

FITOQUÍMICA E QUIMIOSSISTEMÁTICA DE *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)[#]

Marsele Machado Isidoro, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva*, João Batista Fernandes e Paulo Cezar Vieira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Alberto C. Arruda e Sebastião da Cruz Silva

Departamento de Química, Universidade Federal do Pará, 66075-900 Belém - PA, Brasil

Recebido em 27/4/12; aceito em 28/8/12; publicado na web em 28/9/12

PHYTOCHEMICAL AND CHEMOSYSTEMATIC STUDIES OF *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). Phytochemical studies of the leaves and stem have led to the identification of the known coumarins isooxypeucedanin, oxypeucedanin hydrate, xanthotoxin, isopimpinellin, 8-methoxymarmesin and marmesin, flavonoids quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside, myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside and hesperidin, alkaloids skimmianine and N-methylflindersine and limonoid limonin. The compounds isolated and the chemical profile of *Euxylophora* obtained from the literature clearly indicate its phytochemical affinities with other Rutoideae species.

Keywords: *Euxylophora paraensis*; Rutaceae; chemosystematics.

INTRODUÇÃO

A família Rutaceae constitui o maior grupo de plantas da ordem Sapindales, possuindo cerca de 160 gêneros, com 1900 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundante na América tropical, sul da África e Austrália.^{1,2} No Brasil existem cerca de 200 espécies já descritas.² As plantas desta família são muito conhecidas pela presença de uma ampla diversidade de metabólitos secundários, destacando-se os alcaloides, especialmente aqueles derivados do ácido antranílico, as cumarinas, as lignanas, os flavonoides e os limonoides.^{1,3,4} Existem relatos de largo espectro de atividades biológicas associadas a estas classes de metabólitos.^{1,3}

O gênero *Euxylophora* é monotípico, apresentando somente a espécie *Euxylophora paraensis* de ocorrência no norte do Brasil.⁵ Ela é conhecida popularmente como pau-amarelo devido à cor de sua madeira, a qual é de excelente qualidade, encontrando aplicação na confecção de diversos móveis. Suas árvores de grande porte constam na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção desde 1993.⁶ Segundo a literatura, foram isolados de *E. paraensis* somente alcaloides do tipo 2(1*H*)-quinolinona, 4(1*H*)-quinolinona,^{7,9} indolopiridoquinazolínico e bis-2(1*H*)-quinolinona.⁸⁻¹⁶ Estas substâncias resultaram do estudo químico da casca do caule e do cerne, não havendo, até o momento, citação sobre fitoquímica das folhas de *E. paraensis*. As cumarinas são de ocorrência ampla nos gêneros de Rutaceae, ou seja, são marcadores químicos da família. A ausência de citações destes compostos para este gênero despertou o interesse no estudo de outros órgãos na tentativa de se buscar as cumarinas. A análise preliminar via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) de extratos das folhas de *E. paraensis* indicou a presença das cumarinas, o que levou ao presente estudo. Assim, este trabalho relata o primeiro estudo químico das folhas de *E. paraensis* que levou ao isolamento das cumarinas iso-oxipeucedanina, oxipeucedanina hidratada, xantotoxina, isopimpinellina, dos flavonoides quercetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo, miricetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo e hesperidina e do alcaloide esquimianina. O caule foi reestudado, mas foram analisadas somente as frações que em análise de RMN ¹H mostraram a presença de substâncias não isoladas anteriormente. Duas

cumarinas 8-metóxi-marmesina e marmesina, o limonoide limonina e o alcaloide N-metilflindersina foram isolados do caule. Exceto N-metilflindersina, as demais substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX 400 MHz, utilizando-se CDCl₃, CD₃OD e DMSO como solventes e TMS como padrão interno. As separações cromatográficas foram realizadas em colunas utilizando-se gel de sílica 60, 70-230, 230-400 mesh e Sephadex LH-20. As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em coluna semipreparativa C-18 Phenomenex[®] Luna (h x d_c = 250 x 4,6 mm; 10 μ m), utilizando equipamento Shimadzu LC-8A com válvula de reciclo, injetor Rheodyne 7123 com loop de 500 μ L e detector UV/VIS Shimadzu SPD-6AV. Os fracionamentos por cromatografia líquida de média pressão (CLMP) foram realizados em equipamento Amersham bioscience P-900 equipado com bomba binária, loop de 500 μ L, coletor automático de 7 mL por fração com fluxo de 10 mL min⁻¹ e detector UV/VIS. As análises cromatográficas em camada fina foram realizadas em cromatoplasmas de sílica gel F-254 sobre placa de alumínio Merck, de 0,2 mm de espessura, empregando-se como revelador a solução ácida de vanilina (5 g de vanilina em 9 mL de metanol, 0,5 mL de H₂SO₄ e 3 gotas de ácido acético).

Material vegetal

As folhas de *E. paraensis* foram coletadas e identificadas pelo Prof. Dr. A. C. Arruda, do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará, no dia 05/04/2005 na Fazenda Paulo Maria no Município de Marituba (PA). A exsiccata do espécime coletado encontra-se depositada no herbário da EMBRAPA Amazônia Oriental, sob o número 181030.

Preparação dos extratos

As folhas (1,3 kg) e caule (1,0 kg) de *E. paraensis* foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 40 °C, por

*e-mail: dmfs@ufscar.br

[#]Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

aproximadamente 48 h e pulverizadas em moinho; a extração foi feita com etanol em temperatura ambiente e em repouso, durante 5 dias. Após este período, o solvente foi evaporado em evaporadores rotativos, obtendo-se o extrato bruto.

Isolamento das substâncias de *E. paraensis*

O extrato etanólico das folhas foi fracionado através de uma partição líquido-líquido gerando 4 extratos: hexânico, diclorometânico, acetato de etila e metanol. Para o estudo do extrato hexânico foi utilizada cromatografia em coluna (h x d_c = 45,0 x 4,0 cm) de gel de sílica (230-400 mesh) e eluída em gradiente com hexano, hexano/AcOEt 9:1, hexano/AcOEt 1:1, AcOEt e MeOH em eluição gradiente, fornecendo 42 subfrações. As subfrações de 1-10 continham em mistura os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol, os quais foram identificados por CG-EM. Das subfrações agrupadas 11-24 (128 mg) foi isolada a substância **3** (11,1 mg) através de refração em Sephadex LH-20 com eluição em CH_2Cl_2 :MeOH (1:1). As demais frações foram analisadas por RMN ^1H (200 MHz) e indicaram a presença de hidrocarbonetos e ácidos graxos, os quais não eram de interesse quimiossistemático, com isto não foram estudadas.

