

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Conchocarpus cyrtanthus*
(RUTACEAE)

LIDIANA SANTANA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2014

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Conchocarpus cyrtanthus*
(RUTACEAE)

LIDIANA SANTANA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira
Coorientador: Prof. Dr. Raimundo Braz-Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 016/2014

Oliveira, Lidiana Santana dos Santos de

Constituintes químicos de *Conchocarpus cyrtanthus* (RUTACEAE) /
Lidiana Santana dos Santos de Oliveira. – 2014.
220 f. : il.

Orientador: Ivo José Curcino Vieira
Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.
Bibliografia: f. 181 – 187.

1. *Conchocarpus cyrtanthus* 2. Cumarinas 3. Diterpenos I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 583.77

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Conchocarpus cyrtanthus*
(RUTACEAE)

LIDIANA SANTANA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

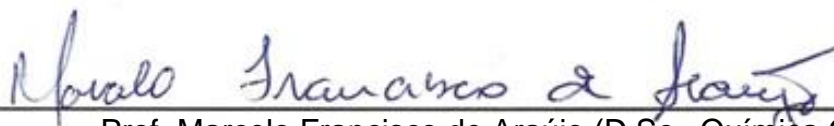
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção vegetal.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2014.

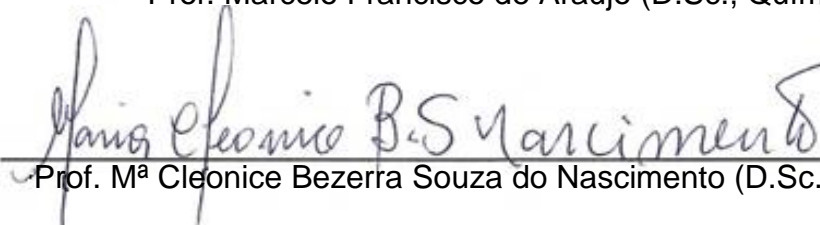
Comissão Examinadora:



Prof. Lara Fonseca Barbosa Siqueira (D.Sc., Química de Produtos Naturais) - IFF



Prof. Marcelo Francisco de Araújo (D.Sc., Química Orgânica) - IFF



Prof. M^a Cleonice Bezerra Souza do Nascimento (D.Sc., Química Orgânica) - IFRJ



Prof. Ivo José Curcino Vieira (D.Sc., Química Orgânica) - UENF
Orientador

Se eu fosse dedicar este trabalho a todos que merecem, uma página seria pouco, pois muitos me ajudaram seja com palavras, amizade ou de muitas outras formas, por isso, atendo-me a dedicar esse trabalho a pessoa mais importante para que eu pudesse continuar com ele até o fim...

À minha mãe, Eunice Domingas de Santana, sinônimo de coragem, determinação, carinho, ternura, compreensão, dedicação, renúncia, entrega e amor, que, assim como Maria, disse sim a Deus vivendo segundo sua vontade, mostrando-me o caminho certo a seguir, não desanimando ao descobrir sua doença crônica, se mantendo de pé frente a perdas (mãe, irmão, neto e filha) que lhe ocorrem e, mesmo depois de tudo isso, continua a dizer sim todas as vezes que é posta à prova.

“A fé é um modo de já possuir aquilo que se espera, é um meio de conhecer realidades que não se veem.”

“... Portanto, o que Deus uniu, o homem não deve separar.”

Hb 11,1; Mt 19, 6

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua imensa capacidade de me ouvir mesmo sem eu pronunciar uma única palavra, por enxugar minhas lágrimas antes mesmo que elas rolassem em meu rosto, por me dar forças para levantar quando eu não tinha ânimo nem mesmo para abrir os olhos e por colocar em minha vida pessoas (Eunice e Geraldo, sinônimo de compreensão, queridos e amados pais, Carlos, sinônimo de fidelidade, ternura companheirismo e carinho, amado esposo) que não me permitiram desistir de concluir mais esta “aventura”;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF – PPGPV – CCTA – LTA – CCT), pela bolsa concedida e oportunidade de realização deste curso;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela parceria na realização das análises de ressonância magnética nuclear e de massas;

Ao professor Doutor Ivo José Curcino Vieira pela orientação e amizade na realização deste trabalho;

Ao professor Doutor Raimundo Braz Filho pela orientação e ajuda na elucidação estrutural das substâncias isoladas;

À professora Maria Cleonice Bezerra do Nascimento por sua amizade e me ajudar no contato com os professores Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz Filho;

Aos professores do programa de pós-graduação do CCT e CCTA – UENF – pelos ensinamentos das disciplinas ministradas que em muito contribuíram para minha formação acadêmica;

Aos meus pais, Geraldo e Eunice, por compreender minhas ausências em momentos difíceis, e minha distância, mesmo quando eu estava perto;

Aos meus irmãos e irmãs, por compreender minha ausência nas festas de aniversário de seus filhos, ou até mesmo para um cafezinho no fim da tarde;

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelos momentos de descontração e alegria quando estamos juntos;

Ao meu esposo, Carlos, sem o qual eu não teria conseguido suportar a distância de minha família, por sua compreensão, seu companheirismo e seu carinho;

A minhas cunhadas, Eva Maria, pelas conversas engraçadas que temos, e Marilene, por além de cunhada ser também minha amiga;

Aos colegas de laboratório de Ciências Químicas (Química de Produtos Naturais) – UENF: Adria (macarrão), Amanda, Antônio Sérgio (Antônio Jorge), Heloisa, Jucimar, Lara, Milena, Michelle, Otoniel (bigode) e Vinícius, pela ajuda nas vezes em que foram solicitados e pelo convívio;

Aos colegas do PPGPV: Cynthia, Ivana e Rene pela ajuda, indispensável, no desenvolvimento dos exercícios das disciplinas cursadas juntos e, especialmente, pela amizade conquistada;

E por fim, a todos aqueles que não foram citados, mas que de forma direta ou indireta colaboraram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de esquemas	xviii
Lista de tabelas	xx
Lista de quadros	xxiii
Lista de abreviaturas e símbolos	xxiv
RESUMO	xxvi
ABSTRACT	xxviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivos gerais	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 A Família Rutaceae	5
3.2 O gênero <i>Conchocarpus</i> J. C. Mikan	10
3.3 Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Conchocarpus</i>	17
3.4 A espécie <i>Conchocarpus cyrtanthus</i> Kallunki & Pirani	19
3.5 Alguns metabólitos secundários	20
3.5.1 Alcaloides	20
3.5.2 Cumarinas	22
4. METODOLOGIA	25
4.1 Material	25

4.1.1	Material botânico	25
4.1.2	Equipamentos	25
4.1.3	Solventes e reagentes	26
4.2	Experimental	27
4.2.1	Preparo dos extratos brutos	27
4.3	Descrição experimental dos constituintes químicos isolados da madeira da espécie <i>Conchocarpus cyrtanthus</i> Kallunki & Pirani.	28
4.3.1	Análise cromatográfica do extrato em hexano (CCHM).	28
4.3.1.1	Análise cromatográfica da fração CCHM-7.	29
4.3.1.2	Análise cromatográfica da fração CCHM-10.	30
4.3.1.3	Análise cromatográfica da fração CCHM-11.	31
4.3.2	Análise cromatográfica do extrato metanólico CCMM.	32
4.3.2.1	Análise cromatográfica da fração CCMM-2.	33
4.3.2.2	Análise cromatográfica da fração CCMM-3.	34
4.3.2.3	Análise cromatográfica da fração CCMM-4.	36
4.3.2.4	Análise cromatográfica da fração CCHM-5.	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
5.1	Substâncias isoladas	40
5.2	Elucidação estrutural	42
5.2.1	Cumarinas	42
5.2.1.1	Elucidação estrutural da mistura das substâncias 1 + 2.	42
5.2.1.2	Elucidação estrutural da substância 3.	50
5.2.2	Esteroides	59
5.2.2.1	Elucidação estrutural da mistura das substâncias 4 + 5 + 6.	59
5.2.2.2	Elucidação estrutural da mistura das substâncias 7 + 8 + 9.	71
5.2.3	Diterpenos	82
5.2.3.1	Elucidação estrutural da substância 10.	82
5.2.3.2	Elucidação estrutural da substância 11.	99
5.2.3.3	Elucidação estrutural da substância 12.	116
5.2.3.4	Elucidação estrutural da substância 13.	131
5.2.3.5	Elucidação estrutural da substância 14.	146
5.3.4	Alcaloides	161
5.2.4.1	Elucidação estrutural da substância 15.	161
5.3.5	Lignana	170

5.2.5.1 Elucidação estrutural da substância 16.	170
6. CONCLUSÕES	179
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global de Rutaceae. Fonte: Stevens (2001).	8
Figura 2: Estrutura do alcaloide pilocarpina e do flavonoide rutina, ambos isolados de <i>Xilocarpus jaborandi</i> e <i>Rute graveolência</i> .	9
Figura 3: Estruturas de algumas substâncias isoladas da família Rutaceae.	9
Figura 4: Estruturas dos tipos de cumarinas produzidos na família Rutaceae.	10
Figura 5: Mapa de distribuição do gênero <i>Conchocarpus</i> J. C. Mikan no Brasil. A parte em branco representa os estados onde ainda não foram descritas nenhuma espécie.	11
Figura 6: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. heterophyllus</i> .	12
Figura 7: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. gaudichaudianus</i> .	13
Figura 8: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. fontanesianus</i> .	13
Figura 9: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. macrocarpus</i> e <i>C. cuneifolius</i> .	14
Figura 10: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. longifolius</i> .	15
Figura 11: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>C. macrophyllus</i> .	15
Figura 12: Estruturas das substâncias isoladas de <i>C. paniculatus</i> .	16
Figura 13: Estruturas das substâncias isoladas de <i>C. inopinatus</i> .	16

Figura 14: Estruturas das substâncias isoladas de <i>C. marginatus</i> .	17
Figura 15: Estruturas de alcaloides que podem ser os princípios ativos que foram ativos sobre as formas tripamastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	17
Figura 16: Estrutura de substâncias que apresentaram redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE).	18
Figura 17: Estrutura de substâncias que apresentaram moderada atividade moluscicida contra <i>Biomphalaria glabrata</i> .	18
Figura 18: Desenho de <i>C. cyrtanthus</i> : a) ápice da haste; b) flor, vista lateral e frontal; c) corola aberta, disco de androceu e gineceu com parte do cálice removido; d) anteras, vistas adaxial e abaxial; e) disco de ápice do estame; f) ovário na seção longitudinal e ovário intacto; g) fruto. Fonte: kallunki e Pirani, 1998	19
Figura 19: Fotografia das flores de <i>Conchocarpus cyrtanthus</i> . Fonte: http://zipcodezoo.com/Plants/C/Conchocarpus_cyrtanthus/	20
Figura 20: Estrutura da colchicina, alcaloide com caráter ácido. (Brandão e colaboradores, 2010).	21
Figura 21: Estrutura dos alcaloides coniina e tubocurarina, substâncias utilizadas como veneno (Hostettmann e colaboradores, 2003).	21
Figura 22: Esqueleto de alcaloides mais comuns em Rutaceae.	22
Figura 23: Estrutura da 7-hidroxicumarina	23
Figura 24: Estrutura de substâncias isoladas de <i>Conchocarpus cyrtanthus</i> .	40
Figura 25: Espectro de Massas 70 eV da cumarina 1 de <i>C. cyrtanthus</i> .	43
Figura 26: Espectro de Massas 70 eV da cumarina 2 de <i>C. cyrtanthus</i> .	45
Figura 27: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃), da mistura das cumarinas seselina (1) e xantoxiletina (2) .	46
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) com ampliação entre δ_H 8,5 e 4,0 ppm da mistura das cumarinas seselina e xantoxiletina (2) .	47
Figura 29: Mapa de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H-COSY (400MHz, CDCl ₃) da mistura das cumarinas seselina (1) e xantoxiletina (2) .	48
Figura 30: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da mistura das cumarinas seselina (1) e xantoxiletina (2) .	49
Figura 31: Efeito de proteção do grupo OMe sobre as posições <i>orto</i> e <i>para</i> .	50
FIGURA 32: Espectro de massas 70 eV da cumarina luvangetina (3) .	52
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância	53

luvangetina (3).

Figura 34: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância **luvangetina (3)**. 54

Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) da substância **luvangetina (3)**. 55

Figura 36: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) da substância **luvangetina (3)**. 56

Figura 37: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3) com ampliação da substância **luvangetina (3)**. 57

Figura 38: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, da substância **luvangetina (3)**. 58

Figura 39: Cromatograma da mistura dos esteroides **4, 5 e 6**. 60

Figura 40: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **β -sitosterol (4)**. 61

Figura 41: Espectro de Massas 70 eV do esteróide **estigmasteol (5)**. 62

Figura 42: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **campesterol (6)**. 63

Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 65

Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 7,4 e 3,4 ppm, da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 66

Figura 45: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 67

Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 68

Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 58,0 e 31,0 ppm, da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 69

Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{C} 32,0 e 10,0 ppm, da mistura dos esteroides **β -sitosterol (4)**, **estigmasterol (5)** e **campesterol (6)**. 70

Figura 49: Cromatograma da mistura dos esteroides **7, 8 e 9**. 72

Figura 50: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **7 α -hidroxisitosterol** 73

(7).	
Figura 51: Espectro de Massas 70 eV do esteroide 7α-hidroxiestigmasterol (8) .	73
Figura 52: Espectro de Massas 70 eV do esteroide 7α-hidroxicampesterol (9) .	74
Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7) , 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9) .	77
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 6,0 e 3,3 ppm, da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7) , 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9) .	78
Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3), da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7) , 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9) .	79
Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{C} 74, 0 e 39,0 ppm, da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7) , 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9) .	80
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{C} 38,0 11,0 ppm, da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7) , 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9) .	81
Figura 58: Efeito de proteção (β) em carbonos da substância 10 .	83
Figura 59: Espectro de Massas de alta resolução EMAR da substância 10 .	83
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxilarixol (10) .	86
Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 6,7 e 4,2 ppm, do diterpeno 16-hidroxilarixol (10) .	87
Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 3,6 e 0,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxilarixol (10) .	88
Figura 63: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxilarixol (10) .	89
Figura 64: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 6,15 e 5,05 ppm, do diterpeno 16-hidroxilarixol (10) .	90

Figura 65: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 4,40 e 0,00 ppm, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	91
Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	92
Figura 67: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 72,0 e 12,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	93
Figura 68: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	94
Figura 69: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	95
Figura 70: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	96
Figura 71: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	97
Figura 72: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxicilarixol (10) .	98
Figura 73: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno Manool (11) .	100
Figura 74: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno manool (11) .	103
Figura 75: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 6,2 e 4,4 ppm, do diterpeno manool (11) .	104
Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 2,6 e 0,0 ppm, do diterpeno manool (11) .	105
Figura 77: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno manool (11) .	106
Figura 78: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 6,05 e 4,40 ppm, do diterpeno manool (11) .	107
Figura 79: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 2,80 e 0,00 ppm, do diterpeno manool (11) .	108
Figura 80: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do diterpeno manool (11) .	109
Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação	110

entre δ_c 45,0 e 10,0 ppm, do diterpeno manool (11).	
Figura 82: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno manool (11).	111
Figura 83: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, $CDCl_3$), com ampliação, do diterpeno manool (11).	112
Figura 84: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, $CDCl_3$), com ampliação, do diterpeno manool (11).	113
Figura 85: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno manool (11).	114
Figura 86: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno manool (11).	115
Figura 87: Efeito da conjugação sobre a carbonila.	117
Figura 88: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	117
Figura 89: Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	119
Figura 90: Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), com ampliação entre δ_H 3,5 e 4,8 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	120
Figura 91: Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$), com ampliação entre δ_H 2,1 e 0,7 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	121
Figura 92: Mapa de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	122
Figura 93: Mapa de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (500 MHz, $CDCl_3$), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	123
Figura 94: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	124
Figura 95: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$), com ampliação entre δ_c 85,0 e 0,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	125
Figura 96: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	126
Figura 97: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, $CDCl_3$), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).	127
Figura 98: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) do	128

diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12) .	
Figura 99: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400MHz, CDCl ₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (10) .	129
Figura 100: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl ₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12) .	130
Figura 101: Interação especial dos núcleos de hidrogênio observados no espectro de NOESY da subatância 13 .	132
Figura 102: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	134
Figura 103: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	135
Figura 104: Mapa de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H-COSY (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	136
Figura 105: Mapa de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H-COSY (500 MHz, CDCl ₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	137
Figura 106: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	138
Figura 107: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃), com ampliação entre δ_c 46,0 e 10,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	139
Figura 108: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	140
Figura 109: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl ₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	141
Figura 110: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	142
Figura 111: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl ₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	143
Figura 112: Mapa de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H-NOESY (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	144
Figura 113: Mapa de correlação homonuclear ¹ H- ¹ H-NOESY (500 MHz, CDCl ₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13) .	145
Figura 114: Interação especial dos núcleos de hidrogênio observados no espectro de NOESY da substância 14 .	147
Figura 115: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno 16-	148

hidroximanoilóxido (12).	
Figura 116: Espectro de Massas de alta resolução EMAR para o diterpeno 16-hidromonoilóxido (14).	149
Figura 117: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	150
Figura 118: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (12).	151
Figura 119: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	152
Figura 120: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	153
Figura 121: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 46,0 e 10,0 ppm, do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	154
Figura 122: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	155
Figura 123: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	156
Figura 124: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	157
Figura 125: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	158
Figura 126: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	159
Figura 127: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).	160
Figura 128: Espectro de Massas 70 eV do alcaloide dictamina (15).	162
Figura 129: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).	164
Figura 130: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliação entre δ_{H} 8,4 e 7,0 ppm do alcaloide dictamina (15).	165
Figura 131: Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).	166
Figura 132: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).	167

Figura 133: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C ($^1J_{\text{HC}}$, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15) .	168
Figura 134: Mapa de correlação HMBC ^1H - ^{13}C ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15) .	169
Figura 135: Configurações possíveis de C-7 e 7' do sistema furofurânico de lignanas.	170
Figura 136: Espectro de Massas 70 eV da ligana siringaresinol (16) .	172
Figura 137: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da lignana siringaresinol (16) .	174
Figura 138: Mapa de correlação 1H-1H-COSY (500 MHz, CDCl_3) da lignana siringaresinol (16) .	175
Figura 139: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da lignana siringaresinol (16) .	176
Figura 140: Mapa de correlação HSQC (500 MHz, CDCl_3) da lignana siringaresinol (16) .	177
Figura 141: Mapa de correlação HMBC (500 MHz, CDCl_3) da lignana Siringaresinol (16) .	178

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota biosintética para alcaloides derivados do ácido antranílico.	22
Esquema 2: Origem biogenética de cumarinas e derivados.	24
Esquema 3: Obtenção de extratos da madeira de <i>C. cyrtanthus</i> .	27
Esquema 4: Procedimento descrito para CCHM e suas frações.	32
Esquema 5: Procedimento descrito para o extrato CCMM e suas frações.	39
Esquema 6: Proposta de fragmentação para a cumarina seselina .	44
Esquema 7: Proposta de fragmentação para a cumarina xantoxiletina (2) .	45
Esquema 8: Proposta de fragmentação para a cumarina luvangetina (3) .	52
Esquema 9: Proposta de fragmentação para o esteroide β-sitosterol (5) .	61
Esquema 10: Proposta de fragmentação para o esteroide estigmasteol (6) .	62
Esquema 11: Proposta de fragmentação para o esteroide campesterol (7) .	63
Esquema 12: Proposta de fragmentação para o esteroide 7α-hidroxiestiterol (7) .	73
Esquema 13: Proposta de fragmentação para o esteroide 7α-hidroxiestigmasterol (8) .	74
Esquema 14: Proposta de fragmentação para o esteroide 7α-hidroxicampesterol (9) .	75
Esquema 15: Principais fragmentos observados no espectro de Massas de	84

alta resolução EMAR para substância **10**.

Esquema 16: Proposta para fragmentação do diterpeno **Manool (11)**. 101

Esquema 17: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroxi-7-labeden-6-ona (12)**. 118

Esquema 18: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**. 134

Esquema 19: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroximanoilóxido (12)**. 149

Esquema 20. Principais fragmentos observados nos espectros de massas EMBR para o alcaloide **dictamina (13)**. 162

Esquema 21: Proposta de fragmentação para a lignana **siringaresinol (14)**. 173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação botânica de Rutaceae, segundo Engler (1931), sendo que a subfamília Aurantioideae é de Swingle and Reece (1967).	6
Tabela 2: Extratos brutos obtidos de <i>C. cyrtanthus</i> .	26
Tabela 3: Fracionamento do extrato hexânico (CCHM).	27
Tabela 4: Fracionamento da fração CCHM-7.	28
Tabela 5: Fracionamento da fração CCHM-10.	29
Tabela 6: Fracionamento da fração CCHM-11.	30
Tabela 7: Fracionamento do extrato metanólico CCMM.	31
Tabela 8: Fracionamento da fração CCMM-2.	33
Tabela 9: Fracionamento da fração CCMM-3.	33
Tabela 10: Fracionamento da fração CCMM-3.2.	34
Tabela 11: Fracionamento da fração CCMM-3.6.	35
Tabela 12: Fracionamento da fração CCMM-4.	35
Tabela 13: Fracionamento da fração CCMM-5.	36
Tabela 14: Fracionamento da fração CCMM-5.9.	37
Tabela 15: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância 1 , em CDCl_3 e comparação com valores da literatura para a cumarina seselina , com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.	43
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância 2 , em CDCl_3 e comparação com valores da literatura	44

para a cumarina **xantoxiletina**, com os deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 17: Dados de RMN de 1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **3**, em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para a cumarina **luvangetina**, com os deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

51

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) das substâncias **4** e **5**, em $CDCl_3$, valores dos deslocamentos químicos (δ_C) obtidos e valores dos deslocamentos químicos (δ_C) da literatura para os esteroides β -**sitosterol** e **estigmasterol** em ppm.

64

Tabela 19: Dados de RMN de 1H (500MHz) e de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) das substâncias **7** e **8**, em $CDCl_3$, valores dos deslocamentos químicos (δ_C) obtidos e valores dos deslocamentos químicos (δ_C) da literatura para os esteroides **7 α -hidroxisitosterol (Mo-1)** e **estigmasterol (Mo-2)** em ppm.

76

Tabela 20: Dados de RMN de 1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **10** em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para o diterpeno larixol **Mo-03**, com os deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

74

Tabela 21: Dados de RMN de 1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **11** em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da literatura para o diterpeno manool **Mo-04**.

90

Tabela 22: Dados de RMN de 1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **12**, em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da **16-hidroxilarixol**.

106

Tabela 23: Dados de RMN de 1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **13**, em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as

121

constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da literatura para o diterpeno **16-hidroximanoilóxico Mo-05**.

Tabela 24: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **14**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores do epímero do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxico**. 136

Tabela 25: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **15**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para o alcaloide **dictamina Mo-06**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. 151

Tabela 26: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **16**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para a lignana **siringaresinol (Mo-07)**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. 160

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ordem decrescente das maiores famílias produtoras de cumarinas.

10

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ax	Axial
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
cm ⁻¹	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Deslocamento químico (ppm)
<i>d</i>	Sinal duplo ou duplete
<i>dd</i>	Duploduplete
<i>dl</i>	Sinal duplo largo ou duplete largo
EM	Espectro de Massas
EMAR	Espectrometria de Massas de alta resolução
eV	Elétron volt
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
HRMS	Mass Spectrometry High Resolution,
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
λ	Comprimento de Onda
<i>m</i>	Sinal múltiplo ou multipleteo
Me	Metila

mg	Miligrama
MHz	Megahertz
[M] ⁺	Pico do íon molecular
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
nm	Namômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
ppm	Parte por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	Sinal simples ou simpleto
<i>sl</i>	Sinal simples largo ou simpleto largo
<i>t</i>	Sinal triplo ou tripleto
UV	Ultravioleta

RESUMO

DE OLIVEIRA, Lidiana Santana dos Santos. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. Constituintes Químicos de *Conchocarpus cyrtanthus* (RUTACEAE). Prof. orientador: Ivo José Curcino Vieira. Prof. coorientador: Prof. Raimundo Braz-Filho.

Este trabalho descreve a investigação fitoquímica dos extratos em hexano e metanol da madeira de *Conchocarpus cyrtanthus* Kallunki & Pirani (Rutaceae), conhecida popularmente por “Orelha de Cabra”, que foi realizada por meio de técnicas cromatográficas clássicas. Este é o primeiro trabalho no âmbito fitoquímico realizado para um espécime de *C. cyrtanthus*. Tal procedimento experimental permitiu o isolamento e a identificação de dezesseis substâncias, das quais, três são inéditas na literatura. No extrato hexânico foram isoladas 9 substâncias, sendo elas: um mistura de cumarinas: seselina e xantoxiletina; duas misturas de esteroides: β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, 7α -hidroxisitosterol, 7α -hidroxiestigmasterol e 7α -hidroxicampesterol; e dois diterpenos, inéditos na literatura: 16-hidroxilarixol e 16-hidróxi-7-labden-6-ona. O extrato metanólico forneceu 6 substâncias, são elas: um alcaloide: dictamina, uma cumarina: luvangetina; três diterpenos: manool, 16-hidroximanoilóxido e o epímero 16-hidroxi-13-*epi*-manoilóxido, inédito na literatura, e uma lignana: siringaresinol. As estruturas foram elucidadas com base na análise dos dados

fornecidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e de ^{13}C) unidimensional e bidimensional, Cromatografia Gasosa acoplada a Massas (CG/MS) de baixa resolução, Espectrometria de Massas (EMAR) de alta resolução, Cromatografia Líquida acoplada ao Massas (CL/MS-MS) de alta resolução.

Palavras-chave: *Conchocarpus cyrtanthus*, cumarinas, diterpenos.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Lidiana Santana dos Santos. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2014. Chemical Constituents of *Conchocarpus cyrtanthus* (RUTACEAE). Advisor: Prof. Ivo José Curcino Vieira. Prof. Co-Advisor: Raimundo Braz-Filho.

This work describe the phytochemical investigation of the hexane and methanol extracts from wood from *Conchocarpus Cyrtanthus* Kallunki & Pirani (Rutaceae), popularly known as "Ear Goat" was performed by classical chromatographic techniques. This are the first work in context phytochemical realized in a specimen of *C. cyrtanthus*. This experimental procedure allowed the isolation and identification of fifteen compounds, with three new in the literature. In hexanic extract were isolated 9 compounds, as: one mixture of coumarins: seselin and xanthoxiletin; two mixture of steroids: sitosterol, stigmasterol and campesterol, 7α -hidroxisitosterol, 7α -hidroxistigmasterol and 7α -hidroxicampesterol; and two diterpenes, new in the literature, 16-hydroxylarixol and 16-hydroxy-7-labden-6-one. The methanolic extract provided 6 compounds, such as: one alkaloid: dictamine, one coumarin: luvangetin; three diterpenes: manool, hydroxymanoiloxide and 16-hydroxy-13-*epi*-manoiloxide epimer, new in the literature, and one lignan: syringaresinol. The structures were elucidated based on analysis by nuclear magnetic resonance one-dimensional and two-dimensional

data (^1H NMR and ^{13}C), gas chromatography coupled to Mass (GC/MS) of low resolution, mass spectrometry high resolution (HRMS), Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass (LC/MS-MS).

KeyWord: *Conchocarpus cyrtanthus*, coumarins, diterpenes.

1. INTRODUÇÃO

A busca do homem por recursos naturais com objetivo de melhorar as condições de vida na terra teve início em tempos que remontam desde o início das civilizações. Como resultado dessa busca, o homem encontrou, nas espécies vegetais, importantes propriedades terapêuticas e, com isso, passou a utilizá-las no tratamento e na cura de doenças, a partir da observação de que nas plantas existe alguma(s) substância(s) que atua(m) na recuperação da saúde humana. Estas substâncias denominam-se princípios ativos, conhecido como complexo fitoterápico, que age simultaneamente na recuperação da saúde (Nascimento, 2008).

O conhecimento e uso de espécies vegetais para tratamento da saúde, transmitido de geração a geração, serviu e continua servindo como fonte de informação para a descoberta de novos medicamentos e isso tem motivado a busca de uma maior racionalização na procura de substâncias que sejam biologicamente ativas.

Durante séculos, essa prática foi considerada como a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, porém com o desenvolvimento da química farmacêutica, a partir do século XIX, ela passou a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (Nascimento, 2008).

Ultimamente, as plantas ditas medicinais vêm sendo utilizadas por um público cada vez maior, recebendo incentivo da própria Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual recomendou aos países membros que desenvolvessem

pesquisas visando o uso da flora com propósito terapêutico. O desenvolvimento de pesquisas do ponto de vista químico e farmacológico que comprovem a eficácia das plantas medicinais é o principal fator a contribuir para o crescimento dessa prática terapêutica (Castro e colaboradores, 2004).

Em 1874 teve início os estudos de Química de Produtos Naturais (QPN) em uma instituição pública brasileira, podendo ser destacado, entre os vários trabalhos realizados por Peckolt, o isolamento de uma substância de *Plumeria lancifolia*, recebendo o nome de agoniadina, primeiro iridoide isolado da natureza em forma pura, tendo sua estrutura química determinada apenas 88 anos depois, hoje conhecido como plumerídeo (Pinto e colaboradores, 2002).

Porém, em uma farmácia localizada no Rio de Janeiro, o farmacêutico Ezequiel Correia dos Santos isolou, no ano de 1838, o alcaloide pereirinha, extraído das cascas do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*), sendo este o primeiro alcaloide, isolado puro no Brasil (Pinto e colaboradores, 2002).

A Química de Produtos Naturais (QPN) apresenta uma fundamental contribuição para o desenvolvimento da sociedade. É estimado que 80% da população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina popular, utilizando vegetais para suas necessidades de saúde (Braz-Filho, 2010).

A QPN tornou-se então a principal linha de pesquisa para a descoberta de novos agentes medicinais de diversas patologias. Em países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos são de origem vegetal e 120 substâncias de origem natural, são obtidas a partir de cerca de 90 espécies de vegetais (Braz-Filho, 1994; Hostettmann e colaboradores, 2003).

Estima-se que na Terra existam entre 250 a 500 mil espécies vegetais, contudo apenas uma pequena porcentagem foi pesquisada (cerca de 5%) do ponto de vista químico e um número ainda menor do ponto de vista farmacológico (Castro e colaboradores, 2004).

O Brasil contribui com mais de 56 mil espécies vegetais, o que significa quase 19% da flora mundial, tendo com isso, a flora mais rica do mundo (Giulietti e colaboradores 2005). Cerca de 10 mil destas, apresentam propriedades medicinais. Estando sua maior parte concentrada na Floresta Amazônica e Mata Atlântica e recentemente no bioma Cerrado. A Mata Atlântica, apesar da grande

devastação sofrida, ainda detém a maior variedade de espécies vegetais do mundo (Nascimento, 2008).

Algumas famílias de espécies vegetais caracterizam-se por constituírem metabólitos secundários de grupos químicos específicos (Simões e colaboradores, 1999), sendo os alcaloides e os terpenos com maior potencial para fornecer substâncias com atividades farmacológicas seguidas por lignanas, flavonoides, cumarinas dentre outros metabólitos (Di Stasi, 1996). Famílias de plantas que produzem tais substâncias tornam-se o alvo de pesquisas visando o isolamento de substâncias com propriedades farmacológicas.

Temos como exemplo, *Conchocarpus cyrtanthus* Kallunki & Pirani, uma espécie que ainda não tem relatos de estudos de seus constituintes químicos e suas atividades biológicas na literatura até o presente momento. Trata-se de um espécime da família Rutaceae, família que produz distintos metabólitos secundários, destacando-se os alcaloides, em especial os derivados do ácido antranílico, as lignanas, os flavonoides, os terpenos, os limonoides, além de ocupar a segunda posição, em produção de cumarinas, entre as seis maiores famílias produtoras dessa classe de metabólitos.

C. cyrtanthus faz parte das quarenta e sete espécies do gênero *Conchocarpus* com distribuição desde a Nicarágua ao Norte da Bolívia (Kallunki & Pirani 1998; Pirani 2002; Groppo e colaboradores, 2008) e em quase todos os estados do Brasil. Aliado a estas informações, onde a espécie não possui relatos químicos na literatura e de que várias espécies pertencentes à família Rutaceae apresentam diversas atividades biológicas, resolveu-se realizar o estudo químico de *C. cyrtanthus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O trabalho proposto tem por objetivo realizar o estudo químico dos extratos, em hexano e metanol, da madeira da espécie *Conchocarpus cyrtanthus* Kallunki (Rutaceae), conhecida popularmente por Orelha de Cabra na região de Linhares, Espírito Santo.

Fornecer dados químicos para uma maior compreensão da quimiotaxonomia deste gênero.

2.2 Objetivos específicos

Isolamento, purificação e caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados presentes nos extratos, hexânico e metanólico, da madeira, de *C. cyrtanthus* Kallunki (Rutaceae);

O aprendizado de técnicas cromatográficas clássicas de isolamento e purificação de substâncias orgânicas bioproduzidas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais;

Aprendizado de técnicas espectroscópicas utilizadas na identificação de substâncias da espécie vegetal *C. cyrtanthus* Kallunki (Rutaceae).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A família Rutaceae

A família Rutaceae encontra-se posicionada na ordem Rurales, ordem esta que inclui mais 4 famílias de grande relevância na flora neotropical: Cneoraceae, Burceraceae, Meliaceae e Simaroubaceae (Bremer e colaboradores, 2009).

A classificação botânica para a família Rutaceae, apresentada por Engler (1931), considera sete subfamílias, Rutoideae, Toddalioideae, Dictyolomatoideae, Aurantoideae (Citroideae), Flindersioideae, Rhabdodendroideae e Spathelioideae, divididas em onze tribos subdivididas em vinte e uma subtribos, compreendendo cerca de sessenta gêneros (**Tabela 1**, página 6).

No entanto, segundo Ferracin (1992), a quimiosistemática de Rutaceae tem sido revisada por pesquisadores de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ- UFSCar), baseando-se, principalmente, em alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas e limonoides. Estes estudos têm mostrado que a fitoquímica entre as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae é tão pronunciada que sua separação fica comprometida.

Tabela 1: Classificação botânica de Rutaceae, segundo Engler (1931), sendo que a subfamília Aurantioideae é de Swingle and Reece (1967).

RUTACEAE				
SUBFAMILIA	TRIBO	SUBTRIBO	GÊNERO	
Aurantioideae		Balsamocitrinae	<i>Aegle</i>	
			<i>Afraegle</i>	
			<i>Balsamocitrus</i>	
			<i>Swinglea</i>	
		Citreae	Citrinae	<i>Atalantia</i>
				<i>Citrus</i>
				<i>Microcitrus</i>
				<i>Naringi</i>
				<i>Poncirus</i>
		Clauseneae	Triphasiinae	<i>Pamburus</i>
<i>Triphasia</i>				
<i>Wenzelia</i>				
Clauseninae	<i>Clausena</i>			
	<i>Glycosmis</i>			
	<i>Murraya</i>			
Merrilliinae	<i>Merrillia</i>			
Micromelinae	<i>Micromelum</i>			
Dictyolomatoideae	Dictyolomatae		<i>Dictyoloma</i>	
Flindersioideae	Flindersieae		<i>Chloroxylon</i> <i>Flindersia</i>	
Rutoideae		Boroniinae	<i>Boronia</i>	
		Correinae	<i>Correa</i>	
		Boroneiae	Diplolaeninae	<i>Diplolaena</i>
			Eriostemoninae	<i>Leionema</i> <i>Philothea</i>
			Nematolepidinae	<i>Chorilaena</i> <i>Nematolepis</i>
		Diosmeae	Diosminae	<i>Agathosma</i>
				<i>Coleonema</i>
		Galipeae		<i>Adiscanthus</i>
				<i>Angostura</i>
				<i>Conchocarpus</i>
<i>Galipea</i>				
<i>Ravenia</i>				
<i>Sigmatanthus</i>				
Galipeinae	<i>Raiua</i> <i>Raputia</i> <i>Ticorea</i>			
<i>Emmerich</i> <i>Leptothyrsa</i>				

Continuação da tabela 1

			<i>Spiranthera</i>
			<i>Decagonocarpus</i>
		Pilocarpinae	<i>Esenbeckia</i>
			<i>Metrodorea</i>
			<i>Pilocarpus</i>
Ruteae	Dictamninae		<i>Dictamnus</i>
	Rutinae		<i>Ruta</i>
	Choisyinae		<i>Choisya</i>
			<i>Medicosma</i>
Zanthoxyleae	Euodiinae		<i>Melicope1</i>
			<i>Melicope2</i>
			<i>Sarcomelicope</i>
			<i>Zanthoxylum</i>
	Lunasiinae		<i>Lunasia</i>
Spathelioideae	Sphateliaeae		<i>Spathelia</i>
Toddalioideae	Toddalieae	Pteleinae	<i>Balfourodendron</i>
			<i>Helietta</i>
			<i>Ptelea</i>
		Toddaliinae	<i>Acronychia</i>
			<i>Casimiroa</i>
			<i>Halfordia</i>
			<i>Hortia1</i>
			<i>Hortia2</i>
			<i>Hortia3</i>
			<i>Hortia4</i>
			<i>Hortia5</i>
			<i>Skimmia</i>
			<i>Toddalia</i>
			<i>Vepris1</i>
			<i>Vepris2</i>

Fonte: Groppo e colaboradores, 2008.

Rutaceae conta com cerca de 150 a 160 gêneros e com 1.500 a 2.000 espécies, distribuídas em regiões Tropicais, Subtropicais, sendo menos frequente, em áreas Temperadas de todo o mundo (**Figura 1**), contando com três principais centros de diversidade: a América Tropical, África do Sul e Austrália. (Costa e colaboradores, 2010; Groppo 2010; Lorenzi & Souza 2005; Sá 2010).

Na região neotropical ocorrem cerca de 48 gêneros e 350 espécies. Já no Brasil são descritos 33 gêneros, 192 espécies sendo 107 endêmicas, 17 subespécies e 8 variedades (Pirani & Groppo, 2010).

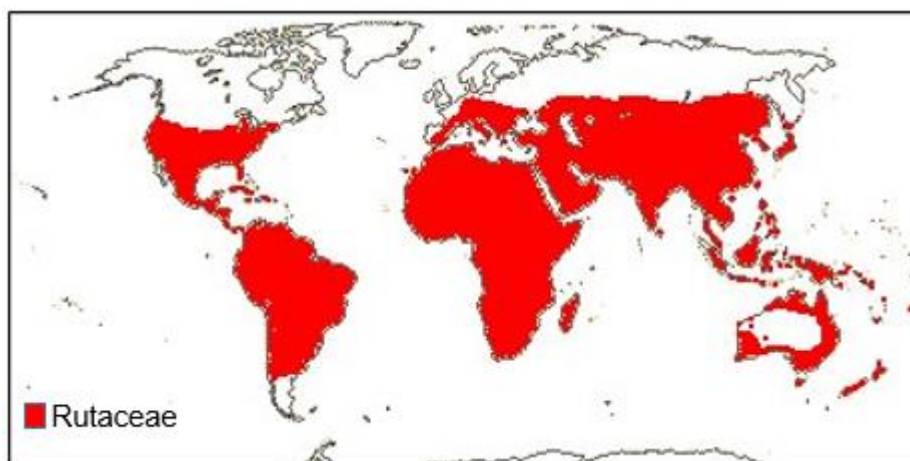


Figura 1: Distribuição global de Rutaceae. Fonte: Stevens (2001).

Rutaceae é representada por árvores ou arbustos, ervas ou lianas, frequentemente com espinhos; folhas alternas ou opostas, compostas ou raramente simples; inflorescência cimosas, menos frequentemente racemosas, às vezes com uma flor única; flores pouco vistosas, unissexuadas ou bissexuadas e seu fruto pode ser drupa, baga, folículo ou capsula (Lorenzi & Souza, 2005).

A família tem grande importância econômica para frutos comestíveis (com destaque para *Citrus*, que tem grande variedade de laranjas, limões e tangerinas), óleos aromáticos (*Boronia* e *Ruta*), espécies que são fontes de madeira de boa qualidade (*Flindersia*, *Zanthoxylum*, *Balfourodendron* e *Euxylophora*) e espécies utilizadas como cerca-viva ou porta-enxerto de espécies de *Citrus* como *Fortunella japonica* e *Poncirus trifoliata* (Albuquerque, 1976; Groppo e colaboradores, 2012; Lorenzi & Souza, 2005).

Sua relevância se dá também devido a representantes de valor medicinal, tendo como exemplo os “jaborandis” (*Pilocarpus jaborandi*, *P. pauciflorus*, *P. Pinnatifolius* e *P. Selloanus*), fonte de pilocarpina (**Figura 2**), um alcaloide que é usado contra glaucoma e a “arruda” (*Ruta graveolens*), fonte de rutina (**Figura 2**), um flavonoide com princípio ativo antiespasmódico (Albuquerque, 1976; Lorenzi & Souza, 2005).

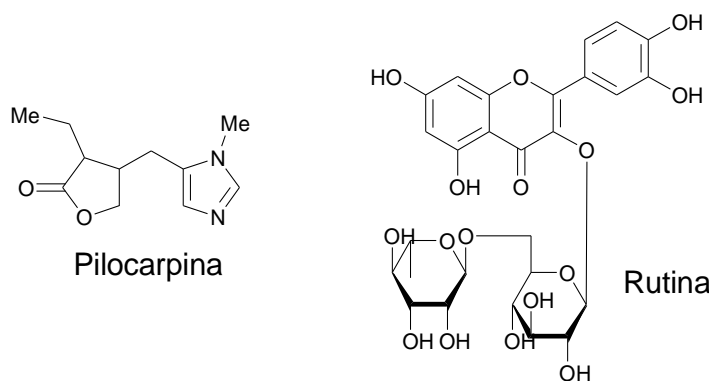


Figura 2: Estrutura do alcaloide pilocarpina e do flavonoide rutina, ambos isolados de *Xilocarpus jaborandi* e *Rute graveolência*.

Além das importâncias acima mencionadas, esta família também merece atenção devido ao fornecimento de distintos metabólitos secundários, destacando-se os alcaloides, em especial os derivados do ácido antranílico, as cumarinas, as lignanas, os flavonoides, os terpenos e os limonoides (Waterman, 1975). Na **Figura 3** observa-se estruturas de substâncias isoladas de algumas espécies da família Rutaceae.

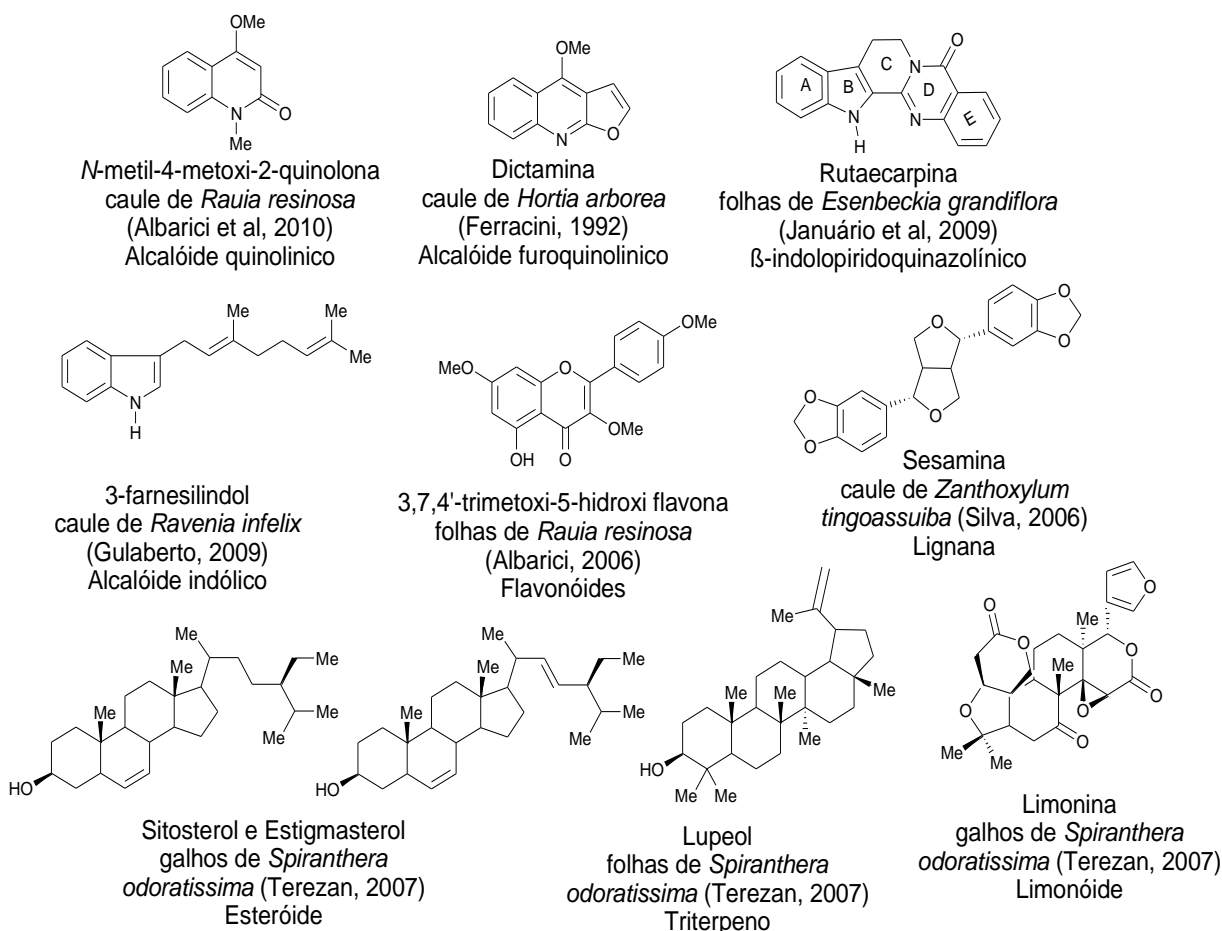
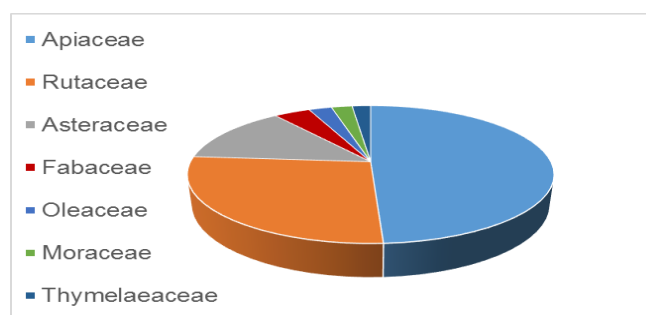


Figura 3: Estruturas de algumas substâncias isoladas da família Rutaceae.

Rutaceae ocupa a segunda posição quando comparada com as outras seis maiores famílias produtoras de cumarinas (**gráfico 1**), produzindo seis tipos distintos de cumarinas, sendo estas classificadas em, cumarinas simples, furocumarinas lineares, furocumarinas angulares, piranocumarinas lineares, piranocumarinas angulares e biscumarinas. Esta classe de metabólitos pode ser encontrada em distintas partes do vegetal, tais como, raízes, flores e frutos (Ribeiro & Kaplan, 2002).

Gráfico 1: Ordem decrescente das maiores famílias produtoras de cumarinas.



Os diferentes tipos de cumarinas isoladas de Rutaceae podem ser observados na **Figura 4** (Ribeiro & Kaplan, 2002).

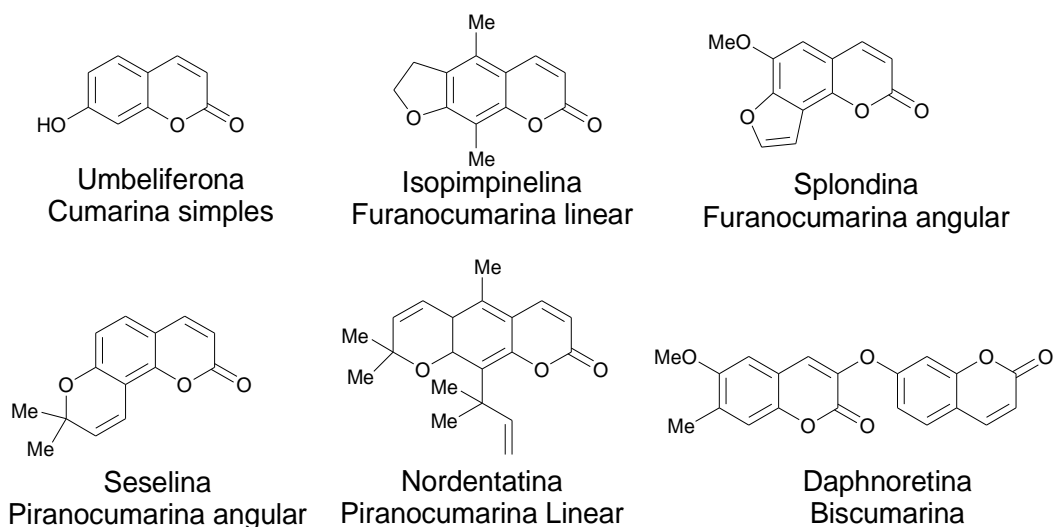


Figura 4: Estruturas dos tipos de cumarinas produzidos na família Rutaceae.

3.2 O gênero *Conchocarpus* J. C. Mikan

O gênero *Conchocarpus* J. C. Mikan tem como sinônimos: *Diglottis* Nees & Mart.; *Lasiostemum* Nees & Mart.; *Obentonia* Vell.; *Dangervilla* Vell. e *Rossenian* Vell.

Posiciona-se na subfamília Rutoideae, tribo Galipeae, subtribo Galipeinae (em substituição a tribo Cusparieae DC. e subtribo Cuspariinae Engl., que foram dados com base no ilegítimo nome genérico *Cusparia* Humb.) da família Rutaceae. Apresenta-se em forma de arbustos ou pequenas árvores alcançando até 7 metros de altura, com folhas alternas, inflorescência geralmente terminal ou extra-axilar, cálice relativamente pequeno, corola tubular formada por pétalas coerentes e filamentos estaminais achatados (Kallunki & Pirani, 1998).

Este gênero possui 47 espécies com distribuição que vai desde a Nicarágua ao norte da Bolívia (Kallunki & Pirani, 1998; Pirani, 2002; Groppo e colaboradores, 2008) e em quase todos os estados do Brasil excetuando-se alguns onde ainda não se tem relatos de espécies descritas (Pirani, 2010).

Apenas duas espécies não são encontradas no Brasil, *C. larenzis* e a *C. nicaraguenses* (Kallunki & Pirani, 1998).

Conchocarpus é um gênero nativo, não endêmico do Brasil (Pirani, 2013).

A **Figura 5** mostra a distribuição do gênero para o Brasil.



Figura 5: Mapa de distribuição do gênero *Conchocarpus* J. C. Mikan no Brasil. A parte em branco representa os estados onde ainda não foram descritas nenhuma espécie.

Algumas espécies do gênero *Angustura* foram reclassificadas, sendo inseridas no gênero *Conchocarpus*. Dentre estas espécies, pode-se citar, a título de exemplo, *Angustura macrophylla* que foi reclassificada como *Conchocarpus macrophyllus*.

Estudos de algumas espécies do gênero *Conchocarpus* revelaram a presença de alcaloides (principalmente os derivados do ácido antranílico), flavonas, esteroides, acetofenonas, amidas e diversas cumarinas.

Estudo, com extratos e frações do caule e das folhas, de *Conchocarpus heterophyllus* permitiu o isolamento de três esteroides, dois alcaloides e oito flavonas (Ambrozin e colaboradores, 2004; Ambrozin e colaboradores, 2008, **Figura 6**).

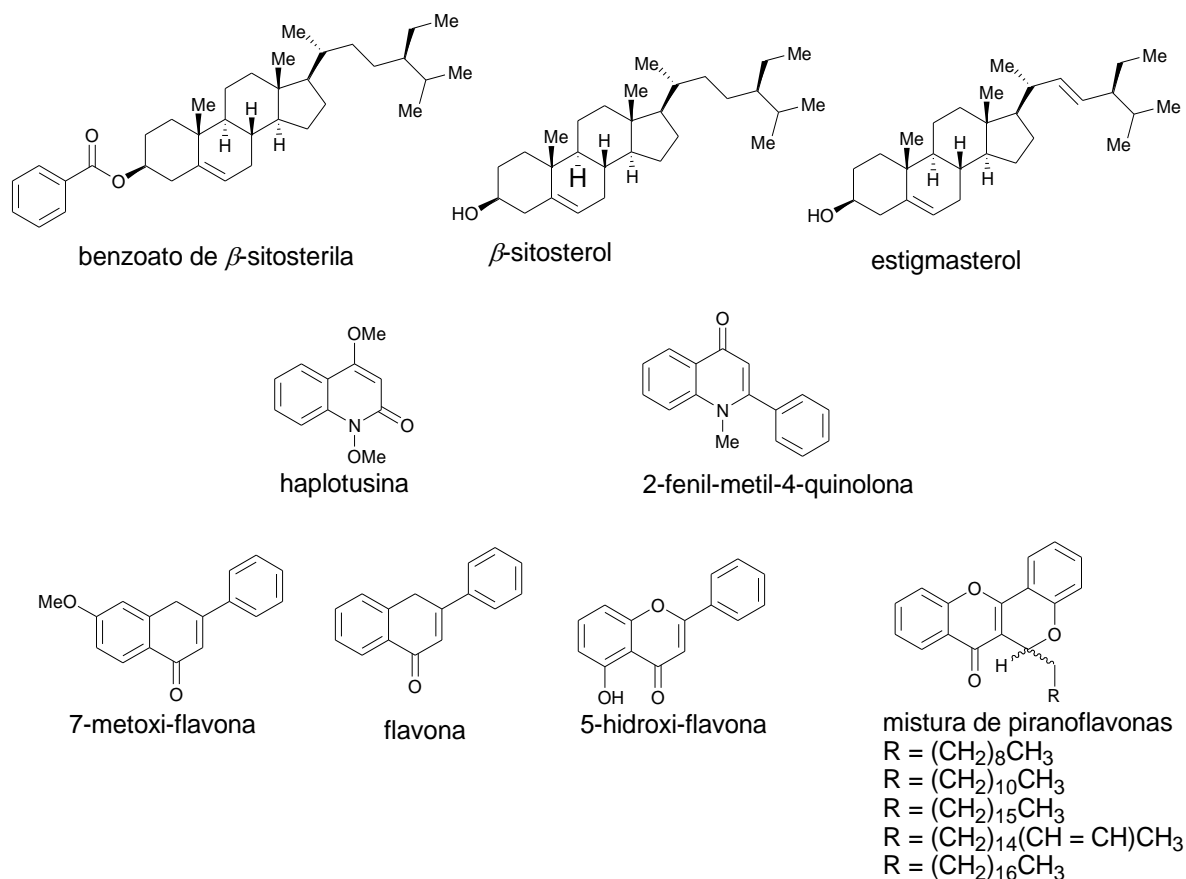


Figura 6: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. heterophyllus*.

Do extrato metanólico, de ramos caulinares, de *Conchocarpus gaudichaudianus* foram isolados quatro novos alcaloides, sendo três deles do tipo indoloquinazolônico e um do tipo quinolônico, além de duas amidas conhecidas, a *N-trans-cumaroiltiramina* e *N-trans-feruloiltiramina* (**Figura 7**) (Cortez e colaboradores, 2009).

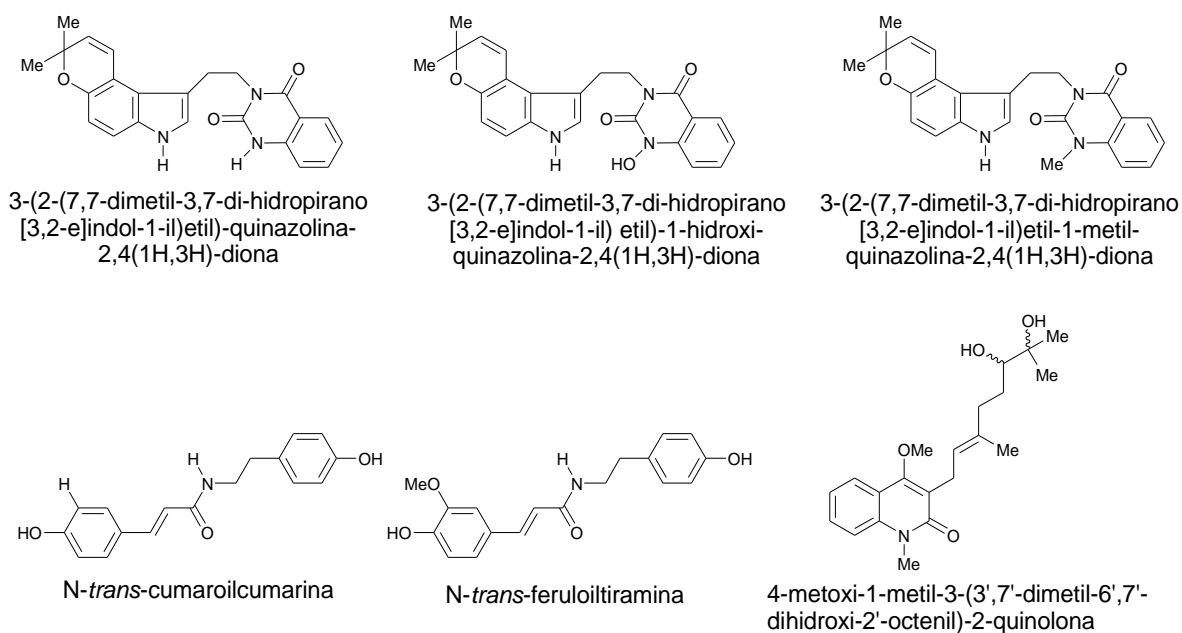


Figura 7: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. gaudichaudianus*.

Da fração clorofórmica, do extrato etanólico, dos ramos caulinares, de *Conchocarpus fontanesianus* foram isolados três alcaloides furoquinolínicos, um quinolínico e uma cumarina do tipo furano, que estão apresentados na **Figura 8** a seguir (Cabral, 2011).

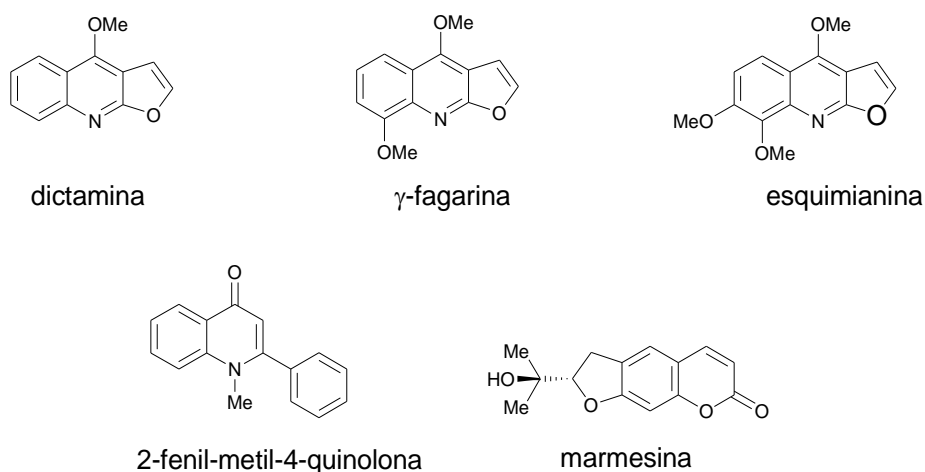


Figura 8: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. fontanesianus*.

O estudo de *Conchocarpus macrocarpus* levou ao isolamento de dois alcaloides do tipo indoloquinazolina e o estudo de *C. cuneifolius*, levou a quatro acetofenonas e três flavonoides glicosilados (Veloso, 1995), como mostra a **Figura 9** a seguir.

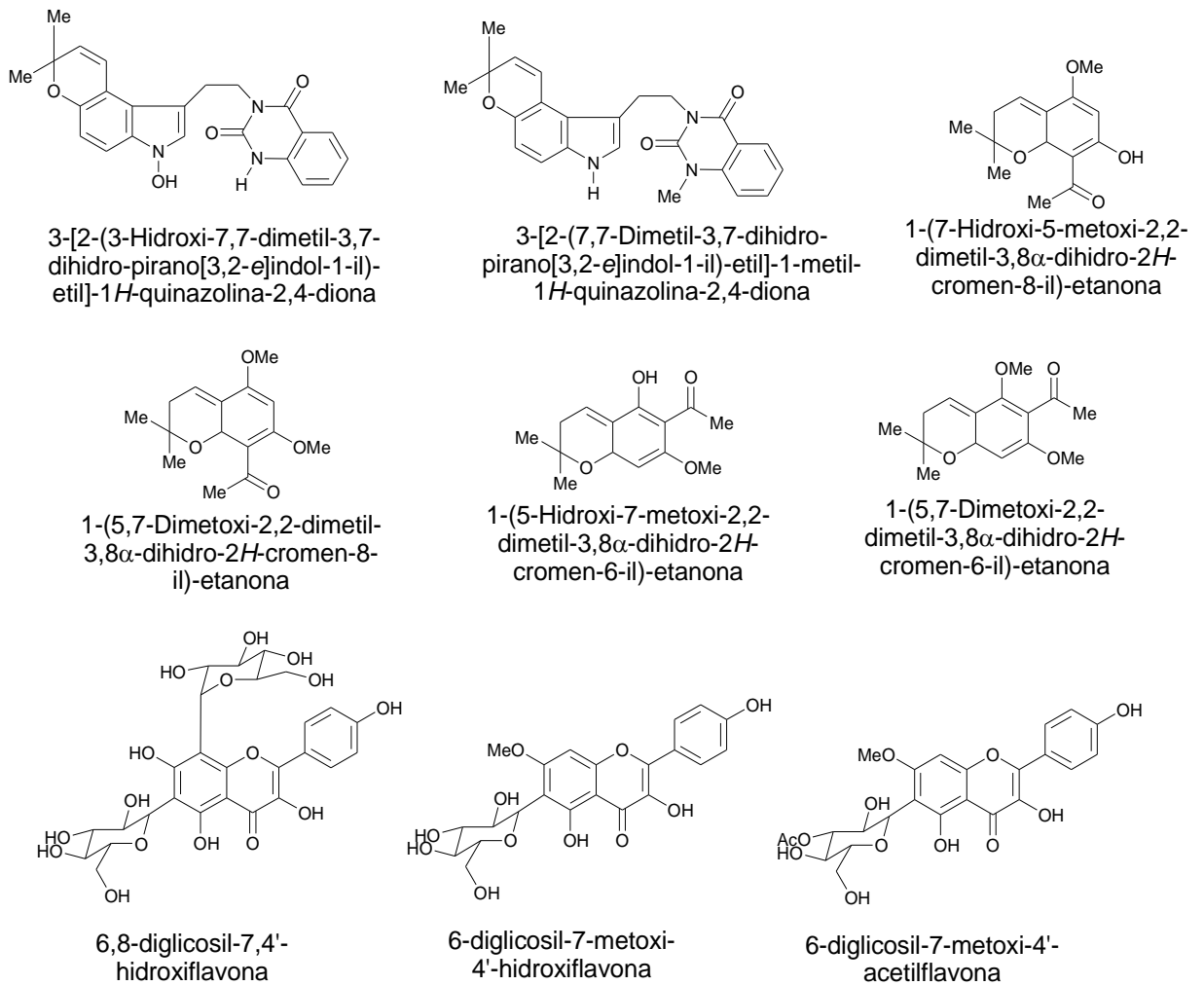


Figura 9: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. macrocarpus* e *C. cuneifolius*.

De *Conchocarpus longifolius*, foram isoladas onze cumarinas e sete alcaloides (Mafezoli, 2001; Facchini, 2005) que estão representados, na **Figura 10**.

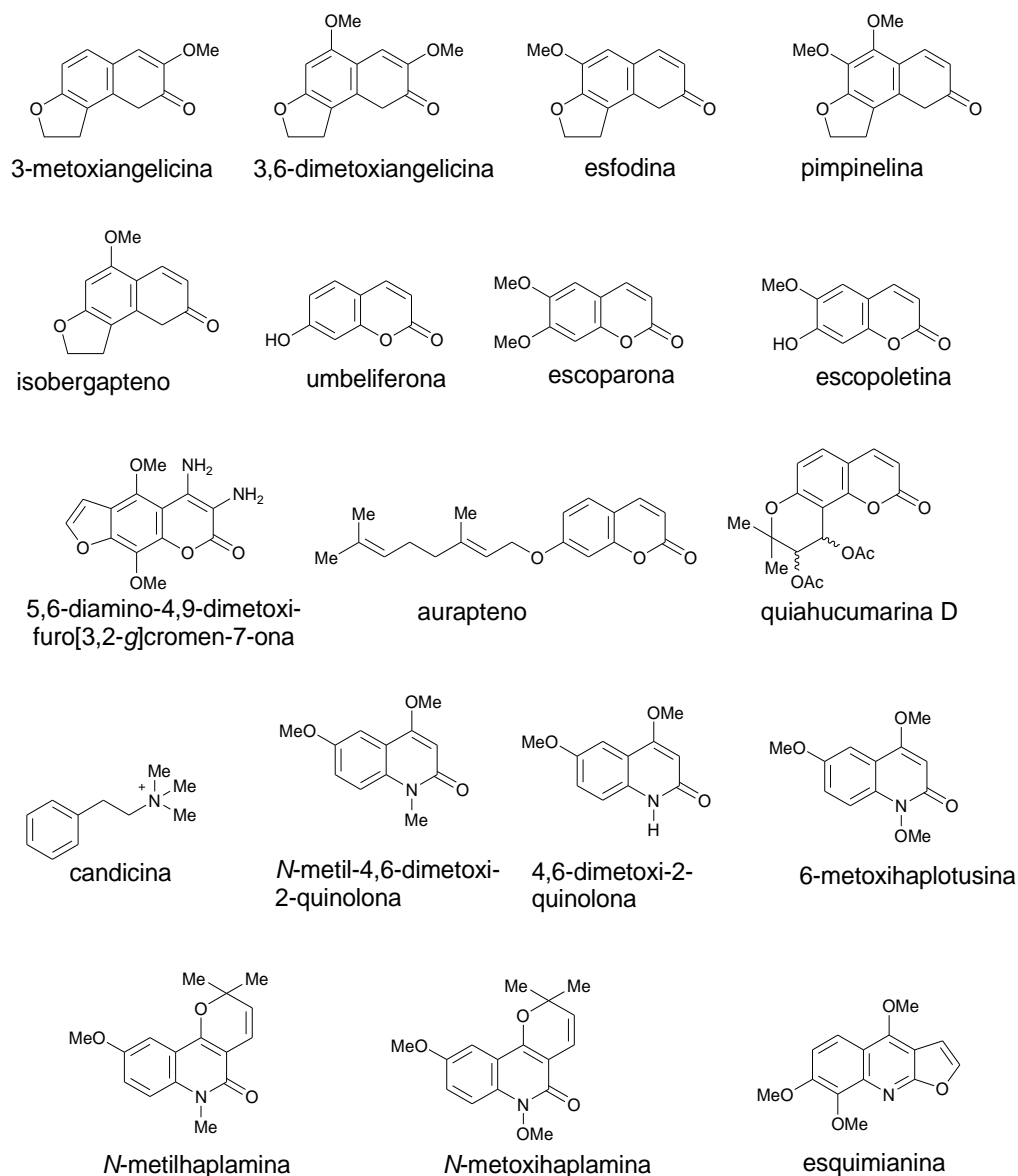


Figura 10: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. longifolius*.

Do extrato em CH_2Cl_2 , do caule, de *Conchocarpus macrophyllus* foram isolados, dois alcaloides acridônicos, arborinina e metilarborinina e uma mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol (Albarici, 2006; Veloso, 1995), que estão a seguir representados na **Figura 11**.

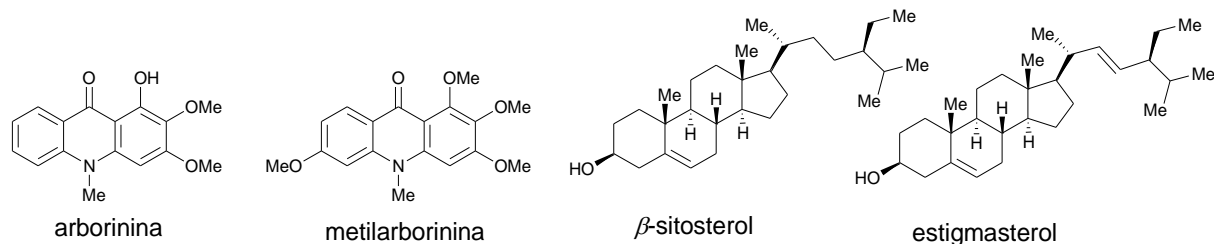


Figura 11: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *C. macrophyllus*.

Foram isolados do extrato em CH_2Cl_2 , das folhas, de *Conchocarpus paniculatus*, dois alcaloides acridônicos denominados cusparina e cusculina, suas estruturas estão representadas a seguir na **Figura 12** (Vieira e colaboradores, 1992).

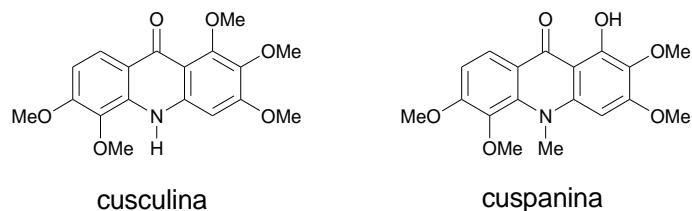


Figura 12: Estruturas das substâncias isoladas de *C. paniculatus*.

Estudos com a espécie *Conchocarpus inopinatus* levaram ao isolamento de seis alcaloides acridônicos, um seco-acridônico, um quinolínico e um alcaloide furoquinolínico e três cumarinas representados na **Figura 13** (Belleite e colaboradores 2012; Sá 2010).

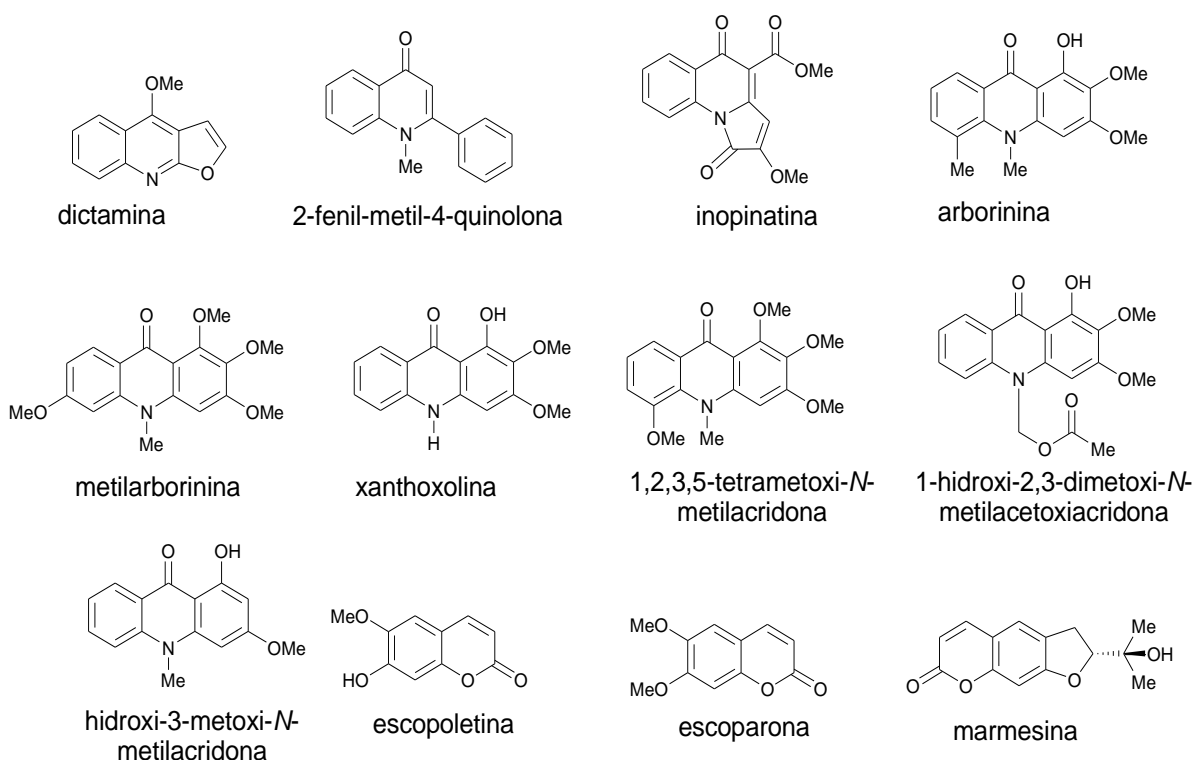


Figura 13: Estruturas das substâncias isoladas de *C. inopinatus*.

Estudos com a espécie *Conchocarpus marginatus* levaram ao isolamento de três alcaloides acridônicos e dois alcaloides arilquinolin-4-onas, que estão representados na **Figura 14** a seguir (Belleite e colaboradores 2012).

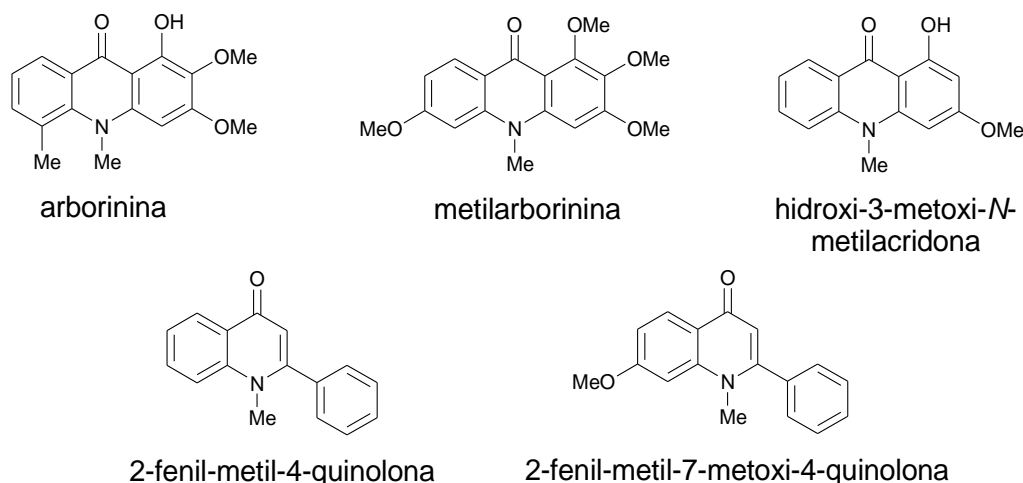


Figura 14: Estruturas das substâncias isoladas de *C. marginatus*.

3.3 Atividades biológicas de espécies do gênero *Conchocarpus*

Algumas espécies do gênero *Conchocarpus* vêm sendo alvo de estudo de muitos pesquisadores quanto às suas atividades biológicas. Ambrozin e colaboradores (2008) demonstraram dentre várias substâncias isoladas de *C. heterophyllus*, que os alcaloides haplotusina e 2-fenil-metil-4-quinolona (**Figura 15**) podem ser os princípios ativos das frações e dos extratos da espécie, que foram ativos sobre as formas tripamastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

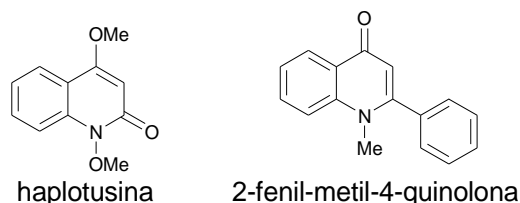


Figura 15: estruturas de alcaloides que podem ser os princípios ativos que foram ativos sobre as formas tripamastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

Mafezoli e colaboradores. (2000) demonstraram ainda que, de algumas espécies de Rutaceae testadas, os extratos hexânicos e metanólicos dos caules e folhas da espécie *C. inopinatus* apresentaram resultados promissores frente às formas tripamastigotas do *T. cruzi*.

Albarici (2006) demonstrou que o extrato em éter de petróleo *C. macrophyllus* apresentou 94% de lise parasitária, sendo considerado ativo frente às formas tripamastigotas do *T. cruzi*. Ele demonstrou também que o extrato em

diclorometano desta mesma espécie apresentou resultado satisfatório no ensaio de inibição da atividade de Adenosina Fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae* (APRT) com 77% de inibição. Posteriormente, este extrato foi fracionado e as frações obtidas foram, novamente, submetidas ao mesmo ensaio, obtendo resultados ainda mais promissores quanto à inibição da atividade de APRT (92% de inibição).

Em 2011, Cabral e colaboradores relataram estudo da atividade anticolinesterase de cumarinas e alcaloides isolados da espécie *C. fontanesianus*. Foram realizados ensaios qualitativo e quantitativo de redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE). O ensaio qualitativo indicou melhor resultado mediante teste com a cumarina marmesina e o alcaloide 2-fenil-metil-4-quinolona (**Figura 16**). Já o ensaio quantitativo, apresentou melhor resultado para o alcaloide esquimianina (**Figura 16**).

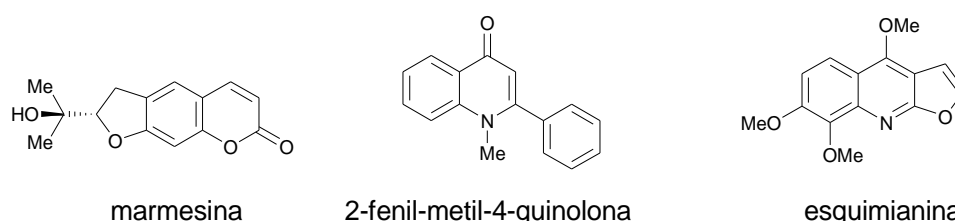


Figura 16: Estrutura de substâncias que apresentaram redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE).

Vieira e colaboradores (1992) ao estudar a espécie *C. paniculata* (syn. *Angostura paniculata*) isolaram alcaloides do tipo acridona (cuspanina e cusculina) (**Figura 17**), os quais apresentaram moderada atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*.

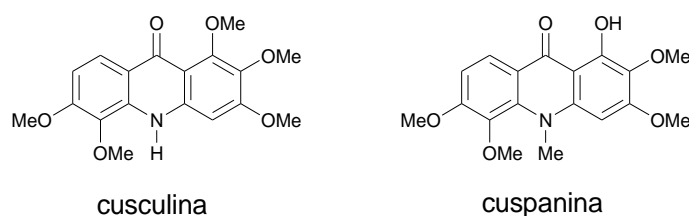


Figura 17: Estrutura de substâncias que apresentaram moderada atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*.

3.4 A espécie *Cnchocarpus cyrtanthus* Kallunki & Pirani

Árvores de pequeno porte medindo de um a seis metros de altura, não ramificadas ou com um ramo ereto; pecíolos patentes, limbo ascendente na base; folhas verdes escuras na face superior, discolores, nervura média com lenticelas; inflorescência subterminal ascendente, verde-clara, com flores de cálice creme-esbranquiçado, corola creme-esbranquiçada, muito zigomorfa, com turbo curvo, uma pétala superior voltada para cima e quatro voltadas para baixo, todas reflexas; estames e estaminódios alvos; com um fruto seco (**Figura 18**). Na **Figura 19**, presente na página 20, é possível observar as flores da espécie, sendo esta uma das suas principais características morfológicas.

