

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA HELENA VERDAN

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS TUBÉRCULOS
DE *Sinningia aggregata* (GESNERIACEAE)**

Curitiba

2011

MARIA HELENA VERDAN

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS TUBÉRCULOS
DE *Sinningia aggregata* (GESNERIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

Curitiba

2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação Aos Meus Pais Francisco e Rosélio,

À minha irmã Maria Cláudia e

Ao meu Noivo Victor Hugo

Porque sem a presença, o apoio e o amor deles

Eu não teria conseguido...

Vale a pena a tentativa e não o receio

Vale a pena confiar e nunca ter medo

Vale a pena encarar e não fugir da realidade

Ainda que eu fracasse, vale a pena lutar

Vale a pena discordar do melhor amigo e não apoiá-lo em suas atitudes

erradas

Vale a pena corrigi-lo

Vale a pena encarar-me no espelho e ver se estou certo ou errado

Vale a pena procurar ser o melhor e aí...

Vale a pena ser o que for

Enfim

Vale a pena viver a vida, já que a vida não é tudo que ela pode nos dar

Mas sim tudo o que podemos dar por ela...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, Pai, Mãe, Cláu por todo o apoio desde a minha decisão de sair de casa para estudar, por todo o amor que recebo, pela vida que temos em conjunto que me dá forças para continuar lutando...

Agradeço ao Victor pela alegria que trouxe à minha vida, pelo amor, companheirismo, pelo apoio, por todo o futuro que teremos pela frente...

Agradeço à Professora Dra. Maria Éli da Alves Stefanello pelos ensinamentos de química e da vida, pela confiança depositada, por mostrar que meus sonhos são possíveis de serem realizados...

Agradeço aos meus sogros, Cláudio e Helena, pela força e apoio nestes anos...

Agradeço aos meus amigos distantes, que mesmo assim estão sempre presentes e me ajudando a seguir o meu caminho...

Agradeço aos meus amigos do laboratório Regiane L. B. Strapasson, Dilamara Riva, Thalita G. Santos, Carlos A. Ehrenfried, Melissa P. Vaz, Carolina S. Kovalski, Edione Canzi, Anderson R. dos Santos, Marineli A. Selinsk, que estão hoje me acompanhando, me auxiliando, pelos momentos de alegria, descontração, mas também por aqueles de reflexão e troca de conhecimentos...

Agradeço aos amigos que passaram pela minha vida acadêmica, me auxiliaram na caminhada, e deixaram boas lembranças, Renata C. Dutra,

Deise A. M. de Oliveira, Emmanoel O. Costa, Stephanie Barneche, Leticia F. Lemos, Keller, Erica L. dos Santos...

Agradeço aos Professores que fizeram parte da minha formação...

Agradeço ao Professor Dr. Francisco de Assis Marques pelas contribuições no exame de qualificação...

Agradeço aos Professores da banca Prof. Dr. Andersson Barison e Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva pela disponibilidade e auxílio para completar mais esta etapa da minha vida...

Agradeço ao Professor Dr. Andersson Barison pela realização de muitas análises de RNN e também pelos ensinamentos compartilhados...

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá pela realização dos cálculos computacionais, por disponibilizar o seu tempo para sanar as minhas dúvidas...

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos José Salvador e Dr. João Ernesto de Carvalho do CPQBA da UNCAAP pela realização dos testes de atividade antiproliferativa...

Agradeço ao Prof. Dr. Armando C. Cervi pela coleta e identificação da planta...

Agradeço à Clarisse B. Poliquesi pela coleta e identificação da *Sinningia aggregata*...

Agradeço ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Paraná e Laboratório Central de Processamento de Alto Desempenho/CTINFRA/UFPR pelas ferramentas disponíveis para a realização deste trabalho...

Agradeço a CAPES pelo financiamento dos meus estudos...

Agradeço a todos que me auxiliaram e tornaram este trabalho possível...

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ESQUEMAS	xv
LISTA DE ESPECTROS	xvi
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Família Gesneriaceae	02
1.2. Gênero <i>Sinningia</i>	05
1.3. <i>Sinningia aggregata</i>	07
1.4. Atividade antiproliferativa	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. ESTUDO FITOQUÍMICO	12
3.1. Materiais e métodos	12
3.1.1. Procedimentos gerais	12
3.1.2. Material Vegetal	14
3.1.3. Preparo de extratos	14
3.1.4. Isolamento dos metabólitos secundários	14
3.1.4.1. <i>Sinningia aggregata</i> I	14
3.1.4.2. <i>Sinningia aggregata</i> II	17

3.1.4.2.1.	Extrato em hexano de <i>Sinningia aggregata</i> II	17
3.1.4.2.2.	Extrato em acetato de etila de <i>Sinningia aggregata</i> II	19
3.1.5.	Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas	25
3.2.	Resultados e discussão	27
3.2.1.	Determinação estrutural das substâncias SA1 , SA2 e SA3	27
3.2.2.	Determinação estrutural da substância SA4	49
3.2.3.	Estudo conformacional e determinação da estereoquímica absoluta das substâncias SA1 , SA2 , SA3 e SA4	62
3.2.4.	Identificação das substâncias SA5 , SA6 , SA7 e SA8	70
3.2.5.	Identificação da substância SA9	90
3.2.5.1.	Estudo conformacional de SA9	97
3.2.6.	Identificação das substâncias SA10 e SA11	101
4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	104
4.1.	Materiais e métodos	104
4.2.	Resultados e discussão	104
5.	BIOSSÍNTESE	111
6.	CONCLUSÃO	114
7.	REFERÊNCIAS	115

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
<i>c</i>	Concentração
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
δ	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>ddq</i>	Duplo duplo quarteto
<i>ddqq</i>	Duplo duplo quádruplo quarteto
<i>dm</i>	Duplo multipleteo
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPT-135	Intensificação dos níveis através da transferência de polarização sem efeito de distorção
ε	Absortividade molar
EM	Espectrometria de massas
FTIR	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier
HMBC	Correlação heteronuclear em múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear em uma única ligação
Hz	Hertz
IV	Espectroscopia do infravermelho
J	Constante de acoplamento

<i>m</i>	Multiplete
[M] ⁺	Íon molecular
MHz	Mega hertz
min	Minutos
multip.	Multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
<i>q</i>	Quarteto
<i>qdd</i>	Quádruplo duplo duplete
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C{ ¹ H}	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
<i>tl</i>	Triplete largo
TMS	Tetrametilsilano
UV-vis	Ultravioleta visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição do óleo essencial de <i>S. aggregata</i> .	09
Tabela 02	Dados das frações obtidas do fracionamento do extrato de <i>S. aggregata</i> I.	15
Tabela 03	Dados das frações obtidas do extrato em hexano (SAH) de <i>S. aggregata</i> II	17
Tabela 04	Reunião das frações da coluna de SAH08.	18
Tabela 05	Dados das frações obtidas do extrato em acetato de etila de <i>S. aggregata</i> II.	20
Tabela 06	Substâncias isoladas de <i>Sinningia aggregata</i> .	27
Tabela 07	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 , SA2 e SA3 .	44
Tabela 08	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 e C_6D_6 de SA4 .	60
Tabela 09	Dados de estabilidade e rotação ótica de SA1 , SA2 e SA3 .	65
Tabela 10	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de SA5 e comparação com dados da literatura (1 VERDAN <i>et al.</i> , 2009).	71
Tabela 11	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de SA6 e comparação com dados da literatura (1 MOREIRA <i>et al.</i> , 2006).	77
Tabela 12	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-D}_4$) de SA7 e comparação com dados da literatura em DMSO-D_6 (1 KAWASAKI <i>et al.</i> , 1990).	80
Tabela 13	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de SA8 e comparação com dados da literatura (1 ITOKAWA <i>et al.</i> , 1989; 2 FRAGA <i>et al.</i> , 2009).	83
Tabela 14	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da substância isolada SA9 e comparação com dados da literatura (1 MESSANA <i>et al.</i> , 1984).	91
Tabela 15	Dados da atividade antiproliferativa dos tubérculos de <i>Sinningia aggregata</i> .	106

LISTA DE FIGURAS

	Espécies de Gesneriaceae. A: <i>Besleria melancholica</i> , B: <i>Aeschynanthus micranthus</i> , C: <i>Seemannia purpurascens</i> , D: <i>Sinningia allagophylla</i> , E: <i>Chirita subrombhoidea</i> .	04
Figura 01		
Figura 02	Compostos isolados e identificados em espécies de <i>Sinningia</i> .	06
Figura 03	Desenho ilustrativo da corola (A) e tricomas (B) de <i>S. aggregata</i> (ARAUJO <i>et. al.</i> , 2005).	07
Figura 04	Exemplares de <i>Sinningia aggregata</i> (Imagens cedidas por Mauro Peixoto)	08
Figura 05	Estruturas dos terpenos do óleo essencial de <i>S. aggregata</i> .	10
Figura 06	Principais correlações observadas no espectro de HMBC de SA1 .	34
Figura 07	Proposta de fragmentação para as substâncias isolada SA1 (R = OH), SA2 (R = H) e SA3 (R = OMe).	48
Figura 08	Fragmentos identificados por RMN de ¹ H na SA4 .	50
Figura 09	Principais correlações observadas no espectro de HMBC de SA4 .	59
Figura 10	Exemplos da conformação mais energética (A), menos energética e dados de NOE 1D (B) para a substância SA2 , os quais se repetem para as substâncias SA1 e SA3 .	64
Figura 11	Exemplo da conformação mais energética (A), menos energética e dados de NOE 1D (B) da substância SA4 .	67
Figura 12	Principais correlações observadas no mapa de correlações ¹ H- ¹³ C a longa distância da SA5 .	72
Figura 13	Principal correlação observada no espectro de HMBC de SA6 .	77
Figura 14	Principais correlações ¹ H- ¹³ C a longa distância observadas para SA9 .	92
Figura 15	Formação do composto SA9 .	98
Figura 16	Conformação menos energética de SA9 .	99
Figura 17	Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato etanólico total.	107
Figura 18	Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em éter de petróleo.	108
Figura 19	Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em diclorometano.	108

Figura 20	Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em acetato de etila.	109
Figura 21	Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em n-butanol.	109
Figura 22	Gráfico da atividade antiproliferativa da substância SA4 .	110
Figura 23	Gráfico da atividade antiproliferativa da substância isolada SA9 .	110
Figura 24	Formação do possível precursor da biossíntese das substâncias SA1 , SA2 , SA3 e SA4 .	112
Figura 25	Proposta de biossíntese das substâncias SA1 , SA2 e SA3 .	113
Figura 26	Proposta de biossíntese da substância isolada SA4 .	113

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01	Procedimento geral para extração, fracionamento dos tubérculos de <i>S. aggregata</i> I e isolamento de SA1, SA5, SA7 e SA9 .	16
Esquema 02	Procedimento geral para obtenção das substâncias SA6, SA8 e SA10+SA11 de <i>S. aggregata</i> II.	21
Esquema 03	Procedimento geral para obtenção das substâncias SA2 e SA10+SA11 do extrato em hexano de <i>S. aggregata</i> II.	22
Esquema 04	Procedimento geral para obtenção das substâncias SA2 e SA4 do extrato em hexano de <i>S. aggregata</i> II.	22
Esquema 05	Procedimento geral para obtenção das substâncias SA3, SA4 e SA10+SA11 do extrato em hexano de <i>S. aggregata</i> II.	23
Esquema 06	Procedimento geral para obtenção das substâncias SA4 e SA10+SA11 do extrato em hexano de <i>S. aggregata</i> II.	23
Esquema 07	Procedimento geral para isolamento da substância SA4 do extrato em acetato de etila de <i>S. aggregata</i> II.	24
Esquema 08	Procedimento geral para isolamento das substâncias SA4 e SA9 do extrato em acetato de etila de <i>S. aggregata</i> II.	24

LISTA DE ESPECTROS

E01	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	29
E02	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	29
E03	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	30
E04	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	30
E05	Ampliação da região do hidrogênio metínico do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	31
E06	Ampliação da região dos hidrogênios da metila do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	31
E07	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	32
E08	Espectro DEPT-135 (50 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	32
E09	Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	33
E10	Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz) em CDCl_3 de SA1 .	33
E11	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA2 .	35
E12	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) da SA2 irradiando a frequência de ressonância da metoxila (4,01 ppm).	35
E13	Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de SA2 .	36
E14	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de SA3 .	37
E15	Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de SA3 .	37
E16	Comparação dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SA1 , SA2 e SA3 .	38
E17	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SA1 , SA2 e SA3 .	39
E18	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de SA1 , SA2 e SA3 .	40
E19	Ampliação da região do hidrogênio olefínico dos espectros de RMN de ^1H	41

	(400 MHz, CDCl ₃) de SA1 , SA2 e SA3 .	
E20	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos dos espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de SA1 , SA2 e SA3 .	42
E21	Ampliação da região dos hidrogênios da metila dos espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de SA1 , SA2 e SA3 .	43
E22	Espectro de infravermelho da substância SA1 .	45
E23	Espectro de infravermelho da substância SA2 .	46
E24	Espectro de infravermelho da substância SA3 .	46
E25	Espectro de ultravioleta da substância SA2 .	47
E26	Espectro de ultravioleta da substância SA3 .	47
E27	Espectro de massas de alta resolução da substância SA1 .	49
E28	Espectro de massas de baixa resolução da substância SA2 .	49
E29	Espectro de massas de baixa resolução da substância SA3 .	49
E30	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da SA4 .	51
E31	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	52
E32	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	52
E33	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	53
E34	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	53
E35	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	54
E36	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,82-4,04 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	54
E37	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,82-4,04 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	55
E38	Ampliação da região dos hidrogênios das metilas (1,63-1,80 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ da substância SA4 .	55

E39	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 da SA4 .	56
E40	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) de SA4 .	56
E41	Ampliação da região do hidrogênio da hidroxila (3,39 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, C_6D_6) da substância SA4 .	57
E42	Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, C_6D_6) de SA4 .	57
E43	Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da SA4 .	58
E44	Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância SA4 .	58
E45	Espectro de infravermelho da substância SA4 .	61
E46	Espectro de ultravioleta da substância SA4 .	62
E47	Espectro de massas de alta resolução da substância SA4 .	62
E48	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) da SA1 irradiando o hidrogênio H-4' (5,72 ppm).	65
E49	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) da SA1 irradiando o hidrogênio H-3' (2,79 ppm).	66
E50	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de SA4 irradiando o hidrogênio em 3,83 ppm.	68
E51	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de SA4 irradiando o hidrogênio em 4,00 ppm.	68
E52	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de SA4 irradiando o hidrogênio em 5,02 ppm.	69
E53	Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de SA4 irradiando o hidrogênio em 1,70 ppm.	69
E54	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA5 .	72
E55	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (8,08-8,28 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SA5 .	73
E56	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,56-7,77 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SA5 .	73
E57	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,24-7,30 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SA5 .	74

E58	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 da SA5 .	74
E59	Mapa de correlação direta $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA5 .	75
E60	Mapa de correlação $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA5 .	75
E61	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA6 .	78
E62	Mapa de correlação $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA6 .	78
E63	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-D}_4$) da substância SA7 .	81
E64	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-D}_4$) da substância SA7 .	81
E65	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SA8 .	84
E66	Mapa de correlação direta $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA8 .	84
E67	Mapa de correlação $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA8 .	85
E68	Espectros de RMN de ^1H das substâncias SA5 , SA6 , SA7 e SA8 .	86
E69	Ampliação da região das metilas (2,30-2,60 ppm) dos espectros de RMN de ^1H das substâncias SA5 , SA6 , SA7 e SA8 .	87
E70	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,95-8,45 ppm) dos espectros de RMN de ^1H das substâncias SA5 , SA6 , SA7 e SA8 .	88
E71	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,00-8,00 ppm) dos espectros de RMN de ^1H das substâncias SA5 , SA6 , SA7 e SA8 .	89
E72	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA9 .	92
E73	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos (5,90-6,90 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de SA9 .	93
E74	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (4,22-4,28 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de SA9 .	93
E75	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,90-4,14 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de SA9 .	94
E76	Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (2,55-2,85 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de SA9 .	94
E77	Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (2,18-2,39 ppm) do espectro	95

	de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de SA9 .	
E78	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 50 MHz) da substância SA9 .	95
E79	Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3 , 50 MHz) da substância SA9 .	96
E80	Mapa de correlação ^1H - ^{13}C direta (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA9 .	96
E81	Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância SA9 .	97
E82	Espectro de NOE da substância SA9 irradiando o hidrogênio H-7a (2,22 ppm).	99
E83	Espectro de NOE da substância SA9 irradiando o hidrogênio H-7b (2,33 ppm).	100
E84	Espectro de NOE da substância SA9 irradiando o hidrogênio H-5 (4,24 ppm).	100
E85	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 de SA10 + SA11 .	102
E86	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos (4,90-5,45 ppm) do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 das substâncias SA10+SA11 .	102
E87	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,35-3,70 ppm) do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 das substâncias SA10+SA11 .	103
E88	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 de SA10 + SA11 .	103
E89	Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de SA9 e da fração de <i>S. aggregata</i> I em DCM.	107

RESUMO

A família Gesneriaceae compreende cerca de 135 gêneros e aproximadamente 3000 espécies de plantas ornamentais. Trata-se de uma família com ampla distribuição em todo o Mundo, representada principalmente nos trópicos e com poucas espécies nativas em regiões temperadas. O principal gênero da família Gesneriaceae no Brasil é *Sinningia*, o qual possui 68 espécies, das quais 57 ocorrem em território brasileiro. *Sinningia aggregata* (Ker-Gawl.) Wiehler muito abundante no estado do Paraná, é uma planta herbácea, de ciclo anual, com flores vermelhas (amareladas no botão), encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, além da região oriental do Paraguai. Com o gênero *Sinningia* foram realizadas poucas investigações químicas e farmacológicas, por isso o presente trabalho descreve o isolamento de compostos de *Sinningia aggregata* com posterior avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* contra um conjunto de linhagens de células tumorais humanas.

Foram realizadas duas coletas dos tubérculos de *S. aggregata*, uma em Curitiba/2004, outra em Tibagi/2007. Tubérculos secos e pulverizados foram extraídos com hexano, acetato de etila e etanol, sendo que os extratos em hexano e acetato de etila foram fracionados neste trabalho. Vários procedimentos cromatográficos foram necessários para o isolamento de onze substâncias. Dentre estas sete foram identificadas como produtos naturais conhecidos: 7-metoxi-2-metilntraquinona (**SA5**), tectoquinona (**SA6**), 7-hidroxi-2-metilntraquinona (**SA7**), 1-hidroxi-2-metilntraquinona (**SA8**), halleridona (**SA9**), β -sitosterol (**SA10**) e estigmasterol (**SA11**). As demais substâncias eram inéditas e receberam os nomes comuns de aggregatina A (**SA1**), aggregatina B (**SA2**), aggregatina C (**SA3**) e aggregatina D (**SA4**). Estas substâncias são aromáticas e apresentam um esqueleto carbônico novo, com um anel heterocíclico de sete membros. As aggregatinas A-C são ϵ -lactonas, derivadas do nafatleno, enquanto que a aggregatina D é derivada de uma naftoquinona prenilada. A formação de anéis de cinco ou seis membros é bastante comum, enquanto que anéis de sete membros são raros. Esta feição estrutural pode ser uma característica do gênero ou mesmo da espécie, situação que tornaria essas substâncias úteis como marcadores químicos.

A avaliação da atividade antiproliferativa mostrou que tanto o extrato etanólico total, quanto a fração em diclorometano e as substâncias **SA4** e **SA9** apresentaram resultados positivos principalmente contra as linhagens de células de melanoma, rim e ovário. Estes resultados indicam que as espécies de *Sinningia* acumulam substâncias com potencial farmacológico.

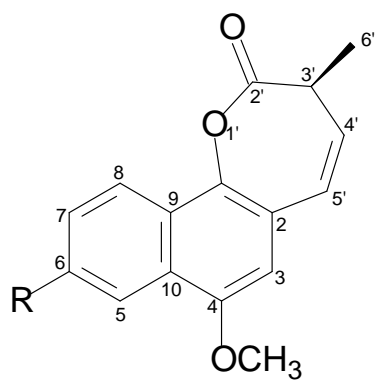
ABSTRACT

The family Gesneriaceae comprises about 135 genus and approximately 3000 species of ornamental plants. It is a family with a huge distribution around the world, represented mainly at the tropics, with few species located at the temperate regions. The main genus of Gesneriaceae in Brazil is *Sinningia* that has 68 species, of which 57 grow in Brazil. *Sinningia aggregata* (Ker-Gawl.) Wiehler, a species very abundant in Parana state, is an herbaceous plant, with annual cycle and red flowers (yellowish button), found at the Midwest, Southeast and South regions of Brazil, beyond the Oriental region of Paraguay. With *Sinningia* genus were realized few chemical and pharmacological investigations. This work describes the isolation of compounds from *Sinningia aggregata* with subsequent evaluation of the antiproliferative activity *in vitro* against a panel of tumor human cell lines.

S. aggregata were collected from two populations, one in Curitiba/2004 and another in Tibagi/2007. Dried and powdered tubers were extracted with hexane, ethyl acetate and ethanol extracts, and the hexane and ethyl acetate extracts were fractionated in this work. Several chromatographic procedures were necessary to isolate eleven substances. Among them, seven were known as natural products: 7-methoxy-2-methylantraquinone (**SA5**), tectoquinone (**SA6**), 7-hydroxy-2-methylantraquinone (**SA7**), 1-hydroxy-2-methylantraquinone (**SA8**), halleridone (**SA9**), β -sitosterol (**SA10**) and stigmasterol (**SA11**). The four new substances were named aggregatin A (**SA1**), aggregatin B (**SA2**), aggregatin C (**SA3**) and aggregatin D (**SA4**). These are aromatic compounds and shown a new carbonic skeleton, with a heterocyclic seven-membered ring. Aggregatins A-C are ϵ -lactones naphthalene derivative, while aggregatin D is a prenyl naphthoquinone derivative. The formation of five or six membered rings is very common, while seven-membered rings are rarer. This structural type can be characteristic of genus or species, becoming these compounds useful as taxonomic markers.

The evaluation of the antiproliferative activity showed that the ethanolic extract, the dichloromethane fraction and the substances **SA4** and **SA9** exhibit cytotoxic activity, mainly against melanoma, kidney and ovary cells lines. These results indicate that the *Sinningia* species accumulate substances with pharmacological potential.

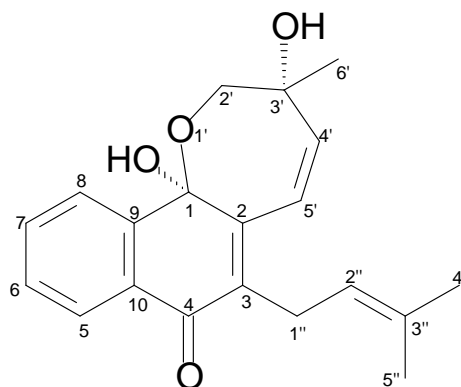
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



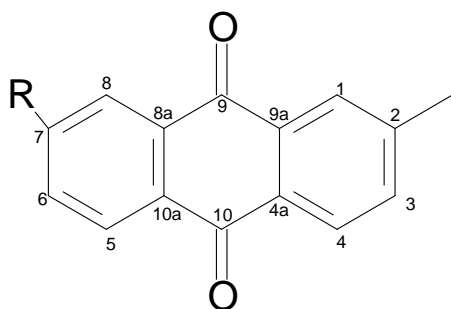
SA1 R=OH

SA2 R=H

SA3 R=OCH₃



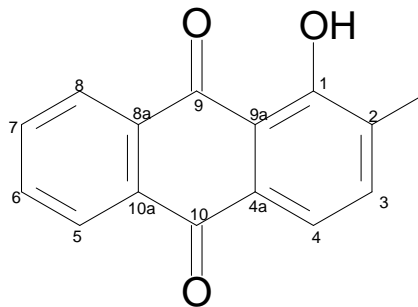
SA4



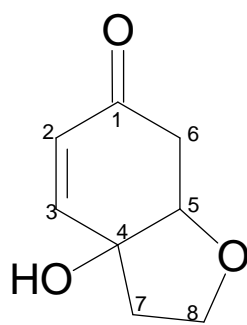
SA5 R=OCH₃

SA6 R=H

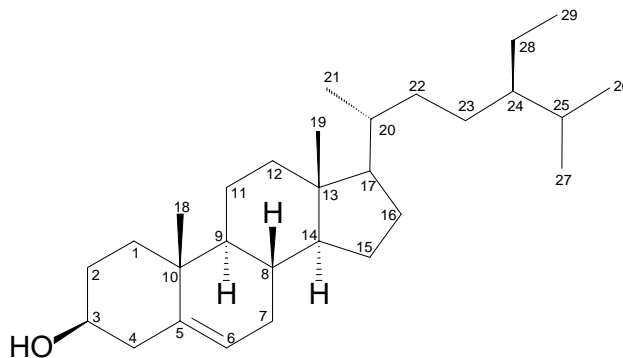
SA7 R=OH



SA8



SA9



SA10

SA11 Δ^{22,23}

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos primordiais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (VIEGAS *et al.*, 2006). Historicamente, os produtos naturais tem sido a melhor e uma fonte praticamente inesgotável de medicamentos (SCHMIDT *et al.*, 2008; TULP & BOHLIN, 2004).

Produtos naturais são tipicamente metabólitos secundários, produzidos por organismos em resposta a estímulos externos, como variações de nutrientes, infecção e competição (STROHL, 2000). São os produtos do metabolismo não essencial para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo. As fontes de metabólitos secundários são plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos (VAISHNAV & DEMAINE, 2010).

As plantas são a principal fonte de produtos naturais. A imensa diversidade química dos metabólitos secundários de origem vegetal é agora reconhecida como uma parte essencial das estratégias das plantas para enfrentar as adversidades e o ecossistema hostil. Cada população possui seus metabólitos secundários únicos adaptados às demandas particulares do nicho ecológico. A diversidade química destes, simplesmente reflete as diferenças entre os organismos com suas particularidades morfológicas (HARTMANN, 2007).

Os metabólitos secundários têm sido uma rica fonte de novas substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se tornaram extremamente importantes na terapia (NISBET & MOORE, 1997). Além disso, algumas substâncias conhecidas têm revelado atividades adicionais, que poderão ser úteis para o tratamento de doenças ainda não controladas (VAISHNAV & DEMAINE, 2010). Atualmente quase um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo são produtos naturais ou seus derivados (STROHL, 2000).

Cerca de 80% da população mundial, principalmente nos países não desenvolvidos, tem os produtos naturais como primeira opção nos cuidados à saúde. Produtos naturais como remédios tem uma história de aproximadamente 5000 anos (Índia, China e Grécia), enquanto que compostos isolados puros ou sintéticos, pouco mais de 100 anos, desde que a Bayer sintetizou o ácido acetilsalicílico (aspirina), no final do século XIX (NÚÑEZ-SELLÉS *et al.*, 2007).

É estimado que haja aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores. Entretanto, alguns reportam o número como sendo 250.000, outros estimam que o número seja maior que 500.000. Esta disparidade no número reflete uma investigação mais agressiva do meio ambiente, particularmente de ecossistemas como as florestas tropicais, onde novas espécies de plantas são continuamente descobertas (McCHESNEY *et al.*, 2007). Apesar desse trabalho intenso, é estimado que apenas cerca de 15% das 300.000 espécies de plantas superiores têm sido sistematicamente investigadas, química e/ou farmacologicamente, enquanto que o potencial dos organismos marinhos, como uma fonte de novos medicamentos, continua praticamente inexplorado (NEWMAN *et al.*, 2008).

Um aspecto preocupante sobre a biodiversidade é a perda de espécies pelas mudanças ambientais. Muitas espécies estão se tornando extintas, e há muitas regiões no mundo e muitos habitats diferentes nos quais uma biodiversidade nova e incomum ainda é desconhecida ou está sendo descoberta (HARVEY, 2000).

Por isso, é importante buscar novas espécies para a realização de estudos químicos e farmacológicos, para que as informações existentes, que muitas vezes serão de imensa importância, não sejam perdidas.

1.1. Família Gesneriaceae

Gesneriaceae é uma família que compreende 135 gêneros e aproximadamente 3000 espécies de plantas ornamentais, sendo primeiramente reconhecida por Jussieu em 1806, mas somente estabelecida em 1816 por De Candolle (WEBER, 2004). Está relacionada com as famílias Calceolariaceae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Martyniaceae, Pedaliaceae, e Lentibulariaceae (BOGGAN & SHALIT, 2006).

Trata-se de uma família com ampla distribuição em todo o Mundo, representada principalmente nos trópicos e com poucas espécies nativas em regiões temperadas (BURTT & WIEHLER, 1995). O centro principal de diversidade da família localiza-se a noroeste da América do Sul (Colômbia ao Equador), sendo que o sudeste brasileiro parece ser um centro secundário de diversidade (ARAUJO *et al.*, 2005; BOGGAN & SHALIT, 2006; CRONQUIST, 1981).

As Gesneriáceas são ervas, trepadeiras, arbustos ou, raramente pequenas árvores. Estas podem ser terrestres, epífitas (crescem sobre árvores) ou rupícolas (crescem sobre pedras). As folhas da maioria das espécies têm pelos, e as flores são

normalmente zigomorfas (simetria bilateral) e encontradas em uma grande variedade de cores e formatos, sendo geralmente muito vistosas (Figura 01 - página 04). As sementes são pequenas e numerosas (BOGGAN & SHALIT, 2006; GASPARINO, 2008). Todas as Gesneriáceas têm raízes fibrosas, mas muitos grupos (principalmente aqueles no Novo Mundo) têm caules modificados, sobre o solo ou enterrados, que agem como órgãos de reserva (BOGGAN & SHALIT, 2006).

As espécies de Gesneriaceae podem ser polinizadas por abelhas, borboletas, moscas, mariposas, morcegos ou pássaros. A diversidade de polinizadores é mantida em função da ocorrência de flores vistosas, com néctar e corolas de cores vivas e adaptadas a cada polinizador (PERRET *et al.*, 2003; GASPARINO, 2008).

Espécies de Gesneriaceae tem importância econômica, pois são comumente cultivadas como ornamentais, como por exemplo, os gêneros *Aeschynanthus*, *Codonanthe*, *Columnea*, *Episcia*, *Gloxinia*, *Kohleria*, *Nautilocalyx*, *Nematanthus*, *Sinningia*, *Streptocarpus* e *Saintpaulia* (violeta-africana) uma das espécies mais comercializadas no Brasil (GASPARINO, 2008). Outras espécies são também utilizadas pela medicina popular na Espanha, países da Ásia, América Central e do Sul.

A família é comumente dividida em duas subfamílias: Cyrtrandoideae e Gesnerioideae, as quais são diferenciadas de acordo com o crescimento igual (Gesnerioideae) ou desigual (Cyrtrandoideae) dos cotilédones e, também, o desenvolvimento (Gesnerioideae) ou não (Cyrtrandoideae) do endosperma na semente. Espécies da subfamília Gesnerioideae, que possuem pétalas com pigmentos incomuns, localizam-se no Novo Mundo (Américas), enquanto que as espécies de Cyrtrandoideae são nativas do Velho Mundo (Ásia, Europa, África e Oceania) (ARAUJO *et al.*, 2005; BOGGAN & SHALIT, 2006).

Estudos moleculares recentes mostraram que as subfamílias do Velho e Novo mundo, refletem uma divisão evolutiva antiga da família. Portanto, características adicionais são usadas para separar as subfamílias em tribos. Alguns poucos gêneros, como *Sanango* e *Titanotrichum*, são isolados, não se agrupando bem em nenhuma tribo ou subfamília. Porém estudos recentes indicaram que *Titanotrichum*, nativo da Ásia, pertence à subfamília do Novo Mundo Gesnerioideae (BOGGAN & SHALIT, 2006).

Em Gesnerioideae são reconhecidas sete tribos (Beslerieae, Episcieae, Gesnerieae, Gloxinieae, Napeantheae, Coronanthereae e Sinningieae) as quais são consideradas monofiléticas com base em dados morfológicos, moleculares, número de cromossomos e metabólitos secundários (GASPARINO, 2008).

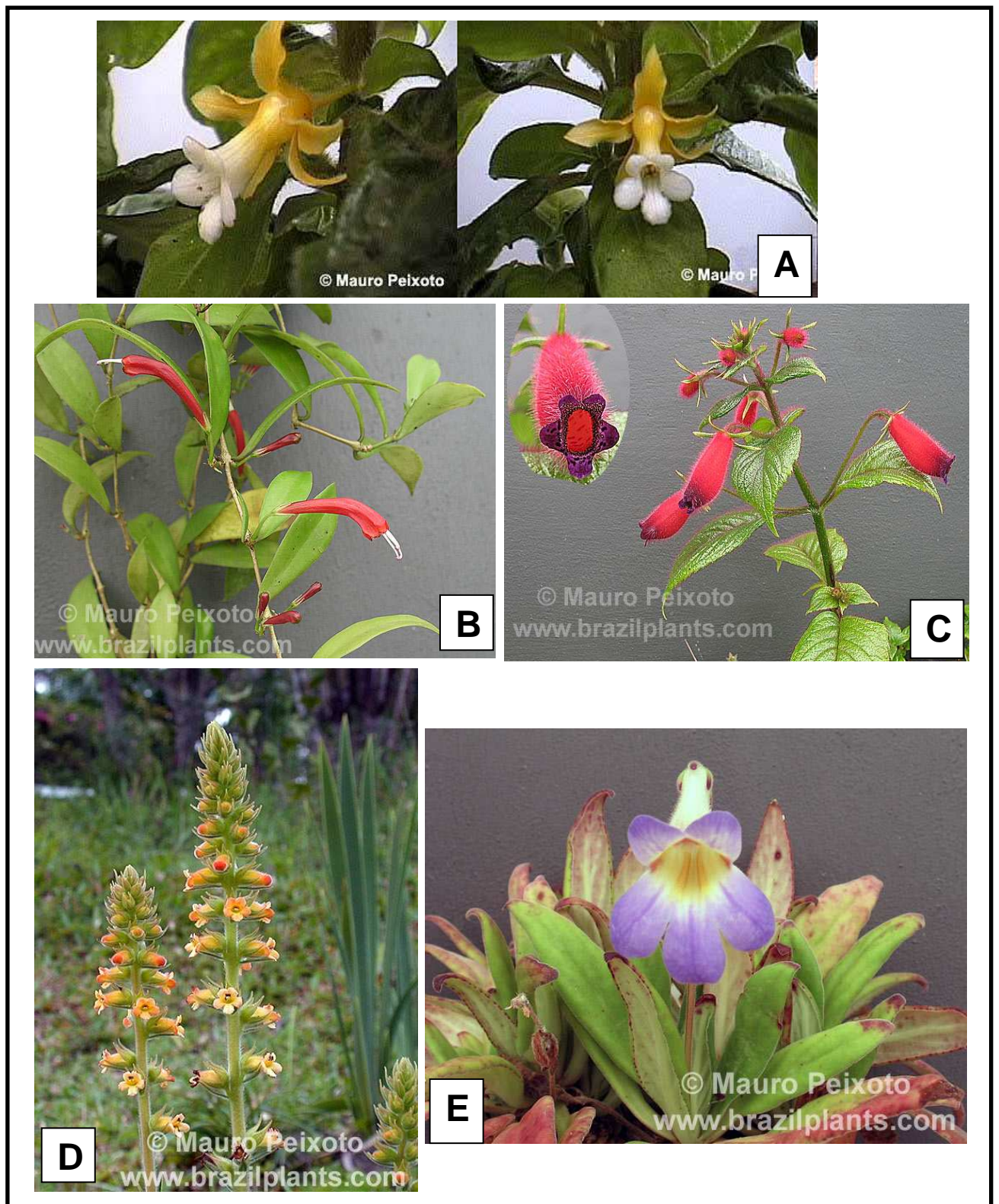


Figura 01. Espécies de Gesneriaceae. **A:** *Besleria melancholica*, **B:** *Aeschynanthus micranthus*, **C:** *Seemannia purpurascens*, **D:** *Sinningia allagophylla*, **E:** *Chirita subrombhoidea*.

No Brasil a família é estimada em 23 gêneros e cerca de 200 espécies. Estas são encontradas principalmente em matas úmidas da região amazônica ou na Mata Atlântica, sendo algumas vezes nativas de campos rupestres de planalto. A maior concentração de táxons se encontra na região Sudeste (ARAUJO *et al.*, 2005; GASPARINO, 2008).

1.2. Gênero *Sinningia*

O principal gênero da família Gesneriaceae no Brasil é *Sinningia*, o qual possui 68 espécies, das quais 57 ocorrem em território brasileiro. O centro de diversidade do gênero é a região sudeste, onde é encontrada a maioria das espécies. As espécies de *Sinningia* são ervas ou subarbustos, a maioria de ciclo anual, com tubérculo perene. Crescem durante a primavera, florescem e entram em declínio durante o outono/inverno, quando perdem a suas partes aéreas. As gemas dormentes permanecem nos tubérculos, ocorrendo o brotamento quando as condições se tornam favoráveis (primavera/verão). Como outras gesneriáceas, todas as espécies de *Sinningia* produzem belas flores, tendo um grande potencial ornamental. As características fenológicas deste gênero aliada a uma coleta indiscriminada tem colocado algumas espécies em risco de extinção (ARAUJO *et al.*, 2005; UNEMOTO *et al.*, 2006; PERRET *et al.*, 2003).

Na literatura foram encontrados poucos relatos de estudos químicos com espécies de *Sinningia*. Ácido cinâmico (1), verbascosideo (2), luteolinidina-5-O-glucopiranosideo (3), apigeninidina-5-O-glucopiranosideo (4), luteolina-7-O-glicosideo (5), luteolina-7-O-glucuronideo (6) e apigenina-7-O-glucuronideo (7) foram isolados de *S. cardinalis* (WINEFIELD *et al.*, 2005; SWINNY *et al.*, 2000; JENSEN, 1996). Em *S. speciosa* foram identificados cleroidicina-B (8), isorengeiol (9), 7-metoxi-2-metilntraquinona (10), rubiawallina-B (11), β -sitosterol (12) e estigmasterol (13) (VERDAN *et al.*, 2009). As flores de *S. tubiflora* produzem uma essência rica em linalol (14), um composto comum no aroma de plantas polinizadas por mariposas (PERRET *et al.*, 2003) (Figura 02 – página 06).

As espécies de *Sinningia* não são comumente usadas na medicina popular, embora *S. allagophylla* tenha a reputação de ser útil como tônico, emoliente e febrífugo (GOMES *et al.*, 2000).

No estado do Paraná são encontradas mais de uma dezena de espécies de *Sinningia*, entre as quais se destaca, por sua abundância, *S. aggregata* (dados do Herbário da UFPR). Considerando que existem poucas investigações fitoquímicas com espécies de *Sinningia*, optou-se por aprofundar o conhecimento da química deste gênero, através do estudo de *Sinningia aggregata*.

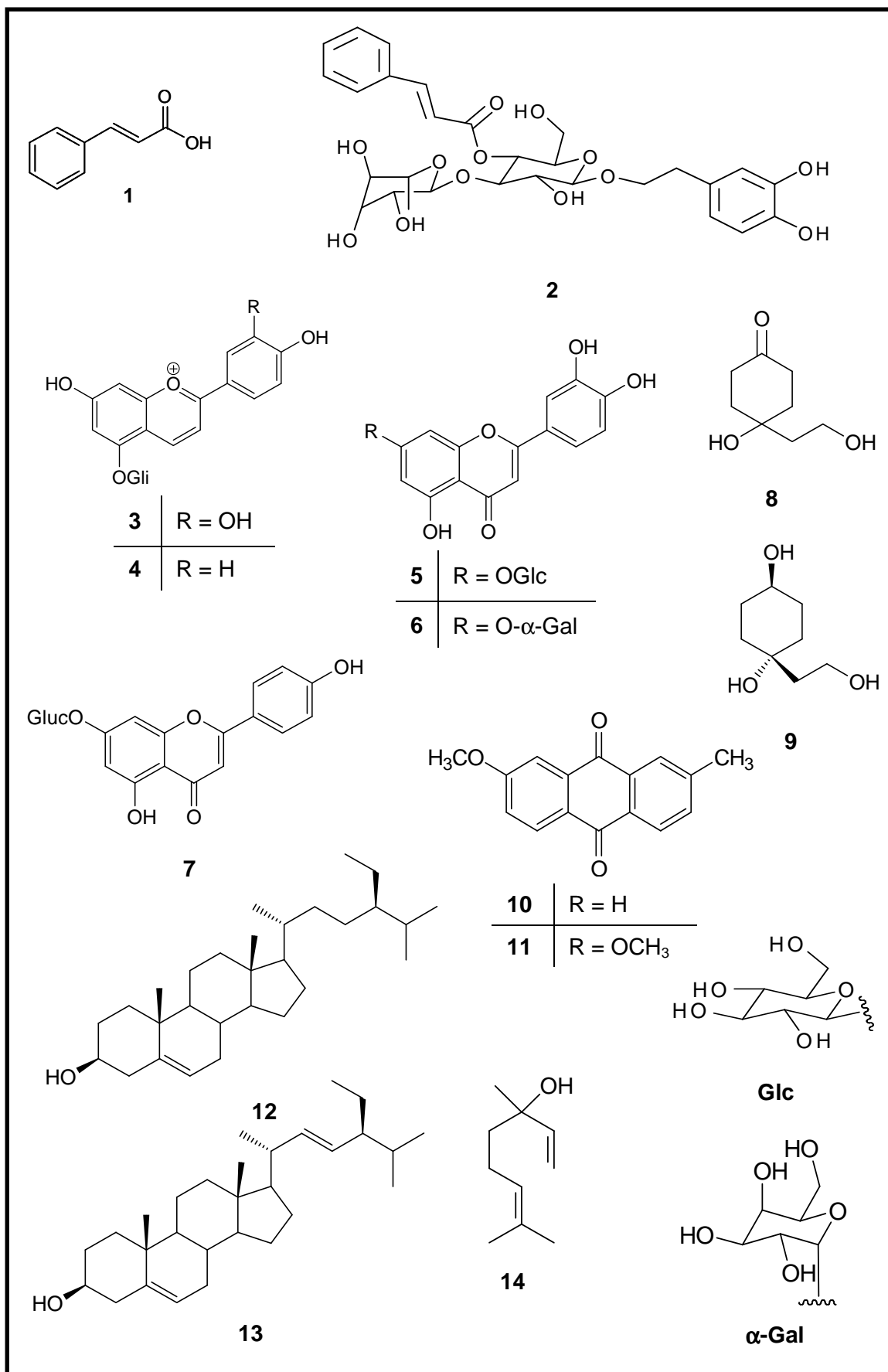


Figura 02. Compostos isolados e identificados em espécies de *Sinningia*.

1.3. *Sinningia aggregata*

S. aggregata (Ker-Gawl.) Wiehler (Figura 04 – página 08) (sinônimo: *Rechsteineria aggregata*) é uma planta herbácea, de ciclo anual, com flores vermelhas (amareladas no botão), encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, além da região oriental do Paraguai. Para esta espécie não há registros de nomes comuns em português, mas em guarani é chamada de “jety itakua”, que significa “batata-de-pedra”, em alusão ao seu habitat favorito. O seu tamanho varia entre 0,5 a 1,5 m, sendo que os exemplares brasileiros são maiores do que aqueles oriundos do Paraguai. Três formas diferentes foram descritas para a espécie *Rechsteineria aggregata*: f. *litoralis*, f. *rupicola* e f. *tomentosa*. Entretanto, um exame minucioso comprovou que as diferenças de tamanho do caule e das folhas, assim como a densidade do indumento, não justificavam o reconhecimento de táxons distintos (CHAUTEMS, 1993; 2003).

S. aggregata distingue-se de outras espécies do gênero pela presença de tricomas que produzem uma resina aromática e pegajosa (Figura 03 – página 07). Esse é um caráter raro no gênero, sendo encontrado em apenas quatro espécies: *S. aggregata*, *S. harleyi*, *S. nordestina* e *S. valsuganensis* (ARAUJO *et al.*, 2005). A composição química dessa resina foi determinada como sendo constituída de compostos alifáticos de cadeia longa, juntamente com uma fração sesquiterpênica (STEFANELLO *et al.*, 2005) (Tabela 01 – página 09, Figura 05 - página 10). Não há outros estudos químicos anteriores com esta espécie, bem como não há relatos de seu uso na medicina popular.

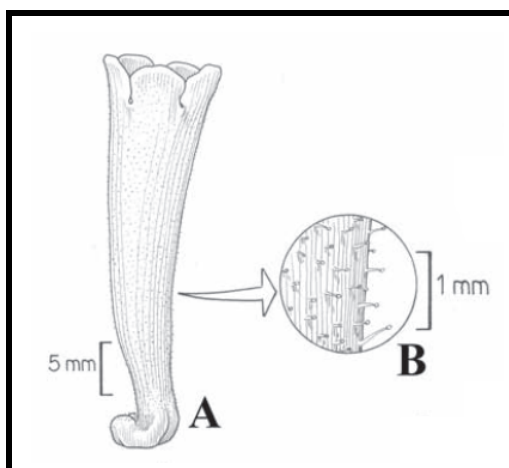


Figura 03. Desenho ilustrativo da corola (A) e tricomas (B) de *S. aggregata* (ARAUJO *et al.*, 2005).



Figura 04. Exemplos de *Sinningia aggregata* (Imagens cedidas por Mauro Peixoto)

Tabela 01. Composição do óleo essencial de *S. aggregata*.

Componente	Quantidade (%)
(<i>E</i>)-Cariofileno (15)	0,8
(<i>E</i>)-Nerolidol (16)	6,7
Espatulenol (17)	7,8
Óxido de cariofileno (18)	3,0
Viridiflorol (19)	1,3
Guaiol (20)	0,8
α -Eudesmol (21)	1,3
Acetato de (<i>Z</i>)-nerolidila (22)	8,8
14-Hidroxi- α -humuleno (23)	0,8
(<i>Z</i>)-Nuciferol (24)	1,4
Acetato de (<i>Z</i>)-sesquilandulila (25)	1,0
Biciclovetivenol (26)	2,8
Acetato de bisabolila (27)	4,5
Isofitol (28)	1,0
1-Octadecanol	16,9
Linoleato de metila	28,4
Docosano	4,5

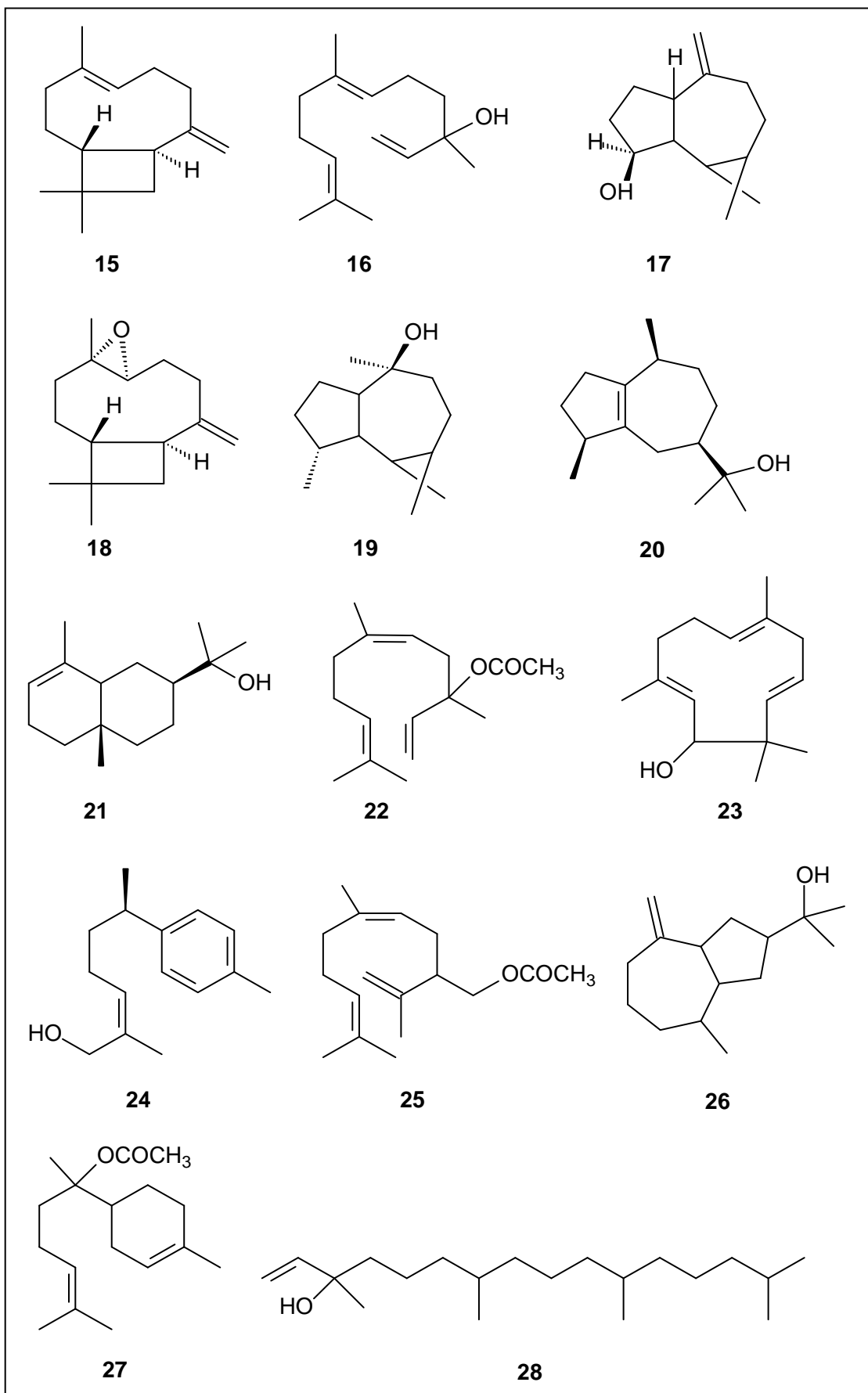


Figura 05. Estruturas dos terpenos do óleo essencial de *S. aggregata*.

1.4. Atividade antiproliferativa

Desde os tempos dos faraós no Egito, há evidências de câncer encontrado em vestígios humanos primitivos e na literatura médica. A literatura médica antiga relata que cirurgias eram feitas, e que os médicos receitavam o uso de alguns produtos naturais, especialmente oriundos de plantas (NOBILI *et al.*, 2009). As plantas têm uma longa história no tratamento de câncer. O maior impacto recente nas drogas derivadas de plantas foi provavelmente nesta área (PESSOA *et al.*, 2006).

Em todo o mundo, mais de dez milhões de novos casos de câncer (todos os tipos, excluindo os de pele sem melanoma), com mais de seis milhões de mortes foram estimados no ano de 2000. Desde 1990 tem havido um aumento de 22% na incidência de câncer e mortalidade com os quatro tipos de câncer mais freqüentes, pulmão, mama, colorretal e estômago; e os quatro tipos mais agressivos, pulmão, estômago, fígado e colorretal (BALUNAS & KINGHORN, 2005). Apesar do esforço realizado nas últimas décadas, não há ainda tratamento eficaz para vários tipos de tumores (PAN *et al.*, 2010).

O câncer pode ser causado de três maneiras: dieta incorreta, predisposição genética e ambiente. Pelo menos 35% de todos os casos de câncer em todo o mundo são causados por uma dieta errada. A combinação de álcool e cigarro eleva essa porcentagem para 60%. Predisposição genética a câncer representa 20% dos casos, sendo que a maioria destes está associada a uma série de carcinógenos ambientais (REDDY *et al.*, 2003).

A descoberta de medicamentos de plantas medicinais tem sido de extrema importância no tratamento de câncer e, de fato, a maioria das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários de plantas e seus derivados na metade do último século foram usados para combater o câncer (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Compostos naturais possuem vantagens em muitos aspectos como agentes quimiopreventivos: eles estão presentes em alimentos comumente consumidos, os quais estão prontamente disponíveis para a maioria das pessoas, normalmente tem baixa ou nenhuma toxicidade, em contraste com a maioria dos medicamentos de quimioterapia, e muitos destes compostos mostraram potenciais como um complemento na quimioterapia em alguns ensaios clínicos (LI *et al.*, 2011).

Atualmente, há um número impressionante de drogas anticâncer derivadas de plantas superiores em uso e também como candidatos a antineoplásicos em triagens clínicas. Uma análise do mercado de medicamentos antitumorais na América do Norte, Europa e Japão entre 1981 e 2006, revelou que 47,1% do total de 155 medicamentos aprovados clinicamente, são produtos naturais ou seus derivados semi-sintéticos, ou

ainda moléculas sintetizadas baseadas em metabólitos secundários. Essa situação mostra a importância do reino vegetal como fonte de novas substâncias com propriedades antitumorais. (PAN *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de um novo medicamento de origem natural começa com a seleção de espécies promissoras, através de testes biológicos básicos. No caso da busca de novos agentes antitumorais, o ensaio mais usado é a avaliação da atividade citotóxica ou antiproliferativa contra linhagens de células *in vitro* (SKEHAN *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral: Realizar o estudo fitoquímico de *Sinningia aggregata* e avaliar o seu potencial farmacológico.

2.2. Objetivos específicos: Isolar e identificar os metabólitos secundários dos extratos menos polares dos tubérculos de *Sinningia aggregata* e avaliar a atividade citotóxica dos extratos, frações de extratos e substâncias isoladas.

3. ESTUDO FITOQUÍMICO

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Procedimentos gerais

Nas separações por cromatografia em coluna (CC), usou-se sílica-gel 7734 da Merck. A proporção de sílica para empacotar a coluna foi de aproximadamente vinte vezes a quantidade de material usado.

Para preparar as placas cromatográficas, espalhou-se uma suspensão de sílica-gel 7747 (60PF244) da Merck em água destilada sobre placas de vidro. Para as placas de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi usado 0,50 mm de espessura e nas preparativas (CCDP), 1,00 mm de espessura. Na revelação destas placas usou-se radiação UV (366 e 254 nm) e solução a 5% de H₂SO₄ em etanol.

Os solventes utilizados foram produtos de grau analítico das marcas Synth ou Vetec.

As frações obtidas de colunas e placas foram agrupadas por semelhança após análise por CCDA. O critério de pureza adotado foi o aparecimento de uma única mancha quando a substância era submetida à CCDA em três diferentes sistemas de solventes.

As substâncias foram identificadas através da análise de espectros (UV-Vis, IV, RMN e EM) e comparação com dados da literatura. Os espectros de UV-vis foram obtidos em MeOH, usando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, em um espectrofotômetro (Shimadzu) UV-2401PC.

Os espectros de IV foram obtidos em pastilha de brometo de potássio (1mg/100mg KBr), em um espectrofotômetro Biorad FTIR.

Para obtenção dos espectros de RMN (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, HSQC, HMBC e NOE) foram utilizados os espectrômetros de ressonância magnética nuclear DPX-200 ou AVANCE-400 (Bruker), operando respectivamente a 200 e 400 MHz para hidrogênio e, 50 e 100 MHz para carbono. As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados (clorofórmio, benzeno ou metanol), utilizando-se TMS como referência interna.

Para a obtenção dos espectros de massas, cada amostra foi diluída em 1,0 mL de metanol com 0,1% de ácido fórmico. A partir destas soluções foi retirado 10,0 μL e diluídos em 1,0 mL do mesmo solvente, originando soluções com concentração aproximada de 10 ppb. Posteriormente as soluções foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas através de um sistema *Nanomate Triversa Advion Biosystem*. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS foram extraídos no modo positivo através do equipamento QToF (Micromass) de configuração de ESI-QqToF. As condições de operação do equipamento para a otimização das análises foram: 3.0-4.0 kV de voltagem do capilar, 80°C a temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 60°C, e voltagem do cone de 20-40 V. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1500 e processados com o software MassLynx 4.0. Outros espectros foram obtidos em um espectrômetro HP-5000 (Shimadzu) CG-HRMS.

A rotação específica dos compostos isolados foi determinada em CHCl_3 , usando um polarímetro Rudolph Research modelo Autopol III com lâmpada de sódio (589 nm). Os valores de rotação específica foram calculados utilizando a fórmula abaixo:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\text{rotação observada em graus} \times 100}{\text{comprimento da cubeta (cm)} \times \text{concentração (g/100 mL)}}$$

Os cálculos de otimização da geometria molecular e de densidade funcional na estrutura eletrônica dos compostos isolados empregaram o híbrido funcional B3LYP

(BECKE, 1993; LEE *et al.*, 1988; VOSKO *et al.*, 1980; STEPHENS *et al.*, 1994) com a base de dados LANL2DZ (HAY & WADT, 1985), como implementado pelo Gaussian03 (rev. E01) (FRISCH *et al.*, 2008). Cálculos de rotação ótica foram realizados empregando um método desenvolvido por Pedersen (PEDERSEN & HANSEN, 1995) como desenvolvido no Gaussian03. Estas técnicas foram primeiramente empregadas com um composto conhecido (mentol), para aferir a confiabilidade do método. Estes procedimentos foram realizados pelo Prof. Dr. Eduardo Lemos de Sá (UFPR).