O extrato diclorometânico das folhas foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) e uma pequena camada de florisil (h x d_c = 60,0 x 5,0 cm), utilizando-se como eluente hexano/diclorometano/acetona/metanol, levando a 13 frações obtidas após reunião daquelas que mostraram R_f similares em cromatoplas de sílica gel (CCD). A análise destas por RMN ^1H (200 MHz) mostrou que somente em 3 delas havia substâncias de interesse quimiossistemático, sendo estas definidas como frações 1-3. A fração 1 foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (CLMP) utilizando coluna preparativa Gemini C-18 (h x d_c = 250 x 21 mm; 10 μm). Após eluição gradiente com $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (5-100% B), 56 subfrações de 7 mL foram coletadas e reunidas após análise por CCD. Esse procedimento resultou no isolamento das substâncias **1** (21 mg) e **2** (11,2 mg), coletadas nos frascos 18 e 21, respectivamente.

O refração da fração 2 foi feito em coluna Sephadex LH-20 eluída com MeOH/ CH_2Cl_2 7:3, levando a outras subfrações. As subfrações 11 e 12 continham o composto **8** puro, e as subfrações 16-19 foram reunidas em uma única fração que foi reanalisada posteriormente via CLAE semipreparativa. Foi utilizada uma coluna C-18 Phenomenex[®] Luna (h x d_c = 250 x 4,6 mm; 10 μm) e eluição com MeOH/ CH_2Cl_2 (7:3), fornecendo a substância **4** (5,9 mg).

O extrato hidroalcoólico foi submetido à cromatografia em coluna de vidro (h x d_c = 50,0 x 4,5 cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20 e eluição isocrática (MeOH 100%). Com a reunião das frações semelhantes foram obtidas 16, sendo que a fração 7 continha o composto **7** (43,4 mg) puro. O refração de uma segunda fração através de CLMP, utilizando coluna preparativa Gemini C-18 (h x d_c = 250 x 21 mm; 10 μm) e eluição gradiente com $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (5-100% B) levou a 51 subfrações de 7 mL, onde as subfrações 16 e 17 corresponderam aos compostos **5** (10,3 mg) e **6** (12,6 mg), respectivamente. As demais frações foram analisadas por RMN ^1H (200 MHz), o que indicou a presença de carboidratos, os quais não eram de interesse quimiossistemático e, por isto, não foram estudadas.

O extrato etanólico (2,7 g) do caule foi submetido à cromatografia em coluna de vidro (h x d_c = 50,0 x 4,5 cm), tendo como fase estacionária Sephadex LH-20 e eluição isocrática (MeOH 100%). Com a reunião das frações semelhantes, foram obtidas 18 frações. A análise destas por RMN ^1H (200 MHz) mostrou que somente em 3 delas havia substâncias de interesse quimiossistemático, sendo estas definidas como frações 1-3. A fração 1 foi submetida à cromatografia em coluna de vidro (h x d_c = 25,0 x 3,5 cm), tendo como fase estacionária gel de sílica (230-400 mesh) e usando hexano/diclorometano/

acetona/metanol em eluição gradiente, chegou-se a 6 subfrações obtidas após reunião daquelas que mostraram R_f similares em CCD. O refração da subfração 5 em cromatografia em camada delgada preparativa em placa de vidro (sílica gel, h = 25,0 x 25,0 cm), eluída com acetona/hexano 4:6 forneceu os compostos **9** (1,6 mg) e **10** (2,2 mg). A fração 2 também foi submetida à cromatografia sob as mesmas condições da fração 1, obtendo-se uma subfração a qual foi recromatografada, utilizando-se Sephadex LH-20 em coluna de vidro (h x d_c = 25,0 x 3,5 cm), fornecendo 6 subfrações obtidas após reunião daquelas que mostraram R_f similares em CCD. Somente a subfração 5 foi reestudada por CLAE semipreparativa, utilizando uma coluna C-18 Phenomenex[®] Luna (h x d_c = 250 x 4,6 mm; 10 μm) e eluição com MeOH/ CH_2Cl_2 (7:3), fornecendo a substância **11** (50,1 mg). A fração 3 foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (CLMP), utilizando coluna preparativa Gemini C-18 (h x d_c = 250 x 21 mm; 10 μm), gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (5-100% B), detector UV (365, 254 e 217 nm), *loop* de 2,5 mL e vazão 10,0 mL/min. Após a eluição foram obtidas 34 subfrações de 14 mL e a subfração 14 continha 20,6 mg da substância **12**. As demais frações não foram estudadas, pois não continham substâncias de interesse quimiossistemático.

Xantotoxina (**1**)

Sólido branco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 7,75 (*d*, 9,5, H-4), 7,68 (*d*, 2,5, H-2'), 7,34 (*s*, H-5), 6,80 (*d*, 2,5, H-3'), 6,35 (*d*, 9,5, H-3), 4,28 (*s*, 8-OCH₃). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 160,3 (C-2), 147,8 (C-7), 146,6 (C-2'), 144,2 (C-4), 146,6 (C-2'), 143,1 (C-8a), 132,9 (C-8), 126,1 (C-6), 116,5 (C-4a), 114,8 (C-3), 112,9 (C-5), 61,3 (8-OCH₃).

Isopimpenilina (**2**)

Sólido branco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 8,11 (*d*, 9,3, H-4), 7,61 (*d*, 2,5, H-2'), 6,99 (*d*, 2,5, H-5), 6,28 (*d*, 9,3, H-3'), 4,16 (*s*, 5-OCH₃), 4,16 (*s*, 8-OCH₃). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 160,5 (C-2), 150,0 (C-7), 145,2 (C-2'), 144,3 (C-5), 145,2 (C-2'), 143,7 (C-8a), 139,4 (C-4), 128,3 (C-8), 114,8 (C-6), 107,7 (C-4a), 112,9 (C-3), 105,1 (C-3'), 60,8 (8-OCH₃), 61,7 (5-OCH₃).

