1996.
- KINGHORN, A. D. et al. Induction of the phase II enzyme, quinone reductase, by withanolides and norwithanolides from *solanaceous* species. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 115-123, 2004.
- KNIGHT, S. A. C-13 NMR - Spectra of lanostenol - euphadienol and euphenol. **Tetrahedron Letters**, n. 1, p. 83-86, 1973.
- KONOSHIMA, M. et al. The constitution of flavonoids from *Garcinia spicata* Hook. **Tetrahedron Letters**, n. 10, p. 121-124, 1969.
- KONOSHIMA, M. et al. The constitution of biflavonoids from *Garcinia* plants. **Tetrahedron Letters**, n. 48, p. 4203-4206, 1970.
- KRETTLI, A. U. et al. Searching new antimalarials from plants used to treat fever and malaria or plants randomly select: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1033-1042, 2001.

- LI, X. C. et al. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, n. 43, p. 8709-8717, 2002.
- LIN, L. C.; KUO, Y. C.; CHOU, C. J. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 627-630, 2000.
- LIN, Y. et al. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.
- LIN, Y. et al. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 120-125, 1999.
- LIN, Y. M.; CHEN, F. C.; LEE, K. H. Antitumor agents. 102. Hinokiflavone, a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxicity of the related biflavonoids. **Planta Medica**, v. 55, p. 166-168, 1989.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: _____. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer Verlag, 1970. p. 41-57.
- MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic activity of some xanthones and biflavonoids from the root bark of *Garcinia livingstonei*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 369-372, 2006.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MOREAU, S. et al. (2-arylhydrazonomethyl)-substituted xanthones as antimycotics: synthesis and fungistatic activity against *Candida* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 237-253, 2002.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NUNOME, S. et al. *In vitro* antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*. **Planta Medica**, v. 70, n. 1, p. 76-78, 2004.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthones from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, 2006.

PARVEEN, N. et al. Flavonoid constituents of *Garcinia xanthochymus* leaves. **Fitoterapia**, v. 65, n. 1, p. 89-90, 1994.

PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 4, p. 177-185, 1998.

PELTER, A. et al. Biflavonyls from Guttifereae - *Garcinia livingstonii*. **Tetrahedron**, v. 27, n. 8, p. 1625-1634, 1971.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 415-440, 1997.

RAMESH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 129-132, 2002.

RAMA RAO, A. V.; VENKATSWAMY, G.; YEMUL, S. S. Xanthochymol and isoxanthochymol, two novel polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia xanthochymus*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 19B, n. 8, p. 627-633, 1980.

REGASINI, L. O. et al. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (Fabaceae-caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 3, p. 218-221, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILEER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multi Ciência: Construindo a história dos Produtos Naturais**, n. 7, 2006.

ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003.

ROUHI, A. M. Betting on natural products for cures. **Chemical and Engineering News**, v. 81, n. 41, p. 77-78, 2003.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5006-5011, 2003.

SCOTT, K. N. C-13 Nuclear magnetic-resonance of biologically important aromatic acids. 1. Chemical-shifts of benzoic-acid and derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 24, p. 8564-8568, 1972.

SILVA, D. H. S. et al. Lipophyllic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 437-442, 2001.

SILVA, G. L. et al. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella-willdenowii*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 129-134, 1995.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, X.; KIEMLE, D. J. Espectroscopia no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2002.

SINGH, M. P. et al. Constituents of *Garcinia xanthochymus*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 286, 1991.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structureactivity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.

SONG, L. L. et al. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. **Cancer Research**, v. 59, n. 3, p. 578-585, 1999.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Potencial alelopático de *Myrcia guianensi*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Ciência & Cultura**, v. 59, n.1, p. 12-13, 2007.

SULTANBAWA, M. U. S. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, n. 11, p. 1465-1506, 1980.

SUZART, L. R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007.

TANDON, R. N. et al. Preliminary investigation on the anti-microbial activity of a phytochemical, xanthochymol from the fruits of *Garcinia xanthochymus* Hook f. **Current Science**, v. 49, n. 12, p. 472-473, 1980.

VAN ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VERDI, L. G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3, p. 360-363, 2004.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

WENIGER, B. et al. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 176-180, 2006.

XIE, D. Y.; DIXON, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers? **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2127-2144, 2005.

YAMAGUCHI, L. F. et al. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2238-2247, 2005.

YANG, B. et al. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 6, p. 747-751, 2001.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.