3.1.2. Material vegetal

Tubérculos de *Sinningia aggregata* foram coletados de plantas cultivadas em Curitiba (outubro/2004, *S. aggregata* I) e de uma população natural crescendo em Tibagi (maio/2007, *S. aggregata* II). Os materiais foram fornecidos pelos botânicos Armando C. Cervi (Departamento de Botânica – UFPR) e Clarisse B. Poliquesi (Museu Botânico Municipal de Curitiba), respectivamente. Exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Paraná (UPCB, Cervi 3873) e no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM 290738).

3.1.3. Preparo de extratos

O material botânico coletado foi secado em estufa a 40°C e em seguida pulverizado. Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração a frio. Nesta técnica, o pó dos tubérculos foi deixado em contacto com o solvente extrator por 24 h, a temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi filtrada e o solvente removido em evaporador rotativo, rendendo o respectivo extrato. Para *S. aggregata* II foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol) e apenas etanol para *S. aggregata* I, sendo realizadas três extrações sucessivas com cada solvente. O volume utilizado em cada extração foi de aproximadamente 500 mL de solvente para cada 100 g de material.

3.1.4. Isolamento dos metabólitos secundários

3.1.4.1. *Sinningia aggregata* I

Os tubérculos secos (18,3 g) foram extraídos por maceração a frio em etanol, rendendo o extrato total (2,0 g). Este extrato foi dissolvido em etanol:água 1:1 (180 mL) e posteriormente extraído com hexano, acetato de etila e 1-butanol (3 X 60 mL, cada). Esse

procedimento resultou em novos extratos: hexano (0,080 g), acetato de etila (0,24 g) e 1-butanol (0,81 g). Os extratos em hexano e acetato de etila mostraram-se similares por CCDA e então foram reunidos. Este extrato resultante foi submetido à cromatografia clássica em coluna (CC), eluída inicialmente com hexano puro (50 mL), depois com misturas de hexano:acetato de etila (95:5, 9:1, 8:2, 7:3 e 1:1, 100 mL cada) e finalmente acetato de etila puro (50 mL), sendo recolhidas 50 frações de aproximadamente 10 mL. As frações obtidas da coluna foram analisadas por CCDA e agrupadas por similaridade em 15 frações (Tabela 02 – página 15).

Tabela 02. Dados das frações obtidas do fracionamento do extrato de *S. aggregata* I.

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
01-02	4,0	10-14	5,0	39	5,0
03	4,0	15-17	5,0	40-41	10,0
04	3,0	18-19	2,0	42-47	110,0
05-07	14,0	20-36	17,0	48-49	37,0
08-09	3,0	37-38	11,0	50	25,0

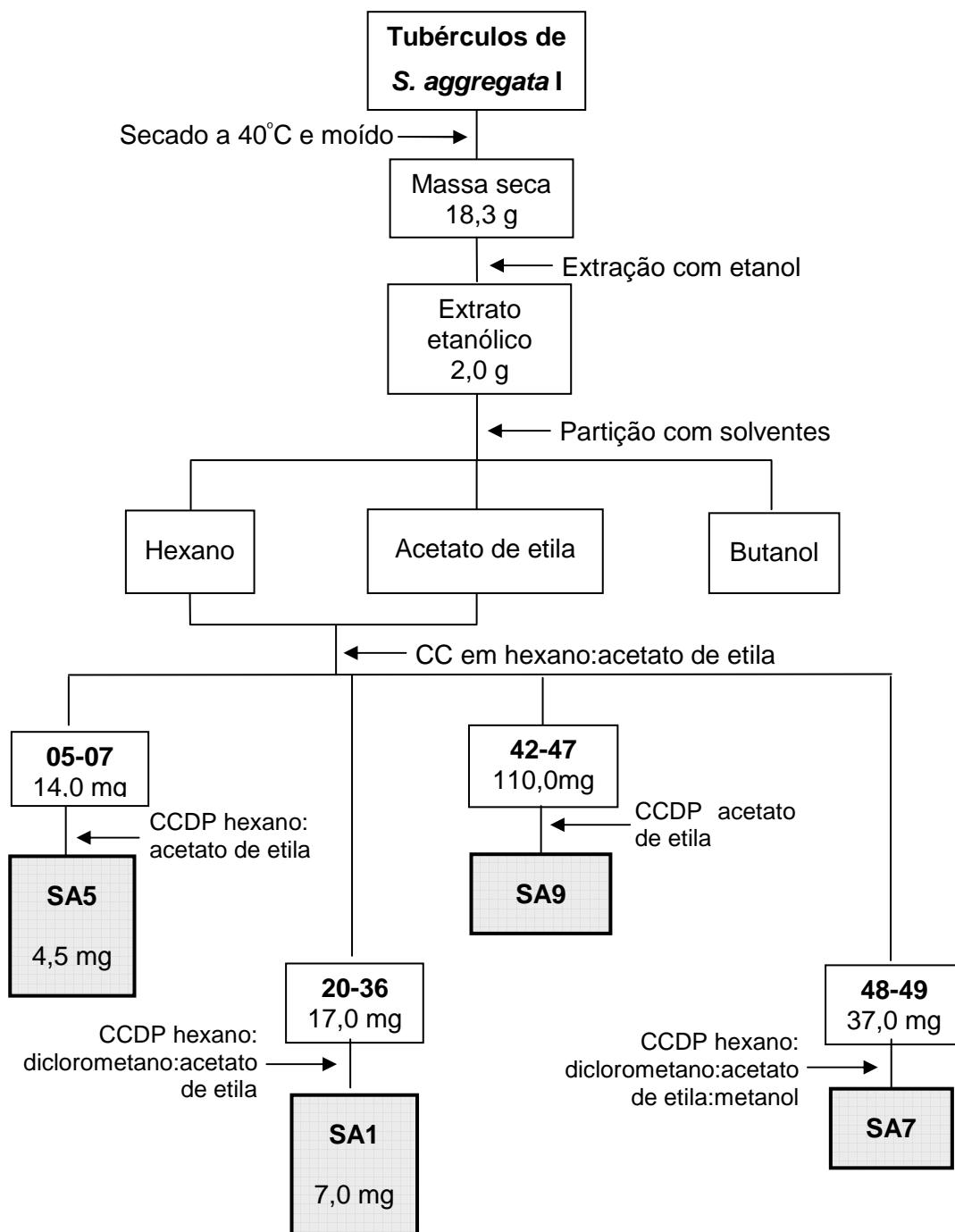
As frações 05-07 (14,0 mg) foram reunidas e purificadas por CCDP usando hexano:acetato de etila 9:1 como fase móvel, resultando no isolamento de **SA5** (4,5 mg).

As frações 20-36 (17,0 mg) foram reunidas e purificadas por CCDP eluída com hexano:diclorometano:acetato de etila 1:1:0,5, rendendo a substância **SA1** (7,0 mg).

As frações 42-47 (110,0 mg) foram reunidas e purificadas por CCDP em acetato de etila puro, resultando no isolamento da substância **SA9** (34,0 mg).

As frações 48-49 (37,0 mg) também foram reunidas e forneceram a substância **SA7** (3,0 mg) após purificação através de CCDP em hexano: diclorometano: acetona: metanol 3:3:2:0,1 (Esquema 01 – página 16).

Esquema 01. Procedimento geral para extração, fracionamento dos tubérculos de *S. aggregata* I e isolamento de SA1, SA5, SA7 e SA9.



3.1.4.2. *Sinningia aggregata* II

Os tubérculos secos (349,2 g) de *S. aggregata* II foram extraídos por maceração a frio, sendo obtidos os extratos em hexano (1,59 g), acetato de etila (1,91 g) e etanol (16,70 g).

3.1.4.2.1. Extrato em hexano de *Sinningia aggregata* II

O extrato em hexano (SAH) foi submetido à CC eluída inicialmente com hexano puro (100 mL), e aumentando a polaridade gradativamente com acetona (9:1, 8:2, 7:3, 3:2, 1:1), utilizando 300, 200, 100, 50 e 100 mL de cada sistema de solvente, respectivamente, depois acetona pura (50 mL) e finalmente metanol (100 mL). Este processo rendeu sete frações após análise por CCDA (Tabela 03 – página 17).

Tabela 03. Dados das frações obtidas do extrato em hexano (SAH) de *S. aggregata* II.

Código	SAH01	SAH08	SAH11	SAH12	SAH19	SAH20	SAH26
Frações	01-07	08-10	11	12-18	19	20-25	26-32
Massa (mg)	64,0	1210	46,0	107,0	12,0	80,0	65,0

A fração SAH08 (1,21 g) foi submetida à CC eluída com hexano:acetona (99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 200 mL cada), e acetona pura (50 mL). Foram recolhidas 97 frações de 10 mL cada, que foram reunidas em 19 grupos. Apenas os grupos VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV e XVI foram purificados, pois os grupos I, II, III, IV, V e XVIII possuem pouca massa e os grupos IX, XI, XVII e XIX tem uma composição complexa, que com a pequena quantidade de material inviabiliza o processo de isolamento e purificação (Tabela 04 – página 18).

Tabela 04. Reunião das frações da coluna de SAH08.

Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)	Grupo	Massa (mg)
I	3,0	VI	400,0	XI	78,0	XVI	135,0
II	11,0	VII	19,0	XII	61,0	XVII	32,0
III	2,0	VIII	26,0	XIII	26,0	XVIII	11,0
IV	6,0	IX	31,0	XIV	41,0	XIX	29,0
V	16,0	X	112,0	XV	157,0		

O grupo VI (400,0 mg) foi cromatografado em CC utilizando-se como fase móvel primeiro hexano (250 mL) e depois hexano:acetona (99:1, 98:2, 95:5, 1:1, 100 mL cada). Este procedimento rendeu 53 frações de 10 mL que foram agrupadas em 13. A fração VI-8 (39,4 mg), continha as substâncias **SA10+SA11**. A fração VI-9 (281,4 mg) foi submetida à CC eluída com hexano:acetato de etila (95:5 e 9:1, 150 mL cada mistura), rendendo 29 frações de 10 mL que foram reunidas em 8 grupos. O grupo VI-9-1 (270,0 mg) foi cromatografado em CC eluída com hexano (70 mL) e hexano:acetato de etila (99:1 e 98:2, 200 mL cada). Este procedimento resultou em 42 frações de 10 mL, reunidas em 13 frações. A fração VI-9-1-8 (21,0 mg) continha a substância **SA6** impura. A fração VI-9-1-10 (24,5 mg) foi submetida a CCDP em hexano:acetato de etila 9:1, rendendo **SA6** (3,1 mg). A fração VI-9-1-4 (132,3 mg) foi cromatografada em hexano puro (50 mL) e misturas de hexano:acetato de etila (99:1, 98:2, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1) em diferentes volumes (100, 50, 20, 20, 30, 20 mL), rendendo 37 frações, agrupadas em 6. A fração VI-9-1-4-3 (5,3 mg) foi submetida a CCDP em hexano:acetato de etila 9:1, resultando na purificação da substância **SA8** (Esquema 02 – página 21).

O grupo VIII (26,0 mg) foi submetido à CCDP em éter de petróleo:acetona 5:0,2, resultando em 8 frações. Destas, três frações (D, F e G) (13,8 mg) foram reunidas ao grupo VII (19,0 mg) do qual foi feito novamente uma CCDP em éter de petróleo:acetona 5:0,2, resultando no isolamento de **SA2** (2,3 mg) e de **SA10+SA11** (2,0 mg) (Esquema 03 – página 22).

O grupo X (112,0 mg) foi fracionado por CCDP em hexano:clorofórmio:metanol 49,5:49,5:1, rendendo as frações X-A (6,2 mg), X-B (70,0 mg) e X-C (6,3 mg). X-A foi submetida à nova CCDP eluída com hexano:clorofórmio 1:1, rendendo **SA2** (2,6 mg) e

SA4 (2,2 mg). A fração X-B mostrou-se ser a substância **SA4** pura e a fração X-C foi caracterizada por conter apenas as substâncias **SA10+SA11** (Esquema 04 – página 22).

O grupo XII (61,0 mg) foi purificado por CCDP em hexano:clorofórmio:metanol 49,5:49,5:1, resultando no isolamento de **SA4** (50,0 mg). Por outro lado, o grupo **XIII** (26,0 mg) não foi purificado, por conter apenas a substância **SA4**.

O grupo XIV (41,0 mg) foi fracionado por CCDP em hexano:acetona 9:1, obtendo-se 3 frações. A fração XIV-A (4,5 mg) foi submetida à nova CCDP eluída com hexano:clorofórmio 1:1, da qual foram isoladas as substâncias **SA10+SA11** (1,5 mg). A fração XIV-B (4,9 mg) continha apenas a substância **SA4**. A fração XIV-C (4,4 mg) foi purificada por CCDP em hexano:diclorometano 1:1, resultando no isolamento de **SA3** (1,4 mg) (Esquema 05 – página 23).

O grupo XV (157,0 mg) não foi purificado por possuir essencialmente a mistura **SA10+SA11**.

Com o grupo XVI (135,0 mg) foi realizada uma CC eluída com diclorometano (150 mL), diclorometano:acetona (9:1, 8:2, 1:1, 50 mL de cada) e acetona (100 mL). Esta separação resultou em 31 frações que foram reunidas em 11. A fração XVI-1 (24,0 mg) foi submetida a CCDP em hexano:acetato de etila 95:5. Este procedimento resultou no isolamento de **SA4** (1,6 mg). A fração XVI-3 (19,0 mg) foi caracterizada por conter as substâncias **SA10+SA11** (Esquema 06 – página 23).

A fração SAH11 (46,0 mg) foi submetida à CCDP em hexano:acetona 8:2, resultando no isolamento da substância **SA4** (9,5 mg) e **SA10+SA11** (1,4 mg).

3.1.4.2.2. Extrato em acetato de etila de *Sinningia aggregata* II

O extrato em acetato de etila (SAA) foi submetido à cromatografia clássica em coluna eluída primeiro com hexano (20 mL), depois diclorometano (70 mL), diclorometano:acetato de etila 1:1 (70 mL), acetato de etila (70 mL) e por último, metanol (50 mL). Este procedimento resultou em 25 frações que foram reunidas em 11 frações (Tabela 05 – página 20). Apenas as frações SAA05 e SAA13 foram purificadas, pois foram as quais mostraram uma quantidade suficiente para purificar uma mistura simples de substâncias.

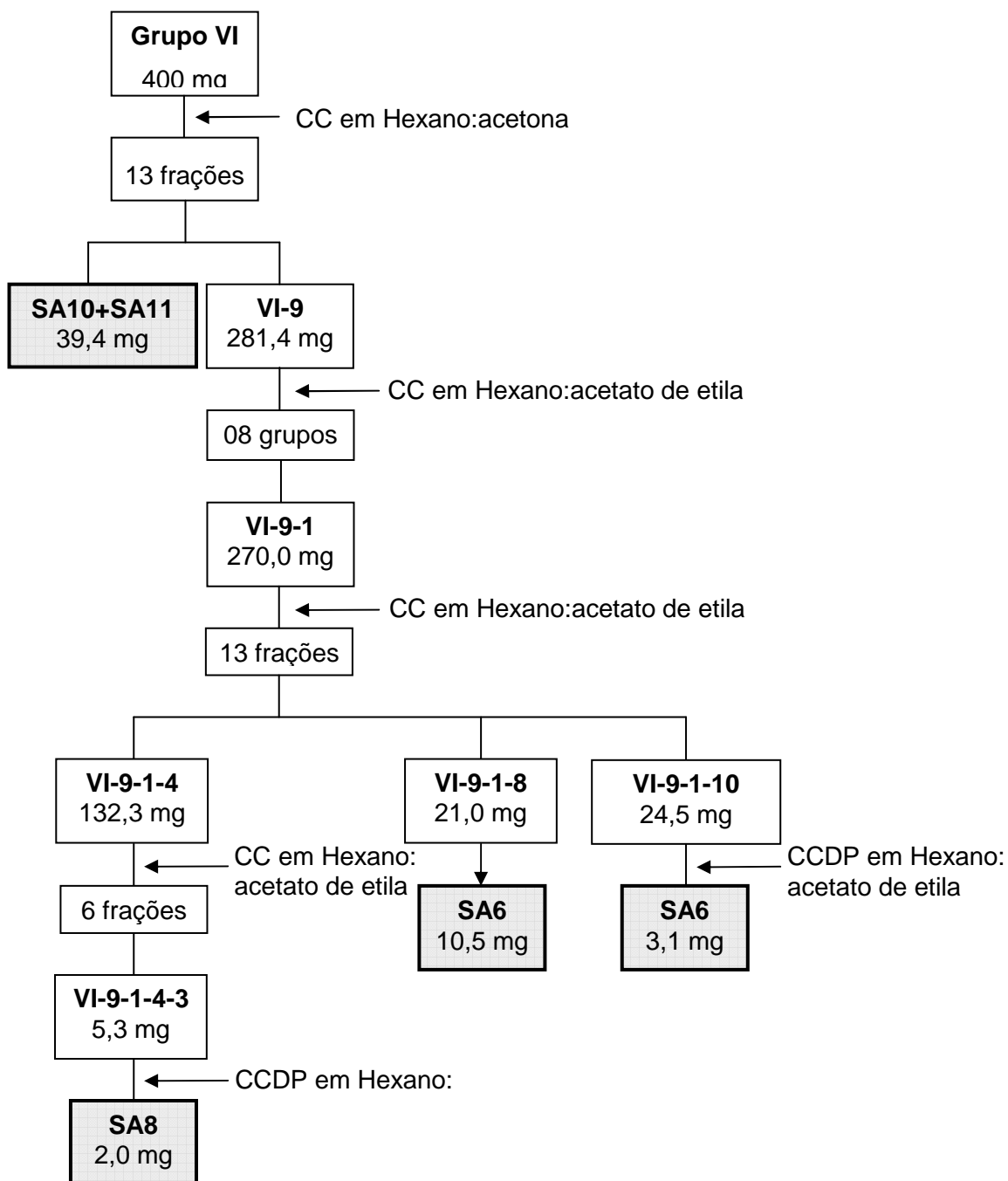
Tabela 05. Dados das frações obtidas do extrato em acetato de etila de *S. aggregata* II.

Código	Frações	Massa (mg)	Código	Frações	Massa (mg)
SAA01	01	18,7	SAA11	11-12	337,6
SAA02	02	3,4	SAA13	13-16	287,5
SAA03	03	41,2	SAA17	17-20	84,4
SAA04	04	24,8	SAA21	21-22	38,8
SAA05	05-07	185,2	SAA23	23-25	731,6
SAA08	08-10	17,1			

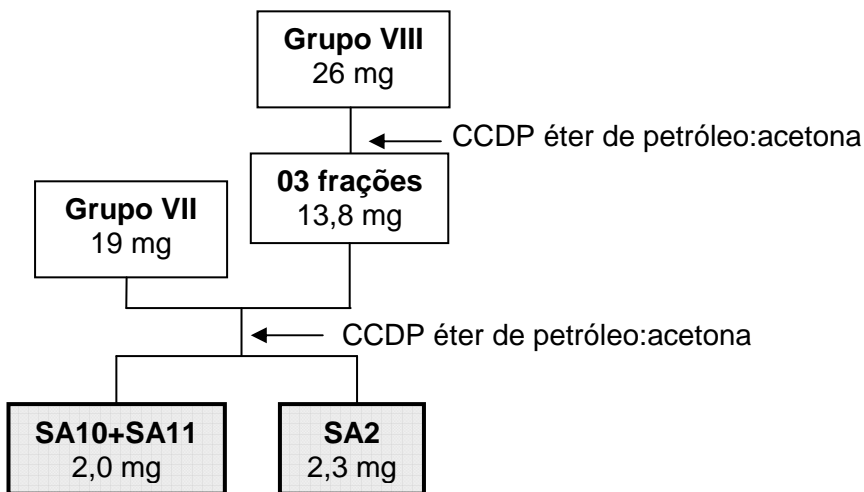
A fração SAA05 (185,2 mg) foi submetida à CC em hexano:éter etílico 8:2 (250 mL) e éter etílico (50 mL) resultando em 27 frações, reunidas em 6. Destas, a fração SAA05-4 (77,1 mg) foi identificada como sendo a substância **SA4** e a fração SAA05-5 (67,0 mg) foi purificada por CCDP em hexano:éter etílico 7:3, resultando novamente no isolamento de **SA4** (49,7 mg) (Esquema 07 – página 24).

A fração SAA13 (287,5 mg) foi submetida à CC em diclorometano (100 mL), diclorometano:acetona (98:2, 95:5, 9:1, 85:15, 8:2, 1:1; 80 mL cada), acetona (50 mL) e metanol (50 mL), resultando em 57 frações, que foram posteriormente reunidas em 17. A fração SAA13-2 (2,3 mg) foi identificada como sendo a substância **SA4**. A fração SAA13-11 foi identificada como contendo a substância **SA9** impura (38,6 mg) (Esquema 08 – página 24).

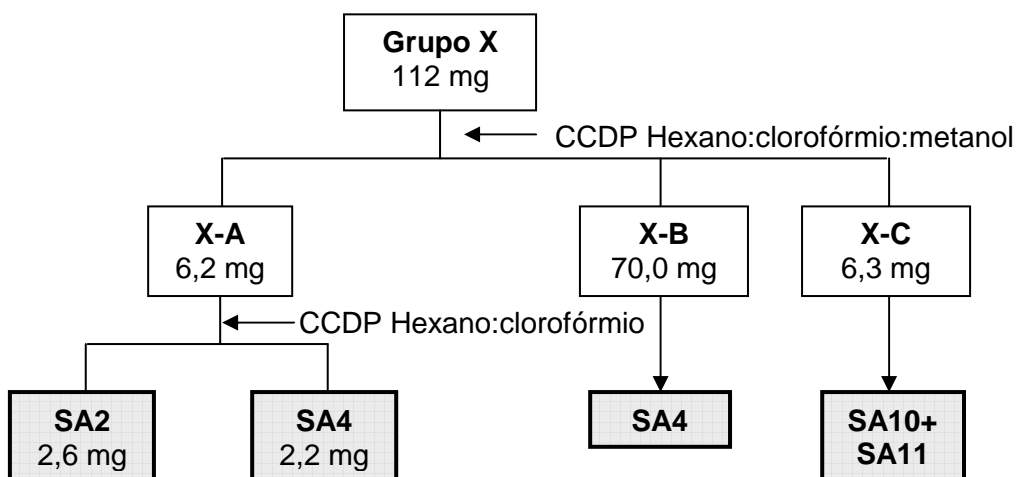
Esquema 02. Procedimento geral para obtenção das substâncias **SA6**, **SA8** e **SA10+SA11** de *S. aggregata* II.



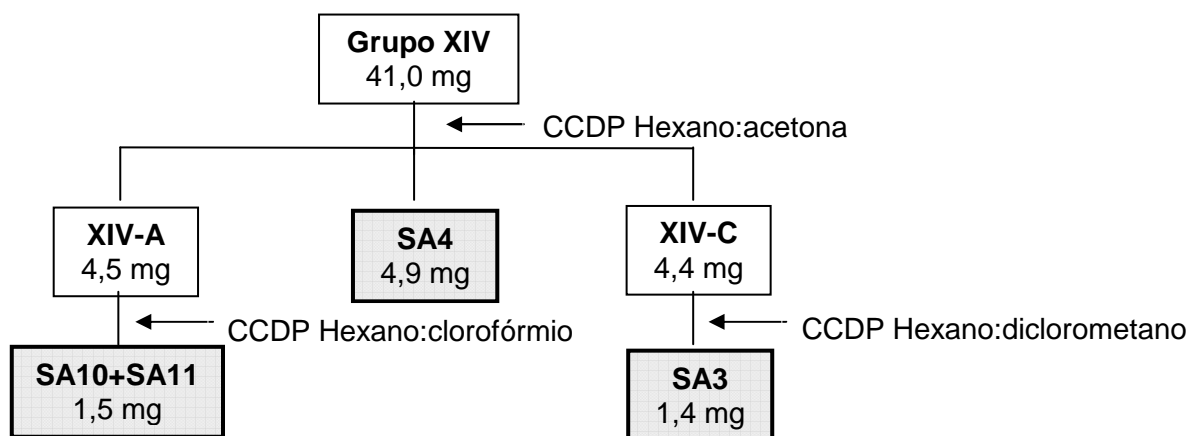
Esquema 03. Procedimento geral para obtenção das substâncias **SA2** e **SA10+SA11** do extrato em hexano de *S. aggregata* II.



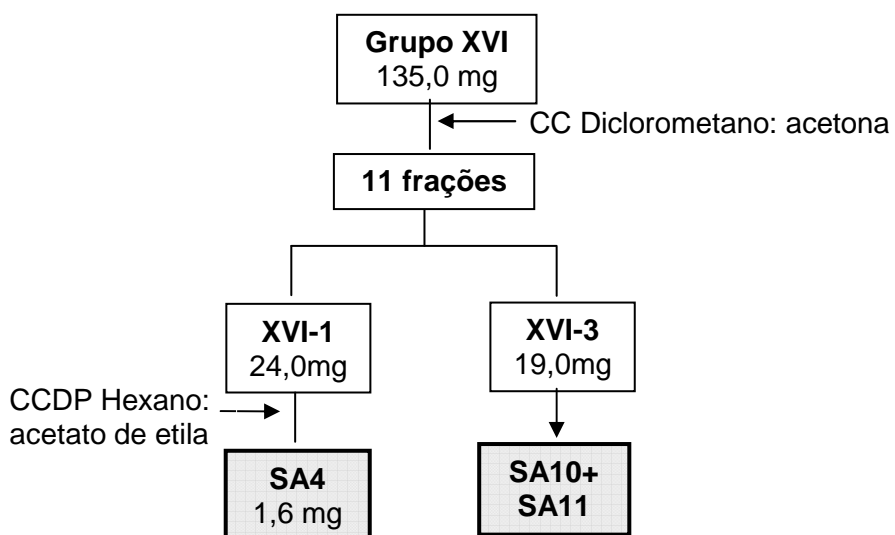
Esquema 04. Procedimento geral para obtenção das substâncias **SA2** e **SA4** do extrato em hexano de *S. aggregata* II.



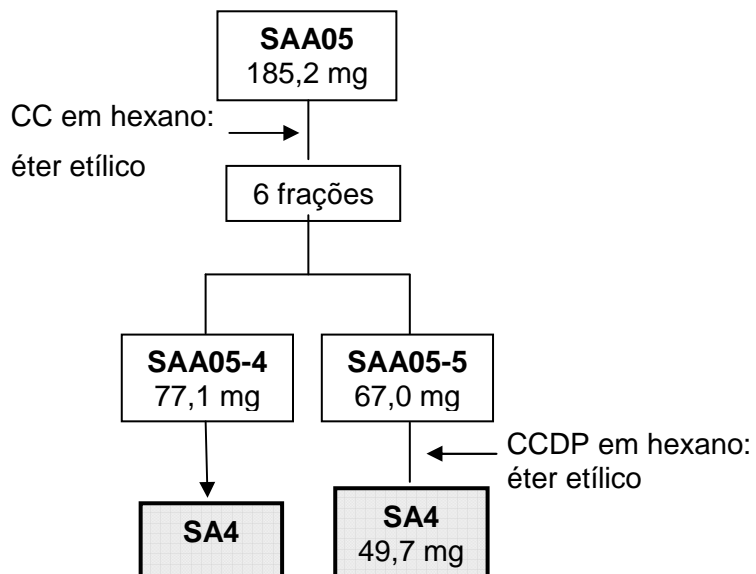
Esquema 05. Procedimento geral para obtenção das substâncias **SA3**, **SA4** e **SA10+SA11** do extrato em hexano de *S. aggregata* II.



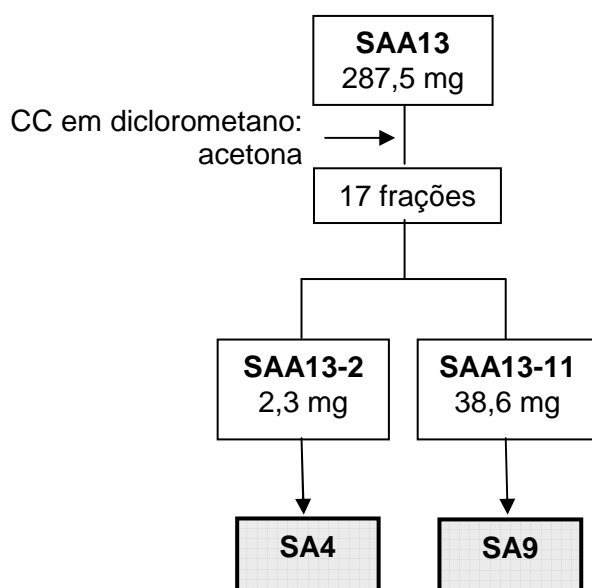
Esquema 06. Procedimento geral para obtenção das substâncias **SA4** e **SA10+SA11** do extrato em hexano de *S. aggregata* II.



Esquema 07. Procedimento geral para isolamento da substância **SA4** do extrato em acetato de etila de *S. aggregata* II.



Esquema 08. Procedimento geral para isolamento das substâncias **SA4** e **SA9** do extrato em acetato de etila de *S. aggregata* II.



3.1.5. Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas

SA1

Aggregatina A: sólido marrom; massa molecular ($C_{16}H_{14}O_4$) 270,0892; ponto de fusão $95^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} +37,6$ ($c=0,01 \text{ g mL}^{-1}$, $CHCl_3$); UV-vis (MeOH) λ_{max} (nm) (log ϵ): 291 (3,8), 239 (3,9), 208 (4,6); IV ν_{max} (KBr) 3410, 1717, 1620 cm^{-1} (E22 – página 45); EM: m/z 270,1131 (52) $[M]^+$ 242,1176 (13), 228,0986 (13), 227,0950 (100), 212,0720 (7) (E27 - página 49); RMN 1H , $^{13}C\{^1H\}$, DEPT-135, HSQC, HMBC, NOE: Tabela 07 - página 44; E01-10 - páginas 27-33; E16-21 – páginas 38-43; E48-49 – páginas 65-66.

SA2

Aggregatina B: sólido verde; massa molecular ($C_{16}H_{14}O_3$) 254,2836; $[\alpha]_D^{20} +53,8$ ($c=0.065 \text{ g mL}^{-1}$, $CHCl_3$); UV-vis (MeOH) λ_{max} (nm) (log ϵ): 263 (3,8), 233 (3,7), 217 (3,7) (E25 – página 47); IV ν_{max} (KBr) 1729, 1597, 1275 cm^{-1} (E23 – página 46); CG-EM: m/z 254 (24) $[M]^+$, 239 (5), 226 (17), 211 (100), 196 (16), 165 (14), 77 (14) (E28 - página 49); HRESIMS m/z 255.1010 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{16}H_{15}O_3$ 255,1021); RMN 1H , HMBC, NOE: Tabela 07 - página 44; E11-13 - páginas 35-36; E16-21 – páginas 38-43.

SA3

Aggregatina C: sólido amarelo; massa molecular ($C_{17}H_{16}O_4$) 284,3094; $[\alpha]_D^{20} +52,0$ ($c=0.05 \text{ g mL}^{-1}$, $CHCl_3$); UV-vis (MeOH) λ_{max} (nm) (log ϵ) 265 (3,7), 233 (3,6), 217 (3,6) (E26 – página 47); IV ν_{max} (KBr) 1729, 1275 cm^{-1} (E24 – página 46); CG-EM: m/z 284 (28) $[M]^+$, 269 (5), 256 (10), 241 (100), 226 (14), 106 (14), 77 (17) (E29 - página 49); HRESIMS m/z 285.1127 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{17}H_{17}O_4$ 285,1127); RMN 1H , HMBC: Tabela 07 - página 44; E14-15 - página 37; E16-21 – páginas 38-43.

SA4

Aggregatina D: óleo amarelo; massa molecular ($C_{20}H_{22}O_4$) 326,3898; $[\alpha]_D^{20} -27.3$ ($c=0.05 \text{ g mL}^{-1}$, $CHCl_3$); UV-vis (MeOH) λ_{max} (nm) (log ϵ) 219 (3,7), 229 (3,7) (E46 – página 62); IV ν_{max} (KBr) 3416, 3070, 2932, 1715, 1649, 1600, 1309, 1070 cm^{-1} (E45 – página 61); HRESIMS: m/z 349.1416 $[M + Na]^+$ (calculado para $C_{20}H_{22}O_4Na$ 349,1416) (E47 - página

62); RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, HSQC, HMBC, NOE: Tabela 08 - página 60; E30-44 - páginas 51-58; E50-53 – páginas 68-69.

SA5

7-metoxi-2-metilantraquinona: sólido alaranjado; massa molecular ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_3$) 252,268; RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, HSQC, HMBC: Tabela 10 - página 71; E54-60 - páginas 72-75; E68-71 - páginas 86-89.

SA6

Tectoquinona: sólido amarelo; massa molecular ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$) 222,242; RMN ^1H , HMBC: Tabela 11 - página 77; E61-62 - página 78; E68-71 - páginas 86-89.

SA7

7-hidroxi-2-metilantraquinona: sólido vermelho; massa molecular ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$) 238,241; RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$: Tabela 12 - página 80; E63-64 - página 81; E68-71 - páginas 86-89.

SA8

1-hidroxi-2-metilantraquinona: sólido amarelo; massa molecular ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$) 238,241; RMN ^1H , HSQC, HMBC: Tabela 13 - página 83; E65-67 - páginas 84-85; E68-71 - páginas 86-89.

SA9

Halleridona: óleo avermelhado; massa molecular ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$) 154,164; $[\alpha]_D^{20}$ 0.0 (mistura racêmica); RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, HSQC, HMBC, NOE: Tabela 14 - página 91; E72-81 - páginas 92-97; E82-84 – páginas 99-100.

SA10+SA11

β -Sitosterol: massa molecular ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$) 414,7130 e **Estigmasterol:** massa molecular ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) 412,6972, sólidos cristalinos transparentes; RMN ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$: E85-88 - páginas 102-103.

3.2. Resultados e Discussão

No presente trabalho foram isoladas onze substâncias de *Sinningia aggregata*, as quais foram identificadas através de técnicas espectrométricas (UV-vis, IV, RMN e EM), além de comparação com dados da literatura (Tabela 06 – página 27).

Tabela 06. Substâncias isoladas de *Sinningia aggregata*.

Substância	Massa (mg)
SA1	7,0
SA2	4,9
SA3	1,4
SA4	293,3
SA5	4,5
SA6	13,6
SA7	3,0
SA8	2,0
SA9	72,6
SA10 + SA11	226,6

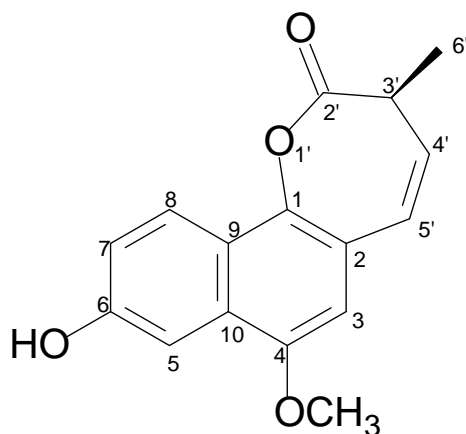
3.2.1. Determinação estrutural das substâncias SA1, SA2 e SA3

A substância **SA1** foi isolada como um sólido marrom de fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_4$, correspondendo a presença de dez insaturações. O espectro de RMN de 1H (E01 – página 29, Tabela 07 – página 44) mostrou quatro sinais de hidrogênios de sistemas aromáticos em 8,22 ppm (*d* 9,1 Hz), 7,54 ppm (*d* 2,5 Hz), 7,20 ppm (*dd* 9,1 e 2,5 Hz) e 6,56 ppm (*s*) (E02-03 – páginas 29-30), sendo que este último está isolado e os outros em um padrão típico de benzeno 1,3,4 trissubstituído. Mostrou ainda sinais de dois hidrogênios olefínicos, um em 5,72 ppm (*dd* 9,5 e 5,0 Hz) e o outro em 6,79 ppm (*dd* 9,5 e 2,3 Hz) (E03-04 – página 30), além de uma hidroxila (5,22 ppm), uma metoxila (3,98 ppm), um hidrogênio metínico (2,79 ppm) (E05 – página 31) e uma metila (1,53 ppm) (E06 – página 31). A constante de acoplamento de 9,5 Hz dos hidrogênios olefínicos é característica de hidrogênios com relação *cis*, enquanto a constante de 2,3 Hz mostra um acoplamento a longa distância.

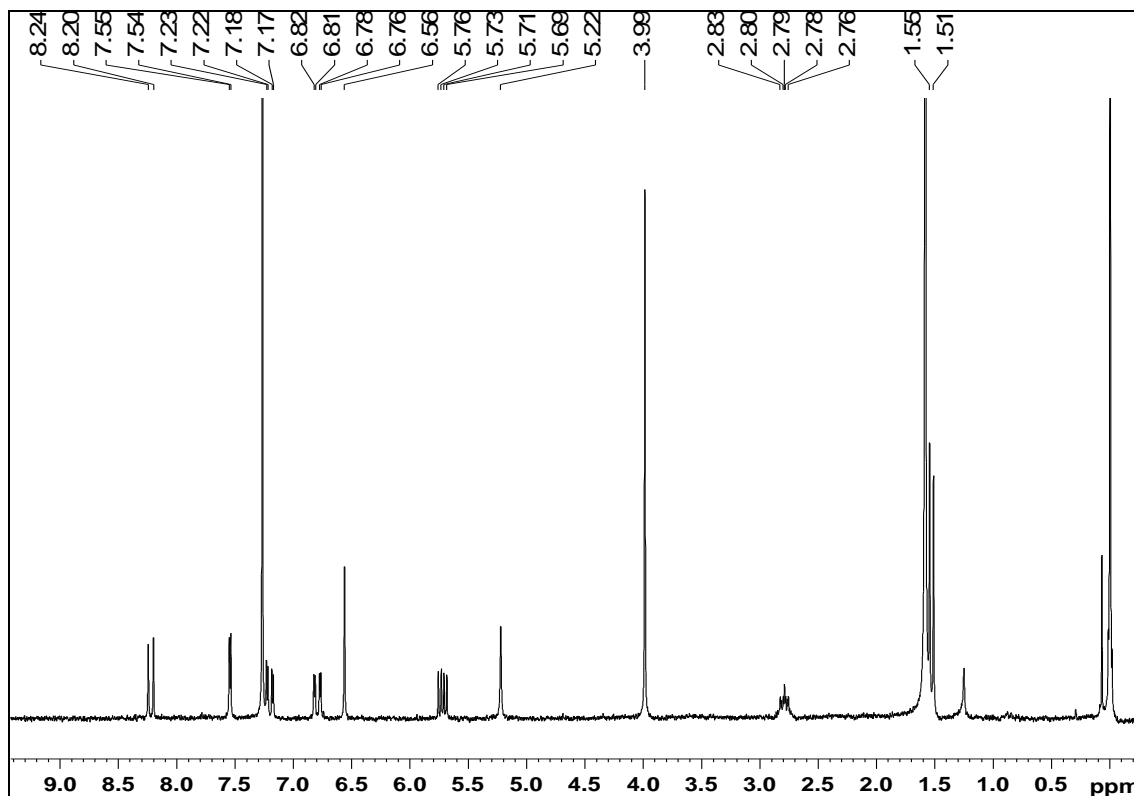
Os espectros de $^{13}C\{^1H\}$ (E07 – página 32, Tabela 07 – página 44) e DEPT-135 (E08 – página 32) mostraram sinais de dezesseis carbonos, correspondendo a uma

metila e uma metoxila (14,6 e 55,8 ppm), sete carbonos metínicos (CH), sendo seis sp^2 e um sp (38,6 ppm), uma carbonila de éster (171,2 ppm) e seis carbonos de sistemas aromáticos não ligados a hidrogênio (C). Com estes dados alguns fragmentos da molécula podem ser determinados, como a presença de dois anéis aromáticos, uma dupla ligação presente em um terceiro anel, um grupamento éster, e os três substituintes, metila, metoxila e hidroxila, porém nenhuma estrutura conhecida foi reconhecida, por isso experimentos de RMN 2D foram realizados.

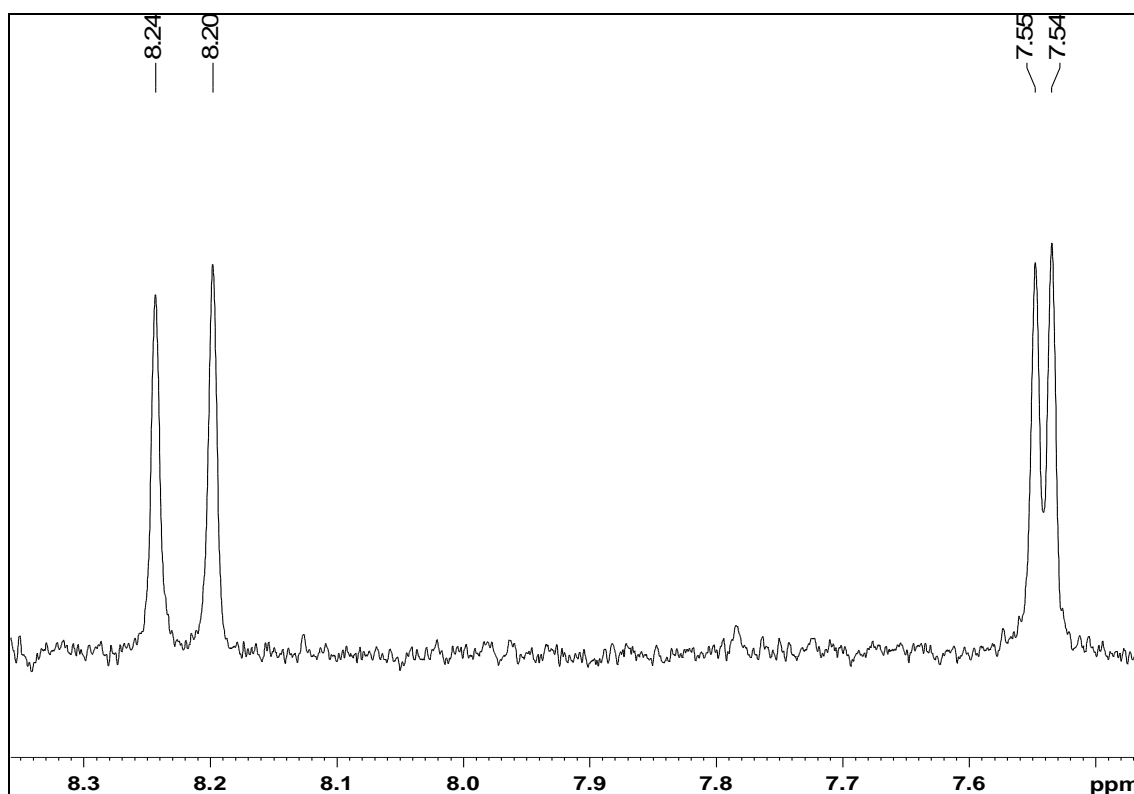
Pelos resultados obtidos de HSQC e HMBC (Tabela 07 - página 44, E09-10 – página 33) foi possível determinar as posições dos hidrogênios em relação aos carbonos a uma e a ligação de longa distância, respectivamente. Para estabelecer a localização da ligação dupla, usou-se as correlações de HMBC do hidrogênio em 6,56 ppm (H-3) com os carbonos C-5', C-1 e C-10, e observou-se a existência de uma ϵ -lactona com as correlações dos hidrogênios da metila com o carbono C-4' e com a carbonila, de H-8 com C-1 e de H-5' com C-3 (Figura 06 – página 37). A posição da metoxila foi determinada pela correlação dos hidrogênios com C-4. A localização da hidroxila foi determinada pela correlação de H-8 com C-6 e C-10 e da correlação do hidrogênio da hidroxila com C-6. Com estes resultados a substância **SA1** foi identificada como sendo uma ϵ -lactona derivada do naftaleno com nome sistemático 4-metoxi-6-hidroxi-3'-metilnafto[1,2b]oxepin-2'(3H)-ona (I). Este esqueleto não foi encontrado na literatura, portanto a substância é inédita e recebeu o nome de agregatina A.



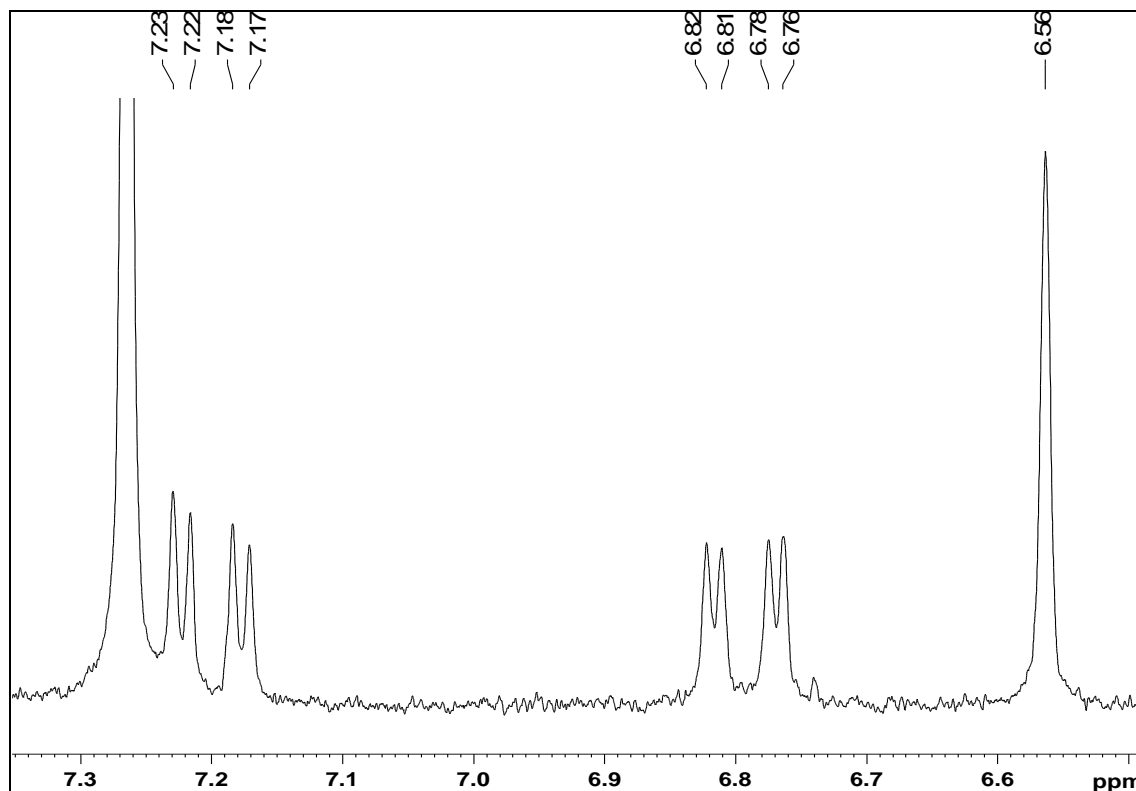
I



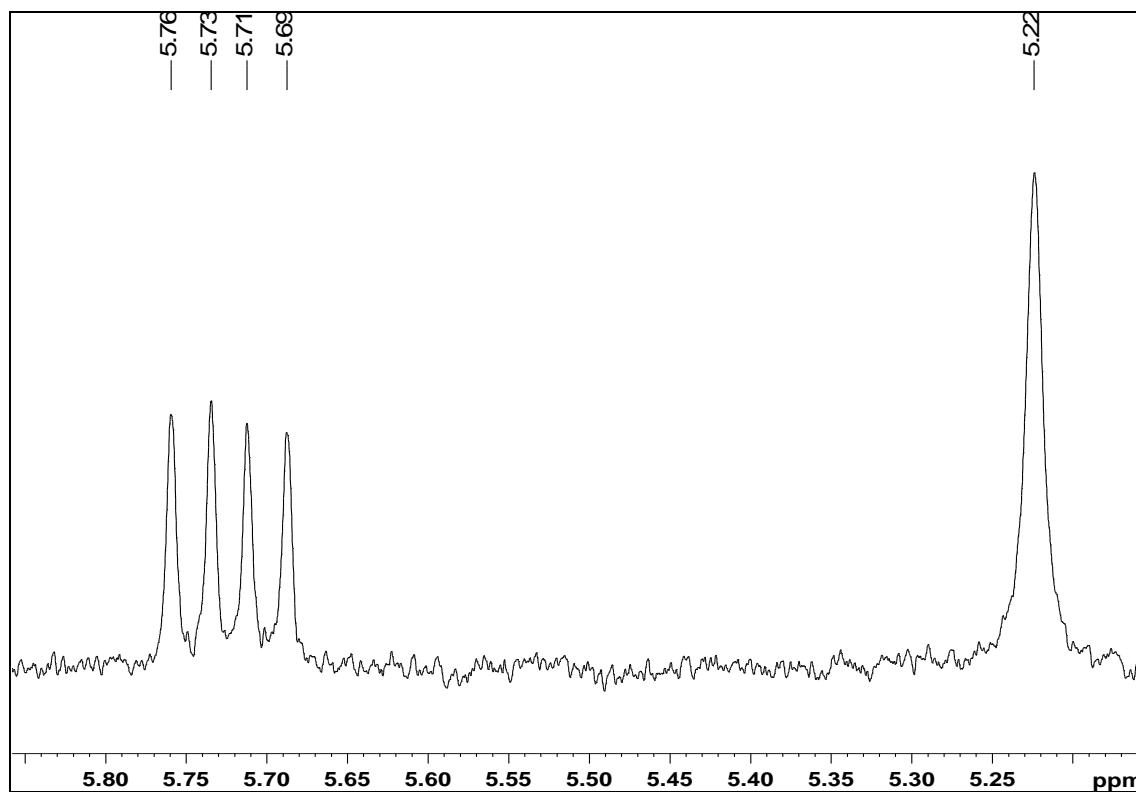
E01. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



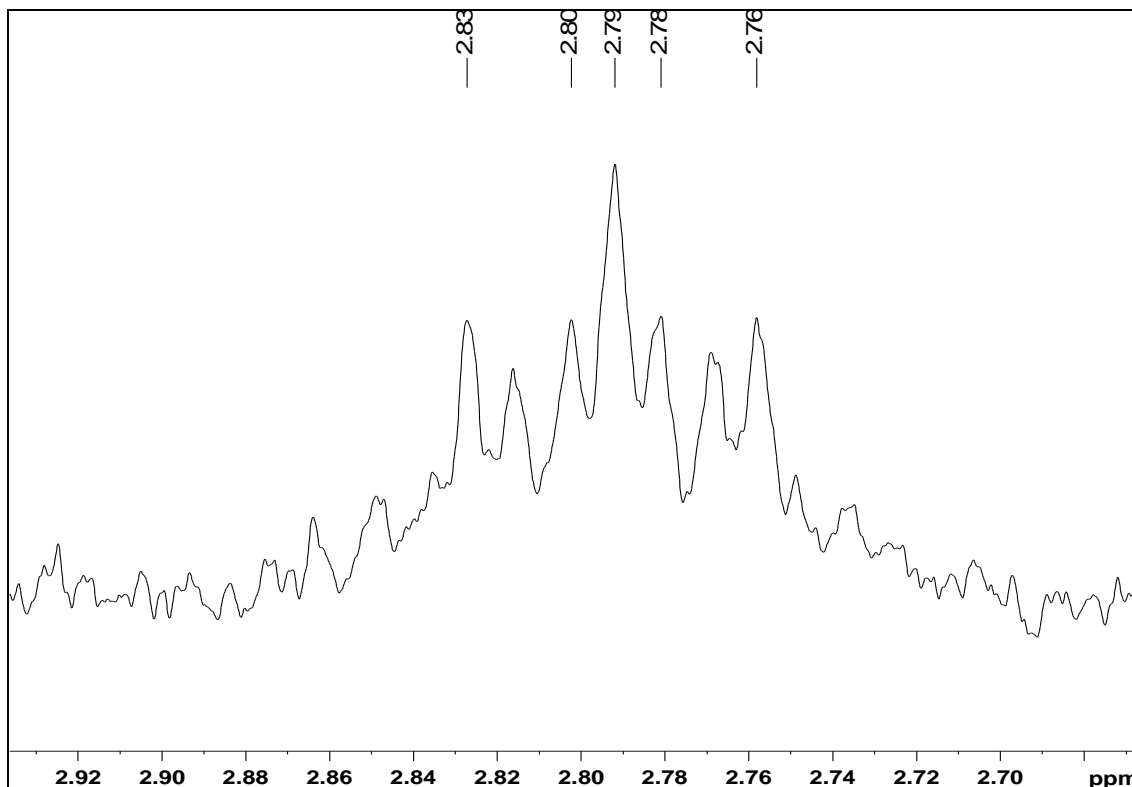
E02. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



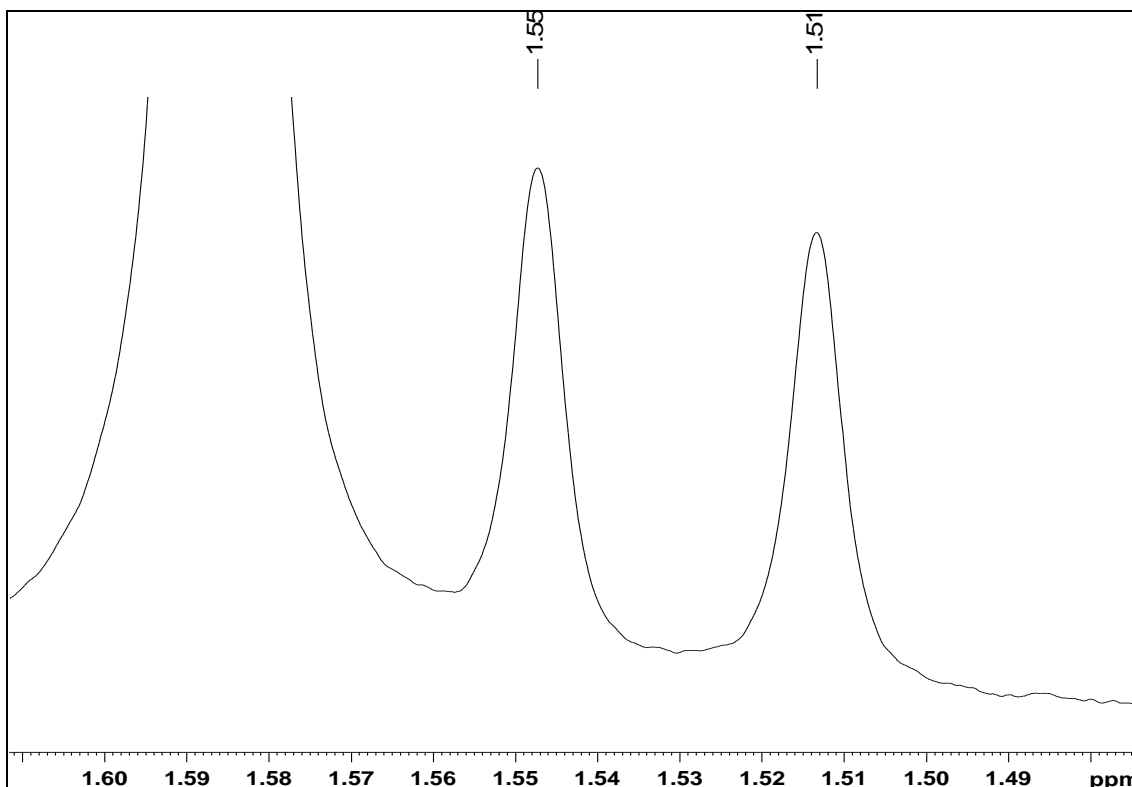
E03. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



