UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo Fitoquímico de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae)

SÃO CRISTOVÃO - SERGIPE FEVEREIRO/ 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Estudo Fitoquímico de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae)

Moacir dos Santos Andrade

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Regina de Souza Moraes Co-Orientador: Prof. Dr. Péricles Barreto Alves

> São Cristovão 2007



A Deus e a Santa Terezinha

dedico este trabalho, por abençoar minha vida, me concedendo sabedoria, humildade, saúde emocional e mental para concluir mais um passo da minha vida..

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, José Pereira e Maria Cleonice, pelo incentivo, amor, entendimento e fornecer subsídios necessários para alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos; Moises e Cleoneide, pelo apoio e em especial a minha irmã pelo acolhimento no período da minha Graduação.

A minha namorada Ana Clécia, pelo companheirismo, otimismo, amor, e principalmente por sua paciência.

As minhas amigas, Larissa Mascarenhas e Taís Sampaio, pelo companheirismo de bancada e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, Kennedy Alexandre e Charlene Matos, pelo companheirismo e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Sergipe através do Departamento de Química pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof.^a Dr^a Valéria Regina de Souza Moraes, pela dedicação, companheirismo e ensinamentos, na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira por sua colaboração e ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Péricles Barretos Alves e a Prof.^a Dr^a Samisia Maria Machado pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Adauto de Souza Ribeiro (DBI-UFS), Dr. Volker Bittrich e Dra. Maria do Carmo Amaral (IB-UNICAMP), pela identificação da espécie *Kielmeyera rugosa* Choisy.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela colaboração com o Prof. Dr. Antonio G. Ferreira e suas alunas Gláucia B. Alcantara e Katyuscya V. Leão, pela aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos Professores Dr. Glaucius Oliva e Dr. Otávio H. Thiemann, e ao técnico Eli F. Pimenta do Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (USP), pela realização dos ensaios bioquímicos frente às enzimas GAPDH e APRT.

Aos Professores Dr. Luiz Eduardo Almeida, Dr^a. lara de Fátima Gimenez e a estagíaria Aline dos Santos do Departamento de Química – UFS, pela colaboração na aquisição dos espectros de infravermelho.

Ao Laboratório METABIO (Laboratório de Pesquisa na Busca de Metabólitos Secundários Bioativos) pela oportunidade de execução deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório METABIO, pelo apoio, amizade, companheirismo, confraternização e alegria.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Química – UFS, que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam a realização deste trabalho.



"A ciência no futuro terá que estar preparada para fornecer respostas para questões ligadas ao funcionamento da natureza condição essencial para o futuro da vida no nosso planeta"

O.R. GOTTLIEB

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais

Nome: Moacir dos Santos Andrade Nome em citações bibliográficas: Andrade, M.S. Naturalidade: Itabaiana-SE Data de Nascimento: 09/10/1981

2. Formação Acadêmica/Titulação:

Nível Superior Curso: Química Licenciatura, Universidade Federal de Sergipe, UFS. Ano de Conclusão: 2004

3. Área de Atuação

Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

4. Produção Cientifica

4.1. Trabalhos em Eventos:

1. ANDRADE, Moacir dos Santos; ANDRADE, Larissa Mascarenhas; RIBEIRO, Adauto de Souza; MACHADO, Samísia Maria Fernandes; OLIVA, Glaucius; THIEMANN, Otávio Henrique; FERREIRA, Antonio Gilberto; ALCANTARA, Glaucia Braz; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; MORAES, Valéria Regina de Souza. Busca de Metabólitos Secundários Bioativos de *Kielmeyera* e *Symphonia* (Clusiaceae). **VII Congresso de Iniciação Científica.** 2005. v. 1, p. 83-83. São Cristóvão - SE.

2. ANDRADE, Moacir dos Santos; MORAES, Valéria Regina de Souza; MACHADO, Samísia Maria Fernandes; RIBEIRO, Adauto de Souza; OLIVA, Glaucius; THIEMANN, Otávio Henrique; ALVES, Péricles Barreto; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. Estudo Fitoquímico de Plantas do Estado de Sergipe: Investigação Fitoquímica de Espécies do Gênero *Clusia* e *Kielmeyera* do Estado de Sergipe e Avaliação do seu Potencial Farmacológico. **57ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC**, 2005, Fortaleza.

3. ANDRADE, Moacir dos Santos; MORAES, Valéria Regina de Souza; RIBEIRO, Adauto de Souza; ALCANTARA, Glaucia Braz; FERREIRA, Antonio Gilberto; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima. 4-Propilcumarinas dos frutos de *Kielmeyera rugosa* (Clusiaceae). **Livro de resumos da 28^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química.** 2005. v. 1, p. PN119. Poços de Caldas - MG.

4. ANDRADE, Moacir dos Santos; ANDRADE, Larissa Mascarenhas de; SAMPAIO, Taís Santos; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; MORAES, Valéria Regina de Souza; ALVES, Péricles Barreto; MACHADO, Samísia Maria Fernandes. 4-propilcumarina das folhas de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,** 2006. v. 1, p. PN218. Águas de Lindóia - SP.

4.2. Artigos completos publicados em periódicos:

1. ANDRADE, Moacir dos Santos; SAMPAIO, Taís Santos; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; RIBEIRO, Adauto de Souza; BITTRICH, Volker; AMARAL, Maria Do Carmo E. Volatile compounds of the leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, v.22, p.49 - 52, 2007.

4.3. Artigos aceitos para publicação:

1. NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; ANDRADE, Moacir dos Santos; SAMPAIO, Taís Santos; RIBEIRO, Adauto de Souza; BITTRICH, Volker; AMARAL, Maria Do Carmo E. Volatile Compound from Leaves and Flowers of *Garcinia macrophylla* (Clusiaceae). *Chemistry of Natural Compounds*. Aceito. 2006.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ESQUEMAS	IX
LISTA DE FLUXOGRAMA	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 PRODUTOS NATURAIS	2
1.1.1 Importância 1.1.2 Brasil: Biodiversidade	2
1.2 A FAMÍLIA: CLUSIACEAE	5
 1.2.1 Ocorrência e Distribuição 1.2.2 Importância	
1.3 ÓLEO ESSENCIAL	20
1.3.1 Importância Econômica	
1.4 DOENÇAS TROPICAIS	
 1.4.1 Doença de Chagas 1.4.2 As Leishmanioses 1.4.2.1 Sergipe: Ocorrência. 	

2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.1.1 Objetivos Específicos	
3. METODOLOGIA	
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.1 Identificação Estrutural	
3.1.2 Isolamento dos Metabólitos Secundários	
3.1.3 Análise dos Óleos Essenciais	
3.2 MATERIAL VEGETAL	
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	
3.2.2 Obtenção dos Extratos	
3.2.2.1 Partição Líquido-Líquido	
3.3 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	
3.3.1 Estudo dos Frutos	
3.3.1.1. Partição Hexânica	
3.3.1.2 Partição Cloroformica	
3 3 2 1 Partição Hexânica	40 40
3.3.2.2. Partição Clorofórmica	
3.3.2.3 Partição Acetato de Etila	
3.3.3 Estudo do Caule	45
3.3.3.1 Partição Hexânica	
3.3.3.2 Partição Clorofórmica	47
3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	
3.4.1 Ensaio bioquímico frente à enzima GAPDH de Trypanosso	oma cruzi.
2 4 1 1 Cáloulog dog Atividados Especifica-	
3 4 1 2 Atividade Inibitória de GAPDH de <i>Trypanossoma cruzi</i>	49 50
3.4.2 Ensaio bioquímico frente à enzima APRT de <i>Leishmania</i> d	lonovani.
······································	
3.4.2.1 Cálculos das Atividades Específicas	
3.4.2.2 Atividade Inibitória de APRT de Leishmania donovani	51

3.5 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES
4.1 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DE KIELMEYERA RUGOSA CHOISY 56
4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS
4.2.1 Identificação Estrutural da Substância 1
4.2.2 Identificação Estrutural da Substância 261
4.2.3 Identificação Estrutural da Substância 363
4.2.4 Identificação Estrutural das Substâncias 4 e 566
4.2.5 Identificação Estrutural da Substância 6 71
4.2.6 Identificação Estrutural das substâncias 7 e 8
4.3 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
4.3.1 Atividade Tripanocida dos Extratos e frações obtidos através da
inibição da enzima GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>
4.3.2 Atividade Leishmanicida dos Extratos e frações através da
inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani.</i>
inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani.</i>
 inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani</i>81 4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL
 inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani</i>
 inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani</i>
 inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani</i>
 inibição da enzima APRT de <i>Leishmania donovani</i>

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 01: Difrentes fontes de agentes terapêuticos
Figura 02: Estruturas da Artemisinina, Forscolina e Taxol4
Figura 03: Calanolídeo A, extraído de Calophyllum lanigerum (1), fotos ilustrativas dos frutos de Garcinia (2) e platonia (3)
Figura 04: Fotos de <i>Kielmeyera rugosa</i> Choisy7
Figura 05: <i>4- (1-metilpropil) - 5,7 - dihidroxi - 8 - (4 - hidroxi - 3 - metilbutiril)- 6 - (3 - metilbut - 2 - enil) cromen-2-ona (1), dafnetina (2) e "GUT-70" (3)</i>
Figura 06: Distribuição geográfica da Tripanossomíase americana
Figura 07: Fotos do protozoario na forma tripomastigota (1) e do insetor vetor (2).24
Figura 08: Estrutura dos fármacos benzonidazol e nifurtimox25
Figura 09: Série histórica de dez anos da distribuição dos casos de LV26
Figura 10: A Glucantime (1), (Pentostam) (2)26
Figura 11: Anfatericina B (3)27
Figura 12: Estrutura da miltefosina (1)
Figura 13: Foto do inseto <i>Lutzomyia longipalpis</i>
Figura 14: Mapa da distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose visceral por município de Sergipe nas décadas de 70, 80 e 90
Figura 15: Reação catalisada pela enzima GAPDH
Figura 16: Reação catalisada pela enzima APRT

Figura 17: Figura ilustrativa do aparato tipo clevenger	53
Figura 18: Propostas estruturais para substância 1	59
Figura 19: Correlações (${}^{3}J_{C-H}$) para a determinação exata do composto	60
Figura 20: 5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6', 6'-dimetilpirano (2', 3': 7 cumarina.	,8)- 61
Figura 21: 7-hidroxi-8-(2-metil-1-oxobutil)-2'-(2-hidroxiisopropil) dihidrofura (5',4': 5,6)-4-propil cumarina.	ano- 63
Figura 22: Propostas estruturais para a substância 3.	64
Figura 23: 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6',6'-dimetilpin (2',3': 7, 8)-cumarina.	rano 66
Figura 24: Propostas estruturais para as substâncias 4 e 5.	68
Figura 25: Substituintes acilas presentes nas cumarinas da mistura	69
Figura 26: Correlações importantes para a determinação da mistura dos composte e 4.	os 3 70
Figura 27: (4): 5-hidroxi-6-(2-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-6', 6'-dimetilpirano	(2′,
3': 7,8)-cumarina. (5): 5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-6', dimetilpirano (2', 3': 7,8)-cumarina	6′- 70
Figura 28: 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-8-(2'-hidroxi-3'-metil-3'-butenil fenilcumarina.)-4- 72
Figura 29: Lupeol (7) e α-amirina (8)	74
Figura 30: Efeito dos extratos e frações obtidos dos frutos frente à enzima GAP de <i>T. cruzi</i>	РDН 79
Figura 31: Efeito dos extratos e frações obtidos das folhas frente à enzima GAF	DH
de T. cruzi	80

Figura 32: Efeito dos extratos e frações obtidos do caule frente à enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> . 81
Figura 33: Efeito dos extratos e frações obtidos dos frutos frente à enzima APRT de <i>L. donovani</i>
Figura 34: Efeito dos extratos e frações obtidos das folhas frente à enzima APRT de L. donovani
Figura 35: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas
Figura 36: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido das folhas
Figura 37: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido dos frutos
Figura 38: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial dos frutos
Figura 39: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido das flores
Figura 40: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das flores de <i>Kielmeyera rugosa</i>
Figura 41: Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 1
Figura 42: Espectro de RMN de ¹ H da substância 1 (500 MHz, CDCl ₃) 105
Figura 43: Ampliações das regiões 5,5-7,5 ppm (1) e 0,5-3,0 ppm (2) do espectro de RMN ¹ H da substância 1
Figura 44: Espectro de RMN de ¹³ C da substância 1 (125,7 MHz, CDCl ₃) 106
Figura 45: Experimento DEPT 135° e 90° da substância 1 1077
Figura 46: Mapa de correlação HSQC da substância 1 (11 tesla, CDCl ₃) 107
Figura 47: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 1 108

Figura 48: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 1 108
Figura 49: Mapa de correlação HMBC da substância 1 (11 tesla, CDCl ₃) 109
Figura 50: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 1 109
Figura 51: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 1 110
Figura 52: Espectro de Infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 2 111
Figura 53: Espectro de RMN de ¹ H substância 2 (400 MHz, CDCl ₃) 111
Figura 54: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da substância 2 112
Figura 55: Espectro de RMN de ¹³ C da substância 2 (100 MHz, CDCl ₃) 112
Figura 56: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C da substância 2 113
Figura 57: Experimento DEPT 135° da substância 2
Figura 58: Espectro de Infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 3 114
Figura 59: Espectro de RMN de ¹ H substância 3 (400 MHz, CDCl ₃) 114
Figura 60: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da substância 3 115
Figura 61: Espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (100 MHz, CDCl ₃) 115
Figura 62: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 116
Figura 63: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 116
Figura 64: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 117
Figura 65: Experimento DEPT 135° da substância 3 (100 MHz, CDCl ₃) 117
Figura 66: Mapa de correlação COSY da substância 3 (9,4 tesla, CDCl ₃) 118
Figura 67: Ampliação do mapa de correlação COSY da substância 3 118
Figura 68: Ampliação do mapa de correlação COSY da substância 3 119

Figura 69: Mapa de correlação HSQC da substância 3 (9,4 tesla, CDCl ₃) 119
Figura 70: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 3 120
Figura 71: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 3 120
Figura 72: Mapa de correlação HMBC da substância 3 (9,4 tesla, CDCl ₃) 121
Figura 73: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3 121
Figura 74: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3 122
Figura 75: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3 122
Figura 76: Espectro de Infravermelho (IV) (janela de KBr) das substâncias 4 e 5 123
Figura 77: Espectro de RMN de ¹ H das substâncias 4 e 5 (500 MHz, CDCl ₃) 123
Figura 78: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H das substâncias 4 e 5 124
Figura 79: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H das substâncias 4 e 5 124
Figura 80: Espectro de RMN de ¹³ C das substâncias 4 e 5 (125,7 MHz, CDCl ₃). 125
Figura 81: Experimento DEPT 135° e 90° das substâncias 4 e 5 125
Figura 82: Mapa de correlação HSQC das substâncias 4 e 5 (9,4 tesla, CDCl ₃).
Figura 83: Ampliação do mapa de correlação HSQC das substâncias 4 e 5 106
Figura 84: Ampliação do mapa de correlação HSQC das substâncias 4 e 5 127
Figura 85: Mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5 (9,4 tesla, CDCl ₃) 107
Figura 86: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5 106
Figura 87: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5 128
Figura 88: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5 107

LISTA DE TABELAS

páginas

Tabela 01: Compostos isolados de espécies de Kielmeyera do cerrado. 9
Tabela 02: Compostos isolados de <i>Kielmeyera</i> da restinga brasileira. 14
Tabela 03: Frações obtidas da coluna da partição hexânica dos frutos (FrH). 36
Tabela 04: Frações obtidas da coluna da partição clorofórmica dos frutos (FrC) 38
Tabela 05: Frações obtidas da coluna da partição Hexânica das folhas (FoH) 40
Tabela 06: Frações obtidas da coluna da partição Clorofórmica das folhas (FoC) 42
Tabela 07: Frações obtidas da coluna da partição Acetato de Etila das folhas (FoA).
Tabela 08: Frações obtidas da coluna da partição Hexânica do Caule (CaH)
Tabela 09: Frações obtidas da coluna da partição Clorofórmica do Caule (CaC) 47
Tabela 10: Correlações heteronucleares $({}^{1}J_{C,H})$ observadas no experimento HSQC 60
Tabela 11: Correlações observadas no espectro de RMN – 2D [HMBC (C-H, ⁿ J)(CDCl ₃ , 9,4 tesla)] da substância 3.65
Tabela 12: Correlações observadas no espectro de RMN – 2D [HMBC (C-H, ⁿ J)(CDCl ₃ , 9,4 tesla)] da mistura de cumarinas 4 e 5.69
Tabela 13: Relação das amostras enviadas para os testes frente a GAPDH e APRT
Tabela 14: Composição do percentual relativo do óleo essencial das folhas, frutos e
flores de <i>K. rugosa</i>

Tabela 15: Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ ; 9,4 tesla) da substância 1.
Tabela 16: Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 9,4 tesla) da substância 2.
Tabela 17: Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 9,4 tesla) da substância 3.
Tabela 18: Dados espectrais de RMN de ¹ H das substâncias 4 e 5. 137
Tabela 19: Dados espectrais de RMN de ¹³ C das substâncias 4 e 5. 1348
Tabela 20: Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 6
Tabela 21: Dados espectrais de RMN de ¹³ C das substâncias 7 e 8

LISTA DE ESQUEMAS

páginas

Esquema 01: Biossíntese das cumarinas via ácido chiquímico......19

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01: Procedimento para obtenção dos extratos particionados do frutos,
caule e folhas
Fluxograma 02: Processo de purificação da fração FrC8 por CCP
Fluxograma 03: Processo de purificação da fração FrC15 por CCP40
Fluxograma 04: Processo de purificação das frações FoH8 e FoH9 por CCP 42
Fluxograma 05: Subfrações obtidas por CCP da fração FoA6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt Acetato de etila

AMP Adenosina 5'-monofosfato

APRT Adenina-fosforribosil-transferase

CC Cromatografia em Coluna

CCDC Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCP Cromatografia em Camada Preparativa

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

CG - EM Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

COSY Homonuclear Shif-Correlation Spectroscopy (Correlação homonuclear de hidrogênio a três ligações)

d dubleto

dd duplo dubleto

DEPT Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Espectro de RMN ¹³C intensificado por transferência de polarização)

DMAPP Dimetilalil Difosfato

DMSO-d₆ Dimetil sulfóxido deuterado

EM Espectro de Massas

eV eletron volts

GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectra ([Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HxC) a várias ligações]

HSQC Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hz Hertz

i-Bu isobutil

IV Espectroscopia no Infravermelho

J Constante de Acoplamento

LV Leishmaniose Visceral

m multipleto

n-Pr Propil

Ph Fenil

ppm parte por milhão

PRPP Fosforribosil -1-pirofosfato

RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

RMN¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s singleto

t tripleto

TIC Cromatograma de Íons Totais

 t_R Tempo de retenção

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico e biológico da espécie Kielmeyera rugosa Choisy pertencente á família Clusiaceae, inédito na literatura. O estudo do caule, frutos e folhas levaram ao isolamento de 8 substâncias, sendo elas: 5-hidroxi-6-(3metil-1-oxobutil)-4-fenil-6',6'-dimetilpirano (2', 3': 7,8)-cumarina; 7-hidroxi-8-(2*metil-1-oxobutil)-2'-(2-hidroxiisopropil)* dihidrofurano-(5',4': 5.6)-4-propil 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6',6'-dimetilpirano cumarina: (2',3': 8)-cumarina; 5-hidroxi-6-(2-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-6', 7. 6'dimetilpirano (2', 3': 7,8)-cumarina; 5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-6', 6'-dimetilpirano (2', 3': 7,8)-cumarina; 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-8-(2'hidroxi-3'-metil-3'-butenil)-4-fenilcumarina, lupeol e α-amirina. As estruturas moleculares das substâncias foram determinadas através da análise dos dados espectrais de RMN (¹H, ¹³C, DEPT e técnicas bidimensionais) e IV. Com os extratos e frações obtidos foram realizados testes bioquímicos frente à enzima GAPDH de Trypanosoma cruzi e APRT de Leishmania donovani, das quais algumas apresentaram inibição maior do que 80%, indicando conter substâncias potencialmente ativas no combate a Doença de Chagas e Leishmaniose. Também foi investigada a composição química dos voláteis das folhas, frutos e flores de K. rugosa. As análises através de CG/EM permitiram verificar que, nas folhas e frutos os sesquiterpenos não oxigenados são os componentes majoritários. Já a composição química dos voláteis das flores, os principais compostos encontrados pertencem à classe dos benzénoides. Assim, este trabalho vem contribuir para o conhecimento químico de K. rugosa. Os nossos resultados foram discutidos em comparação com estudos similares de outras espécies de Clusiaceae.