ZHONG, F. F.; CHEN, Y.; YANG, G. Z. Chemical constituents from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 9, p. 1695-1703, 2008.

ZHONG, F. F. et al. Xanthones from the bark of *Garcinia xanthochymus*. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, n. 7, p. 849-851, 2007.

ZHOU, Y. et al. Analysis of caged xanthones from the resin of *Garcinia hanburyi* using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, n. 1, p. 104-118, 2008.

Anexos

Anexo 1. Espectro de RMN de ¹H da substância **1**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 2. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **1**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1.
(500 MHz – CDCl_3)

Daniara Hex 3-31 ppt 09/09/08
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl₃
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-07
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 0.957 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 28027.0 Hz
14339 repetitions
OBSERVE C13, 125.5814703 MHz
DECOUPLE H1, 499.4513083 MHz
Power 30 dB
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 7 hr, 59 min, 48 sec

Anexo 5. Ampliação do espectro de RMN de ¹³C da substância **1**.
(125 MHz – CDCl₃)

Daniara Hex 3-31 ppt 09/09/08
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl₃
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-07
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 0.957 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 28027.0 Hz
14339 repetitions
OBSERVE C13, 125.5814703 MHz
DECOUPLE H1, 499.4513083 MHz
Power 30 dB
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 7 hr, 59 min, 48 sec

Anexo 6. Ampliação do espectro de RMN de ¹³C da substância **1**.
(125 MHz – CDCl₃)

Daniara Hex 3-31 ppt 09/09/08
Pulse Sequence: DEPT135
Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "multis" 105°

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 29027.6 Hz
1736 repetitions
OBSERVE C13, 125.5814703 MHz
DECOUPLE H1, 499.4313003 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 7. Espectro de DEPT 135° da substância **1**.
(125 MHz – CDCl₃)

Daniara Hex 3-31 ppt 09/09/08
Pulse Sequence: DEPT135
Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "multis" 105°

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 29027.6 Hz
1736 repetitions
OBSERVE C13, 125.5814703 MHz
DECOUPLE H1, 499.4313003 MHz
Power 30 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 8. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância **1**.
(125 MHz – CDCl₃)

Daniera Hex 3-31 ppt 09/09/08
Pulse Sequence: DEPT90
Solvent: CDCl3
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-07
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.042 sec
Width 29027.6 Hz
1756 repetitions
OBSERVE C13, 125.5814703 MHz
DECOUPLE H1, 499.4313903 MHz
Power 30 dB
On during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 9. Espectro de DEPT 90° da substância **1**.
(125 MHz – CDCl₃)

Daniera Hex 3-59 17/11/08
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 0.904 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 4.930 sec
Width 4705.9 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 499.4219825 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 1 min, 20 sec

Anexo 10. Espectro de RMN de ¹H da substância **2**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 11. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **1**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 12. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância **2**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 13. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 14. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 2.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 15. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **2**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 16. Espectro de DEPT 135° da substância **2**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 17. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 2.
(125 MHz – CDCl₃)

Anexo 18. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância 2.
(125 MHz – CDCl₃)

Anexo 19. Espectro de DEPT 90° da substância **2**.
(125 MHz – CDCl₃)

Anexo 20. Espectro de RMN de ¹H da mistura **2** e **3**.
(500 MHz – CDCl₃)

Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura **2 e 3**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 22. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura **2 e 3**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 23. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura **2 e 3**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 24. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da mistura **2 e 3**.
(125 MHz – CDCl_3)

Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 27. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 28. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 29. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **4**.

(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 30. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **4**

(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 31. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **4**.
(500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 32. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **4**.
(500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 33. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 34. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **4**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 35. Espectro de HOMODEC da substância **4**
(500 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 36. Espectro de NOESY 1D (irradiação em δ_H 6,25) da substância **4**.
(500 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H da substância **5**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Danlira AcOEt s11 4 prep 8 11/05/09
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 23027.6 Hz
 16128 Repetitions
 OBSERVE C13, 125.5740467 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4015116 MHz
 Power 30 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 8 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5**.
 (125 MHz – DMSO- d_6)

Danlira AcOEt s11 4 prep 8 11/05/09
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multis5"

Relax. delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 23027.6 Hz
 16128 Repetitions
 OBSERVE C13, 125.5740467 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4015116 MHz
 Power 30 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 8 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 40. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **5**.
 (125 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 4 prep 8 11/05/89
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "multispec"
 Relax. delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 28927.0 Hz
 16128 repetitions
 OBSERVE C13, 125.574067 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4015116 MHz
 Power 30 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 8 hr, 59 min, 47 sec

