

António Manuel Deométrio Rodrigues Lourenço Pereira

**PRODUTOS NATURAIS
DA
PLANTA MEDICINAL
*SARCOCEPHALUS LATIFOLIUS***

**Évora
2001**

António Manuel Deométrio Rodrigues Lourenço Pereira

**PRODUTOS NATURAIS
DA
PLANTA MEDICINAL
*SARCOCEPHALUS LATIFOLIUS***

**Dissertação apresentada para obtenção
do Grau de Doutor no Ramo da Química,
pela Universidade de Évora**

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
120 871

**Évora
2001**

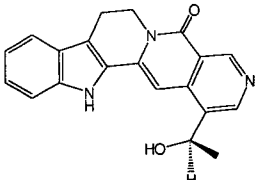
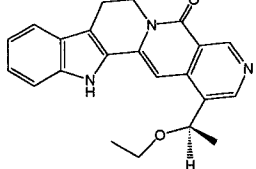
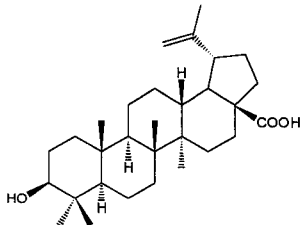
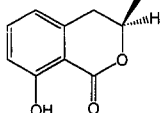
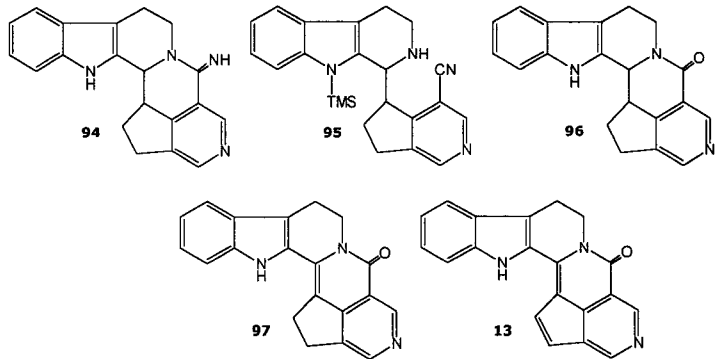
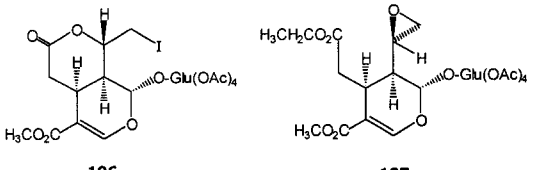
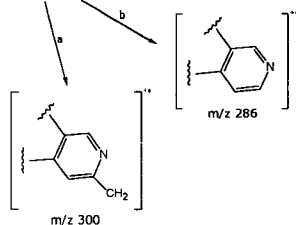
PRODUTOS NATURAIS DA PLANTA MEDICINAL *SARCOCEPHALUS LATIFOLIUS*

ERRATA (Texto)

pg.	onde se lê	deve ler-se
9 (linha 22)	<i>N. latifolius</i>	<i>N. latifolia</i>
23 (linha 9)	Figura I.6, pg. 25	Figura I.6, pg. 26
27 (linha 26)	Figura I.29, pg. 48	Figura I.29, pg. 49
44 (Figura I.24)	99	98
45 (Figura I.25)	99	98
49 (linha 4)	Figura I.29	Figura I.30
108 (linha 26)	C'-1	C-1'
157 (linha 1)	Hor PLC	por HPLC
157 (Tabela II.29)	ComHosto TemHo	Composto Tempo

PRODUTOS NATURAIS DA PLANTA MEDICINAL *SARCOCEPHALUS LATIFOLIUS*

ERRATA (Estruturas)

pg.	deve ler-se
ix e 190 (angustolina)	
ix, 80 e 188 (19-O-etilangustolina)	
xi (ácido betulínico)	
xiii, 126 e 210 (meleína)	
40 (Figura I.20)	
44 (Figura I.24)	
84 (Figura II.18)	

AGRADECIMENTOS

Qualquer palavra é 'pequena' demais, para poder expressar o meu mais sincero agradecimento ao professor Pedro Abreu, supervisor desta tese, pela sua valiosa orientação, excelentes e permanentes ensinamentos, apoio, incentivo e interesse, dedicados à realização deste trabalho.

Ao professor Júlio Manuel da Cruz Morais do Departamento de Química da Universidade de Évora, agradeço o permanente interesse e apoio demonstrados.

Torno extensivos os meus agradecimentos a todos quantos me prestaram, no âmbito deste trabalho, valiosa colaboração científica:

- Professora Angela Relva (FCT/UNL) pela colaboração na cromatografia gás-liquído.
- Dr. Oliver Kayser (Instituto de Farmácia II, da Universidade Livre de Berlim) pelos testes de actividade leishmanicida, antiplasmódica e pela colaboração na espectrometria de massa de alta resolução.
- Professor Gary Gray (Universidade de Minnesota) pela colaboração na espectrometria de massa de alta resolução.
- Professor Hiromitsu Takayama (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Chiba) pela cedência de amostras de alcalóides.
- Professor Karsten Krohn (Universidade de Paderborn) pela cedência de uma amostra de meleína.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Química da Universidade de Évora e da Universidade Nova de Lisboa, agradeço as palavras encorajadoras e de incentivo que sempre me dispensaram.

Agradeço ainda aos meus amigos de Ponte de Sôr, companheiros de tantas 'aventuras', as palavras verdadeiras transmitidas ao longo de todo este tempo.

**Ao meu Pai
À minha Mãe
À Gina**

À Patricia, ao Eurico e à Sara, colegas de 'árido' trabalho laboratorial, o meu mais sincero e profundo agradecimento, pelo companheirismo e apoio manifestados.

Por fim gostaria de agradecer à Gina, a confiança, as palavras carinhosas, e os permanentes incentivos, que nos momentos menos bons me permitiram ultrapassar o que julgava impossível.

RESUMO

Esta dissertação descreve o estudo fitoquímico da Rubiácea *Sarcocephalus latifolius*, originária da Guiné-Bissau.

Após uma abordagem sobre os usos do *S. latifolius* na medicina tradicional, e da sua actividade biológica e farmacológica, é revista a fitoquímica do género *Nauclea*, com relevância nos seus constituintes alcalóides, referindo-se ainda a actividade de diversos produtos naturais isolados da *Nauclea* sps.

Dos extractos etanólicos do *S. latifolius* foram isolados e identificados por métodos espectroscópicos, três novos alcalóides, a 19-*O*-etilangustolina, 21-*O*-metilestrictosamida e 21-*O*-etilestrictosamida, e ainda, a nauclefina, angustina, angustolina, angustidina, strictosamida, naucleidinal, e 19-*epi*-naucleidinal.

A configuração absoluta da angustolina e 19-*O*-etilangustolina, foi determinada por métodos de resolução óptica e dispersão óptica rotatória.

Foram também isolados e caracterizados:

- os triterpenos, β -sitosterol, glucósido do β -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, lupeol, ácido betulínico, 3- β -*O*- β -D-fucopiranosídeo do ácido quinóvico e 3- β -*O*- α -L-ramnopiranosídeo do ácido quinóvico;
- as cumarinas, (R)-(-)-meleína e escopoletina;
- e o 3,4-dimetoxibenzoato de metilo.

A confirmação das estruturas do glucósido do β -sitosterol e da estigmast-4-en-3-ona, foi feita por correlação química com análogos hemissintéticos.

A composição em ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos do *S. latifolius* foi determinada por GC-MS, tendo-se identificado os ácidos mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico, esteárico, palmitoleico, oleico e linoleico.

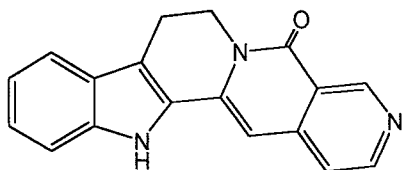
Do mesmo extracto, foram ainda isolados e identificados por métodos de HPLC e RMN, o glicerol, D-eritritol, D-xilose, D-arabinose, D-fructose, D-glucose, e o 2-metoxi- α,β -fructofuranósido.

A actividade antibiótica dos extractos das folhas, raízes e troncos, foi avaliada com as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

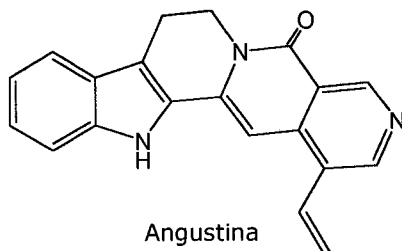
pyogenes, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, e com os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. A actividade antitumoral foi testada no carcinoma escamoso, melanoma, carcinoma do pulmão e carcinoma da mama.

A actividade antiplasmódica da estrictosamida foi determinada para o *Plasmodium falciparum*, enquanto que a actividade leishmanicida da estrictosamida e do glucósido do β -sitosterol foi avaliada contra os parasitas *Leishmania donovani*, *L. major*, *L. infantum*, e *L. enrietti*.

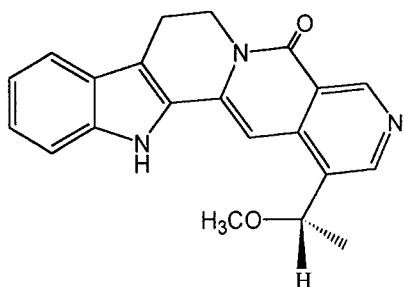
A toxicidade dos extractos etanólicos das folhas, da estrictosamida e do glucósido do β -sitosterol, foi avaliada em larvas do crustáceo *Artemia salina*.



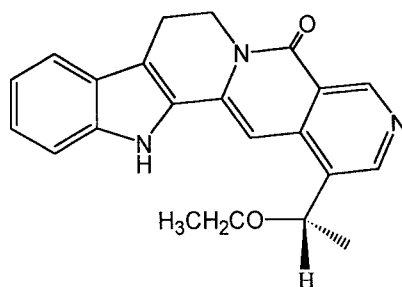
Nauclefina



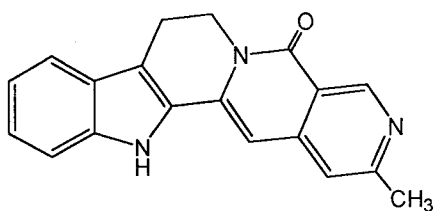
Angustina



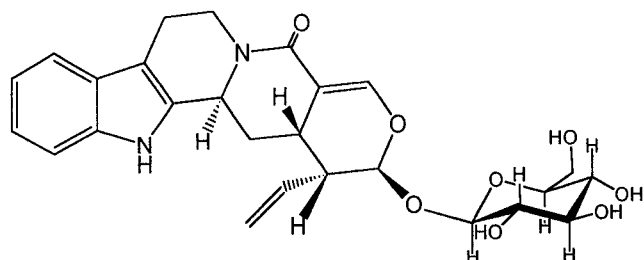
Angustolina



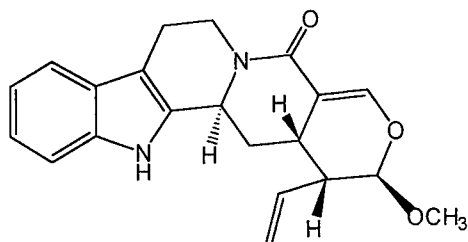
19-O-etilangustolina



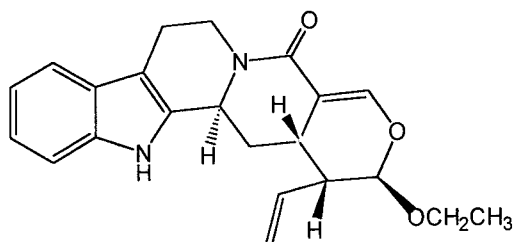
Angustidina



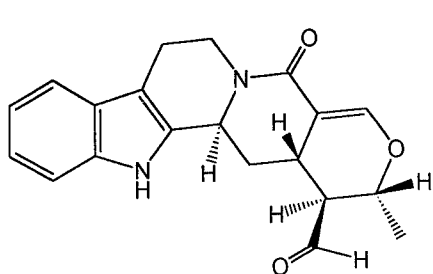
Estrictosamida



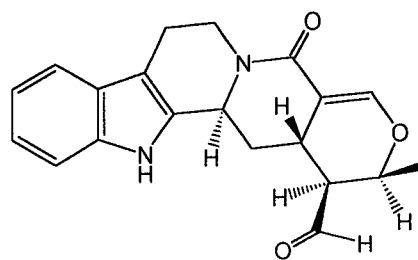
21-O-metilestrictosamida



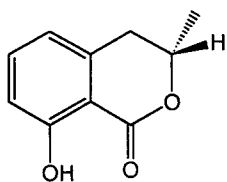
21-O-etilestrictosamida



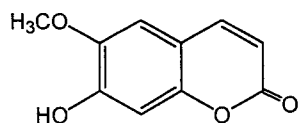
Naucleidinal



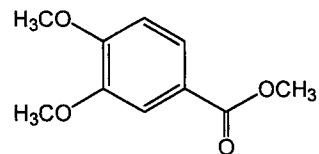
19-Epi-naucleidinal



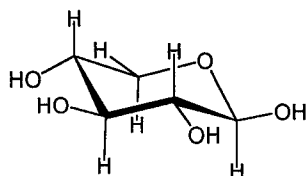
(R)-(-)-Meleína



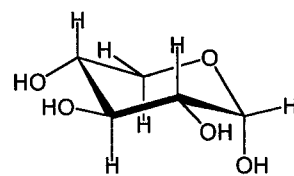
Escopoletina



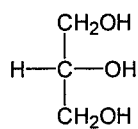
3,4-Dimetoxibenzoato de metilo



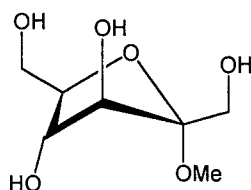
β -D-xilopiranoose



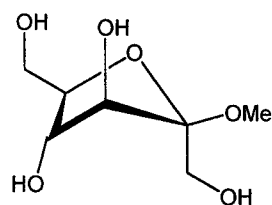
α -D-xilopiranoose



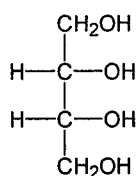
Glicerol



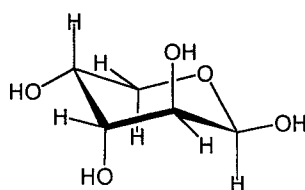
2-Metoxi- α -D-fructofuranosido



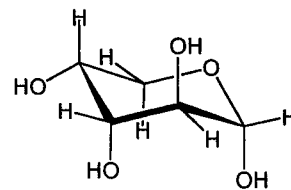
2-Metoxi- β -D-fructofuranosido



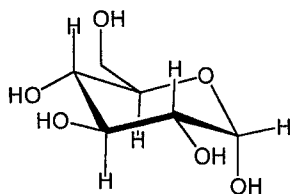
D-Eritritol



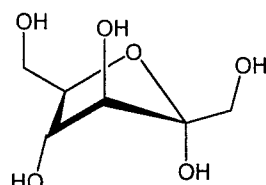
β -D-arabinopiranoose



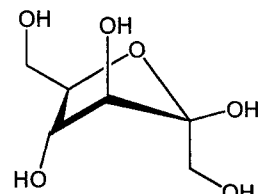
α -D-arabinopiranoose



α -D-glucopiranoose



α -D-fructofuranose



β -D-fructofuranose

ABSTRACT

This thesis describes the phytochemical study of the medicinal plant *Sarcocephalus latifolius* (Rubiceae), collected in Guinea-Bissau.

Following an introduction on the use of *S. latifolius* in traditional medicine, its biological and pharmacological activity, the phytochemistry of *Nauclea* genus is reviewed, with particular emphasis to the alkaloid constituents.

From the ethanolic extracts of *S. latifolius*, the new alkaloids 19-*O*-ethylangustoline, 21-*O*-methylstrictosamide and 21-*O*-ethylstrictosamide were isolated and identified, as well as the known *Nauclea* alkaloids nauclefine, angustine, angustoline, angustidine, strictosamide, naucleidinal, and 19-*epi*-naucleidinal. Extensive spectroscopic methods were used in structural elucidation, whereas the absolute configuration of angustoline and 19-*O*-ethylangustoline was assigned by Horeau's method using HPLC and optical rotatory dispersion.

Other metabolites were isolated and characterized:

- the triterpenes β -sitosterol, β -sitosterol glycoside, stigmast-4-en-3-one, lupeol, betulinic acid, quinovic acid 3- β -*O*- β -D-fucopyranoside and quinovic acid 3- β -*O*- α -L-rhamnopyranoside;
- coumarines (R)-(-)-mellein and scopoletin;
- and methyl 3,4-dimethoxybenzoate.

β -Sitosterol glycoside and stigmast-4-en-3-one structures were confirmed by chemical correlation with hemisynthetic analogues.

The fatty acid composition of neutral ethanolic extracts of *S. latifolius* stem bark, determined by GC-MS, led to the identification of myristic, pentadecanoic, palmitic, margaric, stearic, palmitoleic, oleic and linoleic acid.

From the same extract, glycerol, D-erythritol, D-xylose, D-arabinose, D-fructose, D-glucose, and 2-methoxy- α,β -fructofuranoside, were isolated and identified by HPLC and NMR methods.

Leaves, roots and stem bark extracts of *S. latifolius*, were screened for their antibiotic activity against bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

pyogenes, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*, and fungi *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Antitumour activity was evaluated on squamous carcinoma, melanoma, lung carcinoma and mamma carcinoma.

Antiplasmodial activity of strictosamide was tested on *Plasmodium falciparum*, whereas antileishmanial activity of strictosamide and β -sitosterol glycoside was assayed against *Leishmania donovani*, *L. major*, *L. infantum*, and *L. enrietti*.

The toxicity of leaves ethanolic extracts, strictosamide and β -sitosterol glycoside, was monitored by the brine shrimp assay (*Artemia salina*).

ABREVIATURAS

A	ampere
Ac	acetato
$[\alpha]_D^t$	rotação óptica específica em graus, à temperatura t , na risca D do espectro de emissão do sódio
c	concentração em g/100 mL
ccd	cromatografia em camada delgada
ccp	cromatografia em camada preparativa
CF	cromatografia de 'flash'
^{13}C -RMN	ressonância magnética nuclear de ^{13}C
d	dubleto
DC	dicroísmo circular
dd	dubleto de dubletos
ddd	dubleto de dubleto de dubletos
δ	deslocamento químico em ppm
DEPT	'distortioneless enhancement by polarization transfer'
DIBAL-H	hidreto-aluminato de di-isobutilo
DL ₅₀	dose letal média
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOR	dispersão óptica rotatória
dt	dubleto de tripletos
EIMS	espectrometria de massa por impacto electrónico
Et	etilo
EV	electrão Volt

FABMS	espectrometria de massa por bombardeamento atómico rápido
[ϕ]	rotação molar
GC	cromatografia gás-líquido
GC-MS	cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa
HMBC	'heteronuclear multiple bond correlation'
HMQC	'heteronuclear multiple quantum correlation'
HRCIMS	espectrometria de massa de alta resolução por ionização química
HREIMS	espectrometria de massa de alta resolução por impacto electrónico
HRFABMS	espectrometria de massa de alta resolução por bombardeamento atómico rápido
^1H - ^1H COSY	espectroscopia de correlação protão-protão
HMPA	hexametilfosforamida
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
HPTLC	cromatografia de camada delgada de alta resolução
^1H -RMN	ressonância magnética nuclear de ^1H
Hz	hertz
Int. rel.	intensidade relativa
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento em Hz
λ	comprimento de onda em nm
lit.	literatura
LPLC	cromatografia líquida de baixa pressão
m	multiplete
MIC	concentração inibitória mínima
m/z	relação massa/carga em uma

Me	metilo
MPLC	cromatografia líquida de média pressão
ν	numero de onda em cm^{-1}
NOE	efeito nuclear Overhauser
NOESY	'nuclear overhauser enhancement spectroscopy'
Pd/C	paládio sobre carvão
PCC	clorocromato de piridina
Pf	ponto de fusão
pg.	página
ppm	partes por milhão
PTSCI	cloreto <i>p</i> -toluenossulfónico (cloreto de tosilo)
q	quarteto
R	radical alquilo
s	singuleto
sl	singuleto largo
t	tripleto
TBDMS	<i>t</i> -butildimetilsilil
TFAA	ácido trifluoroacético
THF	tetra-hidrofurano
TMS	tetrametilsilano
uma	unidades de massa atómica
UV	ultra-violeta
V	volt

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO

I.1. Usos do <i>Sarcocephalus latifolius</i> na medicina tradicional	5
I.2. Actividade biológica e farmacológica do <i>Sarcocephalus latifolius</i>	7
I.3. Estudo químico do género <i>Nauclea</i>	9
I.3.1. Alcalóides do género <i>Nauclea</i>	10
I.3.1.1. Características espectrais e cromatográficas	21
I.3.1.2. Síntese dos alcalóides indólicos do género <i>Nauclea</i>	31
I.3.1.3. Biossíntese dos alcalóides indólicos do género <i>Nauclea</i>	49
I.3.2. Terpenos	51
I.3.3. Outros compostos	56
I.4. Actividade biológica de produtos naturais isolados do género <i>Nauclea</i>	57

II – DISCUSSÃO

II.1. Alcalóides	61
II.1.1. Nauclefina (7)	61
II.1.2. Angustina (1)	64
II.1.3. Angustolina (4)	67
II.1.3.1. Determinação da configuração absoluta da angustolina (4)	71
II.1.4. 19- <i>O</i> -etilangustolina (159)	74
II.1.4.1. Determinação da configuração da 19- <i>O</i> -etilangustolina (159)	79
II.1.5. Angustidina (6)	81
II.1.7. Estrictosamida (28)	85

II.1.8. 21- <i>O</i> -metilestrictosamida aglícóna (161)	90
II.1.9. 21- <i>O</i> -etilestrictosamida aglícóna (162)	93
II.1.10. Naucleidinal (39)	95
II.1.11. 19- <i>Epi</i> -naucleidinal (40)	98
II.2. Triterpenos	102
II.2.1 – Glucósido do β -Sitosterol (163)	102
II.2.1.1. Hemissíntese do glucósido do β -sitosterol (163)	108
II.2.2. β -Sitosterol (146)	112
II.2.3. Estigmast-4-en-3-ona (171)	113
II.2.3.1. Hemissíntese da estigmast-4-en-3-ona (171)	115
II.2.4. Lupeol (175)	116
II.2.5. Ácido betulínico (176)	117
II.2.6. Glicosidos do ácido quinóvico (136 e 178)	118
II.2.6.1. Éster dimetílico do ácido 3- β - <i>O</i> - α -L-triacetilramno- piranósido quinóvico (179)	119
II.2.6.2. Éster dimetílico do ácido 3- β - <i>O</i> - β -D-triacetilfuco- piranósido quinóvico (180)	122
II.3. Cumarinas	124
I I.3.1. (R)-(-)-Meleína (183)	124
II.3.2. Escopoletina (184)	127
II.4. Compostos fenólicos	130
II.4.1. 3,4-Dimetoxibenzoato de metilo (185)	130
II.5. Ácidos Gordos	132
II.6. Açúcares	135
II.6.1. Caracterização dos benzoatos dos açúcares	138
II.6.1.1. Aldopentopiranoses tetrabenzoíladadas	139
II.6.1.1.1. 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -benzoil- β -D-xilopiranosose (186)	140

II.6.1.1.2. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- α -D-xilopiranosose (187)	141
II.6.1.1.3. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- β -D-arabinopiranosose (188)	142
II.6.1.1.4. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- α -D-arabinopiranosose (189)	144
II.6.1.2. Aldo-hexapiranososes pentabenoííadas	145
II.6.1.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- α -D-glucopiranosose (168)	145
II.6.1.2.2. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-glucopiranosose (190)	146
II.6.1.3. Cetoses tetra e pentabenoííadas	147
II.6.1.3.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-fructopiranosose (191)	149
II.6.1.3.2. 1,3,4,5-Tetra-O-benzoíl- β -D-fructopiranosose (192)	150
II.6.1.3.3. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- α -D-fructofuranose (193)	151
II.6.1.3.4. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-fructofuranose (194)	152
II.6.1.3.5. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)	153
II.6.1.3.5.1. Síntese da mistura de metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)	155
II.6.1.4. Trioses e tetroses benzoííadas	156
II.6.1.4.1. 1,2,3-Tri-O-benzoíílglicerol (203)	156
II.6.1.4.2. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl-D-eritritol (204)	156
II.6.2. Quantificação dos açúcares livres por HPLC	157
II.7. Actividade biológica dos extractos e de compostos do <i>Sarcocephalus latifolius</i>	160
II.8. Actividade biológica descrita na literatura, de outros metabolitos isolados do <i>Sarcocephalus latifolius</i>	163
II.9. Conclusões	164
 III – PARTE EXPERIMENTAL	
III.1. Aparelhagem e condições experimentais	169
III.2. Material	173

III.3. Extracção	173
III.4. Isolamento dos produtos naturais	176
III.4.1. Extracto etanólico básico dos troncos	176
III.4.2. Extracto etanólico ácido dos troncos	179
III.4.3. Extracto etanólico neutro dos troncos	179
III.4.4. Extracto etanólico básico e ácido das folhas	182
III.4.5. Extracto etanólico neutro das folhas	183
III.4.6. Extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes	185
III.5. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados	188
III.5.1. Alcalóides	188
III.5.1.1. 19- <i>O</i> -etilangustolina (159)	188
III.5.1.2. Angustina (1)	189
III.5.1.3. Angustolina (4)	190
III.5.1.4. Angustidina (6)	192
III.5.1.5. Nauclefina (7)	193
III.5.1.6. Estrictosamida (28)	194
III.5.1.7. Naucleidinal (39)	196
III.5.1.8. <i>Epi</i> -naucleidinal (40)	197
III.5.1.9. 21- <i>O</i> -metilestrictosamida aglícica (161)	198
III.5.1.10. 21- <i>O</i> -etilestrictosamida aglícica (162)	199
III.5.2. Triterpenos	200
III.5.2.1. Glucósido do β -sitosterol (163)	200
III.5.2.2. Estigmast-4-en-3-ona (171)	202
III.5.2.3. Lupeol (175)	203
III.5.2.4. β -Sitosterol (146)	204
III.5.2.5. Ácido Betulínico (176)	205

III.5.2.6. Éster dimetilico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosido quinóvico (179)	207
III.5.2.7. Éster dimetilico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosido quinóvico (180)	208
III.5.3. Cumarinas	210
III.5.3.1. (R)-(-)-Meleína (183)	210
III.5.3.2. Escopoletina (184)	211
III.5.4. Compostos fenólicos	212
III.5.4.1. 3,4-Dimetoxibenzoato de metilo (185)	212
III.6. Determinação da configuração absoluta da angustolina (4) pelo método de Horeau	213
III.6.1. Éster fenil butírico da angustolina (154)	214
III.7. Determinação da configuração absoluta da angustolina (4) pelo método modificado de Horeau por HPLC	215
III.7.1. Síntese de (1R,2'S)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (157) e (1R, 2'R)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (158).	215
III.7.1.1. (1R,2'S)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (157)	216
III.7.1.2. (1R, 2'R)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (158)	217
III.8. Acetilação da estictosamida (28)	218
III.8.1. Tetracetato da estictosamida (160)	218
III.9. Acetilação do glucósido do β -sitosterol (163)	219
III.9.1. Tetracetato do glucósido do β -sitosterol (164)	220
III.10. Benzoilação do glicósido do β -sitosterol (163)	221
III.10.1. Tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (166)	222
III.11. Hidrólise do éster dimetilico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosido quinóvico (179)	223
III.12. Hidrólise do éster dimetilico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosido quinóvico (180)	223
III.13. Síntese do glucósido do β -sitosterol (163)	224

III.13.1. Síntese da 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -benzoíl- α -D-glucopiranosose (168)	224
III.13.2. Síntese da bromo-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoíl- α -D-glucopiranosose (169)	225
III.13.3. Síntese da 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoíl- α,β -D-glucopiranosose (170)	226
III.13.4. Síntese da 1- <i>O</i> -(2,2,2-tricloroetanimidoil)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoíl- α -D-glucopiranosose (165)	228
III.13.5. Síntese do tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (166)	229
III.13.6. Desbenzoílação do tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (170)	230
III.14. Síntese da estigmast-4-en-3-ona (171)	232
III.14.1. Síntese do dibrometo do β -sitosterol (172)	232
III.14.2. Síntese do 5 α ,6 β -dibromoestigmastan-3-ona (173)	232
III.14.3. Síntese da estigmast-5-en-3-ona (174)	233
III.14.4. Isomerização da estigmast-5-en-3-ona (174) em estigmast-4-en-3-ona (171)	234
III.15. Metilação do ácido betulínico (176)	235
III.15.1. Éster metílico do ácido betulínico (177)	235
III.16. Identificação dos ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos	236
III.17. Separação e identificação dos açúcares do extracto etanólico neutro dos troncos	237
III.17.1. Derivatização dos açúcares para GC	237
III.17.2. Benzoílação dos açúcares	238
III.17.2.1. Características físicas e espectroscópicas dos açúcares benzoíladados	241
III.17.2.1.1. 1,2,3-Tri- <i>O</i> -benzoílglicerol (203)	241
III.17.2.1.2. 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -benzoíl-D-eritritol (204)	242
III.17.2.1.3. 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -benzoíl- β -D-xilopiranosose (186)	242

III.17.2.1.4. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- α -D-xilopiranoze (187)	243
III.17.2.1.5. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)	244
III.17.2.1.5.1. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α -D-fructofuranósido (195)	244
III.17.2.1.5.2. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- β -D-fructofuranósido (196)	245
III.17.2.1.6. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- β -D-arabino-piranoze (188)	246
III.17.2.1.7. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- α -D-arabino-piranoze (189)	247
III.17.2.1.8. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- α -D-fructofurano (193)	248
III.17.2.1.9. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-fructofuranose (194)	249
III.17.2.1.10. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- α -D-glucopiranoze (168)	250
III.17.2.1.11. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-fructopiranoze (191)	251
III.17.2.1.12. 1,2,3,4,5-Penta-O-benzoíl- β -D-glucopiranoze (190)	251
III.17.2.1.13. 1,3,4,5-Tetra-O-benzoíl- β -D-fructopiranoze (192)	252
III.17.3. Separação dos açúcares livres por HPLC	254
III.18. Síntese do metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)	254
III.18.1. Síntese da 1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranose (198)	254
III.18.2. Metilação da 1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranose (198)	255
III.18.3. Desbenzoílação do metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)	257
III.19. Determinação da toxicidade para o crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	257
BIBLIOGRAFIA	259

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura I.1 – Alcalóide tipo piridino–indolo–quinolizidinona.	10
Figura I.2 – Alcalóide tipo oxoioimbano.	10
Figura I.3 – Fragmentações características dos alcalóides do grupo piridino–indolo–quinolizidinona.	22
Figura I.4 – Estrutura tridimensional da nauclefina (7).	26
Figura I.5 – Estrutura tridimensional da 3,14–di–hidro–angustina (9).	26
Figura I.6 – Estrutura tridimensional da 19–O–metilangustolina (50).	26
Figura I.7 – Epimerização em C–3 de alcalóides do grupo oxoioimbano em meio ácido.	28
Figura I.8 – NOE do naucleidinal.	29
Figura I.9 – NOE do 3– <i>epi</i> –naucleidinal.	29
Figura I.10 – Curvas de DC do naucleidinal (39) e 3– <i>epi</i> –naucleidinal (51).	30
Figura I.11 – Curvas de DC da strictosamida (28), da 10–hidroxi strictosamida (29), vincosamida (30) e da 10–hidroxivincosamida (52).	30
Figura I.12 – Síntese da angustidina (6), nauclefina (8), (\pm)–angustolina (4) e 19–O–metilangustolina (50).	32
Figura I.13 – Síntese da nauclefina (7), segundo Ninomiya.	33
Figura I.14 – Síntese da nauclefina (7) segundo Laronze.	34
Figura I.15 – Síntese da nauclefina (7), angustina (1), 18,19–di–hidroangustina (3), nauclefina (8) e 19–O–metilangustolina (50).	35
Figura I.16 – Síntese da angustina (1) e da nauclefina (7).	36
Figura I.17 – Síntese da nauclefina (7) segundo Wanner.	37

Figura I.18 – Síntese da angustina (1), da angustidina (6), da nauclefina (7) e da 3,14-di-hidroangustina (9).	38
Figura I.19 – Síntese da nauclefina (7), segundo Vohra.	39
Figura I.20 – Síntese da naulafina (13)	40
Figura I.21 – Síntese da strictosamida (28).	41
Figura I.22 – Síntese do naucleidinal (39).	42
Figura I.23 – Síntese da decarbometoxinauclequina (18).	43
Figura I.24 – Síntese da cadambina (32).	44
Figura I.25 – Síntese da 3 α -di-hidrocadambina (33).	45
Figura I.26 – Síntese da naucleficina (25).	46
Figura I.27 – Síntese da nauclefidina (27).	47
Figura I.28 – Síntese da nauclefidina (27), segundo Manna.	48
Figura I.29 – Classes de alcalóides terpenoide-indólicos biossintetizados a partir da strictosidina (99).	49
Figura I.30 – Biossíntese dos alcalóides indólicos do género <i>Nauclea</i> .	50

II. DISCUSSÃO

Figura II.1 – Espectro de ¹ H-RMN de 7 (DMSO- <i>d</i> ₆).	62
Figura II.2 – Efeito nuclear Overhauser do protão indólico com H-14.	63
Figura II.3 – Espectro de ¹ H-RMN de 1 (DMSO- <i>d</i> ₆).	65
Figura II.4 – Espectro de ¹ H-RMN de 4 (DMSO- <i>d</i> ₆).	68
Figura II.5 – Interações relevantes no espectro NOESY de 4 .	70
Figura II.6 – Espectro NOESY de 4 (DMSO- <i>d</i> ₆).	70
Figura II.7 – Esquema reaccional da angustolina (4) com o anidrido (\pm) 2-fenilbutanóico (153).	73
Figura II.8 – HPLC das amidas 157 e 158 .	74
Figura II.9 – Espectro de ¹ H-RMN de 159 (DMSO- <i>d</i> ₆).	75

Figura II.10 – Fragmentações características de 159 .	77
Figura II.11 – Espectro NOESY de 159 (DMSO- <i>d</i> ₆).	78
Figura II.12 – Estrutura tridimensional de 159 .	79
Figura II.13 – Conformação preferencial da cadeia lateral de 159 .	80
Figura II.14 – Interações relevantes no espectro NOESY de 159 .	80
Figura II.15 – Curvas de DOR da angustolina (4) e 19- <i>O</i> -metil-angustolina (159).	81
Figura II.16 – Espectro de ¹ H-RMN de 6 (DMSO- <i>d</i> ₆).	82
Figura II.17 – Interações relevantes no espectro NOESY de 6 .	83
Figura II.18 – Fragmentações características de 6 .	84
Figura II.19 – Espectro de ¹ H-RMN de 28 (MeOD).	85
Figura II.20 – Estrutura tipo oxoioimbano glicosilado.	87
Figura II.21 – Interações relevantes no espectro NOESY de 28 .	89
Figura II.22 – Espectro de ¹ H-RMN de 161 (CDCl ₃).	90
Figura II.23 – Espectro de HMBC de 161 .	92
Figura II.24 – Interações relevantes no espectro NOESY de 161 .	92
Figura II.25 – Espectro de ¹ H-RMN de 162 (CDCl ₃).	94
Figura II.26 – Espectro de ¹ H-RMN de 39 (CDCl ₃).	96
Figura II.27 – Espectro de ¹ H-RMN de 40 (CDCl ₃).	99
Figura II.28 – NOE entre os prótons H-15 e H-18, e pontes de hidrogénio entre o próton H-19 e o grupo aldeído em C-20.	101
Figura II.29 – Fragmentações características de 163 .	105
Figura II.30 – Formação da 1- <i>O</i> -(2,2,2-tricloroetanimidóil)-2,3,4,6--tetra- <i>O</i> -benzoil- α -D-glucopiranosose (165).	109
Figura II.31 – Glicolização do β -sitosterol.	109
Figura II.32 – Fragmentações características de 171 .	114
Figura II.33 – Hemissíntese de 171 .	116

Figura II.34 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 179 .	121
Figura II.35 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 180 .	123
Figura II.36 – Estrutura proposta para o composto 183 .	125
Figura II.37 – Fragmentações características do composto 183 .	126
Figura II.38 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 184 .	128
Figura II.39 – Fragmentações características de 184 .	129
Figura II.40 – Espectro de ¹ H-RMN da mistura de ácidos gordos metilados.	132
Figura II.41 – Espectro de ¹³ C-RMN da mistura de ácidos gordos metilados.	132
Figura II.42 – Cromatograma da mistura de ácidos gordos metilados, em coluna BP1 (30 m; 0.25 mm d.i.; 0.25 µm), gás de arraste – hélio, temperatura da coluna – isotérmica a 120°C durante 1 minuto; subida a 10°C/minuto de 120 a 160°C; subida a 7°C/minuto de 160 a 300°C; isotérmica a 300 °C durante 5 minutos.	133
Figura II.43 – Espectro de ¹ H-RMN da mistura de açúcares (D ₂ O).	135
Figura II.44 – Espectro de ¹³ C-RMN da mistura de açúcares (D ₂ O).	135
Figura II.45 – Cromatograma da mistura de açúcares sob a forma de alditóis acetatos, em coluna DB-225 (20 m x 0.104 mm, 0.1 µm), gás de arraste – hidrogénio, temperatura da coluna – subida a 5°C/minuto de 200 a 220°C; isotérmica a 220°C durante 20 minutos.	136
Figura II.46 – HPLC da mistura de açúcares benzoíladados, com uma coluna Lichrospher Si-60 (fase normal, 250 mm x 8 mm, 10 µm), fluxo de 6 mL/min e gradiente de eluição de Hexano/AcOEt (90:10 a 10:90).	138
Figura II.47 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 186 .	141
Figura II.48 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 187 .	142
Figura II.49 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 188 .	143
Figura II.50 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 189 .	144
Figura II.51 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 168 .	146

Figura II.52 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 190 .	147
Figura II.53 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 191 .	150
Figura II.54 – Pontes de hidrogénio de 192 .	151
Figura II.55 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 192 .	151
Figura II.56 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 193 .	152
Figura II.57 – Interacções relevantes no espectro NOESY de 194 .	153
Figura II.58 – Síntese da mistura de metil-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoíl- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196).	155
Figura II.59 – Cromatograma da separação dos açúcares livres por HPLC, com coluna Lichrosorb NH ₂ (250 mm x 4 mm, 5 μ m), detecção por índice de refração, fluxo 1 mL/min, eluente CH ₃ CN/H ₂ O (80:20).	157
Figura II.60 – Derivados benzoílados da D-fructose obtidos por reacção de benzoílação com cloreto de benzoílo e piridina.	158

III. PARTE EXPERIMENTAL

Figura III.1 – Figura III.1 – HPLC dos alcalóides 1 , 4 , 6 , 7 e 159 , com coluna Lichrospher Si60 (250 mm x 8 mm, 10 μ m), detecção a 275 nm, fluxo 6 mL/min, gradiente de Hexano/AcOEt.	177
Figura III.2 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico dos troncos	178
Figura III.3 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico neutro dos troncos	181
Figura III.4 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico e ácido das folhas	183
Figura III.5 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico neutro das folhas	184
Figura III.6 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes.	187
Figura III.7 – Cromatograma de HPLC da mistura de açúcares benzoílados.	239

ÍNDICE DE TABELAS

I. INTRODUÇÃO

Tabela I.1 – Alcalóides do género <i>Nauclea</i> .	11
Tabela I.2 – Desvios químicos (ppm) do núcleo indólico.	23
Tabela I.3 – Desvios químicos (ppm) de H-17 e C-17 da nauclefina (7) angustina (1), angustolina (4), 19- <i>O</i> -metil-angustolina (50), angustidina (6), 3,14-di-hidroangustina (9), 3,14,18,19-tetra-hidroangustina (10) e dos isómeros da 3,14-di-hidroangustolina (11 e 12).	24
Tabela I.4 – Desvios químicos (ppm) e multiplicidades características de H-5 _{a,b} e H-6 _{a,b} da nauclefina (7), angustina (1), angustolina (4), 3,14-di-hidroangustina (9), 3,14,18,19-tetra-hidroangustina (9), isómeros da 3,14-di-hidroangustolina (11 e 12) e 19- <i>O</i> -metil-angustolina (50).	25
Tabela I.5 – Terpenos do género <i>Nauclea</i> .	52
Tabela I.6 – Actividade antiproliferativa <i>in vitro</i> sobre o carcinoma humano da vesícula (T-24) e sobre a dependência do factor de crescimento epidérmico (EGF) do rato em relação aos queratinócitos epidérmicos.	57

II. DISCUSSÃO

Tabela II.1 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 7 (DMSO- <i>d</i> ₆).	63
Tabela II.2 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 1 (DMSO- <i>d</i> ₆).	66
Tabela II.3 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 4 (DMSO- <i>d</i> ₆).	69
Tabela II.4 – δ (ppm) de NH, H-14 e H-17, dos estereoisómeros 2'R e 2'S de 154 (CDCl ₃).	72
Tabela II.5 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 159 (DMSO- <i>d</i> ₆).	76
Tabela II.6 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 6 (DMSO- <i>d</i> ₆).	83
Tabela II.7 – ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN de 28 e 160 (MeOD).	86
Tabela II.8 – ¹ H-RMN de 161 (CDCl ₃).	91

Tabela II.9 – ^1H -RMN de 162 (CDCl_3).	94
Tabela II.10 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 39 (CDCl_3).	97
Tabela II.11 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 40 (CDCl_3).	100
Tabela II.12 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 163 (MeOD).	103
Tabela II.13 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 164 (CDCl_3).	106
Tabela II.14 – ^1H -RMN de 168, 169, 170 e 165 (CDCl_3).	110
Tabela II.15 – ^{13}C -RMN de 168, 169, 170 e 165 (CDCl_3).	110
Tabela II.16 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 166 (CDCl_3).	111
Tabela II.17 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 171 (CDCl_3).	113
Tabela II.18 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 179 e 180 (CDCl_3).	120
Tabela II.19 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 183 (CDCl_3).	125
Tabela II.20 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 184 (CDCl_3).	128
Tabela II.21 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 185 (CDCl_3).	131
Tabela II.22 – Ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos.	134
Tabela II.23 – Tempos de retenção dos alditóis acetatos.	137
Tabela II.24 – ^1H -RMN de 186, 187, 188 e 189 (CDCl_3).	139
Tabela II.25 – ^{13}C -RMN de 186, 187, 188 e 189 (CDCl_3).	140
Tabela II.26 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de 168 e 190 (CDCl_3).	145
Tabela II.27 – ^1H -RMN de 191, 192, 195, 196, 193 e 194 (CDCl_3).	148
Tabela II.28 – ^{13}C -RMN de 191, 192, 195, 196, 193 e 194 (CDCl_3).	149
Tabela II.29 – Tempos de retenção dos açúcares livres em HPLC.	157
Tabela II.30 – Actividade antimicrobiana dos extractos do <i>S. Latifolius</i> .	160
Tabela II.31 – Actividade antitumoral dos extractos do <i>S. latifolius</i> .	161

Tabela II.32 – Actividade antileishmania da estrictosamida e do glucósido do β -sitosterol.	162
---	-----

III. PARTE EXPERIMENTAL

Tabela III.1 – Extractos etanólicos (g) do <i>S. latifolius</i> .	175
Tabela III.2 – Gradiente de eluição (HPLC) dos alcalóides 1, 4, 6, 7 e 159 .	177
Tabela III.3 – Tempos de retenção dos alcalóides 1, 4, 6, 7 e 159 .	177
Tabela III.3 – Gradiente de eluição (HPLC) do alcalóide 28 .	196
Tabela III.4 – Ésteres metílicos dos ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos.	237
Tabela III.5 – Gradiente de eluição (HPLC) da mistura de açúcares benzoíladados.	238
Tabela III.6 – Gradiente de eluição (HPLC) da mistura de 186, 187, 195 e 196 .	240
Tabela III.7 – Determinação da toxicidade no crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach para os extractos etanólicos das folhas, para a estrictosamida (28) e para o glucósido do β -sitosterol (163).	258

I. INTRODUÇÃO

O uso de plantas como medicamentos é anterior ao aparecimento da escrita,¹ estando bastante difundido em civilizações milenares como a Chinesa, Egípcia e Suméria, como atestam os registos arqueológicos encontrados. Nos dias de hoje todas as culturas têm conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas da flora local, já que 80% da população mundial usa as plantas como a primeira fonte de agentes medicinais.²

A grande diversidade de espécies vegetais usadas na medicina tradicional ou popular, motivou o interesse pela pesquisa de substâncias úteis em farmacologia e contribuiu para a introdução de drogas de origem natural na prática clínica. No que concerne à farmacologia, as substâncias podem ser úteis como fonte de matéria prima de compostos de diversa actividade biológica, como produtos de partida para hemissíntese de substâncias de maior actividade, menor toxicidade ou melhor biodisponibilidade, em modelos para a síntese total de novas substâncias usadas em terapêutica e ainda, na investigação dos processos biológicos.

Nesta perspectiva, tem-se intensificado nos últimos anos o estudo químico e farmacológico da flora medicinal africana, de onde têm sido isolados um grande número de metabolitos de diversa actividade biológica (antimicrobiana, antibacteriana, antiparasitária, antitumoral, anti-hepatotóxica, repelentes de mosquitos),^{3,4} abrangendo diferentes classes de produtos naturais.⁵

Numa prospecção etnobotânica realizada em Janeiro de 1994, na região de Contuboel, Guiné-Bissau, foi efectuado um levantamento e colheita de plantas medicinais usadas pelos curandeiros, e registado o seu uso terapêutico. De entre estas, foi seleccionada para este trabalho, a espécie *Sarcocephalus latifolius* (Smith) Bruce [*Sarcocephalus esculentus* Afzelius;⁶ *Sarcocephalus esculentis* Afz. ex Sab.; *Sarcocephalus sassandrae* Chev.; *Sarcocephalus samucinus* Schum.; *Sarcocephalus russegeri* Kotschy ex Schweinf.; *Nauclea latifolia* Sm.; *Nauclea esculenta* (Afz. Ex Sab.) Merrill],^{7,8} da família das Rubiáceas, conhecida também na região por quinino africano, quinino do rio Nunez, cinchona africana,

pessegueiro africano, pessegueiro da Guiné, figueira do campo, e ainda, pelos seguintes nomes vernáculos:⁹ dundaque, nando-putcho e naudeputchó (etnia Fula); bôpanicar e bopánicam (etnia Papel); canhame (etnia Bijagó); benáu-utkata (etnia Manjaco); nafuncone (etnia Brame); tètúgde (etnia Balanta); bati-fôrô (etnia Mandinga); madronha (etnia Crioulo); e binahal-ukon (Mancanha).

Trata-se de uma planta essencialmente de savana, tendo sido encontrada em florestas de savana e em franjas de florestas tropicais, desde o Senegal até à República Democrática do Congo (Ex-Zaire).⁸ Aparenta um arbusto de vegetação escassa e irregular ou de uma pequena árvore dispersa, que geralmente atinge 7 m de altura, mas que em florestas fechadas pode atingir 35 m. As folhas (17 x 12 cm) são lisas, oblongas, aguçadas na ponta e com a superfície superior escura. Os estípulos são largos, ovulados e persistentes. As flores têm um perfume adocicado, são largas e carnudas. Os frutos são vermelhos, carnudos, com protuberâncias pouco profundas, e com numerosas sementes cravadas na polpa agridoce comestível.⁸

A espécie *S. latifolius* tem um uso generalizado na medicina tradicional africana,¹⁰ existindo diversos trabalhos publicados sobre a sua composição química e actividade farmacológica.⁸ No entanto, a espécie originária da Guiné-Bissau apenas foi objecto de um estudo preliminar por Prista *et al.*,^{11,12} justificando-se deste modo o interesse no seu estudo mais aprofundado.

Assim, o presente trabalho tem como principais objectivos:

- a extracção, isolamento e determinação estrutural dos produtos naturais do *S. latifolius*;
- a avaliação da actividade biológica dos extractos das raízes, troncos e folhas do *S. latifolius*, assim como de produtos naturais isolados.

O capítulo I desta dissertação começa por descrever os usos do *S. latifolius* na medicina tradicional, com referências à sua actividade biológica e farmacológica, seguindo-se uma revisão da fitoquímica do género *Nauclea* e apresentação dos respectivos compostos isolados. De entre estes, os alcalóides merecem particular relevância, com referências às suas principais características espectrais, exemplos de síntese química, e biossíntese. Na última parte deste

capítulo menciona-se a actividade biológica de diversos produtos naturais isolados da *Nauclea sps.*

O capítulo II trata da discussão dos resultados obtidos na determinação estrutural dos produtos naturais extraídos do *S. latifolius*, de acordo com uma divisão por classes de compostos, e ainda, a avaliação da actividade biológica dos extractos e de alguns produtos isolados.

O capítulo III inclui os resultados experimentais, com a descrição dos métodos de extracção e isolamento, condições reaccionais e características físicas e espectroscópicas dos compostos obtidos.

No final da dissertação é apresentada a bibliografia nela referida.

I.1. Usos do *Sarcocephalus latifolius* na medicina tradicional

As referências na literatura, aos usos do *Sarcocephalus latifolius* na medicina tradicional são, na maior parte dos casos, baseadas em informações colhidas junto dos curandeiros, no âmbito de investigações etnobotânicas e outros trabalhos de campo.

Na primeira referência ao uso medicinal do *S. latifolius*, Walter refere que a casca é usada como tónico, febrífugo, diurético e antiblenorrágico, atribuindo-se ainda propriedades antidiuréticas ao infuso das folhas e raízes.⁶ Posteriormente, o mesmo autor refere que o *S. latifolius* tem uma acção hipotermizante notável e que o decoto das folhas, por si só, ou associado a outras espécies vegetais (*Khaya*, *Mitragyna* e *Morinda*), é usado no tratamento de todos os estados febris, através de administração por via digestiva, ou em banhos e fricções.¹⁰ O decoto da raiz possuiria propriedades diuréticas, quando administrado por via digestiva ou em clister, sendo por isso recomendado no tratamento de doenças venéreas. O decoto da raiz é também preparado em líquido ácido, como o sumo de limão ou as folhas de *Bauhinia*, para tratar afecções gastrointestinais que se traduzem por gastralgias, vómitos, diarreias, enterites, disenterias, etc. O macerado da casca previamente pilada é usado para fins idênticos, pois atribui-se-lhe a propriedade de acalmar as dores intestinais ou abdominais, actuando também como emenagogo. A casca da planta serve ainda para a preparação de um cozimento a

ser usado na lavagem de feridas ou em bochechos, como odontálgico. O macerado das folhas e das raízes é utilizado no tratamento das doenças das crianças.¹⁰

Prista *et al.*¹¹ refere a utilização da casca do *S. latifolius* como antipalúdico, tónico e febrífugo, e o uso pelas populações da Costa do Ouro, de infusões da raiz e folhas como febrífugo, especialmente em medicina infantil. Na Guiné-Bissau, é referido o uso das raízes no tratamento de cólicas intestinais e como purgativo.

Numa nota prévia, Silva *et al.*¹² descreve que o lenho é considerado como estimulante, tónico e agente digestivo idêntico à pepsina, sendo usado na Nigéria como estomáquico e no tratamento da indigestão e vômitos. Também lhe é atribuída a propriedade emenagoga, podendo a raiz ser considerada abortiva. O fruto também possui virtudes medicinais sendo usado no tratamento da disenteria, assim como as folhas, que as populações da Libéria comeriam para combater a diarreia e a disenteria. Refere o uso da casca do *S. latifolius*, no Tanganica, como remédio contra a malária. Segundo este autor, o *S. latifolius* pertence à categoria dos grandes medicamentos africanos, sendo-lhe atribuídas propriedades febrífugas particularmente acentuadas no decoto aquoso da casca do tronco, a qual manifesta também propriedades purgativas, tenífugas e hemostáticas. A maceração das raízes é recomendada nas amenorreias, e as folhas associadas ao *Voacanga africana*, são usadas no tratamento de nevralgias.

Também na medicina local Nigeriana, o fruto é seco e usado no tratamento de hemorróidas e disenterias.⁷ O fruto fresco comido em excesso actua como emético, provocando diarreias. A casca amarga da árvore, é usada sob a forma de decoto ou infusão, como tónico e antipirético. No norte da Nigéria, a infusão fria da casca da árvore é tomada como diurético, anti-helmíntico e como regularizador dos intestinos. O tronco da árvore é usado como hemostático. Uma loção feita a partir da casca da árvore é efectiva no tratamento de uma doença complexa de pele parecida com a leishmaniose cutânea. As raízes são mastigadas para o tratamento de dores de dentes, cáries e como anti-séptico bucal.⁸ O decoto das raízes é usado como remédio para a malária.

Gomes e Diniz referem o uso de uma solução aquosa de raízes maceradas de *S. latifolius* e de *Calotropis procera* no tratamento de reumatismo, e o uso de uma infusão de raízes de *S. latifolius* no tratamento de doenças venéreas.¹³

A utilização da casca do *S. latifolius* no tratamento de cólicas abdominais é referida por Abreu *et al.*³

Registe-se ainda uma referência ao uso das cascas e raízes do *S. latifolius*, na composição do veneno das flechas usadas pelos indígenas das áreas circundantes do rio Nunez, a ocidente da Guiné.¹⁴

I.2. Actividade biológica e farmacológica do *Sarcocephalus latifolius*

De acordo com os resultados do estudo farmacodinâmico de um alcalóide isolado da raiz do *Sarcocephalus latifolius*, colhido na Guiné-Bissau,¹² foi possível registar uma acção hipotensora pouco marcada e de muito curta duração, e efeitos reversíveis inótrópos e cronótrópos negativos exercidos sobre o coração de rã e de coelho. Ensaio sobre órgãos de fibra lisa, como o duodeno de coelho ou o íleo de cobaia isolados, o alcalóide, de estrutura então desconhecida, revelou uma acção inibidora sobre o tónus da musculatura lisa, assim como uma acção igualmente inibidora sobre os movimentos pendulares do intestino. Em ensaios realizados com preparações de intestino isolado, foi também possível verificar que esse composto manifestava uma nítida acção antiacetilcolina e antibário. Em experiências com preparações de útero de cobaia isolado verificou-se que o mesmo alcalóide determinava o aumento das contracções do útero isolado. Idêntica acção farmacodinâmica foi observada a partir de ensaios realizados com o infuso da raiz do *S. latifolius*.¹²

Oliver-Bever refere que uma injeção intraperitoneal em porcos da Índia, equivalente a 6 g/Kg, do extracto aquoso das folhas e dos troncos de *S. latifolius* colhido na Nigéria, produziu um abaixamento da temperatura de 2 °C, efeito esse que durou algumas horas.⁷ Em cães, o extracto aquoso das folhas provocou uma acção hipotérmica com um súbito decréscimo da pressão da carótida seguido do efeito oposto e também a vasoconstricção renal. As folhas demonstraram actividade antipirética e antidepressiva, actividade anticancerígena sobre sarcomas transplantados de 180 tumores, e sobre o carcinoma dos pulmões de Lewis. Este autor refere ainda a actividade cardioinibidora e cardiotónica dos extractos das folhas e troncos.

A actividade moluscicida de extractos de *S. latifolius* sobre a *Lymnaea natalensis* é referida por Iwu.⁸

O extracto alcoólico-aquoso da casca do *S. latifolius* (1g) é letal para um porco da Índia (100 g) em 15 minutos.¹⁴ Em ratos, verificam-se efeitos no sistema nervoso central, como o decréscimo da actividade motora e paralisia.

Udoh investigou os efeitos farmacológicos dos extractos de folhas e raízes do *S. latifolius*, na neuro-transmissão purinérgica da vesícula de rato.¹⁵ O extracto das folhas aumenta as potencialidades da neuro-transmissão purinérgica através das contracções induzidas pelo ATP. Os extractos das raízes provocam a diminuição das contracções purinérgicas da vesícula devido a uma acção directa sobre o seu músculo liso, desde que não se modifiquem as contracções induzidas pelo ATP. Os extractos das folhas e raízes, quando combinados, têm acções farmacológicas antagónicas.

Madubunyi estudou a actividade anti-hepatotóxica e tripanocida exibida pelo extracto das raízes do *S. latifolius*.¹⁶ O extracto etanólico, após lavagem das raízes com éter de petróleo, apresenta um valor de DL₅₀ de 300 mg/Kg em ratos (injecção intra-peritoneal) em 24 horas. A administração oral do extracto reduziu significativamente o sono induzido pela pentobarbitona em ratos envenenados com CCl₄, verificando-se ainda uma atenuação do aumento do soro glutâmico-oxaloacético transaminase (SGOT), glutâmico-pirúvico transaminase (SGPT) e fosfatase alcalina (SALP), induzido pela intoxicação de CCl₄. Verificou-se também a redução da dispersão de lactato desidrogenase (LDH) em hepatócitos isolados de rato, e uma acção significativa na peroxidação dos lípidos. Por último, refere-se a diminuição do nível de infecção em ratos contaminados com *Trypanosoma brucei brucei*, após administração do extracto etanólico.

Os extractos aquosos das cascas e das raízes do *S. latifolius* foram testados por Vical *et al.* em duas variantes de *Plasmodium falciparum*: FcB1-Colombia (cloroquina-resistente) e a variante Nigeriana (cloroquina-sensível).¹⁷ Verificou-se que o extracto aquoso de *S. latifolius* inibe fortemente o *P. falciparum* (variante FcB1) até ao fim do ciclo eritrocítico, registando-se valores de DL₅₀ de 0.6 a 7.5 µg/mL, os quais se encontram dentro dos limites referenciados para outras plantas com propriedades anti-malária como a *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) ou a *Artemisia annua* L. (Astereaceae).

O extracto etanólico/aquoso das raízes da *Nauclea latifolia* revelou actividade microbiana sobre *Aspergillus niger*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Klesbiella sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Mucor sp.*, *Neisseria sp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonela sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptobacillus sp.* e *Streptococcus sp.* O referido extracto revelou um acréscimo de actividade, após a lavagem com n-hexano e CHCl_3 , apresentando ainda actividade bacteriostática e bactericida. O extracto inicial e o extracto após as referidas lavagens revelaram a presença de alcalóides.¹⁸

Extractos aquosos de folhas de *Nauclea latifolia* revelaram um efeito antelmíntico em larvas de *Trichostrongylus columbriformis* com valores de DL_{50} de 0.52 mg/ml em 24 h.¹⁹

As fracções dos extractos das folhas da *Nauclea latifolia*, que contêm compostos polifenólicos, revelaram actividade antiamebica e espasmolítica. A inibição do crescimento da *Entamoeba histolytica* apresenta valores de $\text{MIC} < 10 \mu\text{g/mL}$. A referida fracção com uma concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, num banho de órgãos, inibe com valores superiores a 70% a acetilcolina e/ou as contracções induzidas pela solução de KCl no íleo isolado do porco da Índia.²⁰

I.3. Estudo químico do género *Nauclea*

Os diversos trabalhos sobre a actividade biológica dos extractos do *Sarcocephalus latifolius*, a par do estudo da respectiva composição química, sugerem os alcalóides como principios activos.²¹ Uma vez que esses alcalóides são comuns em diversas espécies do género *Nauclea* (*N. latifolius*, *N. orientalis*, *N. pobeguini*, *N. parva*, *N. officinalis*, *N. gambir* e *N. diderrichii*), tendo por isso recebido a designação genérica de alcalóides do género *Nauclea*,²² optou-se neste capítulo por uma revisão extensiva à fitoquímica das diversas espécies deste género, das quais foram também isolados terpenos, flavonóides, e açúcares.

I.3.1. Alcalóides do género *Nauclea*

Os alcalóides do género *Nauclea* são do tipo indólico e na sua grande maioria podem agrupar-se em dois grandes grupos: o grupo piridino-indolo-quinolizidinona (Figura I.1) representado pelos compostos de **1** a **13** (Tabela I.1); e o grupo oxoioimbano, (Figura I.2) representado pelos compostos **28** a **30** e **36** a **39** (Tabela I.1).

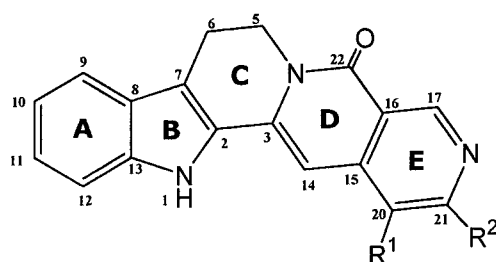


Figura I.1 – Alcalóide tipo piridino-indolo-quinolizidinona.

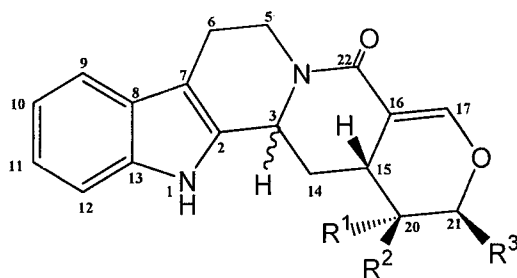


Figura I.2 – Alcalóide tipo oxoioimbano.

Tabela I.1 – Alcalóides do género *Nauclea*.

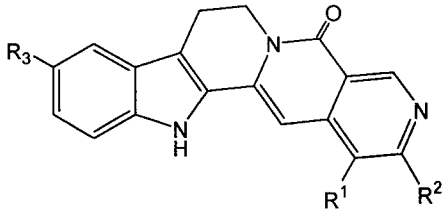
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>The image shows the chemical structure of a Nauclea alkaloid core. It consists of a benzene ring fused to an indole ring, which is further fused to a piperidine ring. The piperidine ring is connected to a pyridine ring via a double bond. The pyridine ring has substituents R¹ and R². The benzene ring has a substituent R³. The indole ring has a hydrogen atom (H) at the 3-position.</p>	<i>Nauclea latifolia</i>	
	Folhas	23
	Raiz	24
	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	25
$R^1 = -CH=CH_2$ $R^2 = R^3 = H$ Angustina (1)	<i>Nauclea pobeguinii</i>	
	Raiz	26
$R^1 = -CH=CH_2$ $R^2 = H$ $R^3 = -OH$ 10-hidroxiangustina (2)	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	25
$R^1 = -CH_2-CH_3$ $R^2 = R^3 = H$ 18,19-di-hidroangustina (3)	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	25
$R^1 = -CHCH_3OH$ $R^2 = R^3 = H$ Angustolina (4)	<i>Nauclea latifolia</i>	
	Folhas	23
	Raiz	24
	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	25
	<i>Nauclea pobeguinii</i>	
	Raiz	26
$R^1 = -CHCH_3OCOCH_3$ $R^2 = R^3 = H$ 19-O-acetilangustolina (5)	<i>Nauclea pobeguinii</i>	
	Raiz	26
$R^1 = H$ $R^2 = -CH_3$ $R^3 = H$ Angustidina (6)	<i>Nauclea latifolia</i>	
	Folhas	23

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

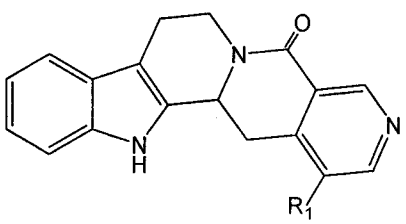
Composto	Planta (parte usada)	Referência
$R^1=R^2=R^3=H$ Nauclefina (7)	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz	24
	<i>Nauclea orientalis</i> Folhas	25
	<i>Nauclea pobeguinii</i> Raiz	26
	<i>Nauclea parva</i> Tronco	27
$R^1= -COCH_3$ $R^2=R^3=H$ Naucletina (8)	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz	24
	<i>Nauclea orientalis</i> Folhas	25
	<i>Nauclea pobeguinii</i> Raiz	26
	$R^1= -CH=CH_2$ 3,14-di-hidroangustina (9)	
$R^1= -CH_2-CH_3$ 3,14,18,19-tetra-hidroangustina (10)	<i>Nauclea orientalis</i> Folhas	25
$R^1= -CHCH_3OH$ ($[\alpha]_D -172.5^\circ$) 3,14-di-hidroangustolina (11)	<i>Nauclea orientalis</i> Folhas	25
$R^1= -CHCH_3OH$ ($[\alpha]_D -301.4^\circ$) 3,14-di-hidroangustolina (12)	<i>Nauclea orientalis</i> Folhas	25

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

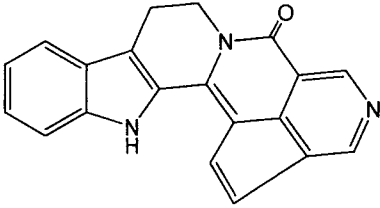
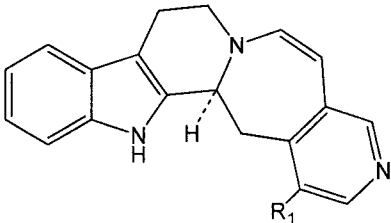
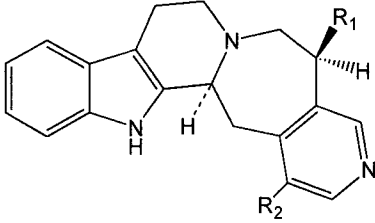
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>Naulafina (13)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Folhas	28, 29
	<i>Nauclea diderrichii</i> Folhas	29, 30
 <p>R¹ = H</p> <p>Naufolina (14)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz	31
	<i>Nauclea pobeguini</i> Raiz	26
<p>R¹ = -COOCH₃</p> <p>16-carbometoxinaufolina (15)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Folhas	30, 32
 <p>R¹ = H R² = -COOCH₃</p> <p>16-carbometoxi-18,19-di-hidro- naufolina (16)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Folhas	30, 32
<p>R¹ = -OH R² = -COOCH₃</p> <p>Nauclequina (17)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Folhas Tronco	30 33, 34
	<i>Nauclea latifolia</i> Folhas	35

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

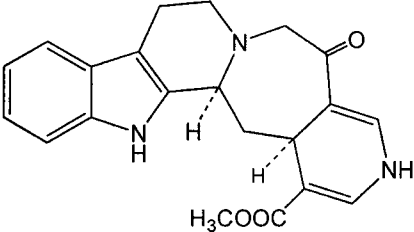
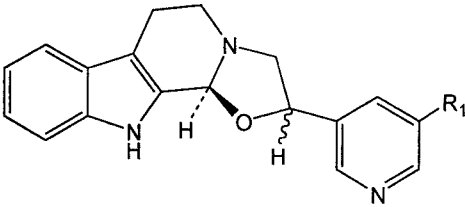
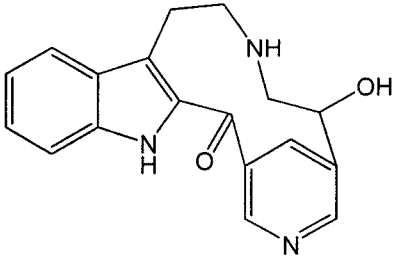
Composto	Planta (parte usada)	Referência
$R^1 = -OH$ $R^2 = H$ Decarbometoxinauclequina (18)	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz	31, 36, 37
 Nauclefolina A (19)	<i>Nauclea latifolia</i> Folhas	35
 $R^1 = H$ Naucleonina (20)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	33, 38, 39
$R^1 = -COOCH_3$ Naucleonidina (21)	<i>Nauclea diderrichii</i> Folhas Tronco	30 33, 38, 39
 Nauclexina (22)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	33, 34

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

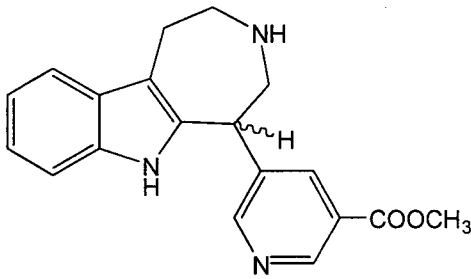
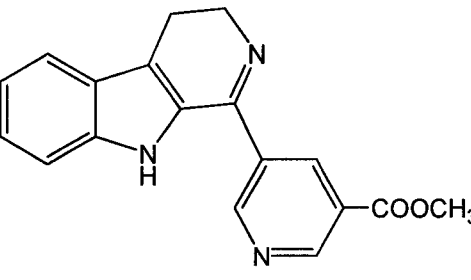
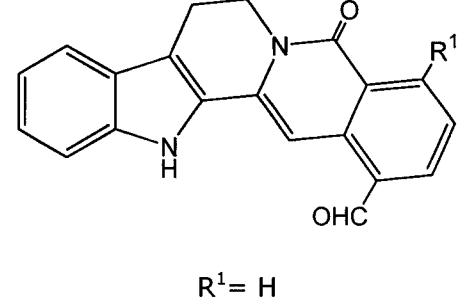
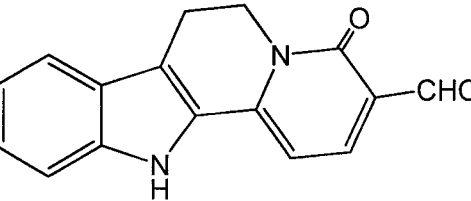
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>Naucleoderina (23)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	33, 34, 38
 <p>Naucedina (24)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	33, 34
 <p>R¹ = H</p> <p>Naucleficina (25)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	40, 41
<p>R¹ = -OH</p> <p>Nauclequinina (26)</p>	<i>Nauclea pobeguinii</i> Raiz	42, 43
 <p>Nauclefidina (27)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	40, 44

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

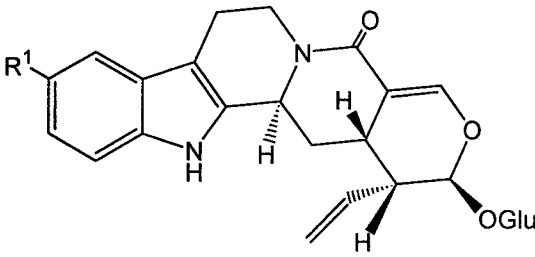
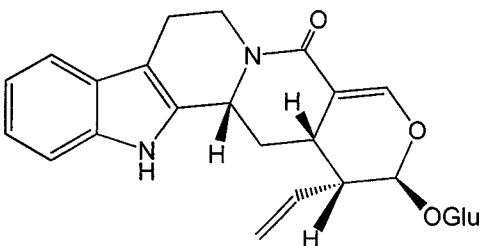
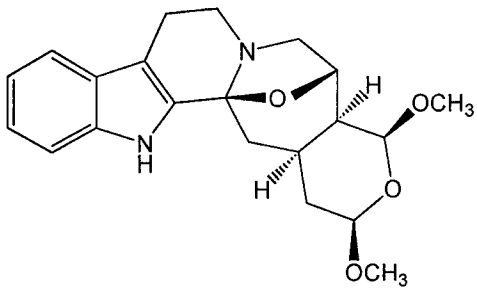
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>R¹ = H</p> <p>Estrictosamida (28)</p>	<i>Nauclea latifolia</i>	
	Folhas	45
	Tronco	46
	Raiz	47
	<i>Nauclea pobeguinii</i>	
	Raiz	26
<p>10-Hidroxiestrictosamida (29)</p>	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Tronco	48
	Folhas	49
<p>10-Hidroxiestrictosamida (29)</p>	<i>Nauclea officinalis</i>	
	Tronco	50
<p>R¹ = -OH</p> <p>10-Hidroxiestrictosamida (29)</p>	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	49, 51-54
	Tronco	48, 51
 <p>Vincosamida (30)</p>	<i>Nauclea orientalis</i>	
	Folhas	49
<p>Vincosamida (30)</p>	Tronco	48
	 <p>Alcalóide ND 370 (31)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i>
Tronco		34, 38

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

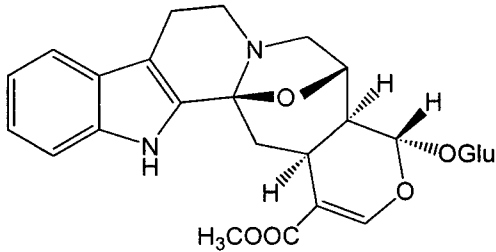
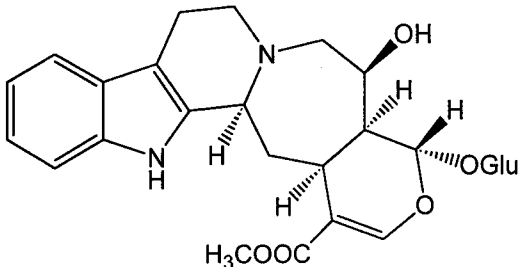
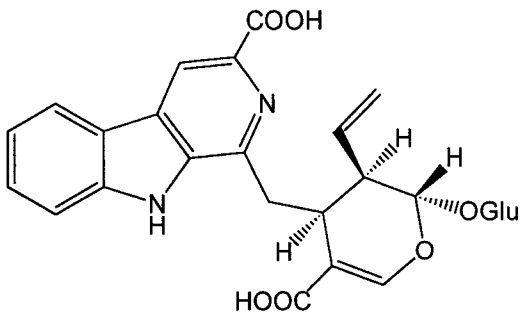
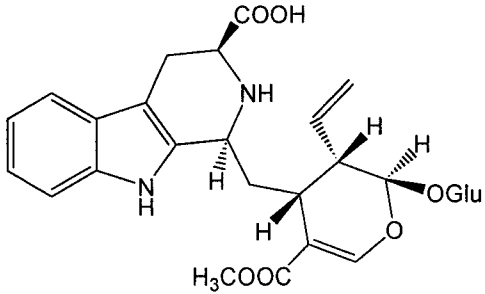
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>Cadambina (32)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Folhas	28, 53, 55
 <p>3α-di-hidrocadambina (33)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Folhas <i>Nauclea diderrichii</i> Folhas Tronco	28, 53 30 56
 <p>Ácido desoxicordifolínico (34)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	57
 <p>3α-5α-tetra-hidrodesoxicordifolina (35)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	58

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

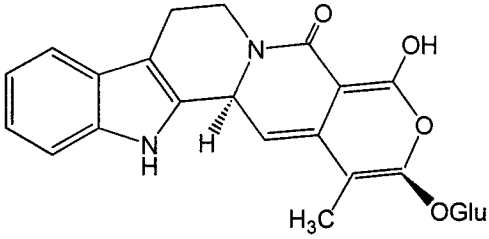
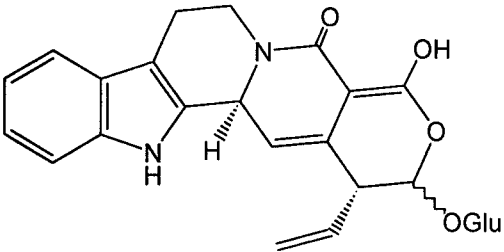
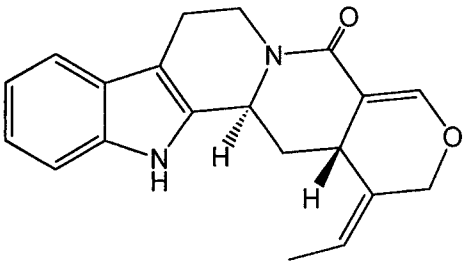
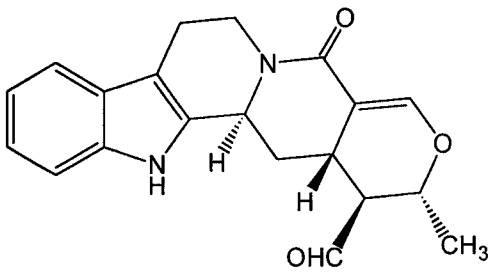
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>Naucleosidina (36)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	50
 <p>Naucleósido (37)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	50, 59
 <p>Nauclefilina (38)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	60
 <p>Naucleidinal (39)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz <i>Nauclea officinalis</i> Tronco	61 40, 62

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

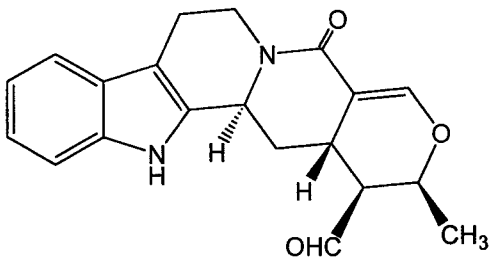
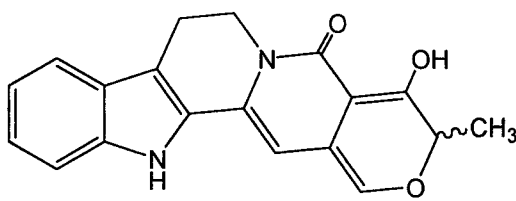
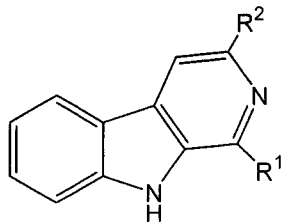
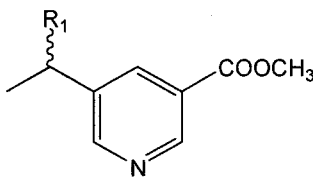
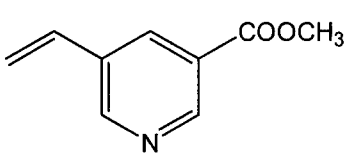
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>19-<i>epi</i>-naucleidinal (40)</p>	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz	61
 <p>Nauclefolina B (41)</p>	<i>Nauclea officinalis</i> Tronco	40
 <p>$R^1 = -CH_3$ $R^2 = H$</p> <p>Harmano (42)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63–66
<p>$R^1 = -CH_3$ $R^2 = -COOCH_3$</p> <p>3-Carbometoxi-harmano (43)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63, 67
<p>$R^1 = -COOCH_3$ $R^2 = H$</p> <p>1-Carbometoxinor-harmano (44)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63, 68–70
<p>$R^1 = -COONH_2$ $R^2 = H$</p> <p>1-Carboxamidonor-harmano (45)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63, 70

Tabela I.1 (cont.) – Alcalóides do género *Nauclea*.

Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>R¹ = -CH₃</p> <p>3-Carbometoxi-5-(1'-metoxi- etil)piridina (46)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63
<p>R¹ = -OH</p> <p>3-Carbometoxi-5-(1'-hidroxi- etil)piridina (47)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63
<p>R¹ = -NH₂</p> <p>3-Carbometoxi-5-(1'-amino- etil)piridina (48)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63
 <p>3-Carbometoxi-5-vinilpiridina (49)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	63

I.3.1.1. Características espectrais e cromatográficas

As características espectrais e cromatográficas dos alcalóides dos grupos piridino-indolo-quinolizidinona e oxoioimano apresentam algumas diferenças significativas, relevantes para a sua identificação.^{24,25,27,46,47,49,61,62,71-75}

A detecção dos alcalóides do grupo piridino-indolo-quinolizidinona em ccd de sílica-gel pode ser feita à lâmpada de UV a λ 366 nm, com sistemas de eluentes do tipo $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. Os métodos de separação deste tipo de compostos incluem: a cromatografia de coluna e de camada delgada, de fase normal, com o sistema de eluentes referido anteriormente;^{24,27} MPLC de fase reversa,^{25,76} com sistema de eluentes do tipo $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, otimizados de acordo com o sistema PRISMA;^{77,78} e HPLC com detecção por UV, quer em fase normal com eluentes do tipo n -hexano/ $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}/\text{NH}(\text{Et})_2$,²⁵ quer em fase reversa com eluentes do tipo $\text{CH}_3\text{CN}/\text{solução tampão (pH 2.5) NaH}_2\text{PO}_4$ (39 mM)-ácido hexanossulfónico (2.5 mM).⁷⁹

Os espectros de UV dos alcalóides deste grupo registam duas bandas intensas de máximos de absorção entre 360 e 404 nm, características de um esqueleto policíclico fortemente conjugado,^{24,28,71,80} enquanto que os espectros de IV apresentam as seguintes bandas características:^{28,71}

- uma banda intensa entre $1665\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ relativa ao grupo lactama;
- uma banda larga entre $3100\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, uma banda larga ou duas bandas próximas entre $1615\text{--}1595\text{ cm}^{-1}$, e uma banda pouco intensa entre $770\text{--}735\text{ cm}^{-1}$ relativas ao grupo indólico.