Palavras-chaves: Kielmeyera rugosa; atividade biológica; Clusiaceae; cumarinas.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical and biological study of the *Kielmevera* rugosa Choisy belongs to family Clusiaceae. Although several phytochemical studies of other Kielmeyera species are known, up to now, there are no chemical investigations from this specie. The phytochemical study of bark, fruits and leaves allowed the isolation of 8 substances: 5-hydroxy-6-(3-mehyl-1-oxobutyl)-4-phenyl-6',6'-dimethylpyran(2',3':7,8)-coumarin;7-hydroxy-8-(2-methyl-1-oxobutyl)-2'-(2hydroxy isopropyl) dihydrofuran-(5',4':5,6)-4-propyl coumarin; 5- hydroxy - 6-(4cinamoyl- 3-methyl-1-oxobutyl)-4-phenyl-6',6'-dimethylpyran (2',3': 7,8)-coumarin; 5-hydroxy-6-(2-methyl-1-oxobutyl)-4-n-propyl- 6', 6'-dimethylpyran (2',3': 7,8)-5-hydroxy-6-(3-methyl-1-oxobutyl)-4-n-propyl-6', 6'-dimethylpyran coumarin: (2',3':7,8)-coumarin; 5,7-dihydroxy-6-(3-methyl-1-oxobutyl)-8-(2'-hydroxy-3'*methylbut-3-enyl)-4-phenylcoumarin, lupeol and \alpha-amirin.* The molecular structures of the substances were determined by the analysis of the respective spectral data of NMR (1D- and 2D-experiments) and IR. The extracts and fractions of K. rugosa were submitted to the test of enzymatic inhibitory activities against glicossomal GAPDH from Trypanosoma cruzi and APRT from Leishmania donovani. Some fractions displayed relevant inhibitory activity (% inhibitory activity > 80%), suggesting that in this fractions have tripanocidal and leishmanicidal agents. The essential oils from the leaves, fruits and flowers of K. rugosa were obtained by hydrodistillation and analysed by GC/MS. Thus, it was possible to verify that sesquiterpenes hydrocarbons are the major compounds in the oils of leaves and fruits. On the other hand, the chemical composition of the flower essential oil was significantly different from that of the leaves and fruits in that benzenoid compounds were present in a high percentage. So, this work contributes to the chemotaxonomy of K. rugosa and the results are discussed in comparison to those obtained in similar studies of other species of Clusiaceae.

Keywords: Kielmeyera rugosa; biological activity; Clusiaceae; coumarins

Parte



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

1.1.1 Importância

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana, e desde os primórdios, as plantas representam a principal fonte de agentes terapêuticos. Com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar, desde o século XIX, a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos.

No entanto, o potencial das plantas superiores como fonte de novas drogas é ainda muito pouco explorado. Dentre as 350.000-500.000 espécies de plantas existentes, apenas uma pequena percentagem tem sido investigada fitoquimicamente e a fração submetida à "screening" biológico ou farmacológico é ainda menor [HAMBURGER *et al.*, 1991].

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. De fato, os produtos naturais são de grande importância para o desenvolvimento de novas drogas (Figura 01); e a medicina popular é responsável por cerca de 75% das recomendações de plantas ativas estudadas e empregados na indústria farmacêutica [YUNES *et al.*, 1998]. As plantas medicinais são usadas basicamente de duas formas diferentes: como misturas complexas contendo uma grande variedade de compostos (infusões, óleos essenciais, tinturas, etc.) e como fontes de compostos puros, princípios ativos quimicamente definidos.



Figura 01: Diferentes fontes de agentes terapêuticos.

Nos últimos anos, vem sendo observado um grande interesse no isolamento de compostos bioativos de plantas, principalmente pela dificuldade de produção e comercialização de medicamentos úteis na forma sintética, além da possibilidade de serem utilizados como protótipos na síntese de compostos mais eficazes e/ou menos tóxicos. Depois de algumas décadas do século XX, a química de produtos naturais passou a representar a principal linha de pesquisa para as descobertas de novos agentes anticancerígenos [HOSTETTMANN *et al.*, 2003].

Nos Estados Unidos, entre 1983 e 1994, 60% dos medicamentos anticancerígenos aprovados eram de origem natural e, entre estes, muitos constituem compostos do metabolismo secundário de vegetais superiores [HOSTETTMANN *et al.*, 2003]. Sob este aspecto, é importante ressaltar que o sucesso das investigações na área de princípios ativos naturais depende, principalmente, do grau de interação entre a Botânica, a Química e a Farmacologia.

Atualmente, entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância, podemos mencionar a forscolina (Figura 02) obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores [De SOUZA, 1993], a artemisinina (Figura 02) presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica [KAMCHONWONGPAISON *et al.*, 1996], e o diterpeno anticancerígeno Taxol (Figura 02) isolado de plantas do gênero *Taxus* que, após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico,

constituindo-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões [KINGSTON, 1991; CORRÊA, 1995 e HORWITZ, 1994].



Figura 02: Estruturas da Artemisinina, Forscolina e Taxol.

1.1.2 Brasil: Biodiversidade

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, sendo considerado o país com maior biodiversidade, apresentando mais de 55.000 espécies catalogadas num total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2004) – entretanto, apenas 8% de suas espécies vegetais foram estudadas na busca de compostos bioativos e apenas 1.100 espécies foram avaliadas quanto suas propriedades medicinais [GARCIA *et al.*, 1996]. Cabe salientar que as oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies [SIMÕES *et al.*, 2004].

Dentre os seis principais biomas do Brasil estão o Cerrado e a Mata Atlântica. O Cerrado, cobrindo 22% do território nacional, é formado por diversos tipos de vegetação savânica que diferem entre si pela abundância relativa de espécies rasteiras e de árvores e arbustos, num total de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas dessa área. A Mata Atlântica, com apenas 7,3% de sua cobertura florestal original, possui ainda cerca de 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo 8.000 espécies endêmicas [MONTEIRO, 2006].

Assim, tendo como exemplo a devastação da Mata Atlântica, o ritmo atual de extinção das espécies vegetais pode fazer com que um grande

número de plantas com propriedades medicinais desapareça antes de ter seu valor reconhecido.

O Nordeste Brasileiro é ocupado em sua maioria por uma vegetação típica de semi-árido, caatinga, possuindo cerca de 600 espécies de plantas registradas, onde 180 são endêmicas, com várias espécies reconhecidas pela população local pelo seu valor medicamentoso [DRUMOND *et al.*, 2000], como o *Cymbopogon citratus* (capim santo), *Schinus terebinthifolius* (Aroeira da praia), *Ruta graveolens L.* (Arruda), *Lippia sp.* (Erva Cidreira), etc [Da SILVA, 2003].

1.2 A FAMÍLIA CLUSIACEAE

1.2.1 Ocorrência e Distribuição

A família Clusiaceae (Guttiferae), de acordo com os estudos de Engler, compreende 50 gêneros e 1200 espécies distribuídas em 6 subfamílias, que estão confinadas nos trópicos quentes e úmidos, sendo a principal exceção o gênero *Hypericum*, o qual ocorre amplamente nas regiões temperadas [BARROSO, 1978]. No Brasil, ela está representada em cerca de 21 gêneros e 183 espécies [CRUZ *et al.*, 1998].

1.2.2 Importância

Uma característica da família é a presença significativa de gêneros e espécies de interesse econômico, seja pelo uso como plantas ornamentais (como algumas espécies de *Clusia*), por fornecer frutos comestíveis como em *Garcinia* e *Platonia* (Figura 03), mas principalmente pelo seu valor terapêutico como *Hypericum perforatum*, que apresenta atividade antidepressiva [HOSTETTMANN *et al.*, 1998], *Calophyllum lanigerum* (Figura 03), da qual se extrai o (+)-Calanolídeo A, candidato à droga frente HIV-1, incluindo linhagens resistentes ao AZT [HOSTETTMANN *et al.*, 1998] e *Garcinia kola* que possui atividade antimicrobiana, etc.



Figura 03: (+)-Calanolídeo A, extraído de Calophyllum lanigerum, os frutos comestíveis de Garcinia e Platonia.

O estudo da constituição química de várias espécies de Clusiaceae brasileiras mostrou, além dos triterpenóides comuns, as xantonas, benzofenonas, "4-fenil" e "4-alquil" cumarinas como seus constituintes predominantes [GOTTLIEB *et al.*, 1968].

A família Clusiaceae pode ser considerada uma fonte de substâncias potencialmente ativas, uma vez que as xantonas apresentam várias atividades farmacológicas, tais como antidepressiva, diurética, antiviral, antileucêmica, antiúlcera, antitumoral, antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana [PERES & NAGEM, 1997] e moluscicida [PINHEIRO *et al*, 2003].

Embora existam vários grupos de pesquisa estudando as várias partes de plantas pertencentes à família Clusiaceae, tanto do ponto de vista fitoquímico [PORTO *et al.*, 2000; FULLER *et al.*, 1999 e HENRY *et al.*, 1999] quanto da atividade biológica [IINUMA *et al.*, 1996], muito pouco se sabe sobre a composição química dos frutos, látex e óleos essenciais [NOGUEIRA *et al.*, 2001; BERTOLI *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2000].

1.2.3 O Gênero Kielmeyera

1.2.3.1 Importância

O gênero *Kielmeyera* é constituído por cerca de 71 espécies distribuídas por toda América do Sul, principalmente no Brasil [SULTANBAWA *et al.*, 1980], sendo encontrada desde a região Nordeste até o Sudeste. Popularmente são conhecidas como "pau-santo", "rosa-do-campo" e "malva-do-campo" [PINHEIRO *et al.*, 2003 e GOTTLIEB *et al.*, 1971]. A figura 04 mostra fotos da espécie *Kielmeyera rugosa* Choisy, conhecida popularmente como "pau-santo".



Figura 04: Fotos de Kielmeyera rugosa Choisy

As plantas do gênero *Kielmeyera* vêm se destacando na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos, etc. [ALVES *et al.*, 2000]. Vários trabalhos científicos já foram realizados evidenciando as importantes atividades farmacológicas e biológicas apresentadas por este gênero, o qual se caracteriza pela presença marcante de xantonas e "4-fenil" e "4-alquil" cumarinas, indicando serem marcadores taxonômicos deste gênero [CRUZ *et al.*, 2001].

As xantonas são descritas na literatura como uma classe de substância com amplo espectro de atividades biológicas. Entre os estudos mais promissores, podemos citar a inibição da enzima monoamino-oxidase (MAO), a qual está associada à atividade antidepressiva [BENNET *et al*, 1989], além

de ação antiinflamatória, antiviral, antimicrobiana, antifúngica e citotóxica [PINHEIRO *et al*, 2003].

Além das xantonas, na literatura são encontrados estudos promissores com as cumarinas. Apresentam atividade antiprotozoária "in vitro", especificamente contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, da cumarina 4- (1-metilpropil) - 5,7 - dihidroxi - 8 - (4 - hidroxi - 3 - metilbutiril)- 6 - (3 - metilbut - 2 - enil) cromen-2-ona (Figura 05), isolada de *Kielmeyera albopunctata*. Esta cumarina mata 80% dos parasitas após 24h de contato com o sangue infectado [SCIO *et al.*, 2003]. A cumarina dafnetina (Figura 05), embora não isolada de *Kielmeyera*, apresenta atividade antimalárica, demonstrada "in vitro" contra *Plasmodium falciparum* provocando redução de 60% da atividade da enzima superóxido dismutase, além de diminuir a síntese de DNA do parasita [MU *et al.*, 2003].

As cumarinas também apresentam atividades anticancerígena [ITOIGAWA *et al.*, 2001], como a "GUT -70" (Figura 05), isolada da casca do caule de *Calophyllum brasiliense* [NOLDIN *et al.* 2006]; anti-HIV [UCHIUMI *et al.*, 2003]; antiplasmódica *in vitro* [KOHLER *et al.*, 2001]; fungicida [ARNOLDI *et al.*, 1986] etc.



Figura 05: 4- (1-metilpropil) - 5,7 - dihidroxi - 8 - (4 - hidroxi - 3 - metilbutiril)- 6 - (3 - metilbut - 2 - enil) cromen-2-ona (1), dafnetina (2) e "GUT-70" (3)

1.2.3.2 Quimiotaxonomia

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos e ambientais, tais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de vários outros [CARDOSO *et al.*, 2007].

Se as interações entre os organismos vivos ocorressem simplesmente através da forma, uma classificação taxonômica baseada somente nos caracteres anatômicos e morfológicos seria suficiente. Desse modo, a variação estrutural e a distribuição de diferentes classes de metabólitos secundários são utilizadas como critério para determinação das relações evolutivas e taxonômicas. Contudo, é de grande importância à inclusão do maior número de informação química [De ANDRADE, 1997].

Em espécies de *Kielmeyera* de ocorrência do Cerrado (Savana) do Planalto Central Brasileiro e regiões vizinhas que já foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico, apresentaram como principais constituintes as xantonas [CORTEZ *et al.*, 1998]. A tabela 01 descreve as principais espécies de *Kielmeyera* de ocorrência do Cerrado e os compostos isolados.



Tabela 01: Compostos isolados de espécies de Kielmeyera do Cerrado.

* Encontrada na Floresta Atlântica nos arredores do Rio de janeiro - Brasil


*Conhecida como "Pau-Santo", encontrada no Planalto Central - Brasil.



*Conhecida como "Rosa-do-Campo", encontrada nas regiões Centro e Sudoeste.

**Encontrada nas regiões Centro, Sudoeste e Noroeste.

*** Encontradas nas regiões serranas próximo a Belo Horizonte.



*Espécie campestre da região Serrana de Minas Gerais

**Encontrada nas regiões Centro e Sudoeste do Brasil.



*Regiões campestres da Chapada Diamantina-Bahia.

** Encontradas em Cerrado Savânico.

Dentre as espécies citadas na tabela anterior, a *Kielmeyera rosea* constitui a única espécie estudada nas regiões do Cerrado e proximidades, na qual não foi possível encontrar xantonas [SILVA *et al*; 1968].

Por outro lado, os trabalhos mais recentes com espécies do gênero *Kielmeyera* vêm sendo desenvolvidos com espécies de ocorrência em Restinga, que mostram as cumarinas, principalmente as "4-fenil" e "4-alquil", como seus principais constituintes (Tabela 02).



Tabela 02: Compostos isolados de Kielmeyera da restinga brasileira.

* Encontradas nas regiões de Ilhéus - Bahia Brasil.

** Encontrada na costa Baiana - Brasil, coletada nas dunas.

*** Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo - Brasil.



*Encontrada na costa Baiana – Brasil, coletada nas dunas.

** Encontrada nas regiões da Chapada Diamantina.



** Encontrada nas regiões da Chapada Diamantina.

É interessante mencionar que as cumarinas vêm sendo caracterizadas no gênero *Kielmeyera* pela presença de um esqueleto 5,7 - dioxigenado, possuindo um substituinte fenila ou alquila ligado ao carbono C-4 e substituintes acila ou prenila ligados aos carbonos C-6 ou C-8 [NOLDIN *et al.*, 2006]. Estas características estão presentes principalmente nos gêneros *Mammea* e *Mesua* (Clusiaceae), sendo raras em outros gêneros. Com exceção para as espécies *Calophyllum dispar* e *Calophyllum brasiliense*, na qual encontram-se cumarinas do tipo "mammea" [RAAD *et al.*, 2006].

1.2.3.3 Cumarinas: Biogênese

As cumarinas derivam do metabolismo da fenilalanina, gerando o ácido *p*-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico), que é, posteriormente, hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação). O derivado *orto*-hidroxilado sofre, então, isomerização fotocatalizada da ligação dupla ($E \rightarrow Z$). O isômero Z lactonizase, espontaneamente, produzindo a umbeliferona (7-hidroxicumarina) [SIMÕES *et al.*, 2004].

Em alguns casos a glicosilação do ácido cinâmico ocorre, impedindo a lactonização, fazendo com que a cumarina surja após injúria tecidual e hidrólise enzimática. Quando isso ocorre, o ácido cinâmico glicolisado sofre ação de uma glicosidase e a molécula de açúcar é retirada. O ácido cinâmico, então, esterifica formando a cumarina. A formação de di e trihidroxicumarinas e seus éteres envolvem a hidroxilação da umbeliferona (7-hidroxicumarina) e não a lactonização dos ácidos cinâmicos correspondentes [BRUNETON, 1995].

A prenilação do anel benzênico nas posições C-6 ou C-8 do derivado 7hidroxicumarina é o passo inicial na biogênese das furanocumarinas e piranocumarinas. A ciclização dos derivados C-6 ou C-8 - isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidróxido em C-7 ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentila. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto poderá ser o hidroxi-iso-propil-dihidrofurano cumarina ou o hidroxi-dimetil-di-hidropirano cumarina. A prenilação na posição C-6 origina furanos e piranocumarinas lineares e na posição C-8 homólogos angulares [SIMÕES *et al.*, 2004].

A maioria das cumarinas é derivada biogeneticamente da via do ácido chiquímico (Esquema 01), mas um número significativo delas parece derivar de uma via mista (ácido chiquímico e acetato) como as 4-fenilcumarinas. As 4-*n*-propilcumarinas, por exemplo, derivam totalmente da via do acetato [SIMÕES *et al.*, 2004].

18



Esquema 01: Biossíntese das cumarinas via ácido chiquímico.

1.3 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais fazem parte da vida do homem há vários séculos. Há relatos históricos da utilização de plantas aromáticas pelos povos civilizados e primitivos na medicina, culinária e em cerimônias religiosas [CARDOSO *et al.*, 2007].

Estas substâncias de origem natural, conhecidas como essências ou óleo essencial são constituídas por moléculas orgânicas voláteis de no máximo 300 daltons e, em geral, compreendem misturas de várias classes de produtos naturais, principalmente terpenóides (especificamente monoterpenos- C_{10} , e sesquiterpenos- C_{15} , embora diterpenos- C_{20} possam também estar presentes), derivados de ácidos graxos, benzenóides e aminóides; e cada uma delas pode conter os mais diversos grupos funcionais (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres).

Os terpenóides são constituídos de unidades de cinco carbonos (unidades isopreno), e a nomenclatura e as classificações refletem o número de unidades isoprenos presentes e as formas de ciclização, apresentando diversos esqueletos cíclicos ou não. Os monoterpenos constituem uma classe simples de isoprenoides com estrutura de 10 carbonos, constituída de 2 unidades isopreno, sendo principalmente encontradas nos óleos essenciais. Constituem a subclasse que inclui compostos muito comuns como citral, linalol, cânfora, carvacrol, dentre outros de ampla utilização na indústria de cosméticos, alimentícia, além de apresentarem importantes propriedades farmacológicas [SIMÕES *et al.*, 1999]. Com relação aos sesquiterpenos, são conhecidos mais de cem esqueletos diferentes, os quais podem ser encontrados em plantas, musgos, fungos e algas. Geralmente ocorrem junto aos monoterpenos nos óleos essenciais, sendo que sua acumulação nas plantas superiores ocorre em estruturas secretoras especializadas, as glândulas de óleo [Da SILVA, 2005].

De acordo com a família as quais pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos, os quais estão associados a várias funções necessárias á sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo um papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores [SIANI *et al.*, 2000].

Os estudos da avaliação da atividade biológica dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas revelaram que alguns deles exibem atividades interessantes tais como inseticida, antibacteriana, antifúngica, antituberculose, espasmolítica e antiplasmódica. Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação como agentes antimicrobianos [ONAWUNMI *et al.*, 1986], e os estudos nesta área mostram, claramente, seu potencial em procedimentos médicos e aplicações nas indústrias de cosmético, alimentação e farmacêutica.

Numa analogia ao papel dos terpenóides nas plantas, a pesquisa de óleos essenciais como agentes repelentes de insetos vem revelando o potencial destes compostos nesta área. Além disso, são relativamente poucos os dados publicados para outros tipos de testes, sendo que alguns estudos têm se concentrado exclusivamente em um óleo ou um microrganismo. Ainda mais escassos são os relatos sobre a atividade antiinflamatória e analgésica dos óleos essenciais, especialmente de plantas do Nordeste brasileiro, embora os estudos com o óleo essencial de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) tenham culminando, recentemente, na produção de um fármaco comercializado com sucesso no Brasil [PASSOS *et al.*, 2006].

