

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Chrysophyllum*
gonocarpum (MART. & EICHLER EX MIQ.)
ENGL. (SAPOTACEAE) COM VISTAS AO
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS
ANTIFÚNGICOS**

HELVÉCIO MARTINS DOS SANTOS JÚNIOR

2010

HELVÉCIO MARTINS DOS SANTOS JÚNIOR

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Chrysophyllum gonocarpum* (MART. & EICHER EX MIQ.) ENGL. (SAPOTACEAE) COM VISTAS AO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador:
Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos Junior, Helvécio Martins dos.

Estudo fitoquímico de *Cryosophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) com vistas ao desenvolvimento de novos antifúngicos / Helvécio Martins dos Santos Junior. – Lavras : UFLA, 2010.

232 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Aspergillus ochraceus*. 2. Atividade antifúngica. 3. Extrato metanólico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.3

HELVÉCIO MARTINS DOS SANTOS JÚNIOR

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Chrysophyllum gonocarpum* (MART. & EICHER EX MIQ.) ENGL. (SAPOTACEAE) COM VISTAS AO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 07 de maio de 2010

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk.....UFLA

Profa. Dra. Esther Maria Ferreira Lucas.....UFLA

Prof. Dr. Jonas Leal Neto.....UFLA

Profa. Dra. Silvana Marcussi.....UFLA

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Meu Deus, obrigado por ter-me iluminado neste percurso que está sendo concluído. Obrigado pelas vitórias e também pelas derrotas e dificuldades superadas que me fizeram aprender muito. Obrigado pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas.

Agradeço a todos os meus familiares, pelo apoio e compreensão, em especial aos meus pais, Helvécio e Maria de Lourdes, e aos meus irmãos Alan, Fabiane e Christiano (*in memoriam*), que tão cedo desta vida partiu.

Agradeço ao meu orientador Denilson, pela atenção, paciência, amizade e por estar sempre pronto para ajudar.

Minha gratidão ao pessoal do Laboratório de Produtos Naturais, com os quais compartilhei momentos muito agradáveis ao longo deste período, em especial ao Willian, Viviane, Dejane, Joyce e Marilua. Muito obrigado a todos, por tudo mesmo!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm e ocratoxina A.....	3
2.2 Plantas com atividade antifúngica.....	7
2.3 A família Sapotaceae.....	12
2.4 O gênero <i>Chrysophyllum</i>	14
2.5 A espécie <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Materiais e equipamentos utilizados.....	19
3.2 Coleta de material botânico.....	20
3.3 Obtenção do extrato bruto.....	20
3.4 Fracionamento do extrato bruto (TA-54-01) por extração com solventes.....	20
3.5 Fracionamento da fração solúvel em metanol (TA-55-03).....	21
3.5.1 Cromatografia líquida em coluna de XAD-16 de TA-55-03.....	21
3.5.2 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr2-106-02	22
3.5.3 Fracionamento em coluna de sílica-C18 de Jr2-106-03.....	23
3.5.4 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-17..	24
3.5.5 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-11..	24
3.5.6 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-06..	25
3.5.7 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-13..	25

3.6 Elucidações estruturais das substâncias isoladas.....	26
3.7 Teste de atividade antifúngica contra <i>Aspergillus ochraceus</i>	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Extrato metanólico das cascas de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i>	28
4.2 Fracionamento do extrato metanólico (TA-54-01) por extração com solventes.....	28
4.3 Fracionamento da fração solúvel em metanol do extrato metanólico de <i>Chrysophyllum gonocarpum</i> (TA-55-03).....	30
4.3.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de amberlite XAD-16 da fração TA-55-03.....	30
4.3.2 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr2-106-02	31
4.3.3 Fracionamento em coluna de sílica-C18 de Jr2-106-03.....	33
4.3.4 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-17..	34
4.3.5 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-11..	36
4.3.6 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-06..	37
4.3.7 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-13..	39
4.4 Elucidações estruturais das substâncias isoladas.....	41
4.4.1 Substância Jr3-11-01.....	44
4.4.2 Substância Jr3-11-02 (inérita).....	49
4.4.3 Substância Jr3-11-03.....	56
4.4.4 Substância Jr3-11-04.....	60
4.4.5 Substância Jr3-11-05.....	65
4.4.6 Substância Jr3-12-03.....	69
4.5 Teste de atividade antifúngica contra <i>Aspergillus ochraceus</i>	74
5 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	Rotação específica na raia D de sódio
^{13}C	Carbono treze
1D	Unidimensional
^1H	Hidrogênio
^1J	Acoplamento a uma ligação
$^{2,3}\text{J}$	Acoplamento a duas ou três ligações
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
<i>c</i>	Concentração
C18	Sílica gel de fase reversa tipo C18 (octadecilsilano)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD ₃ OD	Metanol tetradeuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
d	Dubleto
D ₂ O	Água deuterada
DAD	Detector de arranjo de diodos
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilssulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilssulfóxido hexadeuterado
dq	Duplo quarteto
FM	Fase móvel
H ₂ O	Água
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento, cuja unidade será sempre Hertz
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min.	Minuto(s)

NOE	<i>Nuclear Overhause effect</i>
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROESY	<i>Rotating frame Overhause effect spectroscopy</i>
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – visível
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)
δ_C	Deslocamento químico de carbono treze, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)
λ	Comprimento de onda

RESUMO

SANTOS JÚNIOR, Helvécio Martins dos. **Estudo fitoquímico de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) com vistas ao desenvolvimento de novos antifúngicos.** 2010. 232 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos métodos para a redução da contaminação de grãos de café com *Aspergillus ochraceus* e com a ocratoxina A, que se trata de uma toxina produzida por este fungo, buscou-se, em estudo previamente realizado, selecionar plantas produtoras de substâncias ativas contra tal microrganismo. Para dar continuidade ao referido estudo, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar as substâncias presentes no extrato metanólico das cascas de *Crysophyllum gonocarpum*, que foi uma das plantas selecionadas. Inicialmente, o mencionado extrato, na forma seca, foi submetido a lavagens com solventes, o que resultou na obtenção de três frações: solúvel em hexano, solúvel em acetato de etila e solúvel em metanol. Esta, por ser a mais ativa e apresentar maior massa, foi submetida a vários fracionamentos subsequentes por cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência, o que resultou na purificação de onze substâncias. Após análises por ressonância magnética nuclear, atribuíram-se a tais compostos as seguintes estruturas: (7S*,8S*)-treo-1-C-siringilglicerol 4-O-β-D-glicopiranosídeo, (7R*,8R*)-treo-1-C-siringilglicerol 4-O-β-D-glicopiranosídeo, ácido 4-O-β-D-glicopiranosil-3,3',4'-tri-O-metilelágico, ácido 4-O-β-D-xilopiranosil-3,3'-di-O-metilelágico, (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3α-O-β-D-glicopiranosídeo, (2R*,3R*,4S*)-lioniresinol 2α-O-α-L-fucopiranosídeo-3α-O-β-D-glicopiranosídeo (inérita), cuchilosídeo, kelampaiosídeo A, benzil-β-primeverosídeo, 3,4,5-trimetoxifenol e (7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O-β-D-glicopiranosídeo. Estudos posteriores deverão ser realizados para averiguar os efeitos que estas substâncias têm sobre *A. ochraceus*.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*. Atividade antifúngica. Extrato metanólico.

*Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

ABSTRACT

SANTOS JÚNIOR, Helvécio Martins dos. **Phytochemical study of *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) aimed to the development of new antifungal agents.** 2010. 232 p. Thesis (Doctor in Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

To contribute to the development of new methods for reducing the contamination of coffee beans with *Aspergillus ochraceus* and ochratoxin A, which is a toxin produced by this fungus, the selection of plants able to produce substances active against such microorganism was aimed in a previously performed study. To continue this study, the present work aimed to isolate and identify the substances in the methanol extract of barks from *Crysophyllum gonocarpum*, which was one of the selected plants. Initially, the dry form of this extract was subjected to washes with solvents, resulting in three fractions: soluble in hexane, soluble in ethyl acetate and soluble in methanol. Since the last fraction was the most active and presented the greatest mass, it underwent several subsequent fractionations by column chromatography and by high performance liquid chromatography, which resulted in the purification of eleven substances. After analyses by nuclear magnetic resonance, the following structures were attributed to these compounds: (7S*,8S*)-threo-1-C-syringylglycerol 4-*O*- β -D-glucopyranoside, (7R*,8R*)-threo-1-C-syringylglycerol 4-*O*- β -D-glucopyranoside, 4-*O*- β -D-glucopyranosil-3,3',4'-di-*O*-methylellagic acid, 4-*O*- β -D-xylopyranosil-3,3'-di-*O*-methylellagic acid, (+)-(2R,3R,4S)-lyoniresinol 3 α -*O*- β -D-glucopyranoside, (2R*,3R*,4S*)-lyoniresinol 2 α -*O*- α -L-fucopyranoside-3 α -*O*- β -D-glucopyranoside (unpublished), cuchiloside, kelampayoside A, benzyl- β -primeveroside, 3,4,5-trimethoxyphenol and (7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimethoxylariciresinol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside. Further studies should be conducted to ascertain the effects these substances have on *A. ochraceus*.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*. Antifungal activity. Methanolic extract.

*Advisor: Denilson Ferreira de Oliveira – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de diversas *commodities* com microrganismos e suas toxinas é um dos grandes problemas mundiais na área de alimentação humana e animal. Sabe-se, por exemplo, que o fungo *Aspergillus ochraceus* Wilhelm é capaz de colonizar vários alimentos e de produzir ocratoxina A, que se trata de uma substância de elevada toxicidade. Um dos setores em risco é o da cafeicultura, que responde por 28,3 % das exportações mundiais de café e 6,38% das exportações do agronegócio brasileiro. Somente no ano de 2008, tais percentagens corresponderam a aproximadamente US\$ 4 bilhões. Os principais destinos deste produto foram Estados Unidos, Itália e Japão. Dentre os estados produtores de café se destaca Minas Gerais, que é responsável por 50 % da produção brasileira e que poderá sofrer grande impacto social e econômico se porventura vier a sofrer sanções nas exportações de café em decorrência da contaminação dos grãos com fungos e/ou substâncias tóxicas. Consequentemente, vários trabalhos têm sido conduzidos para detectar o referido fungo e a mencionada toxina em diversos alimentos. Uma das possíveis alternativas para contornar tal problema consiste no emprego de produtos de origem natural em substituição aos pesticidas químicos, que causam os indesejáveis impactos ambientais e elevam o custo de produção, já que são produzidos quase exclusivamente por multinacionais estrangeiras. Assim, poderá ser produzido um café de alta qualidade, o que é um fator importante na comercialização, já que, segundo pesquisas recentes, há uma demanda crescente por produtos comprovadamente isentos de substâncias tóxicas ao homem.

Tendo em vista tais problemas, buscou-se, em estudo previamente realizado, selecionar plantas potencialmente úteis no controle de fungos fitopatogênicos. Para tanto, vários extratos de espécies vegetais foram

submetidos a testes em laboratório, o que permitiu verificar que *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. (Sapotaceae), espécie de ocorrência na flora mineira, apresentava potencial para emprego no controle do fungo fitopatogênico *A. ochraceus*. Para dar continuidade a tal estudo, buscou-se, no presente trabalho, isolar e identificar as substâncias com propriedades antifúngicas produzidas pela mencionada planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Aspergillus ochraceus* Wilhelm e ocratoxina A

A infecção e a produção de toxinas por fungos presentes em alimentos podem ocorrer no campo ou/e durante o armazenamento dos mesmos, sendo *Aspergillus ochraceus* Wilhelm uma das principais espécies que acarreta problemas de contaminação de alimentos. O patógeno, pertencente à família Trichocomaceae, contamina diversas espécies vegetais, dentre as quais podem ser citadas as seguintes: cevada (Maenetje & Dutton, 2007; Medina et al., 2006), uva (Chulze et al., 2006), trigo (Alarcon et al., 2006; Hajjaji et al., 2006), milho (Magnoli et al., 2006), sorgo, arroz, café (Pimenta & Vilela, 2003; Anand & Rati, 2006; Sartori et al., 2006), figo (Iamanaka et al., 2005) e cacau (Brera et al., 2003).

A contaminação com *A. ochraceus* é extremamente preocupante devido à capacidade do fungo de produzir um metabólito secundário denominado ocratoxina A (Figura 1), que é quimicamente conhecida como (R)-N-[(5-cloro-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1-H-2-benzopirano-7-il) carbonil]-L-fenilalanina. Esta toxina é um contaminante de várias plantas e de produtos animais, sendo encontrada com maior frequência em grãos de cereais estocados (Abarca, 1994; Refai et al., 1996). Em café, tal problema pode tornar-se muito grave, principalmente quando a atividade de água dos grãos se encontra acima de 0,85 (Bars & Bars, 1999; Palacios-Cabrera et al., 2004; Suarez-Quiroz et al., 2004).

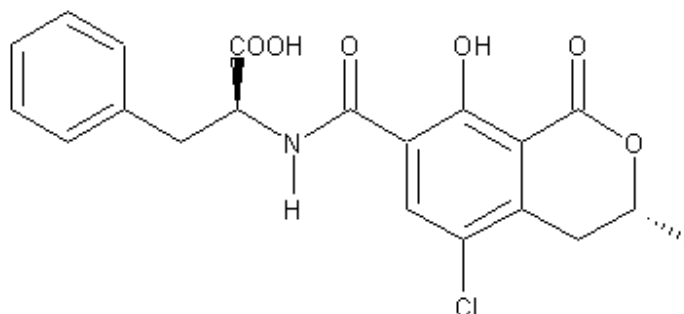


FIGURA 1 Estrutura da ocratoxina A

A presença de ocratoxinas em alimentos está sendo cada vez mais regulada em muitos países (Cotty et al., 1994; Egmond & Dekker, 1997; Romani et al., 2000). Por exemplo, a União Européia em 1998 impôs limites rigorosos quanto à quantidade aceitável de ocratoxina A presente em café e outros alimentos que são importados por esses países. Determinou que a quantidade máxima da toxina deveria ser de apenas 5 µg/kg do alimento (Codex Alimentarius Commission, 1998).

A ocratoxina A vem sendo mundialmente estudada principalmente pelo risco que representa à saúde humana e animal. Um dos primeiros trabalhos que relatam o seu efeito direto em células orgânicas (mitocôndria de ratos) foi realizado por Moore & Truelove (1970). Neste experimento, foi possível observar que a ocratoxina A, em pequenas concentrações, inibe algum ponto da sequência principal da formação da adenosina difosfato (ADP), provocando uma disfunção na respiração celular.

Em frangos alimentados com produtos contaminados com a ocratoxina A, observou-se redução na concentração de hemoglobina e diminuição da atividade da fosfatase alcalina do soro, resultando em diminuição da absorção de cálcio, potássio e fósforo inorgânico (Bailey & Gibson, 1989). Estudos com roedores

também têm deixado evidente a atividade carcinogênica da ocratoxina A, o que está de acordo com estudos epidemiológicos, que relacionam danos em seres humanos de características endêmicas com a contaminação de cereais contendo teores significativos de ocratoxina A. Em resumo, há evidências ou/ comprovação de que a ocratoxina A tem ação imunossupressora, carcinogênica, teratogênica e nefrotóxica em animais e humanos (Smith & Ross, 1991; Xiao et al., 1996; Weidenbach & Petzinger, 2004; Knot et al., 2005; Nakajima, 2005).

Análises do café brasileiro evidenciaram dados bastante preocupantes, pois se verificou que, dentre 60 diferentes amostras, aproximadamente 92% estavam contaminadas com fungos, sendo *A. ochraceus* encontrado em 53,3% de tais amostras. Ademais, 33,3% das amostras estavam contaminadas com ocratoxina A em concentrações que variavam entre 0,2 e 7,3 µg/Kg de café (Martins et al., 2003). Um resultado similar foi relatado por Taniwaki et al. (2003), que obtiveram mais de 800 isolados fúngicos de 408 amostras de café oriundas dos Estados de São Paulo e de Minas Gerais. 31% de tais isolados eram de *A. ochraceus*, sendo que 75% destes eram capazes de produzir a ocratoxina A. Também se verificou que 126 amostras continham a referida toxina em concentrações entre 0,1 e 3,3 µg/Kg de café, enquanto oito estavam com concentrações acima de 5 µg/Kg de café e uma se encontrava com valor acima de 100 µg/Kg de café. Urbano et al. (2001b) também estudaram o café brasileiro, o que permitiu observar que 100% das amostras coletadas de galpões de armazenamento ou de terreiros estavam contaminadas com fungos, dentre os quais se destaca aqui *A. ochraceus*. 88% dos isolados deste microrganismo eram capazes de produzir a ocratoxina A.

Há vários estudos que deixam evidente a grande estabilidade da ocratoxina A frente aos procedimentos utilizados durante os processamentos dos diversos produtos contaminados com esta toxina. Especificamente em café, Nehad et al. (2005) observaram que os processos de torrefação, descafeinação,

decocção e moagem não eliminam a toxina. Verificou-se que o aquecimento dos grãos a 200 °C e 220 °C durante 15 minutos pode destruir até 48% e 94% da ocratoxina A, respectivamente. No entanto, além de não eliminar totalmente a toxina, o maior aquecimento pode comprometer o gosto final da bebida (Urbano et al., 2001a). Além disso, há de se levar em consideração que tais valores destoam daqueles apresentados por Tsubouchi et al. (1987), que registraram redução de apenas 20% na concentração de ocratoxina A após o aquecimento dos grãos de café a 200 °C por 20 minutos.

Também há estudos na literatura que descrevem procedimentos para o bombardeamento de alimentos com radiação γ (gama). No caso específico de *A. ochraceus*, observou-se grande diminuição da população do fungo e da quantidade final de ocratoxina A em meio de cultura de extrato de levedura e sacarose (Aziz et al., 1989). Beux & Soccol (2004) mencionam que alguns metabólitos de origem fúngica podem inibir a produção de toxinas por parte de *A. ochraceus*. Também trabalhando com outros fungos, Masoud & Kaltoft (2006) verificaram que, em meio de cultura, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* são capazes de inibir o crescimento de *A. ochraceus* e a sua produção de toxinas. No entanto, não há dados para avaliar a eficiência de tal método em grãos de café.

Em decorrência da dificuldade de evitar a contaminação fúngica, tanto a Comissão Científica de Alimentos (Scientific Commission on Food) da Comunidade Européia quanto o Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos estão sugerindo medidas legislativas para limitar a quantidade de toxinas em café. Com relação à ocratoxina A, o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) usou o menor efeito observado em suínos para calcular um ISPT - Ingestão Provisional Semanal Tolerável - (Provisional Tolerable Weekly Intake - PTWI) para o homem, aplicando um fator de segurança de 500, o que permitiu chegar a um ISPT de 112 ng/kg. Assim, para

um adulto de 60 kg, o ISPT seria 6000 ng/semana (Walker, 1997). Grupos de pesquisadores trabalhando separadamente têm sugerido valores diferenciados de doses de Ingestão Diária Tolerada Provisória – IDTP. Para um grupo de pesquisadores canadenses, o valor de IDTP para a ocratoxina A deve ficar entre 1,2 - 5,7 ng/Kg p.c. (peso corpóreo), para um nível de risco de 10^{-5} . Já um grupo de toxicologistas nórdicos propôs um valor de 5 ng/Kg de massa corporal (Sabino, 1999).

Podem ocorrer, também, implicações no comércio internacional sobre o limite máximo de micotoxinas nos produtos que sejam mais de interesse político do que de saúde pública. De acordo com Sabino (1999), os países que não são produtores de mercadorias susceptíveis à contaminação com micotoxinas têm limites de tolerância menores do que os produtores, principalmente quando alimentos importados são considerados como luxo. Este fato torna mais simples, para as autoridades, decretar uma medida administrativa do que resolver o problema da presença de um contaminante natural inevitável, ficando a critério dos países exportadores e importadores o estabelecimento dos limites de tolerância. Porém, limites muito baixos podem acarretar perdas econômicas para os países exportadores e ausência de produto para os países importadores. Por outro lado, pode ocorrer de um país exportador selecionar os melhores produtos para a exportação, deixando os de pior qualidade e, conseqüentemente, os produtos contaminados, para o consumo interno, aumentando o risco de contaminação da população local (Sabino, 1999).

2.2 Plantas com atividade antifúngica

Cientes do grande potencial de plantas para o controle de fungos, vários autores têm buscado isolar e identificar novas substâncias de origem vegetal que possuam atividades contra fungos. Os resultados obtidos deixam evidente que estudos envolvendo a utilização de extratos vegetais e das suas substâncias

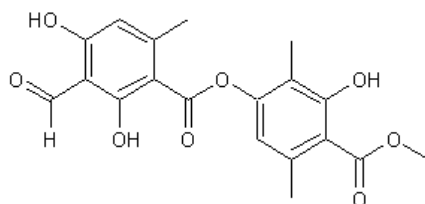
ativas identificadas podem contribuir para atender à crescente demanda por produtos que controlem doenças em culturas não contempladas pela agricultura convencional. Além disto, existe a possibilidade de substituição dos fungicidas sintéticos tóxicos por fungicidas com baixa toxidez, o que corresponderá a opções viáveis de controle de doenças fúngicas em cultivos orgânicos e durante o manejo integrado de doenças de plantas (Penteado, 2001).

São considerados como defensivos alternativos todos os produtos que possuam as seguintes características: praticamente não tóxicos (classe toxicológica IV); baixa agressividade ao homem e à natureza; eficientes no combate a microrganismos nocivos; custo reduzido para aquisição e emprego; e simplicidade quanto ao manejo e à aplicação. Como as substâncias naturais isoladas a partir de extratos vegetais apresentam potencial para satisfazer a todas estas características, são consideradas promissoras fontes de defensivos alternativos (Penteado, 2001; Yunes & Cechinel Filho, 2001).

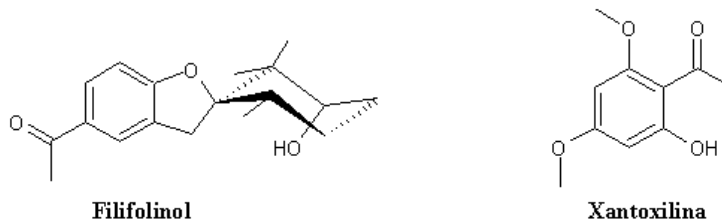
Entre os exemplos de plantas com atividade antifúngica encontrados na literatura, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Athukoralage et al. (2001), que obtiveram o 3-formil-2,4-diidroxi-6-metilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetil-4-(metoxicarbonil)fenila (Figura 2) de *Gardenia dassanayakei*. Tal substância apresentou considerável atividade contra os fungos *Crynespora cassicola*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*. Também é possível mencionar o trabalho desenvolvido por Villarroel et al. (2001), que isolaram o filifolinol (Figura 2) de *Heliotropium huascoense*. Nesse caso, a atividade da substância isolada foi observada contra *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger*.

De forma relativamente análoga, ao trabalhar com a planta *Sebastiania schottiana*, Cechinel Filho et al. (1996) isolaram a xantoxilina (Figura 2), que se mostrou ativa contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, *Microsporium canis*, *Trochophytom rubrum*, *T. mentagrophytes*,

Epidermophyllum floccosum, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Penicillium* sp.



3-Formil-2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetil-4-(metoxicarbonil)fenila



Filifolinol **Xantoxilina**

FIGURA 2 Substâncias isoladas de plantas com atividade antifúngica

Em levantamento recente foi possível observar a atividade antifúngica em diversas espécies vegetais, sendo alguns exemplos apresentados na Tabela 1. Destacam-se aqui os controles *in vitro* da antracnose [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils] e da podridão [*Thielaviopsis paradoxa* (Dade) C. Moreau] do abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.], que foram alcançados com os empregos de extratos de folhas de laranjeira (*Citrus aurantium* L.) e de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), do caule de gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) e do botão floral seco de cravo-da-índia [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. e L.M. Perry]. O extrato de cravo-da-índia inibiu 100% do crescimento micelial de *C. graminicola* e de *T. paradoxa*, enquanto o extrato de eucalipto inibiu 90% do crescimento micelial de *C. graminicola* (Florido et al., 2008).

TABELA 1 Relatos, na literatura, que comprovam a atividade antifúngica de várias espécies vegetais

Plantas de origem dos extratos	Fungos fitopatogênicos inibidos	Referência
<i>Quillaja saponaria</i> Mol. (Quillay)	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fries	Ribera et al. (2008)
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Cercospora coffeicola</i> Berk. <i>Phoma</i> sp.	Resende (2004) Amaral (2005)
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Burk.) Snyder & Hans	Valarini et al. (1994)
<i>Agapanthus africanus</i> L.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Kiessler <i>Mycosphaerella pinodes</i> (Beik & Bloxam) Vestergien	Tegege et al. (2008)
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Fusarium proliferatum</i> Machacek <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	Souza et al. (2007) Morais (2004)
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) <i>Fusarium</i> spp.	Souza et al. (2007) Cruz et al. (1997)

TABELA 1, Cont

<i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.	<i>Alternaria brassicae</i> (Berk.) Sacc. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. <i>Fimbriata ceratocystis</i> Ellis & Halsted	Silva et al. (2005)
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	<i>Colletotrichum lagenarium</i> (Pass.) Penz. & Sacc.	Oliveira et al. (1992)
<i>Piper longum</i> L.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz	Ribeiro & Bedendo (1999)
<i>Nerium oleander</i> L.	<i>Cochliobolus miyabeanus</i> (Ito & Kurib.) Drechs. Ex	Harish et al. (2008)
<i>Pithecolobium dulce</i> Benth.	Dastur <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (Ito & Kurib.) Drechs. Ex Dastur	Harish et al. (2008)

Outro estudo relevante neste campo foi realizado por Fortes et al. (1999). Segundo os autores, Lonlife[®] (produto à base de extratos cítricos) tem comprovada ação sobre o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*. Este fungo, causador da antracnose do feijoeiro, foi sensível *in vitro* à concentração de 10 µg do produto/mL, tendo havido redução significativa no diâmetro das colônias com o aumento das concentrações do Lonlife[®] (Fortes et al., 1999).

Em decorrência do potencial das plantas para a produção de substâncias antifúngicas, um trabalho extenso de seleção de espécies vegetais produtoras de substâncias ativas contra *A. ochraceus* foi previamente realizado, o que permitiu observar que *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. e Eichler) Engl. (Sapotaceae) apresentava potencial para emprego no controle de *A. ochraceus* (trabalho não publicado). Como não se observou qualquer estudo fitoquímico ou da atividade antifúngica de tal planta na literatura científica e de patentes, acredita-se que *C. gonocarpum* pode ser uma nova fonte de substâncias para o controle de *A. ochraceus*.

2.3 A família Sapotaceae

A família Sapotaceae é composta por 53 gêneros, com aproximadamente 600 espécies que são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais como arbustos e árvores. Algumas plantas produzem látex. As folhas são espirais arranjadas ou alternadas, enquanto as flores apresentam simetria radial. Em alguns gêneros (por exemplo: *Mimusops*, *Manilkara* e *Pouteria*) dessa família se observa a produção de frutos comestíveis (Shah et al., 2003).

Em princípio, as plantas da família Sapotaceae podem ser utilizadas na medicina popular para os tratamentos de várias enfermidades, tais como inflamação ovariana e diabetes (Pereira et al., 2004). Segundo dados da literatura, apresentam atividade antibacteriana (Ogunwande et al., 2001), tripanosomicida (Muelas-Serrano et al., 2000), antipirética e anti-inflamatória

(Falcão et al., 2005), antiespasmolítica, anticonvulsivante, depressora do sistema nervoso central e anti-hiperglicêmica (Barbosa-Filho et al., 2005) e antifúngica (Ogunwande et al., 2001), entre outras.

Esta família não é extensivamente estudada, sendo os gêneros *Pouteria*, *Mimusops*, *Manilkara*, *Gambeya*, *Argania*, *Ormosia*, *Sideroxylum*, *Calocarpum*, *Butyrospermum*, *Madhuka*, *Planchonella* e *Chrysophyllum*, os mais investigados quimicamente em função de relatos de seus usos etnofarmacológicos.

Espécies de *Mimusops* são usadas na medicina popular para o controle de distúrbios gástricos e tratamento de úlcera (Shah et al., 2003). Estas plantas forneceram triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupano e ursano, que podem inibir as enzimas β -glucuronidase e α -glucosilase (Jahan et al., 1995, 2000, 2001; Sen et al., 1995), além de saponinas triterpênicas derivadas do ácido protobásico (Figura 3) (Lavaud et al., 1996; Sahu, 1996; Sahu et al., 1997). Espécies de *Gambeya* também fornecem ácido protobásico, além de outros triterpenos pentacíclicos: ácido oleanólico, ácido miriântico e esteróides glicosilados (Figura 3) (Wandji et al., 2002, 2003). Outras saponinas triterpênicas derivadas do ácido protobásico foram isoladas das raízes de plantas do gênero *Sideroxylon* (Jiang et al., 1994; Nicolas et al., 1995) e das sementes de *Madhuca butyraceae* (Nigam et al., 1992; Li et al., 1994). O óleo comestível extraído das sementes de *Argania spinosa*, endêmica do Marrocos, mostrou atividade redutora dos níveis de LDL, colesterol e triglicérides séricos, o que possivelmente está relacionado ao seu conteúdo de ácidos graxos insaturados (Berrougui et al., 2003). Esse óleo mostrou ainda a presença de esteróis, álcoois triterpênicos (Farines et al., 1984a, 1984b; Morton & Voss 1987) e saponinas (Alaoui et al., 2002), enquanto o estudo químico de suas folhas evidenciou a presença de flavonóides glicosilados (Tahrouch et al., 2000). Os óleos essenciais obtidos pela destilação das folhas de *Argania spinosa* apresentaram álcoois sesquiterpênicos (*epi*-cubenol, Figura 3) como constituintes majoritários, que

mostraram atividade antimicrobiana *in vitro* (El Kabouss et al., 2002).

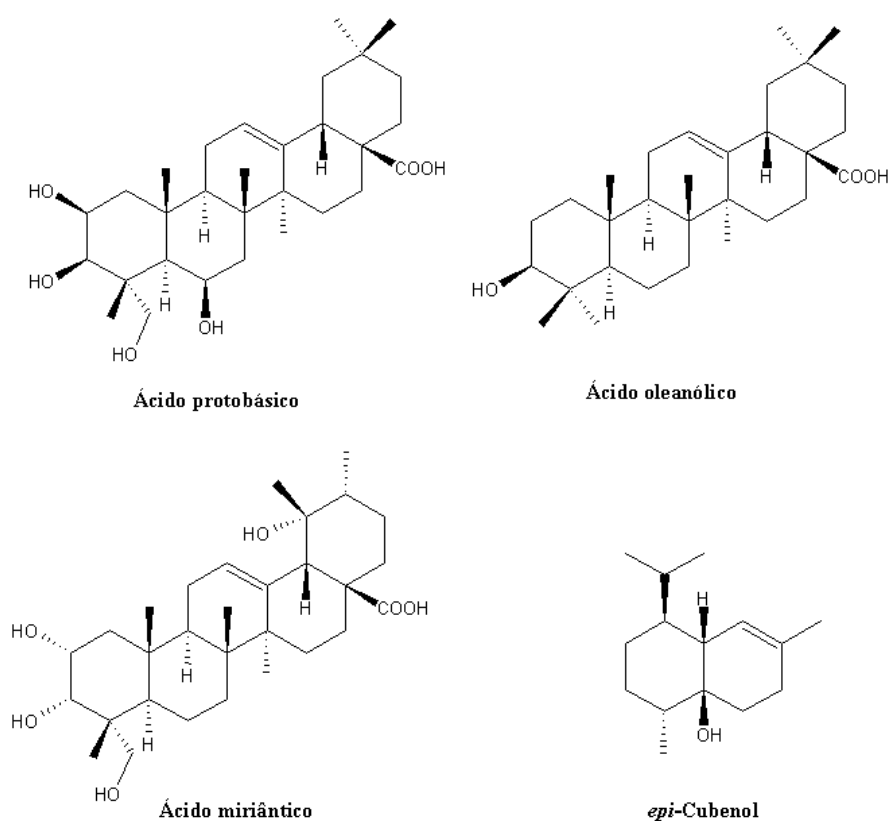


FIGURA 3 Substâncias isoladas de espécies de plantas pertencentes à família Sapotaceae

2.4 O gênero *Chrysophyllum*

Entre os gêneros conhecidos da família Sapotaceae se encontra aquele denominado *Chrysophyllum*. Apesar de algumas espécies deste gênero terem apresentado atividades biológicas importantes, são escassos os trabalhos de investigação química destas espécies. Dentre as atividades relatadas, pode-se destacar a anticonceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa,

antimicrobiana, hepatoprotetora, antiúlcera, antiviral e hipotensiva (Pratt & Miller, 1984; Boring et al., 1994; Liu 1995; Gordon, 1996; Wang et al., 1999; Idowu et al., 2006).

Estudos recentes mostram que frutos e folhas desse gênero contêm flavonóides e outros polifenóis (antioxidantes naturais), que reduzem a velocidade de processos oxidativos associados a desordens neurodegenerativas, doença coronária, arteriosclerose e câncer. As atividades antioxidantes de extratos aquosos de plantas desse gênero não foram estudadas extensivamente, devido à presença de antioxidantes solúveis em água e açúcares, que podem mascarar a atividade de polifenóis. A polaridade e complexidade de extratos aquosos dos frutos dificultam o isolamento de componentes puros como antocianinas e taninos (Gordon, 1996; Wang et al., 1999).

A espécie *C. cainito* contém uma grande variedade de substâncias químicas com atividade antioxidante. A análise nutricional mostrou que os frutos dessa espécie possuem alcalóides, saponinas, cardenolídeos, bufadienolídeos, flavonóides, taninos, antraquinonas, aminoácidos, β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol, terpenos e polifenóis (Figura 4) (King, 1959). Ainda nos frutos, identificaram-se nove componentes antioxidantes: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, miricetrina, e ácido gálico (Figura 4). O acetato de β -amirina e o ácido gentísico (Figura 4) foram isolados das folhas da planta.

O extrato de *C. perpulchrum* mostrou algumas propriedades farmacodinâmicas, o que levou ao isolamento da cardiocrisina (Figura 4), que se trata de um agente hipotensivo, cujo mecanismo de ação se baseia na vasodilatação periférica. Ademais, tal substância apresentou inibição da colesterase e se mostrou um antiespasmódico fraco (Pratt & Miller, 1984). De forma análoga, *C. albidum* apresentou potencial para uso farmacológico, já que Idowu et al. (2006) detectaram as atividades anticonceptiva, anti-inflamatória e

antioxidante para o alcalóide eleagnina (Figura 4), isolado das sementes desta planta.

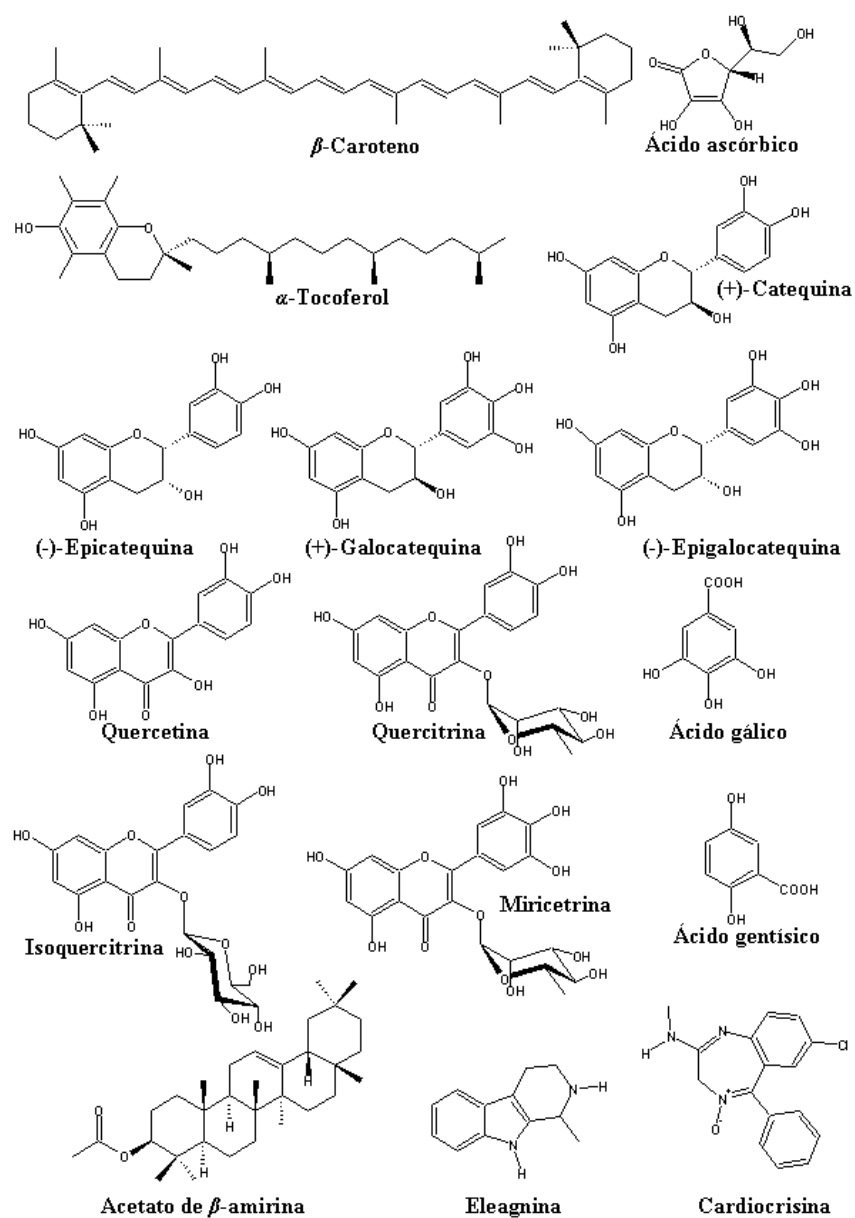


FIGURA 4 Substâncias isoladas de espécies do gênero *Chrysophyllum*

2.5 A espécie *Chrysophyllum gonocarpum*

Chrysophyllum gonocarpum (Mart. & Eichl.) Engl. (Figura 5), conhecida como aguai, peroba branca e cerejinha, entre outros, é uma espécie arbórea de 6–20 m de altura, podendo alcançar até 60 cm de diâmetro de caule (Reitz, 1968). Possui copa densa e verde-escura, com numerosos galhos finos. Por sua importância paisagística, econômica e ecológica, é indicada para a recuperação de áreas degradadas. No Brasil, a espécie ocorre no Nordeste, no Rio de Janeiro, em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul (Lorenzi, 2002). A planta produz anualmente grande quantidade de sementes, sendo de uma a cinco por fruto (Kuera et al., 2002).



FIGURA 5 Ilustrações da espécie *Chrysophyllum gonocarpum*

Em trabalho anteriormente realizado com o extrato das folhas de *C. gonocarpum* por este grupo de pesquisas, isolaram-se três substâncias: o esqualeno, α -tocoferol e ácido *cis*-octadec-9-enóico (Figura 6) (Santos, 2009). Em teste realizado com as substâncias isoladas sobre a oviposição de *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*), verificou-se que o ácido *cis*-octadec-9-enóico possuía atividade, apresentando um valor estatisticamente igual ao obtido para o inseticida comercial Lorsban[®].

A escolha da espécie *C. gonocarpum* para este estudo se deu em decorrência do seu extrato ter apresentado atividade contra *A. achraceus* em estudos preliminares (trabalho não publicado).

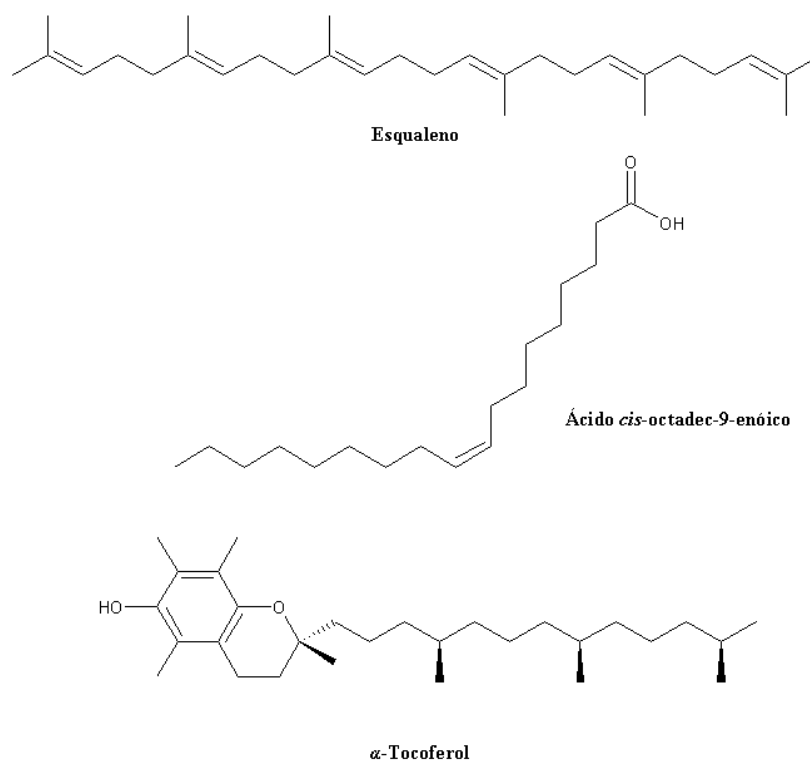


FIGURA 6 Substâncias isoladas do extrato das folhas de *Chrysophyllum gonocarpum*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos utilizados

A não ser quando especificado de outra forma, empregaram-se Hex, AcOEt, MeOH, DMSO, Tween 80, ACN e AcOH de grau analítico (P.A.). A água empregada era destilada. Para as análises por CCD, utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica-C18 (Merck) impregnada com indicador de fluorescência UV 254 nm. Os reveladores empregados em tais análises foram luz UV, vapor de iodo, solução de *p*-anisaldeído sulfúrico 2,5% e solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol. Sílica-C18 (Phenomenex Sepra 50 μm x 65 Å) ou resina de poliestireno amberlite XAD-16 (Sigma) foram empregadas nos fracionamentos por CC. As análises e fracionamentos por CLAE foram realizados em aparelho Shimadzu com detector do tipo DAD modelo SPD-M20A, equipado com duas bombas modelo LC-6AD, injetor manual Reodyne modelo 20i ou injetor automático modelo SIL-10AF, degaseificador de solventes modelo DGU – 20A₃, interface CBM-20A (SCL-10Avp) e *software* LC-SOLUTION 1.21 para aquisição e manipulação de dados. Todo o trabalho por CLAE foi realizado com colunas analíticas (5 μm , 250 x 4,6 mm) ou preparativas (5 μm , 250 x 21,2 mm) de sílica-C18 Phenomenex Gemini ou Fenil-Hexil Phenomenex Luna, sendo todas equipadas com pré-coluna contendo a mesma fase estacionária da coluna. Para tanto, empregou-se H₂O ultrapura do tipo I, enquanto os solventes MeOH, AcOH e ACN eram de grau CLAE-UV. As análises por RMN foram realizadas em aparelho Varian Inova 500 (500 MHz ¹H x 126 MHz ¹³C), Varian Inova 600 equipado com *cryoprobe* (600 MHz ¹H x 151 MHz ¹³C), ambos com *software* VnmrJ 3.0, e Bruker DRX 600 (600 MHz ¹H x 151 MHz ¹³C) com *software* TopSpin 2.1. Para tanto, empregaram-se D₂O, DMSO-*d*₆ e CD₃OD (Merck ou Aldrich) como solventes.

3.2 Coleta de material botânico

Cascas de vários indivíduos de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) foram coletadas em diferentes localidades do município de Lavras – MG, entre julho e setembro de 2008, para serem levadas ao Laboratório de Produtos Naturais (LPN), do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde teve início o processo de purificação e identificação de substâncias da espécie. Uma amostra de folhas foi encaminhada ao Departamento de Biologia (DBI) da UFLA para identificação botânica pelo Prof. Dr. Douglas Antônio de Carvalho e uma exsicata foi depositada no Herbário ESAL (ESAL 6321).

3.3 Obtenção do extrato bruto

As cascas coletadas foram secas em estufa com ventilação e renovação de ar, por no mínimo 96 horas, à temperatura de aproximadamente 40°C, para serem moídas e armazenadas em freezer. Obtiveram-se 787 g de material seco e moído, que foi extraído exaustivamente com metanol (12 X 2000 mL) por processos de maceração estática até o esgotamento. Os extratos obtidos foram reunidos e a solução resultante foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório e, em seguida, liofilizada, dando origem a 97,0 g do extrato bruto seco, de coloração avermelhada (TA-54-01). Tal extrato foi submetido ao teste contra o fungo fitopatogênico *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, conforme descrito nos itens 3.7 e 4.5.

3.4 Fracionamento do extrato bruto (TA-54-01) por extração com solventes

O fracionamento por extração com solventes do extrato bruto seco das cascas de *C. gonocarpum* (TA-54-01) seguiu o esquema mostrado na Figura 7. As frações obtidas foram submetidas à avaliação de atividade biológica contra *A. ochraceus*, como descrito nos itens 3.7 e 4.5.

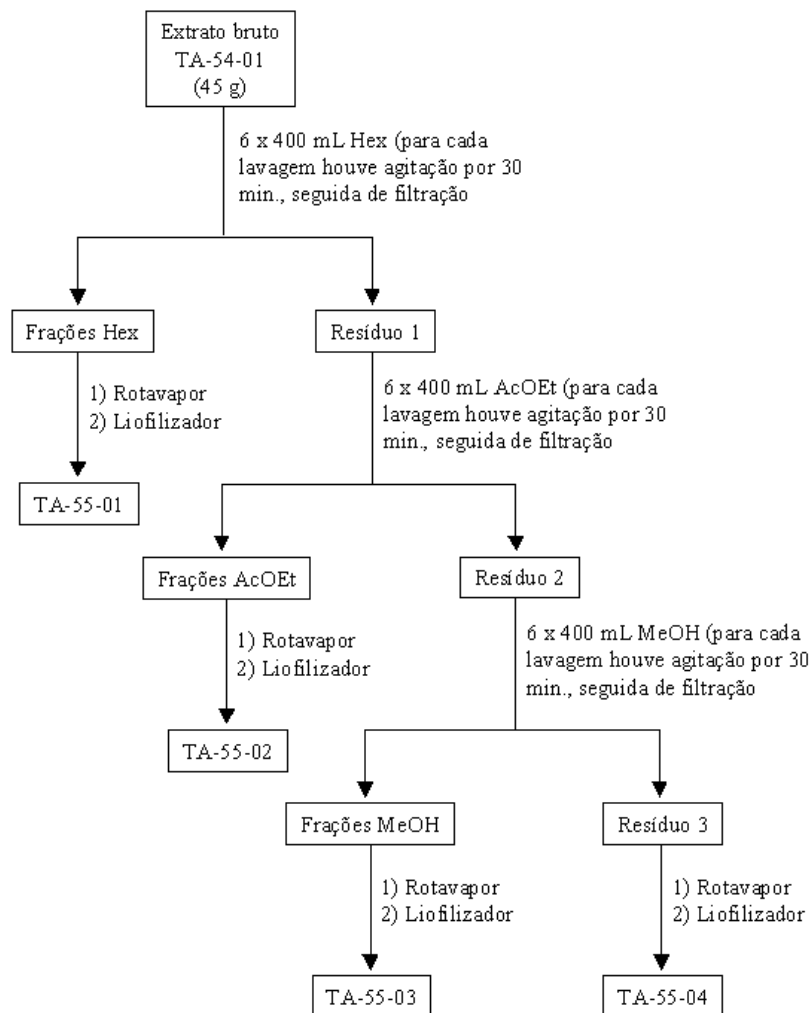


FIGURA 7 Fluxograma do fracionamento por extração com solventes de TA-54-01 (extrato seco das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum*)

3.5 Fracionamento da fração solúvel em metanol (TA-55-03)

3.5.1 Cromatografia líquida em coluna de XAD-16 de TA-55-03

Parte (16,8 g) de TA-55-03 (fração solúvel em metanol do extrato bruto de *C. gonocarpum*, item 3.4) foi solubilizada em metanol e colocada em balão

de fundo redondo com cerca de 32 g de resina amberlite XAD-16. Retirou-se o solvente em evaporador rotatório e adicionou-se o resíduo ao topo de uma coluna com 7 x 15 cm de resina amberlite XAD-16. Através da coluna foram subsequentemente eluídos H₂O (2000 mL), H₂O/MeOH (80:20, 1000 mL), MeOH (2000 mL) e AcOEt (2000 mL), obtendo-se, após concentração até *secura* em evaporador rotatório e liofilização, as quatro respectivas frações: Jr2-106-01 a Jr2-106-04 (Tabela 3 do item 4.3.1). Os perfis cromatográficos em modo gradiente exploratório de tais frações foram obtidos em CLAE-DAD, utilizando-se coluna analítica de sílica-C18 (gradiente de H₂O:MeOH 5% a 100% MeOH em 40 min.; 100% de MeOH de 40 a 60 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 600 nm). Vale mencionar que, antes de todas as análises ou fracionamentos por CLAE, as amostras foram submetidas a um processo de extração em fase sólida (*clean-up*), utilizando-se sílica-C18, conforme descrito por Santos et al. (2007).

3.5.2 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr2-106-02

Após ajuste das condições em CLAE-DAD, a fração Jr2-106-02 (item 3.5.1) foi fracionada por CLAE, utilizando-se a coluna preparativa de sílica-C18, eluição isocrática com H₂O/ACN (99:1) por 30 min., fluxo de 15 mL/min. e λ de 190 a 400 nm. Para tanto, parte de Jr2-106-02 (550 mg) foi solubilizada em 5,0 mL de H₂O (*c* = 110 mg/mL), sendo realizadas 25 injeções de 200 μ L cada. Foram coletadas cinco frações (Jr3-01-01 à Jr3-01-05, Tabela 4 do item 4.3.2) que, após concentração em evaporador rotatório e liofilização, foram analisadas em CLAE-DAD [coluna analítica de sílica-C18, modo isocrático de H₂O/ACN (99:1) em 40 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm]. Como as frações Jr3-01-02 e Jr3-01-03 estavam cromatograficamente puras (item 4.3.2), foram posteriormente submetidas às análises por RMN (itens 3.6 e 4.4).

3.5.3 Fracionamento em coluna de sílica-C18 de Jr2-106-03

Inicialmente, a fração Jr2-106-03 (item 3.5.1 e 4.3.3) foi submetida a várias análises por CCD, o que permitiu o ajuste das condições para a realização da CC. Em seguida, aproximadamente 4,70 g de Jr2-106-03 foram solubilizados em metanol e a solução obtida foi colocada em balão de fundo redondo com cerca de 10 g de sílica-C18. Retirou-se o solvente em evaporador rotatório e adicionou-se o resíduo ao topo de uma coluna empacotada com 7 x 15 cm de sílica-C18. Através da coluna, com velocidade linear aproximada de 2,5 cm/min., eluíram-se, em modo gradiente escalonado e ordem decrescente de polaridade, H₂O/ACN (95:5, 1000 mL; 94:6, 860 mL; 92:8, 860 mL; 88:12, 860 mL; 80:20, 860 mL; 65:35, 860 mL; 50:50, 1000 mL) e ACN (1000 mL). Coletaram-se 84 frações de 75 mL que, após serem analisadas por CCD e em CLAE-DAD (gradiente de H₂O:MeOH 5% a 100% MeOH em 30 min.; 100% de MeOH de 30 a 40 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 600 nm), foram reunidas de acordo com as suas similaridades, concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, resultando em 23 frações (Jr3-06-01 à Jr3-06-23, Tabela 5 do item 4.3.3). Também se coletou uma fração de aproximadamente 1000 mL, resultante da passagem do último eluente na coluna, que foi nomeada Jr3-06-24 (Tabela 5 do item 4.3.3). Por fim, os perfis cromatográficos em modo gradiente exploratório de Jr3-06-01 à Jr3-06-24 foram obtidos em CLAE-DAD (coluna analítica de sílica-C18, FM de H₂O:MeOH 5% a 100% MeOH em 40 min.; 100% de MeOH de 40 a 60 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 600 nm). De acordo com tais análises cromatográficas, selecionaram-se as seguintes frações para dar prosseguimento ao presente trabalho: Jr3-06-17, Jr3-06-11, Jr3-06-06 e Jr3-06-13 (itens 3.5.4, 3.5.5, 3.5.6 e 3.5.7).

3.5.4 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-17

Após o ajuste das condições por CLAE, a fração Jr3-06-17 (item 3.5.3) foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna de sílica-C18, eluição isocrática com H₂O/MeOH (47:53) contendo 0,1% de AcOH, por 30 min., fluxo de 15 mL/min. e λ de 190 a 400 nm. Parte de Jr2-106-02 (650 mg) foi solubilizada em 6,0 mL de H₂O/MeOH (50:50) ($c = 108,3$ mg/mL), sendo realizadas 20 injeções de 300 μ L. Coletaram-se cinco frações (Jr3-09-01 a Jr3-09-05, Tabela 6 do item 4.3.4), que foram concentradas até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadas. Todas foram analisadas em CLAE-DAD [coluna analítica de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (76:24) contendo 0,1% de AcOH, em 40 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm], o que permitiu verificar que as frações Jr3-09-04 e Jr3-09-05 estavam cromatograficamente puras (item 4.3.4). Em decorrência, foram posteriormente submetidas a análises por RMN (itens 3.6 e 4.4).

3.5.5 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-11

A fração Jr3-06-11 (item 3.5.3), após ajuste das condições por CLAE analítica, foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna de sílica-C18, eluição isocrática com H₂O/ACN (82:18) contendo 0,1% de AcOH, por 60 min., fluxo de 15 mL/min. e λ de 190 a 400 nm. Aproximadamente 210 mg de Jr3-06-11 foram solubilizados em 2,0 mL de H₂O/ACN (18:82) ($c = 205$ mg/mL), sendo realizadas 16 injeções de 125 μ L. Coletaram-se duas frações (Jr3-11-01 e Jr3-11-02, item 4.3.5), que foram analisadas em CLAE-DAD [coluna analítica de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH, em 80 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm]. Observou-se que as duas frações obtidas estavam cromatograficamente puras (item 4.3.5), sendo posteriormente submetidas a análises por RMN (itens 3.6 e 4.4).

3.5.6 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-06

A fração Jr3-06-06 (item 3.5.3), após ajuste das condições por CLAE analítica, foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna preparativa Fenil-Hexil, eluição isocrática com H₂O/ACN (94:6) contendo 0,1% de AcOH, por 100 min., fluxo de 15 mL/min. e λ de 190 a 400 nm. Aproximadamente 260 mg de Jr3-06-06 foram solubilizados em 4,0 mL de H₂O/ACN (92:8) ($c = 65$ mg/mL), sendo realizadas 10 injeções de 400 μ L. Coletaram-se três frações (Jr3-11-03 à Jr3-11-05, item 4.3.6), que foram analisadas em CLAE-DAD [coluna analítica de Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (93:7) contendo 0,1% de AcOH, em 60 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm]. Concluiu-se que as três frações obtidas estavam cromatograficamente puras (item 4.3.6). Consequentemente, foram posteriormente submetidas a análises por RMN (itens 3.6 e 4.4).

3.5.7 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-13

Após o ajuste das condições por CLAE, a fração Jr3-06-13 (item 3.5.3) foi fracionada em CLAE-DAD preparativo, utilizando-se coluna Fenil-Hexil, eluição isocrática com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH, por 70 min., fluxo de 15 mL/min. e λ de 190 a 400 nm. Aproximadamente 215 mg de Jr3-06-13 foram solubilizados em 2,0 mL de H₂O/ACN (86:14) ($c = 107,5$ mg/mL), sendo realizadas 12 injeções de 166,6 μ L. Coletaram-se três frações (Jr3-12-01 à Jr3-12-03, item 4.3.7), que foram analisadas em CLAE-DAD [coluna analítica de Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH, em 100 min.; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm]. Verificou-se que as três frações obtidas estavam cromatograficamente puras (item 4.3.7). Porém, apenas as amostras Jr3-12-01 e Jr3-12-03 foram submetidas às análises por RMN (itens 3.6 e 4.4), uma vez que Jr3-12-02 era cromatograficamente idêntica a Jr3-11-01 (itens 3.5.5 e 4.3.5), conforme discutido no item 4.3.7.

3.6 Elucidações estruturais das substâncias isoladas

As elucidações estruturais das substâncias isoladas (Jr3-01-02, Jr3-01-03, Jr3-09-04, Jr3-09-05, Jr3-11-01, Jr3-11-02, Jr3-11-03, Jr3-11-04, Jr3-11-05, Jr3-12-01 e Jr3-12-03) foram feitas por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, em D₂O, DMSO-*d*₆ e CD₃OD, conforme discutido no item 4.4. Realizaram-se experimentos unidimensionais e bidimensionais, empregando-se os picos dos solventes ou TMS como referência.

3.7 Teste de atividade antifúngica contra *Aspergillus ochraceus*

Os testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro Tecnológico do Sul de Minas, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG, Lavras – MG), sob responsabilidade da Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza. A atividade do extrato bruto metanólico de *C. gonocarpum* (TA-54-01) e das frações solúvel em Hex (TA-55-01), solúvel em AcOEt (TA-55-02) e solúvel em MeOH (TA-55-03), resultantes do processo de extração com solventes do extrato bruto, foram avaliadas (resultados no item 4.5) contra o fungo fitopatogênico *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, isolado a partir de plantas de café contaminadas com o patógeno, conforme descrito por Pereira et al. (2008). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), alíquotas de 30 mg do extrato bruto e das frações foram solubilizadas em 312 µL de DMSO. A 200 µL de cada solução obtida foram adicionados 1000 µL do meio de cultura Czapeck sem agar (CYB) (Bejaoui et al., 2006). Colocaram-se 100 µL de cada solução nas duas primeiras cavidades de duas colunas de uma placa ELISA e, em seguida, foram acrescentados 100 µL do meio CYB ao conteúdo da segunda cavidade de cada coluna que, em seguida, foi homogeneizado. Transferiram-se 100 µL do conteúdo da segunda cavidade para a terceira cavidade de cada coluna. Adicionaram-se 100 µL do meio de cultura à terceira cavidade e repetiu-se todo o procedimento até a

décima cavidade de cada coluna. A uma suspensão de conídios de 10 mL do fungo *A. ochraceus*, obtida conforme descrito por Kulwant et al. (1991), na concentração de 5×10^6 conídios/mL, foram adicionados 50 mL de meio CYB. Foram depositados 100 μ L dessa mistura em cada uma das cavidades contendo o extrato bruto, as frações e as testemunhas [DMSO (negativa) e solução de cloreto de benzalcônio (positiva)]. Dessa forma, os extratos e as suas frações foram avaliados em uma faixa de concentração de 8012,00 – 15,60 μ g/mL, enquanto o cloreto de benzalcônio (testemunha positiva) e o DMSO (testemunha negativa) foram avaliados entre 31,00 – 0,06 μ g/mL e 71,00 – 0,14 μ g/mL, respectivamente.

As placas permaneceram incubadas em câmara de crescimento por 48 horas, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi realizado com duas repetições, tendo cada uma sido constituída por uma placa ELISA. Na avaliação, foram consideradas a presença e a ausência de crescimento fúngico nas dez cavidades da placa ELISA. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu completamente o crescimento do patógeno, segundo avaliação visual.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado no item 4.5, o extrato metanólico de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) apresentou atividade contra o fungo *Aspergillus ochraceus* Wilhelm, com CIM de 8012,0 µg/mL, sendo, portanto, confirmado o seu potencial para uso no desenvolvimento de novos produtos para o controle deste fungo em grãos de café. O fluxograma da Figura 8 resume os procedimentos realizados durante as etapas de purificação do referido extrato.

4.1 Extrato metanólico das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum*

Ao se submeter 787 g de cascas secas e moídas de *C. gonocarpum* à extração com metanol (item 3.3), obtiveram-se 97 g de um pó avermelhado (TA-54-01), com rendimento de aproximadamente 12,3 %. Tal valor está perfeitamente de acordo com dados da literatura, segundo os quais o rendimento para processos similares ficam em torno de 10 a 15% (Castilho & Kaplan, 2008).

4.2 Fracionamento do extrato metanólico (TA-54-01) por extração com solventes

O fracionamento por extração com solventes do extrato metanólico de *C. gonocarpum* (TA-54-01, item 3.4) resultou em quatro novas frações (Tabela 2), dentre as quais, aquela solúvel em MeOH (TA-55-03) era a de maior massa, correspondendo a cerca de 83,7% do extrato metanólico. As frações TA-55-01, TA-55-02 e TA-55-03 foram submetidas à avaliação de atividade antifúngica contra *A. ochraceus*, sendo que apenas as frações TA-55-01 e TA-55-03 inibiram o fungo, conforme apresentado no item 4.5. Os valores de CIM foram iguais a 4006,0 e 1001,5 µg/mL, respectivamente. A fração solúvel em MeOH

(TA-55-03) foi selecionada para dar continuidade aos processos de fracionamento, pelo fato de ter apresentado atividade quatro vezes maior que a fração solúvel em Hex (TA-55-01) e maior massa (32,0 g; 83,7%).

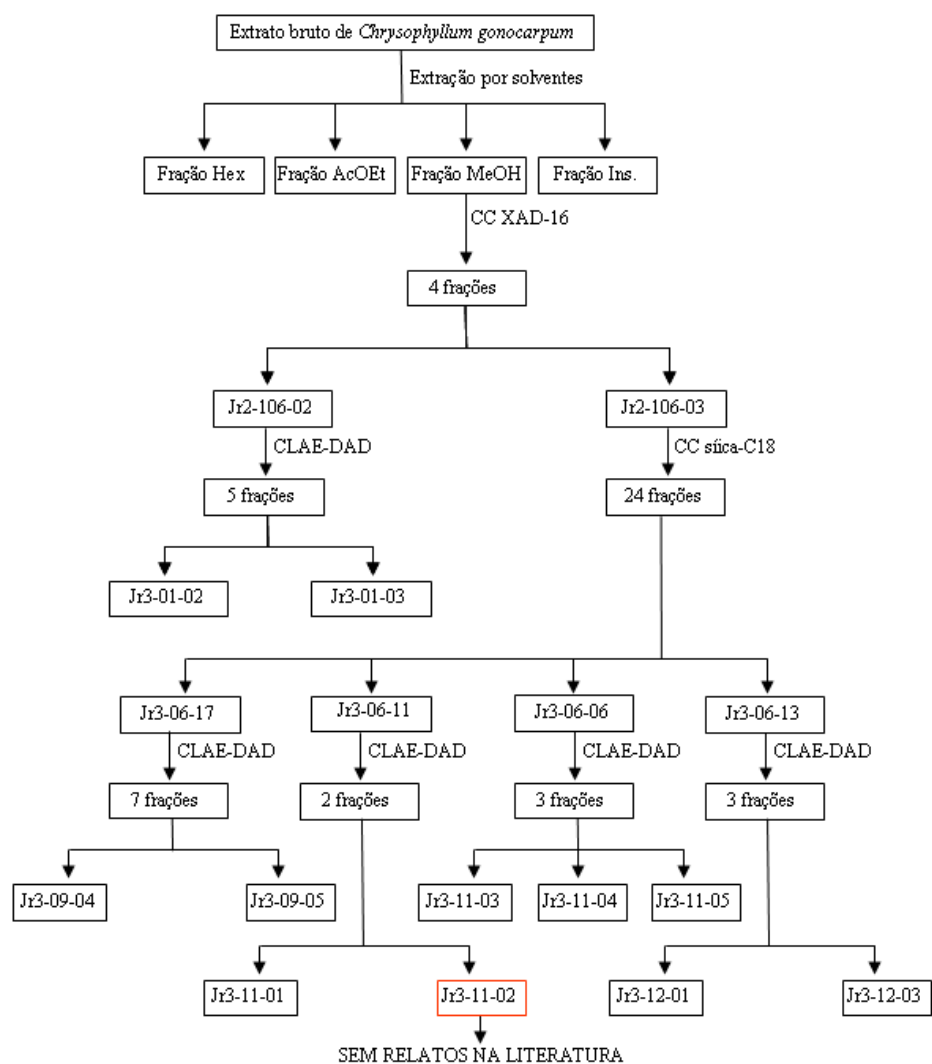


FIGURA 8 Resumo dos procedimentos realizados durante o fracionamento do extrato metanólico das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum*.

TABELA 2 Massas, porcentagens e aspectos das frações obtidas após as extrações com solventes do extrato metanólico das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum* (TA-54-01)

Código	Solvente extrator	Massa (g)	Percentual (%)	Coloração/Aspecto
TA-55-01	Hexano	4,7	12,3	Verde/oleoso
TA-55-02	Acetato de etila	1,4	3,7	Verde/pó
TA-55-03	Metanol	32,0	83,7	Amarelo/pó
TA-55-04	Insolúvel	0,1	0,3	Branco/pó

4.3 Fracionamento da fração solúvel em metanol do extrato metanólico de *Chrysophyllum gonocarpum* (TA-55-03)

4.3.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna de amberlite XAD-16 da fração TA-55-03

As frações obtidas (Tabela 3) foram analisadas em CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.5.1.

TABELA 3 Frações obtidas após o fracionamento em coluna de amberlite XAD-16 da fração solúvel em metanol do extrato de *Chrysophyllum gonocarpum* (TA-55-03)

Código	Eluente	Massa (mg)
Jr2-106-01	H ₂ O	10095,7
Jr2-106-02	H ₂ O/MeOH	566,3
Jr2-106-03	MeOH	4804,2
Jr2-106-04	AcOEt	1011,0

Quanto às outras frações, foram inicialmente avaliadas de acordo com a complexidade cromatográfica e a massa das mesmas. Consequentemente, optou-se por dar continuidade ao trabalho apenas com as frações Jr2-106-02 e Jr3-106-03, conforme descrito nos itens 3.5.2, 4.3.2, 3.5.3 e 4.3.3. Quanto à fração Jr2-

106-04, que apresentava complexidade mais elevada e menor massa que as outras frações, foi armazenada para trabalhos futuros.

4.3.2 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr2-106-02

O cromatograma preparativo obtido durante o processo de fracionamento de Jr2-106-02, juntamente com a representação das frações coletadas (Tabela 4), são apresentados na Figura 9.

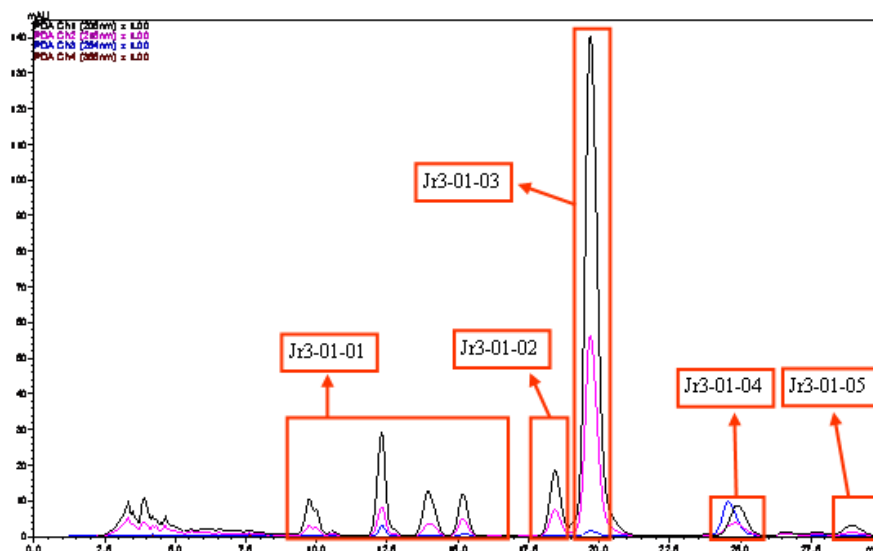


FIGURA 9 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr2-106-02 em CLAE-DAD preparativo e representação das frações coletadas (Jr3-01-01 à Jr3-01-05). Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (99:1); fluxo de 15 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

Todas as cinco frações obtidas foram analisadas em CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.5.2, o que permitiu observar que Jr3-01-02 (5,5 mg) e Jr3-01-03 (32,0 mg) estavam cromatograficamente puras (Figura 10).

TABELA 4 Frações obtidas do fracionamento em CLAE-DAD preparativo de Jr2-106-02

Código	Massa (mg)
Jr3-01-01	10,3
Jr3-01-02	5,5
Jr3-01-03	32,0
Jr3-01-04	8,8
Jr3-01-05	8,4

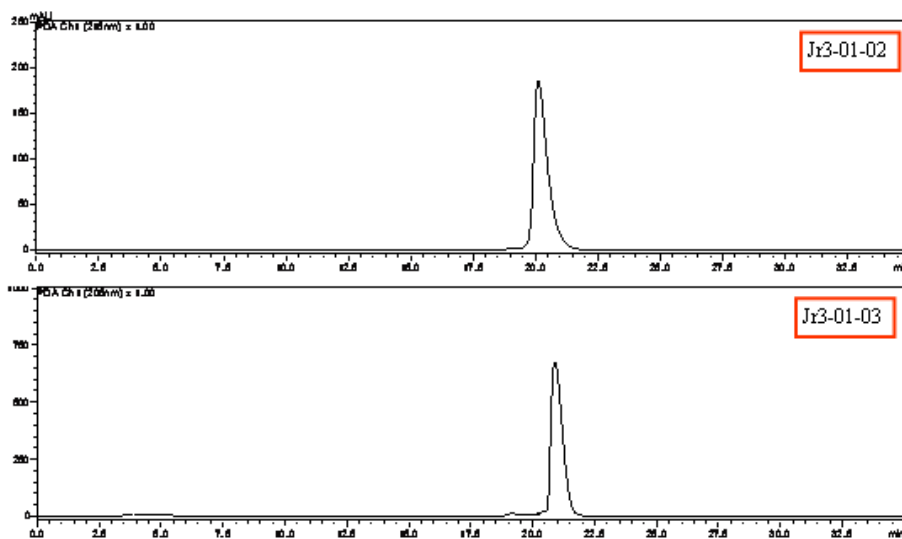


FIGURA 10 Cromatogramas analíticos obtidos em CLAE-DAD para as frações Jr3-01-02 e Jr3-01-03. Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (99:1); fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

Por este motivo, foram submetidas às análises por RMN 1D e 2D (itens 3.6 e 4.4). Uma hipótese para o fato do somatório das massas das cinco frações obtidas (65 mg, Tabela 4) estar bem abaixo da massa total utilizada da fração Jr2-106-02 (550 mg, item 3.5.2) é que tal fração ainda poderia conter quantidades expressivas de açúcares, os quais têm baixa absorção no UV, o que torna seus limites de detecção muito elevados.

4.3.3 Fracionamento em coluna de sílica-C18 de Jr2-106-03

Os perfis cromatográficos das frações provenientes de Jr2-106-03 (Tabela 5) foram obtidos em modo gradiente exploratório (item 3.5.3), o que permitiu selecionar aquelas que apresentavam as melhores relações entre complexidade e massa para serem utilizadas nas etapas seguintes de purificação: Jr3-06-17, Jr3-06-11, Jr3-06-06 e Jr3-06-13 (itens 3.5.4, 3.5.5, 3.5.6 e 3.5.7).