Iso-oxipeucedanina (**3**)

Sólido branco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 8,33 (*dd*, 9,6 e 0,6, H-4), 7,61 (*d*, 2,4, H-2'), 7,21 (*dd*, 0,8 e 0,6, H-8), 6,84 (*dd*, 2,4 e 0,8, H-3'), 6,35 (*d*, 9,6, H-3), 5,08 (*s*, H-1''), 2,87 (*m*, H-3''), 1,19 (*d*, 6,8, H-4''), 1,19 (*d*, 6,8, H-5''). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 161,0 (C-2), 158,0 (C-7), 145,5 (C-2'), 147,0 (C-5), 145,5 (C-2'), 152,0 (C-8a), 139,1 (C-4), 95,1 (C-8), 114,0 (C-6), 108,0 (C-4a), 113,3 (C-3), 104,1 (C-3'), 75,0 (C-1''), 209,0 (C-2''), 37,4 (C-3''), 17,9 (C-4''), 29,5 (C-5'').

Oxipeucedanina hidratada (**4**)

Sólido branco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 8,18 (*dd*, 9,6 e 0,8, H-4), 7,61 (*d*, 2,5, H-2'), 7,19 (*dd*, 0,8 e 0,6, H-8), 6,99 (*dd*, 2,5 e 0,6, H-3'), 6,31 (*d*, 9,5, H-3), 4,45 (*dd*, 10,0 e 3,0 2''), 4,45 (*dd*, 10,0 e 3,0 2''b), 3,91 (*m*, H-3''), 2,81 (*sl*, OH-3''), 1,31 (*s*, H-5''), (*s*, H-6''). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 160,8 (C-2), 157,7 (C-7), 145,5 (C-2'), 148,9 (C-5), 145,5 (C-2'), 153,7 (C-8a), 139,1 (C-4), 95,1 (C-8), 113,5 (C-6), 107,8 (C-4a), 113,3 (C-3), 104,1 (C-3'), 74,8 (C-2''), 72,1 (C-3''), 76,9 (C-4''), 24,6 (C-5''), 26,2 (C-6'').

Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**5**)

Sólido amarelo. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 7,34 (*d*; H-2'), 7,31 (*dd*, 8,0 e 2,0, H-6'), 6,91 (*d*, 8,0, H-5'), 6,37 (*d*, 2,0, H-8), 6,20 (*d*, H-6), 5,34 (*d*, 1,8, H-1''), 4,22 (*dd*, 3,2 e

1,8, H-2''), 3,74 (*dd*, 9,4 e 3,2, H-3''), 3,41 (*m*, H-5''), 3,33 (*m*, H-4''), 0,94 (*d*, 5,6, H-6''). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 179,5 (C-4), 165,8 (C-7), 163,2 (C-5), 158,9 (C-2), 159,0 (C-9), 149,8 (C-4'), 146,2 (C-3'), 136,0 (C-3), 122,1 (C-1'), 123,0 (C-6'), 116,5 (C-2'), 116,4 (C-5'), 105,9 (C-10), 103,5 (C-1''), 99,8 (C-6), 94,7 (C-8), 73,0 (C-4''), 72,2 (C-3''), 71,2 (C-2''), 71,8 (C-5''), 17,9 (C-6'').

Miricetina-3-O- α -L-ramnospiranosídeo (6)

RMN ^1H (CD_3OD), δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): δ 0,94 (3H, *d*, 5,6, H-6''), 3,33 (*t*, 9,2, H-4''), 3,51 (*m*, H-5''), 3,78 (*dd*, 9,2 e 3,2, H-3''), 4,21 (*dd*, 3,2 e 1,8, H-2''), 5,31 (*d*, 2,0, H-1''), 6,20 (*d*, 2,0, H-6), 6,42 (*d*, 2,0, H-8), 6,95 (2H, *s*, H-2', H-6'); RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 17,8 (C-6''), 71,8 (C-2''), 72,0 (C-5''), 72,2 (C-3''), 72,3 (C-4''), 94,9 (C-8), 100,0 (C-6), 103,8 (C-1''), 106,0 (C-10), 108,5 (C-6'), 109,7 (C-2'), 122,1 (C-1'), 136,5 (C-3), 138,1 (C-4'), 147,0 (C-3', C-5'), 158,7 (C-9), 159,6 (C-2), 163,4 (C-5), 166,3 (C-7), 159,6 (C-2), 179,8 (C-4).

Hesperidina (7)

Sólido amarelo, RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 5,38 (*dd*, 3,0 e 12,6, H-2), 2,72 (*dd*, 3,0 e 14,0, H-3eq), 3,14 (*dd*, 14,0 e 12,6, H-3ax), 6,05 (*sl*, H-6), 6,91 (*sl*, H-8), 6,95 (*m*, H-2', H-5', H-6'), 4,50 (*s*, H-1''), 4,98 (*d*, 8,1, H-1''), 3,09-3,90 (H-2''-H-5''), 0,96 (*d*, 6,0, H-6''), 12,00 (*s*, 5-OH), 3,86 (*s*, 4'-OCH₃). RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) δ_{C} : 78,8 (C-2), 42,3 (C-3), 197,4 (C-4), 165,4 (C-5), 96,8 (C-6), 163,3 (C-7), 95,9 (C-8), 162,8 (C-9), 103,6 (C-10), 131,0 (C-1'), 114,2 (C-2'), 146,1 (C-3'), 148,0 (C-4'), 112,0 (C-5'), 118,0 (C-6'), 100,9 (C-1''), 73,3 (C-2''), 76,6 (C-3''), 69,9 (C-4''), 75,7 (C-5''), 66,4 (C-6''), 99,8 (C-1'''), 70,6 (C-2'''), 71,1 (C-3'''), 72,5 (C-4'''), 68,7 (C-5'''), 18,2 (C-6''), 56,0 (4'-OCH₃).