1.3.1 Importância Econômica

A produção de óleo essencial no mundo é estimada por volta de 45–50 mil toneladas, atingindo valores de U\$1bilhão anuais. Alguns países têm grande potencial de produção de óleos essenciais, entre estes se destaca o Brasil que está incluido entre os sete países responsáveis por 85% da produção mundial. Estão presentes em muitos produtos de uso diários tais como componentes de sabonetes, desifentantes, descongestionantes, conservantes, etc. [VERLET, 1993].

Os países em desenvolvimento são as principais fontes de óleos brutos, devido à existência de políticas de incentivos à diversificação da produção e, também, no incremento do volume de exportações ou redução de importações, procurando equilibrar a balança comercial. Assim vários programas de produção de óleos essenciais têm sido iniciados por organizações governamentais e internacionais em todo o mundo, não só visando espécies tradicionais como também novas espécies [MARTINS, 2002]. Além disso, a composição química do óleo essencial tem sido usada na taxonomia e filogenia de algumas espécies.

O maior problema no desenvolvimento das indústrias produtoras de óleo é a grande concorrência com os similares sintéticos. Felizmente, por meio de novas exigências do mercado por produtos naturais, em detrimento dos sintéticos, algumas empresas vêm favorecendo o uso de flavorizantes naturais [MARTINS, 2002]. Além disso, devido ao crescente interesse da população por terapias alternativas e produtos naturais, o mercado de plantas aromáticas vem crescendo de forma expressiva.

22

1.4 DOENÇAS TROPICAIS

O desenvolvimento tem sido historicamente atribuído à tarefa de melhorar a qualidade de vida da população. No entanto, no Brasil, o que se tem observado é um aumento da incidência de doenças infecciosas que estão diretamente ligadas às precárias condições de vida, e cuja disseminação está relacionada com a degradação ambiental, permitindo maior circulação dos parasitas.

O modelo de desenvolvimento atualmente adotado tem-se caracterizado por ausência de políticas que levem em consideração as condições em que vive a população brasileira e que promovam a organização do espaço social. Sem isso, o que tem ocorrido é a ocupação de novas áreas e a invasão do ambiente natural de forma desordenada, promovendo mudanças que levam ao desequilíbrio ecológico, expondo as populações ao risco de contrair infecções por microorganismos que circulam nos seus focos naturais [TAVARES *et al.*, 1999].

Dentre as doenças infecciosas no Brasil, encontram-se as Leishmanioses e a Doença de Chagas, as quais constituem um problema sério para a saúde pública.

1.4.1 Doença de Chagas

A Tripanossomíase americana, ou Doença de Chagas é comum em todos os países da América Central e do Sul (Figura 06), afetando cerca de 17 milhões de indivíduos, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), ameaçando um quarto da população da América Latina.

No Brasil esta Doença afeta quase todo o território nacional, com exceção da Região Amazônica e da Mata Atlântica. A endemicidade é maior nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul. Assim, estima-se que haja cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com

uma população de risco em torno de 20 milhões de habitantes [GOLDENBERG & KRIEGER, 1997].

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, este mal é a maior doença parasitária da América Latina e a maior causa de doenças do coração neste continente.





Figura 06: Distribuição geográfica da Tripanossomíase americana.

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado Trypanosoma cruzi pertencente à família Trypanosomatidae (Figura 07). Os insetos são hematófagos obrigatórios e são capazes de transmitir o protozoário ao homem ao se alimentar do sangue deste último. No Brasil, o inseto transmissor (Figura 07) recebe comumente a denominação de "barbeiro" [FERNANDES, 1997].





Figura 07: Protozoário na forma tripomastigota (1) e do inseto vetor (2).

A transmissão da Doença ocorre principalmente por três mecanismos: através da picada do barbeiro, por transfusão de sangue contaminado e por transmissão congênita, sendo as duas últimas as principais causas de contaminação [GOLDENBERG & KRIEGER, 1997].

Desde a descoberta da Doença pelo médico sanitarista Carlos Chagas, em 1909, até os dias atuais, são realizadas inúmeras pesquisas direcionadas para o seu tratamento. Entretanto, os únicos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento são o benzonidazol e nifurtimox (Figura 08) que apresentam baixa eficiência e fortes efeitos colaterais [ROCHA, 2005].



Figura 08: Estrutura dos fármacos benzonidazol e nifurtimox

A resistência natural do parasita na fase crônica ao tratamento, torna imprescindível a descoberta de novas drogas naturais, semi-sintéticas e sintéticas mais eficazes e menos tóxicas.

1.4.2 As Leishmanioses

Estima-se que estas parasitoses atinjam cerca de 350 milhões de habitantes no mundo, aumentando o número de casos a cada ano, tornando assim, um problema sério para saúde mundial.

É uma doença parasitária causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania,* que por suas características clínico-epidemiológicas, podem ser classificadas como Leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa ou mucocutânea, cutânea difusa e visceral.

A Leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania donovani*, atingindo cerca de 500 mil casos por ano no mundo, com a grande maioria ocorrente na Índia [ROCHA, 2005].

No Brasil, há uma prevalência da Leishmaniose mucocutânea, apesar da expansão geográfica da Leishmaniose Visceral (LV) nas regiões Sudeste, Centro Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Norte (Figura 09).



Figura 09: Distribuição dos casos de LV, segundo região de ocorrência no Brasil.

Entre os fármacos disponíveis para a doença, encontram-se os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) (Figura 10), que apresentam vários efeitos tóxicos renais e cardíacos. Uma segunda linha é empregada no tratamento de casos mais resistentes, como a Anfatericina B (Figura 11). Entretanto, características indesejáveis (toxicidade severa) destas substâncias, aliadas ao aparecimento de forma resistente de *Leishmania*, têm aumentado a necessidade de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos.



Figura 10: Estruturas das Glucantime e Pentostam.



Figura 11: Estrutura da Anfatericina B.

Uma outra droga promissora como futuro fármaco, podendo ser administrada via oral para o tratamento da doença, é a miltefosina (Figura 12). Entretanto, seu mecanismo de ação contra a *leishmania* ainda não é bem compreensível. Sabe-se, apenas, que esta droga é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita e que apresenta poucos efeitos colaterais, sendo eles: vômito e diarréia.

Em relação à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), estudos utilizando a miltefosina no tratamento da forma cutânea da doença resultaram em boa eficácia contra *Leishmania panamensis*, mas não para *L. braziliensis*. Portanto, são necessários maiores estudos com esta medicação para verificar sua eficiência em relação às espécies de L*eishmanias* existentes no Brasil [SOTO *et al.*, 2001].



Figura 12: Estrutura da Miltefosina

1.4.2.1 Sergipe: Ocorrência

Desde 1934, casos humanos de *Leishmaniose visceral* vêm sendo registrados no Estado de Sergipe. Entre 1932 e 1957, dos 330 casos de *L. visceral* identificado no Brasil, 26 eram de origem Sergipana.

Em 1983 foi feito um levantamento e mapeamento das espécies flebotomínicas existentes em Sergipe, constatando que o inseto vetor, o *Lutzomyia longipalpis* (Figura 13), encontra-se disseminado em 38 municípios distribuídos em todas as regiões do Estado.



Figura 13: Foto do inseto Lutzomyia longipalpis

A incidência da *L. visceral* no Estado de Sergipe vem aumentando nas últimas décadas em todas as suas regiões, desde o Sertão, passando pelo Agreste, até a região Leste (Figura 14), porém de forma mais acentuada nessa última [TAVARES *et al.*, 1999]. Isto resulta em um problema para a saúde pública do Estado de Sergipe, sendo indispensável a procura de novas drogas leishmanicidas que sejam mais eficazes e menos tóxicas.



Figura 14: Mapa da distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose visceral por município de Sergipe nas décadas de 70, 80 e 90.

Parte



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

✓ Estudo fitoquímico da espécie *Kielmeyera rugosa* Choisy da família
Clusiaceae encontrada no estado de Sergipe.

2.1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar os metabólitos secundários de *Kielmeyera rugosa* Choisy;
- Avaliar o potencial farmacológico dos extratos e das substâncias isoladas frente às enzimas APRT de *Leishmania donovani* e GAPDH de *Trypanosoma cruzi* na busca de compostos leishmanicidas e tripanocidas, respectivamente;
- Estudar a composição química do óleo essencial de *Kielmeyera* rugosa Choisy.

Parte



Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Identificação Estrutural

A identificação estrutural dos compostos isolados foi realizada através do uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 uni e bidimensionais, Infravermelho e por comparação com dados da literatura.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C (totalmente desacoplado e DEPT) uni e bidimensionais, foram obtidos em um espectrômetro BRUKER, modelo ARX200 e DRX400 de 4,7 e 9,4 Tesla (200 e 400 MHz para freqüência do hidrogênio), pertencente ao Departamento de Química da UFSCar, ou em um espectrômetro INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 Tesla, pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, sendo as amostras solubilizadas em clorofórmio deuterado e acetona deuterada, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, Spectrum BX com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr e janela de KBr.

3.1.2 Isolamento dos Metabólitos Secundários

Para fracionar os extratos e purificar as substâncias foram utilizadas colunas cromatográficas em sílica gel 60 (70-230 mesh) Merk. Na maior parte das vezes optou-se por um sistema de eluição gradiente de polaridade, mediante a utilização de hexano, acetato de etila finalizando sempre com

metanol. Alternativamente, para purificação dos extratos mais polares, foram utilizadas colunas empacotadas com Sephadex LH-20 da marca Sigma.

As frações obtidas das colunas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) empregando-se cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência em UV_{254 e} _{366nm}, da marca Macherey-Nagel e Merk. Para purificação de algumas substâncias foi utilizada a técnica de Cromatografia em Camada Preparativa (CCP), preparadas com sílica gel P/ UV_{254 e 366nm} Macherey-Nagel ou sílica gel 60 F₂₅₄ Merk.

A revelação das substâncias presentes nas placas cromatográficas foi feita por irradiação em lâmpada de $UV_{254 e 366nm}$ seguida da imersão da mesma numa solução de *p*-anisaldeído (álcool etílico absoluto, ácido sulfúrico, *p*-anisaldeído e ácido acético na proporção de 90:5:5:1 em volumes, respectivamente) e subseqüente aquecimento a 300°C, com pistola aquecedora.

3.1.3 Análise dos Óleos Essenciais

Para a análise dos óleos essenciais foi utilizada Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) através de um cromatógrafo Shimadzu modelo QP5050A, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme), usando-se Hélio como gás de arraste (1,5 mL.min⁻¹). As condições empregadas foram: 40°C por 2 minutos, aumentando até 220°C a 4°C.min⁻¹, então aquecida até 280°C a 20°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,5 scans.seg ⁻¹ na faixa de *m/z* 40-550.

Os índices de retenção foram obtidos co-injetando a amostra do óleo com uma mistura de C_{10} - C_{24} de hidrocarboneto linear; índice de retenção de 700 à 999 foram obtidos por extrapolação. A percentagem de cada

componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

A identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectro de massas do sistema CG-EM (NIST107 e NIST21) e com outros espectros de massas da literatura [ADAMS, 1995].

$$IR = 100i \times \frac{Tr_{\chi} - Tr_{HA}}{Tr_{HP} - Tr_{HA}} + 100N$$

onde:

 Tr_x = Tempo de retenção do composto problema Tr_{HA} = Tempo de retenção do Hidrocarboneto anterior Tr_{HP} = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior N = Número de carbonos do hidrocarboneto posterior i = Diferença entre o número de carbono dos hidrocarbonetos anterior

e posterior

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

Os frutos, folhas, caule e flores de *Kielmeyera rugosa* Choisy foram coletados numa mata de restinga próxima ao Rio Pomonga em Santo Amaro das Brotas no Estado de Sergipe.

A coleta e identificação das espécies foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Adauto de Souza Ribeiro (DBI-UFS), Dr. Volker Bittrich e Dra. Maria do Carmo Amaral (IB-UNICAMP).

3.2.2 Obtenção dos Extratos

O material vegetal foi inicialmente disposto em finas camadas para secagem a temperatura ambiente e em seguida triturado em moinho de faca Willey.

A extração das folhas (163,41 g), caule (397,43 g) e frutos (504,71 g) foram realizados por processo de maceração, ficando submersos em metanol durante 30 dias. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, resultando assim nos respectivos extratos brutos: folhas (31,46 g), caule (20,88 g) e frutos (52,42 g).

3.2.2.1 Partição Líquido-Líquido

Do extrato bruto metanólico foram obtidos três novos extratos de polaridade distintas (partição hexânica, partição clorofórmica e partição acetato de etila), conforme o fluxograma 01.



Fluxograma 01: Procedimento para obtenção dos extratos particionados do frutos, caule e folhas.

Assim, foram obtidos a partir do extrato metanólico dos frutos: Partição Hexânica (4,44 g), Partição Clorofórmica (7,32 g) e Partição acetato de etila (2,28 g). Do extrato metanólico das folhas foram obtidos: Partição Hexânica (4,38 g), Partição Clorofórmica (7,19 g) e Partição acetato de etila (1,50 g), enquanto que do extrato metanólico do caule foram obtidos: Partição Hexânica (1,13 g), Partição Clorofórmica (1,70 g) e Partição acetato de etila (2,21 g).

3.3 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

3.3.1 Estudo dos Frutos

3.3.1.1. Partição Hexânica

Parte da partição Hexânica (2,04 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica-gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com 100 % de hexano, aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando com metanol. Foram coletadas 1243 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 42 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (Tabela 03). As primeiras frações coletadas (1 a 47) tratavam-se apenas de solvente, por isso não constam na tabela 03. É importante mencionar também que estão representadas na tabela apenas as amostras reunidas, por isso há a falta de seqüência relativa aos seus números das frações.

Frações	Código	Massa	Eluente	
48-57	FrH1	8,4 mg	Hexano: AcOEt (2%)*	
61-70	FrH2	11,9 mg		
71-89	FrH3	47,0 mg		
92-120	FrH4	61,4 mg		
121-155	FrH5	67,1 mg		
156-203	FrH6	95,2 mg		

Tabela 03: Frações obtidas da coluna da partição hexânica dos frutos (FrH).

Tabe	la 03: Contin	uação	
204-253	FrH7	43,7 mg	
254-276	FrH8	5,5 mg	
277-323	FrH9	52,7 mg	
318-340	FrH10	8,8 mg	
341-373	FrH11	13,4 mg	
374-398	FrH12	8,1 mg	
399-409	FrH13	2,6 mg	
410-455	FrH14	12,0 mg	
456-478	FrH15	3,5 mg	Hexano: AcOEt (3%)*
510-525	FrH16	11,7 mg	
528-566	FrH17	24,2 mg	
570-608	FrH18	37,1 mg	
609-652	FrH19	56,6 mg	
656-734	FrH20	85,3 mg	
735-784	FrH21	40,8 mg	
785-801	FrH22	15,5 mg	
826-842	FrH23	23,2 mg	
843-873	FrH24	42,2 mg	
874-892	FrH25	31,0 mg	
900-991	FrH26	120,2 mg	
996-1050	FrH27	15,5 mg	
1051-1059	FrH28	1,1 mg	
1060-1079	FrH29	9,1 mg	Hexano: AcOEt (20%)* (1065**)
1080-1087	FrH30	6,0 mg	
1088-1090	FrH31	4,2 mg	
1091-1113	FrH32	2,6 mg	
1114-1133	FrH33	14,2 mg	
1134-1168	FrH34	24,6 mg	
1169-1192	FrH35	14,7 mg	
1193-1204	FrH36	5,2 mg	
1205-1211	FrH37	3,1 mg	
1212-1228	FrH38	8,3 mg	

1229-1240	FrH39	5,0 mg	
1241	FrH40	15,9 mg	Hexano: AcOEt (50%)*
1242	FrH41	16,0 mg	Acetato de etila (100%)*
1243	FrH42	736,9 mg	Metanol (100%)*

Tabela 03: Continuação

*Porcentagens da mistura de solventes

** Mudança de polaridade

3.3.1.2 Partição Clorofórmica

Parte da partição clorofórmica (1,38 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica-gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com hexano (100 %), aumentando-se a polaridade do eluente pela adição de acetato de etila e finalizando com metanol. As 615 frações obtidas num volume de 5 mL, desta coluna, foram reunidas em 26 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (Tabela 04).

Frações	Código	Massa	Eluente
1-12	FrC1	5,0 mg	Hexano: AcOEt (3%)*
13-15	FrC2	8,0 mg	
16-20	FrC3	8,0 mg	
21-26	FrC4	5,0 mg	
27-36	FrC5	15,0 mg	
37-46	FrC6	9,0 mg	
47-58	FrC7	14,0 mg	
59-78	FrC8***	22,0 mg	
79-134	FrC9	13,8 mg	
135-159	FrC10	4,3 mg	
160-236	FrC11	26,0 mg	
237-279	FrC12	21,0 mg	
280-302	FrC13	11,0 mg	
303-319	FrC14	11,5 mg	Hexano: AcOEt (5%)*
320-356	FrC15***	26,5 mg	

Tabela 04: Frações obtidas da coluna da partição clorofórmica dos frutos (FrC).

357-407	FrC16	37,6 mg	Hexano: AcOEt (10%)* (401**)
408-435	FrC17	41,0 mg	
436-459	FrC18	67,4 mg	Hexano: AcOEt (20%)*
460-476	FrC19	35,7 mg	
477-514	FrC20	34,8 mg	
515-546	FrC21	14,3 mg	
547-562	FrC22	24,8 mg	
563-589	FrC23	75,1 mg	
590-613	FrC24	22,6 mg	
614	FrC25	108,8 mg	Acetato (100%)*
615	FrC26	485,9 mg	Metanol (100%)*

Tabela 04: Continuação

*Porcentagens da mistura de solventes

** Mudança de polaridade

*** Submetida à cromatografia em camada preparativa

As frações FrC8 e FrC15 foram submetidas à purificação por Cromatografia em Camada Preparativa (20 x 20 cm) de acordo com os fluxogramas 02 e 03, respectivamente.



Fluxograma 02: Subfrações obtidas no processo de purificação da fração FrC8 por CCP.



Fluxograma 03: Subfrações obtidas no processo de purificação da fração FrC15 por CCP.

3.3.2 Estudo das Folhas

3.3.2.1 Partição Hexânica

Parte da partição Hexânica (1,50 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica-gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com hexano (100 %), sendo a polaridade do eluente aumentada pela adição de acetato de etila e finalizando com metanol. Foram obtidas 639 frações num volume de 5 mL, a qual foram reunidas em 21 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (Tabela 05).

É importante mencionar também que estão representadas na tabela apenas as amostras reunidas, por isso há a falta de seqüência relativa aos seus números das frações.

		1 3		
Frações	Código	Massa	Eluente	
1-31	FoH1	13,2 mg	Hexano: AcOEt (2%)*	
32-44	FoH2	188,4mg		
45-47	FoH3	7,0mg		
48-76	FoH4	27,3 mg		

Tabela 05: Frações obtidas da coluna da partição Hexânica das folhas (FoH).

Tabela 05: Continua	ção
---------------------	-----

77-79	FoH5	3,9 mg	
80-106	FoH6	34,8mg	
107-114	FoH7	16,1 mg	
115-129	FoH8**	45,2 mg	
130-150	FoH9**	98,7 mg	Hexano: AcOEt (3%)*
151-155	FoH10	16,0 mg	
156-178	FoH11	25,9mg	
182-194	FoH12	11,3 mg	
196-234	FoH13	32,6 mg	Hexano: AcOEt (4%)*
235-247	FoH14	19,1 mg	Hexano: AcOEt (5%)*
248-286	FoH15	16,0 mg	
290-326	FoH16	26,8 mg	
328-358	FoH17	18,4 mg	
360-454	FoH18	44,0 mg	Hexano: AcOEt (7%)*
520-568	FoH19	10,5 mg	Hexano: AcOEt (10%)*
620-638	FoH20	10,2 mg	Hexano: AcOEt (50%)*
639	FoH21	-	Metanol (100%)*

*Porcentagens da mistura de solventes

** Frações reunidas e submetidas à cromatografia em camada preparativa

As frações FoH8 e FoH9 foram reunidas, pois apresentavam similaridade quando analisadas por CCDC e mesmas características no seu aspecto físico. O fluxograma 04 corresponde à purificação, por Cromatografia em Camada Preparativa (CCP) das frações reunidas *FoH8* e *FoH9*.



Fluxograma 04: Subfrações obtidas no processo de purificação das frações FoH8 e FoH9 por CCP.