Os espectros de massa dão uma indicação sobre a natureza das cadeias laterais, dado que as clivagens β de R^1 ou R^2 produzem iões benzílicos estáveis e as clivagens α produzem geralmente um pico de fragmentação de média intensidade a m/z 286 (Figura I.3). O pico base neste tipo de compostos corresponde ao ião molecular.⁷¹

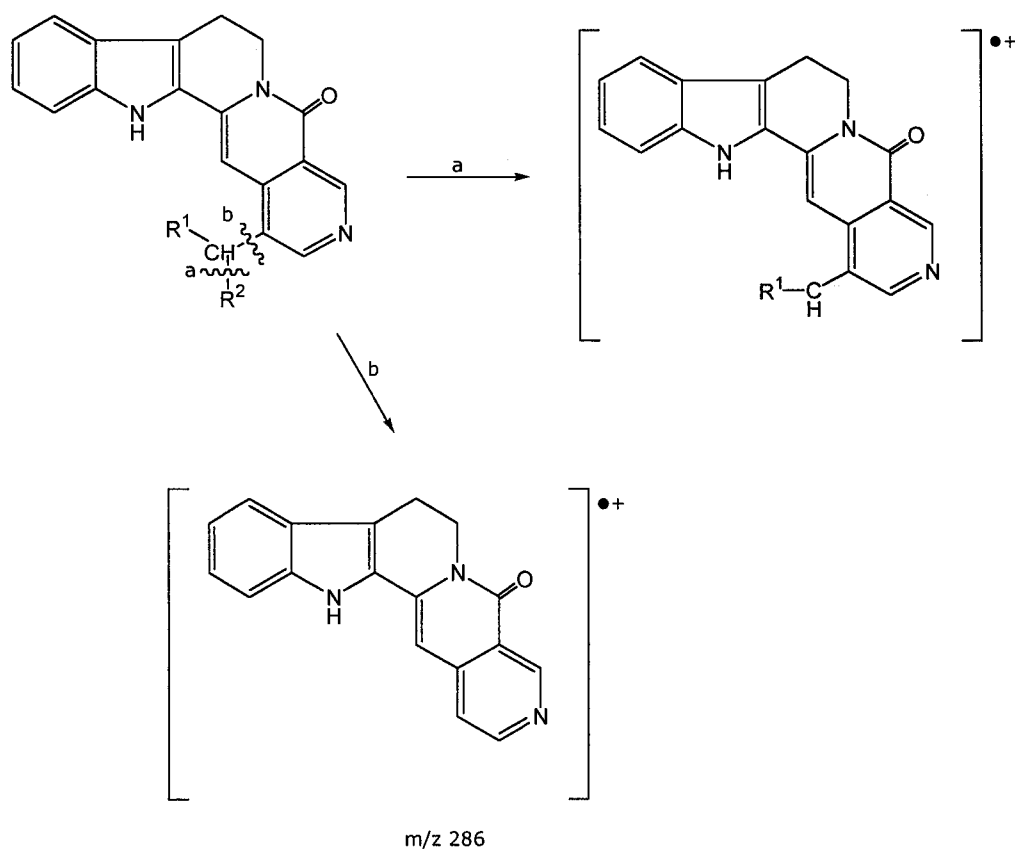


Figura I.3 – Fragmentações características dos alcalóides do grupo piridino-indolo-quinolizidinona.

Os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (4:1) ou DMSO deuterado, apresentam na maior parte dos casos, semelhanças nos desvios químicos de certos prótons e carbonos do esqueleto piridino-indolo-quinolizidinona, assim como nas multiplicidades dos prótons, o que, apesar de algumas diferenças que se possam verificar consoante a posição e natureza de grupos substituintes no núcleo pentacíclico, permite uma padronização do tipo de composto em análise.

As ressonâncias de carbono e próton do anel indólico não registam alterações significativas quaisquer que sejam os substituintes R^1 e R^2 (Tabela I.2).^{25,72,81}

Tabela I.2 - Desvios químicos (ppm) do núcleo indólico.

Posição	$^1\text{H}^*$	$^1\text{H}^{**}$	$^{13}\text{C}^{**}$
2	---	---	127-128
7	---	---	115-116
8	---	---	125-126
9	7.6-7.7	7.6-7.7	119-120
10	7.1-7.2	7.1-7.2	119-120
11	7.3-7.4	7.3-7.4	124-125
12	7.4-7.5	7.4-7.5	111-112
13	---	---	138-139
NH	11.8-12.0	---	---

* - DMSO- d_6

** - $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (4:1)

O próton H-14 apresenta uma ressonância característica a δ 6.8-7.2 ppm, consoante a natureza de R^1 e R^2 . A ressonância de C-14 é característica nesta série de compostos, situando-se sempre a campo mais alto que os restantes carbonos olefínicos, entre δ 94 e 95 ppm.^{25,72,81}

O próton H-17 gera um singuleto característico a campo baixo, com ligeiras variações de desvio químico para campo mais alto com a substituição do anel E em C-20 ou C-21, como ilustram os espectros de ^1H -RMN da angustina (**1**), angustolina (**4**), 19-*O*-metilangustolina (**50**), (composto isolado da *Camptotheca acuminata*, Figura I.6, pg. 25)^{72,82} e angustidina (**6**), em relação ao da nauclefina (**7**) ($\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$) (Tabela I.3).^{25,71,72,81} O mesmo efeito de substituição do núcleo no deslocamento químico de H-17 verifica-se nos deriva-dos 3,14-di-hidropiridino-indolo-quinolizidinona (Tabela I.3).²⁵

Quanto aos desvios químicos de C-17, estes não sofrem alterações significativas com a substituição em C-20 ou C-21 (Tabela I.3).^{25,72}

Tabela I.3 – Desvios químicos (ppm) de H-17 e C-17 da nauclefina (**7**), angustina (**1**), angustolina (**4**), 19-O-metilangustolina (**50**), angustidina (**6**), 3,14-di-hidroangustina (**9**), 3,14,18,19-tetra-hidroangustina (**10**) e dos isómeros da 3,14-di-hidroangustolina (**11** e **12**).

Composto	$^1\text{H}^*$	$^1\text{H}^{**}$	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}^{**}$
Nauclefina (7)	9.32	9.49	---	---
Angustina (1)	9.25	9.34	---	149.3
Angustolina (4)	9.24	9.38	---	150.3
19-O-metilangustolina (50)	9.27	---	149.7	---
Angustidina (6)	9.19	---	---	---
3,14-di-hidroangustina (9)	8.98	9.14	---	148.7
3,14,18,19-tetra-hidroangustina (10)	---	9.10	---	147.6
3,14-di-hidroangustolina (11)	---	9.14	---	149.1
($[\alpha]_D -172.5^\circ$)				
3,14-di-hidroangustolina (12)	---	9.08	---	149.3
($[\alpha]_D -301.4^\circ$)				

* - DMSO- d_6

** - CDCl₃/CD₃OD (4:1)

Os deslocamentos químicos e multiplicidade dos prótons metilénicos H-5_{a,b} e H-6_{a,b}, permitem distinguir os espectros de ^1H -RMN dos alcalóides piridino-indolo-quinolizidinona dos seus derivados 3,14-di-hidro. Assim, enquanto que nos compostos da série $\Delta^{3,14}$ os sinais destes dois grupos metilénicos aparecem como dois tripletos,^{25,71,81} nos compostos 3,14-di-hidropiridino-indolo-quinolizidinona os prótons H-5_a e H-5_b geram respectivamente um duplo triplete e um duplete, com diferenças de desvio químico entre os dois sinais que podem atingir os 2 ppm (Tabela I.4).²⁵ Estas diferenças de desvio químico e multiplicidade reflectem as alterações à planaridade do núcleo pentacíclico quando se passa da série $\Delta^{3,14}$ aos correspondentes derivados saturados, como ilustram os modelos da nauclefina (**7**) (Figura I.4) e 3,14-di-hidroangustina (**9**) (Figura I.5). Este efeito também se verifica em compostos em que o substituinte R₁ é volumoso, como é o caso da 19-O-metilangustolina (**50**) (Figura I.6), cujo espectro de ^1H -RMN apresenta multipletos distintos gerados pelos prótons H-5_a e H-5_b (Tabela I.4).⁷²

Os desvios químicos dos carbonos C-5 e C-6 não apresentam alterações significativas nos compostos das séries $\Delta^{3,14}$ e 3,14-di-hidro. (Tabela I.4)

Tabela I.4 - Desvios químicos (ppm) e multiplicidades características de H-5_{a,b} e H-6_{a,b} da nauclefina (**7**), angustina (**1**), angustolina (**4**), 3,14-di-hidroangustina (**9**), 3,14,18,19-tetra-hidroangustina (**9**), isómeros da 3,14-di-hidroangustolina (**11** e **12**) e 19-O-metilangustolina (**50**).

Composto	Posição	¹ H*	¹ H**	¹³ C*	¹³ C**
Nauclefina (7)	5 _{arb}	4.40, t	4.52, t	---	---
	6 _{arb}	3.13, t	3.18, t	---	---
Angustina (1)	5 _{arb}	4.42, t	4.51, t	---	40.5
	6 _{arb}	3.17, t	3.18, t	---	19.3
Angustolina (4)	5 _{arb}	4.42, t	4.51, t	---	41.1
	6 _{arb}	3.13, t	3.19, t	---	20.0
3,14-di-hidroangustina (9)	5 _a	---	3.07, dt	---	39.7
	5 _b	---	5.17, d	---	
	6 _{arb}	---	2.97, m	---	21.0
3,14,18,19-tetra-hidro- angustina (10)	5 _a	---	3.07, dt	---	39.8
	5 _b	---	5.16, d	---	
	6 _{arb}	---	2.97, m	---	21.1
3,14-di-hidroangustolina (11) ([α] _D -172.5°)	5 _a	---	3.07, dt	---	39.6
	5 _b	---	5.18, d	---	
	6 _{arb}	---	2.98, m	---	20.9
3,14-di-hidroangustolina (12) ([α] _D -301.4°)	5 _a	---	2.98, dt	---	39.5
	5 _b	---	5.13, d	---	
	6 _{arb}	---	2.92, m	---	20.9
19-O-metilangustolina (50)	5 _a	4.39, m	---	40.3	---
	5 _b	4.41, m	---		
	6 _{arb}	3.17, m	---	19.0	---

* - DMSO-*d*₆

** - CDCl₃/CD₃OD (4:1)

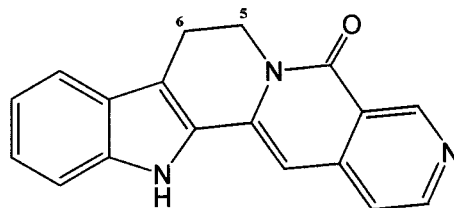
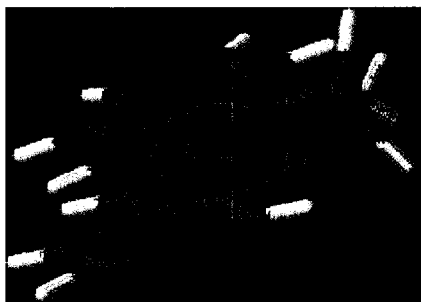


Figura I.4 - Estrutura tridimensional da nauclefina (**7**).

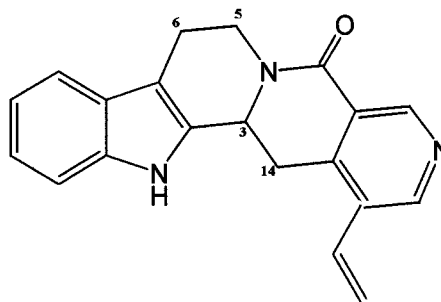
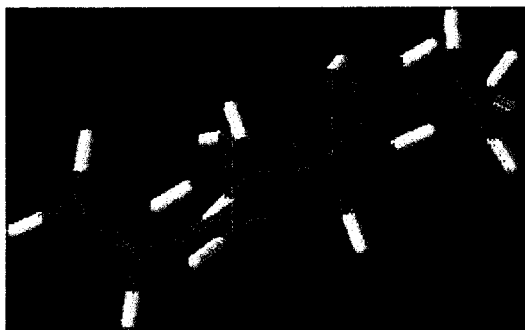


Figura I.5 - Estrutura tridimensional da 3,14-di-hidroangustina (**9**).

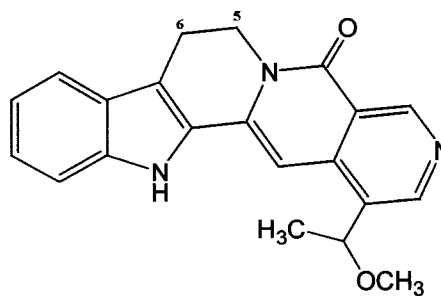


Figura I.6 - Estrutura tridimensional da 19-O-metilangustolina (**50**).

Relativamente aos alcalóides do grupo oxoimbano, existem diversos derivados glucosilados em C-21, como por exemplo a strictosamida (**28**), a 10-hidroxi-strictosamida (**29**), a vincosamida (**30**), a naucleosidina (**36**) e o naucleosido (**37**), o que lhes confere propriedades cromatográficas distintas das agliconas correspondentes. A sua separação pode ser efectuada em suporte de Sephadex LH-20, usando MeOH como eluente, por cromatografia de coluna ou camada delgada, de fase normal, com sistemas de eluentes do tipo $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ou $\text{CHCl}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{MeOH}$,^{45,51} ou por cromatografia de 'flash' de fase reversa com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.⁴⁸ Por HPLC e MPLC de fase reversa e com detecção por UV, conseguiram-se separações e purificações eficientes com sistemas de eluentes do tipo $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, respectivamente.⁴⁹

A determinação quantitativa de strictosamida (**28**) em raízes, folhas e troncos de *N. latifolius* foi efectuada por Duez *et al.*⁴⁵ usando técnicas de HPLC e HPTLC. O método de HPLC em fase reversa (C_{18}) com detecção por UV, usando como eluente uma solução de 0.1 M di-hidrogenofosfato de sódio com 5 mM de 1-octanosulfonato de sódio e MeOH (55:45), permite detecções limite de 11 ng. O método de HPTLC em fase normal com detecção por fluorodensitometria, usando como eluente $\text{CHCl}_3/(\text{CH}_3)_2\text{CO}/\text{MeOH}$ (65:25:10) apresenta maior sensibilidade permitindo detecções limite de 2.5 ng. A degradação da strictosamida catalisada pela sílica-gel foi retardada pela adição de uma solução metanólica a 2% de succinato α -tocoferol às soluções que continham a strictosamida.

Quanto aos alcalóides agliconas do grupo oxoimbano, pouco polares, a sua separação e purificação pode ser efectuada por cromatografia de coluna ou camada delgada de fase normal, com sistemas de eluentes do tipo Hexano/AcOEt ou $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. A separação de compostos estruturalmente semelhantes aos deste tipo, como é o caso dos epímeros da ajmalicina (Figura I.29, pg. 48), isolados a partir do *Catharanthus roseus*^{83,84}, foi efectuada por HPLC de fase reversa com eluentes do tipo $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{N}(\text{Et})_3$ ou $\text{MeOH}-5\text{mM} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e com detecção por UV.

Os espectros de UV dos alcalóides do grupo oxoimbano registam uma banda de grande intensidade entre 220 e 230 nm e duas bandas de fraca intensidade entre 275 e 295 nm,^{46,47,49,61} o que permite a sua detecção por UV a λ 254 nm em ccd.

Os espectros de IV apresentam bandas semelhantes às do grupo piridino-indolo-quinolizidinona:^{47,49,61}

- uma banda intensa entre 1660–1650 cm^{-1} relativa ao grupo lactama;
- uma banda larga entre 3100–3400 cm^{-1} , uma banda larga ou duas bandas próximas entre 1590–1570 cm^{-1} , e uma banda pouco intensa entre 750–740 cm^{-1} relativas ao grupo indólico.

Os espectros de ^1H -RMN dos alcalóides glucosilados e das aglícenas são geralmente efectuados em MeOD e CDCl_3 , respectivamente. A diversidade dos substituintes R^1 , R^2 e R^3 , provoca grandes alterações nos desvios químicos dos prótons de toda a estrutura, não permitindo padronizar desvios característicos, à excepção dos prótons indólicos, cujas ressonâncias se situam na mesma zona (δ 7.0 e 7.5 ppm) dos do grupo piridino-indolo-quinolizidinona.^{40,49,61,62,74}

Para além das alterações à estereoquímica do núcleo oxoioimbano, induzidas pelos grupos R^1 , R^2 e R^3 , há ainda que ter em conta na análise espectral, a possibilidade de epimerização em C-3, a qual pode ocorrer em meio ácido (ou básico)⁸⁵ de acordo com um dos mecanismos (Figura I.7) propostos por Wenkert e Liu.⁸⁶

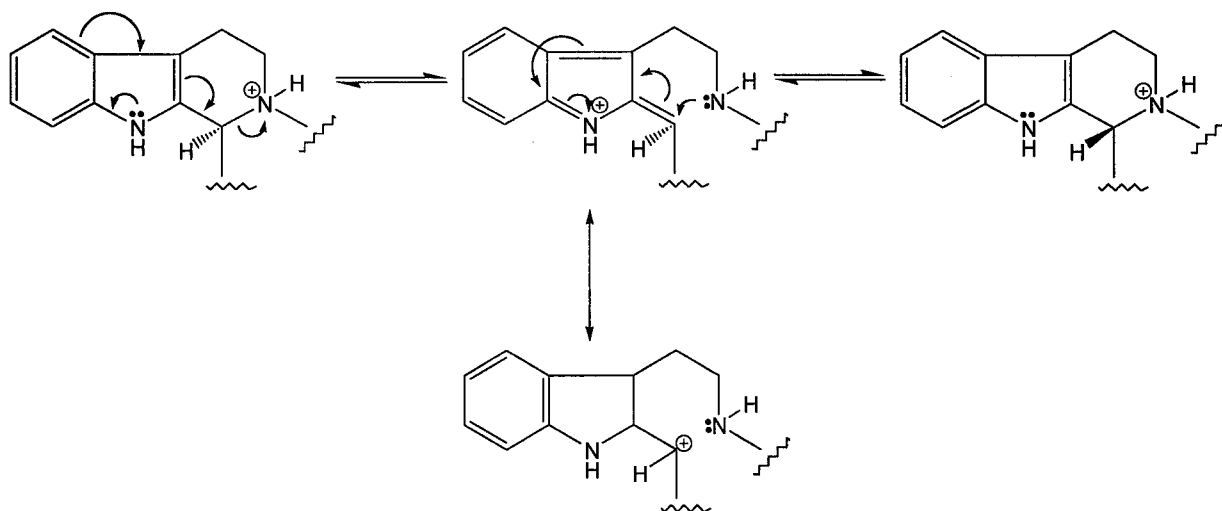


Figura I.7 – Epimerização em C-3 de alcalóides do grupo oxoioimbano em meio ácido.

A configuração em C-3, C-20 e C-21 pode ser determinada a partir do espectro de NOESY, tomando como referência o próton H-15, cuja orientação β é definida no processo de biossíntese (Secção I.3.1.3). Nas figuras I.8 e I.9, ilustra-se a elucidação estereoquímica do naucleidinal (**39**) e do respectivo epímero, o 3-*epi*-naucleidinal (**51**), a partir das interações de Overhauser registadas nos espectros NOESY.⁶²

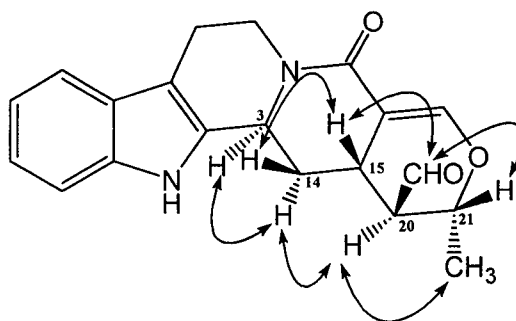


Figura I.8 - NOE do naucleidinal.

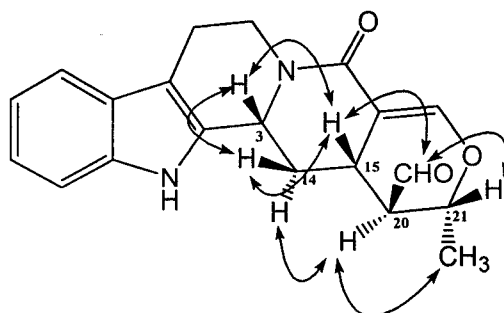


Figura I.9 - NOE do 3-*epi*-naucleidinal.

A determinação e diferenciação da configuração em C-3 pode ainda ser efectuada através das curvas de dicroísmo circular (DC) em compostos que apresentam efeitos de Cotton.^{87,88} Por exemplo, o naucleidinal apresenta um efeito de Cotton positivo a 286 nm, enquanto que o 3-*epi*-naucleidinal apresenta um efeito negativo no mesmo comprimento de onda (Figura I.10).⁶²

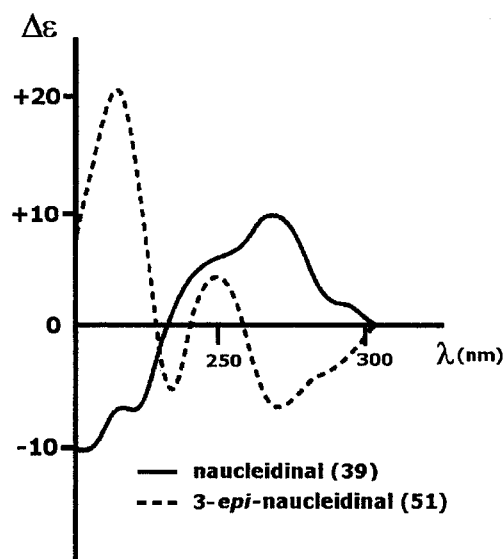


Figura I.10 – Curvas de DC do naucleidinal (**39**) e 3-*epi*-naucleidinal (**51**).

Os alcalóides glucosilados, estrictosamida (**28**) e 10-hidroxiestrictosamida, (**29**) e os respectivos epímeros em C-3, a vincosamida (**30**) e a 10-hidroxivincosamida (**52**), apresentam igualmente efeitos de Cotton opostos (Figura I.11).⁵²

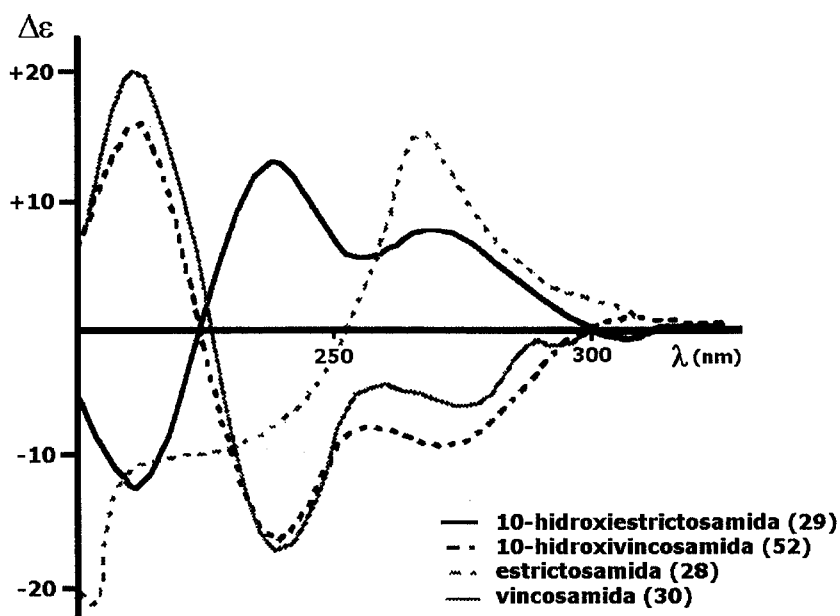


Figura I.11 – Curvas de DC da estrictosamida (**28**), da 10-hidroxiestrictosamida (**29**), vincosamida (**30**) e da 10-hidroxivincosamida (**52**).

I.3.1.2. Síntese dos alcalóides indólicos do género *Nauclea*

A síntese dos alcalóides do género *Nauclea* tem sido objecto de revisões periódicas na literatura.^{32,43,53,54,59,89-94} No que respeita ao grupo piridino-indolo-quinolizidinona, as principais estratégias de síntese, ilustradas nesta secção por alguns exemplos, diferem no modo e sequência da construção do núcleo pentacíclico (Figura I.1, pg. 10). Considerando qual dos cinco anéis é fechado no passo final da sequência sintética, podem comparar-se as diferentes abordagens:

- preparação de enamidas, cuja ciclização induzida por vários processos, permite a formação do anel lactama;^{53,82,92,93,95-99}
- preparação de naftiridinas como intermediários, as quais, sob condições ácidas, permitem o fecho do anel C através da formação de uma ligação simples C-C;¹⁰⁰⁻¹⁰²
- adição nucleófila a sais de N-benzilpiridina para formação de naftiridinodionas, numa sequência reaccional que termina, à semelhança do caso anterior, com o fecho do anel C;¹⁰³
- condensação de derivados organometálicos (anel E) com iminas tricíclicas activadas (anéis A-B-C), que conduz à formação do anel D através das ligações C-C e C-N geradas no último passo reaccional.^{29,81,90,104-106}

Por fotociclização de enamidas, preparadas pela N-acilação da β -carbolina (**53**) com derivados do cloreto de nicotinoílo, Ninomiya *et al.* sintetizaram a angustidina (**6**), naucletina (**8**), (\pm)-angustolina (**4**) e 19-O-metilangustolina (**50**), com rendimentos de 21, 30, 80 e 5 %, respectivamente (Figura I.12).^{82,95-97}

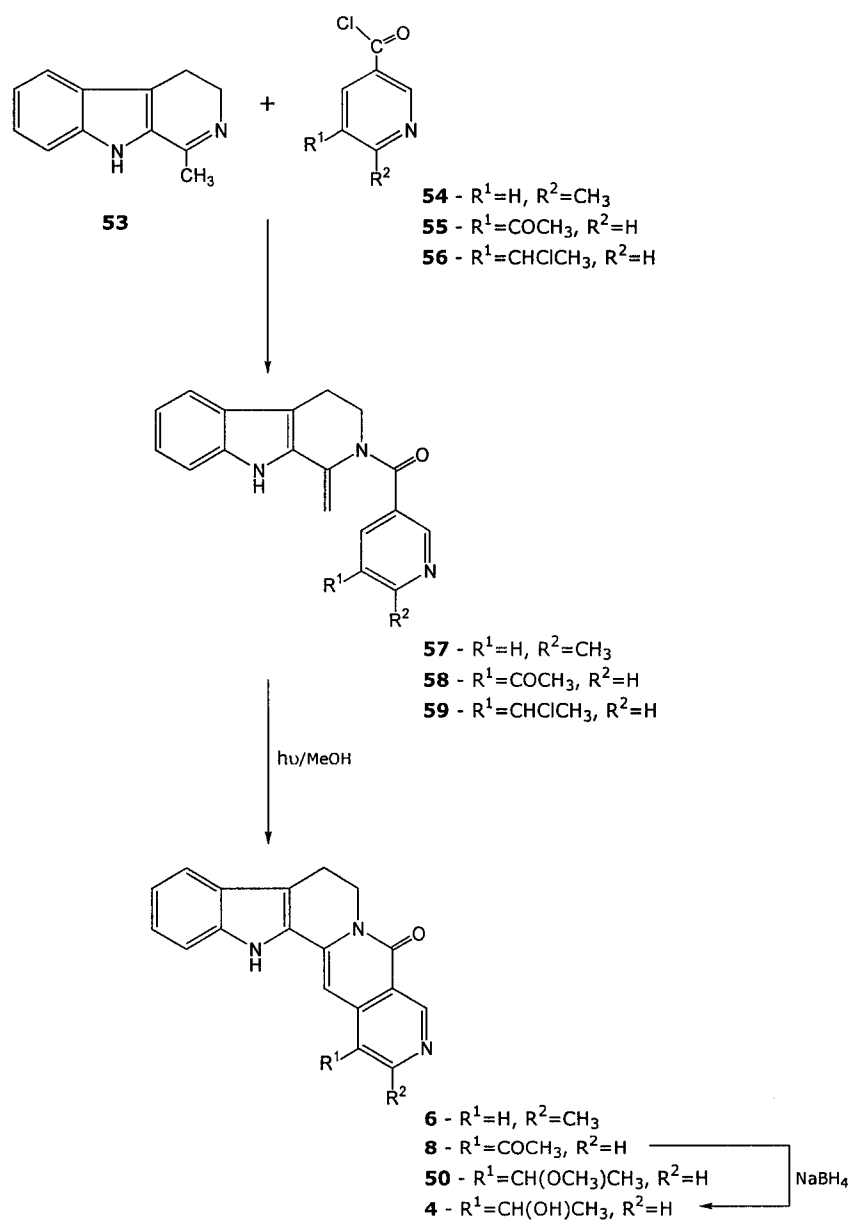


Figura I.12 – Síntese da angustidina (**6**), naucletina (**8**), (\pm)-angustolina (**4**) e 19-O-metilangustolina (**50**).

A nauclefina (**7**) foi também sintetizada por Ninomiya *et al.* mas através da fotociclização de um composto *espiro* (**61**) obtido pela reacção da β -carbolina (**53**) com um excesso de cloreto de isonicotinoílo (**60**). O rendimento reaccional foi de 55% (Figura I.13).¹⁰⁷

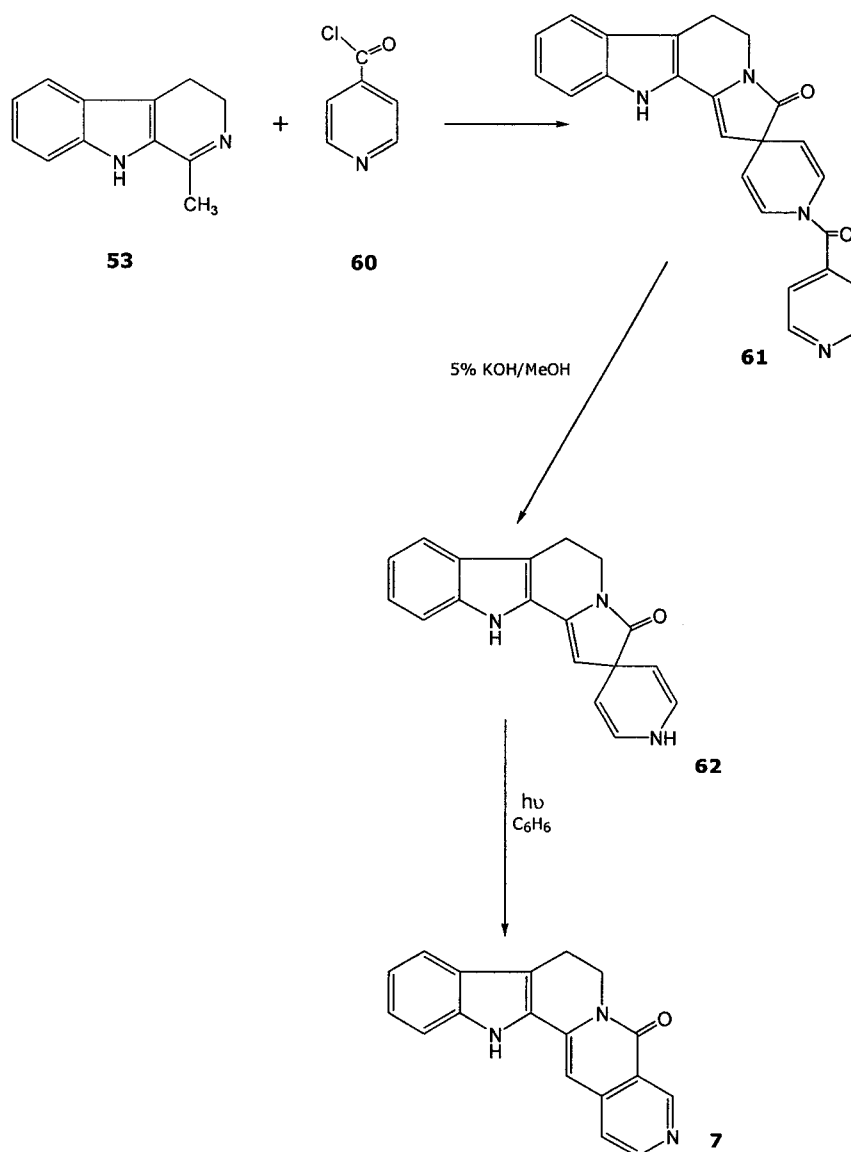


Figura I.13 – Síntese da nauclefina (**7**), segundo Ninomiya.

Usando o anidrido trifluoracético para promover a ciclização da enamida, Laronze *et al.* sintetizaram **7** com um rendimento de 45%. Os produtos laterais formados, **64** e **65** são facilmente convertidos em nauclefina (Figura I.14).^{53,92}

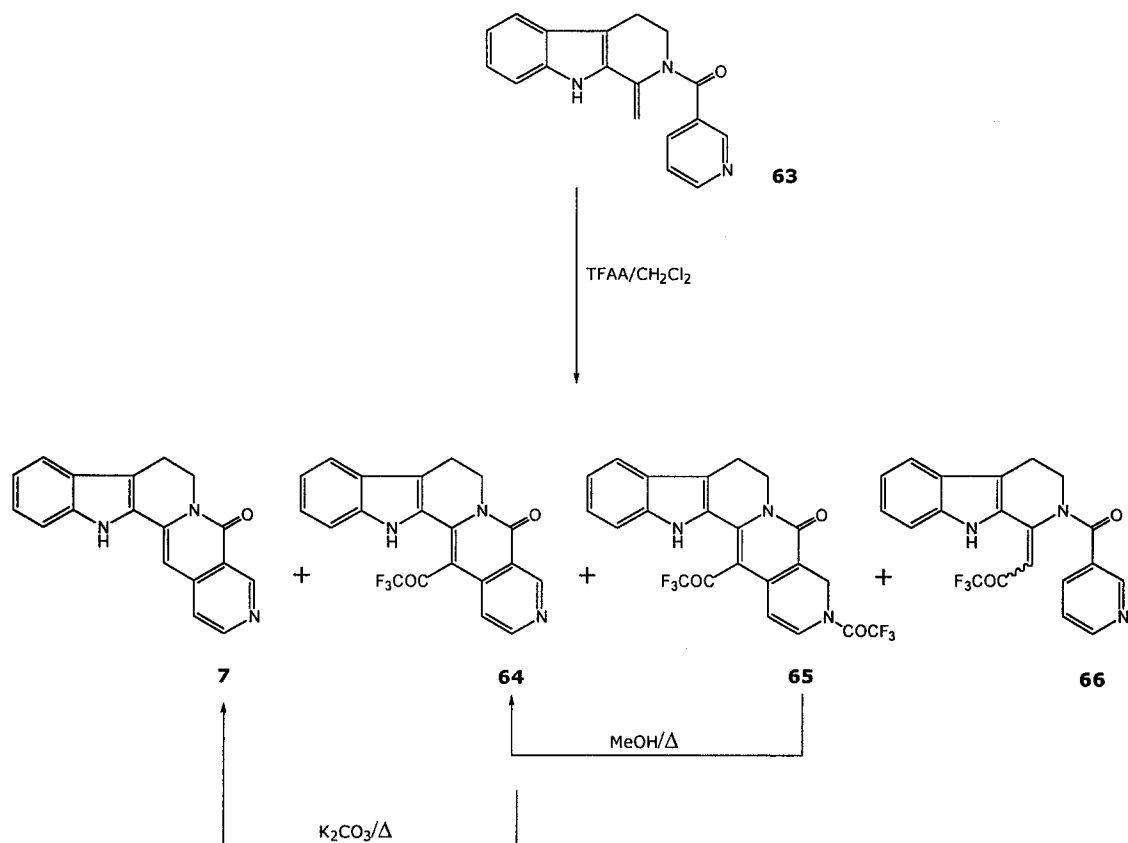


Figura I.14 – Síntese da nauclefina (**7**) segundo Laronze.

Baseados no esqueleto pentacíclico piridino-indolo-quinolizidinona, Lavilla *et al.* sintetisaram a nauclefina (**7**), a angustina (**1**), a 18,19-di-hidroangustina (**3**), a nauclefina (**8**) e a 19-O-metilangustolina (**50**), a partir de um intermediário comum, um derivado bromo naftiridina (**68**), obtido por ciclização térmica da enamida **67** (Figura I.15).^{93,98,99}

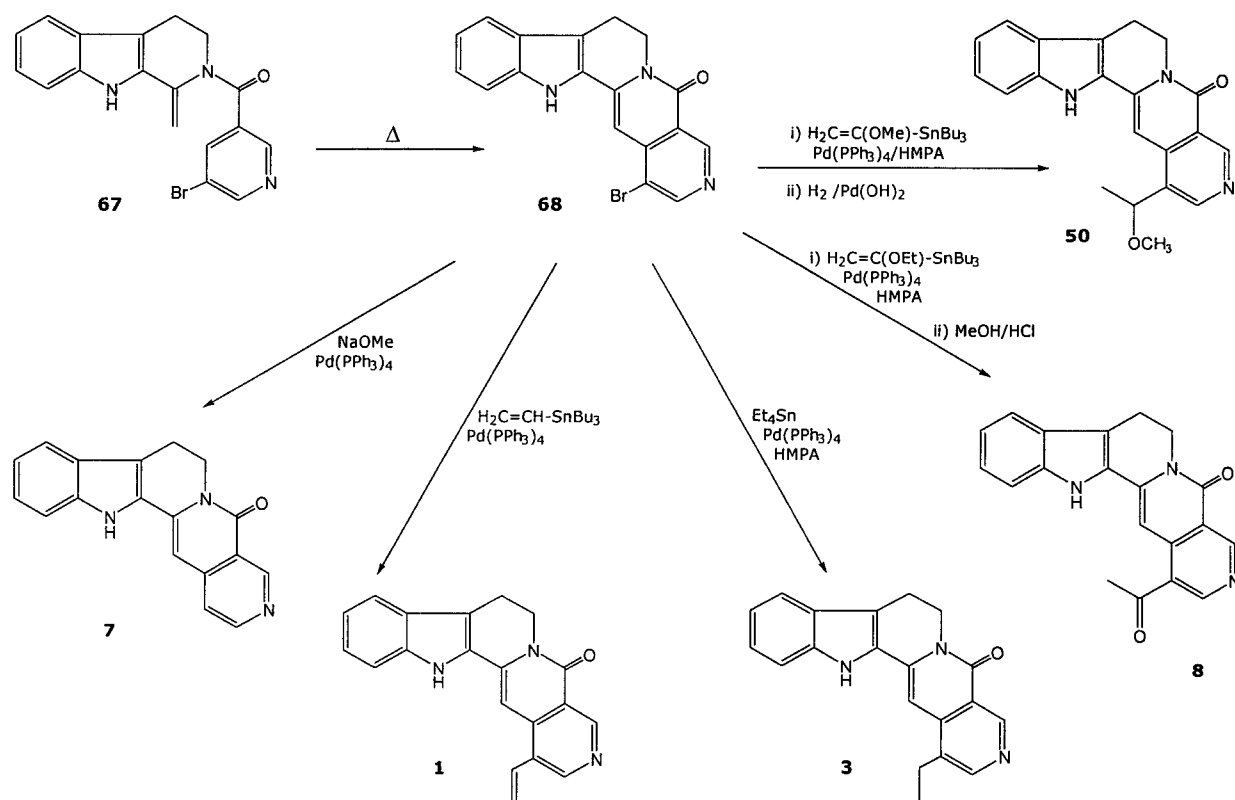


Figura I.15 - Síntese da nauclefina (**7**), angustina (**1**), 18,19-di-hidroangustina (**3**), nauclefina (**8**) e 19-O-metilangustolina (**50**).

Utilizando também naftiridinas (**72** e **73**) como intermediários, obtidas por reacção da triptamina (**71**) com uma lactona (**69** e **70**), Kametani *et al.* sintetizaram a angustina (**1**) e a nauclefina (**7**), com rendimentos de 23.5% e 15%, respectivamente (Figura I.16).¹⁰⁰⁻¹⁰²

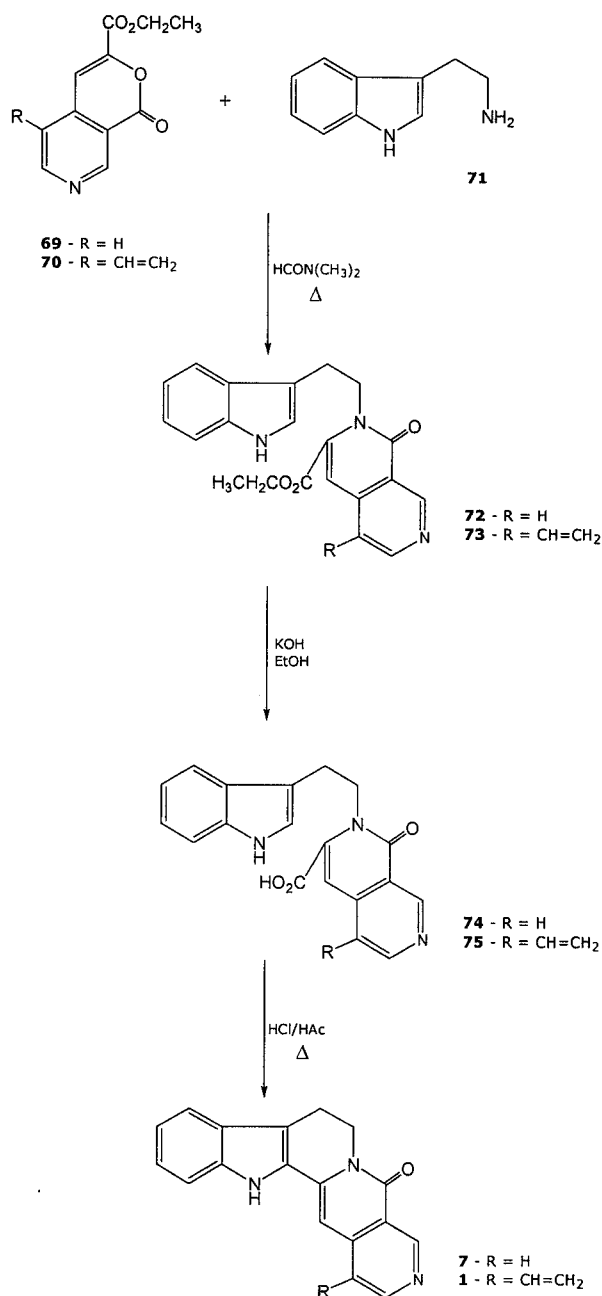


Figura I.16 – Síntese da angustina (**1**) e da nauclefina (**7**).

Uma estratégia alternativa para a síntese de **7**, delineada por Wanner *et al.*¹⁰³ consistiu na reacção de adição nucleofílica de um anião éster a um sal de N-benzilpiridina (**76**), para formar a naftiridinodiona (**77**), que após dessulfurização (Raney-Ni) e posterior ciclização origina o alcalóide **7** (Figura I.17).

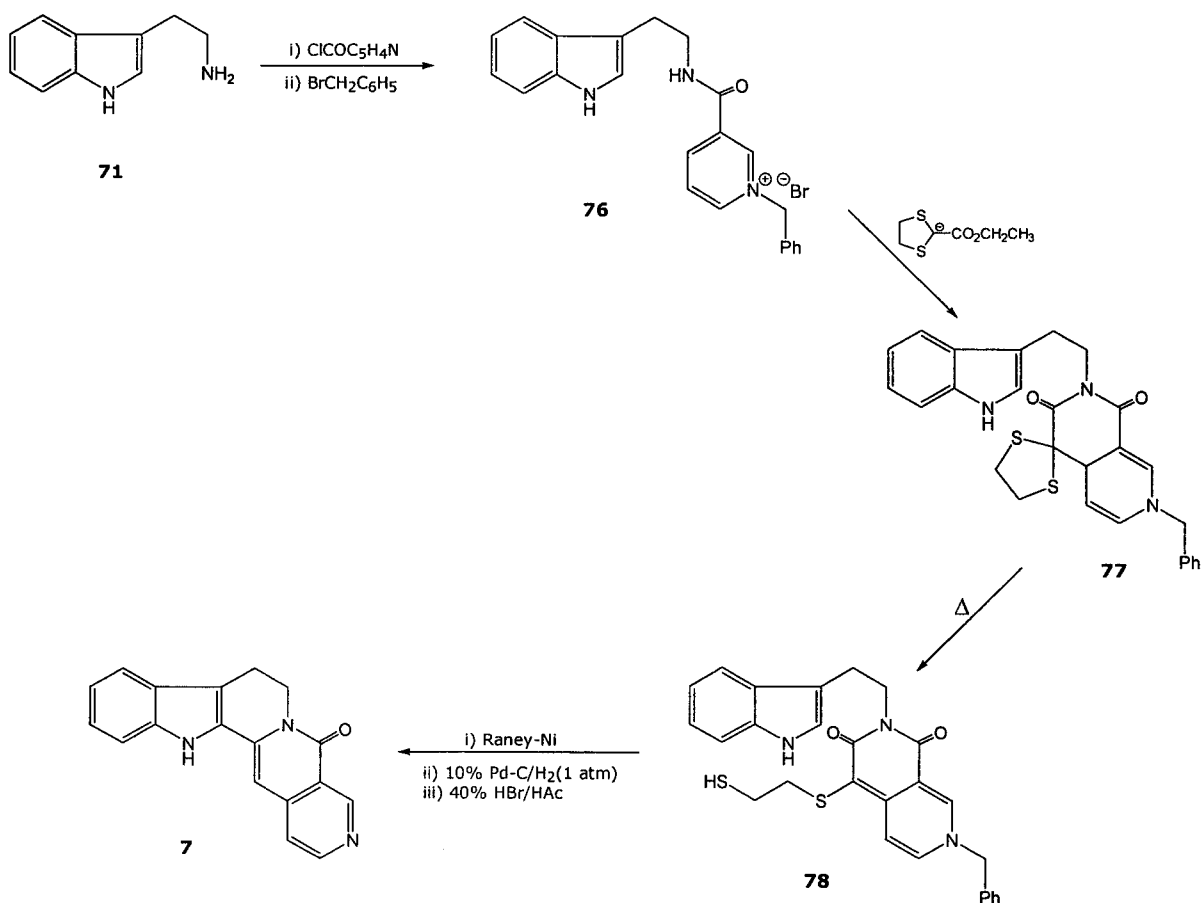


Figura I.17 – Síntese da nauclefina (**7**) segundo Wanner.

Para a construção do núcleo da angustina (**1**), angustidina (**6**), nauclefina (**7**) e 3,14-di-hidroangustina (**9**), Repke, MacLean e colaboradores utilizaram uma amidina pentacíclica (**84 a 86**) como intermediário,^{81,104,105} obtida por reacção de um composto piridinoindólico (**79**) com um derivado litiado de um nicotinonitrilo (**81 a 83**). Da hidrólise de **84**, **85** e **86** resultam os compostos **87**, **9** e **88**, os quais, por oxidação, formam os correspondentes derivados $\Delta^{3,14}$ **7**, **1** e **6**, com rendimentos superiores a 91% (Figura I.18).

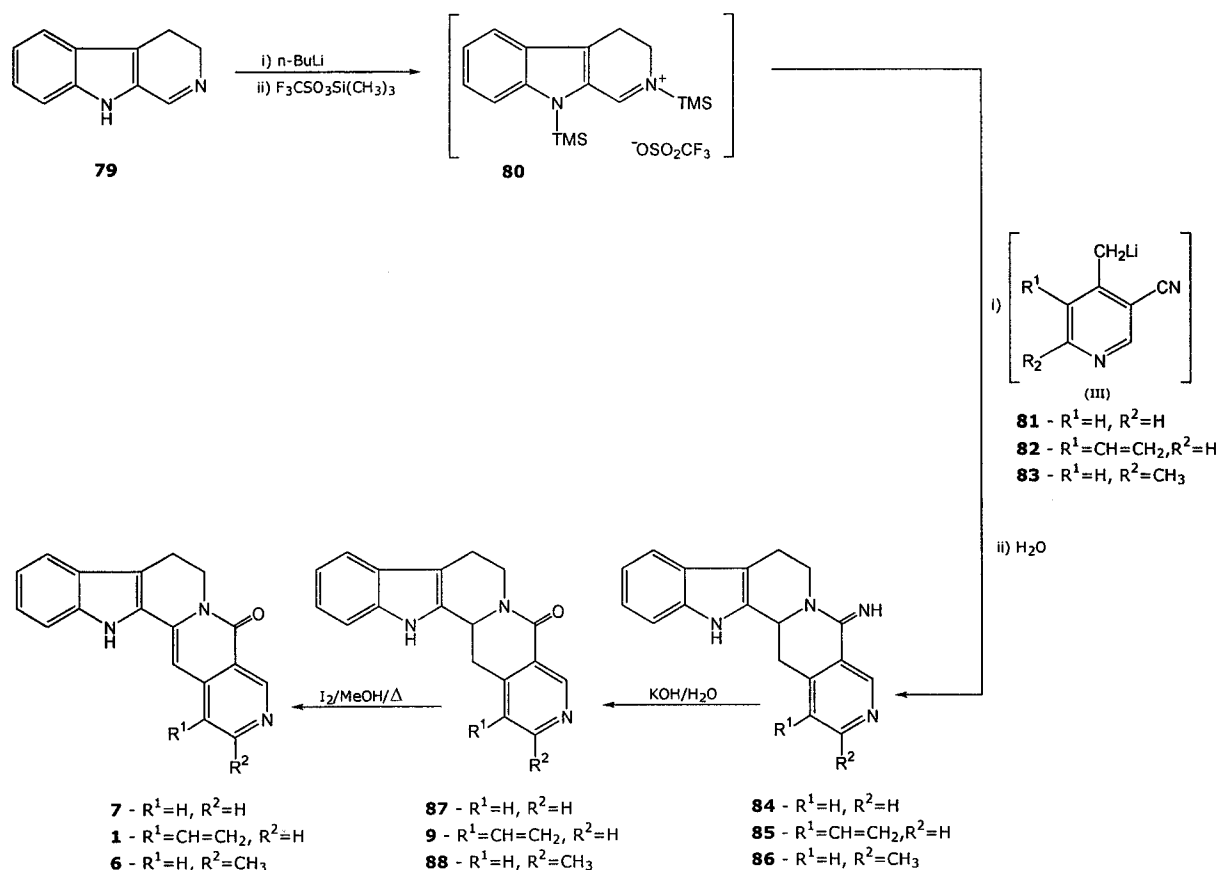


Figura I.18 – Síntese da angustina (**1**), da angustidina (**6**), da nauclefina (**7**) e da 3,14-di-hidroangustina (**9**).

Num método alternativo para a formação da amidina **84**, Vohra e MacLean propuseram um mecanismo em três passos: ¹⁰⁶

- preparação da enamina **91** a partir da reacção do hidrocloreto da triptamina (**89**) com o enolato **90**;
- tratamento da enamina **91** com uma solução saturada de cloreto de hidrogénio em metanol, para obtenção da β -carbolina **92**;
- formação da amidina **84**, por ciclização da β -carbolina **92**.

Este método, cujo passo chave consiste na ciclização da β -carbolina **92** em suporte de sílica-gel, foi empregue na síntese da nauclefina (**7**), com um rendimento reaccional de 91% (Figura I.19).

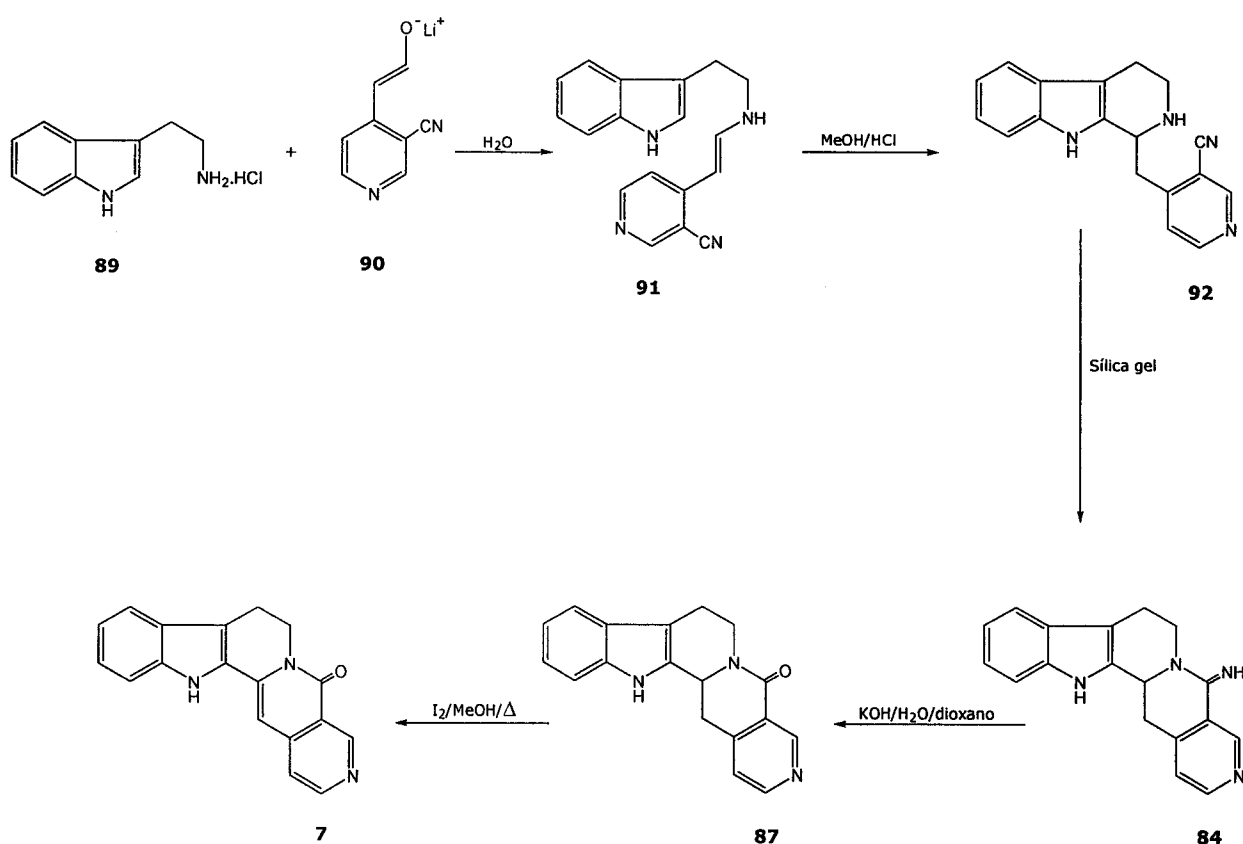


Figura I.19 – Síntese da nauclefina (**7**), segundo Vohra.

Na construção do núcleo hexacíclico da naulafina (**13**), Repke *et al.* obtiveram a partir da reacção de uma imina activada (**80**) e de um piridinocarbonitrilo (**93**), uma mistura da amidina **94** (19%) e do aminonitrilo **95** (39%). O tratamento dos compostos, **94** e **95** com KOH em água/dioxano, origina a lactama **96**, cuja oxidação, num primeiro passo com iodo e depois com 1,2,4-triclorobenzeno na presença de Pd/C, conduz à naulafina, com um rendimento de 40% (Figura I.20).^{29,81,90}

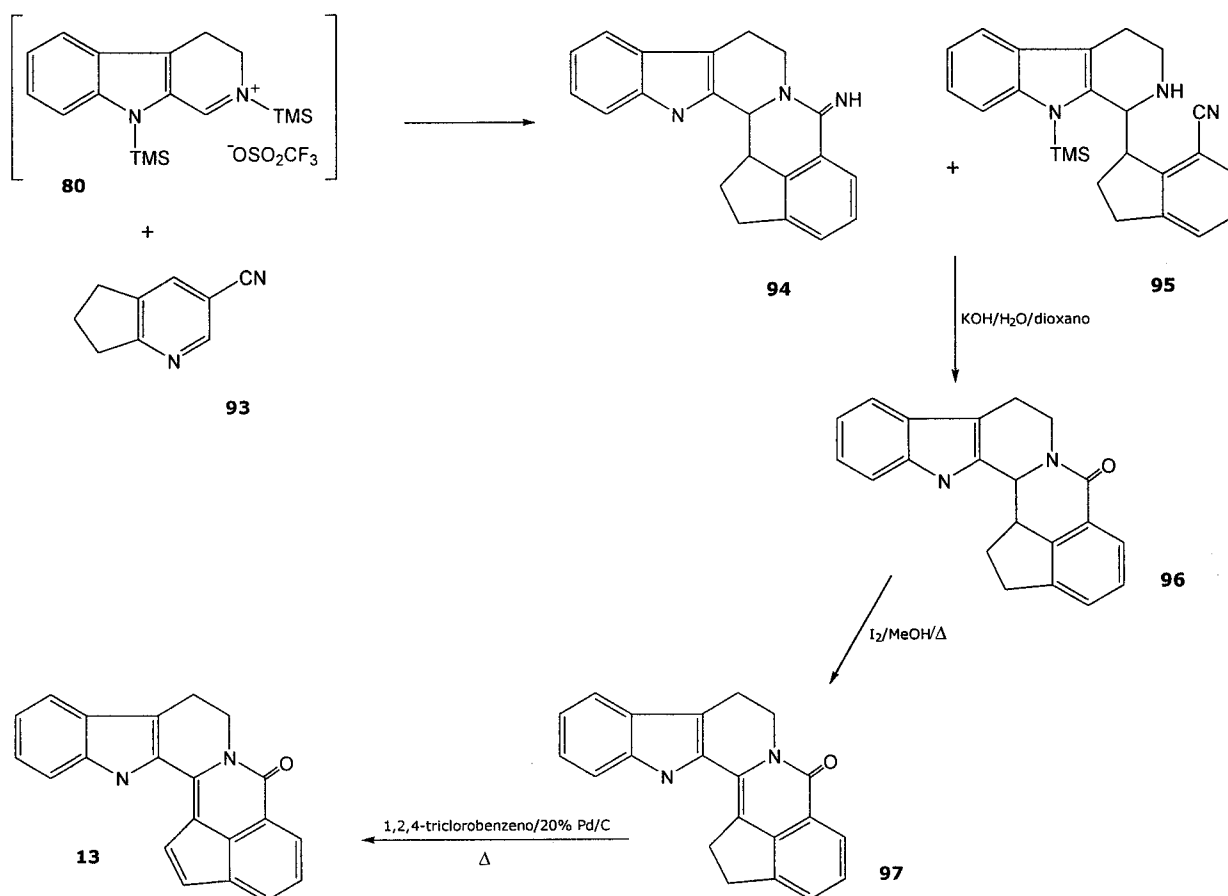


Figura I.20 – Síntese da naulafina (**13**).

A síntese dos alcalóides do grupo oxoioimbano assenta em mecanismos biomiméticos, aqui ilustrados com os exemplos da estrictosidina (**99**), estrictosamida (**28**), 10-hidroxiestrictosamida (**29**) e naucleidinal (**39**).

Lukáts *et al.* efectuaram a síntese biomimética da estrictosidina (**99**) a partir do hidrocloreto da triptamina (**89**) e da secologanina (**98**) com um rendimento de 36% (Figura I.21). A lactamização da estrictosidina induzida pelo carbonato de sódio originou a estrictosamida (**28**) com um rendimento elevado (80%).^{75,108} Pelo mesmo método mas partindo 10-hidroxitriptamina, Takayama *et al.* sintetizaram a 10-hidroxiestrictosamida (**29**) com um rendimento total de 6.6%.⁵²

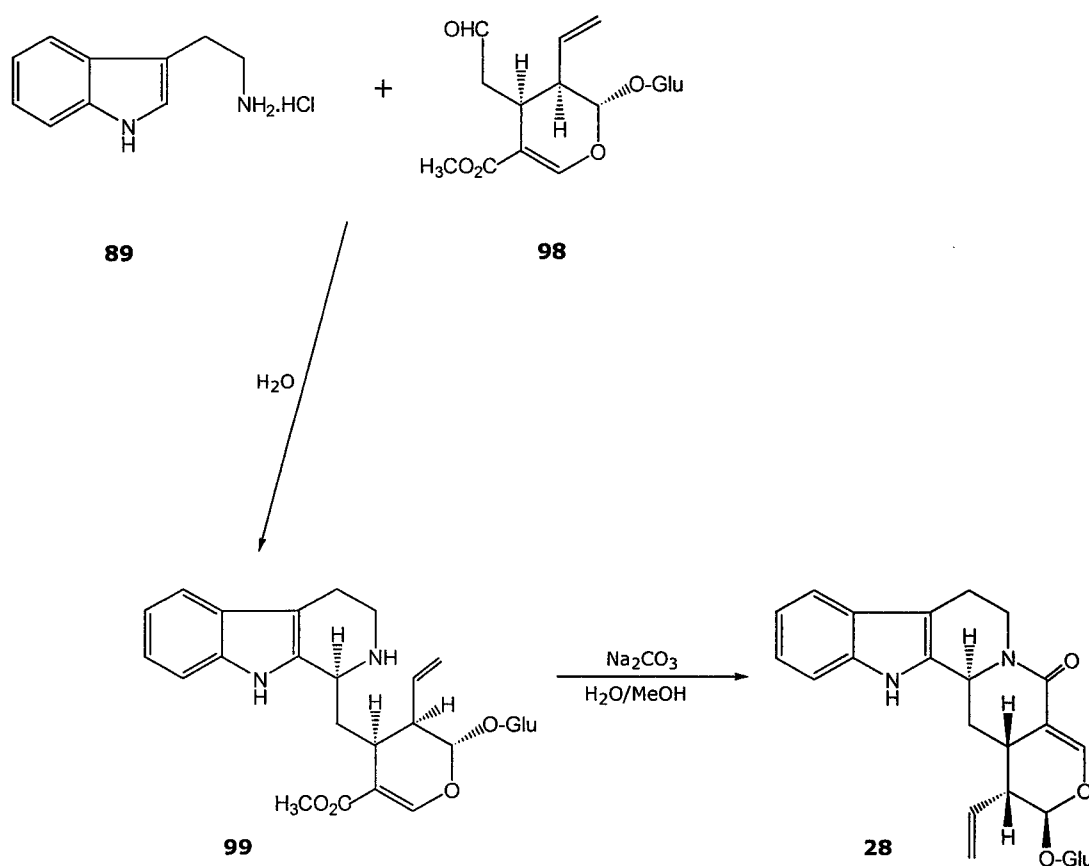


Figura I.21 – Síntese da estrictosamida (**28**).

A síntese biomimética do naucleidinal (**39**) foi conseguida a partir da hidrólise enzimática da estrictosamida (**28**), com um rendimento reaccional de 58% (Figura I.22).^{62,94,109}

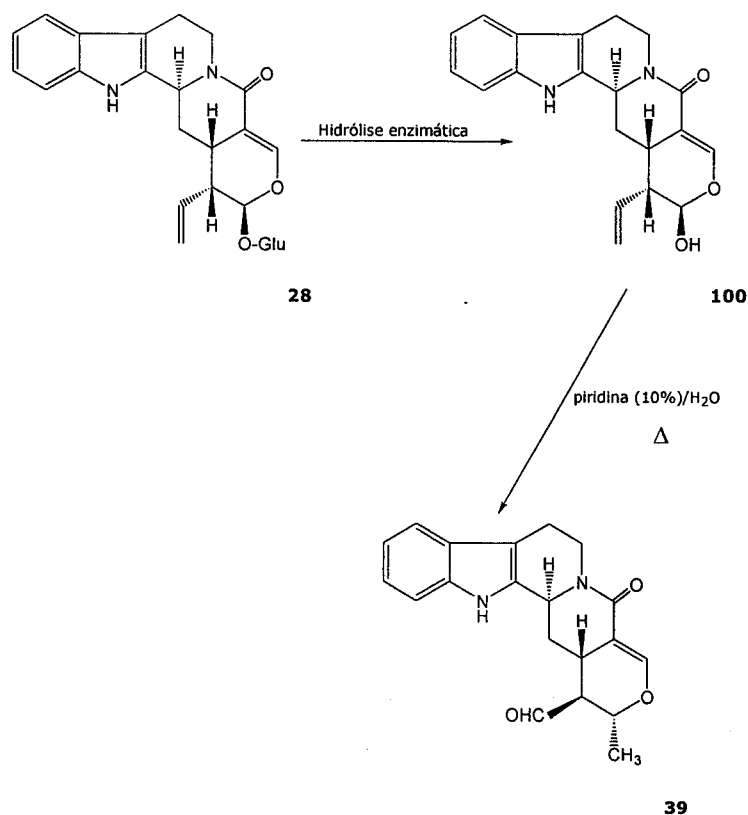


Figura I.22 – Síntese do naucleidinal (**39**).

A síntese de alcalóides do género *Nauclea*, outros que os dos grupos piridino-indolo-quinolizidinona e oxoioimbano, é aqui ilustrada com os exemplos da decarbometoxinauclequina (**18**), cadambina (**32**), 3 α -di-hidrocadambina (**33**), naucleficina (**25**) e nauclefidina (**27**).

Sharif e McLean sintetizaram uma mistura racémica dos dois diastereo-isómeros da decarbometoxinauclequina (**18**),^{36,37} com um rendimento de 78%, mas a configuração relativa do produto natural continua por atribuir. O passo crucial desta reacção envolve a lactamização do composto **102** que forma o anel azepanona da amida **103**, cuja redução com DIBAL-H origina a enamina **104**, a qual cicliza na presença de ácido fórmico para originar **18** (Figura I.23).

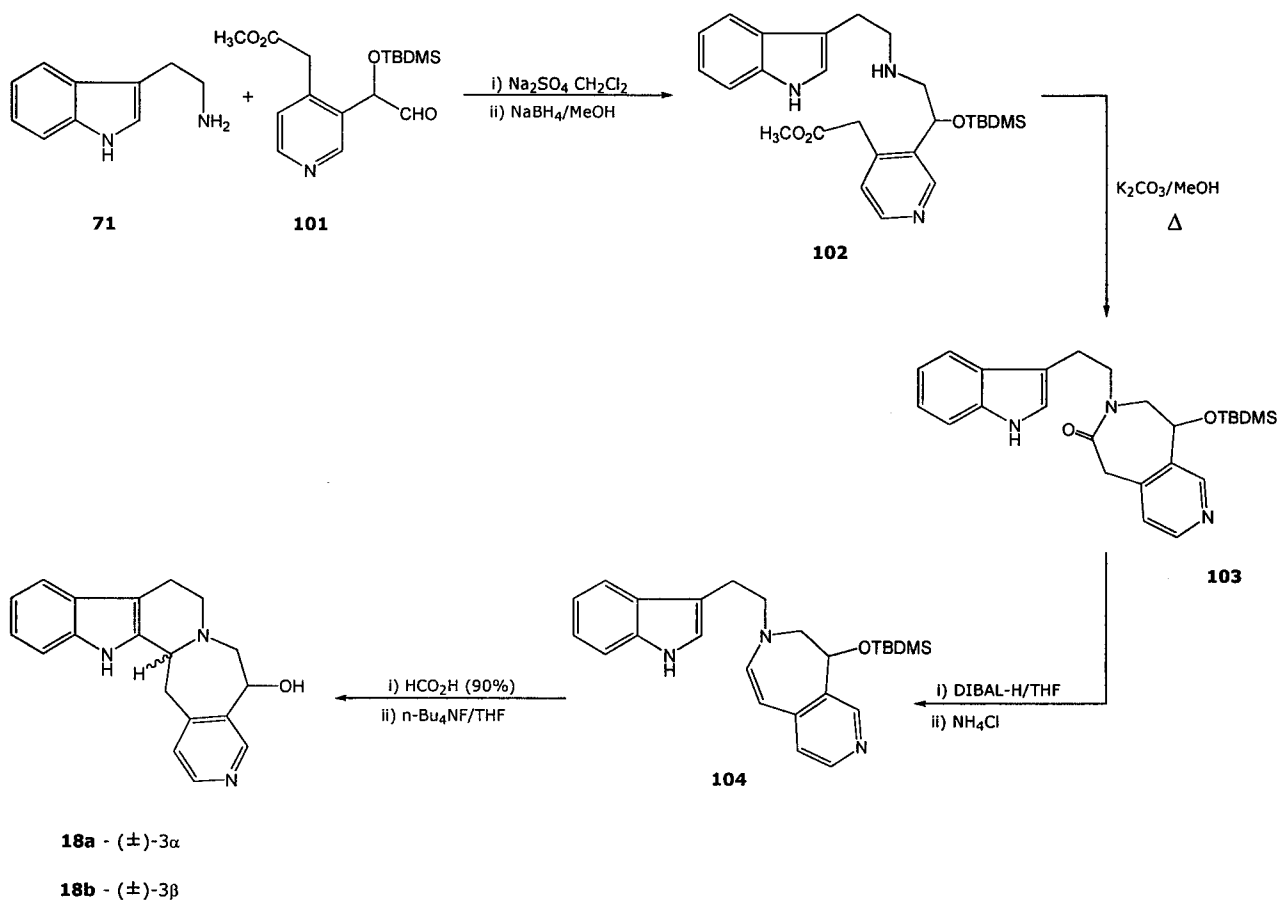


Figura I.23 – Síntese da decarbometoxinauclequina (**18**).

A síntese biomimética da cadambina (**32**) foi efectuada por Brown *et al.* (Figura I.24), com um rendimento de 48%.^{91,110} A reacção chave deste processo consiste na epoxidação selectiva da dupla ligação da secologanina (**98**), via a iodolactona **106**.

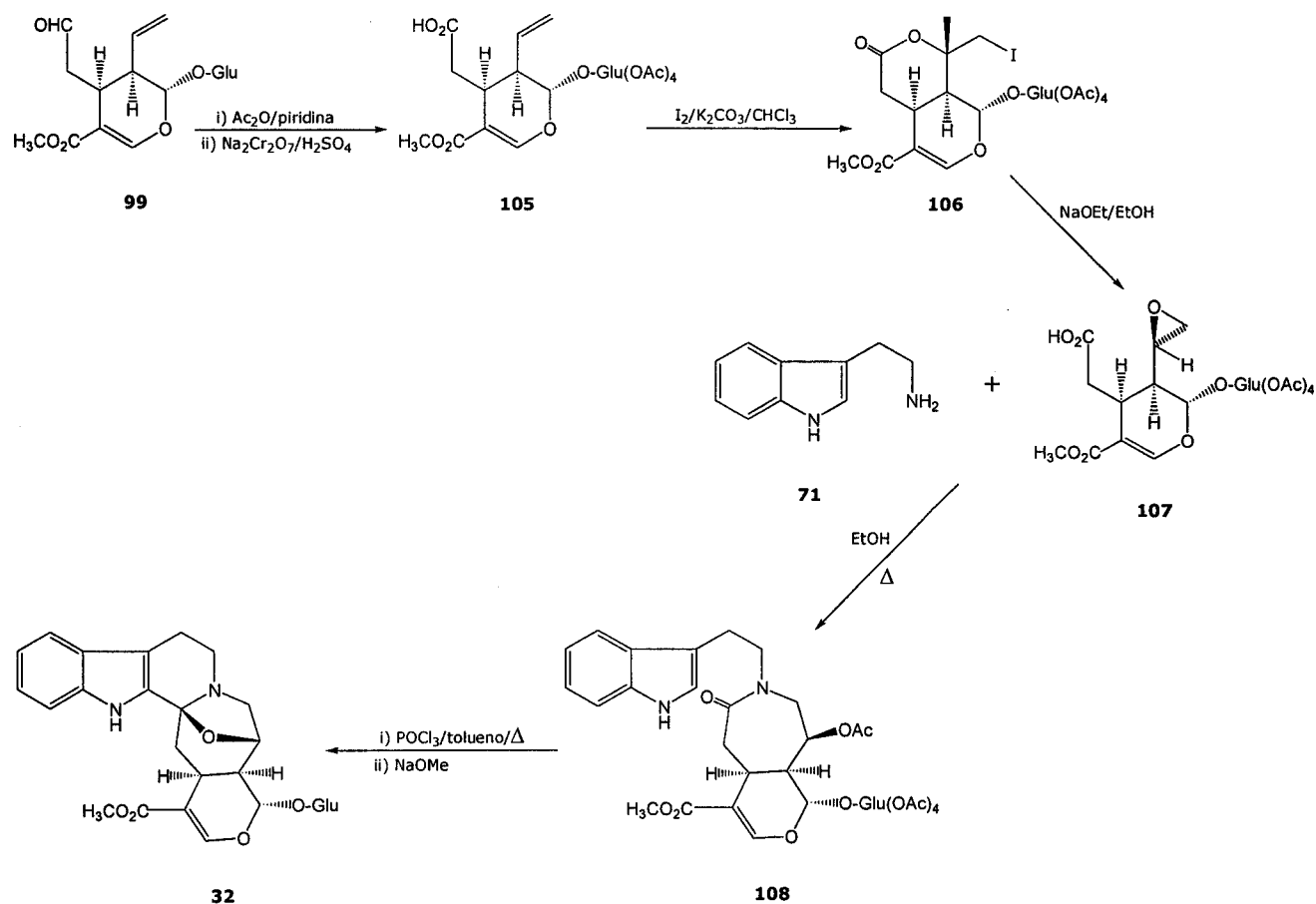


Figura I.24 – Síntese da cadambina (**32**).

A 3 α -di-hidrocadambina (**33**) foi sintetizada por Saunders *et al.*, usando a reacção entre o hidrocloreto da triptamina (**89**) e um derivado acetal da secologanina (**109**) que origina uma mistura separável de anómeros do composto **112**, a qual, após tratamento com ácido fórmico, cicliza para originar **33**, com um rendimento de 10% (Figura I.25)^{111,112}

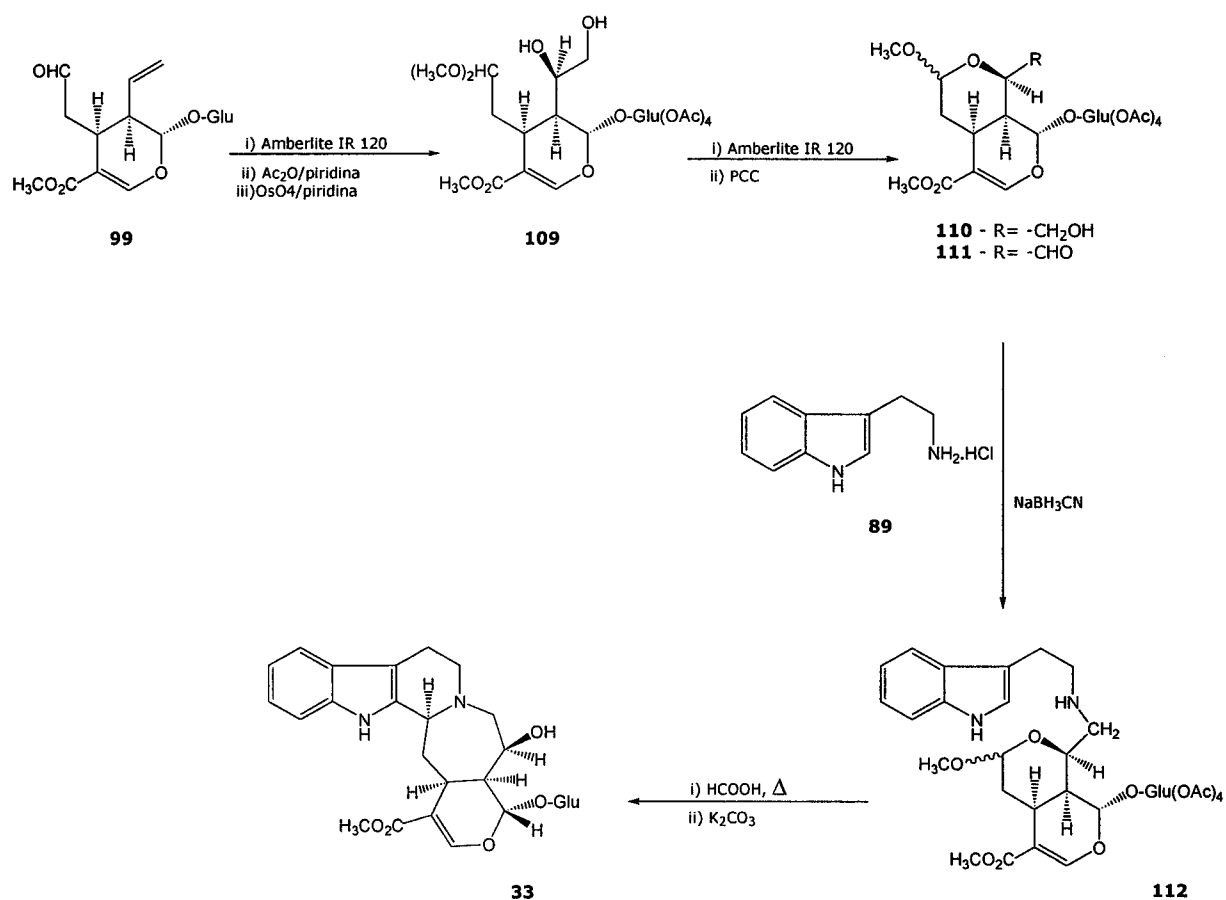


Figura I.25 – Síntese da 3 α -di-hidrocadambina (**33**).

Utilizando o método de fotociclização de enamidas de Ninomiya (Figura I.12), Naito *et al.* sintetizaram a nauclefina (**25**) com um rendimento de 66% (Figura I.26).⁴¹

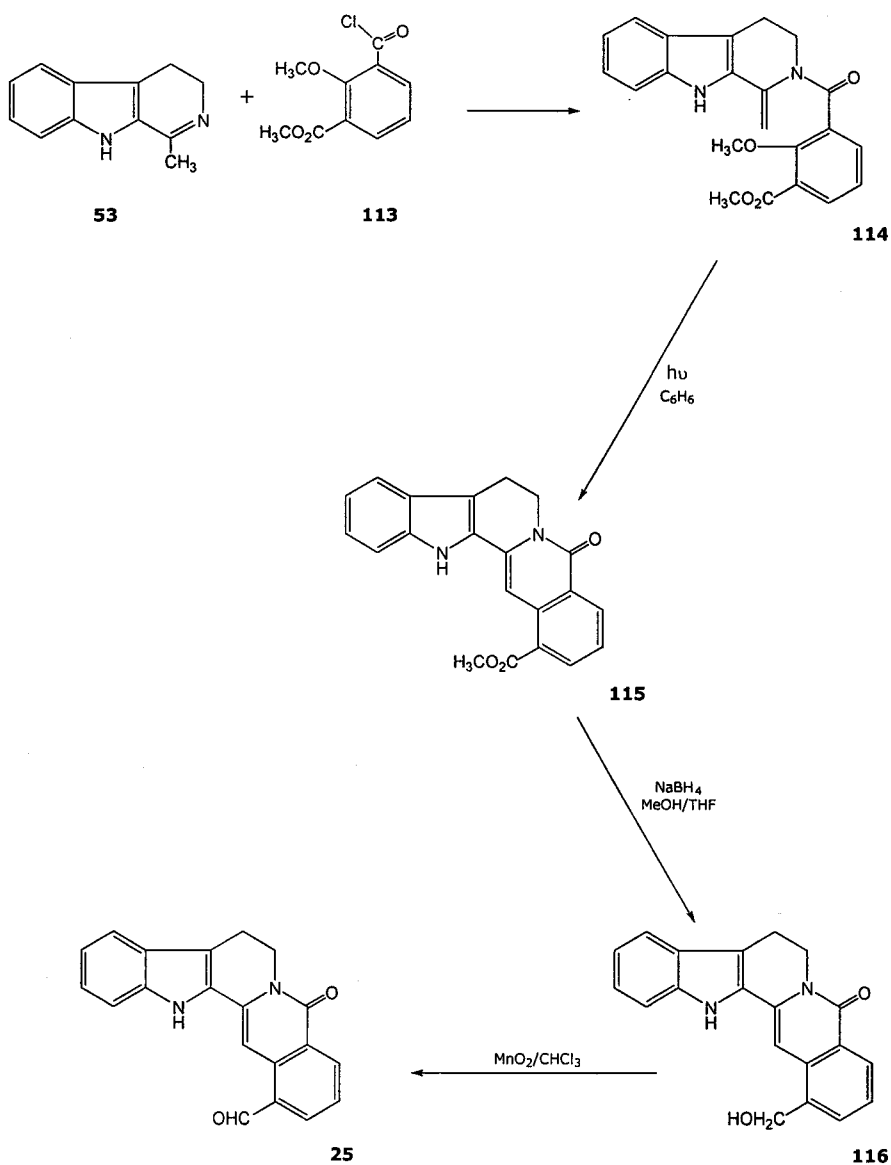


Figura I.26 – Síntese da nauclefina (**25**).

A síntese da nauclefidina (**27**) efectuada por Takayama *et al.* permitiu, por correlação química com o produto natural, sugerir a estrutura **27** para o alcalóide,^{44,93,109} em detrimento da estrutura **118** anteriormente proposta por Mao *et al.* (Figura I.27).⁴⁰ A hidrólise enzimática da vincosamida (**30**) seguida de termólise ácida origina o alcalóide **27**. Os rendimentos obtidos dos compostos **118** e **27** foram de 88 e 89 %, respectivamente.

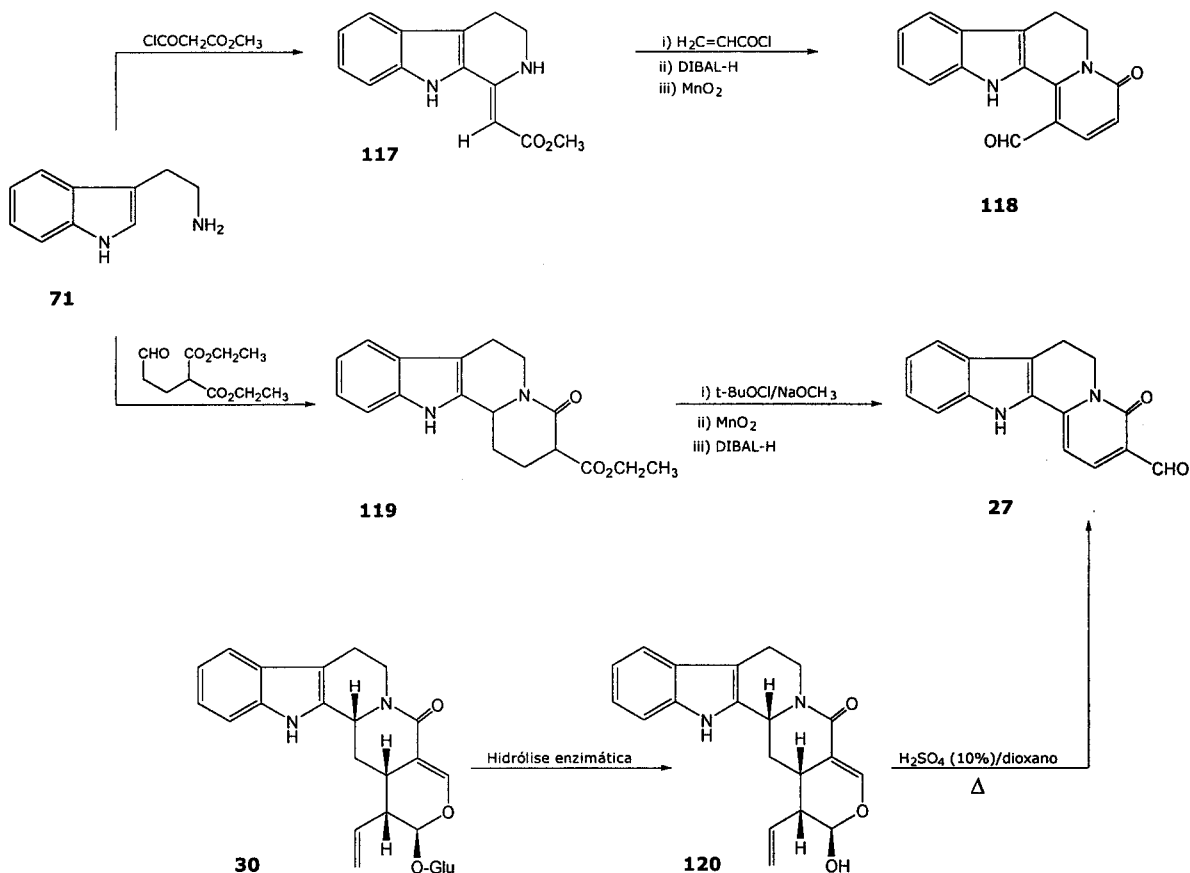


Figura I.27 – Síntese da nauclefidina (**27**).

