

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA, TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE *Maxillaria picta*

Thiago L. de Almeida^a, Josiane A. Monteiro^a, Greice K. P. Lopes^a, Lucas U. R. Chiavelli^a, Silvana M. de O. Santin^a, Cleuza C. da Silva^a, Vanessa Kaplum^b, Débora B. Scariot^b, Celso V. Nakamura^b, Ana L. T. G. Ruiz^c, João E. Carvalho^c, Ricardo T. de Faria^d e Armando M. Pomini^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bDepartamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^cCentro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexandre Cazelatto 999, 13081-970 Paulínia – SP, Brasil

^dDepartamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86055-900 Londrina – PR, Brasil

Recebido em 27/11/2013; aceito em 09/04/2014; publicado na web em 03/07/2014

CHEMICAL STUDY AND ANTIPROLIFERATIVE, TRYPANOCIDAL AND LEISHMANICIDAL ACTIVITIES OF *Maxillaria picta*. The chemical study of the orchid *Maxillaria picta* resulted in the isolation of the bioactive stilbenes phoyunbene B and phoyunbene C, in addition to four phenolic acids, one xanthone, steroidal compounds and two triterpenes. Crude extract, fractions, subfractions and the isolated xanthone were evaluated for anticancer activity against human tumor cell lines and against evolutionary forms of *T. cruzi* and *L. amazonensis*. The structures of the compounds were determined by GC-MS, and ¹H NMR, ¹³C NMR spectral methods as well as bidimensional techniques.

Keywords: *Maxillaria*; *Trypanosoma*; *Leishmania*; stilbenes.

INTRODUÇÃO

Plantas da família Orchidaceae têm se tornado alvo de estudos fitoquímicos sendo uma rica e variada fonte de compostos que apresentam diversos tipos de atividades biológicas. Já foram relatados os isolamentos de triterpenos,¹ alcaloides,² fenantrenos,³ flavonoides,⁴ além de estilbenes e ácidos fenólicos,^{5,6} muitos deles demonstrando propriedades farmacológicas, tais como antioxidante, anticancerígena e analgésica.^{2,4,5}

Pouco se sabe, porém, sobre substâncias com potencial biológico de orquídeas do gênero *Maxillaria*. Estudos químicos e biológicos foram realizados apenas com a espécie *M. densa*, nativa do México, utilizada popularmente como relaxante muscular,⁷ a partir da qual foram identificados fenantrenos e estilbenoides com atividades antifúngicas.^{8,9}

A espécie *M. picta* é endêmica do bioma Mata Atlântica, no Sul e Sudeste do Brasil, principalmente sobre a Serra do Mar, sendo comumente encontrada em modo epifítico sobre perobas. A espécie é facilmente identificada pela presença de seus pseudobulbos bifoliados, sulcados a canaliculados e pelas suas flores campanuladas, duradouras e sem recompensas florais aos polinizadores,¹⁰ mas que apresentam fragrâncias e colorações que atraem abelhas operárias sem ferrão do gênero *Trigona*.¹¹ Alguns trabalhos realizados com *M. picta* descrevem os componentes florais voláteis que se caracterizam por altas concentrações do monoterpene linalol.¹²

O presente trabalho descreve o estudo químico e farmacológico do extrato bruto e frações de *M. picta*, com a realização de ensaios para atividade antiproliferativa contra diversas linhagens de células cancerosas humanas bem como ensaios tripanocida e leishmanicida, agentes causadores de doenças tropicais negligenciadas de considerável

importância, tendo em vista a atual defasagem medicamentosa para o tratamento dessas enfermidades.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os espectros de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C foram obtidos em espectrômetros Varian Mercury Plus, operando a 300,06 MHz para ¹H e 75,45 MHz para ¹³C. Também foram obtidos os espectros pela técnica DEPT e correlações bidimensionais a partir dos mapas de contornos COSY, HMBC e HSQC. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o TMS. Os solventes utilizados foram: CDCl₃, CD₃OD, D₂O e DMSO-*d*₆, Aldrich ou Isotec. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos com um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas modelo Focus GC (Thermo-Finnigan).

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica gel 60 e as filtrações foram feitas em Sephadex LH 20. Os diâmetros das colunas utilizadas variaram de acordo com a massa do material a ser tratado.

O acompanhamento das cromatografias em coluna foi feito por análises de cromatografia em camada delgada (CCD). As placas cromatográficas foram preparadas com fase estacionária sílica-gel 60 G e sílica-gel 60 GF, com 0,25 mm de espessura. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas através do revelador anisaldeído.

Material vegetal

A espécie vegetal *M. picta* foi coletada no campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e identificada pelo Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, em março de 2012. Um espécime é mantido vivo no orquidário da UEL e uma exsiccata é mantida sob código FUEL22314.

*e-mail: ampomini@uem.com

Isolamento dos constituintes químicos

Aproximadamente 6,0 kg do material vegetal (raízes, folhas e pseudobulbos) foram moídos e submetidos a uma extração exaustiva com uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:7) (16 L \times 3) a frio. Após a evaporação sob pressão reduzida, obteve-se um extrato bruto (188,0 g). Parte do extrato bruto clorofórmico-metanólico (142,0 g) foi solubilizado em 500 mL de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 e submetido à partição em hexano, CHCl_3 , AcOEt e $n\text{-BuOH}$, resultando nas frações hexânica (MPH, 12,8 g), CHCl_3 (MPC, 30,7 g), AcOEt (MPA, 21,5 g), $n\text{-BuOH}$ (MPB, 7,0 g) e a remanescente $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (MPM, 67,2 g). A fração MPC foi solubilizada sucessivamente com hexano (MPCH, 5,5 g), CHCl_3 (MPCC, 12,1 g), AcOEt (MPCA, 6,4 g) e MeOH (MPCM, 0,8 g), resultando nas suas respectivas subfrações.

A fração $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$ (523,1 mg) foi submetida a uma separação em cromatografia em Sephadex LH 20 (MeOH), resultando em 71 frações. Após análise por CCD as frações foram agrupadas de acordo com sua similaridade cromatográfica. A subfração CA-1 (102,1 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna de Sephadex LH 20 (MeOH). Esta separação resultou no isolamento das substâncias **1** e **2** na forma de mistura (22,3 mg), enquanto que a fração CA-2 mostrou conter a substância **3** (21,0 mg).

A fração $\text{CHCl}_3\text{-Hexânica}$ (3,60 g) foi submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica, eluída com hexano, CHCl_3 , AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. A subfração CH-1 (10,3 mg) resultou no isolamento da mistura **4** e **5** (14,3 mg), enquanto que a subfração CH-2 (123,6 mg) também foi submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica, resultando na identificação da mistura de substâncias **6**, **7** e **8** de massa igual a 30,3 mg.

A fração $\text{CHCl}_3\text{-CHCl}_3$ (7,11 g) foi submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica com hexano, CHCl_3 , AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. A fração CC-1 (741,0 mg) foi submetida ao mesmo processo, resultando novamente na mistura **1** e **2** (13,3 mg).

A fração hexânica (5,86 g) foi também submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica utilizando como eluentes hexano, CHCl_3 e MeOH , em gradiente crescente de polaridade. As subfrações H-1 (376,8 g) e H-2 (380,3 g) foram submetidas a um fracionamento em coluna de sílica-gel resultando no isolamento da mistura de compostos **4** e **5** (22,9 mg) e **6**, **7** e **8** (30,3 mg), respectivamente.

A fração AcOEt (566,0 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 somente com MeOH , resultando em 126 frações. A fração A-1 (68,1 mg), submetida a uma filtração em Sephadex LH 20, levou ao isolamento da substância **9** (4,8 mg), enquanto que a fração A-2 (115,7 mg) realizada nas mesmas condições, levou ao isolamento das substâncias **10** (4,1 mg), **11** (10,3 mg) e da mistura **11** e **12** (12,7 mg). A filtração em Sephadex LH 20 da fração A-3 (20,7 mg), resultou no isolamento da mistura das substâncias **11** e **13** (3,1 mg).

Parte da fração $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (601,8 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH-20 usando como eluentes H_2O e MeOH em gradiente decrescente de polaridade, resultando no isolamento da substância **9** (26,0 mg). Além disso, a substância **9** foi obtida em grande quantidade (2,54 g) a partir da precipitação dessa fração.

Avaliação da atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e dos compostos isolados foi realizada contra diversas linhagens de células tumorais humanas.