3.3.2.2. Partição Clorofórmica

Parte da partição clorofórmica (1,196 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica-gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com hexano (100 %), sendo a polaridade do eluente aumentada pela adição de acetato de etila e finalizada com metanol. Desta coluna foram obtidas 580 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 37 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisados por CCDC (Tabela 06).

Frações	Código	Massa	Eluente
01-09	FoC1	2,9 mg	Hexano: AcOEt (2 %)*
10-14	FoC2	1,8 mg	
15-17	FoC3	0,8 mg	
18-42	FoC4	0,2 mg	
43-45	FoC5	0,1 mg	
46-51	FoC6	0,2 mg	
52-65	FoC7	2,2 mg	
66-76	FoC8	0,9 mg	
77-79	FoC9	0,4 mg	

Tabela 06: Frações obtidas da coluna da partição Clorofórmica das folhas (FoC).

Tabela	<i>06:</i>	Continu	ıação
--------	------------	---------	-------

80-119	FoC10	3,7 mg	
120-141	FoC11	0,4 mg	
142-154	FoC12	20,0 mg	
155-185	FoC13	2,4 mg	
186-203	FoC14	2,2 mg	
204-234	FoC15	2,8 mg	
235-284	FoC16	3,2 mg	Hexano: AcOEt (5 %)*
285-291	FoC17	0,8 mg	Hexano: AcOEt (10 %)*
292-299	FoC18	1,8 mg	
300-338	FoC19a**	11,3 mg	
300-338	FoC19b**	20,1 mg	
339-371	FoC20	32,1 mg	Hexano: AcOEt (15 %)*
372-393	FoC21	38,9 mg	
394-412	FoC22	24,5 mg	
413-415	FoC23	4 mg	
416-419	FoC24	8,3 mg	
420-443	FoC25	21,5 mg	
444-449	FoC26	2,4 mg	
450-464	FoC27	7,0 mg	Hexano: AcOEt (20 %)*
465-477	FoC28	6,5 mg	
478-508	FoC29	12,5 mg	
509-516	FoC30	3,1 mg	
517-535	FoC31	9,2 mg	Hexano: AcOEt (30 %)*
536-547	FoC32	10,4 mg	
548-557	FoC33	7,2 mg	Hexano: AcOEt (50 %)*
558-567	FoC34	37,7 mg	
568-570	FoC35	9,7 mg	
571-579	FoC36	13,2 mg	
580	FoC37	146,0 mg	Metanol (100%)*

*Porcentagens da mistura de solventes **Frações que, quando analisadas em CCDC apresentaram-se semelhantes em Rf, mas diferenciavam-se quanto ao aspecto morfológico. A reunião destas frações foi feita de acordo com o aspecto morfológico dentro deste intervalo (330-338).

3.3.2.3 Partição Acetato de Etila

Parte da partição Acetato de Etila (0,855 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com Sephadex® LH-20, a pressão ambiente, eluída de forma isocrática com metanol. Foram obtidas 33 frações num volume de 5 mL, sendo que as frações 33 à 55 foram reunidas e denominadas de FoA33 (Tabela 07).

Frações	Código	Massa
1	FoA1	37,7 mg
2	FoA2	48,2 mg
3	FoA3	48,4 mg
4	FoA4	49,2 mg
5	FoA5	68,4 mg
6	FoA6	62,0 mg
7	FoA7	85,6 mg
8	FoA8	79 mg
9	FoA9	80,2 mg
10	FoA10	77,5 mg
11	FoA11	50,6 mg
12	FoA12	27,6 mg
13	FoA13	15,5 mg
14	FoA14	32,8 mg
15	FoA15	19,3 mg
16	FoA16	18,8 mg
17	FoA17	12,8 mg
18	FoA18	11,7 mg
19	FoA19	10,3 mg
20	FoA20	7,8 mg
21	FoA21	6,7 mg

Tabela 07: Frações obtidas da coluna da partição Acetato de Etila das folhas (FoA).

22	FoA22	5,8 mg
23	FoA23	5,7 mg
24	FoA24	5 mg
25	FoA25	4 mg
26	FoA26	3,4 mg
27	FoA27	2,9 mg
28	FoA28	2,2 mg
29	FoA29	2 mg
30	FoA30	1,1 mg
31	FoA31	1,3 mg
32	FoA32	1,1 mg
33	FoA33	7,1 mg

Tabela 07: Continuação

A fração FoA6 foi purificada através de uma Cromatografia em Camada Preparativa (20 x 20 cm), de acordo com o fluxograma 05.



Fluxograma 05: Subfrações obtidas por CCP da fração FoA6.

3.3.3 Estudo do Caule

3.3.3.1 Partição Hexânica

Parte da partição Hexânica (504,1 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com hexano (100 %), aumentando a polaridade do eluente pela adição de

acetato de etila e finalizada com metanol. Foram obtidas 417 frações num volume de 5 mL, posteriormente reunidas em 26 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (Tabela 08).

Frações	Código	Massa	Eluente
1-24	CaH1	5,7 mg	Hexano: AcOEt (1%)*
25-28	CaH2	31,3 mg	
29-45	CaH3	15,4 mg	
46-70	CaH4	19,1 mg	
71-89	CaH5	3,4 mg	
90-107	CaH6	20,7 mg	
108-117	CaH7	8,2 mg	
118-188	CaH8	41,3 mg	
189-191	CaH9	16,7 mg	
192-219	CaH10	5,3 mg	
220-231	CaH11	4,8 mg	Hexano: AcOEt (2%)* 229**
232-239	CaH12	3,6 mg	
240-250	CaH13	3,2 mg	
251-263	CaH14	3,8 mg	Hexano: AcOEt (5%)* 254**
264-293	CaH15	6,6 mg	
294-305	CaH16	3,1 mg	Hexano: AcOEt (10%)*
306-314	CaH17	12,9 mg	
315-331	CaH18	51,6 mg	
332-339	CaH19	2,4 mg	
340-356	CaH20	5,3 mg	
357-375	CaH21	8,6 mg	Hexano: AcOEt (15%)* (354**)
376-386	CaH22	6,2 mg	
387-399	CaH23	1,0 mg	Hexano: AcOEt (30%)* 381**
400-407	CaH24	4,7 mg	
408-416	CaH25	43,2 mg	Acetato de etila (100%)*
417	CaH26	116,4 mg	Metanol (100%)*

Tabela 08: Frações obtidas da coluna da partição Hexânica do Caule (CaH).

*Porcentagens da mistura de solventes

** Mudança de polaridade
3.3.3.2 Partição Clorofórmica

Parte da Partição Clorofórmica (623,6 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel, a pressão ambiente. A eluição da coluna iniciouse com hexano (100 %), sendo a polaridade do eluente aumentada pela adição de acetato de etila, seguida por metanol. As 801 frações obtidas num volume de 5 mL, desta coluna, foram reunidas em 27 grupos, com base nos seus respectivos valores de RFs, quando analisadas por CCDC (Tabela 09).

Tabela 09: Frações obtidas da coluna da partição Clorofórmica do Caule (CaC).

Frações	Código	Massa	Eluente
1-35	CaC1	3,7 mg	Hexano: AcOEt (1%)*
36-96	CaC2	0,4 mg	Hexano: AcOEt (2%)* (49**)
97-124	CaC3	5,1 mg	
125-156	CaC4	0,5 mg	
157-175	CaC5	1,6 mg	
176-182	CaC6	1,0 mg	
183-219	CaC7	4,5 mg	Hexano: AcOEt (3%)* (188**)
220-227	CaC8	0,7 mg	
228-259	CaC9	2,7 mg	Hexano: AcOEt (5%)* (231**)
260-274	CaC10	1,5 mg	
275-297	CaC11	4,5 mg	Hexano: AcOEt (6%)* (278**)
298-313	CaC12	6,6 mg	
314-342	CaC13	9,4 mg	Hexano: AcOEt (8%)* (337**)
343-376	CaC14	53,4 mg	
377-393	CaC15	6,0 mg	Hexano: AcOEt (10%)* (383**)
394-425	CaC16	9,6 mg	Hexano: AcOEt (15%)* (399**)
426-450	CaC17	16,0 mg	Hexano: AcOEt (20%)* (427**)
451-482	CaC18	18,2 mg	
483-492	CaC19	7,6 mg	Hexano: AcOEt (30%)* (485**)
493-498	CaC20	8,0 mg	

Tabela 09: Continuação

499-518	CaC21	15,7 mg	
519-580	CaC22	36,1 mg	Hexano: AcOEt (40%)* (556**)
581-613	CaC23	52,6 mg	Hexano: AcOEt (60%)* (584**)
614-674	CaC24	56,1 mg	Hexano: AcOEt (80%)* (647**)
675-723	CaC25	43,9 mg	Hexano: AcOEt (90%)* (682**)
724-800	CaC26	27,4 mg	Acetato de etila (100%)* (737**)
801	CaC27	214,4 mg	Metanol (100%)*

*Porcentagens da mistura de solventes **Mudança de Polaridade

3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.4.1 Ensaio bioquímico frente à enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*.

A enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e NAD+ como co-fator; esta é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*.

A preparação e a purificação da enzima são feitas rotineiramente de acordo com os procedimentos estabelecidos por SOUZA *et al*, 1998 no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. Os ensaios de atividade são feitos de acordo com uma modificação de um procedimento previamente descrito por BARBOSA E NAKANO, 1987; pela medida espectrofotométrica de NADH formado em 30 segundos a 340 nm (Figura 15).



Figura 15: Reação catalisada pela enzima GAPDH

A atividade da enzima foi medida colocando-a na presença do substrato Gliceraldeído-3-fosfato (G3P), do co-fator NAD⁺ e arseniato de sódio, inibidor da reação inversa, em cubeta de quartzo nas seguintes condições: 50 mM de tampão Tris-HCI pH 8,6 com 1 mM de EDTA e 1mM de β -mercaptoetanol, 30 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de NAD, 0,3 mM de G3P e 4-9 µg de proteína, totalizando o volume final da mistura de 1,0 mL.

Para testar a inibição da enzima são preparadas soluções das amostras em DMSO (concentração de 1,0 mg/mL), que são adicionadas ao meio reacional, fornecendo concentrações finais que variam entre 100, 50, 25 e 10 µg/mL do material a ser testado. Ensaios controle são feitos na ausência das substâncias, mas com adição de igual volume de DMSO. Todas as medidas são feitas em triplicatas e considera-se o valor da média.

O resultado da reação enzimática, acompanhado por espectrofotometria a 340 nm, é obtido pela diferença de absorbância entre os tempos t=30 s e t=0 s. Com o valor desta diferença de absorbância, pode-se calcular a atividade específica da enzima.

3.4.1.1 Cálculos das Atividades Específicas

A atividade específica (U/mg) da enzima e do controle foi calculada usando a fórmula a seguir:

$$(U/mg) = \frac{\{(\frac{\Delta absorbância}{\Delta t}) \times Vc\}}{6,22 \times Ve \times [E]}$$

onde $\Delta t = 0,5$ minuto; Vc (volume da cela) = 1,00 mL; $\varepsilon_{NADH} = 6,22$ (μ Mol/cm³)⁻¹ cm⁻¹; Ve (volume da enzima) = 0,005 mL; [*E*] = concentração da enzima em mg/mL= 0,3 e 0,9 mg/mL.

49

3.4.1.2 Atividade Inibitória de GAPDH de Trypanossoma cruzi.

Os extratos foram testados nas concentrações de 100 µg/mL em 10% de DMSO usando 5 µLde GAPDH na concentração de 0,30 mg/mL. Em cada caso foi feita uma solução controle, usando somente 10% de DMSO no meio reacional, a qual foi considerada o controle positivo do teste. A atividade específica da enzima GAPDH de *T. cruzi* não é significativamente afetada pela adição de 10% de DMSO.

Os dados são obtidos pela média de três repetições e os valores de percentagem de inibição obtidos usando a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{\{(U/mg_{controle}) - (U/mg_{composto})\}}{U/mg_{controle}} x100$$

3.4.2 Ensaio bioquímico frente à enzima APRT de *Leishmania donovani*.

A APRT utilizada foi obtida purificada de *Leishmania donovani*, no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Os ensaios de atividade são feitos pela medida espectrofotométrica de AMP formado em 60 segundos a 259 nm. A reação inicia-se após a adição da enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT), que catalisa a reação nucleofílica entre a base purínica adenina e o 5- fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), formando a Adenosina 5'-monofosfato (AMP) (Figura 16).



Figura 16: Reação catalisada pela enzima APRT

Os resultados destes testes fornecem um suporte mais adequado para o desenho racional de novas drogas leishmanicidas. A mistura reacional contém (volume final de 0,5 mL): 100 μ M de Adenina, 560 μ M de PRPP, 5 mM de MgCl₂, 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,4 e 7,5 μ g de APRT. Para testar a inibição da enzima são utilizadas 475 μ l da mistura reacional e 25 μ l das soluções candidatas a possíveis inibidores, fazendo assim, com que a concentração final do extrato e/ou fração seja de 100 μ g/ml. A atividade da enzima pura é 0,001168 mM de AMP formado por mg/min.

3.4.2.1 Cálculos das Atividades Específicas

A atividade específica (U/mg) da enzima foi calculada usando a fórmula a seguir:

$$(U/mg) = \frac{\{(\frac{\Delta absorb\hat{a}ncia}{\Delta t}) \times Vc\}}{1,24 \times Ve \times [E]}$$

onde $\Delta t = 1$ minuto; *Vc* (volume da cela) = 1,00 ml; $\epsilon_{AMP} = 1,24$ (μ Mol/cm³)⁻¹ cm⁻¹; *Ve* (volume da enzima) = 0,005 mL; [*E*] = concentração da enzima em mg/mL= 0,9 mg/mL.

3.4.2.2 Atividade Inibitória de APRT de Leishmania donovani

Os extratos foram testados na concentração de 50 μ g/mL em 10% de DMSO, usando 5 μ L de APRT na concentração de 0,9 mg/mL. Em cada caso

foi feita uma solução do branco, usando somente 10% de DMSO no meio reacional, o qual foi considerado o controle positivo do teste. A atividade específica da enzima APRT não é significativamente afetada pela adição de 10% de DMSO.

Os dados são obtidos pela média de três repetições e os valores de percentagem de inibição obtidos usando a seguinte fórmula:

 $\% = \frac{\{(U/mg_{controle}) - (U/mg_{composto})\}}{U/mg_{controle}}x100$

3.5 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O óleo essencial das folhas (170,6 g em 1200 mL de H₂O), frutos (187,8 g em 1200 mL de H₂O) e flores (48,4 g em 100 mL de H₂O), recémcoletadas de *Kielmeyera rugosa* foi obtido através da técnica de hidrodestilação (Figura 17), usando aparato tipo clevenger, aquecido até a temperatura de ebulição da água (*ca.* 4 horas), de forma que os compostos voláteis são arrastados pelo vapor, sendo posteriormente condensados e os voláteis, coletados junto com a água, são extraídos da água com solvente orgânico (diclorometano, 3 x 50 mL). A fase orgânica é secada sobre Na₂SO₄ anidro e cuidadosamente concentrada sob atmosfera de N₂ até um volume final <0,5mL. Duas extrações de cada amostra foram executadas e analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).



Figura 17: Figura ilustrativa do aparato tipo clevenger usado para hidrodestilação.

Parte



Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Substâncias Isoladas

4.1 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DE KIELMEYERA RUGOSA CHOISY

O estudo químico das partições hexânica, clorofórmica e acetato de etila dos frutos, folhas e caule permitiu o isolamento das seguintes substâncias:



Fração **FrH6** (95,2 mg) e **CaH8** (41,3 mg), ($C_{25}H_{24}O_5$) *Pf* (132,8°-137,4°), sólido amorfo amarelo Isolada da Partição Hexânica dos Frutos (FrH) e Partição Hexânica do Caule (CaH).



Fração **FoC21** (38,9 mg) (C₂₂H₂₉O₆) *Pf* (92,6°-95,8°), sólido amorfo amarelo Isolada da Partição Clorofórmica das Folhas (FoC)



Fração **CaC14** (53,4 mg) (C₃₄H₃₀O₇), sólido amorfo amarelo Isolada da Partição Clorofórmica do Caule (CaC)



Fração FrH5 (67,1 mg), obtida como óleo amarelo Isolada da Partição Hexânica dos Frutos (FrH).





Subfração M15III (4,2 mg) obtida por CCP da fração FrC15, $(C_{22}H_{29}O_6)$ Isolada da Partição Clorofórmica dos Frutos (FrC)

Subfração **PIV** (37,4 mg) obtida por CCP das frações FoH8 e FoH9, sólido branco Isolada da Partição Hexânica das Folhas (FoH)

4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

4.2.1 Identificação Estrutural da Substância 1

A substância 1 foi isolada através do fracionamento da partição hexânica do extrato metanólico dos frutos de *K. rugosa* e obtido como um sólido amorfo amarelo (FrH6; 95,2 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN 1D (¹H, ¹³C e DEPT 135°) e 2D (HMBC e HSQC), IV e por comparação com os dados da literatura.

O espectro de absorção na região do IV desta substância revelou bandas de absorção características de hidroxila em 3463 cm⁻¹, de δ-lactona α , β -insaturada em 1746 cm⁻¹, e em 704 cm⁻¹ característica de grupo fenílico monosubstituído. As bandas em 1612 cm⁻¹ e 1582 cm⁻¹ referem-se, respectivamente, à carbonila do grupo "3-metil-1-oxo-butil" e aos estiramentos C=C do anel aromático. As absorções em 2963, 2922 e 2865 cm⁻¹ são características das deformações axiais de C_{sp3}-H (Anexo A, Fig. 41, p. 105).

No espectro de RMN ¹H da substância FrH6 (Anexo A, Tab. 15-p.134; Fig. 42-p. 105) foi observado primeiramente a presença de um singleto, integrando para 1H, em δ 14,81, que é característico de hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica, enquanto que dois dubletos, um centrado em δ 6,90 e outro em δ 5,64, com constante de acoplamento de 9,9 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios H-4' e H-5' respectivamente, característicos do anel cromeno. Adicionalmente, um singleto, integrando para 6H em δ 1,60 indicou a presença de duas metilas ligadas a este anel.

A presença de dois mutipletos, um centrado em δ 7,32 (2H) e outro em δ 7,42 (3H) foram atribuídos ao grupo fenil em C-4, substituição confirmada pela presença de um singleto em δ 6,00 (1H) característico do hidrogênio em C-3 de uma cumarina. Os sinais em δ 2,97 (*d*, 2H, *J*=6,9 Hz), δ 2,24 (*m*, 1H) e δ 0,97 (*d*, 6H, *J*=6,9 Hz), são característicos do grupo 3-metil-1-oxobutil, os quais são atribuídos aos hidrogênios H-2", H-3", H-4" e 5", respectivamente.

O espectro de RMN ¹³C, juntamente com o experimento DEPT 135° e 90° (Anexo A, Figs. 44 e 45-pgs. 106 e 107; Tab. 15-p. 134) mostrou a presença de 4CH₃, 1CH₂, 9CH e 11 carbono não hidrogenados. Entre os 11 carbono não hidrogenados, temos um sinal na região de carbono *sp*³, em δ 79,8 característico do carbono C-6' do anel cromeno. Os sinais em δ 159,6 (Co) e δ 154,8 (Co) são típicos dos carbonos C-2 e C-4 do esqueleto cumarínico com substituição em C-4; e a presença dos sinais característicos dos carbonos C-4' e C-5' do anel cromeno foi observada em δ 115,5 e δ 126,3, respectivamente.

Desta forma, pôde-se propor duas possíveis estruturas (Figura 18), baseado nos padrões de oxigenação comumente encontrados em cumarinas de outras espécies de *Kielmeyera* relatadas na literatura [NAGEM et al., 1988 e GRAMACHO et al., 1999].



Figura 18: Propostas estruturais para substância 1.

A posição dos grupos foi determinada através das interações heteronucleares observadas no mapa de contorno HSQC (Anexo A, Fig. 46, p. 107) e HMBC (Anexo A, Fig. 49, p. 109). O espectro bidimensional do tipo HSQC, o qual permite observar a correlação direta carbono-hidrogênio, permitiu determinar com exatidão os deslocamentos químicos de todos os 4CH₃, 1CH₂ e 9CH da estrutura proposta (Tabela 10-p. 60).