Anexo 41. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **5**.
 (125 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt 30 PicoS 26/03/89
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "multispec"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.138 sec
 Width 7598.8 Hz
 20 Width 7598.8 Hz
 10 repetitions
 128 increments
 OBSERVE H1, 499.4102628 MHz
 DATA PROCESSING
 Se. sine bell 0.068 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Se. sine bell 0.008 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 31 min, 49 sec

Anexo 42. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **5**.
 (500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 43. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 44. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/09
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7508.6 Hz
2D Width 25027.6 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.4102628 MHz
DECOUPLE C13, 125.5911590 MHz
Power: 47 dB
on during acquisition
off during delay
GMP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 21 min, 51 sec

Anexo 45. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/09
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7508.6 Hz
2D Width 25027.6 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.4102628 MHz
DECOUPLE C13, 125.5911590 MHz
Power: 47 dB
on during acquisition
off during delay
GMP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 21 min, 51 sec

Anexo 46. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/08
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7539.6 Hz
ZD Width 29027.6 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.4102628 MHz
DECUPLE C13, 125.7611530 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 21 min, 51 sec

Anexo 47. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/08
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multis5"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7539.6 Hz
ZD Width 29027.6 Hz
32 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.4102628 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 23 min, 57 sec

Anexo 48. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multispec"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.138 sec
Width 7509.6 Hz
ZD Width 29027.6 Hz
32 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.4102628 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 23 min, 57 sec

Anexo 49. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet 30 Pico5 26/03/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multispec"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.138 sec
Width 7509.6 Hz
ZD Width 29027.6 Hz
32 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.4102628 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.008 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 23 min, 57 sec

Anexo 50. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 51. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 52. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 53. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **5**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 54. Espectro de RMN de ^1H da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 55. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 56. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 57. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 58. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 59. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 60. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 61. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMOC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 62. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 63. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 64. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 65. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 66. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 5-prep 9 09/07/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.137 sec
Width: 7472.4 Hz
2D Width 22027.6 Hz
128 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 54 min, 54 sec

Anexo 67. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 5-prep 9 09/07/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.137 sec
Width: 7472.4 Hz
2D Width 22027.6 Hz
128 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 54 min, 54 sec

Anexo 68. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet s11 5-prep 9 09/07/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.197 sec
Width 7472.4 Hz
2D Width 28027.6 Hz
136 repetitions
128 increments
OBSERVE F1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 54 min, 54 sec

Anexo 69. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDet s11 5-prep 9 09/07/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.197 sec
Width 7472.4 Hz
2D Width 28027.6 Hz
136 repetitions
128 increments
OBSERVE F1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.089 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 5 hr, 54 min, 54 sec

Anexo 70. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **8**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 71. Espectro de RMN de ^1H da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 72. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 73. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 74. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **9**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 75. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **9**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 76. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **9**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 77. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 78. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 79. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 80. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 81. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 82. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniera AcDet 43-prep 2 07/02/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: l-14-07
INOVA-500 "multispec"

Relax: delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7509.6 Hz
2D Width 28027.6 Hz
64 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.4102698 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.088 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 47 min, 15 sec

Anexo 83. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniera AcDet 43-prep 2 07/02/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: l-14-07
INOVA-500 "multispec"

Relax: delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7509.6 Hz
2D Width 28027.6 Hz
64 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.4102608 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.088 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.003 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 47 min, 15 sec

Anexo 84. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Deniara AcDet 43-prep 2 07/02/09
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-07
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.136 sec
Width 7539.6 Hz
2D Width 29027.6 Hz
64 repetitions
128 increments
OBSERVE H1: 499.4192608 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.068 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.063 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 2 hr, 47 min, 15 sec

Anexo 85. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **9**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Deniara AcDet s11 3 Prep 2 08/06/09
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
INOVA-500 "multis65"

Relax. delay 0.904 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 4.116 sec
Width 7472.4 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1: 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 40 sec