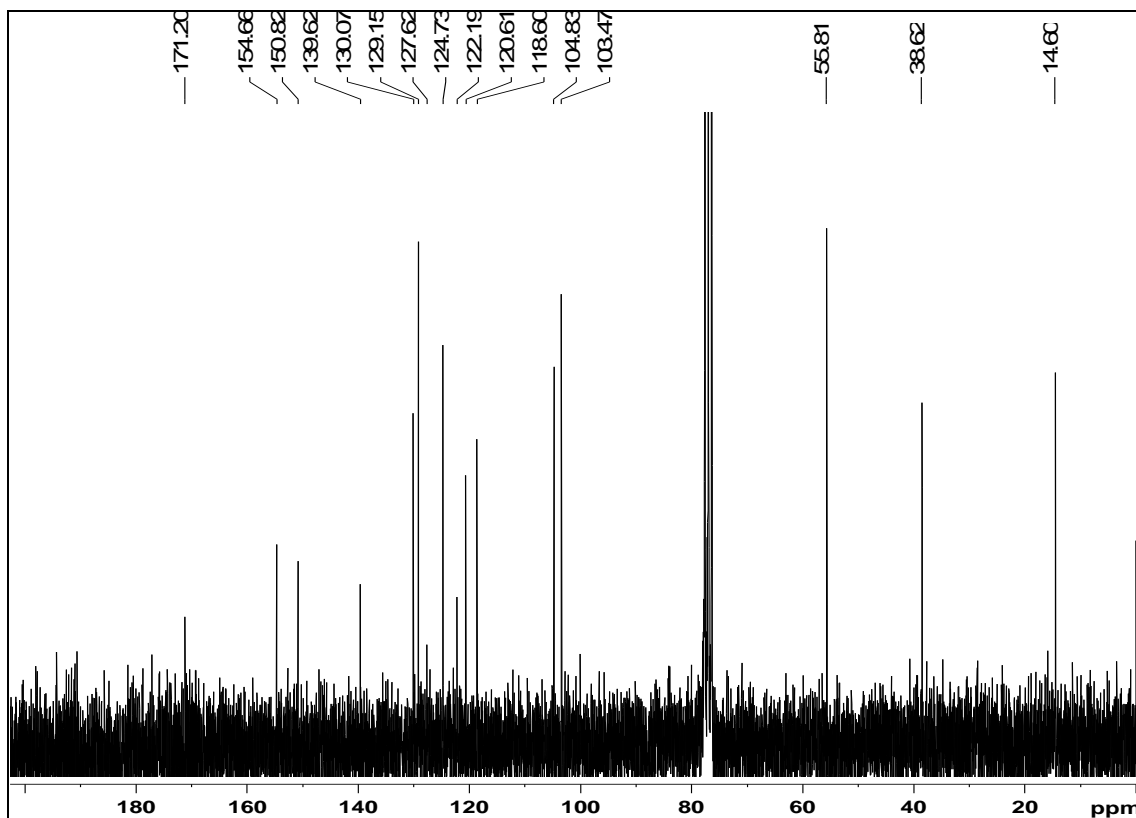
E04. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos e carbinólicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



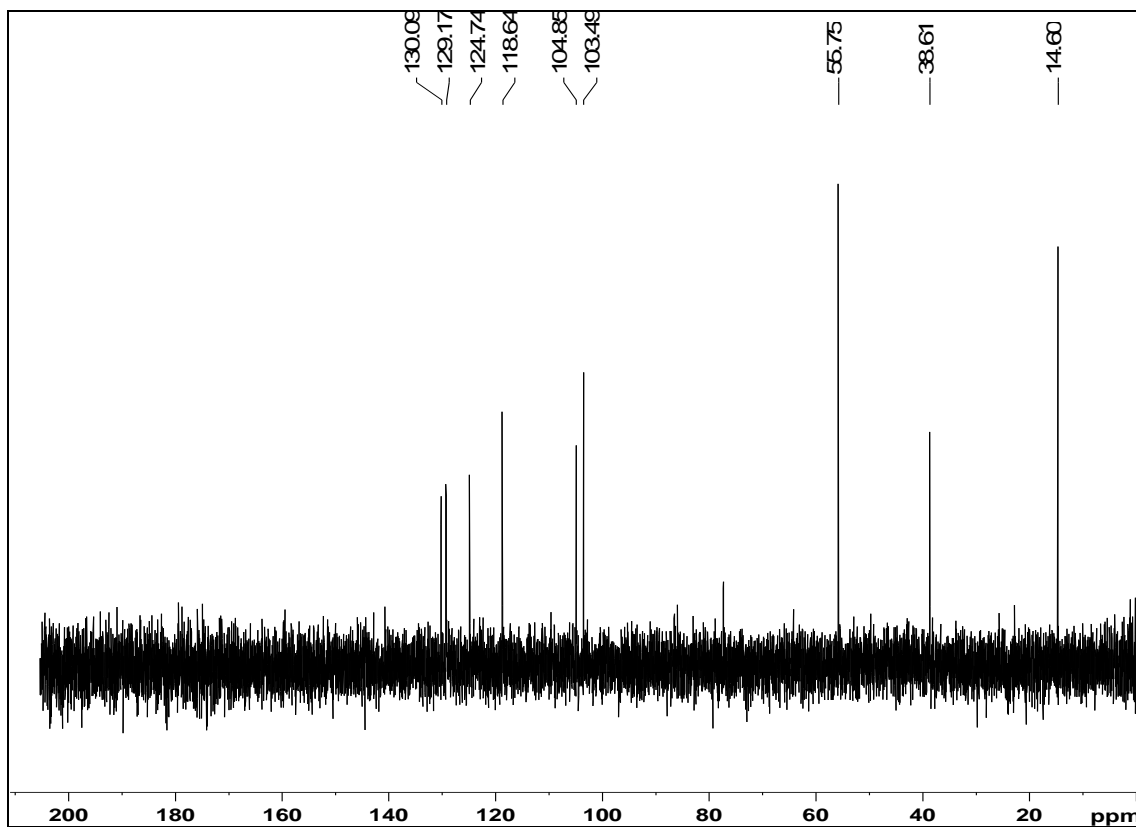
E05. Ampliação da região do hidrogênio metínico do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



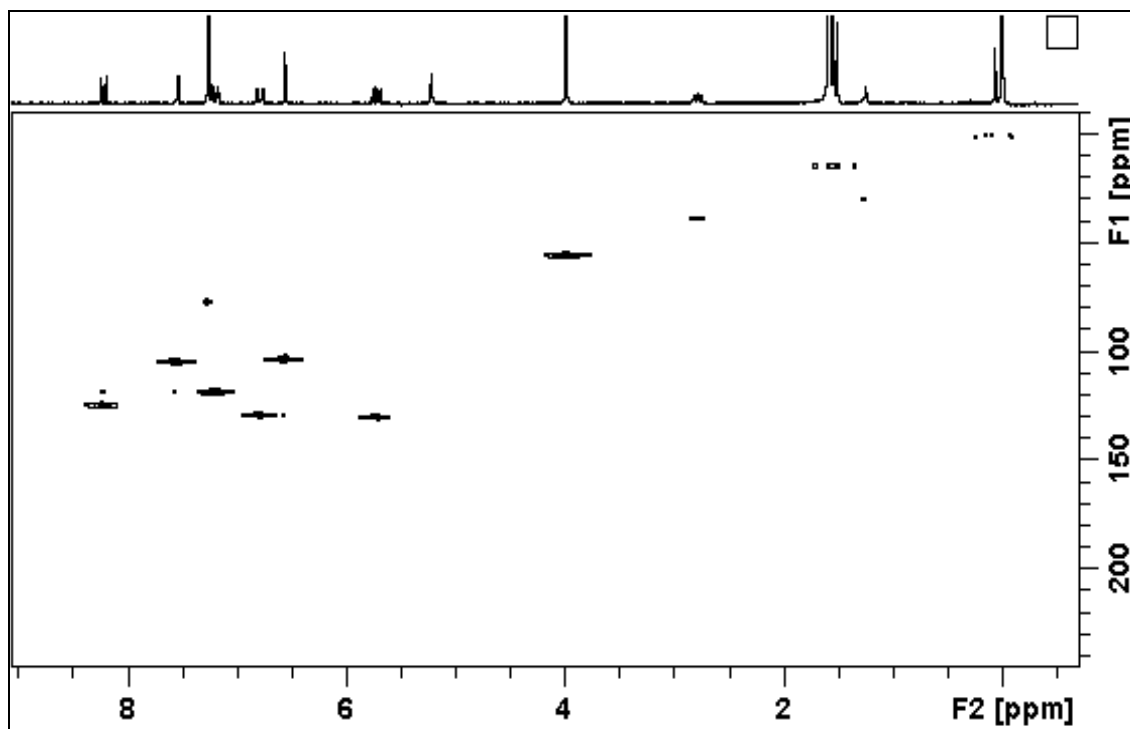
E06. Ampliação da região dos hidrogênios da metila do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



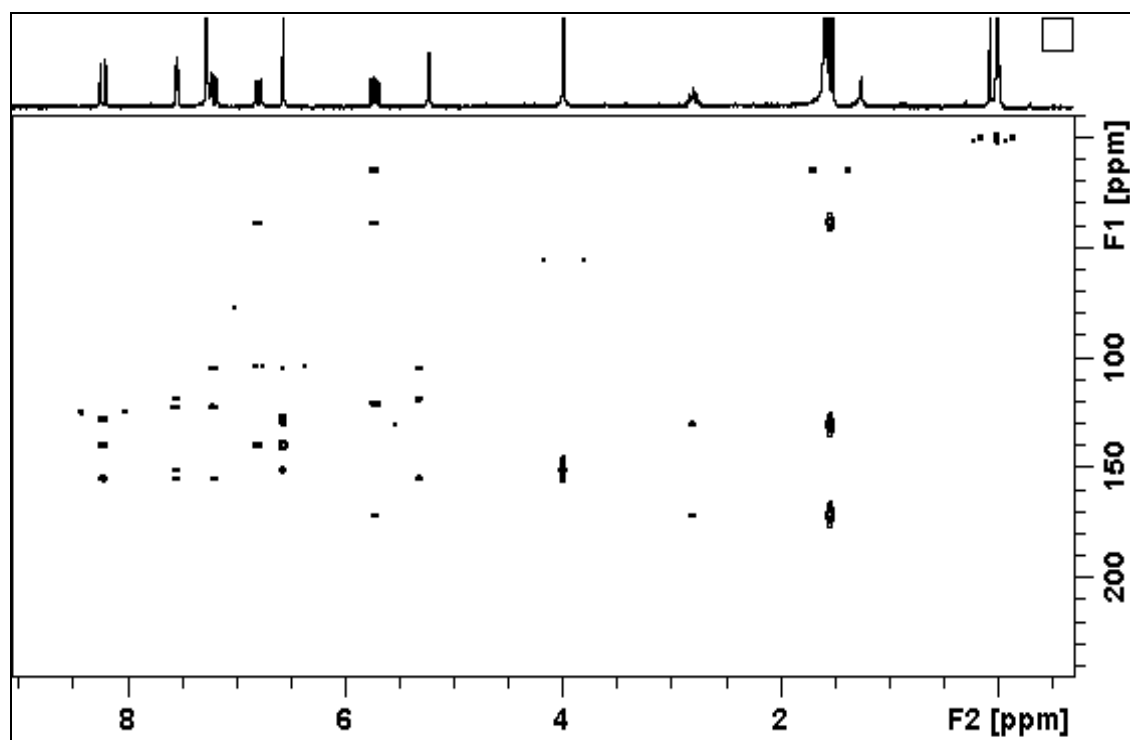
E07. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 de SA1.



E08. Espectro DEPT-135 (50 MHz) em CDCl_3 de SA1.



E09. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.



E10. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (400 MHz) em CDCl_3 de **SA1**.

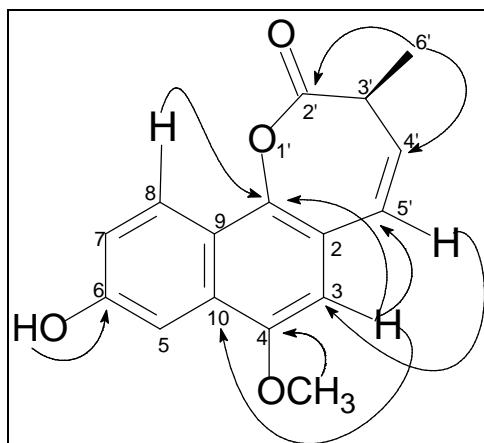
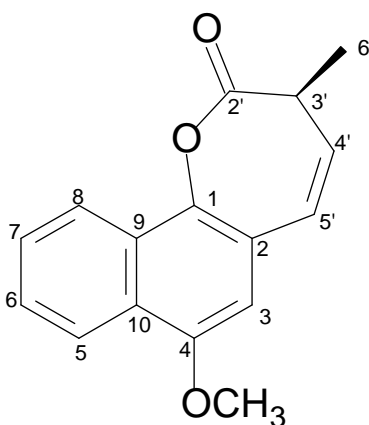
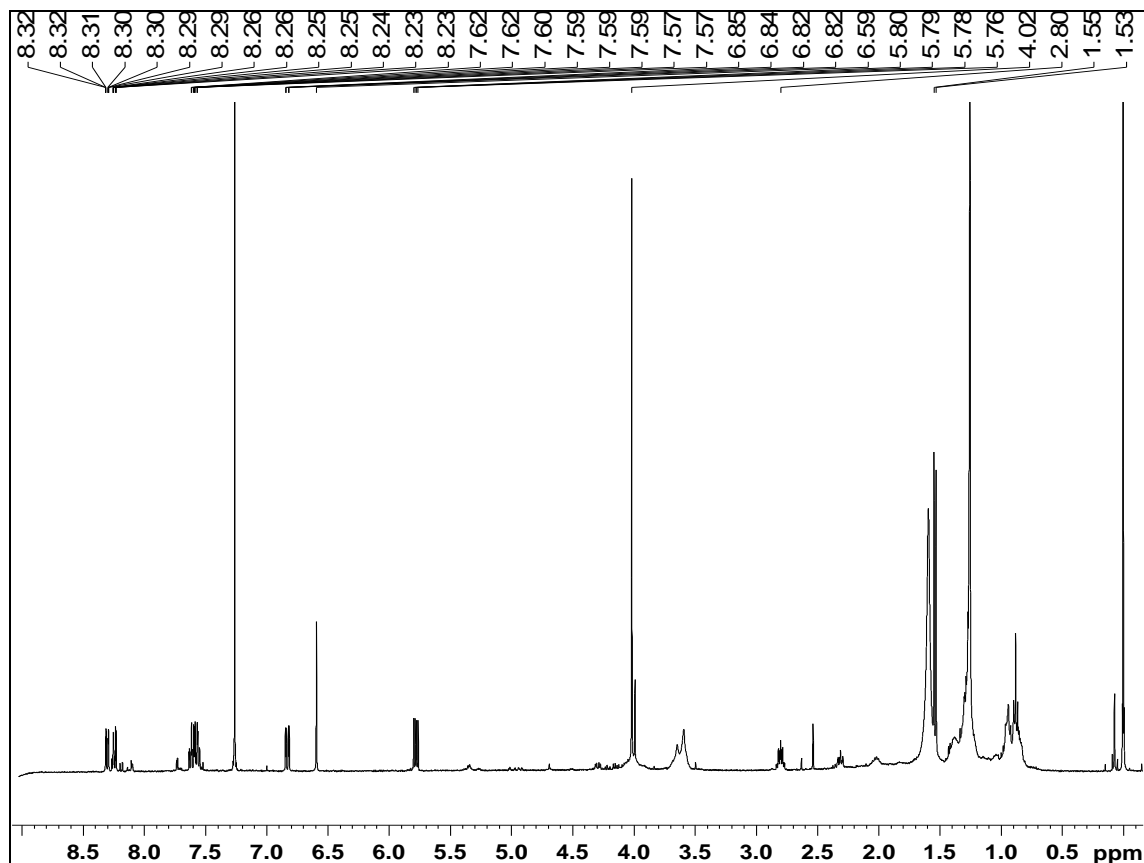


Figura 06. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de **SA1**.

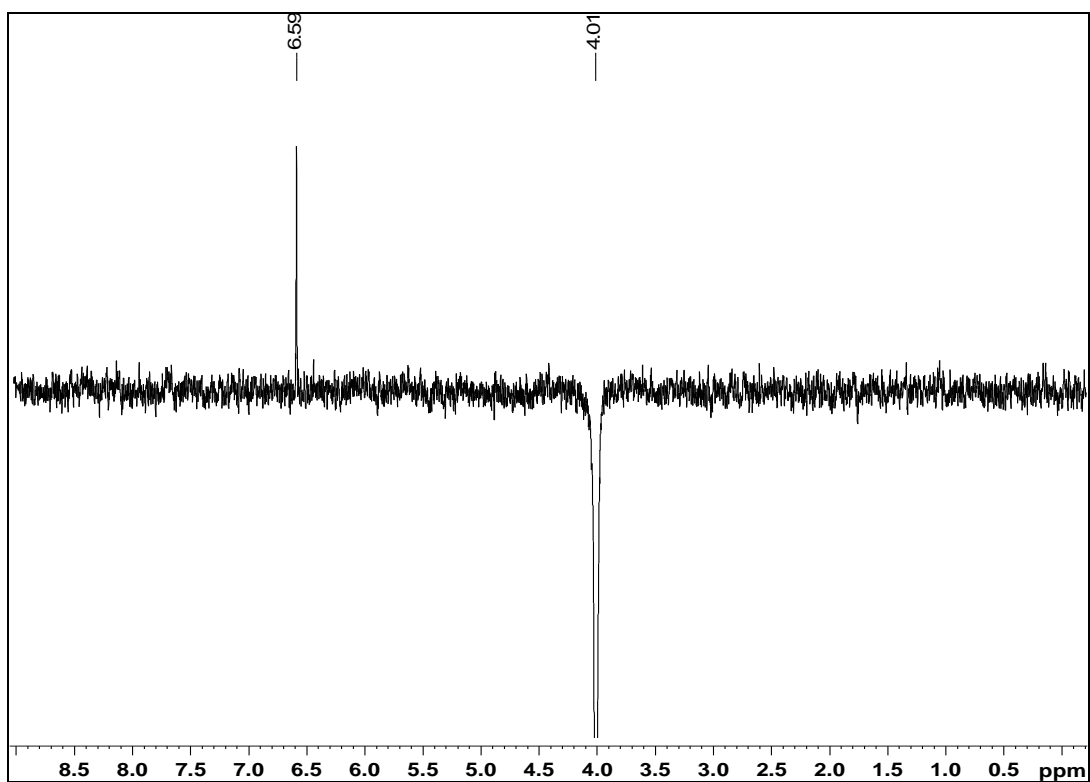
A substância **SA2** foi isolada como um sólido verde de fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ com dez insaturações. Os seus espectros de RMN de 1H (E11 – página 35) e HMBC (Tabela 07 – página 44, E13 – página 36), foram muito semelhantes aos de **SA1** como pode ser visualizado nos espectros sobrepostos destas substâncias (E16-21 – páginas 38-43). As principais diferenças observadas são a ausência do sinal de hidroxila e presença de um sinal extra de um hidrogênio de sistema aromático (6,59, 7,56, 7,62, 8,24 e 8,30 ppm), que faz com que o padrão de substituição, inferido pela multiplicidade dos hidrogênios dos anéis aromáticos, seja diferente entre estes dois compostos. Através da análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios dos anéis aromáticos pode-se determinar que no composto **SA2** o anel benzênico está 1,2 dissustituído. A posição da metoxila foi confirmada pelos resultados apresentados para **SA1** e também por experimentos de NOE (E12 – página 35) que mostraram que a irradiação seletiva desta causou aumento do sinal de H-3. Portanto esta substância foi identificada como sendo outra ϵ -lactona derivada do naftaleno denominada agregatina B (**II**).



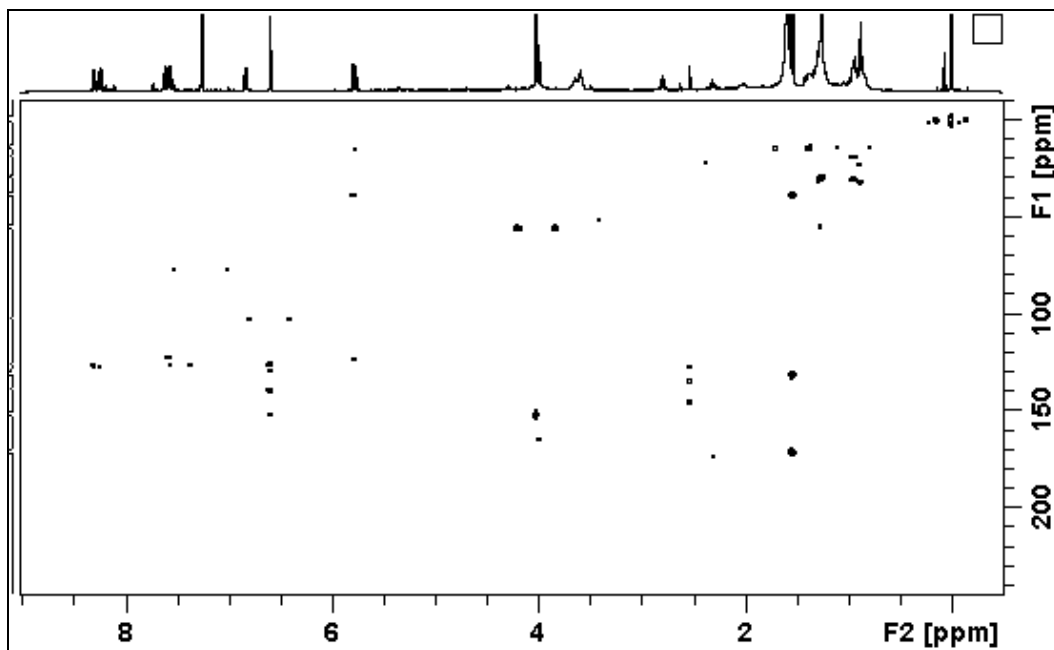
II



E11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA2**.

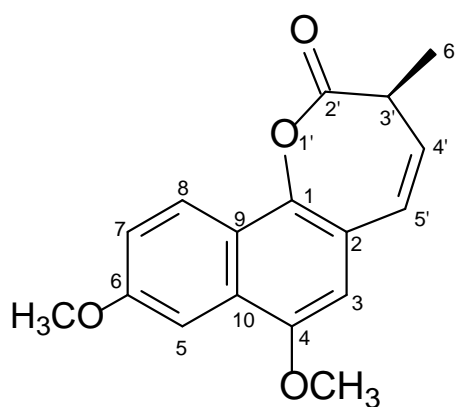


E12. Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) da **SA2** irradiando a frequência de ressonância da metoxila (4,01 ppm).

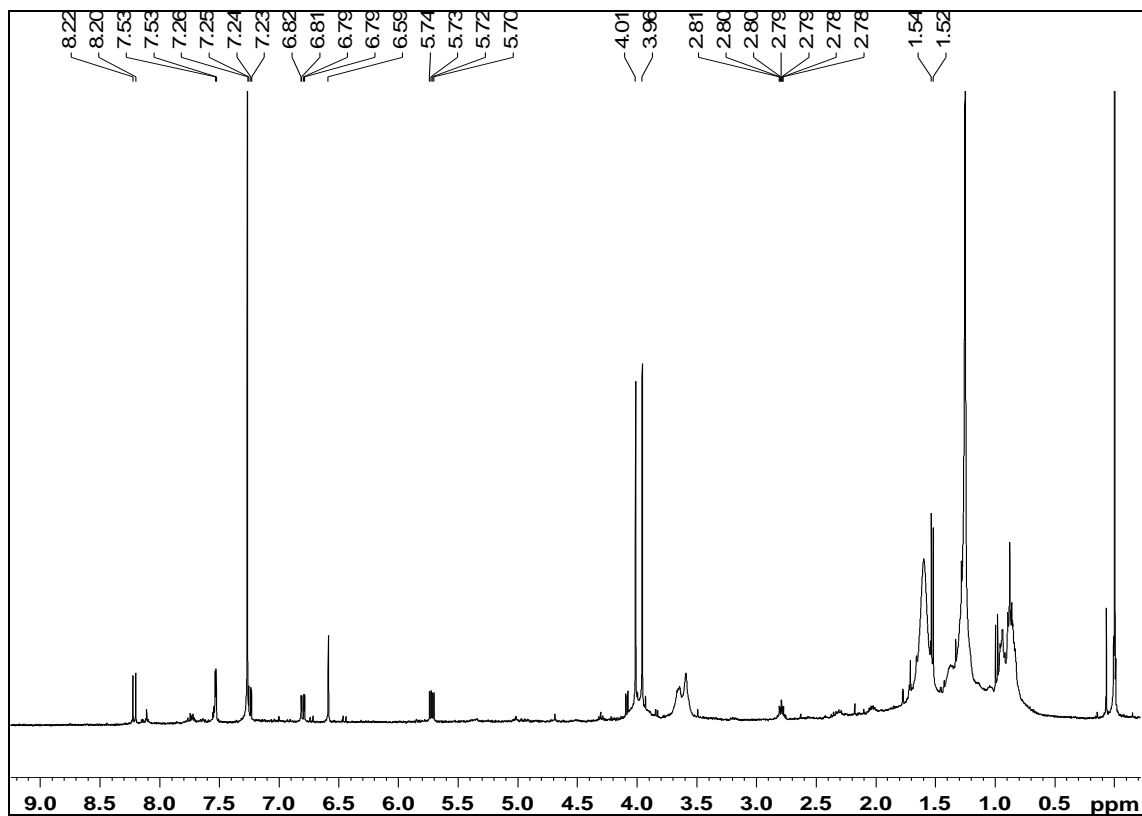


E13. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de **SA2**.

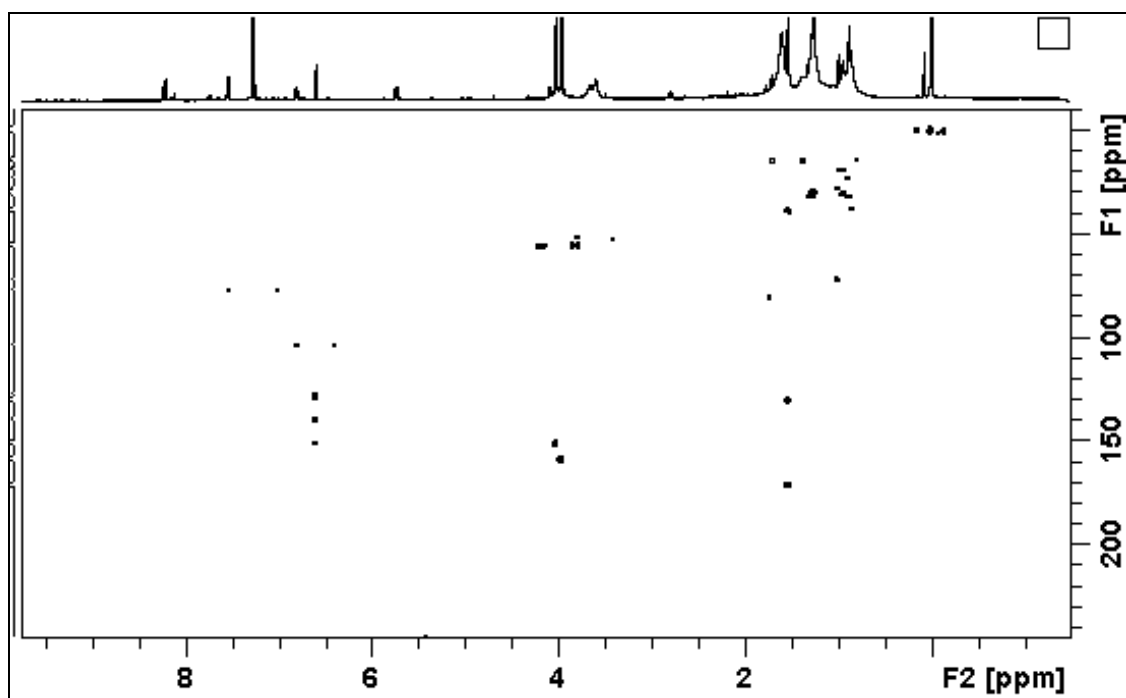
O composto **SA3** foi isolado como um sólido amarelo de fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ com dez insaturações, e seus espectros de RMN de ^1H (E14 – páginas 37) e HMBC (E15 – página 37, Tabela 07 - página 44) foram muito similares aos da substância **SA1**, porém com uma metoxila em 3,96 ppm (s) substituindo a hidroxila. Conseqüentemente esta também foi identificada como outra ϵ -lactona derivada do naftaleno, denominada agregatina C (**III**).



III

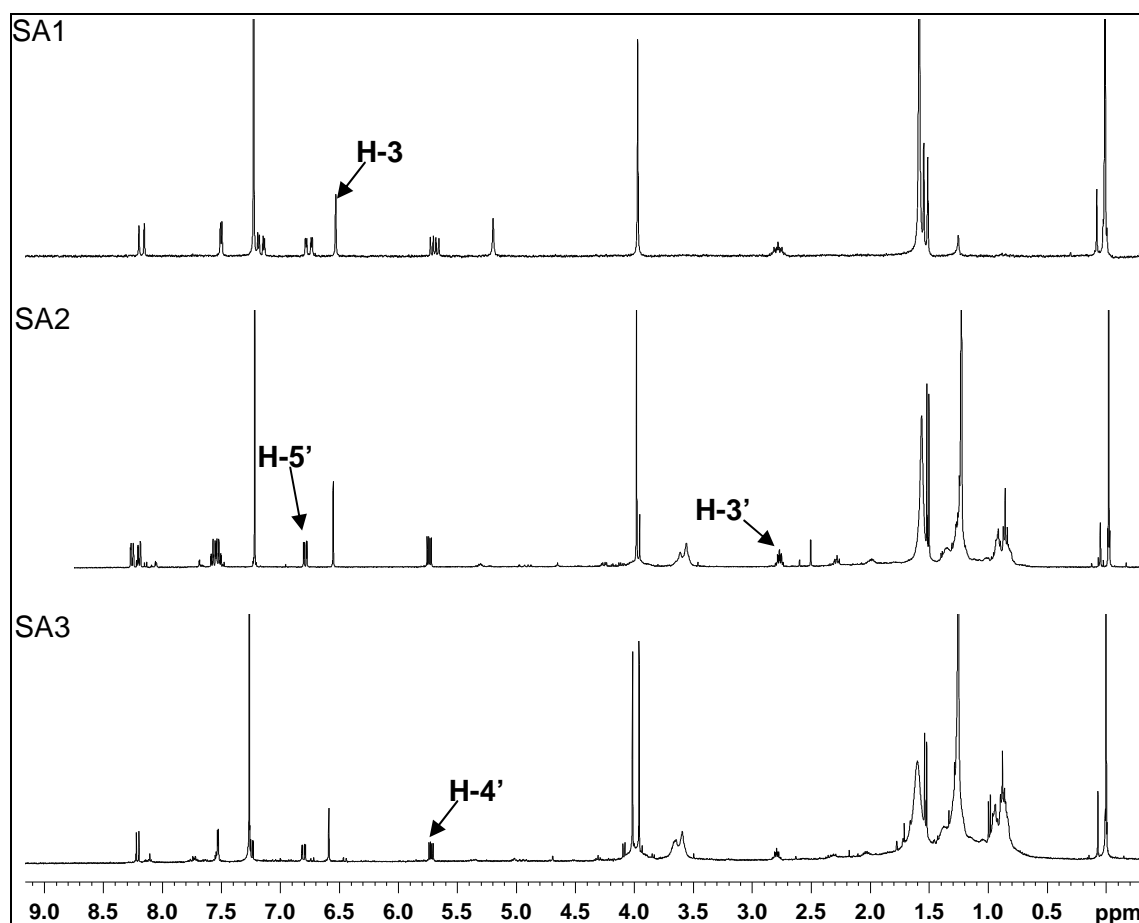


E14. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 de **SA3**.

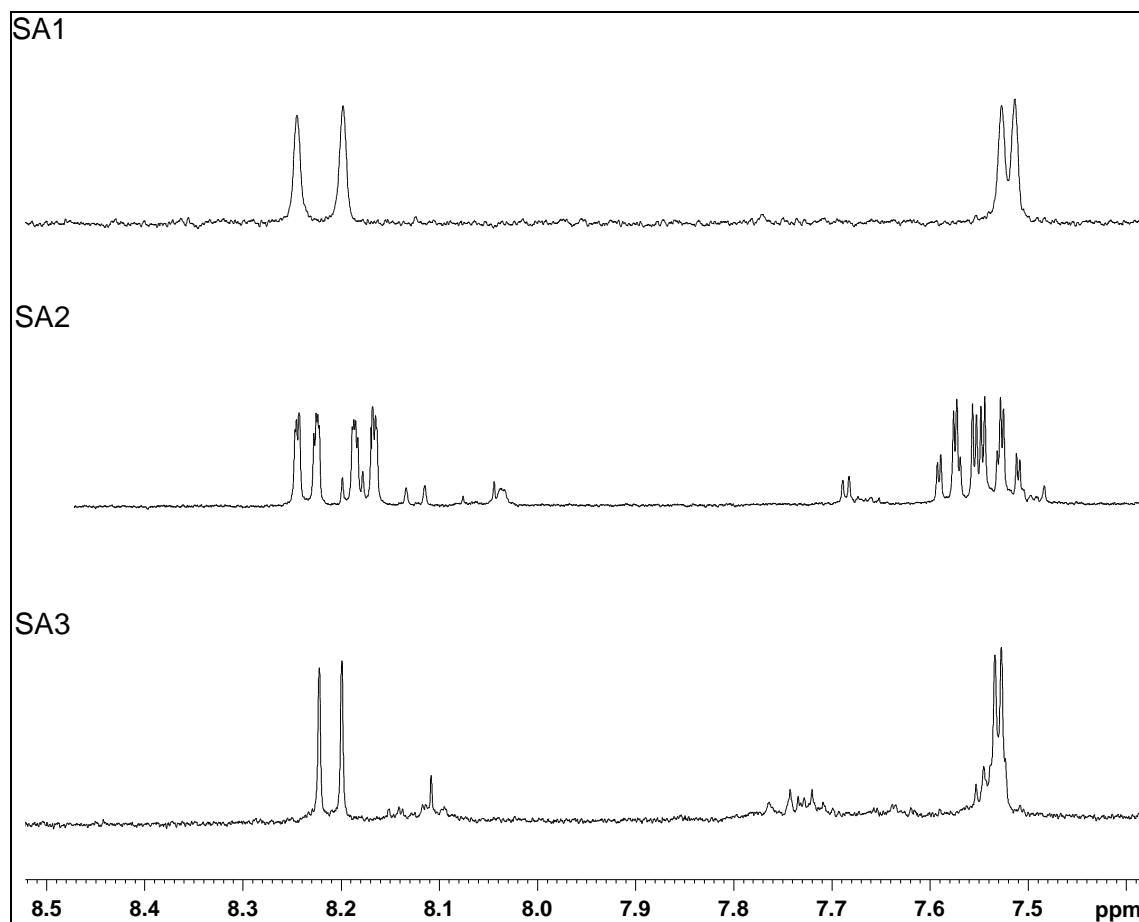


E15. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 de **SA3**.

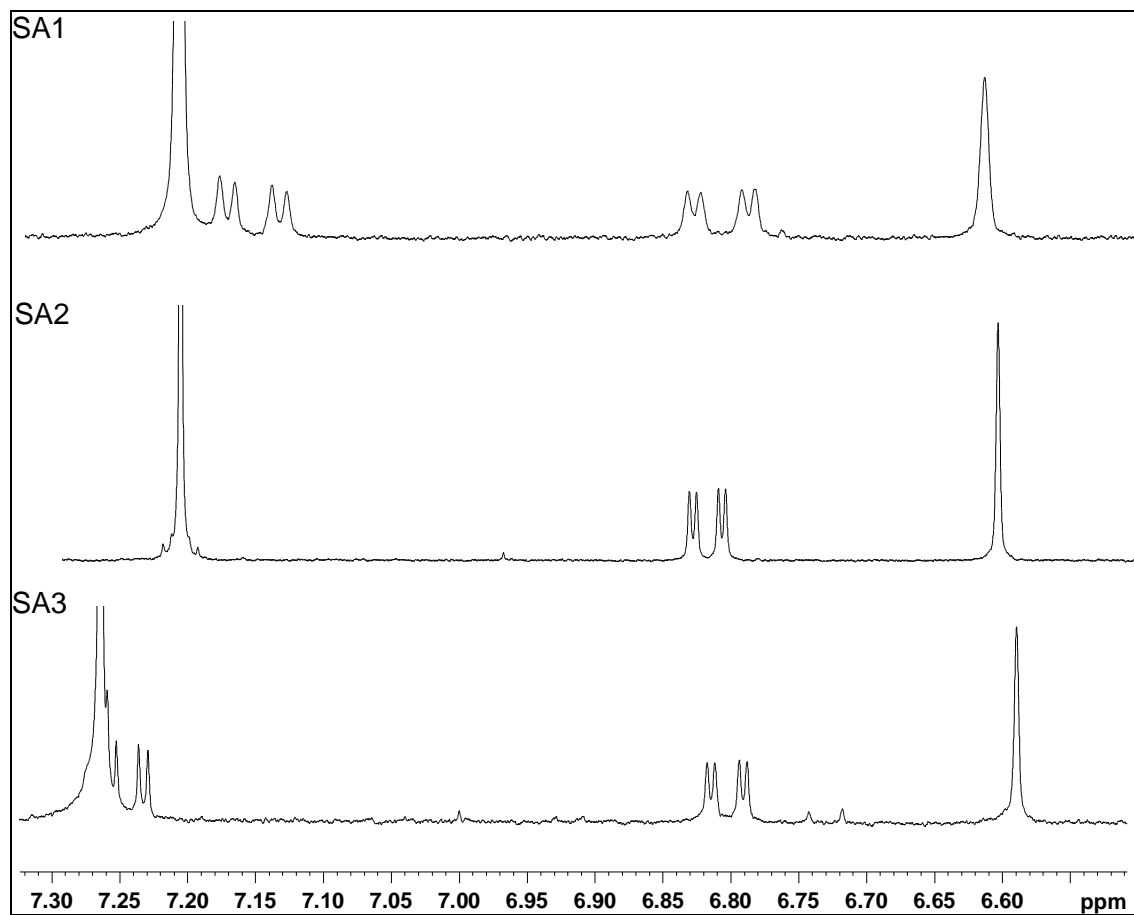
Como as substâncias isoladas **SA1**, **SA2** e **SA3** têm o mesmo esqueleto básico, os espectros de RMN de ^1H foram sobrepostos (E16 – página 38) para evidenciar as diferenças e também as semelhanças. A maior diferença pode ser visualizada na região dos hidrogênios dos sistemas aromáticos (E17-18 – páginas 39-40), na qual os deslocamentos químicos não mudam muito, mas as multiplicidades variam, principalmente para **SA2**, pois não possui substituinte na posição 6, comparada a **SA1** (OH) e **SA3** (OCH₃), apresentando assim os sinais dos hidrogênios sobrepostos, além das metoxilas que **SA1** e **SA2** apresentam uma, enquanto que a substância **SA3** apresenta duas (E20 – página 42). As semelhanças são muito aparentes com os sinais característicos deste esqueleto aparecendo nas três substâncias, H-3 (6,50 ppm, s), H-3' (2,80 ppm, *qdd*), H-4' (5,70 ppm, *dd*) (E19 – página 41) e H-5' (6,80 ppm, *dd*), além dos hidrogênios das metilas em 1,55 ppm (E21 – página 43).



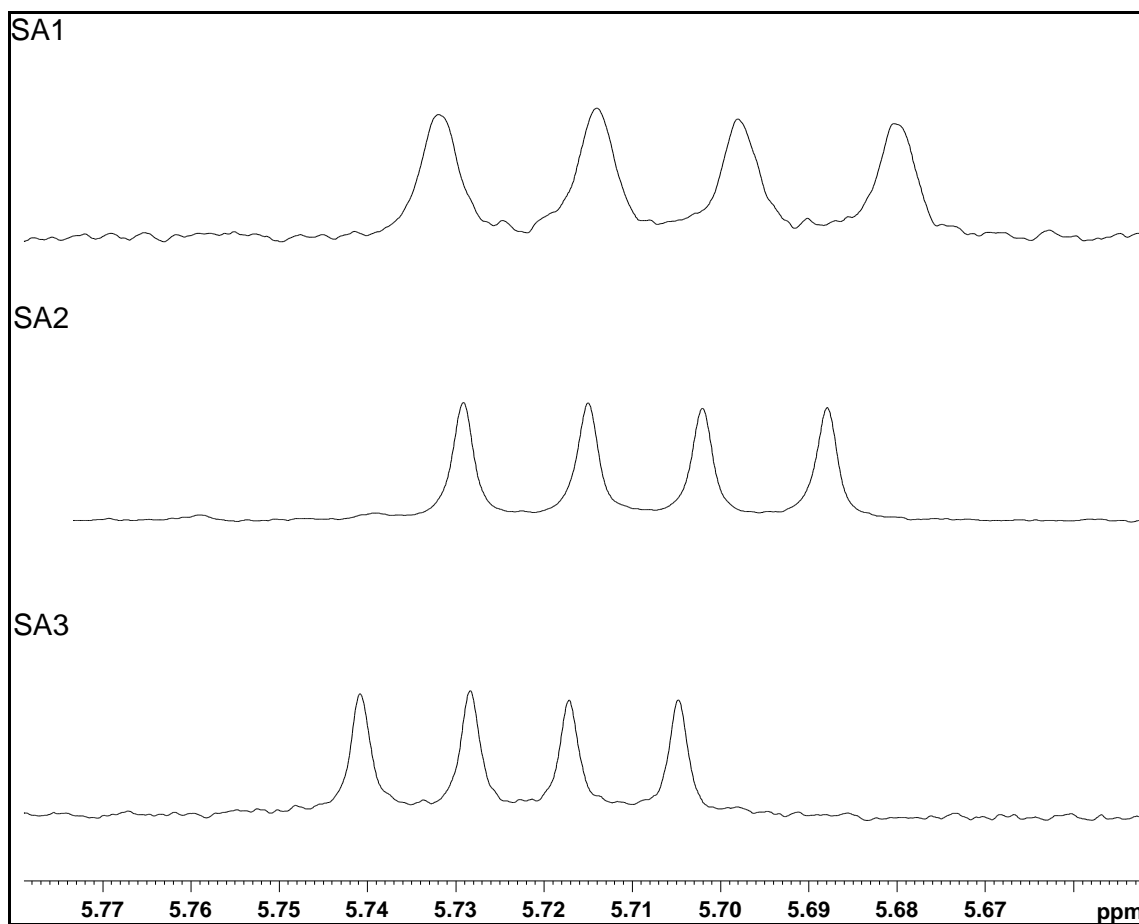
E16. Comparação dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.



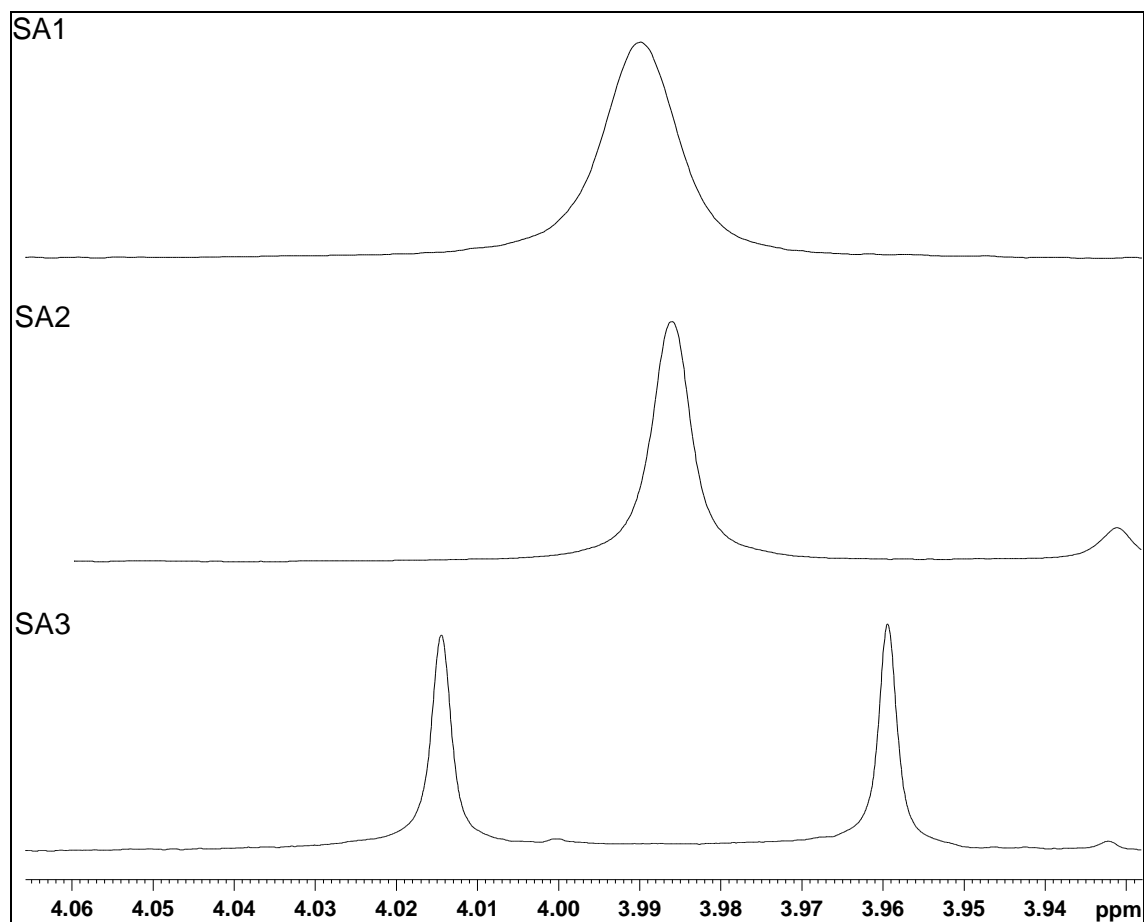
E17. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.



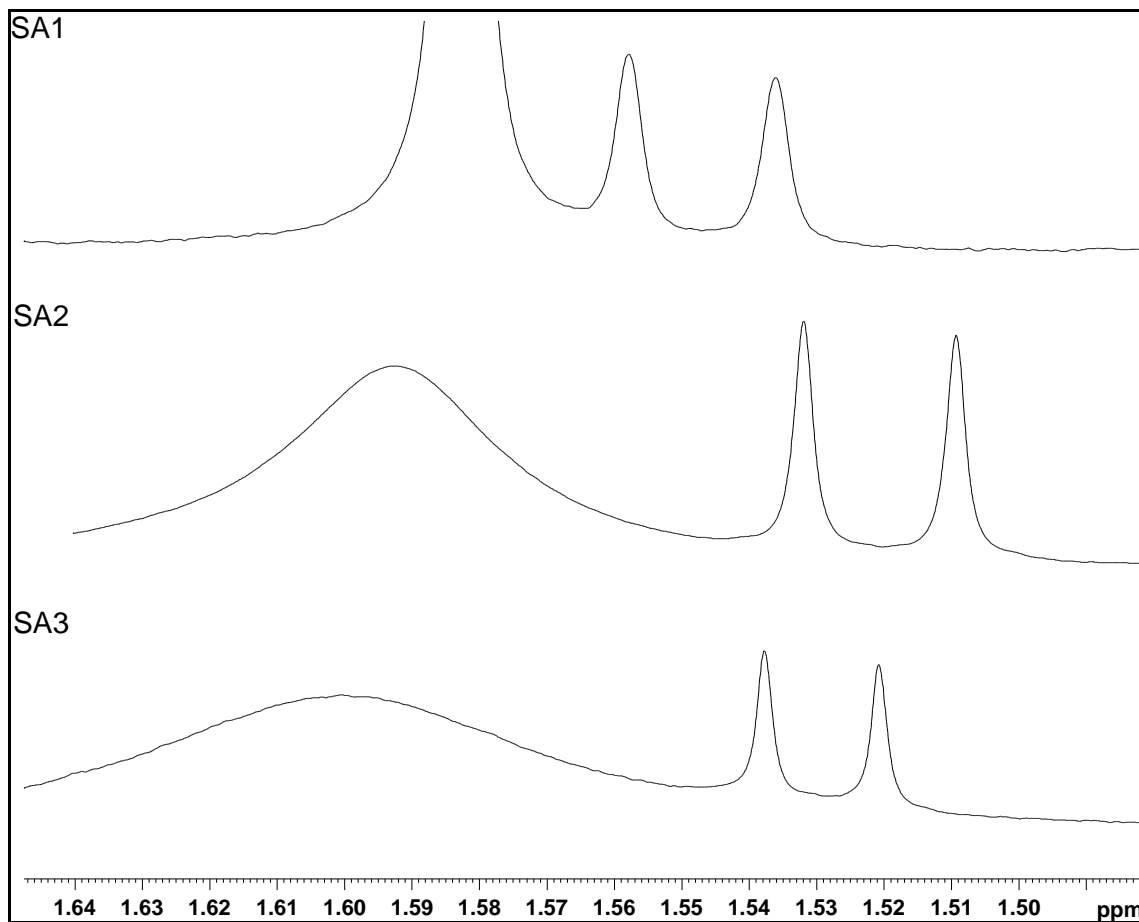
E18. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.



E19. Ampliação da região do hidrogênio olefínico dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.



E20. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.



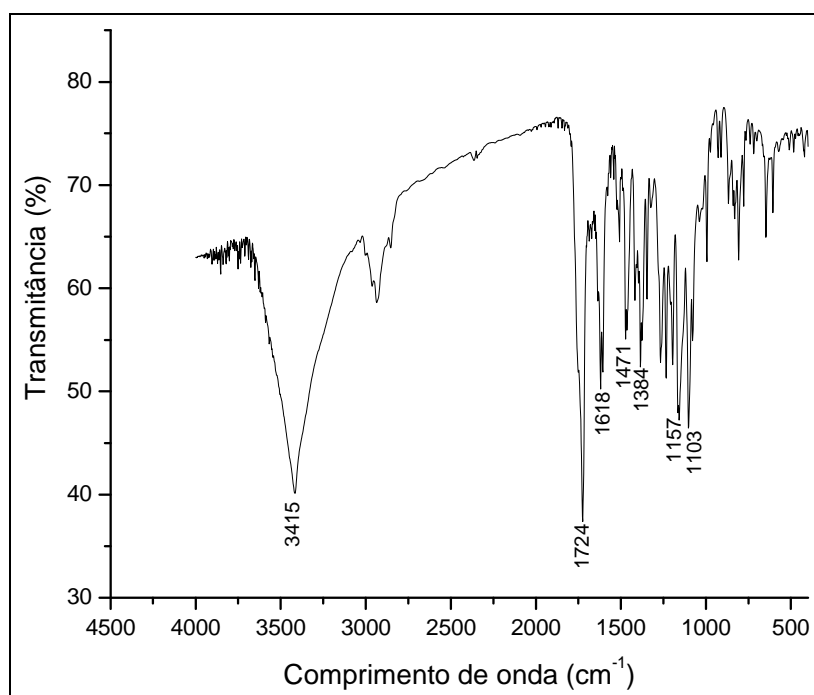
E21. Ampliação da região dos hidrogênios da metila dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **SA1**, **SA2** e **SA3**.

Tabela 07. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de SA1, SA2 e SA3.

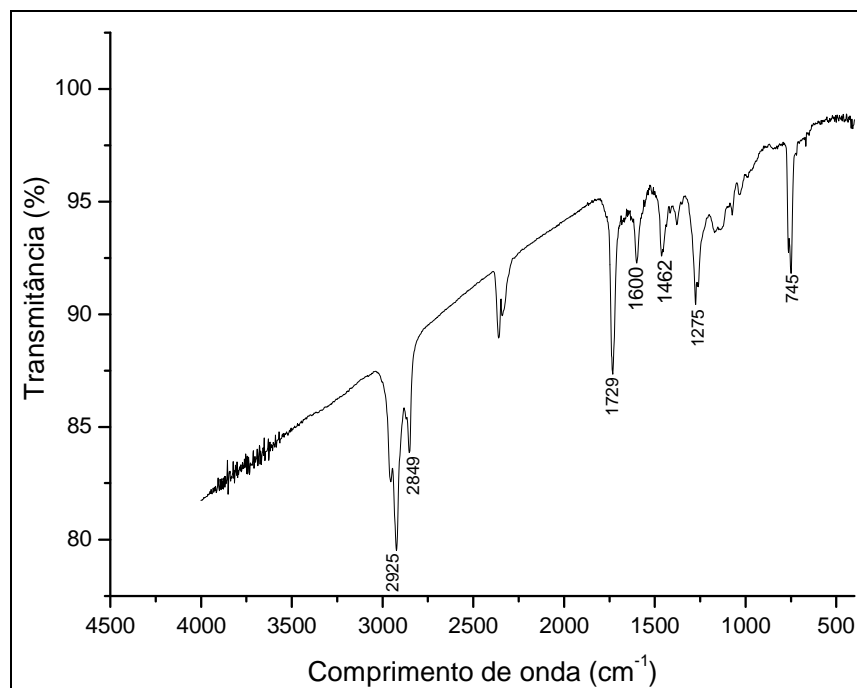
Posição	SA1			SA2			SA3		
	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^{13}C δ	HMBC ^1H - ^{13}C	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^{13}C δ	HMBC ^1H - ^{13}C	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^{13}C δ	HMBC ^1H - ^{13}C
1	-	139,6	-	-	139,3	-	-	139,6	-
2	-	120,6	-	-	122,9	-	-	120,6	-
3	6,56 s	103,4	1,4,5,5',10	6,59 s	102,6	1,4,5',10	6,59 s	103,4	1,4,5',10
4	-	150,7	-	-	151,7	-	-	150,9	-
5	7,54 d (2,5)	104,8	4,6,7,9	8,24 ddd (8,0:1,7:0,6)	121,9	4,7,9	7,53 d (2,6)	100,7	4,7,9
6	-	154,6	-	7,57 ddd (8,0:6,9:1,3)	126,7	8,10	-	158,6	-
7	7,20 dd (9,1:2,5)	118,6	5,6,9	7,62 ddd (8,4:6,9:1,7)	127,5	5,9	7,24 dd (9,2:2,6)	119,3	5,9
8	8,22 d (9,1)	124,7	1,4,5,6,10	8,31 ddd (8,4:1,3:0,6)	122,4	1,6,10	8,21 d (9,2)	124,3	1,6,10
9	-	122,1	-	-	127,1	-	-	122,1	-
10	-	127,6	-	-	126,1	-	-	127,4	-
2'	-	171,2	-	-	171,2	-	-	171,2	-
3'	2,79 qdd (6,8:5,0:2,3)	38,6	2',4',5'	2,80 qdd (6,8:4,9:2,3)	38,6	2',4',5'	2,79 qdd (6,8:5,0:2,3)	38,5	2',4',5'
4'	5,72 dd (9,5:5,0)	130,1	1,2,2',3',5',6'	5,78 dd (9,5:4,9)	131,0	2,2',3',6'	5,71 dd (9,5:5,0)	129,9	2,2',3',6'
5'	6,79 dd (9,5:2,3)	129,1	1,3,3',4'	6,83 dd (9,5:2,3)	129,2	1,3,3'	6,80 dd (9,5:2,3)	129,1	1,3,3'
6'	1,53 d (6,8)	14,6	2',3',4'	1,54 d (6,8)	14,6	2',3',4'	1,53 d (6,8)	14,6	2',3',4'
4-OCH ₃	3,98 s	55,8	4	4,02 s	55,6	4	4,01 s	55,8	4
6-OCH ₃	-	-	-	-	-	-	3,96 s	55,5	6
6-OH	5,22 s/	-	-	-	-	-	-	-	-

As substâncias **SA1**, **SA2** e **SA3** são inéditas, por isso, experimentos de IV, UV-vis e EM foram realizados para comprovação da estrutura e obtenção de todos os dados espectrométricos.