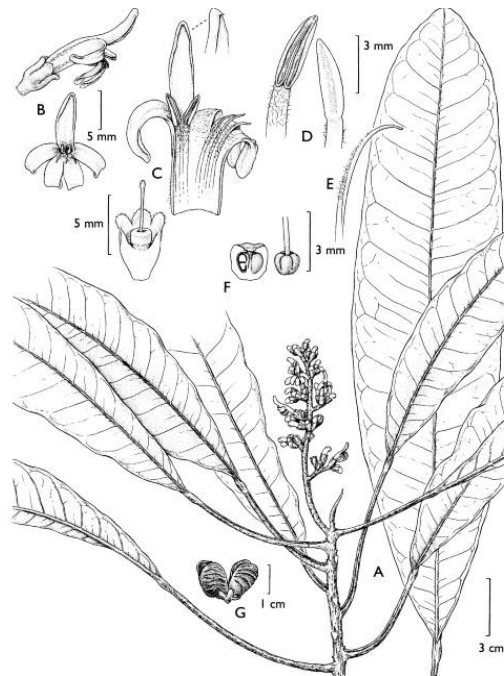


Figura 18: Desenho de *C. cyrtanthus*: a) ápice da haste; b) flor, vista lateral e frontal; c) corola aberta, disco de androceu e gineceu com parte do cálice removido; d) anteras, vistas adaxial e abaxial; e) disco de ápice do estame; f) ovário na seção longitudinal e ovário intacto; g) fruto. Fonte: kallunki e Pirani, 1998.



Figura 19: Fotografia das flores de *Conchocarpus cyrtanthus*.

Fonte: http://zipcodezoo.com/Plants/C/Conchocarpus_cyrtanthus/

Sua distribuição ocorre no Nordeste (Bahia) e Sudeste (Espírito Santo) do Brasil, é uma espécie endêmica do Brasil, tendo como domínio fitogeográfico a Mata Atlântica e de vegetação floresta ombrófila (Pirani, 2013).

Conhecida popularmente no Estado do Espírito Santo, por “Orelha de Cabra”, *Conchocarpus cyrtanthus* Kallunki & Pirani.

Em levantamentos bibliográficos realizados, até o presente momento, foi observada a ausência de estudos químicos e biológicos com a espécie *C. cyrtanthus*, tornando, assim, de grande relevância tal pesquisa, uma vez que espécies do gênero *Conchocarpus* são conhecidas pela bioprodução de distintas classes de metabólitos, tais como, alcaloides, cumarinas, e flavonas, substâncias estas responsáveis por algumas atividades biológicas relacionadas com o gênero, como descritas anteriormente.

3.5 Alguns metabólitos secundários

3.5.1 Alcaloides

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas farmacologicamente ativas, com exceções tais como colchicina (**Figura 20**, página 21), encontradas predominantemente em Angiospermas, porém também podem estar presentes, em menor quantidade, em microrganismos e animais. São classificados segundo

seu aminoácido precursor, que podem ser ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico, triptofano e reações de aminação (Simões e colaboradores, 1999; Dewick, 2002).

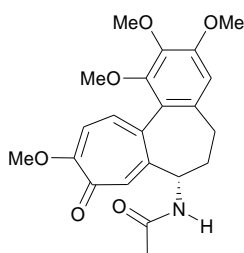


Figura 20: Estrutura da colchicina, alcaloide com caráter ácido. (Brandão e colaboradores, 2010).

Historicamente, os alcaloides compõem um vasto grupo de metabólitos com ampla diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Desde os primórdios das civilizações, extratos vegetais contendo esses metabólitos apresentam utilidades tais como: medicamentos, venenos, e em poções mágicas.

Sua utilidade como veneno pode ser vista, por exemplo, na execução do filósofo Sócrates pela ingestão de uma bebida preparada à base de cicutas contendo o alcaloide coniina (**Figura 21**), ou então o uso de extrato seco da planta curare, contendo o alcaloide tubocurarina (**Figura 21**), no preparo de dardos e flechas envenenadas empregadas na caça e em guerras (Simões e colaboradores, 1999).

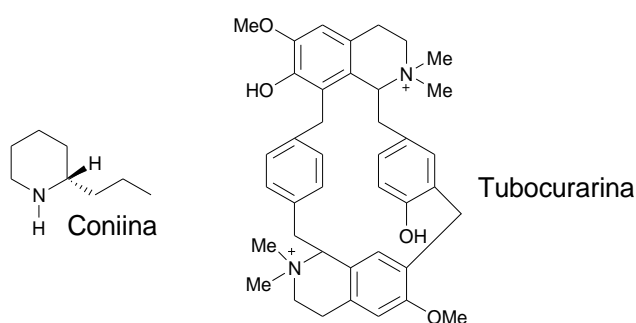


Figura 21: Estrutura dos alcalóides coniina e tubocurarina, substâncias utilizadas como veneno (Hostettmann e colaboradores, 2003).

De acordo com Waterman (1975), os alcaloides que derivam do ácido antranílico têm sua distribuição restrita fora da família Rutaceae, atuando dessa maneira, como marcador quimiotaxonômico desta família, sendo os dois maiores

grupos os alcaloides de esqueletos quinolínicos e acridônicos, como pode ser visto na **Figura 22**, página 22.

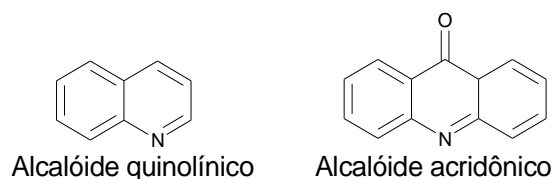
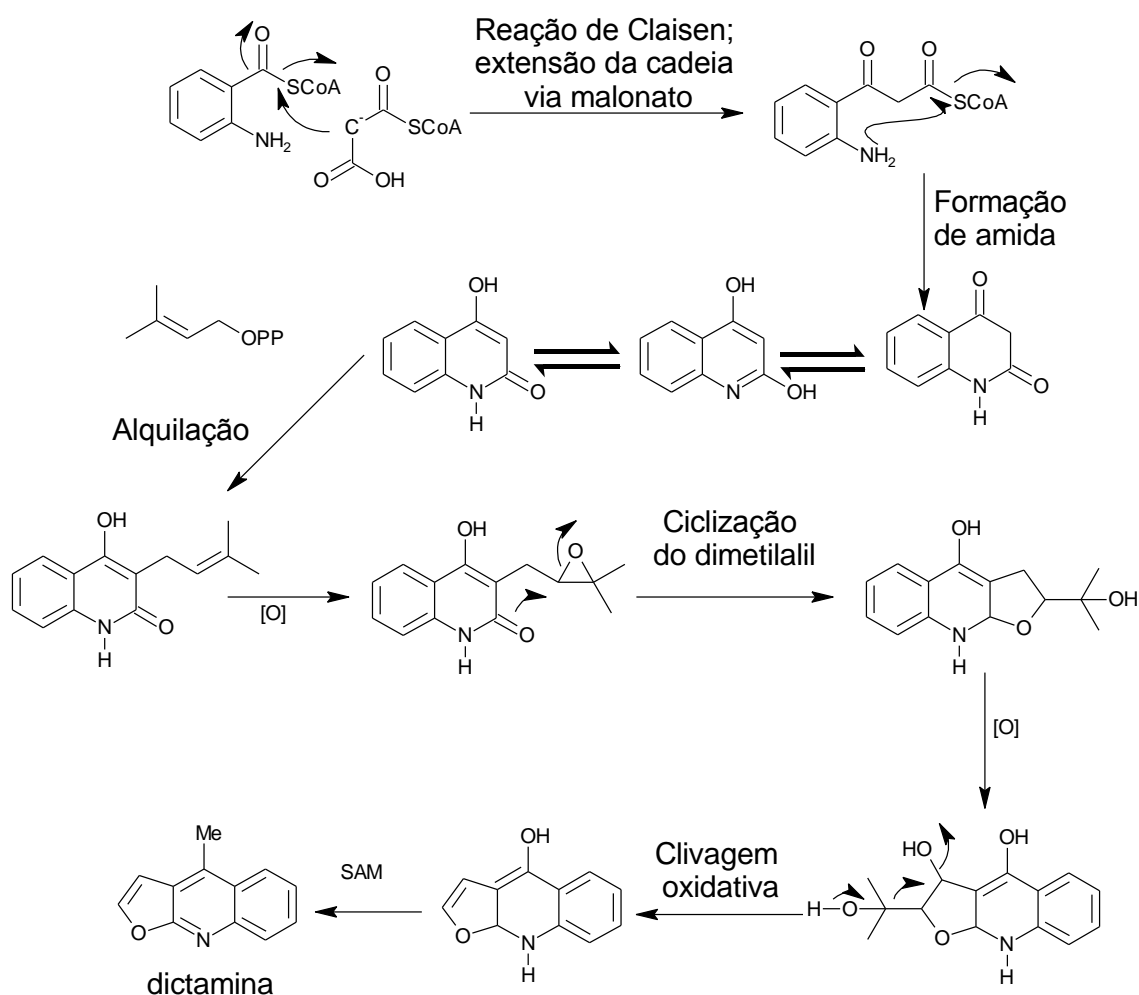


Figura 22: Esqueleto de alcaloides mais comuns em Rutaceae.

No **esquema 1**, presente na página, observa-se a rota biosintética para alcaloides derivados do ácido antranílico.



Esquema 1: Rota biosintética para alcaloides derivados do ácido antranílico.

3.5.2 Cumarinas

As cumarinas são substâncias com ampla ocorrência em espécies vegetais, sendo Rutaceae a segunda família que mais produz essa classe de metabólito (Ribeiro & Kaplan, 2002).

A esses metabólitos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, tais como antiviral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiespasmódica, antioxidante e antitumoral (Gonçalves, 2008), podendo ser encontradas em todas as partes da planta, frequentemente como misturas (Simões e colaboradores, 1999).

As cumarinas de ocorrência em Rutaceae são sempre oxigenadas no átomo do carbono C-7, e têm sua origem no ácido *trans-p*-cumárico, que por meio de transformações leva a formação do 7-hidroxicumarina, também conhecido por umbeliferona (**Figura 23**, página 23) (Gray and Waterman, 1978).

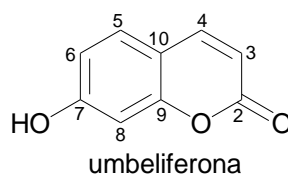
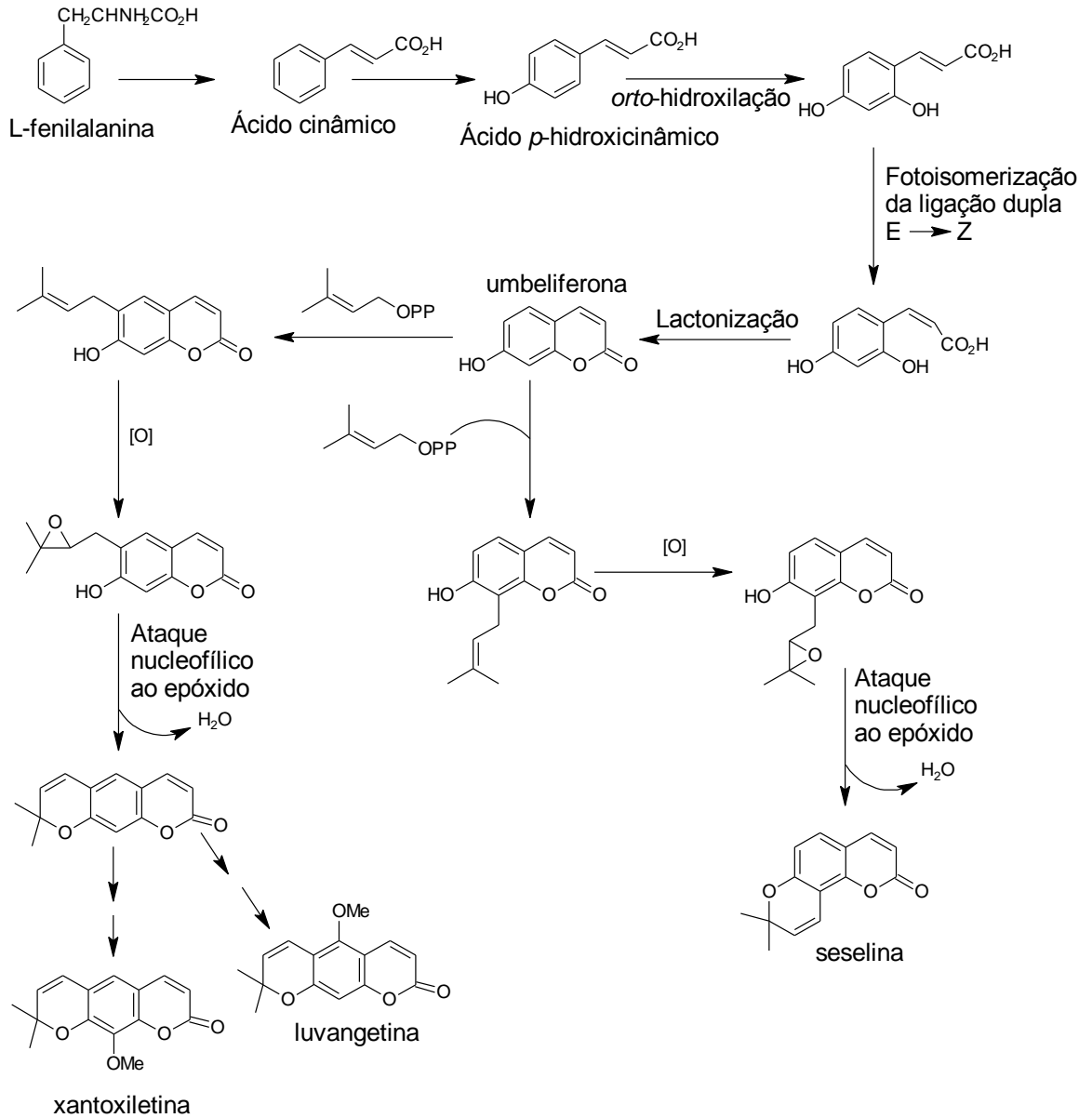


Figura 23: Estrutura da 7-hidroxicumarina

Cumarinas são substâncias derivadas do metabolismo da fenilalanina, tendo como um de seus primeiros precursores o ácido *p*-cumárico, que é hidroxilado na posição *orto* (C-2'), este sofre isomerização fotocatalizada da ligação ($E \rightarrow Z$), sendo o isômero *Z* lactonizado espontaneamente, produzindo então a 7-hidroxicumarina. A prenilação do anel benzênico nas posições C-6 ou C-8 da umbeliferona é o passo inicial na biogênese das furano e piranocumarinas (**Esquema 2**, página 24), a ciclização destes derivados ocorre com ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-7 ao epóxido, que é formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentenila, levando aos produtos hidroxi-isopropil-di-hidrofuranocumarina ou hidroxi-dimetil-di-hidropiranocumarina (Simões e colaboradores, 1999).



Esquema 2: Origem biogênica de cumarinas e derivados.

4. METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

O material vegetal da espécie *Conchocarpus cyrtanthus*, constituído de madeira, foi coletado na Reserva da Cia Vale do Rio Doce em Linhares-ES, em maio de 2011. A espécie foi comparada com exsicata depositada no herbário da Reserva Natural da CVRD sob o número de registro 6498.

4.1.2 Equipamentos

O material botânico foi moído em moinho de martelos, pesado em balança de uso doméstico, e as massas dos extratos secos foram obtidas em balança analítica da marca Shimadzu.

A concentração dos extratos obtidos foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Fisatom.

As colunas de vidro utilizadas foram de tamanhos e diâmetros variados e eluídas a pressão ambiente.

Como reveladores foram utilizados, irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254nm e 365nm, processos não destrutivos, onde a fase estacionária é fluorescente.

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, utilizando capilar e em um equipamento Microquímica MQRPF, o qual utilizou lâminas de vidro, em ambos os valores foram obtidos sem correção.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de ^1H e de ^{13}C (incluindo experimento em 2D), foram obtidos na UFRRJ em um espectrômetro da marca Bruker Advance II 9,4 T (^1H : 400 e ^{13}C : 100 MHz), 11,5 T (^1H : 500 MHz e ^{13}C : 125 MHz), utilizando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) ou resíduo do solvente CDCl_3 (δ_{H} 7,24), e o sinal central do tripleto em δ 77,0 do CDCl_3 .

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo gasoso do modelo CG/EM-QP2010 Plus da marca Shimadzu, utilizando impacto de elétrons a 70 eV.

As análises em CL-EM-IES foram realizadas na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste – LEMANOR, em aparelho Shimadzu CL-EM-TOF (225-07100-34) equipado com fonte de ionização de elétron-spray.

4.1.3 Solventes e reagentes

As análises cromatográficas em coluna foram realizadas com utilização de gel de sílica, Merck Darmstadt 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh ASTM).

Os solventes utilizados nas preparações dos extratos brutos e nas separações cromatográficas foram hexano, cloreto de metileno (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt), acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) e metanol (CH_3OH), todos de grau P.A. da marca Synth.

As análises comparativas, para determinação de composição de cada fração, foram realizadas em Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA) com a utilização de cromatofolhas com fase estacionária de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck.

As análises em Cromatografia em Camada Delgada, em escala Preparativa, foram realizadas com a utilização de placas de vidro 20x20 cm, com gel de sílica 60 PF₂₅₄, contendo gesso, obtidas por meio de diluição de 15 g de gel de sílica 60 F₂₅₄ em 35 mL de água destilada, solubilizada, desgaseificada seguida de distribuição manual da solução sobre a placa.

Os reagentes cromogênicos utilizados como reveladores foram: Vanilina sulfúrica (preparado com 3,0 g de vanilina, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 100% pura, 135 mL de H_2O

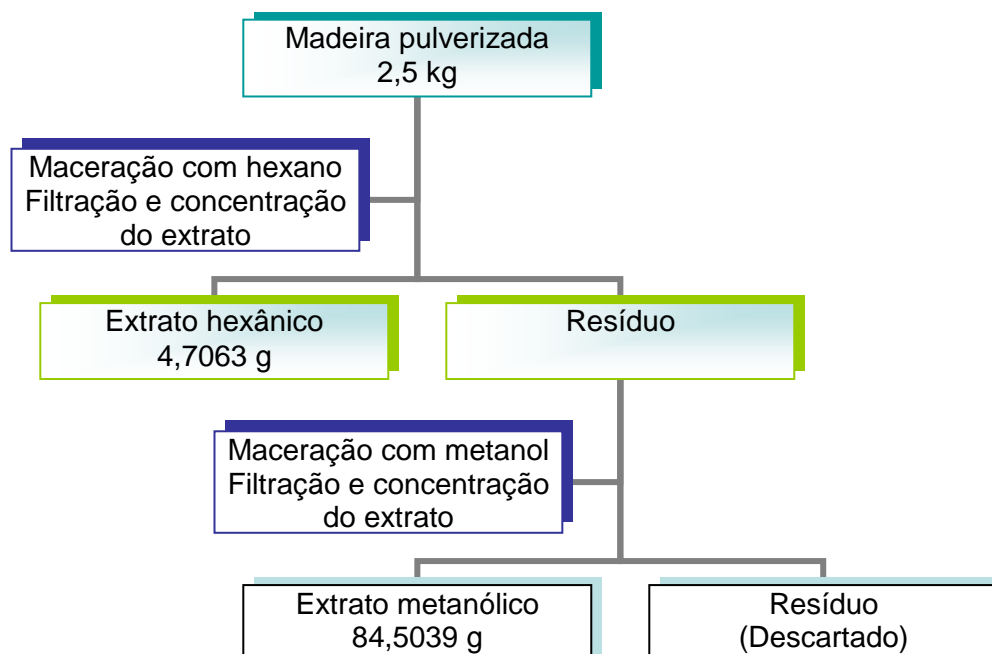
destilada, 135 mL de EtOH, e 30 mL de H₂SO₄) seguida de aquecimento e, reagente de Dragendorff (preparado com 1 mL de solução estoque, 2 mL de ácido acético e 10 mL de H₂O destilada) revelador específico de substâncias nitrogenadas.

O solvente utilizado nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de ¹H e de ¹³C foi clorofórmio (CDCl₃) deuterado.

4.2 Experimental

4.2.1 Preparo da amostra e dos extratos brutos

Após a coleta do material vegetal procedeu-se com a sua secagem ao ar livre seguida de moagem, em moinho de martelos, e pesagem, em balança de uso doméstico, obtendo-se 2,5 Kg para a madeira. Posteriormente iniciou-se a obtenção dos extratos brutos feita à temperatura ambiente por maceração, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade, hexano e metanol. As soluções obtidas foram concentradas a pressão reduzida, em evaporador rotativo. O **Esquema 3** mostra o procedimento descrito.



Esquema 3: Obtenção de extratos da madeira de *C. cyrtanthus*.

A **Tabela 2** mostra a quantidade de cada extrato bruto obtido, o rendimento e o código adotado para cada extrato.

Tabela 2: Extratos brutos obtidos de *C. cyrtanthus*.

Parte botânica	Quantidade material (g)	Solventes utilizados	Quantidade de extrato bruto (g)	Rendimento (%)	Código dos extratos
Madeira	2500	Hexano	4,7063	0,0018	CCHM
		Metanol	84,5039	0,0338	CCMM

Legenda: CC = *C. cyrtanthus*, HM = extrato hexânico da madeira, MM = extrato metanólico da madeira.

4.3 Descrição experimental dos constituintes químicos isolados da madeira da espécie *Conchocarpus cyrtanthus* Kallunki & Pirani.

4.3.1 Análise cromatográfica do extrato em hexano (CCHM).

Inicialmente o extrato CCHM (4,7063 g) foi submetido a um fracionamento cromatográfico em coluna com gel de sílica e eluído em hexano com gradiente crescente de polaridade hexano/acetato de etila (AcOEt) até 100% (v/v), obtendo-se um total de 54 frações (CC1). Estas foram analisadas por CCDA, sendo então reunidas em 11 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado. A **Tabela 3**, mostra o procedimento descrito.

Tabela 3: Fracionamento do extrato hexânico (CCHM)

Frações	Código	Massa (g)
1-3	CCHM-1*	0,0509
4-9	CCHM-2*	0,1222
15-18	CCHM-3*	0,0654
19-22	CCHM-4*	1,0739
23-27	CCHM-5*	0,5728
28-32	CCHM-6*	0,3638
33-36	CCHM-7	0,8421
37-41	CCHM-8*	0,3289
42-45	CCHM-9*	0,5078
46-49	CCHM-10	0,1928
49-54	CCHM-11	0,2641

* frações não trabalhadas

As frações trabalhadas foram selecionadas após análise em CCDA apresentar boa resolução com manchas de coloração características para

cumarinas, diterpenos ou esteroides, quando observadas sob irradiação com luz na região do UV a 254nm e 365nm e/ou reveladas com vanilina sulfúrica.

4.3.1.1 Análise cromatográfica da fração CCHM-7.

A fração CCHM-7 (0,8421 g) foi submetida à uma cromatografia em coluna de gel de sílica e eluída com hexano com gradiente crescente de polaridade hexano/acetato de etila até 30% (v/v), obtendo-se um total de 155 frações (CC2). Estas foram analisadas por CCDA, sendo então reunidas em 11 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, como pode ser visto na **Tabela 4**.

Tabela 4: Fracionamento da fração CCHM-7

Frações	Código	Massa (g)	Substâncias
1-15	CCHM-7.1*	0,0057	
16-35	CCHM-7.2*	0,0026	
36-44	CCHM-7.3*	0,0075	
45-60	CCHM-7.4*	0,0088	
61-73	CCHM-7.5	0,0920	1 e 2 (mistura + impurezas)
74-90	CCHM-7.6*	0,2147	
91-107	CCHM-7.7*	0,0573	
108-125	CCHM-7.8	0,0230	4, 5 e 6 (mistura + impurezas)
126-138	CCHM-7.9*	0,0641	
139-150	CCHM-7.10*	0,0248	
151-155	CCHM-7.11*	0,0391	

* Frações não trabalhadas

A fração CCHM-7.5 (0,0920 g) foi submetida à uma cromatografia em coluna (CC3) de gel de sílica, eluída com hexano com gradiente crescente de polaridade hexano/acetato de etila até 30% (v/v), resultando na mistura das substâncias **1 e 2**.

Foi observado, na fração CCHM-7.8 (0,0230 g), após evaporação do solvente, a presença de cristais esbranquiçados, estes foram removidos, com auxílio de uma espátula, para novo recipiente (15,0 mg), seguido de análise em CCDA, na qual pode ser observado a purificação da amostra, sendo obtida a mistura das substâncias **4, 5 e 6**.

4.3.1.2 Análise cromatográfica da fração CCHM-10

A fração CCHM-10 (0,1928 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, eluída com hexano com gradiente crescente de polaridade hexano/acetato de etila até 100% (v/v), sendo coletado um total de 233 frações (CC4). Estas foram analisadas por CCDA, sendo reunidas em 15 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, como mostra **Tabela 5**.

Tabela 5: Fracionamento da fração CCHM-10.

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(4-10)	CCHM-10.1*	4,9	
(11-17)	CCHM-10.2*	3,8	
(18-23)	CCHM-10.3*	3,4	
(24-57)	CCHM-10.4*	5,8	
(58-83)	CCHM-10.5*	5,9	
(84-101)	CCHM-10.6*	9,8	
(102-119)	CCHM-10.7*	13,8	
(120-132)	CCHM-10.8*	15,4	
(133-151)	CCHM-10.9	14,9	10 (impura)
(152-182)	CCHM-10.10*	38,4	
(183-204)	CCHM-10.11*	6,0	
(205-210)	CCHM-10.12*	4,6	
(211-213)	CCHM-10.13*	16,8	
(214-226)	CCHM-10.14*	13,4	
(227-230)	CCHM-10.15*	32,8	

* Frações não trabalhadas

A fração CCHM-10.9 (14,9 mg) foi submetida a uma cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP1), eluída com um sistema de três solventes: hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (10/20/70), na qual obteve-se a purificação da substância **10**.

4.3.1.3 Análise cromatográfica da fração CCHM-11

A fração CCHM-11 (246,1 mg) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, eluída em hexano com gradiente

crecente de polaridade hexano/acetato de etila até 100% (v/v), sendo coletado um total de 40 frações (CC5). Estas foram analisadas por CCDA, sendo reunidas em 7 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, como mostra **Tabela 6**.

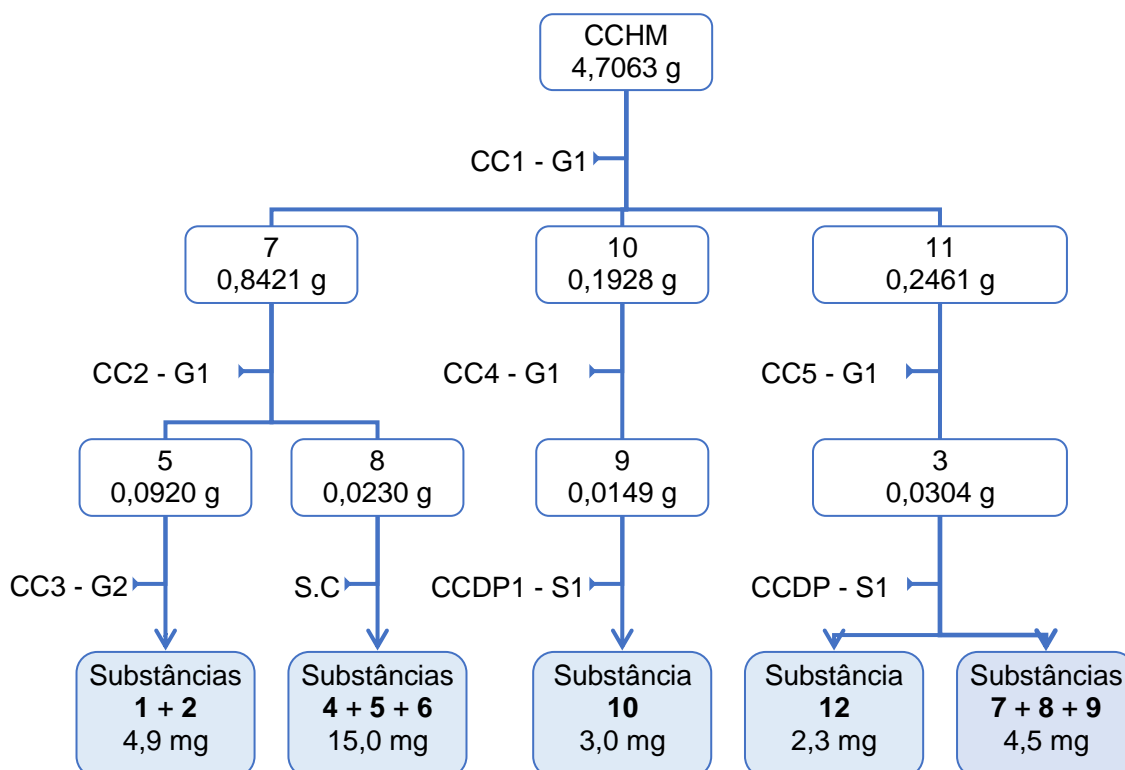
Tabela 6: Fracionamento da fração CCHM-11.

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(0)	CCHM-11.1*	14,7	
(1-3)	CCHM-11.2*	22,0	
(4-6)	CCHM-11.3	30,4	12 impura
(7-14)	CCHM-11.4*	28,3	
(15-20)	CCHM-11.5*	23,0	
(21-24)	CCHM-11.6*	41,9	
(25-40)	CCHM-11.7*	41,9	

* Frações não trabalhadas

A fração CCHM-11.3 (30,4 mg) foi submetida a uma cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP2), eluída com um sistema de três solventes: hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (10/20/70), na qual obteve-se a purificação da substância **12** e uma mistura das substâncias **7**, **8** e **9**.

O **Esquema 4**, mostra todo o procedimento de cromatografia descrito para o extrato CCHM de uma forma generalizada.



Legenda: CC1, CC2, CC3, CC4 = colunas cromatográficas 1, 2, 3 e 4 em gel de sílica 60 (70 - 230 mesh); CCDP1 = Cromatografia em Camada Delgada Preparativa 1 em gel de sílica 60 PF₂₅₄; G1 = hexano/AcOEt até 100% (v/v); G2 = hexano/AcOEt até 30% (v/v); S1= hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (10/20/70); S.C = separação de cristais.

Esquema 4: Procedimento descrito para CCHM e suas frações.

4.3.2 Análise cromatográfica do extrato metanólico CCMM.

O extrato CCMM (84,5039 g) foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluído em CH₂Cl₂ com gradiente crescente de polaridade CH₂Cl₂/MeOH até 100% (v/v), obtendo-se um total de 43 frações (CC6). Estas foram analisadas por CCDA, sendo então reunidas em 10 frações de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, como mostra a **Tabela 7**.

Tabela 7: Fracionamento do extrato metanólico CCMM

Frações	Código	Massa (g)	Substâncias
(0-3)	CCMM-1*	0,2942	
(4-7)	CCMM-2	0,7541	
(8-14)	CCMM-3	0,5679	
(15-19)	CCMM-4	1,0729	
(20-24)	CCMM-5	3,2108	
(25-28)	CCMM-6*	0,7394	
(29-33)	CCMM-7*	3,4932	
(34-37)	CCMM-8*	3,2878	
(38-40)	CCMM-9*	6,5738	
(41-43)	CCMM-10*	45,8139	

* frações não trabalhadas

As frações trabalhadas foram selecionadas após análise em CCDA apresentar boa resolução com manchas de coloração características para alcaloides, cumarinas, diterpenos ou esteroides, quando observadas sob irradiação com luz na região do UV a 254nm e 365nm e/ou reveladas com vanilina sulfúrica e reagente de Dragendorff.

4.3.2.1 Análise cromatográfica de CCMM-2.

A fração CCMM-2 (0,7541 g) sofreu fracionamento em coluna com gel de sílica eluída com CH_2Cl_2 , com gradiente crescente de polaridade $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ até 50% (v/v), sendo coletadas 220 frações (CC7), que foram reunidas em 11 novas frações após serem analisadas em CCDA. Neste fracionamento obteve-se a substância **11 (Tabela 8)**.

Tabela 8: Fracionamento da fração CCMM-2

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-15)	CCMM-2.1*	81,3	
(16-36)	CCMM-2.2*	36,7	
(37-43)	CCMM-2.3	14,9	11
(44-50)	CCMM-2.4*	15,6	
(51-72)	CCMM-2.5*	73,0	
(73-85)	CCMM-2.6*	46,61	
(86-95)	CCMM-2.7*	17,8	
(96-120)	CCMM-2.8*	177,2	
(121-150)	CCMM-2.9*	68,0	
(151-188)	CCMM-2.10*	88,2	
(189-220)	CCMM-2.11*	90,0	

* frações não trabalhadas

4.3.2.2 Análise cromatográfica de CCMM-3

A fração CCMM-3 (0,5679 g) foi submetida a uma coluna de gel de sílica, e eluída com hexano com gradiente crescente de polaridade hexano/AcOEt até 100% (v/v). Esta cromatografia forneceu 213 frações (CC8), sendo reunidas em 8 novas frações, devido ao perfil cromatográfico apresentado por CCDA, **Tabela 9**.

Tabela 9: Fracionamento da fração CCMM-3

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-11)	CCMM-3.1*	3,9	
(12-34)	CCMM-3.2	48,0	13 (impura)
(35-54)	CCMM-3.3	44,0	14 (impura)
(55-92)	CCMM-3.4	101,0	4, 5 e 6 (impura)
(93-120)	CCMM-3.5	63,1	15 (impura)
(121-154)	CCMM-3.6	224,0	3 e 15 (impura)
(154-189)	CCMM-3.7*	29,1	
(190-213)	CCMM-3.8*	37,9	

* frações não trabalhadas

4.3.2.2.1 Análise cromatográfica de CCMM-3.2

A fração CCMM-3.2 (48,0 mg) foi novamente cromatografada em gel de sílica, tendo como eluente hexano e gradiente crescente de eluição hexano/acetona até 20 % (v/v), fornecendo 76 frações (CC8) que, após CCDA, foram reunidas em 6 novas frações. A **Tabela 10** mostra o fracionamento realizado.

Tabela 10: Fracionamento da fração CCMM-3.2

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-14)	CCMM-3.2.1*	2,5	
(15-25)	CCMM-3.2.2	16,0	13 (impura)
(26-36)	CCMM-3.2.3*	9,8	
(37-44)	CCMM-3.2.4*	3,7	
(45-70)	CCMM-3.2.5*	10,0	
(71-76)	CCMM-3.2.6*	5,5	

* frações não trabalhadas

A fração CCMM-3.2.2 (16,0 mg) foi submetida a uma CCDP, sendo utilizado como sistema de solventes hexano/AcOEt (94/6) (v/v), obtendo-se a purificação da substância **13**.

4.3.2.2.2 Análise cromatográfica de CCMM-3.3

A fração CCMM-3.3 (44,0 mg) foi submetida a uma CCDP, sendo utilizado como sistema de solventes hexano/AcOEt (90/10) (v/v), obtendo-se a purificação da substância **14**.

4.3.2.2.3 Análise cromatográfica de CCMM-3.4

A fração CCMM-3.4 (101,0 mg) apresentou presença de cristais, após evaporação de solvente, estes foram lavados com o solvente metanol e separados do sobrenadante, seguido de análise em CCDA, mostrando que os cristais tratavam-se do isolamento da mistura das substâncias **4**, **5** e **6**, já o sobrenadante não mostrou boa resolução sendo então reservada para posterior análise.

4.3.2.2.4 Análise cromatográfica de CCMM-3.6

A fração CCMM-3.6 (224,0 mg) foi submetida à cromatografia em gel de sílica, sendo utilizado como eluente hexano e gradiente crescente de polaridade hexano/acetona até 20 % (v/v), fornecendo 147 frações (CC9) que, após CCDA, foram reunidas em 9 novas frações. A **Tabela 11** mostra o fracionamento realizado.

Tabela 11: Fracionamento da fração CCMM-3.6

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-14)	CCMM-3.6.1*	10,9	
(15-38)	CCMM-3.6.2*	8,9	
(39-52)	CCMM-3.6.3*	50,0	
(53-99)	CCMM-3.6.4*	48,2	
(100-105)	CCMM-3.6.5*	28,4	
(106-147)	CCMM-3.6.6	64,5	3 e 15 (impuras)
(148-173)	CCMM-3.6.7*	54,3	

* frações não trabalhadas

A fração CCMM-3.6.6 (64,5 mg) foi submetida à cromatografia em gel de sílica (CC10), eluída com sistema isocrático de três solventes hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (50/40/10), obtendo-se a purificação das substâncias **3** e **15**.

4.3.2.3 Análise cromatográfica de CCMM-4

A fração CCMM-4 (1,0729 g) sofreu cromatografia em coluna de gel de sílica (CC11) e a amostra foi eluída com hexano em modo gradiente crescente de polaridade hexano/acetona até 70% (v/v), nesta cromatografia 125 frações foram coletadas. Foi observada a presença de cristais tipo agulha em algumas frações e estes foram então removidos, com auxílio de espátula (81,3 mg), em seguida foi realizada análise em CCDA, sendo as frações reunidas em 6 frações, mais 1 fração referente aos cristais. A análise dos cristais mostrou que a substância **15** havia sido purificada. A **Tabela 12**, presente na página 35, mostra o fracionamento realizado.

Tabela 12: Fracionamento da fração CCMM-4

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-6)	CCMM-4.1*	48,8	
(7-15)	CCMM-4.2*	57,6	
(16-30)	CCMM-4.3*	182,6	
(31-60)	CCMM-4.4*	300,7	
(61-98)	CCMM-4.5*	145,3	
(99-125)	CCMM-4.6*	133,4	
Cristais	CCMM-4.7	81,3	15

* frações não trabalhadas

4.3.2.4 Análise cromatográfica de CCMM-5

A fração CCMM-5 (3,2108 g) sofreu fracionamento em gel de sílica, sendo a fase móvel hexano/acetona em modo gradiente de polaridade até acetona 100%. Foi recolhido um total de 168 frações (CC12), que foram reunidas posteriormente, de acordo com o perfil cromatográfico apresentado em CCDA, em 10 frações como mostra a **Tabela 13**.

Tabela 13: Fracionamento da fração CCMM-5

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-9)	CCMM-5.1*	79,5	
(10-22)	CCMM-5.2*	101,5	
(23-37)	CCMM-5.3*	174,7	
(38-71)	CCMM-5.4*	284,1	
(72-83)	CCMM-5.5*	115,2	
(84-103)	CCMM-5.6*	663,0	
(104-115)	CCMM-5.7*	598,7	
(116-120)	CCMM-5.8*	118,9	
(121-150)	CCMM-5.9	554,6	
(151-168)	CCMM-5.10*	472,8	

* frações não trabalhadas

4.3.2.4.1 Análise cromatográfica de CCMM-5.9

A fração CCMM-5.9 (554,6 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída em CH₂Cl₂ e metanol em modo gradiente de polaridade até

50% (v/v), sendo recolhidas de 195 frações (CC13), que foram reunidas, após análise em CCDA, em 10 frações, como mostra a **Tabela 14**.

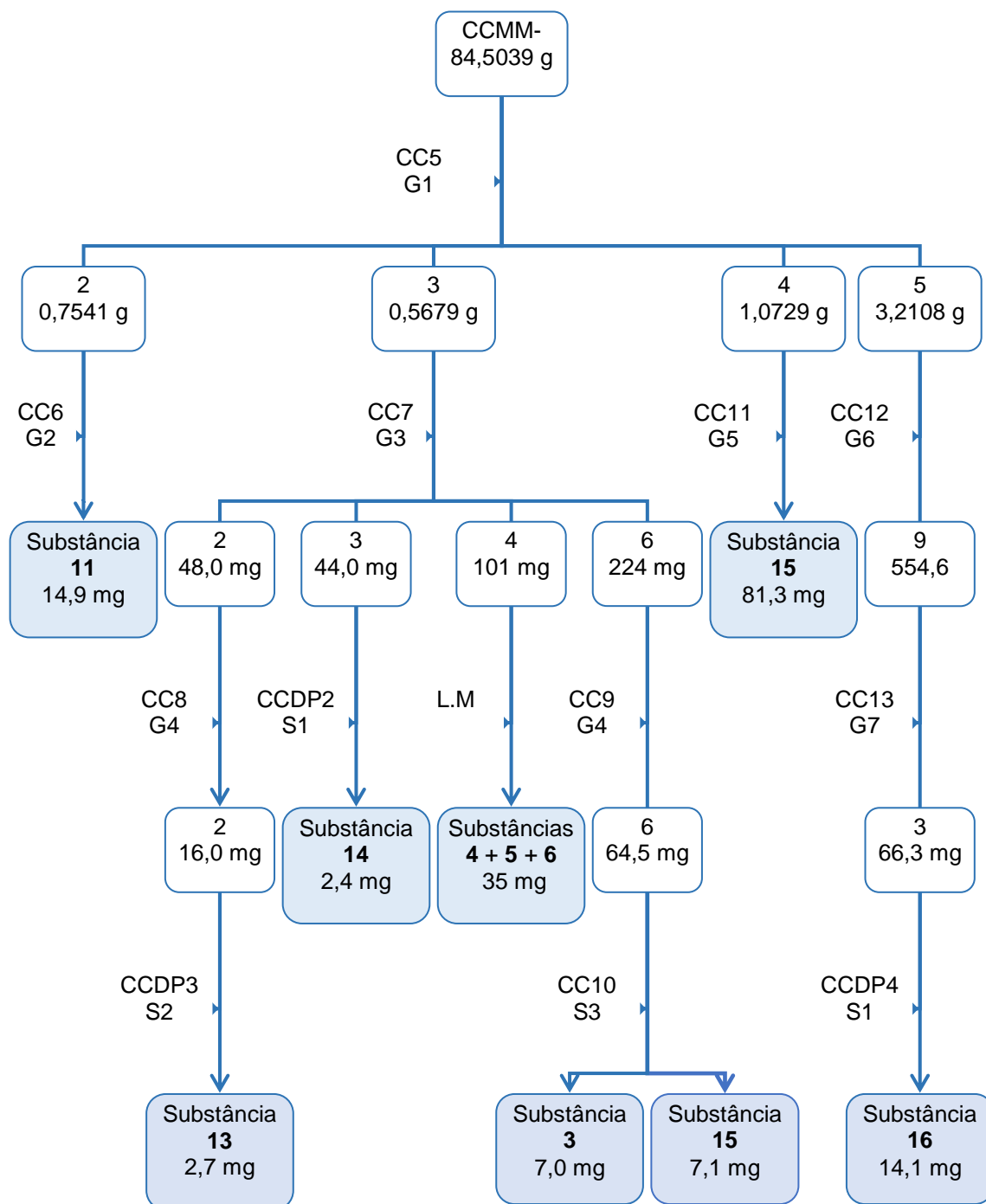
Tabela 14: Fracionamento da fração CCMM-5.9

Frações	Código	Massa (mg)	Substâncias
(1-25)	CCMM-5.9.1*	5,2	
(26-45)	CCMM-5.9.2*	4,5	
(46-71)	CCMM-5.9.3	66,2	16 (impura)
(72-92)	CCMM-5.9.4	27,0	
(93-136)	CCMM-5.9.5*	104,4	
(137-145)	CCMM-5.9.6*	42,5	
(146-163)	CCMM-5.9.7*	56,7	
(164-182)	CCMM-5.9.8*	120,0	
(183-195)	CCMM-5.9.9*	70,5	

* frações não trabalhadas

A fração CCMM-5.9.3 (66,2 mg) foi submetida à CCDP, sendo utilizado como sistema de solventes CH₂Cl₂/AcOEt (9/1) (v/v), obtendo-se a purificação da substância **16**.

O **Esquema 5**, presente na página seguinte, mostra todo o procedimento descrito para o extrato CCMM e suas frações.



Legenda: CC1-CC13= colunas cromatográficas 1-13 em gel de sílica 60 (70 - 230 mesh); CCDP2-CCDP4= Cromatografia em Camada Delgada Preparativa 2-4 em gel de sílica 60 PF₂₅₄; G1= CH₂Cl₂/MeOH até 100% (v/v); G2= CH₂Cl₂/MeOH até 50% (v/v); G3= hexano/AcOEt até 100% (v/v); G4= hexano/acetona até 20% (v/v); G5= hexano/acetona até 70% (v/v); G6= hexano/acetona até 100% (v/v); G7= CH₂Cl₂/MeOH até 50%; S1= hexano/AcOEt (90/10); S2= hexano/AcOEt (94/6); S3= hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (50/40/10); L.M= Lavagem de fração com metanol.

Esquema 5: Procedimento descrito para o extrato CCMM e suas frações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Substâncias isoladas

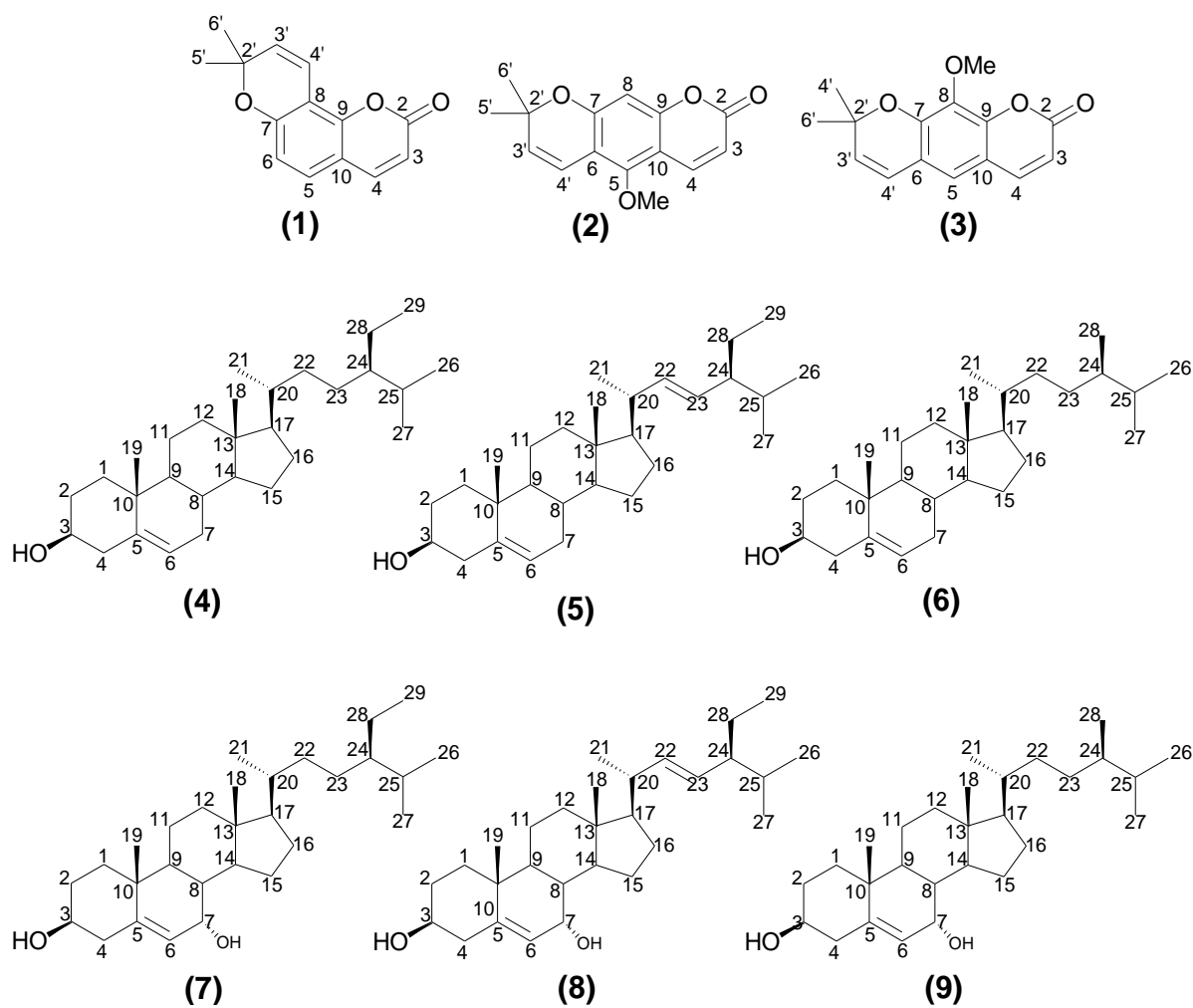
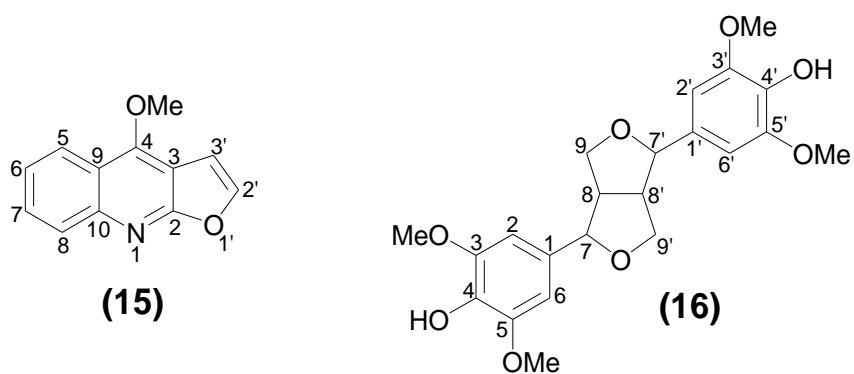
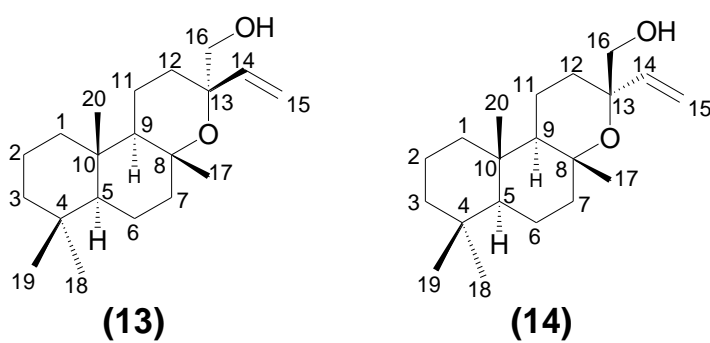
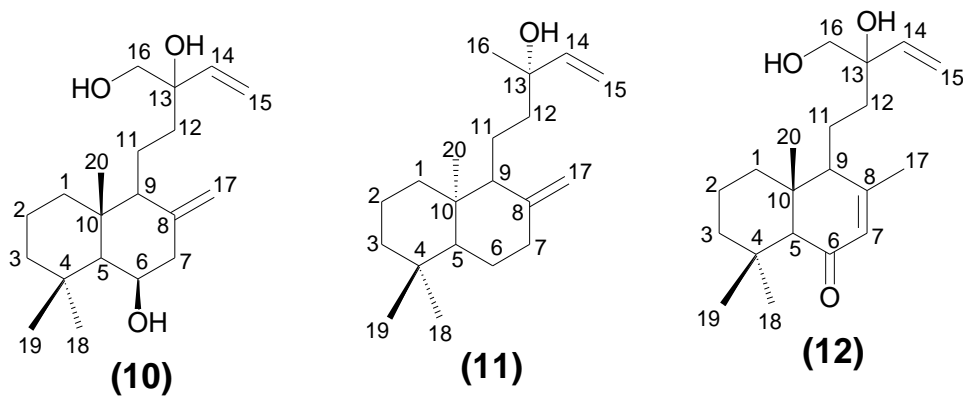


Figura 24: Estrutura de substâncias isoladas de *Conchocarpus cyrtanthus*.

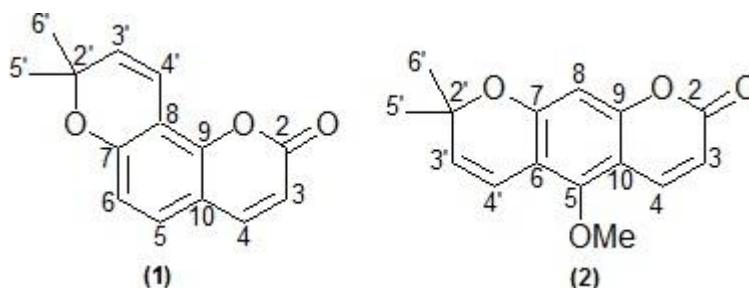


Cont. Figura 24: Estruturas de substâncias isoladas de *Conchocarpus cyrthantus*.

5.2 Elucidação estrutural:

5.2.1 Cumarinas

5.2.1.1 Elucidação estrutural da mistura das substâncias 1 e 2:



O tratamento cromatográfico do extrato hexânico da madeira de *C. cyrtanthus* forneceu a mistura das substâncias **1** e **2** que foram obtidas por meio de cromatografia em coluna aberta (CCA) usando como eluente a mistura de solventes hexano/AcOEt em modo gradiente de polaridade até 30% de AcOEt (**Esquema 4**, página 32).

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 27** e **28**, páginas 46 e 47) exibiu sinais duplicados na região de aromáticos levando a hipótese de a amostra apresentar-se como uma mistura de substâncias, sendo estes em δ_{H} 7,98 (*d*, 9,6 Hz, **2**, H-4) e 7,62 (*d*, 9,5 Hz, **1**, H-4), característicos de hidrogênios de cadeia lateral de cumarinas, substâncias comuns no gênero *Conchocarpus* (Belleite e colaboradores, 2012).

A junção desta cadeia lateral com o anel aromático conduz a configuração *cis*, e desta forma, geram sinais com constante de acoplamento de aproximadamente ($J \approx 9\text{-}12$ Hz).

A conjugação da ligação dupla com a carbonila lactônica produz efeito mesomérico, gerando uma estrutura canônica que desprotege o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono- β (CH-4), produzindo sinal em frequência mais alta que o hidrogênio ligado ao átomo de carbono- α , que apresentou sinais em δ_{H} 6,15 (*d*, 9,7 Hz, **2**, H-3) e 6,25 (*d*, 9,4 Hz, **1**, H-3) (MURRAY e colaboradores, 1982).

O experimento ^1H - ^1H -COSY (**Figura 29**, página 48) corrobora os assinalamentos ao exibir acoplamento entre os sinais.

A duplicação dos sinais característicos de um anel pirano, δ_{H} 5,75 (*d*, 10,0 Hz, **1**, H-3') e 6,91 (*d*, 10,0 Hz, **1**, H-4'), além da presença de dois dupletos em δ_{H} 7,24 (*d*, 8,4 Hz, **1**, H-5) e 6,74 (*d*, 8,5 Hz, **1**, H-6), que exibiram acoplamento no

experimento ^1H - ^1H -COSY, sustentam a proposta de estrutura da cumarina **1** como sendo a **seselina** (Moreira, 2001; Abdelnur, 2006).

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 30**, página 49 e **tabela 15**) exibiu sinais semelhantes ao encontrado na literatura, o que corrobora a proposta estabelecida.

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **1**, em CDCl_3 e comparação com valores da literatura para a cumarina **seselina**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Substância 1			Seselina	
H/C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	-	-	161,0
3	6,25 (d, 9,4)	112,5	6,22 (d, 9,3)	112,8
2'	-	79,7	-	77,9
3'	5,75 (d, 10,0)	130,2	5,73 (d, 10,2)	130,6
4'	6,91 (d, 10,0)	115,0	6,89 (dd, 10,2; 0,6)	114,9
4	7,62 (d, 9,5)	144,0	7,59 (d, 9,5)	144,2
5	7,24 (d, 8,4)	127,8	7,21 (d, 8,4)	121,4
6	6,74 (d, 8,5)	113,5	6,72 (dd, 8,4; 0,6)	113,8
7	-	-	-	144,2
8	-	-	-	144,1
9	-	-	-	108,8
10	-	-	-	113,1
5'/6'	1,48 (s)	28,2	1,48 (s)	28,1

A presença de um pico no cromatograma da amostra, correspondente ao pico do íon molecular em M^+ 228 Dalton no espectro de massas (**Figura 25**) está consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$. As propostas de fragmentação (**Esquema 6**, página 44) juntamente com o conjunto de dados analisados e comparação com modelos na literatura (Moreira, 2001; Abdelnur, 2006) conduzem à determinação estrutural da cumarina **1** como sendo a **seselina**.

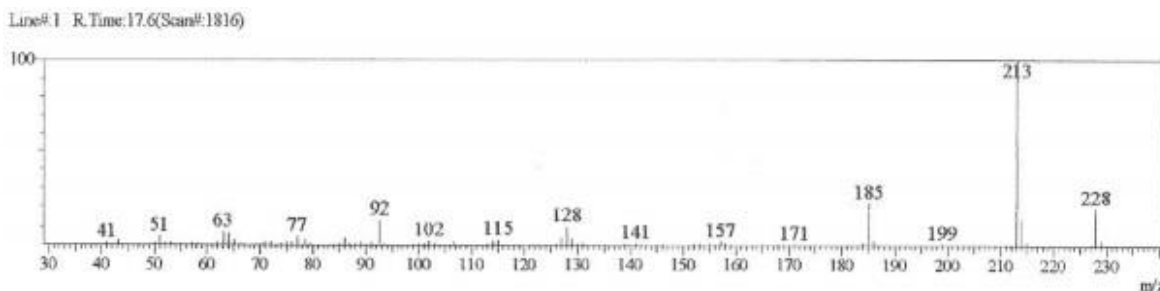
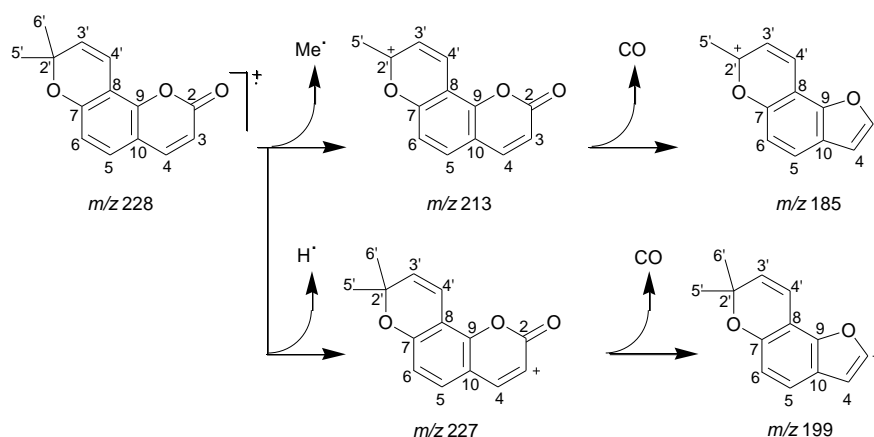


Figura 25: Espectro de Massas 70 eV da cumarina **1** de *C. cyrtanthus*.



Esquema 6: Proposta de fragmentação para a cumarina **seselina**.

A comparação com modelos na literatura possibilitou assinalar os sinais em δ_{H} 6,26 (s) H-8 e 3,90 (s) OMe-5, além dos sinais característicos de um anel pirano em δ_{H} 5,60 (d, 10,0 Hz, 2, H-3') e 6,82 (d, 10,0 Hz, 2, H-4'), conduzindo para elucidação da estrutura da cumarina **xantoxiletina** (Abdelnur, 2006; Steck, 1971).

A proposta foi sustentada através de análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 26**, página 49 e **tabela 16**) e comparação dos deslocamentos químicos com a literatura (Abdelnur, 2006).

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **2**, em CDCl_3 e comparação com valores da literatura para a cumarina **xantoxiletina**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Substância 2			xantoxiletina	
H/C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	-	-	161,0
3	6,15 (d, 9,7)	110,4	6.14 (d, 9.6)	110,3
2'	-	79,7	-	78,0
3'	5,60 (d, 10,0)	127,6	5.57 (d, 10.0)	127,6
4'	6,82 (d, 10,0)	115,0	6.77 (d, 10.0)	114,9
4	7,98 (d, 9,6)	139,0	7.98 (d, 9.6)	139,1
5	-	-	-	156,5
6	-	-	-	102,6
7	-	-	-	157,5
8	6,26 (s)	95,4	6.24 (s)	95,4
9	-	-	-	103,9
10	-	-	-	153,3
5'/6'	1,48 (s)	28,2	1.46 (s)	28,1
MeO-5	3,90 (s)	56,0	3.88 (s)	56,0

A análise da amostra por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas de baixa resolução exibiu perfil cromatográfico que confirma a presença de mistura de substâncias. O espectro de massas de baixa resolução de um dos picos observados no cromatograma (**Figura 26**) exibiu como íon molecular M^+ 258 Dalton, consistente com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_4$, que juntamente com as propostas de fragmentação (**Esquema 7**) justificam a atribuição da estrutura da cumarina **2** como sendo a **xantoxiletina**.

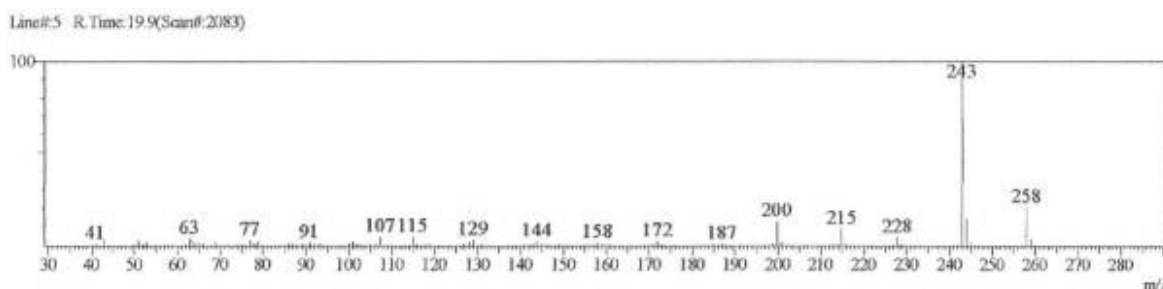
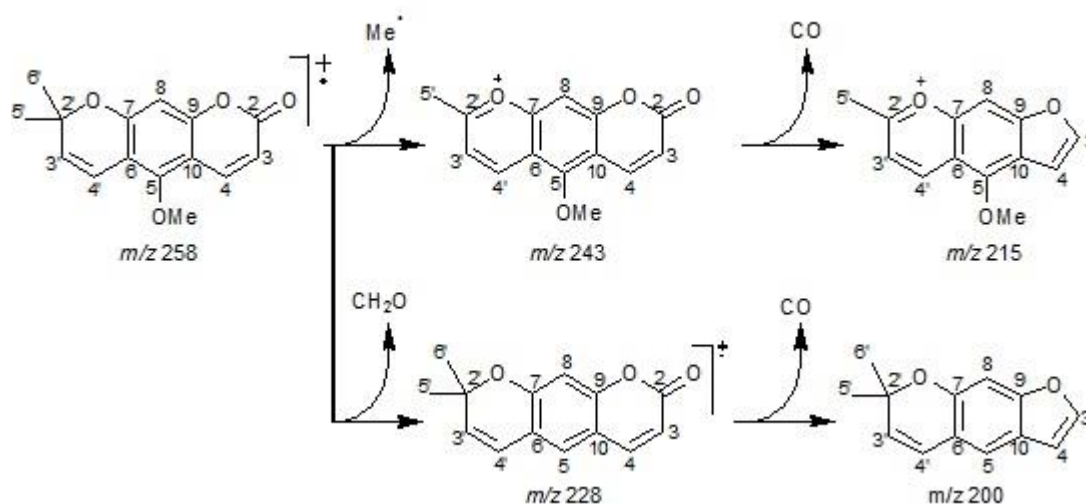


Figura 26: Espectro de Massas 70 eV da cumarina **2** de *C. cyrtanthus*.



Esquema 7: Proposta de fragmentação para a cumarina **xantoxiletina (2)**.

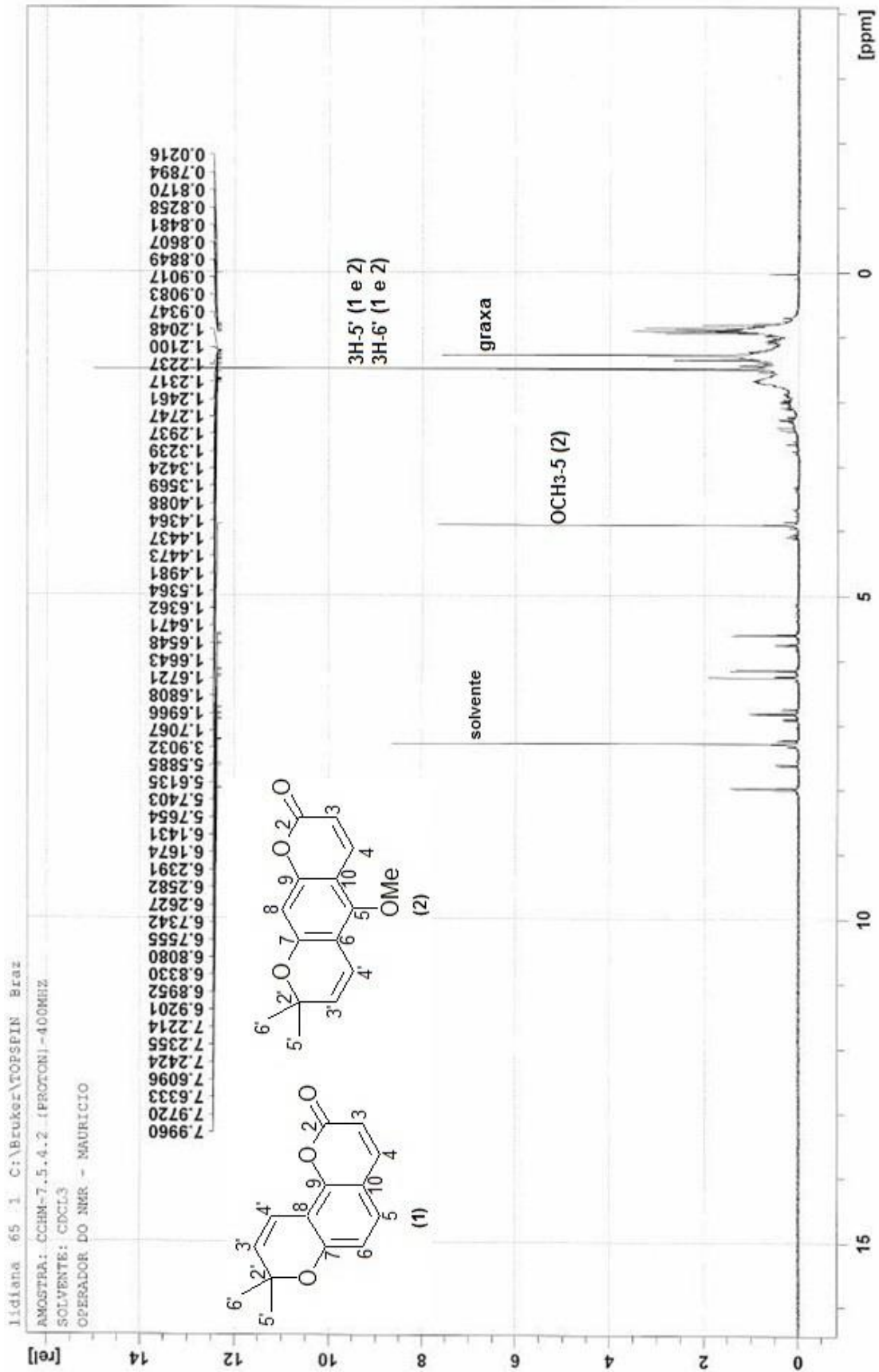


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), da mistura das cumarinas **seselina (1)** e **xantoxilina (2)**.

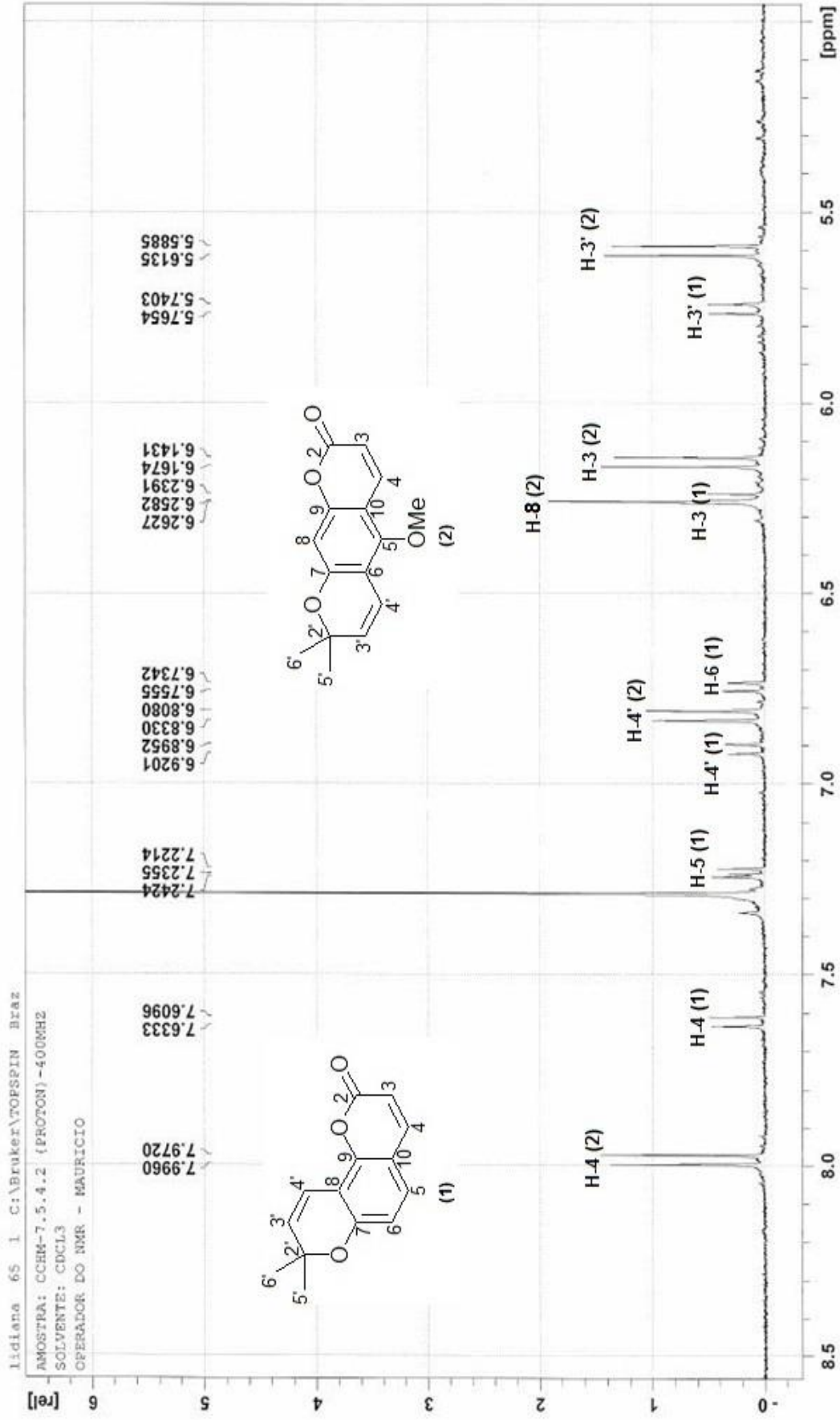


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) com ampliação entre δ_H 8,5 e 4,0 ppm da mistura das cumarinas seselina (1) e xantoxiletina (2).

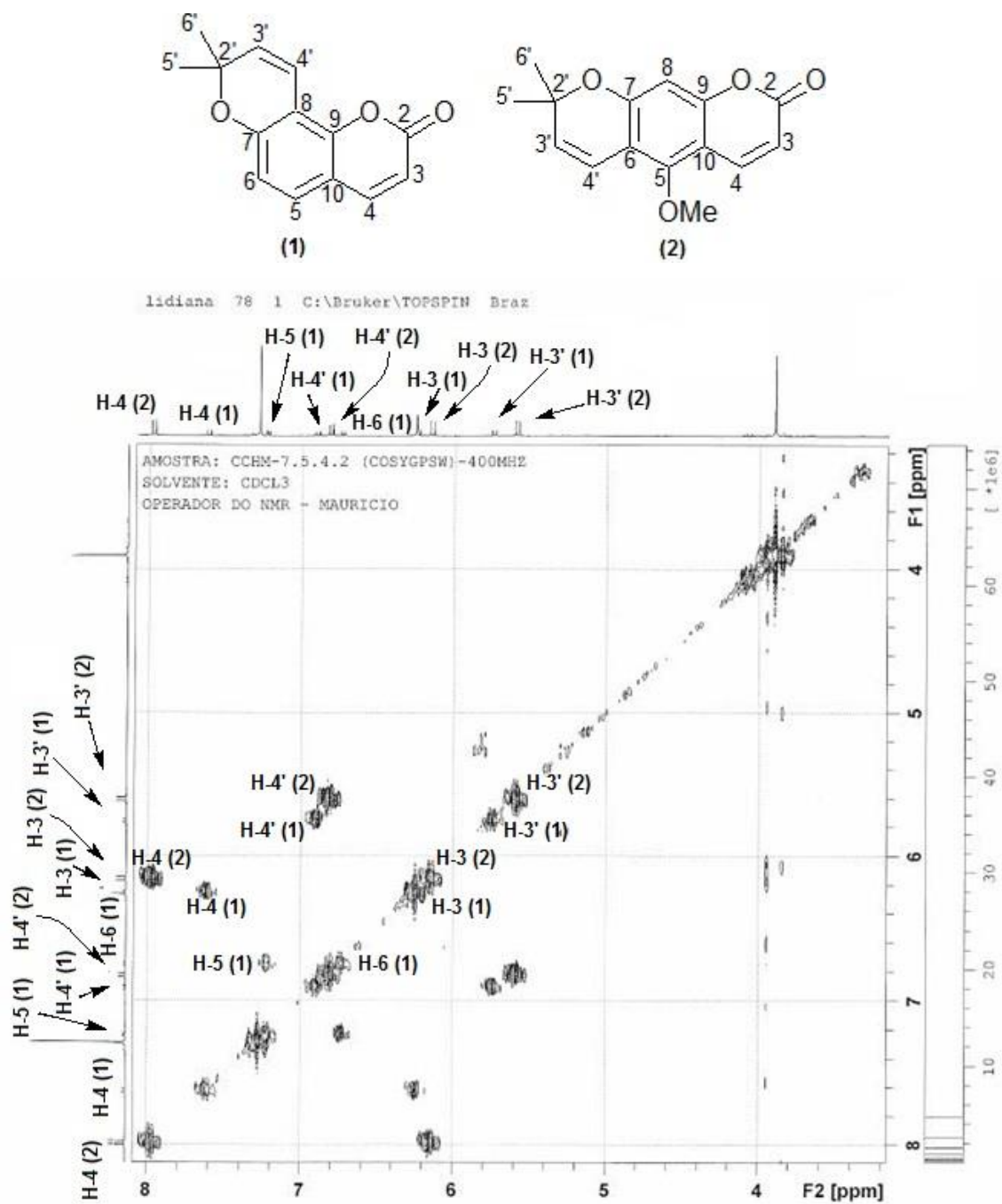


Figura 29: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400MHz, CDCl_3) da mistura das cumarinas **seselina (1)** e **xantoxiletina (2)**.

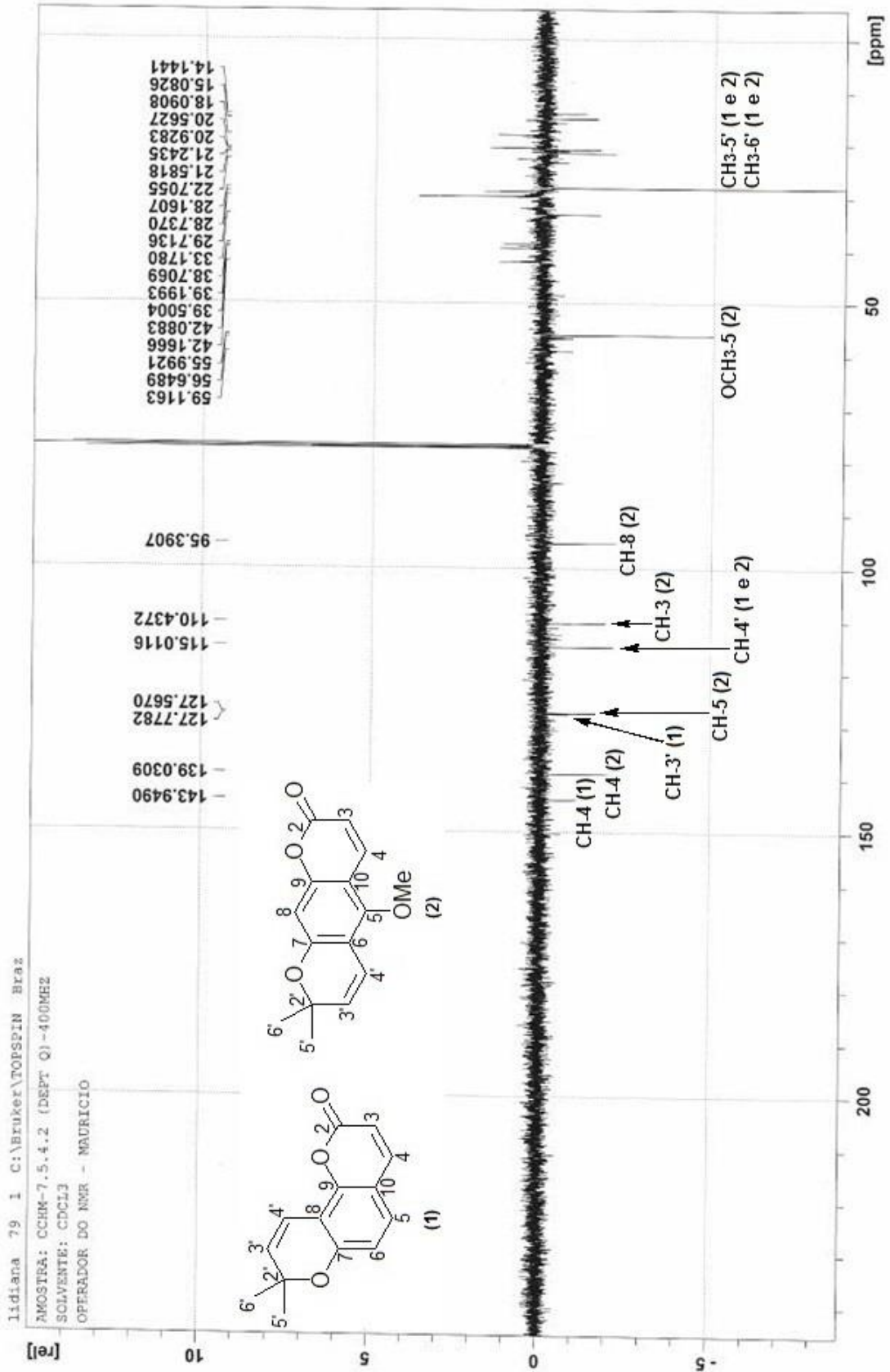
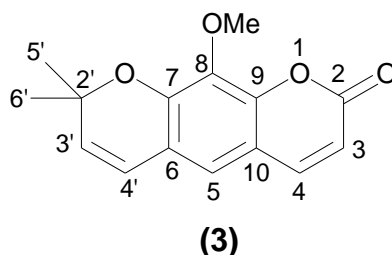


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura das cumarinas seselina (1) e xantiletina (2).

5.2.1.2 Elucidação estrutural da substância 3:



A substância **3** foi obtida após tratamento cromatográfico do extrato metanólico da madeira de *C. cyrtanthus*, o qual foi submetido à CCA e eluído com hexano/acetona em modo gradiente de polaridade até 20% de acetona, e em seguida foram isoladas através de CCDP usando Hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (5/4/1) como sistema de eluentes (**Esquema 5**, página 39).