TABELA 5 Frações combinadas da cromatografia em coluna de Jr3-106-03

Frações Combinadas	Fração resultante	Massa (mg)
1 – 7	Jr3-06-01	23,7
8 e 9	Jr3-06-02	43,1
10 – 12	Jr3-06-03	63,4
13 – 14	Jr3-06-04	32,5
15 – 22	Jr3-06-05	159,3
23 – 34	Jr3-06-06	273,9
35 – 41	Jr3-06-07	159,3
42 – 44	Jr3-06-08	111,9
45 – 49	Jr3-06-09	192,0
50 – 54	Jr3-06-10	135,5
55	Jr3-06-11	227,5
56	Jr3-06-12	243,6
57 e 58	Jr3-06-13	221,7
59 – 62	Jr3-06-14	188,3
63 – 65	Jr3-06-15	90,6
66	Jr3-06-16	857,4

TABELA 5, Cont.

67	Jr3-06-17	712,6
68	Jr3-06-18	295,2
69 e 70	Jr3-06-19	101,6
71 – 74	Jr3-06-20	69,1
75 – 77	Jr3-06-21	37,6
78 e 79	Jr3-06-22	39,5
80 – 84	Jr3-06-23	53,1
ACN (1000 mL)	Jr3-06-24	73,9

4.3.4 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-17

O cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-17 em coluna preparativa, juntamente com a representação das frações coletadas (Tabela 6), são apresentados na Figura 11.

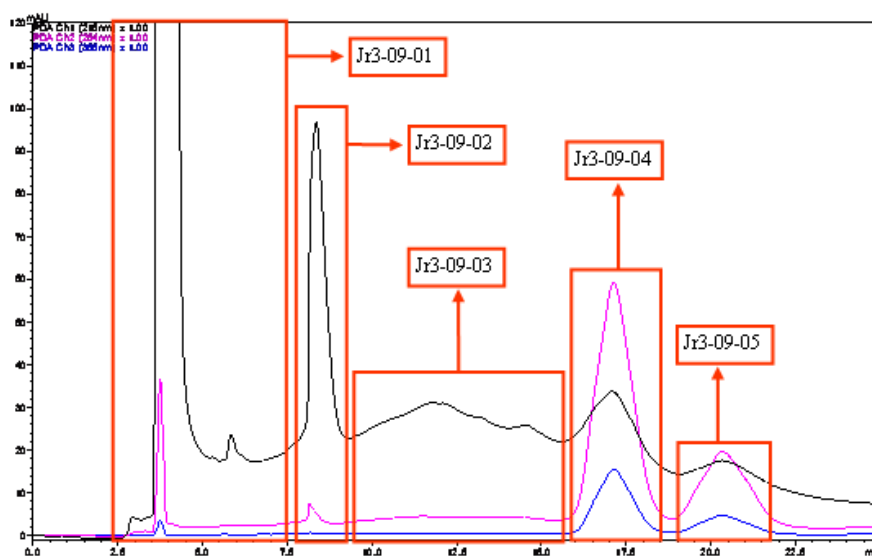


FIGURA 11 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-17 em CLAE-DAD preparativo e representação das frações coletadas (Jr3-09-01 à Jr3-09-05). Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/MeOH (47:53) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 15 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

TABELA 6 Frações obtidas do fracionamento em CLAE-DAD preparativo de Jr3-06-17

Código	Massa (mg)
Jr3-09-01	364,0
Jr3-09-02	46,7
Jr3-09-03	62,1
Jr3-09-04	5,2
Jr3-09-05	1,0

Todas as cinco frações obtidas foram analisadas em CLAE-DAD analítico, conforme descrito no item 3.5.4, o que permitiu observar que Jr3-09-04 (5,2 mg) e Jr3-09-05 (1,0 mg) estavam cromatograficamente puras (Figura 12). Por este motivo, foram submetidas a análises por RMN 1D e 2D (itens 3.6 e 4.4).

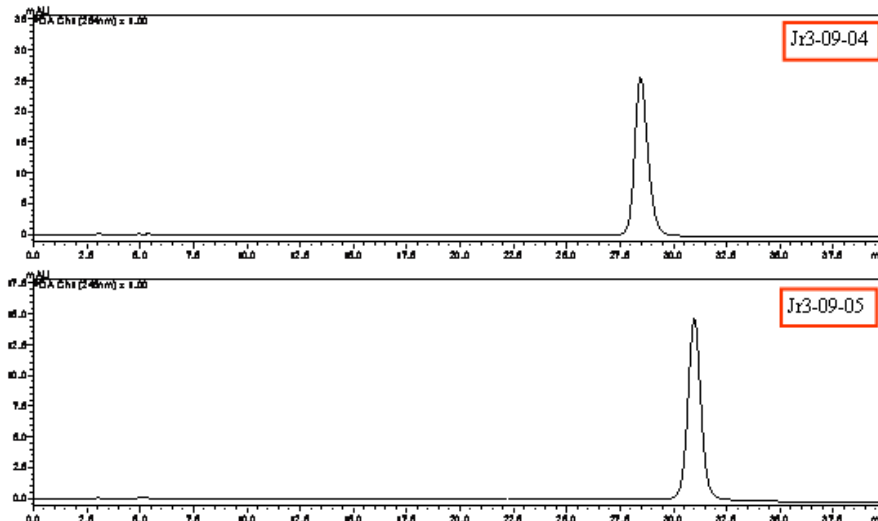


FIGURA 12 Cromatogramas analíticos obtidos em CLAE-DAD para as frações Jr3-09-04 e Jr3-09-05. Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (76:24) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

4.3.5 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-11

O cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-11 em coluna preparativa, juntamente com a representação das frações coletadas, são apresentados na Figura 13. As duas frações coletadas foram analisadas em CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.5.5, o que permitiu observar que ambas (Jr3-11-01, 30,6 mg; Jr3-11-02, 9,9 mg) estavam cromatograficamente puras (Figura 14), sendo, portanto, submetidas a análises por RMN 1D e 2D (itens 3.6 e 4.4).

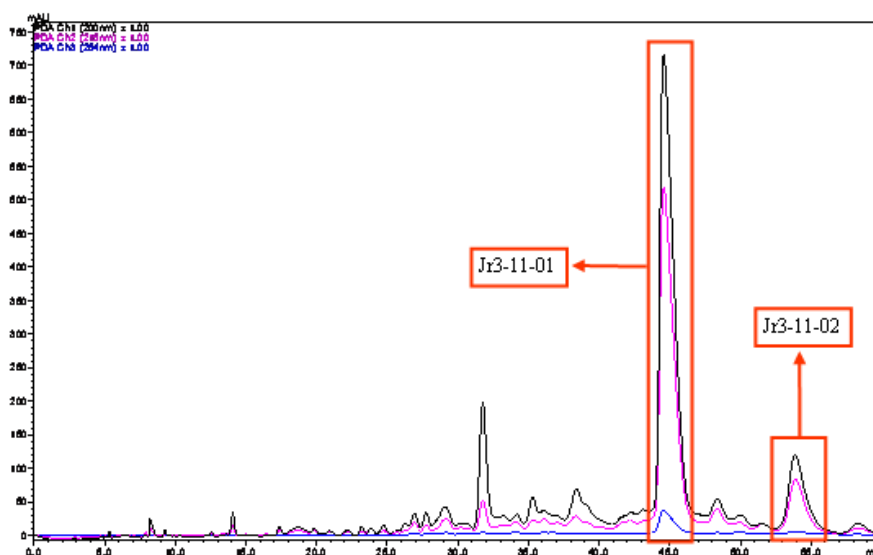


FIGURA 13 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-11 em CLAE-DAD preparativo e representação das frações coletadas (Jr3-11-01 e Jr3-11-02). Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (82:18) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 15 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

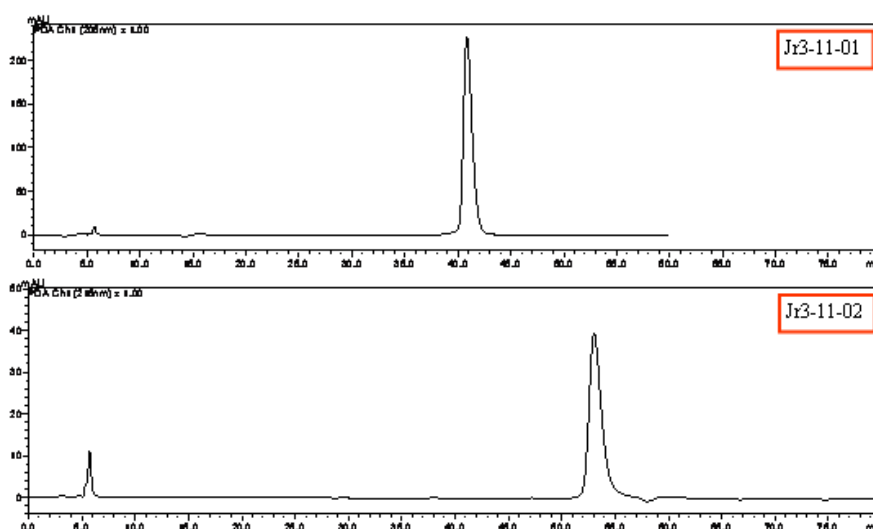


FIGURA 14 Cromatogramas analíticos obtidos em CLAE-DAD para as frações Jr3-11-01 e Jr3-11-02. Condições cromatográficas: coluna de sílica-C18, modo isocrático com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

4.3.6 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-06

O cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-06 em coluna preparativa, juntamente com a representação das frações coletadas, são apresentados na Figura 15. As três frações coletadas foram analisadas em CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.5.6, o que permitiu observar que todas (Jr3-11-03, 47,3 mg; Jr3-11-04, 56,1 mg; Jr3-11-05, 19,3 mg) estavam cromatograficamente puras (Figura 16), sendo, portanto, submetidas a análises por RMN 1D e 2D (itens 3.6 e 4.4).

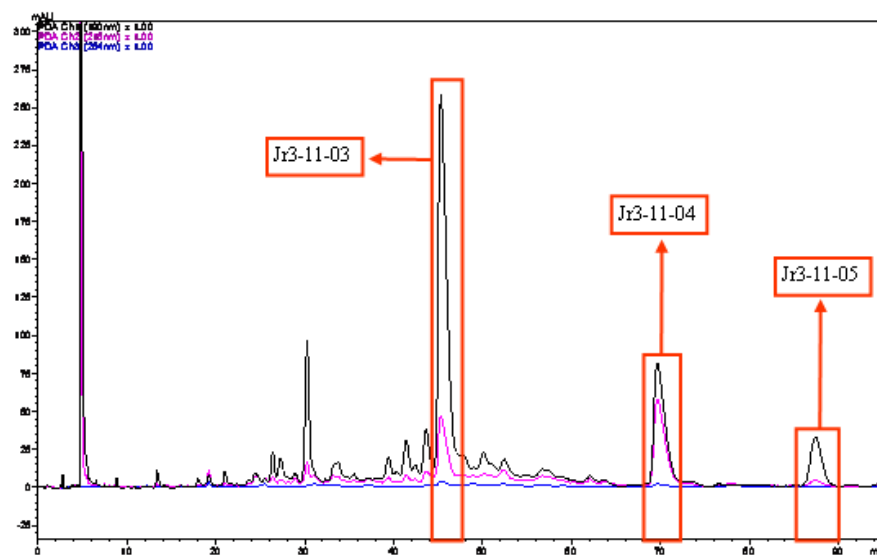


FIGURA 15 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-06 em CLAE-DAD preparativo e representação das frações coletadas (Jr3-11-03 à Jr3-11-05). Condições cromatográficas: coluna Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (94:6) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 15 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

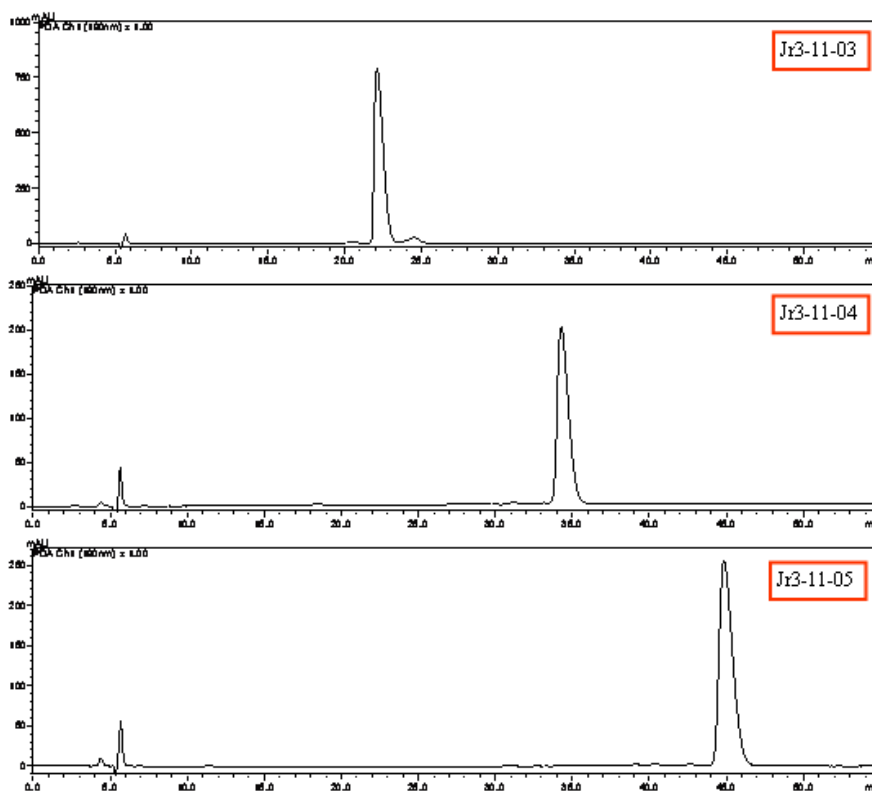


FIGURA 16 Cromatogramas analíticos obtidos em CLAE-DAD para as frações Jr3-11-03 à Jr3-11-05. Condições cromatográficas: coluna Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (93:7) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

4.3.7 Fracionamento em CLAE-DAD preparativo da fração Jr3-06-13

O cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-13 em coluna preparativa, juntamente com a representação das frações coletadas, são apresentados na Figura 17.

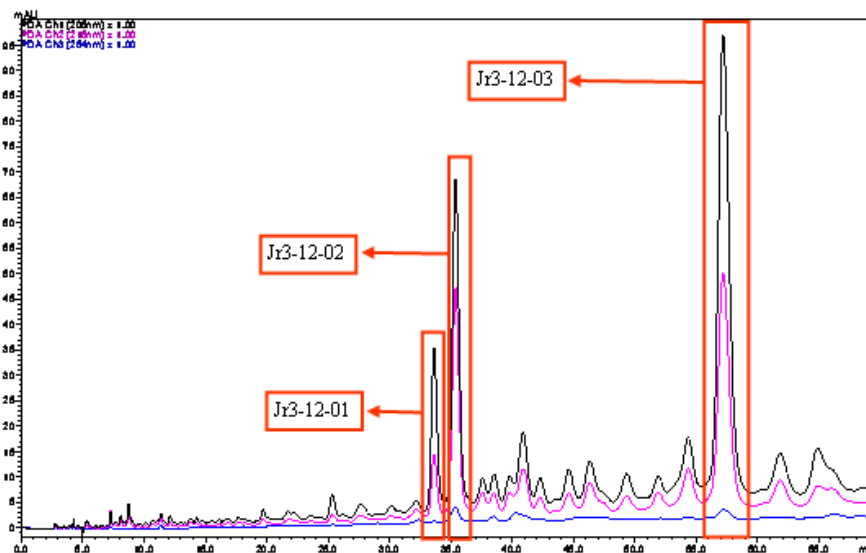


FIGURA 17 Cromatograma obtido durante o processo de fracionamento de Jr3-06-13 em CLAE-DAD preparativo e representação das frações coletadas (Jr3-12-01 à Jr3-12-03). Condições cromatográficas: coluna Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 15 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

As três frações coletadas foram analisadas em CLAE-DAD, conforme descrito no item 3.5.7, o que permitiu observar que todas (Jr3-12-01, 3,2 mg; Jr3-12-02, 8,5 mg; Jr3-12-03, 13,8 mg) estavam cromatograficamente puras (Figura 18). Com o intuito de desreplificar resultados, as amostras Jr3-12-02 e Jr3-11-01 foram analisadas em CLAE-DAD nas mesmas condições, o que permitiu observar que eram a mesma substância. Em decorrência, apenas as amostras Jr3-12-01 e Jr3-12-03 foram submetidas às análises por RMN (itens 3.6 e 4.4).

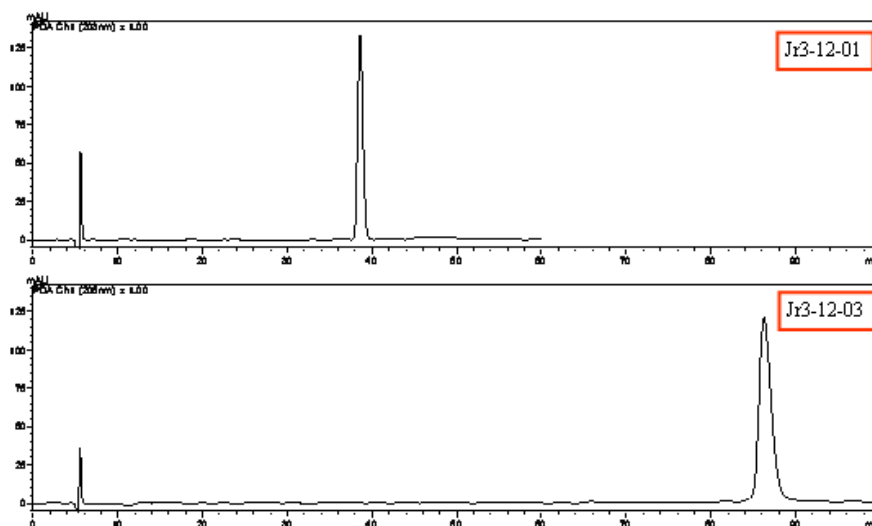


FIGURA 18 Cromatogramas analíticos obtidos em CLAE-DAD para as frações Jr3-12-01 e Jr3-12-03. Condições cromatográficas: coluna Fenil-Hexil, modo isocrático com H₂O/ACN (86:14) contendo 0,1% de AcOH; fluxo de 0,75 mL/min.; λ de 190 a 400 nm

4.4 Elucidações estruturais e dados da literatura das substâncias isoladas

As substâncias isoladas das cascas de *C. gonocarpum* foram analisadas por RMN 1D e 2D, utilizando-se D₂O, DMSO-*d*₆ e CD₃OD como solventes (Tabela 7, Figura 19). Os espectros de Jr3-01-02, Jr3-01-03, Jr3-09-04, Jr3-09-05 e Jr3-12-01 foram obtidos em solvente diferente daquele utilizado por outros autores para a obtenção de dados de RMN. Em decorrência, optou-se por não discutir seus dados até que os espectros correspondentes possam ser obtidos em solventes adequados para que possam ser comparados com os dados da literatura. Os dados das demais substâncias são apresentados e discutidos a seguir (itens 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4, 4.4.5 e 4.4.6).

TABELA 7 Solventes utilizados nos experimentos de RMN para as substâncias isoladas

Código	Substância	Solvente
Jr3-01-02	(7S*,8S*)- <i>treo</i> -1- <i>C</i> -siringilglicerol glicopiranosídeo	4- <i>O</i> - β -D- DMSO- <i>d</i> ₆
Jr3-01-03	(7R*,8R*)- <i>treo</i> -1- <i>C</i> -siringilglicerol glicopiranosídeo	4- <i>O</i> - β -D- DMSO- <i>d</i> ₆
Jr3-09-04	ácido 4- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-3,3',4'-tri- <i>O</i> -metilelágico	DMSO- <i>d</i> ₆
Jr3-09-05	ácido 4- <i>O</i> - β -D-xilopiranosil-3,3'-di- <i>O</i> -metilelágico	DMSO- <i>d</i> ₆
Jr3-11-01	(+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol glicopiranosídeo	3 α - <i>O</i> - β -D- CD ₃ OD
Jr3-11-02 (inérita)	(2R*,3R*,4S*)-lioniresinol fucopiranosídeo-3 α - <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	2 α - <i>O</i> - α -L- CD ₃ OD
Jr3-11-03	cuchilosídeo	D ₂ O
Jr3-11-04	kelampaiosídeo A	CD ₃ OD
Jr3-11-05	benzil- β -primeverosídeo	CD ₃ OD
Jr3-12-01	3,4,5-trimetoxifenol	CD ₃ OD
Jr3-12-03	(7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol glicopiranosídeo	4'- <i>O</i> - β -D- DMSO- <i>d</i> ₆

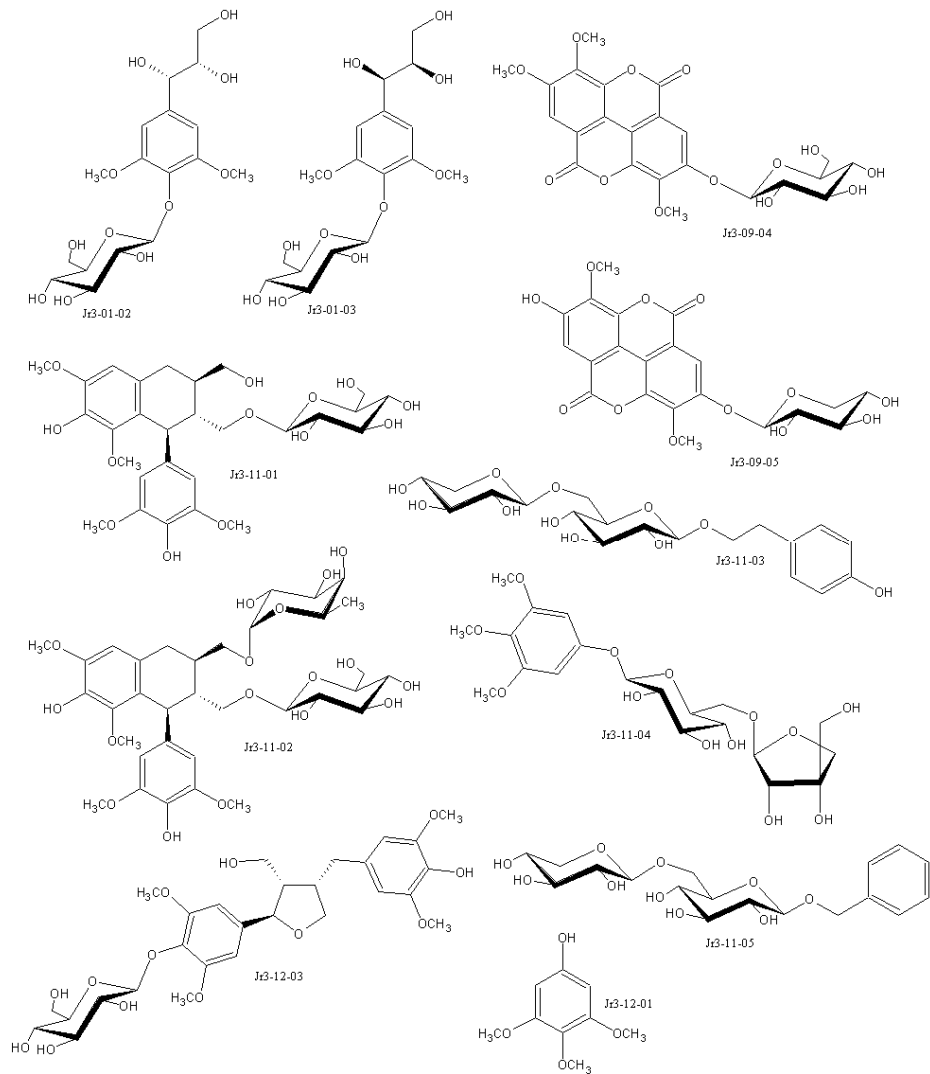


FIGURA 19 Representação estrutural das substâncias isoladas no presente trabalho do extrato metanólico das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum*

4.4.1 Substância Jr3-11-01¹

O espectro de UV da substância Jr3-11-01 sugeria a existência de estruturas aromáticas substituídas com grupos doadores de elétrons (Figura 20), o que foi corroborado no espectro de RMN de ¹³C pelos vários picos entre δ_C 107-150 (Tabela 8).

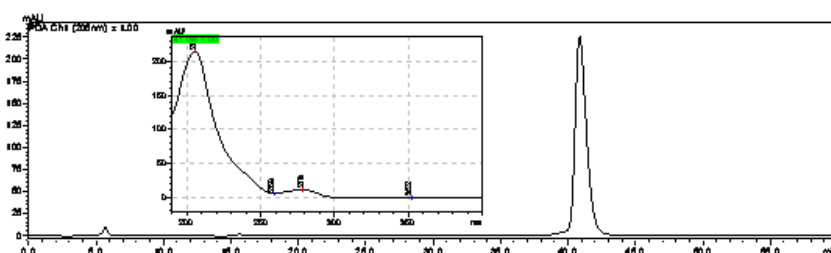


FIGURA 20 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-11-01 [(+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo], obtidos em CLAE-DAD analítico

No espectro de RMN ¹H (Tabela 8) se observaram apenas dois sinais em campo mais baixo [δ_H 6,33 (2H; s) e 6,48 (1H; s)], o que estava de acordo com a presença de grupos aromáticos polissubstituídos com grupos doadores de elétrons. Provavelmente, parte desses grupos eram metoxilas, já que era possível observar, no mapa de contorno do HMBC, as interações a longa distância entre os hidrogênios desses grupos e carbonos com picos ao redor de δ_C 147. O pico em δ_H 4,18 (1H; d, J=7,8) sugeria a presença de uma unidade glicosídica, o que estava de acordo com a presença de vários sinais ao redor de δ_H 3,00. A ausência de correlações entre o hidrogênio anomérico (δ_H 4,18) e carbonos absorvendo acima de δ_C 100,0, sugeria que esta unidade glicosídica não estava diretamente ligada ao anel aromático.

¹ Espectros de RMN ¹H, HSQC, HMBC, COSY e ROESY se encontram no Anexo A.

TABELA 8 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) obtidos para Jr3-11-01 e dados encontrados na literatura para (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3α -O- β -D-glicopiranosídeo

Posição	Jr3-11-01 (CD ₃ OD)		(+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3α -O- β -D-glicopiranosídeo ¹ (CD ₃ OD)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	33,9 (t)	2,62 (1H; dd, J=4,5/15,0; H-1a) e 2,51 (1H; dd, J=12,0/15,0; H-1b)	33,8	2,61 (1H; dd, J=5,0/15,0; H-1a) e 2,51 (1H; dd, J=12,0/15,0; H-1b)
2	40,6 (d)	1,61 (1H; m)	40,6	1,61 (1H; m)
2 α	66,3 (t)	3,55 (1H; m; H-2 α a) e 3,44 (1H; dd, J=6,6/11,0; H-2 α b)	66,2	3,55 (1H; m; H-2 α a) e 3,43 (1H; dd, J=6,5/11,0; H-2 α b)
3	46,7 (d)	1,98 (1H; m)	46,7	1,99 (1H; m)
3 α	71,5 (t)	3,79 (1H; dd, J=5,6/10,0; H-3 α a) e 3,35 (1H; dd, J=3,8/10,0; H-3 α b)	71,5	3,78 (1H; dd, J=5,5/10,0; H-3 α a) e 3,35 (1H; dd, J=4,0/10,0; H-3 α b)
4	42,9 (d)	4,32 (1H; d, J=6,0)	42,7	4,32 (1H; d, J=5,5)
5	147,6 (s)		147,6	
6	138,9 (s)		138,9	
7	148,6 (s)		148,6	
8	107,9 (d)	6,48 (1H; s)	107,9	6,48 (1H; s)
9	130,1 (s)		130,2	

TABELA 8, Cont.

10	126,4 (s)		126,4	
1'	139,4 (s)		139,3	
2' e 6'	107,0 (d)	6,33 (2H; s)	107,0	6,32 (2H; s)
3' e 5'	149,0 (s)		149,0	
4'	134,5 (s)		135,0	
1''	104,9 (d)	4,18 (1H; d, J=7,8)	104,8	4,18 (1H; d, J=7,5)
2''	75,2 (d)	3,14 (1H; m)	75,2	3,11 – 3,15 (1H; m)
3''	78,3 (d)	3,27 (1H; m)	77,9	3,11 – 3,15 (1H; m)
4''	71,7 (d)	3,19 (1H; m)	71,7	3,18 (1H; m)
5''	78,0 (d)	3,15 (1H; m)	78,2	3,24-3,27 (1H; m)
6''	62,9 (t)	3,74 (1H; m; H-6''a) e 3,55 (1H; m; H-6''b)	62,8	3,73 (1H; m; H-6''a) e 3,55 (1H; m; H-6''b)
5-OCH ₃	60,3 (q)	3,25 (3H; s)	60,2	3,25 (3H; s)
7-OCH ₃	56,7 (q)	3,75 (3H; s)	56,6	3,76 (3H; s)
3', 5'- OCH ₃	56,9 (q)	3,64 (6H; s)	56,9	3,64 (6H; s)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; dados de ^{13}C obtidos indiretamente, a partir do experimento de HMBC e HSQC; multiplicidades de ^{13}C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC; ¹ Silva et al. (2006).

Também havia no espectro de RMN ^1H um sinal em δ_{H} 4,32 (1H; d, $J=6,0$), que sugeria a presença de outra unidade glicosídica. No entanto, observou-se que o somatório de áreas dos picos no espectro de ^1H , na região ao redor de δ_{H} 3,0, estava abaixo do esperado para duas unidades glicosídicas. Ademais, verificou-se no mapa de contorno da correlação a longa distância (HMBC) que o hidrogênio absorvendo em δ_{H} 4,32 apresentava várias correlações com os átomos de carbono dos sistemas aromáticos.

A interpretação total dos dados de RMN sugeria que a estrutura se tratasse de uma lignana glicosilada que, segundo comparação com dados de RMN da literatura (Silva et al., 2006), correspondia ao (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 21).

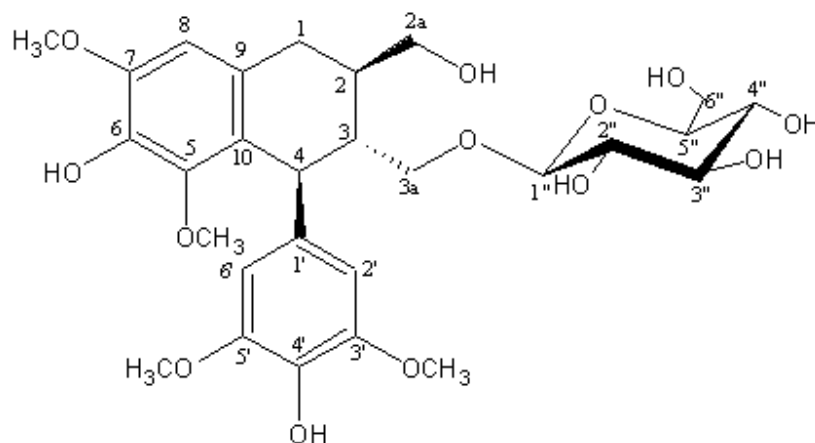


FIGURA 21 Estrutura da substância Jr3-11-01: (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo.

As configurações relativas dos carbonos C-2, C-3 e C-4, foram confirmadas pelo experimento de ROESY e corroboradas pela inspeção das constantes de acoplamento e de dados da literatura (Achenbach et al., 1992;

Yang et al., 2005; Silva et al., 2006; Wangteeraprasert & Likhitwitayawuid, 2009). A correlação espacial (NOE) entre H-1a/H-8 e H-1a/H-2, juntamente com a falta de correlação (NOE) entre H-1b/H-2 e uma constante de acoplamento entre estes hidrogênios de 12,0 Hz, permitiram observar que H-1b e H-2 se encontram em uma relação axial/axial. Já as correlações de NOE entre H-1b/H-2',6' e H-1b/H-3, juntamente com a falta de correlação entre H-2/H-4, permitiram atribuir as configurações relativas de C-3 e C-4. Vale mencionar ainda que, segundo dados da literatura (Silva et al., 2006), o composto 2S,3S,4R apresenta valores de deslocamentos muito diferentes dos observados no presente trabalho. Desta forma, confirmou-se que a estrutura isolada (Jr3-11-01) se tratava daquela com configuração absoluta 2R,3R,4S.

O composto Jr3-11-01 [(+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo] foi anteriormente encontrado nos extratos de diversas plantas. Para exemplificar, podem ser citadas *Phragmites communis*, *Vitex canescens*, *Acanthus ilicifolius*, *Oldelandia corymbosa* e *Callicarpa japonica* (Liu & Lin, 2008; Noiarsa et al., 2008; Choi et al., 2009; Zhang et al., 2009). No caso específico dos trabalhos realizados pelos grupos de pesquisas de Choudhary e Ono, além de isolarem a referida substância, os autores verificaram que a mesma possuía atividade antioxidante, já que era capaz de capturar radicais livres (Ono et al., 2008, 2009; Choudhary et al., 2009).

No ano de 1998, patenteou-se a utilização do composto em cosméticos de baixa irritação da pele devido a sua atividade microbicida (Seki et al., 1998). Aparentemente, tal trabalho está em perfeita consonância com a atividade antimicrobiana posteriormente descrita por Lee e colaboradores, que isolaram a referida substância de raízes de *Lycium chinense* e observaram que a mesma era ativa contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, que são microrganismos causadores de patologias em seres humanos. No entanto, o grupo de pesquisas de Bolzani verificou, ao isolar o (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-

glicopiranosídeo do extrato de galhos de *Alibertia sessilis*, que o composto não apresentava atividade antifúngica sobre os patógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Silva et al., 2007). De qualquer forma, em 2008, protegeu-se pelo emprego de patente, uma fórmula cosmética para clareamento de pele que continha a substância Jr3-11-01 (Lee et al., 2008).

Além da atividade antimicrobiana, observou-se atividade antitumoral sobre células da epiderme de ratos para a substância isolada de *Chaenomeles sinensis* (Gao et al., 2003). De forma análoga, pode-se mencionar a atividade hepatoprotetora e antiulcerogênica do (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, isolado de *Betula platyphylla* var. *japonica* (Matsuda et al., 1998) e *Cinnamomum cassia* (Shiraga et al., 1988), respectivamente.

4.4.2 Substância Jr3-11-02 (inérita)²

A substância Jr3-11-02 foi obtida como um sólido amorfo, cujo espectro de UV (Figura 22), obtido via CLAE-DAD, foi similar ao observado para Jr3-11-01 (Figura 21). Em decorrência, acreditou-se que tais substâncias deveriam ter características estruturais semelhantes e, conseqüentemente, buscou-se utilizar o mesmo solvente (CD₃OD) nas análises por RMN de ambas com vistas a facilitar o processo de elucidação estrutural de Jr3-11-02.

O espectro de RMN de ¹H (Tabela 9) apresentou apenas dois singletos na região de hidrogênios aromáticos, sendo um em δ_H 6,33 (2H) e o outro em δ_H 6,48 (1H). Tais dados sugeriam a existência de dois sistemas aromáticos distintos na estrutura da molécula: um deles seria tetrassubstituído simetricamente e o segundo seria pentassubstituído.

² Espectros de RMN ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC, COSY, ROESY e TOCSY 1D se encontram no Anexo B.

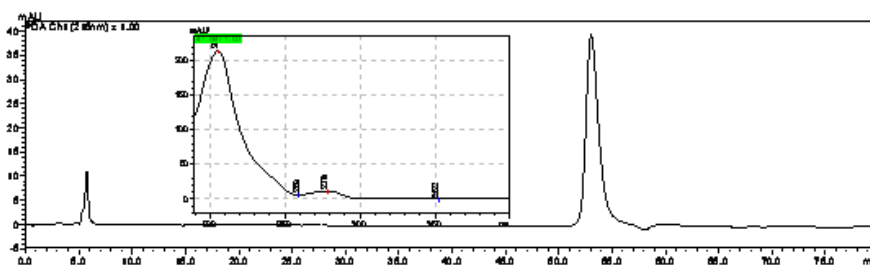


FIGURA 22 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-11-02 [(2R*,3R*,4S*)-lioniresinol 2 α -O- α -L-fucopiranosídeo-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo], obtidos em CLAE-DAD analítico

Foram observados três singletos referentes a quatro metoxilas em δ_H 3,24 (3H), 3,64 (6H) e 3,75 (3H); vários sinais entre δ_H 3,1 e 3,9, característicos de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos; e ainda multipletos em δ_H 1,83, 1,96, 2,51, 2,67 e 4,32, referentes a hidrogênios alifáticos. A presença de dubletos em δ_H 4,20 (1H; J=7,7) e 4,60 (1H; J=2,6) sugeriram a existência de dois hidrogênios anoméricos, correspondentes a dois resíduos de açúcar. Aparentemente, a metila em δ_H 1,06 (3H; d, J=6,7) denunciava que um deles se tratava de um desoxi-açúcar. O hidrogênio anomérico em δ_H 4,60 (1H; d, J=2,6; H-1'''), com um J característico de acoplamento axial/equatorial ou equatorial/equatorial, e a metila em δ_H 1,06 (3H; q, J=6,7; H-6'''), juntamente com a inspeção das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-2''', H-3''', H-4''' e H-5''', e comparação com dados da literatura (Duque et al., 2006), permitiram sugerir que o desoxi-açúcar era a fucose na forma α -L-fucopiranosídea. Já o outro hidrogênio anomérico, em δ_H 4,20 (1H; d, J=7,7; H-1''), com um J característico de acoplamento *trans*-diaxial, segundo comparação com a literatura (Silva et al., 2006) era proveniente de um resíduo de glicose na forma β -D-glicopiranosídea.

TABELA 9 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) correlacionados via HSQC ($^1J_{\text{CH}}$), HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$), COSY e ROESY, obtidos para Jr3-11-02 [(2R*,3R*,4S*)-lioniresinol 2 α -O- α -L-fucopiranosídeo-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo]

Posição	Jr3-11-02 (CD ₃ OD)				
	HSQC		HMBC	COSY	ROESY
	δ_{C}	δ_{H}			
1	34,1 (t)	2,67 (1H; dd, J=4,6/15,0; H-1a) e 2,51 (1H; dd, J=11,5/15,0; H-1b)	H-1a (C-2, C-2 α , C-3, C-8, C-9, C-10), H-1b (C-2, C-3, C-8, C-9, C-10)	H-1a (H-1b, H-2), H-1b (H-1a, H-2)	H-1a (H-1b, H-2, H-8), H-1b (H-1a, H-3, H-2',6')
2	37,9 (d)	1,83 (1H; m)	C-1	H-1a, H-1b, H-2 $\alpha\alpha$, H-2 $\alpha\beta$, H-3	H-1a
2 α	72,9 (t)	3,50 (1H; dd, J=7,2/10,0; H-2 $\alpha\alpha$) e 3,37 (1H; dd, J=5,0/10,0; H-2 $\alpha\beta$)	H-2 $\alpha\alpha$ (C-1, C-1'''), C-2, C-3), H-2 $\alpha\beta$ (C-1, C-1''', C-2, C-3)	H-2 $\alpha\alpha$ (H-2, H-2 $\alpha\beta$), H-2 $\alpha\beta$ (H-2, H-2 $\alpha\alpha$)	H-2 $\alpha\alpha$ (H-2 $\alpha\beta$), H-2 $\alpha\beta$ (H-2 $\alpha\alpha$, H-1''')
3	47,8 (d)	1,96 (1H; m)	C-1', C-4	H-2, H-3 $\alpha\alpha$, H-3 $\alpha\beta$, H-4	H-1b, H-4, H-2',6'
3 α	71,6 ^a (t)	3,80 (1H; dd, J=5,6/10,0; H-3 $\alpha\alpha$) e 3,33 (1H; dd, J=3,8/10,0; H-3 $\alpha\beta$)	H-3 $\alpha\alpha$ (C-1'', C-2, C-3, C-4), H-3 $\alpha\beta$ (C-1'', C-2, C-3, C-4)	H-3 $\alpha\alpha$ (H-3, H-3 $\alpha\beta$), H-3 $\alpha\beta$ (H-3, H-3 $\alpha\alpha$)	H-3 $\alpha\alpha$ (H-3 $\alpha\beta$), H-3 $\alpha\beta$ (H-3 $\alpha\alpha$, H-1''')
4	42,6 (d)	4,38 (1H; d, J=6,0)	C-1', C-2, C-3, C-3 α , C-2',6', C-5, C-9, C-10	H-3	H-3, H-2',6'
5	147,7 (s)				
6	139,0 (s)				

TABELA 9, Cont.

7	148,8 (s)				
8	108,0 (d)	6,48 (1H; s)	C-1, C-6, C-7, C-9, C-10		H-1a, 3H-7- OCH ₃
9	139,9 (s)				
10	126,4 (s)				
1'	139,3 (s)				
2' e 6'	107,0 (d)	6,33 (2H; s)	C-1', C-2', 6', C-3', 5', C-4, C-4'		H-1b, H-3, H-4, 3H-3', 5'-OCH ₃
3' e 5'	149,1 (s)				
4'	134,6 (s)				
1''	105,1 (d)	4,20 (1H; d, J=7,7)	C-3 α , C-2'', C-3'', C-5''	H-2''	H-3 α b
2''	75,3 (d)	3,14 (1H; m)	C-1'', C-3'', C-4''	H-1'', H-3''	
3''	78,4 (d)	3,27 (1H; dd, J=9,0/9,0)	C-1'', C-2'', C-4''	H-2'', H-4''	
4''	71,6 ^a (d)	3,22 (1H; dd, J=9,0/9,0)	C-2'', C-3'', C-5'', C-6''	H-3'', H-5''	
5''	78,0 (d)	3,15 (1H; m)	C-1'', C-3'', C-4''	H-4'', H-6'' ^a , H-6'' ^b	

TABELA 9, Cont.

6''	62,8 (t)	3,74 (1H; dd, J=2,0/12,0; H-6''a) e 3,57 (1H; dd, J=5,3/12,0; H-6''b)	H-6a (C-4''), H-6B (C-5'')		
1'''	100,5 (d)	4,60 (1H; d, J=2,6)	C-2 α , C-2''', C-3''', C-5'''	H-2'''	H-2 α b
2'''	70,2 ^b (d)	3,60 ^c (1H)	C-3'''	H-1'''	
3'''	71,8 ^b (d)	3,60 ^c (1H)	C-2'''	H-4'''	
4'''	73,7 (d)	3,52 (1H; sl)	C-2''', C-3'''	H-3''', H-5'''	
5'''	67,8 (d)	3,78 (1H; q, J=6,7)	C-4''', C-6'''	H-4''', 3H-6'''	
6'''	16,7 (q)	1,06 (3H; d, J=6,7)	C-4''', C-5'''	H-5'''	
5-OCH ₃	60,3 (q)	3,24 (3H; s)	C-5		
7-OCH ₃	56,7 (q)	3,75 (3H; s)	C-7		H-8
3', 5'-OCH ₃	57,0 (q)	3,64 (6H; s)	C-3', 5'		H-2', 6'

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; ^{a,c} sobreposição de sinais; ^b os valores podem estar trocados; multiplicidades de ¹³C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 9) confirma a presença dos anéis aromáticos com os sinais em δ_{C} 107,0, 108,0 e entre δ_{C} 126,4 – 149,1; das metoxilas em δ_{C} 56,7; 57,0 (x2) e 60,3; dos carbonos alifáticos em δ_{C} 34,1, 37,9, 42,6 e 47,8; dos carbonos anoméricos em δ_{C} 100,5 e 105,1; e da metila em δ_{C} 16,7. Entre δ_{C} 62,8 – 78,4, estão os carbonos pertencentes às unidades de açúcar e outros carbonos carbinólicos pertencentes à estrutura. Através das correlações entre H-3 α /C-1'', H-3 β /C-1'', H-1''/C-3 α , H-2 α /C-1''', H-2 β /C-1''', H-1'''/C-2, observadas no mapa de contorno HMBC (Tabela 9), foi possível confirmar as posições de ligação dos resíduos de açúcar. As configurações relativas dos carbonos C-2, C-3 e C-4, foram determinadas pelo experimento de ROESY (Tabela 9) e corroboradas pela inspeção das constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (Achenbach et al., 1992; Yang et al., 2005; Silva et al., 2006, Wangteeraprasert & Likhitwitayawuid, 2009). A correlação espacial (NOE) entre H-1a/H-8 e H-1a/H-2, juntamente com a falta de correlação espacial entre H-1b/H-2 e uma constante de acoplamento entre estes átomos de 11,5 Hz, permitiram concluir que H-1b e H-2 se encontram em uma relação axial/axial. Já as correlações de NOE entre H-1b/H-2',6' e H-1b/H-3, juntamente com a falta de correlação entre H-2/H-4, permitiram atribuir as configurações relativas de C-3 e C-4. Desta forma, estabeleceu-se que a substância se tratava do 2R*,3R*,4S*. Concluindo, com base nas análises dos dados de ^1H , ^{13}C e TOCSY 1D, bem como das correlações nos mapas de contorno de HSQC *phase sensitive*, HMBC, COSY e ROESY, além da inspeção de dados da literatura (Achenbach et al., 1992; Zhang et al., 2004; Yang et al., 2005; Silva et al., 2006; Wangteeraprasert & Likhitwitayawuid, 2009), atribuiu-se a estrutura da lignana glicosilada (2R*,3R*,4S*)-lioniresinol $2\alpha\text{-O-}\alpha\text{-L-fucopiranosídeo-3}\alpha\text{-O-}\beta\text{-D-glicopiranosídeo}$ à amostra Jr3-11-02 (Figura 23).

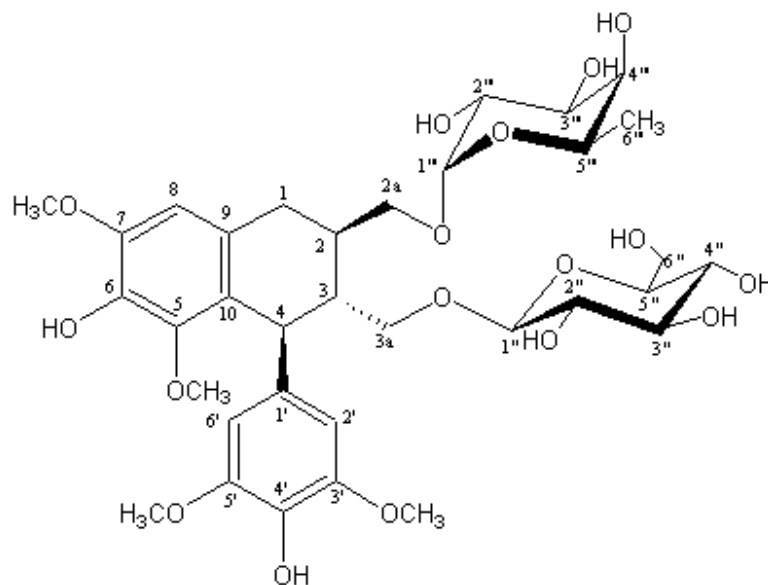


FIGURA 23 Estrutura da substância Jr3-11-02 [(2R*,3R*,4S*)-lioni-resinol 2 α -O- α -L-fucopiranosídeo-3 α -O- β -D-glicopiranosídeo]

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, não há registro desta lignana na literatura. Experimentos posteriores serão realizados para a completa elucidação e caracterização desta substância. As configurações absolutas dos carbonos C-2, C-3 e C-4 serão determinadas por experimentos de dicroísmo circular (DC), pois se sabe que para esta classe de lignanas e seus glicosídeos, os sinais em aproximadamente 273 e 287 nm no espectro de DC refletem a orientação do grupo arila em C-4 (Wangteeraprasert & Likhitwitayawuid, 2009). A hidrólise ácida permitirá a confirmação das unidades de açúcar e as configurações absolutas dos centros quirais da aglicona, as quais serão corroboradas com os dados obtidos de DC. A espectrometria de massas de alta resolução será utilizada para a confirmação, de forma inequívoca, da massa molecular e experimentos como UV, IR e $[\alpha]_D$ serão obtidos para a caracterização desta nova substância.

4.4.3 Substância Jr3-11-03³

O espectro de UV da substância Jr3-11-03 (Figura 24) sugeria claramente a existência de estrutura aromática, o que foi corroborado pelos sinais de RMN de ¹³C entre δ_C 115-155 (Tabela 10).

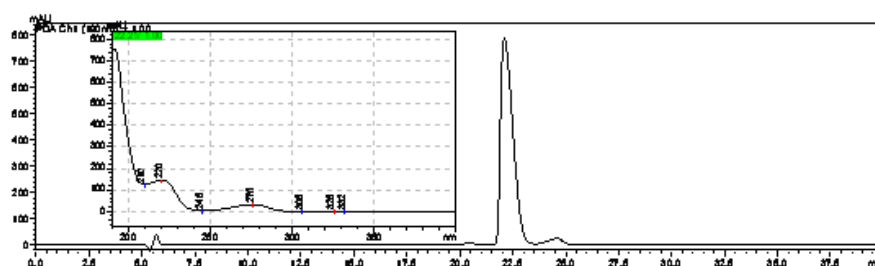


FIGURA 24 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-11-03 (cuchilosídeo), obtidos em CLAE-DAD analítico

No espectro de RMN de ¹H (Tabela 10) se observaram dois sinais na região de hidrogênios aromáticos [δ_H 6,83 (2H; d, J=7,8) e 7,18 (2H; d, J=7,8)], sugerindo a presença de um anel *para* dissustituído na estrutura. O espectro também apresentou um sinal em δ_H 2,85 (2H; dd, J=6,5/6,5), proveniente de um CH₂ alifático, e dois sinais em δ_H 3,82 (1H; m) e 4,04 (1H; m), de um CH₂ carbinólico. As correlações ³J_{H-H}, observadas no COSY, entre os hidrogênios do grupo metileno e oximetileno, juntamente com as correlações ^{2,3}J_{C-H}, observadas no mapa de HMBC, destes hidrogênios com o carbono em δ_C 131,4, foram compatíveis com a presença de uma unidade feniletanoídica.

³ Espectros de RMN ¹H, HSQC, HMBC, COSY e TOCSY 1D se encontram no Anexo C.

TABELA 10 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) obtidos para Jr3-11-03 e dados encontrados na literatura para o cuchilosídeo

Posição	Jr3-11-03 (D_2O)		Cuchilosídeo 1 (D_2O)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	131,4 (s)		131,5	
2 e 6	131,0 (d)	7,18 (2H; d, J=7,8)	130,9	7,18 (2H; d, J=12,0)
3 e 5	116,3 (d)	6,92 (2H; d, J=7,8)	116,3	6,92 (2H; d, J=12,0)
4	154,8 (s)		154,8	
7	35,2 (t)	2,85 (1H; dd, J=6,5/6,5; H-7a) e 2,85 (1H; dd, J=6,5/6,5; H-7b)	35,2	2,90 (1H; t; H-7a) e 2,90 (1H; t; H-7b)
8	72,0 (t)	4,04 (1H; m; H-8a) e 3,82 (1H; m; H-8b)	72,1	4,10 ^a (1H; m; H-8a) e 4,0 – 3,3 ^b (1H; H-8b)
1'	103,1 (d)	4,41 (1H; d, J=7,7)	104,5	4,45 ^c (1H; m)
2'	73,9 (d)	3,22 (1H; dd, J=7,7/8,0)	74,0	3,25 ^d (1H; m)
3'	75,7 (d)	3,52 (1H; dd, J=7,6/8,0)	75,8	4,0 – 3,3 ^b (1H)
4'	70,2 (d)	3,41 (1H; m)	70,6	4,0 – 3,3 ^b (1H)
5'	76,6 (d)	3,42 (1H; m)	76,6	4,0 – 3,3 ^b (1H)
6'	69,4 (t)	4,09 (1H; d, J=11,5; H-6'a) e 3,79 (1H; dd, J=5,6/11,5; H-6'b)	69,5	4,10 ^a (1H; m; H-6'a) e 4,0 – 3,3 ^b (1H; H-6'b)

TABELA 10, Cont.

1''	104,4 (d)	4,40 (1H; d, J=7,6)	103,2	4,45 ^c (1H; m)
2''	73,8 (d)	3,27 (1H; dd, J=7,6/8,0)	73,9	3,25 ^d (1H; m)
3''	76,5 (d)	3,40 (1H; dd, J=8,0/8,9)	76,5	4,0 – 3,3 ^b (1H)
4''	70,0 (d)	3,59 (1H; ddd, J=5,2/8,9/11,0)	70,3	4,0 – 3,3 ^b (1H)
5''	66,0 (t)	3,93 (1H; dd, J=5,2/12,0; H-5''a) e 3,26 (1H; dd, J=11,0/12,0; H-5''b)	66,1	4,0 – 3,3 ^b (1H)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; ^{a,b,c,d} sobreposição de sinais; dados de ¹³C obtidos indiretamente a partir do experimento de HMBC e HSQC; multiplicidades de ¹³C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC; ¹ Bisset et al. (1989).

Já a presença de dubletos em δ_H 4,40 (1H; d, $J=7,7$) e 4,40 (1H; d, $J=7,6$), sugeriu a existência de dois hidrogênios anoméricos, correspondentes a dois resíduos de açúcar.

A análise dos dados de RMN de ^{13}C (Tabela 10) confirma a presença do anel aromático, com os sinais em δ_C 116,3, 131,0, 131,4 e 154,8; do grupo metileno e oximetileno em δ_C 35,2 e 72,0, respectivamente; e dos carbonos anoméricos em δ_C 103,1 e 104,4. Além disto, observam-se claramente os sinais entre δ_C 66,0 – 76,0, correspondentes aos carbonos carbinólicos das duas unidades glicosídicas.

A interpretação total dos dados de RMN sugeria que a estrutura se tratava de um feniletanóide glicosilado que, segundo comparação com dados de RMN da literatura (Bisset et al., 1989), correspondia ao 2-(4-hidroxifenil)etil 8-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo (Figura 25), conhecido como cuchilosídeo.

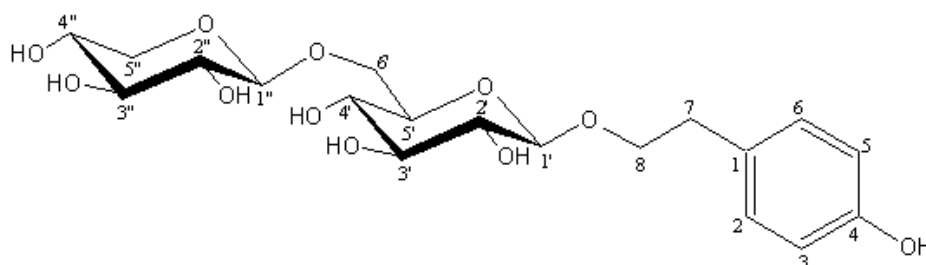


FIGURA 25 Estrutura da substância Jr3-11-03 (cuchilosídeo)

Vale ressaltar que, através de experimentos de TOCSY 1D, os sinais em δ_H 3,93 (1H: dd, $J=5,2/12,0$; H-5''a) e 4,09 (1H; d, $J=11,5$; H-6'a) foram irradiados, deixando evidentes os sistemas de *spins* da xilose (β -D-xilopiranosose) e glicose (β -D-glicopiranosose), respectivamente. Isto permitiu a atribuição dos

sinais de hidrogênios sobrepostos no espectro de RMN ^1H das duas unidades glicosídicas. Ademais, as correlações $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ entre H-8a/C-1', H-8b/C-1', H-1'/C-8, H-6'a/C-1'', H-6'b/C-1'' e H-1''/C-6', observadas no HMBC, deixaram evidente a ligação do resíduo de glicose em C-8 do feniletanóide e ligação do resíduo de xilose em C-6' da glicose.

O composto Jr3-11-03 (cuchilosídeo) é pouco documentado na literatura, tendo sido isolado até o momento apenas de três espécies vegetais: *Cynanchum inamoenum*, *Milium balansae* e *Strychnos nux-vomica* (Bisset et al., 1989; Lei et al., 2008; Wang et al., 2008a). Este composto não tem nenhuma atividade biológica documentada até o momento.

4.4.4 Substância Jr3-11-04⁴

A substância Jr3-11-04 foi obtida como um sólido amorfo. A análise inicial do espectro de UV, obtido via CLAE-DAD, indicava a presença de estrutura(s) aromática(s) substituída(s) com grupos doadores de elétrons (Figura 26), o que foi corroborado pelos sinais de RMN de ^{13}C entre δ_{C} 94-155 (Tabela 11).

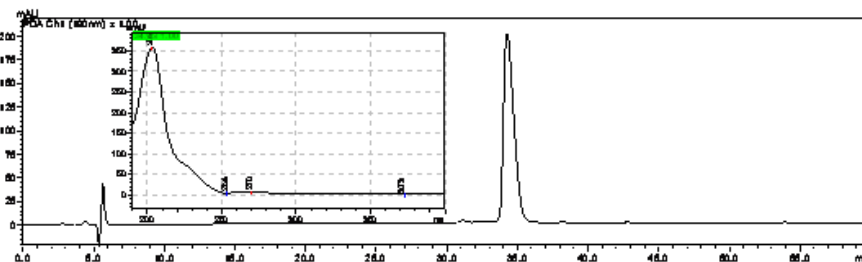


FIGURA 26 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-11-04 (kelampaiosídeo A), obtidos em CLAE-DAD analítico

⁴ Espectros de RMN ^1H , HSQC, HMBC, COSY e TOCSY 1D se encontram no Anexo D.

No espectro de RMN de ^1H (Tabela 11) se observou apenas um singlete na região de hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 6,38, com integração para dois hidrogênios, sugerindo a presença de um anel aromático tetrassubstituído simetricamente. A presença de dois singletos em δ_{H} 3,63 e 3,74, com integrações para três e seis hidrogênios, respectivamente, somada às correlações $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ observadas no mapa de contorno HMBC entre estes sinais e os carbonos em δ_{C} 133,0 e 153,1, respectivamente, indicavam a presença de uma metoxila [δ_{H} 3,63 (3H; s)] na posição C-4 do anel aromático, e de duas metoxilas [δ_{H} 3,74 (6H; s)] em C-3,5.

O espectro de RMN ^1H também apresentou vários sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos entre δ_{H} 3,2 e 4,0. Já os dubletos em δ_{H} 4,90 (1H; d, $J=2,5$) e 4,73 (1H; d, $J=7,0$) foram atribuídos a duas unidades glicosídicas, sendo que a correlação a longa distância ($^3\text{J}_{\text{C-H}}$) entre o sinal em δ_{H} 4,90 e um carbono quaternário (C_0) em δ_{C} 78,9 sugeria que um dos açúcares estava na forma de uma furanose.

Foram observados dezessete sinais de ^{13}C (Tabela 11), sendo quatro atribuídos aos carbonos aromáticos da unidade 3,4,5-trimetoxifenílica [δ_{C} 94,6, 133,0, 153,1 e 154,3], dois às metoxilas (δ_{C} 55,1 e 59,6), dois aos carbonos anoméricos (δ_{C} 101,4 e 109,0) e nove aos outros carbonos das duas unidades glicosídicas. A ligação dissacarídica e a ligação anel aromático-açúcar foram estabelecidas pelas interações observadas no mapa de correlação HMBC entre H-1'/C-1, H-6'a/C-1'', H-6'b/C-1'' e H-1''/C-6'.

TABELA 11 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) obtidos para Jr3-11-04 e dados encontrados na literatura para o kelampaiosídeo A

Posição	Jr3-11-04 (CD_3OD)		Kelampaiosídeo A ¹ (CD_3OD)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	154,3 (s)		154,7	
2 e 6	94,6 (d)	6,38 (2H; s)	95,0	6,39 (2H; s)
3 e 5	153,1 (s)		153,0	
4	133,0 (s)		133,2	
1'	101,4 (d)	4,73 (1H; d, J=7,0)	101,4	4,73 (1H; d, J=7,3)
2'	73,1 (d)	3,35 (1H; dd, J=7,0/9,0)	72,8	3,25 ^a (1H; m)
3'	76,2 (d)	3,38 (1H; dd, J=9,0/9,0)	76,4	3,36 (1H; dd, J=9,6/9,6)
4'	69,9 (d)	3,25 (1H; dd, J=9,0/9,0)	69,1	3,25 ^a (1H; m)
5'	75,2 (d)	3,51 (1H; m)	74,8	3,53 ^b (1H; m)
6'	67,1 (t)	3,97 (1H; dd, J=3,8/9,4; H-6'a) e 3,52 (1H; m; H-6'b)	66,7	3,98 (1H; dd, J=3,9/9,3; H-6'a) e 3,53 ^b (1H; m; H-6'b)
1''	109,0 (d)	4,90 (1H; d, J=2,5)	108,9	4,90 (1H; d, J=2,4)
2''	76,3 (d)	3,80 (1H; d, J=2,5)	76,0	3,81 (1H; d, J=2,1)

TABELA 11, Cont.

3''	78,9 (s)		78,9	
4''	73,2 (t)	3,88 (1H; d, J=9,6; H-4''a) e 3,67 (1H; d, J=9,6; H-4''b)	73,5	3,88 (1H; d, J=9,6; H-4''a) e 3,69 (1H; d, J=9,6; H-4''b)
5''	63,7 (t)	3,47 (1H; s; H-5''a) e 3,47 (1H; s; H-5''b)	64,4	3,48 ^c (1H; s; H-5''a) e 3,48 ^c (1H; s; H-5''b)
3,5-OCH ₃	55,1 (q)	3,74 (6H; s)	55,7	3,74 (6H; s)
4-OCH ₃	59,6 (q)	3,63 (3H; s)	60,5	3,63 (3H; s)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; ^{a,b,c} sobreposição de sinais; dados de ¹³C obtidos indiretamente a partir do experimento de HMBC e HSQC; multiplicidades de ¹³C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC; ¹ Duynstee et al. (1999).

As análises dos espectros de ^1H , HSQC *phase sensitive*, HMBC, COSY e TOCSY 1D permitiram um refinamento da proposta inicial, o que resultou na atribuição da estrutura do 3,4,5-trimetoxifenil-1-*O*- β -D-apiofuranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo, conhecido como kelampaiosídeo A, à amostra Jr3-11-04 (Figura 27). Como se pode observar (Tabela 11), os dados obtidos estão em perfeito acordo com aqueles descritos na literatura (Duynstee et al., 1999).

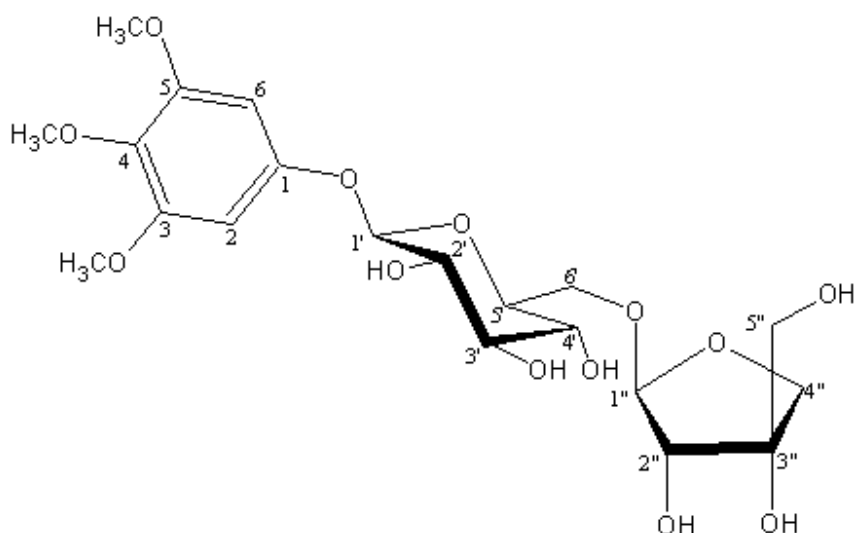


FIGURA 27 Estrutura da substância Jr3-11-04: kelampaiosídeo A.

O composto Jr3-11-04 (kelampaiosídeo A) já é bastante conhecido no meio científico, tendo sido isolado de diversas plantas, dentre as quais podem ser citadas as seguintes: *Tabebuia impetiginosa*, *Croton insularis*, *Symplocos caudata* e *Morinda coreia* (Kanchanapoom et al., 2001; Graikou et al., 2005; Jiang et al., 2005; Warashima et al., 2006). Além de isolá-lo de *Alibertia edulis*, o grupo de pesquisas de Bolzani também observou a sua atividade antifúngica sobre *Candida albicans* e *C. krusei* (Silva et al., 2008).

4.4.5 Substância Jr3-11-05⁵

O espectro de UV da substância Jr3-11-05 (Figura 28) registrou uma discreta absorção máxima em 259 nm, sugerindo a presença de estrutura aromática.

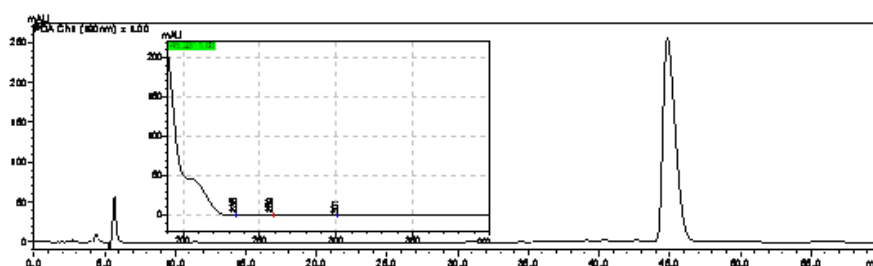


FIGURA 28 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-11-05 (benzil- β -primeverosídeo), obtidos em CLAE-DAD analítico

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 12) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos [δ_{H} 7,26 (1H; t, $J=7,4$), 7,32 (2H; dd, $J=7,4/7,4$) e 7,42 (2H; d, $J=7,4$)], o que indicava tratar-se de uma estrutura contendo um anel monossustituído. O espectro também apresentou dois sinais em δ_{H} 4,66 (1H; d, $J=11,8$) e 4,91 (1H; d, $J=11,8$), de um grupo CH_2 carbinólico. Tais hidrogênios correlacionavam a longa distância (HMBC) com os carbonos em δ_{C} 139,1 (C-1) e 129,4 (C-2,6), evidenciando a presença de uma unidade benzílica. A presença de um dubleto em δ_{H} 4,35 (2H; d, $J=7,6$), com integração para dois átomos de hidrogênio, correlacionado via HSQC ($^1\text{J}_{\text{C-H}}$) a dois átomos de carbono em δ_{C} 103,4 e 105,6, sugeria a presença de duas unidades glicosídicas que, por

⁵ Espectros de RMN ^1H , HSQC, HMBC, COSY e TOCSY 1D se encontram no Anexo E.

coincidência, apresentavam o mesmo deslocamento químico para os seus hidrogênios anoméricos.

Verificou-se que a parte glicosídica de Jr3-11-05 (Figura 29) era idêntica à parte glicosídica de Jr3-11-03 (Figura 26), que correspondia ao *O*- β -D-xilopiranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo.

As correlações entre H-7a/C-1', H-7b/C-1', H-6'a/C-1'' e H-6'b/C-1'' foram observadas no mapa de HMBC. Os experimentos de TOCSY 1D, nos quais os sinais não sobrepostos no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 3,86 (1H; dd, $J=5,3/11,5$; H-5''a) e 4,11 (1H; dd, $J=1,8/11,7$; H-6'a) foram irradiados, possibilitaram a atribuição dos sinais de hidrogênios sobrepostos no espectro de ^1H das duas unidades glicosídicas.

Observaram-se quinze sinais de ^{13}C (Tabela 12), sendo três atribuídos à unidade benzílica [δ_{C} 128,7, 129,4(x4; sobreposição) e 139,1]; um em δ_{C} 72,0, atribuído ao carbono do grupo oximetileno diretamente ligado ao anel aromático; e onze atribuídos aos carbonos das duas unidades glicosídicas.

As análises dos espectros de ^1H , HSQC *phase sensitive*, HMBC, COSY e TOCSY 1D, além da inspeção de dados da literatura (Otsuka et al., 1990), permitiram atribuir a estrutura do benzil-7-*O*- β -D-xilopiranosil-(1'' \rightarrow 6')- β -D-glicopiranosídeo, conhecido como benzil- β -primeverosídeo, à amostra Jr3-11-05 (Figura 29).

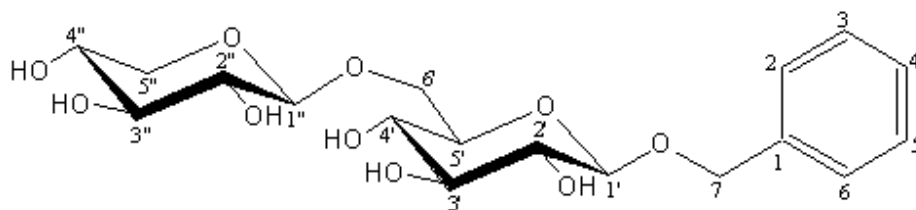


FIGURA 29 Estrutura da substância Jr3-11-05 (benzil- β -primeverosídeo)

TABELA 12 Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (126 MHz) obtidos para Jr3-11-05 e dados encontrados na literatura para o benzil- β -primeverosídeo

Posição	Jr3-11-05 (CD_3OD)		Benzil- β -primeverosídeo ¹ (CD_3OD)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	139,1 (s)		139,1	
2 e 6	129,4 ^a (d)	7,42 (2H; d, J=7,4)	129,28	7,42 (2H; d, J=7,0)
3 e 5	129,4 ^a (d)	7,32 (2H; dd, J=7,4/7,4)	129,31	7,32 (2H; t, J=7,0)
4	128,7 (d)	7,26 (1H; t, J=7,4)	128,7	7,26 (1H; t, J=7,0)
7	72,0 (t)	4,91 (1H; d, J=11,8; H-7a) e 4,66 (1H; d, J=11,8; H-7b)	72,0	4,91 (1H; d, J=12,0; H-7a) e 4,66 (1H; d, J=12,0; H-7b)
1'	103,4 (d)	4,35 ^b (1H; d, J=7,6)	103,4	4,35 ^d (1H; d, J=8,0)
2'	75,1 (d)	3,25 (1H; dd, J=7,6/8,0)	74,9	3,25 (1H; m)
3'	78,0 (d)	3,34 ^c (1H; m)	78,0	3,4 – 3,3 ^e (1H)
4'	71,5 (d)	3,34 ^c (1H; m)	71,2	3,4 – 3,3 ^e (1H)
5'	77,1 (d)	3,44 (1H; m)	77,8	3,45 (1H; m)
6'	69,9 (t)	4,11 (1H; dd, J=1,8/11,7; H-6'a) e 3,76 (1H; dd, J=6,0/11,7; H-6'b)	69,9	4,11 (1H; dd, J=2,0/12,0; H-6'a) e 3,76 (1H; dd, J=5,0/12,0; H-6'b)
1''	105,6 (d)	4,35 ^b (1H; d, J=7,6)	105,6	4,35 ^d (1H; d, J=8,0)

TABELA 12, Cont.