Por uma outra abordagem, Manna *et al.* sintetisaram a nauclefidina (**27**) via condensação de uma β -carbolina (**53**) com o dimetilmtoximetilenomalonato (**121**), obtendo a indoloquinolizina **122** que, por tratamento com hidrazina seguido de tosilação e posterior redução, gerou a nauclefidina com um rendimento de 82% (Figura I.28).¹¹³

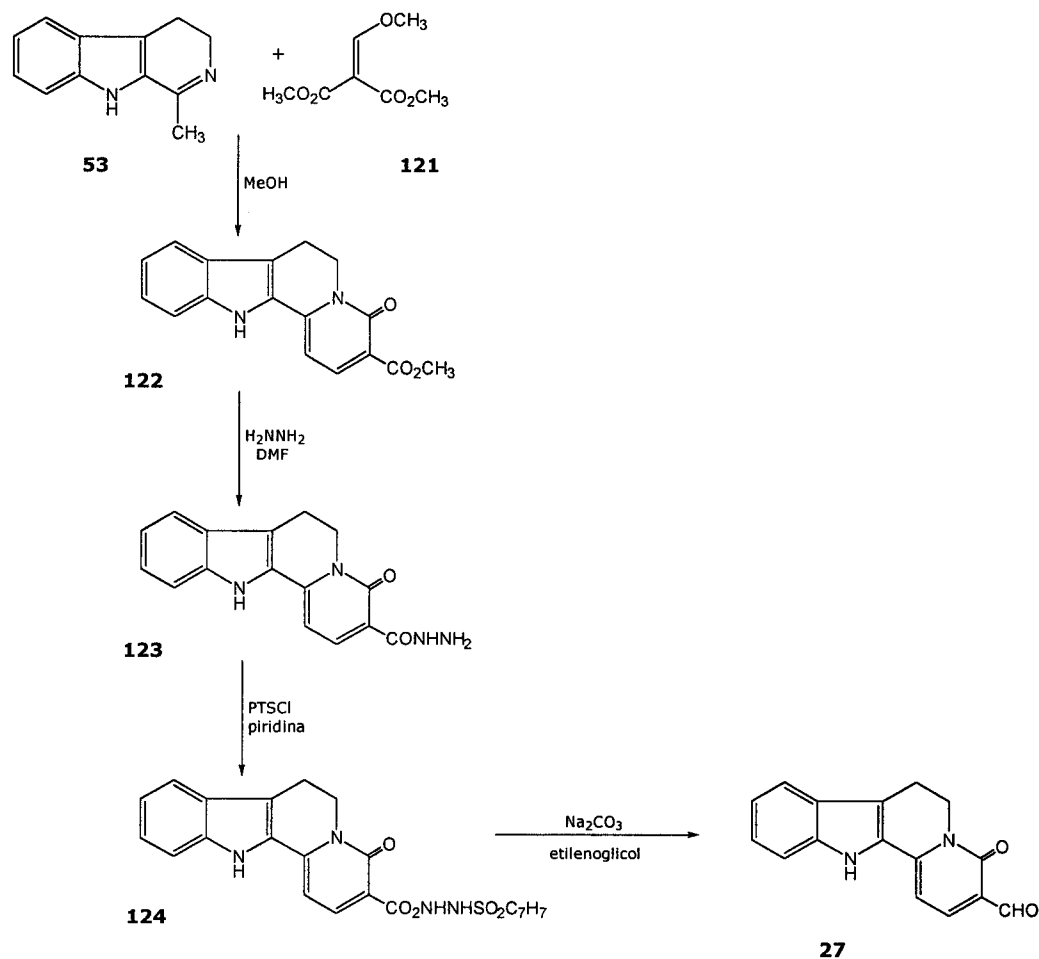


Figura I.28 – Síntese da nauclefidina (**27**), segundo Manna.

I.3.1.3. Biossíntese dos alcalóides indólicos do género *Nauclea*

A strictosidina é a 'matéria prima' para a elaboração *in vivo* de numerosas classes de alcalóides terpenoide-indólicos (Figura I.29).^{14,114} A sua formação ocorre por condensação estereoespecífica entre a triptamina e a *seco*-loganina (Figura I.29),^{53,115-117} catalisada pela (S)-strictosidina sintase, isolada pela primeira vez a partir da *Rhazya stricta*.⁷³ O isolamento desta enzima estereoespecífica e a formação *in vivo* e *in vitro* da strictosidina com a configuração 3 α -(S), é a prova conclusiva de que esta é a configuração do precursor natural dos alcalóides terpenoide-indólicos.^{14,75,108,118,119}

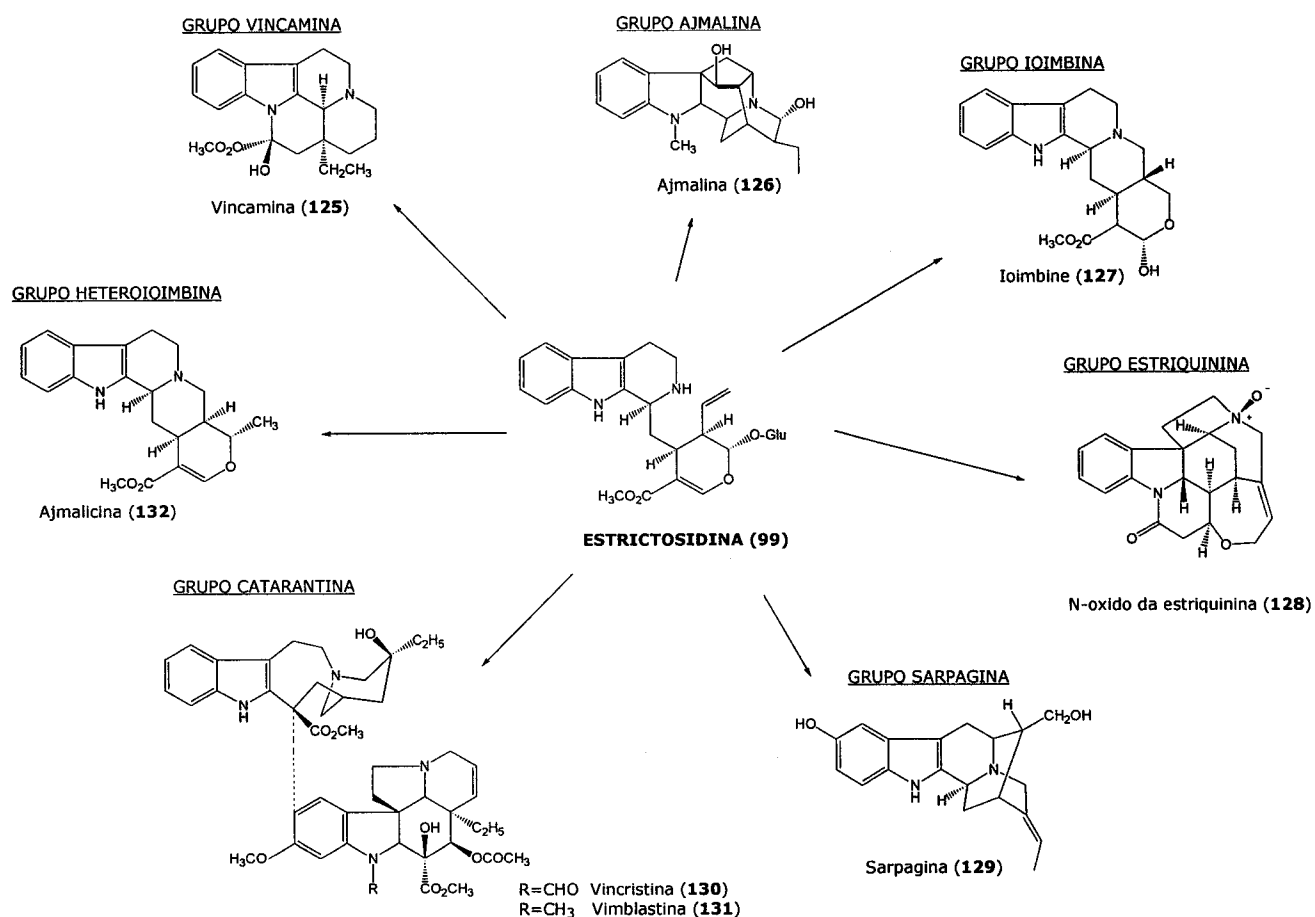


Figura I.29 – Classes de alcalóides terpenoide-indólicos biossintetizados a partir da strictosidina (99).

Em condições biomiméticas, mas na ausência da enzima, a reacção da triptamina (**71**) com o terpeno secologanina (**98**) produz uma mistura de (S)-strictosidina (isovincosido) e (R)-strictosidina (vincosido) na razão de 1:1.¹⁰⁸ A reacção de desglucosilação, catalisada por duas enzimas altamente específicas, as strictosidinas- α -D-glucosidase I e II, é a reacção chave para a formação de muitos tipos de alcalóides terpenoide-indólicos distintos (Figuras I.29 e I.30).^{22,120,121}

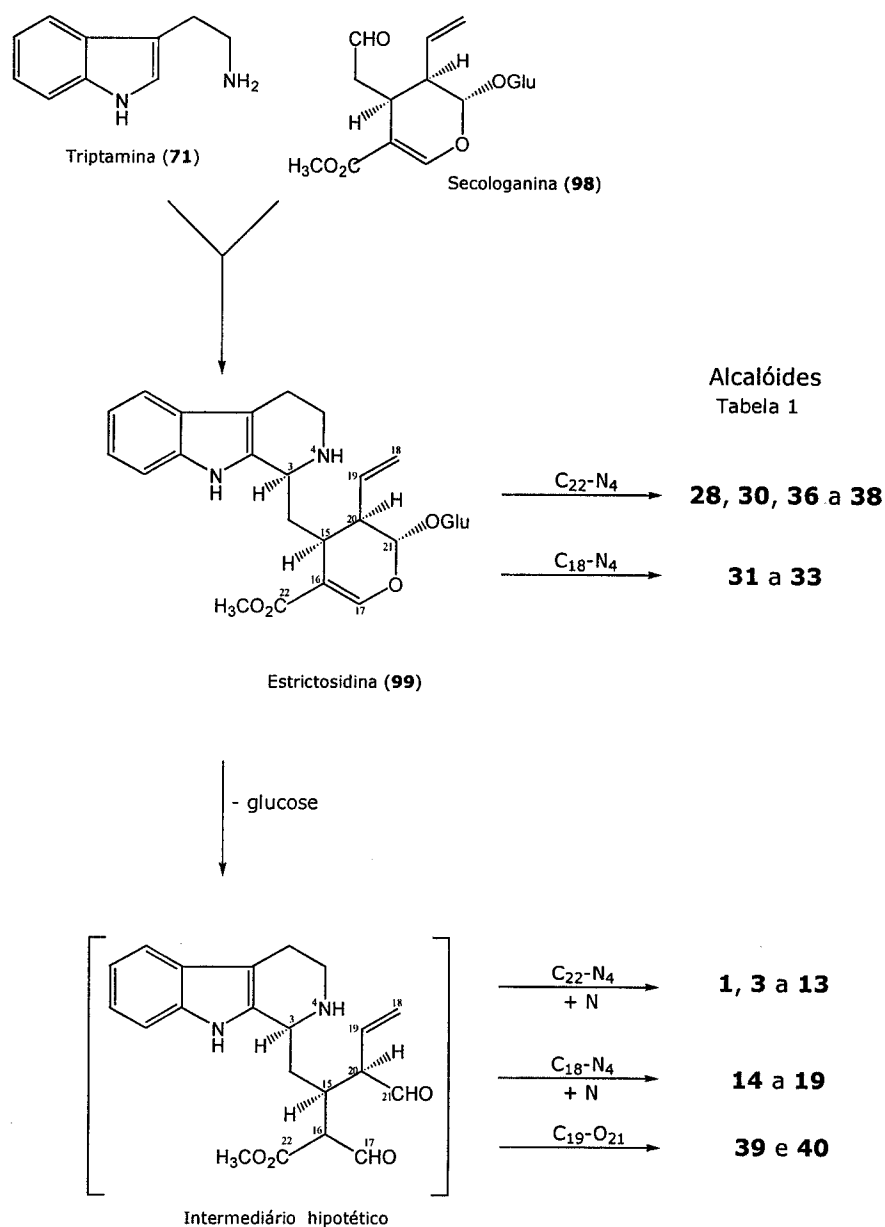


Figura I.30 – Biossíntese dos alcalóides indólicos do género *Nauclea*.

Os alcalóides **2** e **29**, hidroxilados em C-10, e os alcalóides **34** e **35** que apresentam um grupo carboxilato em C-5, têm um processo biossintético semelhante, em que a triptamina é substituída pela serotonina e pelo triptofano, respectivamente.

A biossíntese dos alcalóides indólicos do tipo harmano **42** a **45** resulta da incorporação de sub-unidades de C₂ derivadas do piruvato no esqueleto de triptamina ou triptofano.¹²²

A estrictosamida (**28**), foi também obtida a partir de culturas celulares de *Catharanthus roseus*.¹²³

A existência de alcalóides do tipo piridino-indolo-quinolizidinona é muitas vezes associada a artefactos formados pela reacção da estrictosidina com a amónia usada durante o processo de extracção.^{22,71} No entanto, Phillipson *et al.*²³ e Erdelmeier *et al.*²⁵ referem a existência deste tipo de alcalóides em extractos efectuados na ausência de amónia.

I.3.2. Terpenos

A maior parte dos terpenos isolados do género *Nauclea* são derivados glicosilados do ácido quinóvico (**133**), os quais ocorrem frequentemente nos extractos como misturas irresolúveis. Até à data, apenas foram caracterizados derivados 3-O- e/ou 28-O-glicolisados (Tabela I.5).

Os restantes terpenos referenciados no género *Nauclea* são o ácido quinóvico (**133**), o ácido oxoquinóvico (**145**), o β -sitosterol (**146**), o marounosido (**147**), o diderosido (**148**), o naucledal (**149**) e o naucleol (**150**).

Tabela I.5 - Terpenos do género *Nauclea*.

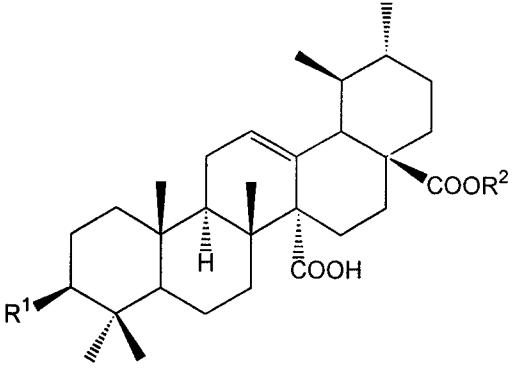
Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p style="text-align: center;">$R^1 = -OH \quad R^2 = H$</p>	<i>Nauclea diderrichii</i>	
	Tronco	124-126
Ácido quinóvico (133)		
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose} \quad R^2 = H$ 3-O- $\beta\text{-D-glucopiranosido}$ do ácido quinóvico (134)	<i>Nauclea pobeguinii</i>	26
	<i>Nauclea diderrichii</i>	
	Tronco	124, 127
$R^1 = -\alpha\text{-L-fucose} \quad R^2 = H$ 3-O- $\alpha\text{-L-fucopiranosido}$ do ácido quinóvico (135)	<i>Nauclea pobeguinii</i>	26
$R^1 = -\alpha\text{-L-ramnose} \quad R^2 = H$ 3-O- $\alpha\text{-L-ramnopiranosido}$ do ácido quinóvico (136)	<i>Nauclea diderrichii</i>	126-129
$R^1 = -\alpha\text{-L-fucose} \quad R^2 = -\beta\text{-D-glucose}$ 3-O- $\beta\text{-D-fucopiranosido}$, éster 28- $\beta\text{-D-glucopiranosídico}$ do ácido quinóvico (137)	<i>Nauclea diderrichii</i>	130
$R^1 = -\alpha\text{-L-ramnose} \quad R^2 = -\beta\text{-D-glucose}$ 3-O- $\alpha\text{-L-ramnopiranosido}$, éster 28- $\beta\text{-D-glucopiranosídico}$ do ácido quinóvico (138)	<i>Nauclea diderrichii</i>	130, 131

Tabela I.5 (cont.) – Terpenos do género *Nauclea*.

Composto	Planta (parte usada)	Referência
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose}$ $R^2 = -\beta\text{-D-glucose}$ 3-O- $\beta\text{-D-glucopiranosido}$, éster 28- $\beta\text{-D-glucopiranosídico}$ do ácido quinóvico (139)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	127, 130, 132, 133
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose (2}\rightarrow\text{1)}$ $\beta\text{-D-glucose}$ $R^2 = \text{H}$ 3-O-[$\beta\text{-D-glucopiranosil (2}\rightarrow\text{1)}$]- $\beta\text{-D-glucopiranosido}$] do ácido quinóvico (140)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	130
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose (1}\rightarrow\text{4)}$ $\alpha\text{-L-ramnose}$ $R^2 = \text{H}$ 3-O-[$\beta\text{-D-glucopiranosil (1}\rightarrow\text{4)}$]- $\alpha\text{-L-ramnopiranosido}$] do ácido quinóvico (141)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	127, 134, 135
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose (1}\rightarrow\text{4)}$ $\beta\text{-D-fucose}$ $R^2 = \text{H}$ 3-O-[$\beta\text{-D-glucopiranosil (1}\rightarrow\text{4)}$]- $\beta\text{-D-fucopiranosido}$] do ácido quinóvico (142)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	127, 134
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose (1}\rightarrow\text{4)}$ $\alpha\text{-L-ramnose}$ $R^2 = -\beta\text{-D-glucose}$ 3-O-[$\beta\text{-D-glucopiranosil (1}\rightarrow\text{4)}$]- $\alpha\text{-L-ramnopiranosido}$], éster 28- $\beta\text{-D-glucopiranosídico}$ do ácido quinóvico (143)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	127, 134

Tabela I.5 (cont.) - Terpenos do género *Nauclea*.

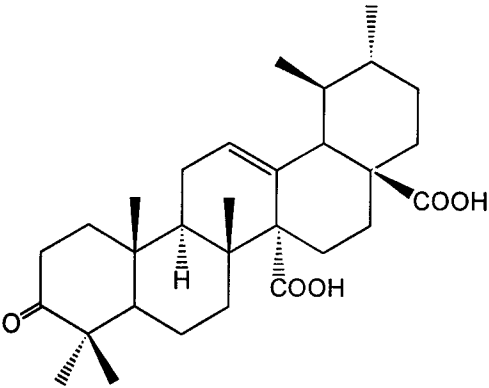
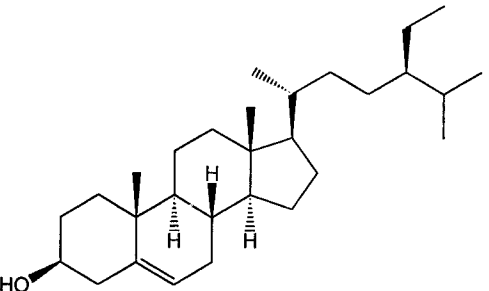
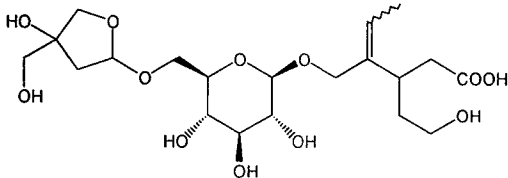
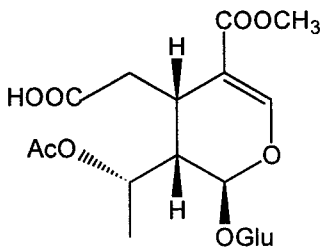
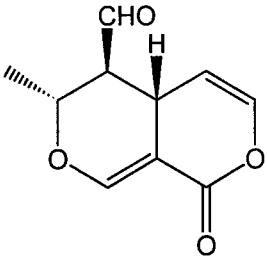
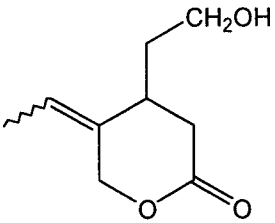
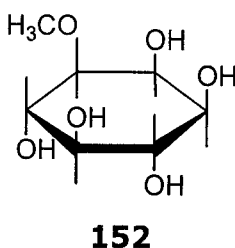
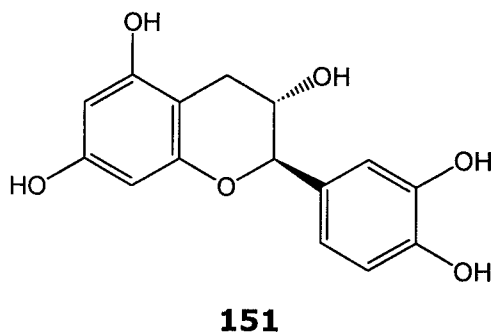
Composto	Planta (parte usada)	Referência
$R^1 = -\beta\text{-D-glucose (1}\rightarrow\text{4)} \beta\text{-D-fucose}$ $R^2 = -\beta\text{-D-glucose}$ 3-O-[$\beta\text{-D-glucopiranosil (1}\rightarrow\text{4)}-\beta\text{-D-fucopiranosido}$], éster 28- $\beta\text{-D-glucopiranosídico}$ do ácido quinóvico (144)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	127, 134
 Ácido oxoquinóvico (145)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	124, 136
 β-sitosterol (146)	<i>Nauclea latifolia</i> Raiz <i>Nauclea diderrichii</i> Folhas <i>Nauclea parva</i> Tronco	11 30, 137 27
 Marounosido (147)	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	138

Tabela I.5 (cont.) – Terpenos do género *Nauclea*.

Composto	Planta (parte usada)	Referência
 <p>Diderosido (148)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	124
 <p>Naucedal (149)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	34, 139, 140
 <p>Naucleol (150)</p>	<i>Nauclea diderrichii</i> Tronco	34

I.3.3. Outros compostos

Do tronco da *Nauclea gambir* foram isolados a (2R,3S)-(+)-catequina (**151**) e o 1-O-metil-*myo*-inositol (L-bornesitol)(**152**).¹⁴¹



Um estudo sobre a composição química e sobre o significado nutritivo do fruto do *Sarcocephalus latifolius* revelou a presença de lactose, maltose, e uma mistura de glucose/frutose, com valores de 20.23, 19.03 e 12.20 mg/100mL, respectivamente, e um valor médio de pectina de 0.34%.¹⁴² Foi registado um conteúdo proteico de 0.18% e de vitamina C entre 11.01 a 12.50%. A concentração de azoto variou entre 0.028 e 0.032%, e a quantidade de cinzas e humidade obtidas foi de 2.10 e 42.23%, respectivamente. Os valores médios da análise mineral para Cu, Co, Fe e Mn foram respectivamente, de 0.012, 0.009, 0.169 e 0.010 ppm. A densidade do sumo do fruto apresentou um valor médio de 1.12, e o pH de 3.58.

I.4. Actividade biológica de produtos naturais isolados do género *Nauclea*

Os alcalóides **1**, **2**, **3**, **4**, **7**, **9**, **10**, **11** e **12** (Tabela I.6), isolados das folhas da *N. orientalis*, apresentam *in vitro*, actividade antiproliferativa sobre o carcinoma humano da vesícula (T-24) e sobre a dependência do factor de crescimento epidérmico (EGF) do rato em relação aos queratinócitos epidérmicos (Tabela I.6)²⁵

Tabela I.6 - Actividade antiproliferativa *in vitro* sobre o carcinoma humano da vesícula (T-24) e sobre a dependência do factor de crescimento epidérmico (EGF) do rato em relação aos queratinócitos epidérmicos.

Compostos	Tumores	
	DL ₅₀ (µg/mL)	
	T-24	EGF
Angustina (1)	3.3	0.4
18,19-di-hidroangustina (3)	9.2	3.4
Nauclefina (7)	4.7	3.6
Angustolina (4)	32.9	4.2
10-hidroxiangustina (2)	3.4	0.5
3,14-di-hidroangustina (9)	4.3	1.1
3,14,18,19-tetra-hidroangustina (10)	5.0	1.2
3,14-di-hidroangustolina (11) ([α] _D -172.5°)	12.4	6.6
3,14-di-hidroangustolina (12) ([α] _D -301.4°)	14.3	6.1

Os resultados dos testes biológicos permitiram retirar as seguintes conclusões sobre a relação estrutura-actividade: não se verificam grandes diferenças de actividade entre os alcalóides do tipo angustina e os do tipo 3,14-di-hidroangustina; a presença de uma cadeia lateral (C₂) na posição C-20 não é essencial

para a actividade biológica, mas a introdução de um grupo substituinte hidróxido na referida cadeia, como no caso dos compostos **4**, **11** e **12**, resulta numa aparente perda de actividade; a estereoquímica, R ou S, não atribuída em C-19 dos compostos **11** e **12**, não se revelou importante no que concerne à actividade de anti-proliferação.

A nauclefina (**7**), isolada do tronco da *Nauclea parva*, induz contracções não específicas sobre o íleo do porco da Guiné e diminui o tónus e a actividade do duodeno do coelho.²⁷

A 19-O-metilangustolina (**50**),⁸² isolada da *Camptotheca acuminata*, revelou actividade em testes *in vitro* sobre a leucemia linfocítica (P-388), com valores de DL₅₀ de 2.32 µg/mL.⁷²

A estrictosamida (**28**), 10-hidroxiestrictosamida (**29**) e vicosamida (**30**), isolados das folhas da *N. orientalis*, foram sujeitos a testes de actividade moluscicida, anti-bacteriana e anti-fúngica, e a respectiva toxicidade avaliada no crustáceo *Artemia salina*, não se tendo verificado qualquer resultado positivo.⁴⁹

O ácido quinóvico (**133**) e o 3-O-α-L-ramnopiranosídeo do ácido quinóvico (**136**) revelaram actividade para o carcinoma escamoso (KB), com valores de DL₅₀ de 21.5 e 80.0 µg/mL, respectivamente.¹²⁶

O β-sitosterol (**146**) induziu a apoptose de células cancerígenas da próstata humana¹⁴³, inibiu o desenvolvimento celular de células cancerígenas no cólon humano e revelou actividade anti-inflamatória.¹⁴⁵ Os efeitos sinérgicos de estimulação do sistema imunitário e os efeitos profiláticos numa grande variedade de doenças, são indicadores da importância do β-sitosterol na nutrição humana.¹⁴⁶

A (2R,3S)-(+)-catequina (**151**) é referenciada no tratamento de doenças hepáticas.¹⁴¹

II – DISCUSSÃO

II.1. Alcalóides

II.1.1. Nauclefina (7)

O composto **7** foi isolado do extracto etanólico básico e neutro dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 366 nm e por 'spray' de Dragendorff e de Van Urk's, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2 a 90:10) como sistema de eluente.

O espectro de UV de **7** apresenta absorções intensas a λ 371 e 389 nm, características de um cromóforo fortemente conjugado,²⁴ enquanto que o espectro de IV sugere a presença de uma estrutura indólica, com bandas características a 3345, 1609 e 730 cm^{-1} , e a presença de um grupo lactama a 1651 cm^{-1} .^{147,148}

O espectro de ^1H -RMN (Figura II.1 e Tabela II.1) revela uma matriz característica de uma estrutura do tipo piridino-indolo-quinolizidinona, através dos seguintes sinais:

- dois tripletos a δ 7.09 (1H, $J=7.6$) e 7.26 ppm (1H, $J=7.2$) e dois dupletos a δ 7.45 (1H, $J=8.4$) e 7.63 ppm (1H, $J=8.0$), atribuíveis respectivamente aos prótons H-10, H-11, H-12 e H-9 do sistema indólico, de acordo com os acoplamentos verificados por ^1H - ^1H COSY;
- um singuleto a δ 11.80 ppm, característico do grupo NH indólico, o qual, no espectro NOESY, apresenta uma interacção com um próton a δ 7.02 ppm, atribuível a H-14 (Figura II.2);
- dois tripletos a δ 3.13 (2H, $J=6.8$) e 4.40 ppm (2H, $J=6.8$), atribuíveis respectivamente aos prótons metilénicos H-6 e H-5 do núcleo pentacíclico, os quais, de acordo com o espectro HMQC, se encontram ligados a carbonos a δ 19.3 e 40.3 ppm, de multiplicidade confirmada pelo espectro DEPT;¹⁴⁹

- um singuleto relativo a um protão a δ 9.32 ppm, que não apresenta nos espectros NOESY e ^1H - ^1H COSY qualquer interacção e acoplamento com outros protões, o que é indicativo de H-17.

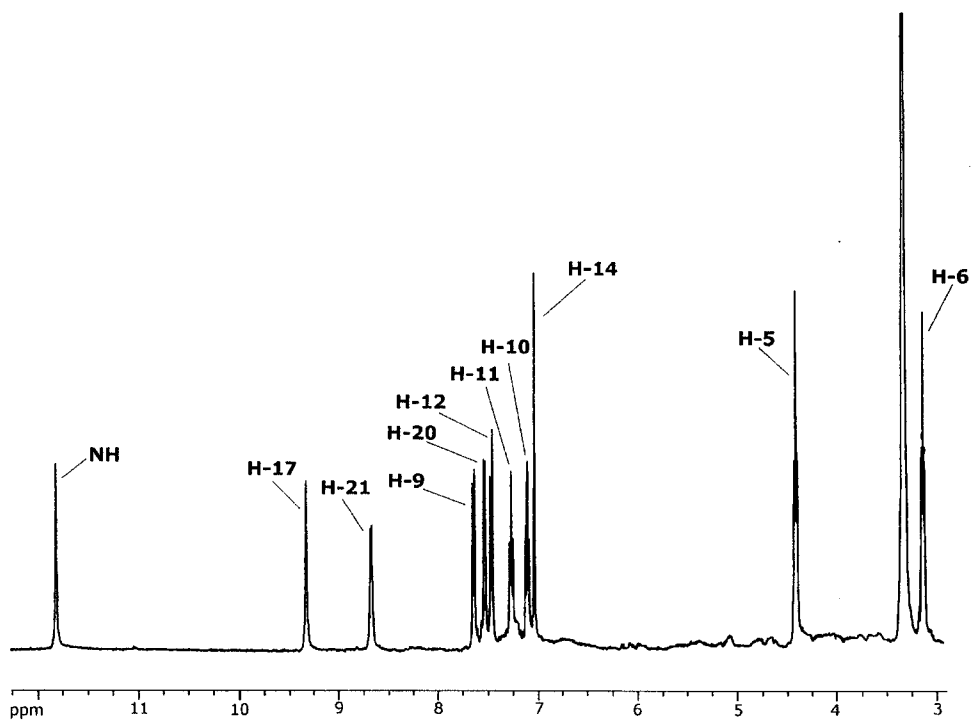


Figura II.1 - Espectro de ^1H -RMN de **7** ($\text{DMSO}-d_6$).

Tabela II.1 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **7** (DMSO- d_6).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	127.6
3	---	137.2
5	4.40, t, (6.8)	40.3
6	3.13, t, (6.8)	19.3
7	---	114.8
8	---	125.4
9	7.63, d, (8.0)	119.7
10	7.09, t, (7.6)	119.9
11	7.26, t, (7.2)	124.5
12	7.45, d, (8.4)	112.0
13	---	138.6
14	7.02, s	97.0
15	---	141.6
16	---	119.0
17	9.32, s	150.5
20	7.52, d, (5.6)	119.0
21	8.66, d, (4.8)	151.0
22	---	161.1
NH	11.80, s	---

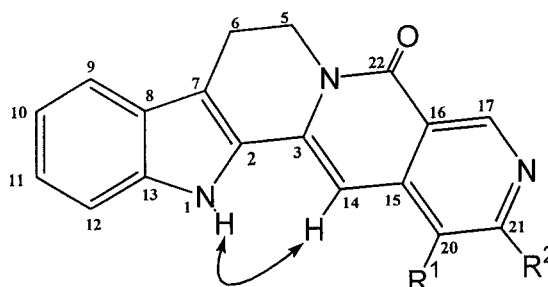
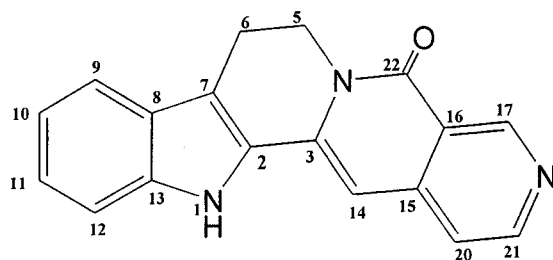


Figura II.2 - Efeito nuclear Overhauser do próton indólico com H-14.

O padrão de substituição do anel piridina é sugerido pelo espectro de massa, que apresenta o pico molecular a m/z 287 e um pico de fragmentação de elevada intensidade a m/z 286, resultante da perda de um próton por clivagem α (Figura I.3, pg. 22). A presença no espectro de ^1H -RMN, de dois dupletos a δ 7.52 (1H, $J=5.6$) e 8.66 ppm (1H, $J=4.8$), relativos a dois prótons acoplados, confirmam a existência de um anel piridina não substituído em C-20 e C-21.

Os dados espectrais de **7** correspondem aos descritos na literatura para a nauclefina.^{24,25,27,81,101,102} A atribuição das ressonâncias de ^{13}C efectuada com base nos espectros DEPT e HMQC, corrige os valores de C-10, C-11, C-15 e C-16 publicados na literatura⁹⁵ e permitiu identificar pela primeira vez o valor da ressonância de C-2 para este composto.



(7)

II.1.2. Angustina (1)

O composto **1**, isolado do extracto etanólico básico dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes, apresenta em ccd menor polaridade que a nauclefina (**7**), no mesmo sistema de eluente.

À semelhança da nauclefina, o espectro de IV de **1** apresenta bandas de absorção indólicas a 3224, 1601 e 738 cm^{-1} , um grupo lactama a 1644 cm^{-1} , e ainda, bandas adicionais a 1399, a 829 e a 817 cm^{-1} .

O espectro de UV apresenta máximos de absorção a λ 379 e 397 nm, o que traduz um deslocamento batocrómico de cerca de 10 nm em relação ao espectro do composto **7**, e o espectro de massa tem um pico molecular coincidente com o pico base, a m/z 313.

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Figura II.3 e Tabela II.2), de matriz piridino-indolo-quinolizidinona, apresentam as seguintes diferenças significativas em relação aos da nauclefina (**7**):

- um multipletto a δ 7.29 ppm que integra para três prótons;
- o sinal de H-17 deslocado para campo mais alto, a δ 9.23 ppm;
- um singuleto a δ 8.87 ppm, relativo a um próton ligado a um carbono olefínico a δ 147.7 ppm;
- dois dupletos relativos a prótons a δ 5.63 e 6.06 ppm posicionados num carbono olefínico a δ 119.8 ppm.

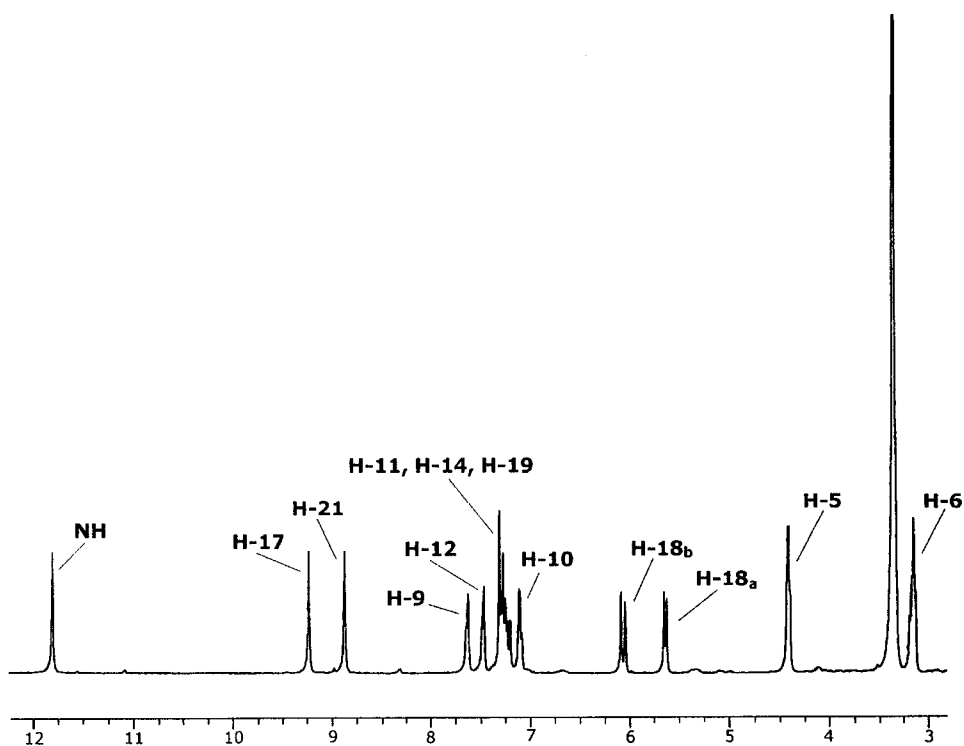


Figura II.3 – Espectro de ^1H -RMN de **1** ($\text{DMSO}-d_6$).

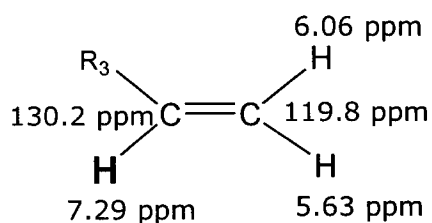
Tabela II.2 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **1** (DMSO- d_6).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	126.8
3	---	136.9
5	4.40, t, (6.0)	40.4
6	3.15, t, (6.0)	19.2
7	---	114.8
8	---	125.5
9	7.63, d, (8.0)	119.9
10	7.12, t, (7.2)	119.9
11	7.29, m	124.6
12	7.47, d, (8.0)	112.0
13	---	138.5
14	7.29, m	93.8
15	---	139.0
16	---	119.8
17	9.23, s	149.7
18_a	5.63, d, (10.8)	119.8
18_b	6.06, d, (17.6)	
19	7.29, m	130.2
20	---	127.8
21	8.87, s	147.7
22	---	161.1
NH	11.81, s	---

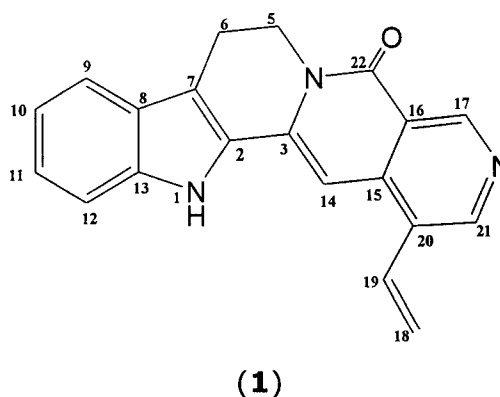
A análise dos espectros ^1H - ^1H COSY, HMQC e NOESY permitiu a identificação dos três prótons a δ 7.29 ppm:

- o próton H-11 do anel benzênico, que está acoplado a H-12;
- H-14, que apresenta um *noe* com NH e está posicionado no carbono olefínico a δ 97.0 ppm, característico de C-14 de acordo com os dados espectrais de ^{13}C desta série de compostos (I.3.1.1 ,pg. 21);

- e um protão que faz parte do fragmento vinílico



O protão H-14 apresenta um *noe* com o protão vinílico a δ 7.29 ppm, o que confirma a posição da cadeia vinílica em C-20, correspondente à estrutura da angustina, cujos dados espectrais se encontram publicados.^{23-25,71,81,102}



II.1.3. Angustolina (4)

O composto **4** foi isolado do extracto etanólico básico dos troncos, do extracto etanólico básico e ácido das folhas e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. Apresenta em ccd, características cromatográficas semelhantes às da nauclefina e angustina, com polaridade intermédia no mesmo sistema de eluente.

O espectro de IV apresenta bandas de absorção indólicas a 3280, 1604 e 744 cm^{-1} , um grupo lactama a 1670 cm^{-1} , e uma banda a 3368 cm^{-1} característica de um grupo hidroxilo.

O espectro de UV de **4** apresenta absorções intensas a λ 373 e 392 nm, o que traduz um deslocamento batocrómico de cerca de 5 nm em relação ao

espectro da nauclefina (**7**) e um deslocamento hipsocrômico de cerca de 5 nm em relação ao espectro da angustina (**1**).

O espectro de massa apresenta o íon molecular a m/z 331, o qual, por perda sucessiva de dois fragmentos de 18 e 15 uma, dá origem aos íões de m/z 313 e m/z 298.

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Figura II.4 e Tabela II.3), de matriz piridino-indolo-quinolizidinona, apresentam as seguintes diferenças significativas em relação aos da nauclefina (**7**):

- dois dupletos, um a δ 1.51 ppm que integra para três prótons e outro a δ 5.32 ppm relativo a um próton, característicos de um sistema A_3X_1 .
- um singuleto relativo a um próton a δ 5.55 ppm, o qual, no espectro HMQC, não está ligado a nenhum carbono;
- o sinal de H-17 deslocado para campo mais alto, a δ 9.24 ppm;
- um singuleto a δ 8.77 ppm, relativo a um próton ligado a um carbono olefínico a δ 147.6 ppm;
- um carbono a δ 63.9 ppm ao qual está ligado o próton metino a δ 5.32 ppm.

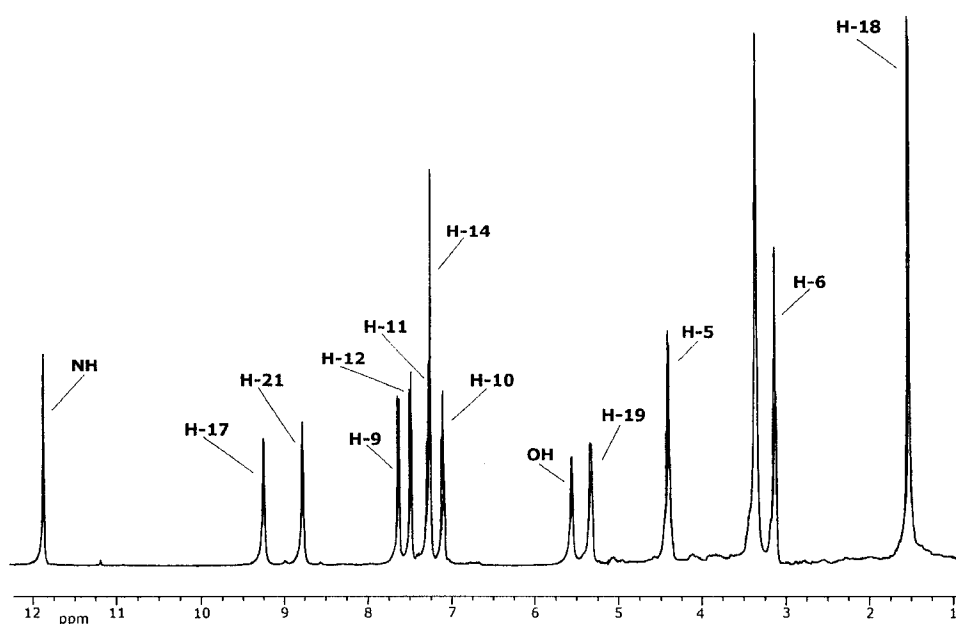


Figura II.4 – Espectro de ^1H -RMN de **4** ($\text{DMSO}-d_6$).

Tabela II.3 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **4** (DMSO- d_6).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	127.8
3	---	136.5
5	4.40, t, (6.2)	40.3
6	3.12, t, (6.4)	19.2
7	---	114.6
8	---	125.5
9	7.62, d, (8.4)	119.9
10	7.09, t, (7.6)	119.8
11	7.27, t, (7.6)	124.5
12	7.48, d, (8.0)	111.9
13	---	138.5
14	7.24, s	93.9
15	---	138.5
16	---	119.0
17	9.24, s	149.2
18	1.51, d, (6.2)	25.3
19	5.32, d, (5.6)	63.9
20	---	134.9
21	8.77, s	147.6
22	---	161.2
NH	11.87, s	---
OH	5.55, s	---

Estes dados de RMN, conjugados com a fragmentação registada no espectro de massa e a presença de uma banda ν_{OH} no espectro de IV, indicam a presença de uma cadeia lateral $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})$ - no anel piridínico. O *noe* registado no espectro NOESY entre H-14 e o próton metino $-\text{CH}(\text{OH})$ - confirma a posição desta cadeia em C-20 (Figura II.5 e II.6)

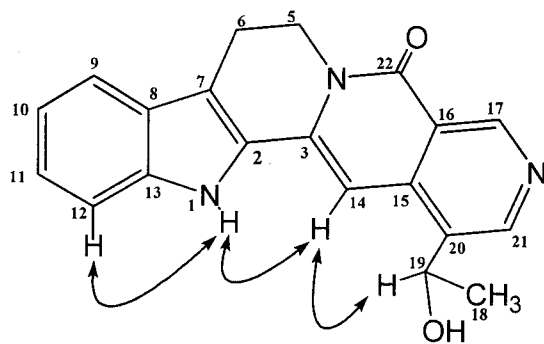


Figura II.5 - Interações relevantes no espectro NOESY de **4**.

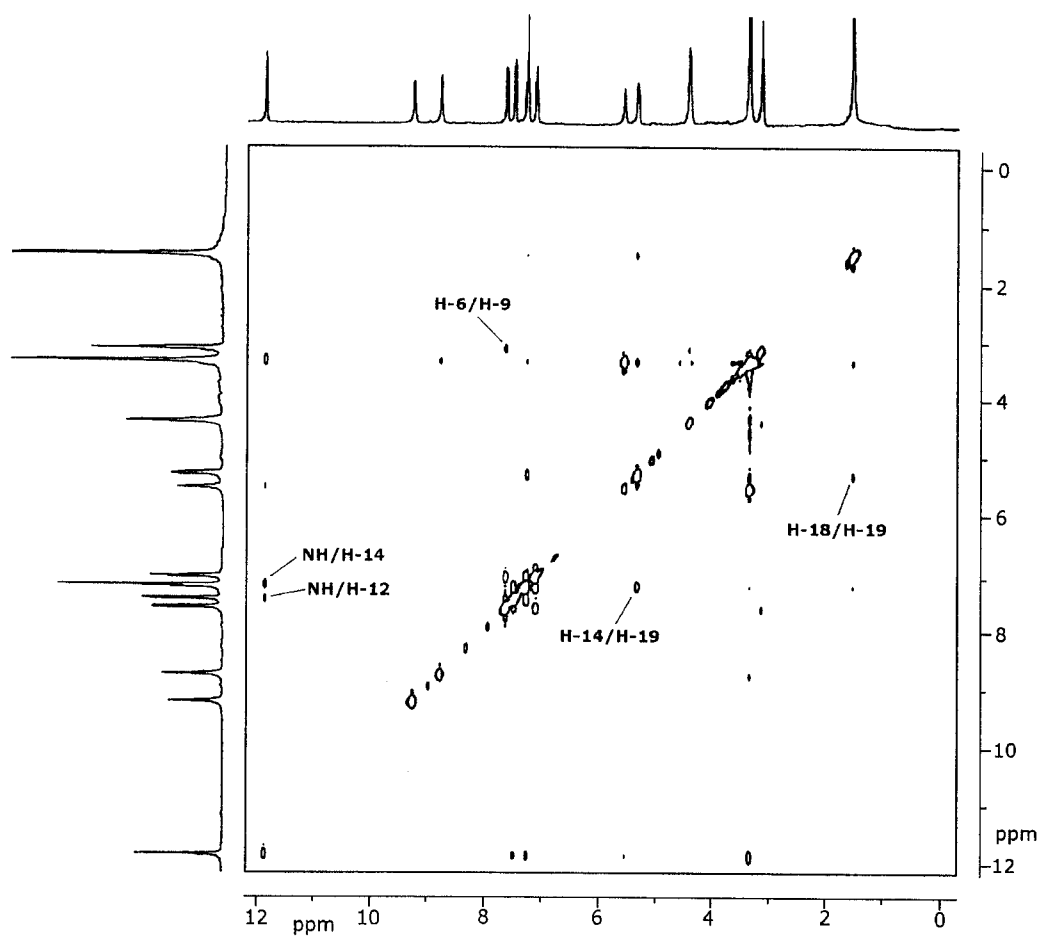
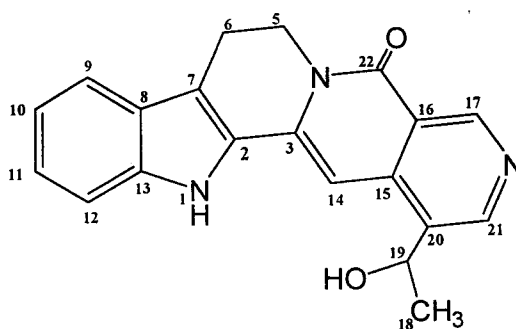


Figura II.6 - Espectro NOESY de **4** (DMSO-*d*₆).

Os dados espectrais do composto **4** correspondem aos publicados na literatura para a angustolina.^{23-25,27,71,72,81,102}



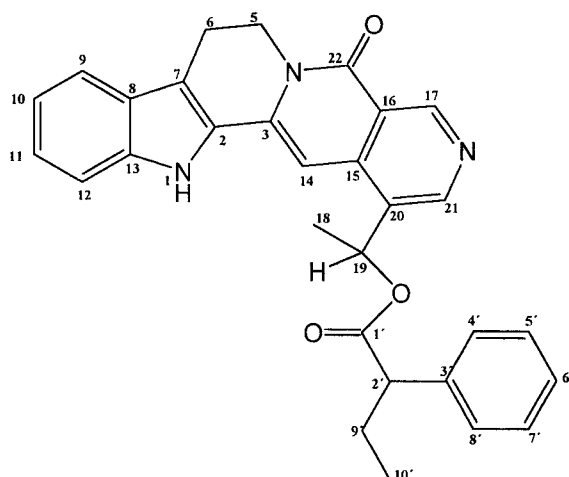
(4)

O desconhecimento, até à data, da configuração absoluta da angustolina (**4**), aliado ao facto de que a sua síntese produz uma mistura racémica de compostos, levou-nos a efectuar a determinação da configuração em C-19 pelo método de Horeau.

II.1.3.1. Determinação da configuração absoluta da angustolina (**4**)

A determinação da configuração absoluta da angustolina (**4**) foi efectuada pelo método de resolução parcial de Horeau.¹⁵⁰⁻¹⁵³ A reacção de **4** com o anidrido (\pm)-2-fenilbutanóico (**153**) originou o éster fenilbutanóico **154** e um excesso de ácido (+)-2-fenilbutanóico (**155**) de rotação óptica $[\alpha]_D^{25} +0.75^\circ$ (*c* 3.2, benzeno), o que corresponde à configuração (R) do álcool secundário em C-19.

O baixo valor de $[\alpha]$ do ácido (+)-2-fenilbutanóico e do rendimento óptico da esterificação (2.2%), levou-nos a isolar e caracterizar o éster **154** para confirmar a resolução do anidrido racémico, e a testar o método modificado de Horeau por HPLC a fim de confirmar a configuração absoluta de C-19.¹⁵⁴



(154)

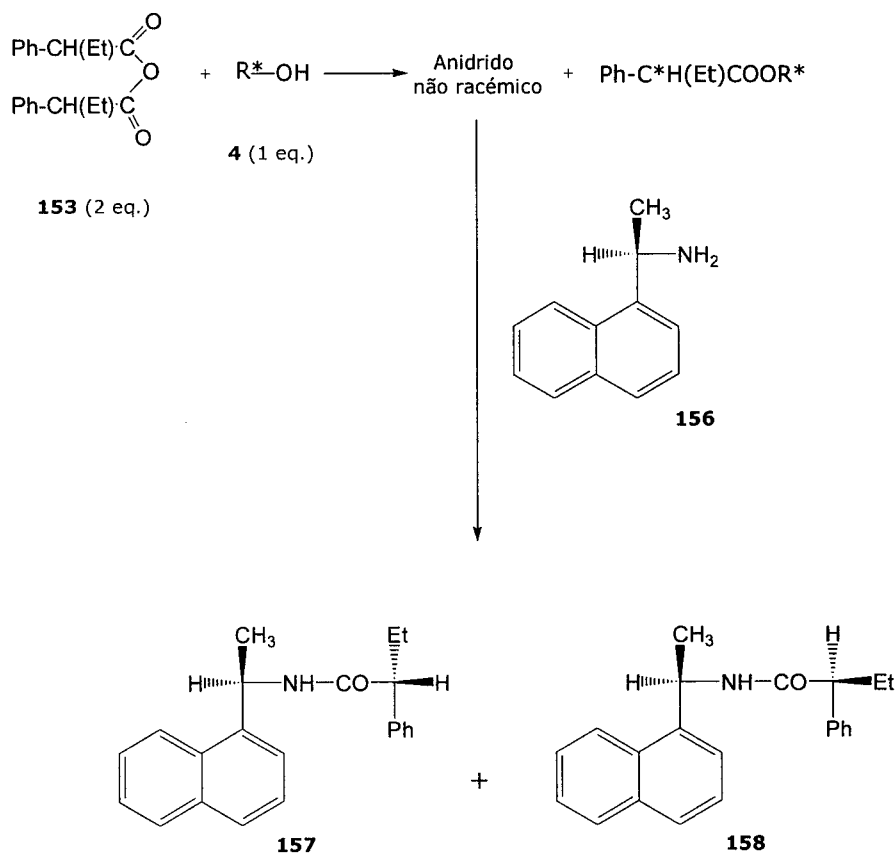
A presença no espectro de ^1H -RMN do fenilbutirato **154**, de dois singletos discerníveis na razão de 56:44 para cada um dos prótons NH , H-14 e H-17, confirma a presença dos estereoisômeros 2'R e 2'S (Tabela II.4).

Tabela II.4 - δ (ppm) de NH , H-14 e H-17, dos estereoisômeros 2'R e 2'S de **154** (CDCl_3).

Protões	2'R (56%)	2'S (44%)
H-14	6.59	6.80
H-17	8.53	8.46
NH	9.27	9.30

O método modificado de Horeau por HPLC, baseia-se, à semelhança do método anterior, na reacção preferencial do álcool secundário da angustolina (**4**) com um dos enantiômeros do anidrido (\pm) 2-fenilbutanóico (**153**). O anidrido não racémico, resultante da reacção anterior, reage com a (R)-(+)-1-(1-naftil)etilamina (**156**), originando uma mistura das amidas, (1R,2'S)-N-[1-(1-naftil)etil]-2-fenilbutanamida (**157**) e (1R, 2'R)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (**158**). A proporção de **157** e **158** determinada por HPLC, permite aferir sobre a configuração do álcool em questão (Figura II.7).¹⁵⁴

A principal vantagem deste método, além da simplicidade e universalidade, reside na sua sensibilidade, já que devido ao elevado valor do coeficiente de absorvidade molar das amidas **157** e **158**, permite determinações na ordem dos 100 nmol de álcool.



* - centros quirais

Figura II.7 - Esquema reaccional da angustolina (**4**) com o anidrido (\pm) 2-fenilbutanóico (**153**).

A proporção de 68:32 das amidas **157** e **158** (Figura II.8), é indicativa da configuração (R) do grupo hidroxilo secundário da angustolina (**4**).¹⁵⁴. Os tempos de retenção de **157** e **158** foram confirmados por comparação com padrões sintetizados (III.7.1,pg. 215).

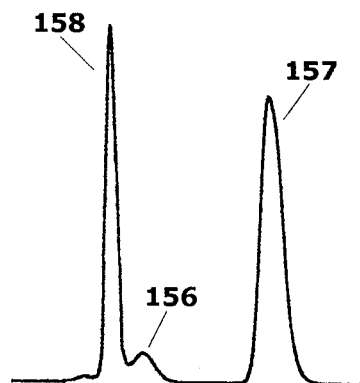


Figura II.8 - HPLC das amidas **157** e **158**.

II.1.4. 19-O-etilangustolina (**159**)

O composto **159** foi isolado do extracto etanólico básico dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. Apresenta em ccd, características cromatográficas semelhantes às dos alcalóides anteriores, mas menor polaridade no mesmo sistema de eluente.

O espectro de IV apresenta bandas de absorção indólicas a 3225, 1606 e 743 cm^{-1} , e um grupo lactama a 1659 cm^{-1} , enquanto que o espectro de UV apresenta absorções intensas a λ 374 e 393 nm, muito próximas das da angustolina (**4**).

A fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ foi estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS).

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN de **159** (Figura II.9 e Tabela II.5) apresentam as ressonâncias características do núcleo piridino-indolo-quinolizidinona, semelhantes às da angustolina, com exceção:

- dos sinais dos prótons metilênicos H-5_{a,b}, que aparecem resolvidos em dois duplos dupletos a δ 4.34 e a δ 4.44 ppm, enquanto que no espectro de **4**, estão sobrepostos a δ 4.34 ppm;
- da ressonância de C-14, que em **159** aparece desviada 5 ppm para campo mais baixo.

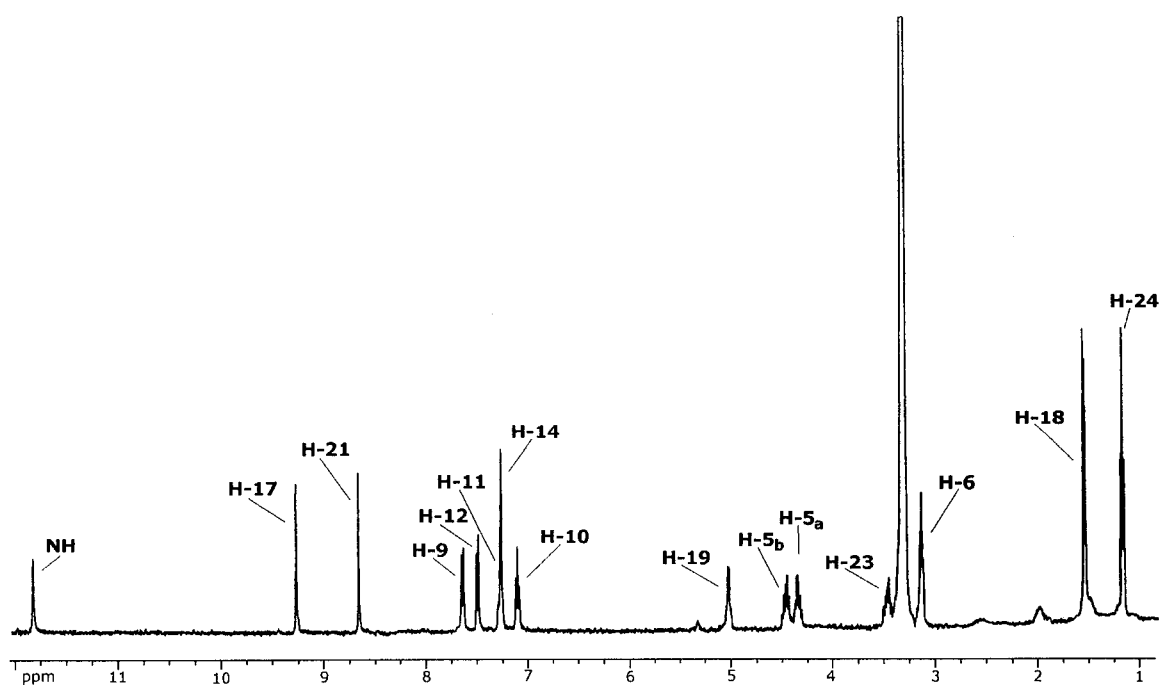
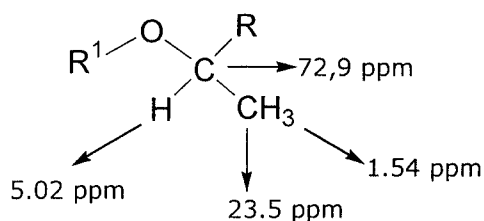


Figura II.9 – Espectro de ^1H -RMN de **159** ($\text{DMSO-}d_6$).

Tabela II.5 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **159** ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	127.5
3	---	137.0
5_a	4.34, dd, (13.6, 6.8)	40.4
5_b	4.44, dd, (13.6, 6.8)	
6	3.13, t, (6.0)	19.5
7	---	116.6
8	---	126.5
9	7.63, d, (8.0)	120.1
10	7.10, t, (8.0)	120.1
11	7.29, t, (8.0)	124.8
12	7.49, d, (8.0)	112.3
13	---	139.0
14	7.27, s	98.9
15	---	139.5
16	---	119.5
17	9.26, s	150.1
18	1.54, d, (8.0)	23.5
19	5.02, q, (8.0)	72.9
20	---	132.0
21	8.66, s	148.5
22	---	161.0
23	3.46, q, (8.0)	64.1
24	1.16, t, (8.0)	15.8
NH	11.82, s	---

Uma outra semelhança significativa dos espectros ^1H -RMN dos dois compostos, é a existência do seguinte sistema A_3X_1 , identificado a partir dos espectros ^1H - ^1H COSY e HMQC:



Nos espectros de RMN mono- e bidimensionais de **159**, regista-se ainda um tripleto atribuível a um grupo metilo a δ_H 1.16 ppm (δ_C 15.8 ppm), acoplado a um grupo metileno a δ_H 3.46 ppm (δ_C 64.1 ppm) que resolve num quarteto.

Estes dados sugerem a existência de uma cadeia lateral $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)$ -ligada ao anel piridina do núcleo pentacíclico, o que é confirmado pelo espectro de massa, o qual regista a seguinte fragmentação (Figura II.10):

- um pico base a m/z 315 ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$), que corresponde à perda de $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$;
- um pico de fragmentação a m/z 286 ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}]^+$), resultado da clivagem α da cadeia lateral;
- fragmentos de m/z 300 e 344.

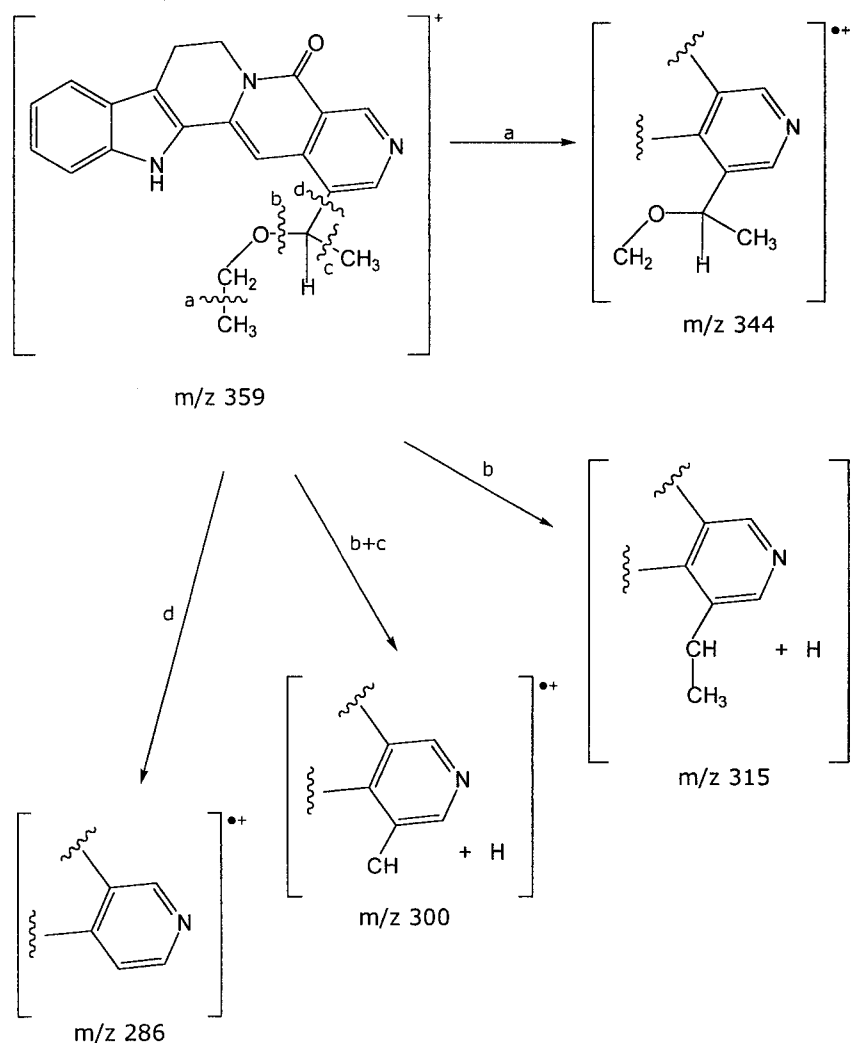


Figura II.10 - Fragmentações características de **159**.

O posicionamento da cadeia lateral em C-20 é confirmado pelo *noe* do próton metino H-19 (δ_H 5.02 ppm), com o próton H-14 (δ_H 7.27 ppm) (Figura II.11).

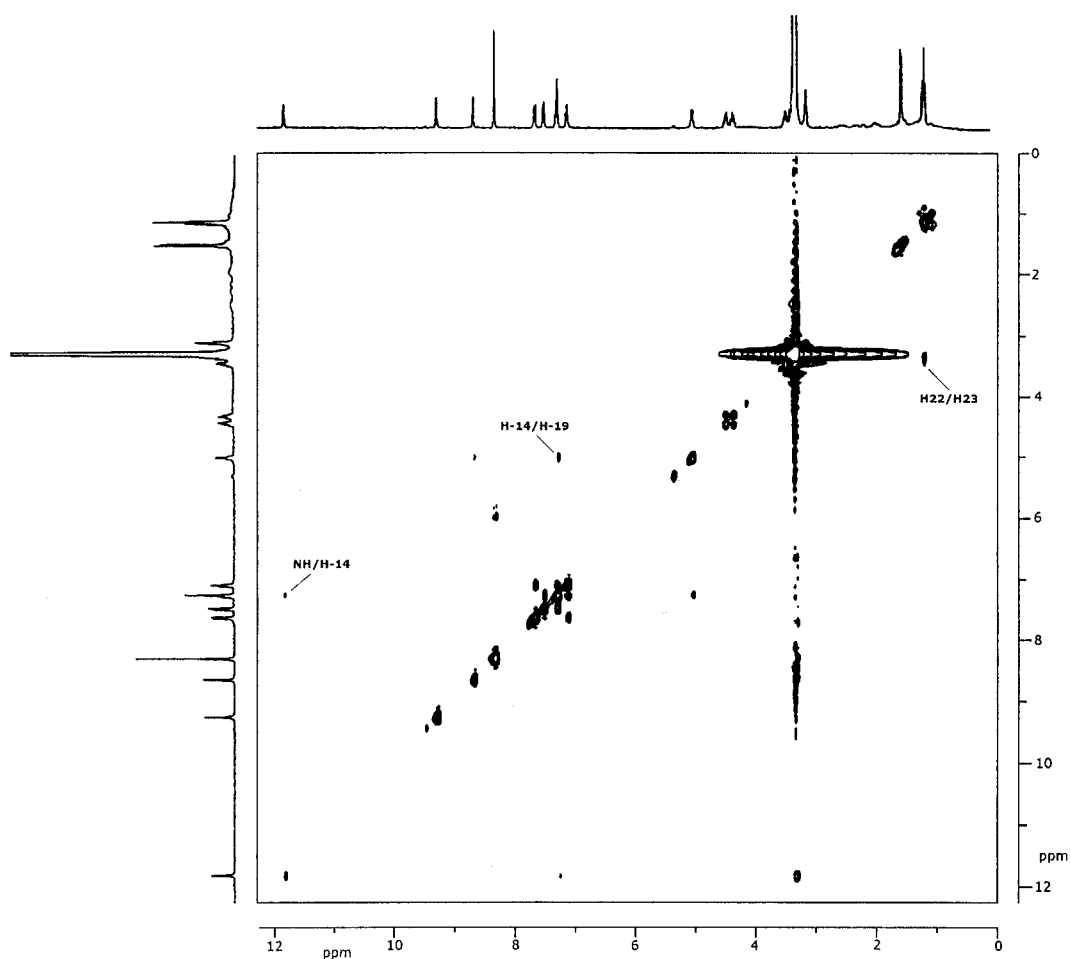
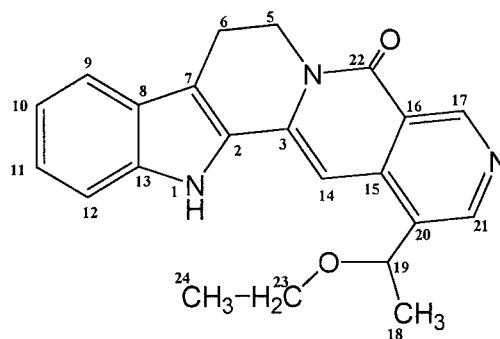


Figura II.11 – Espectro NOESY de **159** (DMSO- d_6).

Assim, a estrutura do composto **159** corresponde à 19-*O*-etilangustolina.



(**159**)

A substituição em C-20 justifica o aparecimento de multipletos distintos para os prótons H-5_a e H-5_b, resultado de um efeito de torção do núcleo pentacíclico, já discutido anteriormente no caso da 19-O-metilangustolina (**50**) (Tabela I.4, pg. 25). Os modelos tridimensionais dos compostos **50** (Figura I.6, pg.26) e **157** (Figura II.12) quando comparados com o da nauclefina (**7**) (Figura I.4, pg. 26), ilustram o desvio à planaridade do núcleo piridino-indolo-quinolizidinona responsável pela resolução de H-5.



Figura II.12 – Estrutura tridimensional de **159**.

II.1.4.1. Determinação da configuração da 19-O-etilangustolina (**159**).

A configuração absoluta da 19-O-etilangustolina (**159**) foi determinada com base na comparação da sua curva de dispersão óptica rotatória (DOR) com a da angustolina. As curvas de DOR para compostos que tenham um centro aromático ligado a um carbono assimétrico posicionado numa cadeia aberta e ligado a um heteroátomo, exibem conformações dependentes dos efeitos de Cotton.^{87,88} De acordo com as interações observadas no espectro de NOESY para a 19-O-etilangustolina e para a angustolina, as cadeias laterais adoptam uma conformação preferencial similar, em que o próton metino H-19 quase eclipsa o anel piridínico ao longo da ligação C₁₅-C₂₀ (Figura II.13).

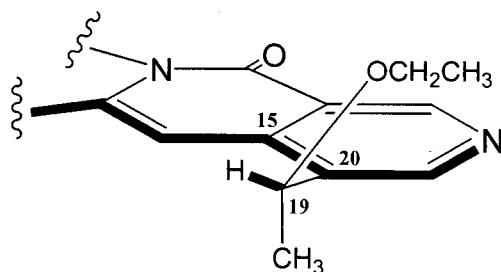


Figura II.13 – Conformação preferencial da cadeia lateral de **159**.

A conclusão anterior é baseada na verificação da única interacção do protão H-14 com o H-19, e a ausência de qualquer interacção do protão H-18 com o H-14 e com o H-21 (Figura II.14).

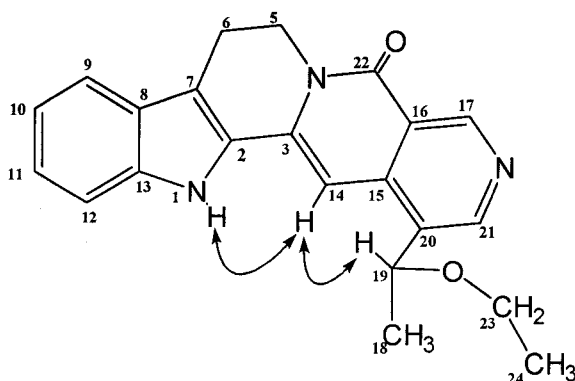
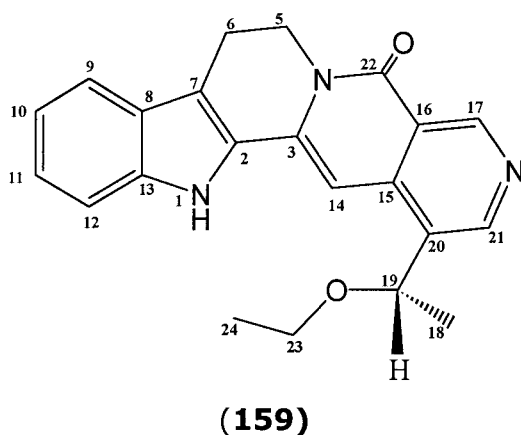


Figura II.14 – Interações relevantes no espectro NOESY de **159**.

Como as curvas de DOR são sobreponíveis (Figura II.15), a configuração absoluta do centro quiral da 19-O-etilangustolina é a mesma da angustolina, ou seja, (R).



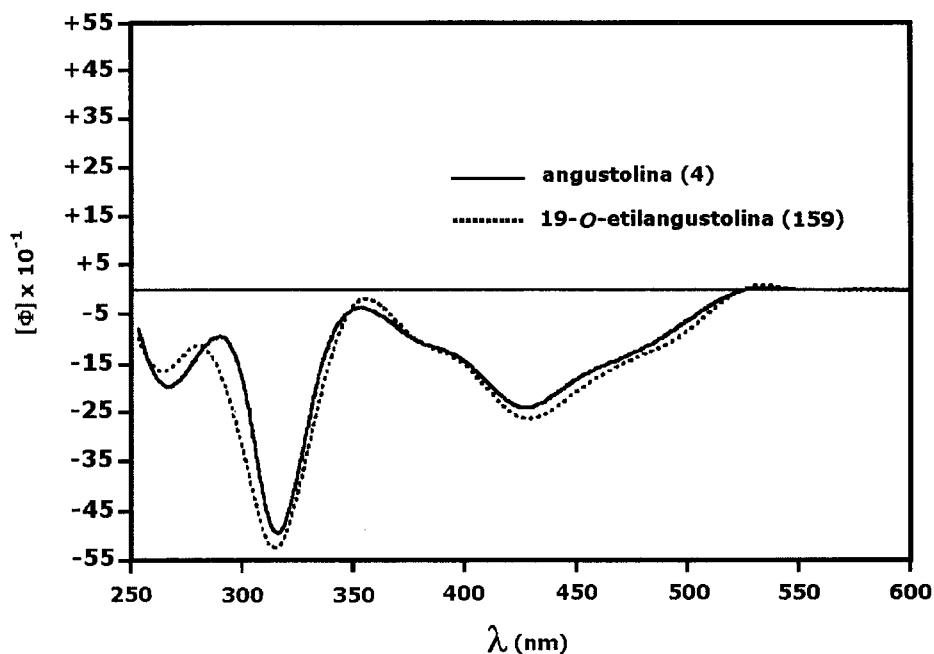


Figura II.15 - Curvas de DOR da angustolina (**4**) e 19-O-~~metil~~etilangustolina (**159**).

II.1.5. Angustidina (**6**)

O composto **6**, foi isolado do extracto etanólico básico dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. Apresenta em ccd, características cromatográficas semelhantes às dos alcalóides anteriores, mas maior polaridade no mesmo sistema de eluente.

O espectro de IV apresenta bandas de absorção indólicas a 3221, 1615 e 743 cm^{-1} , e de um grupo lactama a 1651 cm^{-1} , enquanto que espectro de UV apresenta máximos de absorção a λ 369 e 387 nm.

O espectro de massa regista um ião molecular a m/z 301, ou seja, superior em 14 uma em relação ao da nauclefina (**7**).

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Figura II.16 e Tabela II.6), quando comparados com os da nauclefina, apresentam as seguintes diferenças significativas:

- o sinal de H-17 deslocado para campo mais alto, a δ 9.19 ppm;
- um singuleto a δ 2.58 ppm, que integra para três prótons, ligados a um carbono a δ 24.3 ppm, característico de um grupo metilo;
- um singuleto a δ 7.35 ppm, relativo a um próton ligado a um carbono olefínico a δ 117.2 ppm;
- ausência da ressonância característica de H-21.

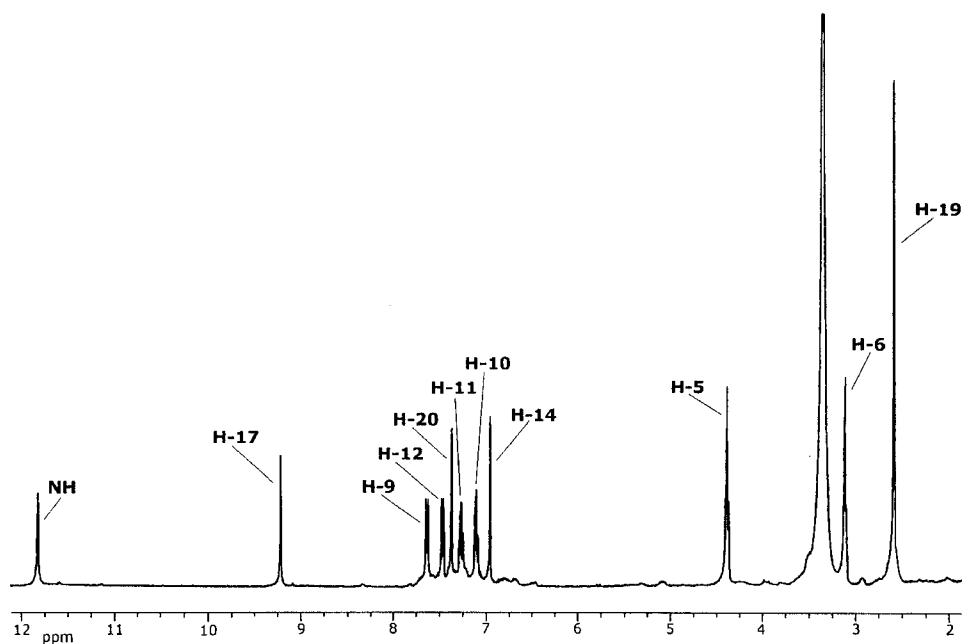


Figura II.16 – Espectro de ^1H -RMN de **6** ($\text{DMSO}-d_6$).

Tabela II.6 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **6** (DMSO- d_6).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	127.7
3	---	137.0
5	4.38, t, (6.8)	40.3
6	3.11, t, (6.5)	19.3
7	---	114.6
8	---	125.5
9	7.62, d, (8.0)	119.7
10	7.09, t, (7.6)	119.9
11	7.23, t, (7.2)	124.4
12	7.45, d, (8.4)	112.0
13	---	138.5
14	6.94, s	97.0
15	---	141.9
16	---	119.9
17	9.21, s	150.2
19	2.58, s	24.3
20	7.35, s	117.2
21	----	145.0
22	---	160.2
NH	11.82, s	---

O espectro de NOESY regista interacções entre NH e H-14, H-14 e o protão a δ 7.35 ppm, e entre este último protão e o grupo metilo a δ 2.58 ppm (Figura II.17).

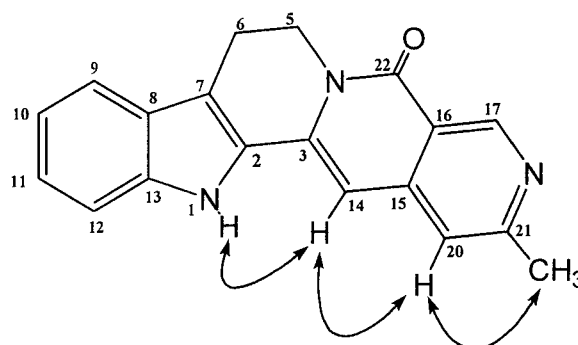


Figura II.17 – Interacções relevantes no espectro NOESY de **6**.

Esta sequência de acoplamentos e a fragmentação registada no espectro de massa (Figura II.18), confirmam a presença de um substituinte metilo em C-21, correspondente à estrutura da angustidina. Os dados espectrais deste alcalóide foram publicados na literatura,^{23,71,81} à excepção dos valores de ¹³C-RMN, aqui registados pela primeira vez.