O espectro de RMN de ¹H da substância **3** (**Figura 33**, páginas 53) exibiu dois sinais em δ_H 6,26 (*d*, 9,6 Hz, H-3) e 7,59 (*d*, 9,6 Hz, H-4) característicos de cumarina. A presença de dois dupletos em δ_H 5,73 (*d*, 9,8 Hz, H-3') e 6,36 (*d*, 9,8 Hz, H-4'), além do simpleto em δ_H 1,54 (*s*, H-5'/6'), indica a presença de um anel pirano na estrutura (Abdelnur, 2006). O experimento ¹H-¹H-COSY (**Figura 34**, página 54) exibiu acoplamento dos sinais sustentando a proposta de uma cumarina.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 33**, página 53) exibiu também um sinal simples em δ_H 4,00 atribuído a um grupo metoxila. A análise do espectro de RMN de ¹³C DEPTQ (**Figura 35**, página 55), e comparação com modelo na literatura possibilitou identificar a posição de ligação do grupo metoxila alocado em C-8. O efeito doador de elétrons por ressonância do grupo metoxila promove proteção nas posições *orto* e *para*, o que justifica os sinais dos átomos de carbono C-7 em δ_C 149,1; C-9 em δ_C 147,9 e CH-5 em δ_{CH} 119,1 estarem em frequências baixas (**Figura 31**).

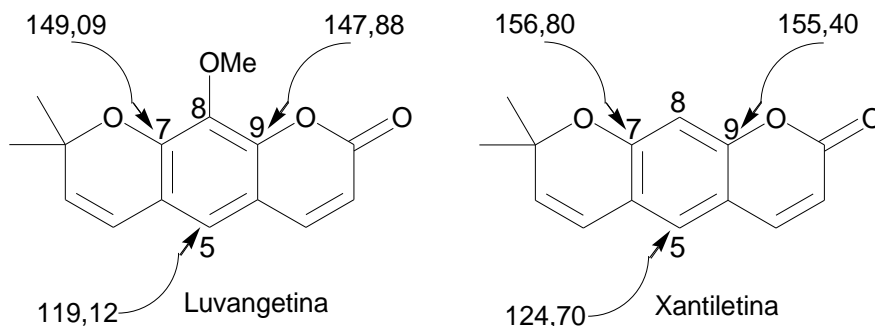


Figura 31: Efeito de proteção do grupo OMe sobre as posições *orto* e *para*.

O sinal em δ_{H} 6,86 (s, H-5) correlacionado com o sinal δ_{HC} 119,1 (CH-5) observado no mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figura 36**, página 56) corrobora o assinalamento do grupo metoxila em C-8. As demais correlações dos carbonos hidrogenados estão apresentadas na **tabela 17**.

Os pontos de ligação na substância foram estabelecidos inequivocamente através do mapa de correlação heteronuclear 2J e 3J ^1H - ^{13}C -HMBC (**Figura 37** e **38**, página 57 e 58), que exibiu correlações entre H-3 em δ_{H} 6,26 e C-2 em δ_{C} 160,0; entre H-4 em δ_{H} 7,59 e C-2 em δ_{C} 160,0 confirmando a presença de carbonila lactônica. O experimento exibiu correlação também entre 3H-5'/6' em δ_{H} 1,54 e CH-3' em δ_{C} 131,3, que corrobora a presença do anel pirano. As demais correlações estão apresentadas na **tabela 17**.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **3**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para a cumarina **luvangetina**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

C/H	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$
2	160,0	-	H-3	H-4
3	113,3	6,26 (d, 9,5)	H-4	
4	143,6	7,59 (d, 9,5)		H-5
2'	77,8	-		3H-5', 3H-6'
3'	131,3	5,73 (d, 9,8)		3H-5', 3H-6'
4'	121,1	6,36 (d, 9,9)		H-5
5	119,1	6,86 (s)		H-4, H-4'
6	114,4	-		
7	149,1	-		H-5, H-4'
8	135,8	-	MeO-8	
9	147,9	-		H-4, H-5
10	113,0	-	H-4	H-3
5'	28,2	1,54 (s)		H-3'
6'	28,2	1,54 (s)		H-3'
MeO-8	61,5	4,00 (s)		

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 32**, página 52) exibiu como pico do íon molecular M^+ 258 Danton, consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ com nove graus de insuficiência de hidrogênio. As propostas de fragmentação (**Esquema 8**, página 52) sustentam a proposta de cumarina visto que, nesta classe de metabólito secundário os fragmentos mais comuns são

devidos às perdas de grupos metila (-CH_3) e de (C=O) (Budzikiewicz e colaboradores, 1964).

A análise do conjunto de dados e comparação com modelos na literatura conduziram a elucidação estrutural da substância **3** para a cumarina conhecida como **luvangetina**.

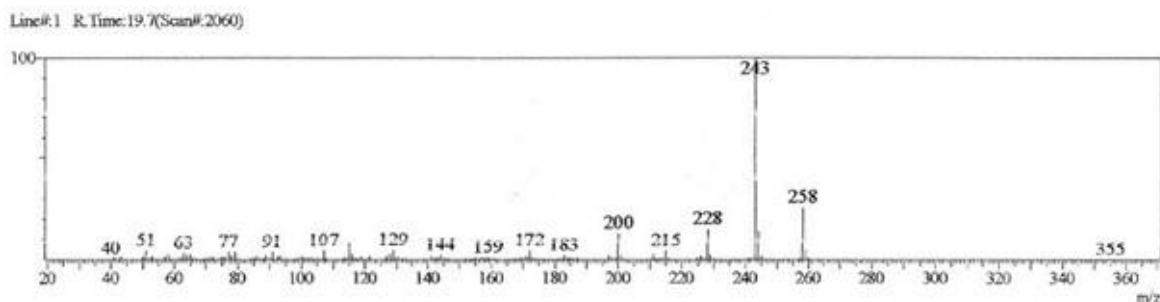
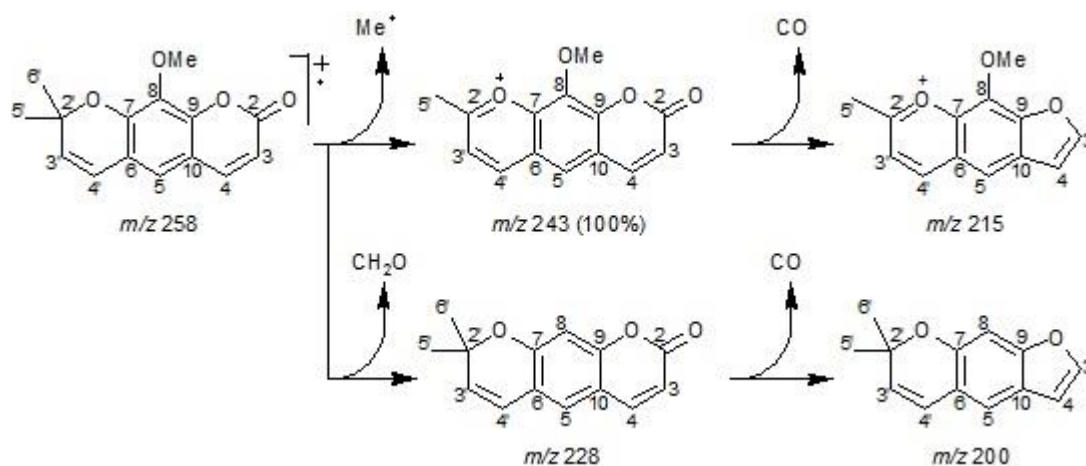


Figura 32: Espectro de massas 70 eV da cumarina **luvangetina (3)**.



Esquema 8: Proposta de fragmentação para a cumarina **luvangetina (3)**.

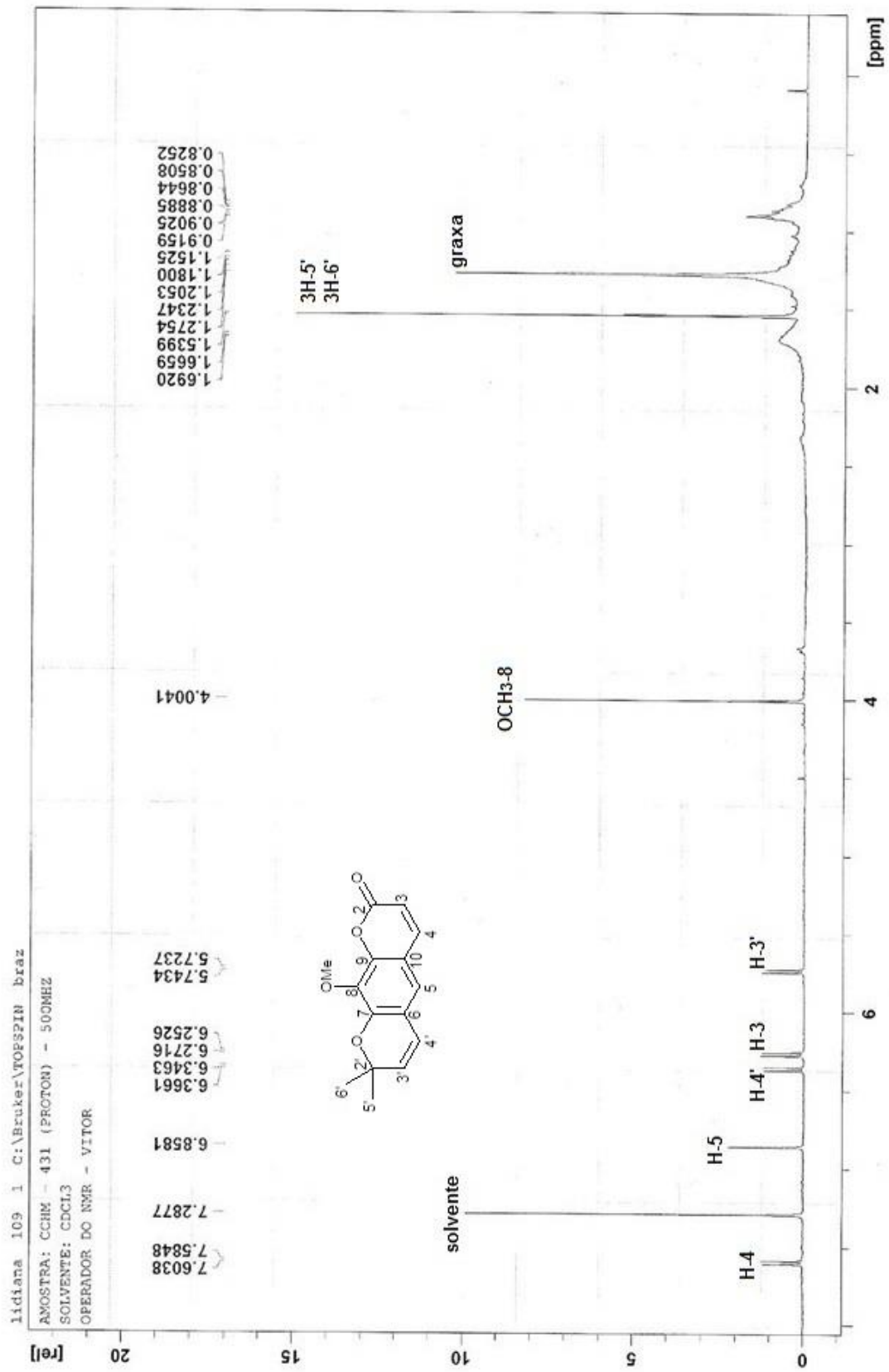


Figura 33: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância luvangetina (3).

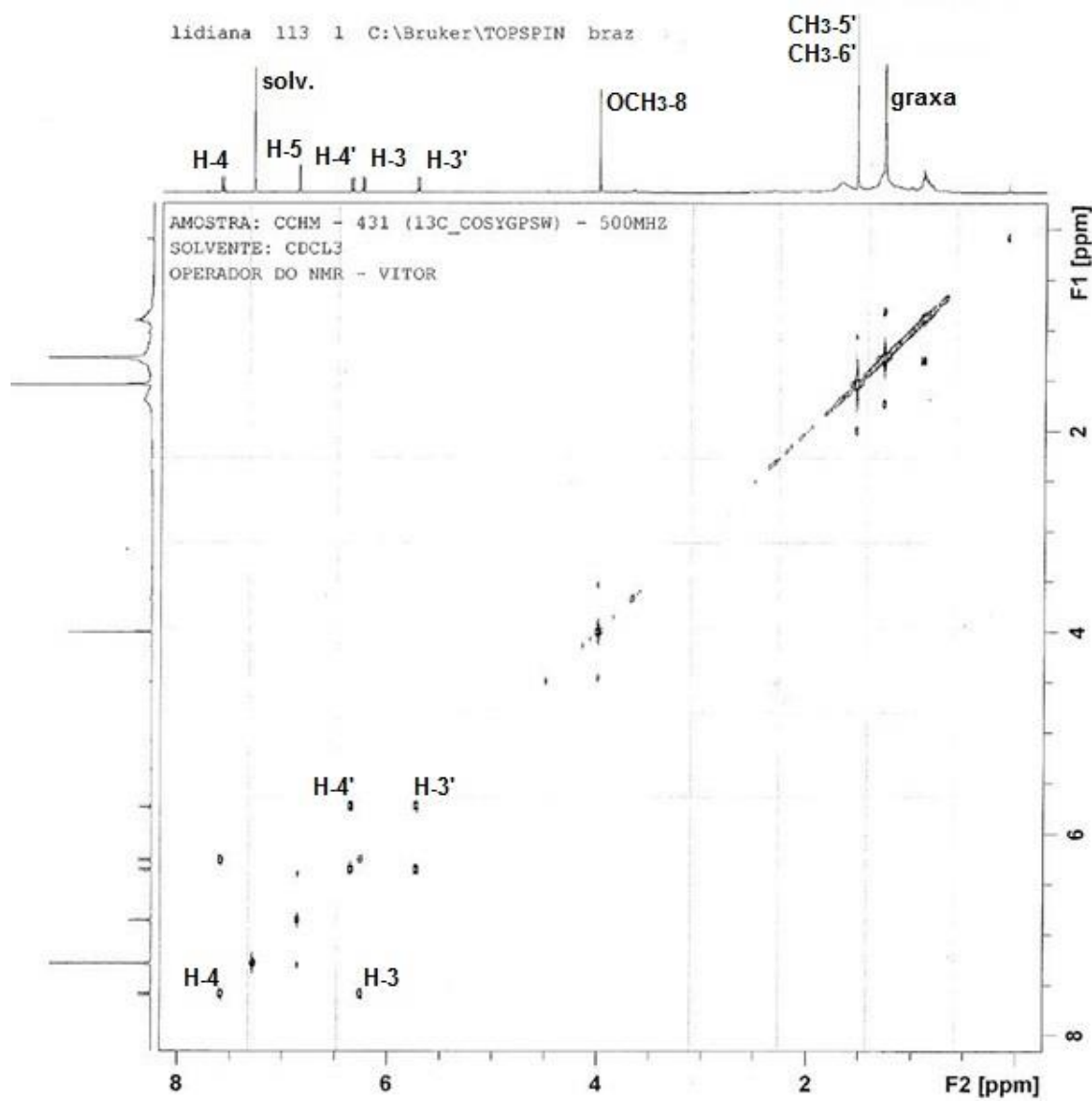
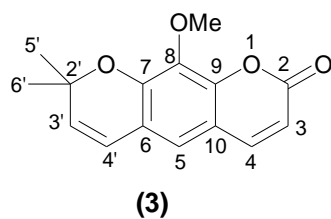


Figura 34: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância luvangetina (3).

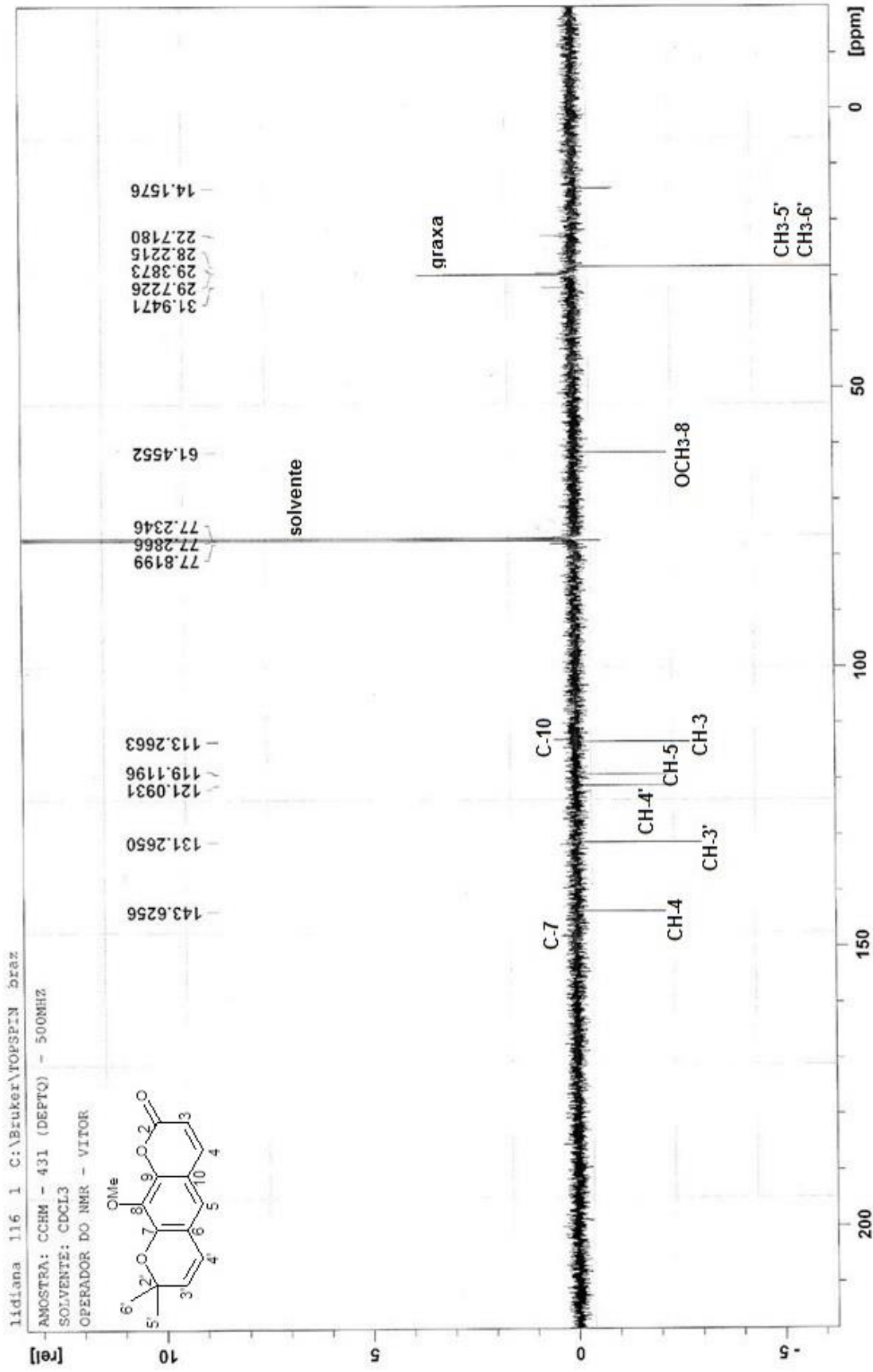
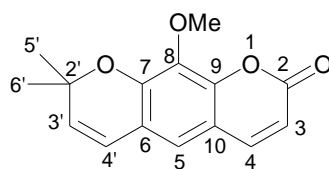


Figura 35: Espectro de RMN de ¹³C-DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) da substância luvangetina (3).



(3)

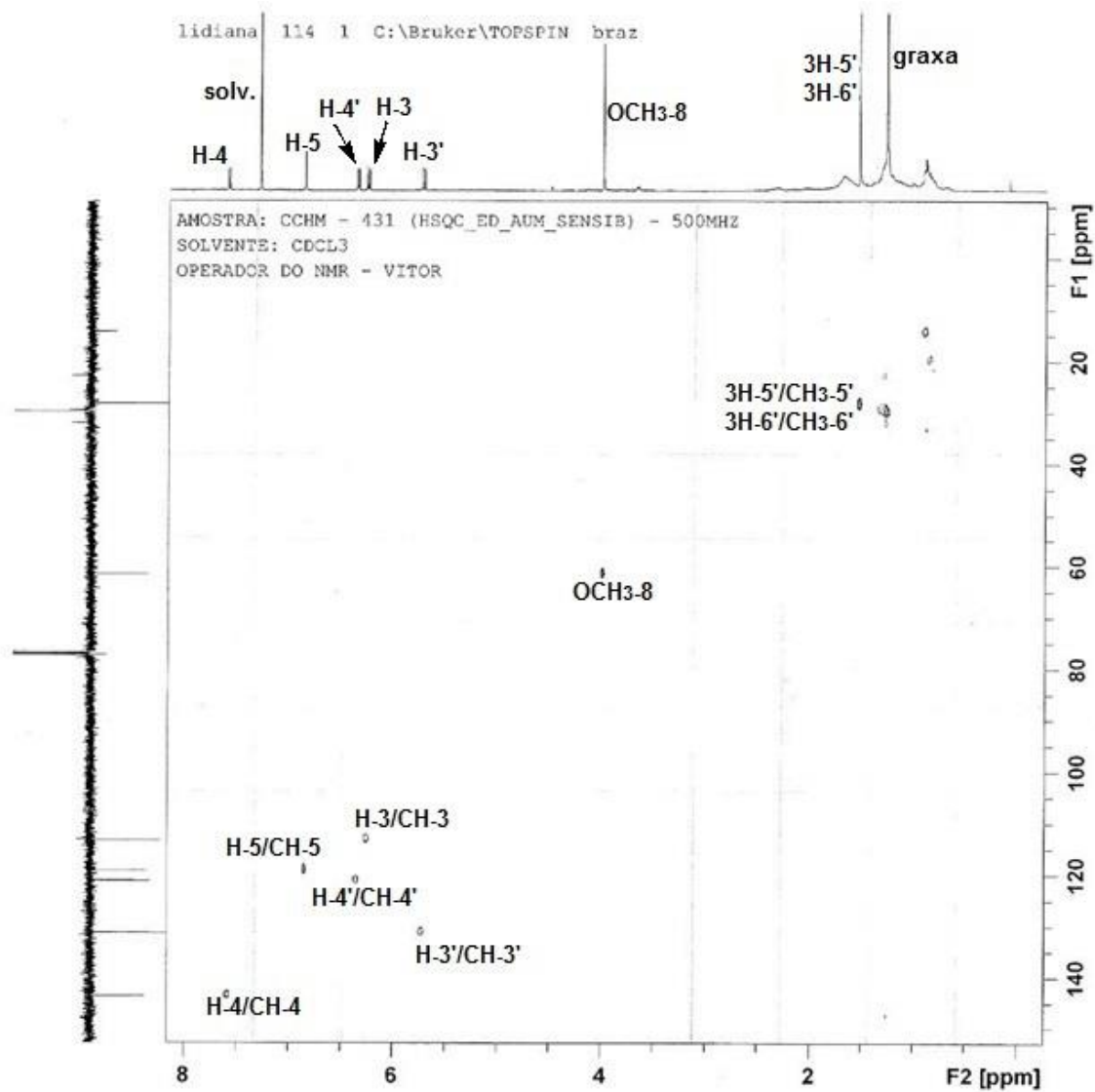


Figura 36: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) da substância **luvangetina (3)**.

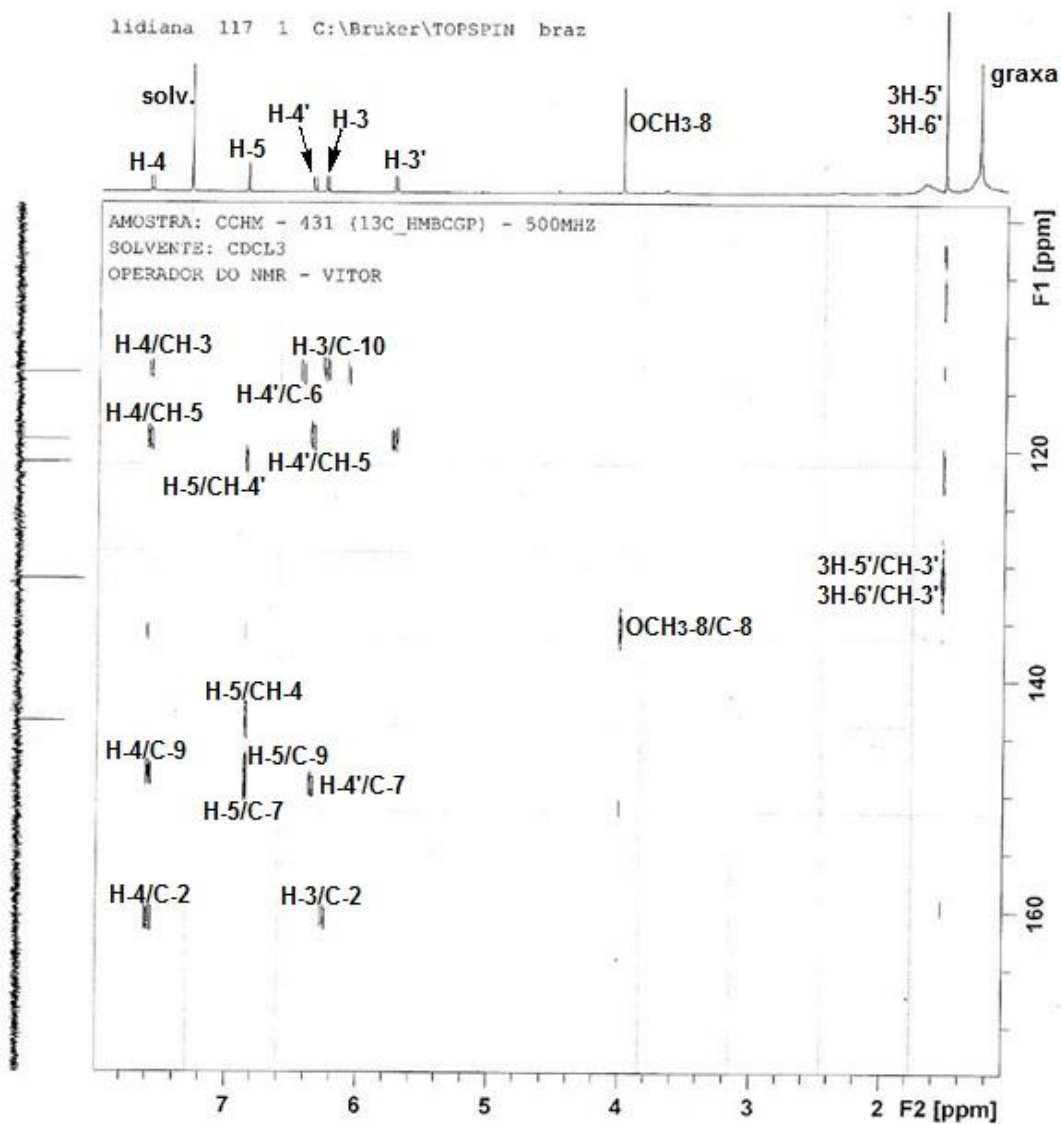
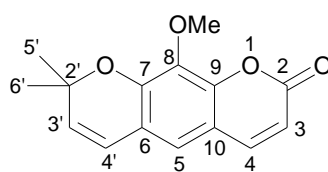
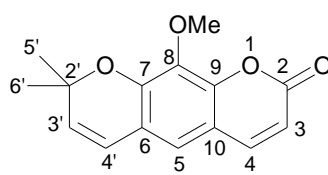


Figura 37: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3) com ampliação da substância **luvangetina (3)**.



(3)

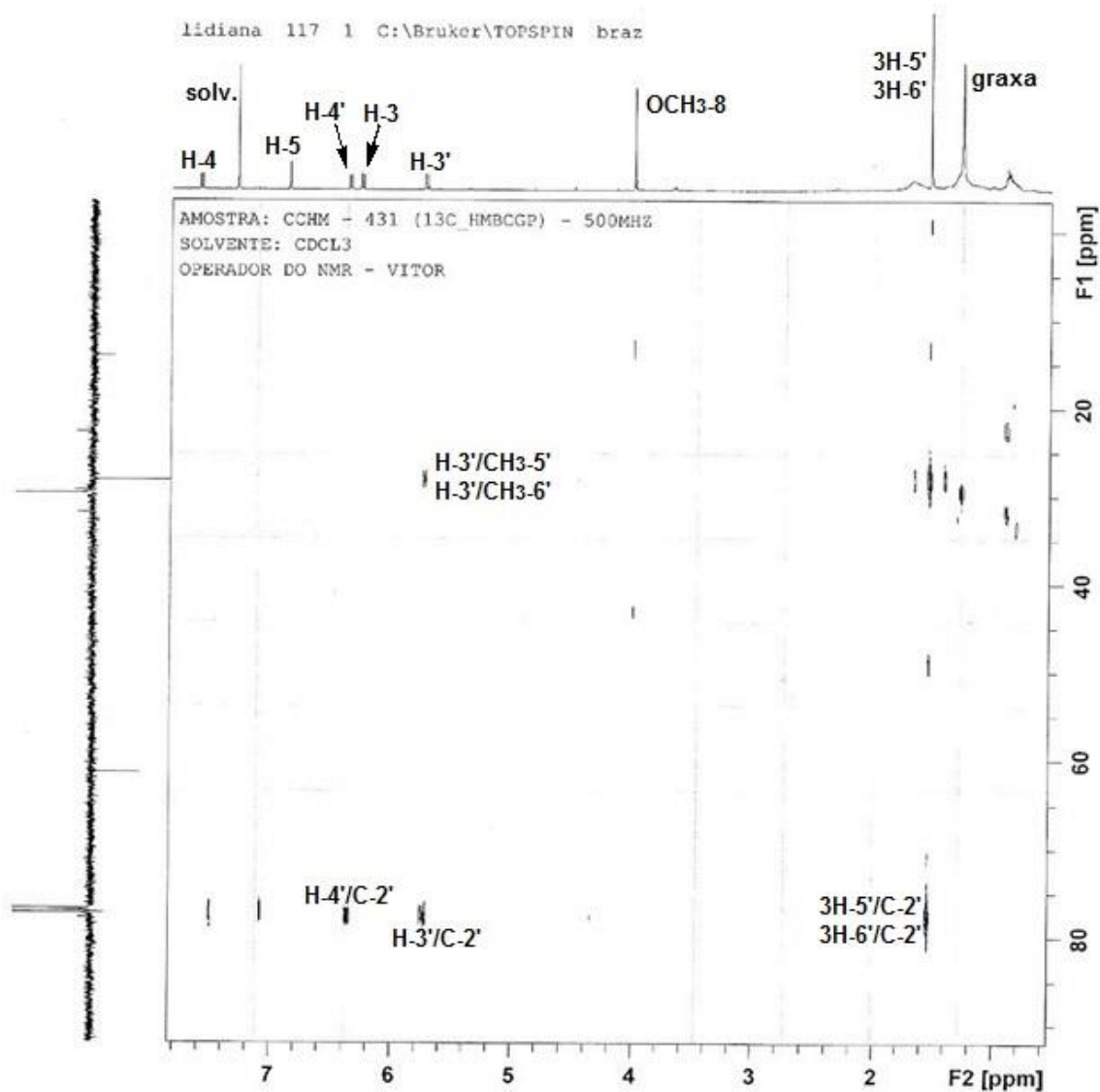
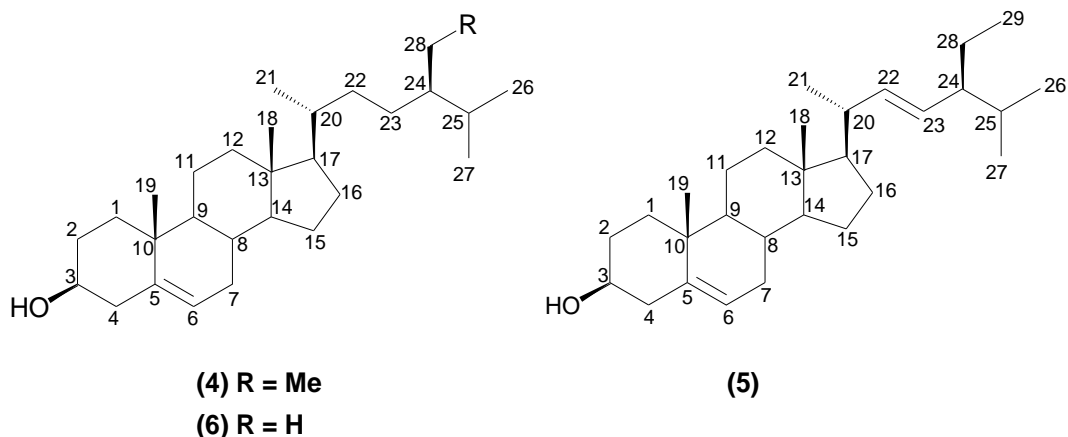


Figura 38: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, da substância **luvangetina (3)**.

5.2.2 Esteroides

5.2.2.1 Elucidação estrutural da mistura das substâncias 4, 5 e 6:

A mistura das substâncias **4**, **5** e **7** (50,0 mg) foi obtida de ambos os extratos (hexano e metanol), por separação de cristais (incolores de formato pontiagudo) formados, com lavagem de fração com o metanol, tendo em vista que estes são insolúveis neste solvente (**Esquemas 4 e 5**, páginas 32 e 39).



Os esteroides são triterpenoides modificados que perderam três grupos metilas, duas ligadas ao átomo de carbono C-4 e uma ao átomo de carbono C-14, e são frequentemente encontrados no reino vegetal.

O **β -sitosterol (4)**, exemplo mais comum de substância desta classe, geralmente é identificado em mistura com outros esteroides por apresentarem estruturas muito semelhantes, dificultando assim sua separação, por isso na maioria das vezes, a identificação desta classe de esteroides tem sido realizada principalmente através de CG/EM e dados de RMN de ^{13}C .

A proposta estrutural para o esteroide **4** foi baseada em técnicas de RMN unidimensional ^1H e ^{13}C , estabelecendo uma completa atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C da substância e comparando-as com dados descritos por Moreira em 2009 e Gonçalves em 2011.

Os dados de RMN de ^{13}C -DEPTQ para a mistura dos esteroides (**Figura 46, 47 e 48**, página 68, 69 e 70) indicaram a presença dos esteroides **β -sitosterol (4)** e **estigmasterol (5)**, no entanto a análise da mesma fração por espectroscopia de massas indicou a presença, em menor proporção, do esteroide **campesterol (6)** (**Figura 39**, página 60).

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 43 e 44**, página 65 e 66) apresenta um duplete largo em δ_{H} 5,37 (H-6) com uma constante de acoplamento de $J = 2,1$ Hz,

que confirma a insaturação de ambas as estruturas, além de um multipletto em δ_H 3,55 (H-3), sugerindo a presença de um grupo hidroxila nesta posição, ambos os sinais confirmados pelo mapa de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (**Figura 45**, página 67).

Através da análise do espectro de RMN de 1H (**Figura 44**, página 66) da mistura, pode-se confirmar a presença do **estigmasterol (5)** notado pelas absorções dos hidrogênios vinílicos referentes à cadeia lateral em δ_H 5,04 (dd, $J = 8,7$ e $15,1$ Hz, H-22) e 5,18 (dd, $J = 8,7$ e $15,2$ Hz, H-23).

O sinal no espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 46**, páginas 68) na região de carbonos carbinólicos em δ_C 71,8 (CH-3), sugere uma estrutura monohidroxilada.

Ainda no espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 46**, páginas 68) pode-se observar os sinais em δ_C 121,8 e 140,7 (C-6 e C-5), sugerindo a ocorrência de uma insaturação entre esses dois átomos de carbono em ambas estruturas.

A distinção entre os esteroides **β -sitosterol (4)** e o **estigmasterol (5)**, pode ser confirmada pelos sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ_C 129,7 e 138,3 (C-23 e C-22), presente apenas no **estigmasterol (6)** (**Figuras 42**, página 68 e **Tabela 19**, página 64).

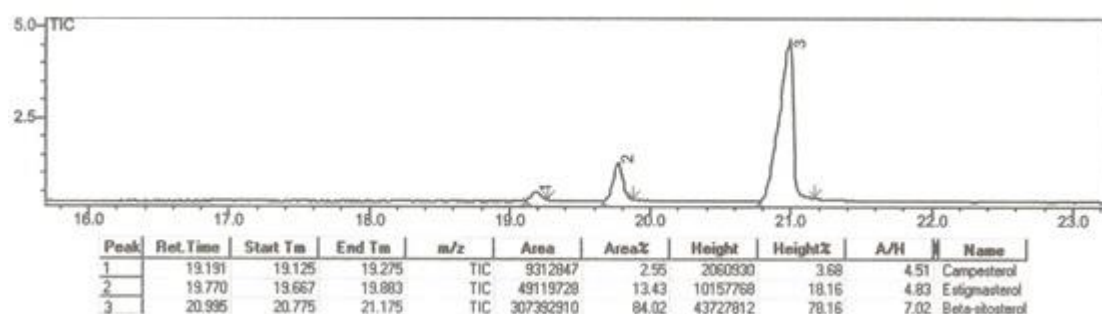


Figura 39: Cromatograma da mistura dos esteroides **4**, **5** e **6**.

Como os três esteroides apresentam fatores de sensibilidade ao detector semelhantes, foi determinada a porcentagem média dos três esteroides, resultando em 84,02 % de **β -sitosterol**, 13,43% de **estigmasterol** e 2,55 % de **campesterol**.

O pico cromatográfico com o tempo de retenção de 21 min. apresentou um espectro de massas (**Figura 40**) com sinal em $m/z = 414$ Daltons que coincide com o valor referente ao íon molecular do **β -sitosterol (4)**. A proposta de

fragmentação do esteroide **4** consiste basicamente na perda da cadeia lateral ($m/z = 273$), seguida da perda de 18 unidades de massa ($m/z = 255$) referentes à perda de uma molécula de H_2O . Outras perdas, também comuns de ocorrerem, puderam ser observadas, tais como, perda de 15 unidades de massa ($m/z = 399$), referentes à perda de um grupo metila (CH_3), e perda de 18 unidades de massa ($m/z = 381$), referente à perda de uma molécula de H_2O (**Esquema 9**).

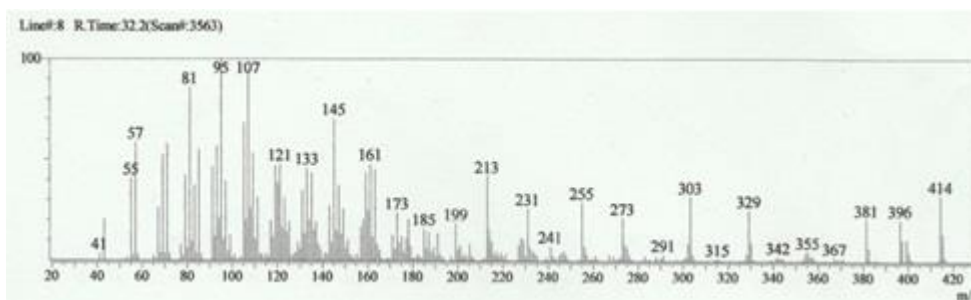
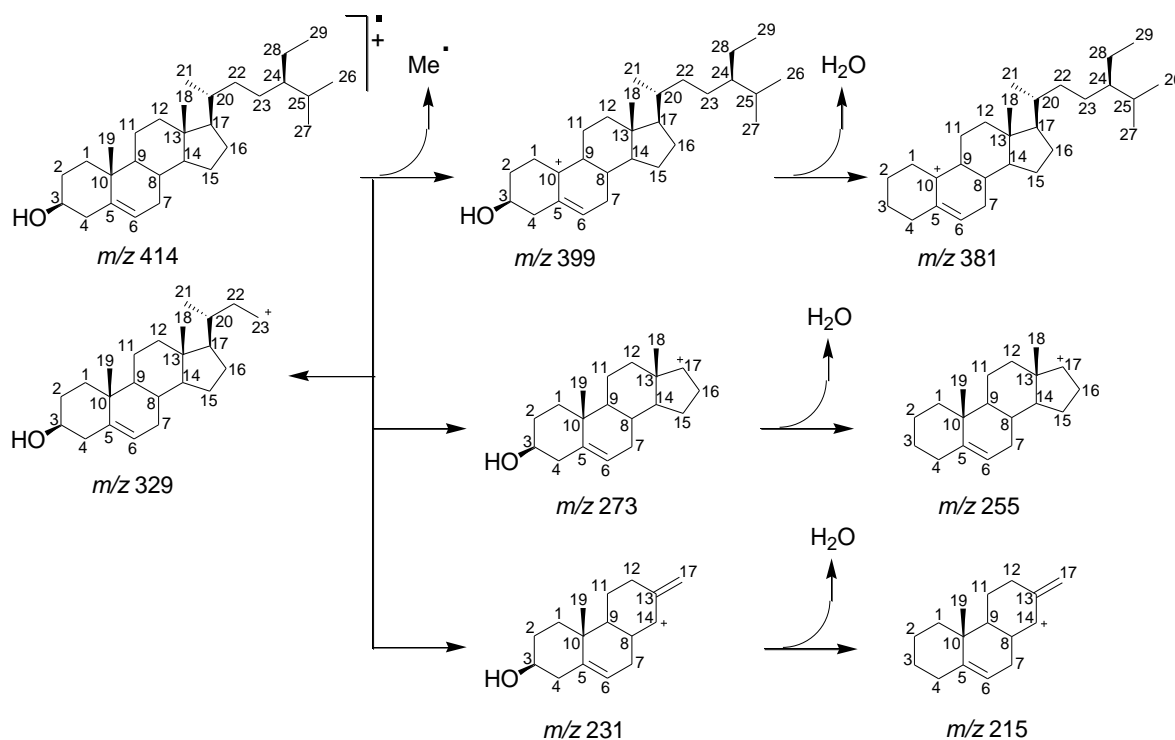


Figura 41: Espectro de Massas 70 eV do esteroide β -sitosterol (**4**).



Esquema 9: Proposta de fragmentação para o esteroide β -sitosterol (**4**).

O pico cromatográfico com o tempo de retenção de 19,8 min. apresentou um espectro de massas (**Figura 41**, página 62) com sinal em $m/z = 412$ Daltons que coincide com o valor referente ao íon molecular do **estigmasterol (5)**. A proposta de fragmentação do esteroide **5** consiste basicamente na perda da cadeia lateral ($m/z = 273$), seguida da perda de 18 unidades de massa ($m/z =$

255) referentes à perda de uma molécula de H₂O. A perda de 18 unidades de massa ($m/z = 381$) da cadeia principal, referentes à perda de outra molécula de H₂O, também foi observada. A proposta de fragmentação para o composto é apresentada no **Esquema 10**.

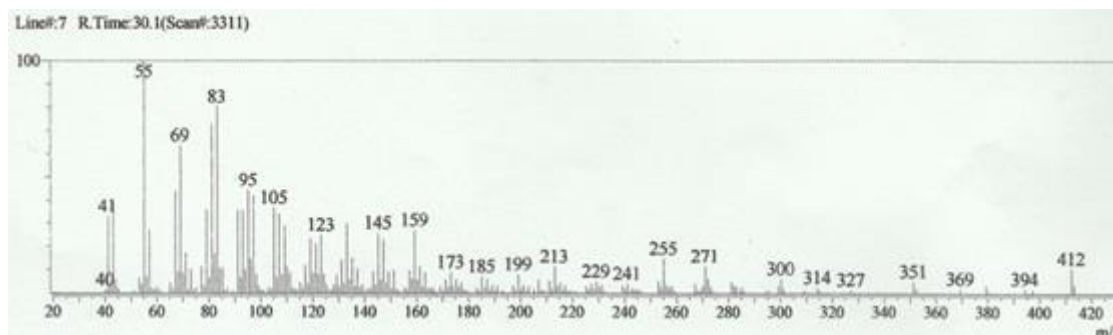
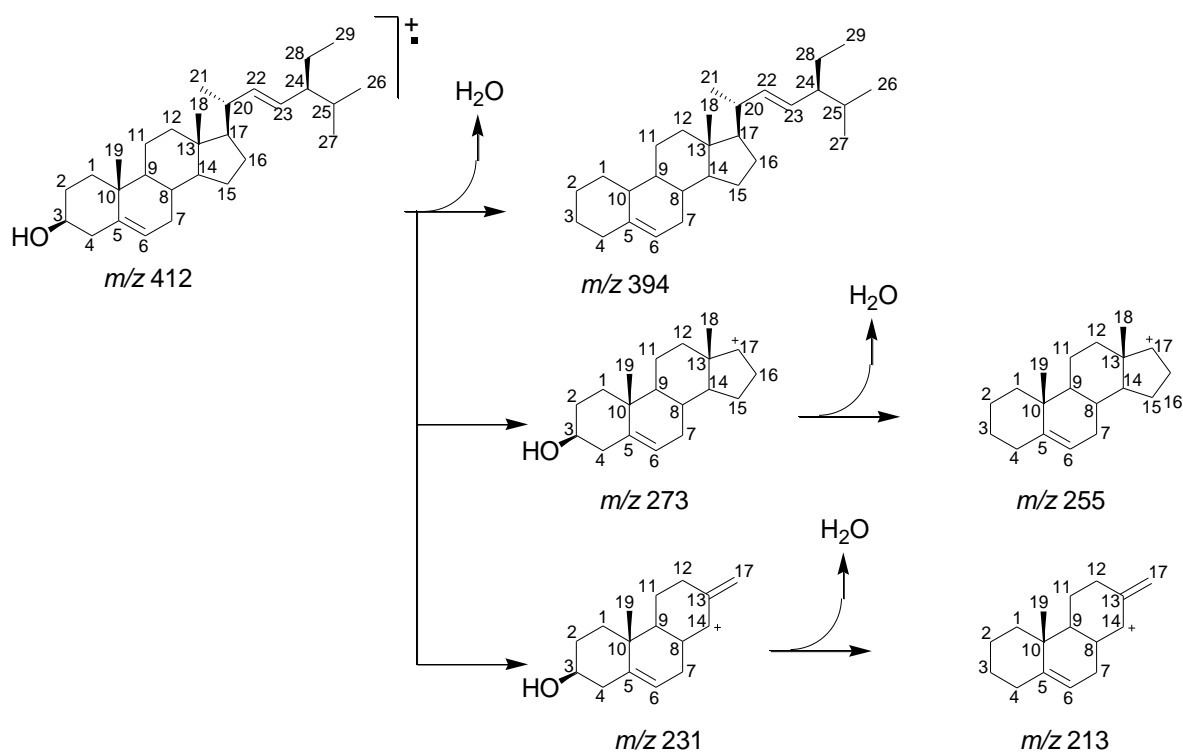


Figura 41: Espectro de Massas 70 eV do esteróide **estigmasterol (5)**.



Esquema 10: Proposta de fragmentação para o esteróide **estigmasterol (5)**.

O pico cromatográfico com o tempo de retenção de 19,2 min. apresentou um espectro de massas (**Figura 42**) com sinal em $m/z = 400$ Daltons que coincide com o valor referente ao íon molecular do **campesterol (6)**. A proposta de fragmentação do esteróide **6** é bastante similar à fragmentação dos esteróides β -**sitosterol** e **estigmasterol**, possuindo os mesmos íons $m/z = 273$ e 255,

provenientes da perda da cadeia lateral seguida da perda de uma molécula de água (**Esquema 11**).

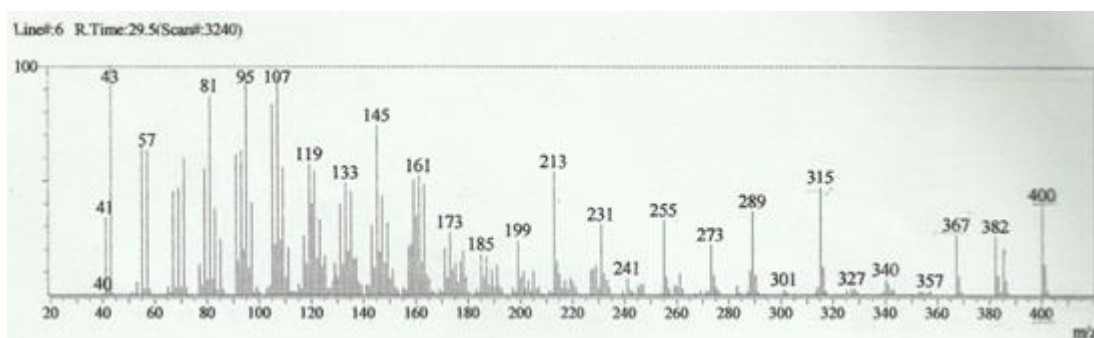
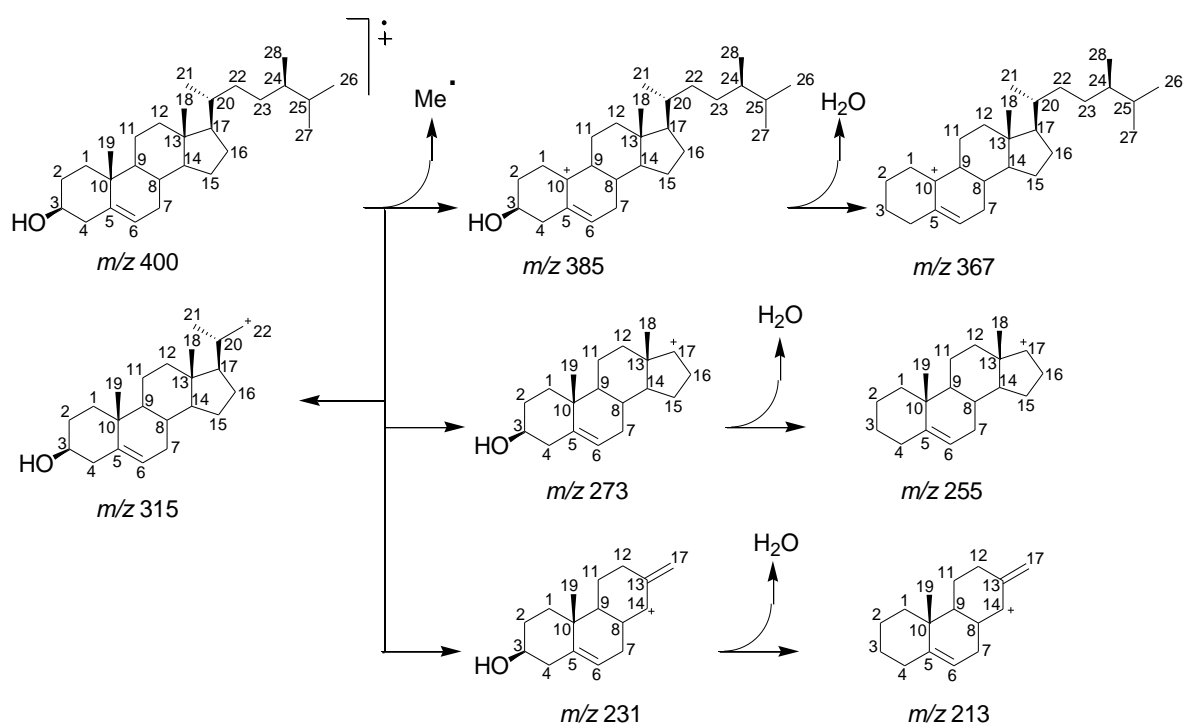


Figura 42: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **campesterol (6)**.



Esquema 11: Proposta de fragmentação para o esteroide **campesterol (6)**.

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) das substâncias **4** e **5**, em CDCl_3 , valores dos deslocamentos químicos (δ) obtidos e valores dos

deslocamentos químicos (δ_c) da literatura para os esteroides β -sitosterol e estigmasterol em ppm.

	4	β -sitosterol	5	Estigmasterol
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	37,2	37,3	37,3	37,3
2	31,9	31,9	31,9	31,9
3	71,8	71,8	71,8	71,8
4	42,3	42,2	42,3	42,2
5	140,7	140,7	140,7	140,7
6	121,8	121,7	121,8	121,7
7	33,9	33,9	33,9	33,9
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,1	50,1	50,1
10	36,2	36,1	36,2	36,1
11	21,1	21,1	21,1	21,1
12	39,8	39,8	39,8	39,8
13	42,3	42,3	42,3	42,3
14	56,8	56,8	56,8	56,8
15	24,4	24,3	24,4	24,3
16	28,9	28,9	28,9	28,9
17	56,0	56,0	56,0	56,0
18	12,3	12,3	12,3	12,3
19	19,4	19,4	19,4	19,4
20	40,5	39,8	40,5	39,8
21	18,8	18,8	21,1	20,5
22	31,7	32,0	138,3	138,3
23	26,1	26,0	129,3	129,3
24	45,8	45,8	51,2	51,2
25	29,1	29,0	29,1	31,9
26	19,9	19,8	21,2	21,2
27	18,9	19,8	18,9	19,8
28	23,1	23,0	25,4	25,4
29	11,9	11,8	11,9	11,9

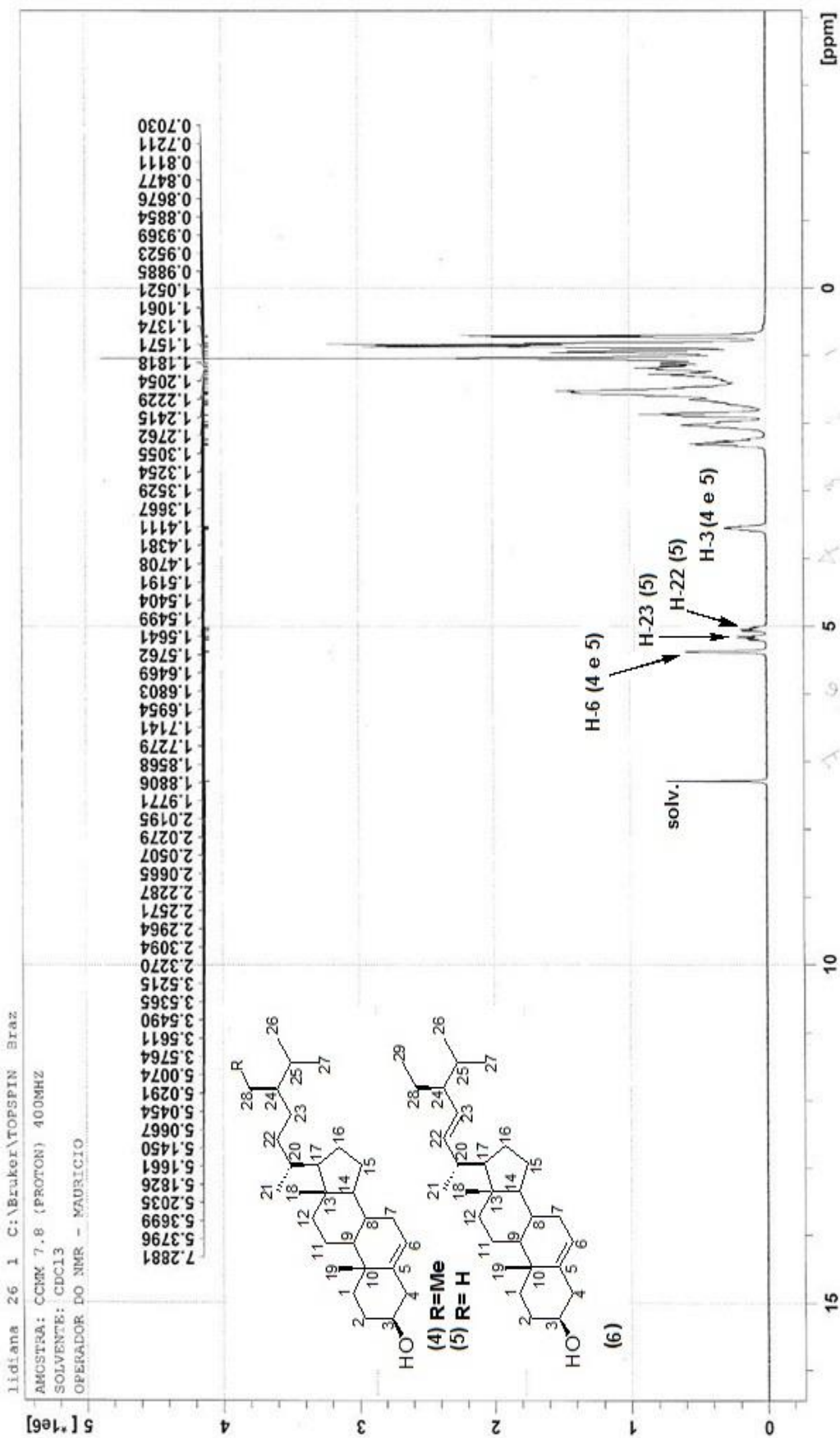


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

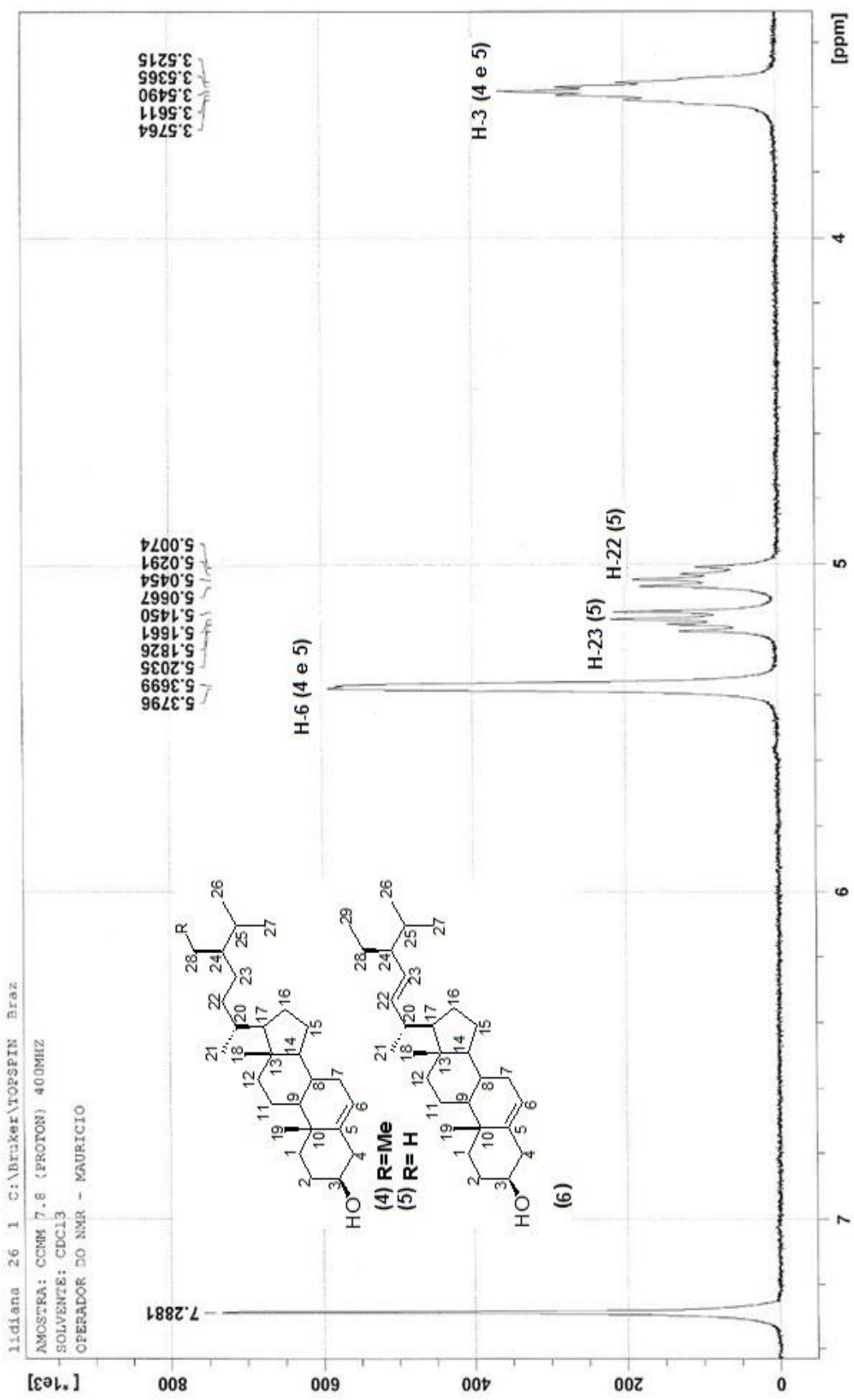


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 7.4 e 3.4 ppm, da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

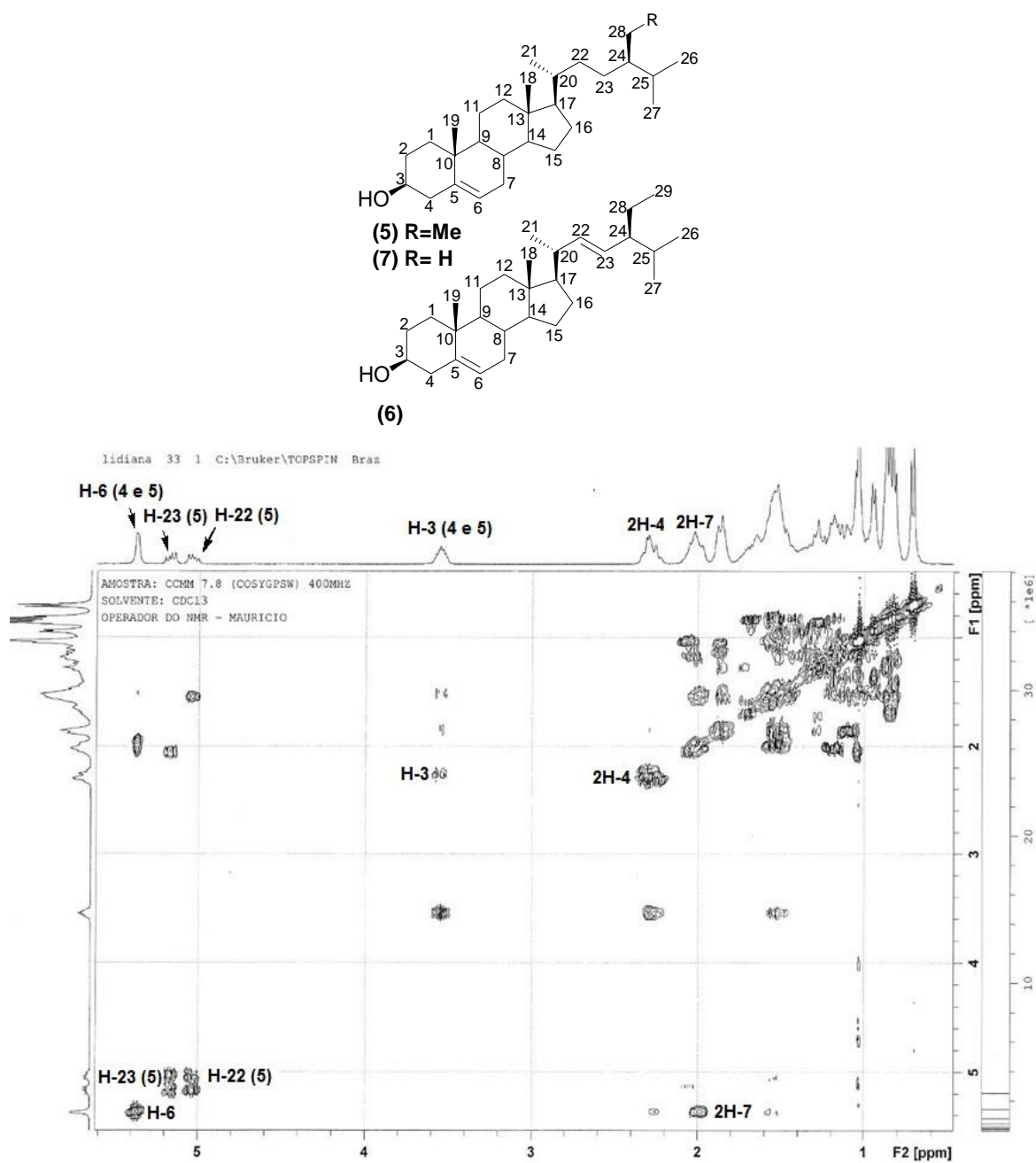


Figura 45: Mapa de correlação homonuclear 1H - 1H -COSY (400 MHz, $CDCl_3$) da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

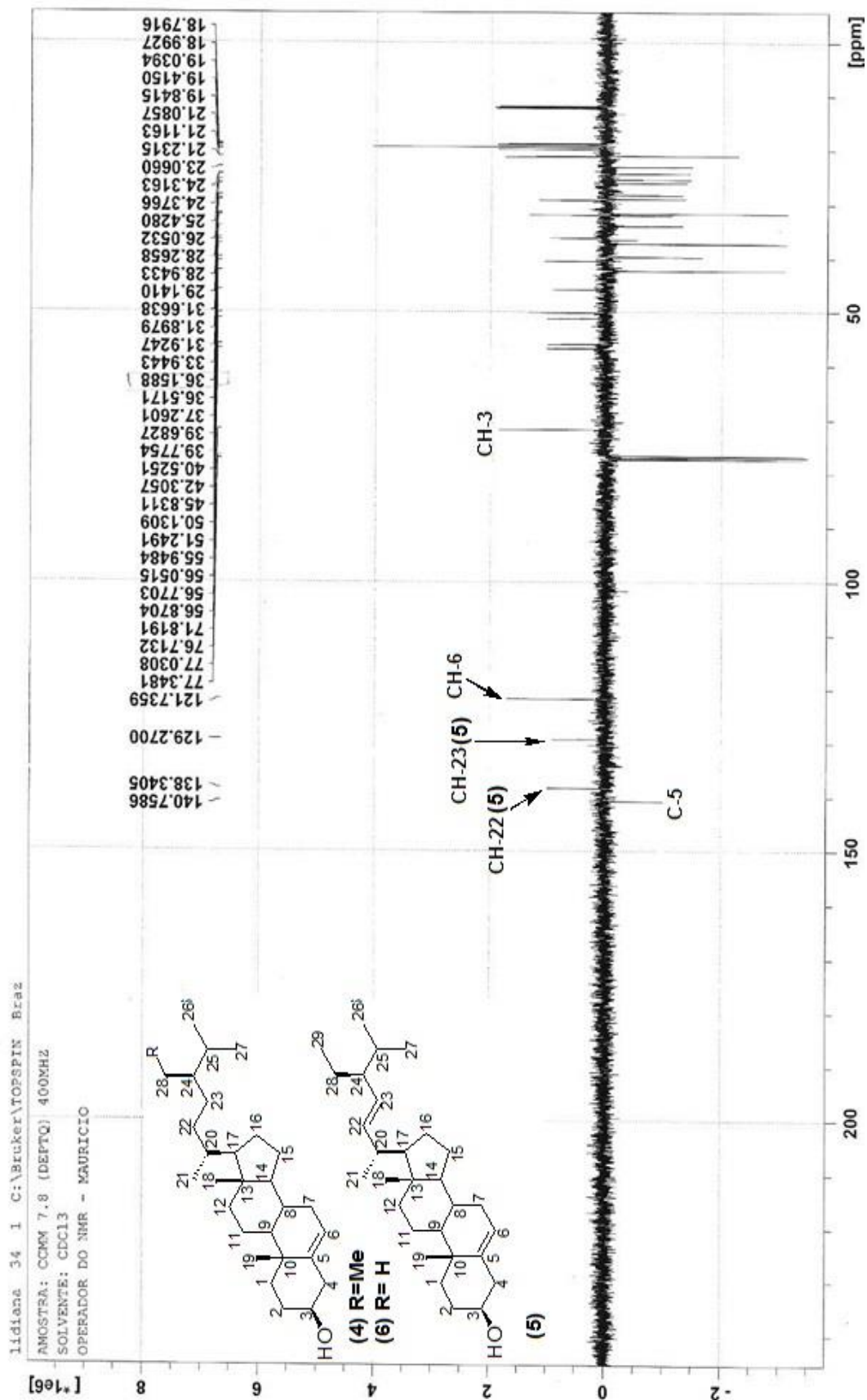


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

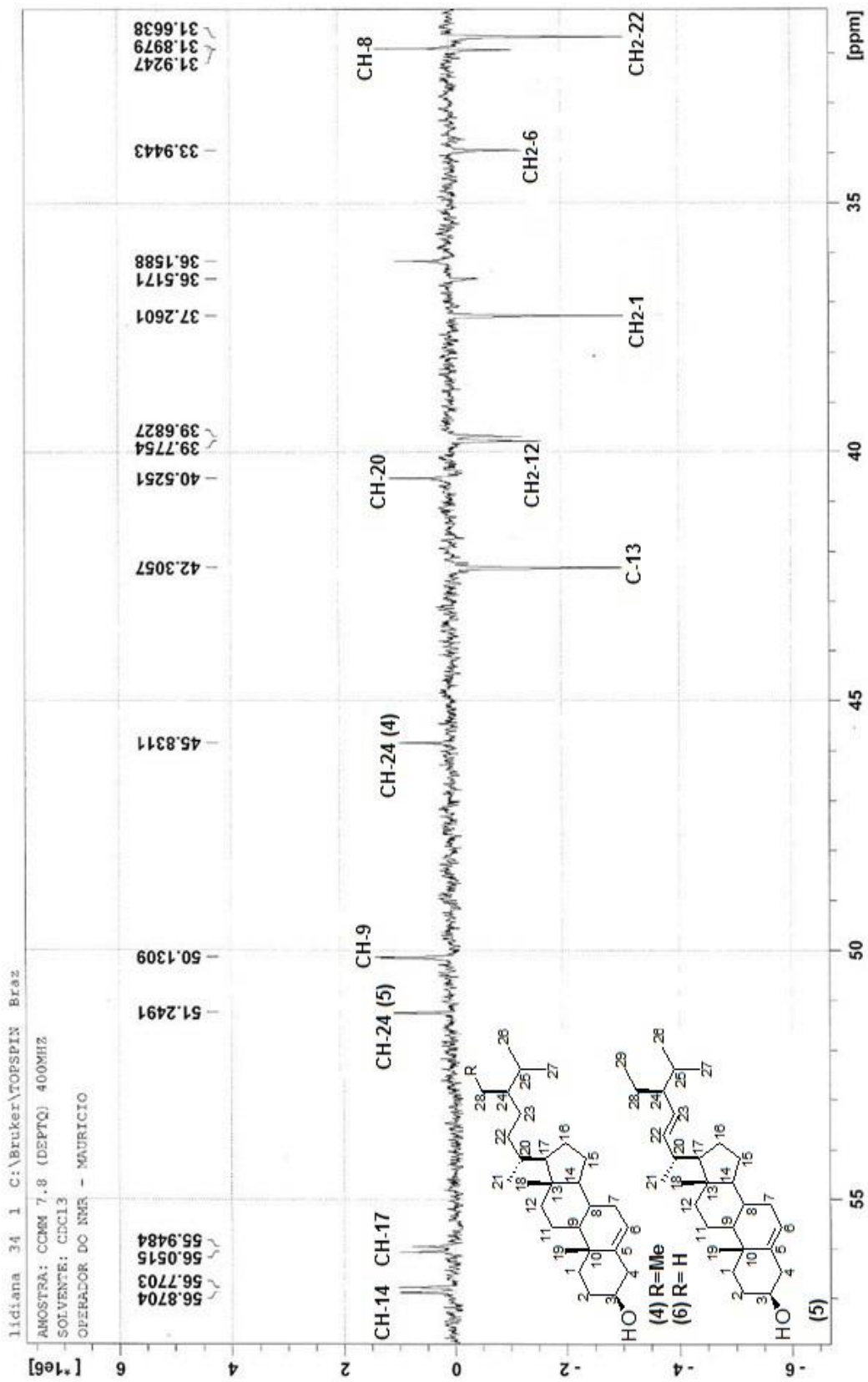


Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 58,0 e 31,0 ppm, da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

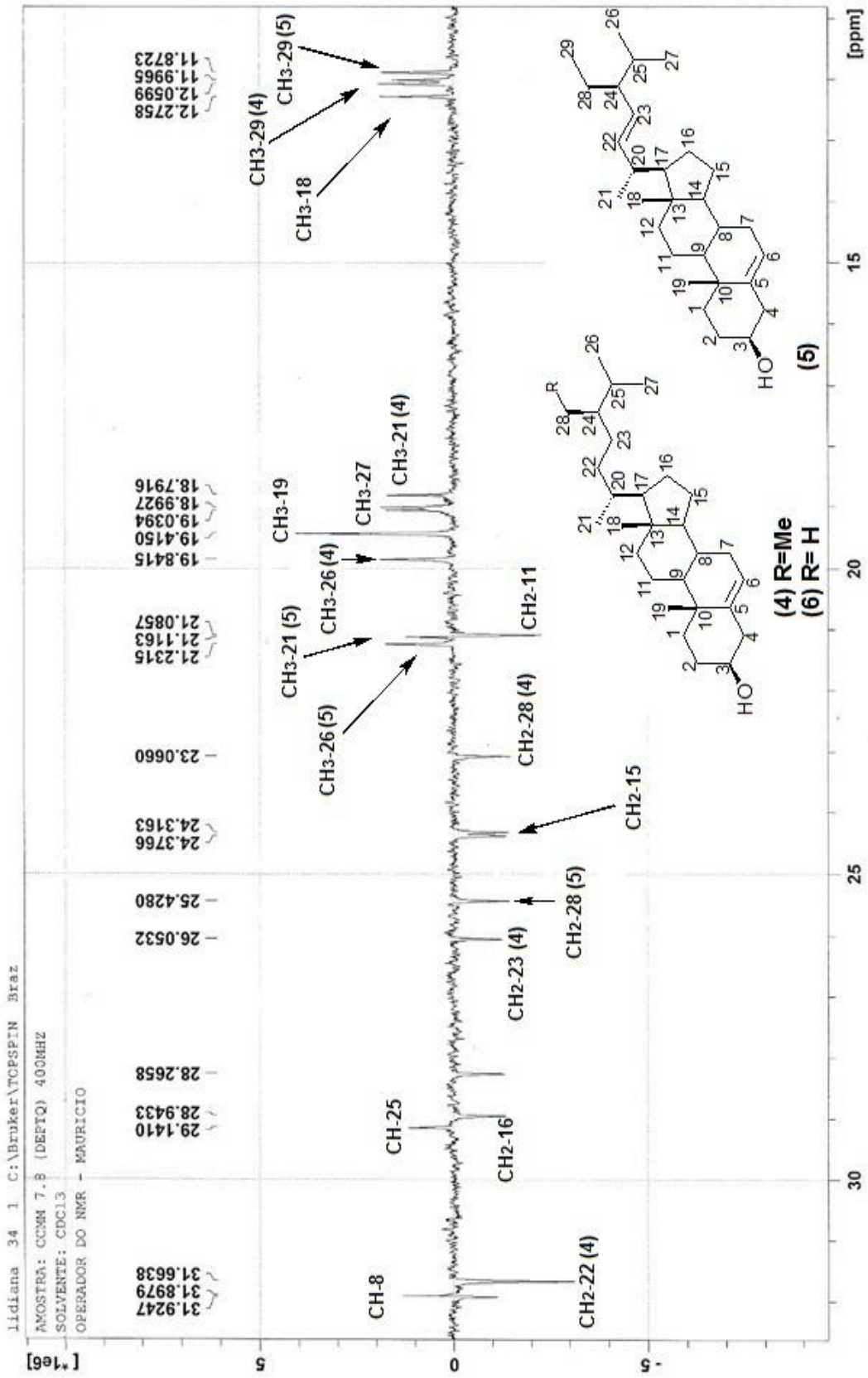
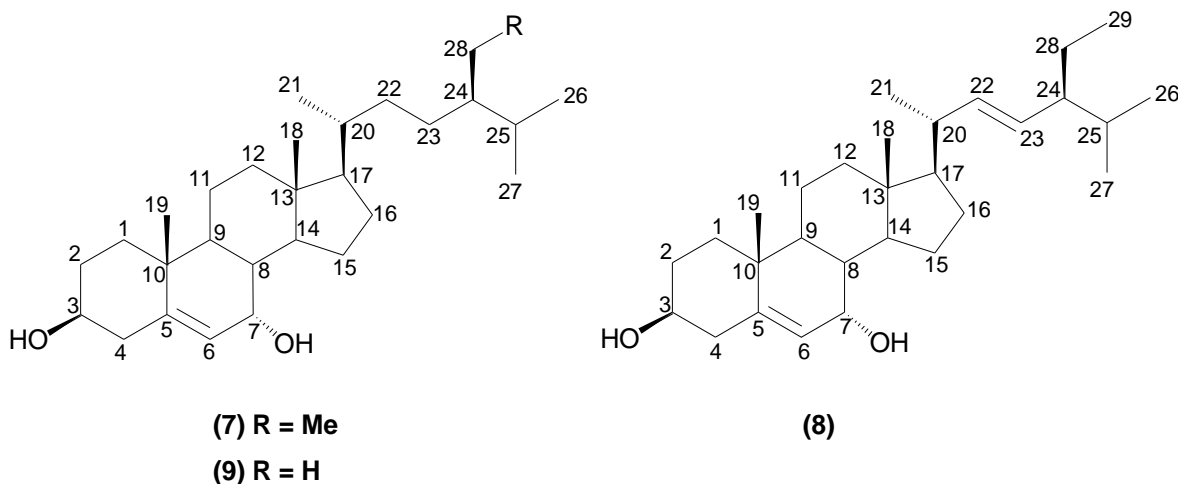


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 32,0 e 10,0 ppm, da mistura dos esteroides β -sitosterol (4), estigmasterol (5) e campesterol (6).

5.2.2.2 Elucidação estrutural da mistura das substâncias 7 e 8:

A mistura das substâncias **7** e **8** (4,5 mg) foi obtida do extrato em hexano por meio de Cromatografia em Camada Delgada em escala Preparativa sendo utilizado como fase móvel um sistema de três solventes, Hexano/CH₂Cl₂/AcOEt (1/2/7) (**Esquemas 4**, páginas 32).



A proposta estrutural para o esteroide **7** foi baseada em técnicas de RMN unidimensional de ¹H e de ¹³C, estabelecendo uma completa atribuição dos sinais de ¹H e de ¹³C da substância e comparando-as com dados descritos por Chaurasia & Wichtl, 1987 e Moreira, 2009.

Os dados de RMN de ¹³C-DEPTQ para a mistura dos esteroides (**Figura 55, 56 e 57**, página 79, 80 e 81) indicaram a presença dos esteroides **7α-hidroxisitosterol (7)** e **7α-hidroxiestigmasterol (8)**, no entanto a análise da mesma fração por espectroscopia de massas indicou a presença, em menor proporção, do esteroide **7α-hidroxicampesterol (9)** (**Figura 49**, página 72).

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 53 e 54**, página 77 e 78) apresenta dois singletos largos, um em δ_H 5,63 (H-6), referente à substância **7** e outro em δ_H 5,64 (H-6), referente à substância **8**, que confirmam a insaturação de ambas as estruturas, além de um multiplete em δ_H 3,62 (H-3), sugerindo a presença de um grupo hidroxila nesta posição em ambas as estruturas.

Por meio da análise do espectro de RMN de ¹H (**Figura 53 e 54**, página 77 e 78) da mistura, pode-se confirmar a presença do **7α-hidroxiestigmasterol (8)** notado pelas absorções dos hidrogênios vinílicos referentes à cadeia lateral em δ_H 5,07 (dd, *J* = 10,0 e 15,0 Hz, H-23) e 5,17 (dd, *J* = 5,0 e 15,0 Hz, H-22).

Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 55, 56**, páginas 79 e 80) na região de carbonos carbinólicos em δ_c 71,8 (CH-3) (**7 e 8**), em δ_c 66,06 (CH-7), (**7**) e em δ_c 65,27 (CH-7), (**8**), sugerem uma estrutura dihidroxilada.