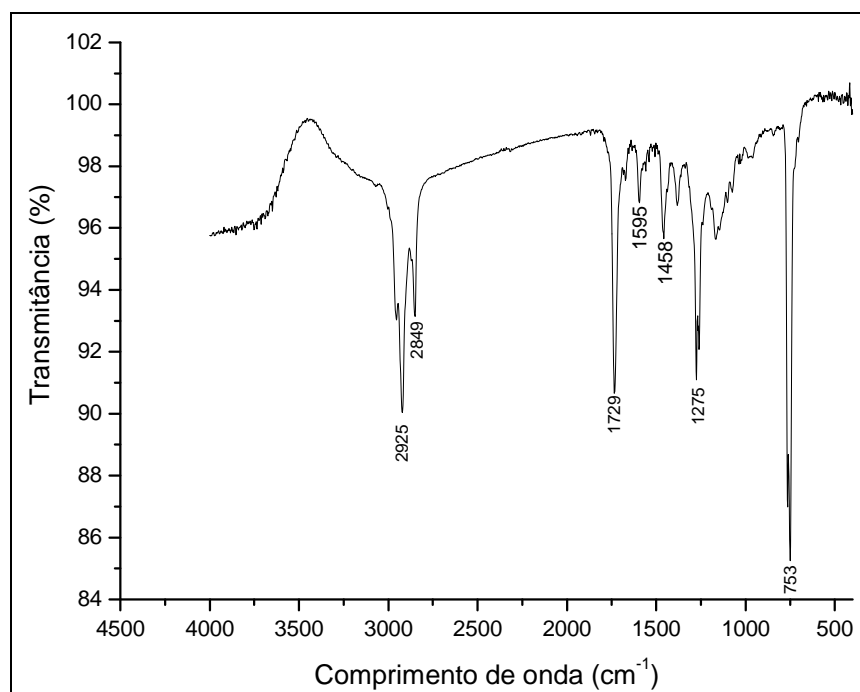
Os espectros de infravermelho das três substâncias (E22-24 – páginas 45-46) apresentaram bandas características correspondentes a estiramento C-H sendo que este carbono é sp^2 ($2930-2840\text{ cm}^{-1}$), deformação axial C=O de éster em torno de $1730-1715\text{ cm}^{-1}$, estiramento C=C ($1600-1450\text{ cm}^{-1}$) e deformação axial C-O sendo este o carbono da carbonila do éster ($1310-1250\text{ cm}^{-1}$), caracterizando a presença de grupamento éster e anéis aromáticos nas moléculas. O espectro de **SA1** mostrou ainda uma banda em 3410 cm^{-1} , característica da presença de hidroxila (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).



E22. Espectro de infravermelho da substância **SA1**.



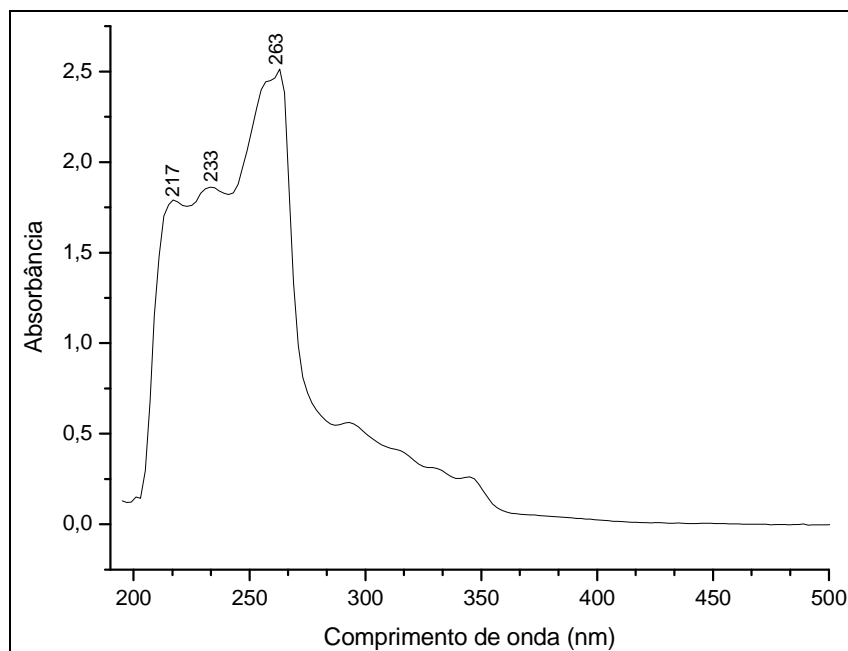
E23. Espectro de infravermelho da substância **SA2**.



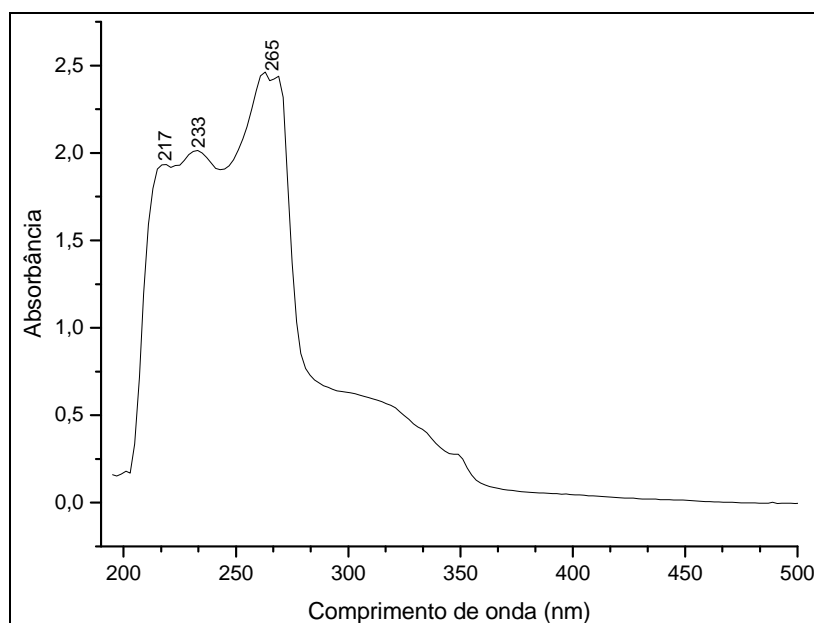
E24. Espectro de infravermelho da substância **SA3**.

Os espectros de ultravioleta das substâncias **SA1**, **SA2** (E25 – página 47) e **SA3** (E26 – página 47) apresentaram três máximos de absorção, **SA1** em 291, 239 e 208 nm, **SA2** em 263,

233 e 217 nm, e **SA3** em 265, 233 e 217 nm. Os resultados de absorvidade molar média foram 6127, 6026 e 4673 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para **SA1**, **SA2** e **SA3**, respectivamente. Estes resultados mostram que as moléculas possuem duplas ligações conjugadas, o anel de naftaleno com mais uma dupla ligação no terceiro anel e dois substituintes no caso de **SA1** e **SA3**, e um para **SA2**.



E25. Espectro de ultravioleta da substância **SA2**.



E26. Espectro de ultravioleta da substância **SA3**.

A massa molar das agregatinas A, B e C foi confirmada através de espectros de massas de alta resolução. Foram observados os picos em m/z 270,11306 (M^+ , **SA1**), 255,1010 (MH^+ , **SA2**) e 285,1127 (MH^+ , **SA3**).

O espectro de massas de alta resolução de **SA1** (E27 – página 49) foi obtido por impacto eletrônico, e mostrou, além do pico do íon molecular, picos referentes à fragmentação. Os picos mais importantes foram observados em m/z 227,09500 (pico-base) e m/z 242,11765. Por outro lado, os espectros de massas de alta resolução de **SA2** e **SA3** (E28-E29 – página 49) foram obtidos pela técnica de ionização por *spray* de elétrons, que não mostra a fragmentação diretamente. Por isso foram também obtidos espectros de baixa resolução por impacto eletrônico (CG-EM). Para o composto **SA2**, os picos principais foram observados em m/z 226 e 211 (pico-base), enquanto que para o composto **SA3**, o pico-base foi observado em m/z 241. Estes dados sugerem que a fragmentação destas substâncias está ocorrendo como mostrado na figura abaixo (Figura 07 – página 48). O íon molecular (B) perde CO, formando um composto com três anéis de seis membros (C), que perde o grupo metila por homólise, ocorrendo a formação de um íon, responsável pelo pico-base, estabilizado por ressonância (D-E).

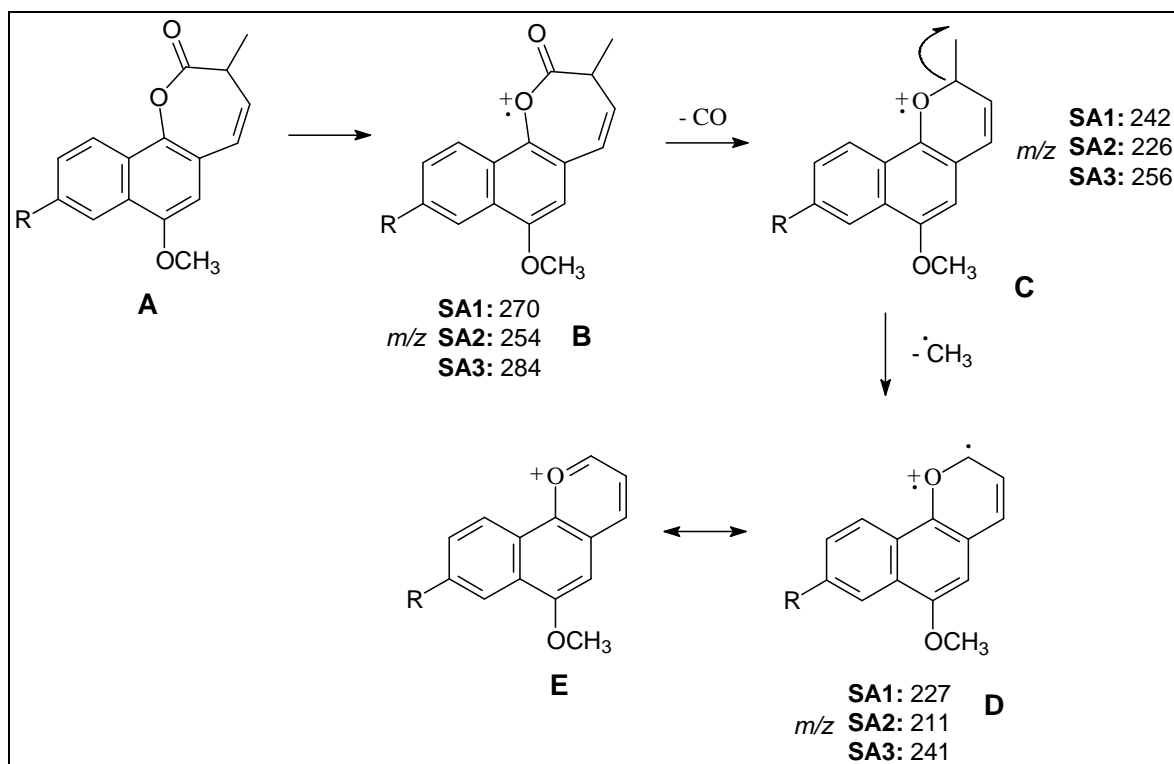
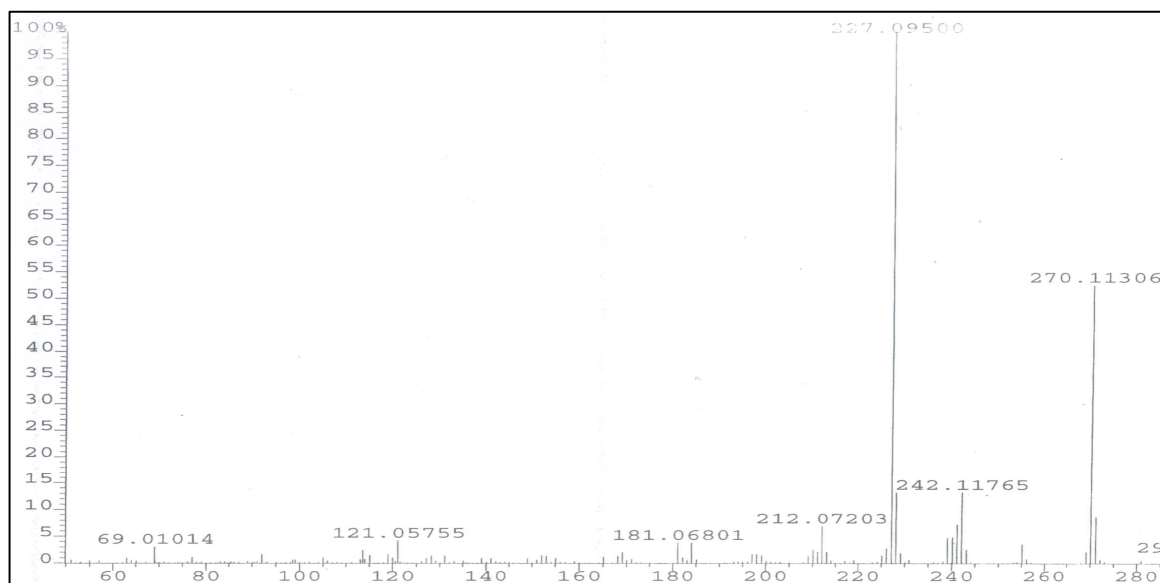
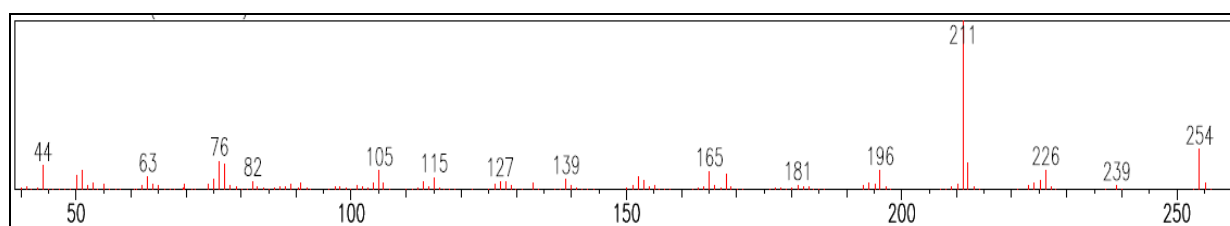


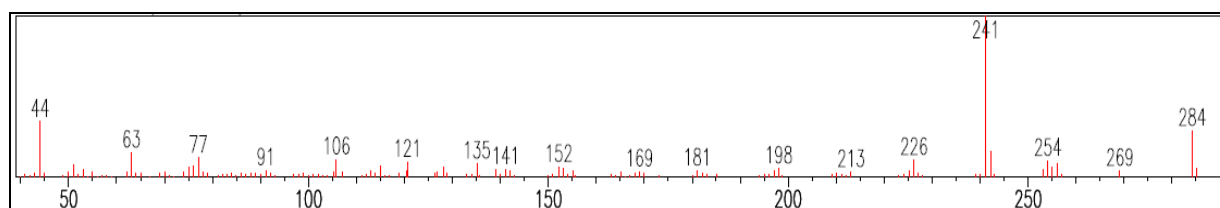
Figura 07. Proposta de fragmentação para as substâncias **SA1** (R = OH), **SA2** (R = H) e **SA3** (R = OMe).



E27. Espectro de massas de alta resolução da substância **SA1**.



E28. Espectro de massas de baixa resolução da substância **SA2**.



E29. Espectro de massas de baixa resolução da substância **SA3**.

3.2.2. Determinação estrutural da substância SA4

A substância **SA4** foi isolada como um óleo amarelo de fórmula molecular $C_{20}H_{22}O_4$ com dez insaturações. O seu espectro de RMN de 1H (E30 – página 51) revelou a presença de 20 hidrogênios. Quatro deles na região de hidrogênios de sistemas aromáticos (7,52, 7,63, 7,75 e

8,10 ppm) (E31-33 – páginas 52-53), com constantes de acoplamento características de um anel 1,2 dissubstituído. Foram observados ainda dois hidrogênios como dupletos (6,72 e 6,44 ppm) com constante de acoplamento de 9,7 Hz, podendo ser uma ligação dupla isolada com configuração *cis* ou os hidrogênios de um anel aromático substituído nas posições 1, 2, 3 e 4 (E34 – página 53). Em 4,00 e 3,83 ppm, há dois dupletos com constante de acoplamento 6,4 Hz (E36 – página 54). O valor do deslocamento químico indica que estes hidrogênios estão vizinhos a um oxigênio e pelo valor da constante de acoplamento estão no mesmo carbono, devendo ser um grupo metileno. Analisando as multiplicidades e constante de acoplamento de outros sinais em 5,02 (*ddqq* 6,8:6,7:1,2:0,7), 3,37 (*dd* 14,5:6,8 Hz), 3,19 (*dd* 14,5:6,7 Hz), 1,77 (*d* 0,7 Hz) e 1,66 ppm (*d* 1,2 Hz) (E35, E37-38 – páginas 54-55), verificou-se a presença de um grupamento prenila. E há ainda um sinal que pode ser atribuído a uma terceira metila isolada em 1,70 ppm (Figura 08 – página 50).

No espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (E39 – página 56) observou-se 20 sinais, entre estes um sinal de uma carbonila de cetona α - β -insaturada (183,9 ppm), sinais de mais 12 carbonos sp^2 (121,4-143,6 ppm), de dois carbonos ligados a oxigênio (74,8 e 80,6 ppm), de um carbono ligado a dois oxigênios (99,4 ppm), de um grupo metileno (23,7 ppm) e de três grupos metila (17,9, 19,5 e 25,6 ppm).

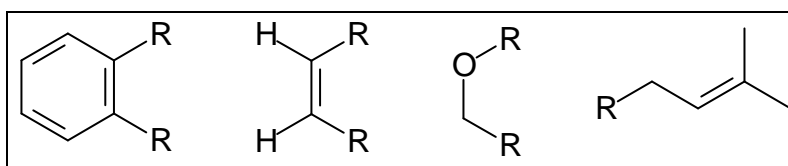
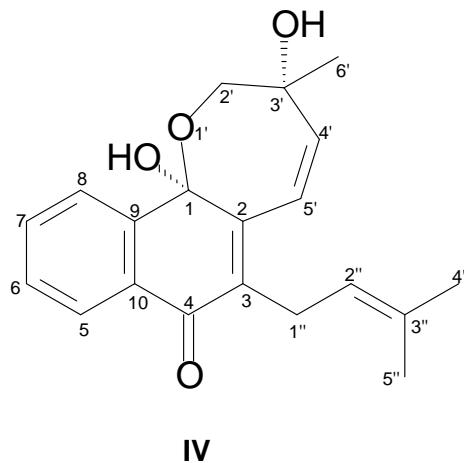


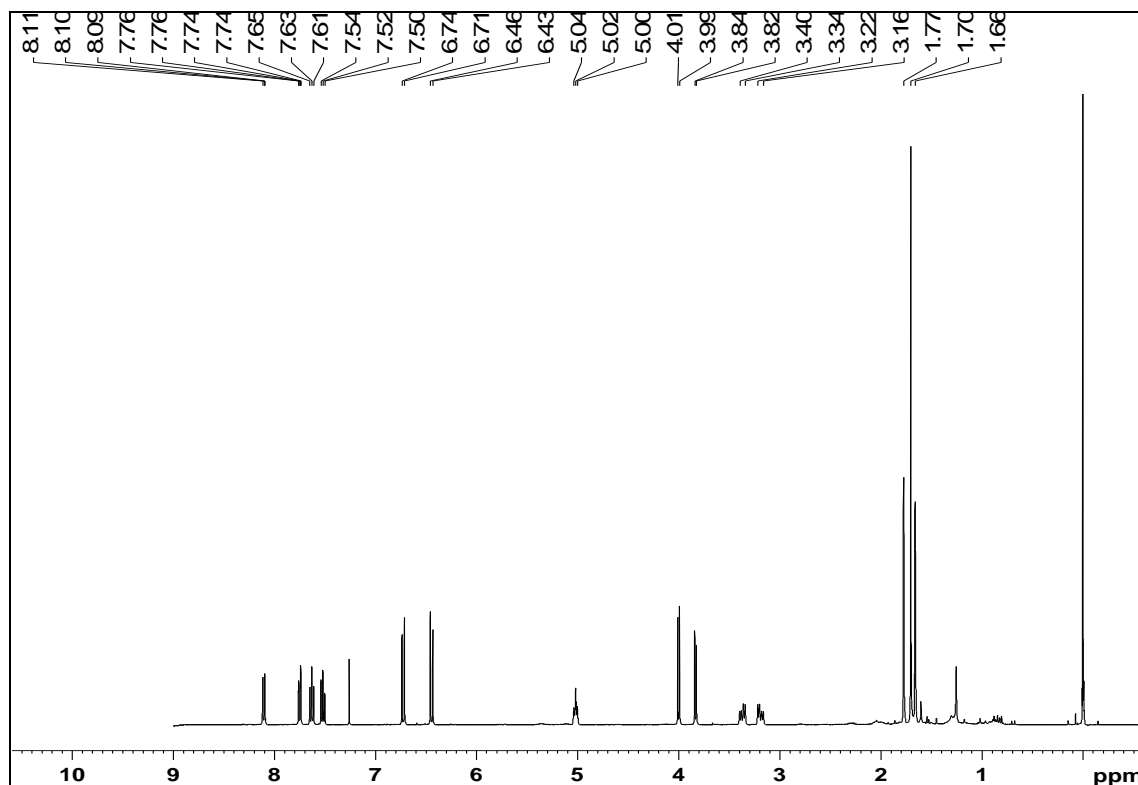
Figura 08. Fragmentos identificados por RMN de ^1H na **SA4**.

O número de carbonos sp^2 sugere a presença de um grupo naftaleno, como nas substâncias anteriores, mas através dos espectros de HSQC e HMBC (E43-44 – página 58) foi observado que havia correlação entre o hidrogênio do anel aromático mais desprotegido H-5 (8,10 ppm) com a carbonila (C-4). Os hidrogênios H-1'' em 3,19 e 3,37 ppm mostraram correlação com a carbonila C-4 e o hidrogênio da ligação dupla H-5' (6,72 ppm) mostrou correlação com o carbono vizinho à carbonila C-3 (132,0 ppm). O outro hidrogênio da ligação dupla H-4' (6,44 ppm) mostrou correlação com o carbono do terceiro grupo metila C-6' (19,5 ppm) e com o carbono oxigenado C-2' (74,7 ppm) (Tabela 08 – página 60, Figura 09 – página 59). Analisando outras correlações do espectro de HMBC e os dados obtidos dos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, foi possível definir a estrutura de **SA4** como um derivado de uma naftoquinona

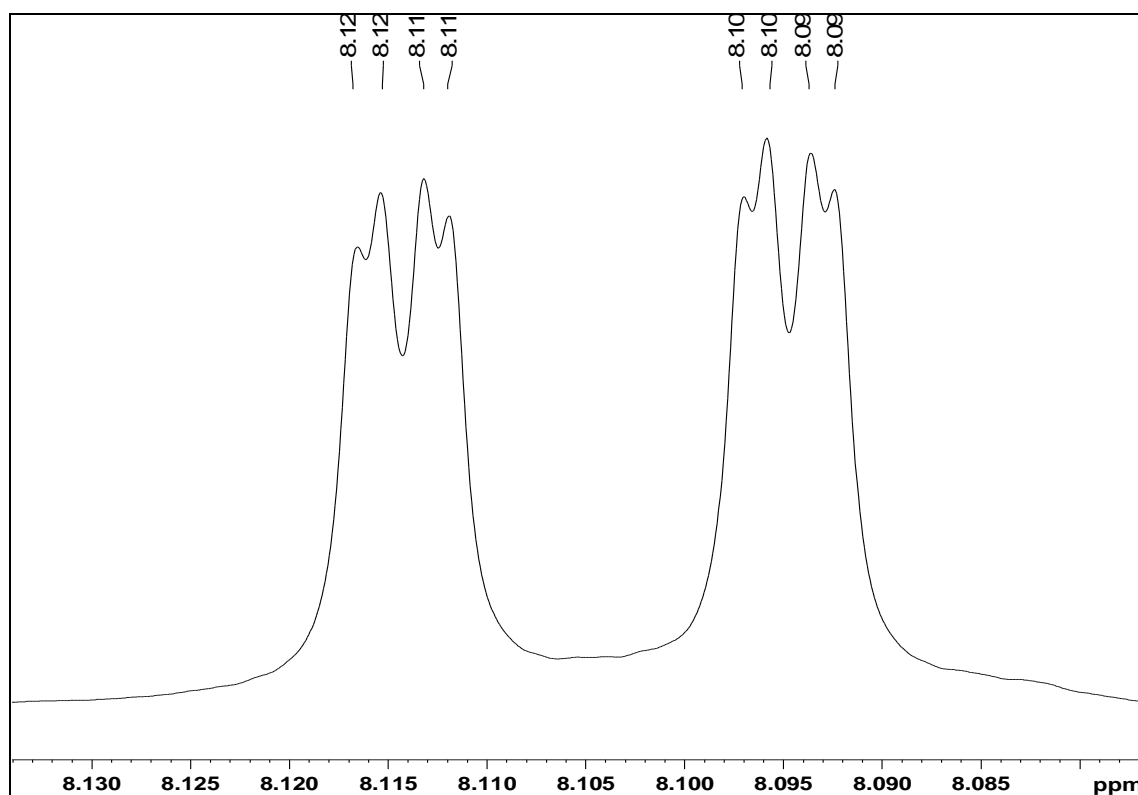
prenilada, com um grupamento hemiacetal, inédito na literatura cujo nome sistemático é 1,3 dihidroxi-3'- metil-3- prenil- 2',3'-dihidronafto [1,2-*b*]oxepin- 4(1H)-ona, denominada usualmente de agregatina D (**IV**).



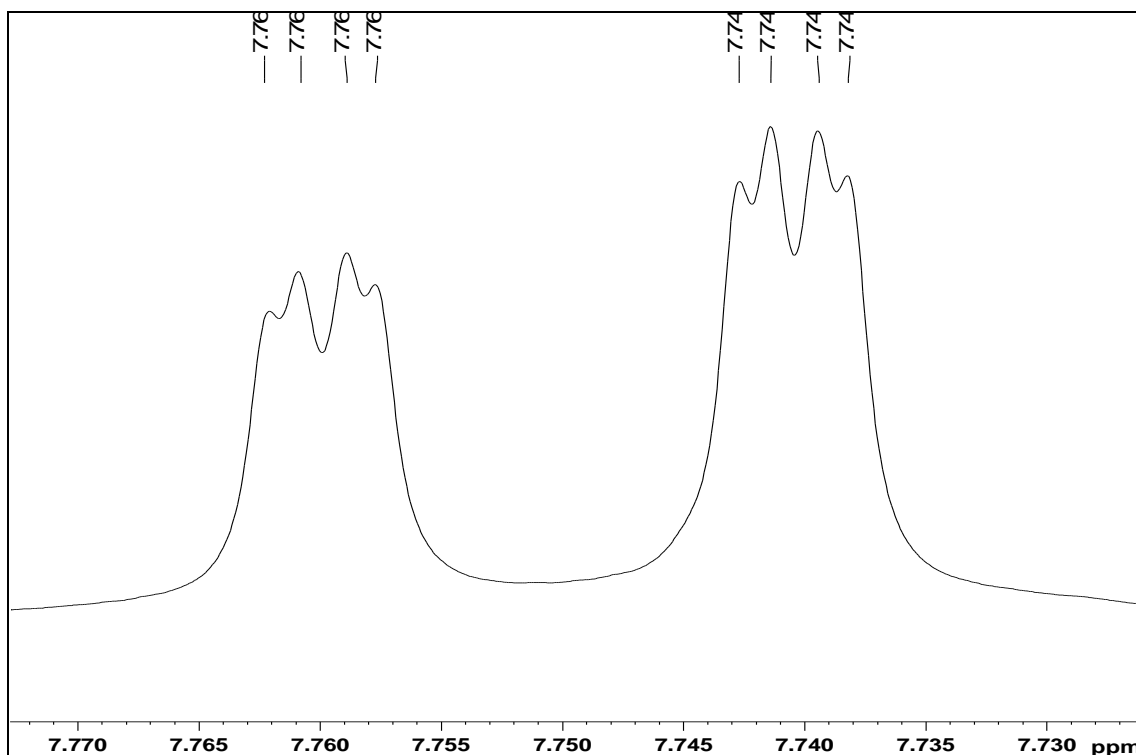
Como o sinal das hidroxilas não foi observado nos experimentos de RMN em CDCl_3 , devido a elevada acidez do solvente, os espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ também foram adquiridos em benzeno deuterado (E40-42 – páginas 56-57, Tabela 08 – página 60). Com isto, o sinal da hidroxila foi visualizado em 3,39 ppm.



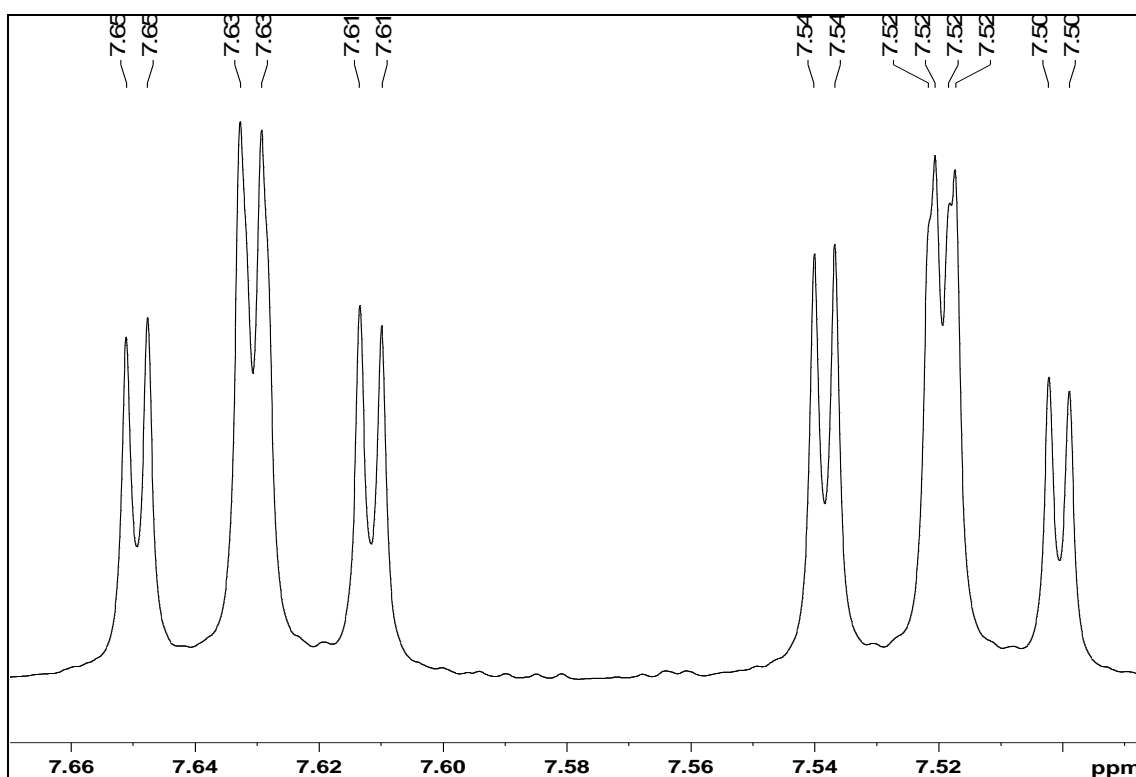
E30. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em CDCl₃ da **SA4**.



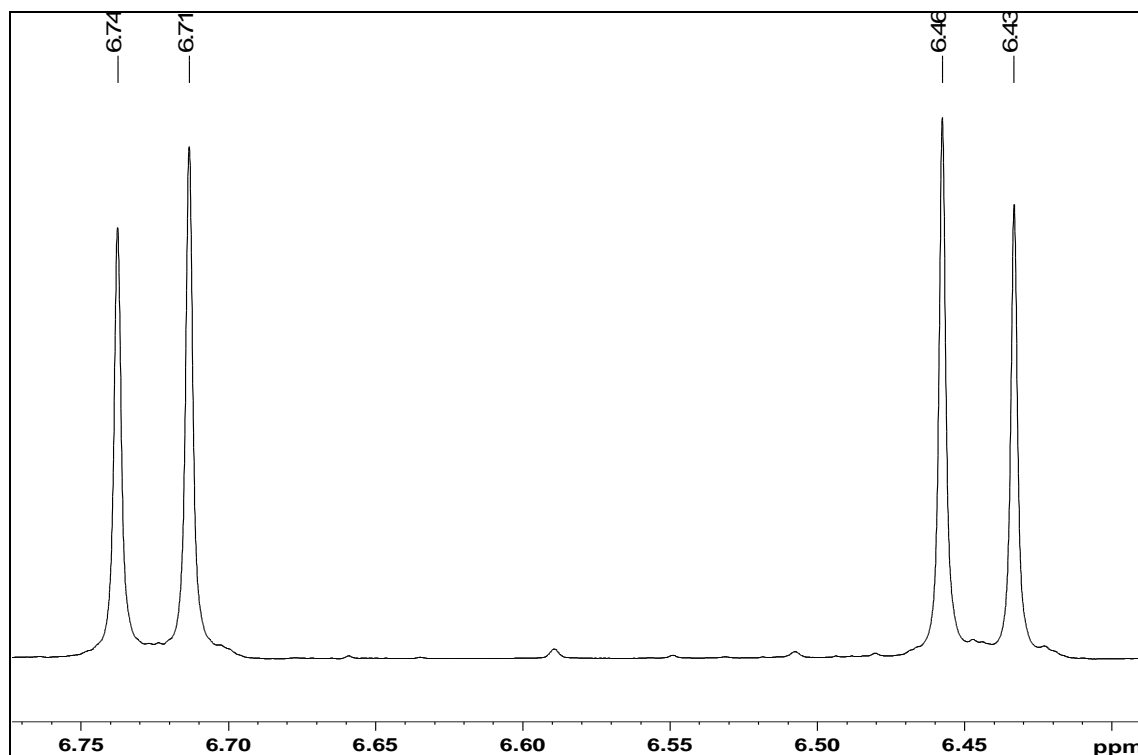
E31. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ¹H (400 MHz) em CDCl₃ da substância **SA4**.



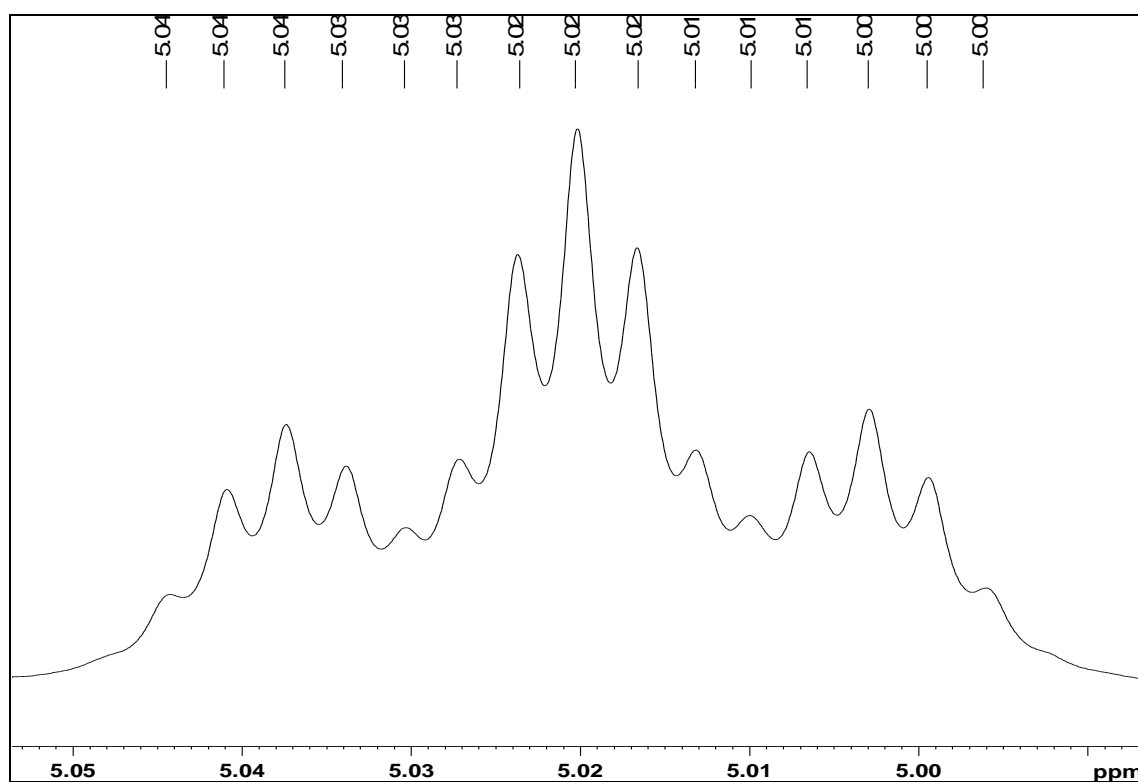
E32. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



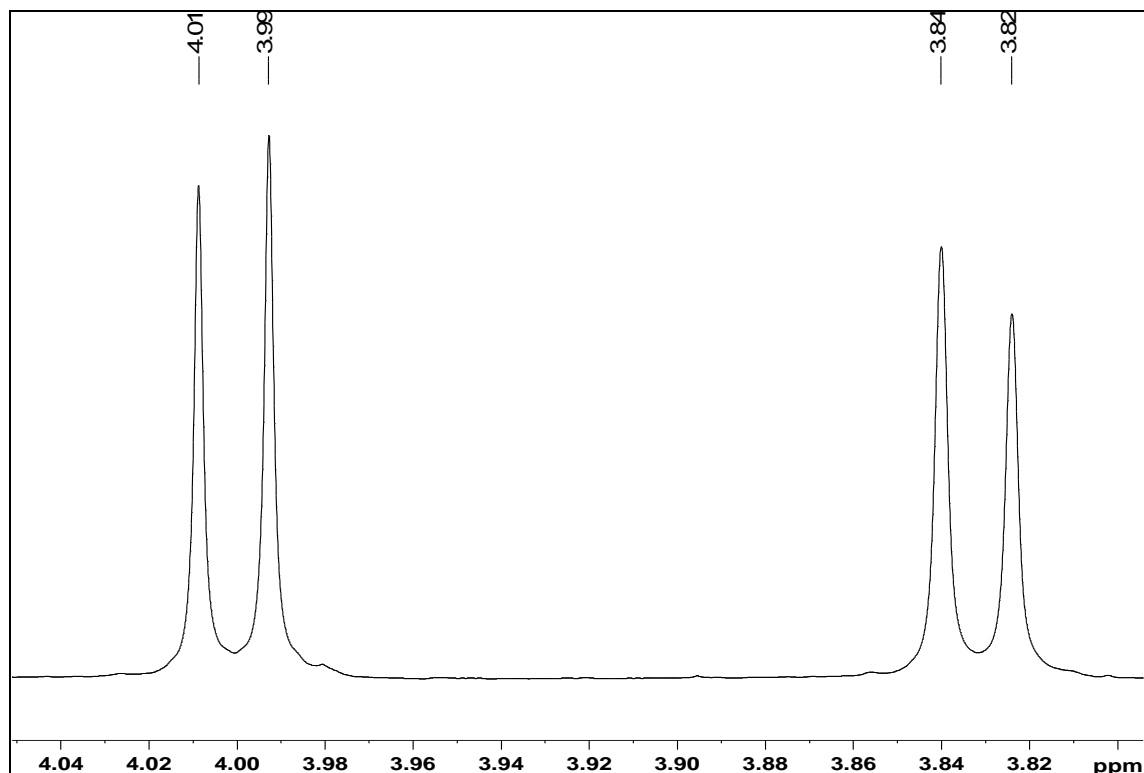
E33. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



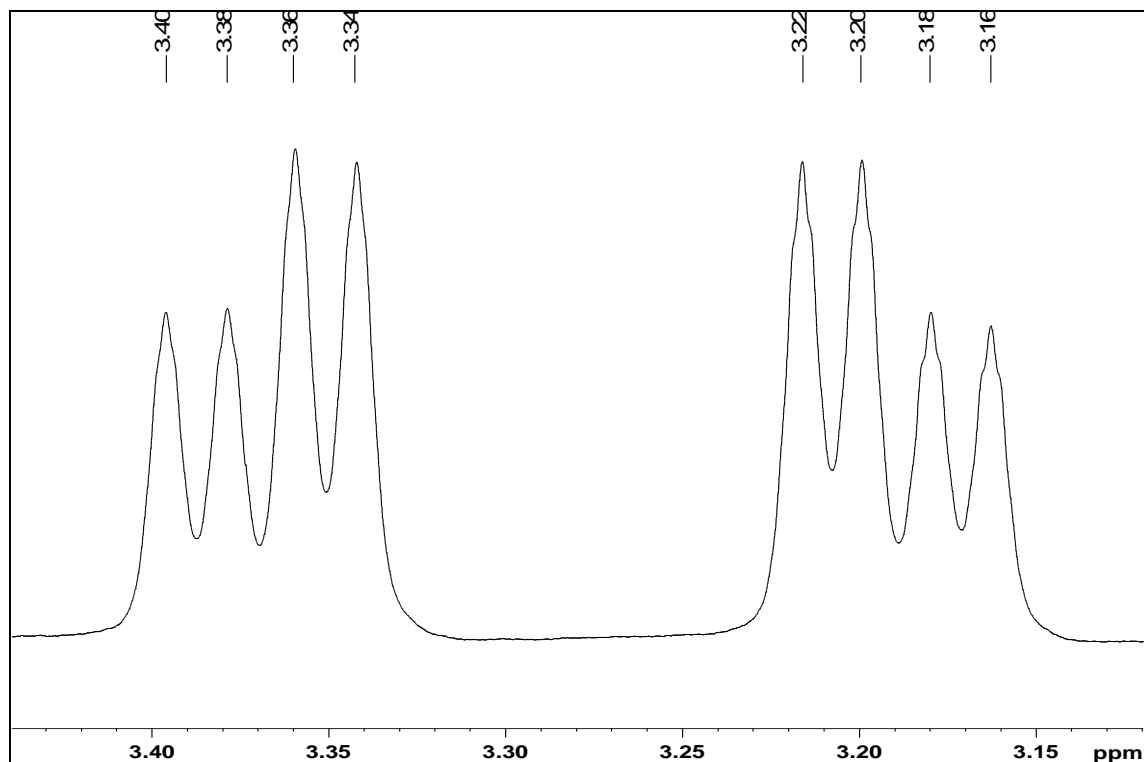
E34. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



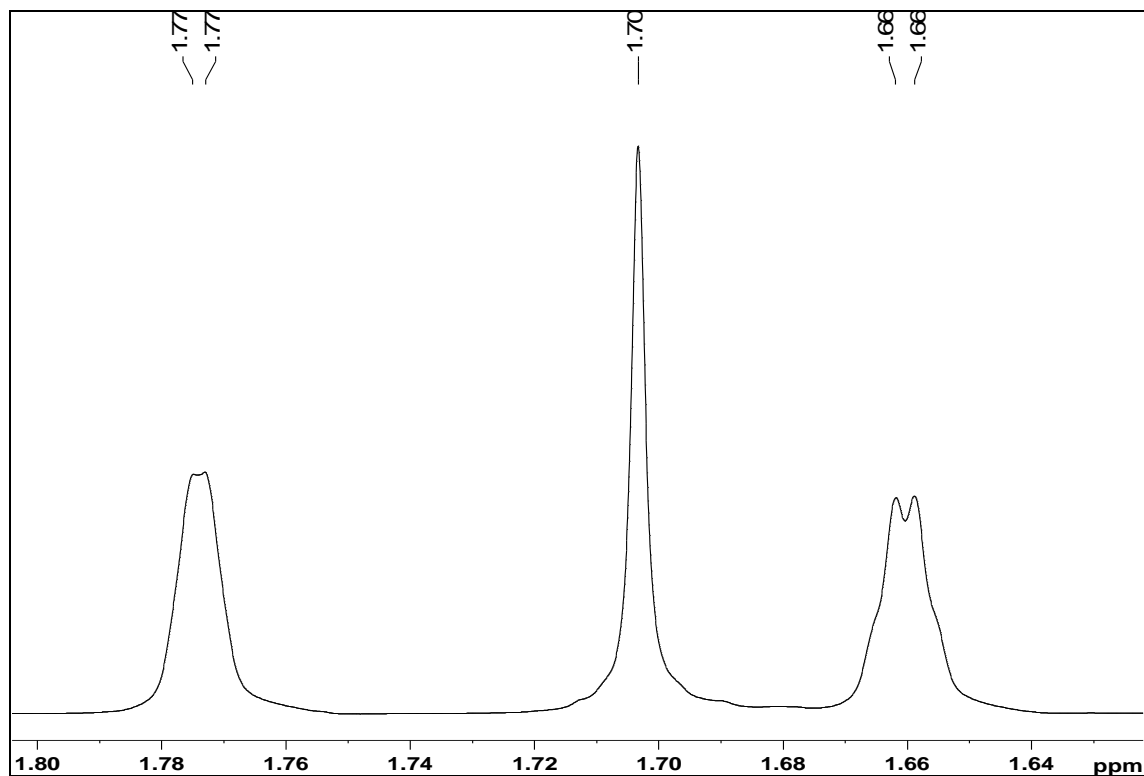
E35. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



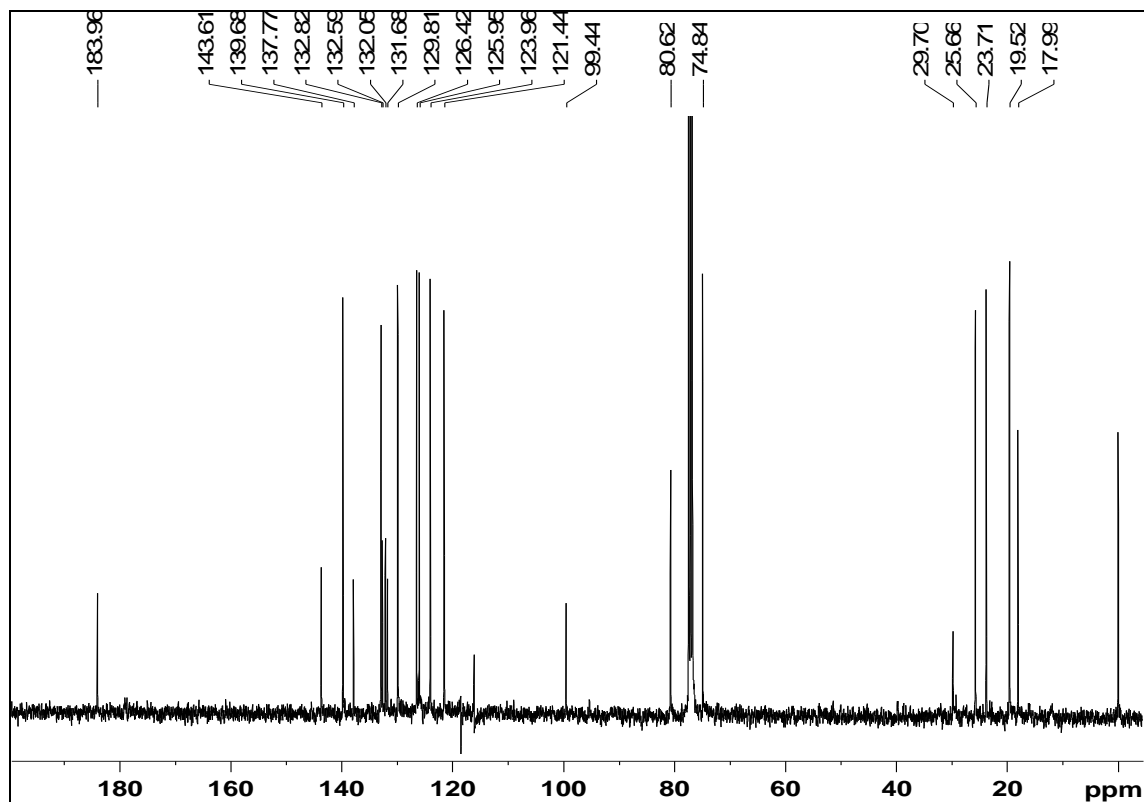
E36. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,82-4,04 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



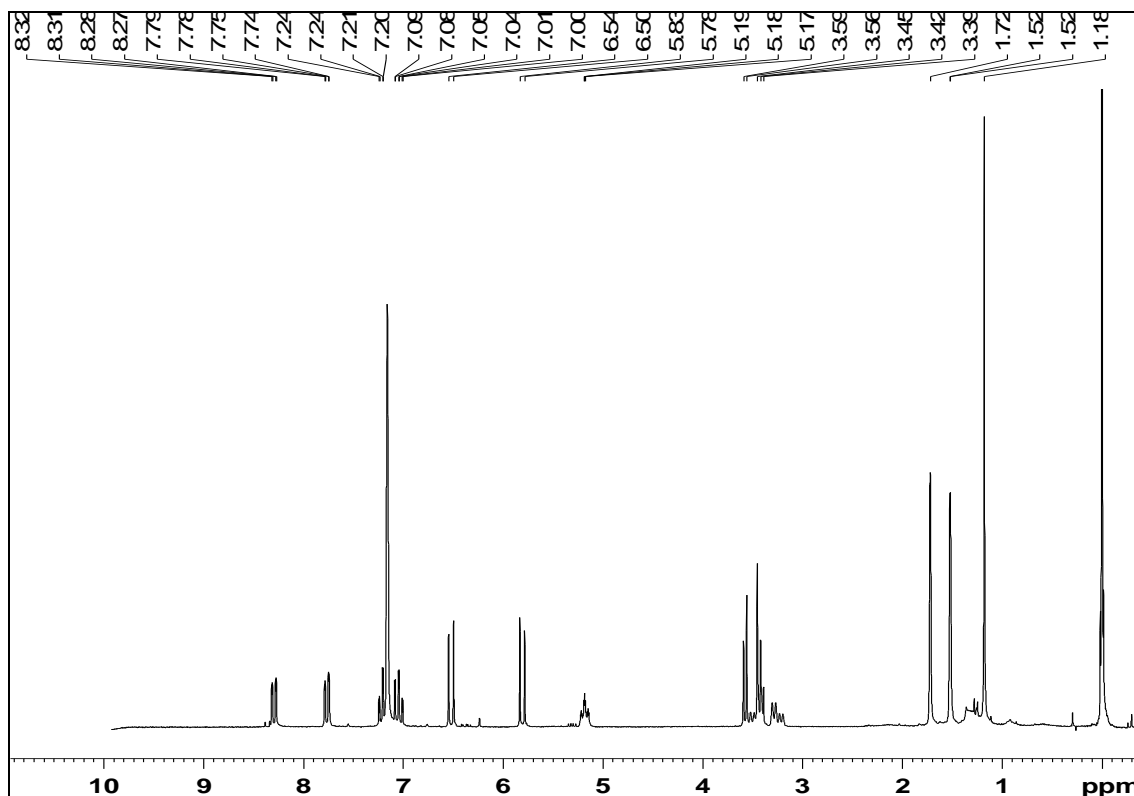
E37. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,82-4,04 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



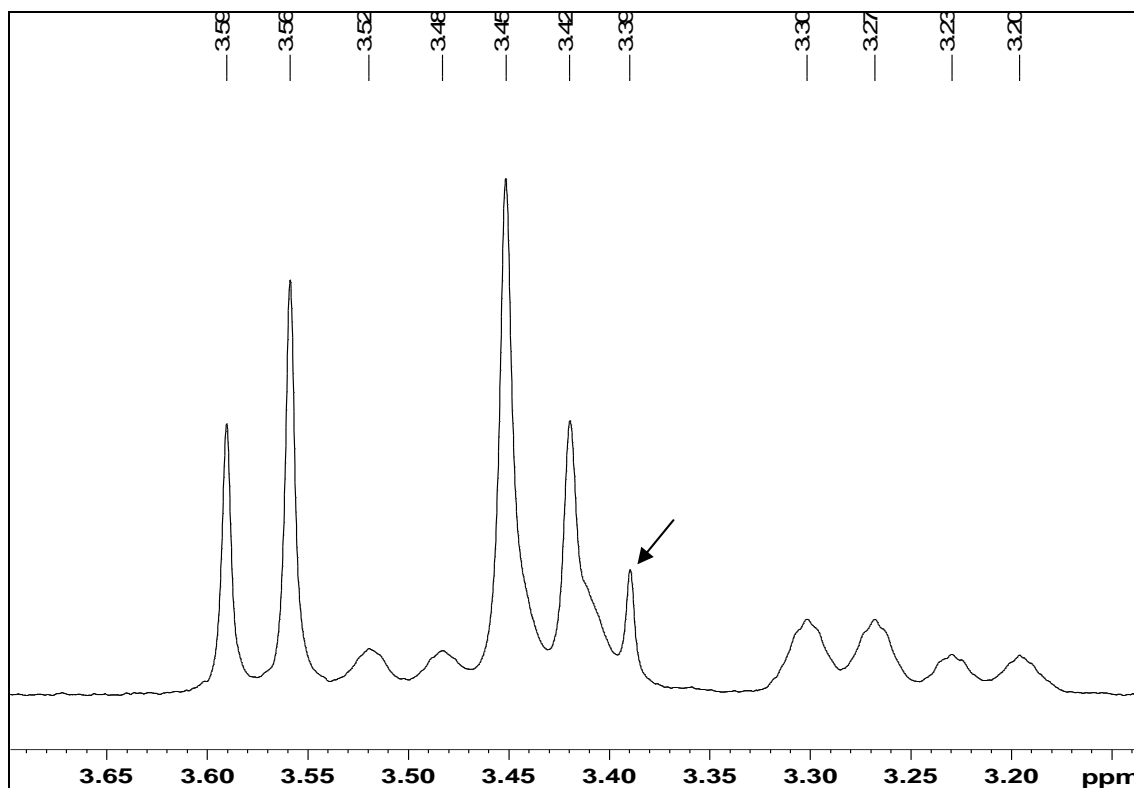
E38. Ampliação da região dos hidrogênios das metilas (1,63-1,80 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da substância **SA4**.



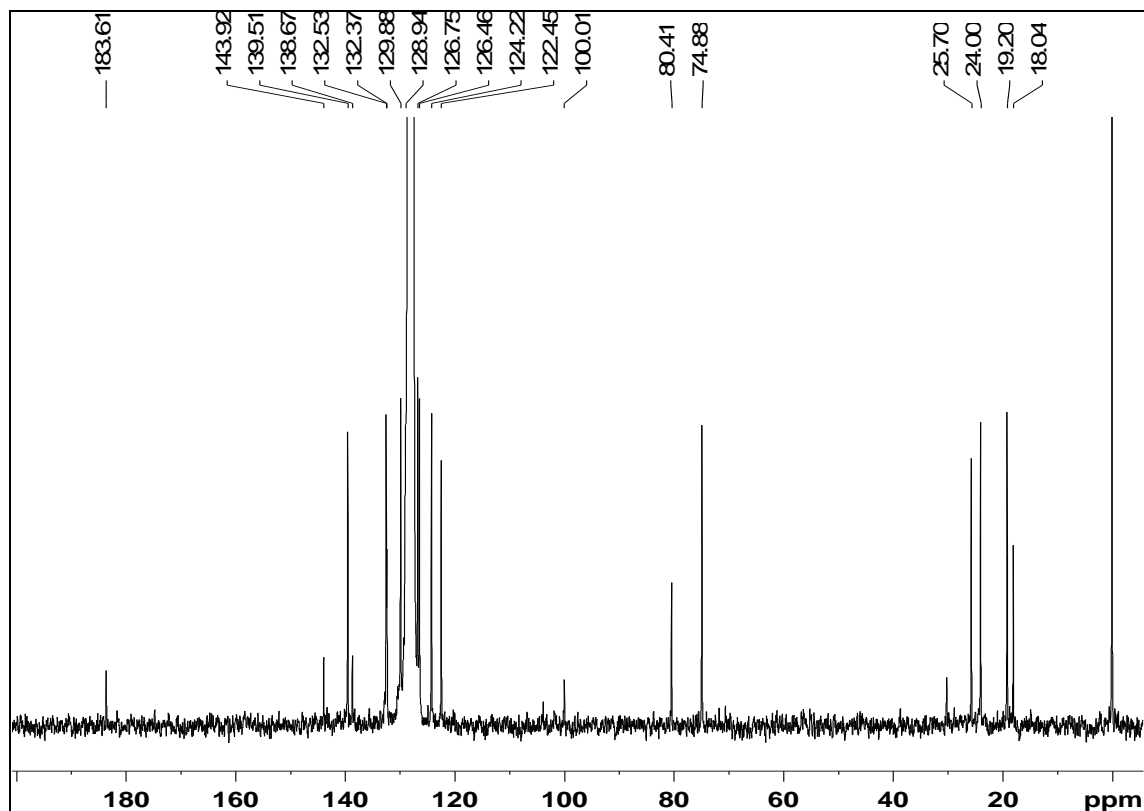
E39. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 da **SA4**.