Esquimianina (8)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 8,03 (*d*, 9,4, H-5), 7,24 (*d*, 9,4, H-6), 7,59 (*d*, H-2'), 7,05 (*d*, 2,8, H-3'), 4,44 (*s*, 4-OCH₃), 4,04 (*s*, 7-OCH₃), 4,12 (*s*, 8-OCH₃).

Marmesina (9)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 7,60 (*d*, 9,4, H-4), 6,22 (*d*, 9,4, H-3), 6,75 (*s*, H-8), 7,22 (*sl*, H-5), 4,74 (*dd*, 9,2 e 8,5, H-2'), 3,22 (*ddd*, 14,8, 8,5 e 1,0, H-3'a), 3,20 (*ddd*, 14,8, 9,2 e 1,0, H-3'b), 1,38 (3H, *s*, H-2''), 1,24 (3H, *s*, H-3''). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 161,1 (C-2), 163,3 (C-7), 91,1 (C-2'), 123,4 (C-5), 29,5 (C-3'), 155,7 (C-8a), 139,4 (C-4), 97,9 (C-8), 125,0 (C-6), 113,7 (C-4a), 112,3 (C-3), 71,6 (C-1''), 26,2 (C-2''), 24,2 (C-3'').

8-Metóxi-marmesina (10)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 7,58 (*d*, 9,5, H-4), 6,22 (*d*, 9,5, H-3), 6,96 (*sl*, H-5), 4,78 (*dd*, 9,2 e 8,5, H-2'), 3,25 (*ddd*, 14,8, 8,5 e 1,0, H-3'a), 3,20 (*ddd*, 14,8, 9,2 e 1,0, H-3'b), 1,39 (3H, *s*, H-2''), 1,25 (3H, *s*, H-3''), 4,06 (3H, *s*, 8-OCH₃). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 161,0 (C-2), 154,4 (C-7), 91,5 (C-2'), 117,2 (C-5), 29,9 (C-3'), 147,5 (C-8a), 143,5 (C-4), 132,0 (C-8), 125,9 (C-6), 113,7 (C-4a), 112,5 (C-3), 71,6 (C-1''), 26,0 (C-2''), 24,4 (C-3''), 61,0 (8-OCH₃).

N-Metilflindersina (11)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): 7,97 (*dd*, 8,4 e 2,0, H-5), 7,23 (*ddd*, 8,6, 6,8 e 2,0, H-6), 7,55 (*ddd*, 8,4, 6,8 e 1,6, H-7), 7,32 (*dl*, H-8), 6,76 (*d*, 9,9, H-4'), 5,54 (*d*, 9,9, H-3'), 1,52 (2H, *s*, 2'(CH₃)), 3,70 (3H, *s*, N-CH₃). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 161,0 (C-2), 106,2 (C-3), 155,0 (C-4), 116,2 (C-5a), 123,0 (C-5), 122,0 (C-6), 131,0 (C-7), 114,0 (C-8), 139,5 (C-8a), 117,9 (C-4').

125,5 (C-3'), 78,8 (C-2'), 29,2 (2'(CH₃)), 28,2 (N-CH₃).

Limonina (12)

Sólido branco, RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (mult., *J* em Hz, H): δ 4,04 (*sl*, H-1), 2,68 (*dd*, 16,8 e 1,9, H-2a), 2,98 (*dd*, 16,8 e 3,8, H-2b), 2,23 (*dd*, 15,8 e 3,2, H-5), 2,86 (*dd*, 15,8 e 14,5, H-6 ax), 2,47 (*dd*, 14,5 e 3,2 H-6 eq), 2,55 (*dd*, 12,2 e 2,8, H-9), 1,78 (*m*, H-11a), 1,90 (*m*, H-11b), 1,84 (*m*, H-12 ax), 1,51 (*m*, H-12 eq), 4,04 (*s*, H-15), 5,47 (*s*, H-17), 1,18 (3H, *s*, H-18), 4,47 (*d*, 13,0, H-19a), 4,77 (*dd*, 13,0 e 0,6 H-19b), 7,42 (*tl*, H-21), 6,34 (*dd*, 1,7 e 0,7, H-22), 7,40 (*tl*, H-23), 1,30 (3H, *s*, H-28), 1,19 (3H, *s*, H-29), 1,30 (3H, *s*, H-30). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ_{C} : 79,2 (C-1), 35,7 (C-2), 169,1 (C-3), 80,4 (C-4), 60,7 (C-5), 36,5 (C-6), 206,1 (C-7), 51,4 (C-8), 48,2 (C-9), 46,0 (C-10), 19,0 (C-11), 30,9 (C-12), 38,0 (C-13), 65,7 (C-14), 53,9 (C-15), 166,0 (C-16), 77,9 (C-17), 20,8 (C-18), 65,4 (C-19), 120,0 (C-20), 141,2 (C-21), 109,7 (C-22), 143,3 (C-23), 30,2 (C-28), 21,5 (C-29), 17,7 (C-30).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico dos extratos das folhas de *E. paraensis* levou ao isolamento de quatro cumarinas (1-4), três flavonoides (5-7) e o alcaloide esquimianina (8) (Figura 1).

