



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MIQUÉIAS FELICIANO DE ALMEIDA

**Derivados Poliprenilados do Floroglucinol de *Kielmeyera
lathrophyton* e *K. Cuspidata* – Calophyllaceae**

Salvador
2013

MIQUÉIAS FELICIANO DE ALMEIDA

**Derivados Poliprenilados do Floroglucinol de *Kielmeyera
lathrophyton* e *K. Cuspidata* – Calophyllaceae**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química – área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz

Salvador
2013

Aos

Meus pais pelo incentivo, amor e confiança depositada à minha pessoa.

AGRADECIMENTOS

São tantos e muito especiais...

A Deus pelo dom da vida e pelas dádivas concedidas.

Aos meus pais, Antonio Feliciano e Maria da Conceição, pela educação que me deram, por todo incentivo e esforço financeiro, que proporcionaram essa conquista.

À minha família por todo incentivo e apoio.

À minha querida esposa Vanessa por todo apoio, carinho e por estar sempre ao meu lado nos diversos momentos.

Ao Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz pela paciência, incentivo, amizade e orientação.

Aos professores da UFBA e da UESC pela formação.

À Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta e a Dra. Isley pela realização dos ensaios antimicrobianos.

À Prof^a Dra. Elisangela F. Boffo pelos espectros de RMN.

À Botânica Prof^a. Maria Lenise S. Guedes pela identificação e coleta das espécies.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e à Prof^a Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi pelos espectros de massas.

Aos colegas do GESNAT pelas discussões científicas acalouradas

Aos Colegas da *Innocent Republic*: Erik, Giovani e Luciano que carinhosamente me receberam com o nome de “Foguinho”.

Aos colegas dos laboratórios 102 e 110 do IQ.

A Ailton e família, pela carinhosa recepção na Capital.

Ao casal Fernando Faustino e Rosilene Aparecida pela formação e amizade.

Ao casal José Carlos e Sirlene Luz pelo apoio, incentivo e amizade.

FINEP, CNPq, CAPES, FAPESB, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

De Almeida, Miquéias Feliciano. *Derivados poliprenilados do floroglucinol de Kielmeyera lathrophyton e K. cuspidata – Calophyllaceae*. 188 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico dos extratos orgânicos do caule de *Kielmeyera lathrophyton* e *K. cuspidata* (Calophyllaceae), espécies vegetais de ocorrência mencionada na Chapada Diamantina (BA), bem como a avaliação antimicrobiana de algumas substâncias destas espécies. Do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton* foram isolados sete novos derivados do floroglucinol: quatro 4-fenilcumarinas, que exibiram um anel ciclobutil não muito comum em compostos naturais, denominados de lathrophytonas A – D e três ésteres metílicos de três novos ácidos 3-fenil-3-floroglucinilpropanóicos poliprenilados, que exibiram um esqueleto biciclo[3.3.1]nonano denominados de ácidos lathrophytóicos D – F. Foram isolados ainda dois neoflavonóides, uma 4-alquilcumarina, o δ -tocotrienol, a friedelina, canofilal e a mistura de β -sitosterol e estigmasterol. Do extrato hexânico de *K. cuspidata* foram isolados cinco novos derivados poliprenilados do floroglucinol que também apresentaram um esqueleto biciclo[3.3.1]nonano denominados de ácidos kielmeyeróicos A – E. As estruturas dessas substâncias foram determinadas por comparação com dados da literatura e por experimentos de espectrometria no infravermelho, de massas de alta resolução, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, HMBC e HMQC. Os ésteres metílicos dos ácidos kielmeyeróicos A – D e a lathrophytona C foram avaliadas quanto às suas propriedades antibacterianas contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e *Micrococcus luteus* (Gram-positivas) e *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) e contra os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Candida albicans*. Das substâncias testadas, o ácido kielmeyeróico C exibiu atividade antibacteriana para as bactérias *S. aureus* e *M. Luteus*.

Palavras-chave: *Kielmeyera lathrophyton*, *K. cuspidata*, Clusiaceae, Calophyllaceae, atividade antibacteriana, derivados poliprenilados do floroglucinol.

De Almeida, Miquéias Feliciano. Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Kielmeyera lathrophyton* e *K. cuspidata* – *Calophyllaceae*. 188 pp. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical analysis and antimicrobial activity of the hexane extract and pure compounds obtained from the trunk of *Kielmeyera lathrophyton* and *K. cuspidata* (*Calophyllaceae*) – two plant species with occurrence in Chapada Diamantina, Bahia state – Brazil. Seven new phloroglucinol derivatives were isolated from the hexane extract *Kielmeyera lathrophyton*: four 4-phenylcoumarins having an unusual cyclobutyl ring in Natural Products named lathrophytone A – D and three methyl esters of three polyprenylated 3-phenyl-3- phloroglucinypropanoic acids that exhibited a highly substituted bicycle[3.3.1]nonane skeleton named lathrophytoic acids D – F. Additionally, this work describes the isolation of two isolated neoflavonoids, a 4-alkylcoumarin, δ -tocotrienol, friedelin, canophyllal and the mixture of β -sitosterol and stigmasterol from *K. lathrophyton*. Phytochemical analysis of *K. cuspidata* led to the isolation of five new polyprenylated phloroglucinol derivatives with a highly substituted bicycle[3.3.1]nonane skeleton named kielmeyroic acids A – E. The structure of these compounds were elucidated on the basis of IR, HRESIMS, NMR ^1H and ^{13}C , DEPT 135, HMBC and HMQC experiments. The methyl esters of the kielmeyroic acids and lathrophytone C were evaluated against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* (Gram-positive), *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative) and against the fungi *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* and *Candida albicans*. The kielmeyroic acid C shows moderate antibacterial activity against *S. aureus* e *M. Luteus*.

Keywords: *Kielmeyera lathrophyton*, *K. cuspidata*, Clusiaceae, Calophyllaceae, antimicrobial activity, polyprenylated phloroglucinol derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da hiperforina (A), isolada de <i>Hypericum perforatum</i> (B).....	22
Figura 2: Distribuição do gênero <i>Kielmeyera</i> na América do Sul.....	22
Figura 3: Espécime florido de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	23
Figura 5: Fórmulas estruturais dos derivados poliprenilados do floroglucinol isolados do gênero <i>Kielmeyera</i>	24
Figura 6: Tipos de esqueletos biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona e biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona presente nos derivados do floroglucinol.....	25
Figura 7: Fórmulas estruturais dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos dos tipos A, B e C.	26
Figura 8: Fórmula estrutural de dois tautômeros obtidos de <i>Hypericum papuanum</i> na proporção de (3:4), respectivamente.	27
Figura 9: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de uma fração do extrato em hexano de <i>K. cuspidata</i>	28
Figura 10: Conformações adotadas pelo anel B dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos.....	29
Figura 11: Esquema geral da biogênese de derivados do floroglucinol em espécies da família Calophyllaceae.....	31
Figura 12: Mecanismo proposto para a biossíntese da hiperforina (ADAM <i>et al.</i> , 2002).	32
Figura 13: Esquema geral do precursor monocíclico dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos.....	32
Figura 14: Formação dos acilfloroglucinóis polipreniladas policíclicas do tipo A e B..	33
Figura 15: Formação dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos do tipo C.....	34
Figura 16: Proposta de mecanismo da biogênese da perforatumona.....	34
Figura 17: Mecanismo de biogênese proposto para o ácido latrofitóico A isolado de <i>K. lathrophyton</i>	35
Figura 18: Obtenção do diazometano a partir da acetamida.	38
Figura 19: Procedimento experimental para a obtenção do extrato orgânico do caule de <i>K. lathrophyton</i>	39
Figura 20: Procedimento experimental para a obtenção dos extratos orgânicos do caule de <i>K. cuspidata</i>	40
Figura 21: Esquema do fracionamento do extrato hexânico de <i>K. lathrophyton</i>	41

Figura 22: Esquema geral do estudo da fração KL-4.	43
Figura 23: Esquema geral do estudo da fração KL-10.	45
Figura 24: Esquema geral do estudo da fração KL-11.	46
Figura 25: Esquema geral do fracionamento e isolamento de substâncias da fração KcH-17 de <i>K. cuspidata</i>	48
Figura 26: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 1.	53
Figura 27: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 2.	53
Figura 28: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , δ) da substância 1.	54
Figura 29: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ , δ) da substância 2.	54
Figura 30: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 1.	55
Figura 31: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 2.	55
Figura 32: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1.	56
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 2.	56
Figura 34: Ampliação da região entre δ 3,20 – 1,80 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1.	58
Figura 35: Ampliação da região entre δ 3,20 – 1,60 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 2.	58
Figura 36: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl ₃) da substância 1.	59
Figura 37: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl ₃) da substância 1.	60
Figura 38: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 1.	60
Figura 39: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 1.	61
Figura 40: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 1.	62
Figura 41: Correlações de gCOSY e gHMBC da substância 1 e dados de RMN ¹³ C δ (ppm) dos grupos prenílicos das substâncias 1 e 2.	62
Figura 42: Correlações de gCOSY e gHMBC da substância 1 e dados de RMN ¹³ C [δ (ppm)] do grupo 3-isoprenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico da substância 2 e do ácido cromanônico 1.	63
Figura 43: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl ₃) da substância 2.	64

Figura 44: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (CDCl ₃) da substância 2.	64
Figura 45: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (CDCl ₃) da substância 2.	65
Figura 46: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (CDCl ₃) da substância 2.	66
Figura 47: Correlações de H – H observadas no experimento de <i>g</i> COSY (CDCl ₃) da substância 2.	66
Figura 48: Correlações de <i>g</i> COSY e <i>g</i> HMBC da substância 1 e dados de RMN ¹³ C δ do caloflorídeo.	68
Figura 49: Correlações de <i>g</i> COSY e <i>g</i> HMBC e fórmula estrutural da substância 1.	69
Figura 50: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl ₃) da substância 1.	69
Figura 51: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa dos carbonos C-4 e C-9, C-29 e C-31 da substância 1.	70
Figura 52: Correlações de <i>g</i> HMBC e estrutura da substância 2.	72
Figura 53: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl ₃) da substância 2.	72
Figura 54: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 3a.	74
Figura 55: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 3a.	75
Figura 56: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 3a.	75
Figura 57: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3a.	76
Figura 58: Ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3a.	77
Figura 59: Correlações de H – H observadas no experimento de <i>g</i> COSY da substância 3a.	77
Figura 60: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMQC (CDCl ₃) da substância 3a.	78
Figura 61: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (CDCl ₃) da substância 3a.	79
Figura 62: Correlações de H – C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC (CDCl ₃) da substância 3a.	80
Figura 63: Dados de RMN ¹³ C (ppm) do grupos fenílico, prenílico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico da substâncias 3a.	81

Figura 64: Correlações de gCOSY e gHMBC da substância 3a e fórmula estrutural da lathrophytona A.	82
Figura 65: Correlações de gCOSY e gHMBC da substância 3a.	83
Figura 66: Correlações de gHMBC da estrutura da lathrophytona C.	83
Figura 67: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl ₃) da substância 3a.	84
Figura 68: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância 3a.	84
Figura 69: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância C-7-15-C.	86
Figura 70: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	87
Figura 71: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da fração C-7-15-C.	88
Figura 72: Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	88
Figura 73: Ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90 do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	89
Figura 74: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	90
Figura 75: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	91
Figura 76: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	92
Figura 77: Correlações de gHMBC (→) do grupo 4-metilpentan-2-ona presente na substância 4a.	93
Figura 78: Correlações de gHMBC (H → C) da estrutura da substância 4a.	94
Figura 79: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl ₃) da fração C-7-15-C.	95
Figura 80: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância 4a.	95
Figura 81: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 5a.	97
Figura 82: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 5a.	98
Figura 83: Ampliação (2,70 – 1,75 ppm) do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 5a.	98
Figura 84: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 5a.	99
Figura 85: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 5a.	100
Figura 86: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da substância 5a.	100

Figura 87: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da substância 5a.....	101
Figura 88: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 5a.....	101
Figura 89: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 5a.....	102
Figura 90: Correlações de gHMBC que permitiram definir a fórmula estrutural parcial da substância 5a.....	103
Figura 91: Dados de RMN ¹³ C da laxifloranona e do éster derivado do ácido lathrophytóico B e correlações de gHMBC que permitiram deduzir a fórmula estrutural parcial da substância 5a.	103
Figura 92: Correlações de gHMBC que permitiram deduzir a fórmula estrutural das prenilas.	104
Figura 93: Correlações de HMBC que permitiram posicionar as prenilas nos carbonos C-5 e C-7.	104
Figura 94: Correlações de HMBC que permitiram definir o a fórmula estrutural parcial da substancia 5a.....	105
Figura 95: Fórmula estrutural da substancia 5a isolada de <i>K. lathrophyton</i>	105
Figura 96: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido lathrophytóico B isolado de <i>K. lathrophyton</i>	106
Figura 97: Correlações de H – H observadas no experimento de NEOSY (CDCl ₃) da substância 5a.....	106
Figura 98: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância 5a.	107
Figura 99: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da mistura das substâncias 6a e 7a.	109
Figura 100: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da mistura das substâncias 6a e 7a.	110
Figura 101: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da mistura das substâncias 6a e 7a.	110
Figura 102: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da mistura das substâncias 6a e 7a.	111
Figura 103: Ampliação (2,85 – 1,75 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da mistura das substâncias 6a e 7a.	112

Figura 104: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da mistura contendo as substância 6a e 7a.	113
Figura 105: Dados de RMN de ¹³ C (ppm) dos grupos 3-fenilpropanoato de metila e prenilicos das substâncias 6a e 7a.	114
Figura 106: Fórmula estrutural e dados de RMN de ¹³ C (ppm) da laxifloronona, éster derivado do ácido lathrophytóico D e dos anéis biciclo do tipo [3.3.1]nonano das substâncias 6a e 7a.	115
Figura 107: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da mistura contendo as substância 6a e 7a.	115
Figura 108: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da mistura contendo as substância 6a e 7a.	116
Figura 109: Correlações de gCOSY e gHMBC que permitiram determinar a fórmula estrutural parcial das substâncias 6a e 7a.	117
Figura 110: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl ₃) da mistura contendo as substâncias 6a e 7a.....	117
Figura 111: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC que permitiram chegar às fórmulas estruturais dos ésters derivados dos ácidos lathrophytoicos E e F, isolados de <i>K. lathrophyton</i>	118
Figura 112: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 8a.	120
Figura 113: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 9a.	120
Figura 114: Sistema isopropilfurano.	121
Figura 115: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 8a.....	122
Figura 116: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 9a.....	122
Figura 117: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 8a.....	123
Figura 118: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 9a.....	123
Figura 119: Dados de RMN ¹³ C dos grupos prenilicos das substâncias 8a e 9a.	124
Figura 120: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl ₃) da substância 8a.....	125
Figura 121: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl ₃) da substância 9a.....	126
Figura 122: Correlações selecionadas de gHMBC da estrutura parcial da substância 8a.....	127
Figura 123: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 8a.....	128

Figura 124: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 8a.....	129
Figura 125: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 9a.....	130
Figura 126: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 9a.....	131
Figura 127: Fórmula estrutural parcial das substâncias 8a e 9a.	131
Figura 128: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 8a.....	132
Figura 129: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da substância 9a.....	132
Figura 130: Correlações de gHMBC do grupo octanoato de metila.	133
Figura 131: Fórmula estrutural das substâncias 8a e 9a, isoladas de <i>K.cuspidata</i>	133
Figura 132: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 10a.....	135
Figura 133: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 10a.	136
Figura 134: Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da substância 10a.....	136
Figura 135: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da substância 10a.....	137
Figura 136: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 10a.....	138
Figura 137: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 10a.....	139
Figura 138: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da mistura da substância 10a. ..	139
Figura 139: Correlações de gHMBC e fórmula estrutural parcial da substância 10a.....	140
Figura 140: Correlações de gHMBC e estrutura parcial da substância 10a.....	140
Figura 141: Estrutura do ácido kielmeyeróico C.....	141
Figura 142: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 11a.	143
Figura 143: Espectro de infravermelho (filme CHCl ₃) da substância 11a.	143
Figura 144: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 11a.....	144
Figura 145: Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da substância 11a.....	145
Figura 146: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da substância 11a.....	145
Figura 147: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da substância 11a.....	146
Figura 148: Ampliação da região entre δ 3,00 – 1,78 do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 11a.	147

Figura 149: Correlações de gHMBC e estrutura parcial da substância 11a.	148
Figura 150: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 11a.	148
Figura 151: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 11a.	149
Figura 152: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da substância 11a.	150
Figura 153: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl ₃) da substância 11a.	150
Figura 154: Correlações de COSY e gHMBC e dados de RMN ¹³ C δ (ppm) do grupo octanoato de metila.	151
Figura 155: Correlações de gHMBC e fórmula estrutural parcial da substância 11a.	151
Figura 156: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido kielmeyeróico D.	152
Figura 157: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	154
Figura 158: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da fração KcM-17-15.	155
Figura 159: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	156
Figura 160: Ampliação (2,60 – 1,90 ppm) do espectro de RMN (500 MHz, CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	156
Figura 161: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	157
Figura 162: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	158
Figura 163: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	158
Figura 164: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	159
Figura 165: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl ₃) da fração KcM-17-15.	160
Figura 166: Espectro no infravermelho (filme com CHCl ₃) da fração KcM-17-15.	161
Figura 167: Dados de RMN ¹³ C (ppm) e correlações observadas no experimento de gHMBC que permitiram identificar a presença de dois grupos prenílicos e o grupo octanoato de metila substituído na posição 3.	161
Figura 168: Correlações de gHMBC que permitiram posicionar o grupo octanoato de metila e as unidades prenílicas nos carbonos C-1, C-5 e C-7, respectivamente, do anel biciclo.	162

Figura 169: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido kielmeyeróico E.	162
Figura 170: Proposta de biossíntese dos precursores das lathrophytonas e dos ácidos lathrophytóicos e kielmeyeróicos.	169
Figura 171: Proposta de biossíntese das lathrophytonas B.	171
Figura 172: Proposta de biossíntese dos enóis precursores dos ácidos lathrophytóicos D – F.	172
Figura 173: Proposta de biossíntese dos ácidos lathrophytóicos D – E.	173
Figura 174: Proposta de biossíntese dos precursores dos ácidos kielmeyeróicos.	174
Figura 175: Proposta de biossíntese dos ácidos kielmeyeróicos A, B e E.	176
Figura 176: Proposta de biossíntese dos ácidos kielmeyeróicos C e D.	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C de acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos que apresentam esqueleto do tipo biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona na conformação em cadeira e bote.	30
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC das substâncias 1 e 2.	73
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC da substância 3a.	85
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, da substância 4a.	96
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC da substância 5a.	108
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, das substâncias 6a e 7a.	119
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, das substância 8a e 9a.	134
Tabela 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, da substância 10a.	142
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC, da substância 11a.	153
Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC, da substância 12a.	163
Tabela 11: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de substâncias isoladas de <i>K. cuspidata</i> e <i>K. Lathrophyton</i>	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AcOEt – Acetato de etila
AcOH – Ácido acético glacial
ATCC – American type culture collection
CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa
CC – Cromatografia em coluna
d – Duplete
dd – Duplo duplete
ddd – Duplo duplo duplete
dl – Duplete largo
DCM – Diclorometano
DEPT – Distortionless enhancement by polarisation transfer
DMSO- d_6 – Dimetilsufóxido deuterado
ESI – Electrospray ionization
EM – Espectrometria de massas
GESNAT – Grupo de Estudo de Substâncias Naturais e Orgânicas
Hex. – hexano
HMBC – Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC – Heteronuclear multiple quantum coherence
Hz – Hertz
IDH – Índice de deficiência de hidrogênio
IV – Infravermelho
J – Constante de acoplamento
m – Multiplete
MeOH – Metanol
m/z – Relação massa/carga
ppm – Partes por milhão
PAL – Fenilamonialase
RMN ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
s – Simpleto

sl – Simpleto largo

t – Tripleto

δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1	O gênero <i>Kielmeyera</i>	22
1.2	Derivados poliprenilados do floroglucinol	25
1.3	Biossíntese dos derivados poliprenilados do floroglucinol	30
2.	OBJETIVOS	36
3.	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	Reagentes e equipamentos	37
3.2	Reação de metilação com diazometano	38
3.3	Coleta e identificação do material vegetal	39
3.4	Obtenção dos extratos orgânicos	39
3.4.1	Extrato do caule de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	39
3.4.2	Extrato do caule de <i>Kielmeyera cuspidata</i>	40
3.5	Fracionamento do extrato hexânico de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	40
3.5.1.	Estudo da fração KL-4	42
3.5.2.	Estudo da fração KL-10	44
3.5.3.	Estudo da fração KL-11	45
3.6	Estudo da fração KcH-17 obtida do extrato hexânico de <i>Kielmeyera cuspidata</i>	47
3.7	Ensaio biológicos	49
3.8	Substâncias Isoladas de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	50
3.9	Substâncias isoladas de <i>Kielmeyera cuspidata</i>	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Derivados poliprenilados do floroglucinol isolados de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	52
4.1.1	Determinação estrutural das substâncias 1 e 2	52
4.1.2	Determinação estrutural da substância 3a	74
4.1.3	Determinação estrutural da substância 4a	86
4.1.4	Determinação estruturação da substância 5a	97
4.1.5	Determinação estrutural das substâncias 6a e 7a	109
4.2	Derivados poliprenilados do floroglucinol isolados de <i>Kielmeyera cuspidata</i>	120
4.2.1	Determinação estrutural das substâncias 8a e 9a	120
4.2.2	Determinação estrutural da substância 10a	135
4.2.3	Determinação estrutural da substância 11a	143

4.2.4	Determinação estrutural da substância 12a.....	154
4.3	Outras substâncias isoladas de <i>Kielmeyera lathrophyton</i>	164
4.3.1	Ácido lathrophytóico C.....	164
4.3.2	4-fenilcumarinas	165
4.3.3	4-alkilcumarina	166
4.3.4	δ -tocoferol.....	166
4.3.5	Friedelina	167
4.3.6	Canofilal	167
4.3.7	β -sitosterol e estigmasterol	168
5.	PROPOSTA DE BIOSÍNTESE DAS LATHROPHYTONAS E DOS ÁCIDOS LATHROPHYTÓICOS E KIELMEYERÓICOS	169
5.1.	Lathrophytonas	170
5.2.	Ácidos lathrophytóicos	172
5.3.	Ácidos kielmeyeróicos.....	174
6.	ENSAIO BIOLÓGICO.....	178
7.	CONCLUSÃO	179
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

1 INTRODUÇÃO

A família Clusiaceae, tradicionalmente conhecida como Guttiferae, constituída por cerca de 36 gêneros e aproximadamente 1200 espécies, difunde-se pelas principais regiões tropicais e temperadas do planeta, sendo que no Brasil são encontrados aproximadamente 21 gêneros e 183 espécies (DIAZ, *et al.*, 2013).

Estudos filogenéticos recentes desmembraram essa família em três novas famílias, de tal forma que pudessem ser reconhecidas através de características morfológicas: Hypericaceae, Clusiaceae *s.s.* e Calophyllaceae (WURDACK e DAVIS, 2009). Na atual divisão, a família Clusiaceae *s.s.* engloba 14 gêneros e cerca de 600 espécies. A Hypericaceae inclui 9 gêneros e cerca de 560 espécies, enquanto que a Calophyllaceae inclui 13 gêneros e cerca de 460 espécies (RUHFEL *et al.*, 2011).

As espécies que pertencem à família Calophyllaceae são de hábitos variados, podendo apresentar-se como árvores, arbustos, ervas anuais, com canais resinosos ou glândulas oleosas amareladas ou esverdeadas e com estípulas glandulares no talo. São plantas anuais ou perenes, latescentes ou não, apresentando folhas alternas ou opostas e sem estípulas (SOUSA, 2005).

As plantas pertencentes às famílias Hypericaceae, Clusiaceae *s.s.* e Calophyllaceae são conhecidas por produzirem como metabólitos secundários triterpenos, xantonas, 4-fenil e 4-alkilcumarinas preniladas (CRUZ *et al.* 2001, 1998), bifenilas, biflavonóides, (BAGGETT *et al.* 2005), acilfloroglucinois poliprenilados, também chamados de derivados do floroglucinol (SINGH e BHARATE, 2006; CIOCHINA E GROSSMAN, 2006), entre outros.

Os acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos fascinam pela sua complexa estrutura química, o que tem despertado a atenção da comunidade científica. Segundo Cao e colaboradores (2006), o acilfloroglucinol poliprenilado policíclico mais conhecido é a hiperforina, isolada de *Hypericum perforatum* (Fig. 1). A essa substância são atribuídas atividades antidepressivas e anticâncer *in vivo* e *in vitro* (GARTER *et al.*, 2005). Outras atividades atribuídas aos acilfloroglucinois poliprenilados incluem inibição de HIV (FULLER *et al.*, 1999), efeito citotóxico contra células carcinogênicas (ROUX *et al.*, 2000), ação anti-inflamatória e inibição da acetiltransferase (FUKUYAMA *et al.*, 1998).

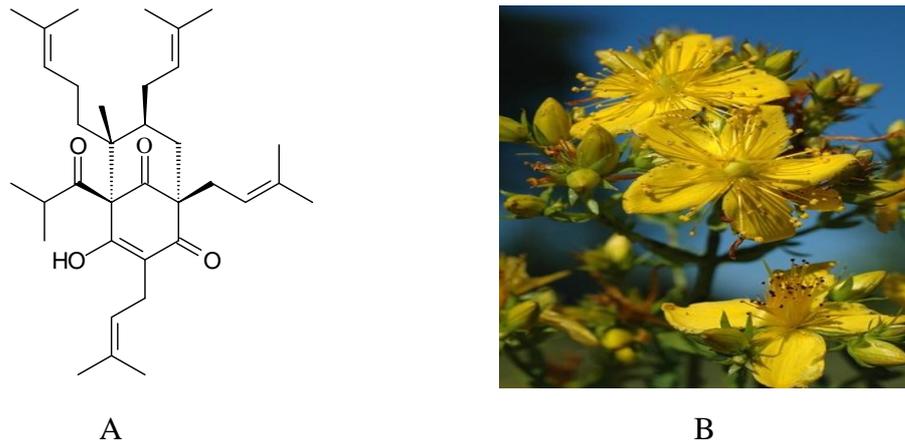


Figura 1: Fórmula estrutural da hiperforina (a), isolada de *Hypericum perforatum* (b). fonte: http://www.naturephoto-cz.com/hypericum-perforatum-photo_lat-5905.html. acesso em 18/07/2013.

1.1 O gênero *Kielmeyera*

O gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul (Fig. 2) e compreende cerca de 47 espécies, sendo 45 nativas do Brasil (CADDAH *et al*, 2012) e, na circunscrição atual, este gênero faz parte da família Calophyllaceae (RUHFEL *et al.*, 2011).

Espécies desse gênero são encontradas nos principais habitats do Brasil: Mata Atlântica, Cerrado, Restinga e Campo Rupestre. Algumas espécies encontradas no cerrado brasileiro têm sido usadas pela população para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras (PINHEIRO, 2003).



Figura 2: Distribuição do gênero *Kielmeyera* na América do Sul. fonte: global biodiversity information facility (gbif) geospatial conservatium services. Disponível em: <http://data.gbif.org/species/6693849/> acesso em 18/07/2012.

A presença de derivados poliprenilados do floroglucinol no gênero *Kielmeyera* foi inicialmente relatada por Silva Neto em 1998, ao analisar, por RMN ^1H , frações do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton* (Fig. 3). Ele constatou a presença dessas substâncias ao observar sinais de RMN ^1H bastante desblindados entre δ 18-19, característicos de hidrogênios hidroxílicos envolvidos em ligação de hidrogênio com grupos carboxílicos, além de observar sinais característicos de hidrogênios de sistema aromático, olefínicos, etc. semelhantes aos sinais exibidos na Figura 4. Esse fato tornou-se inédito, pois, mesmo com o estudo de várias espécies do gênero *Kielmeyera*, inexistiam relatos da ocorrência de tais substâncias neste gênero.



Figura 3: Espécime florido de *Kielmeyera lathrophyton*.

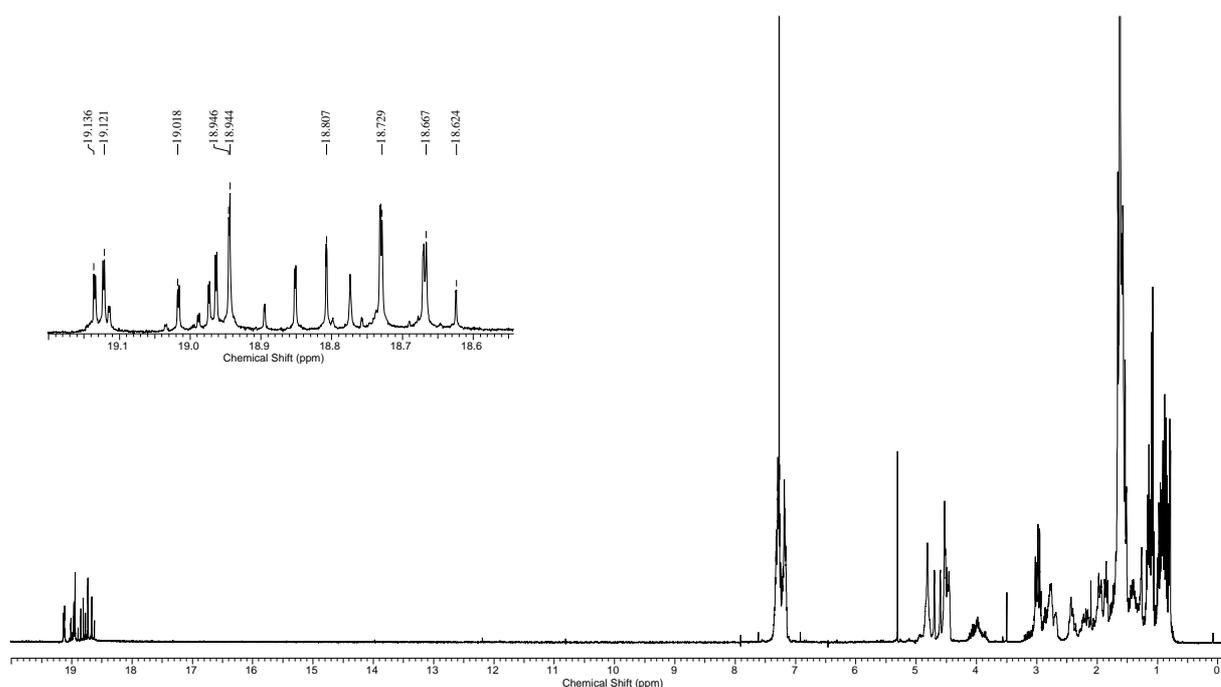


Figura 4: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de uma fração do extrato em hexano de *K. lathrophyton*.

Até aquele momento, o interesse no estudo de espécies do gênero *Kielmeyera* estava relacionado à ocorrência de substâncias como triterpenos, 4-fenil e 4-alquilcumarinas e xantonas, os metabólitos secundários mais amplamente encontrados no gênero (CRUZ *et al.*, 2001, 2002; COTTIGLIA *et al.*, 2004).

A possibilidade de encontrar derivados poliprenilados do floroglucinol no gênero *Kielmeyera* despertou grande interesse no Grupo de Estudos de Substâncias Naturais Orgânicas – GESNAT. Assim, atenção especial foi dada às espécies de *K. coriaceae*, *K. cuspidata* e *K. lathrophyton*, coletadas na Chapada Diamantina/Bahia, pois, os extratos hexânicos dessas três espécies de *Kielmeyera* apresentaram os sinais de RMN ^1H , característicos dos derivados poliprenilados do floroglucinol relatados por Silva Neto (1998).

Em dois trabalhos recentes com extratos hexânicos de *K. lathrophyton* e *K. coriaceae* coletados na Chapada Diamantina/Bahia (SOUSA, 2005; DE ALMEIDA, 2008), foram isoladas e identificadas, na forma de ésteres metílicos, cinco daquelas substâncias com características semelhantes às mencionadas por Silva Neto (1998) – Fig. 5.

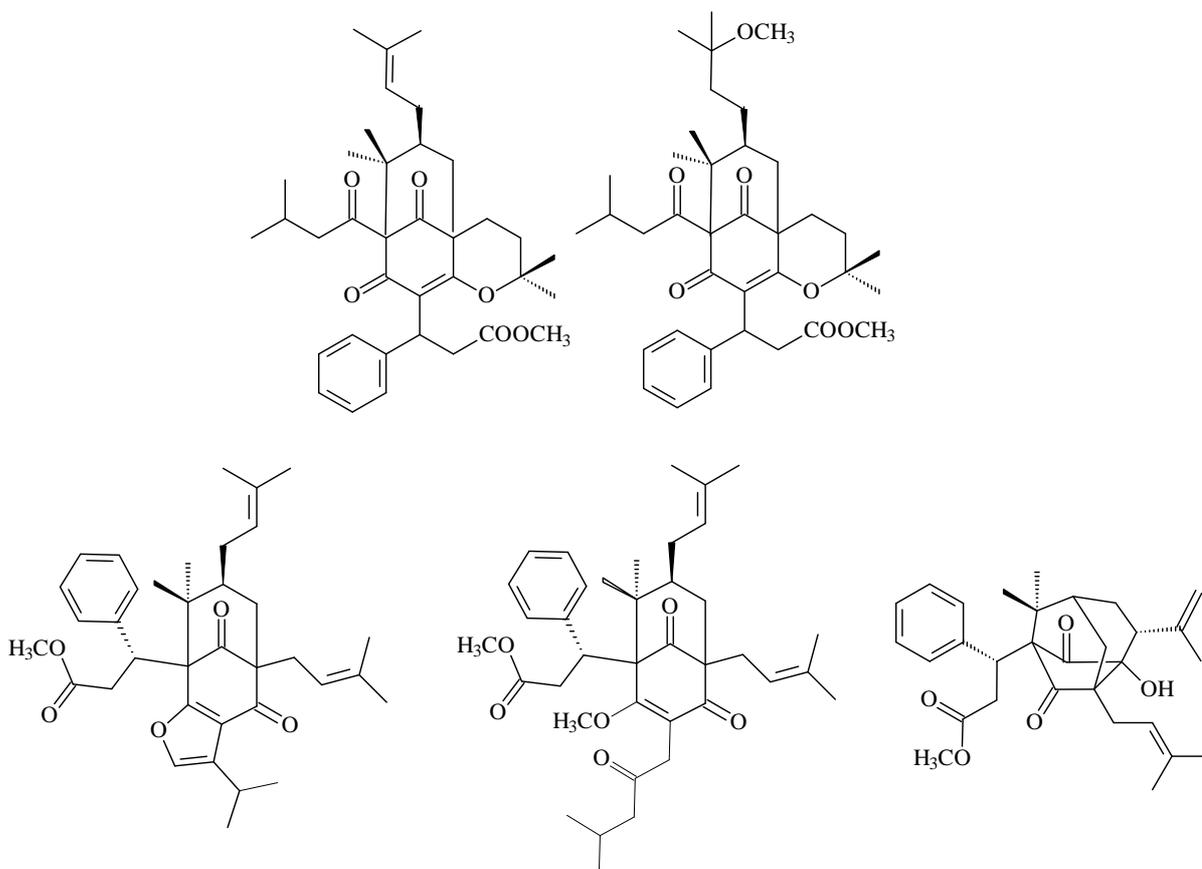


Figura 5: Fórmulas estruturais dos derivados poliprenilados do floroglucinol isolados do gênero *Kielmeyera*.

1.2 Derivados poliprenilados do floroglucinol

Os acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos – também chamados de derivados do floroglucinol – geralmente caracterizam-se pela presença de um esqueleto biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona ou biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona, substituído por grupos acílico, prenílico, benzoílico, geranílico ou ácido 3-fenilpropanóico em C-1, C-3 ou C-5 (Fig. 6). Muitos derivados do floroglucinol também sofrem ciclizações secundárias que envolvem β -dicetona e grupos olefínicos para gerar estruturas de adamantanos, dihidrofurano fundido ou semelhante (GROSSMAN e JACOBS, 2000).

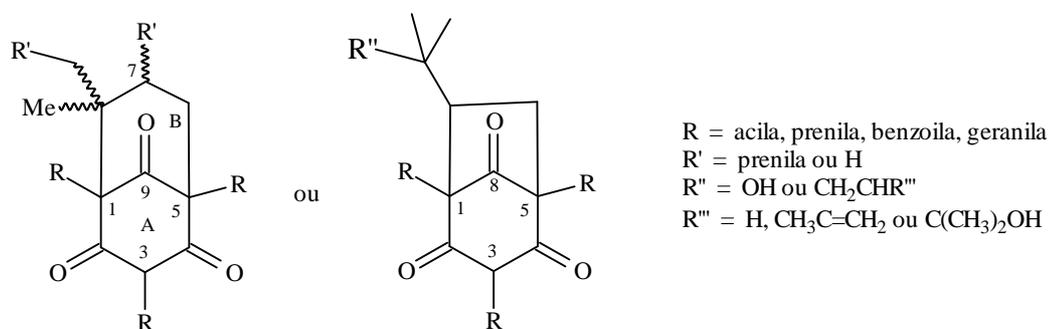
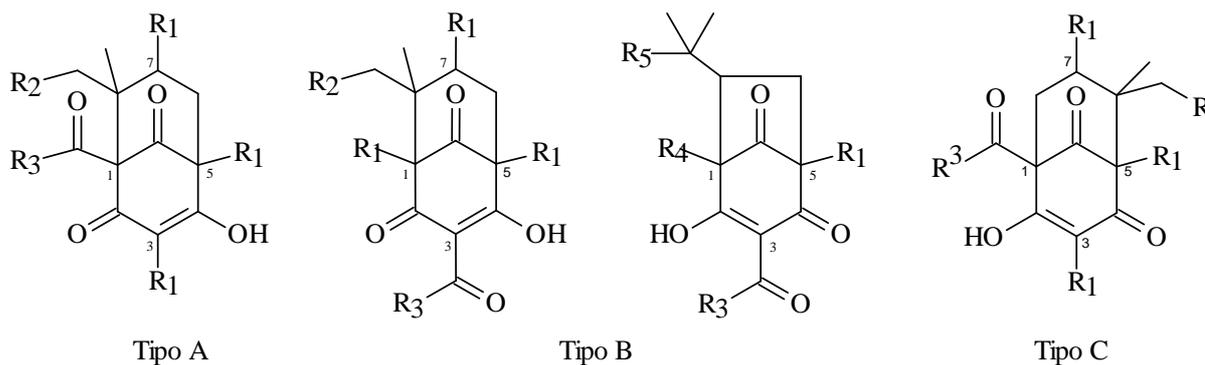


Figura 6: Tipos de esqueletos biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona e biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona presente nos derivados do floroglucinol.

Cuesta-Rubio e colaboradores (2001) classificaram os acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos de acordo com o posicionamento do grupo acílico ou benzoílico nos carbonos do anel bicíclico e destacaram três tipos dessas substâncias: tipo A, que apresentam o grupo acílico ou benzoílico no carbono C-1 e um carbono quaternário vizinho, C-8, geralmente substituído com duas metilas; as do tipo B, que têm o grupo acílico ou benzoílico posicionado em C-3; e as do tipo C, mais raramente, apresentam o grupo acílico ou benzoílico em C-1 e um carbono quaternário em C-6 (Fig. 7). Essa mesma classificação também foi adotada por Ciochina e Grossman (2006).



- $R_1 = C_5H_9$, ou geranila
 $R_2 = H$ ou prenila
 $R_3 = i$ -propila, i -butila, s -butila, prenila, ou fenila
 $R_4 = Me$, $R_5 = OH$ ou CH_2CHR_6
 $R_6 = H$, $CMe=CH_2$, ou $C(Me)_2OH$

Figura 7: Fórmulas estruturais dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos dos tipos A, B e C.

Os derivados do floroglucinol geralmente são obtidos através da metodologia fitoquímica tradicional e, na maioria das vezes, são obtidos de extratos preparados com solventes orgânicos de baixa e média polaridade. Assim, efetua-se extrações diretamente com solventes como n -hexano, éter de petróleo, diclorometano ou acetato de etila (COTTIGLIA *et al.*, 2004; CRUZ e TEIXEIRA, 2004; WU *et al.*, 2008; WINKELMANN *et al.*, 2000; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; MASSIOT *et al.* 2005), ou ainda, mistura de éter de petróleo – éter etílico (FODULOVIC *et al.*, 2003). Outro procedimento envolve a obtenção de um extrato em solvente orgânico polar como etanol, metanol ou acetona (raramente), seguido do particionamento destes extratos com um solvente de baixa polaridade (HUANG *et al.*, 2009; CHEN, *et al.*, 2009; HASHIDA *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2004; FUKUYAMA, 1998; CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001; YIN *et al.*, 2009). Há relatos, também, de extração com dióxido de carbono supercrítico (GLISIC, *et al.*, 2008; VEROTTA *et al.*, 2000).

O fracionamento dos extratos contendo os derivados do floroglucinol é feito através da combinação de vários métodos cromatográficos em coluna de gel de sílica ou dextrana. A purificação das substâncias se dá por cromatografia em camada delgada preparativa e, na maior parte das vezes, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (MARTI *et al.*, 2009; BAGGETT *et al.*, 2005; HILLWIG, *et al.*, 2008; HENRY, 2006; MASSIOT, 2005; VEROTTA *et al.*, 2000; HASHIDA *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2007; FUKUYAMA, 1998).

O isolamento dessas substâncias não é uma tarefa simples. Em alguns casos se faz necessário realizar alguma modificação estrutural. Um dos procedimentos mais comuns consiste no tratamento das frações contendo os derivados do floroglucinol com diazometano. Esse procedimento permite obter derivados metilados e possibilita uma melhor separação dessas substâncias, pois diminui a polaridade dos compostos (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001; DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; 1996; DE ALMEIDA, *et al.*, 2011).

Uma das dificuldades no isolamento de tais substâncias está relacionada ao fato delas existirem na forma de tautômeros, a exemplo do equilíbrio ceto-enólico (Fig. 8) relatado por Winkelmann e colaboradores (2001).

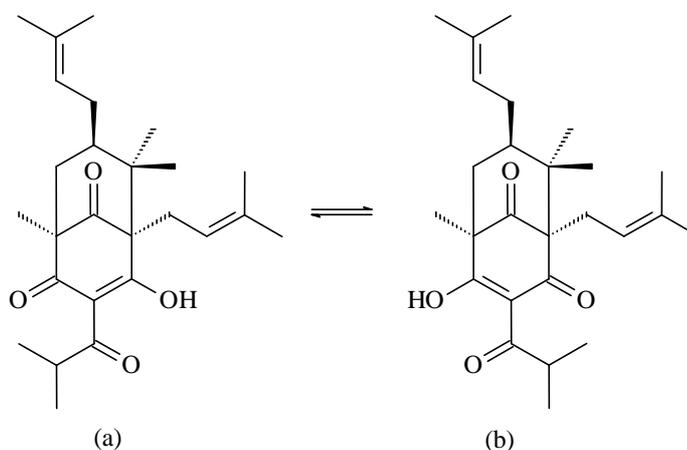


Figura 8: Fórmula estrutural de dois tautômeros obtidos de *Hypericum papuanum* na proporção de (3:4), respectivamente.

Talvez uma das características mais marcantes desses derivados do floroglucinol que apresentam equilíbrio ceto-enólico é a presença de sinais no espectro de RMN ^1H , que podem variar entre δ 15 - 19 (YIN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2008; HASHIDA *et al.*, 2008; COTTIGLIA *et al.*, 2004; FODULOVIC *et al.* 2003; WINKELMANN *et al.*, 2001, 2000;). Um exemplo pode ser observado no espectro de RMN ^1H de uma das frações do extrato em hexano obtido de *K. cuspidata* (Fig. 9).

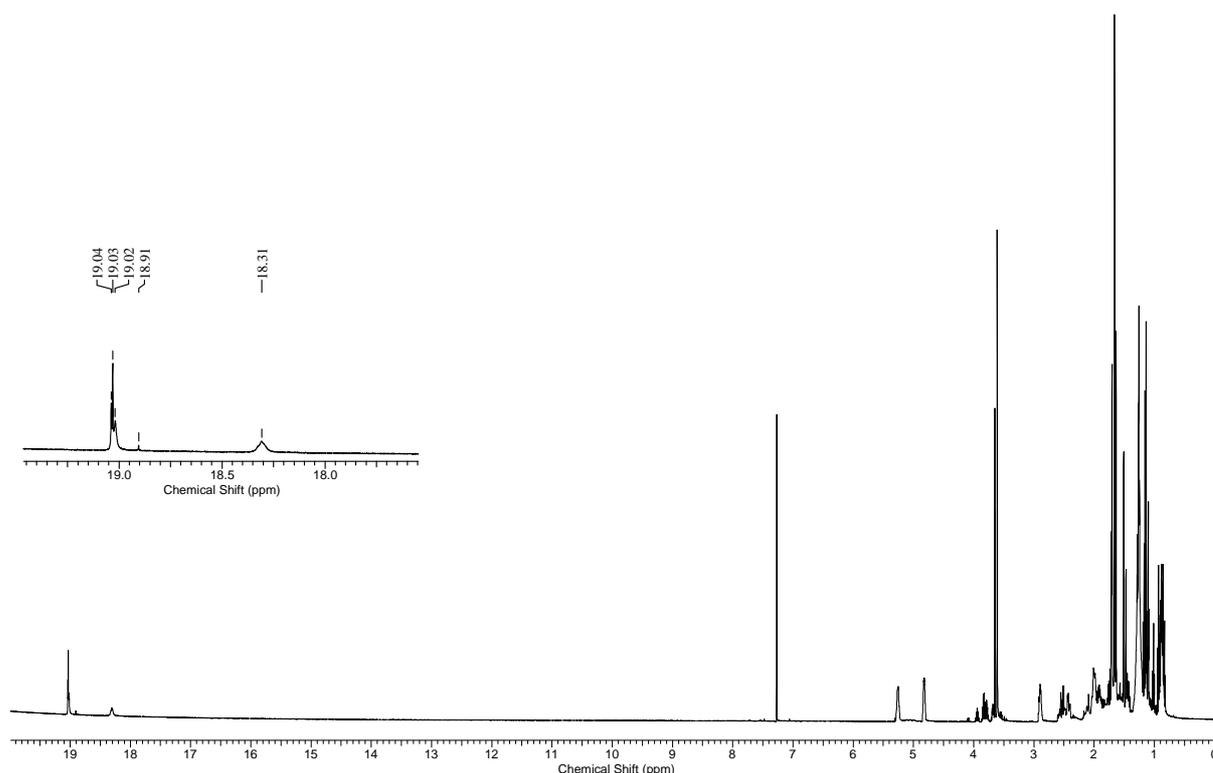


Figura 9: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de uma fração do extrato em hexano de *K. cuspidata*.

A presença de sinais de RMN ^1H bastante desblindado entre δ 15-19 é atribuído a hidrogênio envolvido em forte ligação de hidrogênio com uma carbonila. Fodulovic e colaboradores (2003) relatam que a ocorrência desses sinais desblindados é típica de ligação de hidrogênio enólica em β -dicetonas.

A existência de um equilíbrio ceto-enólico dificulta a purificação e elucidação estrutural dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos. Tal dificuldade pode estar relacionada à grande quantidade de sinais sobpostos observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , referente à presença de tautômeros. Uma das alternativas utilizadas para resolver o problema é a realização dos espectros em diferentes solventes ou variar a temperatura em que os espectros são obtidos (YIN *et al.*, 2009; BOKESCH *et al.*, 1999), ou ainda interromper o equilíbrio ceto-enólico através de uma reação, a exemplo da reação de metilação. Outra alternativa consiste na mudança de pH do meio (PAYTON *et al.* 2007), embora esse procedimento não seja indicado para essas substâncias, dada a sua facilidade de sofrer degradação.

Os dados obtidos a partir da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C são as ferramentas mais úteis na elucidação estrutural dos derivados do floroglucinol. Assim, esses dados podem ser usados para obter informações valiosas quanto à presença de grupos funcionais, estereoquímica, análise conformacional, etc.

O sistema de anel biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona requer necessariamente que os substituintes em C-1 e C-5 ocupem a posição equatorial, enquanto que o substituinte em C-7 (geralmente um prenila) pode assumir a posição axial (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999) ou equatorial (LOKVAM *et al.*, 2000) no anel ciclo-hexanona formado pelos carbonos C-1, C-8, C-7, C-6, C-5 e C-9. Este anel é também chamado de anel B (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999) e pode adotar a conformação em cadeira ou bote, como exibido na Fig. 10. Quando o substituinte em C-7 assume a posição equatorial, o anel B adota a conformação em cadeira. Por outro lado, se a configuração do substituinte for inversa, a conformação desse anel será bote.

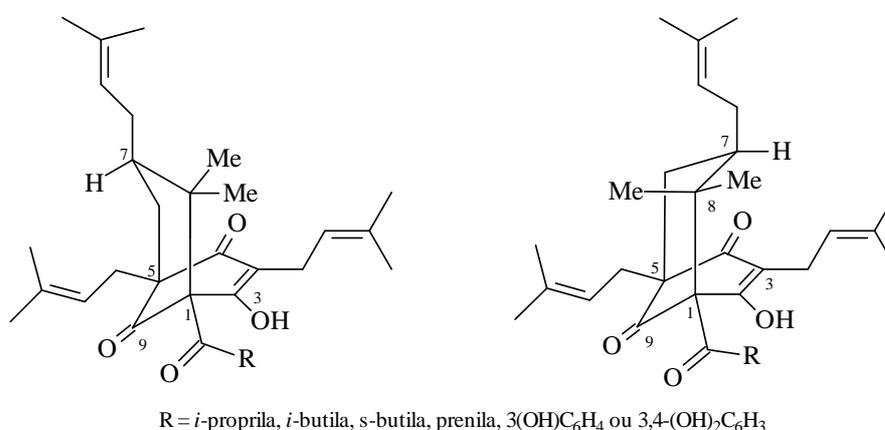


Figura 10: Conformações adotadas pelo anel B dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos.