Linhagens celulares

Para a realização da triagem *in vitro* foram utilizadas as linhagens de células tumorais humanas [rim (786-0), melanona (UACC-62),

leucemia (K562) mama (MCF-7), ovário (OVCAR-3), próstata (PC-3), cólon (HT29), pulmão (NCI-H460), glioma (U251) e ovário resistente (NCI-ADR/RES), queratinócito humano (HaCat)] cedidas pelo Instituto Nacional do Cancer (NCI/EUA, Frederick MA). Todas as linhagens foram cultivadas em RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (1000 U mL^{-1} : 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em atmosfera de 5% de CO_2 , a 37 °C e ambiente úmido.

Teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas

Células tumorais humanas (100 μL suspensão celular compartimento⁻¹, densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ cel mL^{-1}) foram expostas a diferentes concentrações das amostras em DMSO/RPMI/SFB 5% (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C, 5% de CO_2 , em ambiente úmido, por 48 h. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. No momento da adição das amostras (T0) e após o período de exposição (T1), as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e a proliferação celular foi determinada através da quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular usando-se o teste de sulforrodamina B.¹³ A partir da curva de proliferação celular em função da concentração de amostra, calculou-se a concentração efetiva GI_{50} (concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular) através de regressão não linear usando o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

Atividade antiproliferativa em formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Ensaio de toxicidade celular

Os ensaios de toxicidade celular foram realizados com a linhagem LLCMK₂ (células epiteliais de rim de *Macaca mulata*). As células foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina 2 mM, 50 mg mL^{-1} de gentamicina e tamponado com bicarbonato de sódio até pH 7,6, de acordo com metodologia da *American Type Culture Collection* (ATCC®). Em seguida, a cultura foi incubada em garrafas plásticas a 37 °C e 5% de CO_2 em estufa umidificada, para obtenção das células para ensaios.

Para avaliar o efeito citotóxico sobre a linhagem LLCMK₂ foi empregado o método de redução do MTT.¹⁴ A concentração dos compostos com capacidade de reduzir em 50% a densidade óptica das células tratadas, em comparação com o controle, foi determinada pelo cálculo da concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.

Atividade antiproliferativa *in vitro* em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para o ensaio antiproliferativo, ressuspenderam-se em meio LIT suplementado com 10% de SFB as formas epimastigotas de *T. cruzi*, em fase exponencial de crescimento (96 h), o que resultou na concentração de $1,0 \times 10^6$ parasitos mL^{-1} . Em placas de 24 poços, foi adicionado, em cada compartimento, 900 μL da suspensão descrita, bem como 100 μL de meio LIT, na presença ou não de diferentes concentrações dos compostos a serem testados. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 h e, em seguida, avaliou-se o crescimento celular através da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer observada em microscópio óptico. Para mensurar o efeito antiproliferativo, foi tomado o percentual de inibição de crescimento dos parasitos em relação ao controle em 50% (IC_{50}). A substância de referência utilizada como controle foi o Benzonidazol®. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.

Viabilidade in vitro em formas tripomastigotas de T. cruzi

O sobrenadante da cultura de células LLMCK₂ no pico parasistêmico (sexto dia de infecção) foi centrifugado para obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A seguir, as mesmas foram ressuspensas em meio DMEM, chegando-se a uma concentração de $1,0 \times 10^7$ parasitos mL⁻¹. Cada compartimento das placas de 96 poços utilizadas para o ensaio recebeu, além da suspensão de protozoários, uma alíquota dos compostos a serem avaliados em diferentes concentrações, e também dos controles positivo (Benzonidazol®) e negativo (somente meio DMEM). Então, as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ em estufa umidificada. A contagem dos parasitos foi realizada de acordo com o método de Pizzi-Brener.¹⁵ Dessa forma, foi possível quantificar o número de tripomastigotas em movimento, dado que foi utilizado para calcular a concentração de droga capaz de reduzir em 50% a viabilidade dos parasitos (EC₅₀). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.

Atividade antiproliferativa em formas promastigotas e amastigotas axênica de *Leishmania amazonensis**Parasitas e macrófagos*

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram mantidas e cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco®” adicionado de hemina e ácido fólico), pH 7, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e incubados a 25 °C.

As amastigotas axênicas de *L. amazonensis* obtidas a partir de cultura de promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA), pH 4,5, suplementado com 20% de SFB e incubados a 32 °C.¹⁶

Macrófagos de linhagem J774.A1 foram mantidos em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium - Sigma, St Louis, MO, USA), pH 7, suplementado com 10% de SFB e incubados a 37 °C, em tensão de 5% de CO₂.

Ensaio antiproliferativo e de citotoxicidade in vitro

A atividade antiproliferativa *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* foi realizado

como descrito por Britta *et al.*,¹⁷ enquanto que o ensaio citotóxico *in vitro* em macrófagos de linhagem J774.A1 foi descrito por Volpato *et al.*¹⁸

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto clorofórmico-metanólico de *Maxillaria picta* foi submetido a um fracionamento com hexano, CHCl₃, AcOEt e *n*-BuOH em ordem de polaridade crescente, que resultou em suas respectivas frações e a fração H₂O/MeOH que permaneceu após o particionamento.

O extrato bruto e as cinco frações de *M. picta* foram avaliadas em onze linhagens de células tumorais evidenciando-se que a fração clorofórmica (MPC) foi a que apresentou atividade antiproliferativa mais promissora, com GI₅₀ entre 6,9 e 26,5 mg mL⁻¹ em dez linhagens de células. As demais frações ou apresentaram uma atividade mais fraca do que MPC ou foram inativas nas condições avaliadas. Vale a pena ressaltar ainda que, apesar de não ter apresentado uma atividade antiproliferativa média, a fração MPM apresentou uma ação citostática seletiva sobre a linhagem MCF-7 (mama, GI₅₀ = 15,6 mg mL⁻¹).

Continuando a avaliação, MPC foi solubilizada com os solventes hexano, CHCl₃, AcOEt e MeOH, resultando nas subfrações MPCH, MPCC, MPCA e MPCM, respectivamente, as quais também foram avaliadas quanto à atividade antiproliferativa em três linhagens tumorais humanas. Foi possível evidenciar que o fracionamento concentrou as substâncias com atividade antiproliferativa nas subfrações com CHCl₃ (MPCC, média GI₅₀ = 9,8 mg mL⁻¹) e com AcOEt (MPCA, média GI₅₀ = 7,2 mg mL⁻¹), o que potencializou a ação citostática da fração MPC original. Por outro lado, as outras duas subfrações foram bem menos ativas do que a fração MPC original [MPCH (média GI₅₀ = 61,5 mg mL⁻¹) e MPCM (média GI₅₀ = 51,2 mg mL⁻¹)]. Todos esses resultados estão expostos na Tabela 1.

O extrato bruto e frações de *M. picta* também foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. A fração MPC apresentou atividade antiproliferativa sobre as formas epimastigotas (IC₅₀ 70 µg mL⁻¹) bem como afetou de modo expressivo a viabilidade das formas tripomastigotas (EC₅₀ 55 µg mL⁻¹). Por manifestar ação relevante sobre esta última forma, a fração clorofórmica foi, então, submetida ao ensaio

Tabela 1. Valores do GI₅₀ (µg/mL) para o extrato bruto, frações e da mangiferina isolada de *M. picta*

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
Doxorrubicina	0,034	0,029	0,041	0,40	1,5	<0,025	0,25	0,33	0,21	1,0	0,034
MPH	29,6	73,4	40,8	67,3	124,0	97,1	54,4	84,7	68,5	158,7	58,7
MPC	23,0	3,5	6,9	8,3	26,5	13,9	6,9	7,1	24,7	>250	13,9
MPCH	32,2	-	41,5	-	-	110,8	-	-	-	-	-
MPCC	7,0	-	9,2	-	-	13,2	-	-	-	-	-
MPCA	6,0	-	3,3	-	-	12,2	-	-	-	-	-
MPCM	53,9	-	28,8	-	-	70,8	-	-	-	-	-
MPA	51,4	13,4	21,7	27,4	>250	61,0	38,9	113,1	49,4	37,9	68,0
MPB	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MPM	>250	>250	15,6	>250	>250	>250	>250	161,4	>250	>250	104,6
MPEB	63,5	35,1	89,0	83,4	>250	114,4	50,1	58,0	38,6	>250	48,6
1 e 2 (MPCC)	25,6	-	26,9	3,9	20,9	28,4	-	-	32,8	-	40,6
1 e 2 (MPCA)	2,7	-	19,5	2,8	5,8	7,3	-	-	9,8	-	6,1
3	29,7	-	29,0	26,1	27,5	30,7	-	-	31,3	-	29,9
4 e 5	128,5	-	172,9	48,9	60,2	>250	-	-	>250	-	170,3
9	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

a = U251 (glioma, SNC); b = UACC-62 (melanona); c = MCF-7 (mama); d = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); e = 786-0 (rím); f = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); g = PC-3 (próstata); h = OVCAR-3 (ovário); i = HT29 (coloretal); j = K562 (leucemia); k = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada). - não avaliado.

de citotoxicidade em células LLCMK₂, apresentando uma CC₅₀ de 103,35 µg mL⁻¹, conforme observado na Tabela 2.