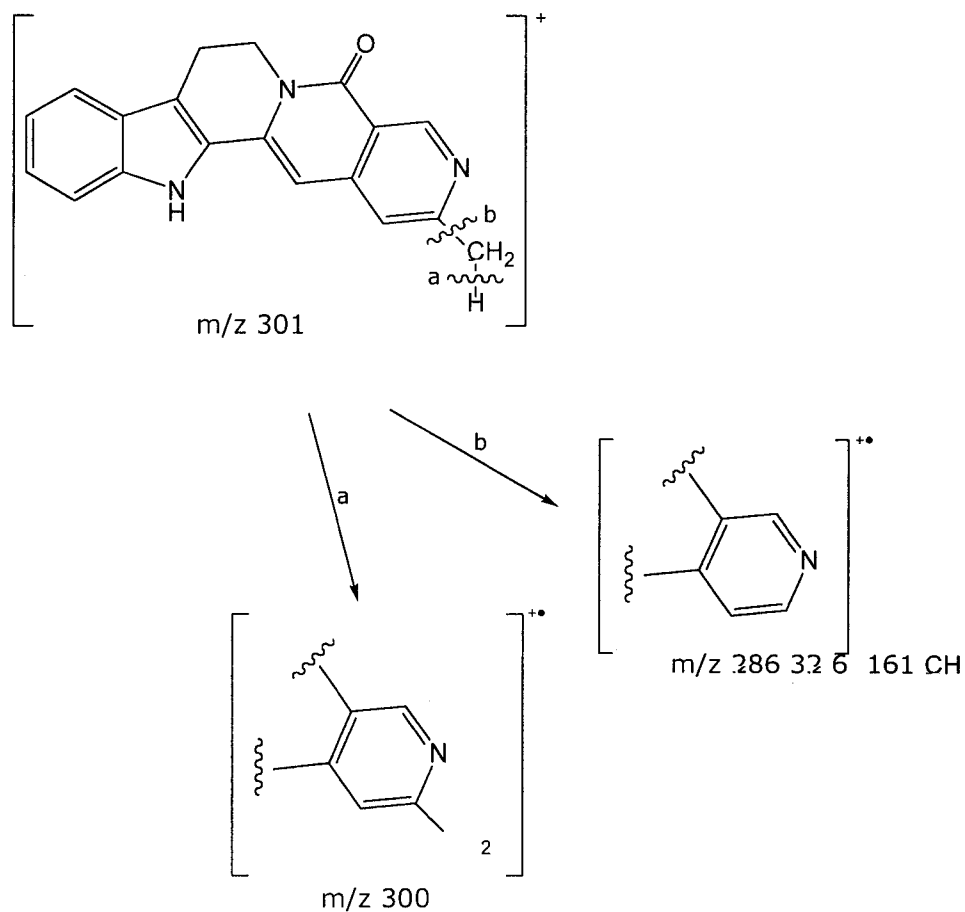
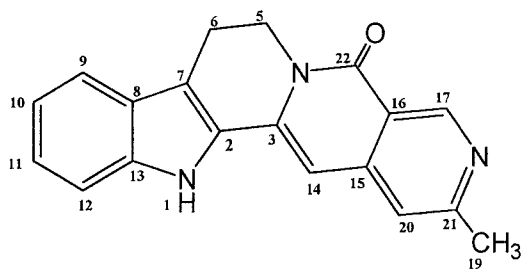


Figura II.18 – Fragmentações características de **6**.



(6)

II.1.7. Estrictosamida (28)

O composto **28** foi isolado do extracto etanólico básico e neutro dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 nm e por 'spray' de Dragendorff e 1-naftol, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10 a 70:30) como sistema de eluente.

Os espectros FABMS positivo e negativo, registam iões $[\text{M}+\text{H}]^+$ e $[\text{M}-\text{H}]^+$ a m/z 499 e 497, respectivamente, correspondendo o ião molecular à fórmula $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$, confirmada por espectrometria de massa de alta resolução (HREIMS).

O espectro de UV de **28** apresenta uma banda de grande intensidade a λ 223 nm e duas bandas de fraca intensidade a λ 279 e 286 nm.

O espectro de IV apresenta bandas indólicas a 1580 e a 745 cm^{-1} , a presença de um grupo lactama com a banda característica a 1651 cm^{-1} , e ainda, uma banda ν_{OH} a 3400 cm^{-1} .

A conjugação dos dados anteriores com os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Figura II.19 e Tabela II.7) sugerem para o composto **28** uma estrutura do tipo

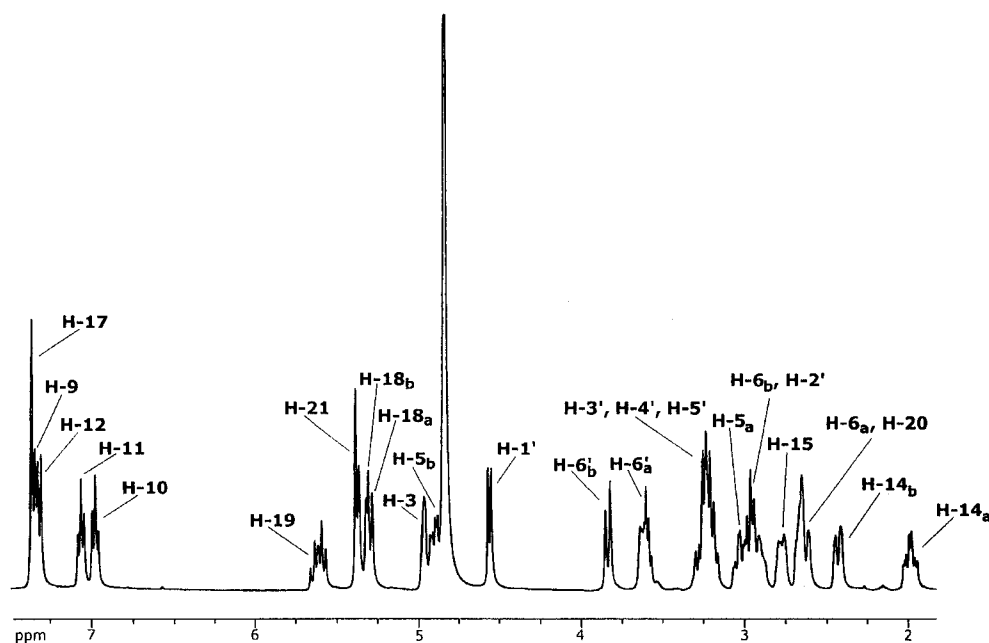


Figura II.19 – Espectro de ^1H -RMN de **28** (MeOD).

oxoioimbano glicosilado (Figura II.20), hipótese corroborada pela presença no espectro FABMS (positivo) de um ião de m/z 337, correspondente ao fragmento $[M-\text{acúcar}]^+$.

Tabela II.7 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **28** e **160** (MeOD).

Posição	28		160	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	---	135.1	---	135.2
3	4.97, m	55.3	5.06, m	55.5
5_a	3.03, dt, (12.2, 4.0)	45.0	3.11, dt, (12.4, 4.6)	45.4
5_b	4.91, dd, (12.5, 5.2)		4.91, dd, (12.4, 4.2)	
6_a	2.61-2.69, m	22.4	2.69, d, (4.2)	22.3
6_b	2.91-2.98, m		2.93, m	
7	---	110.6	---	110.6
8	---	129.0	---	129.2
9	7.35, d, (7.6)	119.0	7.34, d, (7.5)	119.0
10	6.98, t, (7.6)	120.5	6.98, t, (7.5)	120.5
11	7.07, t, (7.6)	122.8	7.08, t, (7.8)	123.0
12	7.32, d, (7.6)	112.6	7.33, d, (7.8)	112.9
13	---	138.1	---	138.4
14_a	1.98, dt, (13.8, 5.8)	27.6	1.98, dt, (14.0, 5.8)	27.1
14_b	2.43, d, (13.8)		2.46, ddd, (14.0, 5.8, 1.6)	
15	2.77, m	25.2	2.61-2.65, m	25.4
16	---	109.6	---	110.5
17	7.37, d, (2.0)	149.5	7.35, d, (1.8)	148.7
18_a	5.30, dd, (10.5, 1.6)	120.9	5.32, dd, (10.2, 1.6)	121.5
18_b	5.35, dd, (17.5, 1.6)		5.37, dd, (17.2, 1.6)	
19	5.69, dt, (17.5, 10.5)	134.6	5.63, dt, (17.2, 10.2)	134.0
20	2.61-2.69, m	45.0	2.61-2.65, m	44.2
21	5.39, d, (1.8)	98.4	5.27, d, (0.9)	96.8
22	---	167.4	---	167.3

Tabela II.7 (cont.) – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **28** e **160** (MeOD).

Posição	28		160		
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	
1'	4.56, d, (7.9)	100.8	4.90, d, (8.2)	96.3	
2'	2.96, t, (8.5)	74.6	4.65, dd, (9.8, 8.2)	72.1	
			OCOCH ₃	1.14, s	19.6
			OCHOCH ₃	---	171.0
3'	3.16-3.30, m	78.5	5.15, dd, (9.6)	73.8	
			OCOCH ₃	1.83, s	20.6
			OCHOCH ₃	---	172.0
4'	3.16-3.30, m	71.7	4.94, dd, (10.0)	70.0	
			OCOCH ₃	1.95, s	20.7
			OCHOCH ₃	---	171.7
5'	3.16-3.30, m	78.2	3.86, ddd, (12.4, 4.4, 2.1)	73.5	
6'	6'a	62.9	4.24, dd, (12.4, 4.4)	63.2	
	6'b		4.30, dd, (12.4, 2.1)		
			OCOCH ₃	2.03, s	20.8
			OCHOCH ₃	---	172.8

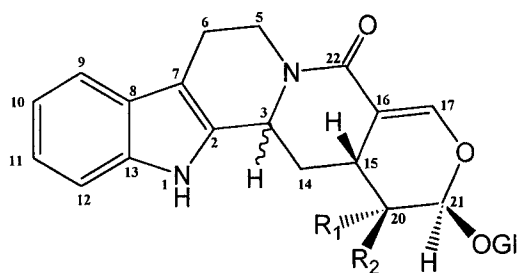


Figura II.20 – Estrutura tipo oxoioimbano glicosilado.

A análise dos espectros de RMN mono- e bidimensionais permitiu identificar os sinais característicos do núcleo pentacíclico oxoioimbano:

- dois tripletos a δ 6.98 (1H, $J=7.6$) e 7.07 ppm (1H, $J=7.6$) e dois dupletos a δ 7.32 (1H, $J=7.6$) e 7.35 ppm (1H, $J=7.6$), atribuíveis respectivamente aos prótons H-10, H-11, H-12 e H-9 do sistema indólico, ligados aos carbonos a δ 120.5 (C-10), 112.6 (C-11), 122.8 (C-12) e 119.0 (C-9) ppm;
- um duplo tripleto a δ 3.03 ppm (1H, $J = 12.2, J = 4.0$), um duplo duplete a δ 4.91 ppm (1H, $J = 12.5, J = 5.2$), e dois multipletos a δ 2.61–2.69 ppm (1H) e a δ 2.91–2.98 ppm (1H), atribuíveis aos prótons metilênicos H-5_a, H-5_b, H-6_a e H-6_b, respectivamente;
- um duplete a δ 7.37 ppm ($J = 2.0$), relativo a um próton ligado a um carbono olefínico a δ 149.5 ppm, atribuível ao próton H-17;
- um multiplete a δ 2.77 ppm atribuível ao próton H-15, que apresenta um acoplamento a longa distância no espectro de ^1H - ^1H COSY com H-17 e no de HMBC com C-17, respectivamente;
- um duplo tripleto a δ 1.98 ppm e um duplete a δ 2.43 ppm, atribuíveis, respectivamente, aos prótons metilênicos H-14_a e H-14_b;
- um multiplete a δ 4.97 ppm, atribuível ao próton H-3, acoplado com os prótons H-14;
- um duplete a δ 5.39 ppm, relativo a um próton ligado a um carbono a δ 98.4 ppm, e acoplado no espectro de HMBC a C-17, atribuível a H-21;
- um multiplete a δ 2.61–2.69 ppm que integra para dois prótons, um dos quais, que acopla com H-15 e H-21, é atribuível a H-20.

Este último próton (H-20), por sua vez, está acoplado a um próton a δ 5.69 ppm que faz parte do fragmento vinílico $-\text{CH}=\text{CH}_2$, substituinte em C-20.

A natureza do glicosido em C-21 foi determinada a partir de uma análise detalhada dos espectros bidimensionais de **28** e do seu derivado acetilado.

O espectro HMBC de **28** registra um acoplamento J_{CH}^3 entre H-21 e o carbono anomérico a δ 100.8 ppm, ligado ao próton H-1' a δ 4.56 ppm. A sequência de acoplamentos registrados a partir de H-1' no espectro ^1H - ^1H COSY, os valores de

$J_{H,H}$, e as interações de *noe* observadas no espectro NOESY, permitiram sugerir a glucose como grupo substituinte em C-21. A confirmação foi feita por análise espectral do derivado acetilado de **28**, o composto **160**, cujo espectro de ^1H -RMN apresenta melhor resolução para os sinais dos prótons do glicosido, deslocados para campo mais baixo (Tabela II.7).

A configuração relativa em C-3, C-20 e C-21, decorre do valor da constante de acoplamento entre H-20 e H-21 ($J = 1.8$) e das interações *noe* observadas no espectro NOESY (Figura II.21), nomeadamente com o próton H-15, cuja orientação β é definida no processo de biossíntese.

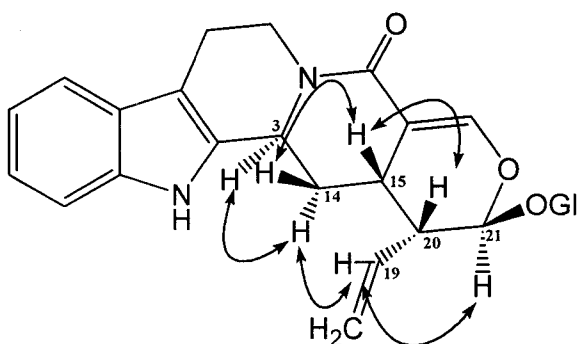
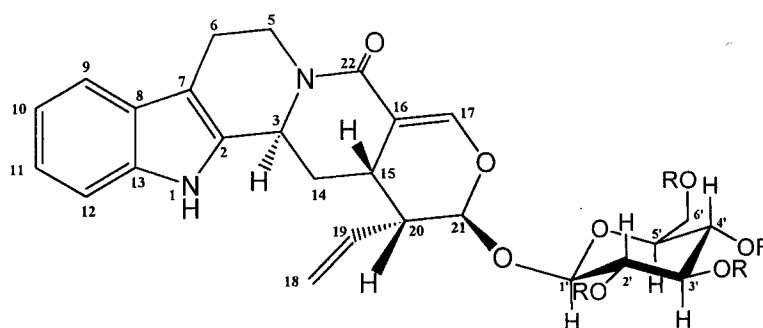


Figura II.21 – Interações relevantes no espectro NOESY de **28**.

Os dados espectrais dos compostos **28** e **160**, correspondem respectivamente, aos publicados na literatura para a strictosamida e o correspondente tetracetato.^{23,26,46-50,73-75,155-157}



R = H (**28**)

R = Ac (**160**)

II.1.8. 21-O-metilestrictosamida aglicona (161)

O composto **161** foi isolado do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 nm e por 'spray' de Dragendorff, usando Hexano/Et₂O (10:90) como sistema de eluente.

A análise do espectro de IV sugere a presença de uma estrutura indólica com bandas características a 3272, 1619 e a 742 cm⁻¹ e a presença de um grupo lactama com a banda característica a 1637 cm⁻¹.^{147,148}

A fórmula molecular C₂₁H₂₂N₂O₃ foi estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução (HRCIMS).

Os espectros de RMN (Figura II.22 e Tabela II.8) apresentam deslocamentos químicos característicos do esqueleto oxoioimbano, mas não registam os sinais dos prótons e carbonos glicosídicos da strictosamida (**28**). De entre as semelhanças dos espectros destes dois compostos, assinala-se ainda a presença do fragmento vinílico -CH=CH₂, o qual, de acordo com os espectros ¹H-¹H COSY e HMBC, se encontra ligado a C-20.

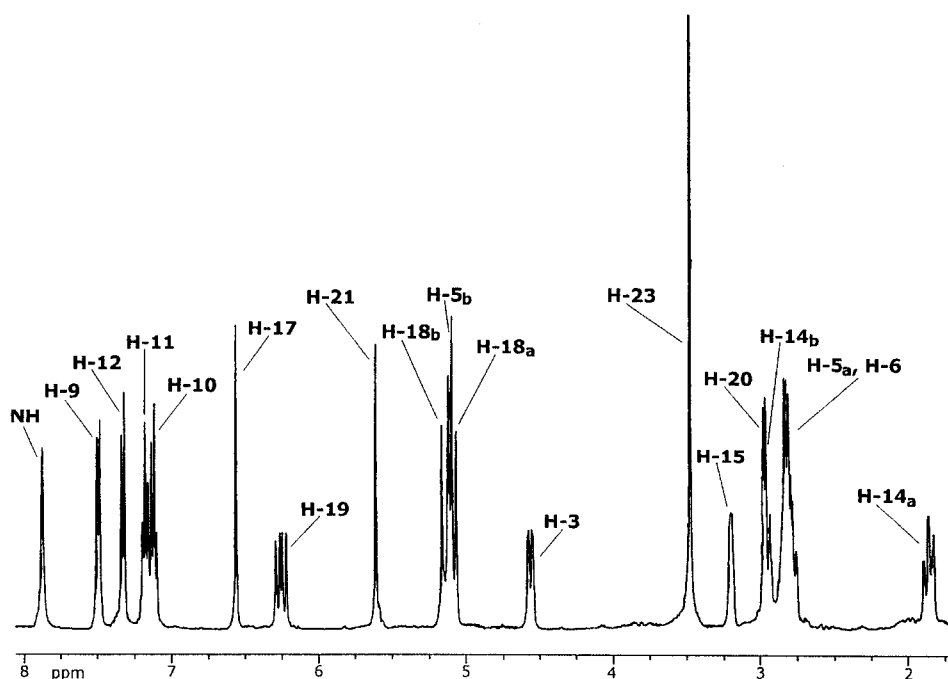


Figura II.22 – Espectro de ¹H-RMN de **161** (CDCl₃).

Tabela II.8 -¹H-RMN de **161** (CDCl₃).

Posição	¹ H	¹³ C
2	---	132.9
3	4.55, d, (11.0)	49.5
5_a	2.74-2.84, m	39.8
5_b	5.08, d, (9.7)	
6	2.74-2.84, m	20.7
7	---	109.7
8	---	126.9
9	7.49, d, (7.6)	118.8
10	7.11, t, (7.6)	119.9
11	7.17, t, (7.4)	122.2
12	7.32, d, (7.9)	110.9
13	---	136.4
14_a	1.84, dt, (11.8, 11.0, 3.0)	29.7
14_b	2.91, m	
15	3.18, sl	24.2
16	---	114.1
17	6.56, s	143.8
18_a	5.07, d, (11.4)	110.9
18_b	5.13, d, (17.8)	
19	6.25, dd, (17.8, 11.4)	133.3
20	2.95, d, (5.0)	44.6
21	5.60, s	98.6
22	---	166.6
23	3.46, s	56.0
NH	7.87, s	---

Estes dados sugerem que, relativamente à strictosamida, a cadeia glicosídica em C-21 foi substituída por um outro fragmento, identificado como um grupo -OCH₃ a partir das seguintes observações:

- a presença de um grupo metilo a δ_H 3.46 (δ_C 56.0) ppm;

- a correlação no espectro de HMBC a $^2J_{CH}$, entre OCH_3 e C-21 (δ_C 98.6 ppm) (Figura II.23).

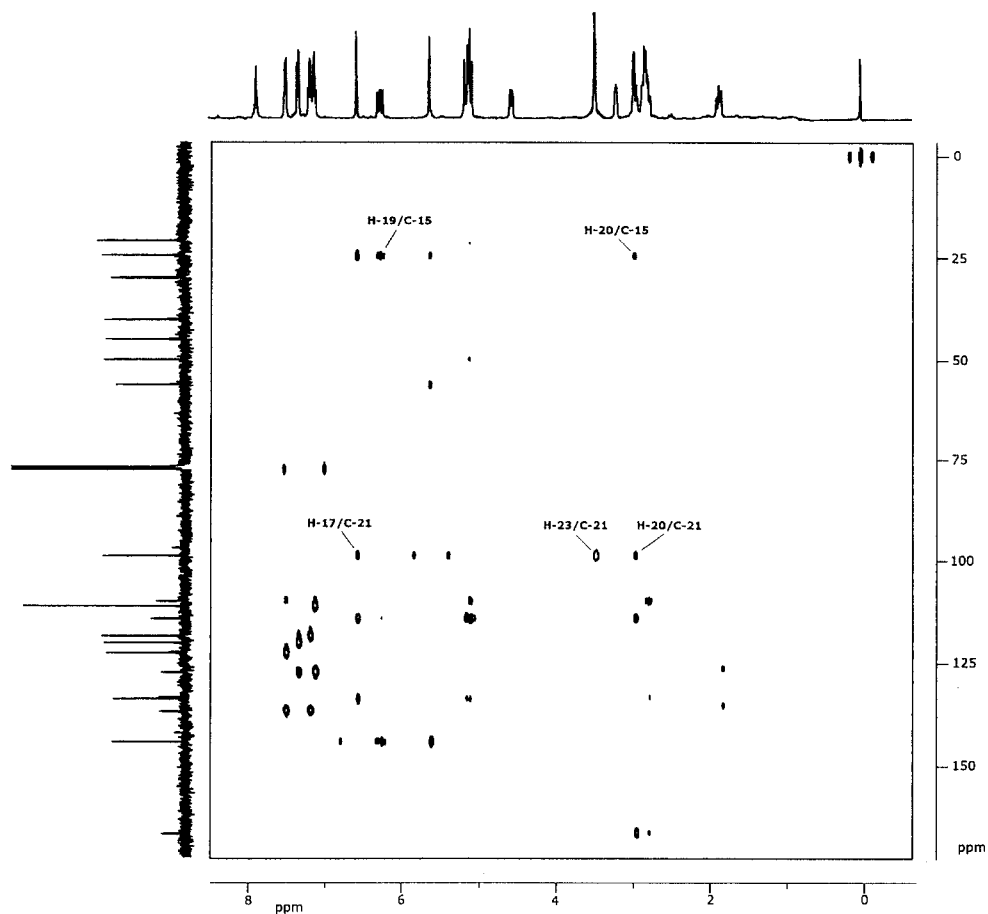


Figura II.23 – Espectro de HMBC de **161**.

As interações verificadas no espectro de NOESY (Figura II.24) e a multiplicidade de H-20 (*d*, $J = 5.0$) e H-21 (*s*), confirmam a estereoquímica deste novo alcalóide, a 21-*O*-metilestrictosamida aglicona (**161**).

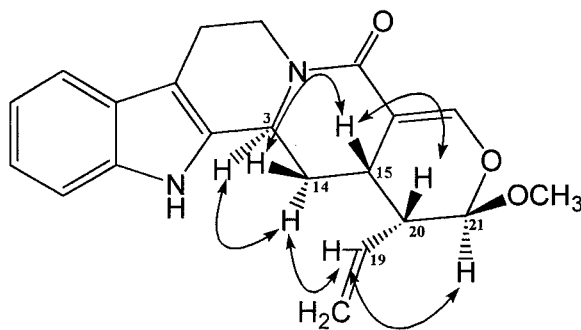
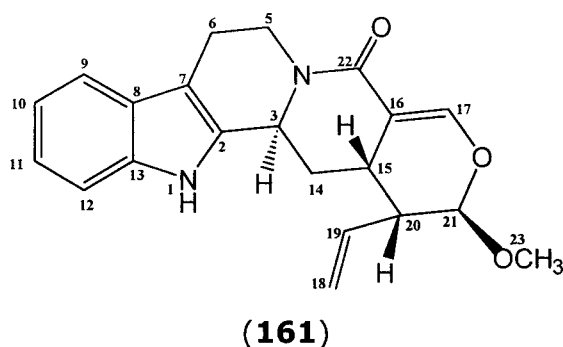


Figura II.24 – Interações relevantes no espectro NOESY de **161**.



II.1.9. 21-O-etilestrictosamida aglícica (162)

O composto **162** foi isolado do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes, e apresenta em ccd, características cromatográficas semelhantes às da 21-O-metilestrictosamida aglícica, mas de menor polaridade no mesmo sistema de eluente.

A fórmula molecular $C_{22}H_{24}N_2O_3$ foi estabelecida por espectrometria de massa de alta resolução (HRCIMS).

O espectro de 1H -RMN (Figura II.25 e Tabela II.9) apresenta uma quase total sobreposição de sinais com o espectro da 21-O-metilestrictosamida aglícica, registando-se no entanto a ausência do singuleto metoxi, aqui substituído por um tripleto relativo a um metilo a δ 1.21 ppm ($J = 7.0$) acoplado a dois prótons metilénicos a δ 3.65 ppm. Este dados indicam a presença de um grupo etoxi em C-21, o que confirma a estrutura de **162** como sendo a do novo alcalóide 21-O-etilestrictosamida aglícica. A escassa quantidade disponível deste composto e a sua rápida decomposição, não permitiram uma caracterização espectral adicional.

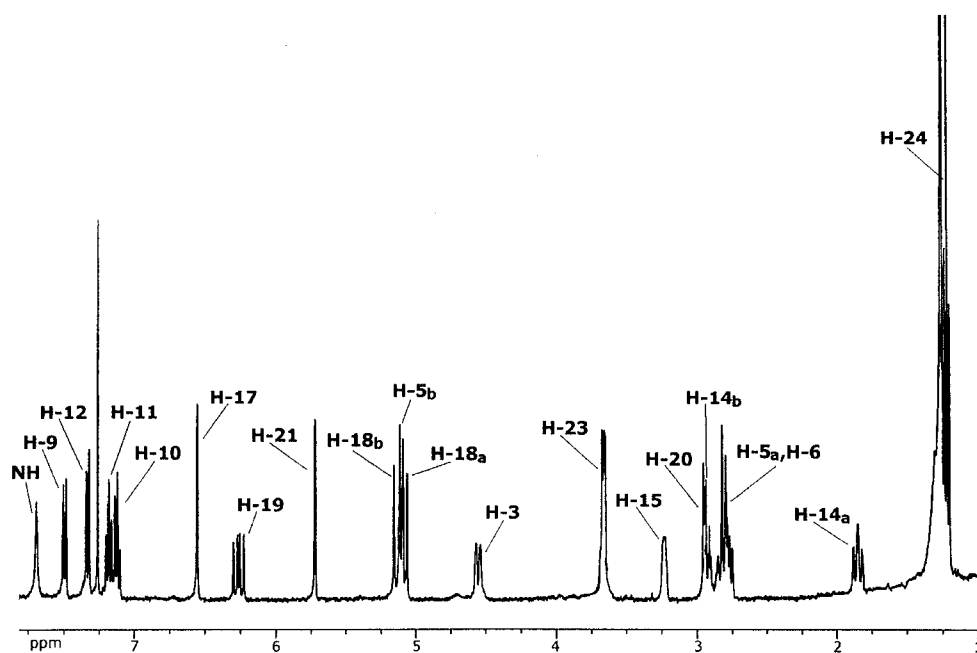


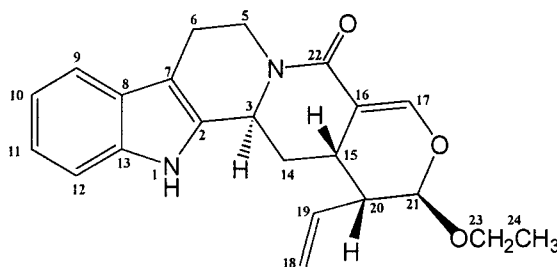
Figura II.25 – Espectro de ^1H -RMN de **162** (CDCl_3).

Tabela II.9 – ^1H -RMN de **162** (CDCl_3).

Posição	^1H
3	4.55, d, (12.0)
5_a	2.74–2.84, m
5_b	5.10, d, (13.1)
6	2.74–2.84, m
9	7.49, d, (7.6)
10	7.11, t, (7.6)
11	7.18, t, (7.4)
12	7.33, d, (8.0)
14_a	1.84, dt, (11.8, 12.0, 3.0)
14_b	2.93, m
15	3.22, sl

Tabela II.9 (cont.) – ^1H -RMN de **162** (CDCl_3).

Posição	^1H
17	6.55, s
18_a	5.07, d, (11.6)
18_b	5.13, d, (17.8)
19	6.26, dd, (17.8, 11.6)
20	2.94, d, (5.4)
21	5.71, d, (1.6)
23	3.65, m
24	1.21, t, (7.0)
NH	7.87, s

**(162)**

II.1.10. Naucleidinal (**39**)

O composto **39** foi isolado do extracto etanólico básico dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 nm e por 'spray' de Dragendorff, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) como sistema de eluente.

O espectro de UV de **39** apresenta uma banda de grande intensidade a λ 226 nm e duas bandas de fraca intensidade a λ 280 e 290 nm.

A análise do espectro de IV sugere a presença de uma estrutura indólica com bandas características a 3269, 1580 e a 745 cm^{-1} e a presença de um grupo lactama com a banda característica a 1652 cm^{-1} .^{147,148}

O espectro de massa apresenta o pico molecular coincidente com o pico base a m/z 336, e um pico de fragmentação bastante intenso a m/z 307 ($[M-CHO]^+$), que sugere a existência de um grupo aldeído na molécula, hipótese suportada pelas bandas características deste grupo a 2850 e 1723 cm^{-1} no espectro de IV.^{147,148}

A análise dos espectros de RMN mono- e bidimensionais permite identificar os sinais característicos do esqueleto 'oxoioimano aglicona' (Figura II.26 e Tabela II.10), e ainda:

- um duplete a δ_H 1.47 ppm (3H, $J = 6.3$) (δ_C 19.3 ppm), característico de um grupo metilo;
- um duplete a δ 9.78 ppm (1H, $J = 2.4$) relativo a um próton ligado a um carbono a δ 200.7 ppm, característico de um aldeído.

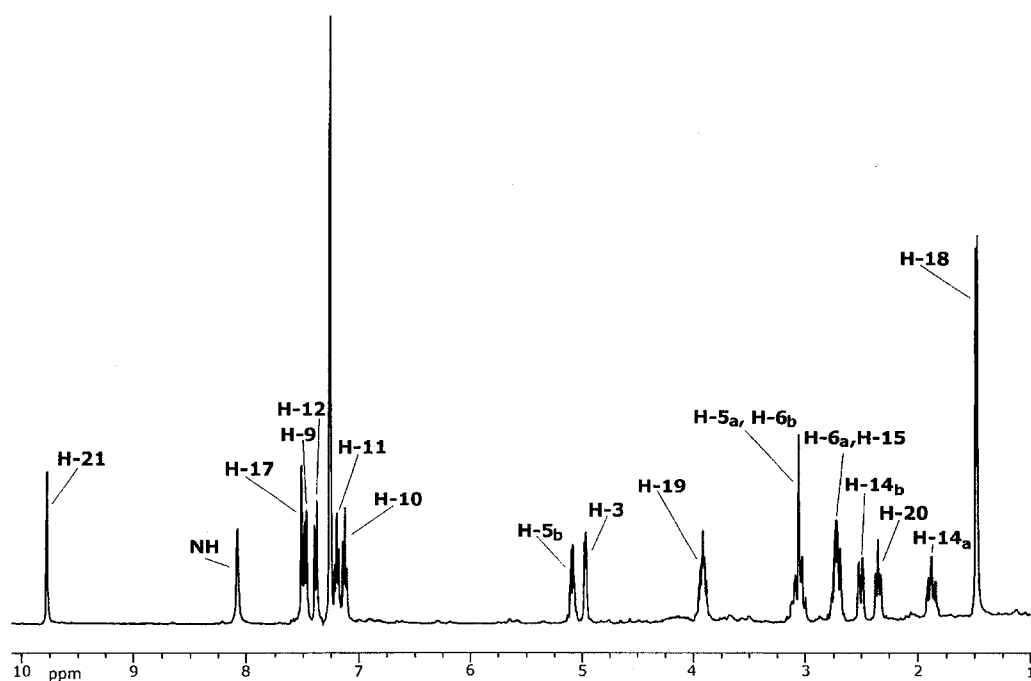


Figura II.26 – Espectro de ^1H -RMN de **39** (CDCl_3).

Tabela II.10 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **39** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	132.6
3	4.96, dd, (5.4, 2.0)	53.3
5_a	2.98-3.11, m	43.4
5_b	5.07, m	
6_a	2.67-2.75, m	20.1
6_b	2.98-3.11, m	
7	---	111.5
8	---	127.5
9	7.47, d, (7.8)	118.3
10	7.12, t, (7.6)	120.0
11	7.19, t, (7.6)	122.3
12	7.38, d, (8.0)	111.3
13	---	135.9
14_a	1.86, ddd, (13.2, 5.4)	29.4
14_b	2.49, dd, (13.2, 2.0)	
15	2.67-2.75, m	27.5
16	---	107.7
17	7.51, s	150.6
18*	1.47, d, (6.3)	19.3
19*	3.90, dq, (10.2, 6.3)	71.5
20	2.34, ddd, (10.2, 2.4)	56.4
21	9.78, d, (2.4)	200.7
22	---	164.5
NH	8.10, s	---

* - numeração dos compostos do tipo oxoiombano, no caso em que R¹ não coincide com o grupo vinílico.

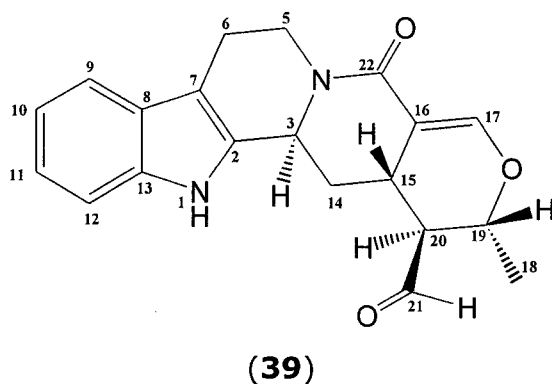
A confirmação dos grupos substituintes CH₃ e CHO em C-19 e C-20, respectivamente, foi feita com base nas seguintes observações:

- o acoplamento dos prótons metílicos a δ 1.47 ppm com o próton H-19 a δ 3.90 ppm;

- e o acoplamento de H-20 com o próton aldeídico e os prótons H-15 e H-19.

As interações verificadas no espectro de NOESY, do próton H-15 em posição β , com H-14_b e o próton aldeídico, e deste último, com o próton H-19, permitem atribuir a H-14_b, H-19 e ao grupo aldeído, igualmente a orientação β (Figura I.9, pg.29). Por outro lado, as interações de H-14_a com H-3 e H-20 e, deste último, com os prótons do grupo metilo, confirmam a orientação α de 18-CH₃, H-3 e H-20 (Figura I.9, pg.29).

Os dados espectrais do composto **39**, correspondem aos publicados na literatura para o naucleidinal.^{40,61,62}



II.1.11. 19-Epi-naucleidinal (40)

O composto **40** foi isolado do extracto etanólico básico dos troncos e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes, e apresenta em ccd, características semelhantes às do naucleidinal, mas menor polaridade no mesmo sistema de eluente.

Também à semelhança no naucleidinal, o espectro de UV de **40** apresenta uma banda de grande intensidade a λ 225 nm e duas bandas de fraca intensidade a λ 280 e 290 nm, enquanto que o espectro de IV regista as bandas indólicas a 3270, 1574 e a 743 cm⁻¹, e a presença de um grupo lactama a 1650 cm⁻¹.^{147,148}

O espectro de massa é idêntico ao do naucleidinal, com o pico molecular também a m/z 336 e um pico de fragmentação a m/z 307 ([M-CHO]⁺), o que sugere igualmente a existência de um grupo aldeído, hipótese suportada pelas

bandas características deste grupo a 2849 e 1722 cm^{-1} no espectro de IV,^{147,148} e pela presença nos espectros de RMN (Figura II.27 e Tabela II.11), de um singuleto a $\delta 9.77$ ppm ligado a um carbonilo a $\delta 199.4$ ppm.

As poucas diferenças significativas dos espectros de RMN de **40** relativamente aos do nauceidinal são as seguintes:

- o próton aldeídico aparece como um singuleto ($\delta 9.77$ ppm) enquanto que no nauceidinal aparecia como um duplete ($\delta 9.77$ ppm, $J = 2.6$);
- o próton H-19 está desviado em 1 ppm para campo mais baixo;
- os prótons H-20 e H-14_b que, no nauceidinal, apareciam como multipletos resolvidos a $\delta 2.34$ e 2.49 ppm, são desviados para campo mais baixo, sobrepondo-se num multiplete aos sinais de H-6_a e H-15, a $\delta 2.64$ - 2.75 ppm;
- o duplete gerado pelos prótons metílicos H-18 sofre um desvio de 0.47 ppm para campo mais alto;
- o carbono C-18 está desviado 3.9 ppm para campo mais alto, enquanto que C-19 e C-20 estão ambos desviados em 2.6 ppm para campo baixo.

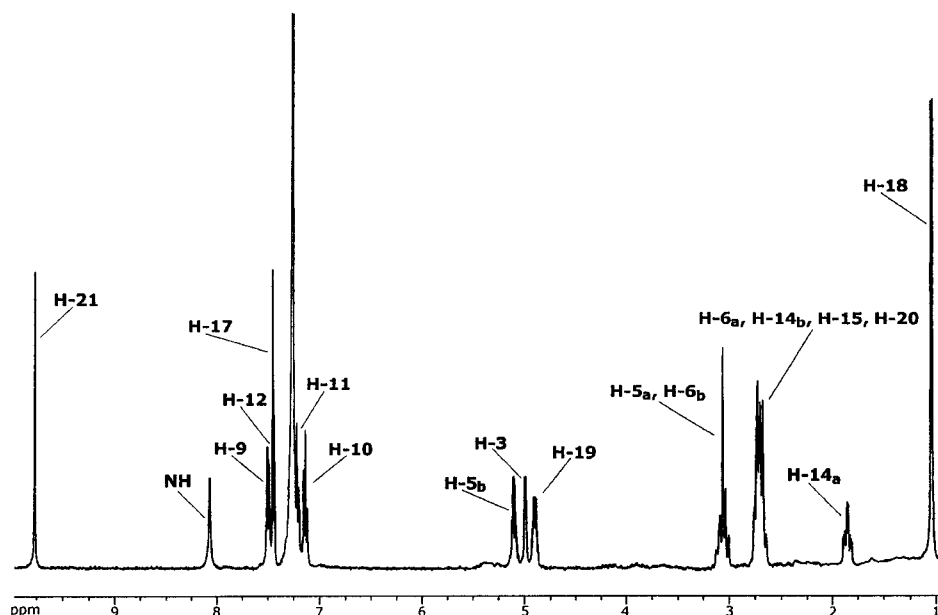


Figura II.27 – Espectro de ^1H -RMN de **40** (CDCl_3).

Tabela II.11 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **40** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	132.7
3	4.99, d, (4.0)	53.4
5_a	3.00–3.13, m	43.3
5_b	5.10, m	
6_a	2.64–2.76, m	21.1
6_b	3.00–3.13, m	
7	---	111.4
8	---	127.7
9	7.49, d, (7.8)	118.3
10	7.14, t, (7.3)	120.0
11	7.22, t, (7.8)	122.2
12	7.44, d, (7.8)	111.4
13	---	136.0
14_a	1.84, ddd, (13.2, 5.4)	29.7
14_b		
15	2.64–2.76, m	29.3
16	---	106.8
17	7.45, s	148.8
18	1.04, d, (6.7)	15.9
19	4.90, dq, (6.7, 2.5)	68.9
20	2.64–2.76, m	53.8
21	9.77, s	199.4
22	---	164.3
NH	8.07, s	---

A análise do espectro de NOESY permite verificar interações entre o próton H-15 em posição β e o grupo metilo C-18 (Figura II.28), o que indica que o composto **40** é um epímero do naucleidinal em C-19, justificando-se assim as diferenças atrás referidas entre as ressonâncias de C-18, C-19 e C-20 dos dois compostos.

A diferença de multiplicidade do sinal do próton aldeídico e da ressonância de H-19, do composto **40** relativamente ao naucleídinal, deve-se à formação de

pontes de hidrogénio intramoleculares entre este protão e o grupo carbonilo do aldeído vicinal (Figura II.28).

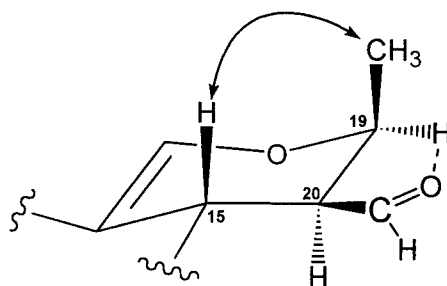
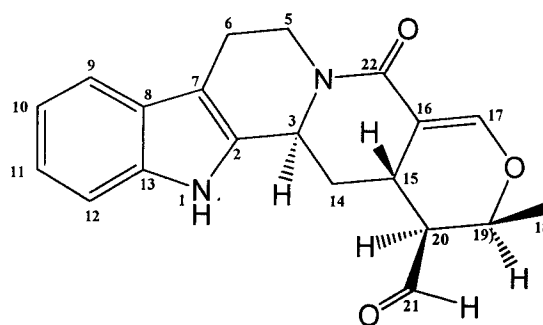


Figura II.28 – NOE entre os protões H-15 e H-18, e pontes de hidrogénio entre o protão H-19 e o grupo aldeído em C-20.

Os dados espectrais do composto **40**, correspondem aos publicados na literatura para o 19-*epi*-naucleidinal.⁶¹



(40)

II.2. Triterpenos

II.2.1 – Glucósido do β -Sitosterol (163)

O composto **163** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos, do extracto etanólico básico e ácido das folhas e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação com 'spray' de ácido fosfomolibdico e 1-naftol, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20) como sistema de eluente.

Os dois iões *quasi* moleculares a m/z 599 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) e a m/z 575 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) obtidos nos espectros de FAB positivo e negativo, respectivamente, indicam que a massa molecular do composto terá um valor de 576.

Por espectrometria de massa de alta resolução (HREIMS), foram estabelecidas as fórmulas moleculares de dois fragmentos a m/z 414.38619 para $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ e a m/z 396.37531 para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}$. Os fragmentos do espectro de massa a m/z 414 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ e a m/z 396 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}]^+$, sugerem um esqueleto carbonado com um grupo hidroxilo ao qual estará ligado um monoglicósido do tipo hexose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

O espectro de IV apresenta uma banda intensa ν_{OH} entre 3500 e 3300 cm^{-1} e bandas $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ e $\nu_{\text{C}=\text{CH}}$ a 1641 e 800 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros de RMN apresentam os seguintes sinais característicos de um esqueleto esterol (Tabela II.12):

- seis grupos metilo entre δ_{H} 0.66 e 0.92 ppm e entre δ_{C} 11.8 e 19.9 ppm;
- um multiplete a δ 3.48 ppm (1H, $W_{1/2} = 16$) cuja forma e deslocamento químico são característicos dum protão metino 3α ,¹⁵⁸ o qual está ligado a um carbono a δ 76.9 ppm;
- um protão olefínico a δ 5.34 ppm ligado a um carbono δ 121.4 ppm, característico de Δ^5 .^{159,160}

Tabela II.12 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **163** (MeOD).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	37.0
2	---	29.5
3	3.48, m	76.9
4	---	38.5
5	---	140.7
6	5.34, s	121.4
7	---	31.6
8	---	31.6
9	---	49.8
10	---	36.4
11	---	20.8
12	---	39.5
13	---	42.0
14	---	56.4
15	---	24.1
16	---	28.0
17	---	55.6
18	0.66, s	11.8
19	0.97, s	19.3
20	---	35.7
21	0.92, d, (5.6)	18.8
22	---	33.5
23	---	25.6
24	---	45.3
25	---	28.9
26	0.82, d, (6.9)	19.9
27	0.80, d, (7.0)	19.1
28	---	22.8
29	0.83, t, (6.9)	11.9

Tabela II.12 (cont.) – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **163** (MeOD).

Posição	^1H	^{13}C
1'	4.23, d, (7.5)	100.9
2'	2.91, m 4.88–4.92 (-OH), m	73.7
3'	3.02–3.14, m 4.88–4.92 (-OH), m	76.9
4'	3.02–3.14, m 4.88–4.92 (-OH), m	70.3
5'	3.02–3.14, m	76.9
6'	6'a 3.35, m	61.3
	6'b 3.65, m	
	4.44 (-OH), t, (5.6)	

Estes dados espectrais sugerem o esqueleto do β -sitosterol para o composto **163**, hipótese que é sustentada pela fragmentação registada no espectro de massa (Figura II.29).¹⁵⁹

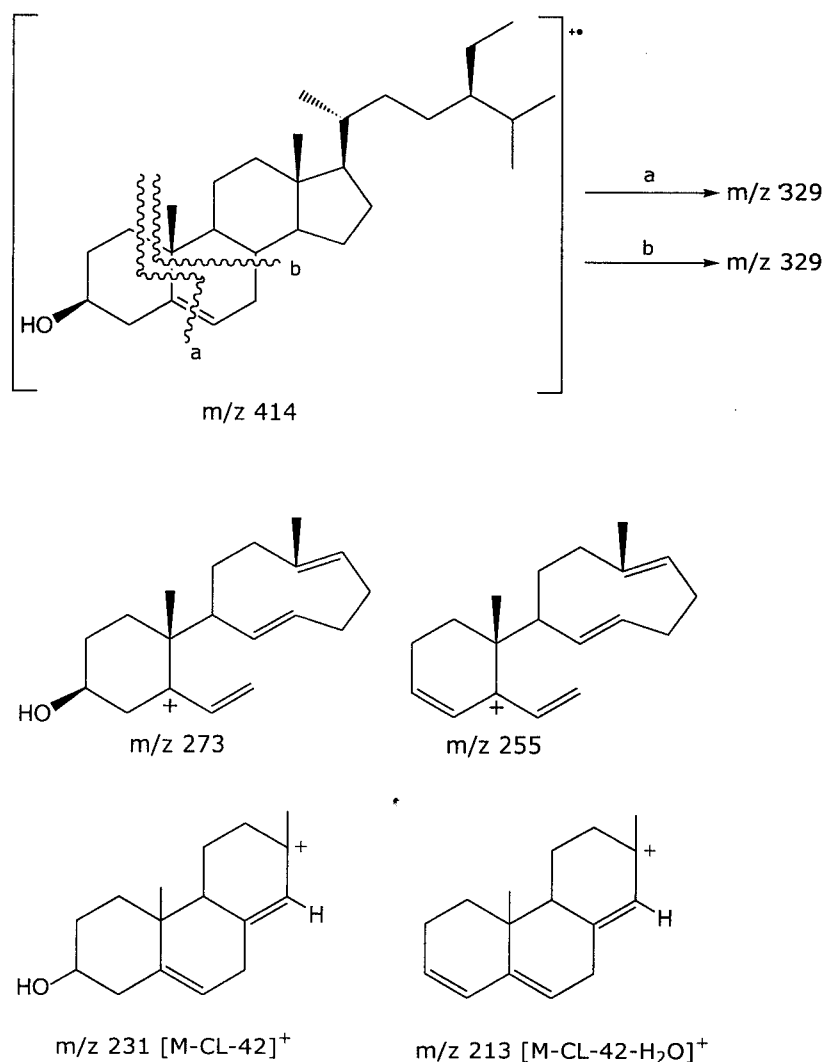


Figura II.29 – Fragmentações características de **163**.

Por outro lado, a presença no espectro de ¹H-RMN de um próton a δ 4.23 (*d*, *J* = 7.5) ppm ligado a um carbono a δ 100.9 ppm, e de uma sequência de multipletos entre δ 2.91 e 3.65 ppm, indica que o esteroide está ligado a um glicosídeo em C-3.

Para confirmar qual o tipo de glicosídeo em questão, optou-se por acetilar (Ac₂O/piridina) o composto **163** (III.9, pg. 219).

O espectro de massa do produto acetilado (**164**) apresenta o pico molecular a m/z 745, correspondente à fórmula molecular C₄₃H₆₈O₁₀, e uma fragmentação semelhante a **163**.

A acetilação de **163** permitiu resolver os sinais dos prótons glicosídicos no espectro de ^1H -RMN (Tabela II.13), os quais, a partir dos acoplamentos registados nos espectros ^1H - ^1H COSY e HMBC, e dos respectivos valores de $J_{\text{H,H}}$, foram identificados de um modo inequívoco. A constante de acoplamento do próton anomérico H-1' a δ 4.59 ppm ($J = 8.0$), indica que a ligação glicosídica está em posição β .

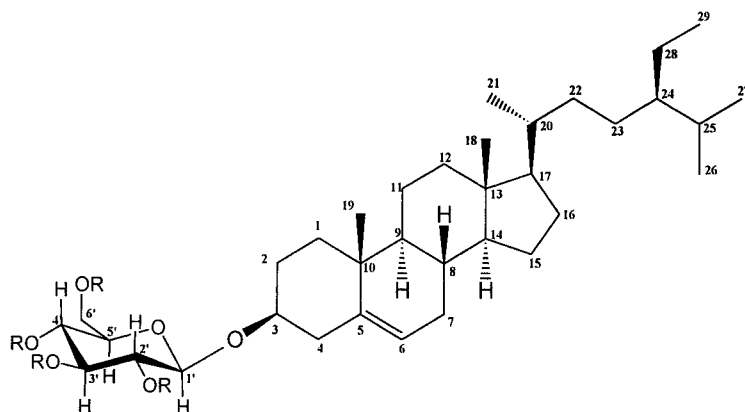
Tabela II.13 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **164** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	37.2
2	---	29.4
3	3.49, dt, (11.1, 5.0)	80.1
4	---	38.9
5	---	140.3
6	5.36, d, (4.3)	122.2
7	---	31.9
8	---	31.8
9	---	50.1
10	---	36.7
11	---	21.0
12	---	39.7
13	---	42.3
14	---	56.7
15	---	24.3
16	---	28.2
17	---	56.0
18	0.68, s	11.8
19	1.00, s	19.3
20	---	36.1
21	0.92, d, (6.2)	18.8
22	---	33.9

Tabela II.13 (cont.) - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **164** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
23	---	26.0
24	---	45.8
25	---	29.1
26	0.83, d, (7.4)	19.8
27	0.81, d, (8.4)	19.0
28	---	23.0
29	0.85, t, (7.5)	12.0
1'	4.59, d, (8.0)	99.6
2'	4.96, dd, (9.3, 8.3)	71.7
3'	5.08, t, (9.7)	68.5
4'	5.21, t, (9.5)	71.5
5'	3.68, m	72.9
6'_a	4.11, dd, (12.2, 1.7)	62.1
6'_b	4.26, dd, (12.2, 4.8)	
COCH₃	2.01, 2.02, 2.05, 2.08, s	---
COCH₃	---	20.5, 20.6, 20.7, 20.8
COCH₃	---	169.3, 169.4, 170.4, 170.7

Os dados espectrais dos compostos **163** e **164**, correspondem respectivamente, aos publicados na literatura para o glucósido do β -sitosterol,¹⁶¹⁻¹⁶³ e para o tetracetato do glucósido do β -sitosterol.¹⁶¹



R = H (**163**)

R = Ac (**164**)

II.2.1.1. Hemissíntese do glucósido do β -sitosterol (**163**)

A confirmação estrutural de **163** foi feita por correlação química com o β -sitosterol (**146**), de acordo com os esquemas reaccionais das figuras II.30 e II.31.

A hemissíntese do glucósido do β -sitosterol foi delineada em duas etapas.¹⁶⁴ A primeira consiste na preparação do derivado da glucose 1-*O*-(2,2,2-tricloro-etanimidoíl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoíl- α -D-glucopiranosose (**165**), o qual, numa segunda etapa, reage com o β -sitosterol para formar o glucósido **166**. A desbenzoílação deste composto forma o glucósido do β -sitosterol (**163**).

A preparação do intermediário **165** é feita a partir da glucose (**167**) que, por sucessiva *per*-benzoílação e bromação selectiva em C-1, forma o derivado **169** com retenção de configuração no carbono anomérico.¹⁶⁵ O tratamento do brometo **169** com carbonato de prata forma a mistura de anómeros α e β do tetrabenzoato **170**, na respectiva proporção de 75 e 25%, quantificada por ¹H-RMN (Tabela II.14). A reacção deste álcool com tricloroacetoneitrilo forma exclusivamente o correspondente derivado anomérico α , o tricloroetanimidoíl **165**, de acordo com o valor da constante de acoplamento entre H-1 e H-2 ($J_{1,2} = 3.6$), no espectro de ¹H-RMN. A análise dos espectros de RMN mono- e bidimensionais dos compostos **165**, **168**, **169** e **170**, permitiu a sua identificação inequívoca (Tabelas II.14 e II.15). O rendimento global da preparação do intermediário **165** foi de 77%.

A reacção de **165** com o β -sitosterol envolve um controlo da temperatura reaccional, -25°C durante 2 horas, para a formação da ligação β -glicosídica no tetrabenzoato **166**, já que um aumento de temperatura favorece a ligação α -glicosídica (Figura II.31).^{164,166} A configuração do carbono anomérico de **166** é confirmada pelo duplete relativo a H-1' (δ 4.95 ppm), cuja constante de acoplamento ($J_{1',2'} = 7.8$) indica uma orientação axial, enquanto que o acoplamento J_{CH}^3 registado no espectro HMBC entre C'-1 e H-3, confirma a ligação glicosídica ao núcleo do β -sitosterol (Tabela II.16).

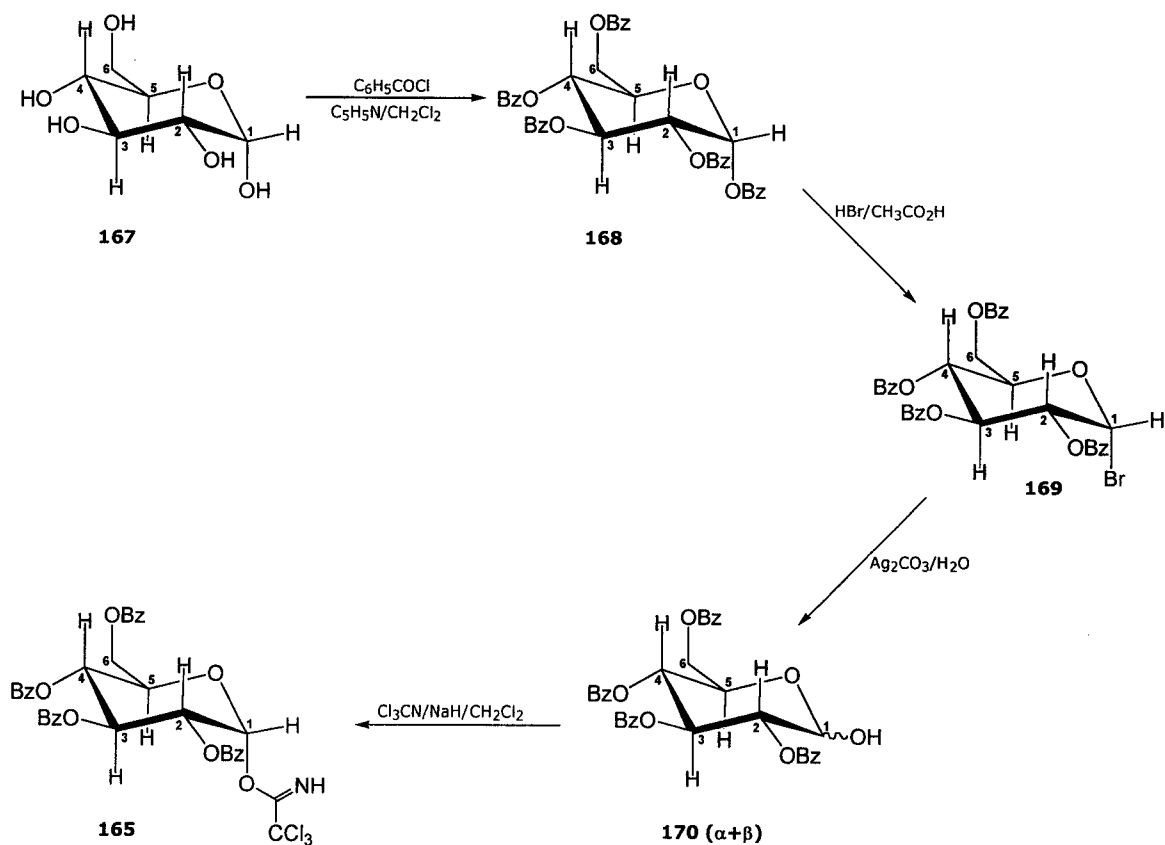


Figura II.30 - Formação da 1-O-(2,2,2-tricloroetanimidoil)-2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosose (**165**).

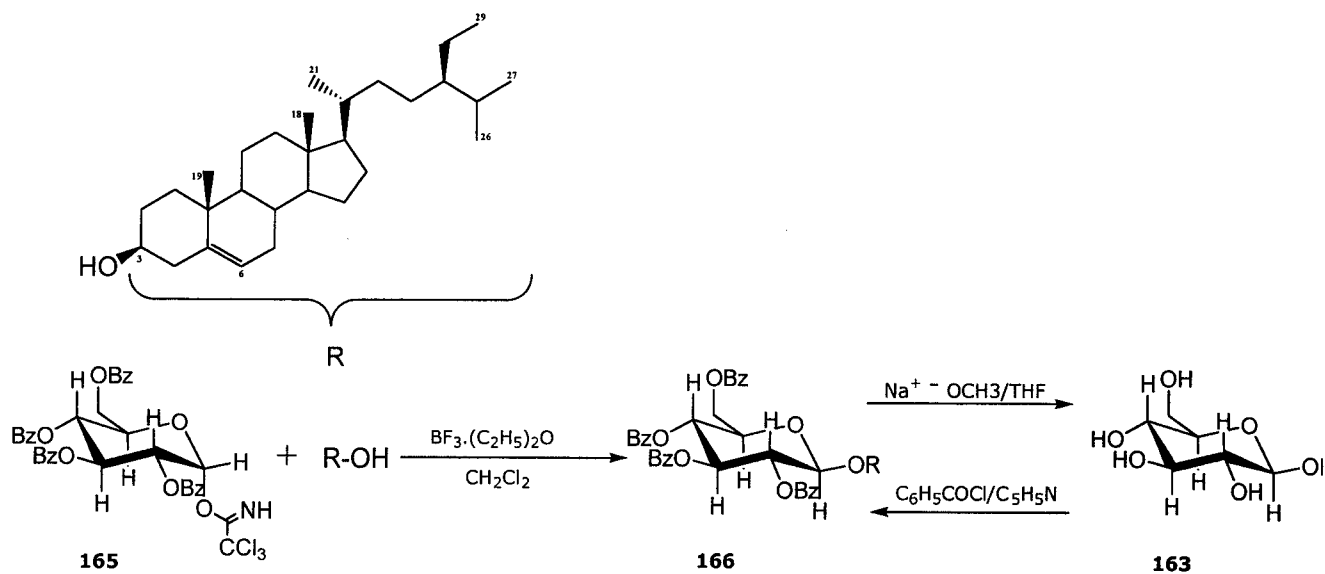


Figura II.31 - Glicosilação do β -sitosterol.

Tabela II.14 – ¹H-RMN de **168**, **169**, **170** e **165** (CDCl₃).

Composto	168	169	170		165
			(α)	(β)	
Protão					
1	6.86, d (3.6)	6.87, d (4.0)	5.77, d (3.5)	5.07, d (8.0)	6.84, d (3.6)
2	5.69, dd, (10.4, 3.6)	5.34, dd (10.0, 4.0)	5.31, dd (10.0, 3.5)	5.38, dd (10.0, 8.0)	5.63, dd (10.2, 3.6)
3	6.33, t (10.4, 10.0)	6.27, t (10.0, 10.0)	6.26, t (10.0, 9.9)	5.97, t (10.0, 9.8)	6.28, t (10.2, 9.9)
4	5.87, t (10.0, 9.9)	5.83, t (10.0, 9.8)	5.74, t (9.9, 9.9)	5.71, t (9.8, 9.8)	5.82, t (9.9, 9.9)
5	4.63, d (5.0)	4.74, dt (9.8, 4.5, 2.4)	4.69, dt (9.9, 4.4, 2.5)	4.18, dt (9.8, 5.0, 2.8)	4.65, d (12.3)
6	4.49, dd (13.1, 5.0)	4.51, dd (12.6, 4.5)	4.43, dd (12.5, 4.4)	4.49, dd (12.2, 5.0)	4.49, dd (12.3, 4.9)
6'	4.63, d (13.1)	4.67, dd (12.5, 2.4)	4.65, dd (12.5, 2.5)	4.64, dd (12.2, 2.8)	4.65, d (12.3)
-CNH	---	---	---	---	8.64, s

Tabela II.15 – ¹³C-RMN de **168**, **169**, **170** e **165** (CDCl₃).

Composto	168	169	170		165
			(α)	(β)	
Carbono					
1	90.2	86.9	90.5	96.1	93.1
2	70.5	71.4	72.2	74.2	70.7
3	70.5	72.7	70.1	72.3	70.2
4	68.8	68.0	69.5	69.5	68.6
5	70.5	70.6	67.8	72.4	70.7
6	62.5	61.9	62.9	63.0	62.4
-CNH	---	---	---	---	160.7
-CCl₃	---	---	---	---	90.7

Tabela II.16 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **166** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	37.1
2	---	29.6
3	3.54, dt, (10.2, 5.0)	80.4
4	---	38.8
5	---	140.3
6	5.22, sl	121.9
7	---	31.9
8	---	31.8
9	---	50.1
10	---	36.6
11	---	21.0
12	---	39.7
13	---	42.3
14	---	56.7
15	---	24.2
16	---	28.2
17	---	56.0
18	0.66, s	11.8
19	0.90, s	19.2
20	---	36.1
21	0.93, d, (5.4)	18.8
22	---	33.9
23	---	26.1
24	---	45.8
25	---	29.2
26	0.83, d, (7.4)	19.8
27	0.81, d, (7.8)	19.0
28	---	23.1
29	0.85, t, (5.3)	11.9

Tabela II.16 (cont.) – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **166** (CDCl_3).

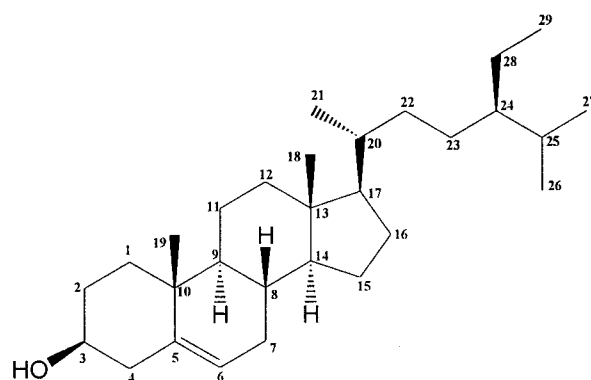
Posição	^1H	^{13}C
1'	4.95, d, (7.8)	100.1
2'	5.51, t, (9.0, 7.8)	72.1
3'	5.91, t, (9.6, 9.0)	73.1
4'	5.64, t, (9.6, 9.6)	70.1
5'	4.17, dt, (9.6, 5.8, 2.3)	72.1
6'_a	4.53, dd, (11.8, 5.8)	63.4
6'_b	4.61, dd, (11.8, 2.3)	

A desbenzoílação do tetrabenzoato **166**, efectuada com metanoato de sódio em THF, formou o glucósido do β -sitosterol, cujos dados espectrais correspondem aos do composto **163**.

II.2.2. β -Sitosterol (**146**)

O composto **146** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos, do extracto etanólico básico, ácido e neutro das folhas e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes.

O seu R_f em ccd de sílica-gel, coincidente com o de um padrão de β -sitosterol, sugeriu tratar-se deste esteroide, comum nas plantas superiores. A confirmação foi feita por comparação dos dados espectrais de **146** com os publicados na literatura para o β -sitosterol,^{159, 167-169} e ainda, por co-injecção em cromatografia gás-líquido com uma amostra comercial.



(**146**)

II.2.3. Estigmast-4-en-3-ona (171)

O composto **171** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 e com 'spray' de ácido fosfomolibdico, usando CHCl_3 como sistema de eluente.

O espectro de IV apresenta uma banda a 1676 cm^{-1} , característica de um grupo carbonilo num anel de seis membros α,β insaturado, e o espectro de UV apresenta um máximo de absorção a λ 241 nm.

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN apresentam (Tabela II.17):

- os sinais característicos dos grupos metilo angulares e da cadeia lateral de esteróis;
- uma ressonância de carbono a δ 199.6 ppm, característico de uma cetona;
- um singuleto a δ 5.72 ppm atribuível a um próton ligado a um carbono olefínico a δ 123.7 ppm.

Tabela II.17 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **171** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	35.6
2	---	33.9
3	---	199.6
4	5.72, s	123.7
5	---	171.6
6	---	32.9
7	---	32.0
8	---	35.7
9	---	53.8
10	---	38.6
11	---	21.0
12	---	39.6
13	---	42.4
14	---	55.9

Tabela II.17 (cont.) - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **171** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
15	---	24.1
16	---	28.1
17	---	56.0
18	0.71, s	11.9
19	1.18, s	17.4
20	---	36.1
21	0.92, d, (6.3)	18.7
22	---	34.0
23	---	26.0
24	---	45.8
25	---	29.1
26	0.84, d, (7.2)	19.8
27	0.81, d, (7.2)	19.0
28	---	23.1
29	0.85, t, (7.5)	11.9

O espectro de massa apresenta o pico molecular a m/z 412 e um padrão de fragmentação semelhante ao do β -sitosterol (Figura II.32).

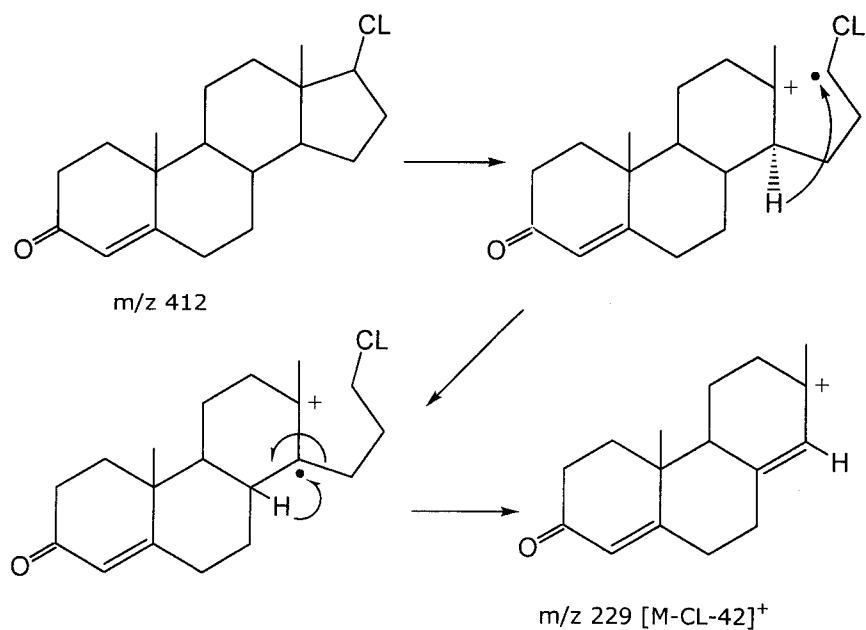
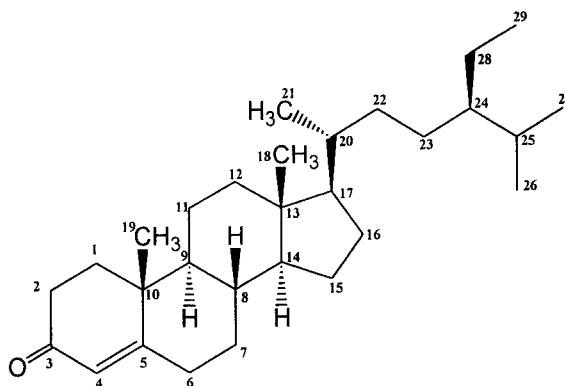


Figura II.32 - Fragmentações características de **171**.

Estes dados espectrais, sugerem uma estrutura esteróide com uma cetona em C-3 conjugada com uma ligação dupla em C-4,¹⁷⁰ e coincidem com os publicados na literatura para a estigmast-4-en-3-ona.^{169,171-173}

A confirmação da estrutura de **171** foi feita por correlação química com o β -sitosterol, descrita na secção seguinte.



(171)

A presença deste composto na planta poderá ter origem na auto-oxidação ou oxidação microbiana do β -sitosterol, hipóteses sustentadas respectivamente por Rowe¹⁷³ e Norin e Winell.¹⁷³

II.2.3.1. Hemissíntese da estigmast-4-en-3-ona (171)

Na confirmação estrutural de **171** por correlação química com o β -sitosterol, seguiu-se o método descrito por Ikan (Figura II.33),¹⁷⁴ que consiste na formação de um derivado dibromado (**172**) que protege a ligação dupla Δ^5 da oxidação com dicromato de sódio. Esta insaturação é regenerada por tratamento do produto oxidado **173** com zinco em meio ácido.

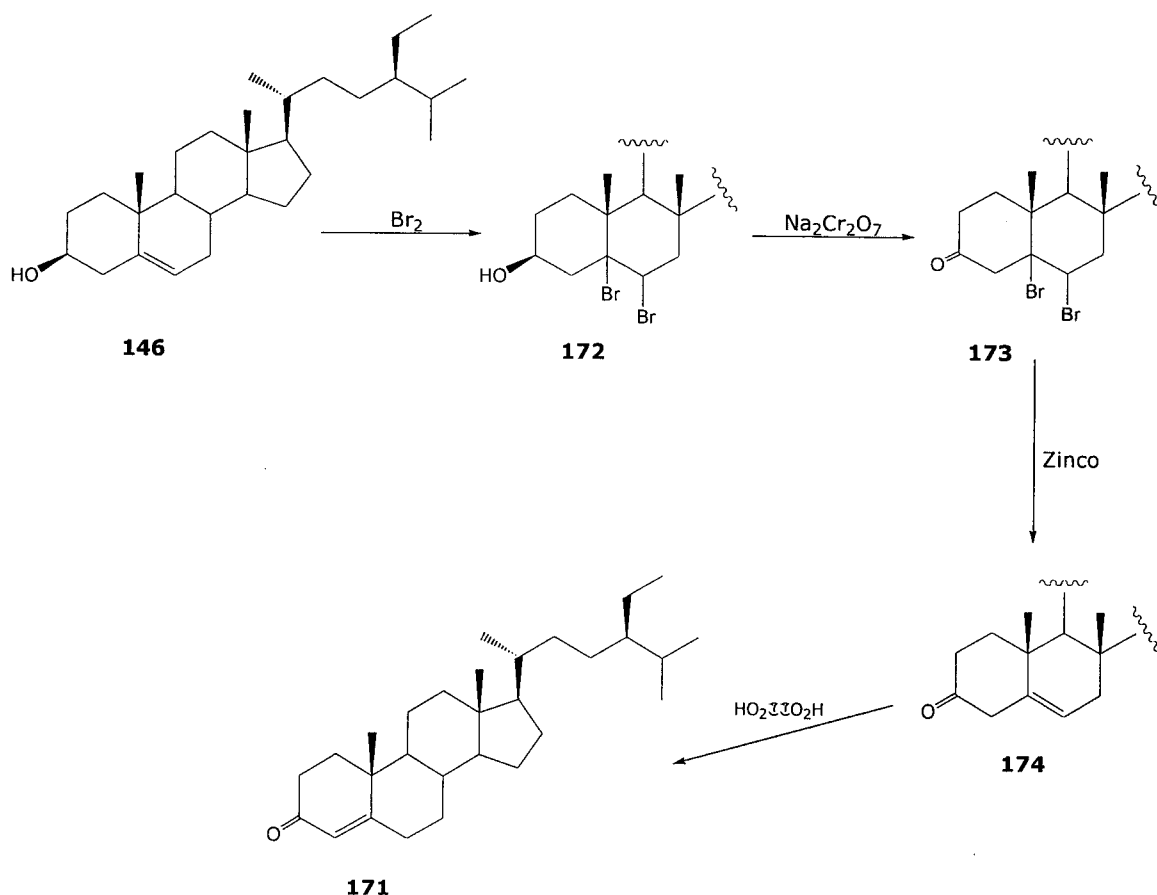


Figura II.33 – Hemissíntese de **171**.

Os dados espectrais e características cromatográficas de **171** correspondem aos do produto natural estigmast-4-en-3-ona.

II.2.4. Lupeol (**175**)

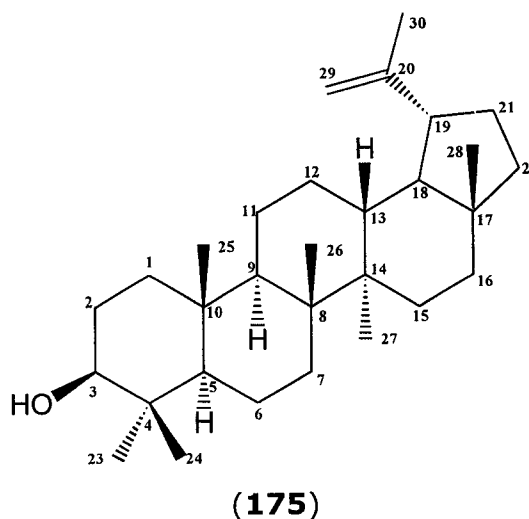
O composto **175** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação com 'spray' de ácido fosfomolibdico, usando AcOEt como sistema de eluente.

Os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN apresentam sinais característicos do núcleo pentacíclico do lupano:

- sete grupos metilo a δ_{H} (δ_{C}) 0.76 (15.3), 0.78 (15.1), 0.83 (16.0), 0.95 (27.9), 0.96 (14.5), 1.03 (16.1) e 1.67 (19.3) ppm;

- dois singuletos largos a δ 4.56 (1H) e a δ 4.68 ppm (1H) relativos a dois prótons ligados a um carbono olefínico a δ 109.3 ppm;
- um duplo duplete a δ 3.18 ppm ($J = 11.0, 5.5$ Hz) relativo ao próton metino adjacente ao grupo hidroxilo em C-3 (δ 79.0 ppm).

Estes dados espectrais correspondem aos publicados na literatura para o lupeol,^{159,175-178} cuja identidade foi confirmada por comparação com uma amostra autêntica deste triterpeno e co-injecção em cromatografia gás-liquido.



II.2.5. Ácido betulínico (176)

O composto **176** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação com 'spray' de ácido fosfomolibdico, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) como sistema de eluente.

A revelação permite visualizar uma mancha com a forma de 'cometa' o que sugere a presença de um ácido carboxílico.

O espectro de IV apresenta bandas a 3450 e a 1686 cm^{-1} características de grupos hidroxilo e carboxilo.

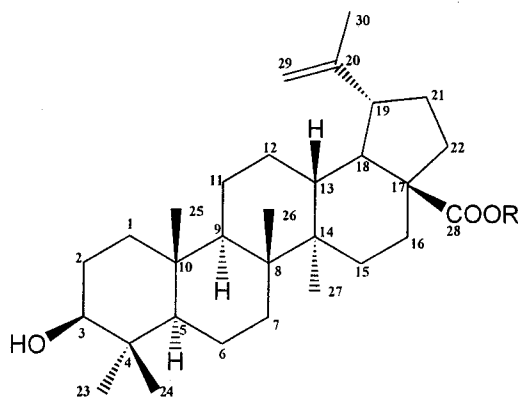
Os espectros de RMN do composto **176** apresentam semelhanças com os do lupeol, nomeadamente, a presença dos grupos metilo a δ_{H} (δ_{C}) 0.75 (15.3), 0.82 (16.0), 0.94 (27.9), 0.96 (16.1), 0.97 (14.7) e 1.69 (19.4) ppm. No entanto, não é visível o singuleto a δ 0.78 ppm relativo aos prótons do grupo 28- CH_3 do lupeol,

nem o respectivo carbono a δ 15.1 ppm, que aqui é deslocado para δ 180.4 ppm, ressonância característica de um grupo carboxilo.

A presença de COOH é também suportada pelo espectro de massa, cujo ião molecular a m/z 456 dá origem ao fragmento $[M-COOH]^+$ a m/z 441.

A presença do ácido carboxílico em C-28 foi confirmada por metilação de **176** com diazometano, que originou o composto **177**, cujo espectro de 1H -RMN regista o grupo metil ester a δ_H 3.67 ppm.

Os dados espectrais do composto **176**, correspondem aos publicados na literatura para o ácido betulínico,¹⁷⁸⁻¹⁸¹ cuja identidade foi confirmada por comparação com uma amostra autêntica e co-injecção em cromatografia gás-liquido.



R = H (**176**)

R = CH₃ (**177**)

II.2.6. Glicosidos do ácido quinóvico (136 e 178)

Os compostos **136** e **178** foram isolados como uma mistura inseparável, a partir do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação com 'spray' de ácido fosfomolibdico, usando CHCl₃/MeOH (95:5) como sistema de eluente.

O espectro de 1H -RMN em DMSO-*d*₆ indicou uma mistura de glicosidos de triterpenos pentacíclicos,¹²⁴ caracterizada pelos seguintes sinais:

- Um singuleto largo a δ 12.1 ppm relativo a grupos carboxílicos;

- um protão olefínico a δ 5.5 ppm;
- um multiplete a δ 3.3 ppm relativo a um protão HC-OR;
- multipletos entre 3.0 e 4.7 ppm relativos aos protões glicosídicos;
- uma série de singuletos e dupletos entre 0.7 e 1.1 ppm, característicos dos grupos metilo do núcleo pentacíclico.

A separação da mistura **136/178** foi conseguida por acetilação e metilação sucessivas, de que resultaram dois compostos, os ésteres dimetílicos **179** e **180**.

II.2.6.1. Éster dimetílico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosídeo quinóvico (**179**)

No espectro de IV do composto **179**, verifica-se a presença de bandas ν_{CO} a 1749 e a 1721 cm^{-1} , o que confirma a metilação de ácidos carboxílicos e a acetilação de grupos hidroxilo da mistura **136/178**.

Os espectros de RMN (Tabela 28) registam sinais característicos do núcleo dos triterpenos pentacíclicos do grupo do urs-12-eno:

- quatro singuletos a δ 0.81, 0.82, 0.91 e 0.92 ppm e dois dupletos a δ 0.84 ($J = 6.0$) e 0.89 ppm ($J = 6.0$) relativos aos grupos metilo;
- um singuleto largo a δ 5.64 ppm acoplado ao carbono olefínico a δ 129.4 ppm, atribuível ao protão H-12;
- um singuleto a δ 3.62 ppm que integra para seis protões, relativo a dois ésteres metílicos;
- um tripleto a 3.09 ppm ($J = 8.0$) atribuível ao protão H-3 α ;¹⁸²
- seis sinais entre δ_C 18.1 e 38.7 ppm relativos a grupos CH₂, cinco entre δ_C 36.9 e 55.5 ppm relativos a grupos CH (além dos dois anteriormente referidos) e ainda seis sinais entre δ_C 36.6 e 132.2 ppm relativos a carbonos tetrassubstituídos.

Tabela II.18 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **179** e **180** (CDCl_3).

Posição	^1H		^{13}C	
	179	180	179	180
1	---	---	38.7	38.6
2	---	---	25.2	25.7
3	3.09, t, (8.0)	3.05, dd, (11.3, 4.6)	89.5	90.2
4	---	---	39.5	39.5
5	---	---	55.5	55.7
6	---	---	18.1	17.9
7	---	---	36.8	36.8
8	---	---	38.8	38.7
9	---	---	47.2	47.1
10	---	---	36.6	36.5
11	---	---	22.6	22.6
12	5.64, sl	5.65, sl	129.4	129.5
13	---	---	132.2	132.1
14	---	---	56.1	56.1
15	---	---	24.5	24.5
16	---	---	25.0	25.0
17	---	---	48.4	48.4
18	2.27, d, (11.6)	2.27, d, (11.4)	53.7	53.6
19	---	---	38.7	38.7
20	---	---	36.9	36.9
21	---	---	29.7	29.7
22	---	---	35.9	35.9
23	0.81, s	0.73, s	28.1	27.6
24	0.94, s	0.92, s	16.2	16.0
25	0.91, s	0.88, s	16.3	16.1
26	0.82, s	0.82, s	18.1	18.1
27	---	---	175.7	175.7
28	---	---	178.2	178.1
29	0.84, d, (6.0)	0.85, d, (6.0)	16.9	16.3
30	0.89, d, (6.0)	0.89, d, (6.0)	20.9	20.9

Tabela II.18 (cont.) – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **179** e **180** (CDCl_3).

Posição	^1H		^{13}C	
	179	180	179	180
1'	4.78, s	4.46, d, (8.0)	99.6	103.4
2'	5.21, sl	5.22, t	70.2	70.3
3'	5.30, dd, (10.0, 3.2)	5.00, dd, (10.5, 3.5)	69.2	69.3
4'	5.06, t, (10.0, 10.0)	5.22, t	71.3	71.3
5'	4.00, dq, (10.0, 6.4)	3.78, dd, (6.4, 6.0)	66.4	68.8
6'	1.19, d, (6.4)	1.20, d, (6.4)	17.1	16.8

Por outro lado, a presença de um glicosido é confirmada pelo carbono e próton anomérico a δ 99.6 e 4.78 ppm, respectivamente, e pelos sinais a δ_{H} 4.00 (δ_{C} 66.4), δ_{H} 5.06 (δ_{C} 71.3), δ_{H} 5.21 (δ_{C} 70.2) e δ_{H} 5.30 (δ_{C} 69.2), os quais, a partir dos acoplamentos registados no espectro de ^1H - ^1H COSY, foram atribuídos a H-5', H-4', H-2 e H-3', respectivamente. O próton H-5', por sua vez, está acoplado a um grupo metilo a δ_{H} 1.19 ppm ($J = 6.4$). A orientação axial dos prótons H-3', H-4' e H-5', e equatorial dos prótons H-1', H-2' e H-6', foi determinada a partir das respectivas constantes de acoplamento e das interações registadas no espectro NOESY (Figura II.34).