A conformação em bote minimiza as repulsões 1,3-diaxial com C-2 e C-4 que o grupo prenílico em axial teria se estivesse na conformação em cadeira (Cruz e Teixeira, 2005). De acordo com Piccinelli e colaboradores (2005), a estereoquímica relativa de C-7 e, portanto, a orientação do substituinte em C-7, pode ser deduzida a partir dos dados de RMN ¹H e ¹³C. As principais características que permitem inferir sobre a conformação do anel B são:

- O sinal dos hidrogênios H-6 aparece no espectro de RMN ¹H mais desblindados (acima de δ 2,0) se a conformação do anel B for bote e o substituinte em C-7 estiver na posição pseudo axial. Além disso, H-6_{ax} exhibe $J_{H6_{ax}-H-7} = 7 - 8$ Hz. Por outro lado, se o substituinte em C-7 estiver na posição equatorial (conformação do anel B em cadeira), H-6_{ax} tem o valor de δ 1,5 e $J_{H6_{ax}-H-7} = 10 - 13$ Hz (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999).
- Quando o substituinte no carbono C-7 está em equatorial, o valor de δ no espectro de RMN ¹³C aparece entre δ 40 e 44, ao passo que se o substituinte estiver na posição pseudo axial, esse valor situa-se entre δ 45-49 (CIOCHINA e GROSSMAN, 2006);

- Os grupos metílicos geminais em C-8 mostram duas faixas de valores no deslocamento químico no espectro de RMN ^{13}C : se o substituinte em C-7 estiver na posição pseudo axial, a metila equatorial (Me_{eq}) terá δ 22-25 e a metila axial (Me_{ax}) terá δ 26 – 28, enquanto que, se o substituinte em C-7 estiver em equatorial, Me_{ax} terá δ 15-17 e Me_{eq} δ 22-25 (CUESTRA-RUBIO *et al.*, 2001).

Essas diferenças que permitem inferir sobre a conformação do anel B a partir dos dados de RMN ^1H e ^{13}C para os acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos estão sumarizadas na Tab. 1.

Tabela 1: Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C de acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos que apresentam esqueleto do tipo biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona na conformação em cadeira e bote.

Conformação	$\Delta\delta$ ^1H		δ ^{13}C
	H-6	CH_3 geminais	C-7
Cadeira	0,3 – 1,2	7,7 - 8,5	40 - 44
Bote	0,0 – 0,2	3,8 – 4,5	45 - 49

Existe um grande número de acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos que diferem principalmente quanto ao grau de substituição no anel biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona ou biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona, sendo que o grupo prenílico é o substituinte mais amplamente encontrado nos carbonos C-1, C-3, C-5 ou C-7 e pelas ciclizações secundárias que eles sofrem. Dentro dessa ampla variedade de substâncias, os acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos do tipo A são os que têm maior ocorrência nas famílias Calophyllaceae, Clusiaceae *s.s.* e Hypericaceae, seguido pelos do tipo B e, mais raramente, os do tipo C.

1.3 Biossíntese dos derivados poliprenilados do floroglucinol

As espécies da família Calophyllaceae caracterizam-se por produzirem metabólitos como xantonas, 4-fenil e 4-alquilcumarinas, cromanonas e, mais raramente, acilfloroglucínóis e ácidos 3-fenil-3-floroglucínolpropanóicos. A biossíntese desses compostos (como esquematizado na Fig.11), geralmente envolve o acoplamento de três unidades de malonil-CoA (porção floroglucinol) com benzoil-CoA, no caso das xantonas e benzofenonas,

com ácido 3-fenilpropanóico (derivado do ácido cinâmico) ou com isobutiril-CoA em acilfloroglucínóis.

As xantonas podem ou não estar preniladas; os neoflavonóides geralmente contêm um ou dois grupos prenilícos, enquanto que as benzofenonas, os acilfloroglucínóis e os ácidos 3-fenil-3-floroglucínolpropanóicos estão extensivamente prenilados. Nas xantonas e neoflavonóides, a porção derivada do floroglucínol conserva seu caráter aromático, enquanto que nas benzofenonas, acilfloroglucínóis e ácidos 3-fenil-3-floroglucínolpropanóicos isto não ocorre.

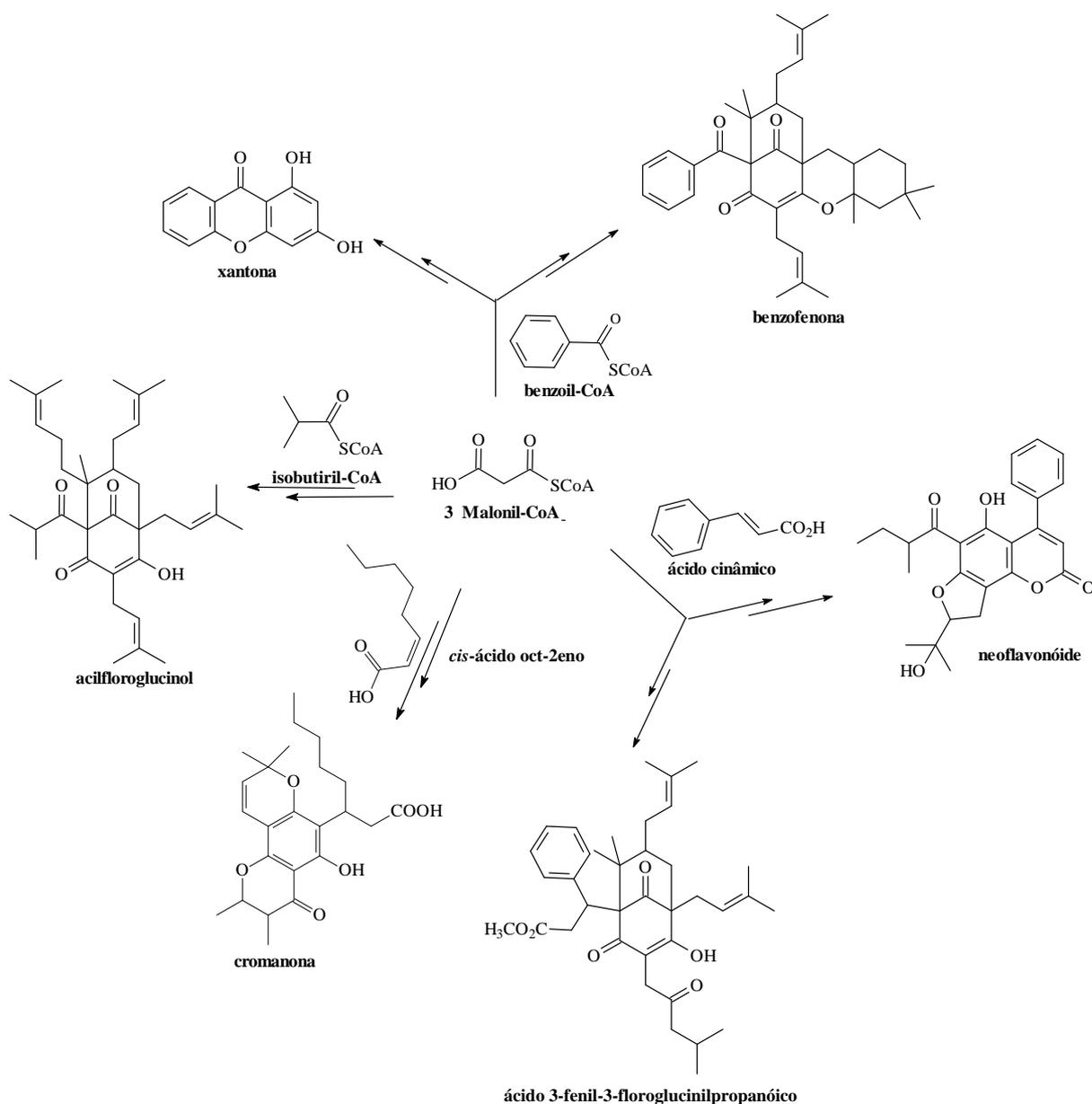


Figura 11: Esquema geral da biogênese de derivados do floroglucínol em espécies da família Calophyllaceae.

A biossíntese dos acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos ainda não foi bem estudada. Dessa classe de substâncias, talvez devido às suas comprovadas propriedades farmacológicas, a biossíntese mais conhecida é a da hiperforina. A proposta de biossíntese dessa substância envolve a condensação de uma molécula de isobutilil-CoA e três unidades de malonil-CoA, gerando a porção acilfloroglucinol. Em seguida, ocorrem substituições eletrofilicas no anel aromático do acilfloroglucinol entre uma unidade de geranyl pirofosfato (GPP) e duas de 3,3-dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Um fechamento de anel ocorre via ataque eletrofilico de um terceiro DMAPP a uma ligação dupla da cadeia gerânica (ADAM *et al.*, 2002; KARPPINEN *et al.*, 2007) – Fig. 12.

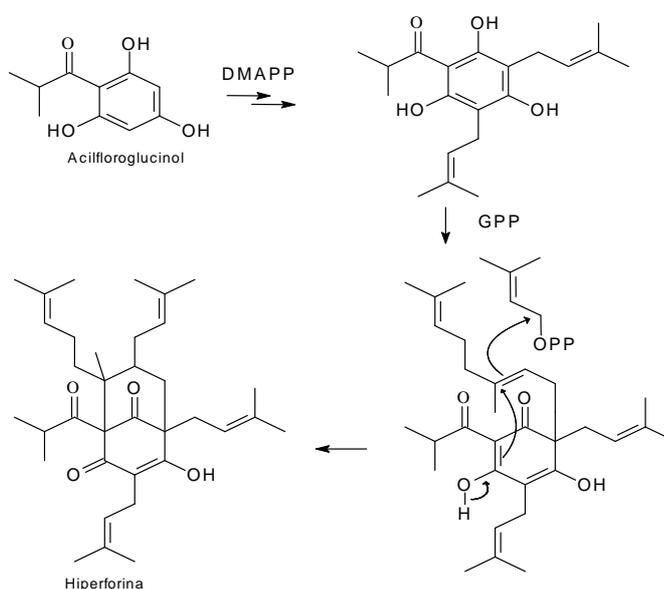


Figura 12: Mecanismo proposto para a biossíntese da hiperforina (ADAM *et al.*, 2002).

Segundo Cuesta-Rubio e colaboradores (2001), do ponto de vista biogênico, os acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos do tipo A e B podem ser biossintetizados a partir de um precursor comum (1) – Fig. 13.

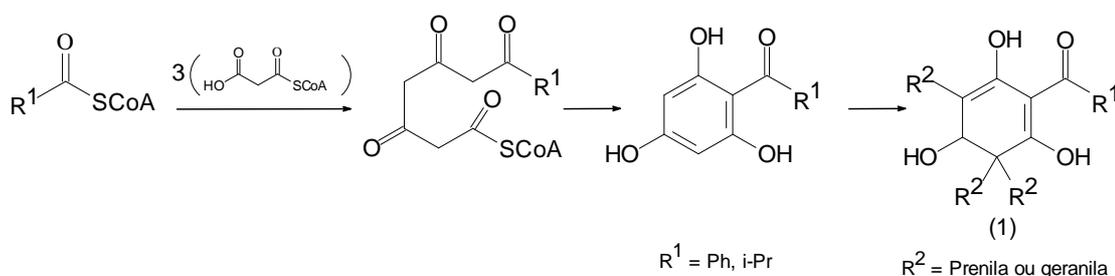


Figura 13: Esquema geral do precursor monocíclico dos acilfloroglucínóis poliprenilados policíclicos.

Segundo Ciochina e Grossman (2006), a adição de um grupo prenilico a um complexo acilfloroglucinol poliprenilado monocíclico (2) produz um carbocátion terciário (3). o ataque de c-1 ao carbocátion pode fornecer um acilfloroglucinol poliprenilado policíclico do tipo a. se o ataque for de c-3, forma-se um acilfloroglucinol poliprenilado policíclico do tipo b – fig. 14.

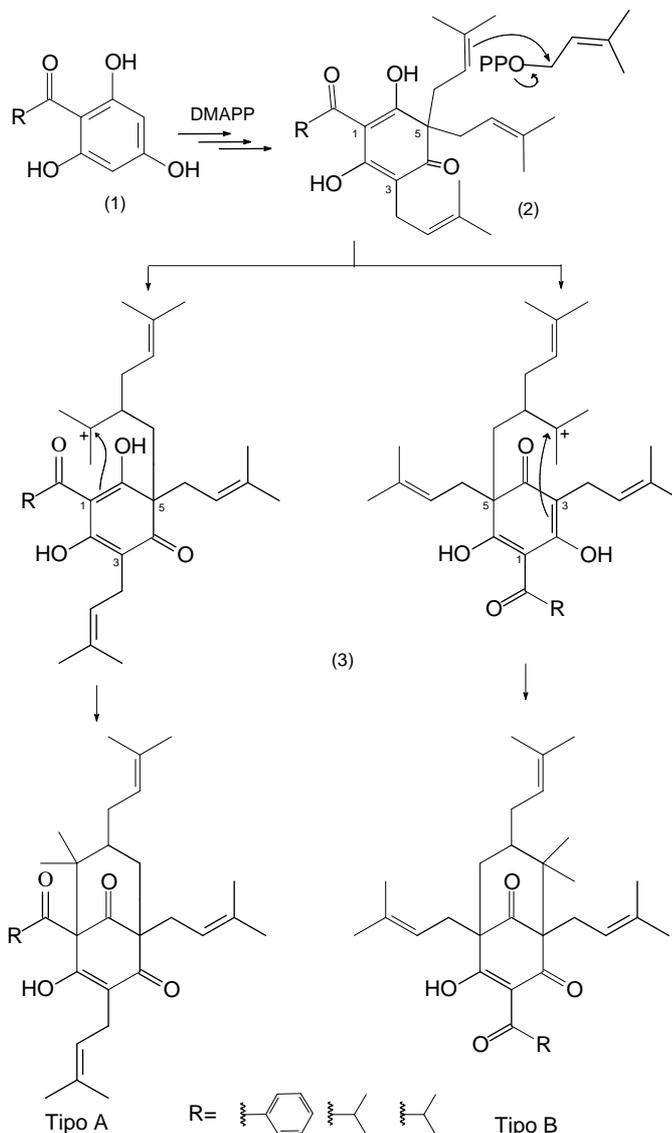


Figura 14: Formação dos acilfloroglucínóis polipreniladas policíclicas do tipo A e B. Adaptado de Ciochina e Grossman (2006).

A biogênese proposta acima por Cuesta-Rubio e colaboradores (2001) está de acordo com o estudo realizado por Klingauf e colaradores (2005). Nesse trabalho, eles relataram que culturas de células de *Hypericum calycinum* formaram adiperforina e hyperforina quando colocadas para crescer juntamente com isobutirofenona sintase no escuro.

Ciochina e Grossman (2006) sugeriram que a biossíntese de um acilfloroglucinol poliprenilado policíclico do tipo C passa por um mecanismo semelhante ao proposto para os do tipo A e B. Entretanto, o carbono quaternário do anel do acilfloroglucinol poliprenilado monocíclico deve ser o carbono ao qual o grupo acila está ligado (C-1) - Fig. 15.

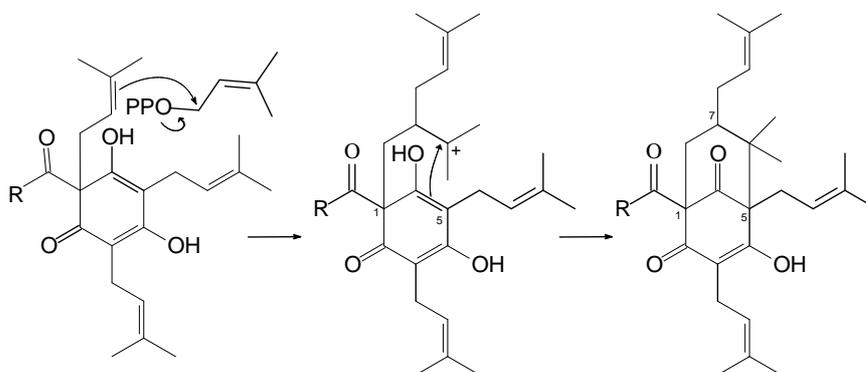


Figura 15: Formação dos acilfloroglucinóis poliprenilados policíclicos do tipo C.

Alguns acilfloroglucinóis poliprenilados sofrem reações secundárias para fornecer outras estruturas que podem não conter o anel do tipo biciclo[3.2.1]octano-2,4,8-triona ou biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona, e exemplo da perforatumona, isolada por Wu e colaboradores (2004). Neste trabalho foi sugerido que essa substância deriva da hiperforina e a rota biogénica proposta por eles envolve uma clivagem de anel do tipo Baeyer-Villiger e um rearranjo de pinacol (Fig. 16).

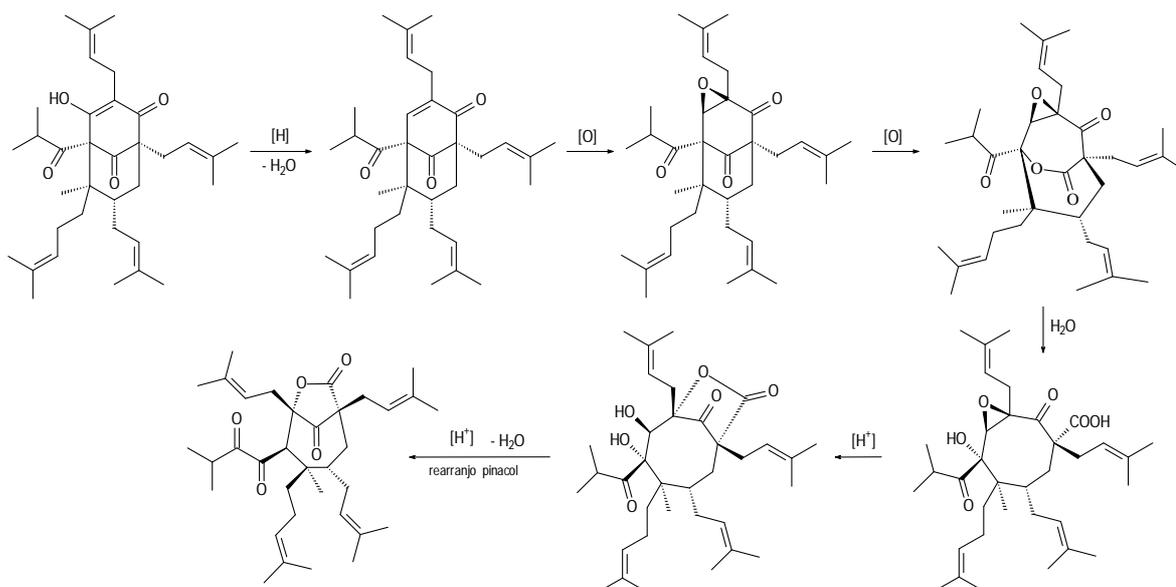


Figura 16: Proposta de mecanismo da biogênese da perforatumona elaborada por Wu e colaboradores (2004).

Outro exemplo é o do ácido lathrophytólico A, isolado de *K. lathrophyton* por De Almeida e colaboradores (2011). Neste trabalho foi proposto que a biogênese desse ácido segue uma rota tipo policetíidica através da condensação do ácido cinâmico, com três unidades de malonil-CoA formando o intermediário (1'). Uma clivagem oxidativa deste, seguida de uma descarboxilação proporciona a formação de um ciclo-1,3-diona-4-pentanol (4') conforme delineado na Figura 17.

As etapas seguintes devem assemelhar-se ao caminho biossintético proposto para a sampsoniona (HU e SIM, 2000; VEROTTA, 2002) e envolvem uma epoxidação seguida de uma cilização intramolecular e uma desidratação formando o ácido lathrophytólico A.

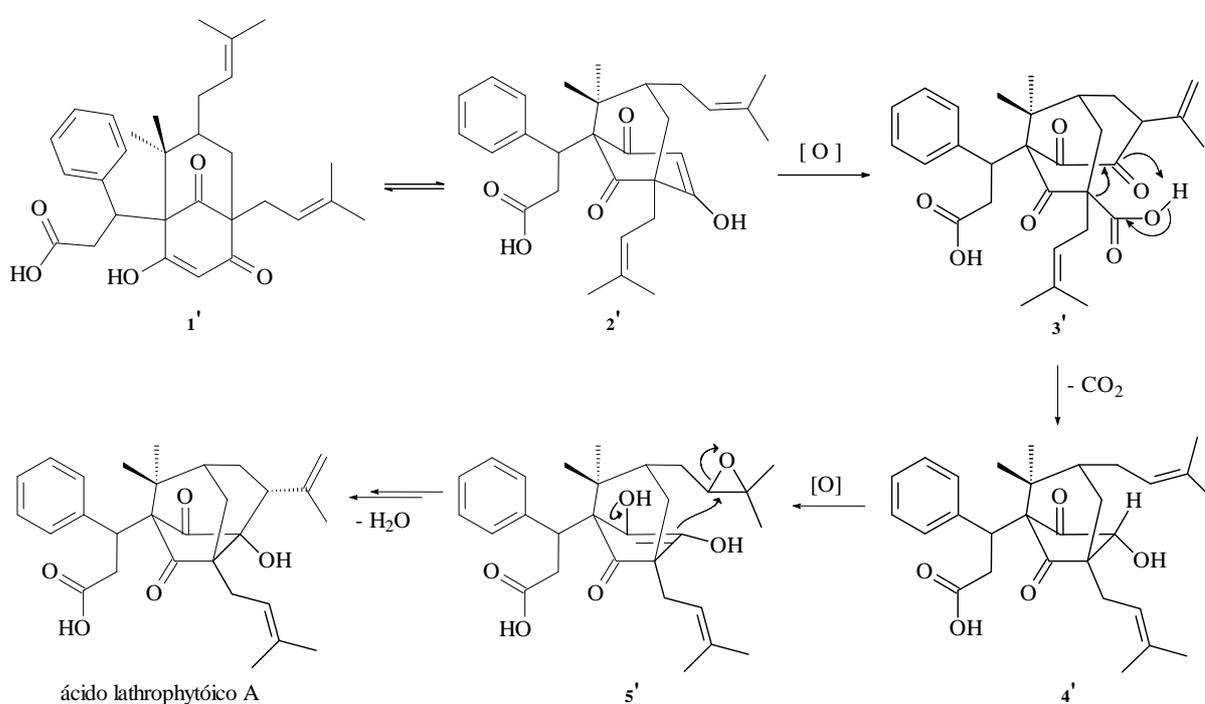


Figura 17: Mecanismo de biogênese proposto para o ácido lathrophytólico A isolado de *K. lathrophyton*.

Assim, o fascínio proporcionado pelas complexas estruturas dos derivados poliprenilados motivou o reestudo químico de duas espécies de *Kielmeyera*, coletados na Chapada Diamantina/Bahia, na busca de tais metabólitos secundários. Desta forma, este trabalho descreve o estudo realizado com *K. lathrophyton* e *K. cuspidata*.

2 OBJETIVOS

- 2.1 Estudar a composição química, em termos de metabólitos secundários das espécies *Kielmeyera lathrophyton* e de *Kielmeyera cuspidata* em especial, os constituintes químicos presentes no extrato hexânico que apresentam sinais de RMN ^1H entre δ 18-19;
- 2.2 Purificar e determinar as estruturas desses metabólitos;
- 2.3 Comparar a composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* presentes na Chapada Diamantina, com as das espécies já estudadas, de ocorrência na restinga e cerrado;
- 2.4 Avaliar as atividades antibacterianas contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e *Micrococcus luteus* (Gram-positivas) e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) das substâncias isoladas;
- 2.5 Avaliar as atividades antifúngicas com os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Candida albicans*, das substâncias isoladas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e equipamentos

- Os reagentes utilizados nos procedimentos cromatográficos e na preparação dos extratos foram das marcas MERCK[®], VETEC[®] e QUIMEX[®], todos de grau analítico;
- Para a trituração do material vegetal foi utilizado um moinho Thomas Wiley Laboratory Mill – Model 4;
- A concentração dos extratos e das frações foi realizada sob pressão reduzida no evaporador rotatório de marca BUCHI[®], modelo R-3000;
- Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizadas sílica gel 60 – 230 mesh (0,063 – 210 μm), 230 – 400 mesh (0,040 – 0,063 μm), sílica gel H (15 μm) Merck[®] e sílica gel LiChroprep[®] RP-18 (25-40 μm);
- Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi utilizado gel de sílica HF₂₅₄₊₃₆₆, Merck[®] e na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizado gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck[®]. As cromatoplasmas para CCDC foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica em água destilada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico (Heidelberg), obtendo-se placas com espessuras de 0,50 mm (comparativas) e 1,00 mm (preparativas). Depois de secar ao ar livre, todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufas a 100 °C por um período de aproximadamente uma hora;
- Como reveladores, foram utilizadas irradiações da luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 a 366 nm e vapores de iodo;
- Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, bem como os experimentos de DEPT 135 foram obtidos no espectrômetro VARIAN GEMINI 2000, operando com frequência a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de δ (ppm), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta= 0,0$) e referência secundária CDCl₃ ($\delta_{\text{H}} 7,27$ e $\delta_{\text{C}} 77,00$) e C₆D₆ ($\delta_{\text{H}} 7,16$ e $\delta_{\text{C}} 128,00$);
- Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros de RMN foram clorofórmio e benzeno deuterados;

- Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na faixa de 4000 – 500 cm^{-1} usando espectrofotômetro Shimadzu IR Affinity-1. As amostras foram preparadas na forma de filme com clorofórmio;
- Os experimentos de rotação óptica foram realizados em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 343;
- Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no modo positivo em um espectrometro Bruker Daltonics MicroTOF.

3.2 Reação de metilação com diazometano

Inicialmente foi preparada a nitrosometiluréia adicionando-se, lentamente e com agitação constante, uma solução de NaOH (38,5%) a uma solução contendo Br_2 (22,0 g) e acetamida (14,75 g). Esta mistura foi aquecida até a ebulição e, posteriormente resfriada em banho de gelo por cerca de duas horas, obtendo-se após filtração a vácuo e secagem ao ar, cristais de acetil-metil-uréia (12,25 g).

Os cristais de acetil-metil-uréia foram dissolvidos em 12,50 mL de HCl concentrado e aquecidos, permanecendo em ebulição por cerca de 12 minutos. Em seguida, a mistura foi diluída com 12,50 mL de água destilada e resfriada abaixo de 10 °C em banho de gelo. A esta solução foi adicionada uma solução gelada de NaNO_2 (43%). Após filtração a vácuo e secagem ao ar, obteve-se 9,0 g de um sólido amarelo pálido – nitrosometiluréia.

A metilação das amostras foi feita em solução etérea de diazometano, recentemente preparada por reação envolvendo a adição lenta de nitrosometiluréia a uma solução aquosa de KOH (50%) em éter sulfúrico colocado em banho de gelo (VOGUEL, 1971). A Figura 18 resume as etapas usadas na obtenção do diazometano (CH_2N_2).

A amostra a ser metilada foi solubilizada em CHCl_3 e adicionou-se, pouco a pouco, a solução etérea de diazometano gelada, até não perceber-se mais desprendimento de gás (excesso de CH_2N_2). O solvente da mistura foi evaporado em temperatura ambiente e examinou-se o produto através de CCDC e RMN ^1H para assegurar que houve metilação.

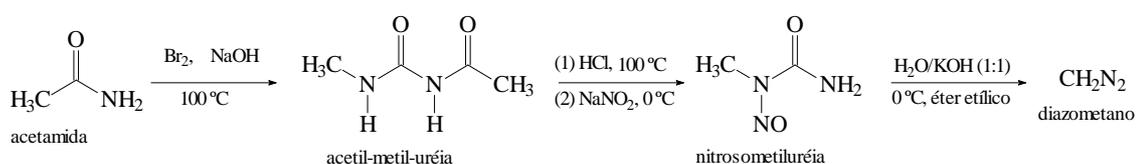


Figura 18: Obtenção do diazometano a partir da acetamida.

3.3 Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Kielmeyera lathrophyton* foi coletada no município de Palmeiras, Chapada Diamantina – Bahia, no dia 27 de fevereiro de 2009 e sua identificação também foi feita pela botânica Prof^a. Maria Lenise S. Guedes e registrada no herbário Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o número 35942.

Espécimes de *Kielmeyera cuspidata* foram coletados sob a orientação do Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz e da botânica Prof^a. Maria Lenise S. Guedes no dia 10 de maio de 2003 em uma área de campo rupestre no município de Andaraí, Chapada Diamantina – Bahia. Uma exsicata foi depositada no herbário Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o registro ALCB – 061902.

3.4 Obtenção dos extratos orgânicos

3.4.1 Extrato do caule de *Kielmeyera lathrophyton*

O material vegetal coletado foi secado à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas. Os caules triturados proporcionaram a obtenção de 5,1 Kg de serragem. Esta foi colocada em contato com o solvente orgânico (hexano) e após um período que variou entre 48 e 72 horas, a solução resultante foi filtrada e, posteriormente, foi destilada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida na temperatura de aproximadamente 35 °C. Esse mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes, obtendo-se ao final 25,64 g de extrato hexânico seco (Fig. 19).

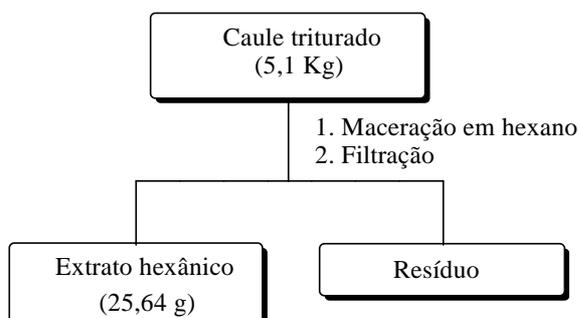


Figura 19: Procedimento experimental para a obtenção do extrato orgânico do caule de *K. lathrophyton*.

3.4.2 Extrato do caule de *Kielmeyera cuspidata*

O extrato do caule de *Kielmeyera cuspidata* foi preparado em um trabalho realizado por Sobral (2006) e seguiu uma metodologia semelhante à descrita para a obtenção do extrato hexânico de *K. lathrophyton*, conforme Fig. 20. Assim, o estudo dessa espécie é uma continuação desse trabalho e teve como partida a fração KcH-17, obtida do fracionamento do extrato hexânico de *K. cuspidata* (Fig. 20).



Figura 20: Procedimento experimental para a obtenção dos extratos orgânicos do caule de *K. cuspidata*.

3.5 Fracionamento do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton*

O extrato hexânico (25,64 g) foi fracionado através de uma coluna cromatográfica, empacotada a seco com sílica gel 60 (70-230 mesh). Inicialmente, utilizou-se como fase móvel *n*-hexano puro; em seguida, a mistura de hexano/DCM 1:1 (v/v), DCM, acetato de etila e por último metanol, obtendo-se 19 frações de aproximadamente 300 mL cada.

As frações foram concentradas em evaporador rotatório e depois procedeu-se a análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Após análise dos resultados obtidos por irradiações da luz UV (λ 254 e 366) e vapores de I₂. As frações que

apresentaram perfil cromatográfico semelhante entre si foram agrupadas conforme resumo na Figura 21, obtendo-se 13 grupos de frações identificadas como “KL”.

A análise da CCDC de algumas frações agrupadas revelou manchas com aspecto semelhante a um cometa, não obtendo nenhum sistema de solvente no qual se obtivesse boa resolução das placas cromatográficas. Algumas frações que apresentaram tal comportamento foram submetidas a uma análise preliminar de RMN ^1H .

Os espectros dessas frações revelaram a presença de compostos com sinais bastante desprotegidos entre δ 18-19, característicos de hidrogênios hidroxílicos envolvidos em ligação de hidrogênio com grupos carbonílicos, além de observar sinais característicos de hidrogênios aromáticos, olefínicos, etc. Percebeu-se a presença destes compostos nas frações denominadas KL-4 a KL-13. Entretanto, por apresentar menor complexidade química, ou seja, apresentou melhor resolução dos constituintes da mistura para os sistemas de eluição frequentemente testados para cromatografia em camada delgada em fase normal, foram selecionadas para estudo as frações KL-4, KL-10 e KL-11 (Fig. 21). As demais foram de difícil separação por cromatografia em fase normal, apresentando perfil frente à CCDC de baixa resolução dos seus constituintes.

Com base nesses resultados tentou-se diminuir a polaridade dos componentes da mistura para possibilitar melhor separação. Para isto foram realizadas reações de metilação com as frações objeto de estudo.

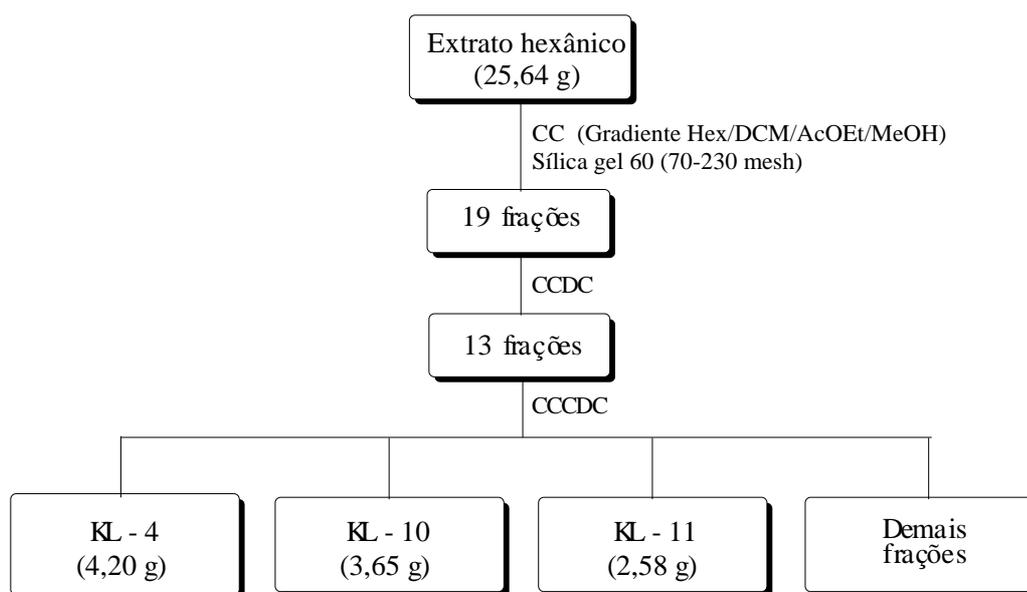


Figura 21: Esquema do fracionamento do extrato hexânico de *K. lathrophyton*.

3.5.1. Estudo da fração KL-4

A fração KL-4 (4,20 g) era constituída por um material oleoso, viscoso de cor amarela alaranjada em mistura com um sólido branco. Esta fração foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída inicialmente com hexano. A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato de etila até a adição de acetato de etila puro e, por último, metanol. Foram obtidas 42 frações de aproximadamente 20 mL (cada uma) que foram analisadas por CCDC e reunidas em 17 novas frações (Figura 22). Foram separadas para estudo as frações KL-4-5, KL-4-(7 e 8), KL-4-(10 a12), denominadas de **A**, **B** e **C**, respectivamente. (Fig. 22).

A fração **A** (400,0 mg) foi submetida a uma reação de metilação com diazometano e, após evaporação do solvente, foi feito um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel (230 – 400 mesh), eluída com uma mistura de hexano/acetato de etila 95:5 (v/v), obtendo-se 20 frações com volume de aproximadamente 15 mL cada. Estas frações foram concentradas e analisadas por CCDC. Desta coluna, reuniu-se as frações 5 e 6 (**A**-5-6), bem como as frações 9, 10 e 11 (**A**-9-11), que por apresentarem menor complexidade, foram separadas para estudo.

Com a fração **A**-5-6 (25,0 mg), fez-se uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) – gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck[®], utilizando-se o sistema de eluição hexano/DCM 1:1 (v/v). Deste procedimento foi obtida a substância **1** (6,8 mg).

A fração **A**-9-11 (43,0 mg) foi estudada usando-se um sistema contendo uma coluna cromatográfica Michel-Miller de 300 × 15 mm, empacotada com sílica gel H (15 µm) e eluída com hexano/DCM 1:1 (v/v). Foram obtidas 25 frações de aproximadamente 10 mL cada. Estas frações foram analisadas por CCDC e após análise, as frações 12 a 16 foram agrupadas e submetidas a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) – gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck[®] – utilizando-se o sistema de eluição hexano/DCM 1:1 (v/v). Deste procedimento foi obtida a substância **2** (5,0 mg).

A maior parte do sólido branco concentrou-se na fração **B** e, por isso, foi feita uma filtração simples, dissolvendo-se parte do material oleoso em acetona. Em seguida, foi realizada uma recristalização em acetona com o sólido branco, obtendo-se a substância **18** (512,0 mg). Uma alíquota da água mãe foi concentrada e submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa utilizando-se o sistema de eluição hexano/DCM 3:7 (v/v) e obtendo-se a substância **14** (44,0 mg).

A fração **C** (152,0 mg) foi estudada usando-se um sistema contendo uma coluna cromatográfica Michel-Miller de 400×15 mm, empacotada com sílica gel H ($15 \mu\text{m}$) e eluída com hexano/DCM 1:1 (v/v). Foram obtidas 30 frações de aproximadamente 10 mL cada. Estas frações foram analisadas por CCDC e após análise, foram agrupadas as frações 7 a 15 e 17 a 24, que foram separadas para estudo. A fração C-7-15 (55,0 mg) foi submetida a uma reação de metilação com diazometano e, após evaporação do solvente foi realizada uma análise CCDC. Em seguida, a amostra foi submetida a uma cromatografia em camada delgada preparativa – gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆ – pregando-se o sistema de eluição hexano/DCM 1:1 (v/v) e obtendo-se a substância **3a** (27,4 mg) e a subfração **C-7-15C** (17,0 mg).

Este último procedimento foi empregado na análise da fração C-17-24 (39,9 mg) da qual foram obtidas as substâncias **15** (7,3 mg) e **16** (21,0 mg) como mostra o esquema geral de estudo da fração KL-4 exibido na Fig. 22.

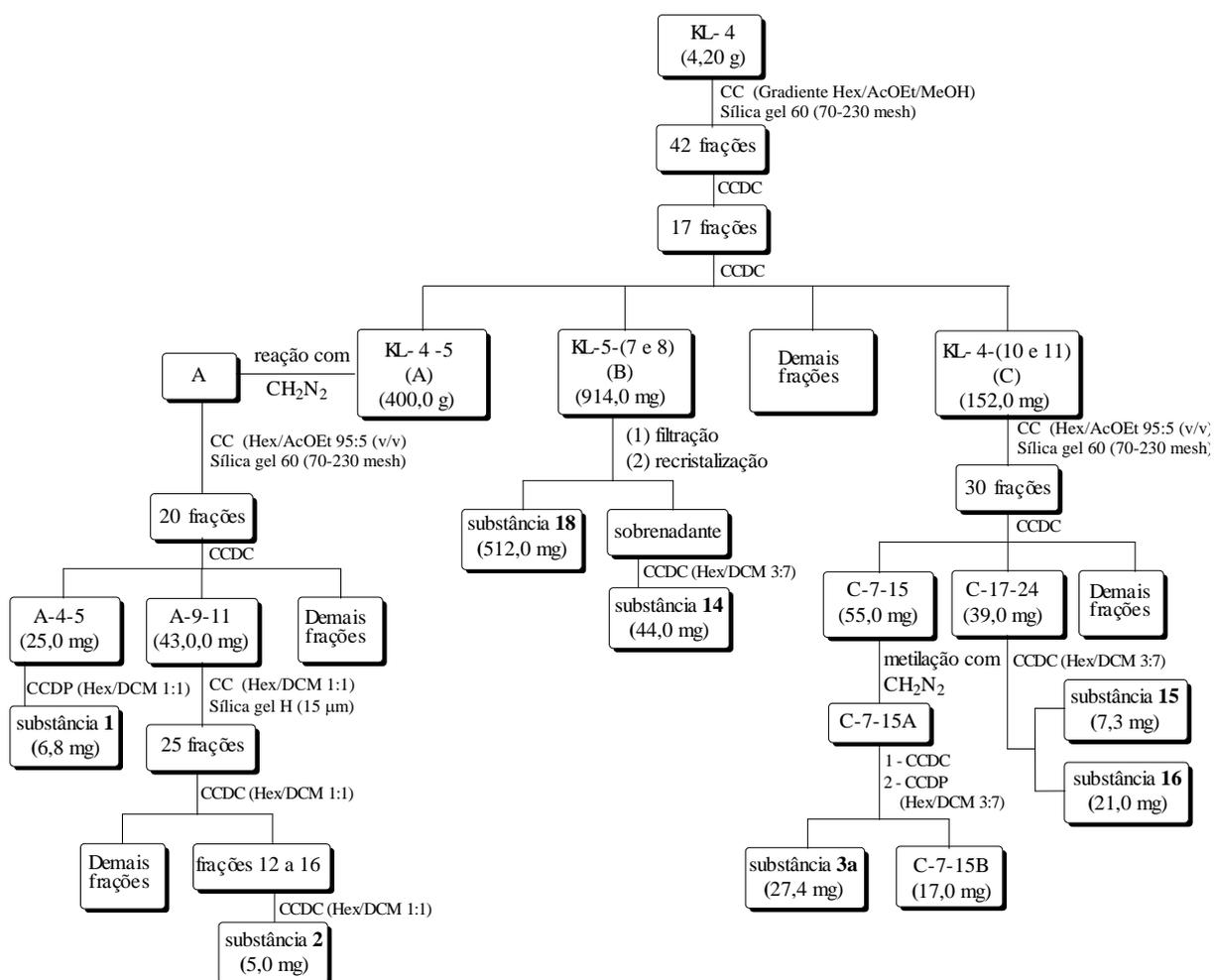


Figura 22: Esquema geral do estudo da fração KL-4.

3.5.2. Estudo da fração KL-10

A fração KL-10 (3,65 g) apresentou-se como um material oleoso, viscoso de cor marrom avermelhada, contendo um material sólido branco. Esta fração foi submetida a uma reação de metilação com diazometano e, após evaporação do solvente, realizou-se um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída inicialmente com hexano. A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato de etila até a adição de acetato de etila puro e, por último, metanol.

Foram obtidas 64 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações que apresentaram menor complexidade química, ou seja, apresentaram melhor resolução dos constituintes da mistura para os sistemas de eluição frequentemente testados para cromatografia em camada delgada em fase normal, foram selecionadas para estudo, como exibido na Fig 23.

As frações 10 a 12 [KL-10-(10-12)] (41,0 mg) foram agrupadas e fez-se uma CCDP (gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆), empregando-se como eluente a mistura hexano/AcOEt 95:5 (v/v), sendo possível obter a substância **13** (9,7 mg).

Um sólido branco foi constatado nas frações 28 a 35 [KL-10-(28-35)]. Para purificá-lo, foi realizada uma lavagem do mesmo com *n*-hexano puro e, depois foi feita uma recristalização deste sólido em metanol, seguida de uma filtração simples, obtendo-se a substância **19** (50,8 mg).

As frações 51 a 53 [KL-10-(51-53)] (520,0 mg) foram reunidas e submetidas a um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 95:5 (v/v). Foram coletadas 40 frações que foram analisadas por CCDC. Desse procedimento foi possível obter a substância **17** (36,6 mg), presente nas frações 11 a 20.

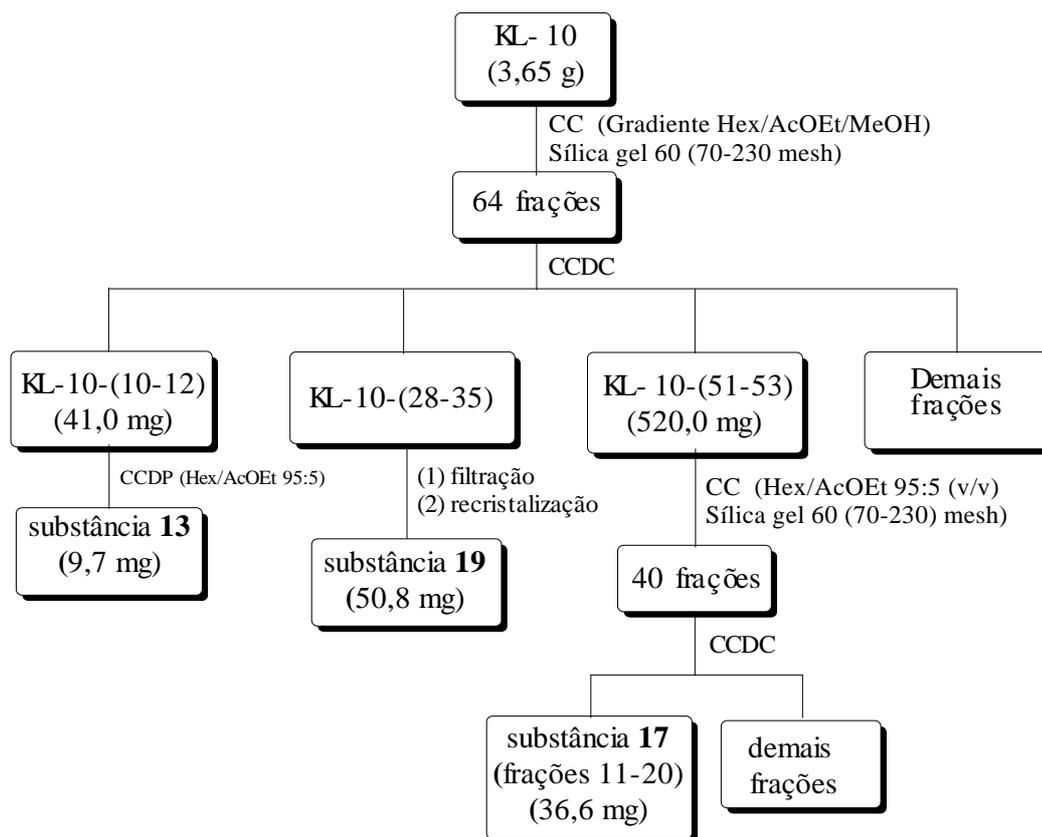


Figura 23: Esquema geral do estudo da fração KL-10.

3.5.3. Estudo da fração KL-11

A fração KL-11 (2,58 g) apresentou-se como um material oleoso, viscoso de cor marrom avermelhada, contendo um material sólido. Esta fração foi submetida a uma reação de metilação com diazometano e, após evaporação do solvente, realizou-se um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída inicialmente com hexano. A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato de etila até a adição de acetato de etila puro e, por último metanol.

Foram obtidas 53 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações que apresentaram menor complexidade química, ou seja, apresentou melhor resolução dos constituintes da mistura para os sistemas de eluição frequentemente testados para cromatografia em camada delgada em fase normal, foram selecionadas para estudo, como exibido na Fig 24.

As frações 6 a 15 [KL-11-(6-15)] apresentaram um sólido branco e para separá-lo foi utilizado o mesmo procedimento empregado na obtenção da substância **18**, obtendo-se uma mistura contendo as substâncias **20** e **21** (33,0 mg).

Selecionou-se, também, as frações 21 a 23 KL-11-(21-23) (72,0 mg). Estas foram reunidas e submetidas a um fracionamento cromatográfico em uma coluna cromatográfica Michel-Miller de 400 × 15 mm, empacotada com sílica gel LiChroprep® RP-18 (25-40 µm), acoplada a um detector UV (λ 254) e eluída com uma mistura de MeOH/H₂O 8:2 (v/v). Foram coletadas 42 frações de aproximadamente 20 mL cada uma. As frações 8 e 9 foram agrupadas e executou-se uma extração com CHCl₃ obtendo-se a substância **5a** (4,0 mg).

A fração KL-11-(24) (32,0 mg) foi estudada usando-se uma CCDC (gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck®), empregando-se o sistema de eluição hexano/AcOEt 95:5 (v/v). Após esse procedimento foi obtida a fração KL-11-(24)-A. Esta foi submetida a uma CCDC novamente empregando-se como fase móvel a mistura hexano/DCM 1:1, levando a obtenção da mistura composta pelas substâncias **6a** e **7a**, como mostra a Figura 24.