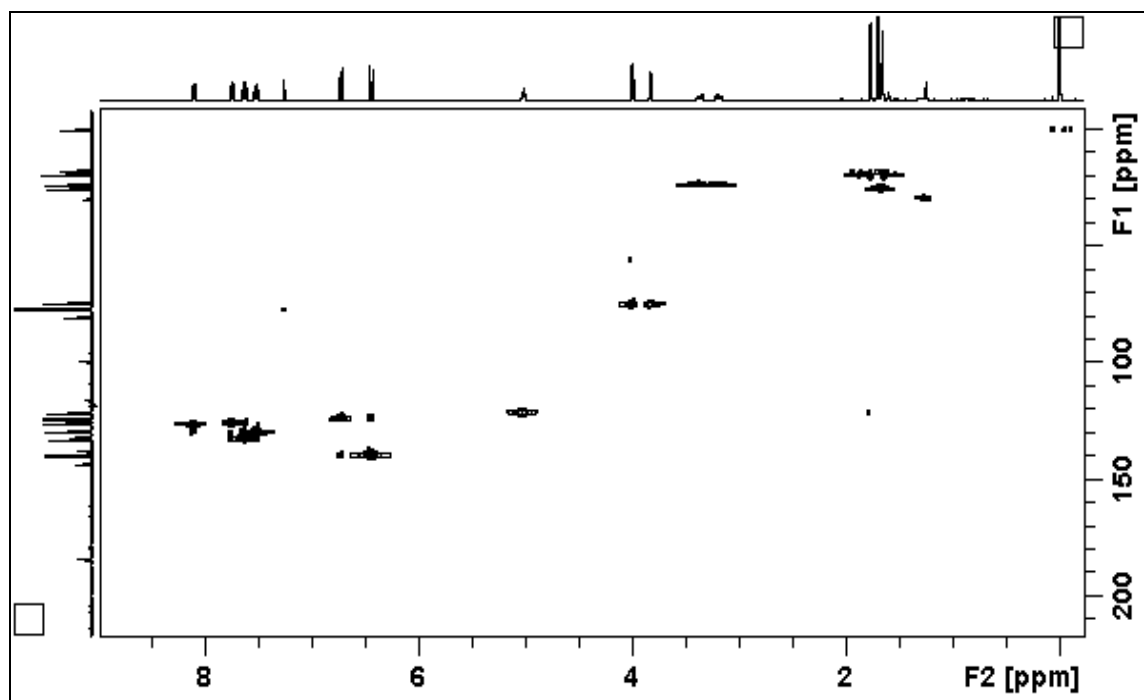
E40. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆) de **SA4**.



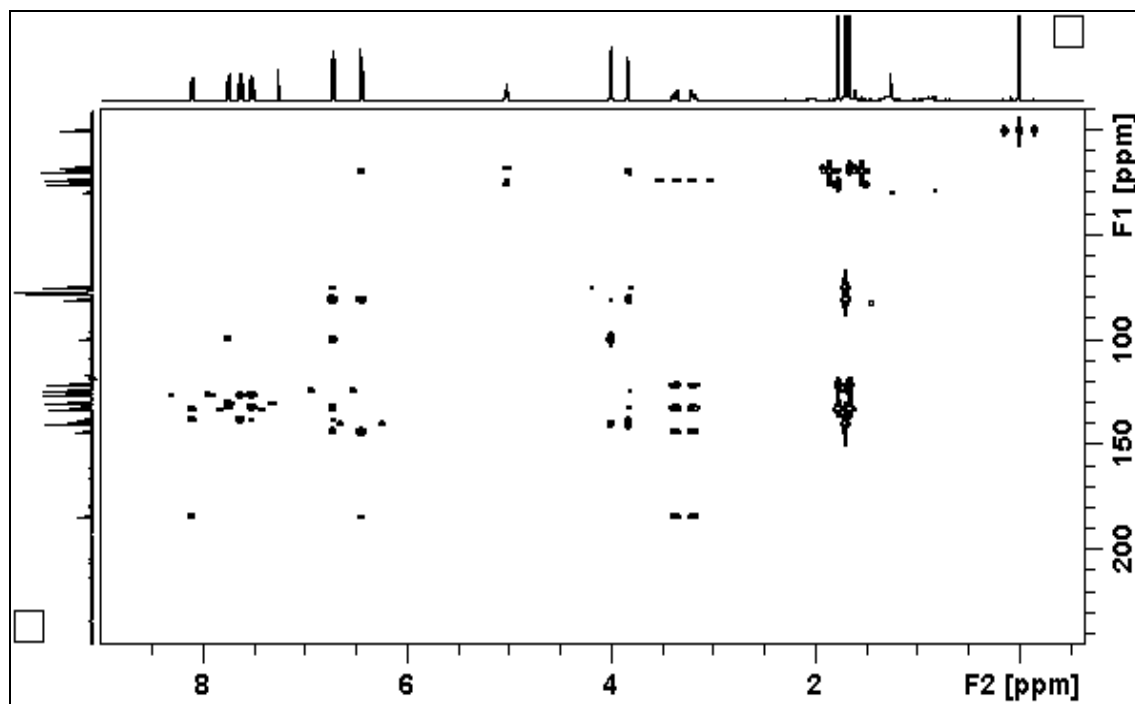
E41. Ampliação da região do hidrogênio da hidroxila (3,39 ppm) do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₆D₆) da substância **SA4**.



E42. Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, C_6D_6) de SA4.



E43. Mapa de correlação direta $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (400 MHz, CDCl_3) da SA4.



E44. Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) da substância **SA4**.

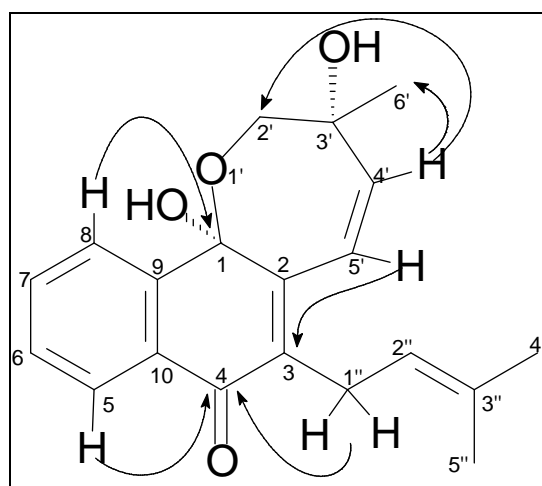


Figura 09. Principais correlações observadas no espectro de HMBC de **SA4**.

Tabela 08. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 e C_6D_6 de **SA4**.

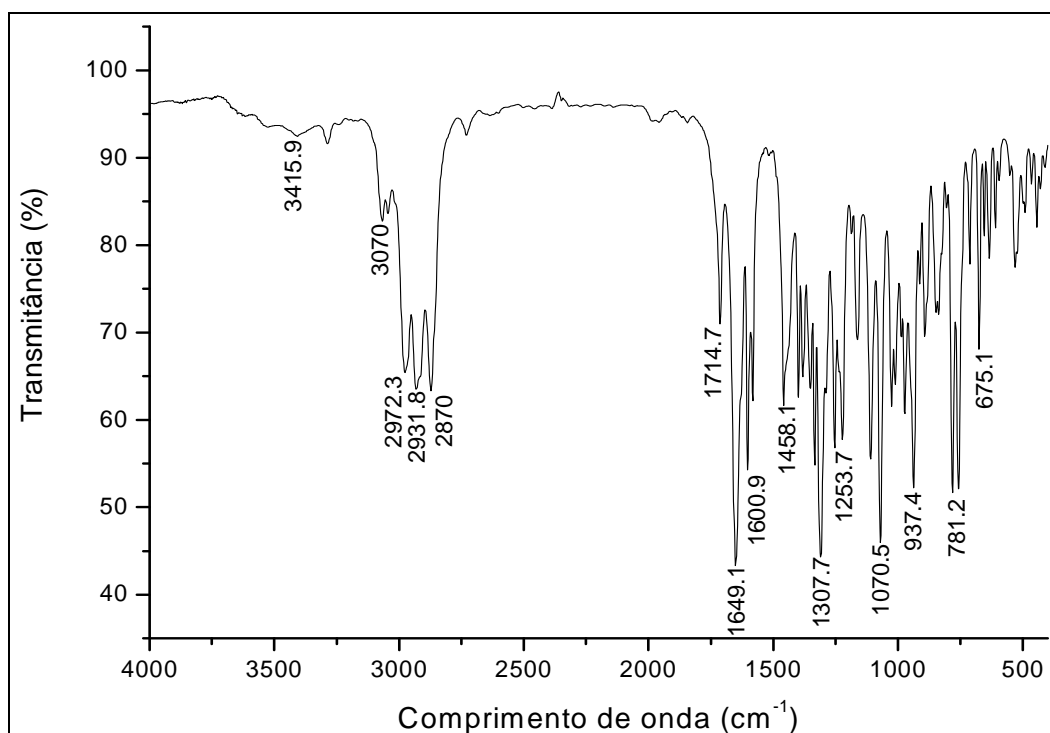
Posição	^1H , δ ; multip.	^1H , δ ; multip.	^{13}C δ	^{13}C δ	HMBC ^1H - ^{13}C
	CDCl_3	C_6D_6	CDCl_3	C_6D_6	
1	-	-	99,4	100,0	-
2	-	-	143,	143,9	-
3	-	-	132,0	132,4	-
4	-	-	183,9	183,6	-
5	8,10 <i>ddd</i> (7,8:1,4:0,5)	8,29 <i>ddd</i> (7,8:1,4:0,5)	126,4	126,7	4, 7, 9
6	7,52 <i>ddd</i> (7,8:7,4:1,3)	7,04 <i>ddd</i> (7,8:7,4:1,3)	129,8	129,9	8, 10
7	7,63 <i>ddd</i> (7,8:7,4:1,4)	7,20 <i>ddd</i> (7,8:7,4:1,4)	132,8	132,5	5, 9
8	7,75 <i>ddd</i> (7,8:1,3:0,5)	7,76 <i>ddd</i> (7,8:1,3:0,5)	125,9	126,5	1, 6, 9, 10
9	-	-	131,7	132,3	-
10	-	-	137,7	138,7	-
2'	3,83 <i>d</i> (6,4)	3,44 <i>d</i> (6,4)	74,8	74,9	3', 4', 6'
	4,00 <i>d</i> (6,4)	3,57 <i>d</i> (6,4)			1, 3', 4'
3'	-	-	80,6	80,4	-
4'	6,44 <i>d</i> (9,7)	5,81 <i>d</i> (9,7)	139,6	139,5	2, 2', 3', 6'
5'	6,72 <i>d</i> (9,7)	6,52 <i>d</i> (9,7)	123,9	124,2	1, 3, 3'
6'	1,70 <i>s</i>	1,18 <i>s</i>	19,5	19,2	2', 3', 4'
1''	3,19 <i>dd</i> (14,5:6,7)	3,46 <i>dd</i> (14,4:7,2)	23,7	24,0	2, 4, 2'', 3''
	3,37 <i>dd</i> (14,5:6,8)	3,26 <i>dd</i> (14,4:6,7)			2, 4, 2'', 3''
2''	5,02 <i>ddqq</i> (6,8:6,7:1,2:0,7)	5,18 <i>ddq</i> (7,2:6,7:1,4)	121,4	122,4	3, 1'', 4'', 5''
3''	-	-	132,6	132,4	-
4''	1,66 <i>d</i> (1,2)	1,52 <i>d</i> (1,4)	25,7	25,7	2'', 3'', 5''
5''	1,77 <i>d</i> (0,7)	1,72 <i>s</i>	17,9	18,1	2'', 3'', 4''
OH	1,56 <i>s</i>	3,45 <i>s</i>	-	-	-

Da mesma forma que as substâncias anteriores, esta é inédita com um esqueleto novo, conseqüentemente outras análises foram realizadas (IV, UV-vis, EM).

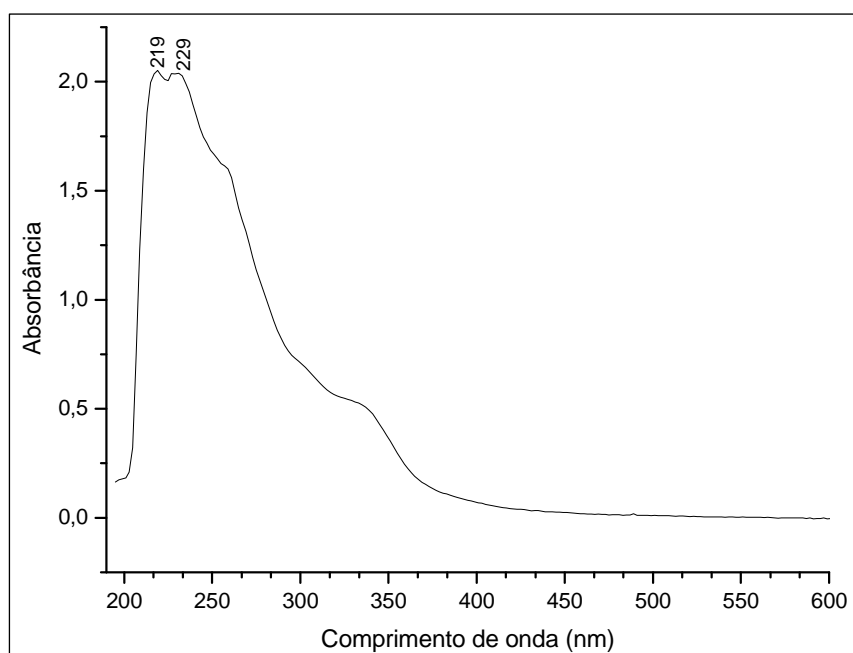
O espectro de infravermelho de **SA4** (E45 – página 61) apresentou bandas características de vibração de deformação axial O-H (3416 cm^{-1}) e C-H de aromático em 2936 cm^{-1} . Em 1649 cm^{-1} há uma banda da deformação axial C=C, e uma banda característica de deformação angular no plano de O-H aparece em 1309 cm^{-1} . Há ainda uma banda em 1070 cm^{-1} característica da deformação axial assimétrica da ligação éster (C-O-C) e outra da deformação angular fora do plano de C-H sendo este carbono sp^2 em 937 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

O espectro de ultravioleta de **SA4** (E46 – página 62) apresentou dois máximos de absorção em 219 e 229 nm, resultando em uma absorvidade molar média de $5129,5\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Estes resultados mostram a presença de duplas ligações conjugadas.

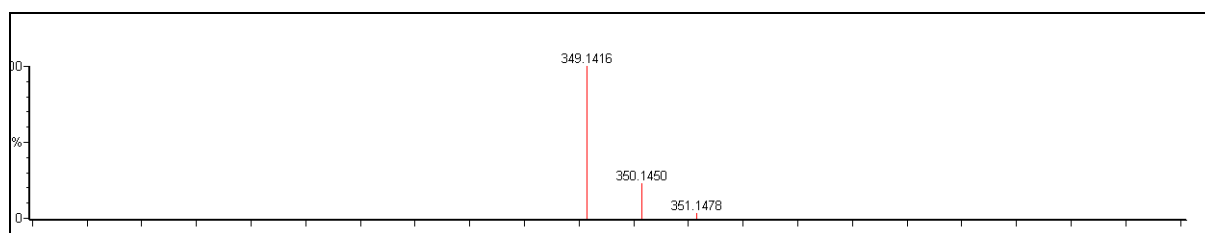
A massa molar foi confirmada através do espectro de massas de alta resolução, obtido pela técnica de ionização de *spray* de elétrons, que mostrou o pico em $m/z\ 349.1416$ (MNa^+) (E47 – página 62). Não foi possível obter o espectro de massas de baixa resolução para esta molécula.



E45. Espectro de infravermelho da substância **SA4**.



E46. Espectro de ultravioleta da substância **SA4**.



E47. Espectro de massas de alta resolução da substância **SA4**.

3.2.3. Estudo conformacional e determinação da estereoquímica absoluta das substâncias SA1, SA2, SA3 e SA4.

Quiralidade é um fator decisivo em muitos aspectos de funcionamento de organismos vivos. Como consequência, esta tem papel importante na indústria farmacêutica, e o desenvolvimento de novos métodos para determinar a configuração absoluta de moléculas quirais é de muito interesse (KWIT *et al.*, 2009). A ausência de simetria tridimensional que caracteriza as moléculas quirais é responsável pelo comportamento de enantiômeros frente a campos eletromagnéticos. O fenômeno de rotação ótica e dicroísmo circular têm sido amplamente utilizados por muitos anos na determinação da configuração absoluta de várias

classes de moléculas quirais. Quando uma nova molécula é obtida, a sua configuração absoluta pode ser determinada comparando-se o seu espectro de dicroísmo circular com o espectro de moléculas semelhantes cuja estereoquímica é conhecida. A análise de raios-X também fornece informações sobre a estereoquímica absoluta, mas exige a obtenção de um monocristal e a molécula deve incorporar quantidade suficiente de um átomo pesado para permitir medidas confiáveis. No caso de compostos não cristalinos, uma alternativa é a síntese total de um estereoisômero conhecido seguido de comparação dos seus espectros com os da amostra. Infelizmente, isto é frequentemente caro e demanda muito tempo. Por essas razões seria de valor inestimável a possibilidade de prever a estereoquímica através de cálculos teóricos confiáveis. Muitos métodos teóricos *ab initio* são bem estabelecidos como ferramentas essenciais para o entendimento e previsão dos fenômenos químicos, como cinética de reação e espectroscopia (CRAWFORD *et al.*, 2007).

O desenvolvimento rápido de novos métodos teóricos e um aumento no poder computacional observado durante a última década levou ao uso de cálculos avançados não somente para modelos, ou compostos simples, mas também para moléculas reais, produtos de síntese, ou ainda substâncias naturais. A abordagem experimental/teórica emerge agora como um método geral e conveniente para a determinação da estereoquímica absoluta, onde a seleção de um método de cálculo adequado é baseada nos dados da literatura e acima de tudo o compromisso entre a precisão e o custo computacional. É conhecido que a conformação das moléculas tem uma influência substancial nas propriedades físicas e químicas. Assim, além da adequação do método computacional usado para calcular as propriedades óticas, a análise conformacional confiável é de extrema importância para se chegar a resultados próximos daqueles experimentais (KWIT *et al.*, 2009).

Recentemente, a aplicação da metodologia *ab initio* da teoria da densidade funcional para calcular estes dados tem aumentado a confiabilidade com estas técnicas computacionais e conseqüentemente sua utilidade na determinação da configuração absoluta de moléculas quirais (McCANN & STEPHENS, 2006).

Devido ao fato dos compostos isolados possuírem um esqueleto inédito e não usual, e os espectros de RMN de ^1H não terem fornecido informação suficiente para determinar a estereoquímica relativa destas moléculas, cálculos computacionais de densidade funcional e rotação ótica foram realizados para encontrar a conformação menos energética e as configuração relativa e absoluta das moléculas.

O anel de sete membros das ϵ -lactonas **SA1**, **SA2** e **SA3**, pode adotar duas conformações diferentes, com o grupo metila em *pseudoaxial* ou *pseudoequatorial* (Figura 10 –

página 64). Estudos computacionais de modelagem molecular mostraram que a conformação menos energética relativa às outras (0.000 kJmol^{-1}), é a que possui a metila em *pseudoequatorial* (Tabela 09 – página 65), o que é mais provável de ocorrer. Esta conformação foi confirmada por experimentos de NOE 1D. Irradiação seletiva da frequência de ressonância do hidrogênio H-4' (E48 – página 65) causou somente aumento do sinal dos hidrogênios da metila. Além disso, irradiação seletiva do H-3' (E49 – página 66) não causou aumento do sinal de H-4'.

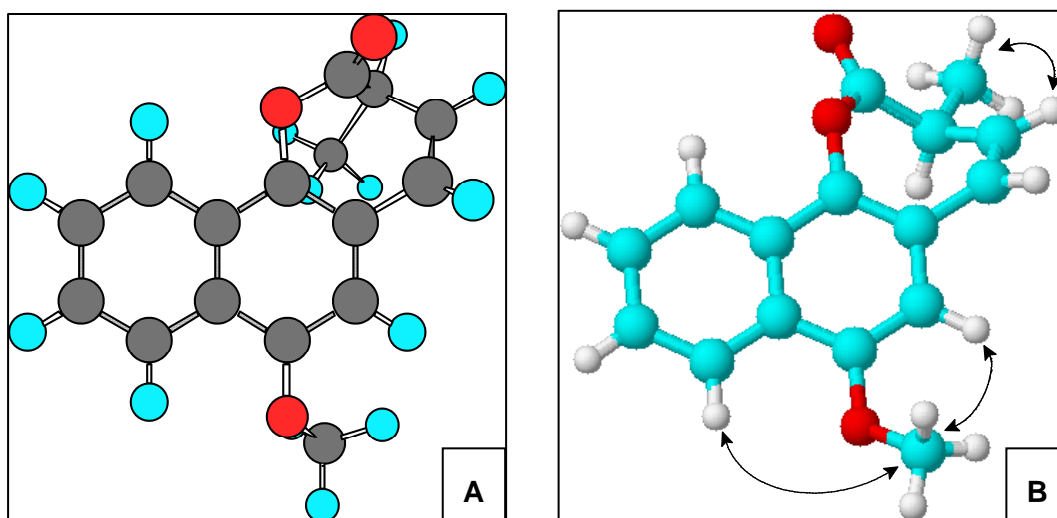
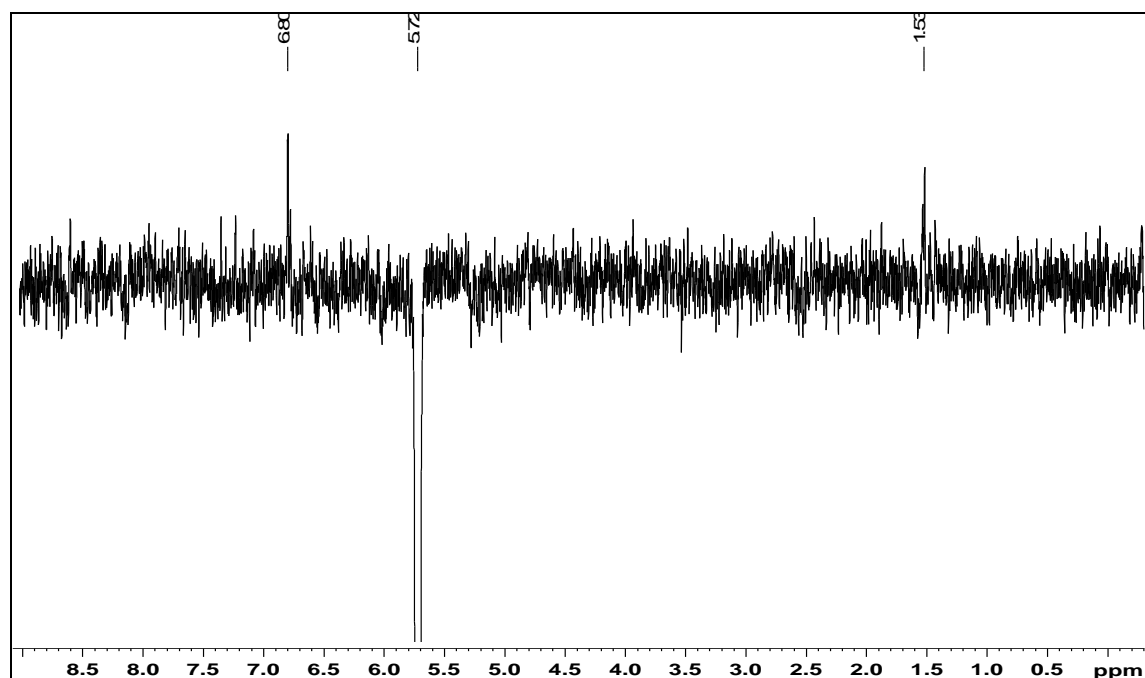


Figura 10. Exemplos da conformação mais energética (A), menos energética e dados de NOE 1D (B) para a substância **SA2**, os quais se repetem para as substâncias **SA1** e **SA3**.

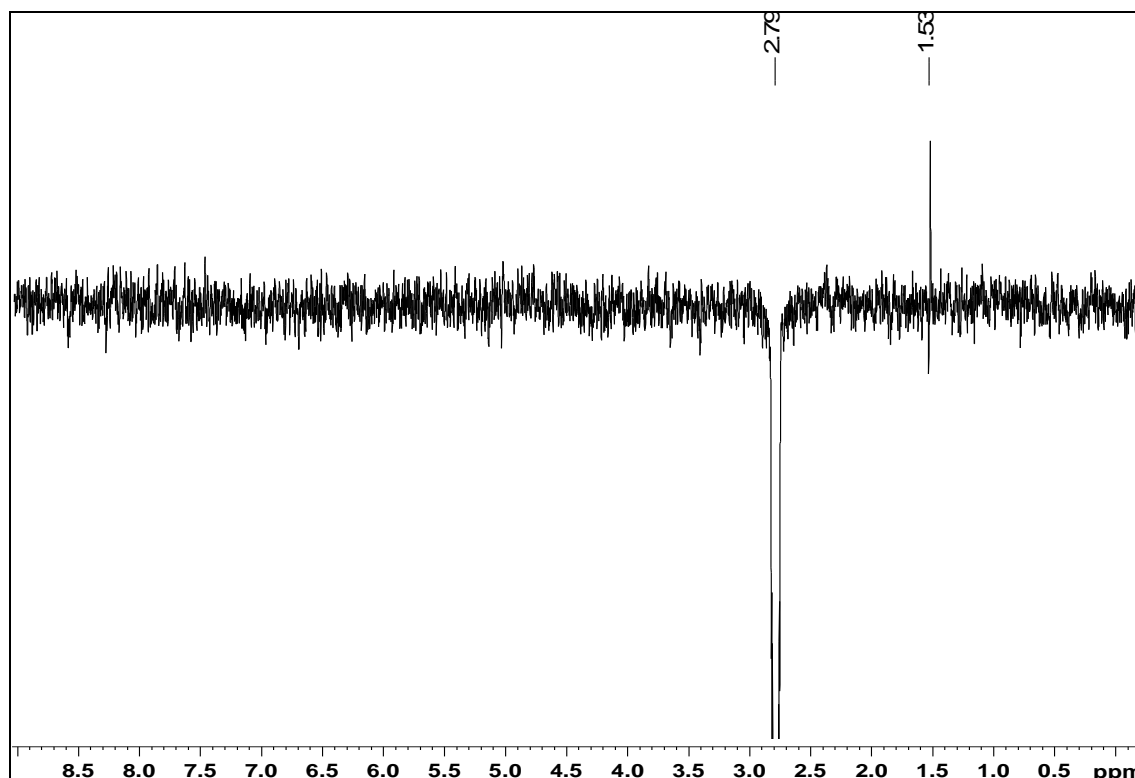
Após a otimização da geometria a rotação ótica dos isômeros *R* e *S* foi calculada, usando o método proposto por Pedersen e Hansen (PEDERSEN & HANSEN, 1995). Os resultados mostraram que o isômero *S* de **SA1**, **SA2** e **SA3** deve ser dextrorrotatório. Como o sinal obtido da análise experimental destes compostos foi positivo, a configuração absoluta foi assinalada como 3'S (Tabela 09 - página 65).

Tabela 09. Dados de estabilidade e rotação ótica de **SA1**, **SA2** e **SA3**.

Posição da metila	Energia relativa (kJmol ⁻¹)	α_D (°)	
		Teórico	Experimental
SA1 (<i>R</i>) equatorial	0.000	- 149.950	
SA1 (<i>R</i>) axial	11.179	- 23.150	
SA1 (<i>S</i>) equatorial	0.000	+ 149.950	+ 37.60
SA1 (<i>S</i>) axial	26.956	-5.390	
SA2 (<i>R</i>) equatorial	0.000	- 117.440	
SA2 (<i>R</i>) axial	11.273	- 61.090	
SA2 (<i>S</i>) equatorial	0.000	+ 116.850	+ 53.85
SA2 (<i>S</i>) axial	15.485	- 81.500	
SA3 (<i>R</i>) equatorial	0.000	- 182.990	
SA3 (<i>R</i>) axial	11.131	+ 28.010	
SA3 (<i>S</i>) equatorial	0.000	+ 183.130	+ 52.00
SA3 (<i>S</i>) axial	16.848	- 0.970	



E48. Espectro de NOE (CDCl₃, 400 MHz) da **SA1** irradiando o hidrogênio H-4' (5,72 ppm).



E49. Espectro de NOE (CDCl₃, 400 MHz) da **SA1** irradiando o hidrogênio H-3' (2,79 ppm).

A substância **SA4** tem o mesmo esqueleto carbônico que **SA1**, **SA2** e **SA3** e por isso foram realizados além de experimentos de RMN, cálculos computacionais de rotação ótica e densidade funcional para determinar a conformação menos energética e a configuração absoluta.

A configuração relativa de **SA4** poderia ter sido determinada por RMN de ¹H se os carbonos quirais da molécula não fossem quaternários. Sem a presença de hidrogênios nestes, os resultados iniciais apresentados por esta técnica foram inconclusivos, por isso, outros experimentos (RMN, análise de modelos moleculares e cálculos computacionais) foram realizados para a obtenção destes dados.

Os grupos hidroxila desta molécula podem estar em relação *trans* ou *cis*. Para os isômeros *trans* (uma hidroxila para cada lado do plano da molécula), estudos de modelos moleculares e computacional *ab initio*, mostraram que, devido ao impedimento estérico entre a hidroxila (C-1) e a metila (C-3') (Figura 11 – página 67), somente uma conformação é possível, com a metila em *pseudoequatorial* e a hidroxila em *pseudoaxial*. Entretanto, os aumentos de intensidade de sinal observados nos experimentos de RMN de NOE 1D foram incompatíveis com esta possibilidade. Por outro lado, os isômeros *cis* (duas hidroxilas para o mesmo lado do

plano da molécula) podem adotar duas conformações principais, com a hidroxila em C-3' em *pseudoaxial* ou *pseudoequatorial*. Para o primeiro ocorre uma ligação de hidrogênio intramolecular com a hidroxila em C-1, mas nenhum sinal típico (~12 ppm) foi observado nos espectros de RMN de ^1H adquiridos tanto em CDCl_3 quanto em C_6D_6 . Adicionalmente, os dados obtidos dos experimentos de NOE foram incompatíveis com este conformero, mas em total acordo com o outro (hidroxila em *pseudoequatorial*). A irradiação seletiva do hidrogênio em 3,83 ppm (E50 – página 68) mostrou uma forte intensificação do sinal da metila (1,70 ppm) e uma fraca intensificação do sinal de H-8. Além do mais, uma irradiação seletiva do hidrogênio em 4,00 ppm (E51 – página 68) causou um aumento do sinal de H-4' e somente um pequeno aumento do sinal da metila, da mesma forma que a irradiação seletiva da metila (1,70 ppm) causou um aumento significativo do sinal em 3,83 ppm (E53 – página 69). Estes resultados suportam o isômero *cis* com a metila na posição *pseudoaxial* e a hidroxila em *pseudoequatorial*. E também, irradiação seletiva de H-2'' (E52 – página 69) causou aumento do sinal de H-5', sugerindo que o grupo prenila está na posição indicada na Figura 11– página 67.

Similarmente às ϵ -lactonas, utilizando o método proposto por Pedersen e Hansen (PEDERSEN & HANSEN, 1995), cálculos de rotação ótica predisseram que o isômero 1*R*, 3'*S* deve ser levorotatório (-49.29°). O composto **SA4** mostrou um desvio ótico negativo (-27.27°), então a configuração absoluta foi assinalada como 1*R*, 3'*S*.

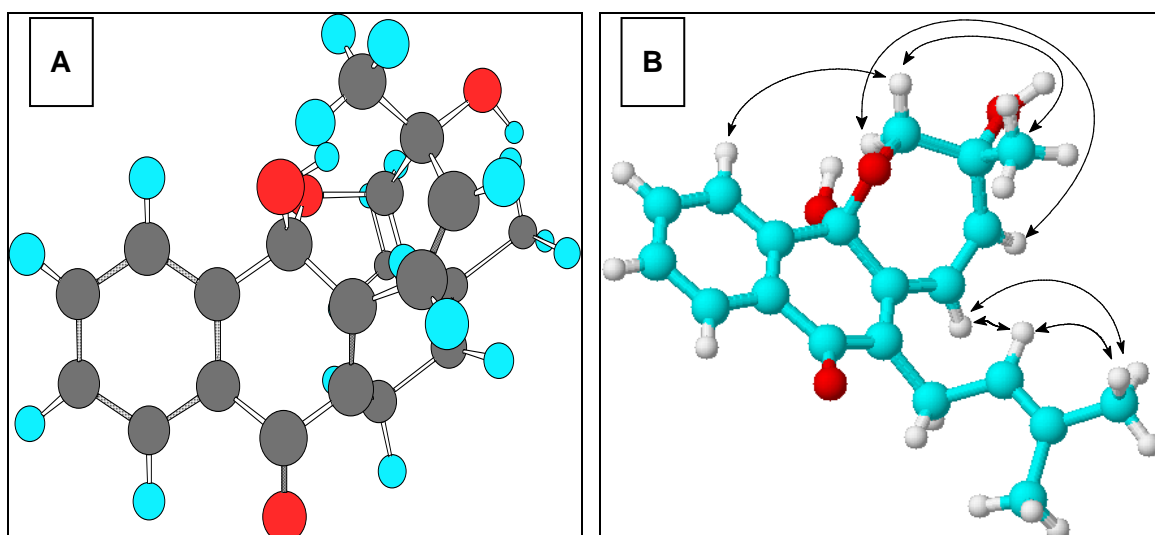
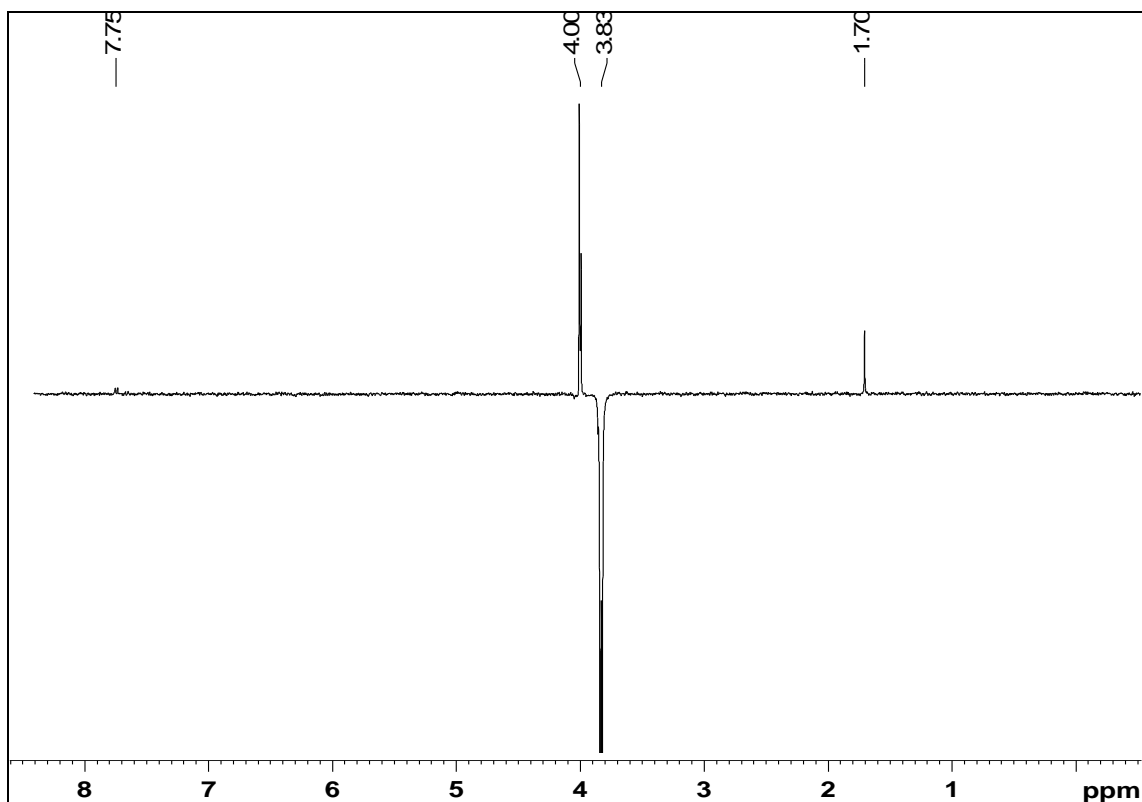
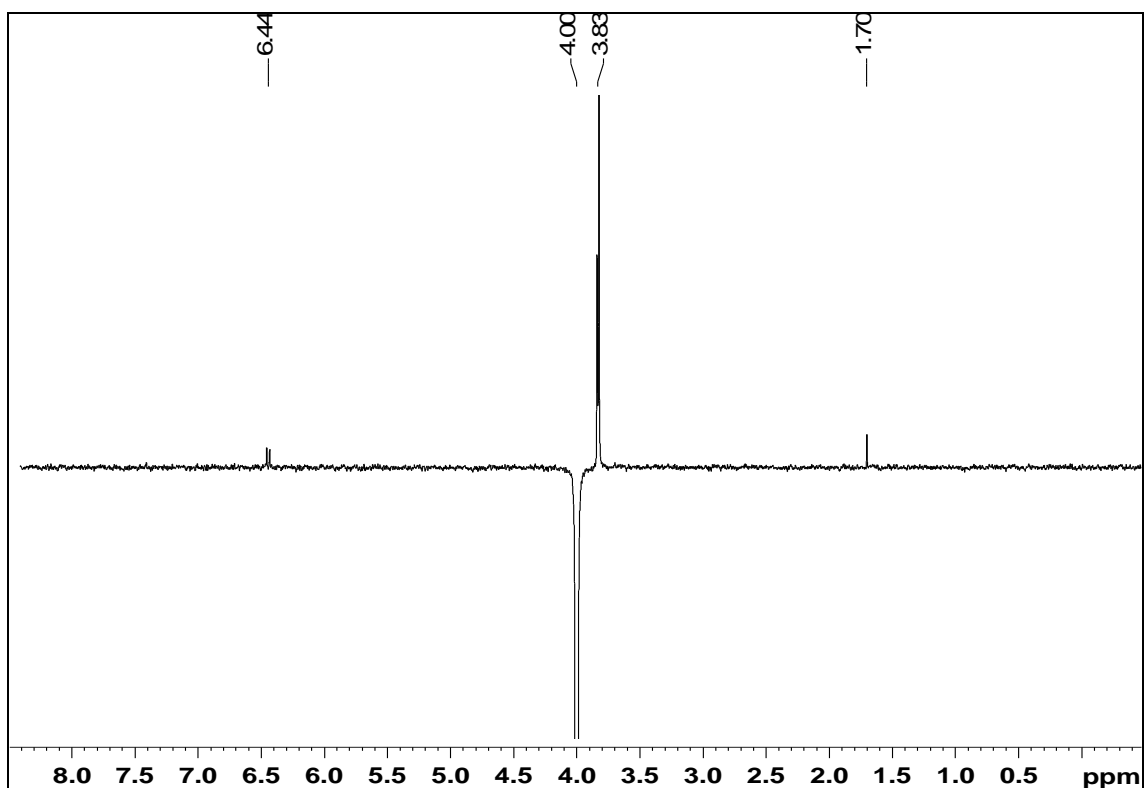


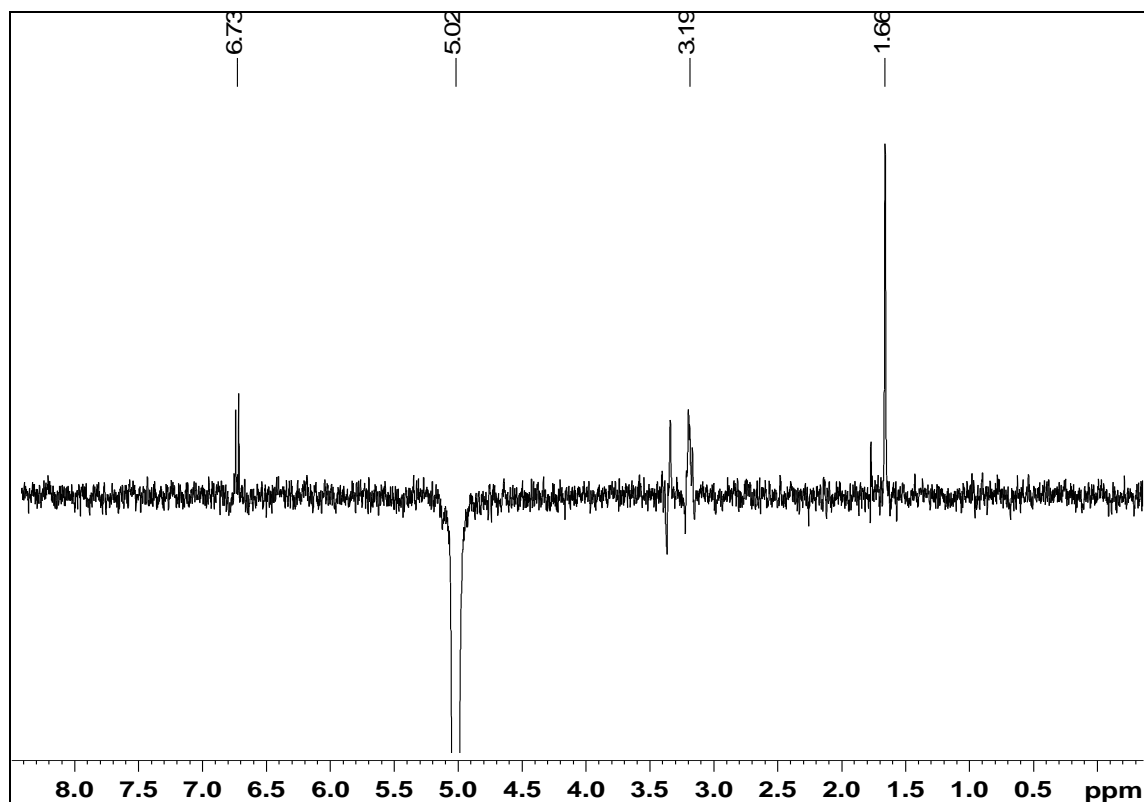
Figura 11. Exemplo da conformação mais energética (A), menos energética e dados de NOE 1D (B) da substância **SA4**.



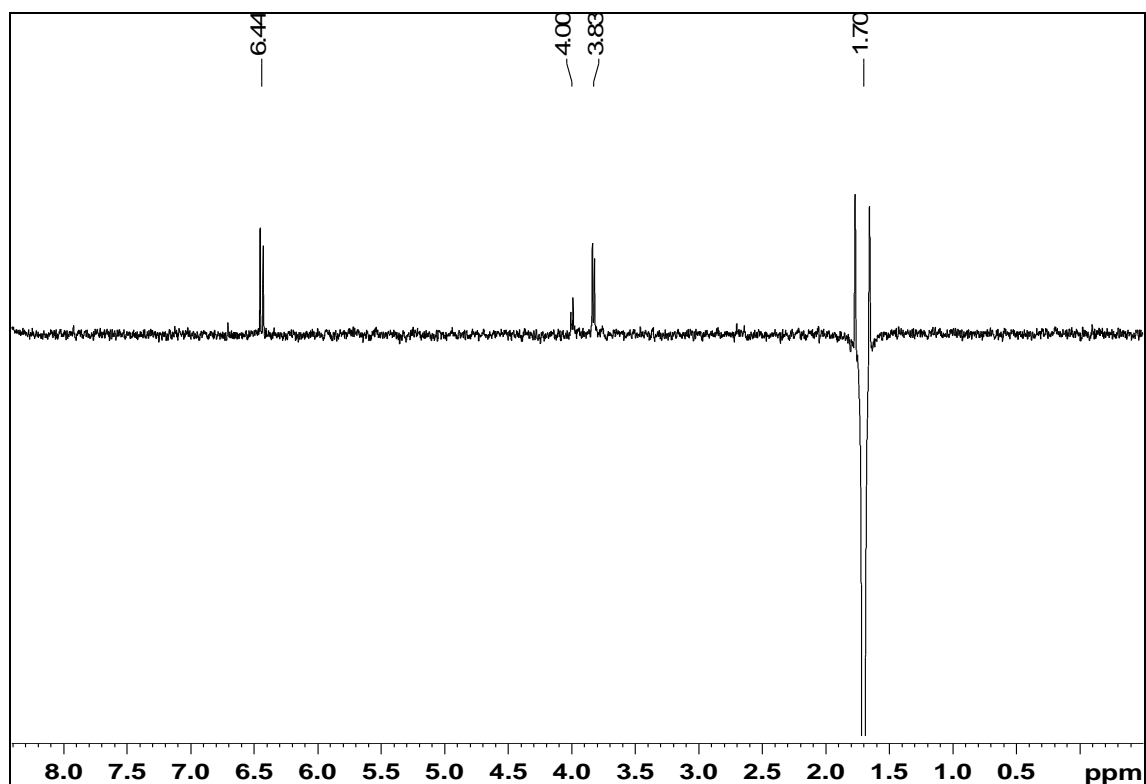
E50. Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de **SA4** irradiando o hidrogênio em 3,83 ppm.



E51. Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de **SA4** irradiando o hidrogênio em 4,00 ppm.



E52. Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de **SA4** irradiando o hidrogênio em 5,02 ppm.



E53. Espectro de NOE (CDCl_3 , 400 MHz) de **SA4** irradiando o hidrogênio em 1,70 ppm.

As substâncias **1-4** foram isoladas pela primeira vez neste trabalho e os seus dados espectrométricos foram publicados recentemente no *Journal of Natural Products* (VERDAN *et al.*, 2010).

3.2.4. Identificação das substâncias **SA5**, **SA6**, **SA7** e **SA8**

O composto **SA5** foi isolado como um sólido alaranjado. O seu espectro de RMN de ^1H (E54 – página 72) mostrou sinais de um grupo metila ligado a anel aromático em 2,53 ppm (*s*), uma metoxila em 3,99 ppm (*s*) e de seis hidrogênios de anéis aromáticos (7,27, 7,59, 7,72, 8,09, 8,20 e 8,26 ppm) (E55-57 – página 73-74). Aparecem ainda sinais de uma impureza alifática na região de 0,80-1,25 ppm e um sinal largo em 1,58 ppm que pode ser atribuído a água presente no solvente. Os dados de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (E58 – página 74) mostraram a presença de 12 sinais correspondentes a dois anéis aromáticos (109,9-164,2 ppm), dois sinais de grupos carbonila (182,1 e 183,6 ppm), um sinal de grupo metoxila (55,9 ppm) e um sinal de grupo metila (21,8 ppm). A presença de dois grupos carbonila e doze carbonos de anéis aromáticos sugeriram um esqueleto de antraquinona para essa substância. A análise da multiplicidade e das constantes de acoplamento dos hidrogênios dos sistemas aromáticos levou a conclusão que havia dois anéis aromáticos trissubstituídos nas posições 1, 2 e 4, confirmando a presença de uma antraquinona. A posição dos grupos substituintes foi determinada por experimentos de HSQC e HMBC (Tabela 10 – página 71, E59-60 – página 75). No mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância pode-se observar que os hidrogênios da metoxila (3,99 ppm) mostraram correlação apenas com o carbono em 164,2 ppm, enquanto que o hidrogênio H-6 (7,27 ppm) mostrou correlação com os carbonos C-7, C-8 e C-10a, confirmando a posição da metoxila como sendo no carbono C-7. Também por este experimento pode-se determinar a posição da metila em C-2, pois os seus hidrogênios mostraram uma correlação muito forte com C-2, e uma um pouco mais fraca com C-1 e C-3. A posição relativa dos grupos carbonila foi determinada pelas correlações dos hidrogênios H-1, H-4, H-5 e H-8 com estas (C-9 e C-10), os hidrogênios H-1 (8,09 ppm) e H-8 (7,72 ppm) mostraram correlação com a carbonila C-9 (183,6 ppm), enquanto que os hidrogênios H-4 (8,20 ppm) e H-5 (8,26 ppm) mostraram correlação com a carbonila C-10 (182,1 ppm) (Figura 12 – página 72). Desse modo a estrutura de **SA5** foi determinada como sendo 7-metoxi-2-metilantraquinona (**V**). Essa estrutura foi confirmada por comparação com dados da literatura. Esta substância já foi isolada de outra espécie de *Sinningia*, *S. speciosa* (VERDAN *et al.*, 2009).

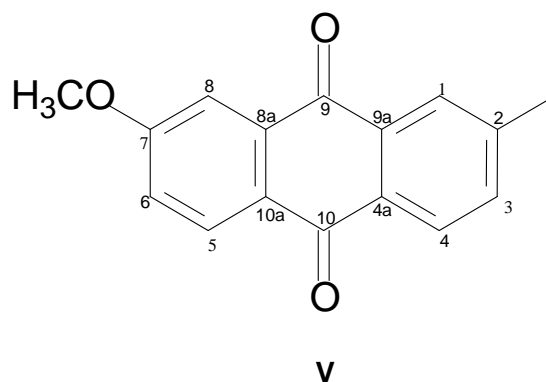


Tabela 10. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de **SA5** e comparação com dados da literatura (1 VERDAN *et al.*, 2009).

Posição	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^1H , δ ; multip. (J em Hz) 1	^{13}C δ	^{13}C δ^1	HMBC ^1H - ^{13}C
1	8,09 dq (1,8:0,6)	8,09 d (0,6)	127,4	127,5	3, 4a, 9, CH_3
2	-	-	144,7	144,7	-
3	7,59 ddd (7,9:1,8:0,7)	7,60 dd (7,9: 0,6)	135,0	135,0	1, 4a, CH_3
4	8,20 d (7,9)	8,20 d (7,9)	127,3	127,4	2, 9a, 10
4a	-	-	131,7	131,4	-
5	8,26 d (8,6)	8,26 d (8,6)	129,6	129,7	7, 8a, 10
6	7,27 dd (8,6:2,7)	7,27 dd (8,6:2,7)	121,2	121,1	7, 8, 10a
7	-	-	164,5	164,2	-
8	7,72 d (2,7)	7,73 d (2,7)	109,9	109,9	6,7,9, 8a,10a
8a	-	-	135,8	139,7	-
9	-	-	183,8	183,6	-
9a	-	-	133,6	133,4	-
10	-	-	182,1	182,1	-
10a	-	-	127,2	127,2	-
CH_3	2,53 s/	2,54 s/	21,8	24,9	1, 2, 3
OH	-	-	-	-	-
OCH_3	3,99 s	3,99 s	56,1	55,9	7

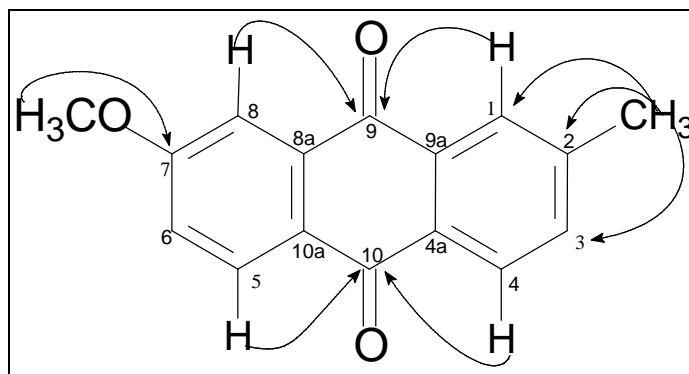
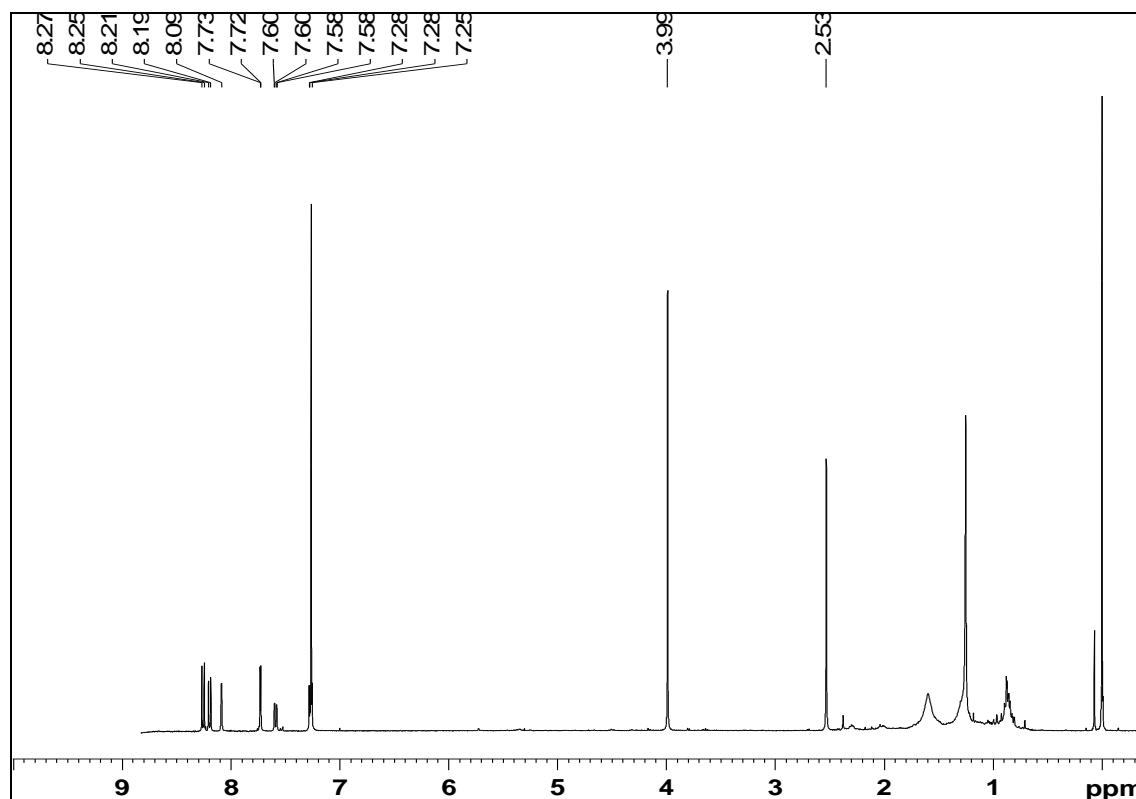
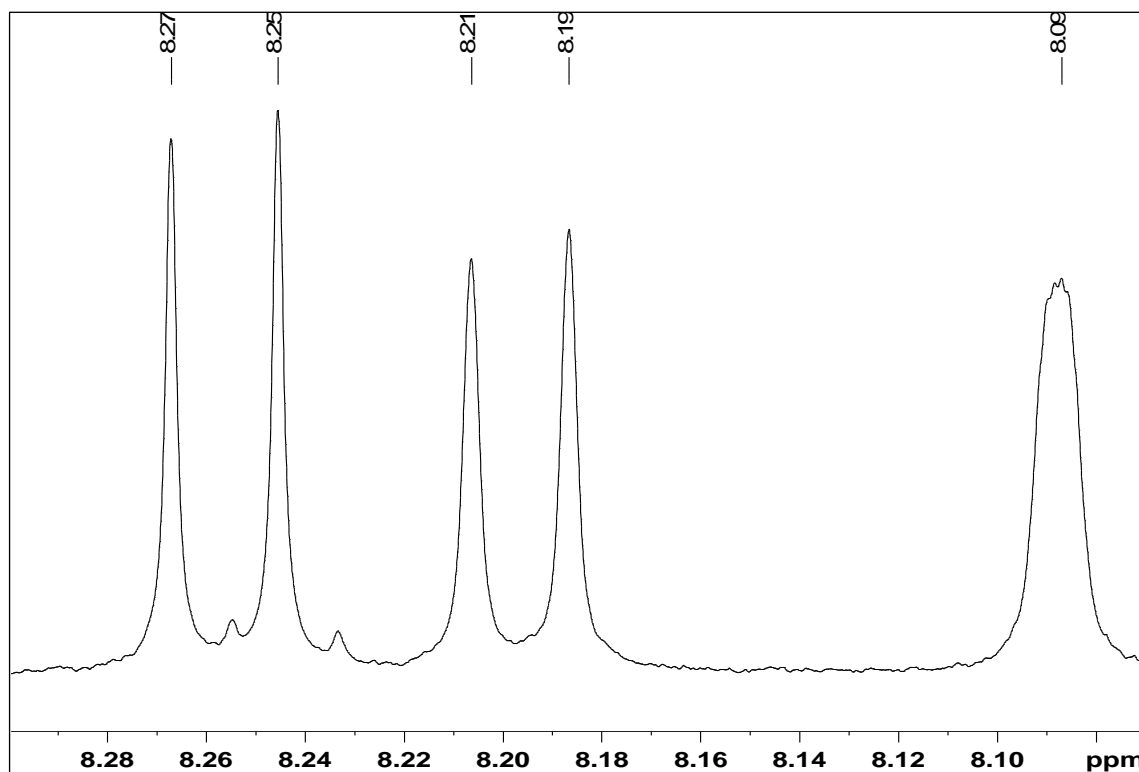


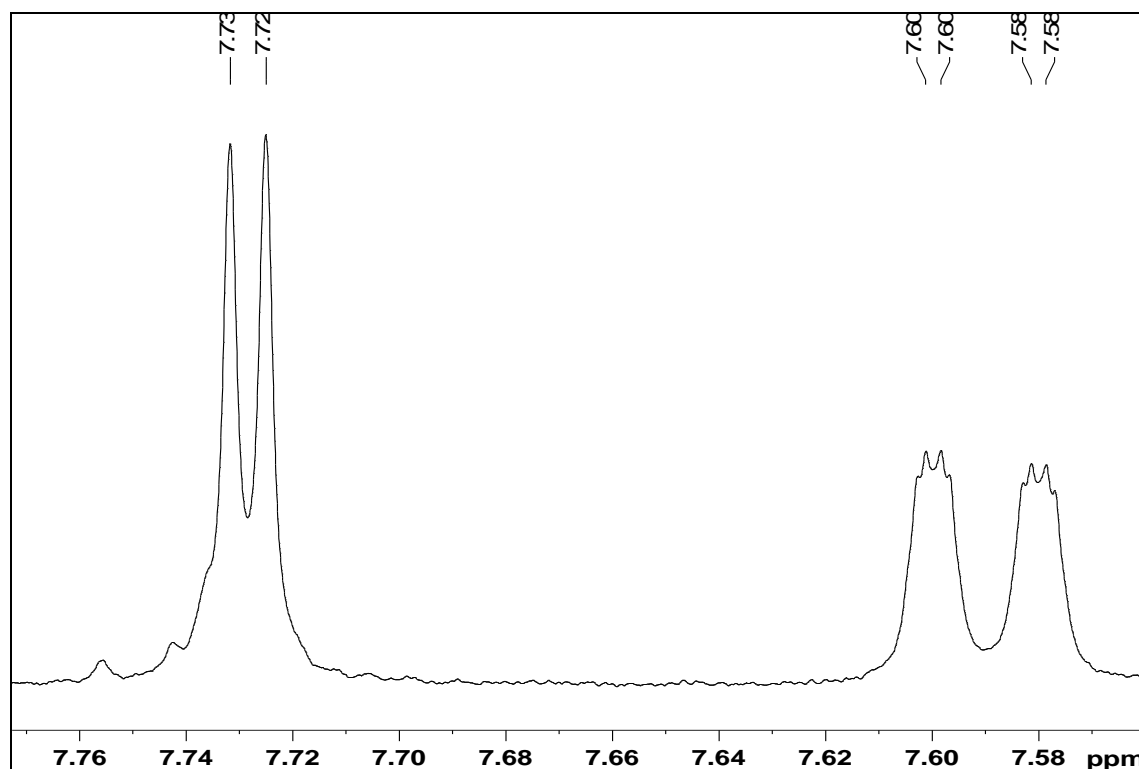
Figura 12. Principais correlações observadas no mapa de correlações ^1H - ^{13}C a longa distância da **SA5**.