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e substância precipitada durante a preparação dos extratos (mangiferina), contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, mostrou que a fração MPC apresentou a melhor atividade sobre as formas evolutivas do parasito, com um IC₅₀ de 67,15 µg mL⁻¹. Já a fração H₂O/MeOH apresentou moderada atividade sobre promastigotas (IC₅₀ 126,66 µg mL⁻¹). No entanto, os valores de CC₅₀ relativos a algumas frações suplantaram os IC₅₀ das mesmas, sugerindo que a atividade está diretamente relacionada à citotoxicidade. As frações MPC, MPM, MPA apresentaram índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀) maior que 1, denotando que essas frações em particular são mais ativas contra os protozoários e menos ativas contra as células de mamíferos. Dentre essas três frações, a MPM foi a que apresentou o melhor índice de seletividade sendo, portanto, submetida ao ensaio antiproliferativo contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, que resultou em uma IC₅₀ de 196,34 µg mL⁻¹ (Tabela 3).

Considerando a ação significativa nas formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. amazonensis* da fração MPC, bem como os bons resultados da atividade antiproliferativa em células tumorais da subfração MPCA, esta subfração foi selecionada para dar início ao isolamento dos constituintes químicos de *M. picta*. A filtração em Sephadex LH-20 dessa subfração resultou na identificação da mistura dos estilbenos foiumbeno B (**1**) e foiumbeno C (**2**), na proporção 6:1, e também do ácido florético (**3**).^{5,19} A mistura de estilbenos também foi isolada da subfração MPCC na proporção 3:2.

Adicionalmente, outros nove compostos foram obtidos e identificados de outras frações, tais como os triterpenos eburicol (**4**) e 24-metilenocicloartenol (**5**),^{20,21} dos compostos esteroidais sitosterol (**6**), estigmasterol (**7**) e campesterol (**8**),²² a xantona mangiferina (**9**),²³ o esteroide glicosilado daucosterol (**10**)²⁴ e os

ácidos 4-*O*-cafeoilchiquímico (**11**),²⁵ 5-*O*-cafeoilchiquímico (**12**) e 5-*O*-cafeoilquinico (**13**).^{26,27} As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base na análise dos dados espectroscópicos (RMN ¹H e ¹³C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC e NOESY), por comparação com os dados disponíveis na literatura.

A mistura das substâncias **1** e **2** foi isolada como um óleo avermelhado. No cromatograma obtido na análise por CG-EM (70 eV) para a amostra, observou-se a existência de duas substâncias, com tempos de retenção de 16,82 min e 17,96 min.

A substância **1**, com o tempo de retenção 17,96 min, apresentou um espectro de massas com o pico do íon molecular em m/z 302. O espectro de RMN de ¹H mostrou dupletos em δ_H 6,90 (H-α') e δ_H 7,24 (H-α) ambas com *J* = 16,5 Hz, indicando uma configuração *trans* para esses hidrogênios e dupletos em δ_H 6,63 (*J* = 8,7 Hz, H-5') e em δ_H 7,24 (*J* = 8,7 Hz, H-6'), indicando a presença de um anel aromático 1, 2, 3, 4 substituído. O tripleto em δ_H 6,26 (*J* = 1,8 Hz), juntamente com os múltiplos em δ_H 6,54 e δ_H 6,57, sugerem a presença de um anel aromático 1, 3 e 5 substituído. Também foram observados sinais referentes de hidrogênios oximetílicos em δ_H 3,87, δ_H 3,86 e δ_H 3,78. O espectro de RMN de ¹³C apresentou sinais em δ_C 128,3 (C-α') e δ_C 124,0 (C-α), correspondentes à ligação dupla e sinais em δ_C 61,6, δ_C 61,1 e δ_C 55,6, correspondendo aos carbonos oximetílicos. Os demais sinais foram atribuídos aos carbonos dos anéis aromáticos. Através do mapa de contornos HMBC foi estabelecida a posição dos grupos oximetílicos, onde os hidrogênios localizados em δ_H 3,78 apresentaram correlação com o carbono C-5 em δ_C 162,5 além das correlações do sinal em δ_H 3,87 com o carbono C-2', em δ_C 153,0 e em δ_H 3,86 com C-3', em δ_C 142,2. Os dados espectroscópicos de **1** foram concordantes com os dados da literatura para o *trans*-3,4'-dihidroxi-2',3',5-trimetóxiestilbeno ou foiumbeno B.⁵

A substância **2**, com o tempo de retenção de 16,82 min., apresentou um espectro de massas com o pico do íon molecular em m/z 272. A análise do espectro de RMN de ¹H para a substância **2** também

Tabela 2. Valores de CC₅₀ (µg/mL), IC₅₀ (µg/mL) e IS para o extrato bruto e frações de *M. picta* frente *Trypanosoma cruzi*

DROGA	Citotoxicidade em LLCMK ₂		Epimastigotas		Tripomastigotas	
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	EC ₅₀ (µg/mL)	IS	
Benzonidazol	614,7 ± 115,2	6,5 ± 0,7	-	34,5 ± 7,6	ND	
MPH	-	154,5 ± 19,1	-	> 200	ND	
MPC	103,4 ± 18,9	70,0 ± 0,0	1,48	55,0 ± 7,0	1,88	
MPA	-	563	-	> 200	ND	
MPB	-	>1000	-	> 200	ND	
MPM	-	>1000	-	> 200	ND	
MPEB	-	153,3 ± 0,0	-	> 200	ND	
9	-	>100	-	> 200	ND	

- não avaliado.

Tabela 3. Valores de CC₅₀ (µg/mL), IC₅₀ (µg/mL) e IS para o extrato bruto e frações de *M. picta* frente *Leishmania amazonensis*

DROGA	Citotoxicidade em J.774.A1		Promastigotas		Amastigotas	
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	
Anfotericina B	-	0,0582	-	0,2301	-	
MPH	77,50 ± 3,54	187,32 ± 5,72	0,41	-	-	
MPC	73,47 ± 1,68	67,15 ± 1,63	1,09	-	-	
MPA	336,76 ± 4,79	258,31 ± 3,97	1,30	-	-	
MPB	143,34 ± 4,72	158,50 ± 4,92	0,90	-	-	
MPM	313,34 ± 4,72	126,66 ± 6,67	2,47	196,34 ± 4,72	1,60	
MPEB	92,75 ± 6,72	186,67 ± 0,01	1,30	-	-	
9	300,74 ± 3,91	> 100	ND	-	-	

- não avaliado.