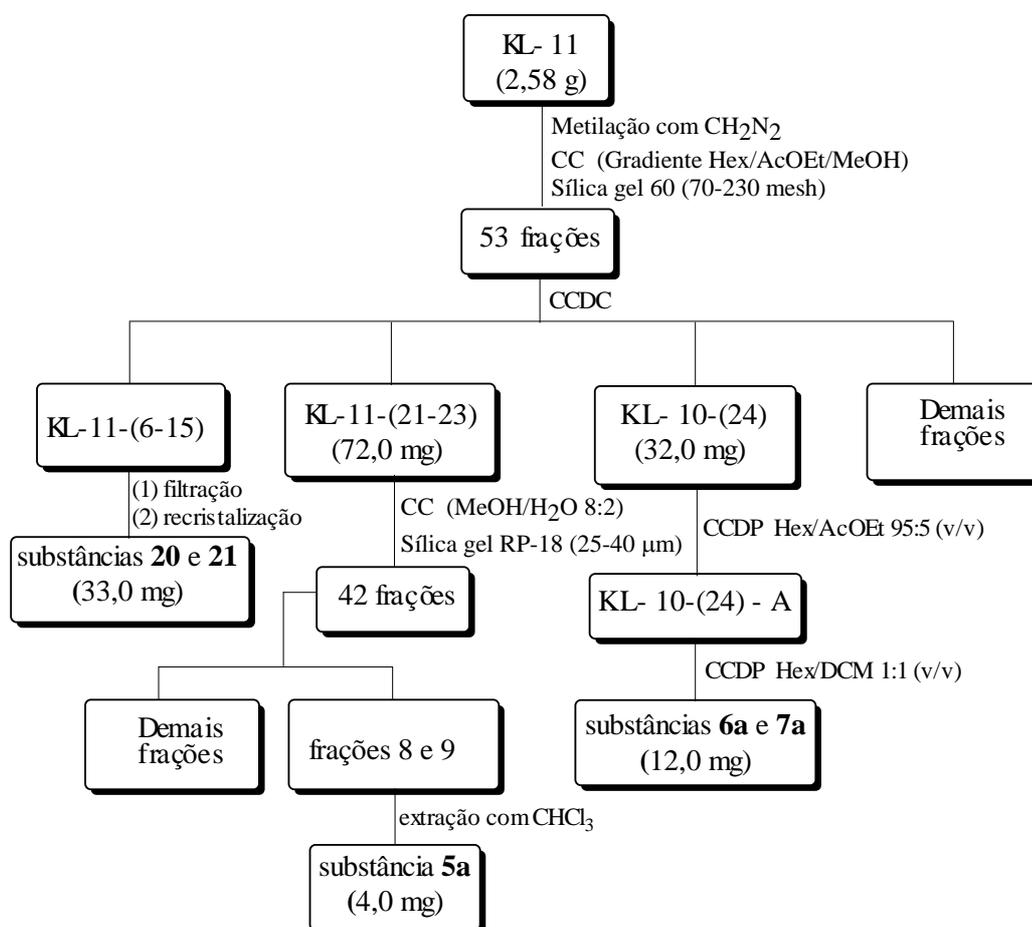


Figura 24: Esquema geral do estudo da fração KL-11.

3.6 Estudo da fração KcH-17 obtida do extrato hexânico de *Kielmeyera cuspidata*

A fração KcH-17 foi inicialmente analisada por CCDC, sendo observada a presença de substâncias ou grupos de substâncias com uma cauda muito intensa, não obtendo nenhum sistema de solvente no qual se alcançasse boa resolução das placas cromatográficas. Essa fração foi então submetida a uma análise preliminar de RMN ^1H e o espectro da mesma revelou a presença de compostos com sinais entre δ 18-19, sinais de hidrogênio aromático, olefínicos, entre outros.

Foi realizada então uma reação de metilação com diazometano com a fração supracitada, objetivando diminuir a polaridade dos compostos presentes na amostra. Em seguida, ela foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh), eluída com a mistura de hexano/acetato em gradiente crescente de polaridade.

A polaridade do eluente foi aumentada de forma gradual com a adição de acetato de etila até a adição de acetato de etila puro e, por último metanol. Foram obtidas 60 frações de aproximadamente 30 mL cada. Estas foram analisadas por CCDC e algumas delas foram reunidas conforme semelhanças das placas cromatográficas, sendo as frações KcH-17 (15-20, 32-39 e 40-41) as que apresentaram menor complexidade e, por isso, foram separadas para estudo, denominadas de KcH-17-A, KcH-17-B, KcH-17-C, respectivamente (Figura 25).

A fração KcH-17-A (770,0 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel H (15 μm) sob pressão de ar comprimido, eluída com a mistura de hexano/DCM 1:1 (v/v), obtendo-se 50 frações de aproximadamente 10 mL cada; estas foram concentradas e analisadas por CCDC. Após análise, as frações KcH-17-A (18-20) foram agrupadas e submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) – gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck® – utilizando-se o sistema de eluição hexano/DCM 1:1 (v/v). Deste procedimento foi obtida a fração KcM-17-15 (11,0 mg) conforme mostra a Figura 25.

O último procedimento acima foi também empregado no estudo da fração KcH-17-C (55,0 mg), mudando apenas a proporção do eluente para hexano/DCM 3:7 (v/v), sendo possível a obtenção de 11,2 mg da substância **10a** e 9,5 mg da substância **11a**.

A fração KcH-17-B (171,0 mg) foi estudada usando-se um sistema contendo uma coluna cromatográfica Michel-Miller de 450 \times 15 mm empacotada com sílica gel H (15 μm) e eluída com hexano/DCM 1:1 (v/v). Foram obtidas 42 frações de aproximadamente 10 mL cada. Estas foram analisadas por CCDC e após análise, as frações 5 a 16 foram agrupadas, obtendo-se a substância **8a** (25,0 mg). Além disso, agrupou-se também as frações 19 a 25 e

fez-se uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) – gel de sílica PF₂₅₄₊₃₆₆, Merck – utilizando-se o sistema de eluição hexano/DCM 6:4 (v/v), da qual foi possível obter-se a substância **9a** (21,0 mg) Fig 25.

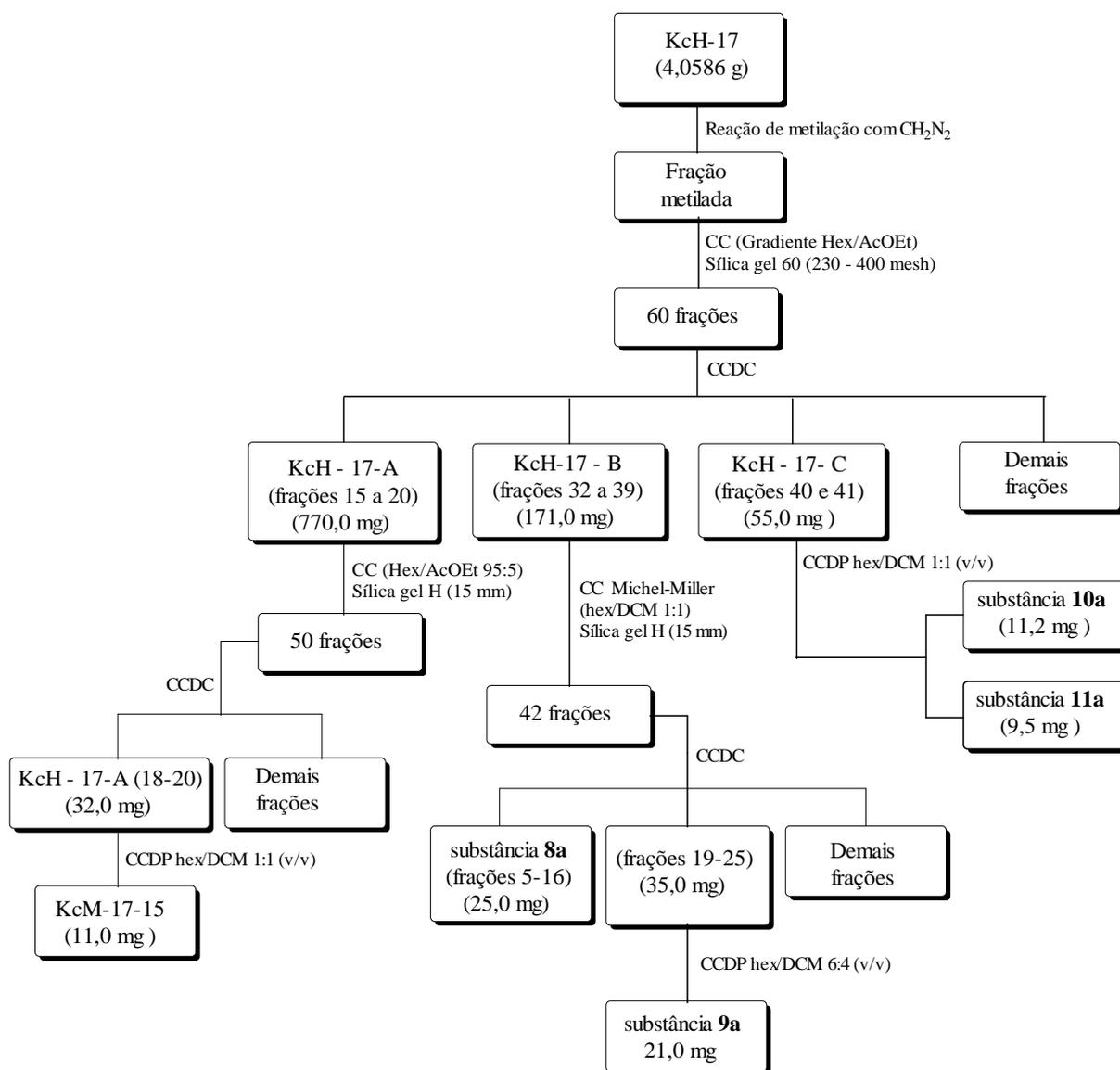


Figura 25: Esquema geral do fracionamento e isolamento de substâncias da fração KcH-17 de *K. cuspidata*.

3.7 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Grupo de Estudos sobre Substâncias Naturais Orgânicas (GESNAT) da UFBA-BA e a técnica utilizada foi a microdiluição em caldo descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards – NCCLS; (WOODS e WASHINGTON, 1995; KUSUCU *et al.*, 2004).

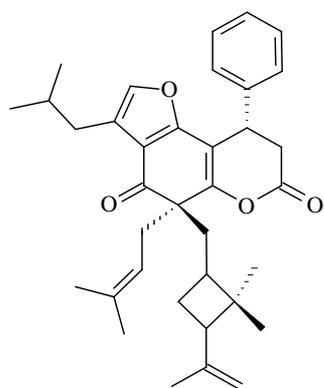
Para realização dos testes foi utilizada placa de poliestireno de 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL do meio de cultivo em cada poço e, em seguida, foram adicionados 100 µL da solução estoque da substância a ser testada numa concentração de 100 µg/mL. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se a substância numa proporção 8:2 (v/v) água/DMSO. Logo após, foi realizada uma microdiluição seriada de razão dois. Como controle do solvente, utilizou-se 100 µL de dimetilsulfóxido 20% (DMSO) e para o controle positivo Benzilpenicilina benzatina 20 µg/mL para bactérias Gram positivas, Sulfato de Gentamicina 100 µg/mL para bactérias Gram negativas e Ciclopirox olamina 400 µg/mL para fungos.

Finalmente, foram adicionados em cada poço 100 µL do inóculo inicial do microrganismo a ser testado (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6638, *M. luteus* ATCC 10240, *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 94863, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ATCC 18804, *A. Níger* ATCC 16404, *C. cladosporioides* IMI 178517, obedecendo a escala 0,5 de Mcfarland ($1,8 \times 10^8$ ufc/mL). A placa de poliestireno de 96 poços contendo o experimento foi levada para incubação por 24 horas em estufa a 35° C para bactérias e por 72 horas em estufa a 26° C para fungos.

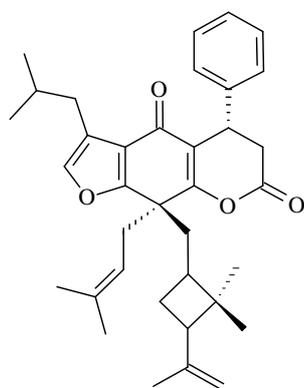
O meio de cultivo utilizado para os ensaios com bactérias e fungos filamentosos foi caldo nutriente e caldo de levedura e malte, respectivamente. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado a 121°C/ 1,0 atm por vinte minutos. Os testes foram realizados em triplicata.

Foram selecionadas para ensaios biológicos as substâncias **3a** (*Kielmeyera lathrophyton*) **8a**, **9a**, **10a** e **11a** (*Kielmeyera cuspidata*).

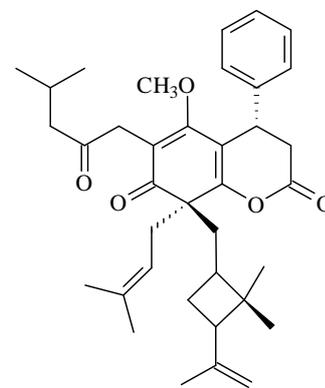
3.8 Substâncias isoladas de *Kielmeyera lathrophyton*



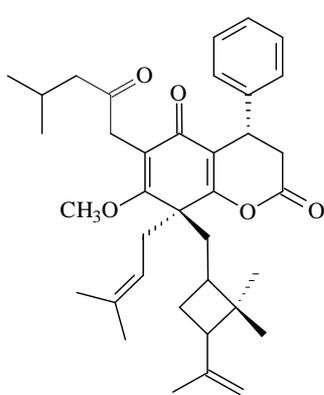
1



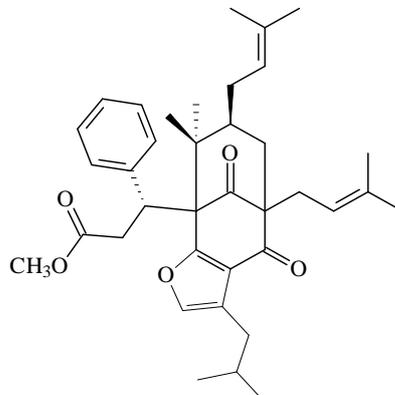
2



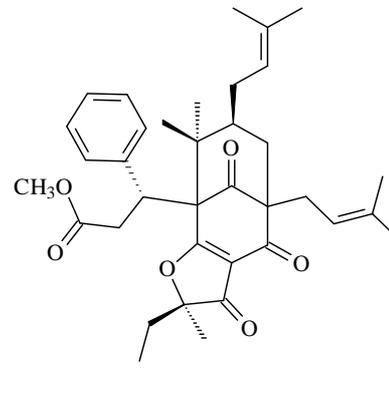
3a



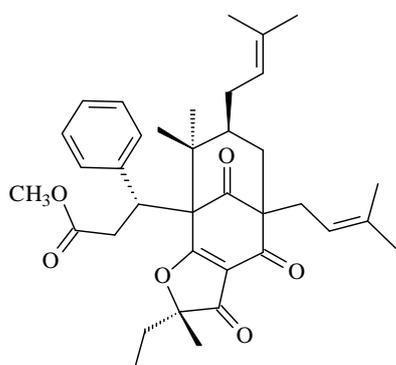
4a



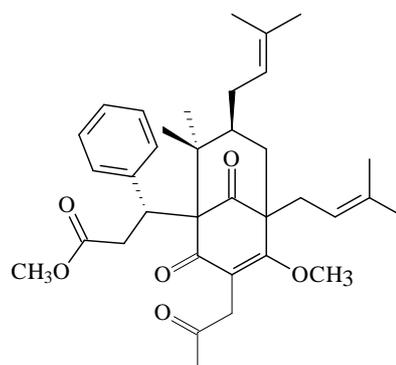
5a



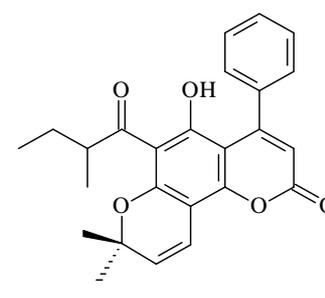
6a



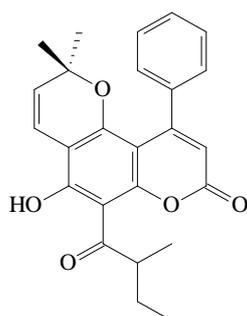
7a



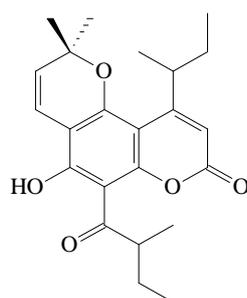
13



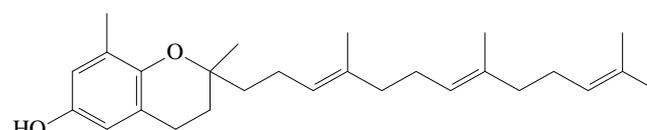
14



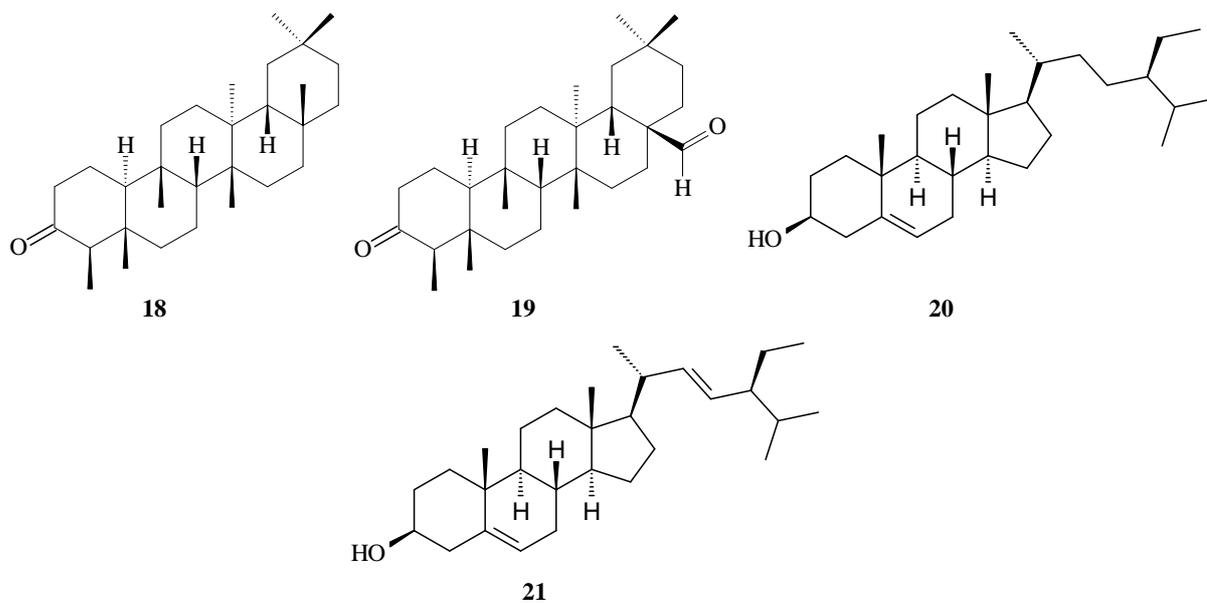
15



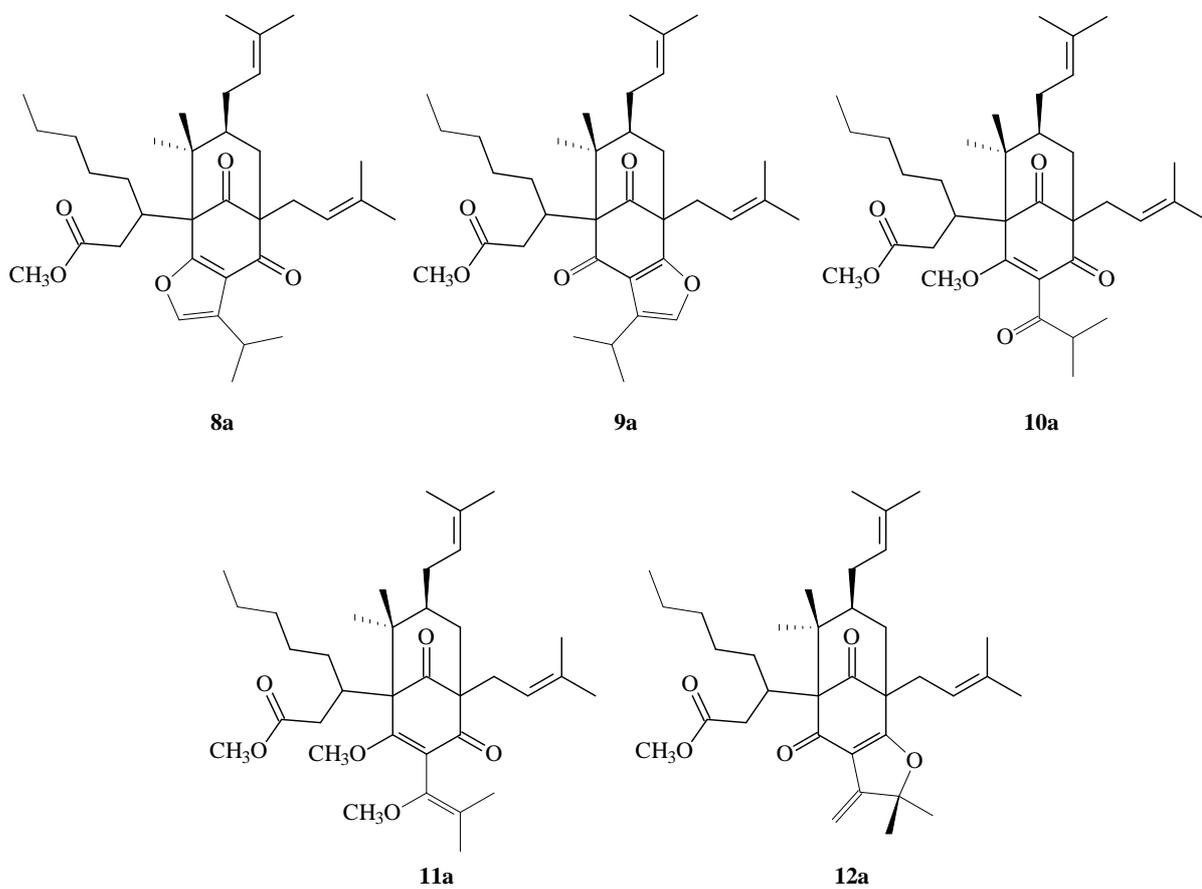
16



17



3.9 Substâncias isoladas de *Kielmeyera cuspidata*



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Derivados poliprenilados do floroglucinol isolados de *Kielmeyera lathrophyton*

4.1.1 Determinação estrutural das substâncias 1 e 2

As substâncias **1** e **2** foram isoladas do extrato hexânico de *K. lathrophyton* na forma de um óleo amarelo, viscoso, opticamente ativas com valores de $[\alpha]_D^{20} + 69$ (c 0,68, CHCl_3) e $[\alpha]_D^{20} + 72$ (c 0,5, CHCl_3), respectivamente e a determinação estrutural de ambas, foi feita com base nos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHSQC, gHMBC, gCOSY, NOESY e HR-ESI-TOF.

Os espectros de infravermelho (Fig. 26 e 27) das substâncias **1** e **2** apresentaram grande similaridade um com o outro, sugerindo uma relação estrutural muito próxima entre essas substâncias. Em ambos os espectros foram observados a presença de absorções fortes em 1659 e 1792 cm^{-1} , indicando a presença de carboníla conjugada e de carboxíla de lactona saturada (SHEN *et al.*, 2004), enquanto que as absorções em 698 e 759 cm^{-1} indicaram a presença de um anel aromático monossustituído nas moléculas.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplados (Figuras 28 e 29) e DEPT 135 (Tab. 1) das substâncias **1** e **2** exibiram um conjunto de sinais parecidos. Eles revelaram (para cada caso) sinais correspondentes a 36 átomos de carbonos sendo: sete carbonos metílicos, seis carbonos metilênicos (um deles do tipo sp^2), onze carbonos metínicos (sete do tipo sp^2) e doze carbonos não-hidrogenados, sendo dois deles referentes a carbonos carbonílicos e outros oito do tipo sp^2 .

Os espectros de massas de alta resolução de **1** e **2** (Figuras 30 e 31), obtidos através da técnica de ionização por eletrospray (modo positivo), exibiram pico relativo à presença de molécula cationizada em m/z 563,3134 e 563,3147 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, permitindo propor a fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Na}$, cuja massa calculada foi 563,3131. Esses dados revelaram que **1** e **2** são isômeros e que apresentam fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_4$ com IDH igual a quatorze.

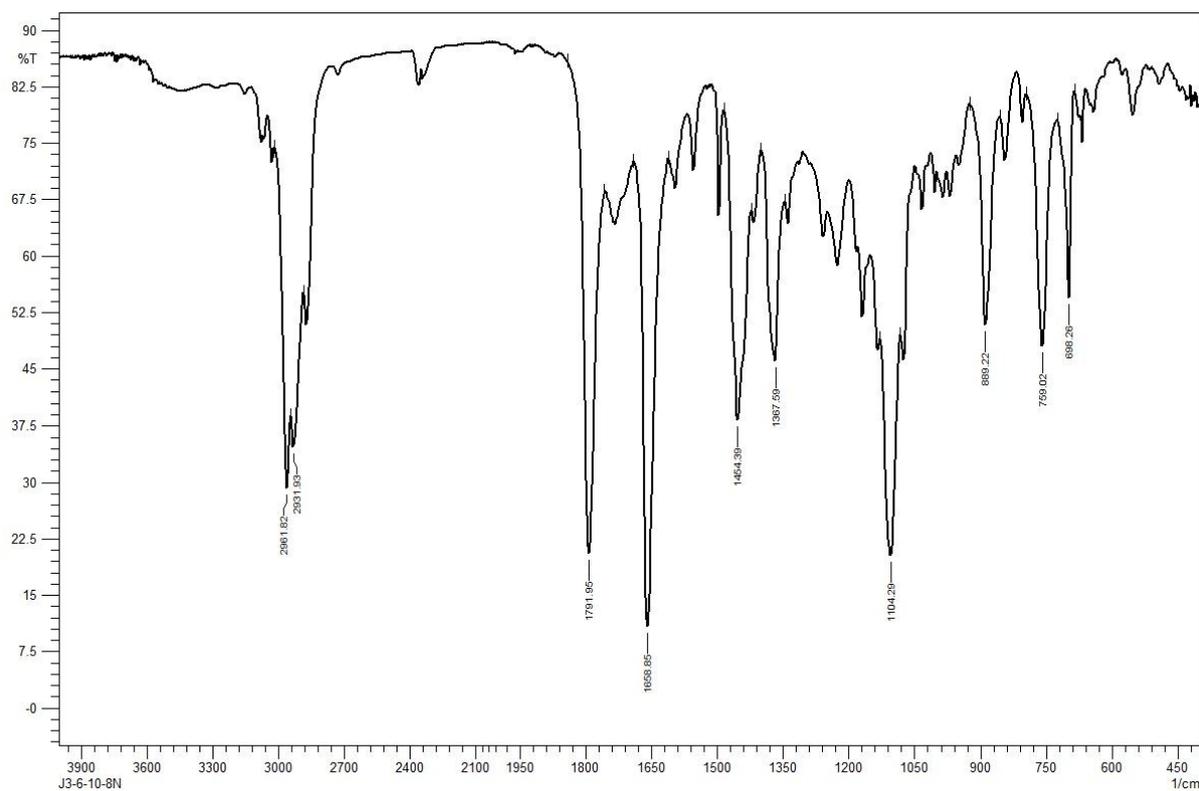


Figura 26: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da substância 1.

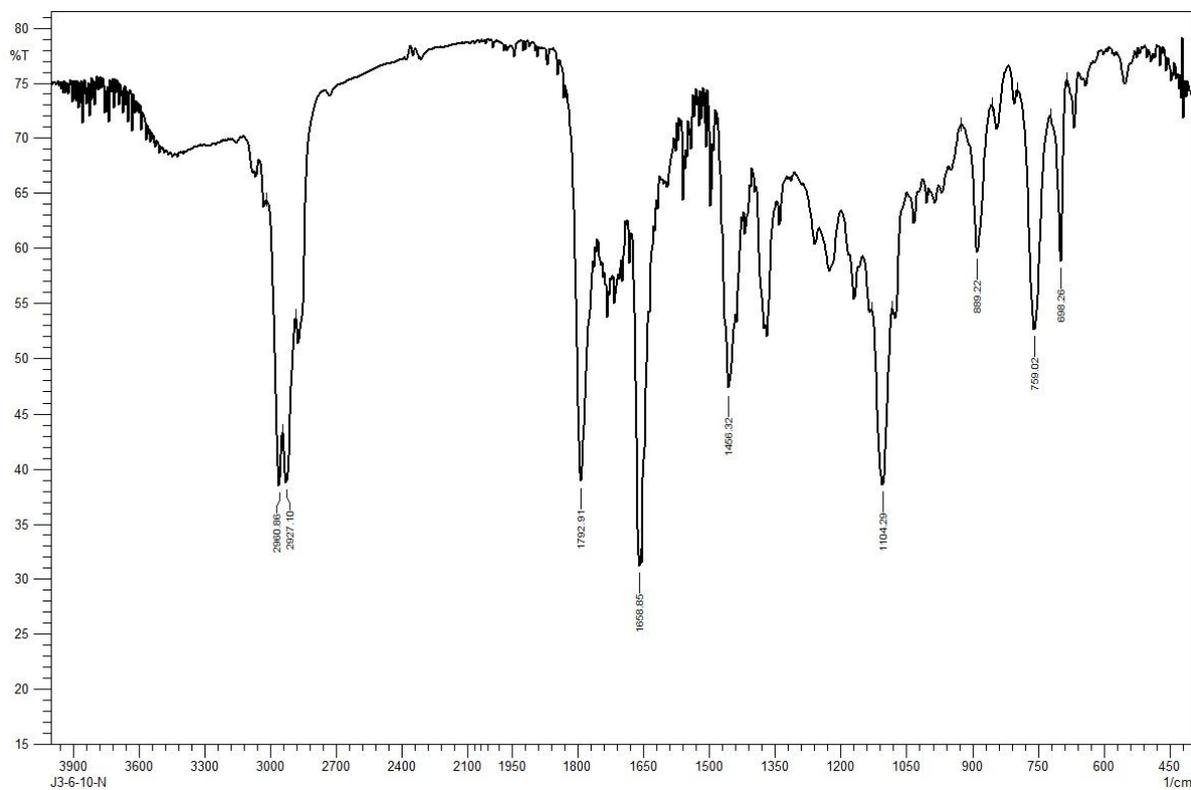


Figura 27: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da substância 2.

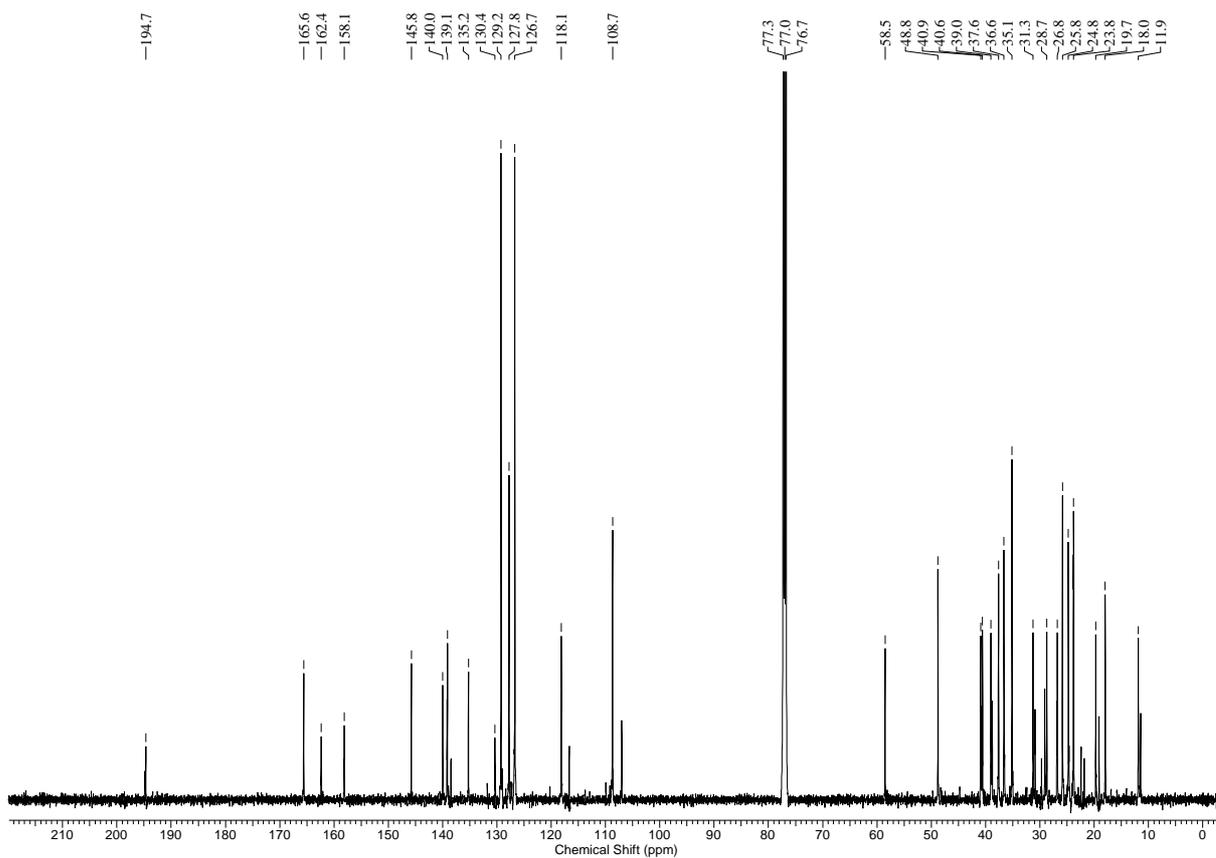


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 1.

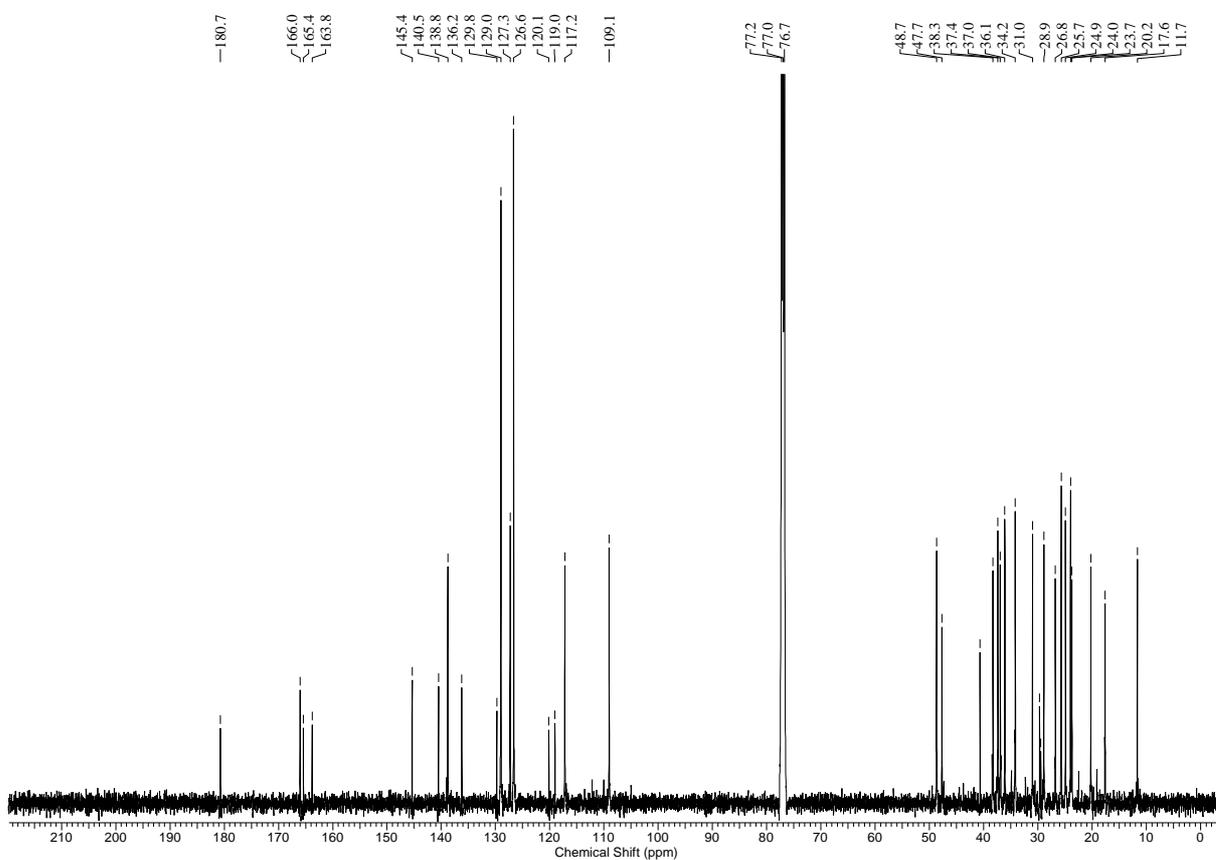


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 2.

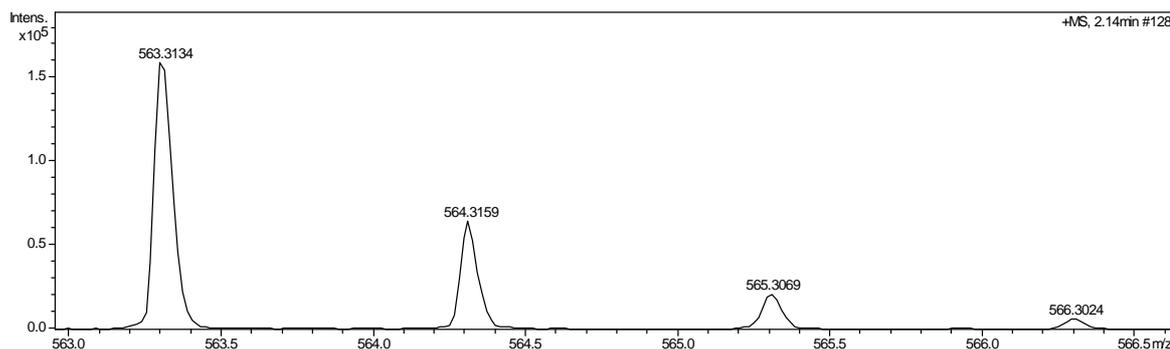


Figura 30: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **1**.

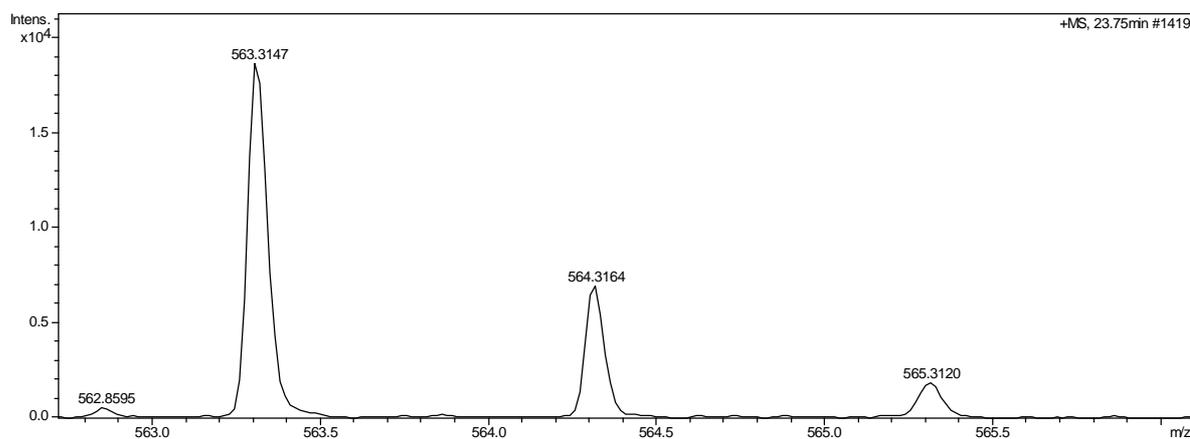


Figura 31: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **2**.

Os espectros de RMN ¹H das substâncias **1** e **2** (Fig. 32 e 33) apresentaram sinais bastante similares com pequenas diferenças. Ambos exibiram, na região entre δ 7,35 – δ 7,00, um conjunto de sinais que foi atribuído a cinco hidrogênios de anel aromático monossustituído. Além desses sinais, o espectro de **1** exibiu um duplete em δ 7,06 ($J = 1,0$ Hz), enquanto que no espectro de **2**, o sinal correspondente foi observado em δ 7,20.

Na região entre δ 4,90 – 4,30 foram observados, para a substância **1**, quatro sinais, com integração para um hidrogênio cada, sendo dois simpletos em δ 4,76 e 4,45, um tripleto em δ 4,80 ($J = 7,5$ Hz), e um duplete em δ 4,37 ($J = 8,0$ Hz). Para a substância **2**, os três primeiros sinais foram observados em δ 4,78, 4,49 e 4,60 ($J = 6,5$ Hz), respectivamente, enquanto que o quarto sinal apresentou-se como um duplo duplete ($J = 2,0$ e 8,0 Hz) em δ 4,54.

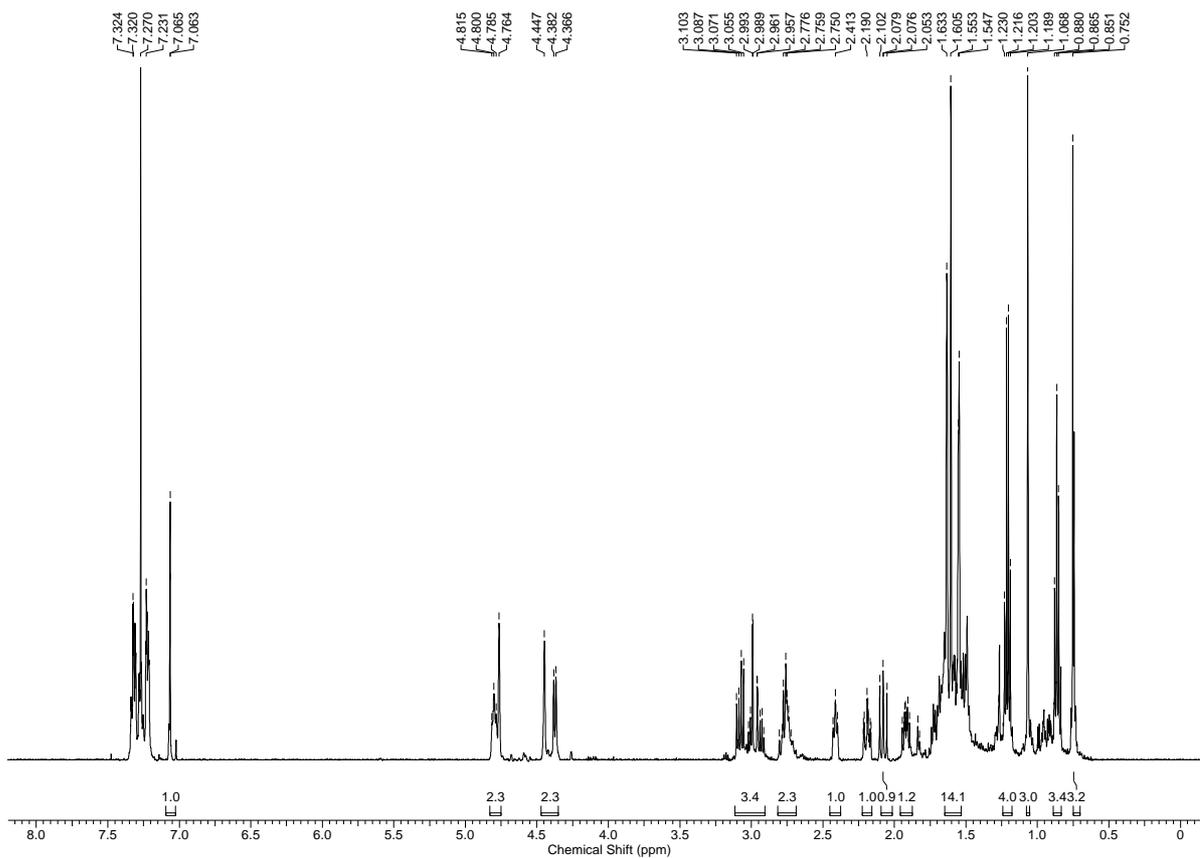


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 1.

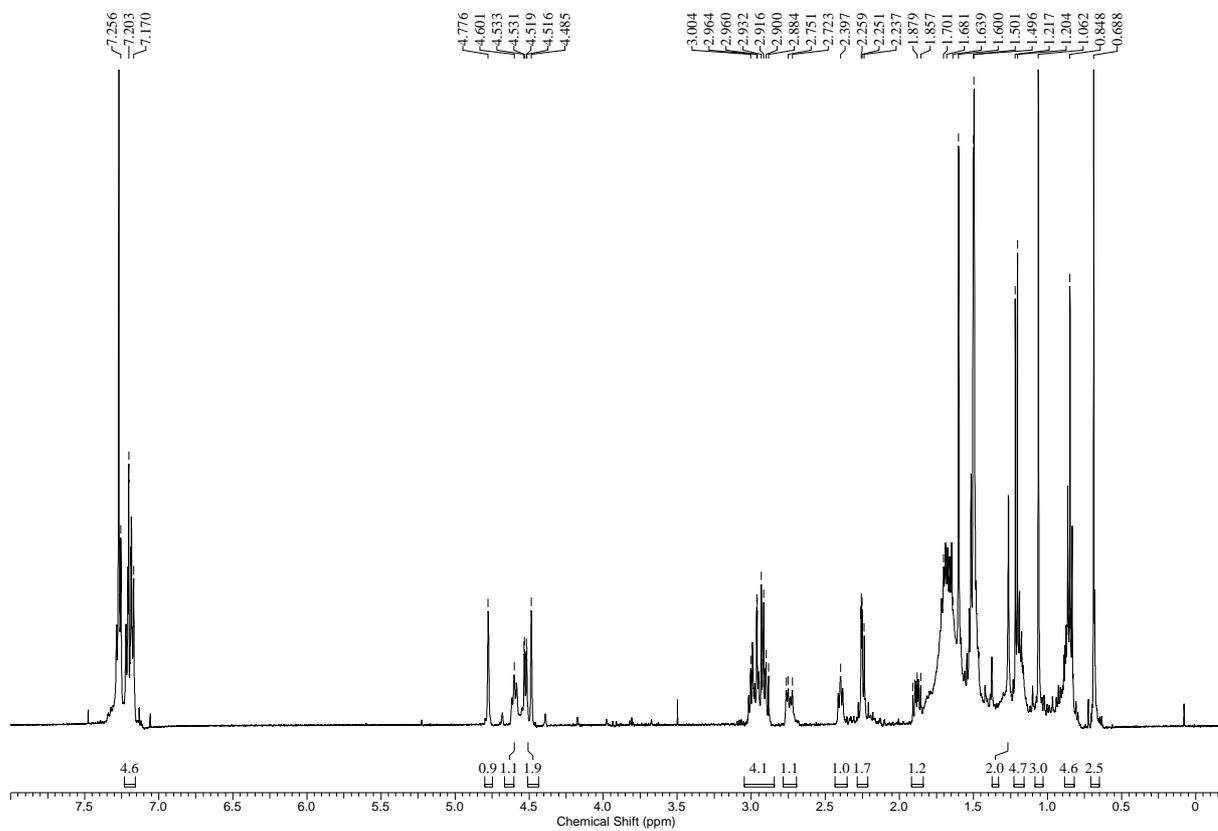


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 2.

A Figura 34 mostra a ampliação da região entre δ 3,20 – 1,80 do espectro de RMN de ^1H da substância **1**. Nela foi possível identificar a presença de quatro duplos dupletos em δ 3,08 (1H; $J = 8,0$; 16,0 Hz), δ 2,97 (1H; $J = 2,0$; 16,0 Hz), δ 2,93 (1H; $J = 7,0$; 13,5 Hz), δ 2,08 (1H; $J = 11,5$; 13,0 Hz), um tripleto largo em δ 2,41 (1H; $J = 7,0$ Hz) e três multipletos nas regiões entre δ 2,80 – 2,75 (2H), δ 2,22 – 2,16 (1H) e δ 1,92 – 1,87 (1H). Já a Fig. 35 exibe a ampliação da mesma região (δ 3,20 – 1,80) do espectro de RMN de ^1H da substância **2** e foi possível identificar a presença de três multipletos entre δ 3,02 – 2,86 (4H), δ 2,27 – 2,21 (2H) e δ 1,92 – 1,84 (1H), um duplo duplete em δ 2,74 (1H; $J = 6,5$; 14,0 Hz) e um tripleto largo em δ 2,40 (1H; $J = 7,5$ Hz).

Foram identificados ainda no espectro de RMN de ^1H da substância **1** cinco simpletos em δ 1,63, 1,60, 1,55, 1,07 e 0,75, integrando para três hidrogênios cada um, além de dois dupletos em δ 1,21 e 0,87, ambos com constante de acoplamento de 7,0 Hz e integrando para três hidrogênios cada. Esse conjunto de sinais indicou a presença de sete grupos metílicos na molécula.

No espectro da substância **2**, também foram observados a mesma quantidade de grupos metílicos em δ 1,60 (3H; *s*), 1,50 (6H; *s*), 1,06 (3H; *s*), 0,69 (3H; *s*), 1,21 (3H; *d*; $J = 6,5$ Hz) e 0,85 (3H; *d*; $J = 7,0$ Hz).

A presença do tripleto em δ 4,80 (*t*; $J = 7,5$ Hz), característico de um hidrogênio olefínico, juntamente com dois simpletos em δ 1,63 (3H) e 1,55 (3H), típico de dois grupos metílicos vinílicos, indicou a presença de uma dupla olefínica trissubstituída na estrutura da substância **1** e permitiu sugerir a presença de um grupo prenílico na estrutura de **1**. Este grupo também foi identificado na estrutura da substância **2** em virtude dos sinais correspondentes em δ 4,80 (1H; *t*; $J = 7,5$ Hz) e 1,50 (6H; *s*).

Os experimentos bidimensionais de gHSQC (Fig. 36), gCOSY (Fig. 37), gHMBC (Fig 38 - 40) tornaram possível a elucidação estrutural das substâncias **1** e **2**.

No experimento de gCOSY da substância **1**, foi possível observar correlação entre o tripleto em δ 4,80 ($J = 7,5$ Hz) e o multiplete entre δ 2,80 – 2,75 (2H), bem como, com os sinais de hidrogênios alílicos de dois grupos metílicos, em δ 1,63 e 1,55. Esses dois últimos sinais também mostraram correlação entre si, permitindo reforçar a proposta da presença de um grupo prenílico na estrutura da substância **1**.