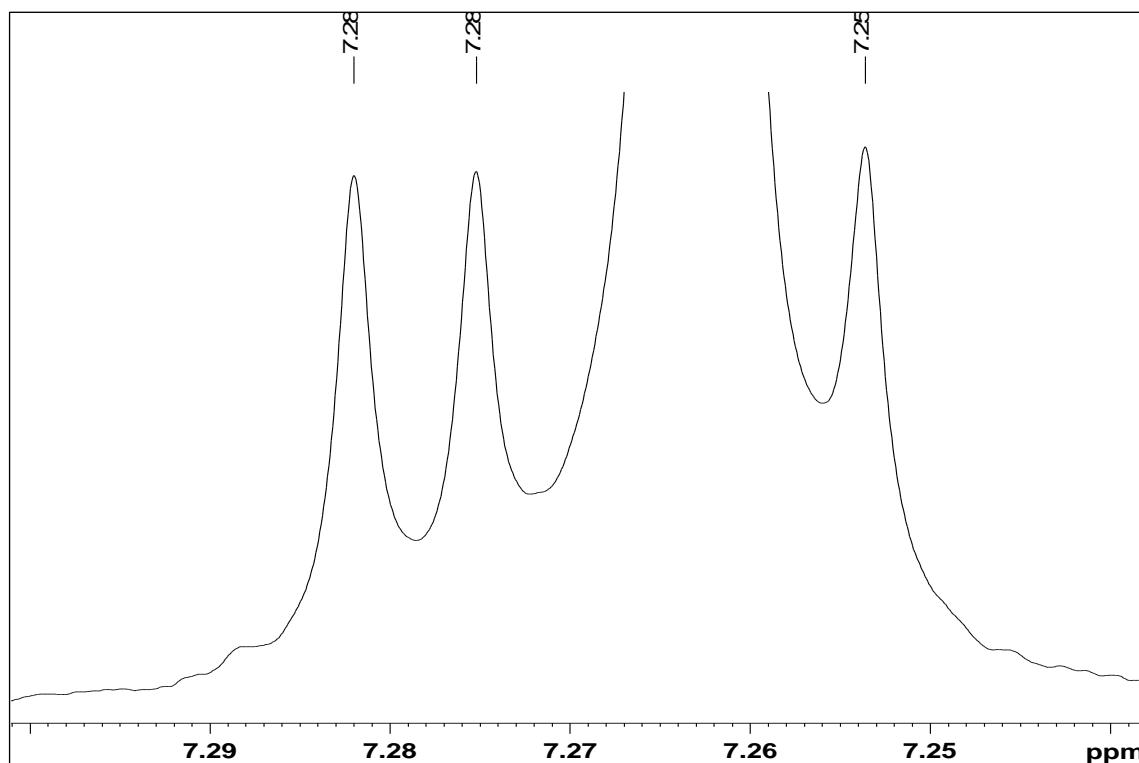
E54. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA5**.



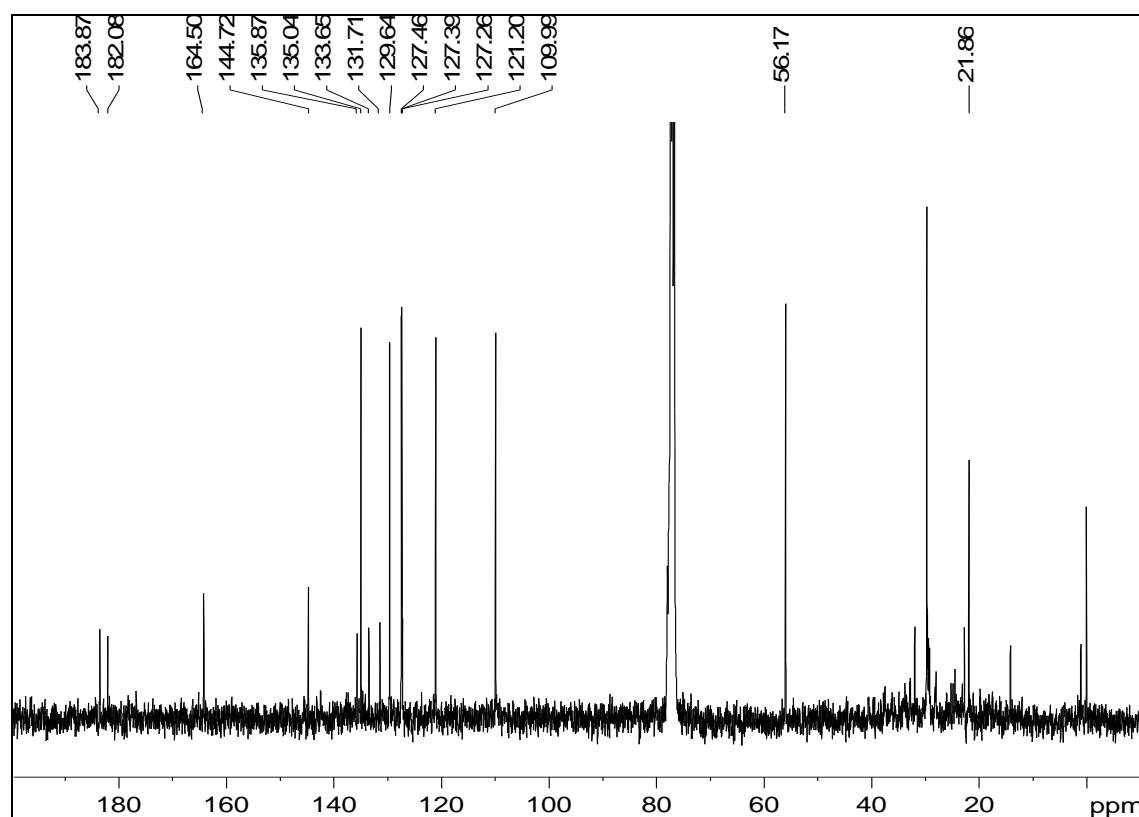
E55. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (8,08-8,28 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SA5**.



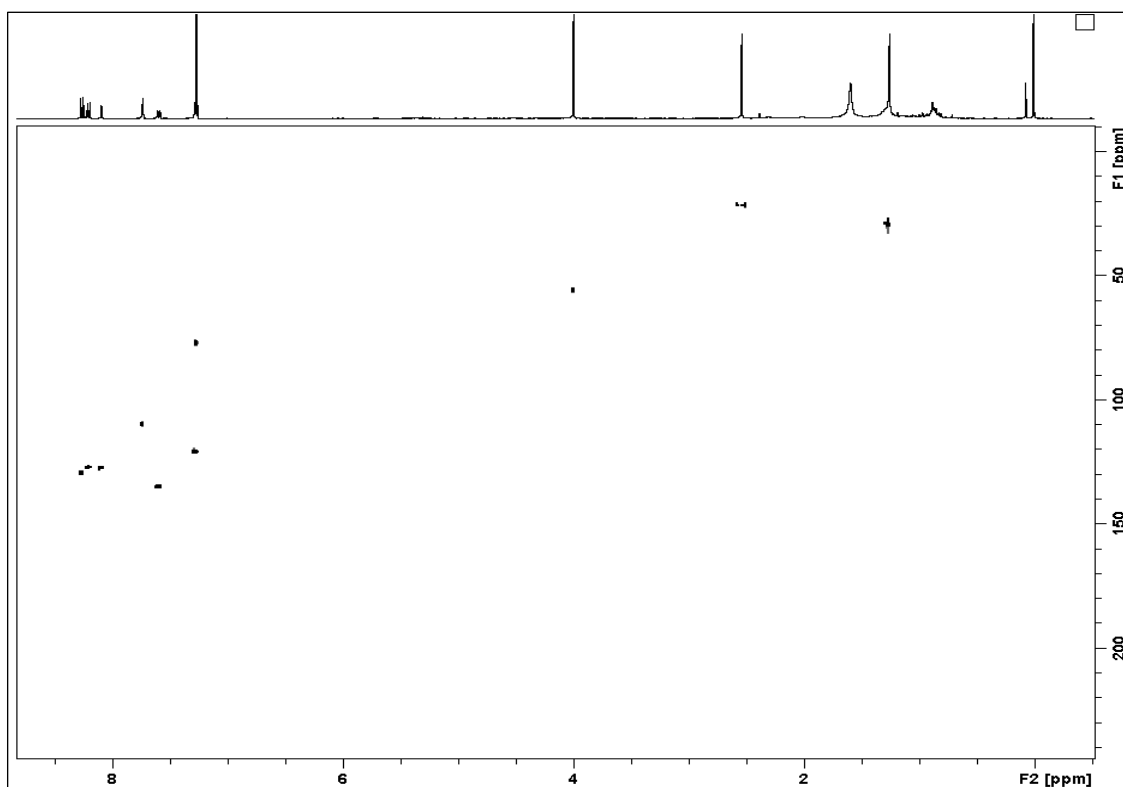
E56. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,56-7,77 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SA5**.



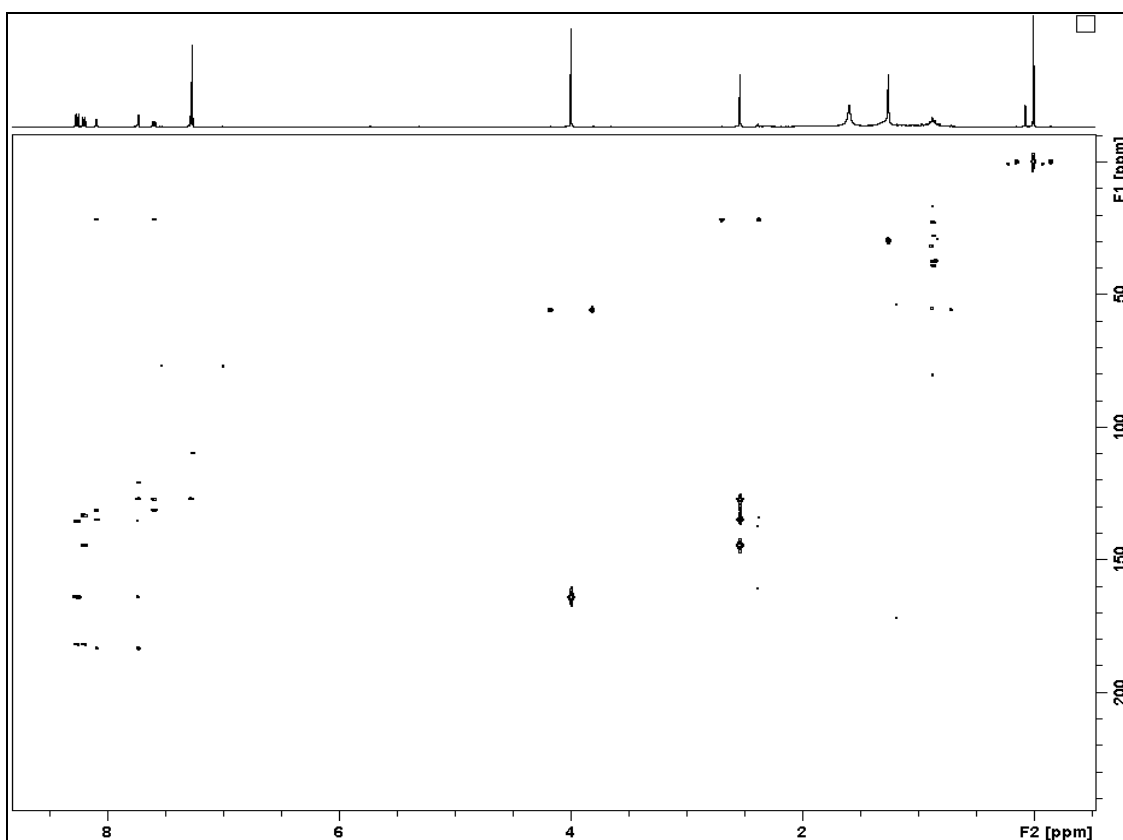
E57. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,24-7,30 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SA5**.



E58. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 da **SA5**.

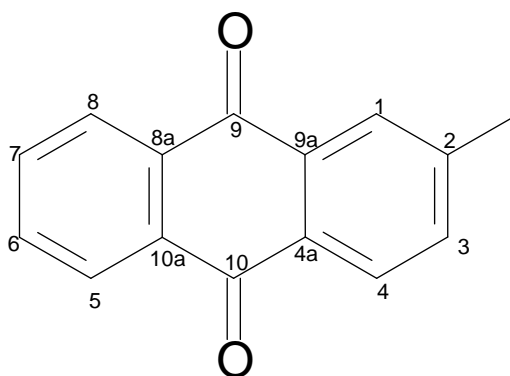


E59. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA5**.



E60. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA5**.

O composto **SA6** também foi isolado como um sólido amarelo. O seu espectro de RMN de ^1H (E61 – página 78) mostrou sinais de um grupo metila ligado a anel aromático em 2,55 ppm (*s*) e de sete hidrogênios aromáticos (7,61-8,31 ppm), sendo muito similar à substância **SA5**. Aparecem ainda sinais de uma impureza alifática na região de 0,80-1,25 ppm. Os dados de RMN de ^{13}C foram obtidos pelo experimento de HMBC (E62 – página 78), no qual foram observados 12 sinais correspondentes a dois anéis aromáticos (126,6-145,5 ppm), dois sinais de grupos carbonila (183,1 e 183,6 ppm) e um sinal de grupo metila (21,8 ppm). A presença de dois grupos carbonila e doze carbonos aromáticos sugeriram também um esqueleto de antraquinona para essa substância. A análise da multiplicidade e das constantes de acoplamento dos hidrogênios aromáticos sugeriu que a metila está na posição 2 (Tabela 11 – página 77). O hidrogênio em 8,11 ppm se desdobra em um *dq* com uma constante de acoplamento *meta* (1,8 Hz) com H-3 e uma constante menor (0,6 Hz) que caracteriza uma correlação a longa distância com os hidrogênios da metila. Adicionalmente o hidrogênio H-4 em 8,22 ppm não possui uma constante de acoplamento *meta* o que sugere a ausência de hidrogênio na posição 2 confirmando a posição da metila em C-2. Isto também pode ser visualizado pelo experimento de HMBC (Figura 13 – página 77) no qual os hidrogênios da metila mostraram uma forte correlação com C-2 (145,5 ppm), confirmando a estrutura da **SA6** como sendo 2-metil-antraquinona (**VI**). Essa estrutura foi confirmada por comparação com dados da literatura. Esta antraquinona já foi isolada anteriormente do tronco de *Morinda lucida* (Rubiaceae) (ADESOGAN, 1973), do extrato metanólico das hastes de *Chirita longgangensis* var. *hongyao* (Gesneriaceae) (WANG *et al.*, 2006) e dos caules de *Tectona grandis* (Verbenaceae), da qual recebeu o nome de tectoquinona (MOREIRA *et al.*, 2006).



VI

Tabela 11. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de **SA6** e comparação com dados da literatura (1 MOREIRA *et al.*, 2006).

Posição	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^1H , δ ; multip. (J em Hz) ¹	^{13}C δ	^{13}C δ^1	HMBC ^1H - ^{13}C
1	8,11 <i>dq</i> (1,8:0,6)	8,11 <i>d</i> (1,3)	127,5	127,4	3, 4a, CH_3
2	-	-	145,5	145,2	-
3	7,61 <i>ddd</i> (7,9:1,8:0,7)	7,60 <i>d</i> (8,0)	135,1	134,9	2, 4, 4a, CH_3
4	8,22 <i>d</i> (7,9)	8,20 <i>dd</i> (8,0:1,3)	127,4	127,5	2, 4a, 9a
4a	-	-	131,2	131,3	-
5	8,31 <i>m</i>	8,31 <i>m</i>	126,6	127,1	7, 8a, 10
6	7,79 <i>m</i>	7,79 <i>m</i>	133,9	133,9	8, 10a
7	7,79 <i>m</i>	7,79 <i>m</i>	133,9	134,0	5, 8a
8	8,31 <i>m</i>	8,31 <i>m</i>	126,6	127,1	6, 9, 10a
8a	-	-	133,8	133,6	-
9	-	-	183,6	183,4	-
9a	-	-	133,4	133,4	-
10	-	-	183,1	183,0	-
10a	-	-	133,8	133,6	-
CH_3	2,55 <i>s</i>	2,54 <i>s</i>	21,8	21,9	1, 2, 3

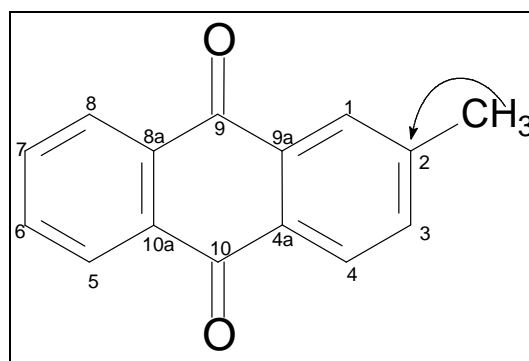
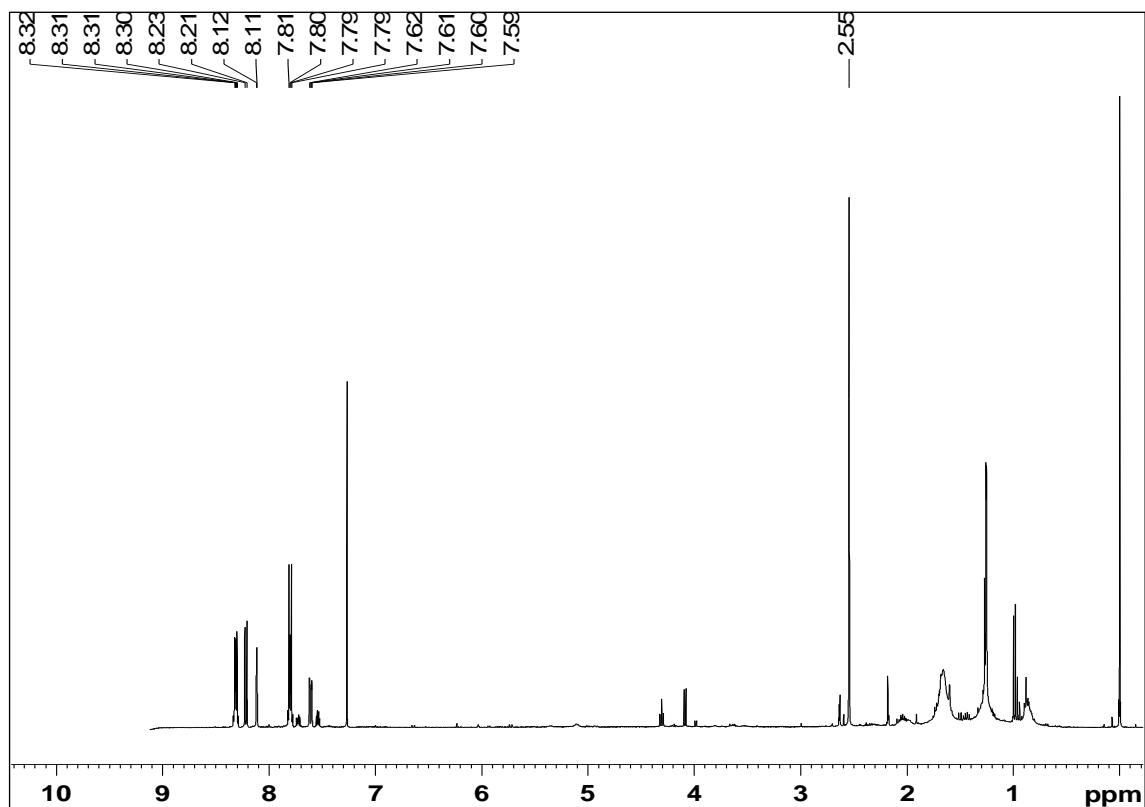
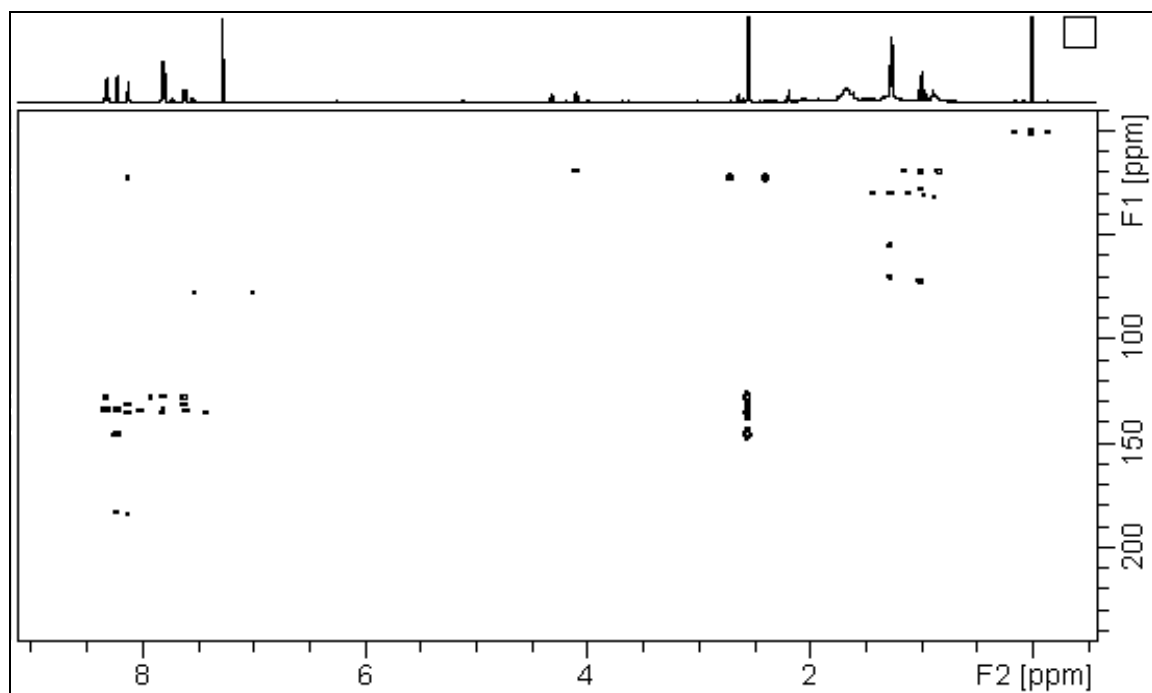


Figura 13. Principal correlação observada no espectro de HMBC de **SA6**.

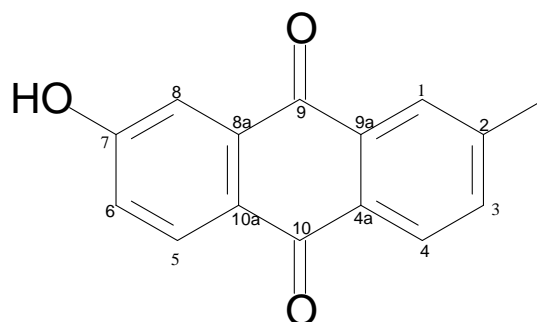


E61. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA6**.



E62. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA6**.

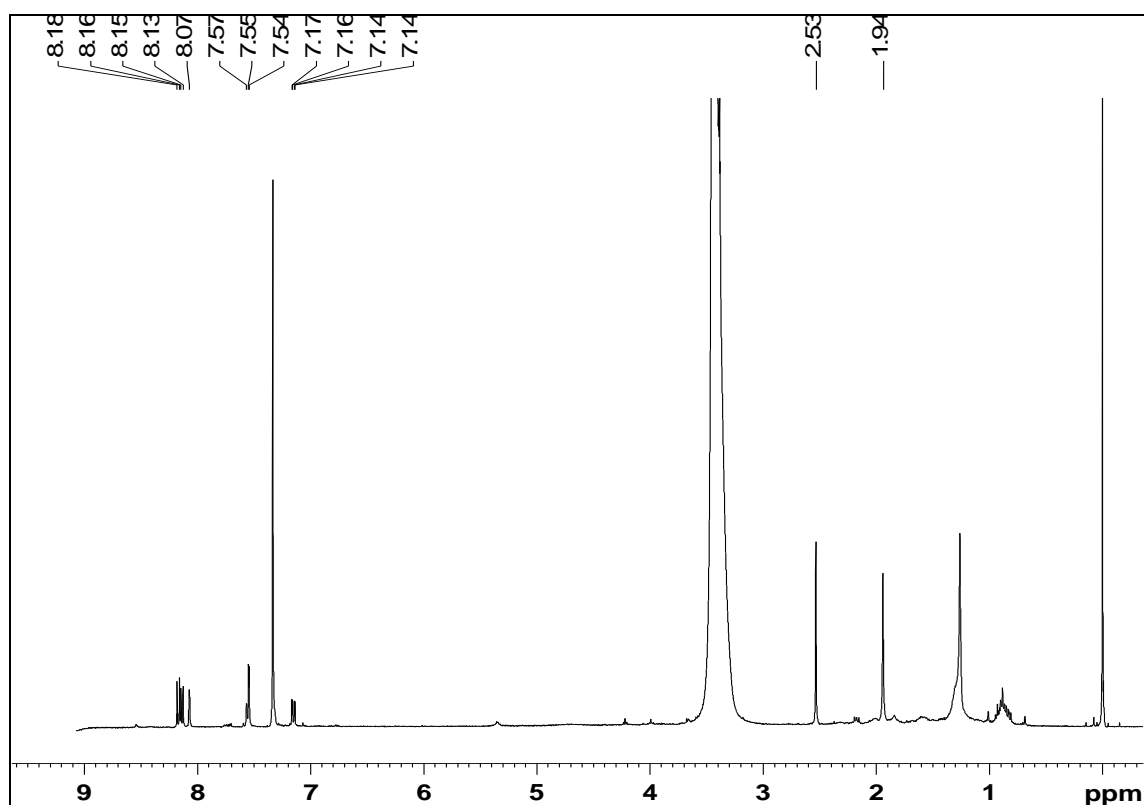
A substância **SA7** foi isolada como um sólido vermelho. Os espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (E63-64 – página 81) mostraram-se muito similares aos da **SA5**. A principal diferença é a presença de uma hidroxila (1,94 ppm) e a ausência da metoxila. Com base nos dados de HMBC (Tabela 12 – página 80) confirmou-se a estrutura desta substância como 7-hidroxi-2-metilantraquinona (**VII**). Este composto já foi isolada do extrato em clorofórmio das raízes de *Rubia tinctorum* (Rubiaceae) (KAWASAI *et al.*, 1990) e também do extrato em metanol das hastes de *Chirita longgangensis* var. *hongyao* (Gesneriaceae) (WANG *et al.*, 2006).



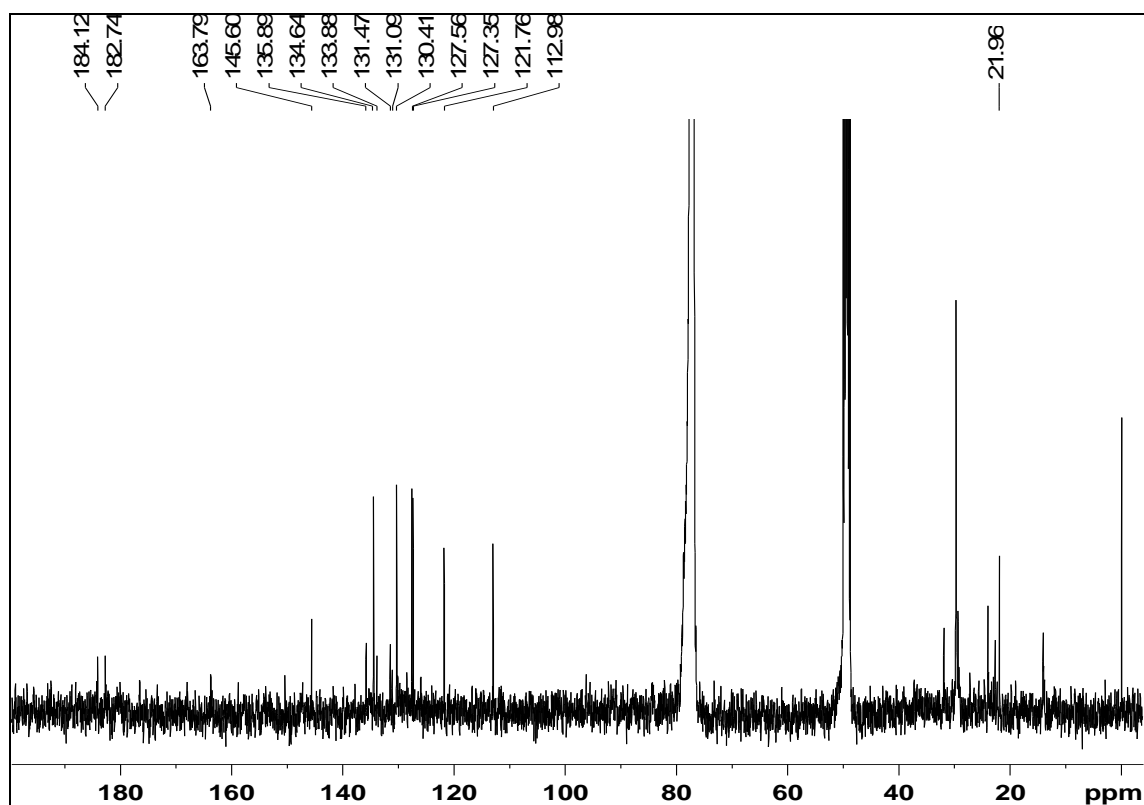
VII

Tabela 12. Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz, CDCl_3 + MeOH-D_4) de **SA7** e comparação com dados da literatura em DMSO-D_6 (1 KAWASAKI *et al.*, 1990).

Posição	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^1H , δ ; multip. (J em Hz) ¹	^{13}C δ	^{13}C δ^1	HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
1	8,07 <i>d</i> (1,2)	7,92 <i>m</i>	127,5	127,1	3, 4a, 9
2	-	-	145,6	145,0	-
3	7,56 <i>dd</i> (7,9:1,2)	7,68 <i>d</i> (7,8)	135,8	135,5	1, 4a, CH_3
4	8,13 <i>d</i> (7,9)	8,03 <i>d</i> (7,8)	127,3	127,1	2, 9a, 10
4a	-	-	131,5	131,3	-
5	8,17 <i>d</i> (8,6)	8,06 <i>d</i> (8,5)	130,3	130,1	7, 8a, 10
6	7,15 <i>dd</i> (8,6:2,5)	7,23 <i>dd</i> (8,5:2,4)	121,7	121,8	8, 10a
7	-	-	163,7	163,5	-
8	7,54 <i>d</i> (2,5)	7,47 <i>d</i> (2,4)	113,0	112,5	6, 9, 10a
8a	-	-	134,4	135,6	-
9	-	-	184,1	183,3	-
9a	-	-	133,9	133,3	-
10	-	-	182,7	181,5	-
10a	-	-	131,1	125,5	-
CH_3	2,53 <i>s</i>	2,50 <i>s</i>	21,9	21,3	1, 2, 3
OH	1,94 <i>s</i>	11,0 <i>s/</i>	-	-	-

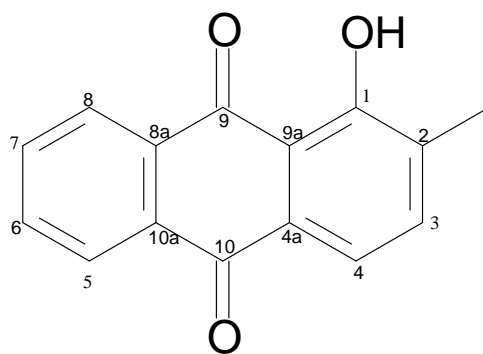


E63. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-D}_4$) da substância **SA7**.



E64. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-D}_4$) da substância **SA7**.

A substância **SA8** foi isolada como um sólido amarelo. Seus espectros de RMN de ^1H (E65 – página 84), HSQC (E66 – página 84) e HMBC (E67 – página 85) foram muito parecidos com os da substância **SA6**. Foram observados sinais de seis hidrogênios de sistemas aromáticos, sendo quatro com multiplicidades típicas de um anel aromático 1,2-dissubstituído e dois deles acoplados entre si, com uma constante de acoplamento de 7,7 Hz, indicando uma relação *orto*. A principal diferença é a presença de um sinal em 12,97 ppm, característico de hidroxila fazendo ligação de hidrogênio. Considerando-se a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H , essa hidroxila deve estar no C-1. A análise dos dados de HMBC (Tabela 13 – página 83) e comparação com dados da literatura permitiram confirmar esta hipótese, embora o espectro não tenha tido boa qualidade devido à pequena quantidade isolada. Portanto **SA8** foi identificada como 1-hidroxi-2-metilntraquinona (**VIII**). Esta substância já foi isolada anteriormente de várias plantas, como das raízes de *Rubia cordifolia* var. *pratensis* (ITOKAWA *et al.*, 1989) e das raízes inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes* de *Plocama pendula* (FRAGA *et al.*, 2009), ambas as espécies pertencem à família Rubiaceae, além de uma espécie de Gesneriaceae, *Streptocarpus dunnii* (SHERIDAN *et al.*, 2011).

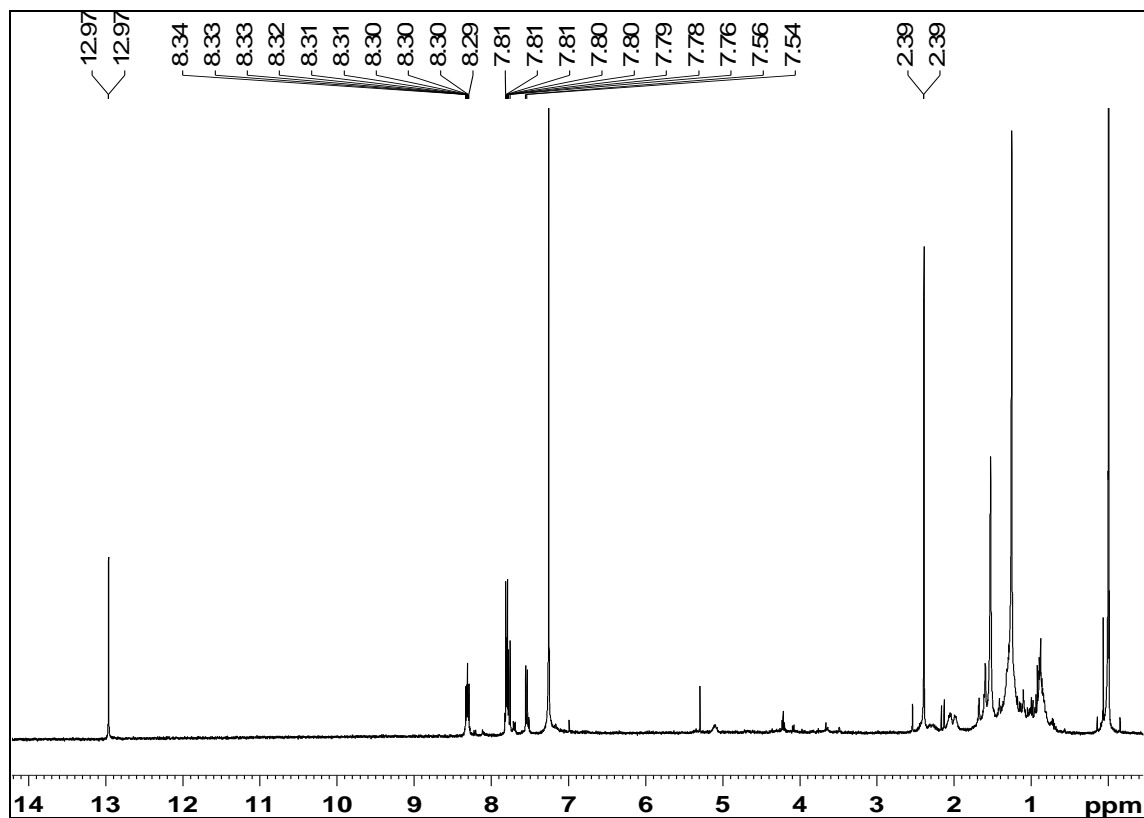


VIII

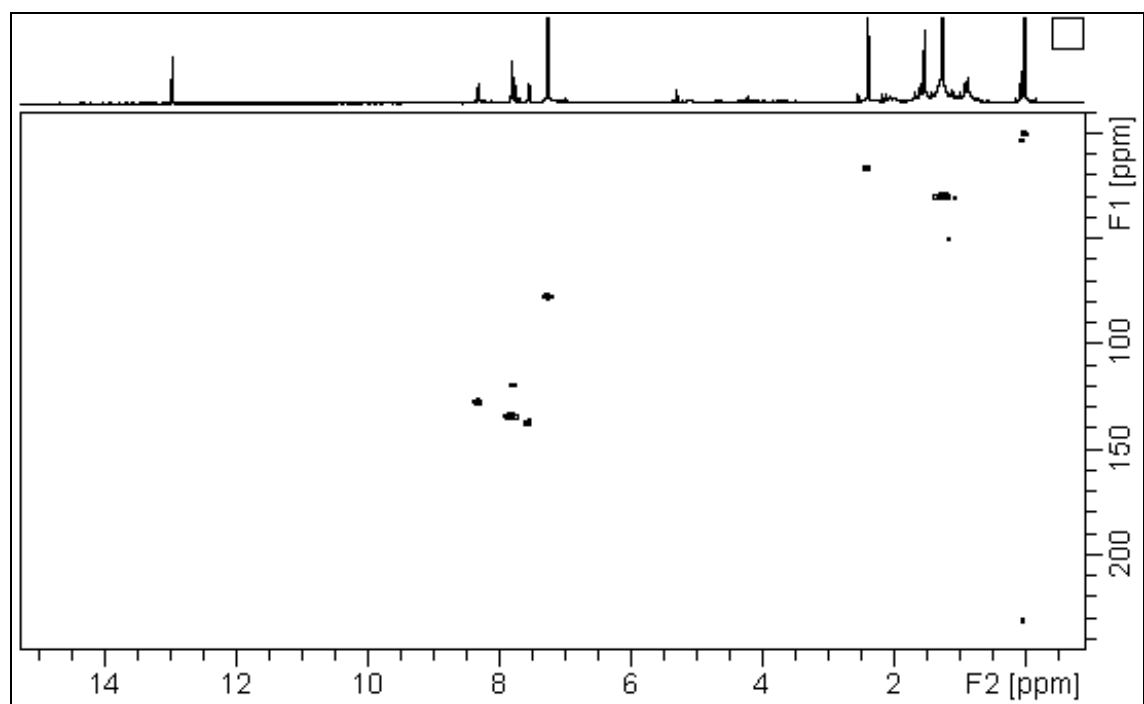
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de **SA8** e comparação com dados da literatura (1 ITOKAWA *et al.*, 1989; 2 FRAGA *et al.*, 2009).

Posição	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^1H , δ ; multip. (J em Hz) 1	^{13}C δ	^{13}C δ 2	HMBC ^1H - ^{13}C
1	-	-	161,2	161,2	-
2	-	-	115,1	115,3	-
3	7,55 <i>dq</i> (7,7:0,8)	7,54 <i>d</i> (7,6)	137,3	137,3	1, 4a
4	7,76 <i>dd</i> (7,7:0,3)	7,76 <i>d</i> (7,6)	119,3	119,3	2, 9a, 10
4a	-	-	131,1	131,4	-
5	8,32 <i>m</i>	8,33 <i>m</i>	127,8	126,9	7
6	7,80 <i>m</i>	7,81 <i>m</i>	134,2	134,0	n/obs
7	7,79 <i>m</i>	7,79 <i>m</i>	134,2	134,6	n/obs
8	8,29 <i>m</i>	8,29 <i>m</i>	127,2	127,4	n/obs
8a	-	-	n/obs	133,3	-
9	-	-	n/obs	189,0	-
9a	-	-	135,0	135,0	-
10	-	-	182,5	182,5	-
10a	-	-	n/obs	133,8	-
CH ₃	2,39 <i>dd</i> (0,8:0,3)	2,39 <i>s</i>	16,1	14,1	1, 3, 9a
OH	12,97 <i>d</i> (0,5)	-	-	-	1, 2, 9a

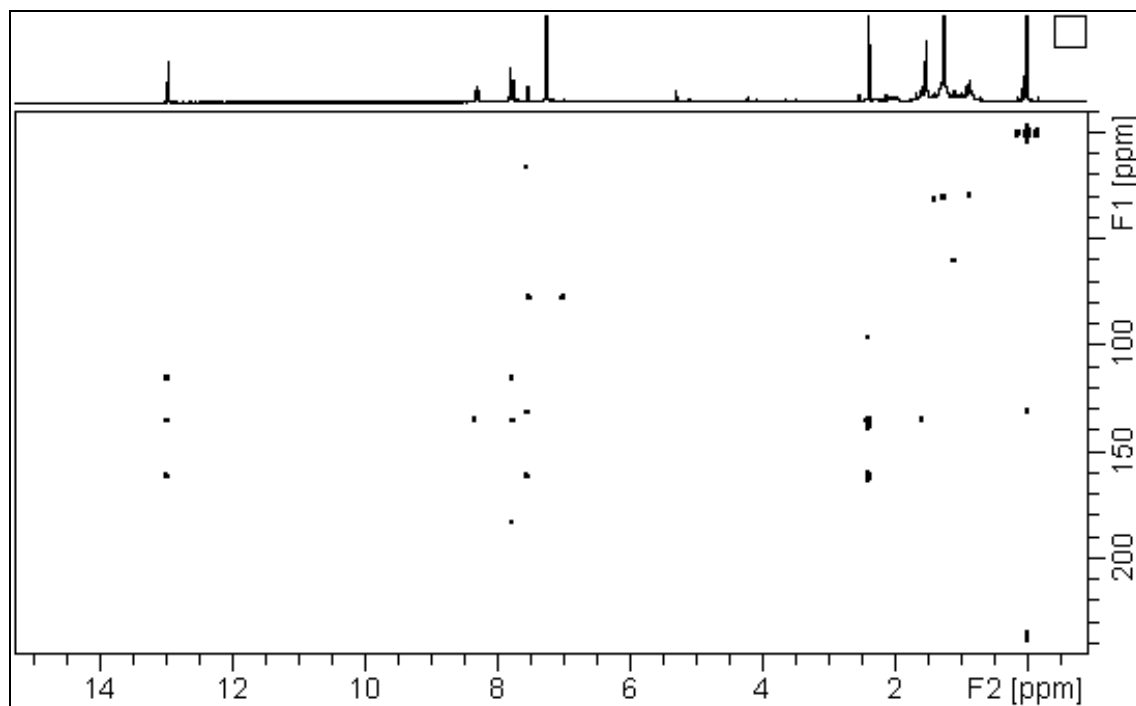
n/obs = não observado



E65. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SA8**.

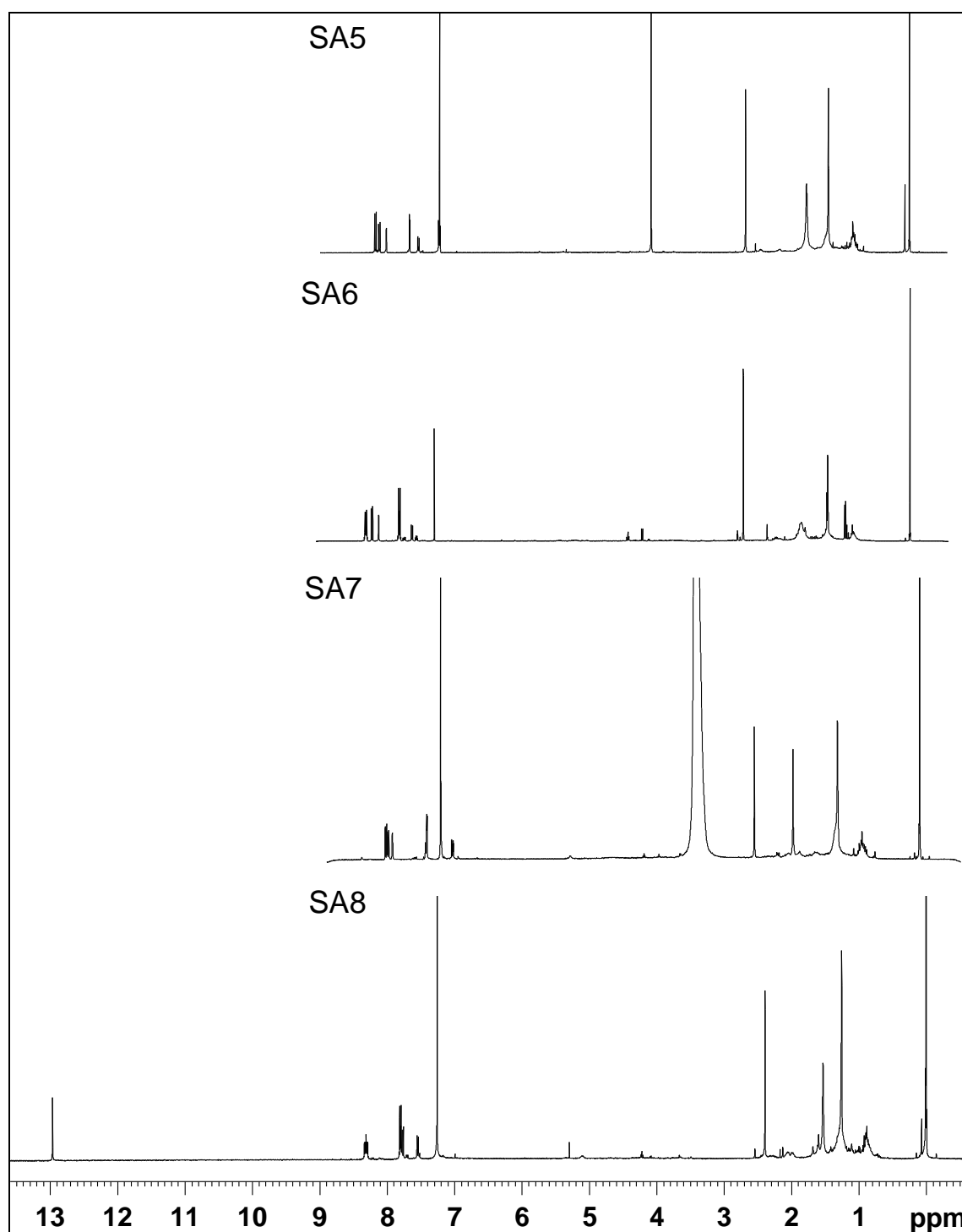


E66. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA8**.

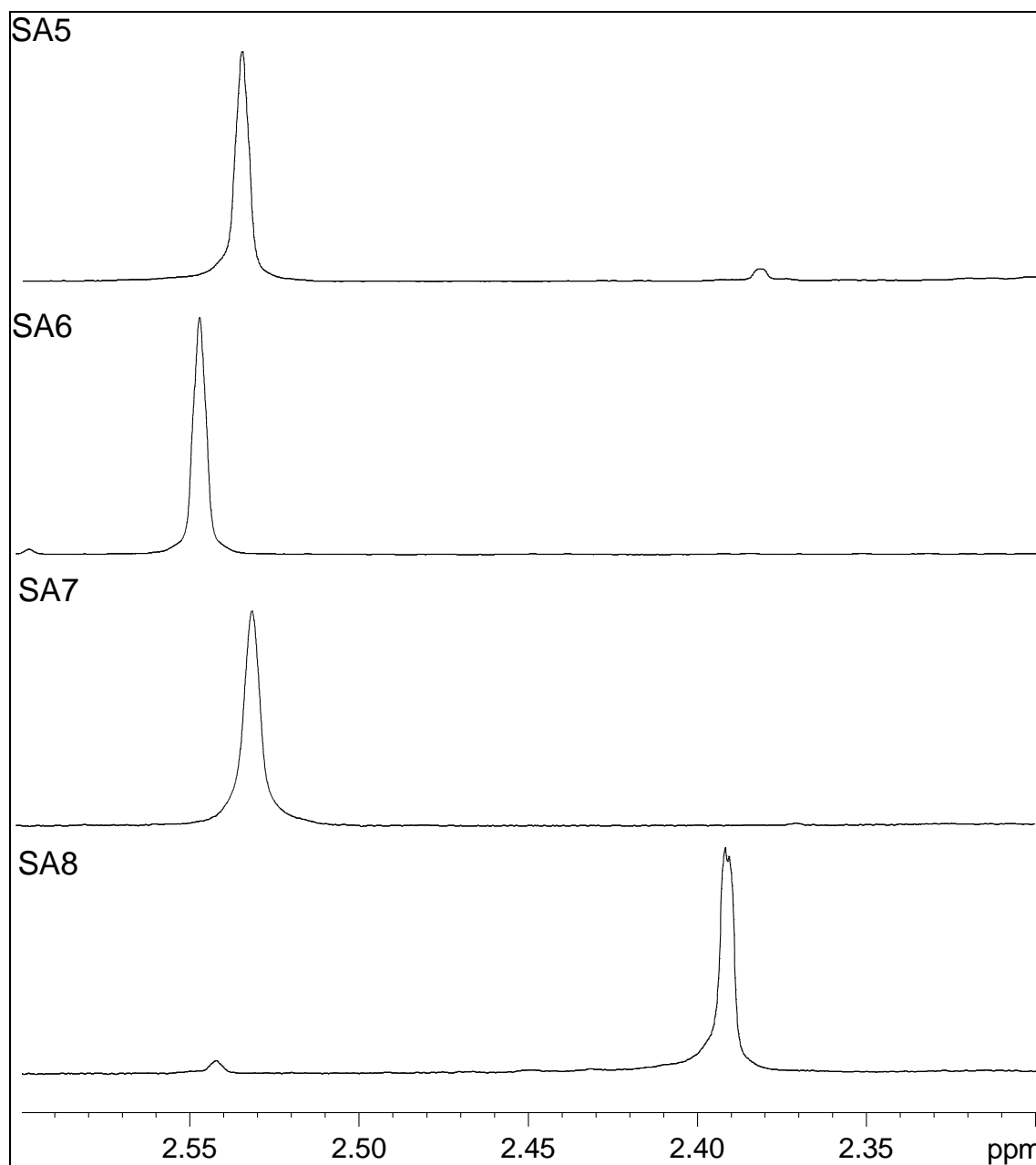


E67. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA8**.

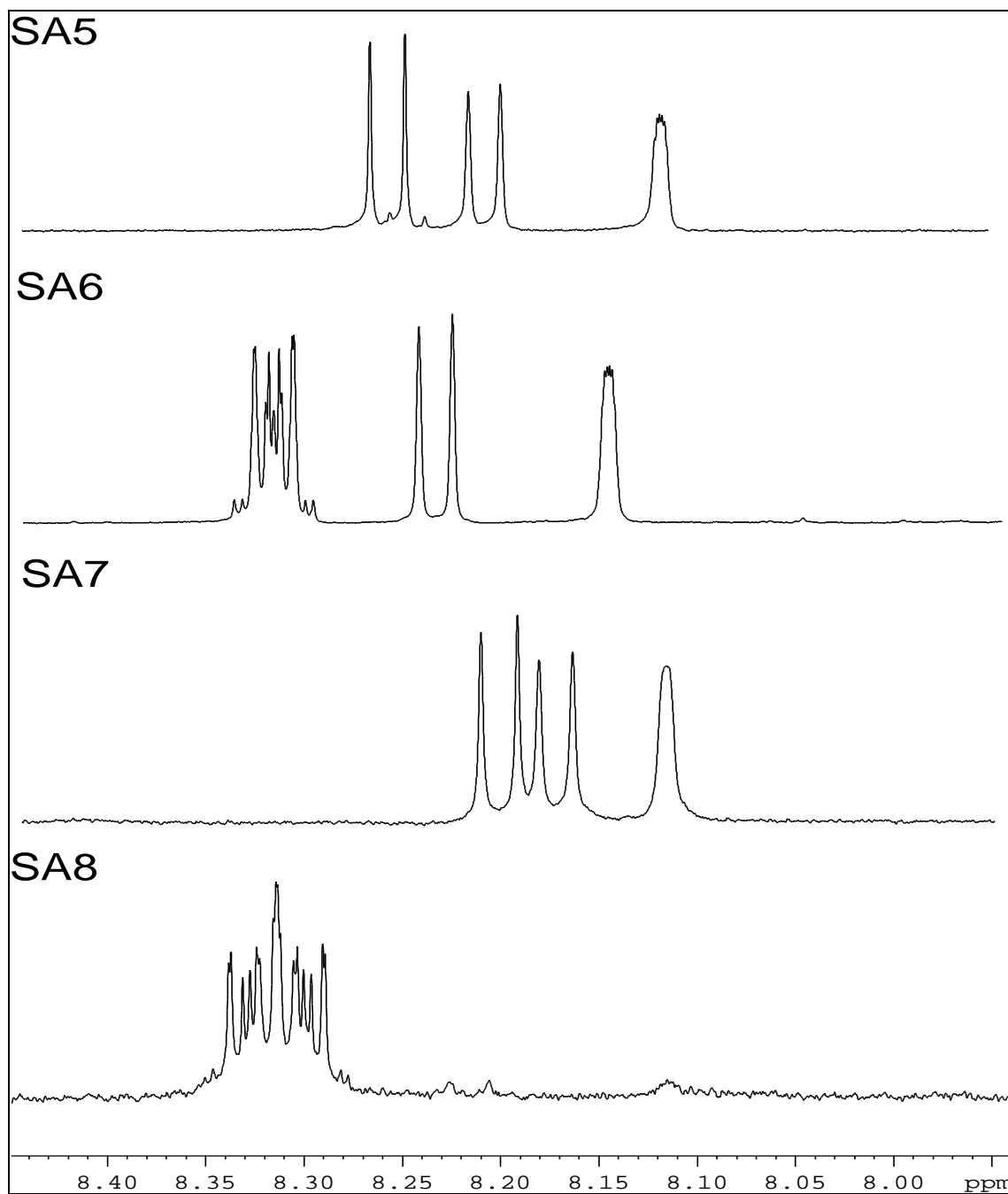
As quatro substâncias **SA5**, **SA6**, **SA7** e **SA8** possuem o mesmo esqueleto básico de antraquinona, por isso seus espectros de RMN de ^1H (E68 – página 86) foram sobrepostos para mostrar as principais diferenças e semelhanças. A diferença mais visível está nas substituições, **SA5** possui uma metila (2,53 ppm) e uma metoxila (3,99 ppm), **SA6** possui apenas uma metila (2,55 ppm), enquanto que **SA7** e **SA8** possuem uma metila e uma hidroxila. Todas as moléculas possuem uma metila na posição C-2 (E69– página 87), que pode ser bem visualizada no espectro, porém a substância **SA8** tem o sinal um pouco protegido (2,39 ppm) por causa da presença da hidroxila na posição C-1 (12,97 ppm). Além do mais, todas as substâncias apresentam sinais de hidrogênios de sistemas aromáticos, variando um pouco os deslocamentos e multiplicidades devido aos diferentes substituintes (E70-71 – página 88-89).