Carbono	δ _H (ppm)	δ _c (ppm)	Tipo de Carbono
3	6,00	112,6	СН
4'	6,90	115,5	СН
5'	5,64	126,3	СН
7' e 8'	1,60	28,1	2 CH ₃
2"	2,97	53,6	CH_2
3"	2,24	25,1	СН
4" e 5"	0,97	22,6	2 CH ₃
2'" e 6'"	7,32	127,1	2 CH
3‴ e 5‴	7,42	127,6	2 CH
4'''	7,42	128,2	СН

Tabela 10: Correlações heteronucleares $({}^{1}J_{C,H})$ observadas no experimento HSQC

Finalizando, foi realizado o experimento de RMN bidimensional HMBC, que permitiu definir com exatidão a estrutura proposta ao composto 1. A correlação (³*J*) entre C-8a (δ 158,1) e o hidrogênio em δ 6,90, definiu a posição do anel cromeno, o qual também foi confirmada com a correlação entre o C-6 (δ 107,1) e os hidrogênios em δ 2,97 e δ 14,81 e a correlação do C-4a (δ 102,2) com os hidrogênios em δ 14, 81 e δ 6,00 (Figura 19).



Figura 19: Correlações $({}^{3}J_{C-H})$ importantes para a determinação exata da substância (1).

Desta forma, a substância foi definida como mostrado na Figura 20, já previamente isolada de *Mesua ferrea L*. [VEROTTA *et al.*, 2004], *Kielmeyera*

pumila [NAGEM et al., 1988] e *Kielmeyera elata* [GRAMACHO, et al., 1999] da família Clusiaceae, cujas referências foram usadas para comparação dos dados espectrais obtidos (Anexo A, Tab. 15, p. 134).



Figura 20: Substância 1: 5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6´, 6´-dimetilpirano (2´, 3´: 7,8)-cumarina.

4.2.2 Identificação Estrutural da Substância 2

A substância 2 foi isolada através do fracionamento da partição clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *K. rugosa*, sendo obtida como um sólido amorfo amarelo (FoC21; 38,9 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135°, IV e por comparação com os dados da literatura.

O espectro de absorção no IV da substância 2 (Anexo A, Fig. 52, p. 111) apresentou uma banda de intensidade forte em 3450 cm⁻¹ característica de hidroxila; bandas na região de 2956 cm⁻¹ caracterizam as deformações axiais de C_{sp3} -H. A absorção em 1740 cm⁻¹ caracteriza a presença da δ-lactona α , β -insaturada, enquanto que as bandas em 1620 cm⁻¹ e 1578 cm⁻¹ referem-se ao grupo carbonila conjugado e as deformações C=C do anel aromático, respectivamente.

No espectro de RMN ¹H (Anexo A, Fig. 53-p. 111; Tab. 16-p. 135), as primeiras observações importantes são a presença de um singleto em δ 14,15 (1H) característico de hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica e um

singleto em δ 6,00 (1H) indicando a presença do hidrogênio na posição C-3 característica do esqueleto cumarínico, confirmando a substituição na posição C-4. Sinais característicos de grupo propilico foram observados na região de δ 2,83 (*m*, 2H), δ 1,63 (*m*, 2H) e δ 1,03 (*t*, 3H), caracterizando uma das substituições no esqueleto básico. Os sinais em δ 3,87 (*m*, 1H); 1,86 (*m*, 1H); 1,65 (*m*, 1H); 0,96 (*t*, 3H, *J*= 7,4Hz) e 1,23 (*d*, 3H, *J*= 6,8 Hz), caracterizaram a presença do grupo 2-metil-1-oxobutílico.

O espectro de RMN ¹³C (Anexo A, Fig. 55-p. 112; Tab. 16-p. 135), juntamente com o experimento DEPT 135°, mostrou a presença de 5CH₃, 4CH₂, 3CH e 10Co. Os sinais de carbono não hidrogenados em δ 159,5 e 162,0 são típicos dos carbonos C-2 e C-4 do esqueleto cumarínico com substituinte alquil em C-4, enquanto aqueles em δ 163,1; 110,1; 163,1 e 104,6 são típicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-8, respectivamente.

Os sinais de hidrogênio em δ 4,85 (*dd*, *J*=9,2 e 8,4 Hz, 1H), 2,82 (*m*, 2H), δ 1,40 (*s*, 3H) e δ 1,28 (*s*, 3H) adicionalmente com os sinais de carbono em δ 92,8 (C-2', CH), 26,5 (C-3', CH₂), 71,4 (C-4', Co), 26,1 (C-5', CH₃), e 24,7 (C-6', CH₃), indicam a presença do sistema dihidrofurano com um grupo 1-hidroxi-1-metil etila.

Desta forma, a substância foi definida como uma 4-propilcumarina (Figura 21), já previamente isolada de *Calophyllum brasilense*, recebendo o nome de Mammea B/BB Cyclo F [REYES-CHILPA *et al.*, 2004]. Os dados espectrais (Anexo A, Tab. 16, p. 115) foram comparados também com cumarinas similares isoladas de *Calophyllum brasiliense* [ITO *et al.*, 2003], *Kielmeyera albopunctata* [SCIO *et al.*, 2003], *Mesua racemosa* [MOREL *et al.*, 1999] e *Kielmeyera reticulata* [CRUZ *et al.*, 2002].



Figura 21: Substância 2: 7-hidroxi-8-(2-metil-1-oxobutil)-2'-(2-hidroxiisopropil) dihidrofurano-(5',4': 5,6)-4-propil cumarina.

4.2.3 Identificação Estrutural da Substância 3

A substância 3 foi isolada através do fracionamento da partição clorofórmica do extrato metanólico do caule de *K. rugosa*, sendo obtida como um sólido amorfo amarelo (CaC14; 53,4 mg).

A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C (uni e bidimensional), DEPT 135°, IV e por comparação com os dados da literatura.

O espectro de absorção na região do IV (Anexo A, Fig. 58, p. 114), desta substância, revelou banda característica de hidroxila em 3460 cm⁻¹, de δ-lactona α , β -insaturada em 1740 cm⁻¹ e de deformações axiais característica de ligações C*sp*³-H em 2956 cm⁻¹. Além disso, a presença de absorções em 1614 cm⁻¹ e 1580 cm⁻¹, referem-se, respectivamente, aos grupos carbonila conjugado e aos estiramentos das ligações C=C de anel aromático.

No espectro de RMN ¹H (Anexo A, Fig. 59-p. 114; Tab. 17-p. 136) foram observados sinais semelhantes à substância 1. Os dois dubletos centrados em δ 6,87 (1H, *J*=10,0 Hz) e 5,62 (1H, *J*=10,0 Hz) observados, juntamente com os dois singletos em δ 1,58 (3H) e δ 1,56 (3H), sugerem a presença do anel cromeno. A presença de multipletos centrados em δ 7,38

(3H) e 7,26 (2H), adicionalmente a presença de um singleto em δ 5,95 (1H), sugerem tratar-se de uma 4-fenilcumarina.

De forma semelhante aos espectros de RMN ¹H apresentados pelas substâncias 1 e 2, no espectro de RMN ¹H desta substância, foi observado também um singleto em δ 14,66 ppm, com integração para 1H, atribuído à um hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica. Estes dados nos levaram a propor as estruturas (C) e (D) para a substância isolada (Figura 22), levando-se em conta o padrão de oxigenação comum para cumarinas desta espécie:



Figura 22: Propostas estruturais para a substância 3.

No espectro de RMN ¹H observamos, ainda, quatro dubletos centrados em δ 4,14 (2H; 6,4 Hz); 6,36 (1H, 16 Hz); 7,61 (1H, 16 Hz) e 1,06 (3H, 6,8 Hz); dois duplos dubletos em δ 3,26 (1H, 6,0 e 17 Hz) e 3,03 (1H, 7,6 e 17 Hz) e um multipleto em 2,63 (1H). Estes sinais indicaram a presença do grupo 4-cinamoil-3-metil-1-oxobutílico, compatíveis com os dados publicados por CRUZ *et al.*, (1998). Este grupo pode estar ligado ao carbono C-6 ou C-8.

No espectro de RMN ¹³C, juntamente com o experimento DEPT 135° (Anexo A; Fig. 61-p. 115; Tab. 17-p. 136), a primeira observação interessante é a presença de um sinal de grupo metilênico (CH₂), absorvendo em δ 68,7, característico do carbono C-4" do grupo 4-cinamoil-3-metil-1-oxobutílico.

Adicionamente, estes espectros, mostraram sinais característicos de dois grupos fenilas, através das absorções em δ 139,1 (Co); 127,1 (2CH); 127,9 (2CH); 128,2 (CH); 134,2 (Co); 127,6 (2CH); 128,9 (2CH) e 130,4 (CH), assim como também do grupo cromeno através dos sinais típicos em δ 115,5; 126,4; 80,0; 28,3 e 28,2 ppm.

A definição do posicionamento do grupo 4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil em C-6 ou C-8, foi determinada através das interações heteronucleares observados no mapa de contorno HMBC (Tabela 11).

Tabela 11: Correlações observadas no espectro de RMN – 2D [HMBC (C-H, ⁿJ) (CDCl₃, 9,4 tesla)] da substância 3.

Η (δ)	$C(\delta, {}^{n}J)$
5-OH (14,66)	4a (102,2); 6 (107,2); 5 (164,2)
3C (7,61)	2C (117,7); 4C (134,2); 1C (166,7); 5C/ 9C (127,6)
5C (7,47)	3C (144,9); 7C (130,4)
2 ′′′/6 ′′′ (7,26)	1 ′′′′ (139,1); 4 (156,2)
4′ (6,87)	6' (80,0); 8a (158,1); 7 (155,0); 8 (101,6)
2C (6,36)	4C (134,2); 1C (166,7)
3 (5,95)	4a (102,2); 1 ^{···} (139,1); 2 (159,5)
5' (5,62)	6' (80,0); 8 (101,6)
4'' (4,14)	5'' (17,2); 3'' (29,3); 2'' (48,5); 1C (166,7)
2'' (3,26 e 3,03)	5'' (17,2); 3'' (29,3); 4'' (68,7); 1''(205,4)
3'' (2,63)	5'' (17,2); 2'' (48,5); 4'' (68,7)
7′/ 8′ (1,58/ 1,56)	7'/8'(28,3/28,2); 6' (80,0); 5'(126,4)
5'' (1,06)	3'' (29,3); 2'' (48,5); 4'' (68,7)

As correlações (³*J*) observadas entre os hidrogênios H-2^{*''*}/6^{*'''*} (δ 7,26) com o carbono C-4 (δ 156,2), juntamente com a correlação entre o hidrogênio H-3 (δ 5,95) com o carbono C-1^{*'''*} (δ 139,1) corroboraram com a estrutura de uma 4-fenilcumarina. Por outro lado, as correlações (³*J*) observadas entre o hidrogênio H-4^{*'*} (δ 6,87) com o carbono C-8a (δ 158,1), aliado a correlação

entre o hidrogênio H-5' (δ 5,62) com o carbono C-8 (δ 101,6) confirmam que o anel pirano encontra-se ligado ao anel cumarínico através dos carbonos C-7 e C-8, fixando, com isso, o posicionamento do grupo "4-cinamoil-3-metil-1oxobutil" no carbono C-6 (proposta C, Figura 22).

Com as análises destes dados, aliadas as informações obtidas da literatura, pudemos definir a substância 3 como sendo a 4-fenilcumarina, representada na Figura 23, previamente isolada de *Kielmeyera argentea* [CRUZ et al., 1998] e *Kielmeyera reticulata* [CRUZ et al., 1998].



Figura 23: Substância 3: 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6',6'dimetilpirano (2',3': 7, 8)-cumarina.

Os experimentos bidimensionais COSY e HSQC (Anexo A, Fig. 66 e Fig. 69, p. 118 e 119), além de corroborarem com a estrutura proposta, também auxiliaram na atribuição completa de todos os hidrogênios e carbonos desta cumarina. Os dados podem ser encontrados na Tabela 17 (Anexo A, p. 136).

4.2.4 Identificação Estrutural das Substâncias 4 e 5

A mistura das substâncias 4 e 5 foi odtida através do fracionamento da partição hexânica do extrato metanólico dos frutos de *K. rugosa*, numa proporção de praticamente 1:1, sendo obtida como um óleo amarelo (FrH5; 67,1 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C (uni e bidimensional), DEPT 90° e 135°, IV e por comparação com os dados da literatura.

O espectro de absorção na região do IV (Anexo A, Fig. 76, p. 123) da mistura, revelou bandas em: 3481 cm⁻¹ característica de hidroxila; 1750 cm⁻¹ referente à δ -lactona α , β -insaturada e 699 cm⁻¹ característica do grupo benzeno monosubstituído. As bandas em 1614 cm⁻¹ e 1581 cm⁻¹ referem-se à deformação axial da ligação C=O de carbonila e estiramento de ligação C=C de anel aromático, respectivamente.

No espectro de RMN ¹H (Anexo A, Fig. 77-p. 123; Tab. 18-p. 137), observamos sinais similares ao composto 1 (4-fenilcumarina), no entanto, o espectro de RMN ¹³C (Anexo A; Fig. 80-p. 125; Tab. 19-p. 137), percebemos alguns sinais intensificados e/ou duplicados, indicando a presença de uma mistura.

No espectro de RMN ¹H foi observado um singleto em δ 5,95 (1H) característico do H-3 indicando tratar-se de cumarinas substituídas em C-4 do anel cumarínico. A presença de dois dubletos, com *J*=10,0 Hz, um em δ 6,83 (1H) e o outro em δ 5,64 (1H), adicionalmente a um singleto, integrando para 6H, em δ 1,54 caracterizam a presença do anel cromeno; enquanto que dois singletos em δ 15,39 e 15,30 indicam a presença de dois hidrogênios de hidroxila quelatogênica. A observação de um tripleto em δ 2,94 (2H, *J*=7,5 Hz), um mutipleto em δ 1,64 (2H) e um tripleto em δ 0,92 (3H, *J*=7,3 Hz) juntamente com os sinais no espectro de RMN ¹³C em δ 38,4 (CH₂), 22,7 (CH₂) e 13,9 (CH₃), indicaram a presença do grupo propil na posição C-4, tal como no composto 2.

Auxiliados pelos experimentos DEPT 135° e 90°, no espectro de RMN ¹³C, (Anexo A, Fig. 81-p. 125), observamos os sinais em δ 160,0 (Co) e δ 159,4 (Co) típicos dos carbonos C-2 e C-4 do esqueleto cumarínico, com substituição em C-4. Os sinais em δ 165,2 (Co), δ 106,9 (107,1) (Co), δ 157,5 (157,2) (Co) e δ 101,5 (Co) são típicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-8 indicando, exceto em C-3, que todas as posições do esqueleto cumarínico encontram-se substituídas.

67

A confirmação de que esta fração (FrH5) tratava-se de uma mistura de duas 4-propilcumarinas ficou mais evidente ao observar a presença, no espectro de RMN ¹³C, de dois sinais típicos de carbonilas cetônicas, uma em δ 211,9 e a outra em 207,1 ppm.

Estes dados nos levaram a propor duas possíveis estruturas, (E) e (F) (Figura 24), para cada uma das cumarinas desta mistura, sempre considerando os padrões de oxigenação comumente encontrados em cumarinas isoladas de outras espécies de *Kielmeyera*.



Figura 24: Propostas estruturais para as substâncias 4 e 5.

A única diferença entre os dois compostos seria quanto a estrutura do substituinte acila posicionado em C-6 ou C-8, que obrigatoriamente deve ser localizado *orto* à hidroxila, uma vez que esta é do tipo quelatogênica, absorvendo em δ 15,30 e 15,39 ppm, no espectro de RMN ¹H (Anexo A; Fig. 77-p. 123; Tab. 18-p. 137).

A confirmação das estruturas dos grupos acilas foi obtida através dos espectros de RMN ¹³C, DEPT 135° e 90° (Anexo A, Fig. 81-p. 125). Assim, a presença dos sinais em δ 26,7 (CH₂, C-3"), δ 46,6 (CH, C-2"), δ 11,8 (CH₃, C-4″) e δ 16,7 (CH₃, C-5″), aliado ao sinal da carbonila cetônica em δ 211,9 (Co, C-1″), indicam a presença do grupo "2-metil-1-oxobutil" (G) (Figura 23). Por outro lado, a presença dos sinais em δ 25,1 (CH, C-3"), δ 53,6 (CH₂, C-2"), δ 22,6 (2CH₃, C-4″ e 5″), aliado ao sinal da carbonila cetônica em δ

207,1 (Co, C-1^{''}), indicam a presença do grupo "3-metil-1-oxobutil" (H) (Figura 25). Estes dados puderam ser confirmados pela comparação com dados da literatura [NAGEM, et al., 1998].



Figura 25: Substituintes acilas presentes, individualmente, em cada uma das cumarinas da mistura.

A definição do posicionamento destes substituintes em C-6 ou C-8, para cada uma das cumarinas da mistura, foi determinada através das interações heteronucleares observados no mapa de contorno HMBC (Anexo A, Fig. 85, p. 127) (Tabela 12).

Tabela 12: Correlações observadas no espectro de RMN – 2D [HMBC (C-H, ⁿJ) (CDCl₃, 9,4 tesla)] da mistura de cumarinas isoladas.

Η (δ)	$C(\delta, {}^{n}J)$
5-OH (15,39)	4a (103,3); 6 (107,1); 5 (165,2)
5-OH (15,30)	4a (103,2); 6 (106,9); 5 (165,2)
H-3 (5,95)	1''' (38,4); 4a (103,2); 2 (160,0); 4 (159,4)
H-5' (5,64)	6' (79,6); 8 (101,5)
H-4' (6,83)	6' (79,6); 8a (155,0); 7 (157,2 e 157,5)
H-2" (2,98)	3'' (25,2); 4'' e 5'' (22,7); 1'' (207,1)
H-1''' (2,94)	3''' (13,9); 2'' (22,7); 4a (103,2); 3 (110,3); 4 (159,4)
H-2''' (1,64)	3''' (13,9); 1''' (38,4); 4 (159,4)
H-7' e H-8' (1,54)	7' e 8' (28,1 e 28,2); 6' (79,6); 5' (126,2 e 126,1)
H-5" (1,19)	3'' (26,7); 2'' (46,6); 1'' (211,9)
H-4" e H-5" (0,98)	2'' (53,6); 3'' (25,1); 4'' (22,6)
H-3''' (0,92)	2''' (22,7); 1''' (38,4)
H-4" (0,92)	3'' (26,7); 2'' (46,6)

A figura 26 mostra as correlações mais importantes para a definição da posição dos grupos no esqueleto cumarínico. A correlação (³*J*) observada entre os carbonos C-8a (δ 155,0) e C-7 (δ 157,5) com o hidrogênio em δ 6,83 (H-4') (I), juntamente com a correlação entre os carbonos C-4a (δ 103,2) e C-6 (δ 106,9) com o hidrogênio em δ 15,30 (J), confirmou o posicionamento dos grupos "2-metil-1-oxobutil" e "3-metil-1-oxobutil" no carbono C-6 para duas cumarinas desta mistura.



Figura 26: Correlações importantes para a determinação da mistura dos compostos *4* e 5.

Assim, as substâncias foram definidas como mostrado na Figura 27.



Figura 27: Substância 4: 5-hidroxi-6-(2-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-6´, 6´dimetilpirano (2´, 3´: 7,8)-cumarina. Substância 5: 5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-npropil-6´, 6´-dimetilpirano (2´, 3´: 7,8)-cumarina.

4.2.5 Identificação Estrutural da Substância 6

A substância 6 foi isolada através da purificação por Cromatografia em Camada Preparativa da fração FrC15 da partição clorofórmiica dos frutos, obtida como subfração M15III (4,2 mg). A identificação foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C e por comparação com os dados da literatura.

No espectro de RMN ¹H da substância 6 (Anexo A; Fig. 89-p. 130; Tab. 20-p. 139), observamos a presença de dois singletos, um em δ 14,68 (1H) e outro em δ 9,96 (1H), sendo atribuídos, respectivamente, a um hidrogênio de uma hidroxila quelatogênica e a um hidrogênio de uma hidroxila fenólica.

O singleto em δ 6,01, integrando para 1H, indicou a presença do hidrogênio do carbono C-3, característico do esqueleto cumarínico substituído em C-4. A observação de três mutipletos centrados em δ 2,90 (2H); 1,63 (2H) e 1,01 (3H), juntamente com os sinais no espectro de RMN ¹³C (Anexo A; Fig. 90-p. 130; Tab. 20-p. 139) em δ 38,9 (CH₂), 22,6 (CH₂) e 14,0 (CH₃), indicaram a presença do grupo propil na posição C-4, similarmente as cumarinas 4 e 5.