A presença do grupo hidroxílico no carbono CH-7 justifica as modificações nos deslocamentos químicos em δ_c 123,8 CH-6 (efeito β), em δ_c 37,5 CH-8 (efeito β), em δ_c 42,3 CH-9 (efeito γ) e em δ_c 49,4 CH-14 (efeito γ), quando comparados com os esteroides β -sitosterol e estigmasterol.

Ainda no espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 55**, página 79) pode-se observar os sinais em δ_c 123,8 e 146,3 (C-6 e C-5), sugerindo a ocorrência de uma insaturação entre esses dois átomos de carbono em ambas as estruturas.

A distinção entre os esteroides **7 α -hidroxisitosterol (7)** e **7 α -hidroxiestigmasterol (8)**, pode ser confirmada pelos sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ_c 129,4 e 138,2 (C-23 e C-22), presente apenas no **7 α -hidroxiestigmasterol (8)** (**Figuras 55**, página 79 e **Tabela 19**, página 76).

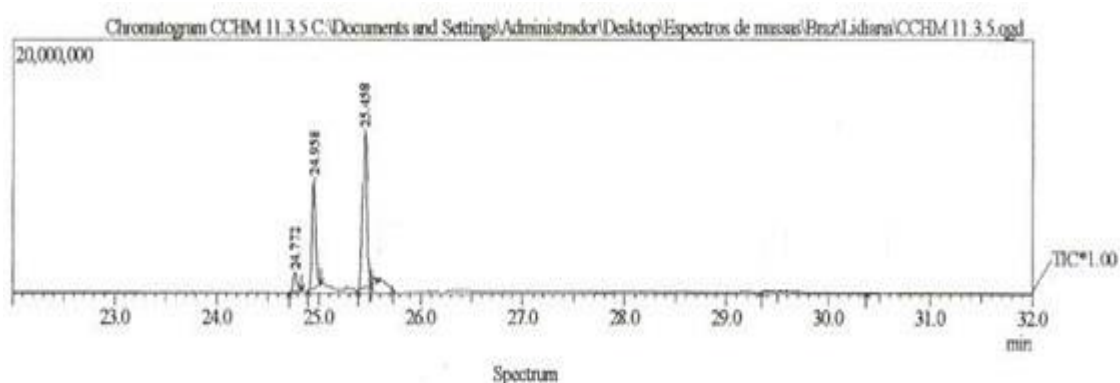


Figura 49: Cromatograma da mistura dos esteroides **7, 8 e 9**.

Como os três esteroides apresentam fatores de sensibilidade ao detector semelhantes, foi determinada a porcentagem média dos três esteroides, resultando em 58,98 % de **β -sitosterol**, 33,83% de **estigmasterol** e 7,19 % de **campesterol**.

O espectro de massas de baixa resolução EMBR (**Figura 50**, página 73), exibiu como pico referente ao íon molecular M^+ . 394, indicando a perda de duas moléculas de água (H_2O , H_2O $m = 36$), justificando a proposta da fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ($\Delta m/z$ 430 - 36 = 394 Daltons) (**Esquema 12**, página 73).

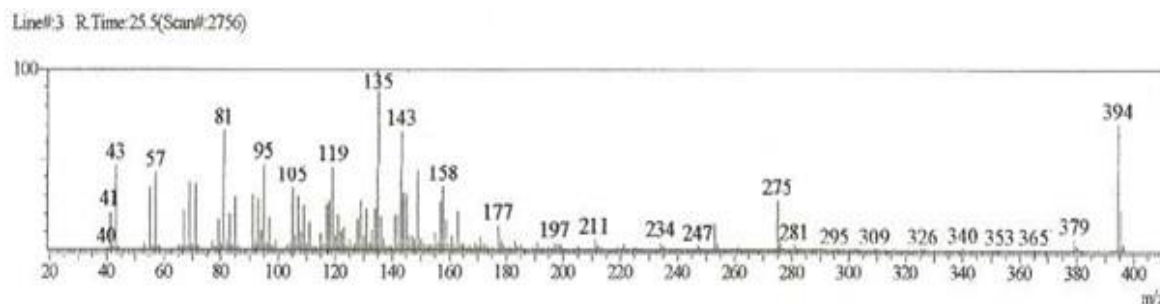
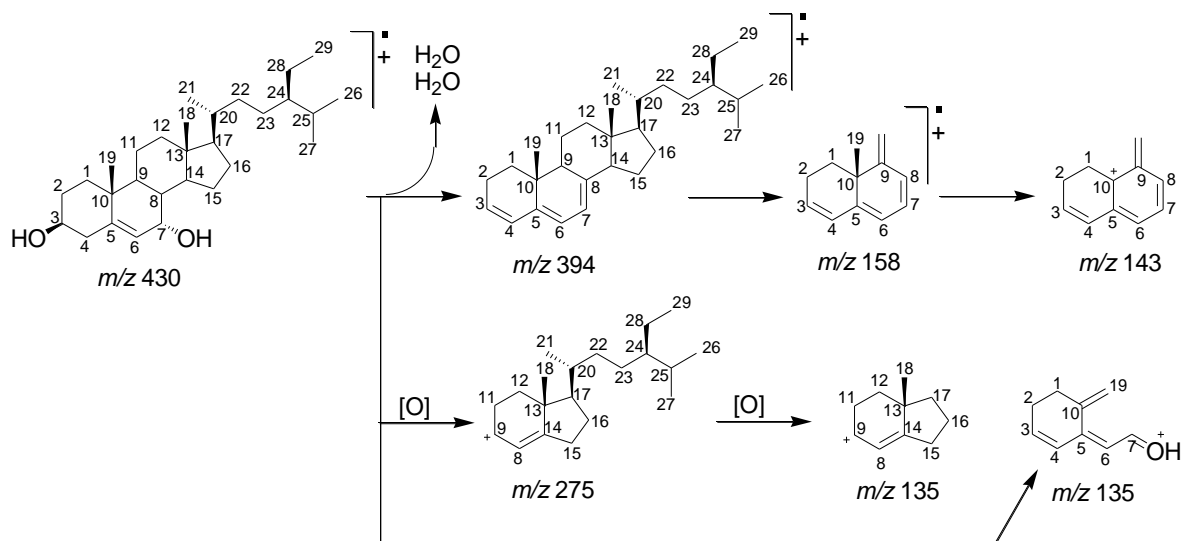


Figura 50: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **7 α -hidroxisteroide (7)**.



Esquema 12: Proposta de fragmentação para o esteroide **7 α -hidroxisteroide (7)**.

O espectro de massas de baixa resolução EMBR (**Figura 51**), exibiu como pico referente ao íon molecular M^+ . 392, indicando a perda de duas moléculas de água (H_2O , H_2O $m = 36$), justificando a proposta da fórmula molecular $C_{29}H_{48}O_2$ ($\Delta m/z$ 428 - 36 = 392 Daltons) como mostra o **Esquema 13**, presente na página 74.

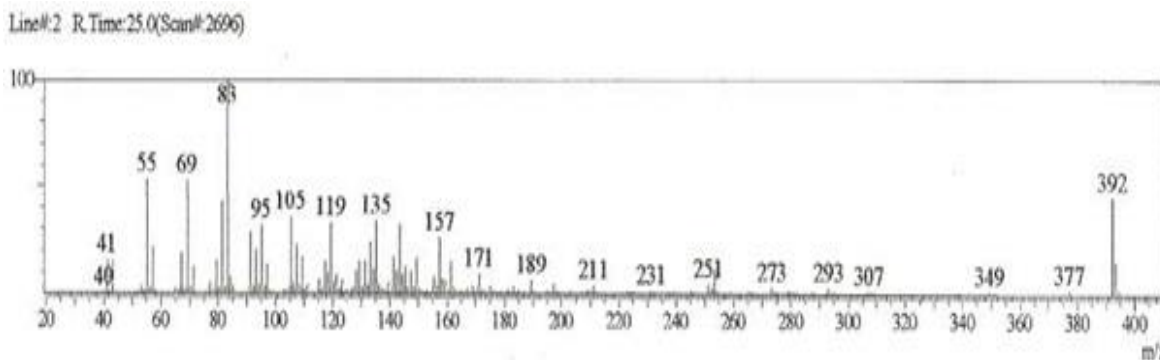
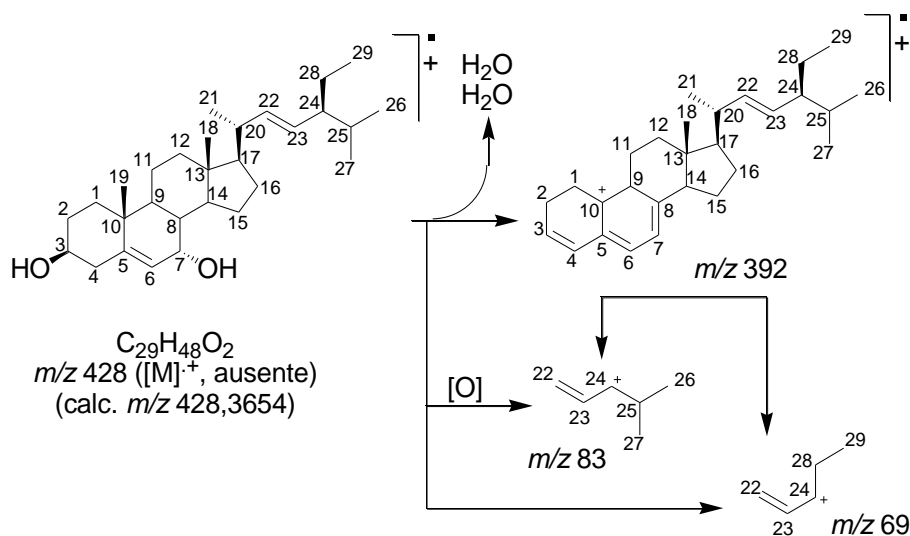


Figura 51: Espectro de Massas 70 eV do esteroide **7 α -hidroxisteroide (8)**.



Esquema 13: Proposta de fragmentação para o esteroide 7α -hidroxiestigmasterol (8).

O espectro de massas de baixa resolução EMBR (**Figura 52**), exibiu como pico referente ao íon molecular M^+ . 380, indicando a perda de duas moléculas de água (H_2O , H_2O $m = 36$), justificando a proposta da fórmula molecular $C_{28}H_{48}O_2$ ($\Delta m/z$ 416 - 36 = 380 Daltons). A proposta de fragmentação do esteroide **9** é bastante similar à fragmentação do esteroide 7α -hidroxisitosterol, possuindo os mesmos íons $m/z = 158$, 143 e 135, diferindo apenas no íon $m/z = 261$ (**Esquema 14**, página 75).

Line#1 R.Time:24.8(Scan#:2674)

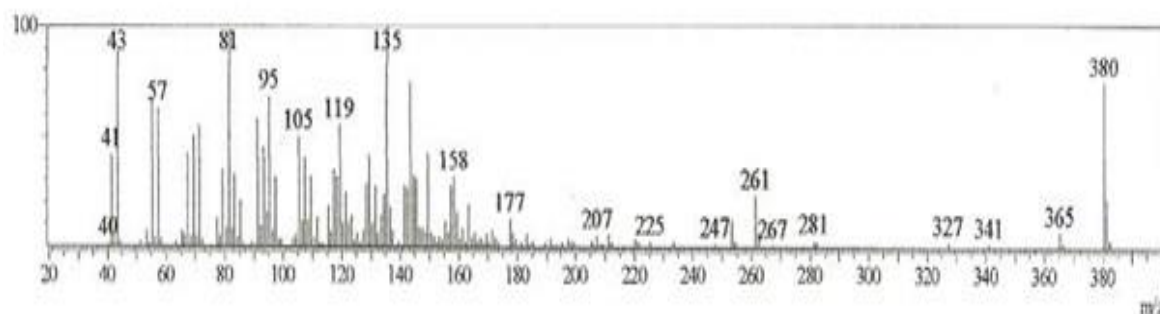
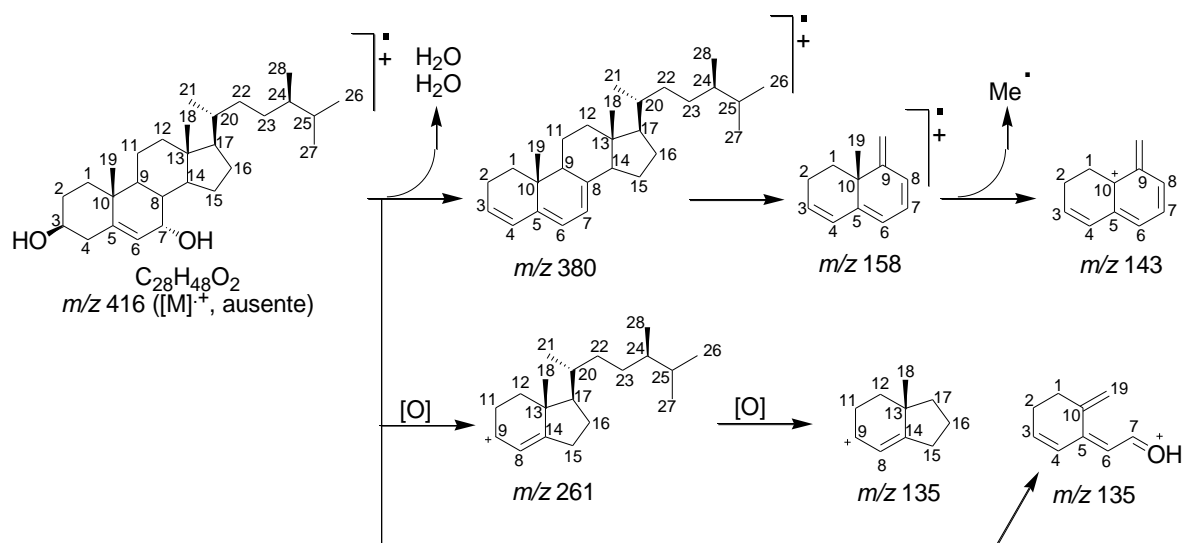


Figura 52: Espectro de Massas 70 eV do esteroide 7α -hidroxicampesterol (9).



Esquema 14: Proposta de fragmentação para o esteroide 7α -hidroxicampesterol (9).

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H (500MHz) e de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) das substâncias **7** e **8**, em CDCl_3 , valores dos deslocamentos químicos (δ_{C}) obtidos e valores dos deslocamentos químicos (δ_{C}) da literatura (Chaurasia and Wichti; 1987, Gonçalves; 2011) para os esteroides **7 α -hidroxisitosterol (Mo-1)** e **estigmasterol (Mo-2)** em ppm.

C	Substância 7		Substância 8		Mo-1	Mo-2
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,0	1,80; 1,25	37,0	1,80; 1,25	37,4	37,3
2	31,4	1,70; 1,55	31,4	1,70; 1,55	31,4	31,9
3	71,4	3,62 (<i>m</i>)	71,4	3,62 (<i>m</i>)	71,3	71,8
4	42,0	2,36 (<i>dd</i> , 15,0; 5,0) 2,30 (<i>t</i> , 15,0)	42,0	2,36 (<i>dd</i> , 15,0; 5,0) 2,30 (<i>t</i> , 15,0)	42,1	42,2
5	146,3	-	146,3	-	146,2	140,7
6	123,9	5,64 (<i>sl</i>)	123,9	5,63 (<i>sl</i>)	123,9	121,7
7	65,3	3,87 (<i>sl</i>)	66,1	3,87 (<i>sl</i>)	65,3	33,9
8	36,1	1,47	37,5	1,49	37,0	31,9
9	42,3	1,25	42,3	1,25	53,0	50,1
10	36,9	-	36,9	-	37,5	36,1
11	20,7	1,55	20,7	1,55	20,7	21,1
12	39,1	2,05; 1,35	39,2	2,05; 1,35	39,2	39,8
13	41,7	-	41,7	-	42,2	42,3
14	49,5	1,39	49,4	1,48	49,4	56,8
15	24,4	1,32	24,3	1,73	24,3	24,3
16	28,9	1,80	28,3	1,93	28,3	28,9
17	55,7	1,21	55,7	1,12	56,0	56,0
18	12,0	0,71 (<i>s</i>)	11,7	0,69 (<i>s</i>)	11,6	12,3
19	18,3	1,00 (<i>s</i>)	18,3	1,00 (<i>s</i>)	18,2	19,4
20	40,9		40,5	2,07	36,1	39,8
21	21,0	1,04 (<i>d</i> , 10,0)	19,0	0,94 (<i>d</i> , 10,0)	19,4	20,5
22	33,9	1,65; 0,89	138,2	5,17 (<i>dd</i> , 15,0;5,0)	34,0	138,3
23	25,9	1,18	129,4	5,07 (<i>dd</i> , 15,0; 10,0)	29,2	129,3
24	45,9		51,2	1,56	45,9	51,2
25	29,1	1,80	31,9	1,88	26,0	31,9
26	21,0		18,8		18,8	21,2
27	19,8		19,8		19,8	19,8
28	23,1		25,4	1,44	22,7	25,4
29	12,3	0,87	11,8	0,87	12,0	11,9
OH					3,51	3,51

quisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CCHM - 11.3.5 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
name	E:\107\data\11r	Date Stamp	18 Nov 2013 09:13:52
n	spect	Frequency (MHz)	500.13
Sequence	2930	Original Points Count	32768
trum Offset (Hz)	3079.6614	Receiver Gain	575.00
		Spectrum Type	STANDARD
		Sweep Width (Hz)	10330.26
		Temperature (degree C)	20.060
		Solvent	CHLOROFORM-d
		Points Count	32768
		Number of Transients	16

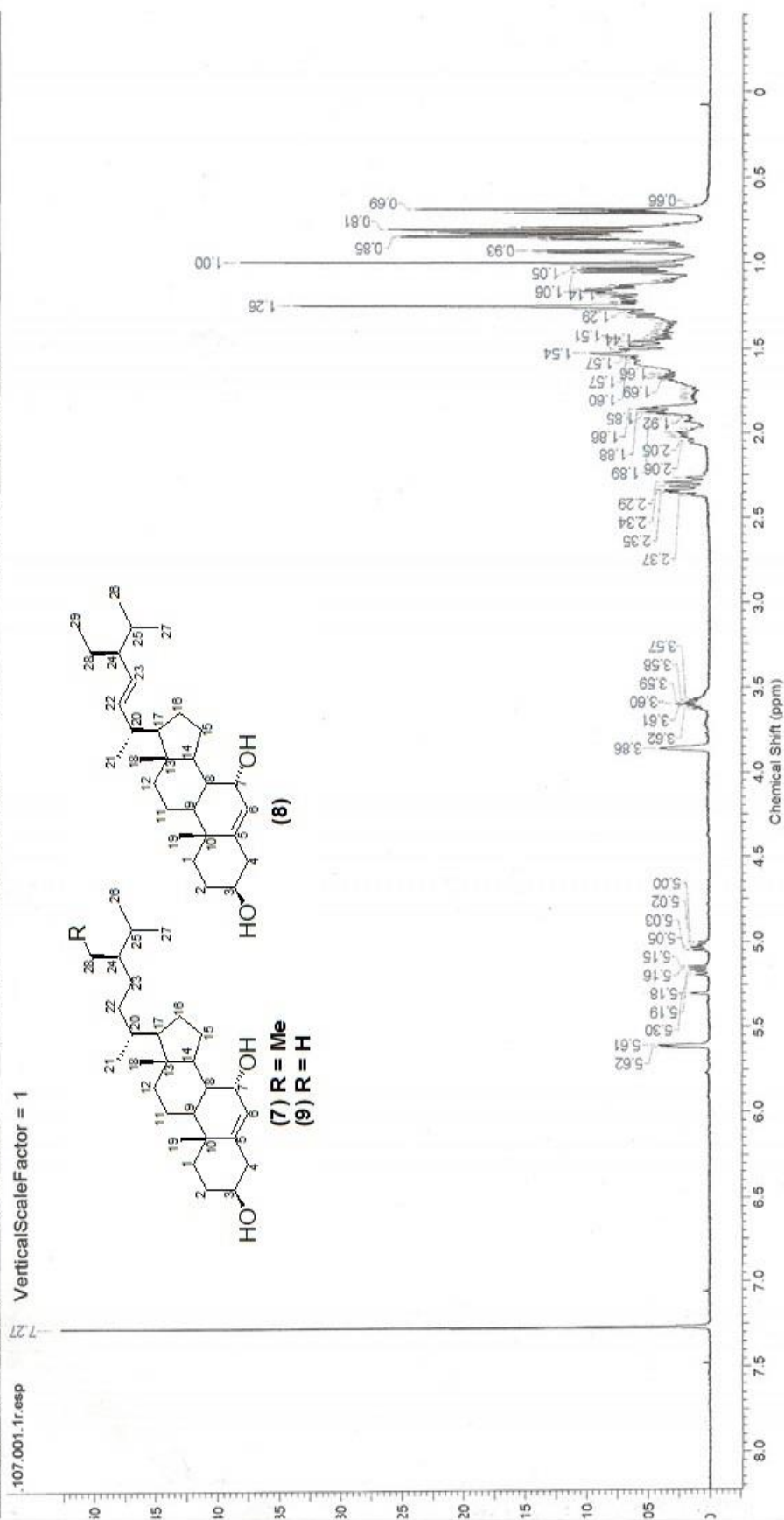


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura dos esteroides 7α -hidroxistosterol (7), 7α -hidroxiestigmasterol (8) e 7α -hidroxicampesterol (9).

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CCHM - 11.3.5 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
Date	18 Nov 2013 08:13:52	Date Stamp	18 Nov 2013 09:13:52
File Name	E:\107\data\11r	Nucleus	¹ H
Origin	spect	Owner	nmrslu
Pulse Sequence	zg30	SW(cyclical) (Hz)	10330.58
Spectrum Offset (Hz)	3088.5063	Spectrum Type	STANDARD
		Sweep Width (Hz)	10330.26
		Points Count	32768
		Solvent	CHLOROFORM-d
		Temperature (degree C)	20.060
		Number of Transients	16

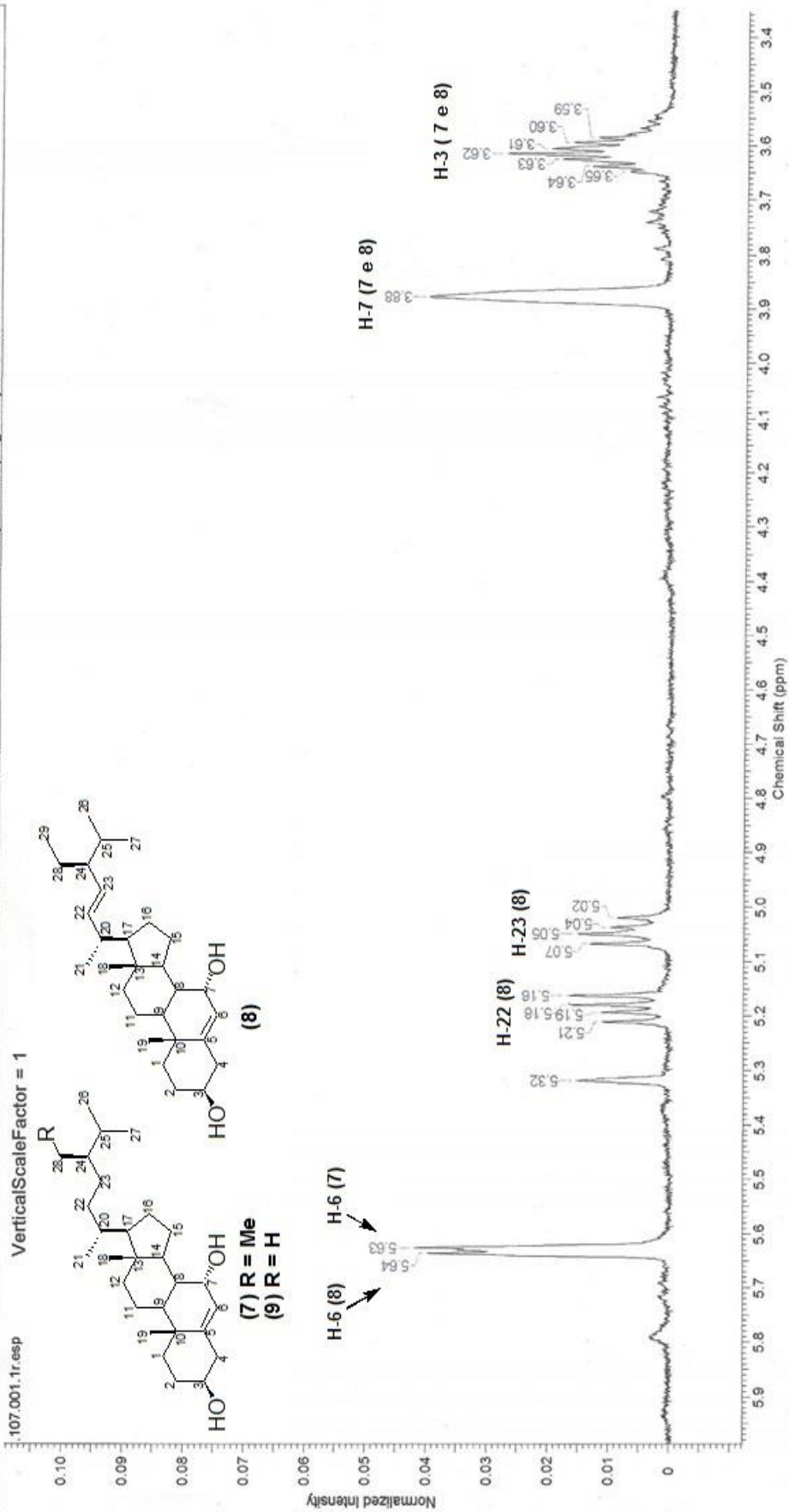


Figura 54: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ_H 6,0 e 3,3 ppm, da mistura dos esteroides 7α-hidroxisitosterol (7), 7α-hidroxiestigmasterol (8) e 7α-hidroxicampesterol (9).

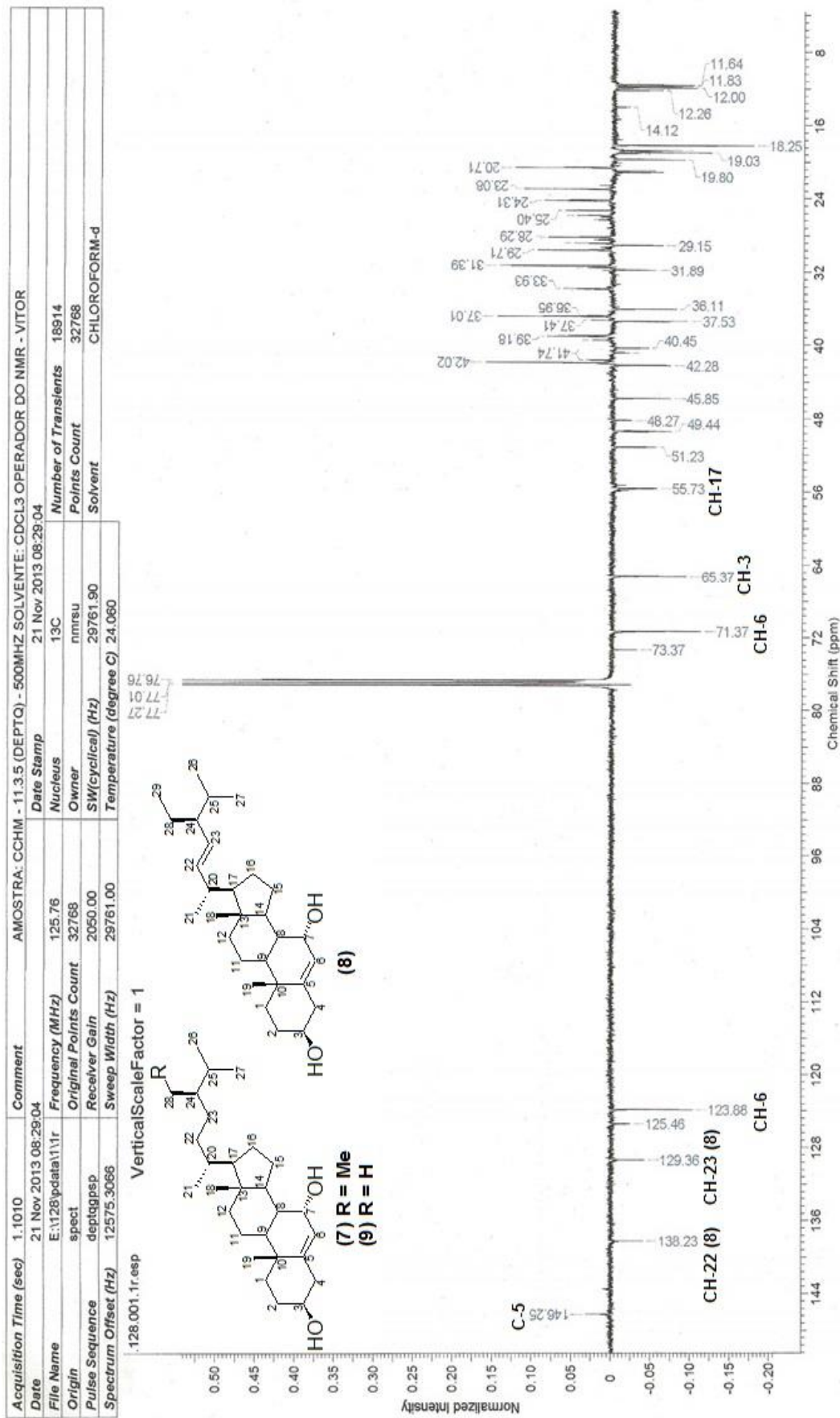


Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3), da mistura dos esteroides 7α -hidroxisterol (7), 7α -hidroxistigmasterol (8) e 7α -hidroxicampesterol (9).

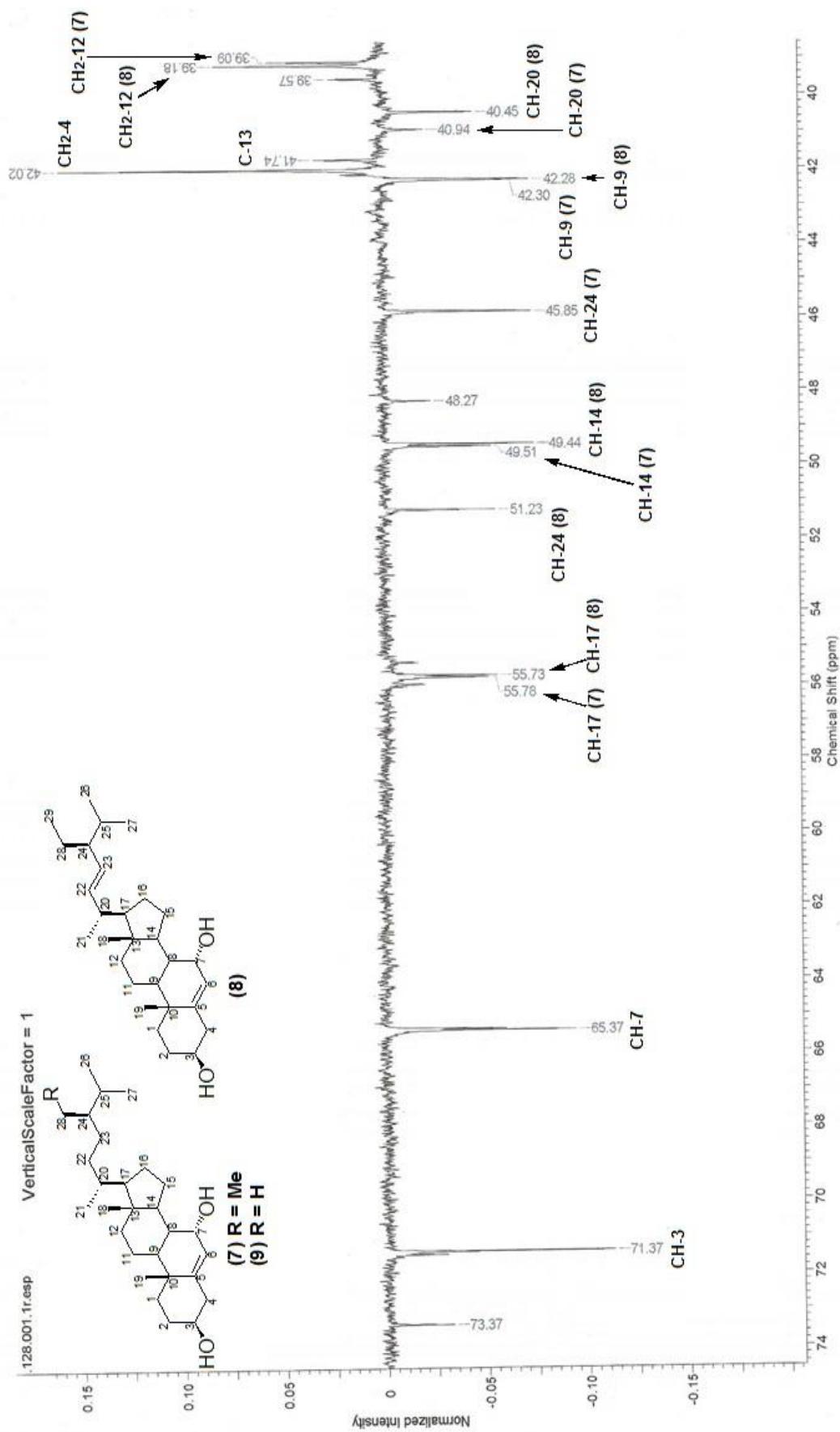


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 74,0 39,0 ppm, da mistura dos esteroides **7 α -hidroxistosterol (7)**, **7 α -hidroxiestigmasterol (8)** e **7 α -hidroxicampesterol (9)**.

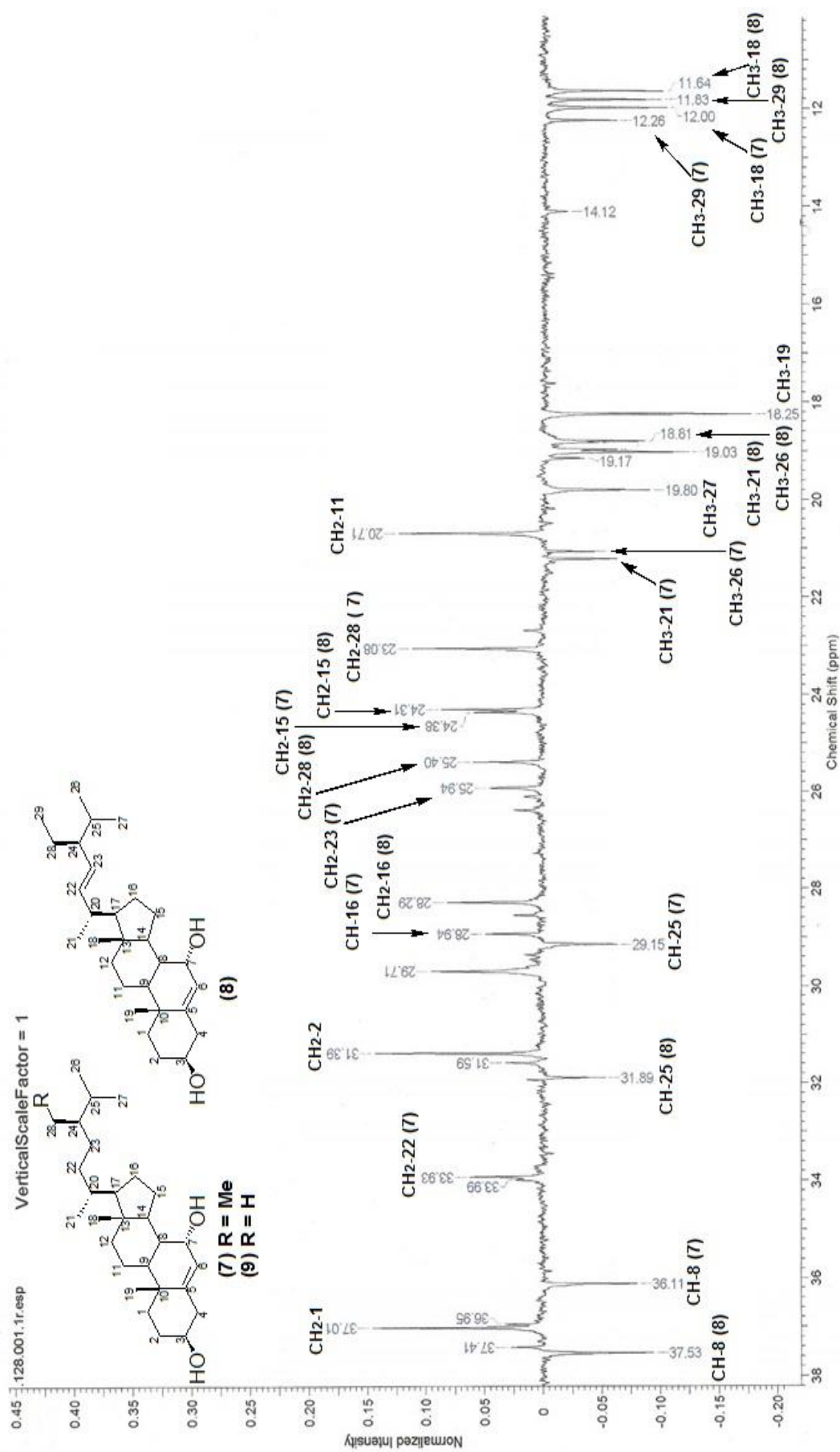
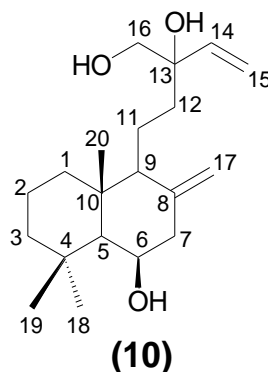


Figura 57: Espectro de RMN de ¹³C (500 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ 38,0 11,0 ppm, da mistura dos esteroides 7 α -hidroxistosterol (7), 7 α -hidroxiestigmasterol (8) e 7 α -hidroxicampesterol (9).

5.2.3 Diterpenos

5.2.3.1 Elucidação estrutural da substância 10:



O tratamento cromatográfico da fração CCHM-10.9 (3,0 mg) resultou no isolamento da substância **10**, que se apresentou como um óleo amarelo claro (**Esquema 4**, página 32).

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) apresentou 20 sinais, sendo quatro não hidrogenados com um sp^2 em δ_{C} 144,1; quatro carbonos metínicos, nove metilênicos e três metílicos caracterizando estrutura de um diterpeno (**Figura 66 e 67**, página 92 e 93).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (**Figura 60, 61 e 62**, páginas 86, 87 e 88) exibiu três sinais simples em δ_{H} 1,00 (3H-18); 1,22 (3H-19) e 0,98 (3H-20), além de um sistema do tipo vinila em δ_{H} 5,83 (*dd*, 17,2; 10,7 Hz, H-14), 5,39 (*d*, 17,2 Hz, H-15a) e 5,33 (*d*, 10,7 Hz, H-15b), que foram confirmados através da análise do mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figura 63, 64 e 65**, páginas 89, 90 e 91), o qual exibiu acoplamento entre os sinais.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também quatro sinais simples largos, sendo dois em δ_{H} 4,38 (H-6) e 3,53 (2H-16), confirmados através das correlações $^1J_{\text{HC}}$ apresentados no mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figura 68 e 69**, página 94 e 95) com os carbonos carbinólicos em δ_{CH} 69,4 (CH-6) e 68,9 (CH₂-16), e dois sinais em δ_{H} 5,04 (H-17a) e 4,89 (H-17b) que apresentaram acoplamento no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figura 63**, página 89), e exibiram correlação com carbono metilênico sp^2 em δ_{CH} 110,7 (CH₂-17) caracterizando um grupo vinilidina exocíclico característico de diterpenos labdanos (Buckwalter e colaboradores, 1975; Zhang e colaboradores, 2013). As demais correlações são observadas para os carbonos hidrogenados no mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figura 68 e 69**, página 94 e 95).

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ apresentou um sinal de carbono quaternário em δ_{C} 75,5 (C-13), indicando a presença de outra oxidação, que foi estabelecida após análise do mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figuras 70, 71 e 72**, páginas 96, 97 e 98), o qual apresentou correlações a longa distância $^2J_{\text{HC}}$ com os hidrogênios δ_{H} 5,83 (H-14) e 3,53 (2H-16), e a $^3J_{\text{HC}}$ com os hidrogênios em δ_{H} 5,39 (H-15a) e 5,33 (H-15b).

A comparação com modelos apresentados na literatura (Buckwalter e colaboradores, 1975), conduziu a proposta de oxidação em CH_2 -16 ao observar efeito- β no carbono C-13 ($\Delta_{\text{C}} = 2,0$ ppm) (**Figura 58**).

O mapa de correlação heteronuclear HMBC, corrobora essas observações ao apresentar correlações a longa distância entre 2H-16/C-13; 2H-16/CH-14; 2H-16/CH₂-12 (**Figuras 70, 71 e 72**, páginas 96, 97 e 98), possibilitando estabelecer as atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio inequívocos para a substância **10**.

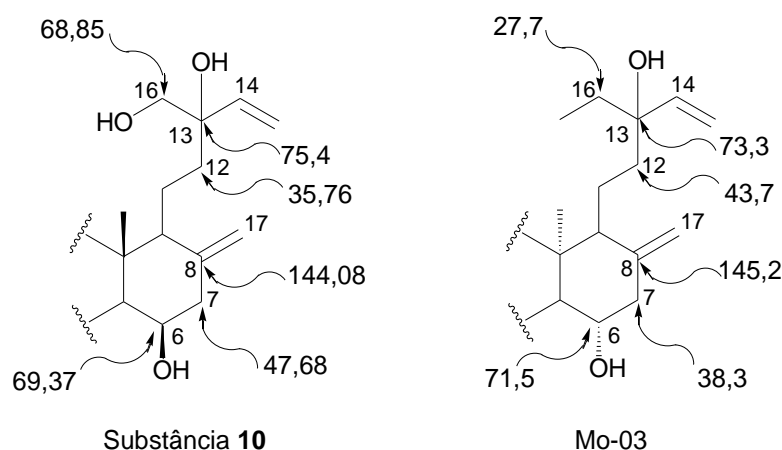


Figura 58: Efeito de de proteção (β) em carbonos da substância **10**.

O espectro de massas de alta resolução EMAR-EI-TOF (**Figura 59**), exibiu como pico íon molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 345,2468 (calc. 345,2406) apresentando erro sistemático de $\Delta = 6,2$ ppm.

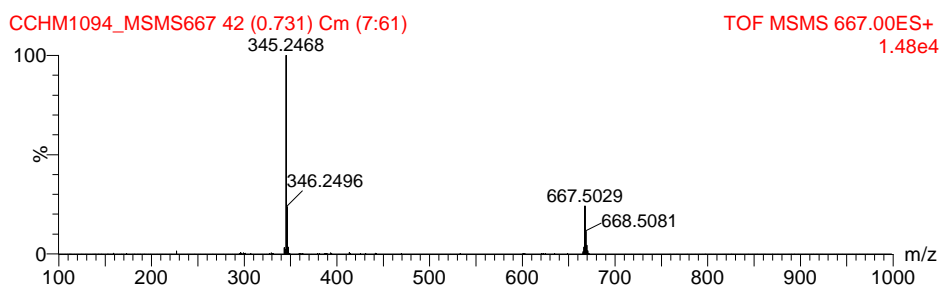
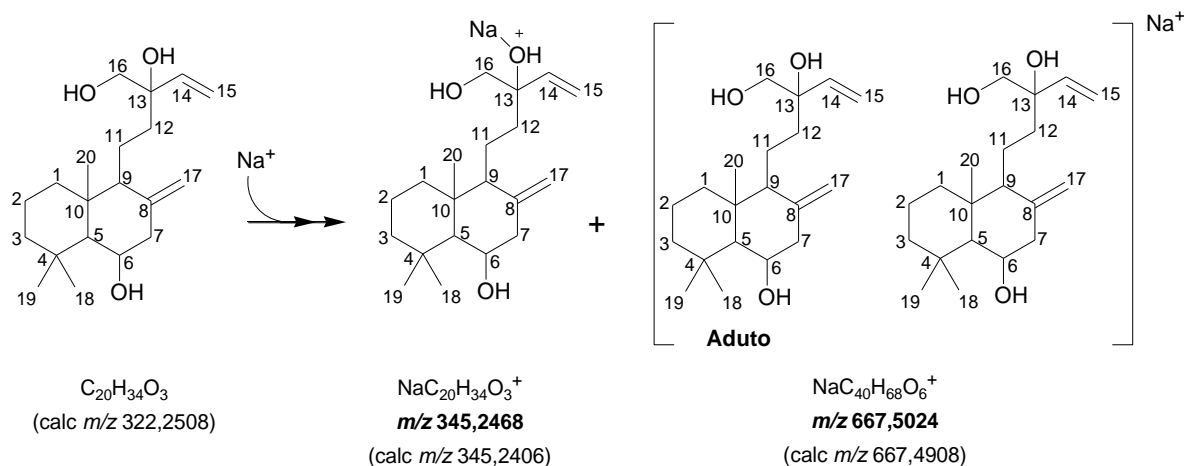


Figura 59: Espectro de Massas de alta resolução EMAR da substância **10**.



Esquema 15. Principais fragmentos observados no espectro de Massas de alta resolução EMAR para substância **10**.

Este resultado aponta para fórmula molecular $NaC_{20}H_{34}O_3^+$ com quatro graus de insuficiência, que em conjunto com os dados discutidos, e comparação com modelos na literatura conduziram a elucidação estrutural da substância **10**, podendo estabelecer a estrutura para um novo diterpeno do tipo labdano denominado **16-hidroxiarixol**.

A estereoquímica da hidroxila alocada no átomo de carbono CH-6 foi definida como β (axial) devido ao sinal simples largo em δ_c 69,4, quando comparado ao diterpeno larixol citado na literatura, onde o grupo hidroxila encontra-se na posição α (equatorial) em δ_c 71,1. A posição β (equatorial) da cadeia lateral alocada no átomo de carbono CH-9 em δ_c 58,0 foi também comparada com os mesmos dados de literatura (Seki e colaboradores, 2012).

Tabela 20: Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **10** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para o diterpeno larixol **Mo-03**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Substância 10					
HSQC			HMBC		Mo-03
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
1	42,0	1,78 (<i>m</i>) 1,08 (<i>m</i>)		3H-20	39,0
2	19,5	1,70 (<i>m</i>); 1,50 (<i>m</i>)			18,4
3	43,5	1,40 (<i>m</i>); 1,20 (<i>m</i>)		3H-18; 3H-19	49,1
4	35,8	-	3H-18; 3H-19		33,5
5	57,5	1,08 (<i>m</i>)		3H-18; 3H-19; 3H-20	56,4
6	69,4	4,38 (<i>sl</i>)			71,5
7	47,7	2,35 (<i>m</i>)		2H-17	38,3
8	144,1	-			145,2
9	58,0	1,70 (<i>m</i>)		2H-17; 3H-20	60,4
10	41,0	-			41,3
11	17,1	1,68 (<i>m</i>) 1,45 (<i>m</i>)			18,0
12	35,8	1,85 (<i>m</i>) 1,30 (<i>m</i>)		2H-16	43,7
13	75,5	-	H-14; 2H-16	2H-15	73,3
14	140,8	5,83 (<i>dd</i> , 17,2; 10,7)		2H-16	144,8
15	115,4	5,39 (<i>d</i> , 17,2) 5,33 (<i>d</i> , 10,7)			111,3
16	68,9	3,53 (<i>sl</i>)			27,7
17	110,7	5,04 (<i>sl</i>); 4,89 (<i>sl</i>)			108,2
18	33,7	1,00 (<i>s</i>)		3H-19	36,1
19	23,6	1,22 (<i>s</i>)		3H-18	22,3
20	17,0	0,98 (<i>s</i>)			16,0

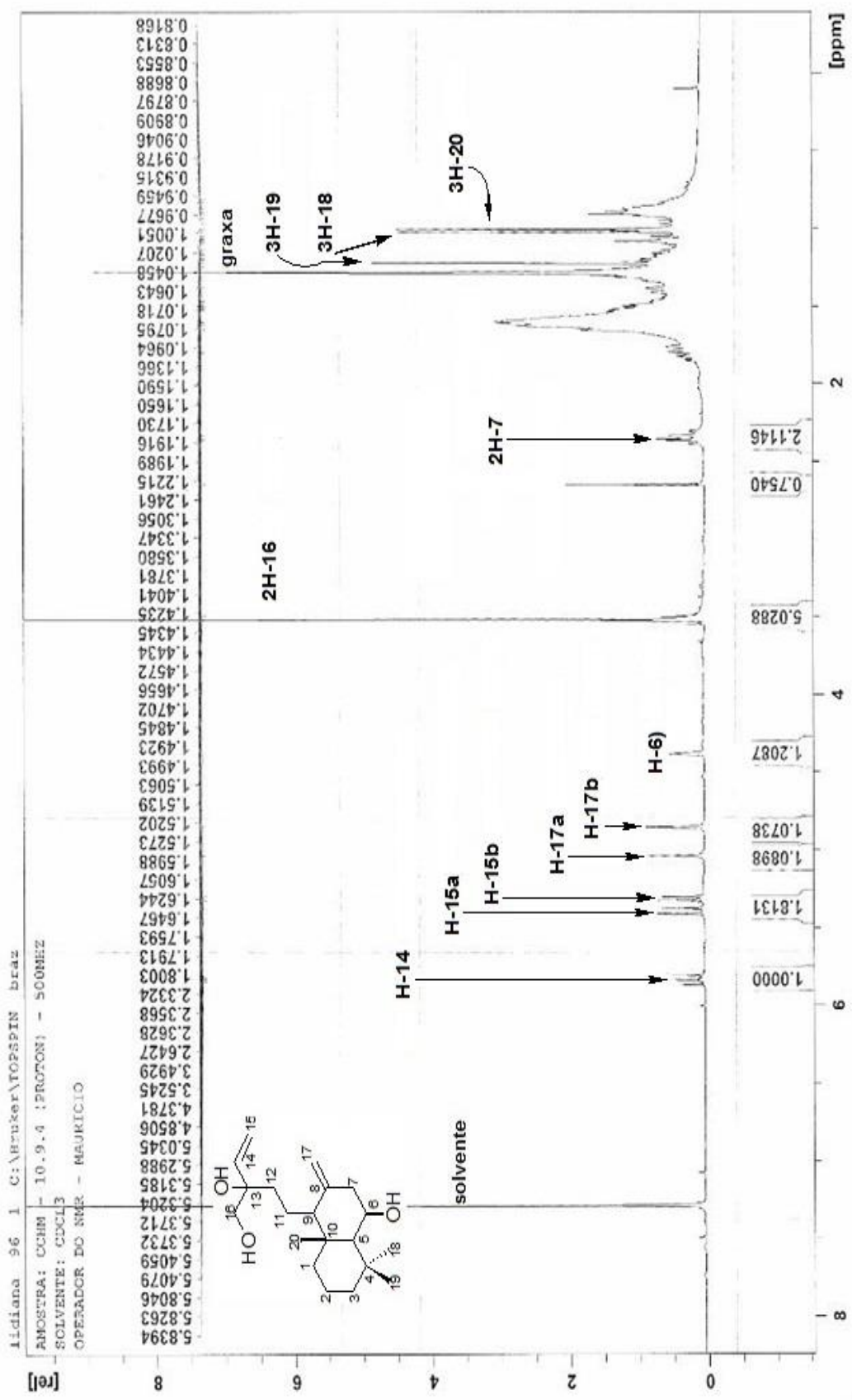


Figura 60: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do diterpene 16-hidroxiarixol (10).

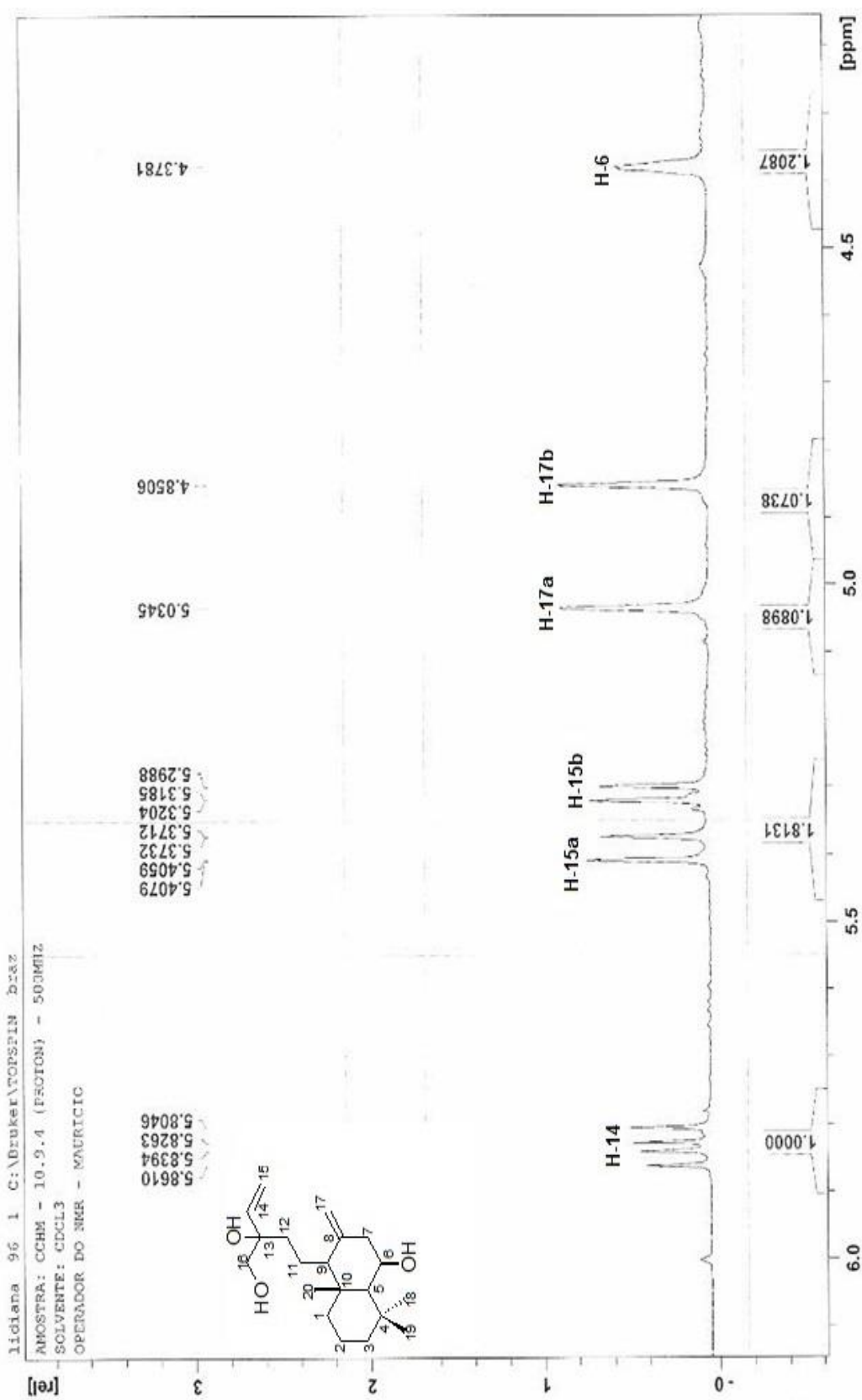


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_{H} 6,7 e 4,2 ppm, do diterpeno 16-hidroilarixol (10).

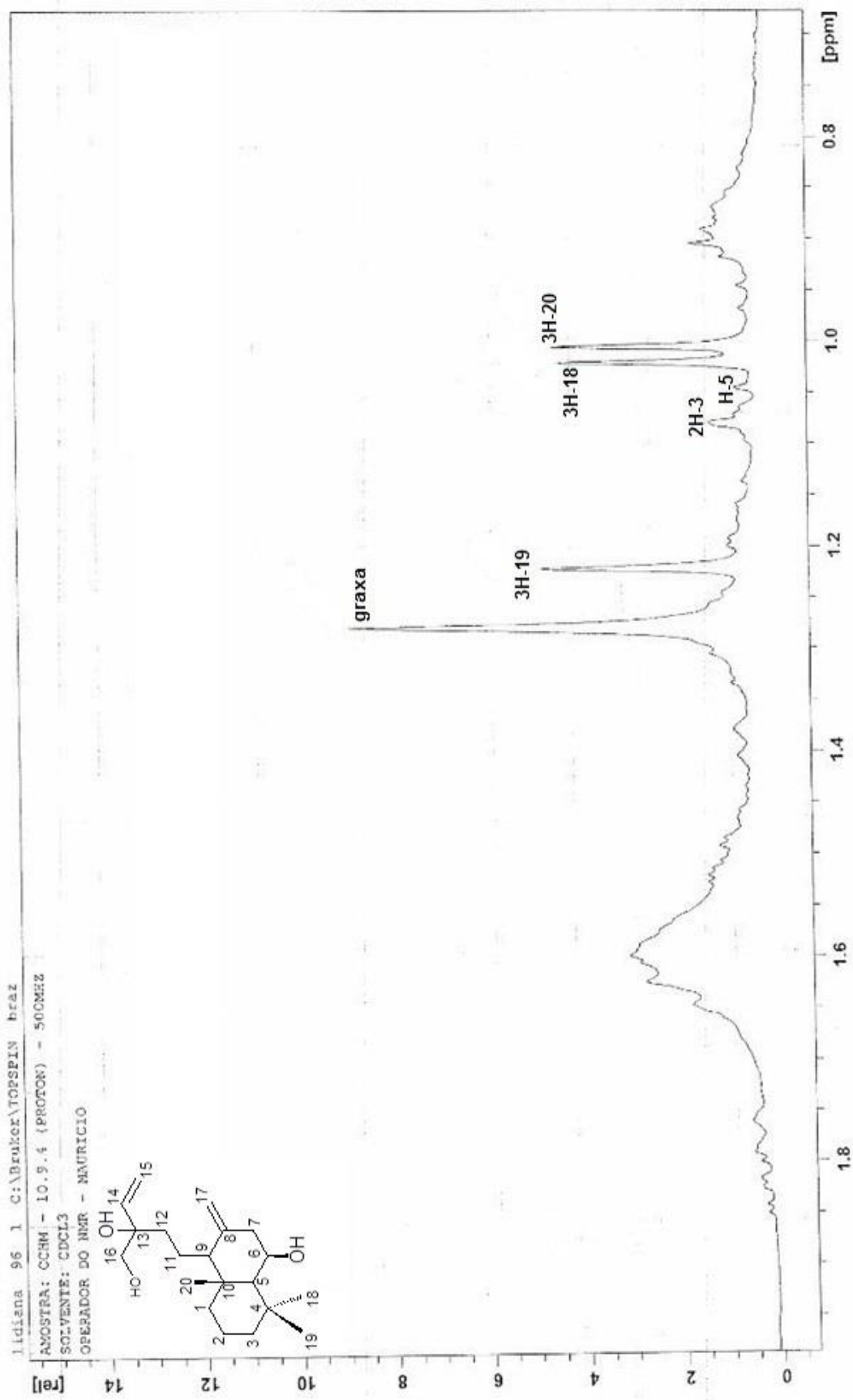


Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 3,6 e 0,0 ppm, do diterpeno **16-hidroxilarixol (10)**.

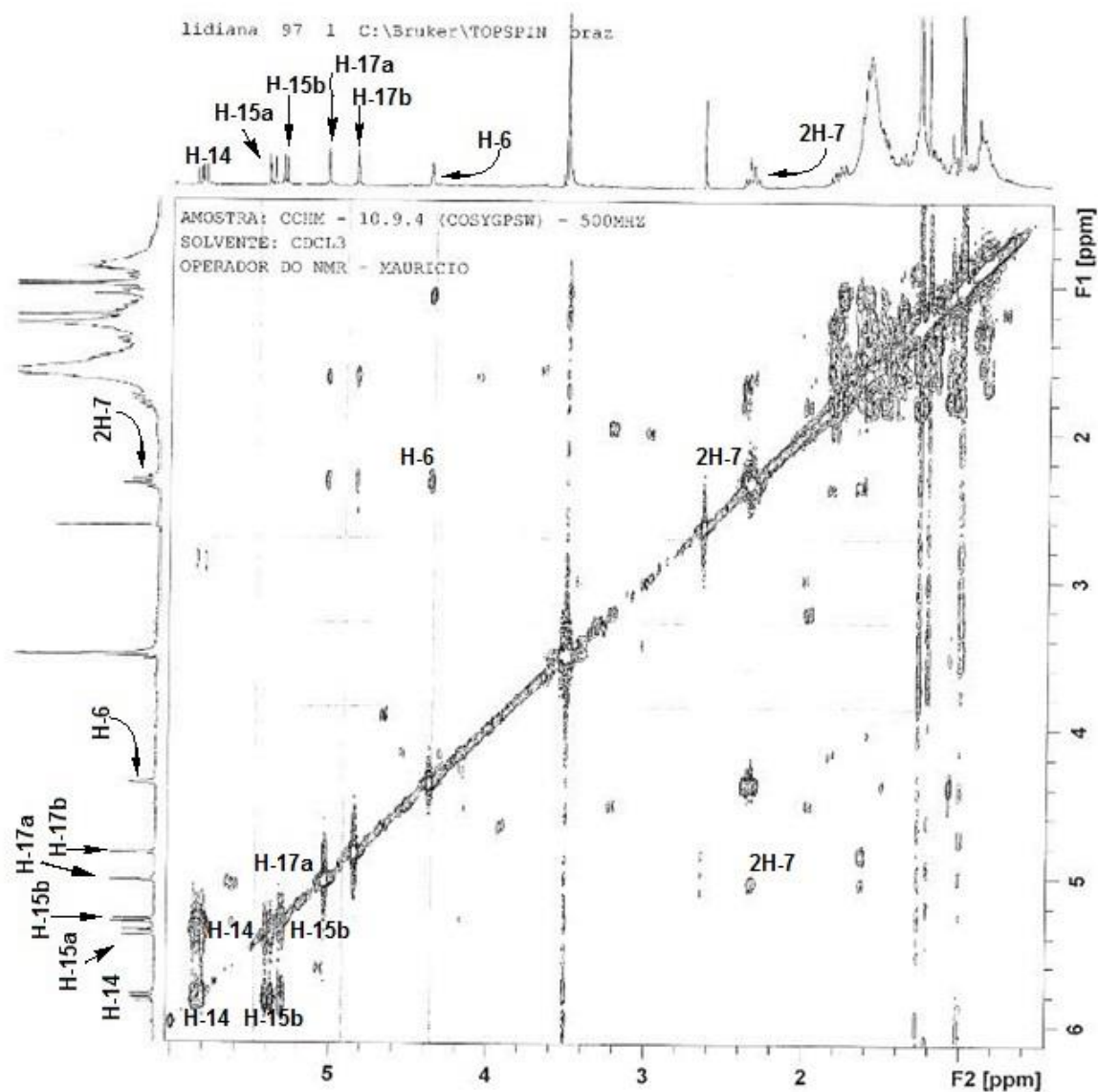
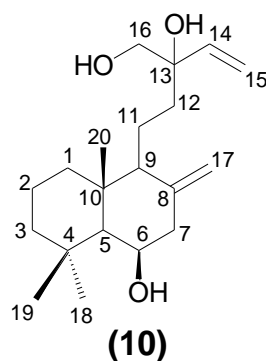


Figura 63: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroilarixol (10).

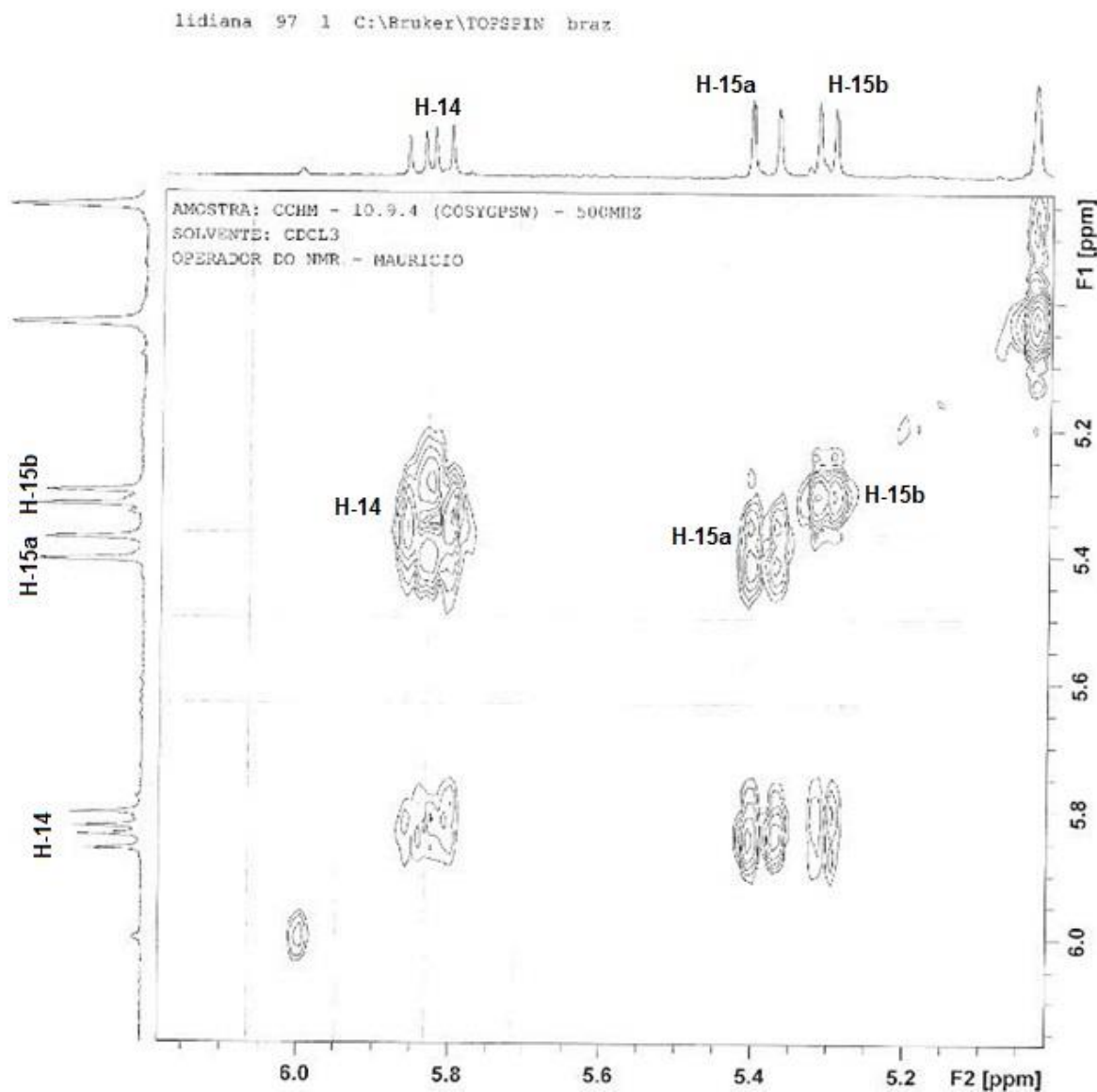
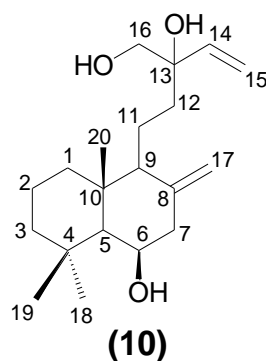


Figura 64: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 6,15 e 5,05 ppm, do diterpeno **16-hidroilarixol (10)**.

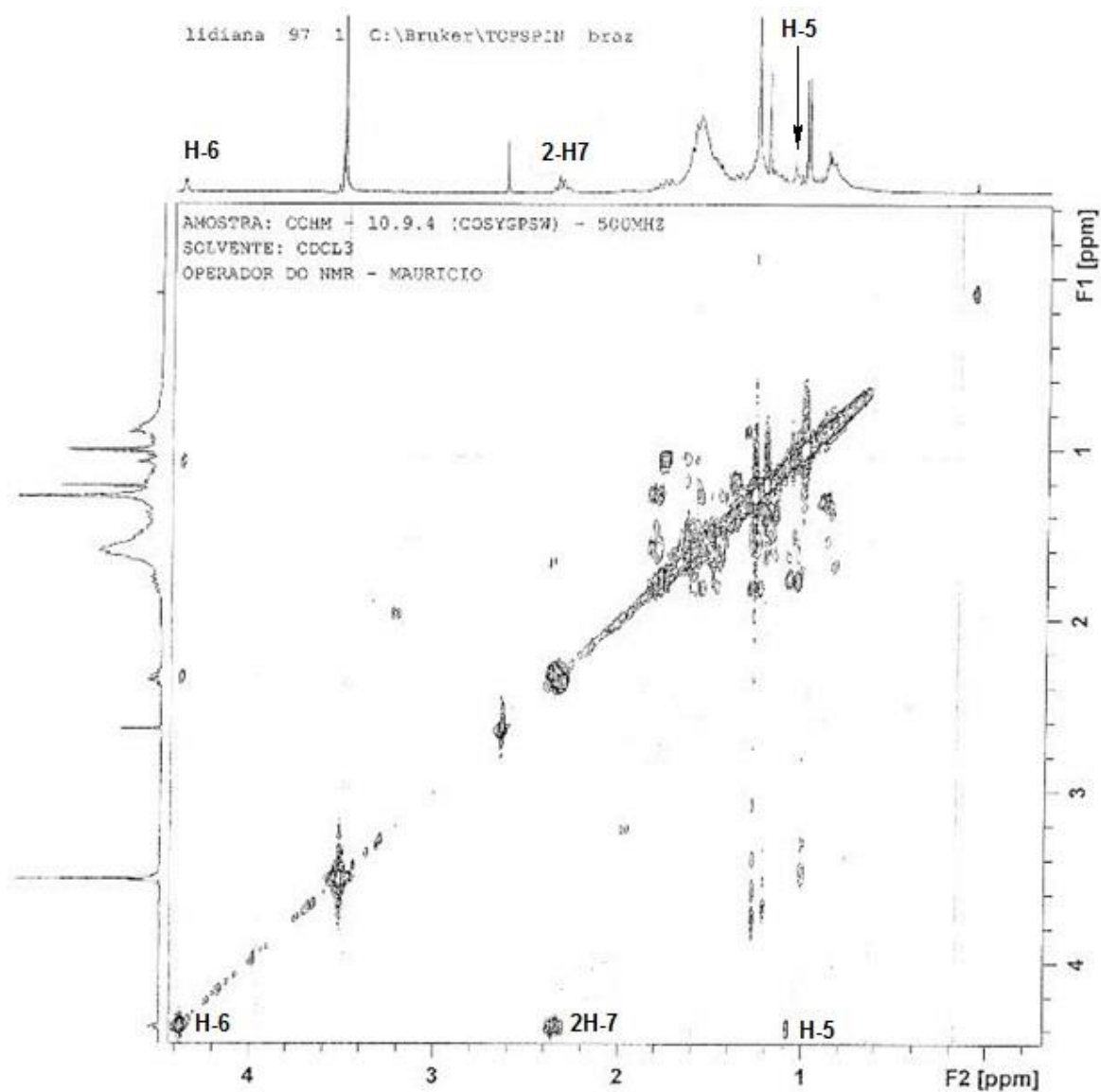
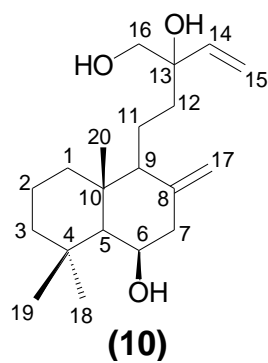


Figura 65: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 4,40 e 0,00 ppm, do diterpeno **16-hidroilarixol (10)**.

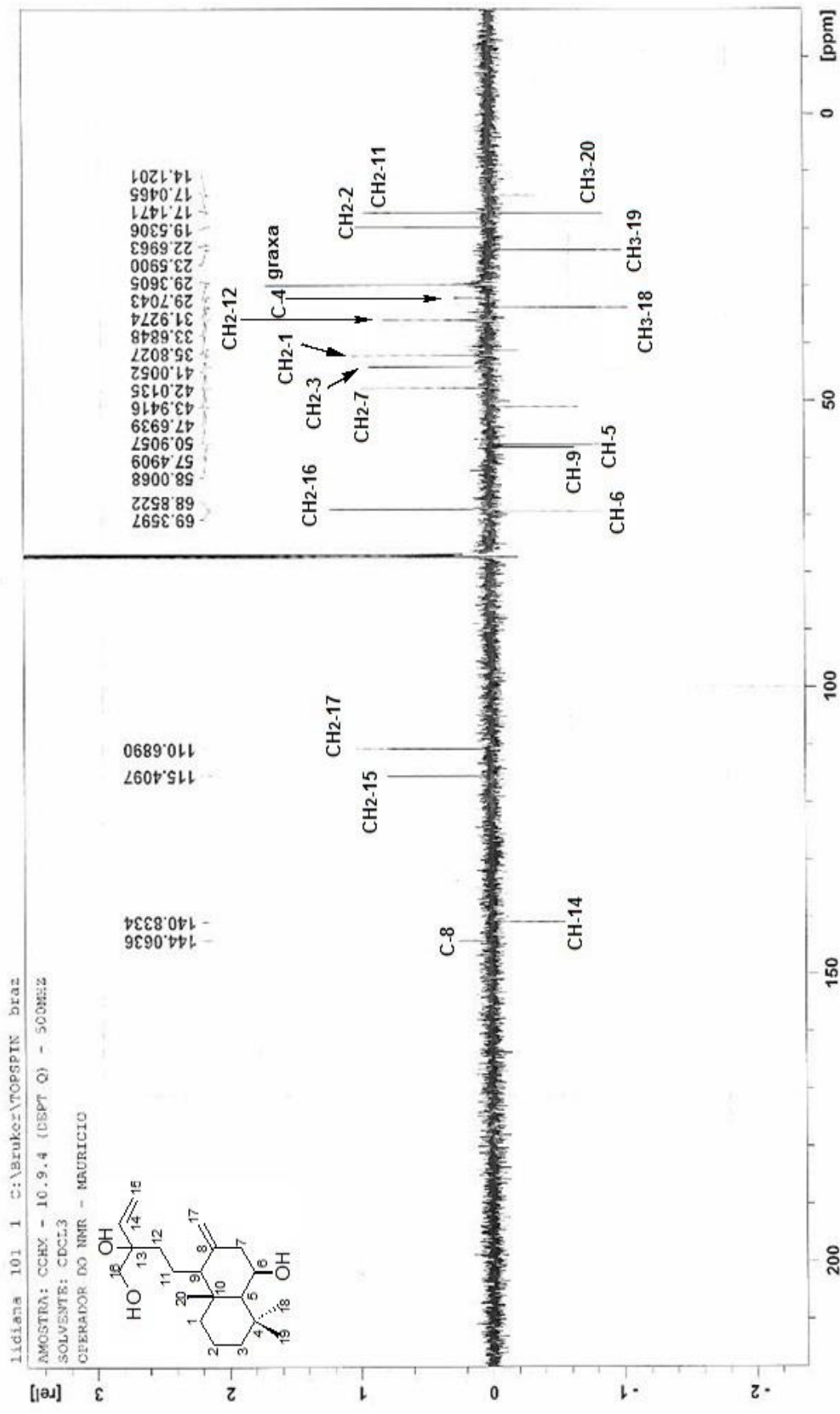


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroilarixol (10).

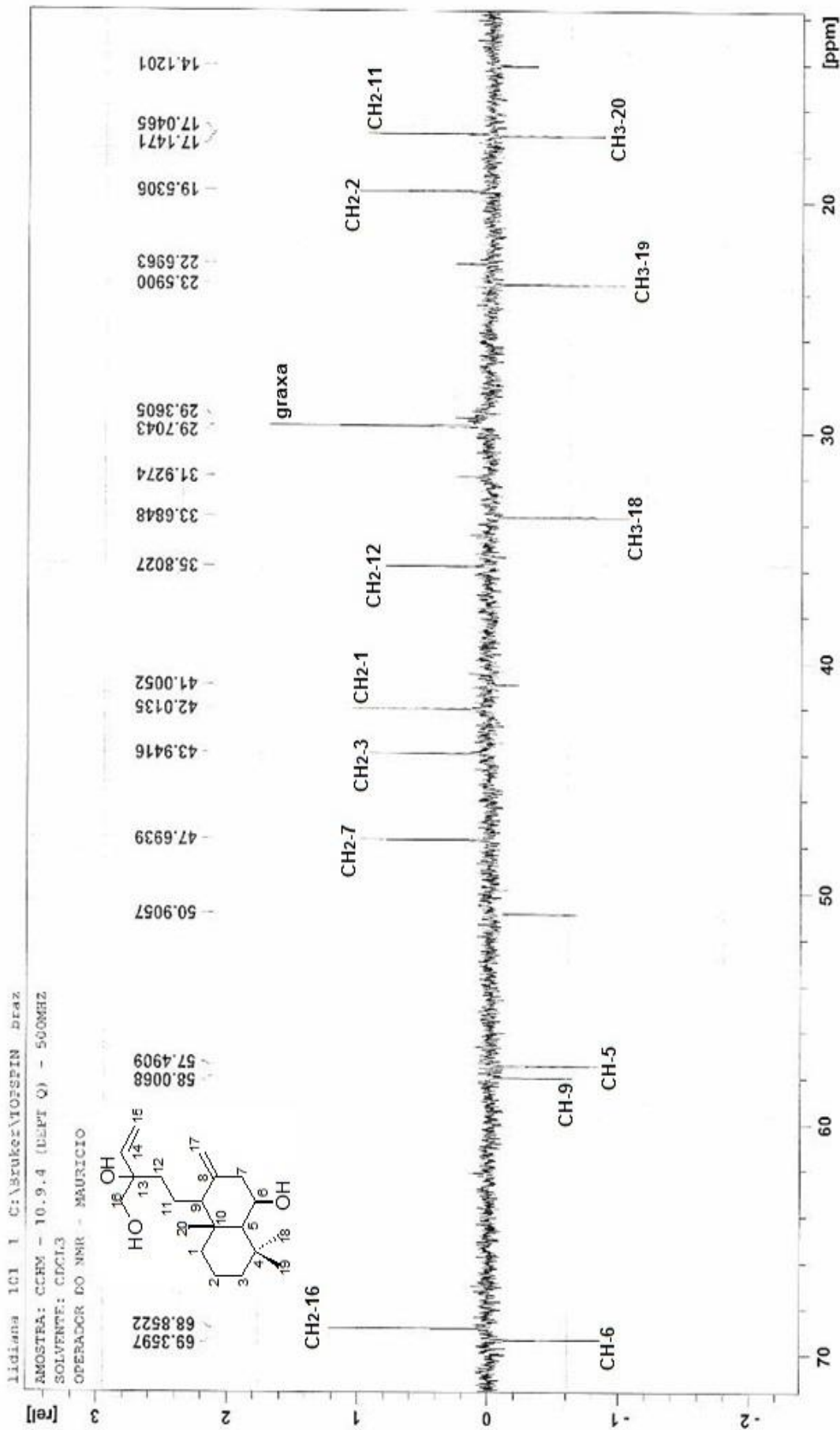


Figura 67: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ 72,0 e 12,0 ppm, do diterpeno 16-hidroilarixol (10)

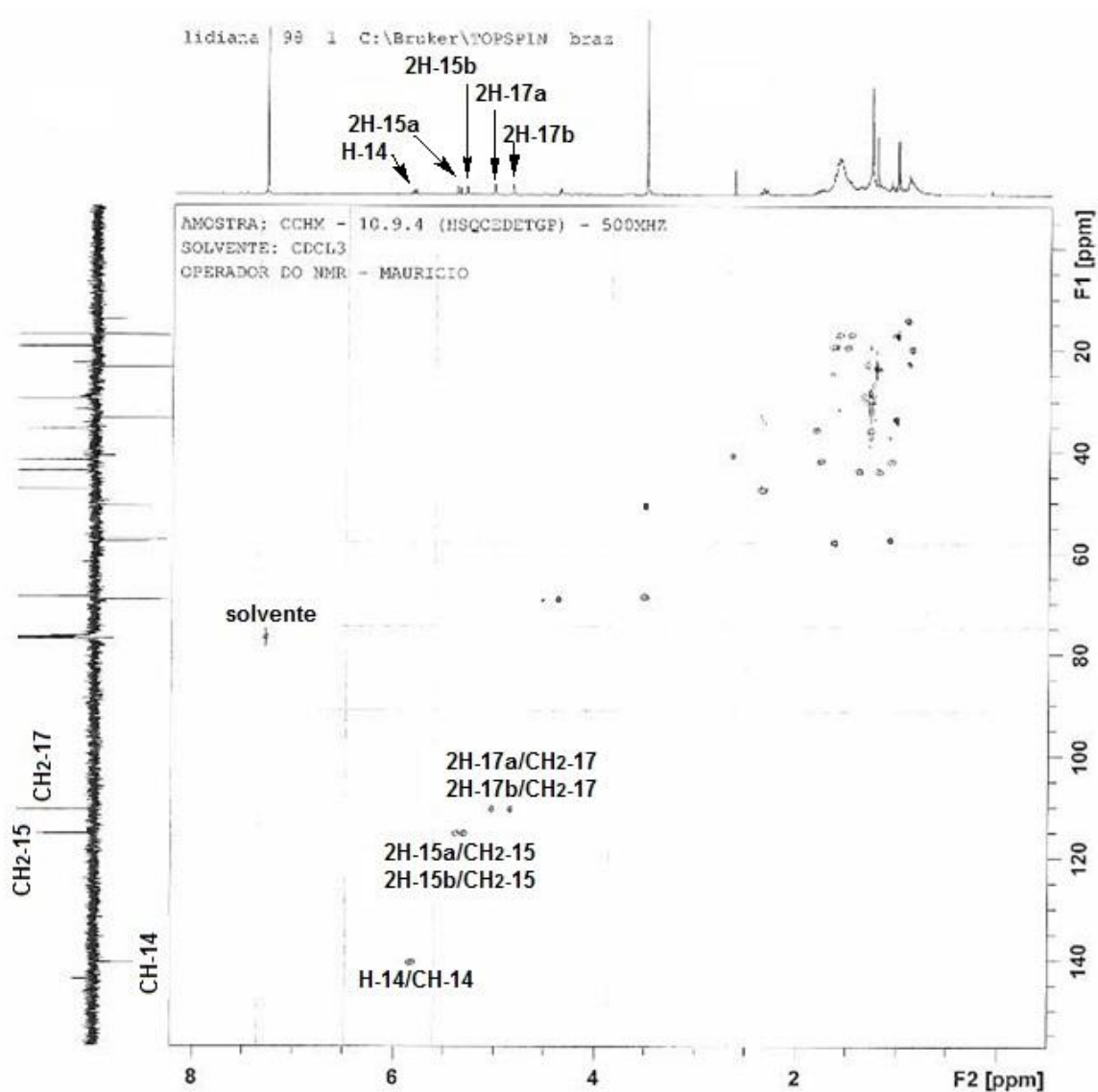
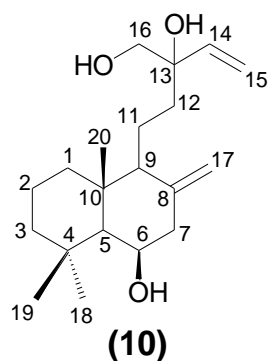


Figura 68: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno **16-hidroxiarixol (10)**.