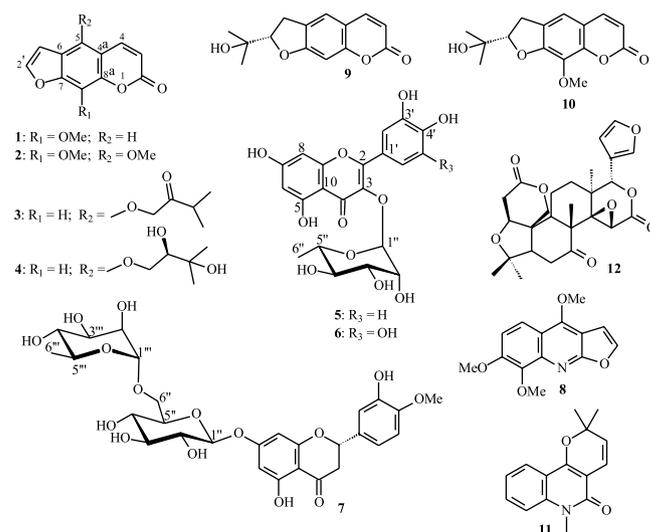


Figura 1. Compostos isolados de *E. paraensis*

As substâncias 1-4 apresentaram no espectro de RMN ^1H (solvente: CDCl_3) um par de dubletos (*J* \cong 9,5 Hz) localizados entre δ 6,1-6,4 e 7,5-8,3, sugerindo a presença de um esqueleto cumarínico, sendo estes sinais característicos dos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente.¹⁷ Também foi observada para estas substâncias a presença de um anel furano α,β -substituído, sendo facilmente reconhecido através de um par de dubletos (*J* = 2,5 Hz) em δ 7,6 e 6,8, atribuídos a H-2' e H-3', respectivamente. O sinal deste último hidrogênio é observado como um duplo dubleto (*J* = 2,4 e 0,8) quando C-8 se encontra hidrogenado, devido a um acoplamento a longa distância (5J) deste com H-3' e isto foi observado para as substâncias 3 e 4. A substância 1 apresentou, além dos sinais relatados acima, um singlete em δ 7,34 e outro em δ 4,28, sendo este último característico do grupo metoxila. A substância 2 apresentou um singlete em δ 4,16 (6H) atribuído a duas metoxilas. Os substituintes presentes em C-5 das substâncias 3 e 4 foram determinados através das correlações observadas nos mapas de contorno de HSQC e HMBC, que estão representadas na Figura 2.

Os espectros de RMN ^{13}C destas cumarinas apresentaram sinais característicos para o esqueleto furanocumarínico: δ 160,3-161,0

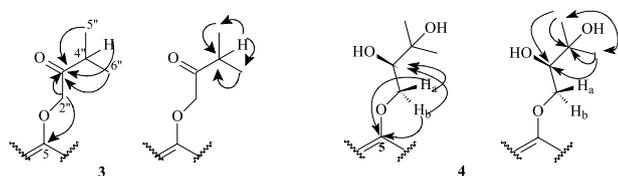


Figura 2. Correlações observadas nos mapas de contorno HMBC para os substituintes presentes em C-5 das substâncias **3** e **4**

(C-2); δ 112,9-114,8 (C-3); δ 139,1-144,2 (C-4); δ 145,0-146,6 (C-2'); δ 104,1-106,7 (C-3'). O conjunto de dados acima e a comparação com a literatura permitiram a identificação das cumarinas xantotoxina (**1**),¹⁸ isopimpinilina (**2**),¹⁹ iso-oxipeucedanina (**3**) e oxipeucedanina hidratada (**4**).^{18,20} A cumarina **3** foi isolada do extrato hexânico e as demais (**1**, **2**, **4**) do extrato diclorometânico.

A configuração do carbono quiral da unidade prenila do composto **4** foi considerada R baseando-se no valor de rotação específica obtida ($[\alpha]_D^{25} = +21$) e comparação deste com aquele citado na literatura para esta mesma substância ($[\alpha]_D^{25} = +8$), a qual além de ser denominada oxipeucedanina hidratada é também conhecida como prangol.²¹ Definir a configuração deste carbono baseando-se na rotação específica obtida foi possível devido à molécula possuir somente este estereocentro.

O estudo do extrato hidroalcoólico forneceu os compostos **5**, **6** e **7**, sendo este o primeiro relato do isolamento de flavonoides nesta espécie. Os espectros de RMN ¹H de **5** e **6** apresentaram, na região de hidrogênios aromáticos, um par de dupletos em δ 6,20 e 6,37 ($J = 2,0$ Hz), característico de sistema de acoplamento AB, correspondente a dois hidrogênios meta-posicionados e atribuídos, respectivamente, a H-6 e H-8 do anel A de um flavonoide. A diferença observada nos espectros destas substâncias está relacionada ao anel B, que apresenta para **5** um sistema de substituição nas posições 3' e 4', sugerido pelos sinais em δ 7,34 (d , $J = 2,0$ Hz), 7,31 (dd , $J = 8,0$ e 2,0 Hz) e 6,91 (d , $J = 8,0$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5', respectivamente; para **6** foi observado apenas um singlete em δ 6,95 relativo a dois hidrogênios, característico dos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B de uma flavona. A presença de sinais entre δ 3,3 e δ 4,2 nos espectros de RMN ¹H de **5** e **6** indicou que as duas substâncias se tratavam de flavonoides glicosilados. Esta afirmação pode ser confirmada pelos sinais em δ 4,21 (dd , $J = 3,2$ e 1,8 Hz), 3,78 (dd , $J = 9,2$ e 3,2 Hz), 3,37 (m , 2H) e pelo duplete em δ 0,90 ($J = 5,6$ Hz), este último sendo característico do grupo metila da ramnose e, assim, o sinal em δ 5,50 (sl) foi atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'') da molécula de açúcar. A estereoquímica do carbono anomérico da ramnose e a posição na qual o açúcar está ligado à aglicona foi determinada pela constante de acoplamento de H-1'' e por comparação com os dados da literatura,^{22,23} sendo possível identificar a substância quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**5**) e miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**6**).²³

O padrão de substituição no anel A do flavonoide **7** foi definido como 5,7-dioxigenado pela presença de dois singletos largos em δ 6,05 (H-6) e 6,91 (H-8), no espectro de RMN ¹H, formando um sistema de acoplamento AB. Para o anel B foi observado um multipletto entre 6,75-6,95 atribuído aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', sugerindo anel B 3'-hidróxi-4'-metoxilado ou 4'-hidróxi-3'-metoxilado. O sinal do grupo metoxila foi observado em δ 3,86 (3H). Esta substância foi definida como flavanona devido à presença dos sinais de hidrogênios alifáticos δ 3,14 (dd , $J = 14,0$ e 12,6 Hz), 2,72 (dd , $J = 14,0$ e 3,0 Hz) e δ 5,38 (dd , $J = 12,6$ e 3,0 Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-3pseudoax, H-3pseudoeq e H-2 do anel C, respectivamente. A presença de sinais na região δ 3,09-3,86 indicou a presença de unidades de açúcar na estrutura proposta. Esta afirmação pode ser confirmada pelos sinais em δ