A presença do grupo "3-metil-1-oxobutil", foi confirmada tanto pelo espectro de RMN ¹H, através das absorções em δ 3,14 (*m*, H-2"); 2,27 (*m*, H-3") e 1,03 (*d*, *J*= 8 Hz, H-4" e 5"), quanto pelo espectro de RMN ¹³C, pelos sinais em δ 206,2 (Co, C-1″); 53,5 (CH₂, C-2"); 25,7 (CH, C-3"); 23,0 (CH₃, C-4″ ou C-5″) e 22,6 (CH₃, C-5″ ou C-4″), similarmente aos compostos 1 e 5.

No espectro de RMN ¹³C, os sinais de carbono não hidrogenados em δ 160,9 e 159,6 são típicos dos carbonos C-2 e C-4 do esqueleto cumarínico com substituição em C-4, enquanto aqueles em δ 166,0; 109,7; 161,0 e 104,2 são típicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-8 do anel totalmente substituído.

71

O grupo "2-hidroxi-3-metilbut-3-enil" foi identificado, no espectro de RMN ¹H, pela presença de dois singletos, um em δ 4,91 (1H) e outro em 5,02 ppm característicos dos hidrogênios no carbono C-4′ (dupla terminal). Adicionalmente, o multipleto centrado em δ 4,43 (1H); o singleto em δ 1,87 (3H); o multipleto na região de δ 2,80 - 2,99 (1H) e o duplo dubleto largo em δ 3,15 (*J*= 1,2 e 13,2 Hz) confirmaram a presença do grupo.

No espectro de RMN ¹³C, a presença deste grupo pôde ser também comprovada, principalmente pelas absorções em δ 77,2 (CH); 146,4 (Co); 110,1 (CH₂) e 18,5 (CH₃).

Finalmente, baseado nestes dados experimentais e comparando-os com os da literatura [GUILET et al., 2001], pudemos propor a estrutura representada na Figura 28 como sendo da substância 6 isolada.



Figura 28: Substância 6: 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-8-(2'-hidroxi-3'-metil-3'butenil)-4-fenilcumarina.

4.2.6 Identificação Estrutural das substâncias 7 e 8

As substâncias 7 e 8 foram obtidas em mistura (Subfração PIV), isolada através da purificação por Cromatografia em Camada Preparativa das frações FoH8 e FoH9, obtidas do fracionamento da partição hexânica do extrato metanólico das folhas. A mistura apresentou-se como um sólido branco (PIV; 37,4 mg) e foi identificada através da análise de seus espectros de RMN ¹H, ¹³C e por comparação com os dados publicados na literatura.

O grande número de sinais na região de δ 0,6 à 1,8 ppm, no espectro de RMN ¹H (Anexo A, Fig. 91, p. 131) desta fração, indicou a presença de uma mistura de triterpenos.

A análise do espectro de RMN ¹³C (Anexo A; Fig. 94-p. 132; Tab. 21-p. 140) nos permitiu a identificação dos triterpenos presentes na mistura como sendo o lupeol e a α -amirina.

O lupeol foi identificado através da presença dos sinais característicos em δ 79,0; 150,9; 109,3 e 19,3 ppm, referentes, respectivamente, aos carbonos C-3 (carbono carbinólico), C-20, C-29 e C-30. Além disso, foi possível também identificar os sinais referentes às metilas C-23, C-24, C-25, C-26, C-27 e C-28 pelos sinais em δ 28,0; 15,3; 16,1; 16,0; 14,6 e 18,0 ppm, respectivamente.

A α -amirina foi reconhecida pela presença dos sinais em δ 79,0; 124,5 e 139,6 que se referem, respectivamente, a absorção dos carbonos C-3 (carbono carbinólico), C-12 e C-13. De forma semelhante ao lupeol, também identificamos os sinais característicos de suas metilas através dos sinais em δ 28,1; 15,6; 15,6; 16,9; 23,4; 28,1; 17,4 e 21, 3, referentes aos carbonos C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30 respectivamente.

A tabela 21 (Anexo A, p. 140) mostra todos os sinais característicos de RMN de ¹³C dos triterpenos isolados comparando-os com os encontrados na literatura [MAHATO E KUNDU, 1994; SOBRINHO et al., 1991].

A Figura 29 mostra a estrutura dos triterpenos lupeol e α -amirina. Vale a pena mencionar que a α -amirina já foi anteriormente isolada de uma espécie de *Kielmeyera*, a *K. pumila* [NAGEM *et al.*, 1988].

73



Figura 29: Substancia 7: Lupeol e Substância 8: α-amirina.

Avaliação Tripanocida e Leishmanicida

4.3 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Todos os extratos obtidos a partir das folhas, frutos e caule foram submetidos aos ensaios de inibição frente à enzima GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. donovani*. No entanto, somente as frações obtidas em maior quantidade e grau de pureza foram submetidos a estes testes. Assim, a Tabela 13 abaixo, mostra todas as amostras enviadas, com seus respectivos códigos e descrição.

Amostas	Descrição
ELFKC	Extrato do Látex dos Frutos de Kielmeyera com Clorofórmio
ELFKH	Extrato do Látex dos Frutos de Kielmeyera com Hexano
FrKAE	Extrato dos Frutos de Kielmeyera com Acetato de Etila
FrKC	Extrato dos Frutos de Kielmeyera com Cloroformio
FrKRDM	Extrato dos Frutos de Kielmeyera com Diclorometano
FoKRM	Extrato Metanólico das Folhas de Kielmeyera
FoH	Partição Hexânica do Extrato Metanólico das Folhas
FoC	Partição Cloroformica do Extrato Metanólico das Folhas
FoA	Partição Acetato de Etila do Extrato Metanólico das Folhas
FrH	Partição Hexânica do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC	Partição Cloroformica do Extrato Metanólico dos Frutos
FrA	Partição Acetato de Etila do Extrato Metanólico dos Frutos
CaH	Partição Hexânica do Extrato Metanólico do Caule
CaC	Partição Cloroformica do Extrato Metanólico do Caule
CaA	Partição Acetato de Etila do Extrato Metanólico do caule
FrH3	Partição Hexânica/Fração 3 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH4	Partição Hexânica/Fração 4 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH5	Partição Hexânica/Fração 5 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH6	Partição Hexânica/Fração 6 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH7	Partição Hexânica/Fração 7 do Extrato Metanólico dos Frutos

Tabela 13: Relação das amostras enviadas para os testes frente a GAPDH e APRT.

FrH8	Partição Hexânica/Fração 8 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH9	Partição Hexânica/Fração 9 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH10	Partição Hexânica/Fração 10 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH11	Partição Hexânica/Fração 11 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH12	Partição Hexânica/Fração 12 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH13	Partição Hexânica/Fração 13 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH18	Partição Hexânica/Fração 18 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH19	Partição Hexânica/Fração 19 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH20	Partição Hexânica/Fração 20 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrH21	Partição Hexânica/Fração 21 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC5	Partição Clorofórmica/Fração 5 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC6	Partição Clorofórmica/Fração 6 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC7	Partição Clorofórmica/Fração 7 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC11	Partição Clorofórmica/Fração 11 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC12	Partição Clorofórmica/Fração 12 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC13	Partição Clorofórmica/Fração 13 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC14	Partição Clorofórmica/Fração 14 do Extrato Metanólico dos Frutos
FrC15	Partição Clorofórmica/Fração 15 do Extrato Metanólico dos Frutos
FoH6	Partição Hexânica/Fração 6 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH7	Partição Hexânica/Fração 7 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH8	Partição Hexânica/Fração 8 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH9	Partição Hexânica/Fração 9 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH10	Partição Hexânica/Fração 10 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH12	Partição Hexânica/Fração 12 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH13	Partição Hexânica/Fração 13 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH15	Partição Hexânica/Fração 15 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH16	Partição Hexânica/Fração 16 do Extrato Metanólico das Folhas
FoH17	Partição Hexânica/Fração 17 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA4	Partição Acetato de etila/Fração 4 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA5	Partição Acetato de etila/Fração 5 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA7	Partição Acetato de etila/Fração 7 do Extrato Metanólico das Folhas
	a de la constante de

Tabela 13: Continuação

FoA8	Partição Acetato de etila/Fração 8 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA9	Partição Acetato de etila /Fração 9 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA10	Partição Acetato de etila /Fração 10 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA11	Partição Acetato de etila/Fração 11 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA12	Partição Acetato de etila/Fração 12 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA13	Partição Acetato de etila/Fração 13 do Extrato Metanólico das Folhas
FoA14	Partição Acetato de etila/Fração 14 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC10	Partição Clorofórmica/Fração 10 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC11	Partição Clorofórmica/Fração 11 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC13	Partição Clorofórmica/Fração 13 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC20	Partição Clorofórmica/Fração 20 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC21	Partição Clorofórmica/Fração 21 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC22	Partição Clorofórmica/Fração 22 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC23	Partição Clorofórmica/Fração 23 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC27	Partição Clorofórmica/Fração 27 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC28	Partição Clorofórmica/Fração 28 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC32	Partição Clorofórmica/Fração 32 do Extrato Metanólico das Folhas
FoC34	Partição Clorofórmica/Fração 34 do Extrato Metanólico das Folhas
CaH7	Partição Hexânica/Fração 7 do Extrato Metanólico do Caule
CaH8	Partição Hexânica/Fração 8 do Extrato Metanólico do Caule
CaH17	Partição Hexânica/Fração 17 do Extrato Metanólico do Caule
CaH18	Partição Hexânica/Fração 18 do Extrato Metanólico do Caule
CaH25	Partição Hexânica/Fração 25 do Extrato Metanólico do Caule
CaH26	Partição Hexânica/Fração 26 do Extrato Metanólico do Caule
CaC3	Partição Clorofórmica/Fração 3 do Extrato Metanólico do Caule
CaC14	Partição Clorofórmica/Fração 14 do Extrato Metanólico do Caule
CaC15	Partição Clorofórmica/Fração 15 do Extrato Metanólico do Caule
CaC17	Partição Clorofórmica/Fração 17 do Extrato Metanólico do Caule
CaC18	Partição Clorofórmica/Fração 18 do Extrato Metanólico do Caule
CaC19	Partição Clorofórmica/Fração 19 do Extrato Metanólico do Caule
CaC20	Partição Clorofórmica/Fração 20 do Extrato Metanólico do Caule
1	

Tabela 13: Continuação

	-
CaC21	Partição Clorofórmica/Fração 21 do Extrato Metanólico do Caule
CaC23	Partição Clorofórmica/Fração 23 do Extrato Metanólico do Caule
CaC24	Partição Clorofórmica/Fração 24 do Extrato Metanólico do Caule
CaC26	Partição Clorofórmica/Fração 26 do Extrato Metanólico do Caule

Tabela 13: Continuação

4.3.1 Atividade Tripanocida dos Extratos e frações obtidos através da inibição da enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*.

A figura 30 apresenta os resultados obtidos dos testes bioquímicos frente à enzima GAPDH de *T. cruzi*, onde se observa que a partição clorofórmica (FrC) e acetato de etila (FrA), do extrato metanólico dos frutos, foram as mais ativas, exibindo porcentagens de inibição igual a 89,3% e 98,7%, respectivamente.



Figura 30: Efeito dos extratos e frações obtidos dos frutos frente à enzima GAPDH de T. cruzi.

Na figura 31 são apresentados os resultados obtidos do extrato metanólico e das frações obtidas das Colunas Cromatográficas das partições acetato de etila e clorofórmica das folhas de *K. rugosa*. O extrato metanólico apresentou inibição de 89,5% (FKRM). No entanto, algumas frações obtidas da Coluna Cromatográfica da partição acetato de etila apresentaram potencial inibitório ainda maior, sendo elas: FoA4 (93,2%) FoA5 (99,4%) e FoA8



(90,2%). Estes resultados podem ser atribuídos a um aumento na concentração da ou das substâncias responsáveis pela inibição da enzima.

Figura 31: Efeito dos extratos e frações obtidos da folhas frente à enzima GAPDH de T. cruzi.

Na figura 32 são apresentados os resultados obtidos das partições hexânica (CaH), clorofórmica (CaC) e acetato de etila (CaA) e das frações obtidas das Colunas Cromatográficas das partições hexânica e clorofórmica dos caules de *K. rugosa*.

A partição acetato de etila mostrou um alto valor de inibição, com um porcentual de 99,4%. No entanto, observamos que todas as frações testadas, provenientes da Coluna Cromatográfica das partições hexânica (CaH) e clorofórmica (CaC), não apresentaram porcentagens inibitórias significantes, resultando em valores abaixo de 40%.



Figura 32: Efeito dos extratos e frações obtidos do Caule frente à enzima GAPDH de T. cruzi.

4.3.2 Atividade Leishmanicida dos Extratos e frações através da inibição da enzima APRT de *Leishmania donovani*.

Inicialmente é importante mencionar que todos os resultados obtidos dos extratos, partições e frações do caule de *K. rugosa* não foram confiáveis, pois a mistura reacional turvou ou absorveu no comprimento de onda usado no teste. Tão logo o protocolo deste teste seja mudado, enviaremos novamente estas amostras para novos ensaios.

Na figura 33 são apresentados os resultados obtidos dos extratos clorofórmico (FrKC) e acetato de etila (FrKAE) dos frutos (sem o látex), da partição hexânica e das frações obtidas da Coluna Cromatográfica desta partição dos frutos de *K. rugosa*.

As frações FrH1 (68,9%) e FrH2 (73,3%), obtidas da Coluna Cromatográfica da partição hexânica, do extrato metanólico dos frutos, apresentaram as melhores porcentagens de inibição.



Figura 33: Efeito dos extratos e frações obtidos dos frutos frente à enzima APRT de Leishmania donovani.

Na figura 34 observamos os resultados obtidos do extrato metanólico (FoKRM), da partição hexânica (FoH) e das frações obtidas da Coluna Cromatográfica da partição hexânica e clorofórmica das folhas de *K. rugosa*.

As frações FoC22 (79,9%), FoC23 (82,7%) e FoC34 (82,1%), obtidas da Coluna Cromatográfica da partição clorofórmica, do extrato metanólico das folhas, apresentaram resultados bastante significativos.



Figura 34: Efeito dos extratos e frações obtidos das folhas frente à enzima APRT de Leishmania donovani.
É importante mencionar que muitas das amostras enviadas para os testes, relatadas na Tabela 13, não estão descritas nos resultados mostrados nas figuras acima, pois elas absorveram e/ou turvaram durante os ensaios bioquímicos. Quando isso acontece os resultados obtidos não são confiáveis, não podendo ser, portanto, relatados.



4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.4.1 Composição Química do Óleo Essencial das Folhas

Kielmeyera rugosa encontrada no estado de Sergipe não foi previamente submetida a qualquer investigação química. Nesta parte do trabalho, a composição química dos voláteis obtidas por hidrodestilação das folhas, flores e frutos desta espécie foi analisada por CG/EM, e identificadas como mostrado na Tabela 14-p. 89.

Desta forma, no óleo essencial das folhas (Figura 36) foram identificados 41 compostos, а maioria pertencendo à classe dos sesquiterpenos não oxigenados. Os dez componentes majoritários identificados (Figura 35) constituem 65-71% do total do óleo foram: (Z)-3hexen-1-ol (3,2%), α -cubebeno (11-13%), α -copaeno (11%), β -cubebeno (5-9%), β-cariofileno (9-13%), germacreno D (2-4%), cis-β-guaieno (3,3%), α selineno (6%), δ-cadineno (7-10,0%), 1-epi-cubenol (3-4%). A análise foi feita em duplicata e não foram observadas mudanças significativas na composição química, apenas uma pequena variação na abundância relativa de alguns compostos.



Figura 35: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de Kielmeyera rugosa.



Figura 36: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG/EM (coluna DB-5 30m) do óleo essencial das folhas de Kielmeyera rugosa. Condições : 40° C(2 min.)-220° C (4° C/min)-280° C (20° C/min). Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás arraste: He – 1,5 mL/min.

As substâncias identificadas, os dados de índices de retenção e a percentagem de cada substância no respectivo óleo estão mostrados na Tabela 14-p. 89.

4.4.2 Composição Química do Óleo Essencial dos Frutos

No cromatograma do óleo essencial dos frutos (Figura 37) foram identificados 32 compostos, a maioria destes pertencentes à classe dos sesquiterpernos não oxigenados, com 9 compostos majoritários (Figura 38) constituindo 76-77% do total do óleo: δ -valerolactona (1-9%), α -cubebeno (3-4%), α -copaeno (10-11%), (*E*,*E*)- α -farneseno (2-9%), β -cariofileno (11-16%), 1-epi-cubenol (1-4%), α -humuleno (3-5%), α -selineno (4-5%), δ -cadineno (23-32%). A análise foi feita em duplicata e não foram observadas mudanças significativas na composição química, apenas uma pequena variação na abundância relativa de alguns compostos.



Figura 37: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG/EM (coluna DB-5 30m) do óleo essencial dos frutos de Kielmeyera rugosa. Condições : 40° C(2 min.)-220° C (4° C/min)-280° C (20° C/min). Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás arraste: He – 1,5 mL/min.



Figura 38: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial dos frutos de Kielmeyera rugosa.

As substâncias identificadas, os dados de índices de retenção e a percentagem de cada substância no respectivo óleo estão mostrados na Tabela 14-p 89.

4.4.3 Composição Química do Óleo Essencial das Flores

No cromatograma do óleo essencial das flores (Figura 39) foram identificados 25 compostos, a maioria destes pertencentes à classe dos benzenóides, com 3 compostos majoritários (Figura 40) constituindo 92,7 % do total do óleo: álcool benzílico (18,6%), 2-feniletanol (58,2%) e eugenol (15,9%).



Figura 39: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG/EM (coluna DB-5 30m) do óleo essencial dos frutos de Kielmeyera rugosa. 40° C(2 min.)-220° C (4° C/min)-280° C (20° C/min). Injetor: 250° C, Detector: 280° C- Gás arraste: He – 1,5 mL/min.



Figura 40: Estrutura dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial das flores de Kielmeyera rugosa.

As substâncias identificadas, os dados de índices de retenção e a percentagem de cada substância no respectivo óleo estão mostrados na Tabela 14.

	Compostos	IRa	IRb	Área (%)					
		(calc.)	(lit.)	E-I	Folhas Frutos		Flores		
				FOI	nas	Fru		Flores	
				S1	S2	S1	S2	S1	
1	Propanoato de etila	726	717	-		-	-	0.2	
2	Acetato de n-propila	728	728	-		-	-	0.4	
3	Álcool isopentilico	747	741	-		-	-	0.2	
4	(Z)-3-Hexen-1-ol	853	859	3.2	3.0	0.5	2.8	-	
5	n-Hexanol	867	871	-	-	0.2	1.1	-	
6	δ- Valerolactona	954	958	-	-	0.9	8.7	-	
7	Álcool benzílico	1031	1032	tr	-	-	-	18.6	
8	(Z)- β -Ocimeno	1037	1037	-	-	0.3	1.2	-	
9	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1047	1050	-	-	1.0	-	-	
10	Acetofenona	1063	1065	tr	-	0.2	2.0	-	
11	Ácido Heptanóico	1071	-	0.2	-	-	-	-	
12	Linalool	1099	1097	0.2	-	-	tr	-	
13	n-Nonanal	1102	1101	0.2	-	-	tr	-	
14	2-Feniletanol	1113	1107	-	-	-	tr	58.2	
15	Acetato de Benzila	1162	1162	-	-	-	-	0.1	
16	Ácido Octanóico	1169	1183	0.5	0.4	-	-	-	
17	Butirato de (Z)-3-Hexenila	1184	1186	0.3	-	-	-	-	
18	2-Decanona	1191	1192	tr	-	-	-	-	
19	Salicilato de metila	1193	1192	tr	-	-	-	-	
20	Acetato de 2-fenil etila	1255	1258	-	-	-	-	0.4	
21	(E)-2-Decenal	1260	1264	0.3	0.3	-	-	-	
22	Ácido Nonanóico	1267	1271	0.5	0.4	-	-	-	
23	Álcool (E)-Cinamílico	1303	1304	-	-	-	-	0.1	
24	α-Cubebeno	1353	1351	12.9	10.8	4.2	3.4	-	
25	Eugenol	1356	1359	-	-	-	-	15.9	
26	Ciclosativeno	1370	1371	-	-	0.3	-	-	

Tabela 14: Composição do percentual relativa do óleo essencial das folhas, frutos e flores de Kielmeyera rugosa.