2''	75,0 (d)	3,22 (1H; dd, J=7,6/8,0)	75,1	3,22 (1H; t, J=8,9)
3''	77,8 (d)	3,30 (1H; dd, J=8,7/8,7)	77,1	3,4 – 3,3 ^e (1H)
4''	71,2 (d)	3,49 (1H; ddd, J=5,3/8,7/10,5)	71,6	3,49 (1H; ddd, J=6,0/9,0/10,0)
5''	67,0 (t)	3,86 (1H; dd, J=5,3/11,5; H-5''a) e 3,18 (1H; dd, J=10,5/11,5; H-5''b)	66,9	3,87 (1H; dd, J=6,0/10,0; H-5''a) e 3,19 (1H; t, J=10,0; H-5''b)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; ^{a,b,c,d,e} sobreposição de sinais; dados de ¹³C obtidos indiretamente a partir do experimento de HMBC e HSQC; multiplicidades de ¹³C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC; ¹ Otsuka et al. (1990).

O composto Jr3-11-05 (benzil- β -primeverosídeo) já é bastante conhecido no meio científico, tendo sido isolado de várias espécies de plantas. Para exemplificar podem ser citadas as seguintes: *Panax notoginseng*, *Spermacoce laevis*, *Prunus domestica*, *Laurus Nobilis*, *Prunus mume*, *Linaria vulgaris*, *Alangium chinense*, *Apocynum venetum* e *Camellia sinensis* (Nishikitani et al., 1999; Murakami et al., 2001; Toh et al., 2001; Hua et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002; De Marino et al., 2004; Kayano et al., 2004; Noiarsa et al., 2007; Wang et al., 2008b). Quanto a sua atividade biológica, cabe mencionar aqui que foi patenteado como agente melhorador da fluidez sanguínea (Watanabe et al., 2003).

4.4.6 Substância Jr3-12-03⁶

A substância Jr3-12-03 foi obtida como um sólido amorfo. A análise inicial do espectro de UV, obtido via CLAE-DAD, indicava a presença de estruturas aromáticas substituídas com grupos doadores de elétrons (Figura 30), o que foi corroborado pelos vários sinais de RMN de ^{13}C entre δ_{C} 103-155 (Tabela 13).

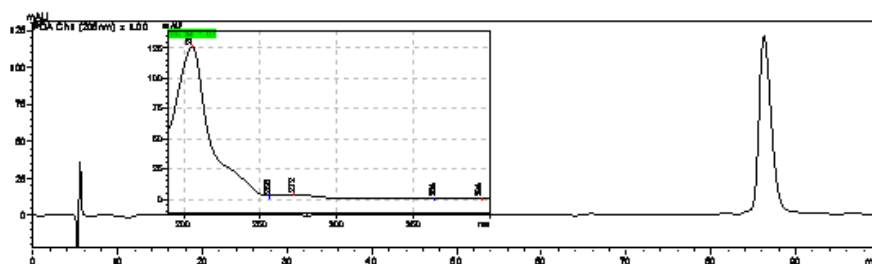


FIGURA 30 Cromatograma e espectro de UV da substância Jr3-12-03 [(7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O- β -D-glicopiranosídeo], obtidos em CLAE-DAD analítico

⁶ Espectros de RMN ^1H , HSQC, HMBC, COSY e ROESY se encontram no Anexo F.

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 13) apresentou apenas dois singletos na região de hidrogênios aromáticos [δ_{H} 6,59 (2H) e 6,44 (2H)], sugerindo a presença de dois sistemas aromáticos distintos, tetrassubstituídos simetricamente. A presença de dois singletos em δ_{H} 3,72 (6H) e 3,74 (6H) e as correlações a longa distância observadas no mapa de contorno HMBC entre estes sinais e os carbonos em δ_{C} 147,9 e 152,4, respectivamente, indicavam que os grupos substituídos simetricamente eram duas metoxilas em cada sistema aromático.

O espectro de RMN de ^1H também apresentou vários sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos entre δ_{H} 3,0 e 4,0; multipletos em δ_{H} 2,23 e 2,59, de dois hidrogênios metínicos; e ainda hidrogênios geminais metilênicos em δ_{H} 2,41 e 2,82. O sinal em δ_{H} 4,87 (1H; d, $J=7,0$) foi atribuído ao hidrogênio anomérico de uma unidade glicosídica, o que estava de acordo com as correlações a longa distância $^{2,3}\text{J}_{\text{C-H}}$ (HMBC) observadas para este sinal com carbonos entre δ_{C} 70,0 – 78,0. Tal sinal também apresentava uma correlação $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ com o carbono C-4' (δ_{C} 133,4), evidenciando que a unidade glicosídica se encontrava diretamente ligada a um dos anéis aromáticos. Também havia no espectro de RMN ^1H um sinal em δ_{H} 4,71 (1H; d, $J=5,6$), que sugeria a presença de outra unidade de açúcar. No entanto, as correlações $^{2,3}\text{J}_{\text{C-H}}$ observadas entre este sinal e os carbonos em δ_{C} 103,8 e 139,6 (aromáticos), e em 52,5 e 42,2 (metínicos), foi suficiente para descartar a hipótese inicial.

Os dados de RMN de ^{13}C (Tabela 13) confirmam a presença dos anéis aromáticos com os sinais em δ_{C} 103,8 e 105,9, e entre δ_{C} 130,8 – 152,4; das metoxilas em δ_{C} 56,1 e 56,5; dos carbonos metínicos em δ_{C} 42,2 e 52,5; do carbono metilênico em 32,8; e do carbono anomérico em δ_{C} 102,8. Entre δ_{C} 58,9 – 81,8 estão os carbonos pertencentes à unidade glicosídica e outros carbonos carbinólicos pertencentes à estrutura.

TABELA 13 Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (151 MHz) obtidos para Jr3-12-03 e dados encontrados na literatura para o (\pm)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-*O*- β -D-glicopiranosídeo

Posição	Jr3-12-03 (DMSO- d_6)		(\pm)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo ¹ (DMSO- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	130,8 (s)		130,7	
2 e 6	105,9 (d)	6,44 (2H; s)	105,9	6,44 (2H; s)
3 e 5	147,9 (s)		147,6	
4	133,6 (s)		133,3	
7	32,8 (t)	2,82 (1H; dd, J=4,5/13,5; H-7a) e 2,41 (1H; dd, J=10,0/13,5; H-7b)	32,9	2,81 (1H; dd, J=4,4/13,6; H-7a) e 2,41 (1H; dd, J=10,1/13,6; H-7b)
8	42,2 (d)	2,59 (1H; m)	42,2	2,59 (1H; m)
9	72,1 (t)	3,90 (1H; dd, J=7,5/7,5; H-9a) e 3,61 (1H; dd, J=7,5/7,5; H-9b)	72,0	3,90 (1H; dd, J=6,6/8,1; H-9a) e 3,60 (1H; dd, J=8,1/8,1; H-9b)
1'	139,6 (s)		139,3	
2' e 6'	103,8 (d)	6,59 (2H; s)	103,8	6,59 (2H; s)
3' e 5'	152,4 (s)		152,1	

TABELA 13, Cont.

4'	133,4 (s)		133,4	
7'	81,8 (d)	4,71 (1H; d, J=5,6)	81,8	4,71 (1H; d, J=5,9)
8'	52,5 (d)	2,23 (1H; m)	52,4	2,23 (1H; m)
9'	58,9 (t)	3,70 (1H; dd, J=7,0/11,0; H-9'a) e 3,51 (1H; dd, J=7,0/11,0; H-9'b)	58,9	3,70 (1H; m; H-9'a) e 3,50 (1H; m; H-9'b)
1''	102,8 (d)	4,87 (1H; d, J=7,0)	102,7	4,87 (1H; d, J=7,3)
2''	74,3 (d)	3,19 (1H; dd, J=7,0/9,0)	74,2	3,1-3,2 (1H)
3''	76,6 (d)	3,18 (1H; dd, J=9,0/9,0)	76,5	3,1-3,2 (1H)
4''	70,0 (d)	3,13 (1H; dd, J=9,0/9,0)	70,0	3,1-3,2 (1H)
5''	77,2 (d)	3,03 (1H; m)	77,1	3,11 (1H)
6''	61,0 (t)	3,60 (1H; d, J=11,4; H-6''a) e 3,41 (1H; dd, J=5,6/11,4; H-6''b)	61,1	3,57 (1H; dd, J=1,8/12,0; H-6''a) e 3,39 (1H; dd, J=5,1/12,0; H-6''b)
3,5-OCH ₃	56,1 (q)	3,72 (6H; s)	56,1	3,74 (6H; s)
3', 5'- OCH ₃	56,5 (q)	3,74 (6H; s)	56,5	3,76 (6H; s)

Valores de deslocamento químico (δ) expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz; dados de ¹³C obtidos indiretamente a partir do experimento de HMBC e HSQC; multiplicidades de ¹³C obtidas a partir do experimento de HSQC *phase sensitive* e HMBC; ¹ Ida et al. (1994).

As configurações relativas dos carbonos C-7', C-8 e C-8', foram estabelecidas como 7'R*,8S*,8'S*, devido às correlações de NOE entre H-8/H-8' e à falta de correlação entre H7'/H-8 e H7'/H-8', observadas no experimento ROESY. A interpretação total dos dados de RMN sugeria que a estrutura se tratava de uma lignana glicosilada que, segundo comparação com dados de RMN da literatura (Ida et al., 1994), correspondia ao (7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O-β-D-glicopiranosídeo (Figura 31).

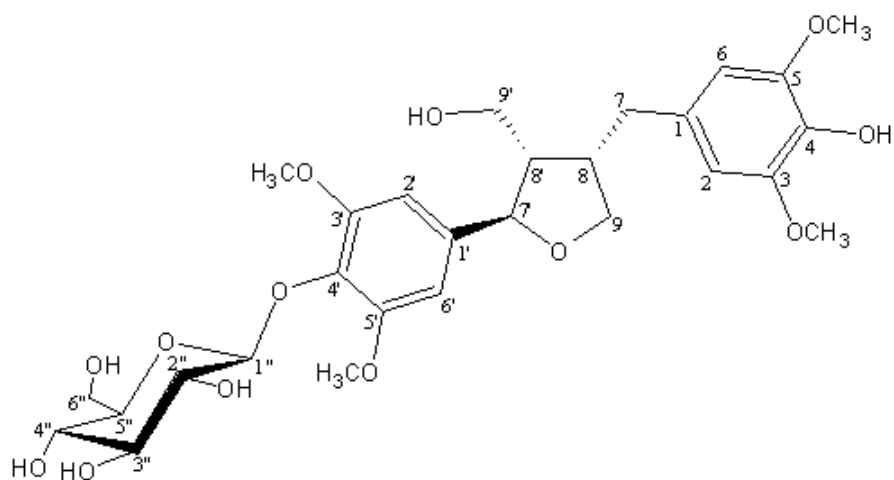


FIGURA 31 Estrutura da substância Jr3-12-03: (7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O-β-D-glicopiranosídeo

Tal substância havia sido anteriormente isolada apenas de duas espécies de plantas: *Acanthus ebracteatus* (Ida et al., 1994) e *Phellodendron amurense* (Kanchanapoom et al., 2001). Ida et al. (1994) relataram o isolamento da mistura de diastereoisômeros (±)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-O-β-D-glicopiranosídeo [(–)-(7'R,8S,8'S) (excesso) e (+)-(7'S,8R,8'R)], cujas configurações das agliconas

foram determinadas após hidrólise das substâncias e comparação de dados de RMN e $[\alpha]_D$ das agliconas com dados da literatura. Já o grupo de Kanchanapoom et al. (2001), que isolaram o estereoisômero (+)-(7'S,8R,8'R), não relataram os dados de RMN ou $[\alpha]_D$ obtidos para a lignana glicosilada. Diante do exposto, faz-se necessária a hidrólise da molécula para a obtenção de dados de RMN e $[\alpha]_D$ da aglicona, para que os mesmos sejam comparados com dados da literatura para se determinar a configuração absoluta dos centros estereogênicos C-7', C-8 e C-8', além da medida de $[\alpha]_D$ da substância glicosilada para a complementação dos dados da literatura.

4.5 Teste de atividade antifúngica contra *Aspergillus ochraceus*

Os resultados do teste contra *A. ochraceus*, obtidos para o extrato metanólico das cascas de *C. gonocarpum* (TA-54-01), fração Hex (TA-54-01), fração AcOEt (TA-54-02) e fração MeOH (TA-54-03), podem ser observados na Tabela 14. Dentre as frações ativas, pode-se destacar o valor da CIM para a fração MeOH, o qual foi oito e quatro vezes menor que os valores obtidos para o extrato bruto e fração Hex, respectivamente.

Embora existam relatos na literatura de atividade antimicrobiana para outras espécies da família Sapotaceae (Kuetze et al, 2006; Pereira et al., 2008; Shahwar & Raza, 2009), esta é a primeira vez que se comprova a capacidade de *C. gonocarpum* de produzir substâncias antifúngicas.

Em trabalho anterior, Pereira et al. (2008) observaram que o extrato bruto de *Solanum palinacanthum* apresentava valor de CIM contra *A. ochraceus* semelhante ao encontrado neste estudo para o extrato bruto de *C. gonocarpum*. Como em tal trabalho os autores isolaram e identificaram uma substância com valor de CIM próximo ao do fungicida comercialmente empregado no controle de *A. ochraceus* (cloreto de benzalcônio), tende-se a acreditar que também seja

possível isolar uma substância bastante ativa contra o fungo a partir de *C. gonocarpum*.

TABEA 14 Concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato metanólico das cascas de *Crysophyllum gonocarpum* e para as suas frações

Tratamento	CIM (µg/mL)
Extrato bruto	8012,00
Fração hexânica (TA-55-01)	4006,00
Fração acetato de etila (TA-55-02)	--- ^a
Fração metanólica (TA-55-03)	1001,50
DMSO (testemunha negativa)	--- ^a
Cloreto de benzoalcônio (testemunha positiva)	7,75

---^a sem inibição

Com base na atividade antifúngica acima descrita para *C. gonocarpum*, pode-se afirmar que esta espécie vegetal apresenta potencial para uso futuro no desenvolvimento de produtos para o controle do referido patógeno, o que sugere que novos estudos devam ser realizados a fim de averiguar mais profundamente a atividade antifúngica das substâncias isoladas a partir das frações consideradas ativas no estudo.

5 CONCLUSÕES

O extrato metanólico das cascas de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) se mostrou promissor para o desenvolvimento de novos produtos para a redução da contaminação de grãos de café com *Aspergillus ochraceus* Wilhelm e com a ocratoxina A, uma vez que apresentou atividade contra este fungo, com concentração inibitória mínima de 8012 µg/mL. O fracionamento do extrato bruto por extração com hexano, acetato de etila e metanol resultou em duas frações ativas (solúvel em hexano e solúvel em metanol), sendo que a fração solúvel em metanol foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, pois apresentou concentração inibitória mínima (1001,5 µg/mL) quatro vezes menor que a fração solúvel em hexano. Os fracionamentos posteriores por cromatografia líquida em coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência, resultou no isolamento de onze substâncias, sendo dez já conhecidas e uma inédita: (7S*,8S*)-*treo*-1-*C*-siringilglicerol 4-*O*-β-D-glicopiranosídeo, (7R*,8R*)-*treo*-1-*C*-siringilglicerol 4-*O*-β-D-glicopiranosídeo, ácido 4-*O*-β-D-glicopiranosil-3,3',4'-tri-*O*-metilelágico, ácido 4-*O*-β-D-xilopiranosil-3,3'-di-*O*-metilelágico, (+)-(2R,3R,4S)-lioniresinol 3α-*O*-β-D-glicopiranosídeo, (2R*,3R*,4S*)-lioniresinol 2α-*O*-α-L-fucopiranosídeo-3α-*O*-β-D-glicopiranosídeo (inédita), cuchilosídeo, kelampaiosídeo A, benzil-β-primeverosídeo, 3,4,5-trimetoxifenol e (7'R*,8S*,8'S*)-5,5'-dimetoxilariciresinol 4'-*O*-β-D-glicopiranosídeo. Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar as atividades destas substâncias sobre *A. ochraceus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin a production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, July 1994.
- ACHENBACH, H.; LOWEL, M.; WAIBEL, R.; GUPTA, M.; SOLIS, P. New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58, n. 3, p. 270-272, June 1992.
- ALAOUI, A.; CHARROUF, Z.; SOUFIAOUI, M.; CARBONE, V.; MALORNI, A.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 16, p. 4600-4603, June 2002.
- ALARCON, S. H.; PALLESCHI, G.; COMPAGNONE, D.; PASCALE, M.; VISCONTI, A.; BARNA-VETRO, I. Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin a in wheat. **Talanta**, London, v. 69, n. 4, p. 1031-1037, June 2006.
- AMARAL, D. R. **Indução de em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ANAND, S.; RATI, E. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of *Aspergillus ochraceus* growth in coffee powder, chili powder and poultry feed. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 59-65, Jan. 2006.
- ATHUKORALAGE, P. S.; HERATH, H. M. T. B.; DERANIYAGALA, S. A.; WIJESUNDERA, R. L. C.; WEERASINGHE, P. A. Antifungal constituent from *Gardenia dassanayakei*. **Fitopatologia**, Santiago de Chile, v. 72, n. 5, p. 565-567, 2001.
- AZIZ, N. H.; REFAI, M.; EL-FAR, F. Gamma irradiation and potassium sorbate in the control of growth and ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus*. **Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association**, Cairo, v. 49, n. 3, p. 951-961, 1989.

BAILEY, C. A.; GIBSON, R. M. Ochratoxin A and dietary protein. 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. **Poultry Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 1664-1671, Dec. 1989.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, p. 392-413, out. 2005.

BARS, L. L.; BARS, P. L. Mycotoxigenic in grains application to mycotoxic prevention in coffee. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 513.

BEJAOUI, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 2, p. 203-208, Feb. 2006.

BERROUGUI, H.; ETTAIB, A.; GONZALEZ, M. D. H.; SOTOMAYOR, M. A.; BENNANIKABCHI, N.; HMAMOUCHE, M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in meriones shawi rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, n. 1, p. 15-18, Nov. 2003.

BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Microbiota isolada durante as fases de pré e pós-colheita dos grãos de café associada à qualidade e sanidade da bebida. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 155-172, jan./jun. 2004.

BISSET, N. G.; CHOUDHURY, A. K. E.; HOUGHTON, P. J. Phenolic glycosides from the fruit of *Strychnos nux-vomica*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 28, n. 5, p. 1553-1554, 1989.

BORING, C. C.; SQUIRES, T. S.; TONG, T. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, New York, v. 44, n. 1, p. 7-26, Jan. 1994.

BRERA, C.; GROSSI, S.; SANTIS, B.; MIRAGLIA, M. High performance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin a in cocoa powder. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 26, n. 4, p. 585-598, Mar. 2003.

CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 66-69, jan. 2008.

CECHINEL FILHO, V.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxyline. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 53, n. 3, p. 171-173, Sept. 1996.

CHOI, S-E.; YOON, J-H.; CHOI, H-K.; LEE, M-W. Phenolic compounds from the root of *Phragmites communis*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 45, n. 6, p. 893-895, 2009.

CHOUDHARY, M. I.; NAHEED, N.; ABBASKHAN, A.; ALI, S.; ATTA-UR-RAHMAN. Hemiterpene glucosides and other constituents from *Spiraea canescens*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 70, n. 11/12, p. 1467-1473, July/Aug. 2009.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxicogenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 5-9, Sept. 2006. Supplement.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Position paper on ochratoxin A**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.

Disponível em:

<http://www.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/ochratoxinpp99_14.pdf>.

Acesso em: 20 abr. 2010.

COTTY, P. J.; BAYMAN, D.; EGEL, D.; ELIAS, K. Agriculture, *Aspergillus* Aspergillus and aflatoxins. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The genus *Aspergillus***. New York: Plenum, 1994. p. 1-27.

CRUZ, M. E. S.; SCHAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 23, n. 1, p. 63-65, 1997.

DE MARINO, S.; BORBONE, N.; ZOLLO, F.; IANARO, A.; DI MEGLIO, P.; IORIZZI, M. Megastigmane and phenolic components from *Laurus Nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 25, p. 7525-7431, Nov. 2004.

DUQUE, C.; PUYANA, M.; CASTELLANOS, L.; ARIAS, A.; CORREA, H.; OSORNO, O.; ASAI, T.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Further studies on the constituents of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean : isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiaene. **Tetrahedron: the International Journal of Organic Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 17, p. 4205-4213, Apr. 2006.

DUYNSTEE, H. I.; KONING, M. C. de; MAREL, G. A. van der; BOOM, J. H. van. An expeditious route to the synthesis of Kelampayosides A and B. **Tetrahedron: the International Journal of Organic Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 32, p. 9881-9898, Aug. 1999.

EGMOND, H. O. van; DEKKER, W. K. **Worldwide regulations for mycotoxins in 1995: a compendium**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1997.

EL KABOUSS, A.; CHARROUF, Z.; FAID, M.; GARNEAU, F.; COLLIN, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Argania spinosa* L. skeels. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 14, n. 2, p. 147-149, Mar. 2002.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 381-391, out./dez. 2005.

FARINES, M.; SOULIER, J.; CHARROUF, M.; CAVE, A. Study of the seed oil from *Argania spinosa* (L.), Sapotaceae 2. Sterols triterpene alcohols and methylsterols. **Revue Française des Corps Grâs**, Paris, v. 31, n. 11, p. 443-448, nov. 1984a.

FARINES, M.; SOULIER, J.; CHARROUF, M.; SOULIER, R. Study on the seed oil from *Argania spinosa* (L.), Sapotaceae 1. The glyceride fraction. **Revue Francaise des Corps Gras**, Paris, v. 31, n. 7/8, p. 283-286, juil. 1984b.

FLORIDO, F. G.; TERRONE, C. C.; MENEGHIN, S. P. Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais para o controle de doenças do sorgo e da cana-de-açúcar. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4., 2008, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2008. p. 29.

FORTES, N. L.; SILVA, J. C.; CASTRO, S. C. Ação de extratos vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum lidemuthianum* e *Fusarium oxysporum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 308, 1999. Suplemento.

GAO, H.; WU, L.; KUROYANAGI, M.; HARADA, K.; KAWAHARA, N.; NAKANE, T.; UMEHARA, K.; HIRASAWA, A.; NAKAMURA, Y. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* Koehne and their activities in JB6 mouse epidermal cells. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 51, n. 11, p. 1318-1321, Nov. 2003.

GORDON, M. H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 265-273, Aug. 1996.

GRAIKOU, K.; ALIGIANNIS, N.; CHINO, I.; SKALTSOUNIS, A-L.; TILLEQUIN, F.; LITAUDON, M. Chemical constituents from *Croton insularis*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, n. 10, p. 2654-2660, Oct. 2005.

HAJJAJI, A.; EL OTMANI, M.; BOUYA, D.; BOUSETA, A.; MATHIEU, F.; COLLIN, S.; LEBRIHI, A. Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 50, n. 6, p. 494-499, May 2006.

HARISH, S.; SARAVANAKUMAR, D.; RADJACOMMARE, R.; EBENEZAR, G.; SEETHARAMAN, K. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 555-567, June 2008.

HUA, H.; CHENG, M.; LI, X.; PEI, Y. A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 50, n. 10, p. 1393-1394, Oct. 2002.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M. H. P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 22, n. 12, p. 1258-1263, Dec. 2005.

IDA, Y.; SATOH, Y.; OHTSUKA, M.; NAGASAO, M.; SHOJI, J. Phenolic constituents of *Phellodendron amurense* bark. **Phytochemistry**: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology, New York, v. 35, n. 1, p. 209-215, Jan. 1994.

IDOWU, T. O.; IWALEWA, E. O.; ADEROGBA, M. A.; AKINPELU, B. A.; OGUNDAINI, A. O. Antinoceptive, anti-inflammatory and antioxidant actives of eleagnine: an alkaloid isolated from *Chrysophyllum albidum* seed cotyledons. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 6, n. 6, p. 1029-1034, 2006.

JAHAN, N.; AHMED, W.; MALIK, A. Lupene-type triterpene from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry**: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology, New York, v. 39, n. 1, p. 255-257, May 1995.

JAHAN, N.; MALIK, A.; AFZA, N.; CHOUDHARY, M. I.; SHAHZAD-UL-HASSAN, S. Triterpenes from *Mimusops elengi*. **Zeitschrift fuer Naturforschung B**: Chemical Sciences, New Jersey, v. 55, n. 12, p. 1206-1210, Dec. 2000.

JAHAN, N.; MALIK, A.; MUSTAFA, G.; AHMAD, Z.; AHMAD, S.; ANIS, E.; MALIK, S.; SHUJAAT, S.; AFZA, N.; RAHMAN, A-U. Triterpenes from *Mimusops elengi*. **Natural Product Letters**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 177-185, May 2001.

JIANG, J.; FENG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, P. New phenolics from the roots of *Symplocos caudata* Wall. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 1, p. 110-113, Jan. 2005.

JIANG, Y. I.; ALI, A. O.; GUILLAUME, D.; WENIGER, B.; ANTON, R. Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon cubense*. **Phytochemistry**: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology, New York, v. 35, n. 4, p. 1013-1015, Mar. 1994.

KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. **Phytochemistry**: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology, New York, v. 59, n. 5, p. 551-556, Mar. 2001.

KAYANO, S-I.; KIKUZAKI, H.; YAMADA, N. F.; AOKI, A.; KASAMATSU, K.; YAMASAKI, Y.; IKAMI, T.; SUZUKI, T.; MITANI, T.; NAKATANI, N. Antioxidant properties of prunes (*Prunus domestica* L.) and their constituents. **BioFactors**, Oxford, v. 21, n. 1/4, p. 309-313, 2004.

- KING, N. M. Preliminary chemical analysis of the leaves of *Chrysophyllum cainito*. **Revista de la Sociedad Venezolana de Química**, Caracas, v. 30, p. 6-13, 1959.
- KNOT, H. J.; LAHER, I.; SOBIE, E. A.; GUATIMOSIM, S.; GOMEZ-VIQUEZ, L.; HARTMANN, H.; SONG, L. S.; LEDERER, W. J.; GRAIER, W. F.; MALL, I. R.; FRIEDEN, M.; PETERSEN, O. H. H. J. Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. **Molecular Interventions**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 112-127, Apr. 2005.
- KUERA, N. Y. M.; LOPEZ, J. A.; LITTLE JUNIOR, E. L.; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. **Arboles comues del Paraguay**. Asunción: Universidad Nacional de Asunción/Facultad de Ciencias Agrarias, 2002. 458 p.
- KUETE, V.; TANGMOUOB, J. G.; PENLAP-BENGA, V.; NGOUNOUB, F. N.; LONTSI, D. Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 104, n. 1/2, p. 5-11, Mar. 2006.
- KULWANT, S.; JENS, C. F.; ULF, T.; MATHUR, S. B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins**. Lyngby: Danish Government, 1991. 123 p.
- LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BECCHI, M.; MISRA, G.; NIGAM, S. K. Saponins from three species of *Mimusops*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 41, n. 3, p. 887-893, Feb. 1996.
- LEE, M. W.; YOON, G. H.; YOON, J. H. **Skin-whitening cosmetic composition containing phenolic compounds extracted from Phragmites communis**. KR n. PI 2008105808 A, 2008. 5 July 2010, 1 June 2007. 19 p.
Disponível em:
<http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en_ep&FT=D&date=20100507&CC=KR&NR=20100046793A&KC=A>. Acesso em: 21 nov. 2008.
- LEI, Y.; WU, L.-J.; SHI, H.-M.; TU, P.-F. Three new glycosides from the stems of *Milium balansae*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 91, n. 3, p. 495-500, Mar. 2008.
- LI, X. C.; LIU, Y. Q.; WANG, D. Z.; YANG, C. R.; NIGAM, S. K.; MISRA, G. Triterpenoid saponins from *Madhuca butyracea*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 37, n. 3, p. 827-829, Oct. 1994.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 49, n. 1/2, p. 57-68, Dec. 1995.

LIU, Q.; LIN, W. H. Study on chemical constituents of *Acanthus ilicifolius* linn of mangrove plant from south sea China. **Harbin Shangye Daxue Xuebao (Journal of Harbin University of Commerce)**, Harbin, v. 24, n. 6, p. 648-651, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 352 p.

MAENETJE, P. W.; DUTTON, M. F. The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes , New York, v. 42, n. 2, p. 229-236, Feb. 2007.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin a-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 161, n. 1, p. 53-58, Jan. 2006.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives & Contaminants**, London, v. 20, n. 12, p. 1127-1131, Dec. 2003.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea Arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 229-234, Feb. 2006.

MATSUDA, H.; ISHIKADO, A.; NISHIDA, N.; NINOMIYA, K.; FUJIWARA, H.; KOBAYASHI, Y.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 8, n. 21, p. 2939-2944, Nov. 1998.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, F.; JIMENEZ, M. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 196-203, Apr. 2006.

MOORE, J. H.; TRUELOVE, B. Ochratoxin A: inhibition of mitochondrial respiration. **Science**, London, v. 168, n. 935, p. 1102-1103, May 1970.

MORAIS, M. S. **Efeito de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem**. 2004. 98 p. Dissertação (Mestrado em Patologia de Sementes) - Universidade Federal da Paraíba, Areia.

MORTON, J. F.; VOSS, G. L. The argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae), a desert source of edible oil. **Economic Botany**, New York, v. 41, n. 2, p. 221-233, Apr. 1987.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J.; MARTINEZ-DIAZ, R.; ESCARIO, J.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; GOMES-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Tricomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 71, n. 1/2, p. 101-107, July 2000.

MURAKAMI, T.; KISHI, A.; MATSUDA, H.; HATTORI, M.; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XXIV. Chemical constituents of the processed leaves of *Apocynum venetum* L.: absolute stereostructures of apocynosides I and II. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 49, n. 7, p. 845-848, July 2001.

NAKAJIMA, M. Ochratoxin A - its carcinogenicity and natural occurrence. **Mycotoxins**, Saitama, v. 55, n. 2, p. 139-148, 2005.

NEHAD, E. A.; FARAG, M. M.; KAWTHER, M. S.; ABDEL-SAMED, A. K. M.; NAGUIB, K. Stability of ochratoxin A (OTA) during processing and decaffeination in commercial roasted coffee beans. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 22, n. 8, p. 761-767, Aug. 2005.

NICOLAS, G.; OULAD-ALI, A.; GUILLAUME, D.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; ANTON, R. Triterpenoid saponins from the root of *Sideroxylon foetidissimum*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 38, n. 1, p. 225-228, Jan. 1995.

NIGAM, S. K.; LI, X. C.; WANG, D. Z.; MISRA, G.; YANG, C. R. Triterpenoidal saponins from *Madhuca butyracea*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 31, n. 9, p. 3169-3172, Sept. 1992.

- NISHIKITANI, M.; WANG, D.; KUBOTA, K.; KOBAYASHI, A.; SUGAWARA, F. (Z)-3-hexenyl and trans-linalool 3,7-oxide β -primeverosides isolated as aroma precursors from leaves of a green tea cultivar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 9, p. 1631-1633, Sept. 1999.
- NOIARSA, P.; RUCHIRAWAT, S.; OTSUKA, H.; KANCHANAPOOM, T. Chemical constituents from *Oldenlandia corymbosa* L. of Thai origin. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 62, n. 2, p. 249-250, Apr. 2008.
- NOIARSA, P.; YU, Q.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; RUCHIRAWAT, S.; KANCHANAPOOM, T. (Z)-3-hexenyl diglycosides from *Spermacoce laevis* Roxb. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 406-409, Oct. 2007.
- OGUNWANDE, I.; BELLO, M.; OLAWIRE, O.; MUILI, K. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, n. 1, p. 54-56, Jan. 2001.
- OLIVEIRA, R. F.; BAGGIO, A. J.; PASCHOALATI, S. F.; LEITE, B. Evidência de compostos fenólicos pré formados com ação anti-fúngica em extratos de folha de *Mimosa scabrella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 269, 1992. Suplemento.
- ONO, M.; MISHIMA, K.; YAMASAKI, T.; MASUOKA, C.; OKAWA, M.; KINJO, J.; IKEDA, T.; NOHARA, T. A new lignan glucoside from the stems of *Callicarpa japonica* Thunb. var. *luxurians* Rehd. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 63, n. 1, p. 86-90, Jan. 2009.
- ONO, M.; ODA, E.; TANAKA, T.; IIDA, Y.; YAMASAKI, T.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 62, n. 1, p. 101-106, Jan. 2008.
- OTSUKA, H.; TAKEDA, Y.; YAMASAKI, K. Xyloglucosides of benzyl and phenethyl alcohols and Z-hex-3-en-1-ol from leaves of *Alangium platanifolium* var. *trilobum*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 29, n. 11, p. 3681-3683, Nov. 1990.
- PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 531-535, Oct. 2004.

PENTEADO, S. R. **Defensivos alternativos e naturais**: para uma agricultura saudável. Campinas: Grafimagem, 2001. 96 p.

PEREIRA, A. C.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CAVALHEIRO, A. J.; CARVALHO, D. A.; SOUZA, L. P.; CHALFOUN, S. M. Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 427-432, set. 2008.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 14, p. 37-40, set. 2004. Suplemento.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Microbial composition and ochratoxin A in coffee (*Coffea arabica* L.) submitted to different waiting times before drying. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov. 2003.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). **Journal of the Amerian Oil Chemists Society**, Berlin, v. 61, n. 6, p. 1064-1067, June 1984.

REFAI, M. K.; AZIZ, N. H.; EL-FAR, F.; HASSAN, A. A. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation. **Applied Radiation and Isotopes**, New York, v. 47, n. 7, p. 617-621, July 1996.

REITZ, P. R. **Sapotáceas**. Itajaí: Ed. H. B. Rodrigues, 1968. 72 p. (Flora ilustrada catarinense. Parte I: as plantas).

RESENDE, M. L. V. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP IN PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...** Helsingor: Denmark, 2004. p. 79.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1267-1271, out. 1999.

RIBERA, A.; COTORAS, M.; ZÚNIGA, G. E. Effect of extracts from in vitro-grown shoots of Quillaja saponaria Mol. on Botrytis cinerea Pers. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 1803-1811, Sept. 2008.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; GHAVES-LÓPEZ, C.; PINNAVAIA, G. G.; DLLA-ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3616-3619, July 2000.

SABINO, M. Normais e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no Mercosul e no mundo. In: ROLIN, R. E.; VALENTIN, M. L. (Ed.). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Campinas: Fundação Cargil, 1999. p. 183-192.

SAHU, N. P. Triterpenoid saponins of *Mimusops elengi*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 41, n. 3, p. 883-886, Feb. 1996.

SAHU, N. P.; KOIKE, K.; JIA, Z. H.; NIKAIDO, T. Triterpenoid saponins from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 44, n. 6, p. 1145-1149, Mar. 1997.

SANTOS, A. G. dos; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, set./out. 2007.

SANTOS JÚNIOR, H. M. dos. **Estudo fitoquímico das folhas de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hall. f. (Convolvulaceae), *Sabicea brasiliensis* Wernh. (Rubiaceae) e *Heteropterys byrsonimifolia* adr. Juss. (Malpighiaceae)**. 2007. 359 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS, M. A. I. **Purificação e identificação de substâncias de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. ativas contra o bichomineiro do cafeeiro**. 2009. 102 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, May 2006.

SEKI, T.; MORI, S.; SEIKI, H. **Microbicides containing birch extracts and low-irritation cosmetics containing them.** JP n. PI 10139601 A, 13 nov. 1996, 1998. 16 p. Disponível em:
<http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en_ep&FT=D&date=19980526&CC=JP&NR=10139601A&KC=A>
. Acesso em: 20 nov. 2008.

SEN, S.; SAHU, N. P.; MAHATO, S. B. Pentacyclic triterpenoids from *Mimusops elengi*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 38, n. 1, p. 205-207, Jan. 1995.

SHAH, P. J.; GANDHI, M. S.; SHAH, M. B.; GOSWAMI, S. S.; SANTANI, D. Study of *Mimusops elengi* bark in experimental gastric ulcers. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 89, n. 2/3, p. 305-311, Dec. 2003.

SHAHWAR, D.; RAZA, M. A. In vitro antibacterial activity of extracts of *Mimusops elengi* against gram positive and gram negative bacteria. **African Journal of Microbiological Research**, Oregon, v. 3, n. 8, p. 458-462, Aug. 2009.

SHIRAGA, Y.; OKANO, K.; AKIRA, T.; FUKAYA, C.; YOKOYAMA, K.; TANAKA, S.; FUKUI, H.; TABATA, M. Structures of potent antiulcerogenic compounds from *Cinnamomum cassia*. **Tetrahedron: the International Journal of Organic Chemistry**, Oxford, v. 44, n. 15, p. 4703-4711, 1988.

SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SILVA, V. C.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N. A new antifungal phenolic glycoside derivative, iridoids and lignans from *Alibertia sessilis* (vell.) K. Schum. (rubiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 7, p. 1405-1409, 2007.

SILVA, V. C.; GIANNINI, M. J. S. M.; CARBONE, V.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, M. N. New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 91, n. 7, p. 1355-1362, July 2008.

SILVA, V. C.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, M. N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

SMITH, J. E.; ROSS, K. The Toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (Ed.). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 101-118.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 465-471, nov./dez. 2007.

SUAREZ-QUIROZ, M. L.; GONZALEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

TAHROUCH, S.; ANDARY, C.; RAPIOR, S.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; FRUCHIER, A. Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. **Acta Botanica Gallica**, Paris, v. 147, n. 3, p. 225-232, jan. 2000.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

TEGEGNE, G.; PRETORIU, J. C.; SWARTB, W. J. Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 7, p. 1052-1060, July 2008.

TOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; INOUE, K.; KUWAJIMA, H.; WU, H-X. Glycosides of benzyl and salicyl alcohols from *Alangium chinense*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 49, n. 10, p. 1343-1345, Oct. 2001.

TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 97, n. 2, p. 111-115, Feb. 1987.

- URBANO, G. R.; FREITAS LEITAO, M. F. de; VICENTINI, M. C.; TANIWAKI, M. H. Preliminary studies on the destruction of ochratoxin A in coffee during roasting. International Scientific Colloquium on Coffee, 19., 2001, Trieste. **Proceedings...** Trieste: ASIC, 2001b. p. 561-565.
- URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITAO, M. F. de F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001a.
- VALARINI, P. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 139-150, 1994.
- VILLARROEL, L.; TORRES, R.; URZÚA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLONIA, A. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 64, n. 9, p. 1123-1126, Aug. 2001.
- WALKER, R. Quality and safety of coffee. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1997, Nairobi. **Proceedings...** Nairobi: ASIC, 1997. p. 51-60.
- WANDJI, J.; TILLEQUIN, F.; MULHOLLAND, D. A.; SHIRRI, J. C.; TSABANG, N.; SEGUIN, E.; VERITE, P.; LIBOT, F.; FOMUM, Z. T. Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 64, n. 4, p. 845-849, Oct. 2003.
- WANDJI, J.; TILLEQUIN, F.; MULHOLLAND, D. A.; WANSI, J-D.; FOMUM, T. Z.; FUENDJIEP, V.; LIBOT, F.; TSABANG, N. Fatty acid esters of triterpenoids and steroid glycosides from *Gambeya africana*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 68, n. 9, p. 822-826, Sept. 2002.
- WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y. C.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 2, p. 294-296, May 1999.
- WANG, L-Q.; SHEN, Y-M.; HU, J-M.; ZHOU, J. A new C21 steroidal glycoside from *Cynanchum inamoenum (Maxim.) Loes.* **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 10, n. 9, p. 867-871, Sept. 2008a.

WANG, X-Y.; WANG, D.; MA, X-X.; ZHANG, Y-J.; YANG, C-R. Two new dammarane-type bisdesmosides from the fruit pedicels of *Panax notoginseng*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 91, n. 1, p. 60-66, Jan. 2008b.

WANGTEERAPRASERT, R.; LIKHITWITAYAWUID, K. Lignans and a sesquiterpene glucoside from *Carissa carandas* stem. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 92, n. 6, p. 1217-1223, June 2009.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, n. 1, p. 14-20, Jan. 2006.

WATANABE, Y.; NAKAYAMA, A.; TAI, H.; KATO, A. **Benzyl alc. disaccharide glycosides as microcirculation improvement medicines**. JP n. PI 2003026577 A, 5 June 2001, 2003. 7 p. Disponível em: <http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en_ep&FT=D&date=20030129&CC=JP&NR=2003026577A&KC=A>. Acesso em: 20 nov. 2008.

WEIDENBACH, A.; PETZINGER, E. Ochratoxin A: toxicology of an abundant mycotoxin. **Current Topics in Pharmacology**, Trivandrum, v. 8, n. 2, p. 235-250, 2004.

XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R. R.; LI, S.; VODELA, J. K.; FROHLICH, A. A.; KEMPPAINEN, B. W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 137, n. 2, p. 182-192, Apr. 1996.

YANG, Y. L.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Squadinorlignoside: A novel 7,9'-dinorlignan from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 88, n. 10, p. 2731-2737, Oct. 2005.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; ISHIWADA, T.; MORIKAWA, T.; KAGAWA, M.; HIGASHI, Y.; MATSUDA, H. New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, n. 8, p. 1151-1155, July 2002.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. C. Breve análise histórica da química da plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

ZHANG, Q.; NI, G.; YU, D. Study on the chemical constituents of *Vitex canescens*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, China, v. 34, n. 10, p. 1305-1306, 2009.

ZHANG, W.; LI, Q.; HUANG, J.; XIAO, Z.; LONG, L. Two new cyclolignan glycosides from *Acanthus ilicifolius*. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 59b, p. 341-344, Nov. 2004.

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A	Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz..... 96
FIGURA 2A	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz..... 97
FIGURA 3A	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz..... 98
FIGURA 4A	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz..... 99
FIGURA 5A	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD 100
FIGURA 6A	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD 101
FIGURA 7A	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD 102
FIGURA 8A	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD 103
FIGURA 9A	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD . 104
FIGURA 10A	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de

	Jr3-11-01 em CD ₃ OD.....	105
FIGURA 11A	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD.....	106
FIGURA 12A	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD.....	107
FIGURA 13A	Correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	108
FIGURA 14A	Expansão da correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	109
FIGURA 15A	Expansão da correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	110
FIGURA 16A	Correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	111
FIGURA 17A	Expansão da correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	112
FIGURA 18A	Expansão da correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	113
FIGURA 19A	Expansão da correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-01 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	114

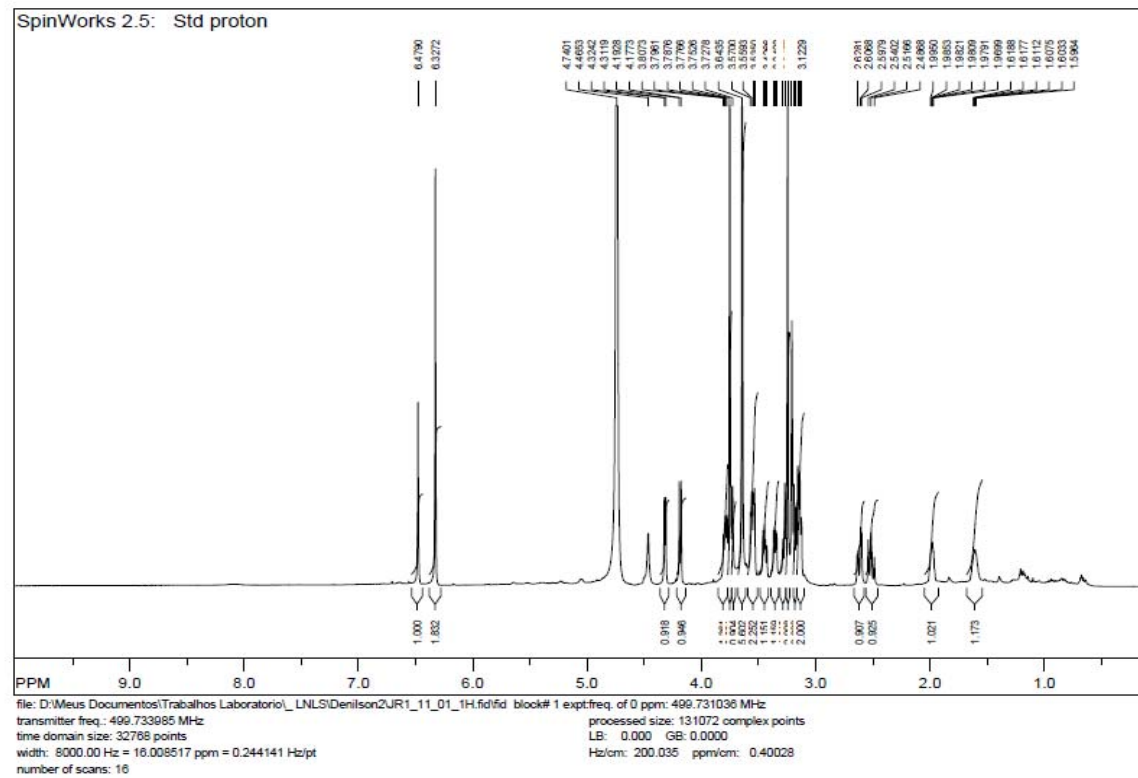
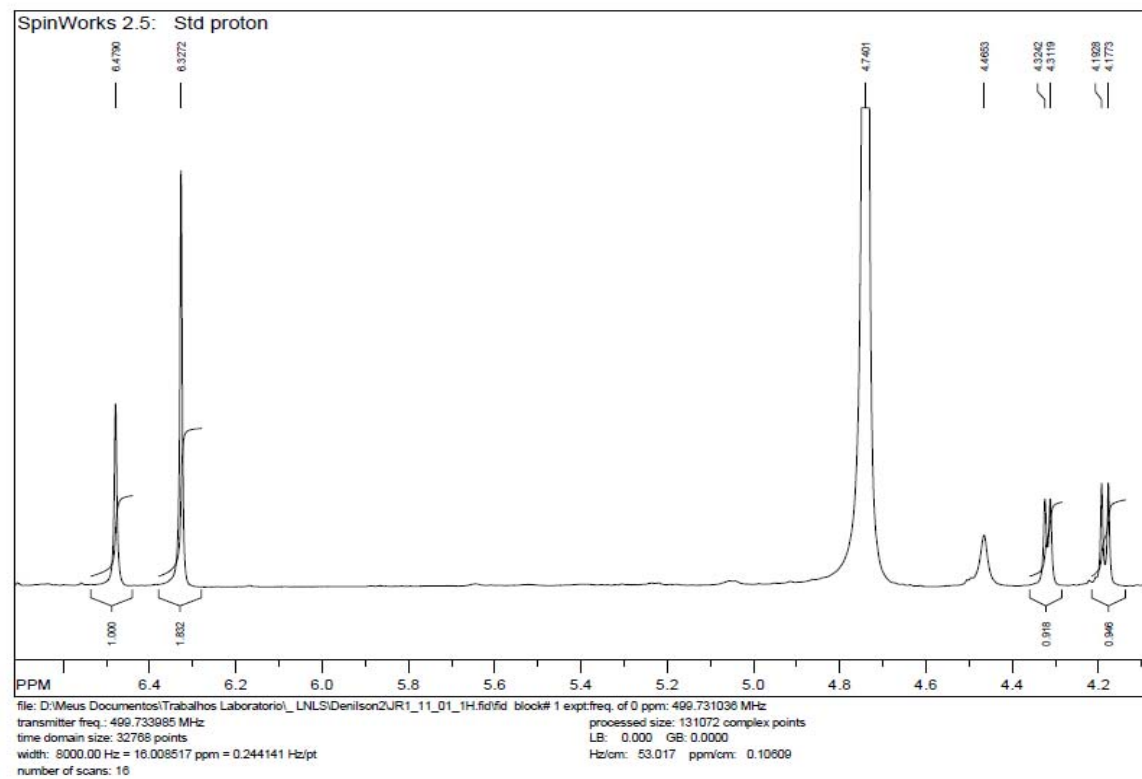


FIGURA 1A Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz

FIGURA 2A Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz

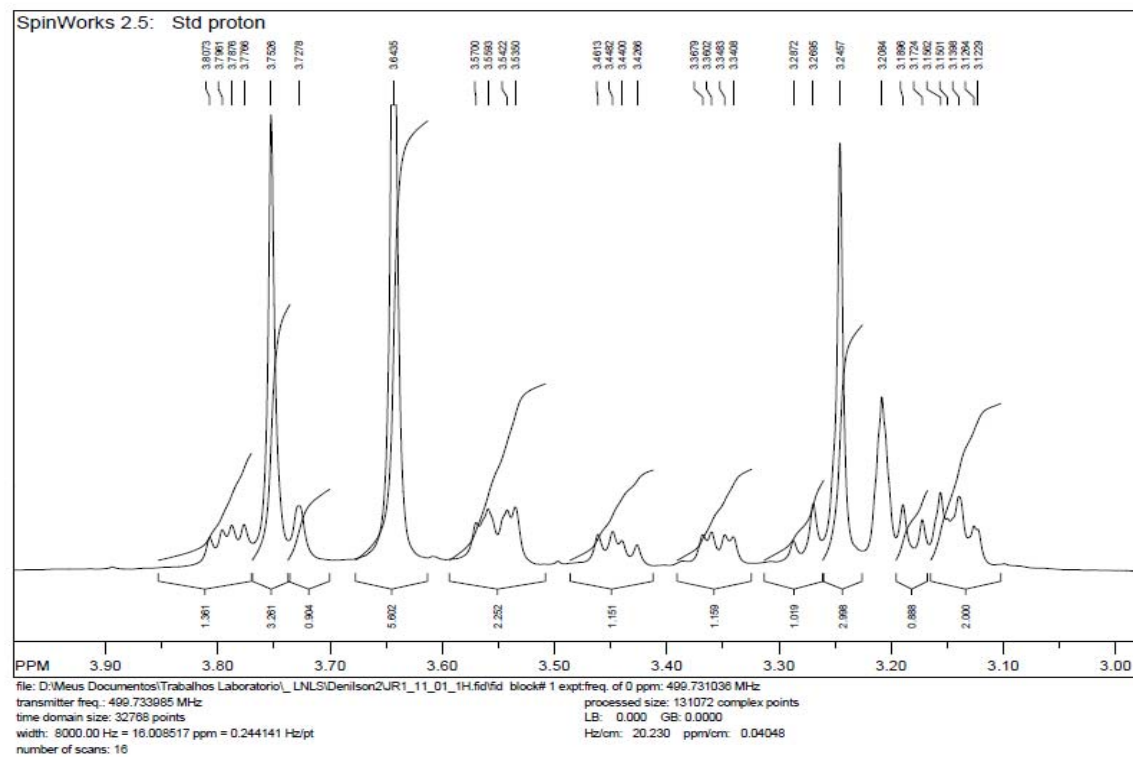


FIGURA 3A Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz

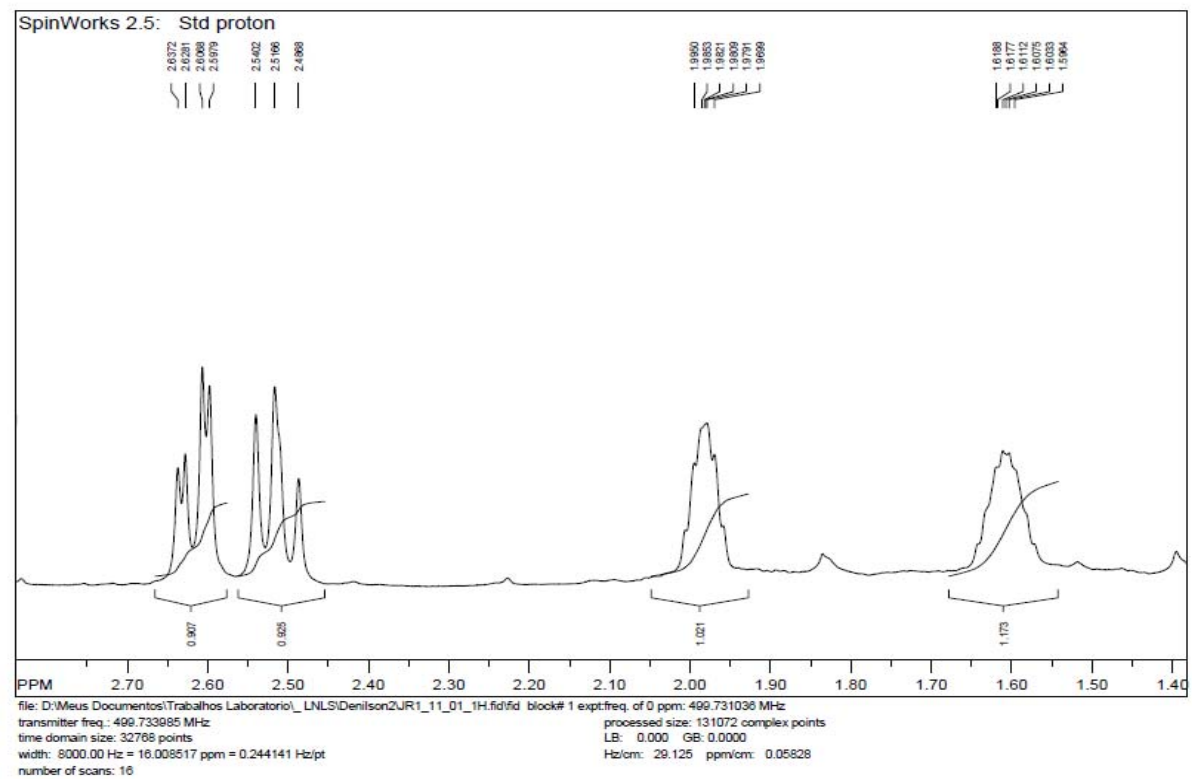


FIGURA 4A Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500MHz

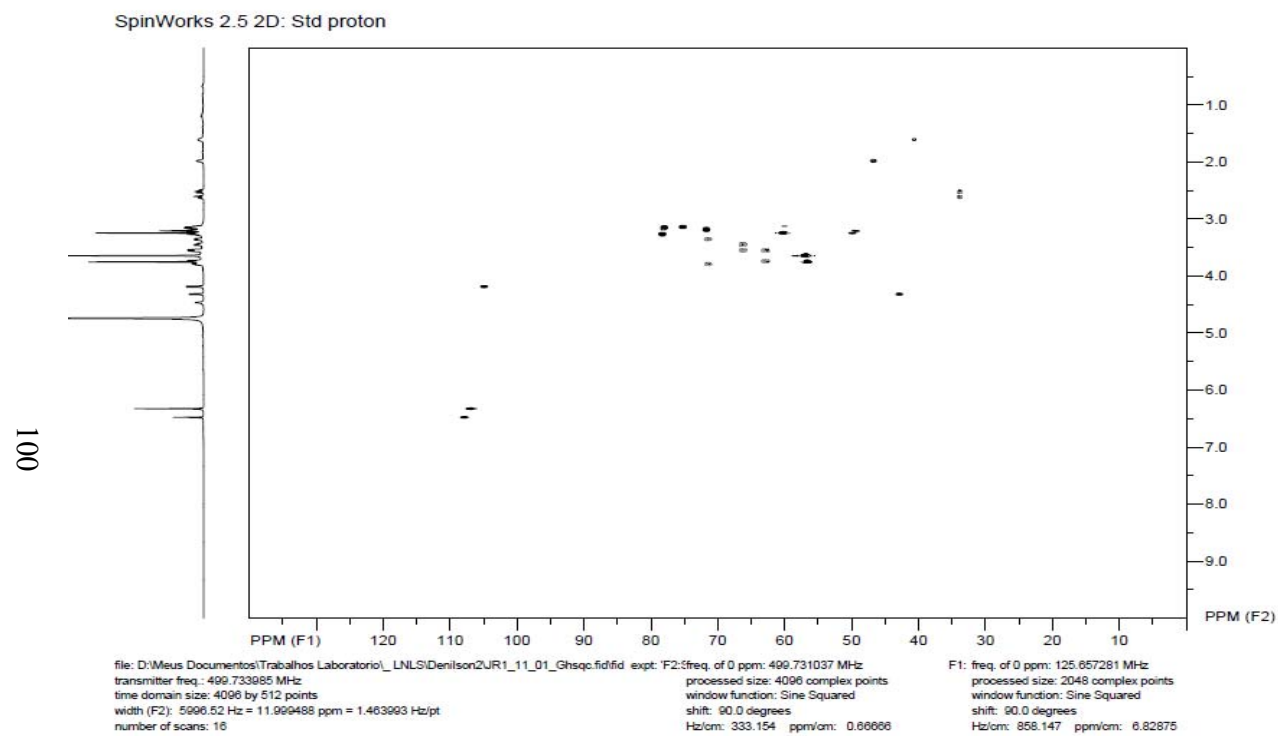


FIGURA 5A Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

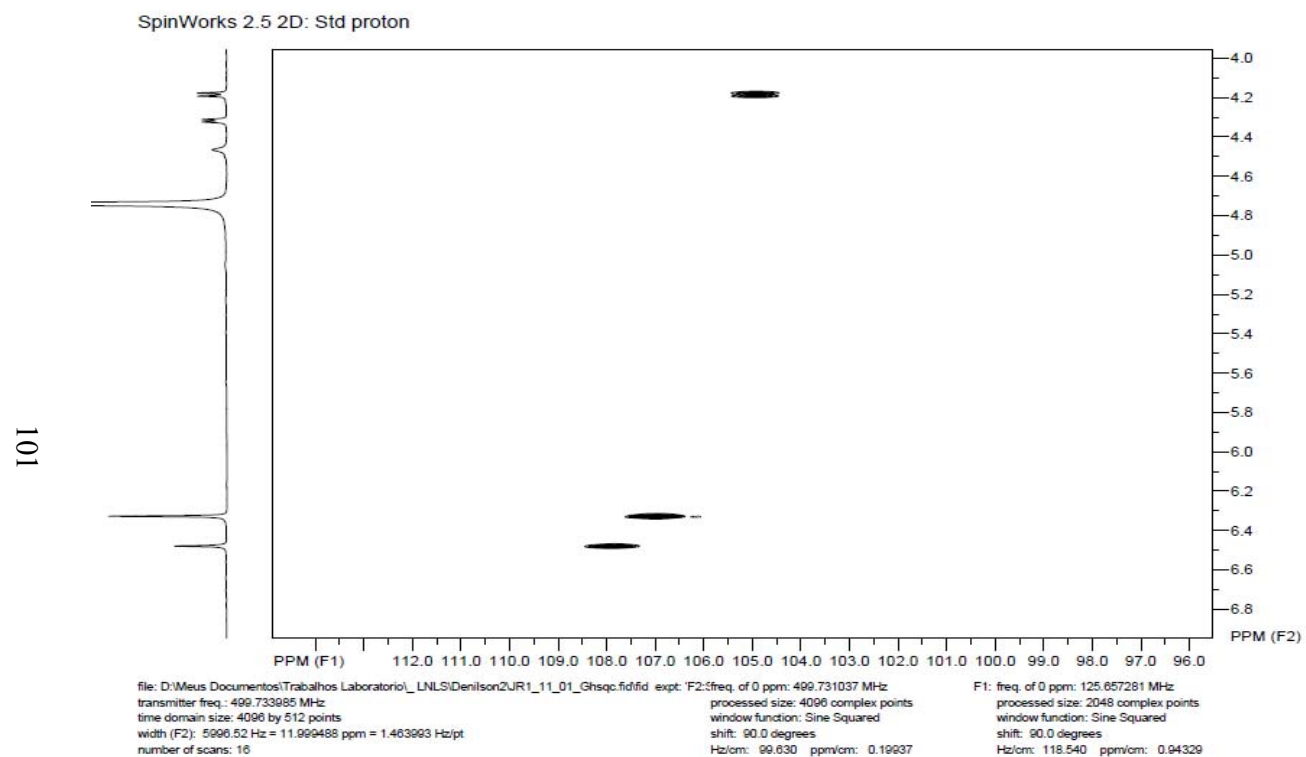


FIGURA 6A Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

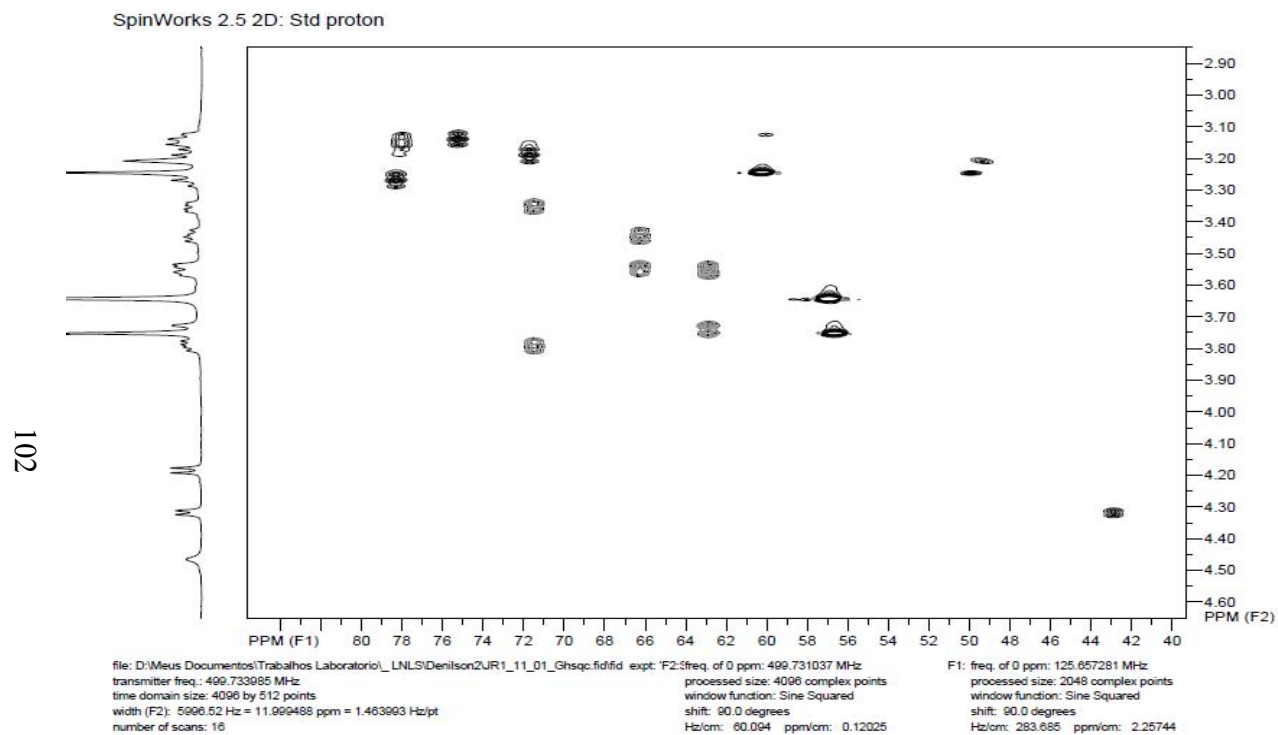


FIGURA 7A Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

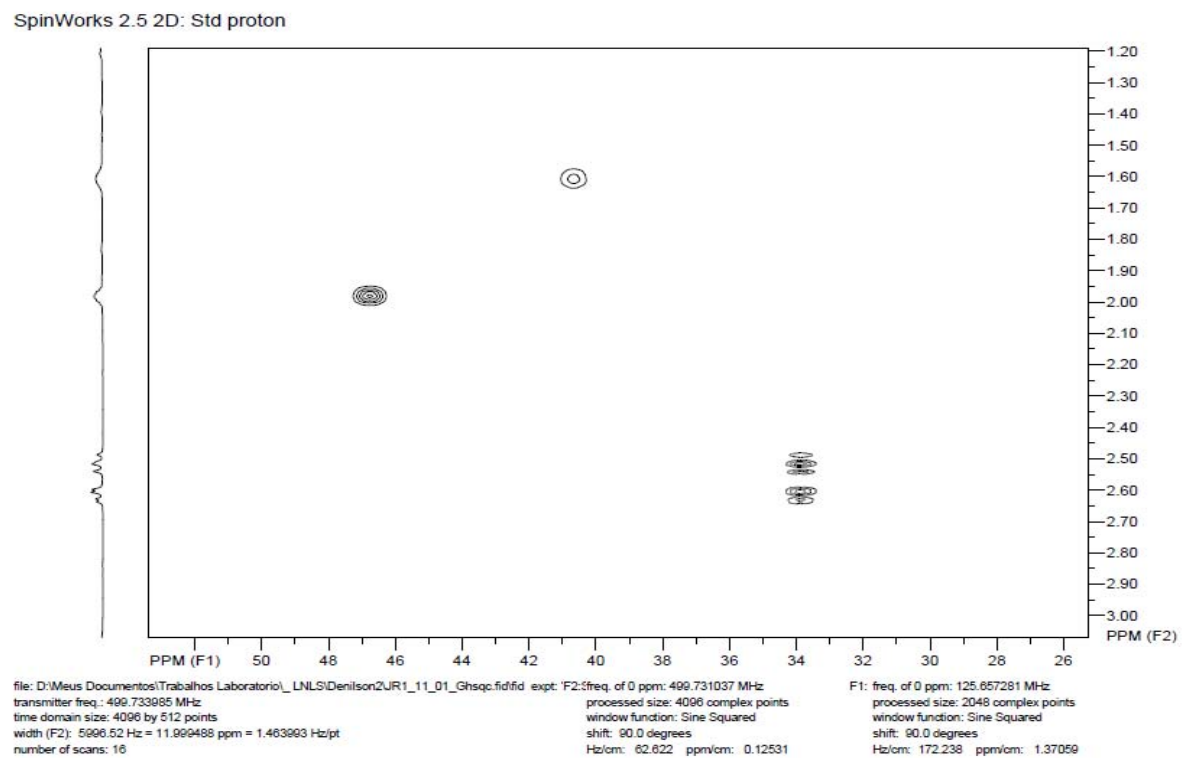


FIGURA 8A Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

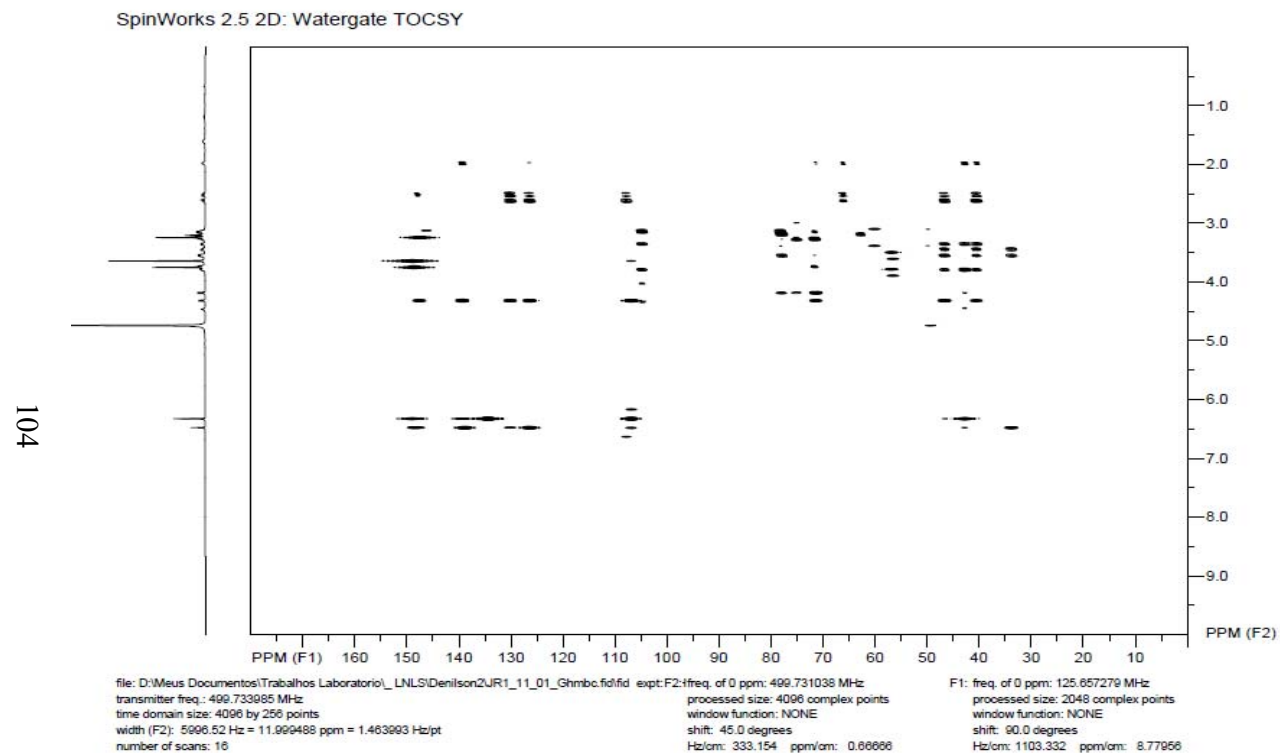


FIGURA 9A Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

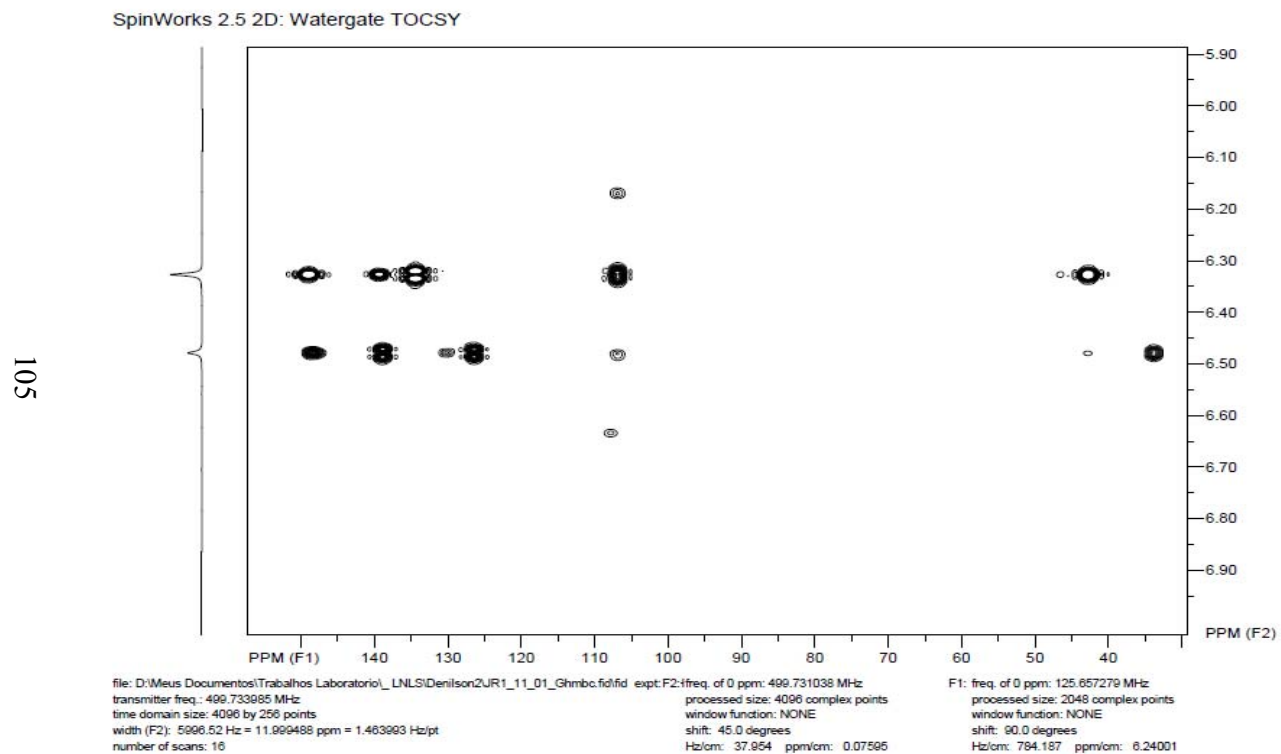


FIGURA 10A Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

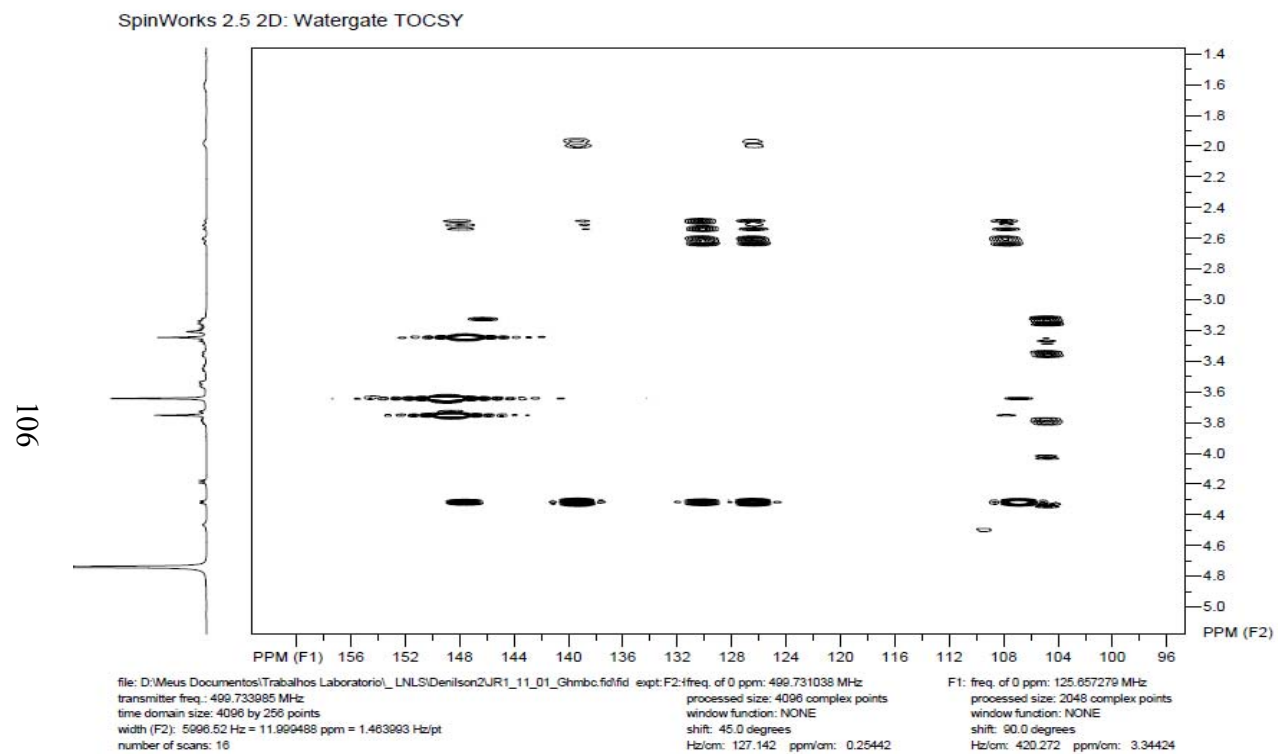


FIGURA 11A Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

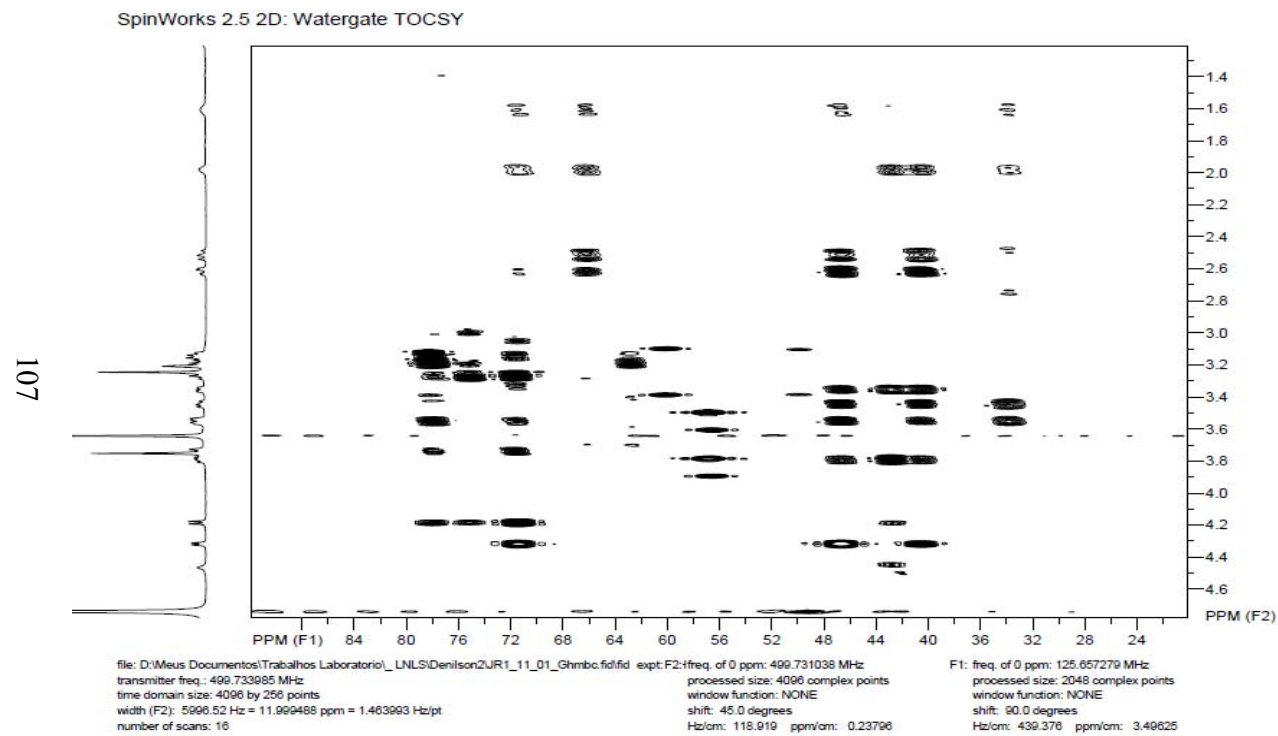


FIGURA 12A Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-01 em CD_3OD

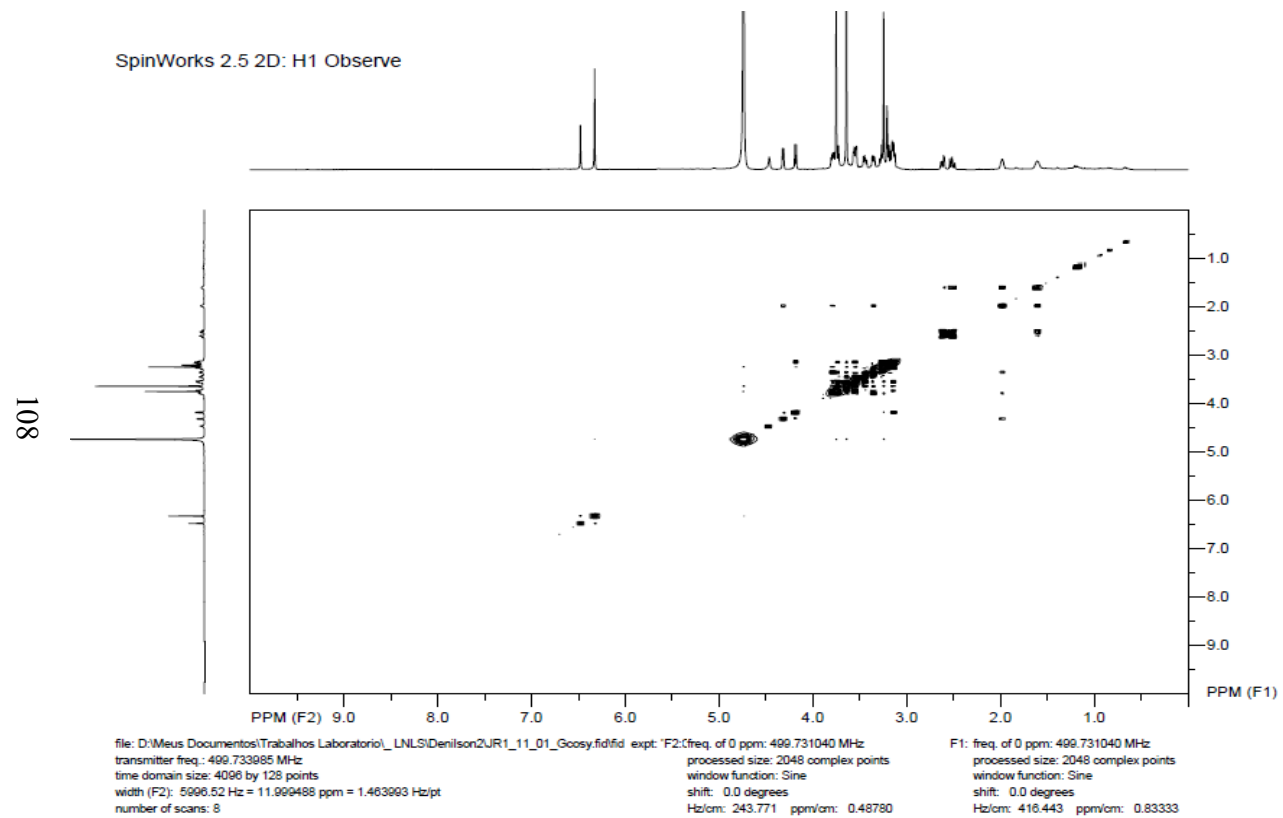


FIGURA 13A Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

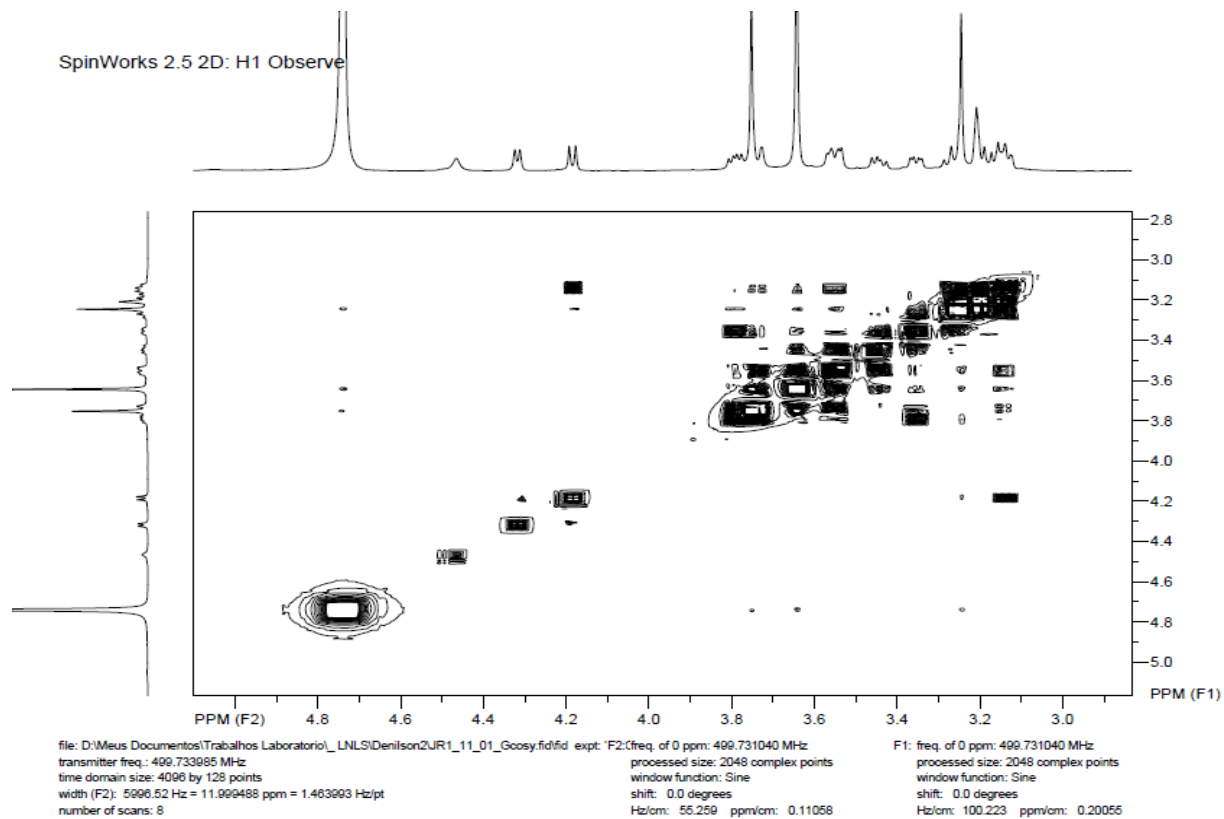


FIGURA 14A Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

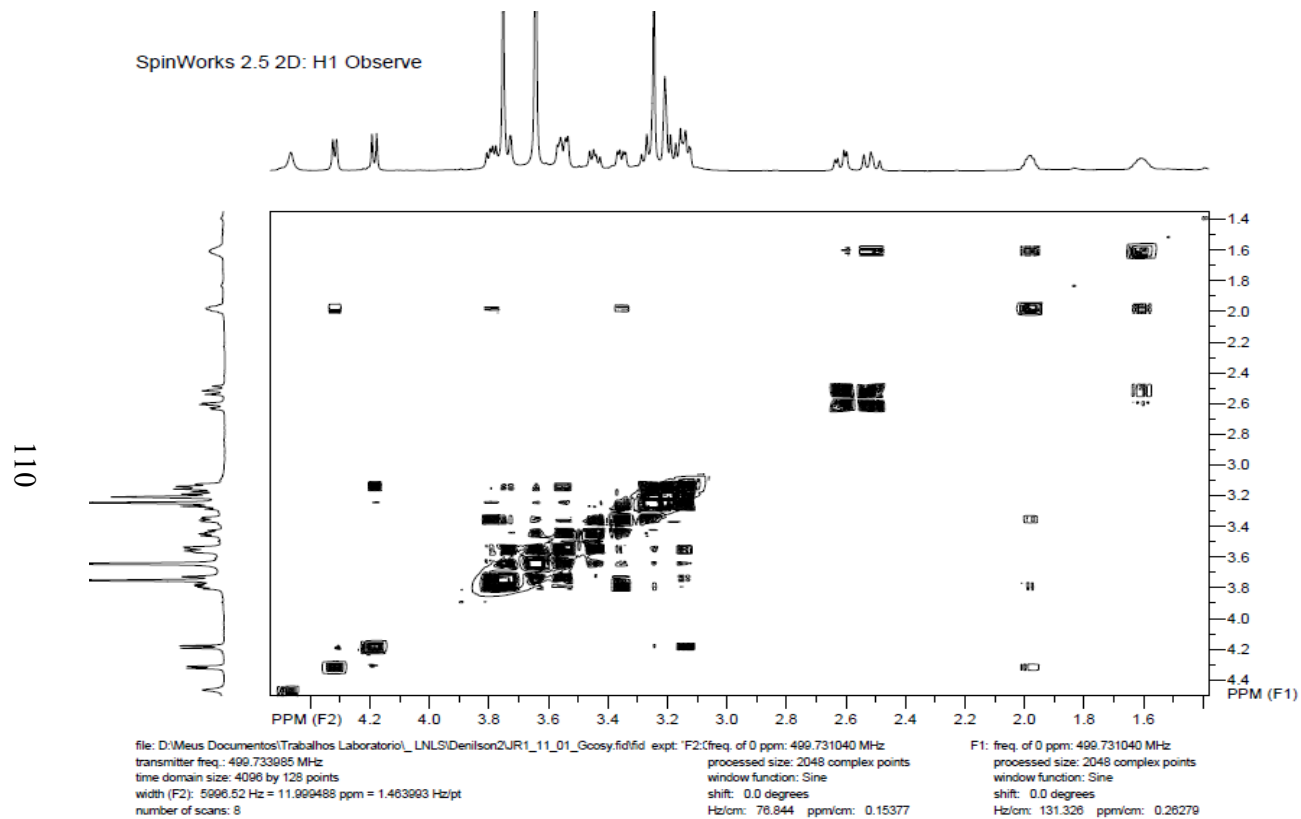


FIGURA 15A Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

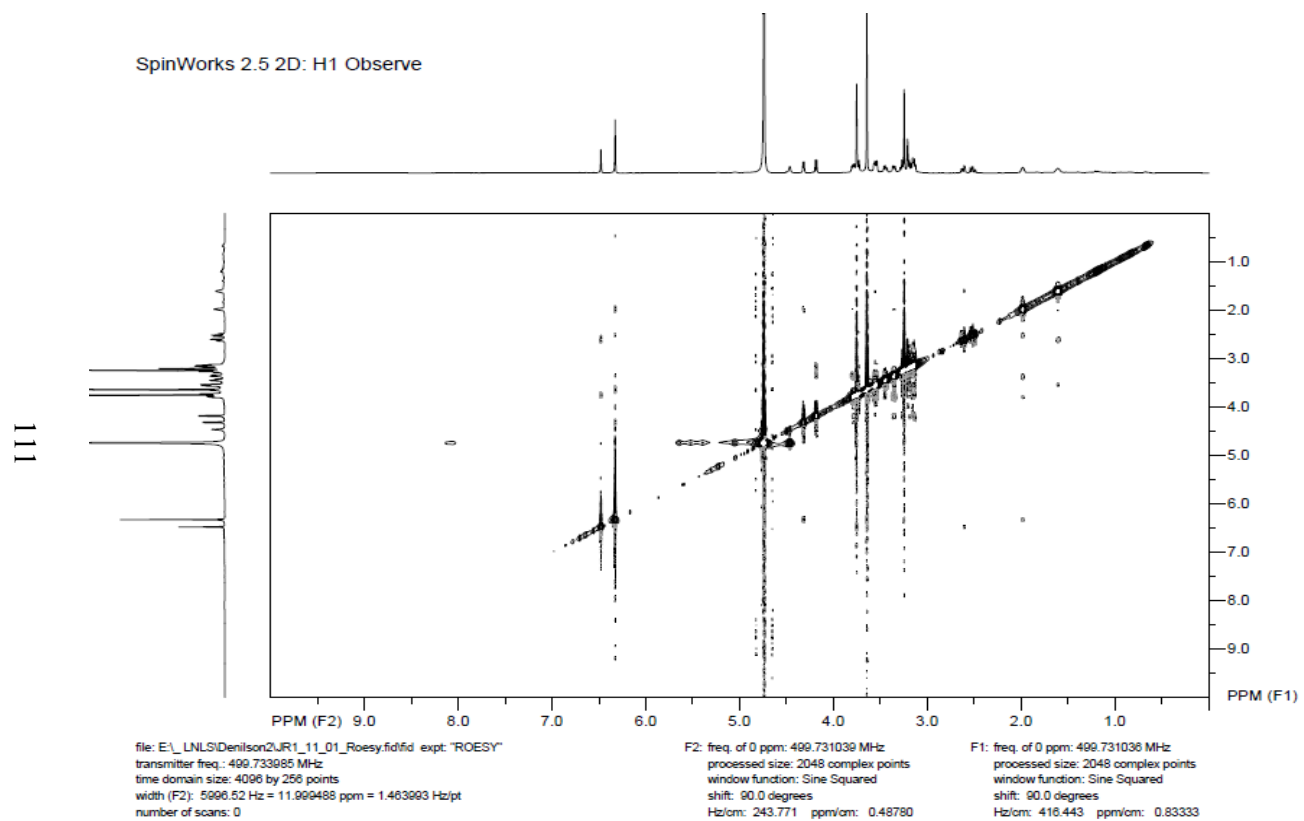


FIGURA 16A Correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

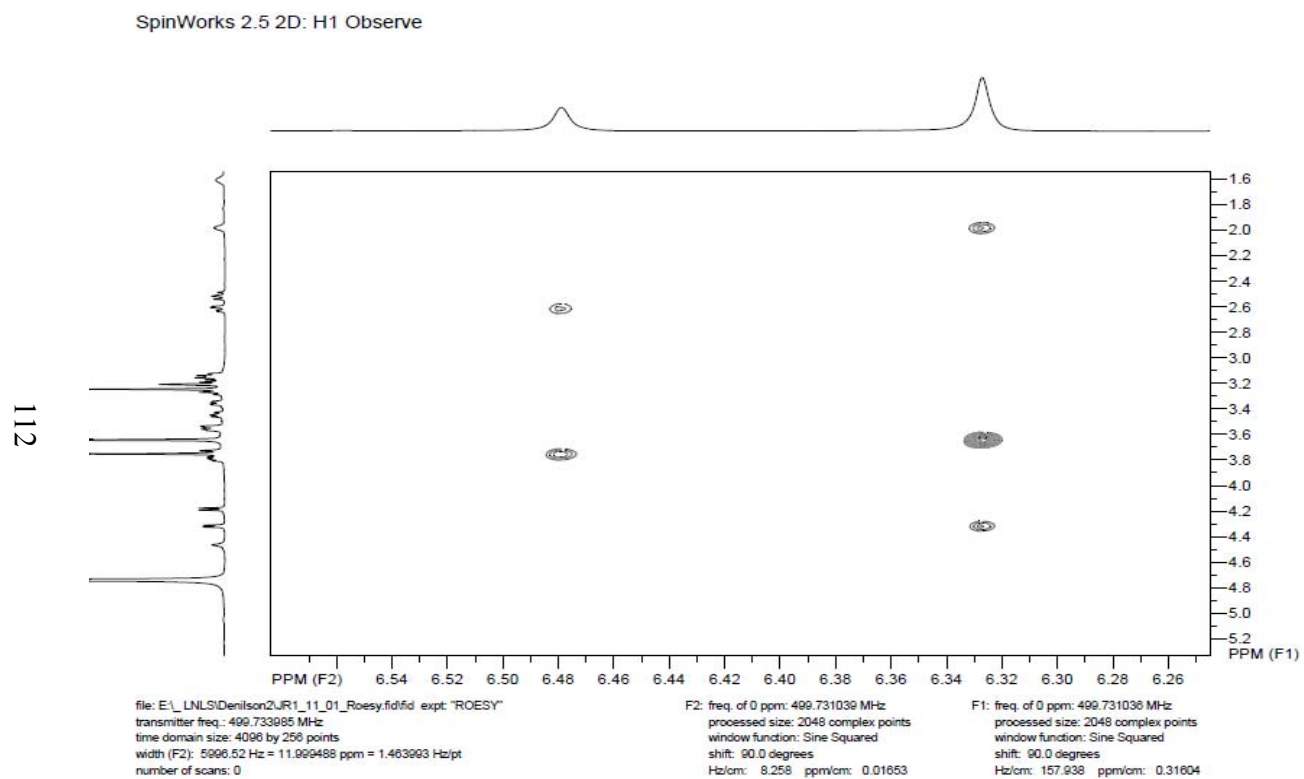


FIGURA 17A Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

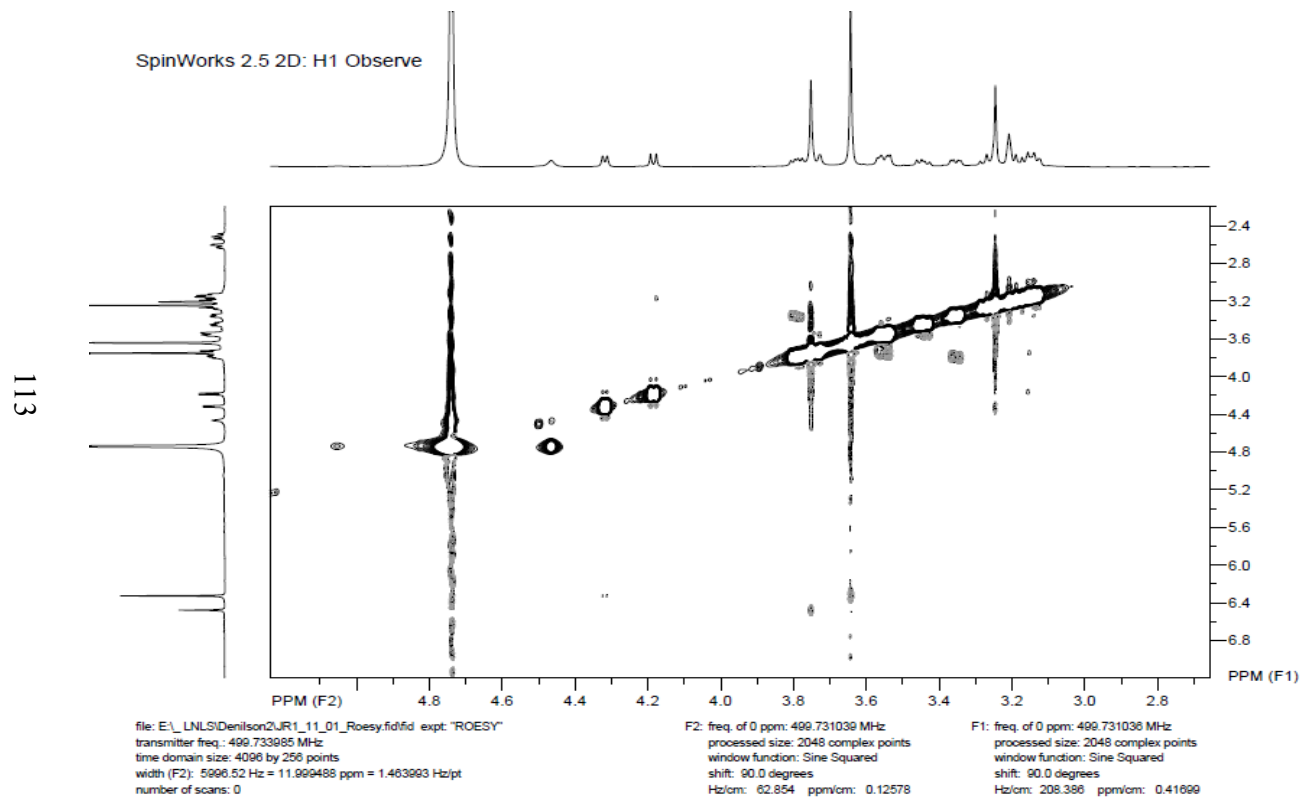


FIGURA 18A Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

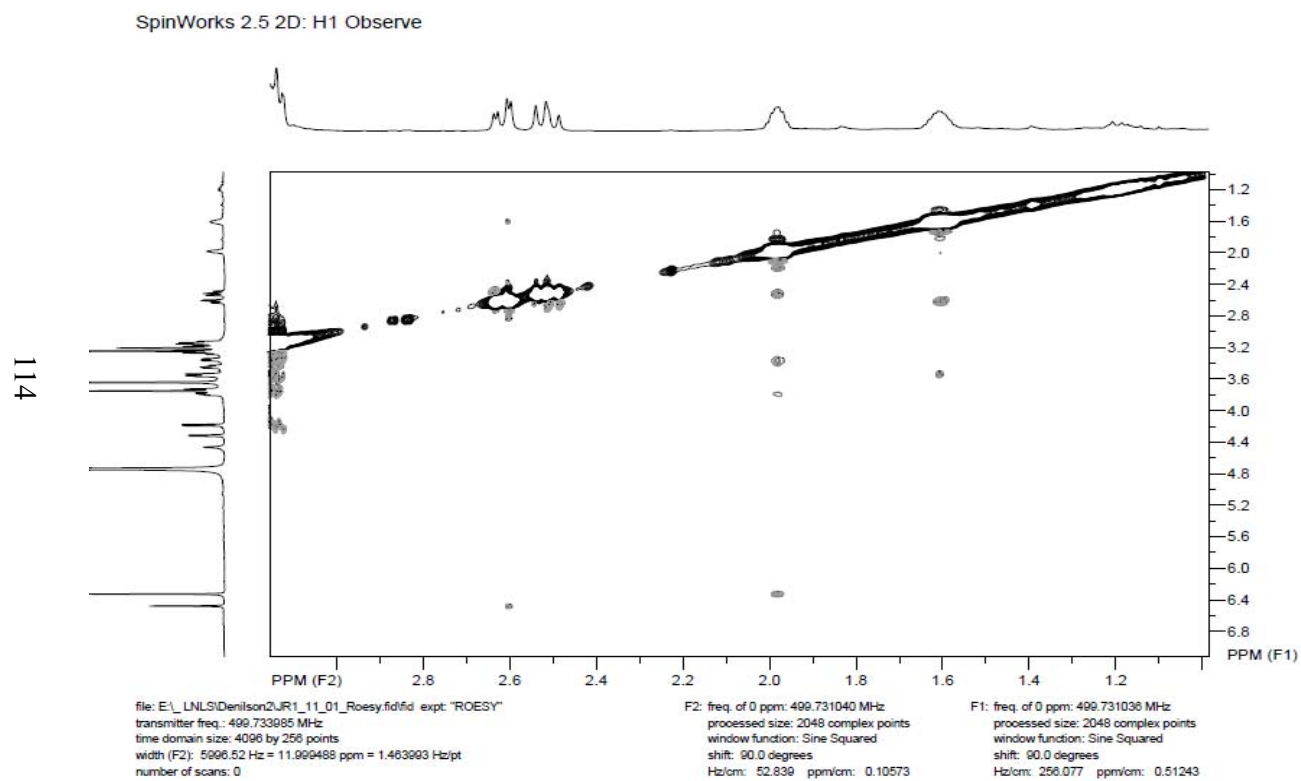
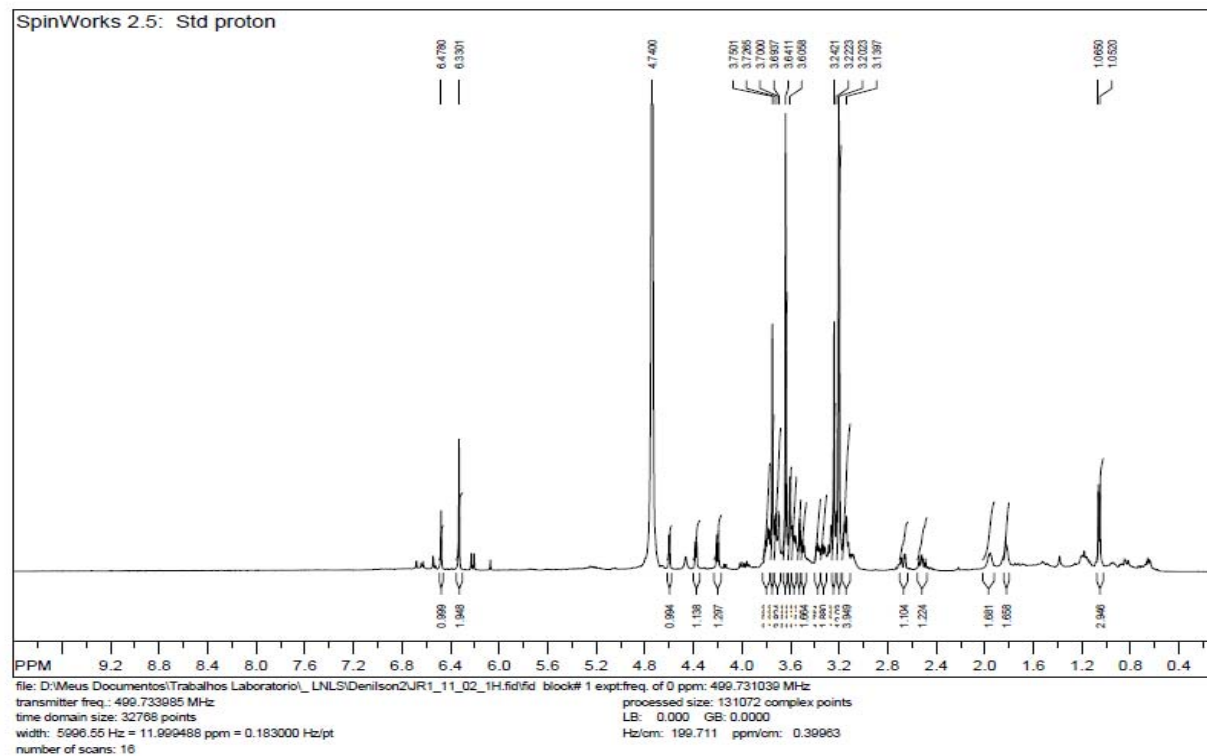


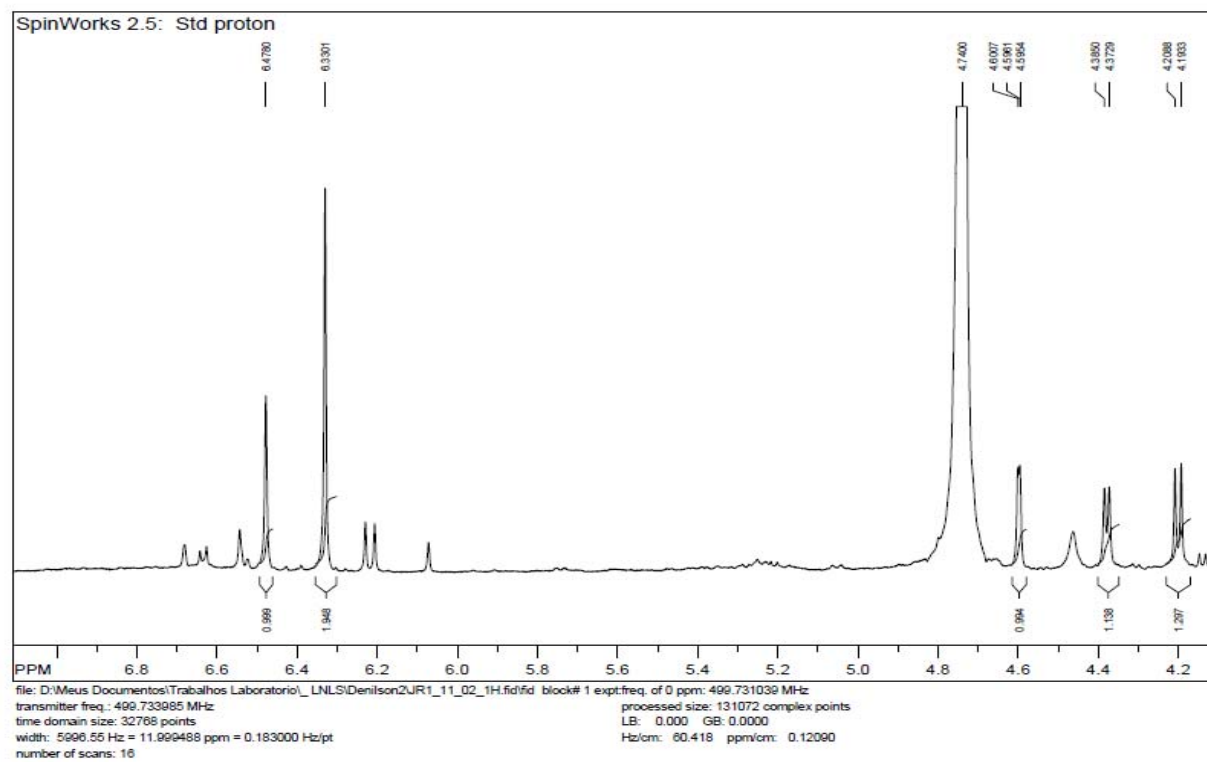
FIGURA 19A Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-01 em CD_3OD , 500 MHz

ANEXO B		Página
FIGURA 1B	Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500MHz.....	118
FIGURA 2B	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500MHz.....	119
FIGURA 3B	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500MHz.....	120
FIGURA 4B	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500MHz.....	121
FIGURA 5B	Espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD , 126MHz.....	122
FIGURA 6B	Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD , 126MHz.....	123
FIGURA 7B	Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD , 126MHz.....	124
FIGURA 8B	Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD , 126MHz.....	125
FIGURA 9B	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD	126
FIGURA 10B	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD	127
FIGURA 11B	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD	128
FIGURA 12B	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x	129

	126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	
FIGURA 13B	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.	130
FIGURA 14B	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	131
FIGURA 15B	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	132
FIGURA 16B	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	133
FIGURA 17B	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	134
FIGURA 18B	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹ H x ¹³ C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD.....	135
FIGURA 19B	Correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	136
FIGURA 20B	Expansão da correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	137
FIGURA 21B	Expansão da correlação homonuclear ¹ H x ¹ H (COSY) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	138
FIGURA 22B	Correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	139
FIGURA 23B	Expansão da correlação espacial homonuclear ¹ H x ¹ H (ROESY) de Jr3-11-02 em CD ₃ OD, 500 MHz.....	140

FIGURA 24B	Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz.....	141
FIGURA 25B	TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 1,06$).....	142
FIGURA 26B	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 1,06$).....	143
FIGURA 27B	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 1,06$).....	144
FIGURA 28B	TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,20$).....	145
FIGURA 29B	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,20$).....	146
FIGURA 30B	TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,38$).....	147
FIGURA 31B	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,38$).....	148
FIGURA 32B	TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,60$).....	149
FIGURA 33B	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: $\delta_{\text{H}} 4,60$).....	150

FIGURA 1B Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

FIGURA 2B Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

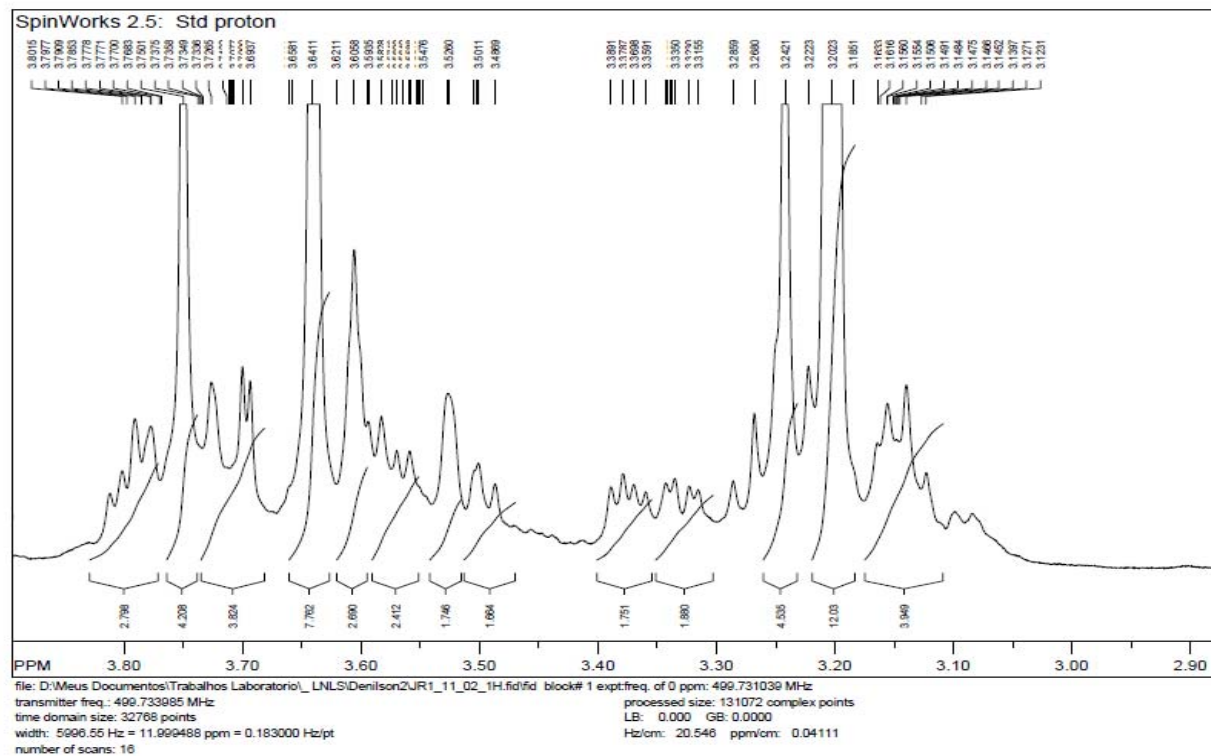
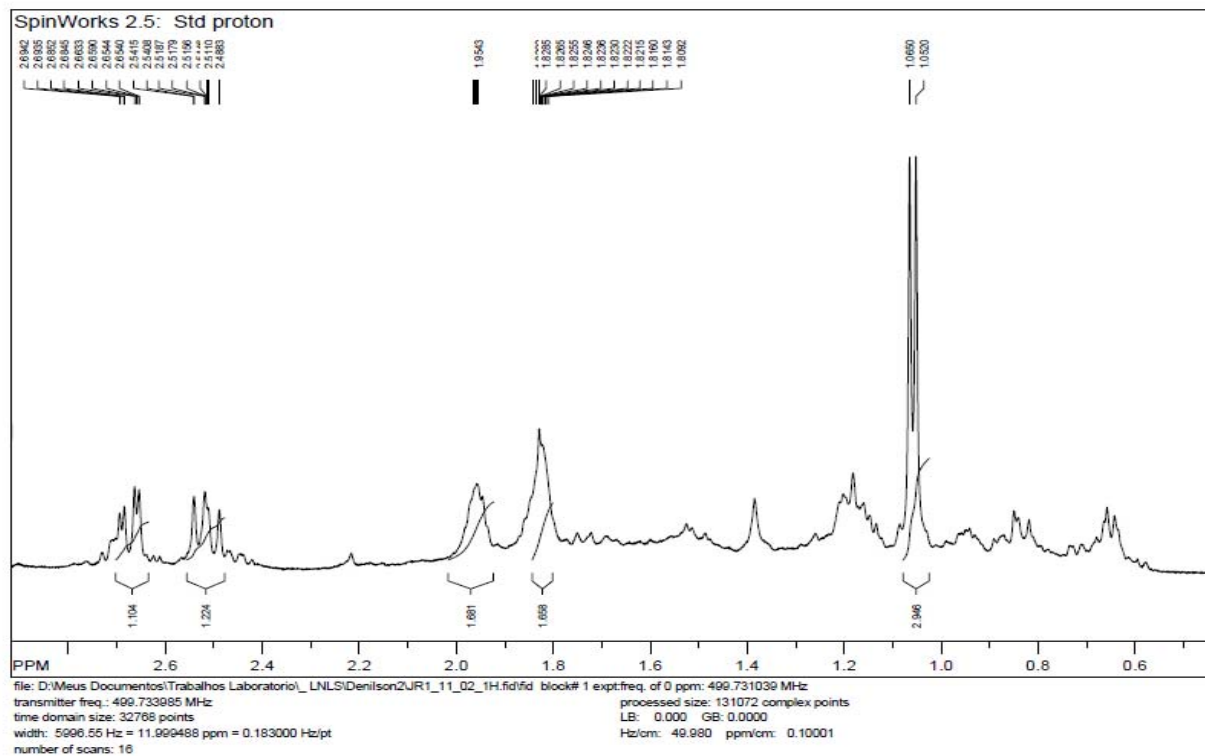
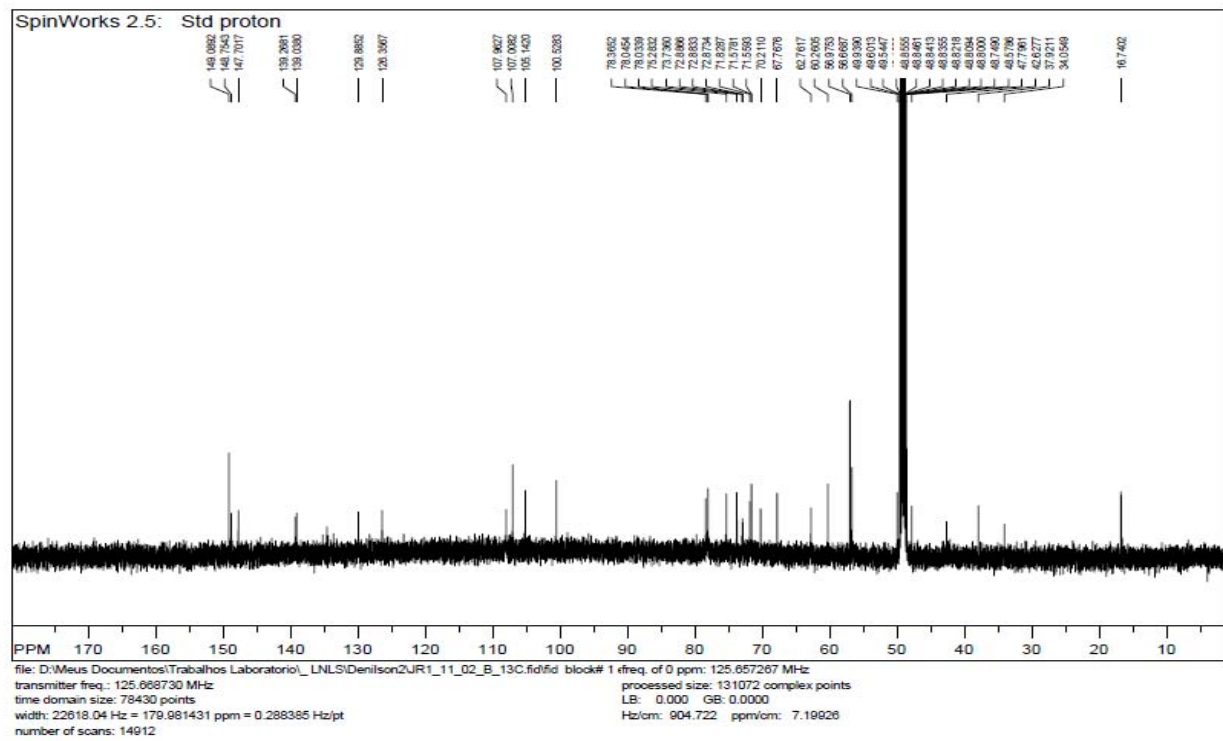
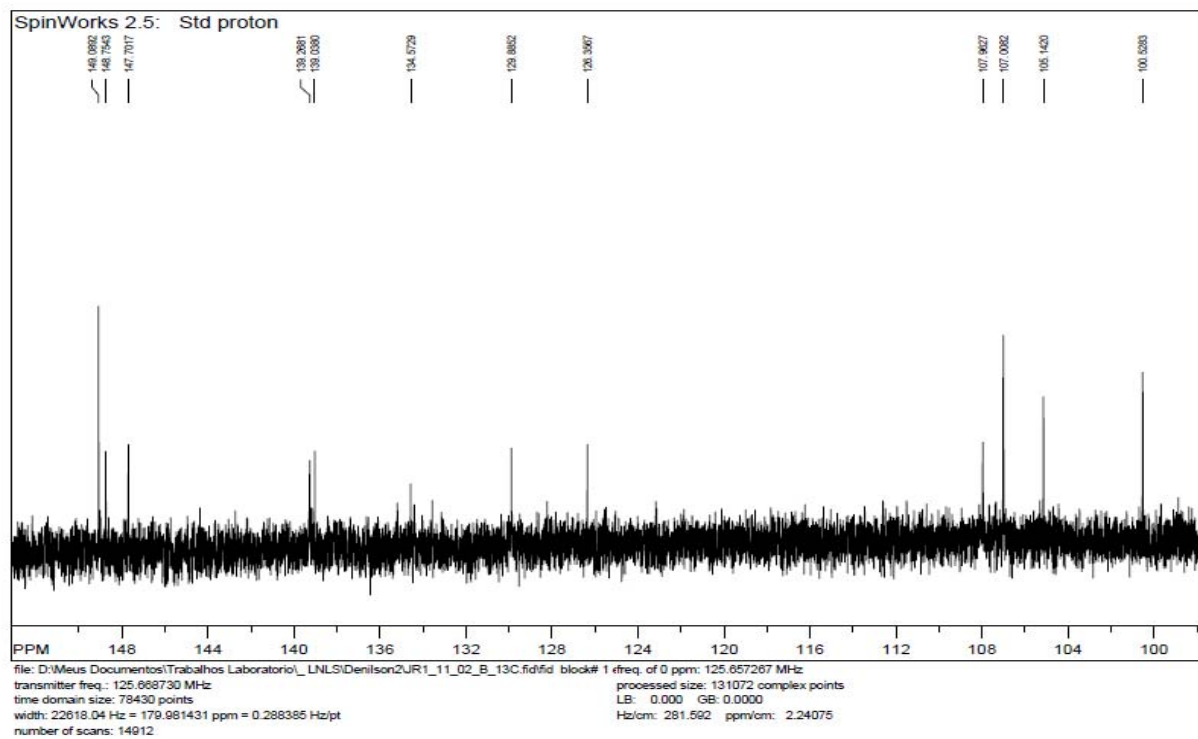
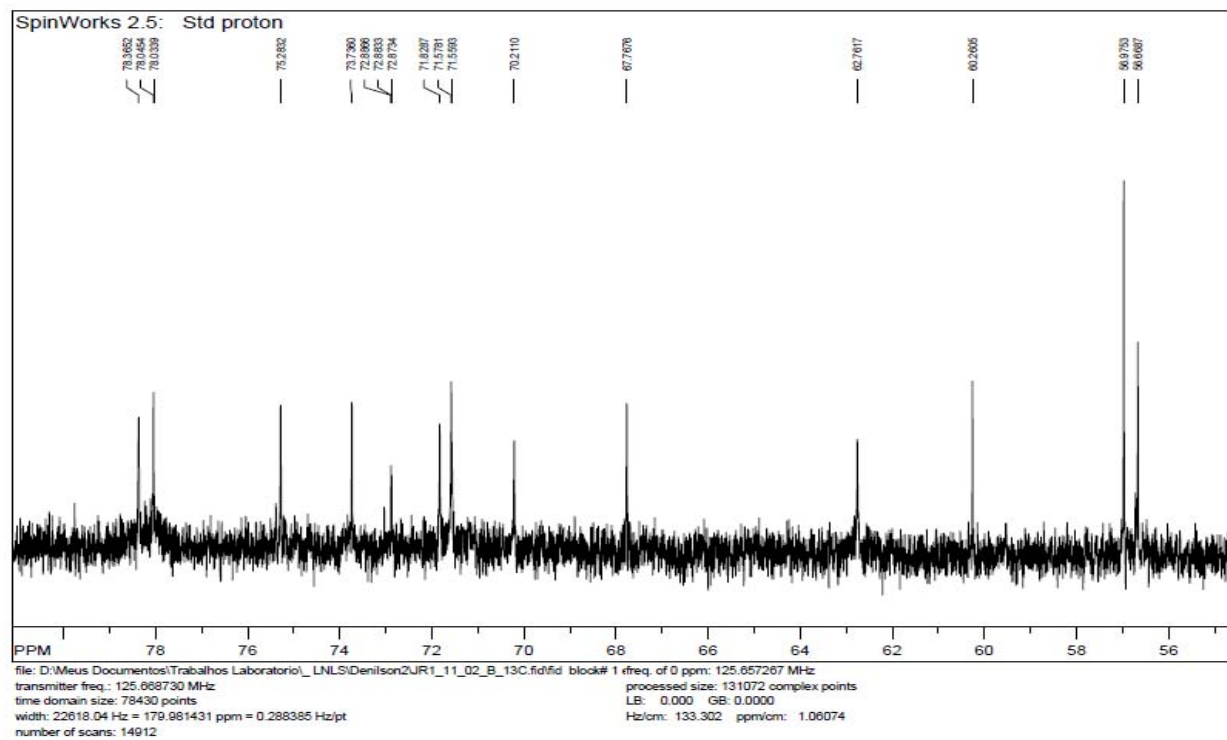


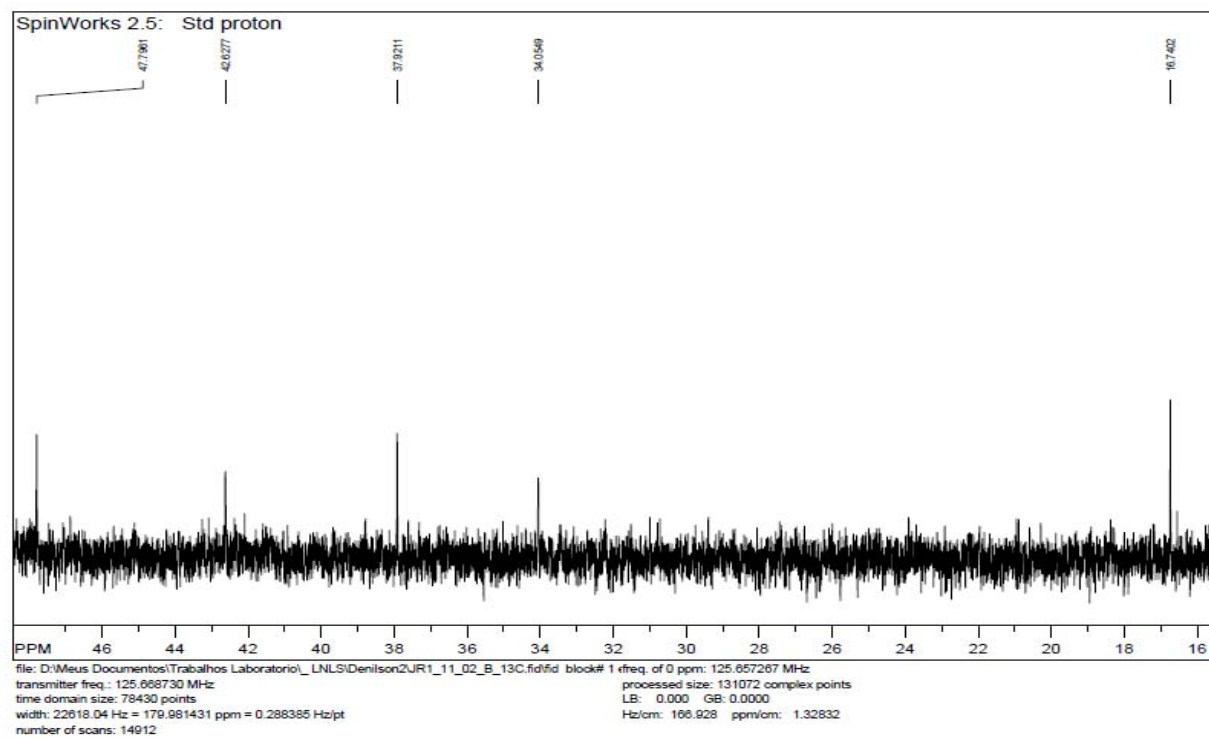
FIGURA 3B Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

FIGURA 4B Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

FIGURA 5B Espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD 126MHz

FIGURA 6B Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD 126MHz

FIGURA 7B Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD 126MHz

FIGURA 8B Expansão do espectro de RMN ^{13}C de Jr3-11-02 em CD_3OD 126MHz

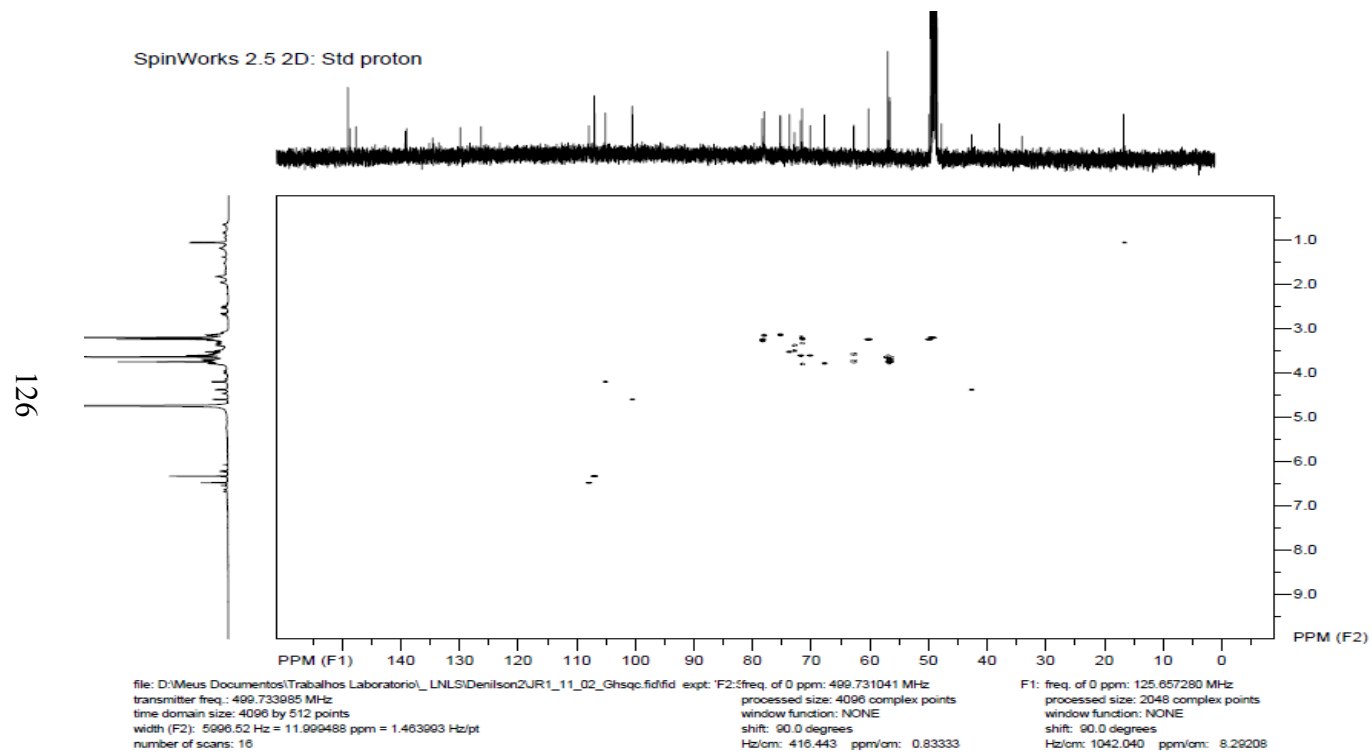


FIGURA 9B Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD3OD

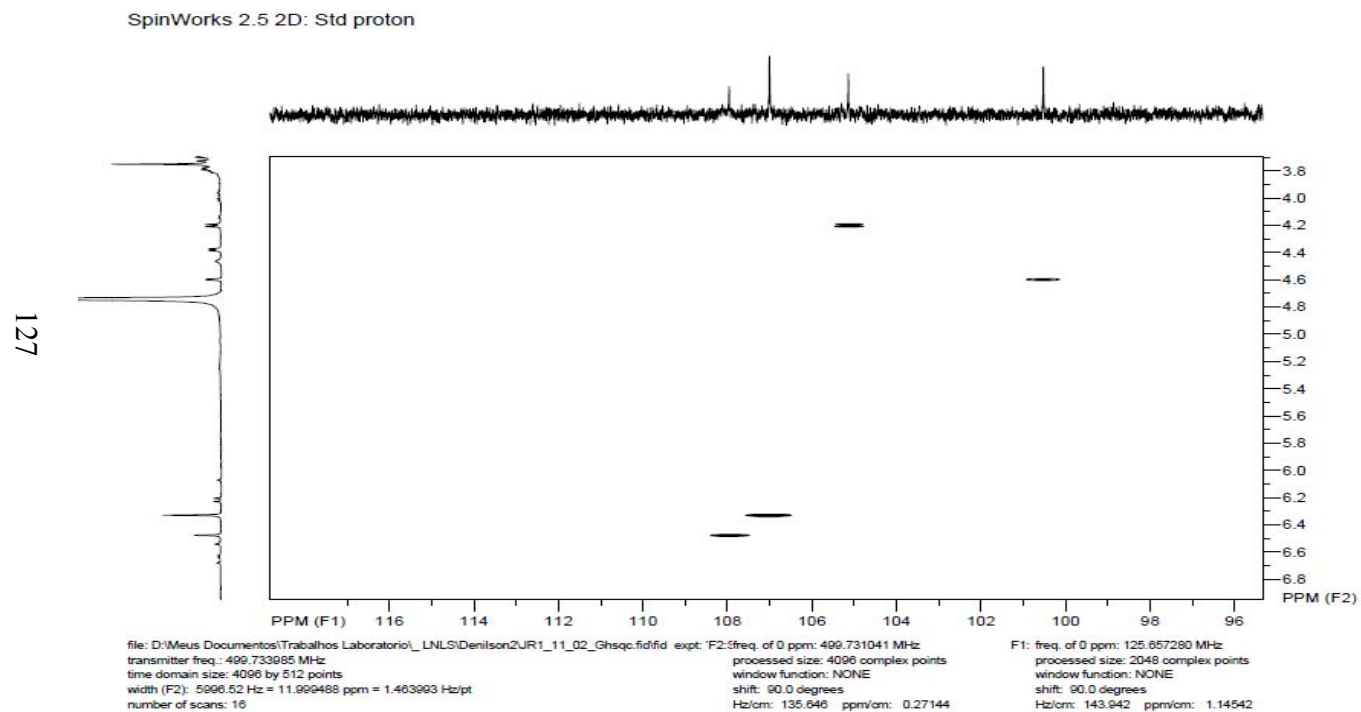


FIGURA 10B Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

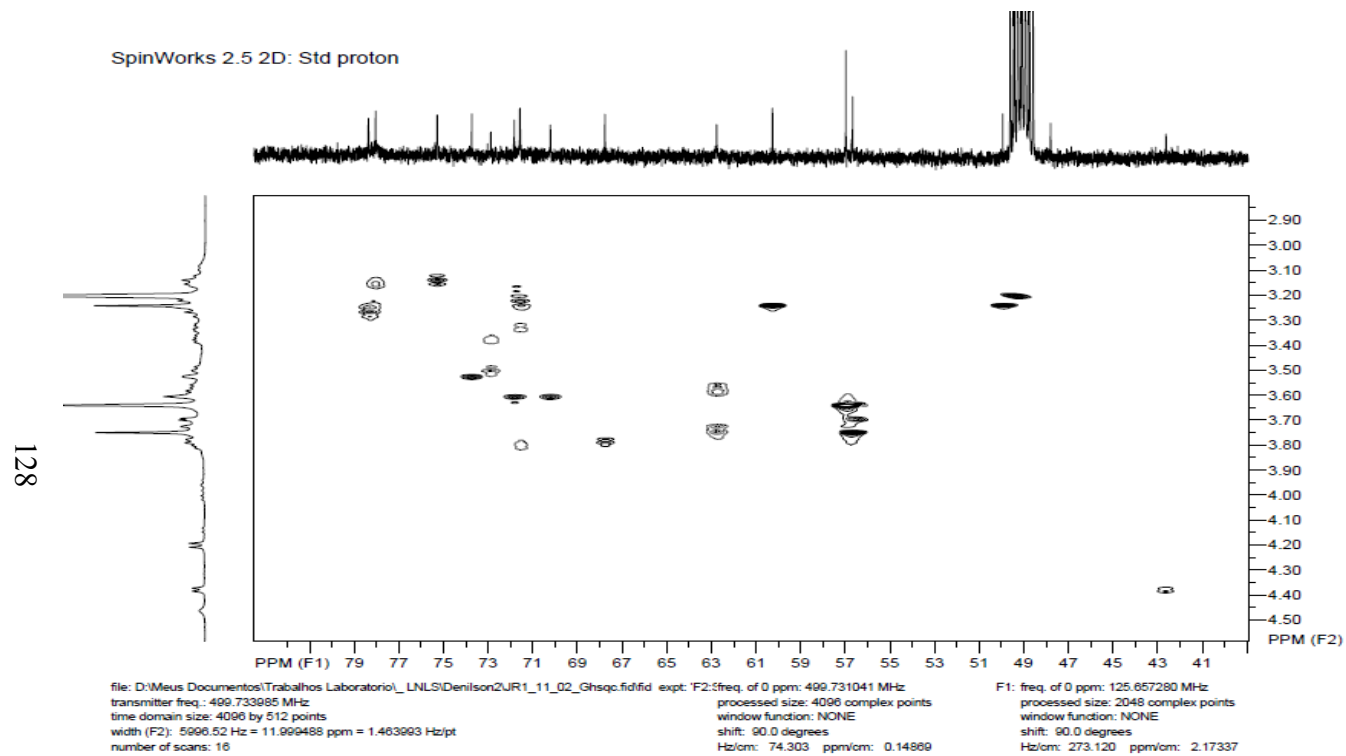


FIGURA 11B Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

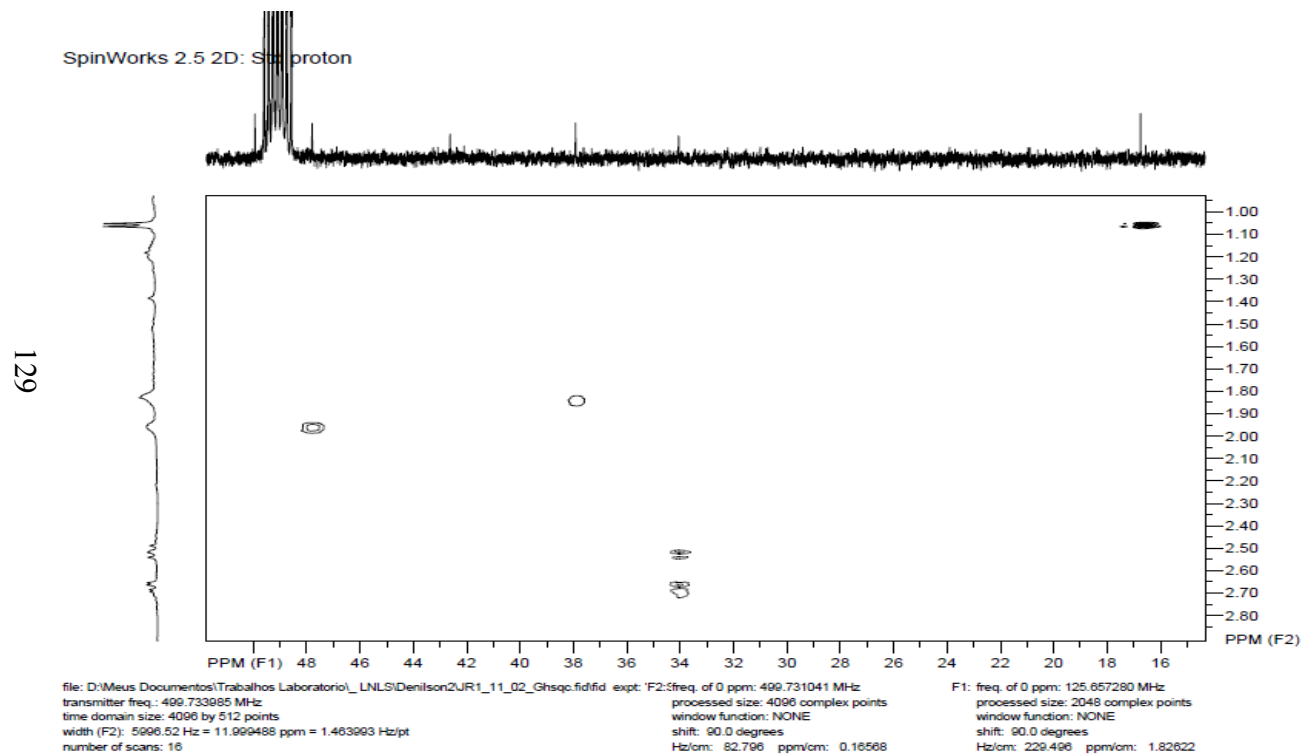


FIGURA 12 Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

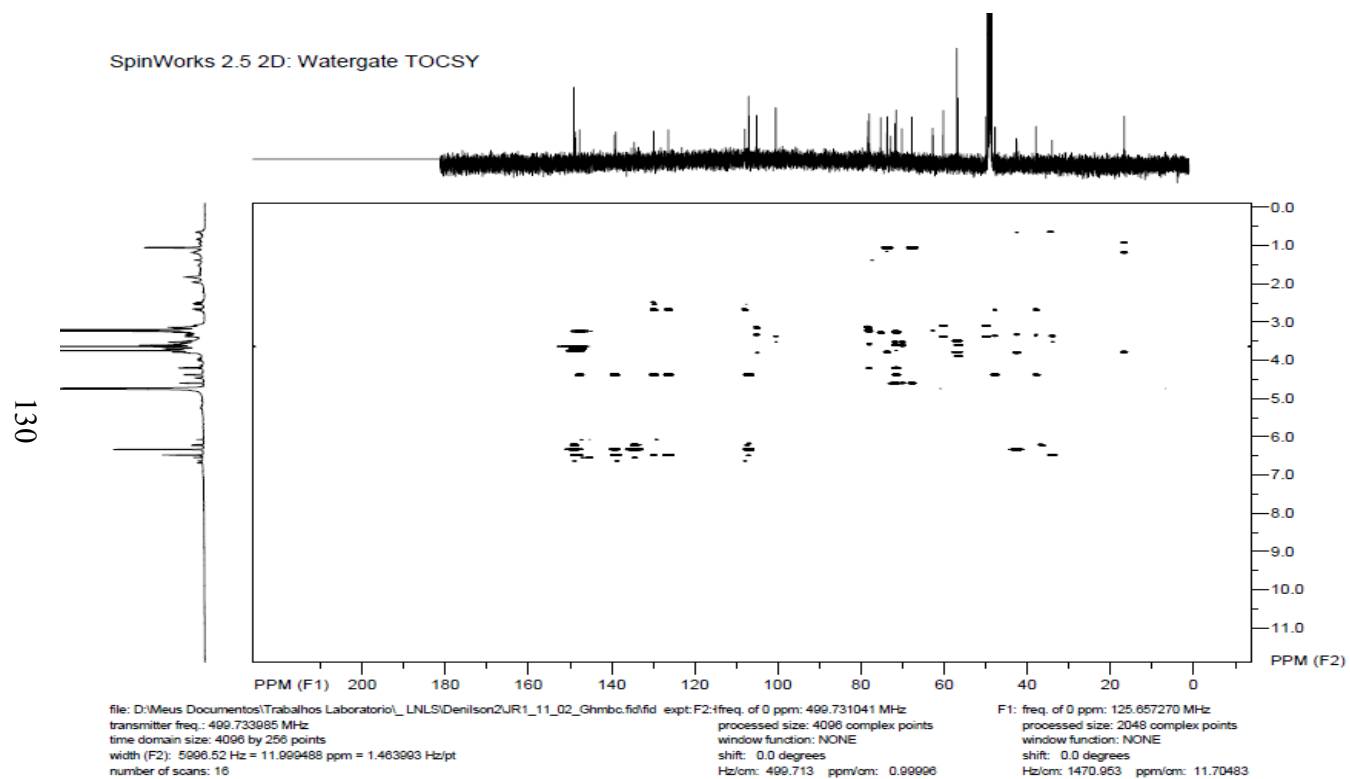


FIGURA 13B Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

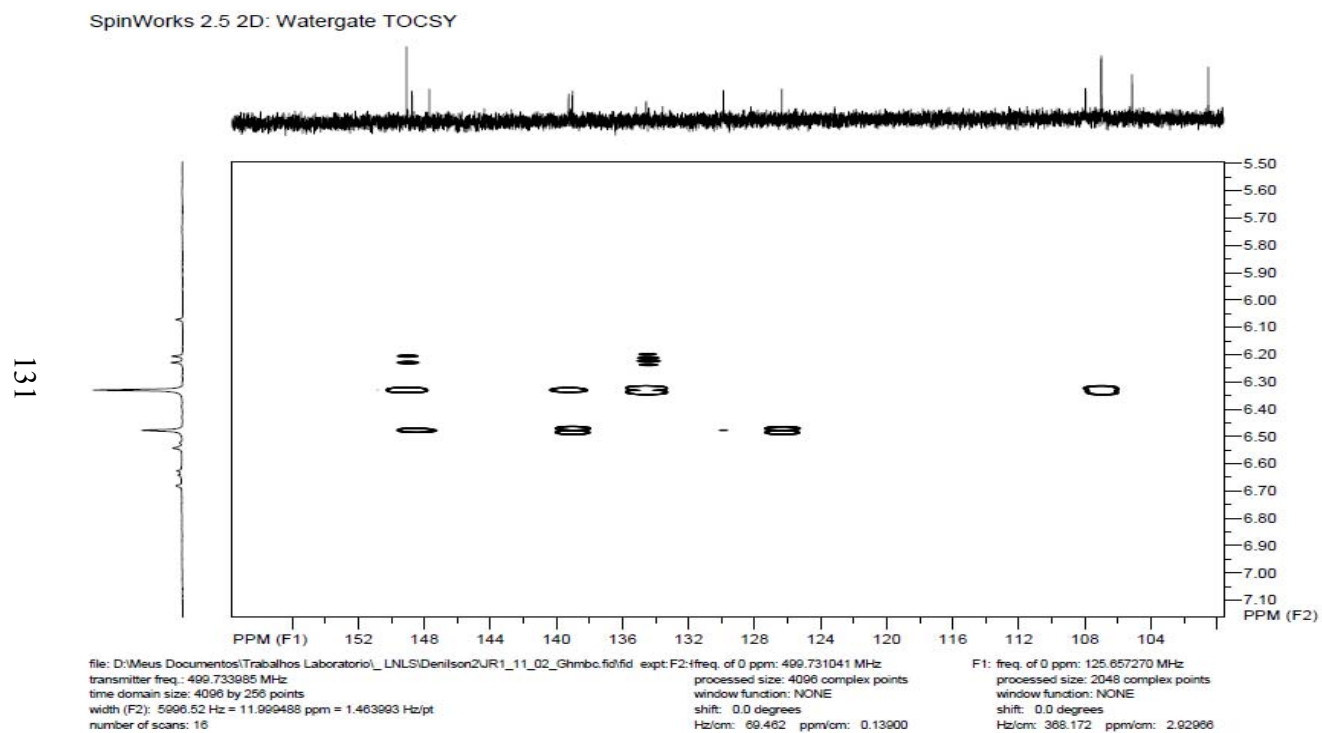


FIGURA 14B Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

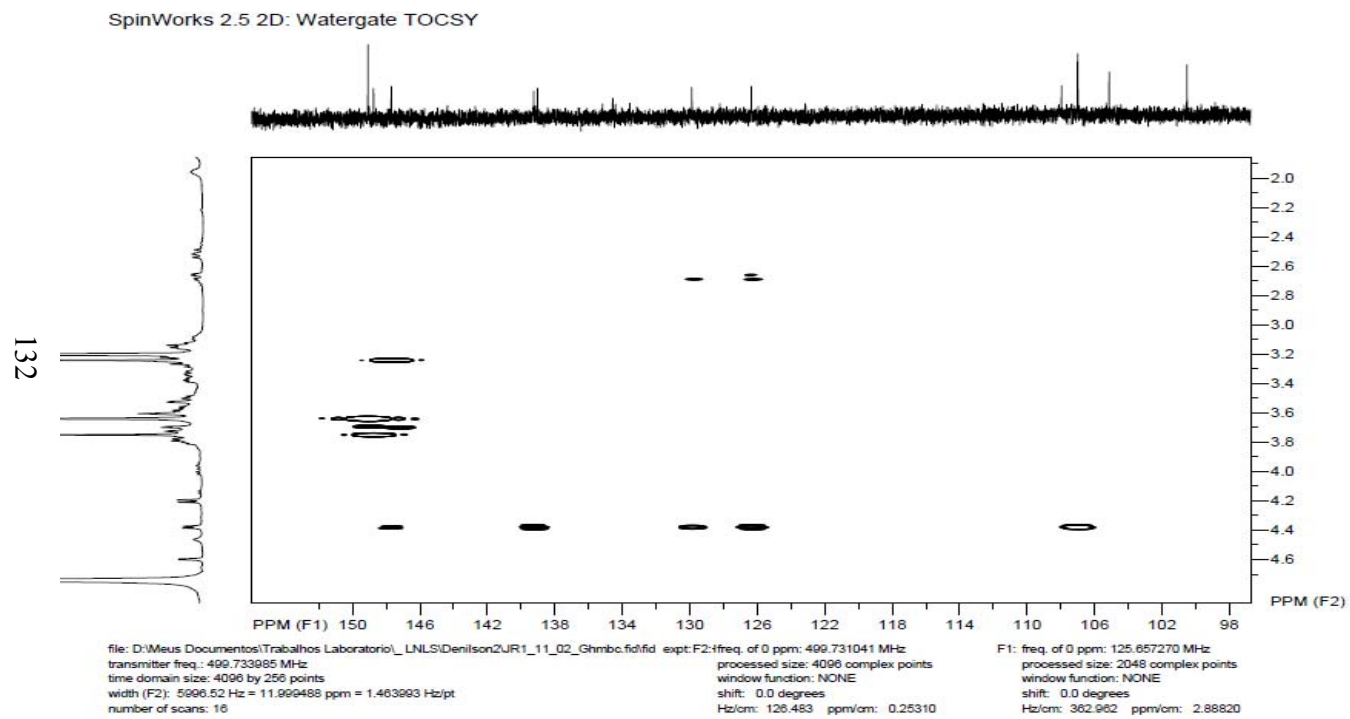


FIGURA 15B Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

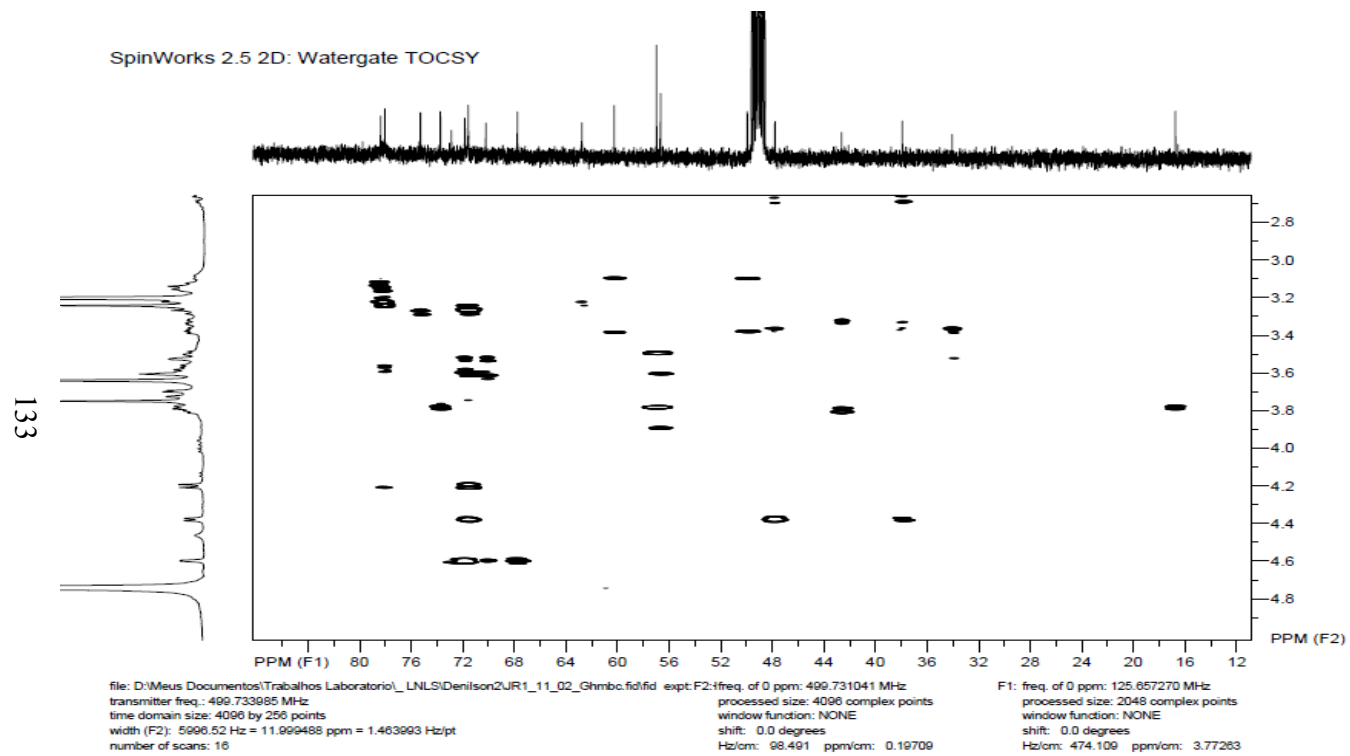


FIGURA 16B Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

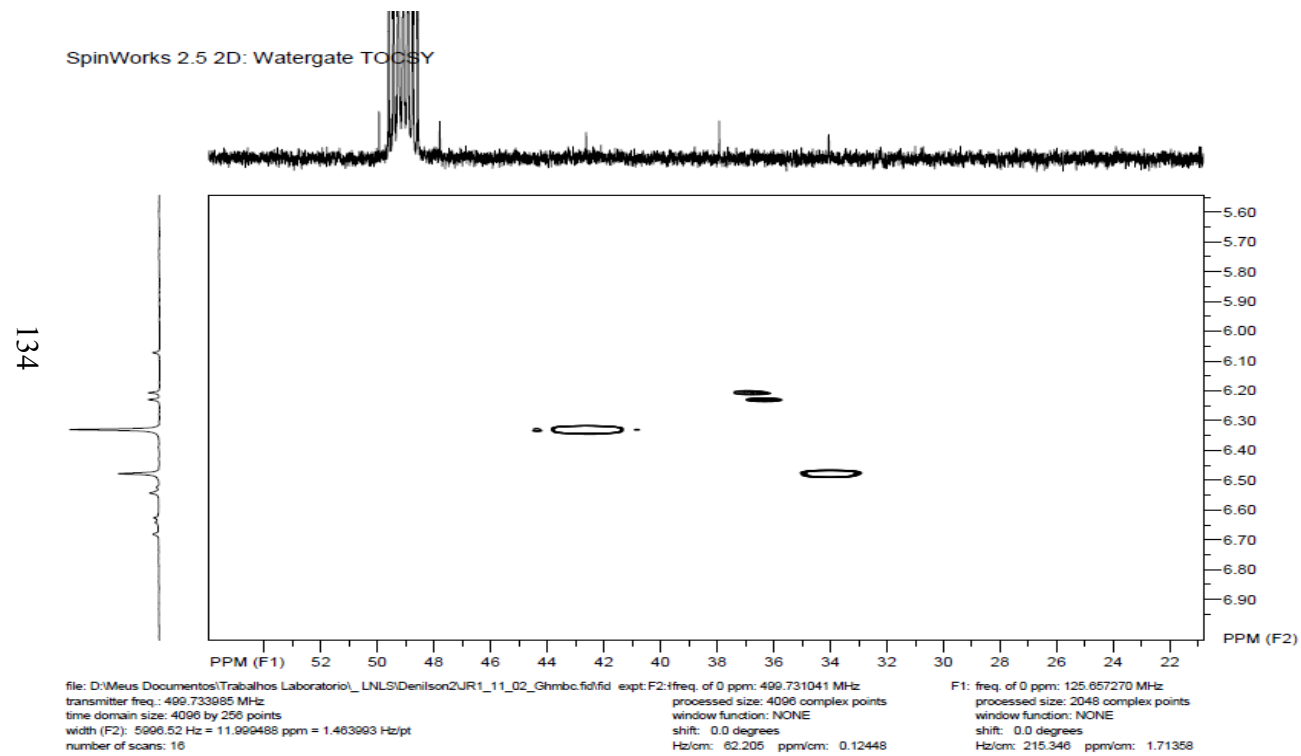


FIGURA 17B Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

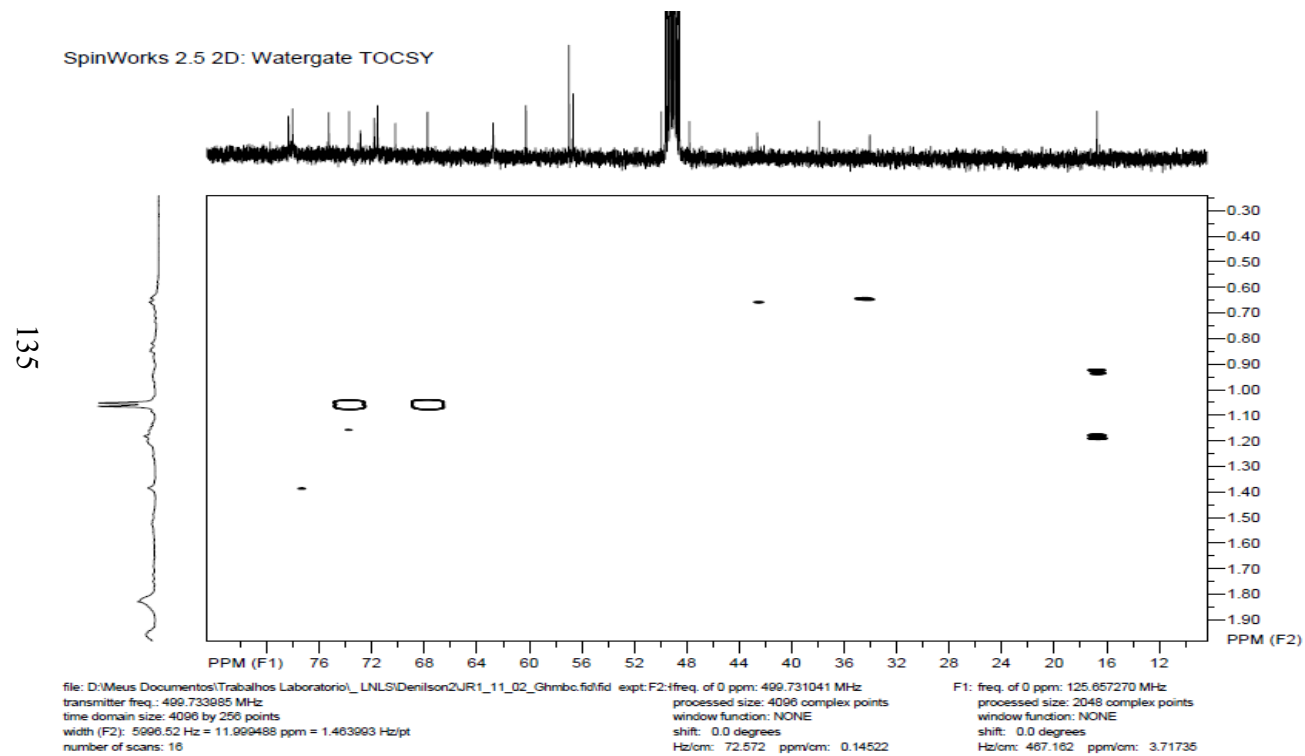


FIGURA 18B Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-02 em CD_3OD

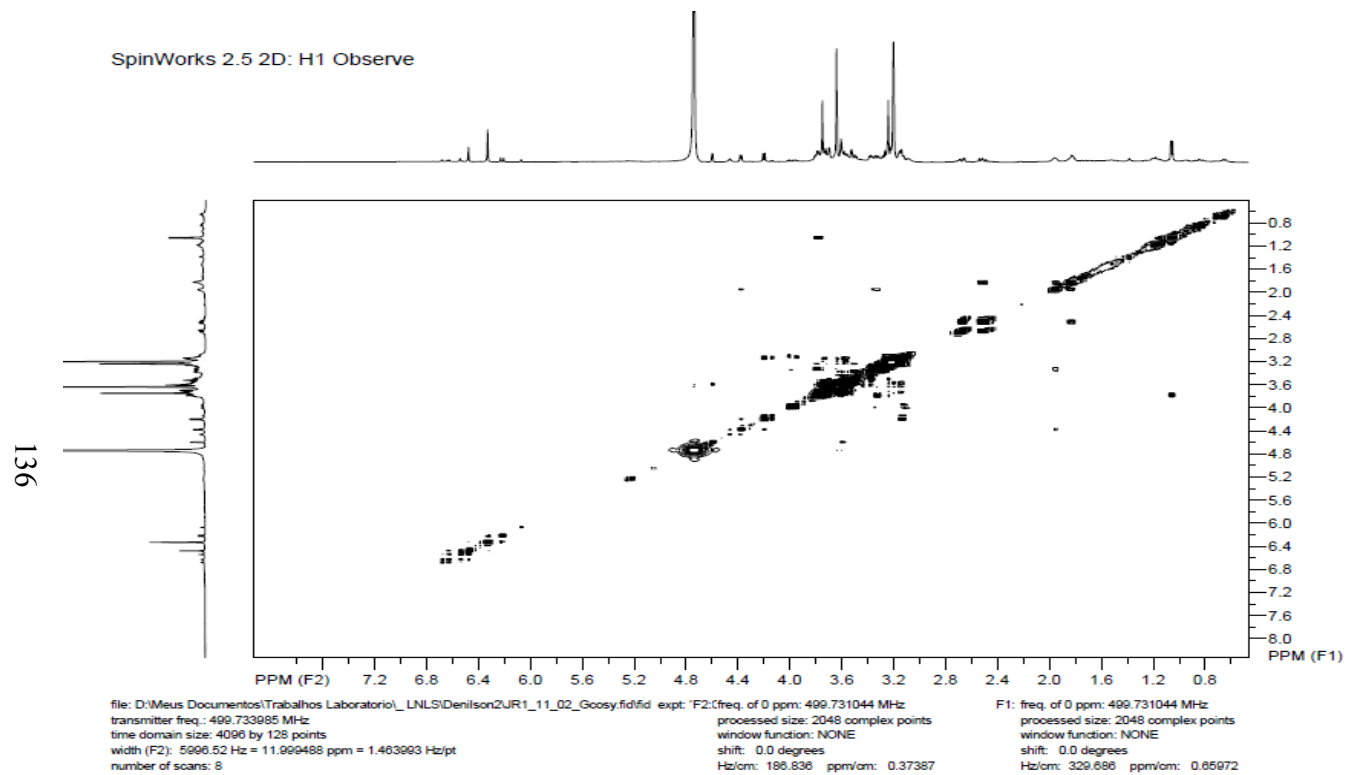


FIGURA 19B Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

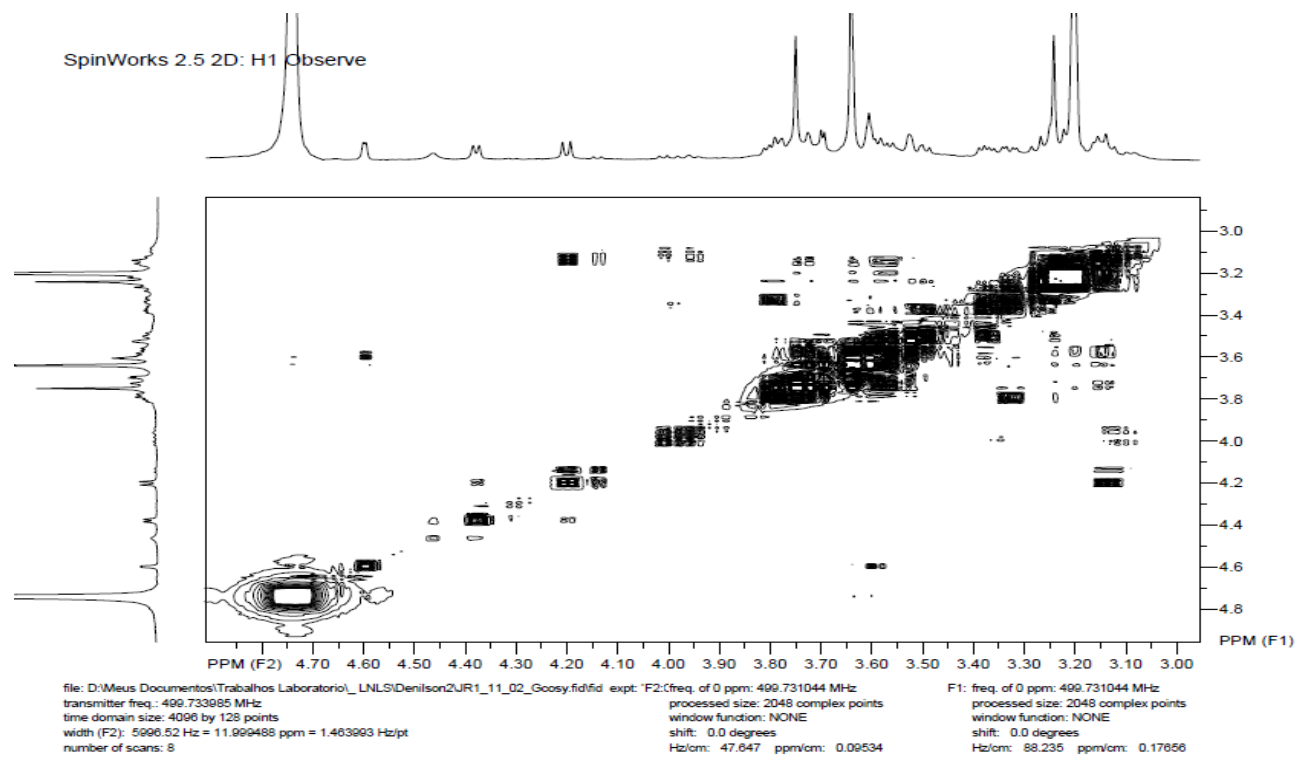


FIGURA 20B Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

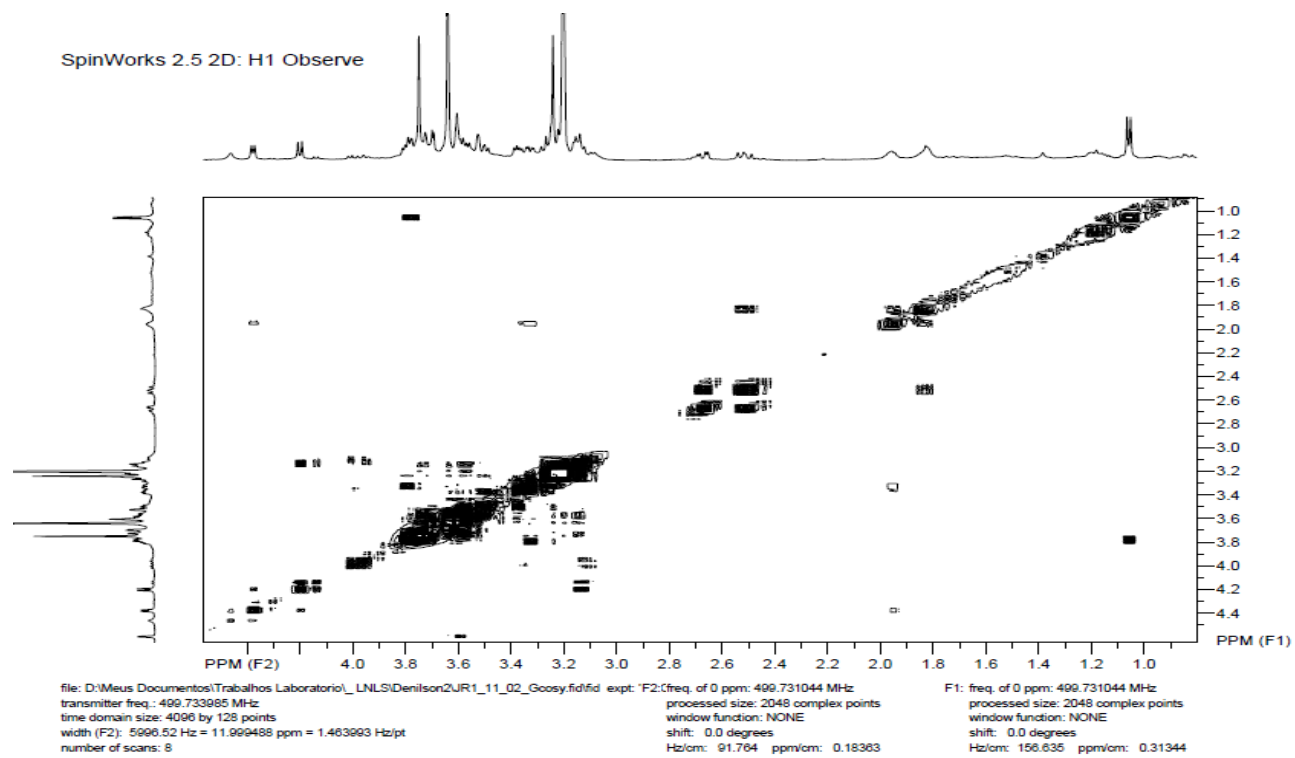
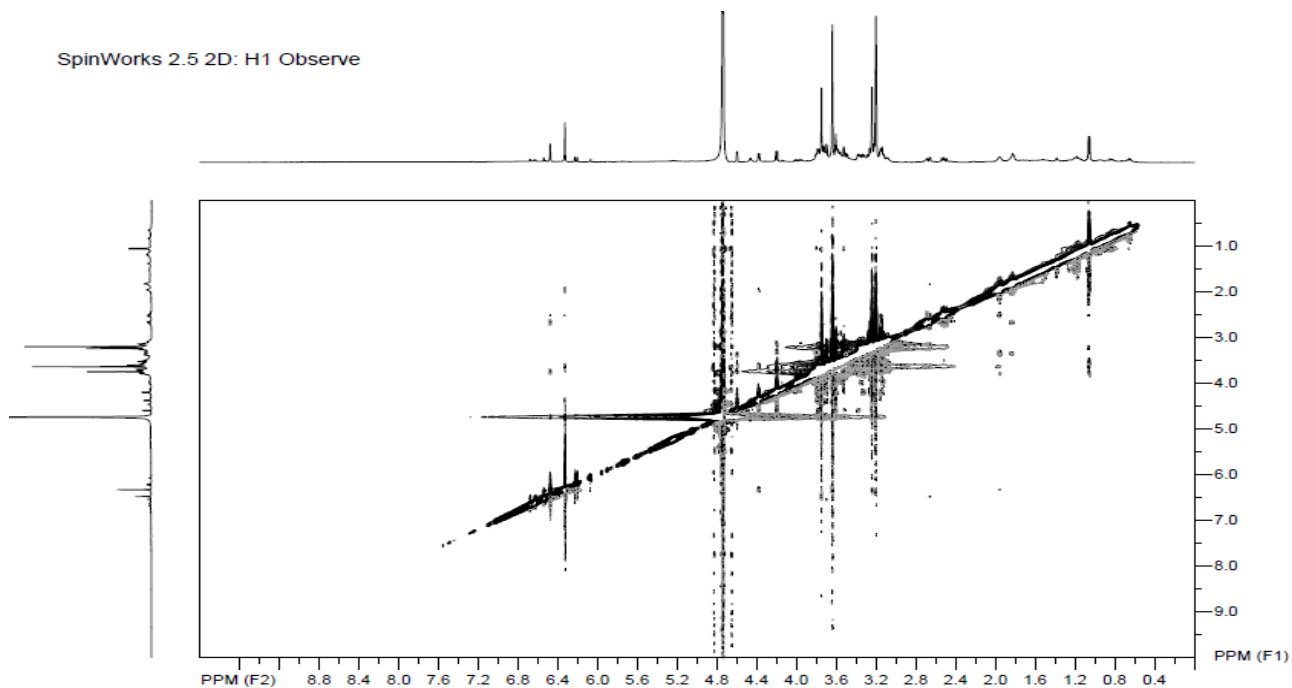


FIGURA 21B Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

SpinWorks 2.5 2D: H1 Observe

139



file: E:_LNLS\Denilson2\JR1_11_02_Roesy.fid\fid exp: "ROESY"
transmitter freq.: 499.733985 MHz
time domain size: 4096 by 256 points
width (F2): 5996.52 Hz = 11.999488 ppm = 1.463993 Hz/pt
number of scans: 8

F2: freq. of 0 ppm: 499.731043 MHz
processed size: 2048 complex points
window function: Sine Squared
shift: 90.0 degrees
Hz/cm: 243.771 ppm/cm: 0.48780

F1: freq. of 0 ppm: 499.731041 MHz
processed size: 2048 complex points
window function: Sine Squared
shift: 90.0 degrees
Hz/cm: 416.443 ppm/cm: 0.83333

FIGURA 22B Correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz.

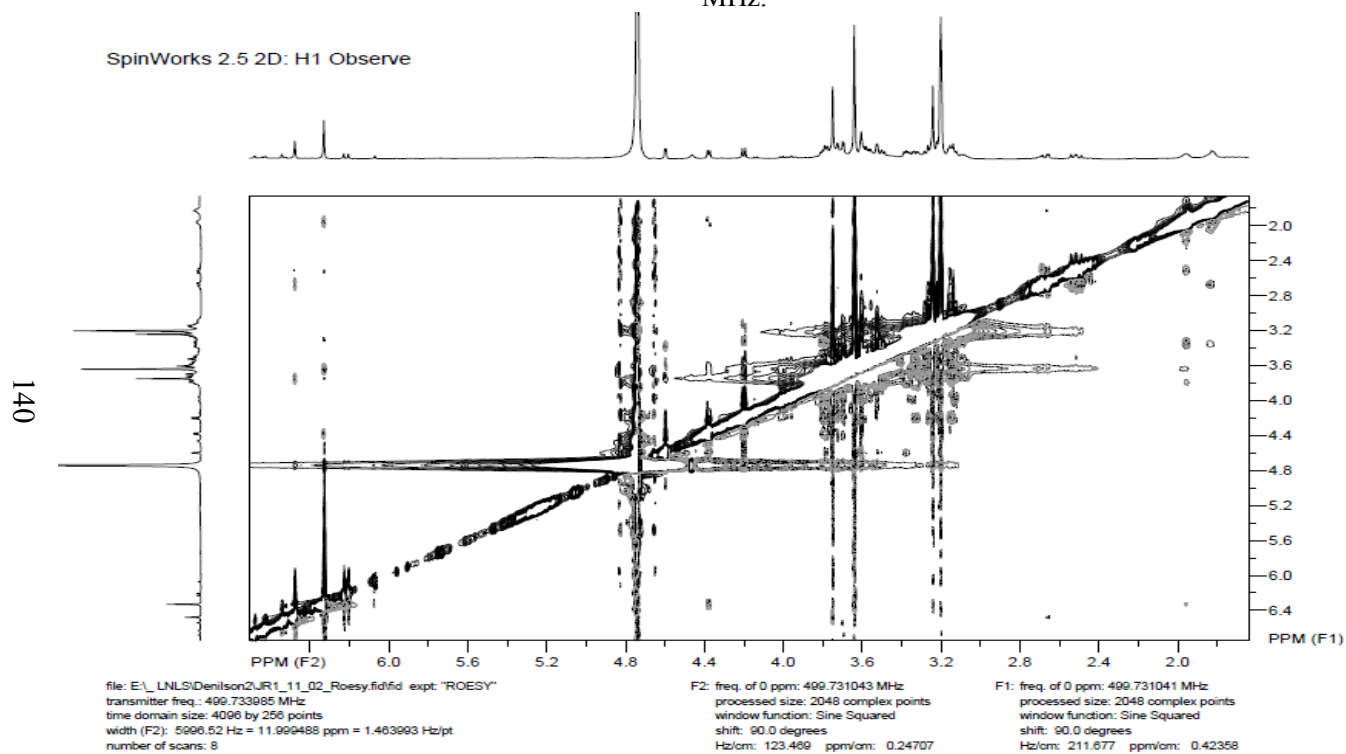


FIGURA 23B Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz.

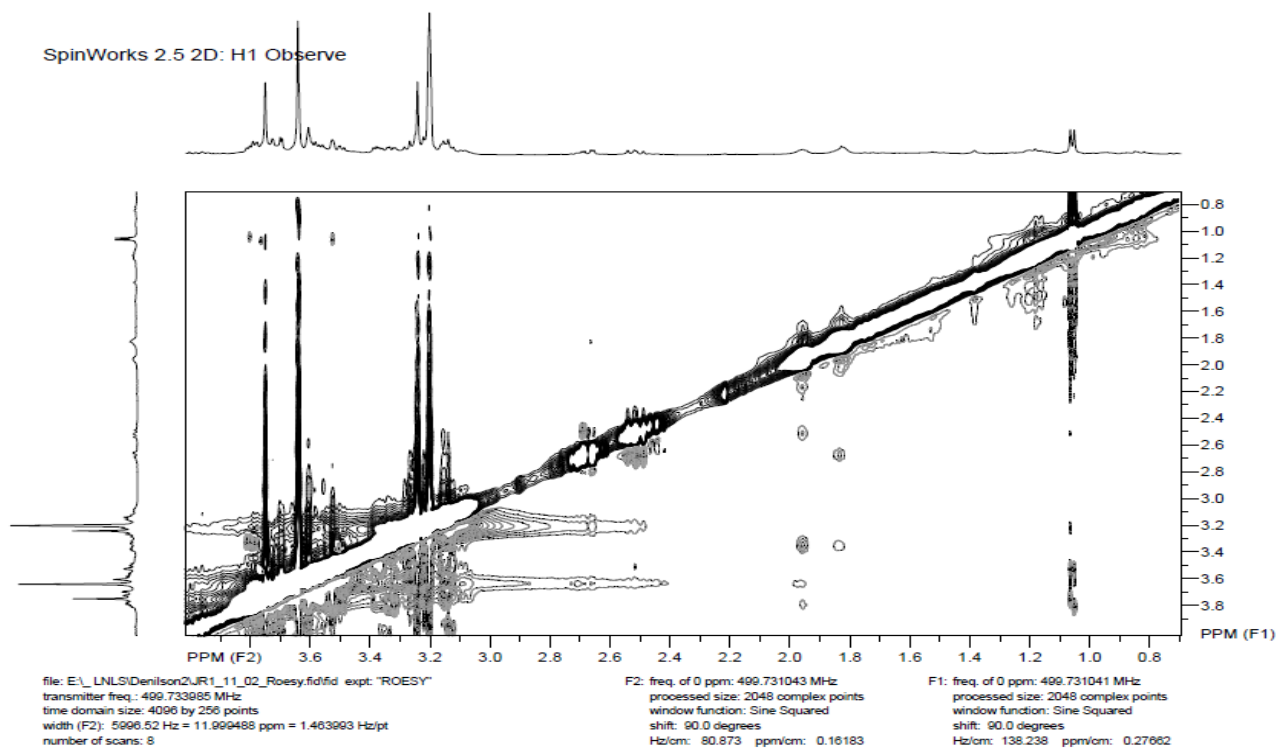
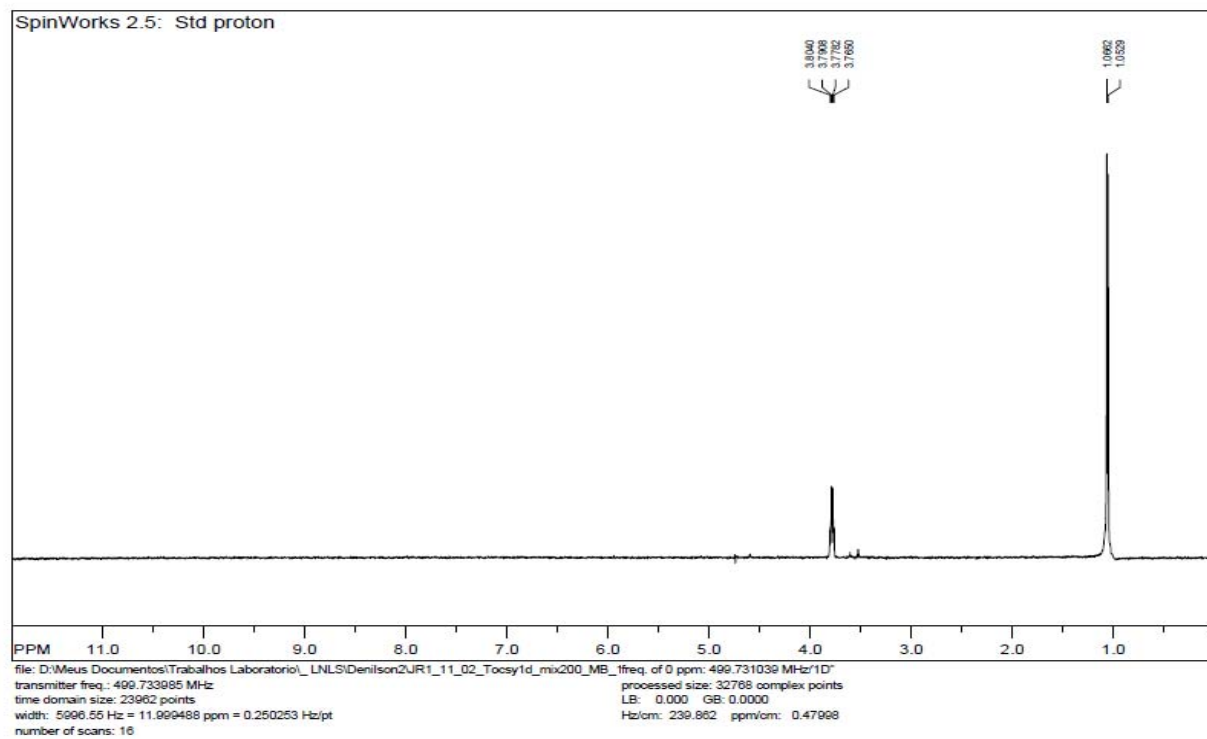


FIGURA 24B Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-11-02 em CD_3OD 500 MHz

FIGURA 25B TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 1,06)

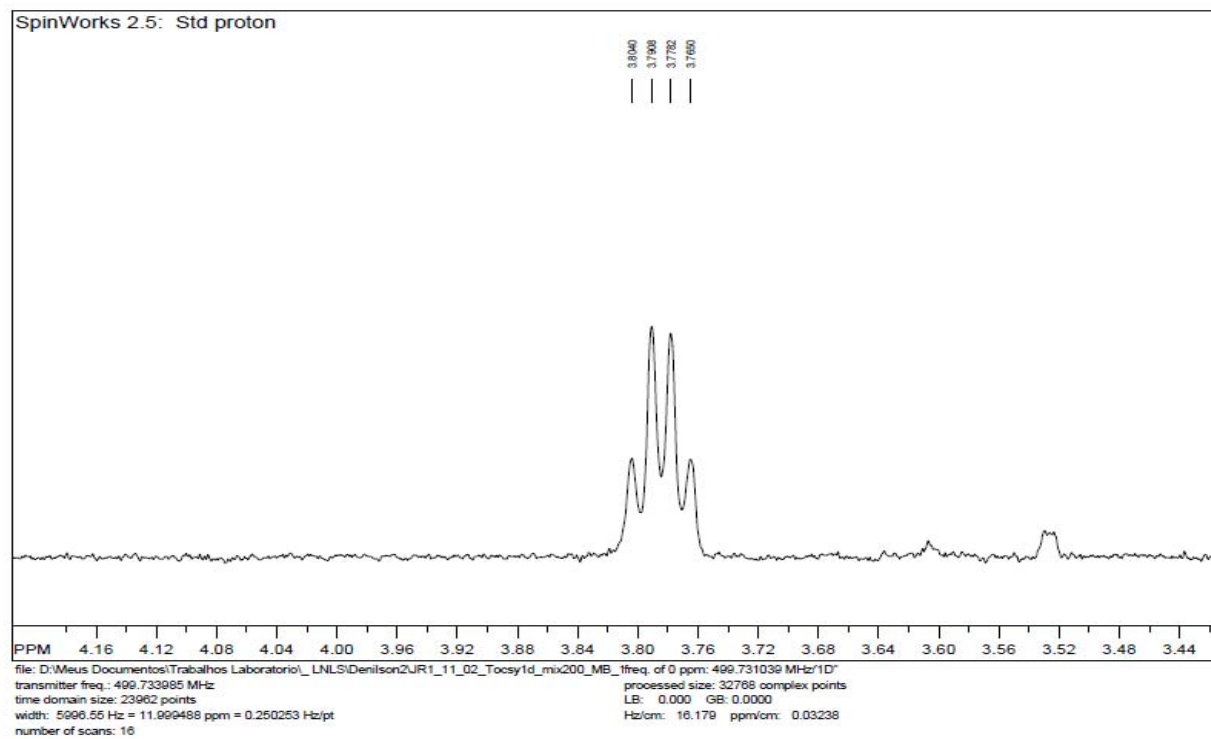


FIGURA 26B Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 1,06)

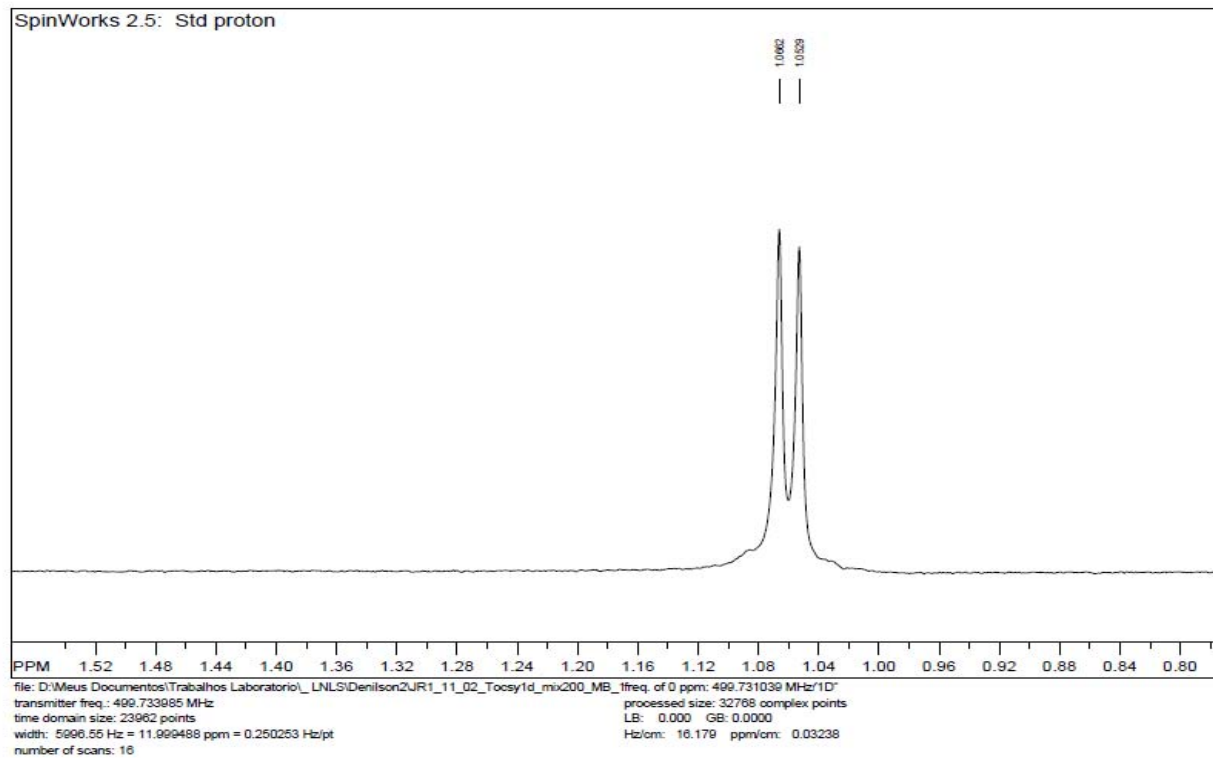
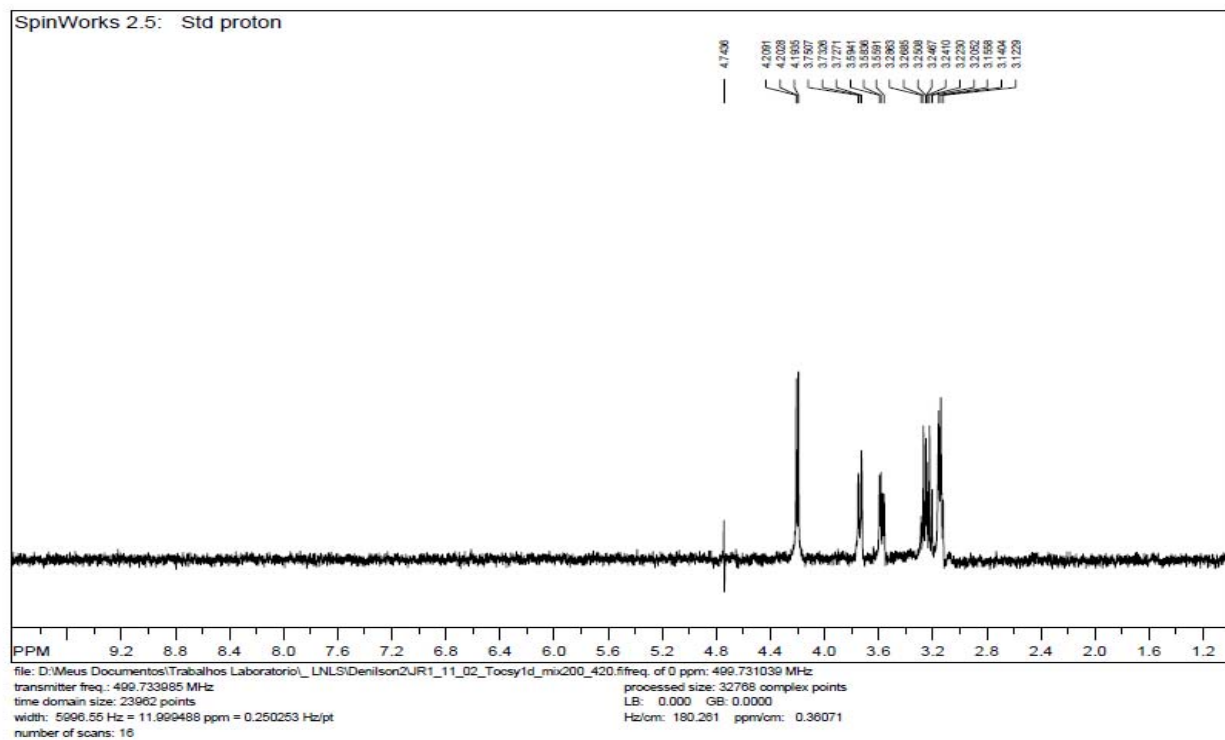


FIGURA 27B Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 1,06)

FIGURA 28B TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,20)

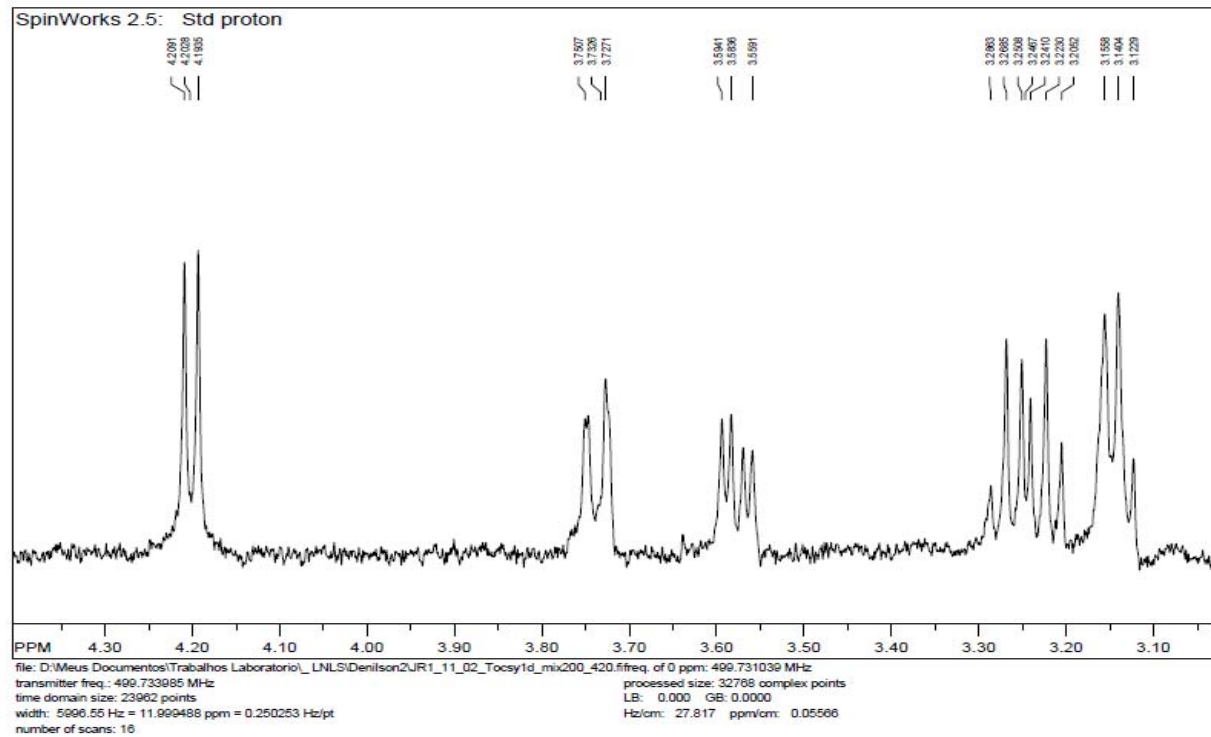
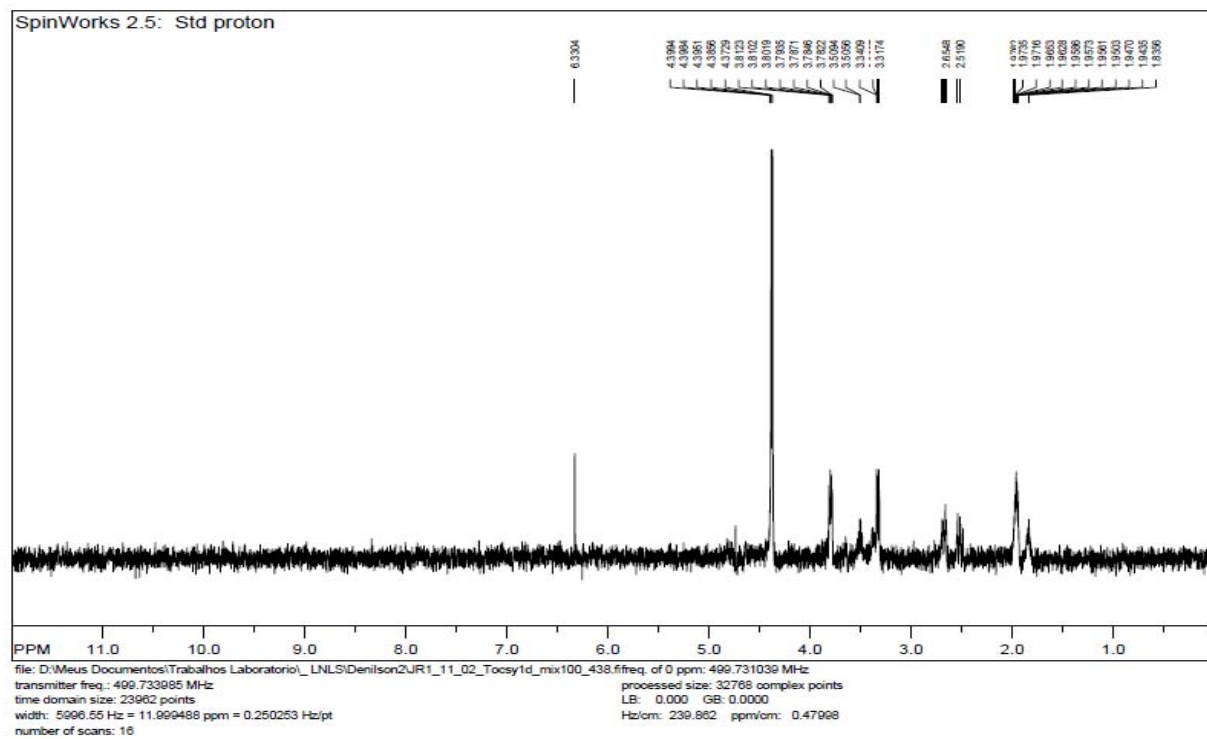


FIGURA 29B Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,20)

FIGURA 30B TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,38)

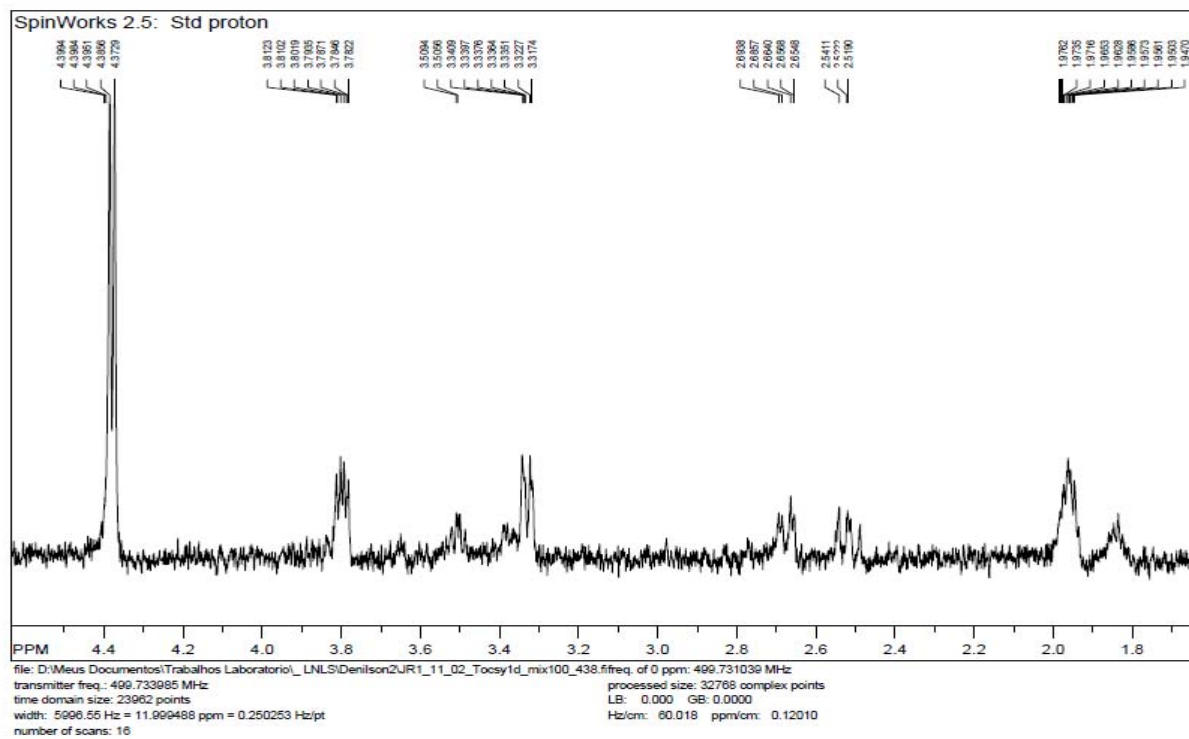
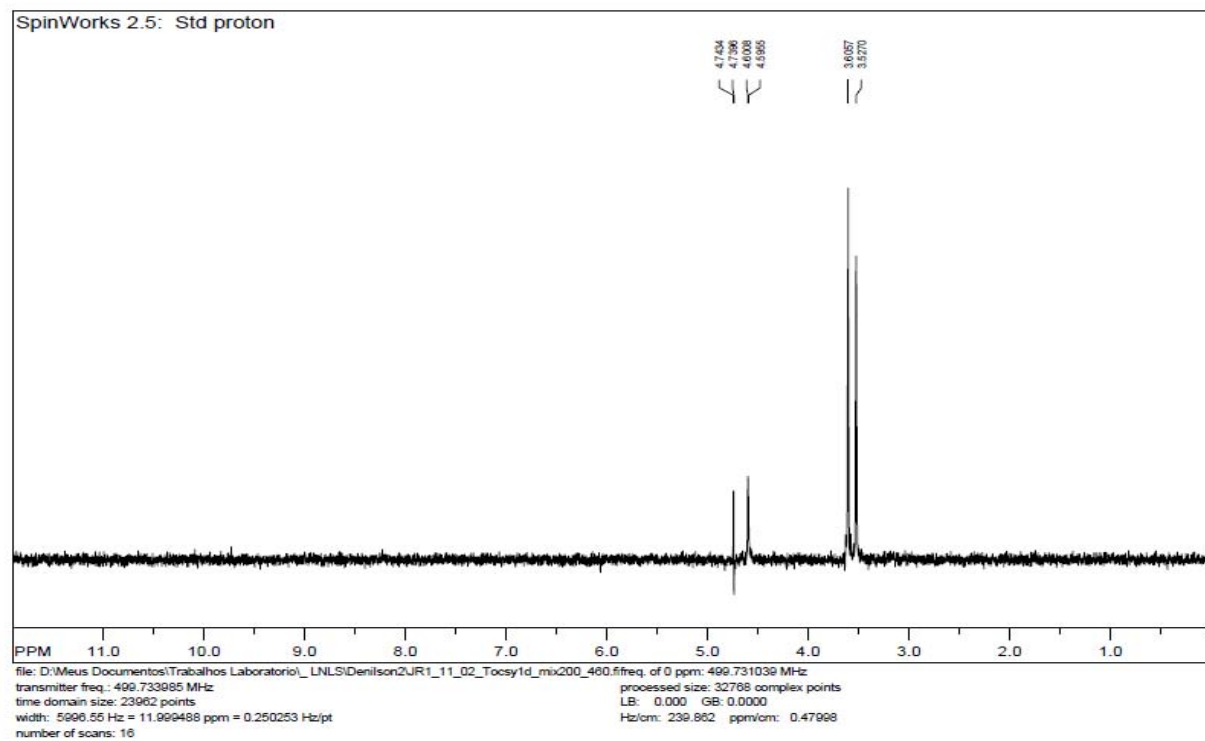


FIGURA 31B Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,38)

FIGURA 32B TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,60)

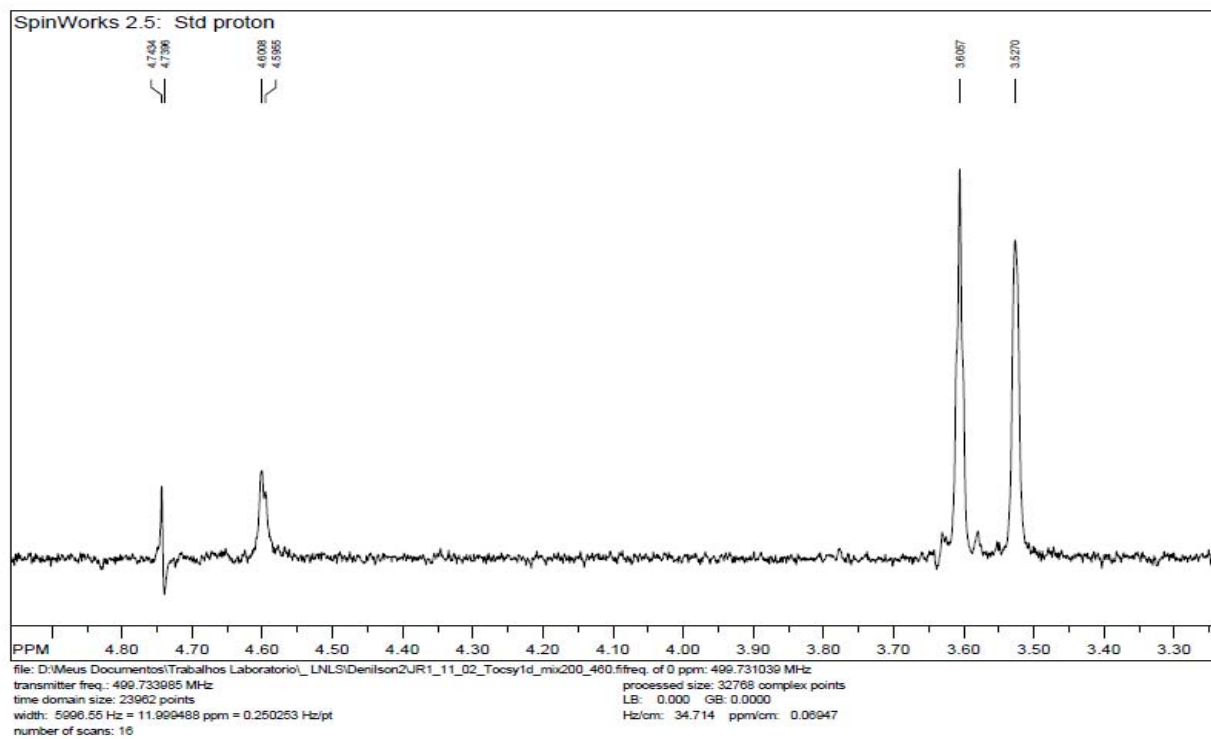
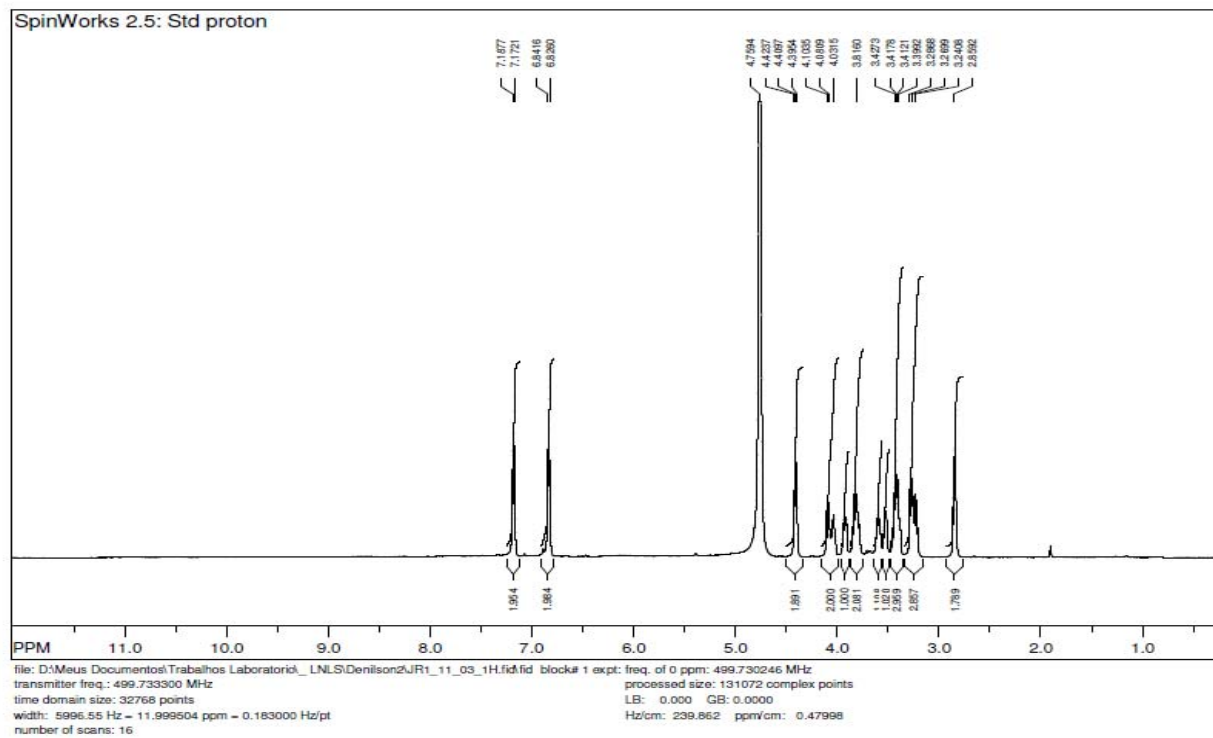
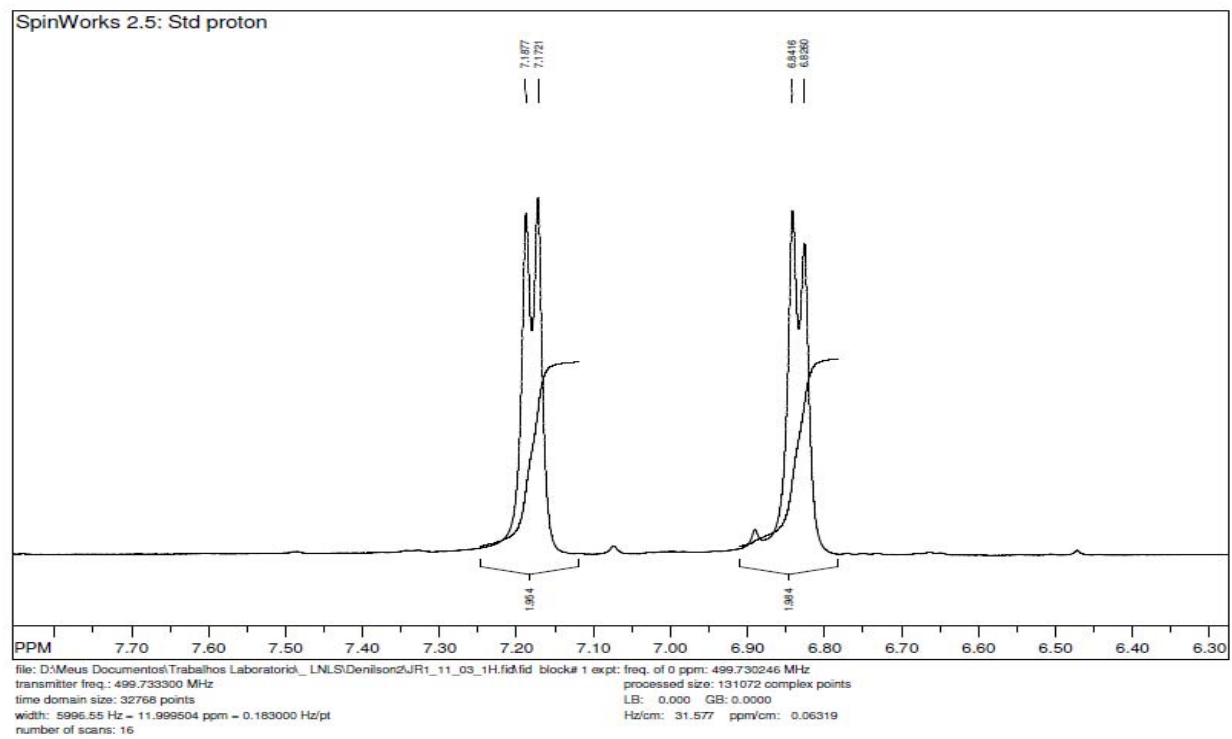


FIGURA 33B Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-02 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,60)

ANEXO C		Página
FIGURA 1C	Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz.....	153
FIGURA 2C	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz.....	154
FIGURA 3C	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz.....	155
FIGURA 4C	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	156
FIGURA 5C	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	157
FIGURA 6C	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	158
FIGURA 7C	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	159
FIGURA 8C	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	160
FIGURA 9C	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O .	161
FIGURA 10C	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	162
FIGURA 11C	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	163
FIGURA 12C	Expansão da correlação heteronuclear a longa	

	distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	164
FIGURA 13C	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O	165
FIGURA 14C	Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz.....	166
FIGURA 15C	Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz.....	167
FIGURA 16C	Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz.....	168
FIGURA 17C	TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,93).....	169
FIGURA 18C	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,93).....	170
FIGURA 19C	TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,09).....	171
FIGURA 20C	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,09).....	172
FIGURA 21C	TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,41).....	173
FIGURA 22C	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,41).....	174

FIGURA 1C Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz

FIGURA 2C Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz

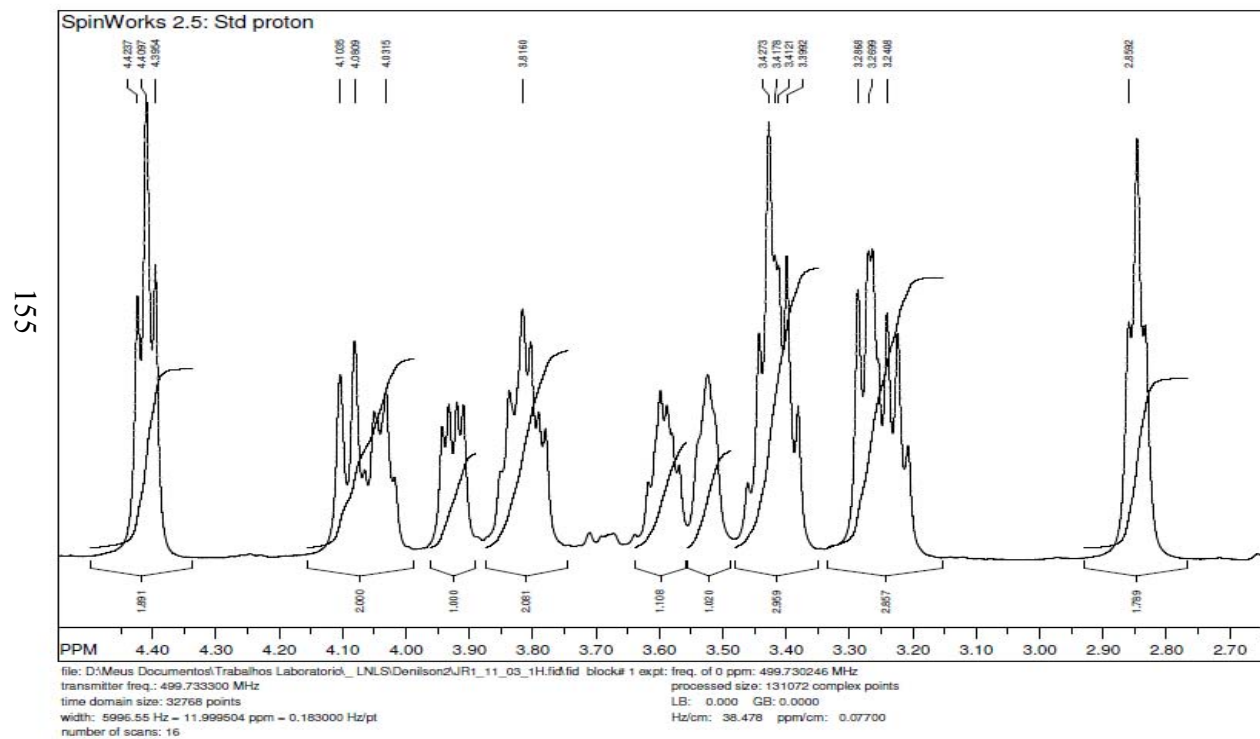


FIGURA 3C Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-03 em D_2O , 500MHz

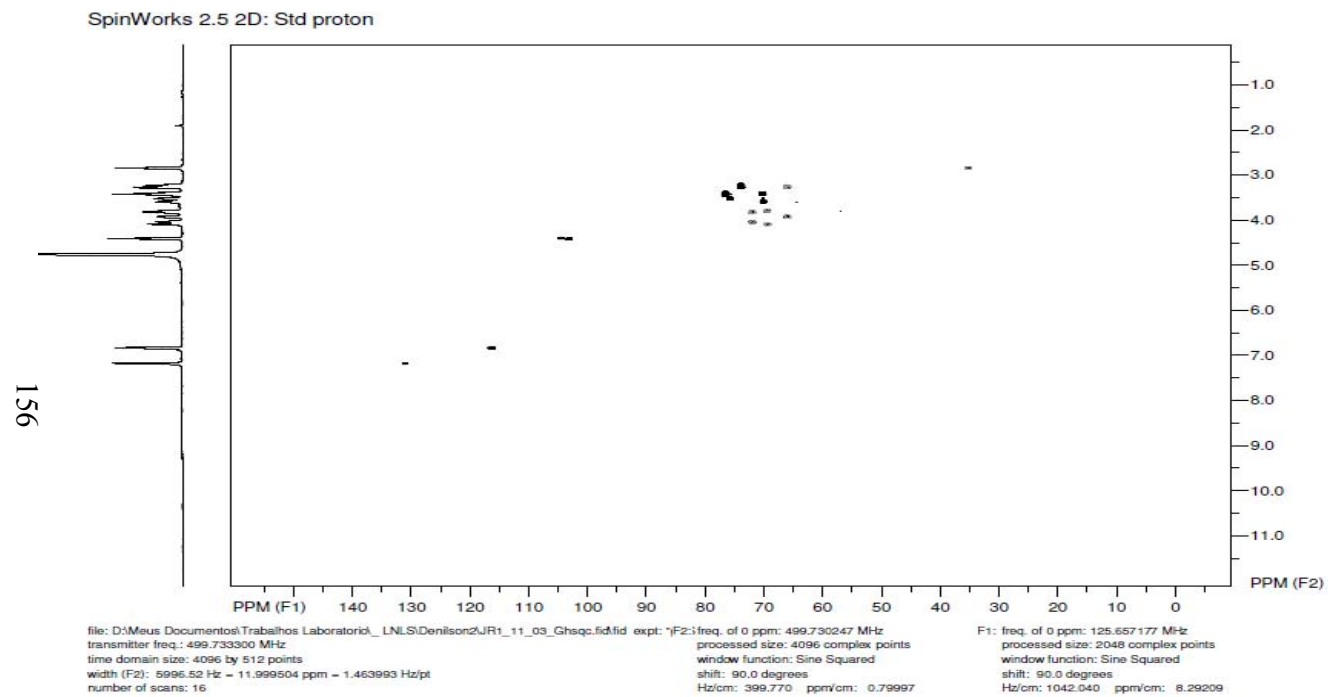


FIGURA 4C Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

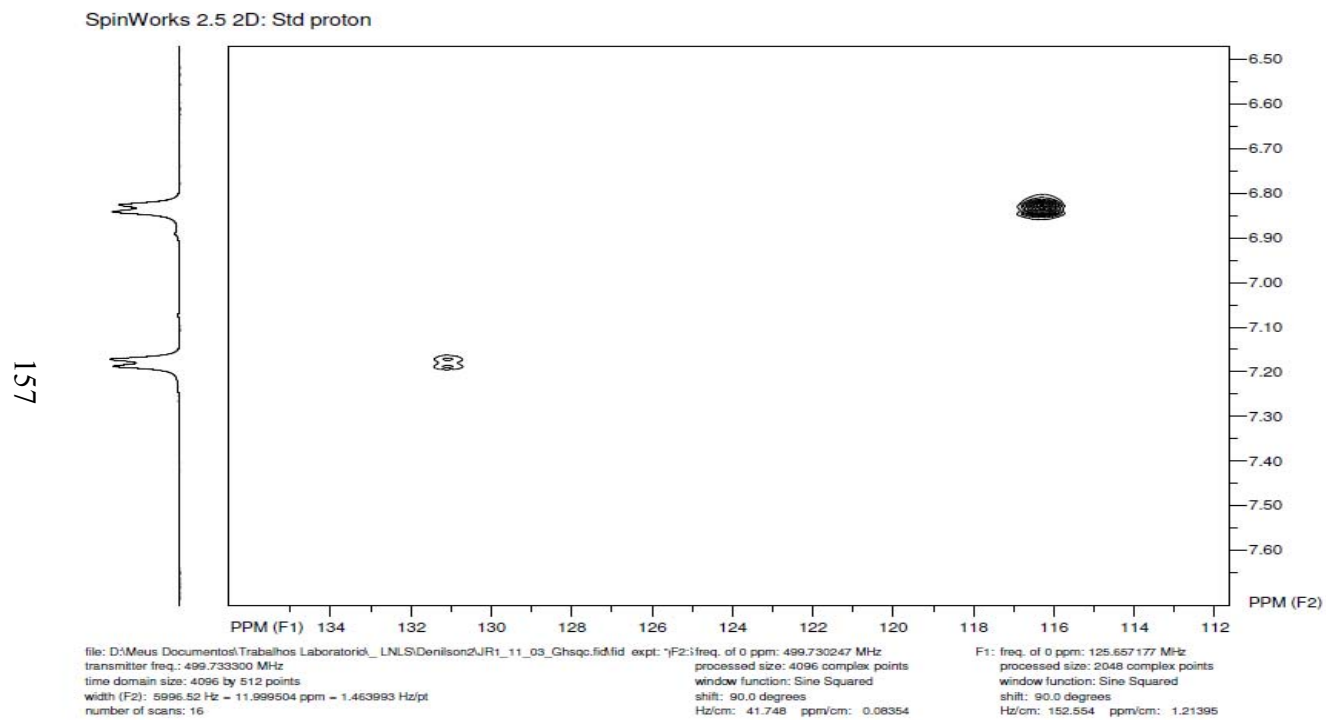


FIGURA 5C Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

158

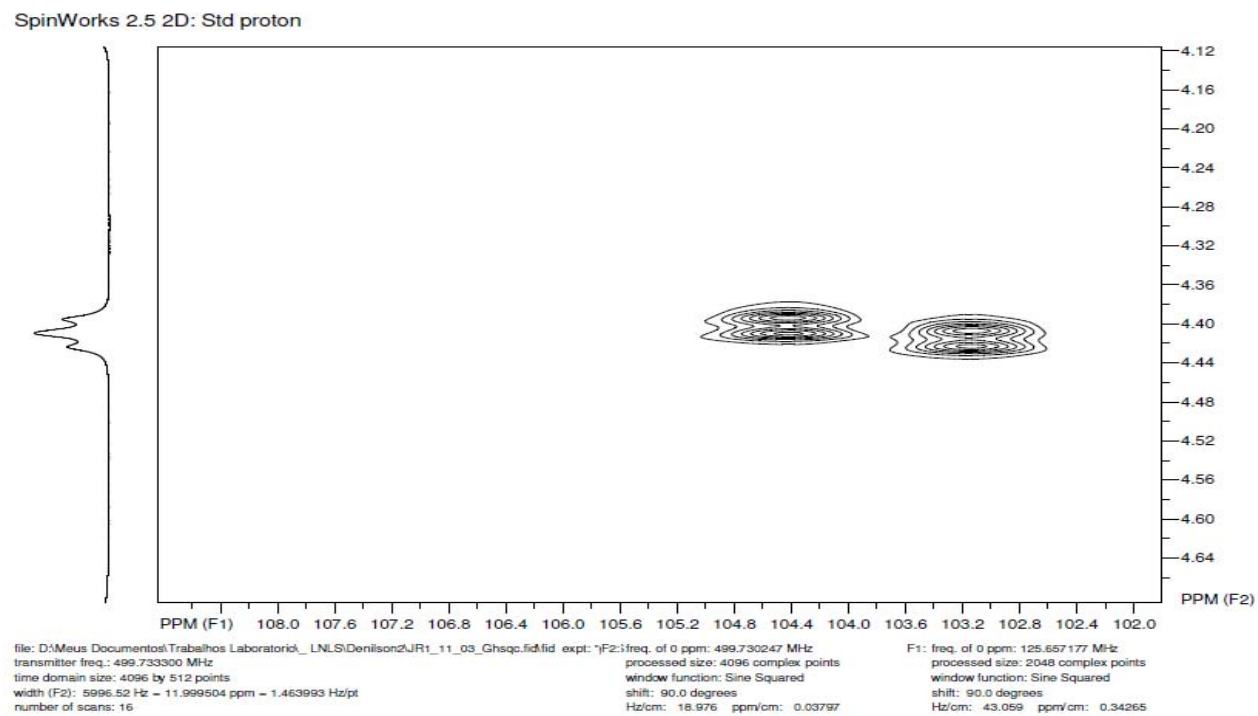


FIGURA 6C Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

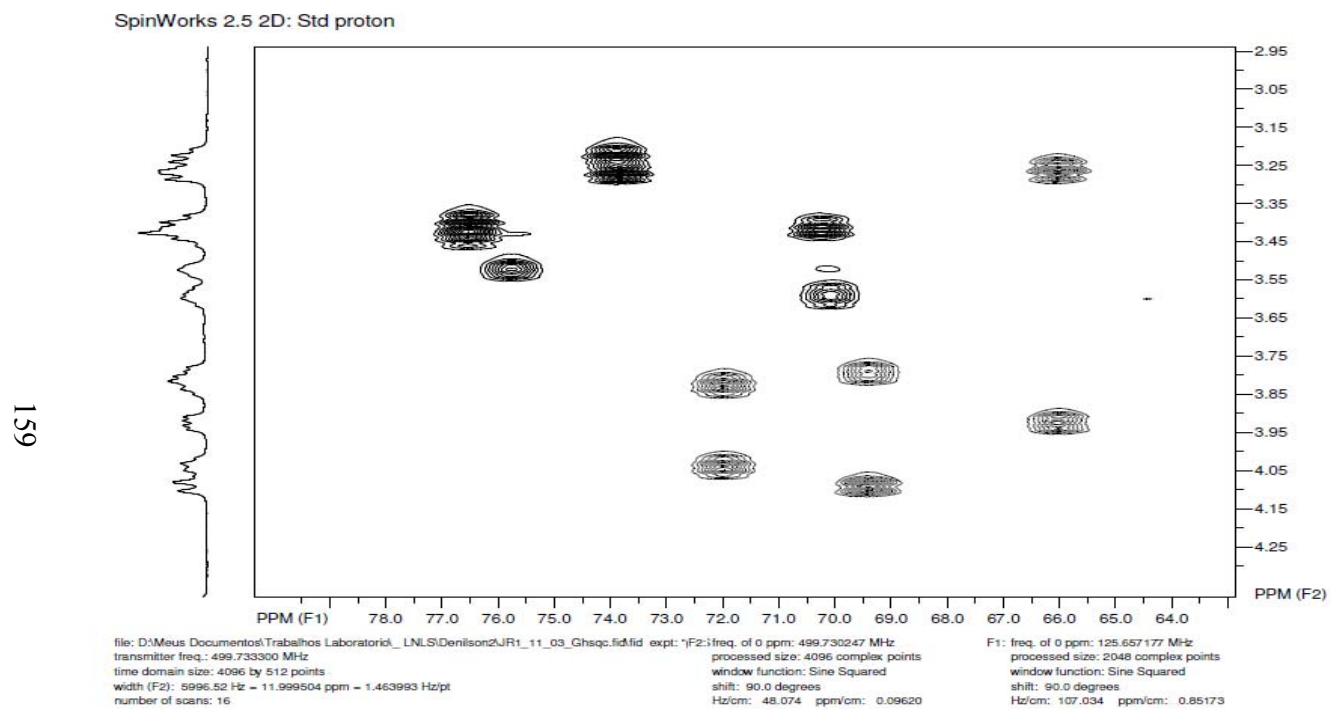


FIGURA 7C Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

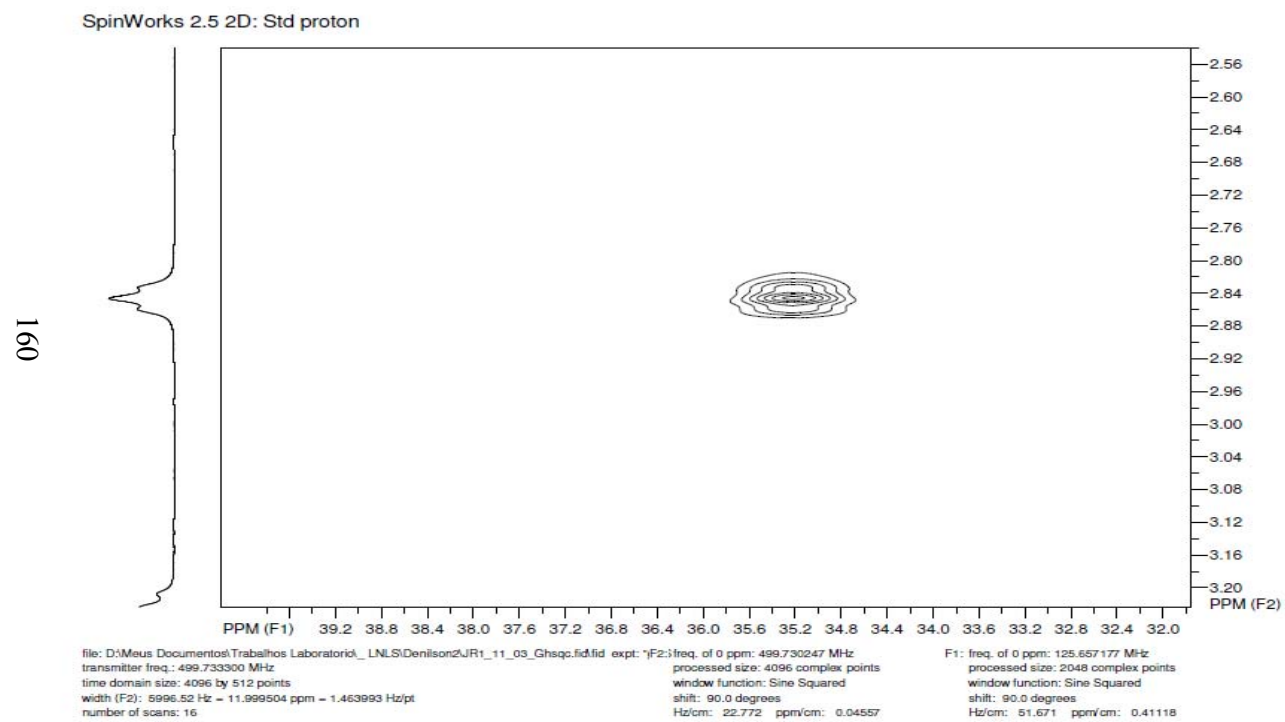


FIGURA 8C Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

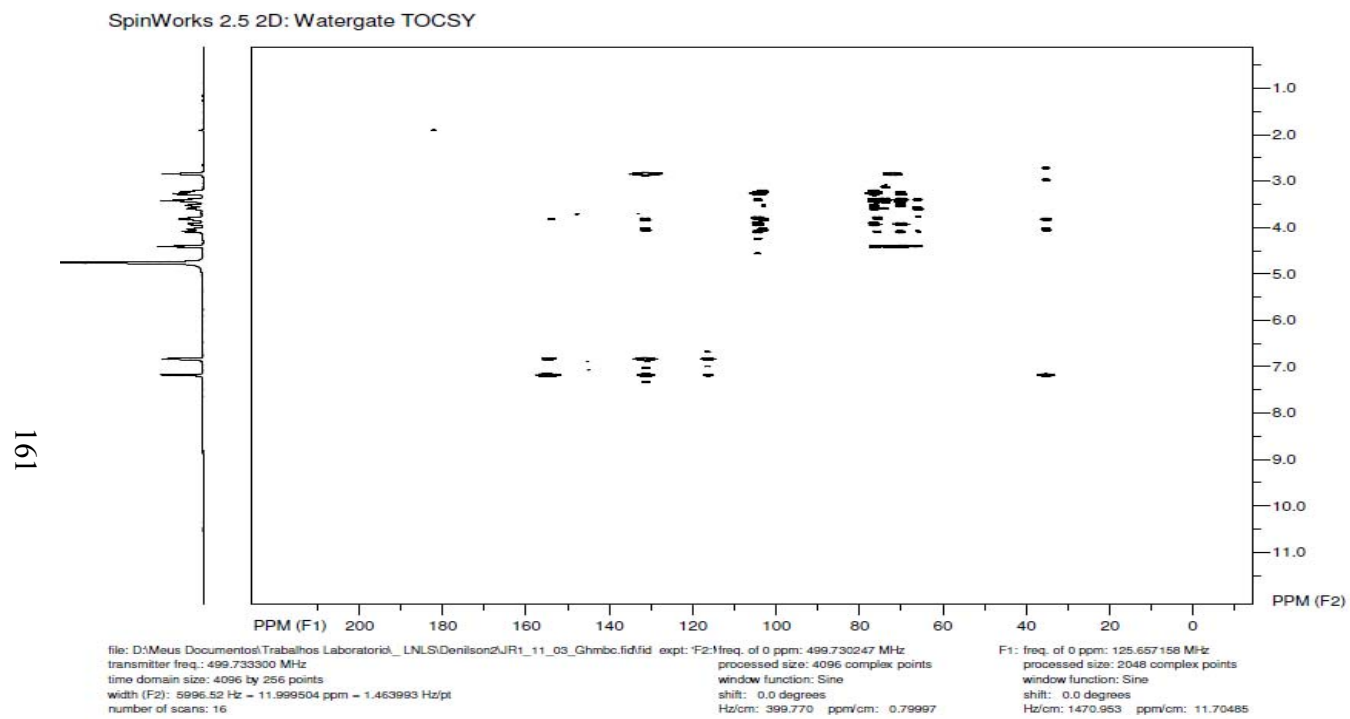


FIGURA 9C Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

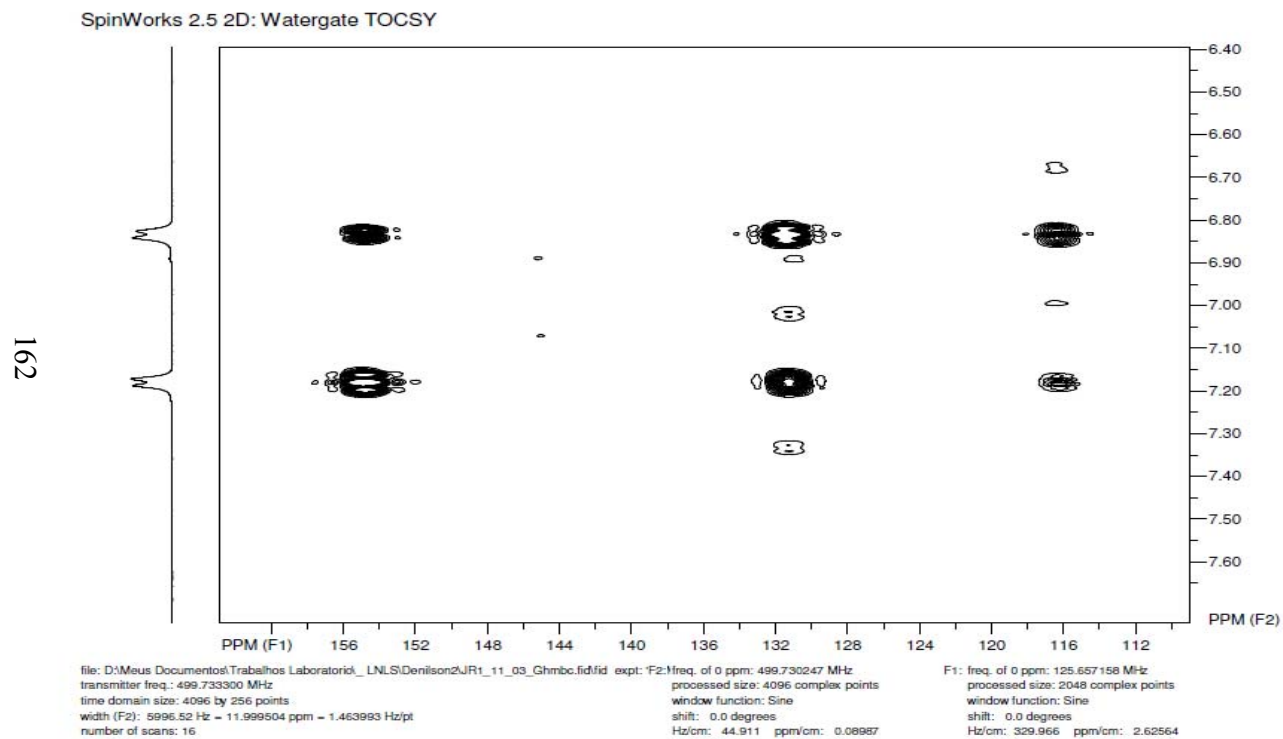


FIGURA 10C Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

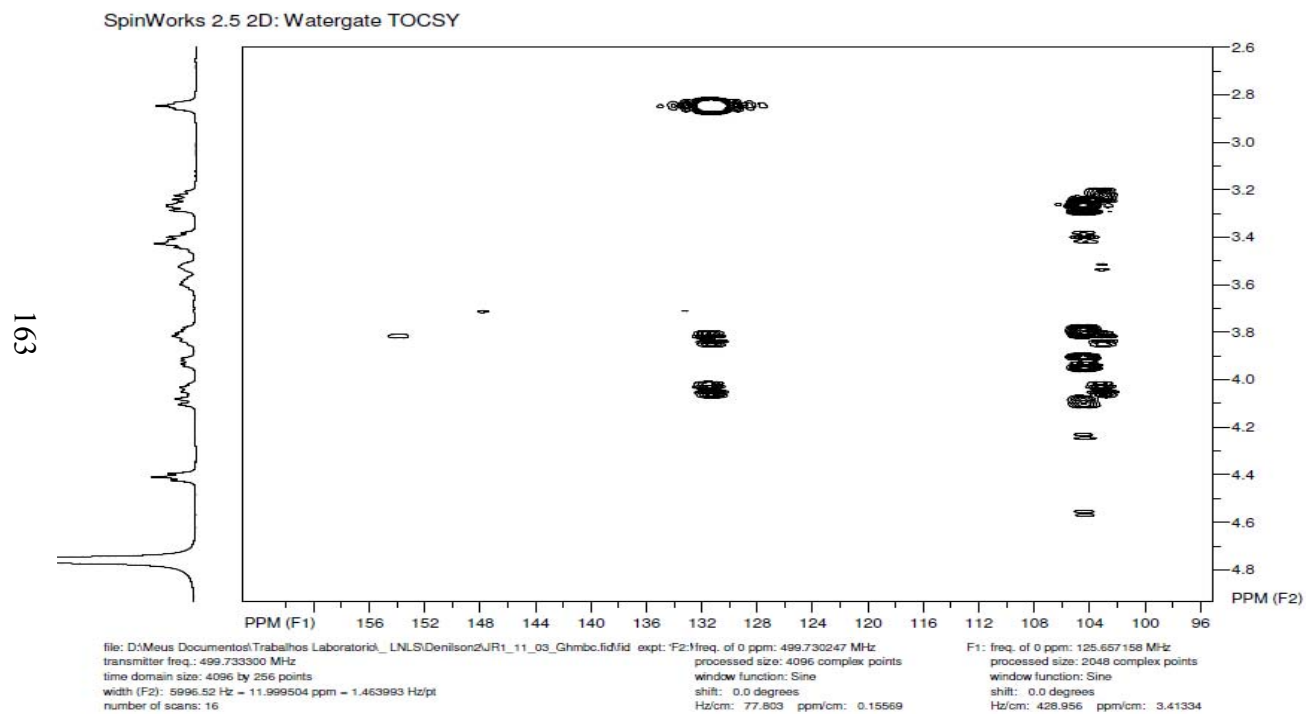


FIGURA 11C Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

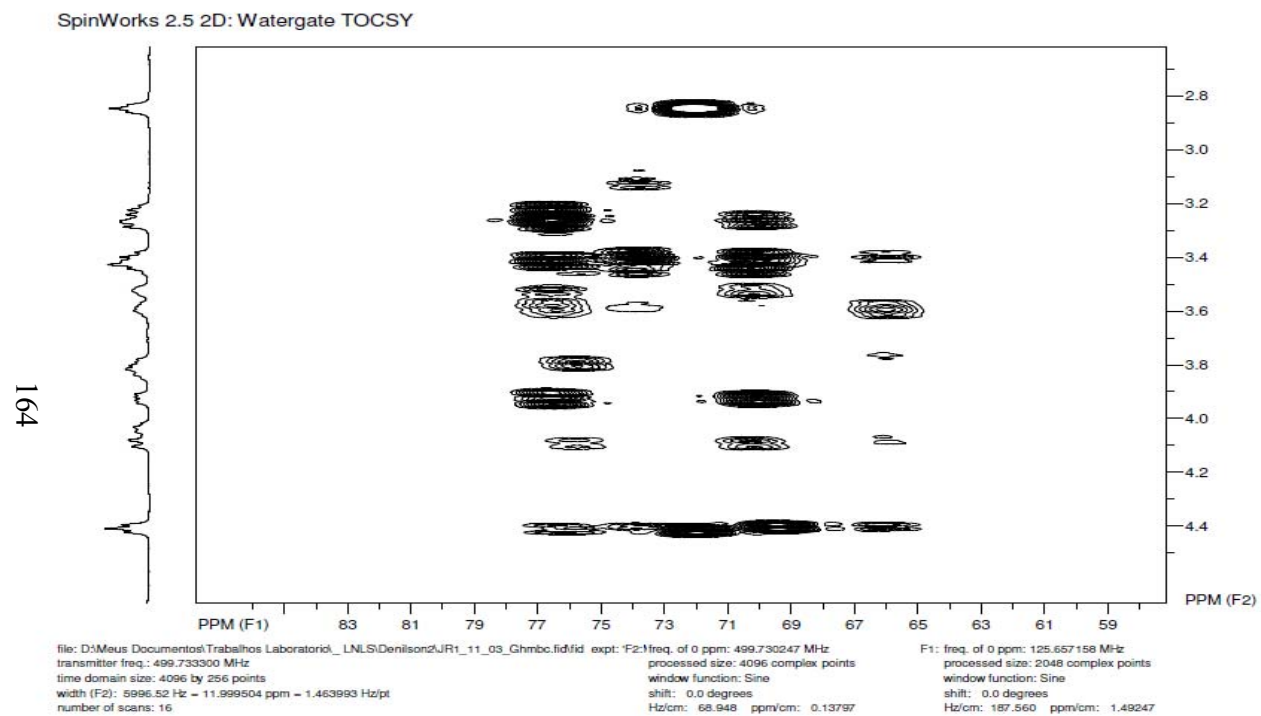


FIGURA 12C Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

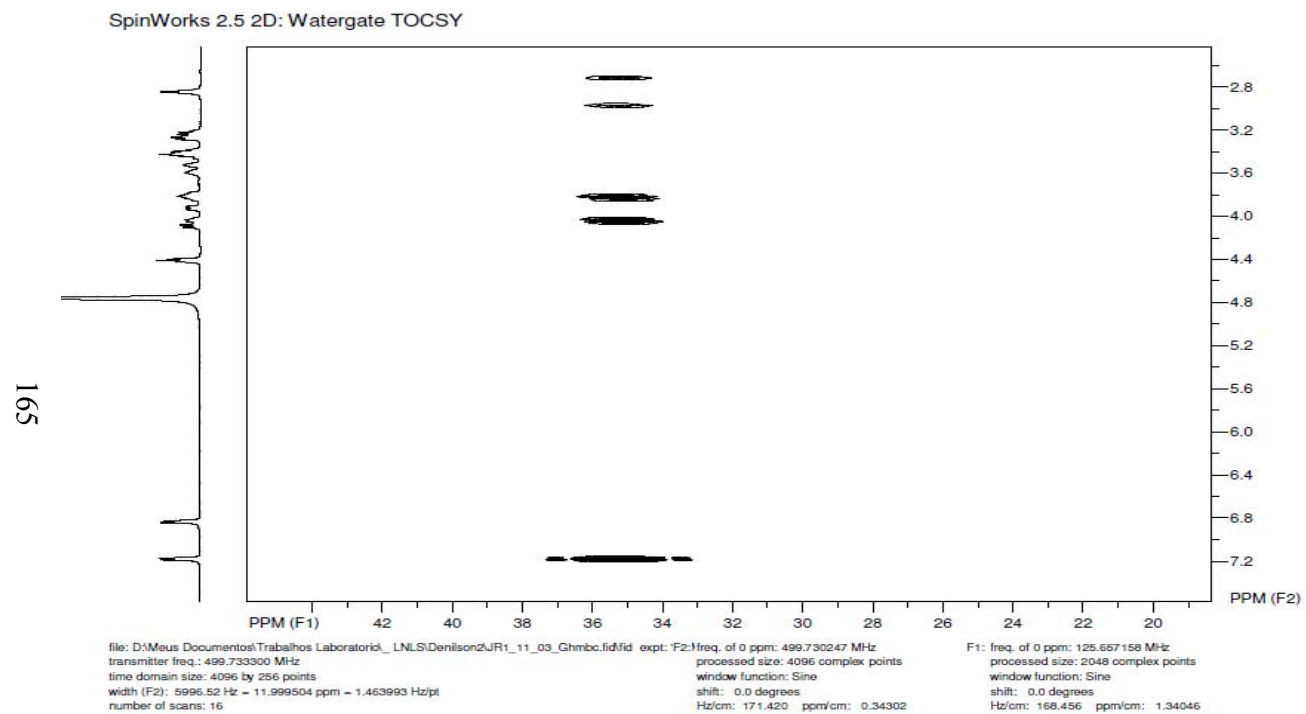


FIGURA 13C Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-03 em D_2O

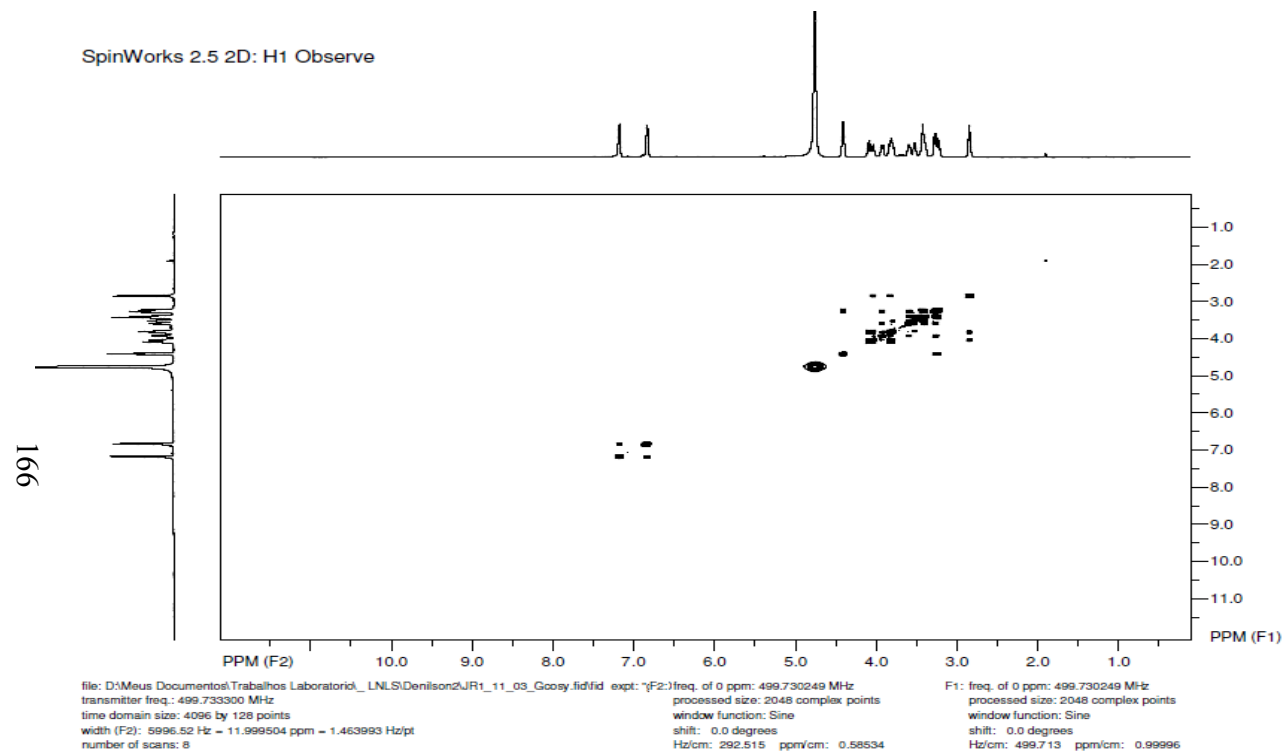


FIGURA 14C Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz

SpinWorks 2.5 2D: H1 Observe

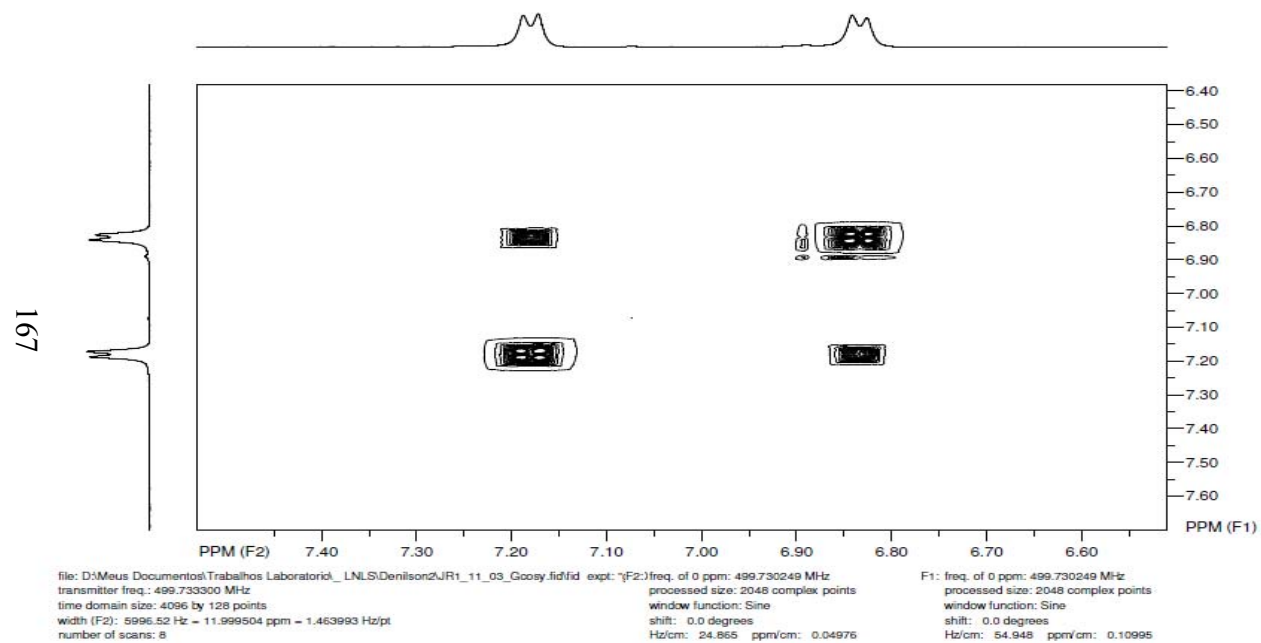


FIGURA 15C Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz

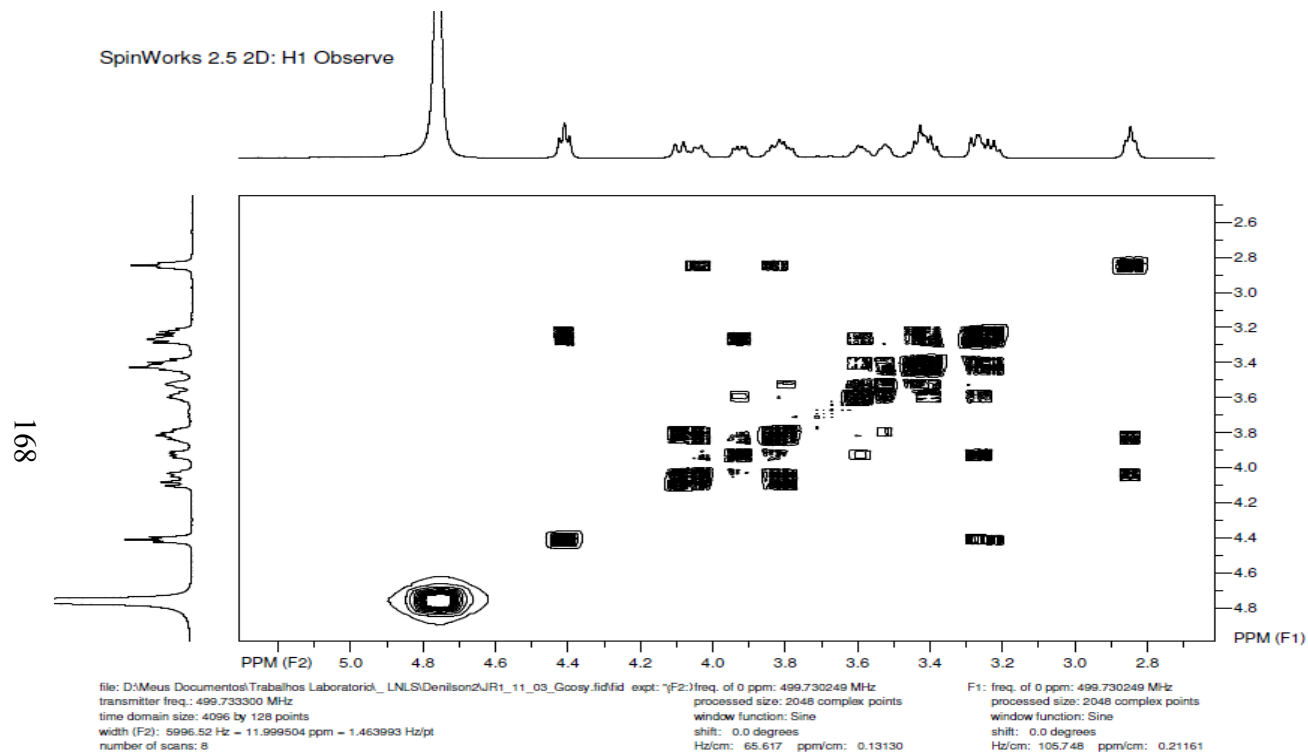


FIGURA 16C Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-03 em D_2O , 500 MHz

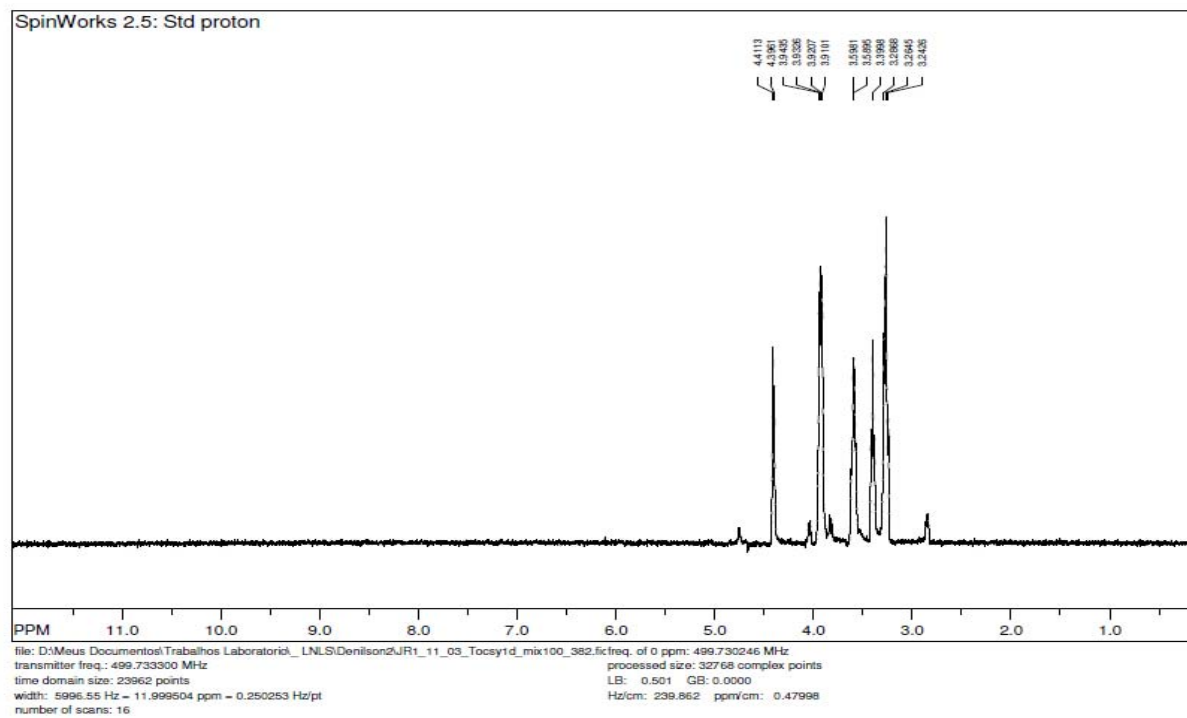
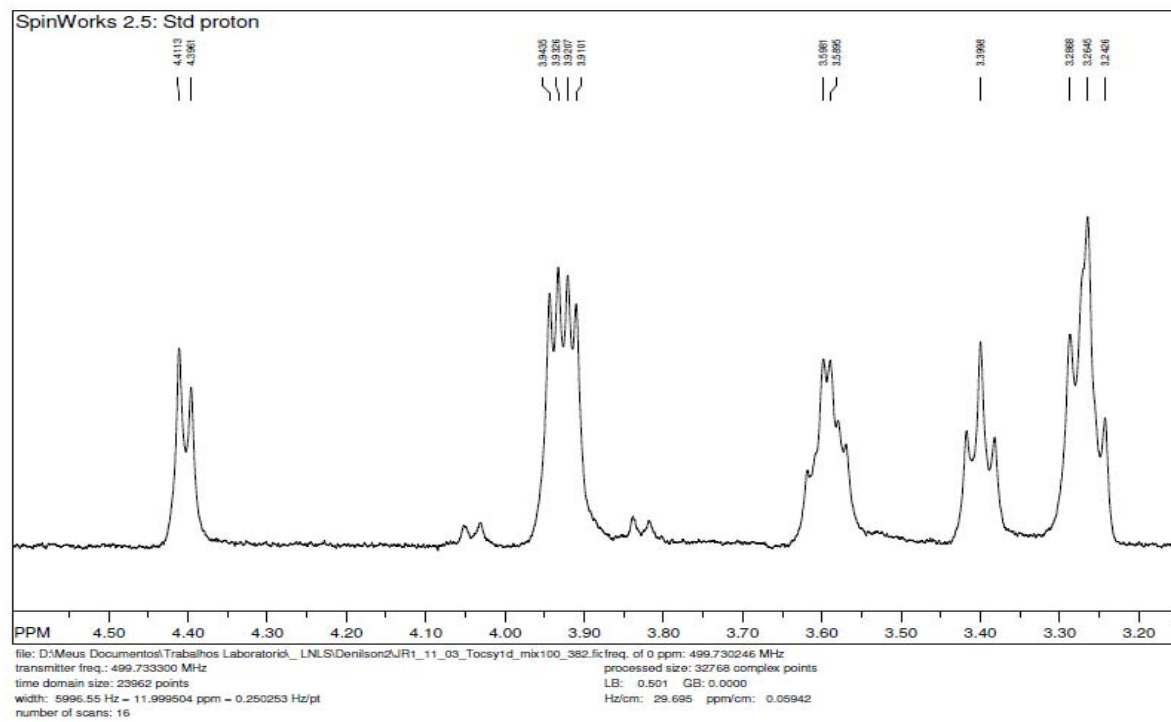
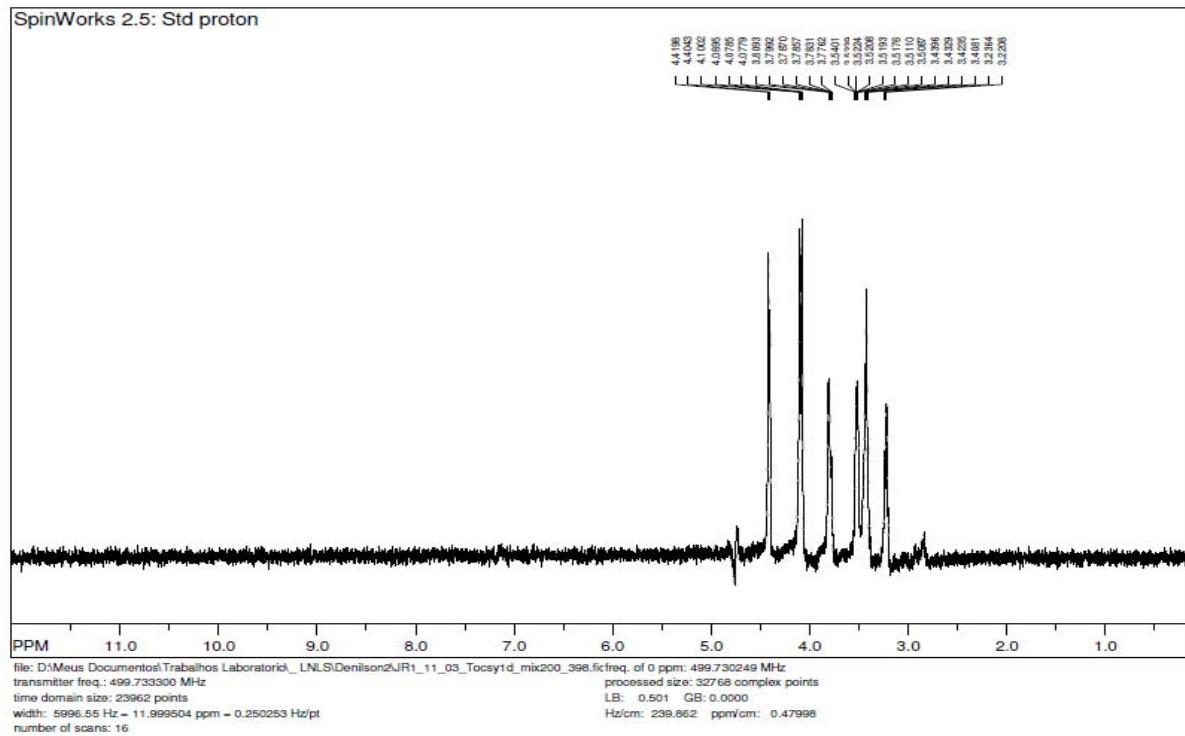


FIGURA 17C TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,93)

FIGURA 18C Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,93)

FIGURA 19C TOCSY 1D de J3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,09)

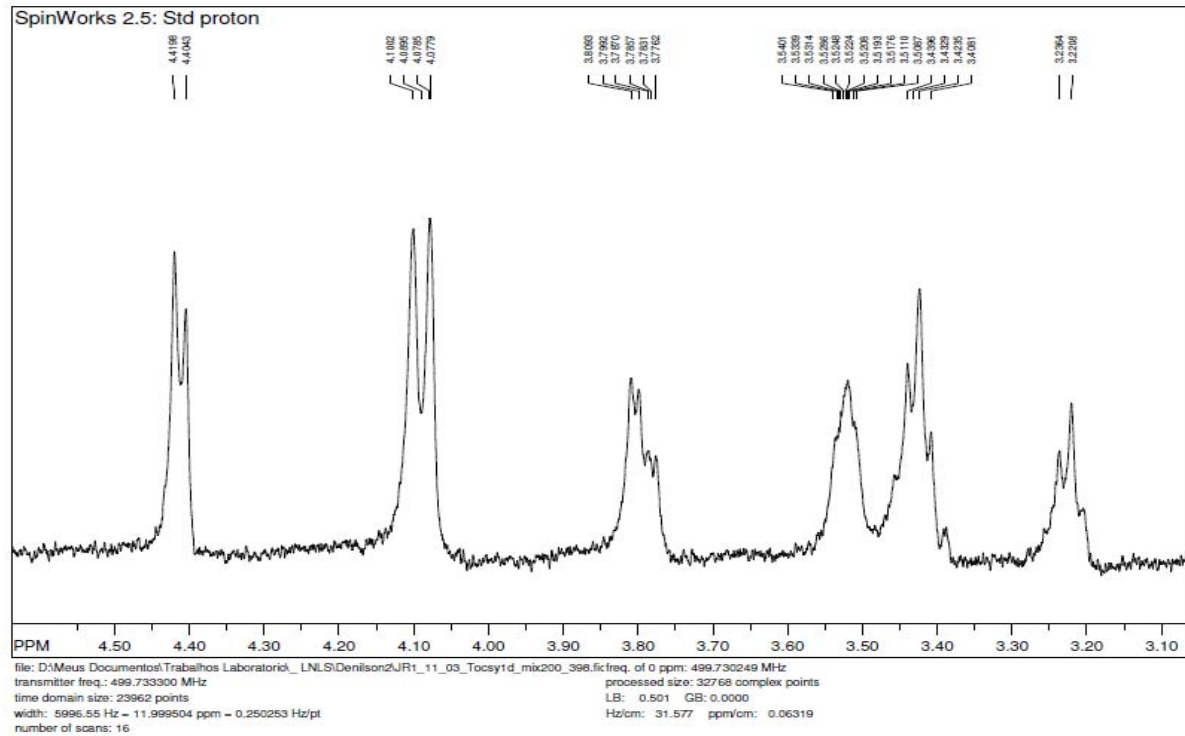


FIGURA 20C Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,09)

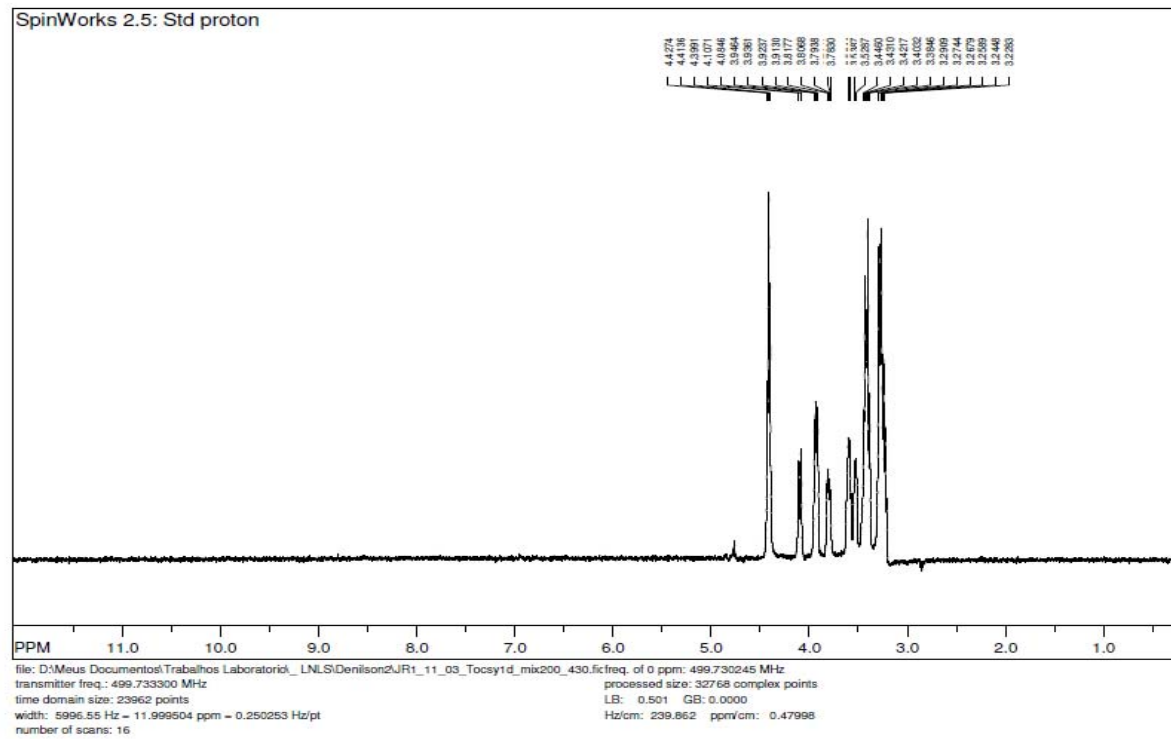


FIGURA 21C TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,41)

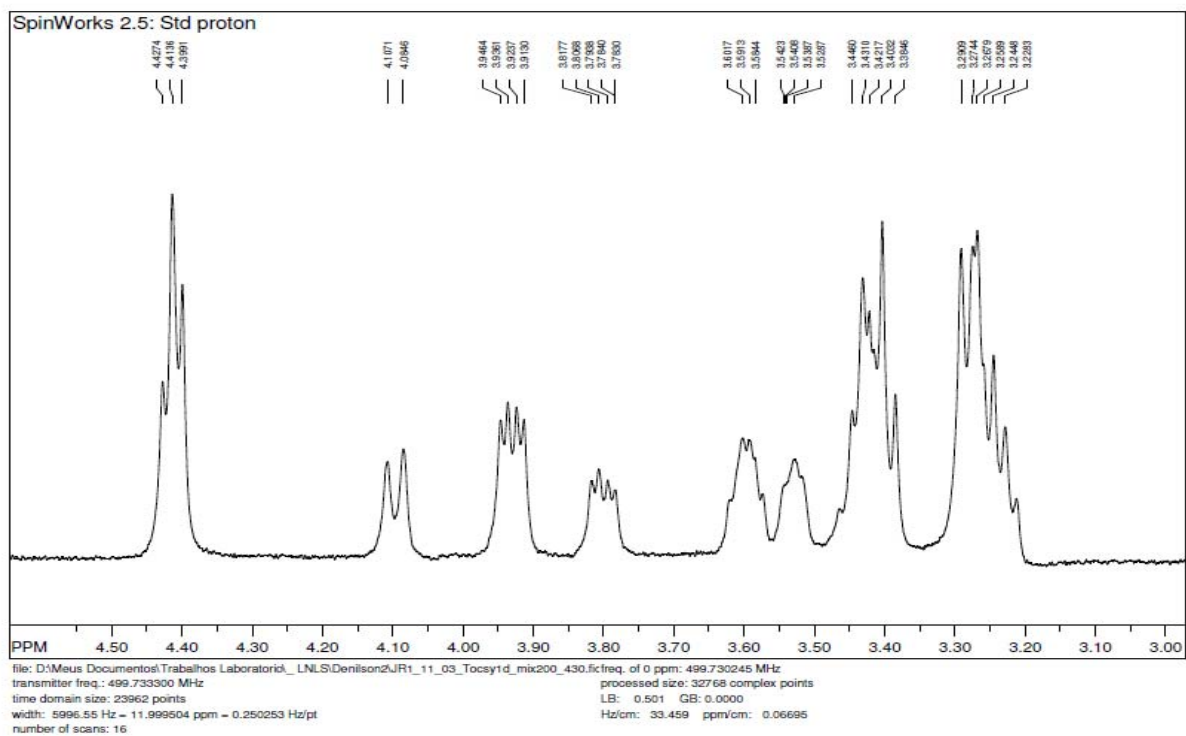
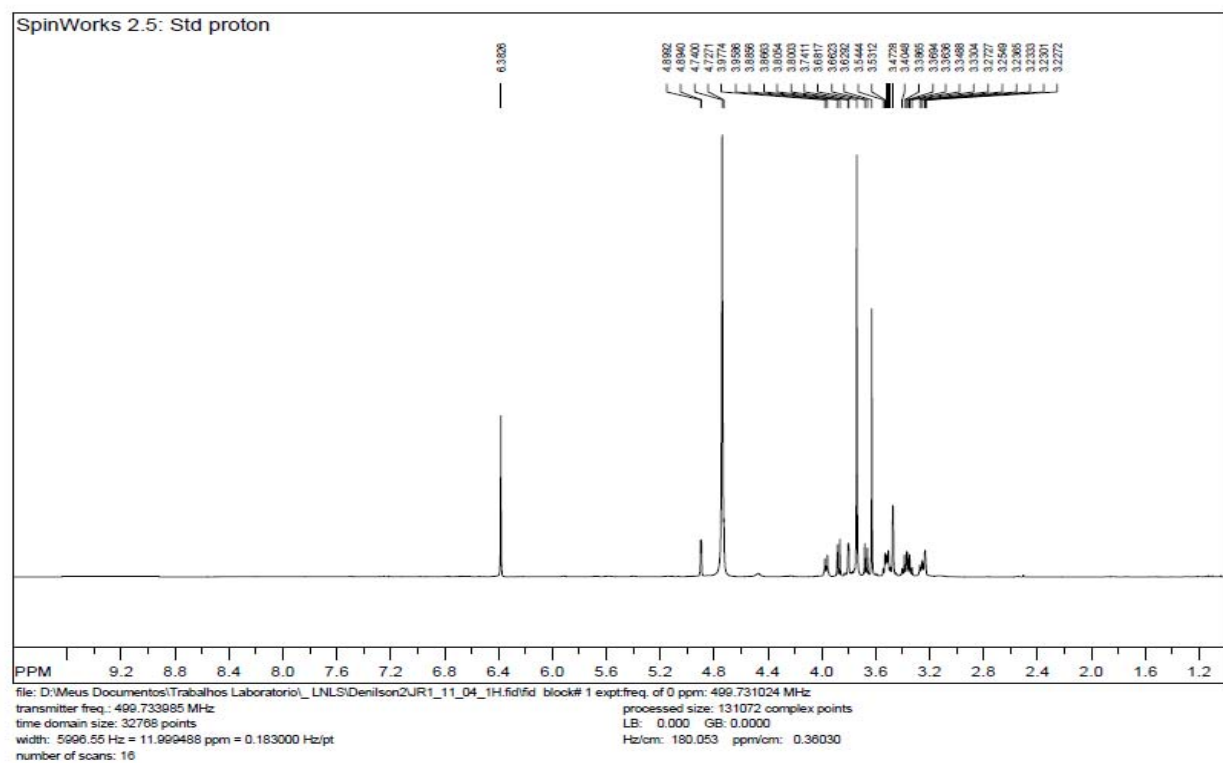
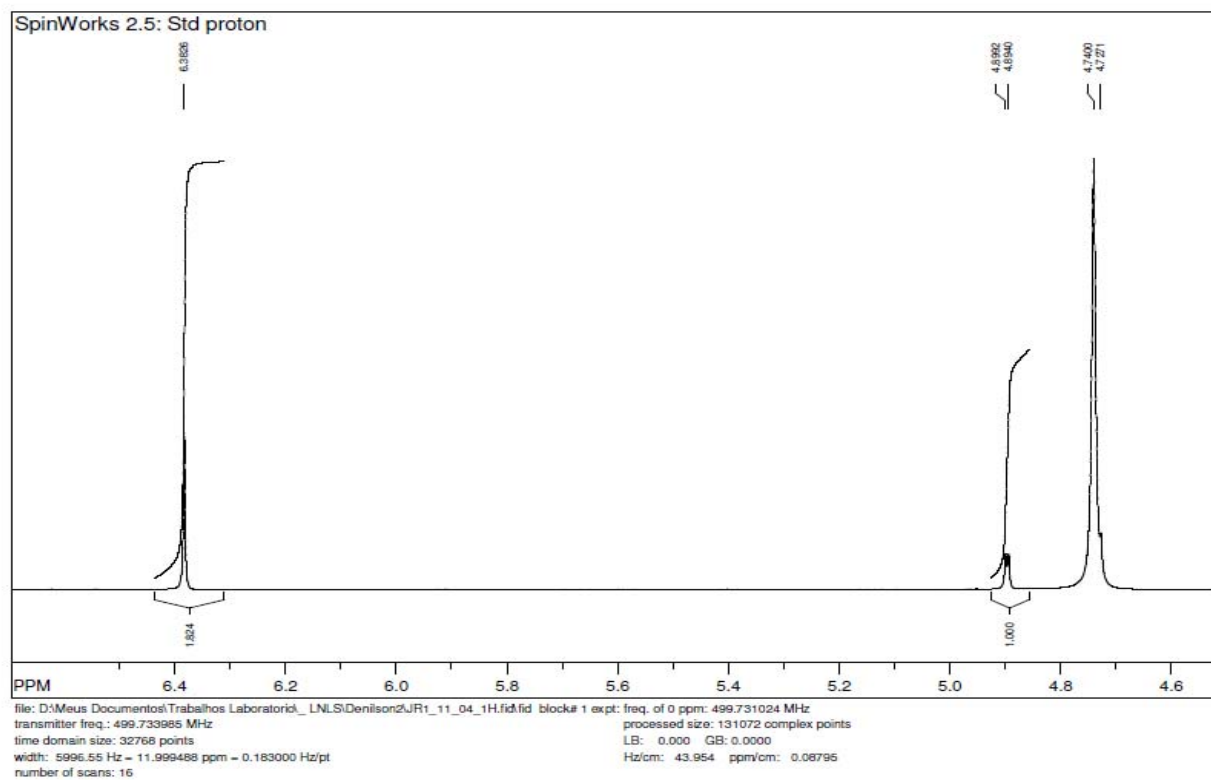


FIGURA 22C Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-03 em D₂O, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,41)

ANEXO D		Página
FIGURA 1D	Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz.....	177
FIGURA 2D	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz.....	178
FIGURA 3D	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz.....	179
FIGURA 4D	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	180
FIGURA 5D	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	181
FIGURA 6D	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	182
FIGURA 7D	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD .	183
FIGURA 8D	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	184
FIGURA 9D	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	185
FIGURA 10D	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD	186
FIGURA 11D	Correlação homonuclear ^1H x ^1H (COSY) de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500 MHz.....	187
FIGURA 12D	Expansão da correlação homonuclear ^1H x ^1H (COSY) de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500 MHz.....	188

FIGURA 13D	TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD ₃ OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,73).....	189
FIGURA 14D	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD ₃ OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,73).....	190
FIGURA 15D	TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD ₃ OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,90).....	191
FIGURA 16D	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD ₃ OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,90).....	192

FIGURA 1D Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz

FIGURA 2D Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz

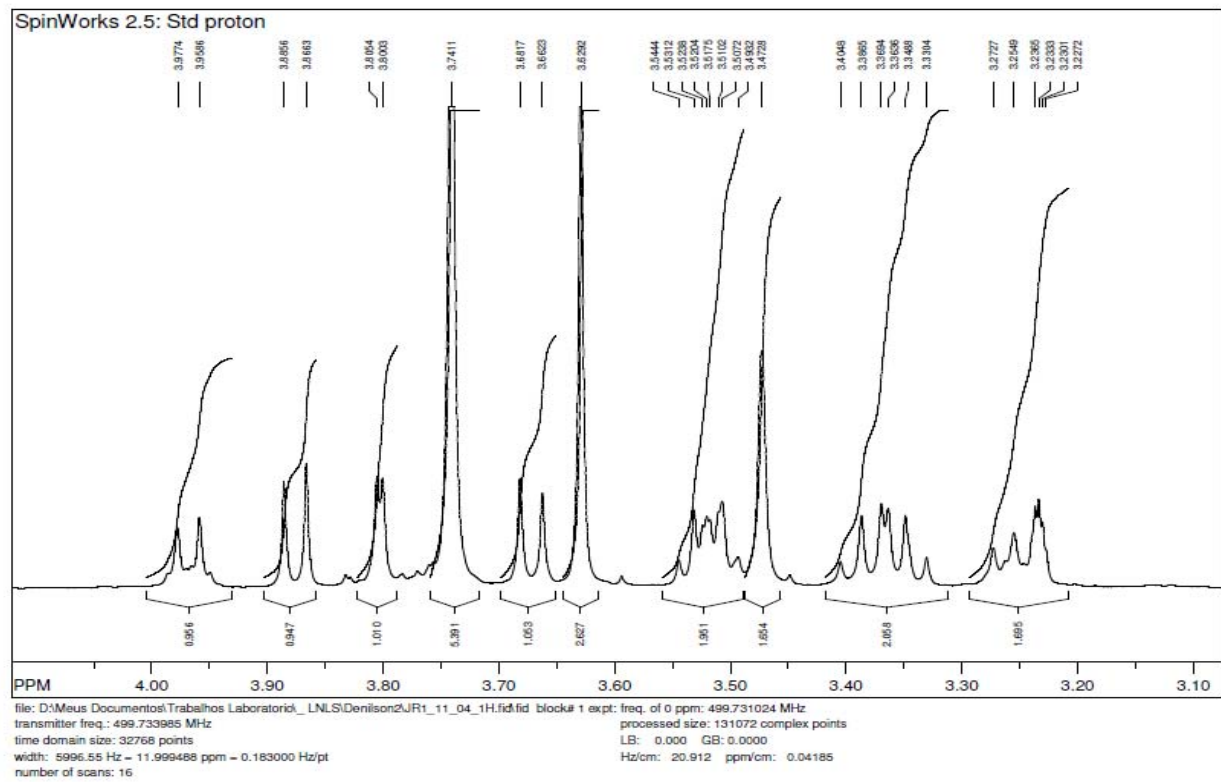


FIGURA 3D Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500MHz

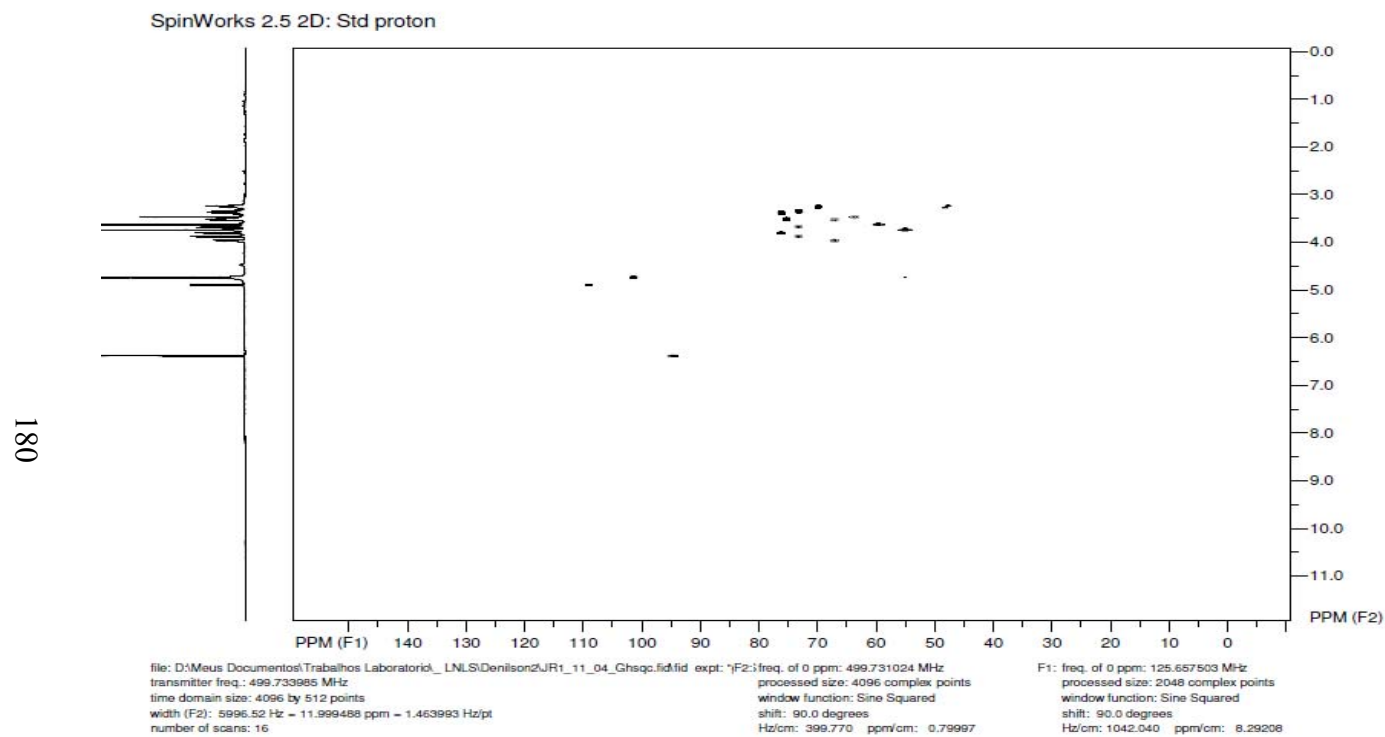


FIGURA 4D Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

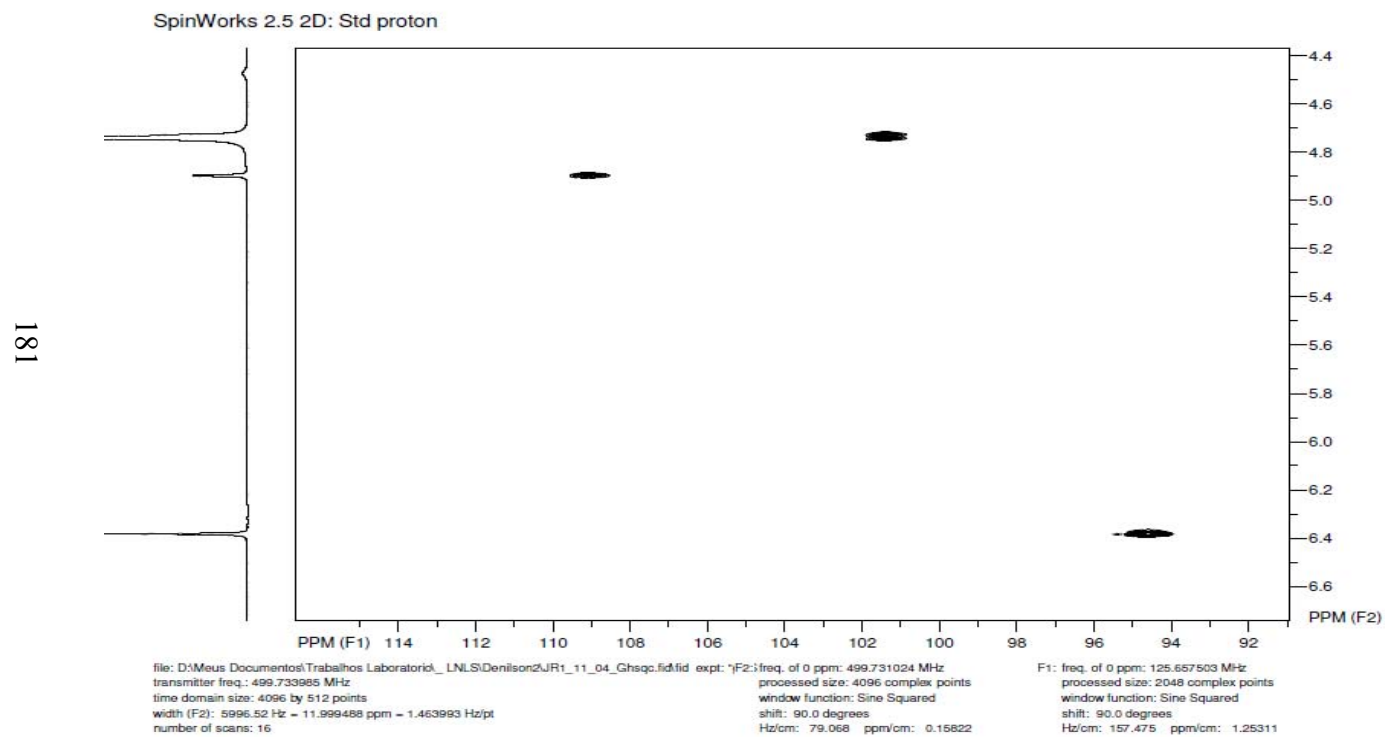


FIGURA 5D Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

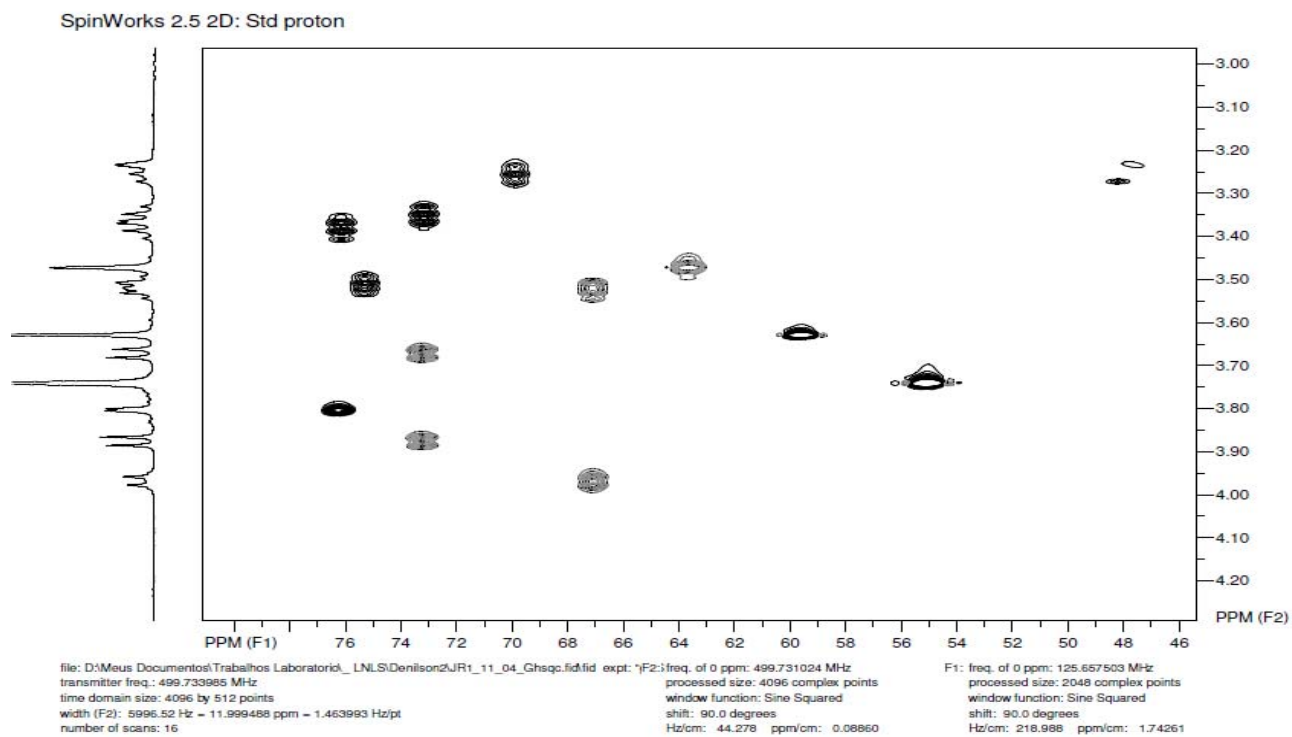
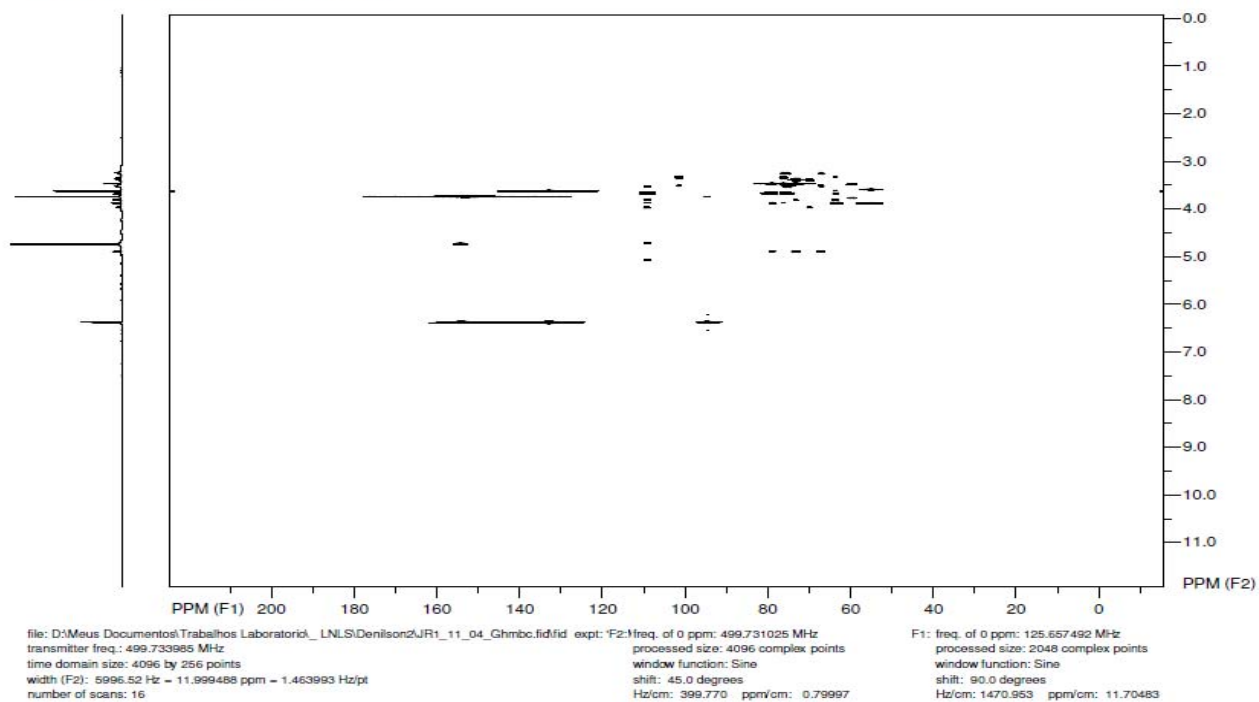