4,98 (d , $J = 8,1$ Hz) e 4,50 (s) e pelo duplete em δ 0,96 ($J = 6,0$ Hz, 3H), este último sendo característico do grupo metila da ramnose. Estes dados sugeriram a presença do substituinte O- β -D-rutinosil e permitiram atribuir os sinais em δ 4,98 e 4,50 aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1'''. A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹H e ¹³C desta flavanona isolada com os dados descritos na literatura para a hesperidina mostrou que o flavonoide **7** referia-se a esta substância (3',5-di-hidróxi-4'-metoxiflavanona-7-O- β -[L-ramnopiranosil(α 1 \rightarrow 6)]-D-glucopiranosídeo, ou hesperetina-7-O- β -[L-ramnopiranosil(α 1 \rightarrow 6)]-D-glucopiranosídeo).²⁴

Somente um alcaloide foi isolado das folhas e este foi obtido do extrato diclorometânico. Seu espectro de RMN ¹H apresentou dois dupletos em δ 7,59 e 7,05, de hidrogênios furânicos, característicos dos alcaloides furoquinolínicos, e um par de dupletos em δ 8,03 e 7,24 com $J = 9,4$ Hz, atribuídos a H-5 e H-6, respectivamente. A presença de três sinais de metoxilas, em δ 4,44, 4,04 e 4,12 e a comparação com dados da literatura permitiu identificar esta substância como sendo a esquimianina (**8**).²⁵

O estudo fitoquímico do extrato etanólico do caule de *E. parensis* levou ao isolamento de duas cumarinas (**9** e **10**), do alcaloide N-metilflindersina (**11**) e do limonoide limonina (**12**) (Figura 1). As cumarinas **9** e **10** apresentam em seus espectros de RMN ¹H os sinais característicos do esqueleto cumarínico com a presença do anel di-hidrofurano, o qual foi evidenciado pelos sinais em δ 4,78 (dd , 9,3 e 8,5 Hz, H-2'), 3,25 (ddd , 14,8, 8,5 e 1,3 Hz, H-3'a) e 3,20 (ddd , 14,8, 9,3 e 0,9 Hz, H-3'b). Ainda no espectro de RMN ¹H foi possível observar sinais que caracterizam um grupo hidróxi-isopropila. Esses sinais apresentaram-se como singletos em δ 1,39 (3H, s) e 1,25 (3H, s). No espectro da cumarina **9** foram observados dois singletos em δ 6,75 (1H, s) e 7,22 (1H, sl) atribuídos, respectivamente, aos H-8 e H-5, sugerindo a presença da marmesina.²⁶ Para a segunda cumarina foram observados dois singletos, um em δ 4,06 (3H, s) relativo a um grupo metoxila posicionado em C-8, e o outro em δ 6,96 atribuído ao H-5, permitindo identificar a 8-metóxi-marmesina (**10**).²⁶ A confirmação destas estruturas foi obtida através de comparação de seus dados de RMN de ¹³C com aqueles citados na literatura para a marmesina (**9**) e seu derivado 8-metóxi-marmesina (**10**).²⁶

O espectro de RMN ¹H da substância **11** mostrou sinais característicos de anel aromático *orto*-dissubstituído, δ 7,97 (1H, $J = 8,4$ e 2,0 Hz), 7,23 (1H, $J = 8,4$; 6,8 e 1,6 Hz), 7,55 (1H, $J = 8,6$; 6,8 e 2,0 Hz), 7,32 (1H, $J = 8,6$; 1,6 Hz), atribuídos aos H-5-H-8, respectivamente. O espectro de RMN ¹³C mostrou sinal característico de lactama em δ 161,0, indicando a presença de alcaloide 2(1H)-quinolin-2-ona. A ausência de sinais para H-3 e H-4 de um alcaloide 2(1H)-quinolin-2-ona e a presença de sinais típicos do anel 2,2-dimetilcromeno (um singlete integrando para 6 hidrogênios em δ 1,52 referente a duas metilas geminais e dois dupletos em δ 5,54 e 6,76 com $J = 10,0$ Hz referente a hidrogênios olefinicos), permitiram identificar este alcaloide como a N-metilflindersina (**11**).²⁷

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C da substância **12** mostraram sinais característicos do anel furano β -substituído, δ_H 7,42 ($J = 0,7$ Hz, H-21), 7,40 ($J = 1,7$ Hz, H-23), 6,34 ($J = 1,7$ e 0,7 Hz, H-22), δ_C 120,0 (C-20), 141,2 (C-21), 109,7 (C-22) e 143,3 (C-23). O espectro de RMN ¹H ainda mostrou quatro singletos intensos com integração para três hidrogênios em δ 1,18 (Me-18), 1,30 (Me-28), 1,19 (Me-29) e 1,07 (Me-30) referentes a grupos metila ligados a carbono sp^3 e atribuídos com o auxílio dos mapas de correlações HSQC e HMBC. A presença de sinais em δ 4,77 (dd , $J = 13,0$ e 0,6 Hz), 4,47 (d , $J = 13,0$ Hz) e 4,04 (sl), atribuídos aos hidrogênios geminais do C-19 e H-1, respectivamente, sugeriram tratar-se de um limonoide com o anel A-seco. A comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C com aqueles da literatura para a limonina permitiu confirmar a estrutura deste limonoide para a substância **12**.²⁸