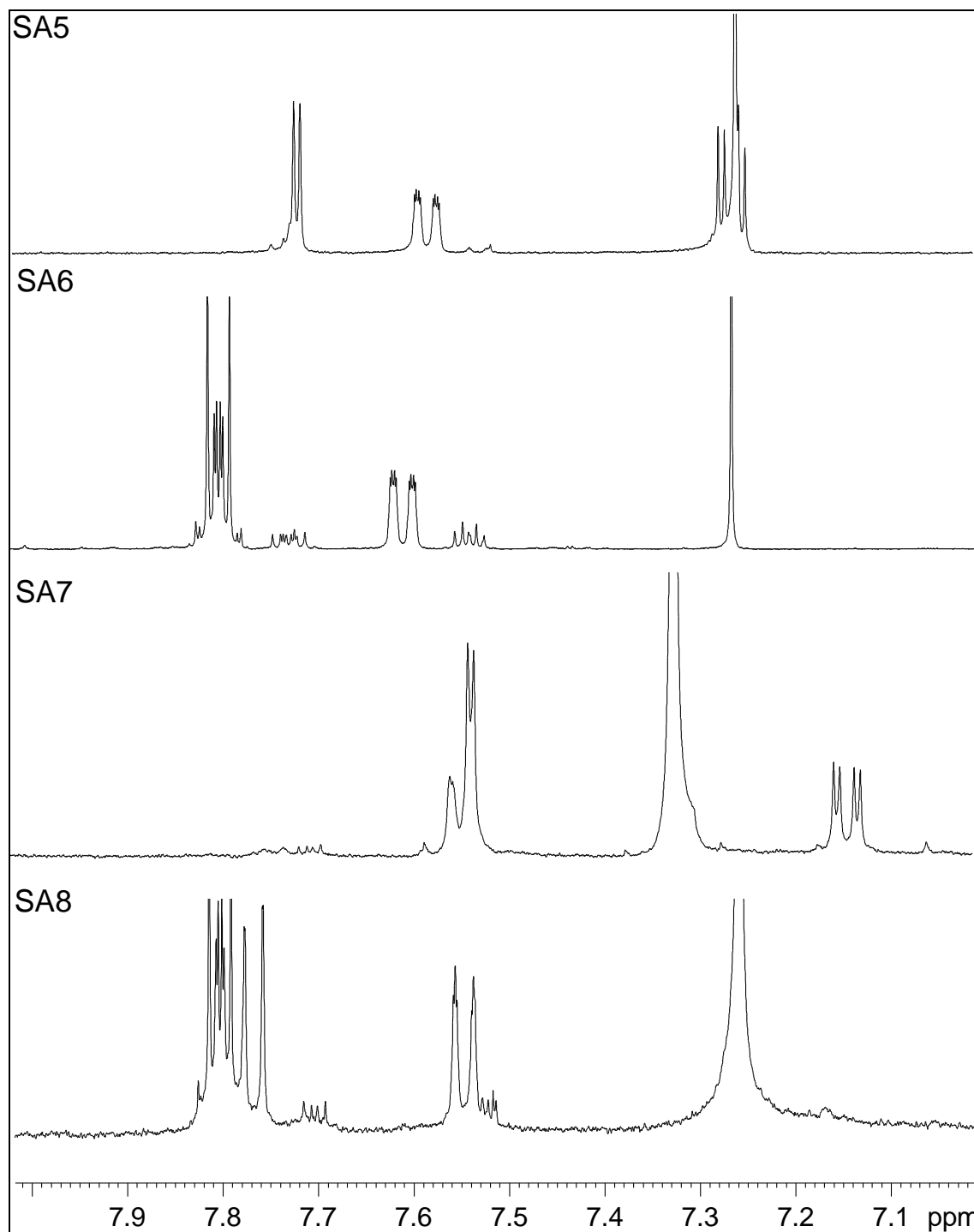
E68. Espectros de RMN de ^1H das substâncias SA5, SA6, SA7 e SA8.



E69. Ampliação da região das metilas (2,30-2,60 ppm) dos espectros de RMN de ^1H das substâncias **SA5**, **SA6**, **SA7** e **SA8**.



E70. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,95-8,45 ppm) dos espectros de RMN de ¹H das substâncias **SA5**, **SA6**, **SA7** e **SA8**.



E71. Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos (7,00-8,00 ppm) dos espectros de RMN de ¹H das substâncias **SA5**, **SA6**, **SA7** e **SA8**.

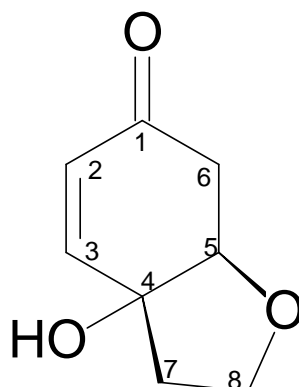
3.2.5. Identificação da substância SA9

A substância **SA9** foi isolada como um óleo avermelhado, de fórmula molecular $C_8H_{10}O_3$ ($154,164 \text{ g mol}^{-1}$). O seu espectro de RMN de 1H (E72 – página 92) apresentou-se muito diferente das substâncias anteriores, por não possuir hidrogênios de sistemas aromáticos. Este espectro mostrou sinais de dois hidrogênios olefínicos um em 6,77 ppm (*dd* 10,2:1,4 Hz) e o outro em 6,02 ppm (*d* 10,2 Hz) (E73 – página 93), sugerindo uma ligação dupla com estereoquímica *cis*. Há ainda sinais de três hidrogênios carbinólicos em 4,25 ppm (*ddd* 5,8:4,7:1,4 Hz) (E74– página 93), 4,08 ppm (*ddd* 8,6:8,3:6,6 Hz) e 3,96 ppm (*ddd* 8,6:8,1:6,4 Hz) (E75 – página 94) e de dois grupos metilênicos em, 2,78 (*dd* 16,8:4,7 Hz), 2,61 (*dd* 16,8:5,8 Hz) (E76 – página 94), 2,34 (*ddd* 13,1:8,3:6,4 Hz) e 2,23 (*ddd* 13,1:8,1:6,6 Hz) (E77 – página 95).

Os espectros de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ e DEPT-135 (E78-79 – páginas 95-96) mostraram a presença de oito carbonos, sendo uma carbonila de cetona α,β insaturada em 197,8 ppm, dois carbonos sp^2 (149,0 e 127,8 ppm), três carbonos oxigenados (um não ligado a hidrogênio em 74,4 ppm, um metínico em 80,8 ppm e um metilênico em 66,0 ppm), além de dois carbonos metilênicos (39,6 e 39,0 ppm).

Analisando os espectros de HSQC (E80 – página 96) e HMBC (E81 – página 97), pode-se correlacionar os dados obtidos dos experimentos 1D e determinar a estrutura de **SA9** como sendo uma cicloexenona com um anel de tetraidrofurano. As principais correlações observadas no espectro de HMBC foram entre o hidrogênio H-3 e o carbono da carbonila (C-1), os hidrogênios H-6 e H-8 com o carbono quaternário C-4, o hidrogênio H-5 com o carbono C-8 e os hidrogênios H-7 com o carbono sp^2 C-3 (Figura 14 – página 92, Tabela 14 – página 91).

Uma busca na literatura permitiu confirmar a estrutura da **SA9** como sendo a halleridona (**IX**). Esta substância já foi isolada anteriormente das folhas de *Halleria lucida* da família Scrophulariaceae (MESSANA *et al.*, 1984) e das partes aéreas de *Teucrium decipiens* da família Lamiaceae (BELLAKHDAR *et al.*, 1988).



IX

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da substância isolada **SA9** e comparação com dados da literatura (1 MESSANA *et al.*, 1984).

Posição	^1H , δ ; multip. (J em Hz)	^1H , δ ; multip. (J em Hz) ¹	^{13}C δ	^{13}C δ ¹	HMBC ^1H - ^{13}C
1	-	-	197,8	197,7	-
2	6,02 <i>d</i> (10,2)	6,02 <i>d</i> (10)	127,8	127,6	1,2,3
3	6,77 <i>dd</i> (10,2:1,4)	6,86 <i>dd</i>	149,0	149,2	1,4,7
4	-	-	74,4	74,7	-
5	4,25 <i>ddd</i> (5,8:4,7:1,4)	4,28 <i>dt</i> (1,5)	80,8	80,8	1,4,5,7,8
6a	2,61 <i>dd</i> (16,8:5,8)	2,70 <i>m</i>	39,6	39,7	1,3,4,6
6b	2,78 <i>dd</i> (16,8:4,7)				
7a	2,23 <i>ddd</i> (13,1:8,1:6,6)	2,30 <i>tl</i>	39,0	39,2	3,4,5,8
7b	2,34 <i>ddd</i> (13,1:8,3:6,4)				
8a	3,96 <i>ddd</i> (8,6:8,1:6,4)	3,96 <i>tl</i>	66,0	65,9	3,4,7
8b	4,08 <i>ddd</i> (8,6:8,3:6,6)				

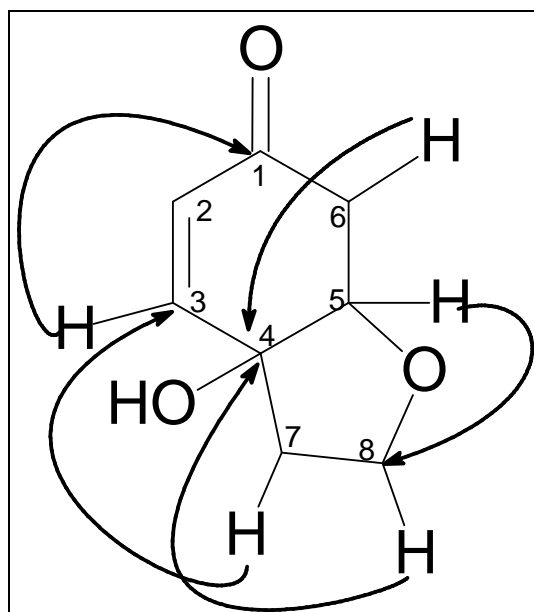
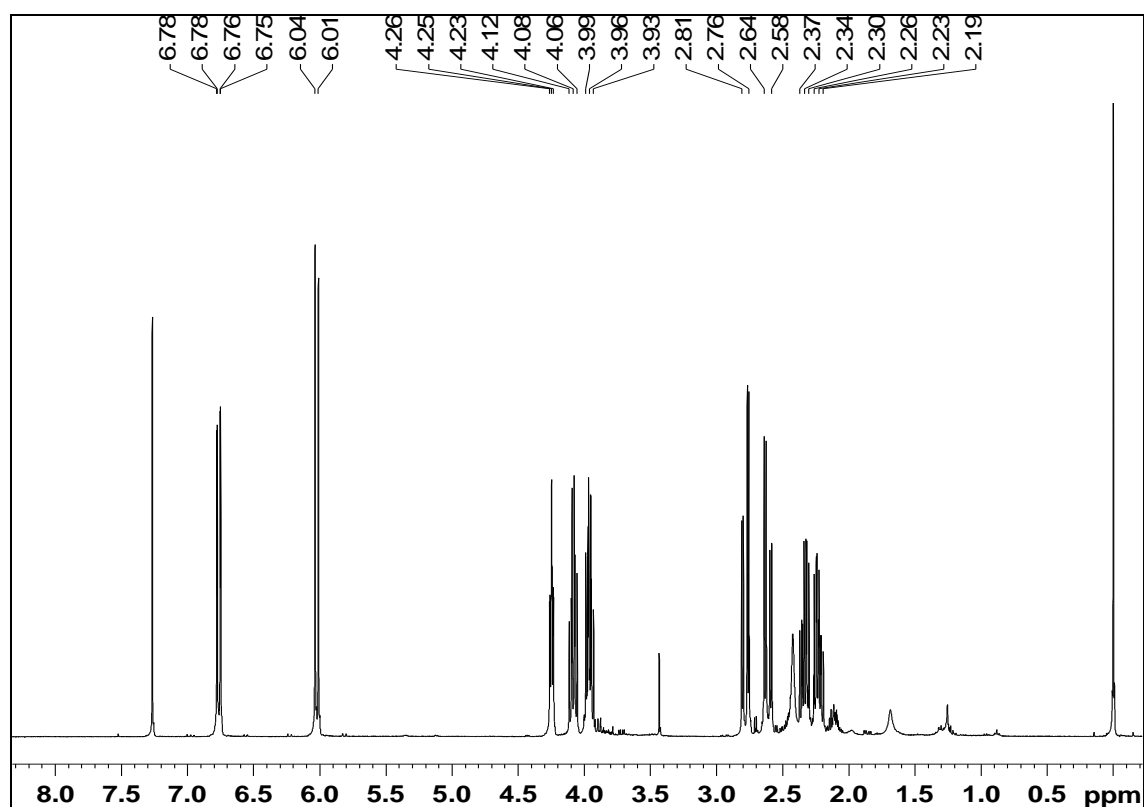
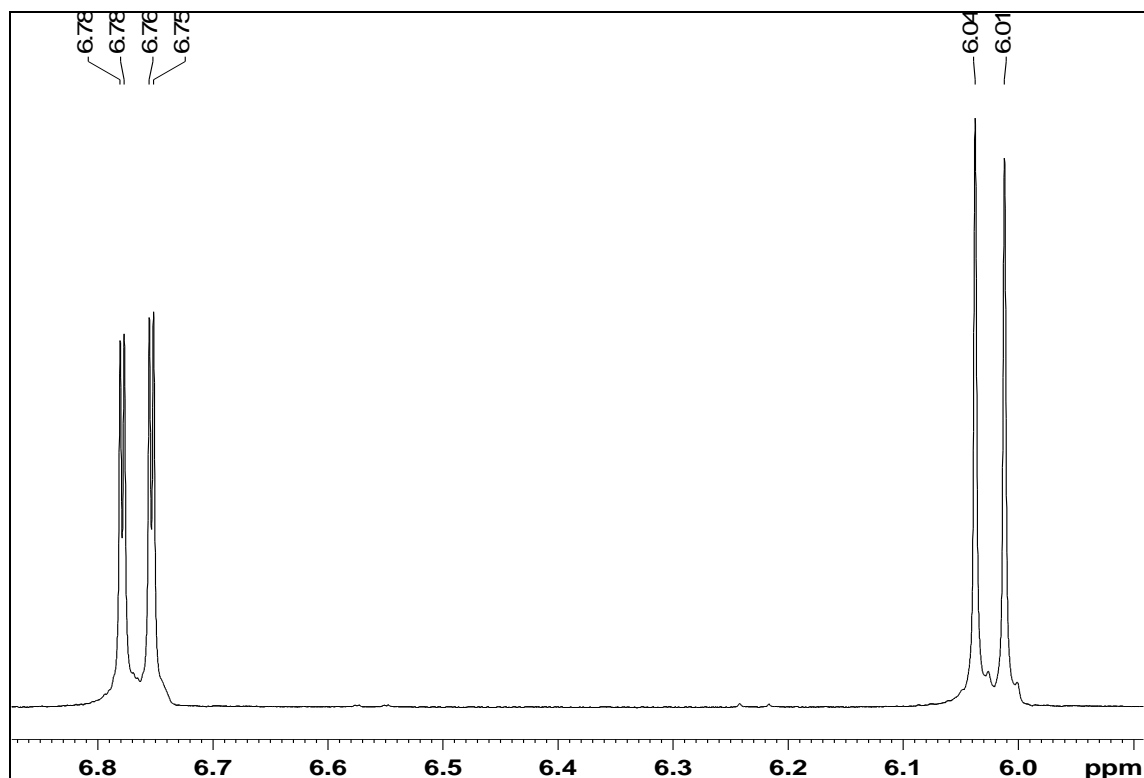


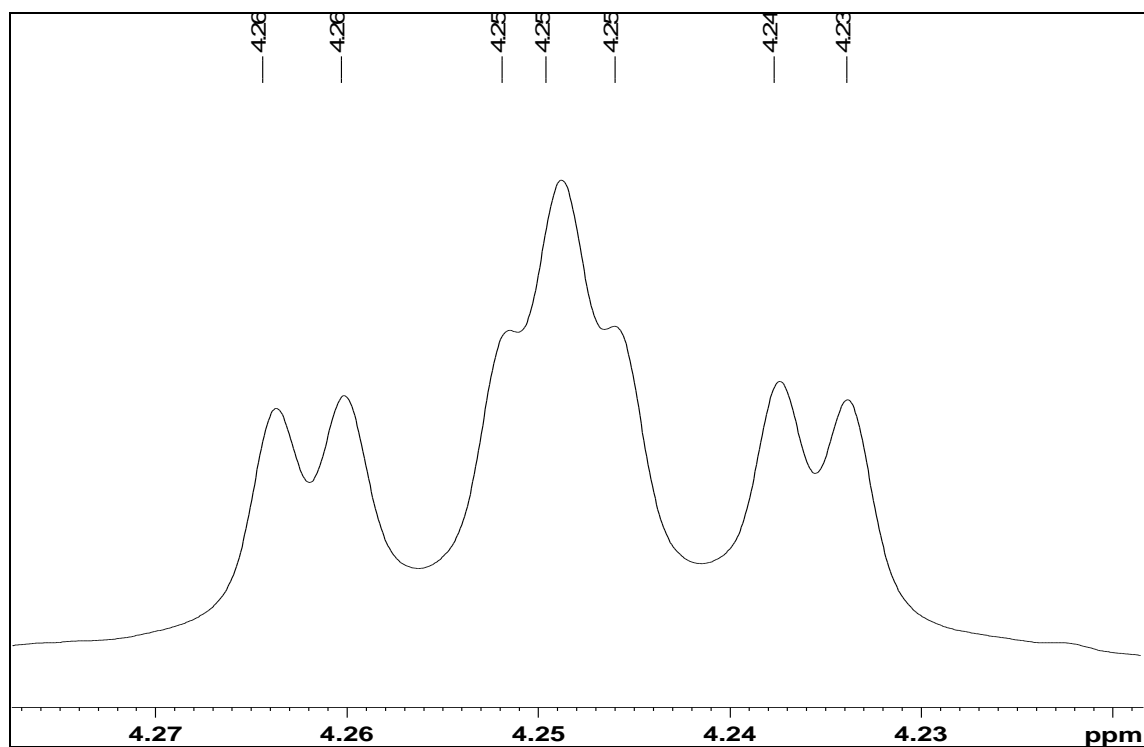
Figura 14. Principais correlações ^1H - ^{13}C a longa distância observadas para **SA9**.



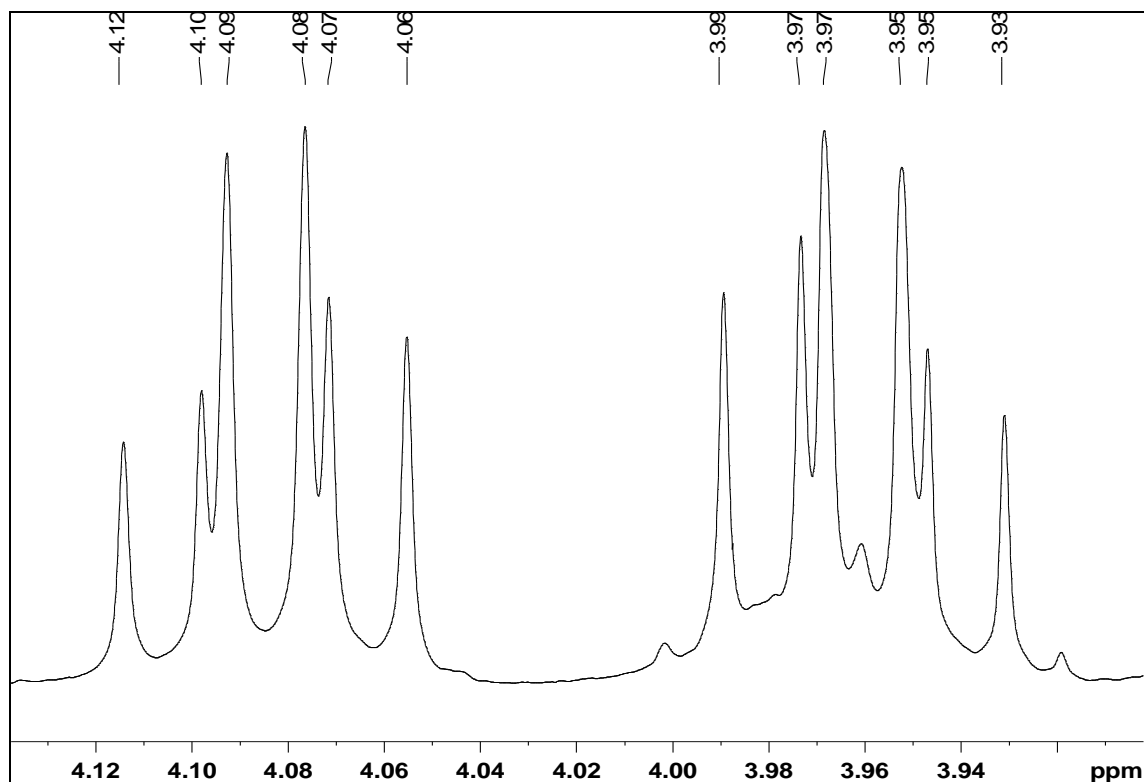
E72. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA9**.



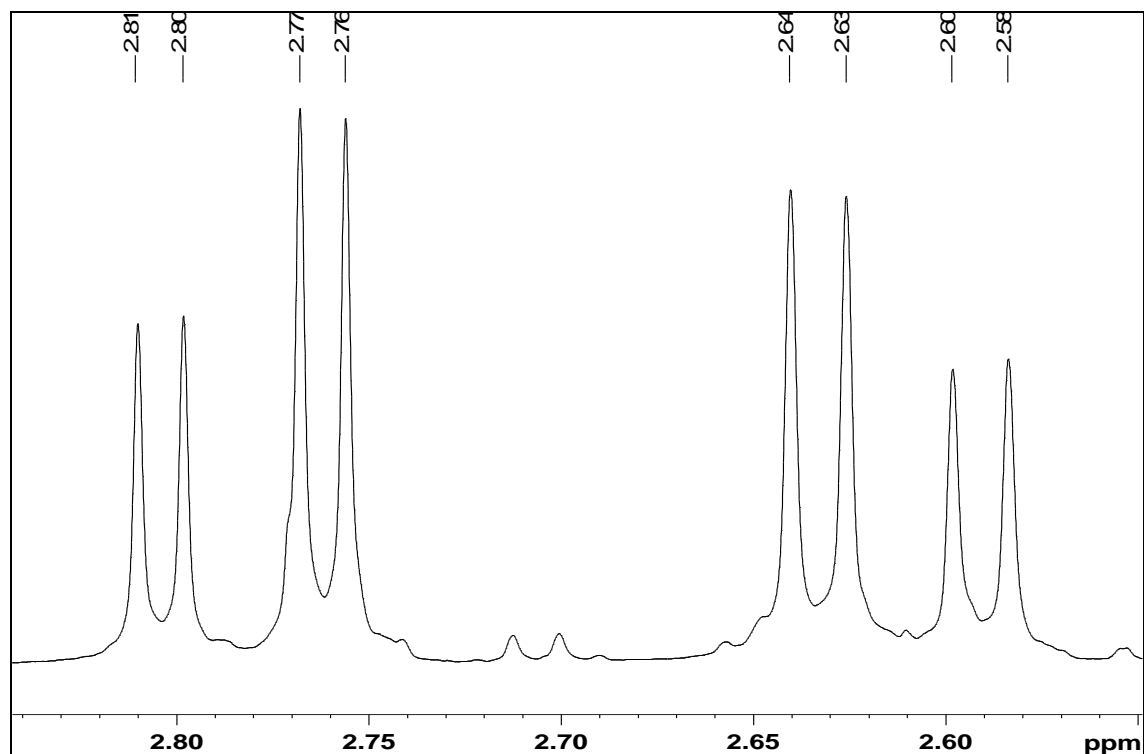
E73. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos (5,90-6,90 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de **SA9**.



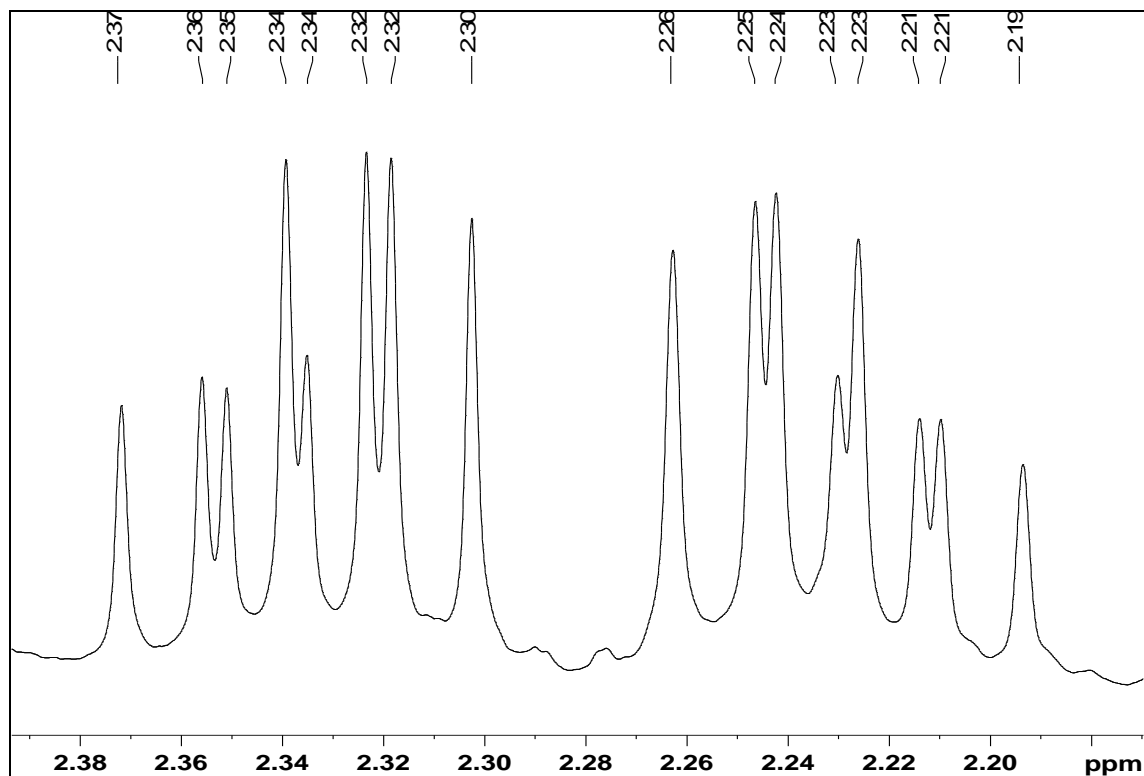
E74. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (4,22-4,28 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de **SA9**.



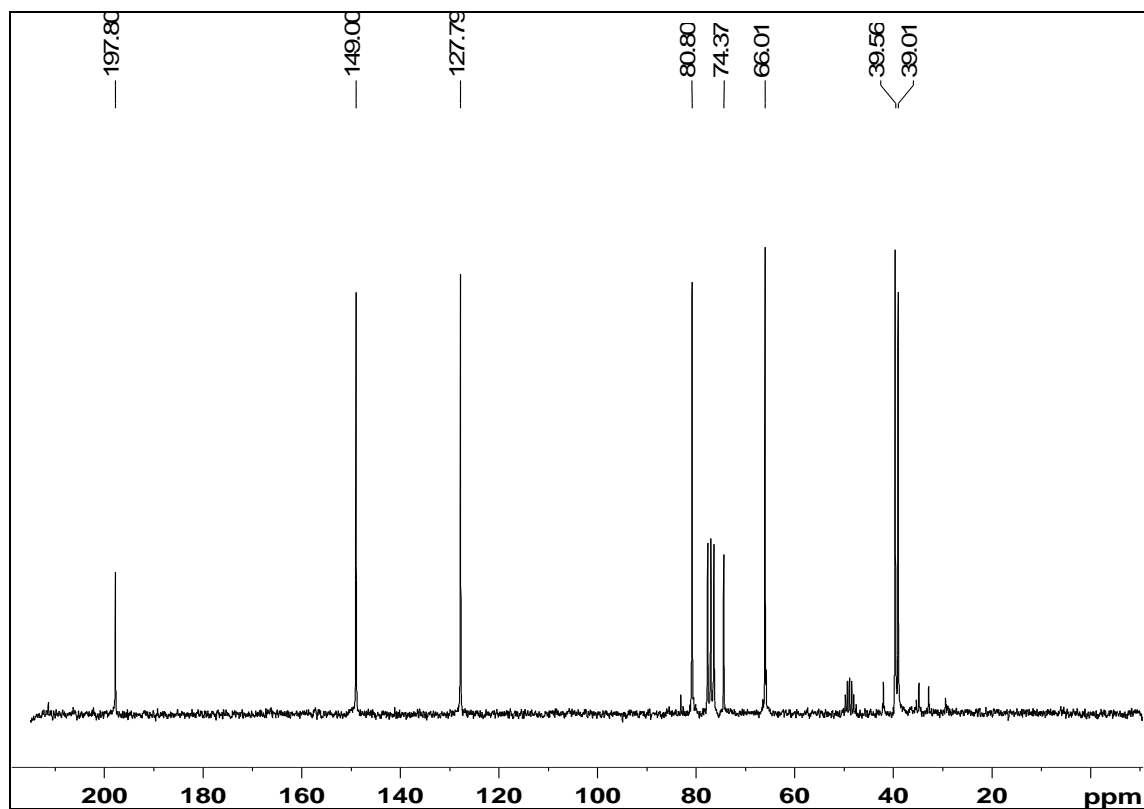
E75. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,90-4,14 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de **SA9**.



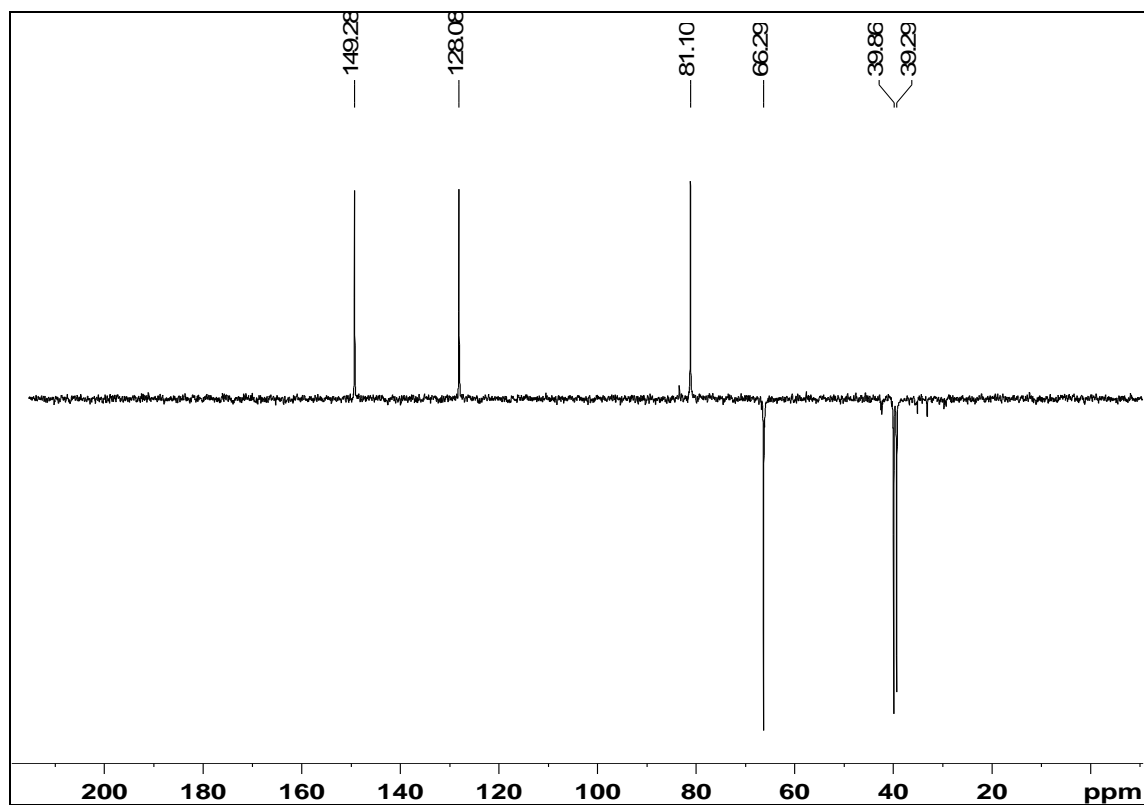
E76. Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (2,55-2,85 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de **SA9**.



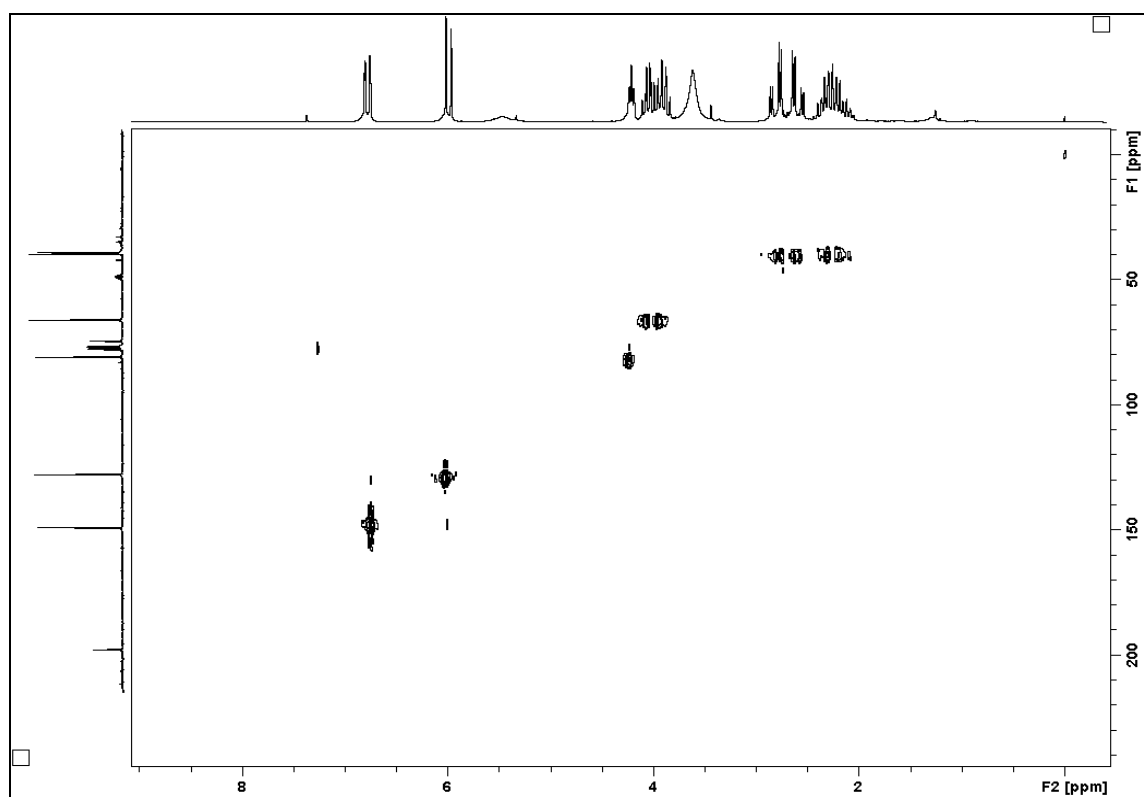
E77. Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos (2,18-2,39 ppm) do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de **SA9**.



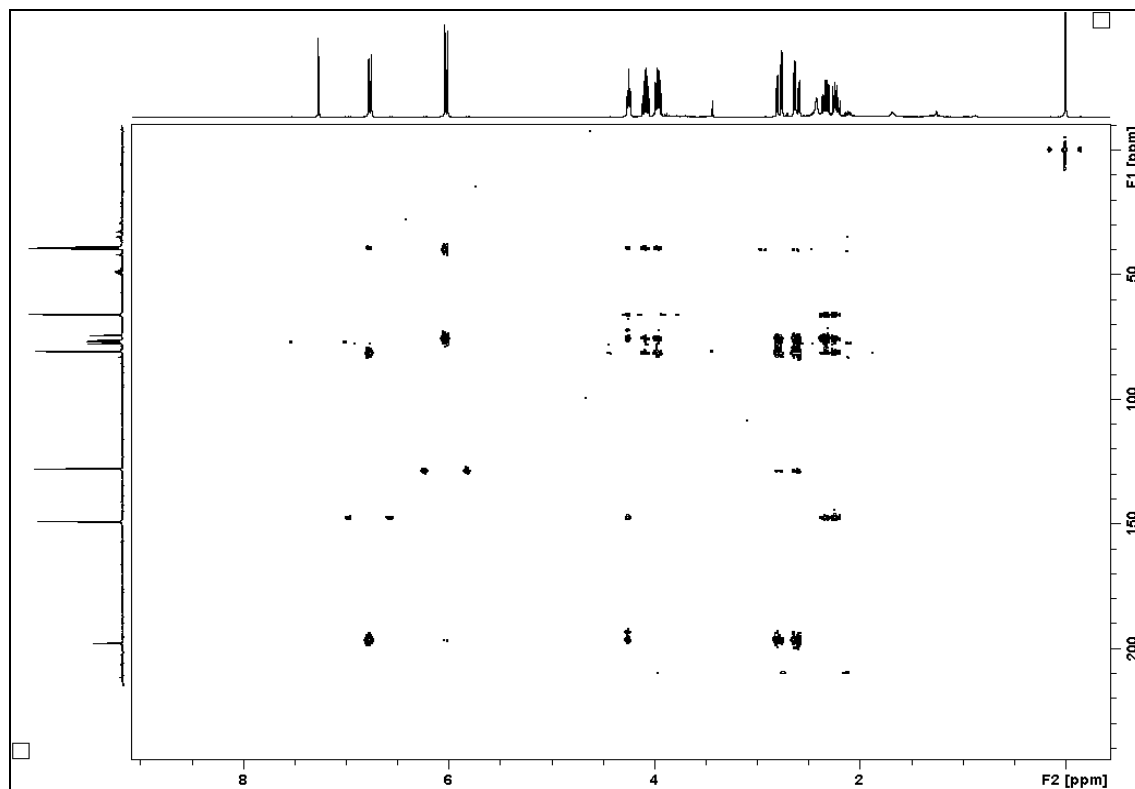
E78. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 50 MHz) da substância **SA9**.



E79. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3 , 50 MHz) da substância **SA9**.



E80. Mapa de correlação ^1H - ^{13}C direta (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **SA9**.



E81. Mapa de correlação ¹H-¹³C a longa distância (CDCl₃, 400 MHz) da substância **SA9**.

3.2.5.1. Estudo conformacional de SA9

O esqueleto da substância **SA9** possui dois anéis fundidos, que podem apresentar a configuração *cis* ou *trans*. Para determinar qual a configuração desta molécula foram realizados experimentos de RMN de NOE, que dá as correlações espaciais entre os átomos, além de uma consulta na literatura.

De acordo com Messana *et al.* (1984), a halleridona é um artefato da planta, sendo produzida pela ciclização não estereoespecífica de outro composto conhecido como cornosídeo (A) durante a etapa de secagem e extração com solventes (Figura 15 – página 98). Como a ciclização não é estereoespecífica, forma-se uma mistura racêmica. Entretanto, a junção entre os anéis pode ser *cis* ou *trans*. No espectro de RMN de ¹H foi observada uma correlação entre os hidrogênios H-3 e H-5. Como estes átomos estão a quatro ligações de distância um do outro, essa correlação só é possível se eles estiverem alinhados em um W, o que justificaria uma constante de acoplamento de 1,4 Hz. Este dado é condizente com o estereoisômero *cis*, no qual o anel de tetraidrofurano está para

cima, ou para baixo do plano, deixando a hidroxila e o H-5 do mesmo lado (Figura 16 – página 99).

Esta hipótese foi confirmada pelos experimentos de NOE, os quais mostram que a irradiação seletiva do hidrogênio H-5 (4,24 ppm) (E84 – página 100), causou um aumento do sinal dos hidrogênios no carbono 6 de intensidade equivalente, além da irradiação do hidrogênio H-7a (2,22 ppm) (E82 – página 99) ter causado um aumento dos sinais de H-7b, H-8a e H-8b, e ainda de H-3, mostrando que este hidrogênio (H-7a) está mais próximo de H-3 do que o H-7b. Esses resultados foram confirmados com a irradiação seletiva de H-7b (E83 – página 100), que não afetou a intensidade do sinal de H-3.

O composto **SA9** foi obtido como uma mistura racêmica ($\alpha_D = \text{zero}$) confirmando a hipótese de ser um artefato possivelmente derivado do cornosídeo.

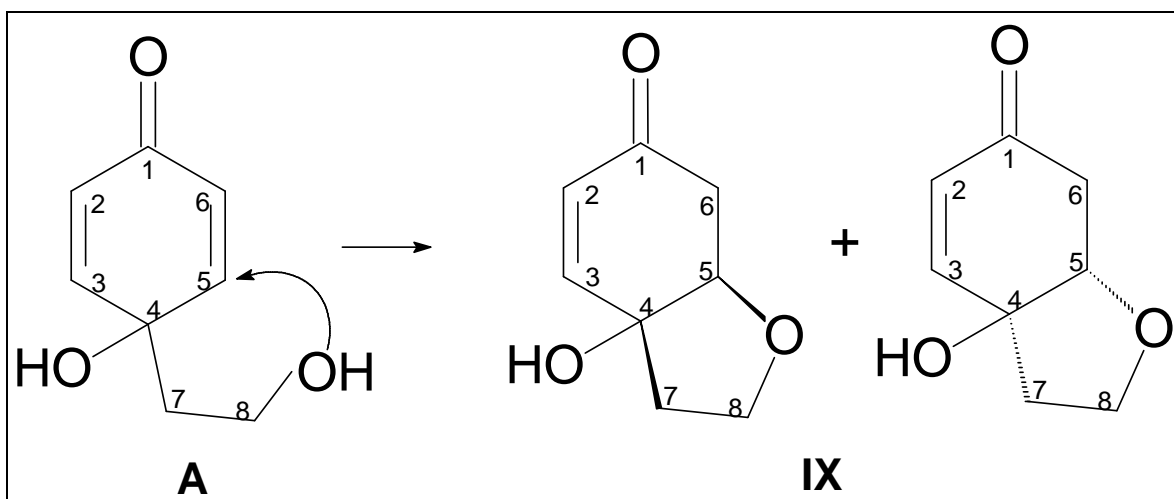


Figura 15. Formação do composto **SA9**.

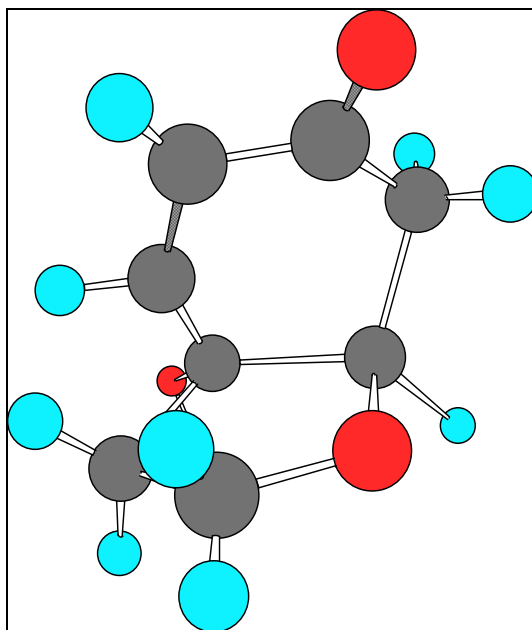
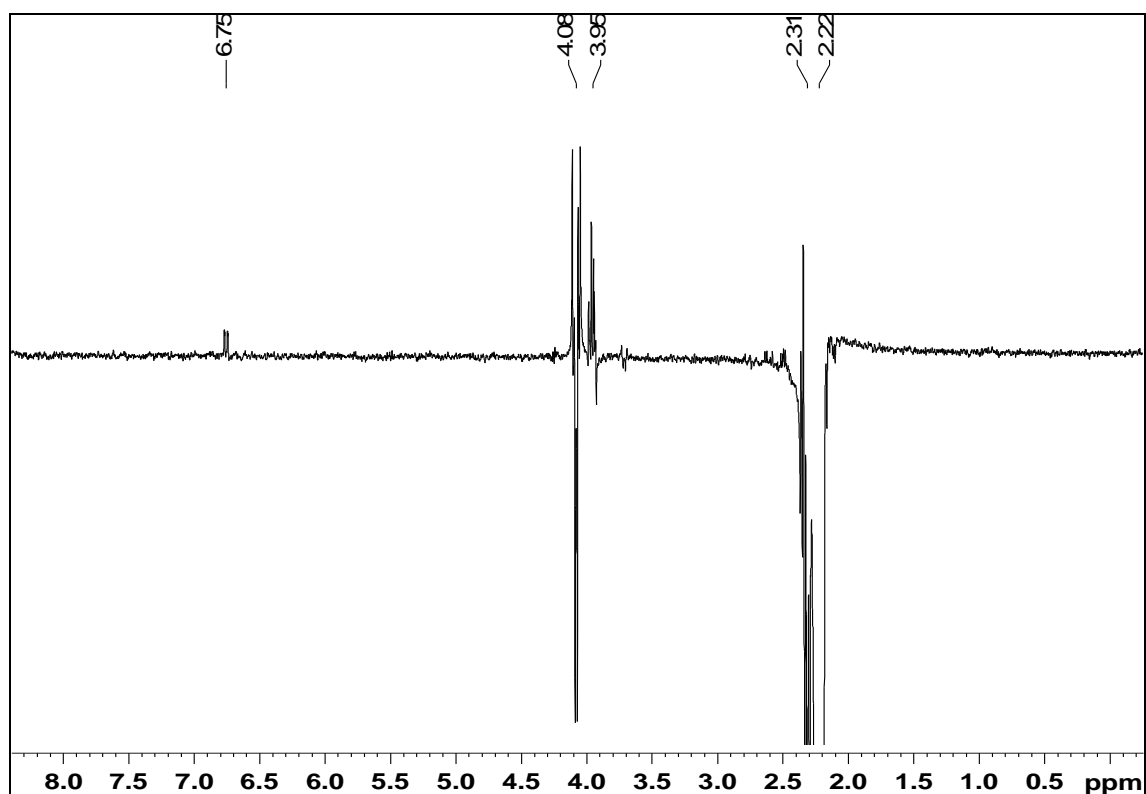
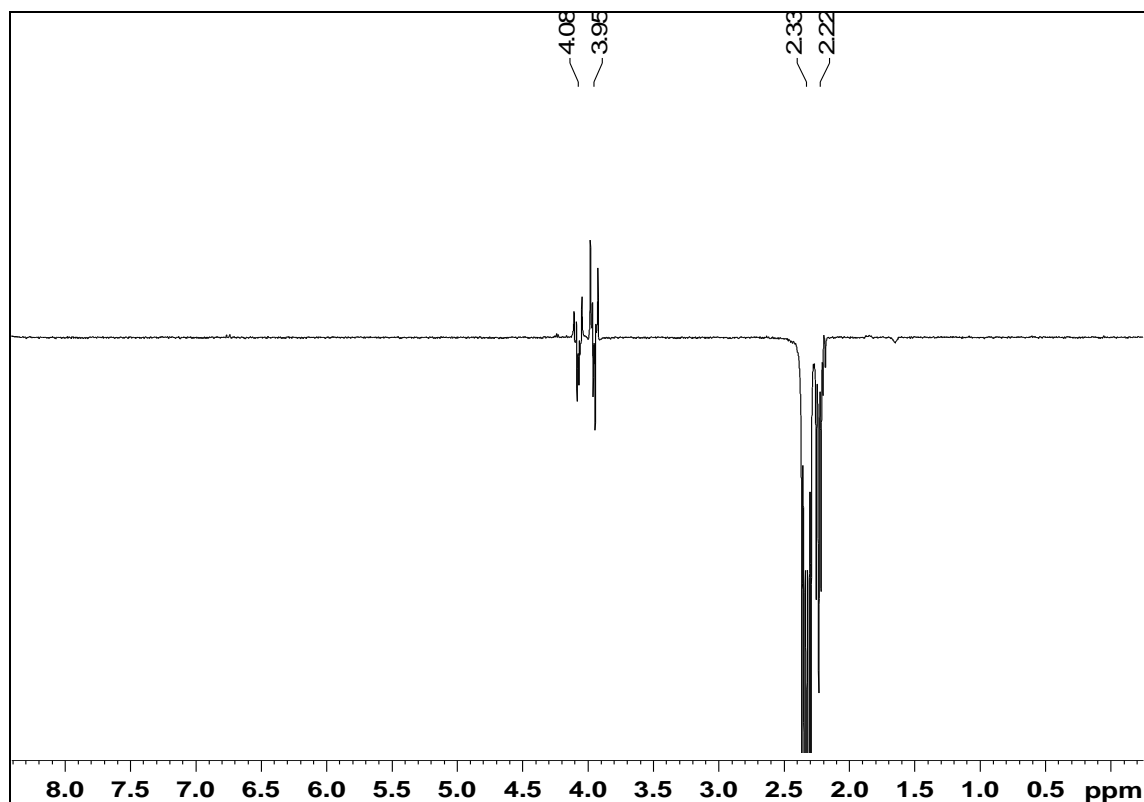


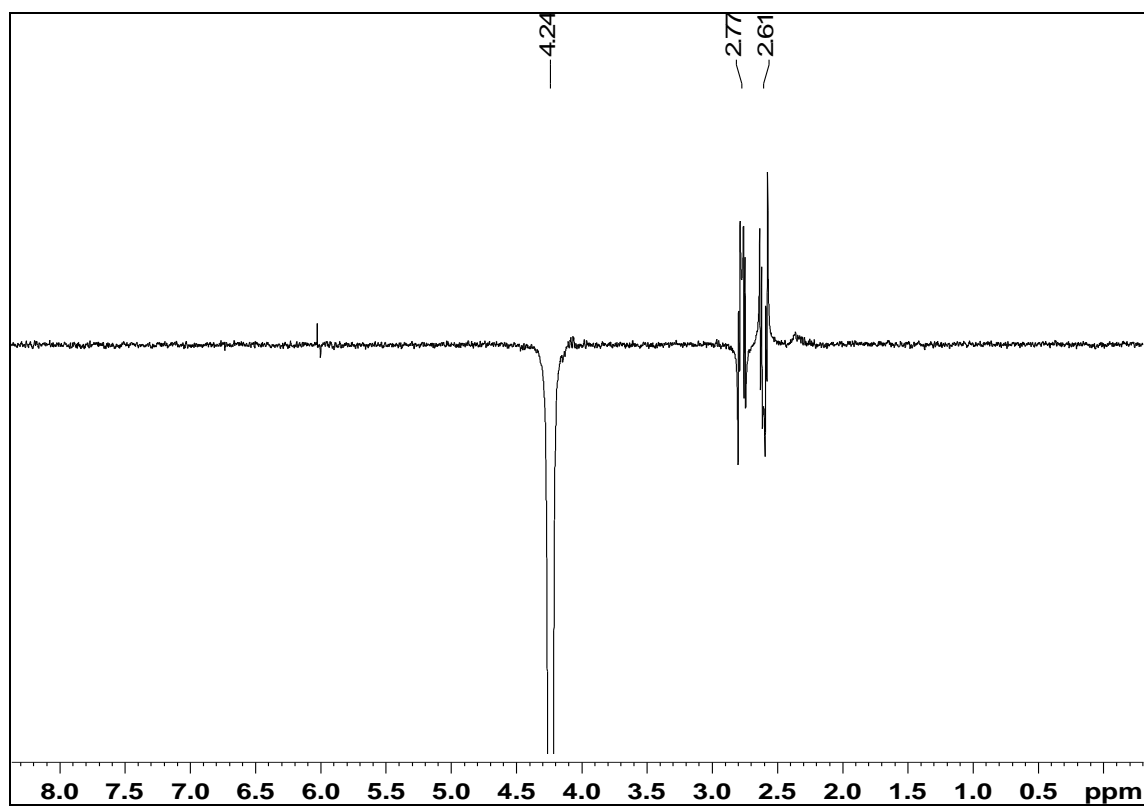
Figura 16. Conformação menos energética de SA9.



E82. Espectro de NOE da substância SA9 irradiando o hidrogênio H-7a (2,22 ppm).



E83. Espectro de NOE da substância **SA9** irradiando o hidrogênio H-7b (2,33 ppm).



E84. Espectro de NOE da substância **SA9** irradiando o hidrogênio H-5 (4,24 ppm).

3.2.6. Identificação das substâncias SA10 e SA11

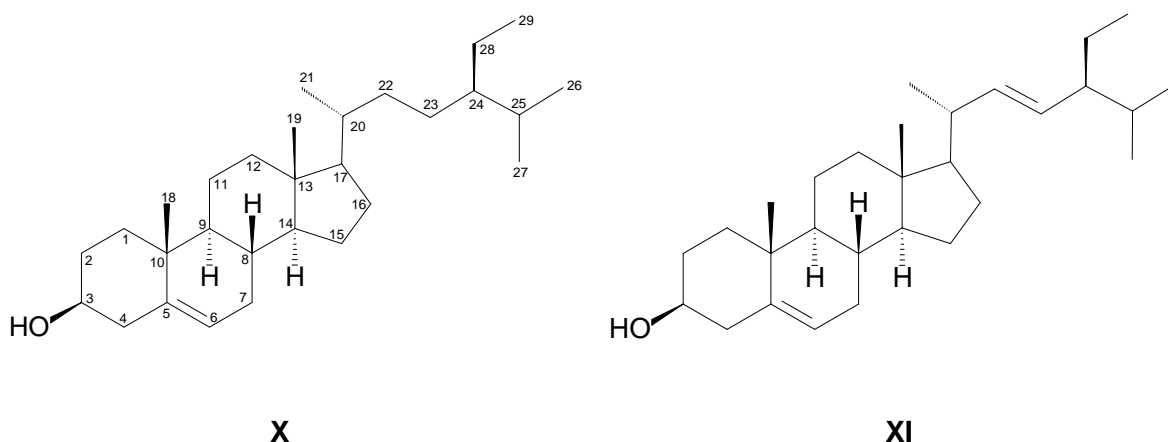
As substâncias **SA10** e **SA11** foram isoladas como um cristal branco. O espectro de RMN de ^1H (E85 – página 102) mostrou vários sinais de grupos metila (0,68-1,03 ppm) e grupos metileno (1,20-2,28 ppm) característicos de terpenos, além de sinais de hidrogênios carbinólicos centrados em 3,52 ppm (E87 – página 103) e hidrogênios olefínicos (4,95-5,36 ppm) (E86 – página 102). O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ mostrou 40 sinais, indicando tratar-se de uma mistura de compostos (E88 – página 103).