Anexo 86. Espectro de RMN de ^1H da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 87. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 88. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 89. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 90. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 91. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 92. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 93. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 94. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 95. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 96. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **10**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 97. Espectro de RMN de ^1H da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 98. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **11**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 99. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 101. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **11**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 102. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **11**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 103. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **11**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 104. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **11**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 105. Espectro de DEPT 135° da substância **11**.
(125 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 106. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância **11**.
(125 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 107. Ampliação do espectro de DEPT 135° da substância **11**.
(125 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 108. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **11**.
(500 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 109. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 110. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 111. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 112. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 113. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **11**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 114. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 115. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 116. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 117. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 118. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 119. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 120. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 121. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 122. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 123. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 124. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 125. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **11**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 126. Espectro de RMN de ^1H da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 127. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 128. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **12**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 4 - prep 9 08/07/09
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "mult165"
 Relax, delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 23027.6 Hz
 33866 repetitions
 OBSERVE C13, 125.5740432 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4015118 MHz
 Power 36 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 23 hr, 59 min, 26 sec

Anexo 129. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **12**
 (125 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 4 - prep 9 08/07/09
 Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-87
 INOVA-500 "mult165"
 Relax, delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.042 sec
 Width 23027.6 Hz
 33866 repetitions
 OBSERVE C13, 125.5740432 MHz
 DECOUPLE H1, 499.4015118 MHz
 Power 36 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 23 hr, 59 min, 26 sec

Anexo 130. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **12**.
 (125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 131. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **12**.
(125 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 132. Mapa de contorno $^1\text{H}-^1\text{H}$ gCOSY da substância **12**.
(500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 133. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 134. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 4 - prep 9 08/07/09
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: i-14-87
INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.137 sec
Width 7472.4 Hz
2D Width 28027.6 Hz
44 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3890145 MHz
DECOUPLE C13, 125.5883303 MHz
Power 47 dB
on during Acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 3 hr, 44 min, 6 sec

Anexo 135. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 4 - prep 9 08/07/09
Pulse Sequence: gHMQC
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 303.1 K
User: i-14-87
INOVA-500 "multi65"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.137 sec
Width 7472.4 Hz
2D Width 28027.6 Hz
44 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.3890145 MHz
DECOUPLE C13, 125.5883303 MHz
Power 47 dB
on during Acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.063 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.003 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 3 hr, 44 min, 6 sec

Anexo 136. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 137. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 138. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 139. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 140. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 141. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 142. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 143. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 144. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 145. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 146. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **12**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 147. Espectro de RMN de ^1H da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 148. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDEt s11 5 prep 2 29/05/09
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: DMSO
Temp.: 30.6 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax.: delay 1.000 sec
Acq. time 0.218 sec
Width: 4705.9 Hz
2D Width 4705.9 Hz
9 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sf: time 0.109 sec
F1: DATA PROCESSING
Sf: time 0.016 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 21 min, 33 sec

Anexo 149. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcDEt s11 5 prep 2 29/05/09
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: DMSO
Temp.: 30.6 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax.: delay 1.000 sec
Acq. time 0.218 sec
Width: 4705.9 Hz
2D Width 4705.9 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sf: time 0.109 sec
F1: DATA PROCESSING
Sf: time 0.016 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 21 min, 33 sec

Anexo 150. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 151. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 152. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 5 prep 2 29/05/08
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.210 sec
Width: 4705.9 Hz
2D Width 29027.6 Hz
10 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.100 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 45 min, 7 sec

Anexo 153. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Daniara AcOEt s11 5 prep 2 29/05/08
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: DMSO
Temp.: 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "multispec"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.210 sec
Width: 4705.9 Hz
2D Width 29027.6 Hz
10 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.3990145 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.100 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.002 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 45 min, 7 sec

Anexo 154. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **13**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 155. Espectro de RMN de ^1H da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 156. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 157. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 158. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **14**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 159. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **14**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 160. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **14**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 161. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **14**.
(125 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 162. Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **14**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 163. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 164. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 165. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 166. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 167. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 168. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 169. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 170. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **14**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 171. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **14**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 172. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **14**
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 173. Espectro de RMN de ^1H da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 174. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 175. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 176. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 179. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 180. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 181. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17.

(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 182. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 17

(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 183. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 184. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 185. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 186. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 187. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 188. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 189. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 190. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **17**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 191. Espectro de RMN de ^1H da substância **18**.
(500 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)

Anexo 192. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **18**.
(500 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)

Anexo 193. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 194. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 195. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **18**.
(125 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 196. Mapa de contorno $^1\text{H}-^1\text{H}$ gCOSY da substância **18**.
(500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)

Anexo 197. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 198. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 199. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 200. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 201. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 202. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 203. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 204. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 205. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 206. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 207. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 208. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)

Anexo 209. Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância **18**.
(500 MHz – DMSO- d_6)