Segundo o sistema de classificação de Engler (1931) o gênero *Euxylophora* encontra-se classificado na subfamília Rutoideae, tribo Cusparieae.²⁹ As classes de alcaloides mais abundantes em Rutaceae são aquelas derivadas do ácido antranílico. Entre estas, 2-(1*H*)-quinolinonas, furoquinolinos, di-hidropiranoquinolinos, furo-4-quinolinonas, di-hidropirano-4-quinolinonas e pirano-2-quinolinonas seriam os que caracterizam a família como um todo. Outra classe que também caracteriza a família são as furanocumarinas. Em morfologia botânica considera-se como gênero típico aquele que possui o maior número de característica da família. Podem-se classificar estes alcaloides e as furanocumarinas como os grupos típicos de Rutaceae, pois são raros os gêneros em que eles ainda não foram citados.^{1,4} As furanocumarinas lineares isoladas nas folhas de *E. paraensis* são citadas em gêneros de todas as grandes subfamílias de Rutaceae,^{3,4} ou seja, confirmando que *Euxylophora* possui a maioria das características químicas das Rutaceae. Considerando o perfil químico de *Euxylophora*, este pode ser considerado um gênero típico de Rutaceae, pois como citado na introdução as cascas do caule e o cerne de sua única espécie possuem os alcaloides típicos da família.⁷⁻¹⁶ Estes trabalhos citam nos estudos com o cerne o isolamento de alcaloides simples do ácido antranílico (Figura 3) como 1-metil-4-(2,3-di-hidróxi-3-metilbutan-1-oxil)-2(1*H*)-quinolin-2-ona (13), furoquinolino (esquimmianina, 8), piranoquinolino (N-metilflindersina, 11), 1,2',2'-trimetil-3',4'-di-hidro,4'-hidróxi-pirano[3,2-c]

quinolin-2-ona (14), 1,2',2',3'-tetrametil-2',3'-di-hidrofuro[2,3-b]quinolin-4-ona (lemobilina, 15), 3-(1,2-dimetil-2-hidróxiopropil)-4-hidróxi-1-metilquinolin-2(1*H*)-ona (16), 2',3',3'-trimetil-2',3'-di-hidrofuro[3,2-c]quinolin-2-ona (17), N-metil-2',3',3'-trimetil-2',3'-di-hidrofuro[3,2-c]quinolin-2-ona (18).^{7-9,15} Nos compostos 15 e 16 o rearranjo de Claisen anormal parece ter ocorrido na sua formação, e 15 foi encontrado também em *Flindersia ifflaiana*, mostrando uma afinidade entre *Euxylophora* e este gênero, o qual pertence a outra subfamília, Flindersioideae.³⁰

Alguns gêneros de Rutaceae sintetizam alcaloides bis-2(1*H*)-quinolinona, estes em geral se formam por uma reação de cicloadição de Diels-Alder entre as unidades prenilas. Alguns destes dímeros foram isolados de *Vepris louisii*, *Oricia renieri*, *E. paraensis* e *Ptelea trifoliata*.³⁰ Paraensidimerinas A (19), B (24), C (20), D (25), E (21), F (22), G (23) isolados do cerne de *E. paraensis* são exemplos da ocorrência da reação de Diels-Alder nestes dímeros.^{8,9,15,16} *Vepris*, *Oricia* e *Ptelea* são classificados em Toddaloideae.

O maior número de alcaloides isolados da casca do tronco de *Euxylophora* é derivado do ácido antranílico e triptofano, os β -indolo-quinazolinos: 1-hidróxi-7,8-di-hidro- β -indolo-quinazolino (26), euxylophoricinas A (29), B (33), C (27), D (31), E (35), F (28), euxylophorinas A (30), B (34), C (32), D (36) e paraensine (37).¹⁰⁻¹⁴ Os alcaloides β -indolo-quinazolinos segundo pesquisa recente foram isolados em três gêneros de Rutoideae, *Zanthoxylum*, *Euodia* e *Euxylophora*, e três de Toddaloideae, *Vepris*, *Araliopsis* e *Hortia*.³⁰ Portanto, *Euxylophora* também mostra afinidade com gêneros da subfamília Toddaloideae, mais uma vez confirmando ser típico de Rutaceae. Dados micro e macromoleculares vêm sugerindo a união destas duas subfamílias, Rutoideae e Toddaloideae.^{31,32}

Os flavonoides são geralmente encontrados em muitas, se não em todas, as plantas de Angiosperma,³⁰ principalmente os glicosilados, portanto de pouco valor quimiosistemático na confirmação da classificação de um táxon. Contudo, os flavonoides de Rutaceae são tri-, tetra- e polioxigenados, uma exceção entre as demais angiospermas. As Rutaceae foram estudadas visando principalmente a busca de alcaloides, sendo em geral desprezadas as frações ricas em flavonoides. Recentemente estes compostos vêm sendo isolados em vários gêneros da tribo Cusparieae. *Neoraputia* e *Conchocarpus* são dois exemplos de gêneros ricos em flavonoides.^{30,33-35} A flavona 6 é pentaóxigenada, assim, também sugerindo afinidade de *E. paraensis* com os demais gêneros de Cusparieae.

AGRADECIMENTOS

À Capes, CNPq (INCT, 573742/2008-1) e FAPESP (INCT, 08/57859-5) pelas bolsas e apoios financeiros concedidos.

REFERÊNCIAS

- Waterman, P. G.; Grondon, M. F.; *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*, Academic Press: London, 1983.
- Groppo, M.; Pirani, J. R.; Salatino, M. L. F.; Blanco, S. R.; Kallunki, J. A.; *Am. J. Bot.* **2008**, *95*, 985.
- Silva, M. F. das G. F. da; Soares, M. S.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; *The Alkaloids* **2007**, *64*, 139.
- Silva, M. F. das G. F. da; Gottlieb, O. R.; Ehrendorfer, F.; *Plant Syst. Evol.* **1988**, *161*, 97.
- Buchanan, B.; Gruissem, R.; Jones, R.; *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists: New York, 2000.
- <http://www.ibama.gov.br/documentos/lista-de-especies-ameacadas-de-extincao>, acessada em Setembro 2012.
- Jurd, L.; Wong, R. Y.; *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 1625.