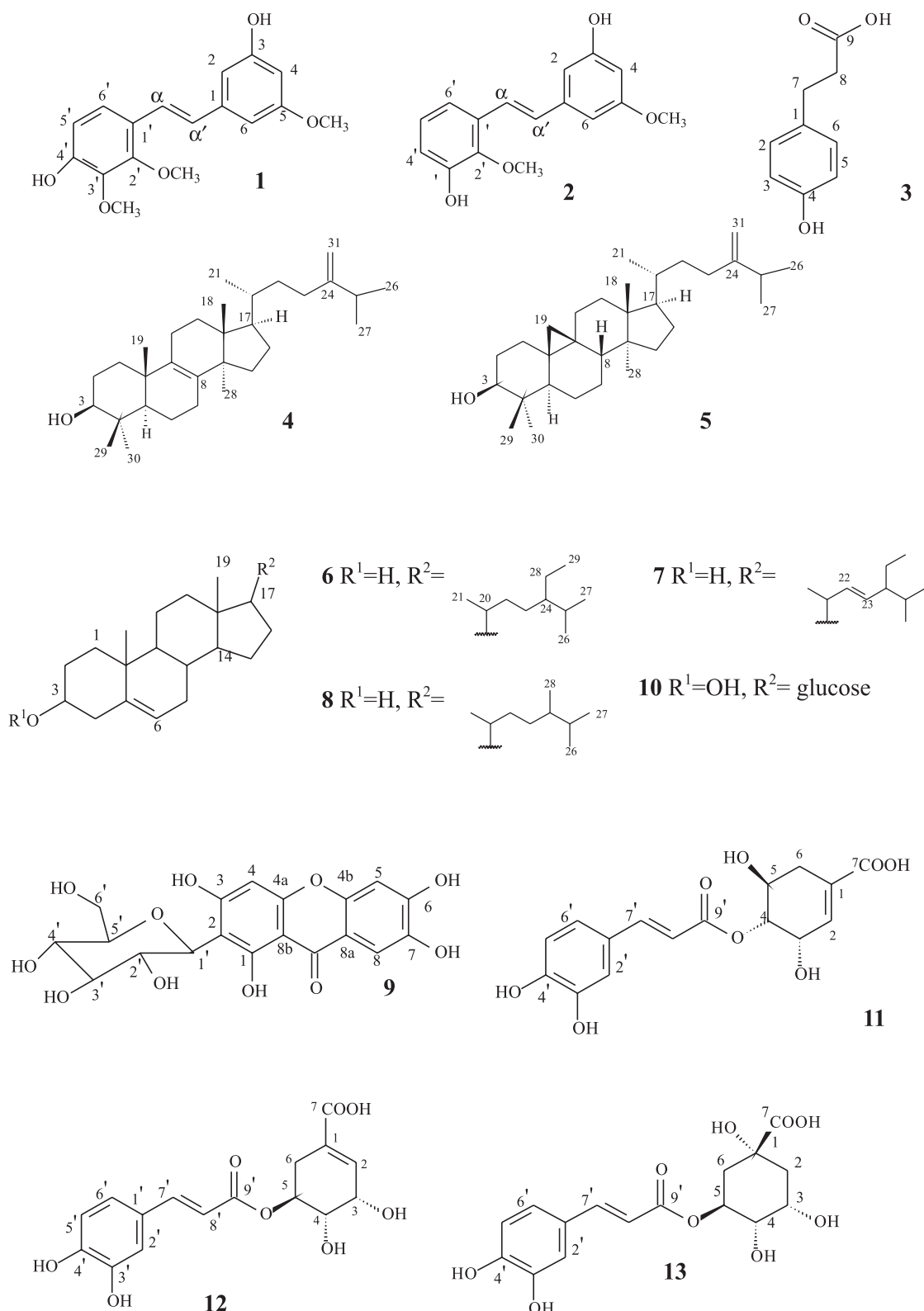


Figura 1. Estruturas dos metabólitos secundários isolados de *M. picta*

apresentou sinais característicos de uma configuração *trans*, em δ_H 7,04 (H- α') e δ_H 7,33 (H- α), além de sinais indicando a existência de um segundo anel aromático 1, 3 e 5 substituído. Também foram observados duplos dupletos em δ_H 7,12 ($J = 1,2$ e 8,1 Hz) e em δ_H 6,77 ($J = 1,2$ e 8,1 Hz), além de um triplo em δ_H 6,93 ($J = 8,1$ Hz), referente aos H-4', H-6' e H-5', respectivamente, indicando a presença de um anel aromático 1, 2 e 3 substituído. Os sinais em δ_H 3,80 e

δ_H 3,78 foram atribuídos aos hidrogênios oximetílicos. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou, entre outros, sinais em δ_C 61,4 e δ_C 55,7 correspondendo aos carbonos oximetílicos. A posição dos grupos oximetílicos foi confirmada no mapa de contornos HMBC, onde observou-se a correlação dos hidrogênios oximetilênicos localizados em δ_H 3,78 com o carbono C-5 em δ_C 162,6 e entre os hidrogênios em δ_H 3,80 com o C-2', em δ_C 147,0. Os dados espectroscópicos de

2 foram comparados com os dados existentes na literatura para o *trans*-3,3'-dihidróxi-2',5'-dimetóxiestilbeno ou foiumbeno C, sendo concordantes.⁵

No estudo realizado por Wang *et al.*,²⁸ testou-se a atividade inibitória dos estilbenos isolados a partir da orquídea *Pholidota yunnanensis*, frente a células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e células de hepatoma humano (FHCC-98). Nesse estudo, o Foiumbeno C apresentou uma pequena atividade inibitória sobre a linhagem HepG2, mas não inibiu o crescimento da linhagem FHCC-98, enquanto que o Foiumbeno B mostrou-se capaz de inibir fortemente essas duas linhagens. A presença destas substâncias na subfração CHCl_3 -AcOEt obtida a partir de *M. picta* permite compreender, portanto, sua grande atividade citostática frente a diversas linhagens de células tumorais humanas testadas no presente trabalho.

A substância **3** foi isolada como um sólido avermelhado solúvel em AcOEt e seu espectro de massas de baixa resolução apresentou o pico do íon molecular em m/z 166. O espectro de RMN ^1H mostrou dupletos em δ_{H} 7,05 ($J = 7,8$ Hz, H-2 e H-6) e δ_{H} 6,73 ($J = 8,4$ Hz, H-3 e H-5), sugerindo a presença de um anel aromático *p*-substituído. Também foram observados tripletos em δ_{H} 2,85 ($J = 7,8$ Hz) e δ_{H} 2,56 ($J = 7,8$ Hz), correspondendo aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal de carbono carbonílico C-9 em δ_{C} 177,8. Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C foram comparados com os da literatura e se mostraram concordantes para o ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico ou ácido florético.¹⁵

A mistura das substâncias **4** (majoritária) e **5** foi isolada na forma de um sólido amarelado amorfo solúvel em CHCl_3 . O cromatograma obtido na análise por CG-EM para a amostra mostrou a presença de duas substâncias, com tempos de retenção de 24,86 min e 25,94 min, e o espectro de massas apresentou o pico do íon molecular em m/z 440 nesses dois tempos de retenção. O espectro de RMN ^1H para essas substâncias mostrou um singlete em δ_{H} 4,71 e um duplete em δ_{H} 4,66 com constante de acoplamento de 1,2 Hz característico de acoplamento *geminal* (H-31). Também foram observados dupletos em δ_{H} 0,92 ($J = 6,3$ Hz), δ_{H} 1,03 ($J = 6,6$ Hz) e 1,02 ($J = 7,2$ Hz) referentes aos grupos metílicos C-21, C-26 e C-27. Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT foram observados sinais na região de carbonos olefínicos em δ_{C} 157,1 (C-24) e δ_{C} 106,1 (C-28), para as duas substâncias, além de um sinal adicional em δ_{C} 134,6 (C-8 e C-9) para **4**. Em δ_{C} 79,2 e δ_{C} 79,0 foram observados os sinais correspondentes ao carbono carbinólico (C-3) das substâncias **4** e **5**, respectivamente. Os dados espectroscópicos para as substâncias **4** e **5** foram condizentes com os da literatura para o triterpeno eburicol (24-metileno-24,25-dihidrolanosterol) e para o triterpeno cicloartânico 24-metilenocicloartenol.^{20,21}

A mistura de substâncias **6**, **7** e **8** foi isolada sob a forma de um sólido branco solúvel em clorofórmio e caracterizada como sendo os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol por conta dos dados de RMN serem concordantes com os da literatura.²²

Através da comparação dos dados de RMN da substância **9** com os constantes na literatura para a xantona mangiferina,²³ concluiu-se que trata-se deste composto, na forma de um sólido amorfo amarelado solúvel em DMSO.

Estudos recentes mostraram que a mangiferina apresenta grande atividade antihiperlipidêmica, anti-diabética e antiaterogênica em ratos com diabetes *mellitus*,^{29,30} além de ser eficaz na prevenção de câncer intestinal neste tipo de animal.³¹ A molécula também mostrou bons resultados nos ensaios relacionados à atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1 e antioxidante,^{32,33} além de outras ações farmacológicas como antihelmíntica,³⁴ radioprotetora e imunomodulatória.^{35,36} Tais relatos mostram que a mangiferina é uma substância promissora para o desenvolvimento de novas terapias no combate a diversas doenças.