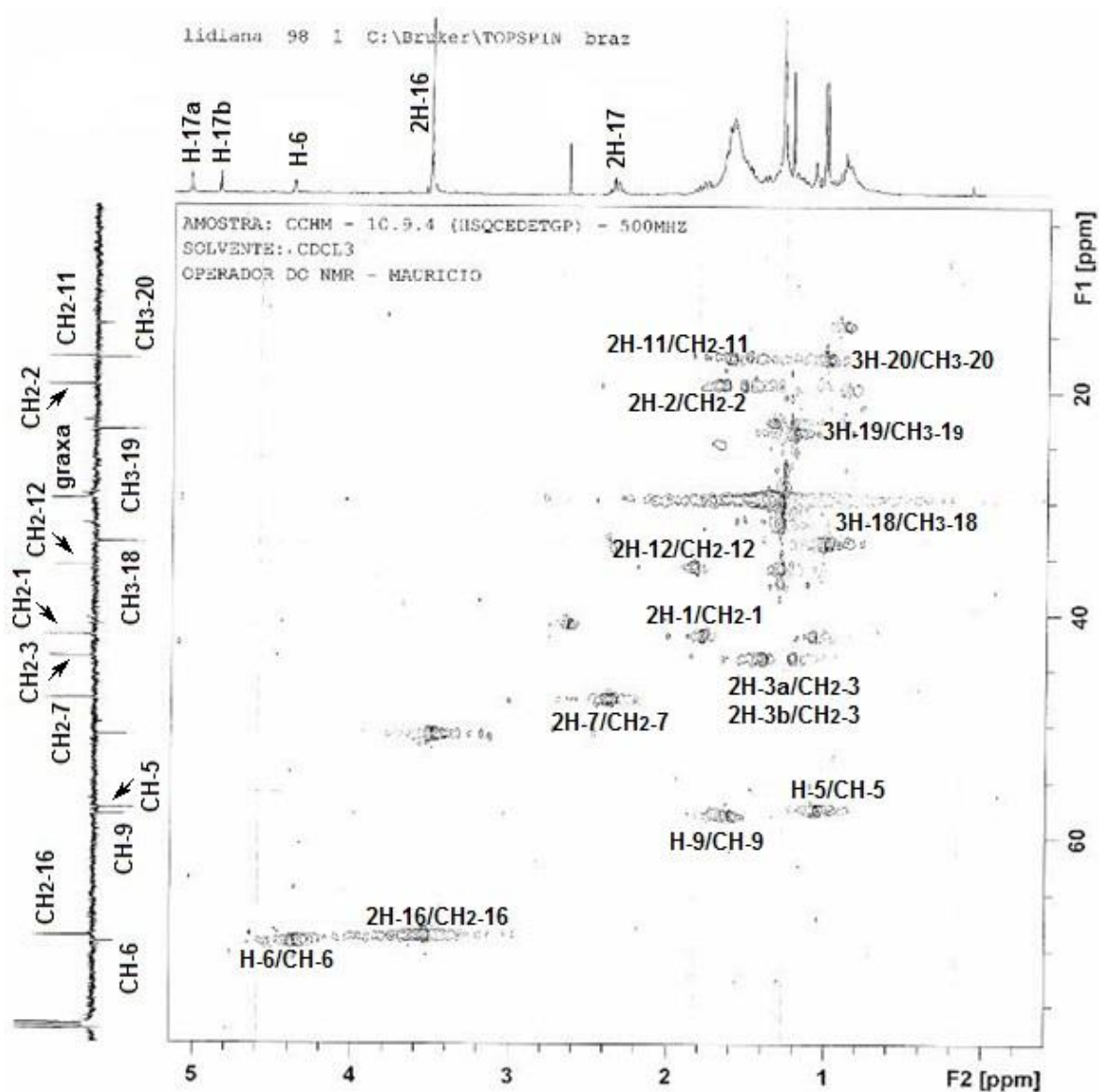
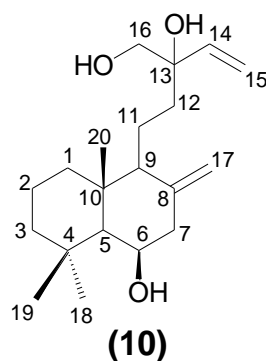


Figura 69: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno **16-hidroilarixol (10)**.

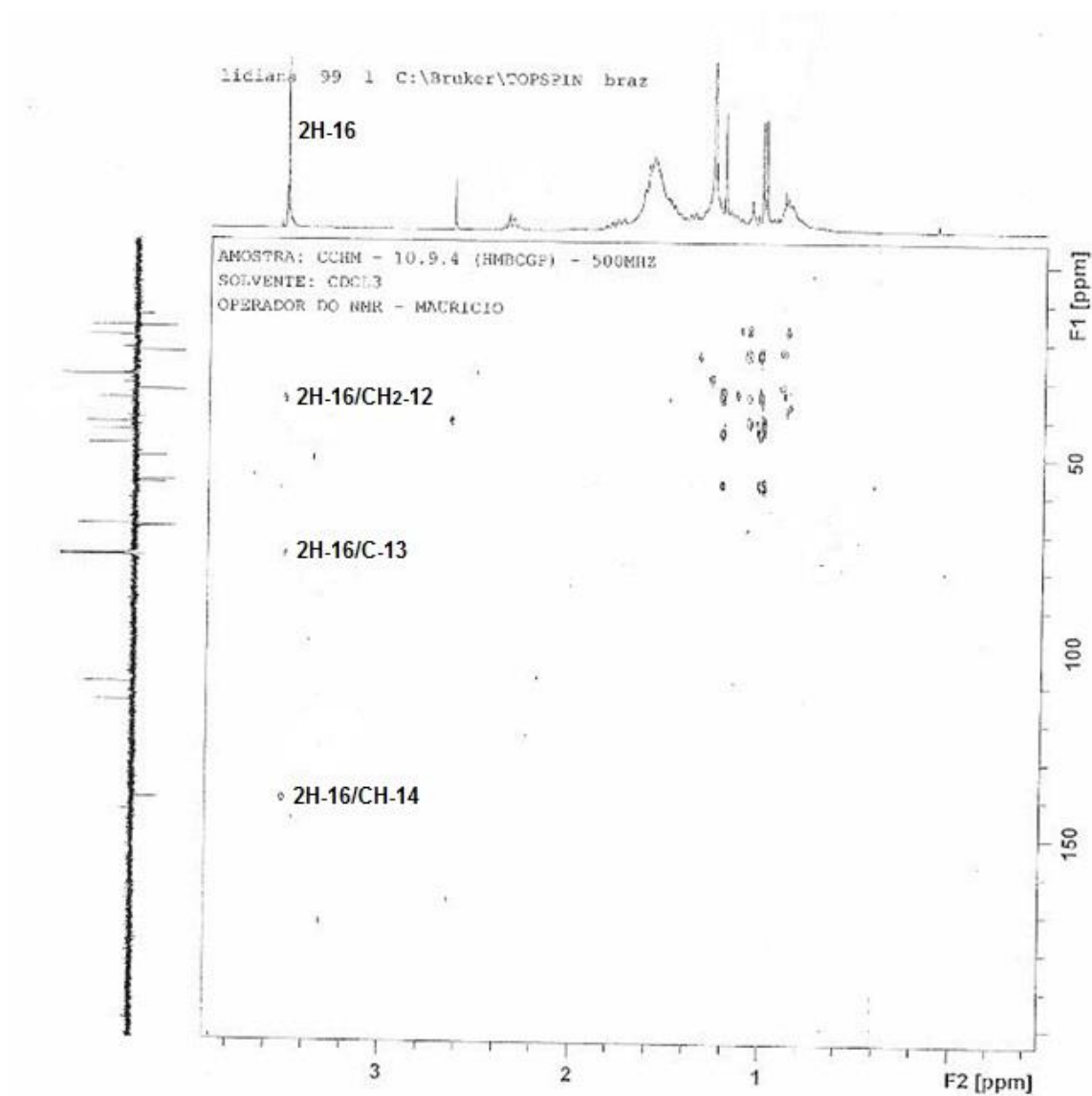
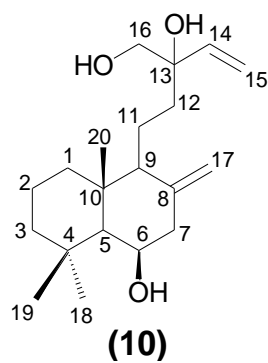


Figura 70: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxicilarixol (10)**.

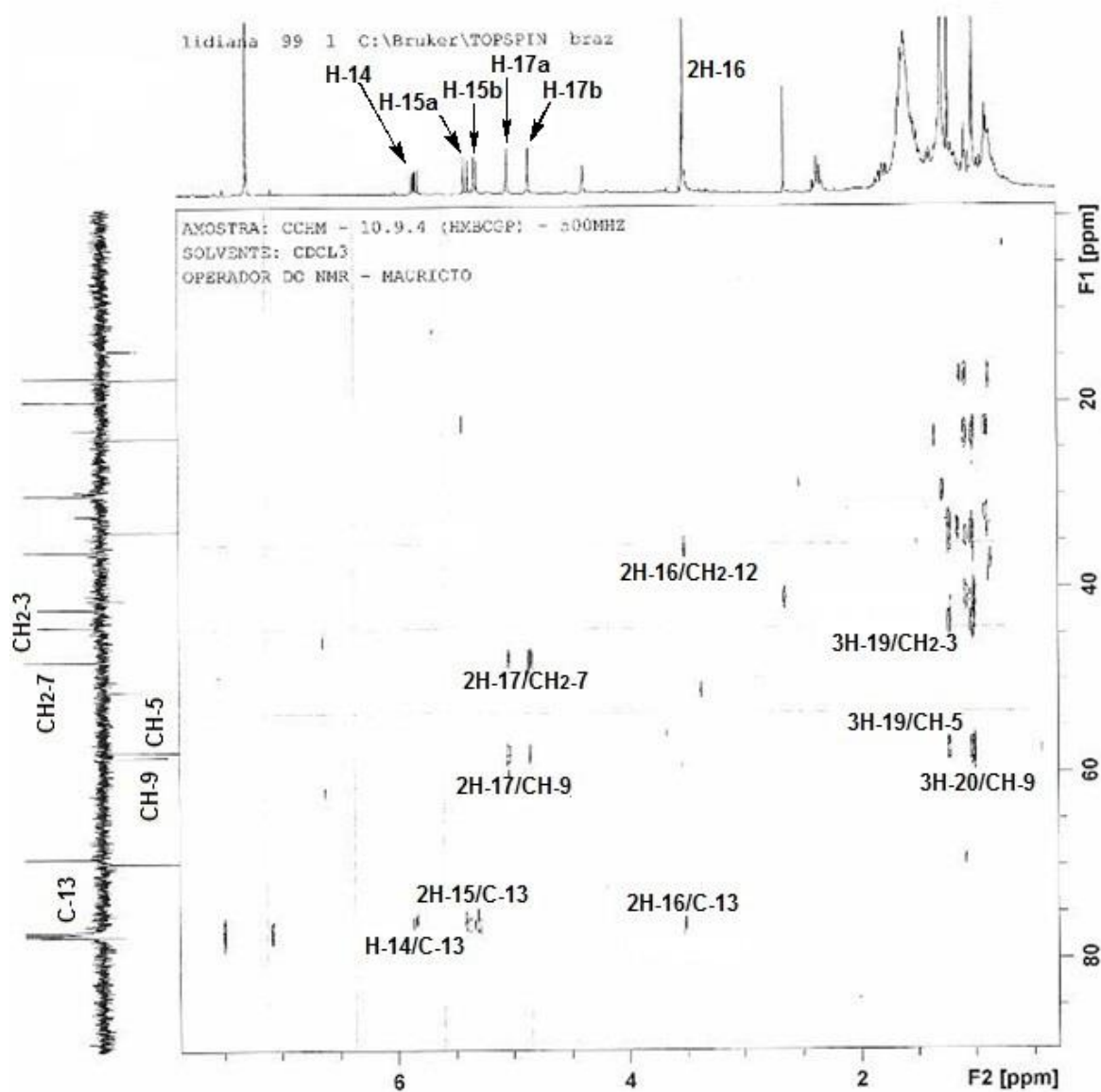
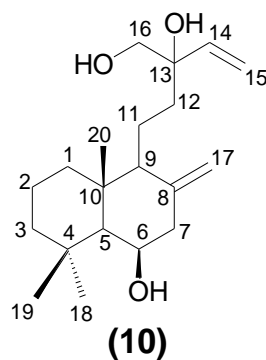


Figura 71: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroilarixol (10)**.

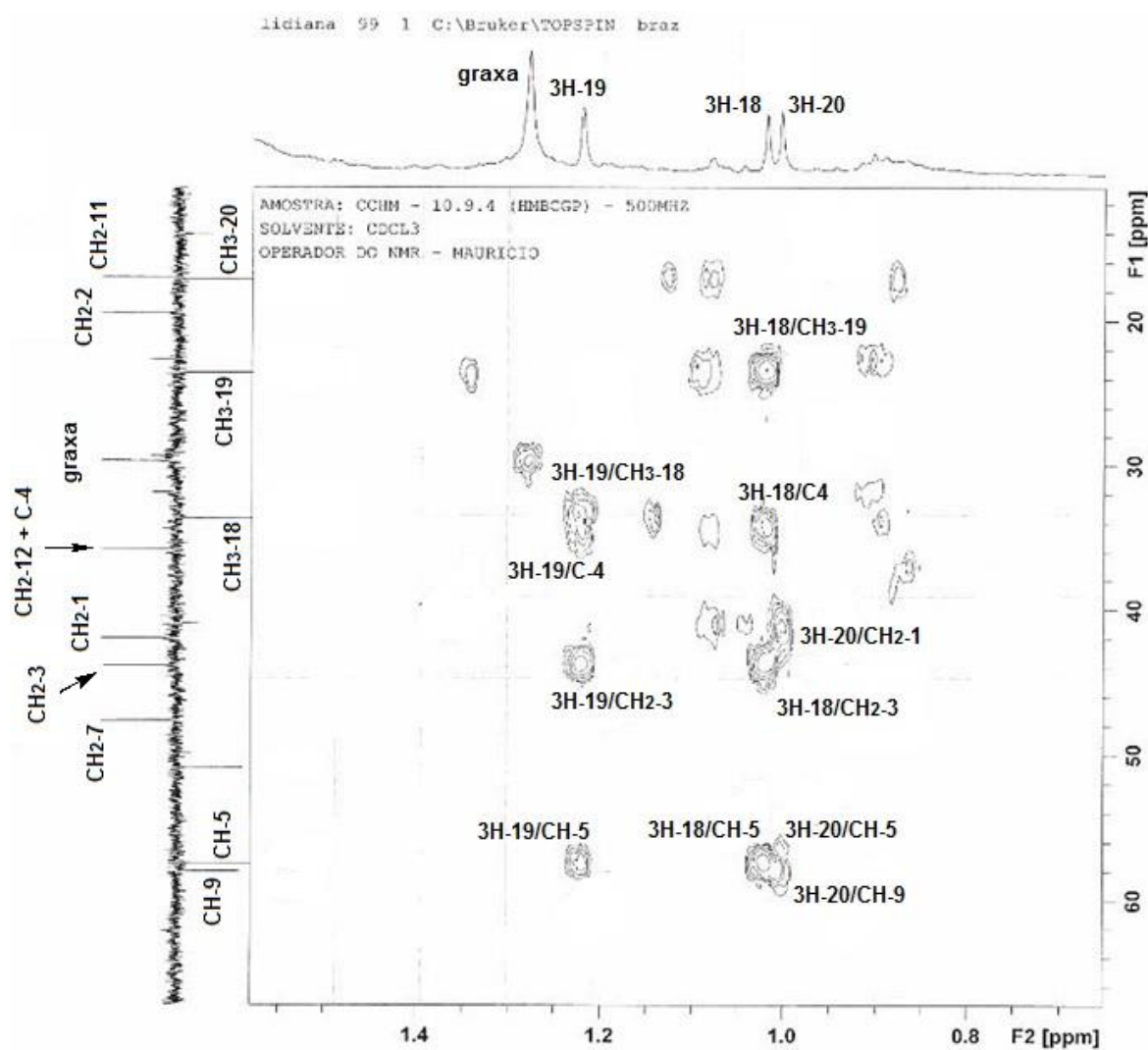
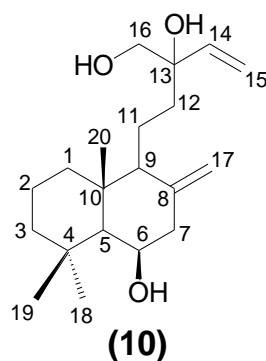
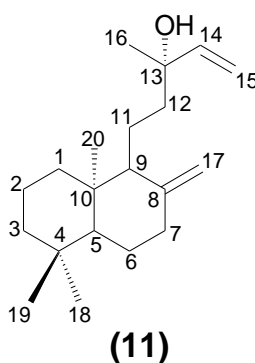


Figura 72: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxilarixol (10)**.

5.2.3.2 Elucidação estrutural das substâncias 11:



O tratamento cromatográfico da fração CCMM-2 resultou no isolamento da substância **11**, que se apresentou como um óleo de coloração amarelo claro e com solubilidade em CH_2Cl_2 (**Esquema 5**, página 39).

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 74, 75 e 76** páginas 103, 104 e 105) apresentou perfil semelhante com da substância **10**, com presença de sinais característicos de um grupo vinilidina em δ_{H} 5,93 (*dd*, 17,1; 10,6 Hz; H-14); 5,08 (*d*, 10,6 Hz, H-15a) e 5,23 (*d*, 17,1 Hz, H-15b), sendo confirmados após análise do experimento de ^1H - ^1H -COSY (**Figura 77, 78 e 79**, páginas 106, 107 e 108) o qual exibiu o acoplamento entre tais sinais.

Além disso, foi possível confirmar também a presença de uma ligação dupla exocíclica com sinais em δ_{H} 4,82 (*s*) H-17a e δ_{H} 4,49 (*s*) H-17b, o que caracteriza uma estrutura da classe dos diterpenos labdanos (Buckwalter e colaboradores, 1975; Zhang e colaboradores, 2013).

Os quatro sinais simples em δ_{H} 1,29 (3H-16); 0,89 (3H-18); 0,82 (3H-19) e 0,69 (3H-20) foram atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos, os assinalamentos foram sustentados pelo experimento $^1J_{\text{HC}}$ HSQC (**Figura 82, 83 e 84**, páginas 111, 112 e 113), que exibiu correlação heteronuclear desses sinais com os carbonos CH_3 -16 em δ_{CH_3} 28,1; CH_3 -18 em δ_{CH_3} 33,7; CH_3 -19 em δ_{CH_3} 21,7 e CH_3 -20 em δ_{CH_3} 14,5.

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figuras 80 e 81**, páginas 109 e 110) exibiu perfil semelhante da substância **10**, que além dos sinais atribuídos aos carbonos metílicos já relatados, exibiu dois sinais de carbonos metilênicos sp^2 em δ_{CH_2} 111,6 (CH_2 -15), correlacionado com os sinais de hidrogênio em δ_{H} 5,08 (H-15a) e 5,23 (H-15b) no mapa de correlação heteronuclear HSQC, e 106,4 (CH_2 -17), que apresentou correlação com os sinais δ_{H} 4,82 H-17a e δ_{H} 4,49 H-17b, que corroboram a presença do grupo vinilidina, juntamente com o sinal de carbono

metínico sp^2 CH-14 em δ_{CH} 145,2, e da ligação dupla exocíclica na estrutura respectivamente. O espectro exibiu também um sinal de carbono sp^3 não hidrogenado característico de carbono carbinólico em δ_C 73,7. O assinalamento deste sinal ao carbono C-13 foi estabelecido após análise do experimento $^2J_{HC}$ e $^3J_{HC}$ apresentado no mapa de correlação heteronuclear HMBC, o qual exibiu correlação dos hidrogênios H-14 em δ_H 5,93; 3H-16 em δ_H 1,29 e 2H-15 em δ_H 5,23 e 5,08 com o carbono C-13 em δ_C 73,7 (**Figura 85**, página 114) além de comparação com modelos na literatura (Buckwalter e colaboradores, 1975). As demais correlações estão ilustradas na **tabela 21**, página 102 e **86**, página 115.

A análise da substância por CG-EM exibiu um pico com tempo de retenção de 13,87 min. O espectro de massas de baixa resolução exibiu um pico em M^+ 290 Dalton (**Figura 73**) referente ao íon molecular, sugerindo como fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$, com quatro graus de insuficiência de hidrogênios. As propostas de fragmentação que justificam a fórmula estrutural estão apresentadas no **Esquema 16**, página 101.

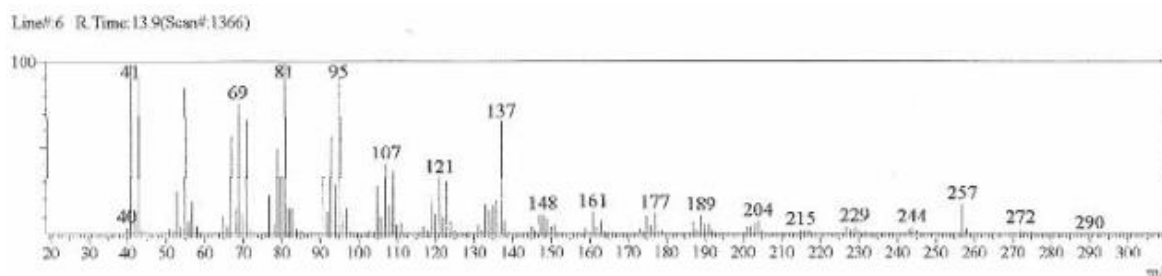
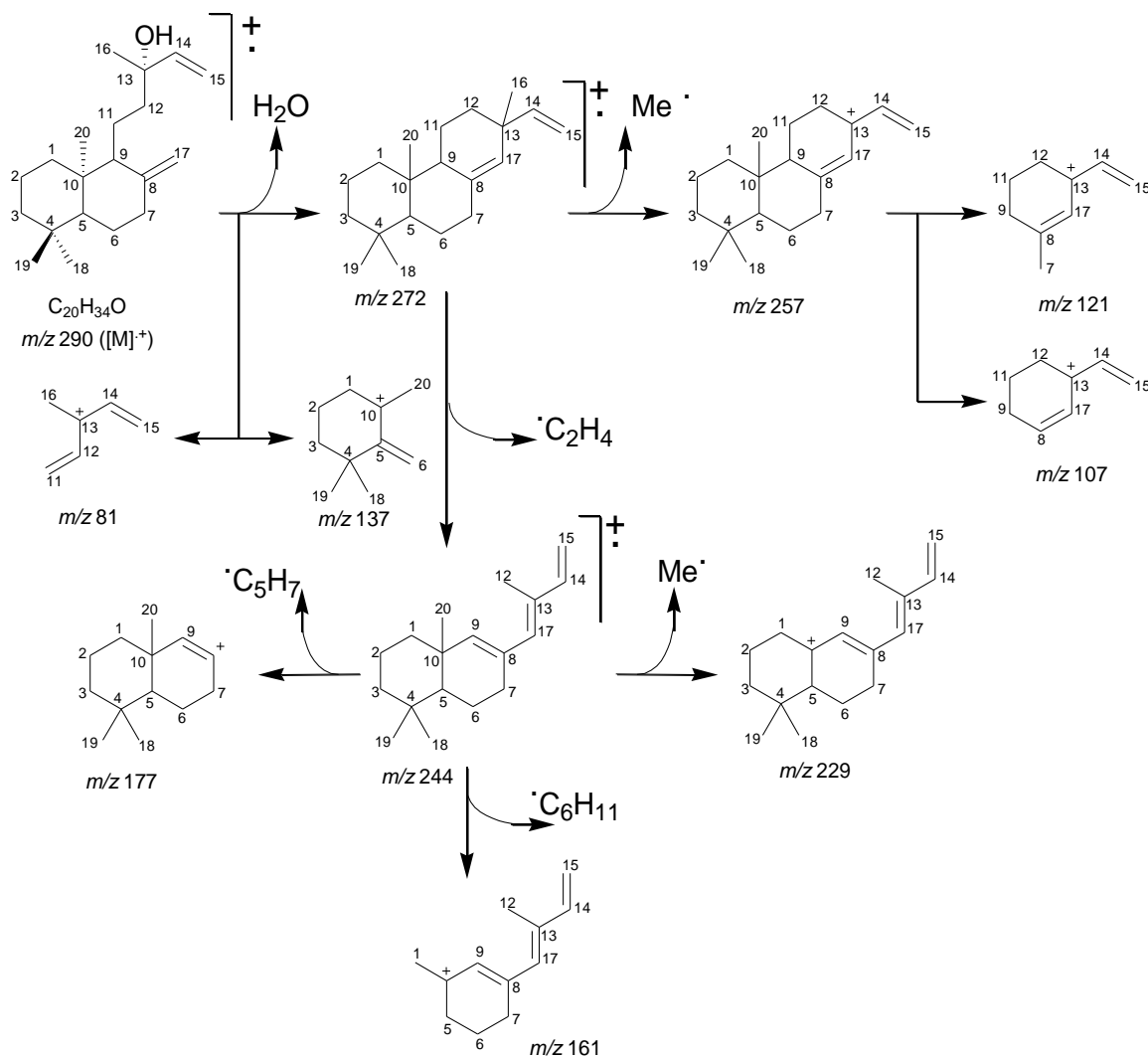


Figura 73: Espectro de Massas 70 eV do diterpene **Manool (11)**.



Esquema 16: Proposta para fragmentação do diterpeno **Manool (11)**.

A análise do conjunto de dados e comparação com modelos na literatura possibilitou elucidar a substância **11** como um diterpeno labdano conhecido na literatura como Manool (Buckwalter e colaboradores, 1975) sendo isolado pela primeira vez no gênero *Conchocarpus*.

Tabela 21: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **11** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da literatura para o diterpeno manool **Mo-04**.

Substância (11)					Mo-04
HSQC			HMBC		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}
1	38,4			3H-20	39,0
2	19,1				19,3
3	42,2			3H-18; 3H-19	42,1
4	33,6	-	3H-18; 3H-19		33,5
5	55,6	1,52 (<i>m</i>)		3H-18; 3H-19; 3H-20	55,5
6	24,5				24,4
7	39,1			2H-17	38,3
8	148,8	-			148,4
9	57,2	1,55 (<i>m</i>)		2H-17; 3H-20	57,2
10	37,3	-	3H-20		39,8
11	17,7				17,6
12	41,1			3H-16	41,3
13	73,7	-	H-14; 3H-16	2H-15	73,4
14	145,2	5,93 (<i>dd</i> , 17,1; 10,6)	2H-15	3H-16	144,9
15	111,6	5,23 (<i>d</i> , 17,1) 5,08 (<i>d</i> , 10,6)			111,4
16	28,1	1,29 (<i>s</i>)		H-14	27,9
17	106,4	4,82 (<i>sl</i>) 4,49 (<i>sl</i>)			106,2
18	33,7	0,89 (<i>s</i>)		3H-19	33,5
19	21,7	0,82 (<i>s</i>)		3H-18	21,7
20	14,5	0,69 (<i>s</i>)			14,4

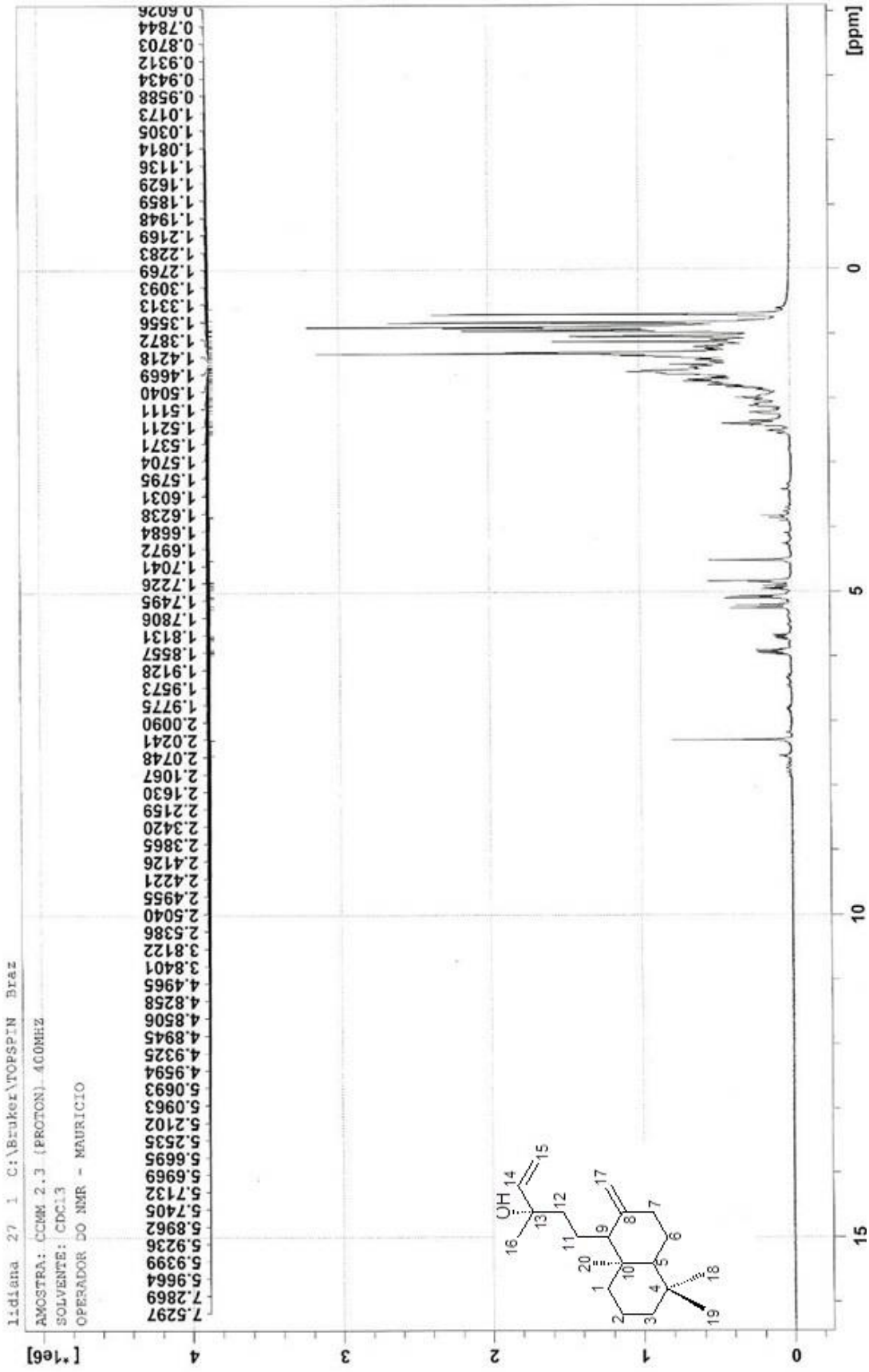


Figura 74: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do diterpene manool (11).

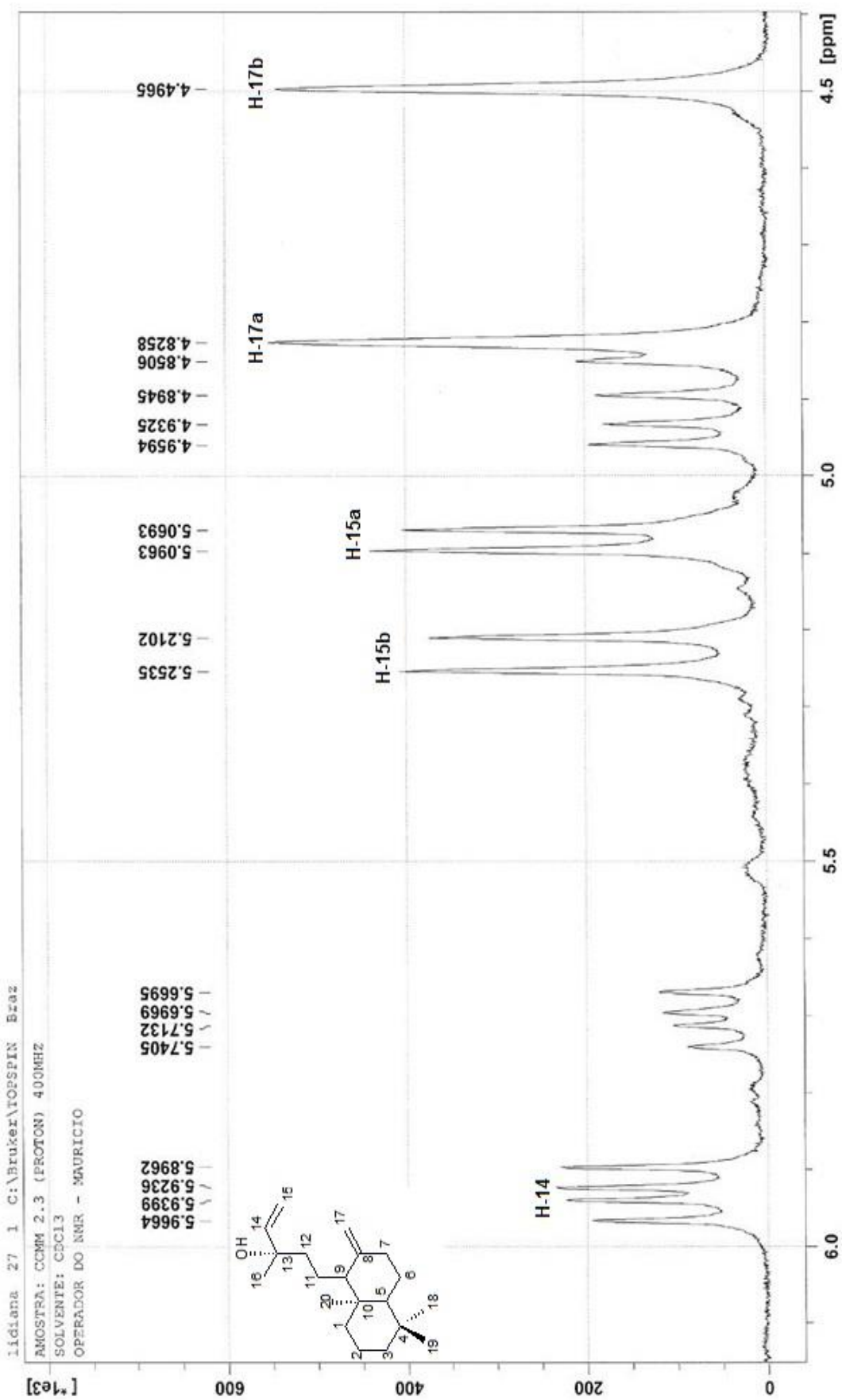


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 6,2 e 4,4 ppm, do diterpeno manool (11).

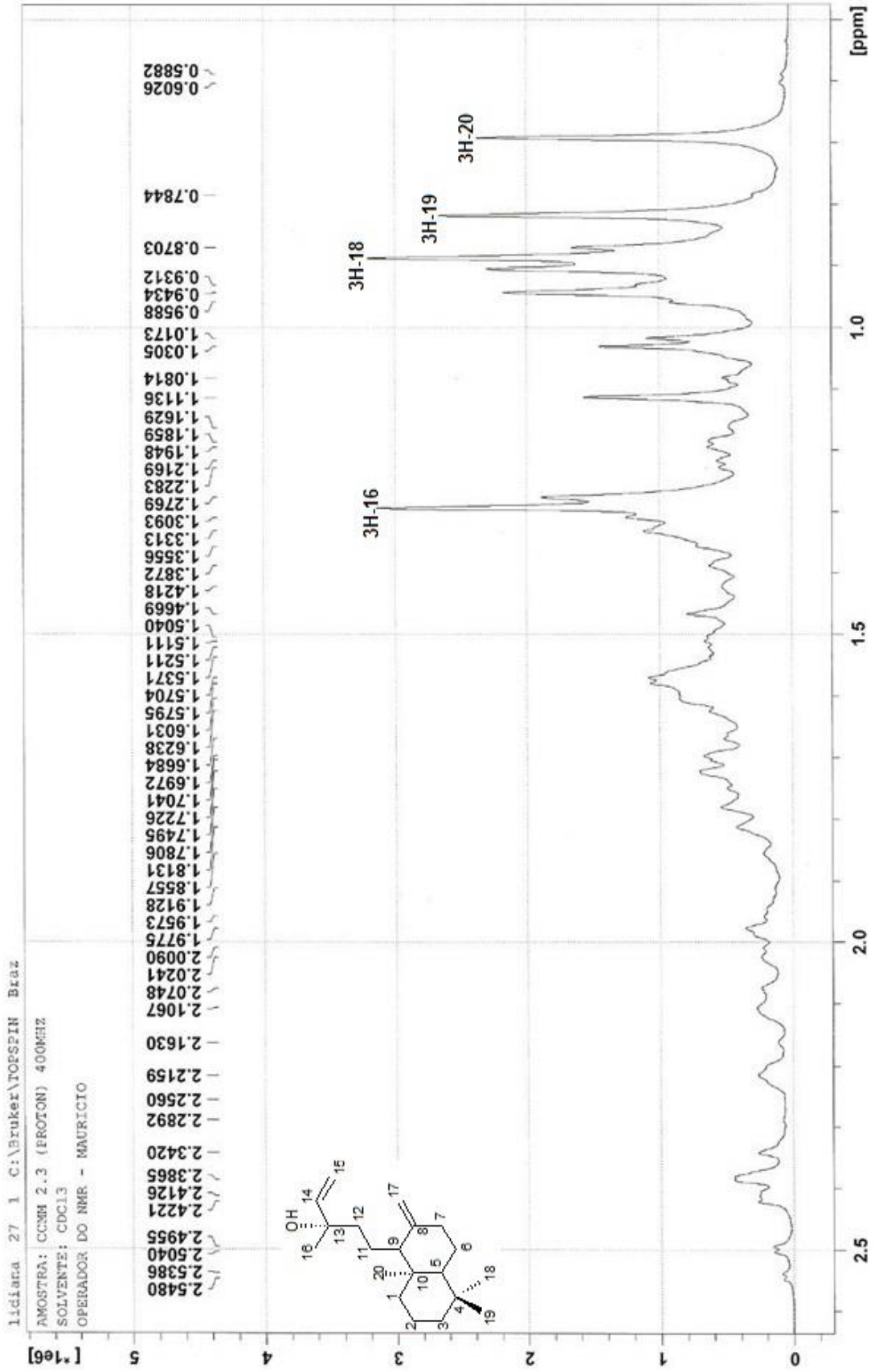


Figura 76: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ_H 2,6 e 0,0 ppm, do diterpene manool (11).

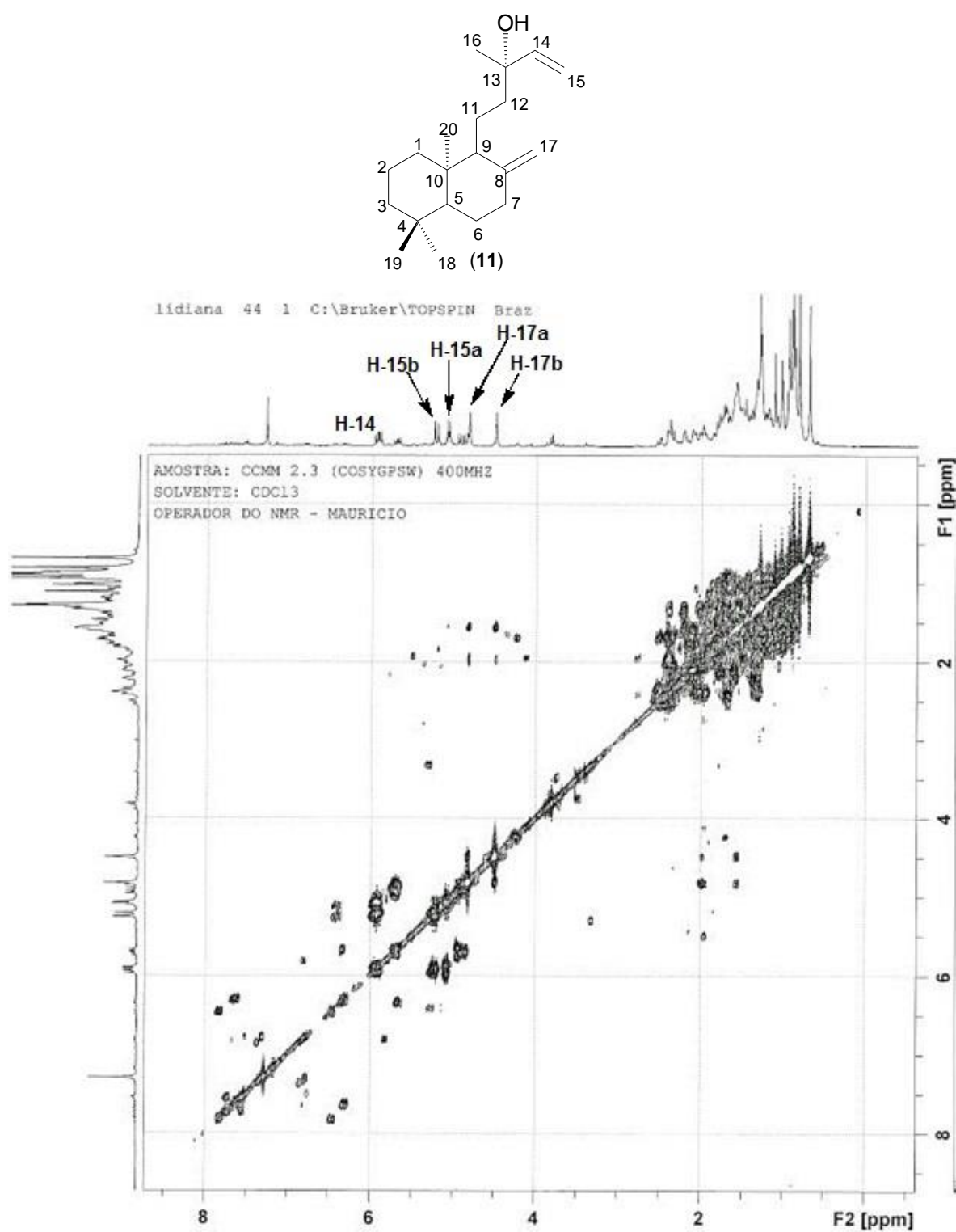


Figura 77: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno **manool** (11).

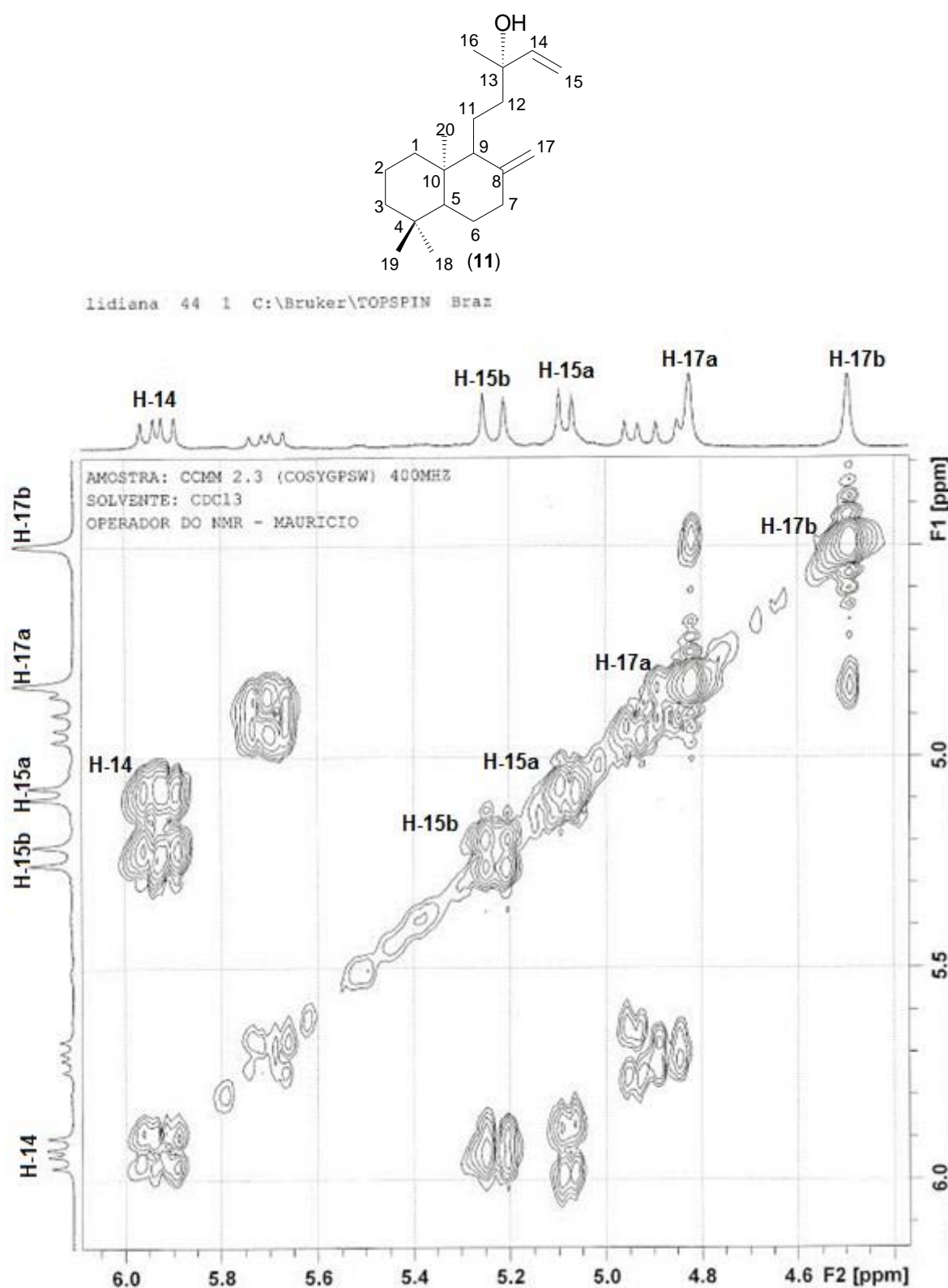


Figura 78: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 6,05 e 4,40 ppm, do diterpeno **manool** (11).

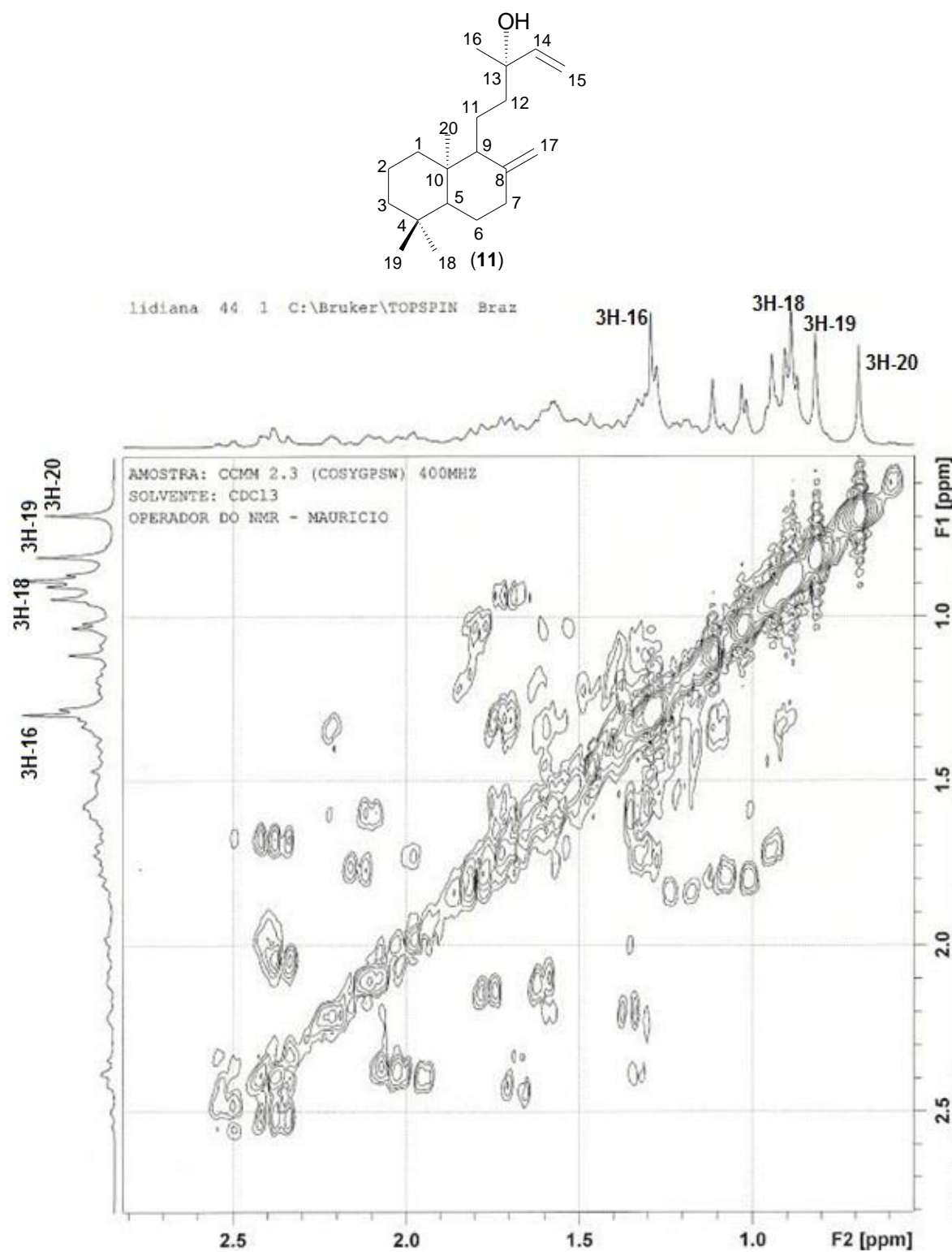


Figura 79: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 2,80 e 0,00 ppm, do diterpeno **manool** (11).

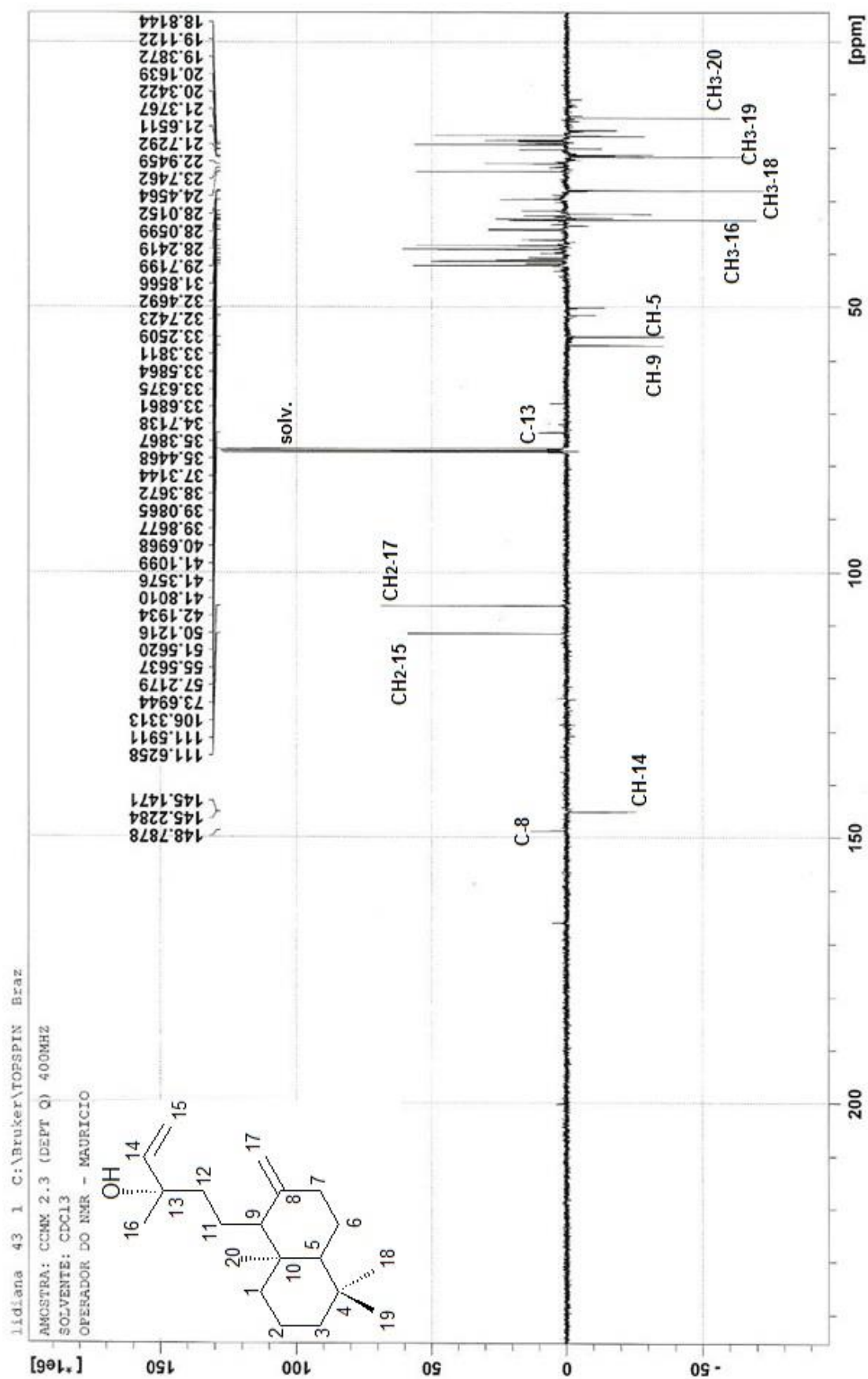


Figura 80: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do diterpene manool (11).

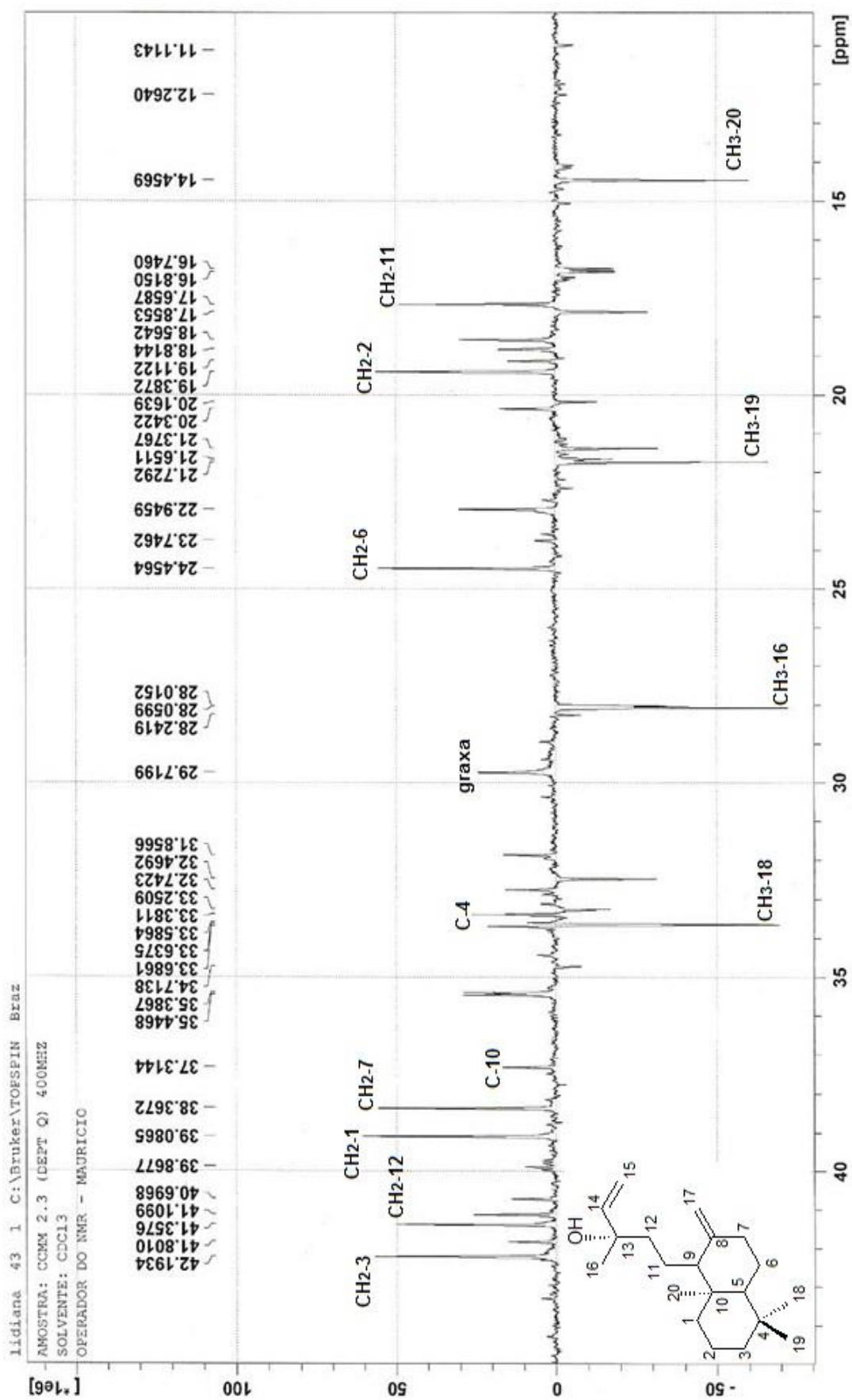


Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ 45,0 e 10,0 ppm, do diterpene manool (11).

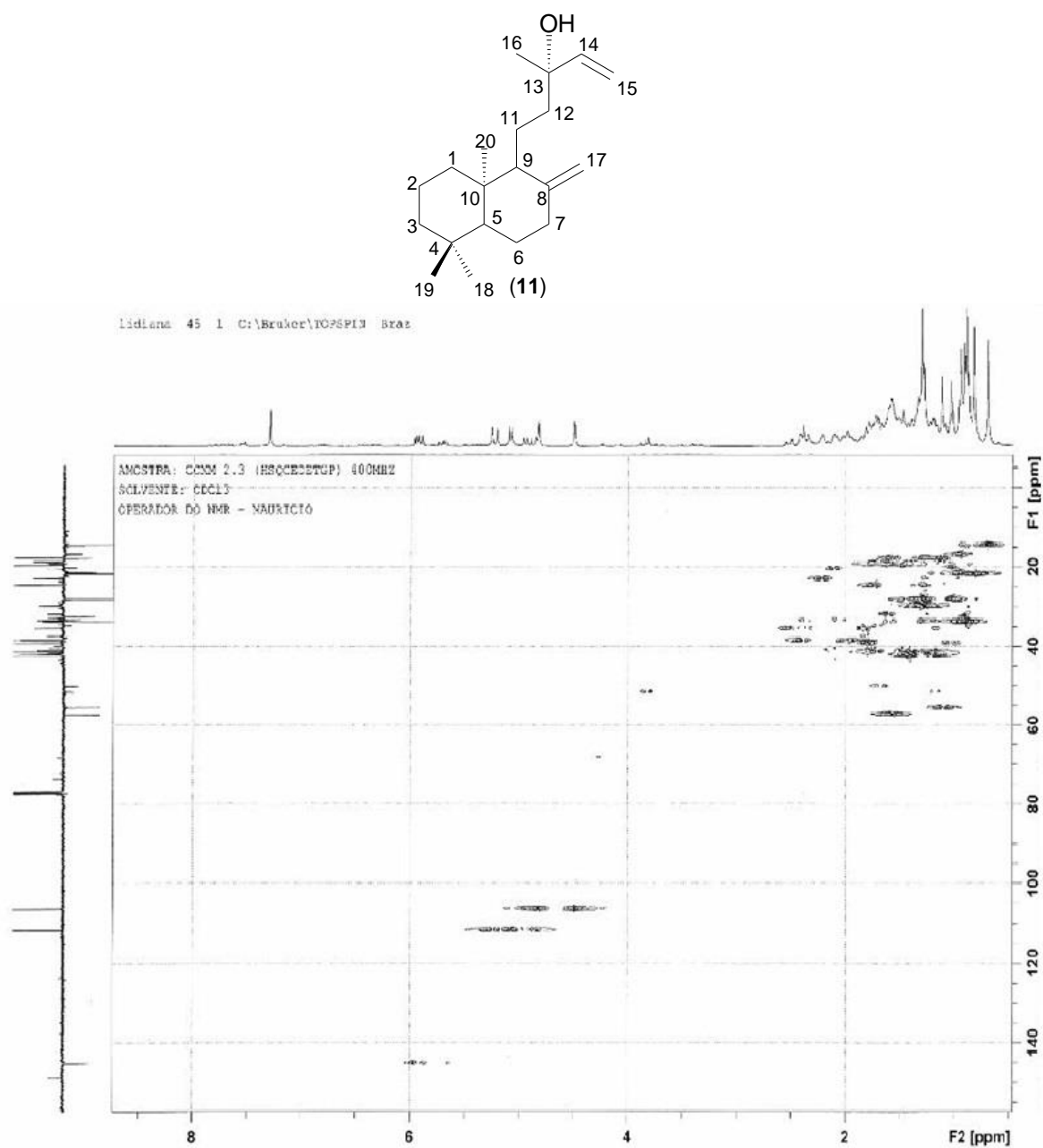


Figura 82: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno **manool** (11).

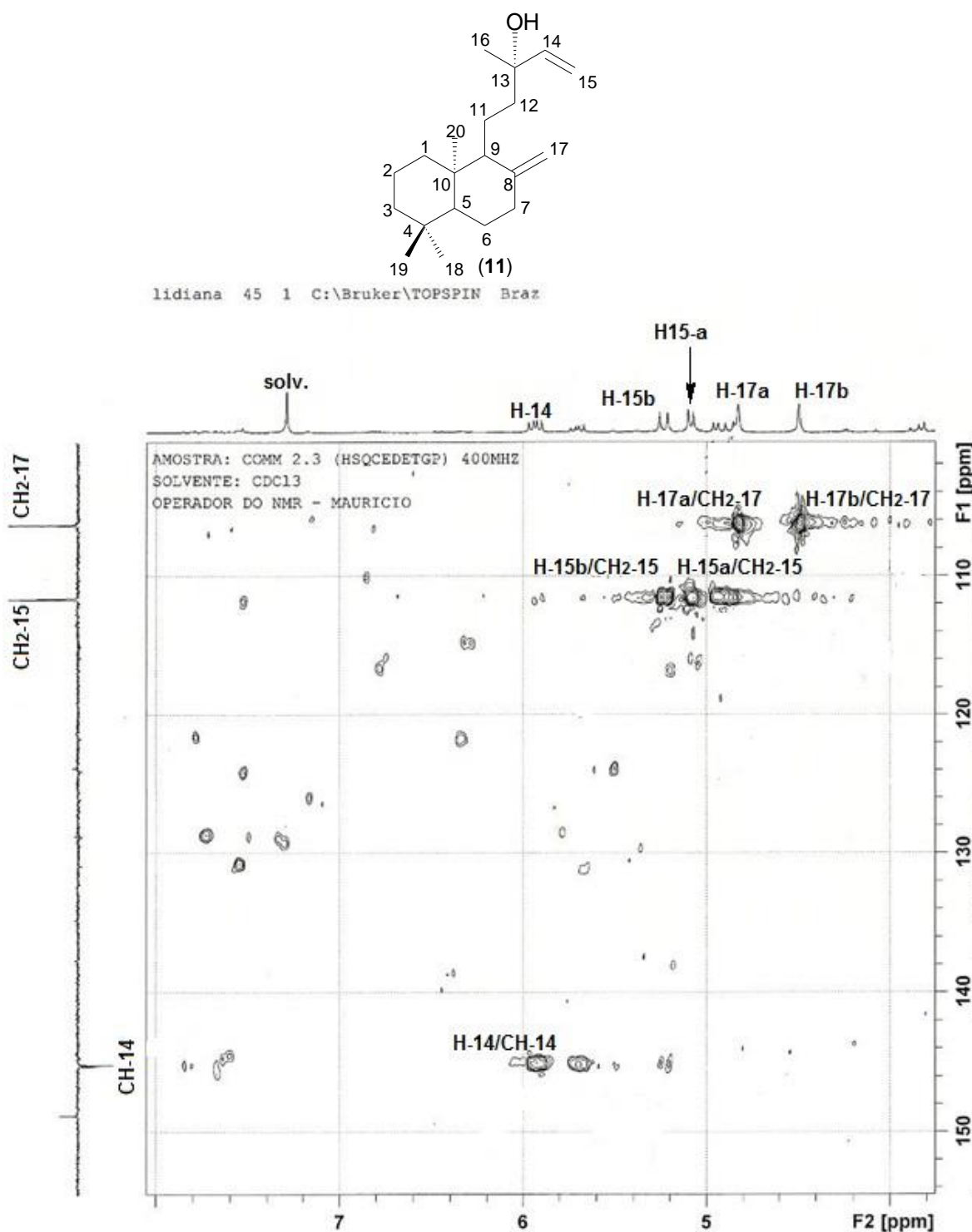


Figura 83: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpene **manool** (11).

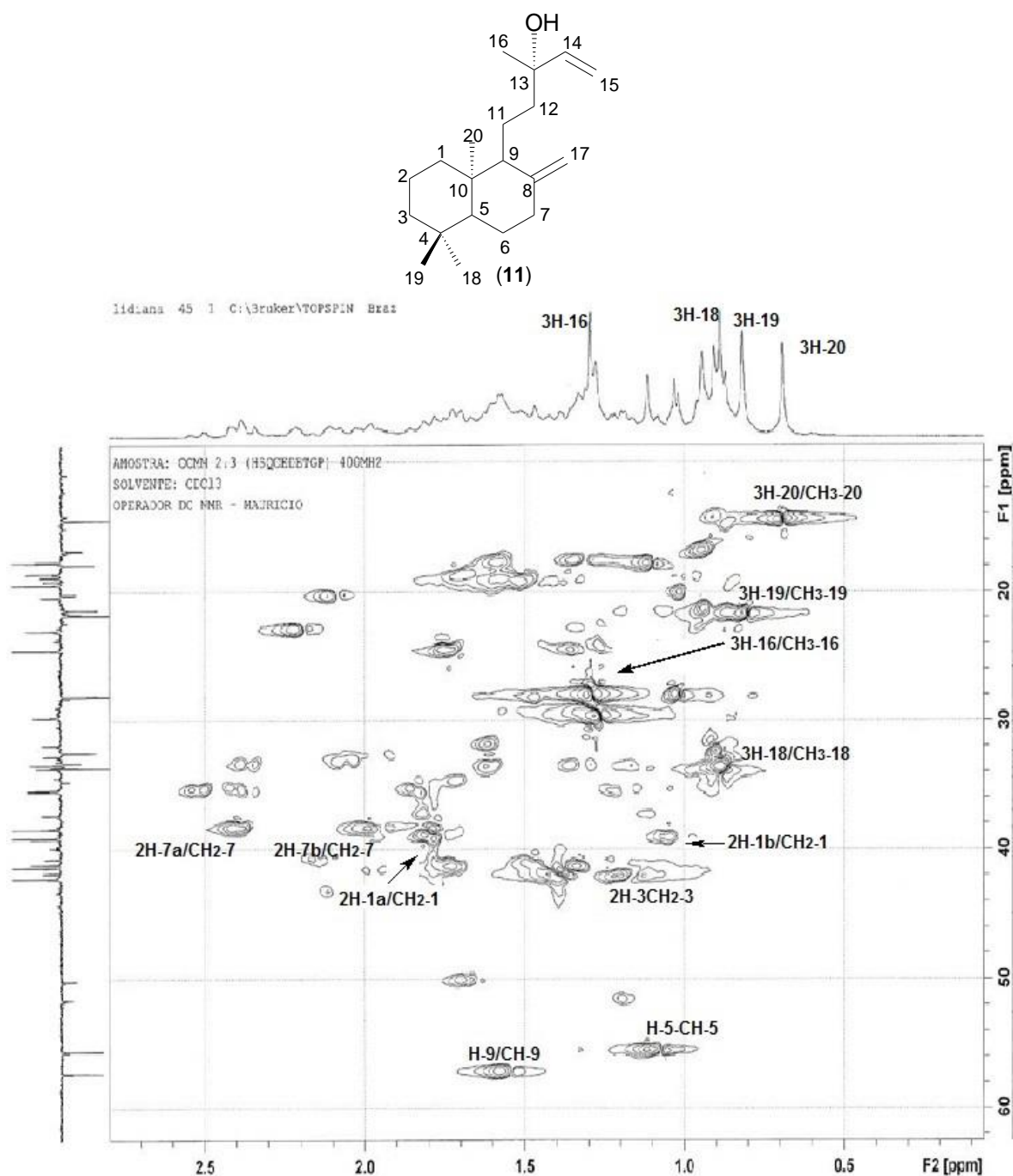


Figura 84: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpene **manool** (11).

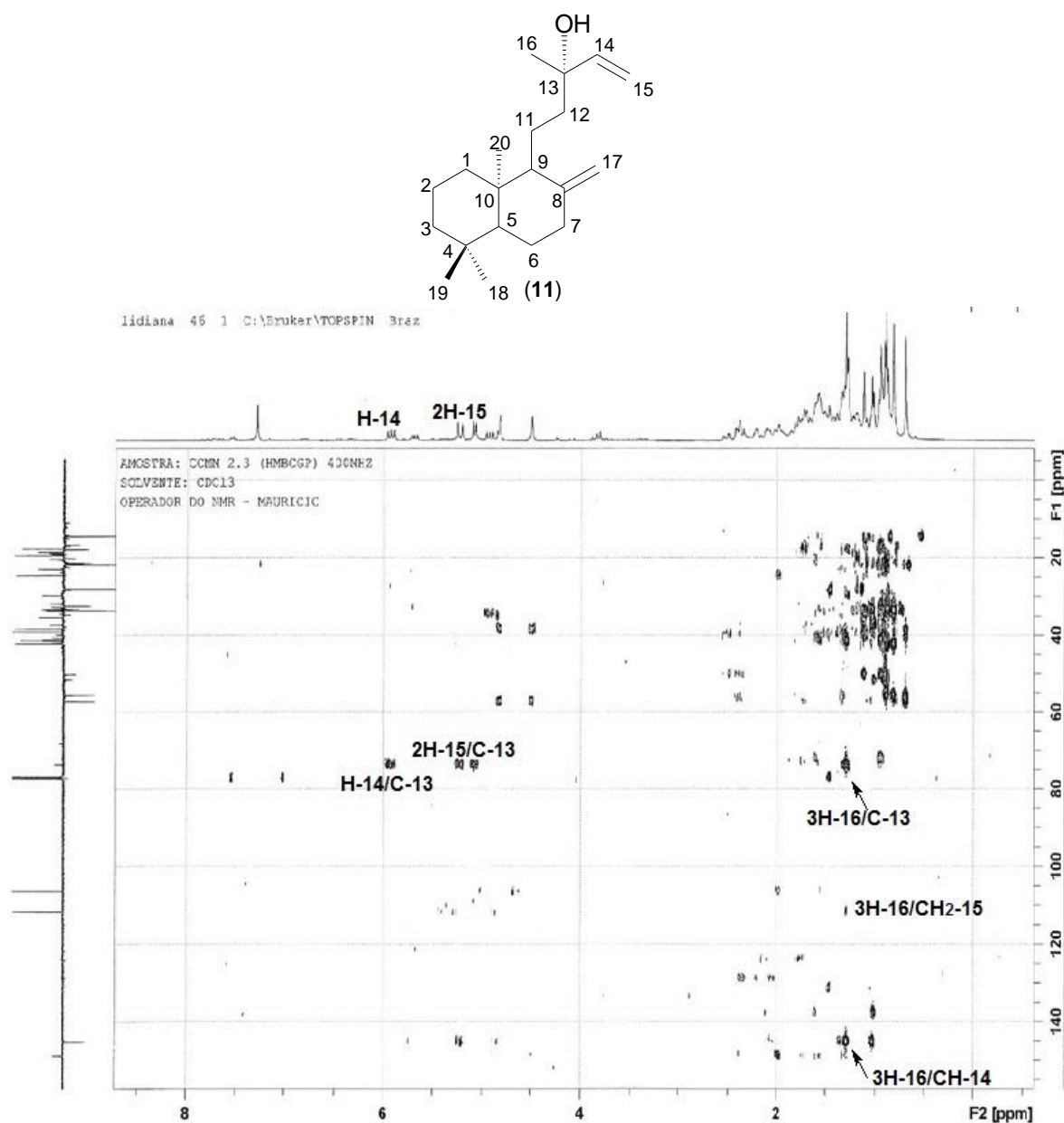


Figura 85: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl_3) do diterpene **manool** (11).

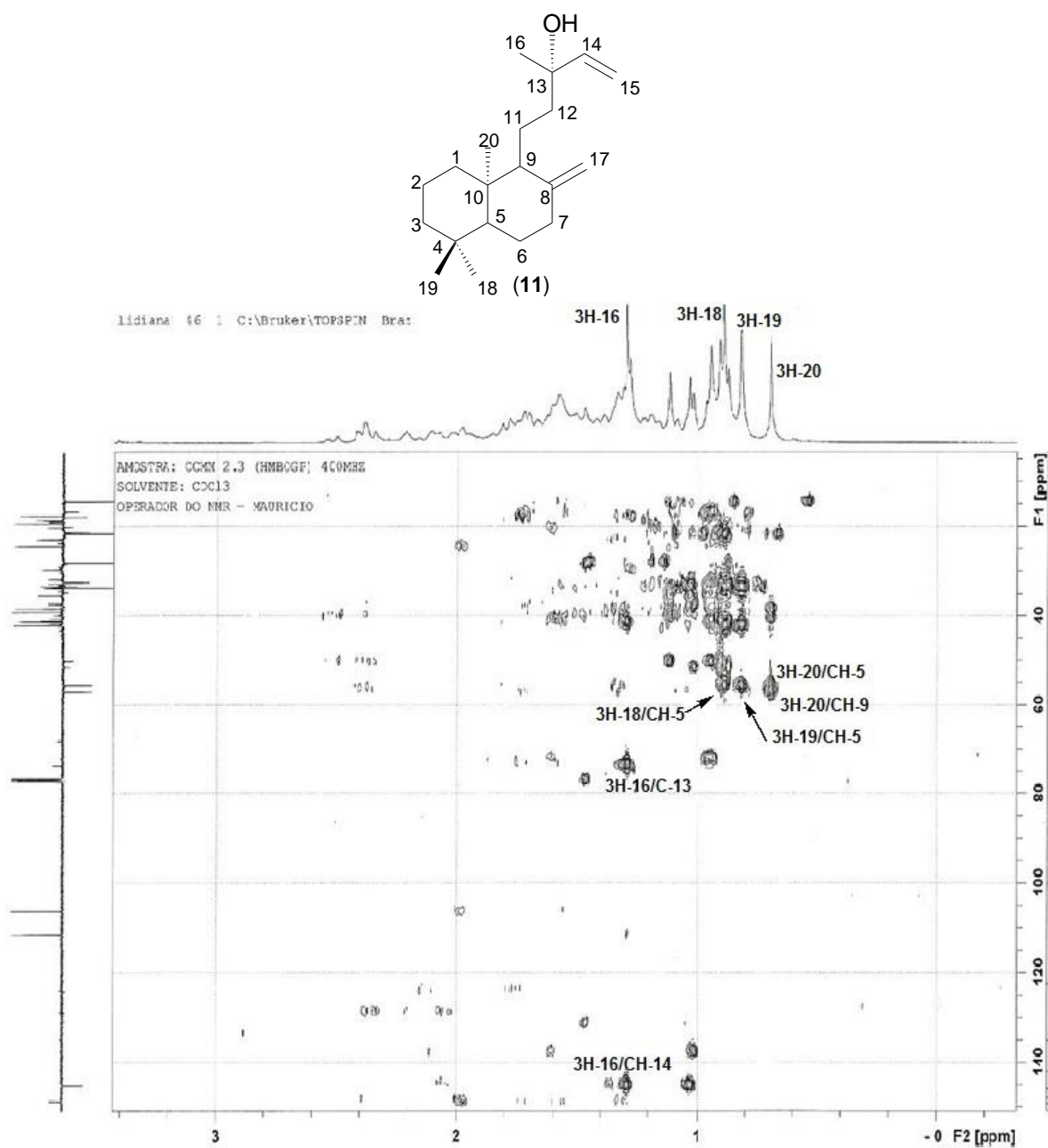
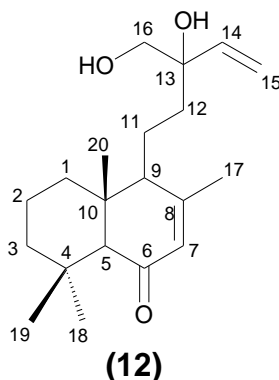


Figura 86: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpene **manool** (11).

5.2.3.3 Elucidação estrutural das substâncias 12:



A substância **12** foi isolada após tratamento cromatográfico da fração CCHM-11.3 fornecendo 2,3 mg de óleo de coloração incolor solúvel em CH₂Cl₂ (**Esquema 3**, página 32)

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 89, 90 e 91**, páginas 119, 120 e 121) apresentou três sinais simples em δ_H 1,15 (3H-18); 1,18 (3H-19) e 0,86 (3H-20) compatíveis com estrutura de diterpenos. O espectro exibiu também dois sinais em δ_H 5,42 (*dd*, 17,4; 1,2 Hz, H-15b) e 5,36 (*dd*, 10,8; 1,2 Hz, 2H-15a) característico de sistema vinilidina. O experimento ¹H-¹H-COSY (**Figura 92 e 93**, páginas 122 e 123) sustenta a proposta ao exibir acoplamento entre os sinais.

Os sinais em δ_H 3,53 (*d*, 10,9 Hz, H-16a) e 3,57 (*d*, 10,9 Hz, H-16b) acoplados no experimento ¹H-¹H-COSY e correlacionados com o sinal em δ_{CH_2} 68,77 no experimento HSQC (**Figura 96 e 97**, páginas 126 e 127), confirmam a presença de carbono carbinólico na estrutura.

A presença de um grupo carbonila na estrutura foi estabelecida após análise do experimento heteronuclear ²J_{HC} e ³J_{HC} HMBC (**Figura 98, 99 e 100**, páginas 128, 129 e 130), que exibiu correlação do hidrogênio em δ_H 2,05 (*s*) (H-5) com o carbono em δ_C 200,00 (C-6). O sinal em δ_{CH} 63,60 (CH-5) observado no espectro de RMN de ¹³C DEPTQ (**Figura 94 e 95**, páginas 124 e 125) e correlacionado com o hidrogênio em δ_H 2,05 (*s*) (H-5) no experimento HSQC confirma a presença de carbono α à carbonila.

O espectro de RMN de ¹³C DEPTQ (**Figura 94 e 95**, páginas 124 e 125) exibiu também dois sinais característicos de carbonos *sp*² em δ_{CH} 128,57 (CH-7) correlacionado no experimento HSQC com o sinal em 5,77 (*m*) (H-7), e o sinal em δ_C 159,00 (C-8). A comparação com modelos na literatura (Buckwalter e colaboradores, 1975; Silveira e Pessoa, 2005) possibilitou assinalar a insaturação

conjugada à carbonila, uma vez que, o carbono carbonílico sofre proteção devido ao efeito mesomérico da conjugação e pelo mesmo efeito o carbono γ sofre desproteção (**Figura 87**).

A presença de um sinal em δ_H 1,95 (*t*, 1,4 Hz, 3H-17) correlacionado no experimento de HMBC com o sinal em δ_C 159,00 (C-8), carbono não hidrogenado, caracteriza um sistema alílico indicando um acoplamento de longo alcance 2J justificando a multiplicidade encontrada (Silverstein e Webster, 2000). Os demais deslocamentos e as correlações observadas nos espectros estão assinalados na **tabela 22**, página 118.

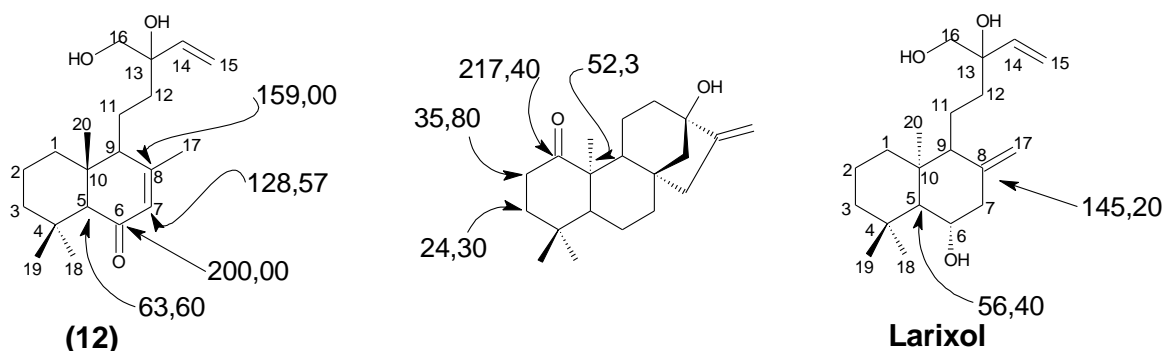


Figura 87: Efeito da conjugação sobre a carbonila.

O espectro de massas de baixa resolução EMBR (**Figura 88**), exibiu como pico referente ao íon molecular M^+ . 289, indicando a perda do radical ($\cdot\text{CH}_2\text{OH}$, $m=31$), justificando a proposta de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ ($\Delta m/z$ 320-31= 289 D). O pico base foi justificado através de um rearranjo do tipo retro Diels-Alder do fragmento m/z 219 (**Esquema 17**).

A análise do conjunto de dados e comparação com modelos na literatura conduziu a elucidação estrutural da substância **12** como sendo um novo diterpeno labdano denominado **16-hidroxi-7-labden-6-ona**.

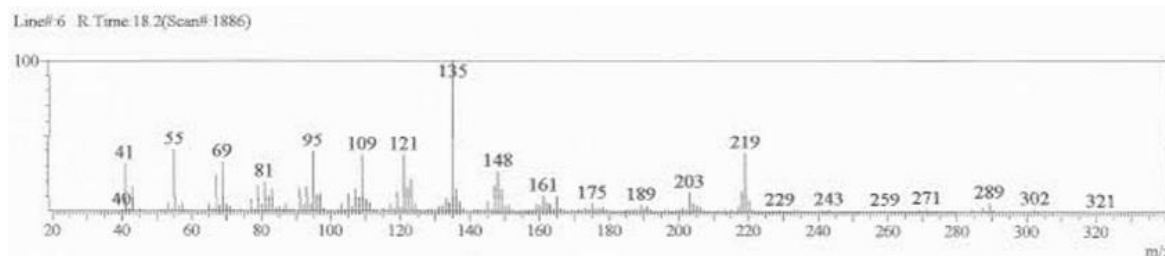
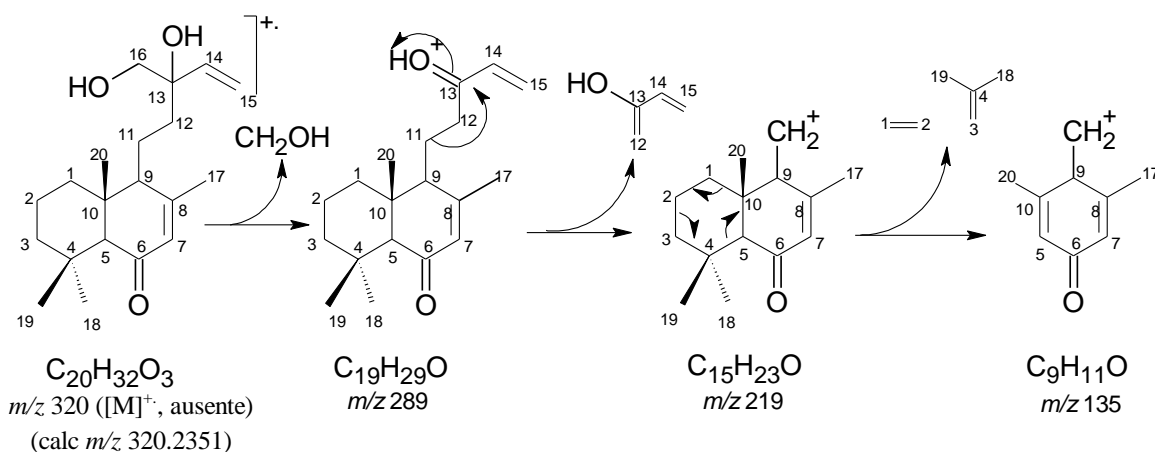


Figura 88: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno **16-hidroxi-7-labden-6-ona** (**12**).



Esquema 17: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroxi-7-labeden-6-ona (12)**.

Tabela 22: Dados de RMN de 1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **12**, em $CDCl_3$, correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da **16-hidroxiarixol**.

C	HSQC		HMBC		16-hidroxiarixol	
	δ_c	δ_H	$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$	δ_c	δ_H
1	39,2	1,90; 1,55		3H-20	42,0	1,78; 1,08
2	20,6	1,55			19,5	1,65; 1,50
3	43,2	1,40; 1,15		H-5; 3H-18; 3H-19	43,5	1,40; 1,20
4	32	-	H-5; 3H-18; 3H-19		35,8	-
5	63,6	2,05 (s)		3H-18; 3H-19; 3H-20	57,5	1,08 (m)
6	200	-	H-5		69,4	4,38 (s)
7	128,6	5,77 (m)		3H-17	47,7	2,85 (m)
8	159	-	3H-17		144,1	-
9	56,8	2,03 (m)		3H-17; 3H-20	57,9	1,70
10	43	-	H-5; 3H-20		37,6	-
11	18,2	1,60; 1,50			17,0	1,48; 1,45
12	38,8	1,90; 1,20			35,8	1,85; 1,60
13		-			75,4	-
14	140,4	5,84 (dd, 17,3; 10,8)		2H-15	140,8	5,83 (dd, 17,2; 10,7)
15	115,9	5,42 (dd, 17,4; 1,2) 5,36 (dd, 10,8; 1,2)			115,4	5,39 (d, 17,2) 5,33 (d, 10,7)
16	68,8	3,57 (d, 10,9) 3,53 (d, 10,9)			68,9	3,53 (s)
17	22,1	1,95 (t, 1,4)	-	-	110,7	5,04 (s), 4,89 (s)
18	33,5	1,15 (s)		H-5; 3H-19	33,7	1,00 (s)
19	21,5	1,18 (s)		3H-18	23,6	1,22 (s)
20	14,7	0,86 (s)		H-5	17,0	0,98 (s)

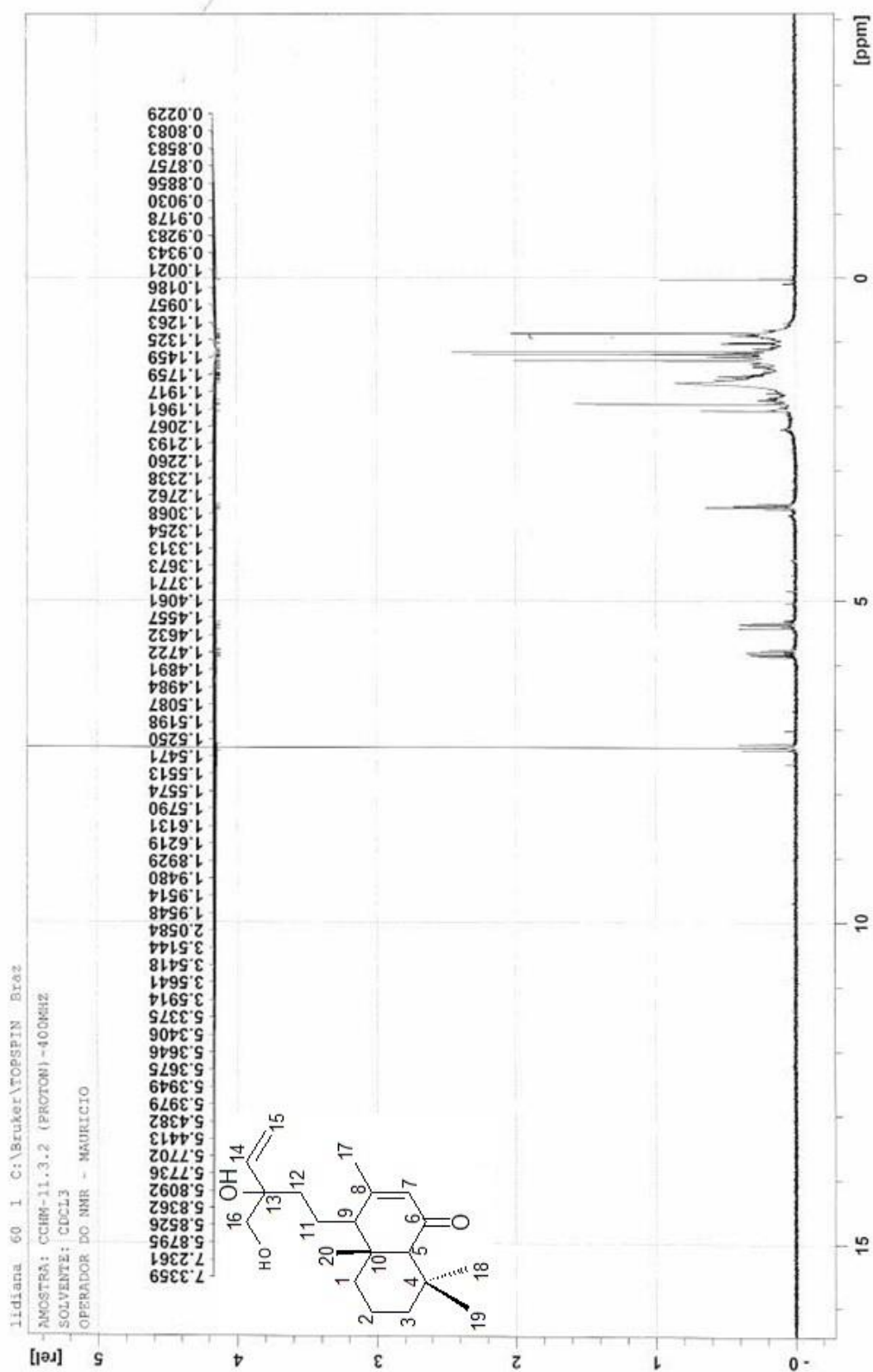


Figura 89: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do diterpene 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

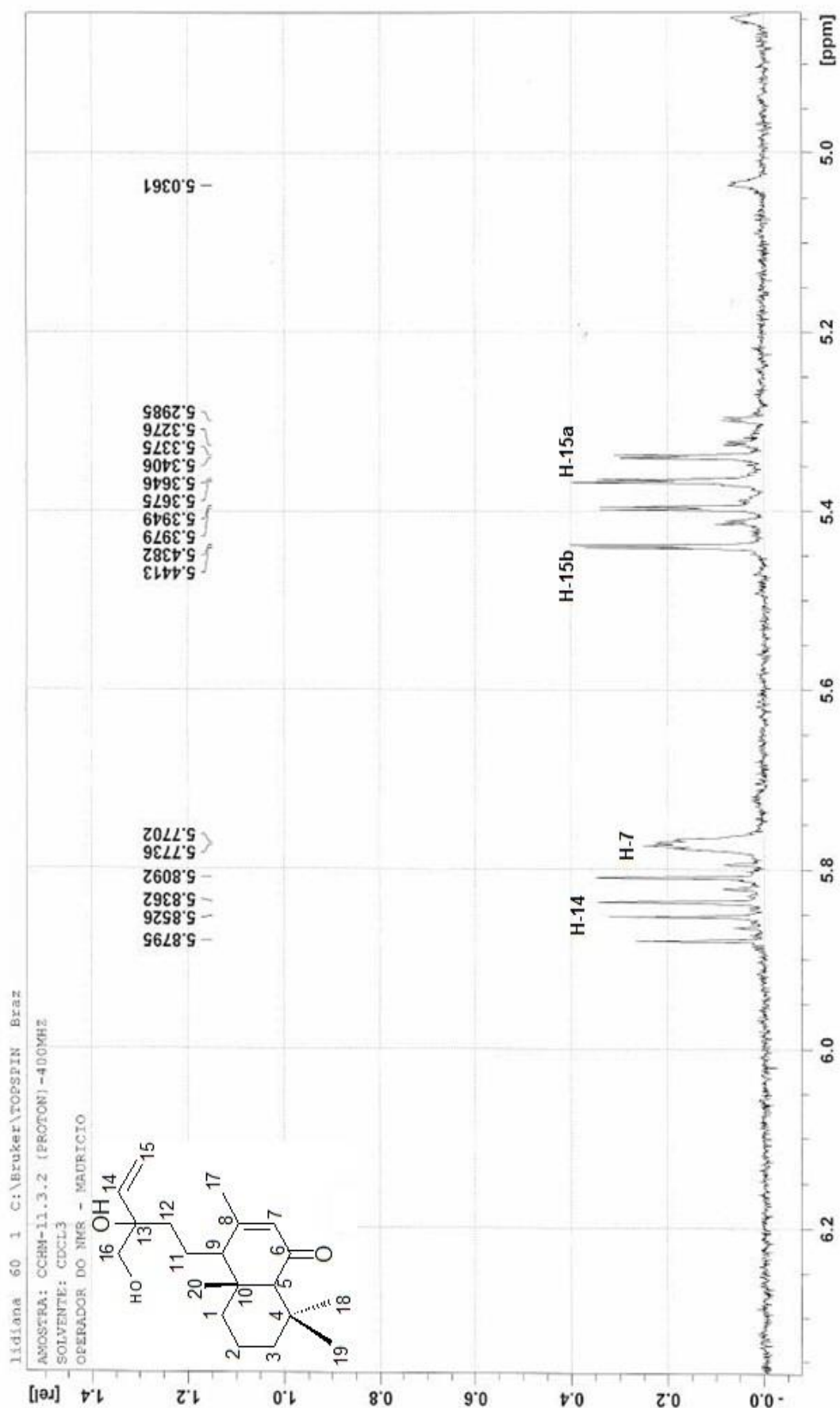


Figura 90: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ _H 3,5 e 4,8 ppm, do diterpeno **16-hidroxi-7-labden-6-ona (12)**.

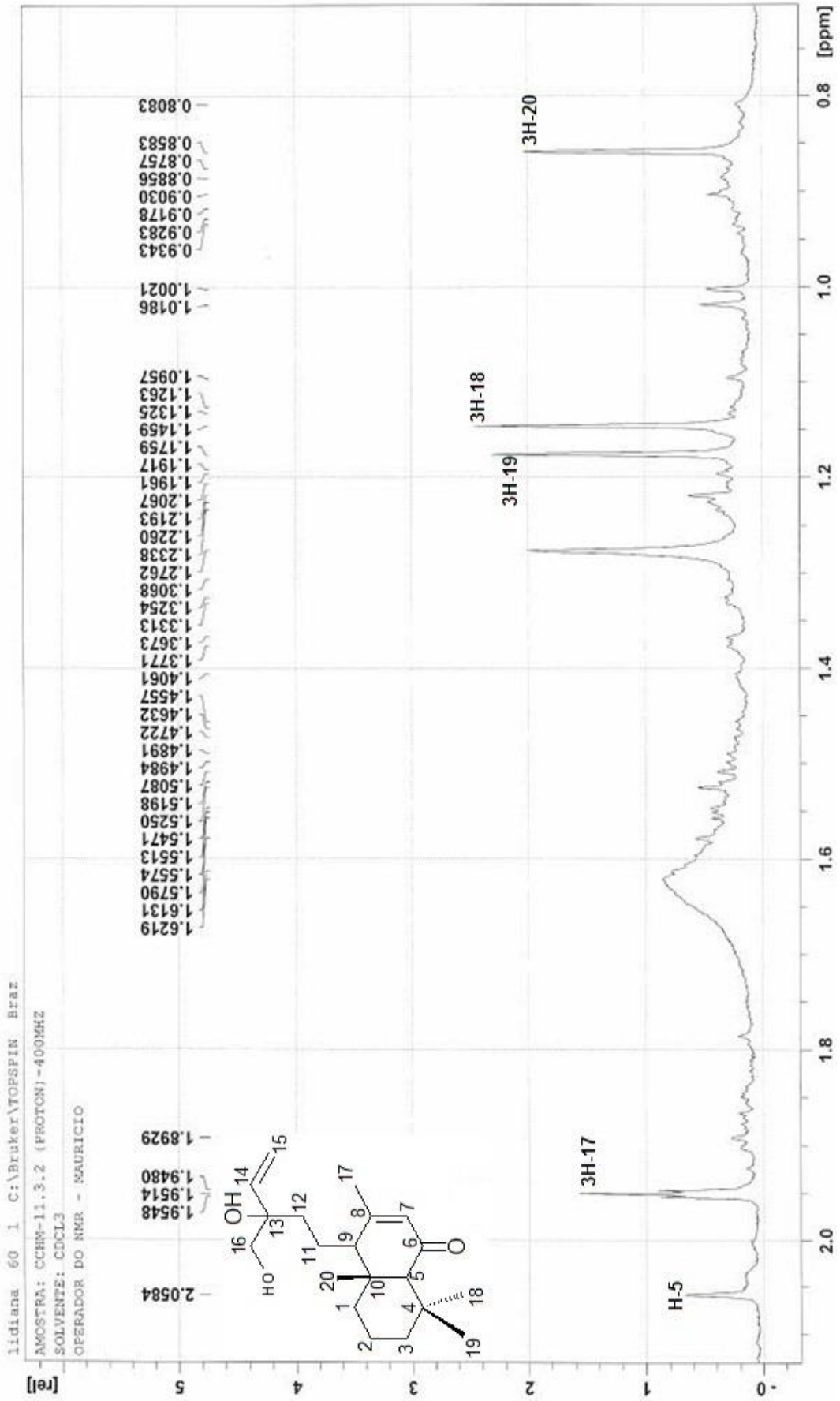


Figura 91: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ_H 2,1 e 0,7 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

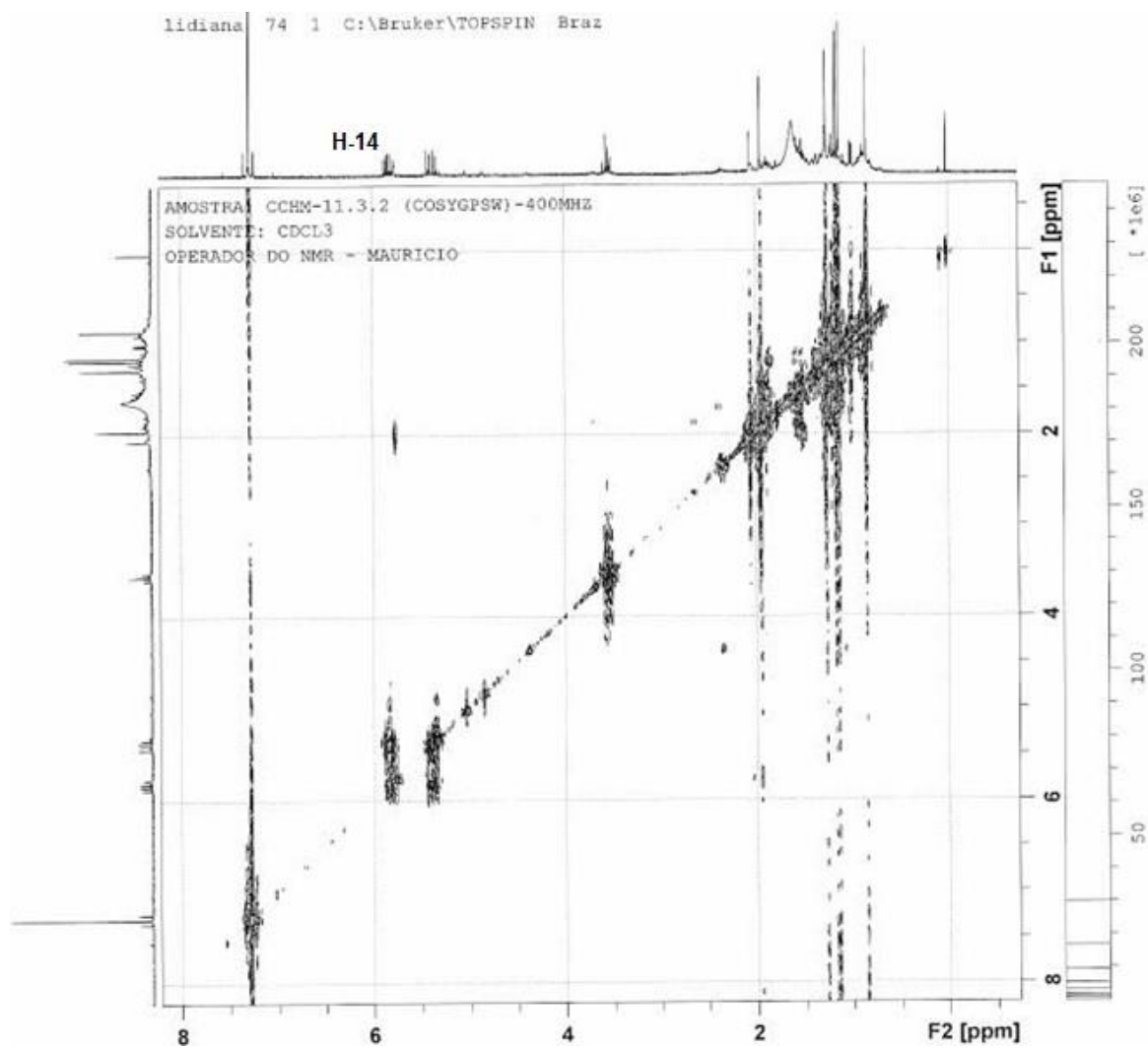
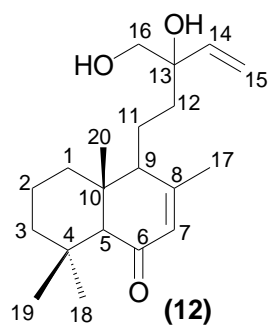


Figura 92: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

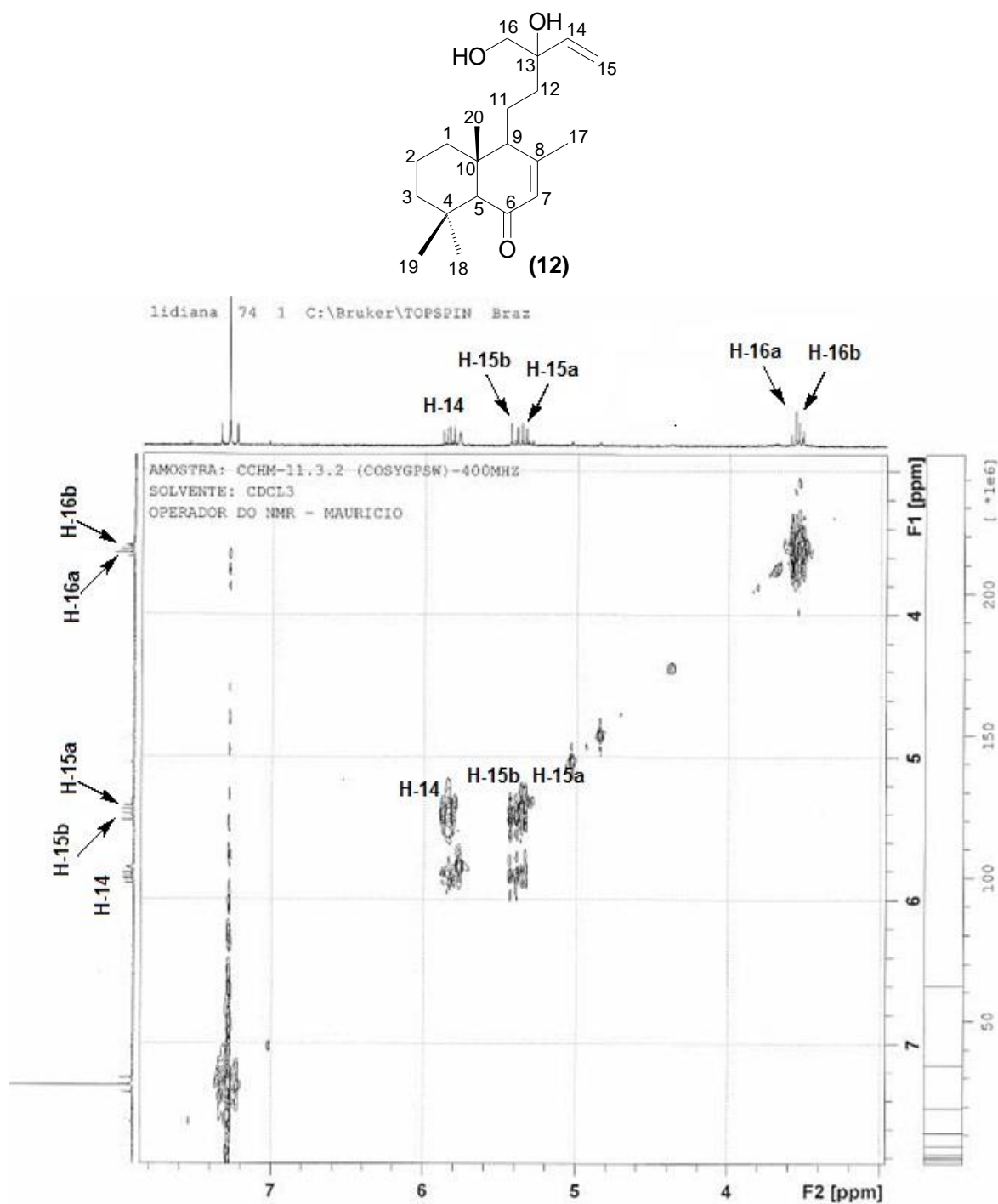


Figura 93: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação entre 8,0 e 3,0 ppm, do diterpeno **16-hidroxi-7-labden-6-ona (12)**.

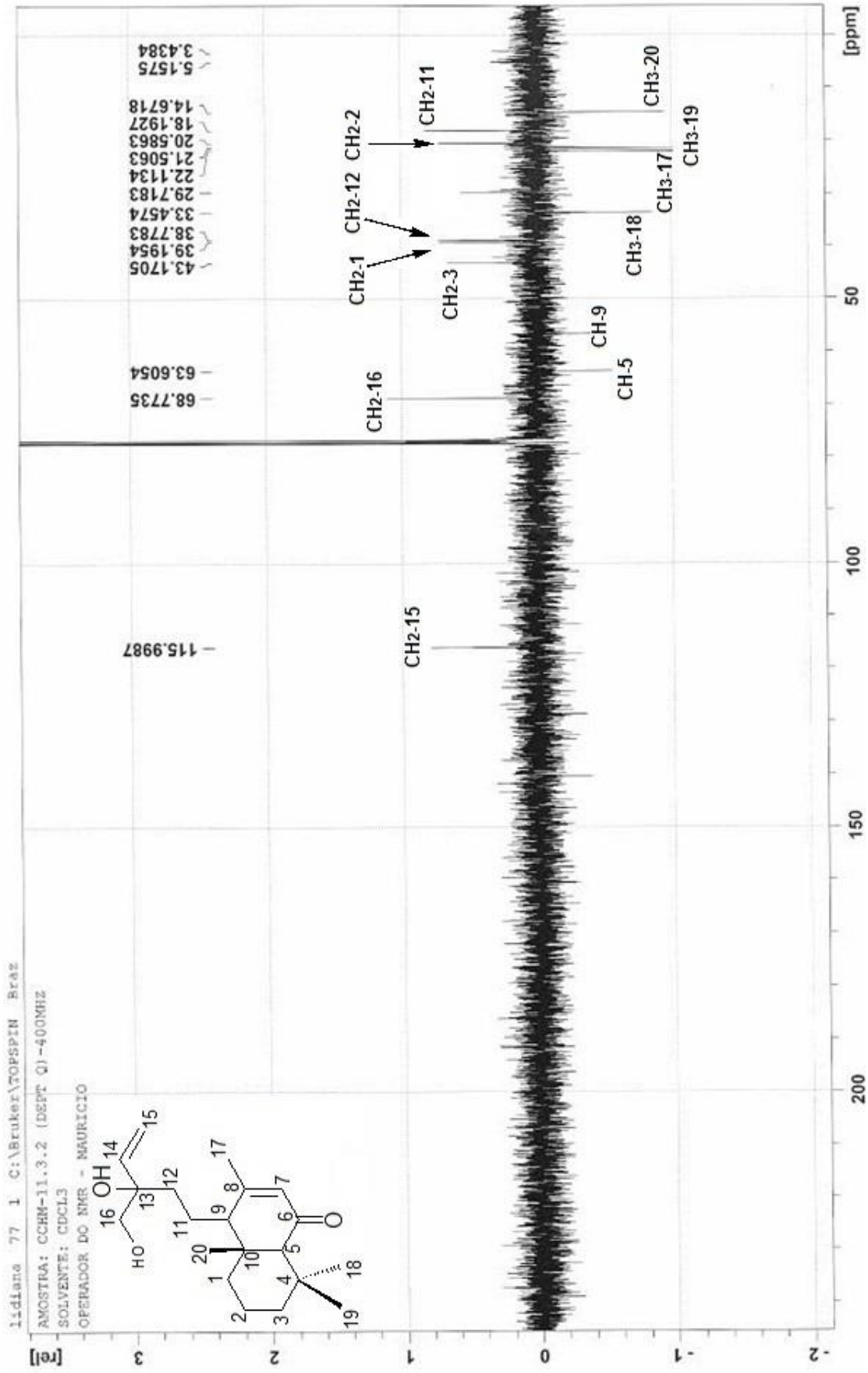


Figura 94: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do diterpene 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

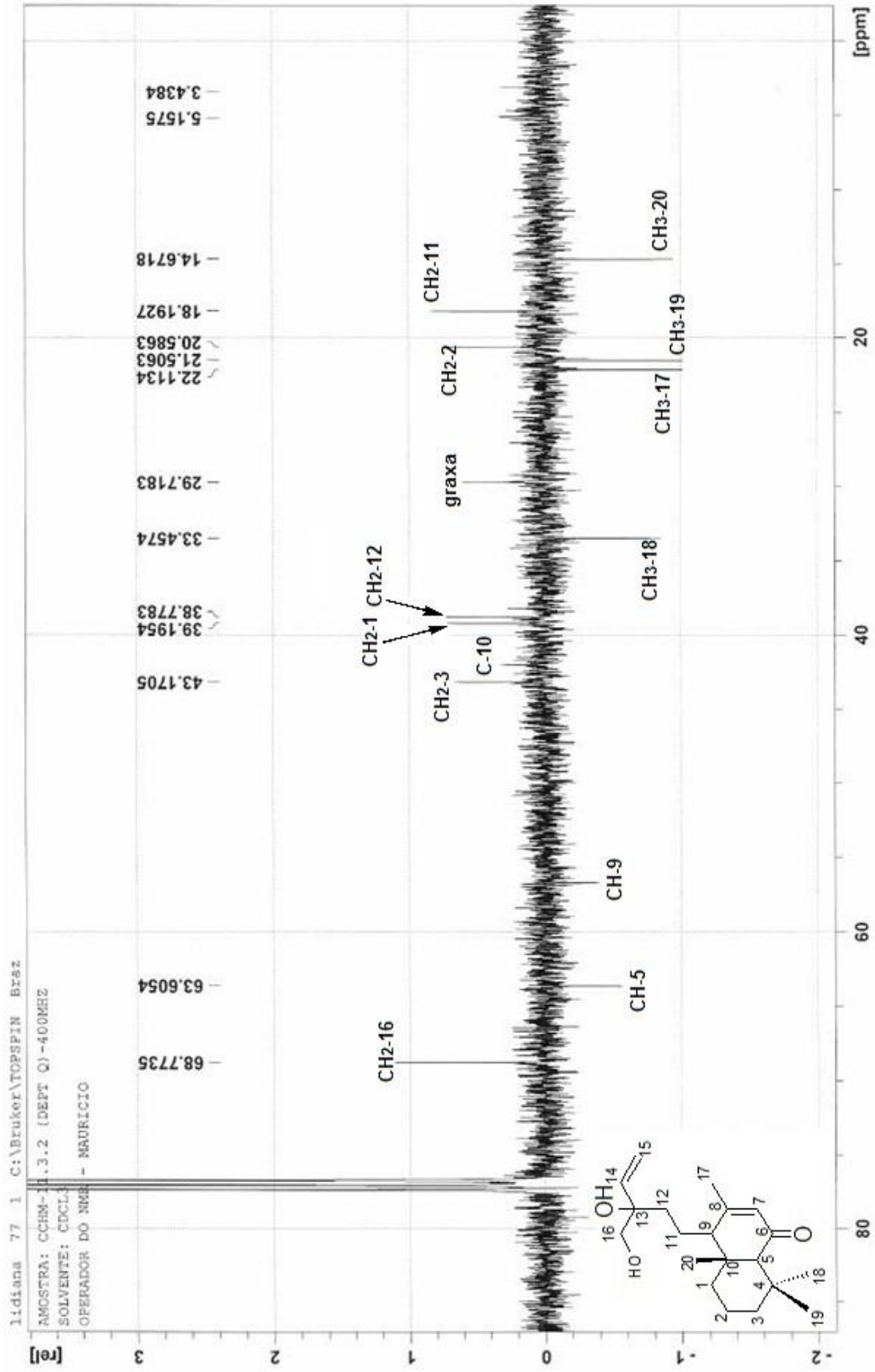


Figura 95: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ_c 85,0 e 0,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-7-

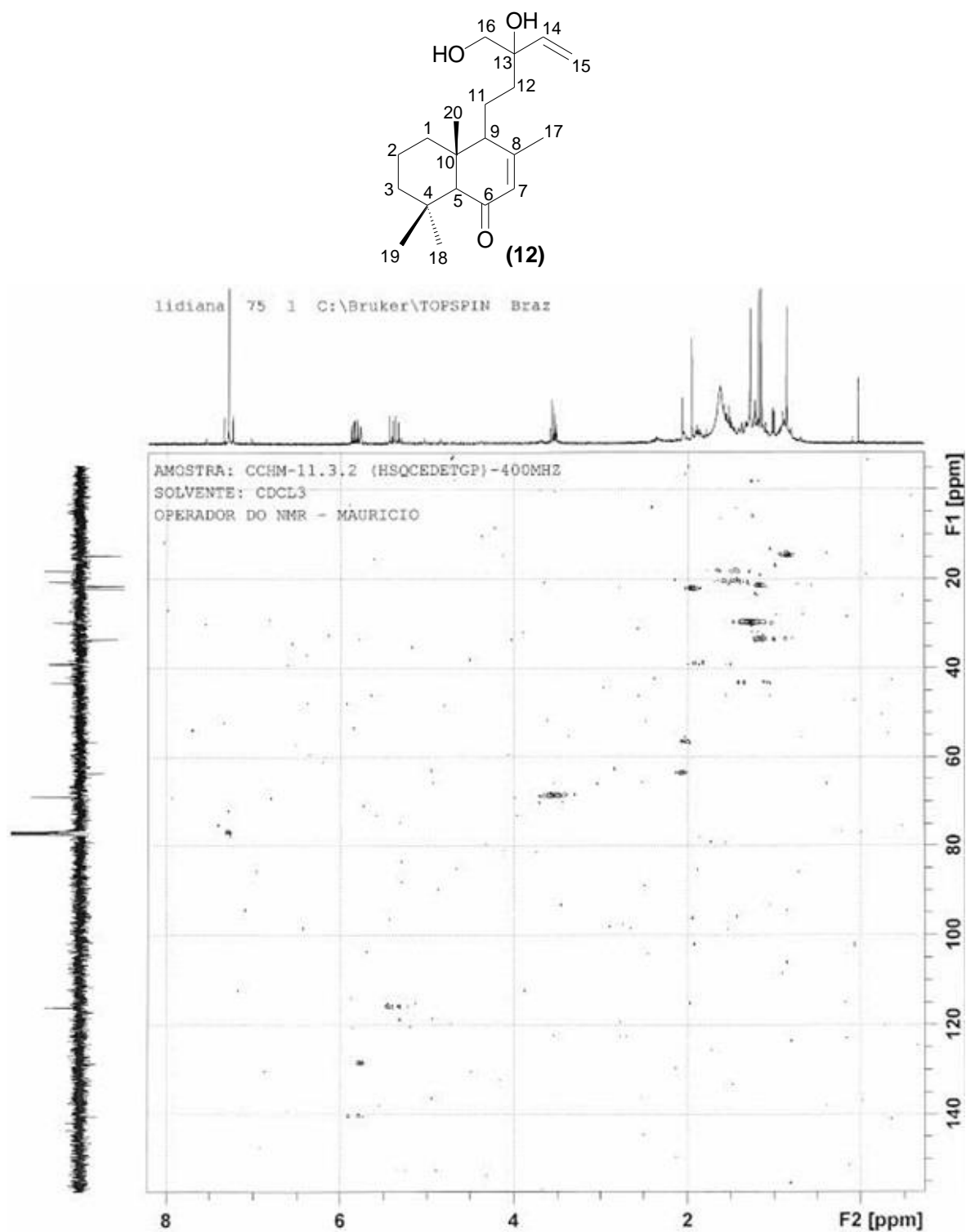


Figura 96: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

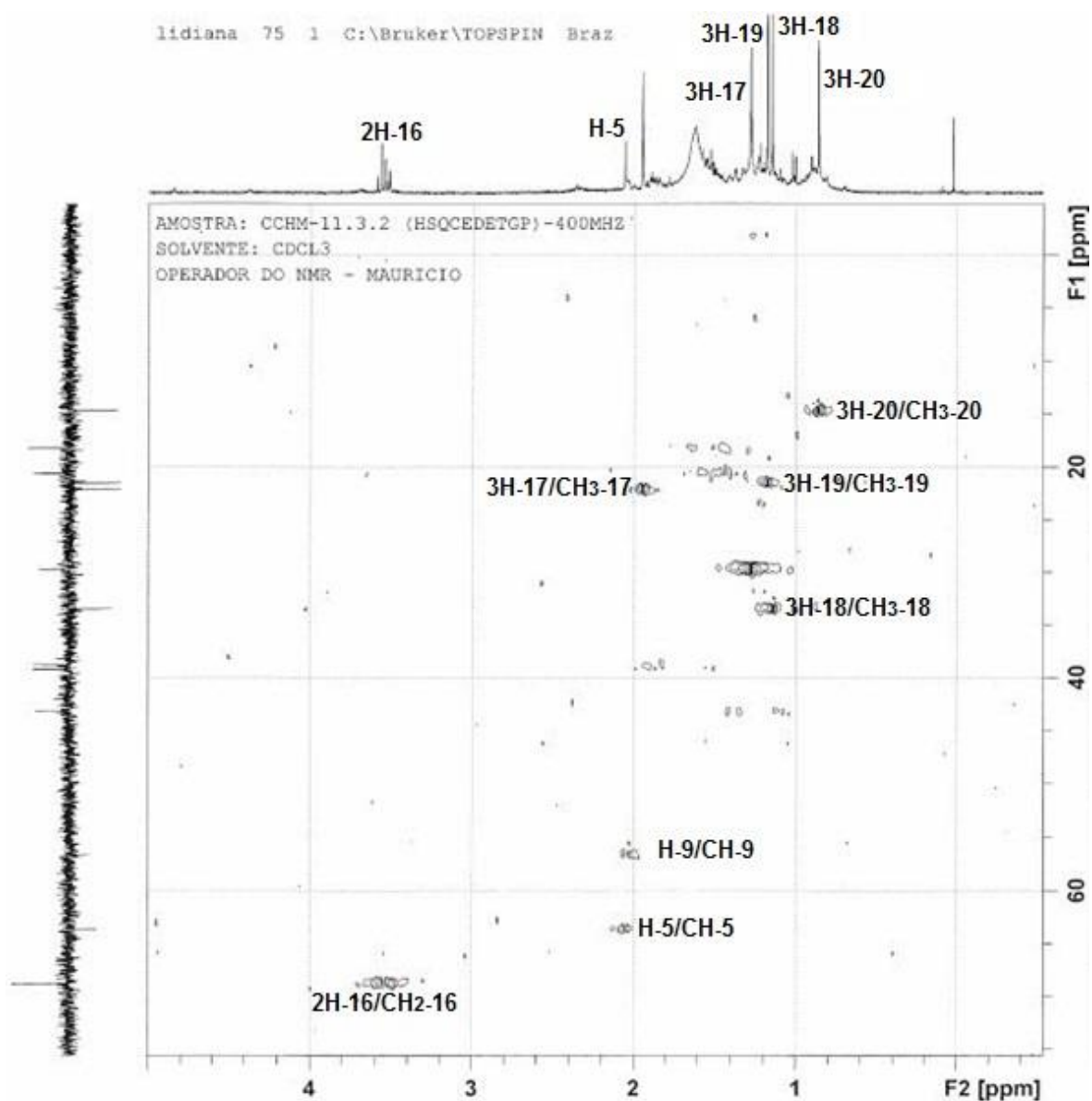
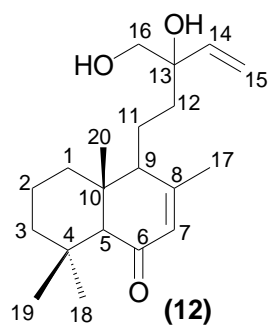


Figura 97: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (400 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-7-labden-6-ona (12)**.

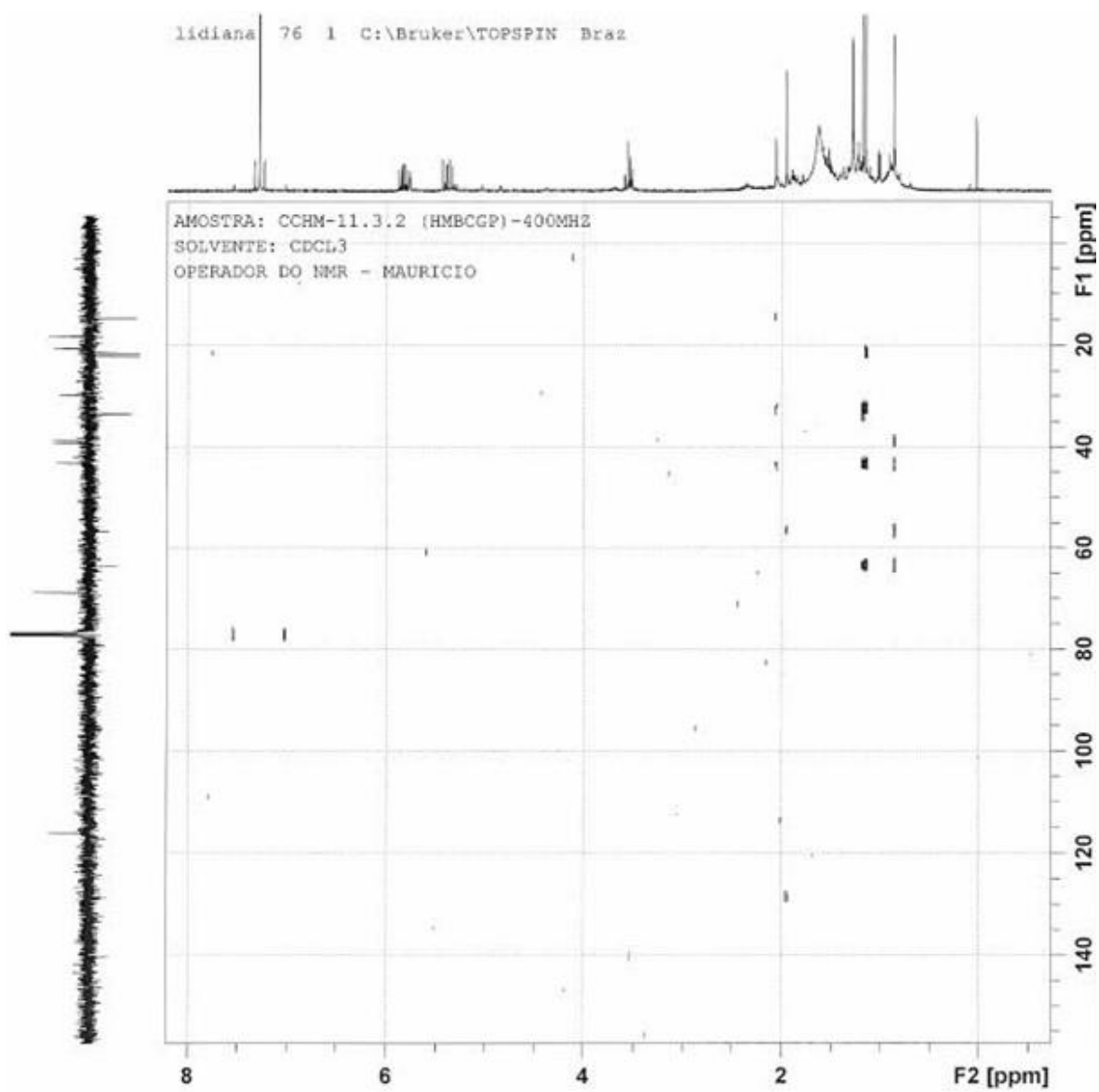
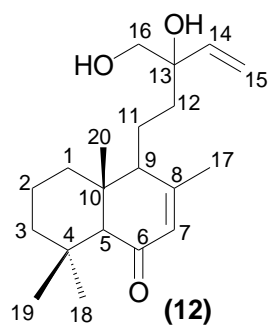


Figura 98: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400 MHz, CDCl₃) do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

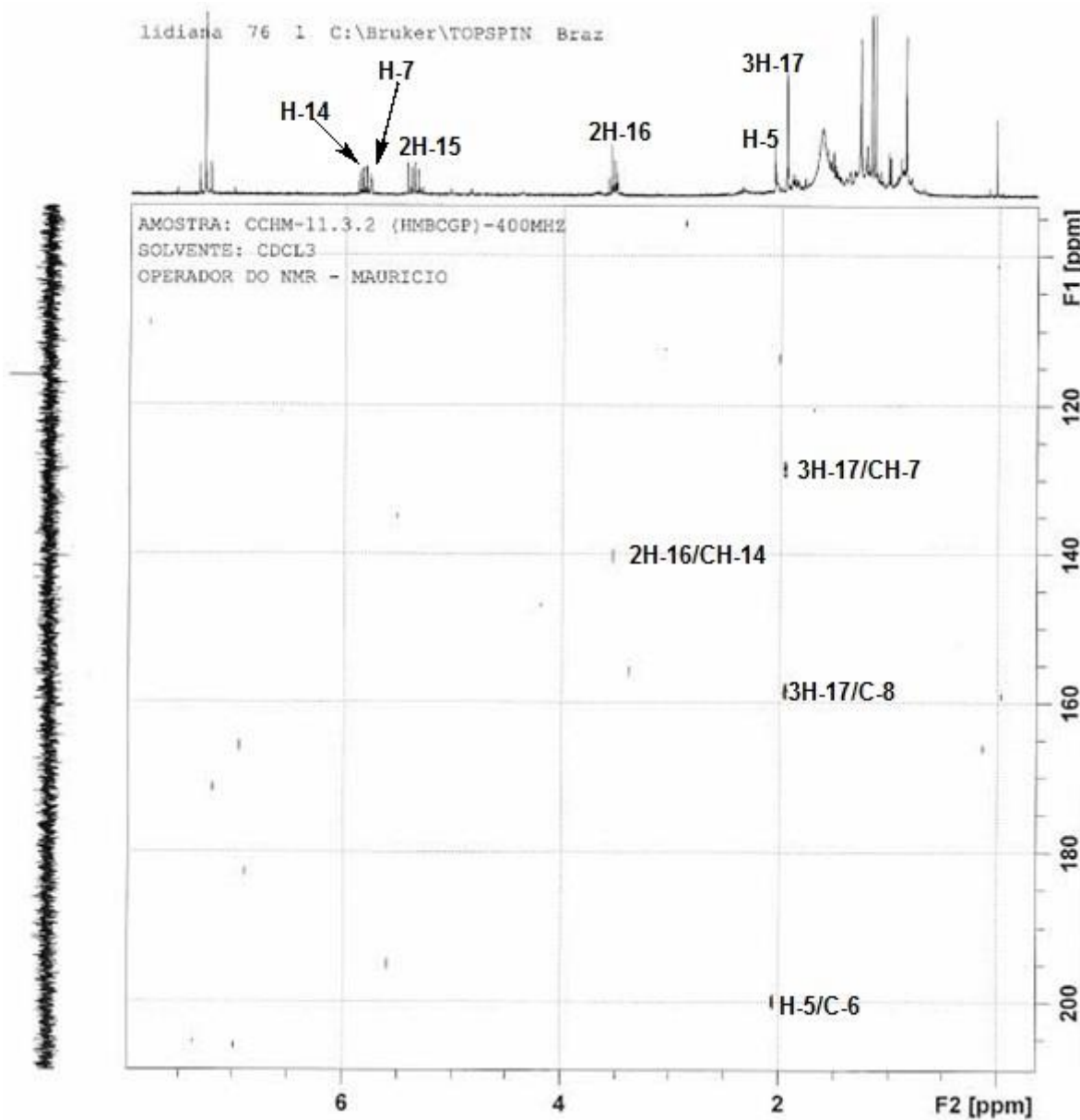
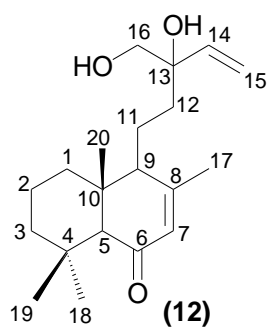


Figura 99: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (400MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12).

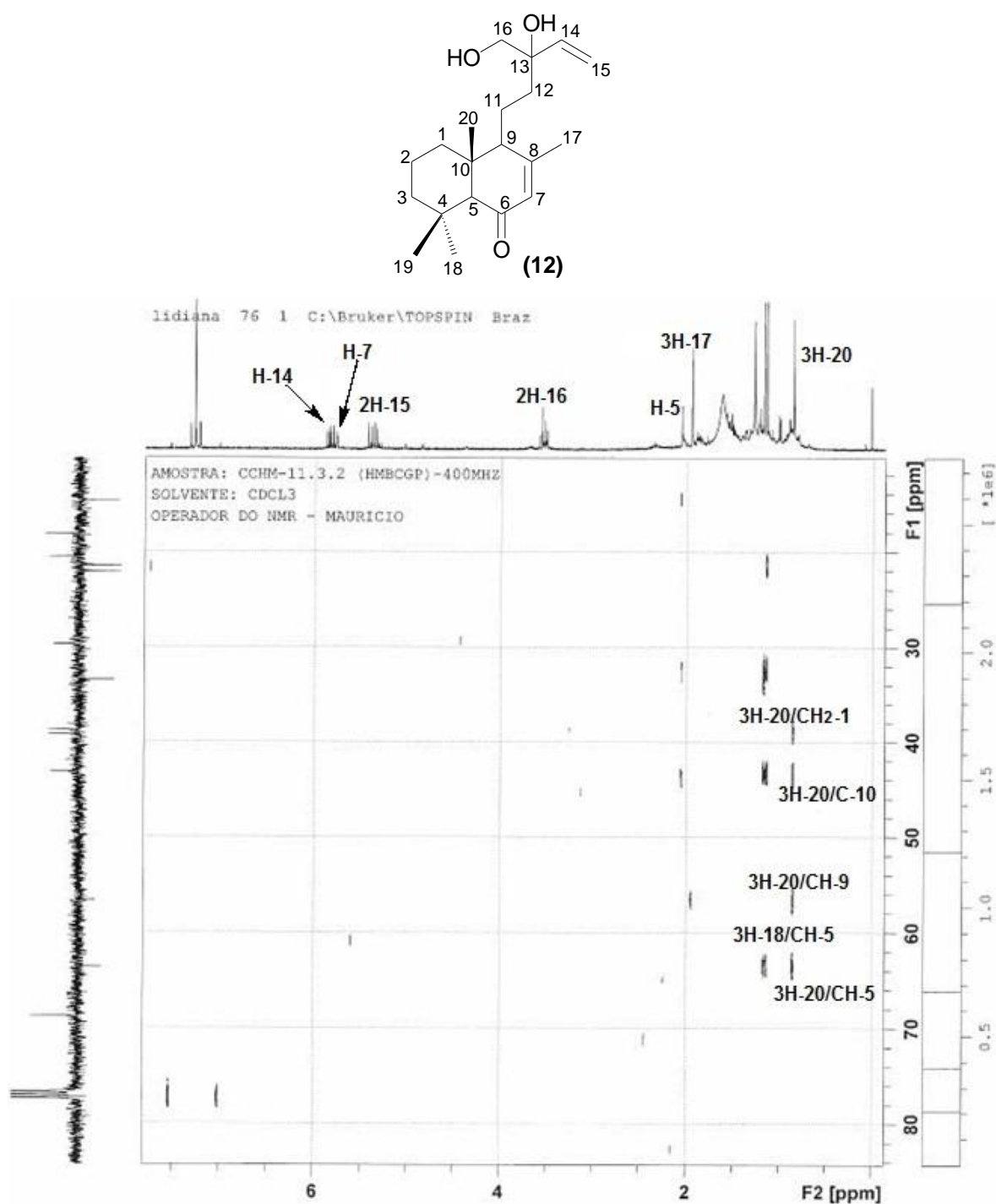
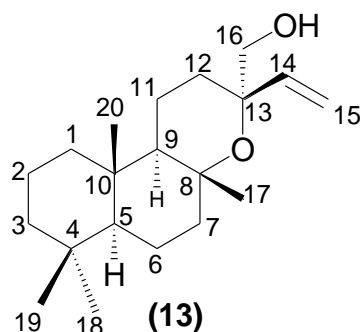


Figura 100: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-7-labden-6-ona (12)**.

5.2.3.4 Elucidação estrutural das substâncias 13:



O tratamento cromatográfico da fração CCMM-3.2.2 forneceu 2,7 mg de um material oleoso solúvel em CH_2Cl_2 sendo caracterizado como a substância **13**.

O espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ (**Figuras 106 e 107**, páginas 138 e 139) exibiu 20 sinais, sendo quatro metílicos, nove metilênicos, dos quais, um carbinólico em δ_{CH_2} 69,5 (CH₂-16), que exibiu correlação no mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figura 108 e 109**, página 140 e 141) com os hidrogênios em δ_{H} 3,39 (H-16a) e 2,98 (H-16b), e um sp^2 em δ_{CH_2} 113,5 (CH₂-15) correlacionado no mapa de correlação heteronuclear HSQC com os hidrogênios em δ_{H} 5,12 (H-15a) e 5,13 (H-15b).

O espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ (**Figuras 106 e 107**, páginas 138 e 139) exibiu também três sinais referentes a carbonos metínicos, sendo um sp^2 em δ_{CH} 144,0 correlacionado com o hidrogênio em δ_{H} 5,93, e quatro sinais referentes a carbonos não hidrogenados.

Os sinais em δ_{C} 76,0 e 78,0 indicam a presença de carbonos oxigenados na estrutura, apresentando perfil de um diterpeno manoilóxido (Dolmazon e colaboradores, 1995; Alcaraz e colaboradores, 1989).

A multiplicidade observada nos sinais em δ_{H} 5,93 (*dd*, 18,2; 10,9 Hz, H-14); 5,12 (*d*, 10,9 Hz, H-15a) e 5,13 (*d*, 18,2 Hz, H-15b) no espectro de RMN de ^1H (**Figura 103**, página 135), caracterizando um sistema do tipo ABX, juntamente com a análise no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figuras 104 e 105**, páginas 136 e 137) possibilitou confirmar a presença de um grupo vinilidina na substância.

O espectro possibilitou também determinar a não equivalência química entre os sinais δ_{H} 3,39 (*d*, 10,7 Hz, H-16a) e 2,99 (*d*, 10,7 Hz, H-16b), que apresentaram acoplamento no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figuras 104 e 105**, páginas 136 e 137), caracterizando com hidrogênios

diastereotópicos (Silverstein e Webster, 2000). Os demais assinalamentos dos carbonos e hidrogênios estão apresentados na **tabela 23**, página 133.

A determinação dos pontos de ligação na substância foi estabelecida através da análise do mapa de correlação heteronuclear $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$ HMBC (**Figura 110 e 111**, página 142 e 143), que exibiu correlação H/C em δ_{H} 5,93 H-14 com δ_{C} 78,0 C-13, do hidrogênio δ_{H} 1,27 3H-17 com o carbono δ_{C} 76,0 C-8, δ_{H} 5,13 e 5,12 2H-15 com δ_{C} 78,0 C-13 confirmando a presença de anel tetrahidropirano característico de diterpenos manoilóxidos (Dolmazon e colaboradores, 1995). As demais correlações estão listadas na **tabela 23**, página 133.

O espectro de Massas de Baixa Resolução EMBR (**Figura 102**, página 134) exibiu um pico M^+ 291 Dalton, indicando a perda de radical metila, justificando a proposta de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ($\Delta m/z$ 306 -15= 291 Dalton) (**Esquema 18**, página 134).

A configuração relativa da estrutura foi estabelecida após análise do mapa de correlação homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$ -NOESY (**Figuras 112 e 113**, páginas 144 e 145), que exibiu NOE entre os hidrogênios 3H-17 em δ_{H} 1,27 e 2H-15 em δ_{H} 5,13 e 5,12; 3H-17 em δ_{H} 1,27 com 3H-20 em δ_{H} 0,75 e 3H-19 em δ_{H} 0,81 com 3H-20 em δ_{H} 0,75 confirmando a conformação 1,3-diaxial entre as metilas (3H-17, 3H-19 e 3H-20) com os hidrogênios do grupo vinila (H-14 e 2H-15) (**Figura 101**).

A análise de modelos na literatura sustenta a proposta do grupo metila 3H-17 em axial ao exibir sinal em frequência baixa para as metilas δ_{H} 0,66-0,79 ppm. A alta frequência encontrada δ_{H} 1,27 ppm 3H-17 indica que houve uma redução da densidade eletrônica do oxigênio do anel tetrahidropirano sobre os hidrogênios da metila (Alcaraz e colaboradores, 1989).

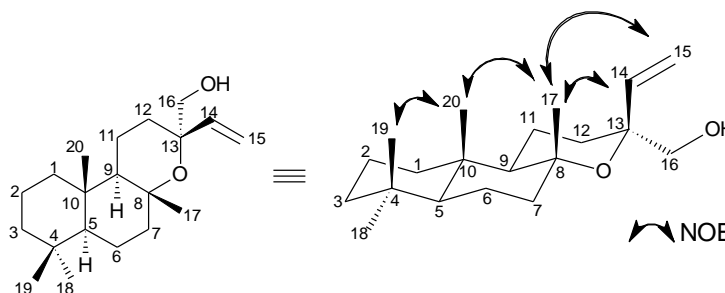


Figura 101: Interação especial dos núcleos de hidrogênio observados no espectro de NOESY da substância **13**.

O conjunto de dados analisados agregado à comparação com modelos de literatura (Dolmazon e colaboradores, 1995; Alcaraz e colaboradores, 1989) conduziram a elucidação estrutural da substância **13** como sendo um diterpeno epímero em C-13 do 16-hidroxi monoilóxico chamado de **16-hidroxi-13-epi-manoilóxico** inédito na literatura pelo melhor do nosso conhecimento.

Tabela 23: Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **13**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores da literatura para o diterpeno 16-hidroxi manoilóxico **Mo-05**.

Substância 13					Mo-05
C	HSQC		HMBC		δ_{C}
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	
1	39,3	1,65; 0,85		3H-20	38,9
2	18,6	1,60; 1,45			18,5
3	42,1	1,42; 1,16		3H-18; 3H-19	42,0
4	31,9	-	3H-18; 3H-19		33,2
5	56,4	0,96 (<i>dd</i> , 12,2; 2,3)			56,4
6	19,8	1,65; 1,25			20,2
7	42,8	1,80; 1,42		3H-17	43,6
8	76,1	-	3H-17		76,3
9	58,4	1,16			52,8
10	37,5	-	3H-20		37,2
11	15,2	1,55; 1,48			14,5
12	28,3	2,05; 1,75			27,2
13	75,9	-	H-14; 2H-16	2H-15	75,6
14	144,0	5,93 (<i>dd</i> , 18,2; 10,9)	2H-15	2H-12; H-16a	144,0
15	113,5	5,13 (<i>d</i> , 18,2); 5,12 (<i>d</i> , 10,9)			114,0
16	69,6	3,39 (<i>d</i> , 10,7); 2,99 (<i>d</i> , 10,7)			68,5
17	24,0	1,27 (<i>s</i>)			25,8
18	33,3	0,88 (<i>s</i>)		H-5; 3H-19	33,4
19	21,3	0,81 (<i>s</i>)		H-5; 3H-18	21,5
20	15,9	0,75 (<i>s</i>)			15,1

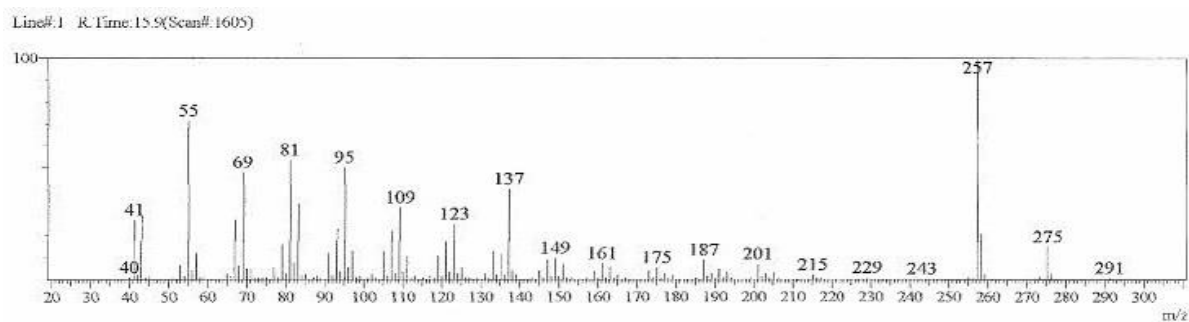
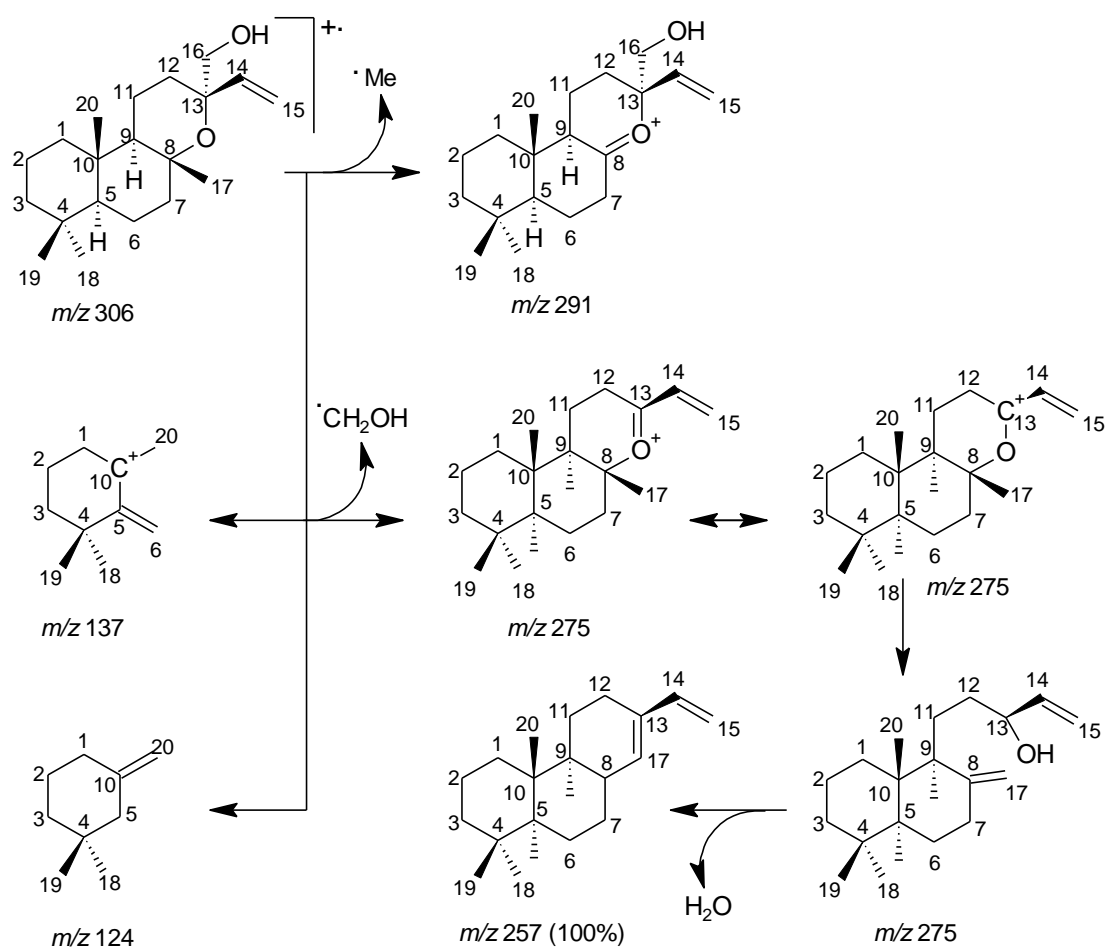


Figura 102: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**.



Esquema 18: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**.

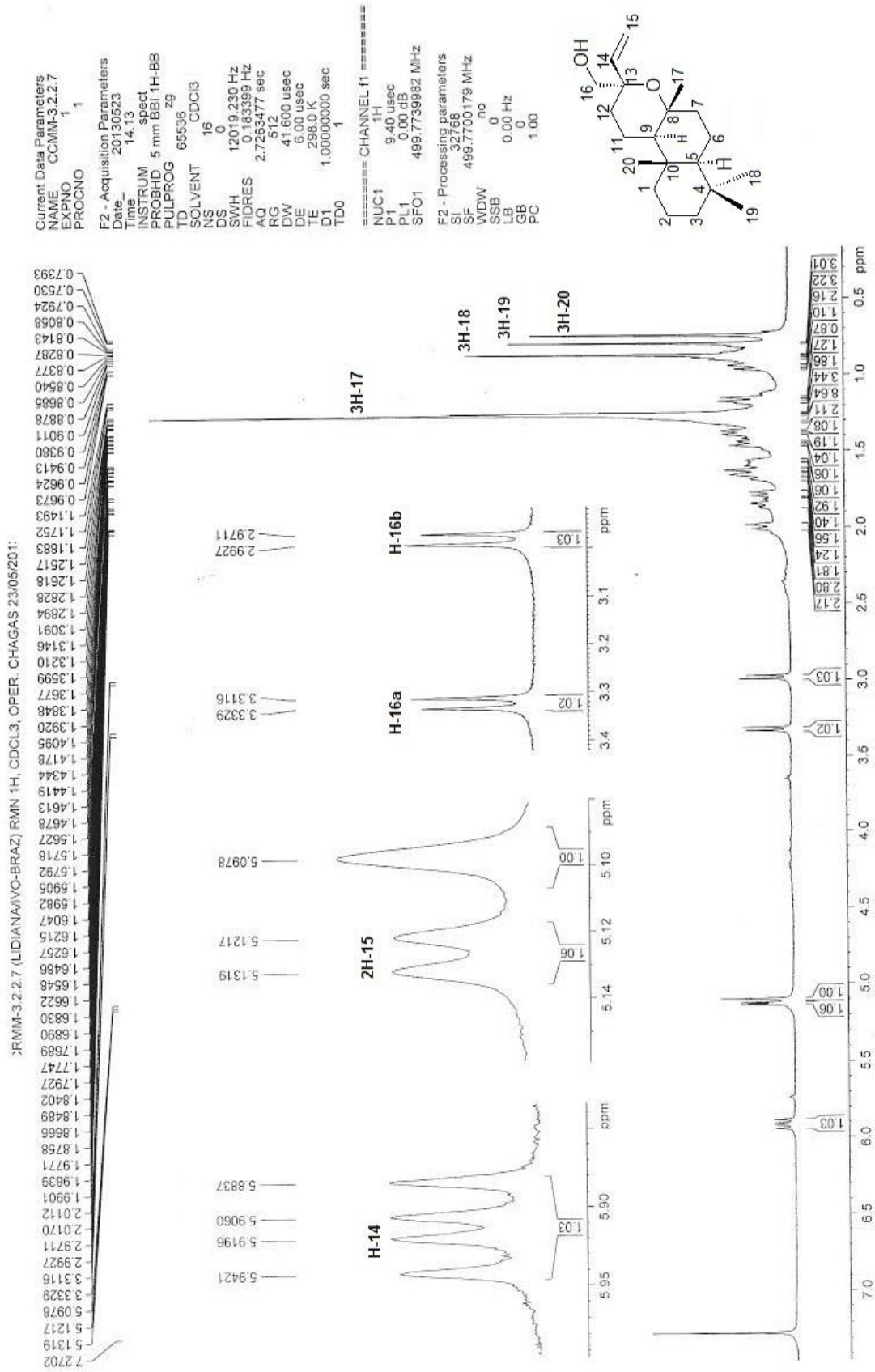


Figura 103: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do diterpene 16-hidroxi-13-epi-manoilóido (13).

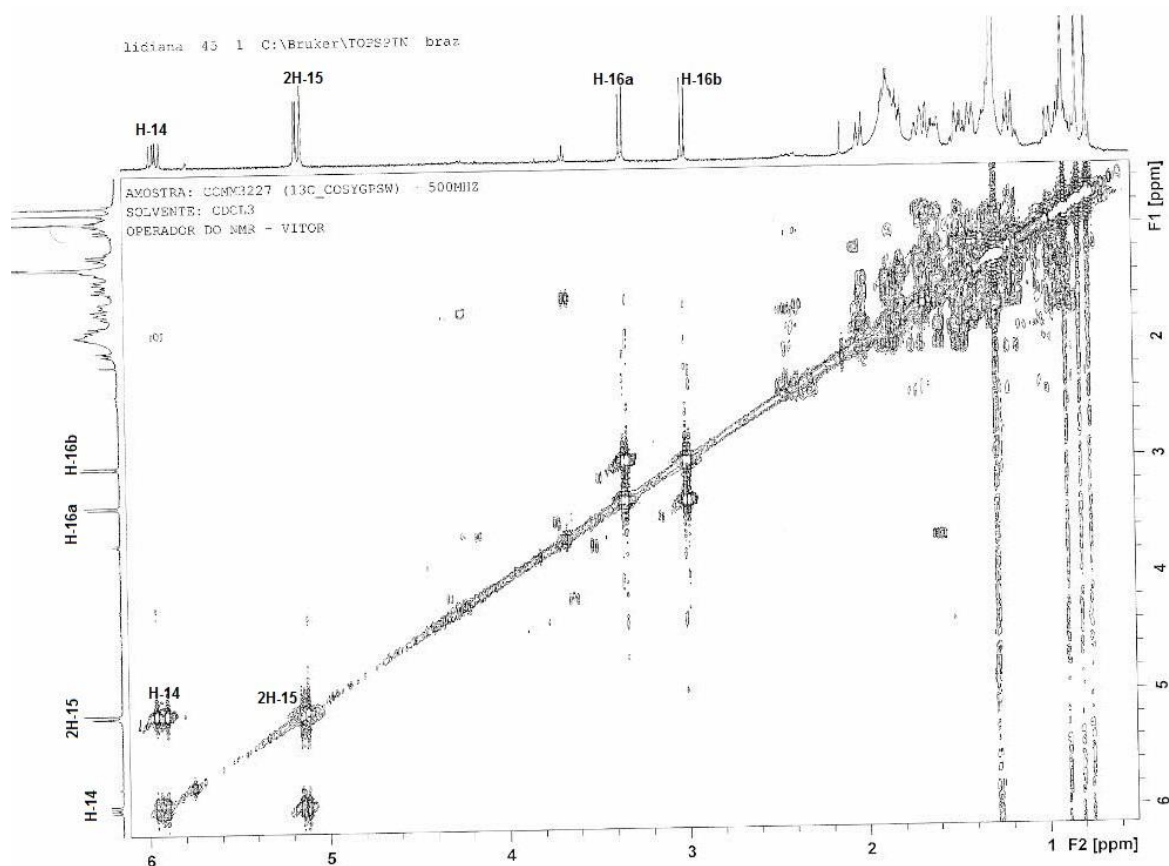
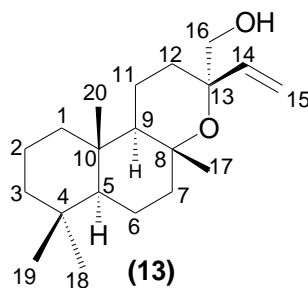


Figura 104: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do diterpene 16-hidroxi-13-*epi*-manoilóxico (13).

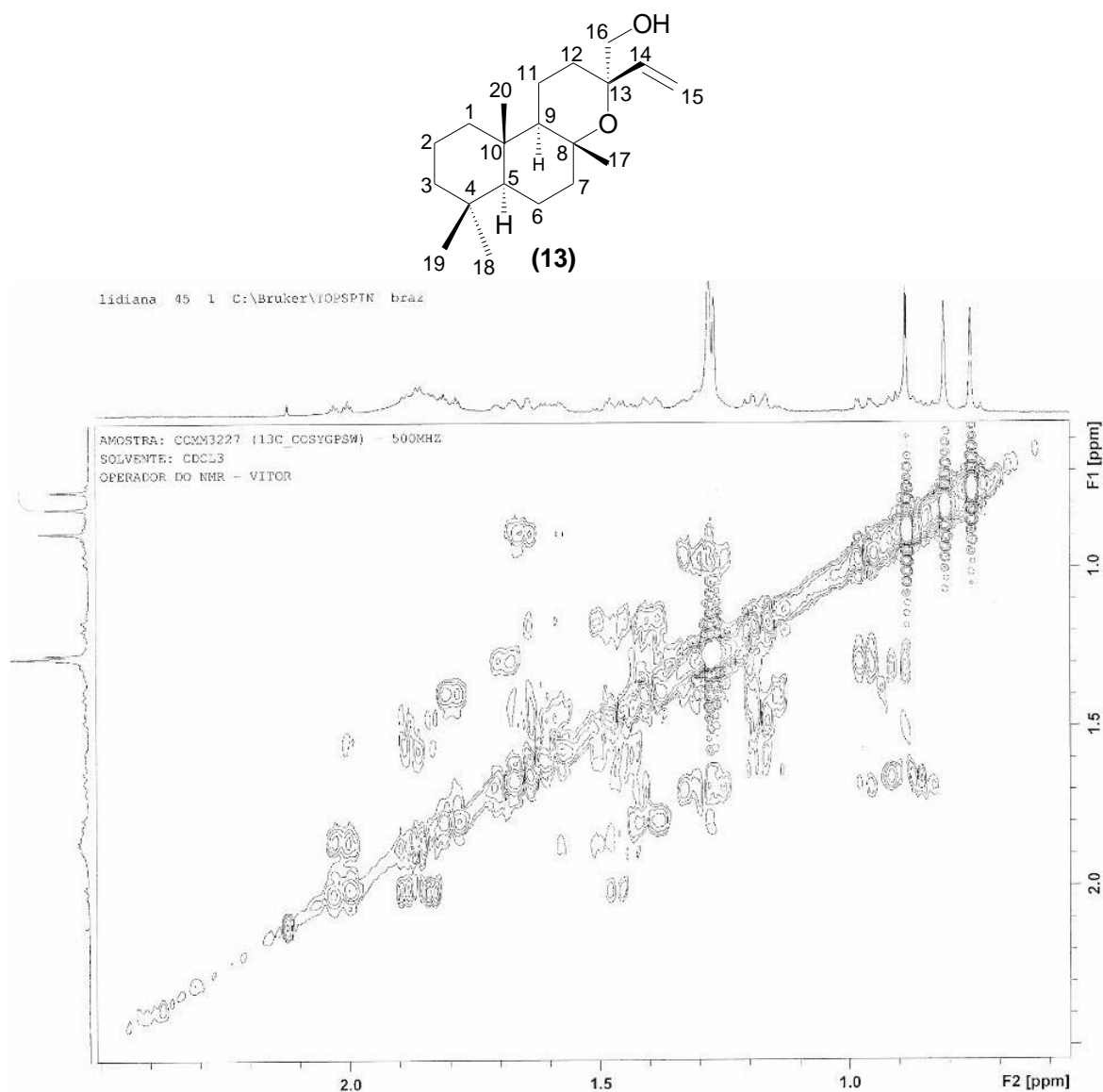


Figura 105: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**.

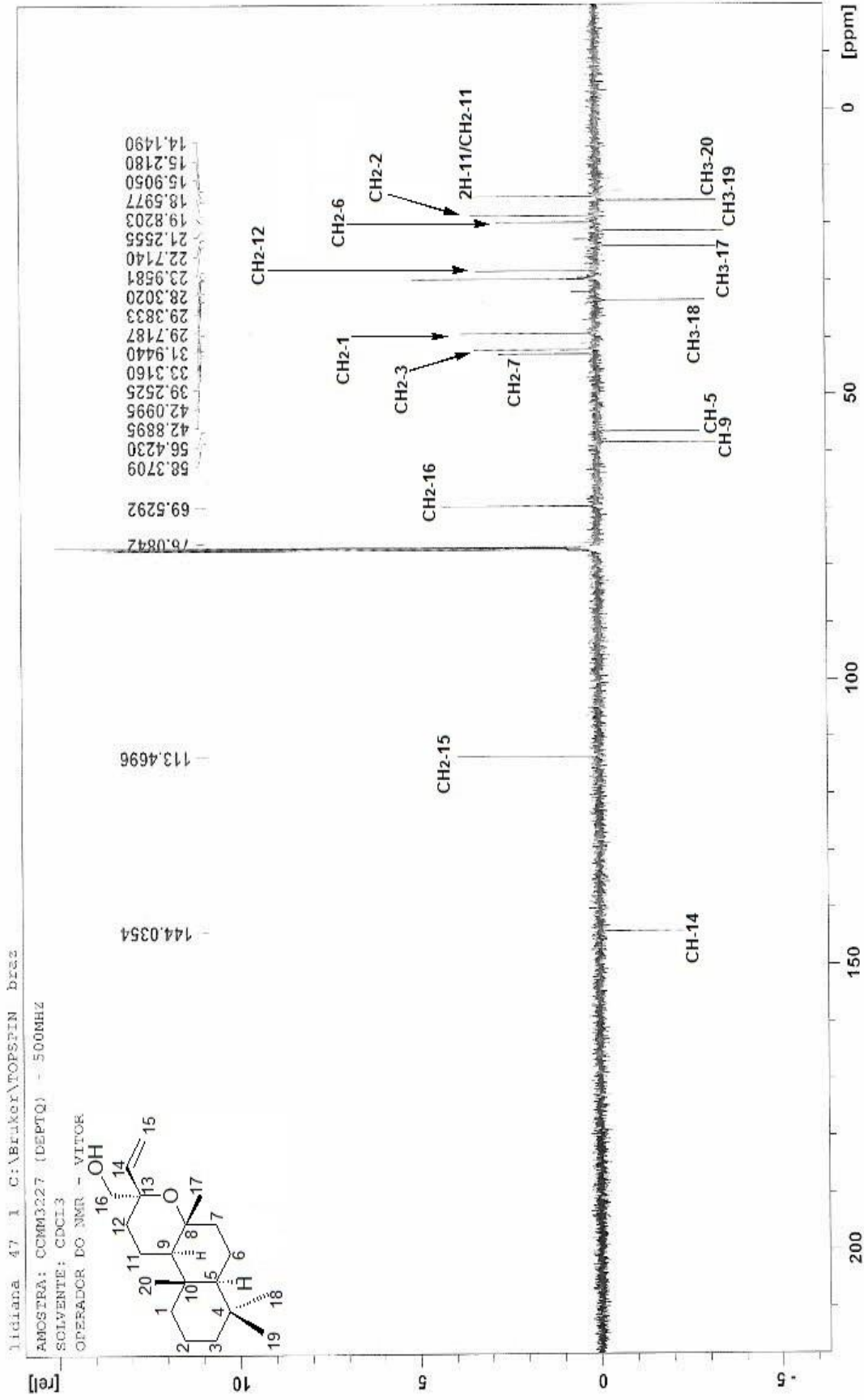


Figura 106: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manoiloxido (13).

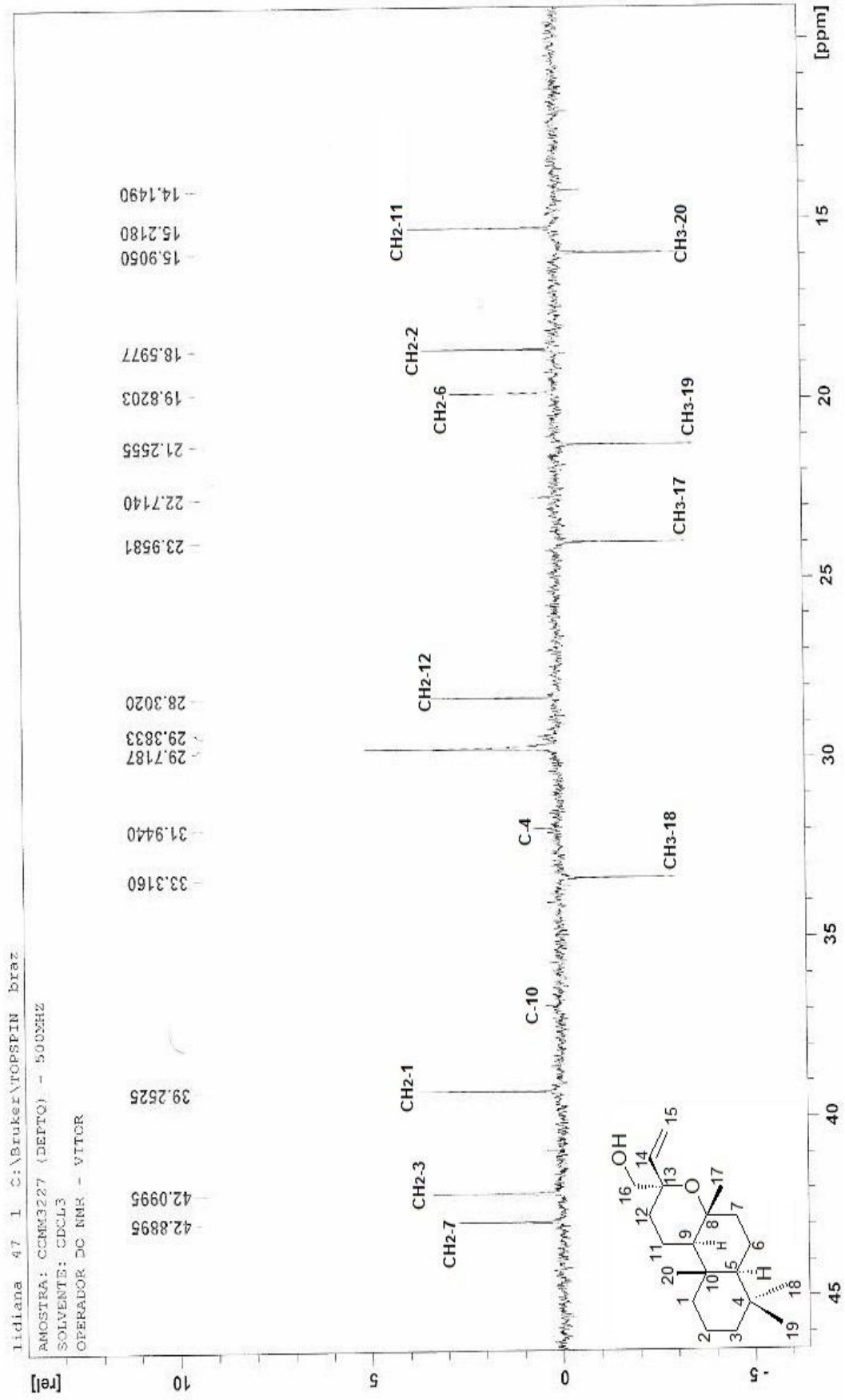


Figura 107: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), com ampliação entre δ_c 46,0 e 10,0 ppm, do diterpeno 16-hidroxi-13-epi-manilóxi (13).

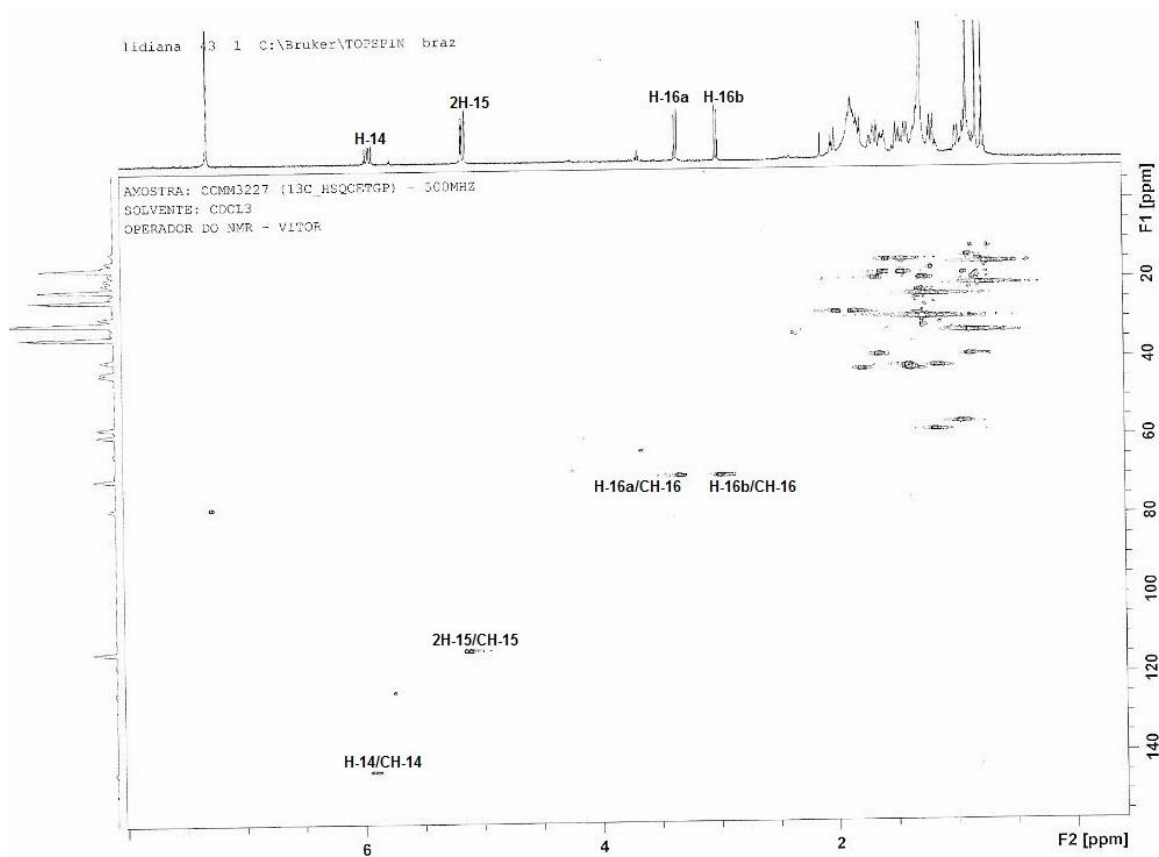
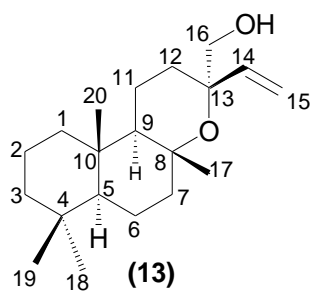


Figura 108: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3) do diterpene **16-hidroxi-13-*epi*-manoilóxico (13)**.

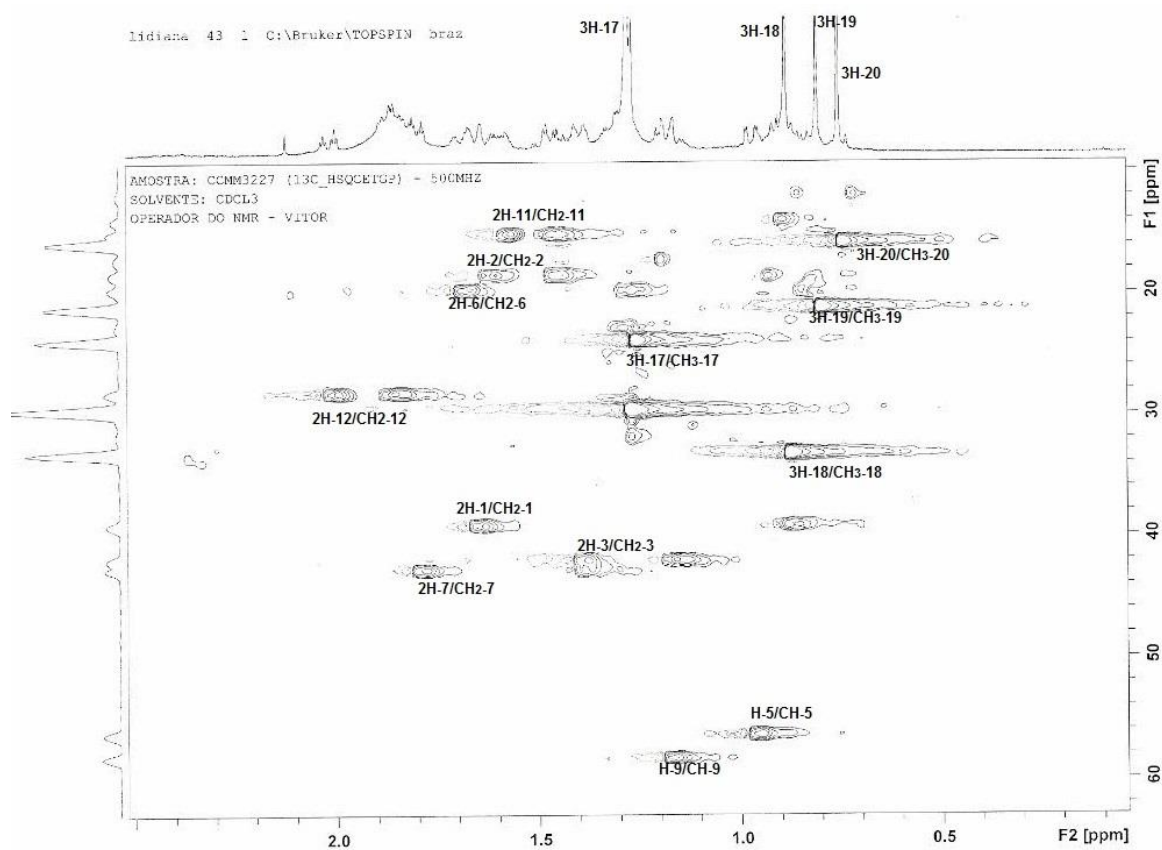
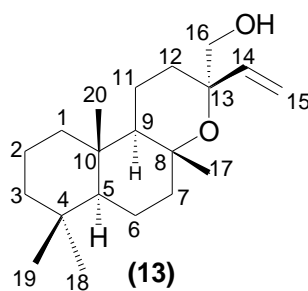


Figura 109: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-13-*epi*-manoilóxido (13)**.

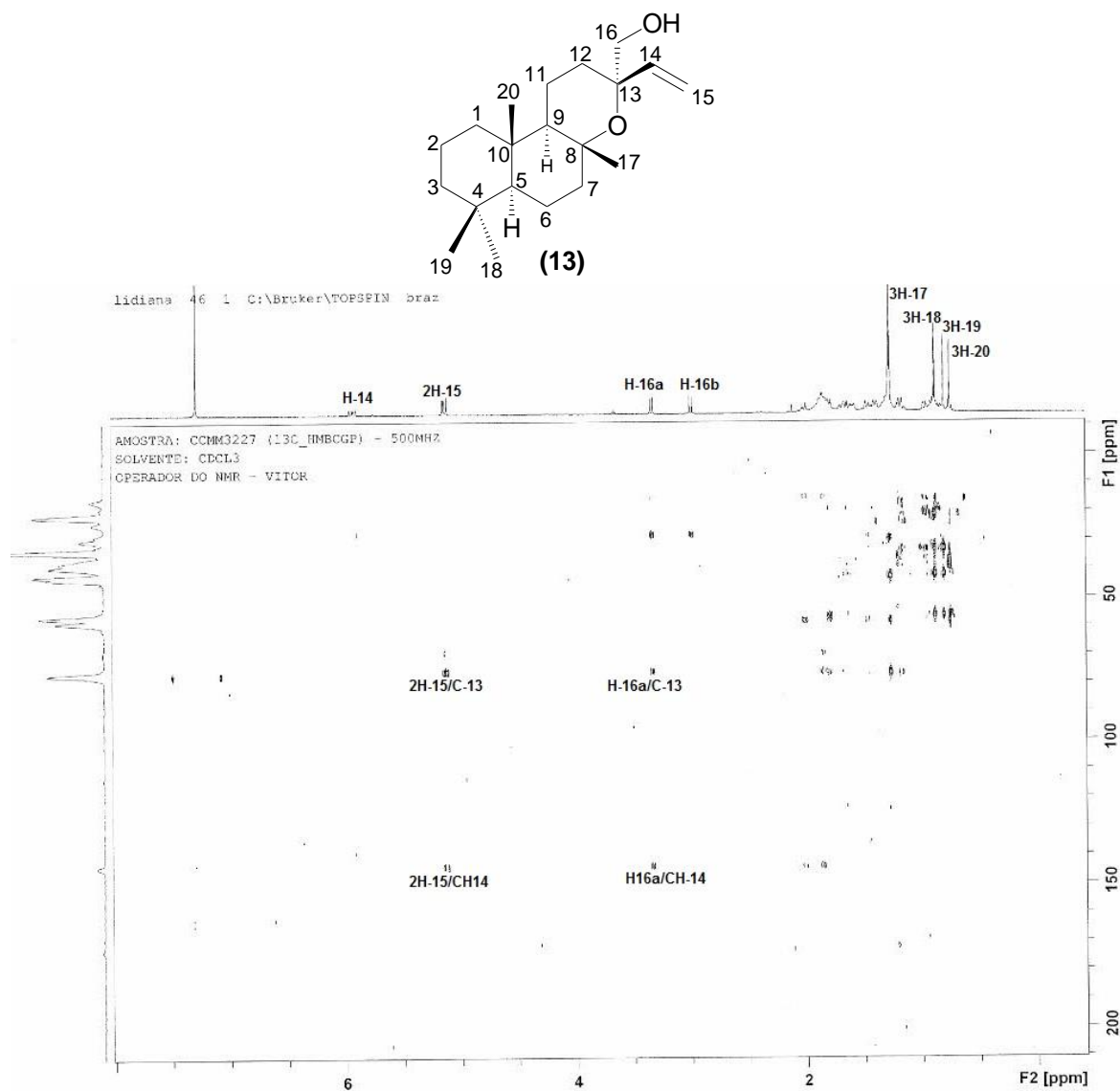


Figura 110: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroxi-13-*epi*-mailóxido (13).

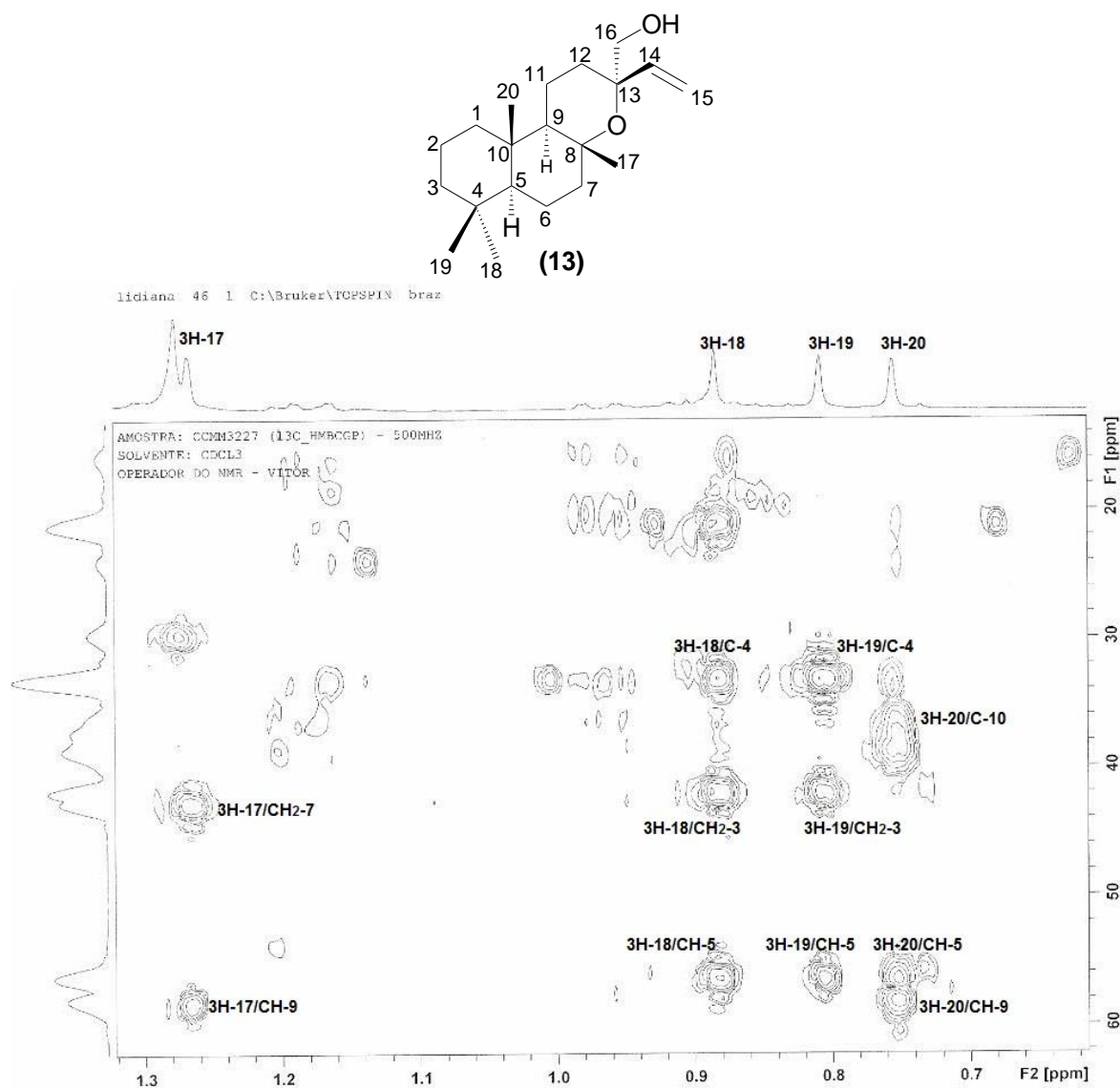


Figura 111: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-13-*epi*-manoilóxido (13)**.

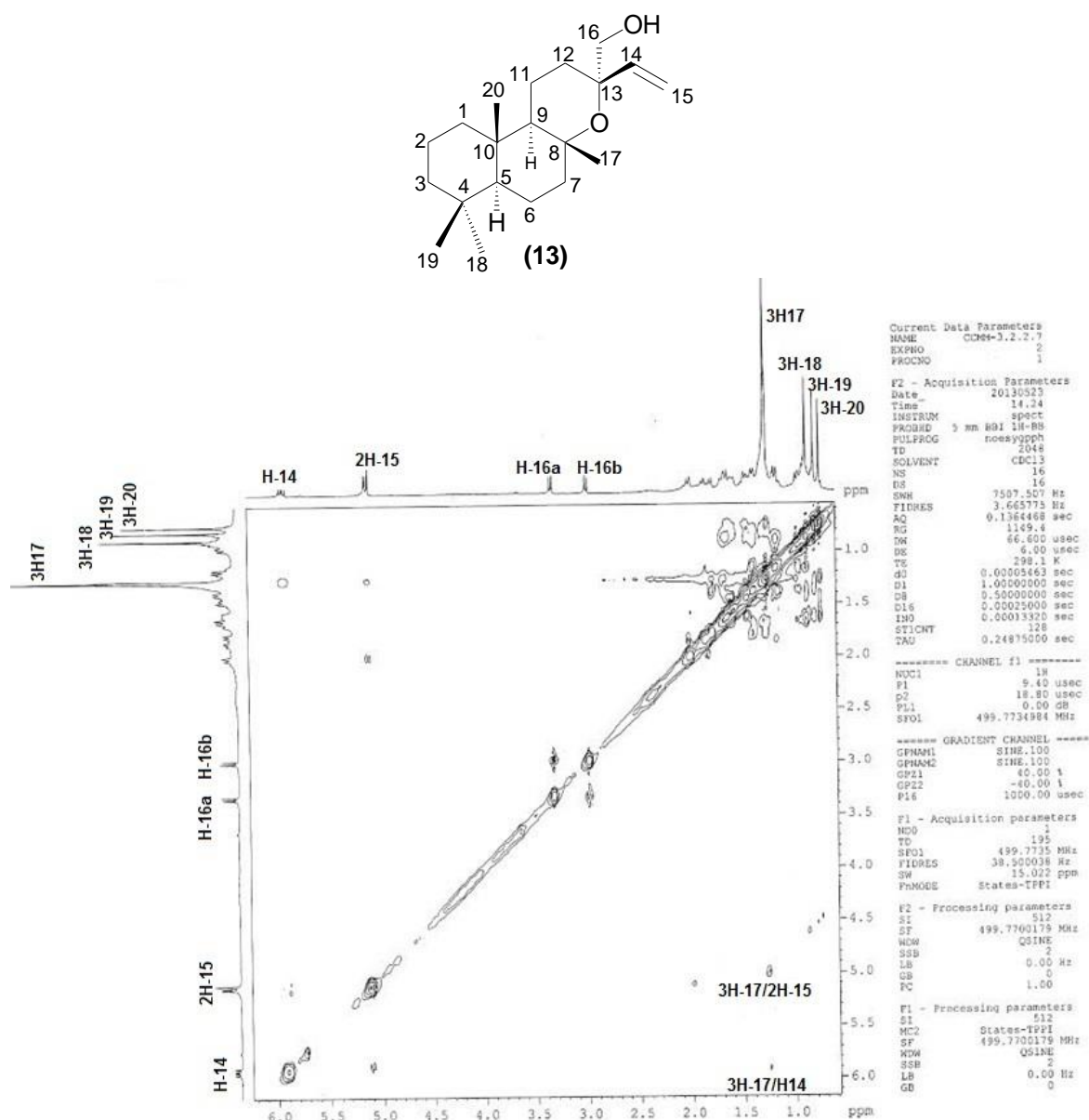


Figura 112: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**.

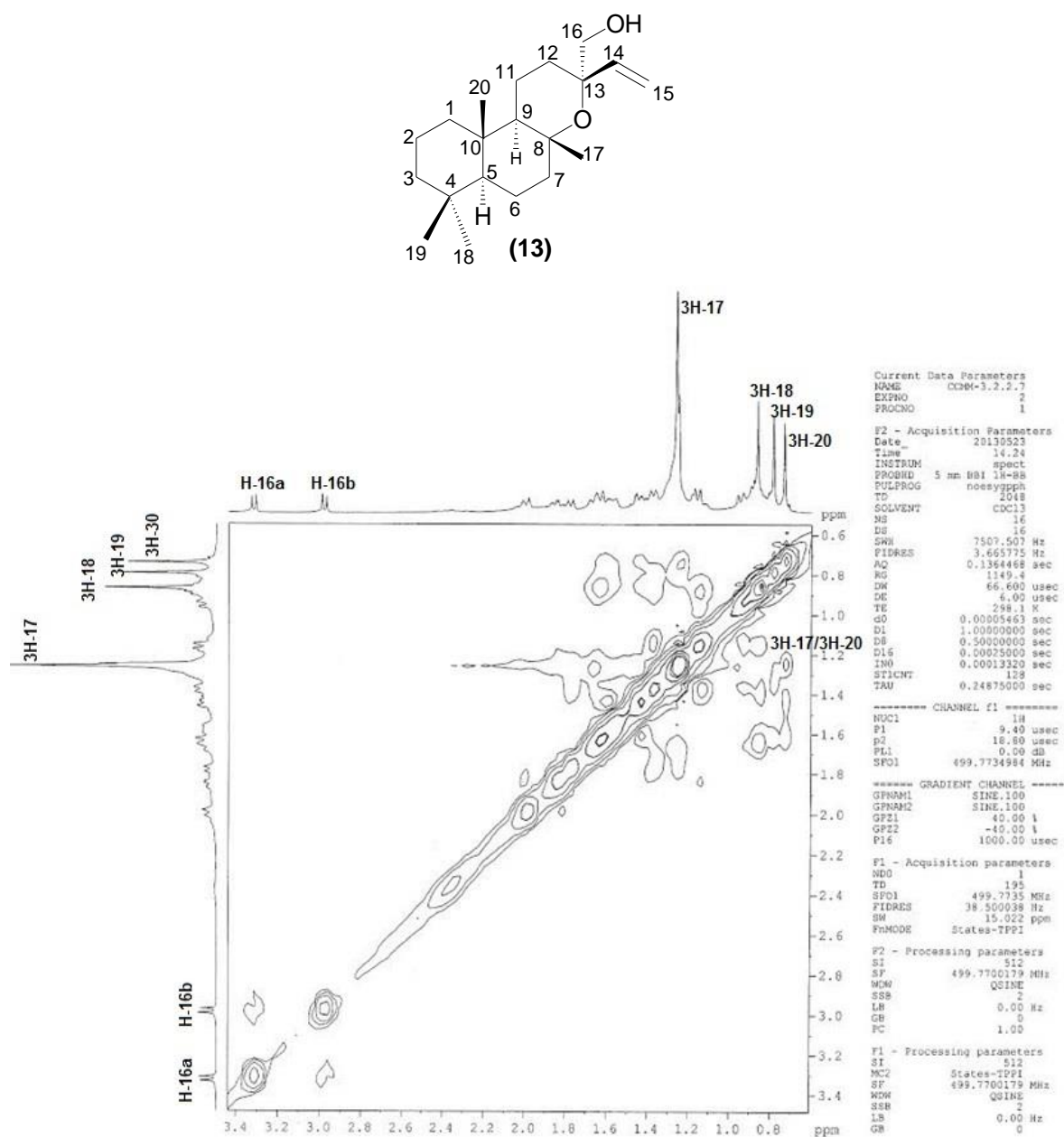
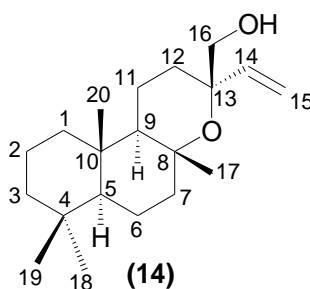


Figura 113: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxido (13)**.

5.2.3.5 Elucidação estrutural das substâncias 14:



O tratamento cromatográfico da fração CCMM-3.3 conduziu ao isolamento da substância **14**, em forma de óleo, solúvel em CH_2Cl_2 e com 5,7 mg de massa.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 117**, página 150) exibiu perfil semelhante ao da substância **14** com um duplo duplete em δ_{H} 5,81 (*dd*, 17,4 e 9,5 Hz, H-14), que exibiu acoplamento no mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figuras 118 e 119**, páginas 151 e 152) com os sinais em δ_{H} 5,28 (*dd*, 17,4 e 1,5 Hz) e 5,14 (*dd*, 9,5 e 1,5 Hz) 2H-15, caracterizando um sistema ABX comum em grupo vinilidina (Silverstein e Webster, 2000). O espectro de RMN de ^1H (**Figura 117**, página 150) apresentou também dois sinais duplos atribuídos a hidrogênios geminais 2H-16 ligados a carbono carbinólico em δ_{H} 3,31 (*d*, 11,0 Hz) e 3,35 (*d*, 11,0 Hz), e três sinais simples em 0,89 3H-18; 0,82 6H-19/20 e 1,27 3H-17.

A sobreposição em δ_{H} 0,82 6H-19/20 foi sustentada após análise do mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figuras 122 e 123**, páginas 155 e 156), que apresentou correlação de δ_{H} 0,82 com os sinais de carbono em δ_{CH_3} 21,7 (CH_3 -19) e 15,1 (CH_3 -20).

O espectro de RMN de ^{13}C DEPTQ (**Figuras 120 e 121**, páginas 153 e 154) apresentou sinais característicos de diterpeno da classe manoilóxido (Dolmazon e colaboradores, 1995; Alcaraz e colaboradores, 1989) com quatro metilas em δ_{CH_3} 25,8 (CH_3 -17); 33,6 (CH_3 -18); 21,7 (CH_3 -19) e 15,1 (CH_3 -20). O espectro exibiu também os sinais em δ_{CH} 143,9 (H-14) e δ_{CH_2} 114,0 (2H-15) atribuídos ao grupo vinila, o sinal em fase positiva em δ_{CH_2} 68,5 foi atribuído ao carbono carbinólico (2H-16).

A presença de um anel tetrahidropirano foi confirmada através dos sinais em δ_{C} 75,5 (C-8) e 76,3 (C-13), que exibiram correlações $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$ no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figura 124 e 125**, página 157 e 158) [δ_{H} 1,89

(2H-7) e 1,30 (3H-17) com δ_C 75,5 (C-8)], e dos hidrogênios δ_H 2,10; 1,68 (2H-12); 5,81 (H-14) e 3,31; 3,35 (2H-16) com o carbono (C-13) em δ_C 76,3.

Os demais assinalamentos dos carbonos e hidrogênios na substância foram estabelecidos através do mapa de correlação heteronuclear HSQC e estão apresentados na **tabela 24**, página 148, bem como os pontos de ligação $^2J_{HC}$ e $^3J_{HC}$ observados no mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figura 124 e 125**, página 157 e 158).

O espectro de Massas de Baixa Resolução EMBR (**Figura 115**, página 148) exibiu um pico em M^+ 291 Dalton, indicando a perda de radical metila, justificando a proposta de fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_2$ ($\Delta m/z$ 306 - 15 = 291 Dalton).

O Espectro de Massas de Alta Resolução EMAR (**Figura 116**, página 149) exibiu, em modo positivo, o pico $[M+K]$ 345,2411 (cálc. m/z 345,2196; $\Delta m/z$ 21,5) consistente com a proposta $KC_{20}H_{34}O_2$. As propostas de fragmentação que justificam os picos no espectro estão ilustradas no **Esquema 19**, página 149.

O experimento de interação espacial 1H - 1H -NOESY **Figura 126 e 127**, página 159 e 160 conduziu a determinação da conformação do grupo vinila ao exibir NOE entre (2H-16) em δ_H 3,31; 3,35 e 3H-17 em δ_H 1,30, sugerindo a conformação α para o grupo vinila. A conformação axial atribuída à metila (CH_3 -17) é sustentada pela alta frequência (δ_H 1,30), indicando que os hidrogênios não estão sob presença da nuvem eletrônica do oxigênio do anel tetrahidropirano (Alcaraz e colaboradores, 1989) (**Figura 114**).

Desta forma, a análise dos dados espectrais agregados à comparação com modelos na literatura (Dolmazon e colaboradores, 1995; Alcaraz e colaboradores, 1989) conduziram a elucidação estrutural da substância **14** como sendo o diterpeno chamado **16-hidroximanoilóxido** isolado pela primeira vez no gênero *Conchocarpus*.

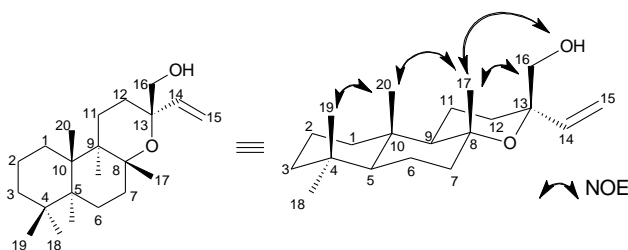


Figura 114: Interação especial dos núcleos de hidrogênio observados no espectro de NOESY da substância **14**.

Tabela 24: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **14**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC, com os deslocamentos químicos (δ) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e comparação com valores do epímero do diterpeno **16-hidroxi-13-epi-manoilóxico**.

Substância 14					CCMM-3.2.2.7	
HSQC			HMBC		HSQC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	38,9	1,55; 0,90		H-5; H-9; 3H-20	39,3	1,65; 0,85
2	18,5	1,59; 1,43	H-3b		18,6	1,60; 1,45
3	41,9	1,42 1,16 (<i>dt</i> , 13,7, 4,0)		3H-18; 3H-19	41,1	1,42; 1,16
4	38,4	-			31,9	-
5	56,4	0,95 (<i>dd</i> , 8,7; 2,0)		H-7a; 3H-18; 3H-19; 3H-20	56,4	0,96 (<i>dd</i> , 12,2; 2,3)
6	20,1	1,70; 1,30			19,8	1,65; 1,25
7	43,7	1,89 (<i>dt</i> , 12,4; 3,2) 1,59		3H-17	42,8	1,80; 1,42
8	75,5	-	2H-7; 3H-17		76,1	-
9	52,7	1,58		H-7a; 3H-17; 3H-20	58,4	1,16
10	37,2	-	3H-20		37,5	-
11	14,5	1,60; 1,44	2H-12		15,2	1,55; 1,48
12	27,2	2,10; 1,68		H-14; 2H-16	28,3	2,05; 1,75
13	76,3	-	2H-12; H-14; 2H-16	2H-15	75,9	-
14	143,9	5,82 (<i>dd</i> , 17,4; 10,9)	H-15a	2H-12; 2H-16	144,0	5,93 (<i>dd</i> , 18,2; 10,9)
15	114,0	5,27 (<i>dd</i> , 17,4; 1,4) 5,13 (<i>dd</i> , 10,9; 1,4)	H-14		113,5	5,13 (<i>d</i> , 18,2) 5,12 (<i>d</i> , 10,9)
16	68,5	3,34 (<i>d</i> , 11,0) 3,30 (<i>d</i> , 11,0)		H-14;	69,6	3,39 (<i>d</i> , 10,7) 2,99 (<i>d</i> , 10,7)
17	25,8	1,30 (<i>s</i>)		H-9; 2H-7	24,0	1,27 (<i>s</i>)
18	33,6	0,89 (<i>s</i>)		H-5; 3H-19	33,3	0,88 (<i>s</i>)
19	21,7	0,82 (<i>s</i>)		H-5; 3H-18	21,3	0,81 (<i>s</i>)
20	15,1	0,82 (<i>s</i>)		H-5	15,9	0,75 (<i>s</i>)

Line#2 R.Time:15.6(Scan#:1577)

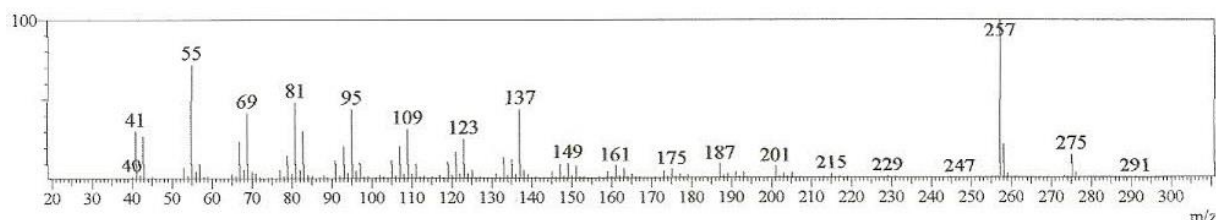


Figura 115: Espectro de Massas 70 eV do diterpeno **16-hidroximanoilóxico (14)**.

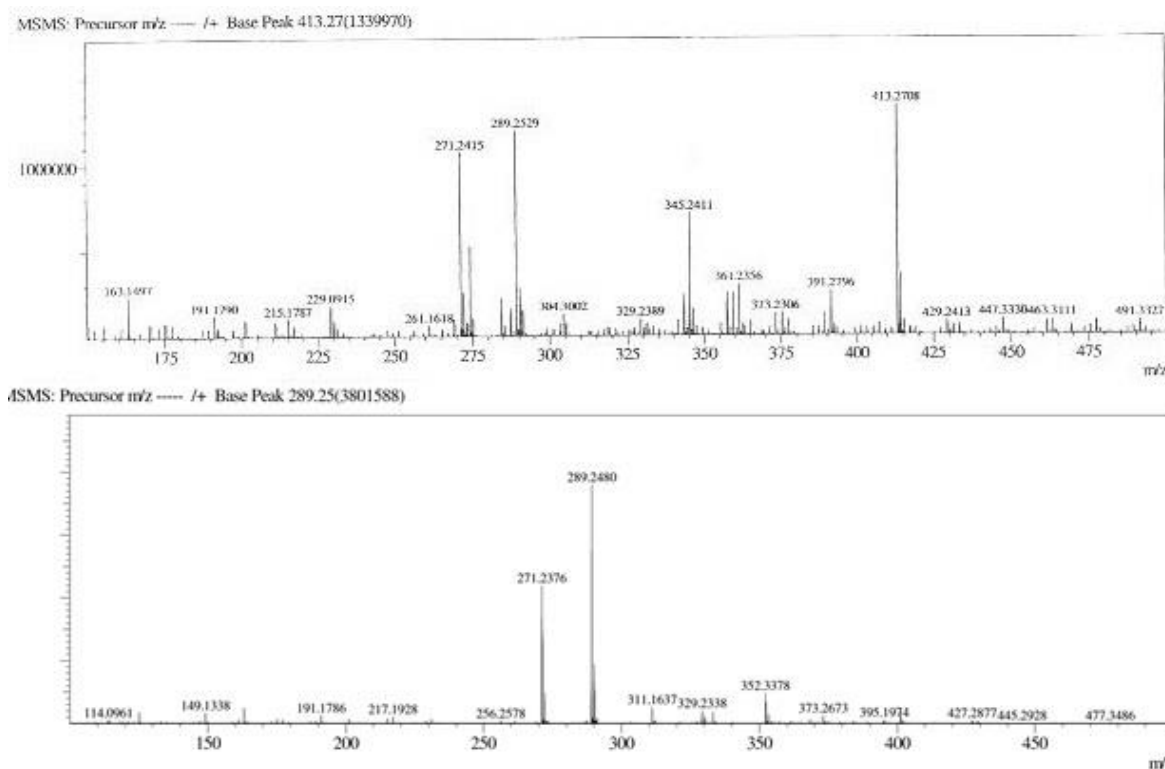
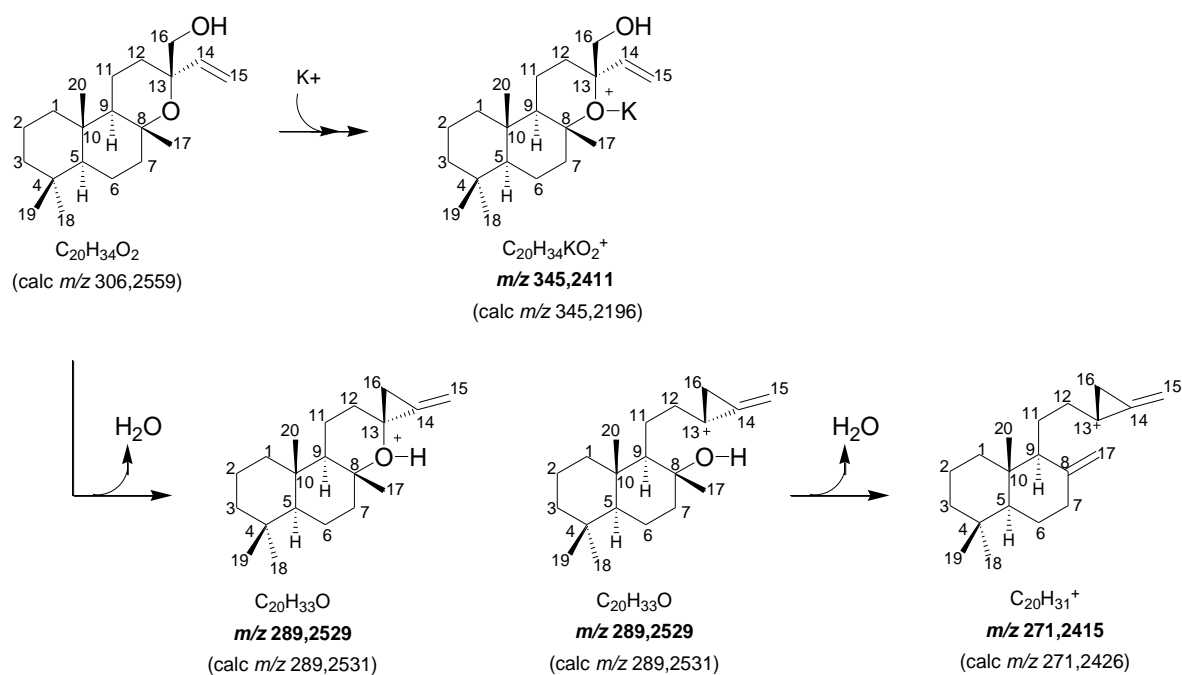


Figura 116: Espectro de Massas de alta resolução EMAR para o diterpeno **16-hidromonilóxido (14)**.



Esquema 19: Proposta de fragmentação para o diterpeno **16-hidroxi-manilóxido (14)**.

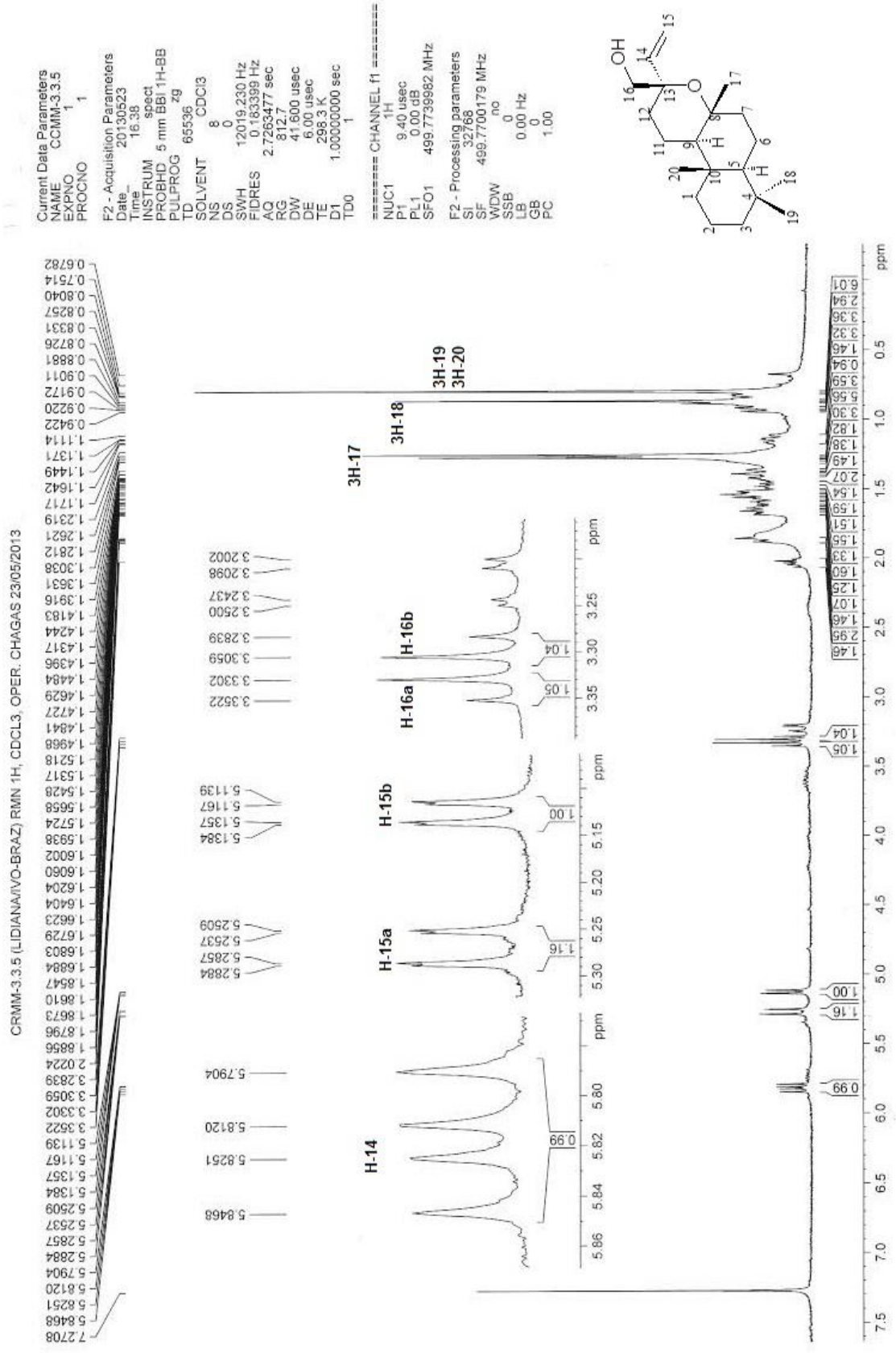


Figura 117: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do diterpene 16-hidroximanoilóxico (14).

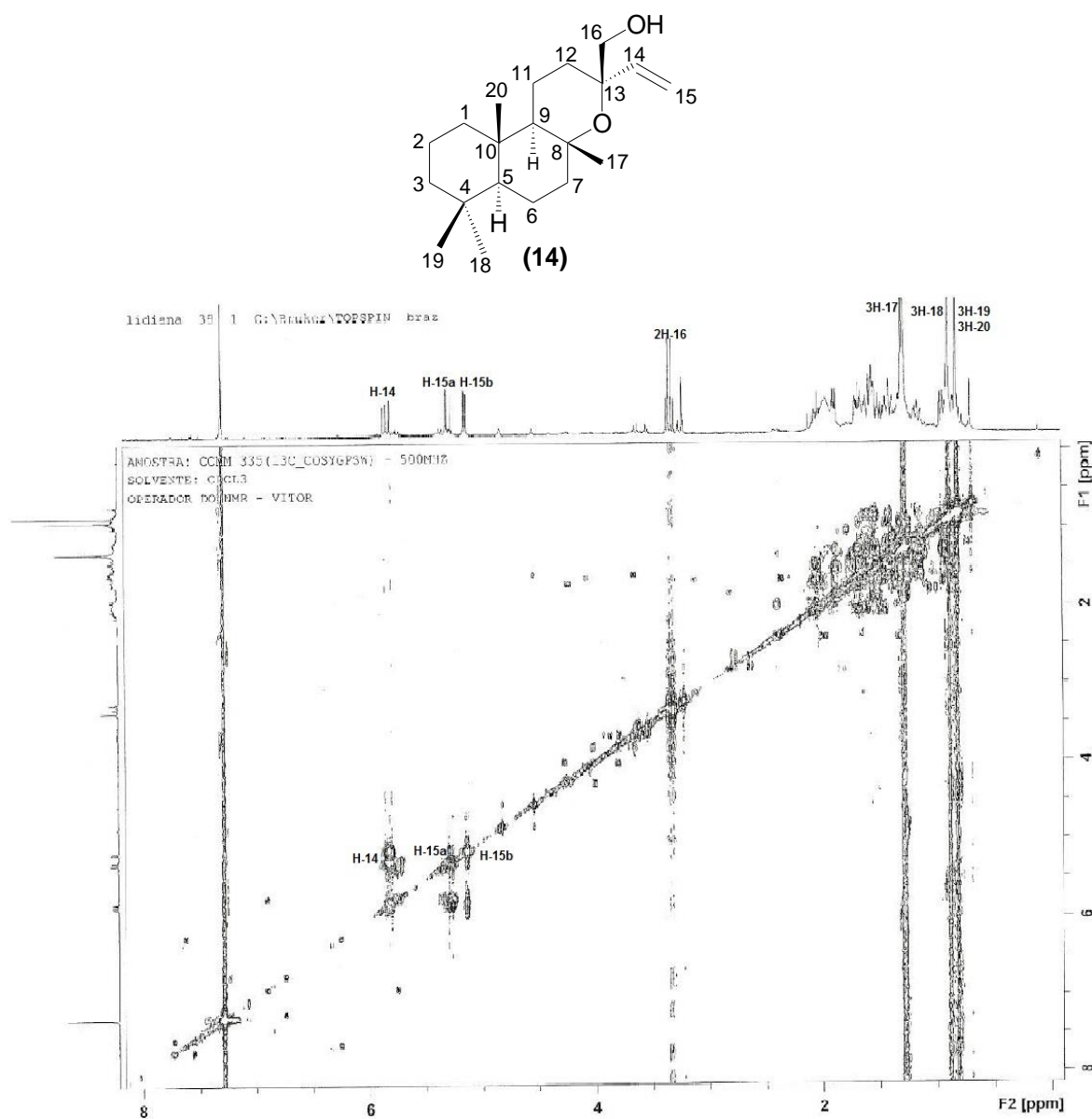


Figura 118: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno 16-hidroximanoilóxido (14).

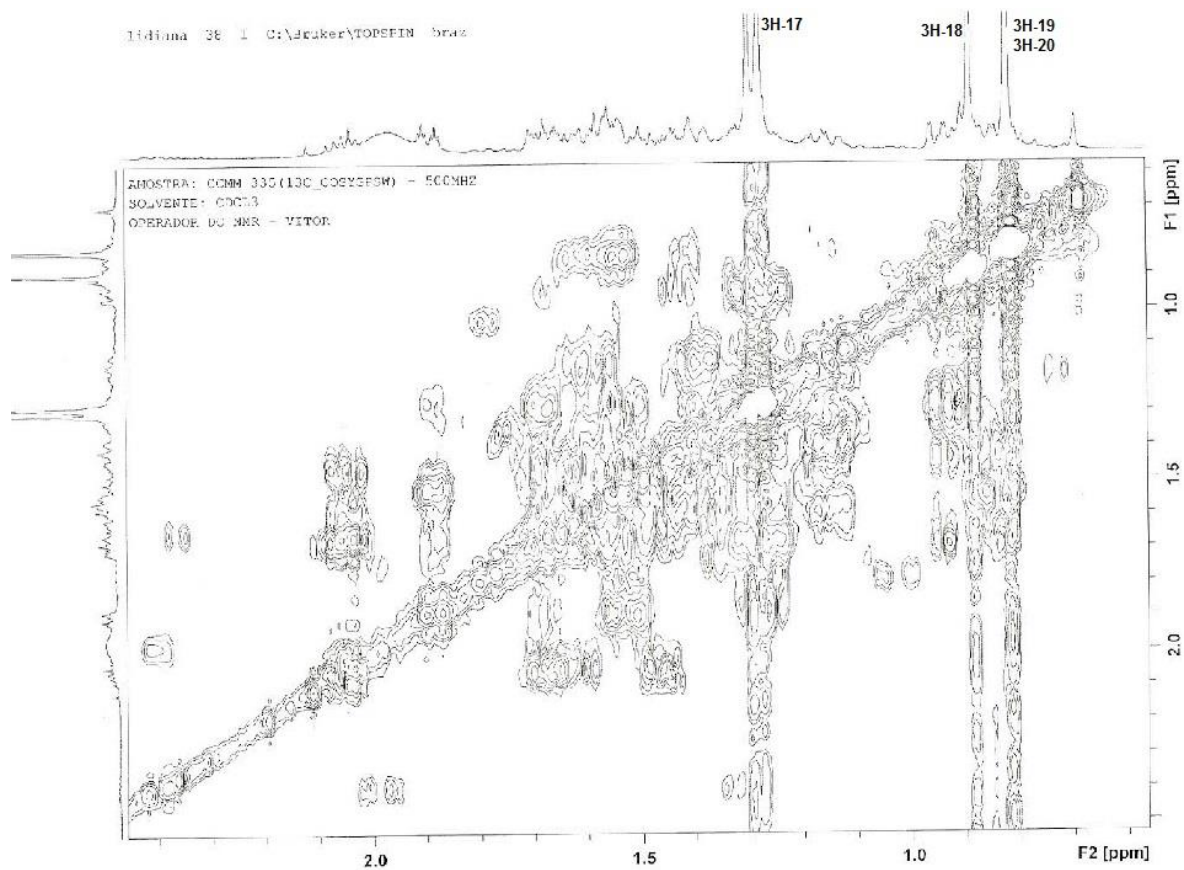
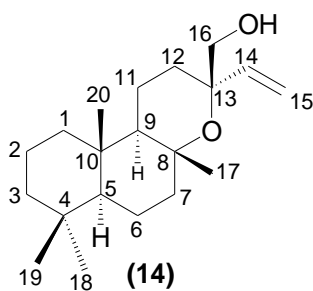


Figura 119: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpene **16-hidroxiimanoilóxido (14)**.

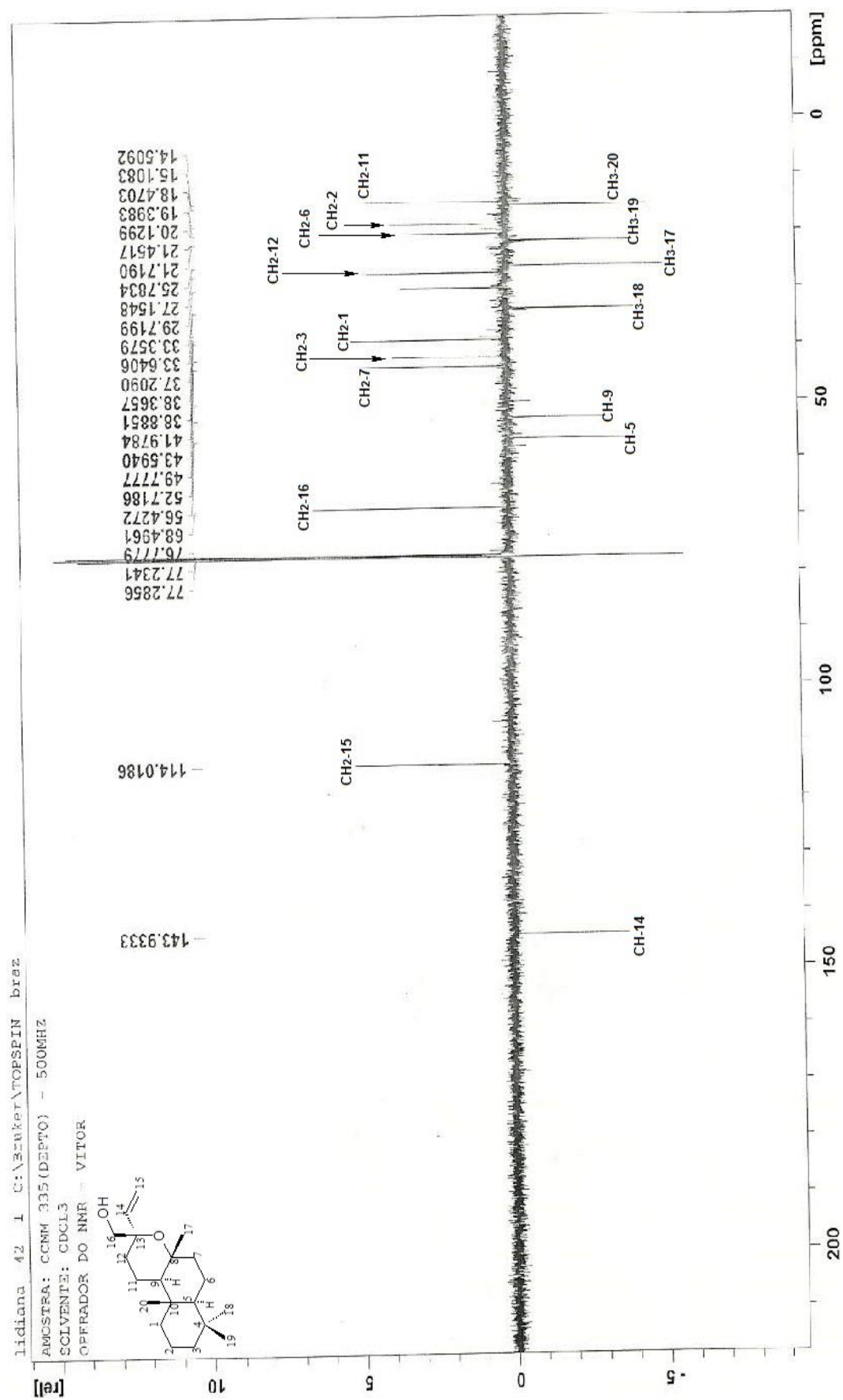


Figura 120: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃), do diterpeno 16-hidroxi-manoilóxido (14).

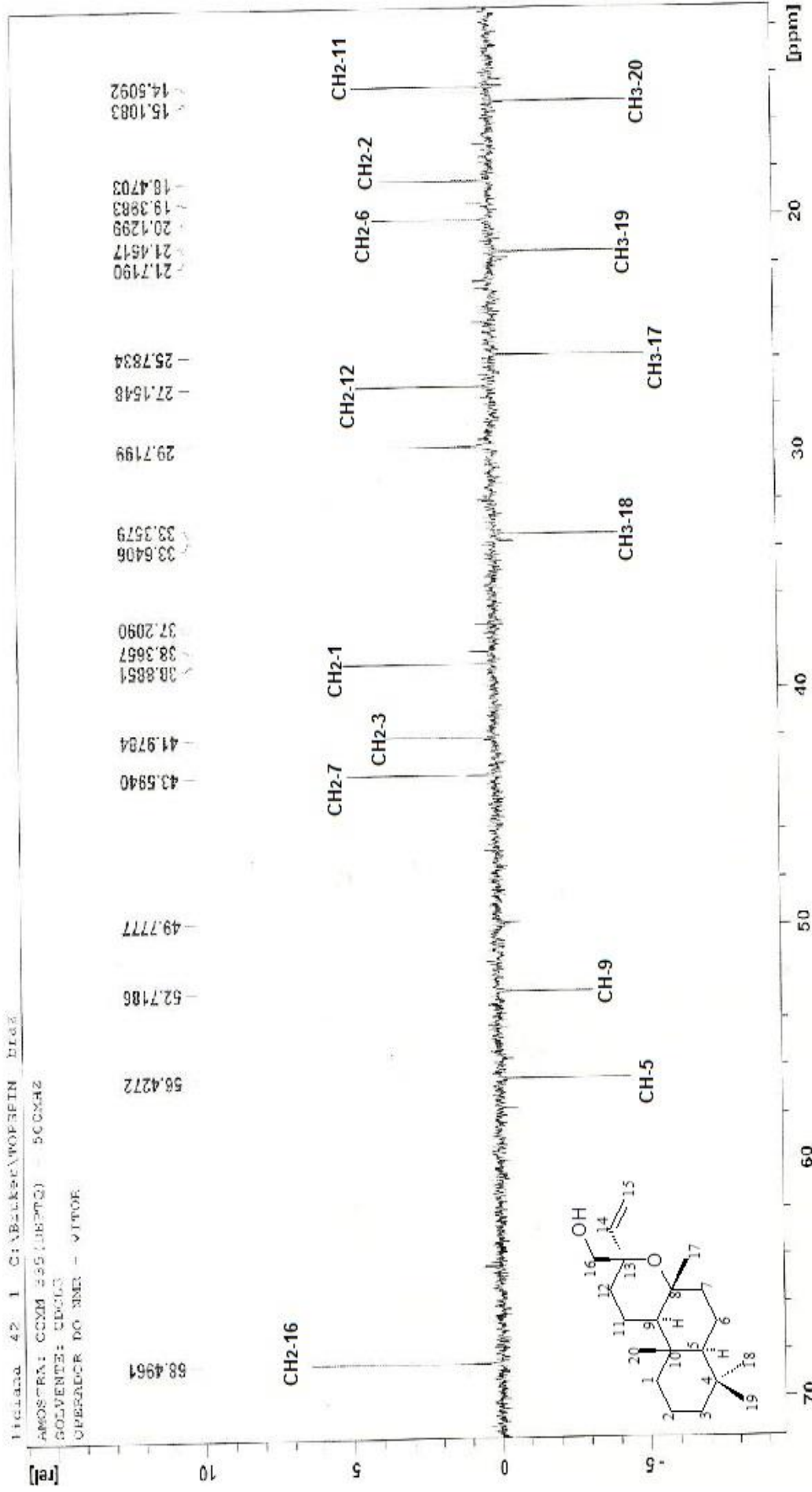


Figura 121: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃), com ampliação entre δ 46.0 e 10.0 ppm, do diterpeno 16-hidroxiimanoilóido (14).

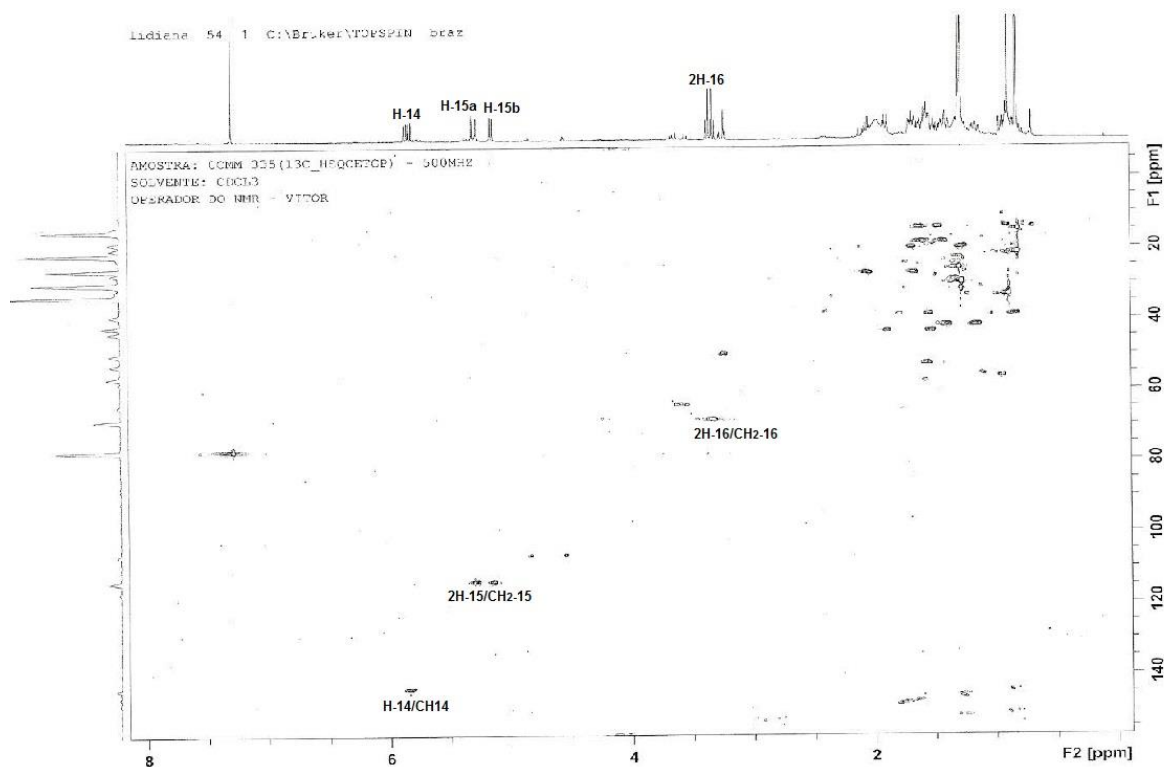
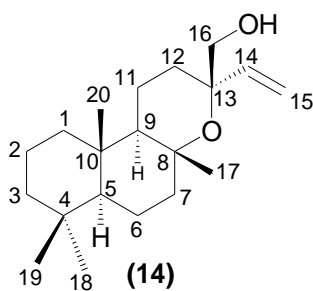


Figura 122: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl₃) do diterpene **16-hidroxiimanoilóxico (14)**.

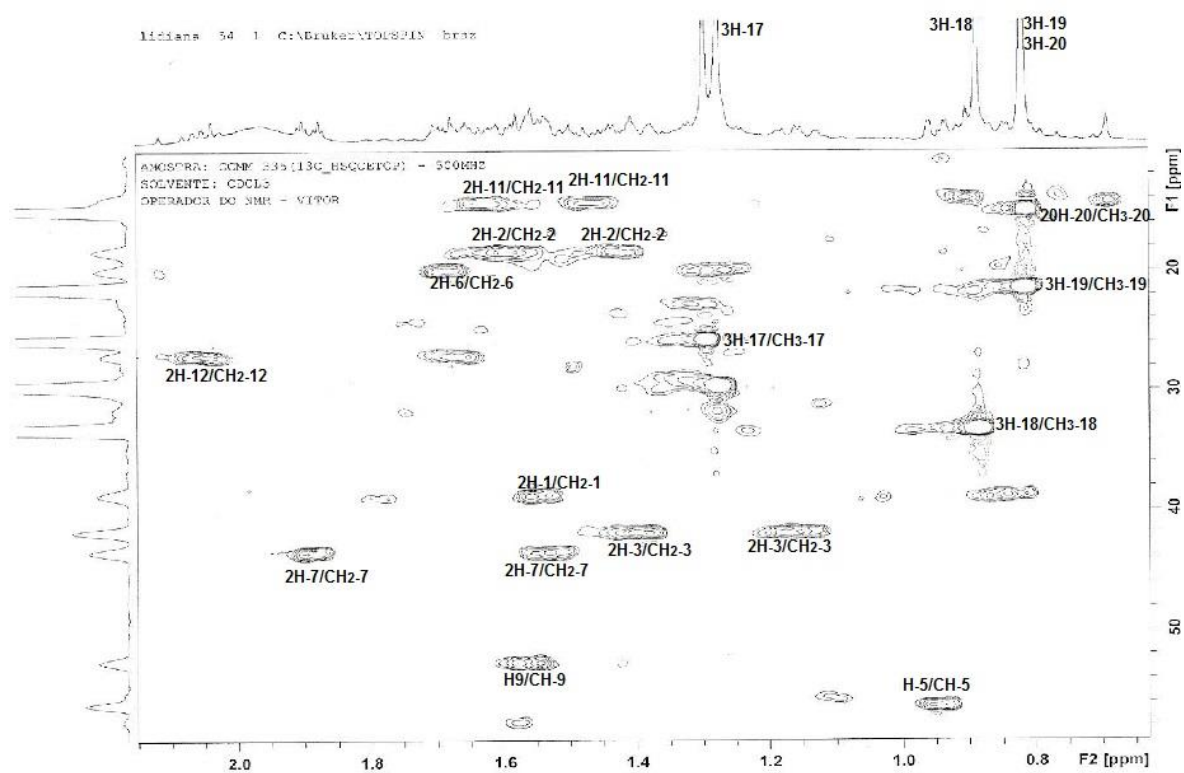
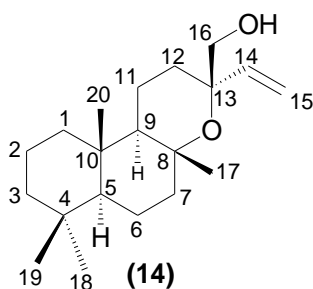


Figura 123: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-manoilóxico (14)**.

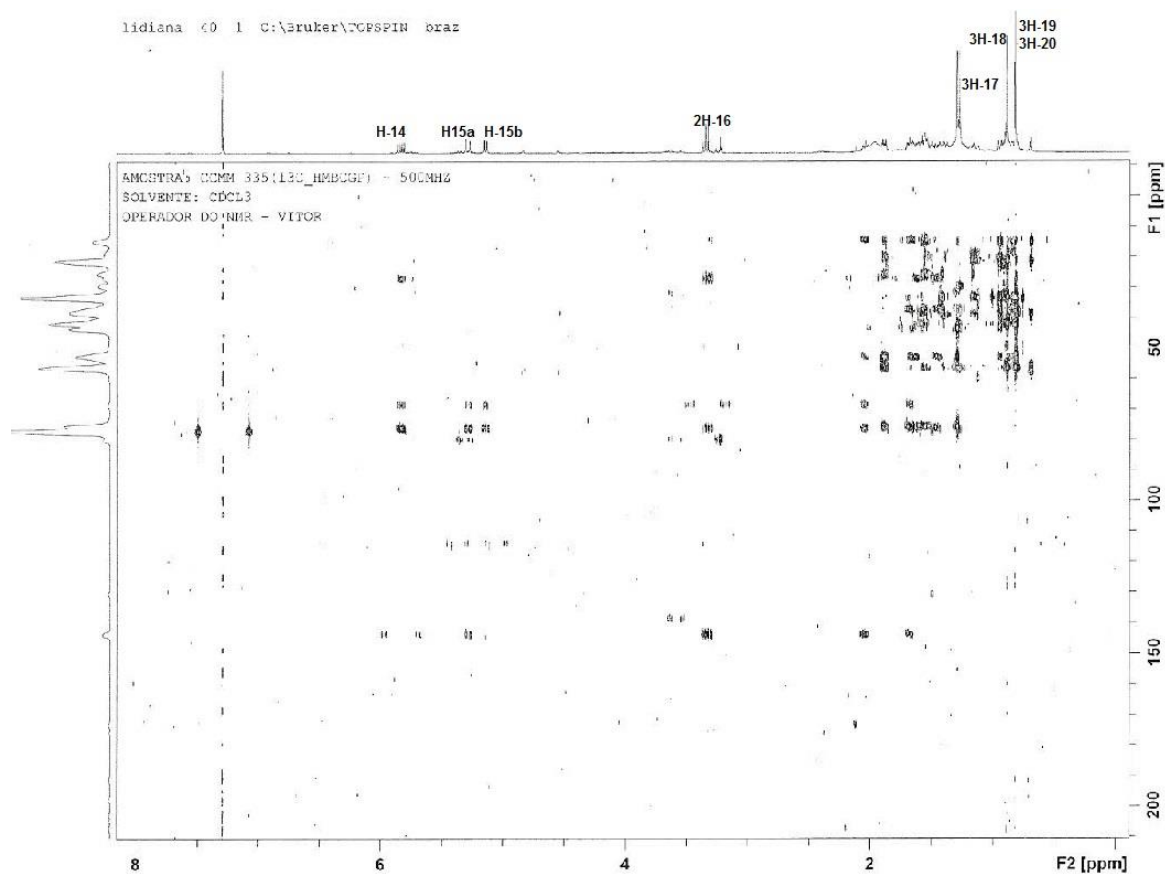
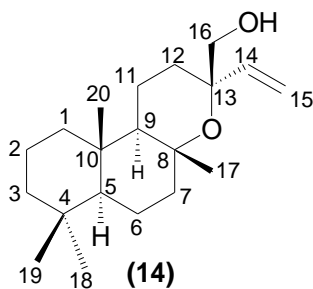


Figura 124: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃) do diterpeno 16-hidroxi-manolóxido (14).

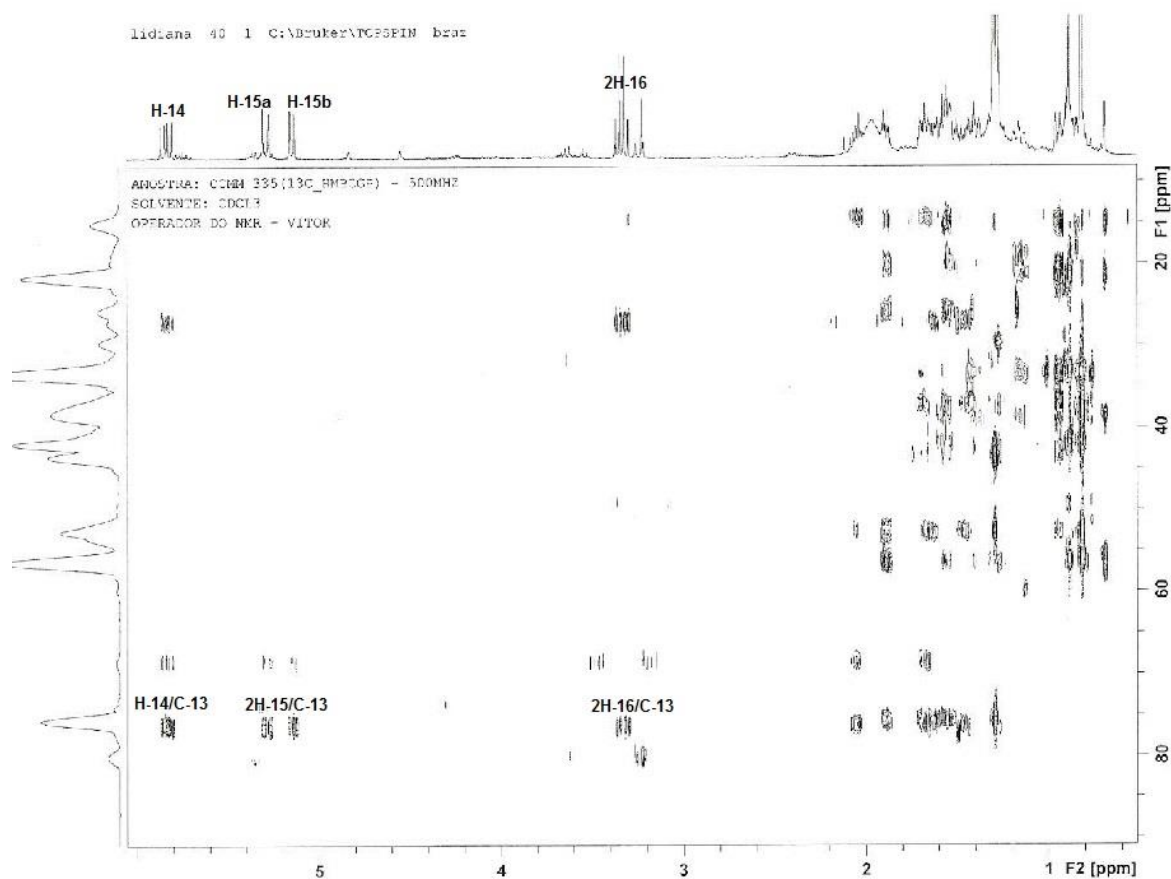
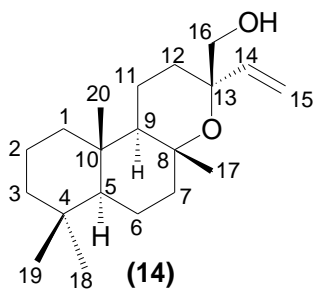
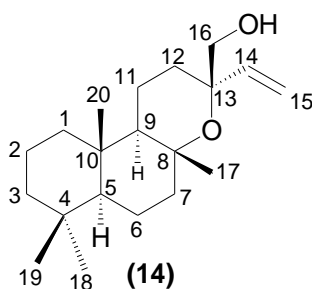


Figura 125: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (500 MHz, CDCl₃), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxiimanoilóxido (14)**.



CCMM-3.3.5 NOESY , RMN 1H, CDCL3, OPER. CHAGAS 23/05/2013

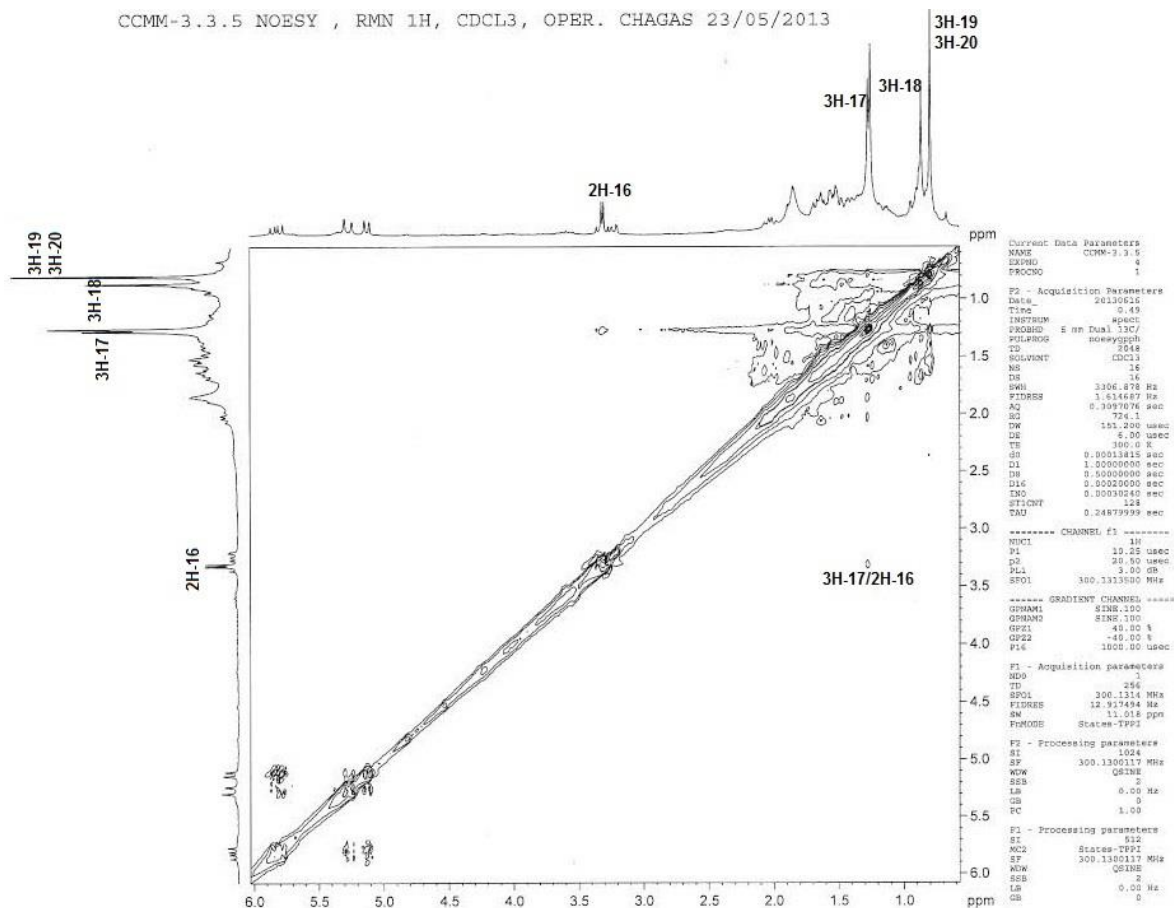


Figura 126: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3) do diterpeno **16-hidroxi-manoilóxido (14)**.

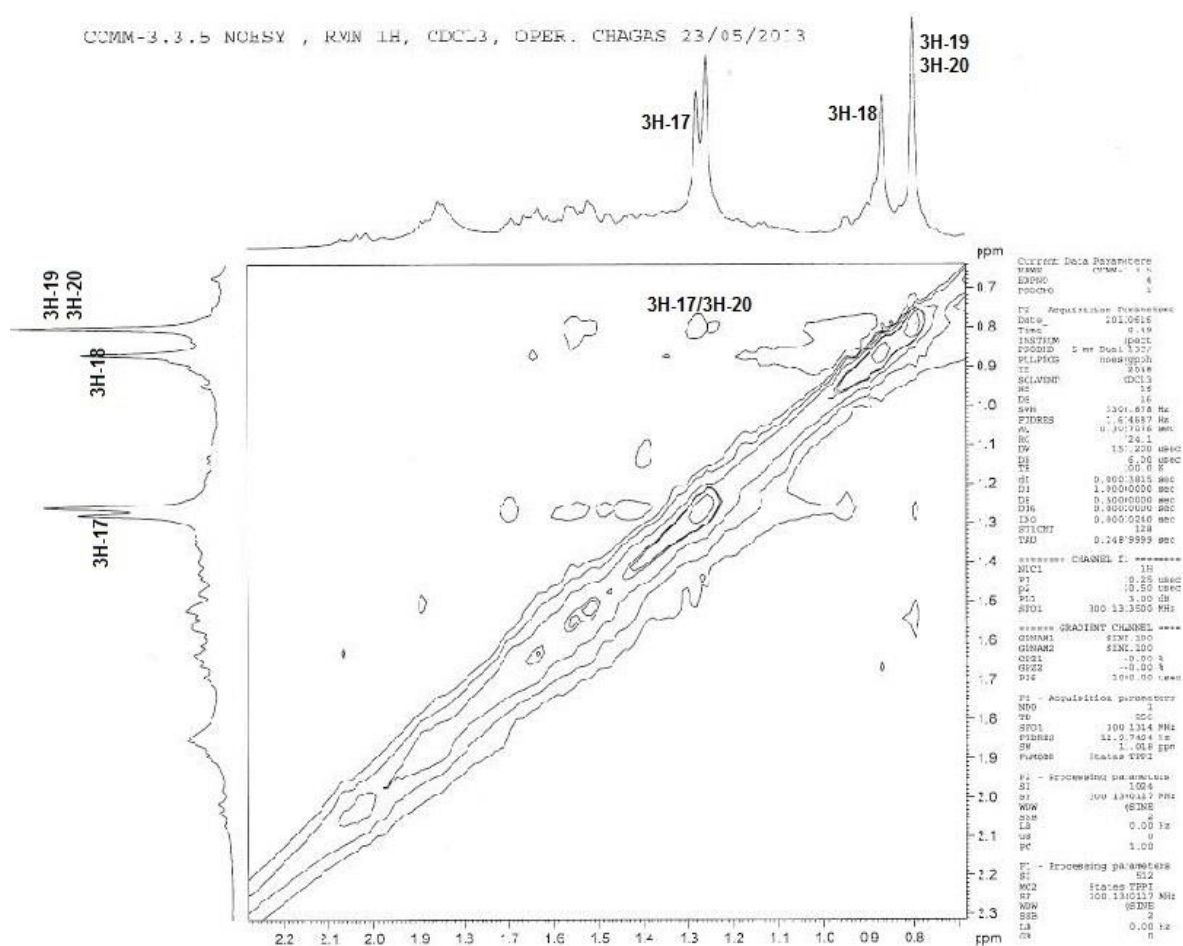
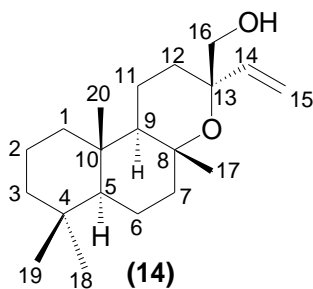
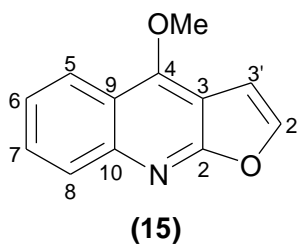


Figura 127: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -NOESY (500 MHz, CDCl_3), com ampliação, do diterpeno **16-hidroxi-manoilóxico (14)**.

5.2.4 Alcaloides

5.2.4.1 Elucidação estrutural da substância 15



A substância **15** (81,3 mg) foi isolada do extrato metanólico da madeira de *C. cyrtanthus*, da fração CCMM-4, e apresentou-se como um sólido amorfo cristalino com 132-133 °C. Ao ser submetida à CCDA e revelada com reagente de Dragendorff, apresentou cor de laranja sugerindo se tratar de um alcaloide.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (100 MHz, CDCl_3) (**Figura 132**, páginas 167) permitiu a identificação de doze sinais, sendo seis metínicos sp^2 , cinco sinais referentes a carbonos não hidrogenados sp^2 , além de um sinal metílico em δ_{C} 59,7 referente a grupo metoxila (**Tabela 25**, página 163).

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (**Figuras 129 e 130**, páginas 164 e 165) exibiu sinais característicos de um sistema aromático dissubstituído em *orto* com sinais em δ_{H} 8,29 (*d*, 8,3 Hz, H-5); 7,46 (*t*, 15,0 Hz, H-6); 7,70 (*t*, 15,0 Hz, H-7) e 8,03 (*d*, 8,5 Hz, H-8), que foram corroborados através da análise do mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H -COSY (**Figura 131**, página 166).

Foram observados também presença de dois sinais duplos em δ_{H} 7,65 (*d*, 2,7 Hz, H-2') e 7,10 (*d*, 2,6 Hz, H-3') característicos de anel furano, além do sinal simples em δ_{H} 4,48, referente a grupo metoxila, característicos de alcaloides furoquinolínicos, comuns em família Rutaceae (Bellete e colaboradores, 2012).

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (**Figura 133**, página 168) exibiu as correlações $^1J_{\text{HC}}$ entre os hidrogênios em δ_{H} 7,65 (*d*, 2,7 Hz, H-2') e 7,10 (*d*, 2,6 Hz, H-3') e do grupo metoxila em δ_{H} 4,48 com os átomos de carbono CH-2'; CH-3' e OMe-4 em δ_{C} 143,6; 104,8 e 59,7 respectivamente, além da atribuição dos deslocamentos químicos dos demais carbonos hidrogenados (**Tabela 25**, página 163).

O espectro de massas de baixa resolução EMBR (**Figura 128**, página 162.) sustenta a proposta de um alcaloide furoquinolínico, ao apresentar pico do íon molecular ($[\text{M}]^+$) em m/z 199 Dalton, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_2$

com nove graus de insuficiência de hidrogênio. A proposta com os principais fragmentos apresentados no espectro de massas esta apresentada logo a seguir no **Esquema 16**.

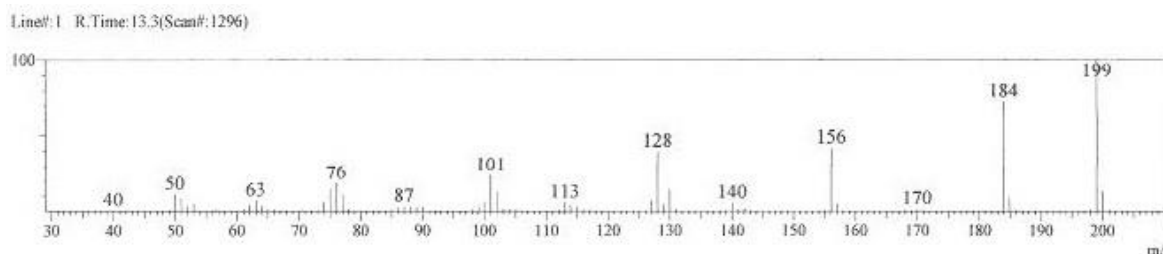
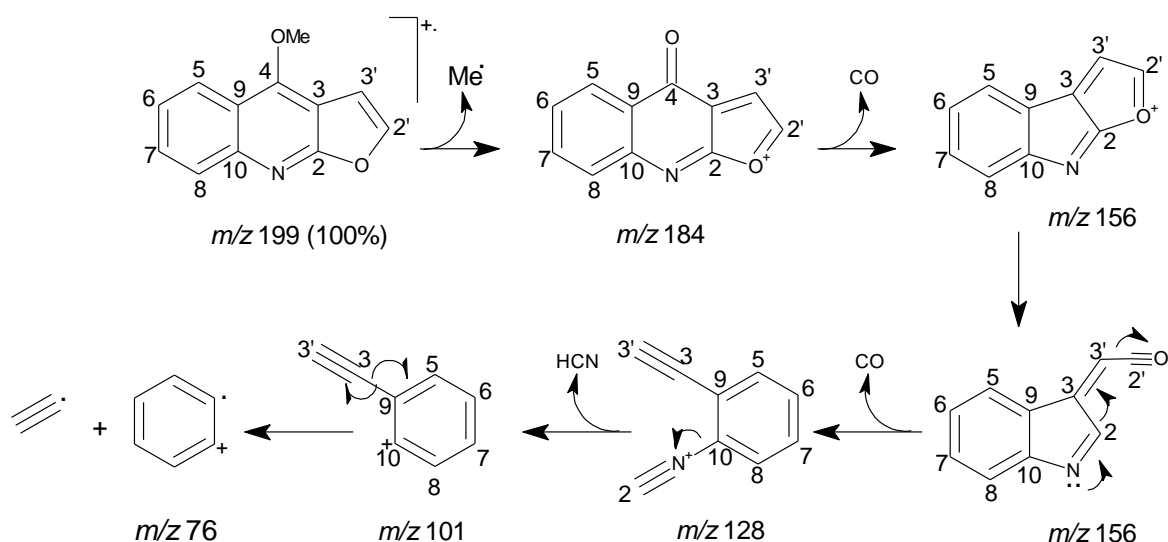


Figura 128: Espectro de Massas 70 eV do alcaloide **dictamina (15)**.



Esquema 20: Principais fragmentos observados nos espectros de massas EMBR para o alcaloide **dictamina (15)**.

A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos, bem como os pontos de ligação na substância foi estabelecida através da análise do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$), o qual exibiu as correlações entre H-2'/CH-3'; H-3'/C-3; H-5/C-4; OMe-4/C-4 (**Figuras 134**, página 169), as demais correlações estão listadas na **Tabela 25** presente na página 163.

A análise deste conjunto de dados, e a comparação com os dados de literatura (Pusset e colaboradores, 1991) conduziram a identificação da substância **15** como sendo o alcaloide Furo[2,3-b]quinolina-4-metoxi, conhecido

como dictamina, isolado anteriormente de *Conchocarpus fontanesianus*, *C. inopinatus* (Bellele e colaboradores 2012; Cabral 2011; Sá 2010).

Tabela 25: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (100 MHz) da substância **15**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para o alcaloide **dictamina Mo-06**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Substância 15					Mo-06	
HSQC			HMBC			
H/C	δ_{H}	δ_{C}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{H}	δ_{C}
2	-	163,8		H-2'; H-3'	-	168,9
3	-	103,5	H-3'	H-2'	-	103,7
2'	7,65 (d, 2,7 Hz)	143,6	H-3'		-	143,7
3'	7,10 (d, 2,6 Hz)	104,8	H-2'		-	104,8
4	-	156,3		H-5; MeO-4	-	157,0
5	8,29 (d, 8,3 Hz)	122,2		H-7	8,20 (dd, 8,4; 1,7Hz)	122,4
6	7,46 (t, 7,7 Hz)	123,9		H-8	7,45 (dd, 8,4; 1,7 Hz)	123,8
7	7,70 (t, 7,7 Hz)	130,2		H-5	7,68 (dd, 8,4; 1,4 Hz)	129,6
8	8,03 (d, 8,5 Hz)	128,1		H-6	8,01 (dd, 8,4; 1,4 Hz)	128,0
9	-	118,7		H-6; H-8	-	119,0
10	-	145,6		H-8; H-7	-	145,9
MeO-4	4,48 (s)	59,7			4,45 (s)	59,1

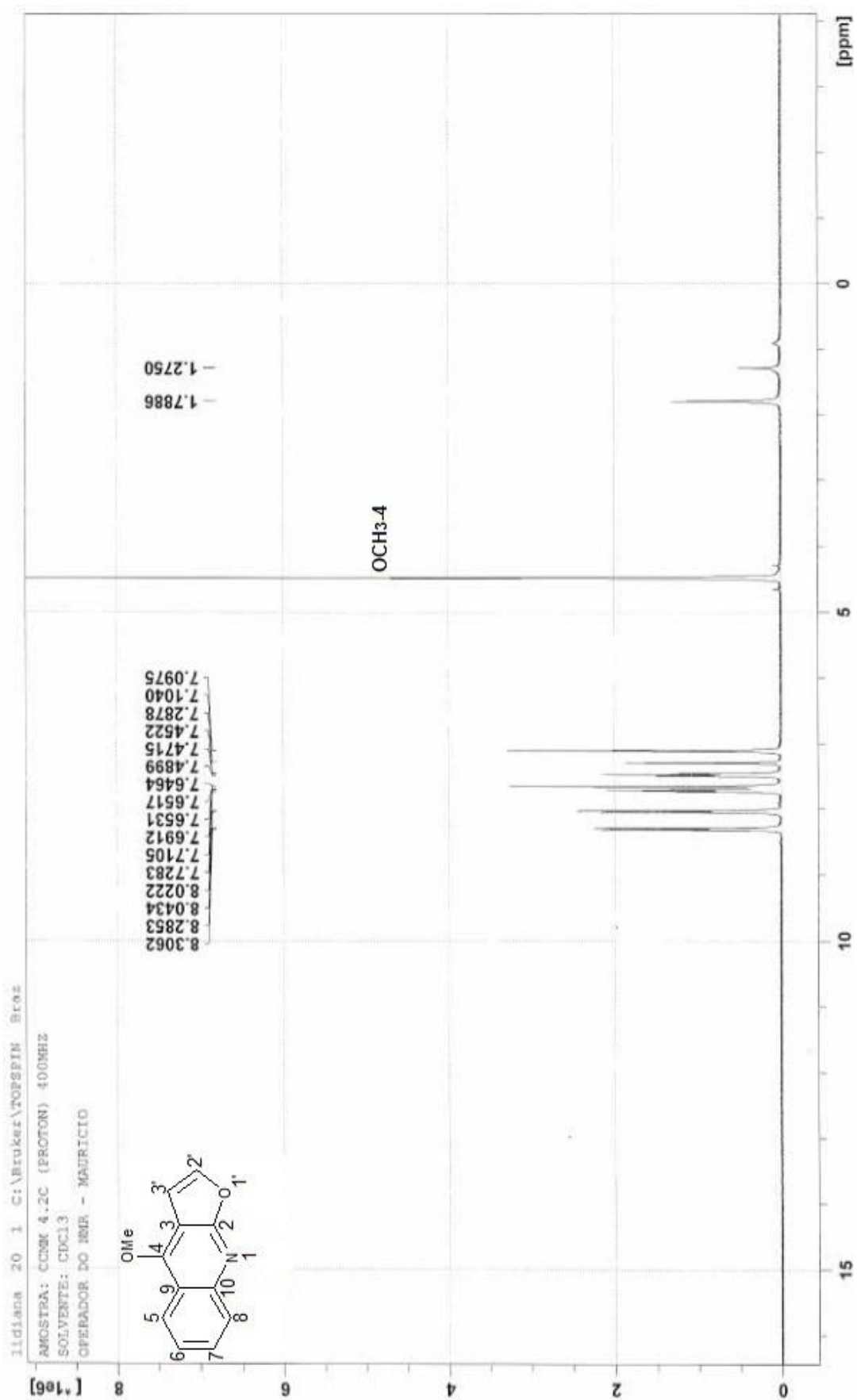


Figura 129: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide dictamina (15).

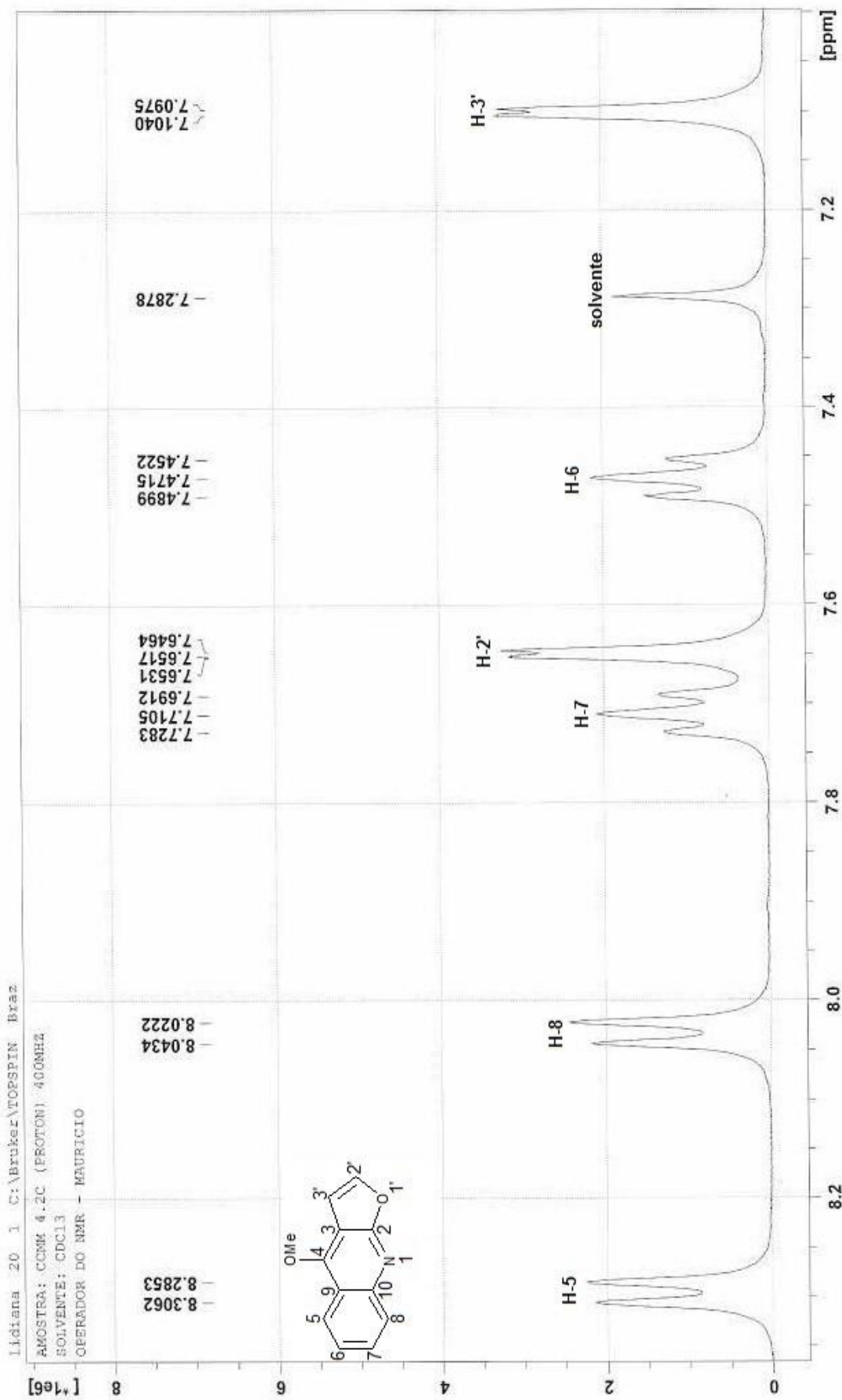


Figura 130: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliação entre δ_{H} 8.4 e 7.0 ppm do alcaloide dictamina (15).

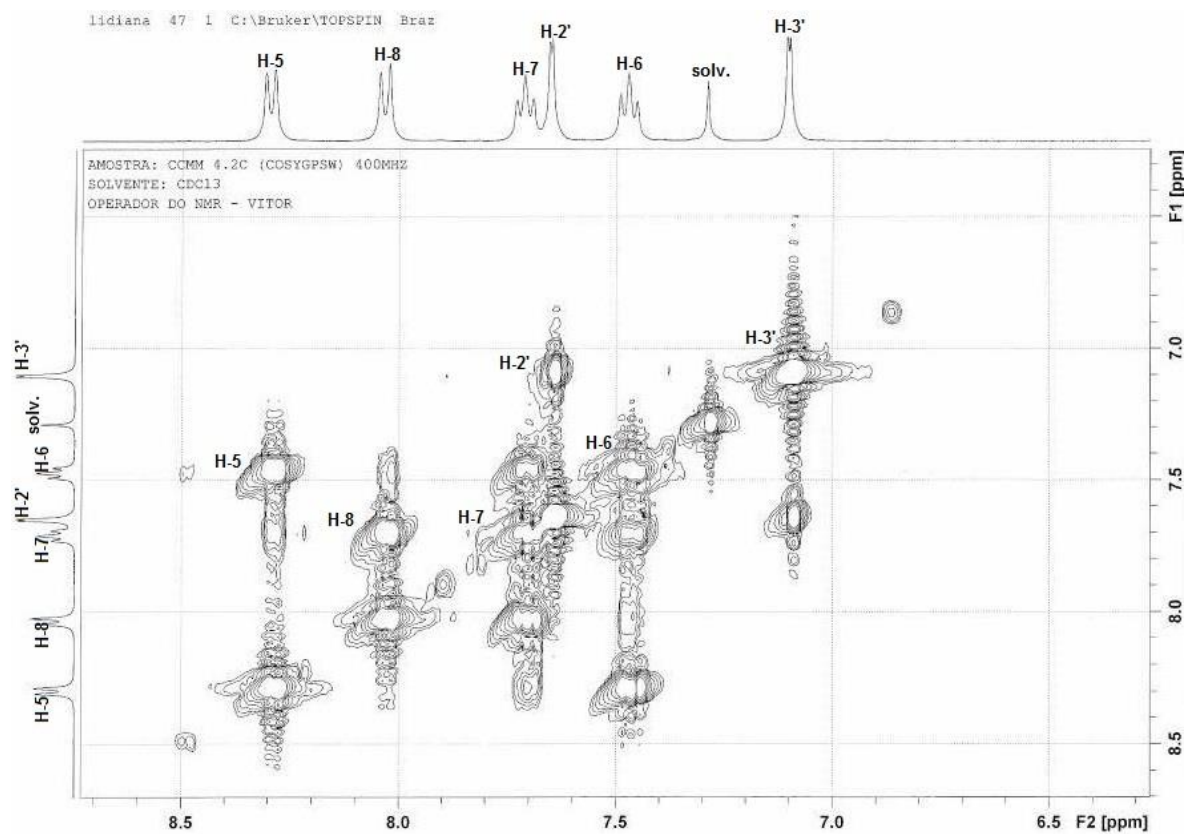
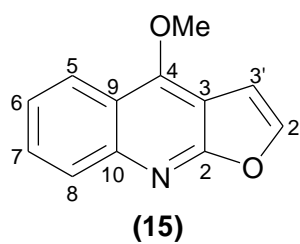


Figura 131: Mapa de correlação ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide dictamina (15).

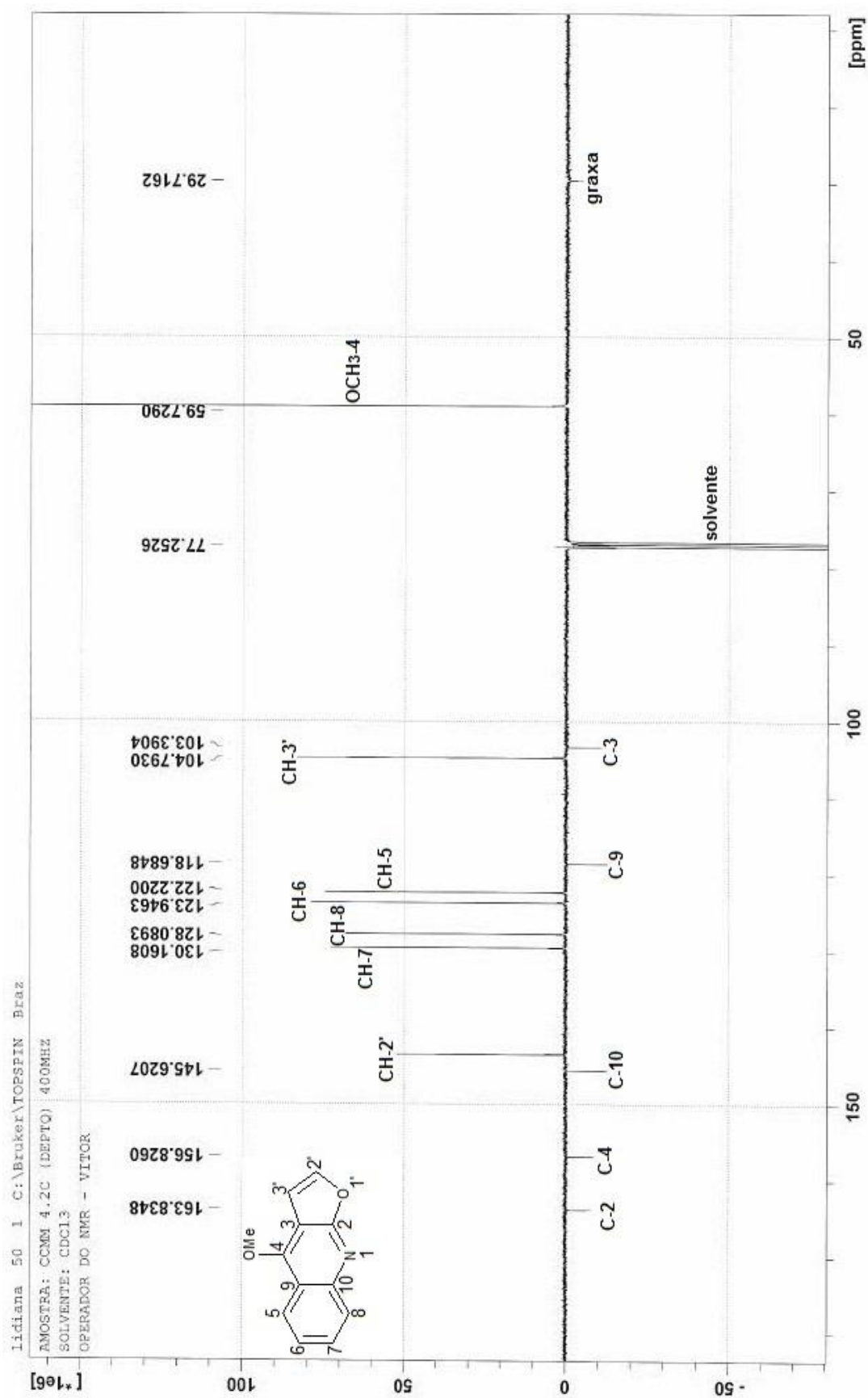


Figura 132: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).

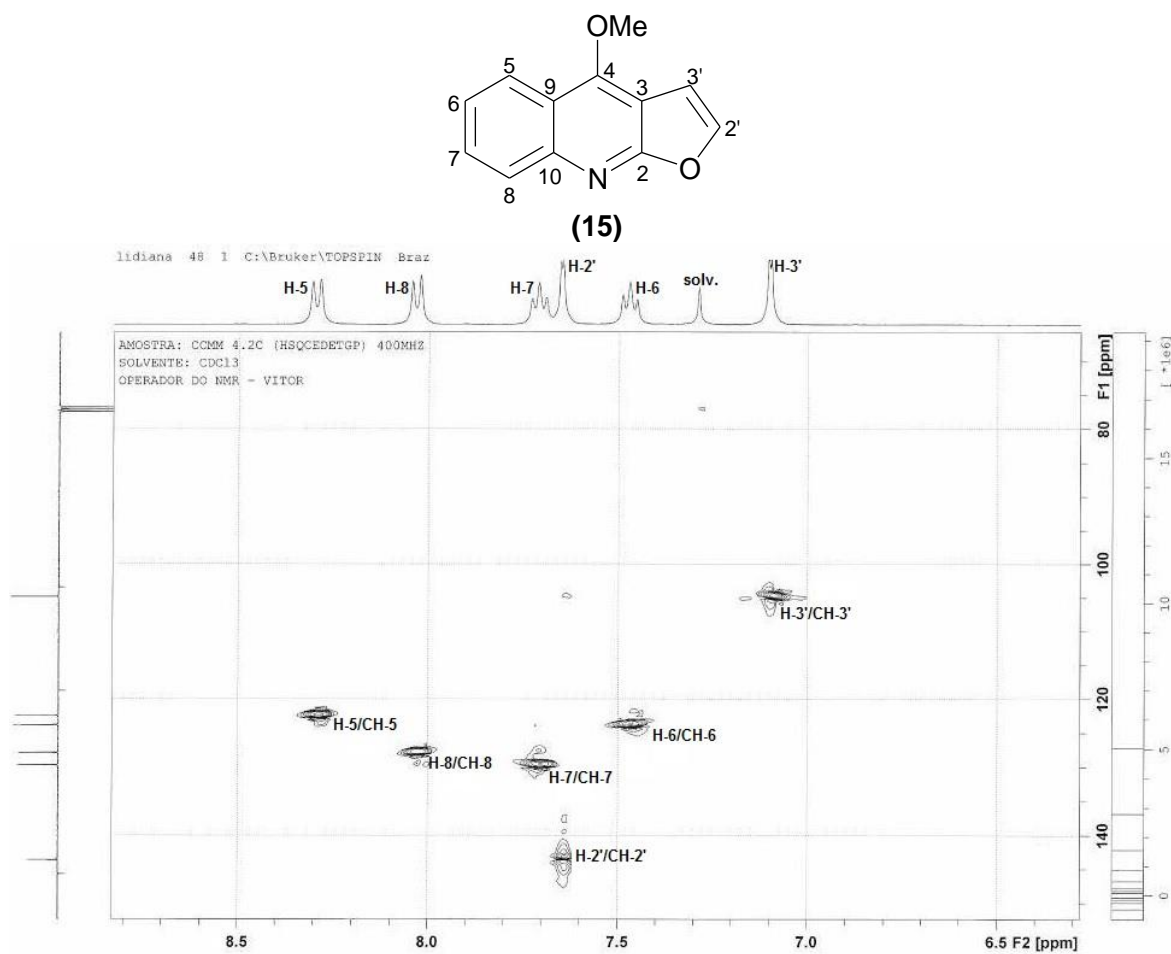


Figura 133: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C ($^1J_{\text{HC}}$, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).

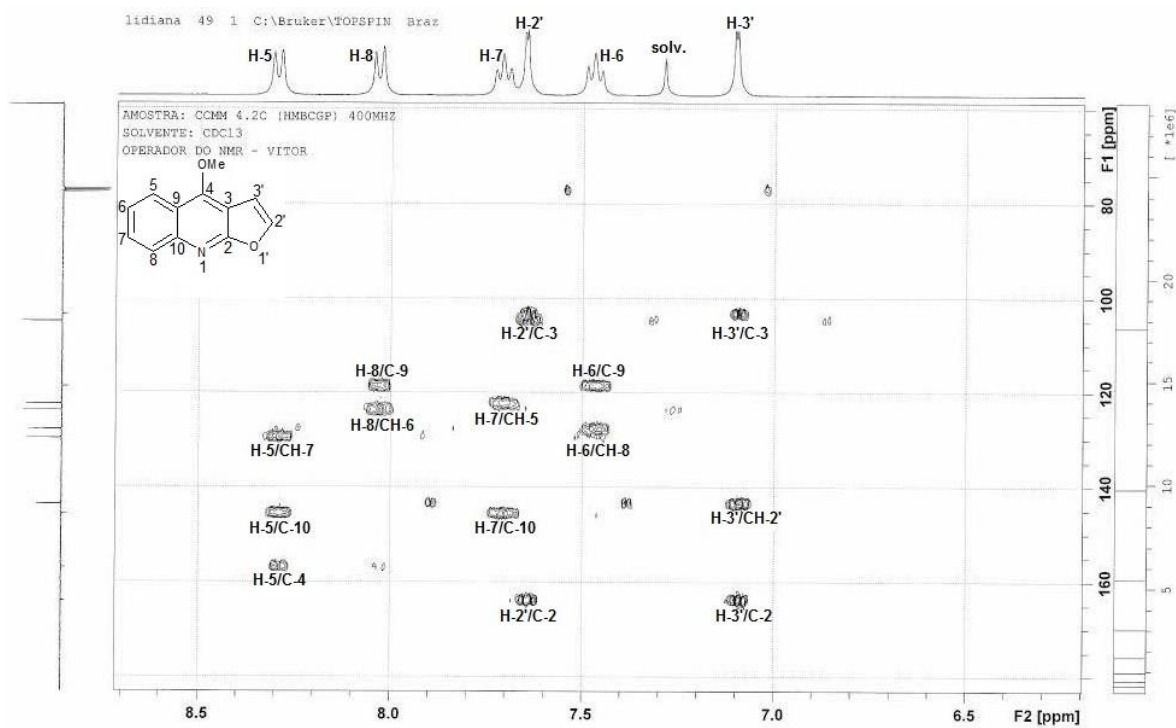
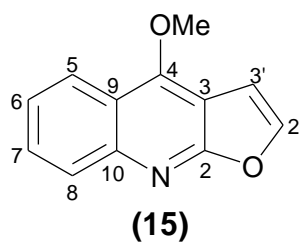
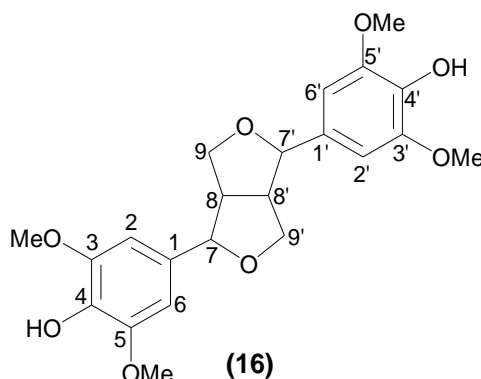


Figura 134: Mapa de correlação HMBC ^1H - ^{13}C ($^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$, CDCl_3) do alcaloide dictamina (15).

5.2.5 Lignanas

5.2.5.1 Elucidação estrutural da substância 16:



A substância **16** foi isolada da fração CCMM-5.9 da madeira de *C. cyrtanthus* após o tratamento cromatográfico CCDP de CCMM-5.9.3. A substância apresentou-se como um sólido amorfo de coloração vermelho claro e com solubilidade em CH_2Cl_2 (**Esquema 4**, página 39).

A análise por cromatografia gasosa apresentou um cromatograma com pequenas impurezas e um sinal intenso em 32,6 minutos (**Figura 136**, página 172). O espectro de RMN de ^1H exibiu um duplete em δ_{H} 4,76 (*d*, 2,8 Hz) correspondente aos hidrogênios oximetínicos H-7/7' além dos sinais em δ_{H} 4,31 (*m*) e 3,12 (*s*) atribuídos aos hidrogênios oximetilênicos H-9/9' e os hidrogênios metínicos H-8/8' respectivamente, que caracterizam anéis tetrahydrofurânicos de lignanas (**Figura 137**, página 174). A semelhança magnética dos hidrogênios H-7/7' sugere a presença de ambos em mesmo plano (**Figura 135**) (Greger & Hofer, 1980). O experimento ^1H - ^1H -COSY exibiu acoplamentos entre os sinais relatados o que corrobora para a proposta de um sistema com dois anéis tetrahydrofurânicos (**Figura 138**, página 175).

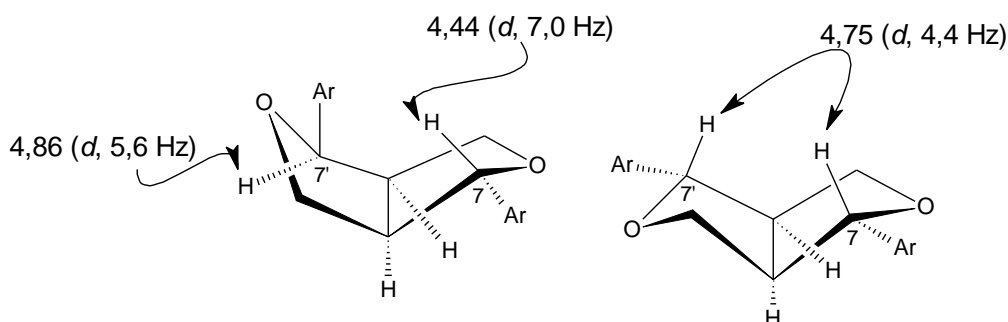


Figura 135: Configurações possíveis de C-7 e 7' do sistema furofurânico de lignanas.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também um simpleto em δ_{H} 3,90 indicando a presença de grupo metoxila na substância. A presença de apenas um sinal em δ_{H} 6,61 (s) atribuído para hidrogênios de anel aromático sugere a estes semelhança magnética com existência de um plano de simetria na substância.

Esta proposta foi sustentada após análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (**Figura 139**, página 176), que exibiu apenas oito sinais: três referentes a carbonos sp^2 não hidrogenados, três sinais de carbonos metínicos, um metilênico em δ_{CH_2} 71,9 atribuído aos carbonos oximetilênicos $\text{CH}_2\text{-9/9'}$, os quais foram confirmados através da correlação observada no mapa de correlação heteronuclear HSQC com os hidrogênios em δ_{H} 4,31 (*m*), e um sinal de carbono metílico característico de grupo metoxila em δ_{CH_3} 56,7 que também exibiu correlação no mapa de correlação heteronuclear HSQC com o sinal simples em δ_{H} 3,90 (**tabela 26**, página 172 e na **Figura 140**, página 177).

As demais correlações observadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC estão apresentadas na **tabela 26**, página 172 e na **figura 140**, página 177.

O sinal em δ_{C} 134,3 foi atribuído a carbono ligado a um grupo hidroxila, porém, observado em frequência mais baixa, o assinalamento deste carbono auxiliou na proposta de substituição dos anéis, visto que o efeito de proteção dos grupos metoxila sugere que estas estejam nas posições C-4/4'.

A comparação dos deslocamentos químicos com os observados na literatura conduziu à fórmula estrutural da lignana siringaresinol, proveniente do acoplamento oxidativo entre duas unidades C_6C_3 do álcool sinapil (Ferreira e colaboradores, 2009).

A proposta foi sustentada após análise do mapa de correlação heteronuclear HMBC (**Figura 141**, página 178), que exibiu correlação $^2J_{\text{HC}}$ entre H-2/6/2'/6' em δ_{H} 6,61 com C-3/5/3'/5' em δ_{C} 147,1 e $^3J_{\text{HC}}$ entre H-2/6/2'/6' em δ_{H} 6,61 com C-4/4' em δ_{C} 134,3, as demais correlações estão apresentadas na **tabela 26**, página 160 e **Figura 141**, página 178.

O espectro de massas de baixa resolução 70 eV (**Figura 136**, página 172) exibiu como íon molecular (M^+ : 418 Dalton) consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$ com dez graus de insuficiência de hidrogênios, sugerindo a presença de quatro grupos metoxila.

Esta proposta é sustentada pelas propostas de fragmentação principalmente pelos fragmentos m/z 154, 181 e 167 que justificam a presença de dois grupos metoxila em cada anel (**Esquema 21**, página 173).

O conjunto de dados analisados e comparados com a literatura (Monteiro e colaboradores, 2007), conduziu à determinação estrutural da substância **16**, identificando-a como a lignana **siringaresinol**.

Tabela 26: Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **16**, em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC e comparação com valores da literatura para a lignana **siringaresinol (Mo-07)**, com os deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

C	HSQC		HMBC		Mo-07	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_{H}	δ_{C}
1/1'	132,2	-	H-7/H-7'		-	132,1
3/5/3'/5'	147,1	-	H-2/H6/H-2'/H-6', MeO-3 / MeO-3'	OH-4/OH-4'	-	147,1
4/4'	134,3	-	OH-4/OH-4'	H-2/H-6/H2'/H6'	-	134,3
CH						
2/6/2'/6'	102,8	6,6 (s)		H-7/H-7'	6.59 (s)	102,7
7/7'	86,4	4,8 (s)		H-2/H6/H-2'/H-6', H-9/H-9'	4.73 (d, 4.2 Hz)	86,1
8/8'	54,9	3,2 (s)	H-7/H-7', H-9/H-9'		3.07 (m)	54,3
CH₂						
9/9'	71,9	4,3 (2H, m)		H-7/H-7'	4.28 (2H, m)	71,8
CH₃						
(MeO) ₄	56,7	3,9 (s)			3.90 (s)	56,4
HO						
4/4'		5,53 (s)				

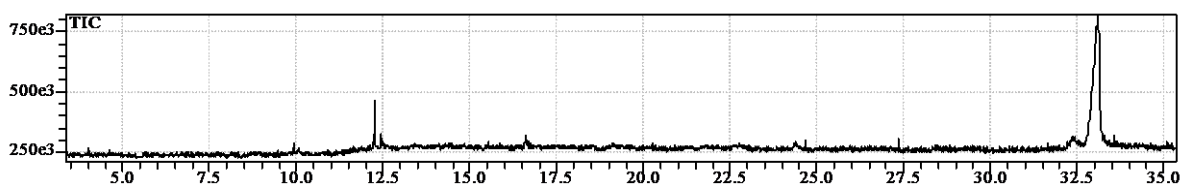
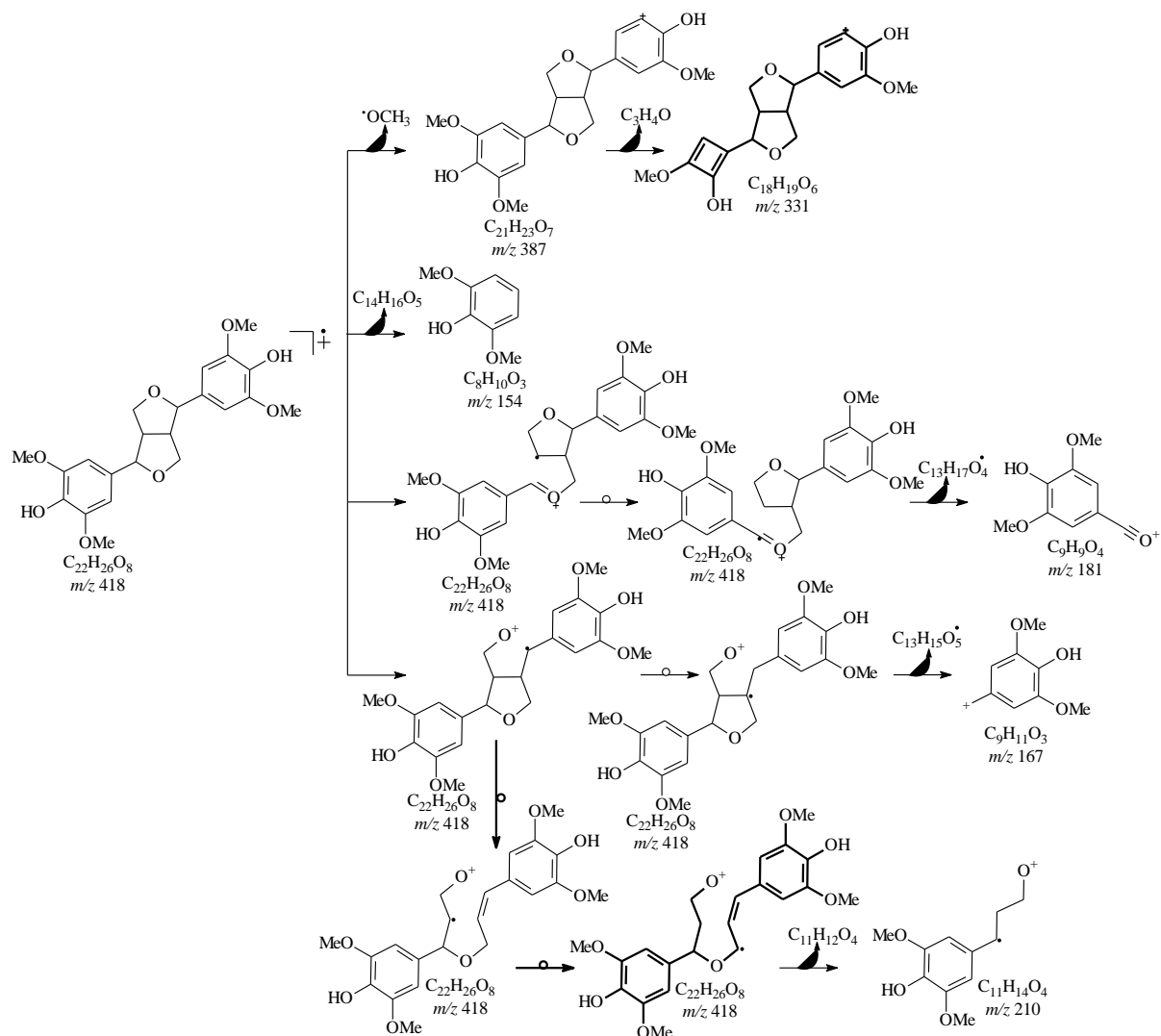


Figura 136: Espectro de Massas 70 eV da ligana **siringaresinol (16)**.



Esquema 21: Proposta de fragmentação para a lignana **siringaresinol (16)**.

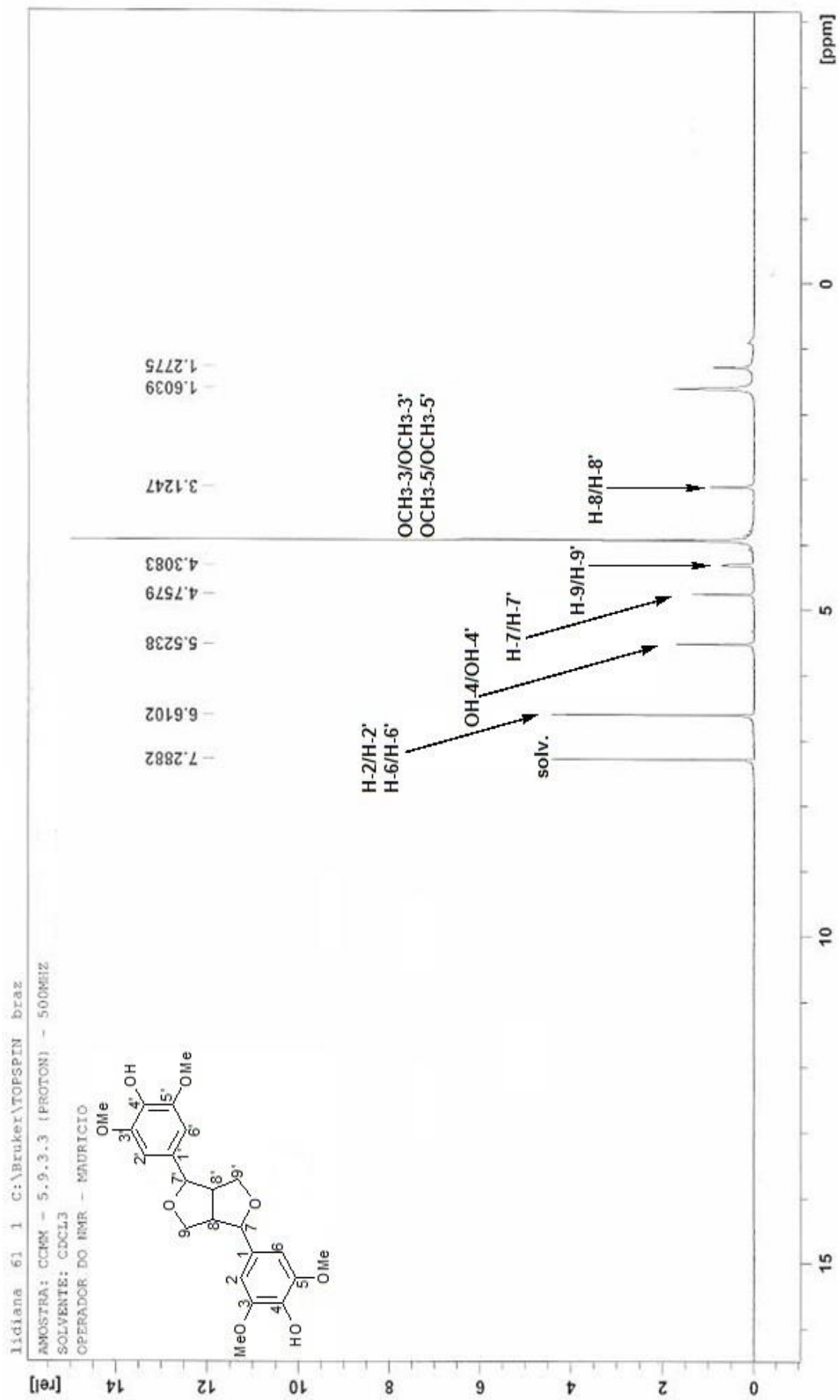


Figura 137. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da lignana siringaresinol (16).

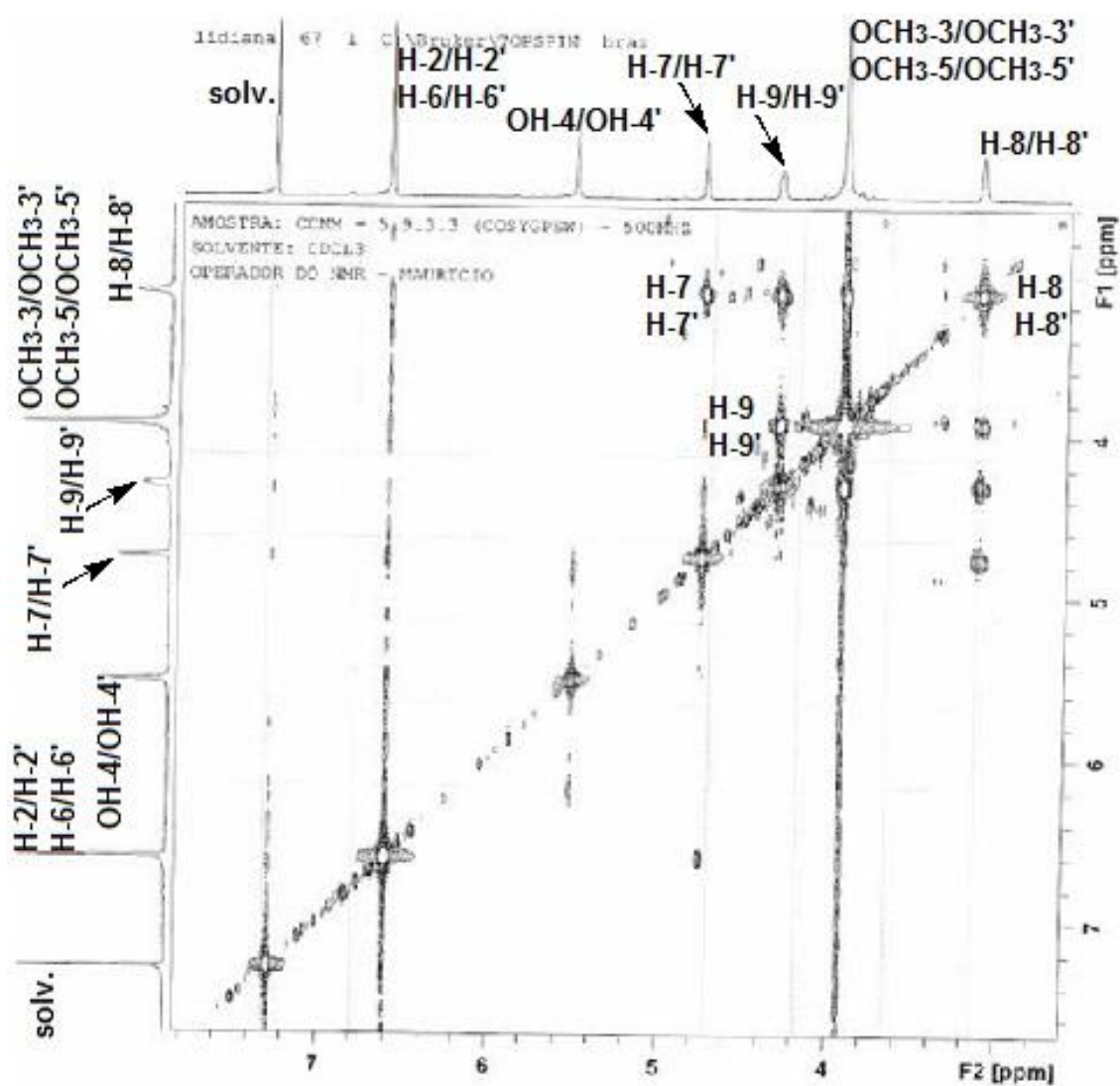
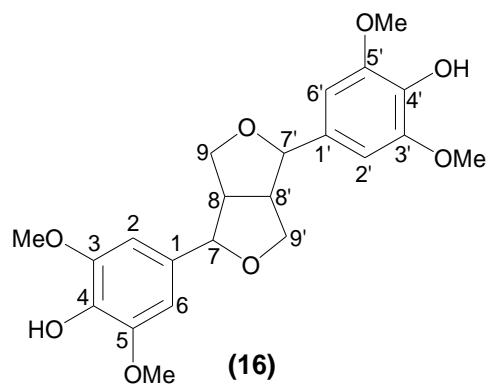


Figura 138: Mapa de correlação 1H-1H-COSY (500 MHz, CDCl₃) da lignana siringaresinol (16).

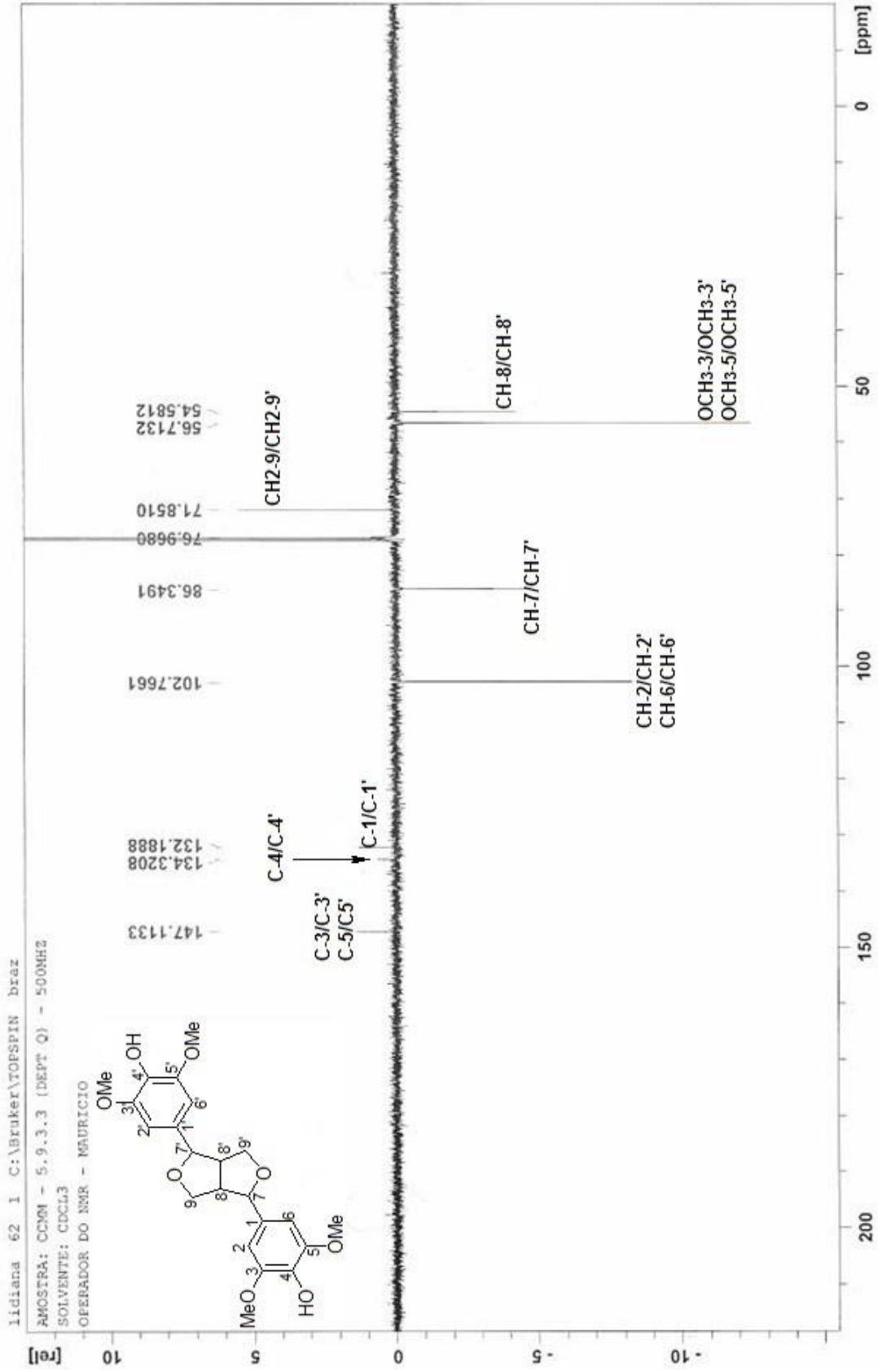


Figura 139: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da lignana siringaresinol (16).

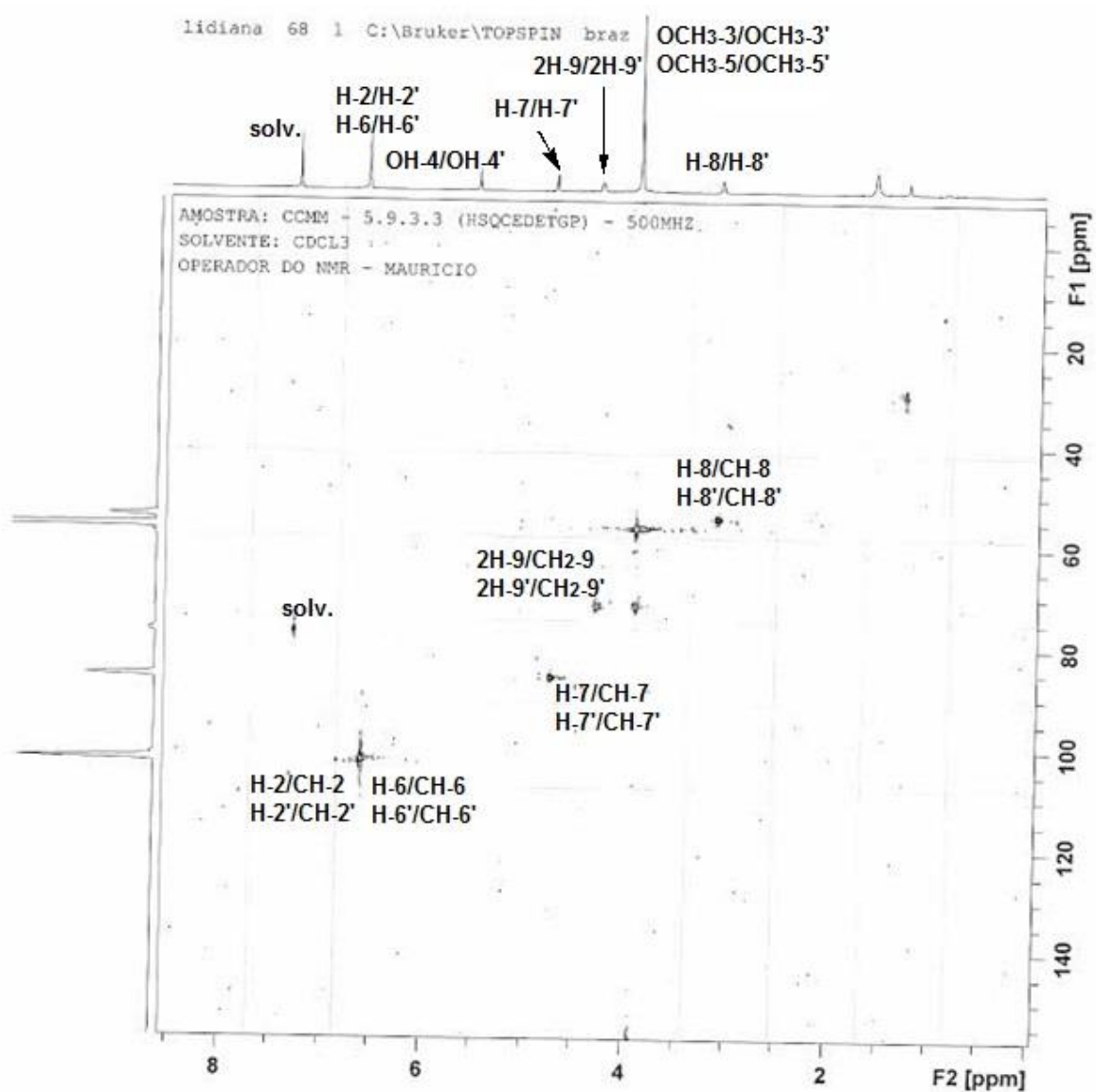
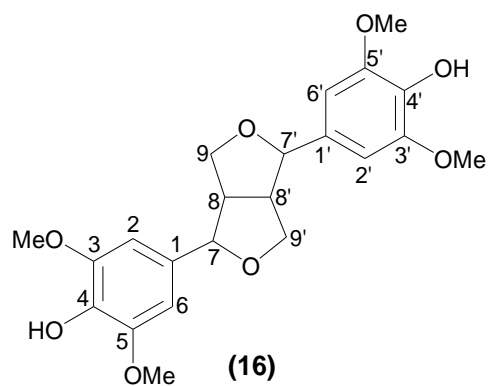


Figura 140: Mapa de correlação HSQC (500 MHz, CDCl₃) da lignana siringaresinol (16).

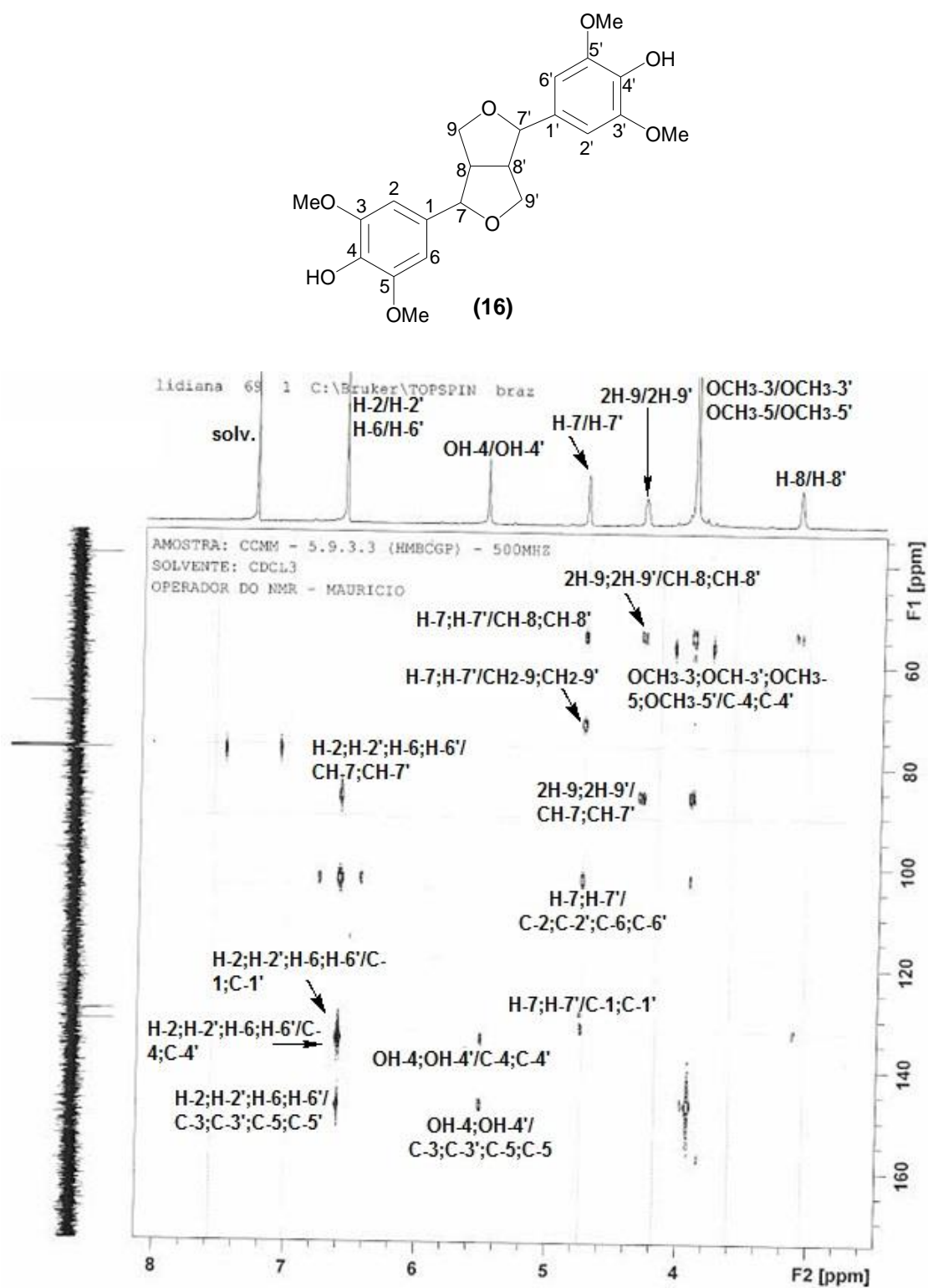


Figura 141: Mapa de correlação HMBC (500 MHz, CDCl₃) da lignana Siringaresinol (16).

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *Conchocarpus cyrthantus* Kallunki & Pirani, permitiu o isolamento e a identificação de cinco distintas classes de metabólitos, num total de dezesseis substâncias, sendo elas: uma piranocumarina angular e duas lineares: seselina (1), xantoxiletina (2) e luvangetina (3); seis esteroides: β -sitosterol (4), estigmasterol (5), campesterol (6), 7α -hidroxisitosterol (7), 7α -hidroxiestigmasterol (8), 7α -hidroxicampesterol (9); cinco diterpenos: 16-hidroxilarixol (10), manool (11), 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12), 16-hidroximanoiloxido (13) e seu epímero, 16-hidroxi-13-*epi*-manoiloxido (14); um alcaloide furoquinolínico: dictamina (15) e uma lignana: siringaresinol (16).

Em levantamento bibliográfico do gênero *Conchocarpus* foi observado a grande presença de furocumarinas, porém as isoladas nesta pesquisa são todas piranocumarinas, sendo estas inéditas no gênero.

Este é o primeiro estudo do gênero no qual é relatado o isolamento de diterpenos sendo que três dos cinco isolados estão sendo descritos pela primeira vez na literatura, sendo eles: 16-hidroxilarixol (10), 16-hidroxi-7-labden-6-ona (12) e o epímero, 16-hidroxi-13-*epi*-manoiloxido (14).

Das substâncias isoladas apenas o alcaloide e três esteroides (5, 6 e 7) já haviam sido isolados no gênero, sendo este trabalho de expressiva contribuição para o conhecimento dos metabólitos secundários do gênero, assinalando a ampla diversidade de metabólitos que o gênero possui.

O alcaloide furoquinolinico, isolado em grande quantidade, confirmou-se como marcador quimiotaxonômico não só do gênero, mas principalmente da família, uma vez que este tipo de alcaloide tem sua distribuição restrita fora da família Rutaceae.

Os resultados de isolamento para *C. cyrtanthus* mostraram-se bastante promissores, tendo em vista as distintas classes de metabólitos secundários encontradas, e o ineditismo de três diterpenos, além do fato de este ser o primeiro trabalho fitoquímico realizado com esta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnur, P.V. (2006) *Estudo fitoquímico de Citrus: resistência a Xylella fastidiosa e interação com Oncometopia facialis*. Dissertação (Mestrado) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 275p.

Alcaraz, M. J.; Garcia-Ochoa, S.; Jimenez, M. J.; Valverde, S.; Villar, A. (1989) A derivative of *ent-13-epi-manoyl* oxide isolated from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 38(4): 1267-1268.

Albuquerque, B. W. P. (1976). Revisão taxonômica das Rutaceae do estado do Amazonas. *Acta Amazonica*, 6(3): 1-67.

Almeida, M. R.; Lima, J. A.; Santos, N. P.; Pinto, A. C. (2009) Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4): 942-952.

Albarici, T. R. (2006) *Estudo fitoquímico de Conchocarpus macrophyllus (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas*. Tese (Doutorado em Ciência) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 182p.

Ambrozin, A. R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S. (2008) Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*, *Química Nova*, 31(4): 740-743.

Ambrozin, A. R. P. (2006) *Estudo fitoquímico de plantas das família Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses*. Tese (Doutorado em Química) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 241p.

Ambrozin, A. R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B. F.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S. (2004) Trypanocidal Activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 99(2): 227-231.

Belleite, B. S.; Sá, I. C. G.; Mafezoli, J.; Cerqueira, C. N.; Silva, M. F. G. F.; F. J. B.; Vieira, P. C. Zukerman-Schpector, J.; Pirani, J. R. (2012) Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). *Química Nova*, 35(11): 2132-2138.

Braz Filho, R. (2010) Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, 33(1): 229-239.

Bremer, B., Bremer, K., Chase, M.W., Fay, M.F., Reveal J.L., Soltis D.E., Soltis P.S., Stevens P.F. (2009) An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of The Linnean Society*.

Buckwalter, B. L.; Burfitt, I. R.; Nagel, A. A.; Wenkert, E.; Naf, F. (1975) ¹³C-NMR. Spectroscopy of Naturally Occurring Substances. XXXV. Labdanic diterpenes. *Helvetica Chimica Acta*, 58 (6): 1567-1573.

Budzikiewicz, H.; Williams, D.H.; Djerassi, C. (1964) *Structure elucidation of natural products by Mass spectrometry. Vol. II: Steroids, triterpenoids, sugars and miscellaneous classes*. Holden-Day, INC. San Francisco, London, Amsterdam. p. 262-263.

Cabral R. S. (2011) *Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anticolinesterásica de Conchocarpus fontanesianus (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae)*. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)

– São Paulo – SP – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio ambiente, 85p.

Castro, H. G., Ferreira, F. A., Silva, D. J. H., Mosquim, P. R. (2004) *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários*. 2ª edição – Visconde do Rio Branco – Viçosa – MG, 113p.

Chaurasia, N.; Wichti, M. (1987) Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural Products*. 50 (5): 881-885.

Corazza-Nunes, M. J.; Novelli, V. M.; Nunes, W. M. C.; Moreira, A. L. O. R.; Carvalho, S. A.; Machado, M. A. (2005) Aurantioideae: uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. Laranja, Cordeirópolis. 26(2): 359-374.

Cortez, L. E. R.; Cortez, D. A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; F, A. G.; Silva, M. F. G. F. (2009) New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles*, 78(8): 2053-2059.

Costa, J. F. O.; Juiz, P.; Pedro, A. S.; David, J. P. L.; David, J. M.; Giulietti, A. M., França, F.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P. (2010) Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4): 502-505.

Dolmazon, R.; Albrand, M.; Bessiere, J.M.; Mahmoud, Y.; Wernerowska, D.; Kolodziejczyk, K. (1995) Diterpenoids from *Kyllinga erecta*. *Phytochemistry*, 38(4): 917-919.

Di Stasi, L. C. (1996) *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora UNESP, 230p.

Gonçalves, M. S. (2011) *Constituintes químicos de Tabernaemontana catharinensis (Aposynaceae)*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, 246p.

Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P.; Wanderley, M. G.; Den-Berg, C. V. (2005) Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megdiversidade*, 1(1): 52-61.

Gray, A. I.; Waterman, P. G. (1978) Review coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry*, 17: 845-864.

Groppo, M.; Pirani, J. R.; Salatino, M. L. F.; Blanco, S. R.; Kallunki, J. A. (2008) Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, 95(8): 985-1005.

Groppo, M.; Kallunki, J. A.; Pirani, J. R.; Antonelli, A. (2012) Chilean Pitavia more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to Neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the Family. *PhytoKeys*, 19: 9-29.

http://zipcodezoo.com/Plants/C/Conchocarpus_cyrtanthus/ em 16/08/2013

Januário, A. H.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B. (2009) Alcaloides β -indolopiridoquinazolinico de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). *Química Nova*, 32(8): 2034-2038.

Kallunki, J. A.; Pirani, J. R. (1998) Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae). *Kew Bulletin*, 53(2): 257-334

Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S. (2000) In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*. 73: 335-340.

Minato, Kazura.; Konaka, Y.; Bremaud, I.; Suzuki, S.; Obataya, E. (2010) Extractives of muirapiranga (*Brosimum* sp.) and its effects on the vibrational properties of wood. *Japan Wood Research Society*, 56: 41-46.

Monteiro, M.C.M.; Leptokarydis, I.H.; Silva, G.H.; Da Silva, V.C.; Bolzani, V. S.; Young, M.C.M.; Lopes, M.N. (2007) Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). *Eclética Química*, 32(3): 13-18.

Moreira, A. S. N. (2001) *Constituintes químicos de Flindersia brayleyana: uma contribuição a química da família Rutaceae*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, 178p.

Moreira, V. F. (2009) *Constituintes químicos de Borreria Verticillata (Rubiaceae)*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, 192p.

Murray, R.D.H.; Mendez, J.; Brown, S.A. (1982) The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry. *John Willey*, p. 21.

Nascimento, M. C. B S. (2008) *Constituintes bioorgânicos isolados de Annona cacans Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades*. Tese (Doutorado em Ciências) – Seropédica – RJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, 198p.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. (2010) *Introdução à espectroscopia*. Tradução da 4ª edição norte americana. São Paulo: Cengage Learning, 716p.

Pinto, A. C.; Silva, H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25(Supl, 1): 45-61.

Pirani, J. R. (2013) *Conchocarpus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB438> em 20/07/2012.

Pirani, J. R. (2010) *Conchocarpus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000438>).

Pirani, J. R., (2005) Flora da reserva de Duke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. *Rodriguésia* 56 (86): 189-204.

Pirani, J. R. (2002) *Conchocarpus* J.C. Mikan. In: M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, A.M. Giuliatti, T.S. Melhem, V. Bittrich, C. Kameyama (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Hucitec, São Paulo, pp. 284-285.

Pirani, J.R. & Groppo M. (2010) Rutaceae in Catalogo de Plantas e Fungos do Brasil. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 1591-1593.

Pusset, J.; Lopez, J. L.; Pais, M. Al-Neirabeyeh, M.; Veillon, J. M. (1991) Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*. *Planta Med.* 57: 153-155.

Sá, I. C. G. *Estudo fitoquímico de Rabdodendron amazonicum, Conchocarpus inopinatus e avaliação dos compostos isolados na inibição da fotossíntese.* (2010) Dissertação (Mestrado em Química) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos, 111 p.

Seki, K.; Orihashi, K.; Sato, M.; Kishino, M.; Saito, N. (2012) Accumulation of constitutive diterpenoids in the rhytidome and secondary phloem of the branch bark of *Larix gmilenii* var. *japonica*. *Japan Wood Research Society.* 58: 437-445.

Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L. (2005) *Constituintes Micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico: com dados de RMN ¹³C.* Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 95-99p.

Silverstein, R.M., Webster, F.X. (2000) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.* 6ª Edição, Editora LTC.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovich, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 1ª edição. Porto alegre/Florianópolis: UFSC, p. 451-470.

Souza, V. A.; Nakamura, C. V.; Corrêa, A. G. (2012) Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. *Revista Virtual Química.* 4(3): 197-207.
<http://www.uff.br/rvq>

Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado na APG II*. Nova Odessa, Instituto Plantarum, pp. 422 - 423.

Steck, W. (1971) New syntheses of demethylsuberosin, xanthyletin, (+/-)-decursidinol, (+)-marmesin, (-)-nodakenetin, (+/-)-decursin and (+/-)-prantschimgin. *Canadian Journal of Chemistry*, 49, p.2297.

Stevens, P. F. (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acessado em 23/09/2013.

Vieira, I.J.C. (1995) *Uma contribuição à química da família Simaroubaceae*. Tese (Doutorado em Química) – São Carlos – SP – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 330p.

Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Albuquerque, S.; Oliva, G.; Pavão, F. (2001) Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure and Applied Chemistry*. 73(3): 617–622.

Vieira, P. C.; Kubo, I.; Kujime, H.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T. (1992) *Molluscicidal acridone alkaloids from Angostura paniculata: isolation, structures, and synthesis*. *Journal of Natural Products*. 55(8): 1112-1117.

Vieira, P. C.; Kubo, I. (1990) *Molluscicidal Quinoline Alkaloids from Galipea bracteata*. *Phytochemistry*. 29(3): 813-815.

Waterman, P. G. (1975) *Alkaloids of the Rutaceae: Their distribution and systematic significance*. *Biochem. Syst. Ecol.* 3: 149-180.

Zhang, M.; Wang, J.; Luo, J.; Wang, P.; Guo, C.; Kong, L. (2013) *Labdane diterpnes from Chloranthus serratus*. *Elsevier Fitoterapia* 91, 96-99.