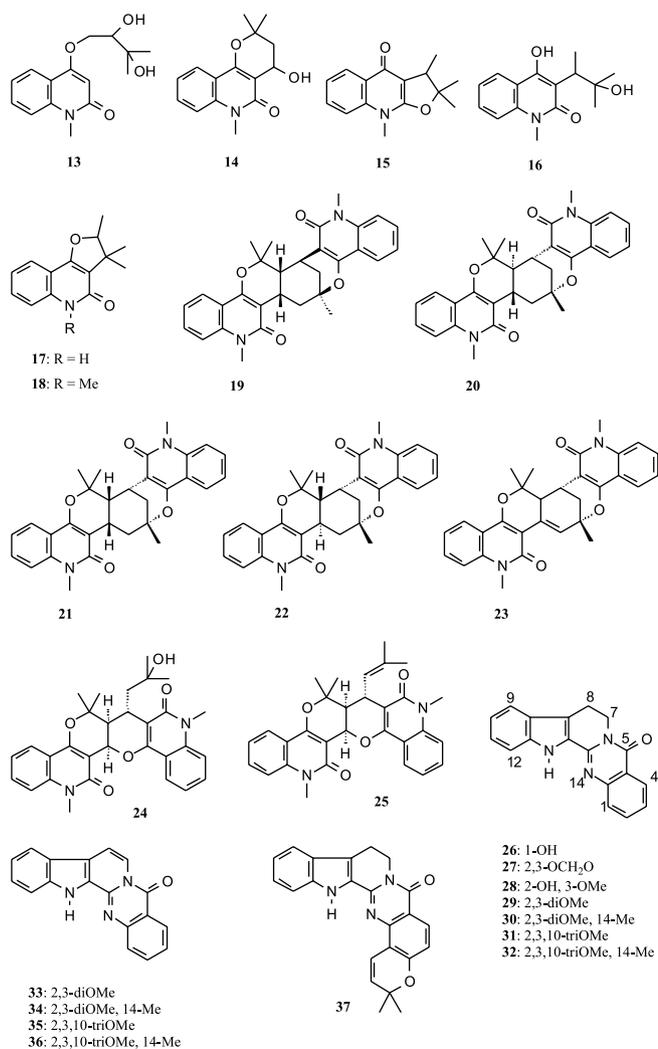


Figura 3. Compostos citados na literatura de ocorrência em *E. paraensis* (os compostos 30, 32, 34 e 36 são iônicos)

8. Jurd, L.; Wong, R. Y.; Benson, M.; *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 2505.
9. Danieli, B.; Manitto, P.; Ronchetti, F.; Russo, G.; Ferrari, G.; *Experientia* **1972**, *28*, 249.
10. Danieli, B.; Palmisano, G.; Rainoldi, G.; Russo, G.; *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1603.
11. Danieli, B.; Farachi, G.; Palmisano, G.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1095.
12. Canonica, L.; Danieli, B.; Manitto, P.; Russo, G.; *Tetrahedron Lett.* **1968**, *47*, 4865.
13. Danieli, B.; Palmisano, G.; Russo, G.; Ferrari, G.; *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2521.
14. Danieli, B.; Manitto, P.; Ronchetti, F.; Russo, G.; Ferrari, G.; *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1833.
15. Jurd, L.; Benson, M.; Wong, R. Y.; *Aust. J. Chem.* **1983**, *36*, 759.
16. Jurd, L.; Benson, M.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, *2*, 92.
17. Müller, A. H.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. das G. F. da; Fernandes, J. B.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1797.
18. Stevenson, P. C.; Simmonds, M. S. J.; Yule, M. A.; Veitch, N. C.; *Phytochemistry* **2003**, *63*, 41.
19. Mikolajczak, K. L.; Weisleder, D.; Parkanyl, L.; Clardy, J.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 606.
20. Tesso, H.; Konig, W. A.; Kubeczka, M. B.; Glowniak, K.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 707.
21. Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Loke, P. L.; Malone, J. F.; Hamilton, T. G.; *Chem. Commun.* **2002**, 3070.
22. Markham, K. R.; Chari, V. M.; *Carbon-13 - NMR Spectroscopy of Flavonoids*, Chapman and Hall Ltda: London, 1982.
23. Braca, A.; Politi, M.; Sanogo, R.; Sanou, H.; Morelli, I.; Pizza, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6689.
24. Chung, S.; Kim, Y.; Takaya, Y.; Terashima, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4664.
25. Jeong, S. H.; Huan, X. H.; Hong, S. S.; Hwang, J. S.; Hwang, J. H.; Lee, M. K.; Ro, J. S.; Hwang, B. Y.; *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 1119.
26. Kim, J. S.; Kim, J. C.; Shim, S. H.; Lee, E. J.; Jin, W. J.; Son, K. H.; Kim, H. P.; Kang, S. S.; Chang, H. W.; *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 617.
27. Kamperdick, C.; Van, N. H.; Sung, T. V.; Adam, G.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 177.
28. Ribeiro, T. A. N.; Ndiaye, E. A. da S.; Velozo, E. da S.; Vieira, P. C.; Ellena, J.; Júnior Sousa, P. T. de; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1347.
29. Engler, A. Em *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*; Engler, H. G. A.; Prantl, K., eds.; 2nd ed., Wilhelm Engelmann: Leipzig, 1931, vol. 19a, p. 187-359.
30. Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Oliva, G.; Silva, M. F. das G.F. da Em *Química Medicinal: Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*; Montanari, C. A., ed.; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2011.
31. Severino, V. G. P.; Braga, P. A. C.; Silva, M. F. das G. F. da; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Theodoro, J. E.; Ellena, J. A.; *Phytochemistry* **2012**, *76*, 52.
32. Braga, P. A. C.; Severino, V. G. P.; Freitas, S. D. L. de; Silva, M. F. das G. F. da; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Pirani, J. R.; Groppo, M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *43*, 142.
33. Passador, E. A. P.; Silva, M. F. das G. F. da; Rodrigues Fo., E.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Pirani, J. R.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1533.
34. Tomazela, D. M.; Pupo, M. T.; Passador, E. A. P.; Silva, M. F. das G. F. da; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Fo., E.; Oliva, G.; Pirani, J. R.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 643.
35. Moraes, V. R. de S.; Tomazela, D. M.; Ferracin, R. J.; Garcia, C. F.; Sannomiya, M.; Soriano, M. P. C.; Silva, M. F. das G. F. da; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Fo., E.; Magalhães, E. G.; Magalhães, A. F.; Pimenta, E. F.; Souza, D. H. F. de; Oliva, G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 380.