O composto **10** foi obtido com um sólido branco e identificado como sendo o esteroide glicosilado daucosterol de acordo com a comparação dos dados espectroscópicos de RMN com a literatura.²⁴

Os compostos **11** e **12** foram obtidos como um sólido marrom e solúvel em MeOH. Foram observados, através do espectro de RMN de ^1H , sinais característicos de uma unidade cafeoila devido aos sinais correspondentes a aromático 1,3,4-trissubstituído, além de dupletos cuja constante de acoplamento indica uma configuração *trans* para esses hidrogênios. Também foram observados sinais na região de δ_{H} 2,30 a δ_{H} 2,90 típicos de hidrogênios metínicos do grupo chiquímico. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais referentes aos carbonos metínicos C-2', C-5' e C-6' e sinais característicos de carbonila de éster α,β -insaturado de grupo cafeoila. Também foram observados sinais de carbonos metilênicos em δ_{C} 30,4 e δ_{C} 32,2 referentes ao C-6, sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 135,6 e δ_{C} 138,2, correspondentes ao C-2, além de sinais de carbonos carbonílicos (C-7) em δ_{C} 168,8 e δ_{C} 169,8 para as substâncias **11** e **12**, respectivamente. A conectividade do grupo cafeoila com o grupo chiquímico para as substâncias foi confirmada através dos deslocamentos químicos dos hidrogênios em relação aos dados da literatura e foram concordantes para o 4-*O*-ácido cafeoilchiquímico e 5-*O*-ácido cafeoilchiquímico.^{21,22}

O composto **13** foi isolado como um sólido marrom solúvel em MeOH. Os dados de RMN da substância foram concordantes aos da literatura para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico.²³

A mistura de triterpenos **4** e **5** foi submetida ao ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* apresentando uma moderada atividade sobre as linhagens NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas, $\text{GI}_{50} = 48,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 786-0 (rim, $\text{GI}_{50} = 60,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que o ácido florético (**3**) apresentou uma ação citostática significativa em todas as linhagens testadas, com GI_{50} entre 26,1 e 31,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A mistura dos estilbenos **1** e **2** proveniente da fração MPCC na proporção 6:1, apresentou boa seletividade sobre a linhagem NCI-ADR/RES ($\text{GI}_{50} = 3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto que as demais linhagens obtiveram um GI_{50} entre 20,9 e 40,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, a mesma mistura isolada na fração MPCa em proporção 3:2, apresentou promissora atividade antiproliferativa, inibindo fortemente o crescimento de todas as linhagens testadas, com valores de GI_{50} entre 2,7 e 19,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (média $\text{GI}_{50} = 7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). Através desses resultados, pode-se concluir que foiumbeno B (**2**) é, ao menos em parte, responsável pela atividade observada no extrato bruto clorofórmico-metanólico e na fração clorofórmica. A mangiferina (**9**), avaliada nas onze linhagens celulares tumorais humanas, mostrou-se inativa nas condições empregadas.

CONCLUSÃO

A fração MPC de *M. picta* apresentou atividade citostática contra diversas linhagens de células cancerosas humanas e uma efetiva atividade sobre a viabilidade das diferentes formas dos parasitos *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

O estudo da fração MPC da espécie vegetal *M. picta* resultou no isolamento dos compostos esteroidais campesterol, sitosterol e estigmasterol, dos triterpenos eburicol e 24-metilenocicloartenol, além do ácido florético e da mistura de estilbenos foiumbeno B e foiumbeno C. A mistura contendo uma maior proporção do estilbeno foiumbeno B foi a que apresentou o resultado mais promissor, concluindo-se que a substância é a principal responsável pela atividade observada no extrato bruto, frações e subfrações da espécie vegetal. Adicionalmente foram isolados o 4-*O*-cafeoilchiquímico, 5-*O*-cafeoilchiquímico, 5-*O*-cafeoilquínico, o esteroide glicosilado daucosterol e a xantona mangiferina. Todos esses compostos são inéditos para o gênero *Maxillaria*.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN unidimensionais das substâncias 1 e 2, bem como os dados espectroscópicos das substâncias 1, 2, 3, 4, 11 e 12 encontram-se disponíveis na forma de arquivo PDF, disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 680.
- Wang, H.; Zhao, T.; Che, C. T.; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 796.
- Hwang, J. S.; Lee, S. A.; Hong, S. S.; Han, X. H.; Lee, C.; Kang, S. J.; Lee, D.; Kim, Y.; Hong, J. T.; Lee, M. K.; Hwang.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3785.
- Pomini, A. M.; Santin, S. M. O.; Silva, C. C.; Faria, T. J.; Faria, R. T.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E. C.; Dela Porte, L. F.; *Planta Med.* **2012**, *78*, 1169.
- Guo, X. Y.; Wang, J.; Wang, N. L.; Kitanaka, S.; Liu, H. W.; Yao, X. S.; *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 21.
- Sinha, A. K.; Verma, S. C.; Sharma, U. K.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 15.
- Gutiérrez, R. P. M.; *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 592.
- Estrada, S.; López-Guerrero, J. J.; Villalobos-Molina, R.; Mata, R.; *Fitoterapia* **2004**, *75*, 690.
- Déciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castañeda-Corral, G.; Angeles-López G. E.; Navarrete, A.; Mata, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 334.
- Singer, R. B.; Koehler, S.; *Lankesteriana* **2003**, *7*, 57.
- Singer, R. B.; *Lankesteriana* **2003**, *7*, 111.
- Flach, A.; *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2005**.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.
- Mossmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- Brener, Z.; *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1962**, *4*, 386.
- Ueda-Nakamura, T.; Attias, M.; Souza, W.; *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 89.
- Brita, E. A.; Silva, A. P. B.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Silva, C. C.; Sernaglia, R. L.; Nakamura, C. V.; *PLoS One* **2012**, *7*, 12.
- Volpato, H.; Desoti, V. C.; Cogo, J.; Panice, M. R.; Sarragiotto, M. H.; Silva, S. O.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C. V.; *Evid Based Complement Alternat Med* (2013), doi:10.1155/2013/874367.
- Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 703.
- Shirane, N.; Murabayashi, A.; Masuko, M.; Uomori, A.; Yoshimura, Y.; Seo, S.; Uchida, K.; Takeda, K.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2513.
- Lee, S. Y.; Choi, S. U.; Lee, J. H.; Lee, D. U.; Lee, K. R.; *Arch. Pharmacol Res.* **2010**, *33*, 515.
- Goulart, M. O. F.; Sant'ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Calvacante, S.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
- Kim, C. Y.; Ahn, M. J.; Kim, J.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *29*, 869.
- Lendl, A.; Werner, I.; Glasl, S.; Kletter, C.; Mucaji, P.; Presser, A.; Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Taylor, D.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2381.
- Saito, T.; Yamane, H.; Murofushi, N.; Takahashi, T.; Phinney, B. O.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1997**, *61*, 1397.
- Ivanova A.; Mikhova, B.; Kostova, I.; Evstatieva L.; *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 294.
- Satake, T.; *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 935.
- Wang, G.; Guo, X.; Chen, H.; Lin, T.; Xu, Y.; Chen, Q.; Liu, J.; Zeng, J.; Zhang, X. K.; Yao, X.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2114.
- Maruganandan, S.; Gupta, S.; Kataria, M.; Lal, J.; Gupta, P. K.; *Toxicology* **2002**, *3*, 165.
- Maruganandan, S.; Gupta, S.; Kataria, M.; Lal, J.; Gupta, P. K.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 497.
- Yoshimi, N.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Qiao, Z.; Hara, A.; Yamahara, J.; Mori, H.; *Cancer Lett.* **2001**, *163*, 163.
- Wang, R. R.; Gao, Y. D.; Ma, C. H.; Zhang, X. J.; Huang, C. G.; Huang, J. F.; Zheng, Y. T.; *Molecules* **2011**, *16*, 4264.
- Chen, Y. H.; Chang, F. R.; Lin, Y. J.; Hsieh, P. W.; Wub, M. J.; Wu, Y. C.; *Food Chem.* **2008**, *2*, 684.
- García, D.; Escalante, M.; Delgado, R.; Ubeira, F. M.; Leiro, J.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1203.
- Jagetia, G. C.; Baliga, M. S.; *Phytomedicine* **2005**, *12*, 209.
- Leiro, J.; Arranz, J. A.; Yáñez, M.; Ubeira, F. M.; Sanmartín, M. L.; Orallo, F.; *Int. J. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 763.