FIGURA 6D Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

FIGURA 7D Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

184

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

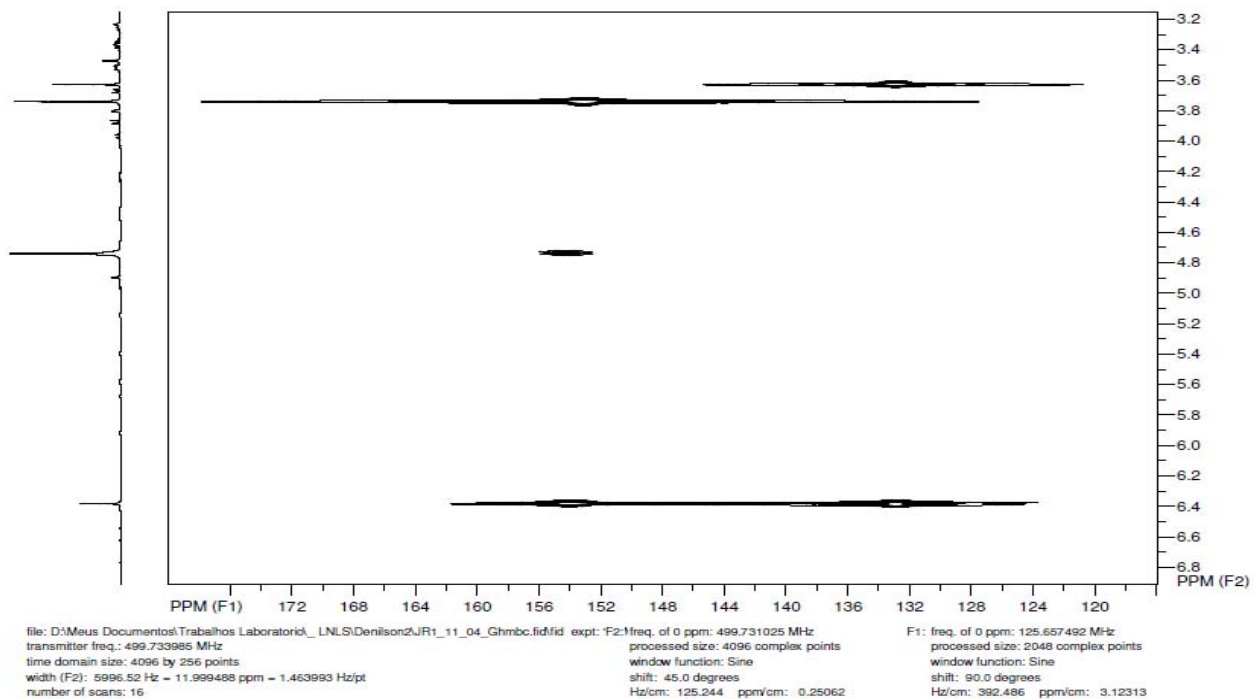
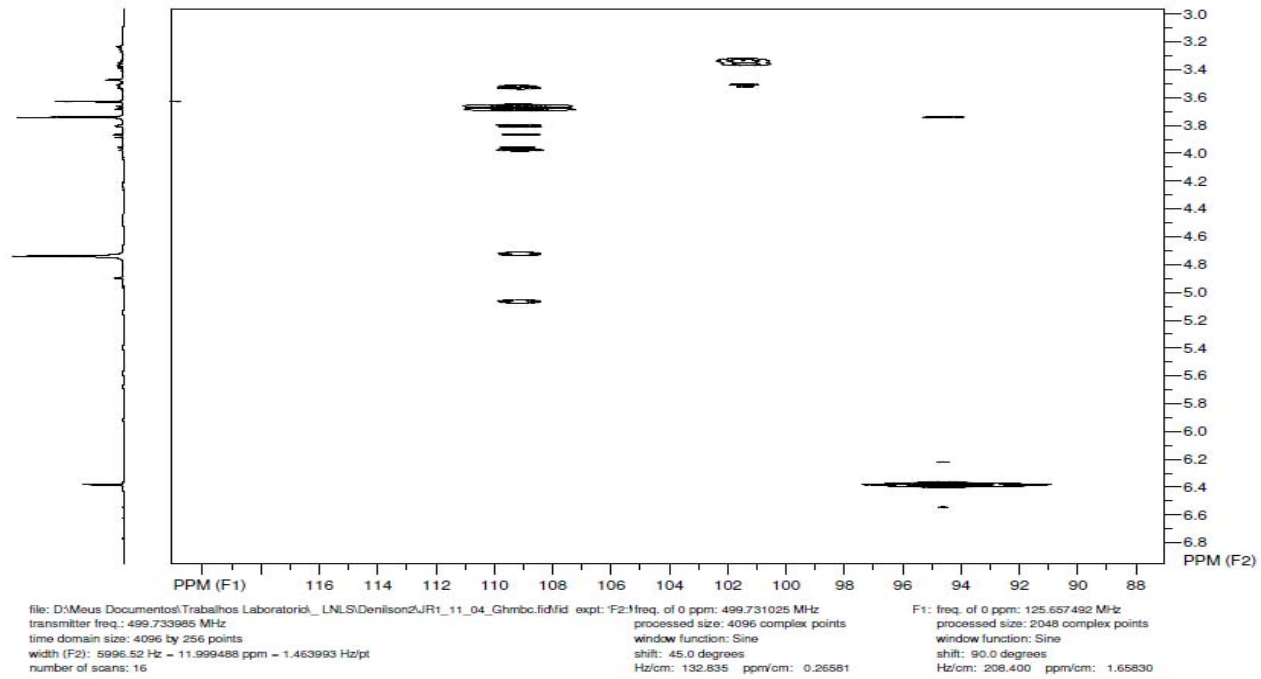
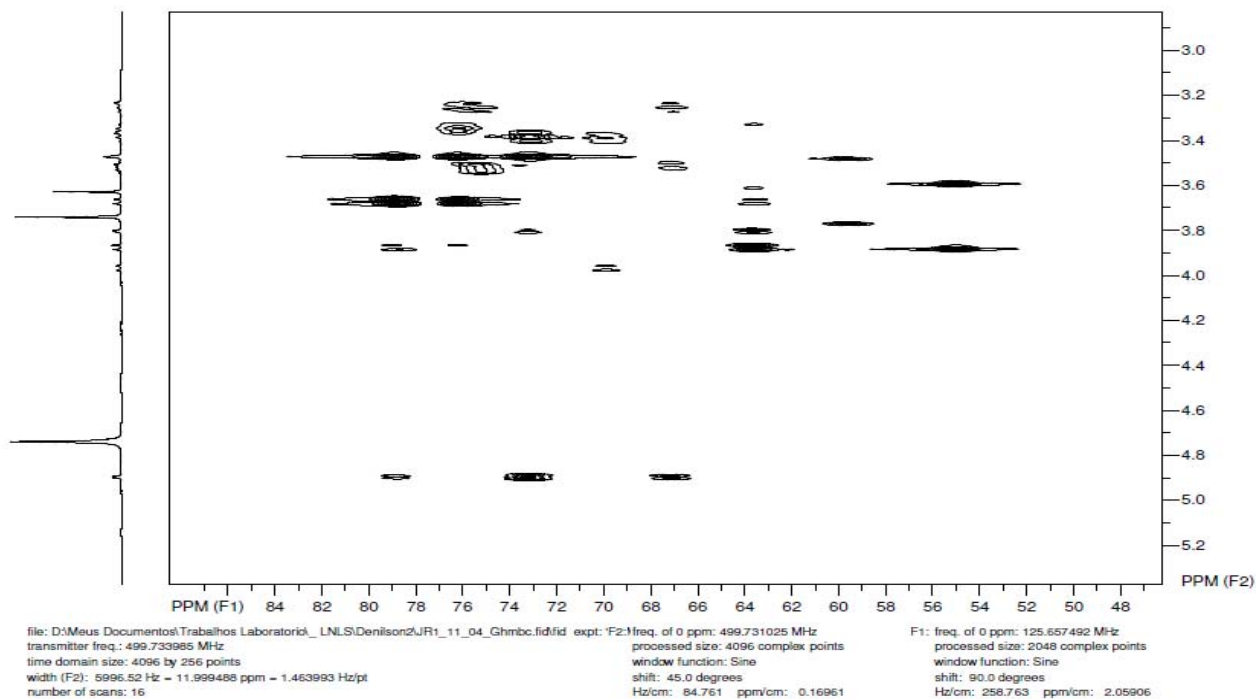


FIGURA 8D Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

FIGURA 9D Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD_3OD

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

FIGURA 10D Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ¹H x ¹³C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-04 em CD₃OD

SpinWorks 2.5 2D: H1 Observe

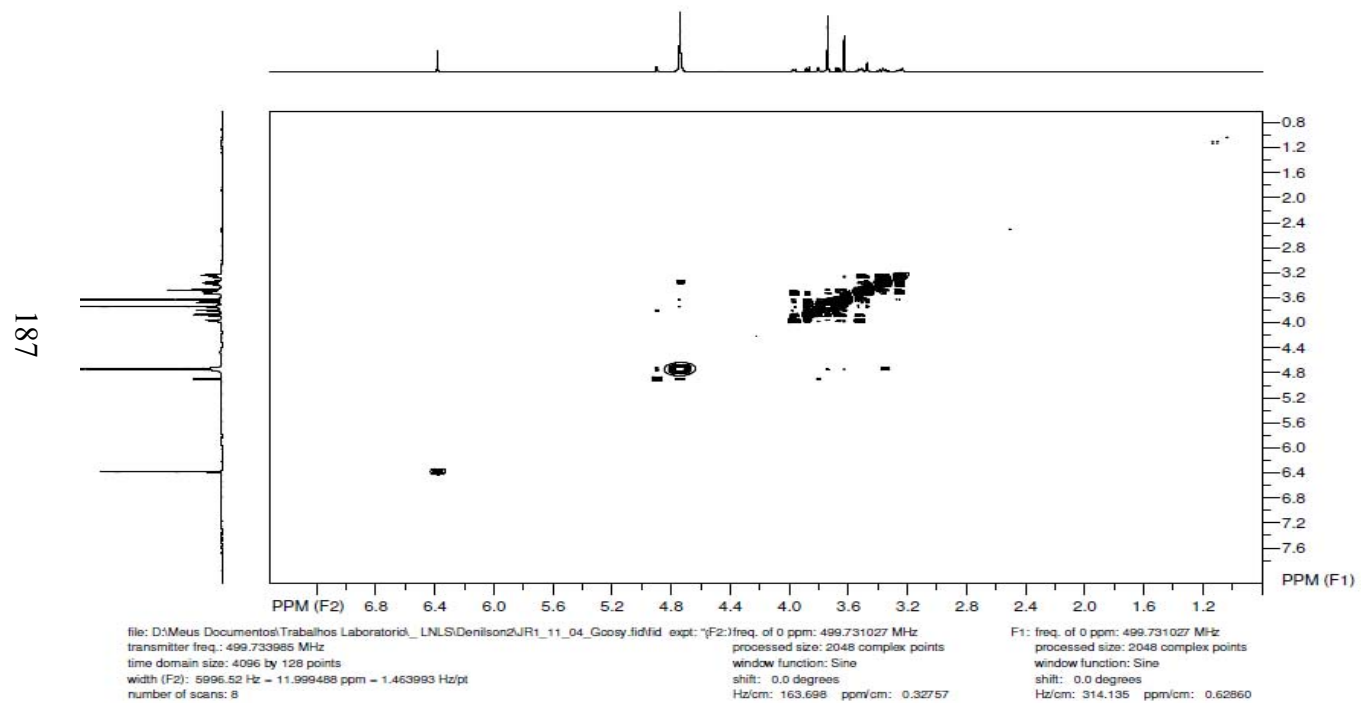
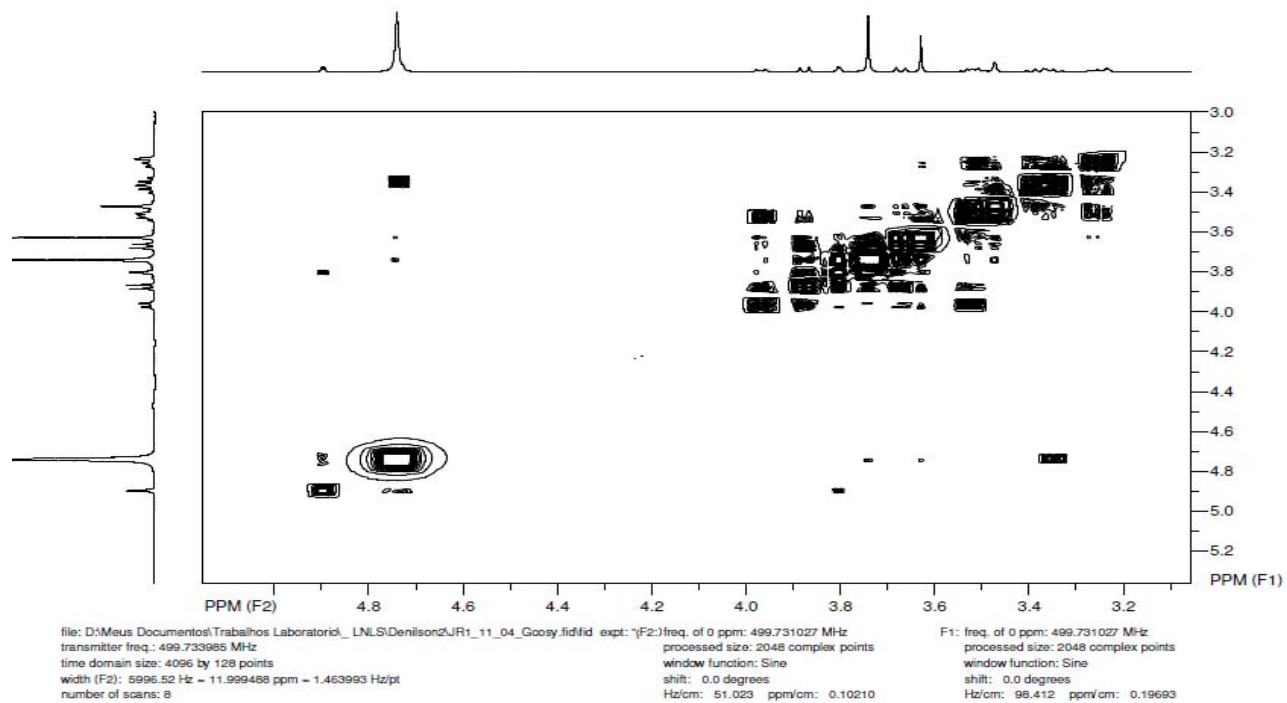
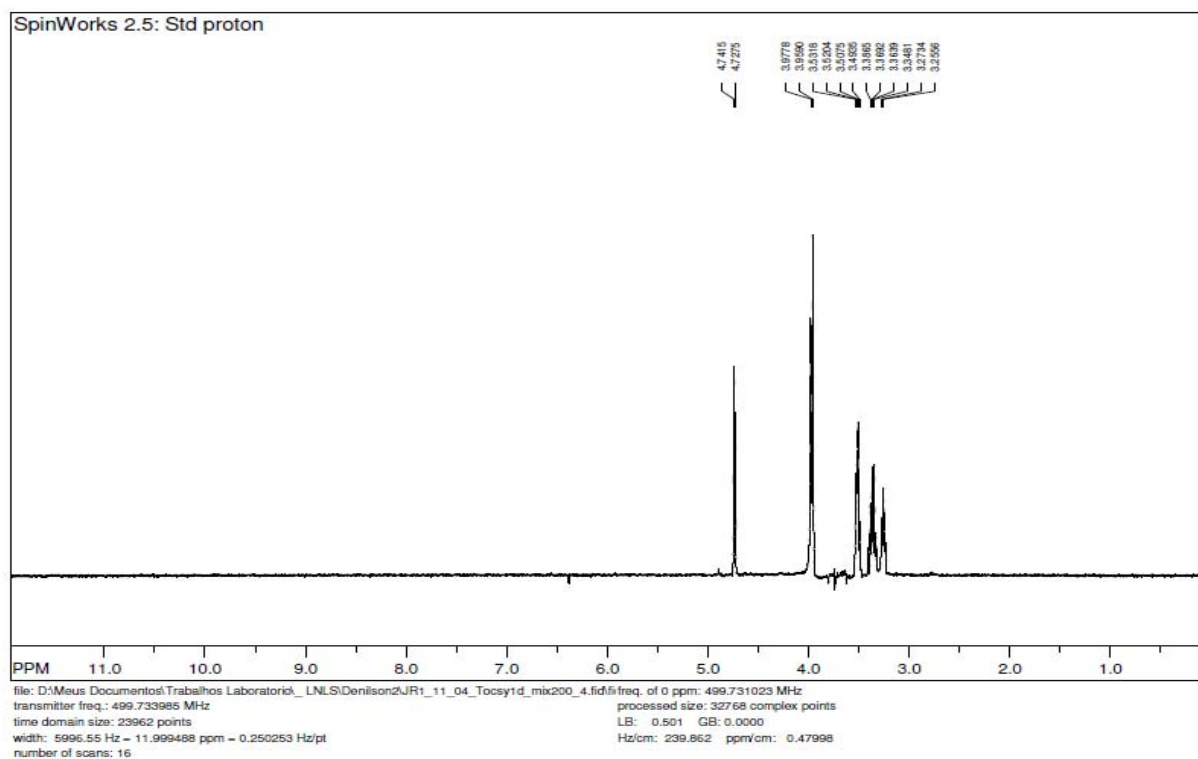


FIGURA 11D Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500 MHz

SpinWorks 2.5 2D: H1 Observe

FIGURA 12D Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-04 em CD_3OD , 500 MHz

FIGURA 13D TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,73)

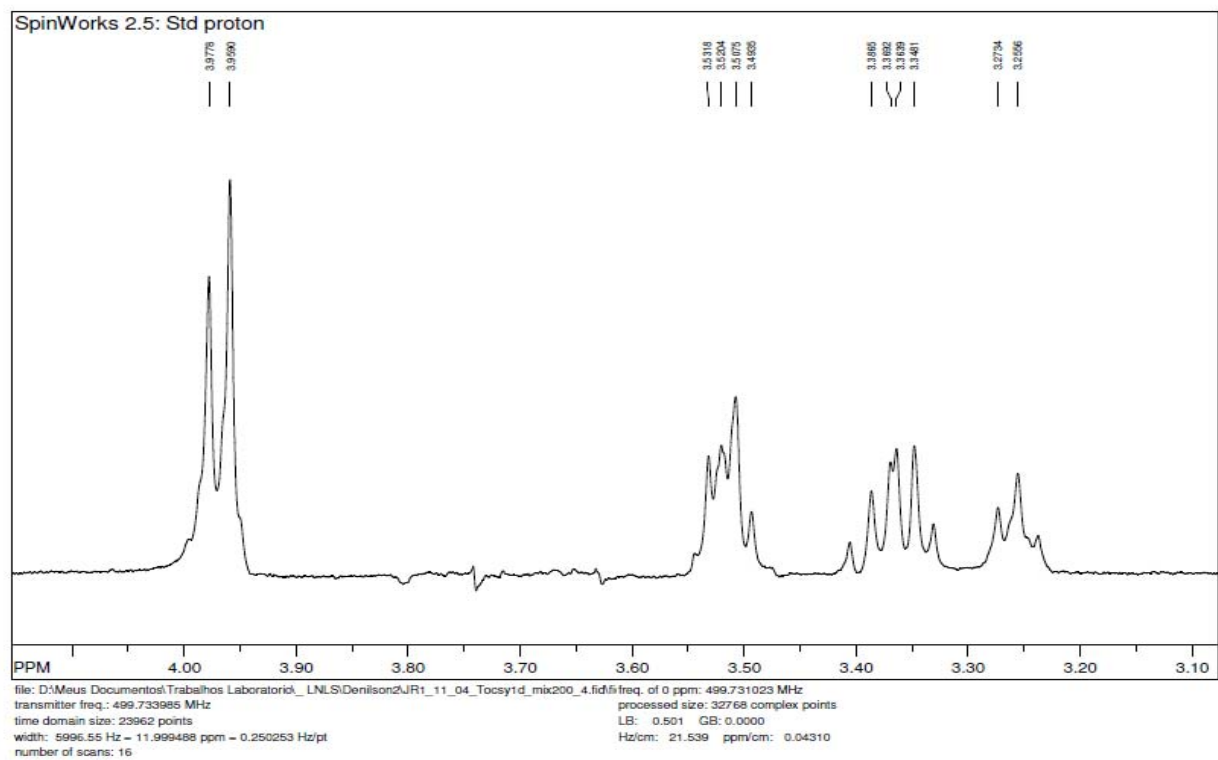


FIGURA 14D Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,73)

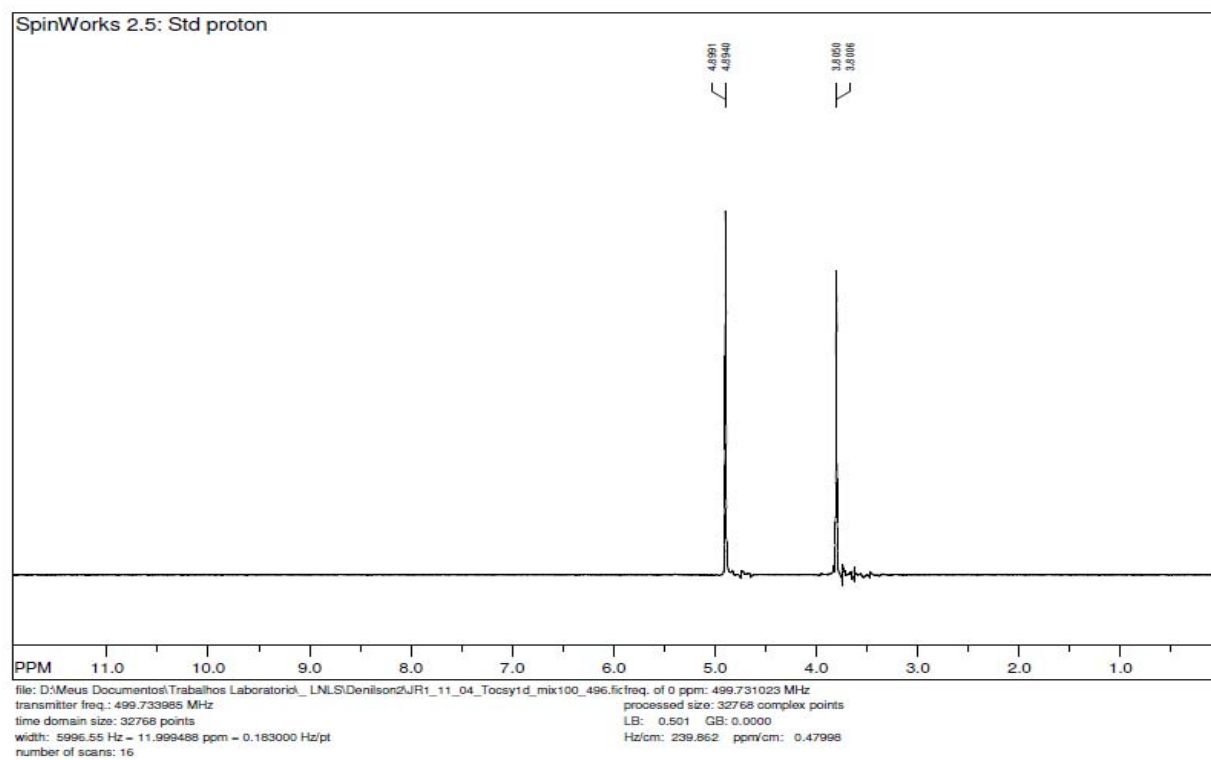


FIGURA 15D TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,90)

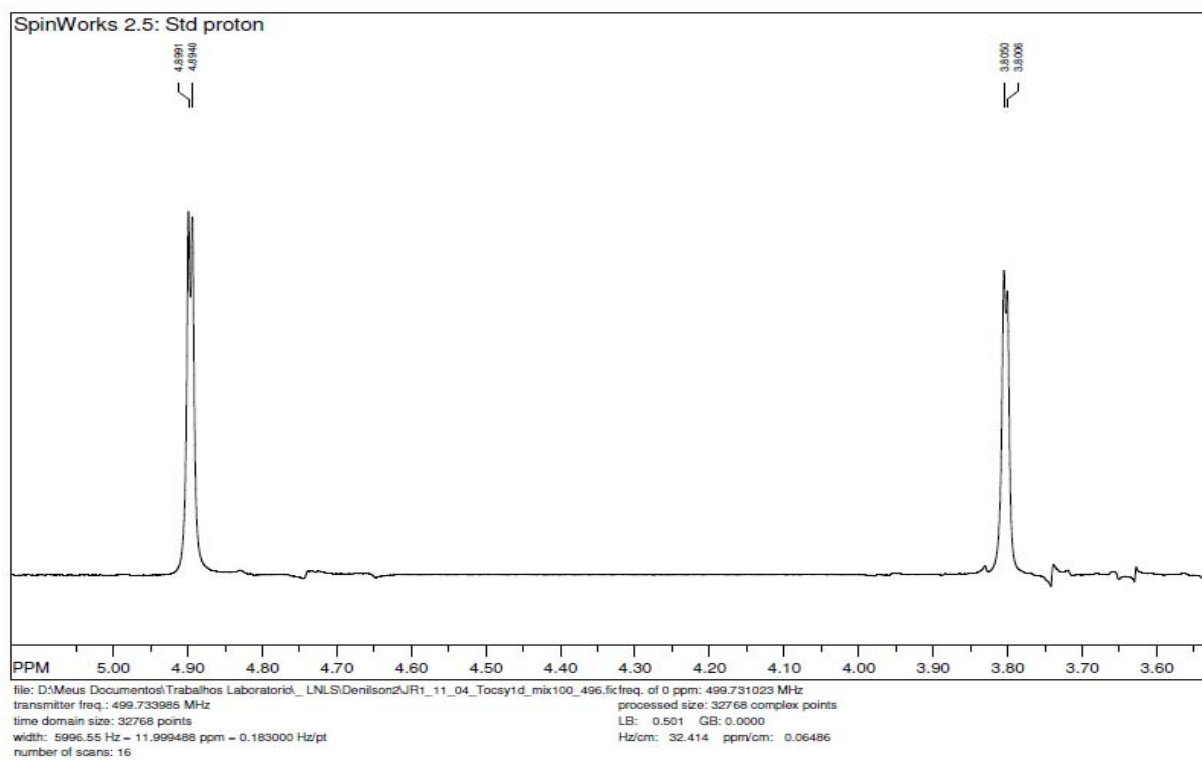


FIGURA 16D Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-04 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,90)

ANEXO E		Página
FIGURA 1E	Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz.....	195
FIGURA 2E	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz.....	196
FIGURA 3E	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz.....	197
FIGURA 4E	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	198
FIGURA 5E	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	199
FIGURA 6E	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	200
FIGURA 7E	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	201
FIGURA 8E	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD .	202
FIGURA 9E	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	203
FIGURA 10E	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	204
FIGURA 11E	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	205
FIGURA 12E	Expansão da correlação heteronuclear a longa	

	distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD	206
FIGURA 13E	Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz.....	207
FIGURA 14E	Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz.....	208
FIGURA 15E	Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz.....	209
FIGURA 16E	TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,86).....	210
FIGURA 17E	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,86).....	211
FIGURA 18E	TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,11).....	212
FIGURA 19E	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,11).....	213
FIGURA 20E	TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,35).....	214
FIGURA 21E	Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,35).....	215

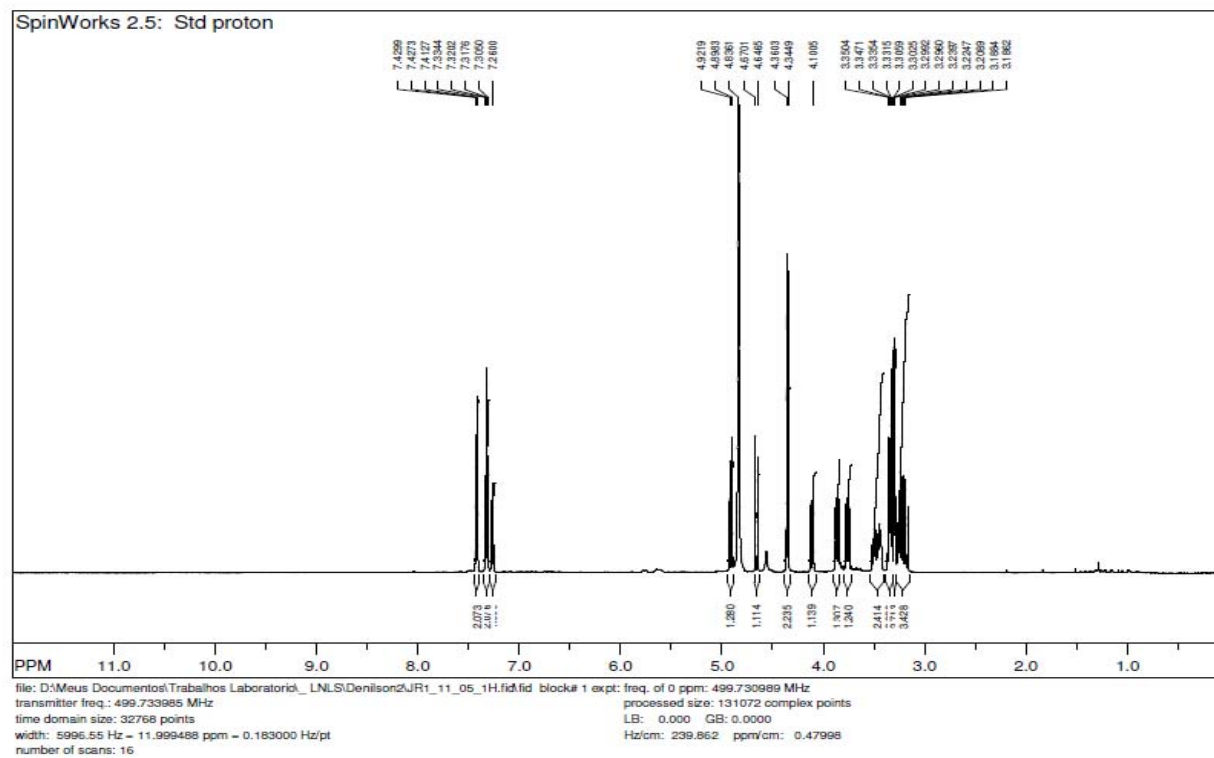
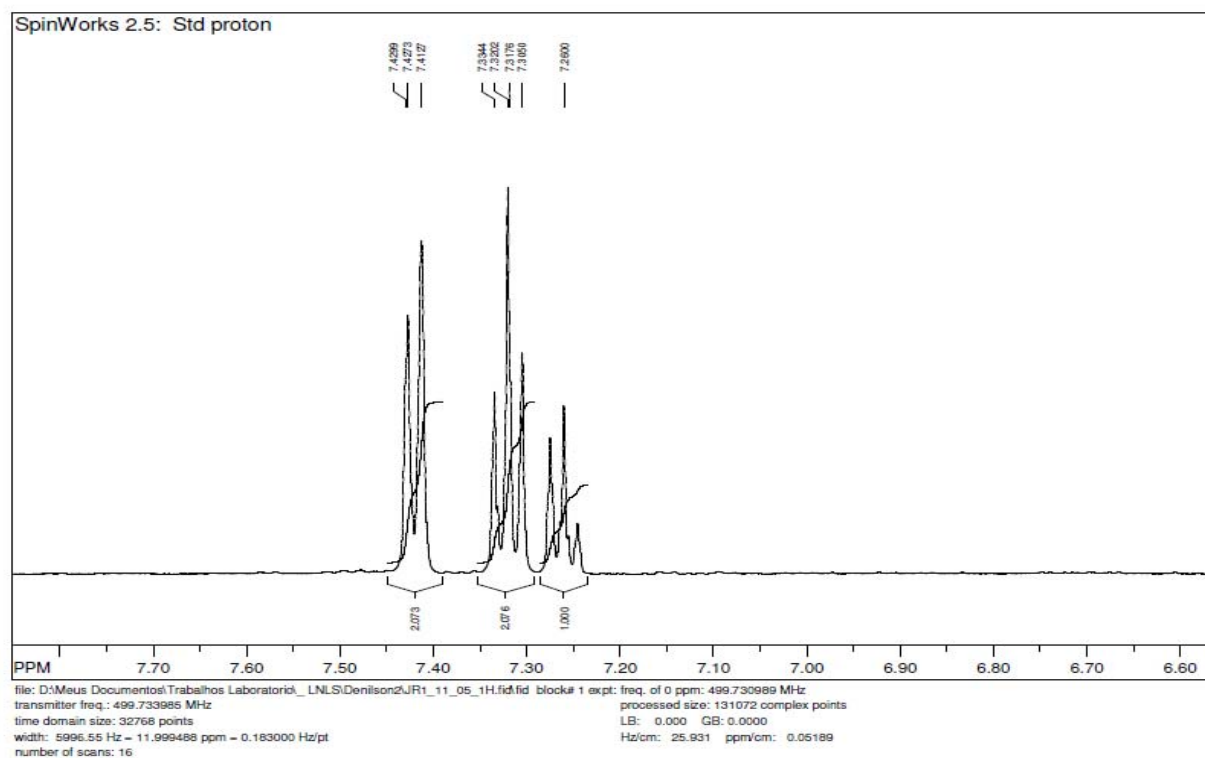


FIGURA 1E Espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz

FIGURA 2E Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz

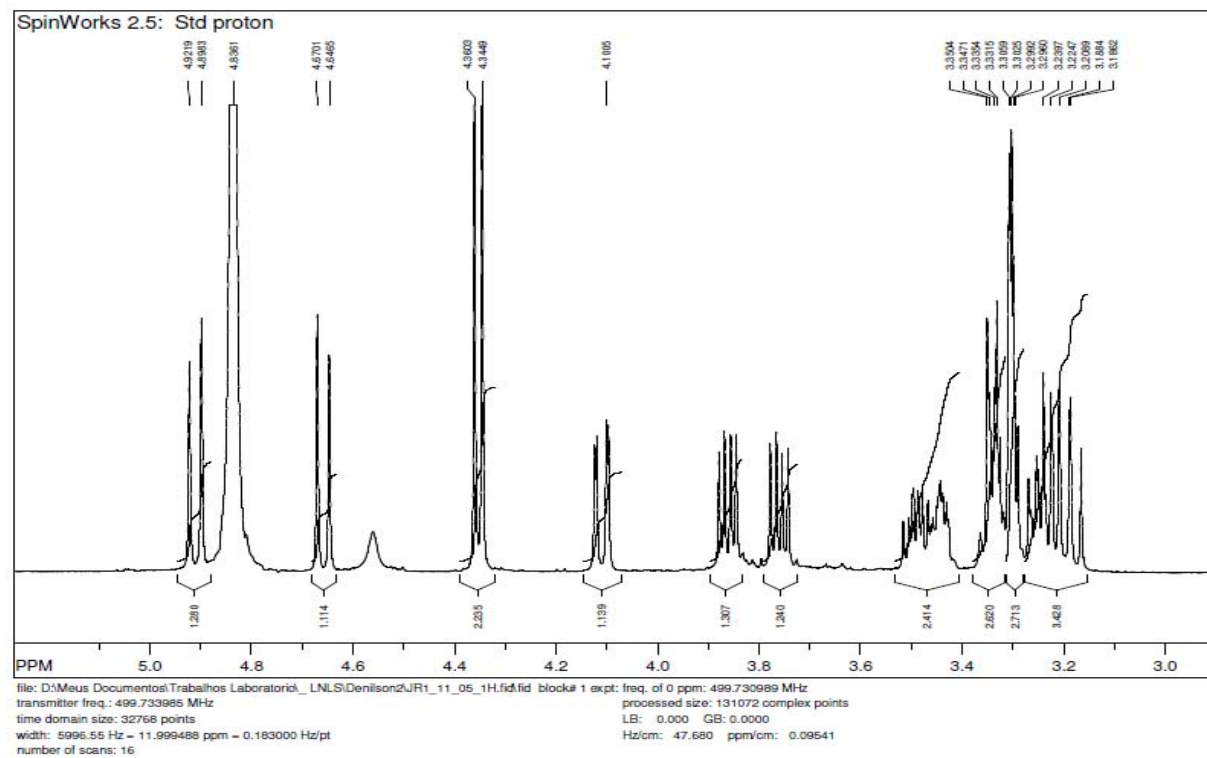


FIGURA 3E Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500MHz

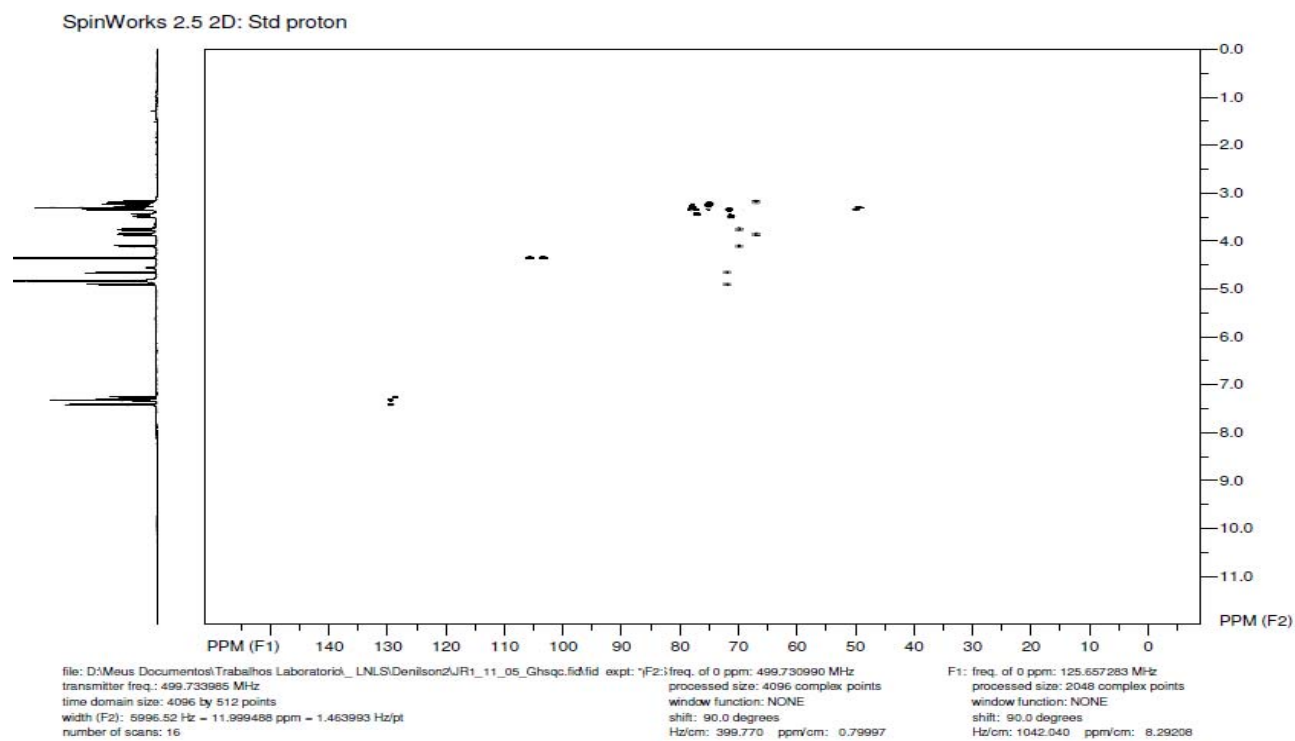


FIGURA 4E Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

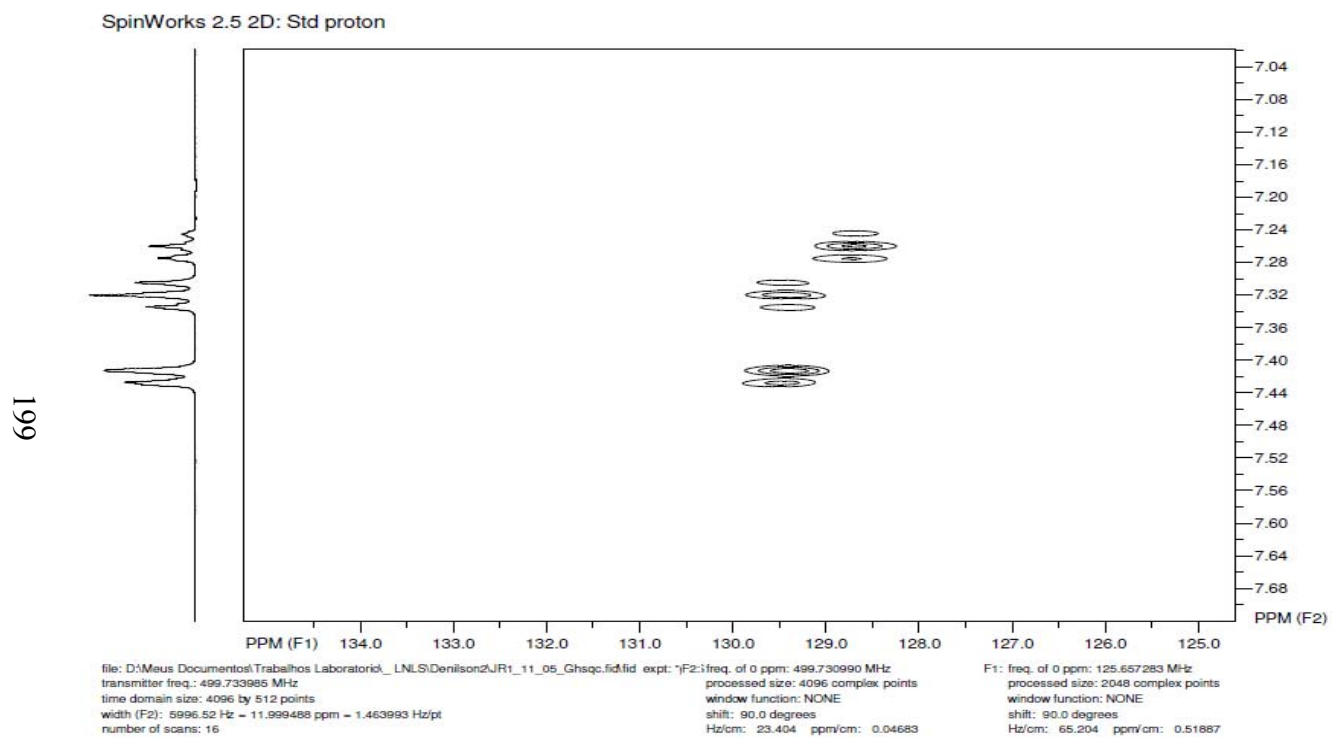


FIGURA 5E Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

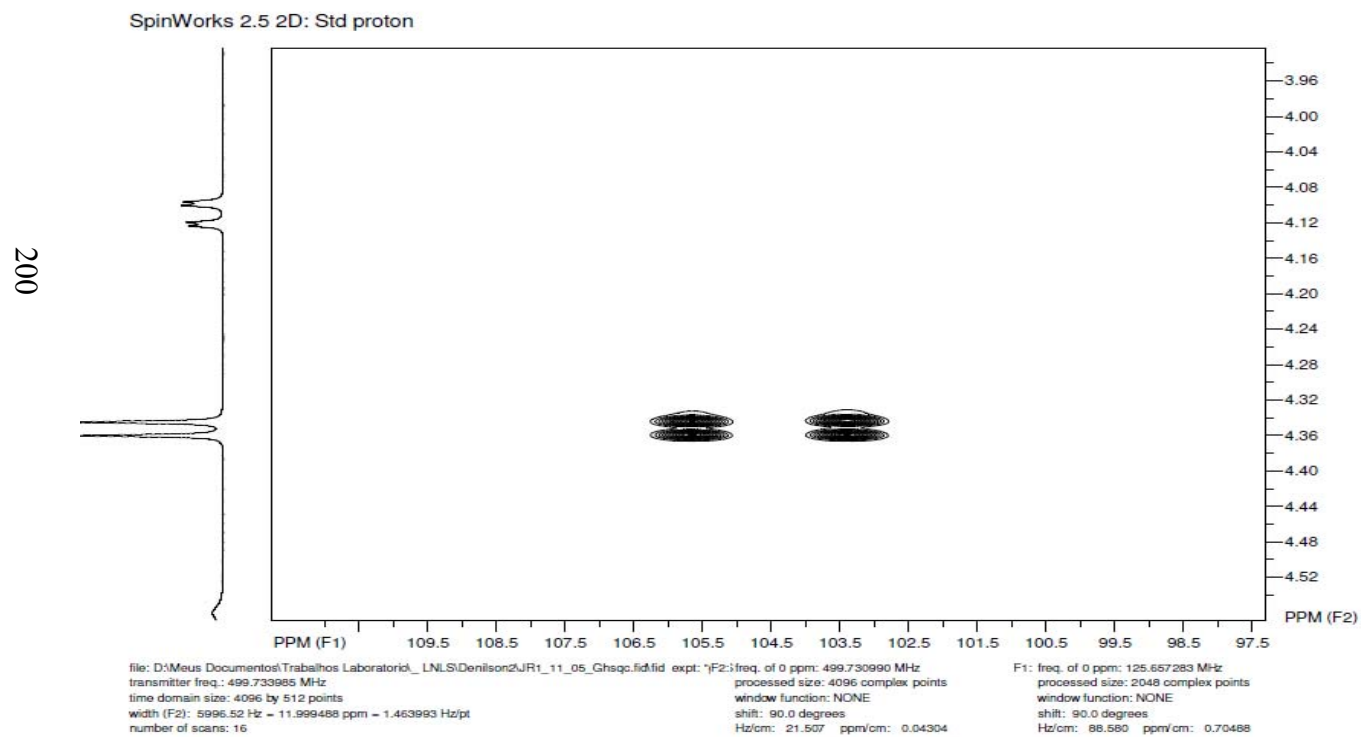


FIGURA 6E Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

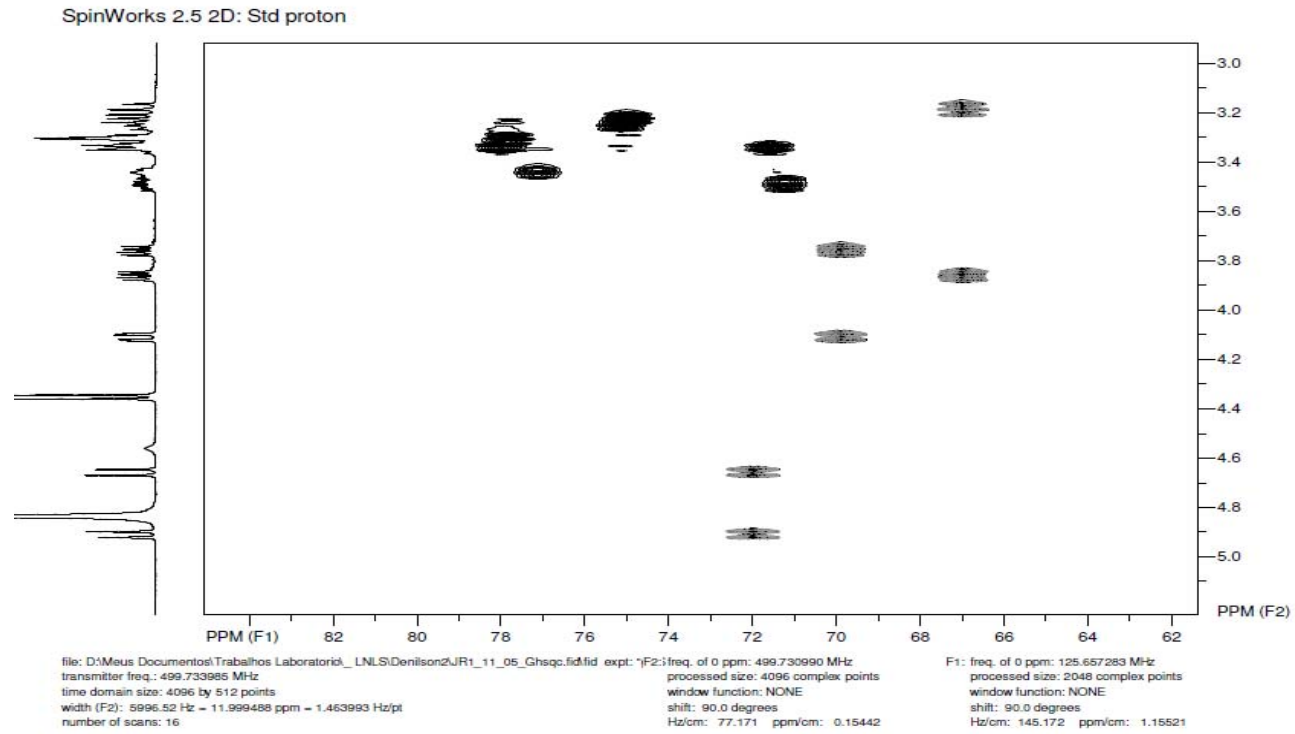


FIGURA 7E Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

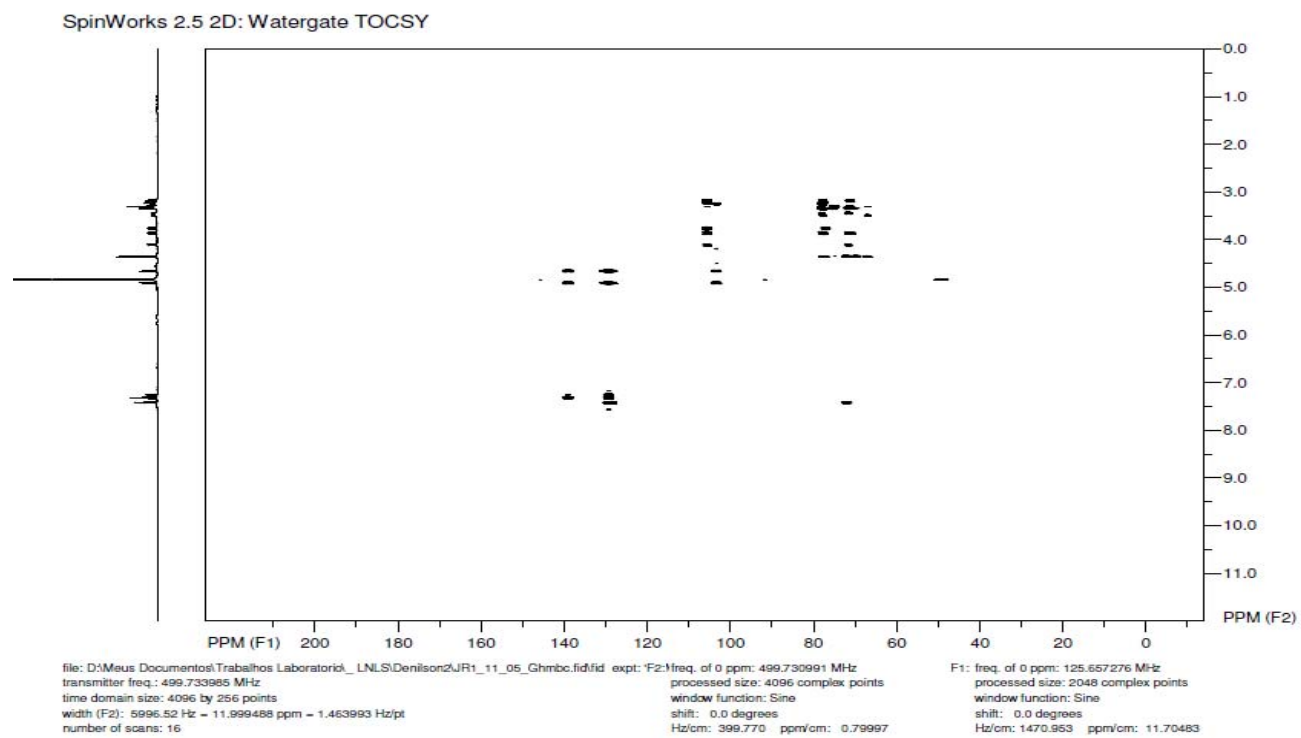
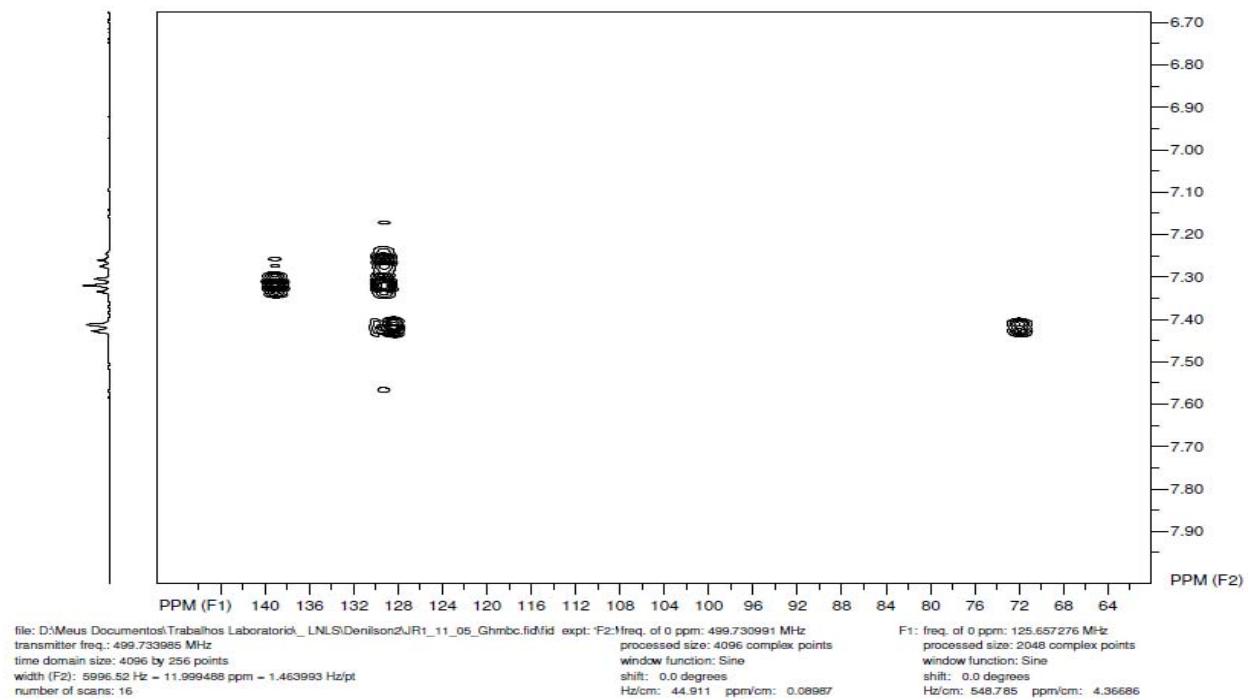


FIGURA 8E Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

FIGURA 9E Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

204

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

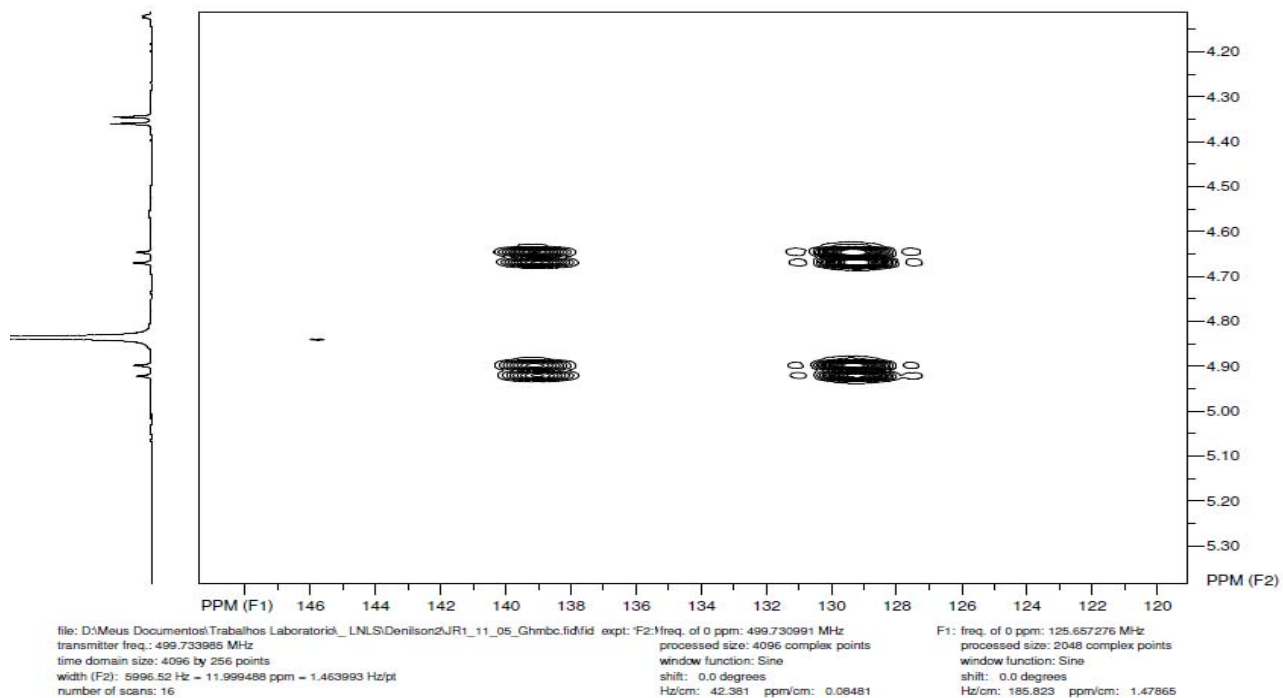


FIGURA 10E Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

205

SpinWorks 2.5 2D: Watergate TOCSY

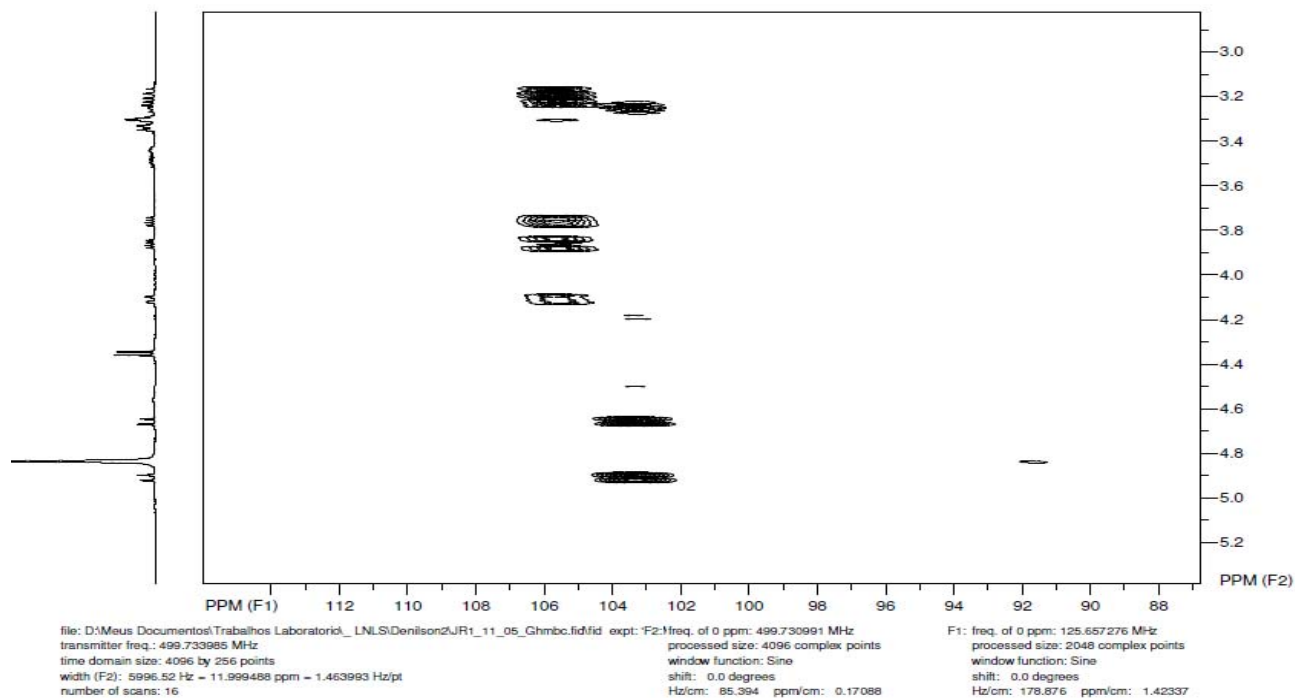


FIGURA 11E Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

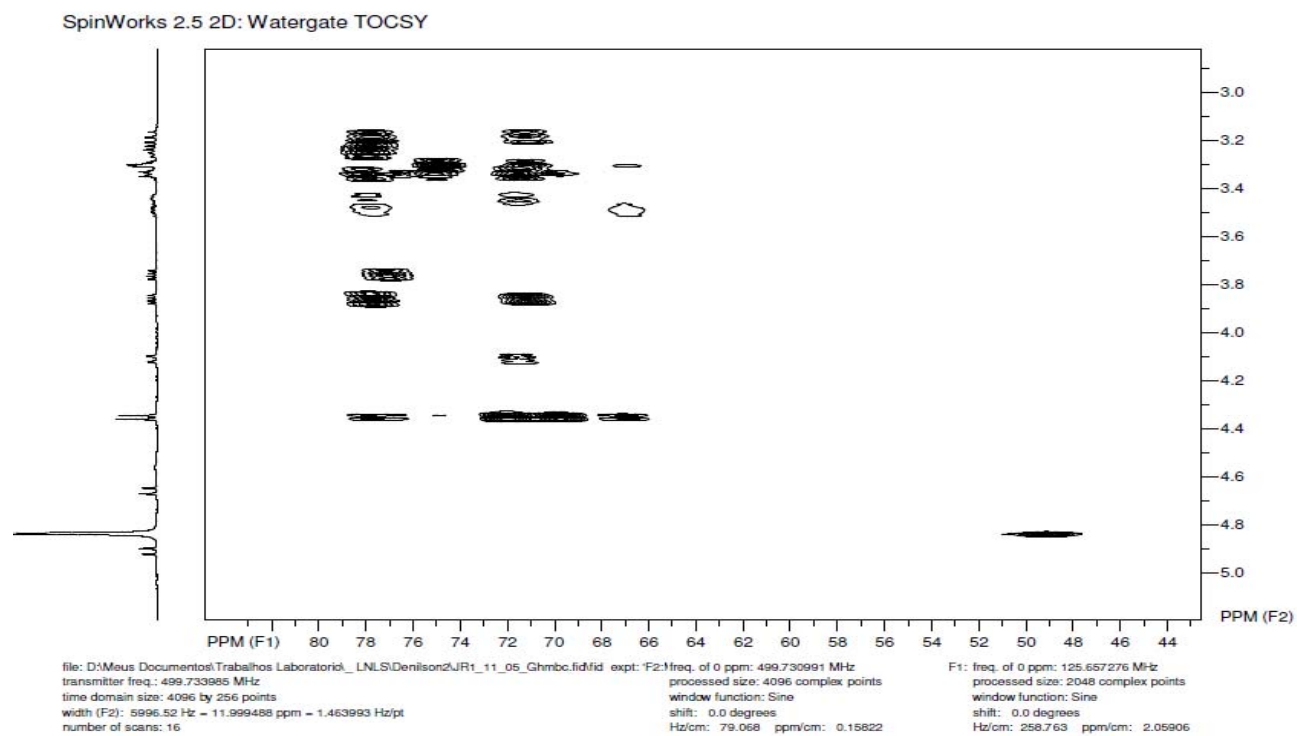


FIGURA 12E Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (500 x 126 MHz) de Jr3-11-05 em CD_3OD