27	α-Copaeno	1379	1377	11.4	10.7	11.3	9.7	-
28	β-Bourboneno	1388	1388	0.2	0.6	-	-	-
29	β-Cubebeno	1393	1388	8.6	5.0	2.4	0.8	-
30	Metil eugenol	1401	1404	-	-	-	-	0.2
31	Cipereno	1403	1399	0.5	2.2	0.6	tr	-
32	α-Gurjuneno	1413	1410	1.3	0.9	0.6	tr	-
33	β-Cariofileno	1423	1419	8.8	12.8	16.4	11.2	0.1
34	β-Gurjuneno	1433	1434	0.2	0.3	0.3	-	-
35	α-Guaieno	1441	1440	0.9	1.1	-	-	-
36	Aromadendreno	1442	1441	-	-	0.3	0.9	-
37	(E)-Isoeugenol	1447	1451	-	-	-	-	0.1
38	cis-Muurola-3,5-dieno	1453	1450	-	-	0.3	-	-
39	α-neo-Cloveno	1453	1454	-	0.3	-	-	-
40	α-Humuleno	1457	1455	2.1	2.3	4.6	2.6	-
41	Allo-aromadendreno	1465	1460	0.8	0.5	1.6	0.8	-
42	trans-Cadina-1(6),4-dieno	1476	1477	-	-	0.8	-	-
43	γ-Muuroleno	1479	1480	1.5	1.1	1.4	2.0	-
44	Germacrene D	1485	1485	4.0	2.3	1.1	0.9	-
45	cis-Eudesma-6,11-dieno	1487	1490	-	-	0.3	-	-
46	β-Selineno	1490	1490	1.9	2.2	1.9	1.1	-
47	cis-β-Guaieno	1494	1493	3.3	3.3	-	-	-
48	γ-Amorfeno	1495	1496	-	-	0.6	-	-
49	α-Selineno	1499	1498	5.9	5.7	4.5	3.9	-
50	α-Muuroleno	1503	1500	-	-	0.7	-	-
51	β-bisaboleno	1509	1506	-	-	-	-	0.1
52	(E,E) - α -Farneseno	1509	1506	-	-	2.4	8.7	-
53	α-Bulneseno	1509	1510	0.9	1.1	-	-	-
54	γ-Cadineno	1515	1514	1.4	1.0	0.6	0.7	-
55	7- <i>epi</i> -α-Selineno	1522	1522	0.3	0.3	-	-	-
56	δ-Cadineno	1526	1523	10.0	7.0	31.6	23.1	0.1

Tabela 14: Continuação

57	trans-Cadina-1(2),4-dieno	1536	1535	0.9	1.2	0.7	0.7	-
58	α-Cadineno	1541	1539	1.6	2.2	0.3	-	-
59	α-Calacoreno	1546	1546	-	-	0.5	-	-
60	Elemicina	1554	1557	-	-	-	-	0.2
61	Germacreno B	1562	1561	0.7	0.8	-	-	-
62	(E)-Nerolidol	1563	1563	-	-	-	-	2.0
63	Espatulenol	1581	1578	0.5	0.8	-	-	-
64	Óxido de cariofileno	1588	1583	1.0	1.6	-	-	-
65	Gleenol	1589	1587	-	-	0.7	2.0	-
66	1-epi-Cubenol	1632	1629	3.3	3.7	1.3	4.3	0.1
67	Cubenol	1647	1647	2.3	2.7	0.3	3.3	-
68	α-Muurolol	1649	1646	0.6	0.6	-	-	-
69	(E)-Isoelemicina	1649	1649	-	-	-	-	0.1
70	α-Cadinol	1658	1654	0.9	1.2	0.4	0.8	-
71	α-Bisabolol	1684	1686	-	-	-	-	0.2
72	(2Z, 6E)-Farnesol	1698	1701	-	-	-	-	0.1
73	(2E,2E)-Farnesol	1721	1725	-	-	-	-	0.1
74	Benzoato de benzila	1765	1760	-	-	-	-	0.6
75	β-Bisabolenol	1785	1790	-	-	-	-	0.3
76	Miristato de isopropila	1826	1830	-	0.3	-	3.0	0.3
77	Acetato de (E,E) -Farnesila	1842	1847	-	-	-	-	0.2
	Derivados de Ácidos Graxos				4,8 ± 0,6		7,8 ± 9,9	
	Hidrocarbonetos Monoterpenos Hydrocarbonetos Sesquiterpenos				$0,1 \pm 0,1$ 87,5 ± 1,7		$1,3 \pm 0,1$ 88,3 $\pm 10,5$	
	Benzenóides				tr		1,1 ± 1,3	

Tabela 14: Continuação

IRa - Índice de Retenção calculado (de acordo com Van den dool & Kratz, 1963); IRb - Índice de retenção da Literatura (Adams, 1995); * tr = traços (<0,1 %).

Como esperado, os perfis dos voláteis das folhas, frutos e flores de *K. rugosa* mostraram diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas. Contudo, o perfil dos voláteis das folhas e frutos apresenta similaridades, pois são caracterizados pela presença de sesquiterpenos. Por outro lado, a

composição química do óleo essencial das flores é significativamente diferente, apresentando o predomínio de compostos do tipo benzenóides [ANDRADE *et al.*, 2007].

Recentemente, NOGUEIRA *et al.* (2001) investigou a possível importância taxonômica dos voláteis florais das espécies, sugerindo que as essencias florais podem refletir parcialmente as afinidades taxonômicas de uma espécie. Assim, agrupando os componentes voláteis das flores de *K. rugosa* em classes diferentes, foi possível observar que a abundância relativa dos compostos fornece um perfil (isoprenoides, 3,3%; derivado de ácidos graxos, 1,1%; benzenóides, 94,5%) similar às das espécies de *Clusia* da seção *Criuva* (*C. criuva* ssp. *criuva* e C. *criuva* ssp. *parviflora*). Espécies desta seção oferecem pólen como recompensa floral para polinizadores, enquanto que, outras espécies de *Clusia* oferecem resina floral.

Vale a pena mencionar que a predominância de sesquiterpenos nãooxigenados de folhas ($87,5 \pm 1,7\%$) e frutos ($88,3 \pm 10,5\%$) de *K. rugosa* pode ser de origem do látex, como revelada pelas análises por CG/EM da fração apolar do látex dos frutos de 12 espécies de *Clusia*, particularmente *C. lanceolata* (seção *Phoianthera*); enquanto uma percentagem muito baixa de benzenóides foi observada na fração apolar do látex dos frutos em apenas 2 espécies de *Clusia* [CÂMARA, 2001].

Parte



Conclusões

5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Kielmeyera rugosa* Choisy é inédito na literatura, permitindo o isolamento de oito substâncias, sendo elas: duas 4-fenilcumarinas (1 e 3), quatro propilcumarinas (2, 4, 5 e 6) e dois triterpenos (7 e 8).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Kielmeyera* de Restinga (dunas) mostraram uma predominância no isolamento de cumarinas preniladas do tipo "4-fenil" e "4-alquil", enquanto que para as espécies do Cerrado, as xantonas predominam [CRUZ *et al.*, 2002].

Considerando a predominância no isolamento de cumarinas "4-fenil" e "4-propil" em *K. rugosa*, nosso trabalho vem corroborar com estas observações, uma vez que o espécime estudado foi coletado em área de Restinga.

Os ensaios bioquímicos frente às enzimas GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. donovani* realizados com os extratos, partições e frações obtidos de *K. rugosa*, nos levam a crer que esta planta pode ser bastante promissora na busca de compostos tripanocidas e leishmanicidas. Esta afirmação pode ser confirmada pelo número de amostras que apresentaram atividade significativa frente à GAPDH (nove amostras acima de 80% e sete entre 60-80%) e APRT (duas amostras acima de 90% e seis entre 60-80%).

A caracterização química dos voláteis de *K. rugosa* representa o primeiro caso reportado no gênero e os nossos resultados mostraram que há diferenças tanto qualitativa quanto quantitativas na composição dos voláteis das folhas, flores e frutos desta espécie. Assim, o perfil dos voláteis de folhas e frutos apresenta similaridades, sendo caracterizados pela presença de sesquiterpenos, enquanto que nos voláteis das flores, os principais componentes pertencem à classe dos benzenóides. Desta forma, nossos resultados corroboram a idéia de que os voláteis florais possam desempenhar um papel importante na taxonomia e em aspectos ecológicos em Clusiaceae.

Parte



Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essencial oil by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois. 1995.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (3): 363-373, 2000.

ANDRADE, M.S.; SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; RIBEIRO, A.S.; RIBEIRO, A.S.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. DO C.E. Volatile compounds of the leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa Choisy* (Clusiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, v.22: 49-52, 2006.

ANTONACCIO, L. D.; SILVA, L. G. F. E; CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. III. Euxanthones from *Kielmeyera excelsa* and *K. corymbosa.* **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 37(2): 229-230, 1965.

ARNOLDI, A.; FARINA, G.; GALLI, R.; MERLINI, L.; PARRINO, MG. Analogs of phytoalexins – synthesis of some 3-phenylcoumarins and their fungicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34 (2): 185-188, 1986.

BARBOSA, V.M.; & NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Anas sp. 1. purification and properties of the enzyme. *Comp. Biochem. Phys. B*, 88 (2): 563-568, 1987.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. LTC/EDUSP, Vol. 1, 139. 1978.

BRUNETON, J.C. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants.* Paris: Intercepted Ltd, 1995. Bibliografia: p. 229-240.

BENNET, G.J.; LEE, H.H. Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*, 28: 967-998, 1989.

BERTOLI, A.; PISTELLI, L.; MORELLI, I.; SPINELLI, G.; MENICHINI, F. Constituents of *Hypericum hircinum* oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 617-620, 2000.

BORGES, E.S.; REZENDE, C.M. Main aroma constituents of genipap (*Genipa americana* L.) and bacuri (*Platonia insignis* M.). *Journal of Essential Oil Research*, 12; 71-74, 2000.

CAMARA, C. A. G. Clusia: cultura de tecidos e importância do seu látex na sobrevivência das especies. *Tese de Doutorado – Unicamp*. 2001

CARDOSO, M. DAS G.; GAVILANES, M. L.; VILLAR SHAN, A. Y. K.; MARQUES, M. C. S.; SANTOS, B. R.; DE OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. *Óleos Essenciais*. Hipertexto disponível em *http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_62.pdf*, acessado em janeiro de 2007.

CORRÊA, A.G. Taxol: da Descoberta ao Uso Terapêutico. *Quimica Nova*. 18 (5): 460-467, 1995.

CORTEZ, D. A.; YOUNG, M. C. M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J-L.; HOSTETTMANN, K. Xanthones, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 47 (7): 1367-1374, 1998.

CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. VII. Constituents of *Kielmeyera corymbosa.* **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 38(2): 269-271, 1966.

COULADIS, M.; BAZIOU, P.; PETRAKIS, P.V.; HARVALA, C. Essential oil composition of *Hypericum perfoliatum* L. growing in different locations in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 204-206, 2001.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60 (1): 52-60, 1997.

CRUZ, F. G., DAVID, J. M., GUEDES, M. L. S., CHAVEZ, J. P., MOREIRA. L. M. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. *Phytochemistry*, 47 (7): 1363-1366, 1998.

CRUZ, F. G.; SANTOS, N. A. S.; DAVID, J. M., GUEDES, M. L. S.; CHÁVEZ, J. P. Coumarins from *Kielmeyera argentea*. *Phytochemistry*, 48 (4): 703-706, 1998.

CRUZ, F.G.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, N.A.S.; GUEDES, M.L.S. Additional coumarins from *Kielmeyera reticulata*. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 13 (5): 704-707, 2002.

CRUZ, F.G.; Da SILVA-NETO, J.T.; GUEDES, M.L.S. Xanthones and Coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. **Journal of The Brazilian** *Chemical Society* 12 (1): 117-122, 2001.

Da SILVA, F. Avaliação do Teor e da Composição Química do Óleo Essencial de Plantas Medicinais Submetidas a Processos de Secagem e Armazenamento. *Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola*, Unicamp-SP, 2005.

Da SILVA, M.S. Uso e Avaliação Farmacológica de Plantas Medicinais Utilizadas na Medicina Popular do Povoado Colônia Treze em Lagarto/SE. 2003. Hipertexto disponível em http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT02/GTMariaSi lene.pdf

De ANDRADE, M. R. Constituintes químicos das Cascas, Folhas e Frutos de *Clusia nemorosa* Mey. (Guttiferae). *Dissertação de Mestrado em Química*, UFAL-AL, 1997.

De SOUZA, N.J. Industrial development of traditional drugs: the forskolin example a mini-review. *Journal and Ethnopharmacology*, 38 (2-3): 167-175, 1993.

DRUMOND, M.A.; KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; DE OLIVEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, V.R.; DE ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTI, J. Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. 2000. Hipertexto disponível em *http://www.Biodiversitas.org/caatinga/relatórios/uso_sustentável.pdf.*

DUARTE, A. P., CORRÊA, D. de B., SILVA, L. G. F., GONÇALVES, S. J., GOTTLIEB, O. R. Constituintes do *Kielmeyera rupestris*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 40: 307-311, 1968.

FERNANDES, A.M.A.P. Síntese, caracterização e avaliação de atividade biológica da mistura isomérica de 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromo-fenil)N,N-dimetil-2-propeno-1-amina e de seus isômeros geométricos. *Tese de Mestrado em Química*. Campinas-SP, 1997.

FULLER, R.W.; BLUNT, J.W.; BOSWELL, J.L.; CARDELLINA II, J.H.; BOYD, M.R. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. *Journal of Natural Products*, 62; 130-132, 1999.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, 1996.

GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M.A. "Doença de Chagas: Novas perspectivas no diagnóstico imunológico". *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 1 (3): 26-27, 1997.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; PEREIRA, M. O. S.; MESQUITA, A. A. L.; CORRÊA, D. B.; OLIVEIRA, G. G. The chemistry of brazilian guttiferae – XII Isopentenylated xanthones from *Kielmeyera* and *Calophyllum* species. *Tetrahedron*, 24: 1601-1610, 1968.

GOTTLEIB, O. R.; MESQUITA, A. A. LINS; MARTINS DA SILVA, E.; TEIXEIRA DE MELO, M. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XVII. Xanthones of *Kielmeyera ferruginea*. *Phytochemistry*, 8(3): 665-666, 1969.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; STEFANI, G. M. The chemistry of brazilian guttiferae—VI : 1,2,8-trioxygenated xanthones from *Kielmeyera petiolaris*. *Tetrahedron*, 22 (6): 1785-1788, 1966.

GOTTLIEB, O. R.; ANTONACCIO, L. D.; STEFANI, G.M.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. IV. 1,7,8- Trihydroxyxanthones from *Kielmeyera petiolaris and K. excelsa.* **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 37(2): 229-30, 1965.

GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; OLIVEIRA, G. G.; MELO, M. T. Xanthones from *Kielmeyera speciosa*. *Phytochemistry*, *9* (12): 2537-2544, 1970.

GOTTLIEB, O. R.; STEFANI, G. M. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XIX. Xanthones from *Kielmeyera excelsa*. *Phytochemistry*, 9 (2): 453-454, 1970.

GOTTLIEB, O.R.; LINSMESQ.A.A.; NAGEM T.J. Chemistry of brazilian guttiferae .27. xanthones from *kielmeyera rubriflora*. *Phytochemistry*, 10 (9): 2253-2255, 1971.

GRAMACHO, R. DA S.; NAGEM, T. J.; DE OLIVEIRA, T. T.; ELIANA, M.; DE QUEIROZ, L. R.; NEVES, A. A.; SADDI, N. Phenylcoumarins from *Kielmeyera elata*. *Phytochemistry*, 51(4): 579-581, 1999.

GUILET, D.; SERAPHIN D.; RONDEAU, D.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. *Phytochemistry*, 58 (4): 571-575, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30 (12): 3864-3874, 1991.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32 (7): 1141-1148, 1983.

HENRY, G.E.; JACOBS, H.; CARRINGTON, C.M.S.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F. Prenylated benzophenone derivatives from Caribbean *Clusia* species (Guttiferae). Plukenetiones B-G and xerophenone A. *Tetrahedron*, 55 (6): 1581-1596, 1999.

HORWITZ, S. B. How to make taxol from scratch: Devising a total synthesis of the anti-cancer drug taxol has engaged the attention of chemists for more than 20 years. But their ingenuity — and perseverance — has been rewarded. *Nature*, 367: 593-594, 1994.

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F. E VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores* (serie de textos da Escola de verão em química, Vol. IV), São Carlos: EdUFSCar. Pág.9 e 33, 2003.

HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.-L. The potencial of higher plants as a source of new drug. *Chimia*, 52: 10-17, 1998.

IINUMA, M.; TOSA, H.; TANAKA, T.; KANAMARU, S.; ASAI, F.; KOBAYASHI, Y.; MIYAUCHI, K.-I.; SHIMANO, R. Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19 (2): 311-314, 1996.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; FILHO, V.C.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense.* 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. *Journal Natural Products*, 66 (3): 368-371, 2003.

ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TAN, H.T.W.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Letters*, 169 (1): 15-19, 2001.

KAMCHONWONGPAISON, S., MESHNICK, S.R. The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *General Pharmacology: The Vascular System,* 27 (4): 587-592, 1996.

KINGSTON, D.G.I. The chemistry of taxol. *Pharmacology and Therapeutics*, 52: 1-34, 1991.

KOHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F.P.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; GONZALEZ, J.C.; HERNANDEZ, M.A.; IBARRA, R.A.; BERENDSOHN, W.G.; BIENZLE, U.; EICH, E. In vitro antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*, 67 (1): 89-91, 2001.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; GILBERT, B.; BONINI, S. E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 16 (7): 1101, 1977.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37 (6): 1517-1575,1994.

MARTINS, P.M. Inflência da Temperatura e da Velocidade do Ar de Secagem no Teor e na Composição Química do Óleo Essencial de Capim-Limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF.). **Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola** – Universidade Federal de Visçoca – MG, 2000.

MONTEIRO, M. C. M. Estudo químico dos caules de *Kielmeyera rubriflora* Camb.(Clusiaceae). *Dissertação (mestrado)* – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química – Araraquara, 2006.

MOREL, C.; GUILET, D.; OGER, JM.; SÉRAPHIN, D.; SÉVENET, T.; WIART, C.; HADI, A.H.A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. 6-Acylcoumarins from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry* 50 (7): 1243-1247, 1999.

MU, L.Y.; WANG, Q.M.; NI, Y.C. Effect of Daphnetin on SOD Activity and DNA Synthesis of Plasmodium falciparum in vitro. *Chinese J Parasitol parasit Dis*, 21 (3): 157-159, 2003.

NAGEM, T. J.; DE A. E SILVA, M. Xanthones and phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila*. *Phytochemistry*, 27 (9): 2961-2962, 1988.

NOGUEIRA, P.C.L. Contribuição a Química dos Compostos Voláteis e Interações com Organismos Receptores. *Tese de Doutorado – Unicamp*, Instituto de Química, SP: [s.n], 2002.

NOGUEIRA, P.C.L.; MARSAIOLI, A.J.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G.J.; LOPES, A.V. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry*, 56 (5): 443-452, 2001.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, B.; FILHO, V.C. Gênero *Calophyllum*: Importância Química e Farmacológica. *Química nova*, 29 (3): 549-554, 2006.

ONAWUNMI GO, OGUNLANA EO. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (Cymbopogon citratus). Int *J Crude Drug Res* 1986;24:64-8.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; F.M., DA CUNHA, ; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from Cordia verbenacea. (In Press). Journal of Ethnopharmacology, 2006.

PERES, V.; NAGEM, T. J. Trioxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry*, 4 (2): 191-214, 1997.

PIMENTA, A.; MESQUITA, A.A.L.; CAMEY, M.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHAES, M.T. Chemistry of Brazilian Guttiferae; xanthonic constituents of *Kielmeyera coriacea*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 36(1): 39-41, 1964.

PINTO, M.M. DE M.; MESQUITA, A.A.L.; GOTTLIEB, O.R. The chemistry of Brazilian Guttiferae. Part 4. Xanthonolignoids from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 26 (7): 2045-2048, 1987.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M; FERREIRA, A. G. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). *Química Nova*, 26 (2): 157-160, 2003.

PORTO, A.L.M.; MACHADO, S.M.F.; DE OLIVEIRA, C.M.A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E.; MARSAIOLI, A.J. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry*, 55 (7): 755-768, 2000.

RAAD, I.; TERREUX, R.; RICHOMME, P.; MATERA, E-L.; DUMONTET,C.; RAYNAUD, J.; GUILET, D. Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarins inhibiting the multidrug transporter P-glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14 (20): 6979-6987, 2006.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; APAN, T. R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C. K.; VÁZQUEZ-TORRES, M. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences*, 75 (13): 1635-1647, 2004.