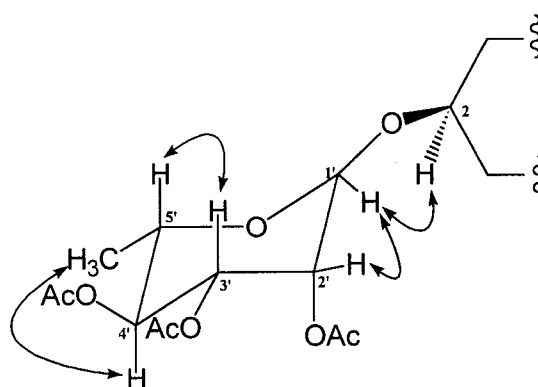
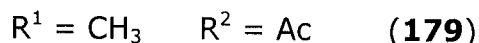
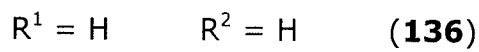
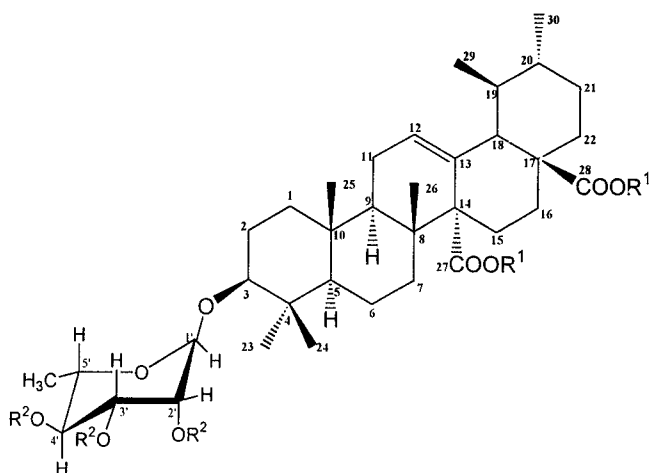


Figura II.34 – Interações relevantes no espectro NOESY de **179**.

Estes dados indicam que o glicosido em causa corresponde à ramnose, o que pôde ser confirmado pelo isolamento do açúcar livre, obtido por hidrólise de **179**

com ácido trifluoracético, o qual regista o valor da rotação óptica (+ 7.33°) da α -L-ramnose (**181**).¹⁸³

O espectro de massa de **179** regista o pico molecular a m/z 787 e um pico de fragmentação a m/z 497 ([M-triacetilramnopiranosido]⁺), o que, a par dos restantes dados espectrais, permitiu identificar o composto **179** como o éster dimetilico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosido quinóvico,^{126,184} e o produto natural **136** como 3- β -O- α -L-ramnopiranosido do ácido quinóvico.¹²⁶⁻¹²⁸



II.2.6.2. Éster dimetilico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosido quinóvico (**180**)

Os espectros de RMN do segundo derivado (**180**), obtido por metilação e acetilação da mistura **136/178**, regista ressonâncias semelhantes às do núcleo do ácido quinóvico do composto **179**, e as seguintes diferenças nos sinais do glicosido (Tabela II.18):

- o protão anomérico aparece como um duplete a δ 4.46 ppm ($J = 8.0$), enquanto que o carbono anomérico está deslocado para campo mais baixo em 3.8 ppm;
- o protão H-2' resolve num tripleto a δ 5.22 ppm, enquanto que em **179** aparecia como um singuleto largo;

- os prótons H-3' e H-5' estão deslocados para campo mais alto, e H-4' para campo baixo.

A análise dos espectros de ^1H - ^1H COSY e NOESY (Figura II.35), considerando os valores das constantes de acoplamento, indica a posição axial para os prótons H-1', H-2', H-3' e H-5', e a posição equatorial para os prótons H-4' e H-6'.

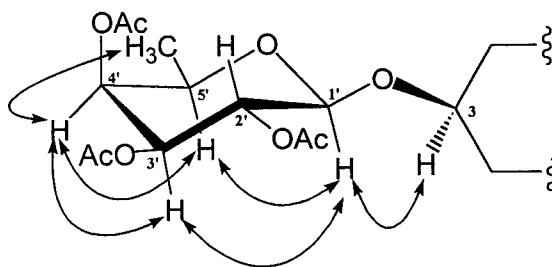
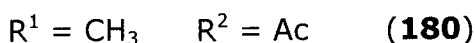
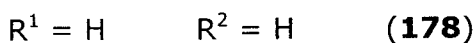
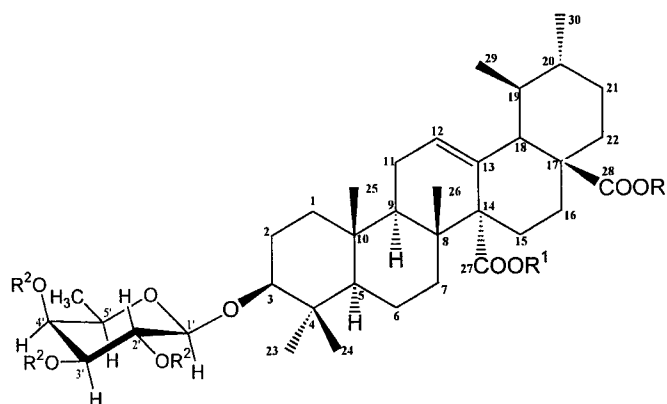


Figura II.35 – Interações relevantes no espectro NOESY de **180**.

O glicosido foi identificado como a β -D-fucose (**182**), por medição da sua rotação óptica ($+70.85^\circ$),¹⁸³ após hidrólise de **180** com ácido trifluoracético e isolamento do açúcar livre.

O espectro de massa de **180**, à semelhança do seu isómero **179**, regista o pico molecular a m/z 787 e um pico de fragmentação a m/z 497, o que, a par dos restantes dados espectrais, corresponde à estrutura do éster dimetilico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosido quinóvico, derivado do produto natural 3- β -O- β -D-fucopiranosido do ácido quinóvico (**178**).^{185,186}



II.3. Cumarinas

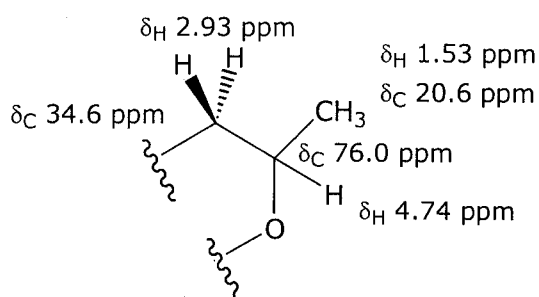
I I.3.1. (R)-(-)-Meleína (183)

O composto **183** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 nm, usando CHCl_3 como sistema de eluente.

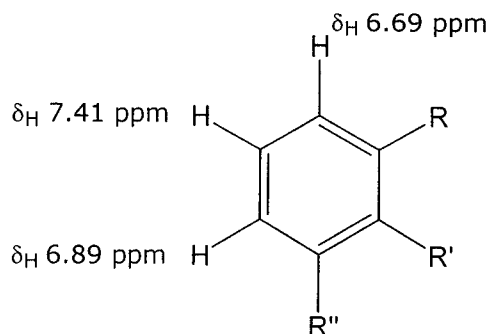
O espectro de IV apresenta uma banda larga ν_{OH} entre 3300 e 3600 cm^{-1} , e bandas a 1674 e 1221 cm^{-1} , características de *o*-hidroxibenzoatos e fenóis, respectivamente.¹⁴⁸

O espectro de UV apresenta absorções intensas a λ 243 e 310 nm, o que sugere um sistema aromático conjugado.¹⁴⁷

Os espectros de RMN (Tabela II.19) mono e bidimensionais do composto **183**, permitiram a identificação do fragmento



e do sistema aromático *o*, *m*, e *p* trissubstituído



O aparecimento dum singuleto a δ 11.03 ppm, o qual, no espectro de HMQC, não está ligado a nenhum carbono, sugere um protão fenólico com pontes de hidrogénio intramoleculares.

Tabela II.19 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **183** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	169.9
3	4.74, m	76.0
4	2.93, d, (7.3)	34.6
5	6.69, d, (7.2)	117.9
6	7.41, t, (7.9)	136.1
7	6.89, d, (8.4)	116.2
8	11.03 (-OH), s	162.2
9	---	108.3
10	---	139.4
11	1.53, d, (6.3)	20.8

A conjugação destes dados aponta para a estrutura da Figura II.36, a qual é confirmada pela fragmentação registada no espectro de massa (Figura II.37).

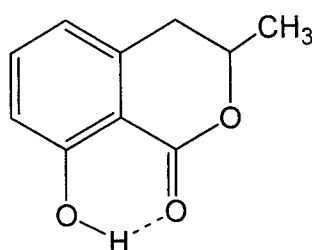


Figura II.36 – Estrutura proposta para o composto **183**.

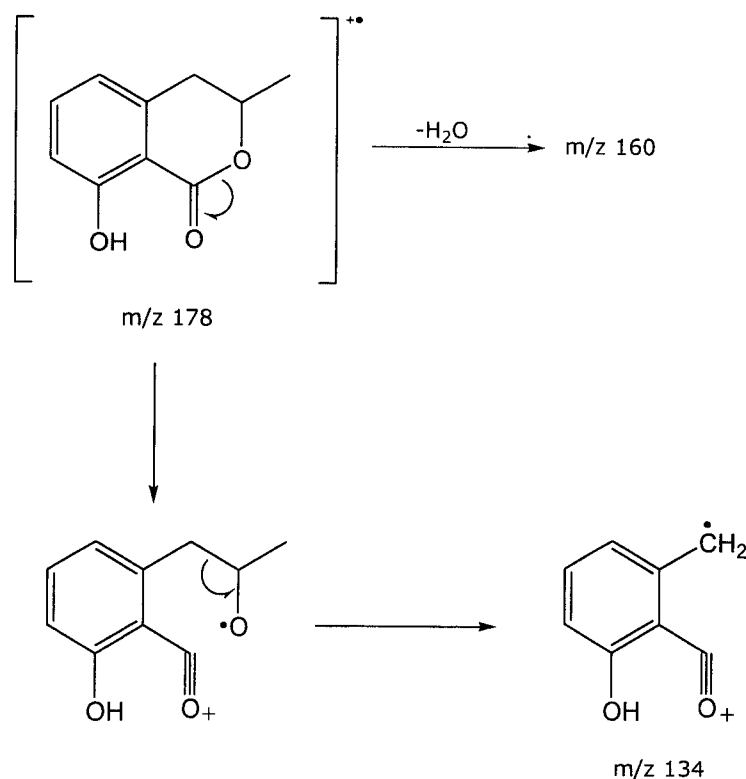
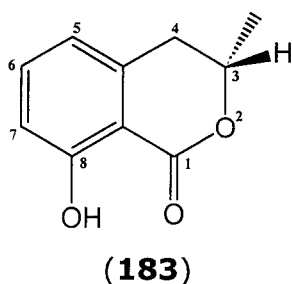


Figura II.37 – Fragmentações características do composto **183**.

A estrutura do composto **183** e a configuração em C-3 foi confirmada por co-injecção em cromatografia gás-liquido, com uma amostra autêntica de (R)-(-)-meleína.

Os dados espectrais de **183**, correspondem aos publicados na literatura para esta cumarina,¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ a qual, até à data, apenas foi isolada a partir de fungos,^{189,191-195} e de alguns insectos,¹⁸⁹ o que sugere uma possível contaminação fúngica dos troncos do *S. latifolius*.



II.3.2. Escopoletina (184)

O composto **184** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos, do extracto etanólico básico, ácido e neutro das folhas, e do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 e 366 nm, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) como sistema de eluente.

O espectro de IV apresenta uma banda larga ν_{OH} entre 3200 e 3500 cm^{-1} , uma banda $\nu_{\text{C=O}}$ a 1708 cm^{-1} e uma banda 1142 cm^{-1} , característica de fenóis.

O espectro de UV apresenta máximos de absorção a λ 251, 259, 296 e 342 nm, o que sugere um sistema aromático conjugado.¹⁴⁷

O espectro de massa apresenta o pico molecular a m/z 192.

Os espectros de RMN (Tabela 32) do composto **184** permitem identificar:

- um anel aromático tetrassubstituído, com dois prótons não acoplados a δ 6.84 e 6.91 ppm, ligados a carbonos a δ 107.5 e 103.2 ppm, respectivamente;
- dois prótons olefínicos apenas acoplados entre si, a δ 6.26 e 7.59 ppm, e cuja constante de acoplamento ($J = 9.4$) indica a conformação *cis*;
- um singuleto a δ_{H} 3.95 ppm (δ_{C} 56.2), relativo um grupo metoxi;
- um singuleto largo a δ 6.15 ppm, o qual, no espectro de HMQC, não aparece ligado a nenhum carbono, o que sugere um próton fenólico.

Tabela II.20 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **184** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
2	---	161.6
3	6.26, d, (9.4)	113.5
4	7.59, d, (9.4)	143.4
5	6.84, s	107.5
6	---	144.1
7	6.15 (-OH), sl	150.0
8	6.91, s	103.2
9	---	150.0
10	---	111.5
11	3.95, s	56.4

A substituição do anel aromático e a posição da ligação olefínica foram determinadas a partir das interações registadas no espectro NOESY (Figura II.38). A ausência de interação entre o grupo metoxi e H-8, indica a posição *para* deste protão relativamente a H-5.

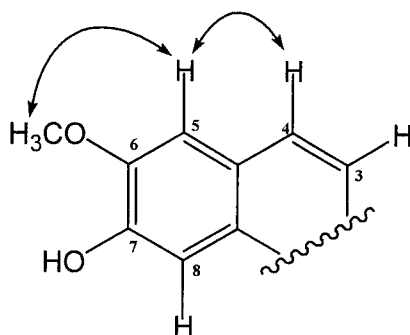


Figura II.38 – Interações relevantes no espectro NOESY de **184**.

O deslocamento químico do protão olefínico H-4 (δ 6.26 ppm), quando comparado com valores tabelados,¹⁴⁷ sugere a conjugação da ligação dupla com um carbonilo, cuja frequência de absorção no espectro de IV (ν 1708 cm^{-1}) e ressonância de ^{13}C (δ 161.6 ppm) são características de uma δ lactona.

A existência de um grupo fenólico, o valor do ião molecular do espectro de massa a m/z 192, assim como os picos de fragmentação (Figura II.39), sugerem a

estrutura da escopoletina para o composto **184**, o que foi confirmado por co-injecção em cromatografia gás-liquido, com uma amostra autêntica. Os dados espectrais de **184** correspondem aos publicados na literatura para esta cumarina.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

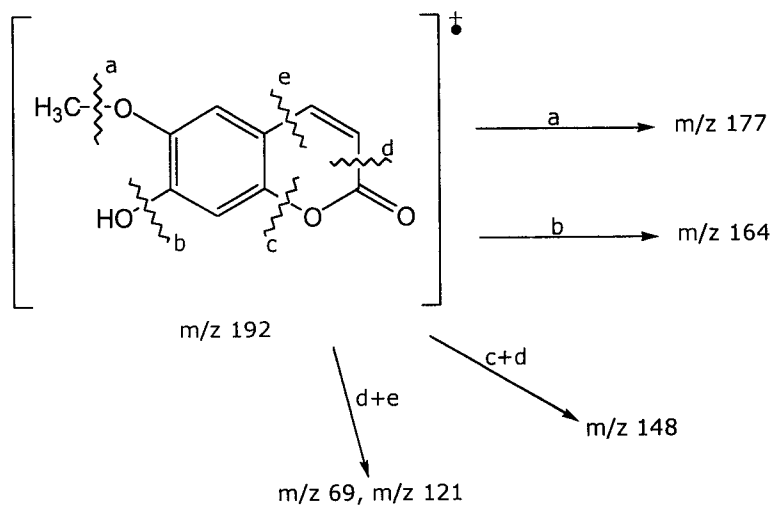
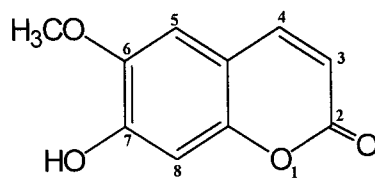


Figura II.39 – Fragmentações características de **184**.



(184)

II.4. Compostos fenólicos

II.4.1. 3,4-Dimetoxibenzoato de metilo (185)

O composto **185** foi isolado do extracto etanólico neutro dos troncos. A sua detecção em ccd de sílica-gel é feita por revelação a λ 254 nm, usando CHCl_3 como eluente.

O espectro de IV apresenta bandas $\nu_{\text{C-O}}$ a 2840 e 1231 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ a 1720 cm^{-1} , e bandas relativas a ligações C=C aromáticas a 1595, 1518 e 1461 cm^{-1} .

O espectro de massa apresenta o pico molecular coincidente com o pico base a m/z 192 e picos de fragmentação a m/z 165 ($[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$) e a m/z 79 ($[\text{C}_6\text{H}_5+2\text{H}]^+$).

Os espectros de RMN apresentam os seguintes sinais (Tabela II.21):

- dois dupletos a δ 6.88 ($J = 8.4$) e a 7.68 ppm ($J = 8.3$), relativos a dois prótons aromáticos acoplados entre si, ligados a carbonos a δ 110.1 e 123.4 ppm, respectivamente;
- um singuleto a δ 7.55 ppm, relativo a um próton aromático ligado a um carbono a δ 111.8 ppm;
- um singuleto a δ 3.94 que integra para seis prótons, característico de dois grupos metoxi aromáticos (δ_{C} 55.9 ppm);
- um singuleto a δ 3.89 relativo a um outro grupo metoxi (δ_{C} 51.8 ppm), cujos prótons apresentam um acoplamento no espectro de HMBC com o carbono a δ 166.6 ppm, característico de um grupo ester.

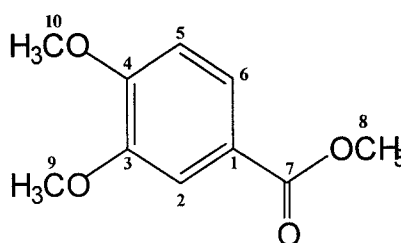
Tabela II.21 – ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **185** (CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	---	122.5
2	7.55, s	111.8
3	---	152.7
4	---	148.4
5	6.88, d, (8.4)	110.1
6	7.68, d, (8.3)	123.4
7	---	166.6
8	3.89, s	51.8
9	3.94, s	55.9
10	3.94, s	55.9

Outros acoplamentos são visíveis no espectro de HMBC:

- do próton aromático a δ 6.88 ppm com os carbonos a δ 122.5, 123.4 e 148.4 ppm;
- do próton aromático a δ 7.55 ppm com os carbonos a δ 122.5, 123.4, 148.4 e 152.7 ppm e com o carbonilo do grupo metil éster;
- do próton aromático a δ 7.68 ppm com o carbono a δ 111.8 ppm e com o carbonilo do grupo metil éster;
- dos prótons dos grupos metoxi a δ 3.94 ppm com os carbonos a δ 148.4 e 152.7 ppm.

Este conjunto de dados espectrais correspondem aos publicados na literatura para o 3,4-dimetoxibenzoato de metilo,¹⁸³ tendo a co-injeção de uma amostra autêntica deste composto com **185**, dado origem a um pico único.



(185)

II.5. Ácidos Gordos

A mistura de ácidos gordos isolada do extracto etanólico neutro dos troncos, foi metilada com diazometano. Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Figuras II.40 e II.41), apresentam o perfil típico das misturas de óleos e gorduras.²⁰⁰

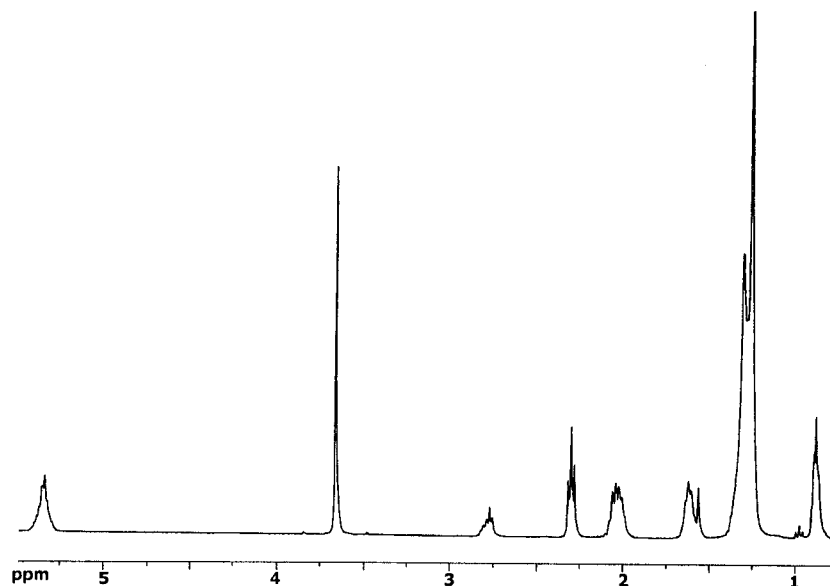


Figura II.40 – Espectro de ^1H -RMN da mistura de ácidos gordos metilados.

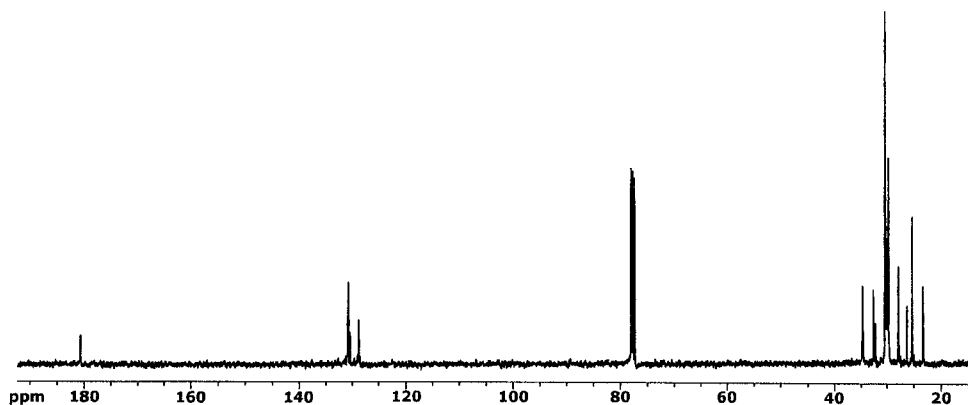


Figura II.41 – Espectro de ^{13}C -RMN da mistura de ácidos gordos metilados.

A separação e caracterização da mistura foi efectuada por GC e GC-EM (Figura II.42).

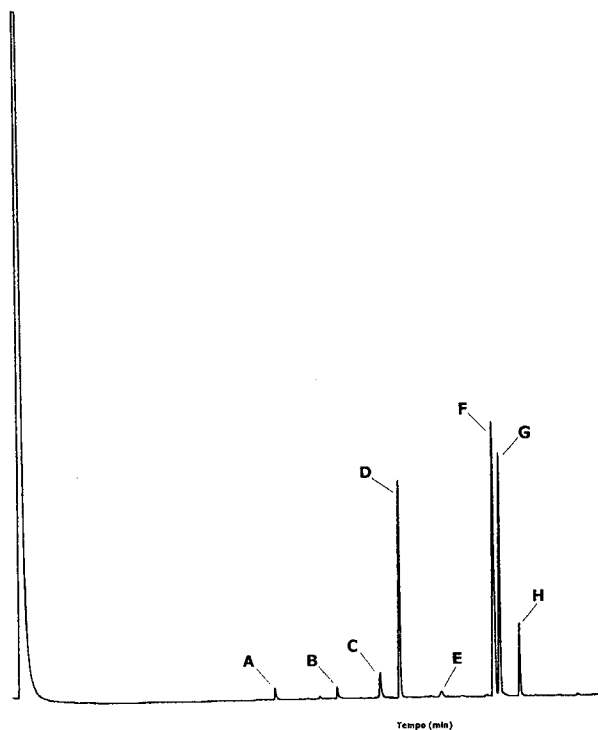


Figura II.42 - Cromatograma da mistura de ácidos gordos metilados, em coluna BP1 (30 m; 0.25 mm d.i.; 0.25 μ m), gás de arraste - hélio, temperatura da coluna - isotérmica a 120°C durante 1 minuto; subida a 10°C/minuto de 120 a 160°C; subida a 7°C/minuto de 160 a 300°C; isotérmica a 300 °C durante 5 minutos.

Pela análise dos espectros de massa e por comparação com padrões, foram identificados os ácidos gordos, que constam da tabela II.22.

Tabela II.22 – Ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos.

Ácidos gordos do <i>Sarcocephalus latifolius</i>			
Saturados		Insaturados	
A	Mirístico 14:0	F	Palmitoleico 16:1
B	Pentadecanóico 15:0	G	Oleico 18:1
C	Palmítico 16:0	H	Linoleico 18:2
D	Margárico 17:0		
E	Estearico 18:0		

II.6. Açúcares

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN da fracção de açúcares isolada do extracto etanólico neutro dos troncos, apresentam o perfil típico das misturas de açúcares livres (Figuras II.43 e II.44).²⁰¹

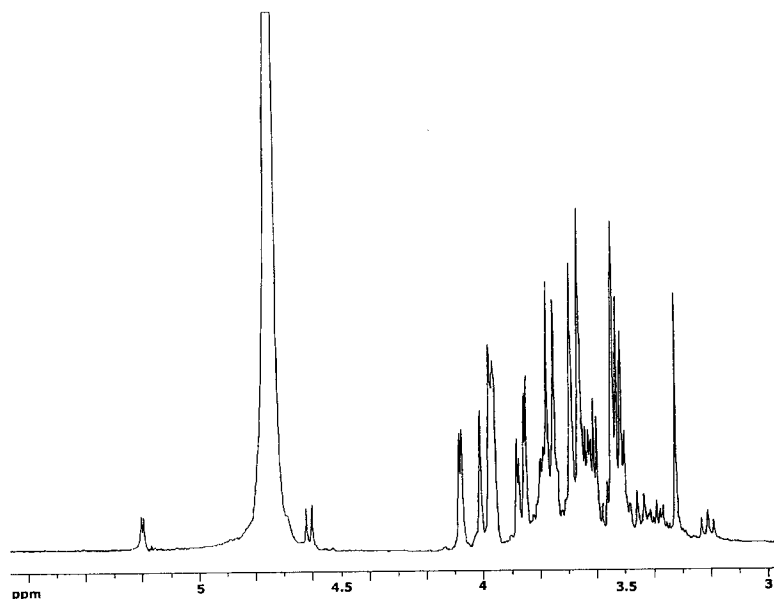


Figura II.43 – Espectro de ^1H -RMN da mistura de açúcares (D_2O).

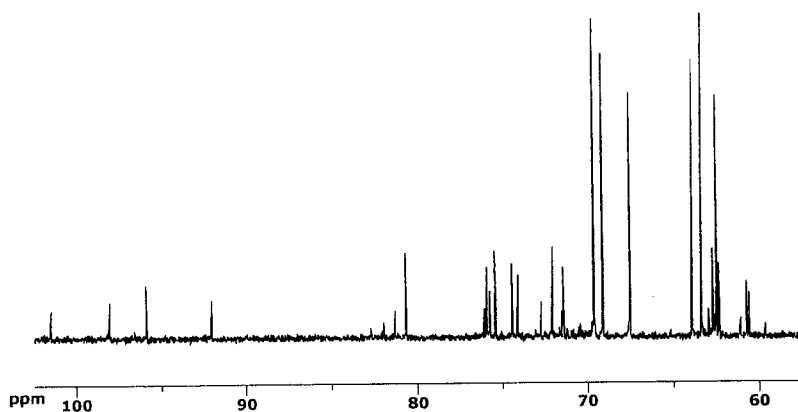


Figura II.44 – Espectro de ^{13}C -RMN da mistura de açúcares (D_2O).

A caracterização preliminar da mistura foi efectuada por cromatografia gás-líquido, sob a forma de alditóis acetatos (Figura II.45).²⁰²

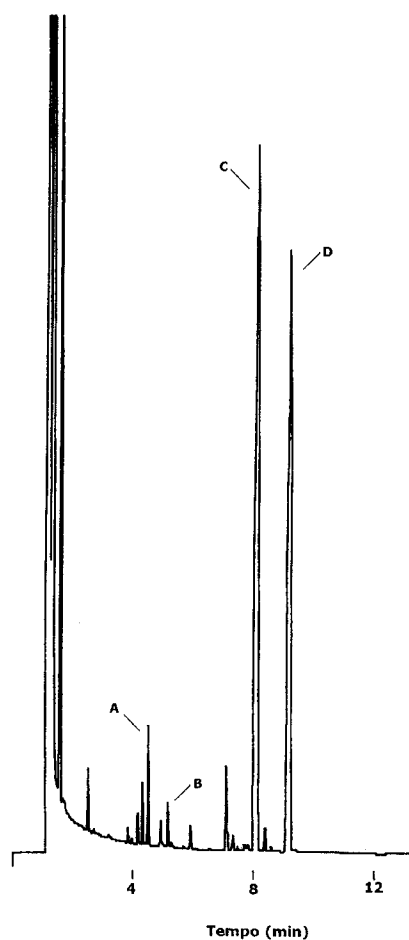


Figura II.45 – Cromatograma da mistura de açúcares sob a forma de alditóis acetatos, em coluna DB-225 (20 m x 0.104 mm, 0.1 μ m), gás de arraste – hidrogénio, temperatura da coluna – subida a 5°C/minuto de 200 a 220°C; isotérmica a 220°C durante 20 minutos.

A co-injecção com amostras autênticas, permitiu a identificação dos alditóis acetatos (Tabela II.23).

Tabela II.23 – Tempos de retenção dos alditóis acetatos.

Alditol acetato		Tempo de retenção (min.)	Área (%)
A	D-Arabinitol	4.56	3
B	D-Xilitol	5.21	1
C	D-Manitol	8.30	42
D	D-Glucitol	9.46	39

Os resultados da Tabela II.23, indicam o D-manitol (42%) e o D-glucitol (39%) como os constituintes maioritários da mistura, mas estes resultados não são conclusivos, uma vez que o D-manitol pode resultar da D-frutose e/ou D-mannose e o D-glucitol pode resultar da D-frutose e/ou D-glucose, ou D-gulose.

Dada a morosidade e baixa resolução evidenciada pelos métodos preparativos cromatográficos na separação de misturas de açúcares livres, optou-se pela derivatização com cloreto de benzoílo/piridina, seguida do isolamento dos benzoatos por HPLC, com detecção por DAD. Esta metodologia permite um rápido fraccionamento de misturas de açúcares, e com melhor resolução, quando comparada com metodologias que usam a detecção por índice de refração, cujos sistemas não permitem o uso de gradientes de eluição, essenciais neste tipo de separações.^{203,204} A benzoilação permite a determinação quantitativa ao nível de picomoles, já que a absorvância a λ 230 nm destes derivados é directamente proporcional ao numero de grupos benzoílo presentes.²⁰³

Uma vez isolados, os açúcares benzoíladados foram identificados por RMN.

II.6.1. Caracterização dos benzoatos dos açúcares

Da mistura benzoíada dos açúcares livres foram isolados por HPLC, catorze compostos, **168**, **186** a **196**, **203** e **204** e de, dois dos quais numa mistura inseparável (**195** e **196**) (Figura II.46).

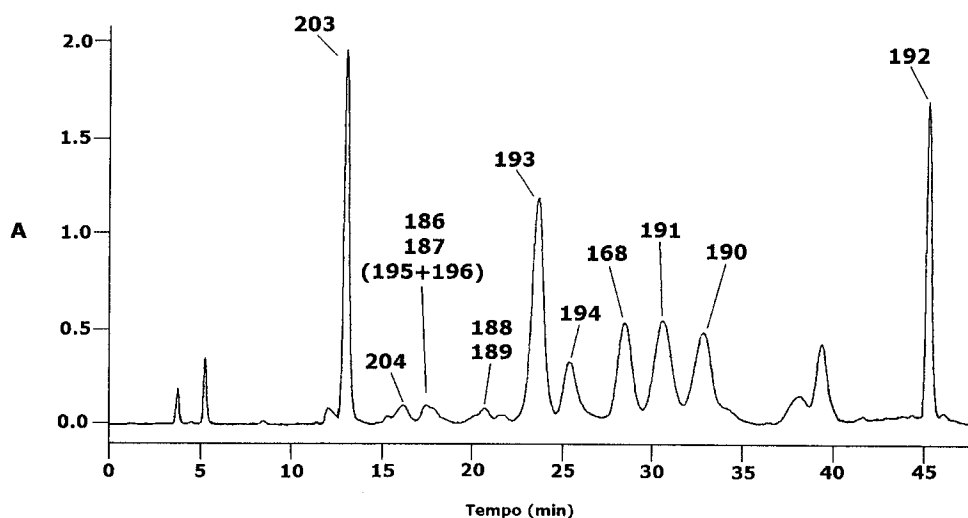


Figura II.46 – HPLC da mistura de açúcares benzoíados, com uma coluna Lichrospher Si-60 (fase normal, 250 mm x 8 mm, 10 μ m), fluxo de 6 mL/min e gradiente de eluição de Hexano/AcOEt (90:10 a 10:90).

Uma primeira análise dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN, permitiu agrupar os compostos em quatro grupos:

- aldopentopiranoses tetrabenzoíadas,^{205,206} cujos espectros apresentam seis prótons e cinco carbonos, um dos quais metilénico, como é o caso dos compostos **186**, **187**, **188** e **189**;
- aldo-hexapiranoses pentabenzoíadas,²⁰⁶ cujos espectros apresentam sete prótons e seis carbonos, um dos quais metilénico, como é o caso dos compostos **168** e **190**;
- cetoses tetra e pentabenzoíadas,²⁰⁶ cujos espectros apresentam dois grupos CH_2 , três grupos CH e um carbono tetrassubstituído ligado a oxigénio, o que, atendendo à ausência no espectro de ^1H -RMN do próton anomérico, é indicativo de formas cíclicas de cetoses. Incluem-se neste grupo os compostos **191**, **192**, **193**, **194**, **195** e **196**;

- trioses e tetroses benzoíadas, cujos espectros de ^1H e ^{13}C -RMN apresentam respectivamente, cinco prótons e três carbonos, e seis prótons e quatro carbonos, como é o caso dos compostos **197** e **198**.

II.6.1.1. Aldopentopiranoses tetrabenzoíadas

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN dos compostos **186**, **187**, **188** e **189** (Tabelas II.24 e II.25), apresentam seis prótons, quatro carbonos CH , e um CH_2 . Tomando como referência o carbono anomérico, cujo deslocamento químico é característico de um anel piranósico (δ_{C} 88.5–92.7 ppm),^{201,206} e o próton anomérico, a análise dos espectros DEPT, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC e NOESY, permitiu a identificação inequívoca de todos os sinais.

Tabela II.24 – ^1H -RMN de **186**, **187**, **188** e **189** (CDCl_3).

Protão	Compostos					
	186	187	188	188*	189	189*
1	6.36, d (4.4)	6.76, d (3.5)	6.86, s	6.96, d (3.5)	6.61, d (3.4)	6.67, d (3.2)
2	5.62, t (5.4, 4.4)	5.63, dd, (10.1, 3.5)	6.07, s	6.12, dd (10.7, 3.5)	5.72, t (3.5, 3.4)	5.81, t (3.5, 3.2)
3	5.82, t (5.9, 5.4)	6.27, t (10.1, 9.8)	6.07, s	6.23, dd (10.7, 3.6)	6.05, t (3.5, 3.4)	6.18, t (3.8, 3.5)
4	5.39, ddd (7.3, 5.9, 3.8)	5.54, ddd (10.0, 9.8, 5.8)	5.90, s	6.02, d (3.6, 1.0)	5.70, t (4.1, 3.4)	5.81, t (3.8, 3.7)
5	4.01, dd (12.5, 7.3)	4.07, t (11.2, 10.0)	4.19, d (13.2)	4.26, dd (13.5, 1.0)	4.28, dd (12.9, 4.1)	4.34, dd (13.1, 3.7)
5'	4.56, dd (12.5, 3.8)	4.30, dd (11.2, 5.8)	4.41, d (13.2)	4.29, d (13.5)	4.40, dd (12.9, 2.1)	4.64, dd (13.1, 2.3)

* – $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Tabela II.25 ^{13}C -RMN de **186**, **187**, **188** e **189** (CDCl_3).

Carbono	Compostos					
	186	187	188	188*	189	189*
1	92.1	90.3	91.2	91.8	92.2	93.4
2	68.5	70.3	67.8	69.0	67.8	68.7
3	69.1	69.9	68.2	69.0	66.7	67.6
4	68.1	69.5	69.5	70.6	67.1	68.3
5	61.8	61.2	63.0	63.8	63.2	64.0

* - $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

II.6.1.1.1. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil- β -D-xilopiranosose (**186**)

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN (Tabelas II.24 e II.25), apresentam uma matriz característica de uma aldopentapiranosose, com o carbono anomérico a δ 92.1 ppm.

As constantes de acoplamento, $^3J_{1,2}$ (4.4 Hz), $^3J_{2,3}$ (5.4 Hz) e $^3J_{3,4}$ (5.9 Hz) do composto **186**, apresentam valores superiores aos das constantes de acoplamento tipo equatorial/equatorial ($J \cong 3$ Hz) e equatorial/axial ($J \cong 3.5$ Hz), características de aldopentapiranososes tetrabenzoiladas,²⁰⁵ o que sugere a posição *quasi* axial de H-1, H-2, H-3 e H-4, de que resultaria uma configuração β -anomérica.

A relação *cis*-axial dos prótons H-1, H-3 e H-5_{ax}, e entre H-2 e H-4, é ilustrada pelas interações registadas no espectro de NOESY, o qual apresenta ainda um *noe* intenso entre H-1 e H-2, H-2 e H-3, H-3 e H-4, e H-4 e H-5_{ax} (Figura II.47). Este conjunto de interações sugere a presença das conformações interconvertíveis $^4\text{C}_1$ e $^1\text{C}_4$,^{205,207} o que confirma a configuração β -anomérica e justifica os valores das constantes de acoplamento.

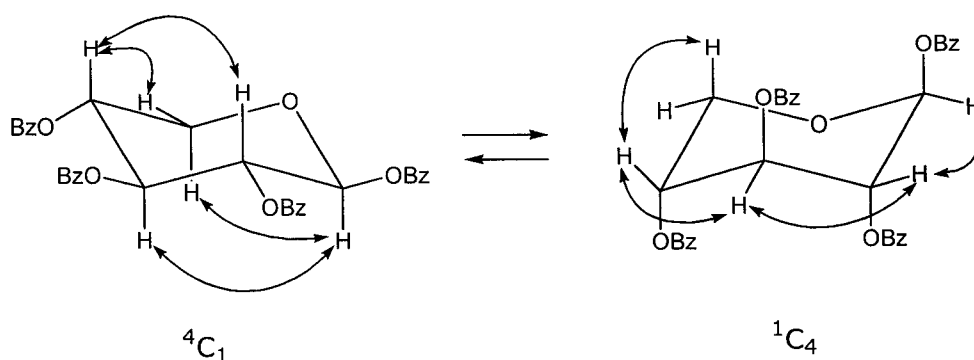
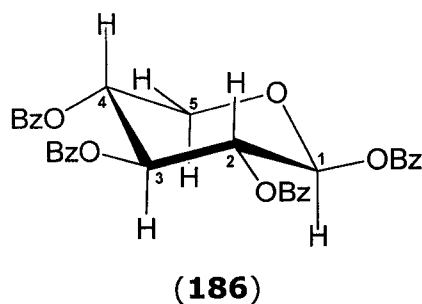


Figura II.47 – Interações relevantes no espectro NOESY de **186**.

Esta observação está de acordo com resultados de análise conformacional realizados para D-aldopentapiranoses tetrabenzoíladadas,^{205,208} que indicam uma proporção idêntica para as duas conformações em cadeira (4C_1 e 1C_4), à temperatura ambiente, da β -D-xilose tetrabenzoílada (**186**), cujos dados espectrais se encontram publicados na literatura.^{205,206}



II.6.1.1.2. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoí- α -D-xilopiranosose (**187**)

Os espectros de ${}^1\text{H}$ - e ${}^{13}\text{C}$ -RMN de **187** apresentam a mesma matriz do composto anterior, com desvios para campo mais baixo do próton anomérico (+ 0.4 ppm), de H-3 (+ 0.45 ppm) e de H-4 (+ 0.15 ppm).

Os valores das constantes de acoplamento entre H-2 e H-3, e H-3 e H-4, da ordem dos 10 Hz, indicam a respectiva posição axial, enquanto que o valor de ${}^3J_{1,2}$ (3.5 Hz) confirma a configuração α -anomérica de **187**, correspondente à α -D-xilose tetrabenzoílada, cujos dados espectrais se encontram publicados na literatura.^{205,206} Esta configuração é também ilustrada pelo espectro de NOESY, que apresenta um *noe* intenso entre os pares de prótons H-1/H-2, H-2/H-4 e

H-3/H-5 (Figura II.48). No entanto, o aparecimento neste espectro, de interações de fraca intensidade do próton H-3 com os prótons H-2 e H-4, indiciam a presença da conformação 1C_4 a par da conformação maioritária 4C_1 , o que está de acordo com o resultado do estudo conformacional de D-aldopentapiranoses tetrabenzoíladas que refere uma proporção de cerca de 98:2 das duas conformações.²⁰⁵

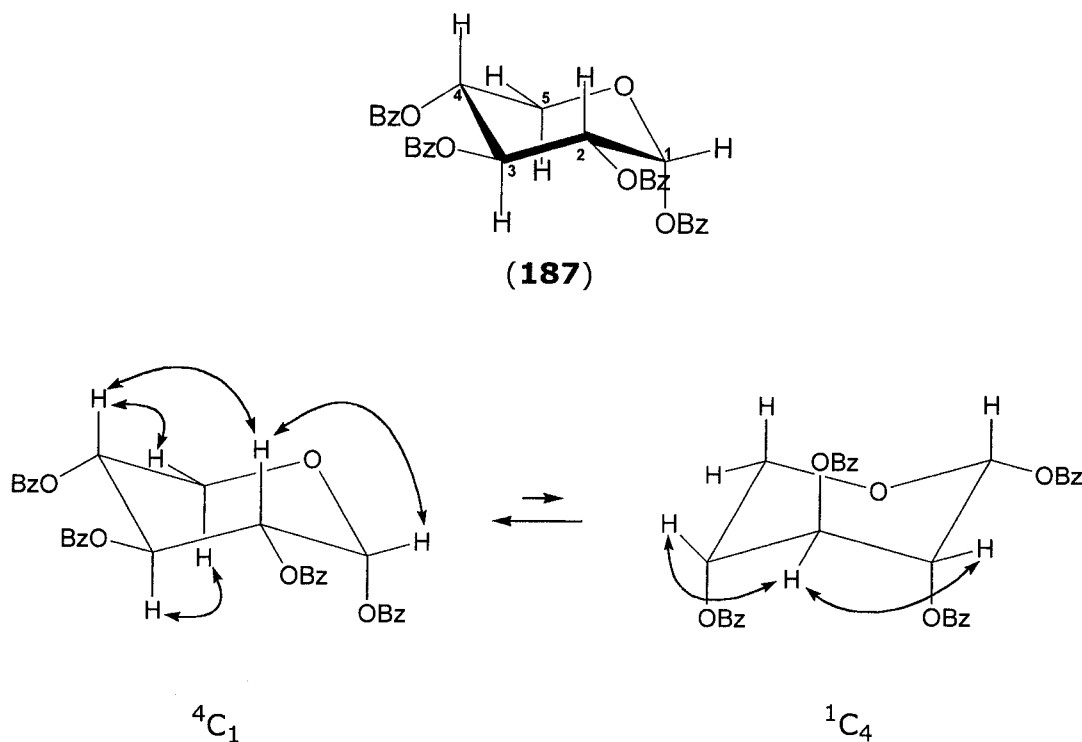


Figura II.48 – Interações relevantes no espectro NOESY de **187**.

II.6.1.1.3. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-β-D-arabinopiranosose (188)

O espectro de 1H -RMN em $CDCl_3$, apresenta uma baixa resolução de sinais, já que apenas se observam dois duplos dupletos atribuíveis pelos espectros de HMQC e DEPT a um grupo metilénico ($-CH_2-$) e três singletos relativos a quatro prótons.

Em $(CD_3)_2CO$, os espectros de 1H - e ${}^{13}C$ -RMN apresentam a mesma matriz dos casos anteriores (Tabelas II.24 e II.25), sugerindo um composto do tipo aldopentapiranosose.

Os valores das constantes de acoplamento ${}^3J_{2,3}$ (10.7 Hz), ${}^3J_{3,4}$ (~ 0 Hz) e ${}^3J_{1,2}$ (3.5 Hz), indicam a posição axial de H-2 e H-3, e a posição equatorial de H-4 e H-1.

O espectro de NOESY, apresenta um *noe* intenso entre os pares de prótons H-3/H-5' e H-4/H-5' (Figura II.49), e um *noe* de fraca intensidade de H-1 com H-2, o que confirma a configuração β -anomérica do composto **188** e sugere que este se apresenta preferencialmente na conformação 1C_4 .

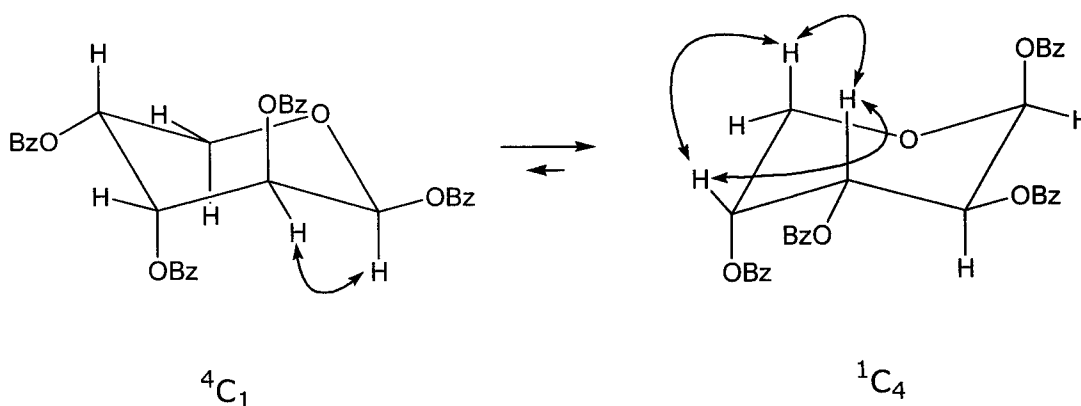
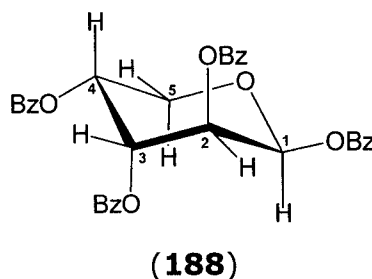


Figura II.49 – Interações relevantes no espectro NOESY de **188**.

Esta observação está de acordo com resultados de análise conformacional realizados para D-aldopentapiranoses tetrabenzoiladas,²⁰⁵ que indicam uma proporção maioritária da conformação 1C_4 (95%) em detrimento da conformação 4C_1 (5%), à temperatura ambiente, da β -D-arabinose tetrabenzoilada (**188**), cujos dados espectrais se encontram publicados na literatura.^{205,206}



II.6.1.1.4. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil- α -D-arabinopiranosose (189)

Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C de **189** (Tabelas II.24 e II.25), correspondem aos da literatura para a α -D-arabinose tetrabenzoilada.^{205,206}

À semelhança dos compostos anteriores, a análise conjunta dos espectros de ^1H -RMN e NOESY permitiu deduzir que **189** se encontra em equilíbrio entre as conformações $^1\text{C}_4$ e $^4\text{C}_1$. O intenso *noe* entre os dois pares de prótons H-1/H-5 e H-4/H-5' (Figura II.50), a par das interações de fraca intensidade entre H-1 e H-2, e H-2 e H-3, confirmam a configuração maioritária $^1\text{C}_4$, o que está de acordo com os resultados do estudo conformacional de D-aldopentapiranoses tetrabenzoiladas, que refere uma proporção de 70:30 entre as conformações $^1\text{C}_4$ e $^4\text{C}_1$ da α -D-arabinose tetrabenzoilada.²⁰⁵

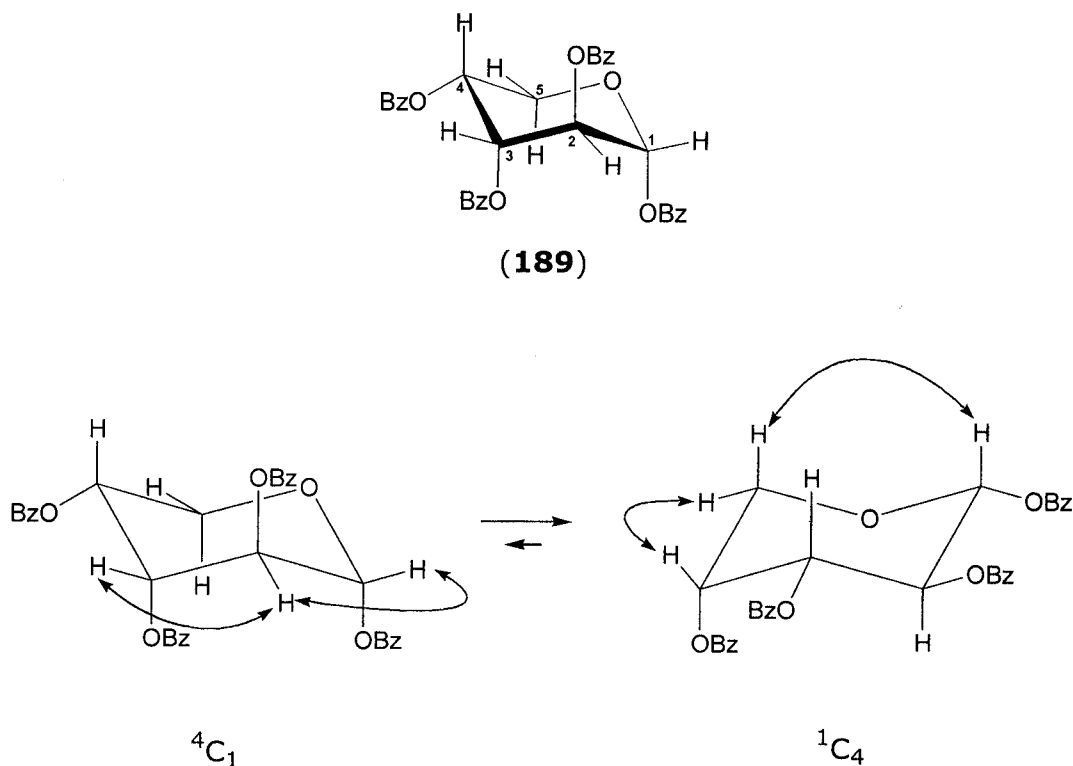


Figura II.50 - Interações relevantes no espectro NOESY de **189**.

II.6.1.2. Aldo-hexapiranoses pentabenzoiladas

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN dos compostos **168** e **190** (Tabela II.26), apresentam sete prótons, cinco carbonos CH , e um CH_2 . Tomando como referência o carbono e o próton anomérico,^{201,206,209} a análise dos espectros DEPT, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC e NOESY, permitiu a identificação inequívoca de todos os sinais.

Tabela II.26 - ^1H -RMN e ^{13}C -RMN de **168** e **190** (CDCl_3).

Posição	168		190	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	6.86, d, (3.6)	90.2	6.32, d, (8.1)	92.7
2	5.69, dd, (10.4, 3.6)	70.5	5.88, dd, (9.2, 8.1)	70.8
3	6.33, t, (10.4, 10.0)	70.5	6.05, t, (9.5, 9.2)	72.8
4	5.87, t, (10.0, 9.9)	68.8	5.84, t, (9.5, 9.8)	69.1
5	4.63, d, (5.0)	70.5	4.42, ddd, (9.8, 4.8, 2.8)	73.2
6	4.49, dd, (13.1, 5.0)	62.5	4.52, dd, (12.4, 4.8)	62.7
6'	4.63, d, (13.1)		4.67, dd, (12.4, 2.8)	

II.6.1.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- α -D-glucopiranosose (168)

Os valores das constantes de acoplamento $^3J_{2,3}$, $^3J_{3,4}$ e $^3J_{4,5}$, da ordem dos 10 Hz, e o valor de $^3J_{1,2}$ (3.6 Hz), sugerem a posição axial dos prótons H-2, H-3, H-4 e H-5, e a posição equatorial de H-1, o que é confirmado pelo espectro NOESY, o qual apresenta um *noe* intenso entre os pares de prótons H-1/H-2, H-2/H-4 e H-3/H-5, na conformação $^4\text{C}_1$ (Figura II.51). Por outro lado, o registo das interacções menos intensas H-1/H-6, H-2/H-3, H-3/H-4, H-4/H-5 e H-4/H-6', ilustra a presença da conformação minoritária $^1\text{C}_4$.

Estes dados espectrais de **168** correspondem à estrutura α -D-glucose pentabenzoilada.²⁰⁹

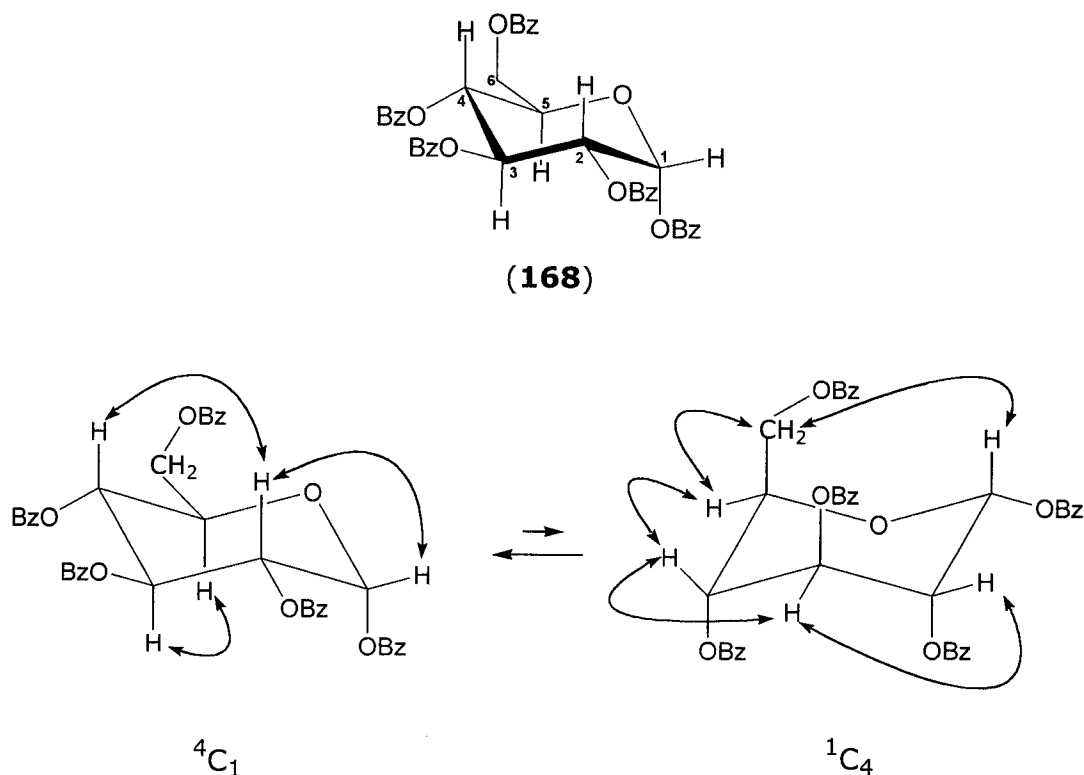
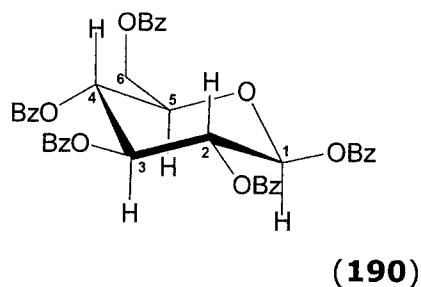


Figura II.51 – Interações relevantes no espectro NOESY de **168**.

II.6.1.2.2. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- β -D-glucopiranosose (**190**)

Em comparação com o composto anterior, a única diferença significativa do espectro de ${}^1\text{H}$ -RMN de **190**, reside no valor de ${}^3J_{1,2}$ (8.1 Hz), o qual indica a orientação axial do próton anomérico, aqui deslocado em 0.54 ppm para campo alto. As interações registadas no espectro de NOESY (Figura II.52), ilustram as duas conformações em equilíbrio, 4C_1 (maioritária) e 1C_4 , da β -D-glucose pentabenoilada.²⁰⁹



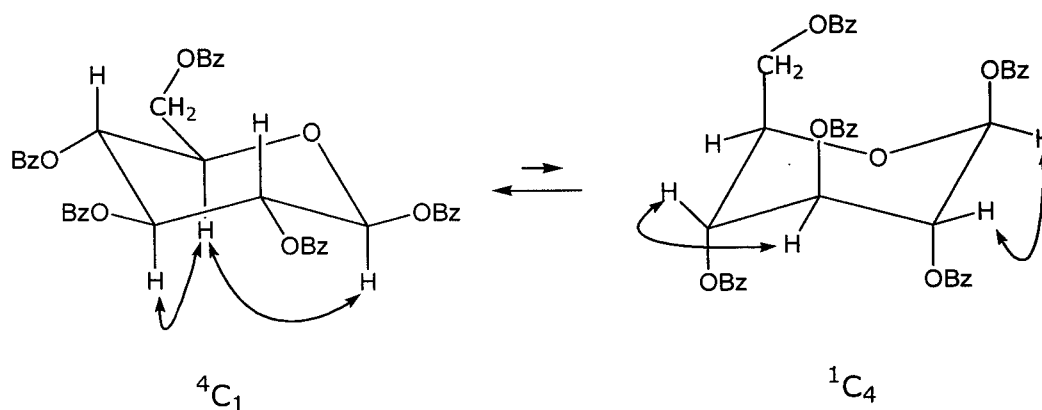


Figura II.52 – Interações relevantes no espectro NOESY de **190**.

A atribuição dos sinais relativos aos prótons H-2 e H-4, devido à sobreposição destes no espectro de ^1H -RMN, foi feita a partir dos espectros bidimensionais, com o auxílio do reagente de deslocamento tris-1,1,1,2,2,3,3,3-heptafluoro-7,7-dimetil-3,5-octanodionato de európio ($\text{Eu}(\text{fod})_3$).

II.6.1.3. Cetoses tetra e pentabenzoiladas

Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN dos compostos **191**, **192**, **193**, **194**, **195** e **196** (Tabelas II.27 e II.28), apresentam dois grupos CH_2 , três grupos CH e um carbono tetrassubstituído ligado a oxigênio, o qual, relativamente ao carbono anomérico dos compostos da série das hexoses, apresenta um deslocamento significativo para campo mais baixo. Estes dados, a par da ausência de próton anomérico, são característicos das formas cíclicas das cetoses.

Tomando como referência o carbono anomérico (C-2) e o próton H-3, a análise dos espectros DEPT, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC e NOESY, permitiu a identificação inequívoca de todos os sinais.

Tabela II.27 - $^1\text{H-RMN}$ de **191**, **192**, **193**, **194**, **195** e **196** (CDCl_3).

		Compostos									
Protão	191	192	192*	193	194	194*	195	196	196*	196	196*
	4.80, d (11.8)	4.52, d (11.8)	4.24, d (11.6)	5.03, d (12.0)	5.05, s	5.02, d (11.5)	4.39, d (12.3)	4.64, d (11.2)	4.60, d (11.6)		
1											
	5.55, d (11.8)	4.58, d (11.8)	4.55, d (11.6)	5.31, d (12.0)	5.05, s	5.10, d (11.5)	4.97, d (12.3)	4.66, d (11.2)	4.60, d (11.6)		
1'											
	6.50, d (10.6)	6.19, d (10.4)	6.13, d (10.5)	6.47, d (2.4)	6.32, s	6.40, d (6.9)	5.88, s	6.10, d (6.8)	6.07, d (7.0)		
3											
	6.03, dd (10.6, 3.0)	5.96, dd (10.4, 3.0)	5.85, dd (10.5, 3.1)	5.77, dd (4.2, 2.4)	6.31, d (6.6)	6.19, t (6.9, 6.9)	5.56, d (4.7)	5.99, t (6.8, 6.1)	5.93, t (7.0, 6.6)		
4											
	5.86, sl	5.78, sl	5.78, sl	4.93, dd (5.0, 3.4)	4.74, dd (6.8, 5.5)	4.91, dd (5.1, 3.1)	4.53, m	4.59, m	4.71, m		
5											
	4.29, d (13.4)	4.07, d (13.1)	4.02, d (13.1)	4.74, dd (12.1, 5.0)	4.74, dd (14.0, 6.8)	4.61, dd (12.0, 5.1)	4.72, dd (11.8, 4.7)	4.67, d (11.5)	4.56, dd (11.7, 5.0)		
6											
	4.29, d (13.4)	4.45, d (13.1)	4.43, d (13.1)	4.83, dd (12.1, 3.4)	4.86, dd (14.0, 5.5)	4.70, dd (12.0, 3.1)	4.85, dd (11.8, 4.7)	4.78, dd (11.5, 3.6)	4.66, dd (11.7, 3.6)		
6'											
-OCH₃	---	---	---	---	---	---	3.46, s	3.46, s	3.39, s		

* - DMSO-d_6

Tabela II.28 - ^{13}C -RMN de **191**, **192**, **193**, **194**, **195** e **196** (CDCl_3).

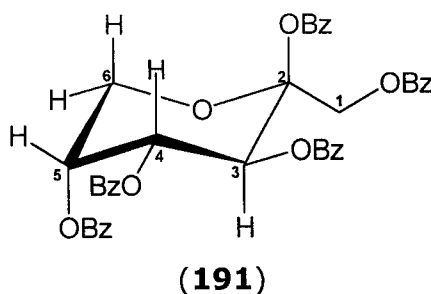
Carbono	191	192	193	194	194*	195	196	196*
1	63.3	66.7	62.3	65.2	68.8	58.9	63.1	67.1
2	103.2	96.8	109.5	105.4	108.6	104.0	103.4	106.6
3	68.0	68.8	79.7	77.7	81.5	81.0	77.9	80.2
4	69.4	69.3	77.4	76.9	79.6	78.9	77.2	81.7
5	69.3	70.1	81.9	80.3	82.6	81.3	78.8	81.1
6	63.7	61.7	63.5	64.3	67.4	63.6	65.1	68.2
-OCH₃	---	---	---	---	---	48.9	49.9	53.5

* - $\text{DMSO}-d_6$

II.6.1.3.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- β -D-fructopirranose (**191**)

O acoplamento de fraca intensidade no espectro de ^1H - ^1H COSY dos prótons H-6/H-6' com o próton H-5, e o deslocamento químico do carbono anomérico a δ 103.2 ppm (valor característico de cetopirranoses, δ_{C} 96-104 ppm), sugerem uma estrutura cetohexapiranósica.

O valor da constante de acoplamento $^3J_{3,4}$ (10.6 Hz) indica a posição axial dos prótons H-3 e H-4, enquanto que o valor de $^3J_{4,5}$ (3.0 Hz) sugere a posição equatorial de H-5. Estes dados espectrais correspondem aos da literatura para a β -D-fructopirranose perbenzoilada (**191**) na conformação de cadeira $^2\text{C}_5$.²¹⁰



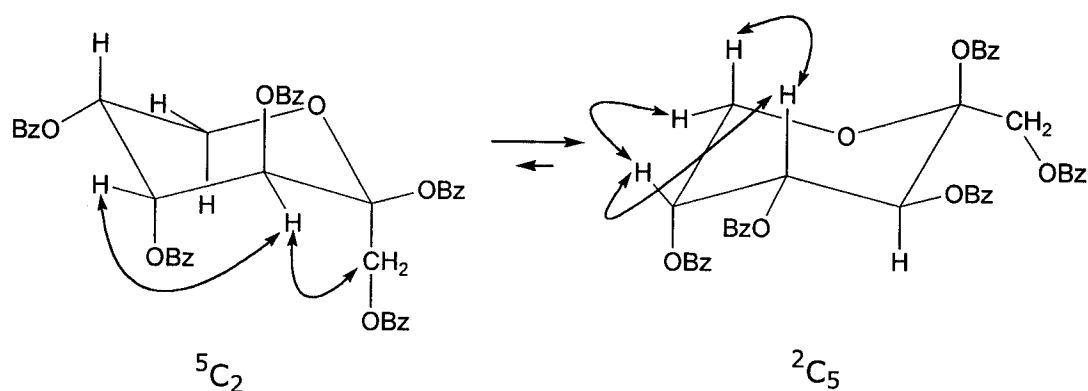


Figura II.53 – Interações relevantes no espectro NOESY de **191**.

II.6.1.3.2. 1,3,4,5-Tetra-O-benzoil-β-D-fructopiranosose (**192**)

Os espectros de ${}^1\text{H}$ e ${}^{13}\text{C}$ -RMN (Tabelas II.27 e II.28) de **192**, assim como os valores das constantes de acoplamento de próton, apresentam uma matriz semelhante ao composto anterior. As diferenças residem no deslocamento químico dos carbonos C-1 e C-2 para campo alto (desvios de 3.4 e 6.4 ppm, respectivamente), no deslocamento químico do próton H-1' para campo baixo ($\cong 1$ ppm), e no número de prótons aromáticos (20 H) provenientes da benzoilação, o que sugere uma estrutura de β-D-fructopiranosose com um dos hidroxilos não benzoilados. Esta hipótese foi confirmada pelo aparecimento no espectro de IV, de uma banda larga ν_{OH} a 3415 cm^{-1} .

A localização do grupo hidroxilo em C-2 é sugerida pelas variações atrás referidas, nos deslocamentos químicos de C-1 e C-2 relativamente aos do composto **191**, e ainda, pelo deslocamento para campo mais alto de H-1', o qual é justificado pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio deste próton com o grupo hidroxilo (Figura II.54).

Estes dados espectrais correspondem aos da literatura para a β-D-fructopiranosose tetrabenzoilada (**192**).²¹⁰

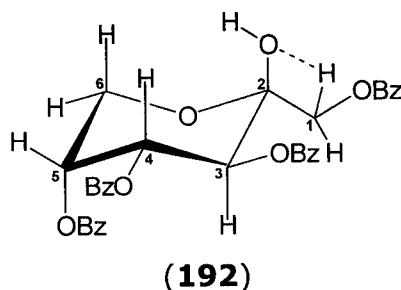


Figura II.54 – Pontes de hidrogénio de **192**.

As diferentes intensidades das interações registadas no espectro de NOESY de **192** ilustram mais uma vez o equilíbrio entre as conformações 2C_5 (conformação maioritária) e 5C_2 (Figura II.55).

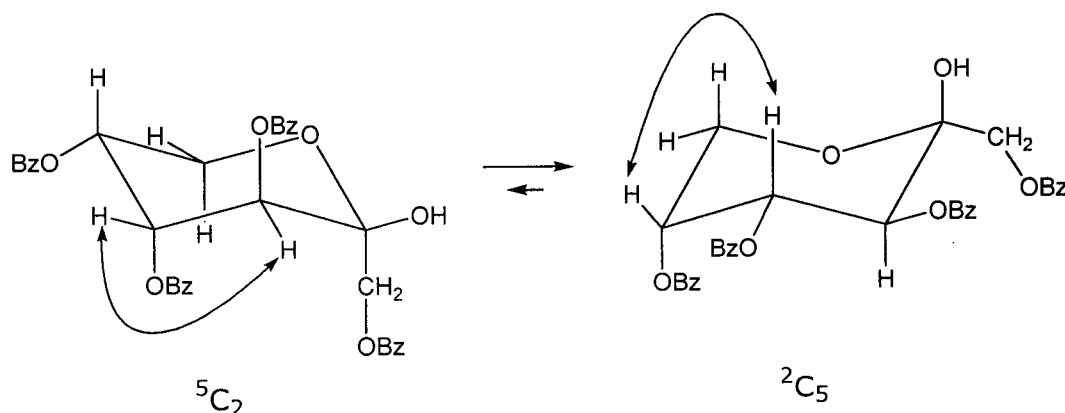


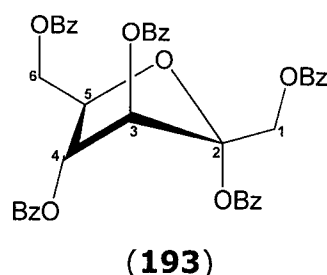
Figura II.55 – Interações relevantes no espectro NOESY de **192**.

II.6.1.3.3. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- α -D-fructofuranose (**193**)

A existência de acoplamento entre os prótons H-6/H-6' com o próton H-5 ($J_{6,5} = 5.0$, $J_{6',5} = 3.4$), assim como o deslocamento para campo alto de H-5 e para campo baixo de H-6/H-6' e do carbono anomérico (valor característico de cetofuranoses, $\delta_c > 104$ ppm), em relação aos compostos anteriores, sugerem uma estrutura cetohexafuranósica.

Os valores das constantes de acoplamento ${}^3J_{3,4}$ (2.4 Hz) e ${}^3J_{4,5}$ (4.2 Hz) são característicos de anómeros α de derivados furanósicos da frutose,^{210,211} o que, para o composto **193**, corresponde à α -D-fructofuranose pentabenzoilada na

conformação preferencial de envelope E_2 , cujos dados espectrais se encontram publicados na literatura.²¹⁰



As interações registadas no espectro de NOESY ilustram que esta conformação é maioritária relativamente à conformação E_5 , com a qual se encontra em equilíbrio (Figura II.56).^{210,212,213}

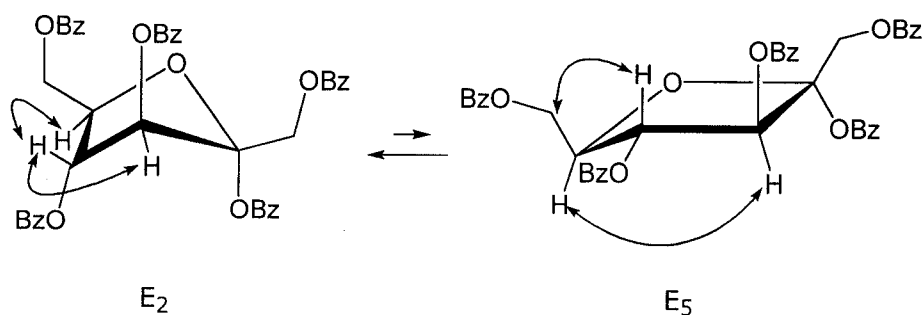
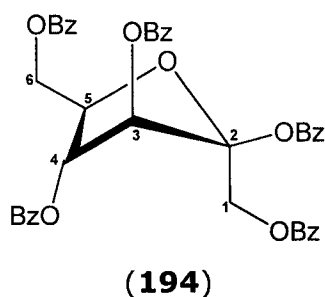


Figura II.56 – Interações relevantes no espectro NOESY de **193**.

II.6.1.3.4. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoíl- β -D-fructofuranose (**194**)

Os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN (Tabelas II.27 e II.28) de **194**, apresentam uma matriz semelhante ao composto anterior, em que a diferença principal reside no valor da constante de acoplamento $^3J_{3,4}$ (6.9 Hz), característico de anómeros β de derivados furanósicos da frutose,^{210,211} o que, para o composto **194**, corresponde à estrutura da β -D-fructofuranose pentabenzóilada na conformação torcida 4T_3 , cujos dados espectrais se encontram publicados na literatura.²¹⁰



A diferença de intensidades das interações registadas no espectro de NOESY permitem, mais uma vez, diferenciar as duas conformações em equilíbrio, 4T_3 (conformação maioritária) e 3T_4 (Figura II.57).

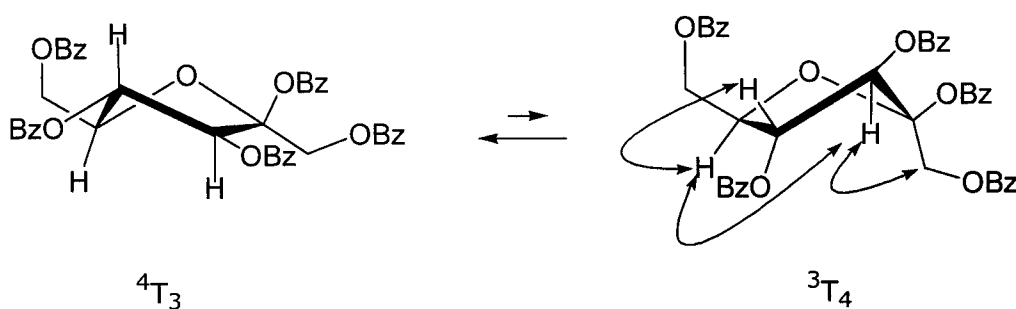


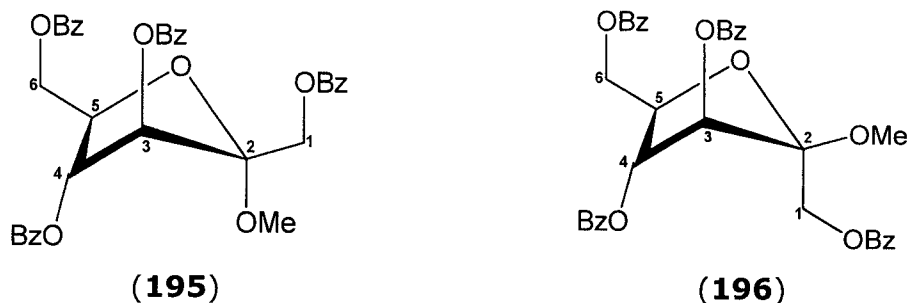
Figura II.57 – Interações relevantes no espectro NOESY de **194**.

II.6.1.3.5. Metil-1,3,4,6-tetra-*O*-benzoíl- α,β -*D*-fructofuranosido (**195** e **196**)

A presença de uma mistura de dois compostos (**195** e **196**) na fracção F3.2 do HPLC (III.17.2, pg. 238) é ilustrada pela presença, no espectro de ${}^{13}\text{C}$ -RMN, de dois carbonos anoméricos a δ 104.2 e 103.4 ppm. Os espectros de RMN da mistura inseparável (Tabelas II.27 e II.28) apresentam uma matriz furanósica semelhante à dos compostos **193** e **194**, mas em que um dos grupos benzoatos é substituído por um metoxi, identificável pela presença de um singuleto a δ_{H} 3.46, o qual, no espectro de HMQC, correlaciona com dois carbonos (δ_{C} 48.9 e 49.9 ppm) correspondentes aos dois anómeros.

O espectro de massa de **195/196** regista um pico a m/z 579 resultante da fragmentação $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$.

A correlação no espectro de HMBC entre o grupo metoxi e o carbono C-2, assim como os valores das constantes de acoplamento, idênticas para os dois compostos (Tabela II.27), sugerem a seguinte mistura de anômeros da fructofuranose:



O espectro de NOESY, devido à sobreposição de sinais, apenas permite verificar o *noe* do grupo metoxi do anômero β , com o próton H-4, a δ 5.93 ppm, o que possibilita a diferenciação de sinais entre os anômeros. Um vez identificados os sinais dos prótons relativos aos dois anômeros, a proporção destes (α -18% + β -82%) foi calculada a partir da integração no espectro de ^1H -RMN.

Os valores das constantes de acoplamento permitem, à semelhança dos compostos anteriores, sugerir a conformação em envelope E_2 para o anômero α e a conformação torcida 4T_3 para o anômero β (confirmado por NOESY), como as conformações preferenciais.

Os valores de ^1H - e ^{13}C -RMN da mistura de compostos **195** e **196** correspondem aos da mistura de metil-1,3,4,6-tetra-*O*-benzoíl- α,β -D-fructofuranósido, sintetizada a partir da D-fructose.²¹¹ Até à data, não há registo da ocorrência destes compostos de origem natural.

A confirmação das estruturas de **195** e **196** foi feita por comparação com os análogos sintéticos.

II.6.1.3.5.1. Síntese da mistura de metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)

A síntese da mistura metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructo-furanósido a partir da D-fructose foi efectuada de acordo com o método de Bouali *et al.*²¹¹. O primeiro passo consiste na benzoilação dos grupos hidroxilo 1,3,4 e 6 da D-fructose, com temperatura e duração reaccional controlada para evitar a pentabenoilação, e o segundo passo envolve a metilação do grupo hidroxilo em C-2 através da reacção de Mitsunobu (Figura II.58).²¹⁴ Os compostos **195** e **196**, numa mistura inseparável são caracterizados por ^1H - e ^{13}C -RMN.

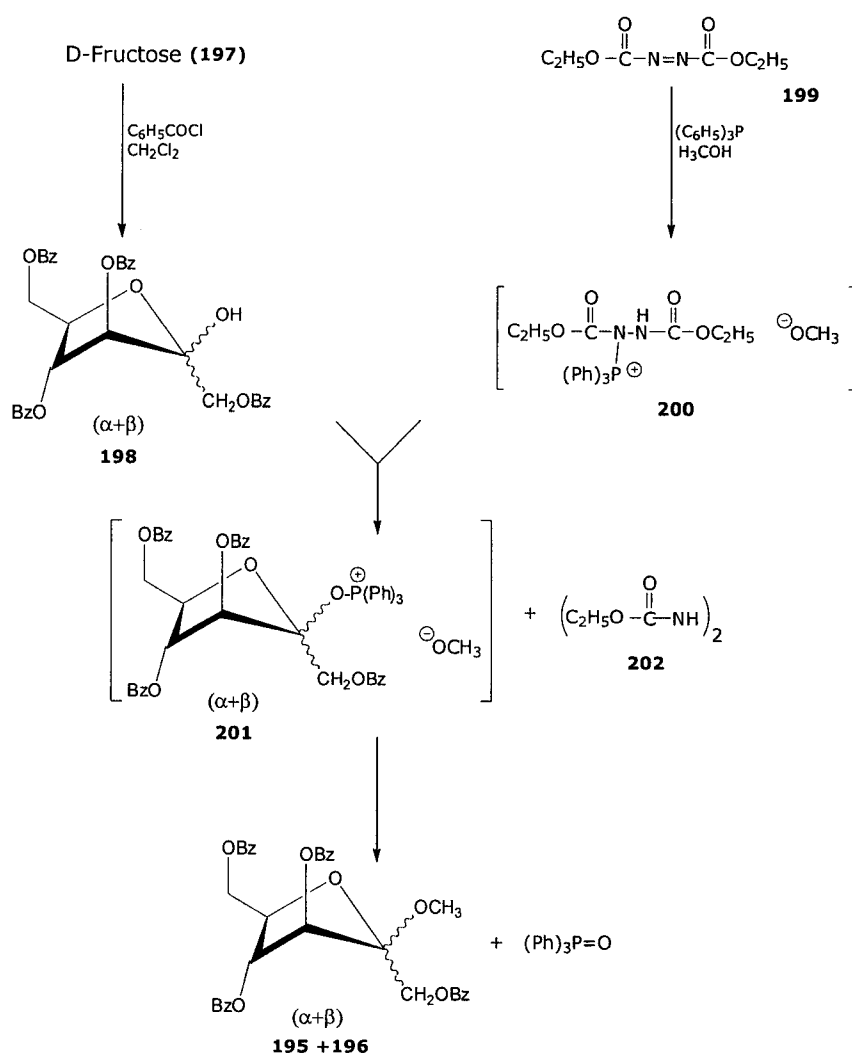


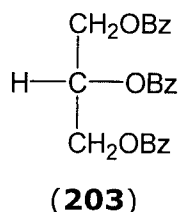
Figura II.58 – Síntese da mistura de metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranósido (**195** e **196**).

II.6.1.4. Trioses e tetroses benzoíadas

II.6.1.4.1. 1,2,3-Tri-O-benzoílglicerol (**203**)

O espectro de ^1H -RMN de **203** apresenta dois duplos dupletos simétricos a δ 4.70 (2H, $J = 11.9$) e δ 4.76 ppm (2H, $J = 4.4$), atribuíveis a dois grupos metilénicos simétricos (δ_{C} 62.9 ppm) acoplados a um protão metino a δ 5.84 ppm (δ_{C} 69.7 ppm).

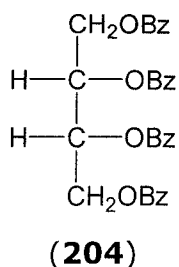
Estes dados, a par da existência de quinze protões aromáticos no espectro de ^1H -RMN e do valor nulo da rotação óptica, indicam que a estrutura de **203** corresponde ao 1,2,3-tri-O-benzoílglicerol, descrito na literatura.²¹⁵



II.6.1.4.2. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl-D-eritritol (**204**)

Os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN são semelhantes ao do composto anterior, à excepção do número de protões metino (2H) e do aumento do número de protões aromáticos para vinte, o que sugere um composto com quatro grupos hidroxilo.

A existência de dois carbonos a δ 62.7 e 70.1 ppm, correlacionados, respectivamente, com os quatro protões metilénicos e com os dois protões metinos, associados ao valor nulo da rotação óptica, sugerem um composto simétrico, cuja estrutura corresponde ao 1,2,3,4-tetra-O-benzoíl-D-eritritol (**204**), descrito na literatura.²¹⁵



II.6.2. Quantificação dos açúcares livres por HPLC

Uma vez caracterizados os açúcares da mistura benzoílada, procedeu-se à sua quantificação através de HPLC dos açúcares livres, com detecção por índice de refração (III.17.4, pg. 254)(Figura II.59 e Tabela II.29). A identificação foi feita por co-injecção com padrões comerciais de Glicerol, D-Eritritol, D-Xilose, D-Arabinose, D-Fructose, e D-Glucose, e ainda, uma amostra de metil α , β -fructofuranosido, obtido pela desbenzoilação do metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α , β -D-fructofuranosido com metóxido de sódio em THF.²¹⁶

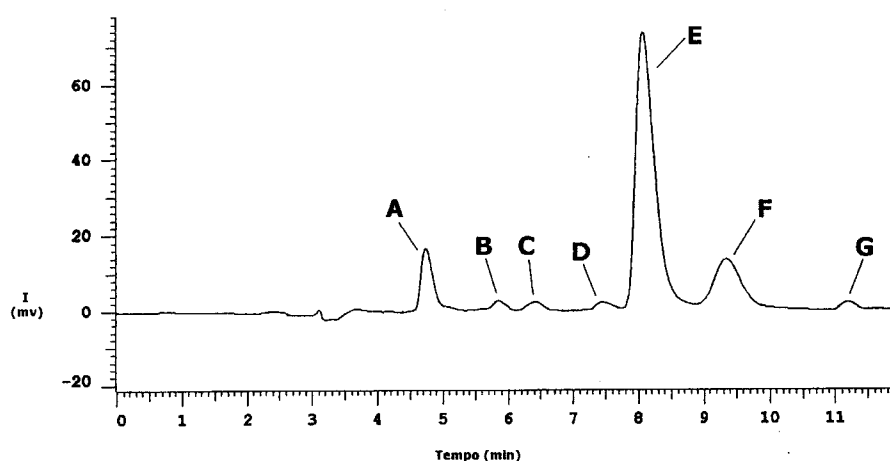


Figura II.59 – Cromatograma da separação dos açúcares livres por HPLC, com coluna Lichrosorb NH₂ (250 mm x 4 mm, 5 μ m), detecção por índice de refração, fluxo 1 mL/min, eluente CH₃CN/H₂O (80:20).

Tabela II.29 – Tempos de retenção dos açúcares livres em HPLC.

	Com Hosto	Tempo de retenção (min.)	Área (%)
A	Glicerol	4.72	9.1
B	D-Eritritol	5.81	0.3
C	D-Xilose	6.33	0.2
D	D-Arabinose	7.42	0.3
E	D-Fructose	8.02	73.4
F	D-Glucose	9.29	16.4
G	2-Metoxi- α , β -fructofuranosido	11.14	0.3

A existência de D-frutose nos açúcares livres dos troncos do *S. latifolius*, sugere que as fructopiranoses (**191** e **192**) e as fructofuranoses (**193** a **196**) correspondem a produtos da benzoílação, uma vez que a acilação da D-frutose é fortemente dependente das condições reaccionais.^{210,211,217} No caso específico da benzoílação com cloreto de benzoílo/piridina, Lichtenthaler *et al.* refere a formação de seis derivados (Figura II.60):²¹⁰ o tetrabenzoato β -D-fructopiranosídeo (**192**), os tetrabenzoatos α e β -D-fructofuranósídeo (**206** e **207**), o pentabenzoato β -D-fructopiranosídeo (**191**), o pentabenzoato α -D-fructofuranósídeo (**193**) e o pentabenzoato aciclíco (**205**).

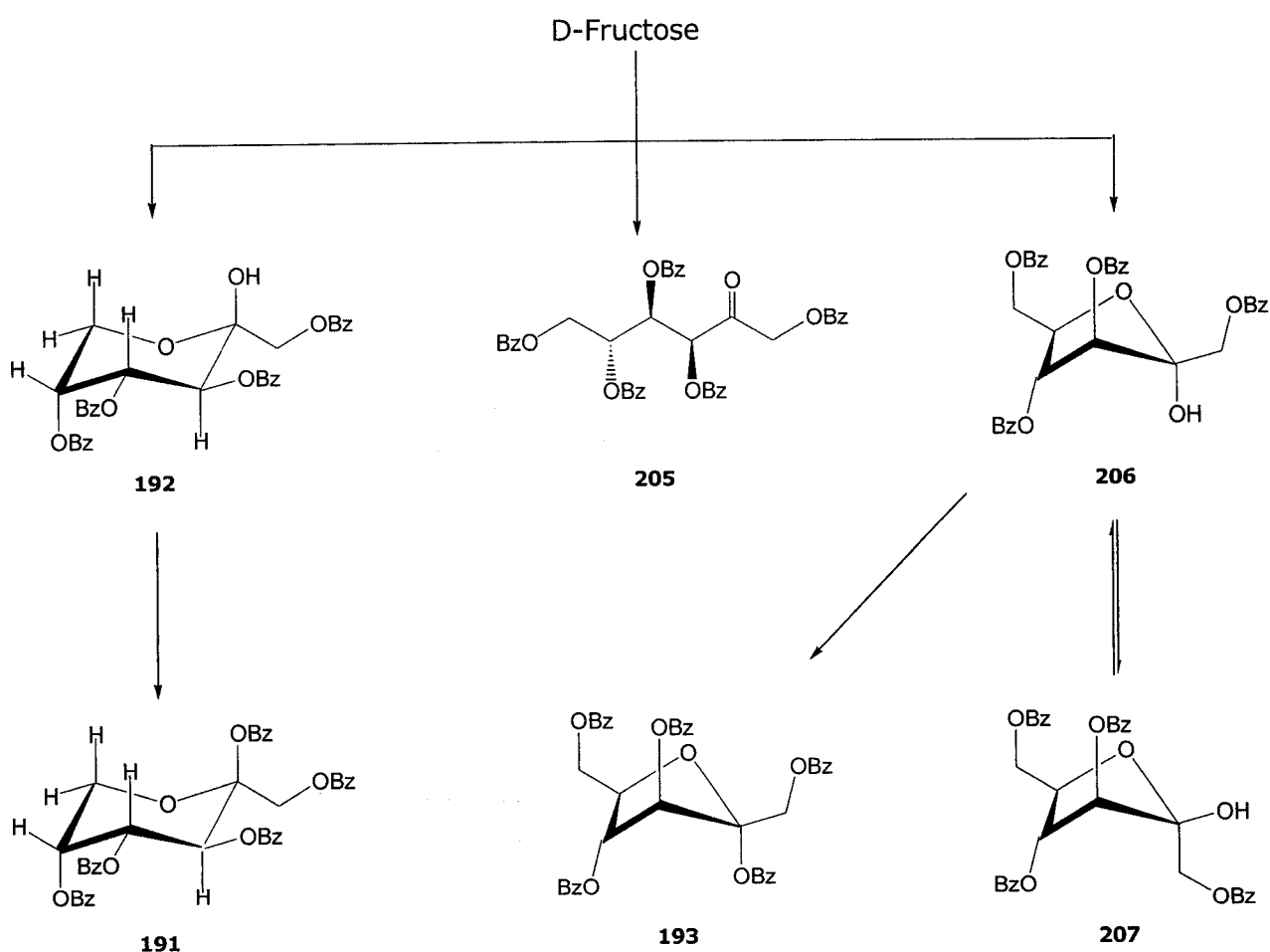


Figura II.60 – Derivados benzoíladados da D-frutose obtidos por reacção de benzoílação com cloreto de benzoílo e piridina.

A quantidade e a natureza destes benzoatos é função da temperatura de reacção: a -10°C obtém-se um elevado rendimento de **192** ($\eta > 80\%$); à temperatura ambiente obtém-se maioritariamente uma mistura de **191**, **192**,

205 e **206**; e a 60°C a mistura maioritária passa a ser constituída por **193**, **205** e **206**.

Nas condições experimentais da benzoílação usadas nesta dissertação (III.17.2, pg. 238), para além da formação de **191**, **192** e **193**, formou-se ainda o pentabenoato β -D-fructofuranósido (**194**), que não foi detectado no trabalho de Lichtenthaler *et al.*.

II.7. Actividade biológica dos extractos e de compostos do *Sarcocephalus latifolius*

A avaliação da actividade biológica dos extractos de *S. latifolius*, foi efectuada em colaboração com a empresa farmacêutica 'Analyticon, A.G.' de Berlim e com o Instituto de Farmácia II da Universidade Livre de Berlim.

A avaliação da actividade antibiótica dos extractos foi efectuada com as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Tabela II.30).²¹⁸

Tabela II.30 – Actividade antimicrobiana dos extractos do *S. latifolius*.

Parte da planta	Microorganismos*																				
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Raiz	0	0	8	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tronco	0	0	9	9	0	0	0	0	0	8	0	0	8	8	0	0	0	10	0	0	0
Folhas	0	0	8	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0
Penicilina G**	0	0	0	0	0	0	0	0	37	37	40	40	31	31	22	22	-	-	-	-	-
Nistatina**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	14	0	0

* - 1. *Escherichia coli*; 2. *Pseudomonas aeruginosa*; 3. *Klebsiella pneumoniae*; 4. *Citrobacter freundii*; 5. *Staphylococcus aureus*; 6. *Streptococcus pyogenes*; 7. *Listeria monocytogenes*; 8. *Bacillus subtilis*; 9. *Candida albicans*; 10. *Aspergillus niger*

A – Zonas de inibição (mm) com concentrações dos extractos de 1 mg/mL.

B – Zonas de inibição (mm) com concentrações dos extractos de 5 mg/mL.

** – Padrões de controlo.

Os extractos da raiz do *S. latifolius* revelaram actividade antibiótica para *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*, os extractos do tronco para *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*, e os extractos das folhas para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*.

A actividade antitumoral foi avaliada contra o carcinoma escamoso (KB), melanoma (SK-Mel 28), carcinoma do pulmão (A 549) e carcinoma da mama (MDA-MB 231) (Tabela II.31).²¹⁸

Tabela II.31 – Actividade antitumoral dos extractos do *S. latifolius*.

Parte da planta	Tumores DL ₅₀ (µg/mL)			
	KB	SK-MEL 28	A-549	MDA-MB 231
Raiz	*	*	*	21.1
Tronco	*	*	*	*
Folhas	19.7	32.8	29.9	*

* valores de DL₅₀ >> 20 µg/mL

O extracto das folhas é activo para o carcinoma escamoso, melanoma e carcinoma do pulmão, enquanto que o extracto das raízes é activo apenas para o carcinoma da mama.

A actividade antiplasmódica da estrictosamida foi avaliada contra as estirpes de *Plasmodium falciparum* K1 e *Plasmodium falciparum* NF54, tendo sido encontrados valores de DL₅₀ de 0.45 e 0.37 µg/ml, respectivamente.^{17,219}

A avaliação da actividade leishmanicida da estrictosamida e do glucósido do β-sitosterol foi efectuada com amastigotos intracelulares de *Leishmania donovani* e promastigotos extracelulares de *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum*, e *L. enrietti*, (Tabela II.32).²²⁰

Tabela II.32 – Actividade antileishmania da estrictosamida e do glucósido do β -sitosterol.

Microorganismos	Isotionato de pentamidina*	Anfoterici-na B*	DL ₅₀ (μ g/mL)	
			Estrictosamida	Glucósido do β -sitosterol
<i>L. donovani</i> , intracelular	0.276	0.252	> 50.00	5.870
<i>L. donovani</i> , extracelular	0.265	0.029	30.57	0.251
<i>L. major</i> , extracelular	0.132	0.028	> 50.00	0.306
<i>L. infantum</i> , extracelular	0.252	0.038	> 50.00	0.238
<i>L. enrietti</i> , extracelular	0.152	0.023	> 50.00	0.468
RAW-Macrófagos (não infectados)	--	--	> 50.00	8.190

* – Padrões de controlo.

O glucósido do β -sitosterol revelou actividade antileishmania para os bioensaios com os promastigotos extracelulares da *L. donovani* e *L. infantum*, enquanto que a estrictosamida não revelou actividade.

Na determinação da toxicidade para o crustáceo *Artemia salina* Leach foram testados os extractos etanólicos, neutro, básico e ácido das folhas, assim como a estrictosamida e o glucósido do β -sitosterol, cujos resultados foram negativos.²²¹⁻²²³

II.8. Actividade biológica descrita na literatura, de outros metabolitos isolados do *Sarcocephalus latifolius*

Para além da strictosamida e do glucósido do β -sitosterol, a actividade biológica de outros compostos isolados do *S. latifolius* neste trabalho, está descrita na literatura.

A estigmast-4-en-3-ona (**171**) revelou-se como agente hipoglicémico²²⁴ e com efeitos antieméticos.²²⁵

O lupeol (**175**) revelou actividade citotóxica sobre células tumorais, Hep-G2, A-431 e H-4IIE, por inibição da topoisomerase II,²²⁶ e actividade protectora contra a nefrotoxicidade induzida por cádmio,²²⁷ revelando ainda actividade anti-inflamatória,²²⁸ antiurólítica,²²⁹ anti-artrítica.²³⁰

O lupeol e o ácido betulínico (**176**) revelaram potencial actividade alelopática sobre as plantas dicotiledóneas.²³¹

O ácido betulínico e seus derivados revelaram-se como potentes agentes inibidores da replicação do vírus HIV-1.²³²⁻²³⁷ O ácido betulínico induziu a apoptose do neuroblastoma^{238,239} e melanoma humano,²⁴⁰⁻²⁴² além de revelar actividade anti-inflamatória²⁴³ e antimalária.²⁴⁴

A meleína (**183**), produzida por fungos, é usada por estes como atractor de insectos, sendo considerada uma feromona.^{245,246}

A escopoletina (**184**), revelou actividade fungicida,²⁴⁷⁻²⁵¹ e hepatoprotectiva.²⁵²

II.9. Conclusões

O estudo fitoquímico dos extractos etanólicos das raízes, troncos e folhas, da planta medicinal *Sarcocephalus latifolius*, originária da Guiné-Bissau, conduziu ao isolamento e identificação dos novos alcalóides, 19-*O*-etilangustolina (**159**), do grupo piridino-indolo-quinolizidinona, 21-*O*-metilestrictosamida (**161**) e 21-*O*-etilestrictosamida (**162**), do grupo oxoioimbano, e ainda:

- dos alcalóides do género *Nauclea*, angustina (**1**), angustolina (**4**), angustidina (**6**), nauclefina (**7**), naucleidinal (**39**), 19-*epi*-naucleidinal (**40**) e strictosamida (**28**);
- dos triterpenos β -sitosterol (**146**), glucósido do β -sitosterol (**163**), estigmast-4-en-3-ona (**171**), lupeol (**175**), ácido betulínico (**176**), 3- β -*O*- β -D-fucopiranosídeo do ácido quinóvico (**178**), e 3- β -*O*- α -L-ramnopiranosídeo do ácido quinóvico (**136**);
- das cumarinas, (R)-(-)-meleína (**183**) e escopoletina (**184**);
- e do composto fenólico, 3,4-dimetoxibenzoato de metilo (**185**).

A elucidação estrutural dos alcalóides foi feita por meios espectroscópicos, com recurso extensivo a técnicas de ressonância magnética nuclear bidimensionais. A determinação da configuração absoluta da angustolina, desconhecida até à data, foi conseguida pelo método de resolução parcial de Horeau, modificado para HPLC. A correlação das curvas de dispersão óptica rotatória da angustolina e da 19-*O*-etilangustolina, permitiu deduzir a configuração absoluta em C-19 deste novo alcalóide.

Os desvios químicos de ^{13}C -RMN da angustidina foram pela primeira vez atribuídos, e corrigiram-se e completaram-se os da nauclefina, previamente publicados na literatura.⁹⁵

A 21-*O*-metilestrictosamida e 21-*O*-etilestrictosamida são dois derivados *O*-alquilados da aglicona da strictosamida, da qual não há registo da sua ocorrência como produto natural. Se bem que, no que respeita à biossíntese, estes compostos possam ter resultado da hidrólise enzimática da strictosamida e posterior alquilação, não excluimos a possibilidade de serem artefactos formados no decorrer do processo de extracção com etanol em meio básico ou ácido, e do fraccionamento cromatográfico com metanol. A mesma questão colocou-se em

relação à 19-O-etilangustolina, o primeiro derivado O-alkilado da angustolina isolado do *Sarcocephalus* sps. No entanto, em ensaios realizados com a strictosamida e a angustolina dissolvidas em metanol e etanol, e nas mesmas condições de pH usadas na extracção, não se detectaram, por ccd, vestígios dos compostos **159**, **161** e **162**.

A strictosamida é o principal constituinte dos extractos do *S. latifolius*, e trata-se seguramente do alcalóide de estrutura desconhecida referido por Silva et al., isolado do infuso da raiz desta espécie originária da Guiné-Bissau, e responsável pela sua actividade farmacodinâmica.¹² Também os efeitos farmacológicos dos extractos na neuro-transmissão purinérgica da vesícula de rato, referidos por Udoh, poderão ter origem na acção deste metabolito.¹⁵

Por outro lado, a actividade antiplasmódica que encontramos para a strictosamida, sugere que esta constitui o princípio activo dos extractos aquosos da *Nauclea latifolia*, usados no tratamento da malária na medicina tradicional africana.¹⁷ Ainda em relação à actividade antiparasitária deste alcalóide, não dispomos de dados que nos permitam apontá-lo como o responsável da actividade tripanocida dos extractos etanólicos,¹⁶ sendo que, para a *Leishmania*, a strictosamida não revelou actividade.

Os triterpenos, glucósido do β -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, lupeol, ácido betulínico, e 3- β -O- β -D-fucopiranosídeo do ácido quinóico, foram isolados e identificados pela primeira vez do *Sarcocephalus* sps. A par dos métodos espectroscópicos, a caracterização estrutural do glucósido do β -sitosterol e da estigmast-4-en-3-ona foi feita por correlação química com análogos hemissintéticos.

O glucósido do β -sitosterol revelou actividade leishmanicida nos bioensaios com promastigotos extracelulares da *L. donovani* e *L. infantum*.

Os restantes metabolitos, (R)-(-)-meleína, escopoletina, e 3,4-dimetoxi-benzoato de metilo, são também aqui referidos pela primeira vez no *Sarcocephalus* sps. A presença da meleína, previamente isolada de fungos e insectos, sugere uma possível contaminação da planta.

Foi também determinada a composição em ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos, tendo sido identificados por GC-MS os ácidos mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico, esteárico, palmitoleico, oleico e linoleico.

Finalmente, para o mesmo extracto, foi estudada a composição qualitativa e quantitativa em açúcares. No primeiro caso, recorreu-se ao isolamento por HPLC com detector de DAD, dos derivados benzoíladados, técnica que se revelou particularmente eficaz e de excelente resolução. A caracterização dos benzoatos foi conseguida por RMN mono e bidimensional, tendo-se identificado o glicerol, D-eritrol, D-glucose, D-xilose, D-arabinose, D-fructose e 2-metoxi- α,β -fructofuranósido, este último, aqui identificado pela primeira vez como um produto natural.

A análise quantitativa, feita por HPLC dos açúcares livres, com detecção por índice de refração, revelou a fructose como o constituinte maioritário do extracto (73.4 %). A identificação dos açúcares foi conseguida por co-injecção com padrões, dos quais, o 2-metoxi- α,β -fructofuranósido foi obtido por hemissíntese.

III – PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Aparelhagem e condições experimentais

Os pontos de fusão (Pf) foram determinados num microscópio Reichert de placa aquecida Köfler e não são corrigidos.

Os valores de rotação óptica específica ($[\alpha]_D^t$) foram determinados num polarímetro Perkin Elmer 241 MC, estando indicado em cada caso o solvente utilizado.

Os espectros de infravermelho (IV) foram registados num espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier, Perkin Elmer 157G, em pastilha de brometo de potássio (KBr) ou em filme (NaCl).

Os espectros de ultravioleta (UV) foram registados num espectrómetro Milton Roy Spectronic 1201, estando indicado em cada caso o solvente utilizado.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN), mono e bi-dimensionais, foram registados a 400 MHz (^1H) e a 100.61 MHz (^{13}C), num espectrómetro Brücker ARX-400. O tetrametilsilano foi utilizado como padrão interno (referência zero), salvo especificações em contrário apresentadas no texto. Os solventes usados foram o deuterochloroformio, o hexa-deuterodimetilsulfóxido, o metanol deuterado e a hexa-deuterodimetilcetona. Os dados obtidos são indicados em valores de desvio químico (δ , em p.p.m.); a intensidade relativa é indicada pelo número de prótons (H); as multiplicidades são indicadas por s (singuleto), sl (singuleto largo), d (duplete), t (tripleto), q (quadruplete) e m (multiplete); as constantes de acoplamento são indicadas em Hertz (Hz).

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) analítica foi efectuada num aparelho Spectra Physics 100, equipado com detector de UV, usando um injector Rheodyne 7725 e num aparelho D-7000 Merck, equipado com detectores de DAD L-7450 A e índice de refração L-7490, usando um injector Rheodyne 7725 I, ambos com 'loop' de 20 μL .

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) semi-preparativa foi efectuada num aparelho D-7000 Merck, equipado com detectores de DAD L-7450 A e de índice de refração L-7490, usando um injector Rheodyne 7725 I, com 'loop' de 200 μL .

A cromatografia gás-líquido (GC) foi efectuada num Shimadzu 14-A e num Carlo Erba GC 6000 Veja Series 2, ambos equipados com detector de ionização de chama (FID).

A cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), foi realizada num espectrómetro de massa Kratos MS25RF (sistema de tratamento de dados MASPEC II) acoplado ao cromatógrafo Carlo Erba HRGC-MS, com ionização por impacto electrónico (EI) a 70 eV.

Os espectros de massa obtidos por impacto electrónico (EIMS), a 70 eV, foram registados num espectrómetro Shimadzu QP-1000 EX.

Os espectros de massa HREIMS/HRFABMS foram obtidos num espectrómetro de massa Finnigan MAT 711.

Os espectros de massa FABMS foram obtidos num espectrómetro de massa Kratos MS25RF (sistema de tratamento de dados MASPEC II) com ionização por bombardeamento atómico rápido (FAB) a 6.0 KV e 0,1 mA de corrente iónica.

Os espectros de massa HRCIMS foram obtidos num espectrómetro de massa Finnigan MAT 95, com a temperatura da fonte de ionização a 150°, com acelerador da voltagem de 5 KV e usando como gás de arraste CH₄ com 4% de NH₃.

A cromatografia de baixa pressão (LPLC), foi efectuada em colunas Michel-Miller, com sílica Merck Lichroprep Si-60. A fase móvel foi bombeada através de uma bomba Fluid Metering QSY (fluxo máximo de 15 mL/min) e a detecção de UV efectuada a 254 nm por um detector Isco UA-6.

Na cromatografia em coluna de fase normal e de fase reversa, foi usada sílica gel 60 de 70-230 'mesh' (Merck) e Lichroprep RP-18 de 40-63 µm (Merck), respectivamente.

A cromatografia de 'flash' foi efectuada com sílica gel 60 de 230-400 'mesh' (Merck), salvo especificação em contrário.

A cromatografia de exclusão molecular foi efectuada com Sephadex Lipophilic LH-20 (Sigma).

Na cromatografia de camada preparativa (ccp) utilizaram-se placas de sílica Merck 60 F₂₄₅ de 0.5, 1.0 e 2.0 mm de espessura.

Na cromatografia de camada delgada de alta resolução (HPTLC), utilizaram-se placas de HPTLC-NH₂ Merck de 0.25 mm de espessura.

Na cromatografia de camada delgada (ccd) utilizaram-se placas de sílica gel Merck 60 F₂₄₅ de 0.25 mm de espessura. A composição das fracções recolhidas em cromatografia e a evolução das reacções foi seguida por ccd, indicando-se os eluentes na proporção usada (v:v).

A revelação das placas de ccd foi efectuada por 'spray' de:

H₂SO₄

Mistura de partes iguais de ácido sulfúrico (95%) e metanol.
Revelação por aquecimento até visualização das manchas.

Iodo

O iodo é disperso em sílica gel num copo fechado onde são imersas as placas para revelação.

Ácido fosfomolibdico²⁵³

Solução de 10% de ácido fosfomolibdico em etanol.
Revelação por aquecimento até visualização das manchas.

Para a detecção específica de alcalóides a revelação das placas de ccd foi efectuada por 'spray' de:

Dragendorff²⁵³

Solução A: 1.7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água.

Solução B: 16 g iodeto de potássio em 40 mL de água.

Solução C: Mistura de igual volume da solução A e B.

Solução 'spray': 10 mL da solução C, numa solução de 10 g de ácido tartárico em 50 mL de água.

Van Urk's^{254,255}

Solução de 1.0 g de p-dimetilaminobenzaldeído em 50 mL de HCl (conc.) e 50 mL de etanol.

Van Urk's / Salkowski^{254,255}

Solução A: 1.0 g de p-dimetilaminobenzaldeído em 50 mL de HCl (conc.) e 50 mL de etanol.

Solução B: 2.03 g de cloreto de ferro (III) hexa-hidratado em 500 mL de água e 300 mL de ácido sulfúrico (97%).

Solução 'spray': Mistura das soluções A e B na proporção de 1 para 3, respectivamente.

Para a detecção específica de açúcares a revelação das placas de ccd foi efectuada por 'spray' de:

1-naftol²⁵³

Mistura de 10.5 mL de uma solução a 15% de 1-naftol em etanol, 6.5 mL de ácido sulfúrico (97%), 40.5 mL de etanol e 4 mL de água.

Revelação por aquecimento até visualização das manchas.

As 'acetilações nas condições habituais' foram efectuadas adicionando em excesso uma mistura de volumes iguais de piridina seca e anidrido acético à substância a acetilar, decorrendo a reacção sob agitação magnética à temperatura ambiente. No final adicionou-se água gota a gota, e a piridina foi removida por sucessivas adições de tolueno seguidas de evaporação a pressão reduzida. O resíduo obtido foi eluído por cromatografia de coluna de fase normal de sílica gel 60, com o eluente indicado para cada caso.

As 'metilações nas condições habituais' foram efectuadas dissolvendo a substância a metilar em éter etílico (adicionando metanol se necessário para a dissolução completa), seguindo-se a adição de diazometano até que termine a libertação gasosa e persista a coloração amarela. A solução obtida foi evaporada à secura a pressão reduzida. A purificação dos produtos finais é efectuada por cristalização ou cromatografia de coluna de fase normal de sílica gel 60, com o eluente indicado para cada caso.

O diazometano usado em metilações foi obtido por dissolução de 2.14 g de N-metil-N-nitrosotolueno-p-sulfonamida em 30 mL de éter etílico, seguida da adição em banho de gelo duma solução de 0.4 g de hidróxido de potássio em

10 mL de etanol (96%). Após 5 minutos destila-se a mistura etérea que contém o diazometano.

A nomenclatura dos produtos naturais isolados é a usual de acordo com a bibliografia existente, e que por vezes coincide com a nomenclatura IUPAC. Nos casos em que a situação atrás descrita não se verifica é apresentado entre parêntesis o nome IUPAC de acordo com as recomendações de 1993.

III.2. Material

A colheita da planta (*Sarcocephalus latifolius*) estudada foi realizada em Janeiro de 1994, em Contuboel, Guiné-Bissau, a qual foi identificada no Herbário do Centro Botânico (LISC), onde foi depositado um espécime.

A colheita foi dividida em três grupos, troncos, folhas e raízes.

III.3. Extracção

Os troncos do *Sarcocephalus latifolius*, depois de secos e finamente pulverizados (680 g), foram extraídos em Soxhlet com etanol (95%, 4L), durante 48 horas a refluxo, obtendo-se 110.00 g de um resíduo castanho, que foi posteriormente lavado com n-hexano (3L) (Tabela III.1). Da referida lavagem obtiveram-se 1.94 g de extracto hexânico. Após a extracção em Soxhlet, seguiu-se a maceração dos troncos com 5L de etanol/amónia (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com ácido acético a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L). Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 3.00 g de extracto etanólico básico. Os troncos foram ainda extraídos por maceração com 5L de etanol/ácido acético (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com amónia (27%) a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L). Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 0.35 g de extracto etanólico ácido (Tabela III.1).

As folhas do *Sarcocephalus latifolius*, depois de secas e finamente pulverizadas (838 g), foram extraídas em Soxhlet com etanol (95%, 4L), durante 48 horas a refluxo, obtendo-se 107.00 g de um resíduo esverdeado, que foi posteriormente lavado com n-hexano (3L) (Tabela III.1). Da referida lavagem obtiveram-se 16.17 g de extracto hexânico. Após a extracção em Soxhlet, seguiu-se a maceração das folhas com 5L de etanol/amónia (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com ácido acético a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L). Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 1.25 g de extracto etanólico básico. As folhas foram ainda extraídas por maceração com 5L de etanol/ácido acético (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com amónia (27%) a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L). Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 1.07 g de extracto etanólico ácido (Tabela III.1).

As raízes do *Sarcocephalus latifolius*, depois de secas e finamente pulverizadas (1496 g), foram extraídas em Soxhlet com etanol (95%, 4L), durante 48 horas a refluxo, obtendo-se 133.00 g de um resíduo castanho, que foi posteriormente lavado com n-hexano (3L) (Tabela III.1). Da referida lavagem obtiveram-se 3.87 g de extracto hexânico. Após a extracção em Soxhlet, seguiu-se a maceração das raízes com 5L de etanol/ácido acético (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com amónia (27%) a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L). Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 5.60 g de extracto etanólico básico. As raízes foram ainda extraídas por maceração com 5L de etanol/amónia (10%) à temperatura ambiente durante 48 horas. O extracto resultante foi concentrado no evaporador rotativo e neutralizado com ácido acético a pH 7, sendo posteriormente extraído com clorofórmio (6 x 0.5L) Após a evaporação do clorofórmio obtiveram-se 1.82 g de extracto etanólico ácido (Tabela III.1).

Tabela III.1 - Extractos etanólicos (g) do *S. latifolius*

	Troncos	Folhas	Raízes
Extracto etanólico neutro	108.00	90.00	129.00
Extracto etanólico básico	3.00	1.25	1.82
Extracto etanólico ácido	0.35	1.07	5.60
Extracto hexânico	1.94	16.17	3.87

III.4. Isolamento dos produtos naturais

O isolamento dos produtos naturais, foi feito separadamente a partir dos extractos etanólicos neutro, básico e ácido, dos troncos, folhas e raízes da planta.

III.4.1. Extracto etanólico básico dos troncos

O extracto foi fraccionado por cromatografia de coluna 'flash',²⁵⁶ de sílica gel 60 desactivada a 10% com água, usando como eluente um gradiente de CHCl₃/MeOH (100:0 a 20:80). Os eluatos recolhidos foram reunidos em cinco fracções de polaridade crescente (F1 a F5) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando como eluentes, CHCl₃/MeOH (99:1, 95:5 e 90:10).

A fracção menos polar F1 (121 mg) foi eluída por LPLC, usando como eluentes CHCl₃/MeOH (99:1 e 95:5). Os eluatos recolhidos foram reunidos em duas fracções (F1.1 e F1.2) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando como eluentes, CHCl₃/MeOH (99:1 e 95:5). Das fracções F1.1 e F1.2, isolaram-se por ccp usando como eluente CHCl₃/MeOH (95:5), os compostos **159** (19-O-etilangustolina, 4 mg) e **1** (angustina, 15 mg), respectivamente.

A fracção F2 (500 mg) foi eluída por LPLC usando como eluente AcOEt. Os eluatos recolhidos foram reunidos em três fracções (F2.1, F2.2 e F2.3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando como eluentes, CHCl₃/MeOH (95:5 e 90:10). Das fracções F2.1, F2.2 e F2.3, isolaram-se por ccp usando como eluente CHCl₃/MeOH (90:10), os compostos **4** (angustolina, 45 mg), **6** (angustidina, 8 mg) e **7** (nauclefina, 12 mg), respectivamente.

As fracções F3, F4 e F5, de composição idêntica, foram reunidas (800 mg) e a fracção resultante eluída por cromatografia de coluna 'flash', usando como eluentes CHCl₃/MeOH (90:10, 80:20 e 70:30), de que resultou o isolamento do composto **28** (strictosamida, 85 mg), que foi purificado por ccp usando como eluente CHCl₃/MeOH (80:20).

Efectuou-se o HPLC dos alcalóides **1**, **4**, **6**, **7** e **159**, para posterior detecção dos mesmos noutros extractos (Figura III.1 e Tabelas III.2 e III.3).

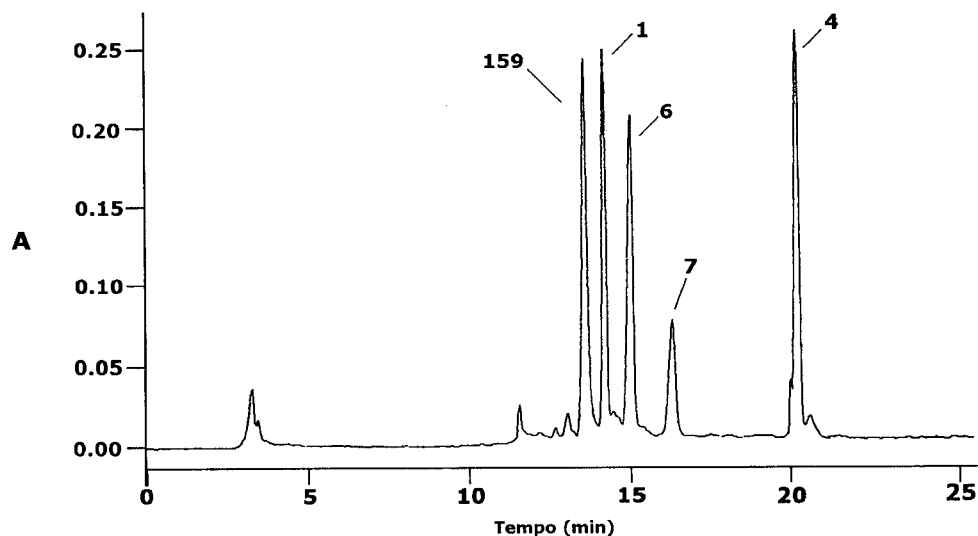


Figura III.1 - HPLC dos alcalóides **1**, **4**, **6**, **7** e **159**, com coluna Lichrospher Si60 (250 mm x 8 mm, 10 μ m), detecção a 275 nm, fluxo 6 mL/min, gradiente de Hexano/AcOEt.

Tabela III.2 - Gradiente de eluição (HPLC) dos alcalóides **1**, **4**, **6**, **7** e **159**.

t (min)	Hexano	AcOEt
0	90	10
10	80	20
35	80	20
40	60	40
44	50	50
48	90	10

Tabela III.3 - Tempos de retenção dos alcalóides **1**, **4**, **6**, **7** e **159**.

Alcalóide	Tempo de retenção (min.)
159	13.60
1	14.20
6	15.04
7	16.31
4	20.19

O esquema de separação do extracto etanólico básico dos troncos está representado na figura III.2.

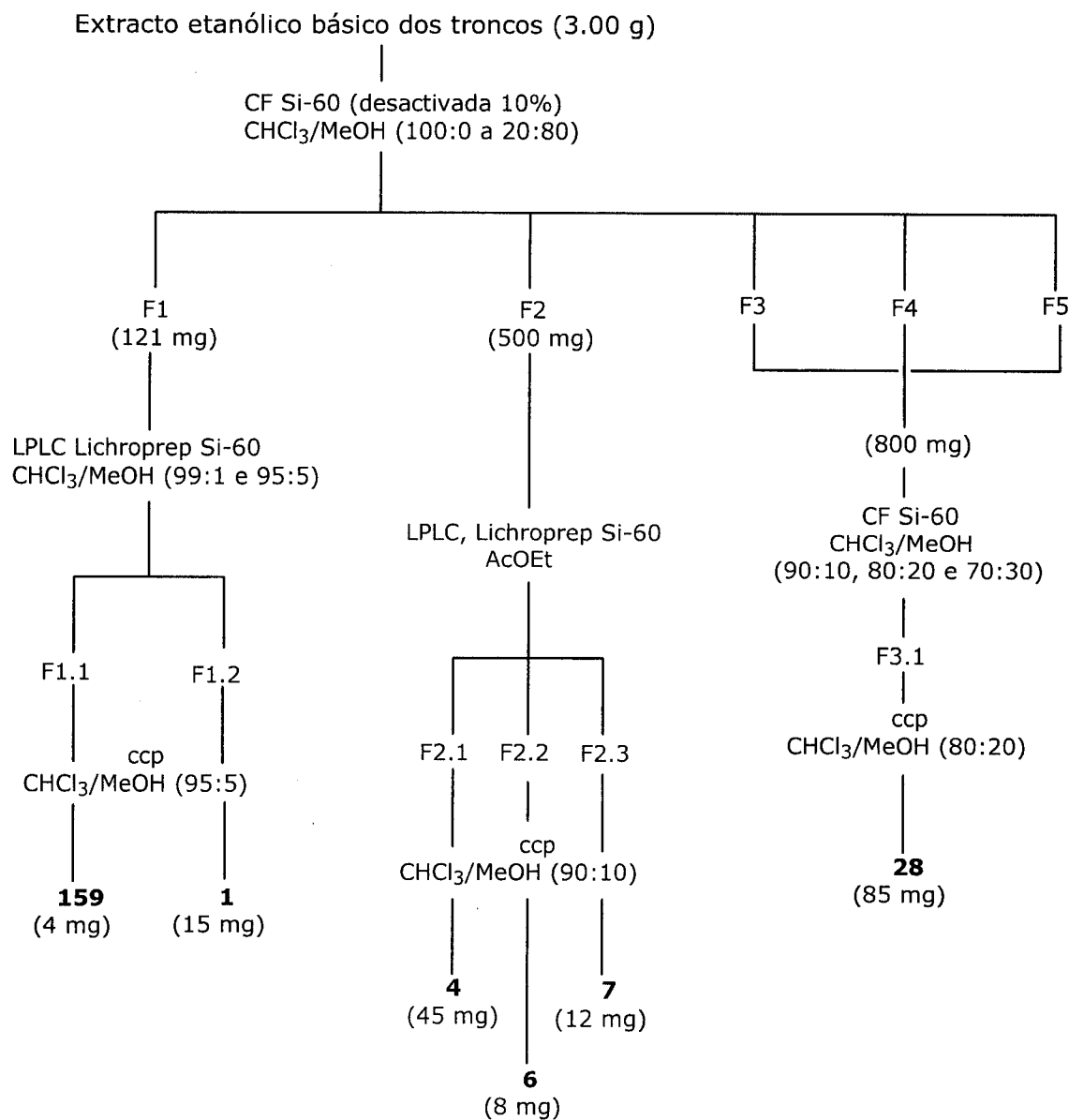


Figura III.2 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico dos troncos

III.4.2. Extracto etanólico ácido dos troncos

Devido à pequena quantidade deste extracto, as tentativas de isolamento de compostos revelaram-se infrutíferas, verificando-se apenas por ccd, usando os eluentes, CHCl₃/MeOH (99:1, 95:5, 90:10 e 80:20), a presença dos compostos previamente isolados do extracto etanólico básico.

III.4.3. Extracto etanólico neutro dos troncos

O extracto foi separado por cromatografia de coluna 'flash', em suporte de celite, usando como eluente um gradiente de CHCl₃/MeOH (100:0 a 20:80). Os eluatos recolhidos foram reunidos em três fracções (F1 a F3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando como eluentes, CHCl₃/MeOH (99:1, 95:5, 90:10 e 80:20).

A fracção F1 (7.6 g) apresentou a mesma composição da fracção hexânica de lavagem do extracto com hexano, pelo que foi adicionada a esta última.

A fracção F2 (1.9 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluentes THF/Hexano/CHCl₃/MeOH (22:38:22:18),^{77,78} tendo-se isolado o composto **163** (glucósido do β-sitosterol, 600 mg).

A fracção F3 (25 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de CHCl₃/MeOH (100:0 a 70:30). Os eluatos recolhidos foram reunidos em quatro fracções (F3.1 a F3.4) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando como eluentes, CHCl₃/MeOH (99:1, 95:5, 90:10 e 80:20). A fracção F3.1 (500 mg) foi eluída por cromatografia de coluna 'flash', usando como eluentes CHCl₃ e CHCl₃/MeOH (99:1), tendo-se obtido duas fracções, F3.1.1 (90 mg) e F3.1.2 (380 mg). A fracção F3.1.1 foi separada por ccp, usando como eluente CHCl₃, da qual se isolaram os compostos **183** (meleína, 16 mg), **185** (3,4-dimetoxibenzoato de metilo, 12 mg) e **171** (estigmast-4-en-3-ona, 20 mg). A fracção F3.1.2 foi eluída por ccp, usando como eluente AcOEt, da qual se isolaram os compostos **175** (lupeol, 60 mg) e **146** (β-sitosterol, 200 mg). A fracção F3.2 (1.7 g) foi eluída por cromatografia de coluna 'flash', usando como eluentes CHCl₃ e CHCl₃/MeOH (97.5:2.5), da qual se obtiveram três fracções, F3.2.1 (260 mg), F3.2.2 (380 mg) e F3.2.3 (300 mg) de polaridade

crescente. A fracção F.3.2.1 foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), de onde se obtiveram três fracções, que continham os compostos **176** (ácido betulínico, 40 mg), **184** (escopoletina, 25 mg) e **39** (naucleidinal, 35 mg), respectivamente. O composto **176** foi purificado através de dois desenvolvimentos sucessivos em ccp, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (80: 20). O composto **184** foi purificado por ccp, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5). O composto **39** foi purificado por ccp, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20). A fracção F.3.2.2 foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (80:20), de onde se obtiveram duas fracções, em que a menos polar continha uma mistura de ácidos gordos (80 mg), e a mais polar o composto **40** (19-*epi*-naucleidinal, 15 mg). O composto **40** foi purificado por ccp, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10). Da fracção F.3.2.3 foi isolado por ccp, o composto **7** (nauclefina, 30 mg), usando como eluente AcOEt/MeOH (95:5). A fracção F3.3 (3.6 g) foi purificada por cromatografia de coluna de Sephadex LH-20, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20), da qual se obteve o composto **28** (strictosamida, 1.3 g). A fracção F3.4 (7.2 g) foi solubilizada em 500 mL de água e filtrada numa coluna de celite, sendo de seguida concentrada por evaporação e separada por cromatografia de coluna de fase reversa, usando como eluentes, água e MeOH. Por HPTLC-NH₂, verificou-se que a fracção aquosa continha uma mistura de açúcares livres (3.7 g).

O esquema de separação do extracto etanólico neutro dos troncos está representado na figura III.3.

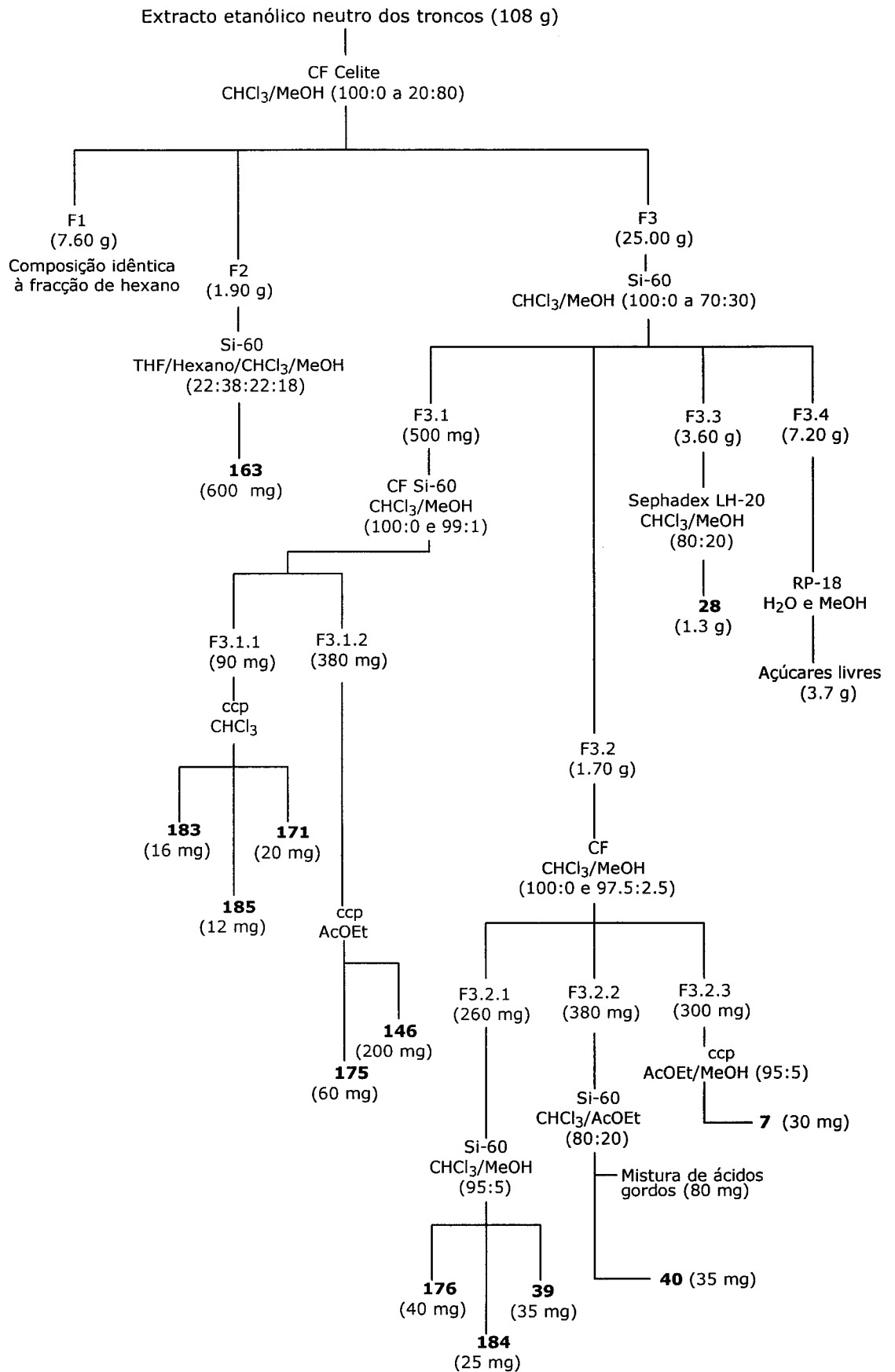


Figura III.3 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico neutro dos troncos

III.4.4. Extracto etanólico básico e ácido das folhas

Por ccd, usando diferentes sistemas de eluentes, como CHCl_3 /Hexano (50:50), CHCl_3 e CHCl_3 /MeOH (95:5, 90:10 e 80:20), verificou-se que os extractos etanólicos básico e ácido, apresentavam a mesma composição, pelo que se optou proceder ao seu tratamento conjunto.

O extracto conjunto (2.2 g) foi fraccionado por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluentes CHCl_3 /Hexano (50:50), CHCl_3 e CHCl_3 /MeOH (98:2, 95:5, 90:10 e 80:20). Os eluatos foram reunidos em três fracções (F1 a F3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando o mesmo sistema de eluentes do fraccionamento.

A fracção F1 (860 mg) foi separada por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente CHCl_3 /MeOH (95:5) e os eluatos foram reunidos em duas fracções (F1.1 e F1.2) de acordo com a sua composição verificada por ccd. A fracção F1.1 (150 mg) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente Hexano/AcOEt (60:40), da qual se isolou o composto **146** (β -sitosterol, 90 mg) e uma mistura de ácidos gordos (30 mg).

Da fracção F1.2 (240 mg), isolou-se por ccp, usando como eluente CHCl_3 /MeOH (95:5), o composto **184** (escopoletina, 45 mg).

Da fracção F2 (120 mg), isolou-se por ccp, usando como eluente AcOEt/MeOH (95:5), o composto **4** (angustolina, 10 mg).

Da fracção F3 (180 mg), isolou-se por ccp, usando como eluente CHCl_3 /MeOH (90:10), o composto **163** (glucósido do β -sitosterol, 10 mg).

O esquema de separação do extracto etanólico básico e ácido das folhas está representado na figura III.4.

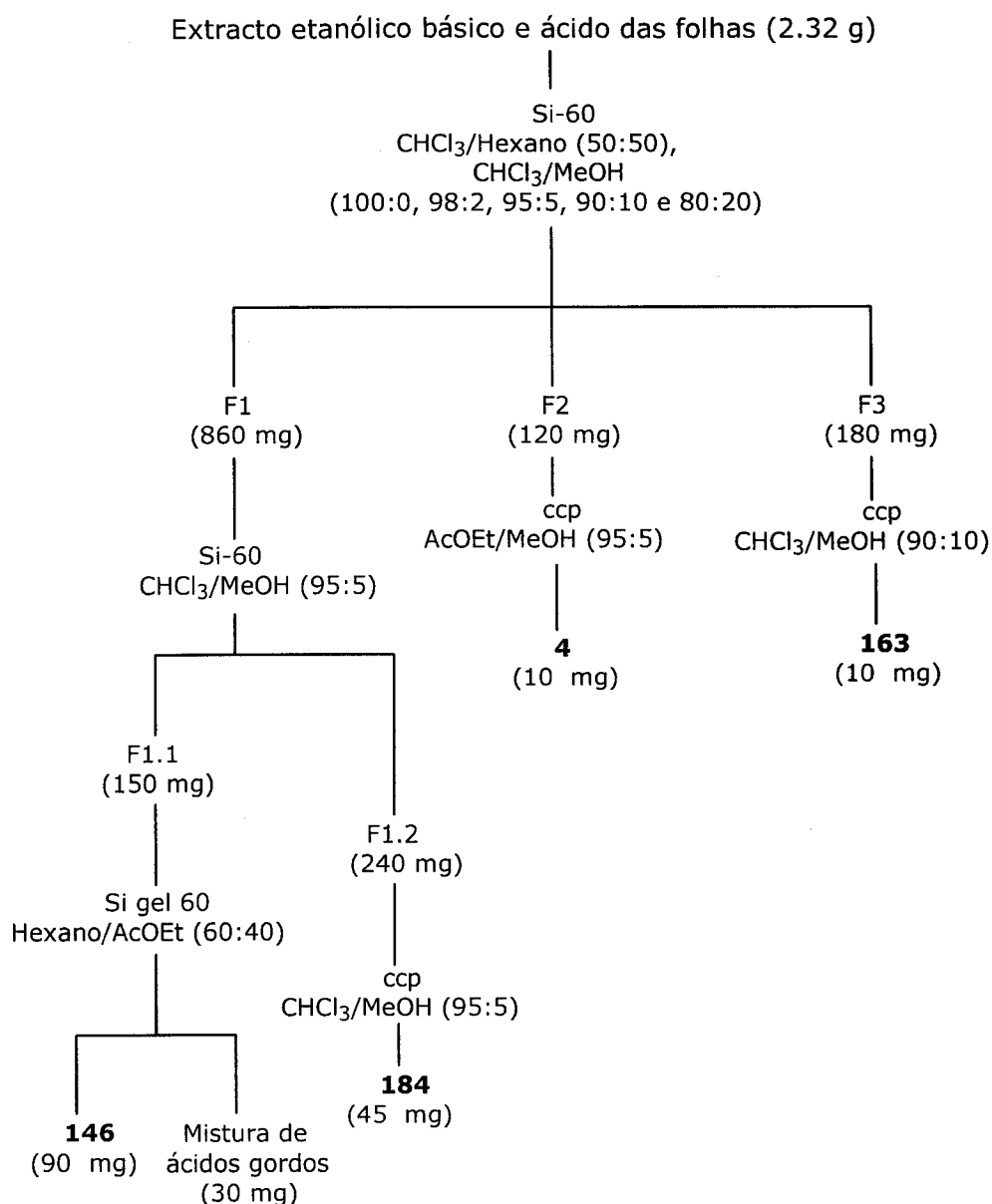


Figura III.4 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico e ácido das folhas

III.4.5. Extracto etanólico neutro das folhas

O extracto (90.00 g) foi fraccionado por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluentes Hexano, CHCl₃/Hexano (50:50), CHCl₃ e CHCl₃/MeOH (95:5 e 90:10). Os eluatos foram reunidos em três fracções (F1 a F3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando o mesmo sistema de eluentes de fraccionamento.

A fracção F1 (4.50 g) apresentou a mesma composição da fracção hexânica de lavagem do extracto com hexano, pelo que foi adicionada a esta última.

A fracção F2 (2.00 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de Hexano/Et₂O (90:10 a 0:100), da qual se isolou o composto **146** (β-sitosterol, 500 mg) e a uma mistura de ácidos gordos (250 mg).

A fracção F3 (16.00 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de CHCl₃/MeOH (100:0 a 80:20), da qual se isolou o composto **184** (escopoletina, 250 mg).

O esquema de separação do extracto etanólico neutro das folhas está representado na figura III.5.

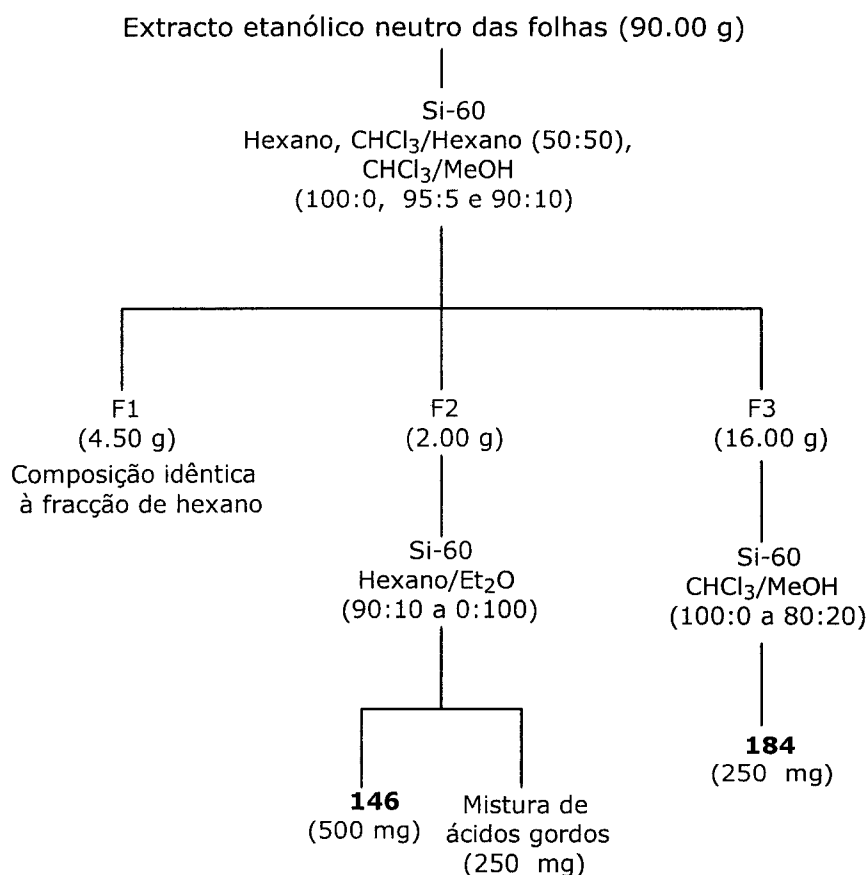


Figura III.5 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico neutro das folhas

III.4.6. Extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes

Os extractos etanólicos básico, ácido e neutro foram reunidos num só, já que apresentavam a mesma composição, verificada por ccd, usando como eluentes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0, 95:5, 90:10 e 80:20).

O extracto total (136.00 g), foi fraccionado por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 a 20:80). Os eluatos recolhidos foram reunidos em três fracções (F1 a F3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando o mesmo sistema de eluentes e fraccionamento.

A fracção F1 (5.00 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente CHCl_3 , da qual resultaram duas fracções, F1.1 e F1.2. Da fracção menos polar, F1.1 (1.10 g), isolou-se o composto **146** (β -sitosterol, 260 mg) por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente CHCl_3 . A fracção F1.2 (1.26 g), foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente Hexano/ Et_2O (60:40, 20:80 e 0:100). Os eluatos foram reunidos em três fracções (F1.2.1 a F1.2.3) de acordo com a sua composição verificada por ccd, usando o mesmo sistema de eluentes da cromatografia de coluna. Das fracções mais polares, F1.2.2 e F1.2.3., isolaram-se respectivamente o composto **184** (escopoletina, 40 mg) e uma mistura de ácidos gordos (200 mg). A fracção F1.2.1 (187 mg), foi eluída por ccp, através de duas eluições sucessivas com Hexano/ Et_2O (10:90), tendo-se isolado os compostos **161** (21-O-metil-strictosamida aglícica, 4 mg) e **162** (21-O-etilestrictosamida aglícica, 35 mg).

A fracção F2 (16.00 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 a 80:20), da qual resultaram duas fracções, F2.1 e F2.2. A fracção F2.1 (2.00 g), foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), donde resultaram seis fracções. As referidas fracções foram purificadas individualmente por ccp, com o eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5), de que resultou o isolamento, por ordem crescente de polaridade, dos compostos, **159** (19-O-etil-angustolina, 12 mg), **39** (naucleidinal, 103 mg), **40** (19-*epi*-naucleidinal, 60 mg), **1** (angustina, 42 mg), **4** (angustolina, 45 mg) e **6** (angustidina, 47 mg). A fracção F2.2 (1.50 g), foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10), da qual se isolou o composto **7** (nauclefina, 36 mg).

A fracção F3 (64.00 g) foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente um gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5 a 80:20), da qual resultaram duas fracções, F3.1 e F3.2. A fracção F3.1 (4.76 g), foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5 e 90:10), da qual se obtiveram 2.8 g duma mistura polar de compostos. Devido à impossibilidade de separação, optou-se por acetilar e posteriormente metilar nas condições habituais, 110 mg da referida mistura. O resíduo resultante foi eluído por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente Hexano/ Et_2O (40:60), do qual se obtiveram os compostos **179** (éster dimetílico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosídeo quinóvico, 42 mg) e **180** (éster dimetílico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosídeo quinóvico, 100 mg). A fracção F3.2 (56.00 g), foi eluída por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10 e 80:20), da qual se obteve o composto **28** (estrictosamida, 25 g). A purificação de **28** foi efectuada por HPLC em fase reversa, usando como eluentes $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50:50 a 0:100).

O esquema de separação do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes está representado na figura III.6.

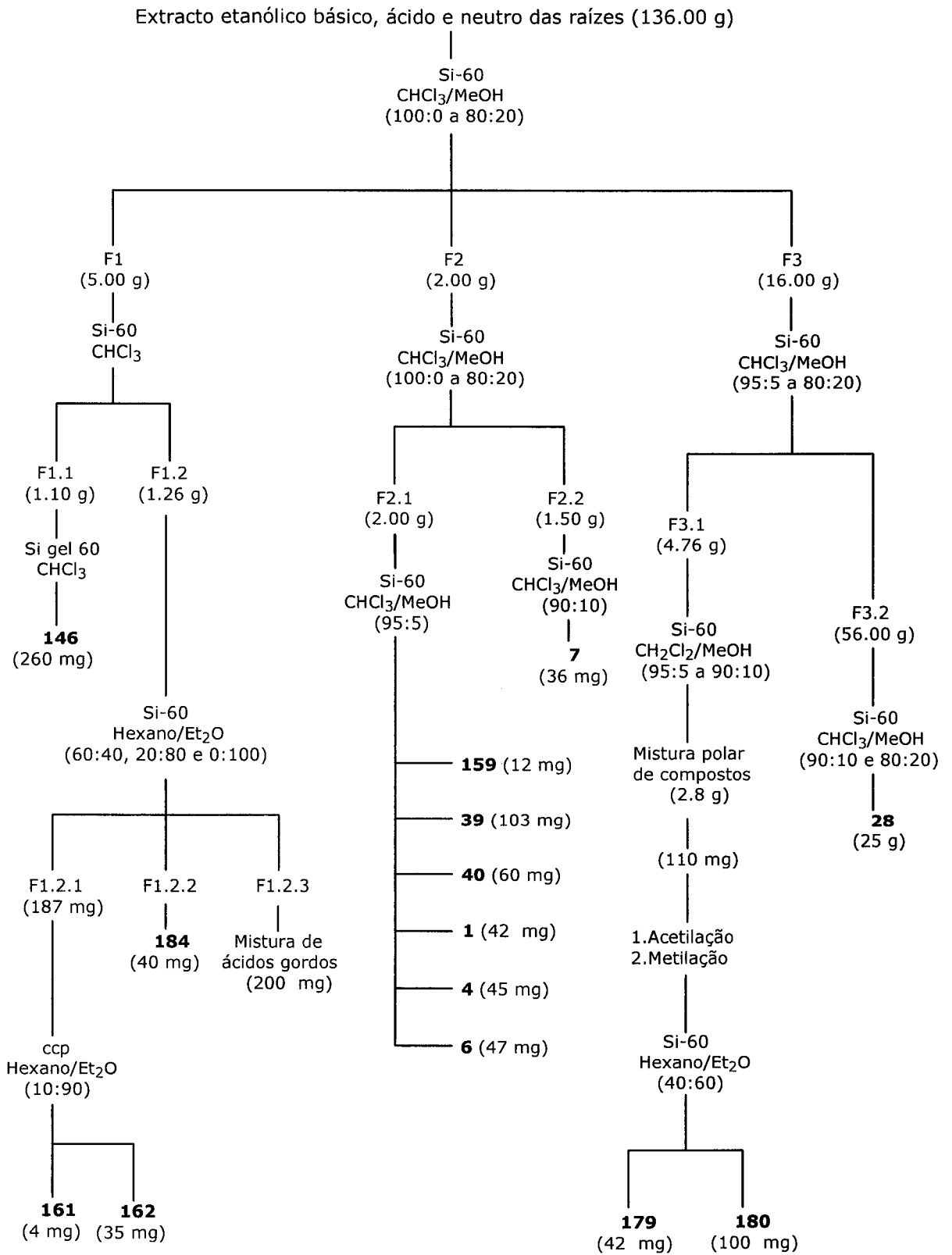


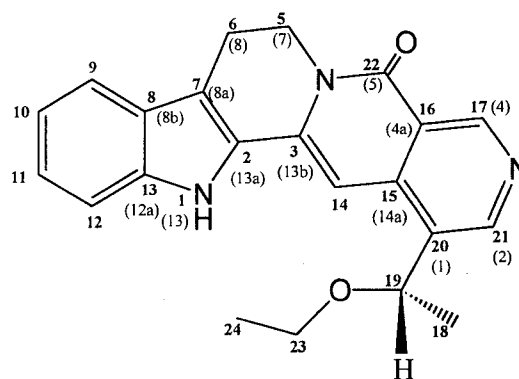
Figura III.6 – Esquema do fraccionamento do extracto etanólico básico, ácido e neutro das raízes.

III.5. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados

III.5.1. Alcalóides

III.5.1.1. 19-O-etilangustolina (159)

(1-[(1R)-1-etoxietil]-8,13-di-hidroindole[2',3':3,4]pirido[1,2-b][2,7]naftiridin-5(7H)-
-ona)



Pf 230-240°C

$[\alpha]_D^{25} -0.006^\circ$ (c 0.09, CHCl₃)

DOR: $[\phi]_{254} -1.0^\circ$, $[\phi]_{265} -1.7^\circ$, $[\phi]_{280} -1.1^\circ$, $[\phi]_{302} -3.5^\circ$, $[\phi]_{313} -5.2^\circ$,
 $[\phi]_{334} -2.4^\circ$, $[\phi]_{350} -0.4^\circ$, $[\phi]_{400} -1.5^\circ$, $[\phi]_{450} -1.8^\circ$, $[\phi]_{500} -0.7^\circ$.

HREIMS m/z (int. rel.): 359.16340 (16) [M⁺] (valor calculado 359.16338 para C₂₂H₂₁N₃O₂), 344.13971 (9) (valor calculado 344.13990 para C₂₁H₁₈N₃O₂), 315.13720 (100) (valor calculado 315.13710 para C₂₀H₁₇N₃O), 300.11364 (17) (valor calculado 300.11369 para C₁₉H₁₄N₃O), 286.09802 (8) (valor calculado 286.09804 para C₁₈H₁₂N₃O).

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3225, 2924, 2853, 1659, 1606, 1462, 1324, 1105, 743.

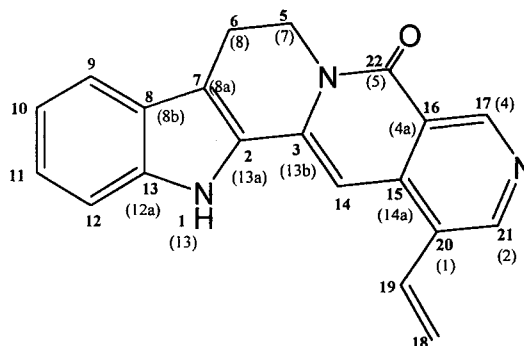
UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 247, 298, 374, 393.

^1H -RMN (400 MHz , DMSO- d_6) δ : 1.16 (3H, t, $J_{24,23} = 8.0$, H-24), 1.54 (3H, d, $J_{18,19} = 8.0$, H-18), 3.13 (2H, t, $J_{6,5} = 6.0$, H-6_a, H-6_b), 3.46 (2H, q, $J = 8.0$, H-23), 4.34 (1H, dd, $J_{5a,5b} = 13.6$, $J_{5a,6} = 6.8$, H-5_a), 4.44 (1H, dd, $J_{5b,5a} = 13.6$, $J_{5b,6} = 6.8$, H-5_b), 5.02 (1H, q, $J_{19,18} = 8.0$, H-19), 7.10 (1H, t, $J_{10,11} = 8.0$, H-10), 7.27 (1H, s, H-14), 7.29 (1H, t, $J_{11,10} = 8.0$, H-11), 7.49 (1H, d, $J_{12,11} = 8.0$, H-12), 7.63 (1H, d, $J_{9,10} = 8.0$, H-9), 8.66 (1H, s, H-21), 9.26 (1H, s, H-17), 11.82 (1H, s, NH).

^{13}C -RMN (100.61 MHz , DMSO- d_6) δ : 15.8 (C-24), 19.5 (C-6), 23.5 (C-18), 40.4 (C-5), 64.1 (C-23), 72.9 (C-19), 98.9 (C-14), 112.3 (C-12), 116.6 (C-7), 119.5 (C-16), 120.1 (C-9, C-10), 124.8 (C-11), 126.5 (C-8), 127.5 (C-2), 132.0 (C-20), 137.0 (C-3), 139.0 (C-13), 139.5 (C-15), 148.5 (C-21), 150.1 (C-17), 161.0 (C-22).

III.5.1.2. Angustina (1)

(1-vinil-8,13-di-hidroindole[2',3':3,4]pirido[1,2-b][2,7]naftiridin-5(7H)-ona)



Pf > 320°C

Pf lit.²³ > 283–284°C (decomp.); Pf lit.²⁴ > 320°C; Pf lit.⁷¹ > 340°C

Pf lit.⁸¹ > 350°C; Pf lit.¹⁰² > 300°C

IV ν $\overset{KBr}{\text{max}}$ cm^{-1} : 3224, 2922, 2851, 1644, 1601, 1529, 1468, 1399, 1321, 1148, 829, 817, 738.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 217, 254, 290, 300, 379, 397.

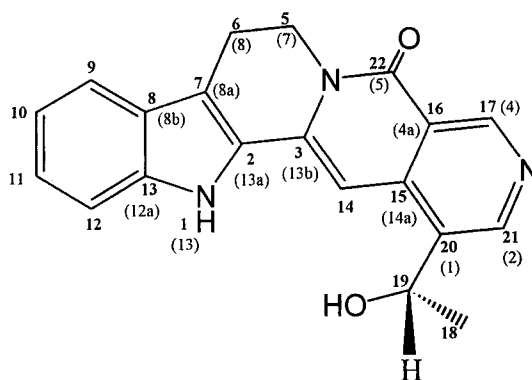
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.15 (2H, t, $J_{6,5} = 6.0$, H-6_a, H-6_b), 4.40 (2H, t, $J_{5,6} = 6.0$, H-5_a, H-5_b), 5.63 (1H, d, $J_{18a,19} = 10.8$, H-18_a), 6.06 (1H, d, $J_{18b,19} = 17.6$, H-18_b), 7.12 (1H, t, $J_{10,11} = 7.2$, H-10), 7.29 (3H, m, H-11, H-14, H-19), 7.47 (1H, d, $J_{12,11} = 8.0$, H-12), 7.63 (1H, d, $J_{9,10} = 8.0$, H-9), 8.87 (1H, s, H-21), 9.23 (1H, s, H-17), 11.81 (1H, s, NH).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, DMSO- d_6) δ : 19.2 (C-6), 40.4 (C-5), 93.8 (C-14), 112.0 (C-12), 114.8 (C-7), 119.8 (C-16, C-18), 119.9 (C-9, C-10), 124.6 (C-11), 125.5 (C-8), 126.8 (C-2), 127.8 (C-20), 130.2 (C-19), 136.9 (C-3), 138.5 (C-13), 139.0 (C-15), 147.7 (C-21), 149.7 (C-17), 161.1 (C-22).

EIMS m/z (int. rel.): 313 (100) [M^+ , $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$], 298 (29), 255 (13), 186 (26), 157 (21), 129 (56).

III.5.1.3. Angustolina (4)

(1-(1-hidroxietil)8,13-di-hidroindole[2',3':3,4]pirido[1,2-b][2,7]naftiridin-5(7H)-ona)



Pf 290–300°C

Pf lit.²⁴ 285°C; Pf lit.⁷¹ 310–314°C

$[\alpha]_D^{25} -0.04^\circ$ (c 0.1, CHCl_3)

lit.²⁴ $[\alpha]_{578}^{25} -31.5^\circ$ (c 1.1, piridina); lit.⁷¹ $[\alpha]_D -34.0^\circ$ (CHCl₃);

lit.²⁵ $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$

DOR: $[\phi]_{254} -0.8^\circ$, $[\phi]_{265} -1.9^\circ$, $[\phi]_{280} -1.3^\circ$, $[\phi]_{302} -2.1^\circ$, $[\phi]_{313} -4.7^\circ$,
 $[\phi]_{334} -1.8^\circ$, $[\phi]_{350} -0.4^\circ$, $[\phi]_{400} -1.5^\circ$, $[\phi]_{450} -1.8^\circ$, $[\phi]_{500} -0.7$.

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3368, 3280, 2921, 2851, 1670, 1604, 1527, 1495, 1326,
1232, 1117, 816, 744.

UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 227, 248, 288, 298, 373, 392.

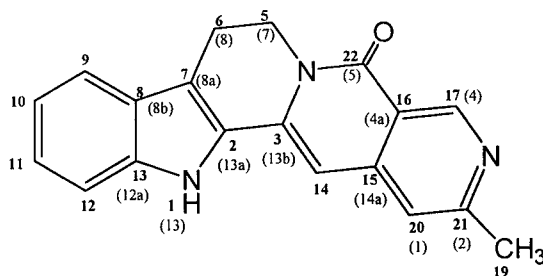
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.51 (3H, d, $J_{18,19} = 6.2$, H-18), 3.12 (2H, t, $J_{6,5} = 6.4$, H-6_a, H-6_b), 4.40 (2H, t, $J_{5,6} = 6.2$, H-5_a, H-5_b), 5.32 (1H, d, $J_{19,18} = 5.6$, H-19), 5.55 (1H, s, OH), 7.09 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.24 (1H, s, H-14), 7.27 (1H, t, $J_{11,10} = 7.6$, H-11), 7.48 (1H, d, $J_{12,11} = 8.0$, H-12), 7.62 (1H, d, $J_{9,10} = 8.4$, H-9), 8.77 (1H, s, H-21), 9.24 (1H, s, H-17), 11.87 (1H, s, NH).

¹³C-RMN (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 19.2 (C-6), 25.3 (C-18), 40.3 (C-5), 63.9 (C-19), 93.9 (C-14), 111.9 (C-12), 114.6 (C-7), 119.0 (C-16), 119.8 (C-10), 119.9 (C-9), 124.5 (C-11), 125.5 (C-8), 127.8 (C-2), 134.9 (C-20), 136.5 (C-3), 138.5 (C-13, C-15), 147.6 (C-21), 149.2 (C-17), 161.2 (C-22).

EIMS *m/z* (int. rel.): 331 (2) [M⁺, C₂₀H₁₇N₃O₂], 313 (42), 298 (1), 157 (3), 129 (12), 55 (100).

III.5.1.4. Angustidina (6)

(2-metil-8,13-di-hidroindole[2',3':3,4]pirido[1,2-b][2,7]naftiridin-5(7H)-ona)



Pf 300–308°C

Pf lit.⁷¹ 309–311°C; Pf lit.⁸¹ > 350°C; Pf lit.²⁵⁷ 300°C

IV ν $\frac{KBr}{max}$ cm^{-1} : 3321, 3235, 2923, 2853, 1713, 1651, 1615, 1598, 1537, 1464, 1414, 1236, 1154, 743.

UV λ $\frac{EtOH}{max}$ nm: 298, 369, 387.

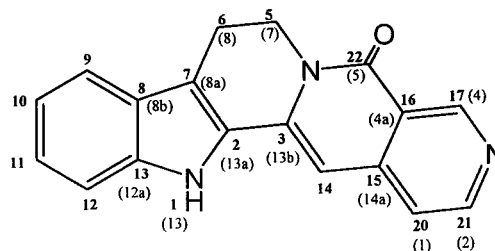
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.58 (3H, s, H-19), 3.11 (2H, t, $J_{6,5} = 6.5$, H-6_a, H-6_b), 4.38 (2H, t, $J_{5,6} = 6.8$, H-5_a, H-5_b), 6.94 (1H, s, H-14), 7.09 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.23 (1H, t, $J_{11,10} = 7.2$, H-11), 7.35 (1H, s, H-20), 7.45 (1H, d, $J_{12,11} = 8.4$, H-12), 7.62 (1H, d, $J_{9,10} = 8.0$, H-9), 9.21 (1H, s, H-17), 11.82 (1H, s, NH).

¹³C-RMN (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 19.3 (C-6), 24.3 (C-19), 40.3 (C-5), 97.0 (C-14), 112.0 (C-12), 114.6 (C-7), 117.2 (C-20), 119.7 (C-9), 119.9 (C-10, C-16), 124.4 (C-11), 125.5 (C-8), 127.7 (C-2), 137.0 (C-3), 138.5 (C-13), 141.9 (C-15), 145.0 (C-21), 150.2 (C-17), 160.2 (C-22).

EIMS m/z (int. rel.): 301 (97) [M^+ , C₁₉H₁₅N₃O], 300 (100), 286 (26), 270 (7), 257 (5), 243 (6), 230 (7), 217 (4), 204 (4), 194 (7), 177 (38), 150 (27), 115 (15).

III.5.1.5. Nauclefina (7)

(8,13-di-hidroindole[2',3':3,4]pirido[1,2-b][2,7]naftiridin-5(7H)-ona)



Pf 283–293°C

Pf lit.^{24,101} 285–290°C; Pf lit.²⁷ 292–294°C; Pf lit.⁸¹ 288–292°C

IV ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3345, 2923, 2851, 1713, 1651, 1609, 1535, 1455, 1326, 1178, 1042, 840, 730.

UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 259, 287, 371, 389.

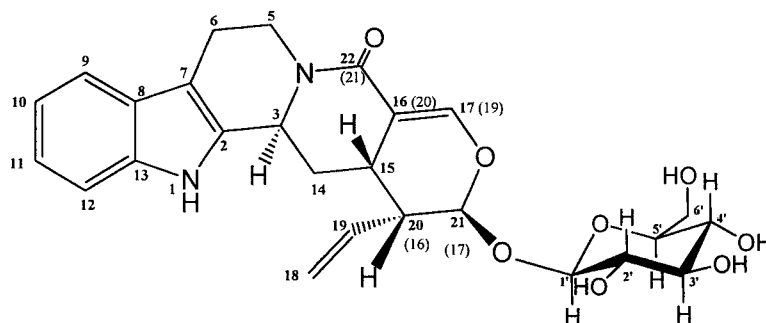
^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.13 (2H, t, $J_{6,5} = 6.8$, H-6_a, H-6_b), 4.40 (2H, t, $J_{5,6} = 6.8$, H-5_a, H-5_b), 7.02 (1H, s, H-14), 7.09 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.26 (1H, t, $J_{11,10} = 7.2$, H-11), 7.45 (1H, d, $J_{12,11} = 8.4$, H-12), 7.52 (1H, d, $J_{20,21} = 5.6$, H-20), 7.63 (1H, d, $J_{9,10} = 8.0$, H-9), 8.66 (1H, d, $J_{21,20} = 4.8$, H-21), 9.32 (1H, s, H-17), 11.80 (1H, s, NH).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 19.3 (C-6), 40.3 (C-5), 97.0 (C-14), 112.0 (C-12), 114.8 (C-7), 119.0 (C-16, C-20), 119.7 (C-9), 119.9 (C-10), 124.5 (C-11), 125.4 (C-8), 127.6 (C-2), 137.2 (C-3), 138.6 (C-13), 141.6 (C-15), 150.5 (C-17), 151.0 (C-21), 161.1 (C-22).

EIMS m/z (int. rel.): 287 (94) [M^+ , $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$], 286 (92), 272 (23), 257 (15), 229 (11), 222 (9), 203 (6), 177 (9), 151 (15), 143 (27), 129 (25), 122 (19), 115 (36), 31 (100).

III.5.1.6. Estrictosamida (28)

(3 α ,15 β ,16 β ,17 α)-21-oxo-16-vinil-19,20-di-hidro-oxoimban-17-ilo- β -D-glucopiranosido



$[\alpha]_D^{25} -65.2^\circ$ (c 0.23, MeOH)

lit.⁴⁷ $[\alpha]_D -61.0^\circ$ (c 2.10, piridina); lit.⁴⁹ $[\alpha]_D^{22} -67.5^\circ$ (c 0.53, MeOH);

lit.⁷⁴ $[\alpha]_D -33.0^\circ$ (c 0.17, MeOH); lit.¹¹⁵ $[\alpha]_D -118.0^\circ$ (c 2.80, MeOH)

Pf 200-202 °C

Pf lit.⁴⁷ 178-182°C; Pf lit.⁵⁰ 200-203°C; Pf lit.⁷⁴ 200°C

Pf lit.¹¹⁵ 201-202°C;

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 2930, 2850, 1651, 1580, 1434, 1304, 1076, 1016, 894, 829, 745.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 223, 279, 286.

^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.98 (1H, dt, $J_{14a,14b}=J_{14a,15} = 13.8$, $J_{14a,3} = 5.8$, H-14_a), 2.43 (1H, d, $J_{14b,14a} = 13.8$, H-14_b), 2.61-2.69 (2H, m, H-6_a, H-20), 2.77 (1H, m, H-15), 2.91-2.98 (1H, m, H-6_b), 2.96 (1H, t, $J_{2',3'} = 8.5$, H-2'), 3.03 (1H, dt, $J_{5a,5b} = 12.2$, $J_{5a,6b} = 4.0$, H-5_a), 3.16-3.30 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 3.62 (1H, dd, $J_{6'a,6'b} = 11.7$, $J_{6'a,5'} = 5.3$, H-6'_a), 3.83 (1H, dd, $J_{6'b,6'a} = 11.7$, $J_{6'b,5'} = 1.6$, H-6'_b), 4.56 (1H, d, $J_{1',2'} = 7.9$, H-1'), 4.91 (1H, dd, $J_{5b,5a} = 12.5$, $J_{5b,6b} = 5.2$, H-5_b), 4.97 (1H, m, H-3), 5.30 (1H, dd, $J_{18a,19} = 10.5$, $J_{18a,18b} = 1.6$, H-18_a), 5.35 (1H, dd, $J_{18b,19} = 17.5$, $J_{18b,18a} = 1.6$, H-18_b), 5.39 (1H, d, $J_{21,20} = 1.8$, H-21), 5.69 (1H, dt, $J_{19,18b} = 17.5$, $J_{19,18a} = 10.5$, H-19), 6.98 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.07 (1H, t, $J_{11,10} = 7.6$, H-11), 7.32 (1H, d, $J_{12,11} = 7.6$, H-12), 7.35 (1H, d, $J_{9,10} = 7.6$, H-9), 7.37 (1H, d, $J_{17,15} = 2.0$, H-17).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CD_3OD) δ : 22.4 (C-6), 25.2 (C-15), 27.6 (C-14), 45.0 (C-5, C-20), 55.3 (C-3), 62.9 (C-6'), 71.7 (C-4'), 74.6 (C-2'), 78.2 (C-5'), 78.5 (C-3'), 98.4 (C-21), 100.8 (C-1'), 109.6 (C-16), 110.6 (C-7), 112.6 (C-12), 119.0 (C-9), 120.5 (C-10), 120.9 (C-18), 122.8 (C-11), 129.0 (C-8), 134.6 (C-19), 135.1 (C-2), 138.1 (C-13), 149.5 (C-17), 167.4 (C-22).

HREIMS m/z (int. rel.): 498.20010 (8) [M^+] (valor calculado 498.20022 para $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$).

FABMS (positivo) m/z (int. rel.): 521 (40) [$\text{M}+\text{Na}]^+$, 499 (5) [$\text{M}+\text{H}]^+$, 337 (13) [M -glucose] $^+$.

FABMS (negativo) m/z (int. rel.): 497 (26) [M -H] $^-$.

HPLC - Semi-preparativo

Coluna - Lichrospher 100 RP18 (fase reversa, 250 mm x 8 mm, 10 μm)

Deteccão - 270 nm

Fluxo - 4 mL/min

Eluentes - Gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (Tabela III.3)

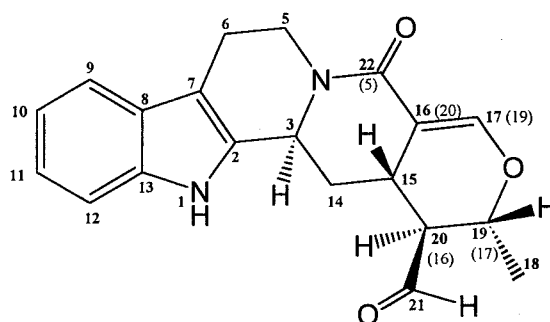
Tabela III.3 – Gradiente de eluição (HPLC) do alcalóide **28**.

t (min)	H ₂ O	MeOH
0	50	50
15	0	100
20	50	50

Tempo de retenção de **28** – 10.97 min.

III.5.1.7. Naucleidinal (**39**)

((3 α ,15 β ,16 α ,17 β)-17-metil-21-oxo-19,20-di-hidro-oxoimban-16-carbaldeído)



Pf 192–194°C

Pf lit.⁴⁰ 192–194°C; Pf lit.⁶¹ 203°C; Pf lit.⁶² 191–194°C

$[\alpha]_D^{25}$ +96.1° (c 2.8, MeOH)

lit.⁴⁰ $[\alpha]_D^{28}$ +97.7° (c 0.085, EtOH); lit.⁶¹ $[\alpha]_D^{20}$ +124.0° (c 1.06, EtOH)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3269, 2925, 2850, 1723, 1652, 1580, 1465, 1305, 1186, 745.

UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 226, 280, 290.

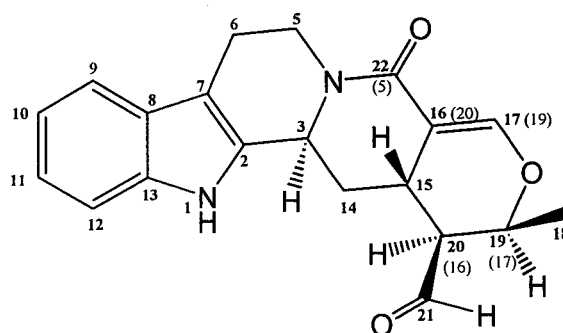
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.47 (3H, d, $J_{18,19} = 6.3$, H-18), 1.86 (1H, ddd, $J_{14a,14b} = J_{14a,15} = 13.2$, $J_{14a,3} = 5.4$, H-14_a), 2.34 (1H, ddd, $J_{20,19} = J_{20,15} = 10.2$, $J_{20,21} = 2.4$, H-20), 2.49 (1H, dd, $J_{14b,14a} = 13.2$, $J_{14b,3} = 2.0$, H-14_b), 2.67–2.75 (2H, m, H-6_a, H-15), 2.98–3.11 (2H, m, H-5_a, H-6_b), 3.90 (1H, dq, $J_{19,20} = 10.2$, $J_{19,18} = 6.3$, H-19), 4.96 (1H, dd, $J_{3,14a} = 5.4$, $J_{3,14b} = 2.0$, H-3), 5.07 (1H, m, H-5_b), 7.12 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.19 (1H, t, $J_{11,10} = 7.6$, H-11), 7.38 (1H, d, $J_{12,11} = 8.0$, H-12), 7.47 (1H, d, $J_{9,10} = 7.8$, H-9), 7.51 (1H, s, H-17), 8.10 (1H, s, NH), 9.78 (1H, d, $J_{21,20} = 2.4$, H-21).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 19.3 (C-18), 20.1 (C-6), 27.5 (C-15), 29.4 (C-14), 43.4 (C-5), 53.3 (C-3), 56.4 (C-20), 71.5 (C-19), 107.7 (C-16), 111.3 (C-12), 111.5 (C-7), 118.3 (C-9), 120.0 (C-10), 122.3 (C-11), 127.5 (C-8), 132.6 (C-2), 135.9 (C-13), 150.6 (C-17), 164.5 (C-22), 200.7 (C-21).

EIMS m/z (int. rel.): 336 (100) [M^+ , $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$], 307 (39), 265 (67), 235 (51), 169 (48), 156 (37), 144 (33), 143 (35).

III.5.1.8. 19-Epi-naucleidinal (40)

((3 α ,15 β ,16 α ,17 α)-17-metil-21-oxo-19,20-di-hidro-oxoioimban-16-carbaldeído)



Pf 222–223°C

$[\alpha]_D^{25} -6.2^\circ$ (c 0.15, MeOH)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3270, 2920, 2849, 1722, 1650, 1574, 1467, 1304, 1190, 743.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 225, 280, 290.

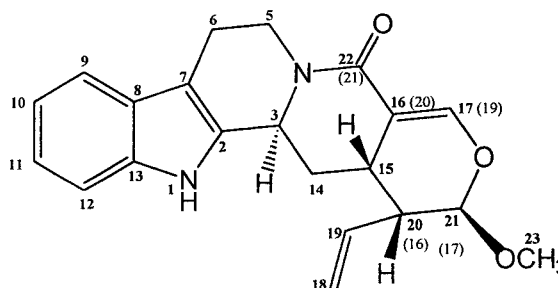
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.04 (3H, d, $J_{18,19} = 6.7$, H-18), 1.84 (1H, ddd, $J_{14a,14b}=J_{14a,15} = 13.2$, $J_{14a,3} = 5.4$, H-14_a), 2.64–2.76 (4H, m, H-6_a, H-14_b, H-15, H-20), 3.00–3.13 (2H, m, H-5_a, H-6_b), 4.90 (1H, dq, $J_{19,18} = 6.7$, $J_{19,20} = 2.5$, H-19), 4.99 (1H, d, $J_{3,14b} = 4.0$, H-3), 5.10 (1H, m, H-5_b), 7.14 (1H, t, $J_{10,11} = 7.3$, H-10), 7.22 (1H, t, $J_{11,10} = 7.8$, H-11), 7.44 (1H, d, $J_{12,11} = 7.8$, H-12), 7.49 (1H, d, $J_{9,10} = 7.8$, H-9), 7.45 (1H, s, H-17), 8.07 (1H, s, NH), 9.77 (1H, s, H-21).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 15.9 (C-18), 21.1 (C-6), 29.3 (C-15), 29.7 (C-14), 43.3 (C-5), 53.4 (C-3), 53.8 (C-20), 68.9 (C-19), 106.8 (C-16), 111.4 (C-7, C-12), 118.3 (C-9), 120.0 (C-10), 122.2 (C-11), 127.7 (C-8), 132.7 (C-2), 136.0 (C-13), 148.8 (C-17), 164.3 (C-22), 199.4 (C-21).

EIMS m/z (int. rel.): 336 (30) [M^+ , $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$], 314 (15), 307 (11), 265 (26), 235 (100), 206 (36), 169 (18), 156 (15), 144 (13), 143 (13).

III.5.1.9. 21-O-metilestrictosamida aglicona (161)

(3 α , 15 β , 16 β , 17 α)-17-metoxi-16-vinil-19,20-di-hidro-oxoimban-21-ona)



Óleo

$[\alpha]_D^{25} -0.09^\circ$ (c 0.06, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3272, 2923, 2850, 1637, 1619, 1468, 1444, 1305, 1089, 742.

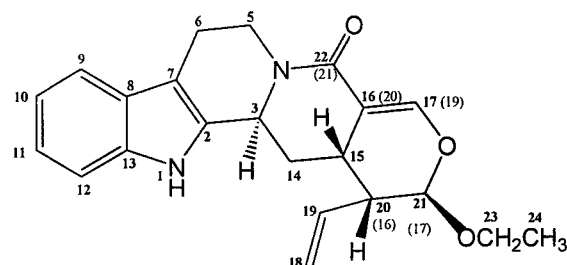
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (1H, dt, $J_{14a,14b} = 11.8$, $J_{14a,3} = 11.0$, $J_{14a,15} = 3.0$, H-14_a), 2.74–2.84 (3H, m, H-5_a, H-6_a, H-6_b), 2.91 (1H, m, H-14_b), 2.95 (1H, d, $J_{20,21} = 5.0$, H-20), 3.18 (1H, sl, H-15), 3.46 (3H, s, H-23), 4.55 (1H, d, $J_{3,14a} = 11.0$, H-3), 5.07 (1H, d, $J_{18a,19} = 11.4$, H-18_a), 5.08 (1H, d, $J_{5b,5a} = 9.7$, H-5_b), 5.13 (1H, d, $J_{18b,19} = 17.8$, H-18_b), 5.60 (1H, s, H-21), 6.25 (1H, dd, $J_{19,18b} = 17.8$, $J_{19,18a} = 11.4$, H-19), 6.56 (1H, s, H-17), 7.11 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.17 (1H, t, $J_{11,10} = 7.4$, H-11), 7.32 (1H, d, $J_{12,11} = 7.9$, H-12), 7.49 (1H, d, $J_{9,10} = 7.6$, H-9), 7.87 (1H, s, NH).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 20.7 (C-6), 24.2 (C-15), 29.7 (C-14), 39.8 (C-5), 44.6 (C-20), 49.5 (C-3), 56.0 (C-23), 98.6 (C-21), 109.7 (C-7), 110.9 (C-12, C-18), 114.1 (C-16), 118.8 (C-9), 119.9 (C-10), 122.2 (C-11), 126.9 (C-8), 132.9 (C-2), 133.3 (C-19), 136.4 (C-13), 143.8 (C-17), 166.6 (C-22).

HRCIMS m/z : 351.1727 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (valor calculado 351.1709 para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3$).

III.5.1.10. 21-O-etilestrictosamida aglícica (162)

((3 α , 15 β , 16 β , 17 α)-17-etoxi-16-vinil-19,20-di-hidro-oxoioimban-21-ona)



Óleo

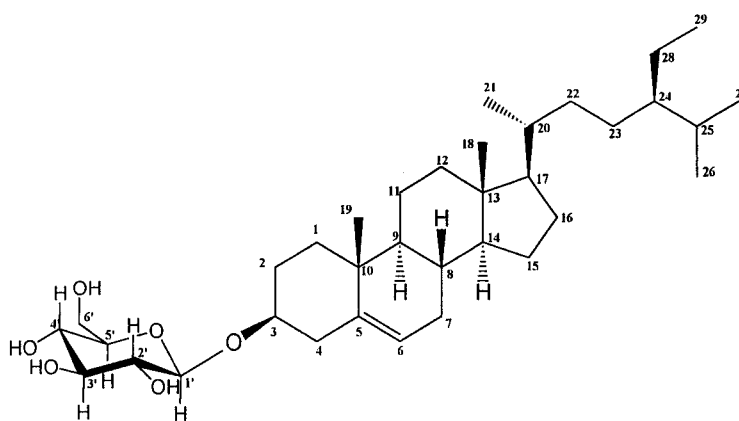
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.21 (3H, t, $J_{24,23} = 7.0$, H-24), 1.84 (1H, dt, $J_{14a,14b} = 11.8$, $J_{14a,3} = 12.0$, $J_{14a,15} = 3.0$, H-14_a), 2.74–2.84 (3H, m, H-5_a, H-6_a, H-6_b), 2.93 (1H, m, H-14_b), 2.94 (1H, d, $J_{20,21} = 5.4$, H-20), 3.22 (1H, sl, H-15), 3.65 (2H, m, H-23), 4.55 (1H, d, $J_{3,14a} = 12.0$, H-3), 5.07 (1H, d, $J_{18a,19} = 11.6$, H-18_a), 5.10 (1H, d, $J_{5b,5a} = 13.1$, H-5_b), 5.13 (1H, d, $J_{18b,19} = 17.8$, H-18_b), 5.71 (1H, d, $J_{21,20} = 1.6$, H-21), 6.26 (1H, dd, $J_{19,18b} = 17.8$, $J_{19,18a} = 11.6$, H-19), 6.55 (1H, s, H-17), 7.11 (1H, t, $J_{10,11} = 7.6$, H-10), 7.18 (1H, t, $J_{11,10} = 7.4$, H-11), 7.33 (1H, d, $J_{12,11} = 8.0$, H-12), 7.49 (1H, d, $J_{9,10} = 7.6$, H-9), 7.87 (1H, s, NH).

HRCIMS m/z : 365.1863 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (valor calculado 365.1865 para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$).

III.5.2. Triterpenos

III.5.2.1. Glucósido do β -Sitosterol (163)

((3β)-estigmast-5-en-3-ilo- β -D-glucopiranosídeo)



Pf 280–282°C

Pf lit.¹⁶¹ 280–283°C (dec.); Pf lit.¹⁶² 286–289°C; Pf lit.²⁵⁸ 265–267°C (dec.);

$[\alpha]_D^{25} -36.8^\circ$ (c 0.6, piridina)

lit.¹⁶² $[\alpha]_D -42.6^\circ$ (c 2.0, CHCl₃); lit.¹⁶¹ $[\alpha]_D -42.1^\circ$ (c 0.57, piridina)

IV $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3391, 2918, 2849, 1735, 1641, 1465, 1378, 1367, 1167, 1107, 1073, 1022, 800, 719.

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J_{27,25} = 7.0$, H-27), 0.82 (3H, d, $J_{26,25} = 6.9$, H-26), 0.83 (3H, t, $J_{29,28} = 6.9$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 5.6$, H-21), 0.97 (3H, s, H-19), 2.91 (1H, m, H-2'), 3.02-3.14 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 3.35 (1H, m, H-6_a'), 3.48 (1H, m, $W_{1/2} = 16$, H-3), 3.65 (1H, m, H-6_b'), 4.23 (1H, d, $J_{1',2'} = 7.5$, H-1'), 4.44 (1H, t, $J_{OH(6'),6'} = 5.6$, -OH (6')), 4.88-4.92 (3H, m, -OH (2', 3', 4')), 5.34 (1H, sl, H-6).

¹³C-RMN (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.8 (C-18), 11.9 (C-29), 18.8 (C-21), 19.1 (C-27), 19.3 (C-19), 19.9 (C-26), 20.8 (C-11), 22.8 (C-28), 24.1 (C-15), 25.6 (C-23), 28.0 (C-16), 28.9 (C-25), 29.5 (C-2), 31.6 (C-7, C-8), 33.5 (C-22), 35.7 (C-20), 36.4 (C-10), 37.0 (C-1), 38.5 (C-4), 39.5 (C-12), 42.0 (C-13), 45.3 (C-24), 49.8 (C-9), 55.6 (C-17), 56.4 (C-14), 61.3 (C-6'), 70.3 (C-4'), 73.7 (C-2'), 76.9 (C-3, C-3', C-5'), 100.9 (C-1'), 121.4 (C-6), 140.7 (C-5).

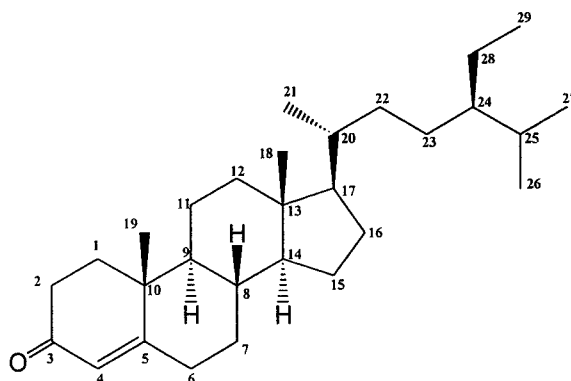
HREIMS m/z (int. rel.): 414.38619 (3) $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ (valor calculado 414.38617 para C₂₉H₅₀O), 396.37531 (100) (valor calculado 396.37560 para C₂₉H₄₈).

EIMS m/z (int. rel.): 414 (11) $[M^+, C_{35}H_{60}O_6]$, 399 (8), 396 (100), 381 (20), 329 (8), 303 (6), 275 (13), 273 (7), 255 (18), 231 (5), 229 (6), 213 (12).

FABMS (positivo) m/z (int. rel.): 599 (10) $[M+Na]^+$, 413 (22) $[C_{29}H_{49}O]^+$, 397 (100) $[C_{29}H_{48}]^+$.

FABMS (negativo) m/z (int. rel.): 575 (1) $[M-H]^-$.

III.5.2.2. Estigmast-4-en-3-ona (171)



Pf 94–96°C

Pf lit.¹⁷¹ 95–96.5°C; Pf lit.¹⁷² 92–94°C

$[\alpha]_D^{25} +81^\circ$ (c 0.5, CHCl₃)

lit.¹⁷¹ $[\alpha]_D +81.3^\circ$ (c 2.78); lit.¹⁷² $[\alpha]_D^{23} +80^\circ$ (c 0.35, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2955, 2931, 2869, 2852, 1677, 1614, 1463, 1377, 1228.

UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 241.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.71 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J_{27,25} = 7.2$, H-27), 0.84 (3H, d, $J_{26,25} = 7.2$, H-26), 0.85 (3H, t, $J_{29,28} = 7.5$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 6.3$, H-21), 1.18 (3H, s, H-19), 5.72 (1H, s, H-4).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 11.9 (C-18, C-29), 17.4 (C-19), 18.7 (C-21), 19.0 (C-27), 19.8 (C-26), 21.0 (C-11), 23.1 (C-28), 24.1 (C-15), 26.0 (C-23), 28.1 (C-16), 29.1 (C-25), 32.0 (C-7), 32.9 (C-6), 33.9 (C-2), 34.0 (C-22), 35.6 (C-1), 35.7 (C-8), 36.1 (C-20), 38.6 (C-10), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 45.8 (C-24), 53.8 (C-9), 55.9 (C-14), 56.0 (C-17), 123.7 (C-4), 171.6 (C-5), 199.6 (C-3).

EIMS m/z (int. rel.): 412 (20) [M⁺, C₂₈H₄₉O], 271 (18), 229 (42), 147 (36), 124 (100), 107 (38).

GC

Coluna – DB1 (15 m x 0.25 mm, 0.1 μm)

Gás de arraste – Argon

Atenuação – 32

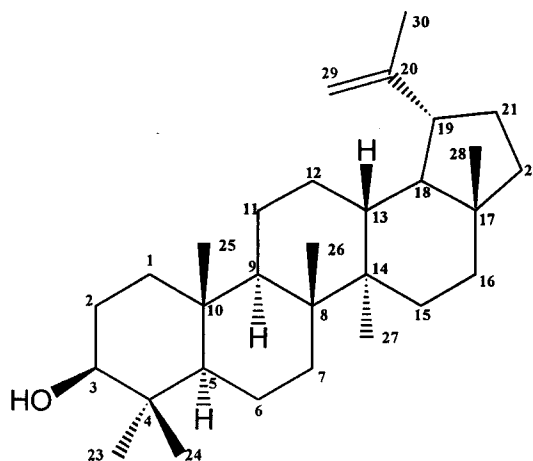
Amostra em CHCl_3

Temperatura do injetor – 300°C

Temperatura do detector – 300°C

Temperatura da coluna – Subida a 5°C/minuto de 50 a 325°C;

isotérmica a 325°C durante 5 minutos.

Tempo de retenção de **171** – 46.33 min.**III.5.2.3. Lupeol (175)****(lup-20(29)-en-3 β -ol)**

Pf 212–215°C

Pf lit.¹⁵⁹ 213.5–216.5°C; Pf lit.¹⁷⁵ 212°C $[\alpha]_D^{25} +28.0^\circ$ (c 2.0, CHCl_3)lit.¹⁵⁹ $[\alpha]_D +28.1^\circ$ (CHCl_3)IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3368, 3081, 1646, 1383, 1032, 884.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.76 (3H, s, H-24), 0.78 (3H, s, H-28), 0.83 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, s, H-23), 0.96 (3H, s, H-27), 1.03 (3H, s, H-26), 1.67 (3H, s, H-30), 2.38 (1H, ddd, $J_{19,21a} = 11.0$, $J_{19,21b(18)} = 6.0$, H-19), 3.18 (1H, dd, $J_{3,2a} = 11.0$, $J_{3,2b} = 5.5$, H-3), 4.56 (1H, sl, H-29_a), 4.68 (1H, sl, H-29_b).

GC

Coluna - DB1 (15 m x 0.25 mm, 0.1 μm)

Gás de arraste - Argon

Atenuação - 16

Amostra em CHCl_3

Temperatura do injetor - 300°C

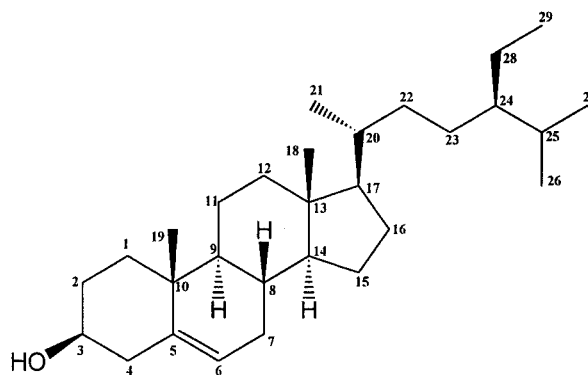
Temperatura do detector - 300°C

Temperatura da coluna - Isotérmica - 230°C

Tempo de retenção de **175** - 37.81 min.

III.5.2.4. β -Sitosterol (146)

(Estigma-5-en-3 β -ol)



Pf 139-141°C

Pf lit.¹⁸³ 139-142°C; Pf lit.¹⁵⁹ 140°C

$[\alpha]_D^{25} -38.0^\circ$ (c 1.8, CHCl_3)

lit.¹⁸⁰ $[\alpha]_D^{25} -37^\circ$ (c 2.0, CHCl_3)

IV ν $\frac{KBr}{max}$ cm^{-1} : 3435, 2960, 2934, 1632, 1466, 1384, 1068.

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.68 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J_{27,25} = 8.2$, H-27), 0.83 (3H, d, $J_{26,25} = 7.4$, H-26), 0.85 (3H, t, $J_{29,28} = 7.5$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 6.2$, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 3.52 (1H, dt, $J_{3,2a(4a)} = 11.6$, $J_{3,2b(4b)} = 5.0$, H-3), 5.35 (1H, d, $J_{6,7} = 2.8$, H-6).

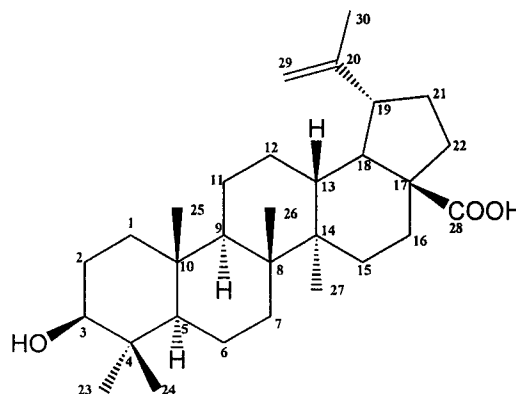
GC

Condições idênticas a III.5.2.2 (pg. 202).

Tempo de retenção de **146** – 45.05 min.

III.5.2.5. Ácido Betulínico (176)

(Ácido 3-hidroxilup-20(30)-en-28-óico)



Pf 294–297°C

Pf lit.¹⁴ 295–298°C; Pf lit.¹⁶² 290–292°C; Pf lit.¹⁸⁰ 291–297°C;

Pf lit.²³⁷ 290–293°C;

$[\alpha]_D^{25} +8.0^\circ$ (c 1.0, piridina)

lit.¹⁴ $[\alpha]_D^{20} +7.8^\circ$ (c 0.9, piridina); lit.¹⁶² $[\alpha]_D +6.8^\circ$ (c 0.29, MeOH);

lit.¹⁸⁰ $[\alpha]_D^{23} +6.8^\circ$ (c 0.1, piridina); lit.²³⁷ $[\alpha]_D^{25} +7.5^\circ$ (c 0.37, piridina);

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450, 2927, 2867, 1686, 1453, 1375, 1236, 1032, 882, 756.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.75 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-26), 1.69 (3H, s, H-30), 3.19 (1H, dd, $J_{3,2a} = 11.0$, $J_{3,2b} = 5.0$, H-3), 4.61 (1H, sl, H-29_a), 4.74 (1H, sl, H-29_b).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 14.7 (C-27), 15.3 (C-24), 16.0 (C-26), 16.1 (C-25), 18.3 (C-6), 19.4 (C-30), 20.8 (C-11), 25.5 (C-12), 27.4 (C-2), 27.9 (C-23), 29.7 (C-21), 30.5 (C-15), 32.1 (C-16), 34.3 (C-7), 37.0 (C-22), 37.2 (C-10), 38.4 (C-13), 38.7 (C-1), 38.8 (C-4), 40.7 (C-8), 42.4 (C-14), 46.8 (C-18), 49.3 (C-19), 50.5 (C-9), 55.3 (C-5), 56.3 (C-17), 79.0 (C-3), 109.6 (C-29), 150.4 (C-20), 180.4 (C-28).

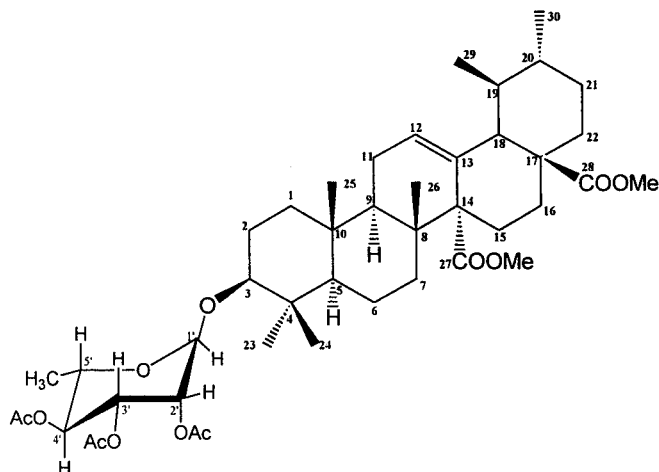
EIMS m/z (int. rel.): 456 (5) [M^+ , $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$], 438 (3), 411 (4), 410 (9), 207 (35), 189 (57), 173 (28), 135 (41), 119 (55), 105 (66), 91 (55), 81 (79), 69 (63), 55 (90), 41 (100).

GC

Condições idênticas a III.5.2.2 (pg. 202).

Tempo de retenção de **176** – 44.53 min.

III.5.2.6. Éster dimetílico do ácido 3- β -O- α -L-triacetilramnopiranosídeo quinóvico (179)



Pf 103–105°C

Pf lit.¹⁸⁴ 208–211°C; Pf lit.¹²⁶ 243–245°C

$[\alpha]_D^{25} +36.4^\circ$ (c 8.3, CHCl₃)

lit.¹²⁶ $[\alpha]_D +55.5^\circ$ (c 0.92, EtOH)

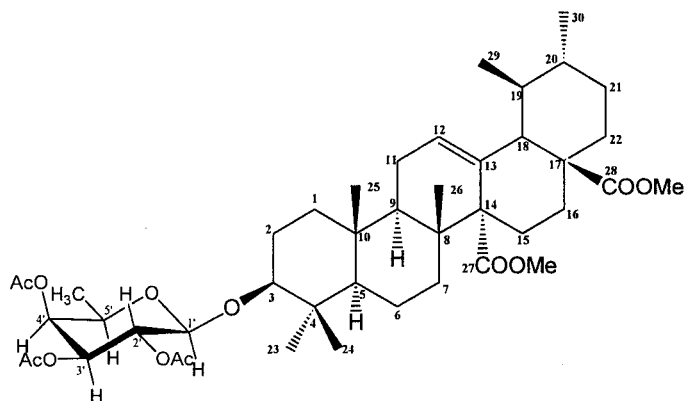
IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2944, 2873, 1749, 1721, 1453, 1370, 1222, 1076, 1050, 756.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, d, $J_{29,19} = 6.0$, H-29), 0.89 (3H, d, $J_{30,20} = 6.0$, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-24), 1.19 (3H, d, $J_{6',5'} = 6.4$, H-6'), 1.99 (3H, s, OCOCH₃), 2.05 (3H, s, OCOCH₃), 2.15 (3H, s, OCOCH₃), 2.27 (1H, d, $J_{18,19} = 11.6$, H-18), 3.09 (1H, t, $J_{3,2a} = 8.0$, H-3), 3.62 (6H, s, 2 x CO₂CH₃), 4.00 (1H, dq, $J_{5',4'} = 10.0$, $J_{5',6'} = 6.4$, H-5'), 4.78 (1H, sl, H-1'), 5.06 (1H, t, $J_{4',3'} = 10.0$, $J_{4',5'} = 10.0$, H-4'), 5.21 (1H, sl, H-2'), 5.30 (1H, dd, $J_{3',4'} = 10.0$, $J_{3',2'} = 3.2$, H-3'), 5.64 (1H, sl, H-12).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 16.2 (C-24), 16.3 (C-25), 16.9 (C-29), 17.1 (CH_3 -6'), 18.1 (C-6, C-26), 20.5 (OCOCH_3), 20.6 (OCO_2CH_3), 20.8 (OCOCH_3), 20.9 (C-30), 22.6 (C-11), 24.5 (C-15), 25.0 (C-16), 25.2 (C-2), 28.1 (C-23), 29.7 (C-21), 35.9 (C-22), 36.6 (C-10), 36.8 (C-7), 36.9 (C-20), 38.7 (C-1, C-19), 38.8 (C-8), 39.5 (C-4), 47.2 (C-9), 48.4 (C-17), 51.1 (CO_2CH_3), 51.4 (CO_2CH_3), 53.7 (C-18), 55.5 (C-5), 56.1 (C-14), 66.4 (C-5'), 69.2 (C-3'), 70.2 (C-2'), 71.3 (C-4'), 89.5 (C-3), 99.6 (C-1'), 129.4 (C-12), 132.2 (C-13), 170.2 (2 x OCOCH_3), 170.4 (OCOCH_3), 175.7 (C-27), 178.2 (C-28).

EIMS m/z (int. rel.): 787 (<1) [M^+ , $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$], 497 (6) [M -triacetilramnopiranosido] $^+$, 437 (7), 273 (46), 170 (30), 153 (100).

III.5.2.7. Éster dimetílico do ácido 3- β -O- β -D-triacetilfucopiranosido quinóvico (180)



Pf 132-134°C

$[\alpha]_D^{25} +51.9^\circ$ (c 9.9, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2944, 2872, 1753, 1721, 1454, 1367, 1222, 1171, 1074, 979, 911, 755.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.73 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, d, $J_{29,19} = 6.0$, H-29), 0.88 (3H, s, H-25), 0.89 (3H, d, $J_{30,20} = 6.0$, H-30), 0.92 (3H, s, H-24), 1.20 (3H, d, $J_{6',5'} = 6.4$, H-6'), 1.98 (3H, s, OCOCH_3), 2.03 (3H, s, OCOCH_3), 2.16 (3H, s, OCOCH_3), 2.27 (1H, d, $J_{18,19} = 11.4$, H-18), 3.05 (1H, dd, $J_{3,2a} = 11.3$, $J_{3,2b} = 4.6$, H-3), 3.62 (3H, s, CO_2CH_3), 3.63 (3H, s, CO_2CH_3), 3.78 (1H, dd, $J_{5',6'} = 6.4$, $J_{5',4'} = 6.0$, H-5'), 4.46 (1H, d, $J_{1',2'} = 8.0$, H-1'), 5.00 (1H, dd, $J_{3',2'} = 10.5$, $J_{3',4'} = 3.5$, H-3'), 5.22 (2H, t, H-2', H-4'), 5.65 (1H, sl, H-12).

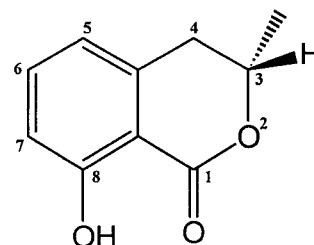
^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 16.0 (C-24), 16.1 (C-25), 16.3 (C-29), 16.8 (CH_3 -6'), 17.9 (C-6), 18.1 (C-26), 20.4 (OCOCH_3), 20.5 (OCOCH_3), 20.7 (OCOCH_3), 20.9 (C-30), 22.6 (C-11), 24.5 (C-15), 25.0 (C-16), 25.7 (C-2), 27.6 (C-23), 29.7 (C-21), 35.9 (C-22), 36.5 (C-10), 36.8 (C-7), 36.9 (C-20), 38.6 (C-1), 38.7 (C-8, C-19), 39.5 (C-4), 47.1 (C-9), 48.4 (C-17), 51.1 (CO_2CH_3), 51.4 (CO_2CH_3), 53.6 (C-18), 55.7 (C-5), 56.1 (C-14), 68.8 (C-5'), 69.3 (C-3'), 70.3 (C-2'), 71.3 (C-4'), 90.2 (C-3), 103.4 (C-1'), 129.5 (C-12), 132.1 (C-13), 169.6 (OCOCH_3), 170.4 (OCOCH_3), 170.9 (OCOCH_3), 175.7 (C-27), 178.1 (C-28).

EIMS m/z (int. rel.): 787 (<1) [M^+ , $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$], 497 (8) [M -triacetilfucopiranosido] $^+$, 437 (9), 377 (7), 273 (37), 170 (32), 153 (100).

III.5.3. Cumarinas

III.5.3.1. (R)-(-)-Meleína (183)

((3R)-8-hidroxi-3-metil-3,4-di-hidro-1H-isocromen-1-ona)



Pf 55–56°C

Pf lit.¹⁸⁷ 51–52°C; Pf lit.¹⁸⁹ 55.5–56°C; Pf lit.¹⁹⁰ 47–48°C;

Pf lit.¹⁹² 54–56°C

²⁵
[α]_D -98.5° (c 1.3, CHCl₃)

lit.¹⁸⁷ [α]_D -94.0° (c 1.3, CHCl₃); lit.¹⁸⁹ [α]_D²⁶ -101.3° (c 0.07, CHCl₃);

lit.¹⁹⁰ [α]_D²² -94.0° (c 0.48, CHCl₃)

IV ν ^{KBr}_{max} cm⁻¹: 3500, 2917, 2849, 1731, 1674, 1619, 1464, 1237, 1221, 1119, 808.

UV λ ^{EtOH}_{max} nm: 208, 243, 310.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.53 (3H, d, $J_{11,3}$ = 6.3, H-11), 2.93 (2H, d, $J_{4,3}$ = 7.3, H-4), 4.74 (1H, m, H-3), 6.69 (1H, d, $J_{5,6}$ = 7.2, H-5), 6.89 (1H, d, $J_{7,6}$ = 8.4, H-7), 7.41 (1H, t, $J_{6,7}$ = 7.9, H-6), 11.03 (1H, s, -OH(8)).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 20.8 (C-11), 34.6 (C-4), 76.0 (C-3), 108.3 (C-9), 116.2 (C-7), 117.9 (C-5), 136.1 (C-6), 139.4 (C-10), 162.2 (C-8), 169.9 (C-1).

EIMS m/z (int. rel.): 178 (90) [M^+ , $C_{10}H_{10}O_3$], 160 (84), 149 (83), 135 (41), 134 (100), 132 (40), 104 (55), 78 (83).

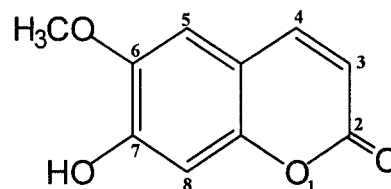
GC

Condições idênticas a III.5.2.2 (pg. 202).

Tempo de retenção de **183** – 14.79 min.

III.5.3.2. Escopoletina (184)

(7-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona)



Pf 203–205°C

Pf lit.¹⁹⁶ 202–204°C; Pf lit.¹⁹⁷ 205–207°C

IV ν $\overset{KBr}{\text{max}}$ cm^{-1} : 3338, 1708, 1608, 1565, 1511, 1293, 1142, 1017, 922, 860, 820, 745.

UV λ $\overset{MeOH}{\text{max}}$ nm: 209, 226, 251, 259, 296, 342.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.95 (3H, s, H-11), 6.15 (1H, sl, -OH(6)), 6.26 (1H, d, $J_{3,4} = 9.4$, H-3), 6.84 (1H, s, H-5), 6.91 (1H, s, H-8), 7.59 (1H, d, $J_{4,3} = 9.4$, H-4).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 56.4 (C-11), 103.2 (C-8), 107.5 (C-5), 111.5 (C-10), 113.5 (C-3), 143.4 (C-4), 144.1 (C-6), 150.0 (C-7, C-9), 161.6 (C-2).

EIMS m/z (int. rel.): 192 (81) [M^+ , $C_{10}H_8O_4$], 177 (53), 164 (33), 149 (74), 121 (51), 79 (49), 69 (100), 51 (66).

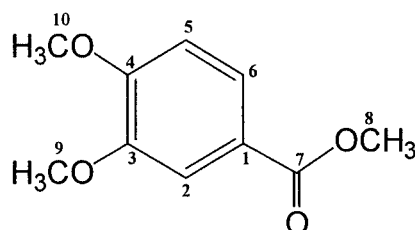
GC

Condições idênticas a III.5.2.2 (pg. 202).

Tempo de retenção de **184** – 23.86 min.

III.5.4. Compostos fenólicos

III.5.4.1. 3,4-Dimetoxibenzoato de metilo (185)



Pf 60–62°C

Pf lit.¹⁸³ 59–62°C

IV ν $\frac{KBr}{max}$ cm^{-1} : 3008, 2958, 2840, 1720, 1595, 1518, 1464, 1432, 1350, 1296, 1275, 1231, 1188, 1138, 1108, 1035, 990, 870, 760, 635.

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.89 (3H, s, H-8), 3.94 (6H, s, H-9, H-10), 6.88 (1H, d, $J_{5,6} = 8.4$, H-6), 7.55 (1H, s, H-2), 7.68 (1H, d, $J_{6,5} = 8.3$, H-5).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, $CDCl_3$) δ : 51.8 (C-8), 55.9 (C-9, C-10), 110.1 (C-6), 111.8 (C-5), 122.5 (C-1), 123.4 (C-2), 148.4 (C-4), 152.7 (C-3), 166.6 (C-7).

EIMS m/z (int. rel.): 196 (100) [M^+ , $C_{10}H_{12}O_4$], 165 (81), 149 (23), 79 (21).

GC

Condições idênticas a III.5.2.2 (pg. 202).

Tempo de retenção de **185** – 16.45 min.

III.6. Determinação da configuração absoluta da angustolina (**4**) pelo método de Horeau

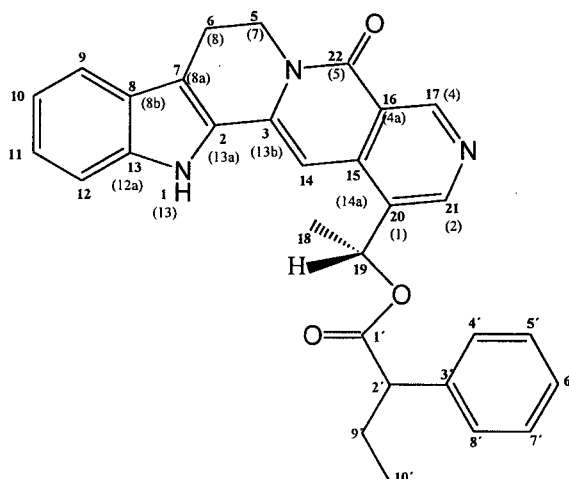
Dissolveram-se num balão, sob argon, 20.0 mg (6.04×10^{-5} moles) de angustolina (**4**), numa solução de 37.4 mg (12.08×10^{-5} moles) de anidrido (\pm) 2-fenilbutanóico em 35 μ L de piridina seca. Após 16 horas sob agitação magnética e à temperatura ambiente, adicionou-se uma gota de água e aqueceu-se em banho-maria durante 30 minutos. Arrefeceu-se à temperatura ambiente e adicionou-se em seguida, 2 mL de água, 3 mL de benzeno e 2 gotas de fenolftaleína. Titulou-se a mistura anterior com uma solução 0.1 N de hidróxido de sódio (1.95 mL). A fase aquosa foi extraída com clorofórmio (2 x 10 mL), acidificada com 1 mL de 1 N de ácido clorídrico e extraída novamente com benzeno (2 x 10 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), o solvente evaporado, tendo-se obtido 32 mg de ácido 2-fenilbutírico. Da fase orgânica de clorofórmio foi isolado o composto **154** (éster fenil butírico da angustolina, 12.5 mg)

$[\alpha]_D^{25} +0.75^\circ$ (c 3.2, benzeno)

Rendimento da esterificação 72 %

Rendimento óptico 2.2%

III.6.1. Éster fenil butírico da angustolina (154)



óleo

$[\alpha]_D^{25} -19.0^\circ$ (c 1.1, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3227, 2926, 2853, 1735, 1661, 1606, 1533, 1454, 1326, 1163, 1076, 818, 747, 699.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 250, 300, 376, 395.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.92 (3H, t, $J_{10',9'} = 7.0$, H-10'), 1.65 (3H, d, $J_{18,19} = 6.4$, H-18), 1.86 (1H, m, H-9'a), 2.15 (1H, m, H-9'b), 2.97 (1H, m, H-6'a), 3.02 (1H, m, H-6'b), 3.57 (1H, m, H-2'), 4.26 (1H, m, H-5'a), 4.43 (1H, m, H-5'b), 6.16 (1H, d, $J_{19,18} = 6.2$, H-19), 6.59 (14/25H, s, H-14, (2'R)), 6.80 (11/25H, s, H-14, (2'S)), 7.04-7.30 (9H, m, H-9, H-10, H-11, H-12, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8'), 7.56 (1H, s l, H-21), 8.46 (11/25H, s, H-17, forma 2S'), 8.53 (14/25H, s, H-17, (2R')), 9.27 (14/25H, s, NH (2R')), 9.30 (11/25H, s, NH (2S')).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.83 (3H, t, $J_{10',9'} = 7.0$, H-10'), 1.64 (3H, d, $J_{18,19} = 6.3$, H-18), 1.71 (1H, m, H-9'a), 2.01 (1H, m, H-9'b), 3.12 (2H, d, $J_{6,5} = 5.2$, H-6a, H-6b), 3.68 (1H, t, $J_{2',9'} = 7.5$, H-2'), 4.29 (1H, m, H-5a), 4.44 (1H, m, H-5b), 6.28 (1H, d, $J_{19,18} = 6.4$, H-19), 7.09–7.65 (10H, m, H-9, H-10, H-11, H-12, H-14, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8'), 8.33 (1H, s, H-21), 9.19 (1H, s, H-17), 11.80 (1H, s, NH).

III.7. Determinação da configuração absoluta da angustolina (4) pelo método modificado de Horeau por HPLC

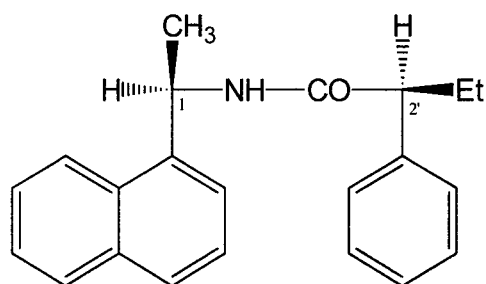
Dissolveram-se num balão, sob argon, 1.7 mg de angustolina (4) em 51 μL de piridina, ao qual se adicionaram 3.16 mg de anidrido (\pm)-2-fenilbutanóico em 54 μL de tolueno. Após 24 horas sob agitação magnética e à temperatura ambiente, adicionou-se à mistura, 5.23 mg de (R)-(+)-1-(1-naftil)etilamina (156) em 153 μL de tolueno. A mistura permaneceu em agitação magnética durante 30 minutos e em seguida adicionaram-se 100 μL de ácido perclórico (4.7 M) em acetonitrilo. O conteúdo do balão foi transferido para um 'vial' e o balão foi lavado com 200 μL da mistura Et₂O/Éter de petróleo (1:2), sendo a solução total filtrada numa mini-coluna contendo 0.5 g de Florisil (100–200 'mesh'). O filtrado foi evaporado sob azoto, diluído em 100 μL de Hexano/AcOEt (9:1) e injectado em HPLC analítico, equipado com uma coluna Nucleosil 100 (fase normal, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm), usando como eluente Hexano/AcOEt (9:1), com fluxo de 1 mL/min e detecção a 281 nm.

III.7.1. Síntese de (1R,2'S)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (157) e (1R, 2'R)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (158).

Num balão equipado com suba, colocaram-se sob argon, 144 mg de anidrido racémico 2-fenilbutanóico e 72 mg de dimetilaminopiridina, solubilizados em 1 mL de diclorometano (seco). O balão foi colocado num banho de água e gelo, ao qual, passados 5 minutos foi adicionada uma solução de 34 mg de (R)-(+)-1-(1-naftil)-etilamina em diclorometano (200 μL). Após 1 hora e 30 minutos em

banho de gelo e sob agitação magnética, adicionou-se 10 mL de uma solução gelada de ácido clorídrico (1M), e transferiu-se toda a solução para uma ampola de decantação. O balão reaccional foi lavado com 10 mL de diclorometano, que se adicionaram à ampola de decantação, da qual se extraiu a fase orgânica, que foi lavada sucessivamente com água, com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e água. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente, o resíduo foi eluído numa coluna de sílica gel 60, com Hexano/AcOEt (4:1), obtendo-se 16 mg da amida menos polar (**157**), 18 mg da amida mais polar (**158**) e 26 mg da mistura das duas amidas.

III.7.1.1. (1R,2'S)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (**157**)



Pf 154–155°C

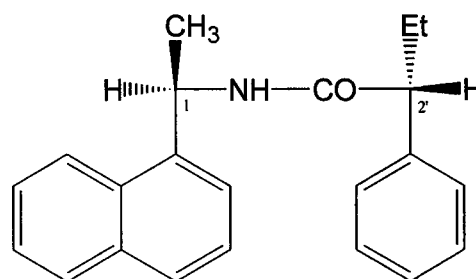
Pf lit.¹⁵⁴ 155–156°C

$[\alpha]_D^{25} +56.0^\circ$ (c 0.33, EtOH)

lit.¹⁵⁴ $[\alpha]_D +57.0^\circ$ (c 0.37, EtOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.84 (3H, t, $J_{4',3'} = 7.4$, H-4'), 1.53 (3H, d, $J_{2,1} = 6.8$, H-2), 1.77 (1H, m, H-3'_a), 2.18 (1H, m, H-3'_b), 3.14 (1H, t, $J_{2',3'} = 7.6$, H-2'), 5.66 (1H, dl, $J_{NH,1} = 7.6$, NH), 5.90 (1H, dq, $J_{1,NH} = 7.6$, $J_{1,2} = 6.8$, H-1), 7.27–8.09 (12H, m, H-aromáticos).

III.7.1.2. (1R, 2'R)-N-[1-(1-Naftil)etil]-2-fenilbutanamida (158)



Pf 153°C

Pf lit.¹⁵⁴ 152–153°C

$[\alpha]_D^{25}$ -21.2° (c 0.47, EtOH)

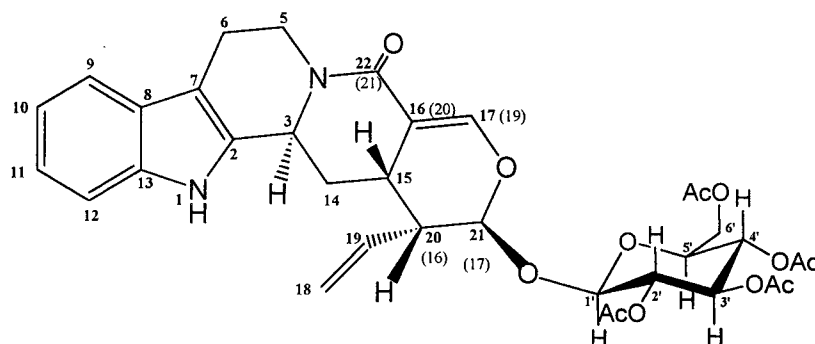
lit.¹⁵⁴ $[\alpha]_D$ -20.0° (c 0.47, EtOH)

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.89 (3H, t, $J_{4',3'}$ = 7.4, H-4'), 1.61 (3H, d, $J_{2,1}$ = 6.8, H-2), 1.78 (1H, m, H-3'a), 2.20 (1H, m, H-3'b), 3.21 (1H, t, $J_{2',3'}$ = 7.6, H-2'), 5.71 (1H, dl, $J_{NH,1}$ = 7.2, NH), 5.84 (1H, dq, $J_{1,NH}$ = 7.2, $J_{1,2}$ = 6.8, H-1), 7.21–7.86 (12H, m, H-aromáticos).

III.8. Acetilação da estrictosamida (28)

Procedeu-se à acetilação nas condições habituais de 20 mg de estrictosamida (28). O resíduo foi eluído em coluna de sílica gel 60, com Hexano/Et₂O (30:70), tendo-se obtido 26.5 mg ($\eta = 99\%$) do tetracetato da estrictosamida (160).

III.8.1. Tetracetato da estrictosamida (160)



Pf 156–157°C

Pf lit.⁵⁰ 156–158°C; Pf lit.⁴⁷ 155–160°C

$[\alpha]_D^{25} -42.9^\circ$ (*c* 1.4, MeOH)

lit.⁴⁶ $[\alpha]_D^{20} -71.0^\circ$ (*c* 0.3, CHCl₃); lit.⁴⁷ $[\alpha]_D^{20} -60.0^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

IV $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 2938, 1754, 1658, 1592, 1429, 1367, 1223, 1065, 1038, 753.

UV $\lambda_{\max}^{MeOH} \text{ nm}$: 222, 280, 288.

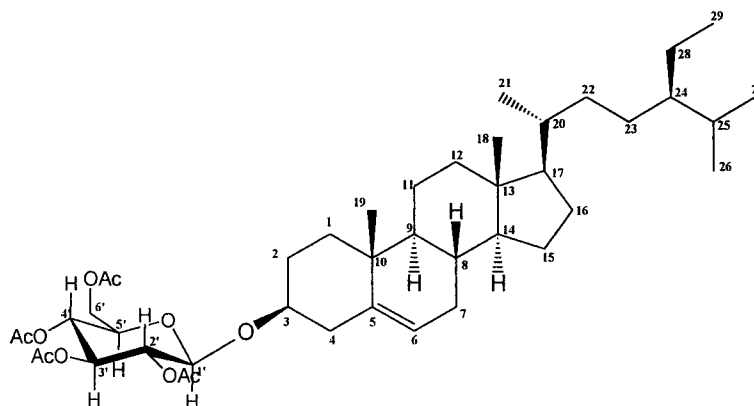
^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.14 (3H, s, OCOCH_3 -2'), 1.83 (3H, s, OCOCH_3 -3'), 1.95 (3H, s, OCOCH_3 -4'), 1.98 (1H, dt, $J_{14a,14b}=J_{14a,15} = 14.0$, $J_{14a,3} = 5.8$, H-14_a), 2.03 (3H, s, OCOCH_3 -6'), 2.46 (1H, ddd, $J_{14b,14a} = 14.0$, $J_{14b,15} = 5.8$, $J_{14b,3} = 1.6$, H-14_b), 2.61-2.65 (2H, m, H-15, H-20), 2.69 (1H, d, $J_{6a,5b} = 4.2$, H-6_a), 2.93 (1H, m, H-6_b), 3.11 (1H, dt, $J_{5a,5b} = 12.4$, $J_{5a,6b} = 4.6$, H-5_a), 3.86 (1H, ddd, $J_{5'4'} = 12.4$, $J_{5',6'b} = 4.4$, $J_{5',6'a} = 2.1$, H-5'), 4.24 (1H, dd, $J_{6'a,6'b} = 12.4$, $J_{6'a,5'} = 2.1$, H-6'_a), 4.30 (1H, dd, $J_{6'b,6'a} = 12.4$, $J_{6'b,5'} = 4.4$, H-6'_b), 4.65 (1H, dd, $J_{2',3'} = 9.8$, $J_{2',1'} = 8.2$, H-2'), 4.90 (1H, d, $J_{1',2'} = 8.2$, H-1'), 4.91 (1H, dd, $J_{5b,5a} = 12.4$, $J_{5b,6a} = 4.2$, H-5_b), 4.94 (1H, dd, $J_{4',5'} = 10.0$, H-4'), 5.06 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, dd, $J_{3',4'} = 9.6$, H-3'), 5.27 (1H, d, $J_{21,20} = 0.9$, H-21), 5.32 (1H, dd, $J_{18a,19} = 10.2$, $J_{18a,18b} = 1.6$, H-18_a), 5.37 (1H, dd, $J_{18b,19} = 17.2$, $J_{18b,18a} = 1.6$, H-18_b), 5.63 (1H, dt, $J_{19,18b} = 17.2$, $J_{19,18a} = 10.2$, H-19), 6.98 (1H, t, $J_{10,9} = 7.5$, H-10), 7.08 (1H, t, $J_{11,10} = 7.8$, H-11), 7.33 (1H, d, $J_{12,11} = 7.8$, H-12), 7.34 (1H, d, $J_{9,10} = 7.5$, H-9), 7.35 (1H, d, $J_{17,15} = 1.8$, H-17).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CD_3OD) δ : 19.6 (OCOCH_3 -2'), 20.6 (OCOCH_3 -3'), 20.7 (OCOCH_3 -4'), 20.8 (OCOCH_3 -6'), 22.3 (C-6), 25.4 (C-15), 27.1 (C-14), 44.2 (C-20), 45.4 (C-5), 55.5 (C-3), 63.2 (C-6'), 70.0 (C-4'), 72.1 (C-2'), 73.5 (C-5'), 73.8 (C-3'), 96.3 (C-1'), 96.8 (C-21), 110.5 (C-16), 110.6 (C-7), 112.9 (C-12), 119.0 (C-9), 120.5 (C-10), 121.5 (C-18), 123.0 (C-11), 129.2 (C-8), 134.0 (C-19), 135.2 (C-2), 138.4 (C-13), 148.7 (C-17), 167.3 (C-22), 171.0 (OCOCH_3 -2'), 171.7 (OCOCH_3 -4'), 172.0 (OCOCH_3 -3'), 172.8 (OCOCH_3 -6').

III.9. Acetilação do glucósido do β -sitosterol (163)

Procedeu-se à acetilação nas condições habituais de 30 mg do glucósido do β -sitosterol (**163**). O resíduo foi eluído em coluna de sílica gel 60, com Et_2O tendo-se obtido 38.7 mg ($\eta = 100\%$) do tetracetato do glucósido do β -sitosterol (**164**).

III.9.1. Tetracetato do glucósido do β -sitosterol (164)



Pf 162–167°C

Pf lit.¹⁶¹ 169–170°C

$[\alpha]_D^{25} -33.3^\circ$ (c 0.73, CHCl₃)

lit.¹⁶¹ $[\alpha]_D^{25} -34.5^\circ$ (c 0.39, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2932, 2863, 1750, 1740, 1641, 1431, 1376, 1365, 1221, 1161, 1103, 1047, 906, 801, 758.

UV λ_{\max}^{EtOH} nm: 216.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.68 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J_{27,25} = 8.4$, H-27), 0.83 (3H, d, $J_{26,25} = 7.4$, H-26), 0.85 (3H, t, $J_{29,28} = 7.5$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 6.2$, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 2.01 (3H, s, OCOCH₃), 2.02 (3H, s, OCOCH₃), 2.05 (3H, s, OCOCH₃), 2.08 (3H, s, OCOCH₃), 3.49 (1H, dt, $J_{3,2a(4a)} = 11.1$, $J_{3,2b(4b)} = 5.0$, H-3), 3.68 (1H, m, H-5'), 4.11 (1H, dd, $J_{6'a,6'b} = 12.2$, $J_{6'a,5'} = 1.7$, H-6'a), 4.26 (1H, dd, $J_{6'b,6'a} = 12.2$, $J_{6'b,5'} = 4.8$, H-6'b), 4.59 (1H, d, $J_{1',2'} = 8.0$, H-1'), 4.96 (1H, dd, $J_{2',3'} = 9.3$, $J_{2',1'} = 8.3$, H-2'), 5.08 (1H, t, $J_{3',4'} = 9.7$, H-3'), 5.21 (1H, t, $J_{4',5'} = 9.5$, H-4'), 5.36 (1H, d, $J_{6,7} = 4.3$, H-6).

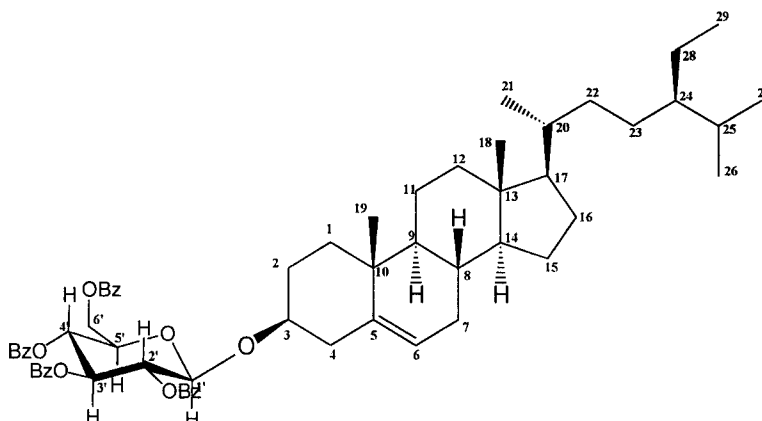
^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 11.8 (C-18), 12.0 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-27), 19.3 (C-19), 19.8 (C-26), 20.5 (OCOCH_3), 20.6 (OCOCH_3), 20.7 (OCOCH_3), 20.8 (OCOCH_3), 21.0 (C-11), 23.0 (C-28), 24.3 (C-15), 26.0 (C-23), 28.2 (C-16), 29.1 (C-25), 29.4 (C-2), 31.8 (C-8), 31.9 (C-7), 33.9 (C-22), 36.1 (C-20), 36.7 (C-10), 37.2 (C-1), 38.9 (C-4), 39.7 (C-12), 42.3 (C-13), 45.8 (C-24), 50.1 (C-9), 56.0 (C-17), 56.7 (C-14), 62.1 (C-6'), 68.5 (C-3'), 71.5 (C-4'), 71.7 (C-2'), 72.9 (C-5'), 80.1 (C-3), 99.6 (C-1'), 122.2 (C-6), 140.3 (C-5), 169.3 (OCOCH_3), 169.4 (OCOCH_3), 170.4 (OCOCH_3), 170.7 (OCOCH_3).

EIMS m/z (int. rel.): 745 (1) [M^+ , $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{10}$], 397 (29), 332 (5), 276 (3), 256 (6), 229 (3), 213 (4), 169 (53), 109 (47), 69 (20), 43 (100).

III.10. Benzoilação do glucósido do β -sitosterol (163)

Colocaram-se num balão, 20 mg do glucósido do β -sitosterol e 1 mL de piridina (seca), sob agitação magnética e em banho de gelo. Adicionou-se à referida mistura 1 mL de cloreto de benzoílo e deixou-se sob agitação durante 2 horas (a reacção foi seguida por ccd até desaparecimento total do material de partida). Adicionou-se à mistura 5 mL de diclorometano e transferiu-se para uma ampola de decantação, lavando-se a referida mistura com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (2 x 5 mL), com água (2 x 5 mL) e com uma solução de 2M de ácido sulfúrico (2 x 5 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido no evaporador rotativo, obtendo-se 33.6 mg ($\eta = 98\%$) do tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (**166**).

III.10.1. Tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (166)



Pf 189–190°C

$[\alpha]_D^{25} +12.3^\circ$ (c 0.7, CHCl₃)

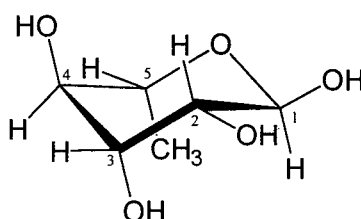
IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2954, 2935, 2868, 1732, 1450, 1265, 1094, 708.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J = 7.8$, H-27), 0.83 (3H, d, $J = 7.4$, H-26), 0.85 (3H, t, $J = 5.3$, H-29), 0.90 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 5.4$, H-21), 3.54 (1H, dt, $J = 10.2$, $J = 5.0$, H-3), 4.17 (1H, dt, $J_{5,4} = 9.6$, $J_{5,6} = 5.8$, $J_{5,6'} = 2.3$, H-5'), 4.53 (1H, dd, $J_{6'a,6'b} = 11.8$, $J_{6'a,5} = 5.8$, H-6'a), 4.61 (1H, dd, $J_{6'b,6'a} = 11.8$, $J_{6'b,5} = 2.3$, H-6'b), 4.95 (1H, d, $J_{1,2} = 7.8$, H-1'), 5.22 (1H, sl, H-6), 5.51 (1H, t, $J_{2,3} = 9.0$, $J_{2,1} = 7.8$, H-2'), 5.64 (1H, t, $J_{4,3} = 9.6$, $J_{4,5} = 9.6$, H-4'), 5.91 (1H, t, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{3,2} = 9.0$, H-3'), 7.24–8.02 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 11.8 (C-18), 11.9 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-27), 19.2 (C-19), 19.8 (C-26), 63.4 (C-6'), 70.1 (C-4'), 72.1 (C-2', C-5'), 73.1 (C-3'), 80.4 (C-3), 100.1 (C-1'), 121.9 (C-6), 128.2–133.4 (C-aromáticos), 140.3 (C-5), 165.1 (CO), 165.2 (CO), 165.8 (CO), 166.0 (CO).

III.11. Hidrólise do éster dimetílico do ácido 3-β-O-α-L-triacetilramno-piranósido quinóvico (**179**)

Colocaram-se 20 mg de **179** em 10 mL de ácido trifluoracético (4N) num tubo selado, aquecendo-se a mistura em banho de água durante 2 horas. A solução foi evaporada à secura e o resíduo sujeito a cromatografia de fase reversa, usando como eluentes água, metanol e clorofórmio. Por ccd (RP-18; 'spray' de α-naftol), verificou-se que o açúcar livre resultante da hidrólise estava na fracção aquosa, da qual, após evaporação, se obtiveram 3.8 mg ($\eta = 91\%$) de α-L-ramnopiranosose (**181**).

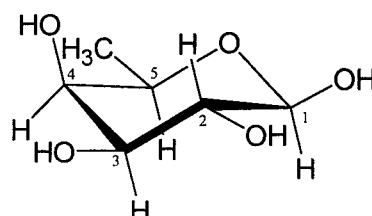


$$[\alpha]_D^{25} +7.33^\circ \text{ (c 0.03, H}_2\text{O)}$$

$$\text{lit.}^{183} [\alpha]_D^{20} +8.2^\circ \text{ (c 10.0, H}_2\text{O)}$$

III.12. Hidrólise do éster dimetílico do ácido 3-β-O-β-D-triacetilfucopiranósido quinóvico (**180**)

Colocaram-se 30 mg de **180** em 15 mL de ácido trifluoracético (4N) num tubo selado, aquecendo-se a mistura em banho de água durante 2 horas. A solução foi evaporada à secura e o resíduo sujeito a cromatografia de fase reversa, usando como eluentes água, metanol e clorofórmio. Por ccd (RP-18; 'spray' de α-naftol), verificou-se que o açúcar livre resultante da hidrólise estava na fracção aquosa, da qual, após evaporação, se obtiveram 7.5 mg ($\eta = 96\%$) de β-D-fucopiranosose (**182**).



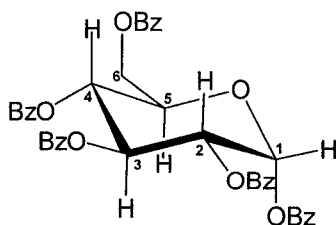
$$[\alpha]_D^{25} +70.85^\circ (c 0.05, \text{H}_2\text{O})$$

$$\text{lit.}^{183} [\alpha]_D^{21} +76.0^\circ (c 10.0, \text{H}_2\text{O})$$

III.13. Síntese do glucósido do β -sitosterol (163)

III.13.1. Síntese da 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- α -D-glucopirranose (168)

Num balão de duas tubuladuras, equipado com um termómetro e com uma ampola de carga, arrefecido num banho de gelo e sal, colocaram-se 5.25 mL de cloreto de benzoílo em 5.25 mL de diclorometano (seco) sob agitação magnética. Adicionaram-se 6.3 mL de piridina (seca) em 5.25 mL de diclorometano (seco). Retirou-se a ampola de carga e adicionaram-se em pequenas porções 2.5 g de α -D-glucose, mantendo a temperatura da reacção a 10°C. A mistura foi mantida a 0°C durante 24 horas, após o que foi diluída com 20 mL de diclorometano e transferida para uma ampola de decantação. A solução foi lavada sucessivamente, com uma solução de ácido sulfúrico 2M (3 x 30 mL), água (3 x 30 mL) e com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 30 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido no evaporador rotativo. O sólido obtido 7.45 g ($\eta = 77\%$) foi recristalizado de acetona/água.



Pf 184–185°C

Pf lit.¹⁶⁵ 184–186°C; Pf lit.¹⁸³ 185–188°C

$$[\alpha]_D^{25} +125.4^\circ (c 0.3, \text{CHCl}_3)$$

lit.¹⁶⁵ $[\alpha]_D^{20} +184.4^\circ$ (c 1.75, CHCl₃); lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20} +127.0^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

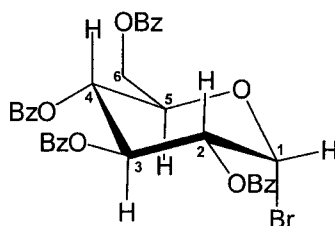
IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3065, 3034, 2960, 1732.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.49 (1H, dd, $J_{6,6'} = 13.1$, $J_{6,5} = 5.0$, H-6), 4.63 (2H, d, $J_{5,6} = 5.0$, $J_{6',6} = 13.1$, H-5, H-6'), 5.69 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{2,1} = 3.6$, H-2), 5.87 (1H, t, $J_{4,3} = 10.0$, $J_{4,5} = 9.9$, H-4), 6.33 (1H, t, $J_{3,2} = 10.4$, $J_{3,4} = 10.0$, H-3), 6.86 (1H, d, $J_{1,2} = 3.6$, H-1), 7.25–8.18 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 62.5 (C-6), 68.8 (C-4), 70.5 (C-2, C-3, C-5), 90.2 (C-1), 129.1–134.6 (C-aromáticos), 165.1 (C=O), 165.8 (C=O), 166.0 (C=O), 166.6 (C=O), 166.8 (C=O).

III.13.2. Síntese da bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosose (169)

Num balão, solubilizaram-se 4.00 g de 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil- α -D-glucopiranosose em 8 mL de 1,2-dicloroetano, ao qual se adicionaram 8 mL de uma solução de brometo de hidrogénio em ácido acético glacial (45% w/v HBr). A mistura foi colocada a 0°C durante 24 horas, após o qual foi decantada para uma ampola de separação que continha uma mistura de água e gelo (± 25 mL). A fase orgânica foi lavada sucessivamente com uma solução saturada de NaHCO₃, água, e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido no evaporador rotativo e o sólido obtido recristalizado de Et₂O/Éter de petróleo, do qual se obtiveram 3.5 g ($\eta = 93\%$) de bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosose (**169**).



Pf 129–131°C

Pf lit.¹⁶⁵ 129–130°C; Pf lit.¹⁸³ 128–131°C

$[\alpha]_D^{25} +124^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

lit.¹⁶⁵ $[\alpha]_D^{20} +125.0^\circ$ (c 2.0, CHCl₃); lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20} +125.0^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3063, 2960, 1731, 1268, 1105, 707.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.51 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.5$, $J_{6,5} = 4.5$, H-6), 4.67 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.5$, $J_{6',5} = 2.4$, H-6'), 4.74 (1H, dt, $J_{5,4} = 9.8$, $J_{5,6} = 4.5$, $J_{5,6'} = 2.4$, H-5), 5.34 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.0$, $J_{2,1} = 4.0$, H-2), 5.83 (1H, t, $J_{4,3} = 10.0$, $J_{4,5} = 9.8$, H-4), 6.27 (1H, t, $J_{3,2} = 10.0$, $J_{3,4} = 10.0$, H-3), 6.87 (1H, d, $J_{1,2} = 4.0$, H-1), 7.25–8.08 (H-aromáticos).

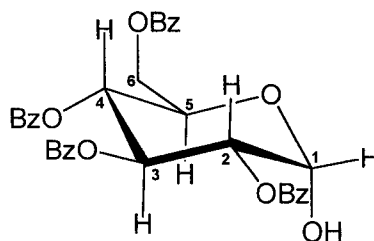
¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 61.9 (C-6), 68.0 (C-4), 70.6 (C-5), 71.4 (C-2), 72.7 (C-3), 86.9 (C-1), 128.5–133.9 (C-aromáticos), 165.3 (CO), 165.5 (CO), 165.8 (CO), 166.2 (CO).

III.13.3. Síntese da 2,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-glucopirranose (170)

Num balão, solubilizaram-se 2.00 g de bromo-2,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α -D-glucopirranose (**169**) em 12 mL de éter etílico, ao qual se adicionaram 1.7 g de Ag₂CO₃ e 0.1 mL de água. A reacção foi seguida por ccd, usando como eluente CHCl₃, verificando-se estar completa após duas horas. A mistura reaccional foi filtrada e seca com sulfato de sódio anidro, e o composto purificado por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente CHCl₃, tendo-se obtido 1.76 g ($\eta = 98\%$) de 2,3,4,6-tetra-O-benzoíl- α,β -D-glucopirranose (**170**).

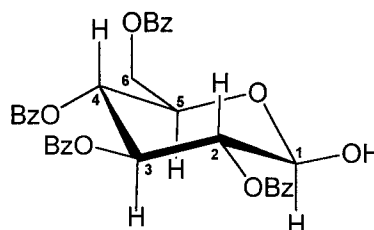
Pf 82–84°C

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3444, 3063, 2961, 1729, 1270, 1094, 708.

Anómero α (75%)

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.43 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.5$, $J_{6,5} = 4.4$, H-6), 4.65 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.5$, $J_{6',5} = 2.5$, H-6'), 4.69 (1H, dt, $J_{5,4} = 9.9$, $J_{5,6} = 4.4$, $J_{5,6'} = 2.5$, H-5), 5.31 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.0$, $J_{2,1} = 3.5$, H-2), 5.74 (1H, t, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{4,3} = 9.9$, H-4), 5.77 (1H, d, $J_{1,2} = 3.5$, H-1), 6.26 (1H, t, $J_{3,2} = 10.0$, $J_{3,4} = 9.9$, H-3), 7.28–8.06 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 62.9 (C-6), 67.8 (C-5), 69.5 (C-4), 70.1 (C-3), 72.2 (C-2), 90.5 (C-1), 128.3–133.6 (C-aromáticos), 165.3 (CO), 165.9 (CO), 166.3 (CO).

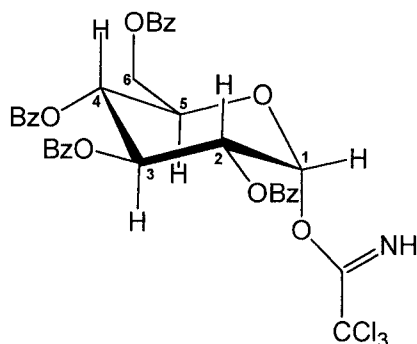
Anómero β (25%)

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.18 (1H, dt, $J_{5,4} = 9.8$, $J_{5,6} = 5.0$, $J_{5,6'} = 2.8$, H-5), 4.49 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.2$, $J_{6,5} = 5.0$, H-6), 4.64 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.2$, $J_{6',5} = 2.8$, H-6'), 5.07 (1H, d, $J_{1,2} = 8.0$, H-1), 5.38 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.0$, $J_{2,1} = 8.0$, H-2), 5.71 (1H, t, $J_{4,5} = 9.8$, $J_{4,3} = 9.8$, H-4), 5.97 (1H, t, $J_{3,2} = 10.0$, $J_{3,4} = 9.8$, H-3), 7.27–8.03 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 63.0 (C-6), 69.5 (C-4), 72.3 (C-3), 72.4 (C-5), 74.2 (C-2), 96.1 (C-1), 128.4–133.7 (C-aromáticos), 165.4 (CO), 166.0 (CO), 166.4 (CO), 166.9 (CO).

III.13.4. Síntese da 1-O-(2,2,2-tricloroetanimidoí)-2,3,4,6-tetra-O-benzoí- α -D-glucopirranose (165)

Num balão colocaram-se 1.0 g de 2,3,4,6-tetra-O-benzoí- α,β -D-glucopirranose (**170**) em 20 mL de CH_2Cl_2 (seco), ao qual se adicionaram 2.4 g de tricloroacetnitrilo e, 1 minuto depois, 0.034 g de hidreto de sódio (suspensão a 70%). Após 15 minutos em agitação magnética e à temperatura ambiente, evaporou-se o solvente a pressão reduzida, e o composto foi purificado por cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente Hexano/AcOEt (80:20), tendo-se obtido 0.95 g ($\eta = 77\%$) de 1-O-(2,2,2-tricloroetanimidoí)-2,3,4,6-tetra-O-benzoí- α -D-glucopirranose (**165**).



Pf 59–60°C

$[\alpha]_D^{25} +73.3^\circ$ (c 0.4, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3340, 3064, 2957, 1731, 1676, 1268, 1093, 707.

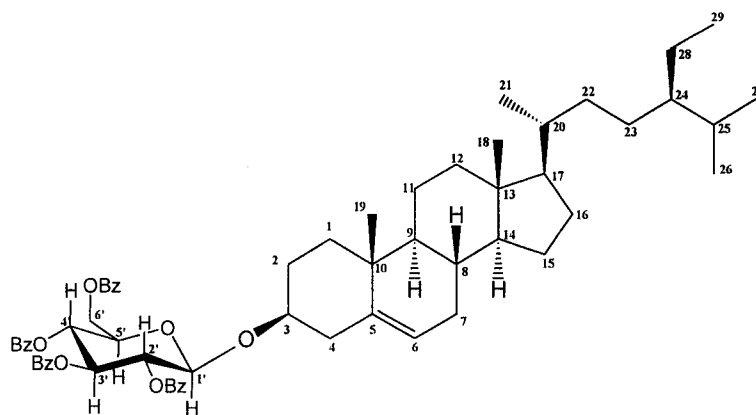
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.49 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.3$, $J_{6,5} = 4.9$, H-6), 4.65 (2H, d, $J_{6',6} = 12.3$, H-5, H-6'), 5.63 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.2$, $J_{2,1} = 3.6$, H-2), 5.82 (1H, t, $J_{4,3} = 9.9$, $J_{4,5} = 9.9$, H-4), 6.28 (1H, t, $J_{3,2} = 10.2$, $J_{3,4} = 9.9$, H-3), 6.84 (1H, d, $J_{1,2} = 3.6$, H-1), 7.25–8.05 (H-aromáticos), 8.64 (1H, s, -CNH).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 62.4 (C-6), 68.6 (C-4), 70.2 (C-3), 70.7 (C-2, C-5), 90.7 ($-\text{CCl}_3$), 93.1 (C-1), 128.4–133.4 (C-aromáticos), 160.7 ($-\text{CNH}$), 165.4 (C=O), 165.6 (C=O), 165.8 (C=O), 166.2 (C=O).

FABMS (positivo) m/z (int. rel.): 579 (15) $[M-C_2H_2NOCl_3]^+$, 230 (39), 165 (29), 136 (100).

III.13.5. Síntese do tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (**166**)

Num balão, dissolveram-se 0.700 g de 1-O-(2,2,2-tricloroetanimidoil)-2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranoose (**165**) e 0.330 g de β -sitosterol comercial em 10 mL de CH_2Cl_2 seco, colocando-se de seguida a mistura reaccional num banho de azoto/acetona a $-25^\circ C$, após o que se adicionou, gota a gota, uma solução de 0.2 mL de trifluoreto eterato de boro em 1.0 mL de CH_2Cl_2 (seco). Após 2 horas a $-25^\circ C$ e sob agitação, neutralizou-se a solução com 0.4 g de $NaHCO_3$ sólido e posteriormente com 12 mL de uma solução saturada de $NaHCO_3$, arrefecida em gelo. A fase orgânica, foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O composto foi purificado por cromatografia de coluna de fase normal de sílica gel 60, usando como eluente Hexano/AcOEt (80:20), tendo-se obtido 0.553 g ($\eta = 70\%$) de tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (**166**).



Pf 189–190°C

$[\alpha]_D^{25} +12.3^\circ$ (c 0.7, $CHCl_3$)

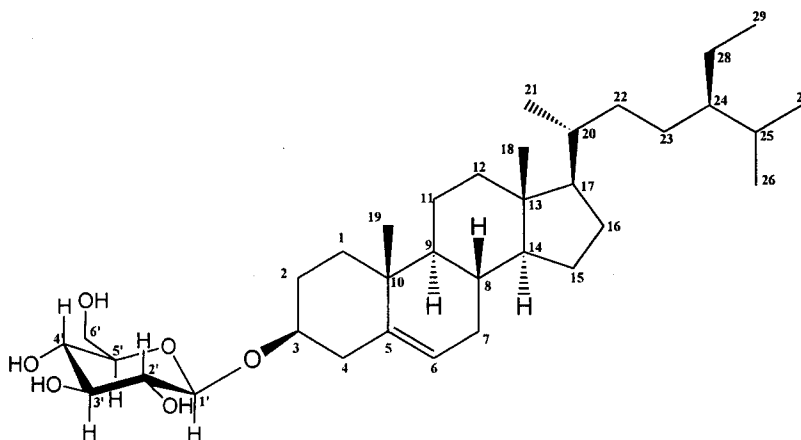
IV ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 2954, 2935, 2868, 1732, 1450, 1265, 1094, 708.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J_{27,25} = 7.8$, H-27), 0.83 (3H, d, $J_{26,25} = 7.4$, H-26), 0.85 (3H, t, $J_{29,28} = 5.3$, H-29), 0.90 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J_{21,20} = 5.4$, H-21), 3.54 (1H, dt, $J_{3,2a(4a)} = 10.2$, $J_{3,2b(4b)} = 5.0$, H-3), 4.17 (1H, dt, $J_{5',4'} = 9.6$, $J_{5',6'a} = 5.8$, $J_{5',6'b} = 2.3$, H-5'), 4.53 (1H, dd, $J_{6'a,6'b} = 11.8$, $J_{6'a,5'} = 5.8$, H-6'a), 4.61 (1H, dd, $J_{6'b,6'a} = 11.8$, $J_{6'b,5'} = 2.3$, H-6'b), 4.95 (1H, d, $J_{1',2'} = 7.8$, H-1'), 5.22 (1H, sl, H-6), 5.51 (1H, t, $J_{2',3'} = 9.0$, $J_{2',1'} = 7.8$, H-2'), 5.64 (1H, t, $J_{4',3'} = 9.6$, $J_{4',5'} = 9.6$, H-4'), 5.91 (1H, t, $J_{3',4'} = 9.6$, $J_{3',2'} = 9.0$, H-3'), 7.24–8.02 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 11.8 (C-18), 11.9 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-27), 19.2 (C-19), 19.8 (C-26), 21.0 (C-11), 23.1 (C-28), 24.2 (C-15), 26.1 (C-23), 28.2 (C-16), 29.2 (C-25), 29.6 (C-2), 31.8 (C-8), 31.9 (C-7), 33.9 (C-22), 36.1 (C-20), 36.6 (C-10), 37.1 (C-1), 38.8 (C-4), 39.7 (C-12), 42.3 (C-13), 45.8 (C-24), 50.1 (C-9), 56.0 (C-17), 56.7 (C-14), 63.4 (C-6'), 70.1 (C-4'), 72.1 (C-2', C-5'), 73.1 (C-3'), 80.4 (C-3), 100.1 (C-1'), 121.9 (C-6), 128.2–133.4 (C-aromáticos), 140.3 (C-5), 165.1 ($\underline{\text{CO}}$), 165.2 ($\underline{\text{CO}}$), 165.8 ($\underline{\text{CO}}$), 166.0 ($\underline{\text{CO}}$).

III.13.6. Desbenzoilação do tetrabenzoato do glucósido do β -sitosterol (166)

Solubilizaram-se 100 mg do glucósido do β -sitosterol benzoilado (**166**) em 50 mL de THF (seco), ao qual se adicionaram 2 mL de metóxido de sódio (obtido pela reacção total de sódio em metanol), à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Após 10 minutos adicionaram-se 1 mL de ácido acético e deixou-se em agitação durante 5 minutos. A mistura foi evaporada a pressão reduzida e eluída em coluna de fase normal, com um gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 a 80:20), tendo-se obtido 55 mg ($\eta = 95\%$) do glucósido do β -sitosterol (**163**).



Pf 280–282°C

$[\alpha]_D^{25} -36.8^\circ$ (c 6.6, piridina)

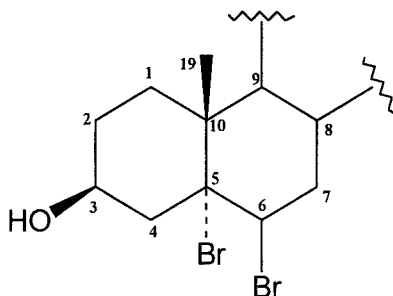
IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3391, 2918, 2849, 1735, 1641, 1465, 1378, 1367, 1167, 1107, 1073, 1022, 800, 719.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J_{27,25} = 7.0$, H-27), 0.82 (3H, d, $J_{26,25} = 6.9$, H-26), 0.83 (3H, t, $J_{29,28} = 6.9$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 5.6$, H-21), 0.97 (3H, s, H-19), 2.91 (1H, m, H-2'), 3.02–3.14 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 3.35 (1H, m, H-6_a'), 3.48 (1H, m, $W_{1/2} = 16$, H-3), 3.65 (1H, m, H-6_b'), 4.23 (1H, d, $J_{1',2'} = 7.5$, H-1'), 4.44 (1H, t, $J_{\text{OH}(6'),6'} = 5.6$, -OH (6')), 4.88–4.92 (3H, m, -OH (2', 3', 4')), 5.34 (1H, sl, H-6).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.8 (C-18), 11.9 (C-29), 18.8 (C-21), 19.1 (C-27), 19.3 (C-19), 19.9 (C-26), 20.8 (C-11), 22.8 (C-28), 24.1 (C-15), 25.6 (C-23), 28.0 (C-16), 28.9 (C-25), 29.5 (C-2), 31.6 (C-8), 31.6 (C-7), 33.5 (C-22), 35.7 (C-20), 36.4 (C-10), 37.0 (C-1), 38.5 (C-4), 39.5 (C-12), 42.0 (C-13), 45.3 (C-24), 49.8 (C-9), 55.6 (C-17), 56.4 (C-14), 61.3 (C-6'), 70.3 (C-4'), 73.7 (C-2'), 76.9 (C-3, C-3', C-5'), 100.9 (C-1'), 121.4 (C-6), 140.7 (C-5).