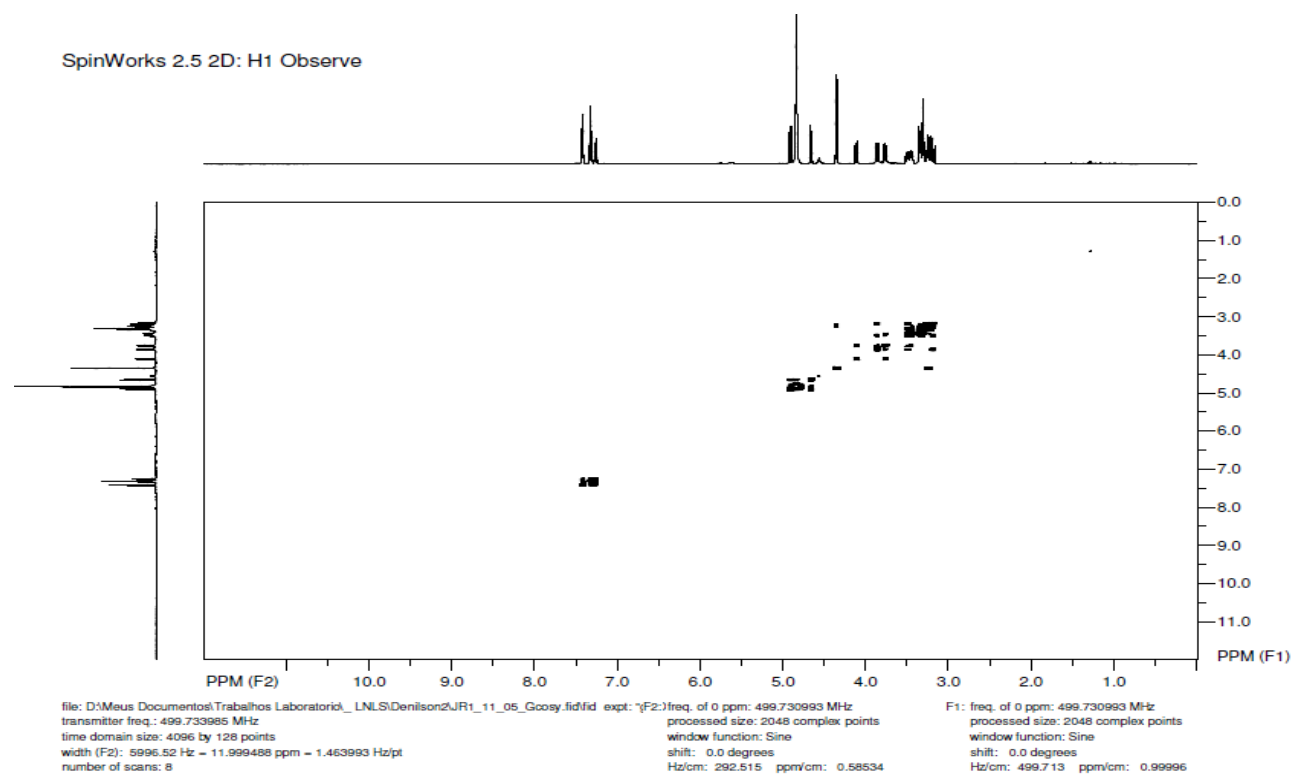


FIGURA 13E Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz

SpinWorks 2.5 2D: H1 Observe

208

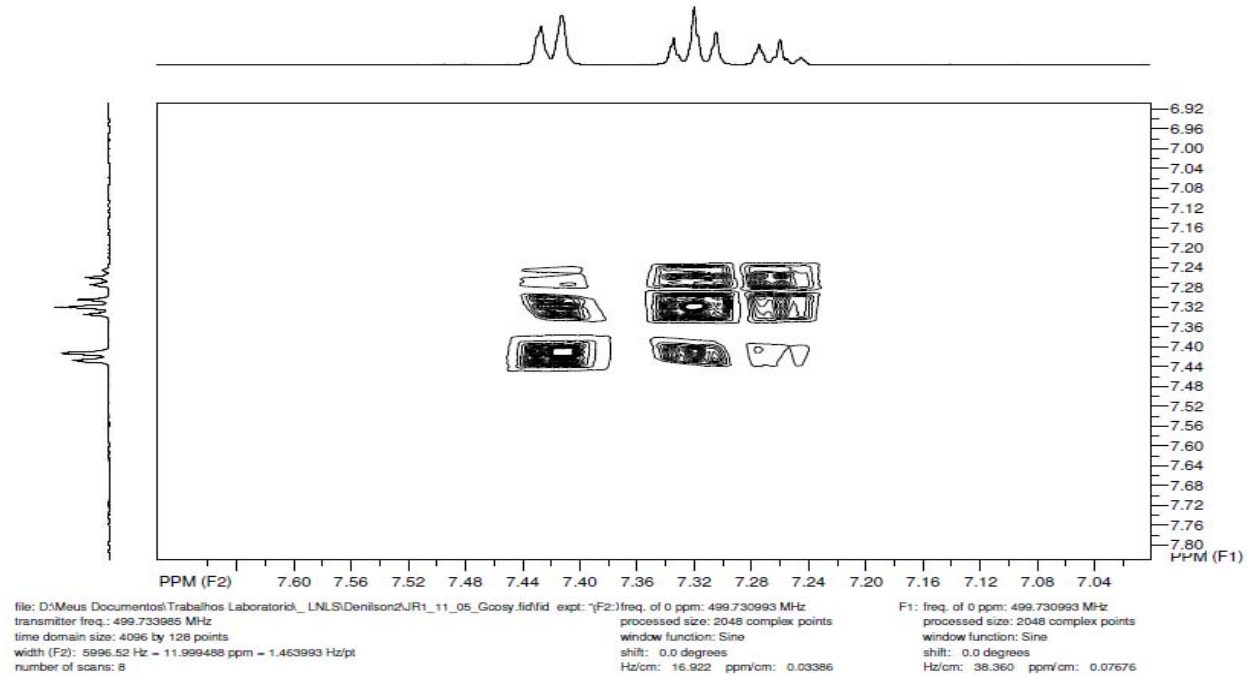


FIGURA 14E Expansão da correlação homonuclear ¹H x ¹H (COSY) de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz

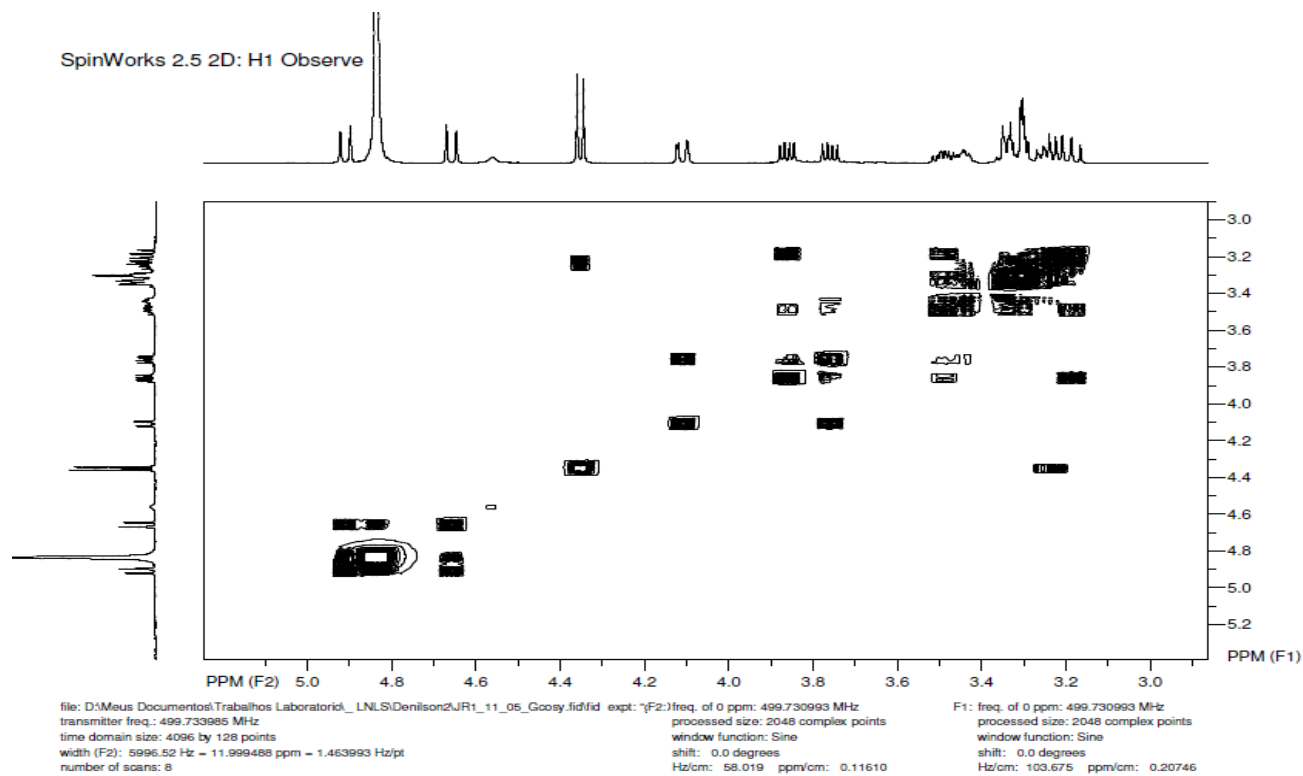
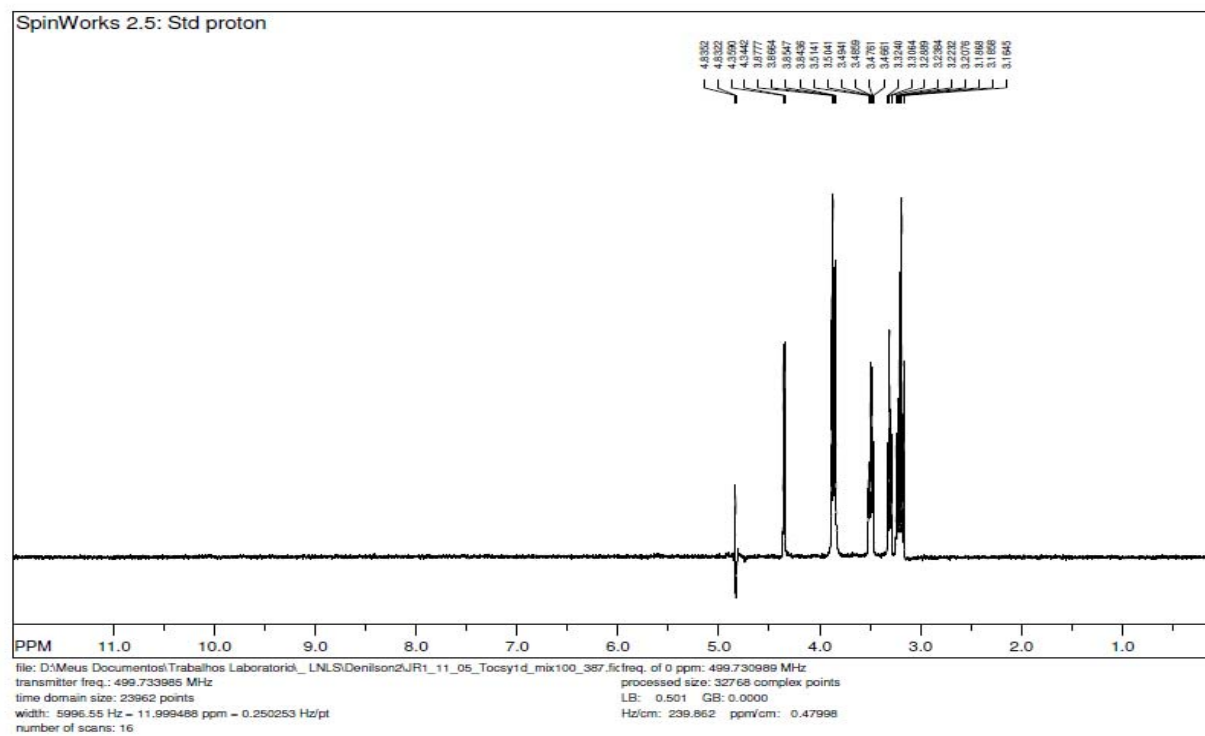


FIGURA 15E Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-11-05 em CD_3OD , 500 MHz

FIGURA 16E TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 3,86)

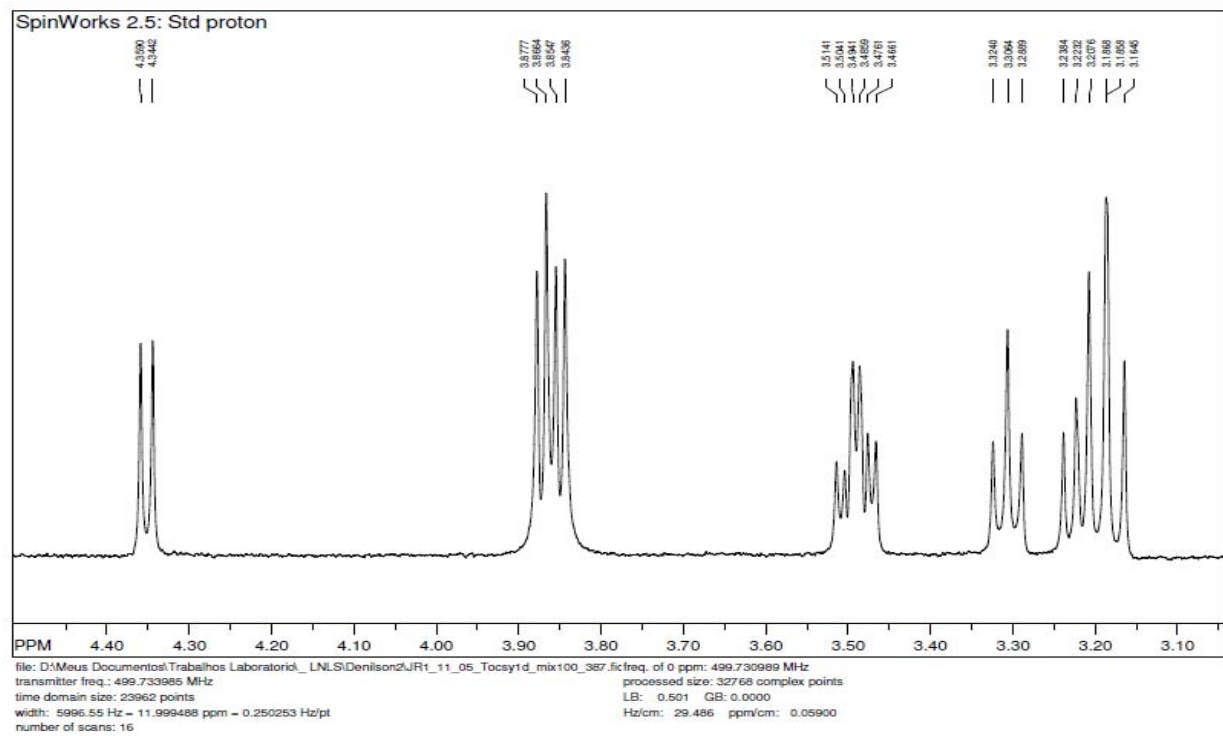
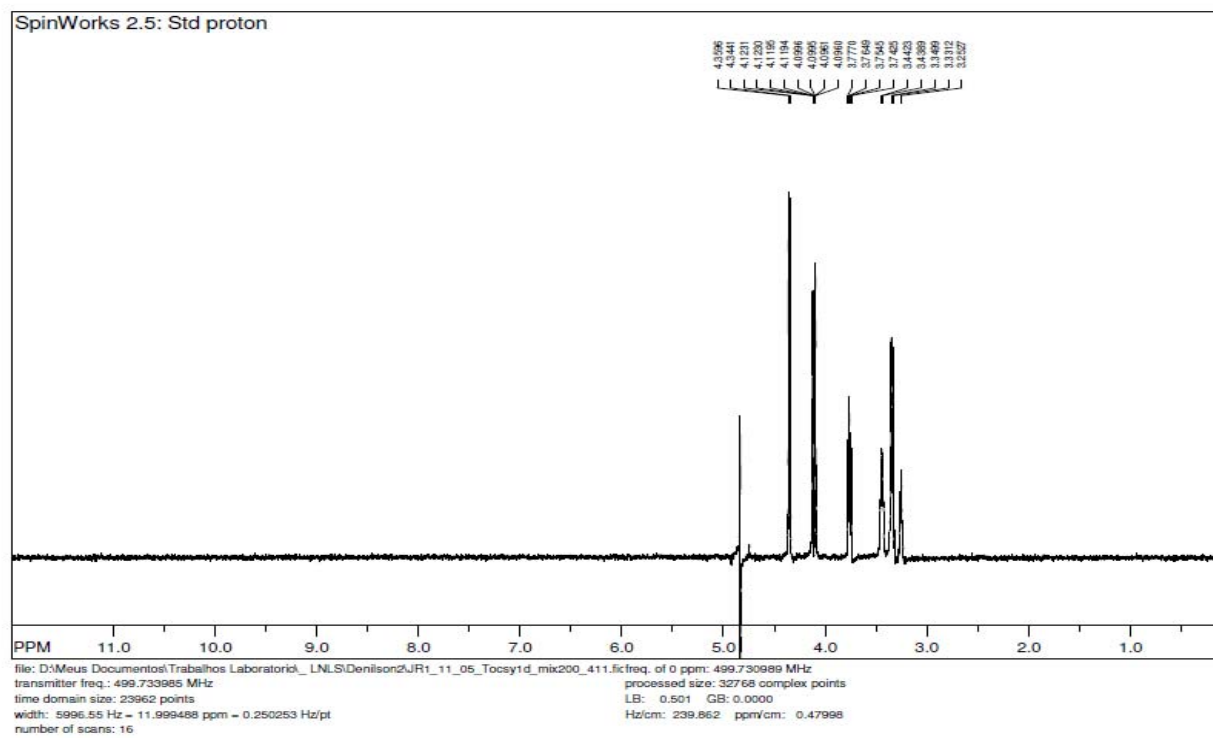
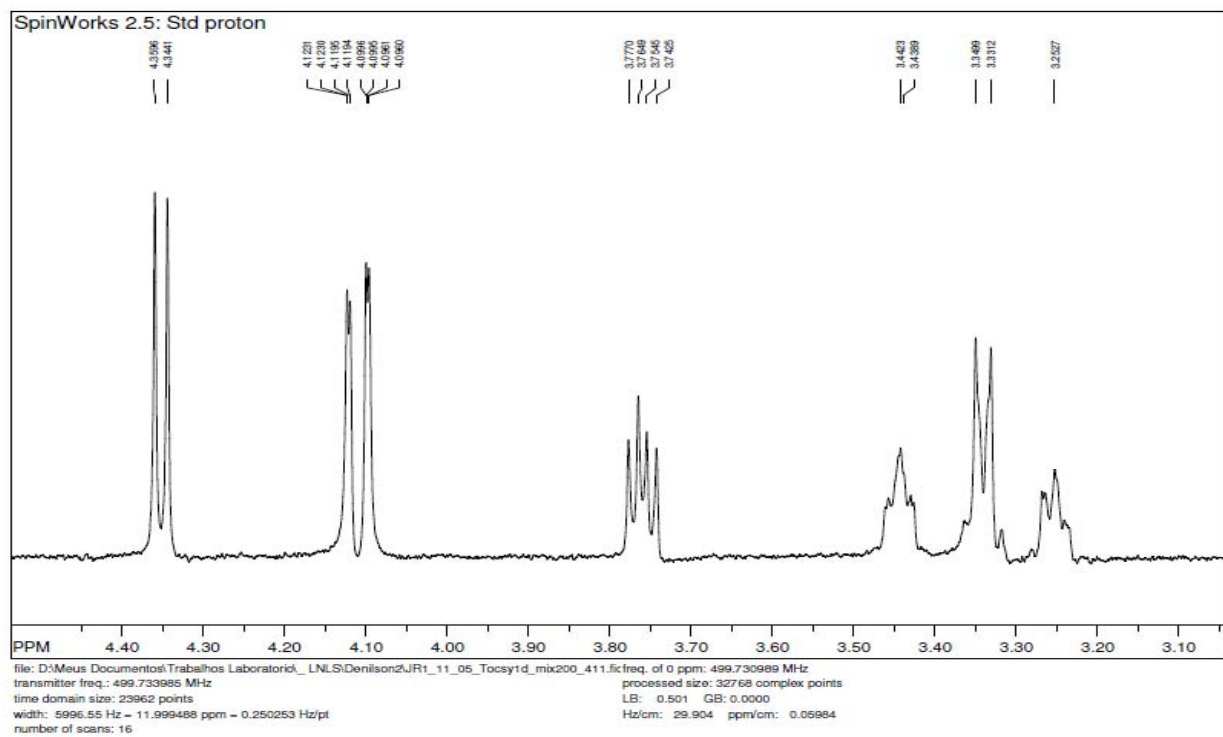
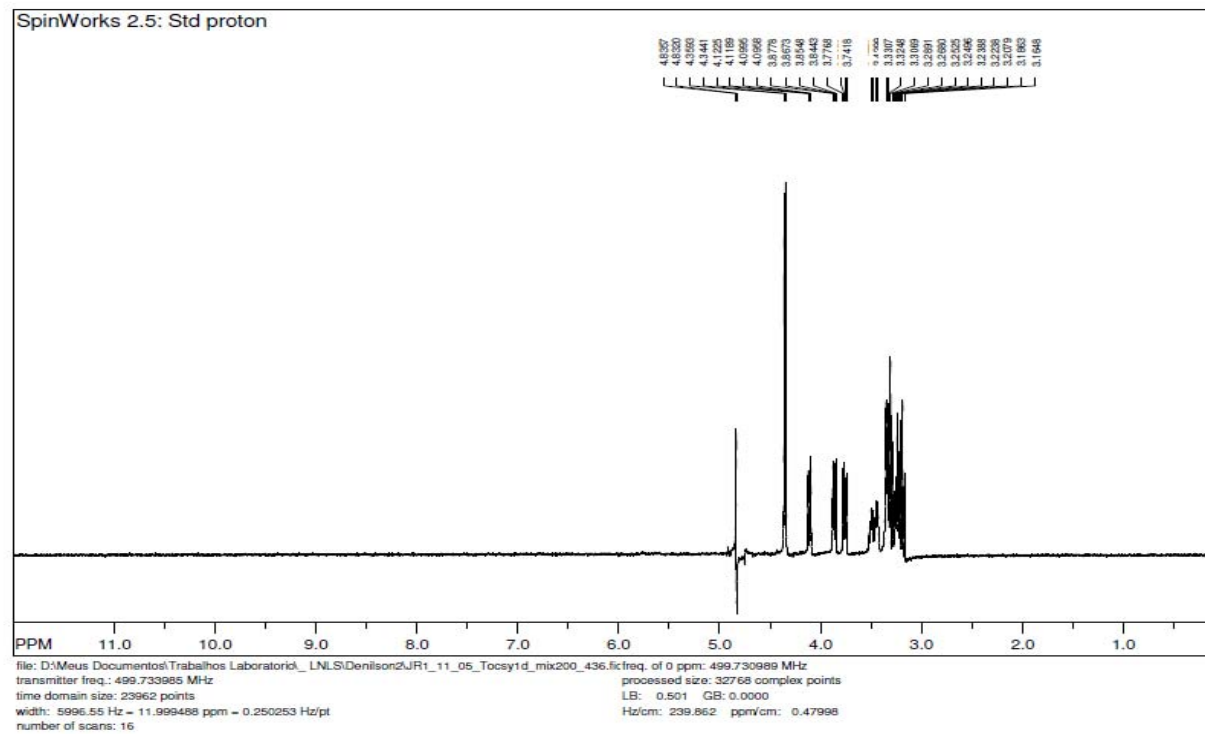


FIGURA 17E Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 3,86)

FIGURA 18E TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,11)

FIGURA 19E Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,11)

FIGURA 20E TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_{H} 4,35)

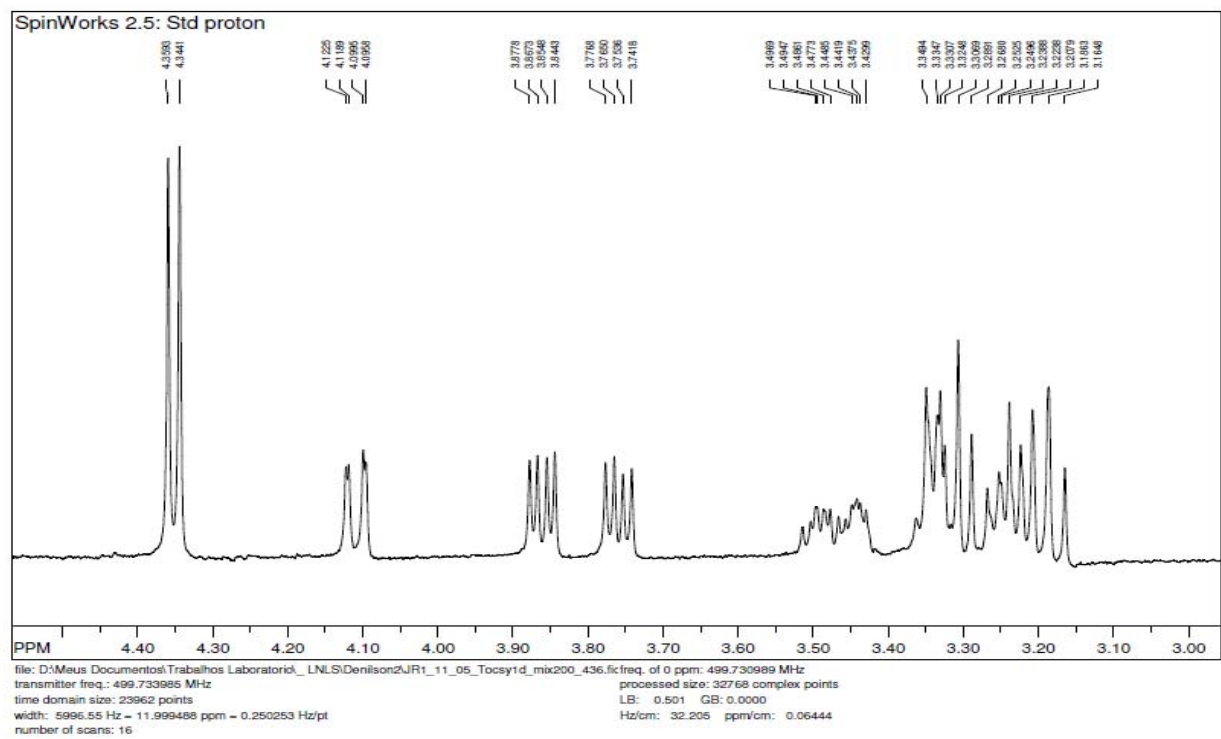
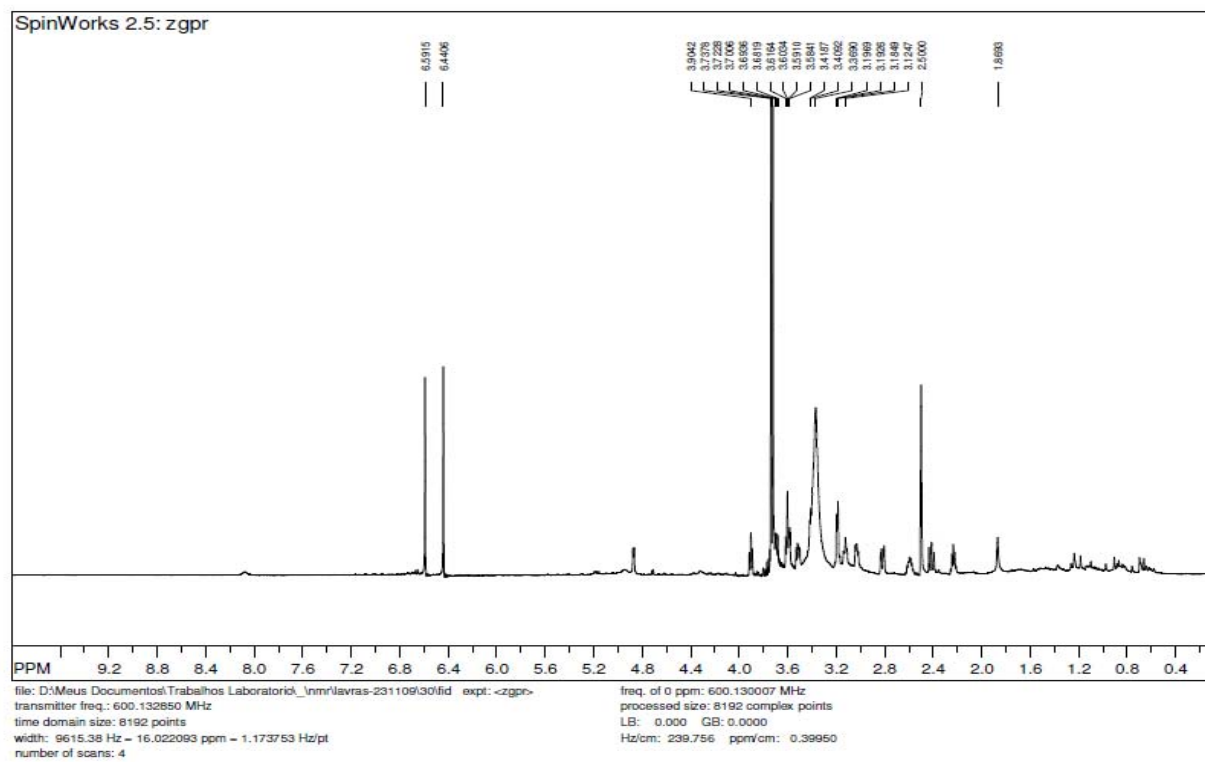
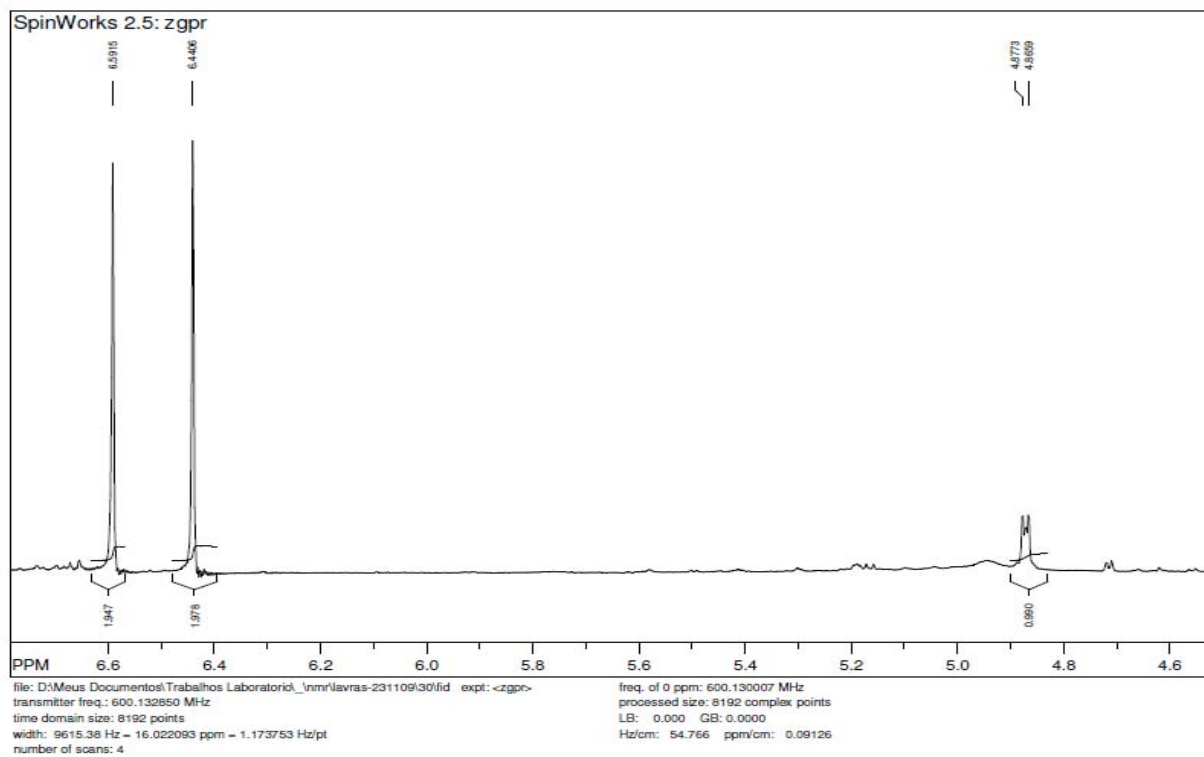


FIGURA 21E Expansão do TOCSY 1D de Jr3-11-05 em CD₃OD, 500 MHz (sinal irradiado: δ_H 4,35)

ANEXO F		Página
FIGURA 1F	Espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600MHz.....	218
FIGURA 2F	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600MHz.....	219
FIGURA 3F	Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600MHz.....	220
FIGURA 4F	Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	221
FIGURA 5F	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	222
FIGURA 6F	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	223
FIGURA 7F	Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC <i>phase sensitive</i>) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	224
FIGURA 8F	Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	225
FIGURA 9F	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	226
FIGURA 10F	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	227
FIGURA 11F	Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) ^1H x ^{13}C (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6	228

FIGURA 12F	Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600 MHz.....	229
FIGURA 13F	Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600 MHz.....	230
FIGURA 14F	Correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600 MHz.....	231
FIGURA 15F	Expansão da correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-12-03 em DMSO- d_6 , 600 MHz.....	232

FIGURA 1F Espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$, 600MHz

FIGURA 2F Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$, 600MHz

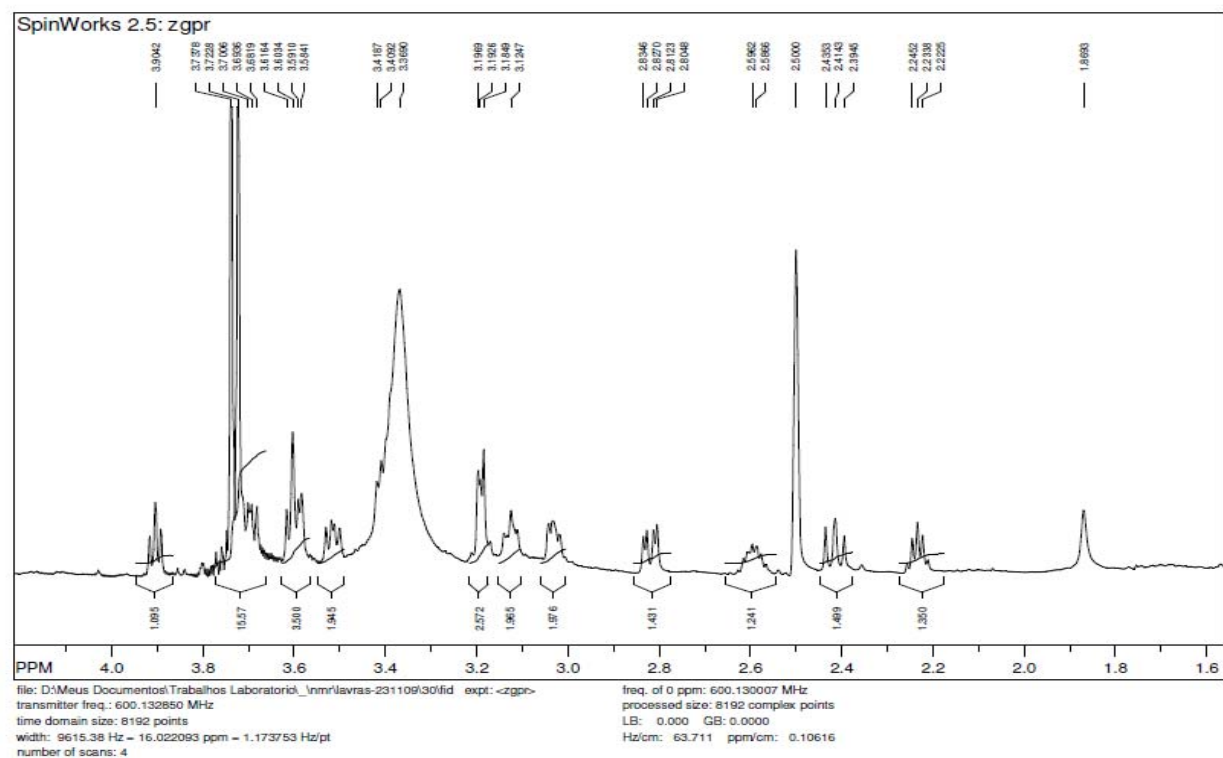


FIGURA 3F Expansão do espectro de RMN ^1H de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$, 600MHz

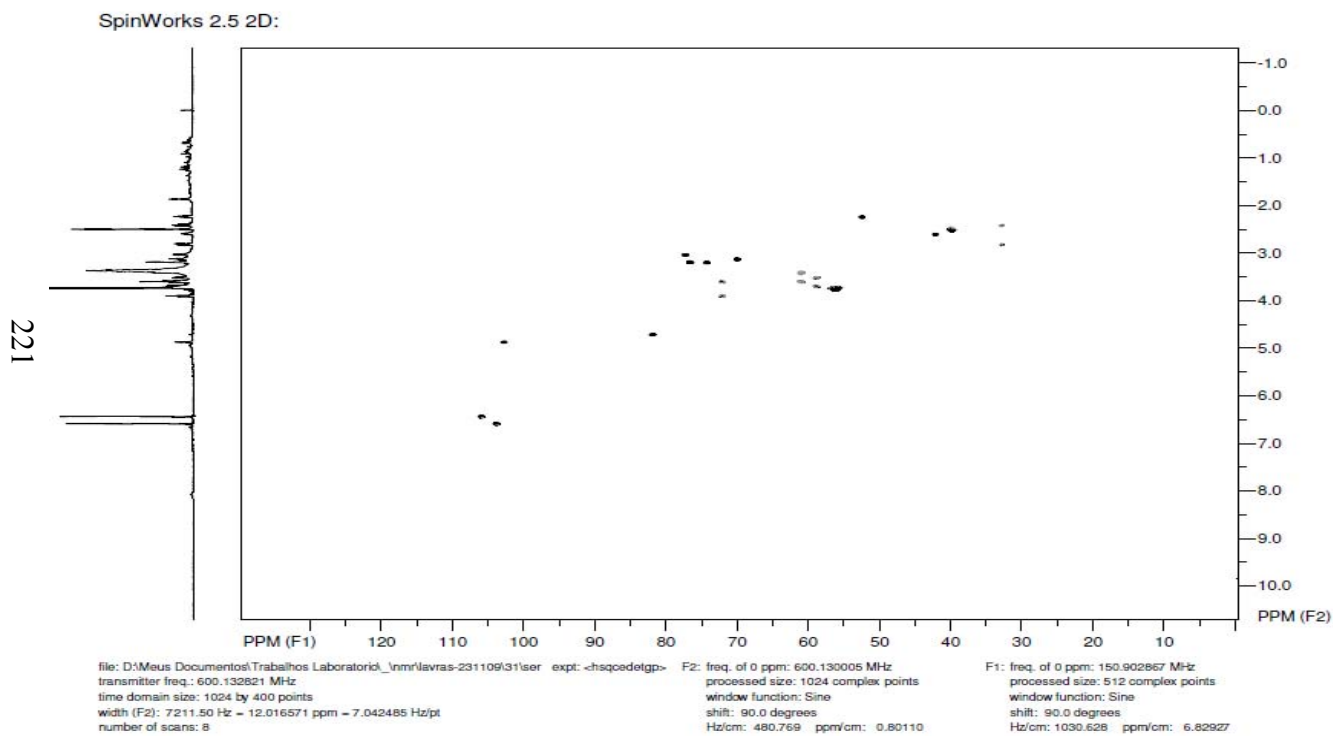


FIGURA 4F Correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

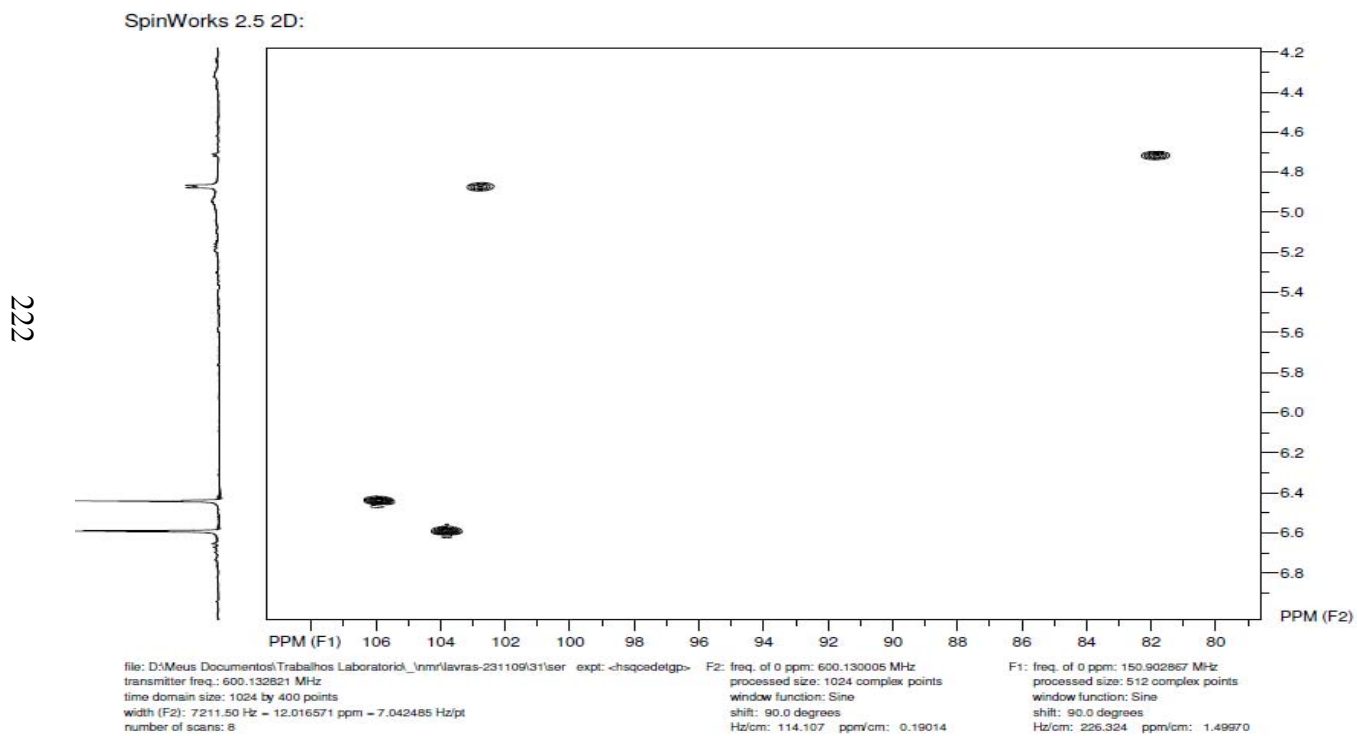


FIGURA 5F Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

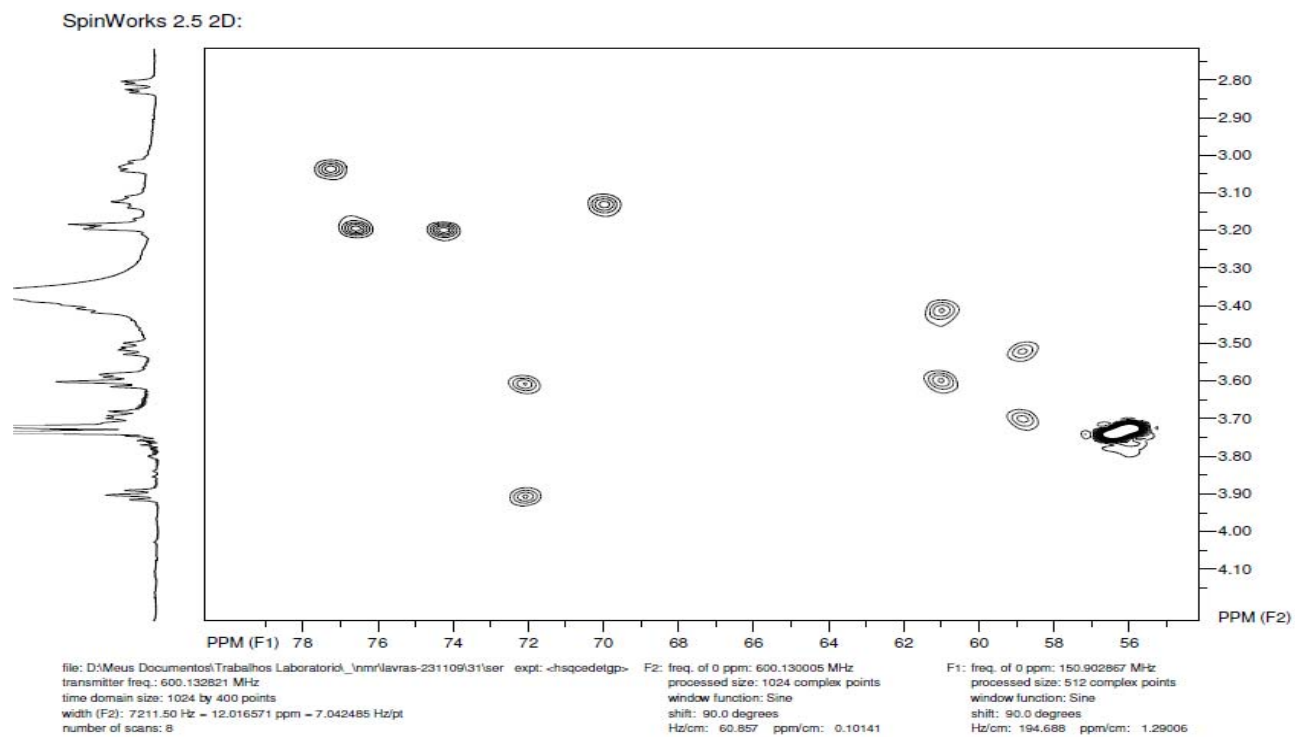


FIGURA 6F Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

224

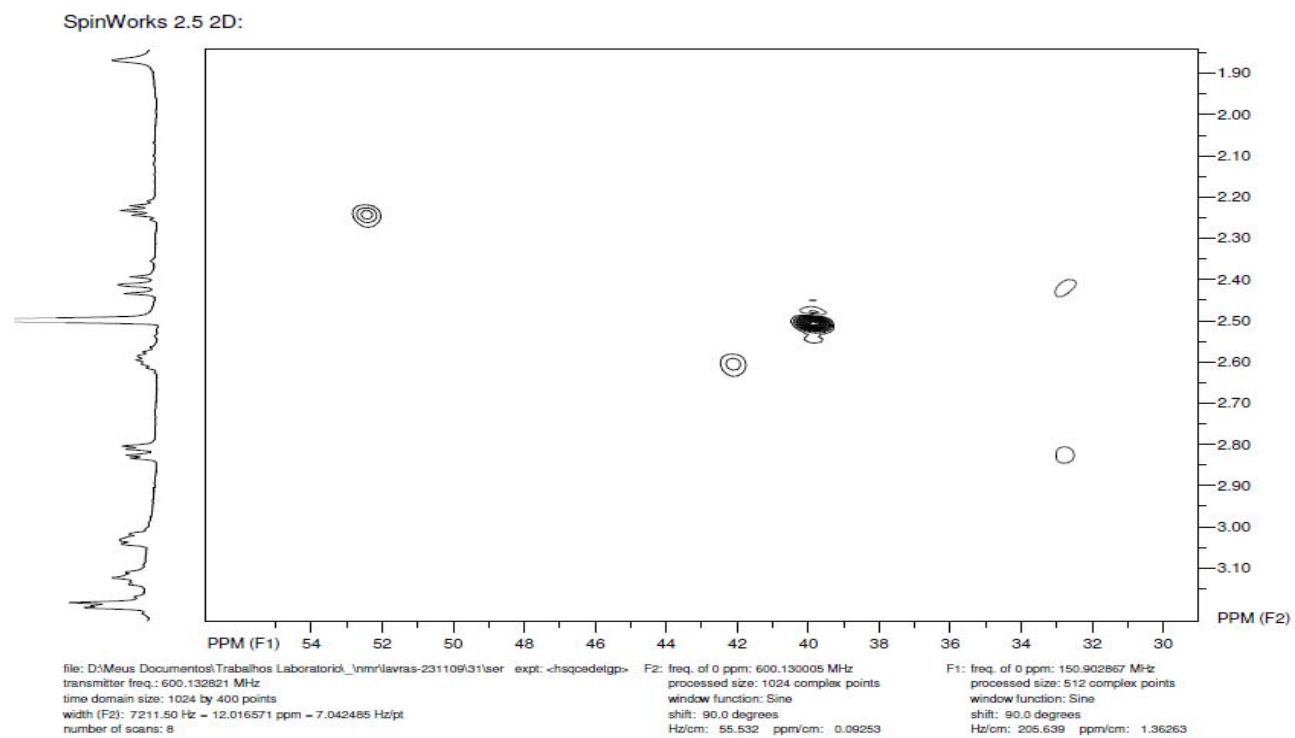


FIGURA 7F Expansão da correlação heteronuclear a curta distância (HSQC *phase sensitive*) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

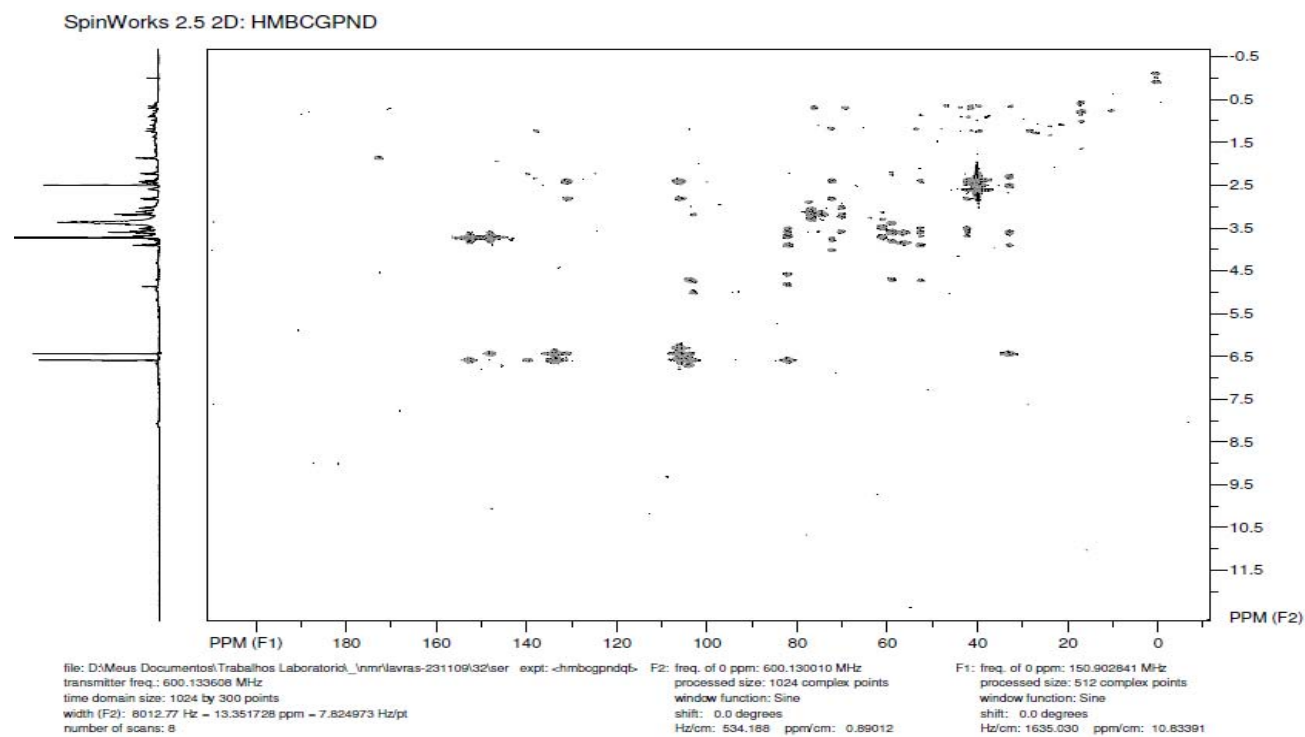
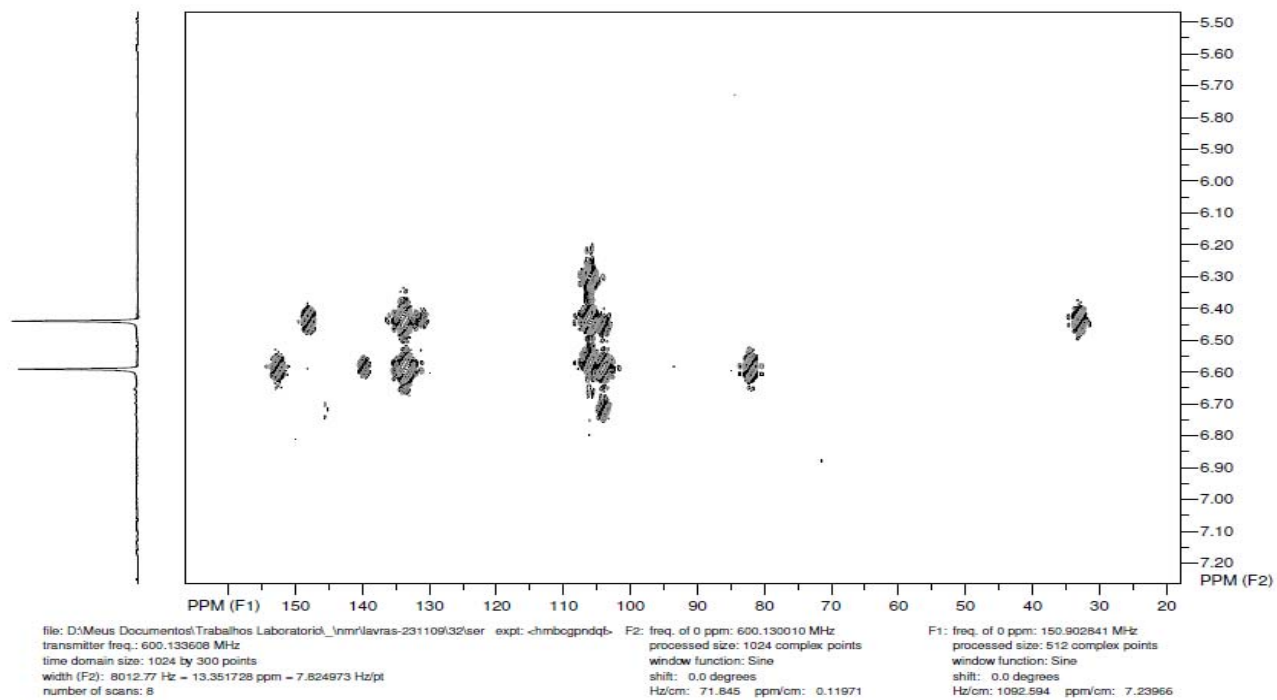


FIGURA 8F Correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

SpinWorks 2.5 2D: HMBCGPND

FIGURA 9F Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

SpinWorks 2.5 2D: HMBCGPND

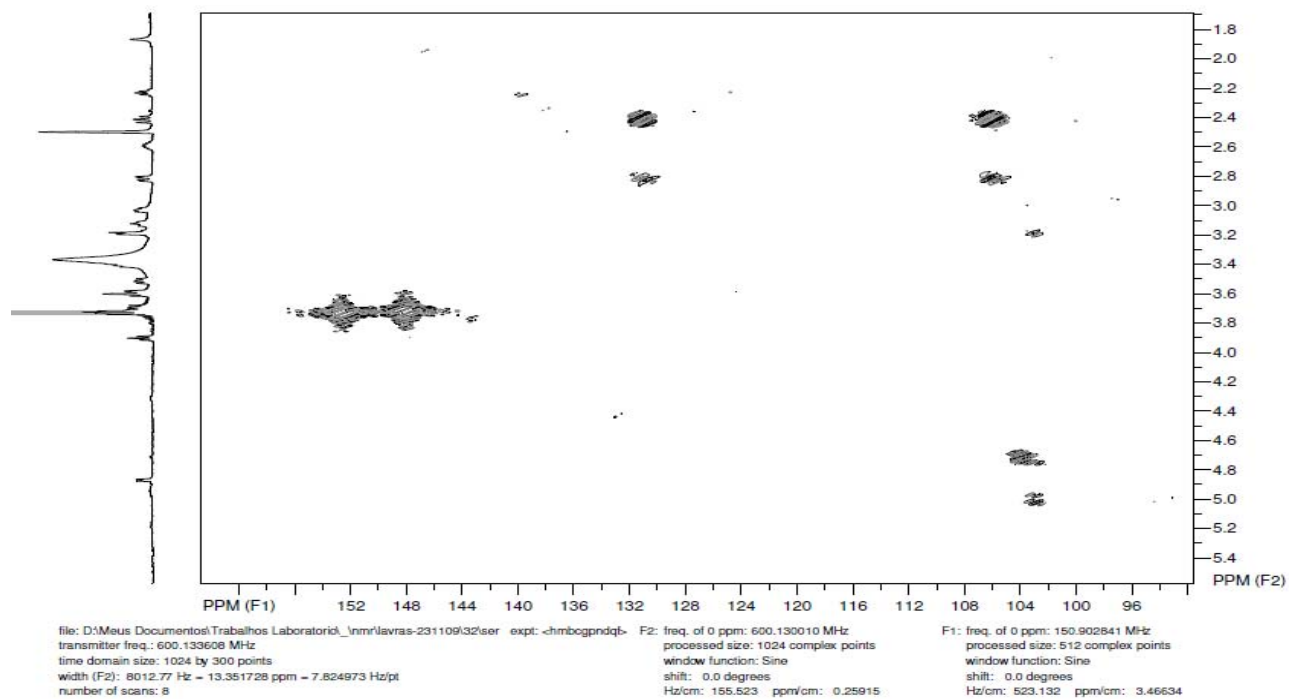


FIGURA 10F Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

SpinWorks 2.5 2D: HMBCGPND

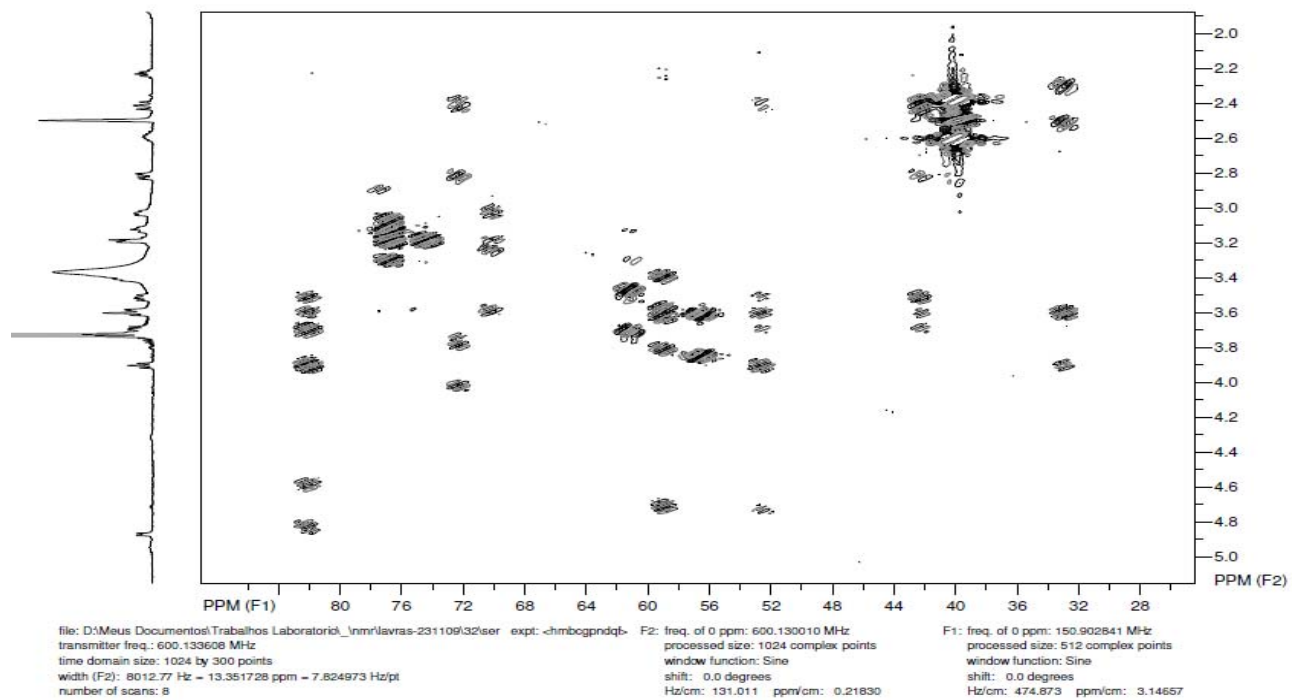


FIGURA 11F Expansão da correlação heteronuclear a longa distância (HMBC) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 x 151 MHz) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$

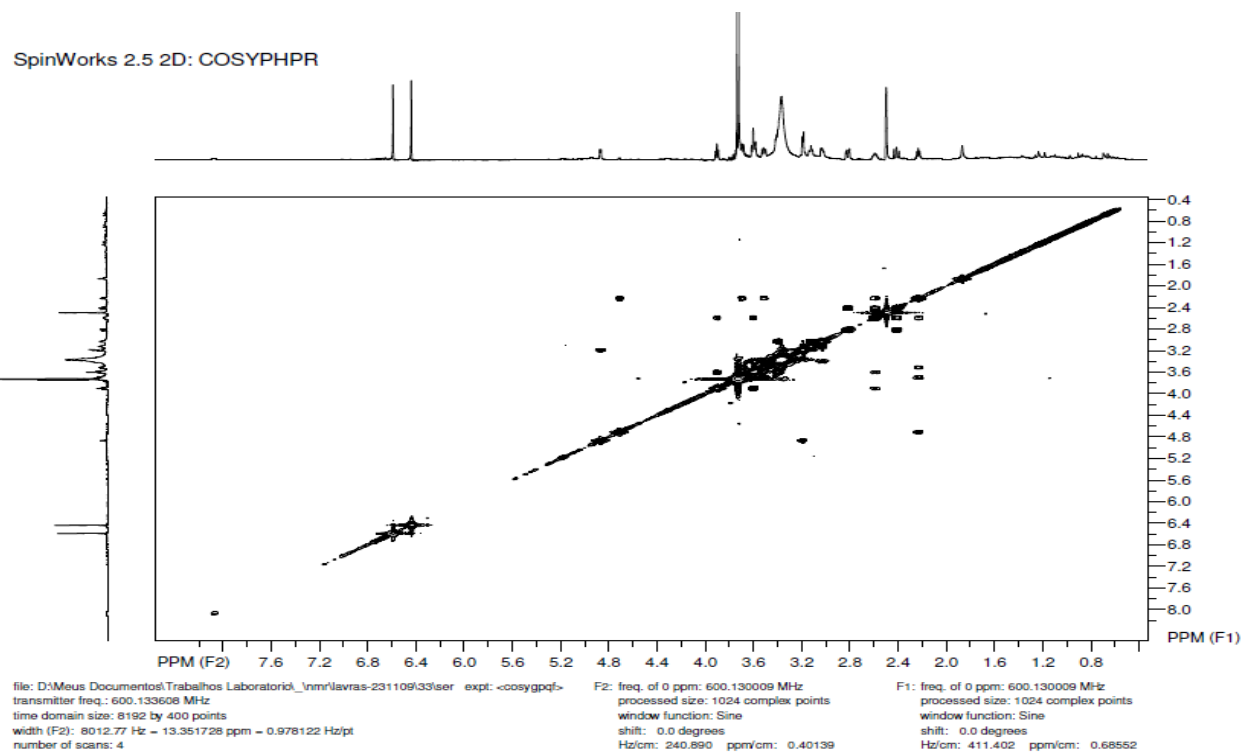


FIGURA 12F Correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz

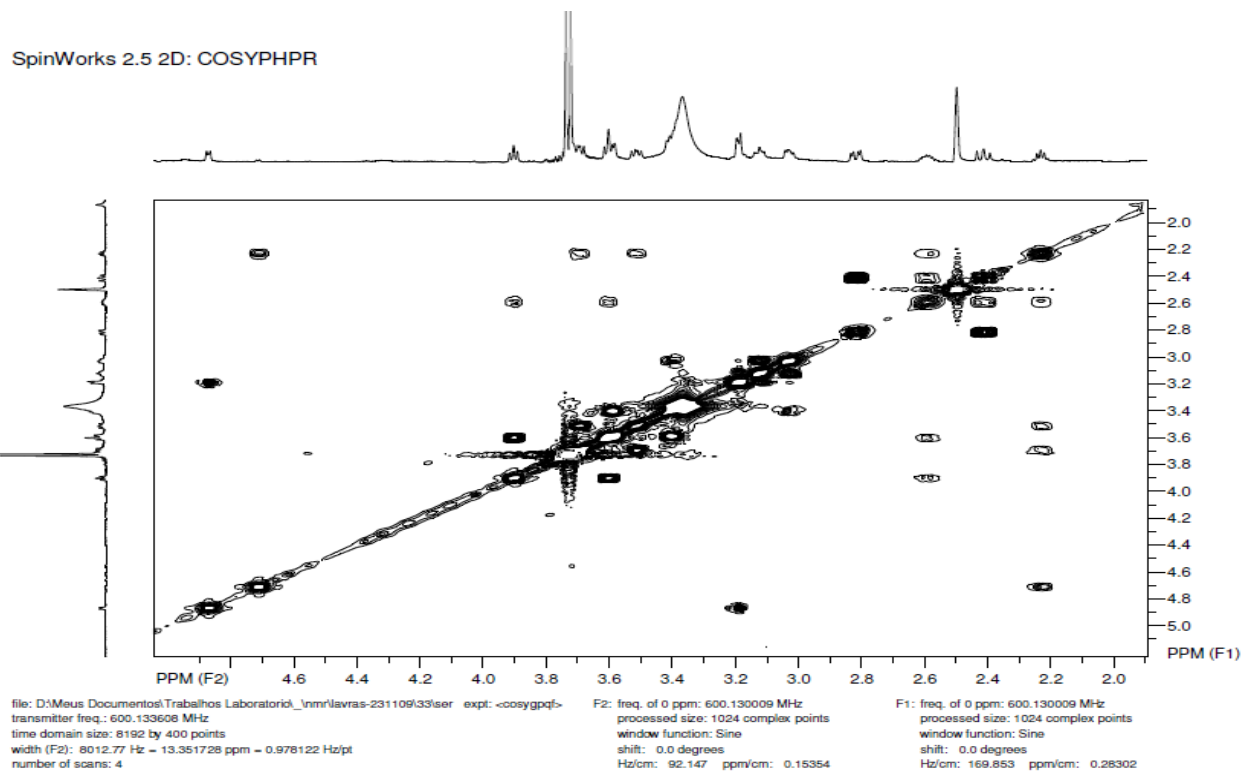
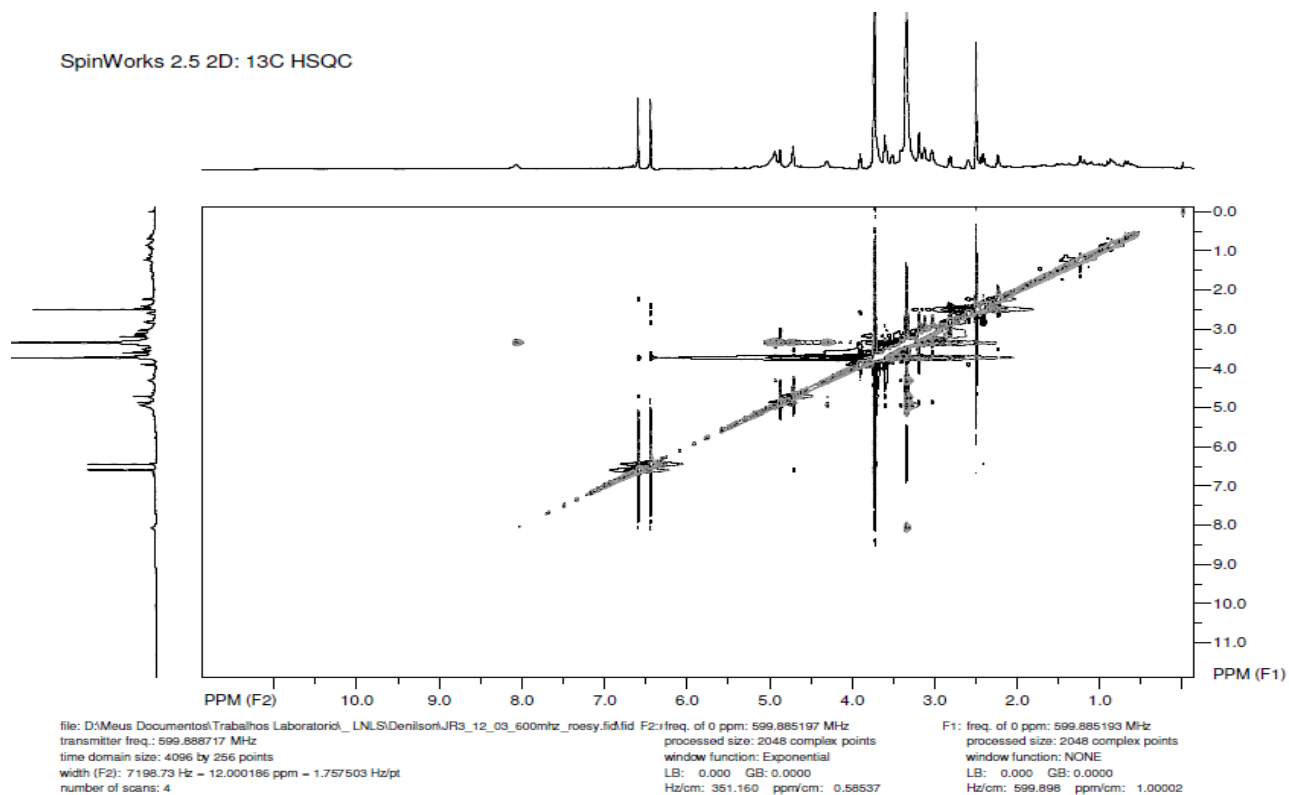


FIGURA 13F Expansão da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz

SpinWorks 2.5 2D: 13C HSQC

FIGURA 14F Correlação espacial homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (ROESY) de Jr3-12-03 em $\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz

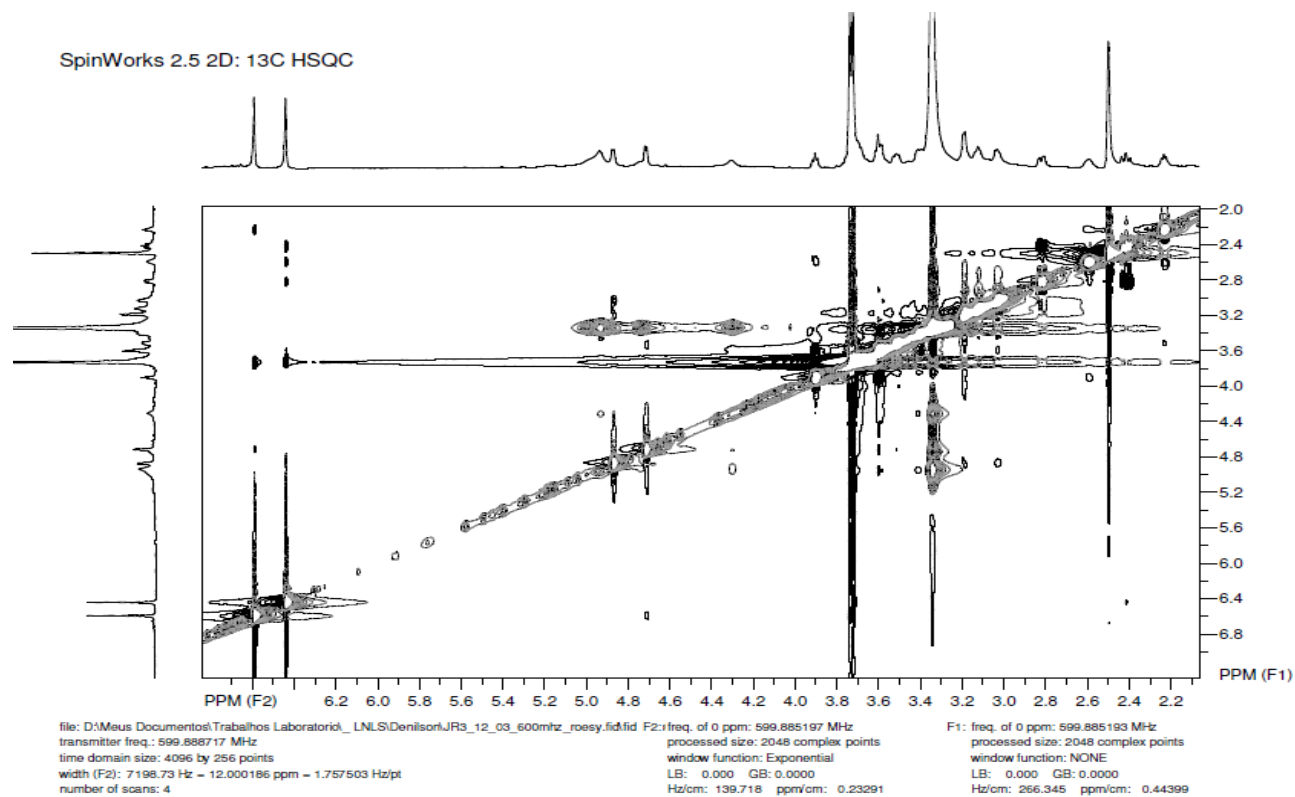


FIGURA 15F Expansão da correlação espacial homonuclear ¹H x ¹H (ROESY) de Jr3-12-03 em DMSO-*d*₆, 600 MHz