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA, TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE *Maxillaria picta*

Thiago L. de Almeida^a, Josiane A. Monteiro^a, Greice K. P. Lopes^a, Lucas U. R. Chiavelli^a, Silvana M. de O. Santin^a, Cleuza C. da Silva^a, Vanessa Kaplum^b, Débora B. Scariot^b, Celso V. Nakamura^b, Ana L. T. G. Ruiz^c, João E. Carvalho^c, Ricardo T. de Faria^d e Armando M. Pomini^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bDepartamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^cCentro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexandre Cazelatto 999, 13081-970 Paulínia – SP, Brasil

^dDepartamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86055-900 Londrina – PR, Brasil

Foiumbeno B (1):

Aspecto físico: óleo avermelhado. CG-EM 70 eV, m/z (rel. int.): 302 [M]⁺ (100), 256 (35), 255 (60), 227 (90).

RMN ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): δ_c (multiplicidade): 55,6 (q, OCH₃), 61, 6 (q, OCH₃), 61,1 (q, OCH₃), 101,4 (d, C-4), 104,7 (d, C-6), 106,4 (d, C-2), 113,2 (d, C-5'), 122,2 (d, C-6'), 124,0 (d, C-α), 124,1 (s, C-1'), 128,3 (d, C-α'), 141,5 (d, C-1), 142,2 (s, C-3'), 152,1 (s, C-4'), 153,0 (s, C-2'), 159,7 (s, C-3), 162,5 (s, C-5).

RMN ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): δ_H (multiplicidade, J em Hz): 3,78 (s), 3,86 (s), 3,87 (s), 6,26 (t; 1,8), 6,56 (m; H-6), 6,57 (m; H-2), 6,63 (d; 8,7; H-5'), 6,90 (d; 16,5; H-α'), 7,24 (d; 16,5; H-α), 7,24 (d; 8,7; H-6).

Foiumbeno C (2):

Aspecto físico: óleo avermelhado. CG-EM 70 eV, m/z (rel. int.): 272 [M]⁺ (100), 241 (78), 240 (96), 212 (40), 197 (55).

RMN ¹³C (75,45 MHz, CD₃OD): δ_c (multiplicidade): 55,7 (q, OCH₃), 61,4 (q, OCH₃), 101,8 (d, C-4), 104,9 (d, C-6), 106,7 (d, C-2), 116,7 (d, C-6'), 118,0 (d, C-4'), 124,1 (d, C-α), 125,5 (d, C-5'), 130,9 (d, C-α'), 132,4 (s, C-1'), 141,1 (s, C-1), 147,0 (s, C-2'), 151,5 (s, C-3'), 159,8 (s, C-3), 162,6 (s, C-5).

RMN ¹H (300,06 MHz, CD₃OD): δ_H (multiplicidade, J em Hz): 3,78 (s), 3,80 (s), 6,30 (t; 2,1; H-4), 6,57 (m; H-6), 6,61 (m; H-2), 6,76 (dd; 8,1; 1,2; H-6'), 6,93 (t; 8,1; H-5'), 7,04 (d; 16,2; H-α'), 7,11 (dd; 8,1; 1,2; H-4'), 7,33 (d; 16,2 Hz; H-α).

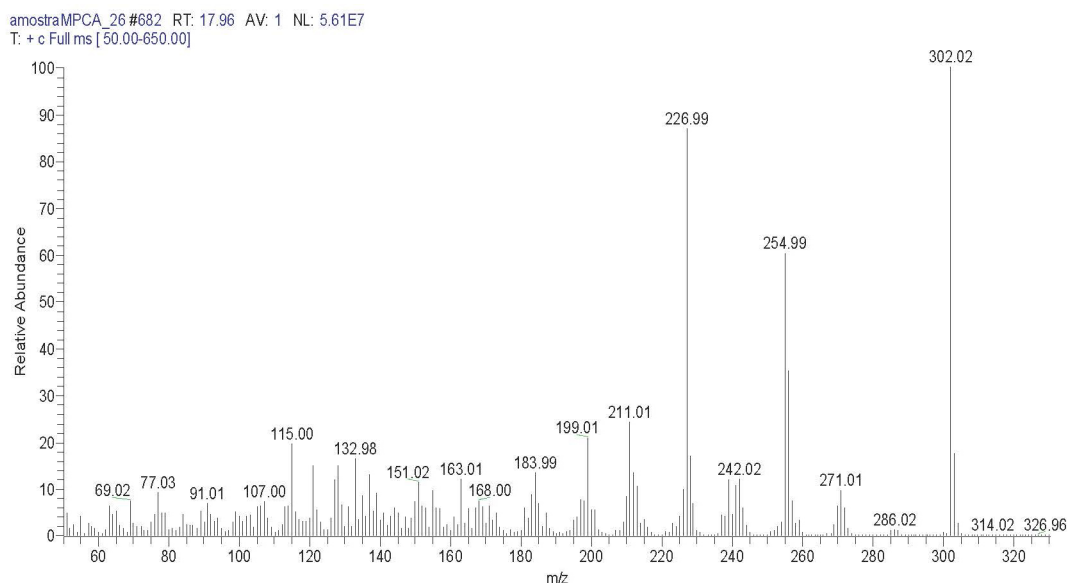


Figura 1S. Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) de 1

amostraMPCA 26 #625 RT: 16.80 AV: 1 NL: 5.97E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]

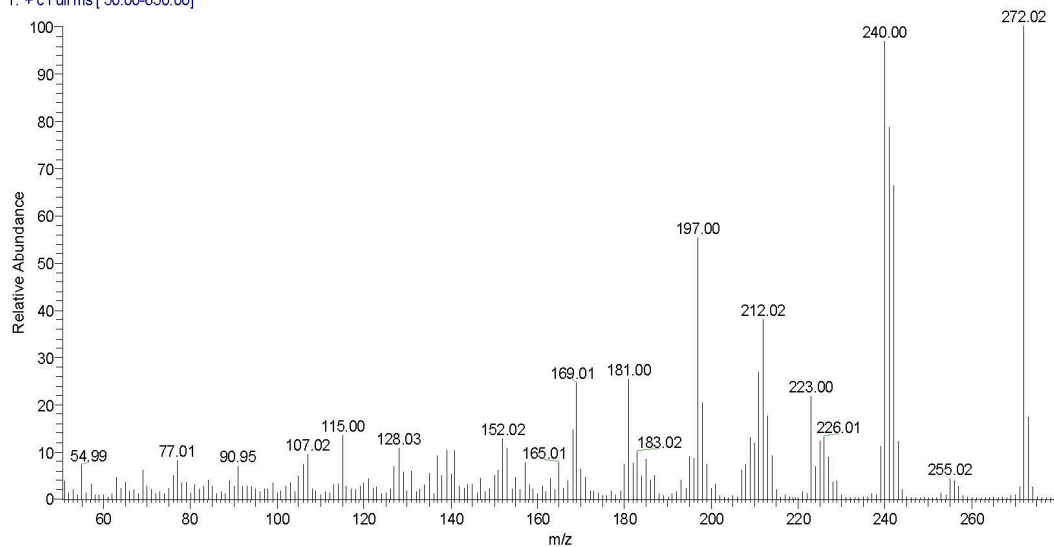


Figura 2S. Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) de 2

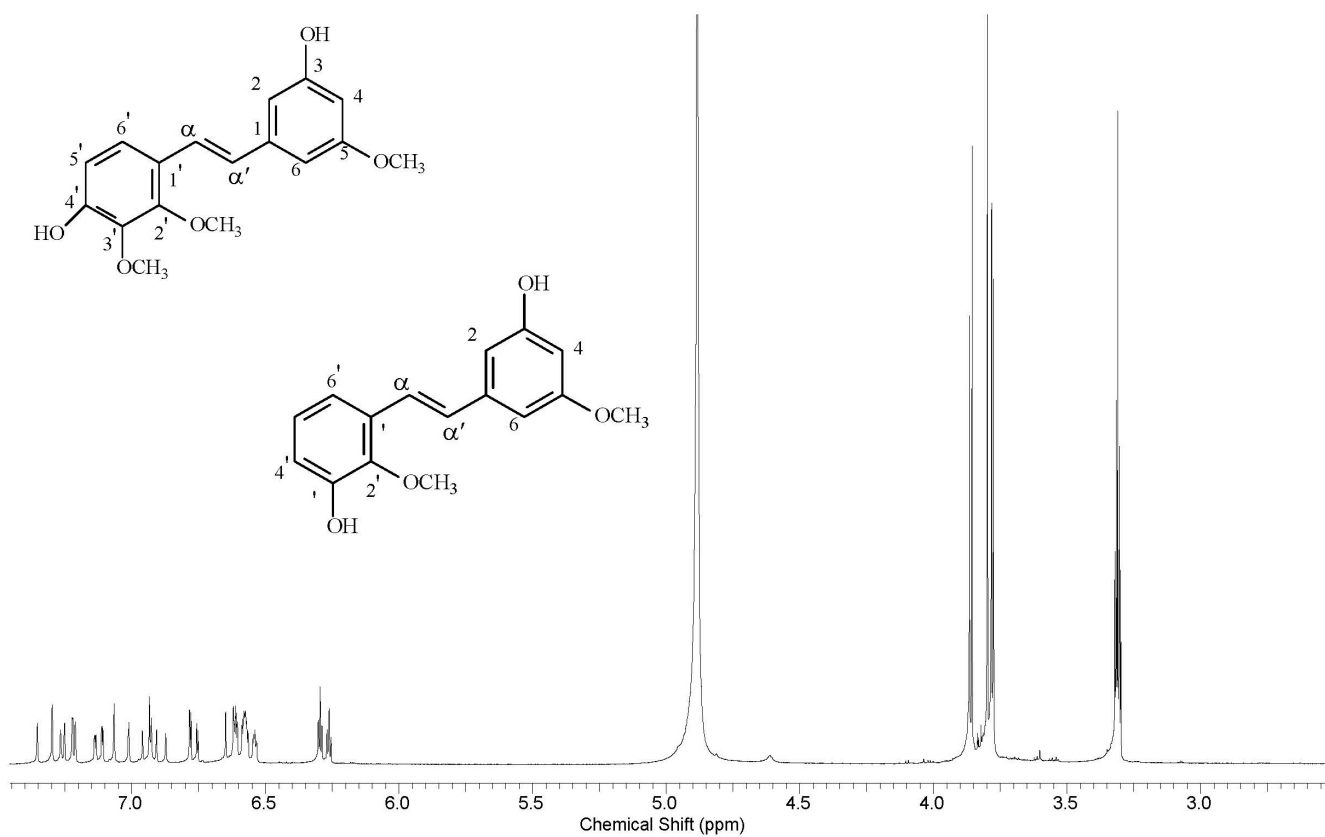


Figura 3S. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) de 1 e 2

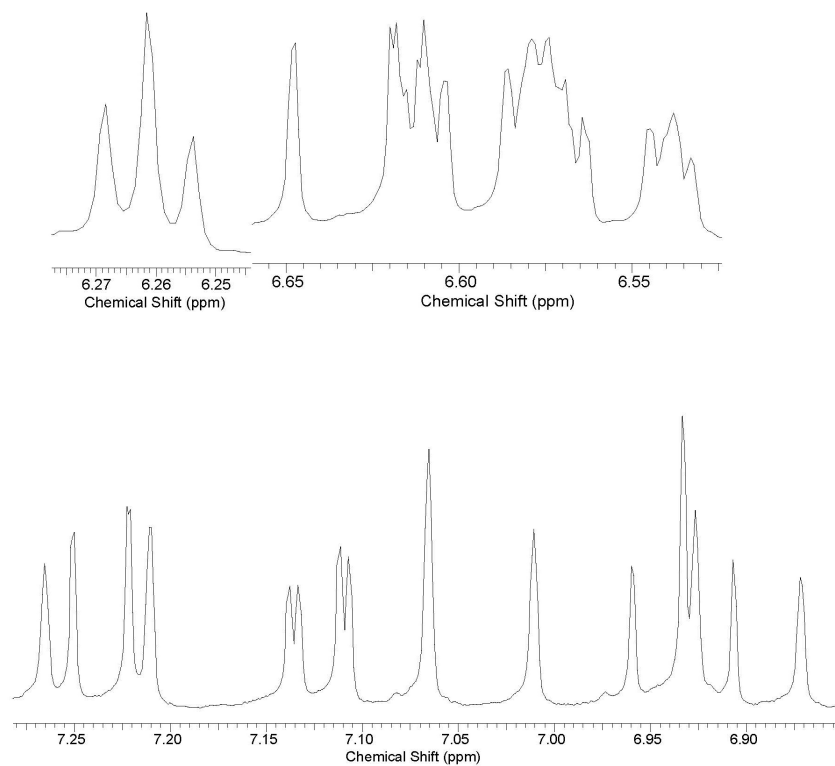


Figura 4S. Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) de **1**

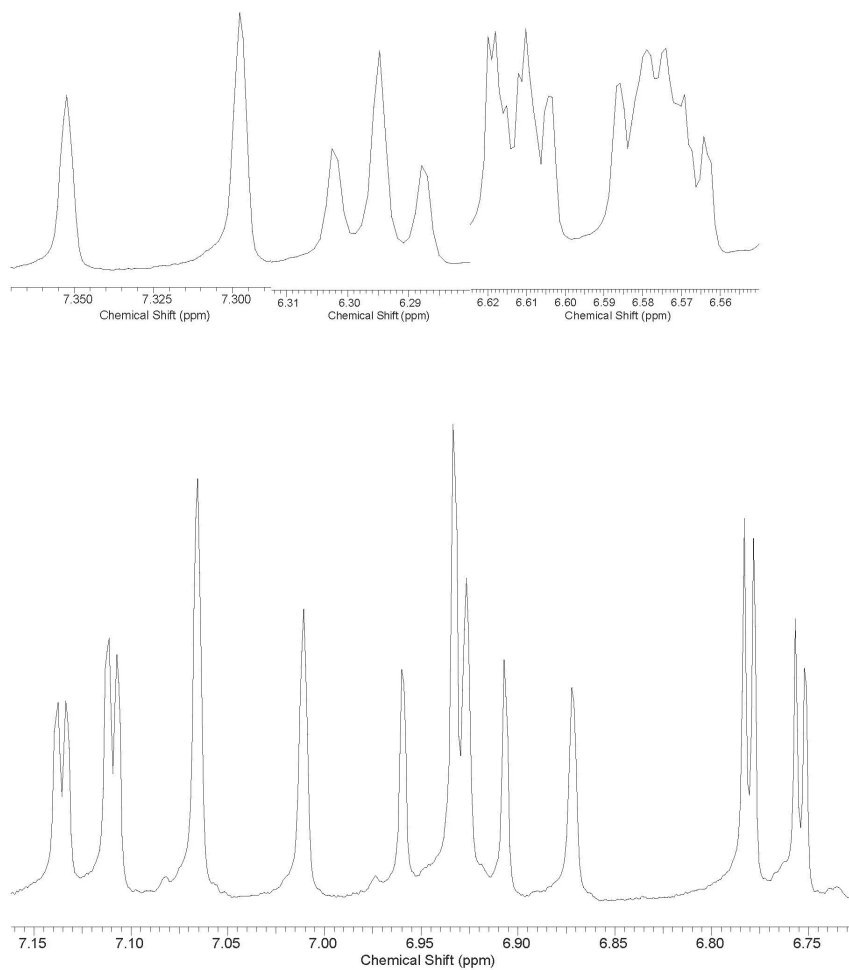


Figura 5S. Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) de **2**

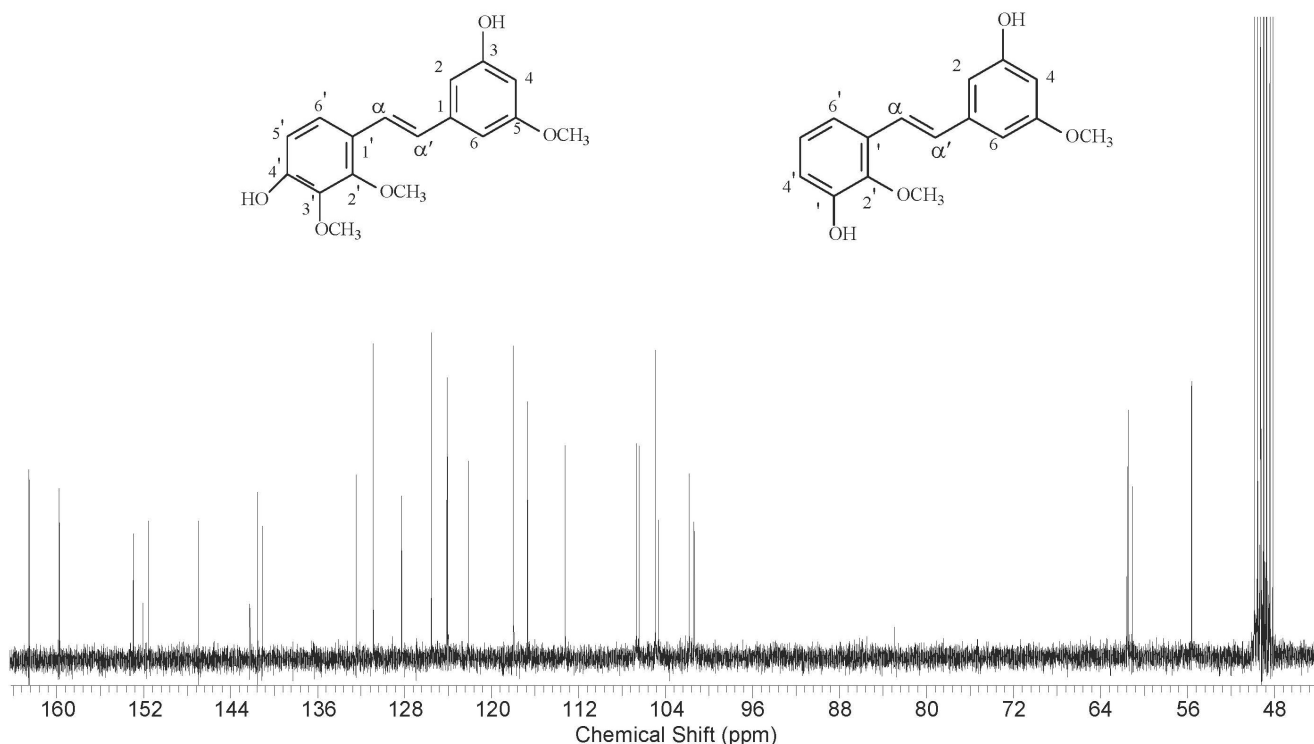


Figura 6S. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD ; 75,45MHz) de 1 + 2

Ácido Florético (3):

Aspecto físico: óleo avermelhado. CG/EM (IE 70 eV) m/z: 166 $[\text{M}]^+$ 164 (100), 147 (85), 107 (30), 97 (60), 83 (70).

RMN ^{13}C (75,45 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ_{C} (multiplicidade): 30,8 (t, C-7), 36,8 (t, C-8), 115,8 (d, C-3), 115,8 (d, C-5), 129,8 (d, C-2), 129,8 (d, C-6), 132,4 (s, C-1), 155,9 (s, C-4), 177,2 (s, C-9).

RMN ^1H (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ_{H} (multiplicidade; J em Hz): 2,56 (t; 7,8; H-8), 2,84 (t; 7,8; H-7), 6,73 (d; 8,4; H-3 e H-5), 7,04 (d; 7,8; H-2 e H-6).

Eburicol (4):

Aspecto físico: Sólido branco. CG-EM 70 eV, m/z (rel. int.): 440 $[\text{M}]^+$ (19), 425 (50), 109 (54), 83 (75), 69 (90), 55 (100).

RMN ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3): δ_{C} (multiplicidade): 15,6 (q, C-30), 16,0 (q, C-18), 18,7 (t, C-6), 18,9 (t, C-21), 19,4 (q, C-19), 21,1 (t, C-11), 22,1 (t, C-27), 22,2 (q, C-26), 24,5 (q, C-28), 26,7 (t, C-7), 28,0 (t, C-2), 28,2 (q, C-29), 28,4 (t, C-16), 31,0 (t, C-15), 31,2 (t, C-12), 31,5 (t, C-23), 34,0 (d, C-25), 35,2 (t, C-22), 35,8 (t, C-1), 36,7 (d, C-20), 37,2 (s, C-10), 39,1 (s, C-4), 44,7 (s, C-13), 50,0 (s, C-14), 50,6 (d, C-17), 50,6 (d, C-5), 79,2 (d, C-3), 106,1 (t, C-31), 134,6 (s, C-8), 134,6 (s, C-9), 157,1 (s, C-24).

RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3): δ_{H} (multiplicidade; J em Hz): 4,66 (d; 1,2; H-31), 4,71 (s, H-31), 3,24 (dd; 4,8; 11,4; H-3), 2,23 (m; H-25), 1,03 (d; 6,6; H-26), 1,02 (d; 7,2; H-27), 1,00 (s; H-29), 0,98 (s; H-19), 0,92 (d; 6,3; H-21), 0,88 (s; H-28), 0,81 (s; H-30), 0,69 (s, H-18).