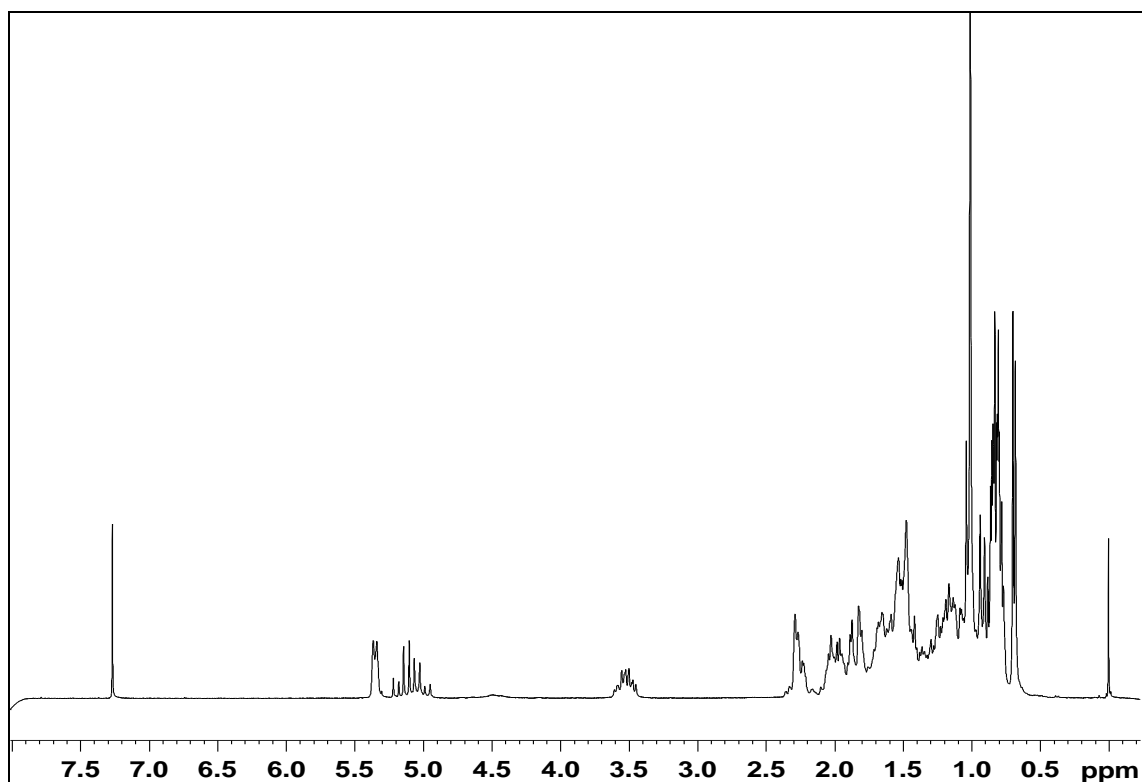
Estes dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, além de comparação com dados da literatura (GOULART *et al.*, 1993) permitiram identificar estas substâncias como a mistura dos esteróides β -sitosterol (**X**) e estigmasterol (**XI**).

Pode-se determinar a presença dos dois compostos, pelos sinais entre 121,7 e 140,7 ppm, relativos aos carbonos sp^2 C-5, C-6 de ambos esteróides e, C-22 e C-23 do estigmasterol. Adicionalmente, pode-se visualizar a presença do sinal em 71,8 ppm típico de carbono carbinólico, atribuído ao C-3 dos dois compostos. No espectro de hidrogênio também foi possível diferenciar os dois compostos pela presença dos hidrogênios olefínicos referentes à H-6 de ambos os compostos (5,34-5,36 ppm) e H-22 e H-23 (4,95-5,22 ppm) do estigmasterol.

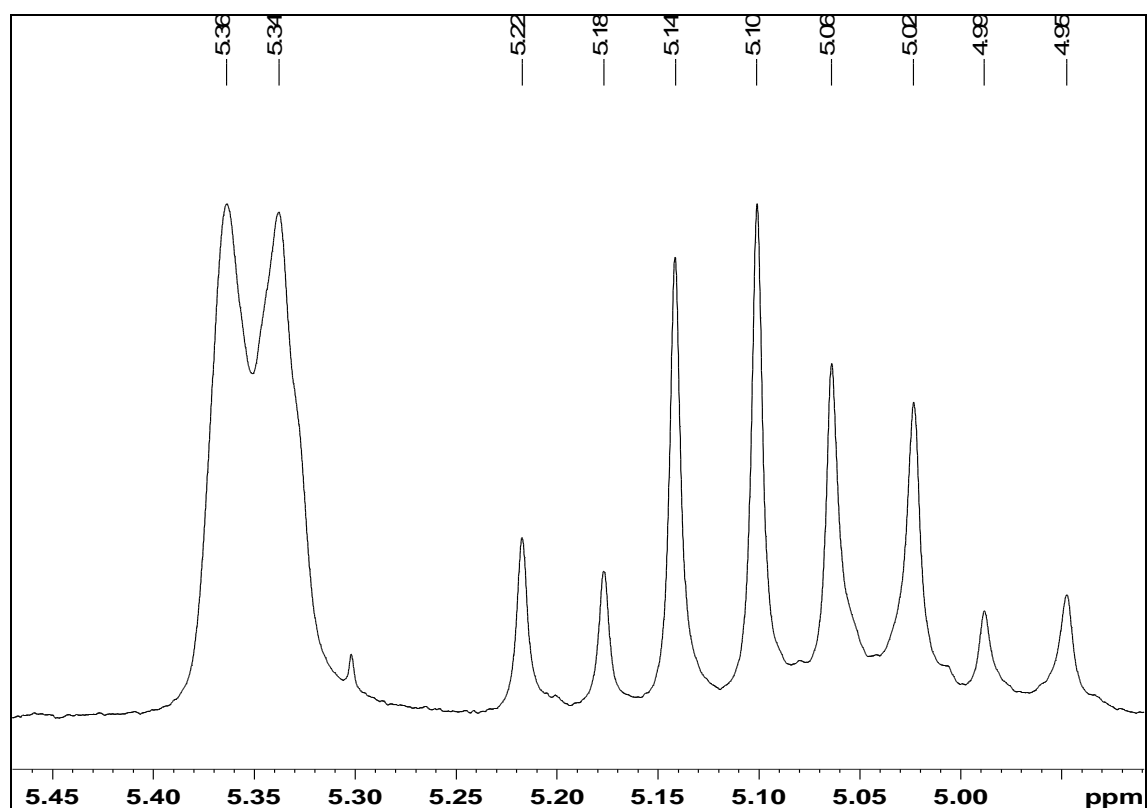
As quantidades relativas dos dois compostos na mistura foram calculadas com base nas integrações dos sinais de H-6 de ambos e H-22 e H-23 do estigmasterol. Com isto deduziu-se que na mistura há 54,61% de estigmasterol enquanto que de β -sitosterol há 45,39%.

Estas substâncias são muito comuns em plantas, sendo encontradas em todas as famílias vegetais.

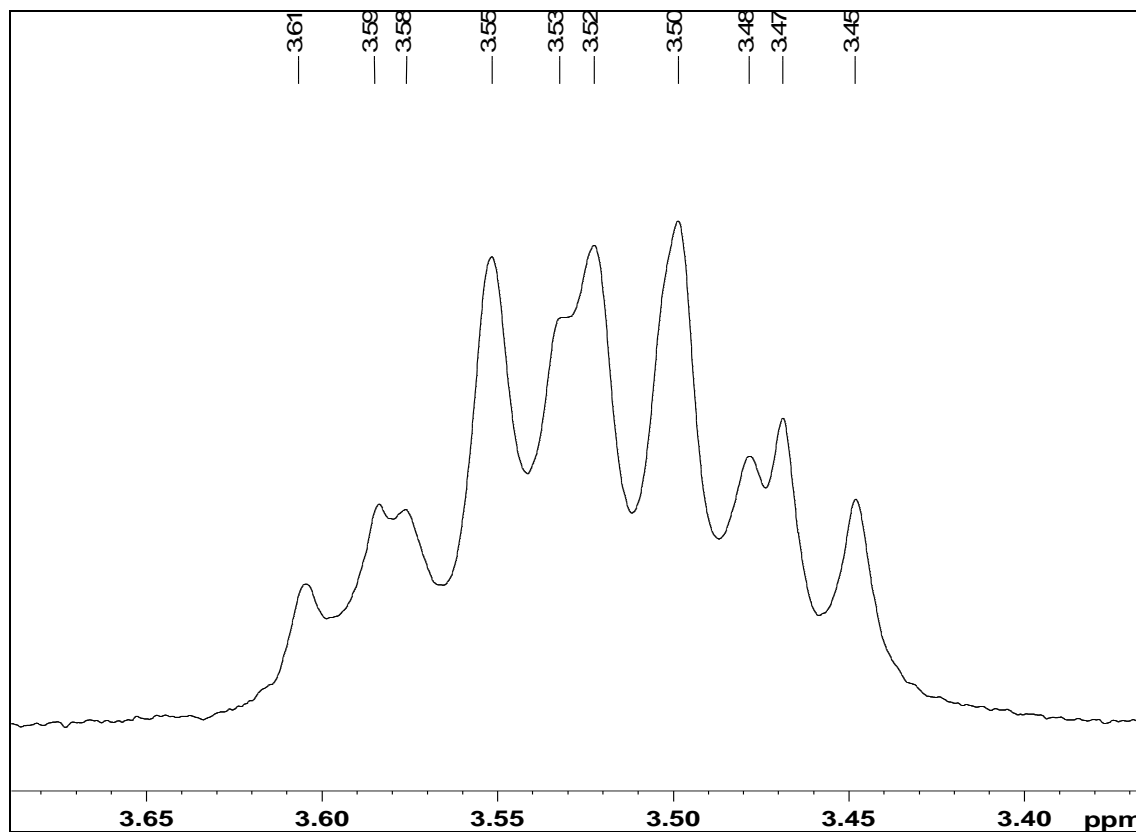




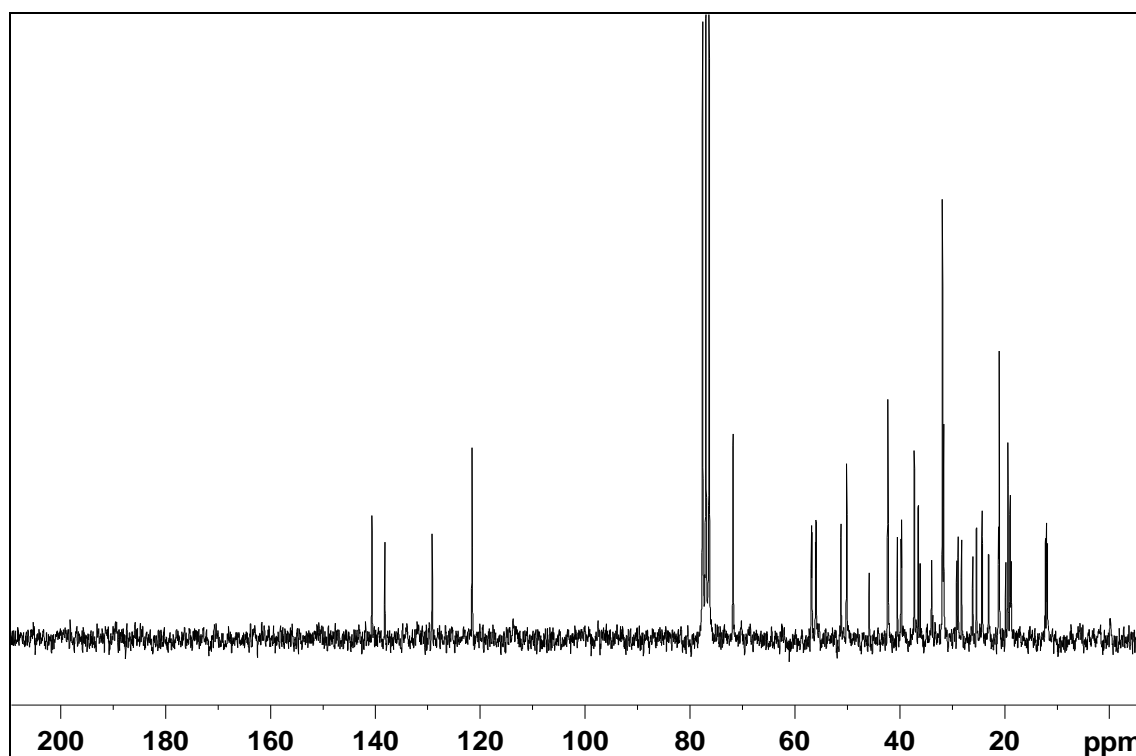
E85. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 de **SA10 + SA11**.



E86. Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos (4,90-5,45 ppm) do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 das substâncias **SA10+SA11**.



E87. Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos (3,35-3,70 ppm) do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 das substâncias **SA10+SA11**.



E88. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 MHz) em CDCl_3 de **SA10 + SA11**.

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

4.1. Materiais e métodos

Para a realização dos ensaios de atividade antiproliferativa, tubérculos secos e moídos de *S. aggregata* I (50,5 g) foram extraídos com etanol por maceração a frio (3 x 250 mL). Após evaporação do solvente foi obtido o extrato etanólico total dos tubérculos de *S. aggregata* (EETSA, 4,20 g). Parte de EETSA (2,50 g) foi dissolvido em etanol:água 1:1 (100 mL) e submetido a partição com éter de petróleo (3 x 30 mL), diclorometano (4 x 25 mL), acetato de etila (4 x 25 mL) e n-butanol (3 x 30 mL), rendendo as respectivas frações (EP-SA = 82,6 mg; D-SA = 100,6 mg; AC-SA = 472,3 mg e, Bu-SA = 711,1 mg). O extrato, as frações e as substâncias puras **SA4** e **SA9** foram utilizados para a realização dos testes de atividade antiproliferativa.

As linhagens de células tumorais testadas foram: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia). Também foi testada a linhagem de célula não tumoral VERO (rim, macaco verde) (Tabela 15 – página 106).

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito anteriormente (SKEHAN *et al.*, 1990). As linhagens de células tipo ATCC (American Type Culture Collection) foram distribuídas em pratos de 96 poços (100 µL célula/poço) e tratadas com quatro níveis diferentes de concentração 0,25; 2,5; 25,0 e 250,0 µg mL⁻¹ do extrato, frações, **SA4** e **SA9** em DMSO (0,1%) a 37°C, com 5% de CO₂ por 48 horas. A concentração final de DMSO não afeta a viabilidade da célula. Uma solução de ácido tricloroacético 50% foi adicionada e depois de incubação de 30 minutos a 4°C, as células foram lavadas e secadas. A proliferação das células foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular usando sulforodamina B. Os experimentos foram feitos em triplicata, e os dados analisados usando ANOVA, e o teste F foi usado para determinar qualquer diferença entre os grupos. Doxorrubicina foi usada como controle positivo e o solvente DMSO, como controle negativo. Estes testes foram realizados pelo Dr. João Ernesto de Carvalho do CPQBA (UNICAMP).

4.2. Resultados e discussão

Diferentes linhagens de células apresentam diferentes susceptibilidades frente a compostos químicos. Por isso o uso de mais de uma linhagem de célula é considerada

necessária para a detecção de substâncias citotóxicas. Os resultados geralmente são expressos em termos da concentração necessária para inibir 50% (GI_{50} – growth inhibition) ou a totalidade do crescimento das células (TGI – total growth inhibition) em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Neste trabalho a potência da amostra foi avaliada pelo valor de TGI, considerando-se que valores acima de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ caracterizam ausência de atividade, e os menores que $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ representam boa atividade.

O extrato etanólico total (EETSA) apresentou baixa atividade, inibindo o crescimento de apenas três linhagens de células (melanoma, rim e ovário) com valores de TGI entre 106,6 e $116,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 15 – página 106, Figura 17 – página 107).

Após o fracionamento com solventes foi observado que a atividade ficou concentrada na fração em diclorometano (D-SA). Esta foi muito mais ativa que o extrato total, inibindo o crescimento de quase todas as linhagens de células testadas, com exceção de K-562 (leucemia). Os valores de TGI variaram de 51,5 a $175,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A fração em acetato de etila (AC-SA) também apresentou atividade significativa, mas com valores maiores de TGI de 77,9 a $175,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em comparação, a fração em éter de petróleo (EP-SA) inibiu o crescimento de apenas duas linhagens de células (TGI 136,8 e $144,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que a fração em 1-butanol (Bu-SA) foi ativa contra três linhagens de células com elevados valores de TGI ($>89,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 15 - página 106, Figuras 18-21 – página 108-109).

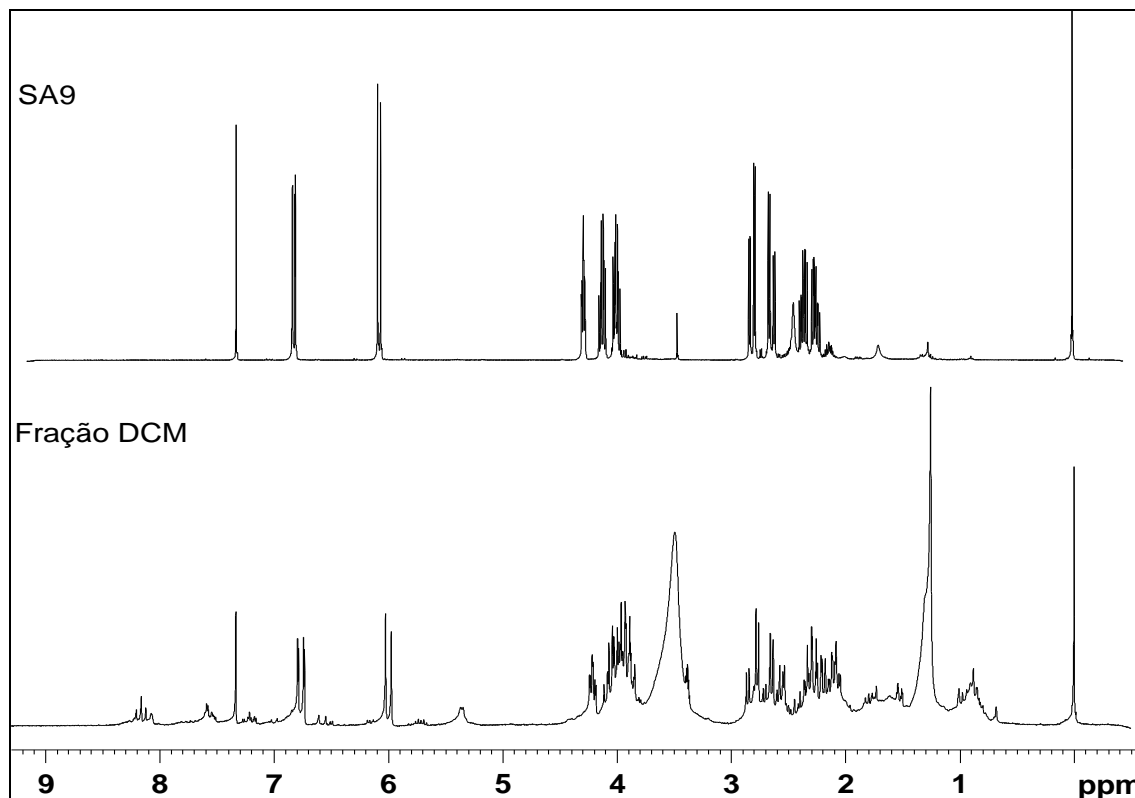
O nosso estudo fitoquímico foi conduzido com extratos em hexano e acetato de etila. A fração em diclorometano pode conter compostos isolados desses dois extratos, pois esse solvente tem polaridade intermediária entre hexano e acetato de etila. A fim de verificar quais os compostos presentes nesta fração ativa, foi obtido o seu espectro de RMN de ^1H (E89 – página 107). A análise do espectro mostrou a presença predominante da substância **SA9**, juntamente com os esteróides sitosterol e estigmasterol (**SA10 e SA11**) e compostos aromáticos. Não foi possível detectar nessa fração bruta a presença da substância **SA4** (majoritária nos extratos em hexano e acetato de etila fracionados), mas isso não exclui a sua presença como um constituinte minoritário. É interessante notar que **SA4** (Figura 22 – página 110; Tabela 15 – página 106) mostrou maior atividade contra as mesmas linhagens que tinham sido afetadas pelo extrato bruto, sugerindo que a sua presença neste extrato tenha causado tais resultados. A substância apresentou atividade contra cinco linhagens de células, com TGI variando entre 23,8 e $61,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. A atividade foi particularmente significativa contra a linhagem OVCAR-3 (ovário) para a qual o valor de TGI de **SA4** foi comparável ao da doxorrubicina, o que torna essa

substância potencialmente útil para o desenvolvimento de um novo fármaco. A substância **SA9** (Figura 23 – página 110; Tabela 15 – página 106) também repetiu algumas atividades que estavam presentes no extrato bruto como melanoma (33,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rim (70,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ovário (101,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$), porém estes valores foram mais altos que aqueles apresentados por **SA4**. Além disso, para as células de glioma e VERO, que não foram testadas para **SA4**, a substância **SA9** apresentou atividade semelhante às frações em diclorometano e acetato de etila, 50,8 e 63,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sugerindo que esse constituinte majoritário foi o responsável por esse resultado. Vale ressaltar que as células VERO são consideradas células normais, portanto tanto as frações D-AS, AC-AS e a substância **SA9** são ligeiramente tóxicas para células saudáveis.

Tabela 15. Dados da atividade antiproliferativa dos tubérculos de *Sinningia aggregata*.

Linhagens de células	TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	EETSA	EP-SA	D-SA	AC-SA	Bu-SA	SA4	SA9	Dox
U251	NT	>250	60,5	77,9	>250	NT	50,8	25,3
UACC-62	116,8	NT	NT	NT	NT	29,5	33,8	0,26
MCF-7	>250	>250	95,9	101,1	124,1	61,2	>125	>25
NCI-ADR/RES	>250	136,8	124,7	175,0	234,7	>250	>125	<0,025
786-0	106,6	>250	71,0	86,9	>250	34,3	70,3	0,05
NCI-H460	>250	>250	175,0	>250	>250	>250	125,0	0,054
PC-3	>250	>250	129,4	216,4	>250	>250	>125	2,20
OVCAR-3	106,6	NT	NT	NT	NT	23,8	101,9	>25
HT-29	>250	144,8	51,5	127,6	89,0	57,3	>125	0,64
K562	>250	>250	>250	209,1	>250	>250	NT	>25
VERO	NT	>250	58,5	116,6	>250	NT	63,8	11,6

NT – não testado; EETSA – extrato etanólico total; EP-SA – fração em éter de petróleo; D-SA – fração em diclorometano; AC-SA – fração em acetato de etila; Bu-SA – fração em 1-butanol; SA4 e SA9 – substâncias puras, Dox - doxorrubicina. Linhagens: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo células não pequenas), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon), K562 (leucemia), VERO (rim, célula normal, macaco verde).



E89. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de **SA9** e da fração de *S. aggregata* I em DCM.

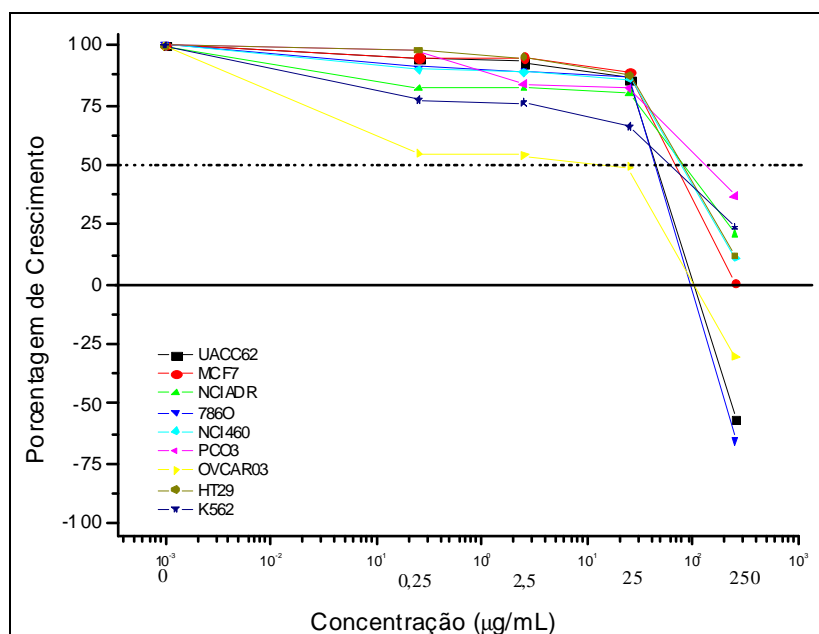


Figura 17. Gráfico da atividade antiproliferativa do extrato etanólico total.

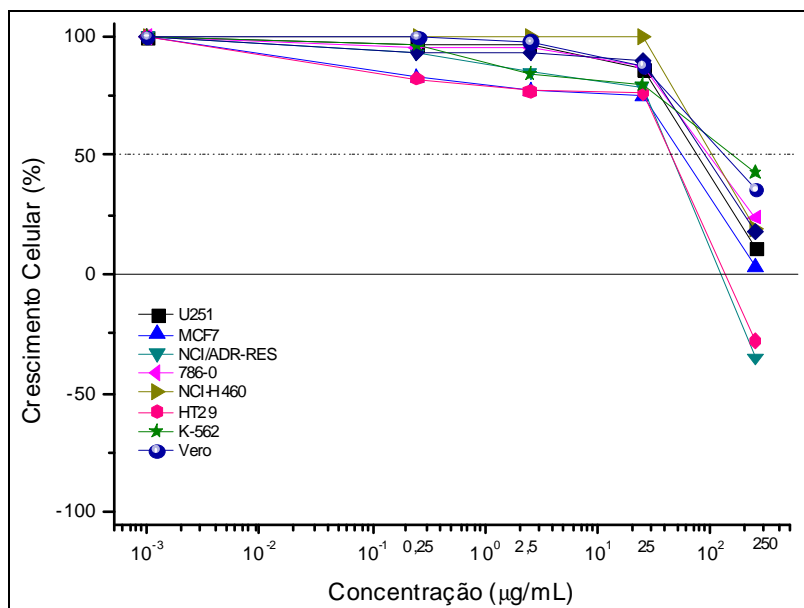


Figura 18. Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em éter de petróleo.

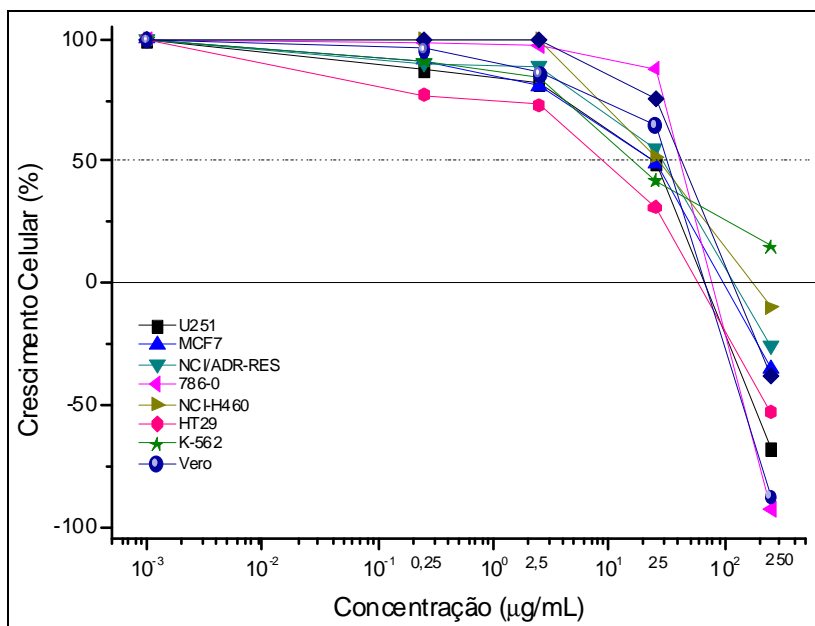


Figura 19. Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em diclorometano.

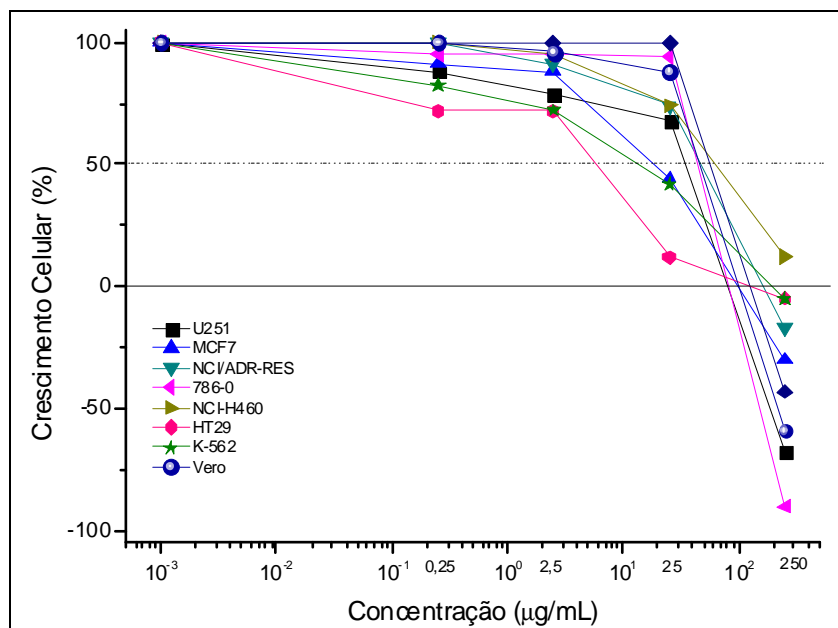


Figura 20. Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em acetato de etila.

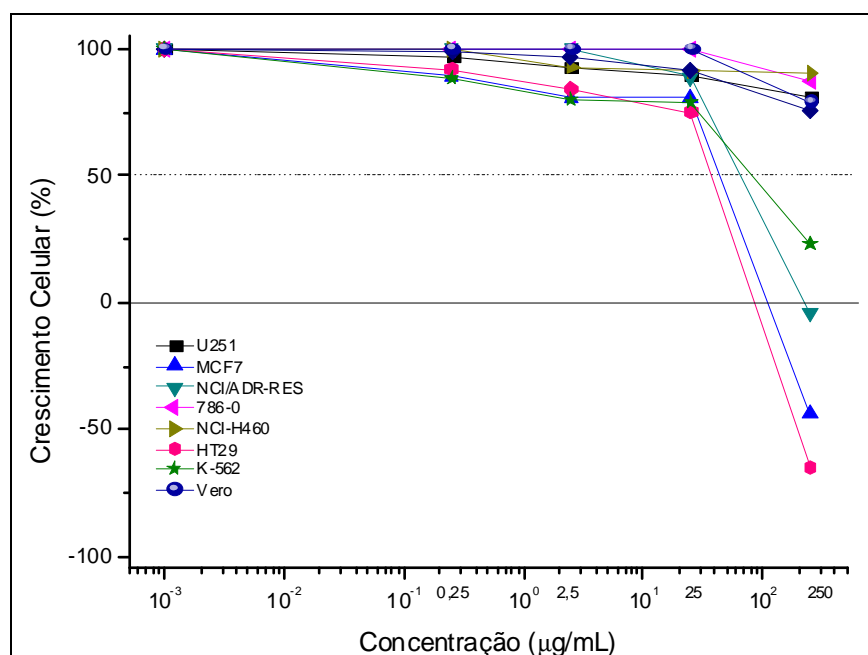


Figura 21. Gráfico da atividade antiproliferativa da fração em n-butanol.

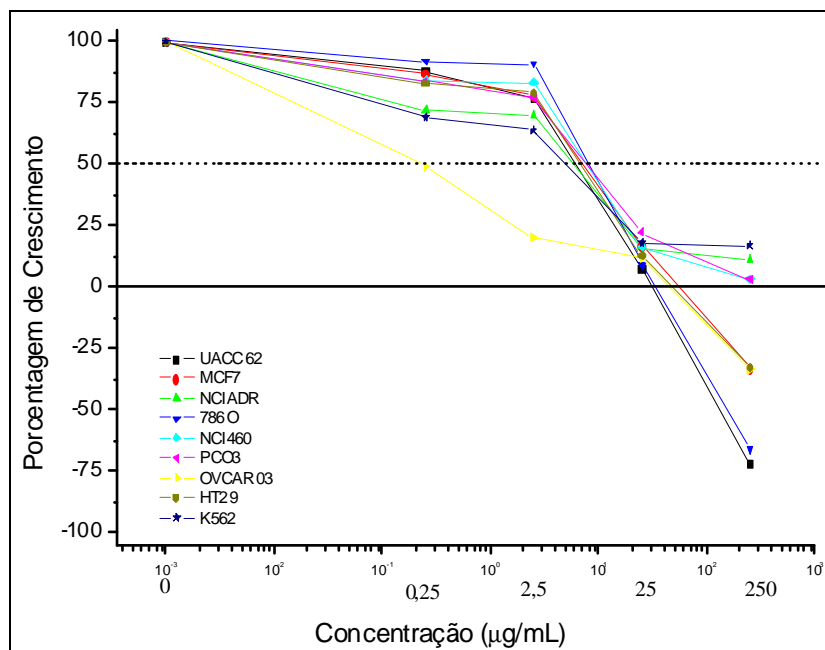


Figura 22. Gráfico da atividade antiproliferativa da substância SA4.



Figura 23. Gráfico da atividade antiproliferativa da substância isolada SA9.

5. BIOSÍNTESE

Devido ao fato de terem sido isoladas quatro substâncias inéditas, a biossíntese destas moléculas foi proposta com base em estudos já realizados com precursores e outros compostos da família.

De uma forma geral, a biossíntese de quinonas pode ocorrer por duas vias, do acetato ou do chiquimato. Uma grande quantidade de derivados de quinonas e estruturas relacionadas contendo um fragmento terpenóide (da via do mevalonato) bem como uma porção derivada do chiquimato, é amplamente distribuída (DEWICK, 1997). Sem um estudo biossintético não se pode definir com certeza o precursor das substâncias isoladas **SA1**, **SA2**, **SA3** e **SA4**. Entretanto, há um estudo realizado com uma espécie de Gesneriaceae, *Streptocarpus dunnii* (INOUE *et al.*, 1984), que avaliou o precursor de naftoquinonas e antraquinonas, concluindo que estas moléculas vêm da via do chiquimato passando pelo ácido 2-succinilbenzóico (Figuras 24 – página 112). Consideramos os resultados desse trabalho para propor uma rota biossintética para as aggregatinas.

Como pode ser visualizada na figura 24 (página 112), a biossíntese das aggregatinas, começaria com a reação aldólica entre o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4P para, após algumas etapas, formar o ácido chiquímico. Posteriormente, ocorre a reação com fosfoenolpiruvato seguida de eliminação de ácido fosfórico e formação do ácido corísmico. Seguidas adições e eliminações levam à formação do ácido succinilbenzóico, que após a reação com acetilcoenzima-A e alquilação do grupo prenila concomitante a descarboxilação, forma o precursor direto das substâncias **SA1**, **SA2**, **SA3** e **SA4**.

Na biossíntese das aggregatinas A-C (Figura 25 – página 113), ocorre oxidação de uma das metilas do grupo prenila, e posteriormente uma reação de esterificação intramolecular, formando o anel de uma ϵ -lactona. Com isso o esqueleto básico dessas moléculas está formado, depois seguem as reações de hidroxilação, seguida ou não de metilação, gerando os diferentes substituintes.

A biossíntese do composto **SA4** (Figura 26 – página 113) pode ocorrer através de oxidação de uma metila do grupamento prenila, formando um álcool, seguido de uma reação intramolecular de adição nucleofílica entre o álcool e a carbonila da cetona, gerando um hemi-cetal cíclico. Uma nova oxidação, agora no carbono terciário 3' completa a formação da aggregatina D.

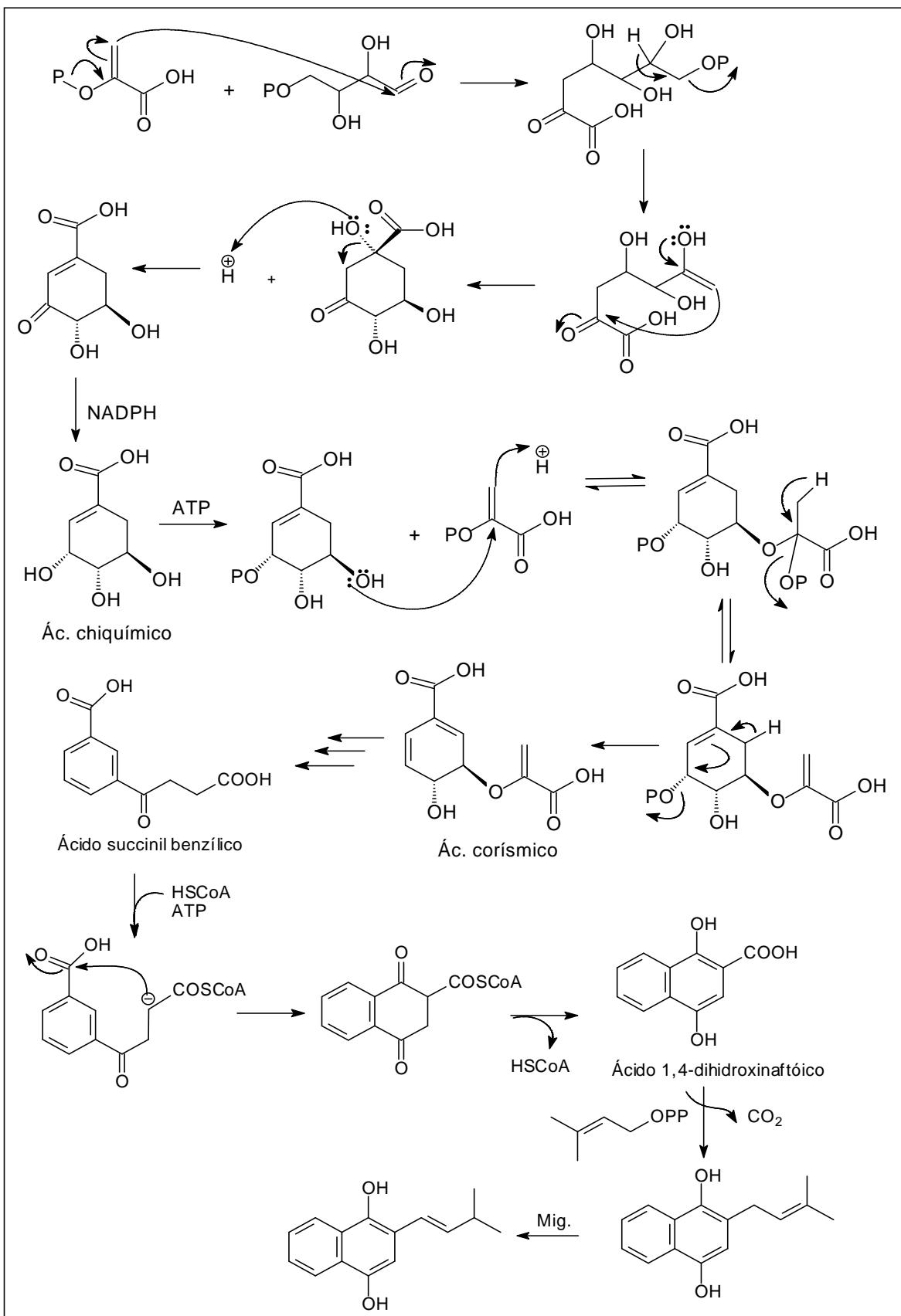


Figura 24. Formação do possível precursor da biossíntese das substâncias **SA1**, **SA2**, **SA3** e **SA4**.

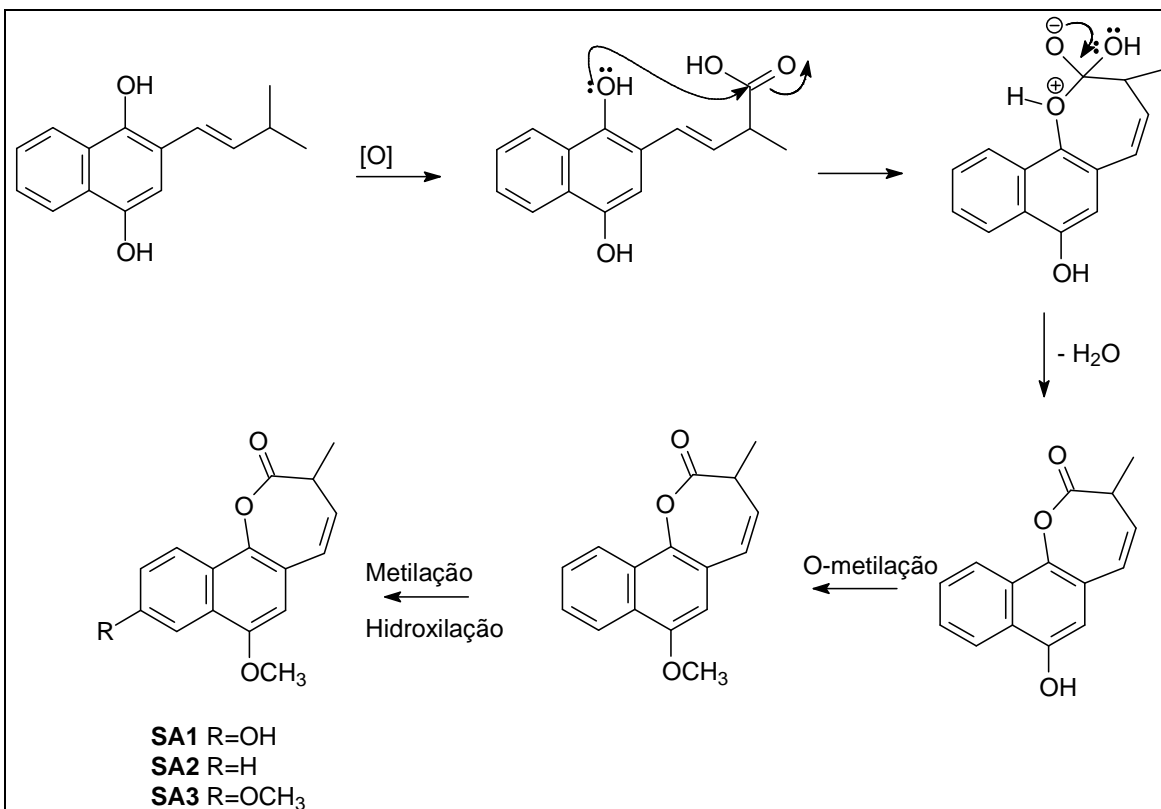


Figura 25. Proposta de biossíntese das substâncias **SA1**, **SA2** e **SA3**.

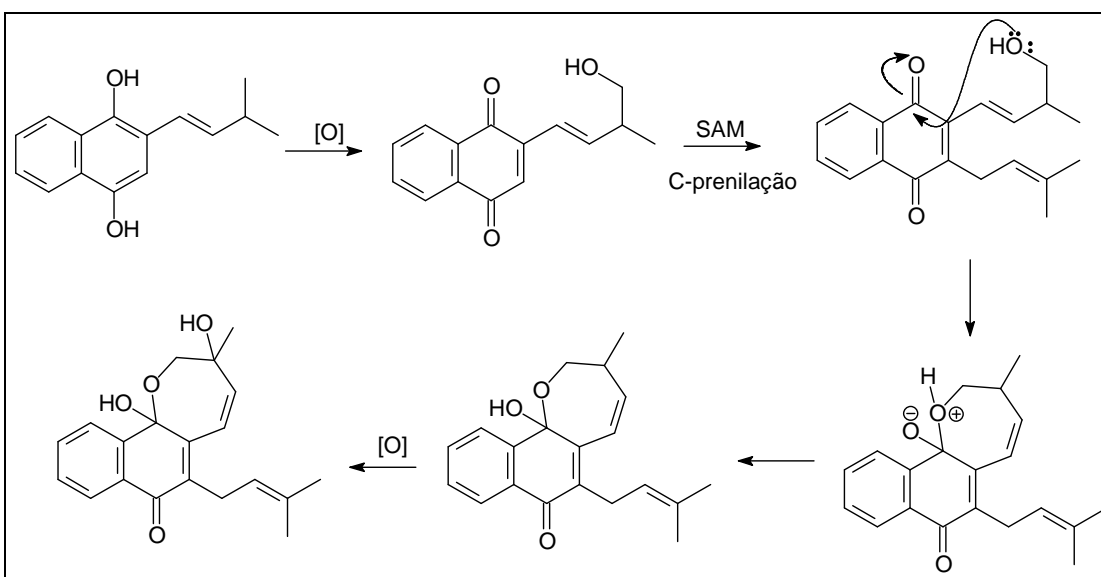


Figura 26. Proposta de biossíntese da substância isolada **SA4**.

6. CONCLUSÃO

Nos estudos com os extratos menos polares dos tubérculos de *S. aggregata*, foram isoladas neste trabalho 11 substâncias, dentre elas 7 conhecidas como produtos naturais (tectoquinona, 7-metoxi-2-metilantraquinona, 7-hidroxi-2-metilantraquinona, 1-hidroxi-2-metilantraquinona, halleridona, sitosterol e estigmasterol) e 4 inéditas (aggregatinas A, B, C e D).

As novas substâncias isoladas de *S. aggregata* apresentam um esqueleto carbônico novo, com um anel heterocíclico de sete membros. A formação de anéis de cinco ou seis membros é bastante comum, enquanto que anéis de sete membros são raros. Esta feição estrutural pode ser uma característica do gênero ou mesmo da espécie, situação que tornaria essas substâncias úteis como marcadores químicos. Além do mais, antraquinonas também são compostos de ocorrência restrita. Em Gesneriaceae há alguns registros de ocorrência de antraquinonas, em espécies dos gêneros *Chirita* (CAI *et al.*, 2005), *Didymocarpus* (SEGAWA *et al.*, 1999), *Rhyncholechum* (LU *et al.*, 1998), *Sinningia* (VERDAN *et al.*, 2009) e *Streptocarpus* (INOUE *et al.*, 1983). É interessante ressaltar que estes gêneros estão localizados em todo o planeta, *Chirita* e *Rhyncholechum* na China, *Didymocarpus* na Índia, *Sinningia* no Brasil e *Streptocarpus* na África, sugerindo que a biossíntese de antraquinonas é uma característica da família como um todo, servindo como marcador taxonômico. O estudo com outras espécies é necessário para confirmar estas hipóteses. A cicloexenona halleridona, foi isolada pela primeira vez no gênero *Sinningia*. Embora seja um artefato, o seu precursor, cornosídeo, é um composto com uma distribuição limitada em plantas, tendo sido encontrado apenas em alguns gêneros do grupo Scrophulariales/Lamiales, principalmente na família Gesneriaceae (JENSEN, 1996; 2000).

A avaliação da atividade antiproliferativa mostrou que tanto o extrato etanólico total, quanto a fração em diclorometano e as substâncias **SA4** e **SA9** apresentaram resultados positivos principalmente contra as células de melanoma, rim e ovário. Estes resultados indicam que as espécies de *Sinningia* acumulam substâncias com potencial farmacológico.

7. REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, E. K., Anthraquinones and anthraquinols from *Morinda lucida*: Biogenetic significance of oruwal and oruwalol. *Tetrahedron*, **29**(24), 4099-4102, 1973.
- ARAUJO, A. O.; SOUZA, V. C.; CHAUTEMS, A., Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **28**(1), 109-135, 2005.
- BALUNAS, M. J. & KINGHORN, A. D., Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, **78**, 431-441, 2005.
- BECKE, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, **98**, 5648-5652, 1993.
- BELLAKHDAR, J.; TORRE, M. C.; RODRIGUEX, B.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; PIOZZI, F., Halleridone and Related Products from *Teucrium decipiens*. *Planta Medica*, **54**, 267, 1988.
- BOGGAN, J. & SHALIT, P., What is a Gesneriad?. *Gesneriads*, **56**(1), 14-21, 2006.
- BURTT, B. L. & WIEHLER, H., *Classification of the family Gesneriaceae*. *Gesneriana*, **1**, 1-4, 1995.
- CAI, X.; LUO, X.; ZHOU, J.; HAO, X., Quinones from *Chirita eburnea*. *Journal of Natural Products*, **68**, 797-799, 2005
- CHAUTEMS, A., Gesneriaceae. In: Flora del Paraguay 22. *Conservatoire et Jardin Botanique de la Ville de Genève*, Genève, 12-16, 1993.
- CHAUTEMS, A., *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. FAPESP – RiMa, São Paulo, 75-103, 2003.
- CHHETRI, D. R., Medicinal plants used as antipyretic agents by the traditional healers of Darjeeling Himalayas. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, **3**, 271, 2004.
- CRAWFORD, T. D.; TAM, M. C.; ABRAMS, M. L., The Current State of *Ab Initio* Calculations of Optical Rotation and Electronic Circular Dichroism Spectra. *The Journal of Physical Chemistry A*, **111**(48), 12057-12068, 2007.
- CRONQUIST, A., *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia Univ. Press, New York, 1981.
- DEWICK, P. M., *Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, 1997.

- FRAGA, B. M.; QUINTANA, N.; DÍAZ, C. E., Anthraquinones from natural and transformed roots of *Plocama pendula*. *Chemistry & Biodiversity*, **6**, 182-192, 2009.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY Jr., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A., *Gaussian 03, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2008.
- GASPARINO, E. C., *Palinotaxonomia de espécies brasileiras de Gesneriaceae, com ênfase nas ocorrentes no Estado de São Paulo*. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.
- GOMES, M. A. N. & SHEPHERD, S. L. K., Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, **23**(2), 153-159, 2000
- GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R., Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*, atribuição dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. *Química Nova*, **16**(2), 95-100, 1993.
- GUPTA, M. P.; SOLÍS, P. N.; CALDERÓN, A. I.; GUINNEAU-SINCLAIR, F.; CORREA, M.; GALDAMES, C.; GUERRA, C.; ESPINOSA, A.; ALVENGA, G. I.; ROBLES, G.;

- OCAMPO, R., Medical Ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**, 389, 2005.
- HARTMANN, T., From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **68**, 2831–2846, 2007.
- HARVEY, A., Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, **5**(7), 294-300, 2000.
- HAY, P. J. & WADT, W. R., *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *Journal of Chemical Physics*, **82**, 270-283, 1985.
- ITOKAWA, H.; QIAO, Y.; TAKEYA, K., Anthraquinones and naphthoquinones from *Rubia cordifolia*. *Phytochemistry*, **28**(12), 3465-3468, 1989.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; INOUE, H., Quinones and related compounds in higher plants. Part 18. Quinones of *Streptocarpus dunnii*. *Phytochemistry*, **22**(3), 737-741, 1983.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; MORITOME, N.; INOUE, H., Biosynthesis of naphthoquinones and anthraquinones in *Streptocarpus dunnii* cell cultures. *Phytochemistry*, **23**(2), 313-318, 1984.
- JENSEN, S. R., Caffeoyl phenylethanoid glycosides in *Sanango racemosum* and in the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, **43**, 777-783, 1996.
- JENSEN, S. R., Chemical relationships of *Prolyprenum procumbens*, *Tetrachondra hamiltonii* and *Peltanthera floribunda*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 45-51, 2000.
- JOLY, L. G.; GUERRA, S.; SEPTIMO, R.; SOLIS, P. N.; CORREA, M.; GUPTA, M.; LEVY, S.; SANDBERG, F., Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in Western Panamá. Part I., *Journal of Ethnopharmacology*, **20**(2), 145-171, 1987.
- KAWASAI, Y.; GODA, Y.; YOSHIHIRA, K.; NOGUCHI, H., A New Anthraquinone from *Rubia tinctorum*. *Shoyakugaku Zasshi*, **44**, 95-97, 1990.
- KWIT, M.; ROZWADOWSKA, M. D.; GAWRONSKI, J.; GRAJEWSKA, A., Density Functional Theory Calculations of the Optical Rotation and Electronic Circular Dichroism: The Absolute Configuration of the Highly Flexible trans-Isocytosaxzone Revised. *Journal of Organic Chemistry*, **74**, 8051–8063, 2009.

- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, **37**, 785-789, 1988.
- LI, Y.; WICHA, M. S.; SCHWARTZ, S. J.; SUN, D., Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *Journal of Nutritional Biochemistry*, available online, 2011.
- LU, Y.; XU, P. -J.; CHEN, Z. -N.; LIU, G. -M., Anthraquinones glycosides from *Rhynchotechum vestitum*. *Phytochemistry*, **49**(4), 1135-1137, 1998.
- McCANN, D. M. & STEPHENS, P. J., Determination of Absolute Configuration Using Density Functional Theory Calculations of Optical Rotation and Electronic Circular Dichroism: Chiral Alkenes. *Journal of Organic Chemistry*, **71**, 6074-6098, 2006.
- McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T., Plant natural products: Back to the future or into extinction?. *Phytochemistry*, **68**, 2015–2022, 2007.
- MESSANA, I.; SPERANDEI, M.; MULTARI, G.; GALEFFI, C.; BETTOLO, G. B. M., A cyclohexadienone and a cyclohexenone from *Halleria lucida*. *Phytochemistry*, **23**(11), 2617-2619, 1984.
- MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E., Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **16**, 392-396, 2006.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I., Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. *Wermuth's The Practice of Medicinal Chemistry*, **8**, 159-186, 2008.
- NISBET, L. J. & MOORET, M., Will natural products remain an important source of drug research for the future?. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 708-712, 1997.
- NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S., Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, **59**, 365–378, 2009.
- NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-GARRIDO, G.; GARCÍA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCÍA, M.; PARDO-ANDREU, G. L., The paradox of natural products as pharmaceuticals - Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacological Research*, **55**, 351–358, 2007.

- PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, D., The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Letters*, **3**(1), 1-8, 2010.
- PEDERSEN, T. B. & HANSEN, A. E., *Ab initio* calculation and display of the rotary strength tensor in the random phase approximation. Method and model studies. *Chemical Physics Letters*, **246**(1-2), 1-8, 1995.
- PERRET, M.; CHAUTEMS, A.; SPICHIGER, R.; KITE, G.; SAVOLAINEN, V., Systematics and Evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and Nuclear NCPGS. *American Journal of Botany*, **90**(3), 445-460, 2003.
- PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O., Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. *Lead molecules from natural products: discovery and new trends*, 197-211, 2006.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D., Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, **99**, 1–13, 2003.
- SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I., A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, **57**(Suppl 1), S3–S9, 2008.
- SEGAWA, B.; MIYAICHI, Y.; TOMIMORI, T.; KIUCHI, F.; OHTA, T., Phenolic constituents of the leaves of *Didymocarpus leucocalyx* C. B. Clarke (Gesneriaceae). *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **47**(10), 1404-1411, 1999.
- SHERIDAN, H.; NESTOR, C.; O'DRISCOLL, L.; HOOK, I., Isolation, Structure elucidation, and Cytotoxic Evaluation of Furanonaphthoquinones from in Vitro Plantlets and Cultures of *Streptocarpus dunnii*. *Journal of Natural Products*, **74**, 82-85, 2011.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of Natural Cancer Institute*, **82**, 1107-1118, 1990.
- STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI Jr, A., Composição do óleo essencial de *Sinningia aggregata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **15**(4), 331-333, 2005.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J., *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons, Inc., 7° edição, USA, 2005.

- STEPHENS, P. J.; DEVLIN, F. J.; CHABALOWSKI, C. F.; FRISCH, M. J., *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *Journal of Physical Chemistry*, **98**, 11623-11627, 1994.
- STROHL, W. R., The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, **5**(2), 39-41, 2000.
- SWINNY, E. E.; BLOOR, S. J.; WONG, H., H^1 and C^{13} NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **38**, 1031-1033, 2001.
- TULP, M. & BOHLIN, L., Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today*, **9**(10), 450-458, 2004.
- UEDA, J.; TERUZA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, Q. L.; TRAN, Q. K.; HARIMAYA, Y.; SAIKI, I.; KADOTA, S., Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **25**(6), 753, 2002.
- UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M., Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Gesneriaceae). *Acta Science Agronomic*, **28**(4), 503-506, 2006.
- VAISHNAV, P. & DEMAINE, A. L., Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, **29**, 223–229, 2010.
- VERDAN, M. H.; CERVI, A.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A., Anthraquinones and ethylcyclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* “Fyfiana”. *Biochemical Systematic and Ecology*, **37**, 40-42, 2009.
- VERDAN, M. H.; BARISON, A.; SÁ, E. L.; SALVADOR, M. J.; POLIQUESI, C. B.; EBERLIN, M. N.; STEFANELLO, M. E. A., Lactones and Quinones from the Tubers of *Sinningia aggregata*. *Journal of Natural Products*, **73**(8), 1434-1437, 2010.
- VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J., Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, **29**(2), 326-337, 2006.
- VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M., Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Canadian Journal of Physics*, **58**, 1200-1211, 1980.
- WANG, M. –Y.; YANG, L.; TU, Y. –Y., Studies on the chemical constituents from stem of *Chirita longgangensis* var. *hongyao*. *China Journal of Chinese Materia Medica*.

31(4), 307-308, 2006.

WEBER, A., Gesneriaceae and Scrophulariaceae: Robert Brown and now. *Telopea*, **10**(2), 543-571, 2004.

WINEFIELD, C. S.; LEWIS, D. H.; SWINNY, E. E.; ZHANG, H.; ARATHOON, H. S.; FISCHER, T. C.; HALBWIRTH, H.; STICH, K.; GOSCH, C.; FORKMANN, G.; DAVIES, K. M., Investigation of the biosynthesis of 3-deoxyanthocianins on *Sinningia cardinalis*. *Physiologia Plantarum*, **124**, 419-430, 2005.