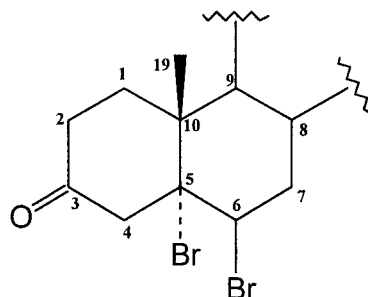
III.14. Síntese da estigmast-4-en-3-ona (171)

III.14.1. Síntese do dibrometo do β -sitosterol (172)



Dissolveram-se 1.5 g de β -sitosterol comercial em 10 mL de eter etílico (seco), num balão com agitação magnética. Uma segunda solução foi preparada por adição de 0.05 g de acetato de sódio anidro a 6 mL de ácido acético, à qual se adicionou, após solubilização completa do sólido, 0.68 g de bromo. A segunda solução foi adicionada à primeira, gota a gota, através de uma ampola isobárica, mantendo sempre a agitação. A solução foi arrefecida num banho de gelo a 20°C, e a pasta amarela que se formou, foi filtrada num funil de Büchner e lavada com ácido acético até ficar incolor, tendo-se obtido 1.8 g ($\eta = 87\%$) de dibrometo do β -sitosterol (172).

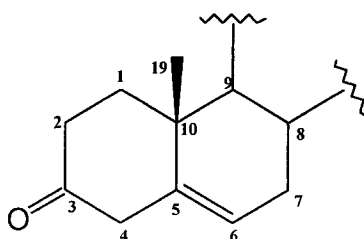
III.14.2. Síntese do $5\alpha,6\beta$ -dibromoestigmastan-3-ona (173)



O dibrometo do β -sitosterol obtido no passo anterior foi colocado num balão ao qual se adicionam 2 mL de ácido acético, sob agitação magnética. O balão foi colocado num banho de gelo, e adicionou-se de uma só vez, uma solução pré-

aquecida (90°C) de 0.8 g de dicromato de sódio di-hidratado em 20 mL de ácido acético. A mistura reaccional atingiu uma temperatura de 55–58 °C, e o sólido dissolveu-se totalmente em 3 minutos. Exactamente 7 minutos depois da adição da solução de dicromato, o balão foi colocado num banho de gelo durante 10 minutos, de onde se formaram cristais. Adicionou-se então 4 mL de água gota a gota e os cristais formados foram filtrados num funil de Büchner, lavados com 2 mL de metanol e secos na bomba de vácuo, tendo-se obtido 1.6 g ($\eta = 89\%$) de 5 α ,6 β -dibromoestigmastan-3-ona (**173**).

III.14.3. Síntese da estigmast-5-en-3-ona (**174**)

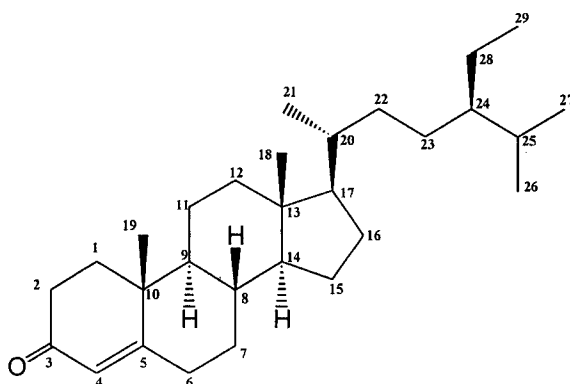


A 5 α , 6 β -dibromoestigmastan-3-ona (**173**) obtida, foi colocada num balão com agitação magnética e em banho de gelo (15 °C), ao qual se adicionaram 20 mL de éter etílico e 0.25 mL de ácido acético. Adicionou-se ao balão 0.4 g de zinco em pó, em porções de 0.05 g/min., mantendo a temperatura em valores próximos dos 15 °C, deixando-se no final o balão em agitação à temperatura ambiente durante 10 minutos. À mistura reaccional adicionou-se 0.5 mL de piridina para precipitar o brometo de zinco formado durante a reacção. Filtrou-se a mistura num funil de Büchner, lavando-se com éter etílico. Numa ampola de decantação a solução de éter etílico foi lavada sucessivamente com água (2x10 mL) e com uma solução a 5% de NaHCO₃ (2x10 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se até um volume aproximado de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de metanol, reduziu-se o volume da mistura por evaporação e deixou-se a cristalizar à temperatura ambiente e posteriormente a 0–4°C, tendo-se obtido 1.0 g ($\eta = 87\%$) da estigmast-5-en-3-ona (**174**).

Pf 118–122°C

IV ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹: 2954, 2868, 1716, 1682, 1463, 1377, 960, 756.

III.14.4. Isomerização da estigmast-5-en-3-ona (174) em estigmast-4-en-3-ona (171)



Uma mistura de 1.0 g de estigmast-5-en-3-ona (**174**), 0.1 g de ácido oxálico e 8 mL de etanol (95%), foi aquecida até à solubilização total e seguidamente por mais 10 minutos. A mistura deixou-se a cristalizar à temperatura ambiente e posteriormente a 0-4°C, tendo-se obtido por filtração, 0.8 g ($\eta = 80\%$) da estigmast-4-en-3-ona (**171**).

Pf 95-96°C

Pf lit.¹⁷¹ 95-96.5°C; Pf lit.¹⁷² 92-94°C

$[\alpha]_D^{25} +80^\circ$ (c 0.6, CHCl₃)

lit.¹⁷¹ $[\alpha]_D +81.3^\circ$ (c 2.78); lit.¹⁷² $[\alpha]_D^{23} +80^\circ$ (c 0.35, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2955, 2931, 2869, 2852, 1677, 1614, 1463, 1377, 1228.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.71 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J_{27,25} = 7.2$, H-27), 0.84 (3H, d, $J_{26,25} = 7.2$, H-26), 0.85 (3H, t, $J_{29,28} = 7.5$, H-29), 0.92 (3H, d, $J_{21,20} = 6.3$, H-21), 1.18 (3H, s, H-19), 5.72 (1H, s, H-4).

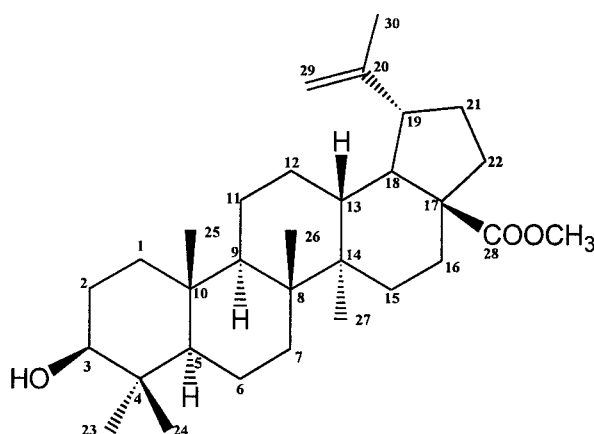
^{13}C -RMN (100.61 MHz , CDCl_3) δ : 11.9 (C-18, C-29), 17.4 (C-19), 18.7 (C-21), 19.0 (C-27), 19.8 (C-26), 21.0 (C-11), 23.1 (C-28), 24.1 (C-15), 26.0 (C-23), 28.1 (C-16), 29.1 (C-25), 32.0 (C-7), 32.9 (C-6), 33.9 (C-2), 34.0 (C-22), 35.6 (C-1), 35.7 (C-8), 36.1 (C-20), 38.6 (C-10), 39.6 (C-12), 42.4 (C-13), 45.8 (C-24), 53.8 (C-9), 55.9 (C-14), 56.0 (C-17), 123.7 (C-4), 171.6 (C-5), 199.6 (C-3).

Nota: Todas as reacções (14.1 a 14.4) foram seguidas por ccd, usando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2)

III.15. Metilação do ácido betulínico (176)

O ácido betulínico (10 mg), foi metilado nas condições habituais, tendo-se obtido 10.3 mg ($\eta = 100\%$) do éster metílico do ácido betulínico (**177**).

III.15.1. Éster metílico do ácido betulínico (177)



^1H -RMN (400 MHz , CDCl_3) δ : 0.76 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.92 (3H, s, H-23), 0.97 (6H, s, H-26, H-27), 1.69 (3H, s, H-30), 3.18 (1H, dd, $J_{3,2a} = 11.0$, $J_{3,2b} = 5.0$, H-3), 3.67 (3H, s, COOCH_3), 4.60 (1H, sl, H-29_a), 4.74 (1H, sl, H-29_b).

III.16. Identificação dos ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos

A mistura de ácidos gordos (30 mg) , solubilizado em Et₂O seco, foi metilada com diazometano, tendo-se obtido 32 mg dos respectivos ésteres. A separação e identificação dos ésteres dos ácidos gordos foi efectuada por GC-EM (Tabela III.4).

GC

Coluna - BP1 (30 m; 0.25 mm d.i.; 0.25 μm)

Gás de arraste - Hélio

Amostra em CHCl₃

Temperatura do injector - 250°C

Temperatura do detector - 200°C

Temperatura da coluna - Isotérmica a 120°C durante 1 minuto; subida a 10°C/minuto de 120 a 160°C; subida a 7°C/minuto de 160 a 300°C; isotérmica a 300 °C durante 5 minutos.

Tabela III.4 – Ésteres metílicos dos ácidos gordos do extracto etanólico neutro dos troncos.

Tempo de retenção (min.)	Intensidade (%)	[M ⁺]	Éster metílico do ácido gordo
11.48	0.96	242	Ácido mirístico (Ácido tetradecanoico)
13.24	1.04	256	Ácido pentadecanoico
14.37	2.55	268	Ácido palmitoleico ((Z) Ácido 9-hexadecenoico)
15.04	21.20	270	Ácido palmítico (Ácido hexadecanoico)
16.31	0.70	284	Ácido margárico (Ácido heptadecanoico)
17.37	38.00	296	Ácido oleico ((Z) Ácido 9-octadecenoico)
18.00	25.60	298	Ácido esteárico (Ácido octadecanoico)
19.57	0.80	294	Ácido linoleico ((Z,Z) Ácido 9,12-octadecadienoico)

III.17. Separação e identificação dos açúcares do extracto etanólico neutro dos troncos

III.17.1. Derivatização dos açúcares para GC

Uma fracção dos açúcares, 2 mg, foi dissolvida em 0.1 mL de NH₄OH 1 M e reduzida com 1 mL de uma solução de 2% de NaBH₄ em DMSO, a uma temperatura de 45°C durante 90 minutos. Após o arrefecimento da solução adicionaram-se a esta 100 µL de ácido acético glacial, seguidos de 200 µL de 1-metilimidazol e 1 mL de anidrido acético. A solução foi colocada sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante 25 minutos. O excesso de anidrido

acético foi destruído com água e os acetatos dos alditois extraídos com diclorometano e separados por GC (Figura II.45, pg. 136 e Tabela II.23, pg. 137).

III.17.2. Benzoilação dos açúcares

Uma parte da fracção dos açúcares, 2.00 g, foi dissolvida em 19 mL de piridina seca e arrefecida num banho de gelo (aprox. 0°), à qual foram adicionados 28 mL de cloreto de benzoílo. Após 2 horas retirou-se o banho de gelo e manteve-se a mistura em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Adicionou-se à mistura um excesso de água (30 mL), e deixou-se novamente em agitação durante 24 horas. A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, dissolvendo-se o resíduo final em CHCl₃ que foi lavado sucessivamente com uma solução saturada de NaHCO₃ (2x100 mL), H₂SO₄ 2M (2x100 mL), e água (2x100 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada à secura, donde se obtiveram 6.00 g da mistura benzoílada. Uma fracção da mistura benzoílada (250 mg), foi separada por HPLC, de acordo com as condições abaixo indicadas, através de repetidas injecções (28x200 µL)

HPLC – Semi-preparativo

Coluna – Lichrospher Si-60 (fase normal, 250 mm x 8 mm, 10 µm)

Detecção – 275 nm

Fluxo – 6 mL/min

Eluentes – Gradiente de Hexano/AcOEt (Tabela III.5)

Tabela III.5 – Gradiente de eluição (HPLC) da mistura de açúcares benzoíladados.

T (min)	Hexano	AcOEt
0	90	10
10	80	20
35	80	20
40	60	40
44	50	50
48	90	10

Foram recolhidas 11 fracções (F1 a F11) de cada injeção, das quais se isolaram os compostos, **168**, **186** a **196**, **203** e **204** (Figura III.7).

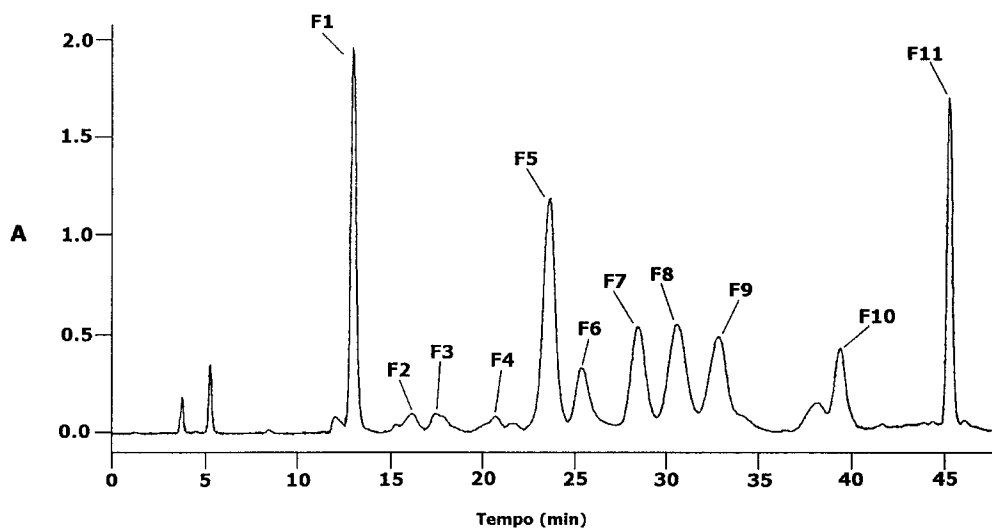


Figura III.7 – Cromatograma de HPLC da mistura de açúcares benzoíladados.

Da fracção F1 isolou-se o composto **203** (1,2,3-tri-*O*-benzoílglicerol, 30.3 mg).

Da fracção F2 isolou-se o composto **204** (1,2,3,4-tetra-*O*-benzoíl-D-eritritol, 2.6 mg).

A fracção F3 continha uma mistura de compostos (**186**, **187**, **195** e **196**), que foram posteriormente separados por HPLC, de acordo com as seguintes condições:

HPLC – Semi-preparativo

Coluna – Lichrospher 100 RP18 (fase reversa, 250 mm x 8 mm, 10 µm)

Deteção – 275 nm

Fluxo – 6 mL/min

Eluentes – Gradiente de H₂O/MeOH (Tabela III.6)

Tabela III.6 – Gradiente de eluição (HPLC) da mistura de **186**, **187**, **195** e **196**.

T (min)	H ₂ O	MeOH
0	20	80
20	0	100
22	20	80

Da referida fracção F3, recolheram-se duas fracções F3.1 e F3.2. A fracção F3.1 continha uma mistura de dois compostos (**186** e **187**) cuja separação foi efectuada por ccp, de sílica gel de fase normal, através de sucessivas eluições usando como eluente Hexano/AcOEt (90:10), obtendo-se então o composto **186** (1,2,3,4-tetra-*O*-benzoíl-β-D-xilopirranose, 1.9 mg) e o composto **187** (1,2,3,4-tetra-*O*-benzoíl-α-D-xilopirranose, 1.5 mg). A fracção F3.2 continha uma mistura inseparável, através dos métodos anteriormente usados, dos compostos **195** e **196** (metil-1,3,4,6-tetra-*O*-benzoíl-α,β-D-fructofuranósido, 1.2 mg).

A fracção F4 continha uma mistura dos compostos **188** (1,2,3,4-tetra-*O*-benzoíl-β-D-arabinopirranose, 2.4 mg) e **189** (1,2,3,4-tetra-*O*-benzoíl-α-D-arabinopirranose, 1.9 mg), que foram posteriormente separados por ccp, de sílica gel de fase normal, através de sucessivas eluições com Hexano/AcOEt (90:10).

Da fracção F5 isolou-se o composto **193** (1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoíl-α-D-fructofuranose, 48.0 mg).

O composto **194** (1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoíl-β-D-fructofuranose, 6.5 mg), foi isolado da fracção F6 e posteriormente purificado por HPLC, nas condições acima referidas para a fracção F3, excepto no caso do eluente, em que se usou a mistura isocrática Hexano/Dioxano (80:20).

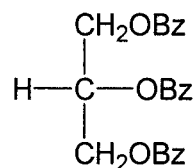
O composto **168** (1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoíl-α-D-glucopirranose, 35.3 mg), foi isolado da fracção F7 e posteriormente purificado por HPLC, nas mesmas condições do composto **194**.

O composto **191** (1,2,3,4,5-penta-*O*-benzoíl-β-D-fructopiranosose, 31.3 mg), foi isolado da fracção F8 e posteriormente purificado por HPLC, nas mesmas condições do composto **194**.

Da fracção F9 isolou-se o composto **190** (1,2,3,4,6-penta-*O*-benzoíl-β-D-glucopiranosose, 34.1 mg) e da fracção F11 o composto **192** (1,3,4,5-tetra-*O*-benzoíl-β-D-fructopiranosose, 24.4 mg).

III.17.2.1. Características físicas e espectroscópicas dos açúcares benzoíladados

III.17.2.1.1. 1,2,3-Tri-*O*-benzoílglicerol (203)



Pf 70–71°C

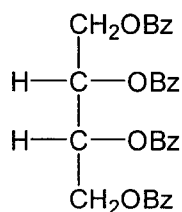
$[\alpha]_D^{25}$ 0° (c 0.3, CHCl₃)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3064, 3034, 2959, 1732.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.70 (2H, dd, $J_{1,1'} = J_{3,3'} = 11.9$, H-1, H-3), 4.76 (2H, dd, $J_{1',2} = J_{3',2} = 4.4$, H-1', H-3'), 5.84 (1H, m, H-2), 7.40–8.09 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ: 62.9 (C-1, C-3), 69.7 (C-2), 128.4–133.2 (C-aromáticos), 165.6 (CO), 166.0 (CO).

III.17.2.1.2. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-D-eritritol (204)



Pf 188–189°C

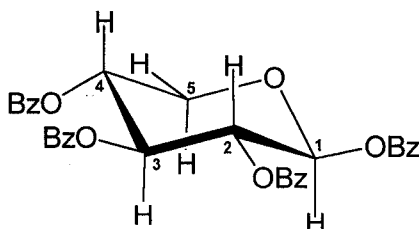
$[\alpha]_D^{25} 0^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3069, 3034, 2950, 1725.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.66 (2H, dd, $J_{1,1'} = J_{4,4'} = 11.9$, H-1, H-4), 4.89 (2H, dd, $J_{1',2} = J_{4',3} = 4.4$, H-1', H-4'), 5.97 (2H, s, H-2, H-3), 7.38–8.05 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 62.7 (C-1, C-4), 70.1 (C-2, C-3), 128.4–133.4 (C-aromáticos), 165.3 (CO), 166.0 (CO).

III.17.2.1.3. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-β-D-xilopiranoose (186)



Pf 175–177°C

Pf lit.²⁰⁵ 175–177°C; Pf lit.²⁵⁹ 173–177°C

$[\alpha]_D^{25} -22.7^\circ$ (c 0.8, CHCl₃)

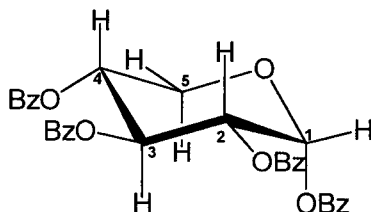
lit.²⁵⁹ $[\alpha]_D^{20} -42.1^\circ$ (c 2.27, CHCl₃)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3065, 2918, 2851, 1727.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.01 (1H, dd, $J_{5,5'} = 12.5$, $J_{5,4} = 7.3$, H-5), 4.56 (1H, dd, $J_{5',5} = 12.5$, $J_{5',4} = 3.8$, H-5'), 5.39 (1H, ddd, $J_{4,5} = 7.3$, $J_{4,3} = 5.9$, $J_{4,5'} = 3.8$, H-4), 5.62 (1H, t, $J_{2,3} = 5.4$, $J_{2,1} = 4.4$, H-2), 5.82 (1H, t, $J_{3,4} = 5.9$, $J_{3,2} = 5.4$, H-3), 6.36 (1H, d, $J_{1,2} = 4.4$, H-1), 7.32–8.04 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 61.8 (C-5), 68.1 (C-4), 68.5 (C-2), 69.1 (C-3), 92.1 (C-1), 128.4–133.7 (C-aromáticos), 164.5 ($\underline{\text{CO}}$), 165.1 ($\underline{\text{CO}}$), 165.7 ($\underline{\text{CO}}$).

III.17.2.1.4. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil- α -D-xilopiranoze (187)



Pf 118–120°C

Pf lit.²⁰⁵ 119–121°C; Pf lit.²⁵⁹ 119–120°C; Pf lit.²⁶⁰ 115–116°C

$[\alpha]_D^{25}$ +138.5° (c 0.8, CHCl_3)

lit.²⁵⁹ $[\alpha]_D^{20}$ +149.5° (c 2.09, CHCl_3); lit.²⁵⁹ $[\alpha]_D^{20}$ +115.0° (c 2.0, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3065, 3034, 2961, 2896, 1732.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.07 (1H, t, $J_{5,5'} = 11.2$, $J_{5,4} = 10.0$, H-5), 4.30 (1H, dd, $J_{5',5} = 11.2$, $J_{5',4} = 5.8$, H-5'), 5.54 (1H, ddd, $J_{4,5} = 10.0$, $J_{4,3} = 9.8$, $J_{4,5'} = 5.8$, H-4), 5.63 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.1$, $J_{2,1} = 3.5$, H-2), 6.27 (1H, t, $J_{3,2} = 10.1$, $J_{3,4} = 9.8$, H-3), 6.76 (1H, d, $J_{1,2} = 3.5$, H-1), 7.29-8.16 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 61.2 (C-5), 69.5 (C-4), 69.9 (C-3), 70.3 (C-2), 90.3 (C-1), 128.4-133.8 (C-aromáticos), 164.6 ($\underline{\text{C}}\text{O}$), 165.4 ($\underline{\text{C}}\text{O}$), 165.5 ($\underline{\text{C}}\text{O}$), 165.9 ($\underline{\text{C}}\text{O}$).

III.17.2.1.5. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranosido (195 e 196)

óleo

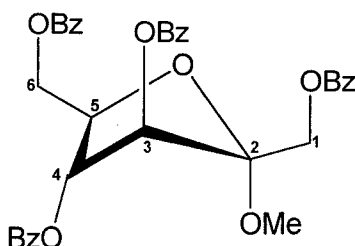
$[\alpha]_D^{25} -17.2^\circ$ (c 0.4, CHCl_3)

lit.²¹¹ $[\alpha]_D^{22} -12.0^\circ$ (c 1.9, CHCl_3) (α -50% + β -50%)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3064, 2925, 2853, 1726.

FABMS (positivo) m/z (int. rel.): 579 (7) $[\text{M-OCH}_3]^+$, 335 (24), 230 (11), 166 (28), 148 (100).

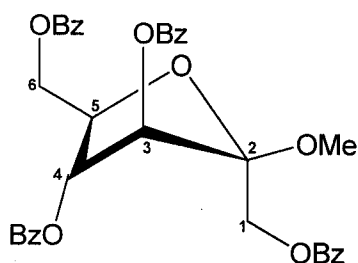
III.17.2.1.5.1. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-fructofuranósido (195)



^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.46 (3H, s, OCH_3), 4.39 (1H, d, $J_{1,1'} = 12.3$, H-1), 4.53 (1H, m, H-5), 4.72 (1H, dd, $J_{6,6'} = 11.8$, $J_{6,5} = 4.7$, H-6), 4.85 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.8$, $J_{6',5} = 4.7$, H-6'), 4.97 (1H, d, $J_{1',1} = 12.3$, H-1'), 5.56 (1H, d, $J_{4,5} = 4.7$, H-4), 5.88 (1H, s, H-3), 7.24–8.09 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 48.9 (OCH_3), 58.9 (C-1), 63.6 (C-6), 78.9 (C-4), 81.0 (C-3), 81.3 (C-5), 104.0 (C-2), 128.9–134.2 (C-aromáticos), 166.2–166.9 (CO).

III.17.2.1.5.2. Metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-fructofuranósido (196)



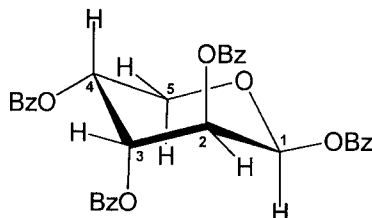
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.46 (3H, s, OCH_3), 4.59 (1H, m, H-5), 4.64 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.2$, H-1), 4.66 (1H, d, $J_{1',1} = 11.2$, H-1'), 4.67 (1H, d, $J_{6,6'} = 11.5$, H-6), 4.78 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.5$, $J_{6',5} = 3.6$, H-6'), 5.99 (1H, t, $J_{4,3} = 6.8$, $J_{4,5} = 6.1$, H-4), 6.10 (1H, d, $J_{3,4} = 6.8$, H-3), 7.24–8.09 (H-aromáticos).

^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.39 (3H, s, OCH_3), 4.56 (1H, dd, $J_{6,6'} = 11.7$, $J_{6,5} = 5.0$, H-6), 4.60 (2H, d, $J_{1,1'} = 11.6$, H-1, H-1'), 4.66 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.7$, $J_{6',5} = 3.6$, H-6'), 4.71 (1H, m, H-5), 5.93 (1H, t, $J_{4,3} = 7.0$, $J_{4,5} = 6.6$, H-4), 6.07 (1H, d, $J_{3,4} = 7.0$, H-3), 7.26–8.01 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 49.9 (OCH_3), 63.1 (C-1), 65.1 (C-6), 77.2 (C-4), 77.9 (C-3), 78.8 (C-5), 103.4 (C-2), 128.9–134.2 (C-aromáticos), 166.2–166.9 (CO).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 53.5 (OCH_3), 67.1 (C-1), 68.2 (C-6), 80.2 (C-3), 81.1 (C-5), 81.7 (C-4), 106.6 (C-2), 132.5–137.8 (C-aromáticos), 168.8–169.4 (CO).

III.17.2.1.6. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoíl- β -D-arabino iranose (188)



Pf 163–165°C

Pf lit.²⁰⁵ 159–161°C; Pf lit.²⁶¹ 160–161°C

$[\alpha]_D^{25}$ +293.8° (c 0.6, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3064, 3034, 2975, 1730.

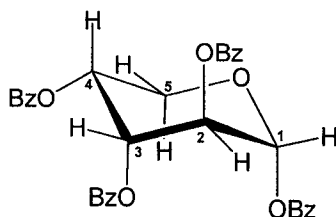
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.19 (1H, d, $J_{5,5'} = 13.2$, H-5), 4.41 (1H, d, $J_{5',5} = 13.2$, H-5'), 5.90 (1H, s, H-4), 6.07 (2H, s, H-2, H-3), 6.86 (1H, s, H-1), 7.28–8.19 (H-aromáticos).

^1H -RMN (400 MHz, $(\text{CO})\text{CD}_6$) δ : 4.26 (1H, dd, $J_{5,5'} = 13.5$, $J_{5,4} = 1.0$, H-5), 4.29 (1H, d, $J_{5',5} = 13.5$, H-5'), 6.02 (1H, d, $J_{4,3} = 3.6$, $J_{4,5} = 1.0$, H-4), 6.12 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{2,1} = 3.5$, H-2), 6.23 (1H, dd, $J_{3,2} = 10.7$, $J_{3,4} = 3.6$, H-3), 6.96 (1H, d, $J_{1,2} = 3.5$, H-1), 7.33–8.25 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 63.0 (C-5), 67.8 (C-2), 68.2 (C-3), 69.5 (C-4), 91.2 (C-1), 129.1–134.5 (C-aromáticos), 165.4 (CO), 165.8 (CO), 166.2 (CO), 166.5 (CO).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, $(\text{CO})\text{CD}_6$) δ : 63.8 (C-5), 69.0 (C-2, C-3), 70.6 (C-4), 91.8 (C-1), 129.3–134.8 (C-aromáticos), 165.4 ($\underline{\text{CO}}$), 165.9 ($\underline{\text{CO}}$), 166.1 ($\underline{\text{CO}}$), 166.3 ($\underline{\text{CO}}$).

III.17.2.1.7. 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil- α -D-arabinopiranoose (189)



Pf 158–160°C

Pf lit.²⁰⁵ 163–164°C

$[\alpha]_D^{25}$ -32.4° (c 0.5, CHCl_3)

lit.²⁶¹ $[\alpha]_D^{25}$ -114.4° (c 0.848, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3065, 2918, 2850, 1728.

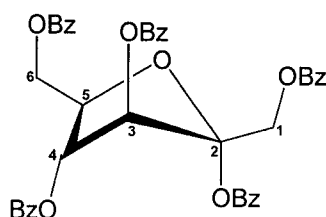
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.28 (1H, dd, $J_{5,5'} = 12.9$, $J_{5,4} = 4.1$, H-5), 4.40 (1H, dd, $J_{5',5} = 12.9$, $J_{5',4} = 2.1$, H-5'), 5.70 (1H, t, $J_{4,5} = 4.1$, $J_{4,3} = 3.4$, H-4), 5.72 (1H, t, $J_{2,3} = 3.5$, $J_{2,1} = 3.4$, H-2), 6.05 (1H, t, $J_{3,2} = 3.5$, $J_{3,4} = 3.4$, H-3), 6.61 (1H, d, $J_{1,2} = 3.4$, H-1), 7.29–8.13 (H-aromáticos).

^1H -RMN (400 MHz, $(\text{CO})\text{CD}_6$) δ : 4.34 (1H, dd, $J_{5,5'} = 13.1$, $J_{5,4} = 3.7$, H-5), 4.64 (1H, dd, $J_{5',5} = 13.1$, $J_{5',4} = 2.3$, H-5'), 5.81 (1H, t, $J_{2,3} = 3.5$, $J_{2,1} = 3.2$, H-2), 5.81 (1H, t, $J_{4,3} = 3.8$, $J_{4,5} = 3.7$, H-4), 6.18 (1H, t, $J_{3,4} = 3.8$, $J_{3,2} = 3.5$, H-3), 6.67 (1H, d, $J_{1,2} = 3.2$, H-1), 7.37–8.22 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 63.2 (C-5), 66.7 (C-3), 67.1 (C-4), 67.8 (C-2), 92.2 (C-1), 129.1–134.6 (C-aromáticos), 165.0 ($\underline{\text{CO}}$), 166.3 ($\underline{\text{CO}}$).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, $(\text{CO})\text{CD}_6$) δ : 64.0 (C-5), 67.6 (C-3), 68.3 (C-4), 68.7 (C-2), 93.4 (C-1), 129.6–135.0 (C-aromáticos), 166.0 ($\underline{\text{CO}}$), 166.4 ($\underline{\text{CO}}$).

III.17.2.1.8. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- α -D-fructofuranose (193)



Pf 125–127°C

Pf lit.²¹⁰ 114°C; 124–125°C

$[\alpha]_D^{25}$ +8.1° (c 0.3, CHCl_3)

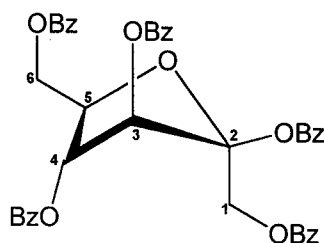
lit.²¹⁰ $[\alpha]_D^{22}$ +8.0° (c 1.3, CHCl_3); +9.4° (c 1.0, CHCl_3)

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3064, 3034, 1727.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.74 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.1$, $J_{6,5} = 5.0$, H-6), 4.83 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.1$, $J_{6',5} = 3.4$, H-6'), 4.93 (1H, dd, $J_{5,6} = 5.0$, $J_{5,6'} = 3.4$, H-5), 5.03 (1H, d, $J_{1,1'} = 12.0$, H-1), 5.31 (1H, d, $J_{1',1} = 12.0$, H-1'), 5.77 (1H, dd, $J_{4,5} = 4.2$, $J_{4,3} = 2.4$, H-4), 6.47 (1H, d, $J_{3,4} = 2.4$, H-3), 7.19–8.14 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 62.3 (C-1), 63.5 (C-6), 77.4 (C-4), 79.7 (C-3), 81.9 (C-5), 109.5 (C-2), 128.9–134.4 (C-aromáticos), 165.2 ($\underline{\text{CO}}$), 165.4 ($\underline{\text{CO}}$), 166.1 ($\underline{\text{CO}}$), 166.2 ($\underline{\text{CO}}$).

III.17.2.1.9. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil-β-D-fructofuranose (194)



Pf 64–66°C

$[\alpha]_D^{25} -27.7^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3066, 3034, 2918, 2850, 1729.

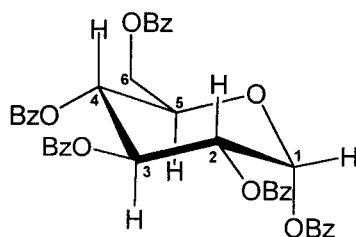
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.74 (1H, dd, $J_{6,6'} = 14.0$, $J_{6,5} = 6.8$, H-6), 4.74 (1H, dd, $J_{5,6} = 6.8$, $J_{5,6'} = 5.5$, H-5), 4.86 (1H, dd, $J_{6',6} = 14.0$, $J_{6',5} = 5.5$, H-6'), 5.05 (2H, s, H-1, H-1'), 6.31 (1H, d, $J_{4,5} = 6.6$, H-4), 6.32 (1H, s, H-3), 7.23–8.04 (H-aromáticos).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.61 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.0$, $J_{6,5} = 5.1$, H-6), 4.70 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.0$, $J_{6',5} = 3.1$, H-6'), 4.91 (1H, dd, $J_{5,6} = 5.1$, $J_{5,6'} = 3.1$, H-5), 5.02 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.5$, H-1), 5.10 (1H, d, $J_{1',1} = 11.5$, H-1'), 6.19 (1H, t, $J_{4,5} = 6.9$, $J_{4,3} = 6.9$, H-4), 6.40 (1H, d, $J_{3,4} = 6.9$, H-3), 7.21–8.00 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 64.3 (C-6), 65.2 (C-1), 76.9 (C-4), 77.7 (C-3), 80.3 (C-5), 105.4 (C-2), 128.9–134.2 (C-aromáticos), 163.8 (CO), 165.2 (CO), 165.5 (CO), 166.1 (CO).

¹³C-RMN (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 67.4 (C-6), 68.8 (C-1), 79.6 (C-4), 81.5 (C-3), 82.6 (C-5), 108.6 (C-2), 132.3–137.9 (C-aromáticos), 167.5 (CO), 168.4 (CO), 168.7 (CO), 169.1 (CO), 169.3 (CO).

III.17.2.1.10. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil- α -D-glucopiranosose (168)



Pf 184–186°C

Pf lit.¹⁶⁵ 184–185°C; Pf lit.¹⁸³ 185–188°C

$[\alpha]_D^{25} +125.4^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

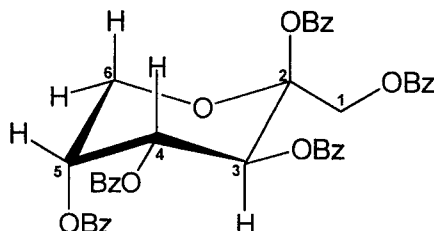
lit.¹⁶⁵ $[\alpha]_D^{20} +184.4^\circ$ (c 1.75, CHCl₃); lit.¹⁸³ $[\alpha]_D^{20} +127.0^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3065, 3034, 2960, 1732.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.49 (1H, dd, $J_{6,6'} = 13.1$, $J_{6,5} = 5.0$, H-6), 4.63 (1H, d, $J_{6',6} = 13.1$, H-6'), 4.63 (1H, d, $J_{5,6} = 5.0$, H-5), 5.69 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{2,1} = 3.6$, H-2), 5.87 (1H, t, $J_{4,3} = 10.0$, $J_{4,5} = 9.9$, H-4), 6.33 (1H, t, $J_{3,2} = 10.4$, $J_{3,4} = 10.0$, H-3), 6.86 (1H, d, $J_{1,2} = 3.6$, H-1), 7.25–8.18 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 62.5 (C-6), 68.8 (C-4), 70.5 (C-2, C-3, C-5), 90.2 (C-1), 129.1–134.6 (C-aromáticos), 165.1 (CO), 165.8 (CO), 166.0 (CO), 166.6 (CO), 166.8 (CO).

III.17.2.1.11. 1,2,3,4,5-Penta-O-benzoil-β-D-fructopiranosose (191)



Pf 154–156°C

Pf lit.²¹⁰ 155–156°C; Pf lit.²¹⁷ 152–153°C

$[\alpha]_D^{25}$ -198.7° (c 0.2, CHCl₃)

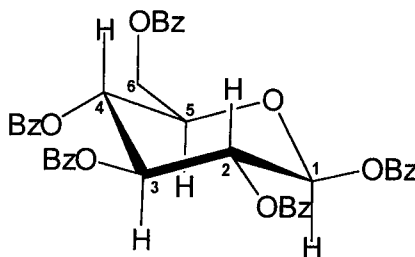
lit.²¹⁰ $[\alpha]_D^{20}$ -201.0° (c 1.0, CHCl₃); lit.²¹⁷ $[\alpha]_D^{20}$ -212.0° (c 1.0, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3066, 3034, 2963, 1732.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.29 (2H, d, $J_{6,6'} = 13.4$, H-6, H-6'), 4.80 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.8$, H-1), 5.55 (1H, d, $J_{1',1} = 11.8$, H-1'), 5.86 (1H, sl, H-5), 6.03 (1H, dd, $J_{4,3} = 10.6$, $J_{4,5} = 3.0$, H-4), 6.50 (1H, d, $J_{3,4} = 10.6$, H-3), 7.25–8.25 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ: 63.3 (C-1), 63.7 (C-6), 68.0 (C-3), 69.3 (C-5), 69.4 (C-4), 103.2 (C-2), 125.5–134.0 (C-aromáticos), 163.5 (CO), 165.2 (CO), 165.3 (CO), 165.6 (CO), 165.9 (CO).

III.17.2.1.12. 1,2,3,4,6-Penta-O-benzoil-β-D-glucopiranosose (190)



Pf 138–141°C

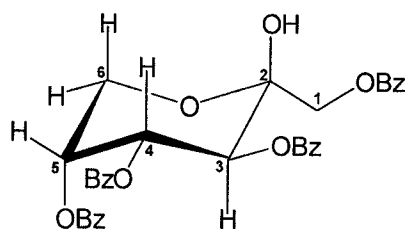
$[\alpha]_D^{25} +11.1^\circ$ (c 0.4, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3065, 3034, 2960, 1732.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.42 (1H, ddd, $J_{5,6} = 4.8$, $J_{5,6'} = 2.8$, $J_{5,4} = 9.8$, H-5), 4.52 (1H, dd, $J_{6,6'} = 12.4$, $J_{6,5} = 4.8$, H-6), 4.67 (1H, dd, $J_{6',6} = 12.4$, $J_{6',5} = 2.8$, H-6'), 5.84 (1H, t, $J_{4,5} = 9.8$, $J_{4,3} = 9.5$, H-4), 5.88 (1H, dd, $J_{2,3} = 9.2$, $J_{2,1} = 8.1$, H-2), 6.05 (1H, t, $J_{3,4} = 9.5$, $J_{3,2} = 9.2$, H-3), 6.32 (1H, d, $J_{1,2} = 8.1$, H-1), 7.25–8.05 (H-aromáticos).

¹³C-RMN (100.61 MHz, CDCl₃) δ : 62.7 (C-6), 69.1 (C-4), 70.8 (C-2), 72.8 (C-3), 73.2 (C-5), 92.7 (C-1), 129.0–134.5 (C-aromáticos), 165.3 (C=O), 165.8 (C=O), 166.4 (C=O), 166.8 (C=O).

III.17.2.1.13. 1,3,4,5-Tetra-O-benzoíl- β -D-fructopiranosose (192)



Pf 175–177°C

Pf lit.²¹⁰ 177–178°C

$[\alpha]_D^{25} -165.0^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

lit.²¹⁰ $[\alpha]_D^{20} -165.0^\circ$ (c 1.7, CHCl₃)

IV ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3415, 3071, 3020, 2960, 1727.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.07 (1H, d, $J_{6,6'} = 13.1$, H-6), 4.45 (1H, d, $J_{6',6} = 13.1$, H-6'), 4.52 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.8$, H-1), 4.58 (1H, d, $J_{1',1} = 11.8$, H-1'), 5.78 (1H, sl, H-5), 5.96 (1H, dd, $J_{4,3} = 10.4$, $J_{4,5} = 3.0$, H-4), 6.19 (1H, d, $J_{3,4} = 10.4$, H-3), 7.23–8.07 (H-aromáticos).

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 4.02 (1H, d, $J_{6,6'} = 13.1$, H-6), 4.24 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.6$, H-1), 4.43 (1H, d, $J_{6',6} = 13.1$, H-6'), 4.55 (1H, d, $J_{1',1} = 11.6$, H-1'), 5.78 (1H, sl, H-5), 5.85 (1H, dd, $J_{4,3} = 10.5$, $J_{4,5} = 3.1$, H-4), 6.13 (1H, d, $J_{3,4} = 10.5$, H-3), 7.34–8.10 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 61.7 (C-6), 66.7 (C-1), 68.8 (C-3), 69.3 (C-4), 70.1 (C-5), 96.8 (C-2), 129.0–134.1 (C-aromáticos), 166.4 ($\underline{\text{CO}}$), 166.5 ($\underline{\text{CO}}$), 167.5 ($\underline{\text{CO}}$).

III.17.4. Separação dos açúcares livres por HPLC

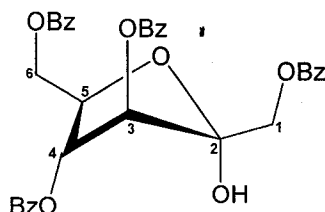
A separação dos açúcares livres foi efectuada por HPLC (Figura II.59 e Tabela II.29, pg. 157).

III.18. Síntese do metil-1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)

III.18.1. Síntese da 1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranose (198)

Colocou-se num balão, sob agitação magnética, 1.5 g de D-fructose numa mistura de 2.5 mL de piridina e 17.5 mL de diclorometano. Adicionou-se, gota a gota, 4.8 mL de cloreto de benzoílo e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante 2.5 h. Verteu-se a mistura para uma ampola de decantação contendo uma mistura de gelo e água (10 mL), separou-se a fase orgânica, que foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ (10 mL) e água (10 mL), e seca com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o solvente e o resíduo foi sujeito a cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluente CH₂Cl₂, tendo-se obtido 3.44 g (η = 70 %) da mistura de anómeros.²¹¹

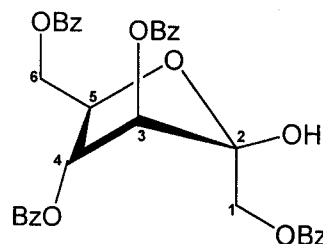
Anómero α (50 %)



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.55 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.9$, H-1), 4.67 (1H, m, H-6), 4.76 (1H, m, H-5), 4.80 (1H, d, $J_{1',1} = 11.9$, H-1'), 4.81 (1H, m, H-6'), 5.60 (1H, dd, $J_{4,5} = 4.8$, $J_{4,3} = 1.7$, H-4), 5.89 (1H, d, $J_{3,4} = 1.7$, H-3), 7.25-8.08 (H-aromáticos).

^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 63.6 (C-6), 64.8 (C-1), 78.5 (C-4), 80.9 (C-5), 81.3 (C-3), 104.5 (C-2), 128.4–133.7 (C-aromáticos), 165.1–166.9 (CO).

Anômero β (50 %)



^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.56 (1H, m, H-5), 4.58 (1H, d, H-1), 4.61 (1H, d, H-1'), 4.70 (1H, d, $J_{5,6} = 4.1$, H-6), 4.94 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.7$, $J_{6',5} = 7.2$, H-6'), 5.92 (1H, t, $J_{4,5} = 5.2$, H-4), 6.00 (1H, d, $J_{3,4} = 5.7$, H-3), 7.25–8.08 (H-aromáticos).

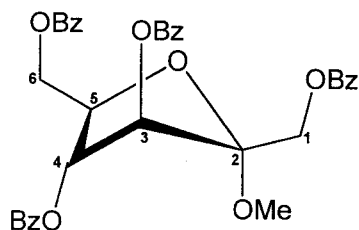
^{13}C -RMN (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 65.4 (C-6), 66.5 (C-1), 77.4 (C-3), 77.8 (C-4), 79.4 (C-5), 102.0 (C-2), 128.4–133.7 (C-aromáticos), 165.1–166.9 (CO).

III.18.2. Metilação da 1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranose (198)

Aqueceu-se a refluxo uma solução de 0.29 g de trifetilfosfina em 6 mL de metanol seco, durante 40 minutos, à qual, após arrefecimento à temperatura ambiente, se adicionou gota a gota 0.22 mL de di-isopropilazodicarboxilato, seguido de 0.5 g de 1,3,4,6-tetra-O-benzoil- α,β -D-fructofuranose. A mistura foi aquecida a refluxo e seguiu-se a reacção por ccd (eluyente, AcOEt/tolueno (10:90)) até esta estar completa (\cong 6 horas), após o que, se evaporou o metanol, obtendo-se um resíduo oleoso. O resíduo foi sujeito a cromatografia de coluna de fase normal, usando como eluyente, AcOEt/tolueno (10:90), tendo-se obtido 0.28 g ($\eta = 67\%$) da mistura de anômeros.

Óleo

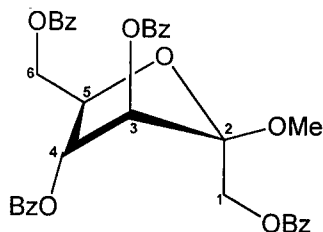
Anómero α (50 %)



$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.45 (3H, s, OCH_3), 4.40 (1H, d, $J_{1,1'} = 12.3$, H-1), 4.53 (1H, m, H-5), 4.72 (1H, dd, $J_{6,6'} = 11.8$, $J_{6,5} = 4.7$, H-6), 4.85 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.8$, $J_{6',5} = 4.7$, H-6'), 4.97 (1H, d, $J_{1',1} = 12.3$, H-1'), 5.57 (1H, d, $J_{4,5} = 4.7$, H-4), 5.88 (1H, s, H-3), 7.24–8.09 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 48.8 (OCH_3), 58.8 (C-1), 63.5 (C-6), 78.9 (C-4), 81.0 (C-3), 81.3 (C-5), 107.3 (C-2), 128.3–133.6 (C-aromáticos), 165.7–166.3 (CO).

Anómero β (50 %)

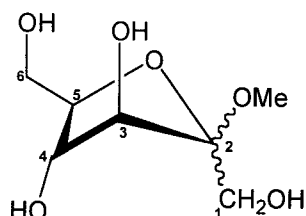


$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.46 (3H, s, OCH_3), 4.59 (1H, m, H-5), 4.64 (1H, d, $J_{1,1'} = 11.2$, H-1), 4.66 (1H, d, $J_{1',1} = 11.2$, H-1'), 4.67 (1H, d, $J_{6,6'} = 11.5$, H-6), 4.78 (1H, dd, $J_{6',6} = 11.5$, $J_{6',5} = 3.6$, H-6'), 5.99 (1H, t, $J_{4,3} = 6.8$, $J_{4,5} = 6.1$, H-4), 6.11 (1H, d, $J_{3,4} = 6.8$, H-3), 7.24–8.09 (H-aromáticos).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100.61 MHz, CDCl_3) δ : 49.8 (OCH_3), 63.0 (C-1), 65.0 (C-6), 77.2 (C-4), 77.9 (C-3), 78.7 (C-5), 103.4 (C-2), 128.3–133.6 (C-aromáticos), 165.7–166.3 (CO).

III.18.3. Desbenzoilação do metil-1,3,4,6-tetra-O-benzóil- α,β -D-fructofuranósido (195 e 196)

Solubilizaram-se 100 mg do metiltetrabenzoato em 50 mL de THF (seco), ao qual se adicionaram 2 mL de metóxido de sódio (obtido pela reacção total de sódio em metanol), à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Após 10 minutos adicionaram-se 1 mL de ácido acético e deixou-se em agitação durante 5 minutos. A mistura foi evaporada a pressão reduzida e eluída em coluna de fase reversa, com um gradiente de H₂O/MeOH (100:0 a 80:20), tendo-se obtido 30 mg (η = 93%) do metil- α,β -D-fructofuranósido (**205**).



¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ : 3.46 (3H, s, OCH₃), 3.73–4.27 (7H, m, H-1, H-1', H-3, H-4, H-5, H-6 e H-6').

¹³C-RMN (100.61 MHz, D₂O) δ : (anómero- β) 58.2 (OCH₃), 61.3 (C-6), 62.9 (C-1), 77.3 (C-4), 79.9 (C-3), 83.3 (C-5), 103.8 (C-2); (anómero- α) 58.2 (OCH₃), 59.9 (C-6), 61.3 (C-1), 81.3 (C-4), 90.6 (C-5), 90.6 (C-3), 108.4 (C-2).

III.19. Determinação da toxicidade no crustáceo *Artemia salina* Leach

As amostras (compostos puros, fracções ou extractos), prepararam-se dissolvendo 40 mg do material em 4 mL do solvente apropriado. Da solução anterior, transferiram-se 500, 250, 100, 50, 25 e 5 μ L para frascos individuais (cada concentração é preparada em triplicado, assim como um branco), dos quais é evaporado o solvente a pressão reduzida.

Os ovos de *A. salina* foram incubados em meio salino artificial (30 g de sal/litro de água) durante 48 horas. Ao fim deste tempo transferiram-se 10 larvas do crustáceo para cada frasco que contém as amostras a testar e aferiu-se o volume a 5 mL com o meio salino. A concentração final para cada frasco é de 1000, 500, 200, 100, 50 e 10 µg/mL, respectivamente. Os frascos mantiveram-se com iluminação durante 24 horas, após as quais se procedeu à contagem do número de crustáceos sobreviventes, para determinação da DL₅₀. Para que um extracto ou fracção se considere activo a DL₅₀ deve ser menor que 1000 µg/mL e no caso de um composto puro a DL₅₀ deve ser menor que 200 µg/mL.²²¹⁻²²³

Foram testados individualmente os extractos etanólicos neutro, básico e ácido das folhas do *S. latifolius*, a estrictosamida (**28**) e o glucósido do β-sitosterol (**163**), cujos resultados se apresentam na tabela III.7.

Tabela III.7 – Determinação da toxicidade no crustáceo *Artemia salina* Leach para os extractos etanólicos das folhas, para a estrictosamida (**28**) e para o glucósido do β-sitosterol (**163**).

Extractos/Compostos		Solvente	Resultado
Extracto etanólico das folhas	Ácido	3% de DMSO e 3% de 'Tween 80'	negativo
	Básico	3% de DMSO e 3% de 'Tween 80'	negativo
	Neutro	3% de DMSO e 3% de 'Tween 80'	negativo
Estrictosamida		1% de DMSO	negativo
Glucósido do β-sitosterol		3% de DMSO e 2% de 'Tween 80'	negativo

BIBLIOGRAFIA

1. Houghton, P., *The Journal of alternative and complementary medicine*, **1995**, 1, 131–143.
2. Cordell, G., *Phytochemistry*, **1995**, 40, 1585–1612.
3. Martins, E.; Abreu, P.; Candé, U., 'Contribuição para o conhecimento de algumas plantas medicinais da Guiné-Bissau', Simpósio sobre agricultura e agro-indústria tropicais, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1996**.
4. Pålsson, K.; Jaenson, T., *Acta Tropica*, **1999**, 72, 39–52.
5. Silva, O.; Duarte, A.; Cabrita, J.; Pimentel, M.; Diniz, A.; Gomes, E., *Journal of Ethnopharmacology*, **1996**, 50, 55–59.
6. Walter, J., *Breve estudo da flora medicinal da Guiné*, Boletim Cultural da Guiné Portuguesa, **1946**, 1, 635–662.
7. Bever, O., *Medicinal plants in tropical West Africa*, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, **1986**.
8. Iwu, M., *Handbook of African Medicinal Plants*, CRC Press Inc, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, **1993**.
9. Santo, J., *Nomes vernáculos de algumas plantas da Guiné Portuguesa*, Junta de Investigações do Ultramar, **1963**.
10. Vieira, R., *Subsídio para o estudo da flora medicinal da Guiné Portuguesa*, Agência Geral do Ultramar, Lisboa, **1959**.
11. Silva, A.; Prista, L.; Alves, A., *Garcia de Horta*, **1963**, 11, 89–95.
12. Silva, A.; Costa, A.; Paiva, M., *Garcia de Horta*, **1964**, 12, 309–316.
13. Gomes, E.; Diniz, M., 'Plantas usadas em medicina tradicional na região de Contuboeil', *Comunicações do Instituto de Investigação Científica Tropical, Sér. Ciênc. Agrárias*, Lisboa, **1993**, 13, 153–165.
14. Roberts, M.; Wink, M., *Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications*, Plenum Press, New York, **1998**.
15. Udoh, F., *Phytotherapy Research*, **1995**, 9, 239–243.
16. Madubunyi, I., *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **1995**, 3, 23–35.

17. Vical, F.; Valentin, A.; Cournac, V.; Pélisser, Y.; Mallié, M.; Bastide, J., *Journal of Ethnopharmacology*, **1998**, *61*, 173–178.
18. Deni, I.; Hussain, H., *Journal of Ethnopharmacology*, **1991**, *35*, 91–96.
19. Asuzu, I.; Njoku, C., *Fitoterapia*, **1996**, *67*, 220–222.
20. Tona, L.; Kambu, K.; Mesia, K.; Penge, O.; Lusakibanza, M.; Cimanga, K.; Bruyne, T.; Apers, S.; Totte, J.; Pieters, L.; Vlietink, A., *Phytomedicine*, **2000**, *7*, 31–38.
21. Raffauf, R., *Plant alkaloids: a guide to their discovery*, Food Products Press, New York, **1996**.
22. Phillipson, J.; Hemingway, S.; Ridsale, C., *J. Nat. Prod.*, **1982**, *45*, 145–162.
23. Phillipson, J.; Hemingway, S.; Bisset, N.; Houghton, P.; Shellard, J., *Phytochemistry*, **1974**, *13*, 973–978.
24. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Pousset, J., *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 1407–1409.
25. Erdelmeier, C.; Regenass, U.; Rali, T.; Sticher, O., *Planta Med.*, **1992**, *58*, 43–48.
26. Zeches, M.; Richard, B.; Bahia, L.; Olivier, L., *J. Nat. Prod.*, **1985**, *48*, 42–46.
27. Sainsbury, M.; Webb, B.; *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 2691–2693.
28. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Pousset, J., *Planta Med.*, **1979**, *35*, 242–246.
29. Repke, D.; Jahangir; Clark, R.; Nelson, J., *Heterocycles*, **1988**, *27*, 2289–2292.
30. Richard, B.; Zeches, M.; Olivier, L., *Bull. Soc. R. Sci. Liege*, **1992**, *61*, 423–428.
31. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Besselièvre, R.; Pousset, J., *C. R. Acad. Sc. Paris, Série C*, **1976**, *282*, 595–597.
32. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1995**, *12*, 385–411.
33. Murray, D.; Szokolcai, A.; McLean, S., *Can. J. Chem.*, **1972**, *50*, 1486–1495.
34. McLean, S.; Murray, D., *Can. J. Chem.*, **1972**, *50*, 1496–1501.

35. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Pousset, J., *C. R. Acad. Sc. Paris (II)*, **1981**, 293, 577–578.
36. Shariff, A.; McLean, S., *Tetrahedron Letters*, **1982**, 23, 4895–4898.
37. Shariff, A.; McLean, S., *Can. J. Chem.*, **1983**, 61, 2813–2820.
38. McLean, S.; Dimitrienko, G.; Szokolcai, A., *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 1262–1277.
39. Dimitrienko, G.; Szokolcai, A.; McLean, S., *Tetrahedron Letters*, **1974**, 30, 2599–2602.
40. Mao, L.; Xin, L.; Dequan, Y., *Planta Med.*, **1984**, 50, 459–461.
41. Naito, T.; Doi, E.; Miyata, O.; Ninomiya, I., *Heterocycles*, **1986**, 24, 903–906.
42. Anam, E., *Indian Journal of Chemistry, Sect. B.*, **1997**, 36, 54–56.
43. Leonard, J., *Natural Product Reports*, **1999**, 16, 319–338.
44. Takayama, H.; Yamamoto, R.; Kurihara, M.; Kitajima, M.; Aimi, N.; Mao, L.; Sakai, S., *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35, 8813–8816.
45. Duez, P.; Milcamp, A.; Lompo, M.; Guissou, P.; Hanocq, M., *Journal of Planar Chromatography*, **1994**, 7, 5–9.
46. Brown, R.; Chapple, C.; Lashford, A., *Phytochemistry*, **1977**, 16, 1619–1620.
47. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Pousset, J., *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **1977**, 11, 106–108.
48. Erdelmeier, C.; Wright, A.; Orjala, J.; Baumgartner, B.; Rali, T.; Sticher, O., *Planta Med.*, **1989**, 55, 602–603.
49. Erdelmeier, C.; Wright, A.; Orjala, J.; Baumgartner, B.; Rali, T.; Sticher, O., *Planta Med.*, **1991**, 57, 149–152.
50. Mao, L.; Xin, L.; Dequan, Y., *Acta Pharmaceutica Sinica*, **1989**, 24, 32–36.
51. Itoh, A.; Tanahashi, T.; Nagakura, N., *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1228–1239.
52. Takayama, H.; Ohmori, O.; Sakai, M.; Funahashi, M.; Kitajima, M.; Santiarworm, D.; Liawruangrath, B.; Aimi, N., *Heterocycles*, **1998**, 49, 49–52.

53. Saxton, J., *Monoterpenoid indole alkaloids*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **1994**, 25 (parte 4).
54. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1993**, 10, 349–395.
55. Brown, R.; Chapple, C., *Tetrahedron Letters*, **1976**, 31, 2723–2724.
56. Dimitrienko, G.; Murray, D.; McLean, S., *Tetrahedron Letters*, **1974**, 30, 1961–1964.
57. Adeoye, A.; Waigh, R., *Phytochemistry*, **1983**, 22, 2097–2098.
58. Lamidi, M.; Ollivier, E.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Ekekang, L.; Balansard, G., *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **1995**, 5, 8–9.
59. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1991**, 8, 251–307.
60. Mao, L.; Xin, L.; Dequan, Y.; Shi-Qi, D.; You-Ji, Z.; Qing-Mei, L., *Acta Pharmaceutica Sinica*, **1985**, 20, 902–905.
61. Hottelier, F.; Delaveau, P.; Pousset, J., *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1884–1885.
62. Takayama, H.; Miyabe, Y.; Shito, T.; Kitajima, M.; Aimi, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44, 2192–2194.
63. McLean, S.; Murray, D., *Can. J. Chem.*, **1972**, 50, 1478–1485.
64. Snyder, H.; Parmeter, S.; Katz, L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 222–225.
65. Snyder, H.; Walker, H.; Werber, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 527–529.
66. Castañeda, P.; Albor, C.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E., *Fitoterapia*, **1991**, 62, 366.
67. Snyder, H.; Hansch, C.; Katz, L.; Parmeter, S.; Spaeth, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 219–221.
68. Ohomoto, T.; Koike, K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1984**, 32, 3579–3583.
69. Achenbach, H.; Biemann, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 4177–4181.
70. Joshi, B.; Kamat, V.; Gawad, D., *Heterocycles*, **1977**, 7, 193–200.
71. Au, T.; Cheung, H.; Sternhell, S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1973**, 13–16.
72. Lin, L.; Cordell, G., *Phytochemistry*, **1990**, 29, 2744–2746.

73. Takayama, H.; Ohmori, O.; Subhadhirasakul, S.; Kitajima, M.; Aimi, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, *45*, 1231–1233.
74. Achenbach, H.; Benirschke, M., *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 1387–1390.
75. Lukáts, Á.; Kocsis, Á.; Szabó, L.; Podányi, B., *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 1492–1499.
76. Marston, A.; Hostettmann, K., *Natural Product Reports*, **1991**, *8*, 391–413.
77. Nyiredy, S.; Erdelmeier, C; Meier, B.; Sticher, O., *Planta Med.*, **1985**, *51*, 241–246.
78. Nyiredy, S.; Tölke, K.; Sticher, O., *Journal of Planar Chromatography*, **1988**, *1*, 336–342.
79. Gerasimenko, I.; Sheludko, Y.; Unger, M.; Stöckigt, J., *Book of Abstracts*, Amsterdam, The Netherlands, **1999**, N° 264.
80. Phillipson, J.; Hemingway, S., *Journal of Chromatography*, **1975**, *105*, 163–178.
81. Repke, D.; Jahangir; Clark, R.; Nelson, J., *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 2541–2550.
82. Ninomiya, I.; Naito, T.; Takasugi, H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1976**, 1865–1868.
83. Kohl, W.; Witte, B; Höfle, G., *Planta Med.*, **1983**, *47*, 177–182.
84. Renaudin, J., *Journal of Chromatography*, **1984**, *291*, 165–174.
85. MacPhillamy, H.; Dorfman, L.; Huebner, C.; Schlittler, E.; André, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1071–1072.
86. Lounasmaa, M.; Berner, M.; Tolvanen, A., *Heterocycles*, **1998**, *48*, 1275–1290.
87. Lyle, G., *J. Org. Chem.*, **1960**, *25*, 1779–1784.
88. Verbit, L.; Mitsui, S.; Senda, Y., *Tetrahedron*, **1966**, *22*, 753–760.
89. Jahangir, Brook, M.; MacLean, D.; Holland, H., *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 5761–5768.
90. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1990**, *7*, 191–243.

91. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1992**, 9, 393–446.
92. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1994**, 11, 493–531.
93. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1996**, 13, 327–363.
94. Saxton, J., *Natural Product Reports*, **1997**, 14, 559–590.
95. Sainsbury, M.; Uttley, N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1976**, 2416–2418.
96. Sainsbury, M.; Uttley, N., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, 319–320.
97. Sainsbury, M.; Uttley, N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1977**, 2109–2115.
98. Lavilla, R.; Gullón, F.; Bosch, J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1675–1676.
99. Lavilla, R.; Gullón, F.; Bosch, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 373–378.
100. Kametani, T.; Takeshita, M.; Ihara, M.; Fukumoto, K., *Heterocycles*, **1975**, 3, 627–631.
101. Kametani, T.; Takeshita, M.; Ihara, M., *Heterocycles*, **1976**, 4, 247–250.
102. Kametani, T.; Takeshita, M.; Ihara, M.; Fukumoto, K., *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 2542–2545.
103. Wanner, M.; Koomen, G.; Pandit, U., *Tetrahedron*, **1983**, 39, 3673–3681.
104. Repke, D.; Jahangir; Clark, R.; MacLean, D., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 439–440.
105. Jahangir; MacLean, D.; Brook, M.; Holland, H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 1608–1609.
106. Vohra, R.; MacLean, D.; *Heterocycles*, **1994**, 39, 445–448.
107. Naito, T.; Miyata, O.; Ninomiya, I., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 517–518.
108. Lukáts, Á.; Károlyházy, L.; Szabó, L.; Podányi, B., *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 69–75.
109. Stöckigt, J., *Phytochemistry*, **1979**, 18, 965–971.
110. Brown, R.; Duckworth, M.; Santos, C., *Tetrahedron Letters*, **1991**, 32, 1987–1990.

111. Saunders, G.; Hamilton, R.; McLean, S., *Tetrahedron Letters*, **1982**, *23*, 2359–2360.
112. Hamilton, R.; Saunders, G.; McLean, S., *Can. J. Chem.*, **1983**, *61*, 284–287.
113. Manna, R.; Jaisankar, P.; Giri, V., *Synthetic Communications*, 1998, *28*, 9–16
114. Mann, J., '*Chemical Aspects of Biosynthesis*', Oxford Chemistry Primers, *20*, Oxford, **1994**.
115. Battersby, A.; Burnett, A.; Parsons, P., *J. Chem. Soc. (C)*, **1969**, 1193–1200.
116. Tedder, J.; Nechvatal, A.; Murray, A.; Carnduff, J., *Basic Organic Chemistry*, Part 4, John Wiley & Sons, London, **1972**.
117. Kutchan, T., *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 493–506.
118. Silva, K.; Smith, G.; Warren, K., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1971**, 905–911.
119. Blackstock, W.; Brown, R.; Lee, G., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1971**, 910–911.
120. Warzecha, H.; Gerasimenko, I.; Kutchan, T.; Stöckigt, J., *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 657–666.
121. Rueffer, M.; Nagakura, N.; Zenk, M., *Tetrahedron Letters*, **1978**, *18*, 1593–1596.
122. Mann, J., *Secondary Metabolism*, 2nd ed., Oxford Science Publications, Oxford, **1996**.
123. Kutney, J., *Natural Product Reports*, **1990**, *7*, 85–103.
124. Adeoye, A.; Waigh, R., *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 975–978.
125. Miana, G.; Hazimi, H., *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 225–227.
126. Raffauf, R.; Quesne, P.; Ghosh, P., *Lloydia*, **1978**, *41*, 432–434.
127. Lamidi, M.; Ollivier, E.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Ekekang, L.; Balansard, G., *Planta Med.*, **1995**, *61*, 280–281.

128. Aquino, R.; Tommasi, N.; Simone, F.; Pizza, C., *Phytochemistry*, **1997**, *45*, 1035–1040.
129. Lamidi, M.; Martinlopez, T.; Ollivier, E.; Crespinmaillard, F.; Ekekang, L.; Balansard, G., *Chromatographia*, **1995**, *41*, 581–584.
130. Lamidi, M.; Ollivier, E.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Ekekang, L.; Balansard, G., *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 209–212.
131. Ohashi, K.; Kojima, H.; Tanikawa, T.; Okumura, Y.; Kawazoe, K.; Tataru, N.; Shibuya, H.; Kitagawa, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 1596–1600.
132. Aquino, R.; Simone, F.; Pizza, C.; Cerri, R.; Mello, J., *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2927–2930.
133. Aquino, R.; Simone, F.; Pizza, C.; Mello, J., *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 199–201.
134. Lamidi, M.; Ollivier, E.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Ekekang, L.; Balansard, G.; *Planta Med.*, **1997**, *63*, 284–285.
135. Fang, S.; He, Z.; Gao, J.; Wang, P., *Phytochemistry*, **1995**, *39*, 1241–1243.
136. Haan, W.; Li, M.; *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 985–986.
137. King, F.; Jurd, L., *J. Chem. Soc.*, **1953**, 1192–1195.
138. Lamidi, M.; Ollivier, E.; Balansard, G.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Ekekang, L., *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 921–923.
139. Purdy, J.; McLean, S., *Can. J. Chem.*, **1977**, *55*, 4233–4237.
140. Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C., *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2591–2598.
141. 'Dictionary of Natural Products', 1st edition, Chapman & Hall, London, **1994**.
142. Amoo, I.; Lajide, L., *Riv. Ital. Soatanze Grasse*, **1999**, *76*, 331–332.
143. Holtz, R.; Fink, C.; Awad, A., *Nutrition & Cancer—An International Journal*, **1998**, *32*, 8–12.
144. Awad, A.; Chen, Y.; Fink, C.; Hennessey, T., *Anticancer Research*, **1996**, *16*, 2797–2804.

145. Hikawczuk, V.; Saad, J.; Guardia, T.; Juarez, A.; Giordiano, O., *Anales de la Asociacion Quimica Argentina*, **1998**, *86*, 167–170.
146. Pegel, K., *South African Journal of Science*, **1997**, *93*, 263–268.
147. Siverstein, R.; Webster, F., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1997**.
148. Cross, A., 'An introduction to practical Infra-Red Spectroscopy', 2nd ed., Butterworths, London, **1964**.
149. Rahman, A., 'Solving problems with NMR spectroscopy', Academic Press Limited, London, **1996**.
150. Horeau, A., *Tetrahedron Letters*, **1961**, *15*, 506–512.
151. Horeau, A.; Kagan, H., *Tetrahedron*, **1964**, *20*, 2431–2441.
152. Weidmann, R.; Horeau, A., *Tetrahedron Letters*, **1973**, *31*, 2979–2982.
153. Horeau, A., *Stereochem.: Fundam. Methods*, **1977**, *3*, 51–94.
154. Svatos, A.; Valterová, I.; Fábryová, A.; Vrkoc, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1989**, *54*, 151–159.
155. Heckendorf, A.; Mattes, K.; Hutchinson, C.; Hagaman, E.; Wenkert, E., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 2045–2047.
156. Hutchinson, C.; Hsia, M.; Heckendorf, A.; O'Loughlin, G., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 3493–3494.
157. Aimi, N.; Shito, T.; Fukushima, K.; Itai, Y.; Aoyama, C.; Kunisawa, K.; Sakai, S.; Haginiwa, J.; Yamasaki, K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1982**, *30*, 4046–4051.
158. Bridgeman, J.; Cherry, P.; Clegg, A.; Evans, J.; Jones, E.; Kasal, A.; Kumar, V.; Meakins, G.; Morisawa, Y.; Richards, E.; Woodgate, P., *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 250–257.
159. Goad, L.; Akihisa, T., *Analysis of Sterols*, Chapman & Hall, London, **1997**.
160. Goswami, P.; Kotoky, J.; Chen, Z.; Lu, Y., *Phytochemistry*, **1996**, *41*, 279–281.
161. Ramaiah, P.; Lavie, D.; Budhiraja, R.; Sudhir, S.; Garc, K., *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 143–149.

162. Lin, H.; Ding, H.; Wu, Y., *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 343–346.
163. Kizu, H.; Hirabayashi, S.; Suzuki, M.; Tomimori, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 3473–3478.
164. Schmidt, R.; Grundler, G., *Synthesis Communications*, **1981**, 885–887.
165. Vogel, A., *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Ed., Longman, Scientific & Technical, London, **1989**.
166. Fukase, K.; Winarno, H.; Kusumoto, S., *Chemistry Express*, **1993**, *8*, 409–412.
167. Wright, J.; McInnes, A.; Shimidzu, S.; Smith, D.; Walter, J., *Can. J. Chem.*, **1978**, *56*, 1898–1903.
168. Matsumoto, T.; Shigemoto, T.; Itoh, T., *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 2622–2624.
169. Greca, M.; Monaco, P.; Previtiera, L., *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1430–1435.
170. Rizvi, S.; Williams, J., *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 1127–1132.
171. Lavie, D.; Kaye, I., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 5001–5002.
172. Ohtsu, H.; Tanaka, R.; Michida, T.; Shingu, T.; Matsunaga, S., *Phytochemistry*, **1998**, *49*, 1761–1768.
173. Weston, R., *Aust. J. Chem.*, **1973**, *26*, 2729–2734.
174. Ikan, R., *Natural Products—A Laboratory Guide*, 2nd Ed., Academic Press, **1991**.
175. Pereira, F.; Domingues, F.; Silva, A., *Natural Product Letters*, **1996**, *8*, 97–103.
176. Ahmad, V.; Bano, S.; Mohammad, F., *Planta Med.*, **1985**, 521–523.
177. Reynolds, W.; McLean, S.; Poplawski, J.; Enriquez, R.; Escobar, L.; Leon, I., *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 3419–3428.
178. Mahato, S.; Kundu, A., *Phytochemistry*, **1994**, *37*, 1517–1575.
179. Siddiqui, S.; Hafeez, F.; Begum, S.; Siddiqui, B., *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, 229–233.

180. Otsuka, H.; Fujioka, S.; Komiya, T.; Goto, M.; Hiramatsu, Y.; Fujimora, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 3099–3104.
181. Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O., *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, *28*, 1006–1008.
182. Torre, M.; Bruno, M.; Piozzi, F.; Savona, G.; Rodriguez, B.; Arnold, N., *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 668–670.
183. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Aldrich Chemical Company, Inc., Wisconsin, 1999–2000.
184. Matos, M.; Sousa, M.; Machado, M.; Filho, R., *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 1419–1422.
185. Ferrari, F.; Cornelio, I.; Monache, F.; Bettolo, G., *Planta Med.*, **1981**, *43*, 24–27.
186. Yepes, A.; Ugaz, O.; Alvarez, C.; Feo, V.; Aquino, R.; Simone, F.; Pizza, C., *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 1635–1637.
187. Takeuchi, N.; Goto, K.; Sasaki, Y.; Fujita, T.; Okazaki, K.; Kamata, K.; Tobinaga, S., *Heterocycles*, **1992**, *33*, 357–374.
188. Sun, C.; Toia, R., *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 953–956.
189. Dimitriadis, C.; Gill, M.; Harte, M., *Tetrahedron: Assymetry*, **1997**, *8*, 2153–2158.
190. Nakamori, K.; Matsuura, H.; Yoshihara, T.; Ichihara, A.; Koda, Y., *Phytochemistry*, **1994**, *35*, 835–839.
191. Parisi, A., Piattelli, M.; Tringali, C.; Lio, G., *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 865–867.
192. Holker, J.; Simpson, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, *5*, 1397–1400.
193. Abell, C.; Doddrell, D.; Garson, M.; Laue, E.; Staunton, J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, *12*, 694–696.
194. Abell, C.; Garson, M.; Leeper, F.; Staunton, J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, *17*, 1011–1013.

195. Abell, C.; Sutkowski, C.; Stauton, J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 586–587.
196. Kayser, O.; Kolodziej, H., *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1181–1185.
197. Vasconcelos, J.; Silva, A.; Cavaleiro, J., *Phytochemistry*, **1998**, 49, 1421–1424.
198. Ballantyne, M.; McCabe, P.; Murray, R., *Tetrahedron*, **1971**, 27, 871–877.
199. Herath, W.; Sultanbawa, M.; Wannigama, G.; Cavé, A., *Phytochemistry*, **1979**, 18, 1385–1387.
200. Horman, I.; Brambilla, E., *Europ. Spectro. News*, **1982**, 45, 25–27
201. Agrawal, P., *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3307–3330.
202. Blakeney, A.; Harris, P.; Henry, R.; Stone, B., *Carbohydrate Research*, **1983**, 113, 291–299.
203. Daniel, P.; Feudis, D.; Lott, I.; McCluer, R., *Carbohydrate Research*, **1981**, 97, 161–180.
204. Oshima, R.; Kumanotani, J., *Journal of Chromatography*, **1983**, 265, 335–341.
205. Durette, P.; Horton, D., *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 2658–2669.
206. Bock, K.; Pederson, C., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 41, 27–66.
207. Rao, V.; Qasba, P.; Balaji, P.; Chandrasekaran, R., *Conformation of Carbohydrates*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands, **1998**.
208. Brakta, M.; Farr., R.; Chaguir, B.; Massiot, G.; Lavaud, C.; Anderson, W.; Sinou, D.; Daves, G., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2992–2998.
209. D'Accorso, N.; Thiel, I., *Carbohydrate Research*, **1983**, 124, 177–184.
210. Lichtentaler, F.; Klotz, J.; Flath, F., *Liebigs Ann.*, **1995**, 2069–2080.
211. Bouali, A.; Descotes, G.; Ewing, D.; Grouiller, A.; Lefkidou, J.; Lespinasse, A.; Mackenzie, G., *J. Carbohydrate Chem.*, **1992**, 11, 159–169.
212. Schneider, B.; Lichtenthaler, F.; Steinle, G.; Schiweck, H., *Liebigs Ann. Chem.*, **1985**, 2443–2453.

213. Lichtentaler, F.; Rönninger, S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1990**, 1489–1496.
214. Mitsunobu, O., *Synthesis*, **1981**, 1–28.
215. D'Accorso, N.; Thiel, M., *Rev. Latinoamer. Quim.*, **1986**, *17*, 36–39.
216. Itoh, T.; Takamura, H.; Watanabe, K.; Araki, Y.; Ishido, Y., *Carbohydrate Research*, **1986**, *156*, 241–246.
217. Kraska, B.; Lichtel, R., *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24*, 361–364.
218. Abreu, P.; Martins, E.; Kayser, O.; Bindseil, K.; Siems, K.; Seemann, A.; Frevert, J., *Phytomedicine*, **1999**, *6*, 187–195.
219. Desjardins, R.; Canfield, C.; Haynes, J.; Chulay, J., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1979**, *16*, 710–718.
220. Loukaci, A.; Kayser, O.; Bindseil, U.; Siems, K.; Frevert, J.; Abreu, P., *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 52–56.
221. Sam, T., *Bioact. Nat. Prod*, **1993**, 441–456.
222. Anderson, J.; Goetz, C.; McLaughlin, J.; Suffness, M., *Phytochemical Analysis*, **1991**, *2*, 107–111.
223. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D.; McLaughlin, J., *Planta Med.*, **1982**, *45*, 31–34.
224. Jamaluddin, F.; Mohamed, S.; Lajis, M., *Food Chemistry*, **1995**, *54*, 9–13.
225. Yang, Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Tai, T.; Nunoura, Y.; Watanabe, K., *Phytomedicine*, **1999**, *6*, 89–93.
226. Moriarity, D.; Huang, J.; Yancey, C.; Zhang, P.; Setzer, W.; Lawton, R.; Bates, R.; Caldera, S., *Planta Med.*, **1998**, *64*, 370–372.
227. Sunitha, S.; Nagaraj, M.; Varalakshmi, P., *Medical Science Research*, **1999**, *27*, 535–540.
228. Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Oinuma, H.; Kasahara, Y.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumaki, K.; Tamura, T., *Phytochemistry*, **1996**, *43*, 1255–1260.
229. Anand, R.; Patnaik, G.; Kulshreshtha, D.; Dhawan, B., *Phytotherapy Research*, **1994**, *8*, 417–421.

230. Kweifiookai, G.; Demunk, F.; Macrides, T.; Smith, P.; Rumble, B., *Drug Development Research*, **1995**, *36*, 20–24.
231. Macías, F.; Simonet, A.; Esteban, M., *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 1369–1379.
232. Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L.; Chen, C.; Garrett, P.; Lee, K., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1016–1017.
233. Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L.; Chen, C.; Garrett, P.; Lee, K., *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 2133–2143.
234. Lee, K.; Morris, S., *Pure & Applied Chemistry*, **1999**, *71*, 1045–1051.
235. Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1056–1068.
236. Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J.; Henin, Y.; Bousseau, A.; Huet, T.; Pauwels, R.; Declercq, E.; Mayaux, J.; Lepecq, J.; Dereu, N., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1069–1083.
237. Fujioka, T.; Kashiwada, Y., *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 243–247.
238. Schmidt, M.; Kuzmanoff, K.; Ling, L.; Pezzuto, J., *European Journal of Cancer*, **1997**, *33*, 2007–2010.
239. Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H.; Pietsch, T.; Debatin, K., *International Journal of Cancer*, **1999**, *82*, 435–441.
240. Kim, D.; Pezzuto, J.; Pisha, E., *Bioorganic & Medicinal Letters*, **1998**, *8*, 1707–1712.
241. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.; Chagwedera, T.; Farnsworth, N.; Cordell, G.; Beecher, C.; Fong, H.; Kinghorn, A.; Brown, D.; Wani, M.; Wall, M.; Hieken, T.; Dsagupta, T.; Pezzuto, J., *Nature Medicine*, **1995**, *1*, 1046–1051.
242. Kouzi, S.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J.; Hamann, M., *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1653–1657.
243. Recio, M.; Giner, R.; Mániz, S.; Gueho, J.; Julien, H.; Hostettmann, K.; Ríos, J., *Planta Med.*, **1995**, *61*, 9–12.
244. Steele, J.; Warhurst, D.; Kirby, G.; Simmonds, M., *Phytotherapy Research*, **1999**, *13*, 115–119.

245. Nago, H.; Matsumoto, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1994**, *58*, 1267–1272.
246. Kern, F.; Klein, R.; Janssen, E.; Bestmann, H.; Attygalle, A.; Schafer, D.; Maschwitz, U., *Journal of Chemical Ecology*, **1997**, *23*, 779–792.
247. Elmodafar, C.; Clerivet, A.; Vigouroux, A.; Macheix, J., *European Journal of Plant Pathology*, **1995**, *101*, 503–509.
248. Garcia, D.; Sanier, C.; Macheix, J.; Dauzac, J., *Physiological & Molecular Plant Pathology*, **1995**, *47*, 213–223.
249. Edwards, R.; Stones, S.; Mellado, M.; Jorrin, J., *Phytochemistry*, **1997**, *45*, 1109–1114.
250. Roseland, C.; Grosz, T., *Journal of Chemical Ecology*, **1997**, *23*, 517–542.
251. Valle, T.; Lopez, J.; Hernandez, J.; Corchete, P., *Plant Science*, **1997**, *125*, 97–101.
252. Kang, S.; Sung, S.; Park, J.; Kim, Y., *Arch. Pharm. Res.*, **1998**, *21*, 718–722.
253. 'Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography', Reagents Merck, Darmstadt, Germany, **1978**.
254. Court, W.; Iwu, M., *Journal of Chromatography*, **1980**, *187*, 199–207.
255. Ehmann, A., *Journal of Chromatography*, **1977**, *132*, 267–276.
256. Still, W.; Kahn, M.; Mitra, A., *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923–2925.
257. Shafiee, A.; Winterfeldt, E., *Chem. Ber.*, **1974**, *107*, 966.
258. Kitajima, J.; Tanaka, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 2007–2009.
259. Fletcher, H.; Hudson, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1947**, *69*, 921–924.
260. Major, R.; Cook, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, *58*, 2333–2334.
261. Fletcher, H.; Hudson, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1947**, *69*, 1145–1147.