Ácido 5-O-cafeiolchiquímico (11):

Aspecto físico: Sólido marrom.

RMN ^{13}C (75,45 MHz, CD_3OD): δ_{C} (multiplicidade): 30,6 (t, C-6), 67,7 (d, C-3), 70,8 (d, C-4), 71,8 (d, C-5), 115,1 (d, C-2'), 115,2 (d, C-8'), 116,5 (d, C-5'), 123,0 (d, C-6'), 127,7 (s, C-1'), 133,6 (s,

C-1), 135,6 (d, C-2), 146,8 (s, C-3'), 147,1 (d, C-7'), 149,6 (s, C-4'), 168,7 (s, C-9'), 168,7 (s, C-7).

RMN ^1H (300,06 MHz, CD_3OD): δ_{H} (multiplicidade; J em Hz): 2,30 (dd; 18,6; 6,0; H-6), 2,90 (dd; 18,6; 6,0; H-6), 3,86 (dd; 8,1; 4,2; H-4), 4,36 (t; 3,6; H-3), 5,23 (m, H-5), 6,27 (d; 15,9; H-8'), 6,71 (m; H-2), 6,77 (d; 8,1; H-5'), 6,94 (dd; 8,1; 2,1; H-6'), 7,04 (d; 2,1; H-2'), 7,55 (d; 15,9; H-7').

Ácido 4-O-cafeiolchiquímico (12):

Aspecto físico: Sólido marrom.

RMN ^{13}C dados espectroscópicos (75,45 MHz, CD_3OD): δ_{C} (multiplicidade): 32,2 (t, C-6), 65,6 (d, C-3), 65,8 (d, C-5), 75,0 (d, C-4), 115,1 (d, C-2'), 115,2 (d, C-8'), 116,5 (d, C-5'), 123,0 (d, C-6'), 127,7 (s, C-1'), 130,5 (s, C-1), 138,0 (d, C-2), 146,8 (s, C-3'), 147,2 (d, C-7'), 149,6 (s, C-4'), 168,9 (s, C-9'), 169,8 (s, C-7).

RMN ^1H (300,06 MHz, CD_3OD): δ_{H} (multiplicidade; J em Hz): 2,30 (m, H-6), 2,75 (m, H-6), 4,20 (dt; 7,2; 5,7 Hz; H-5), 4,61 (t; 3,6; H-3), 5,01 (dd; 7,8; 4,2; H-4), 6,33 (d; 16,2; H-8'), 6,77 (d; 8,1 Hz, H-5'), 6,82 (m, H-2), 6,96 (dd; 8,4; 2,1; H-6'), 7,04 (d; 2,1; H-2'), 7,59 (d; 16,2 Hz, H-7').

Ácido 5-O-cafeiolchiquímico (13):

Aspecto físico: Sólido marrom.

RMN ^{13}C dados espectroscópicos (75,45 MHz, CD_3OD): 39,8 (C-2); 72,3 (C-3); 74,6 (C-4); 72,1 (C-5); 38,2 (C-6); 127,6 (C-1'); 115,0 (C-2'); 146,9 (C-3'); 149,4 (C-4'); 116,3 (C-5'); 122,9 (C-6'); 147,2 (C-7'); 115,2 (C-8'); 168,7 (C-9').

RMN de ^1H (75 MHz, CD_3OD): 1,94-2,25 (m, H-2); 4,16 (dl, 3,0 Hz, H-3); 3,70 (dd, 9,3; 3,0, H-4); 5,36 (ddd, 9,4; 9,4; 4,2, H-5); 1,94-2,25 (m, H-6); 7,03 (d, 2,1, H-2'); 6,76 (d, 8,1, H-5'); 6,93 (dd, 1,8, 8,1, H-6'); 7,55 (d, 16,2, H-7') e 6,27 (d, 16,2, H-8').