ROCHA, W. C. Busca de Substância Bioativas em Plantas Amazônicas: *Adiscanthus fusciflores* (Rutaceae), *Trichilia Pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). *Tese de Doutorado em Química*, UFSCar. São Carlos – SP, 2005.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.A.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata. Journal of Natural Products*, 66 (5): 634-637, 2003.

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61 (8): 1053-1071, 1998.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; DE SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* (16), 38-43, 2000.

SILVA, L.G.F.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. Constituintes da *Kielmeyera rosea*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40 (2): 155-156, 1968.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5° ed.Ed.UFRGS, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SOBRINHO, D.C.; HAUPTLI, M.B.; APPOLINÁRIO, E.V.; KOLLENZ, C.L.M.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids isolated from *Parahancornia ampa*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2 (1): 15-20, 1991.

SOTO, J.; ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J.D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for new world cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 33: 54-61, 2001.

SOUZA, D. H. F., GARRAT. R. C., ARAÚJO, A. P. U., GUIMARÃES, B. G., JESUS, W. D. P., MICHELIS, P. A. M., HANNAERT, V., OLIVA, G. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted Inhibitor Design. *Febs Letters*, Amsterdam, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

SULTANBAWA, M.U.S. Xanthonoids of tropical plants. *Tetrahedron*, 36 (11): 1465-1506, 1980.

TAVARES, L.M.S.A.; TAVARES, E.D. Incidência, Distribuição Geografica e Aspectos Ambientais das áreas Endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. *Informe Epidemiológico do SUS*, 8 (1): 47-52, 1999.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Research*, 58 (1): 89-98, 2003.

VERLET, N.(1993). Overview of the essential oils economy. *Acta Horticulturae.*, v. 6333, p. 5-67, 1993.

VEROTTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, P.V.; NERI, M.G.; RAIMONDI, A.; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. *Phytochemistry*, 65 (21): 2867-2879, 2004.

YUNES, R. A., FILHO, V. C. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(1): 99-105, 1998.

Parte



Anexos





Figura 41: Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 1.



Figura 42: Espectro de RMN de ¹H da substância 1 (500 MHz, CDCl₃).



Figura 43: Ampliações das regiões δ 5,5-7,5 ppm (1) e δ 0,5-3,0 ppm (2) do espectro de RMN¹H da substância 1.



Figura 44: Espectro de RMN de ¹³C da substância 1 (125,7 MHz, CDCl₃).



El (ppm) Figura 46: Mapa de correlação HSQC da substância 1 (11 Tesla, CDCl₃).

14-



Figura 47: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 1.



Figura 48: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 1.



Figura 50: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 1.



Figura 51: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 1.



Figura 52: Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (pastilha de KBr) da substância 2.





155

Figura 55: Espectro de RMN de ¹³C da substância 2 (100 MHz, CDCl₃).

T

155

Т

766

ppm (il)

50





Figura 58: Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (IV) (pastilha de KBr) da substância 3.





Figura 60: Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância 3.





Figura 62: Ampliação do espectro de RMN de ¹³C da Substância 3.



Figura 63: Ampliação do espectro de RMN de ¹³C da Substância 3.



Figura 64: Ampliação do espectro de RMN de ¹³C da Substância 3.







Figura 67: Ampliação do mapa de correlação COSY da substância 3.


Figura 68: Ampliação do mapa de correlação COSY da substância 3.





Figura 70: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 3.



Figura 71: Ampliação do mapa de correlação HSQC da substância 3.



Figura 72: Mapa de correlação HMBC da substância 3 (9,4 Tesla, CDCl₃).



Figura 73: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3.



Figura 74: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3.



Figura 75: Ampliação do mapa de correlação HMBC da substância 3.



Figura 76: Espectro de Absorção na Região do Infravermelho (IV) (janela de KBr) das substâncias 4 e 5.



Figura 77: Espectro de RMN de ¹H das substâncias 4 e 5 (500 MHz, CDCl₃).



Figura 78: Ampliação do espectro de RMN de ¹H das substâncias 4 e 5.



Figura 79: Ampliação do espectro de RMN de ¹H das substâncias 4 e 5.



Figura 80: Espectro de RMN de ¹³C das substâncias 4 e 5 (125,7 MHz, CDCl₃).



Figura 81: Experimento DEPT 135° e 90° das substâncias 4 e 5 (125,7 MHz, CDCl₃).



Figura 83: Ampliação do mapa de correlação HSQC das substâncias 4 e 5.



Figura 84: Ampliação do mapa de correlação HSQC das substâncias 4 e 5.



Figura 85: Mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5 (9,4 Tesla, CDCl₃).



Figura 86: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5.



Figura 87: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5.



Figura 88: Ampliação do mapa de correlação HMBC das substâncias 4 e 5.



Figura 89: Espectro de RMN de ¹H da substância 6 (400 MHz, CDCI₃).



Figura 90: Espectro de RMN ¹³C da substância 6 (100 MHz, CDCl₃).



Figura 92: Ampliação do espectro de RMN de ¹H das substâncias 7 e 8.

1.00

152



Figura 93: Ampliação do espectro de RMN de ¹H das substâncias 7 e 8 (400 MHz, CDCl₃).







Figura 96: Ampliação do espectro de RMN ¹³C das substâncias 7 e 8 (100 MHz, CDCl₃).

H/C	δc Exp.	δ _H Exp. (ppm)	δc Lit.	δ _H Lit. (ppm)
	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J=</i> Hz)
2	159,6	-	159, 6	
3	112,6	6,00 (<i>s</i> , 1H)	112,6	5,99 (s, 1H)
4	154,8	-	154,7	
4 a	102,2	-	102,2	
5	164,4	14,81(<i>s</i> , 1H, 5-OH)	164,5	14,73 (s, 1H, 5-OH)
6	107,1	-	106,9	
7	156,4	-	156,4	
8	101,5	-	101,4	
8 a	158,1	-	157, 8	
4'	115,5	6,90 (<i>d</i> , 1H, 9, 9 Hz)	115,5	6,90 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)
5'	126,3	5,64 (<i>d</i> , 1H, 9, 9 Hz)	126,2	5,60 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)
6'	79,8	-	79,8	
7' e 8'	28,1	1,60 (<i>s</i> , 6H)	28,1	1,60 (s, 6H [°])
1"	206,7	-	206,7	
2"	53,6	2,97 (<i>d</i> , 2H, 6, 9 Hz)	53,5	2,90 (<i>d</i> , 2H, 6.9 Hz)
3"	25,1	2,24 (<i>m</i> , 1H)	25,0	2,19 (<i>m</i> , 1H)
4" e 5"	22,6	0,97(<i>d</i> , 6H, 6, 9 Hz)	22,6	0,94 (<i>d</i> , 6H, 6,7 Hz)
1""	139,2	-	139,2	
2"" e 6""	127,1	7,32 (<i>m</i> , 2H)	127,1	7,30 (<i>m</i> , 1H)
3"" e 5""	127,6	7,42 (<i>m</i> , 2H)	127,5	7,40 (<i>m</i> , 2H)
4""	128,2	7,42 (<i>m</i> , 1H)	128,1	7,40 (<i>m</i> , 2H)

Tabela 15: Dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃; 9,4 tesla) da substância 1.

H/C	δc Exp.	δ _H Exp. (ppm)	δc Lit.	δ _H Lit. (ppm)
	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)
2	159,5	-	160,9	
3	109,3	6,00 (s, 1H)	111,2	5,95 (s, 1H)
4	162,0	-	163,8	
4 a	99,3	-	99,4	
5	163,1	-	162,2	
6	110,1	-	110,7	
7	163,1	14,15 (s, 1H)	163,2	14,18 (s, 1H)
8	104,6	-	104,6	
8 a	157,3	-	157,7	
2`	92,8	4,85 (<i>dd</i> , 2H, 9,2 e 8,4 Hz)	92,9	4,85 (<i>t</i> , 2H, 9,0 Hz)
3`	26,5	2,82 (<i>m</i> , 1H)	26,4	2,87 (<i>dd</i> , 1H, 15,4 e 8,9 Hz)
				2,99 (<i>dd</i> , 1H, 15,4 e 9,7 Hz)
4`	71,4	-	71,6	
5`	26,1*	*1,40 (s, 3H)	26,0	1,41 (s, 3H)
6	24,7*	*1,28 (s, 3H)	24,6	1,28 (s, 3H)
1``	210,4	-	210,5	
2``	46,6	3,87 (<i>m</i> , 1H)	46,7	3,85 (<i>m</i> , 1H)
3``	27,1	1,86 (<i>m</i> , 1H) e 1,65 (<i>m</i> ,	27,2	1,92 (<i>m</i> , 1H) e 1,50 (<i>m</i> , 1H)
		1H)		
4``	11,6	0,96 (<i>t</i> , 3H, <i>J</i> =7,4 Hz)	11,7	0,99 (<i>t</i> , 3H, 5,6 Hz)
5``	17,0	1,23 (<i>d</i> , 3H, 6,8 Hz)	16,6	1,23 (<i>d</i> , 3H, 8,0 Hz)
1```	37,6	2,83 (<i>m</i> , 2H)	39,5	2,82 (<i>m</i> , 2H)
2```	22,6	1,63 (<i>m</i> , 2H)	23,8	1,64 (<i>m</i> , 2H)
3```	13,9	1,03 (<i>t</i> , 3H, 7,2 Hz)	14,0	1,03 (<i>t</i> , 3H, 6,4 Hz)
*Into	naamhiánai			

Tabela 16: Dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 9,4 tesla) da substância 2.

*Intercambiáveis

H/C	δc Exp.	δ _H Exp. (ppm)	δc Lit.	δ _H Lit. (ppm)
	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)
2	159,5	-	159,9	-
3	112,8	5,95 (s, 1H)	113,4	5,96 (s, 1H)
4	156,2	-	156,8	-
4 a	102,2	-	102,8	-
5	164,2	14,66 (s, 1H)	164,8	14,45 (s, 1H)
6	107,2	-	107,9	-
7	155,0	-	155,5	-
8	101,6	-	102,2	-
8 a	158,1	-	158,7	-
4'	115,5	6,87 (<i>d</i> , 1H, 10,0 Hz)	116,1	6,88 (<i>d</i> , 1H, 10,1 Hz)
5'	126,4	5,62 (<i>d</i> , 1H, 10,0 Hz)	127,0	5,64 (<i>d</i> , 1H, 10,01 Hz)
6'	80,0	-	80,7	-
*7'	*28,2	*1,58 (s, 3H)	28,8	1,57 (s, 3H)
*8'	*28,3	*1,56 (s, 3H)	28,7	1,55 (s, 3H)
1"	205,4	-	206,0	-
2"	48,5	3,03 (<i>dd</i> , 1H, 7,6 e 17,0 Hz)	49,1	3,05 (<i>dd</i> , 1H, 7,3 e 17,0 Hz)
		3,26 (<i>dd</i> , 1H, 6,0 e 17,0 Hz)		3,25 (<i>dd</i> , 1H, 6,1 e 17,0 Hz)
3"	29,3	2,63 (<i>m</i> , 1H)	30,0	2,65 (<i>m</i> , 1H)
4"	68,7	4,14 (<i>d</i> , 2H, 6,4 Hz)	69,3	4,16 (<i>d</i> , 2H, 6,1 Hz)
5"	17,2	1,06 (<i>d</i> , 3H, 6,8 Hz)	17,8	1,06 (<i>d</i> , 3H, 6,7 Hz)
1""	139,1	-	139,8	-
2""e 6""	127,1	7,26 (<i>m</i> , 2H)	127,6	7,26 (<i>m</i> , 2H)
3"" e 5""	127,9	7,38 (<i>m</i> , 2H)	128,2	7,38 (<i>m</i> , 2H)
4""	128,2	7,38 (<i>m</i> , 1H)	128,8	7,38 (<i>m</i> , 1H)
1C	166,7	-	167,3	-
2 C	117,7	6,36 (<i>d</i> , 1H, 16,0 Hz)	118,4	6,38 (<i>d</i> , 1H, 16,0 Hz)
3 C	144,9	7,61 (<i>d</i> , 1H, 16,0 Hz)	145,5	7,62 (<i>d</i> , 1H, 16,0 Hz)
4 C	134,2	-	134,9	-
5C e 9C	127,6	7,47 (<i>m</i> , 2H)	128,6	7,46 (<i>m</i> , 2H)
6C e 8C	128,9	7,38 (<i>m</i> , 2H)	129,5	7,38 (<i>m</i> , 2H)
7C	130,4	7,38 (<i>m</i> , 1H)	130,9	7,38 (<i>m</i> , 1H)

Tabela 17: Dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 9,4 tesla) da substância 3.

*intercambiáveis

Н	δ _H Exp. (ppm)	δ _H Lit. (ppm)	δ _H Exp. (ppm)	δ _H Lit. (ppm)
	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)
	Substância 4	Substância 4	Substância 5	Substância 5
3	5,95 (s, 1H)	5,99 (s, 1H)	5,95 (s, 1H)	5,99 (s, 1H)
5	15,39 (s, 1H, 5-OH)	15,29 (s, 1H, 5-OH)	15,39 (s, 1H, 5-OH)	15,29 (s, 1H, 5-OH)
4'	6,83 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)	6,90 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)	6,83 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)	6,90 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)
5'	5,64 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)	5,60 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz ['])	5,64 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz)	5,60 (<i>d</i> , 1H, 10 Hz ['])
7' e 8'	1,54 (s, 6H)	1,56 (<i>m</i> , 2 H, H-2''')	1,54 (s, 6H)	1,60 (s, 6H)
2"	3,74 (<i>m</i> , 1 H)	3,72 (<i>m</i> , 1 H, H-2 ^{'''})	2,97 (<i>d</i> , 2H, 6, 8 Hz)	2,90 (<i>d</i> , 2H, 6,9 Hz)
3"	1,45 (<i>m</i> , 2H)	1,40 (<i>m</i> , 2H, H-3'')	2,27 (<i>m</i> , 1H)	2,19 (<i>m</i> , 1H)
4"	0,92 (t, 3H, 7,5 Hz)	0,97 (t, 3H, 7,3 Hz)	0,98 (<i>d</i> , 3H, 6, 9 Hz)	0,94 (<i>d</i> , 6H, 6,7 Hz)
5"	1,19 (<i>d</i> , 3H, 6,7 Hz)	1,17 (<i>d</i> , 3H, 6,7 Hz)	0,98 (<i>d</i> , 3H, 6, 9 Hz)	0,94 (<i>d</i> , 6H, 6,7 Hz)
1""	2,94 (t, 2H, 7,5 Hz)	2,89 (<i>t</i> , 2H, 7,5 Hz)	2,94 (<i>t</i> , 2H, 7,5 Hz)	2,89 (<i>t</i> , 2H, 7,5 Hz)
2""	1,64 (<i>m</i> , 2 H)	1,65 (<i>m</i> , 2H)	1,64 (<i>m</i> , 2 H)	1,65 (<i>m</i> , 2H)
3""	0,92 (t, 3H, 7,3 Hz)	0,89 (<i>t</i> , 3H, 7,5 Hz)	0,92 (<i>t</i> , 3H, 7,3 Hz)	0,89 (<i>t</i> , 3H, 7,5 Hz)

Tabela 18: Dados espectrais de RMN ¹H (9,4 Tesla, CDCl₃) das sustâncias 4 e 5.

С	δc Exp. (ppm)	δc Lit. (ppm)	δc Exp. (ppm)	δc Lit. (ppm)
	Substância 4	Substância 4	Substância 5	Substância 5
2	160,0	159, 6	160,0	159, 6
3	110,3	110,1	110,3	110,1
4	159,4	159,2	159,4	159,2
4 a	103,2	103,1	103,3	103,1
5	165,2	165,1	165,2	165,1
6	106,9	106,7	107,1	106,7
7	157,5	157,1	157,2	157,1
8	101,5	101,4	101,5	101,4
8a	155,0	154,9	155,0	154,9
4'	115,7	115,5	115,7	115,5
5'	126,2	126,1	126,1	126,1
6'	79,6	79,5	79,6	79,5
7' e 8'	28,1	27,9	28,2	28,2
1"	211,9	211,7	207,1	207,2
2"	46,6	46,5	53,6	53,6
3"	26,7	26,6	25,1	25,1
4"	11,8	11,7	22,6	22,6
5"	16,7	16,6	22,6	22,6
1""	38,4	38,3	38,4	38,3
2""	22,7	22,6	22,7	22,6
3""	13,9	13,8	13,9	13,8

Tabela 19: Dados espectrais de RMN de ¹³C (11 Tesla, CDCl₃) das sustâncias 4 e 5.

H/C	δc	δ _H Exp. (ppm)	δc Lit.	δ _H Lit. (ppm)
	Exp.	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)	(ppm)	(<i>mult.</i> , int, <i>J</i> =Hz)
	(ppm)			
2	160,9		160,5	
3	110,1	6,01 (s, 1H)	109,6	5,94 (s, 1H)
4	159,6		160,1	
4 a	103,1		103,2	
5	166,0	14,68 (s, 1H)	164,4	15,23 (s, 1H)
6	109,7		107,4	
7	161,0	9,96 (s, 1H)	161,5	10,00 (s, 1H)
8	104,2		104,6	
8 a	159,5		157,9	
1'	28,7	2,80-2,99 (<i>m</i> , 1H)	28,7	2,95-3,00 (<i>m</i> , 1H)
		3,15 (<i>ddl</i> , 1H, 1,2 e 13,2 Hz)		3,26 (<i>dd</i> , 1H, 2,0 e 15,0 Hz)
2'	77,2	4,43 (<i>m</i> , 1H)	77,2	4,46 (<i>t</i> , 1H, 8,5 Hz)
3'	146,4		145,9	
4'	110,1	4,91 (s, 1H) e 5,02 (s, 1H)	111,1	4,90 (s, 1H) e 5,00 (s, 1H)
5'	18,5	1,87 (s, 3H)	18,7	1,91 (s, 3H)
1"	206,2		207,2	
2"	53,5	3,24 (<i>m</i> , 2H)	53,6	3,19 (<i>d</i> , 2H, 6,5 Hz)
3"	25,7	2,27 (<i>m</i> ,1H)	25,1	2,31 (<i>m</i> , 1H)
4"	22,6	0,98 (s, 3H)	22,6	0,94 (<i>d</i> , 6H, 6,7 Hz)
5"	23,0	0,98 (s, 3H)	22,6	0,94 (<i>d</i> , 6H, 6,7 Hz)
1""	38,9	2,98 (<i>m</i> , 2H)	38,6	2,97 (<i>m</i> , 2H)
2""	22,6	1,63 (<i>m</i> , 2H)	22,8	1,65 (<i>m</i> , 2H)
3,,,	14,0	1,01(m, 3H)	14,0	1,02 (<i>t</i> , 3H, 7,0 Hz)

Tabela 20: Dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 9,4 tesla) da substância 6.

*intercambiáveis

H/C	δc Exp. (ppm)	δc Lit. (ppm)	δc Exp. (ppm)	δc Lit. (ppm)
	(lupeol)	(lupeol)	(α-amirina)	(a-amirina)
1	38,8	38,7	38,8	38,7
2	27,5	27,4	27,5	27,2
3	79,0	78,9	79,0	78,3
4	38,9	38,8	38,8	38,7
5	55,4	55,3	55,3	55,2
6	18,3	18,3	18,3	18,3
7	34,4	34,2	33,0	32,9
8	40,9	40,8	40,0	40,0
9	50,5	50,4	47,8	47,7
10	37,2	37,1	37,2	36,9
11	21,0	20,9	23,4	23,3
12	25,2	25,1	124,5	124,3
13	38,1	38,0	139,6	139,3
14	43,0	42,8	42,9	42,0
15	27,5	27,4	28,7	28,7
16	35,6	35,5	26,7	26,6
17	43,0	43,0	33,0	33,7
18	48,4	48,2	59,1	58,9
19	48,0	47,9	39,6	39,6
20	150,9	150,9	39,7	39,6
21	29,9	29,8	31,3	31,2
22	40,0	40,0	41,6	41,5
23	28,0	28,0	28,1	28,1
24	15,3	15,4	15,6	15,6
25	16,1	16,1	15,6	15,6
26	16,0	15,9	16,9	16,8
27	14,6	14,5	23,4	23,3
28	18,0	18,0	28,1	28,1
29	109,3	109,3	17,4	17,4
30	19,3	19,3	21,3	21,3

Tabela 21: Dados espectrais de RMN ¹³C (CDCl₃, 9,4 tesla) da substância 7(lupeol) e 8 (α-amirina).

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo