HONORINA MARIA DE MATOS CIDADE

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Elucidação Estrutural e Actividade Farmacológica de Compostos Bioactivos de Origem Vegetal

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2001

HONORINA MARIA DE MATOS CIDADE

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Elucidação Estrutural e Actividade Farmacológica de Compostos Bioactivos de Origem Vegetal

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

2001

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor Apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

ORIENTADOR:

Professora Doutora Maria José Teixeira Guedes González - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

CO-ORIENTADOR:

Professor Doutor Anake Kijjoa- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Ao Luís

Aos meus pais

À minha irmã

Pelo seu amor, carinho e compreensão

Este trabalho foi realizado no Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto (Unidade I.& D. nº 226/94), Faculdade de Farmácia, e com o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FEDER, Praxis XXI, POCTI).

Parte do trabalho incluído nesta dissertação foi apresentada nas publicações e comunicações seguintes:

- A. Kijjoa, H.M. Cidade, M.M.M. Pinto, M.J.T.G. González, C. Anantachoke, T.E. Gedris, W. Herz, "Prenylflavonoids from *Artocarpus elasticus*", *Phytochemistry*, 1996, **43**, 3, 691-694.

- M.S.J. Nascimento, H.M. Cidade, M. Pinto, A. Kijjoa, "Anticomplementary Activity of Prenylated Flavones from *Artocarpus elasticus*" no 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Regensburg, 7-12 de Setembro de 1997.

- H.M. Cidade, M.J. González, C.M.M. Afonso, M.M.M. Pinto, Artur M.S. Silva, A. Kijjoa, "Novel Prenylflavones from *Artocarpus elasticus*" no 2º Encontro Nacional de Química Orgânica da Sociedade Portuguesa de Química, no ITQB, Oeiras, 17-19 de Setembro de 1997.

- M.S.J. Nascimento, H.M. Cidade, A. Kijjoa, M.M.M. Pinto, A. Kijjoa, "Anticomplementary Activity of Prenylated Flavones from *Artocarpus elasticus*", *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 1997, **7**, 135-137.

- A. Kijjoa, H.M. Cidade, M.J.T.G. González, C.M.M. Afonso, A.M.S. Silva, W. Herz, "Further Prenylflavonoids from *Artocarpus elasticus*", *Phytochemistry*, 1998, **47**, 875-878.

- M.S.J. Nascimento, H. Cidade, M.M.M. Pinto, M. Pedro, F. Cerqueira, A. Kijjoa, "Cytotoxic and Anti-Proliferative Effects of Prenylated Flavones from *Artocarpus elasticus*" no XVIth International Symposium on Medicinal Chemistry, Bolonha, Itália, 18-22 de Setembro de 2000.

- H.M. Cidade, M.S.J. Nascimento, M.M.M. Pinto, A. Kijjoa, A. Silva, W. Herz, "Artelastocarpin and Carpelastofuran, Two New Flavones and Cytotoxicities of Prenyl Flavonoids from *Artocarpus elasticus* against Three Cancer Cell Lines", *Planta Med.*, 2001 (aceite para publicação).

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho teria sido impossível sem a colaboração e o incentivo de várias pessoas. Desta forma, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento:

Ao Professor Doutor Anake Kijjoa, co-orientador desta tese, gostaria de agradecer a possibilidade de poder trabalhar na área de Produtos Naturais. A ele devo o meu início na investigação e o entusiasmo pelo trabalho nesta área. Quero ainda manifestar a minha profunda admiração e reconhecimento pela inestimável orientação científica e por todo o apoio e amizade demonstradas durante estes anos de trabalho em conjunto. Agradeço ainda a disponibilidade que sempre demonstrou para me auxiliar em todas as fases do meu trabalho, nomeadamente na execução e interpretação de espectros de RMN.

À Professora Doutora Maria José González, supervisora desta tese, gostaria de agradecer a formação científica e o permanente incentivo e amizade, que sempre me proporcionou. Pela orientação que permitiu a realização deste trabalho, expresso também o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Madalena Pinto o meu especial reconhecimento por ter acreditado em mim e me ter concedido a possibilidade de trabalhar no Laboratório de Química Orgânica. Quero ainda manifestar o meu agradecimento pelos constantes ensinamentos, o estimulo e a amizade que sempre me proporcionou desde o início da minha actividade neste Laboratório.

À Professora Doutora Maria José Alcaraz Tormo quero manifestar o meu agradecimento pelos ensinamentos e facilidades concedidas para a realização dos ensaios de avaliação das actividades antioxidante e anti-inflamatória no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência.

À Professora Doutora Maria de São José Nascimento agradeço o apoio técnico e científico prestado para a interpretação dos resultados de actividade biológica e a maneira diligente com que sempre respondeu às minhas solicitações. À responsável pelo grupo de Bioensaios do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto e às licenciadas Drª Fátima Cerqueira e Drª Madalena Pedro agradeço

a maneira generosa e desinteressada com que me cederam os resultados de actividade imunomoduladora e do crescimento de linhas celulares tumorais humanas.

Ao Professor Doutor Werner Herz do Departamento de Química, The Florida State University, Tallahassee, EUA, pela valiosa discussão do trabalho.

À Doutora Choojit Anantachoke, Forest Products Research Division, Royal Forest Department, Bangkok, Tailândia, pela colheita, classificação e obtenção do extracto da planta.

Ao Professor Doutor Artur Silva, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, as facilidades concedidas e a disponibilidade na obtenção dos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz, bem como os espectros de COSY, HETCOR e HMBC.

Ao Serviço de Espectrometria de Massa do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, na pessoa da Professora Doutora Ana Magalhães Cardoso e Drª Cristina Barros a obtenção de espectros de EM-IE, EM-FAB^{+} e EM-IQ^{+}.

Ao Doutor Graham Eaton do Departamento de Química da Universidade de Leicester, Inglaterra, pela realização de espectros de massa de alta resolução.

Ao Professor Doutor Carlos Afonso do Laboratório de Química Orgânica pela colaboração na purificação de compostos naturais através de HPLC e disponibilidade que sempre demonstrou para me auxiliar.

À Professora Doutora Maria Elizabeth Tiritan do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto pelos ensinamentos na área de modelização molecular e pela amizade e apoio que sempre demonstrou.

Ao Professor Doutor Luís Vieira do Departamento de Química do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar a amizade e disponibilidade com que sempre atendeu aos meus pedidos.

Ao Serviço de Iconografia da Faculdade de Farmácia, na pessoa da D. Conceição Poiares, toda a colaboração prestada.

A todos os Docentes, Colegas e Auxiliares do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto que me acompanharam ao longo destes anos e de quem sempre recebi uma grande amizade.

A todos os Amigos que sempre me apoiaram com as suas palavras sábias nos momentos mais difíceis.

RESUMO

Parte A: Isolamento e elucidação estrutural de metabolitos secundários de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

Esta dissertação relata o estudo químico dos metabolitos secundários de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex. Blume (Moraceae). Do extracto clorofórmico da madeira desta espécie foram isoladas nove flavonas isopreniladas: artocarpesina, artelasticina, ciclocomunina, artelastina, artelastocromeno, artelastofurano, artelastinina, artelastocarpina e carpelastofurano. Isolou-se ainda o β-sitosterol e o 2,4-diidroxibenzoato de etilo.

Dos compostos referidos a artelasticina, artelastina, artelastocromeno, artelastofurano, artelastocarpina e carpelastofurano são descritos pela primeira vez.

As estruturas foram todas estabelecidas com base em métodos espectroscópicos (IV, UV, RMN de ^{1}H e ^{13}C, COSY, HETCOR, HMBC, INEPT, NOESY), sendo algumas auxiliadas por transformação química, através da obtenção de derivados acetilados.

Parte B: Determinação da actividade biológica dos metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

Neste trabalho avaliou-se a actividade anti-inflamatória e antioxidante da artocarpesina, artelasticina, artelastina e artelastocromeno. Realizaram-se ensaios *in vitro* para avaliar a influência destas flavonas na libertação de radicais livres (anião superóxido) e de enzimas lisosómicas (elastase e mieloperoxidase) em leucócitos humanos, bem como a sua actividade sobre tipos diversos de PLA_2 secretoras sobre as cicloxigenases humanas 1 e 2. Foi ainda estudada a acção destes flavonóides no processo da peroxidação lipídica e na captação de radicais superóxido e peroxilo. Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* mostraram que, de um modo geral, as flavonas estudadas na concentração de 10 μM apenas interferiram ligeiramente nos vários parâmetros do processo inflamatório testados, tendo somente o artelastocromeno revelado uma forte inibição da enzima mieloperoxidase. Com o objectivo de verificar se esta actividade se manifestava em ensaios *in vivo* utilizou-se o modelo de "bolsa de ar em ratinho", usando o zimosano como indutor da inflamação. Neste ensaio avaliou-se a influência do artelastocromeno na migração leucocitária, libertação de mieloperoxidase e

geração de PGE_2. O artelastocromeno não revelou interferir com qualquer um dos parâmetros estudados.

Para todas as flavonas isoladas desta planta foram ainda determinadas as actividades imunoduladora e sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas.

Na avaliação da actividade imunomoduladora determinou-se a influência destas flavonas sobre as vias clássica e alternativa do sistema humano do complemento e sobre a proliferação de linfócitos humanos. Embora não se tenha observado qualquer actividade na via alternativa da activação do complemento, todas as flavonas revelaram uma actividade anticomplementar moderada na via clássica de activação do complemento, verificando-se uma maior actividade para a artocarpesina, artelastina, artelastofurano e carpelastofurano. As oito flavonas isopreniladas exibiram uma forte actividade inibidora da proliferação de linfócitos humanos, principalmente a artelasticina, a artelastina e o artelastocromeno.

Na determinação da actividade sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas foram usadas as seguintes linhas: mama (MCF-7), renal (TK-10), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-H460) e SNC (SF-268). As flavonas isopreniladas inibiram o crescimento de todas as linhas tumorais, verificando-se que a artelastina exibiu a maior actividade.

ABSTRACT

Part A: Isolation and structural elucidation of secondary metabolites of *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

This Thesis reports chemical studies of secondary metabolites of *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume (Moraceae). Nine isoprenylated flavones have been isolated from the chloroformic extract of its wood: artocarpesin, artelasticin, Cyclocommunin, artelastin, artelastochromene, artelastofuran, artelastinin, artelastocarpin and carpelastofuran, as well as β-sytosterol and ethyl 2,4-dihydroxybenzoate.

While artocarpesin and cyclocommunin have been previously isolated from other species of *Artocarpus*, artelasticin, artelastin, artelastochromene, artelastofuran, artelastocarpin and carpelastofuran are new natural compounds.

Spectroscopic methods (IR, UV, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HETCOR, HMBC, INEPT and NOESY) and chemical modification, especially acetylation were used for structure elucidation of the compounds.

Part B: Biological activity evaluation of secondary metabolites of *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

In this study the anti-inflammatory and antioxidant activity of artocarpesin, artelasticin, artelastin and artelastochromene were evaluated. By *in vitro* assays it was studied the influence of these flavones in the liberation of free radicals (superoxide anion) and lysosomic enzymes (elastase and myeloperoxidase) from human leukocytes, as well as their activity in different types of secretory PLA_2 and human cyclooxygenases 1 and 2. The effect of these flavones in lipid peroxidation and superoxide and peroxyl radicals scavenging was also evaluated. In general, the results obtained showed that all flavones, assayed at 10 μM, had little effect in the inflammatory parameters studied, except for artelastochromene, which was a potent inhibitor of the myeloperoxidase enzyme. To determinate if this activity was observed using *in vivo* methods it was performed the "rat air pouch model" stimulated by zymosan. In this assay the effect of artelastochromene in leukocytes migration, myeloperoxidase liberation and PGE_2 generation was evaluated. None of these parameters were affected by artelastochromene at the concentration tested.

Immunomodulatory activity and the effect on the growth of human tumor cell lines have been evaluated for all flavones isolated from this plant.

Concerning the immunomodulatory activity the influence of these flavones in the classical and alternative pathway of human complement system activation and in the proliferation of human lymphocytes was studied. While no anticomplementary activity has been observed in the alternative pathway of human complement system activation, all flavones showed moderate anticomplementary activity in the classical pathway, namely for artocarpesin, artelastin, artelastofuran and carpelastofuran, which was the most active compounds. The eight isoprenylated flavones showed a strong inhibitory activity in the proliferation of human lymphocytes, specially artelasticin, artelastin and artelastochromene.

In the evaluation of the activity on the growth of human tumor cell lines, five lines derived from different tumors were used: breast (MCF-7), melanoma (UACC-62), renal (TK-10), lung (NCI-H460) and CNS (SF-268). All flavones inhibited the growth of all tumoral lines, whereas artelastin was the most active flavone tested.

RÉSUMÉ

Parte A: Isolement et évaluation structurale des métabolites secondaires de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

Cette dissertation rapporte l'étude chimique des métabolites secondaires de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Bleume (Moraceae). De l'extrait chloroformique du bois de cette espèce nous avons isolé neuf flavones isoprenilées: artocarpesine, artelasticine, ciclocomunine, artelastine, artelastocromene, artelastofurane, artelastinine, artelastocarpine et carpelastofurane. Nous avons isolé, aussi, le β-sitosterol et le 2,4-dihydroxybenzoate de éthile.

Parmi ces composés l'artelasticine, la ciclocomunine, l'artelastine, l'artelastocromene, l'artelastocarpine et la carpelastofurane sont des substances décrites pour la premiére fois.

Des méthodes spectroscopiques et de modification chimique, particulièrement l'acétylation, on eté utilisés pour l'élucidation structurale des composés.

Parte B: Évaluation de l'activité biologique des métabolites secondaires de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

Dans ce travail l'activité anti-inflammatoire et antioxydative de l'artocarpesine, de l'artelasticine, de l'artelastine et de l'artelastocromene a eté evaluée. Nous avons fait des essais *in vitro* pour l'évaluation de la influence de ces flavones dans la libération des radicaux livres (anion superoxyde) et des enzymes lisosomiques (elastase et mieloperoxydase) dans des leucocytes humains, aussi bien que leur activité dans différentes PLA_2 sécretoires et cycloxygénases humaines 1 et 2. L'effect de ces flavonoides dans la peroxydation lipidique et dans la captation des radicaux anion superoxyde et peroxyle a eté aussi evalué. D'une façon génerale, les flavones etudiés, dans la concentration de 10 μM, on démontré une petit variation des paramétres du processus inflammatoire étudié, mais l'artelastocromene a montrée une forte inhibition de l'enzyme mieloperoxydase. Pour savoir si cette activité existe aussi *in vivo* nous avons utilisé le modèle de "bourse d'air chez le rat" oú le zimosane agit comme inducteur de l'inflammation. Dans cet essai nous avons observé l'influence de l'artelastocromene sur la migration leucocytaire, la libération de mieloperoxydase et la génération de PGE_2. L'artelastocromene n'a pas d'activité sur aucun des paramétres etudiés.

L'activité immunomodulatrice et l'effect dans l'acroissement de lignées céllulaires neoplasiques humaines de toutes les flavones isolées de cette plante a eté aussi evaluée.

L'évaluation de l'activité immunomodulatrice a eté faite à travers de la détermination de l'influence sur la voie classique et alternative du sistéme de complement humain et sur la prolifération des lymphocytes humains. Nous n'avons vu aucune activité dans le voie alternative du complement, mais toutes les flavones ont montré une activité anticomplementaire moderée sur la voie clássique. L'artocarpesine, l'artelastine, l'artelastofurane et la carpelastofurane on eté plus effectives en ce qui concerne leur activité anticomplementaire. Les huit flavones isoprenilés on montré une forte activité inhibitrice de la proliferation des lymphocytes humains, particulierement l'artelasticine, l'artelastine et l'artelastocromene.

Dans la determination de l'activité sur le acroissement de lignées cellulaires neoplasiques humaines on a utilisé cinq lignées derivées de différentes neoplasies: mamelle (MCF-7), rénal (TK-10), melanome (UACC-62), poumon (NCI-H60) et SNC (SF-268). Toutes les flavones isoprenilées on provoqué l'inhibition de toutes les lignées neoplasiques, don't l'artelastine est la plus effective.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABAP	2,2'-Azo-bis-2-amidinopropano
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroídicos
BB	Desacoplamento de banda larga por ruído modulador (Broad band decoupling)
Boc-Ala-OPhNO$_2$	N-terbutoxicarboxialanina-*p*-nitrofenilléster
BSA	Albumina sérica (Bovine seric albumine)
CAH	Cinamato 4-hidroxilase (Cinnamic acid 4-hydroxylase)
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
CD	"Cluster of differentiation"
CDK	Cinase dependente da ciclina (Cyclin dependent kinase)
C.E.Q.O.F.F.U.P.	Centro de Estudos de Química Orgânica Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto
CI_{50}	Concentração inibitória de 50 % da actividade em estudo
CHS	Chalcona síntase
CHI	Chalcona isomerase
COSY	"Correlated spectroscopy"
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
cpm	Cintilações por minuto
CTL	Linfócitos T citotóxicos (Cytotoxic T lymphocytes)
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	"Distortionless enhancement by polarization transfer"
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo (Dimethylallylpirophosphate)
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
Ed.	Edição
Edt.	Editores
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EM	Espectrometria de massa
FAB	"Fast atomic bombardment"
EM-IE	Espectrometria de massa de impacto electrónico
EM-IQ$^+$	Espectrometria de massa de ionização química positiva
fMLP	N-formilmetionilleucilfenilalanina
FNSI/II	Flavona síntase I/II
GI_{50}	Concentração que provoca 50 % de inibição do crescimento celular
HETCOR	"Heteronuclear chemical shift correlation"
HMBC	"Heteronuclear multiple bond correlation"
HR EM	Espectrometria de massa de alta resolução
Hz / MHz	Hertz / MegaHertz
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleuquinas
INEPT	"Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer"
IV	Infravermelho
int. rel.	Intensidade relativa
J	Constante de acoplamento
Kg	Quilograma
LT	Leucotrieno
m	Multipleto
M	Molar
$M^{+\bullet}$	Ião molecular em EM-IE
mL	Mililitros
μM	Micromolar
μg	Micrograma
MAC	Complexo de ataque da membrana (Membrane attack complex)
m/e	Relação massa/carga em unidades de massa atómica
MeOH	Metanol
MHC-II	"Major histocompatibility complex-II"
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio
min.	Minuto
NADP/NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NBA	Álcool 3-nitrobenzílico
NCI	Instituto Nacional do Cancro (National Cancer Institute)
NE	Não estudada
NO	Não observado
NOESY	"Nuclear overhauser and exchange spectroscopy"
nm	Nanómetros
n.s.	Não significativo
OMe	Metoxilo
Pág.	Página
PAF	Factor de activação das plaquetas (Platelets activating factor)
PAL	Fenilalanina amoníaco líase (Phenylalanine ammonia lyase)
PF	Ponto de fusão
PGs	Prostaglandinas
PHA	Fito-hemaglutinina
PLA_2	Fosfolipase A_2
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
rf	Factor de retenção
RIA	Radioimunoensaio
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de protão
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxilo
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido lipídico
rpm	Rotações por minuto
s	Singuleto
*s*l	Singuleto largo
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
t	Tripleto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

TCR	Receptores das células T (T cell receptors)
TH	"Helper T cells"
THF	Tetra-hidrofurano
tl	Tripleto largo
TNF-α	"Tumor necrosis factor-α"
TPA	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
TX	Tromboxano
UI	Unidades internacionais
u.m.a.	Unidades de massa atómica
UV	Ultravioleta
UV-Vis.	Ultravioleta-Visível
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ΔA/min	Variação da Absorvência por minuto
Δδ	Variação de deslocamento químico
ε	Absortividade molar ou coeficiente de extinção molar
$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica medida com a risca D do sódio a 20 graus centígrados
$\bar{\nu}$	Número de onda em centimetros
λ	Comprimento de onda máximo em nanómetros

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. Enquadramento e objectivos 3
2. Planta estudada 5
3. Estrutura de apresentação da dissertação 7

PARTE A

ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

CAPÍTULO I - Considerações gerais sobre o género *Artocarpus* 11

1. Estudos químicos 13
1. 1. Flavonóides 13
1. 1. 1. Chalconas e diidrochalconas isopreniladas 14
1. 1. 2. Flavonas isopreniladas 15
1. 1. 3. Flavanonas isopreniladas 19
1. 1. 4. Aductos de Diels-Alder 20
1. 2. Xantonas isopreniladas 21
1. 3. Estilbenos 22
1. 4. Outros compostos fenólicos 23
1. 5. Terpenos 24
2. Actividade biológica 25
2. 1. Introdução 25
2. 2. Actividade anti-inflamatória 25
2. 2. 1. Flavonas 26
2. 2. 2. Flavanonas e diidrochalconas 27
2. 3. Actividade antiplaquetária 29
2. 4. Actividade citotóxica 30
2. 5. Actividade antioxidante 32
2. 6. Outras actividades 34

CAPÍTULO II - Metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume 35

1. β-sitosterol (**77**) 37
2. Artocarpesina (**78**) 37
3. Artelasticina (**79**) 38
4. Ciclocomunina (**73**) 38
5. Artelastina (**80**) 38
6. Artelastocromeno (**81**) 39
7. Artelastofurano (**82**) 39

8. Artelastinina (**83**) e Artelastocarpina (**84**) 39
9. Carpelastofurano (**85**) 40
10. 2,4-Diidroxibenzoato de etilo (**86**) 40

CAPÍTULO III - Considerações biogenéticas sobre os metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume 41

1. Flavonóides 43
2. Proposta de biossíntese para os compostos **78** e **79** 45
3. Proposta de biossíntese para os compostos **73**, **80** e **81** 49
4. Proposta de biossíntese para os compostos **82**, **83/84** e **85** 51

CAPÍTULO IV – Resultados e discussão: Determinação estrutural dos metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume 55
1. β-sitosterol (**77**) 57
2. Artocarpesina (**78**) 57
3. Artelasticina (**79**) 69
4. Ciclocomunina (**73**) 83
5. Artelastina (**80**) 92
6. Artelastocromeno (**81**) 103
7. Artelastofurano (**82**) 116
8. Artelastinina (**83**) e Artelastocarpina (**84**) 129
9. Carpelastofurano (**85**) 162
10. 2,4-Diidroxibenzoato de etilo (**86**) 176

CAPÍTULO V – Material e metodologia experimental 177

1. Materiais, instrumentos e métodos de aplicação geral 179
2. Isolamento e purificação dos metabolitos secundários de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume 180
2. 1. Preparação do extracto bruto 180
2. 2. Fraccionamento do extracto bruto 181
2. 3. Isolamento e purificação dos compostos 183
2. 3. 1. Purificação dos compostos do grupo 2 183
2. 3. 2. Purificação dos compostos dos grupos 5 e 7 183
2. 3. 3. Purificação dos compostos do grupo 9 183
2. 3. 4. Purificação dos compostos do grupo 10 185
2. 3. 5. Purificação dos compostos do grupo 11 185
2. 3. 6. Purificação dos compostos do grupo 12 187
2. 3. 7. Purificação dos compostos do grupo 13 187
2. 3. 8. Purificação dos compostos do grupo 16 188
2. 4. Acetilação dos compostos isolados 189
2. 4. 1. Acetilação do composto **78** 189
2. 4. 2. Acetilação do composto **79** 190
2. 4. 3. Acetilação do composto **73** 190
2. 4. 4. Acetilação do composto **80** 190
2. 4. 5. Acetilação do composto **81** 190
2. 4. 6. Acetilação do composto **82** 191

2. 4. 7. Acetilação do composto **83** 191
2. 4. 8. Acetilação do composto **84** 191
2. 4. 9. Acetilação do composto **86** 191
2. 5. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados 192
2. 5. 1. β-sitostertol (**77**) 192
2. 5. 2. Artocarpesina (**78**) 192
2. 5. 3. Triacetato de artocarpesina (**78Ac**) 193
2. 5. 4. Artelasticina (**79**) 193
2. 5. 5. Triacetato de artelasticina (**79Ac**) 194
2. 5. 6. Ciclocomunina (**73**) 195
2. 5. 7. Diacetato de ciclocomunina (**73Ac**) 196
2. 5. 8. Artelastina (**80**) 196
2. 5. 9. Diacetato de artelastina (**80Ac**) 197
2. 5. 10. Artelastocromeno (**81**) 197
2. 5. 11. Monoacetato de artelastocromeno (**81Ac1**) 198
2. 5. 12. Diacetato de artelastocromeno (**81Ac2**) 198
2. 5. 13. Artelastofurano (**82**) 199
2. 5. 14. Diacetato de artelastofurano (**82Ac**) 200
2. 5. 15. Artelastinina (**83**) 200
2. 5. 16. Diacetato de artelastinina (**83Ac**) 201
2. 5. 17. Artelastocarpina (**84**) 201
2. 5. 18. Diacetato de artelastocarpina (**84Ac**) 202
2. 5. 19. Carpelastofurano (**85**) 202
2. 5. 20. 2,4-Diidroxibenzoato de etilo (**86**) 203
2. 5. 21. Diacetato de 2,4-diidroxibenzoato de etilo (**86Ac**) 204

PARTE B

DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

B_1 – ACTIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

CAPÍTULO I – Introdução 209

1. Preâmbulo 211
2. Considerações sobre o processo inflamatório 212
2. 1. Migração leucocitária e libertação de enzimas lisosómicas 212
2. 2. Radicais livres 213
2. 3. Mediadores lipídicos 216

CAPÍTULO II – Material e metodologia experimental 219

1. Reagentes químicos e material biológico 221
2. Soluções tampão e meios de cultura 222
2. 1. Soluções tampão fosfato 222
2. 2. Solução tampão Dulbecco 222
2. 3. Soluções tampão HBSS 222
2. 4. Solução tampão PBS 223
2. 5. Soluções tampão Tris 223
2. 6. Meios de cultura 223
3. Animais 224
4. Material e instrumentos 224
5. Métodos 225
5. 1. Ensaios *in vitro* 225
5. 1. 1. Captação de radicais livres 226
5. 1. 1. 1. Captação de anião superóxido no sistema hipoxantina / xantina oxidase 226
5. 1. 1. 2. Captação de radical peroxilo 227
5. 1. 2. Inibição da peroxidação lipídica em membranas microssomais 228
5. 1. 2. 1. Obtenção de microssomas hepáticos 229
5. 1. 2. 2. Inibição da peroxidação lipídica por Fe^{2+} / ácido ascórbico 229
5. 1. 3. Estudo das funções leucocitárias e da libertação de mediadores em leucócitos humanos 230
5. 1. 3. 1. Obtenção de leucócitos PMNs humanos 230
5. 1. 3. 2. Inibição da libertação de elastase por PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP 231
5. 1. 3. 3. Inibição da libertação do anião superóxido em PMNs humanos 233
5. 1. 4. Inibição da mieloperoxidase de PMNs humanos 234
5. 1. 4. 1. Obtenção do sobrenadante de PMNs humanos estimulados por citocalasina B/fMLP 234
5. 1. 4. 2. Inibição da mieloperoxidase 235
5. 1. 5. Mediadores lipídicos 236
5. 1. 5. 1. Inibição da fosfolipase A_2 236
5. 1. 5. 1. 1. Obtenção de culturas de *Escherichia coli* em fase exponencial de crescimento 236
5. 1. 5. 1. 2. Incorporação de ^{3}H-ácido oleico nas membranas de *Escherichia coli* 236
5. 1. 5. 1. 3. Cálculo da incorporação de ^{3}H-ácido oleico nas membranas 237
5. 1. 5. 1. 4. Inibição da PLA_2 237
5. 1. 5. 2. Inibição da cicloxigenase 1 238
5. 1. 5. 2. 1. Preparação de microssomas de plaquetas humanas 239
5. 1. 5. 2. 2. Inibição da COX-1 239

5. 1. 5. 3. Inibição da cicloxigenase 2 240
5. 1. 5. 3. 1. Preparação de microssomas de monócitos humanos 240
5. 1. 5. 3. 2. Inibição da COX-2 241
5. 2. Ensaios *in vivo*: Modelo de "bolsa de ar em ratinho" 242
5. 2. 1. Inibição da migração leucocitária 243
5. 2. 2. Inibição da libertação de mieloperoxidase 243
5. 2. 3. Inibição da libertação de PGE_2 243
6. Análise estatística e expressão dos resultados 243

CAPÍTULO III – Resultados e discussão 245

1. Ensaios *in vitro* 247
1. 1. Captação de radicais livres 247
1. 1. 1. Captação do anião superóxido no sistema hipoxantina / xantina oxidase 247
1. 1. 2. Captação de radical peroxilo 249
1. 2. Inibição da peroxidação lipídica em membranas microssomais 249
1. 3. Estudo das funções leucocitárias e da libertação de mediadores em leucócitos humanos 250
1. 3. 1. Inibição da libertação de elastase por PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP 250
1. 3. 2. Inibição da libertação de anião superóxido em PMNs humanos 251
1. 4. Inibição da mieloperoxidase de PMNs humanos 252
1. 5. Mediadores lipídicos 253
1. 5. 1. Inibição da fosfolipase A_2 253
1. 5. 2. Inibição das cicloxigenases 1 e 2 255
2. Ensaios *in vivo*: Modelo de "bolsa de ar em ratinho" 255
2. 1. Inibição da migração leucocitária 256
2. 2. Inibição da libertação de mieloperoxidase 256
2. 3. Inibição da libertação de PGE_2 257

B_2 – ACTIVIDADE IMUNOMODULADORA

CAPÍTULO I – Introdução 261

1. Preâmbulo 263
2. Considerações sobre imunomodulação 264
2. 1. O sistema do complemento e sua activação 264
2. 1. 1. Interesse da modulação da actividade do complemento 266
2 2. Linfócitos e activação dos linfócitos 267

CAPÍTULO II – Resultados e discussão 269

1. Actividade sobre as vias clássica e alternativa
de activação do sistema humano do complemento 271
2. Actividade sobre a proliferação dos linfócitos humanos 273

B_3 – ACTIVIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS HUMANAS

CAPÍTULO I – Introdução 279

CAPÍTULO II – Resultados e discussão 283

CONCLUSÕES 289

BIBLIOGRAFIA 293

INTRODUÇÃO GERAL

1. Enquadramento e objectivos

O uso de plantas medicinais na terapia pode considerar-se tão antigo quanto a própria humanidade, estando descrito para períodos anteriores às civilizações ancestrais na China, Índia e Extremo Oriente. Após séculos de utilização empírica de preparações de origem vegetal, foi durante o século dezanove que se isolaram os primeiros compostos activos como os alcalóides morfina, estricnina e quinino, iniciando-se uma nova era no uso de plantas medicinais e a investigação nesta área. A partir da década de quarenta, com o desenvolvimento dos métodos de síntese, a investigação de metabolitos vegetais restringia-se apenas ao ponto de vista fitoquímico e quimiotaxonómico. Na década de oitenta assistiu-se a um crescente interesse nos fármacos de origem vegetal, tendo o seu consumo praticamente duplicado na Europa ocidental [1].

Actualmente as plantas constituem uma fonte importante de compostos farmacologicamente activos para grande parte da população dos países subdesenvolvidos. Mesmo nos países industrializados, como nos EUA, estes compostos bioactivos constituem cerca de vinte e cinco por cento das prescrições médicas, existindo disponíveis no mercado cerca de cento e dezanove fármacos extraídos de noventa espécies de plantas, setenta e sete por cento dos quais derivam de plantas utilizadas na medicina tradicional [1-4].

Uma das áreas em que se tem assistido a um interesse crescente na investigação de produtos naturais é o tratamento do cancro e infecções provocadas por novos agentes patogénicos, para as quais ainda não existe terapia eficaz. Para estas patologias verificou-se que entre 1989 e 1995 cerca de sessenta por cento de novos compostos bioactivos eram de origem natural, incluindo neste grupo aqueles obtidos por semi-síntese e síntese a partir de modelos naturais [5].

Muitos dos agentes terapêuticos têm sido obtidos a partir de plantas medicinais particularmente quando os métodos de síntese, ao contrário dos processos de extracção, não são económica e tecnicamente viáveis. Exemplos clássicos são a morfina e codeína, extraídas de *Papaver somniferum*, o quinino de *Cinchona* sp., a atropina de *Atropa belladonna*, reserpina de *Rauwolfia* sp., vincristina de *Catharanthus roseus* e digitoxina de *Digitalis purpurea* [5, 6]. Um exemplo mais recente é o taxol, um composto de origem natural, isolado da madeira de *Taxus brevifolia* [7] e de outras espécies [8-11], que emergiu dos programas de

"screening" de produtos naturais com actividade antitumoral [12]. Actualmente este composto é utilizado no tratamento de certos tipos de cancro resistentes à cisplatina como o cancro da mama, ovário e pulmão [5, 13].

O uso directo na terapia é apenas uma das aplicações das plantas medicinais. Já há muito tempo que os compostos químicos de origem vegetal têm sido utilizados como modelos para "design", semi-síntese e síntese total de compostos bioactivos [6, 14]. São exemplos os anestésicos locais derivados da cocaína, os analgésicos opióides derivados da morfina por simplificação molecular e as cumarinas como precursores de antitrombóticos [6]. Muitas vezes os metabolitos secundários de origem vegetal funcionam como compostos líderes de série, sendo submetidos a modificações moleculares com o objectivo de originar compostos com maior actividade e menor toxicidade [6, 14, 15]. Além disso, os compostos naturais contribuem substancialmente para a identificação e estudo de muitos processos bioquímicos, constituindo ferramentas importantes para a investigação de novos mecanismos de acção farmacológica ou descoberta de novos receptores [5, 14, 16, 17].

Apesar do crescente interesse nos fármacos de origem vegetal, o potencial de plantas superiores como fonte de novos fármacos está ainda largamente inexplorado. Entre os duzentos e cinquenta mil a quinhentos mil espécies de plantas, apenas uma pequena percentagem tem sido investigada do ponto de vista fitoquímico, sendo ainda menor o número de plantas submetidas a estudos de despiste de actividades biológicas e farmacológicas [1]. O elevado número e a diversidade molecular de metabolitos existentes em cada espécie vegetal proporciona uma fonte importante de compostos química ou biológicamente inéditos [1]. A destruição irreparável da flora e fauna naturais provocada pela invasão do homem resultará, futuramente, na perda de conhecimento etnobotânico empírico que tem sido adquirido ao longo de milhares de anos, tornando-se urgente a investigação de produtos naturais bioactivos [18].

Tendo em conta o enquadramento descrito, o nosso trabalho teve como objectivo principal contribuir para o estudo da diversidade molecular do reino vegetal, bem como enriquecer o arsenal químico, farmacológico e taxonómico com a descoberta de compostos químicos inéditos ou com actividade biológica não documentada. Por outro lado, pretendeu-se ainda manipular e aperfeiçoar várias técnicas analíticas, que visam o isolamento e purificação

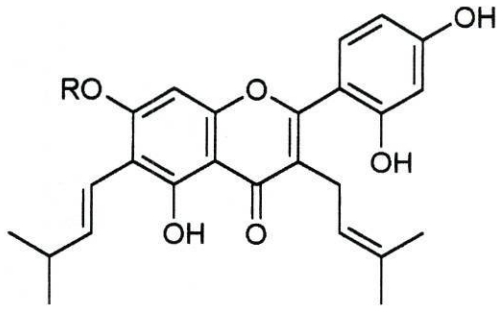
dos metabolitos secundários, assim como aprofundar os conhecimentos dos métodos conducentos à elucidação estrutural.

2. Planta estudada

O presente estudo incidiu sobre o isolamento, elucidação estrutural e determinação de actividades biológicas de metabolitos secundários da madeira de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume, colhida na provincia de Trang, no sul da Tailândia.

A planta estudada pertence à família Moraceae, que compreende cerca de sessenta géneros e mil e quatrocentos espécies [19]. O género *Artocarpus* consiste em cerca de cinquenta espécies de arbustos distribuídos por regiões tropicais e sub-tropicais do sudeste asiático [20, 21], tendo sido considerado por Jarrett [20] o género mais frequentemente encontrado nas regiões tropicais, com a excepção de África. Algumas destas espécies são utilizadas pelas populações locais pelos seus frutos, nomeadamente *A. heterophyllus* Lamk. [22], *A. incisa* Linn. [21], *A. champeden.* Spreng. [23], *A. integer* Thunb. [24] e *A. artilis* [25]. Outras espécies são comercialmente importantes pela madeira que produzem principalmente *A. hirsutus* [21], *A. chaplasha* Roxb. [21], *A. lakoocha* Roxb. [21] e *A. champeden* Spreng. [23] ou são utilizadas na medicina tradicional como *A. lakoocha* Roxb. [24], *A. chaplasha* Roxb [24] e *A. altilis Fosb.* [26, 27].

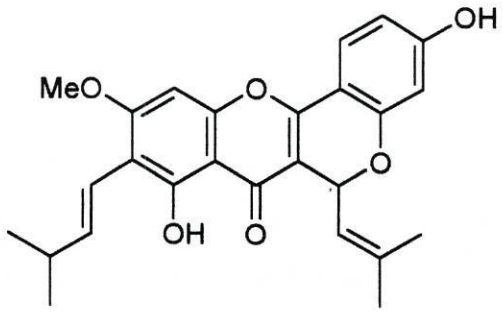
A madeira de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume já tinha sido estudada por Pendse *et. al.* [28] em 1976, tendo-se isolado para além do β-sitosterol, várias flavonas isopreniladas como a artocarpina (**1**), cicloartocarpesina (**2**), cicloartocarpina (**3**), norartocarpina (**4**) e integrina (**5**).



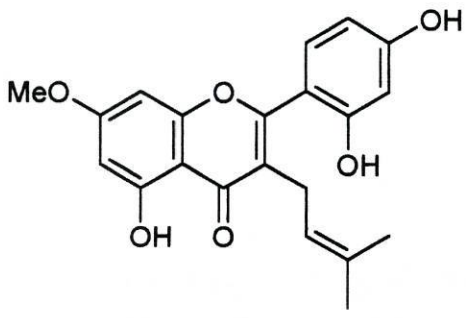
1: R = Me
4: R = H



2

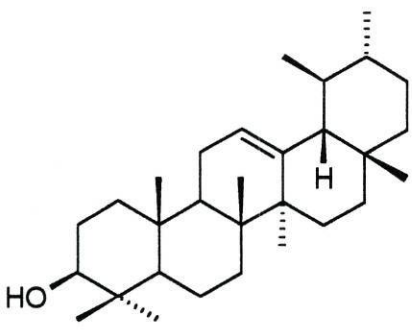


3

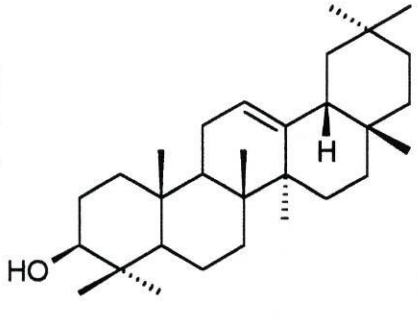


5

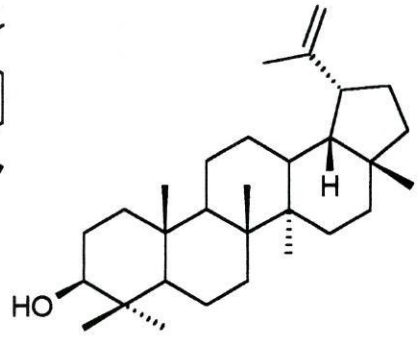
Do látex da mesma espécie foi também descrito o isolamento de ácido cerótico (ácido hexacosanóico) e triterpenos pentacíclicos α- amirina (**6**), β-amirina (7) e lupeol (**8**) [20].



6



7



8

3. Estrutura de apresentação da dissertação

A apresentação dos resultados obtidos durante o trabalho de investigação encontra-se dividida fundamentalmente em duas partes: **A** e **B**.

Parte A - Isolamento e elucidação estrutural de metabolitos secundários de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume.

Constituída por 5 capítulos:

- **I** - Considerações gerais sobre o género *Artocarpus*
- **II** - Metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume
- **III** - Considerações biogenéticas sobre os metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume
- **IV** - Resultados e discussão
- **V** - Material e metodologia experimental

Parte B - Determinação da actividade biológica dos metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume.

Divida em $\mathbf{B_1}$, $\mathbf{B_2}$ e $\mathbf{B_3}$.

Parte $\mathbf{B_1}$ - Actividades anti-inflamatória e antioxidante.

Constituída por 3 capítulos:

- **I** - Introdução
- **II** - Material e metodologia experimental
- **III** - Resultados e discussão.

Parte $\mathbf{B_2}$ - Actividade imunomoduladora.

Constituída por:

- **I** - Introdução
- **II** - Resultados e discussão.

Parte B_3 – Actividade sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas.

Constituída por:

- **I** - Introdução
- **II** - Resultados e discussão

PARTE A

ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

CAPÍTULO I

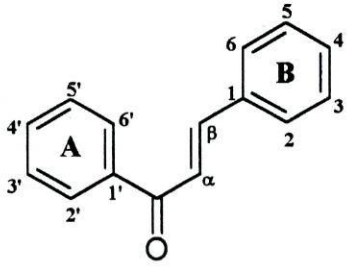
Considerações gerais sobre o género *Artocarpus*

1. Estudos químicos

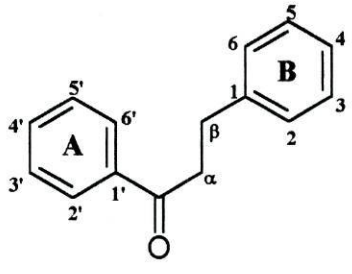
O género *Artocarpus*, tal como outros géneros da família Moraceae, é particularmente rico em flavonóides, principalmente isoprenilados, embora tenha sido relatado o isolamento de outro tipo de metabolitos, nomeadamente xantonas, estilbenos, além de outros compostos fenólicos e terpenos.

1. 1. Flavonóides

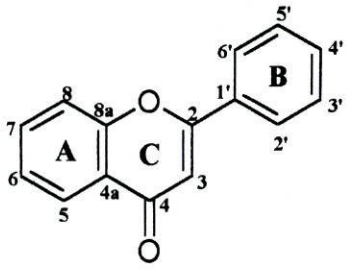
Os flavonóides existem sob diferentes formas estruturais. O núcleo básico destes compostos contem quinze átomos de carbono, englobando dois grupos fenilo (anéis A e B) ligados por uma ponte de três carbonos. A estrutura e disposição destes três carbonos contribui para a diversidade de estruturas destes compostos, podendo encontrar-se flavonóides em que os três átomos de carbono formam uma cadeia, como acontece com as chalconas e diidrochalconas, ou estão incorporados num ciclo formando um terceiro anel heterocíclico (anel C), como nas flavonas, flavonóis, flavanonas e diidroflavonóis [29, 30].



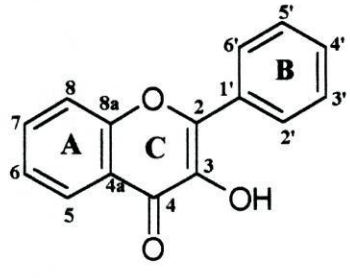
Chalcona



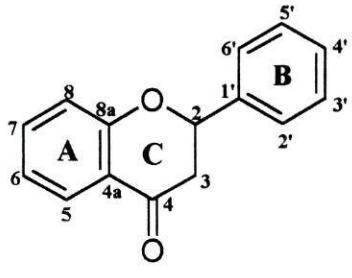
Diidrochalcona



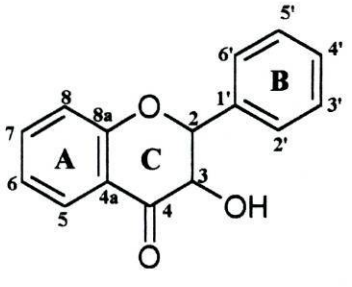
Flavona



Flavonol

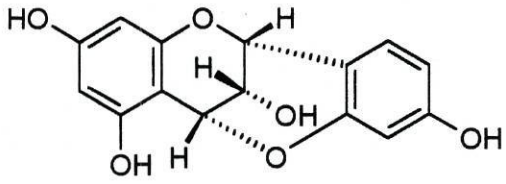


Flavanona



Diidroflavonol

Um dos primeiros estudos fitoquímicos em plantas do género *Artocarpus* data de 1895 e foi realizado por Perkin e Cope [20] sobre a madeira de *A. heterophyllus* Lamk., da qual foi isolada a cianomaclurina (**9**) e a morina (**10**). Desde esta data foram estudadas muitas espécies deste género, tendo-se isolado vários flavonóides, particularmente isoprenilados [19].



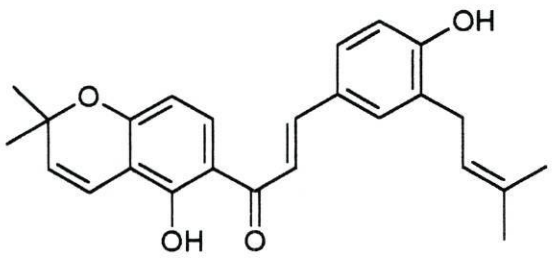
9



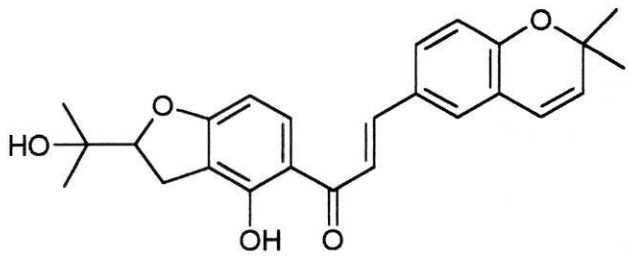
10

1. 1. 1. Chalconas e diidrochalconas isopreniladas

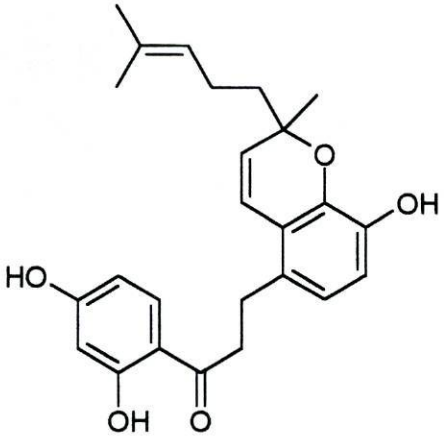
O isolamento de chalconas e diidrochalconas em plantas do género *Artocarpus* é pouco frequente, sendo no entanto conhecidas algumas chalconas isopreniladas de *A. venenosa* Zoll (**11**, **12**) [31, 32] e diidrochalconas isopreniladas de *A. communis* Forst. (**13 - 15**) [19].



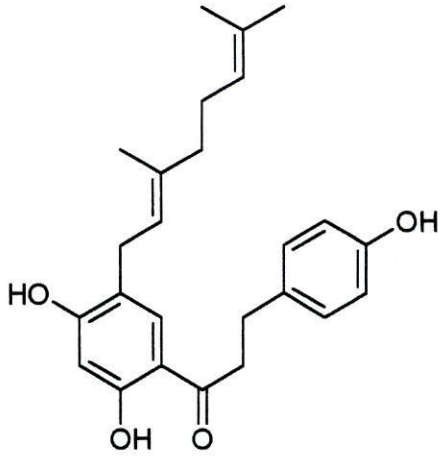
11



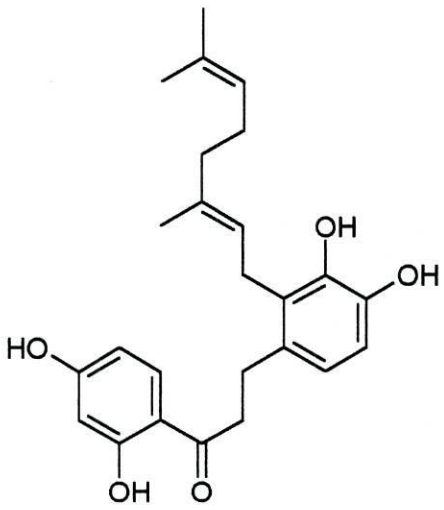
12



13



14

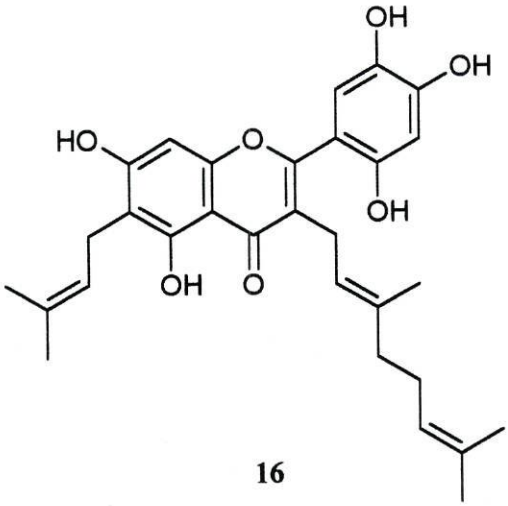


15

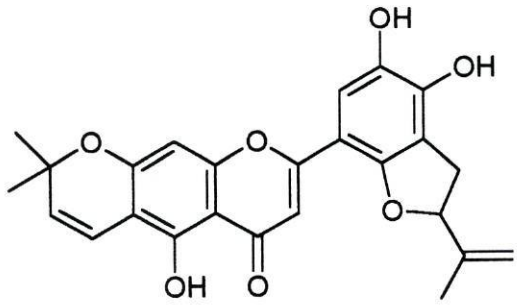
1. 1. 2. Flavonas isopreniladas

Os flavonóides mais frequentemente isolados de plantas do género *Artocarpus* são flavonas isopreniladas, caracterizadas pela presença de um anel B com um padrão de substituição 2',4'-dioxigenado ou 2',4',5'-trioxigenado e uma cadeia lateral isoprenilo na posição 3 [19, 33, 34]. Outras posições habitualmente substituídas por grupos isoprenilo incluem C-6 e C-8. À semelhança de muitos flavonóides, o anel A é geralmente derivado do fluoroglucinol [35].

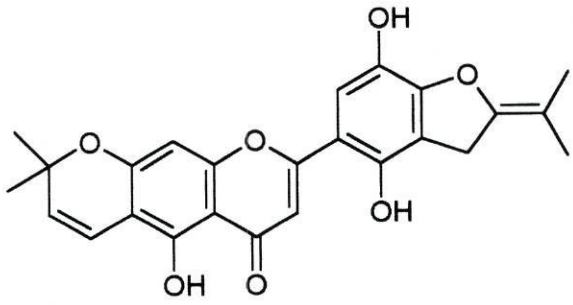
O padrão de isoprenilação mais frequente é representado pela cadeia 3,3-dimetilalilo [20], embora também sejam conhecidas cadeias geranilo, como por exemplo a artonina H (**16**) [36] isolada de *A. rigida* Bl, e derivadas do furano como as estruturas **17** e **18** [37] isoladas da casca de *A. nobilis* Thw. Está também descrito o isolamento de flavonas com um anel derivado do cromano, nomeadamente as isoladas das cascas de *A. rigida* Bl. (**19**) [36] e *A. communis* Forst. (**19** e **20**) [38, 39].



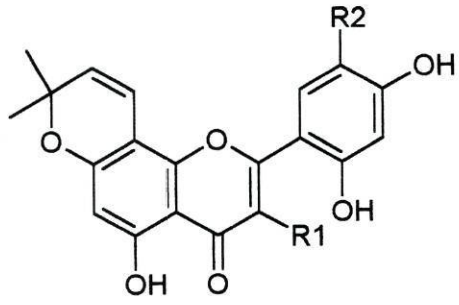
16



17



18

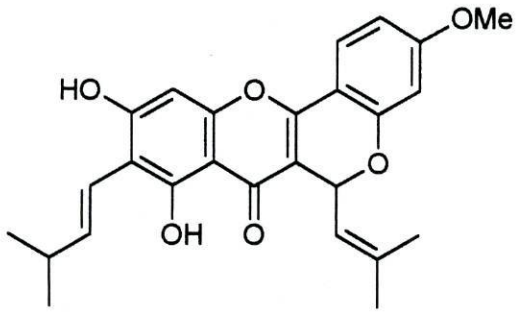


19: R1 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$; R2 = OH

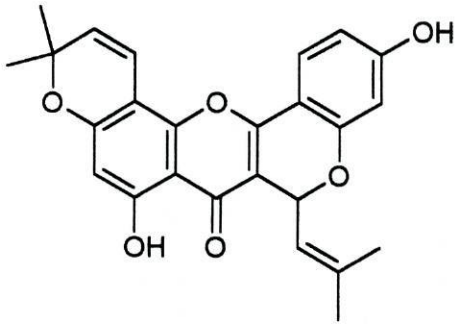
20: R1 = $CH_2CH_2C(CH_3)_2OH$; R2 = OH

Algumas flavonas isoladas de plantas do género *Artocarpus* possuem uma estrutura única com um quarto anel contendo um número variável de átomos, formado pela ligação entre o grupo isoprenilo na posição 3 e um dos carbonos do anel B. Este anel pode formar-se através do estabelecimento de uma ponte etérea entre os grupos isoprenilo em C-3 e C-2' [40], resultando um anel adicional (anel D) de seis, sete ou oito átomos. Exemplos de flavonas com

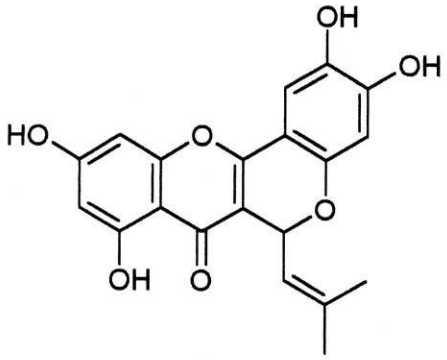
um anel D de seis átomos incluem a cicloartocarpina A (**21**) [41] e a ciclomorusina (**22**) [42] isoladas da casca da raiz de *A. heterophyllus* Lamk. e *A. communis* Forst., respectivamente. Da casca do tronco foi isolado o ciclochampedol (**23**) [23] de *A. champeden* Spreng. e a ciclo--heterofilina (**24**) [35, 43, 44] de *A. heterophyllus* Lamk.



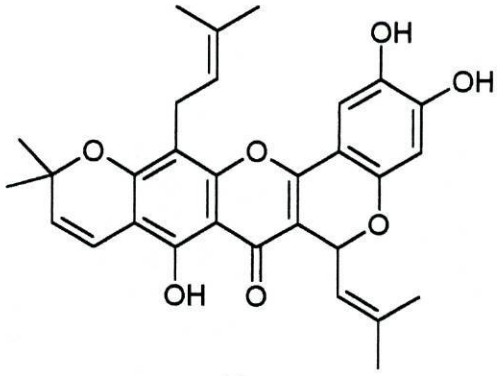
21



22

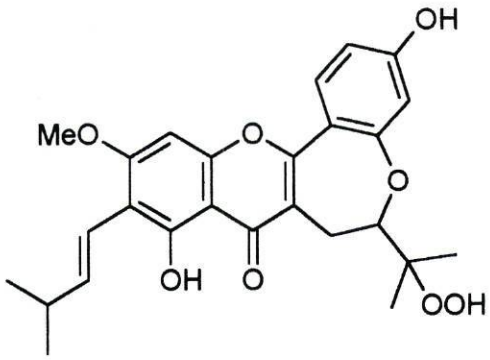


23

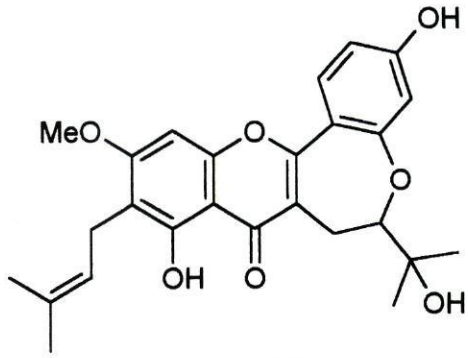


24

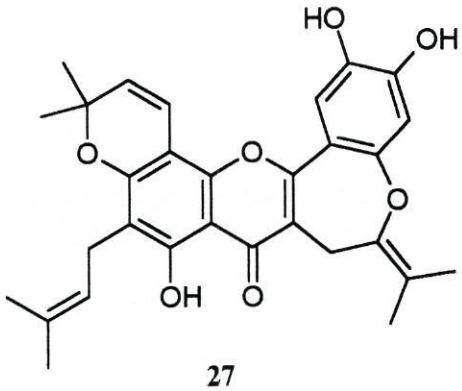
Flavonas com um anel D de sete átomos foram isoladas da casca das espécies *A. champeden* Spreng. (**25**) [45], *A. heterophyllus* Lamk. (**26** e **27**) [46, 47] e *A. rigida* Bl. (**28**) [48]. Da madeira de *A. integer* Thunb. está descrito o isolamento de uma única flavona com um anel D de oito átomos (**29**) [28].



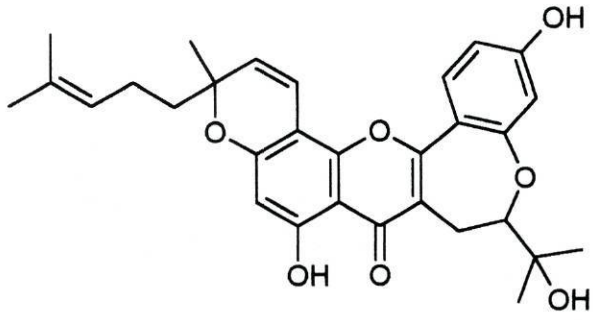
25



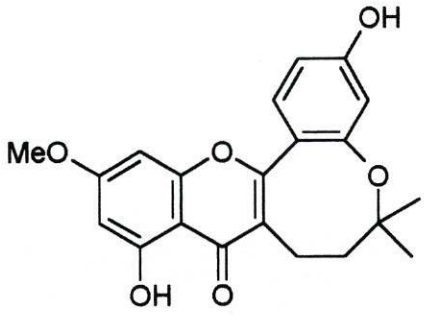
26



27

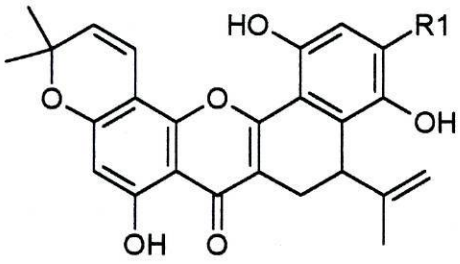


28



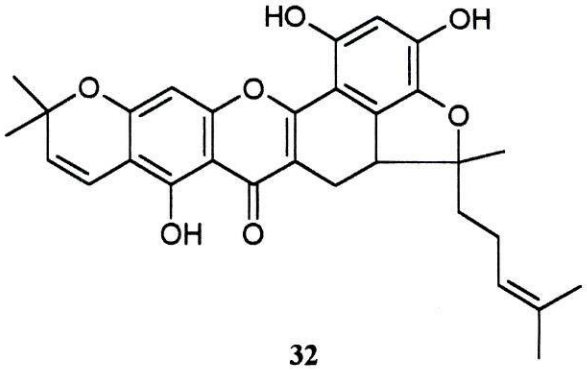
29

Estão ainda descritas flavonas com estrutura de diidrobenzoxantona, resultante da formação de um anel D de seis átomos por estabelecimento de uma ponte etilénica entre C-3 e C-6' [43, 49]. Exemplos deste tipo de flavonas incluem as estruturas de **30** a **35** isoladas de várias espécies do género *Artocarpus* [36, 38, 39, 49-54].

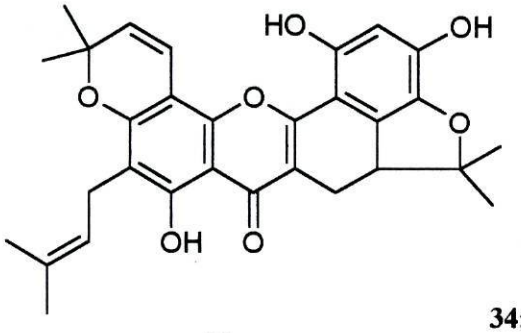


30: R1 = OH

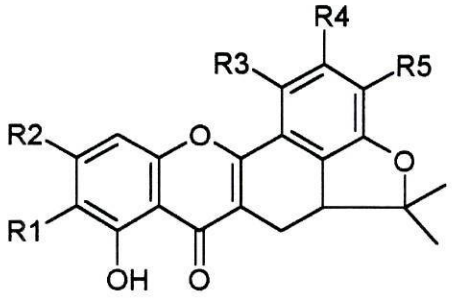
31: R1 = OMe



32



33

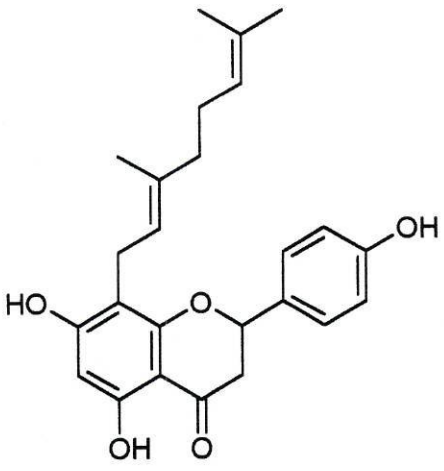


34: R1 = H; R2 = R3 = R5 = OH; R4 =$CH_2CH=C(CH_3)_2$

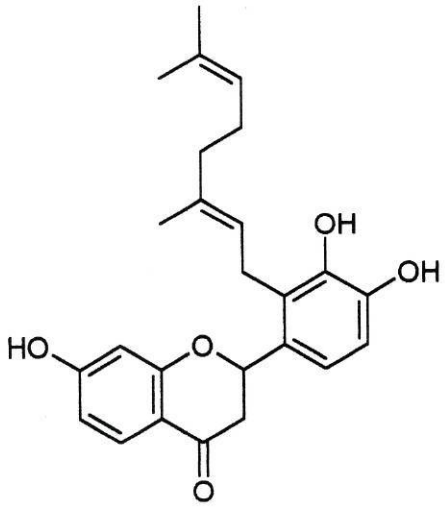
35: R1 = R4 = H; R2 = OMe; R3 = R5 = OH

1. 1. 3. Flavanonas isopreniladas

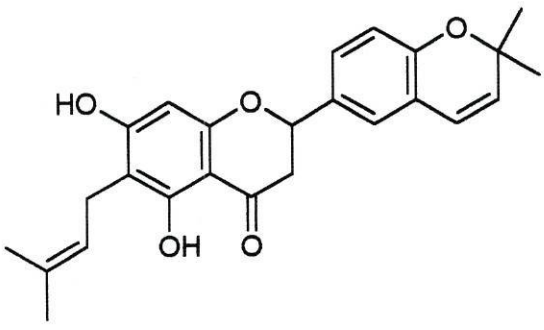
As flavanonas mais frequentemente isoladas do género *Artocarpus* são substituídas por grupos 3,3-dimetilalilo, encontrando-se ainda algumas flavanonas com grupos geranilo (**36**, **37**) [19] e derivados do cromano (**38** e **39**) [32].



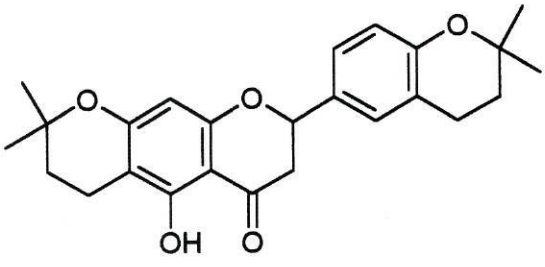
36



37



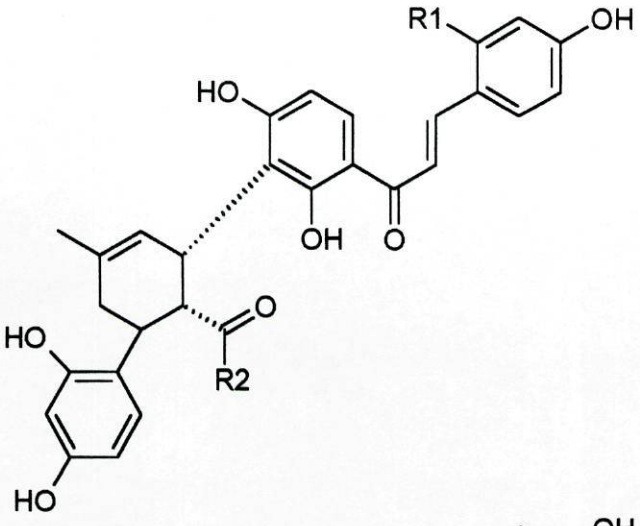
38



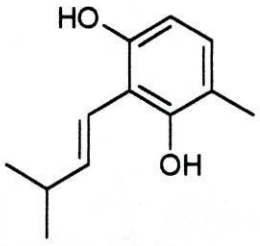
39

1. 1. 4. Aductos de Diels-Alder

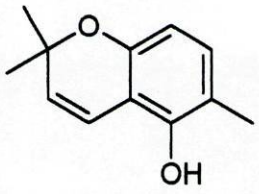
Um grupo peculiar de flavonóides isoprenilados consiste em biflavonóides resultantes da condensação de Diels-Alder entre dois flavonóides isoprenilados [40]. Pelo menos uma das unidades nestes compostos é uma chalcona podendo a outra unidade corresponder a uma flavanona, chalcona, flavona ou um diidroflavonol, desde que possuam um substituinte isoprenilo sob a forma de um sistema diénico [40]. Exemplos de aductos de Diels-Alder são as estruturas **40** a **44** isoladas da casca da raiz de *A. heterophyllus* Lamk [55-57].



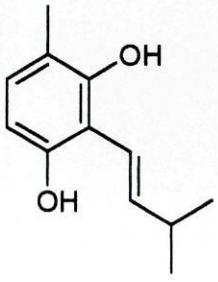
40: R1 = OH; R2 =



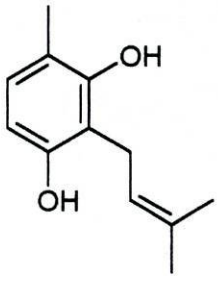
41: R1 = OH, R2 =

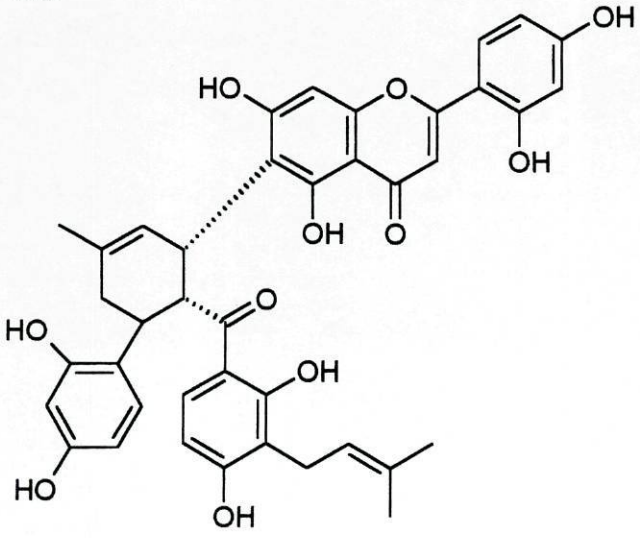


42: R1 = H; R2 =



43: R1 = H; R2 =



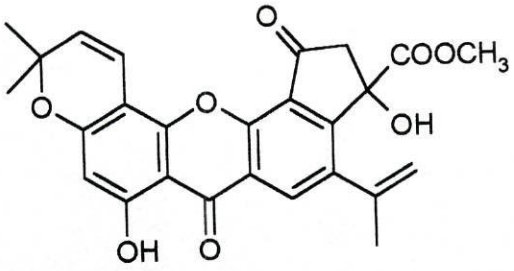


44

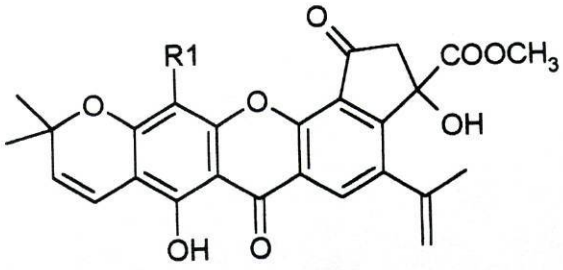
1. 2. Xantonas isopreniladas

Embora os flavonóides constituam o grupo de metabolitos secundários mais frequentemente isolados, na literatura são vários os exemplos de outros compostos fenólicos obtidos de plantas deste género, nomeadamente xantonas isopreniladas.

O isolamento de derivados de xantonas está descrito para *A. teysmanii* Miq., *A. heterophyllus* Lamk. e *A. communis* Forst. Destas espécies foram isoladas cinco xantonas isopreniladas com um anel 2,2-dimetilcromeno, a artoindonesianina C (**45**) [58], a artonina Q (**46**) [46], a artonina R (**47**) [46], o artonol B (**48**) [50] e a artomunoxantentriona (**49**) [51].

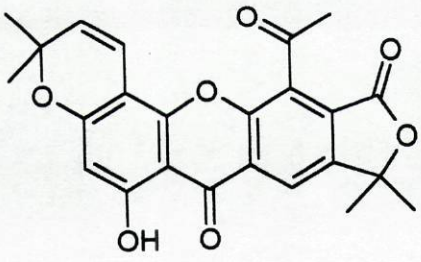


45

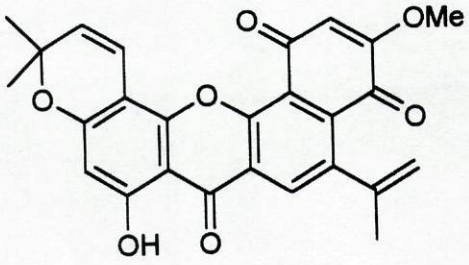


46: R1 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$

47: R1 = $CH=CHC(CH_3)_2OOH$



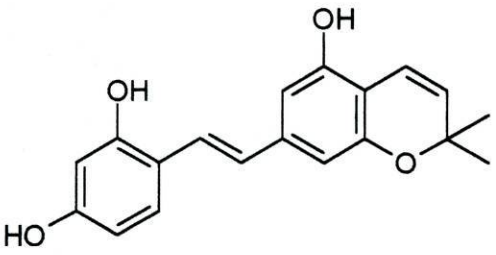
48



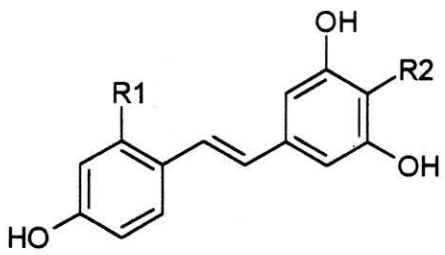
49

1. 3. Estilbenos

Os estilbenos são uma classe de compostos fenólicos com uma predominância muito reduzida neste género [34]. Shimizu *et al.* isolaram da madeira de *A. incisus* três estilbenos isoprenilados (**50** – **52**) [59, 60]. Da raiz de *A. gomezianus* Wall. ex Trec'c [61] está descrito o isolamento de resveratrol (**53**), já anteriormente isolado em *A. chaplasha* Roxb [20]. O oxiresveratrol (**54**) foi também isolado nesta espécie [20], bem como em *A. lakoocha* Roxb. [20] e *A. tonkinensis* A. Cheval. [62].



50



51: R1 = OH; R2 = $CH_2CH=C(CH_3)CH_2CH_2CH=C(CH_3)_2$

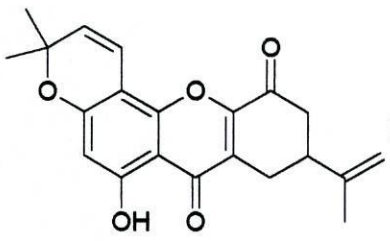
52: R1 = OH; R2 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$

53: R1 = R2 = H

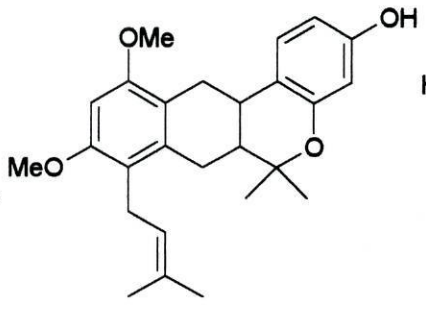
54: R1 = OH; R2 = H

1. 4. Outros compostos fenólicos

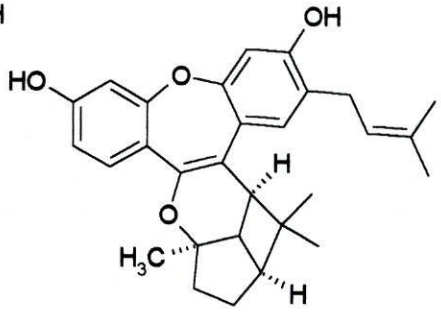
Exemplos de compostos fenólicos descritos na literatura são o artonol A (**55**) [50], o heterofilol (**56**) [44], o artocarpol A (**57**) [63], D (**58**) [48] e E (**59**) [48] e a artotonkina (**60**) [62] isolados de várias espécies de *Artocarpus*. Fenóis de estrutura mais simples como o resorcinol e o β--resorsilaldeído foram isolados de *A. lakoocha* Roxb. e *A. chaplasha* Roxb. [20].



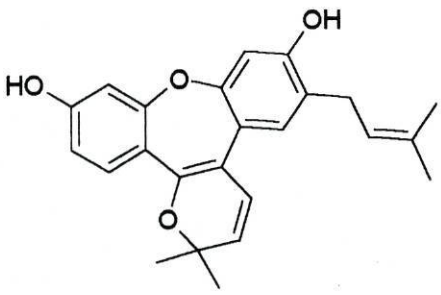
55



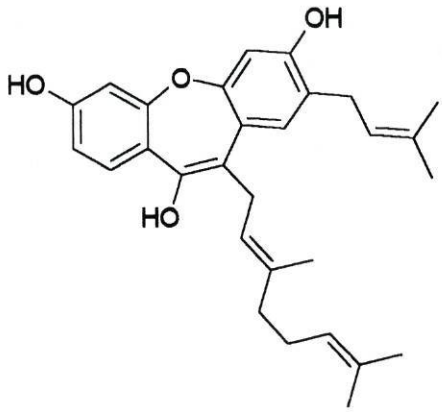
56



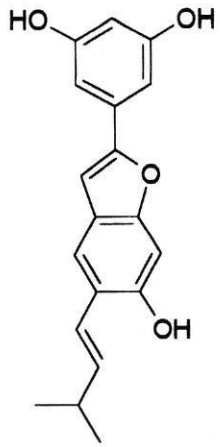
57



58



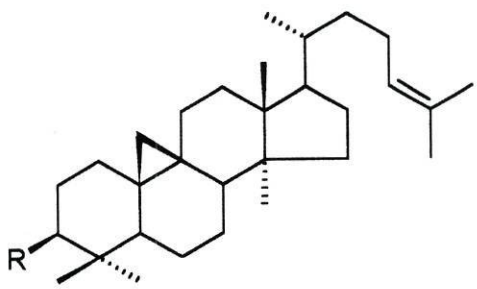
59



60

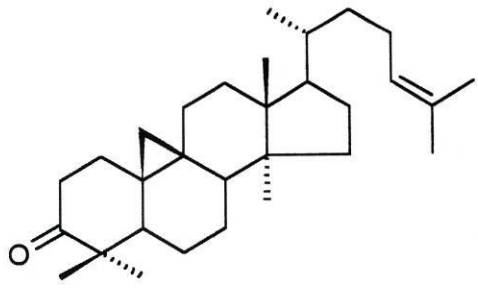
1. 5. Terpenos

Os terpenos representam a classe de metabolitos secundários mais ubíquos e de estrutura mais diversificada [64], sendo os triterpenos os mais comuns no género *Artocarpus*. Alguns exemplos são as α- e β-amirinas (**6** e **7**) e o lupeol (**8**) isoladas de *A. elasticus* Reinw. ex Blume descritos anteriormente (pág. 6), bem como os triterpenos **61** a **63** isolados da casca de várias espécies do mesmo género [65]. O ácido betulínico (**64**), betulina (**65**) e ácido ursólico (**66**) correspondem também a esta classe de compostos isolada da casca de *A. heterophyllus* Lamk. [41, 66].

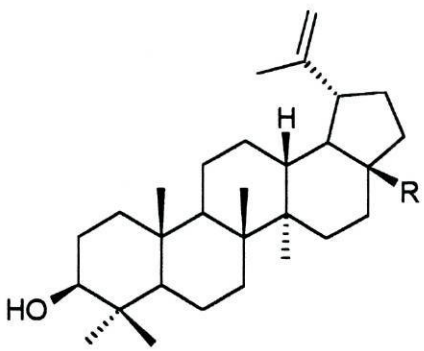


61: R = OH

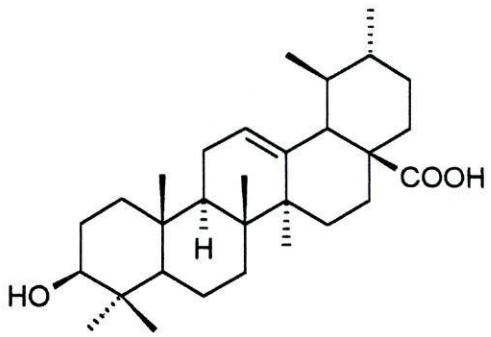
63: R = $OCOCH_3$



62



64: R = COOH
65: R = CH_2OH



66

2. Actividade biológica

2. 1. Introdução

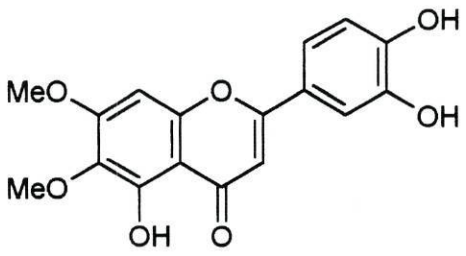
Algumas partes das plantas do género *Artocarpus* são utilizadas na medicina tradicional com as mais diversas finalidades nos locais de onde são endémicas. Alguns exemplos dessas utilizações estão relacionados com actividades antiparasitária em infestações por *Taeniasis saginata* [24] e malária [19], hipoglicemiante [67], hipotensora [26] e anti-inflamatória em estados inflamatórios da pele [27]. Está ainda descrita a utilização de plantas deste género na cirrose hepática [26], doenças intestinais e dores abdominais [27]. Muitos destes usos terapêuticos podem estar relacionados com a presença de fenóis isoprenilados, particularmente flavonóides [19].

2. 2. Actividade anti-inflamatória

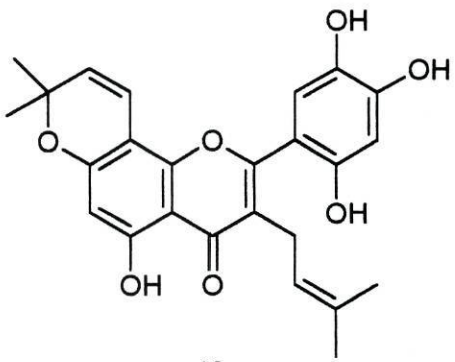
Atendendo à complexidade da resposta inflamatória os agentes anti-inflamatórios podem ter múltiplos modos de acção, nomeadamente por inibição da actividade das enzimas envolvidas na libertação de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de membrana (fosfolipase A_2) e na síntese de prostaglandinas e tromboxanos (cicloxigenase) ou leucotrienos (lipoxigenase). Uma das actividades descritas para os flavonóides isoprenilados é o efeito inibitório sobre as enzimas cicloxigenase e lipoxigenase [68].

2. 2. 1. Flavonas

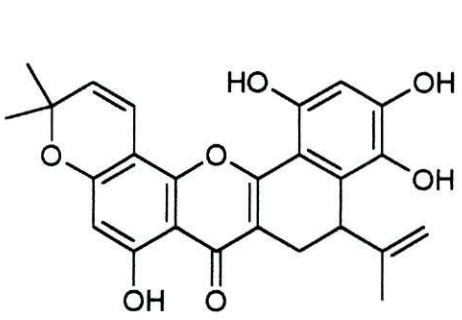
Reddy *et al.* [69] determinaram a actividade de oito flavonas isopreniladas, isoladas das espécies *A. heterophyllus* Lamk. e *A. communis* Forst., e do cirsiliol (**67**) sobre a enzima 5-lipoxigenase purificada de leucócitos de suíno. Neste estudo verificou-se que os compostos artonina E (**19**), artobiloxantona (**30**) e heterofilina (**68**) mostravam valores de CI_{50} mais promissores comparativamente à morusina (**69**), concluindo-se pela importância da presença de um anel B com grupos hidroxilo vicinais nas posições 4' e 5'. A maior actividade da artonina E (**19**) relativamente à do cirsiliol (**67**), obtida nestes ensaios, revelou estar de acordo com o aumento da actividade por introdução de um grupo alquílico lipófilo na posição 3 de flavonas, descrito na literatura [19, 69]. Foi ainda avaliada a actividade da artonina E (**19**) e da morusina (**69**) sobre outras enzimas, como a 12-lipoxigenase, a 15-lipoxigenase e a cicloxigenase. A artonina E (**19**) mostrou um efeito inibitório sobre ambas as enzimas obtendo-se, no entanto, um valor maior de CI_{50} comparativamente ao obtido para a 5-lipoxigenase, que poderia indicar uma certa especificidade para esta enzima. É de realçar que esta maior especificidade não se verificou com a morusina (**69**) [69].



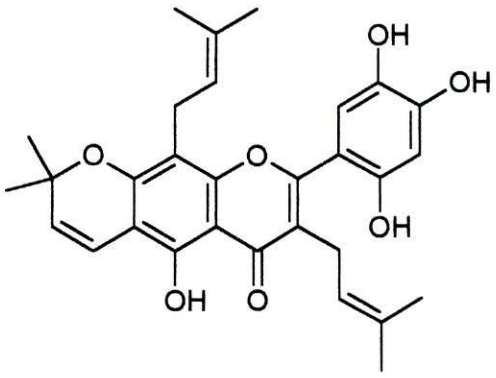
67



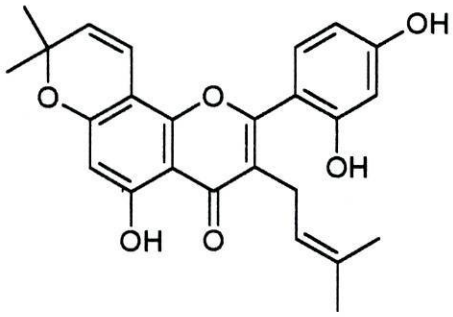
19



30



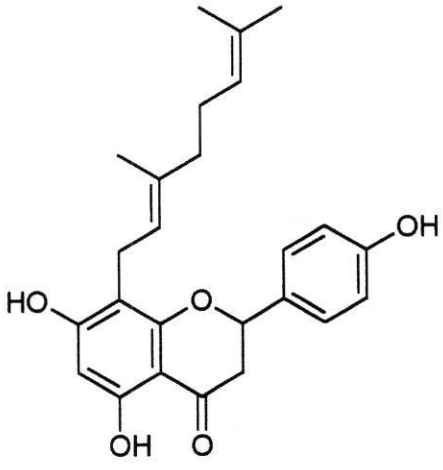
68



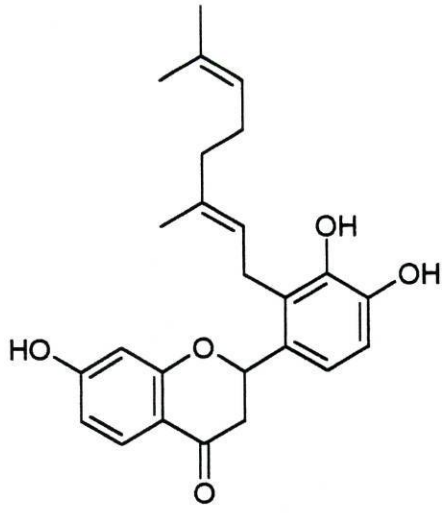
69

2. 2. 2. Flavanonas e diidrochalconas

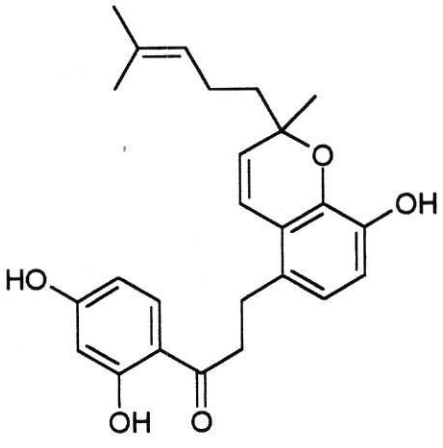
As flavanonas **36** e **37** e as diidrochalconas **13**, **14** e **15** isoladas das flores de *A. communis* Forst. revelaram ser potentes inibidores das enzimas intervenientes na síntese de eicosanóides. Entre estes flavonóides o composto **15** mostrou ser mais activo e específico para a inibição da 5-lipoxigenase, uma vez que à concentração de 10^{-5} M inibiu 96 % da síntese de leucotrieno C_4 e não inibiu a cicloxigenase. Estes estudos foram confirmados por ensaios *in vivo* [70].



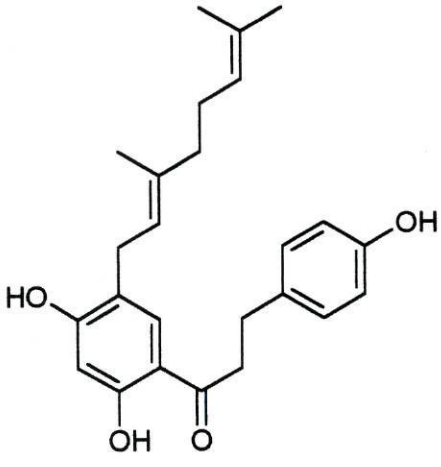
36



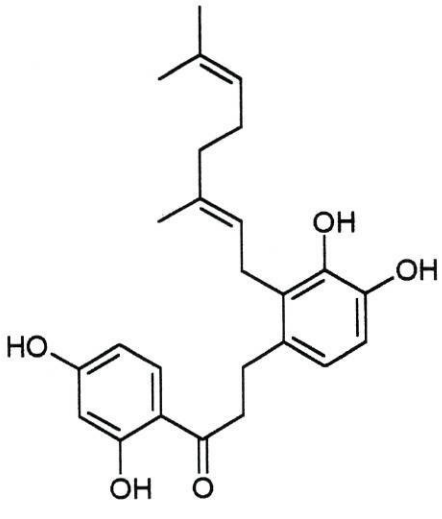
37



13



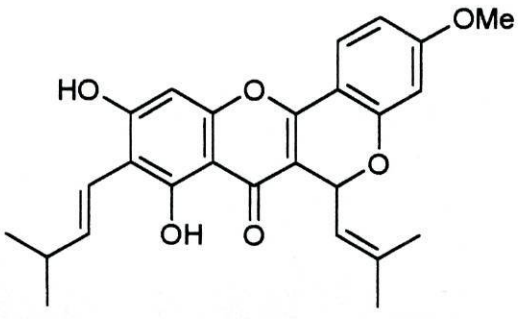
14



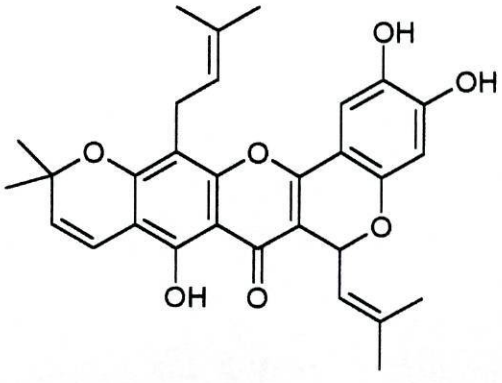
15

2. 3. Actividade antiplaquetária

Lin *et al.* [71] estudaram a actividade antiplaquetária de flavonóides isoprenilados, incluindo os isolados *A. heterohyllus* Lamk. Nestes estudos verificou-se que flavonas com um anel D, resultante da ciclização do grupo isoprenilo na posição 3 com o grupo hidroxilo em 2', como a cicloartocarpina A (**21**) e a ciclo-heterofilina (**24**) eram potentes inibidores da agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidónico.

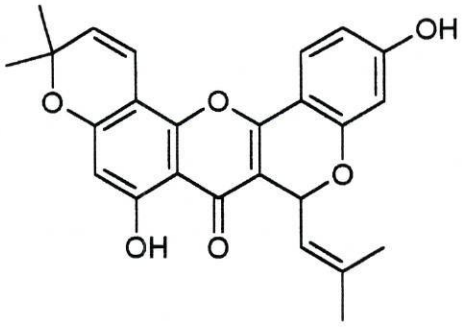


21

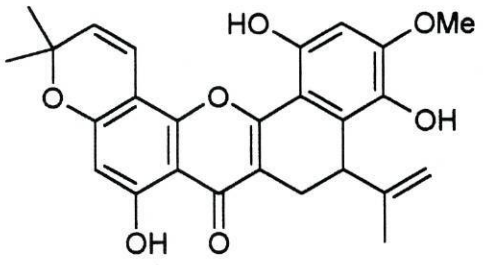


24

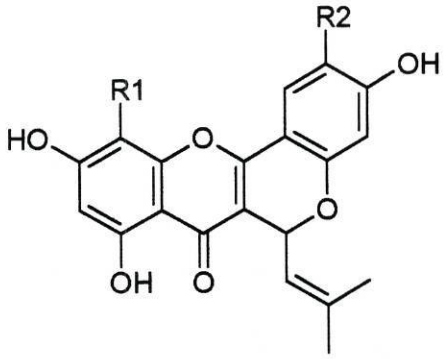
Várias flavonas isopreniladas isoladas de *A. communis* Forst. revelaram ser inibidoras da agregação plaquetária induzida pelo PAF, ácido araquidónico e colagéneo. A ciclomorusina (**22**) e a artomunoxantona (**31**) inibiam a agregação plaquetária induzida pelo PAF. Pelo contrário, a ciclomulberina (**70**), a diidroisocicloartomunina (**71**), o ciclocomunol (**72**) e a ciclocomunina (**73**) revelaram um efeito inibidor sobre a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidónico e colagéneo, sendo a flavona mais activa a ciclocomunina (**73**). A comparação entre as actividades dos compostos permitiu concluir pela importância da existência de grupos 3,3-dimetilalilo em C-6 e metoxilo em C-3' [72].



22



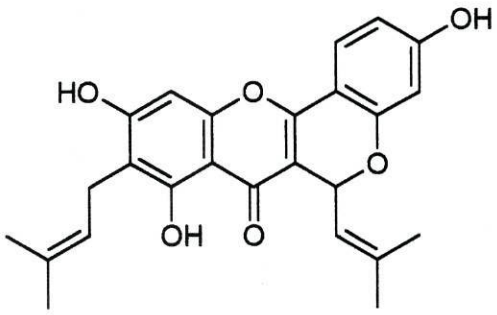
31



70: R1 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$; R2 = H

71: R1 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$; R2 = OMe

72: R1 = R2 = H

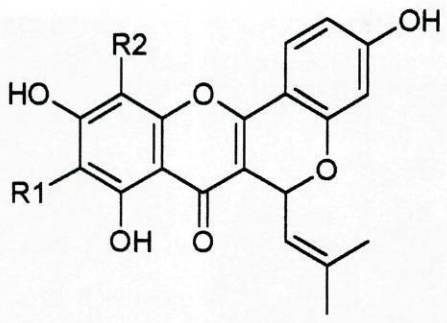


73

2. 4. Actividade citotóxica

Na tentativa de encontrar novos agentes antitumorais de origem vegetal muitos flavonóides isoprenilados têm sido estudados a fim de avaliar a actividade citotóxica [19].

Liou *et al.* [73] compararam a citotoxicidade de isoprenilflavonas isoladas de *Artocarpus communis* Forst. com a actividade citotóxica obtida para a cisplatina em linhas celulares de hepatoma humano (PLC/PRF/5) e carcinoma epidermóide oral (KB). Comparando a actividade da ciclocomunina (**73**) e ciclomulberina (**70**) relativamente à do ciclocomunol (**72**), foi possível concluir que a introdução de grupos 3,3-dimetilalilo em C-6 ou C-8 de flavonas com um anel D derivado do pirano aumenta a actividade citotóxica nas células KB. No entanto, este efeito não foi verificado para as linhas celulares PLC/PRF/5.



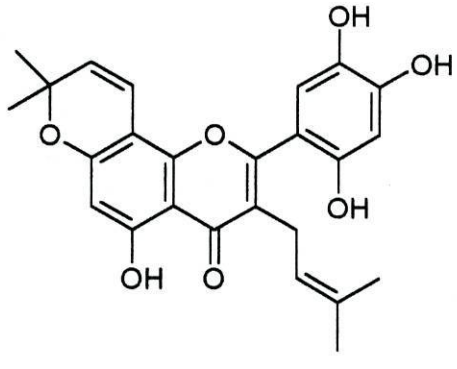
73: R1 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$; R2 = H

70: R1 = H; R2 = $CH_2CH=C(CH_3)_2$

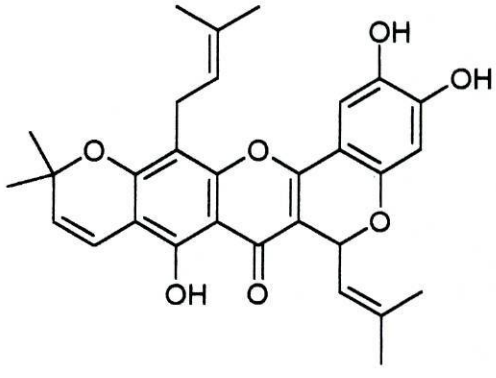
72: R1 = R2 = H

Estes investigadores verificaram ainda que a presença de anel cromeno na posição 7 e 8 de flavonas isopreniladas contribui para o decréscimo do efeito citotóxico em ambas as linhas celulares [73].

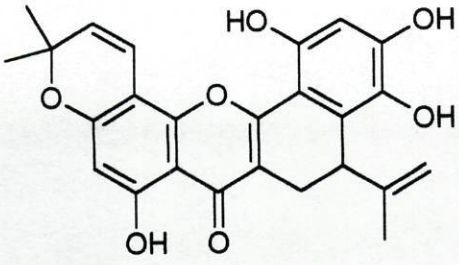
Nomura *et al.* [19] estudaram o efeito inibidor de alguns flavonóides (**19**, **24**, **30**, **68**, **69**, **74**) isolados de *Artocarpus* na libertação de TNF-α estimulada pelo ácido ocadaico em células BALB/3T3. Todos os compostos testados inibiram a libertação de TNF-α a baixas concentrações, levando os autores a sugerir que estes flavonóides poderiam actuar como promotores antitumorais. Foi ainda estudada a actividade citotóxica destes compostos sobre linhas celulares de rato L-1210 e de cólon 38 tendo-se verificado que todos eles apresentavam uma actividade citotóxica em ambas as culturas celulares [19].



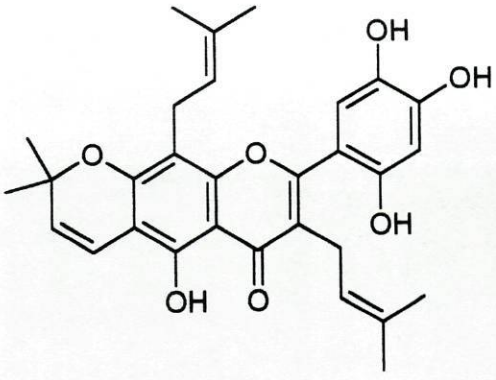
19



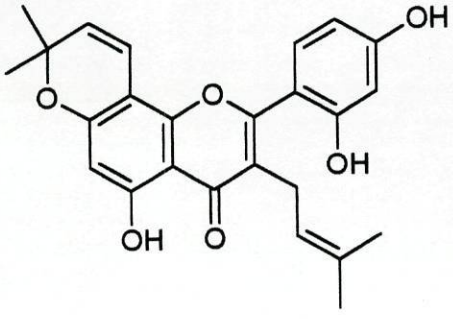
24



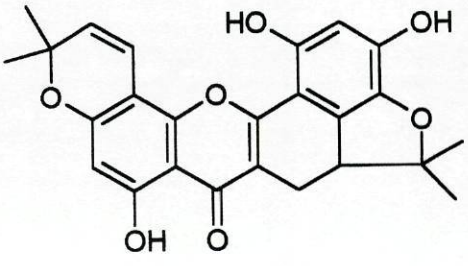
30



68



69

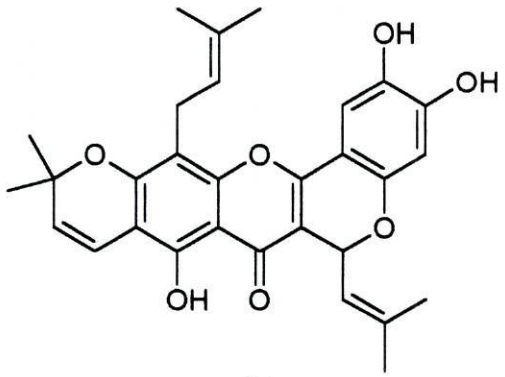


74

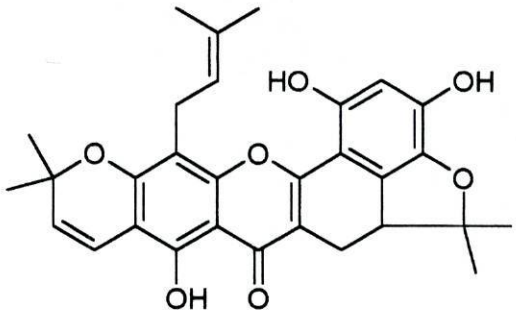
2. 5. Actividade antioxidante

Embora as espécies reactivas do oxigénio participem na defesa dos organismos vivos, elas podem ser responsáveis por danificação de componentes celulares, desempenhando um papel importante em várias condições patológicas [74-79]. Por esta razão são frequentes na literatura os estudos que pretendem avaliar as propriedades antioxidantes de produtos naturais, nomeadamente flavonóides [80-94].

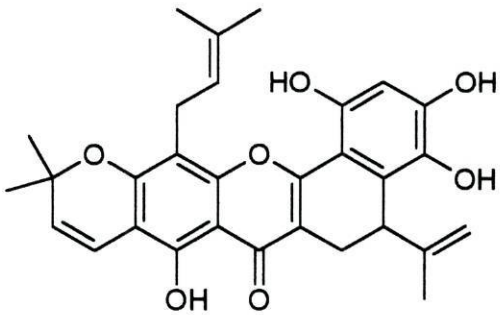
Algumas flavonas isopreniladas isoladas de *A. heterophyllus* Lamk. como a ciclo-heterofilina (**24**) e a artonina A (**75**) e B (**76**) revelaram ser fortes inibidores da peroxidação lipídica e captoras de radicais livres peroxilo, hidroxilo e DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo). No entanto, estas flavonas não mostraram qualquer efeito sobre a actividade da enzima xantina oxidase e sobre a captação de anião superóxido, peróxido de hidrogénio e radical carbono. Verificou-se ainda que estes compostos inibiram a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade [95].



24

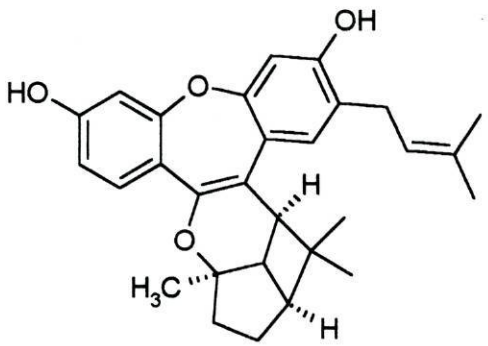


75



76

Chung *et al.* [63] isolaram de *Artocarpus rigida* Bl. um fenol de estrutura complexa (**57**), que mostrou ser um forte inibidor da formação de anião superóxido em neutrófilos de rato.



57

2. 6. Outras actividades

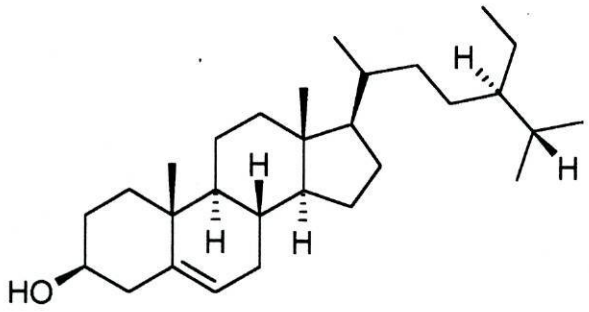
Além das actividades acima referidas têm também sido descritas na literatura outras actividades, nomeadamente antimalárica para alguns estilbenos isolados de *A. integer* Thunb. [24], antibacteriana para algumas flavonas isopreniladas de *A. heterophyllus* Lamk. [19] e estimuladora da síntese de anião superóxido para a ciclocomunina (**73**), isolada da casca da raiz de *A. communis* Forst. [96]. Alguns flavonóides e estilbenos de plantas de *Artocarpus* têm-se revelado como inibidores enzimáticos, particularmente da 5α-reductase, enzima envolvida na conversão da testosterona em 5α-diidrotestosterona [97, 98] e da tirosinase, uma enzima chave para a biossíntese da melanina [60, 61, 99].

CAPÍTULO II

Metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

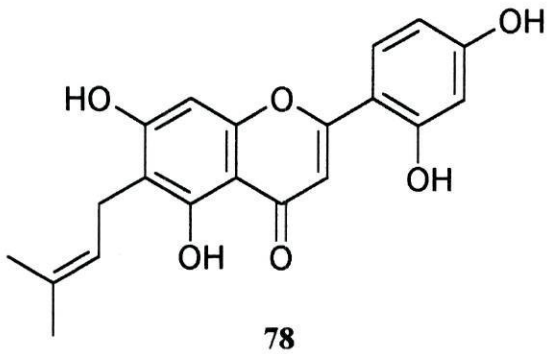
A nossa contribuição para o arsenal químico e biológico do género *Artocarpus* consistiu no isolamento de nove flavonas isopreniladas (**73**, **78-85**), seis das quais foram descritas pela primeira vez (**79-82**, **84** e **85**), bem como do β-sitosterol (**77**) e do 2,4-di-idroxibenzoato de etilo (**86**).

1. β-sitosterol (77)



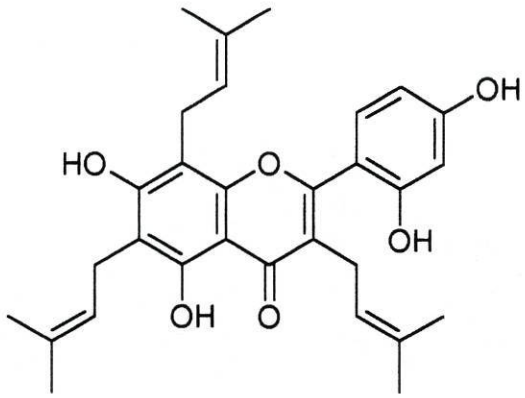
77

2. Artocarpesina (78)



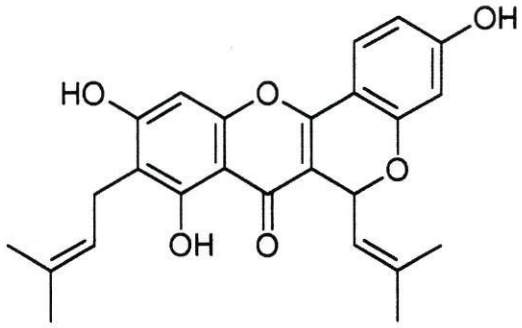
78

3. Artelasticina (79)



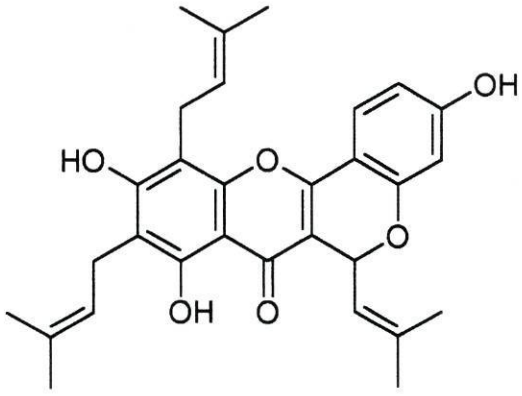
79

4. Ciclocomunina (73)



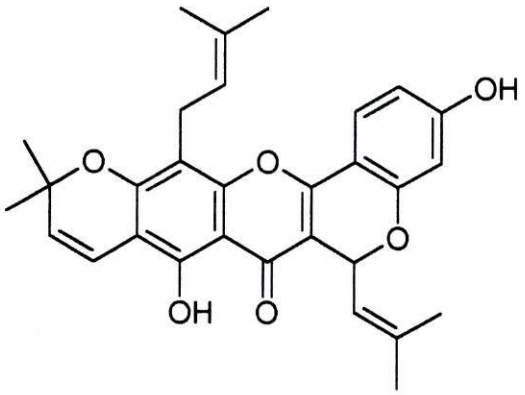
73

5. Artelastina (80)



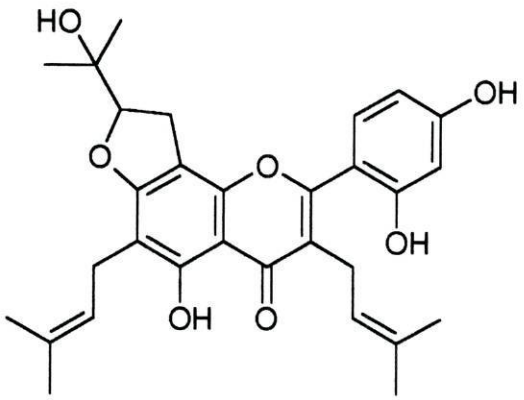
80

6. Artelastocromeno (81)



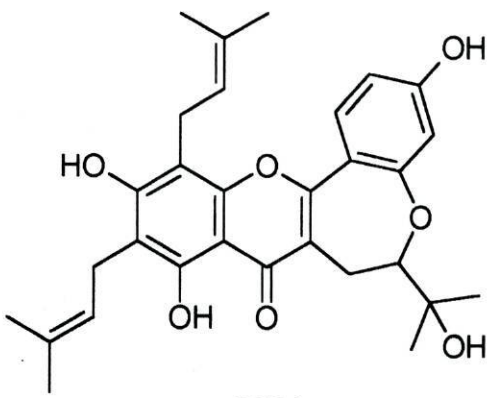
81

7. Artelastofurano (82)



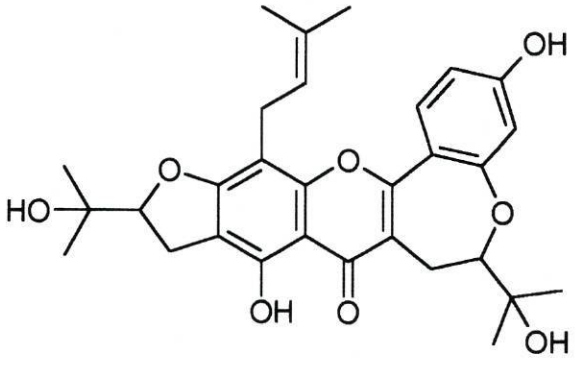
82

8. Artelastinina (83) e Artelastocarpina (84)



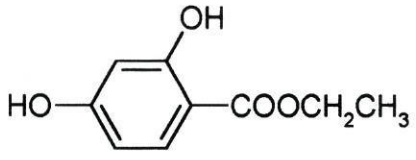
83/84

9. Carpelastofurano (85)



85

10. 2,4-Diidroxibenzoato de etilo (86)



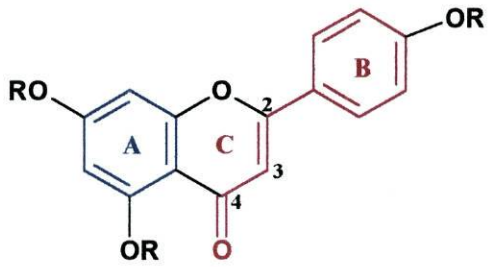
86

CAPÍTULO III

Considerações biogenéticas sobre os metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

1. Flavonóides

Todas as classes de flavonóides estão relacionadas por uma via biossintética comum, que apresenta como precursores os produtos resultantes de ambas as vias xiquimato / acetato [100]. Estudos com precursores marcados com radioisótopos estabeleceram que o anel A dos flavonóides é formado pela condensação de três unidades acetato provenientes da malonil--CoA, enquanto que o anel B e os átomos de carbono 2, 3 e 4 do anel C são provenientes do precursor fenilpropanóide derivado da via xiquimato [101, 102].



A sequência de reacções que conduzem à formação do precursor fenilpropanóide para a biossíntese de vários metabolitos vegetais, nomeadamente flavonóides, é designada genericamente por "metabolismo geral fenilpropanóide". Estas reacções consistem na conversão da fenilalanina e/ou tirosina em ésteres da CoA derivados de ácidos cinâmicos substituídos [103, 104].

A enzima fenilalanina amónia liase (PAL) catalisa a eliminação estereoespecífica de amónia da fenilalanina, originando a formação de (*E*)-cinamato, controlando o fluxo de material da via do xiquimato para muitos dos metabolitos secundários baseados nos fenilpropanóides [105]. A segunda enzima do metabolismo geral fenilpropanóide, a cinamato 4--hidroxilase (CAH), catalisa a hidroxilação em C-4 do cinamato para formar o 4-cumarato (Figura 1, pág. 44) [103, 104].

Algumas das vias específicas em que se divide o metabolismo geral fenilpropanóide requerem, para além da 4-hidroxilação, outras substituições no anel aromático. As substituições mais vulgares são a hidroxilação e subsequente metilação catalisadas por fenolases e *O*-metiltransferases, respectivamente [104]. De acordo com Rao *et al.* [35], a presença de um anel B 2',4'-diidroxilado em todos os flavonóides isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume [28, 106, 107] sugere que o padrão de hidroxilação do anel B seja definido nesta fase de biossíntese (Figura 1, pág. 44). Este mecanismo foi já anteriormente descrito para a

umbeliferona (7-hidroxicumarina), cuja biossíntese envolve a hidroxilação em *orto* do 4-cumarato [108].

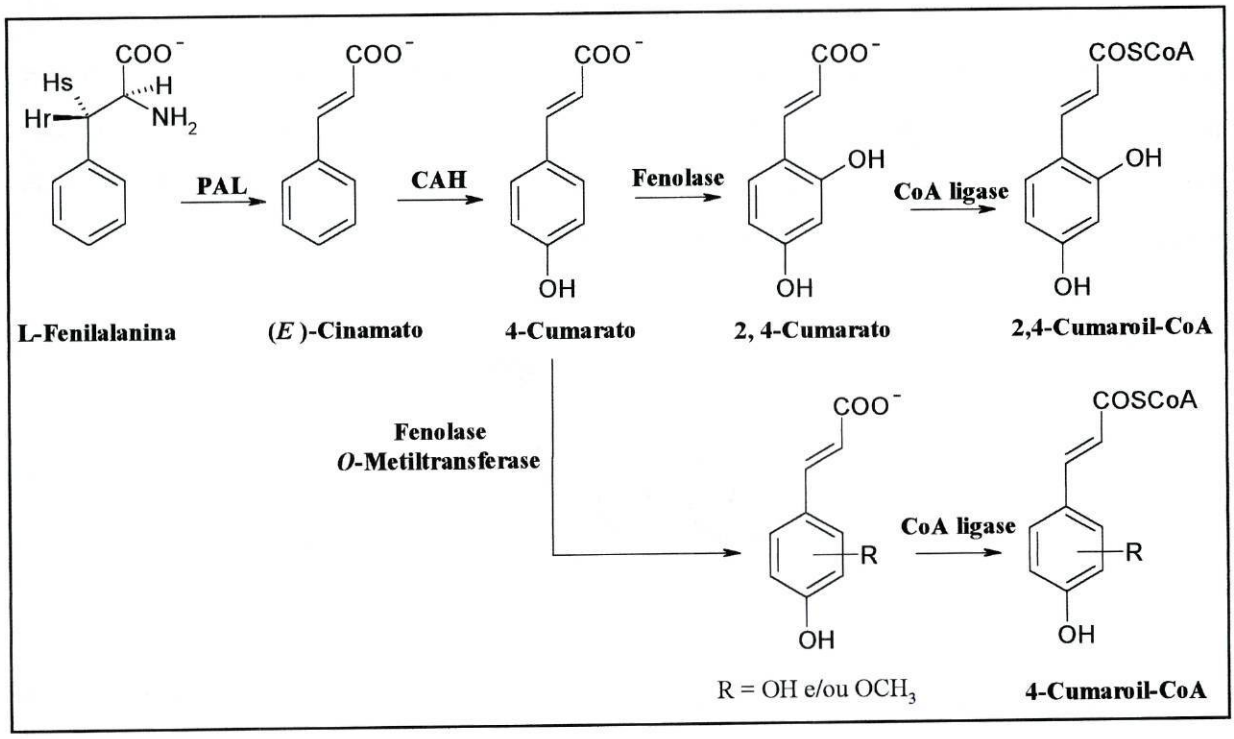


Figura 1 - Reacções catalisadas por enzimas do metabolismo geral fenilpropanóide.

O primeiro flavonóide a ser obtido é a 2',4',6',2,4-pentaidroxichalcona (**87**), resultante da condensação de resíduos acilo de uma molécula de 2,4-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil CoA, uma reacção catalisada pela chalcona síntase (CHS) [104, 109, 110]. Foi demonstrado experimentalmente que a chalcona é o produto imediato da reacção catalisada pela CHS [104]. Numa segunda etapa a enzima chalcona isomerase (CHI) catalisa a conversão estereoespecífica de **87** à correspondente (2*S*)-flavanona (**88**) [103, 110, 111]. Por introdução de uma dupla ligação entre C-2 e C-3, esta é posteriormente convertida na respectiva flavona (**89**), catalisada pela enzima flavona síntase tipo I (FNSI) [112]. A (2*S*)-flavanona (**88**) pode também originar a respectiva flavona (**89**) por hidroxilação na posição 2 da flavanona e posterior desidratação, catalisada pela flavona síntase tipo II (FNSII) [105, 112, 113] (Figura 2, pág. 45).

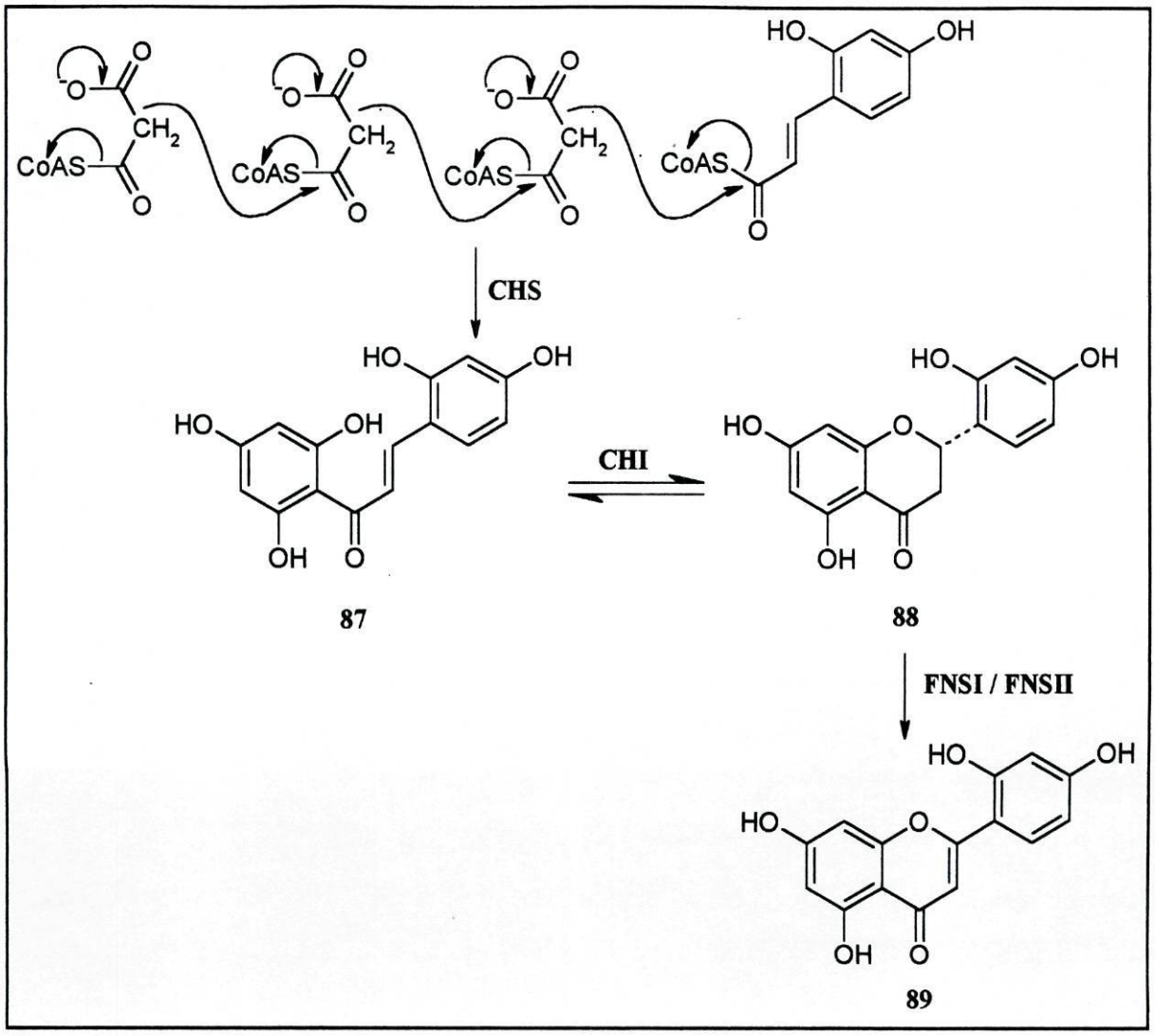


Figura 2 - Esquema proposto para a biossíntese de flavonas a partir do 2,4-cumaroil CoA e do malonil CoA.

As etapas seguintes da biossíntese de agliconas de flavonóides envolvem a introdução de substituintes isoprenilo.

2. Proposta de biossíntese para os compostos 78 e 79

As enzimas responsáveis pela introdução de grupos 3,3-dimetilalilo são designadas por preniltransferases e catalisam a transferência do resíduo 3,3-dimetilalilo do pirofosfato de dimetilalilo para os flavonóides [40].

Do ponto de vista biossintético é geralmente aceite que o esqueleto básico das diferentes classes de flavonóides seja construído antes da introdução de grupos isoprenilo [40, 114]. A análise estrutural de dezanove flavonóides de diferentes classes, isolados de duas espécies de *Dahlstedtia*, sugere que todas as modificações do anel A, incluindo a isoprenilação, ocorram pelo menos na etapa correspondente à formação de chalcona [115]. O facto da isoprenilação enzimática ser uma reacção tardia da biossíntese de flavonóides é também confirmado pela especificidade das preniltransferases para diferentes classes de flavonóides [40, 116-118].

Similarmente a outras enzimas de conjugação é de esperar que as preniltransferases sejam não só enzimas específicas de substrato como também de posição. Esta hipótese foi comprovada pelo facto da isoprenilação das isoflavonas genisteína (5,7,4'-triidroxiflavona) e 2'-hidroxigenisteína, provenientes da raiz de *Lupinus albus* L., ocorrer nas posições 6, 8 e/ou 3' por diferentes preniltransferases específicas de posição [116].

Tal como as *O*-metiltransferases e *O*-glucosiltransferases [119], as preniltransferases parecem encontrar-se associadas a membranas, formando sistemas multienzimáticos responsáveis pela introdução consecutiva de vários grupos 3,3-dimetilalilo em diferentes posições do núcleo flavonóide [116, 118].

De acordo com o exposto anteriormente propõe-se como caminho biossintético para os compostos **78** e **79** o indicado na Figura 3 (pág. 47). Este caminho biossintético está de acordo com o proposto por Uvais *et al.* [54] para a biossíntese de artobiloxantona e cicloartobiloxantona.

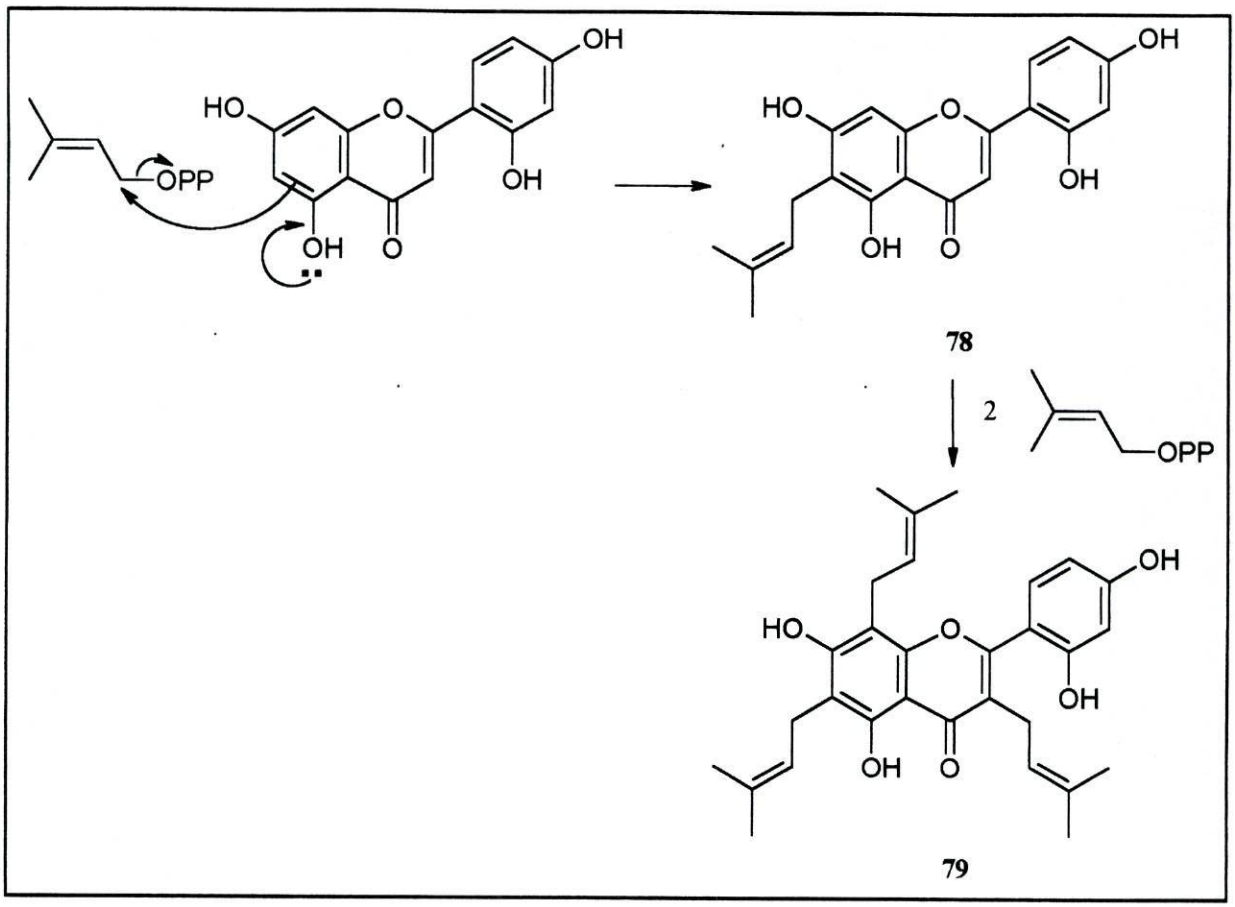


Figura 3 - Esquema proposto para a biossíntese dos compostos **78** e **79**.

Alternativamente ao caminho biossintético proposto para os compostos **78** e **79**, a introdução de grupos 3,3-dimetilalilo no anel A pode ocorrer na etapa correspondente à formação de chalcona, tal como está representado na Figura 4 (pág. 48). Relativamente ao grupo 3,3-dimetilalilo em C-3, alguns investigadores sugerem que a introdução deste possa ocorrer através de uma preniltransferase específica para o grupo metilénico do intermediário dibenzoilmetano derivado da 2',4',6',2,4-pentaidroxichalcona (Figura 4, pág. 48) [20, 21, 28]. Segundo Rao *et al.* [35] esta segunda hipótese é a mais provável considerando a maior reactividade do grupo metilénico do dibenzoilmetano e o desconhecimento, até ao momento, do isolamento de flavanonas com grupos 3,3-dimetilalilo em C-3, em plantas do género *Artocarpus*. Alguns estudos em culturas celulares confirmam esta hipótese [21, 35].

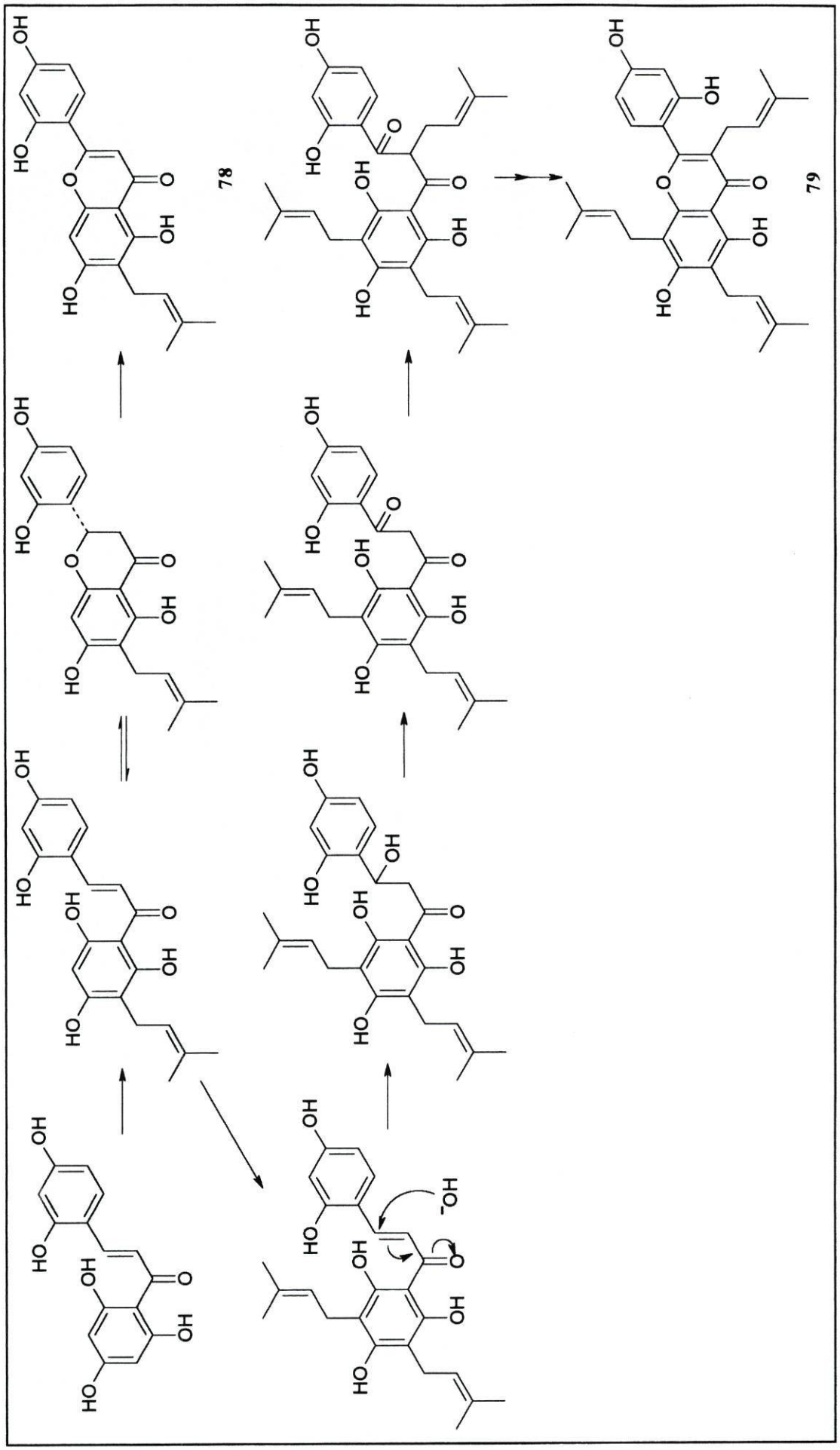


Figura 4 – Alternativa para a biossíntese dos compostos **78** e **79**.

3. Proposta de biossíntese para os compostos 73, 80 e 81

Os compostos **73, 80 e 81** apresentam um anel adicional D que, segundo alguns autores, resulta de um mecanismo de ciclização oxidativa [54, 120, 121].

O anel pirano existente nos compostos **73, 80** e **81** resulta da ciclização oxidativa do grupo 3,3-dimetilalilo ligado ao C-3 e o grupo hidroxilo em C-2', catalisada por prenilciclases (Figura 5, pág. 50).

O composto **81** está biossinteticamente relacionado com o composto **80**, devendo resultar da ciclização oxidativa entre o grupo 3,3-dimetilalilo em C-8 e o grupo hidroxilo em posição *orto* (Figura 5, pág. 50).

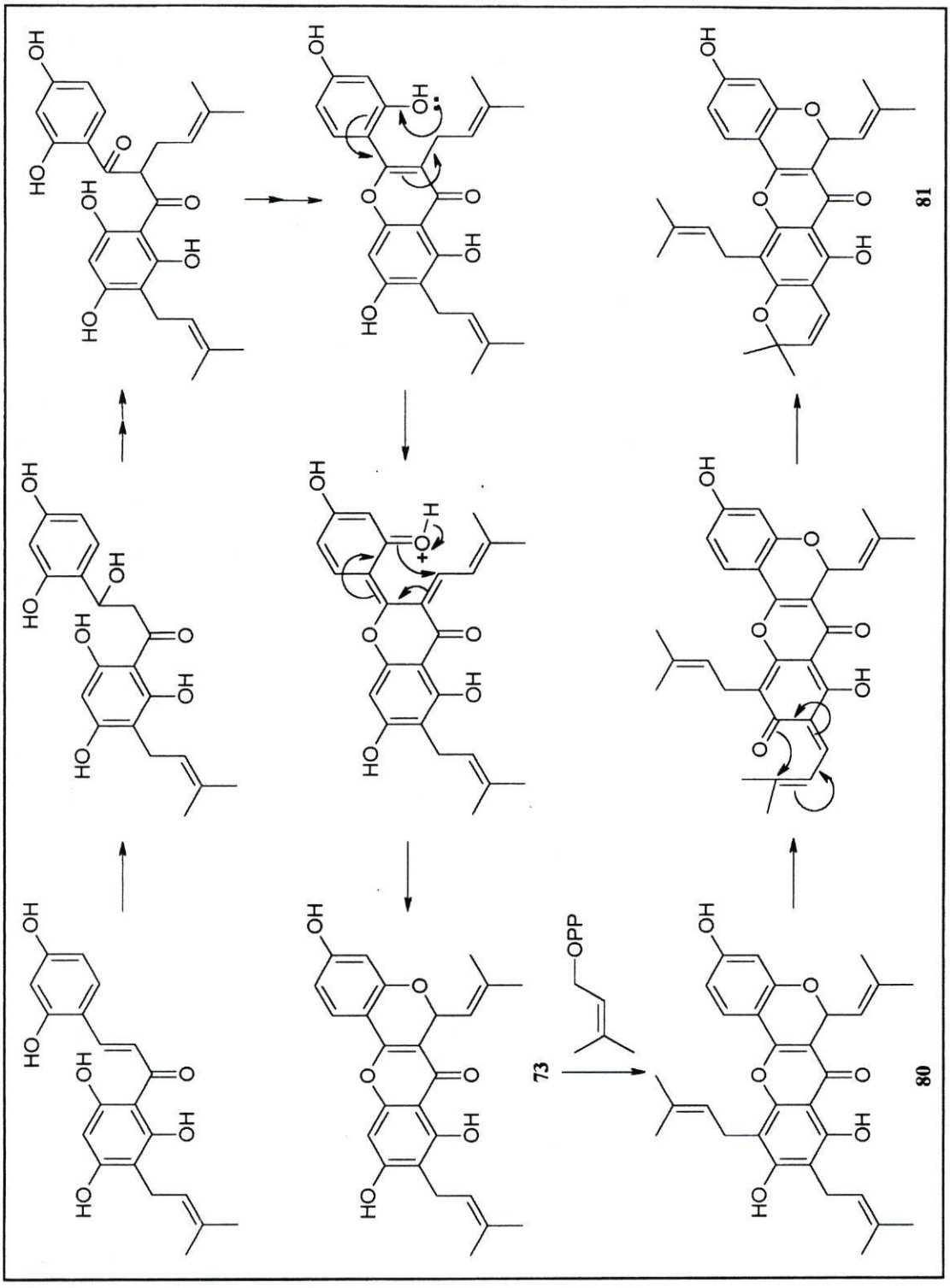


Figura 5 - Esquema proposto para a biossíntese dos compostos **73**, **80** e **81**.

4. Proposta de biossíntese para os compostos 82, 83/84 e 85

Os compostos **83/84** e **85** contêm na sua molécula um anel adicional de sete átomos. A formação deste anel pode ter origem na obtenção de um epóxido, por oxidação da posição 3 do grupo 3,3-dimetilalilo catalisada por uma epoxidase, seguida da abertura do anel oxirano e ciclização com o grupo hidroxilo na posição 2' (Figura 6). Este mecanismo de biossíntese foi já anteriormente descrito para a isociclo-heterofilina isolada da casca de *Artocarpus heterophyllus* Lamk. por Rao *et al.* [47].

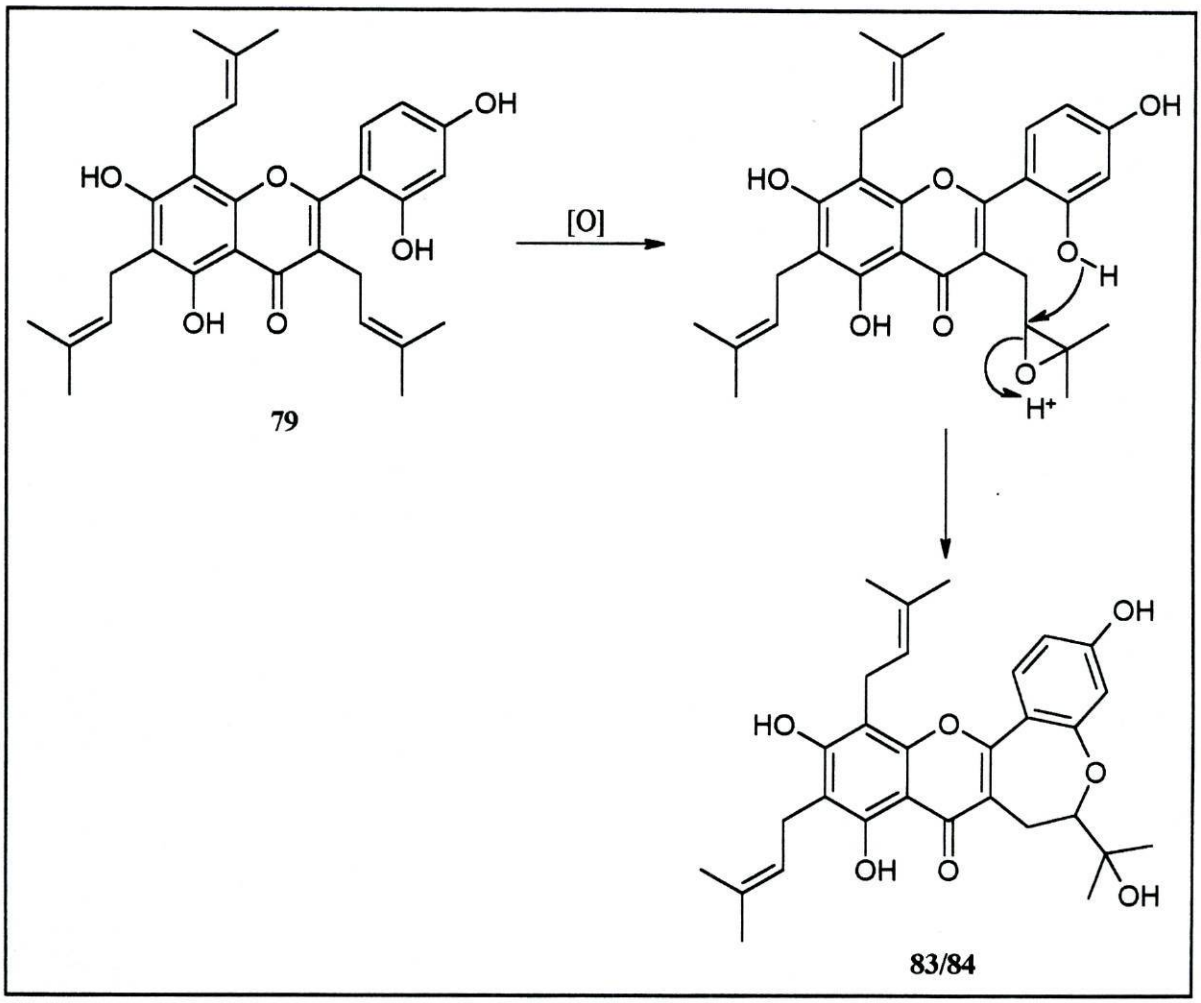


Figura 6 - Esquema proposto para a biossíntese do composto **83/84**.

A formação do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano está descrita para rotenóides [104], furanocumarinas [112, 122], isoflavonas [114, 123, 124] e flavanonas [125, 126] como

resultado da ciclização via epóxido entre os grupos 3,3-dimetilalilo e hidroxilo em posição *orto*, pelo que provavelmente poderá ser este o mecanismo de formação deste anel nos compostos **82** e **85**. Nas Figuras 7 e 8 (pág. 53) apresenta-se uma proposta para a biossíntese dos compostos **82** e **85** a partir dos compostos **78** e **83/84**, respectivamente.

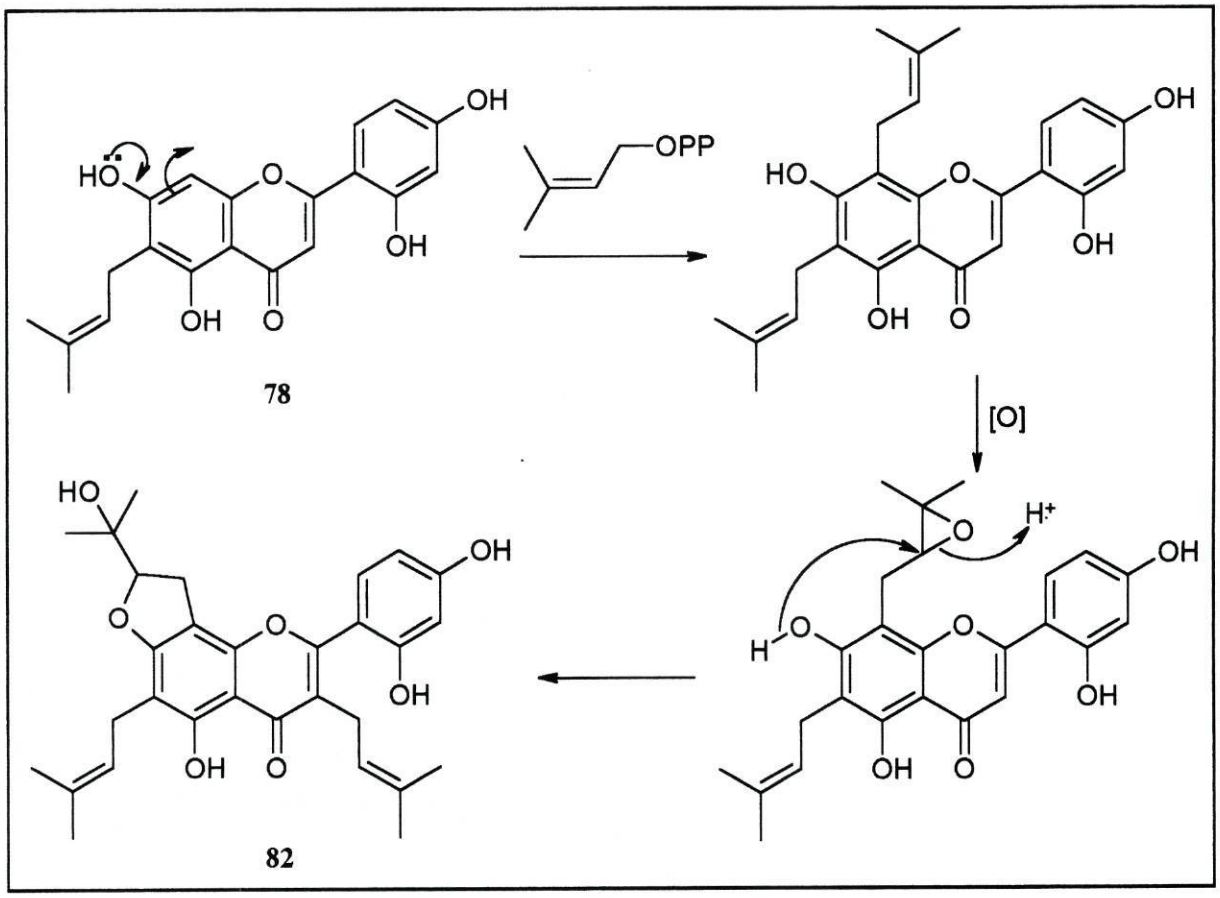


Figura 7 - Esquema proposto para a biossíntese do composto **82**.

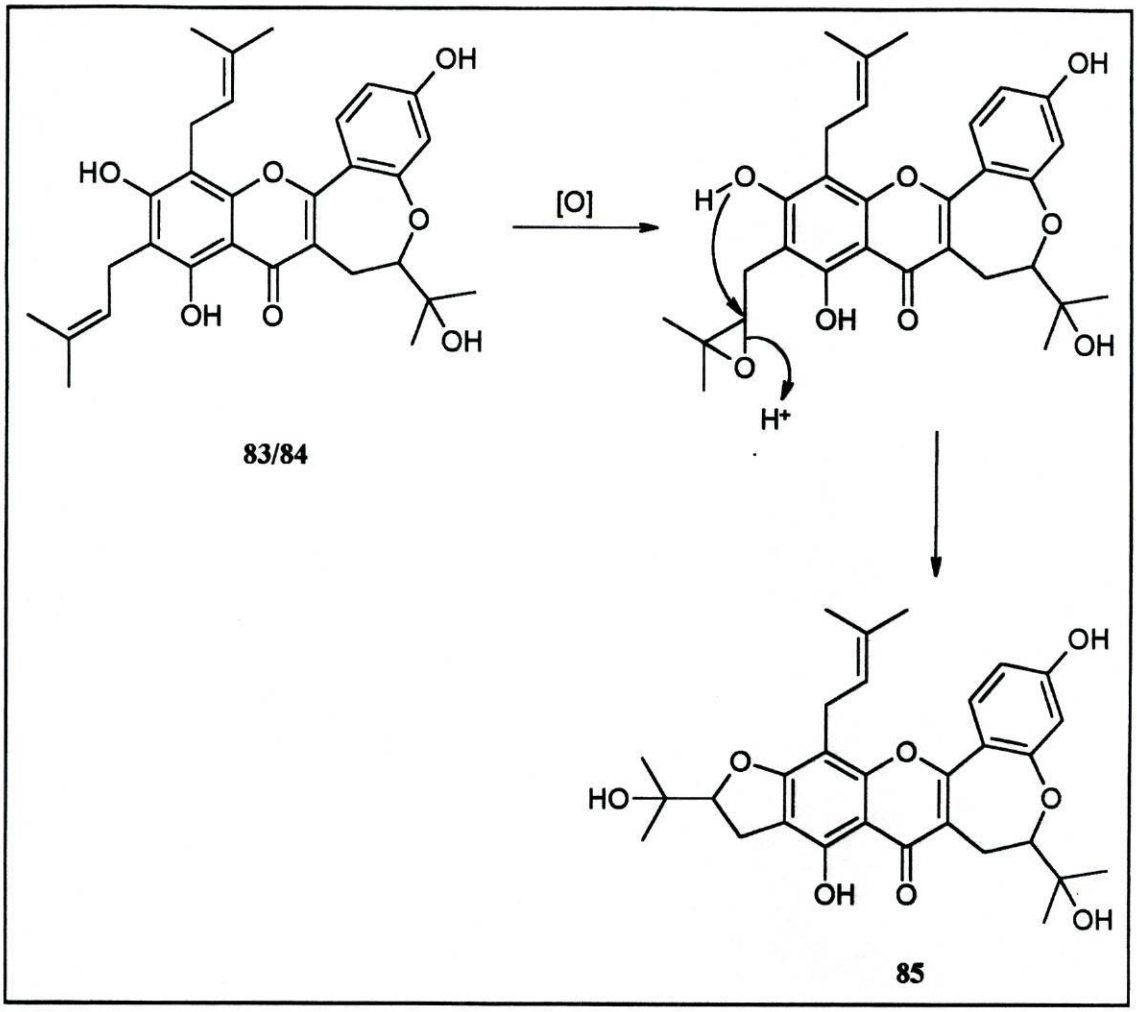


Figura 8 - Esquema proposto para a biossíntese do composto **85**.

CAPÍTULO IV

Resultados e discussão:
Determinação estrutural dos metabolitos secundários isolados de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

1. β-sitosterol (77)

Este composto foi identificado como o β-sitosterol (Figura 9) através da comparação dos dados de RMN de ^{1}H a 200 MHz e RMN de ^{13}C a 50 MHz, em $CDCl_3$, (pág. 192) com os descritos na literatura [127]. Trata-se de um composto de distribuição ubiquitária no reino vegetal, estando o seu isolamento descrito para várias plantas do género *Artocarpus*, nomeadamente nas cascas de *A. chaplasha* Roxb. [128], *A. champeden* Spreng. [23] e na raiz *A. communis* Forst. [51] e *A. heterophyllus* Lamk. [41, 66]. Anteriormente, este composto já tinha sido isolado da madeira de *A. elasticus* Reinw. ex Blume por Pendse *et al.* [28].

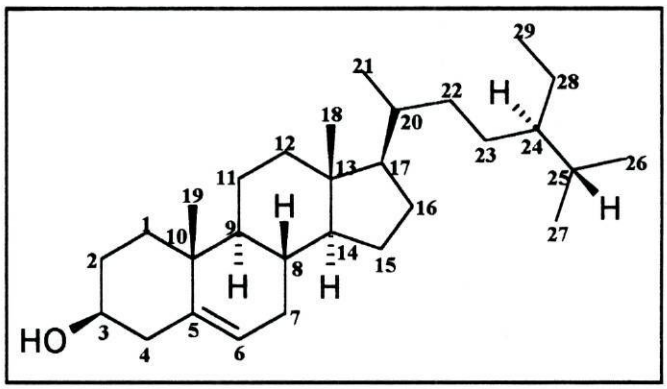


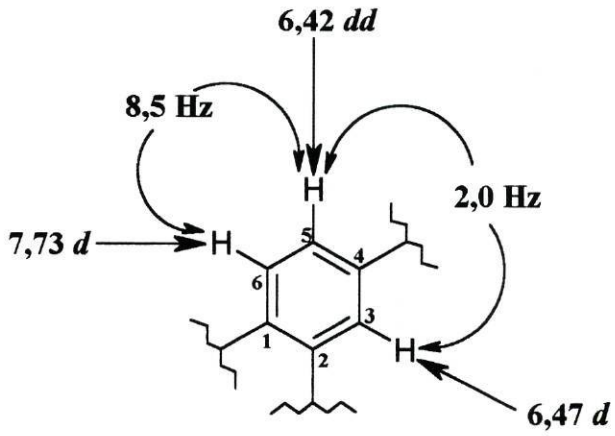
Figura 9 - Estrutura do β-sitosterol (**77**).

2. Artocarpesina (78)

O espectro no IV do composto **78** (pág. 193) evidenciou uma banda larga de absorção de estiramento entre 3500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} característica de grupo hidroxilo, uma banda de média intensidade a 2924 cm^{-1} de distensão de ligação C-H alquílica e uma banda de forte intensidade a 1658 cm^{-1} indicadora da presença de um grupo carbonilo conjugado. Este espectro mostrou ainda três bandas de forte e média intensidade a 1620 cm^{-1}, 1477 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} de estiramento de ligações C=C de anel aromático, uma banda a 1358 cm^{-1} indicadora da presença de grupos metilo geminais e uma banda a 1250 cm^{-1} de estiramento de ligação C-O [129-131].

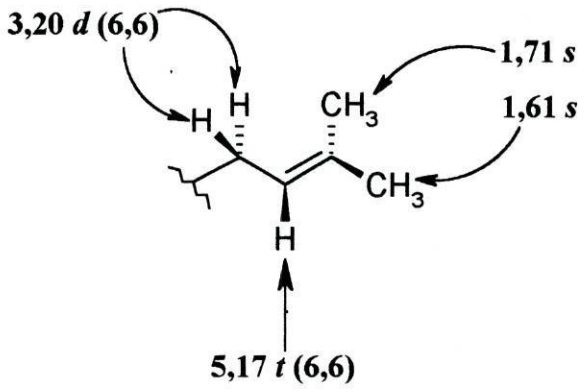
No espectro no UV em metanol do composto **78** (pág. 193) observaram-se três bandas de absorção a 204 (log ε 4,8), 271 (log ε 3,7, banda II) e 348 nm (log ε 3,7, banda I), sugerindo que o composto **78** poderia corresponder a um flavonóide [132-135]. A natureza fenólica deste composto foi evidenciada por visualização de um efeito batocrómico da banda a 348 nm (log ε 3,7) para 408 nm (log ε 3,8, $\Delta\lambda_{máx.}$ = 60 nm), após adição de uma solução de hidróxido de sódio 10 % [132-135]. Os espectros no UV, após a adição de uma solução metanólica de $AlCl_3$, revelaram um efeito batocrómico da banda a 348 nm (log ε 3,7) para 372 nm (log ε 3,8, $\Delta\lambda_{máx.}$ = 24 nm), estável após adição de ácido clorídrico, mostrando a presença de um grupo hidroxilo fenólico em posição *orto* ao carbonilo em C-4 [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 2, pág. 68) apresentou um singuleto a δ 13,28 referente a um grupo hidroxilo fenólico ligado por ponte de hidrogénio com o grupo carbonilo em C-4. Na região dos protões aromáticos observaram-se sinais correspondentes a dois dupletos, com integração para um protão cada, a δ 7,73 (J = 8,5 Hz) e δ 6,47 (J = 2,0 Hz) e um duplo dupleto de um protão a δ 6,42 (J = 8,5 e 2,0 Hz), cujos valores das constantes de acoplamento indicaram o acoplamento do protão correspondente ao duplo dupleto com os outros protões aromáticos em posição *orto* e *meta*. O espectro de COSY confirmou os acoplamentos entre os protões referidos, sugerindo a presença de um anel de benzeno 1,2,4-trissubstituído:



Nesta mesma região observaram-se ainda dois singuletos, com integração para um protão cada, a δ 6,98 e δ 6,48. A ausência de acoplamento no espectro de COSY sugeriu que poderiam corresponder a protões de anéis diferentes do núcleo flavonóide.

Na região dos protões alifáticos observou-se um tripleto a δ 5,17 (1H, J = 6,6 Hz) acoplado, de acordo com o espectro de COSY, a um dupleto a δ 3,20 (2H, J = 6,6 Hz) bem como dois singuletos de três protões cada, a δ 1,71 e δ 1,61, característicos de grupos metilo. O espectro de COSY mostrou que os protões destes singuletos também acoplavam com o protão do tripleto a δ 5,17. Estes dados levaram a concluir que existia um grupo 3,3-di-metilalilo na molécula do composto **78** [136].

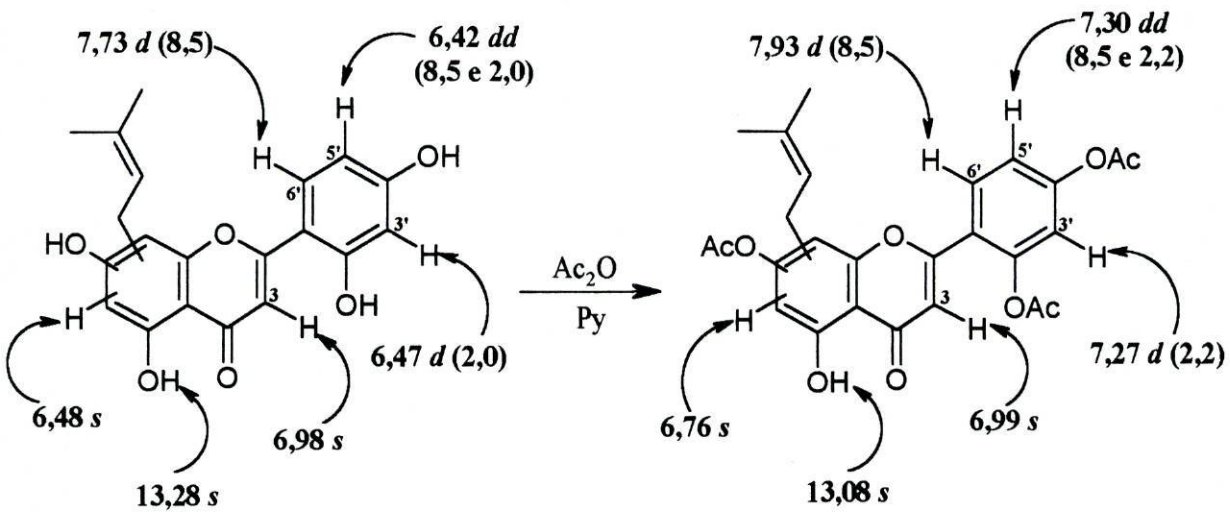


Com o objectivo de averiguar a presença de outros grupos hidroxilo para além do hidroxilo fenólico em ponte de hidrogénio foi efectuada a acetilação do composto, da forma usual (pág. 189). O espectro de RMN de ^{1}H a 200 MHz em DMSO-d_6 do derivado acetilado (**78Ac**) (Tabela 2, pág. 68) mostrou três singuletos a δ 2,32, δ 2,30 e δ 2,26 correspondentes a três grupos acetoxilo, mantendo-se o singuleto do protão hidroxílico em ponte de hidrogénio a δ 13,08. A comparação dos valores de deslocamento químico dos sinais correspondentes aos protões aromáticos do composto **78** com os observados para o seu derivado triacetilado apresenta-se na Tabela 1 (pág. 60).

Tabela 1 – Comparação dos valores de δ de ^{1}H dos protões aromáticos do composto **78** com os do seu derivado triacetilado **78Ac**.

δ ^{1}H		Δδ (ppm)
78	**78Ac**	
7,73 *d* (*J* = 8,5 Hz)	7,93 *d* (*J* = 8,5 Hz)	0,20
6,47 *d* (*J* = 2,0 Hz)	7,27 *d* (*J* = 2,2 Hz)	0,80
6,42 *dd* (*J* = 8,5 e 2,0 Hz)	7,30 *dd* (*J* = 8,5 e 2,2 Hz)	0,88
6,98 *s*	6,99 *s*	0,01
6,48 *s*	6,76 *s*	0,28

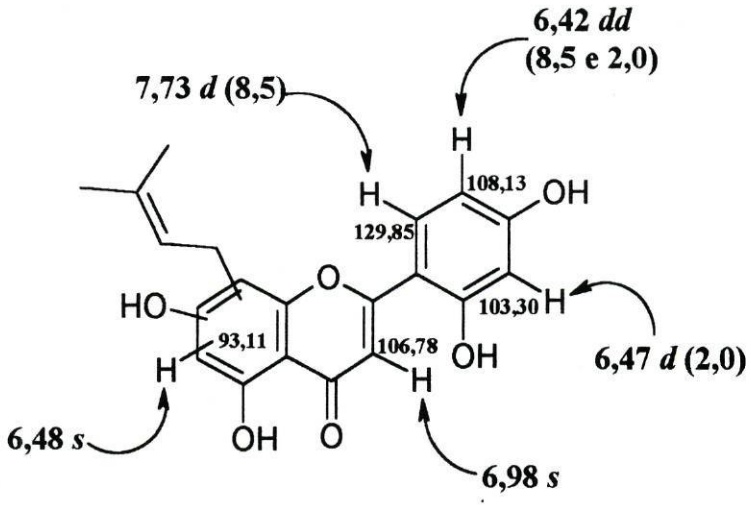
Como se pode observar nesta Tabela, após acetilação do composto **78** verificou-se um significativo deslocamento paramagnético dos sinais a δ 6,47 *d* (*J* = 2,0 Hz) e δ 6,42 *dd* (*J* = 8,5 e 2,0 Hz) para δ 7,27 *d* (*J* = 2,2 Hz, Δδ = 0,80 ppm) e δ 7,30 *dd* (*J* = 8,5 e 2,2 Hz, Δδ = 0,88 ppm), respectivamente, e um menor deslocamento paramagnético do sinal a δ 7,73 *d* (*J* = 8,5 Hz) para δ 7,93 *d* (*J* = 8,5 Hz, Δδ = 0,20 ppm). Estas variações nos valores de deslocamento químico sugeriram que os sinais a δ 6,47 e δ 6,42 correspondiam a protões aromáticos em posição *orto* a dois grupos hidroxilo ou em posição *orto* a um grupo hidroxilo e posição *para* a outro grupo hidroxilo [133, 136]. O sinal a δ 7,73 correspondia a um protão aromático em posição *meta* a um grupo hidroxilo [133, 136]. Com base nestes deslocamentos concluiu-se que o composto **78** possuía um anel 2,4-diidroxilado. O protão aromático a δ 6,48 sofreu também um desvio paramagnético significativo aparecendo a δ 6,76 *s* (Δδ = 0,28 ppm), sugerindo a sua localização em posição *orto* ou *para* a um grupo hidroxilo que foi acetilado. O singuleto a δ 6,98 quase não sofreu um deslocamento aparecendo a δ 6,99 (Δδ = 0,01 ppm), sugerindo que este singuleto deve corresponder ao protão da posição 3 de uma flavona.



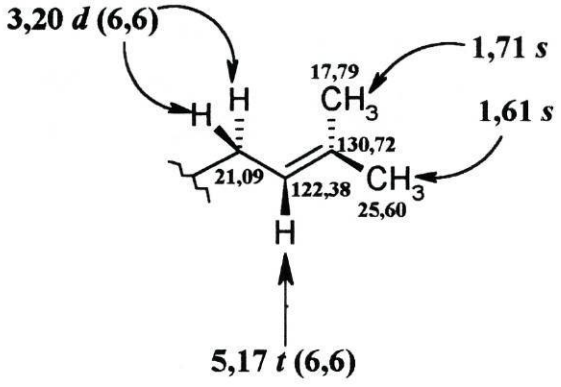
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 do composto **78** (Tabela 2, pág. 68) evidenciaram a existência de dezanove sinais de carbono. O sinal a δ 181,99 (C) deveria corresponder ao carbono carbonílico da flavona com grupo hidroxilo na posição 5 [137-139].

Na região dos átomos de carbono com hibridação sp^2 observou-se um sinal a δ 161,77 (C), cuja elevada intensidade sugeriu a hipótese de corresponder a dois átomos de carbono, e oito sinais de carbonos quaternários, de um carbono cada, a δ 161,61, δ 158,85, δ 158,32, δ 155,18, δ 130,72, δ 110,70, δ 108,75 e δ 103,36. Além destes sinais apareceram nesta região do espectro seis sinais de carbonos metínicos a δ 129,85, δ 122,38, δ 108,13, δ 106,78, δ 103,30 e δ 93,11.

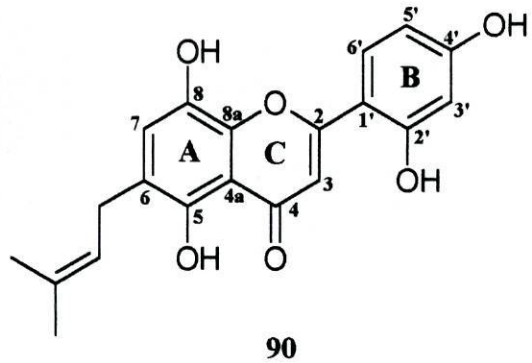
O espectro de HETCOR permitiu atribuir os sinais a δ 129,85 (CH), δ 108,13 (CH) e δ 103,30 (CH) aos carbonos C-6', C-5' e C-3', respectivamente, devido ao acoplamento destes carbonos com os protões a δ 7,73 *d* (J = 8,5 Hz, H-6'), δ 6,42 *dd* (J = 8,5 e 2,0 Hz, H-5') e δ 6,47 *d* (J = 2,0 Hz, H-3'). Este espectro mostrou também o acoplamento entre os carbonos a δ 106,78 (CH) e δ 93,11 (CH) e os protões a δ 6,98 *s* e δ 6,48 *s*, respectivamente, permitindo a atribuição do sinal a δ 106,78 ao C-3. O valor do deslocamento químico deste último sinal mostrou-se concordante com os desvios químicos descritos na literatura para o carbono da posição 3 de flavonas [137-139].



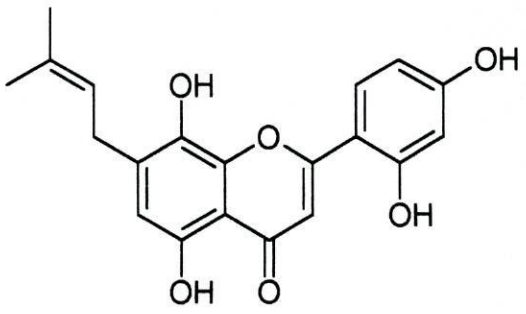
Nos espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) observaram-se ainda na região dos carbonos alifáticos três sinais a δ 25,60 (CH_3), δ 21,09 (CH_2) e δ 17,79 (CH_3), que juntamente com os sinais a δ 130,72 (C) e δ 122,38 (CH) eram característicos de átomos de carbono de um grupo 3,3-dimetilalilo [138]. O espectro de HETCOR confirmou a atribuição dos carbonos a δ 122,38 (CH), δ 25,60 (CH_3), δ 21,09 (CH_2) e δ 17,79 (CH_3) devido ao acoplamento verificado com os protões a δ 5,17 *t* (*J* = 6,6 Hz), δ 1,61 *s*, δ 3,20 *d* (*J* = 6,6 Hz) e δ 1,71 *s*, respectivamente.



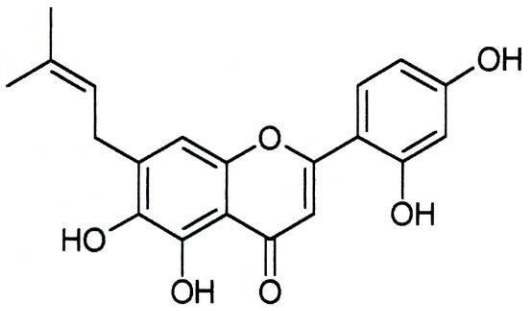
Com base nos dados referidos anteriormente o composto **78** poderia corresponder a uma das seis seguintes estruturas:



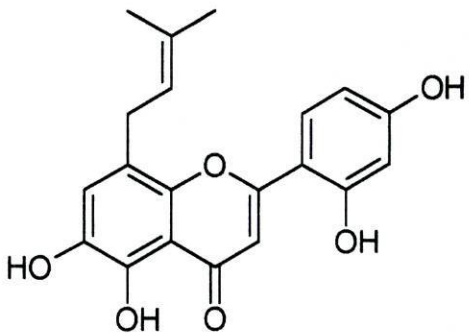
90



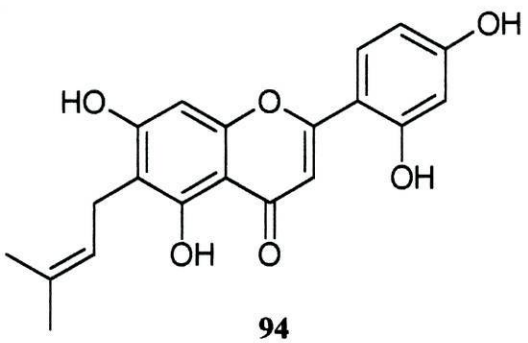
91



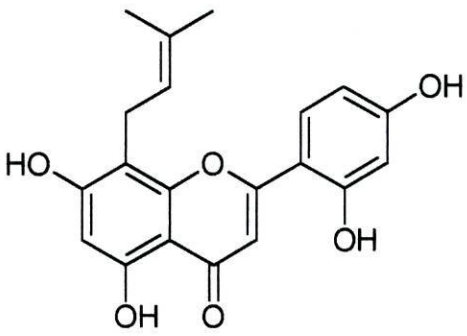
92



93



94

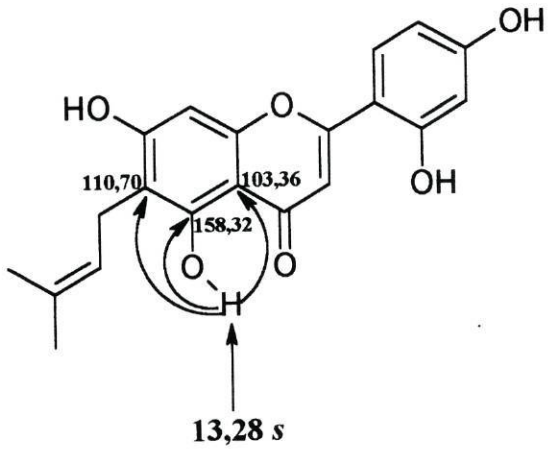


95

A localização do grupo 3,3-dimetilalilo e dos dois grupos hidroxilo no anel A foi determinada por experiências de INEPT selectivo.

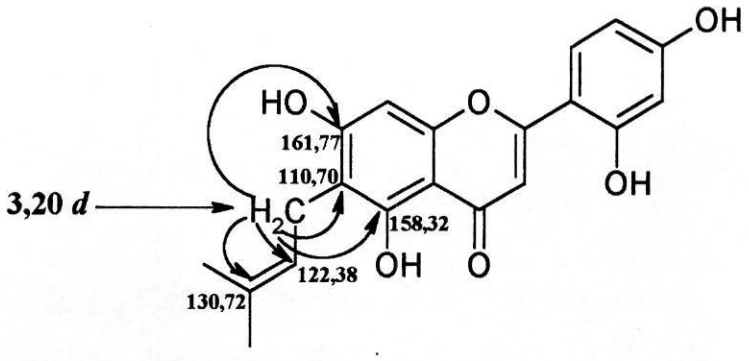
δ ^{1}H irradiado	δ ^{13}C observado
13,28 *s* (5-OH)	158,32 (C) 110,70 (C) 103,36 (C)
6,98 *s* (H-3)	161,61 (C) 103,36 (C)
3,20 *d* (CH_2-9)	161,77 (C) 158,32 (C) 130,72 (C) 122,38 (CH) 110,70 (C)

A irradiação do protão a δ 13,28 *s* (5-OH) mostrou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 158,32 (C), δ 110,70 (C) e δ 103,36 (C), permitindo a atribuição destes a C-5, C-6 e C-4a, respectivamente.

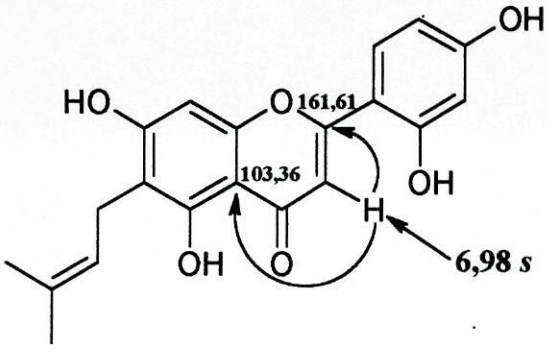


A irradiação do protão do dupleto a δ 3,20 mostrou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 161,77 (C), δ 158,32 (C), δ 130,72 (C), δ 122,38 (CH_2) e δ 110,70 (C), permitindo confirmar as atribuições anteriormente efectuadas para o grupo 3,3-dimetilalilo. Tendo-se atribuído o

sinal a δ 158,32 ao carbono da posição 5, estas experiências permitiram ainda concluir pela estrutura **94** e assinalar o sinal a δ 161,77 (C) a C-7.



A irradiação do protão a δ 6,98 *s* (H-3) mostrou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 161,61 (C) e δ 103,36 (C), permitindo a atribuição do primeiro sinal ao carbono da posição 2.



No espectro de EM-IE do composto **78** (pág. 193) observaram-se, além do sinal a 354 u. m. a. (55 %) correspondente ao pico do ião molecular, picos característicos devido à degradação do grupo 3,3-dimetilalilo a 339 ($[M^{+\bullet}-CH_3]^+$, 16 %), 311 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7]^+$, 100 %), 299 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7]^+$, 86 %) e 286 ($[M^{+\bullet}-C_5H_8]$, 5 %). A baixa intensidade do sinal a 286 u. m. a. (5%) indicou que o grupo 3,3-dimetilalilo estava ligado ao carbono 6 [140, 141]. Neste espectro também se observou um pico a 165 u. m. a. (14 %) resultante da fissão retro-Diels-Alder posterior à perda do grupo 3,3-dimetilalilo, confirmando que o anel A era diidroxilado (Figura 10, pág. 66) [142].

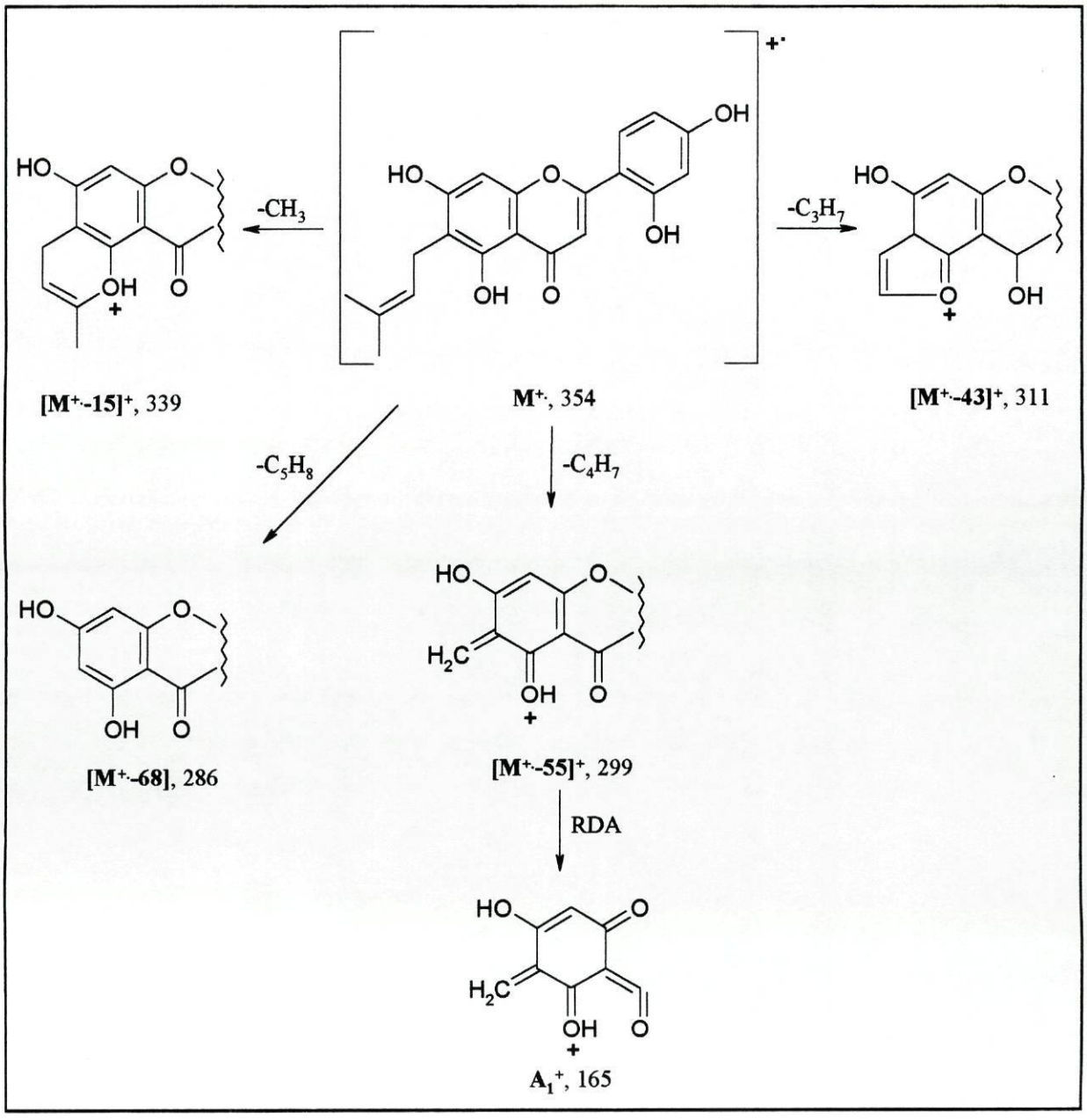


Figura 10 – Esquema proposto para a fragmentação por EM-IE do composto **78**.

Os dados espectroscópicos analisados permitiram concluir que o composto **78** correspondia à 6-(3,3-dimetilalil)-5,7,2',4'-tetraidroxiflavona (Figura 11).

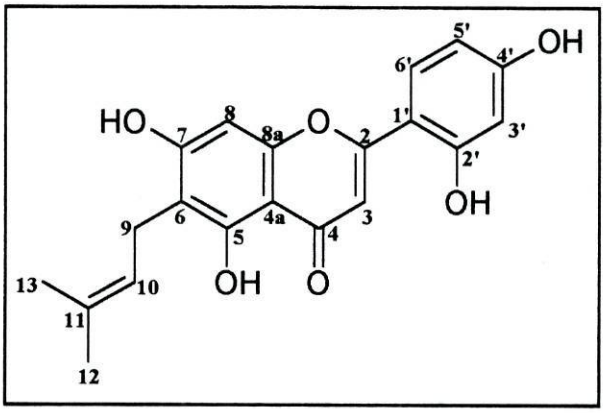


Figura 11 - Estrutura da artocarpesina (**78**).

A pesquisa bibliográfica revelou que este composto foi isolado pela primeira vez da madeira de *Artocarpus heterophyllus* Lamk [143], tendo sido designado por artocarpesina. Os valores de RMN de ^{1}H descritos na literatura foram obtidos em piridina-d_5, não estando disponíveis dados de RMN de ^{13}C, o que impede a sua comparação com os do composto em estudo. Posteriormente esta flavona foi também isolada de outras plantas do género *Artocarpus* como a madeira de *A. hirsutus* [20], *A. gomezianus* Wall. ex tre'c [20], *A. chaplasha* Roxb. [20], *A. integer* Thunb. [28] e *A. incisus* [60].

Tabela 2 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz e ^{13}C a 75 MHz da artocarpesina (**78**) e no espectro de RMN de ^{1}H a 200 MHz do triacetato de artocarpesina (**78Ac**) em DMSO-d_6.

	δ ^{1}H / multiplicidade/ (*J* em Hz)		δ ^{13}C
C/H	**78**	**78Ac**	**78**
2	-	-	161,61 (C)
3	6,98 *s*	6,99 *s*	106,78 (CH)
4	-	-	181,99 (C)
4a	-	-	103,36 (C)
5	13,28 *s*	13,08 *s*	158,32 (C)
6	-	-	110,70 (C)
7	NO	-	161,77 (C)
8	6,48 *s*	6,76 *s*	93,11 (CH)
8a	-	-	155,18 (C)[a]
9	3,20 *d* (6,6)	3,15 *d* (7,0)	21,09 (CH_2)
10	5,17 *t* (6,6)	5,06 *t* (7,0)	122,38 (CH)
11	-	-	130,72 (C)
12	1,61 *s*	1,61 *s*	25,60 (CH_3)
13	1,71 *s*	1,71 *s*	17,79 (CH_3)
1'	-	-	108,75 (C)
2'	NO	-	158,85 (C)[a]
3'	6,47 *d* (2,0)	7,27 *d* (2,2)	103,30 (CH)
4'	NO	-	161,77 (C)[a]
5'	6,42 *dd* (8,5 e 2,0)	7,30 *dd* (8,5 e 2,2)	108,13 (CH)
6'	7,73 *d* (8,5)	7,93 *d* (8,5)	129,85 (CH)
-OCOC$\underline{H}_3$	-	2,32 *s*	-
		2,30 *s*	
		2,26 *s*	

[a] permutáveis dentro da mesma coluna; NO: sinal não observado.

3. Artelasticina (79)

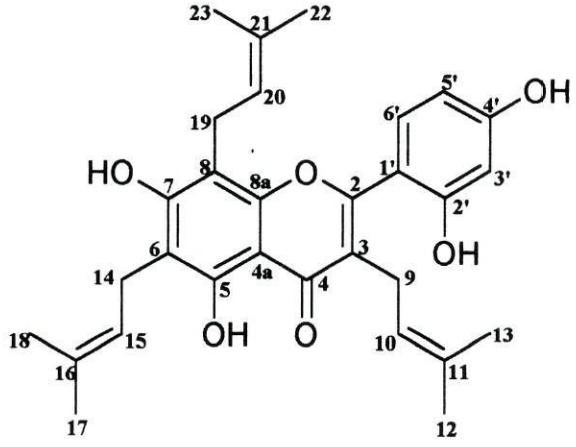
Semelhante ao espectro no IV da artocarpesina (**78**), o espectro no IV do composto **79** (pág. 194) apresentou uma banda larga de absorção de estiramento entre 3400 e 3200 cm^{-1} reveladora da presença de um grupo hidroxilo, bandas de média intensidade a 2922 e 2855 cm^{-1} de distensão de ligação C-H alquílica e uma banda de forte intensidade a 1658 cm^{-1} indicadora da presença de um grupo carbonilo conjugado. Este espectro revelou ainda bandas de forte e média intensidade a 1630, 1565, 1467 e 1440 cm^{-1} de estiramento de ligações C=C de anel aromático, uma banda a 1378 cm^{-1} indicadora da presença de grupos metilo geminais e uma banda de forte intensidade a 1230 cm^{-1} de estiramento da ligação C-O [129-131].

O carácter fenólico do composto **79** foi verificado ao traçar-se o espectro no UV (pág. 194) em solução metanólica e constatar-se que a adição de uma solução de NaOH promovia um deslocamento batocrómico da banda a 371 nm (log ε 4,0) para 407 nm (log ε 4,2, $\Delta\lambda_{máx.}$= 36 nm). Além da banda a 371 nm (log ε 4,0, banda I), o espectro no UV do composto **79** possuía ainda outra banda a 269 nm (log ε 4,1, banda II) característica da estrutura de um flavonóide [132-135]. Após adição de uma solução de $AlCl_3$ à solução metanólica do composto **79** verificou-se um deslocamento batocrómico da banda a 371 nm (log ε 4,0) para 415 nm (log ε 4,0, $\Delta\lambda_{máx.}$= 44 nm), estável após adição de ácido clorídrico. À semelhança do composto **78**, este deslocamento indicou a presença de um grupo hidroxilo em posição *orto* ao grupo carbonilo em C-4 [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em $CDCl_3$ (Tabela 3, pág. 81) evidenciou um singuleto a δ 13,06 correspondente a um protão hidroxílico fenólico ligado por uma ponte de hidrogénio intramolecular com o grupo carbonilo em C-4.

Na região dos protões aromáticos observou-se um dupleto a δ 7,16 (J = 8,3 Hz), um singleto largo a δ 6,51 sobreposto a um duplo dupleto a δ 6,49 (J = 8,3 e 2,2 Hz). Os valores de deslocamento químico e o padrão de acoplamento destes protões aromáticos sugeriram que o composto **79** poderia possuir o grupo 2',4'-diidroxifenilo como na artocarpesina (**78**). Ao contrário da artocarpesina (**78**), no espectro de RMN de ^1H do composto **79** não se observaram os dois singuletos de H-3 (δ 6,98) e H-8 (δ 6,48). No entanto, existia um singuleto largo a δ 6,33 que poderia corresponder ao protão de outro grupo hidroxilo fenólico.

Na região dos protões alifáticos, observaram-se dois multipletos entre δ 5,3 – 5,2 e δ 5,2 - 5,1, com integração 1:2, três dupletos a δ 3,42 (J = 7,0 Hz), δ 3,39 (J = 6,8 Hz) e δ 3,12 (J = 6,5 Hz), com integração para dois protões cada, e seis singuletos de três protões cada com valores de δ 1,82, 1,75, 1,67, 1,66, 1,59 e 1,41. A semelhança entre os valores de deslocamento químico e de integração destes sinais com os do grupo 3,3-dimetilalilo da artocarpesina (**78**) indicou a presença de três substituintes idênticos no composto **79**. Este facto sugeriu que o composto **79** poderia ser o derivado isoprenilado da artocarpesina (**78**), em que H-3 e H-8 da artocarpesina (**78**) foram substituídos por dois grupos 3,3-dimetilalilo.



Para confirmar a presença do grupo 2',4'-diidroxifenilo procedeu-se à acetilação do composto **79** da forma usual (pág. 190). O espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz em $CDCl_3$ do produto obtido (Tabela 3, pág. 81) mostrou que se tratava do derivado triacetilado pela presença de três singuletos, de três protões cada, a δ 2,31, δ 2,30 e δ 2,10 característicos de grupos acetoxilo. O singuleto do protão hidroxílico em ponte de hidrogénio não foi acetilado, aparecendo a δ 13,00. Na região dos protões aromáticos observou-se um deslocamento paramagnético dos três protões a δ 7,16 *d* (J = 8,3 Hz, H-6'), δ 6,51 *sl* (H-3') e δ 6,49 *dd* (J = 8,3 e 2,2 Hz, H-5') para δ 7,39 *d* (J = 8,0 Hz, Δδ = 0,23 ppm), δ 7,13 *d* (J = 2,0 Hz, Δδ = 0,62 ppm) e δ 7,10 *dd* (J = 8,0 e 2,0 Hz, Δδ = 0,61 ppm), respectivamente. Com base nestes deslocamentos foi possível confirmar a presença de um grupo 2',4'-diidroxifenilo semelhante ao composto **78**. Mais uma vez, a ausência de outros sinais de protões aromáticos nos

espectros de RMN de ^{1}H do derivado triacetilado corroborou que os anéis A e C desta flavona eram totalmente substituídos e que o terceiro grupo hidroxilo devia estar no anel A.

Com o objectivo de confirmar a estrutura proposta, recorreu-se a várias técnicas de RMN de ^{13}C.

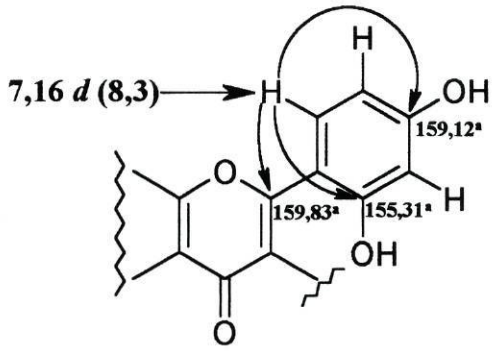
A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT de 90° e 135°) a 75 MHz do composto **79** em $CDCl_3$ (Tabela 4, pág. 82) revelou a presença de um carbono carbonílico a δ 182,69 da estrutura de uma flavona [137-139], semelhante ao C-4 da artocarpesina (**78**). Na região dos átomos de carbono com hibridação sp^2 observaram-se catorze sinais de carbonos quaternários a δ 159,83, δ 159,31, δ 159,12, δ 156,82, δ 155,31, δ 153,33, δ 135,33, δ 134,19, δ 132,92, δ 120,74, δ 112,66, δ 109,81, δ 105,06 e δ 104,76 e seis sinais de carbonos metínicos a δ 131,60, δ 121,55, δ 121,45, δ 121,18, δ 108,21 e δ 103,72. Os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono a δ 159,83, δ 159,31, δ 159,12, δ 156,82, δ 155,31 e δ 153,33 mostraram ser de carbonos ligados a funções oxigenadas, confirmando a hipótese do composto **79** ser tetraidroxilado. Além dos sinais anteriormente referidos, os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT de 90° e 135°) mostraram ainda seis sinais de carbonos metilvinílicos a δ 25,84, δ 25,76, δ 25,64, δ 17,93, δ 17,77 e δ 17,65 e três sinais a δ 24,35, δ 21,71 e δ 21,65 correspondentes a três átomos de carbono metilénicos.

Tendo em conta que ambos, artocarpesina (**78**) e composto **79**, possuiam o mesmo anel B (2',4'-diidroxifenilo), podia fazer-se a comparação dos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono nas posições 3', 5' e 6' da artocarpesina (**78**) com os dos carbonos metínicos apresentados na região dos átomos de carbono com hibridação sp^2 do composto **79**. Desta forma foi possível fazer a atribuição dos sinais de carbono para o anel B do composto **79** como a seguir se indica.

	Artocarpesina (**78**)	**79**
C-3'	δ 103,30 (CH)	δ 103,72 (CH)
C-5'	δ 108,13 (CH)	δ 108,21 (CH)
C-6'	δ 129,85 (CH)	δ 131,60 (CH)

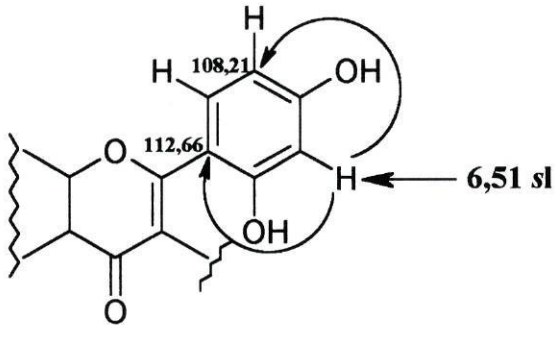
A confirmação destes assinalamentos, bem como a atribuição dos carbonos das posições 2, 1', 2' e 4', foi efectuada pela interpretação das seguintes correlações observadas no espectro de HMBC:

- entre o dupleto a δ 7,16 (J = 8,3 Hz, H-6') e os sinais de carbono a δ 159,83 (C), δ 159,12 (C) e δ 155,31 (C), sugerindo que dois destes sinais correspondiam a C-2' e C-4' e o outro correspondia a C-2,

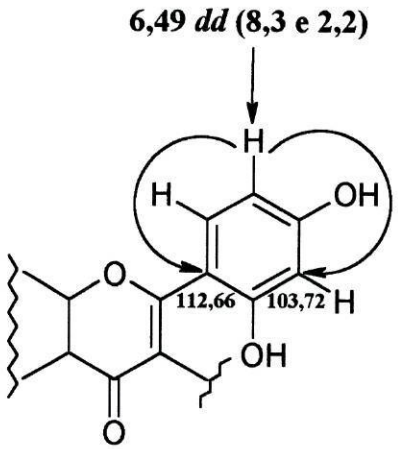


ª permutáveis entre si

- entre o singuleto largo a δ 6,51 (H-3') e os sinais de carbono a δ 112,66 (C) e δ 108,21 (CH) permitindo a atribuição do sinal a δ 112,66 (C) a C-1' e a confirmação de que o sinal a δ 108,21 (CH) correspondia a C-5',



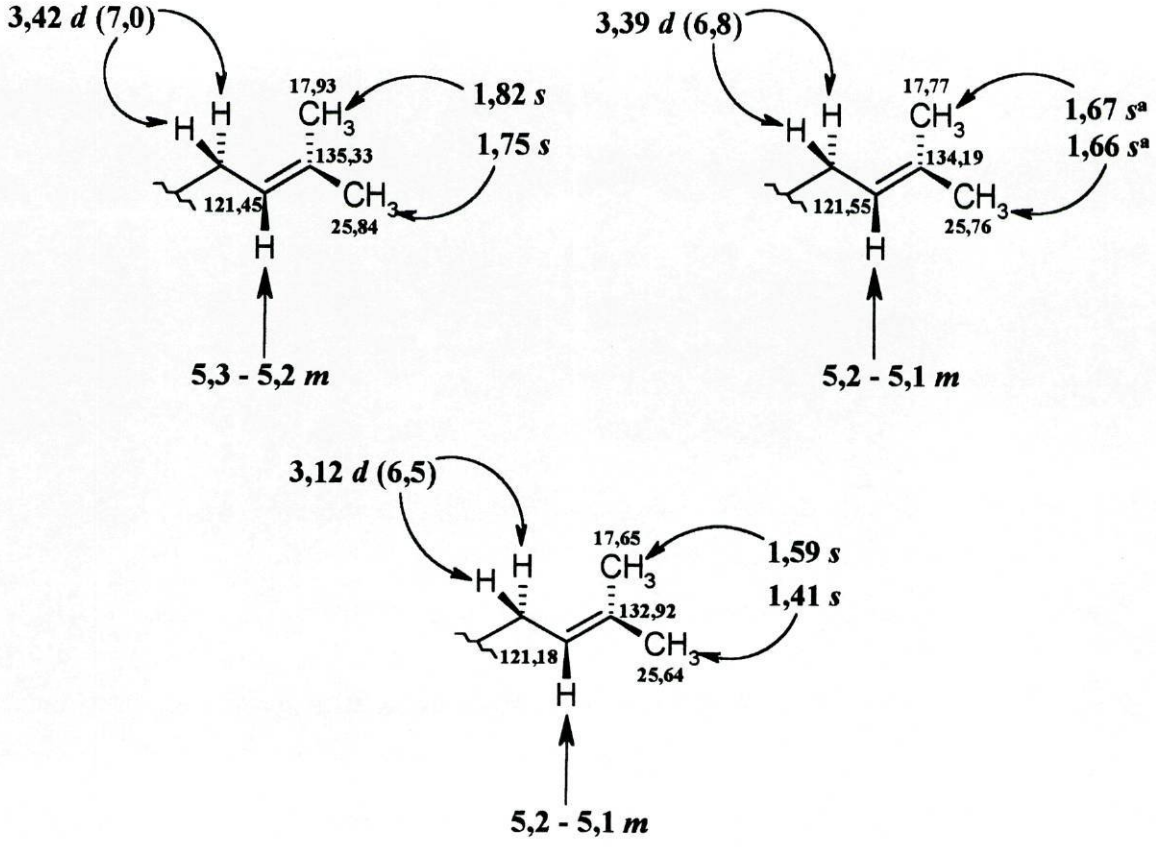
- entre o duplo dupleto a δ 6,49 (J = 8,3 e 2,2 Hz, H-5') e os sinais de carbono a δ 112,66 (C) e δ 103,72 (CH), confirmando a atribuição destes sinais a C-1' e C-3', respectivamente.



A observação no espectro de RMN de ^{13}C de seis sinais de carbonos metílicos (δ 25,84, δ 25,76, δ 25,64, δ 17,93, δ 17,77 e δ 17,65) e três sinais de carbonos metilénicos (δ 24,35, δ 21,71 e δ 21,65), juntamente com os sinais de seis carbonos olefínicos a δ 135,33 (C), δ 134,19 (C), δ 132,92 (C), δ 121,55 (CH), δ 121,45 (CH) e δ 121,18 (CH), confirmaram a presença de três grupos 3,3-dimetilalilo [138]. O espectro de HMBC mostrou as correlações entre os sinais destes carbonos e os sinais dos protões seguintes:

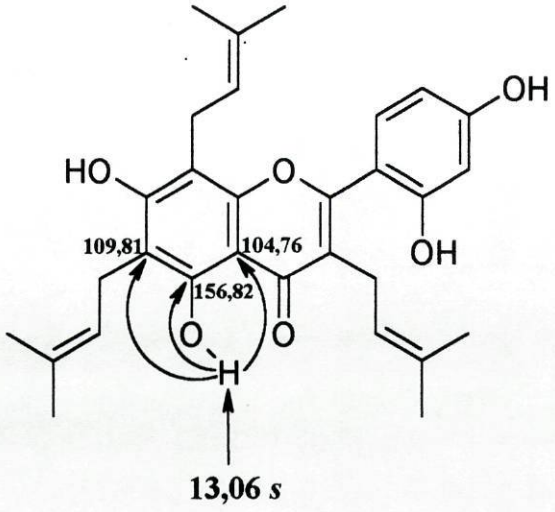
δ ^{1}H	δ ^{13}C
5,3 – 5,2 *m*	25,84 e 17,93 (CH_3)
5,2 - 5,1 *m*	25,76 e 25,64 (CH_3) 17,77 e 17,65 (CH_3)
3,42 *d* (*J* = 7,0 Hz)	135,33 (C) 121,45 (CH)
3,39 *d* (*J* = 6,8 Hz)	134,19 (C) 121,55 (CH)
3,12 *d* (*J* = 6,5 Hz)	132,92 (C) 121,18 (CH)
1,82 *s* e 1,75 *s*	135,33 (C) 121,45 (CH) 25,84 (CH_3) 17,93 (CH_3)
1,67 *s* e 1,66 *s*	134,19 (C) 121,55 (CH) 25,76 (CH_3) 17,77 (CH_3)
1,59 *s* e 1,41 *s*	132,92 (C) 121,18 (CH) 25,64 (CH_3) 17,65 (CH_3)

De acordo com estas correlações foi possível atribuir os valores de δ de ^{1}H e ^{13}C para os três grupos 3,3-dimetilalilo a seguir indicados:

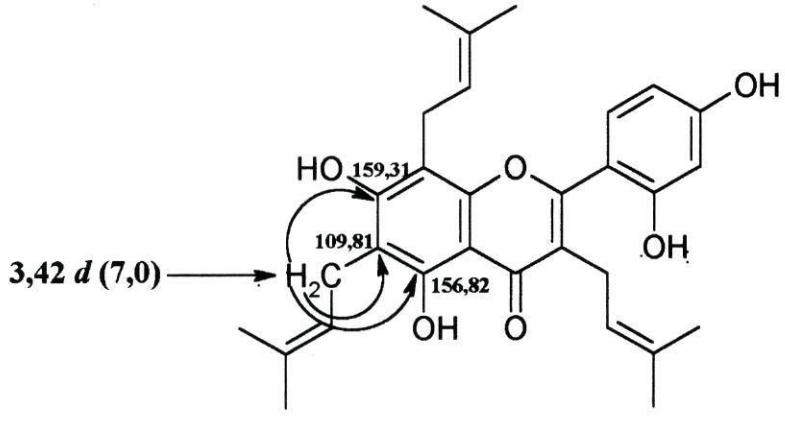


[a] permutáveis entre si

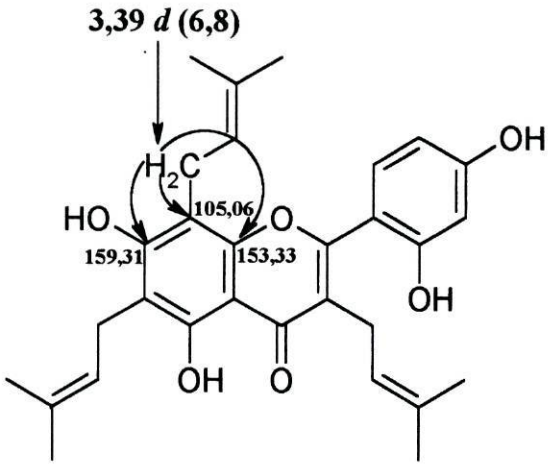
O espectro de HMBC mostrou ainda o acoplamento entre o protão do grupo hidroxilo fenólico (5-OH) a δ 13,06 e os carbonos a δ 156,82 (C), δ 109,81 (C) e δ 104,76 (C), permitindo a atribuição destes sinais aos átomos de carbono das posições 5, 6 e 4a, respectivamente.



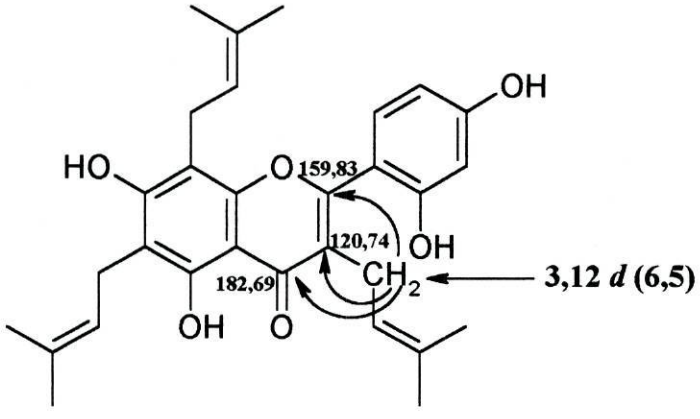
Além disto, os acoplamentos detectados no espectro de HMBC entre os protões metilénicos de cada um dos substituintes 3,3-dimetilalilo a δ 3,42 *d* (*J* = 7,0 Hz), δ 3,39 *d* (*J* = 6,8 Hz) e δ 3,12 *d* (*J* = 6,5 Hz) e os átomos de carbono aromáticos permitiram determinar a localização de cada um destes substituintes. Assim, o acoplamento do protão a δ 3,42 *d* (*J* = 7,0 Hz) com os carbonos a δ 159,31 (C), δ 156,82 (C) e δ 109,81 (C) sugeriu a localização deste grupo 3,3-dimetilalilo no anel A entre dois grupos hidroxilo fenólicos. Tendo-se atribuído os sinais a δ 156,82 (C) e δ 109,81 (C) a C-5 e C-6, respectivamente, concluiu-se que este substituinte se encontrava ligado ao carbono da posição 6 e que o sinal a δ 159,31 (C) correspondia a C-7.



O acoplamento entre o protão a δ 3,39 *d* (*J* = 6,8 Hz) e os carbonos a δ 159,31 (C), δ 153,33 (C) e δ 105,06 (C) indicou a localização deste substituinte 3,3-dimetilalilo na posição 8 e a atribuição dos sinais a δ 153,33 (C) e δ 105,06 (C) aos carbonos 8a e 8, respectivamente.



Por último, o acoplamento do protão a δ 3,12 *d* (*J* = 6,5 Hz) com os carbonos a δ 182,69 (C-4), δ 159,83 (C) e δ 120,74 (C) sugeriu a ligação deste substituinte 3,3-dimetilalilo a C-3 e permitiu atribuir os sinais a δ 159,83 e δ 120,74 a C-2 e C-3, respectivamente.

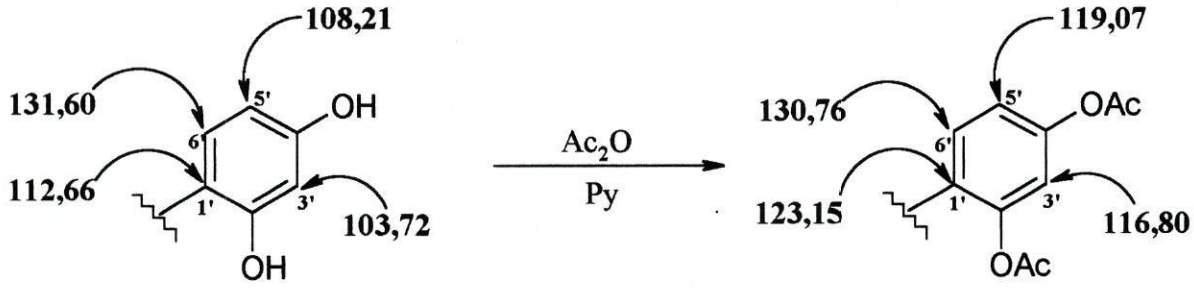


Os dados dos espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) do derivado triacetilado (**79Ac**) em $CDCl_3$ a 50 MHz (Tabela 4, pág. 82) também estavam de acordo com

a estrutura proposta. Estes espectros evidenciaram três sinais de carbonos quaternários a δ 169,13, δ 168,64 e δ 168,13 e três sinais de carbonos metílicos a δ 21,03, δ 20,72 e δ 20,47 correspondentes, respectivamente, aos carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos acetoxilo.

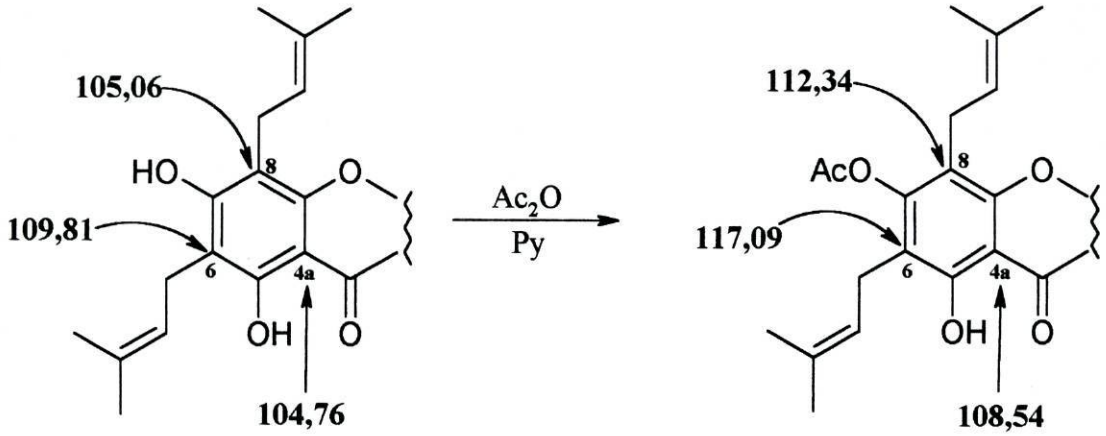
Para além destes sinais verificaram-se as seguintes alterações de valores de deslocamento químico:

- dos carbonos a δ 159,31 (C-7), δ 159,12 (C-4' ou 2') e δ 155,31 (C-2' e 4') para δ 152,54 (Δδ = -6,77 ppm), δ 149,16 (Δδ = -9,96 ppm) e δ 148,69 (Δδ = -6,62 ppm), respectivamente, confirmando que estes sinais correspondiam a átomos de carbono ligados a grupos hidroxilo que foram acetilados [137, 139],
- dos carbonos a δ 108,21 (CH-5') e δ 103,72 (CH-3') para δ 119,07 (Δδ = 10,86 ppm) e δ 116,80 (Δδ = 13,08 ppm), respectivamente, confirmando que os carbonos se encontravam em posição *orto* e *para* relativamente aos dois grupos hidroxilo do anel B [137, 139],
- do carbono a δ 112,66 (C-1') para δ 123,15 (Δδ = 10,49 ppm), confirmando a atribuição deste sinal a C-1' [137, 139].



Nos espectros de RMN de ^{13}C do composto **79Ac** observou-se ainda o deslocamento dos sinais seguintes:

- dos carbonos a δ 109,81 (C-6) e δ 105,06 (C-8) para δ 117,09 (Δδ = 7,28 ppm) e δ 112,34 (Δδ = 7,28 ppm), respectivamente, confirmando a localização de dois dos substituintes 3,3-dimetilalilo em posição *orto* ao grupo hidroxilo do anel A [137, 139],
- do carbono a δ 104,76 (C-4a) para δ 108,54 (Δδ = 3,78 ppm), confirmando a localização deste átomo em posição *para* relativamente ao hidroxilo em C-7 [137, 139].



O espectro de EM-IE (pág. 194) mostrou um pico de ião molecular (pico base) a 490 u. m. a., a que conjuntamente com os dados anteriores correspondia a fórmula molecular $C_{30}H_{34}O_6$. Além deste, observaram-se no espectro de massa vários picos característicos devido à perda de grupos 3,3-dimetilalilo a 447 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7]^+$, 59 %), 435 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7]^+$, 55 %), 391 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7-C_4H_8]^+$, 24 %), 379 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-C_4H_8]^+$, 43 %) e 323 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-C_4H_8-C_4H_8]^+$, 17 %) [140, 141]. Este espectro revelou ainda os picos de fragmentos provenientes da fissão retro-Diels-Alder a 189 ($[A_1+H]^{2+}$, 29 %), 177 ($[A_1^+]$, 26 %) e 137 ($[B_2^+]$, 25 %), cujas u. m. a. indicaram a presença de anéis A e B diidroxilados e de dois substituintes 3,3-dimetilalilo no anel A [142]. O padrão de fragmentação proposto está representado na Figura 12 (pág. 80).

O conjunto dos dados apresentados indicou a estrutura do composto **79** como a 3,6,8--tris-(3,3-dimetilalil)-5,7,2',4'-tetraidroxiflavona. A pesquisa bibliográfica revelou que se trata de uma estrutura inédita, a que se atribuiu o nome de artelasticina.

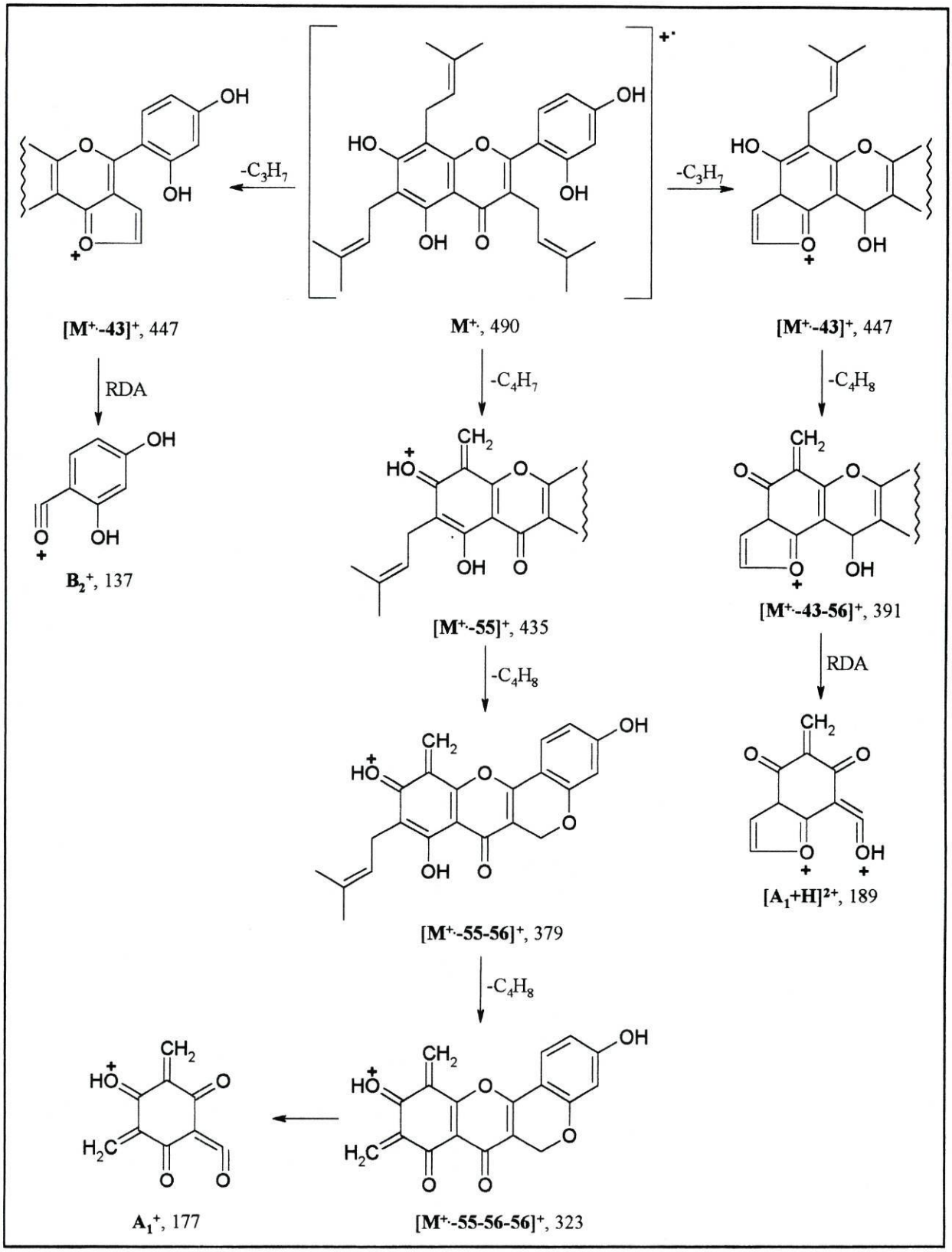


Figura 12 - Esquema proposto para a fragmentação por EM-IE do composto **79**.

Tabela 3 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz da artelasticina (**79**) e a 500 MHz do triacetato de artelasticina (**79Ac**) em $CDCl_3$.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)		H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)	
	79	**79Ac**		**79**	**79Ac**
5	13,06 *s*	13,00 *s*	**20**	5,2-5,1 *m*	5,12 *tl* (7,5)[b]
7	6,33 *sl*[a]	-	**22**	1,66 *s*[b]	1,55 *s*
9	3,12 *d* (6,5)	3,25 *sl*[a]	**23**	1,67 *s*[b]	1,55 *s*
10	5,2-5,1 *m*	4,99 *tl* (7,5)[b]	**2'**	NO[a]	-
12	1,41 *s*	1,38 *s*	**3'**	6,51 *sl*	7,13 *d* (2,0)
13	1,59 *s*	1,48 *s*	**4'**	NO[a]	-
14	3,42 *d* (7,0)	3,20 *sl*[a]	**5'**	6,49 *dd* (8,3 e 2,2)	7,10 *dd* (8,0 e 2,0)
15	5,3-5,2 *m*	5,01 *tl* (7,5)[b]	**6'**	7,16 *d* (8,3)	7,39 *d* (8,0)
17	1,75 *s*	1,66 *s*	**-OCOC$\underline{H}_3$**	-	2,31 *s*
18	1,82 *s*	1,74 *s*			2,30 *s*
19	3,39 *d* (6,8)	3,00 *sl*[a]			2,10 *s*

[a] e [b] permutáveis dentro da mesma coluna; NO: sinal não observado

Tabela 4 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 75 MHz da artelasticina (**79**) e a 50 MHz do triacetato da artelasticina (**79Ac**) em $CDCl_3$.

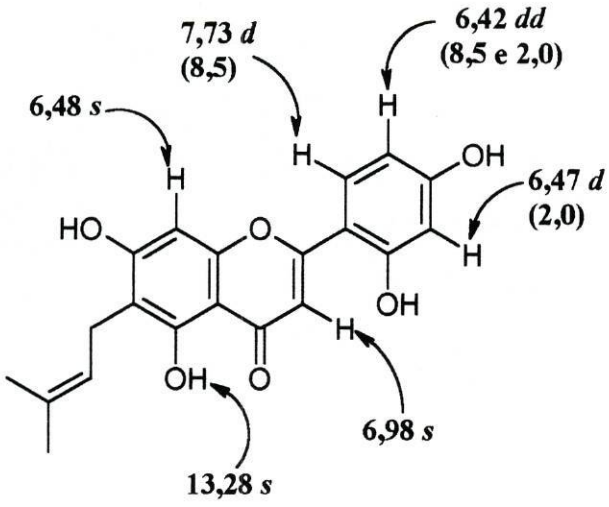
	δ ^{13}C			δ ^{13}C	
C	**79**	**79Ac**	**C**	**79**	**79Ac**
2	159,83 (C)	159,22 (C)	**18**	17,93 (CH_3)	17,50 (CH_3)[d]
3	120,74 (C)	121,66 (C)	**19**	21,65 (CH_2)[a]	22,76 (CH_2)[a]
4	182,69 (C)	183,06 (C)	**20**	121,55 (CH)	120,98 (CH)[b]
4a	104,76 (C)	108,54 (C)	**21**	134,19 (C)	132,59 (C)[c]
5	156,82 (C)	157,04 (C)	**22**	25,76 (CH_3)	25,53 (CH_3)
6	109,81 (C)	117,09 (C)	**23**	17,77 (CH_3)	17,75 (CH_3)[d]
7	159,31 (C)	152,54 (C)	**1'**	112,66 (C)	123,15 (C)
8	105,06 (C)	112,34 (C)	**2'**	155,31 (C)[e]	148,69 (C)[e]
8a	153,33 (C)	152,79 (C)	**3'**	103,72 (CH)	116,80 (CH)
9	24,35 (CH_2)[a]	24,10 (CH_2)[a]	**4'**	159,12 (C)[e]	149,16 (C)[e]
10	121,18 (CH)	120,81 (CH)[b]	**5'**	108,21 (CH)	119,07 (CH)
11	132,92 (C)	132,25 (C)[c]	**6'**	131,60 (CH)	130,76 (CH)
12	25,64 (CH_3)	25,53 (CH_3)	**-OCO$\underline{C}$H$_3$**	-	21,03 (CH_3)
13	17,65 (CH_3)	17,50 (CH_3)[d]			20,72 (CH_3)
14	21,71 (CH_2)[a]	23,86 (CH_2)[a]			20,47 (CH_3)
15	121,45 (CH)	121,08 (CH)[b]	**-O$\underline{C}$OCH$_3$**	-	169,13 (C)
16	135,33 (C)	132,40 (C)[c]			168,64 (C)
17	25,84 (CH_3)	25,53 (CH_3)			168,13 (C)

[a], [b], [c], [d] e [e] permutáveis dentro da mesma coluna

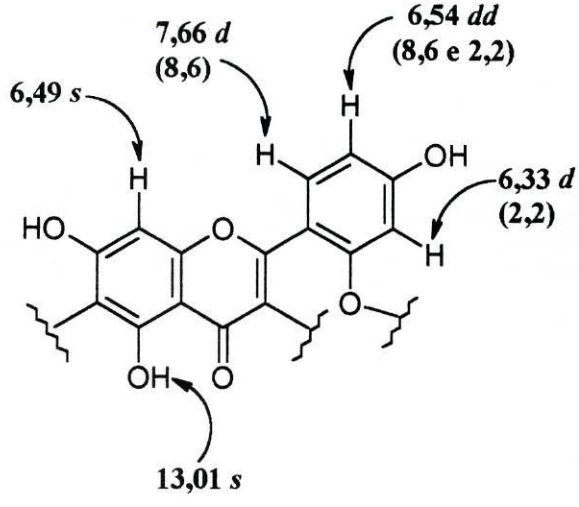
4. Ciclocomunina (73)

Os espectros no IV e no UV do composto **73** mostraram-se muito semelhantes aos da artocarpesina (**78**) e artelasticina (**79**). Assim, o espectro no IV (pág. 195) revelou a presença de grupos hidroxilo (3400-3100 cm^{-1}), carbonilo conjugado (1651 cm^{-1}) e metilo geminais (1380 e 1362 cm^{-1}) [129-131]. Neste espectro observaram-se ainda bandas de distensão de ligação C-H alquílica (2970 e 2924 cm^{-1}), de estiramento de ligações C=C de anel aromático (1627, 1570 e 1466 cm^{-1}) e de ligação C-O (1254 cm^{-1}) [129-131]. Por seu turno, o espectro no UV (pág. 195) confirmou a natureza flavonóide ao mostrar as bandas a 369 nm (log ε 4,3, banda I), 275 e 216 nm (log ε 4,3 e 4,6, respectivamente, banda II) [132-135]. A presença de função fenólica foi confirmada pelo deslocamento batocrómico da banda a 369 nm (log ε 4,3) para 408 nm (log ε 4,5, $\Delta\lambda_{máx.}$ = 39 nm) após adição de uma solução metanólica de hidróxido de sódio [132-135]. O deslocamento batocrómico foi também observado após a adição de uma solução metanólica de $AlCl_3$, permanecendo este efeito após adição de uma solução de ácido clorídrico, confirmando-se a presença do sistema *orto*-hidroxicarbonilo, tal como se verificou para a artocarpesina (**78**) e a artelasticina (**79**) [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 5, pág. 90) mostrou uma grande semelhança com o espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 da artocarpesina (**78**). Assim, além do sinal do protão do 5-OH, que apareceu como um singuleto fino a δ 13,01, observaram-se quatro protões aromáticos a δ 7,66 *d* (*J* = 8,6 Hz), 6,54 *dd* (*J* = 8,6 e 2,2 Hz), δ 6,33 *d* (*J* = 2,2 Hz) e δ 6,49 *s*. Os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento dos primeiros três protões aromáticos eram muito próximos aos protões do anel B da artocarpesina (**78**), enquanto que o singuleto a δ 6,49 era semelhante a H-8.



Artocarpesina (**78**)

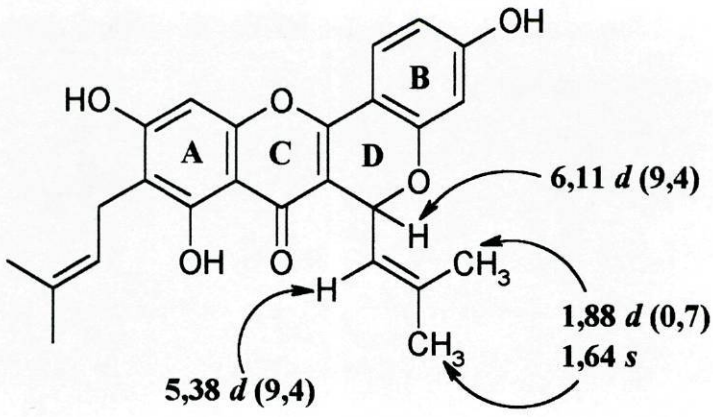


73

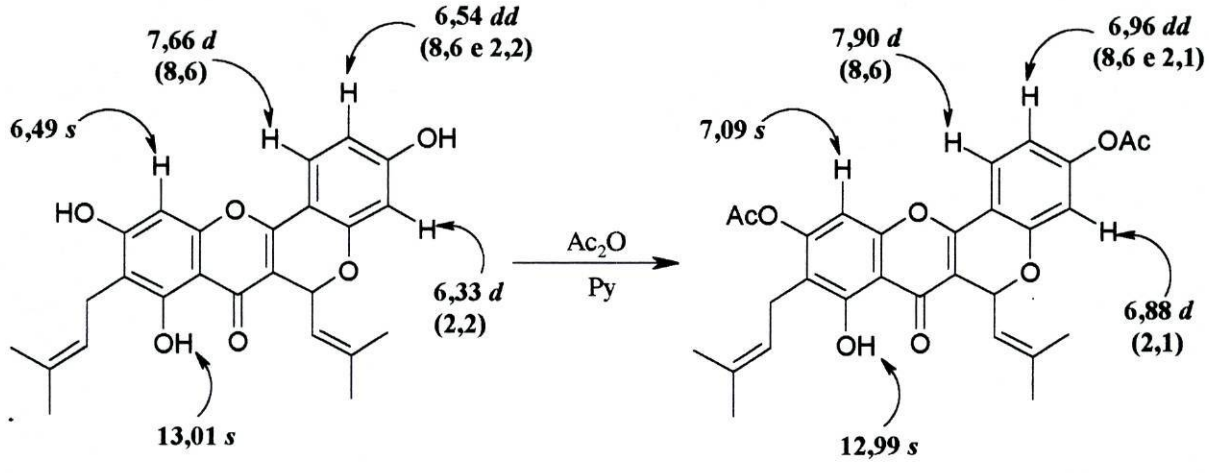
No entanto, não se observou o sinal do protão correspondente a H-3 da artocarpesina (**78**) no espectro de RMN de ^{1}H do composto **73**.

A presença de um grupo 3,3-dimetilalilo, que poderia ser substituinte no C-6, foi evidenciada pelo conjunto de sinais característicos deste grupo a δ 5,15 *t* (*J* = 7,1 Hz, C<u>H</u>), δ 3,20 *d* (*J* = 7,1 Hz, C<u>H</u>$_2$), δ 1,71 *s* (C<u>H</u>$_3$) e δ 1,61 *s* (C<u>H</u>$_3$) [136]. As experiências de dupla irradiação confirmaram o acoplamento entre o protão a δ 5,15 *t* (*J* = 7,1 Hz) e o protão a δ 3,20 *d* (*J* = 7,1 Hz).

O espectro de RMN de ^{1}H do composto **73** mostrou ainda os sinais de dois grupos metilvinílicos a δ 1,88 *d* (*J* = 0,7 Hz) e δ 1,64 *s*, bem como o sinal de um protão vinílico a δ 5,38 *d* (*J* = 9,4 Hz). Este facto sugeriu que poderia existir mais um grupo 3,3-dimetilalilo na molécula do composto **73**. No entanto, não se observou nenhum sinal de protões a cerca de 3 ppm característico de protões metilénicos deste grupo. Em vez disto, apareceu no espectro de RMN de ^{1}H do composto **73** um dupleto de um protão a δ 6,11 (*J* = 9,4 Hz) que, através de experiências de dupla irradiação, se mostrou acoplado com o protão vinílico a δ 5,38 *d* (*J* = 9,4 Hz). O facto de não se observar o sinal de H-3 e a existência de um dupleto a δ 6,11 (*J* = 9,4 Hz) sugeriu que devia existir um quarto anel (D), resultante da ciclização oxidativa do grupo OH-2' com o carbono alílico do grupo 3,3-dimetilalilo em C-3.



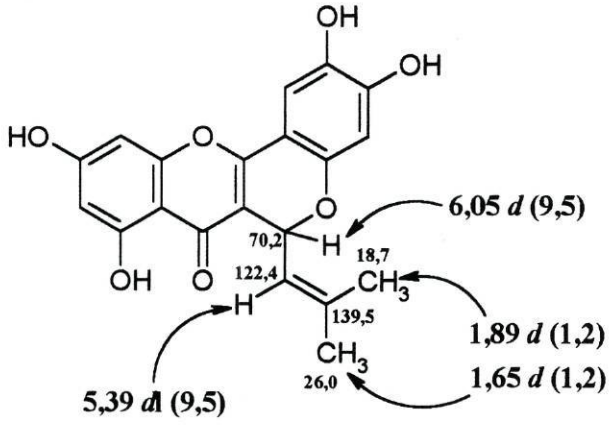
Numa tentativa de confirmar esta hipótese foi efectuada a acetilação do composto do modo usual (pág. 190). O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 do produto obtido (Tabela 5, pág. 90) mostrou que se tratava de um derivado diacetilado, pela presença de dois singuletos a δ 2,34 e δ 2,28 de dois grupos acetoxilo. Nesta condição o OH-5 não sofreu reacção de acetilação, aparecendo a δ 12,99 como um singuleto. Os protões aromáticos sofreram um deslocamento paramagnético após acetilação. Assim, H-3' e H-5' do anel B sofreram maior efeito aparecendo a δ 6,88 *d* (J = 2,1 Hz, Δδ = 0,55 ppm) e δ 6,96 *dd* (J = 8,6 e 2,1 Hz, Δδ = 0,42 ppm), respectivamente, enquanto que H-6' sofreu menor efeito (δ 7,90 *d*, J = 8,6 Hz, Δδ = 0,24 ppm). O H-8 do anel A foi também deslocado muito significativamente, aparecendo a δ 7,09 *s* (Δδ = 0,60 ppm).



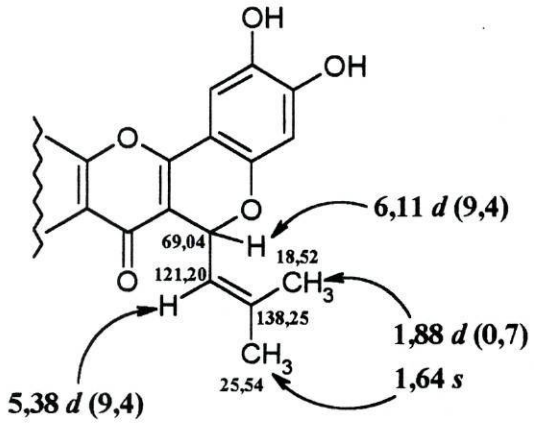
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 6, pág. 91), bem como o espectro de HETCOR, foram usados para confirmar a estrutura proposta para o composto **73**.

O espectro de HETCOR permitiu assinalar os seguintes carbonos aromáticos: δ 125,68 (CH-6'), δ 110,29 (CH-5'), δ 103,90 (CH-3') e δ 93,47 (CH-8). Estes valores de deslocamento químico eram muito semelhantes aos dos carbonos aromáticos correspondentes na artocarpesina (**78**).

Além dos carbonos aromáticos não substituídos, o espectro de HETCOR revelou ainda o acoplamento do carbono a δ 69,04 (CH) com o protão a δ 6,11 *d* (*J* = 9,4 Hz), do carbono olefínico a δ 121,20 (CH) com o protão a δ 5,38 *d* (*J* = 9,4 Hz) e dos carbonos metílicos a δ 25,54 e δ 18,52 com os protões a δ 1,64 *s* e δ 1,88 *d* (*J* = 0,7 Hz), respectivamente. Com base nestes acoplamentos foi possível fazer a atribuição dos sinais dos carbonos do grupo isoprenilo em C-3. Os valores de deslocamento químico atribuídos a estes sinais mostraram-se concordantes com os descritos para o ciclochampedol (**23**) uma flavona isoprenilada isolada de *Artocarpus champeden* Spreng.



Ciclochampedol (**23**)

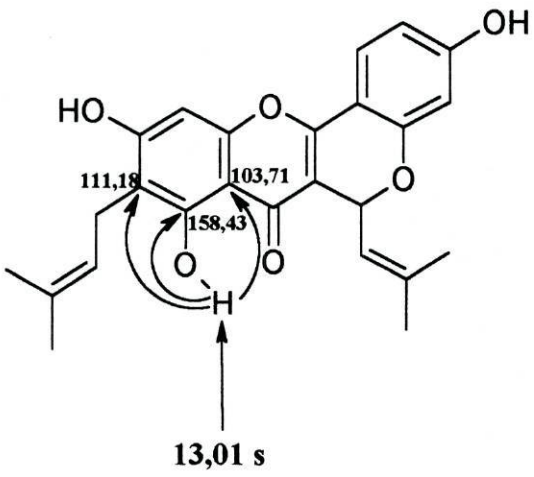


73

As correlações entre os sinais de carbonos e protões do grupo 3,3-dimetilalilo observadas no espectro de HETCOR foram as a seguir indicadas:

	δ ^{13}C	δ ^{1}H
CH-15	122,24	5,15 *t* (J = 7,1 Hz)
CH_3-17	25,61	1,61 *s*
CH_2-14	21,10	3,20 *d* (J = 7,1 Hz)
CH_3-18	17,81	1,71 *s*

Com o objectivo de confirmar que o substituinte 3,3-dimetilalilo estava em C-6 recorreu-se à técnica de INEPT selectivo. Assim, a irradiação do protão de 5-OH a δ 13,01 *s* levou ao aparecimento dos sinais de carbono a δ 158,43 (C), δ 111,18 (C) e δ 103,71 (C), permitindo a atribuição destes sinais a C-5, C-6 e C-4a, respectivamente. A semelhança entre o valor de deslocamento químico de C-6 do composto **73** e do mesmo carbono na artocarpesina (**78**) confirmou a substituição em C-6 por um grupo 3,3-dimetilalilo.



O assinalamento inequívoco de todos os carbonos do composto **73** permitiu a identificação de todos os sinais do espectro de RMN de ^{13}C do derivado diacetilado (**73Ac**). Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) do derivado diacetilado (**73Ac**) em DMSO-d_6 a 75 MHz (Tabela 6, pág. 91) revelaram o aparecimento de dois sinais de carbonos

quaternários a δ 168,73 e δ 168,48 e dois sinais de carbonos metílicos a δ 21,00 e δ 20,98 correspondentes, respectivamente, aos carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos acetoxilo.

Para além destes sinais observaram-se alterações significativas dos valores de deslocamento químico:

- dos carbonos a δ 163,37 (C) e δ 161,69 (C) para δ 153,83 (Δδ = -9,54 ppm) e δ 153,33 (Δδ = -8,36 ppm), respectivamente, permitindo a atribuição destes sinais aos carbonos das posições 7 e 4' [137, 139],
- dos carbonos a δ 110,29 (CH-5') e δ 103,90 (CH-3') para δ 115,99 (Δδ = 5,70 ppm) e δ 111,38 (Δδ = 7,48 ppm), respectivamente, confirmando que ambos os sinais correspondem a carbonos em posição *orto* ao grupo acetoxilo do anel B [137, 139],
- do carbono a δ 93,47 (CH-8), para δ 102,22 (Δδ = 8,75 ppm), confirmando a localização em posição *orto* ao grupo acetoxilo presente no anel A [137, 139],
- dos carbonos a δ 111,18 (C-6), δ 108,41 (C) e δ 103,71 (C-4a), para δ 116,18 (Δδ = 5,7 ppm), δ 115,94 (Δδ = 7,53 ppm) e δ 111,01 (Δδ = 7,3 ppm), permitindo confirmar a atribuição dos sinais de C-6 e C-4a e o assinalamento do sinal a δ 108,41 a C-1' [137, 139].

O espectro de EM-IE (pág. 195) mostrou para o composto **73** um pico de ião molecular a 420 (98%) que, conjuntamente com os dados dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, permitiu estabelecer para este composto a fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_6$, que estava de acordo com a estrutura proposta. Além do pico de ião molecular observaram-se picos característicos de flavonóides isoprenilados a 405 ($[M^{+\bullet}-CH_3]^+$, 33%), 377 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7]^+$, 24%), 365 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7]^+$, 100%), 352 ($[M^{+\bullet}-C_5H_8]$, 39%), 321 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7-C_4H_8]^+$, 96%) e 309 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-C_4H_8]^+$, 76%) [140, 141]. Os sinais a 321 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7-C_4H_8]^+$, 96%) e 309 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-C_4H_8]^+$) confirmaram a presença no composto de dois grupos 3,3-dimetilalilo. Este espectro revelou ainda um pico a 165 ($[A_1^+]$, 35%) resultante de uma fissão retro-Diels-Alder, posterior à degradação do grupo isoprenilo do anel A, indicando que este anel era diidroxilado e apresenta um grupo 3,3-dimetilalilo [142].

Os dados espectroscópicos analisados permitiram concluir que o composto **73** apresentava a estrutura indicada na Figura 13. A pesquisa bibliográfica revelou que este composto já tinha sido isolado do tronco de *Artocarpus altilis* Fosb. [26], com o nome vulgar de isociclomulberina, e da casca do tronco de *Artocarpus communis* Forst. [144], com o nome vulgar de ciclocomunina, sendo esta última designação a adoptada nesta dissertação.

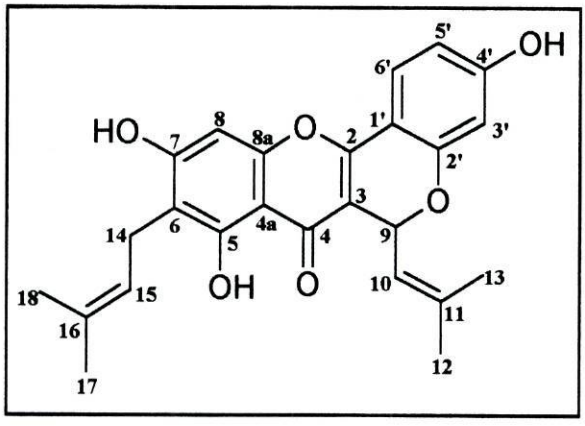


Figura 13 - Estrutura da ciclocomunina (**73**).

Tabela 5 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz da ciclocomunina (**73**) e do diacetato de ciclocomunina (**73Ac**) em DMSO-d_6.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 73	73Ac	H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 73	73Ac
5	13,01 *s*	12,99 *s*	**15**	5,15 *t* (7,1)	5,06 *t* (7,0)
6	-	-	**17**	1,61 *s*	1,62 *s*
7	NO	-	**18**	1,71 *s*	1,71 *s*
8	6,49 *s*	7,09 *s*	**3'**	6,33 *d* (2,2)	6,88 *d* (2,1)
9	6,11 *d* (9,4)	6,25 *d* (9,4)	**4'**	NO	-
10	5,38 *d* (9,4)	5,47 *d* (9,4)	**5'**	6,54 *dd* (8,6 e 2,2)	6,96 *dd* (8,6 e 2,1)
12	1,64 *s*	1,67 *s*	**6'**	7,66 *d* (8,6)	7,90 *d* (8,6)
13	1,88 *d* (0,7)	1,91 *s*	**-OCOC$\underline{H}_3$**	-	2,34 *s*
14	3,20 *d* (7,1)	3,16 *d* (7,0)			2,28 *s*

NO: sinal não observado

Tabela 6 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 75 MHz da ciclocomunina (**73**) e do diacetato de ciclocomunina (**73Ac**) em DMSO-d_6.

	δ ^{13}C			δ ^{13}C	
C	**73**	**73Ac**	**C**	**73**	**73Ac**
2	157,56 (C)[a]	156,63 (C)[a]	**14**	21,10 (CH_2)	21,02 (CH_2)
3	106,72 (C)	108,09 (C)	**15**	122,24 (CH)	120,89 (CH)[c]
4	177,69 (C)	178,61 (C)	**16**	130,90 (C)	131,85 (C)
4a	103,71 (C)	111,01 (C)	**17**	25,61 (CH_3)	25,47 (CH_3)[d]
5	158,43 (C)	158,36 (C)	**18**	17,81 (CH_3)	17,78 (CH_3)
6	111,18 (C)	116,88 (C)	**1'**	108,41 (C)	115,94 (C)
7	163,37 (C)[b]	153,83 (C)[b]	**2'**	155,13 (C)[a]	155,26 (C)[a]
8	93,47 (CH)	102,22 (CH)	**3'**	103,90 (CH)	111,38 (CH)
8a	154,49 (C)[a]	154,92 (C)[a]	**4'**	161,69 (C)[b]	153,33 (C)[b]
9	69,04 (CH)	69,23 (CH)	**5'**	110,29 (CH)	115,99 (CH)
10	121,20 (CH)	120,76 (CH)[c]	**6'**	125,68 (CH)	125,21 (CH)
11	138,25 (C)	139,27 (C)	**-OCO$\underline{C}$H$_3$**	-	21,00 (CH_3)
12	25,54 (CH_3)	25,41 (CH_3)[d]			20,98 (CH_3)
13	18,52 (CH_3)	18,58 (CH_3)	**-O$\underline{C}$OCH$_3$**	-	168,73 (C)
					168,48 (C)

[a], [b], [c] e [d] permutáveis dentro da mesma coluna

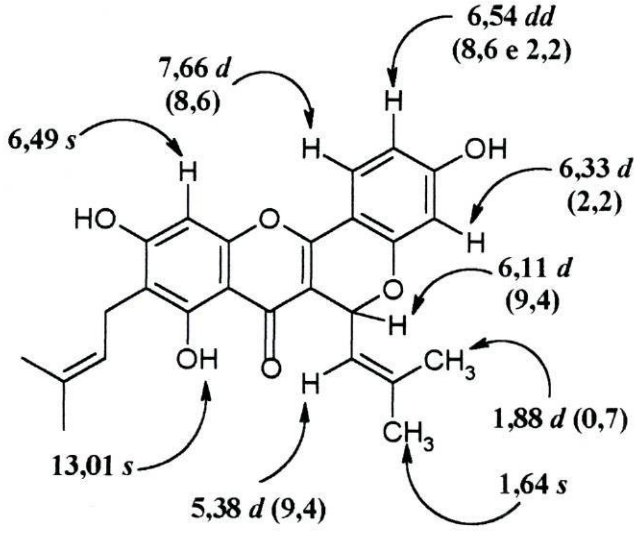
5. Artelastina (80)

À semelhança da artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**) e ciclocomunina (**73**) o espectro no IV do composto **80** (pág. 196) apresentou bandas características de grupos hidroxilo (3500-3200 cm^{-1}), carbonilo conjugado (1651 cm^{-1}) e metilo geminal (1377 e 1354 cm^{-1}). Este espectro evidenciou ainda bandas que indicaram a presença de ligações C-H alquílica (2974 e 2912 cm^{-1}), C=C de anel aromático (1628, 1562 e 1434 cm^{-1}) e C-O (1296 e 1219 cm^{-1}) [129-131].

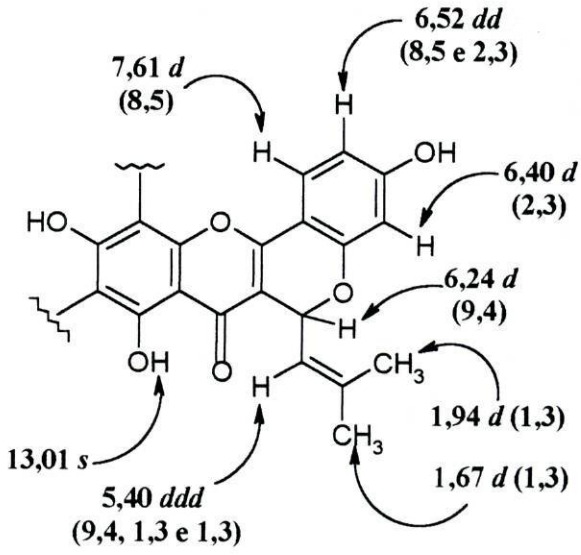
O espectro no UV em solução metanólica deste composto (pág. 196) mostrou bandas semelhantes às das flavonas discutidas anteriormente a 260, 276 nm (log ε 4,2 e 4,2, respectivamente, banda II) e 369 nm (log ε 4,1, banda I), indicando que também poderia ser um flavonóide [132-135]. O deslocamento batocrómico observado da banda a 369 nm após a adição de solução de hidróxido de sódio sugeriu o carácter fenólico deste composto [132-135]. A observação de um deslocamento batocrómico na mesma banda, provocado pela adição de uma solução de cloreto de alumínio, e a estabilidade deste deslocamento após adição de ácido clorídrico revelou que também devia existir um grupo *orto*-hidroxicarbonilo [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 200 MHz em $CDCl_3$ (Tabela 7, pág. 101) mostrou-se semelhante ao da ciclocomunina (**73**). Este espectro evidenciou um singuleto a δ 13,01, que deveria corresponder ao grupo hidroxilo fenólico em C-5 ligado por ponte de hidrogénio ao grupo carbonilo. Na região dos protões aromáticos apresentou dois dupletos de um protão cada a δ 7,61 (J = 8,5 Hz) e δ 6,40 (J= 2,3 Hz), bem como um duplo dupleto de um protão a δ 6,52 (J = 8,5 e 2,3 Hz). Estes valores de deslocamento químico, de constantes de acoplamento e multiplicidade eram similares aos observados para o anel B da ciclocomunina (**73**). Ao contrário do espectro de RMN de ^1H da ciclocomunina (**73**), o espectro do composto **80** não mostrou o sinal de H-8 a δ 6,49 *s*, observando-se um singuleto largo a δ 6,28, provavelmente correspondente a um grupo hidroxilo, e um dupleto a δ 6,24 (J = 9,4 Hz). Este último sinal juntamente com os sinais a δ 5,40 *ddd* (J = 9,4, 1,3 e 1,3 Hz), δ 1,94 *d* (J = 1,3 Hz) e δ 1,67 *d* (J = 1,3 Hz) indicaram a presença de um anel D semelhante ao da ciclocomunina (**73**). Esta hipótese foi apoiada pelo acoplamento evidenciado pelos valores da constante de acoplamento

entre os sinais do duplo duplo dupleto a δ 5,40 e o dupleto a δ 6,24 e entre o primeiro sinal e os dupletos a δ 1,94 e δ 1,67.

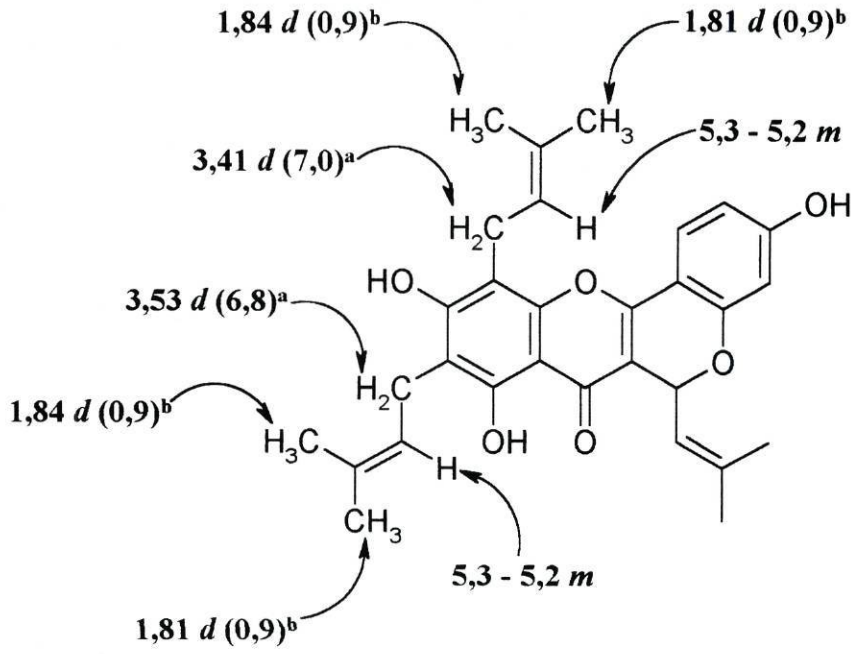


Ciclocomunina (**73**)



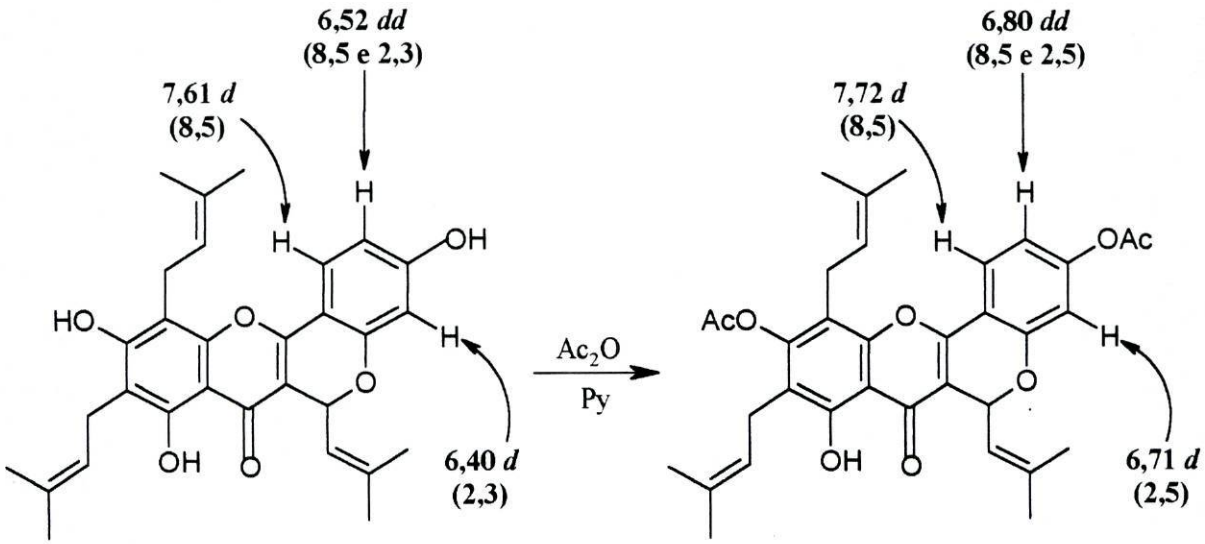
80

A ausência do sinal de H-8 e a observação neste espectro de sinais característicos de dois grupos 3,3-dimetilalilo a δ 5,3 - 5,2 (2H, *m*), δ 3,53 *d* (2H, J = 6,8 Hz), δ 3,41 *d* (2H, J = 7,0 Hz), δ 1,84 *d* (6H, J = 0,9 Hz) e δ 1,81 *d* (6H, J = 0,9 Hz) sugeriu que este composto podia ser derivado da ciclocomunina (**73**) por introdução de um grupo 3,3-dimetilalilo em C-6.



[a], [b] permutáveis entre si

Com o objectivo de confirmar a estrutura proposta foi efectuada a acetilação do composto **80** (pág. 190). O espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em $CDCl_3$ do derivado acetilado (Tabela 7, pág. 101) mostrou, além do desaparecimento do singuleto largo a δ 6,28, o aparecimento de dois singuletos a δ 2,32 e δ 2,29 de grupos acetoxilo, mantendo-se o grupo hidroxilo da posição 5 a δ 12,92 *s*. Estes sinais comprovaram que o composto **80** possuía três grupos hidroxilo um dos quais não foi acetilado. Na região dos protões aromáticos verificou-se o deslocamento paramagnético significativo dos protões das posições 3' e 5' para δ 6,71 *d* (J = 2,5 Hz, Δδ = 0,31 ppm) e δ 6,80 *dd* (J = 8,5 e 2,5 Hz, Δδ = 0,28 ppm), respectivamente. O protão em C-6' apareceu também ligeiramente deslocado para δ 7,72 *d* (J = 8,5 Hz, Δδ = 0,11 ppm). Estes valores de deslocamento confirmaram a presença de um anel B idêntico ao da ciclocomunina (**73**).



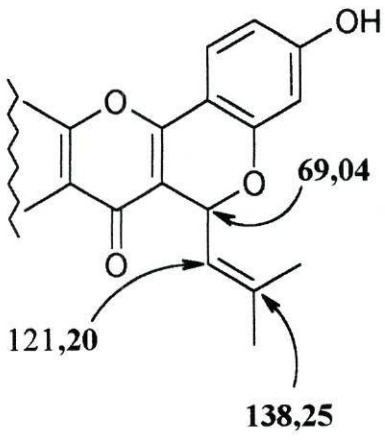
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 50 MHz em $CDCl_3$ do composto **79** (Tabela 8, pág. 102) evidenciaram a existência de um carbono carbonílico a δ 178,91 (C) de uma flavona [137-139], semelhante ao observado para a ciclocomunina (**73**).

Na região dos átomos de carbono com hibridação sp^2 observaram-se catorze sinais de carbonos quaternários a δ 161,00, δ 159,01, δ 158,05, δ 157,11, δ 154,50, δ 152,30, δ 139,24, δ 135,38, δ 134,04, δ 110,04, δ 109,48, δ 108,98, δ 105,45, δ 105,24, em que os seis primeiros correspondiam a átomos de carbono oxigenados, e seis sinais de carbonos metínicos a δ 125,27, δ 121,75, δ 121,39, δ 121,14, δ 109,58 e δ 104,49. Além destes sinais, os espectros de RMN de ^{13}C mostraram ainda um sinal de carbono oximetínico a δ 69,88, dois sinais de carbonos metilénicos a δ 21,96 e δ 21,62 e seis sinais de carbonos metilvinílicos a δ 25,89, δ 25,84, δ 25,79, δ 18,66, δ 18,03 e δ 17,93.

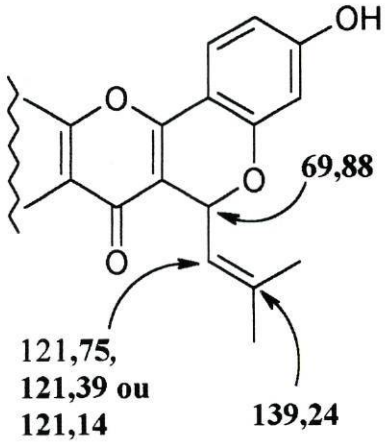
A semelhança entre o anel B da ciclocomunina (**73**) e o do composto **80** permitiu a atribuição dos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono não oxigenados do anel B do composto **80**, levando em consideração as ligeiras alterações provocadas pela mudança do solvente.

	Ciclocomunina (**73**)	**80**
C-1'	δ 108,41 (C)	δ 109,48 (C) ou δ 108,98 (C)
C-3'	δ 103,90	δ 104,49
C-5'	δ 110,29	δ 109,58
C-6'	δ 125,68	δ 125,27

A comparação dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C do composto **80** com os valores de deslocamento químico dos sinais atribuídos ao grupo isoprenilo em C-3 da ciclocomunina (**73**) permitiu confirmar a semelhança entre estes anéis e atribuir os valores de δ de ^{13}C como se indica a seguir.

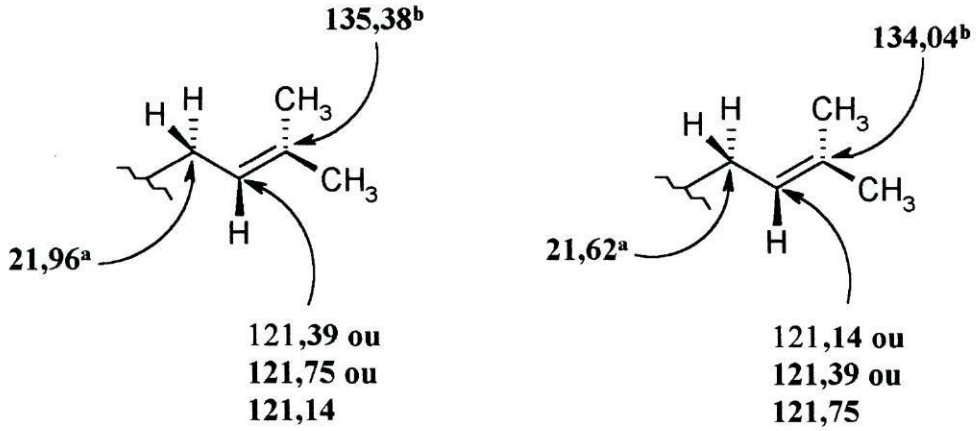


Ciclocomunina (**73**)



80

A presença neste espectro dos sinais a δ 135,38 (C), δ 134,04 (C), δ 21,96 (CH_2) e δ 21,62 (CH_2) conjuntamente com os sinais característicos de quatro carbonos metilvinílicos confirmou a existência de dois grupos 3,3-dimetilalilo.



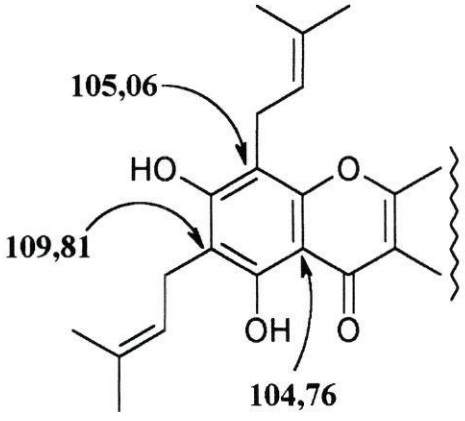
[a], [b] permutáveis entre si

Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) do composto **80Ac** a 50 MHz em $CDCl_3$ (Tabela 8, pág. 102) evidenciaram os sinais de carbono a δ 168,73 (C), δ 168,44 (C), δ 21,13 (CH_3) e δ 20,56 (CH_3) correspondentes a dois grupos acetoxilo. Na análise comparativa dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **80** e **80Ac** verificou-se o deslocamento de vários sinais no espectro:

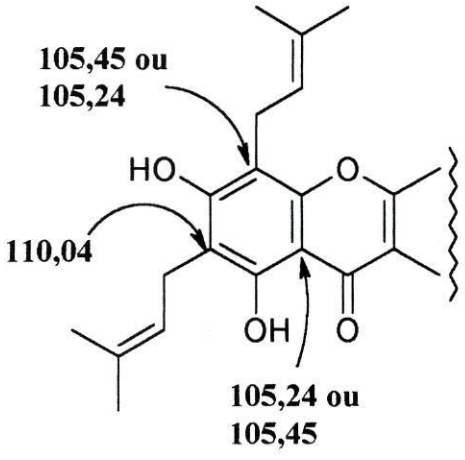
- dos carbonos a δ 161,00 (C) e δ 159,01 (C) para δ 154,99 (Δδ = -6,01 ppm) e δ 151,87 (Δδ = -7,14 ppm), respectivamente, sugerindo a atribuição destes sinais a C-7 e 4' [137, 139],
- dos carbonos a δ 109,58 (CH-5') e δ 104,49 (CH-3') para δ 115,17 (Δδ = 5,59 ppm) e δ 111,37 (Δδ = 6,88 ppm), respectivamente, confirmando o assinalamento destes sinais a C-5' e C-3' [137, 139],
- do carbono a δ 109,48 (C) para δ 113,37 (Δδ = 3,89 ppm), confirmando a atribuição deste sinal a C-1' [137, 139],
- dos carbonos a δ 110,04 (C), δ 105,45 (C) e δ 105,24 (C), correspondentes ao C-4a e a dois carbonos ligados a grupos 3,3-dimetilalilo, para δ 117,74 (Δδ = 7,70 ppm), δ 112,74 (Δδ = 7,29 ppm) e δ 111,56 (Δδ = 6,32 ppm), respectivamente, sugerindo a localização em posição *orto* ou *para* a grupos acetoxilo [137, 139].

O deslocamento provocado pela acetilação dos carbonos a δ 110,04, δ 105,45 e δ 105,24 e a semelhança dos seus valores de deslocamento químico com os dos C-6, C-8 e C-4a da

artelasticina (**79**) permitiu confirmar a presença de um anel A com o mesmo padrão de substituição e atribuir os valores de deslocamento químico destes carbonos.



Artelasticina (**79**)



80

O espectro de EM-IE (pág. 196) revelou para o composto **80** um pico de ião molecular com m/e de 488 ($M^{+\bullet}$, 100 %) que, em combinação com os restantes dados espectroscópicos, permitiu o estabelecimento da fórmula molecular $C_{30}H_{32}O_6$, concordante com a estrutura proposta. Este espectro mostrou ainda vários picos característicos da presença de grupos 3,3--dimetilalilo a 473 ($[M^{+\bullet}-CH_3]^+$, 17%), 445 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7]^+$, 26%), 433 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7]^+$, 87%), 418 ($[M^{+\bullet}-CH_3-C_4H_7]^+$, 22%), 389 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7-C_4H_8]^+$, 75%), 377 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-C_4H_8]^+$, 28%) e 321 ($[M^{+\bullet}- C_4H_7-C_4H_8-C_4H_8]^+$, 27%), em que este último confirmou a presença no composto **80** de três grupos isoprenilo [140, 141]. Verificou-se ainda o aparecimento de um sinal resultante da fissão retro-Diels-Alder a 189 ($[A_1-H]^{2+}$, 42%), cujo valor de m/e comprovou que o anel A era diidroxilado e apresentava dois grupos isoprenilo (Figura 14, pág. 99) [142].

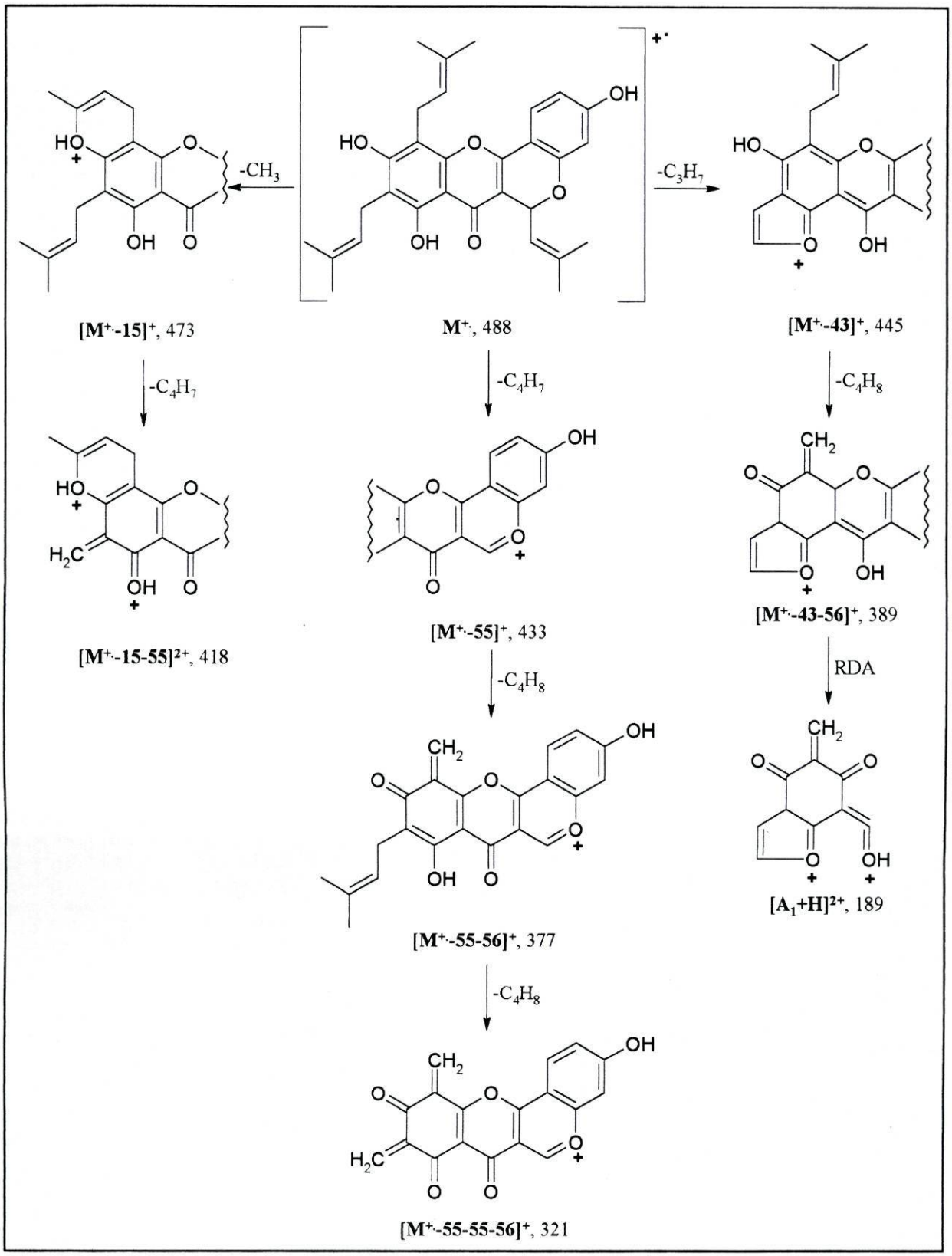


Figura 14 - Esquema proposto de fragmentação por EM-IE do composto **80**.

Pelos dados descritos concluiu-se que o composto **80** apresentava a estrutura indicada na Figura 15. Esta flavona nunca tinha sido descrita, tendo sido denominada por artelastina.

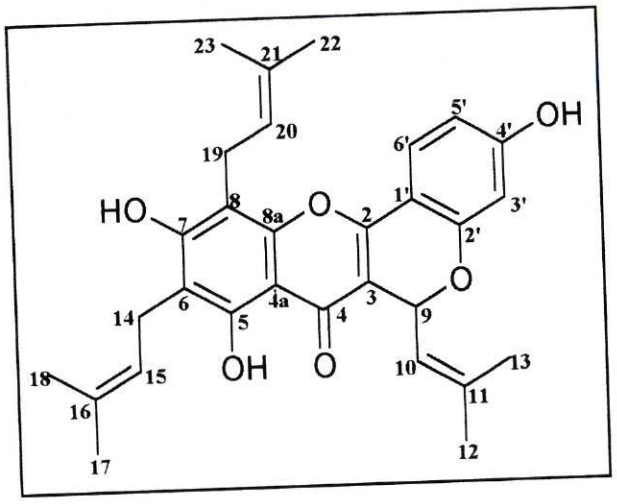


Figura 15 - Estrutura da artelastina (**80**).

Tabela 7 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H a 200 MHz da artelastina (**80**) e a 500 MHz do diacetato de artelastina (**80Ac**) em $CDCl_3$.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 80	80Ac	H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 80	80Ac
5	13,01 *s*	12,92 *s*	**19**	3,41 *d* (7,0)[b]	3,25 *d* (7,0)[b]
7	6,28 *sl*[a]	-	**20**	5,3 - 5,2 *m*	5,10 *tl* (7,0)[c]
9	6,24 *d* (9,4)	6,28 *d* (9,5)	**22**	1,81 *d* (0,9)[c]	1,68 sl[a]
10	5,40 *ddd* (9,4, 1,3 e 1,3)	5,40 *dl* (9,5)	**23**	1,84 *d* (0,9)[c]	1,73 *sl*[d]
12	1,67 *d* (1,3)	1,66 *sl*[a]	**3'**	6,40 *d* (2,3)	6,71 *d* (2,5)
13	1,94 *d* (1,3)	1,95 *d* (1,5)	**4'**	NO[a]	-
14	3,53 *d* (6,8)[b]	3,39 *d* (7,0)[b]	**5'**	6,52 *dd* (8,5 e 2,3)	6,80 *dd* (8,5 e 2,5)
15	5,3 - 5,2 *m*	5,15 *tl* (7,0)[c]	**6'**	7,61 *d* (8,5)	7,72 *d* (8,5)
17	1,81 *d* (0,9)[c]	1,68 *sl*[a]	**-OCOC$\underline{H}_3$**	-	2,32 *s*
18	1,84 *d* (0,9)[c]	1,78 *sl*[d]			2,29 *s*

[a], [b], [c] e [d] permutáveis dentro da mesma coluna; NO sinal não observado.

Tabela 8 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 50 MHz da artelastina (**80**) e do diacetato de artelastina (**80Ac**) em $CDCl_3$.

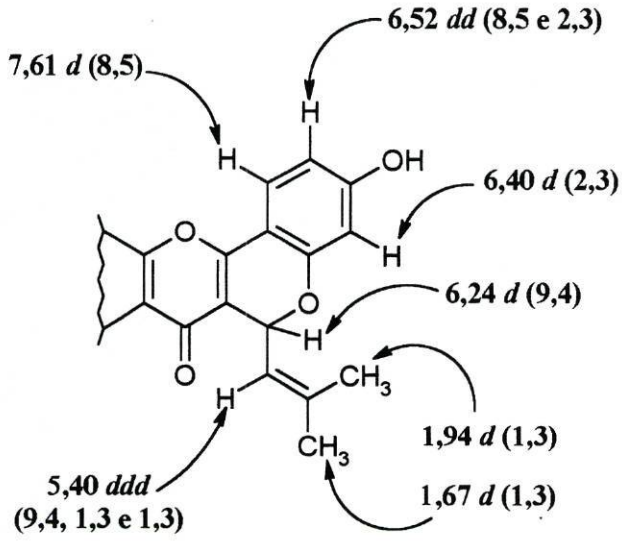
	δ ^{13}C			δ ^{13}C	
C	**80**	**80Ac**	**C**	**80**	**80Ac**
2	157,11 (C)[a]	157,35 (C)[a]	**17**	25,79 (CH_3)[e]	25,67 (CH_3)[e]
3	108,98 (C)	109,26 (C)	**18**	18,03 (CH_3)[f]	18,05 (CH_3)[f]
4	178,91 (C)	179,39 (C)	**19**	21,62 (CH_2)[g]	22,81 (CH_2)[g]
4a	105,24 (C)[b]	111,56 (C)[b]	**20**	121,14 (CH)[d]	120,66 (CH)[d]
5	158,05 (C)[a]	157,42 (C)[a]	**21**	134,04 (C)[h]	132,28 (C)[h]
6	110,04 (C)	117,74 (C)	**22**	25,84 (CH_3)[e]	25,63 (CH_3)[e]
7	161,00 (C)[c]	154,99 (C)[c]	**23**	17,93 (CH_3)[f]	17,82 (CH_3)[f]
8	105,45 (C)[b]	112,74 (C)[b]	**1'**	109,48 (C)	113,37 (C)
8a	152,30 (C)[a]	152,59 (C)[a]	**2'**	154,50 (C)[a]	154,65 (C)[a]
9	69,88 (CH)	70,01 (CH)	**3'**	104,49 (CH)	111,37 (CH)
10	121,75 (CH)[d]	121,56 (CH)[d]	**4'**	159,01 (C)[c]	151,87 (C)[c]
11	139,24 (C)	139,69 (C)	**5'**	109,58 (CH)	115,17 (CH)
12	25,89 (CH_3)[e]	25,84 (CH_3)[e]	**6'**	125,27 (CH)	124,58 (CH)
13	18,66 (CH_3)[f]	18,67 (CH_3)[f]	**-OCOCH$_3$**	-	21,13 (CH_3)
14	21,96 (CH_2)[g]	23,21 (CH_2)[g]			20,56 (CH_3)
15	121,39 (CH)[d]	121,19 (CH)[d]	**-OCOCH$_3$**	-	168,73 (C)
16	135,38 (C)[h]	132,31 (C)[h]			168,44 (C)

[a], [b], [c], [d], [e], [f], [g] e [h] permutáveis dentro da mesma coluna

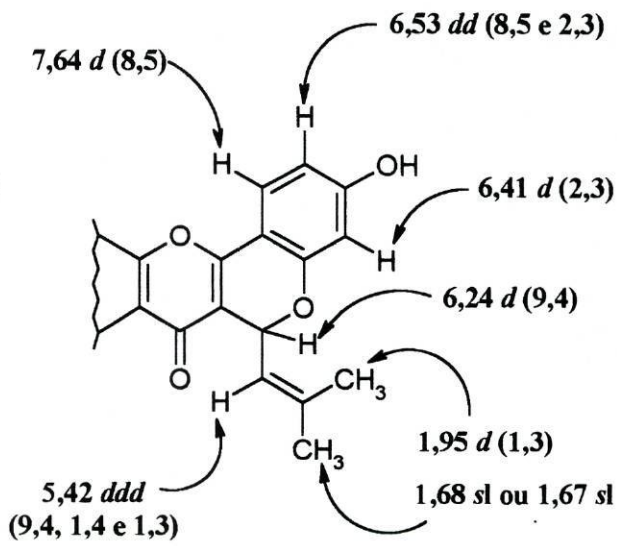
6. Artelastocromeno (81)

Os espectros no IV e no UV do composto **81** revelaram-se semelhantes aos espectros das flavonas discutidas anteriormente (**73**, **78-80**). Assim, no espectro no IV (pág. 197) observaram-se bandas que sugeriram a presença de grupos hidroxilo (3400-3100 cm^{-1}), carbonilo conjugado (1652 cm^{-1}) e metilo geminais (1377 e 1351 cm^{-1}) [129-131]. Este espectro evidenciou ainda a existência de ligações C-H alquílica (2923 cm^{-1}), C=C de anel aromático (1617, 1548 e 1465 cm^{-1}) e C-O (1240 e 1215 cm^{-1}) [129-131]. Relativamente ao espectro no UV (pág. 198) observaram-se três bandas a 202 nm (log ε 5,2), 296 nm (log ε 4,3, banda II) e 375 nm (log ε 4,2, banda I), que sugeriram a natureza flavonóide do composto **81** [132-135]. O deslocamento batocrómico, evidenciado após adição de uma solução metanólica de hidróxido de sódio, da banda a 375 nm (log ε 4,2) para 412 nm (log ε 4,4, $\Delta\lambda$ = 37 nm) indicou a presença de um hidroxilo fenólico [132-135]. Um deslocamento batocrómico semelhante foi também observado após a adição de uma solução metanólica de $AlCl_3$, permanecendo este efeito após adição de uma solução de ácido clorídrico. Este resultado mostrou que o composto podia ser um derivado da 5-hidroxiflavona [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 200 MHz em $CDCl_3$ do composto **81** (Tabela 9, pág. 114) evidenciou que este deve possuir os mesmos anéis B, C e D que a artelastina (**80**). Assim, este espectro revelou, além do sinal do protão de 5-OH a δ 12,95 *s*, três protões aromáticos do anel B a δ 7,64 *d* (*J* = 8,5 Hz, H-6'), δ 6,53 *dd* (*J* = 8,5 e 2,3 Hz, H-5') e δ 6,41 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3'), um dupleto a δ 6,24 (*J* = 9,4 Hz, H-9), um duplo duplo dupleto a δ 5,42 (*J* = 9,4, 1,4 e 1,3 Hz, H-10), um dupleto a δ 1,95 (*J* = 1,3 Hz) e um singuleto largo a δ 1,68 ou δ 1,67 referentes aos grupos metílicos em C-13 e C-12, respectivamente.



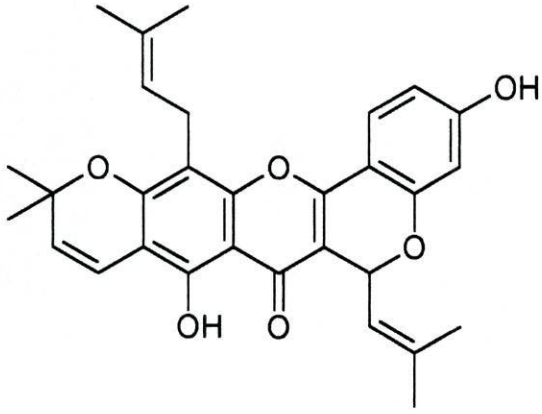
Artelastina (**80**)



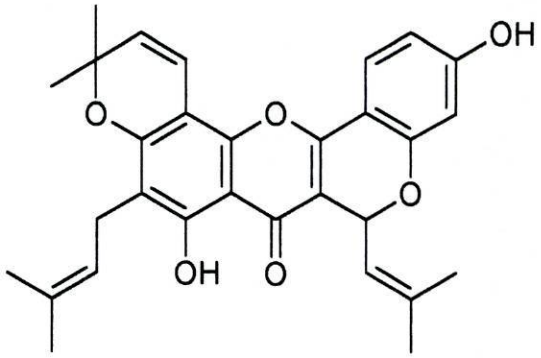
81

Ao contrário do espectro de RMN de ^{1}H da artelastina (**80**), este espectro mostrou a presença de apenas um grupo 3,3-dimetilalilo no anel A, evidenciada pelos sinais característicos dos protões deste grupo a δ 5,23 *tl* (J = 7,0 Hz, -C<u>H</u>=), δ 3,46 *dl* (J = 7,0 Hz, -C<u>H$_2$</u>-CH=), δ 1,83 *sl* (CH_3) e δ 1,68 *sl* ou δ 1,67 *sl* (CH_3) [136].

Outra diferença do espectro de RMN de ^{1}H do composto **81** relativamente ao espectro da artelastina (**80**) foi o aparecimento de dois dupletos a δ 6,70 (1H, J = 9,9 Hz) e a δ 5,58 (1H, J = 9,9 Hz). Os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento destes dois protões sugeriram que deviam corresponder a dois protões olefínicos em posição *cis* [145-147]. Este facto, juntamente com a observação de dois singuletos largos dos protões de dois grupos metílicos a δ 1,44 e δ 1,43, revelou que podia existir um anel 2,2-dimetilcromeno na estrutura do composto **81**. Este anel devia resultar da ciclização oxidativa entre o OH-7 e um dos grupos 3,3-dimetilalilo em C-6 (estrutura **96**) ou C-8 (estrutura **97**) da artelastina (**80**).

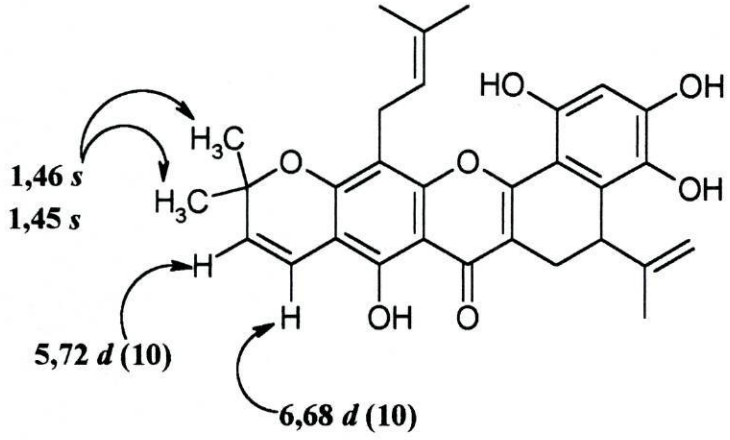


96

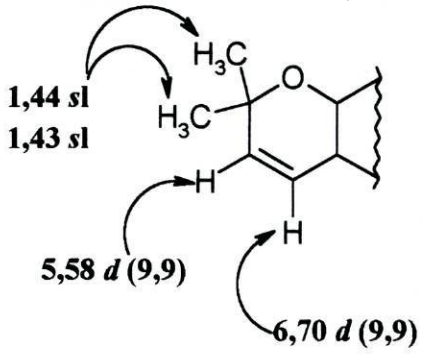


97

Esta hipótese foi apoiada pela semelhança entre os valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento destes protões e os de anéis 2,2-dimetilcromeno descritos na literatura [32, 148-166], como o existente na artonina B (**76**), uma flavona isoprenilada isolada de *Artocarpus heterophyllus* [43].



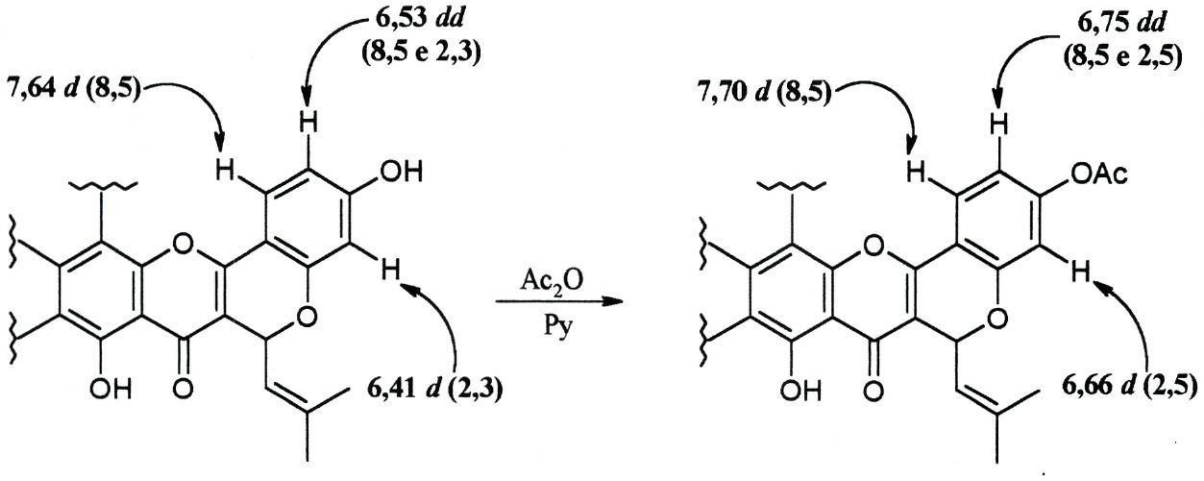
Artonina B (**76**)



81

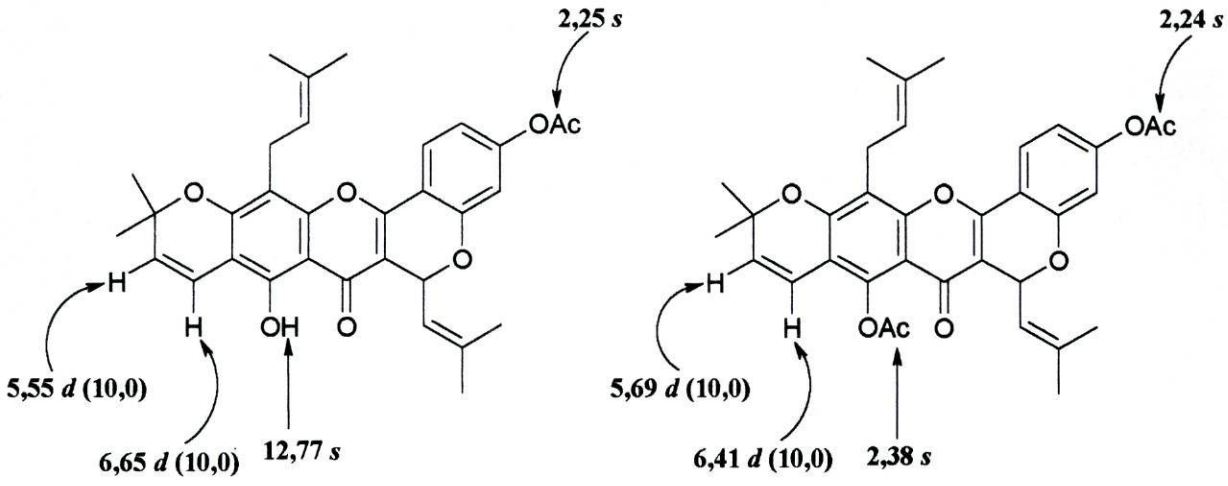
Com o objectivo de determinar a localização do anel 2,2-dimetilcromeno e confirmar a posição de grupos hidroxilo procedeu-se à acetilação do composto com anidrido acético e piridina pelo processo habitual (pág. 190), tendo-se obtido os derivados mono e diacetilado. O espectro de RMN de ^1H do derivado monoacetilado a 300 MHz em $CDCl_3$ (**81Ac1**, Tabela 9,

pág. 114) evidenciou o aparecimento de um singuleto de três protões metílicos do grupo acetoxilo a δ 2,25, bem como a permanência do sinal do protão do grupo 5-OH a δ 12,77 *s*. Na região dos protões aromáticos verificou-se um deslocamento significativo dos protões a δ 6,41 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3') e δ 6,53 *dd* (*J* = 8,5 e 2,3 Hz, H-5') para δ 6,66 *d* (*J* = 2,5 Hz, Δδ = 0,25 ppm, H-3') e δ 6,75 *dd* (*J* = 8,5 e 2,5 Hz, Δδ = 0,22 ppm, H-5'), respectivamente. O protão a δ 7,64 *d* (*J* = 8,5 Hz, H-6') sofreu um deslocamento menor para δ 7,70 *d* (*J* = 8,5 Hz, Δδ = 0,06 ppm, H-6'). Estes deslocamentos paramagnéticos confirmaram a presença de um grupo hidroxilo na posição 4' do anel B.



81 **81Ac**

Os protões olefínicos do anel 2,2-dimetilcromeno ficaram inalterados aparecendo a δ 6,65 *d* (*J* = 10,0 Hz) e δ 5,55 *d* (*J* = 10,0 Hz). Pelo contrário, o espectro de RMN de ^{1}H do derivado diacetilado (**81Ac2**) (Tabela 9, pág. 114) não revelou a presença do sinal do protão hidroxílico fenólico da posição 5, aparecendo dois singuletos de três protões cada a δ 2,38 e δ 2,24, referentes a protões metílicos dos grupos acetoxilo. Os valores de deslocamento químico dos protões aromáticos do anel B mantiveram-se quase idênticos aos dos protões correspondentes no derivado monoacetilado (**81Ac1**). No entanto, um dos protões olefínicos do anel 2,2-dimetilcromeno sofreu um deslocamento paramagnético aparecendo a δ 5,69 *d* (*J* = 10,0 Hz, Δδ = +0,14 ppm), enquanto que o outro sofreu um deslocamento diamagnético para δ 6,41 *d* (J = 10,0 Hz, Δδ = -0,24 ppm).



81Ac1 **81Ac2**

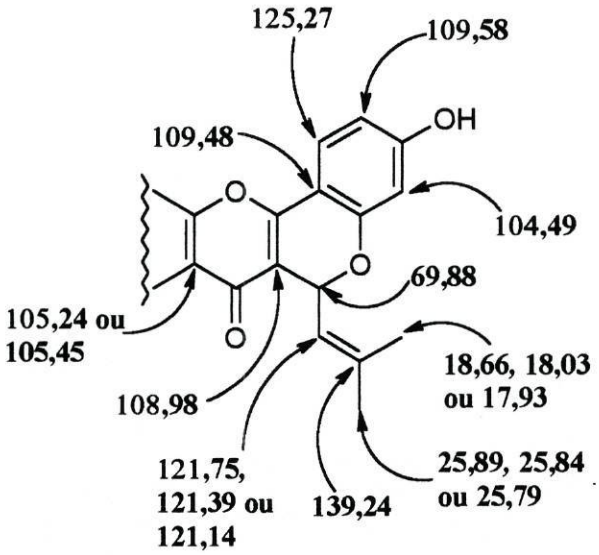
A alteração do deslocamento químico dos protões olefínicos do anel pirano após acetilação do grupo 5-OH de flavonóides foi utilizado por vários autores para estabelecer a sua posição [43, 153, 154, 167-169]. No caso do anel pirano estar em orientação linear em relação ao núcleo flavonóide, como na estrutura **96**, a acetilação do grupo 5-OH provocaria o deslocamento diamagnético do protão olefínico mais próximo deste grupo hidroxilo e o deslocamento paramagnético do protão olefínico mais afastado. Pelo contrário, se o anel pirano estiver em orientação angular, como na estrutura **97**, a acetilação do grupo 5-OH não causaria nenhuma alteração do deslocamento químico de ambos os protões olefínicos. A comparação dos deslocamentos químicos dos protões olefínicos do anel 2,2-dimetilcromeno do derivado monoacetilado (**81Ac1**) com os do derivado diacetilado (**81Ac2**) levou a concluir que este anel se encontrava numa orientação linear com o núcleo flavónico e que o grupo 3,3-dimetil-alilo estava ligado a C-8 (estrutura **96**).

Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 50 MHz em $CDCl_3$ do composto **81** (Tabela 10, pág. 115) evidenciaram a existência de trinta sinais de átomos de carbono, apresentando um sinal a δ 178,87 correspondente a um carbono carbonílico idêntico ao da artelastina (**80**).

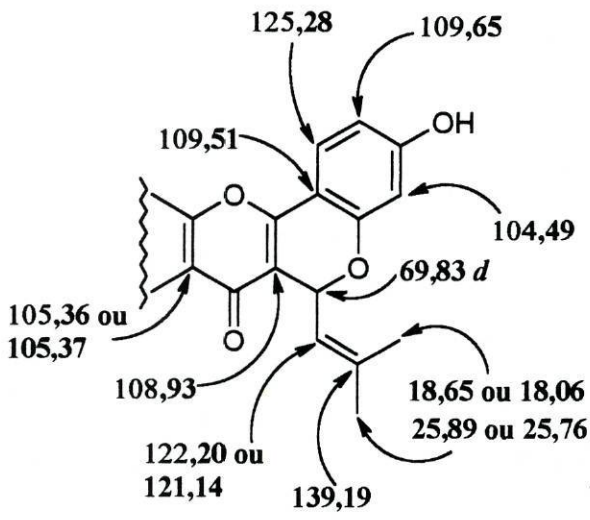
Na região dos átomos de carbono com hibridação sp^2 observaram-se treze sinais de carbonos quaternários (δ 161,13, δ 158,06, δ 156,44, δ 155,17, δ 154,51, δ 153,64, δ 139,19, δ 131,61, δ 109,51, δ 108,93, δ 107,53, δ 105,37 e δ 105,36) e sete sinais de carbonos

metínicos (δ 127,81, δ 125,28, δ 122,20, δ 121,14, δ 115,93, δ 109,65 e δ 104,49). Além destes sinais, os espectros de RMN de ^{13}C mostraram ainda um carbono quaternário a δ 77,20, um carbono metínico a δ 69,83, um carbono metilénico a δ 21,54 e seis carbonos metílicos a δ 28,15, δ 28,10, δ 25,89, δ 25,76, δ 18,65 e δ 18,06.

A comparação dos valores de deslocamento químico dos carbonos dos anéis B, C e D do composto **81** com os da artelastina (**80**) confirmou a hipótese destes anéis serem idênticos e permitiu a atribuição dos sinais a seguir indicados.



Artelastina (**80**)

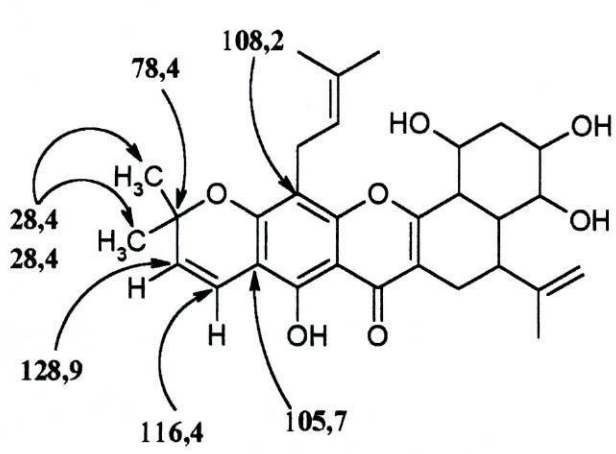


81

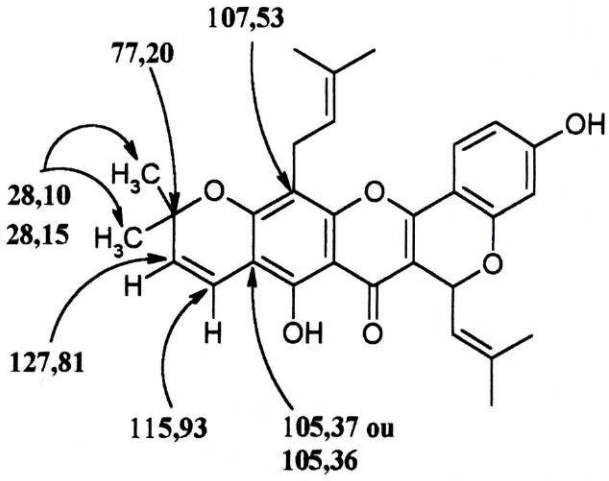
Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C de um carbono olefínico (δ 121,14 ou δ 122,20) e dois carbonos metilvinílicos (δ 25,76 ou δ 25,89 e δ 18,06 ou δ 18,65), além dos referidos anteriormente, juntamente com os sinais a δ 131,61 (C) e δ 21,54 (CH_2) confirmaram a existência de um substituinte 3,3-dimetilalilo.

Os valores de deslocamento químico dos carbonos olefínicos a δ 127,81 (CH) e δ 115,93 (CH), do carbono quaternário a δ 77,20 e dos dois carbonos metílicos a δ 28,15 e δ 28,10 observados no espectro deste composto estavam de acordo com os dos carbonos do anel 2,2-dimetilcromeno linear descritos para a artonina B (**76**) [43]. Com base nos valores de

deslocamento químico da artonina B (**76**) foi também possível atribuir os sinais de carbono das posições 6 e 8 do composto **81**.



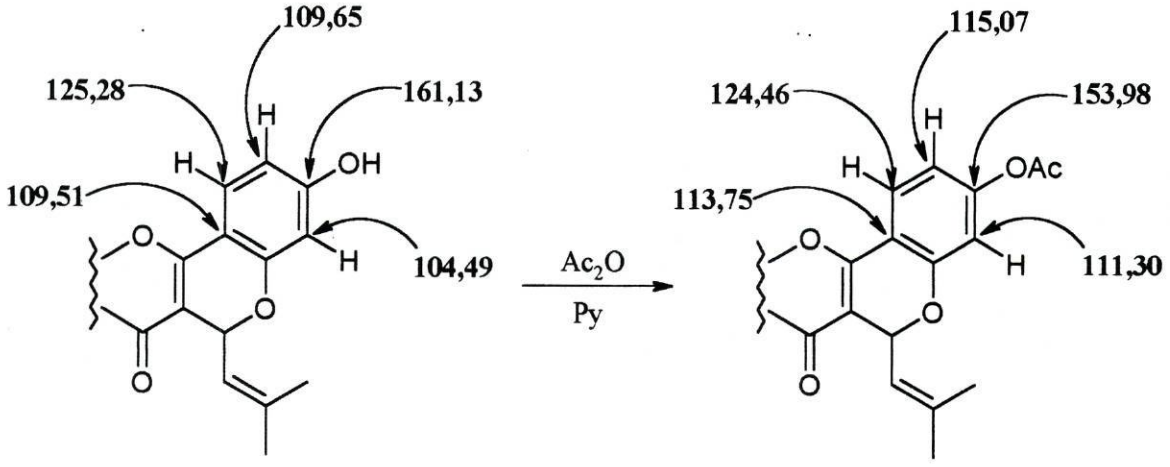
Artonina B (**76**)



81

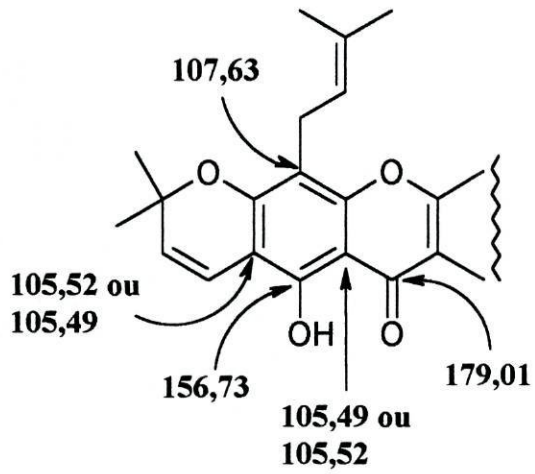
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) dos derivados mono (**81Ac1**) e diacetilado (**81Ac2**) do composto **81** permitiram confirmar as atribuições descritas anteriormente e atribuir os sinais de ^{13}C ainda não assinalados.

Os espectros de RMN de ^{13}C do composto **81Ac1** (BB e DEPT 90° e 135°) a 50 MHz em $CDCl_3$ (Tabela 10, pág. 115) evidenciaram sinais correspondentes aos carbonos carbonílico e metílico de um grupo acetoxilo a δ 168,76 (C) e δ 21,15 (CH_3). Além destes verificou-se o deslocamento dos sinais a δ 109,65 (CH-5'), δ 109,51 (C-1') e δ 104,49 (CH-3') para δ 115,07 (Δδ = 5,42 ppm), δ 113,75 (Δδ = 4,24 ppm) e δ 111,30 (Δδ = 6,81 ppm), respectivamente. O enquadramento destes valores de deslocamento nos habitualmente provocados pela acetilação confirmou as atribuições atrás referidas [137, 139]. Neste espectro verificou-se ainda o deslocamento do sinal a δ 161,13 (C) para δ 153,98 (Δδ = -7,15 ppm), permitindo o assinalamento deste sinal a C-4' [137, 139].

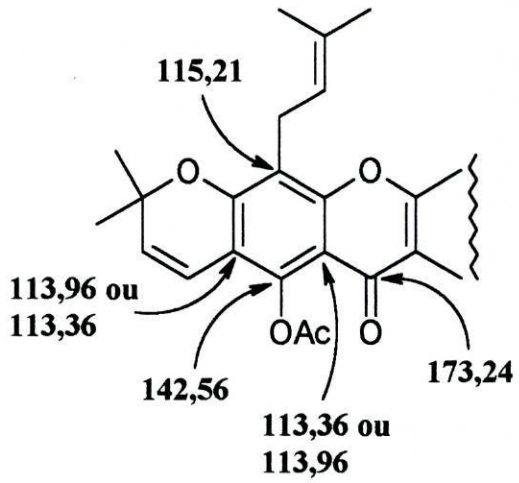


81 **81Ac1**

A comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) em $CDCl_3$ do composto **81Ac2** com os do composto **81Ac1** (Tabela 10, pág. 115) revelou, o deslocamento do sinal do carbono carbonílico a δ 179,01 para δ 173,24 (Δδ = -5,77 ppm) e do carbono a δ 156,73 (C) para δ 142,56 (Δδ = -14,17 ppm), o que sugeriu que este último sinal correspondia a C-5 [137, 139]. Além destes sinais verificou-se ainda um deslocamento dos carbonos a δ 107,63 (C) para δ 115,21 (Δδ = 7,58 ppm) e de cada um dos sinais a δ 105,52 (C) e δ 105,49 (C) para δ 113,96 (Δδ ≈ 8,4 ppm) ou 113,36 (Δδ ≈ 7,8 ppm). Estas variações no valores de δ permitiram confirmar a atribuição do sinal a δ 107,63 ao carbono da posição 8 e dos sinais a δ 105,52 e δ 105,49 aos carbonos das posições 6 e 4a [137, 139].



81Ac1



81Ac2

A maior intensidade do sinal a δ 113,36 relativamente a outros sinais do espectro sugeriu que este correspondia, para além de C-6 ou C-4a, a outro átomo de carbono. Comparando o seu valor de desvio químico com os valores do espectro de RMN de ^{13}C do composto **81Ac1** atribuiu-se este sinal também a C-1'.

O espectro de EM-IE (pág. 197) apresentou um pico molecular a 486 u. m. a., o que juntamente com os dados espectroscópicos anteriores, permitiu estabelecer para o composto **81** a fórmula molecular $C_{30}H_{30}O_6$, que estava de acordo com a estrutura proposta. Neste espectro destacou-se o pico a 471 ($[M^{+\cdot}-15]$, 100 %), resultante da perda do radical metilo do anel 2,2-dimetilcromeno, característico de flavonóides com este grupo [140, 141, 150, 152, 156, 159, 162-164, 170, 171]. Além do pico base observaram-se sinais devidos à perda dos fragmentos de grupos isoprenilo a 443 ($[M^{+\cdot}-C_3H_7]^+$, 10 %), 431 ($[M^{+\cdot}-C_4H_7]^+$, 35 %), 415 ($[M^{+\cdot}-CH_3-C_4H_8]^+$, 10 %) e 387 ($[M^{+\cdot}-C_3H_7-C_4H_8]^+$, 10 %) [140, 141] (Figura 16, pág. 112).

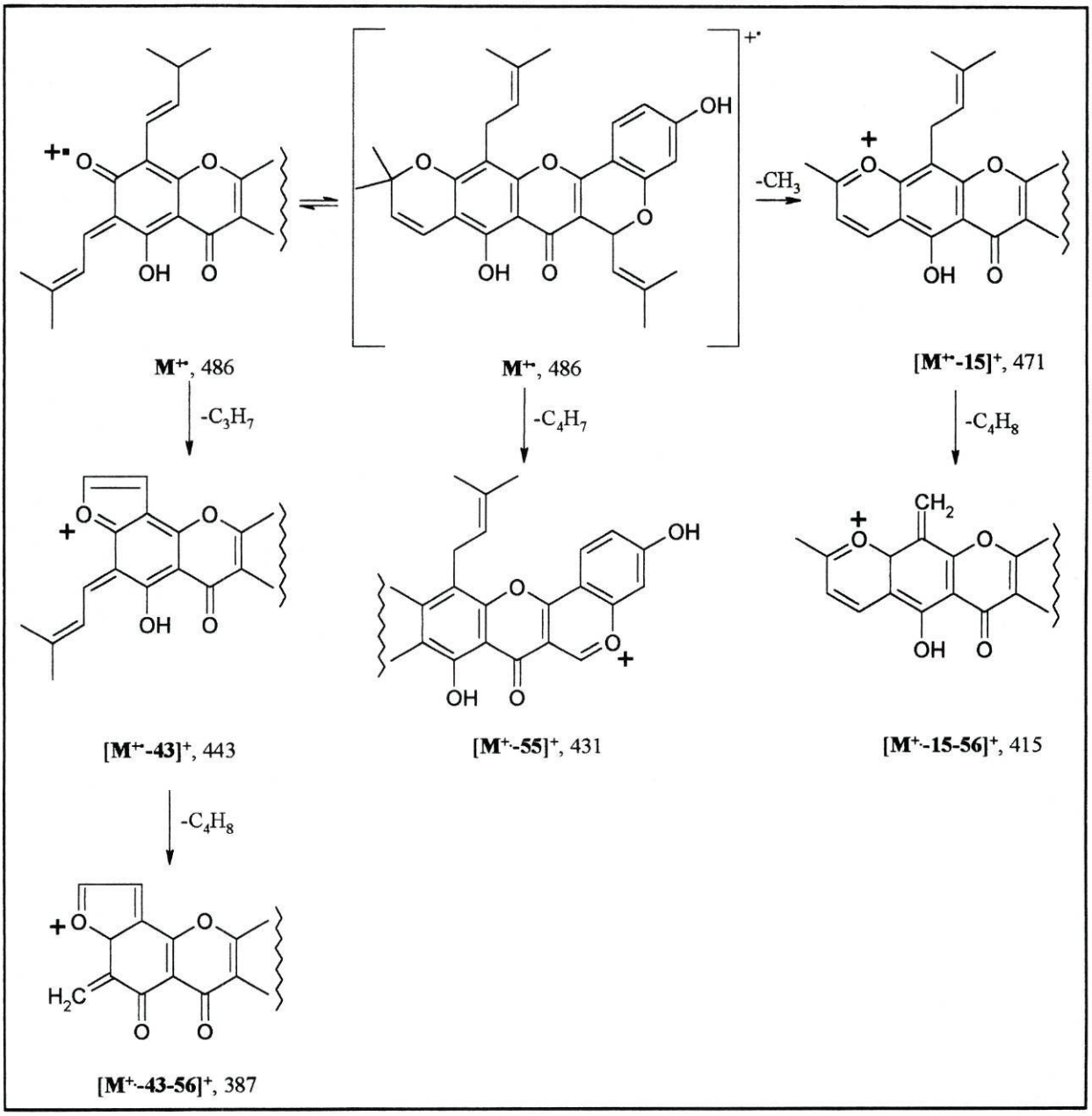


Figura 16 – Esquema proposto para a fragmentação por EM-IE do composto **81**.

O conjunto dos dados discutidos (IV, UV, RMN de ^{1}H e ^{13}C do composto e dos seus derivados acetilados e EM-IE) permitiu concluir que o composto **81** correspondia à estrutura apresentada na Figura 17. A pesquisa bibliográfica revelou que este composto correspondia a uma estrutura inédita, a qual foi denominada pelo nome comum de artelastocromeno.

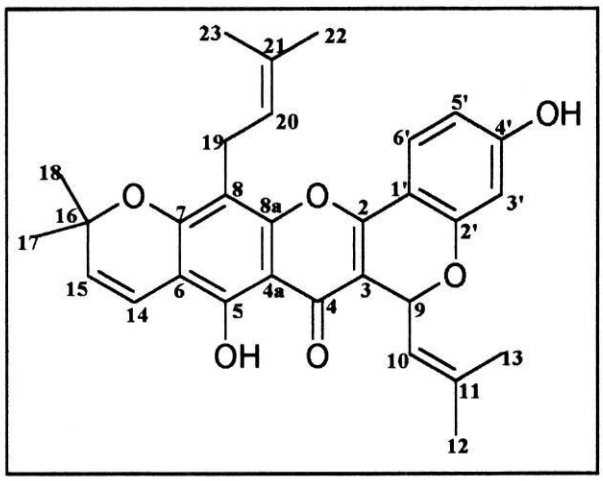


Figura 17 - Estrutura do artelastocromeno (**81**).

Tabela 9 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H a 200 MHz do artelastocromeno (**81**) e a 300 MHz do monoacetato (**81Ac1**) e diacetato de artelastocromeno (**81Ac2**) em $CDCl_3$.

	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)				δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)		
H	**81**	**81Ac1**	**81Ac2**	**H**	**81**	**81Ac1**	**81Ac2**
5	12,95 *s*	12,77 *s*	-	**19**	3,46 *dl* (7,0)	3,42 *dl* (7,1)	3,51 *dl* (7,1)
9	6,24 *d* (9,4)	6,21 *d* (9,4)	6,19 *d* (9,2)	**20**	5,23 *tl* (7,0)	5,17 *tl* (7,1)	5,20 *tl* (7,1)
10	5,42 *ddd*	5,37 *ddd*	5,30 *ddd*	**22**	1,67 *sl*[a]	1,62 *d* (0,7)[a]	1,63 *s*[a]
	(9,4, 1,4 e 1,3)	(9,4, 1,4 e 1,3)	(9,2, 1,3 e 1,3)	**23**	1,83 *sl*	1,78 *d* (0,7)	1,79 *s*
12	1,68 *sl*[a]	1,63 *d* (1,3)[a]	1,60 *d* (1,3)[a]	**3'**	6,41 *d* (2,3)	6,66 *d* (2,5)	6,63 *d* (2,2)
13	1,95 *d* (1,3)	1,90 *d* (1,3)	1,88 *d* (1,3)	**4'**	NO	-	-
14	6,70 *d* (9,9)	6,65 *d* (10,0)	6,41 *d* (10,0)	**5'**	6,53 *dd*	6,75 *dd*	6,77 *dd*
15	5,58 *d* (9,9)	5,55 *d* (10,0)	5,69 *d* (10,0)		(8,5 e 2,3)	(8,5 e 2,5)	(8,5 e 2,2)
17	1,44 *sl*[b]	1,39 *s*[b]	1,41 *s*[b]	**6'**	7,64 *d* (8,5)	7,70 *d* (8,5)	7,67 *d* (8,5)
18	1,43 *sl*[b]	1,38 *s*[b]	1,40 *s*[b]	**-OCOC<u>H</u>$_3$**		2,25 *s*	2,38 *s*
							2,24 *s*

[a] e [b] permutáveis dentro da mesma coluna; NO sinal não observado.

Tabela 10 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 50 MHz do artelastocromeno (**81**), monoacetato de artelastocromeno (**81Ac1**) e diacetato de artelastocromeno (**81Ac2**) em $CDCl_3$.

		δ ^{13}C				δ ^{13}C	
C	**81**	**81Ac1**	**81Ac2**	**C**	**81**	**81Ac1**	**81Ac2**
2	158,06 (C)[a]	157,17 (C)[a]	157,01 (C)[a]	**17**	28,15 (CH_3)[f]	28,20 (CH_3)[f]	28,27 (CH_3)[f]
3	108,93 (C)	111,22 (C)	112,48 (C)	**18**	28,10 (CH_3)[f]	28,15 (CH_3)[f]	28,23 (CH_3)[f]
4	178,87 (C)	179,01 (C)	173,24 (C)	**19**	21,54 (CH_2)	21,55 (CH_2)	22,15 (CH_2)
4a	105,36 (C)[b]	105,49 (C)[b]	113,36 (C)[b]	**20**	121,14 (CH)[c]	120,99 (CH)[c]	121,23 (CH)[c]
5	156,44 (C)	156,73 (C)	142,56 (C)	**21**	131,61 (C)	131,74 (C)	132,34 (C)
6	105,37 (C)[b]	105,52 (C)[b]	113,96 (C)[b]	**22**	25,76 (CH_3)[d]	25,75 (CH_3)[d]	25,74 (CH_3)[d]
7	155,17 (C)[a]	154,72 (C)[a]	154,89 (C)[a]	**23**	18,06 (CH_3)[e]	18,07 (CH_3)[e]	18,14 (CH_3)[e]
8	107,53 (C)	107,63 (C)	115,21 (C)	**1'**	109,51 (C)	113,75 (C)	113,36 (C)
8a	154,51 (C)[a]	154,56 (C)[a]	154,81 (C)[a]	**2'**	153,64 (C)[a]	153,72 (C)[a]	152,30 (C)[a]
9	69,83 (CH)	70,01 (CH)	70,42 (CH)	**3'**	104,49 (CH)	111,30 (CH)	111,19 (CH)
10	122,20 (CH)[c]	122,11 (CH)[c]	121,32 (CH)[c]	**4'**	161,13 (C)	153,98 (C)	154,38 (C)
11	139,19 (C)	139,56 (C)	139,38 (C)	**5'**	109,65 (CH)	115,07 (CH)	114,89 (CH)
12	25,89 (CH_3)[d]	25,88 (CH_3)[d]	25,91 (CH_3)[d]	**6'**	125,28 (CH)	124,46 (CH)	124,19 (CH)
13	18,65 (CH_3)[e]	18,68 (CH_3)[e]	18,71 (CH_3)[e]	**-OCO$\underline{C}$H$_3$**	-	21,15 (CH_3)	21,15 (CH_3)
14	115,93 (CH)	115,87 (CH)	115,52 (CH)				21,07 (CH_3)
15	127,81 (CH)	127,95 (CH)	131,71 (CH)	**-O$\underline{C}$OCH$_3$**	-	168,76 (C)	169,60 (C)
16	77,20 (C)	77,20 (C)	77,20 (C)				168,80 (C)

[a], [b], [c], [d], [e] e [f] permutáveis dentro da mesma coluna.

7. Artelastofurano (82)

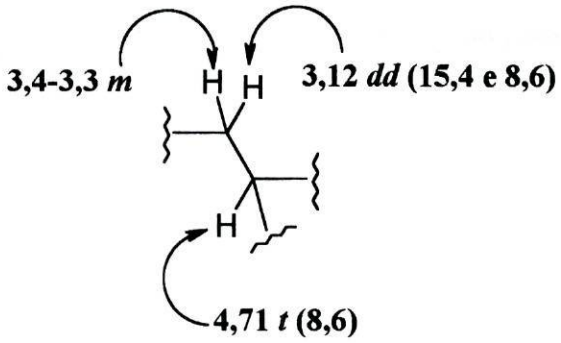
Os espectros no IV e no UV do composto **82** apresentaram bandas semelhantes às observadas para as flavonas discutidas anteriormente (**73**, **78-81**). O espectro no IV do composto **82** (pág. 199) sugeriu a presença de grupos hidroxilo (3500-3200 cm^{-1}), carbonilo conjugado (1653 cm^{-1}) e metilo geminais (1312 cm^{-1}). Observaram-se ainda bandas que poderiam corresponder a ligações C-H alquílica (2974 e 2926 cm^{-1}), C=C de anel aromático (1610 e 1458 cm^{-1}) e C-O (1244 cm^{-1}) [129-131]. O espectro no UV (pág. 199) sugeriu uma estrutura flavonóide ao evidenciar bandas características deste grupo de compostos a 213, 268 nm (log ε 5,0 e 4,8, banda II) e 316 nm (log ε 4,5, banda I) [132-135]. O deslocamento batocrómico observado da banda a 316 nm (log ε 4,5) para 390 nm (log ε 4,6; $\Delta\lambda$ = 74 nm), após adição de uma solução de hidróxido de sódio à solução metanólica do composto **82**, revelou o seu caracter fenólico [132-135]. A formação de um quelato com cloreto de alumínio, estável em meio ácido, indicou que se poderia tratar do derivado de uma 5-hidroxiflavona [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 11, pág. 127) evidenciou um singuleto a δ 13,60 referente ao grupo hidroxilo fenólico no C-5, ligado por ponte de hidrogénio com o grupo carbonilo em C-4. A expansão do espectro na região dos protões aromáticos revelou a presença de dois protões a δ 7,03 *d* (J = 8,3 Hz) e δ 6,38 *d* (J= 2,0 Hz), acoplados de acordo com o espectro de COSY, com um protão a δ 6,25 *dd* (J = 8,3 e 2,0 Hz). Os valores de deslocamento químico e o padrão de acoplamento destes protões eram semelhantes aos dos protões aromáticos do anel B das flavonas discutidas anteriormente (**73**, **78-81**), principalmente da artelasticina (**79**). Este facto e a ausência do sinal do protão a cerca de 6 ppm (*d*, J = 9,4 Hz), característico de H-9 da ciclocomunina (**73**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) sugeriu que não existia o anel D nesta estrutura e que o composto **82** poderia possuir o grupo 2',4'-diidroxifenilo.

Ao contrário do espectro de RMN de ^1H da artelasticina (**79**) que continha três grupos 3,3-dimetilalilo, o espectro do composto **82** revelou a presença de apenas dois grupos 3,3-dimetilalilo pela observação no espectro dos sinais de dois protões vinílicos a δ 5,20 *t* (J = 6,5 Hz) e δ 5,03 *t* (J = 6,4 Hz) acoplados, de acordo com espectro de COSY, com os protões metilénicos a δ 3,3-3,2 *m* (2H) e δ 3,03 *d* (2H, J = 6,4 Hz), respectivamente, e de quatro

singuletos de protões metilvinílicos a δ 1,71, δ 1,62, δ 1,53 e δ 1,37. No entanto, não se observou nenhum sinal de protões aromáticos do anel A, nem do H-3 do núcleo da flavona.

Além destes sinais, na região dos protões alifáticos existia ainda outro conjunto de sinais que consistia num tripleto de um protão a δ 4,71 (J = 8,6 Hz), um multipleto a δ 3,4-3,3 (1H), um duplo dupleto a δ 3,12 (1H, J = 15,4 e 8,6 Hz) e dois singuletos a δ 1,14 e δ 1,09 de protões metílicos. O espectro de COSY revelou o acoplamento entre os protões a δ 3,4-3,3 *m* (1H) e δ 3,12 *dd* (1H, J = 15,4 e 8,6 Hz) e de cada um destes protões com o protão a δ 4,71 *t* (1H, J = 8,6 Hz).



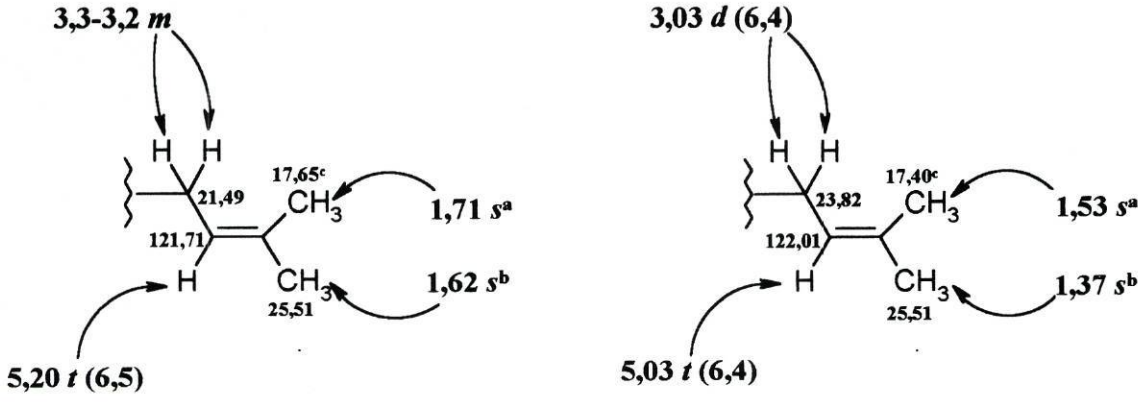
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 12, pág. 128) evidenciaram a presença de um carbono carbonílico a δ 181,65 da estrutura de uma flavona com um grupo hidroxilo na posição 5 [137-139]. Na região dos carbonos com hibridação sp^2 observaram-se doze sinais de carbonos quaternários (δ 164,19, δ 162,04, δ 161,38, δ 158,37, δ 150,57, δ 131,03, δ 130,91, δ 119,35, δ 110,84, δ 105,68, δ 103,66 e δ 102,53) e cinco sinais de carbonos metínicos (δ 130,92, δ 122,01, δ 121,71, δ 106,10 e δ 103,11). Além dos sinais anteriormente referidos, os espectros de RMN de ^{13}C mostraram ainda dois sinais com valores de δ característicos de carbonos ligados a funções oxigenadas a δ 90,81 (CH) e δ 70,21 (C) [172] e ainda três sinais de carbonos metilénicos (δ 26,53, δ 23,82, δ 21,49) e cinco sinais de carbonos metilícos (δ 26,08, δ 25,51, δ 24,18, δ 17,65 e δ 17,40).

Através do espectro de HETCOR foi possível assinalar os sinais de carbono a δ 130,92 (CH), δ 106,10 (CH) e δ 103,11 (CH) aos carbonos das posições 6', 5' e 3', devido ao seu acoplamento com os protões a δ 7,03 *d* (J = 8,3 Hz, H-6'), δ 6,25 *dd* (J = 8,3 e 2,0 Hz, H-5') e

δ 6,38 *d* (*J* = 2,0 Hz, H-3'), respectivamente. Estes valores revelaram-se mais semelhantes aos observados para C-6', C-5' e C-3' da artocarpesina (**78**) e artelasticina (**79**) do que para os mesmos carbonos da ciclocomunina (**73**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**). É de notar que o ligeiro desvio dos valores de deslocamento químico destes carbonos poderia ser causado pelo facto do espectro do composto **82** ter sido registado em DMSO-d_6.

	73 (DMSO-d_6)	**78** (DMSO-d_6)	**79** ($CDCl_3$)	**80** ($CDCl_3$)	**81** ($CDCl_3$)	**82** (DMSO-d_6)
C-3'	δ 103,90	δ 103,30	δ 103,72	δ 104,49	δ 104,49	δ 103,11
C-5'	δ 110,29	δ 108,13	δ 108,21	δ 109,58	δ 109,65	δ 106,10
C-6'	δ 125,68	δ 129,85	δ 131,60	δ 125,27	δ 125,28	δ 130,92

Observaram-se ainda neste espectro os acoplamentos dos protões assinalados aos grupos 3,3-dimetilalilo com os respectivos átomos de carbono.

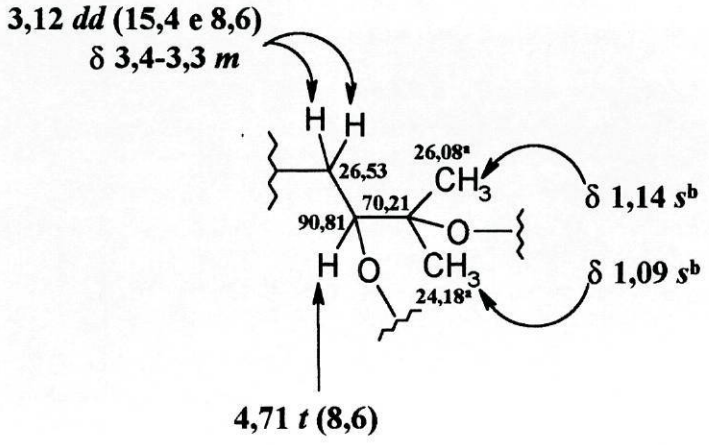


[a], [b], [c] permutáveis entre si

O espectro de HETCOR permitiu ainda a observação dos acoplamentos dos carbonos que ainda não foram assinalados com alguns protões do espectro de RMN de ^{1}H. Assim, o

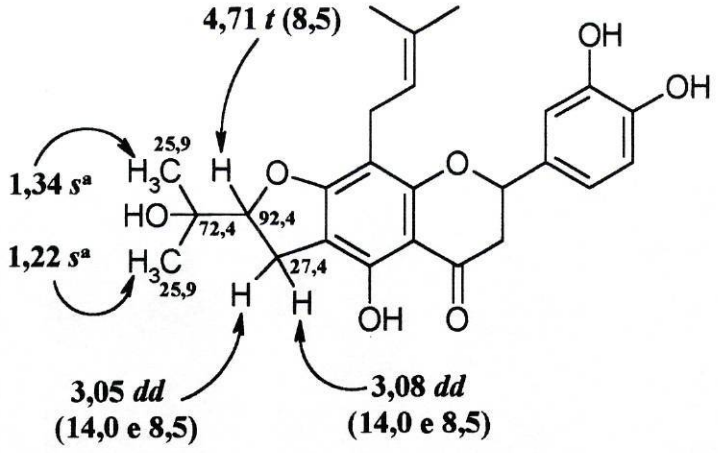
acoplamento do carbono metínico a δ 90,81 com o protão a δ 4,71 *t* (*J* = 8,6 Hz) revelou a presença de um grupo oximetínico. Além disto, o acoplamento do carbono metilénico a δ 26,53 com ambos os protões a δ 3,4-3,3 *m* e δ 3,12 *dd* (*J* = 15,4 e 8,6 Hz) indicou a existência de dois protões geminais ligados ao mesmo carbono metilénico. Finalmente, o acoplamento dos carbonos a δ 26,08 (CH_3) e δ 24,18 (CH_3) com os protões a δ 1,14 *s* e δ 1,09 *s*, respectivamente, confirmou a atribuição destes sinais a dois grupos metílicos.

Com base nestes acoplamentos e nos obtidos por análise do espectro de COSY concluiu-se pela existência no composto **82** da seguinte estrutura parcial:

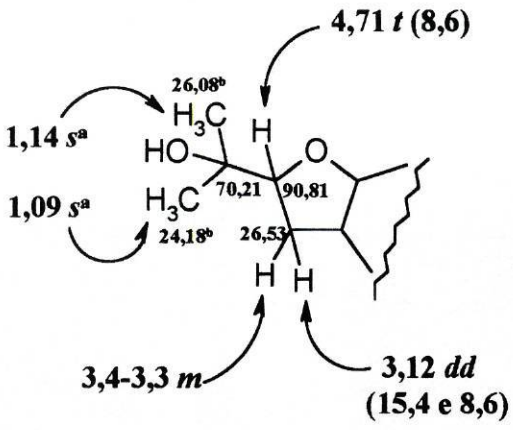


ª, ᵇ permutáveis entre si

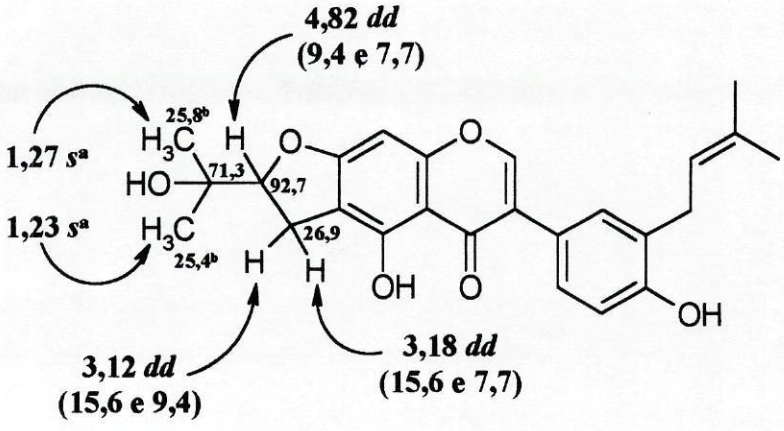
A ausência de protões aromáticos no anel A e do H-3 do núcleo flavónico, bem como a inexistência de um anel D como o encontrado na ciclocomunina (**73**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) levou a sugerir que a estrutura parcial referida devia estar ligada ao anel A. A analogia dos valores do deslocamento químico e constantes de acoplamento dos sinais desta estrutura parcial com os descritos na literatura para anéis 2-hidroxiisopropil--2*H*,3*H*-diidrofurano [123, 125, 173-179], como por exemplo os anéis da dorsmanina G (**98**) isolada dos rebentos de *Dorstenia mannii* [178] e da lupinisoflavona G (**99**) isolada do tronco de *Derris scandens* [179] indicou a possibilidade deste anel existir na estrutura do composto **82**.



Dorsmanina G (**98**)



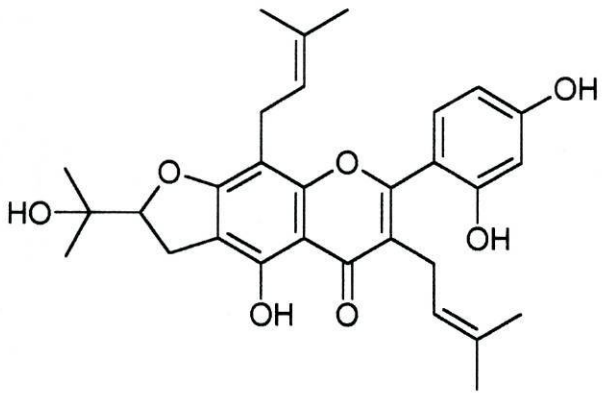
82



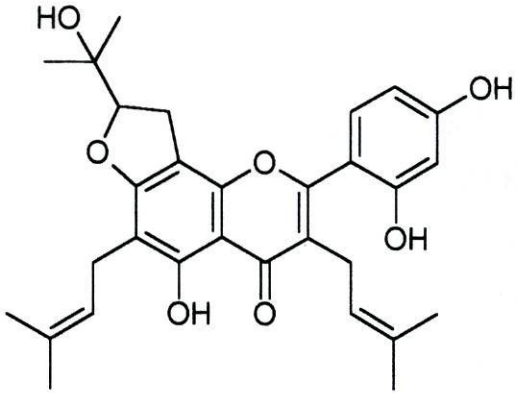
Lupinisoflavona G (**99**)

[a], [b] permutáveis entre si

Assim, o composto **82** devia corresponder a um derivado da artelasticina (**79**) em que um dos grupos 3,3-dimetilalilo do anel A sofreu uma ciclização oxidativa, originando um anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano (estruturas **100** ou **101**).

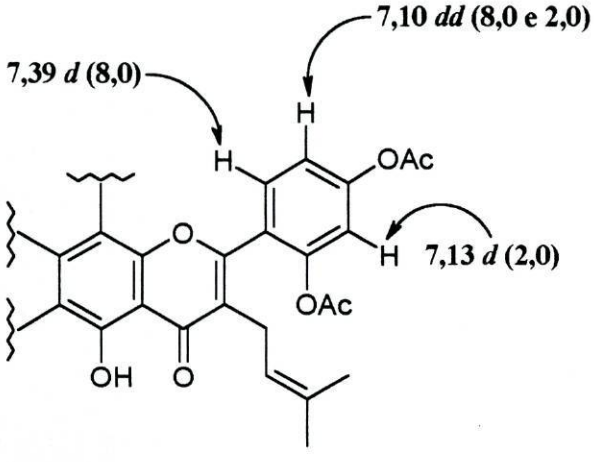


100

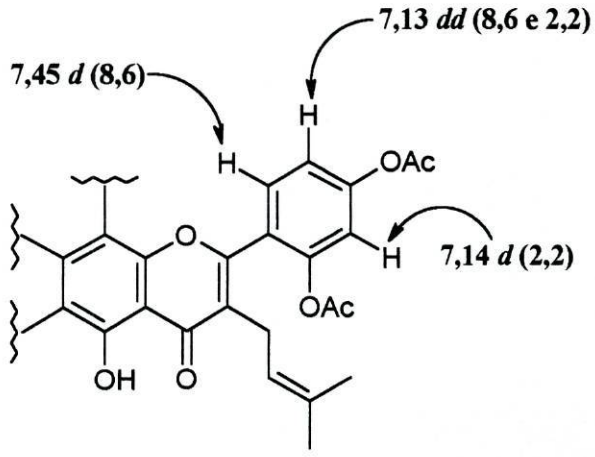


101

Com o objectivo de comprovar a hipótese das estruturas acima propostas procedeu-se à acetilação do composto **82** do modo usual (Ac_2O/Py, pág. 191). O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em $CDCl_3$ (Tabela 11, pág. 127) revelou que o produto obtido era um derivado diacetilado, através do aparecimento de dois singuletos a δ 2,34 e δ 2,14, que correspondiam aos protões metílicos de dois grupos acetoxilo. Este espectro ainda mostrou, além da presença do protão de 5-OH a δ 13,21, dois duplos dupletos a δ 3,16 (*J* = 15,4 e 9,3 Hz) e δ 3,09 (*J* = 15,4 e 8,2 Hz) de protões metilénicos do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano. Os protões aromáticos do anel B apareceram, neste espectro, a δ 7,45 *d* (*J* = 8,6 Hz, H-6'), δ 7,14 *d* (*J* = 2,2 Hz, H-3'), e δ 7,13 *dd* (*J* = 8,6 e 2,2 Hz, H-5'). Os seus deslocamentos químicos após acetilação eram comparáveis aos dos protões aromáticos do anel B do derivado diacetilado da artelasticina (**79Ac**), confirmando a hipótese do composto **82** possuir o anel B 2',4'-diidroxilado.



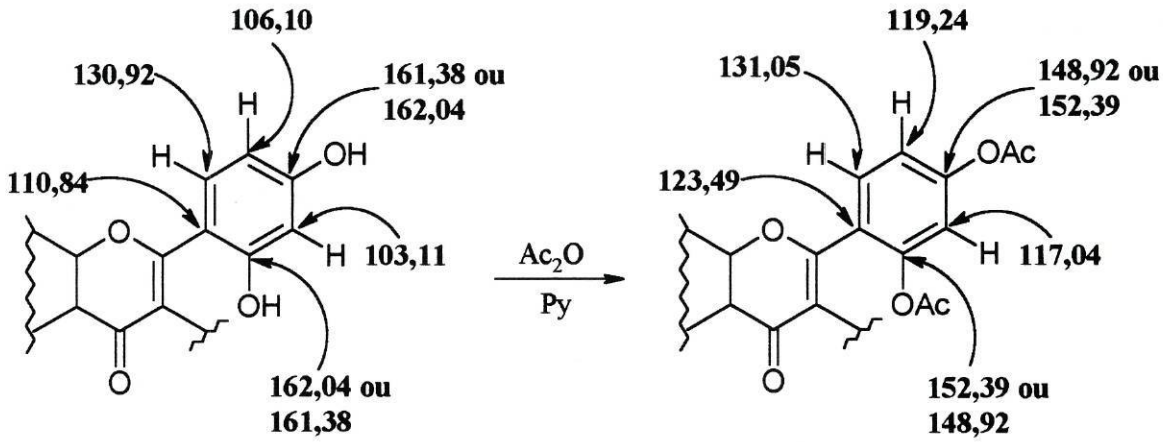
Artelasticina diacetilada (**79Ac**)



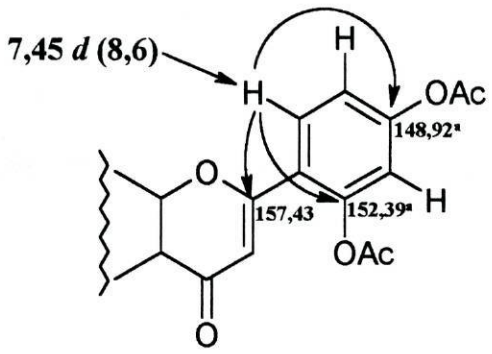
82Ac

Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT de 90° e 135°) do composto **82Ac** em $CDCl_3$ (Tabela 12, pág. 128) confirmaram esta hipótese, tendo evidenciado a presença dos sinais de carbono a δ 168,64, δ 168,42, δ 21,14 e δ 20,84 correspondentes, respectivamente, aos carbonos carbonílicos e metílicos de dois grupos acetoxilo. Além destes, verificou-se o deslocamento dos sinais dos carbonos a δ 106,10 (CH-5') e δ 103,11 (CH-3') para δ 119,24 (Δδ = 13,14 ppm) e δ 117,04 (Δδ = 13,93 ppm), respectivamente. Os assinalamentos dos sinais de carbonos não substituídos do anel B foram também confirmados pelos acoplamentos observados no espectro de HETCOR entre os carbonos a δ 131,05, δ 119,24 e δ 117,04 e os protões a δ 7,45 *d* (*J* = 8,6 Hz, H-6'), δ 7,13 *dd* (*J* = 8,6 e 2,2 Hz, H-5') e δ 7,14 *d* (*J* = 2,2 Hz, H-3'), respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **82Ac** verificou-se ainda o deslocamento dos sinais a δ 162,04 (C), δ 161,38 (C) e δ 110,84 (C) para δ 152,39 (Δδ = -9,65 ppm), δ 148,92 (Δδ = -12,46 ppm) e δ 123,49 (Δδ = 12,65 ppm), respectivamente, permitindo a atribuição dos sinais a δ 162,04 (C) e δ 161,38 (C) a C-2' e 4' e do sinal a δ 110,84 (C) a C-1' [137, 139].



A confirmação desta hipótese foi realizada através de experiências de INEPT selectivo, com irradiação do dupleto a δ 7,45 (H-6'), que mostrou os sinais a δ 157,43 (C), δ 152,39 (C) e δ 148,92 (C). Estas experiências permitiram não só a confirmação do valor do desvio químico dos carbonos 2' e 4', como também a atribuir o singuleto a δ 157,43 a C-2.

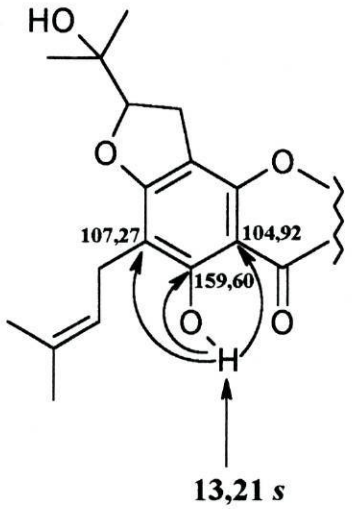


ª permutáveis entre si

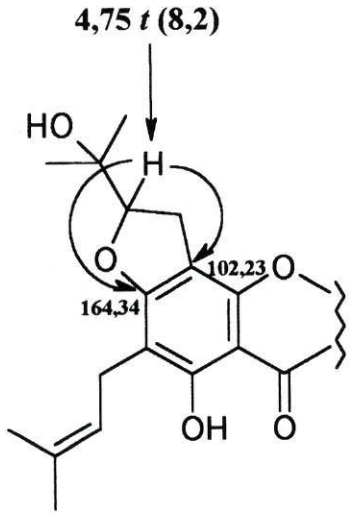
Os valores de deslocamento químico dos carbonos do anel B do derivado diacetilado do composto **82** revelaram-se semelhantes aos atribuídos ao derivado diacetilado da artelasticina (**79Ac**).

Os valores dos deslocamentos químicos dos restantes sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C do composto **82Ac** não sofreram alterações significativas, tal como está evidenciado na Tabela 12 (pág. 128). Na atribuição dos sinais dos grupos 3,3-dimetilalilo deste derivado acetilado utilizaram-se espectros de HETCOR.

Os dados dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C tanto do composto **82** como do seu derivado diacetilado (**82Ac**) não permitiram distingir entre as estruturas **100** e **101**. Contudo, as experiências de INEPT selectivo foram também úteis para determinar a localização do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano. Assim, a irradiação do protão do singuleto a δ 13,21 (5-OH) mostrou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 159,60 (C), δ 107,27 (C) e δ 104,92 (C), permitindo a sua atribuição a C-5, 6 e 4a, respectivamente.



A irradiação do protão do tripleto a δ 4,75 (J = 8,2 Hz) mostrou o aparecimento dos carbonos a δ 164,34 (C) e δ 102,23 (C). Não se observando neste espectro o singuleto a δ 107,27 atribuído ao C-6, concluiu-se que no composto **82Ac** o anel do 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-di-idrofurano tinha orientação angular (estrutura **101**). Este espectro permitiu também a atribuição dos sinais a δ 164,34 (C) e δ 102,23 (C) a C-7 e C-8, respectivamente.



O espectro de EM-IE (pág. 199) revelou para o composto **82** um pico correspondente ao ião molecular a 506 u. m. a. que, conjuntamente com os dados dos espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C, permitiu estabelecer para o composto a fórmula molecular $C_{30}H_{34}O_7$, concordante com a estrutura proposta. Além do pico do ião molecular observaram-se picos característicos de flavonóides isoprenilados a 491 ($[M^{+\bullet}-CH_3]$, 10 %), 463 ($[M^{+\bullet}-C_3H_7]^+$, 65 %), 451 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7]^+$, 85 %) e 433 ($[M^{+\bullet}-C_4H_7-H_2O]^+$, 15 %) (Figura 18, pág. 125) [140, 141].

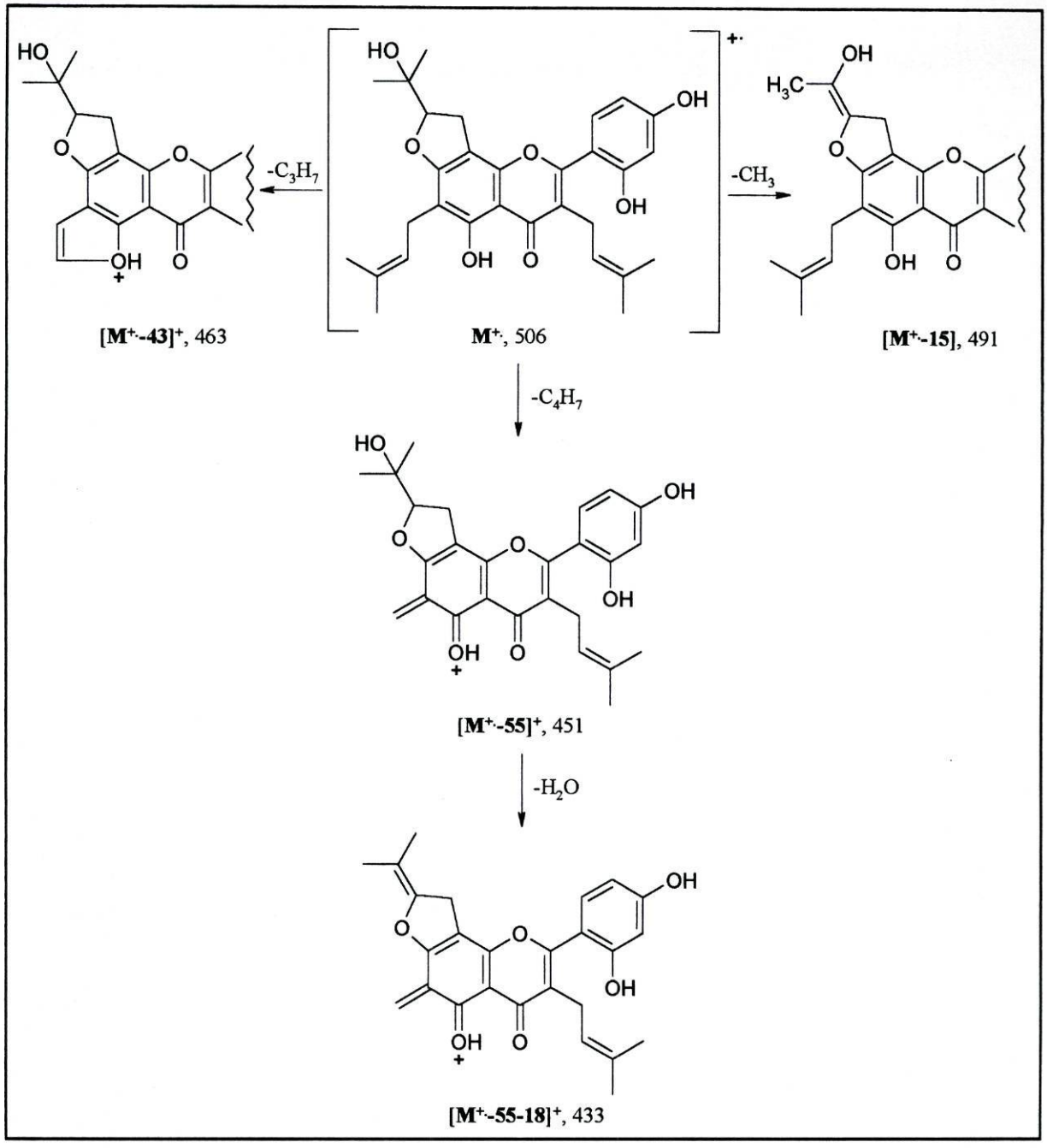


Figura 18 - Esquema proposto para a fragmentação por EM-IE do composto **82**.

O conjunto dos dados apresentados (IV, UV, RMN de ^{1}H e ^{13}C) confirmaram que o composto **82** correspondia à estrutura indicada na Figura 19. A pesquisa bibliográfica revelou que este composto ainda não tinha sido isolado anteriormente, sendo uma estrutura inédita a que se atribuiu o nome comum de artelastofurano.

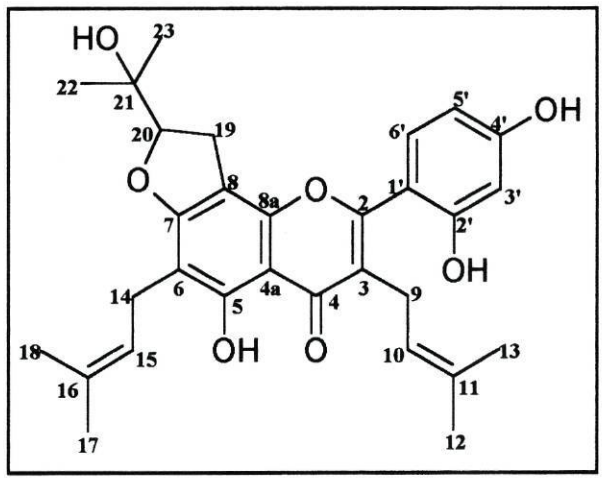


Figura 19 - Estrutura do artelastofurano (**82**).

Tabela 11 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H a 300 MHz do artelastofurano (**82**) em DMSO-d_6 e do diacetato de artelastofurano (**82Ac**) em $CDCl_3$.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 82	82Ac	H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 82	82Ac
5	13,60 *s*	13,21 *s*	**20**	4,71 *t* (8,6)	4,75 *t* (8,2)
9	3,3-3,2 *m*[a]	3,34 *d* (6,8)[a]	**22**	1,14*s*[e]	1,33 *s*[e]
10	5,20 *t* (6,5)[b]	5,28 *t* (6,8)[b]	**23**	1,09 *s*[e]	1,19 *s*[e]
12	1,62 *s*[c]	1,69 *s*[c]	**2'**	NO	-
13	1,71 *s*[d]	1,79 *s*[d]	**3'**	6,38 *d* (2,0)	7,14 *d* (2,2)
14	3,03 *d* (6,4)[a]	3,07 *d* (6,8)[a]	**4'**	NO	-
15	5,03 *t* (6,4)[b]	5,07 *t* (6,8)[b]	**5'**	6,25 *dd* (8,3 e 2,0)	7,13 *dd* (8,6 e 2,2)
17	1,37 *s*[c]	1,42 *s*[c]	**6'**	7,03 *d* (8,3)	7,45 *d* (8,6)
18	1,53 *s*[d]	1,62 *s*[d]	**-OCOC$\underline{H}_3$**	-	2,34 *s*
19	3,12 *dd* (15,4 e 8,6)	3,16 *dd* (15,4 e 9,3)			2,14 *s*
	3,4-3,3 *m*	3,09 *dd* (15,4 e 8,2)			

[a], [b], [c], [d] e [e] permutáveis dentro da mesma coluna; NO: sinal não observado.

Tabela 12 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 75 MHz do artelastofurano (**82**) em DMSO-d_6 e do diacetato de artelastofurano (**82Ac**) em $CDCl_3$.

C	δ ^{13}C 82	δ ^{13}C 82Ac	C	δ ^{13}C 82	δ ^{13}C 82Ac
2	158,37 (C)[a]	157,43 (C)	**17**	25,51 (CH_3)	25,63 (CH_3)[d]
3	119,35 (C)	121,22 (C)	**18**	17,40 (CH_3)[e]	17,64 (CH_3)[e]
4	181,65 (C)	181,89 (C)	**19**	26,53 (CH_2)	27,23 (CH_2)
4a	103,66 (C)	104,92 (C)	**20**	90,81 (CH)	91,07 (CH)
5	NO[a]	159,60 (C)	**21**	70,21 (C)	71,96 (C)
6	105,68 (C)	107,27 (C)	**22**	26,08 (CH_3)[f]	25,77 (CH_3)[f]
7	164,19 (C)	164,34 (C)	**23**	24,18 (CH_3)[f]	23,80 (CH_3)[f]
8	102,53 (C)	102,23 (C)	**1'**	110,84 (C)	123,49 (C)
8a	150,57 (C)	150,82 (C)	**2'**	162,04 (C)[g]	152,39 (C)[g]
9	21,49 (CH_2)[b]	21,87 (CH_2)[a]	**3'**	103,11 (CH)	117,04 (CH)
10	121,71 (CH)[c]	121,51 (CH)[b]	**4'**	161,38 (C)[g]	148,92 (C)[g]
11	131,03 (C)[d]	132,69 (C)[c]	**5'**	106,10 (CH)	119,24 (CH)
12	25,51 (CH_3)	25,77 (CH_3)[d]	**6'**	130,92 (CH)	131,05 (CH)
13	17,65 (CH_3)[e]	17,80 (CH_3)[e]	**-OCOCH$_3$**	-	21,14 (CH_3)
14	23,82 (CH_2)[b]	24,06 (CH_2)[a]			20,84 (CH_3)
15	122,01 (CH)[c]	120,97 (CH)[b]	**-OCOCH$_3$**		168,64 (C)
16	130,91 (C)[d]	132,16 (C)[c]			168,42 (C)

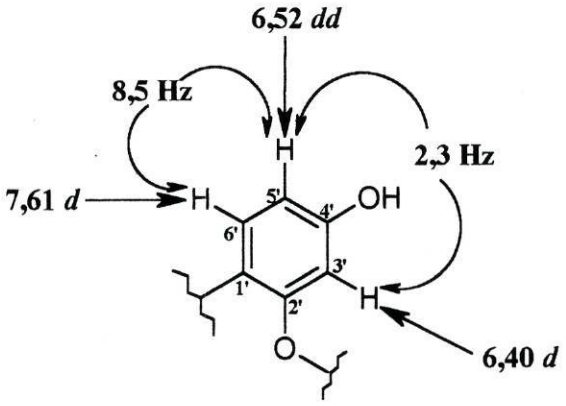
[a], [b], [c], [d], [e], [f] e [g] permutáveis dentro da mesma coluna; NO: sinal não observado.

8. Artelastinina (83) e artelastocarpina (84)

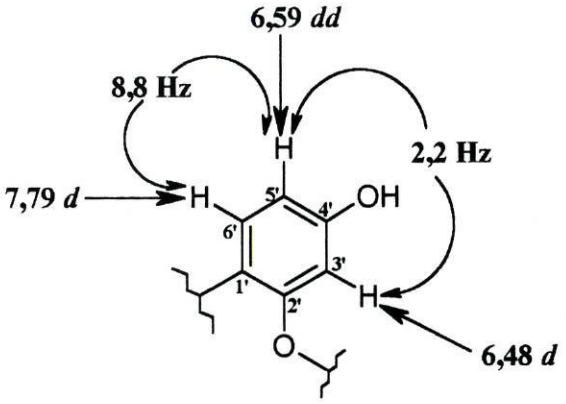
À semelhança das flavonas discutidas anteriormente (**73** e **78** a **82**), o espectro no IV do composto **83** (pág. 200) revelou a presença de bandas características de grupos hidroxilo entre 3500 e 3200 cm^{-1}, carbonilo conjugado a 1650 cm^{-1} e metilo geminais a 1370 e 1350 cm^{-1}. Este espectro evidenciou ainda bandas a 2974 e 2912 cm^{-1} de distensão de ligação C-H alquílica, a 1600, 1562 e 1464 cm^{-1} de estiramento de ligações C=C de anel aromático e a 1260, e 1245 cm^{-1} de estiramento de ligação C-O. [129-131].

No espectro no UV do composto **83** (pág. 200) observaram-se três bandas de absorção a 214, 272 nm (log ε 4,4 e 4,1, respectivamente, banda II) e 337 nm (log ε 4,0, banda I). A analogia entre estas bandas e os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção das flavonas **73**, **78** a **82** sugeriu que este composto também podia ser uma flavona [132-135]. O seu carácter fenólico foi evidenciado após adição de solução de hidróxido de sódio e visualização do efeito batocrómico da banda a 337 nm (log ε 4,0) para 385 nm (log ε 4,1, $\Delta\lambda$ = 48 nm) [132-135]. A presença de um grupo hidroxilo em C-5 foi sugerida pelo deslocamento batocrómico da banda a 337 nm (log ε 4,0), por adição de uma solução metanólica de $AlCl_3$, e manutenção deste efeito após a adição de ácido clorídrico. [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 do composto **83** (Tabela 13, pág. 156) mostrou-se semelhante ao espectro da artelasticina (**79**) e artelastina (**80**). Assim, este espectro revelou um singuleto a δ 13,17, referente ao grupo hidroxilo fenólico em C-5, e a presença de três protões aromáticos a δ 7,79 *d* (*J* = 8,8 Hz), δ 6,59 *dd* (*J* = 8,8 e 2,2 Hz) e δ 6,48 *d* (*J*= 2,2 Hz). Com base nos valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento destes sinais e na observação de acoplamento no espectro de COSY de cada um dos protões a δ 7,79 *d* (*J* = 8,8 Hz) e δ 6,48 *d* (*J*= 2,2 Hz) com o protão a δ 6,59 *dd* (*J* = 8,8 e 2,2 Hz) foi possível concluir que o composto **83** apresentava um anel 1,2,4-trissubstituído. A comparação dos valores do deslocamento químico destes sinais com os obtidos para o anel B da artelastina (**80**) sugeriu a presença de um anel idêntico.

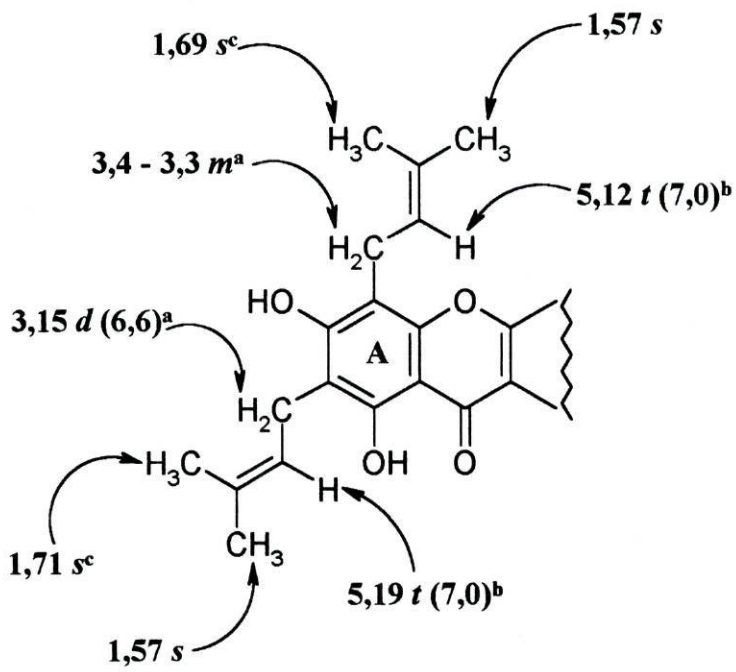


Artelastina (**80**)



83

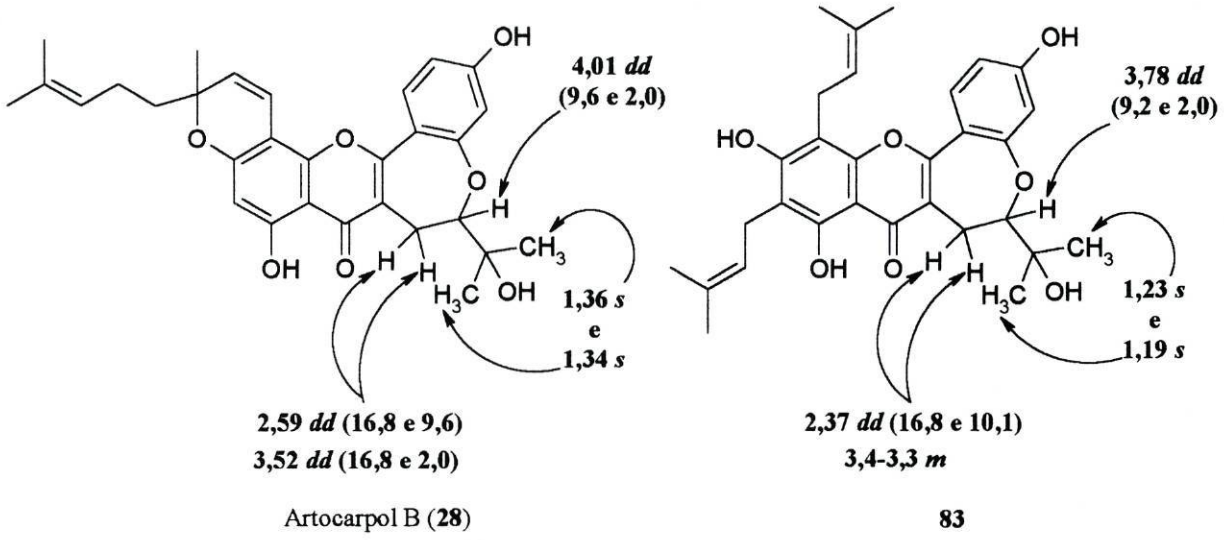
Na região dos protões alifáticos o espectro de RMN de ^{1}H do composto **83** mostrou os sinais característicos de dois grupos 3,3-dimetilalilo a δ 5,19 *t* (1H, *J* = 7,0 Hz), δ 5,12 *t* (1H, *J* = 7,0 Hz), δ 3,15 *d* (2H, *J* = 6,6 Hz), δ 3,4-3,3 (*m*, 2H), δ 1,71 *s* (3H), δ 1,69 *s* (3H) e δ 1,57 *s* (6H) [136]. A presença destes dois grupos foi confirmada pelos acoplamentos observados no espectro de COSY dos protões vinílicos a δ 5,19 *t* (*J* = 7,0 Hz) e δ 5,12 *t* (*J* = 7,0 Hz) com os protões metilénicos a δ 3,15 *d* (*J* = 6,6 Hz) e 3,4-3,3 *m*, respectivamente, bem como o acoplamento de ambos os protões vinílicos com os protões de quatro grupos metílicos a δ 1,71 *s* (3H), δ 1,69 *s* (3H) e δ 1,57 *s* (6H). A observação no espectro de RMN de ^{1}H do composto **83** destes sinais e a ausência do sinal de H-8 e H-6 sugeriu a presença de um anel A com um padrão de substituição idêntico ao da artelasticina (**79**) e artelastina (**80**).



[a], [b], [c] permutáveis entre si

Ao contrário do espectro de RMN de ^{1}H da artelasticina (**79**) e da artelastina (**80**), o espectro de RMN de ^{1}H do composto **83** não mostrou sinais que revelassem a existência de outro grupo 3,3-dimetilalilo em C-3, nem o dupleto (J = 9,4 Hz) a cerca de 6,0-6,3 ppm característico de H-9 do anel D (2-isobutenil-2*H*-oxino) da artelastina (**80**). Em vez disto, observou-se na região dos protões alifáticos um duplo dupleto de um protão a δ 3,78 (J = 9,2 e 2,0 Hz) que, através do espectro de COSY, estava acoplado com os protões do duplo dupleto a δ 2,37 (J = 16,8 e 10,1 Hz) e do multipleto entre δ 3,4-3,3. O protão a δ 2,37 *dd* (J = 16,8 e 10,1 Hz), por sua vez, encontrava-se acoplado com o protão a δ 3,4-3,3 *m*. Além destes sinais, o espectro de RMN de ^{1}H ainda mostrou dois singuletos de protões metílicos a δ 1,23 (3H) e δ 1,19 (3H). Os valores de deslocamento químico destes protões metílicos eram mais baixos do que os valores obtidos para os protões metílicos, tanto do grupo 3,3-dimetilalilo existente no C-3 da artelasticina (**79**), como do anel D da artelastina (**80**). Os valores de deslocamento químico, bem como os acoplamentos destes protões, aliados com a ausência do singuleto característico de H-3 a cerca de 7 ppm, sugeriram que o composto **83** devia possuir um anel hidroxiisopropiloxepino resultante da ciclização oxidativa entre o grupo hidroxilo de C-2' do anel B e o C-10 do grupo 3,3-dimetilalilo em C-3 da artelasticina (**79**).

De facto, os flavonóides que contêm o anel 2-hidroxiisopropiloxepino já foram isolados de várias plantas da família Moraceae [45, 46, 48, 168], nomeadamente do género *Artocarpus* [45, 46, 48]. Os valores do deslocamento químico e constantes de acoplamento dos protões do anel 2-hidroxiisopropiloxepino do composto **83** revelaram-se comparáveis aos correspondentes encontrados no artocarpol B (**28**) [48], uma flavona isoprenilada isolada da casca de *Artocarpus rigida* Bl.



Artocarpol B (**28**) **83**

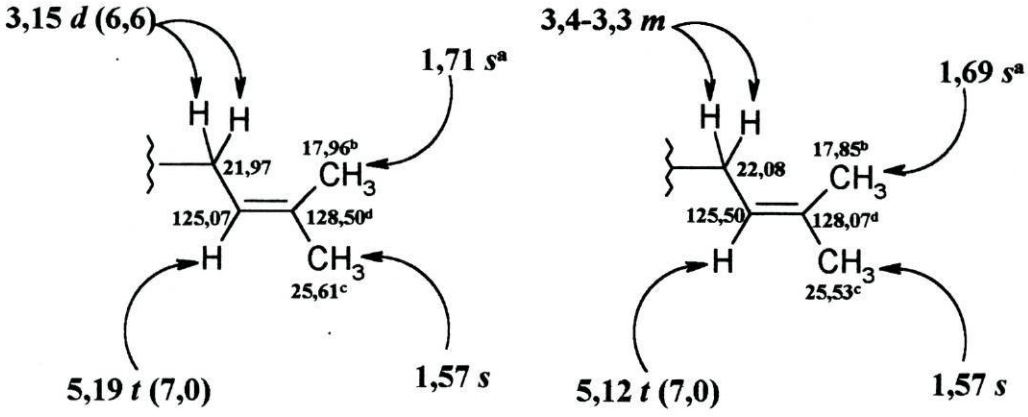
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT de 90° e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 14, pág. 157), bem como o espectro de HETCOR do composto **83** foram usados para comprovar a estrutura proposta.

O acoplamento observado no espectro de HETCOR entre os sinais de átomos de carbono a δ 129,25 (CH), δ 111,91 (CH) e δ 107,53 (CH) e os protões a δ 7,79 *d* (*J* = 8,8 Hz, H-6'), δ 6,59 *dd* (*J* = 8,8 e 2,2 Hz, H-5') e δ 6,48 *d* (*J* = 2,2 Hz, H-3') permitiu atribuir os sinais a δ 129,25, δ 111,91 e δ 107,53 aos carbonos das posições 6', 5' e 3', respectivamente.

O espectro de HETCOR evidenciou ainda o acoplamento entre os carbonos e os protões dos dois grupos 3,3-dimetilalilo.

δ ^{13}C		δ ^{1}H
125,50 (CH)	→	5,12 *t* (*J* = 7,0 Hz)
125,07 (CH)	→	5,19 *t* (*J* = 7,0 Hz)
25,61 (CH_3)	→	1,57 *s*
25,53 (CH_3)		
22,08 (CH_2)	→	3,4-3,3 *m*
21,97 (CH_2)	→	3,15 *d* (*J* = 6,6 Hz)
17,96 (CH_3)	→	1,71 *s*
17,85 (CH_3)	→	1,69 *s*

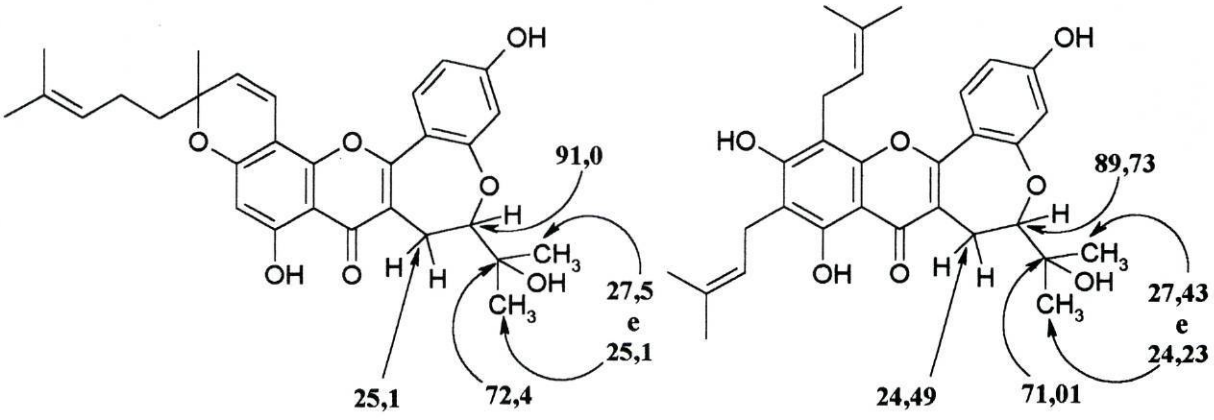
Estes acoplamentos e o aparecimento no espectro de RMN de ^{13}C dos sinais de carbonos olefínicos tetrassubstituídos a δ 128,50 e δ 128,07 permitiram a atribuição dos sinais de carbono para os dois grupos 3,3-dimetilalilo.



[a], [b], [c] permutáveis entre si

O assinalamento dos sinais a δ 25,61, δ 25,53, δ 17,96 e δ 17,85 aos quatro grupos metilvinílicos dos dois substituintes 3,3-dimetilalilo foi comprovado pelo aparecimento destes sinais no espectro de INEPT selectivo obtido por irradiação dos protões a δ 5,1. Deve-se notar que os valores de deslocamento químico dos carbonos da ligação dupla destes grupos 3,3--dimetilalilo eram bastante diferentes dos valores encontrados para os mesmos carbonos das flavonas discutidas anteriormente (**73**, **78-82**).

A comparação dos sinais do espectro de RMN do ^{13}C do composto **83** com os valores de deslocamento químico dos carbonos descritos para o anel hidroxiisopropiloxepino do artocarpol B (**28**) [48] confirmou a presença deste anel no composto **83**.

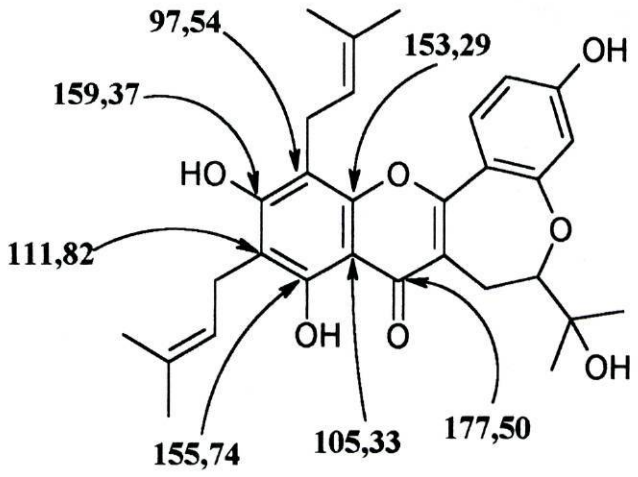


Artocarpol B (**28**) **83**

Estas atribuições foram confirmadas pelas correlações observadas no espectro de HETCOR entre os sinais seguintes:

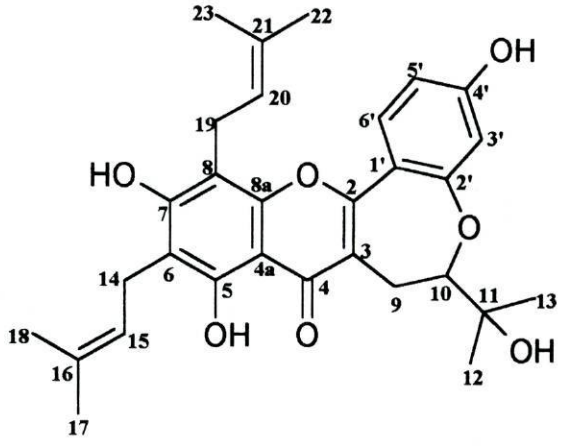
		δ ^{13}C		δ ^{1}H
CH-10	→	89,73	→	3,78 *dd* (J = 9,2 e 2,0 Hz)
CH_2-9	→	24,49	→	2,37 *dd* (J = 16,8 e 10,1 Hz) 3,4-3,3 *m*
CH_3-12	→	27,43	→	1,23 *s*
CH_3-13	→	24,23	→	1,19 *s*

O resto dos sinais de carbonos aromáticos neste espectro foi assinalado aos carbonos do anel A, tendo como base os valores de deslocamento químico dos carbonos deste anel na artelastina (**80**) e artelasticina (**79**). Além disso, a atribuição de C-5 a δ 155,74, C-6 a δ 111,82 e C-4a a δ 105,33 foi confirmada pela experiência de INEPT selectivo, em que a irradiação do protão de 5-OH a δ 13,17 *s* levou ao aparecimento dos respectivos sinais de carbono.



É de salientar que neste assinalamento o único sinal de carbono que restava para atribuir ao C-8 era a δ 97,54. Este valor foi bastante mais baixo que os valores de deslocamento químico de C-8 atribuídos para a artelasticina (**79**) e artelastina (**80**), cujos valores eram δ 105,06 e δ 105,45 ou δ 105,24, respectivamente.

O espectro de massa em FAB^+ (pág. 200) mostrou o pico de $M+H^+$ a m/e 507 u. m. a. Conjuntamente com os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estabeleceu-se a fórmula molecular $C_{30}H_{34}O_7$. Todos os dados espectroscópicos obtidos para o composto **83** levaram a propor a sua estrutura como:

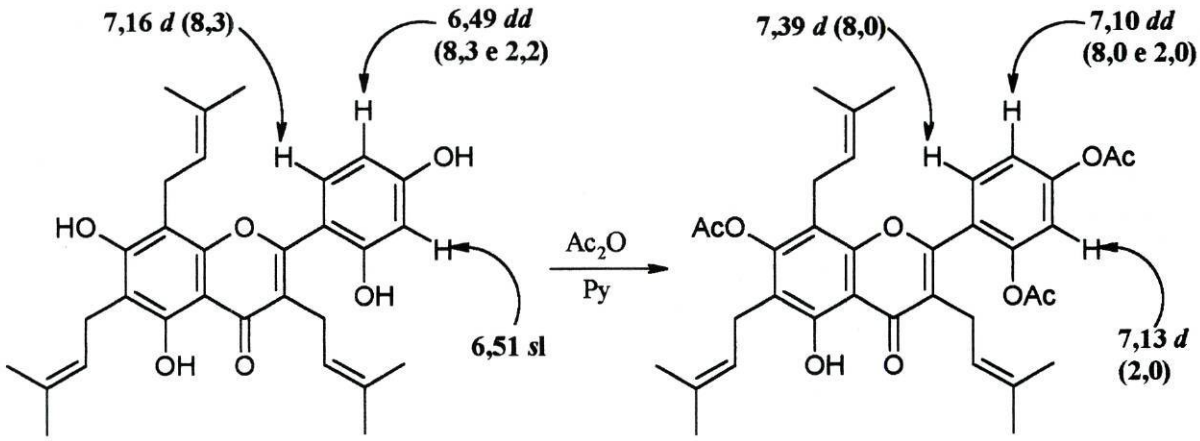


83

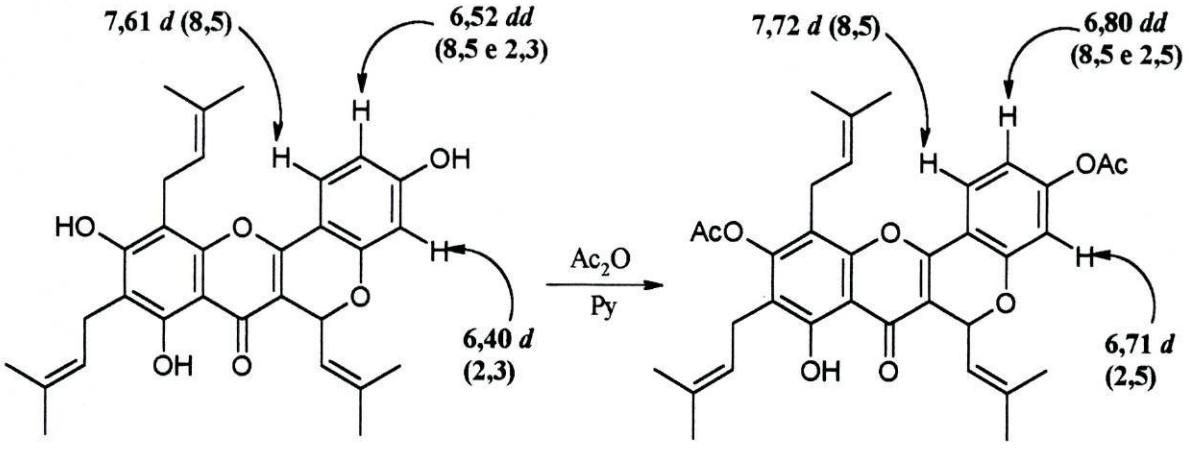
A pesquisa bibliográfica revelou que o composto com esta estrutura nunca tinha sido isolado nem sintetizado anteriormente. Consequentemente, tratava-se de um composto inédito, ao qual foi dado o nome de artelastinina. A grande diferença dos valores de deslocamento químico no espectro de RMN de ^{13}C do C-8 e dos carbonos da ligação dupla dos grupos 3,3-dimetilalilo no composto **83**, levou a que se pusesse em reserva a estrutura proposta.

Com o objectivo de confirmar a estrutura foi efectuada a acetilação do composto **83** do modo usual (Ac_2O/Py, pág. 191). O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em $CDCl_3$ do derivado acetilado (**83Ac**) (Tabela 15, pág. 158) mostrou dois singuletos a δ 2,26 e δ 2,04, de três protões cada, típicos dos protões metílicos de dois grupos acetoxilo, mantendo-se o singuleto do protão hidroxílico em ponte de hidrogénio a δ 12,92. Estes sinais demonstraram que o composto **83Ac** era um derivado diacetilado que mantinha o grupo hidroxilo em C-5.

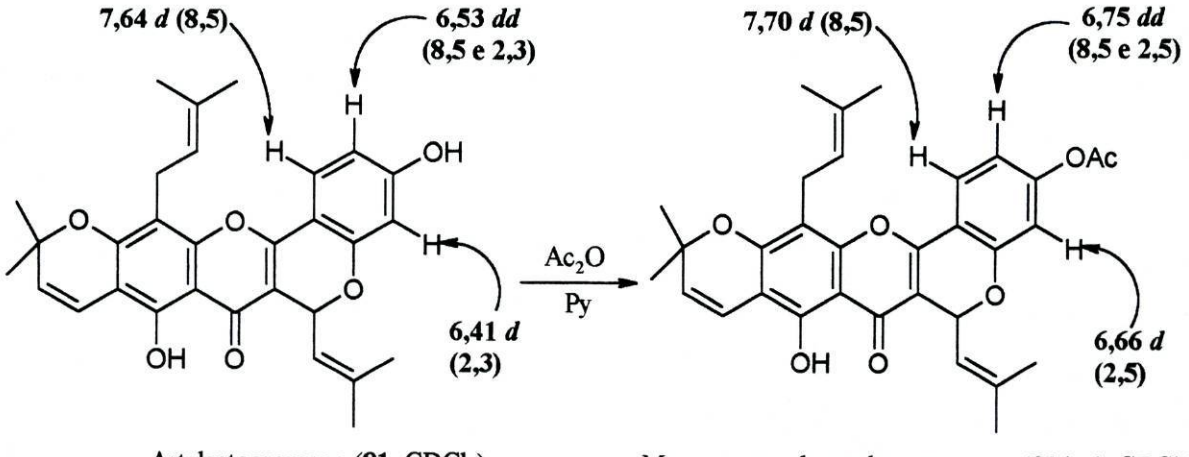
Na região dos protões aromáticos observaram-se dois dupletos a δ 7,37 (J = 9,0 Hz) e δ 7,07 (J = 2,2 Hz) acoplados, de acordo com o espectro de COSY, com um duplo dupleto a δ 7,06 (J = 8,8 e 2,2 Hz). Comparando os valores dos deslocamentos químicos destes sinais com os dos derivados acetilados da artelasticina (**79Ac**), artelastina (**80Ac**), artelastocromeno (**81Ac1**) e artelastofurano (**82Ac**) concluiu-se que o anel B do composto **83Ac** tinha um padrão de substituição idêntico ao dos derivados acetilados da artelasticina (**79Ac**) e do artelastofurano (**82Ac**).



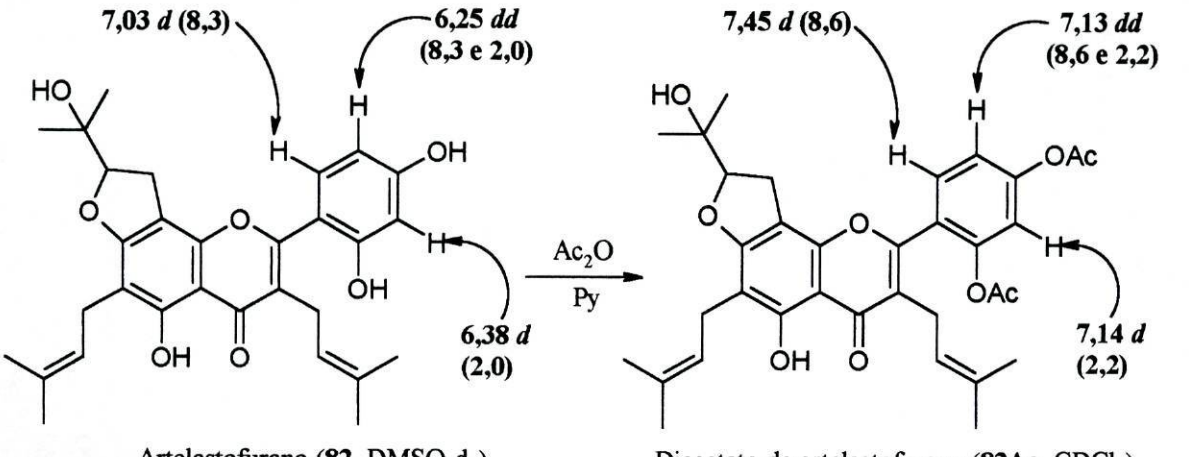
Artelasticina (**79**, $CDCl_3$) Triacetato de artelasticina (**79Ac**, $CDCl_3$)



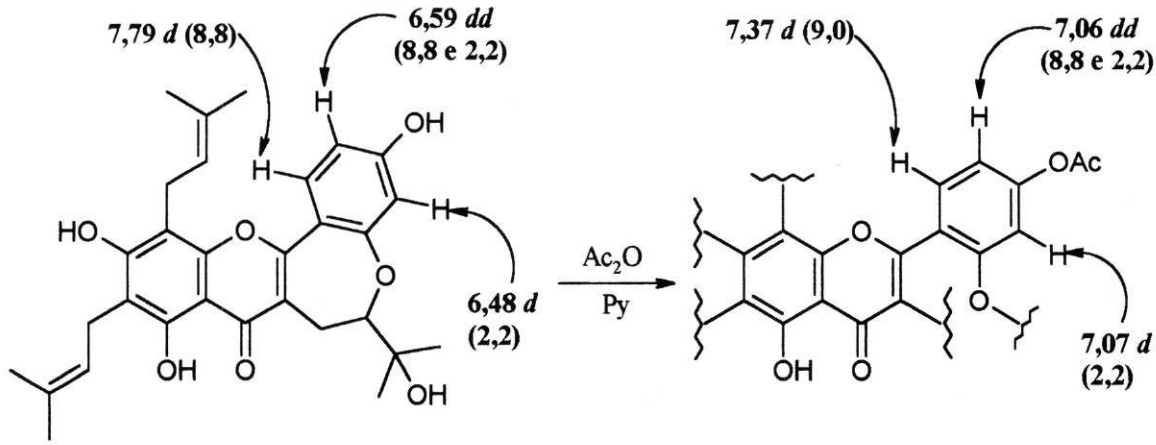
Artelastina (**80**, $CDCl_3$) Diacetato de artelastina (**80Ac**, $CDCl_3$)



Artelastocromeno (**81**, $CDCl_3$) Monoacetato de artelastocromeno (**81Ac1**, $CDCl_3$)



Artelastofurano (**82**, DMSO-d_6) Diacetato de artelastofurano (**82Ac**, $CDCl_3$)



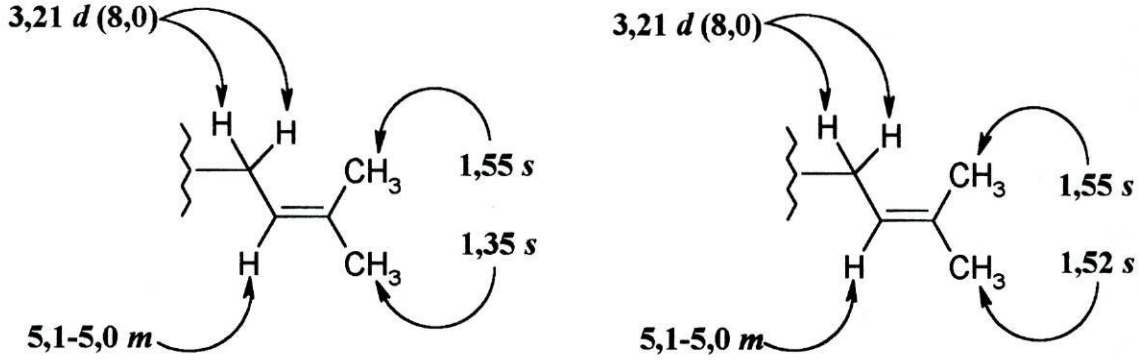
Artelastinina (**83**, DMSO-d_6) Diacetato de artelastinina (**83Ac**, $CDCl_3$)

O maior efeito paramagnético (desprotecção) sofrido pelos H-3' e H-5', após acetilação do composto **83,** relativamente aos efeitos provocados pela acetilação da artelastina (**79**) e do artelastocromeno (**81**) sugeriu que o anel B do composto **83Ac** devia possuir dois grupos acetoxilo em C-4' e C-2'. Consequentemente, não poderia haver este grupo acetoxilo no anel A. O facto de H-6' aparecer a valor de deslocamento químico mais baixo no diacetato de artelastinina (**83Ac**) (δ 7,37 *d*, *J* = 9,0 Hz) do que no composto original (δ 7,79 *d*, *J* = 8,8 Hz) levou a sugerir que, ao ocorrer a acetilação, o anel 2-hidroxiisopropiloxepino do composto **83** sofreu uma abertura, formando o grupo hidroxilo em C-2', que a seguir foi acetilado pelo anidrido acético na presença de piridina.

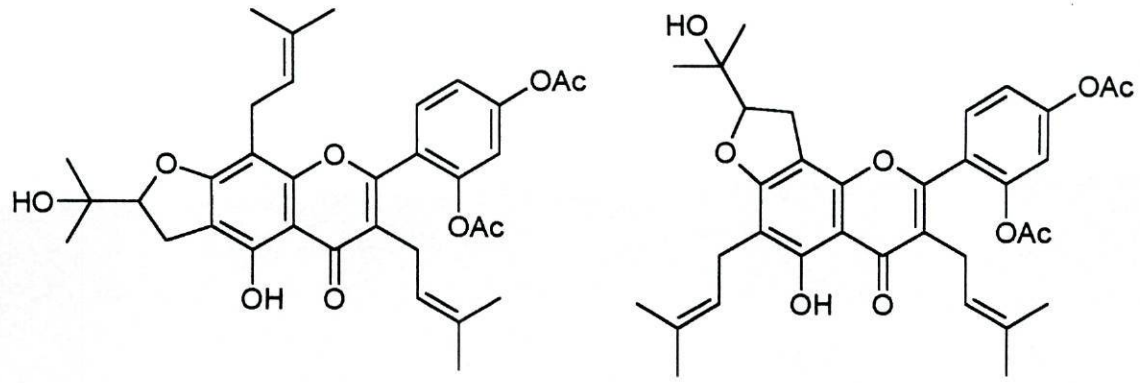
Ao contrário do espectro de RMN de ^{1}H da artelastinina (**83**), o espectro de RMN de ^{1}H do seu diacetato (**83Ac**) não mostrou os sinais característicos de protões do anel 2-hidroxi-isopropiloxepino a δ 3,78 *dd* (*J* = 9,2 e 2,0 Hz, H-10), δ 3,4-3,3 *m* (H-9a) e δ 2,37 *dd* (*J* = 16,8 e 10,1 Hz, H-9b) do composto **83**. Em vez disto, observaram-se três duplos dupletos a δ 4,70 *dd* (*J* = 9,1 e 8,0 Hz), δ 3,15 *dd* (*J* = 16,0 e 9,5 Hz) e δ 3,06 *dd* (*J* = 16,0 e 8,0 Hz) e dois singuletos a δ 1,26 e δ 1,15, característicos de sinais dos protões do anel 2-hidroxiisopropil-*-2H,3H*-diidrofurano, como foi observado no espectro de RMN de ^{1}H do artelastofurano (**82**). O espectro de COSY do composto **83Ac** mostrou o acoplamento entre os protões a δ 3,15 *dd* (*J* = 16,0 e 9,5 Hz) e a δ 3,06 *dd* (*J* = 16,0 e 8,0 Hz) e de cada um deles com o protão a δ 4,70 *dd* (*J* = 9,1 e 8,0 Hz).

Na região dos protões alifáticos observaram-se ainda os sinais dos protões de dois grupos 3,3-dimetilalilo a δ 5,1-5,0 *m* (2H), δ 3,21 *d* (*J* = 8,0 Hz, 4H), δ 1,55 *s* (6H), δ 1,52 *s*

(3H) e δ 1,35 *s* (3H). O espectro de COSY revelou que os protões a δ 5,1-5,0 *m* (2H) estavam acoplados com os protões metilénicos a δ 3,21 *d* (*J* = 8,0 Hz, 4H) e os protões metílicos a δ 1,55 *s* (6H), δ 1,52 *s* (3H) e δ 1,35 *s* (3H).



Como já foi mencionado que o anel B do composto **83Ac** continha os grupos acetoxilo nas posições 2' e 4', um dos grupos 3,3-dimetilalilo tinha que estar ligado a C-3 e o outro a C-6 ou C-8 do anel A. Consequentemente, o anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano devia estar no anel A na posição linear (estrutura **102**) ou angular (estrutura **103**) com o núcleo flavónico.

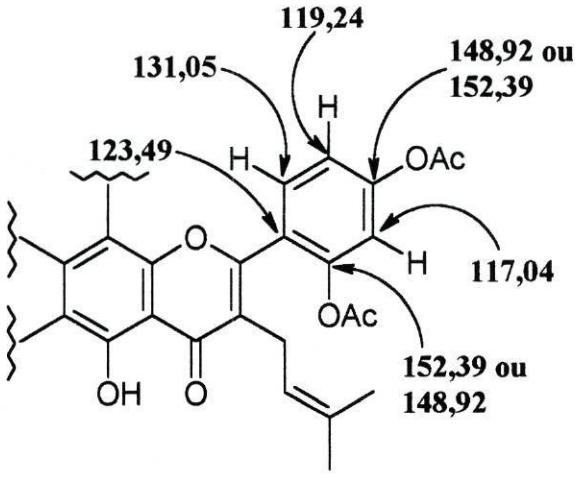


102 **103**

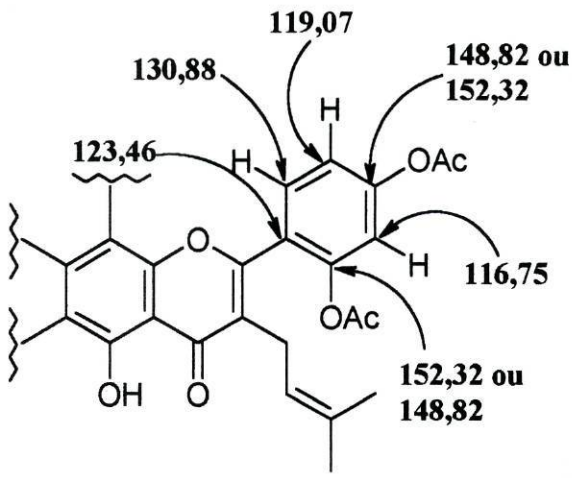
A estrutura **103** correspondia à do diacetato de artelastofurano (**82Ac**) anteriormente descrito.

Numa tentativa de averiguar se o composto **83Ac** correspondia às estruturas **102** ou **103** recorreu-se aos espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT de 90° e 135°) (Tabela 16, pág. 159) e HETCOR. O espectro de HETCOR do composto **83Ac** mostrou os acoplamentos dos carbonos a δ 130,88 (CH), δ 119,07 (CH) e δ 116,75 (CH) com os protões a δ 7,37 *d* (*J* = 9,0

Hz, H-6'), δ 7,06 *dd* (*J* = 8,8 e 2,2 Hz, H-5') e δ 7,07 *d* (*J* = 2,2 Hz, H-3'), respectivamente. Estes valores eram muito semelhantes aos dos sinais atribuídos para o C-6', C-5' e C-3' do anel B do diacetato de artelastofurano (**82Ac**).



Diacetato de artelastofurano (**82Ac**)



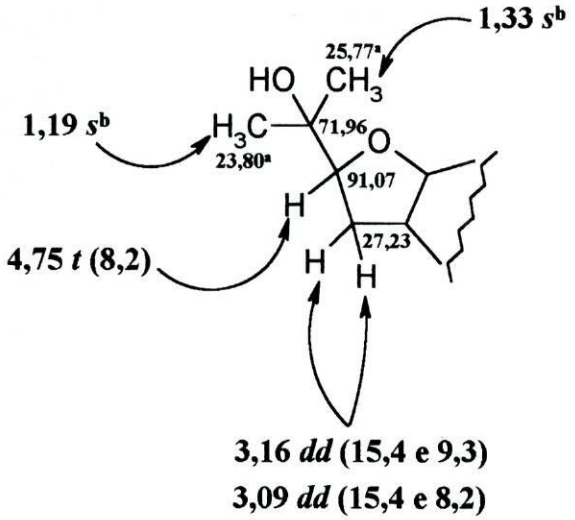
Diacetato de artelastinina (**83Ac**)

Baseados nos valores de deslocamento químico atribuídos a C-1', C-2' e C-4' do anel B do artelastofurano (**82Ac**), o sinal do carbono a δ 123,46 (C) foi atribuído ao C-1' e os sinais a δ 152,32 (C) e δ 148,82 (C) foram assinalados aos carbonos das posições 2' e 4' do anel B.

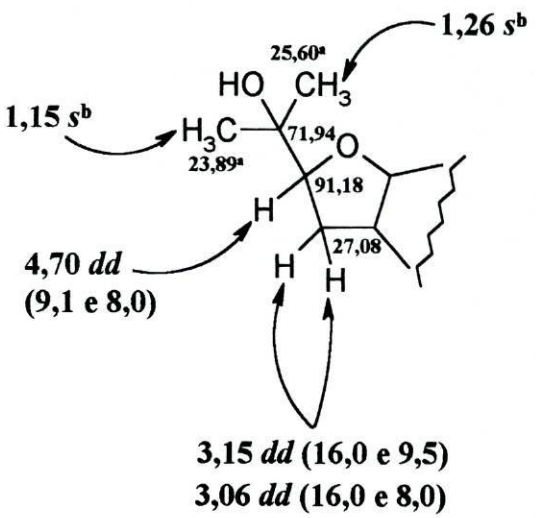
Em relação aos carbonos do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano, o espectro de HETCOR mostrou os acoplamentos entre:

- o carbono a δ 91,18 (CH) e os protões a δ 4,70 *dd* (*J* = 9,1 e 8,0 Hz);
- o carbono a δ 27,08 (CH_2) e os protões a δ 3,15 *dd* (*J* = 16,0 e 9,5 Hz) e δ 3,06 *dd* (*J* = 16,0 e 8,0 Hz);
- os carbonos a δ 25,60 (CH_3) e δ 23,89 (CH_3) e os protões a δ 1,26 *s* e δ 1,15 *s*, respectivamente.

Estes acoplamentos, o sinal a δ 71,94 (C) observado no espectro de RMN de ^{13}C e a comparação com o espectro correspondente do diacetato de artelastofurano (**82Ac**) permitiram atribuir os sinais de carbono para este anel no composto **83Ac**.



Diacetato de artelastofurano (**82Ac**)

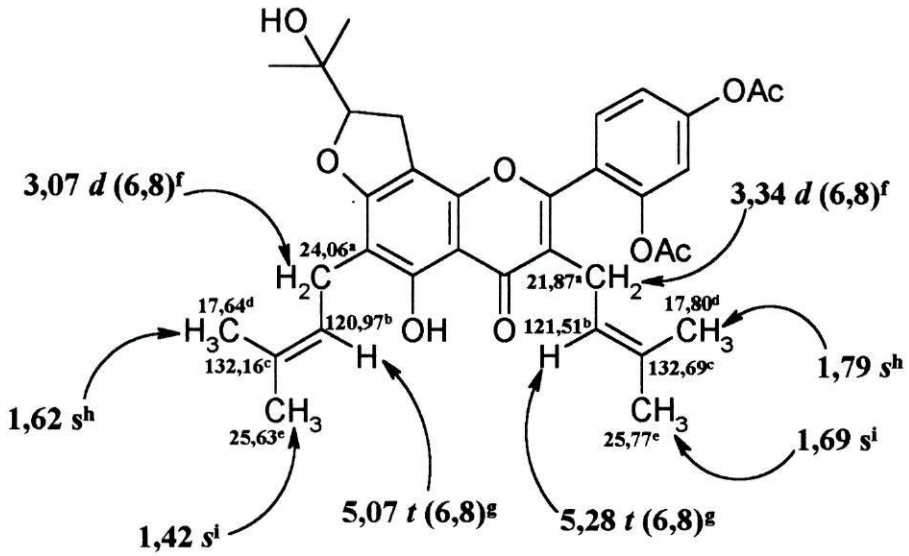


Diacetato de artelastinina (**83Ac**)

[a], [b] permutaveis entre si

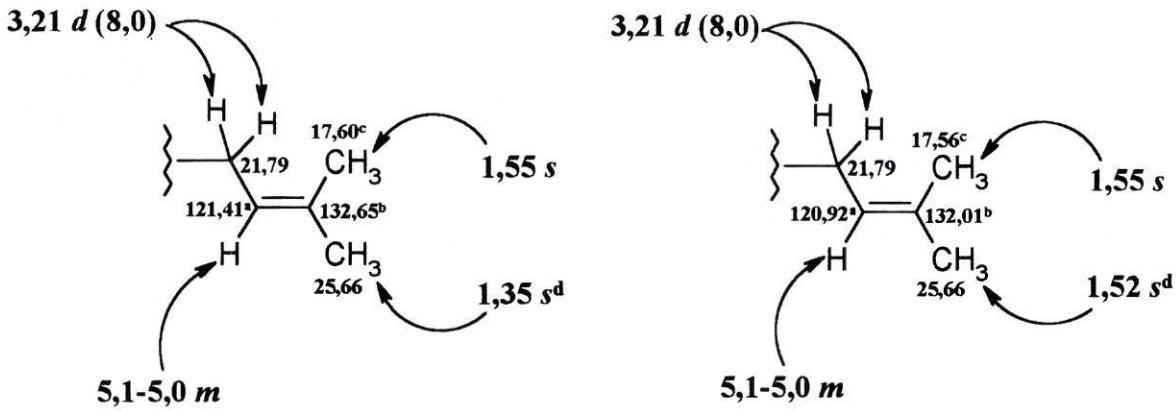
Os seus valores de deslocamento químico de ^{1}H e ^{13}C revelaram-se muito semelhantes aos do diacetato do artelastofurano (**82Ac**) e não permitiram concluir se este anel estaria na orientação linear ou angular.

Com o objectivo de verificar a orientação deste anel diidrofurano fez-se a comparação entre os valores de deslocamento químico de ^{1}H e ^{13}C dos grupos 3,3-dimetilalilo do diacetato de artelastofurano (**82Ac**) com os do composto **83Ac**. No derivado acetilado do artelastofurano (**82Ac**) obtiveram-se os seguintes valores de deslocamento químico:



[a], [b], [c], [d], [e], [f], [g], [h] e [i] permutáveis entre si

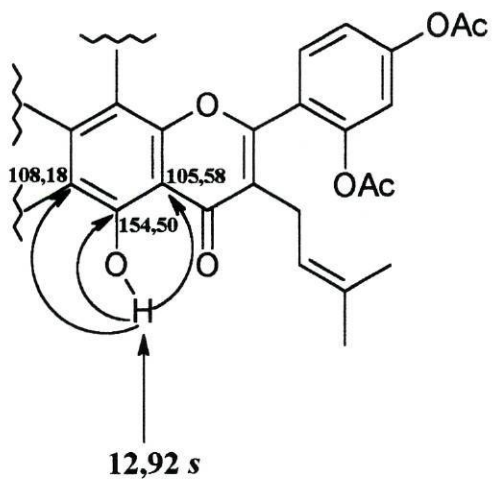
Através do espectro de HETCOR foi possível assinalar os sinais dos carbonos dos grupos 3,3-dimetilalilo do composto **83Ac**.



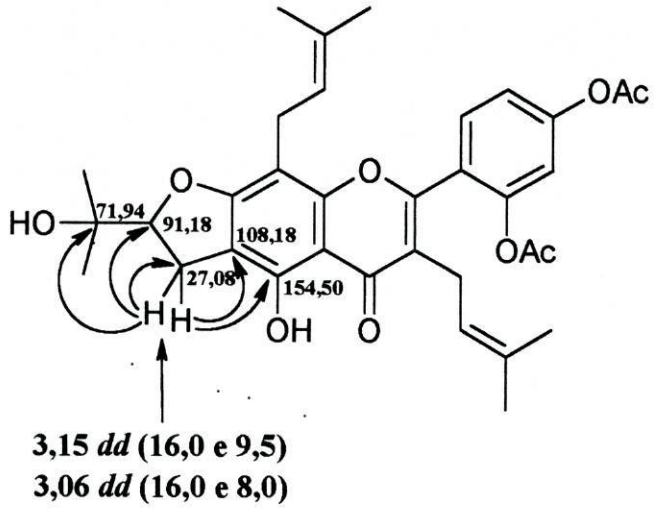
[a], [b], [c] e [d] permutáveis entre si

Mais uma vez, não foi possível concluir sobre a localização dos grupos 3,3-dimetilalilo no composto **83Ac** através dos seus valores de deslocamento químico de ^{1}H e ^{13}C.

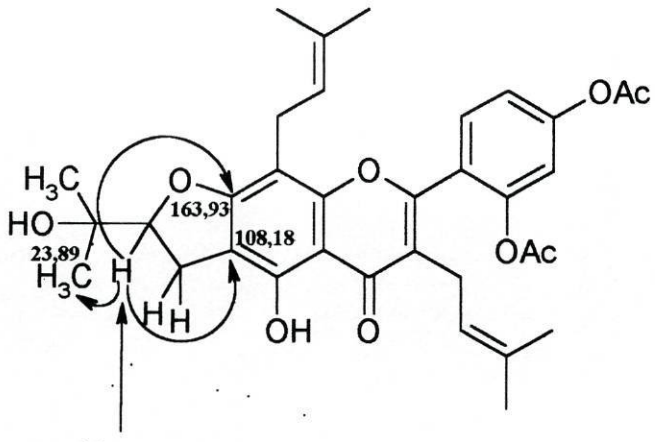
A última tentativa para estabelecer a orientação do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano foi por experiências de INEPT selectivo. Assim, ao irradiar o protão do 5-OH a δ 12,92 verificou-se o aparecimento dos sinais de carbono a δ 154,50 (C), δ 108,18 (C) e δ 105,58 (C). Consequentemente o sinal a δ 154,50 (C) foi assinalado a C-5, enquanto que os sinais a δ 108,18 (C) e δ 105,58 (C) foram assinalados a C-7 e C-4a, de acordo com os valores atribuídos às flavonas anteriormente mencionadas.



A estratégia a seguir foi tentar irradiar um dos protões metilénicos do anel diidrofurano e observar se existia o aparecimento do sinal de C-6 a δ 108,18 (C). Caso o anel diidrofurano estivesse na orientação linear com o núcleo flavónico, a irradiação dos protões metilénicos deste anel iria causar o aumento da intensidade de C-6 e, consequentemente, mostrar o sinal a δ 108,18 (C). Assim, a irradiação da frequência do protão a cerca de 3,1 ppm causou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 154,50 (C), δ 108,18 (C), δ 91,18 (CH), δ 71,94 (C) e δ 27,08 (CH_2). Este resultado permitiu concluir que o anel 2-hidroxiisopropil-*-2H,3H*-diidrofurano estava na orientação linear com o núcleo flavónico e que o outro grupo 3,3-dimetilalilo estava no C-8.



As experiências de INEPT selectivo ainda permitiram atribuir outros sinais de carbono. A irradiação do protão a δ 4,70 *dd* (*J* = 9,1 e 8,0 Hz) levou ao aparecimento dos sinais de carbono a δ 108,18 (C-6), δ 23,89 (CH_3-17 ou 18) e δ 163,93 (C), permitindo o assinalamento deste último sinal a C-7.

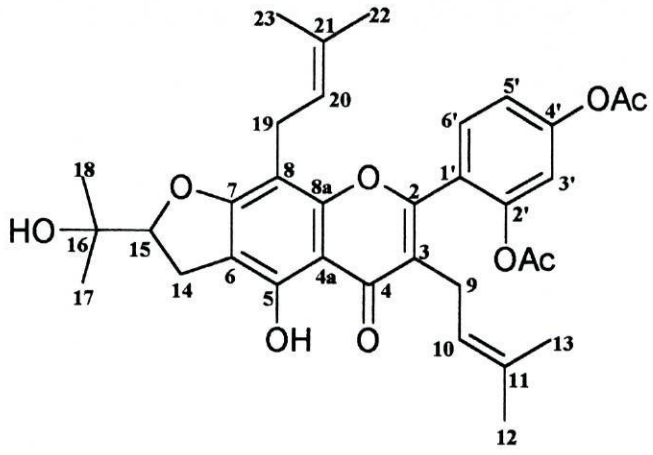


4,70 *dd* (9,1 e 8,0)

A irradiação da frequência de H-6' (≈ 7,4 ppm) revelou o aparecimento dos sinais a δ 158,02 (C), δ 152,32 (C) e δ 148,82 (C), indicando que o sinal a δ 158,02 correspondia a C-2 e que os sinais a δ 152,32 e δ 148,82 eram de C-2' e C-4'. A irradiação da frequência de H-3' e H-5' (≈ 7,1 ppm) mostrou os sinais a δ 152,32 (C), δ 148,82 (C) e δ 123,46 (C), confirmando o anterior assinalamento para os carbonos do anel B.

A irradiação da frequência dos protões metílicos dos grupos 3,3-dimetilalilo foi importante para confirmar a sua localização. Assim, a irradiação dos protões metílicos a cerca de 1,5 ppm (CH_3-12, CH_3-13, CH_3-22 e CH_3-23) provocou o aparecimento dos sinais de carbono a δ 132,65 (C-11 ou 21), δ 132,01 (C-21 ou 11), δ 121,41 (CH-10 ou 20), δ 120,92 (CH-20 ou 10), δ 25,66 (CH_3-12 e 22), δ 17,60 e δ 17,56 (CH_3-13 e 23), bem como o sinal a δ 101,85 (C). Este sinal foi atribuído a C-8, confirmando a posição de um grupo 3,3-dimetilalilo neste carbono.

Os dados espectrais descritos para o derivado acetilado do composto **83** (**83Ac**) levaram a concluir que este composto possuía a seguinte estrutura:

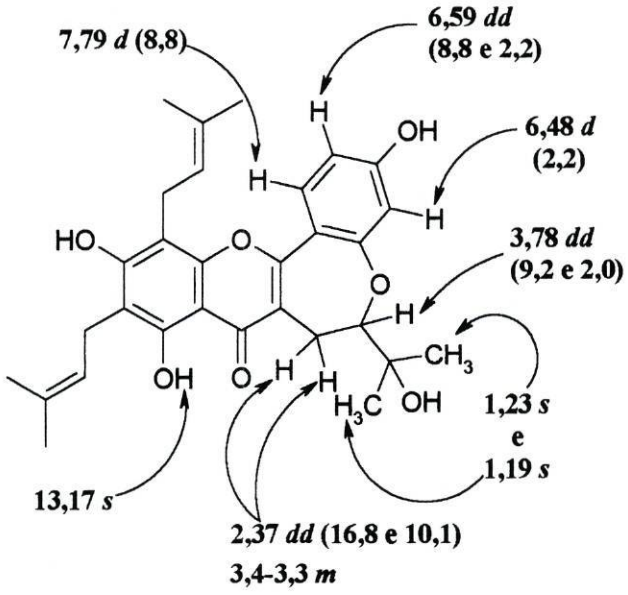


Esta estrutura podia ser originada pela abertura do anel 2-hidroxiisopropiloxepino e posterior acetilação dos grupos hidroxilo em C-2' e C-4', com o rearranjo concomitante que resultou da adição nucleofílica do grupo hidroxilo no C-7 à ligação dupla do grupo 3,3-dimetilalilo em C-6.

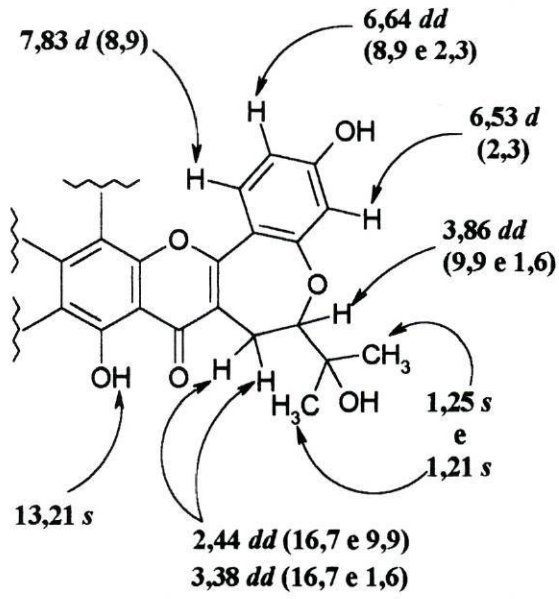
Numa tentativa de obter maior quantidade do composto **83** para a realização de ensaios de actividade biológica isolou-se outro composto (**84**), a partir das fracções obtidas a seguir da mesma cromatografia em coluna, cujo valor do factor de retenção (Rf) observado no cromatograma de CCF e os dados espectroscópicos de IV (pág. 201), UV (pág. 202), RMN de ^{1}H (Tabela 13, pág. 156) e ^{13}C (Tabela 14, pág. 157) se revelaram quase idênticos aos da artelastinina (**83**). Ao contrário da artelastinina (**83**) que era um liquido viscoso, o composto **84** apresentou-se sob a forma de cristais amarelos (PF = 207-210 °C).

O espectro de RMN de ^{1}H a 300 MHz em DMSO-d_6 do composto **84** (Tabela 13, pág. 156) evidenciou, além do sinal do protão do grupo hidroxilo em C-5 a δ 13,21 *s*, dois singuletos largos de dois grupos hidroxilo fenólicos a δ 10,32 e δ 9,66. Na região dos protões aromáticos observaram-se sinais de três protões com valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento semelhantes aos dos protões do anel B da artelastinina (**83**) a δ 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6'), δ 6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz, H-5') e δ 6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3'). A região dos protões alifáticos revelou a presença de um protão a δ 3,86 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz) acoplado, de acordo com o espectro de COSY (Tabela 17, pág. 160), com ambos os protões a δ 3,38 *dd* (1H, *J* = 16,7 e 1,6 Hz) e δ 2,44 *dd* (1H, *J* = 16,7 e 9,9 Hz), encontrando-se estes

últimos acoplados entre si no espectro de COSY (Tabela 17, pág. 160). Estes sinais e a observação no espectro de RMN de ^1H do composto **84** de dois protões metílicos a δ 1,25 *s* e δ 1,21 *s* sugeriram que devia existir um anel hidroxiisopropiloxepino semelhante ao da artelastinina (**83**).



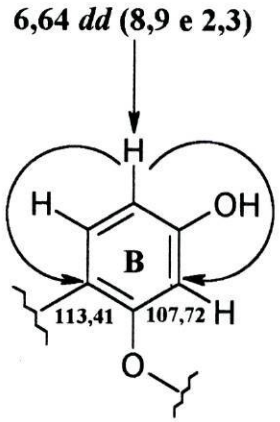
Artelastinina (**83**)



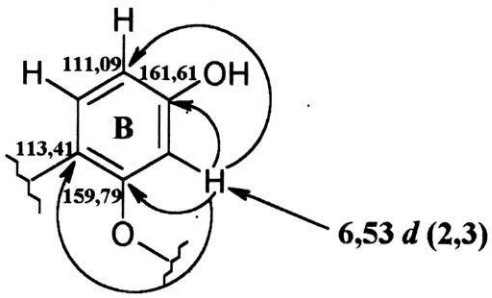
84

Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90 e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 14, pág. 157) mostraram os sinais de carbonos metínicos correspondentes a C-6', C-5' e C-3' do anel B a δ 129,89, δ 111,09 e δ 107,72, respectivamente. Os valores de deslocamento químico são muito próximos dos valores observados para os mesmos carbonos da artelastinina (**83**). Esta atribuição foi também confirmada pelos acoplamentos observados nos espectro de HETCOR (Tabela 18, pág. 160). O assinalamento de C-1', C-2' e C-4' do anel B bem como de C-2 foi auxiliado pelo espectro de HMBC (Tabela 19, pág. 161). Neste espectro observaram-se os seguintes acoplamentos:

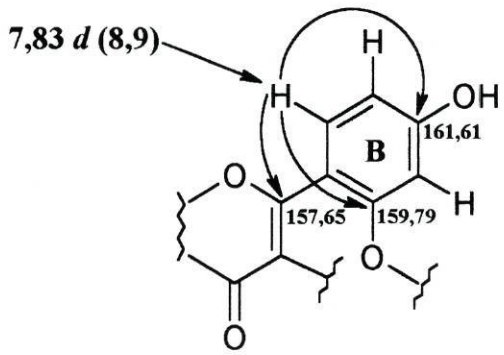
- entre o protão a δ 6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz, H-5') e ambos os carbonos a δ 113,41 (C) e δ 107,72 (CH-3'), permitindo assinalar o sinal a δ 113,41 ao C-1';



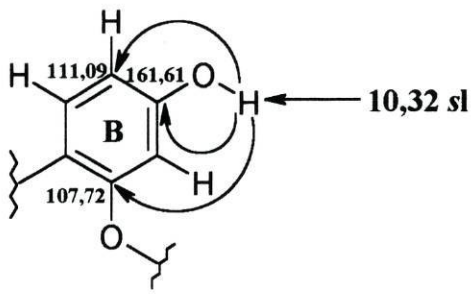
- entre o protão a δ 6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3') e os carbonos a δ 161,62 (C), δ 159,79 (C), δ 113,41 (C-1') e δ 111,09 (CH-5'), indicando que os sinais a δ 161,61 e δ 159,80 correspondiam a C-4' e 2';



- entre o protão a δ 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6') e os carbonos a δ 161,61 (C-4'), δ 159,79 (C-2') e δ 157,65 (C), sugerindo que este último sinal correspondia a C-2;

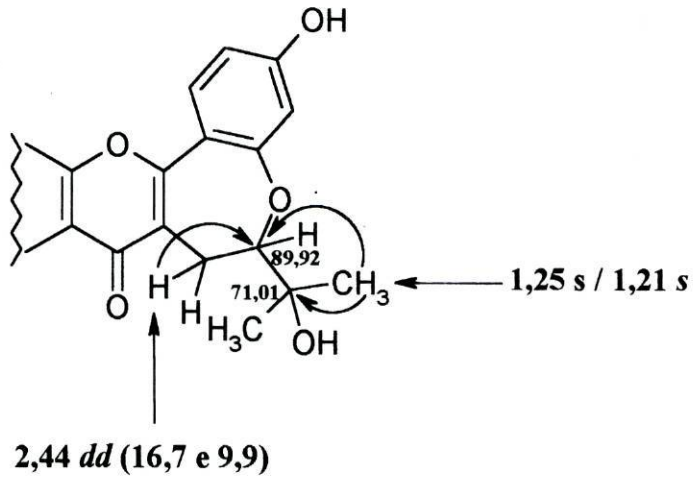


- entre o protão a δ 10,32 *sl* e os carbonos a δ 161,61 (C-4'), δ 111,09 (CH-5') e δ 107,72 (CH-3'), permitindo concluir que o singuleto largo a δ 10,32 correspondia ao protão fenólico em 4'.

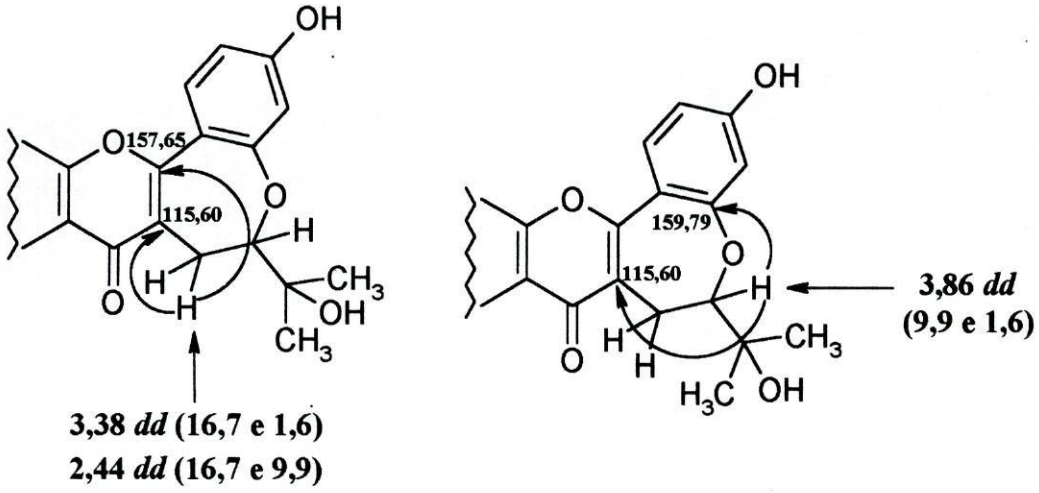


É importante notar que o espectro de HMBC do composto **84** permitiu o assinalamento inequívoco de C-1', C-2' e C-4' do anel B, bem como C-2 do anel C.

Os valores de deslocamento químico dos carbonos do anel 2-hidroxiisopropiloxepino do composto **84** também eram compatíveis com os observados para a artelastinina (**83**). Os valores de deslocamento químico de C-9 (δ 24,08), C-10 (δ 89,92), C-12 e C-13 (δ 27,33 e δ 24,35) foram confirmados pelo espectro de HETCOR (Tabela 18, pág. 160). A atribuição do sinal a δ 71,01 ao C-11 foi confirmada pela observação de acoplamentos no espectro de HMBC. Neste espectro observaram-se, além do acoplamento entre H-9b (δ 2,44 *dd*, J = 16,7 e 9,9 Hz) e C-10 (δ 89,92), os acoplamentos de H-12 e H-13 (δ 1,25 *s* e δ 1,21 *s*) com C-10 (δ 89,92) e C-11 (δ 71,01).



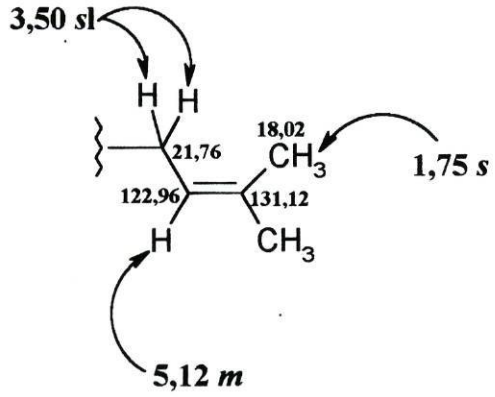
Além disto, o espectro de HMBC evidenciou ainda o acoplamento dos protões geminais a δ 3,38 *dd* (*J* = 16,7 e 1,6 Hz) e δ 2,44 *dd* (*J* = 16,7 e 9,9 Hz) com os carbonos a δ 157,65 (C-2) e δ 115,60 (C) e entre o protão oximetínico a δ 3,86 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz) e os carbonos a δ 159,79 (C-2') e δ 115,60 (C). Estes acoplamentos permitiram atribuir o sinal a δ 115,60 (C) ao C-3.



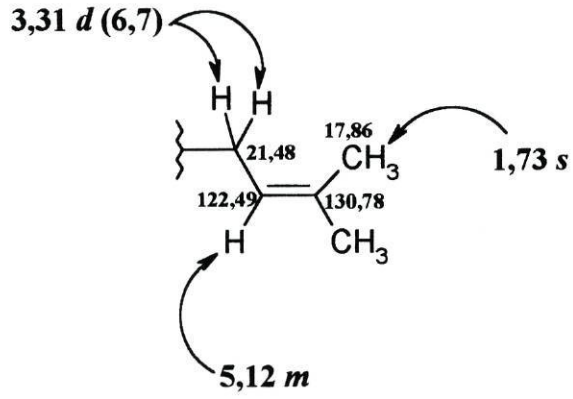
A presença de dois grupos 3,3-dimetilalilo no anel A foi apoiada pela ausência de outros sinais de protões aromáticos, além de H-3', H-5' e H-6', bem como pela presença dos sinais característicos destes grupos a δ 5,12 *m* (2H), δ 3,50 *sl* (2H), δ 3,31 *d* (2H, *J* = 6,7 Hz), δ 1,75 *s* (3H), δ 1,73 *s* (3H) e 1,62 *s* (6H) [136]. A presença destes dois grupos foi confirmada

pelos acoplamentos observados no espectro de COSY (Tabela 17, pág. 160) e HETCOR (Tabela 18, pág. 160). O espectro de HMBC foi também decisivo para assinalar os carbonos e protões de cada grupo 3,3-dimetilalilo. Este espectro mostrou os seguintes acoplamentos:

- entre o protão a δ 3,50 *sl* e os carbonos a δ 131,12 e δ 122,96, estando estes carbonos por sua vez acoplados com os protões a δ 1,75 *s*. De acordo com estes acoplamentos e os observados no espectro de HETCOR (Tabela 18, pág. 160) foi possível assinalar os carbonos e protões a seguir indicados.

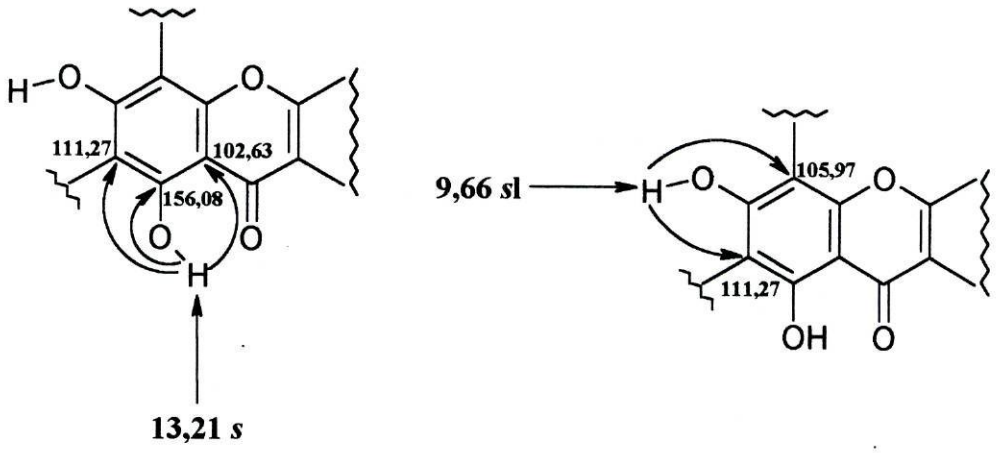


- entre o protão a δ 3,31 *d* (2H, J = 6,7 Hz) e os carbonos a δ 130,78 (C) e δ 122,49 (CH), estando estes carbonos por sua vez acoplados com os protões a δ 1,73 *s*. Estes acoplamentos e os observados no espectro de HETCOR (Tabela 18, pág. 160) permitiram assinalar os carbonos e protões a seguir indicados.

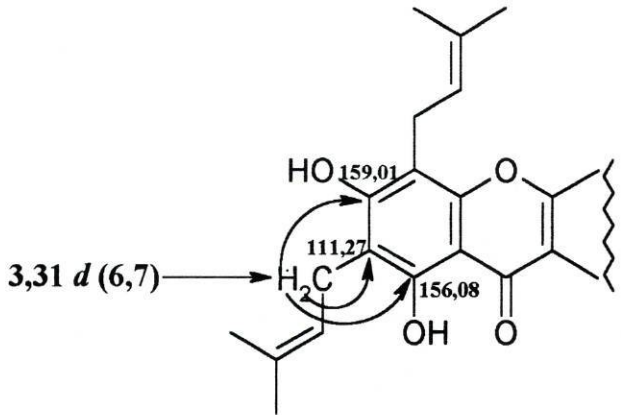


- entre os protões a δ 5,12 *m* e os carbonos metílicos a δ 25,58, δ 25,48, δ 18,02 e δ 17,86. Como o sinal a δ 5,12 *m* correspondia a ambos os protões vinílicos não foi possível distinguir entre os carbonos a δ 25,58 e δ 25,48.

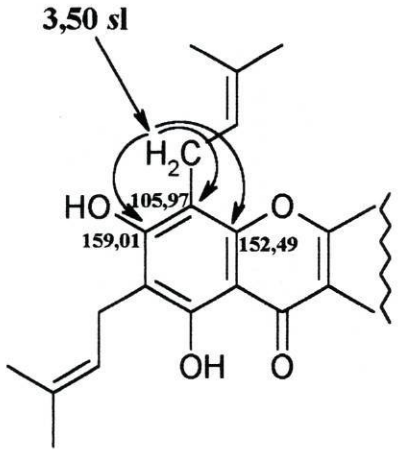
O espectro de HMBC, além de ter permitido o assinalamento inequívoco de carbonos e protões dos grupos 3,3-dimetilalilo, foi ainda útil para determinar a sua localização. Este espectro evidenciou as correlações entre o singuleto a δ 13,21 (OH-5) e os sinais de carbonos a δ 156,08 (C), δ 111,27 (C) e δ 102,63 (C) que foram atribuídos a C-5, C-6, e C-4a, respectivamente. O acoplamento observado entre o protão hidroxílico a δ 9,66 *sl* e os carbonos a δ 111,27 (C-6) e δ 105,97 (C), indicou que este grupo hidroxilo estava no C-7 e que o sinal a δ 105,97 (C) correspondia a C-8.



Após o assinalamento inequívoco dos carbonos do anel A foi possível determinar a posição dos grupos 3,3-dimetilalilo através da observação dos acoplamentos entre os protões metiléncos deste grupo e os carbonos do anel A. Assim, o acoplamento dos protões metilénicos de um grupo 3,3-dimetilalilo a δ 3,31 *d* (J = 6,7 Hz) com os carbonos a δ 159,01 (C), δ 156,08 (C-5) e δ 111,27 (C-6) permitiu concluir que este grupo era substituinte em C-6 e que o sinal do carbono a δ 159,01 correspondia a C-7.



Por sua vez, o acoplamento dos protões metilénicos de outro grupo 3,3-dimetilalilo a δ 3,50 *sl* com os carbonos a δ 159,01 (C-7), δ 152,49 (C) e δ 105,97 (C-8) revelou que este grupo estava no C-8 e que o sinal de carbono a δ 152,49 seria de C-8a.

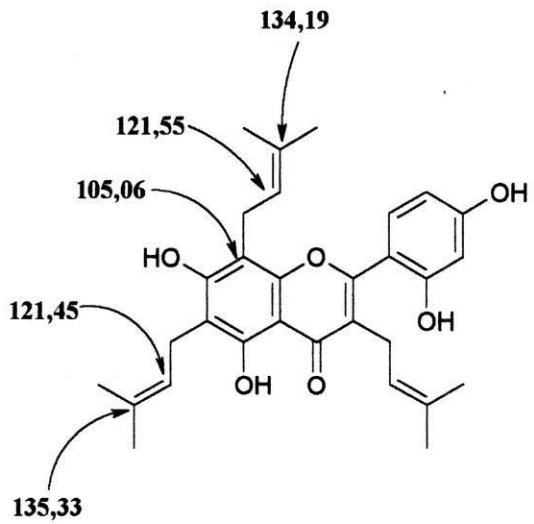


O espectro de massa de alta resolução de FAB^+ em NBA (pág. 201) do composto **84** mostrou o pico de $M+H^+$ a m/e 507,2383 u.m.a. (calculado para $C_{30}H_{35}O_7$ = 507,2389), que permitiu estabelecer para este composto a fórmula molecular $C_{30}H_{34}O_7$.

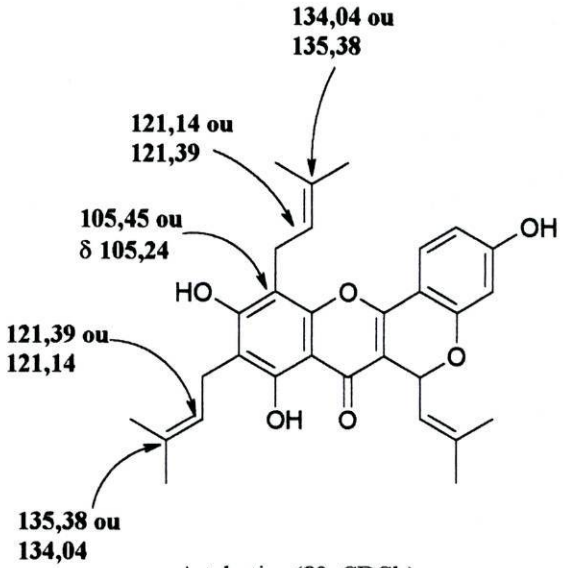
Pelos dados espectroscópicos descritos concluiu-se que a estrutura do composto **84** era a proposta anteriormente para a artelastinina (**83**), tendo-se atribuído a esta estrutura a designação de artelastocarpina. A artelastinina (**83**) seria um isómero da artelastocarpina (**84**),

cuja estrutura não foi possível averiguar uma vez que não se dispunha de mais quantidade deste composto para fazer o espectro de HMBC e de massa de alta resolução.

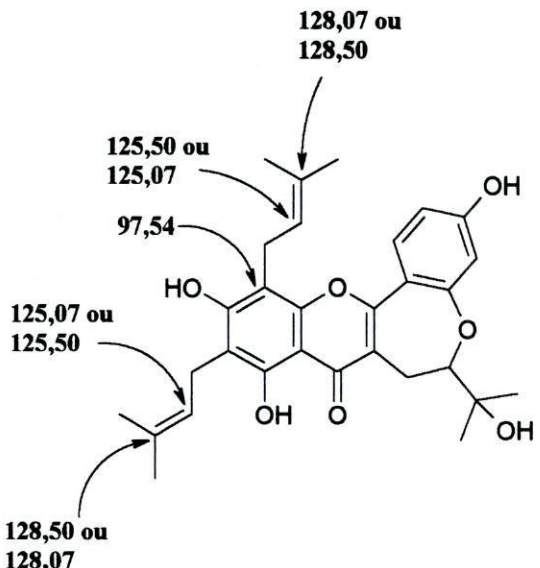
A maioria dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C da artelastocarpina (**84**) mostraram ser semelhantes aos da artelastinina (**83**). Todavia observaram-se nestes espectros alguns sinais de carbono de deslocamento químico diferentes, salientando-se os sinais atribuídos inequivocamente, pelos espectros de HETCOR e HMBC, ao carbono aromático da posição 8 e aos carbonos olefínicos dos grupos 3,3-dimetilalilo. Ao contrário da artelastinina (**83**), os valores dos deslocamentos químicos destes sinais na artelastocarpina (**84**) mostraram-se concordantes com os obtidos para a artelasticina (**79**) e artelastina (**80**).



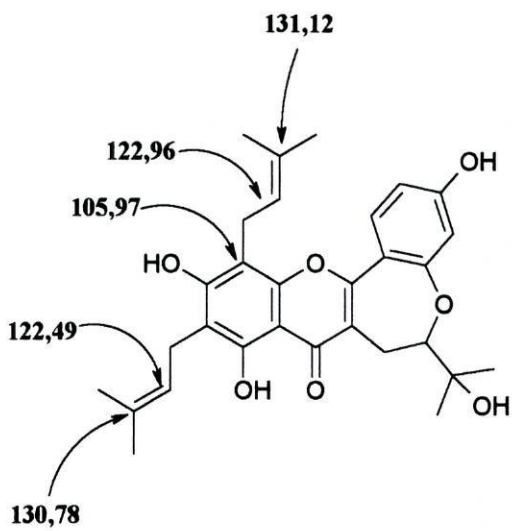
Artelasticina (**79**, $CDCl_3$)



Artelastina (**80**, $CDCl_3$)



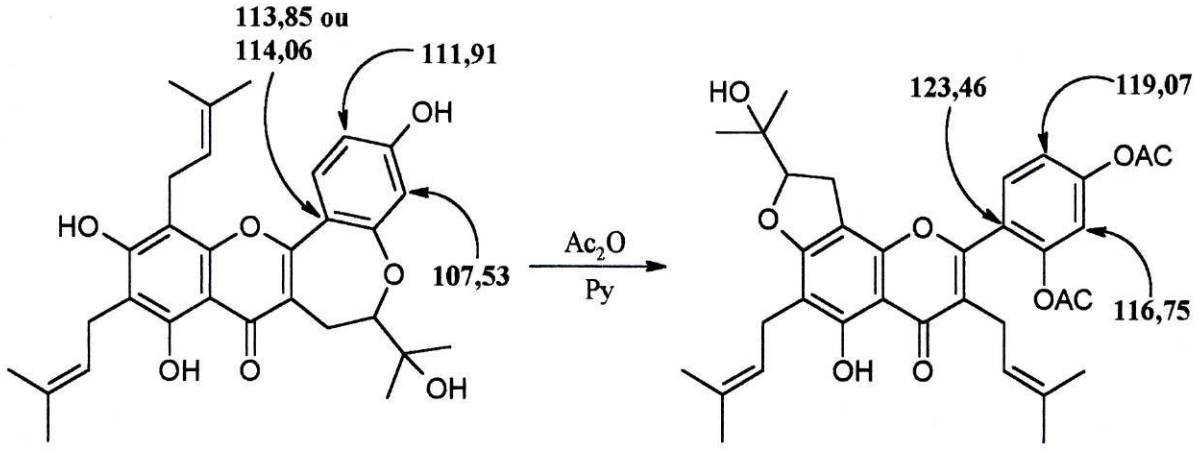
Artelastinina (**83**, DMSO-d_6)



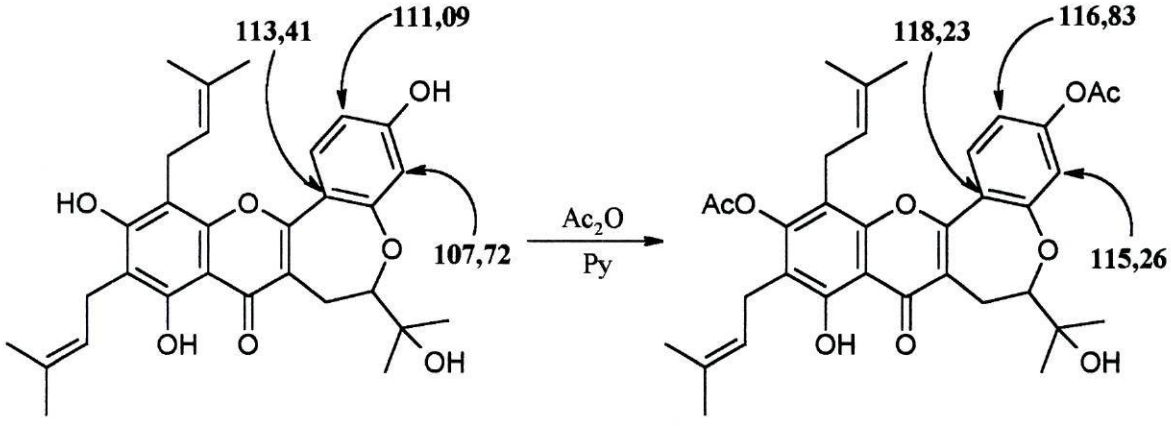
Artelastocarpina (**84**, DMSO-d_6)

A acetilação da artelastocarpina (**84**) do modo habitual (Ac_2O/Py, pág. 191) resultou na formação de um derivado diacetilado (**84Ac**). O espectro de RMN de ^1H deste composto (**84Ac**) em $CDCl_3$ a 300 MHz (Tabela 15, pág. 158) revelou, além do sinal a δ 12,95 *s* correspondente ao grupo hidroxilo em C-5, a presença de dois singuletos a δ 2,33 e δ 2,31 característicos de protões de grupos acetoxilo. Na região dos protões aromáticos verificou-se um deslocamento dos protões do anel B a δ 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6'), δ 6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz, H-5') e δ 6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3') para δ 7,94 *d* (*J* = 8,6 Hz, Δδ = 0,11 ppm), δ 6,96 *dd* (*J* = 8,6 e 2,3 Hz, Δδ = 0,43 ppm) e δ 6,95 *d* (*J* = 2,3 Hz, Δδ = 0,31 ppm), respectivamente. O deslocamento paramagnético destes protões aliado ao aparecimento de sinais característicos de protões do anel hidroxiisopropiloxepino a δ 3,33 *dd* (*J* = 16,5 e 2,7 Hz, H-9a), δ 2,75 *dd* (*J* = 16,5 e 8,5 Hz, H-9b), δ 4,13 *dd* (*J* = 8,5 e 2,7 Hz, H-10), δ 1,37 *s* e δ 1,35 *s* revelaram que o anel B do composto **84Ac** devia possuir um grupo acetoxilo em C-4' e que não ocorreu abertura do anel hidroxiisopropiloxepino, como sucedeu com a artelastinina (**83**).

Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 75 MHz em $CDCl_3$ do derivado diacetilado da artelastocarpina (**84Ac**, Tabela 16, pág. 159) mostraram, além dos sinais característicos de carbonos de dois grupos acetoxilo a δ 168,79 e δ 168,55, δ 21,20 e δ 20,64, alterações significativas dos valores de deslocamento químico atribuídos aos carbonos 1', 3' e 5' do anel B. Assim, os carbonos a δ 113,41 (C-1'), δ 111,09 (C-5') e δ 107,72 (C-3') sofreram um deslocamento paramagnético aparecendo a δ 118,23 (Δδ = 4,91 ppm), δ 116,83 (Δδ = 5,81 ppm) e δ 115,26 (Δδ = 7,62 ppm), respectivamente. O menor efeito paramagnético sofrido pelos carbonos das posições 5', 3' e 1', após acetilação da artelastocarpina (**84**), relativamente ao efeito observado após a acetilação da artelastinina (**83**), revelou-se concordante com a estrutura proposta para o derivado diacetilado da artelastocarpina (**84Ac**), em que o anel hidroxiisopropiloxepino se mantém intacto.



Artelastinina (**83**, DMSO-d_6) Diacetato da artelastinina (**83Ac**, $CDCl_3$)



Artelastocarpina (**84**, DMSO-d_6) Diacetato de artelastocarpina (**4Ac**, $CDCl_3$)

Tabela 13 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz da artelastinina (**83**) e da artelastocarpina (**84**) em DMSO-d_6.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) **83**	**84**	H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) **83**	**84**
5	13,17 *s*	13,21 *s*	**17**	1,57 *s*	1,62 *s*
7	NO	9,66 *sl*	**18**	1,71 *s*[d]	1,73 *s*
9	3,4-3,3 *m*	3,38 *dd* (16,7 e 1,6)	**19**	3,4-3,3 *m*[b]	3,50 *sl*
	2,37 *dd* (16,8 e 10,1)	2,44 *dd* (16,7 e 9,9)	**20**	5,12 *t* (7,0)[c]	5,12 *m*
10	3,78 *dd* (9,2 e 2,0)	3,86 *dd* (9,9 e 1,6)	**22**	1,57 *s*	1,62 *s*
11	NO	4,76 *s*	**23**	1,69 *s*[d]	1,75 *s*
12	1,23 *s*[a]	1,25 *s*[a]	**3'**	6,48 *d* (2,2)	6,53 *d* (2,3)
13	1,19 *s*[a]	1,21 *s*[a]	**4'**	NO	10,32 *sl*
14	3,15 *d* (6,6)[b]	3,31 *d* (6,7)	**5'**	6,59 *dd* (8,8 e 2,2)	6,64 *dd* (8,9 e 2,3)
15	5,19 *t* (7,0)[c]	5,12 *m*	**6'**	7,79 *d* (8,8)	7,83 *d* (8,9)

[a], [b], [c] e [d] permutáveis dentro da mesma coluna, NO: sinal não observado

Tabela 14 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 75 MHz da artelastinina (**83**) e da artelastocarpina (**84**) em DMSO-d_6.

C	δ ^{13}C 83	δ ^{13}C 84	C	δ ^{13}C 83	δ ^{13}C 84
2	159,29 (C)[a]	157,65 (C)	**15**	125,07 (CH)[e]	122,49 (CH)
3	114,06 (C)[b]	115,60 (C)	**16**	128,50 (C)[f]	130,78 (C)
4	177,50 (C)	180,64 (C)	**17**	25,61 (CH_3)[g]	25,48 (CH_3)[b]
4a	105,33 (C)	102,63 (C)	**18**	17,96 (CH_3)[h]	17,86 (CH_3)
5	155,74 (C)	156,08 (C)	**19**	22,08 (CH_2)[d]	21,76 (CH_2)
6	111,82 (C)	111,27 (C)	**20**	125,50 (CH)[e]	122,96 (CH)
7	159,37 (C)	159,01 (C)	**21**	128,07 (C)[f]	131,12 (C)
8	97,54 (C)	105,97 (C)	**22**	25,53 (CH_3)[g]	25,58 (CH_3)[b]
8a	153,29 (C)	152,49 (C)	**23**	17,85 (CH_3)[h]	18,02 (CH_3)
9	24,49 (CH_2)	24,08 (CH_2)	**1'**	113,85 (C)[b]	113,41 (C)
10	89,73 (CH)	89,92 (CH)	**2'**	154,23 (C)[i]	159,79 (C)
11	71,01 (C)	71,01 (C)	**3'**	107,53 (CH)	107,72 (CH)
12	27,43 (CH_3)[c]	27,33 (CH_3)[a]	**4'**	NO[a,i]	161,61 (C)
13	24,23 (CH_3)[c]	24,35 (CH_3)[a]	**5'**	111,91 (CH)	111,09 (CH)
14	21,97 (CH_2)[d]	21,48 (CH_2)	**6'**	129,25 (CH)	129,89 (CH)

[a], [b], [c], [d], [e], [f], [g], [h] e [i] permutáveis dentro da mesma coluna, NO: sinal não observado.

Tabela 15 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H a 300 MHz dos diacetatos de artelastinina (**83Ac**) e de artelastocarpina (**84Ac**) em $CDCl_3$.

H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 83Ac	84Ac	H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz) 83Ac	84Ac
5	12,92 *s*	12,95 *s*	**19**	3,21 *d* (8,0)	3,40 *sl*
9	3,21 *d* (8,0)	3,33 *dd* (16,5 e 2,7)	**20**	5,1-5,0 *m*	5,11 *t* (6,5)
		2,75 *dd* (16,5 e 8,5)			
10	5,1-5,0 *m*	4,13 *dd* (8,5 e 2,7)	**22**	1,52 *s*[a]	1,67 *s*[b]
12	1,35 *s*[a]	1,37 *s*[a]	**23**	1,55 *s*	1,74 *s*
13	1,55 *s*	1,35 *s*[a]	**3'**	7,07 *d* (2,2)	6,95 *d* (2,3)
14	3,15 *dd* (16,0 e 9,5)	3,40 *sl*	**5'**	7,06 *dd* (8,8 e 2,2)	6,96 *dd* (8,6 e 2,3)
	3,06 *dd* (16,0 e 8,0)				
15	4,70 *dd* (9,1 e 8,0)	5,11 *t* (6,5)	**6'**	7,37 *d* (9,0)	7,94 *d* (8,6)
17	1,15 *s*[b]	1,66 *s*[b]	**-OCOC$\underline{H}_3$**	2,26 *s*	2,33 *s*
18	1,26 *s*[b]	1,74 *s*		2,04 *s*	2,31 *s*

[a] e [b] permutáveis dentro da mesma coluna

Tabela 16 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{13}C a 75 MHz dos diacetatos de artelastinina (**83Ac**) e de artelastocarpina (**84Ac**) em $CDCl_3$.

C	δ ^{13}C 83Ac	δ ^{13}C 84Ac	C	δ ^{13}C 83Ac	δ ^{13}C 84Ac
2	158,02 (C)	157,84 (C)	**17**	23,89 (CH_3)[d]	25,74 (CH_3)[c]
3	121,08 (C)	115,26 (C)	**18**	25,60 (CH_3)[d]	17,91 (CH_3)
4	182,34 (C)	180,77 (C)	**19**	21,79 (CH_2)	23,27 (CH_2)
4a	105,58 (C)	107,84 (C)	**20**	120,92 (CH)[a]	121,74 (CH)
5	154,50 (C)	157,23 (C)	**21**	132,01 (C)[b]	132,48 (C)[b]
6	108,18 (C)	117,36 (C)	**22**	25,66 (CH_3)	25,68 (CH_3)[c]
7	163,93 (C)	152,94 (C)	**23**	17,56 (CH_3)[c]	18,15 (CH_3)
8	101,85 (C)	112,50 (C)	**1'**	123,46 (C)	118,23 (C)
8a	155,16 (C)	152,60 (C)	**2'**	152,32 (C)[e]	158,52 (C)
9	21,79 (CH_2)	24,10 (CH_2)	**3'**	116,75 (CH)	115,26 (CH)
10	121,41 (CH)[a]	91,94 (CH)	**4'**	148,82 (C)[e]	153,80 (C)
11	132,65 (C)[b]	72,91 (C)	**5'**	119,07 (CH)	116,83 (CH)
12	25,66 (CH_3)	25,85 (CH_3)[a]	**6'**	130,88 (CH)	129,73 (CH)
13	17,60 (CH_3)[c]	25,34 (CH_3)[a]	**-OCOCH$_3$**	21,12 (CH_3)	21,20 (CH_3)
14	27,08 (CH_2)	22,87 (CH_2)		20,76 (CH_3)	20,64 (CH_3)
15	91,18 (CH)	121,30 (CH)	**-OCOCH$_3$**	168,56 (C)	168,79 (C)
16	71,94 (C)	132,38 (C)[b]		168,07 (C)	168,55 (C)

[a], [b], [c], [d] e [e] permutáveis dentro da mesma coluna.

Tabela 17 – Correlações ^{1}H-^{1}H observadas no espectro de COSY a 300 MHz em DMSO-d_6 da artelastocarpina (**84**).

δ ^{1}H		δ ^{1}H
7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6')	→	6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz, H-5')
6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz, H-3')		
5,12 *m* (H-15 e 20)	→	3,31 *d* (*J* = 6,7 Hz, H-14)
		3,50 *sl* (H-19)
		1,75 *s* (CH_3-23)
		1,73 *s* (CH_3-18)
		1,62 *s* (CH_3-17 e 22)
3,86 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10)	→	3,38 *dd* (*J* = 16,7 e 1,6 Hz, H-9a)
		2,44 *dd* (*J* = 16,7 e 9,9 Hz, H-9b)
3,38 *dd* (*J* = 16,7 e 1,6 Hz, H-9a)	→	2,44 *dd* (*J* = 16,7 e 9,9 Hz, H-9b)

Tabela 18 – Correlações ^{13}C-^{1}H observadas no espectro de HETCOR em DMSO-d_6 da artelastocarpina (**84**).

	δ ^{13}C		δ ^{1}H
CH-6'	129,89	→	7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz)
CH-20	122,96	→	5,12 *m*
CH-15	122,49		
CH-5'	111,09	→	6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz)
CH-3'	107,72	→	6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz)
CH-10	89,92	→	3,86 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz)
CH_3-12	27,33	→	1,25 *s*
CH_3-13	24,35	→	1,21 *s*
CH_3-22	25,58	→	1,62 *s*
CH_3-17	25,48		
CH_2-9	24,08	→	3,38 *dd* (*J* = 16,7 e 1,6 Hz)
			2,44 *dd* (*J* = 16,7 e 9,9 Hz)
CH_2-19	21,76	→	3,50 *sl*
CH_2-14	21,48	→	3,31 *d* (J = 6,7 Hz)
CH_3-23	18,02	→	1,75 *s*
CH_3-18	17,86	→	1,73 *s*

Tabela 19 – Correlações ^{13}C-^{1}H observadas no espectro de HMBC em DMSO-d_6 da artelastocarpina (**84**).

δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C
OH-5 → 13,21 *s*	→ 156,08 (C-5); 111,27 (C-6); 102,63 (C-4a)	H-19 → 3,50 *sl*	→ 159,01 (C-7); 152,49 (C-8a); 131,12 (C-21); 122,96 (CH-20); 105,97 (C-8)
OH-4' → 10,32 *sl*	→ 161,61 (C-4'); 111,09 (CH-5'); 107,72 (CH-3')	H-9a → 3,38 *dd* (*J* = 16,7 e 1,6 Hz)	→ 157,65 (C-2); 115,60 (C-3)
OH-7 → 9,66 *sl*	→ 111,27 (C-6); 105,97 (C-8)	H-14 → 3,31 *d* (*J* = 6,7 Hz)	→ 159,01 (C-7); 156,08 (C-5); 130,78 (C-16); 122,49 (CH-15); 111,27 (C-6)
H-6' → 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz)	→ 161,61 (C-4'); 159,79 (C-2'); 157,65 (C-2)	H-9b → 2,44 *dd* (*J* = 16,7 e 9,9 Hz)	→ 157,65 (C-2); 115,60 (C-3); 89,92 (CH-10)
H-5' → 6,64 *dd* (*J* = 8,9 e 2,3 Hz)	→ 113,41 (C-1'); 107,72 (CH-3')	CH_3-23 → 1,75 *s*	→ 131,12 (C-21); 122,96 (CH-20)
H-3' → 6,53 *d* (*J* = 2,3 Hz)	→ 161,61 (C-4'); 159,79 (C-2'); 113,41 (C-1'); 111,09 (CH-5')	CH_3-22; CH_3-17 → 1,62 *s*	→ 131,12 (C-21); 130,78 (C-16); 122,96 (CH-20); 122,49 (CH-15)
H-15; H-20 → 5,12 *m*	→ 25,58 (CH_3-22/17); 25,48 (CH_3-17/22); 18,02 (CH_3-23); 17,86 (CH_3-18)	CH_3-18 → 1,73 *s*	→ 130,78 (C-16); 122,49 (C-15)
H-10 → 3,86 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz)	→ 159,79 (C-2'); 115,60 (C-3)	CH_3-12; CH_3-13 → 1,25 *s*; 1,21 *s*	→ 89,92 (CH-10); 71,01 (C-11)

9. Carpelastofurano (85)

À semelhança das flavonas **73**, **78-84** o espectro no IV do composto **85** (pág. 203) sugeriu a presença de grupos hidroxilo (3500-3200 cm^{-1}), carbonilo conjugado (1660 cm^{-1}) e metilo geminais (1354 e 1313 cm^{-1}). Este espectro revelou ainda bandas que poderiam corresponder a ligações C-H alquílica (2976 e 2885 cm^{-1}), C=C de anel aromático (1623, 1549, 1481 e 1429 cm^{-1}) e C-O (1238 cm^{-1}) [129-131].

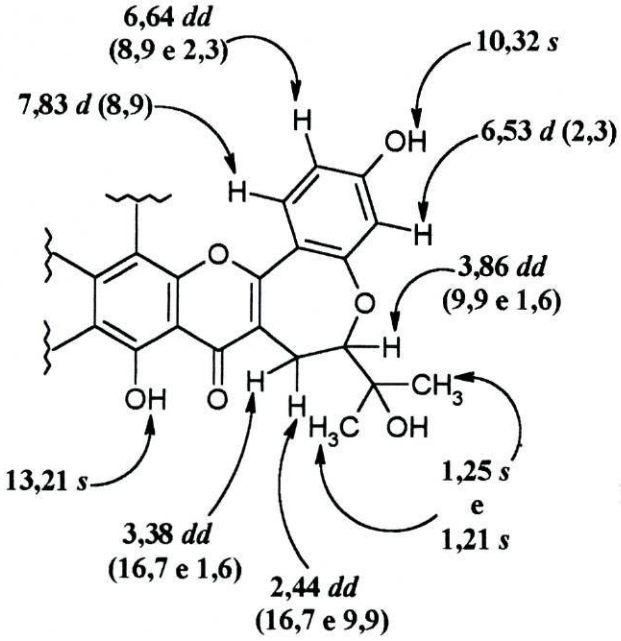
O espectro no UV (pág. 203) sugeriu a natureza flavonóide deste composto ao mostrar bandas a 215 (log ε 5,4), 274 (log ε 5,1, banda II) e 344 nm (log ε 5,1, banda I) [132-135]. A presença de função fenólica foi evidenciada pelo deslocamento batocrómico da banda a 344 nm (log ε 5,1) para 387 nm (log ε 5,2, $\Delta\lambda_{máx.}$ = 43 nm), após adição de uma solução de hidróxido de sódio à solução metanólica do composto **85** [132-135]. A formação de um quelato com cloreto de alumínio, estável em meio ácido, indicou a existência de um grupo hidroxilo na posição 5 do núcleo flavonóide [132-135].

O espectro de RMN de ^1H a 300 MHz em DMSO-d_6 do composto **85** (Tabela 20, pág. 172) mostrou alguma semelhança com o da artelastocarpina (**84**). Este espectro evidenciou dois singuletos a δ 13,10 e δ 10,35, correspondentes a protões hidroxílicos fenólicos, cujos valores de deslocamento químico eram idênticos aos protões hidroxílicos das posições 5 e 4' da artelastocarpina (**84**).

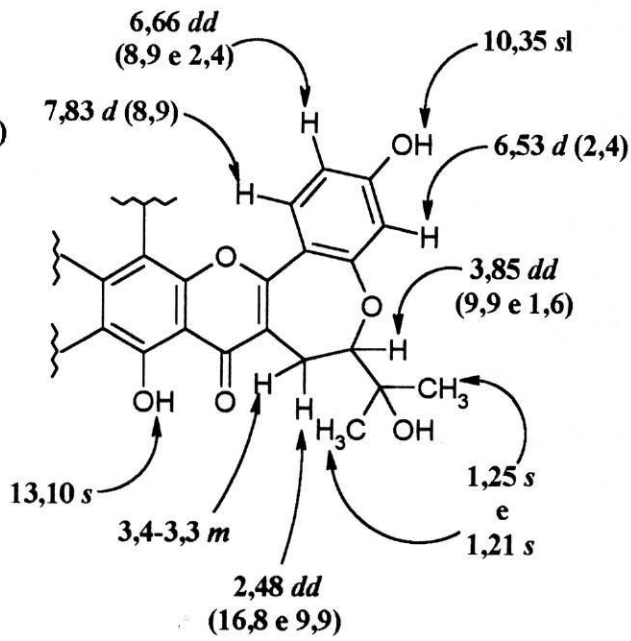
Na região dos protões aromáticos observaram-se dois dupletos a δ 7,83 (J = 8,9 Hz) e δ 6,53 (J = 2,4 Hz) e um duplo dupleto a δ 6,66 (J = 8,9 e 2,4 Hz), com integração para um protão cada. O espectro de COSY (Tabela 21, pág. 173) permitiu confirmar o acoplamento sugerido pelos valores de constantes de acoplamento. A semelhança entre os valores de deslocamento químico destes sinais e os descritos para os protões do anel B da artelastocarpina (**84**) sugeriu um padrão de substituição idêntico.

Na região dos protões alifáticos o espectro de RMN de ^1H do composto **85** mostrou dois duplos dupletos a δ 3,85 (J = 9,9 Hz e 1,6 Hz) e δ 2,48 (J = 16,8 e 9,9 Hz), um multipleto entre δ 3,4-3,3 e dois singuletos correspondentes a protões de dois grupos metílicos a δ 1,25, δ 1,21. Os valores de deslocamento químico destes sinais e o acoplamento, observado no espectro de COSY (Tabela 21, pág. 173), entre os protões a δ 3,4-3,3 *m* e δ 2,48 *dd* (J = 16,8

e 9,9 Hz) e de cada um destes com o protão a δ 3,85 *dd* (*J* = 9,9 Hz e 1,6 Hz) indicou que no composto **85** devia existir um anel hidroxiisopropiloxepino, semelhante ao da artelastocarpina (**84**).



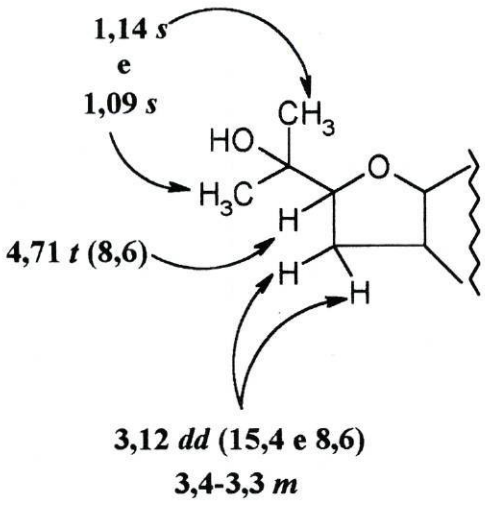
Artelastocarpina (**84**)



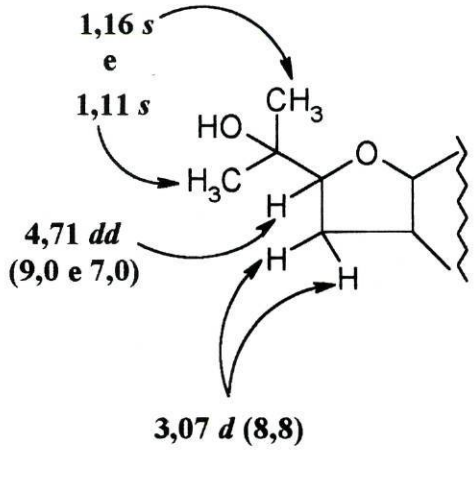
85

Na região dos protões alifáticos o espectro de RMN de ^{1}H do composto **85** mostrou ainda um tripleto a δ 5,18 (1H, *J* = 6,9 Hz), um duplo dupleto a δ 4,71 (1H, *J* = 9,0 e 7,0 Hz), um dupleto a δ 3,07 (2H, *J* = 8,8 Hz) e quatro singuletos a δ 1,74, δ 1,62, δ 1,16 e δ 1,11. O espectro de COSY (Tabela 21, pág. 173) revelou o acoplamento do protão vinílico a δ 5,18 (*J* = 6,9 Hz) com os protões a δ 3,4-3,3 *m*, δ 1,74 *s* e δ 1,62 *s*. Estes acoplamentos sugeriram que o composto **85** possuía um grupo 3,3-dimetilalilo ligado ao anel A e que o multipleto entre δ 3,4-3,3 correspondia não só a um protão metínico do anel hidroxiisopropiloxepino, como também aos protões metilénicos do grupo 3,3-dimetilalilo.

Os sinais de dois grupos metílicos a δ 1,16 *s* e δ 1,11 *s* e o acoplamento evidenciado no espectro de COSY (Tabela 21, pág. 173) entre os protões a δ 4,71 *dd* (1H, *J* = 9,0 e 7,0 Hz) e δ 3,07 *d* (2H, *J* = 8,8 Hz) sugeriram que no composto **85** também podia existir um anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano ligado ao anel A, como no artelastofurano (**82**).



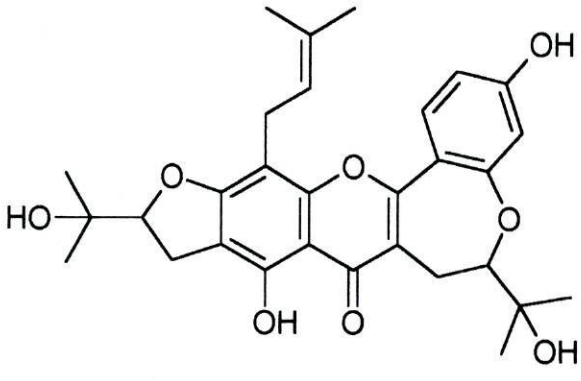
Artelastofurano (**82**)



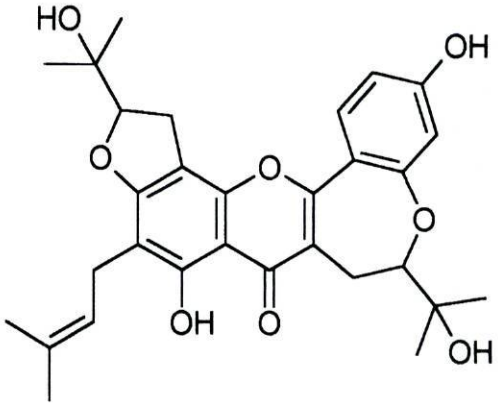
85

Comparando os sinais atribuídos aos protões do anel diidrofurano do composto **85** com os atribuídos ao mesmo anel do artelastofurano (**82**) verificou-se que os dois protões do grupo metilénico no composto **85** originaram apenas um sinal (δ 3,07 *d*, *J* = 8,8 Hz), enquanto que no artelastofurano (**82**) originaram dois sinais (δ 3,12 *dd*, *J* = 15,4 e 8,6 Hz, e δ 3,4-3,3 *m*). Todavia, esta diferença não excluía a hipótese de existir um anel diidrofurano no composto **85**, uma vez que estavam descritos na literatura flavonóides [126, 179-181] em que os protões metilénicos deste anel originavam um único sinal no espectro de RMN de ^{1}H.

Os sinais característicos de protões de um grupo 3,3-dimetilalilo e de um anel diidrofurano e a ausência de outros protões aromáticos indicaram que este composto podia ser um derivado da artelastocarpina (**84**), em que um dos grupos 3,3-dimetilalilo no C-6 ou no C-8 sofreu uma ciclização oxidativa para formar um anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano, com orientação linear (estrutura **104**) ou angular (estrutura **105**) relativamente ao núcleo flavónico.



104

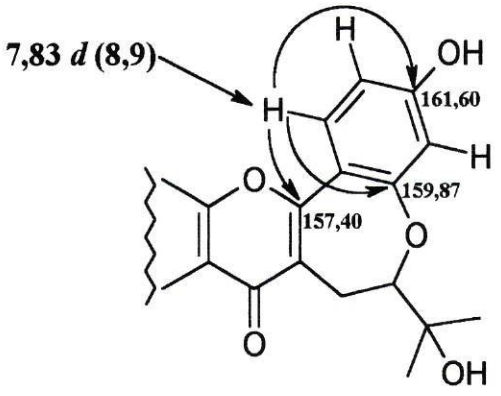


105

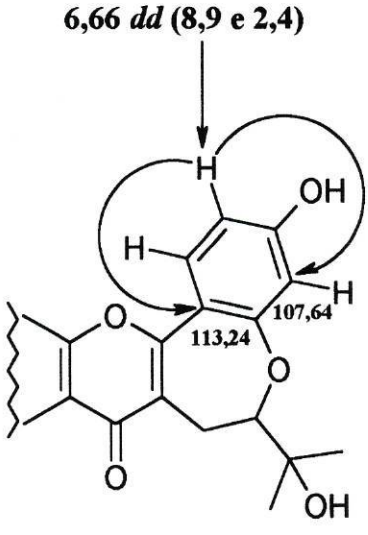
Os espectros de RMN de ^{13}C (BB e DEPT 90° e 135°) a 75 MHz em DMSO-d_6 (Tabela 20, pág. 172) revelaram sinais de trinta átomos de carbono, apresentando um sinal a δ 180,72, cujo valor de deslocamento químico indicou ser do carbono carbonílico de uma flavona 5-hidroxilada.

O acoplamento registado no espectro de HETCOR (Tabela 22, pág. 173) dos sinais de carbono a δ 129,69 (CH), δ 111,17 (CH) e δ 107,64 (CH) com os protões a δ 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6'), δ 6,66 *dd* (*J* = 8,9 e 2,4 Hz, H-5') e δ 6,53 *d* (*J* = 2,4 Hz, H-3'), permitiu atribuir os sinais destes carbonos aromáticos às posições 6', 5' e 3', respectivamente. A semelhança dos valores de deslocamento químico destes sinais com os dos obtidos para a artelastocarpina (**84**) confirmou que o anel B tinha o mesmo padrão de substituição. Mais uma vez, a confirmação da atribuição dos sinais do anel B, bem como a atribuição dos restantes carbonos do mesmo anel foi realizada pela observação no espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174) das correlações ^{1}H-^{13}C seguintes:

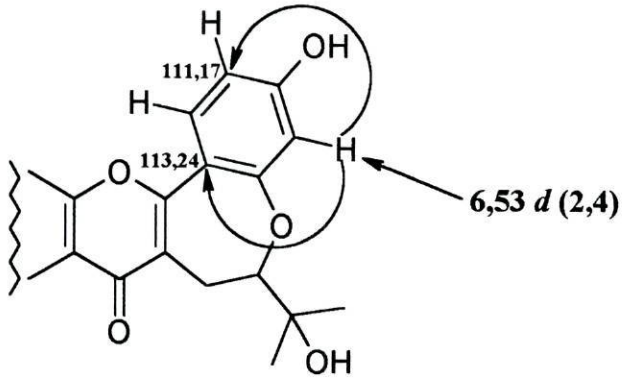
- do dupleto a δ 7,83 (H-6') com os sinais a δ 161,60 (C), δ 159,87 (C) e δ 157,40 (C), indicando que estes sinais correspondiam a carbonos oxigenados do anel B e a C-2;



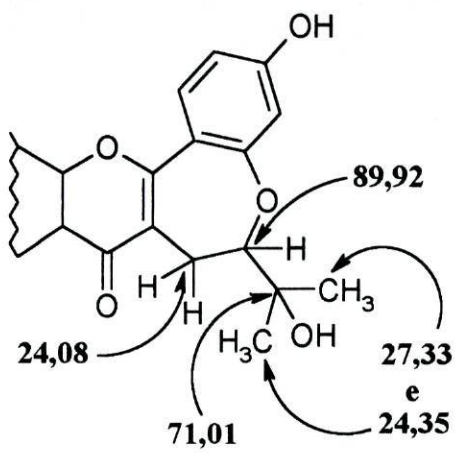
- do duplo dupleto a δ 6,66 (H-5') com os sinais a δ 113,24 (C) e δ 107,64 (CH-3'), permitindo atribuir o sinal a δ 113,24 a C-1';



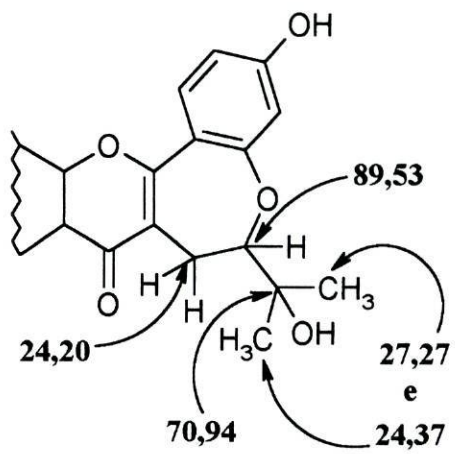
- do dupleto a δ 6,53 (H-3') com os sinais a δ 111,17 (CH-5') e δ 113,24 (C-1'), confirmando a atribuição de C-1' atrás efectuada.



O espectro de HETCOR (Tabela 22, pág. 173) mostrou ainda a existência de acoplamento do carbono a δ 89,53 (CH) com o protão a δ 3,85 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz), do carbono metilénico a δ 24,20 com ambos os protões a δ 3,4-3,3 *m* e δ 2,48 *dd* (*J* = 16,8 e 9,9 Hz) e dos carbonos metílicos a δ 27,27 e δ 24,37 com os protões a δ 1,25 *s* e δ 1,21 *s*, respectivamente. Estes resultados, juntamente com as correlações ^{1}H-^{13}C observadas no espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174) de cada um dos singuletos a δ 1,25 e δ 1,21 com ambos os sinais a δ 89,53 (CH) e δ 70,94 (C) confirmaram a presença de um anel hidroxiisopropiloxepino semelhante ao da artelastocarpina (**84**).

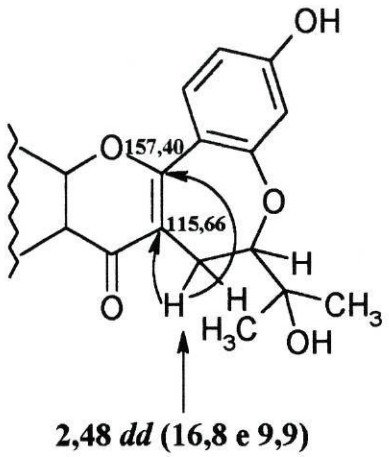


Artelastocarpina (**84**)



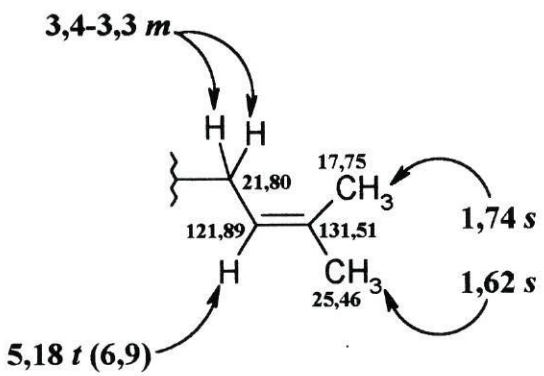
85

A localização deste anel entre os carbonos 3 e 2' do núcleo de flavona foi confirmada pelo acoplamento registado no espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174) entre o protão a δ 2,48 *dd* (*J* = 16,8 e 9,9 Hz, H-9b) e os carbonos a δ 157,40 (C-2) e 115,66, permitindo a atribuição deste último sinal a C-3.



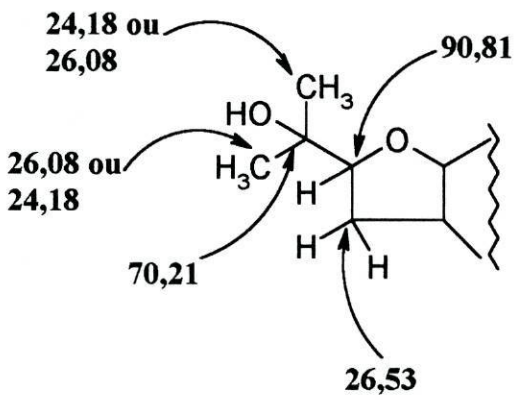
Relativamente a este anel, no espectro de HMBC observou-se ainda o acoplamento entre o protão a δ 4,77 *s* e os carbonos a δ 70,94 (C), δ 27,27 (CH_3) e δ 24,37 (CH_3). De acordo com este acoplamento foi possível atribuir o sinal a δ 4,77 ao protão do grupo hidroxilo na posição 11.

O espectro de HETCOR (Tabela 22, pág. 173) permitiu assinalar os carbonos metílicos, metilénicos e metínicos do grupo 3,3-dimetilalilo através do acoplamento com os protões anteriormente atribuídos para este grupo. Com base nos acoplamentos observados neste espectro e no aparecimento do sinal a δ 131,51 (C) foi possível assinalar os valores de deslocamento químico de ^{1}H e ^{13}C para o grupo 3,3-dimetilalilo a seguir indicados:

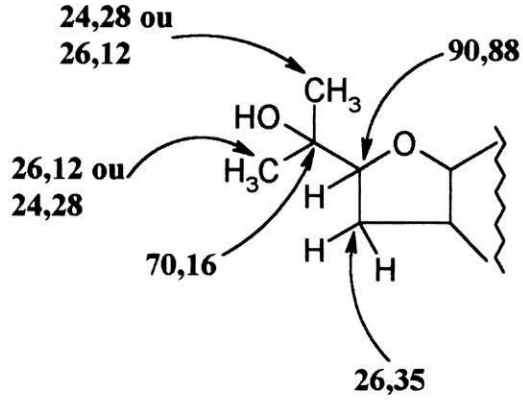


Estes assinalamentos foram também confirmados pelos acoplamentos observados no espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174) dos protões metílicos a δ 1,74 *s* e δ 1,62 *s* com os carbonos a δ 131,51 e δ 121,89 e do protão a δ 5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz) com os carbonos a δ 25,46 e δ 17,75.

Além dos acoplamentos referidos anteriormente, o espectro de HETCOR (Tabela 22, pág. 173) revelou ainda o acoplamento do carbono a δ 90,88 (CH) e o protão metínico a δ 4,71 *dd* (*J* = 9,0 e 7,0 Hz), do carbono a δ 26,35 (CH_2) e o protão a δ 3,07 *d* (*J* = 8,8 Hz) e dos carbonos metílicos a δ 26,12 e δ 24,28 com os protões a δ 1,16 e δ 1,11, respectivamente. Estes acoplamentos e as correlações observadas no espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174) entre ambos os sinais a δ 90,88 (CH) e δ 70,16 (C) e cada um dos singuletos a δ 1,16 e δ 1,11 permitiram atribuir os sinais de carbono do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano do composto **85**. A semelhança entre os valores de deslocamento químico destes carbonos e os observados para o artelastofurano (**82**) confirmaram a presença deste anel no composto **85**.



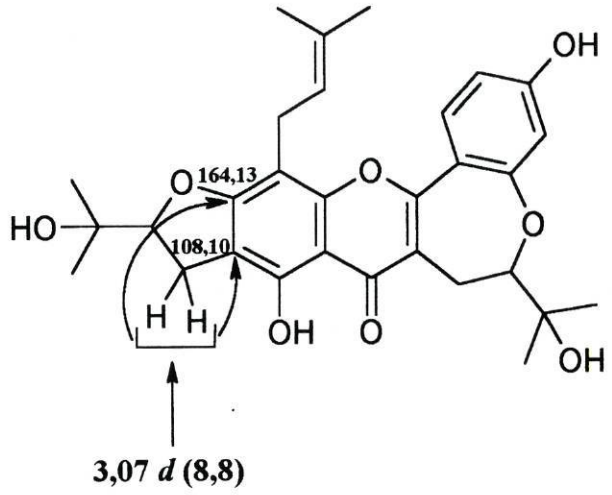
Artelastofurano (**82**)



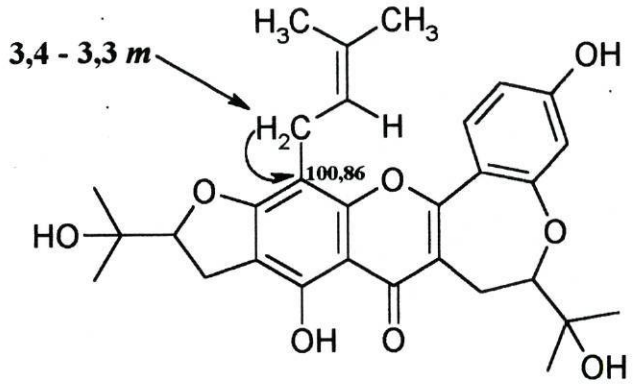
85

A localização do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano estabeleceu-se através do espectro de HMBC (Tabela 23, pág. 174). Este mostrou o acoplamento entre protão a δ 13,10 (5-OH) e os carbonos a δ 153,53 (C), δ 108,10 (C) e δ 103,31 (C) permitindo a sua atribuição a C-5, C-6 e C-4a, respectivamente. Por seu turno, o acoplamento detectado no espectro de HMBC do protão a δ 3,07 *d* (*J* = 8,8 Hz), referente aos protões metilénicos do anel 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano, com os carbonos a δ 164,13 (C) e δ 108,10 (C-6)

revelou que este anel estava em orientação linear e permitiu também assinalar o sinal a δ 164,13 a C-7.



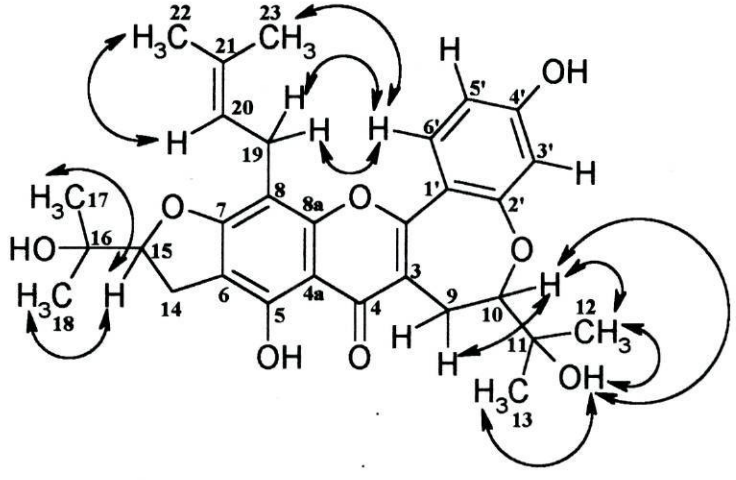
Consequentemente, o grupo 3,3-dimetilalilo teria de estar ligado ao C-8. O acoplamento entre o protão a δ 3,4-3,3 *m* e o carbono a δ 100,86 (C), observado no espectro de HMBC, permitiu concluir que este sinal correspondia a C-8.



A ligação do grupo 3,3-dimetilalilo ao C-8 foi confirmada pela observação de correlações ^{1}H-^{1}H no espectro bidimensional de NOESY (Tabela 24, pág. 175). Neste espectro verificou-se que ambos os sinais a δ 1,74 *s* (CH_3-23) e δ 3,4-3,3 *m* (CH_2-19) estavam correlacionados com o dupleto a δ 7,83 (J = 8,9 Hz, H-6'). Pelo contrário, os protões do outro

grupo metílico deste substituinte a δ 1,62 *s* mostraram estar correlacionados com o protão vinílico a δ 5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz, H-20).

Além disto observaram-se ainda correlações ^{1}H-^{1}H concordantes com a presença dos anéis 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-oxepino e 2-hidroxiisopropil-2*H*,3*H*-diidrofurano no composto **85** (Tabela 24, pág. 175). Assim, a correlação do duplo dupleto a δ 3,85 (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10) com os sinais a δ 2,48 *dd* (J = 16,8 e 9,9 Hz, H-9b) e δ 1,25 *s* (CH_3-12 ou 13) foi explicada pela proximidade entre os protões atribuídos a estes sinais. A orientação espacial dos grupos metílicos nas posições 17 e 18, próxima do protão na posição 15, justificou a correlação observada no espectro de NOESY entre os singuletos a δ 1,16 e δ 1,11 e o duplo dupleto a δ 4,71 (*J* = 9,0 e 7 0 Hz). A correlação entre o singuleto a δ 4,77 (HO-11) e cada um dos sinais a δ 3,85 (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10), δ 1,25 *s* e δ 1,21 *s* (CH_3-12 e 13) revelou-se concordante com a atribuição do sinal a δ 4,77 *s* ao grupo hidroxilo no C-11.



O espectro de massa de alta resolução de FAB^{+} em NBA (pág. 203) mostrou para o composto **85** um pico de $M+H^{+}$ a 523,23319 (calculado para $C_{30}H_{36}O_8$ = 523,23304) que permitiu estabelecer a fórmula molecular $C_{30}H_{35}O_8$ concordante com a estrutura proposta.

A pesquisa bibliográfica revelou que o composto **85** nunca tinha sido isolado nem sintetizado anteriormente, tendo-se atribuiu o nome de carpelastofurano.

Tabela 20 – Valores de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz do carpelastofurano (**85**) em DMSO-d_6.

C/H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)	δ ^{13}C	C/H	δ ^{1}H/multiplicidade/(*J* em Hz)	δ ^{13}C
2	-	157,40 (C)	**15**	4,71 *dd* (9,0 e 7,0)	90,88 (CH)
3	-	115,66 (C)	**16**	-	70,16 (C)
4	-	180,72 (C)	**17**	1,11 *s*[b]	24,28 (CH_3)[b]
4a	-	103,31 (C)	**18**	1,16 *s*[b]	26,12 (CH_3)[b]
5	13,10 *s*	153,53 (C)	**19**	3,4-3,3 *m*	21,80 (CH_2)
6	-	108,10 (C)	**20**	5,18 *t* (6,9)	121,89 (CH)
7	-	164,13 (C)	**21**	-	131,51 (C)
8	-	100,86 (C)	**22**	1,62 *s*	25,46 (CH_3)
8a	-	153,98 (C)	**23**	1,74 *s*	17,75 (CH_3)
9	3,4-3,3 *m* 2,48 *dd* (16,8 e 9,9)	24,20 (CH_2)	**1'**	-	113,24 (C)
10	3,85 *dd* (9,9 e 1,6)	89,53 (CH)	**2'**	-	159,87 (C)
11	4,77 *s*	70,94 (C)	**3'**	6,53 *d* (2,4)	107,64 (CH)
12	1,25 *s*[a]	27,27 (CH_3)[a]	**4'**	10,35 *sl*	161,60 (C)
13	1,21 *s*[a]	24,37 (CH_3)[a]	**5'**	6,66 *dd* (8,9 e 2,4)	111,17 (CH)
14	3,07 *d* (8,8)	26,35 (CH_2)	**6'**	7,83 *d* (8,9)	129,69 (CH)

[a] e [b] permutáveis dentro da mesma coluna

Tabela 21 – Correlações ^{1}H-^{1}H observadas no espectro de COSY a 300 MHz em DMSO-d_6 do carpelastofurano (**85**).

δ ^{1}H		δ ^{1}H
7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6')	→	6,66 *dd* (*J* = 8,9 e 2,4 Hz)
6,53 *d* (*J* = 2,4 Hz, H-3')		
5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz, H-20)	→	3,4-3,3 *m* (H-19)
		1,74 *s* (CH_3-23)
		1,62 *s* (CH_3-22)
4,71 *dd* (*J* = 9,0 e 7,0 Hz, H-15)	→	3,07 *d* (*J* = 8,8 Hz, H-14)
3,85 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10)	→	3,4-3,3 *m* (H-9a)
		2,48 *dd* (*J* = 16,8 e 9,9 Hz, H-9b)

Tabela 22 – Correlações ^{13}C-^{1}H observadas no espectro de HETCOR em DMSO-d_6 do carpelastofurano (**85**).

C	δ ^{13}C	δ ^{1}H
CH-6'	129,69	7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz)
CH-20	121,89	5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz)
CH-5'	111,17	6,66 *dd* (*J* = 8,9 e 2,4 Hz)
CH-3'	107,64	6,53 *d* (*J* = 2,4 Hz)
CH-15	90,88	4,71 *dd* (*J* = 9,0 e 7,0 Hz)
CH-10	89,53	3,85 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz)
CH_3-12	27,27	1,25 *s*
CH_3-13	24,37	1,21 *s*
CH_2-14	26,35	3,07 *d* (*J* = 8,8 Hz)
CH_3-18	26,12	1,16 *s*
CH_3-17	24,28	1,11 *s*
CH_3-22	25,46	1,62 *s*
CH_2-9	24,20	3,4-3,3 *m*
		2,48 *dd* (*J* = 16,8 e 9,9 Hz)
CH_2-19	21,80	3,4-3,3 *m*
CH_3-23	17,75	1,74 *s*

Tabela 23 – Correlações ^{1}H-^{13}C observadas no espectro de HMBC em DMSO-d_6 do carpelastofurano (**85**).

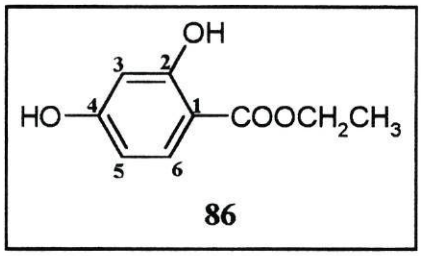
δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C
OH-5 → 13,10 *s*	153,53 (C-5) 108,10 (C-6) 103,31 (C-4a)	H-9a, H-19 → 3,4-3,3 *m*	121,89 (CH-20) 100,86 (C-8) 89,53 (CH-10)
OH-4' → 10,35 *sl*	161,60 (C-4') 111,17 (CH-5') 107,64 (CH-3')	H-14 → 3,07 *d* (*J* = 8,7 Hz)	164,13 (C-7) 108,10 (C-6) 90,88 (CH-15)
H-6' → 7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz)	161,60 (C-4') 159,87 (C-2') 157,40 (C-2)	H-9b → 2,48 *dd* (*J* = 16,8 e 9,9 Hz)	157,40 (C-2) 115,66 (C-3) 70,94 (C-11) 89,53 (CH-10)
H-5' → 6,66 *dd* (*J* = 8,9 e 2,4 Hz)	113,24 (C-1') 107,64 (CH-3')		
H-3' → 6,53 *d* (*J* = 2,4 Hz)	113,24 (C-1') 111,17 (CH-5')	CH_3-23 → 1,74 *s*	131,51 (C-21) 121,89 (CH-20) 25,46 (CH_3-22)
H-20 → 5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz)	100,86 (C-8) 25,46 (CH_3-22) 17,75 (CH_3-23)	CH_3-22 → 1,62 *s*	131,51 (C-21) 121,89 (CH-20) 17,75 (CH_3-23)
HO-11 → 4,77 *s*	70,94 (C-11) 27,27 (CH_3-12/13) 24,37 (CH_3-13/12)	CH_3-12 → 1,25 *s* CH_3-13 → 1,21 *s*	89,53 (CH-10) 70,94 (C-11) 24,37 (CH_3-13/12)
H-15 → 4,71 *dd* (*J* = 9,0 e 7,0 Hz)	164,13 (C-7) 108,10 (C-6) 26,12 (CH_3-18/17) 24,28 (CH_3-17/18)		89,53 (CH-10) 70,94 (C-11) 27,27 (CH_3-12/13)
H-10 → 3,85 *dd* (*J* = 9,9 e 1,6 Hz)	159,87 (C-2') 115,66 (C-3) 27,27 (CH_3-12/13) 24,37 (CH_3-13/12)	CH_3-18 → 1,16 *s* CH_3-17 → 1,11 *s*	90,88 (CH-15) 70,16 (C-16) 24,28 (CH_3-17/18)
			90,88 (CH-15) 70,16 (C-16) 26,12 (CH_3-18/17)

Tabela 24- Correlações ^{1}H-^{1}H observadas no espectro de NOESY a 300 MHz em DMSO-d_6 do carpelastofurano (**85**).

δ ^{1}H		δ ^{1}H
7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6')	→	6,66 *dd* (*J* = 8,9 e 2,4 Hz) 1,74 *s* (CH_3-23) 3,4-3,3 *m* (H-19)
6,53 *d* (*J* = 2,4 Hz, H-3')	→	1,21 s (CH_3-13 ou 12)
5,18 *t* (*J* = 6,9 Hz, H-20)	→	1,62 *s* (CH_3-22)
4,77 *s* (HO-11)	→	3,85 (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10) 1,25 *s* (CH_3-12 ou 13) 1,21 *s* (CH_3-13 ou 12)
4,71 *dd* (*J* = 9,9 e 7,0 Hz, H-15)	→	1,16 *s* (CH_3-18 ou 17) 1,11 *s* (CH_3-17 ou 18)
3,85 (*J* = 9,9 e 1,6 Hz, H-10)	→	2,48 *dd* (J = 16,8 e 9,9 Hz, H-9b) 1,25 *s* (CH_3-12 ou 13)
3,4-3,3 *m* (H-19)	→	7,83 *d* (*J* = 8,9 Hz, H-6') 1,74 *s* (CH_3-23)

10. 2,4-Diidroxibenzoato de etilo (86)

Este composto foi identificado como 2,4-diidroxibenzoato de etilo (Figura 20) pela interpretação dos dados de EM-IE, IV, UV, RMN de ^{1}H a 300 MHz e RMN de ^{13}C a 75 MHz em DMSO-d_6 (págs. 203 e 204). Na elucidação estrutural deste composto usaram-se ainda técnicas de RMN bidimensionais (HETCOR e HMBC) e preparou-se o derivado diacetilado (pág. 191). Tanto quanto é do nosso conhecimento, até este momento este composto ainda não foi isolado de plantas do género *Artocarpus*.



86

Figura 20 - Estrutura do 2,4-diidroxibenzoato de etilo (**86**).

CAPÍTULO V

Material e metodologia experimental

1. Materiais, instrumentos e métodos de aplicação geral

• No fraccionamento do extracto bruto e na purificação de alguns compostos foi utilizada a cromatografia em coluna de gele de sílica 60 de 0,2-0,5 mm de diâmetro de partícula, 70-230 mesh ASTM (Merck), em coluna de vidro.

• No isolamento dos compostos **73** e **79** a partir das fracções 59 a 61 usou-se a cromatografia em coluna de gele de sephadex LH-20 com 25 μ de diâmetro de partícula (Sigma).

• Na cromatografia em camada fina, analítica e preparativa, utilizaram-se placas de gele de sílica 60 (GF_{254}, Merck), preparadas no laboratório, com a espessura de 0,25 mm. Antes da sua utilização foram activadas em estufa a 100 °C durante uma hora. A revelação dos cromatogramas foi efectuada por fluorescência directa ou contraste seguida de revelação química utilizando vapores de iodo sublimado. A extracção das amostras após CCF preparativa foi efectuada com clorofórmio e acetona.

• Os pontos de fusão foram determinados em bloco de Koefler e não foram corrigidos.

• Os espectros no IV foram obtidos num espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FTIR em discos de brometo de potássio (Uvasol, Merck) a 1%.

• Os espectros no UV foram registados num espectrofotómetro Varian Cary 1 em células de quartzo.

• Os espectros de RMN de ^{1}H a 300 MHz e RMN de ^{13}C a 75 MHz foram registados num espectrómetro Brucker Pulse NMR AMX 300, os espectros de RMN de ^{1}H a 200 MHz e RMN de ^{13}C a 50 MHz num espectrómetro Brucker Pulse NMR Spectrometer CxP e os espectros de RMN de ^{1}H a 500 MHz em aparelho Varian. Os solventes usados foram o clorofórmio deuterado (Merck) ou o dimetilsulfóxido hexadeuterado (Merck), com um grau de deuteração superior a 99,0 %.

• Os espectros de massa foram registados num espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer RMU-6M (impacto electrónico e FAB), espectrómetro Finnigan GC/MS System modelo 4510 (ionização química positiva) e espectrómetro Kratus Concept III (HR EM-FAB$^+$). Em todos os espectros os resultados foram referidos em m/e u. m. a. (% de fragmentos).

• Os critérios de pureza adoptados foram a nitidez e constância do ponto de fusão e a observação de uma única mancha em cromatografia de camada fina em diferentes fases móveis.

• Os solventes usados foram de marca Merck e Pronalab, com graus de pureza "pro--análise" e "puro".

• Os solventes foram evaporados com auxílio da pressão reduzida, usando um evaporador rotativo "Buchi" ou em corrente de azoto.

• As pesagens foram efectuadas numa balança Metler AE 163.

2. Isolamento e purificação dos metabolitos secundários de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

2. 1. Preparação do extracto bruto

O material botânico estudado foi a madeira de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume, colhida em Janeiro de 1991 na Província de Trang no sul da Tailândia. Um exemplar deste material encontra-se depositado no herbário do Royal Forest Department, Bangkok, Tailândia.

A madeira, depois de seca e finamente pulverizada (2 Kg), foi percolada até à exaustão com etanol à temperatura ambiente. A solução obtida foi concentrada a pressão reduzida fornecendo o extracto bruto etanólico (125 g). Este extracto foi extraído com clorofórmio à temperatura ambiente. A evaporação do solvente com auxilio da pressão reduzida, até à secura, originou o extracto bruto clorofórmico (61 g).

2. 2. Fraccionamento do extracto bruto

O extracto clorofórmico foi submetido a cromatografia preparativa em coluna de gele de sílica 60 (200 g, Artº Merck 7734), usando como fase móvel misturas de diferentes proporções de éter de petróleo 60-80º/ clorofórmio e clorofórmio / acetona, obtendo-se 130 fracções de 500 ml cada, tal como está indicado na Tabela 25.

Tabela 25 - Fraccionamento por cromatografia em coluna do extracto clorofórmico de *Artocarpus elasticus* Reinw ex. Blume.

Fase móvel	Fracções recolhidas
Éter de petróleo / Clorofórmio (3:2)	1-12
Éter de petróleo / Clorofórmio (2:3)	13-27
Éter de petróleo / Clorofórmio (3:7)	28-50
Éter de petróleo / Clorofórmio (1:9)	51-77
Clorofórmio / Acetona (9:1)	78-114
Clorofórmio / Acetona (4:1)	115-130

Todas as fracções foram analisadas por CCF analítica e foram reunidas em 10 grupos de acordo com o seu comportamento cromatográfico. Os compostos isolados de cada um dos grupos estão indicados na Tabela 26 (pág. 182).

Tabela 26 - Grupos de fracções reunidas de acordo com as características cromatográficas e compostos isolados.

Grupos	Fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos Isolados (mg)
1	1 - 5	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (3:2)	286	NE
2	6 - 12	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (3:2)	950	**77** (500)
3	13 - 22	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (2:3)	135	NE
4	23 - 25	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (2:3)	255	NE
5	26 - 32	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (2:3) Éter de petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	1200	**80** (300), **81** (400)
6	33 - 46	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	1203	NE
7	47 - 55	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (3:7) Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	600	**80** (40), **81** (100)
8	56 - 58	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	780	**NE**
9	59 - 61	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	3469	**79** (340), **73** (76) **82** (32), **83** (42)
10	62 - 68	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	2249	**82** (7)
11	69 - 75	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	6479	**73** (26), **84** (90), **85** (37), **86** (14)
12	76 - 79	Éter de petróleo / $CHCl_3$ (1:9) $CHCl_3$ / Acetona (9:1)	2000	**79** (1200)
13	80	$CHCl_3$ / Acetona (9:1)	3086	**84** (38)
14	81 - 90	$CHCl_3$ / Acetona (9:1)	1200	NE
15	91 - 97	$CHCl_3$ / Acetona (9:1)	500	NE
16	98 - 115	$CHCl_3$ / Acetona (9:1) $CHCl_3$ / Acetona (4:1)	1800	**78** (262)
17	116 - 130	$CHCl_3$ / Acetona (4:1)	315	NE

NE: Não estudada

2. 3. Isolamento e purificação dos compostos

2. 3. 1. Purificação dos compostos do grupo 2

Nas fracções deste grupo notou-se a presença de uns cristais de cor branca que foram isolados por cristalização em éter de petróleo / clorofórmio, obtendo-se o composto **77** (500 mg).

2. 3. 2. Purificação dos compostos dos grupos 5 e 7

As fracções destes grupos (26-32 e 47-55) foram purificadas por CCF preparativa em gele de sílica GF $_{254}$ usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo / ácido fórmico (70:30:1), isolando-se uma goma de cor vermelho-alaranjada (composto **80**, 340 mg) e um sólido cristalino amarelo (composto **81**, 500 mg).

2. 3. 3. Purificação dos compostos do grupo 9

As fracções 59-61 (3,5 g) foram purificadas por CC preparativa numa coluna com 25 g de gele de sílica, usando como fase móvel éter de petróleo 60-80°, clorofórmio e acetona em proporções variadas e de polaridade crescente, tendo-se recolhido 314 sub-fracções de 100 ml cada. A Tabela 27 (pág. 184) resume os resultados obtidos.

Tabela 27 - Sub-fracções das fracções 59/61 reunidas após CC e compostos isolados.

Sub-fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos isolados (mg)
1 - 17	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3)	326	NE
18 - 41	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3)	551	NE
42 - 102	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3)	961	**73** (26) e **79** (140)
103 - 124	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3)	344	NE
125 - 174	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3) Éter petróleo / $CHCl_3$ (5:5)	877	**73** (30) e **79** (200)
175 - 190	Éter petróleo / $CHCl_3$ (5:5)	49	NE
191 - 261	Éter petróleo / $CHCl_3$ (5:5) Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	374	**73** (20) e **83** (30)
262 - 277	$CHCl_3$	134	**82** (32) e **83** (12)
278 - 314	$CHCl_3$ $CHCl_3$ / acetona (8:2) $CHCl_3$ / acetona (5:5)	55	NE

NE: Não estudada

As sub-fracções 42-102 foram recromatografadas em CC de Sephadex LH-20 (15 g), usando como fase móvel o metanol. Foram recolhidas 12 fracções de 10 ml cada. As fracções 6-10 foram reunidas e posteriormente purificadas por CCF preparativa, usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo (7:3), obtendo-se o composto **79** (140 mg). As fracções 11 e 12 foram purificadas por CCF preparativa (gele de sílica GF_{254}, éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo, 65:35) originando 26 mg do composto **73**.

As sub-fracções 125-174 foram reunidas e submetidas a CC de Sephadex LH-20 (15 g). Após eluição com metanol resultaram 12 fracções. Das fracções 4-7 obteve-se o composto **79** (200 mg) por CCF preparativa, usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo (7:3). Das fracções 8-12 isolou-se o composto **73** (30 mg) por CCF preparativa (gele de sílica GF_{254}, éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo, 65:35).

As Sub-fracções 191-261 foram purificadas por CCF preparativa, usando éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo (55:45) como fase móvel, tendo-se obtido os compostos **73** (20 mg) e **83** (30 mg).

As sub-fracções 262-277 foram submetidas a CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo (60:40), tendo-se isolado os compostos **82** (32 mg) e **83** (12 mg).

2. 3. 4. Purificação dos compostos do grupo 10

As fracções correspondentes a este grupo foram recromatografadas por CC de gele de sílica (25 g), usando como fase móvel proporções variadas de éter de petróleo 60-80° / clorofórmio e clorofórmio / acetona. Foram recolhidas 87 fracções de 100 ml, controladas por CCF analítica e reunidas conforme se resume na Tabela 28.

Tabela 28 - Sub-fracções das fracções 62-68 reunidas após CC e compostos isolados.

Sub-fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos isolados (mg)
1 - 20	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	1589	NE
21 - 24	Éter petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	57	NE
25 - 30	Éter petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	160	NE
31 - 40	Éter petróleo / $CHCl_3$ (1:9)	114	**82** (7)
41 - 63	$CHCl_3$/acetona (9:1) → $CHCl_3$/acetona (7:3)	283	NE
64 - 87	$CHCl_3$/acetona (7:3) → $CHCl_3$/acetona (5:5)	76	NE

NE: Não estudada

As sub-fracções 31-40 foi purificadas por CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo / ácido fórmico (60:40:1), fornecendo o composto **82** (7 mg).

2. 3. 5. Purificação dos compostos do grupo 11

As fracções 69-75 foram recromatografadas por CC, com 200 g de gele de sílica e usando como fase móvel proporções variáveis de éter de petróleo 68-80°, clorofórmio e

acetona, tendo-se recolhido fracções de 250 ml cada. A Tabela 29 resume os resultados obtidos.

Tabela 29 – Sub-fracções das fracções 69-75 reunidas após CC e compostos isolados.

Sub-fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos isolados (mg)
1 - 12	Éter petróleo / $CHCl_3$ (7:3) → Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:2)	98	NE
13 - 23	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:2) → Éter petróleo / $CHCl_3$ (1:1)	77	NE
24 - 50	Éter petróleo / $CHCl_3$ (1:1) → Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	40	**86** (14)
51 - 62	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	34	NE
63 - 83	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	156	**73** (26)
84 - 108	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	758	NE
109 - 126	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	951	NE
127 - 185	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	2850	NE
186 - 265	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	397	**84** (63)
266 - 275	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7)	15	**84** (27)
276 - 340	Éter petróleo / $CHCl_3$ (3:7) → $CHCl_3$	271	NE
341 - 383	$CHCl_3$	313	NE
384 - 385	$CHCl_3$ / acetona (4:1)	190	**85** (37)
386 - 488	$CHCl_3$ / acetona (4:1) → $CHCl_3$ / acetona (1:1)	1768	NE

NE: Não estudada

As sub-fracções 24-50 foram purificadas por CCF preparativa utilizando como fase móvel clorofórmio / acetona / ácido fórmico (97:3:1), obtendo-se 14 mg do composto **86**.

As sub-fracções 63-83 foram cromatografadas por CCF preparativa tendo-se utilizado como fase móvel clorofórmio / acetona / ácido fórmico (95:5:1), originando 26 mg do composto **73**.

As sub-fracções 186-265 foram dissolvidas em acetona com auxilio de aquecimento. Após o arrefecimento separaram-se cristais de cor amarela, correspondentes ao composto **84**. Obteve-se ainda este composto por CCF preparativa das fracções 266-275 usando com fase móvel a mistura de clorofórmio / acetona / ácido fórmico (80:20:1).

As sub-fracções 384 e 385 foram dissolvidas em acetona com auxilio de aquecimento e após arrefecimento foram separados cristais de cor amarela, que foram identificados como o composto **85** (37 mg).

2. 3. 6. Purificação dos compostos do grupo 12

As fracções deste grupo foram purificadas por CCF preparativa em gele de sílica GF_{254} usando como fase móvel clorofórmio / acetona / ácido fórmico (90:10:1), obtendo-se o composto **79** (1,2 g).

2. 3. 7. Purificação dos compostos do grupo 13

A fracção 80 foi submetida a uma nova CC numa coluna contendo cerca de 25 g de gele de sílica como fase estacionária e soluções de éter de petróleo, clorofórmio, acetona e metanol em proporções variáveis e de polaridade crescente. Foram recolhidas fracções de 100 ml, controladas por CCF analítica e reunidas conforme se resume na Tabela 30 (pág. 188).

Tabela 30 – Sub-fracções da fracção 80 reunidas após CC e compostos isolados.

Sub-fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos isolados (mg)
1 - 4	$CHCl_3$ / Éter petróleo (5:5)	19	NE
5 - 41	$CHCl_3$ / Éter petróleo (5:5)	1960	NE
42 - 67	$CHCl_3$ / Éter petróleo (5:5)	597	NE
68 - 82	$CHCl_3$ / Éter petróleo (5:5) $CHCl_3$ / Éter petróleo (7:3)	88	NE
83 - 92	$CHCl_3$ / Éter petróleo (7:3)	45	NE
93 - 101	$CHCl_3$ / Éter petróleo (7:3)	42	NE
102 - 120	$CHCl_3$ / Éter petróleo (7:3)	1092	**84** (38)
121 - 137	$CHCl_3$ / Éter petróleo (7:3) $CHCl_3$ / Éter petróleo (9:1)	91	NE
138 - 158	$CHCl_3$ / Éter petróleo (9:1)	103	NE
159 - 193	$CHCl_3$ / acetona (9:1) acetona / metanol (5:5) metanol	243	NE

NE: Não estudada

Nas sub-fracções 102-120 notou-se a presença de uns cristais de cor amarela correspondentes ao composto **84**. Estes foram separados por cristalização em éter de petróleo 60-80° / acetona obtendo-se 38 mg deste composto.

2. 3. 8. Purificação dos compostos do grupo 16

As fracções deste grupo foram dissolvidas em clorofórmio / acetona. Após longo repouso, verificou-se a formação de um resíduo. Este foi separado do sobrenadante e purificado por CCF preparativa utilizando como fase móvel clorofórmio / acetona / ácido fórmico (90:10:1). Deste processo de purificação resultou o isolamento de 250 mg de composto **78**.

Após evaporação do solvente, o sobrenadante originou um resíduo (1 g). Este foi purificado por CC de gele de sílica (25 g), usando como fase móvel misturas de clorofórmio e

acetona de polaridade crescente, recolhendo-se 118 sub-fracções de 100 ml cada. Os resultados obtidos são indicados na Tabela 31.

Tabela 31 – Sub-fracções do sobrenadante das fracções 98-115 reunidas após CC e compostos isolados.

Sub-fracções reunidas	Fase móvel	Massa (mg)	Compostos isolados (mg)
1 - 14	$CHCl_3$	120	NE
15 - 23	$CHCl_3$ / acetona (9:1)	264	**78** (12)
24 - 34	$CHCl_3$ / acetona (9:1)	34	NE
35 - 90	$CHCl_3$ / acetona (7:3) $CHCl_3$ / acetona (5:5)	216	NE
91 - 118	$CHCl_3$ / acetona (5:5) acetona	63	NE

NE: Não estudada

As sub-fracções 15-23, após dissolução em acetona e arrefecimento, originaram a formação de cristais branco-amarelados. Estes cristais foram separados fornecendo 12 mg do composto **78**.

2. 4. Acetilação dos compostos isolados

2. 4. 1. Acetilação do composto 78

Uma amostra do composto **78** (10 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. A mistura foi vertida sobre água gelada (50 mL) e o produto resultante extraído com clorofórmio (4 x 50 mL). A fase clorofórmica foi lavada com solução de ácido clorídrico (1 %) e solução de bicarbonato de sódio (5 %) até pH neutro. A fase orgânica foi lavada com água (4 x 20 mL) e, após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado com auxílio da pressão reduzida, obtendo-se 8 mg do derivado triacetilado (**78Ac**).

2. 4. 2. Acetilação do composto 79

Uma amostra do composto **79** (10 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. A mistura foi tratada tal como está descrito em **2. 4. 1.** obtendo-se 9 mg do derivado triacetilado (**79Ac**).

2. 4. 3. Acetilação do composto 73

Uma amostra do composto **73** (11 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após eliminação da piridina e anidrido acético, recorrendo a corrente de azoto, a mistura obtida foi purificada por CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80° / acetato de etilo (80:20), obtendo-se 7 mg de derivado diacetilado (**73Ac**).

2. 4. 4. Acetilação do composto 80

Uma amostra do composto **80** (12 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. A mistura foi tratada tal como está descrito em **2. 4. 1.** obtendo-se 10 mg do derivado diacetilado (**80Ac**).

2. 4. 5. Acetilação do composto 81

Uma amostra do composto **81** (15 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após o tratamento da mistura como está descrito em **2. 4. 1.** obteve-se 12 mg do derivado monoacetilado (**81Ac1**).

Outra amostra do composto **81** (25 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas) a 60°C durante 30 minutos, deixando-se, posteriormente, a mistura em repouso à temperatura ambiente durante uma semana. A mistura obtida após o tratamento descrito em **2. 4. 1.** foi purificada por CCF preparativa (gele de sílica GF_{254}, éter de petróleo / acetato de etilo / ácido fórmico, 70:30:1) obtendo-se 10 mg do derivado monoacetilado (**81Ac1**) e 12 mg do derivado diacetilado (**81Ac2**).

2. 4. 6. Acetilação do composto 82

Uma amostra do composto **82** (18 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após eliminação da piridina e anidrido acético com recurso a corrente de azoto, a mistura obtida foi purificada por CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80°/ acetato de etilo (60:40), obtendo-se o 8 mg do derivado diacetilado (**82Ac**).

2. 4. 7. Acetilação do composto 83

Uma amostra do composto **83** (10 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após eliminação da piridina e anidrido acético com recurso a corrente de azoto obteve-se um resíduo, o qual foi purificado por CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80°/ acetato de etilo (60:40), obtendo-se 7 mg do derivado diacetilado (**83Ac**).

2. 4. 8. Acetilação do composto 84

Uma amostra do composto **84** (10 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após eliminação da piridina e anidrido acético com recurso a corrente de azoto obteve-se um resíduo, o qual foi purificado por CCF preparativa usando como fase móvel éter de petróleo 60-80°/ acetato de etilo (60:40), obtendo-se 8 mg do derivado diacetilado (**84Ac**).

2. 4. 9. Acetilação do composto 86

Uma amostra do composto **86** (5 mg) foi tratada com anidrido acético (1 mL) e piridina (2 gotas), deixando em repouso à temperatura ambiente durante 48 horas. Após eliminação da piridina e anidrido acético com recurso a corrente de azoto, obteve-se 4 mg do derivado diacetilado (**86Ac**)

2. 5. Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados

2. 5. 1. β-sitosterol (77)

Cristais de cor branca.

PF : 139-141 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -35° ($CHCl_3$, c = 60 mg/100 ml).

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz): δ 5,31 (*dl*, *J* = 5,0 Hz, H-6), δ 3,3-3,5 (*m*, H-3α), δ 2,2-2,1 (*m*, 2H, H-4), δ 1,98 (*sl*, H-8), δ 1,83 (*sl*, 2H, H-1), δ 1,22 (*sl*, 2H, H-28), δ 1,00 (*sl*, H-14), δ 0,97 (*s*, 3 H, H-19), δ 0,89 (*d*, 3H, *J* = 6,3 Hz, H-21), δ 0,66 (*s*, 3H, H-18).
Nota: Alguns assinalamentos foram efectuados por comparação com os dados de RMN de ^1H para o β-sitosterol obtidos da ref. [127].

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): δ 140,70 (C-5), δ 121,69 (CH-6), δ 71,85 (CH-3), δ 56,70 (CH-14), δ 56,08 (CH-17), δ 49,95 (CH-9), δ 45,81 (CH-24), δ 42,33 (C-13), δ 39,67 (CH_2-12), δ 42,52 (CH_2-4), δ 37,21 (CH_2-1), δ 36,50 (C-10), δ 36,10 (CH-20), δ 33,93 (CH_2-22), δ 31,86 (CH_2-7), δ 31,74 (CH-8), δ 31,60 (CH_2-2), δ 28,71 (CH-25), δ 29,14 (CH_2-16), δ 26,42 (CH_2-23), δ 23,89 (CH_2-15), δ 23,02 (CH_2-28), δ 21,13 (CH_2-11), δ 19,76 (CH_3-26), δ 19,44 (CH_3-19), δ 19,16 (CH_3-27), δ 18,85 (CH_3-21), δ 11,90 (CH_3-29 ou 18) e δ 12,01 (CH_3-18 ou 29).

2. 5. 2. Artocarpesina (78)

Cristais branco-amarelados.

PF: 250-251 °C.

EM-IE, m/e (int. rel.): 354 ($M^{+\bullet}$, 55), 339 (16), 311 (100), 299 (86), 286 (5), 177 (10), 165 (14), 135 (8), 123 (7), 77 (6), 69 (15), 55 (6).

IV, $_{máx.}^{Kbr}$ ν, cm^{-1}: 3500-3200, 2924, 1658, 1620, 1477, 1450, 1358, 1250, 1180, 995.

UV $_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 348 (3,7), 271 (3,7), 204 (4,8).

UV $_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 408 (3,8), 227 (3,7), 216 (4,1).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 372 (3,8), 280 (3,6), 204 (4,8).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$, nm (log ε): 371 (3,8), 281 (3,6), 203 (4,8).

RMN de ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 2 (pág. 68).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 2 (pág. 68).

2. 5. 3. Triacetato de artocarpesina (78Ac)

Sólido amarelo-acastanhado.

RMN de ^1H (DMSO-d_6, 200 MHz): Tabela 2 (pág. 68).

2. 5. 4. Artelasticina (79)

Goma de cor vermelho alaranjada.

EM-IE, m/e (int. rel.): 490 ($M^{+\bullet}$, 100), 473 (17), 463 (37), 447 (59), 435 (55), 419 (14), 403 (10), 391 (24), 379 (43), 361 (10), 335 (31), 323 (17), 189 (29), 177 (26), 147 (19), 137 (25).

IV, $_{máx.}^{Kbr}$ ν, cm^{-1}: 3400-3200, 2922, 2855, 1658, 1630, 1565, 1467, 1440, 1378, 1230.

UV $_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 371 (4,0), 269 (4,1).

UV $_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 407 (4,2), 277 (4,1), 261 (4,0).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 415 (4,0), 383 (4,1), 285 (4,2).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$, nm (log ε): 414 (4,0), 383 (4,1), 286 (4,2).

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 3 (pág. 81).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 4 (pág. 82).

2. 5. 5. Triacetato de artelasticina (79Ac)

Goma de cor vermelho alaranjada.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz): Tabela 3 (pág. 81).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 4 (pág. 82).

2. 5. 6. Ciclocomunina (73)

Sólido cristalino amarelo.

PF: 277-279 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -59° (acetona, c = 68 mg/100 ml).

EM-IE, m/e (int. rel.): 420 ($M^{+\bullet}$, 98), 405 (33), 377 (24), 365 (100), 352 (39), 335 (20), 321 (96), 309 (76), 297 (19), 177 (21), 165 (35), 137 (19), 77 (19), 69 (26).

EM-FAB$^+$, m/e (int. rel.): 421 ($M+H^+$, 10), 329 (10), 307 (25), 289 (10), 176 (25), 154 (100), 136 (72), 120 (12), 107 (24), 91 (21), 77 (22).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$**, cm^{-1}:** 3400-3100, 2970, 2924, 1651, 1627, 1570, 1466, 1380, 1362, 1254.

UV $\lambda_{max.}^{MeOH}$**, nm (log ε):** 369 (4,3), 275 (4,3), 216 (4,6).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + NaOH}$**, nm (log ε):** 408 (4,5), 271 (4,3), 211 (5,0).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$**, nm (log ε):** 414 (4,2), 372 (4,4), 277 (4,4), 204 (4,7).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$**, nm (log ε):** 413 (4,2), 372 (4,4), 278 (4,4), 206 (4,7).

RMN de ^{1}H (DMSO-d$_6$, 300 MHz): Tabela 5 (pág. 90).

RMN de ^{13}C (DMSO-d$_6$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 6 (pág. 91)

2. 5. 7. Diacetato de ciclocomunina (73Ac)

Sólido cristalino amarelo.

PF: 202-204 °C

RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 5 (pág. 90).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 6 (pág. 91).

2. 5. 8. Artelastina (80)

Goma de cor vermelho-alaranjada.

$[\alpha]_D^{20}$: -54° (acetona, c = 374 mg/100 ml).

EM-IE, m/e (int. rel.): 488 ($M^{+\bullet}$, 100), 473 (17), 445 (26), 433 (87), 418 (22), 403 (40), 389 (75), 377 (28), 321 (27), 189 (42), 137 (23), 63 (19).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2974, 2912, 1651, 1628, 1562, 1434, 1377, 1354, 1296, 1219, 1180, 934, 852, 814.

UV $_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 369 (4,1), 276 (4,2), 260 (4,2), 207 (4,8).

UV $_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 403 (4,3), 268 (4,2).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 420 (3,9), 375 (4,1), 278 (4,2), 265 (4,2), 207 (4,8).

$UV_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$ **, nm (log ε):** 420 (3,9), 375 (4,1), 278 (4,2), 265 (4,2), 207 (4,8).

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz): Tabela 7 (pág. 101).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 8 (pág. 102).

2. 5. 9. Diacetato de artelastina (80Ac)

Sólido cristalino de cor vermelho-alaranjada.

PF: 181-183 °C.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz): Tabela 7 (pág. 101).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 8 (pág. 102).

2. 5. 10. Artelastocromeno (81)

Sólido cristalino amarelo.

PF: 238-240 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -81° (acetona, c = 308 mg/100 ml).

EM-IE, m/e (int. rel.): 486 ($M^{+\bullet}$, 93), 471 (100), 443 (10), 431 (35), 415 (10), 387 (10), 228 (15), 215 (10), 194 (30), 149 (29), 137 (10), 109 (19), 69 (15).

IV, $_{máx.}^{Kbr}$ ν, cm^{-1}: 3400-3100, 2923, 1652, 1617, 1548, 1465, 1377, 1351, 1240, 1215, 1187.

$UV_{max.}^{MeOH}$, **nm (log ε):** 375 (4,2), 296 (4,3), 202 (5,2).

$UV_{max.}^{MeOH + NaOH}$, **nm (log ε):** 412 (4,4), 277 (4,3), 207 (5,2).

$UV_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, **nm (log ε):** 440 (3,8), 372 (4,2), 296 (4,3), 202 (5,2).

$UV_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$, **nm (log ε):** 440 (3,8), 372 (4,2), 296 (4,3), 202 (5,2).

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz): Tabela 9 (pág. 114).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 10 (pág. 115).

2. 5. 11. Monoacetato de artelastocromeno (81Ac1)

Sólido cristalino amarelo.

PF: 185-187 °C.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 9 (pág. 114).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 10 (pág. 115).

2. 5. 12. Diacetato de artelastocromeno (81Ac2)

Sólido cristalino de cor amarela-alaranjada.

PF: 215-218 °C.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 9 (pág. 114).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 10 (pág. 115).

2. 5. 13. Artelastofurano (82)

Goma de cor amarela-alaranjada.

$[\alpha]_D^{20}$: -7° (MeOH, c = 158 mg/100 ml).

EM-IQ$^+$, m/e (int. rel.): 507 ($M+H^+$, 100), 451 (55), 379 (15), 343 (15), 177 (20), 115 (40).

EM-IE, m/e (int. rel.): 506 ($M^{+\bullet}$, 100), 491 (10), 463 (65), 451 (85), 433 (15), 391 (10), 335 (15), 189 (15).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2974, 2926, 1653, 1610, 1458, 1312, 1244, 1151.

UV $\lambda_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 316 (4,5), 268 (4,8), 213 (5,0).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 390 (4,6), 266 (4,8), 219 (5,0).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 360 (4,7), 312 (4,7), 266 (4,9), 215 (5,0).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3+HCl}$, nm (log ε): 359 (4,7), 306 (4,7), 265 (4,9), 215 (5,0).

RMN de ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 11 (pág. 127).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 12 (pág. 128).

2. 5. 14. Diacetato de artelastofurano (82Ac)

Goma de cor amarela-alaranjada.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 11 (pág. 127).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 12 (pág. 128).

2. 5. 15. Artelastinina (83)

Líquido viscoso de cor amarelo-alaranjada.

$[\alpha]_D^{20}$: 0° (MeOH, c = 184 mg/100 ml).

EM-FAB$^+$, m/e (int. rel.): 507 ($M+H^+$, 59), 451 (12), 395 (7), 377 (16), 335 (10), 207 (23), 185 (52), 115 (86), 93 (100).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2974, 2912, 1650, 1600, 1562, 1464, 1370, 1350, 1260, 1245, 1170.

UV $\lambda_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 337 (4,0), 272 (4,1), 214 (4,4).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 385 (4,1), 267 (4,1), 214 (4,6).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 364 (4,1), 280 (4,1), 216 (4,4).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3+HCl}$, nm (log ε): 356 (4,0), 281 (4,1), 216 (4,4).

RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 13 (pág. 156).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e de 135°): Tabela 14 (pág. 157).

2. 5. 16. Diacetato de artelastinina (83Ac)

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 15 (pág. 158).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e de 135°): Tabela 16 (pág. 159).

2. 5. 17. Artelastocarpina (84)

Sólido cristalino de cor amarela.

PF: 207-210 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: 0° (MeOH, c = 164 mg/100 ml).

EM-IE, m/e (int. rel.): 506 ($M^{+\bullet}$, 12), 451 (10), 412 (15), 390 (85), 362 (60), 316 (88), 264 (70), 251 (74), 236 (52), 144 (36), 121 (100).

EM-FAB$^+$ (NBA), m/e (int. rel.): 507 (10), 176 (15), 154 (100), 136 (75), 89 (25), 51 (15).

HR EM-FAB$^+$ (NBA), m/e: 507,2383 (calculado para $C_{30}H_{35}O_7$, 507,2389).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2978, 2928, 1647, 1620, 1554, 1473, 1446, 1354, 1315, 1277, 1246, 1176.

$UV_{max.}^{MeOH}$, **nm (log ε):** 341 (3,8), 275 (3,9), 207 (4,2).

$UV_{max.}^{MeOH + NaOH}$, **nm (log ε):** 387 (4,1), 272 (4,1), 216 (4,6).

$UV_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, **nm (log ε):** 359 (4,0), 275 (4,0), 206 (4,3).

$UV_{max.}^{MeOH + AlCl_3+HCl}$, **nm (log ε):** 357 (3,9), 283 (3,9), 214 (4,2).

RMN de ^1H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 13 (pág. 156).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e de 135°): Tabela 14 (pág. 157).

2. 5. 18. Diacetato de artelastocarpina (84Ac)

Goma de cor amarela-alaranjada.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): Tabela 15 (pág. 158).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 16 (pág. 159).

2. 5. 19. Carpelastofurano (85)

Sólido de cor amarela.

PF: 236-239 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: 0° (MeOH, c = 1,36 mg/100 ml).

EM-IE, m/e (int. rel.): 522 ($M^{+\bullet}$, 70), 507 (10), 479 (22), 467 (100), 335 (20), 189 (8), 59 (18).

EM-FAB$^+$ (NBA), m/e (int. rel.): 523 ($M+H^+$, 65), 505 (20), 463 (20), 307 (20), 154 (100), 136 (78), 107 (35), 77 (35).

HR EM-FAB$^+$ (NBA), m/e: 523,23319 (calculado para $C_{30}H_{36}O_8$, 523,23304).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2976, 2885, 1660, 1623, 1549, 1481, 1429, 1354, 1313, 1238, 1174, 1028.

UV $\lambda_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 344 (5,1), 274 (5,1), 215 (5,4).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 387 (5,2), 270 (5,1), 214 (5,4).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 410 (4,9), 362 (5,1), 282 (5,1), 215 (5,4).

UV $\lambda_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$, nm (log ε): 409 (4,9), 363 (5,1), 285 (5,1), 216 (5,4).

RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz): Tabela 20 (pág. 172).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): Tabela 20 (pág. 172).

2. 5. 20. 2,4-diidroxibenzoato de etilo (86)

Goma de cor castanha.

EM-IE, m/e (int. rel.): 182 ($M^{+\bullet}$, 40), 136 (100), 108 (28).

IV, $\nu_{máx.}^{Kbr}$, cm^{-1}: 3500-3200, 2924, 2349, 2314, 1655, 1462, 1265.

UV $_{max.}^{MeOH}$, nm (log ε): 296 (3,3), 260 (3,6), 220 (3,6).

UV $_{max.}^{MeOH + NaOH}$, nm (log ε): 309 (3,6), 239 (3,5), 216 (2,6).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3}$, nm (log ε): 322 (3,2), 280 (3,4), 231 (3,4).

UV $_{max.}^{MeOH + AlCl_3 + HCl}$, nm (log ε): 323 (3,2), 279 (3,4), 230 (3,4).

RMN de ^{1}H (DMSO-d$_6$, 300 MHz): δ 10,80 (*s*, 2-OH), δ 8,30 (*s*, 4-OH), δ 7,64 (*d*, *J* = 8,8 Hz, H-6), δ 6,36 (*dd*, *J* = 8,8 e 2,3 Hz, H-5), δ 6,28 (*d*, *J* = 2,3 Hz, H-3), δ 4,30 (*q*, 2H, *J* = 7,1 Hz, -COOC<u>H</u>$_2$CH$_3$), δ 1,30 (*t*, 3H, *J* = 7,1 Hz, -COOCH$_2$C<u>H</u>$_3$).

RMN de ^{13}C (DMSO-d$_6$, 75 MHz BB e DEPT de 90° e 135°): δ 169,37 (-<u>C</u>OOCH$_2$CH$_3$), δ 164,27 (C-2 ou 4), δ 162,88 (C-4 ou 2), δ 131,68 (CH-6), δ 108,42 (CH-5), δ 104,12 (C-1), δ 102,53 (CH-3), δ 60,90 (-COO<u>C</u>H$_2$CH$_3$), δ 14,18 (-COOCH$_2$<u>C</u>H$_3$).

2. 5. 21. Diacetato de 2,4-diidroxibenzoato de etilo (86Ac)

Goma de cor castanha.

RMN de ^{1}H (DMSO-d$_6$, 200 MHz): δ 7,98 (*d*, *J* = 8,6 Hz, H-6), δ 7,21 (*dd*, *J* = 8,6 e 2,3 Hz, H-5), δ 7,13 (*d*, *J* = 2,3 Hz, H-3), δ 4,25 (*q*, 2H, *J* = 7,1 Hz, -COOC<u>H</u>$_2$CH$_3$), δ 2,28 e δ 2,27 (*s* e 3H cada, -OCOC<u>H</u>$_3$), δ 1,27 (*t*, 3H, *J* = 7,1 Hz, -COOCH$_2$C<u>H</u>$_3$).

PARTE B

DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume

PARTE B_1

ACTIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE

CAPÍTULO I

Introdução

1. Preâmbulo

A procura de novos compostos com actividade anti-inflamatória dotados de menores efeitos secundários indesejáveis contínua a ser uma área importante de investigação. Entre os compostos com esta actividade encontram-se estruturas bastante diversas, nomeadamente vários compostos fenólicos, incluindo os flavonóides [68, 182-193]. Ao contrário dos anti-inflamatórios não esteroídicos (AINEs) clássicos, que frequentemente revelam efeitos ulcerogénicos, alguns flavonóides naturais como a gossipina, a (+)-catequina e a naringenina não apresentam este efeito, podendo mesmo ser protectores da mucosa gástrica [68, 184].

Alguns flavonóides isoprenilados tem revelado actividade anti-inflamatória, particularmente os isolados de plantas do género *Artocarpus* referidos na **Parte A (Capítulo I**, págs. 25 a 28) [69, 70, 194]. Este facto pode, em parte, explicar a utilização de algumas plantas do género *Artocarpus* na medicina tradicional no tratamento de várias patologias que envolvem inflamação aguda ou crónica da pele e mucosas [19]. Esta actividade foi já confirmada em ensaios *in vitro* e *in vivo*, nomeadamente para o extracto alcoólico de *A. altilis* Fosb., que mostrou inibir fortemente a cicloxigenase 1 e diminuir o edema da orelha de ratinho, um ensaio *in vivo* frequentemente usado como modelo de inflamação [27].

Os mecanismos pelos quais os flavonóides têm revelado actividade anti-inflamatória envolvem a interferência na actividade de enzimas da cascata do ácido araquidónico (fosfolipase A_2, cicloxigenases e lipoxigenases) [68-70, 182, 185, 187-195], na libertação pelos leucócitos de enzimas lisosómicas [68, 183-186, 193, 195] e de espécies reactivas do oxigénio [68, 183, 185, 186, 195-197]. A capacidade de captar radicais do oxigénio foi demostrada para diversas classes de flavonóides e outros compostos fenólicos [80, 81, 83-86, 88, 90, 91, 94, 95, 189, 198, 199]. Esta propriedade pode também contribuir para a actividade anti-inflamatória, prevenindo os efeitos deletérios dos radicais livres sobre os tecidos inflamados [68].

Assim, justificou-se o estudo da influência das flavonas isopreniladas isoladas de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume sobre os processos envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória. As flavonas estudadas foram a artocarpesina (**77**), a artelasticina (**78**), a artelastina (**79**) e o artelastocromeno (**80**).

Na primeira etapa do plano de trabalho realizaram-se ensaios *in vitro* para avaliar a influência das quatro flavonas isopreniladas na libertação de radicais livres e enzimas lisosómicas em leucócitos humanos, bem como a sua actividade sobre fosfolipases A_2 (PLA_2) secretoras e cicloxigenases 1 e 2 humanas. Foi ainda estudada a acção destes flavonóides no processo da peroxidação lipídica e na captação de radicais superóxido e peroxilo.

Na segunda etapa deste plano de trabalho completou-se o estudo com ensaios *in vivo*, tendo-se utilizado o modelo de "bolsa de ar em ratinho" estimulada com zimosano, para avaliar o efeito das flavonas sobre a migração leucocitária, libertação de mieloperoxidase e vias de metabolização do ácido araquidónico. Este modelo apenas foi utilizado para as flavonas que revelaram interferir significativamente com os parâmetros do processo inflamatório estudados nos ensaios *in vitro*.

Antes da apresentação dos ensaios que foram realizados e da discussão dos resultados far-se-à uma abordagem introdutória sobre a relevância das actividades e testes biológicos efectuados.

2. Considerações sobre o processo inflamatório

A inflamação pode definir-se como um mecanismo de defesa em resposta a qualquer estímulo físico, químico ou biológico, que provoque lesões celulares, envolvendo uma rede organizada de interacções celulares e moleculares [200, 201]. Ainda que a resposta inflamatória seja um meio eficaz de protecção e de reparação das lesões provocadas por vários agentes, as células e mediadores químicos que participam no processo inflamatório podem conduzir a lesões tecidulares e interferir com o funcionamento normal do organismo. A inflamação e as lesões mediadas pelo sistema imunitário são comuns a muitas patologias humanas, grande parte delas de carácter sistémico e crónico [202].

2. 1. Migração leucocitária e libertação de enzimas lisosómicas

Um dos primeiros fenómenos da resposta inflamatória aguda é o recrutamento de células sanguíneas com capacidade fagocítica com o objectivo de destruir o agente agressor. Após a aderência do neutrófilo ao endotélio vascular, este atravessa a parede do vaso e migra até ao foco inflamatório. Este fenómeno é mediado por agentes quimiotácticos presentes no tecido extravascular, que podem exercer a sua acção sobre receptores específicos da

membrana dos neutrófilos. Entre os agentes quimiotácticos mais estudados encontram-se o factor do complemento C5a, o leucotrieno B_4 (LTB_4), o PAF, vários péptidos formilados (fMLP), ésteres do forbol (PMA, TPA) e citoquinas [201, 203-206].

Os neutrófilos activados englobam o agente agressor num vacúolo fagocítico, que posteriormente se funde no citoplasma com vesículas contendo enzimas lisosómicas com actividade proteolítica, como a mieloperoxidase e elastase, ocorrendo a fagocitose. A desgranulação pode também ocorrer extracelularmente, contribuindo significativamente para as lesões tecidulares observadas durante o processo inflamatório [201, 203].

A mieloperoxidase, enzima mais abundante dos neutrófilos, catalisa a oxidação de aniões cloreto a ácido hipocloroso por acção do peróxido de hidrogénio. Este é o oxidante mais reactivo produzido pelos neutrófilos. É capaz de danificar estruturas proteicas e reagir com ácidos gordos insaturados, causando a perda da estabilidade das membranas celulares [207-209].

A elastase é uma metaloproteína com actividade de protease que degrada o colagéneo, os proteoglicanos da cartilagem, a elastina e a membrana basal [201].

Embora a activação dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs) seja a primeira linha de defesa contra agentes agressores, frequentemente a acumulação leucocitária participa na patogénese de certos transtornos inflamatórios causados pela activação inapropriada ou excessiva de leucócitos. É o que acontece, por exemplo, na asma, artrite reumatóide e colite ulcerosa [207, 210].

2. 2 Radicais livres

A presença de electrões desemparelhados nos radicais livres é responsável pela sua elevada reactividade frente a diversas moléculas biológicas. Da reacção entre estes radicais e compostos biológicos resulta a formação de novos radicais livres, iniciando-se uma série de reacções radicalares em cadeia de que podem resultar alterações em moléculas biologicamente importantes, como as proteínas, os ácidos gordos insaturados e os constituintes dos ácidos nucleicos (açúcares e bases azotadas) [78, 211].

Os fosfolípidos componentes das membranas celulares são especialmente vulneráveis ao ataque radicalar, dada a elevada susceptibilidade das suas cadeias poliinsaturadas amplificarem o ataque inicial, através de um processo radicalar em cadeia conhecido por peroxidação lipídica (Figura 21) [78, 79, 212].

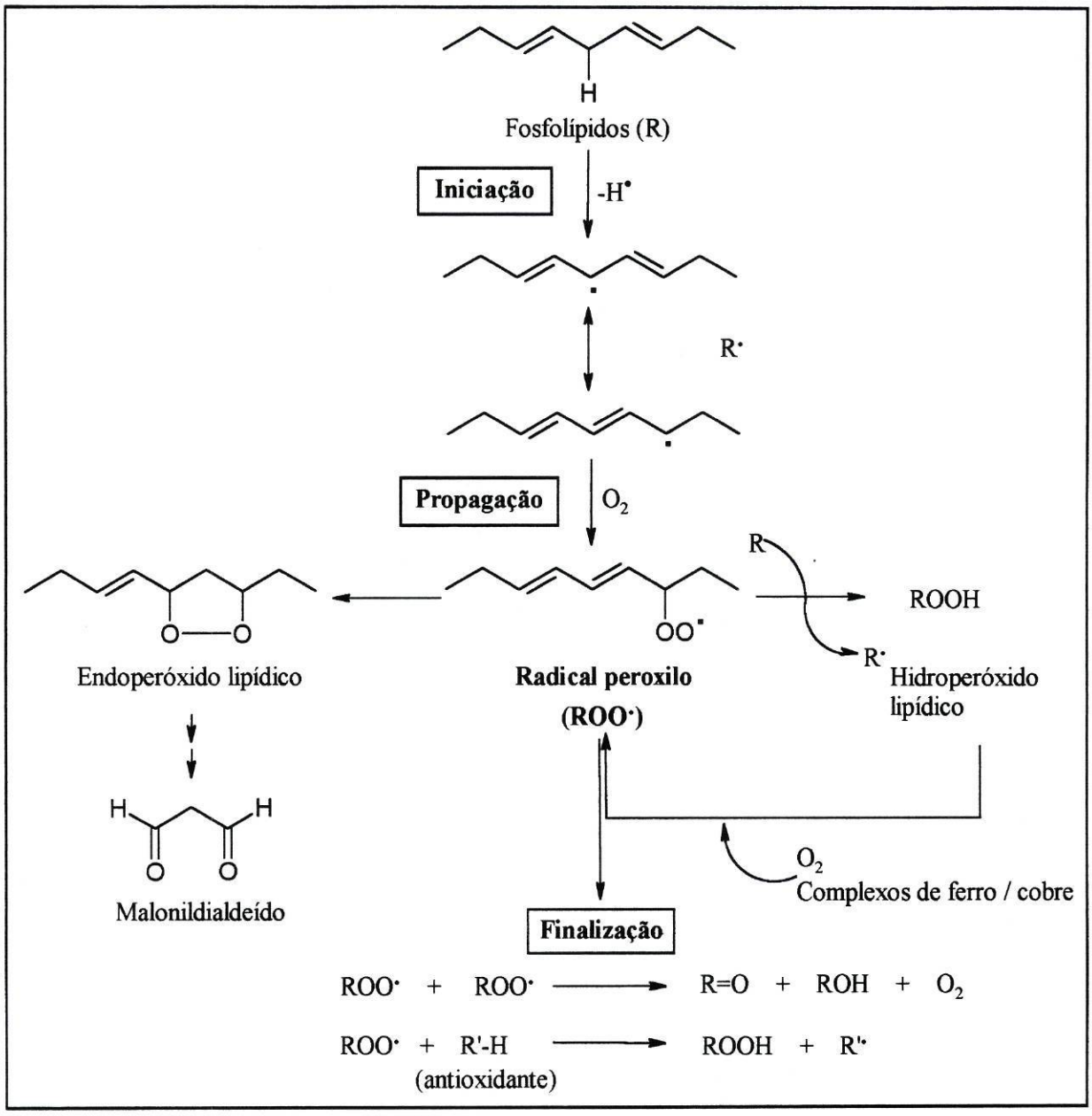


Figura 21 – Etapas da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica pode ser desencadeada por vários radicais livres como os radicais hidroxilo ($HO^{\bullet}$) e hidroperoxilo ($HOO^{\bullet}$). Este processo pode também ser iniciado pela formação de radicais peroxilo ($ROO^{\bullet}$) e alcoxilo ($RO^{\bullet}$) através da interacção dos complexos metálicos de ferro e cobre com os hidroperóxidos lipídicos preexistentes nas fracções lipídicas [210, 213]. Em consequência da peroxidação lipídica ocorrem graves modificações da permeabilidade e da fluidez da membrana, estando este processo associado a várias situações patológicas, como a aterosclerose, o alcoolismo, o envelhecimento, o cancro, etc [210]. Considera-se mais provável que a peroxidação lipídica não seja o agente responsável pelas patologias, mas surja posteriormente e contribua de uma forma determinante para a produção de alterações metabólicas que caracterizam o processo patológico [210, 214].

O envolvimento dos neutrófilos no desenvolvimento do processo inflamatório não está só relacionado com a libertação de enzimas lisosómicas, como também com a geração de radicais livres oxigenados. Durante a fagocitose verifica-se a geração de anião superóxido, por redução do oxigénio molecular, catalisada pelo complexo enzimático NADPH oxidase presente na membrana plasmática dos neutrófilos [75, 214]. Devido à reduzida reactividade do anião superóxido, este radical livre não contribui directamente para o desenvolvimento do processo inflamatório, no entanto, irá ser responsável pelo início da produção em cadeia de outras espécies oxigenadas como o peróxido de hidrogénio, o radical hidroxilo e o ácido hipocloroso (Figura 22, pág. 216) [75, 214]. As espécies oxidantes, principalmente o HOCl e o $HO^{\bullet}$, são agentes fundamentais da degradação do ácido hialurónico e podem interagir com lípidos das membranas celulares desencadeando a peroxidação lipídica, participando de forma directa na destruição da membrana dos eritrócitos, neutrófilos e das células endoteliais [210].

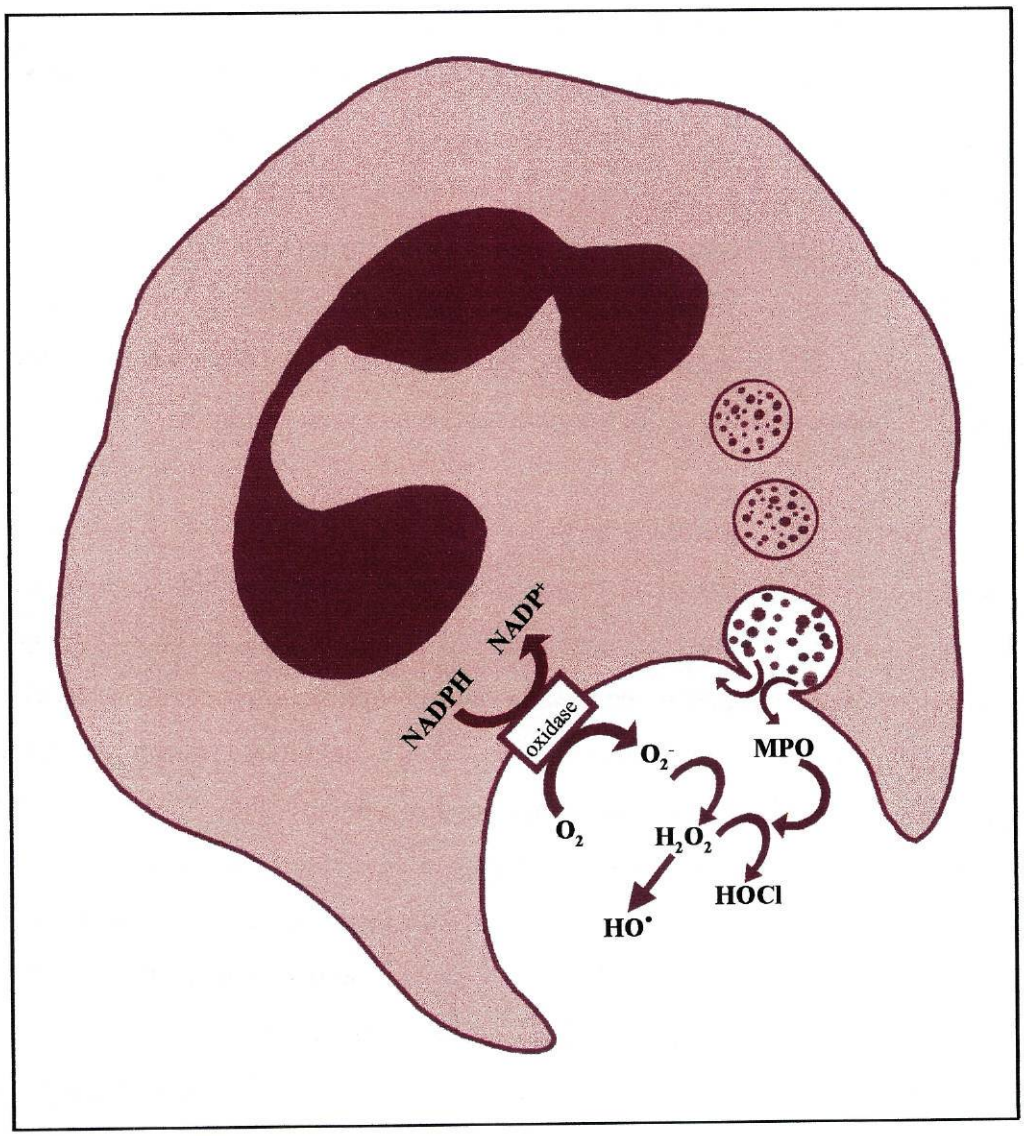


Figura 22 – Geração de radicais livres durante a fagocitose.

2. 3. Mediadores lipídicos

A resposta inflamatória é mediada pela biossíntese de eicosanóides. O primeiro passo na formação destes compostos é a libertação de ácido araquidónico por hidrólise dos fosfolípidos catalisada por fosfolipases A_2 (PLA_2) [214]. Estas enzimas são um grupo

heterogéneo amplamente distribuído, responsável pela hidrólise da ligação éster do ácido gordo ligado à posição 2 dos fosfoglicéridos de membrana [215-224].

O destino posterior do ácido araquidónico é ser metabolizado por duas vias diferentes. Uma via depende da actuação do complexo enzimático prostaglandina H síntase, que apresenta actividade de cicloxigenase (COX) e hidroperoxidase. Em consequência da actividade destas enzimas resulta a formação de prostaglandinas G_2 (PGG_2) e H_2 (PGH_2), que posteriormente são transformadas noutras prostaglandinas (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ e PGI_2) e tromboxanos (TXA_2, TXB_2). A outra via de metabolização do ácido araquidónico está ligada à existência de lipoxigenases e origina a formação de leucotrienos (LTA_4, LTB_4, LTC_4, LTD_4 e LTE_4) e lipoxinas (A e B) [214, 225-227].

Entre os vários prostanóides sintetizados durante a inflamação, a PGE_2 e a prostaciclina são os mais importantes. Ambos são vasodilatadores potentes e agentes hiperalgésicos detectados em tecidos inflamados, pelo que se pensa que contribuam para o eritema, edema e dor característica da inflamação. A PGE_2 é ainda uma substância pirogénica poderosa [225].

Reconhece-se a existência de duas formas de cicloxigenase, a isoenzima tipo 1 (constitutiva) e a isoenzima tipo 2 (indutível). Os AINEs clássicos inibem ambos os tipos de cicloxigenases e pensa-se que os efeitos secundários associados a estes fármacos estejam relacionados com a falta de especificidade para a cicloxigenase-2. Por esta razão, actualmente procura-se desenvolver inibidores selectivos desta isoenzima [224, 228].

Os leucotrienos participam em reacções de defesa e em condições patofisiológicas como os fenómenos de hipersensibilidade e inflamação. Os leucotrienos C_4, D_4 e E_4 são broncoconstrictores potentes, aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a secreção de muco. O LTB_4 estimula a migração leucocitária, a libertação de enzimas e a geração do anião superóxido nos neutrófilos. Os LTC_4, LTD_4 e LTE_4, libertados no tecido pulmonar de indivíduos asmáticos, parecem ter um papel fundamental em reacções de hipersensibilidade imediata. Estes leucotrienos, assim como o LTB_4, manifestam efeitos pró-inflamatórios [230-233].

CAPÍTULO II

Material e metodologia experimental

1. Reagentes químicos e material biológico

O ácido acetilsalicílico, ácido araquidónico, ácido ascórbico, ácido 2-tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, alopurinol, albumina sérica bovina (BSA), azida sódica, azul de toluidina, azul de tripano, citocalasina B, dextrano PM: 580, dimetilformamida, estreptomicina, etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA. Na_2), ferricitocromo C, fosfolipase A_2 *Naja naja*, fosfolipase A_2 de *Apis mellifera*, galhato de propilo, hematina, hipoxantina, L-glutamina, lisozima, lipopolissacárido de *Escherichia coli*, manoalida, *Micrococcus lysodeiktikus*, N-formilmetionilleucilfenilalanina (fMLP), N-terbutoxicarboxi-alanina-*p*-nitrofenilléster (BOC-Ala-OphNO_2), penicilina, peróxido de hidrogénio, RPMI-1640, saponina, superóxido dismutase, 12-O-tetradacanoilforbol-13-acetato, tetra-hidrofurano, tetrametilbenzidina, triptofano, trizma base, tween 80, xantina, xantina oxidase e zimosano utilizados foram produtos da marca Sigma.

Os ácidos clorídrico e acético, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), oxalato de amónio e todos os restantes reagentes químicos utilizados foram produtos da marca Panreac.

O líquido de cintilação aquoso Aquasol-2 e o ^{3}H-ácido oleico foram produtos da firma NEM-Dupont.

O 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) foi um produto da firma Park Scientific Ltd.

A bactotriptona e o extracto de levedura utilizados foram da marca Oxoid.

A estirpe de *Escherichia coli* utilizada foi a CECT-101 (Colección Española de Cepas Testigos) oferecida pelo Prof. Doutor Uruburu do Departamento de Microbiologia da Universidade de Valência.

O soro bovino fetal utilizado foi um produto da firma Gibco.

As células sanguíneas (PMNs, monócitos e plaquetas) utilizadas foram obtidos a partir de sangue citratado de dadores sãos procedentes do Centro de transfusões de Valência (Espanha). Na separação destas células utilizou-se Ficoll-Paque, um produto da Pharmacia Biotech.

2. Soluções tampão e meios de cultura

2. 1. Soluções tampão fosfato

Tampão KH_2PO_4-KOH (10 mM) - 1,36 g/L de diidrogenofosfato de potássio. Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição de hidróxido de potássio 10 M.

Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM) - 6,8 g/L de diidrogenofosfato de potássio. Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição de hidróxido de potássio 10 M.

Tampão NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 – 36,7 g/L de diidrogenofosfato de sódio, 6,7 g/L de hidrogenofosfato dissódico. Ajustou-se o pH a 5,4.

2. 2. Solução tampão Dulbecco

Tampão Dulbecco - 8 g/L de cloreto de sódio, 0,2 g/L de cloreto de potássio, 1,15 g/L de hidrogenofosfato dissódico, 0,2 g/L de diidrogenofosfato de potássio, 0,1 g/L de cloreto de magnésio hexaidratado, 0,132 g/L de cloreto de cálcio e 1 g/L de D-glucose. Ajustou-se o pH a 7,4.

2. 3. Soluções tampão HBSS

Tampão HBSS - 8 g/L de cloreto de sódio, 0,4 g/L de cloreto de potássio, 0,048 g/L de hidrogenofosfato dissódico, 0,06 g/L de diidrogenofosfato de potássio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio, 0,138 g/L de cloreto de cálcio e 1 g/L de D – glucose. Ajustou-se o pH a 7,4.

Tampão HBSS modificado – 8 g/L de cloreto de sódio, 0,4 g/L de cloreto de potássio, 0,048 g/L de hidrogenofosfato dissódico, 0,06 g/L de diidrogenofosfato de potássio e 1 g/L de D-glucose. Ajustou-se o pH até 7,4.

Tampão HBSS modificado concentrado – 80 g/L de cloreto de sódio, 4 g/L de cloreto de potássio, 0,48 g/L de hidrogenofosfato dissódico, 0,6 g/L de diidrogenofosfato de potássio e 10 g/L de D-glucose. Ajustou-se o pH até 7,4.

2. 4. Solução tampão PBS

Tampão PBS – 8 g/L de cloreto de sódio, 0,2 g/L de cloreto de potássio, 1 g/L de hidrogenofosfato dissódico e 0,2 g/L de diidrogenofosfato de potássio. Ajustou-se o pH até 7,4.

2. 5. Soluções tampão Tris

Tampão Tris / HCl (50 mM) – 6 g/L de Trizma base, 1 mM de EDTA.Na_2. Ajustou--se o pH a 7,4 pela adição de ácido clorídrico 1 M.

Tampão Tris / HCl (0,1 M) – 12 g/L de Trizma base. Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição de ácido clorídrico 1 M.

Tampão Tris / HCl (0,7 M) – 84 g/L de Trizma base. Ajustou-se o pH a 7,4 pela adição de ácido clorídrico 1 M.

Tampão 1 - Tampão Tris / HCl (0,1 M), 1 mM de cloreto de cálcio, 0,2 % de azida sódica em água destilada. Ajustou-se o pH a 7,5.

Tampão 2 - 0,25 % BSA em tampão 1. Ajustou-se o pH a 7,5.

Tampão de lavagem - 10 mM de cloreto de cálcio, 0,1 % de BSA e 0,2 % de azida sódica em tampão Tris-HCl (0,7 M). Ajustou-se o pH a 8,0.

2. 6. Meios de cultura

Meio de cultura para *Escherichia coli* - 1 % de bactotriptona, 0,5 % de cloreto de sódio, 50 mM de diidrogenofosfato de sódio. Ajustou-se o pH entre 5,0 - 5,5.

3. Animais

Utilizaram-se ratos Wistar (machos) de 200 a 250 g de peso e ratinhos Swiss (machos) de 25 a 30 g.

4. Material e instrumentos

- Os ensaios foram efectuados em tubos de polipropileno (Nunc) ou em microplacas (96 cupulas) de fundo em U (Nunc).

- Na determinação da incorporação ^{3}H-ácido oleico nas membranas de *Escherichia coli* utilizaram-se minicolunas de troca iónica Bond Elut-NH_2 da firma Varian.

- Nas incubações a 37°C e 45°C utilizou-se um banho P-Selecta Tectron S-543 termostatado. As incubações a 100° C foram efectuadas num termostato de bloco metálico P--selecta.

- Na preparação dos microssomas hepáticos utilizou-se um homogeneizador Potter.

- Nas centrifugações utilizou-se a centrífuga P-Selecta Medifriger e a ultracentrífuga Sorvall RS 28S.

- As determinações espectrofotométricas no UV-Vis foram realizadas num espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda, em células de plástico ou de quartzo de 1 mL de volume mínimo. Nos ensaios realizados em microplacas as leituras foram efectuadas num leitor de placas Labsystems Multiskan MCC/340.

- Nos ensaios de avaliação da actividade inibidora da fosfolipase A_2 e cicloxigenases as leituras foram realizadas num cintilómetro refrigerado Wallac 1410.

• Na determinação da actividade inibidora das cicloxigenases 1 e 2 quantificaram-se os níveis de PGE_2 mediante técnicas de radioimunoensaio (RIA) comercializadas pela AMI Research Products.

• Na preparação de monócitos utilizaram-se caixas de cultura de tecidos da marca Nunc, tendo-se utilizado uma estufa (Leec) com atmosfera de CO_2.

5. Métodos

5. 1. Ensaios *in-vitro*

A artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) foram dissolvidos em metanol ou DMSO, de acordo com a respectiva solubilidade, de modo a ser obtida uma solução de concentração 10^{-2} M. Em todos os ensaios a concentração máxima da solução estudada foi de 10 μM.

Nos ensaios foram usados quatro grupos de amostras, testados em triplicado, que foram designados por:

- grupo "**Branco**", correspondente ao mínimo de actividade;
- grupo "**Controlo**", correspondente ao máximo de actividade;
- grupo "**Branco Problema**", diferindo do grupo "**Branco**" pela presença da solução da flavona e que permitiu minimizar a interferência das flavonas no protocolo experimental;
- grupo "**Problema**", diferindo do grupo "**Controlo**" pela presença da solução da flavona e que permitiu estudar o efeito das flavonas na actividade ensaiada.

5. 1. 1. Captação de radicais livres

5. 1. 1. 1. Captação do anião superóxido no sistema hipoxantina / xantina oxidase

Os aniões superóxido foram gerados no sistema hipoxantina/xantina oxidase e protocolo experimental utilizado encontra-se esquematizado na Tabela 32.

Tabela 32 – Protocolo experimental para a avaliação da captação de anião superóxido no sistema hipoxantina/xantina oxidase.

	Branco (µL)	**Branco Problema (µL)**	**Controlo (µL)**	**Problema (µL)**
Composto	---	10	---	10
Solvente*	10	---	10	---
EDTA.Na_2 (1 mM)	100	100	100	100
Hipoxantina (100 µM)	10	10	10	10
Ferricitocromo C (100 µM)	100	100	100	100
Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM)	800	800	700	700
	Agitação			
Xantina oxidase (66 mU/mL)	---	---	100	100
	Determinação cinética a 550 nm durante 2 minutos			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

A mistura reaccional continha tampão KH_2PO_4/KOH (50 mM, pH 7,4), EDTA (1 mM), hipoxantina (100 µM) e ferricitocromo C (100 µM). A reacção iniciou-se pela adição da enzima xantina oxidase (66 mU/mL), que provocou a geração de radicais superóxido ao oxidar a hipoxantina a ácido úrico. Mediu-se a velocidade de redução do ferricitocromo C pelos radicais superóxido mediante a determinação cinética do aumento da absorvência a 550 nm durante 2 minutos.

Neste ensaio foram realizadas duas provas preliminares: uma para determinar se as flavonas eram inibidoras da xantina oxidase e outra para detectar se reduziam directamente o ferricitocromo C. A avaliação da influência sobre a actividade da xantina oxidase foi

determinada medindo a formação de ácido úrico a 295 nm, utilizando xantina como substracto. O protocolo experimental encontra-se esquematizado na Tabela 33. O protocolo experimental para a avaliação da redução directa do ferricitocromo C pelas flavonas estudadas está indicado na Tabela 34.

Tabela 33 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da xantina oxidase.

	Branco (μL)	**Branco Problema (μL)**	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
Composto	---	10	---	10
Solvente*	10	---	10	---
Xantina oxidase (66 mU/mL)	---	---	100	100
Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM)	100	100	---	---
	Incubação durante 15 minutos a 25°C			
EDTA.Na_2 (1 mM)	100	100	100	100
Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM)	800	800	800	800
Xantina (100 μM)	10	10	10	10
	Determinação cinética a 295 nm durante 2 minutos			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

Tabela 34 – Protocolo experimental para a avaliação da redução directa do ferricitocromo C.

	Branco (μL)	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
Composto	---	---	10
EDTANa_2 (1 mM)	100	100	100
Hipoxantina (100 μM)	10	10	10
Ferricitocromo C (100 μM)	---	100	100
Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM)	910	810	800
	Determinação da absorvência a 550 nm		

5. 1. 1. 2. Captação de radical peroxilo

A mistura reaccional contendo tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM, pH 7,4), lisozima (68 μM), ABAP (10 mM) e a solução da flavona a estudar foi incubada durante 90 minutos a 45

°C, para facilitar a decomposição do ABAP, com a formação de radicais peroxilo. Determinou-se a actividade da lisozima, medindo a diminuição da turvação de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* 0,3 mg/mL em tampão Dulbecco a 450 nm por determinação cinética durante 30 segundos. O protocolo experimental encontra-se esquematizado na Tabela 35.

Tabela 35 – Protocolo experimental para a avaliação da captação de radical peroxilo.

	Branco (µL)	**Branco problema (µL)**	**Controlo (µL)**	**Problema (µl)**
Composto	---	5	---	5
Solvente*	5	---	5	---
Lisozima (68 µM)	450	450	450	450
ABAP (10 mM)	---	---	50	50
Tampão KH_2PO_4-KOH (50 mM)	50	50	---	---
	Incubação durante 90 minutos a 45°C			
	Medição de 50 µL da mistura reaccional			
	Adição de 950 µl de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,3 mg/mL)			
	Determinação cinética a 450 nm durante 30 segundos			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

Segundo este método, o grupo "**Branco**" apresentava o máximo de actividade da lisozima, sendo a diminuição de absorvência máxima. Pelo contrário, no grupo "**Controlo**" esta diminuição era muito menor, já que a enzima era inactivada pelos radicais peroxilo. Se o compostos em estudo fossem captores de radicais peroxilo, a enzima não seria inactivada.

5. 1. 2. Inibição da peroxidação lipídica em membranas microssomais

O sistema biológico utilizado para avaliar o efeito inibidor da peroxidação lipídica pelos compostos em estudo foi a fracção microssomal hepática de rato.

5. 1. 2. 1. Obtenção de microssomas hepáticos

Utilizaram-se ratos Wistar macho (200-250 g) em jejum desde o dia anterior, sacrificados por deslocamento cervical. Extraiu-se o fígado, que foi pesado, fragmentado e lavado com solução de KCl (1,15 %). Após adição de uma solução de KCl (1,15 %) na proporção de três partes de solução por parte de fígado, o fígado foi homogeneizado (1 200 rpm). Centrifugou-se a 12 062 g durante 10 minutos a 4°C e recolheu-se o sobrenadante, que foi submetido a nova centrifugação nas mesmas condições. Centrifugou-se o sobrenadante obtido a 189 560 g durante 40 minutos a 4°C, recolhendo-se o sedimento. Este foi homogeneizado e diluído com solução de KCl de forma a obter-se uma suspensão cujo volume em mL fosse igual ao peso inicial de fígado. Esta suspensão foi fraccionada em alíquotas de 2 - 3 mL e conservada a -70°C.

5. 1. 2. 2. Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+}/ácido ascórbico

A suspensão microssomal foi diluída com uma mistura de tampão Tris-HCl (0,1M) e KCl 1,15 %, na proporção de 1:2, de modo a obter uma concentração final de proteínas de 2 mg/mL (Método de Lowry [233]). A peroxidação lipídica foi induzida por adição de ácido ascórbico (500 μM) e $FeSO_4$ (5 μM) a 900 μL de suspensão microssomal, sendo esta mistura incubada durante 20 minutos a 37 °C. Após paragem da reacção por adição de ácido tricloroacético (10 %), centrifugou-se a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Recolheu-se 1 mL de sobrenadante e adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67 %), aquecendo-se durante 15 minutos a 100 °C. Após arrefecimento mediu-se a absorvência a 535 nm. O esquema do protocolo experimental utilizado está representado na Tabela 36 (pág. 230).

Tabela 36 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} / ácido ascórbico.

	Branco (μL)	**Branco problema (μL)**	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
Suspensão microssomal	900	900	900	900
Tampão Tris HCl/KCl	90	90	30	30
Composto	---	10	---	10
Solvente*	10	---	10	---
Ácido ascórbico (500 μM)	---	---	30	30
$FeSO_4$ (5 μM)	---	---	30	30
	Incubação durante 20 minutos a 37°C			
TCA (10 %)	1800	1800	1800	1800
	Centrifugação a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C Adição de 1mL de TBA 0,67 % a 1mL de sobrenadante Incubação durante 15 minutos a 100 °C Determinação da absorvência a 535 nm			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

5. 1. 3. Estudo das funções leucocitárias e da libertação de mediadores em leucócitos humanos

5. 1. 3. 1. Obtenção de leucócitos PMNs humanos

A 20 mL de sangue citratado adicionou-se igual volume de uma solução de dextrano (2 %) em soro fisiológico (NaCl 0,9 %). Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos para facilitar a sedimentação dos eritrócitos. Recolheu-se a fase superior rica em PMNs e concentrou-se por centrifugação a 1 100 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente, tendo-se obtido um sedimento ligeiramente contaminado com eritrócitos. Os eritrócitos contaminantes foram eliminados por lise hipotónica com 45 mL de água destilada fria (2 - 4°C) durante 20 a 30 segundos, seguida pela adição de 5 mL de tampão HBSS modificado concentrado. Após centrifugação a 1 300 rpm durante 10 minutos recolheu-

-se o sedimento, que foi ressuspendido em 10 mL de tampão HBSS modificado. No fundo do tubo com esta suspensão adicionaram-se 7 mL de Ficoll-Paque com o fim de estabelecer um gradiente de centrifugação adequado para a obtenção dos PMNs. Posteriormente centrifugou-se a 1500 rpm durante 40 minutos à temperatura ambiente. O sedimento celular ressuspendeu-se em tampão HBSS para obter uma concentração de $2{,}5x10^6$ células/mL. A viabilidade dos PMNs obtida, mediante a coloração com azul de tripano, foi superior a 95 %.

5. 1. 3. 2. Inibição da libertação de elastase por PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP

A 500 μL de uma suspensão de PMNs ($2{,}5 \times 10^6$ células/mL), adicionaram-se as soluções das flavonas (10 μM), incubando-se durante 5 minutos a 37 °C. Adicionou-se o pré indutor citocalasina B (10 μM) repetindo-se a incubação durante 5 minutos a 37 °C. Procedeu-se à estimulação dos leucócitos com a adição do peptido fMLP (10 μM) e incubou-se 10 minutos a 37°C. Com o objectivo de separar a elastase libertada pelos PMNs centrifugou-se a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Recolheram-se 250 μL dos sobrenadantes para micro-placas, aos quais se adicionou 5 μL do substrato da elastase, o BOC-Ala-$OPhNO_2$ (200 μM). Após uma incubação de 20 minutos a 37°C quantificou-se o *p*-nitrofenol formado por determinação espectrofotométrica a 414 nm. Na Tabela 37 (pág. 232) encontra-se esquematizado o protocolo experimental utilizado.

Tabela 37 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da libertação de elastase por PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP

	Branco (µL)	**Branco do problema (µL)**	**Controlo (µL)**	**Problema (µL)**
PMNs	500	500	500	500
Composto	---	5	---	5
Solvente*	5	---	5	---
	Incubação durante 5 minutos a 37 °C com agitação			
Citocalasina B (10 µM)	---	---	5	5
	Incubação durante 5 minutos a 37 °C com agitação			
fMLP (10 µM)	---	---	5	5
	Incubação durante 10 minutos a 37 °C com agitação Centrifugação a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C Medição de 250 µL de sobrenadantes para microplacas			
Sobrenadantes	250	250	250	250
BOC-Ala-OPhNO_2 (200 µM)	5	5	5	5
	Incubação durante 20 minutos a 37 °C Determinação da absorvência a 414 nm			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

Neste ensaio realizou-se uma prova preliminar para determinar se as flavonas inibiam directamente a enzima elastase. Com esse objectivo, procedeu-se à lise dos PMNs com ultrassons a fim de se libertar o conteúdo enzimático. O grau de hidrólise foi comprovado ao longo do tempo em câmara de Neubauer, mantendo o tratamento com ultrassons até se conseguir a lise praticamente total dos PMNs. Mediante centrifugação a 100 000 g durante uma hora a 4 °C, obteve-se um sobrenadante no qual se encontravam várias enzimas, nomeadamente a elastase. Utilizando o protocolo experimental descrito anteriormente, ensaiaram-se diferentes diluições do sobrenadante até à obtenção de uma concentração de elastase similar à libertada pelos PMNs estimulados.

Na Tabela 38 (pág. 233) esquematiza-se o protocolo experimental utilizado para a avaliação da inibição da elastase.

Tabela 38 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da elastase.

	Branco (μL)	Branco do problema (μL)	Controlo (μL)	Problema (μL)
Sobrenadante	---	---	250	250
Composto	---	2,5	---	2,5
Solvente*	2,5	---	2,5	---
Tampão HBSS	250	250	---	---
BOC-Ala-OPhNO$_2$ (200 μM)	5	5	5	5
	Incubação durante 20 minutos a 37°C			
	Determinação da absorvência a 414 nm			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

Dispôs-se em microplacas, nos poços "**Controlo**" e "**Problema**", 250 μL da diluição do sobrenadante. Prepararam-se amostras "**Branco**" e "**Branco Problema**" empregando tampão HBSS em vez de sobrenadante. Nas amostras "**Problema**" adicionou-se 2,5 μL da solução da flavona a estudar, enquanto que nas amostras "**Controlo**" foi adicionado 2,5 μL do solvente correspondente tendo-se, em qualquer um dos casos, adicionado 5 μL de BOC-Ala--OPhNO$_2$ (200 μM). Após a incubação da placa durante 20 minutos a 37 °C procedeu-se à leitura da absorvência a 414 nm.

5. 1. 3. 3. Inibição da libertação do anião superóxido em PMNs humanos

Incubou-se a suspensão de PMNs (2,5x10^6 células/mL) com as soluções das flavonas durante 5 minutos a 37 °C com agitação. Adicionou-se ferricitocromo C (1 mg/mL) incubando-se durante 10 minutos a 37 °C. Terminada a incubação adicionou-se o agente estimulante da desgranulação leucocitária 12-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) (1 μM) e incubou-se novamente durante 10 minutos a 37 °C. Após a paragem da reacção por imersão em banho de gelo, centrifugou-se a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, para eliminar as células em suspensão, que poderiam interferir na determinação espectrofotométrica. Recolheu-se o sobrenadante e quantificou-se a redução do ferricitocromo C pelo anião

superóxido mediante determinação espectrofotometrica a 550 nm. Na Tabela 39 indica-se o esquema do protocolo experimental seguido nesta determinação.

Tabela 39 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da libertação de anião superóxido em PMNs humanos.

	Branco (μL)	**Branco Problema (μL)**	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
PMNs	1000	1000	1000	1000
Composto	---	10	---	10
Solvente*	10	---	10	---
	Incubação durante 5 minutos a 37 °C com agitação			
Ferricitocromo C (1 g/mL)	50	50	50	50
	Incubação durante 10 minutos a 37 °C com agitação			
TPA (1 μM)	---	---	10	10
	Incubação durante 10 minutos a 37°C Colocar em banho de gelo durante 5 minutos Centrifugação a 3 000 rpm / 10 minutos / 4°C Determinação da absorvência do sobrenadante a 550 nm			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

5. 1. 4. Inibição da mieloperoxidase de PMNs humanos

5. 1. 4. 1. Obtenção do sobrenadante de PMNs humanos estimulados por citocalasina B/fMLP

Para a obtenção de PMNs humanos estimulados com citocalasina B/fMLP incubou-se uma suspensão de PMNs ($2{,}5x10^6$ células/mL) com o pré-indutor citocalasina B (10 μM) durante 5 minutos a 37 °C. Procedeu-se à estimulação dos leucócitos com a adição do peptido fMLP (10 μM) e incubou-se 10 minutos a 37 °C. Centrifugou-se a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e separou-se por decantação o sobrenadante, no qual se encontravam várias enzimas, entre estas a mieloperoxidase.

5. 1. 4. 2. Inibição da mieloperoxidase

Nos poços de uma microplaca juntou-se o sobrenadante rico em mieloperoxidase, tampão PBS, tampão NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 e H_2O_2 (0,013 %). Após uma incubação de 5 minutos a 37°C, adicionou-se como substrato da mieloperoxidase uma solução de tetrametilbenzidina (18 mM) em dimetilformamida 8%. Incubou-se novamente durante 3 minutos a 37°C e adicionou-se acetato sódico (1,97 M, pH 3), com o objectivo de parar a reacção e diminuir a turvação. A actividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 620 nm. Na Tabela 40 esquematiza-se o protocolo experimental deste ensaio.

Tabela 40 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da mieloperoxidase.

	Branco (µL)	**Branco Problema (µL)**	**Controlo (µL)**	**Problema (µL)**
Composto	---	2,5	---	2,5
Solvente*	2,5	---	2,5	---
Sobrenadante	---	---	50	50
Tampão PBS	100	100	100	100
Tampão NaH_2PO4-Na_2HPO_4	75	75	75	75
H_2O_2 (0,013 %)	20	20	20	20
	Incubação durante 5 minutos a 37 °C			
Tetrametilbenzidina (18 mM)	20	20	20	20
	Incubação durante 3 minutos a 37°C			
	Paragem da reacção com 30 µl de acetato de sódio (1,97 M, pH 3)			
	Determinação da absorvência a 620 nm			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

5. 1. 5. Mediadores lipídicos

5. 1. 5. 1. Inibição da fosfolipase A_2

O método adoptado baseou-se na incorporação de ácido oleico tritiado nas membranas de *Escherichia coli*. Uma vez incorporado o ácido oleico, em presença dos compostos a estudar e das enzimas fosfolipase A_2 de serpente *Naja naja* (0,1 UI / 10 µl) e de abelha *Apis mellifera* (0,005 UI / 10 µl) avaliou-se a capacidade de inibição de ambas as enzimas pelas flavonas.

5. 1. 5. 1. 1. Obtenção de culturas de *Escherichia coli* em fase exponencial de crescimento

A 60 mL de meio de cultura para *Escherichia coli* adicionou-se 10 µL de uma suspensão de *E. coli* CECT-101 (conservada em glicerol a 20 % e a –70 °C). Incubou-se durante aproximadamente 10 horas a 37 °C tendo-se, posteriormente, medido a absorvência a 550 nm. Esta incubação foi mantida até se obter uma absorvência entre 0,25 e 0,30, correspondente à fase exponencial de crescimento.

5. 1. 5. 1. 2. Incorporação de ^{3}H-ácido oleico nas membranas de *Escherichia coli*

A 1 mL da cultura de *Escherichia coli* preparada como descrito em **5. 1. 5. 1. 1.** adicionaram-se 19 mL de meio de cultura para *E. coli* e 20 µL de ^{3}H-ácido oleico (actividade inicial de 1 mCi / 0,2 mL), de forma a obter 50 µCi de ^{3}H-ácido oleico por cada 10 mL de meio. Incubou-se durante 6 a 8 horas em banho a 37 °C, com agitação, até se obter uma absorvência entre 0,8 e 1 a 550 nm. Uma vez atingido o final da fase exponencial de crescimento, a cultura foi centrifugada a 1 500 g/ 10 min / 4 °C. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi lavado com cerca de 20 mL de tampão de lavagem, para eliminar o ^{3}H-ácido oleico livre. Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se o sedimento em igual volume de NaCl 0,9 %. Por último a suspensão de *Escherichia coli*, contendo membranas com ^{3}H-ácido

oleico incorporado, foi esterilizada em autoclave durante 30 minutos e após o seu arrefecimento foi adicionada azida sódica a 0,2 % para prevenir a contaminação.

5. 1. 5. 1. 3. Cálculo da incorporação de ^{3}H-ácido oleico nas membranas

Para avaliar a incorporação de ^{3}H-ácido oleico nas membranas bacterianas utilizaram-se minicolunas de troca iónica Bond Elut-NH_2, que permitiram separar os lípidos com ^{3}H-ácido oleico incorporado em três fracções:

- Fracção 1: triglicéridos correspondentes à fracção neutra não retida nas colunas;
- Fracção 2: ácidos gordos correspondentes à fracção ácida;
- Fracção 3: fosfolípidos correspondentes à fracção básica.

Para obter estas três fracções seguiu-se o seguinte protocolo:

As minicolunas foram lavadas inicialmente com 500 µL de tetra-hidrofurano (THF) e posteriormente com 500 µL de solução de THF:H_2O (19:1). Após esta lavagem fez-se passar através das minicolunas a suspensão de *Escherichia coli* em THF (100 µL de suspensão de *E. coli* preparada como descrito em **5. 1. 5. 1. 2.** em 900 µL de THF), recolhendo-se a fracção 1. As fracções 2 e 3 foram obtidas por eluição das colunas com misturas de THF e ácido acético glacial (49:1) e de metanol : amoniaco 0,91 % (19:1), respectivamente.

Às fracções 1, 2 e 3 adicionou-se 2 mL de líquido de cintilação e procedeu-se à contagem da emissão β do trítio em cintilómetro. A incorporação de ^{3}H-ácido oleico nos fosfolípidos obtida deveria ser superior a 95 %.

5. 1. 5. 1. 4. Inibição da PLA_2

Incubaram-se as soluções das flavonas com 10 µL fosfolipase A_2 e 250 µL tampão 1 durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente adicionaram-se 10 µL de membranas de *Escherichia coli* com ^{3}H-ácido oleico incorporado e incubou-se durante 15 minutos a 37 °C. Após a precipitação das membranas por adição de 100 µL de tampão 2, centrifugou-se a 3 000 rpm / 10 minutos / 4°C. Por último, decantaram-se os sobrenadantes em tubos de cintilação, aos quais se adicionou 2 mL de líquido de cintilação para proceder à contagem. Na Tabela 41 (pág. 238) encontra-se esquematizado o protocolo experimental utilizado.

Tabela 41 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição das PLA_2 de *Naja naja* e *Apis mellifera*.

	Branco (μL)	**Branco Problema (μL)**	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
Composto	---	2,5	---	2,5
Tampão 1	250	250	250	250
PLA_2	---	---	10	10
	Incubação durante 5 minutos a 37 °C			
Membranas de *E. coli*	10	10	10	10
	Incubação durante 15 minutos a 37 °C			
Tampão 2	100	100	100	100
	Centrifugação 3 000 rpm / 10 minutos / 4°C Decantação e adição de 2 mL de líquido de cintilação Leitura em contador β			

Antes da determinação da actividade das flavonas sobre a fofolipse A_2 realizaram-se ensaios para verificar se o solvente (DMSO ou metanol) utilizado na preparação das soluções das flavonas interferia com o protocolo experimental. Com este objectivo usaram-se dois grupos de amostras:

- grupo "**Branco do solvente**", preparado do mesmo modo que o grupo "**Branco**" com a excepção da adição no primeiro caso de 2,5 μL de solvente a 250 μL de tampão 1, antes da primeira incubação;
- grupo "**Controlo com solvente**", preparado do mesmo modo que o grupo "**Controlo**" com a excepção da adição no primeiro caso de 2,5 μL de solvente a 250 μL de tampão 1 e 10 μL de fosfolipase A_2, antes da primeira incubação.

5. 1. 5. 2. Inibição da cicloxigenase 1

Utilizou-se como fonte de COX-1 microssomas de plaquetas humanas preparadas segundo o protocolo que se apresenta a seguir.

5. 1. 5. 2. 1. Preparação de microssomas de plaquetas humanas

Para a obtenção de plaquetas partiu-se de um volume de sangue humano citratado e adicionaram-se quatro volumes de soro fisiológico. Realizou-se uma primeira centrifugação a 1100 rpm durante 20 minutos, com o objectivo de eliminar os eritrócitos e os leucócitos. Após a separação do sobrenadante, este foi novamente centrifugado a 3 400 rpm durante 10 minutos para separar o plasma, obtendo-se um sedimento rico em plaquetas. Os eritrócitos contaminantes foram lisados, deixando em repouso o sedimento com uma mistura de tampão tris HCl (50 mM, pH 7,4) e oxalato de amónio 2 % (1:20), durante 5 minutos. Após centrifugação a 3 400 rpm durante 10 minutos separou-se o sedimento, que foi ressuspendido em 15 mL de tampão tris HCl (50 mM, pH 7,4) e submetido a tratamento no ultrassons durante 20 segundos a 4 °C. Esta suspensão foi posteriormente centrifugada a 15 000 g durante 20 minutos a 4 °C recolhendo-se o sobrenadante, que foi novamente centrifugado a 10 000 g durante 100 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi suspenso em cerca de 15 mL de tampão tris HCl (50 mM, pH 7,4) de forma a obter uma suspensão de microssomas ricos em COX-1.

5. 1. 5. 2. 2. Inibição da COX-1

A suspensão de microssomas na concentração de 20 μg de proteínas/100 μL, determinada pelo método de Lowry [233], foi incubada durante 30 minutos a 37 °C, com ácido araquidónico (5 μM) e as soluções das flavonas, na presença de hematina (4 μM) e triptofano (1 mM). A reacção foi parada por incubação durante 5 minutos a 90 °C, tendo sido todas as amostras centrifugadas a 10 000 g durante 15 minutos a 4°C. Recolheram-se os sobrenadantes e conservaram-se a –75 °C até posterior determinação dos níveis de PGE_2, mediante uma técnica de RIA utilizando um kit comercial [234]. O protocolo experimental adoptado está esquematizado na Tabela 42 (pág. 240).

Tabela 42 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da COX-1.

	Branco (µL)	Branco Problema (µL)	Controlo (µL)	Problema (µL)
Composto	---	1	---	1
Solvente*	1	---	1	---
Hematina (4 µM)	10	10	10	10
Triptofano (1 mM)	5	5	5	5
Microssomas (20 µg/100 µL)	80	80	80	80
Ácido araquidónico (5 µM)	---	---	5	5
			Incubação durante 30 minutos a 37 °C	
	Incubação durante 5 minutos a 90 °C			
	Centrifugação a 10 000 g /15 minutos / 4 °C			
	Recolha do sobrenadante para a posterior determinação de PGE_2			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

5. 1. 5. 3. Inibição da cicloxigenase 2

Utilizou-se como fonte de COX-2 microssomas de monócitos humanos preparados segundo o protocolo que se apresenta a seguir.

5. 1. 5. 3. 1. Preparação de microssomas de monócitos humanos

A 20 mL de sangue citratado adicionou-se igual volume de uma solução de dextrano (2 %) em soro fisiológico (NaCl 0,9 %). Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos para facilitar a sedimentação dos eritrócitos. Recolheu-se a fase superior rica em leucócitos e concentrou-se por centrifugação a 1200 g durante 10 minutos a 4 °C, tendo-se obtido um sedimento ligeiramente contaminado com eritrócitos. Os eritrócitos contaminantes foram eliminados por lise hipotónica com 45 mL de água destilada fria (2 - 4°C) durante 20 a 30 segundos, seguida pela adição de 5 mL de tampão HBSS modificado concentrado. Após centrifugação a 1 400 g durante 10 minutos recolheu-se o sedimento, que foi ressuspendido em 10 mL de tampão HBSS modificado. No fundo do tubo com esta

suspensão adicionaram-se 7 mL de Ficoll-Paque com o fim de estabelecer um gradiente de centrifugação adequado para a separação de monócitos e linfócitos. Posteriormente centrifugou-se a 400 g durante 40 minutos a 20 °C e separou-se o sedimento rico em monócitos e linfócitos. Este foi ressuspendido em meio de cultura RPMI-1640 (pH 7,4) contendo 10 % de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina e 50 μg/mL de estreptomicina até se obter uma densidade celular de 10^7 células/mL. As células foram incubadas em caixas de cultura de tecidos 60/15 mm e deixadas a aderir durante 2 horas a 37 °C em estufa de CO_2 (5 %). Após este período as células não aderentes foram removidas por aspiração do meio seguida de duas lavagens com 1 mL de RPMI-1640. As células aderentes obtidas corresponderam a pelo menos 90 % da população de monócitos. Estas células foram posteriormente ressuspendidas em RPMI-1640 contendo 300 μM de ácido acetilsalicílico e foram incubadas a 37 °C durante 2 horas. Os monócitos foram lavados duas vezes, ressuspendidos em RPMI-1640 com soro bovino fetal (10 %) e incubados com lipopolissacárido de *E. coli* (10 μg /mL) a 37 °C durante 24 horas. Após esta incubação seguiu-se a centrifugação dos monócitos, os quais foram submetidos a tratamento em ultrassons a 4 °C e centrifugados a 100 000 g durante 100 minutos a 4 °C.

5. 1. 5. 3. 2. Inibição da COX-2

O método experimental utilizado foi semelhante ao referido para a inibição da COX-1, utilizando-se como fonte de enzima uma suspensão de microssomas de monócitos humanos (40 μg/100 μL). Na Tabela 43 (pág. 242) representa-se o protocolo experimental utilizado neste ensaio.

Tabela 43 – Protocolo experimental para a avaliação da inibição da COX-2.

	Branco (μL)	**Branco Problema (μL)**	**Controlo (μL)**	**Problema (μL)**
Composto	---	1	---	1
Solvente*	1	---	1	---
Hematina (4 μM)	10	10	10	10
Triptofano (1 mM)	5	5	5	5
Microssomas (40 μg/100 μL)	80	80	80	80
Ácido araquidónico (5 μM)	---	---	5	5
			Incubação durante 30 minutos a 37 °C	
	Incubação durante 5 minutos a 90 °C Centrifugação a 10 000 g /15 minutos / 4 °C Recolha do sobrenadante para a posterior determinação de PGE_2			

* DMSO ou metanol, usado na preparação das soluções das flavonas estudadas

5. 2. Ensaios *in-vivo*: Modelo de "bolsa de ar em ratinho"

Utilizaram-se ratinhos machos de raça Swiss (25-30g) que foram distribuídos aleatoriamente em 3 lotes de seis animais: o lote "**Branco**", o lote "**Controlo**" e o lote "**Problema**".

Injectou-se no dorso dos animais um volume de 10 mL de ar estéril. Três dias depois, reinsuflou-se a bolsa com 5 mL de ar estéril e, ao sexto dia da injecção inicial, administrou-se na bolsa dos ratinhos do lote "**Controlo**" 1 mL de uma solução de zimosano em soro fisiológico a 1%, contendo 1% de DMSO usado como solvente na preparação da solução do artelastocromeno (**80**). Simultaneamente foi injectada na bolsa dos ratinhos do lote "**Branco**" uma solução em soro fisiológico a 1% do mesmo solvente (1 mL/ratinho) e na bolsa dos ratinhos do lote "**Problema**" 1 mL de uma mistura da solução de artelastocromeno (**80**) (0,1 μmol/mL) com zimosano 1% em soro fisiológico.

Após quatro horas sacrificaram-se os animais por deslocamento cervical e recolheu-se o exsudado contido nas bolsas com 1 mL de soro fisiológico. Com o objectivo de avaliar a migração leucocitária efectuou-se a contagem dos PMNs.

Posteriormente, centrifugou-se o exsudado das bolsas a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante, o qual foi conservado a −70 °C para posterior determinação dos níveis de mieloperoxidase e PGE_2.

5. 2. 1. Inibição da migração leucocitária

A 9,9 mL de azida sódica 1‰ em soro fisiológico adicionou-se 100 μL de saponina, para lisar os eritrócitos, e 20 μL (no lote "**Branco**") ou 10 μL (nos lotes "**Controlo**" e "**Problema**") de exsudado de bolsa. Procedeu-se à leitura em Coulter Counter e expressou-se a migração em percentagem em relação ao lote "**Controlo**".

5. 2. 2. Inibição da libertação de mieloperoxidase

O método utilizado foi semelhante ao da avaliação da inibição da mieloperoxidase pelas flavonas estudadas, descrito em **5. 1. 4. 2.** (pág. 235). Nesta determinação as soluções das flavonas e o sobrenadante com mieloperoxidase foram substituídos pelo sobrenadante obtido por centrifugação do exsudado das bolsas.

5. 2. 3. Inibição da libertação de PGE_2

Determinou-se a libertação de PGE_2 mediante uma técnica de RIA, utilizando um kit comercial [234].

6. Análise estatística e expressão dos resultados

Os resultados foram expressos sob a forma de média ± desvio médio padrão, tendo sido submetidos a tratamento estatístico segundo o método de "t" de Dunnett para comparações múltiplas. Este permitiu comparar os resultados médios obtidos para os vários grupos "**Problema**" com o grupo "**Controlo**" testado em simultâneo, considerando o erro associado a comparações múltiplas. A diferença dos resultados obtidos entre o grupo "**Problema**" e o grupo "**Controlo**" foi considerada:

- significativa (*) quando o valor de "t" obtido foi maior que o indicado em tabelas para uma margem de confiança de 95% ($p<0,05$);
- muito significativa (**) quando o valor de "t" obtido foi maior que o indicado em tabelas para uma margem de confiança de 99 % ($p<0,01$);
- não significativa (n. s.) quando o valor de "t" obtido foi menor que o indicado em tabelas para uma margem de confiança de 95 % ($p>0,05$).

A percentagem de inibição (ou de captação de radicais livres) foi calculada comparando a diferença dos valores obtidos entre os grupos "**Problema**" e "**Branco Problema**" com a diferença dos valores entre os grupos "**Controlo**" e "**Branco**", considerando que a esta última correspondia 0 % de inibição.

As flavonas que apresentaram percentagens de inibição superiores a 50 %, à concentração de 10 μM, foram ensaiados posteriormente a concentrações menores e à concentração de 100 μM, a fim de se determinar a concentração que inibia 50 % da actividade estudada (CI_{50}). Este cálculo efectuou-se mediante a extrapolação da recta de regressão dos mínimos quadrados, representando a percentagem de inibição frente ao logaritmo das concentrações molares. Estas CI_{50} foram expressas acompanhadas das margens de confiança de 95 %.

CAPÍTULO III

Resultados e discussão

1. Ensaios *in-vitro*

1. 1. Captação de radicais livres

1. 1. 1. Captação do anião superóxido no sistema hipoxantina / xantina oxidase

Os resultados da avaliação da actividade captora de anião superóxido, representados pela variação das absorvências por minuto (ΔA/min) e respectivas percentagens de captação, encontram-se na Tabela 44.

Tabela 44 – Actividade das flavonas na captação de anião superóxido no sistema hipoxantina / xantina oxidase.

	ΔA/min (550 nm)	% Captação
Controlo	0,159 ± 0,009	---
Artocarpesina (**78**)	0,075 ± 0,008 **	52,8 ± 0,5**
Artelasticina (**79**)	0,132 ± 0,008 *	17,0 ± 0,1*
Artelastina (**80**)	0,122 ± 0,005 *	23,3 ± 0,2*
Artelastocromeno (**81**)	0,132 ± 0,007 *	17,0 ± 0,1*

Resultados de seis determinações expressos como Média ± desvio padrão médio; Galato de propilo a 10 μM, controlo positivo, % de inibição = 12,1 ± 0,1; "t" de Dunnette: ** $p<0,01$, *$p<0,05$.

Todas as flavonas estudadas à concentração de 10 μM mostraram diminuir a velocidade de redução do ferricitocromo C a ferrocitocromo C, sugerindo uma actividade captora de anião superóxido. A artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) revelaram uma fraca actividade captora de anião superóxido, com percentagens de captação que variaram entre 17 ± 0,1 e 23,3 ± 0,2 %, enquanto que a artocarpesina (**78**) mostrou uma actividade moderada (% captação = 52,8 ± 0,5). Uma vez que esta actividade poderia ser devida à inibição da xantina oxidase ou à redução do ferricitocromo C pelas flavonas avaliou-se uma possível interferência destes compostos no desenvolvimento da reacção. Nas Tabelas 45 (pág. 248) e 46 (pág. 248) apresentam-se os resultados do estudo da redução do ferriciticromo C e da inibição da xantina oxidade pelas flavonas estudadas.

Tabela 45 – Efeito das flavonas sobre a redução do ferricitocromo C.

	Absorvência (550 nm)
Controlo	1,158 ± 0,002
Artocarpesina (**78**)	1,129 ± 0,010 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	1,200 ± 0,004 (n. s.)
Artelastina (**80**)	1,189 ± 0,009 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	1,226 ± 0,005 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio padrão médio; "t" de Dunnette: n. s. = não significativo, $p>0,05$.

A diferença entre as absorvências obtidas com as flavonas e com o "**Controlo**" não foi significativa ($p>0,05$), podendo-se concluir que nenhuma destas flavonas reduziu directamente o ferricitocromo C.

Tabela 46 – Actividade das flavonas sobre a xantina oxidase.

	ΔA/min (295 nm)	% Inibição
Controlo	0,104 ± 0,005	---
Artocarpesina (**78**)	0,050 ± 0,001**	51,9 ± 0,4**
Artelasticina (**79**)	0,086 ± 0,003*	17,3 ± 1,9*
Artelastina (**80**)	0,082 ± 0,003*	21,2 ± 3,1*
Artelastocromeno (**81**)	0,089 ± 0,004 (n. s.)	14,4 ± 2,4 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; Alopurinol a 10 μM, controlo positivo, % de inibição = 96,1 ± 0,3; "t" de Dunnette: **$p<0,01$; *$p<0,05$; n. s. = não significativo, $p>0,05$.

A artocarpesina (**78**) revelou ser uma forte inibidora da enzima xantina oxidase (% inibição = 51,9 ± 0,4) apresentando, no entanto, uma actividade consideravelmente menor que a do alopurinol à mesma concentração (% de inibição = 96,1 ± 0,3), um composto de referência usado no tratamento das hiperuricémias. Comparando os resultados obtidos para a inibição da xantina oxidase com os obtidos para a captação de anião superóxido verificou-se que, para todas as flavonas, os resultados da avaliação da actividade captora do anião superóxido resultavam da inibição da xantina oxidase, podendo-se concluir pela ausência de actividade captora deste radical.

1. 1. 2. Captação de radical peroxilo

No estudo da captação de radicais peroxilo, gerados por decomposição térmica do ABAP, foi avaliada a inibição da inactivação da lisozima produzida por este radical. Os resultados obtidos, representados pela variação das absorvências por minuto (ΔA/min), estão apresentados na Tabela 47.

Tabela 47 – Actividade das flavonas sobre a captação de radical peroxilo.

	ΔA/min (450 nm)
Controlo	0,234 ± 0,008
Artocarpesina (**78**)	0,229 ± 0,011 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	0,246 ± 0,008 (n. s.)
Artelastina (**80**)	0,238 ± 0,007 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	0,265 ± 0,004 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnette: n. s. = não significativo, $p>0,05$.

Comparando os resultados obtidos para o "**Controlo**" com os obtidos para cada uma das flavonas estudadas concluiu-se que nenhuma das flavonas apresentou, à concentração de 10 μM, actividade captora de radicais peróxilo significativa ($p>0,05$).

1. 2. Inibição da peroxidação lipídica em membranas microssomais

Escolheu-se como sistema indutor da peroxidação lipídica o sistema não enzimático Fe^{2+}/ácido ascórbico. Uma vez induzida a peroxidação lipídica, os seus níveis foram determinados pelo método espectrofotométrico do ácido tiobarbitúrico. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 48 (pág. 250).

Tabela 48 – Actividade das flavonas sobre a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+}/ácido ascórbico.

	Absorvência (535 nm)	% Inibição
Controlo	0,368 ± 0,001	---
Artocarpesina (**78**)	0,317 ± 0,005*	13,9 ± 1,3*
Artelasticina (**79**)	0,327 ± 0,013 (n. s.)	11,1 ± 3,2 (n. s.)
Artelastina (**80**)	0,269 ± 0,021**	26,9 ± 5,7**
Artelastocromeno (**81**)	0,330 ± 0,009 (n. s.)	10,3 ± 2,7 (n. s.)

Resultados de seis determinações expressos em Média ± desvio médio padrão; Galato de propilo a 10 μM, controlo positivo, % de inibição = 93,1 ± 4,7; "t" de Dunnette: ** $p<0,01$; *$p<0,05$; n s = não significativo, $p>0,05$.

Tal como demonstra a tabela anterior nenhuma das flavonas, à concentração de 10 μM, revelou uma forte inibição da peroxidação lipídica. Entre as flavonas estudadas a artelastina (**80**) foi a que mostrou maior capacidade para inibir a peroxidação em microssomas hepáticos, apresentando uma percentagem de inibição muito inferior (% Inibição = 26,9 ± 5,7) à do galato de propilo (% de inibição = 93,1 ± 4,7), usado à mesma concentração como controlo positivo.

1. 3. Estudo das funções leucocitárias e da libertação de mediadores em leucócitos humanos

1. 3. 1. Inibição da libertação de elastase por PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP

Os resultados da avaliação da actividade da artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) sobre a libertação e a actividade da elastase de PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP estão representados nas Tabelas 49 (pág. 251) e 50 (pág. 251).

Tabela 49 – Actividade das flavonas sobre a libertação da elastase em PMNs estimulados por citocalasina B/fMLP

	Absorvência (414 nm)	% Inibição
Controlo	0,198 ± 0,003	---
Artocarpesina (**78**)	0,224 ± 0,006 (n. s.)	0 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	0,175 ± 0,008 (n. s.)	11,6 ± 2,3 (n. s.)
Artelastina (**80**)	0,212 ± 0,011 (n. s.)	0 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	0,220 ± 0,006 (n. s.)	0 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnett: n.s. = não significativo, $p>0,05$.

Tabela 50 – Actividade das flavonas sobre a elastase

	Absorvência (414 nm)	% Inibição
Controlo	0,234 ± 0,019	---
Artocarpesina (**78**)	0,224 ± 0,016 (n. s.)	4,3 ± 2,3 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	0,215 ± 0,014 (n. s.)	8,1 ± 2,3 (n. s.)
Artelastina (**80**)	0,247 ± 0,008 (n. s.)	0 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	0,205 ± 0,011 (n. s.)	12,4 ± 2,3 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnett: n.s. = não significativo, $p>0,05$.

As percentagens de inibição obtidas nestas determinações levaram a concluir que as flavonas, à concentração de 10 μM, não inibiram significativamente ($p>0,05$) a libertação desta enzima, nem a sua actividade. A percentagem máxima de inibição conseguida para a libertação de elastase foi de apenas 11,6 ± 2,3 % para a artelasticina (**79**). Para a inibição da actividade da elastase foi também apenas conseguida uma inibição máxima de 12,4 ± 2,3 % para o artelastocromeno (**81**).

1. 3. 2. Inibição da libertação de anião superóxido em PMNs humanos

O efeito das flavonas sobre a geração do anião superóxido em PMNs humanos estimulados por TPA está representado na Tabela 51 (pág. 252).

Tabela 51 – Actividade das flavonas na libertação de anião superóxido em PMNs humanos.

	Absorvência (550 nm)	% Inibição
Controlo	1,286 ± 0,006	---
Artocarpesina (**78**)	1,169 ± 0,009 *	9,1 ± 0,7*
Artelasticina (**79**)	0,943 ± 0,032**	26,7 ± 2,5**
Artelastina (**80**)	1,158 ± 0,016*	9,9 ± 1,4*
Artelastocromeno (**81**)	1,242 ± 0,046 (n. s.)	3,4 ± 2,4 (n. s.)

Resultados de seis determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; Superóxido dismutase 25 μg / mL, controlo positivo, % de inibição = 95,1 ± 1,3; "t" de Dunnett: ** $p<0,01$; * $p<0,05$; n.s. = não significativo, $p>0,05$

A artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**) e artelastina (**80**) apresentaram um ligeiro efeito inibidor da libertação do anião superóxido por PMNs humanos ($9,1 \pm 0,7 <$ % Inibição $< 26,7 \pm 2,5$) que, embora significativo, ($p<0,05$ e $p<0,01$) mostrou ser muito inferior ao obtido para a superóxido dismutase, usada como controlo positivo. Pelo contrário, o artelastocromeno (**81**) não revelou inibir significativamente ($p>0,05$) a geração deste anião.

1. 4. Inibição da mieloperoxidase de PMNs humanos

Os resultados da avaliação das flavonas sobre a mieloperoxidase, representados sob a forma de percentagem de inibição, encontram-se na Tabela 52.

Tabela 52 – Actividade das flavonas sobre a mieloperoxidase.

	% Inibição
Artocarpesina (**78**)	26,9 ± 1,2**
Artelasticina (**79**)	17,5 ± 0,7**
Artelastina (**80**)	13,6 ± 1,4**
Artelastocromeno (**81**)	64,3 ± 1,4**

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnett: ** $p < 0,01$

Todas as flavonas estudadas inibiram significativamente ($p<0,01$) a mieloperoxidase. A artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**) e artelastina (**80**) mostraram ser fracos inibidores,

tendo apresentado percentagens de inibição entre 13,6 ± 1,4 e 26,9 ± 1,2 %, enquanto que o artelastocromeno (**81**) mostrou ser um potente inibidor desta enzima (% Inibição = 64,3 ± 1,4).

Com o objectivo de calcular a concentração de artelastocromeno (**81**) que provocava 50 % de inibição da actividade da mieloperoxidase (CI_{50}) repetiu-se o ensaio para outras concentrações. Os resultados destes ensaios estão resumidos na Tabela 53.

Tabela 53 - Efeito da concentração na inibição da mieloperoxidase pelo artelastocromeno (**81**).

Concentração (μM)	% Inibição
100	81,2 ± 4,5**
10	64,3 ± 1,4**
1	53,3 ± 2,1**
0,1	39,7 ± 3,9**

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnette: **p < 0,01.

A actividade inibidora do artelastocromeno (**81**) sobre a mieloperoxidase mostrou ser dependente da concentração, tendo-se obtido um valor de CI_{50} de 0,6 ± 0,9 μM. De salientar que mesmo à concentração de 0,1 μM ainda se detectou uma inibição significativa ($p<0,01$) da actividade desta enzima (% Inibição = 39,7 ± 3,9).

1. 5. Mediadores lipídicos

1. 5. 1. Inibição da fosfolipase A_2

Avaliou-se a possível actividade inibitória das flavonas sobre dois tipos de PLA_2 secretoras, PLA_2 de abelha *Apis mellifera* e PLA_2 de veneno de serpente *Naja naja*. Os resultados obtidos, expressos em cintilações por minuto (cpm) e respectivas percentagens de inibição, estão descritos nas Tabelas 54 (pág. 254) e 55 (pág. 254).

Tabela 54 – Actividade das flavonas sobre a fosfolipase A_2 de *Apis millefera*.

	cpm	% Inibição
Controlo	11390,3 ± 263,8	---
Artocarpesina (**78**)	9256,3 ± 293,3**	18,7 ± 2,6**
Artelasticina (**79**)	9047,4 ± 576,9**	20,6 ± 1,9**
Artelastina (**80**)	9231,3 ± 197,6**	19,0 ± 1,8**
Artelastocromeno (**81**)	9585,2 ± 195,6**	15,8 ± 1,5**

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; manoalida 10 μM, controlo positivo, % de inibição = 62,5 ± 3,8 %**, "t" de Dunnett: ** $p < 0,01$.

As quatro flavonas isopreniladas revelaram uma actividade inibitória significativa ($p<0,01$) sobre a PLA_2 de *Apis mellifera*, à concentração de 10 μM (15,8 ± 1,5 < % Inibição < 20,6 ± 1,9). No entanto, esta actividade foi consideravelmente menor que a do composto usado como controlo positivo, a manoalida (% Inibição = 62,5 ± 3,8).

Tabela 55 – Actividade das flavonas sobre a fosfolipase A_2 de *Naja naja*.

	cpm	% Inibição
Controlo	11610,7 ± 136,8	---
Artocarpesina (**78**)	11137,3 ± 161,6 (n. s.)	4,1 ± 1,6 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	11572,3 ± 195,8 (n. s.)	0,3 ± 1,0 (n. s.)
Artelastina (**80**)	11615,1 ± 205,2 (n. s.)	0 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	11267,0 ± 94,5 (n. s.)	3,0 ± 1,4 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnett: n. s. = não significativo, $p>0,05$.

A observação dos resultados indicados na Tabela 55 levou a concluir que nenhuma das flavonas estudadas inibiu significativamente ($p>0,05$) a actividade da PLA_2 de *Naja naja*, à concentração de 10 μM.

1. 5. 2. Inibição das cicloxigenases 1 e 2

Foi também avaliada a actividade das quatro flavonas isoladas sobre as cicloxigenases 1 e 2. O ensaio consistiu na quantificação da PGE_2, formada a partir do metabolismo do ácido araquidónico catalisado por estas enzimas, na presença de co-factores enzimáticos e dos compostos em estudo. A quantidade de PGE_2 (ng/mL) formada foi avaliada mediante técnica de RIA, apresentando-se os resultados na Tabela 56.

Tabela 56 – Actividade das flavonas sobre as cicloxigenases 1 e 2.

	PGE_2 (ng/mL)	
	COX-1	**COX-2**
Controlo	8,9 ± 0,8	0,9 ± 0,1
Artocarpesina (**78**)	9,5 ± 0,1 (n. s.)	1,0 ± 0,2 (n. s.)
Artelasticina (**79**)	8,7 ± 0,2 (n. s.)	0,8 ± 0,1 (n. s.)
Artelastina (**80**)	9,6 ± 0,3 (n. s.)	1,2 ± 0,3 (n. s.)
Artelastocromeno (**81**)	10,5 ± 0,2 (n. s.)	1,6 ± 0,2 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnett: n. s.: não significativo, $p>0,05$.

A comparação entre as quantidades de PGE_2 produzidas na presença das quatro flavonas com as obtidas para o "**Controlo**" permitiu concluir que, à concentração de 10 μM, nenhuma das flavonas inibiu significativamente ($p>0,05$) qualquer uma das isoformas de cicloxigenase.

2. Ensaios *in vivo*: Modelo de "bolsa de ar em ratinho"

Os resultados obtidos anteriormente nos ensaios *in vitro* mostraram que, de um modo geral, as flavonas estudadas apenas interferiram ligeiramente nos vários parâmetros do processo inflamatório testados, tendo somente o artelastocromeno (**81**) revelado uma forte inibição da enzima mieloperoxidase. Com o objectivo de verificar se esta actividade se manifestava em ensaios *in vivo* utilizou-se o modelo de "bolsa de ar em ratinho", usando o zimosano como indutor da inflamação. Neste ensaio recolheu-se o exsudado da bolsa,

formada por injecção de ar estéril seguida de administração de zimosano e do artelastocromeno (**81**) (0,1 μM), e avaliou-se a migração leucocitária, a libertação de mieloperoxidase e a geração de um dos metabolitos do ácido araquidónico, a PGE_2.

2. 1. Inibição da migração leucocitária

A actividade do artelastocromeno (**81**) sobre a migração leucocitária está apresentada na Tabela 57, sob a forma de número de PMNs por bolsa.

Tabela 57 – Actividade do artelastocromeno (**81**) na migração leucocitária no modelo da bolsa de ar de ratinho

	PMNs ($x10^6$ células/bolsa)	**% Inibição**
Branco	3,3 ± 0,4	---
Controlo	18,7 ± 3,6	---
Artelastocromeno (**81**)	15,24 ± 2,8 (n. s.)	26,4 ± 12,1 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio padrão médio; "t" de Dunnette: n. s. = não significativo, $p>0,05$.

Comparando o número de PMNs obtidos para os lotes "**Branco**" e "**Controlo**", verificou-se que a administração de zimosano na bolsa de ar dos ratinhos do lote "**Controlo**" produziu um aumento do número total de PMNs presentes no exsudado de bolsa de ar (de 3,3 ± 0,4x10^6 para 18,7 ± 3,6x10^6 células). O artelastocromeno (**81**) não mostrou ser capaz de inibir significativamente ($p>0,05$) essa migração, tendo apresentado apenas um valor de percentagem de inibição de 26,4 ± 12,1 %.

2. 2. Inibição da libertação de mieloperoxidase

A actividade do artelastocromeno (**81**) sobre a libertação de mieloperoxidase no modelo da inflamação da "bolsa de ar de ratinho" encontra-se apresentada na Tabela 58 (pág. 257).

Tabela 58 – Actividade do artelastocromeno (**81**) sobre a libertação da mieloperoxidase no modelo da bolsa de ar de ratinho

	Absorvência (620 nm)
Branco	0,037 ± 0,002
Controlo	0,145 ± 0,016
Artelastocromeno (**81**)	0,158 ± 0,025 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como Média ± desvio padrão médio; "t" de Dunnette: n. s. = não significativo, p>0,05.

A comparação entre os valores de absorvências obtidos para os lotes de ratinhos "**Problema**" e "**Controlo**" permitiu concluir que o artelastocromeno (**81**) não revelou qualquer efeito inibidor na libertação da mieloperoxidase induzida pelo zimosano, quando testado à concentração de 0,1 μM.

2.3. Inibição da libertação de PGE_2

Os resultados da avaliação da actividade do artelastocromeno (**81**) sobre a libertação *in vivo* de PGE_2, expressos em quantidade de PGE_2 formada (ng/mL), estão indicados na Tabela 59.

Tabela 59 – Actividade do artelastocromeno (**81**) sobre os níveis de PGE_2 no modelo da bolsa de ar de ratinho.

	PGE_2 (ng/ml)
Branco	0,1 ± 0,0
Controlo	33,7 ± 16,2
Artelastocromeno (**81**)	39,6 ± 16,5 (n. s.)

Resultados de 6 determinações expressos como média ± desvio médio padrão; "t" de Dunnette: n. s. = não significativo, p>0,05.

O artelastocromeno (**81**) não inibiu significativamente (p>0,05) a libertação de PGE_2 induzida pelo zimosano *in vivo*. Este resultado mostrou-se concordante com os obtidos *in vitro*, que demonstraram a ausência de interferência do artelastocromeno (**81**) com a actividade das enzimas COX-1 e COX-2.

PARTE B_2

ACTIVIDADE IMUNOMODULADORA

CAPÍTULO I

Introdução

1. Preâmbulo

A descoberta de novos compostos imunomoduladores constitui uma importante área de investigação, dada a existência de várias patologias associadas a condições de compromisso imunológico ou disfunções de imuno-factores, incluindo os estados malignos, de imunodeficiência e de auto-imunidade [235].

Os produtos naturais constituem um excelente material para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos imunomoduladores [236, 237], para além de poderem contribuir para a descoberta de novos mecanismos de acção.

Os flavonóides apresentam uma grande variedade de actividades biológicas, algumas das quais sugerem uma interferência com o funcionamento do sistema imunológico. Flavonóides hidroxilados e metoxilados, pertencentes a diferentes classes, mostram ser capazes de não só inibir o processo secretório e mitogénico de certas células, como também de interferir nas interacções celulares, incluindo a expressão de moléculas de adesão e sua função [186]. Além disso existem evidências de que alguns destes flavonóides podem interferir na síntese de determinadas citoquinas e respectivos receptores, assim como nos efeitos a elas associados [186]. Se a actividade imunomoduladora de flavonóides hidroxilados e metoxilados está bem documentada, o mesmo não acontece para flavonóides isoprenilados [238].

Como já foi referido anteriormente, algumas plantas do género *Artocarpus* têm sido utilizadas na medicina tradicional no tratamento de estados inflamatórios. É do conhecimento geral que as respostas imunológicas desempenham um papel importante na patogénese de estados inflamatórios e que a interferência com o sistema imunitário pode ser benéfica para o seu tratamento.

De acordo com o exposto pareceu ser de grande interesse avaliar a actividade imunomoduladora para as flavonas artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**), ciclocomunina (**73**), artelastina (**80**), artelastocromeno (**81**), artelastofurano (**82**), artelastocarpina (**84**) e carpelastofurano (**85**) isoladas de *A. elasticus* Reinw. ex Blume. A avaliação desta actividade incluiu parâmetros da imunidade inespecífica e específica. No que respeita à imunidade inespecífica foi avaliada a capacidade da flavonas em interferir na via clássica e na via alternativa de activação do sistema humano do complemento. Quanto à imunidade específica foi avaliado o efeito das flavonas sobre a proliferação de linfócitos humanos, após estimulação com uma lectina mitogénica, a fito-hemaglutinina (PHA).

A determinação da actividade imunomoduladora foi realizada pelo grupo de Bioensaios do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto (C.E.Q.O.F.F.U.P.) sob orientação da Prof. Doutora Maria São José Nascimento. No estudo da actividade anticomplementar foram usados ensaios hemolíticos baseados na hemólise de eritrócitos pelo "complexo de ataque de membrana" (MAC) gerado após activação do sistema humano do complemento. [239]. Para estudar a interferência na proliferação linfocitária foram usados linfócitos humanos periféricos estimulados com PHA, tendo-se utilizado um método colorimétrico com sais de tetrazólio (MTT) para quantificar o número de células viáveis [240, 241].

2. Considerações sobre imunomodulação

Pode considerar-se a actividade imunomoduladora como um conceito que abrange os efeitos biológicos específicos ou inespecíficos sobre os factores humorais e celulares intervenientes na resposta imune. Dependendo do modo de acção, os compostos com actividade imunomoduladora podem ser usados quer para estimular o sistema imune, funcionando como reconstituintes de uma defesa imunológica deficiente, como acontece com doentes com imunodeficiência congénita ou adquirida, quer, alternativamente, para suprimir o sistema imune em casos de reactividade excessiva deste sistema em doentes com alergia, doenças reumáticas e/ou autoimunes e transplantados [236, 242].

2. 1. O sistema do complemento e sua activação

O sistema do complemento é um dos primeiros mecanismos de defesa humoral existente no plasma sanguíneo, sendo constituído por mais de vinte e cinco proteínas, incluindo os componentes C1 a C9, os factores B, D e P, bem como muitos componentes reguladores que circulam na corrente sanguínea normalmente numa forma inactiva [243, 244].

São duas as principais vias de activação do complemento: a via clássica e a via alternativa (Figura 23, pág. 265).

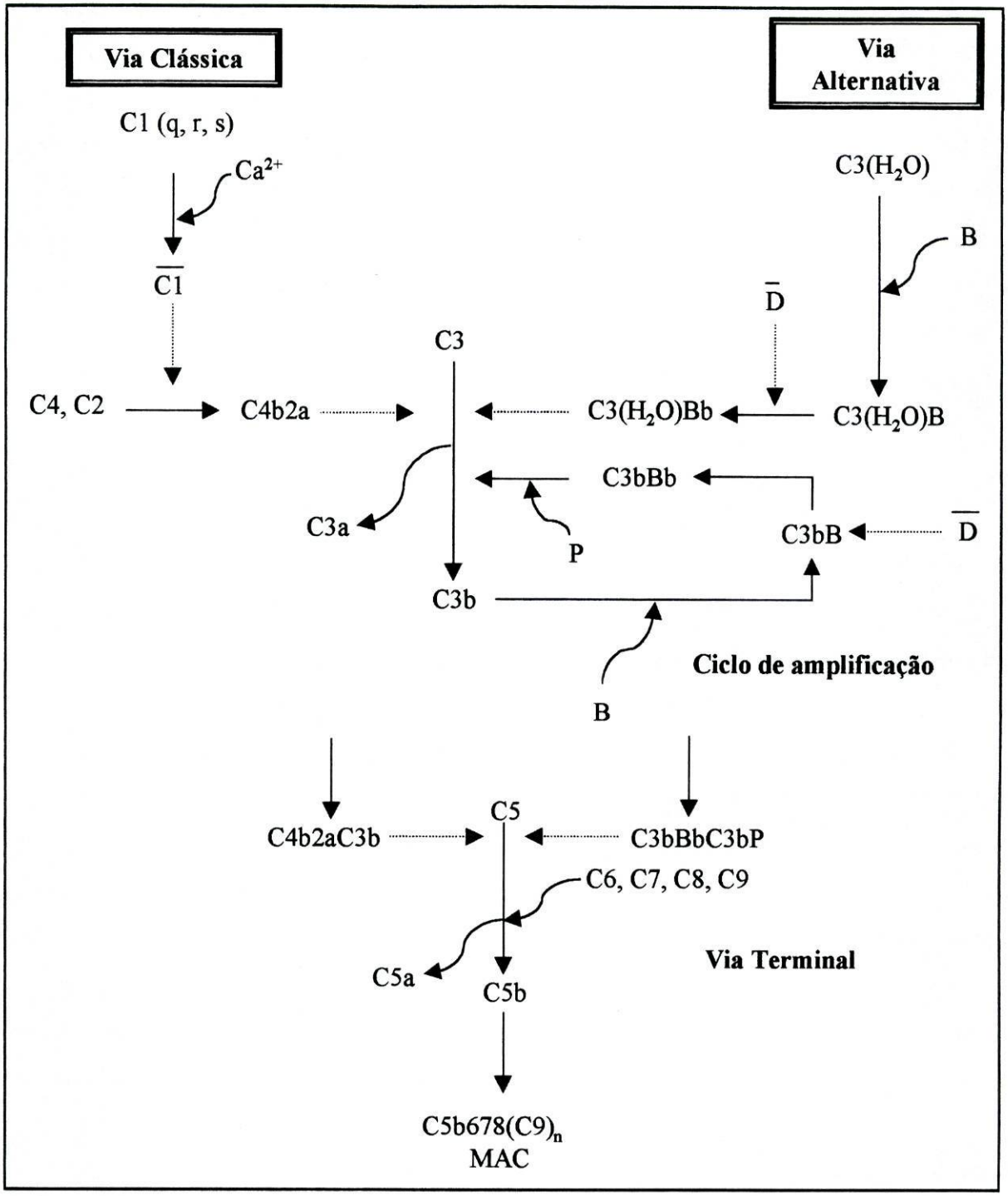


Figura 23 - Vias de activação do sistema do complemento.

A via clássica de activação do complemento estabelece uma ligação entre o sistema do complemento e a resposta imunitária humoral, pois a sua activação necessita da presença de anticorpos ligados ao antigénio (complexo antigénio-anticorpo), que se ligam ao componente

C1 [243, 245]. Desta ligação resulta uma quebra proteolítica em cascata com a activação dos componentes essenciais à via clássica C1, C4 e C2 na presença de iões cálcio. A via alternativa de activação do complemento pode ser iniciada na ausência de anticorpos, sendo directamente activada por polissacáridos, bactérias, vírus e certas classes de imunoglobulinas (IgA e IgD) [243, 246, 247]. É uma via espontânea que pode ser iniciada pela hidrólise da ligação tioéster intramolecular de C3, originando a activação deste fragmento. Ambas as vias de activação convergem no componente C3 do complemento que, após activação, inicia a via lítica comum ou via terminal [244]. Em consequência desta última via verifica-se a formação de um canal transmembranar cilíndrico, o MAC, o qual vai permitir a passagem de solutos e água, com consequente perda de homeostasia e lise celular [243, 244, 246-248].

2. 1. 1. Interesse da modulação da actividade do complemento

Além da morte celular mediada pelo MAC, várias outras actividades biológicas têm sido atribuídas aos produtos libertados durante a activação do complemento. As anafilotoxinas C3a, C4a e C5a ligam-se a receptores nos mastócitos e basófilos induzindo a libertação de mediadores solúveis da inflamação, entre os quais a histamina, que aumenta a permeabilidade capilar e promove a contracção do músculo liso. O fragmento C5a é um potente factor quimiotáctico que induz a migração de leucócitos, estimula a produção de espécies reactivas de oxigénio e promove a desgranulação leucocitária de células fagocíticas. Este fragmento promove ainda a libertação das interleuquinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 pelos monócitos e macrófagos, e a mobilização do ácido araquidónico com a produção de eicosanóides. Embora o fragmento C3a seja menos activo que o C5a, também é responsável pela activação da geração de espécies reactivas de oxigénio pelos neutrófilos. Os fragmentos C3b e C4b possuem também a função de opsonização de microorganismos e células estranhas possibilitando a sua destruição pelos fagócitos [243-247].

Embora o sistema do complemento seja um elemento importante na defesa do hospedeiro, as actividades biológicas resultantes da sua activação não são sempre benéficas, parecendo estar associadas a várias patologias. A activação do complemento pode contribuir para danos tecidulares, especialmente em doenças auto-imunes mediadas por complexos antigénio-anticorpo, como a gota, miastenia *gravis*, artrite reumatóide e lupus eritematoso sistémico [246-250]. O choque séptico resultante de uma septicémia por bactérias Gram negativo parece ser parcialmente mediado pelo complemento, que se encontra permanentemente

activado pelas endotoxinas bacterianas [248]. Também a activação do complemento parece ter um papel importante na danificação tecidular associada ao enfarte do miocardio [248]. Pode então concluir-se que a modulação da actividade do sistema do complemento pode ter inúmeros benefícios terapêuticos, quer em situações de falência em que se torna necessário a sua estimulação, quer nos estados em que existe uma inapropriada activação em que é desejável a sua supressão.

2. 2. Linfócitos e activação de linfócitos

Os linfócitos T e B constituem os principais factores celulares da imunidade específica ou adquirida, pois são capazes de desencadear respostas defensivas para antigénios específicos.

A principal função dos linfócitos B é a síntese de um grupo particular de proteínas, as imunoglobulinas, que se ligam especificamente e com elevada afinidade aos antigénios. Da ligação do anticorpo ao antigénio específico resulta uma grande variedade de efeitos benéficos para o hospedeiro. Por exemplo, a ligação a anticorpos pode sequestrar e inactivar uma proteína tóxica existente na corrente sanguínea, bloquear proteínas virais de superfície impossibilitando a adsorção do vírus às células do hospedeiro e promover a fagocitose de microrganismos mediante a opsonização [251].

Os linfócitos T são activados na presença de antigénios através da sua ligação a proteínas de superfície específicas designadas por receptores de células T (TCR). O reconhecimento de substâncias estranhas por estes linfócitos requer a apresentação dos antigénios associados a proteínas específicas, as MHC-II, existentes à superfície das células apresentadoras, linfócitos B e macrófagos. Além dos receptores TCR, os linfócitos T expressam outras proteínas de superfície características designadas vulgarmente pelas iniciais CD seguidas de um número, que permite a sua identificação e divisão em diferentes sub-classes. Entre as diferentes classes de células T distinguem-se pela sua importância as células CTLs, que expressam proteínas CD8 e apresentam actividade citotóxica, sendo responsáveis pela lise celular, e as células TH, que expressam proteínas CD4 e geralmente não são citotóxicas mas promovem a proliferação, maturação e funções imunológicas de outros tipos de células mediante a síntese de interleuquinas [251, 252].

Embora os linfócitos T apresentem funções imunológicas importantes, como é comprovado pela maior susceptibilidade a infecções oportunistas por doentes com deficiência

a nível dos linfócitos T [253], eles têm sido também implicados em processos inflamatórios e outras patologias, nomeadamente alergias, asma, doenças auto-imunes e rejeição de transplantes [254-256]. Deste modo, pode concluir-se que a utilização de inibidores selectivos de linfócitos T, que não interfiram com a imunidade humoral, podem ser potencialmente úteis no tratamento de doenças associadas a uma activação inapropriada dos linfócitos T.

Na pesquisa deste tipo de compostos recorre-se a ensaios *in vitro*, em que a proliferação de linfócitos é conseguida à custa de mitogénios como as lectinas PHA e concanavalina, que estimulam predominantemente a proliferação de linfócitos T. Em presença destes mitogénios ocorre nos linfócitos uma série de eventos bioquímicos que incluem, numa primeira fase, o aumento da síntese de fosfolípidos e da permeabilidade a catiões divalentes, bem como a activação da adenilato ciclase, com a consequente elevação dos níveis de AMPc. Numa fase posterior verifica-se a síntese de proteínas, RNA, DNA e divisão celular [257].

CAPÍTULO II

Resultados e discussão

1. Actividade sobre as vias clássica e alternativa de activação do sistema humano do complemento

Os resultados da avaliação da actividade das flavonas **73**, **78-82**, **84** e **85** sobre as vias clássica e alternativa de activação do sistema humano do complemento, representados pelas concentrações que provocam 50 % de inibição da actividade do complemento (CI_{50}), encontram-se na Tabela 60.

Tabela 60 – Actividade das flavonas nas vias clássica e alternativa do sistema humano do complemento.

	CI_{50} (μM)	
	Via Clássica	**Via alternativa**
Artocarpesina (**78**)	30,0 ± 3,8	>400
Artelasticina (**79**)	98,8 ± 10,9	>400
Ciclocomunina (**73**)	115,1 ± 8,9	>400
Artelastina (**80**)	35,3 ± 1,3	>400
Artelastocromeno (**81**)	51,7 ± 7,6	>400
Artelastofurano (**82**)	38,1 ± 2,2	>400
Artelastocarpina (**84**)	44,9 ± 5,6	>400
Carpelastofurano (**85**)	30,7 ± 1,1	>400

Resultados de 6 a 9 determinações expressos como Média ± desvio médio padrão; Sulfato de dextrano, controlo positivo: CI_{50} (via clássica) = 1,91 μg/ml peso molecular médio 5000.

Todas as flavonas estudadas apresentaram capacidade de inibir a via clássica de activação do complemento, mas não foi detectada actividade na via alternativa, mesmo quando testadas à concentração de 400 μM.

A actividade anticomplementar apresentada pelos compostos na via clássica mostrou ser moderada e dependente da dose. Na Figura 24 (pág. 272) são comparadas as actividades das várias flavonas sobre esta via de activação do complemento.

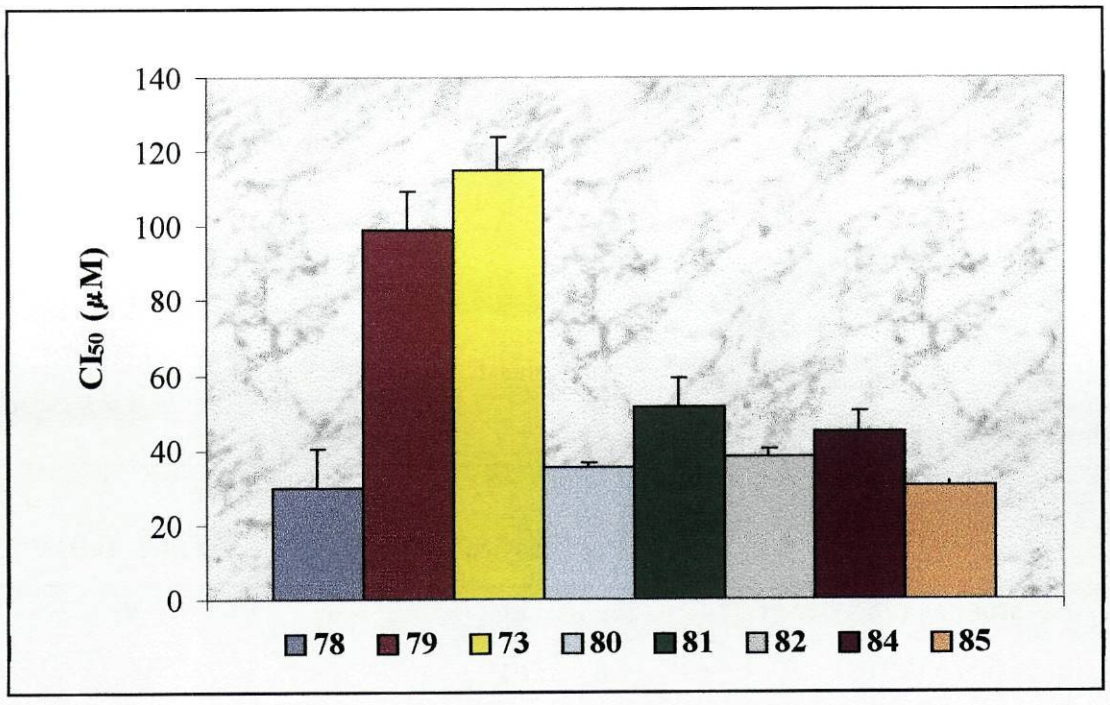


Figura 24 – Gráfico comparativo da actividade das flavonas na via clássica de activação do sistema humano do complemento.

A artocarpesina (**78**), artelastina (**80**), artelastofurano (**82**) e carpelastofurano (**85**) apresentaram-se como as mais activas, enquanto que a artelasticina (**79**) e ciclocomunina (**73**) revelaram uma actividade anticomplementar pouco significativa.

Embora o número de compostos ensaiados seja reduzido para efectuar estudos de relação estrutura-actividade, salientam-se algumas tendências que se consideram relevantes. Comparando a actividade da artelastina (**80**) (CI_{50} = 35,3 ± 1,3 μM) com a da artelasticina (**79**) (CI_{50} = 98,8 ± 10,9 μM) podemos aventar a hipótese de que a presença de um anel adicional D na artelastina será responsável pelo aumento da sua actividade anticomplementar. A baixa actividade da ciclocomunina (**73**) (CI_{50} = 115,1 ± 8,9 μM), relativamente à da artelastina (**80**) (CI_{50} = 35,3 ± 1,3 μM) sugere que a existência de um grupo 3,3-dimetilalilo em C-8 possa ser também importante. No entanto, quando se compara o valor de CI_{50} da artelasticina (**79**) com o da artocarpesina (**77**) (98,8 ± 10, e 30,0 ± 3,8 μM, respectivamente) a presença adicional de um grupo 3,3-dimetilalilo em C-3 parece contribuir para uma perda da actividade anticomplementar.

O facto dos compostos inibirem selectivamente a via clássica de activação do complemento, mas não apresentarem qualquer efeito sobre a via alternativa, sugere uma interferência com os factores do complemento essenciais à via clássica (C1, C4 e C2) ou uma quelatação com o ião cálcio, ião indispensável para a activação desta via. A elucidação do mecanismo responsável por esta actividade terá de assentar em estudos mais aprofundados.

2. Actividade sobre a proliferação dos linfócitos humanos

Os resultados da avaliação da actividade das flavonas **73**, **78-82**, **84** e **85** sobre a proliferação de linfócitos humanos induzida pela PHA, representados pelas concentrações que provocam 50 % de inibição da proliferação, encontram-se na Tabela 61.

Tabela 61 – Actividade das flavonas sobre a proliferação de linfócitos humanos induzida pela PHA.

	CI_{50} (μM)	% de viabilidade
Artocarpesina (**78**)	34,7 ± 1,3	> 70
Artelasticina (**79**)	9,2 ± 0,5	> 70
Ciclocomunina (**73**)	59,2 ± 6,1	> 70
Artelastina (**80**)	4,9 ± 0,6	> 70
Artelastocromeno (**81**)	6,8 ± 1,0	> 70
Artelastofurano (**82**)	33,6 ± 3,1	> 70
Artelastocarpina (**84**)	13,7 ± 2,3	> 70
Carpelastofurano (**85**)	16,3 ± 1,3	> 70

Resultados de 4 a 6 determinações obtidas em dias diferentes expressos como Média ± desvio médio padrão; Ciclosporina A, controlo positivo, CI_{50} = 0,34 μM.

Todas as flavonas inibiram a proliferação dos linfócitos humanos, tal como o demostram os valores de CI_{50} apresentados.

A artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) mostraram ser potentes inibidores (CI_{50} < 10 μM) da resposta mitogénica dos linfócitos humanos, enquanto que a ciclocomunina (**73**) revelou apenas uma fraca capacidade inibitória desta proliferação (CI_{50} >

50 μM). Na Figura 25 podem ser comparadas as várias actividades apresentadas por estes compostos.

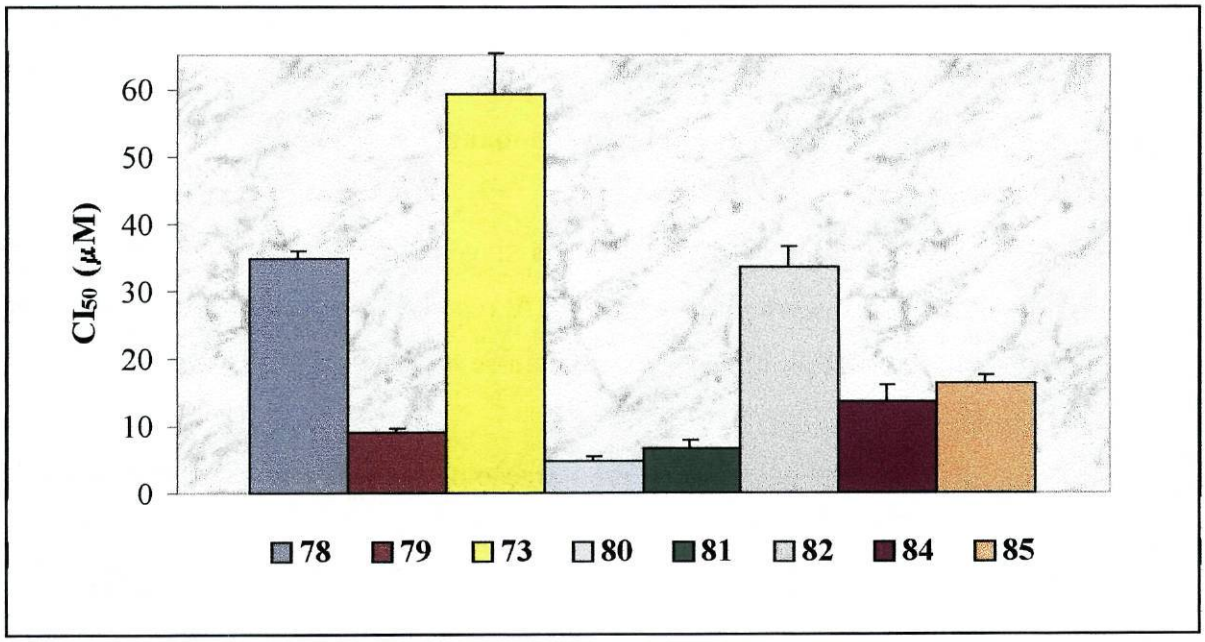


Figura 32 - Gráfico comparativo da actividade das flavonas na proliferação de linfócitos humanos induzida pela PHA.

Para se comprovar se o efeito sobre a proliferação dos linfócitos resultava da inibição do crescimento celular ou da toxicidade directa dos compostos sobre os linfócitos (com a consequente perda de viabilidade), os linfócitos foram expostos a concentrações correspondentes aos CI_{50} dos compostos, sendo posteriormente avaliada a sua viabilidade. Nenhuma toxicidade foi observada (viabilidade > 70%, Tabela 61, pág. 273) o que levou a concluir que a actividade inibidora destes compostos estava associada a uma verdadeira inibição da proliferação celular e não a um efeito tóxico sobre os linfócitos.

Comparando a actividade apresentada pela artocarpesina (**78**) (CI_{50} = 34,7 ± 1,3 μM) com a da artelasticina (**79**) (CI_{50} = 9,2 ± 0,5 μM) pode dizer-se que a presença de dois grupos 3,3-dimetilalilo nas posições 3 e 8 está associada a um aumento da actividade antiproliferativa da artelasticina. Igualmente a presença deste grupo em C-8 na artelastina (**80**) conferiu a este composto uma elevada actividade antiproliferativa (CI_{50} = 4,9 ± 0,6 μM) quando comparada com a da ciclocomunina (**73**) (CI_{50} = 59,2 ± 6,1 μM), flavona estruturalmente relacionada.

A forte inibição da proliferação dos linfócitos humanos apresentada pelas flavonas artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**) poderá estar relacionada com a lipofília apresentada por estes compostos, o que facilitaria a sua entrada nos linfócitos. No entanto, flavonas hidroxiladas e metoxiladas têm também revelado uma potente actividade antiproliferativa de linfócitos, mostrando-se esta actividade superior à observada noutras classes de flavonóides [258, 259]. Este facto levou a que fosse aventada a hipótese de que a existência de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 poderia ser essencial para esta actividade, dependendo a potência desta inibição do número e da posição da hidroxilação do núcleo flavonóide [259]. Curiosamente a ligação dupla entre C-2 e C-3 está presente em todos os flavonóides incluídos nesta dissertação, o que pode justificar a actividade antiproliferativa por eles apresentada. Mais estudos serão necessários para confirmar esta hipótese e esclarecer o mecanismo de acção responsável por esta inibição.

PARTE B_3

ACTIVIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DE LINHAS CELULARES TUMORAIS HUMANAS

CAPÍTULO I

Introdução

Os produtos naturais constituem uma excelente fonte de estruturas químicas complexas possuidoras de um largo espectro de actividades biológicas, entre as quais se salienta a actividade anticancerígena. Na área do tratamento do cancro, dos noventa e dois fármacos comercializados nos Estados Unidos até 1983 ou aprovados mundialmente entre 1983 e 1994, cerca de sessenta e dois por cento foram de origem natural, incluindo compostos naturais modificados por semi-síntese e compostos cuja síntese teve como modelo compostos naturais [258]. Exemplos como o paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia*, a podofilotoxina de *Podophyllum peltatum*, a vimblastina e vincristina de *Catharanthus roseus* evidenciam da importância das plantas como fontes de novos agentes quimioterápicos [260, 261].

Do ponto de vista molecular os compostos de origem natural que apresentam actividade anticancerígena pertencem a diferentes classes estruturais, o que pode reflectir, de certo modo, diferentes mecanismos de acção. Os flavonóides são uma das classes com reconhecida actividade antitumoral e citotóxica [262-277], que apresentam uma diversidade de mecanismos entre os quais a inibição da mitose e a inibição da actividade de enzimas fundamentais para a célula, tais como, as topoisomerases I e II, a proteína cínase C, a proteína tirosina cínase e as cínases dependentes das ciclinas (CDKs) [277]. A indução da morte celular programada (apoptose) nas células cancerígenas tem sido apontado recentemente como um dos mecanismos responsáveis pelo efeito antitumoral de certos quimioterápicos [278]. A quercetina, flavonóide amplamente distribuído na natureza, é um dos exemplos onde a indução da apoptose parece contribuir para a sua actividade antitumoral [279].

Entre os flavonóides com actividade citotóxica, estão descritos vários exemplos de flavonóides isoprenilados, incluindo flavanas [280], flavanonas [281, 282, 283], chalconas [282, 283] e flavonas [73].

Pelo exposto e com base nos resultados obtidos por Liou *et al.* [73], que mostraram a capacidade inibidora de flavonas isopreniladas isoladas de *Artocarpus communis* Forst. no crescimento *in vitro* de duas linhas celulares tumorais humanas, decidiu-se proceder ao estudo da actividade das flavonas isopreniladas isoladas de *Artocarpus elasticus* Reinw ex Blume no crescimento de várias linhas celulares tumorais derivadas de cinco tipos de cancro, nomeadamente cancro da mama (MCF-7), cancro renal (TK-10), melanoma (UACC-62), cancro do pulmão (NCI-H460) e cancro do sistema nervoso central (SF-268).

Estes ensaios foram realizados pelo grupo de Bioensaios do C.E.Q.O.F.F.U.P., sob orientação da Prof. Doutora Maria São José Nascimento. Foi utilizado o método da sulforodamina B, adoptado pelo NCI (EUA), que avalia a inibição do crescimento celular com base no conteúdo proteico [284].

CAPÍTULO II

Resultados e discussão

Foi avaliado a actividade das flavonas **73**, **78-82**, **84** e **85** no crescimento de cinco linhas celulares tumorais humanas derivadas de diferentes cancros: mama (MCF-7), renal (TK-10), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-H4609) e SNC (SF-268). Os resultados obtidos, apresentados sob a forma de concentrações que provocam 50 % de inibição do crescimento celular (GI_{50}), encontram-se na Tabela 62.

Tabela 62 – Actividade das flavonas sobre o crescimento de cinco linhas tumorais humanas.

	GI_{50} (μM)				
	MCF-7 (mama)	**TK-10** (renal)	**UACC-62** (melanoma)	**NCI-H460** (pulmão)	**SF-268** (SNC)
Artocarpesina (**78**)	42,4 ± 1,6	64,1 ± 5,7	38,1 ± 2,4	27,2 ± 0,6	58,4 ± 2,5
Artelasticina (**79**)	8,9 ± 2,4	10,6 ± 3,1	8,8 ± 0,2	10,1 ± 0,2	17,0 ± 0,4
Ciclocomunina (**73**)	21,8 ± 1,3	40,5 ± 1,4	26,6 ± 3,2	33,3 ± 0,1	38,9 ± 0,8
Artelastina (**80**)	2,2 ± 0,3	4,6 ± 1,7	2,2 ± 0,5	1,9 ± 0,1	2,6 ± 0,3
Artelastocromeno (**81**)	9,6 ± 0,7	10,5 ± 1,1	10,5 ± 1,7	19,3 ± 0,2	20,7 ± 1,0
Artelastofurano (**82**)	18,3 ± 0,2	25,2 ± 1,2	17,9 ± 1,4	8,5 ± 0,2	16,7 ± 1,1
Artelastocarpina (**85**)	7,1 ± 0,3	12,5 ± 0,1	8,5 ± 0,3	7,1 ± 0,6	11,6 ± 1,0
Carpelastofurano (**85**)	8,7 ± 0,5	12,3 ± 1,9	8,9 ± 0,6	3,6 ± 0,1	11,4 ± 0,2

Resultados de 3 a 6 determinações independentes realizadas em duplicado expressos como Média ± desvio médio padrão. Doxorubicina, controlo positivo: GI_{50} (MCF-7) = $5{,}5x10^{-2}$ μM, GI_{50} (TK-10) = $57{,}0x10^{-2}$ μM, GI_{50} (UACC-62) = $9{,}4x10^{-2}$ μM, GI_{50} (NCI-H460) = $0{,}81x10^{-2}$ μM; GI_{50} (SF-268) = $9{,}3x10^{-2}$ μM

Todas as flavonas testadas inibiram o crescimento *in vitro* das cinco linhas tumorais. Esta inibição mostrou ser dependente da concentração.

A artelastina (**80**) revelou-se uma potente inibidora do crescimento de todas as linhas celulares testadas, exibindo valores de GI_{50} que variaram entre 1,9 ± 0,1 e 4,6 ± 1,7 μM. As flavonas **79**, **81**, **82, 84**, e **85** exibiram uma menor actividade inibitória ($5 < GI_{50} < 20$ μM), enquanto que a artocarpesina (**78**) e a ciclocomunina (**73**) apresentaram apenas uma fraca capacidade para inibir o crescimento celular ($GI_{50} > 20$ μM).

Na Figura 26 são comparadas as actividades de cada uma das flavonas nas cinco linhas celulares tumorais humanas.

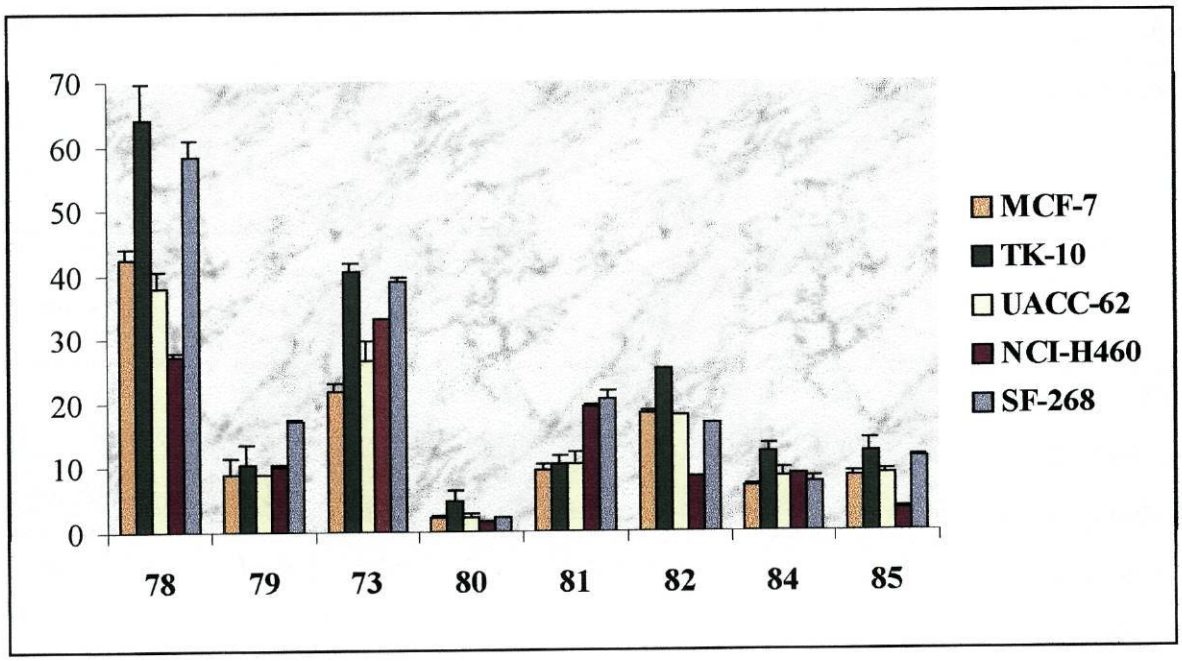


Figura 26 – Gráfico comparativo da actividade das flavonas no crescimento de cinco linhas tumorais.

Embora o número de compostos ensaiados seja reduzido para efectuar estudos de relação estrutura/actividade, salientam-se algumas observações. A presença do grupo 3,3-dimetilalilo na posição 8 de flavonas isopreniladas parece ser importante para a sua actividade inibitória do crescimento das linhas celulares tumorais. A sua ausência na artocarpesina (**78**) e na ciclocomunina (**73**) está associada a uma baixa actividade, tal como revelam os valores de GI_{50} obtidos com estas flavonas nas várias linhas celulares (GI_{50} > 20 μM). Também a presença do anel D na artelastina (**80**) parece contribuir para o aumento da actividade quando comparada com a artelasticina (**79**) (GI_{50} = 1,7 – 4,6 μM *versus* GI_{50} = 8,8 – 17,0 μM). Resultados semelhantes foram obtidos por Liou *et al.* [73] que, estudando a citotoxicidade de isoprenilflavonas com anel D derivado do pirano na linha celular de carcinoma epidermóide

oral (KB), concluíram que a actividade citotóxica aumentava com a presença de grupos 3,3--dimetilalilo em C-6 ou C-8.

Atendendo ao potente efeito inibidor revelado pela artelastina (**80**) no crescimento das linhas celulares tumorais será interessante tentar elucidar o seu mecanismo de acção.

CONCLUSÕES

Da madeira de *Artocarpus elasticus* Reinw. ex Blume (Moraceae) isolaram-se e caracterizaram-se através de métodos espectroscópicos, nomeadamente RMN, nove flavonas isopreniladas: artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**), artelastina (**80**), ciclocomunina (**73**), artelastocromeno (**81**), artelastofurano (**82**), artelastinina (**83**), artelastocarpina (**84**) e carpelastofurano (**85**). Entre as flavonas isoladas a artelasticina (**79**), artelastina (**80**), artelastocromeno (**81**), artelastofurano (**82**), artelastocarpina (**84**) e carpelastofurano (**85**) corresponderam a estruturas inéditas. Deste estudo foram também isolados o β-sitosterol (**77**) e o 2,4-diidroxibenzoato de etilo (**86**).

De modo geral, as flavonas artocarpesina (**78**), artelasticina (**79**), artelastina (**80**) e artelastocromeno (**81**), à concentração de 10 μM, não revelaram interferir com a maior parte dos parâmetros do processo inflamatório estudados utilizando ensaios *in vitro*. No entanto, estas flavonas inibiram ligeiramente a peroxidação lipídica, induzida por catião ferro (II) e ácido ascórbico, a libertação de anião superóxido em PMNs humanos estimulados por TPA e a PLA_2 de abelha *Apis mellifera*. A artelasticina (**79**), a artelastina (**80**) e o artelastocromeno (**81**) inibiram ligeiramente a xantina oxidase, enquanto que a artocarpesina (**78**) revelou ser uma forte inibidora desta enzima (% Inibição = 51,9 ± 0,4). As quatro flavonas estudadas exibiram uma actividade inibitória da mieloperoxidase, particularmente o artelastocromeno (**81**), que inibiu fortemente esta enzima (CI_{50} = 0,6 ± 0,9 μM).

Nos ensaios *in vivo* utilizando-se o modelo da "bolsa de ar em ratinho" verificou-se que o artelastocromeno (**81**) não apresentou qualquer actividade sobre a migração leucócitária e a libertação de mieloperoxidase e PGE_2.

Na avaliação da actividade sobre as vias clássica e alternativa de activação do complemento humano, as flavonas isopreniladas apresentaram capacidade para inibir moderadamente a via clássica de activação do complemento, não revelando qualquer actividade sobre a via alternativa. As flavonas artocarpesina (**78**), artelastina (**80**), artelastofurano (**82**) e carpelastofurano (**85**) foram as mais activas, enquanto que a artelasticina (**73**) e a ciclocomunina (**73**) revelaram uma actividade anticomplementar pouco significativa.

Todas as flavonas isoladas inibiram a proliferação de linfócitos humanos estimulada por PHA. A artelasticina (**79**), a artelastina (**80**) e o artelastocromeno (**81**) mostraram ser potentes inibidores (CI_{50} < 10 μM) da resposta mitogénica dos linfócitos humanos, enquanto que a ciclocomunina (**73**) revelou apenas uma fraca capacidade inibitória desta proliferação (CI_{50} > 50 μM).

As flavonas isopreniladas inibiram o crescimento *in vitro* das linhas tumorais humanas derivadas de diferentes cancros: mama (MCF-7), renal (TK-10), melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-H460) e SNC (SF-268). Das flavonas testadas a artelastina (**80**) foi a mais activa, exibindo valores de GI_{50} que variaram entre 1,9 ± 0,1 e 4,6 ± 1,7 μM. A artocarpesina (**78**) e a ciclocomunina (**73**) apresentaram apenas uma fraca capacidade para inibir o crescimento celular (GI_{50} > 20 μM).

BIBLIOGRAFIA

1. M. Hamburger, K. Hostettmann, "7. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine", *Phytochemistry*, 1991, **30**, 3864-3874.
2. G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, "Natural Products in Drug Discovery and Development", *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**, 52-60.
3. N.R. Farnsworth, "The Role of Ethnopharmacology in Drug Development" em "Bioactive Compounds from Plants", 1990, Ciba Foundation Symposium 154, 2-21.
4. G.A. Cordell, "Biodiversity and Drug Discovery - a Symbiotic Relationship", *Phytochemistry*, 2000, **55**, 463-480.
5. S. Grabley, R. Thiericke, "The Impact of Natural Products on Drug Discovery" em "Drug Discovery from Nature", 1999, Edt. S. Grabley, R. Thiericke, Springer-Verlag, Berlin, 3-37.
6. A.M.V. Fresno, "Farmacognosia. Conceptos Generales" em "Farmacognosia General", 1999, Edt. A.M.V. Fresno, Editorial Síntesis, S. A., Madrid, 19-32.
7. M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail, "Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*", *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 2325-2327.
8. Q-W. Shi, T. Oritani, T. Sugiyama, "Three Rearranged 2(3→20) *abeo*taxanes from the Bark of *Taxus mairei*", *Phytochemistry*, 1999, **52**, 1559-1563.
9. Y-C. Shen, Y-J. Chen, C-Y. Chen, "Taxane Diterpenoids from the Seeds of Chinese Yew *Taxus chinensis*", *Phytochemistry*, 1999, **52**, 1565-1569.
10. R.W. Miller, "A Brief Survey of *Taxus* Alkaloids and Other Taxane Derivatives", *J. Nat. Prod.*, 1980, **43**, 425-437.
11. G. Appendino, P. Gariboldi, B. Gabetta, E. Bombardelli, "Taxoids from the Needles of Yew", *Fitoterapia*, Suppl. *al* N. 1, 1993, **64**, 37-46.
12. G.M. Cragg, "Paclitaxel (Taxol®): a Success Story with Valuable Lessons for Natural Product Drug Discovery and Development", *Med. Res. Rev.*, 1998, **18**, 315-331.
13. T.C. Boge, R.H. Himes, D.G.V. Velde, G.I. Georg, "The Effect of the Aromatic Rings of Taxol on Biological Activity and Solution Conformation: Synthesis and Evaluation of Saturated Taxol and Taxotere Analogues", *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 3337-3343.
14. M.J.T.G. González, "Estudo de Compostos de Origem Vegetal com Potencial Actividade Biológica e Obtenção de Derivados", Tese de doutoramento, 1995, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1-11.

15. G.A. Cordell, C.W.W. Beecher, J.M. Pezzuto, "Can Ethnopharmacology Contribute to the Development of New Anticancer Drugs?", *J. Ethnopharmacol.*, 1991, **32**, 117-133.

16. A.H. Drummond, P.J. Hughes, "The Interaction of Natural Products with Cellular Signalling Mechanisms", *Phytotherapy Res.*, 1987, **1**, 1-16.

17. F.J. Evans, "Natural Products as Probes for New Drug Target Identification", *J. Ethnopharmacol.*, 1991, **32**, 91-101.

18. S. M. Colegate, R.J. Molyneux, "Introduction and Overview" em "Bioactive Natural Products", 1993, CRC Press, Inc., 2-8.

19. T. Nomura, Y. Hano, M. Aida, "Isoprenoid-Substituted Flavonoids from *Artocarpus* plants (Moraceae)", *Heterocycles*, 1998, **47**, 1179-1205.

20. K. Venkataraman, "Wood Phenolics in the Chemotaxonomy of the Moraceae", *Phytochemistry*, 1972, **11**, 1571-1586.

21. K. Venkataraman, "Flavones" em "The Flavonoids", 1975, Edt. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, Chapman and Hall, London, 267-295.

22. F.A.Chowdhury, M.A. Raman, A.J. Mian, "Distribution of Free Sugars and Fatty Acids in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)", *Food Chem.*, 1997, **60**, 25-28.

23. S.A. Achmad, E.H. Hakim, L.D. Juliawaty, L. Makmur, S.N. Aimi, "A Prenylated Flavone from *Artocarpus champeden*", *J. Nat. Prod.*, 1996, **59**, 878-879.

24. C. Boonlaksiri, W. Oonanant, P. Kongsaeree, P. Kittakoop, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, "An Antimalarial Stilbene from *Artocarpus integer*", *Phytochemistry*, 2000, **54**, 425-417.

25. K.O. Esuoso, F.O. Bamiro, "Studies on the Backing Properties of Non-Wheat Flours-I. Breadfruit (*Artocarpus artilis*)", *Int. J. Food Sci. Nutrit.*, 1995, **46**, 267-273.

26. C-C. Chen, Y-L. Huang, J-C. Ou, "Three New Prenylflavones from *Artocarpus altilis*", *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, 1594-1597.

27. C.A. Dunstan, Y. Noreen, G. Serrano, P.A. Cox, P. Perera, L. Bohlin, "Evaluation of Some Samoan and Peruvian Medicinal Plants by Prostaglandin Biosynthesis and Rat Oedema Assays", *J. Ethnopharmacol.*, 1997, **57**, 35-56.

28. A.D. Pendse, R. Pendse, A.V.R. Rao, K. Venkataraman, "Integrin, Cyclointegrin & Oxyisocyclointegrin, Three New Flavones from Heartwood of *Artocarpus integer*", *Indian J. Chem.*, 1976, **14B**, 69-72.

29. T.A. Geissman, D.H.G. Crout, "Flavonoid Compounds" em "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism", 1969, Freeman, Cooper & Company, San Francisco, 183-230.

30. D. Marcano, M. Hasegawa, "Compostos Aromáticos" em "Fitoquímica Orgânica", 1991, Edt. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Univerdidad Central de Venezuela, Caracas, 81-82.

31. Y. Hano, N. Itoh, A. Hanaoka, T. Nomura, "Paratocarpins A-E, Five New Isoprenoid-Substituted Chalcones from *Paratocarpus venenosa* Zoll.", *Heterocycles*, 1995, **41**, 191-198.

32. Y. Hano, N. Itoh, A. Hanaoka, T. Nomura, "Paratocarpins F-L, Seven New Isoprenoid-Substituted Flavonoids from *Paratocarpus venenosa* Zoll.", *Heterocycles*, 1995, **41**, 2313-2326.

33. T. Nomura, "Phenolic Compounds of the Mulberry Tree and Related Plants" em "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", Vol. 53, 1988, Edt. W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby, C. Tamm, Springer-Verlag, Wien, New York, 87-201.

34. T. Nomura, Y. Hano, "Isoprenoid-substituted Phenolic Compounds of Moraceous Plants", *Nat. Prod. Rep.*, 1994, **11**, 205-218.

35. A.V.R. Rao, M. Varadan, K. Venkataraman, "Colouring Matters of the Wood of *Artocarpus heterophyllus*: Part VI-Cycloheterophyllin, a Flavone Linked to Three Isoprenoid Groups", *Indian J. Chem.*, 1971, **9**, 7-13.

36. Y. Hano, R. Inami, T. Nomura, "Components of the Bark of *Artocarpus rigida* Bl. 1. Structures of Two New Isoprenylated Flavones, Artonins G and H", *Heterocycles*, 1990, **31**, 2173-2179.

37. N.S. Kumar, G. Pavanasasivam, M.U.S. Sultanbawa, R. Mageswaran, "Chemical Investigation of Ceylonese Plants. Part 24. New Chromenoflavonoids from the Bark of *Artocarpus nobilis* Thw. (Moraceae)", *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 1977, 1243-1251.

38. Y. Fujimoto, X-X. Zhang, M. Kirisawa, J. Uzawa, M. Sumatra, "New Flavones from *Artocarpus communis* Forst.", *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, **38**, 1787-1789.

39. Y. Hano, Y. Yamagami, M. Kobayashi, R. Isohata, T. Nomura, "Artonins E and F, Two New Prenylflavones from the Bark of *Artocarpus communis* Forst.", *Heterocycles*, 1990, **31**, 877-882.

40. D. Barron, R.K. Ibrahim, "Isoprenylated Flavonoids-a Survey", *Phytochemistry*, 1996, **43**, 921-982.

41. C-M. Lu, C-N. Lin, "Flavonoids and 9-Hydroxytridecyl Docosanoate from *Artocarpus heterophyllus*", *Phytochemistry*, 1994, **35**, 781-783.

42. C-N. Lin, W-L. Shieh, "Prenylflavonoids and a Pyranodihydrobenzoxanthone from *Artocarpus communis*", *Phytochemistry*, 1991, **30**, 1669-1671.

43. Y. Hano, M. Aida, M. Shiina, T. Nomura, T. Kawai, H. Ohe, K. Kagei, "Artonins A and B, Two New Prenylflavones from *Artocarpus heterophyllus* Lamk.", *Heterocycles*, 1989, **29**, 1447-1453.

44. C-N. Lin, C-M. Lu, P-L. Huang, "Flavonoids from *Artocarpus heterophyllus*", *Phytochemistry*, 1995, **39**, 1447-1451.

45. E.H. Hakim, A. Fahriyati, M.S. Kau, S.A. Achmad, L. Makmur, E.L. Ghisalberti, T. Nomura, "Artoindonesianins A and B, Two New Prenylated Flavones from the Root of *Artocarpus champeden*", *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 613-615.

46. M. Aida, K. Shinomiya, K. Matsuzawa, Y. Hano, T. Nomura, "Artonins Q, R, S, T. and U, Five New Isoprenylated Phenols from the Bark of *Artocarpus heterophyllus* Lamk.", *Heterocycles*, 1994, **39**, 847-858.

47. A.V.R. Rao, M. Varadan, K. Venkataraman, "Colouring Matters of the Wood of *Artocarpus heterophyllus*. Part VII-Isocycloheterophyllin, a new flavone", *Indian J. Chem.*, 1973, **11**, 298-299.

48. H-H. Ko, C-N. Lin, "New Constituents of *Artocarpus rigida*", *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 3000-3005.

49. M. Aida, Y. Yamagami, Y. Hano, T. Nomura, "Formation of Dihydrobenzoxanthone Skeleton from 3-Isoprenylated 2',4',5'-Trioxygenated Flavone", *Heterocycles*, 1996, **43**, 2561-2565.

50. M. Aida, N. Yamaguchi, Y. Hano, T. Nomura, "Artonols A, B, C, D and E, Five New Isoprenylated Phenols from the Bark of *Artocarpus communis* Forst.", *Heterocycles*, 1997, **45**, 163-175.

51. W-L. Shieh, C-N. Lin, "A Quinonoid Pyranobenzoxanthone and Pyranodihydrobenzoxanthone from *Artocarpus communis*", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 364-367.

52. M. Aida, K. Shinomiya, Y. Hano, T. Nomura, "Artonins J, K, and L, Three New Isoprenylated Flavones from the Root Bark of *Artocarpus heterophyllus* Lamk.", *Heterocycles*, 1993, **36**, 575-583.

53. Y. Hano, R. Inami, T. Nomura, "Components of the Bark of *Artocarpus rigida* Bl. 2. Structures of Four New Isoprenylated Flavone Derivatives Artonins M, N, O and P", *Heterocycles*, 1993, **35**, 1341-1350.

54. M. Uvais, S. Sultanbawa, S. Surendrakumar, "Two Pyranodihydrobenzoxanthones from *Artocarpus nobilis*", *Phytochemistry*, 1989, **28**, 599-605.

55. Y. Hano, M. Aida, T. Nomura, "Two New Natural Diels-Alder Type Adducts from the Root Bark of *Artocarpus heterophyllus*", *J. Nat. Prod.*, 1990, **53**, 391-395.

56. K. Shinomiya, M. Aida, Y. Hano, T. Nomura, "A Diels-Alder Type Adduct from *Artocarpus heterophyllus*", *Phytochemistry*, 1995, **40**, 1317-1319.

57. Y. Hano, M. Aida, T. Nomura, S. Ueda, "A Novel Way of Determining the Structure of Artonin I, an Optically Active Diels-Alder Type Adduct, with the Aid of an Enzyme System of *Morus alba* Cell Cultures", *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.*, 1992, **17**, 1177-1178.

58. L. Makmur, S. Tukiran, S.A. Achmad, N. Aimi, E.H. Hakim, M. Kitajima, H. Takayama, "Artoindonesianin C, a New Xanthone Derivative from *Artocarpus teysmanii*", *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 243-244.

59. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, "A Stilbene Derivative from *Artocarpus incisus*", *Phytochemistry*, 1997, **45**, 1297-1298.

60. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, S-H. Lee, H. Sato, "The Inhibitory Components from *Artocarpus incisus* on Melanin Biosynthesis", *Planta Med.*, 1998, **64**, 408-412.

61. K. Likhitwitayawuid, B. Sritularak, W. De-Eknamkul, "Tyrosinase Inhibitors from *Artocarpus gomezianus*", *Planta Med.*, 2000, **66**, 275-277.

62. T.P. Lien, H. Ripperger, A. Porzel, T.V. Sung, G. Adam, "Constituents of *Artocarpus tonkinensis*", *Pharmazie*, 1998, **53**, 353.

63. M.I. Chung, H-H. Ko, M.H. Yen, C.N. Lin, S.Z. Yang, T.T. Tsao, J.P. Wang, "Artocarpol A, a Novel Constituent with Potent Anti-inflammatory Effect, Isolated from *Artocarpus rigida*", *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 1200-1204.

64. T.A. Geissman, D.H.G. Crout, "Terpenoid Compounds" em "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism", 1969, Freeman, Cooper & Company, San Francisco, 233-266.

65. G. Pavanasasivam, M. Uvais, S. Sultanbawa, "Cycloartenyl Acetate, Cycloartenol and Artenone in the Bark of *Artocarpus* Species", *Phytochemistry*, 1973, **12**, 2725-2726.

66. R. Daval, T.R. Seshadri, "Colourless Components of the Roots of *Artocarpus heterophyllus*: Isolation of a New Compound, Artoflavanone", *Indian J. Chem.*, 1974, **12**, 895-896.

67. M.R. Fernando, S.M.D.N. Wickramasinghe, M.I. Thabrew, P.L. Ariyananda, E.H. Karunanayake, "Effect of *Artocarpus heterophyllus* and *Asteracanthus longifolia* on Glucose Tolerance in Normal Human Subjects and in Maturity-onset Diabetic Patients", *J. Ethnopharmacol.*, 1991, **31**, 277-282.

68. M.J. Alcaraz, A. Villar, "Anti-inflammatory Effects of Natural Phenolic Compounds" em "Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine", Vol. II, 1989, Edt. J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber, CRC Press, Boca Raton, 77-85.

69. G.R. Reddy, N. Ueda, T. Hada, A.C. Sackeyfio, S. Yamamoto, Y. Hano, M. Aida, T. Nomura, "A Prenylflavone Artonin E, as Arachidonate 5-Lipoxygenase Inhibitor", *Biochem. Pharmacol.*, 1991, **41**, 115-118.

70. Y. Koshihara, Y. Fujimoto, H. Inoue, "A New 5-Lipoxygenase Selective Inhibitor Derived from *Artocarpus communis* Strongly Inhibits Arachidonic Acid-induced Ear Edema", *Biochem. Pharmacol.*, 1988, **37**, 2161-2165.

71. C-N. Lin, C-M. Lu, "Novel Antiplatelet Constituents from Formasan Moraceous plants", *J. Nat. Prod.*, 1996, **59**, 834-838.

72. C.-N. Lin, "Antiplatelet Activity of Some Prenylflavonoids", *Biochem Pharmacol.*, 1993, **45**, 509-512.

73. S-S. Liou, W-L. Shieh, T-H. Cheng, S-J. Won, C-N. Lin, "γ-Pyrone Compounds as Potential Anti-cancer Drugs", *J. Pharm. Pharmacol.*, 1993, **45**, 791-794.

74. H. Sies, H. Groot, "Role of Reactive Oxygen Species in Cell Toxicity", *Toxicol. Lett.*, 1992, **64/65**, 547-551.

75. V.R. Winrow, P.G. Winyard, C.J. Morris, D.R. Blake, "Free Radicals in Inflammation: Second Messengers and Mediators of Tissue Destruction", *British Med. Bull.*, 1993, **49**, 506-522.

76. J. Miquel, "Historical Introduction to Free Radical and Antioxidant Biomedical Research" em "Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine", Vol. I, 1989, Edt. J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber, CRC Press, Boca Raton, 3-13.

77. R. Azevedo-Bernarda, "Oxigénio, Sim ... ma non Troppo", *Coimbra Méd.*, 1987, **1**, 75-82.

78. H. Sies, "Biochemistry of Oxidative Stress", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, **25**, 1058-1071.

79. T.P. Ryan, S.D. Aust, "The Role of Iron in Oxygen-mediated Toxicities", *Critical Rev. Toxicol.*, 1992, **22**, 119-141.

80. M.J. Sanz, M. L. Ferrandiz, M. Cejudo, M.C. Terencio, B. Gil, G. Bustos, A. Ubeda, R. Gunasegaran, M.J. Alcaraz, "Influence of a Series of Natural Flavonoids on Free Radical Generating Systems and Oxidative Stress", *Xenobiotica*, 1994, **24**, 689-699.

81. L.G. Korkina, I.B. Afanas'ev, "Antioxidative and Chelating Properties of Flavonoids", *Adv. Pharmacol.*, 1997, **38**, 151-163.

82. S.A.B.E. van Acker, D-J. van den Berg, M.N.J.L. Tromp, D.H. Griffioen, W.P. van Bennekom, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, "Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1996, **20**, 331-342.

83. G. Sichel, C. Corsaro, M. Scalia, A.J. Di Bilio, R.P. Bonomo, "In Vitro Scavenger Activity of Some Flavonoids and Melanins Against $O_2^{\cdot-}$", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1991, **11**, 1-8.

84. M.C. Montesinos, A. Ubeda, M.C. Terencio, M. Payá, M.J. Alcaraz, "Antioxidant Profile of Mono- and Dihydroxylated Flavone Derivatives in Free Radical Generating Systems", *Z. Naturforsch.*, 1995, **50c**, 552-560.

85. Y. Hanasaki, S. Ogawa, S. Fukui, "The Correlation Between Active Oxygens Scavenging and Antioxidative Effects of Flavonoids", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1994, **16**, 845-850.

86. S.R. Husain, J. Cillard, P. Cillard, "Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Flavonoids", *Phytochemistry*, 1987, **26**, 2489-2491.

87. A. Mora, M. Payá, J.L. Rios, M.J. Alcaraz, "Structure-Activity Relationship of Polymethoxyflavones and Other Flavonoids as Inhibitors of Non-enzymic Lipid Peroxidation", *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **40**, 793-797.

88. A.I. Huguet, S. Mañez, M.J. Alcaraz, "Superoxide Scavenging Properties of Flavonoids in a Non-enzymic System", *Z. Naturforsch.*, 1990, **45c**, 19-24.

89. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, "The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids", *Free Rad. Res.*, 1995, **22**, 375-383.

90. J.L. Rios, S. Mañez, M. Payá, M.J. Alcaraz, "Antioxidant Activity of Flavonoids from *Sideritis javalambrensis*", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 1947-1950.

91. C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, "Structure-Antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1996, **20**, 933-956.

92. G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, "Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1997, **22**, 749-760.

93. A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, F. Castelli, "Flavonoids as Antioxidant Agents: Importance of Their Interaction with Biomembranes", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1995, **19**, 481-486.

94. J. Torel, J. Cillard, P. Cillard, "Antioxidant Activity of Flavonoids and Reactivity with Peroxy Radical", *Phytochemistry*, 1986, **25**, 383-385.

95. F.N. Ko, Z.J. Cheng, C.N. Lin, C.M. Teng, "Scavenger and Antioxidant Properties of Prenyflavones Isolated from *Artocarpus heterophyllus*", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1998, **25**, 160-168.

96. J-P. Wang, L-T. Tsao, S-L. Raung, P-L. Lin, C-N. Lin, "Stimulation of Respiratory Burst by Cyclocommunin in Rat Neutrophils is Associated with the Increase in Cellular Ca^{2+} and Protein Kinase C Activity", *Free Rad. Biol. & Med.*, 1999, **26**, 580-588.

97. K. Shimizu, M. Fukuda, R. Kondo, K. Sakai, "The 5α-Reductase Inhibitory Components from Heartwood of *Artocarpus incisus*: Structure-Activity Investigations", *Planta Med.*, 2000, **66**, 16-19.

98. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, S. Buabarn, U. Dilokkunanant, "A Geranylated Chalcone With 5α-Reductase Inhibitory Properties from *Artocarpus incisus*", *Phytochemistry*, 2000, **54**, 737-739.

99. K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, "Inhibition of Tyrosinase by Flavonoids, Stilbenes and Related 4-substituted Resorcinols: Structure-Activity Investigations", *Planta Med.*, 2000, **66**, 11-15.

100. K.R. Markham, "Techniques of Flavonoid Identification", 1982, Academic Press, London, 1-5.

101. W. Heller, G. Forkmann, "Biosynthesis of Flavonoids" em "The Flavonoids: Advances in Research Since 1986", 1994, Edt. J.B. Harborne, Chapman & Hall, London, 499-535.

102. J. Mann, "Secondary Metabolism", 1987, 2ª Ed., Clarendon Press, Oxford, 275-285.

103. J. Ebel, K. Hahlbrock, "Biosynthesis" em "The Flavonoids: Advances in Research Since 1980", 1988, Edt. J.B. Harborne e T.J. Mabry, Chapman & Hall, London, 641-679.

104. K. Hahlbrock, H. Hansgrisebach, "Biosynthesis of Flavonoids" em "The Flavonoids", 1975, Edt. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, Chapman & Hall, London, 866-915.

105. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Nat. Prod. Rep.*, 1989, **6**, 263-290.

106. A. Kijjoa, H.M. Cidade, M.M.M. Pinto, M.J.T.G. González, C. Anantachoke, T. E. Gedris, W. Herz, "Prenylflavonoids from *Artocarpus elasticus*", *Phytochemistry*, 1996, **43**, 691-694.

107. A. Kijjoa, H.M. Cidade, M.J.T.G. González, C.M. Afonso, A.M.S. Silva, W. Herz, "Further Prenylflavonoids from *Artocarpus elasticus*", *Phytochemistry*, 1998, **47**, 875-878.

108. D.J. Austin, M.B. Meyers, "The Biosynthesis of 7-oxygenated coumarins in Hydrangea and Lavender", *Tetrahedron Lett.*, 1964, **14**, 765-771.

109. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Nat. Prod. Rep.*, 1991, **8**, 149-170.

110. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Nat. Prod. Rep.*, 1995, **12**, 579-607.

111. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Nat. Prod. Rep.*, 1986, **3**, 565-585.

112. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Nat. Prod. Rep.*, 1992, **9**, 153-181.

113. S. Martens, G. Forkmann, "Genetic Control of Flavone Synthase II Activity in Flowers of *Gerbera hybrids*", *Phytochemistry*, 1998, **49**, 1953-1958.

114. S. Tahara, R.K. Ibrahim, "Prenylated Isoflavonoids", *Phytochemistry*, 1995, **38**, 1073-1094.

115. F.R. Garcez, S. Scramin, M.C. Nascimento, W.B. Mors, "Prenylated Flavonoids as Evolutionary Indicators in the Genus *Dahlstedtia*", *Phytochemistry*, 1988, **27**, 1079-1083.

116. P. Laflamme, H. Khouri, P. Gulick, R. Ibrahim, "Enzymatic Prenylation of Isoflavones in White Lupin", *Phytochemistry*, 1993, **34**, 147-151.

117. R. Welle, H. Grisebach, "Properties and Solubilization of the Prenyltransferase of Isoflavonoid Phytoalexin Biosynthesis in Soybean", *Phytochemistry*, 1991, **30**, 479-484.

118. H. Yamamoto, J. Kimata, M. Senda, K. Inoue, "Dimethylallyl diphosphate: Kaempferol 8-dimethylallyl Transferase in *Epimedium diphyllum* Cell Suspension Cultures", *Phytochemistry*, 1997, **44**, 23-28.

119. R.K. Ibrahim, V. Luca, H. Khouri, L. Latchinian, L. Brisson, P.M. Charest, "Enzymology and Compartmentation of Polymethylated Flavonol Glucosides in *Chrysosplenium americanum*", *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1237-1245.

120. L. Crombie, J.T. Rossiter, N. Van Bruggen, D.A. Whiting, "Deguelin Cyclase, a Prenyl to Chromene Transforming Enzyme from *Tephrosia vogellii*", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 451-461.

121. P.M. Dewick, "The Biosynthesis of Shikimate Metabolites", *Planta Med.*, 1988, **4**, 73-97.

122. V. Stanjek, J. Piel, W. Boland, "Biosynthesis of Furanocoumarins: Mevanolate–Independent Prenylation of Umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae)", *Phytochemistry*, 1999, **50**, 1141-1145.

123. S. Tahara, J.L. Ingham, S. Nakahara, J. Mizutani, J.B. Harborne, "Fungitoxic Dihydrofuranoisoflavones and Related Compounds in White Lupin, *Lupinus albus*", *Phytochemistry*, 1984, **23**, 1889-1900.

124. M. Tanaka, S. Tahara, "FAD-dependent Epoxidase as a Key Enzyme in Fungal Metabolism of Prenylated Flavonoids", *Phytochemistry*, 1997, **46**, 433-439.

125. S. Tahara, M. Tanaka, W. Barz, "Fungal Metabolism of Prenylated Flavonoids", *Phytochemistry*, 1997, **44**, 1031-1036.

126. V. Roussis, S.A. Ampofo, D.F. Wiemer, "Flavanones from *Lonchocarpus miniflorus*", *Phytochemistry*, 1987, **26**, 2371-2375.

127. W.D. Nes, R.A. Norton, M. Benson, "Carbon-13 NMR Studies on Sitosterol Biosynthesized from [^{13}C]mevalonates", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 805-811.

128. S.B. Mahato, S.K. Banerjee, R.N. Chakravarti, "Beta-sitosterol from Bark of *Artocarpus chaplasha*", *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med.*, 1966, **14**, 44-45.

129. D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz Jr, "Infrared Spectroscopy" em "Introduction to Spectroscopy: a Guide for Students of Organic Chemistry", 1979, Edt. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U. S. A, 13-80.

130. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, "Infrared Spectrometry" em "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 1991, 5ª Ed., John Wiley & Sons, Singapore, 91-164.

131. P.K. Agrawal, K.R. Markham, "Introduction" em "Carbon-13 NMR of Flavonoids", 1989, Edt. P.K. Agrawal, New York, U. S. A., 1-40.

132. K.R. Markham, "Techniques of Flavonoid Identification", 1982, Academic Press, London, 36-51.

133. K.R. Markham, T.J. Mabry, "Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids" em "The Flavonoids", 1975, Edt. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, Chapman & Hall, London, 45-77.

134. T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, "The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols" em "Systematic Identification of Flavonoids", 1970, Springer-Verlag, Berlin, 41-164.

135. H.M.M. Cidade, "Espectrofotometria de Absorção no Ultra-Violeta (UV)" em "Flavonóides Prenilados – Distribuição, Isolamento, Elucidação Estrutural, Biossíntese e Actividades Biológicas", Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Cientifica, 1999, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 38-50.

136. H.M.M. Cidade, "Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H" em "Flavonóides Prenilados – Distribuição, Isolamento, Elucidação Estrutural, Biossíntese e Actividades Biológicas", Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Cientifica, 1999, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 53-65.

137. P.K. Agrawal, R.S. Thakur, M.C. Bansal, "Flavonoids" em "Carbon-13 NMR of Flavonoids", 1989, Edt. P.K. Agrawal, New York, U. S. A., 95-182.

138. H.M.M. Cidade, "Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C" em "Flavonóides Prenilados –Distribuição, Isolamento, Elucidação Estrutural, Biossíntese e Actividades Biológicas", Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Cientifica, 1999, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 66-83.

139. K.R. Markham, V.M. Chari, "Carbon-13 NMR Spectroscopy of flavonoids" em "The Flavonoids: Advances in Research Since 1980", 1988, Edt. J.B. Harborne e T.J. Mabry, Chapman & Hall, London, 19-134.

140. M. Takayama, T. Fukai, Y. Hano, T. Nomura, "Mass Spectrometry of Prenylated Flavonoids", *Heterocycles*, 1992, **33**, 405-434.

141. H.M.M. Cidade, "Espectrometria de Massa" em "Flavonóides Prenilados – Distribuição, Isolamento, Elucidação Estrutural, Biossíntese e Actividades Biológicas", Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Cientifica, 1999, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 85-99.

142. T.J. Mabry, K.R. Markham, "Mass Spectrometry of Flavonoids" em "The Flavonoids", 1975, Edt. J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry, Chapman & Hall, London, 78-126.

143. P.V. Radhakrishnan, A.V.R. Rao, "Colouring Matters of the Wood of *Artocarpus heterophyllus*: Part IV: Constitution of Artocarpesin & Norartocarpetin, & Synthesis of Dihydroartocarpesin Tetramethyl Ether", *Indian J. Chem.*, 1966, **4**, 406-412.

144. C-N. Lin, W-L. Shieh, "Pyranoflavonoids from *Artocarpus communis*", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 2922-2924.

145. D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz Jr, "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Part One: Basic Concepts" em "Introduction to Spectroscopy: a Guide for Students of Organic Chemistry", 1979, Edt. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U. S. A, 81-113.

146. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, "Proton Magnetic Resonance Spectrometry" em "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 1991, 5ª Ed., John Wiley & Sons, Singapore, 165-225.

147. A.M.A.R. Gonçalves, T.M.V.D.P. Melo, "Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear", 2000, Edt. Chymiotechnon, Coimbra, Portugal, p. 41.

148. E.V. Rao, P. Sridhar, B.V.L.N. Rao, P. Ellaiah, "A Prenylated Dihydroflavonol from Mundulea suberosa", *Phytochemistry*, 1999, **50**, 1417-1418.

149. H. Tanaka, T. Tanaka, A. Hosoya, Y. Kitade, H. Etoh, "Three Isoflavanones from *Erythrina orientalis*", *Phytochemistry*, 1998, **48**, 355-357.

150. Y-L. Lin, Y-L. Chen, Y-H. Kuo, "Two New Flavanones and Two New Chalcones from the Root of *Derris Laxiflora* Benth.", *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, **40**, 2295-2299.

151. E.N. Mahmoud, P.G. Waterman, "Minimiflorin: A New 2'-Hydroxyflavanone from *Lonchocarpus miniflorus* Seeds", *J. Nat. Prod.*, 1985, **48**, 648-650.

152. P.S. Khattri, M. Sahai, P. Dasgupta, A.P. Ray, "Flemiculosin, a Novel Chalcone from *Flemengia fruticulosa*", *Heterocycles*, 1984, **22**, 249-256.

153. T. Fujimoto, T. Nomura, "Structures of Cudraflavanone A and Euchrestaflavanone C", *Heterocycles*, 1984, **22**, 997-1003.

154. T. Nomura, T. Fukai, Y. Hano, "Constituents of the Chinese Crude Drug "Sang-Bái-Pi" (*Morus* Root Bark)", *Planta Med.*, 1983, **47**, 30-34.

155. A.K. Singhal, R.P. Sharma, G. Thyagarajan, W. Herz, S.V. Govindan, "New Prenylated Isoflavones and a Prenylated Dihydroflavonol from *Millettia pachycarpa*", *Phytochemistry*, 1980, **19**, 929-934.

156. K.N. Rao, G. Srimannarayana, "Fleminone, a Flavanone from the Stems of *Flemingia macrophylla*", *Phytochemistry*, 1983, **22**, 2287-2290.

157. P.G. Waterman, E.N. Mahmoud, "Flavonoids from the Seeds of *Lonchocarpus costaricensis*", *Phytochemistry*, 1985, **24**, 571-574.

158. Z.T. Fomum, J.F. Ayafor, J. Wandji, "Erythrisenegalone, a Prenylated Flavanone from *Erythrina senegalensis*", *Phytochemistry*, 1985, **24**, 3075-3076.

159. S. Sultana, M. Ilyas, "A Flavanone from *Lannea acida*", *Phytochemistry*, 1986, **25**, 963-964.

160. M. Mizuno, N. Matsuura, M. Iinuma, T. Tanaka, "Isoflavones from Roots of *Euchresta japonica*", *Phytochemistry*, 1992, **31**, 675-678.

161. N. Matsuura, M. Iinuma, T. Tanaka, M. Mizuno, "Flavonoids and a Benzofuran in Roots of *Euchresta tubulosa*", *Phytochemistry*, 1993, **33**, 701-705.

162. E. Dagne, B. Dinku, A.I. Gray, P.G. Waterman, "Pumilaisoflavones A and B from the Seed Pods of *Tephrosia pumila*", *Phytochemistry*, 1988, **27**, 1503-1505.

163. M. Mizuno, K-I. Tamura, T. Tanaka, M. Iinuma, "Three Prenylflavanones from *Euchresta japonica*", *Phytochemistry*, 1988, **27**, 1831-1834.

164. Y-L. Lin, Y-L. Chen, Y-H. Kuo, "Three New Flavonoids, 3'-Methoxylupinifolin, Laxifolin, and Isolaxifolin from the Roots of *Derris laxiflora* Benth", *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 3132-3135.

165. P.G. Waterman, E-H.N. Mahmoud, "Unusual Flavonoids from *Lonchocarpus orotinus* Seeds", *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1189-1193.

166. T. Nomura, T. Fukai, M. Katayanagi, "Studies on the Constituents of the Cultivated Mulberry Tree. III. Isolation of Four New Flavones, Kuwanon A, B, C and Oxydihydromorusin from the Root Bark of *Morus alba* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, **26**, 1453-1458.

167. T. Nomura, T. Fukai, S. Yamada, M. Katayanagi, "Studies on the Constituents of the Cultivated Mulberry Tree. I. Three New Prenylflavones from the Root Bark of *Morus alba* L.", *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, **26**, 1394-1402.

168. T. Nomura, T. Fukai, "Prenylflavonoids from the Root Bark of the Cultivated Mulberry Tree", *Heterocycles*, 1981, **15**, 1531-1567.

169. Y. Hano, S. Suzuki, T. Nomura, S. Ueda, "Two New Phenolic Compounds, Kuwanols C and D, from the Root Bark of a Mulberry Tree Redifferentiated from the Callus Tissues", *Heterocycles*, 1989, **29**, 807-1567.

170. B. Jackson, P.J. Owen, F. Scheinmann, "Extractives from Poisonous British Plants. Part I. The Structure of Alpinumisoflavone, a New Pyranoisoflavone from *Laburnum alpinum* J. Presl.", *J. Chem. Soc.* (C), 1971, 3389-3392.

171. M.C. Nascimento, W.B. Mors, "Flavonoids of *Derris araripensis*", *Phytochemistry*, 1981, **20**, 147-152.

172. R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, "^{13}C NMR Spectometry" em "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 1991, 5ª Ed., John Wiley & Sons, Singapore, 227-265.

173. M. Mizuno, T. Tanaka, K-I. Tamura, N. Matsuura, M. Iinuma, C. Phengklai, "Flavonoids in the roots of *Euchresta horsfieldii* in Thailand", *Phytochemistry*, 1990, **29**, 2663-2665.

174. S.L. Torres, M.S.P. Arruda, A.C. Arruda, A.H. Muller, S.C. Silva, "Flavonoids from *Brosimum acutifolium*", *Phytochemistry*, 2000, **53**, 1047-1050.

175. S. Tahara, M. Moriyama, J.L. Ingham, J. Mizutani, "Diverse Oxygenated Isoflavonoids from *Piscidia erythrina*", *Phytochemistry*, **34**, 303-315.

176. S. Tahara, Y. Katagiri, J.L. Ingham, J. Mizutani, "Prenylated Flavonoids in the Roots of Yellow Lupin", *Phytochemistry*, 1994, **36**, 1261-1271.

177. S. Tahara, M. Moriyama, J.L. Ingham, J. Mizutani, "Isoflavone Atropisomers from *Piscidia erythrina*", *Phytochemistry*, 1993, **34**, 545-552.

178. B.T. Ngadjui, E. Dongo, H. Tamboue, K. Fogue, B.M. Abegaz, "Prenylated Flavanones from the twigs of *Dorstenia mannii*", *Phytochemistry*, 1999, **50**, 1401-1406.

179. T. Sekine, M. Inagaki, F. Ikegami, Y. Fujii, N. Ruangrungsi, "Six Diprenylisoflavones, Derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*", *Phytochemistry*, 1999, **52**, 87-94.

180. T. Fukai, T. Nomura, "Isoprenoid-Substituted Flavonoids from Roots of *Glycyrrhiza inflata*", *Phytochemistry*, 1995, **38**, 759-765.

181. Y-C. Li, Y-H. Kuo, "Two New Isoflavones from the bark of *Ficus microcarpa*", *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**, 292-293.

182. M.J. Alcaraz, J.R.S. Hoult, "Actions of Flavonoids and the Novel Anti-inflammatory Flavone, Hypolaetin-8-glucoside, on Prostaglandin Biosynthesis and Inactivation", *Biochem. Pharmacol.*, 1985, **34**, 2477-2482.

183. H-K. Hsieh, T-A. Lee, J-P. Wang, J-J. Wang, C-N. Lin, "Synthesis and Anti--inflammatory Effect of Chalcones and Related Compounds", *Pharmac. Res.*, 1998, **15**, 39-46.

184. D. Pathak, K. Pathack, A. Singla, "Flavonoids as Medicinal agents – Recent Advances", *Fitoterapia*, 1991, **LXII**, 371-389.

185. J.V. Formica, W. Regelson, "Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids", *Fd. Chem. Toxic.*, **33**, 1061-1080.

186. E. Middleton Jr., C. Kandaswami, "Effects of Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Functions", *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1167-1179.

187. H.W. Chang, S.H. Baek, K.W. Chung, K.H. Son, H.P. Kim, S.S. Kang, "Inactivation of Phospholipase A_2 by Naturally Ocurring Biflavonoid, Ochnaflavone", *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 1994, **205**, 843-849.

188. A.A. Fawzy, B.S. Vishwanath, R.C. Franson, "Inhibition of Human Non-pancreatic Phospholipases A_2 by Retinoids and Flavonoids. Mechanism of Action", *Agents and Actions*, 1988, **25**, 394-400.

189. J.F. Ballesteros, M.J. Sanz, A. Ubeda, M.A. Miranda, S. Iborra, M. Payá, M.J. Alcaraz, "Synthesis and Pharmacological Evaluation of 2'-Hydroxychalcones and Flavones as Inhibitors of Inflammatory Mediators Generation", *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 2794-2797.

190. T. Horie, M. Tsukayama, H. Kouri, C. Yokoyama, M. Furukawa, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, S. Watanabe-Kohno, K. Ohata, "Synthesis of 5,6,7- and 5,7,8-Trioxygenated 3',4'-Dihydroxyflavones Having Alkoxy Groups and Their Inhibitory Activities Against Arachidonate 5-Lypoxygenase", *J. Med. Chem.*, 1986, **29**, 2256-2262.

191. M.A. Moroney, M.J. Alcaraz, R.A. Forder, F. Carey, J.R.S. Hoult, "Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids", *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, **40**, 787-792.

192. B. Gil, M.J. Sanz, M.C. Terencio, M.L. Ferrándiz, G. Bustos, M. Payá, R. Gunasegaran, M.J. Alcaraz, "Effects of Flavonoids on *Naja naja* and Human Recombinant Synovial Phospholipases A_2 and Inflammatory Responses in Mice", *Life Sci.*, 1994, **54**, PL333-338.

193. B. Gil, M.J. Sanz, M.C. Terencio, R. Gunasegaran, M. Payá, M.J. Alcaraz, "Morelloflavone, a Novel Biflavonoid Inhibitor of Human Secretory Phospholipase A_2 With Anti-Inflammatory Activity", *Biochem. Pharmacol.*, 1997, **53**, 733-740.

194. V.R. Hegde, P. Dai, M.G. Patel, M.S. Puar, P. Das, J. Pai, R. Bryan, P.A. Cox, "Phospholipase A_2 Inhibitors from an *Erythrina* Species from Samoa", *J. Nat. Prod.*, 1997, **60**, 537-539.

195. R. Puerta, R.A. Forder, J.R.S. Hoult, "Inhibition of Leukocyte Eicosanoid Generation ans Radical Scavenging Activity by Gnaphalin, a Lipophilic Flavonol Isolated from *Helichrysum picardii*", *Planta Med.*, 1999, **65**, 507-511.

196. B. Limasset, C. Doucen, J-C. Dore, T. Ojasoo, M. Damon, A.C. Paulet, "Effects of Flavonoids on the Release of Reactive Oxygen Species by Stimulated Human Neutrophils", *Biochem. Pharmacol.*, 1993, **46**, 1257-1271.

197. I. Merfort, J. Heilmann, M. Weiss, P. Pietta, C. Gardana, "Radical Scavenger Activity of Three Flavonoid Metabolites Studied by Inhibition of Chemiluminescence in Human PMNs", *Planta Med.*, 1996, **62**, 289-292.

198. A.L. Catapano, "Antioxidant Effect of Flavonoids", *Angiology*, 1997, **48**, 39-44.

199. W. Bors, M. Saran, "Radical Scavenging by Flavonoid Antioxidants", *Free Rad. Res. Comms.*, 1987, **2**, 289-294.

200. A.D. Sedgwick, D.A. Willoughby, "Initiation of the inflammatory response and its prevention" em "Handbook of Inflammation", Vol. 5, 1985, Edt. I.L. Bonta, M.A. Bray, M.J. Parnham, Elsevier Science Publishers B. V., 27-46.

201. M.G. Bustos, "Mecanismo de Acción Anti-inflamatória de la Florifenina", Tese de doutoramento, 1995, Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência, 4-48.

202. J.D. Canete, A. Collado, J. Munoz-Gómez, J.B. Gómez, D.R. Alvira, X. Rabasseda, "Inflamación y Radicales Libres", *Drugs of Today*, 1993, **29**, 1-42.

203. M. Baggiolini, "Phagocyte Activation and Its Modulation by Drugs" em "Handbook of Inflammation", Vol. 5, 1985, Edt. I.L. Bonta, M.A. Bray, M.J. Parnham, Elsevier Science Publishers B. V., 117-135.

204. I. Yuli, A. Tomonaga, R. Snyderman, "Chemoattractant Receptor Functions in Human Polymorphonuclear Leucocytes are Divergently Altered by Membrane Fluidizers", *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1982, **79**, 5906-5910.

205. B.N. Cronstein, K.A. Haines, "Stimulus-Response Uncoupling in the Neutrophil", *Biochem. J.*, 1992, **281**, 631-635.

206. S Nourshargh, J.A. Perkins, H.J. Showell, K. Matsushima, T.J. Williams, P.D. Collins, "A Comparative Study of the Neutrophyl Stimulatory Activity *in vitro* and Pro-

inflammatory Properties *in vivo* of 72 Amino Acid and 77 Amino Acid IL-8", *J. Immunol.*, 1992, **148**, 106-111.

207. S.J. Weiss, "Tissue Destruction by Neutrophils", *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 365-376.

208. P.M. Bozeman, D.B. Learn, E.L. Thomas, "Inhibition of Human Leukocyte Enzymes Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase by Dapsone", *Biochem. Pharmacol.*, 1992, **44**, 553-563.

209. A.J. Kettle, C.A. Gedye, C.C. Winterbourn, "Superoxide is an Antagonist of Antiinflammatory Drugs that Inhibit Hypochlorous Acid Production Mieloperoxidase, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, **45**, 2003-2010.

210. M.C.M. Mezquita, "Estudio de las Propriedades Antioxidantes de una serie de Derivados Bencilisoquinoleícos y Flavonoides", Tese de Doutoramento, 1994, Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência, 3-43.

211. R.S Pardini, "Toxicity of Oxygen from Naturally Occuring Redox-Active Pro-Oxidants", *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 1995, **29**, 101-118.

212. G.W. Burton, K.U. Ingold, "Mechanisms of Antioxidant Action: Preventive and Chain-Breacking Antioxidants" em "Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine", Vol. II, 1989, Edt. J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber, CRC Press, Boca Raton, 29-42.

213. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, "Lipid Peroxidation: a Radical Chain Reaction" em "Free Radicals in Biology and Medicine", 1989, Clarendon Press, Oxford, 188-276.

214. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, "Free Radicals as Useful Species" em "Free Radicals in Biology and Medicine", 1989, Clarendon Press, Oxford, 365-415.

215. P. Vadas, W. Pruzanski, "Biology of Disease Role of Secretory Phospholipases A_2 in the Pathobiology of Disease", *Laboratory Investigation*, 1986, **55**,391-401.

216. A.B. Mukherjee, L. Miele, N. Pattabiraman, "Phospholipase A_2 Enzymes: Regulation and Physiological Role", *Biochem. Pharmacol.*, 1994, **48**, 1-10.

217. E. Kaiser, P. Chiba, K. Zaky, "Phospholipases in Biology and Medicine", *Clin. Biochem.*, 1990, **23**, 349-370.

218. K.B. Glaser, D. Mobilio, J.Y. Chang, N. Senko, "Phospholipase A_2: Enzymes: Regulation and Inhibition", *TIPS*, 1993, **14**, 92-98.

219. B.C.M. Potts, D.J. Faulkner, R.S. Jacobs, "Phospholipase A_2 Inhibitors from Marine Organisms", *J. Nat. Prod.*, 1992, **55**, 1701-1717.

220. M.R.C. Echeandía, "Estudio de la Influencia de Escalaradial e Ircinina sobre la Actividad PLA_2 y Otros Parámetros del Processo Inflamatorio", Tese de Doutoramento, 1995, Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência, 56-59.

221. R. Cholbi, M.L. Ferrándiz, M.C. Terencio, S. Rosa, M.J. Alcaraz, M. Payá, "Inhibition of Phospholipase A_2 Activities and Some Inflammatory Responses by the Marine Product Ircinin", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1996, **354**, 677-683.

222. V. Escrig, A. Ubeda, M.L. Ferrandiz, J. Darias, J.M. Sanchez, M.J. Alcaraz, M. Paya, "Variabilin: A Dual Inhibitor of Human Secretory and Cytosolic Phospholipase A_2 With Anti.inflammatory Activity", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, **282**, 123-131.

223. M. Paya, M.C. Terencio, M.L. Ferrándiz, M.J. Alcaraz, "Involvement of Secretory Phospholipase A_2 Activity in the Zymosan Rat Air Pouch Model of Inflammation", *Br. J. Pharmacol.*, 1996, **117**, 1773-1779.

224. G. Cirino, "Multiple Controls in Inflammation: Extracellular and Intracellular Phospholipase A_2, Inducible and Constitutive Cyclooxygenase, and Inducible Nitric Oxide Synthase", *Biochem. Pharmacol.*, 1998, **55**, 105-111.

225. J.A. Salmon, G.A. Higgs, "Prostaglandins and Leucotrienes as Inflammatory Mediators", *Br. Med. Bull.*, 1987, **43**, 285-296.

226. W.L. Smith, "The Eicosanoids and their Biochemical Mechanism of Action", *Biochem. J.*, 1989, **259**, 315-324.

227. S. Moncada, J.R. Vane, "Pharmacology and Endogenus Roles of Prostaglandin Endoperoxides, Tromboxane A_2, and Prostacyclin", *Pharmacol. Rev.*, 1979, **30**, 293-331.

228. J.A. Mitchell, T.D. Warner, "Cyclo-oxygenase-2: Pharmacology, Physiology, Biochemistry and Relevance to NSAID Therapy", *Br. J. Pharmacol.*, 1999, **128**, 1121-1131.

229. M.A. Bray, "The Pharmacology and Pathophysiology of Leukotriene B_4", *Br. Med. Bull.*, 1983, **39**, 249-254.

230. B. Samuelsson, S-E. Dahlén, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, C.N. Serhan, "Leukotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis and Biological Effects", *Science*, 1987, **237**, 1171-1176.

231. B. Samuelsson, Leukotrienes: "Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation", *Science*, 1983, **220**, 568-575.

232. P. Sirois, C. Robidoux, "Leukotrienes and Related Substances: Inflammatory and Pharmacological Effects" em "Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine", Vol. I, 1989, Edt. J. Miquel, A.T. Quintanilha, H. Weber, CRC Press, Boca Raton, 127-145.

233. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.

234. J.A. Salmon, "Measurement of Eicosanoids by Bioassay and Radioimmunoassay", *Br. Med. Bull.*, 1983, **39**, 227-231.

235. R.B. Gallagher, R. Brines, D. Girdlestone, "Why Immunopharmacology ?", *Immunology Today*, 1993, **14**, 241.

236. R. P. Labadie, "Immunomodulatory Compounds" em "Bioactive Natural Products", 1993, CRC Press, Inc., 279-317.

237. H. Wagner, "Search for Plant Derived Natural Products With Immunostimulatory Activity (Recent Advances)", *Pure & Appl. Chem.*, 1990, **62**, 1217-1222.

238. M.S.J. Nascimento, H. Cidade, M. Pinto, A. Kijjoa, "Anticomplementary Activity of Prenylated Flavones from *Artocarpus elasticus*", *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 1997, **2/3**, 135-137.

239. J.P.A.M. Klerx, C.J. Beukelman, H. Van Dijk, J.M.N. Willer, "Microassay for Colorimetric Estimation of Complement Activity in Guinea Pig, Human and Mouse Serum", *J. Immunol. Methods.*, 1983, **63**, 215-220.

240. T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55-63.

241. M.B. Hansen, S.E. Nielsen, K. Berg, "Re-examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell Growth/Cell Kill", *J. Immunol. Methods*, 1989, **119**, 203-210.

242. H. Van Dijk, C.J. Beukelman, B.H. Kroes, S.B.A. Halkes, H.F. Smit, L.C.Q. Van Ufford, E. Van Den Worm, T.L. T. Boer, J.H. Van Meer, A.J.J. Van Den Berg, R.P. Labadie, "*In Vitro* Assays for Activity-Guided Enrichment of Immunomodulatory Plant Constituents" em "Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development", Vol. 43, 1999, Edt. L. Bohlin, J.G. Bruhn, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 101-111.

243. M.M. Frank, "Complement & Kinin" em " Basic & Clinical Immunology", 1994, Edt. D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow, Appleton & Lange, London, U. K., 124-136.

244. S.B.A. Halkes, "*Filipendula ulmaria*, A Study on the Immunomodulatory Activity of Extracts and Constituents", Tese de Doutoramento, 1998, Faculdade de Farmácia da Universidade de Utrecht, 13-37.

245. M.K. Liszewski, J.P. Atkinson, "The Complement System" em "Fundamental Immunolology", 1993, Edt. W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York, 917-938.

246. S.F.A.J. Horsten, "Cyclic Peptides in The Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae)", Tese de Doutoramento, 1995, Faculdade de Farmácia da Universidade de Utrecht, 12-47.

247. B.H. Kroes, "*Nimba Arishta*, Impact of The Preparation Process on Chemical Parameters And Immunomodulatory Activity", Tese de Doutoramento, 1990, Faculdade de Farmácia da Universidade de Utrecht, 10-24.

248. I. Roit, J. Brostoff, D. Male, "Complement" em "Immunology", 1996, Mosby, London, 13.1-13.17.

249. W. Vogt, "Drugs and The Complement System", *TIPS*, 1985, 114-118.

250. S.M. Linton, B.P. Morgan, "Complement Activation and Inhibition in Experimental Models of Arthritis", *Molecular Immunol.*, 1999, **36**, 905-914.

251. T.G. Parslow, "Lymphocytes & Lymphoid Tissues" em " Basic & Clinical Immunology", 1994, Edt. D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow, Appleton & Lange, London, U. K., 22-39.

252. I. Roit, J. Brostoff, D. Male, "Introduction to the Immune System" em "Immunology", 1996, Mosby, London, 1.1-1.12.

253. I. Roit, J. Brostoff, D. Male, "Immunodeficiency" em "Immunology", 1996, Mosby, London, 21.1-21.10.

254. A.I. Terr, "Mechanisms of Hypersensitivity" em " Basic & Clinical Immunology", 1994, Edt. D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow, Appleton & Lange, London, U. K., 317.

255. I. Roit, J. Brostoff, D. Male, "Transplantation and Rejection" em "Immunology", 1996, Mosby, London, 26.1-26.13.

256. M.R.Garovoy, P. Stock, G. Bumgardner, F. Keith, C. Linker, "Clinical Transplantation" em " Basic & Clinical Immunology", 1994, Edt. D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow, Appleton & Lange, London, U. K., 747-749.

257. D.P. stites, "Clinical Laboratory Methods for Detection of Cellular Immunity" em " Basic & Clinical Immunology", 1994, Edt. D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow, Appleton & Lange, London, U. K., 204-205.

258. S.Y. Namgoong, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, H.P. Kim, "Effects of Naturally occurring flavonoids on mitogen-induced Lymphocyte Proliferation and Mixed Lymphocyte Culture", *Life Sci.*, 1994, **54**, 313-320.

259. K.M. You, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, H.P. Kim, "Vitexicarpin, a Flavonoid from the Fruits of *Vitex rotundifolia*, Inhibits Mouse Lymphocyte Proliferation and Growth of Cell Lines *In Vitro*", *Planta Med.*, 1998, 64, 546-550.

260. D.J. Newman, G.M. Cragg, K. M. Snader, "The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery", *Nat. Prod. Rep.*, 2000, **17**, 215-234.

261. G.M. Cragg, M.R. Boyd, M.A. Christini, R. Kneller, T.D. Mays, K.D. Mazan, D.J. Newman, E.A. Sausville, "Screening of Natural Products of Plant, Microbial and Marine Origin: The NCI Experience" em "Phytochemical Diversity: A Source of New Industrial Products", The Proceedings of the Symposium organized by the Biotechnology Group of The Royal Society of Chemistry, 1997, 1-29.

262. N. Kaneda, J.M. Pezzuto, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, N.R. Farnsworth, T. Santisuk, P. Tuchinda, J. Udchachon, V. Reutrakul, "Plant Anticancer Agents, XLVIII. New Cytotoxic Flavonoids from *Muntingia calabura* Roots", *J. Nat. Prod.*, 1991, **54**, 196-206.

263. M. Drees, W.A. Dengler, T. Roth, H. Labonte, J. Mayo, L. Malspeis, M. Grever, E.A. Sausville, H.H. Fiebig, "Flavopiridiol (L86-8275): Selective Antitumor Activity in Vitro and Activity in Vivo for Prostate Carcinoma Cells", *Clinical Cancer Res.*, 1997, **3**, 273-279.

264. J.M. Cassady, W.M. Baird, C-J. Chang, "Natural Products as a Source of Potencial Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents", *J. Nat. Prod.*, 1990, **53**, 23-41.

265. M. Arisawa, T. Hayashi, M. Shimizu, N. Morita, H. Bai, S. Kuze, Y. Ito, "Isolation and Cytotoxicity of Two New Flavonoids from *Chrysosplenium grayanum* and Related Flavonols", *J. Nat. Prod.*, 1991, **54**, 898-901.

266. T. Akama, Y. Shida, T. Sugaya, H. Ishida, K. Gomi, M. Kasai, "Novel 5-Aminoflavone Derivatives as Specific Antitumor Agents in Breast Cancer", *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 3461-3469.

267. T. Akama, H. Ishida, U. Kimura, K. Gomi, H. Saito, "Structure-Activity Relationships of the 7-Substituents of 5,4'-Diamino-6,8,3'-Trifluoroflavone, a Potent Antitumor Agent", *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 2056-2067.

268. F. Boege, T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob, J. Koehrle, "Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eucaryotic Topoisomerase I", *The J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 2262-2270.

269. K.C. Bible, S.H. kaufmann, "Cytotoxic Synergy Between Flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and Various Antineoplastic Agents: The Importance of Sequence of Administration", *Cancer Res.*, 1997, **57**, 3375-3380.

270. B. A. Carlson, M.M. Dubay, E.A. Sausville, L. Brizuela, P.J. Worland, "Flavopiridol Induces G_1 Arrest with Inhibition of Cyclin-dependent Kinase (CDK) 2 and CDK4 in Human Breast Carcinoma Cells", *Cancer Res.*, 1996, **56**, 2973-2978.

271. K.C. Bible, R.H. Bible, T.J. Kottke, P.A. Svingen, K. Xu, Y-P. Pang, E. Hajdu, S.H. Kaufmann, "Flavopiridol Binds to Duplex DNA", *Cancer Res.*, 2000, **60**, 2419-2428.

272. N.J. Panaro, N.C. Popescu, S.R. Harris, U.P. Thorgeirsson, "Flavone acetic acid induces a G2/M Cell Cycle Arrest in Mammary Carcinoma Cells", *Br. J. Cancer*, 1999, **80**, 1905-1911.

273. R.A Aitken, M.C. Bibby, J.A. Double, R.M. Phillips, S.K. Sharma, "Synthesis and Antitumor Activity of New Derivatives of Flavone-8-acetic Acid (FAA). Part 1: 6-Methyl Derivatives, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 1996, **329**, 489-497.

274. R.A Aitken, M.C. Bibby, J.A. Double, A.L. Laws, R.B. Ritchie, D.W.J. Wilson, "Synthesis and Antitumor Activity of New Derivatives of Flavone-8-acetic Acid (FAA). Part 2: Ring-Substituted Derivatives, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 1997, **330**, 215-224.

275. R.A Aitken, M.C. Bibby, P.A. Cooper, J.A. Double, A.L. Laws, R.B. Ritchie, D.W.J. Wilson "Synthesis and Antitumor Activity of New Derivatives of Flavone-8-acetic Acid (FAA). Part 4: Variation of the Basic Structure, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 2000, **333**, 181-188.

276. H.S. Chung, L.C. Chang, S.K. Lee, L.A. Shamon, R.B. van Breemen, R.G. Mehta, N.R. Farnsworth, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, "Flavonoid Constituents of *Chorizanthe diffusa* With Potential Cancer Chemopreventive Activity", *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 36-41.

277. E. Middleton, C. Kandaswami, "Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation, and Cancer" em "The Flavonoids: Advances in Research Since 1986", 1994, Edt. J.B. Harborne, Chapman & Hall, London 1994, 619-652.

278. Y. Hannum, "Apoptosis and Dilemma of Cancer Chemotherapy", *Blood*, 1997, **89**, 1845-1853.

279. Y.Q. Wei, X. Zhao, Y. Kariya, H. Fukata, K. Teshigawara, A. Uchida, "Induction of Apoptosis by Quercetin: Involvement of It Shoke Protein", *Cancer Res.*, 1994, **54**, 4952-4957.

280. H-H. Ko, M-H. Yen, R-R. Wu, S-J. Won, C-N Lin, "Cytotoxic Isoprenylated Flavans of *Broussonetia kazinoki*", *J. Nat. Prod.*, 1999, **62**, 164-166.

281. E-K. Seo, G.L. Silva, H-B. Chai, T.E. Chagwedera, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, "Cytotoxic Prenylated Flavanones from *Monotes engleri*", *Phytochemistry*, 1997, **45**, 509-515.

282. M.C. Henderson, C.L. Miranda, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, D.R. Buhler, "*In Vitro* Inhibition of Human P450 Enzymes by Prenylated Flavonoids from Hops, *Humulus lupulus*", *Xenobiotica*, 2000, **30**, 235-251.

283. C.L. Miranda, J.F. Stevens, A. Helmrich, M.C. Henderson, R.J. Rodriguez, Y-H. Yang, M.L. Deinzer, D.W. Barnes, D.R. Buhler, " Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines", *Fd. Chem. Toxic..*, 1999, **37**, 271-285.

284. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A.V. Wolff, M.G. Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, "Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines", *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, **83**, 757-766.