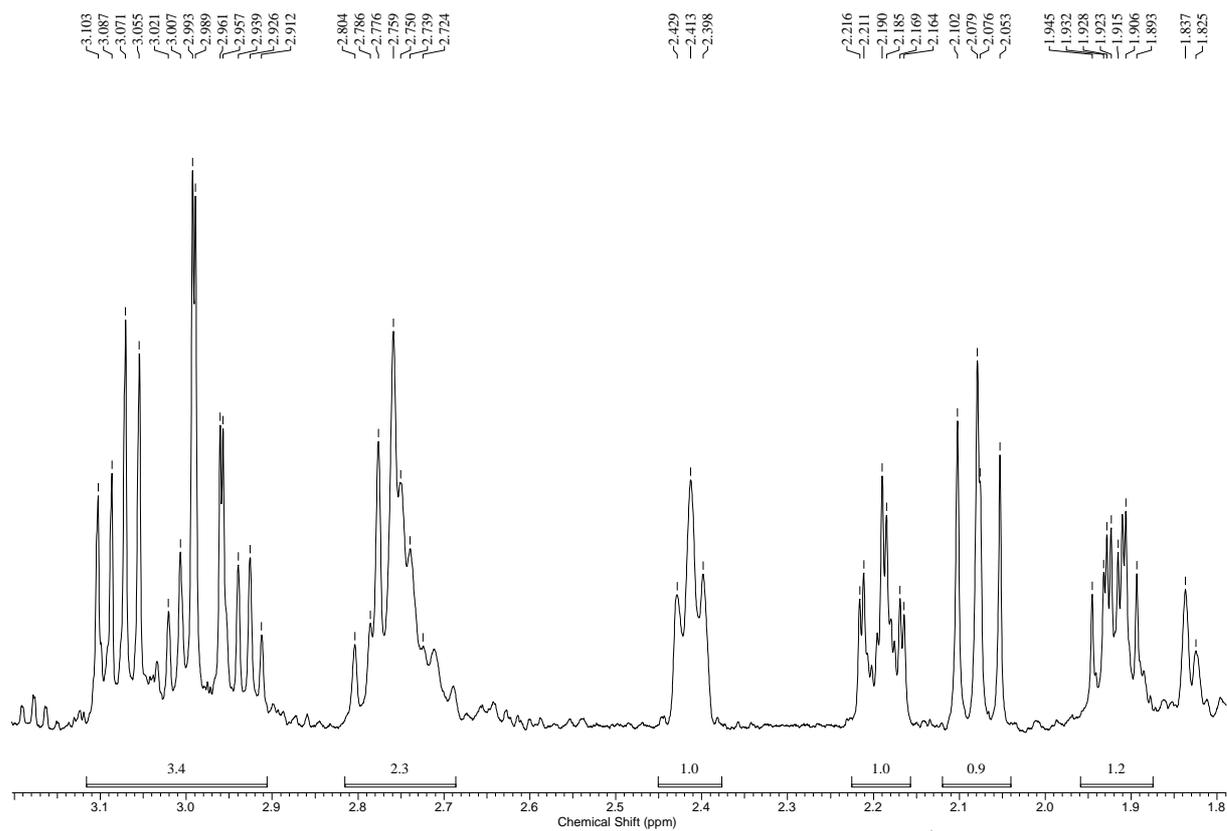


Figura 34: Ampliação da região entre δ 3,20 – 1,80 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

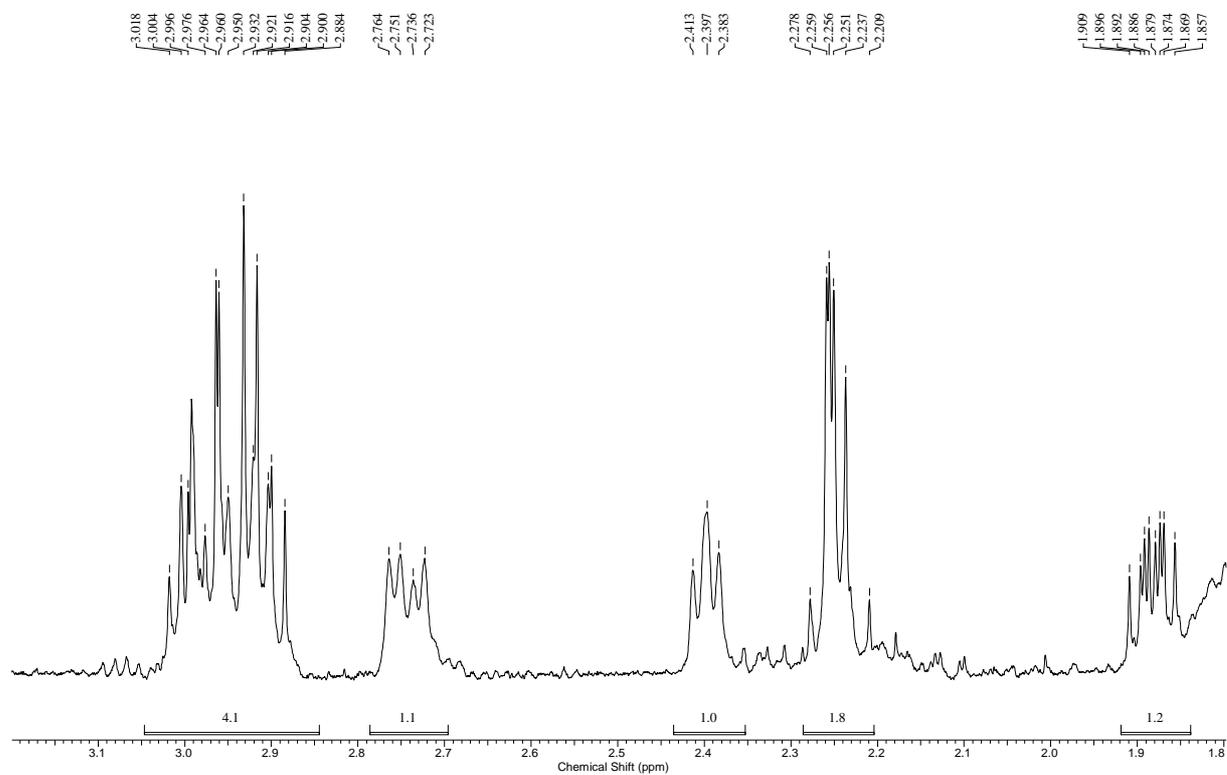


Figura 35: Ampliação da região entre δ 3,20 – 1,60 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **2**.

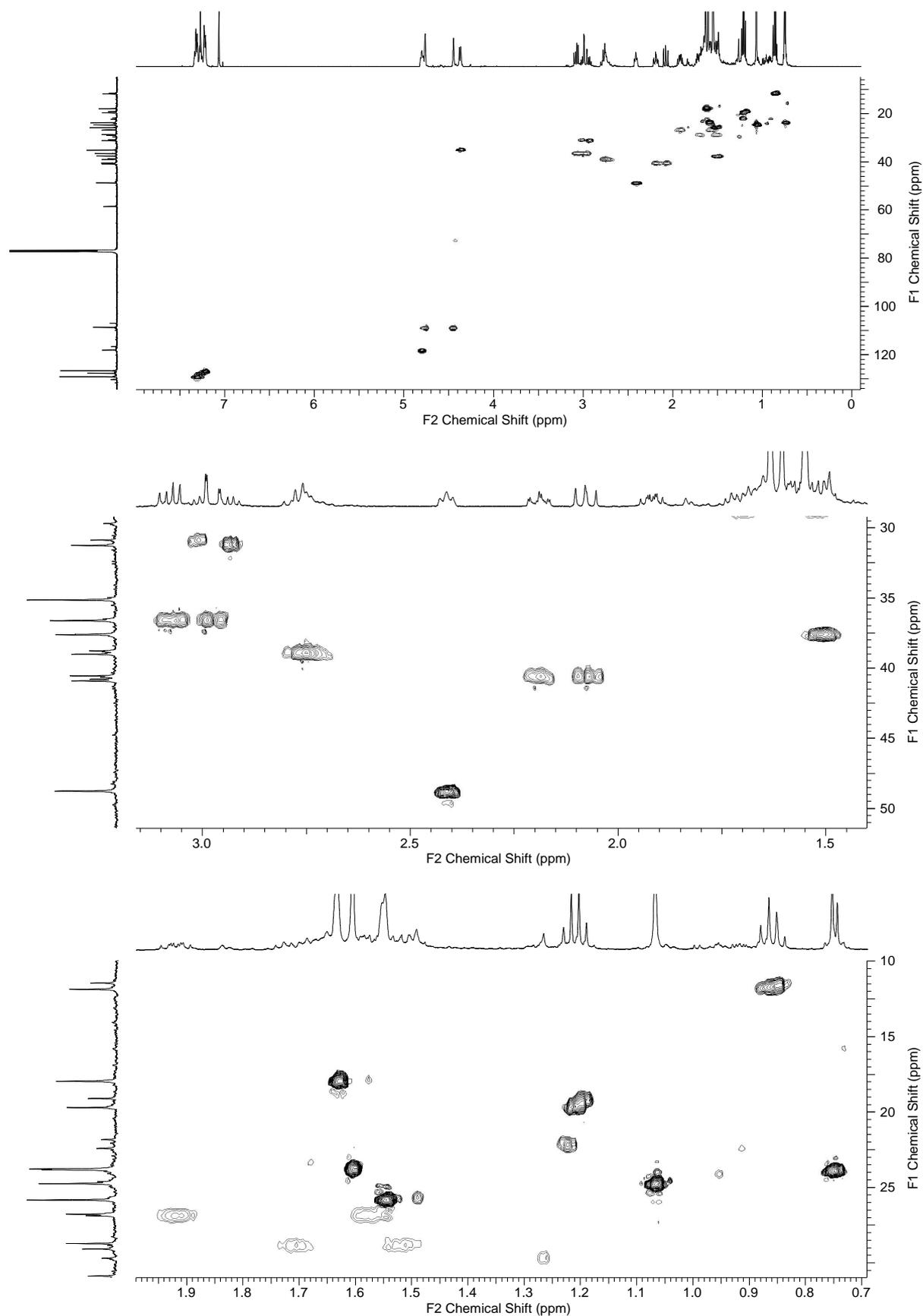


Figura 36: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl_3) da substância 1.

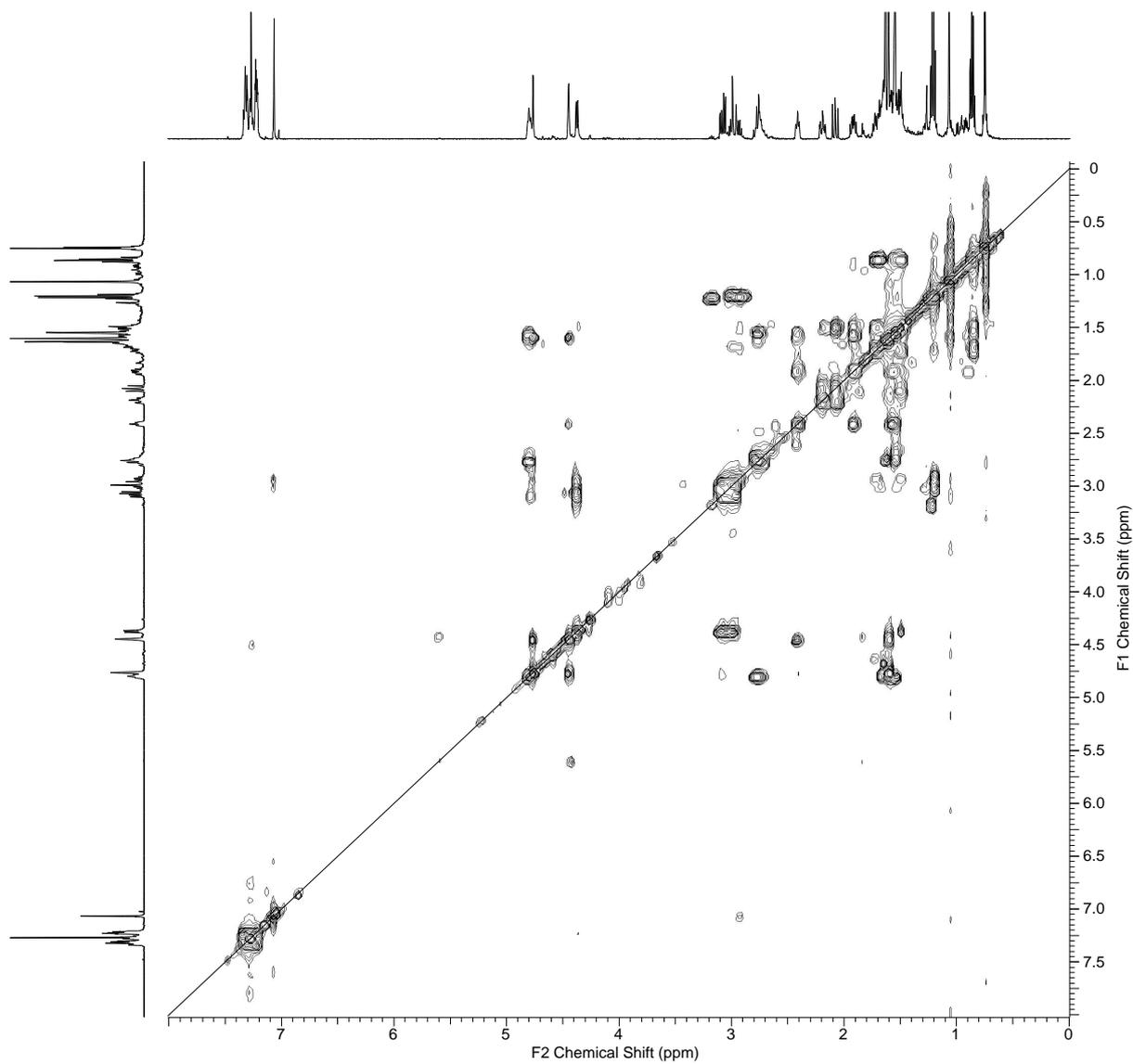


Figura 37: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl₃) da substância **1**.

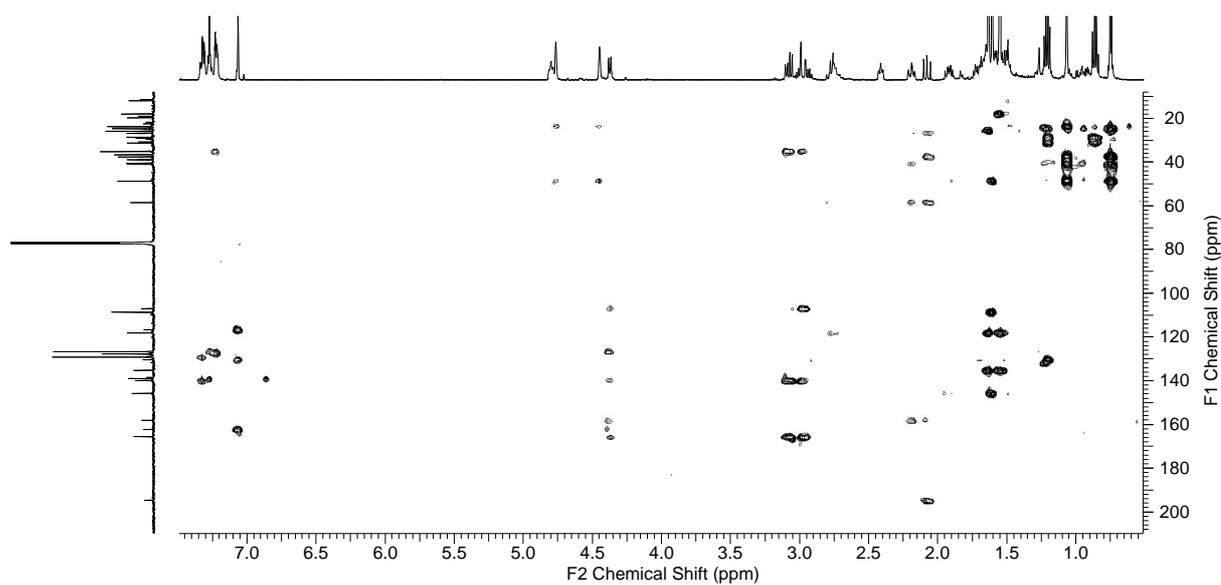


Figura 38: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da substância **1**.

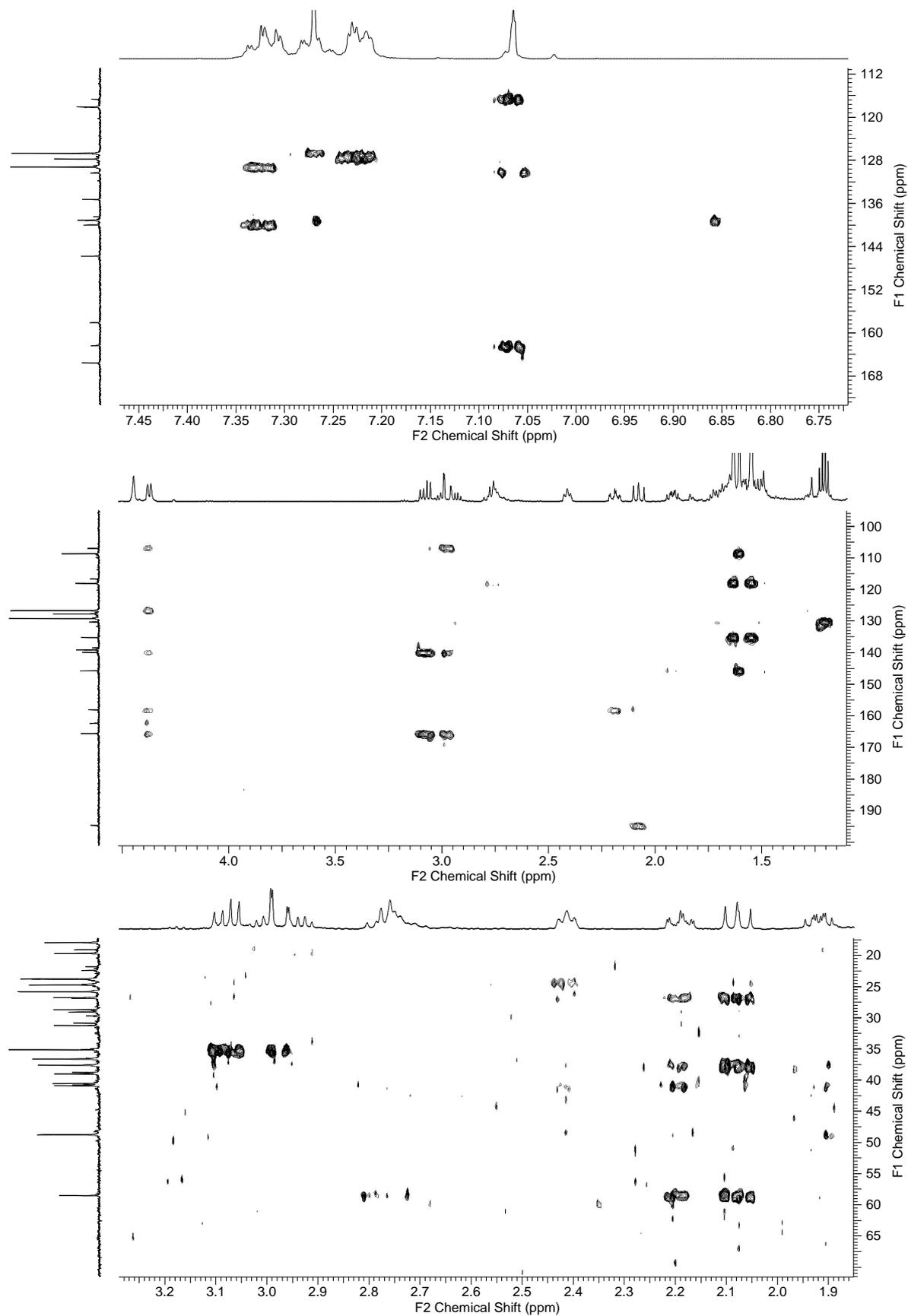


Figura 39: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **1**.

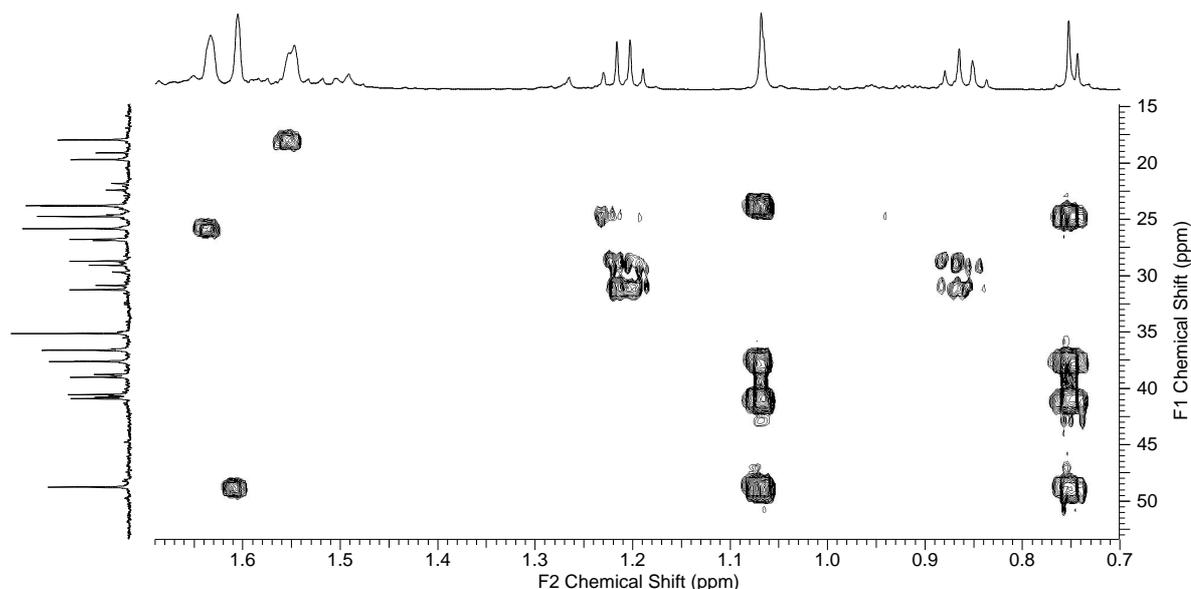


Figura 40: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **1**.

Após análise do espectro bidimensional gHMBC foi possível confirmar a presença do grupo prenila na estrutura da substância **1** mediante correlações observadas entre o sinal do hidrogênio metílico alílico em δ 1,63 com os sinais em δ 135,2, 118,1 e 26,0 e do sinal em δ 1,55 com δ 135,2, 118,1 e 18,0, bem como através da correlação entre o sinal do hidrogênio metilênico alílico em δ 2,80 – 2,75 com o sinal em δ 118,1 referente ao carbono metínico olefínico (Fig. 41). Essas informações estão de acordo com dados reportados na literatura (COTTIGLIA *et al.*, 2004). A comparação dos dados de RMN ^{13}C da substância **2** com os dados de **1** permitiu identificar a presença do grupo prenila na estrutura de **2** (Fig.41).

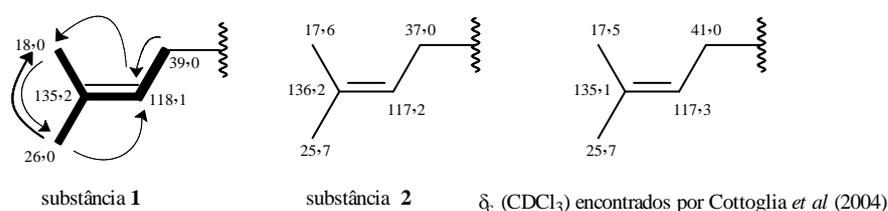


Figura 41: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (→) da substância **1** e dados de RMN ^{13}C (ppm) dos grupos prenilicos das substâncias **1** e **2**.

A presença de dois simples em δ 4,76 e δ 4,45, no espectro de RMN de ^1H da substância **1**, indicou a presença de dois prótons vinílicos terminais. Esses sinais apresentaram correlação, no experimento de gHMBC, com os sinais δ 23,8 (CH_3) e δ 48,8 (CH). Observou-se ainda correlação do sinal δ 1,60 com δ 145,8 (C), δ 108,7 (CH_2) e 48,8 (CH). Esses dados foram compatíveis com a presença de um grupo isoprenílico.

Foram observadas ainda, no espectro de gHMBC da substância **1**, correlação dos sinais relativos a hidrogênios metílicos em δ 1,07 e δ 0,75 com os sinais δ 48,8 (CH), δ 40,8 (C) e δ 37,6 (CH) e dos sinais δ 2,08 (1H; *dd*; $J = 11,5$ e $13,0$, Hz) e δ 2,22 – 2,16 (1H, *m*), referentes a hidrogênios metilênicos, com os sinais δ 40,7, 37,6 e 26,8 (CH₂).

Complementar aos dados de gHMBC, foram verificadas correlações no experimento de gCOSY do sinal entre δ 1,95 – 1,87 (1H, *m*) com δ 2,41 (1H; *t*; $J = 7,8$ Hz); deste último com δ 1,60 (3H; *s*), 4,45 (1H; *s*) e 4,76 (1H; *s*); de δ 1,49 (1H, *m*) com δ 2,08 (1H; *dd*; $J = 11,5$ e $13,0$, Hz) e δ 2,22 - 2,16 (1H, *m*) e do sinal δ 1,60 com 4,45 e 4,76. Esses dados foram compatíveis com a presença de um grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico, conforme descrito por Cottiglia e colaboradores (2004), para o ácido cromanônico 1 (Fig. 42).

A presença desse mesmo grupo foi deduzida na estrutura da substância **2** após análise dos dados de RMN de ¹H e ¹³C e de correlações observadas nos espectros de gHSQC (Fig.43), gHMBC (Fig. 44 - 46), e gCOSY (Fig. 47).

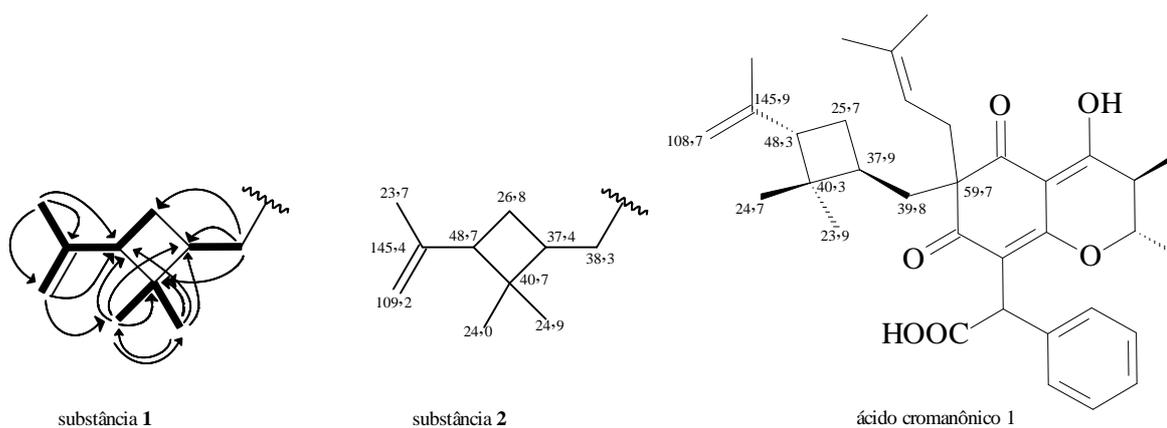


Figura 42: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (—) da substância **1** e dados de RMN ¹³C (ppm) do grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico da substância **2** e do ácido cromanônico **1**.

A ocorrência do grupo ciclobutano na estrutura de compostos naturais é muito rara. Até o momento, além das substâncias relatadas nesse trabalho, somente três espécies do gênero *Calophyllum* apresentaram substâncias com o grupo ciclobutano em suas estruturas, conforme descrito por Stout e Breck (1970), Ravelonjato *et al.*, (1987) e Cottiglia *et al.*, (2004).

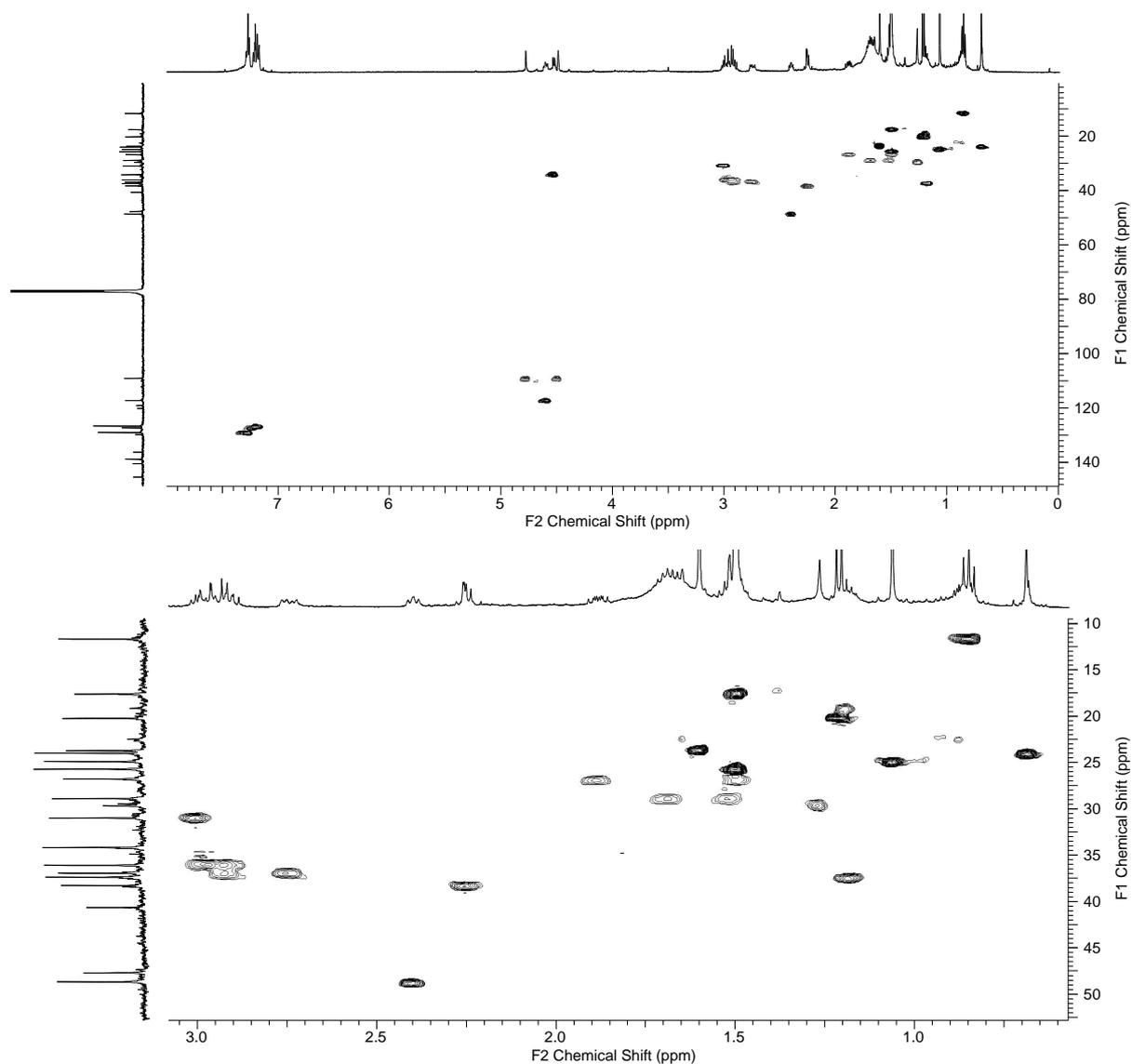


Figura 43: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl_3) da substância 2.

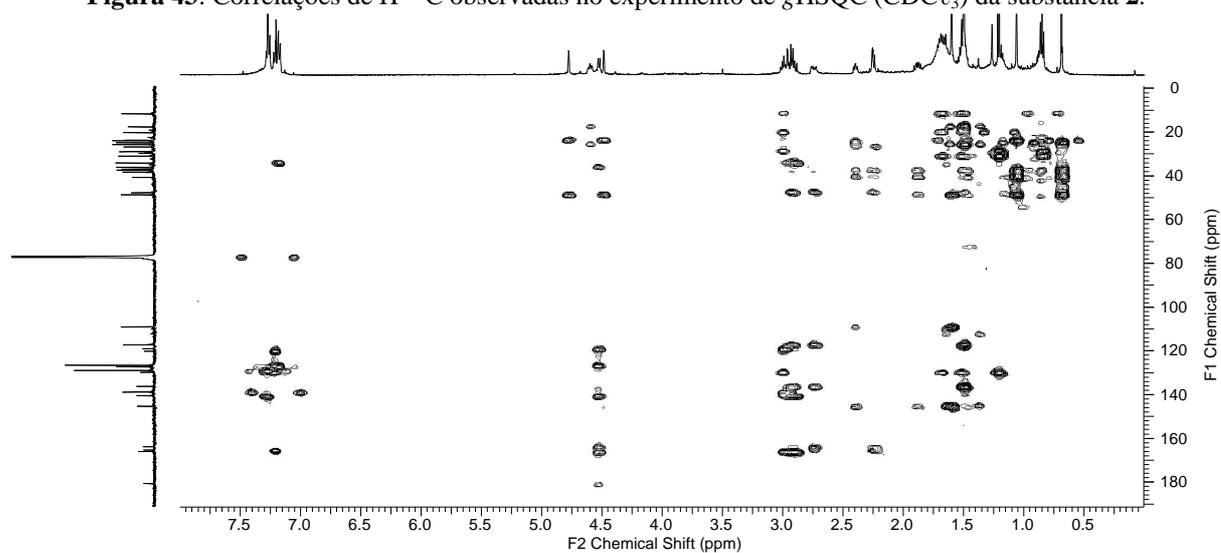


Figura 44: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 2.

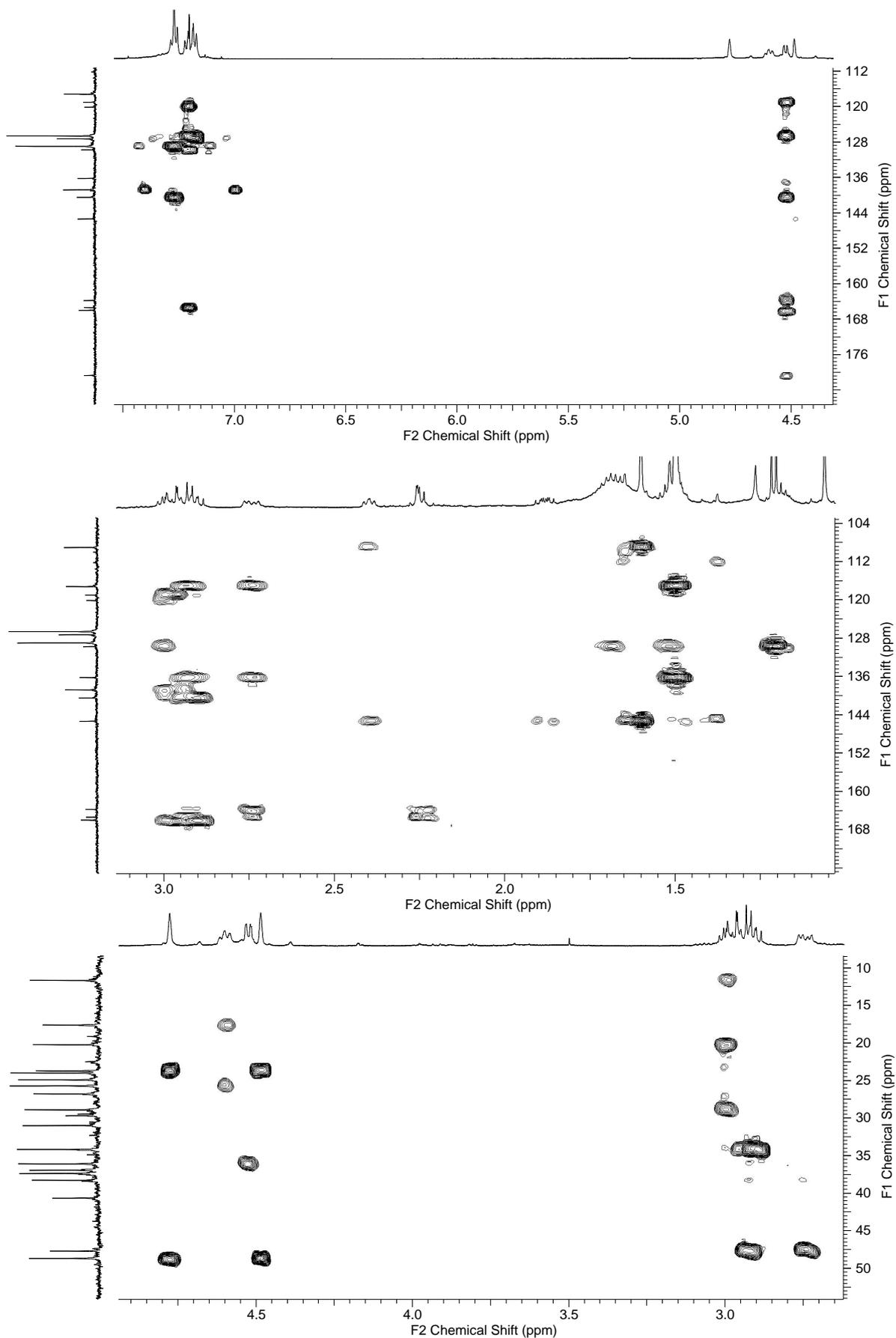


Figura 45: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 2.

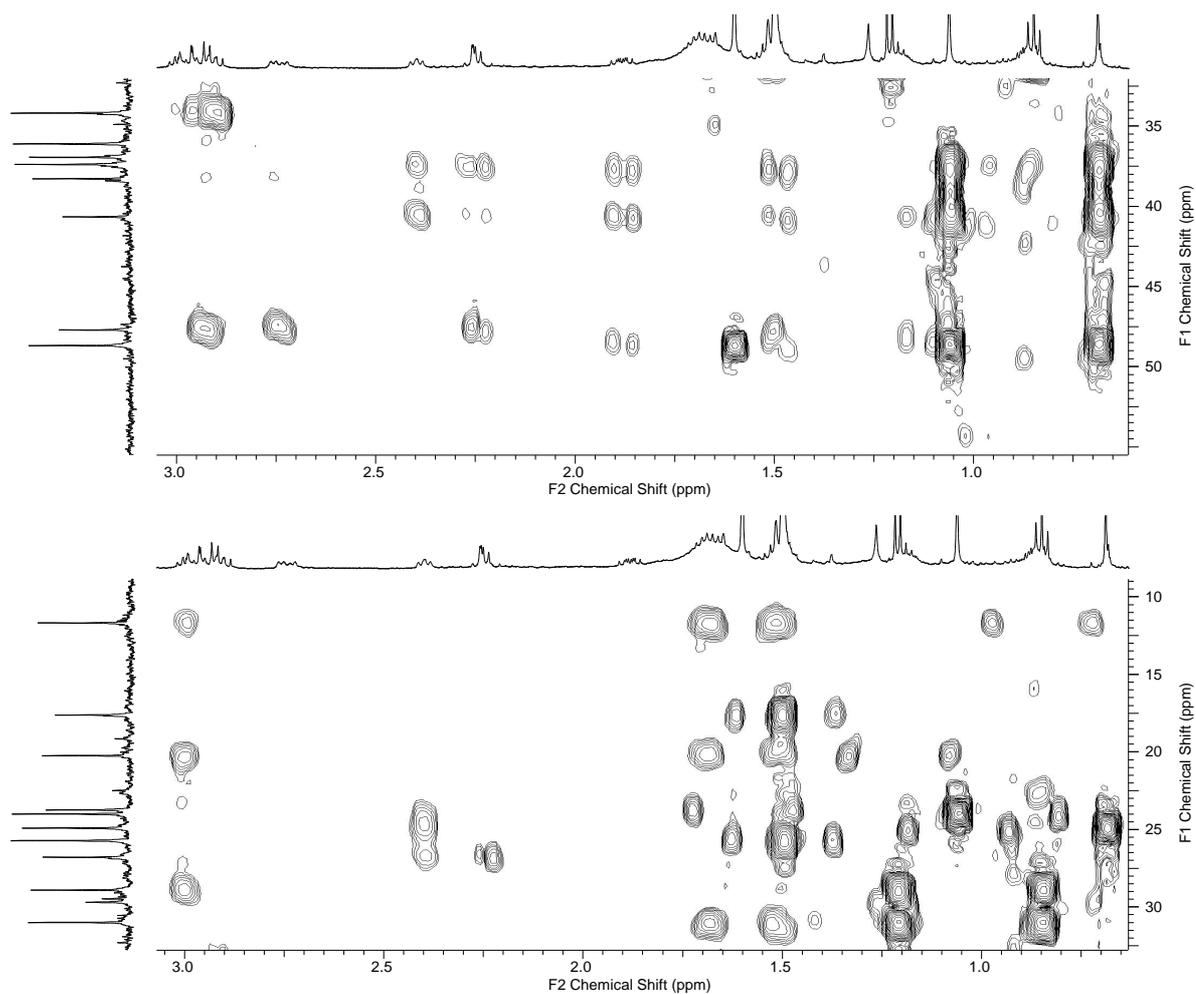


Figura 46: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 2.

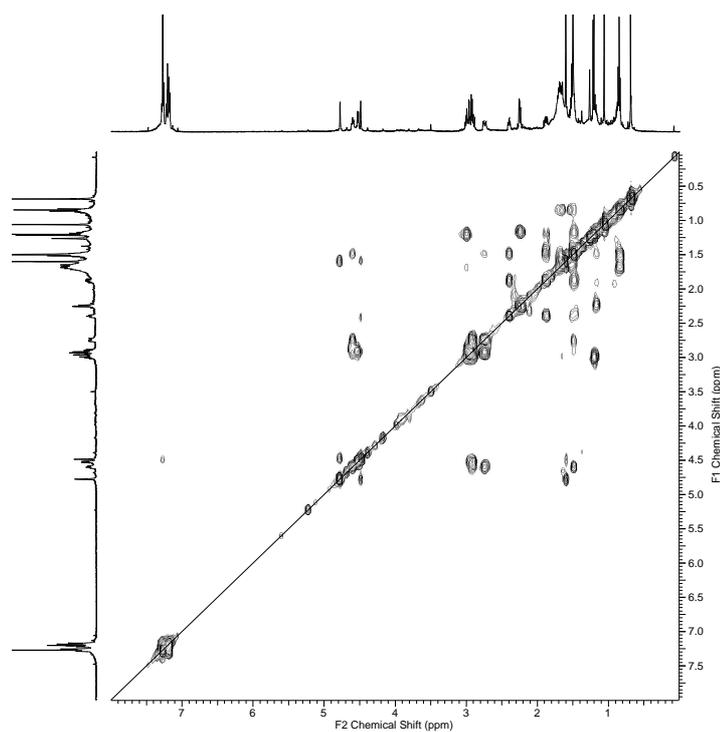


Figura 47: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl_3) da substância 2.

Até o momento pode-se identificar na estrutura das substâncias **1** e **2** a presença de um anel aromático monossustituído, um grupo prenílico e um grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico. Além desses, a presença de absorções fortes em 1659 e 1792 cm^{-1} no espectro de infravermelho da substância **1** e os sinais de RMN de ^{13}C em δ 194,7 e 165,6, permitiram sugerir a presença de uma carbonila conjugada e de uma carbonila de lactona saturada (MA *et al.*, 2004).

A conexão dos grupos já identificados com a estrutura de uma provável lactona foi possível com a análise do espectro bidimensional gHMBC da substância **1** através da correlação entre os sinais δ 2,08 e 2,22 - 2,16 (1H, *m*), atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos do grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico, com os sinais δ 194,7 (C), 158,1 (C) e 58,5 (C), como visto na Fig. 48. Além dessas, observou-se correlação do sinal δ 2,80 - 2,75 (2H, *m*), atribuído aos hidrogênios metilênicos do grupo prenílico, com o sinal δ 58,5. Essas informações permitiram sugerir que ambos os grupos prenílico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico estavam ligados ao mesmo carbono não hidrogenado (δ 58,5) e que este apresentava como vizinhos uma carbonila e um carbono olefínico oxigenado.

Diante dessas informações, juntamente com a indicação da presença de uma lactona, foi possível sugerir que os grupos prenílico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico estavam ligados ao carbono de um esqueleto do tipo cumarínico (Fig.48). Essa hipótese foi confirmada através das correlações observadas no espectro de gCOSY da substância **1**, entre o sinal δ 4,37 (1H; *d*; $J = 8,0$) com os sinais δ 3,08 (1H; *dd*; $J = 8,0$; 16,0 Hz) e δ 2,97 (1H; *dd*; $J = 2,0$; 16,0 Hz), bem como, através das correlações observadas no espectro de gHMBC do sinal δ 4,37 (1H; *d*; $J = 8,0$) com os sinais δ 165,6 (C), 162,4 (C), 158,1 (C), 140,0 (C), 126,9 (CH), 107,0 (C) e 36,3 (CH_2). Observou-se também correlação do sinal de hidrogênios aromáticos, δ 7,24 - 7,20 (2H; *m*) com o sinal δ 35,1 (CH) e dos sinais δ 3,08 e 2,97 com 165,6, 140,0, 107,0 e 35,1.

Esse conjunto de informações e a comparação com os dados do caloflorídeo (RAMIANDRASOA *et al.*, 1983), do ácido inofilóidico (RAVELONJATO *et al.*, 1987), ambos isolados de *Calophyllum vertillatum*, e do calopolianolídeo C, isolado de *C. polyanthum* (MA *et al.*, 2004), permitiram identificar a presença de um esqueleto do tipo dihidroneoflavonoídico e chegar à estrutura parcial mostrada na Figura 48.

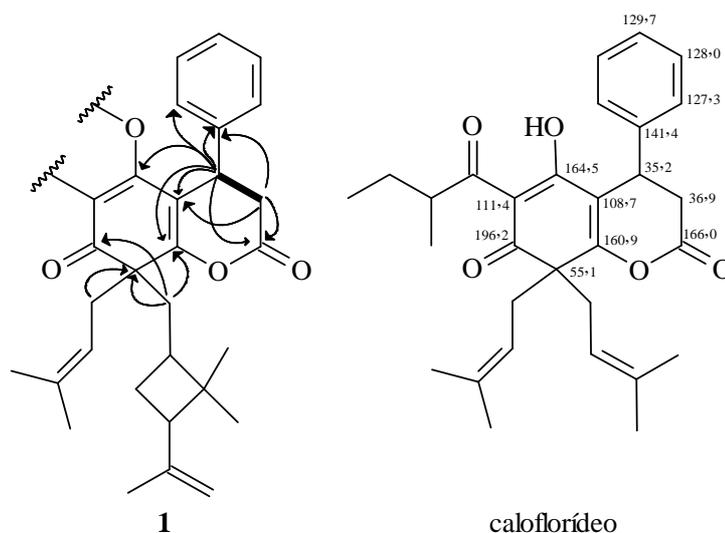


Figura 48: Correlações de g COSY (—) e g HMBC (---) da substância **1** e dados de RMN ^{13}C , (ppm) do caloflorídeo.

Após ter sido proposta a estrutura parcial acima, ainda faltava justificar os sinais δ 7,06 (1H; d ; 1,0 Hz), δ 2,93 (1H; dd ; $J = 7,0$; 13,5 Hz), δ 1,69 (1H; m), δ 1,49 (1H; m), δ 1,21 (3H; d ; $J = 7,0$ Hz) e δ 0,87 (3H; d ; $J = 7,0$ Hz).

O sinal em δ 7,06 (1H; d ; 1,0 Hz) foi sugestivo da presença de um hidrogênio com acoplamento a longa distância semelhante ao encontrado no ácido lathrophytóico B – também isolado de *K. lathrophyton* (DE ALMEIDA *et al.*, 2011) – para uma ligação dupla olefínica trissubstituída de um anel furânico. Esse sinal mostrou correlação com os sinais δ 162,4 (C) δ 130,4 (C) e δ 116,7 (C), atribuídos a carbono olefínico oxigenado não hidrogenado e carbonos olefínicos não hidrogenados, respectivamente, Fig 49.

O experimento de g COSY da substância **1**, mostrou correlação de δ 2,93 (1H; dd ; $J = 7,0$; 13,5 Hz) com δ 1,21 (3H; $J = 7,0$ Hz) e com δ 0,87 (3H; $J = 7,0$ Hz), e, deste último sinal com δ 1,69 (1H; m) e δ 1,49 (1H; m), Fig. 49.

Foram observadas ainda correlações de δ 2,93 com 130,4; 0,87 com 19,7 (CH_3), 31,3 (CH) e 28,7 (CH_2); 1,21 com 11,9 (CH_3), 31,3, 28,7 e 130,4 permitiram deduzir a presença de um grupo isobutílico ligado ao anel furânico.

Esse conjunto de informações permitiram definir **1** como sendo a estrutura da substância em análise, denominada de lathrophytona A, sendo este o primeiro relato de sua obtenção e, portanto trata-se de uma substância inédita.

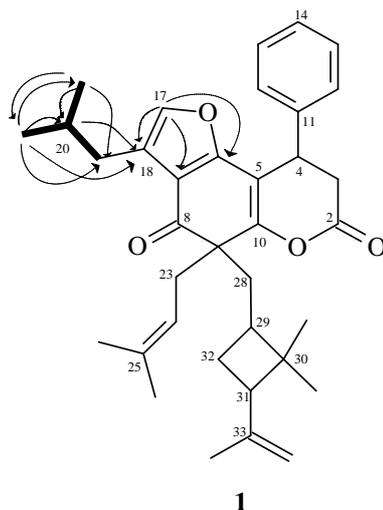


Figura 49: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (→) e fórmula estrutural da substância **1**.

A estereoquímica da substância **1** foi elucidada através do experimento de NOESY (Fig. 50). Observou-se correlação de δ 4,45 (H_b-34) com δ 0,75 (H-36) e δ 1,49 (H-29); de δ 0,75 com δ 1,49 e de δ 1,07 (H-37) com δ 2,41 (H-31) e 1,92 (H_b-33). Assim a configuração de C-29 e C-31 foi proposta como mostrada na Fig. 51. A estereoquímica relativa de C-4 e C-9 foi definida através das correlações observadas de δ 1,55 (H-26) com δ 2,97 (H_b-3), 7,32 e 7,23.

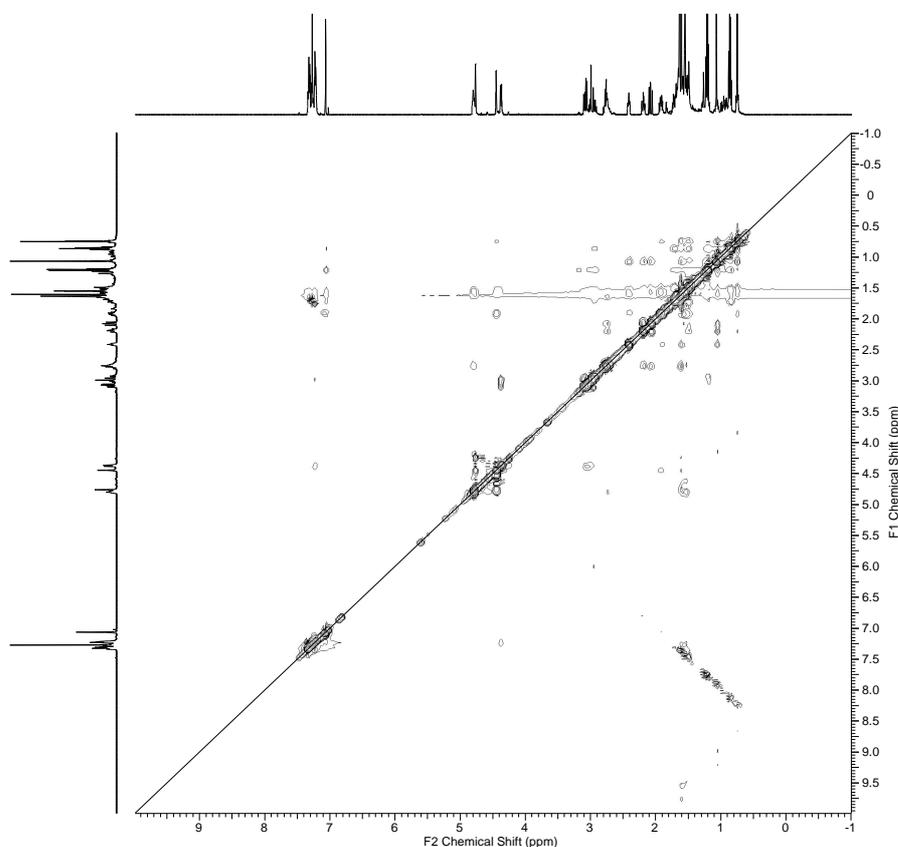


Figura 50: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl₃) da substância **1**.

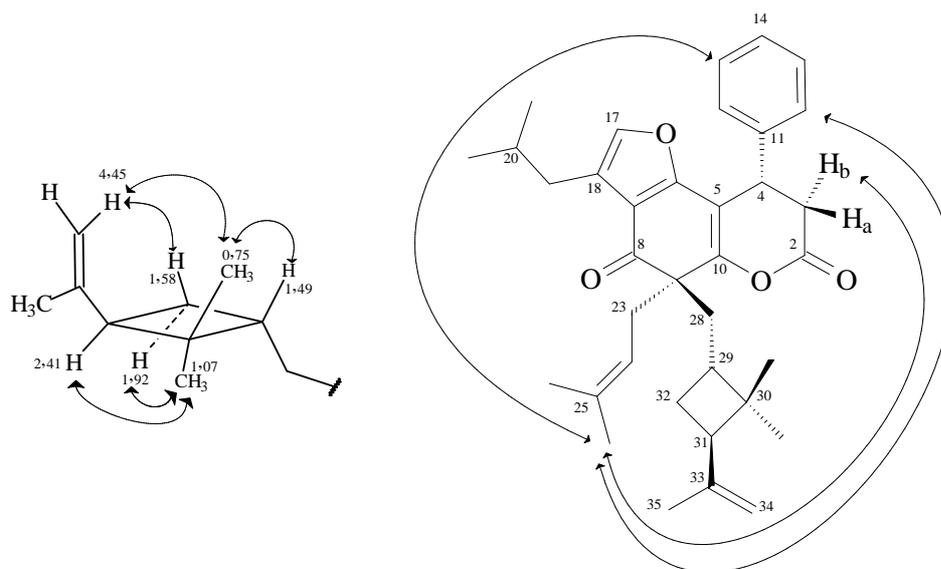


Figura 51: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa dos carbonos C-4 e C-9, C-29 e C-31 da substância **1**.

Após determinar a estrutura da substância **1**, foi realizada uma comparação dos dados de ^1H , ^{13}C e dados obtidos dos experimentos 2D, da substância **2** com os da substância **1** (Tabela 2), bem como, a comparação desses dados com os relatados na literatura (RAMIANDRASOA *et al.*, 1983; RAVELONJATO *et al.*, 1987; COTTIGLIA *et al.*, 2004), com o propósito de identificar as demais similaridades estruturais existentes entre as duas substâncias. Inicialmente já haviam sido constatadas as presenças dos grupos fenílico, prenílico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico. Posteriormente, foi verificado que a substância **2** também apresentava o esqueleto do tipo cumarínico e o grupo isobutilfurânico.

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C da substância **1** com os dados da substância **2** permitiram deduzir a presença de um anel do tipo cumarínico semelhante ao encontrado na lathrophytona A devido à presença dos sinais em δ 180,7 e 166,0 (carbonos carbonílico conjugado e de lactona saturada, respectivamente), δ 165,4 e 163,8 (carbonos vinílicos não hidrogenados ligados a oxigênio) δ 129,0, e 119,0, referentes a carbonos olefínicos não hidrogenados, δ 47,7, 36,1 e 34,2 relativos a carbonos quaternários, metilênico e metínico, respectivamente.

A presença de um grupo fenila monossustituído foi corroborada pela presença dos sinais de RMN de ^{13}C em δ 140,5 (C), 129,0 (2CH), 127,3 (CH) e 126,6 (2CH).

O sistema isobutilfurânico foi identificado pela presença dos sinais de RMN de ^1H referentes a dois grupos metílicos em δ 1,21 (d; $J = 7,0$ Hz) e δ 0,85 (d; $J = 7,0$ Hz), um multiplete em δ 3,00 (1H) e um sinal concernente a um hidrogênio olefínico em δ 7,20 (d; $J =$

0,7 Hz). Juntamente com os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C , em δ 20,2 (CH_3), 11,7 (CH_3), 28,9 (CH_2), 31,0 (CH), 138,8 (CH), 120,1 (C), 129,8 (C) e 165,4.

Como pode ser observado as substâncias **1** e **2** apresentam uma semelhança estrutural bastante grande. A diferença entre elas só foi identificada após uma análise criteriosa do espectro de gHMBC.

A análise deste experimento bidimensional da substância **2** permitiu constatar a correlação do sinal δ 7,20 com 165,4, 129,0 e 120,1; de 3,00 com 129,5, 29,5, 20,2 e 11,7; de δ 0,85 com 31,0, 29,5 e 20,2; de δ 1,21 com 31,0, 29,5 e 11,7, bem como, da correlação dos sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos do grupo prenílico (δ 2,94 e 2,74) com δ 165,4, 163,8 e 47,7; dos sinais δ 2,95 ($\text{H}_a\text{-3}$) e 2,90 ($\text{H}_b\text{-3}$) com δ 166,0 e 119,0; dos hidrogênios metilênicos ligados ao anel ciclobutil [δ 2,25 – 2,27 (2H; *m*)] com os sinais δ 165,4 e 163,8. Além disso, o sinal δ 4,54 (H-4) mostrou correlação com os sinais δ 34,2, 36,1, 119,0, 140,5, 166,0, 163,8 e 180,7 conforme Fig. 52.

Essas correlações permitiram definir a estrutura da substância **2** conforme mostrado na Fig. 52, na qual o grupo carbonílico se encontra na posição 6 do anel tipo cumarínico, ao contrário da substância **1**, na qual a carbonila se encontra na posição 8. Essa substância foi denominada de lathrophytona B e esse é o primeiro relato de sua obtenção.

As posições relativas dos grupos isobutilfurânico nos compostos **1** e **2** são corroborados pelos deslocamentos químicos dos sinais H-17 que em **1** está mais protegido do que em **2**, provavelmente devido ao efeito de proteção causado pelo grupo fenílico em C-4 e pelos deslocamentos químicos dos grupos carbonílicos C-8 em **1** e C-6 em **2**, sendo este último bem mais protegido devido à extensão da conjugação.

Sua estereoquímica foi parcialmente determinada após a análise do experimento de NOESY (Fig. 53) que mostrou correlação do sinal δ 1,50 (H-26 e H-27) com os sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,17 – 7,26. Para além disso, o fato dos $[\alpha]_D^{20}$ serem próximos e dos deslocamentos químicos dos grupos 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico serem muito próximos, pode-se concluir que ambas as substâncias têm a mesma estereoquímica relativa.

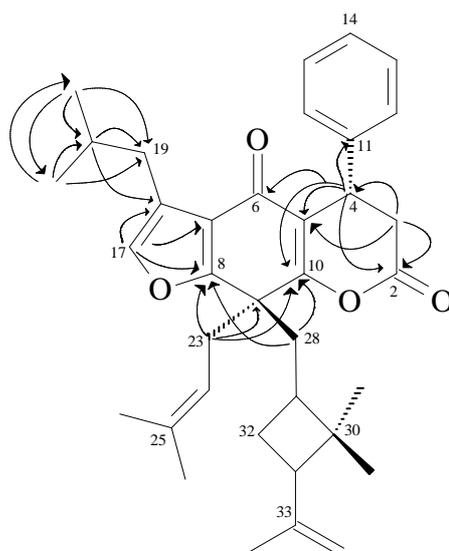


Figura 52: Correlações de gHMBC (→) e estrutura da substância 2.

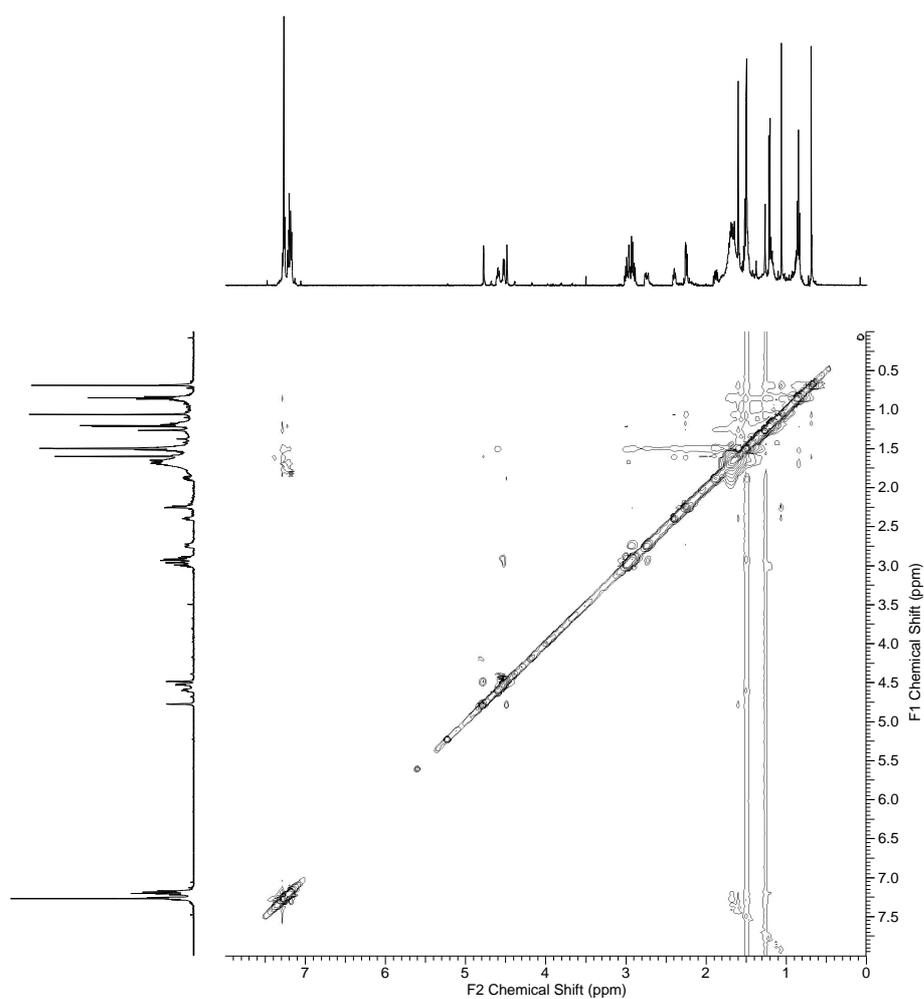


Figura 53: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl_3) da substância 2.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC das substâncias **1** e **2**.

Nº	Substância 1.			Substância 2		
	δ ^1H (<i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (<i>mult.</i> , <i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
2		165,6 (C)			166,0 (C)	
3	2,97 (<i>dd</i> ; 2,0; 16,0) 3,08 (<i>dd</i> ; 8,0; 16,0)	36,6 (CH ₂)	2, 4, 5, 11	2,91 (<i>dd</i> ; 8,0; 16,0) 2,98 (<i>dd</i> ; 2,0; 16,0)	36,1 (CH ₂)	2, 4, 5, 11
4	4,37 (<i>d</i> ; 8,0)	35,1 (CH)	2, 3, 5, 6, 10, 11, 12	4,54 (<i>dd</i> ; 2,0; 7,0)	34,2 (CH)	2, 3, 5, 6, 10, 11,
5		107,0 (C)			119,0 (C)	
6		162,4 (C)			180,7 (C)	
7		116,7 (C)			120,1 (C)	
8		194,7 (C)			165,4 (C)	
9		58,5 (C)			47,7 (C)	
10		158,1 (C)			163,8 (C)	
11		140,0 (C)			140,5 (C)	
12, 16	7,23 (<i>m</i>)	126,9 (CH)		7,17 (<i>m</i>)	126,6 (CH)	
13, 15	7,32 (<i>m</i>)	129,2 (CH)		7,27 (<i>m</i>)	129,0 (CH)	
14	7,28 (<i>m</i>)	127,8 (CH)		7,20 (<i>m</i>)	127,3 (CH)	
17	7,06 (<i>d</i> ; 1,0)	139,1 (CH)	6, 7, 18	7,20 (<i>d</i> ; 0,7)	138,8 (CH)	7, 8, 18
18		130,4 (C)			129,0 (C)	
19	1,49* 1,69*	28,7 (CH ₂)		1,53* 1,70*	29,5 (CH ₂)	
20	2,93 (<i>dd</i> ; 7,0; 13,5)	31,3 (CH)	18	3,00 (<i>dd</i> ; 7,0; 13,5)	31,0 (CH)	18, 19, 21, 22
21	0,87 (<i>d</i> ; 7,0)	11,9 (CH ₃)	19, 20, 22	0,85 (<i>d</i> ; 7,0)	11,7 (CH ₃)	19, 20, 22
22	1,21 (<i>d</i> ; 7,0)	19,7 (CH ₃)	19, 20, 21	1,21 (<i>d</i> ; 6,5)	20,2 (CH ₃)	19, 20, 21
23	2,80 - 2,75 (<i>m</i>)	39,0 (CH ₂)	9, 24	2,74 (<i>dd</i> ; 6,5; 14,0) 2,94 (<i>dd</i> ; 6,5; 14,0)	37,0 (CH ₂)	8, 9, 10, 24, 26, 27
24	4,80 (<i>t</i> ; 7,5)	118,1 (CH)		4,60 (<i>t</i> ; 6,5)	117,2 (CH)	
25		135,2 (C)			136,2 (C)	
26	1,55 (<i>s</i>)	26,0 (CH ₃)	24, 25, 27	1,50 (<i>s</i>)	25,7 (CH ₃)	24, 25, 27
27	1,63 (<i>s</i>)	18,0 (CH ₃)	24, 25, 26	1,50 (<i>s</i>)	17,6 (CH ₃)	24, 25, 26
28	2,08 (<i>dd</i> ; 11,7; 13,0) 2,22 - 2,16 (<i>m</i>)	40,7 (CH ₂)	8, 9, 10, 29, 30,32	2,25 - 2,27 (<i>m</i>)	38,3 (CH ₂)	8, 10, 29, 30, 32
29	1,50*	37,6 (CH)		1,19 *	37,4 (CH)	30, 32
30		40,9 (C)			40,7 (C)	
31	2,41 (<i>tl</i> ; 7,8)	48,8 (CH)		2,40 (<i>tl</i> ; 7,5)	48,7 (CH)	2, 30, 32, 33, 34, 36, 37
32	1,58* 1,95 - 1,87 (<i>m</i>)	26,8 (CH ₂)		1,50* 1,92 - 1,84 (<i>m</i>)	26,8 (CH ₂)	
33		145,8 (C)			145,4 (C)	
34	4,76 (<i>s</i>) 4,45 (<i>s</i>)	108,7 (CH ₂)	31, 35	4,78 (<i>s</i>) 4,49 (<i>s</i>)	109,2 (CH ₂)	31, 33, 35
35	1,60 (<i>s</i>)	23,8 (CH ₃)	31, 33, 34	1,60 (<i>s</i>)	23,7 (CH ₃)	31, 33, 34
36	0,75 (<i>s</i>)	23,8 (CH ₃)	29, 30, 31, 37	0,69 (<i>s</i>)	24,0 (CH ₃)	29, 30, 31, 37
37	1,07 (<i>s</i>)	24,8 (CH ₃)	29, 30, 31, 36	1,06 (<i>s</i>)	24,9 (CH ₃)	29, 30, 31, 36

tl – tripleto largo;

* multiplicidade não observada

4.1.2 Determinação estrutural da substância 3a

A substância **3a** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. lathrophyton* na forma de um óleo amarelo, viscoso, opticamente ativo com valor de $[\alpha]_D^{20} + 101$ (c 2,3, CHCl_3), após reação de metilação. Sua determinação estrutural foi feita com base nos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMQC, gHMBC, gCOSY, NOESY e HR-ESI-TOF.

A análise do espectro de IV (Fig 54) da substância **3a** revelou a presença de absorções fortes em 1659 e 1792 cm^{-1} , indicando a presença de carbonila conjugada e de carboxila de lactona saturada (SHEN *et al.*, 2004), enquanto que as absorções em 698 e 759 cm^{-1} indicaram a presença de um anel aromático monossustituído na molécula.

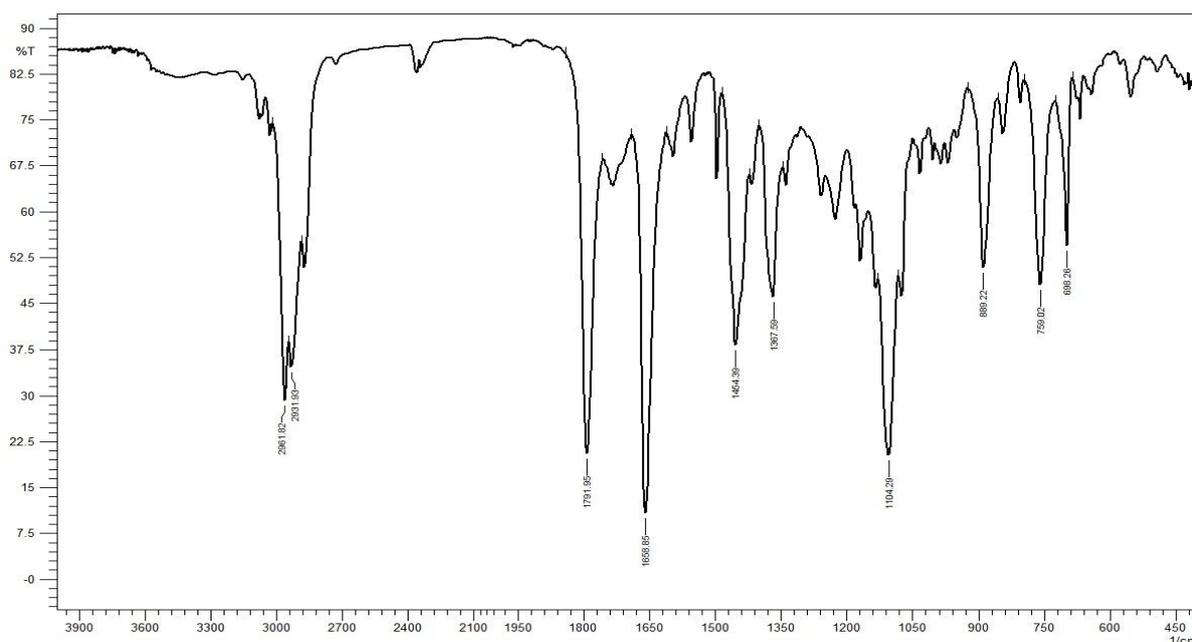


Figura 54: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da substância **3a**.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 55) e DEPT 135 (sumarizado na Tab. 3) da substância **3a** revelaram sinais correspondentes a 37 átomos de carbonos, dos quais oito referentes a carbonos metílicos, sete a carbonos metilênicos, sendo um do tipo sp^2 , dez carbonos metínicos, sendo seis do tipo sp^2 e doze referentes a carbonos não-hidrogenados: dois deles atribuídos a carbonos carbonílicos e um a carbono carboxílico.

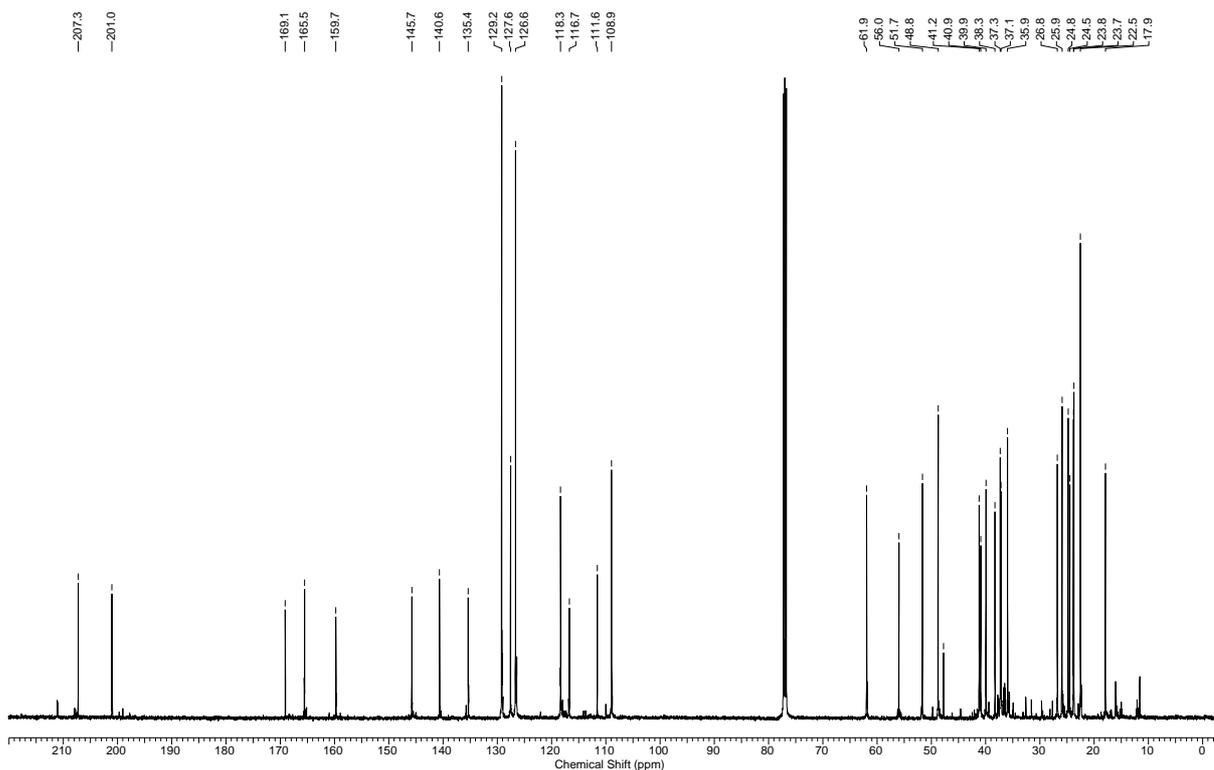


Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **3a**.

O espectro de massas de alta resolução de **3a** (Figura 56), obtidos através da técnica de ionização por eletrospray (modo positivo), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em m/z 595,3395 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e, assim, a fórmula molecular dessa substância foi estabelecida com sendo $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5$ (calculada para $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Na}$: 595,3399), apresentando IDH igual a quatorze.

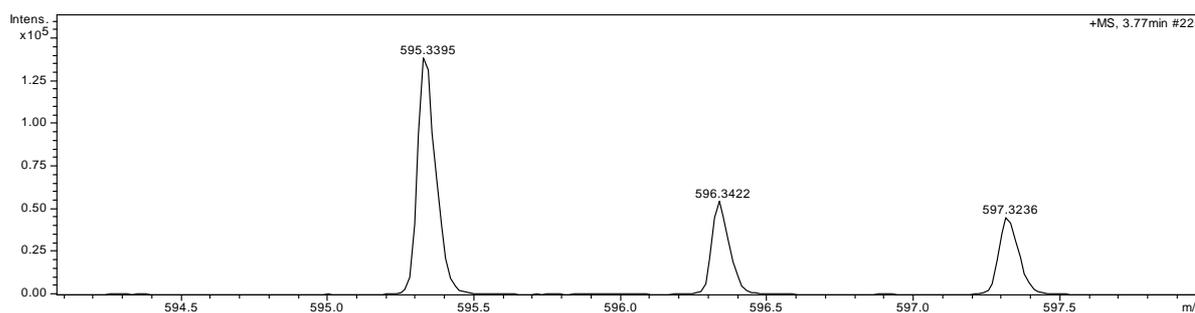


Figura 56: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **3a**.

O espectro de RMN ^1H da substância **3a** (Fig. 57) exibiu, na região de hidrogênios aromáticos, (δ 7,35 – 7,10) um conjunto de sinais que foi atribuído a cinco hidrogênios de anel aromático monossustituído. Na região entre δ 5,00 – 4,00 foram observados quatro

sinais, com integração para um hidrogênio cada, sendo eles: um multipletto entre δ 4,98 – 4,91, dois simpletos em δ 4,83 e 460 e um duplo dupletto em δ 4,23 ($J = 1,5; 8,0$ Hz).

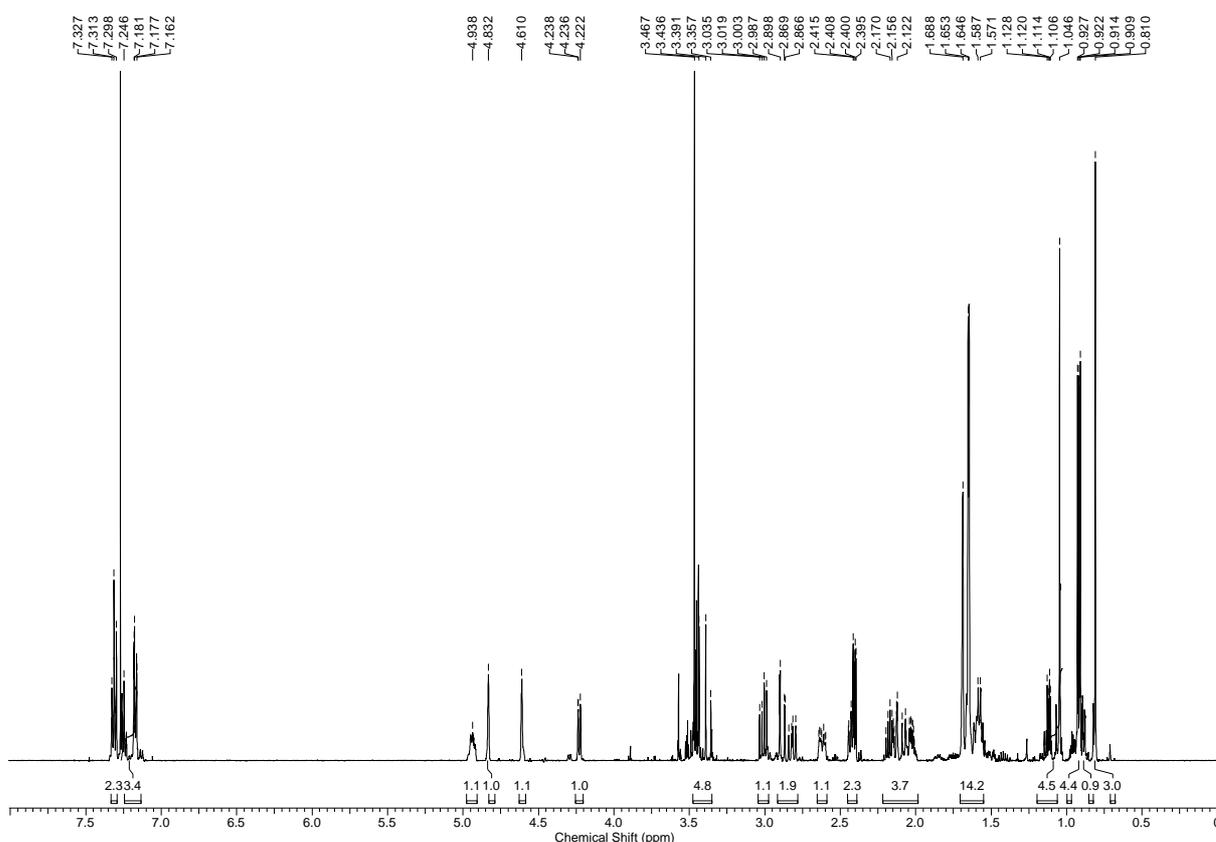


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **3a**.

O espectro de RMN ^1H da substância **3a** também revelou a presença de dois dupletos com integração para um hidrogênio cada um, em δ 3,45 (1H; $J = 17,0$ Hz) e δ 3,37 (1H; $J = 17,0$ Hz) e um simpleto integrando para três hidrogênios em δ 3,47, indicando a presença de um grupo metoxílico na molécula. A Figura 58 mostra a ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90, onde foi possível identificar seis duplos dupletos em δ 3,02 (1H; $J = 8,0$ e 16,0 Hz), δ 2,89 (1H; $J = 1,5$ e 16,0 Hz), δ 2,82 (1H; $J = 10$ e 13,5 Hz), δ 2,41 (1H; $J = 3,0$ e 7,0 Hz), δ 2,15 (1H; $J = 2,5$ e 11,0 Hz) e δ 2,08 (1H; $J = 2,0$ e 11,0 Hz), além de três multipletos entre δ 2,65 – 2,59 (1H), 2,21 – 2,13 (1H) e 2,06 – 1,99 (2H) e um dupletto largo em δ 2,44 (1H; $J = 7,5$ Hz).

Foram identificados ainda no espectro de RMN de ^1H da substância **3a** cinco simpletos em δ 1,69, 1,66, 1,65, 1,05 e 0,81, cada um integrando para três hidrogênios e dois dupletos em δ 0,92 e 0,91, ambos com constante de acoplamento de 6,8 Hz e integrando para três hidrogênios, cada um. Esse conjunto de sinais indicou a presença de sete grupos metílicos na molécula, sendo os três primeiros sinais, típicos de hidrogênios de metilas vinílicas.

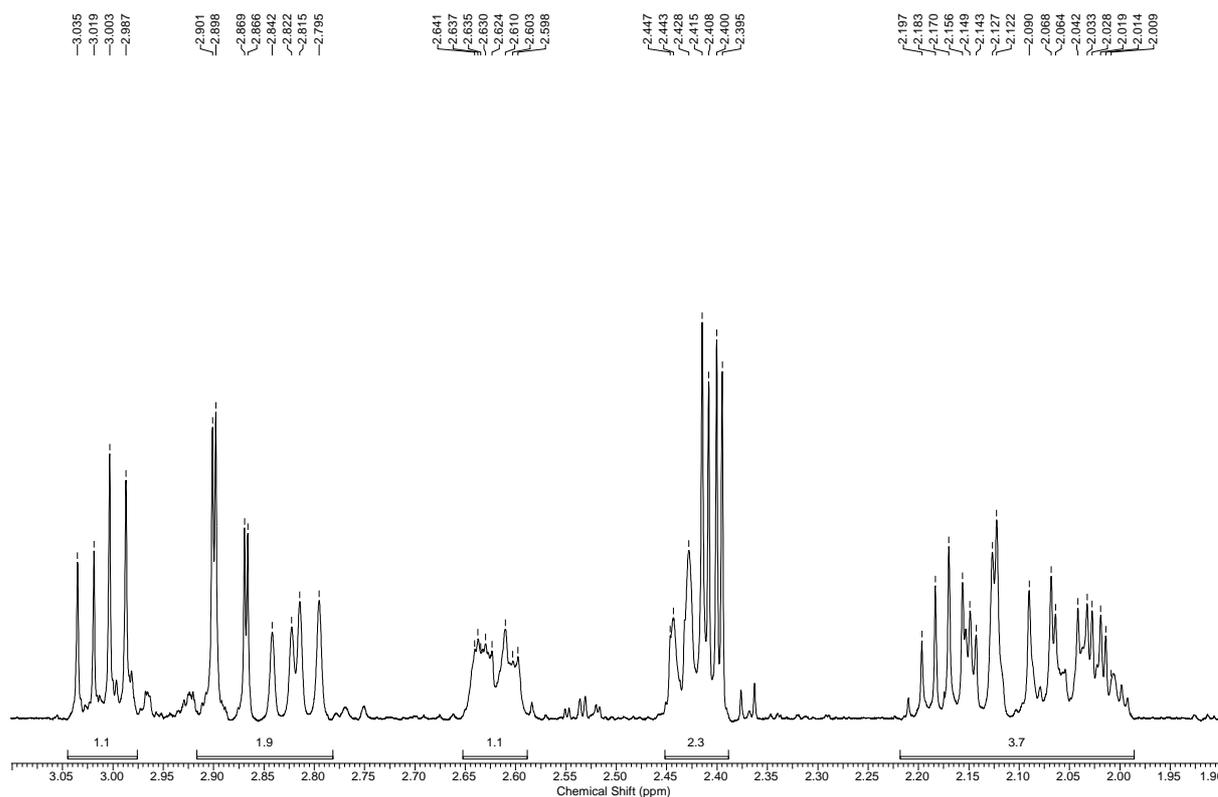


Figura 58: Ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **3a**.

As Figuras (59 – 62) mostram os experimentos bidimensionais de gCOSY, gHMQC e gHMBC da substância **3a**.

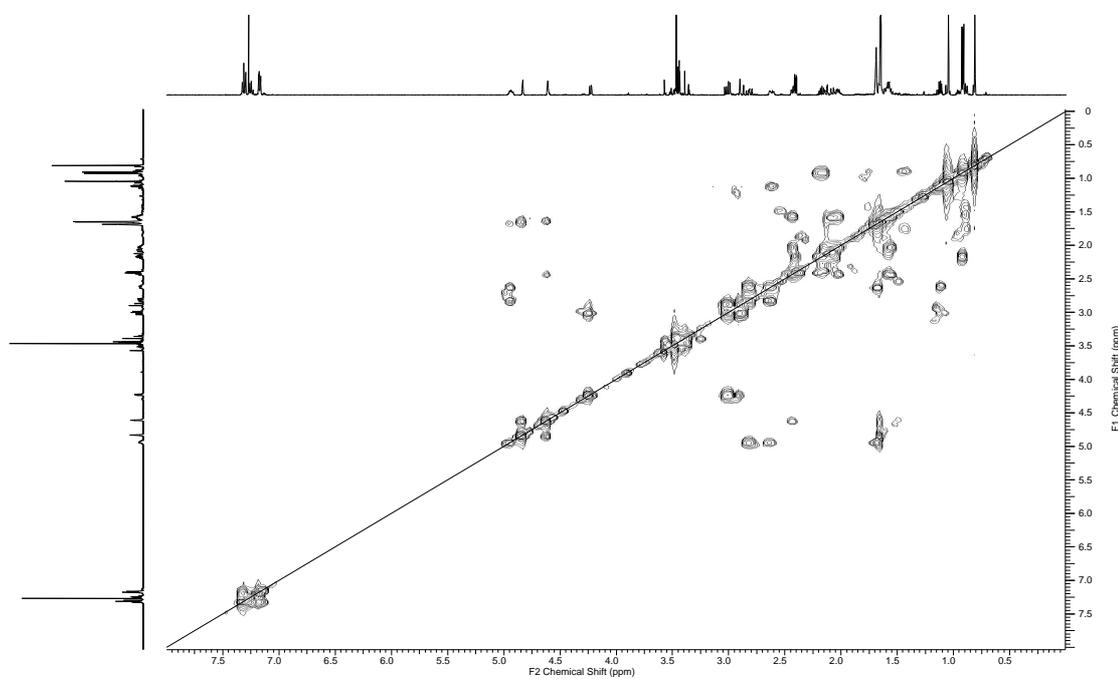


Figura 59: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY da substância **3a**.

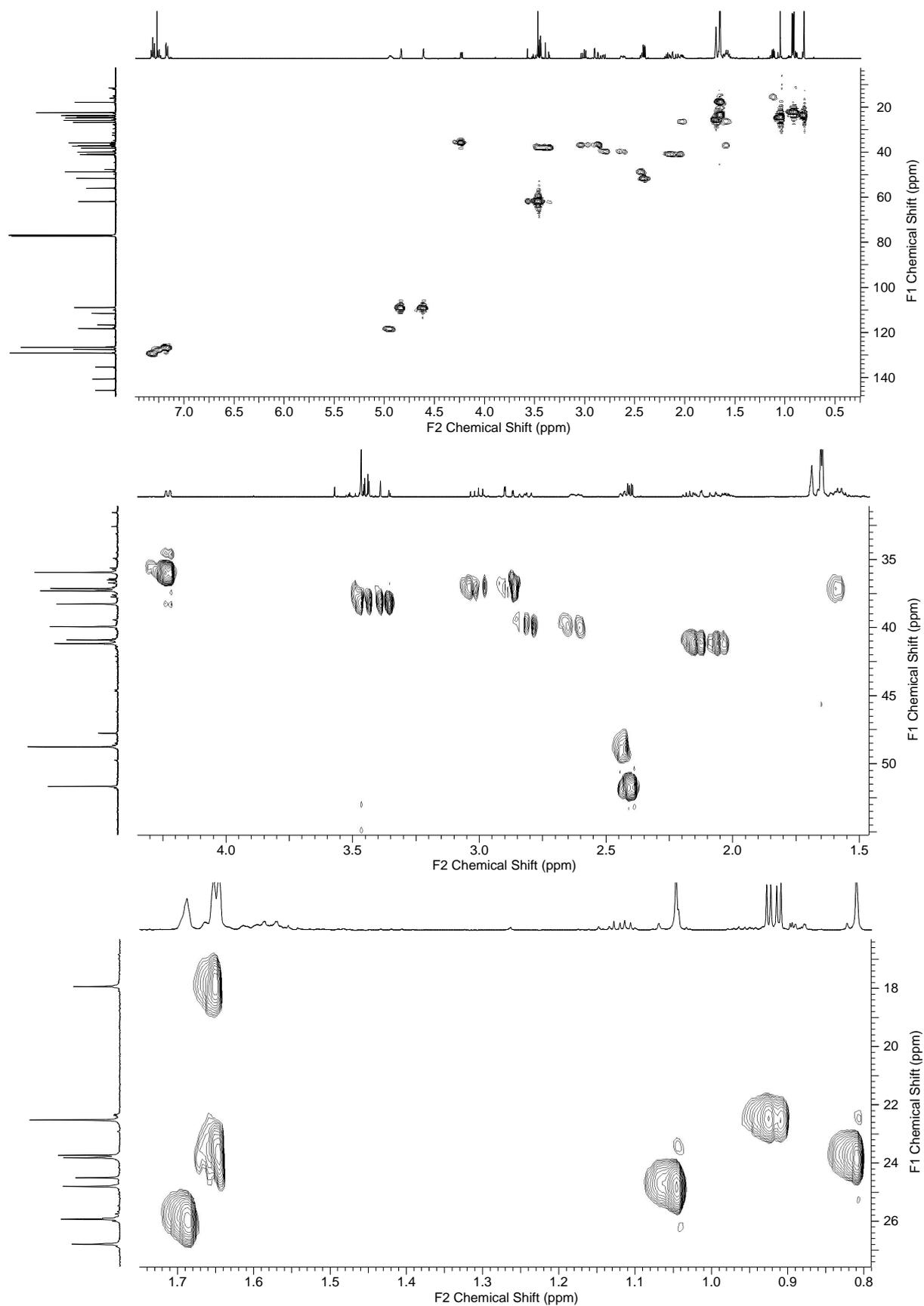


Figura 60: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl_3) da substância **3a**.

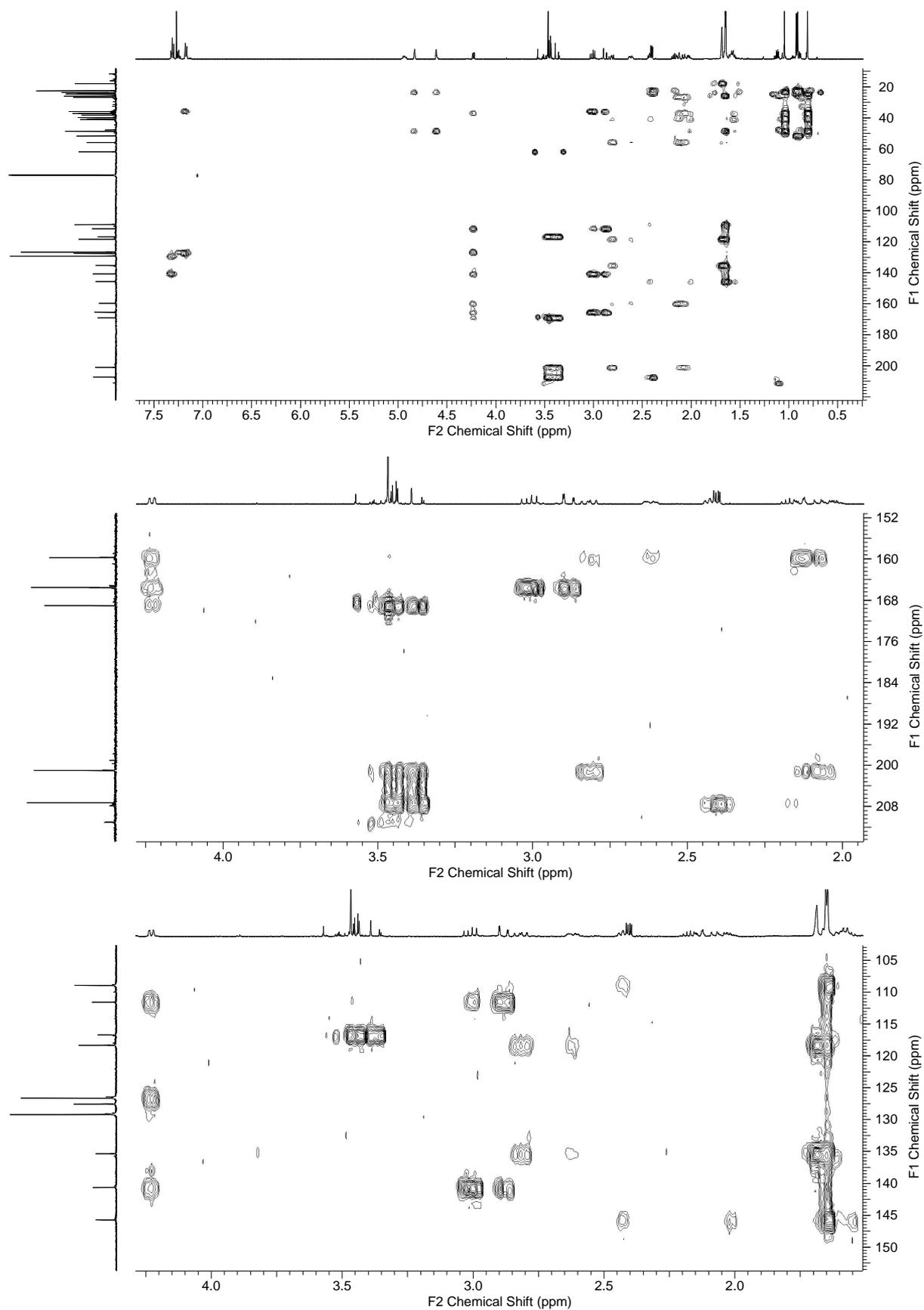


Figura 61: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **3a**.

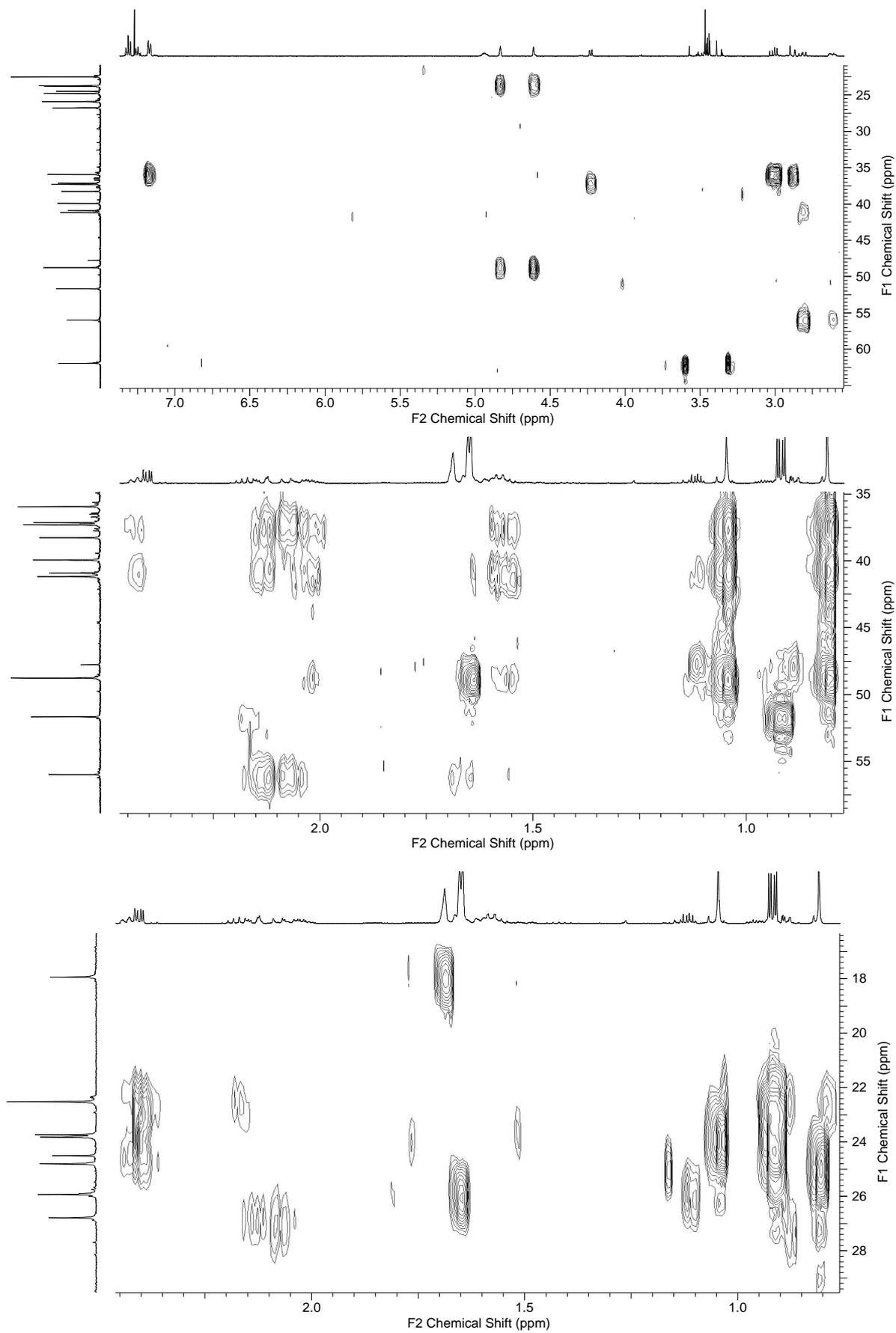


Figura 62: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da substância **3a**.

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **3a** com os dados da lathrophytona A e da literatura (COTTIGLIA *et al.*, 2004; RAVELONJATO *et al.*, 1987; RAMIANDRASOA *et al.* 1983), bem como a análise dos dados obtidos dos experimentos 2D, permitiram propor para a substância **3a** uma estrutura bastante similar à encontrada para a lathrophytona A, conforme descrição a seguir.

A presença de um anel aromático monossustituído na estrutura da substância **3a** foi confirmada pela presença dos sinais de RMN ^{13}C em δ 140,6 (C), 129,2 (2CH), 127,6 (CH) e 126,6 (2CH). Já o grupo prenílico foi identificado através dos sinais em δ 135,5 (C), 118,3 (CH), 39,9 (CH_2), 25,9 (CH_3) e 17,9 (CH_3), juntamente com os sinais em δ 1,69 e 1,66 referentes a duas metilas vinílicas, δ 2,89 (*dd*; $J = 10,0$ e $13,5$ Hz) e δ 2,65 – 2,59 (*m*) referentes aos hidrogênios metilênicos e o sinal entre δ 4,98 – 4,91 (*m*) atribuído a um hidrogênio vinílico – Fig. 63.

Foi possível identificar também o grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico, devido à presença dos sinais de RMN ^{13}C em δ 145,7 (C), 108,9 (CH_2), 48,8 (CH), 41,2 (CH_2), 40,9 (C), 37,3 (CH), 26,8 (CH_2), 24,8 (CH_3), 23,8 (CH_3), 23,7 (CH_3) e dos sinais de RMN ^1H relativos a dois prótons vinílicos em δ 4,83 (*s*) e 4,61 (*s*); quatro hidrogênios referentes a dois grupos metilênicos em δ 2,15 (1H; $J = 2,5$ e $11,0$ Hz), δ 2,08 (1H; $J = 2,0$ e $11,0$ Hz) e δ 2,06 – 1,99 (2H; *m*); dois hidrogênios metínicos em δ 2,44 (1H; $J = 7,5$ Hz) e δ 1,58 (*m*) e três grupos metílicos em δ 1,65 (*s*), 1,05 (*s*) e 0,81 (*s*).

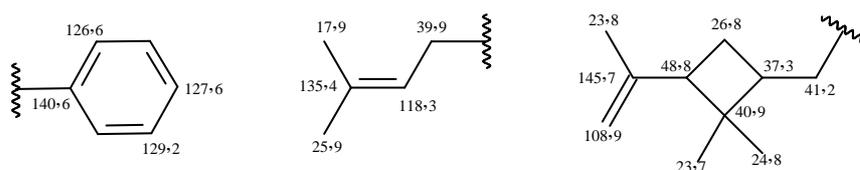


Figura 63: Dados de RMN ^{13}C (ppm) do grupos fenílico, prenílico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico da substâncias **3a**.

A presença do anel tipo dihidroneoflavonoídico foi sugerida devido às absorções fortes em 1659 cm^{-1} e 1792 cm^{-1} no espectro de infravermelho da substância **3a** e aos sinais de RMN de ^{13}C em δ 194,7 e 165,6 que foram atribuídos a um carbono carbonílico α,β -insaturado e ao carbono carboxílico de lactona saturada (MA *et al.*, 2004).

Após confirmar a presença de grupos idênticos aos relatados para a lathrophytona A foi realizada uma análise do experimento de gCOSY e gHMBC para verificar se esses grupos estavam conectados da mesma forma.

O experimento de gCOSY da substância **3a**, mostrou correlação dos sinais δ 3,02 (1H; *dd*; $J = 8,0$ e $16,0$ Hz) e δ 2,89 (1H; *dd*; $J = 1,5$ e $16,0$ Hz) com o sinal δ 4,23 (1H; *dd*; $J = 10$ e $13,5$ Hz). Já o experimento de gHMBC mostrou correlação dos sinais δ 3,02 e 2,89 com os sinais δ 165,5 (C), 140,6 (C), 111,6 (C) e 36,1 (CH); do sinal δ 4,23 com 169,1 (C), 165,5, 159,7 (C), 111,6, 140,6, 126,6 (CH) e 37,1 (CH₂).

Os sinais dos hidrogênios metilênicos do grupo prenilico, δ 2,89 (*dd*; $J = 10,0$; $13,5$, Hz) e δ 2,65 – 2,59 (*m*), mostraram correlação com os sinais δ 201,0 (C), 159,7 (C), 56,0 (C) e 41,2 (CH₂). Correlações semelhantes também foram observadas entre os hidrogênios metilênicos do grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico com os sinais δ 201,0, 159,7 e 56,0. Observou-se também correlação do sinal referente a hidrogênios metoxílicos (δ 3,47) com o sinal δ 169,1. Essas correlações permitiram confirmar que os grupos prenilico e 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico idênticos aos da lathrophytona A, estavam conectados da mesma forma conforme estrutura parcial exibida na Figura 64.

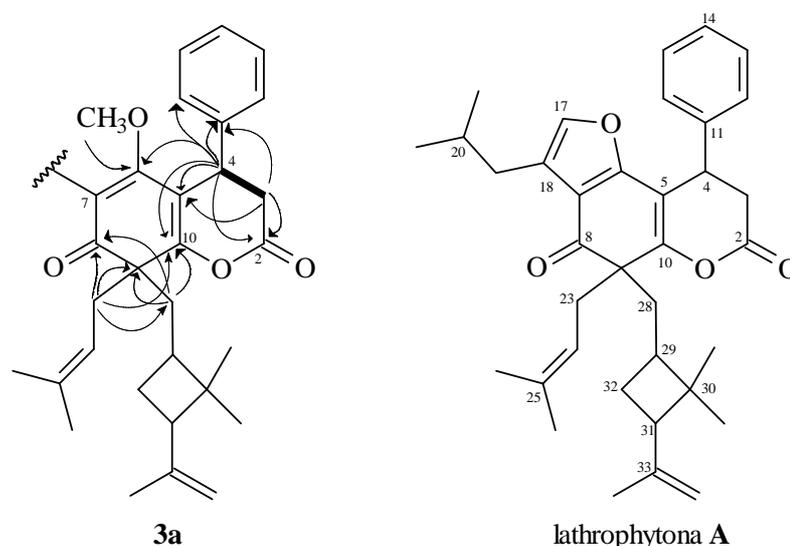


Figura 64: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (→) da substância **3a** e fórmula estrutural da lathrophytona A.

Constatou-se então que as diferenças existentes entre essas substâncias estavam nos grupos localizados nos carbonos C-6 e C-7. Na lathrophytona A, há um anel furânico condensado aos carbonos C-6 e C-7 do anel tipo dihidroneoflavonoídico, enquanto que na substância **3a** o carbono C-6 sustenta um grupo metoxílico e o carbono C-7, um outro grupo que foi identificado através das correlações de gCOSY e gHMBC relatadas a seguir.

O experimento de *g*COSY exibiu correlação do sinal δ 2,17 (1H; m) com os sinais atribuídos a hidrogênios metílicos em δ 0,91 (*d*; $J = 6,8$ Hz) e 0,92 (*d*; $J = 6,8$ Hz) e com o sinal atribuído a hidrogênio metilênico em δ 2,41 (*dd*; $J = 3,0$ e 7,0 Hz), conforme mostrado na Fig. 65. Complementar a estas informações, o experimento de *g*HMBC mostrou correlação do sinal δ 2,17 com os sinais δ 51,7 (CH₂) e δ 22,5 (2CH₃); de δ 0,91 com 24,5 (CH) e 51,7; de δ 0,92 com 24,5 e 51,7; de δ 2,41 com 22,5 e com o sinal atribuído a uma carbonila não conjugada (δ 207,3), que também mostrou correlação com os sinais δ 3,45 (*d*; $J = 17,0$) e δ 3,37 (*d*; $J = 17,0$). Essas correlações sugeriram a presença de uma unidade 4-metilpentan-2-ona na substância **3a** (Fig. 65).

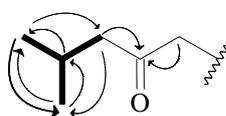


Figura 65: Correlações de *g*COSY (—) e *g*HMBC (→) da substância **3a**.

Esse substituinte foi posicionado em C-7, em virtude das correlações observadas entre os sinais δ 3,45 (*d*; $J = 17,0$) e δ 3,37 (*d*; $J = 17,0$) com os sinais δ 201,0 (C-8), 169,1 (C-6) e 116,7 (C-7) (Fig. 71). Essas correlações permitiram definir **3a** como sendo a estrutura da substância em análise, a qual foi nomeada de lathrophytona C, sendo este o primeiro relato de sua obtenção e, portanto, trata-se de uma substância inédita.

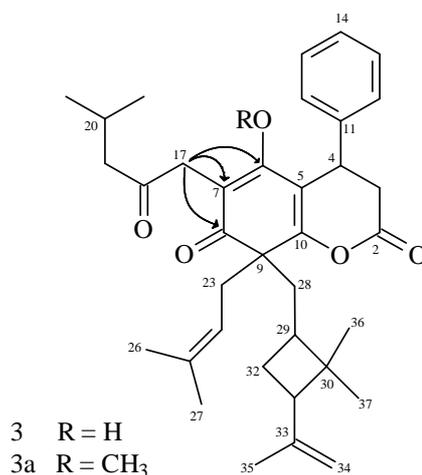


Figura 66: Correlações de *g*HMBC da estrutura da lathrophytona C.

A estereoquímica relativa de C-4, C-9, C-29 e C-31 da substância **3a** foi elucidada através do experimento de NOESY (Fig. 67).

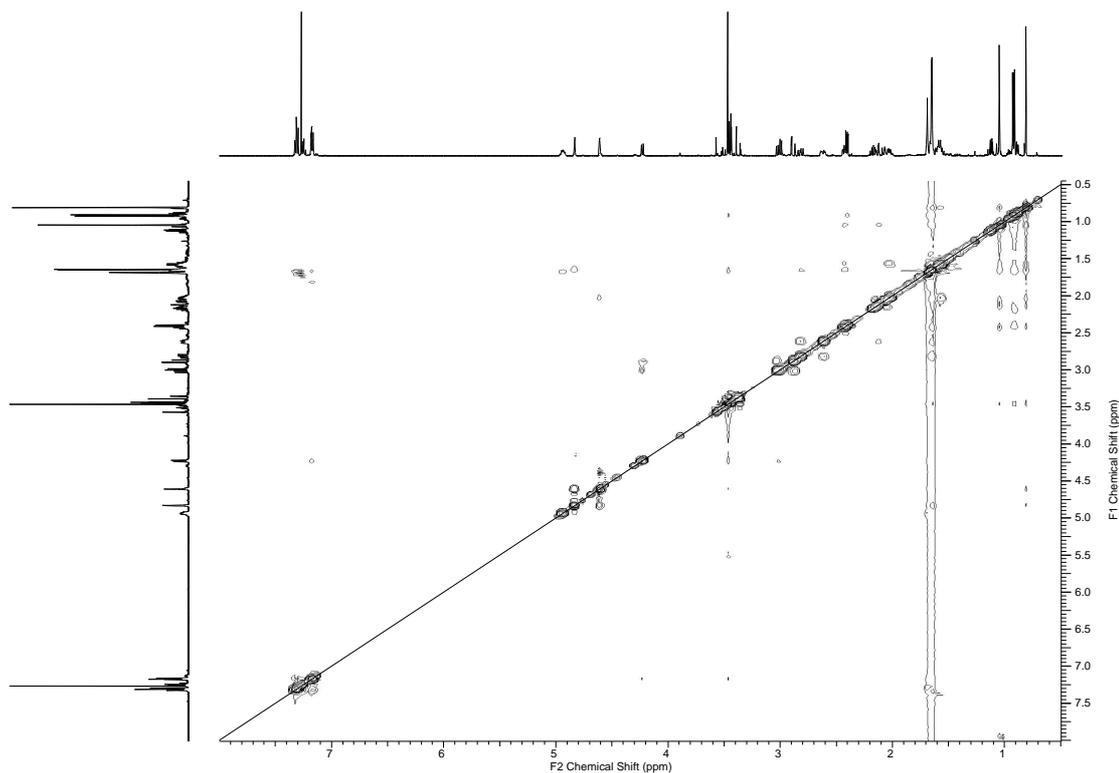


Figura 67: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl₃) da substância **3a**.

Este experimento mostrou correlação dos hidrogênios do anel aromático em δ 7,32 e 7,17 com 1,69 e 1,66; de δ 1,58 (H-29) com 0,81 (H-36) e 4,61 (H_a-34); de H-36 com H-35 (δ 1,65) e de δ 1,05 (H-37) com δ 2,44 (H-31). Assim, a configuração relativa da substância **3a** foi definida como mostrada na Fig. 68.

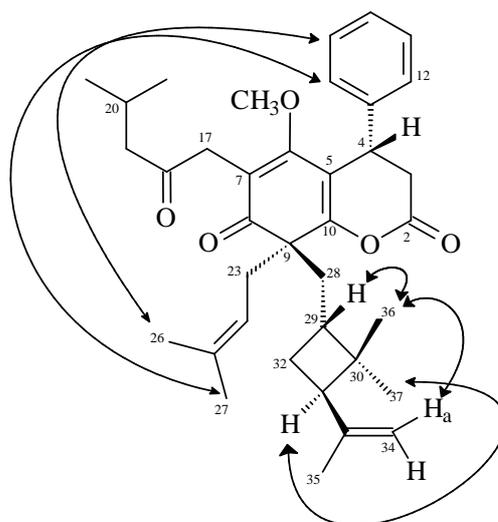


Figura 68: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância **3a**.

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC da substância **3a**.

Nº	Substância 3a		
	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
2		165,5 (C)	
3	2,89 (<i>dd</i> ; 1,5; 16,0) 3,02 (<i>dd</i> ; 8,0; 16,0)	37,1 (CH_2)	2, 4, 5, 11
4	4,23 (<i>dd</i> ; 1,5 8,0)	36,1 (CH)	2, 3, 5, 6, 10, 11, 12
5		111,6 (C)	
6		169,1 (C)	
7		116,7 (C)	
8		201,0 (C)	
9		56,0 (C)	
10		159,7 (C)	
11		140,6 (C)	
12, 16	7,17 (<i>m</i>)	126,6 (CH)	4
13, 15	7,32 (<i>m</i>)	129,2 (CH)	
14	7,25 (<i>m</i>)	127,6 (CH)	
17	3,37 (<i>d</i> ; 17,0) 3,45 (<i>d</i> ; 17,0)	38,3 (CH_2)	6, 7, 8, 18
18		207,3 (C)	
19	2,41 (<i>d</i> ; 7,0)	51,7 (CH_2)	18
20	2,21 – 2,13 (<i>m</i>)	24,5 (CH)	19, 21, 22
21	0,92 (<i>d</i> ; 6,8)	22,5 (CH_3)	19, 20, 22
22	0,91 (<i>d</i> ; 6,8)	22,5 (CH_3)	19, 20, 21
23	2,65 – 2,59 (<i>m</i>) 2,82 (<i>dd</i> ; 10,0; 13,5)	39,9 (CH_2)	8, 9, 10, 24, 28
24	4,98 – 4,91 (<i>m</i>)	118,3 (CH)	
25		135,4 (C)	
26	1,69 (<i>s</i>)	25,9 (CH_3)	24, 25, 27
27	1,66 (<i>s</i>)	17,9 (CH_3)	24, 25, 26
28	2,08 (<i>m</i>) 2,15 (<i>m</i>)	41,2 (CH_2)	8, 9, 10, 29, 30,32
29	1,59*	37,3 (CH)	
30		40,9 (C)	
31	2,44 (<i>dl</i> ; 7,5)	48,8 (CH)	29, 30, 32, 33, 34, 35
32	2,06 – 1,99 (<i>m</i>)	26,8 (CH_2)	
33		145,7 (C)	
34	4,83 (<i>s</i>) 4,61 (<i>s</i>)	108,9 (CH_2)	31, 35
35	1,65 (<i>s</i>)	23,8 (CH_3)	31, 33, 34
36	0,81 (<i>s</i>)	23,7 (CH_3)	29, 30, 31, 37
37	1,05 (<i>s</i>)	24,8 (CH_3)	29, 30, 31, 36
OCH_3	3,47 (<i>s</i>)	61,9 (CH_3)	6

l - largo; *Multiplicidade não observada

4.1.3 Determinação estrutural da substância 4a

A substância **4a** foi obtida como componente majoritário da fração C-7-15-C, obtida do extrato hexânico do caule de *K. lathrophyton* na forma de um óleo amarelo, viscoso, após reação de metilação e sua determinação estrutural foi feita após cuidadosa análise dos dados obtidos dos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMQC, gHMBC, gCOSY, NOESY e HR-ESI-TOF.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , indicaram que essa fração era constituída por uma mistura de pelo menos dois componentes com estruturas muito semelhantes, assim, foram selecionados os sinais de maior intensidade nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e atribuídos como sendo da substância **4a**.

O espectro de IV da fração C-7-15-C (Fig 69) apresentou muita semelhança com o espectro de IV da substância **3a**. A análise desse espectro revelou a presença de absorções fortes em 1659 e 1792 cm^{-1} , indicando a presença de carboníla conjugada e carboxila de lactona saturada (SHEN *et al.*, 2004), enquanto que as absorções em 698 e 759 cm^{-1} indicaram a presença de um anel aromático monossustituído na molécula.

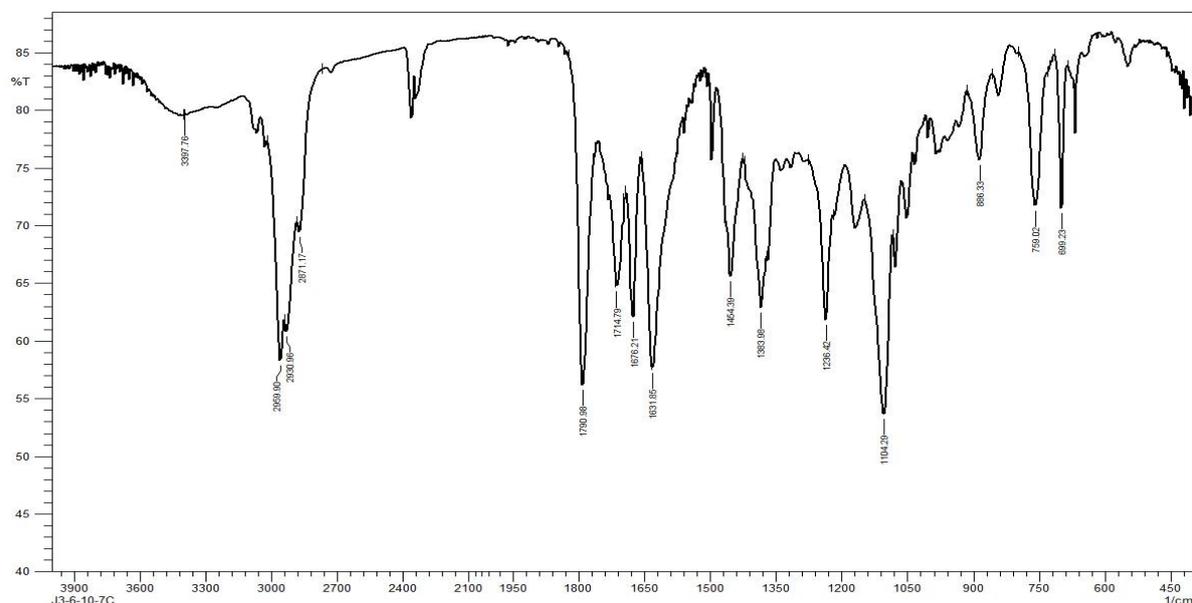


Figura 69: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da fração C-7-15-C.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Fig. 70) e DEPT 135 (sumarizado na Tab. 4) da fração C-7-15-C exibiram um conjunto de sinais correspondentes a

37 átomos de carbonos, dos quais oito eram referentes a carbonos metálicos, sete a carbonos metilênicos, sendo um do tipo sp^2 , dez a carbonos metínicos, sendo seis do tipo sp^2 e doze referentes a carbonos não-hidrogenados, dos quais dois foram atribuídos a carbonos carbonílicos e um a carbono carboxílico.

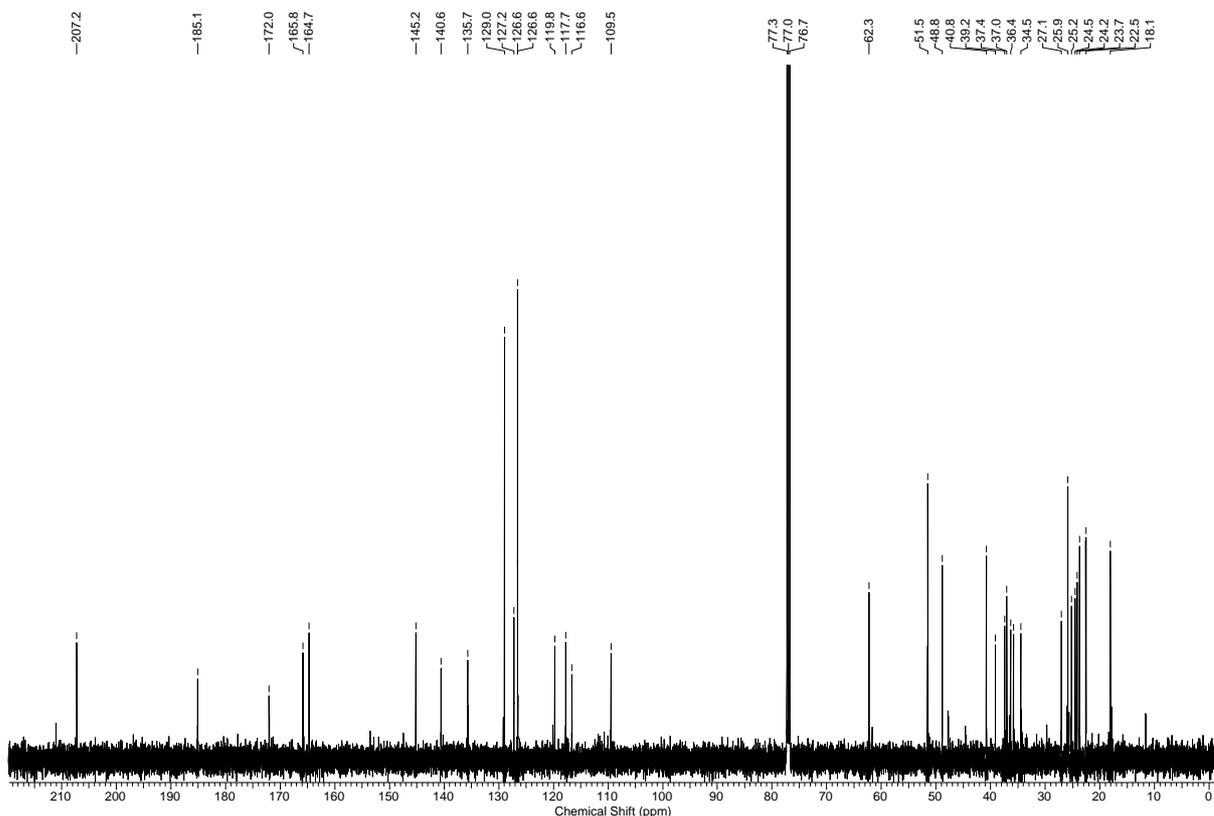


Figura 70: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração C-7-15-C.

O espectro de massas de alta resolução da fração C-7-15-C (Fig. 71), obtidos através da técnica de ionização por eletrospray (modo positivo), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em m/z 595,3392 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e a fórmula do componente majoritário presente nessa fração (substância **4a**) foi deduzida como sendo a mesma encontrada para a substância **3a** – $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5$ (calculada para $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Na}$: 595,3399), apresentando IDH igual a quatorze. Esses dados revelaram que as substâncias **3a** e **4a** eram isômeras. Desta forma, a determinação estrutural de **4a** foi feita tendo como parâmetro **3a**, devido à grande semelhança entre os dados desses compostos.

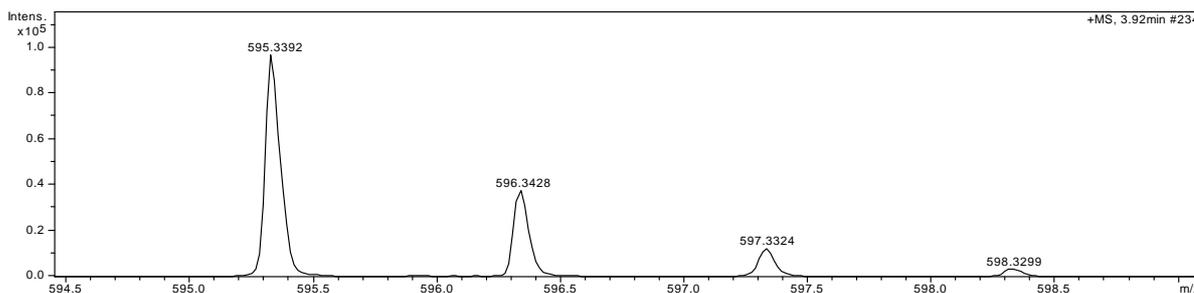


Figura 71: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da fração C-7-15-C.

O espectro de RMN ^1H da fração C-7-15-C (Fig. 72) apresentou sinais parecidos aos da substância **3a**. Na região de hidrogênios aromáticos, (δ 7,35 - 7,10) observou-se um conjunto de sinais que foi atribuído a cinco hidrogênios de anel aromático monossustituído corroborando assim com o espectro de IV. Na região entre δ 5,00 – 4,00 foram observados quatro sinais, com integração para um hidrogênio cada, sendo eles: um multipletto entre δ 4,87 – 4,80, dois simpletos em δ 4,85 e 4,63 e um duplo dupletto em δ 4,39 ($J = 5,0$ e $8,0$ Hz).

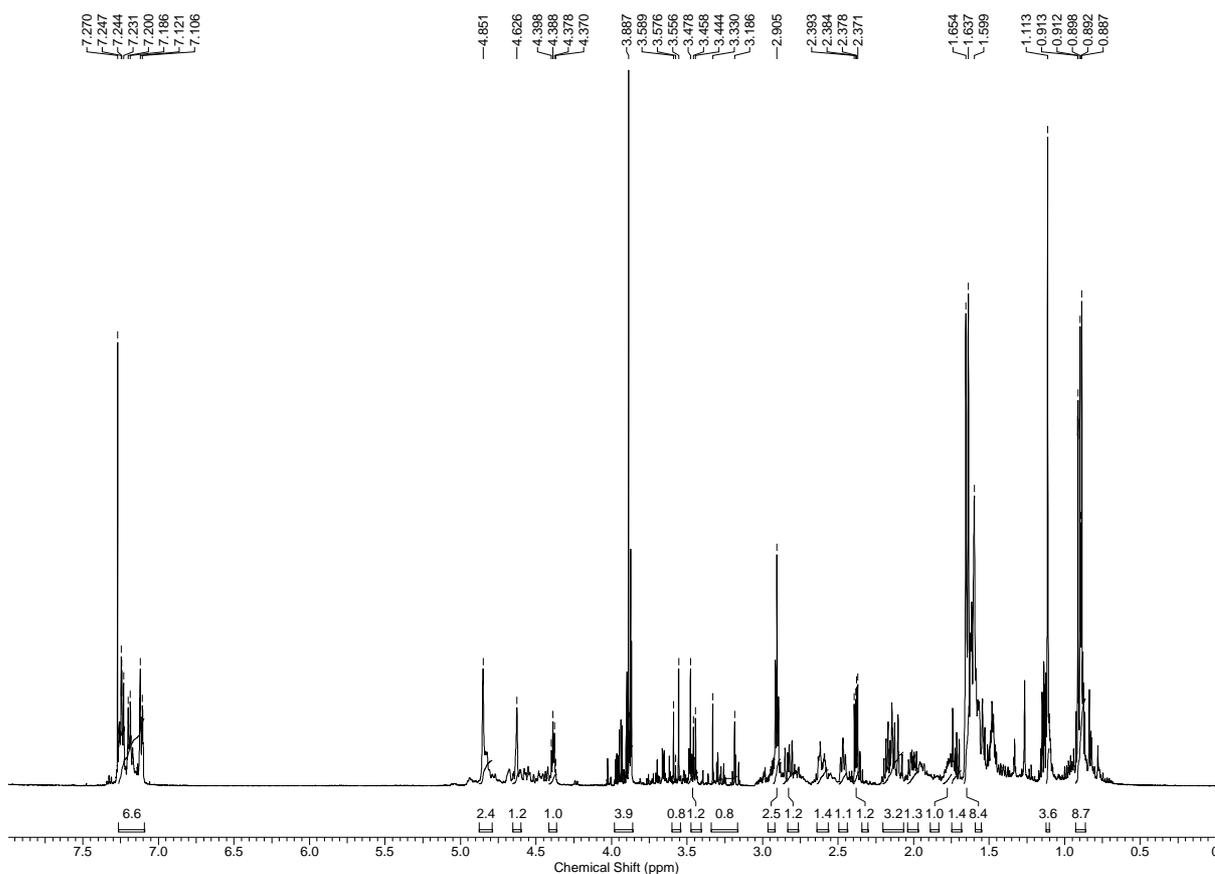


Figura 72: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da fração C-7-15-C.

No espectro da fração C-7-15-C também foram observados a presença de sete grupos metílicos em δ 1,65 (3H; s), 1,64 (3H; s), 1,60 (3H; s), 1,11 (3H; s), 0,89 (3H; s), 0,91 (3H; d; $J = 6,5$) e 0,90 (3H; d; $J = 6,5$) e um grupo metoxílico em δ 3,98 (3H; s). Vale ressaltar que os hidrogênios do grupo metoxílico em C-7-15-C apresentaram-se mais desprotegidos que os do grupo metoxílico da substância **3a**, com uma diferença de deslocamento químico de 0,51 ppm. Também foi observada a presença de dois dupletos em δ 3,57 (1H; $J = 16,5$ Hz) e δ 3,46 (1H; $J = 16,5$ Hz).

A Figura 73 mostra a ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90, do espectro de RMN ^1H da fração C-7-15-C, onde foi possível identificar dois tripletos em δ 2,91 (2H; $J = 5,0$ Hz) e δ 2,47 (1H; $J = 7,8$ Hz), dois duplos dupletos em δ 2,83 (1H; $J = 9,5; 14,5$ Hz), δ 2,38 (1H; $J = 4,5; 7,5$ Hz) e três multipletos entre δ 2,65 – 2,55 (1H), 2,21 – 2,07 (3H), e 2,04 – 1,97 (1H).

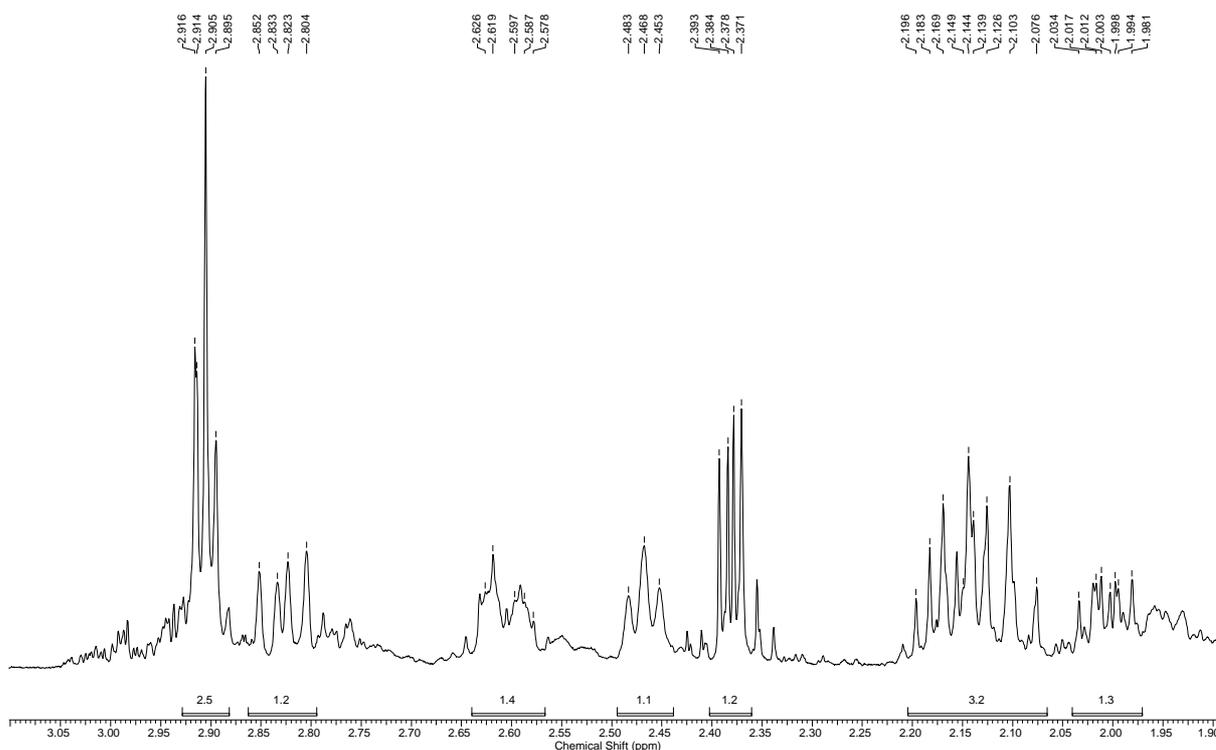


Figura 73: Ampliação da região entre δ 3,10 – 1,90 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração C-7-15-C.

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **3a** com os da substância **4a**, bem como com os dados obtidos dos experimentos 2D (Fig. 74 – 76) e o confronto destes com os dados da literatura, (RAMIANDRASOA *et al.*, 1983; RAVELONJATO *et al.*, 1987; COTTIGLIA *et al.*, 2004), permitiram identificar a presença de um esqueleto do tipo dihidroneoflavonoídico na estrutura da substância **4a** semelhante ao encontrado na substância **3a**.

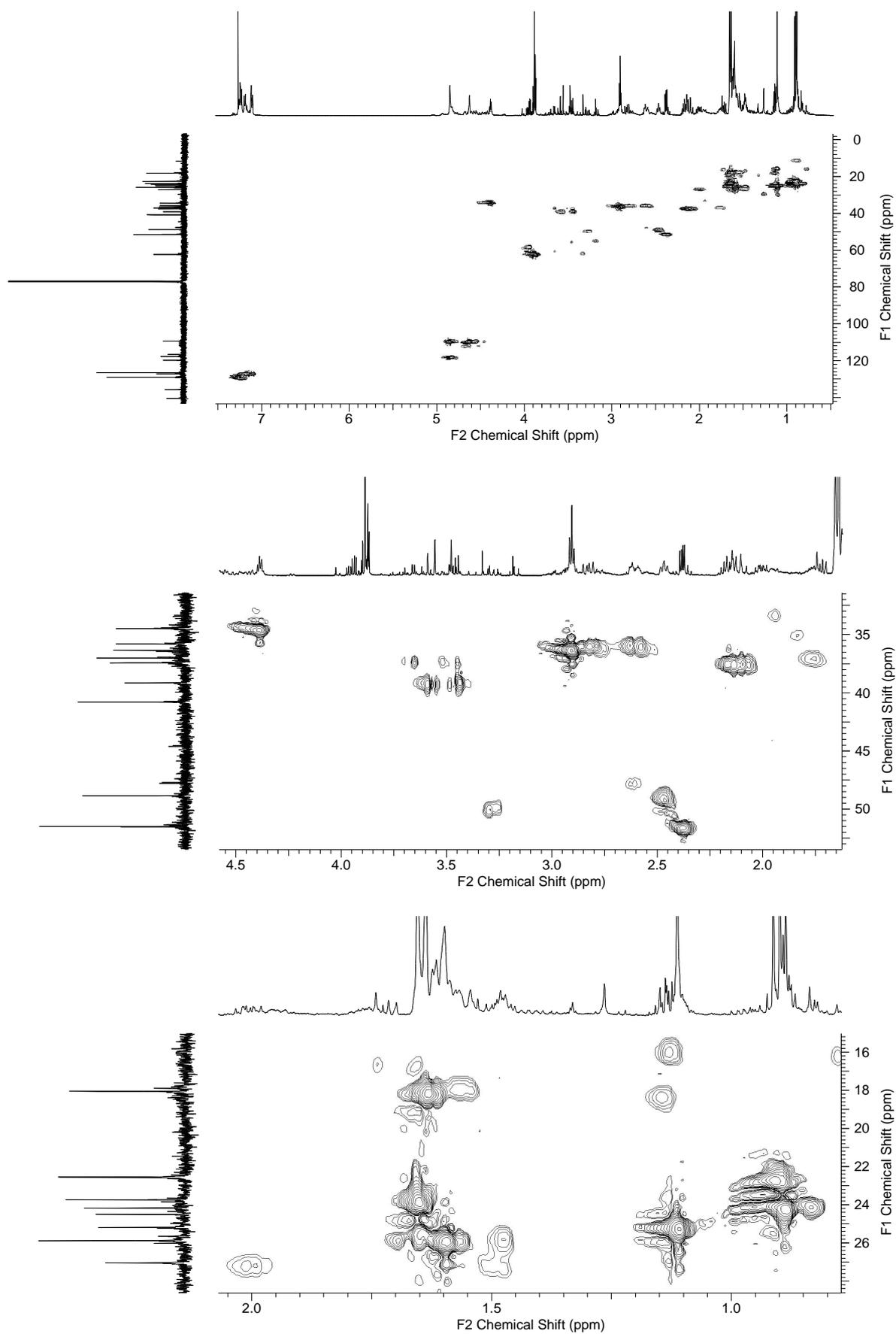


Figura 74: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl₃) da fração C-7-15-C.

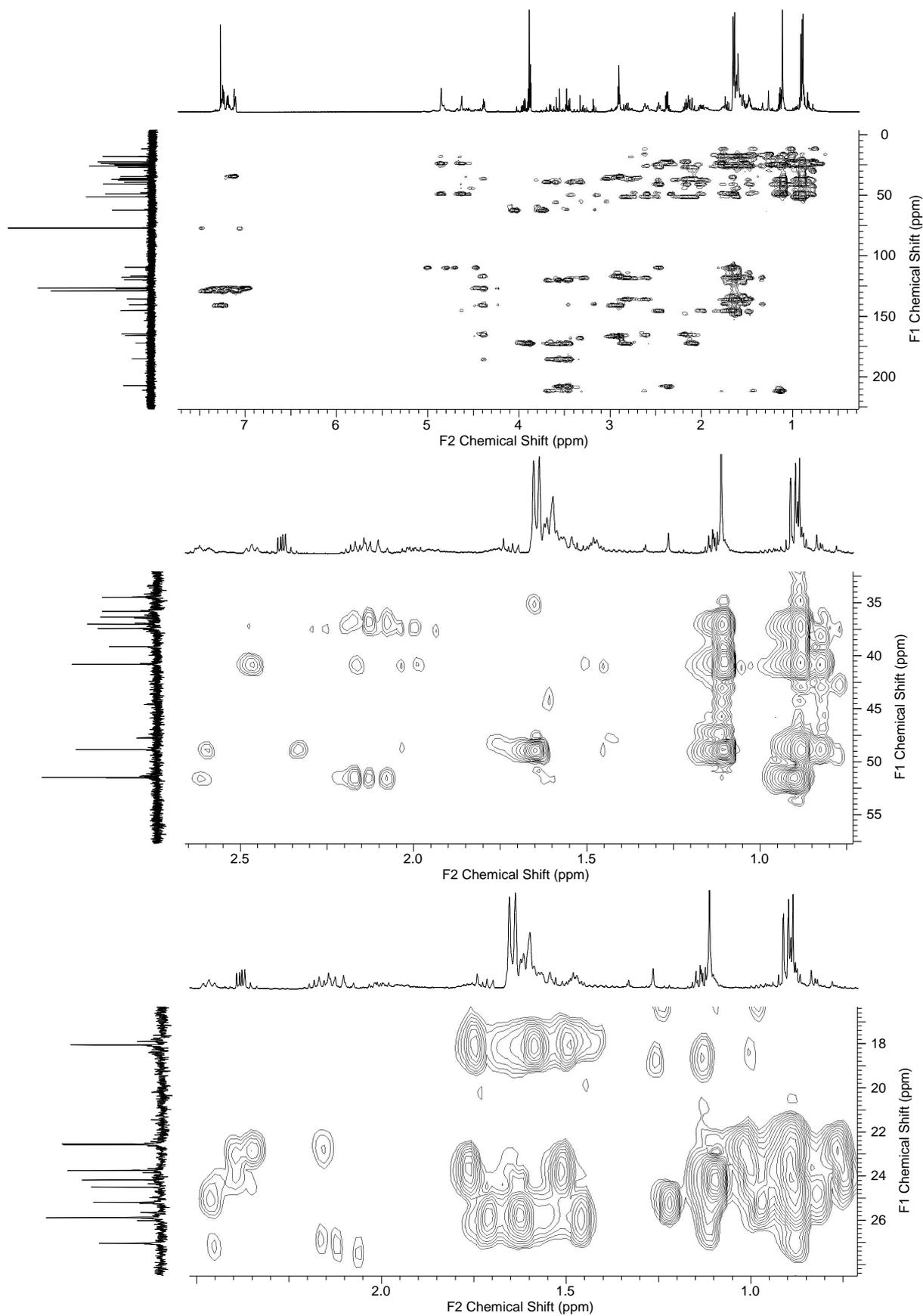


Figura 75: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da fração C-7-15-C.

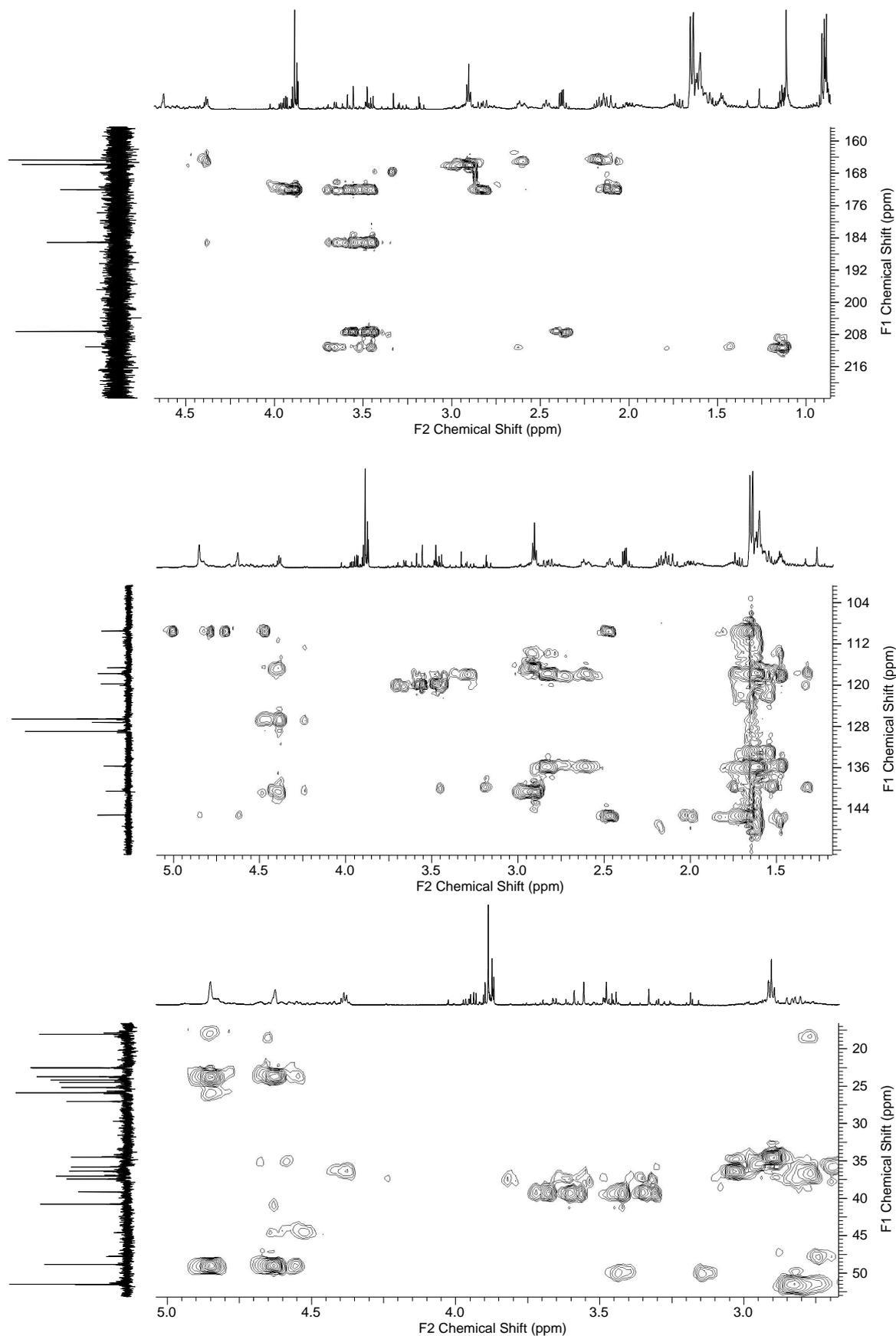


Figura 76: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da fração C-7-15-C.

O esqueleto do tipo dihidroneoflavonoídico foi caracterizado pela presença dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ 185,1 e 164,7 referentes a carbonos carbonílicos conjugado e de carbono carboxílico de lactona saturada, respectivamente, δ 172,0 e 165,8, atribuídos a carbonos vinílicos não hidrogenados ligados a oxigênio, δ 119,8, e 116,6 referentes a carbonos olefínicos não hidrogenados, δ 51,5, 36,4 e 34,5 relativos a carbonos quaternários, metilênico e metínico, respectivamente.

A presença de um grupo fenila monossustituído foi reforçada pela presença dos sinais de RMN de ^{13}C em δ 140,6 (C), 129,0 (2CH), 127,2 (CH) e 126,6 (2CH). Os sinais em δ 135,7 (C), 117,7 (CH), 35,8 (CH_2), 25,9 (CH_3) e 18,0 (CH_3), juntamente com os sinais de RMN ^1H referentes a duas metilas vinílicas em δ 1,64 e 1,60; dos hidrogênios metilênicos em δ 2,83 (*dd*; $J = 9,5$ e $14,5$, Hz) e δ 2,60 (m) e um hidrogênio vinílico em δ 4,83 (m), caracterizou a presença de um grupo prenílico na estrutura da substância **4a**.

A presença dos sinais de RMN ^{13}C em δ 145,2 (C), 109,5 (CH_2), 48,8 (CH), 37,4 (CH_2), 40,8 (C), 37,0 (CH), 27,0 (CH_2), 25,2 (CH_3), 24,2 (CH_3) e 23,7 (CH_3); dos sinais de RMN ^1H relativos a dois prótons vinílicos em δ 4,85 (s) e 4,63 (s); quatro hidrogênios referentes a dois grupos metilênicos em δ 2,21 – 2,07 (2H; *m*) e 2,04 – 1,97 (2H; *m*); dois hidrogênios metínicos em δ 2,47 (1H; *t*; $J = 7,8$ Hz) e δ 1,77 (m) e dos três grupos metílicos em δ 1,65 (s), 1,11 (s) e 0,89 (s), bem como as correlações observadas no experimento de gHMBC (mostradas na Tabela 4), permitiram identificar o grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico.

O grupo 4-metilpentan-2-ona também foi identificado na estrutura da substância **4a**. Sua presença foi identificada através das correlações observadas no experimento de gHMBC entre os sinais atribuídos a hidrogênios metílicos em δ 0,91 (*d*; $J = 6,5$ Hz) e δ 0,90 (*d*; $J = 6,5$ Hz) com os sinais δ 24,5 (CH) e 51,5 (CH_2) e também através das correlações entre o sinal δ 2,21 – 2,07 (1H; *m*) com δ 22,5 (CH_3), 22,6 (CH_3) e com 51,5; de δ 2,38 com δ 24,5 e 207,2 (C); dos sinais δ 3,57 (1H; *d*; $J = 16,5$ Hz) e δ 3,46 (1H; *d*; $J = 16,5$ Hz) com δ 207,2, conforme exibido na Fig 77.

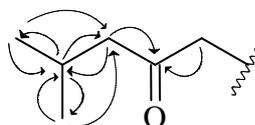


Figura 77: Correlações de gHMBC (→) do grupo 4-metilpentan-2-ona presente na substância **4a**.

Assim como na substância **3a**, o grupo 4-metilpentan-2-ona foi posicionado em C-7, em virtude das correlações observadas entre os sinais δ 3,57 (H_a -17) e 3,46 (H_b -17) com os sinais δ 119,8 (C-7) e 185,1 (C-6). A fenila foi posicionada em C-4 (δ 34,5) devido às correlações de δ 4,39 (H-4) com δ 140,6 e 126,6 e de δ 7,11 (H-12 e H-16) com δ 34,5. A prenila e o grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico foram posicionados em C-9 (δ 51,5) em virtude das correlações observadas deste sinal com δ 2,83 (H_a -23), 2,61 (H_b -23), 2,13 (H_a -28) e com δ 2,11 (H_b -28) – Fig. 78.

Além disso, foi observado também correlação do sinal δ 3,89 com δ 172,0. Ao contrário da substância **3a**, H-4 mostrou correlação com o sinal δ 185,1, atribuído a um carbono carbonílico α,β -insaturado e, assim foi proposto que C-6, tratava-se de uma carbonila e não de um éter como em **3a** (Fig. 78). Essas correlações permitiram definir **4a** com sendo a estrutura do composto majoritário da fração C-7-15-C, denominado de lathrophytona D. Este é o primeiro relato da obtenção dessa substância, sendo, portanto, inédita.

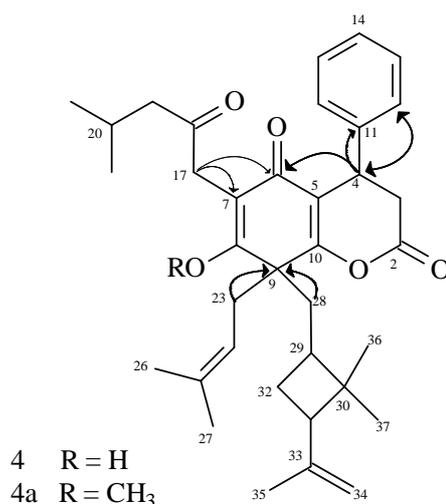


Figura 78: Correlações de gHMBC (H \rightarrow C) da estrutura da substância **4a**.

O experimento de NOESY da fração C-7-15-C (Fig. 79) não foi tão conclusivo quanto a estereoquímica relativa de C-29 e C-31, devido à sobreposição de muitos sinais, uma vez que tratava-se de uma mistura. Mas, foi possível inferir quanto à estereoquímica de C-4 e C-9.

Semelhante ao observado no experimento de NOESY da substância **3a** foi constatada correlação de NOE dos hidrogênios do anel aromático (δ 7,24 e 7,11) com os hidrogênios metílicos do grupo prenilico: δ 1,64 e δ 1,60. Esses dados permitiram definir a estereoquímica relativa de C-4 e C-9 como definido na Fig. 80.

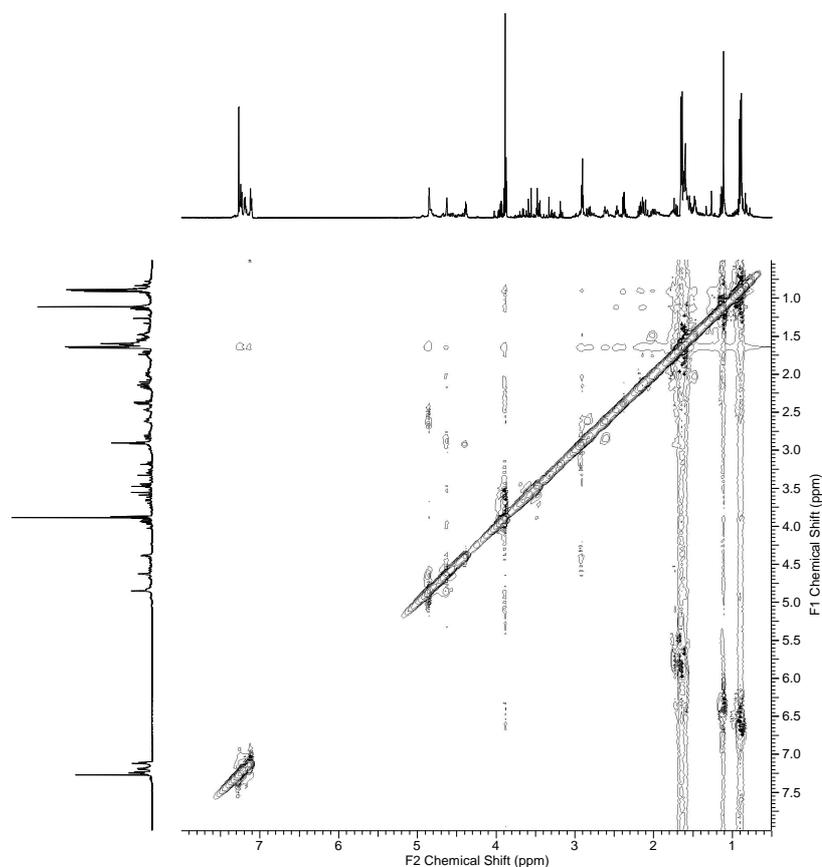


Figura 79: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl_3) da fração C-7-15-C.

A substância **3a** apresentou $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 101$ (c 2,3, CHCl_3), valor muito próximo ao encontrado para a mistura contida na fração C-7-15-C – $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 102$ (c 1,82, CHCl_3). Além disso, os deslocamentos químicos dos grupos 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico e prenílicos também foram muito próximos, o que permite concluir que as substâncias **3a** e **4a** têm a mesma estereoquímica relativa.

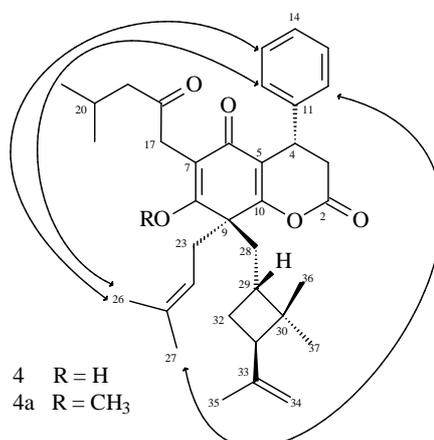


Figura 80: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância **4a**.

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMBC, gHMBC, da substância **4a**.

Nº	Substância 4a		
	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
2		164,7 (C)	
3	2,91 (<i>t</i> ; 5,0)	36,4 (CH_2)	2, 4, 5
4	4,39 (<i>t</i> ; 5,0)	34,5 (CH)	2, 3, 5, 6, 10, 11,
5		116,6 (C)	
6		185,1 (C)	
7		119,8 (C)	
8		172,0 (C)	
9		51,5 (C)	
10		165,8 (C)	
11		140,6 (C)	
12, 16	7,11 (<i>m</i>)	126,6 (CH)	
13, 15	7,24 (<i>m</i>)	129,0 (CH)	
14	7,19 (<i>m</i>)	127,2 (CH)	
17	3,37 (<i>d</i> ; 16,5) 3,45 (<i>d</i> ; 16,5)	39,2 (CH_2)	6, 7, 18
18		207,2 (C)	
19	2,38 (<i>d</i> ; 7,5)	51,5 (CH_2)	18
20	2,21 – 2,07 (<i>m</i>)	24,5 (CH)	19, 21, 22
21	0,91 (<i>d</i> ; 6,8)	22,6 (CH_3)	19, 20, 22
22	0,90 (<i>d</i> ; 6,8)	22,5 (CH_3)	19, 20, 21
23	2,65 -2,55 (<i>m</i>) 2,83 (<i>dd</i> ; 9,5; 14,5)	35,8 (CH_2)	9, 24
24	4,87 – 4,80 (<i>m</i>)	117,7 (CH)	
25		135,7 (C)	
26	1,60 (<i>s</i>)	25,9 (CH_3)	24, 25, 27
27	1,64 (<i>s</i>)	18,0 (CH_3)	24, 25, 26
28	2,11 (<i>m</i>) 2,13 (<i>m</i>)	37,4 (CH_2)	9, 29, 30, 32
29	1,77*	37,0 (CH)	
30		40,8 (C)	
31	2,47 (<i>tl</i> ; 7,8)	48,8 (CH)	29, 30, 32, 33, 34, 36, 37
32	2,04 – 1,99 (<i>m</i>)	27,0 (CH_2)	
33		145,2 (C)	
34	4,85 (<i>s</i>) 4,63 (<i>s</i>)	109,5 (CH_2)	31, 33, 35
35	1,65 (<i>s</i>)	23,8 (CH_3)	31, 33, 34
36	0,89 (<i>s</i>)	24,2 (CH_3)	29, 30, 31, 37
37	1,11(<i>s</i>)	25,2 (CH_3)	29, 30, 31, 36
OCH_3	3,89 (<i>s</i>)	62,3 (CH_3)	8

l - largo; *multiplicidade não observada

4.1.4 Determinação estruturação da substância 5a

A substância **5a** foi isolada do extrato hexânico de *K. lathrophyton*, na forma de um óleo amarelo, viscoso, opticamente ativo $\{[\alpha]_D^{20} + 68 (c 0,35, \text{CHCl}_3)\}$, após reação de metilação e sua estrutura foi estabelecida com base nos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMBC, gHMBC, NOESY e espectrometria de massas de alta resolução.

A análise do espectro de infravermelho (Fig. 81) revelou a presença de absorções em 703 e 757 cm^{-1} , atribuídas à deformação fora do plano da ligação C-H de anel aromático monossustituído bem como, de absorção de carboxilas de éster e carbonila de cetona conjugada em 1734 e 1677 cm^{-1} respectivamente.

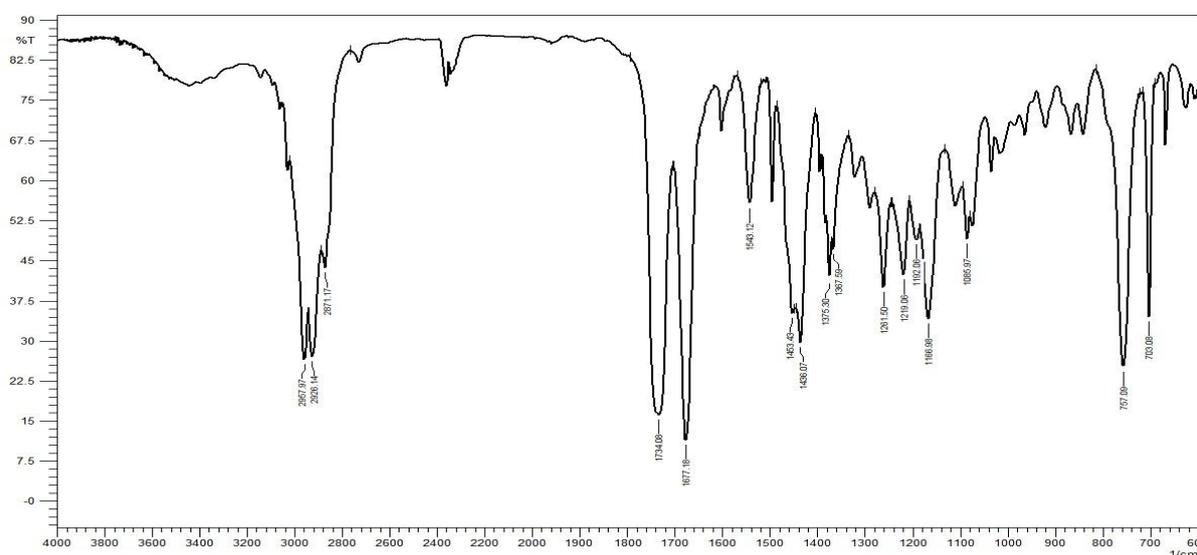


Figura 81: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da substância **5a**.

O espectro de RMN ^1H (Fig. 82) exibiu, na região de hidrogênios de sistema aromático, um simpleto largo, mais desblindado, em δ 7,70 (2H) e um conjunto de sinais entre δ 7,30 – 7,22 (3H), caracterizando a presença de um anel aromático monossustituído.

A presença de outro simpleto em δ 7,38 (1H) foi sugestiva de um hidrogênio de uma olefina trissustituída de um anel furânico, semelhante ao encontrado no ácido lathrophytóico B – também isolado de *K. lathrophyton* (DE ALMEIDA *et al.*, 2011).

Foram observados também, um simpleto em δ 3,46 (3H), atribuído a um grupo metoxílico, cinco duplos dupletos em: δ 4,52 (1H; *dd*; $J = 2,1$ e $11,0$ Hz), δ 2,45 (1H; *dd*; $J = 6,7$ e $14,0$ Hz), δ 2,43 (1H; *dd*; $J = 11,0$ e $14,6$ Hz), δ 2,12 (1H; *dd*; $J = 6,1$ e $14,3$ Hz) e δ 1,96 (1H; *dd*; $J = 3,1$ e $14,3$ Hz), um duplo duplete em δ 2,61 (1H; *dd*; $J = 6,7$ e $14,0$ Hz), um duplete largo em δ 2,22 (1H; $J = 14,6$ Hz), um multiplete entre δ 2,60 – 2,55 (2H), um noneto

em δ 1,89 (1H; $J = 6,7$ Hz) (Fig. 83), além de dois dupletos e dois simpletos em: δ 0,93 (3H; $J = 6,7$ Hz), δ 0,88 (3H, $J = 6,7$ Hz), δ 1,15 (3H) e δ 0,61 (3H), respectivamente.

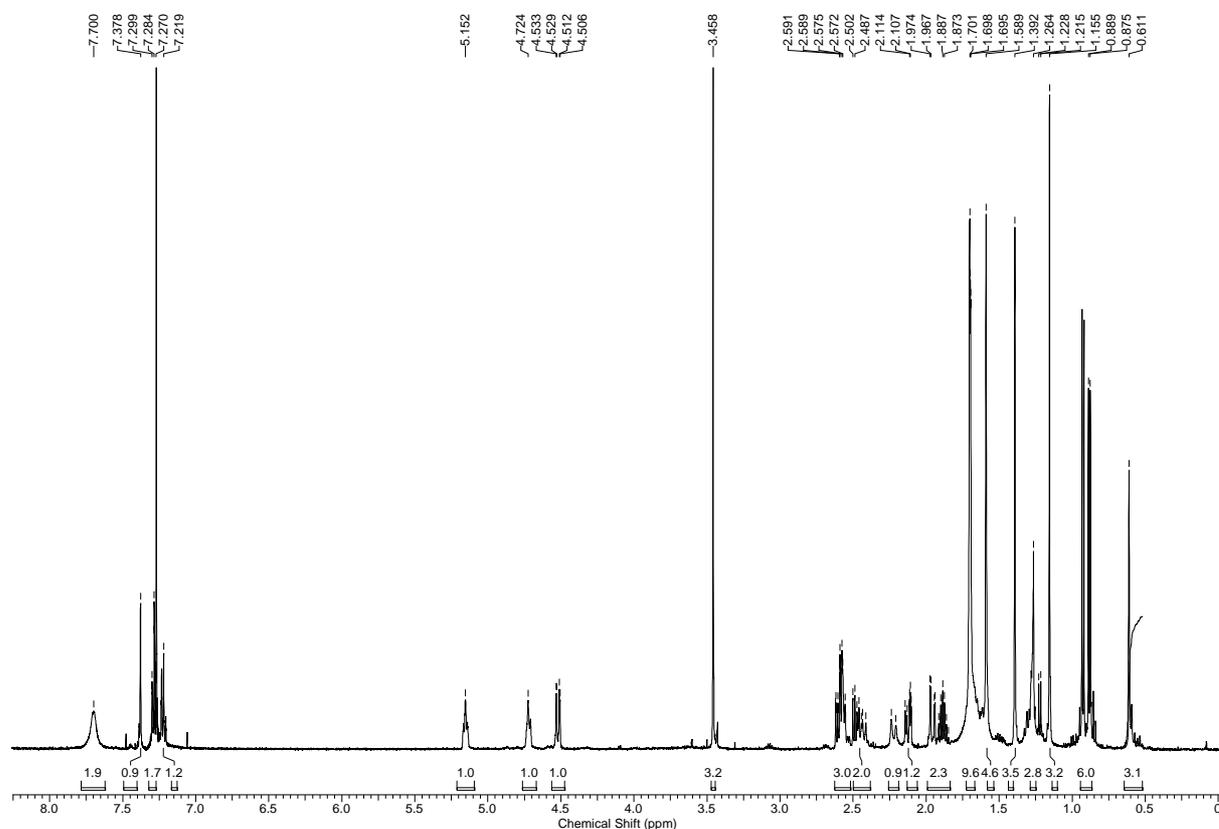


Figura 82: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **5a**.

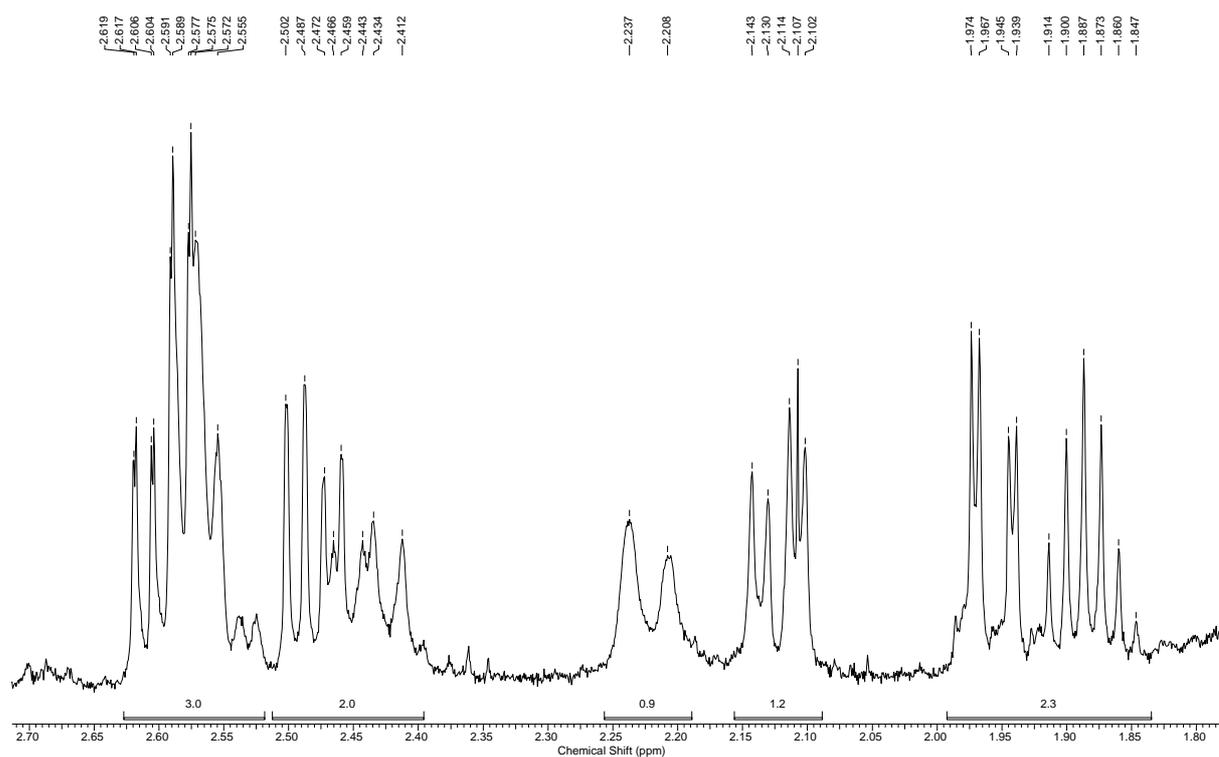


Figura 83: Ampliação (2,70 – 1,75 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **5a**.

A presença de dois multipletos atribuídos a dois hidrogênios olefínicos entre δ 5,20 – 5,10 e 4,75 – 4,70, juntamente com a existência de quatro simpletos, integrando para três hidrogênios cada um, em δ 1,71, 1,70, 1,59 e 1,39, característicos de quatro grupos metílicos ligados a carbono olefínico, indicaram a presença de duas duplas olefínicas trissubstituídas.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 84) e DEPT 135 (Tab. 5) indicaram a presença de nove carbonos metílicos, cinco carbonos metilênicos, onze carbonos metínicos, dos quais, oito do tipo sp^2 sendo cinco deles referentes a anel aromático monossustituído, e doze carbonos não-hidrogenados, sendo dois deles referentes a carbonos carbonílicos e um a carbono carboxílico, totalizando 37 carbonos e quarenta e oito hidrogênios.

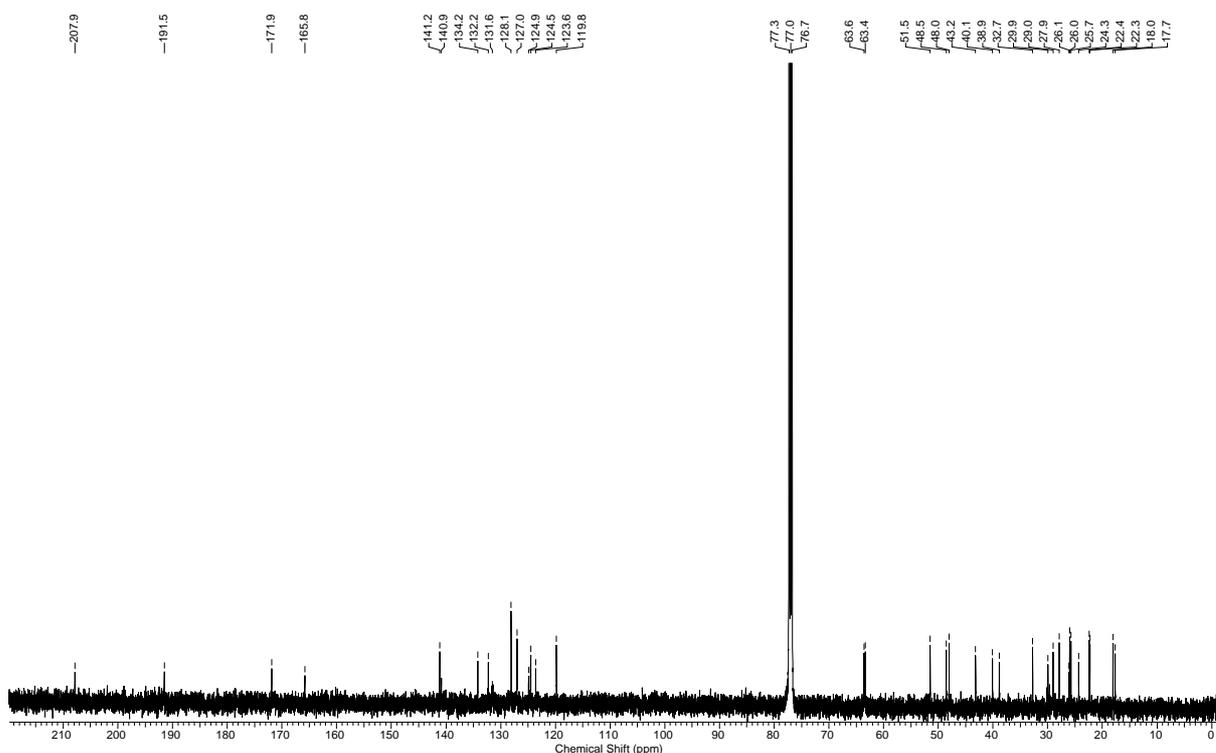


Figura 84: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **5a**.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 85) obtido através da técnica de ionização por electrospray (modo positivo), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em 595,3409 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calculada para $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Na}$: 595,3399) e, assim, foi deduzida a fórmula molecular como sendo $(\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5)$, apresentando IDH igual a quatorze.

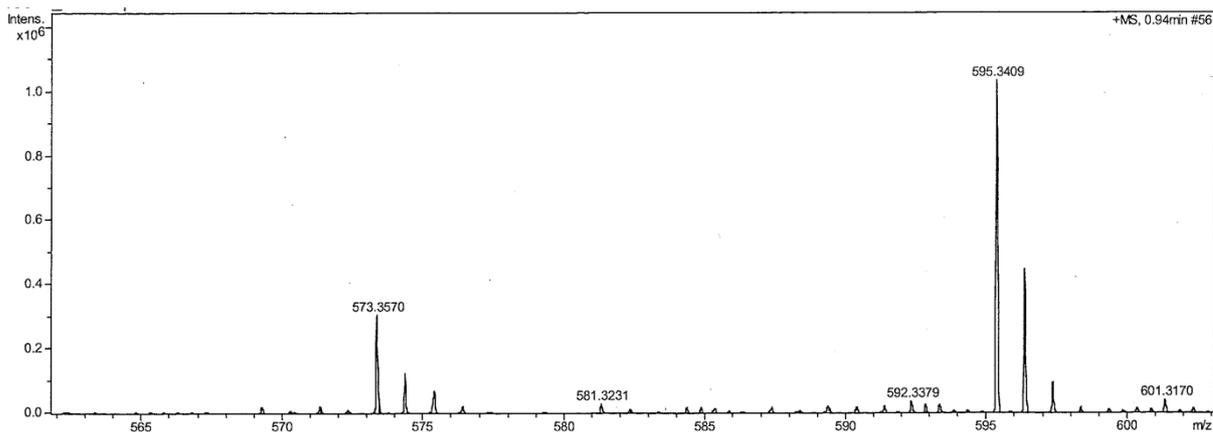


Figura 85: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **5a**.

A análise dos dados do experimento de gHMQC (Figuras 86 e 87, sumarizado na Tabela 5) permitiu estabelecer as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos enquanto que as correlações observadas no experimento de gHMBC (Fig. 88 e 89) permitiram estabelecer as correlações a duas e três ligações entre carbonos e hidrogênios, sendo fundamental na determinação estrutural da substância **5a**.

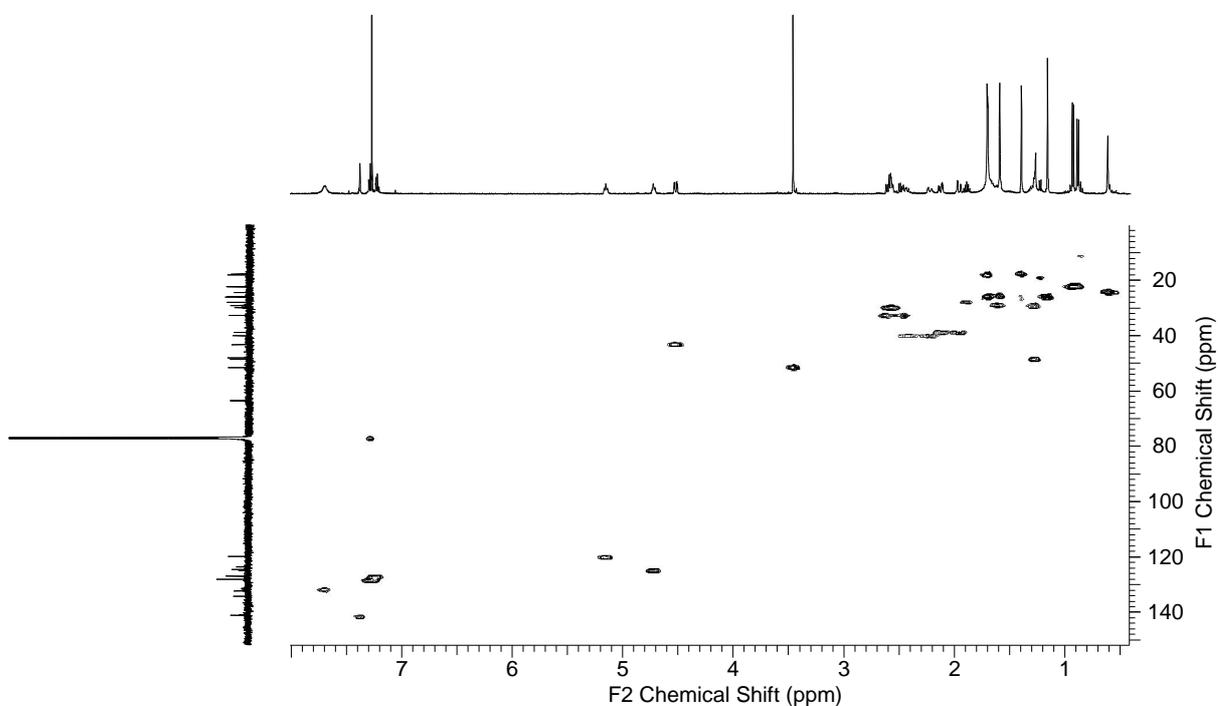


Figura 86: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl₃) da substância **5a**.

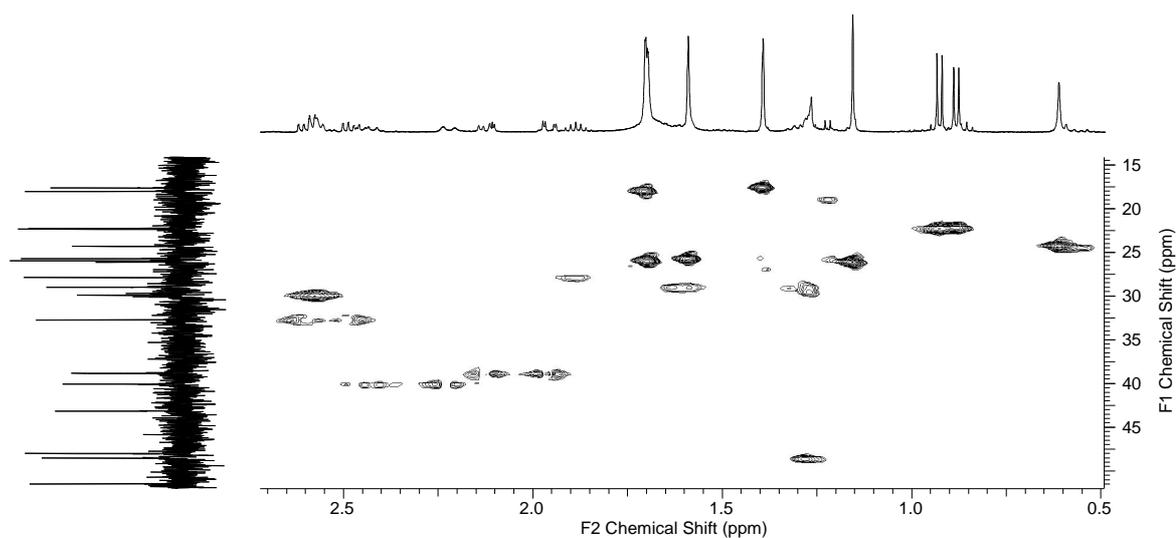


Figura 87: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl_3) da substância 5a.

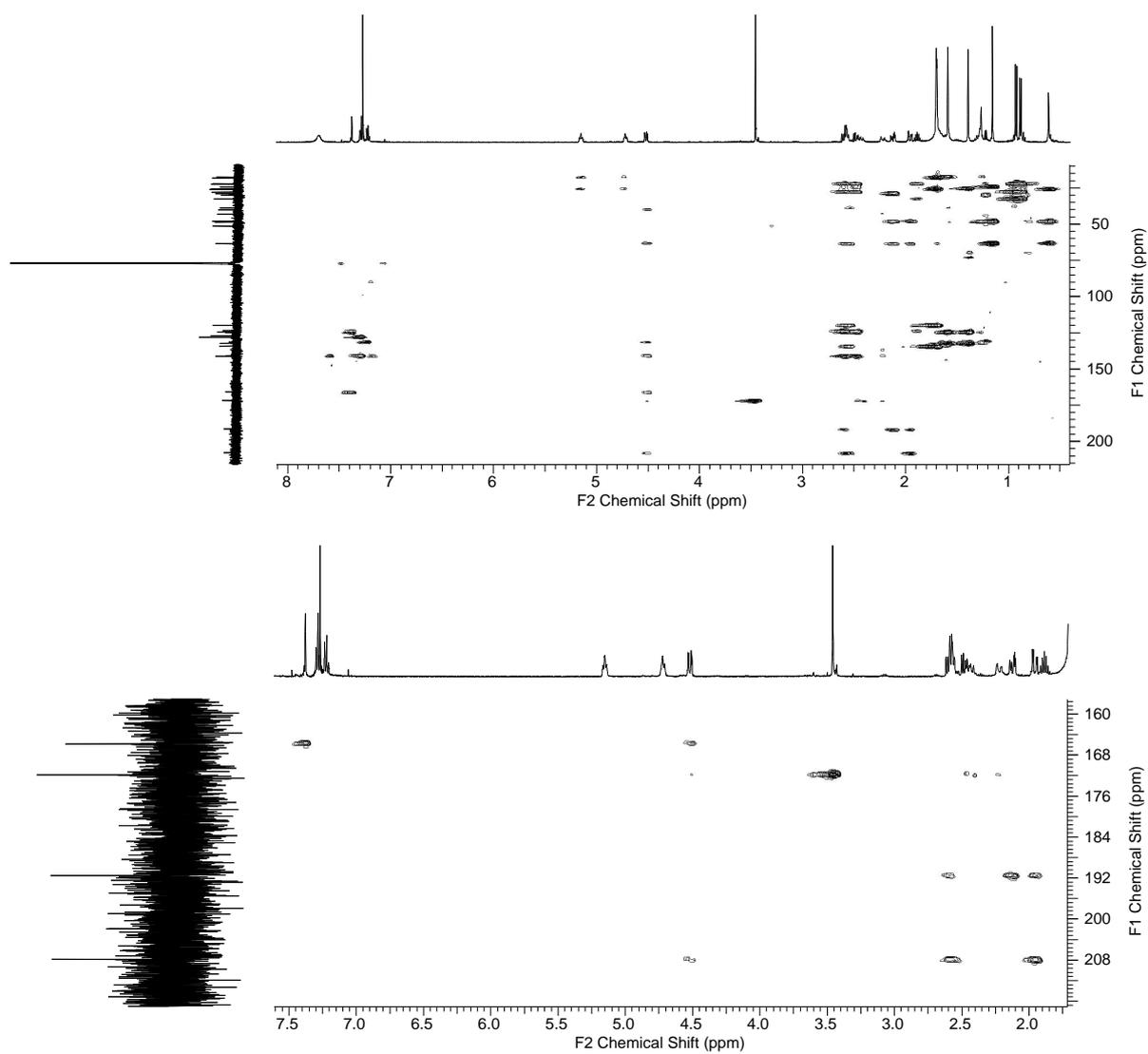


Figura 88: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 5a

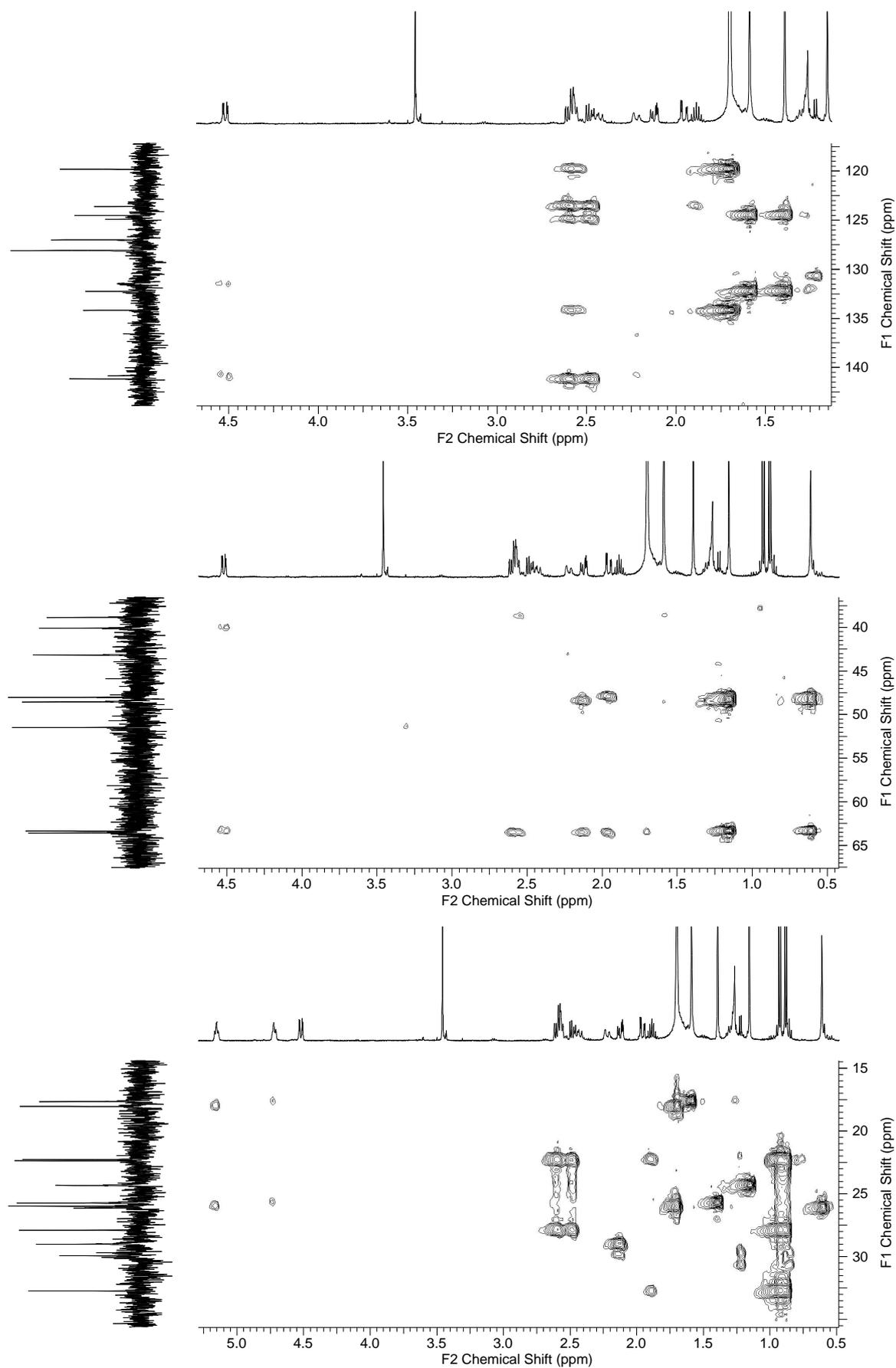


Figura 89: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **5a**

A presença dos sinais de RMN ^{13}C em: δ 18,0, 17,7, 25,7 e 26,0, atribuídos a quatro grupos metílicos vinílicos, dos sinais em δ 119,8, 124,5, 132,2 e 134,2 – atribuídos a carbonos olefínicos – além dos sinais relativos aos carbonos metilênicos em δ 29,9 e 29,0 sugeriram a presença de dois grupos 3-metil-2-butenílico (duas unidades prenilicas) na molécula. As correlações que permitiram confirmar a presença dos grupos prenilicos foram: δ 1,39 com 132,2, 124,5 e 25,7; δ 1,59 com δ 132,2, 124,5 e 17,7; δ 4,72 com 25,7 e 17,7; δ 5,15 com 18,0 e 26,0; δ 1,71 com 119,8, 134,1 e 26,0; 1,70 com 119,8, 134,1 e 18,0 (Fig. 92).

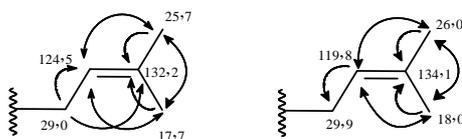


Figura 92: Correlações de gHMBC que permitiram deduzir a fórmula estrutural das prenilas.

Esses grupos prenilicos foram posicionados em C-5 (δ 63,6) e C-7 (δ 48,5) devido às correlações observadas no experimento de gHMBC do sinal δ 2,57 com 191,5 (C-4) e 207,9 (C-9); de δ 1,96 (1H; *dd*; $J = 3,1$ e $14,3$ Hz) e δ 2,12 (1H; *dd*; $J = 6,1$ e $14,3$ Hz) com δ 29,9 e 29,1 e de δ 1,61 com C-7 conforme a Fig. 93.

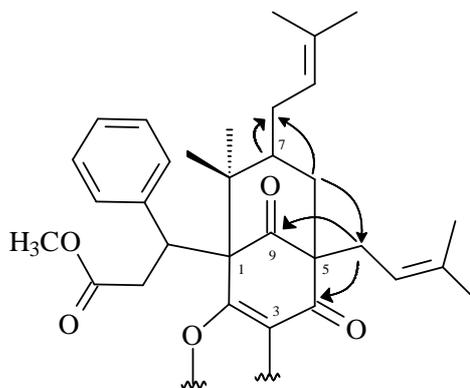


Figura 93: Correlações de gHMBC que permitiram posicionar as prenilas nos carbonos C-5 e C-7.

O sinal em δ 7,38 (*s*) mostrou correlação com os sinais δ 165,8 (C-2) 124,9 (C-3) e 123,6 (C). Essas correlações permitiram inferir que o anel furânico trissubstituído estava condensado com o anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano conforme estrutura do fragmento B (Fig. 94).

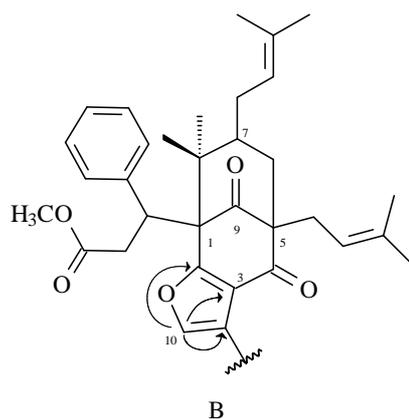


Figura 94: Correlações de gHMBC que permitiram definir o a fórmula estrutural parcial da substancia **5a**.

As correlações observadas entre δ 1,89 (1H; *noneto*; $J = 6,7$ Hz) com δ 123,6, 32,7 (CH₂), 22,4 (CH₃) e 22,3 (CH₃); de δ 0,92 (3H; *d*; $J = 6,7$ Hz) com δ 27,9 e 32,7; de δ 0,88 (3H; *d*; $J = 6,7$ Hz) com δ 32,7, 27,9 e 22,4 e dos sinais δ 2,45 (1H; *dd*; $J = 6,7; 14,0$) e δ 2,63 (1H; *dd*; $J = 6,7; 14,0$) com 123,6 e 141,2 (CH), permitiram deduzir a presença de um grupo isobutílico ligado ao anel furânico. assim foi possível definir 5a como sendo a estrutura da substância em análise (fig. 95).

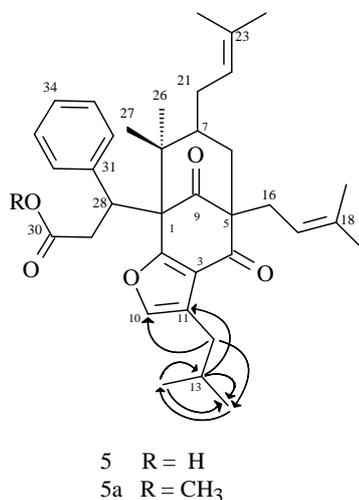


Figura 95: Fórmula estrutural da substancia **5a** isolada de *K. lathrophyton*.

A substância (**5a**) foi obtida de uma fração que sofreu reação de metilação com diazometano, assim, (**5**) deve ser a provável estrutura da substância presente na fração bruta obtida do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton*. Este derivado do floroglucinol é inédito, visto ser este o primeiro relato de sua obtenção, aqui denominado de ácido lathrophytóico D.

Vale salientar também, que (**5**) difere do ácido lathrophytólico B, também isolado de *K. lathrophyton* por De Almeida e colaboradores (2011), apenas pela presença do carbono metilênico (C-12) conforme estrutura exibida na Fig. 96.

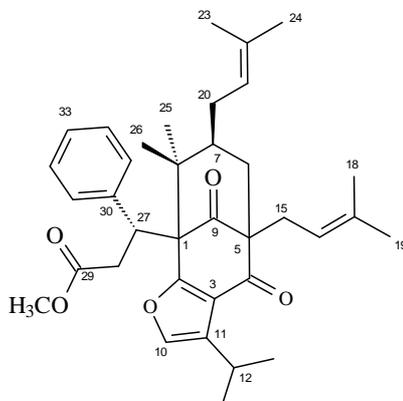


Figura 96: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido lathrophytólico B isolado de *K. lathrophyton*.

Segundo Piccinelli e colaboradores (2005), o valor do deslocamento químico de C-7 igual a 48,5 ppm sugere que o anel ciclo-hexanona formado pelos carbonos C-1, C-8, C-7, C-6, C-5 e C-9 (anel B) adota a conformação em bote e que o substituinte em C-7 (prenila) assume a orientação pseudo axial. Essas informações foram corroboradas pelo experimento de NOESY (Fig. 97). Este forneceu informações valiosas quanto à estereoquímica relativa desse carbono, bem como de C-28.

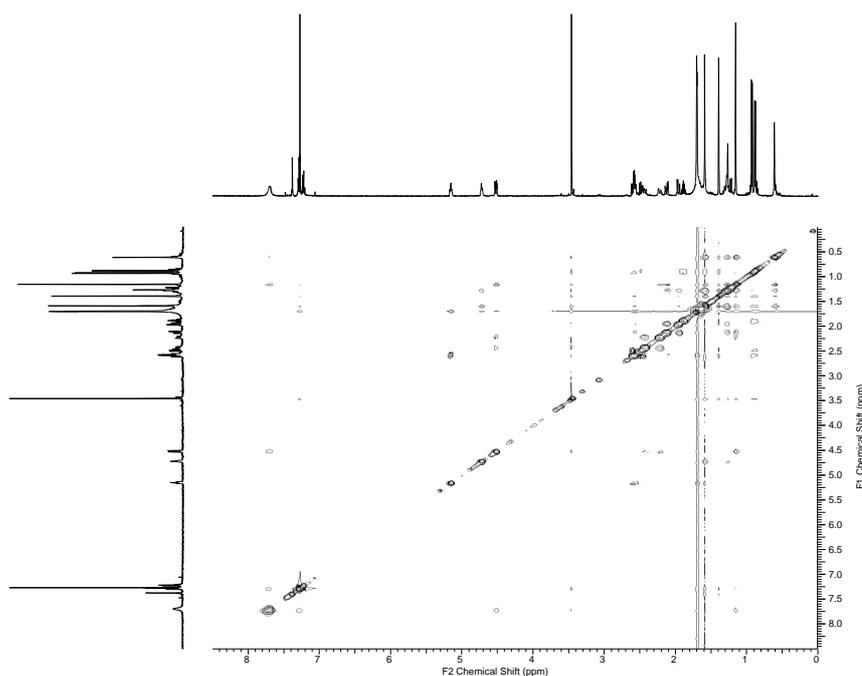


Figura 97: Correlações de H – H observadas no experimento de NOESY (CDCl₃) da substância **5a**.

Foram observadas correlação de δ 1,15 (H-27) com δ 2,12 (H_b-6) e δ 4,52 (H-28) e de δ 1,59 com δ 1,70 e δ 1,71, sugerindo que a molécula tem a configuração exibida na Fig. 98. O anel B adota a conformação bote para minimizar as repulsões 1,3-diaxial com C-2 e C-4 que o grupo prenílico em axial teria se estivesse na conformação em cadeira (CRUZ e TEIXEIRA, 2005).

Devido ao impedimento estérico, o grupo 3-fenilpropanoato de metila não pode girar livremente e assume uma conformação em que o anel fenila está muito próximo do grupo metílico H-26, o que justifica a alta proteção destes hidrogênios (0,61 ppm) e H-28 está no plano do anel furânico.

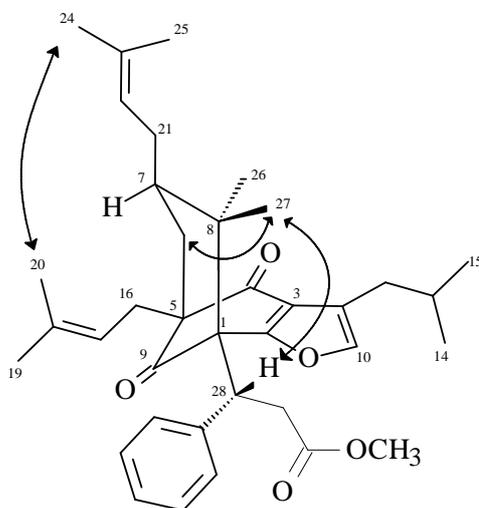


Figura 98: Correlações selecionadas de NOESY e estereoquímica relativa da substância **5a**.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC da substância **5a**.

Nº	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		63,4 (C)	
2		165,8 (C)	
3		124,9 (C)	
4		191,5 (C)	
5		63,6 (C)	
6	1,96 (<i>dd</i> ; 14,3; 3,1) 2,12 (<i>dd</i> ; 14,3; 6,1)	38,8 (CH_2)	4, 5, 7, 8, 9, 16, 21
7	1,28**	48,5 (CH)	
8		48,0 (C)	
9		207,9 (C)	
10	7,38; (<i>s</i>)	141,2 (CH)	2, 3, 11
11		123,6 (C)	
12	2,45 (<i>dd</i> ; 14,0; 6,7) 2,61 (<i>dd</i> ; 14,0; 6,7)	32,7 (CH_2)	10, 11, 13, 14, 15
13	1,89 (<i>non</i> ; 6,7)	27,9 (CH)	11, 12, 14, 15
14	0,93 (<i>d</i> ; 6,7)	22,4 (CH_3)	12, 13, 15
15	0,88 (<i>d</i> ; 6,7)	22,3 (CH_3)	12, 13, 14
16	2,60 – 2,55 (<i>m</i>)	29,9 (CH_2)	4, 5, 9
17	5,20 – 5,10 (<i>m</i>)	119,8 (CH)	19, 20
18		134,2 (C)	
19	1,70*; (<i>s</i>)	26,0* (CH_3)	17, 18, 20
20	1,71*; (<i>s</i>)	18,0 (CH_3)	17, 18, 19
21	1,61**	29,0 (CH_2)	7,
22	4,75 – 4,70; (<i>m</i>)	124,5 (CH)	21, 24, 15
23		132,2 (C)	
24	1,59; (<i>s</i>)	25,7* (CH_3)	22, 23, 25
25	1,39; (<i>s</i>)	17,7 (CH_3)	22, 23, 24
26	0,61; (<i>s</i>)	24,3 (CH_3)	1, 7, 8, 26
27	1,15 (<i>s</i>)	26,1* (CH_3)	1, 7, 8, 27
28	4,52; (<i>dd</i> ; 2,1; 11,0)	43,2 (CH)	1, 2, 29,30, 31, 32
29	2,22 (<i>dl</i> ; 14,6) 2,43 (<i>dd</i> ; 11,0; 14,6)	40,1 (CH_2)	1, 28, 30, 31
30		171,9 (C)	
31		140,9 (C)	
32	7,70 (<i>sl</i>)	131,6 (CH)	
33	7,30 – 7,27 (<i>m</i>)	128,1 (CH)	
34	7,25 – 7,20 (<i>m</i>)	127,0 (CH)	
35	7,30 – 7,27 (<i>m</i>)	128,1 (CH)	
36	7,70 (<i>sl</i>)	131,6 (CH)	
OCH_3	3,46 (<i>s</i>)	51,5 (CH_3)	30

*sinais podem estar trocados **multiplicidade não observada

4.1.5 Determinação estrutural das substâncias 6a e 7a

As substâncias **6a** e **7a** foram obtidas do extrato hexânico de *K. lathrophyton* na forma de um óleo amarelo, viscoso, como uma mistura, na qual encontravam-se na proporção de aproximadamente 2:1. Suas estruturas foram determinadas após análise dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMQC, gHMBC, gCOSY e HR-ESI-TOF.

A análise do espectro de infravermelho (Fig 99) revelou a presença de absorções fortes em 1739 e 1720 cm^{-1} indicando a presença de carbonílas, enquanto que as absorções em 704 e 754 cm^{-1} indicaram a presença de um anel aromático monossustituído.

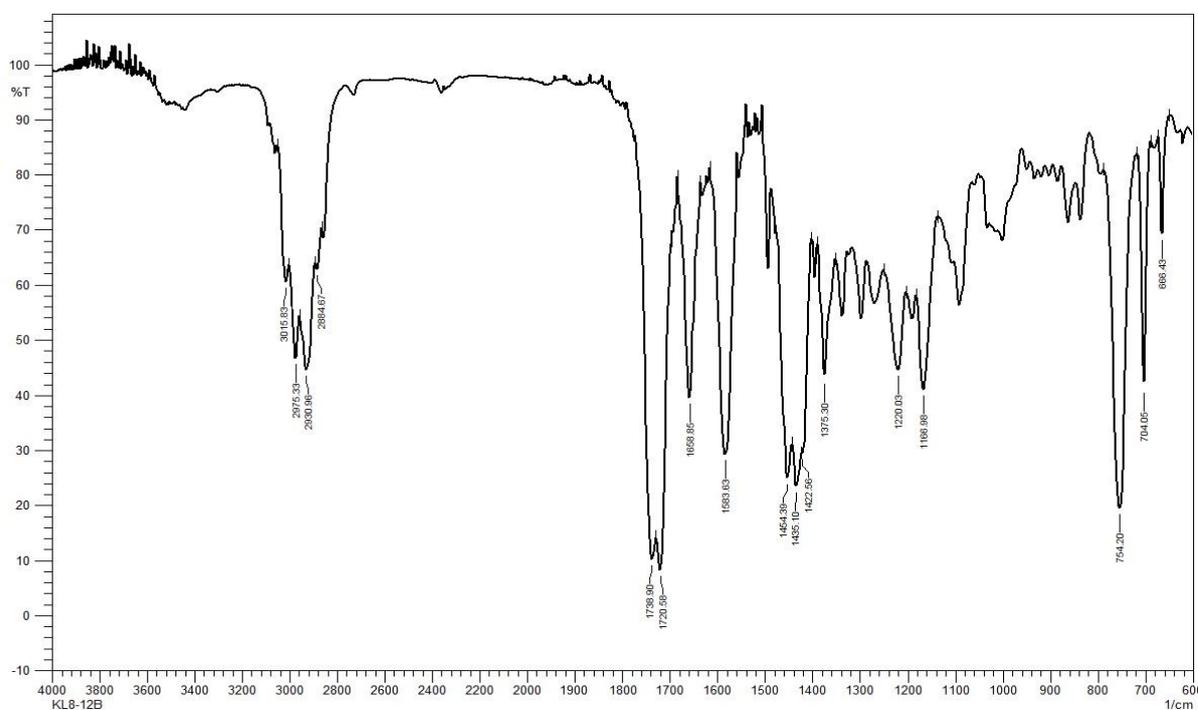


Figura 99: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da mistura das substâncias **6a** e **7a**.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 100) e DEPT 135 (Tab. 6) revelaram a presença de alguns sinais duplicados, na sua maioria, com variação de deslocamento químico ($\Delta\delta$) menor que 1 ppm e apresentando quase que a mesma intensidade, destacando-se, entretanto, poucos sinais que estavam com uma intensidade ligeiramente maior. Esse fato sugeriu que se tratava de duas substâncias com estruturas muito semelhantes, provavelmente isômeras.

O de HR-ESI-TOF (modo positivo) (Figura 101), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em 575,3400 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

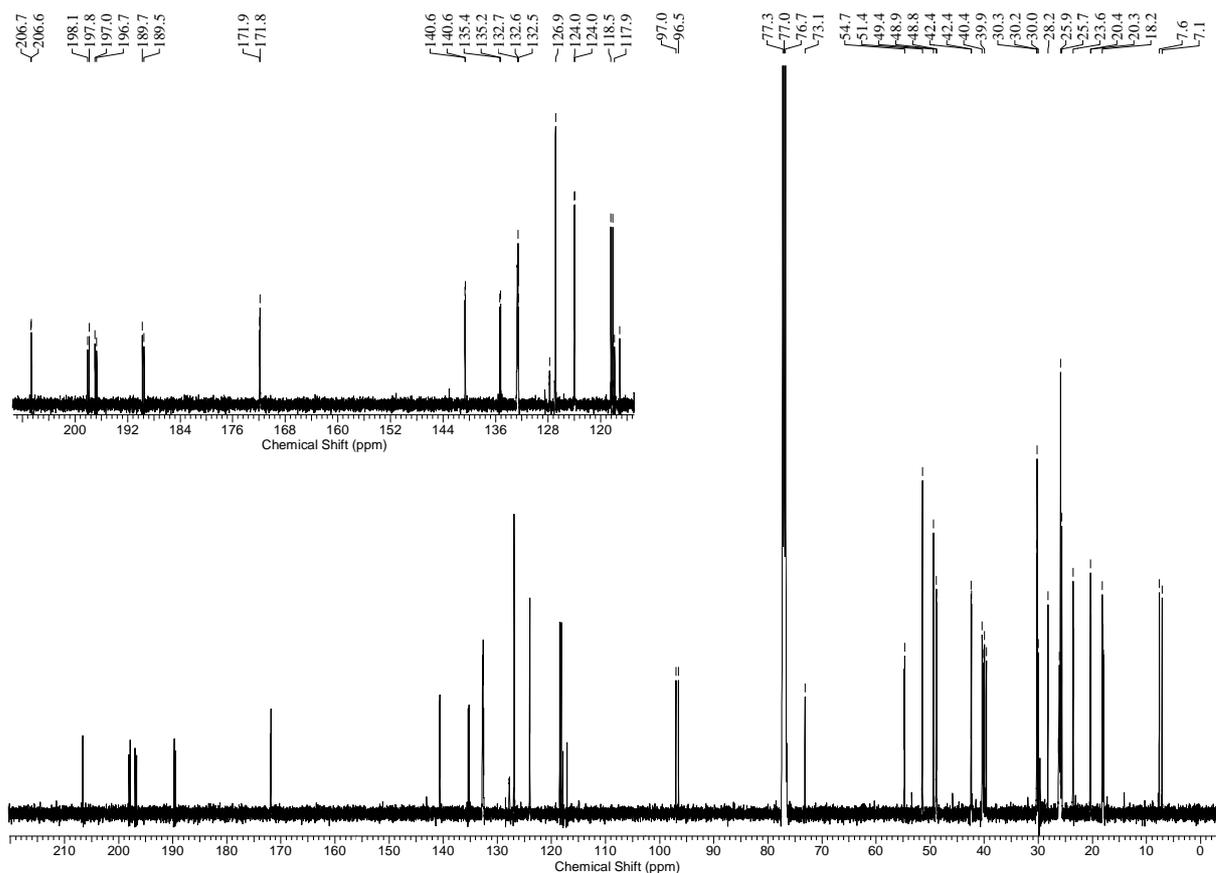


Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias **6a** e **7a**.

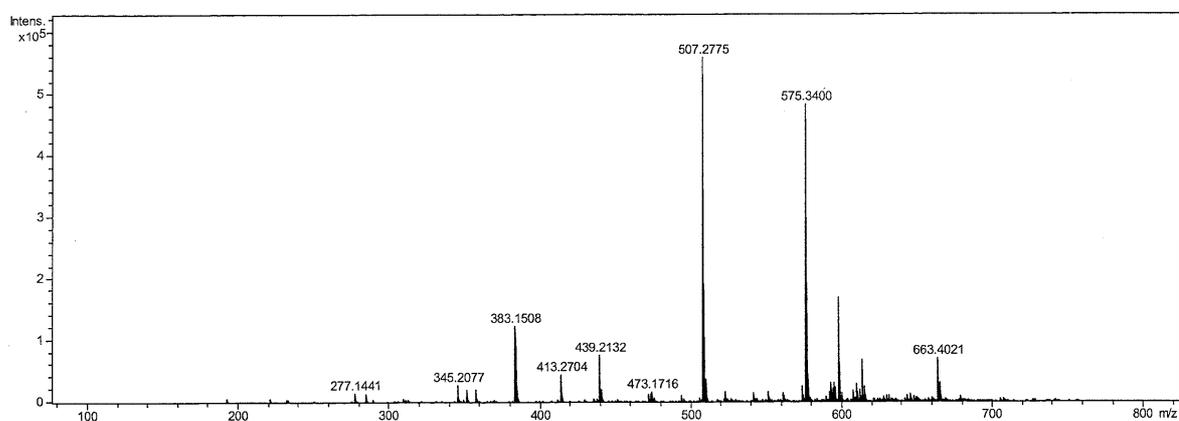


Figura 101: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da mistura das substâncias **6a** e **7a**.

Como alguns sinais no espectro de RMN de ^{13}C estavam duplicados, na determinação estrutural das substâncias **6a** e **7a**, foram relacionados, inicialmente, os sinais que apresentaram maior intensidade como sendo da substância **6a**, os de menor intensidade como sendo da substância **7a** e os que não estavam duplicados como pertencentes às duas substâncias. Assim, foi possível identificar a presença de nove carbonos metálicos, cinco carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos, dos quais, sete do tipo sp^2 e treze carbonos não-hidrogenados, sendo quatro deles referentes a carbonos carbonílicos e outros cinco do

tipo sp^2 , totalizando 36 carbonos e quarenta e seis hidrogênios para cada substância. Desta forma, foi deduzida a fórmula molecular das substâncias **6a** e **7a** como sendo $C_{36}H_{46}O_6$ (calculada para $C_{36}H_{47}O_6$: 575,3373), apresentando IDH igual a quatorze.

Assim como observado no experimento de RMN de ^{13}C , no qual muitos dos sinais estavam duplicados, esse fenômeno também foi verificado no espectro de RMN de 1H (Fig. 102). Este espectro exibiu, na região de hidrogênios aromáticos, (δ 7,26 – 7,16) um conjunto de sinais que foi atribuído a anel aromático monossustituído. Além disso, foram observados dois multipletos entre δ 5,16 – 5,05 e 4,90 – 4,80 (atribuídos a hidrogênios olefínicos) e um duplo duplete em δ 4,31 ($J = 2,7$ e $10,8$ Hz), este último sinal, sua integração foi referenciada para dois hidrogênios – uma vez que os dados evidenciavam que a amostra em análise era uma mistura de isômeros.

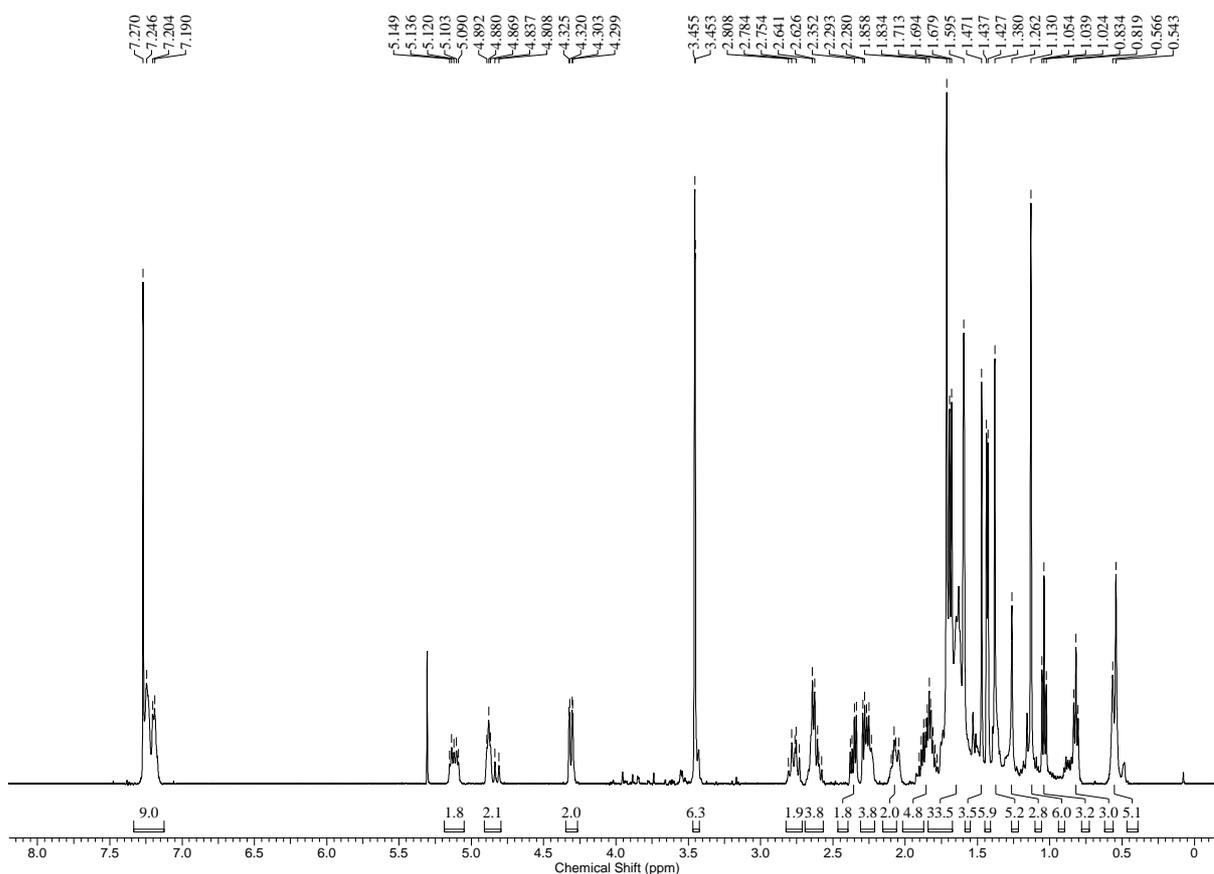


Figura 102: Espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) da mistura das substâncias **6a** e **7a**.

A presença dos hidrogênios olefínicos juntamente com a existência dos simpletos, em δ 1,71 (6H), 1,69 (3H), 1,68 (3H), 1,59 (6H) e 1,44 (3H) e 1,43 (3H), foram sugestivos da presença de grupos metílicos vinílicos, indicando a presença de duplas olefínicas trissubstituídas. Já a existência de mais dois duplos dupletos em δ 2,75 (2H; $J = 10,8$ e $15,4$

Hz) e δ 2,06 (2H; $J = 2,7$ e 15,4 Hz) (conforme ampliação da Fig. 103), um simpleto largo em δ 3,45 (6H), característico de dois grupos metoxílicos, além do duplo duplete em δ 4,31 e de sinais dois anéis aromáticos monossobstituídos, sugeriu que ambas as substâncias tinham, cada uma, dois grupos prenílicos e um grupo 3-fenilpropanoato de metila, dada a presença desses substituintes na estrutura dos ácidos lathrophytólicos A, B, C e D e a semelhança entre os dados de RMN de ^1H .

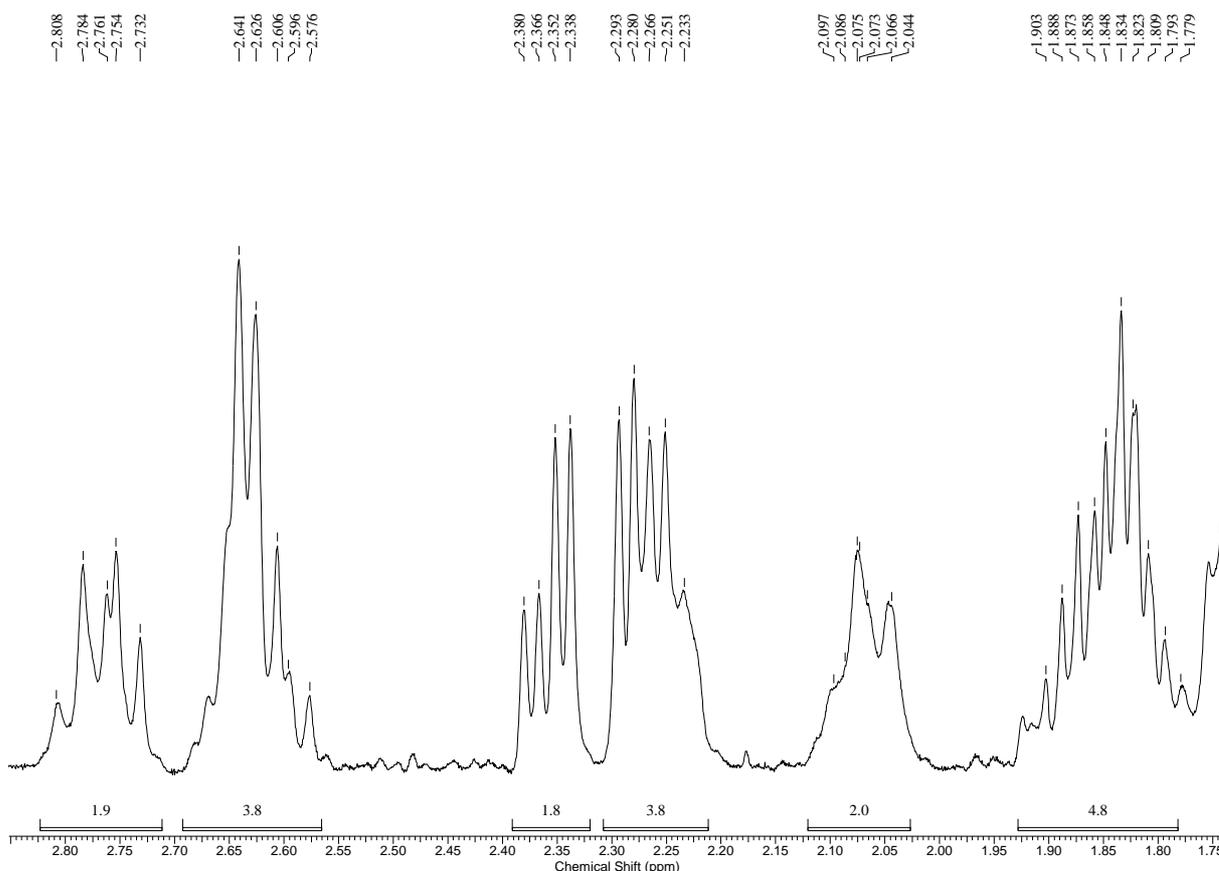


Figura 103: Ampliação (2,85 – 1,75 ppm) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias **6a** e **7a**.

Foram identificados ainda, dois multipletos entre δ 2,70 – 2,55 (4H) e 1,91 – 1,77, dois duplos dupletos em δ 2,36 (2H; $J = 7,0$ e 14,0 Hz) e δ 2,27 (2H; $J = 6,5$ e 13,5 Hz), 2,25 (2H; $J = 7,0$ e 14,0 Hz), cinco simpletos em δ 1,47 (3H), 1,38 (3H), 1,13 (6H), 0,57 (3H) e 0,54 (3H), além de dois tripletos em δ 1,04 (3H, $J = 7,5$ Hz) e δ 0,82 (3H, $J = 7,5$ Hz).

A presença dos grupos 3-fenilpropanoato de metila e prenílicos foi confirmada a partir dos dados de gHMQC (Fig. 104), gHMBC (sumarizados na Tab. 6) e pelos sinais de RMN de ^{13}C .

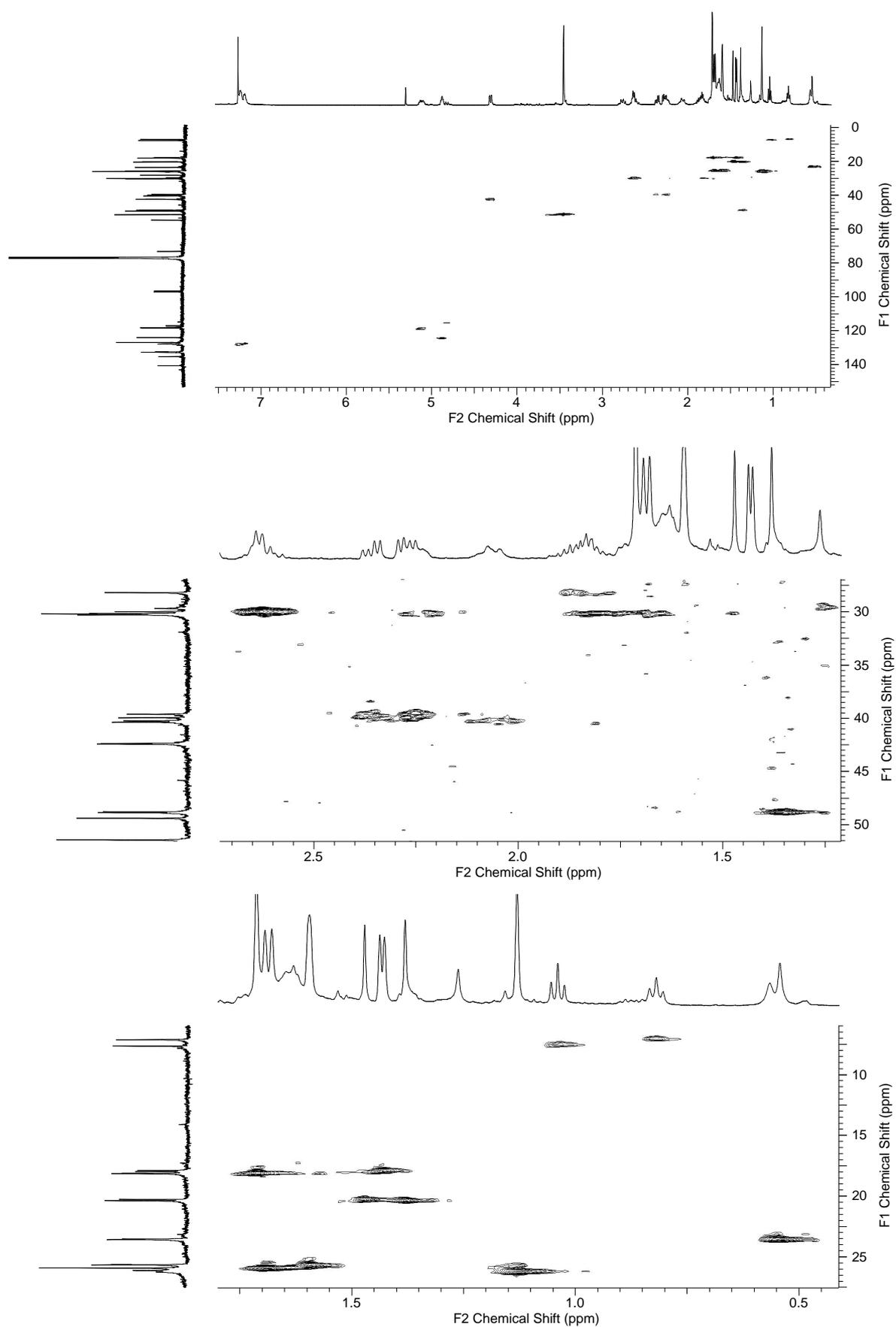


Figura 104: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da mistura contendo as substância **6a** e **7a**.

O grupo 3-fenilpropanoato de metila foi caracterizado pelos sinais em δ 171,9, δ 171,8 (atribuídos a duas carbonílas de éster), δ 51,4 (atribuído a duas metoxilas de ester), dois carbonos metilênicos (δ 40,4 e 40,2), dois carbonos metínicos em δ 42,4, além dos sinais referentes aos carbonos de anel aromático: δ 140,6 (2C), 132,7 (2CH), 132,5 (2CH), 127,8 (2CH), 127,0 (4CH). Já a presença dos grupos prenílicos foi confirmada pela presença dos sinais em δ 135,4 (C), 135,2 (C), 132,6 (C), 132,5 (C), 124,0 (2CH), 118,5 (CH), 118,2 (CH), 127,0 (4CH), 30,3 (CH₂), 30,2 (CH₂), 30,1 (CH₂), 30,0 (CH₂), 25,9 (2CH₃), 25,7 (2CH₃), 18,2 (CH₃), 18,1 (CH₃), 18,0 (CH₃) e 17,9 (CH₃), conforme Figura 105.

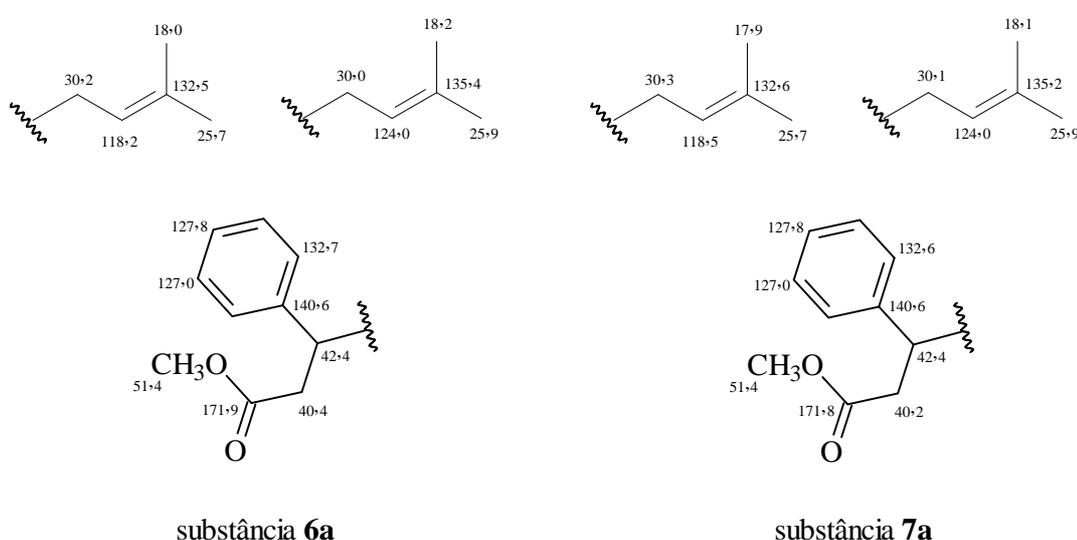


Figura 105: Dados de RMN de ¹³C (ppm) dos grupos 3-fenilpropanoato de metila e prenílicos das substâncias **6a** e **7a**.

A comparação dos de RMN de ¹³C do ácido lathrophytólico D e da laxifloranona (BOKESCH *et al.*, 1999), permitiram deduzir que as substâncias **6a** e **7a** também apresentavam em seu esqueleto um anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano com duas metilas geminais em C-8, devido à presença dos sinais de: carbonos carbonílicos de cetona não-conjugado em δ 206,6 e 206,7 (C-9), cetona conjugada em δ 198,1 e 192,1 (C-4), quatro carbonos metílicos (δ 26,4, 26,1, 23,6 e 23,5), dois carbonos metínicos (δ 48,8 e 48,9 – C-7), dois carbonos metilênicos (δ 39,9 e 39,6), dos carbonos não hidrogenados, sendo quatro do tipo sp²: δ 117,1, 117,9 (C-3) e 189,5 e 189,7 – ligado a oxigênio – C-4, e outros seis (magneticamente equivalentes para as duas substâncias) do tipo sp³: δ 73,1 (C-1), 54,8 (C-5) e 49,4 (C-8) – Fig 106.

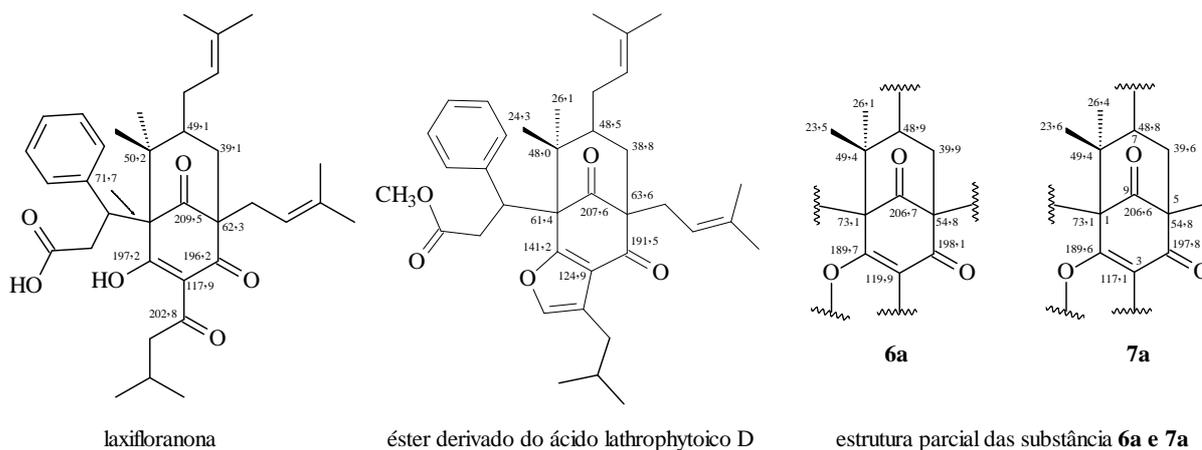


Figura 106: Fórmula estrutural e dados de RMN de ^{13}C (ppm) da laxifloronona, éster derivado do ácido lathrophytoico D e dos anéis biciclo do tipo [3.3.1]nonano das substâncias **6a** e **7a**.

O experimento de gHMBC (Fig 107 e 108) mostrou correlações do sinal δ 4,31 com δ 71,3 (C-1), de δ 2,63 com δ 206,7, δ 206,6, δ 198,1 e δ 197,8, e de δ 2,25 com δ 48,9 e δ 48,8 (C-7). Essas correlações permitiram posicionar os grupos 3-fenilpropanato de metila e prenílicos das substâncias **6a** e **7a** nos carbonos C-1, C-5 e C-7 do anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano, assim como na substância **5a**, sendo possível definir a estrutura parcial exibida na Fig. 109 para as duas substâncias em análise, justificando, portando um IDH de 12.

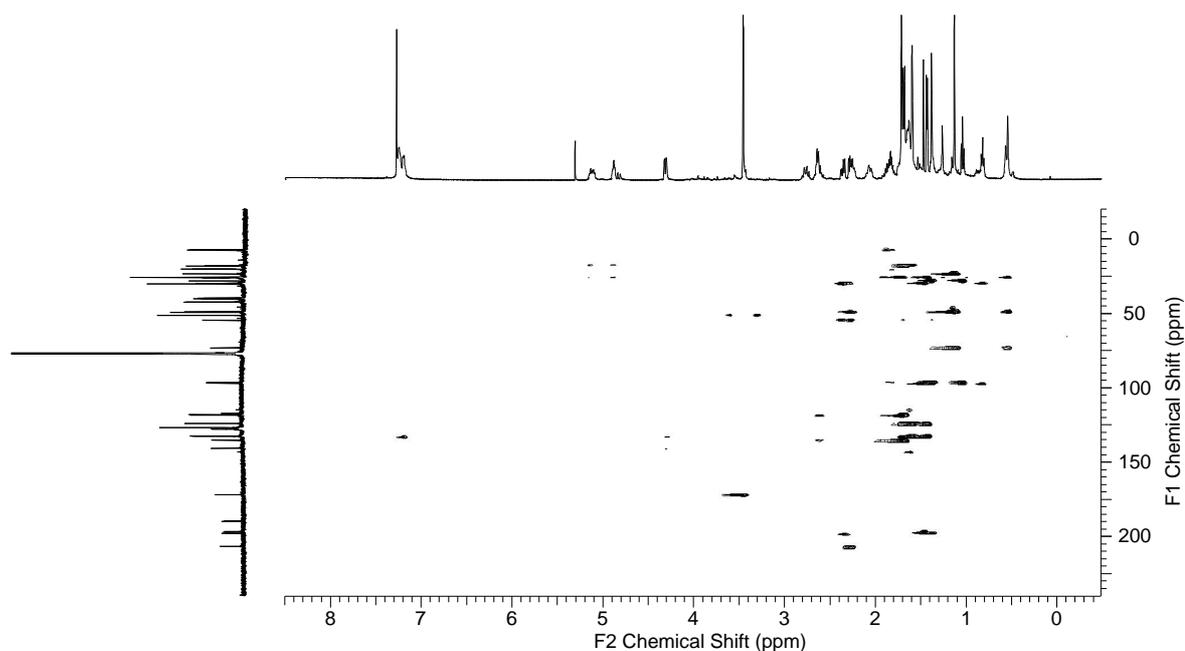


Figura 107: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da mistura contendo as substâncias **6a** e **7a**.

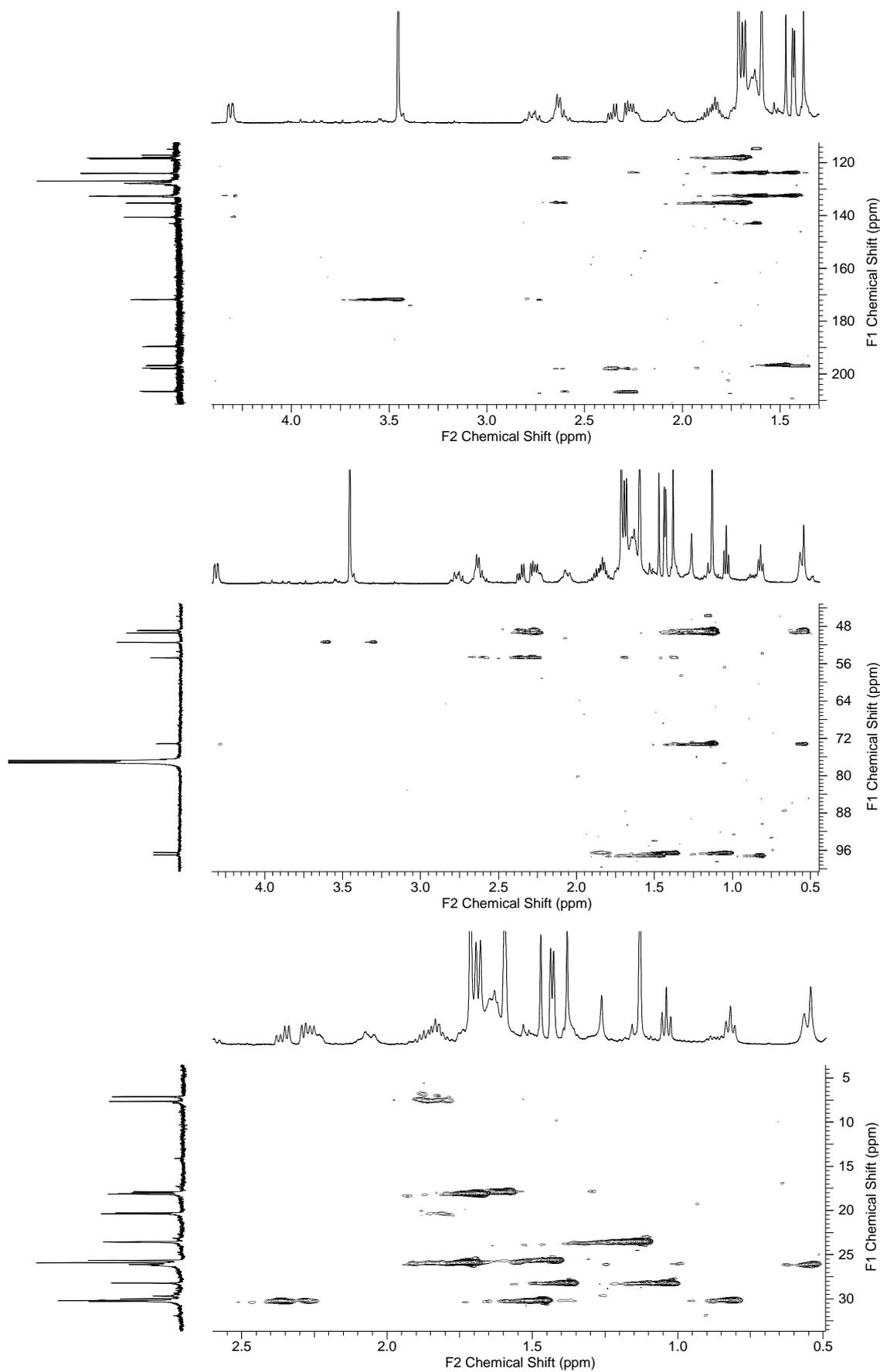


Figura 108: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da mistura contendo as substância **6a** e **7a**.

Esta proposta foi reforçada pelas correlações observadas no experimento de gCOSY (Fig 110). Verificou-se correlação do sinal δ 4,31 (1H; dd; $J = 2,7; 10,8$ Hz) com os sinais δ 2,06 (1H; dd; $J = 2,7; 15,4$ Hz) e δ 2,75 (1H; dd; $J = 10,8; 15,4$ Hz); de δ 1,38 com 2,27 (1H; dd; $J = 7,0; 14,0$ Hz), δ 2,36 (1H; dd; $J = 7,0; 14,0$ Hz) e δ 2,25, como mostrado na Fig. 109.

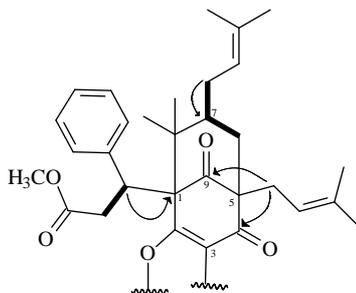


Figura 109: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (—) que permitiram determinar a fórmula estrutural parcial das substâncias **6a** e **7a**.

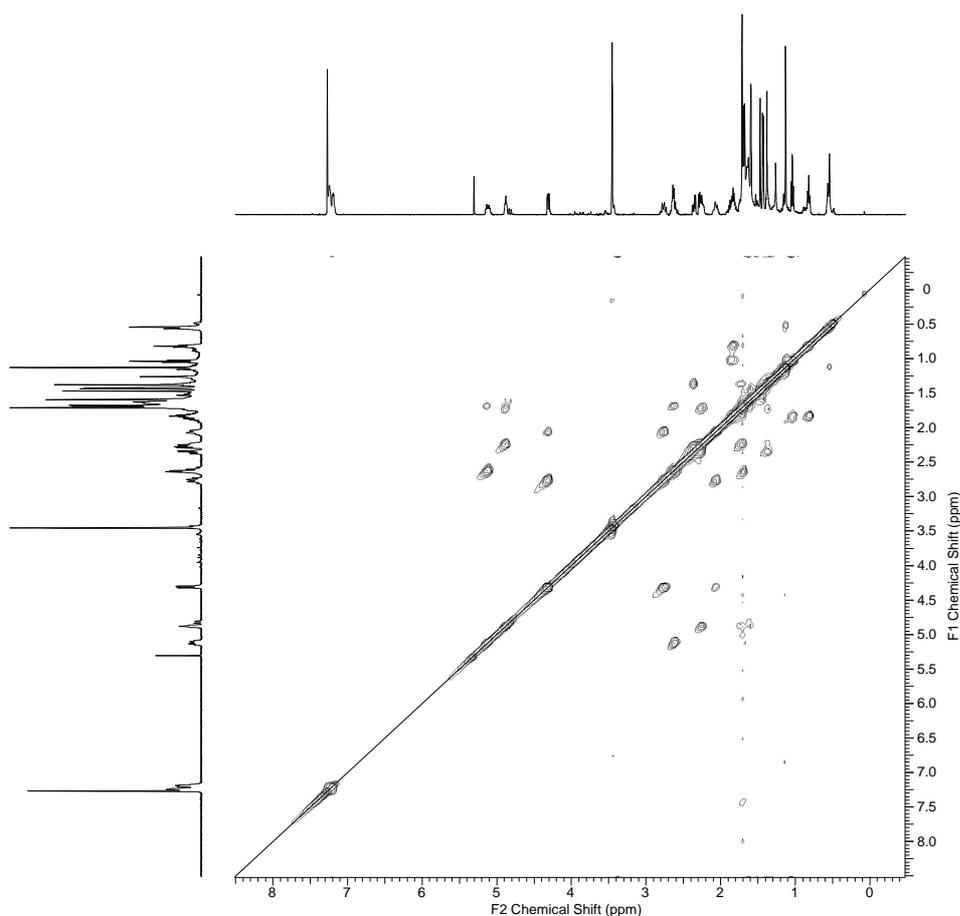


Figura 110: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl₃) da mistura contendo as substâncias **6a** e **7a**.

A presença de dois tripletos em δ 1,04 (3H, $J = 7,5$ Hz) e δ 0,82 (3H, $J = 7,5$ Hz) indicou que ambas as substâncias apresentavam uma metila ligada a um carbono metilênico

do tipo sp^3 . O experimento de $gHMBC$ mostrou correlação do sinal δ 1,04 (3H; t ; $J = 7,5$ Hz) com δ 96,5 (C) e 28,2 (CH₂), enquanto que o sinal δ 0,82 (3H; t ; $J = 7,5$ Hz) mostrou correlação com δ 97,0 (C) e 30,2(CH₂). Além disso, foi observada ainda correlação do sinal δ 1,38 (3H; s) com 196,7 (C), 96,5 (C) e 28,2 e do sinal δ 1,47 (3H; s) com δ 197,0 (C), 97,0 e 30,2 (Fig. 111).

As correlações supracitadas permitiram propor a mesma estrutura plana para as substâncias **6a** e **7a**. Entretanto, a diferença observada nos deslocamentos químicos dos sinais atribuídos às metilas (δ 1,38, 1,47, 0,82 e 1,04), bem como aos respectivos carbonos e, em especial os carbonos metilênicos (δ 28,2 e 30,2), permitiram inferir que eles estão localizados em ambientes magneticamente distintos.

Assim, foi proposto que as substâncias **6a** e **7a** são, provavelmente, estereoisômeras, apresentando uma relação epímera no carbono C-10. O experimento de NOESY da mistura não foi conclusivo quanto à estereoquímica relativa de **6a** e **7a** devido à sobreposição dos sinais. Todavia, como descrito por Piccinelli e colaboradores (2005), o valor do deslocamento químico de C-7 igual a 48,8 ppm sugere que o anel B adota a conformação em bote e que a prenila em C-7 assume a orientação pseudo axial.

Esse dados permitiram inferir que a provável estrutura das substâncias **6a** e **7a** é a exibida na Fig. 111 – ambas inéditas, visto ser este o primeiro relato da obtenção das mesmas, sendo denominadas de ácidos lathrophytóicos E e F.

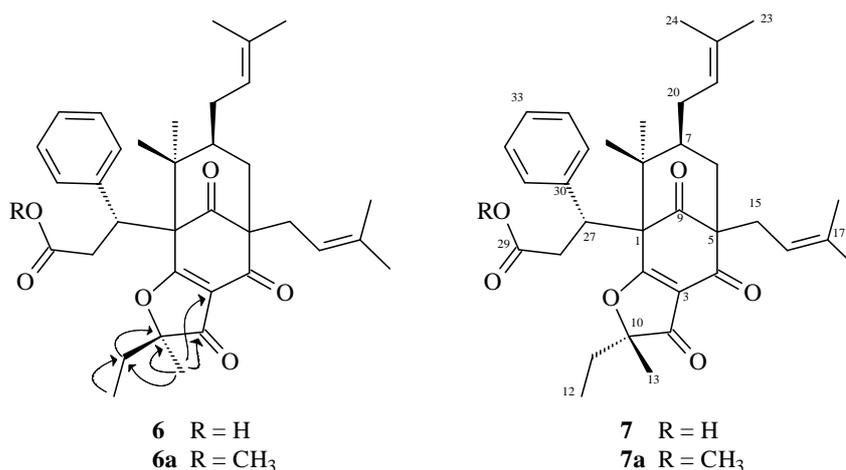


Figura 111: Correlações de H – C observadas no experimento de $gHMBC$ que permitiram chegar às fórmulas estruturais dos ésteres derivados dos ácidos lathrophytóicos E e F, isolados de *K. lathrophyton*.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, das substâncias **6a** e **7a**.

Nº	substância 6a			substância 7a		
	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		73,1 (C)			73,1 (C)	
2		189,5 (C)			189,7 (C)	
3		117,1 (C)			117,9 (C)	
4		197,8 (C)			198,1 (C)	
5		54,8(C)			54,8(C)	
6	2,27 (dd; 7,0; 14,0) 2,36 (dd; 7,0; 14,0)	39,6 (CH ₂)	4, 9	2,27 (dd; 7,0; 14,0) 2,36 (dd; 7,0; 14,0)	39,9 (CH ₂)	4, 9
7	1,38*	48,8 (CH)		1,38*	48,9 (CH)	
8		49,4 (C)			49,4 (C)	
9		206,6 (C)			206,7 (C)	
10		96,5 (C)			97,0(C)	
11	1,91 – 1,77; (m)	28,2 (CH ₂)	12	1,91 – 1,77; (m)	30,2 (CH ₂)	12
12	1,04; (t; 7,5)	7,6 (CH ₃)	10, 11	0,82; (t; 7,5)	7,1 (CH ₃)	10, 11
13	1,38; (s)	20,3 (CH ₃)	10, 11, 14	1,47; (s)	20,4 (CH ₃)	10, 11, 14
14		196,7 (C)			197,0 (C)	
15	2,67 – 2,55 (m)	30,1 (CH ₂)	4, 9, 16, 17	2,67 – 2,55 (m)	30,0 (CH ₂)	4, 9, 16, 17
16	5,16 – 5,05; (m)	124,0 (CH)	18, 19	5,16 – 5,05; (m)	124,0 (CH)	18, 19
17		135,2 (C)			135,4 (C)	
18	1,71; (s)	25,9 (CH ₃)	16, 17, 19	1,69; (s)	25,9 (CH ₃)	16, 17, 19
19	1,71; s()	18,1 (CH ₃)	16, 17, 18	1,71; s()	18,2 (CH ₃)	16, 17, 18
20	2,25 (dd; 6,5; 13,5)	30,3 (CH ₂)	7,	2,25 (dd; 6,5; 13,5)	30,2 (CH ₂)	7,
21	4,90 – 4,80; (m)	118,5 (CH)	23, 24	4,90 – 4,80; (m)	118,2 (CH)	23, 24
22		132,6 (C)			132,5 (C)	
23	1,59; s()	25,7 (CH ₃)	21, 22, 24	1,59; s()	25,7 (CH ₃)	21, 22, 24
24	1,44; (s)	17,9 (CH ₃)	21, 22, 23	1,43; (s)	18,0 (CH ₃)	21, 22, 23
25	1,13 s	26,1 (CH ₃)	1, 7, 8, 26	1,13 s	26,4 (CH ₃)	1, 7, 8, 26
26	0,54; s	23,5 (CH ₃)	1, 7, 8, 25	0,57; s	23,6 (CH ₃)	1, 7, 8, 25
27	4,31 (dd; 2,7; 10,8)	42,4 (CH)	1, 30, 31	4,31 (dd; 2,7; 10,8)	42,4 (CH)	1, 30, 31
28	2,06 (dd; 2,7; 15,4) 2,75 (dd; 10,8; 15,4)	40,2 (CH ₂)	27, 29	2,06 (dd; 2,7; 15,4) 2,75 (dd; 10,8; 15,4)	40,4 (CH ₂)	27, 29
29		171,8 (C)			171,9 (C)	
30		140,6 (C)			140,6 (C)	
31, 35		132,6 (CH)			132,6 (CH)	
32, 34		127,0 (CH)			127,0 (CH)	
33		127,8 (CH)			127,8 (CH)	
OCH ₃	3,45; (s)	51,4 (CH ₃)	29	3,45; (s)	51,4 (CH ₃)	29

*multiplicidade não observada

4.2 Derivados poliprenilados do floroglucinol isolados de *Kielmeyera cuspidata*

4.2.1 Determinação estrutural das substâncias 8a e 9a

As substâncias **8a** e **9a** foram isoladas do extrato hexânico de *K. cuspidata*, após reação de metilação, na forma de um óleo amarelo, viscoso, opticamente ativas $\{[\alpha]_D^{20} -18$ (c 1,3, MeOH) $\}$ e $\{[\alpha]_D^{20} -79$ (c 1,0, MeOH) $\}$, respectivamente e a determinação estrutural de ambas foi feita com base nos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHSQC, gHMBC, gCOSY, e HR-ESI-TOF.

Os espectros de massas de alta resolução das substâncias **8a** e **9a** (Figuras 112 e 113), obtido através da técnica de ionização por electrospray (modo positivo), exibiram pico relativo à presença de molécula cationizada em 553,3885 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 553,3890 $[\text{M} + \text{H}]^+$ respectivamente (ambas calculadas para $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{O}_5$: 553,3888). Assim foi deduzida, para ambas as substâncias, a fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_5$, tendo IDH igual a dez, cada uma.

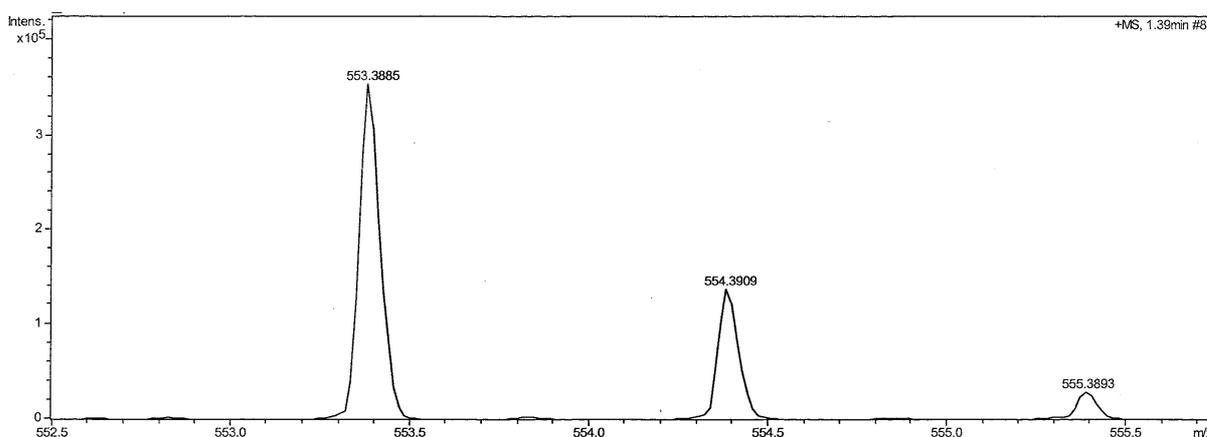


Figura 112: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **8a**.

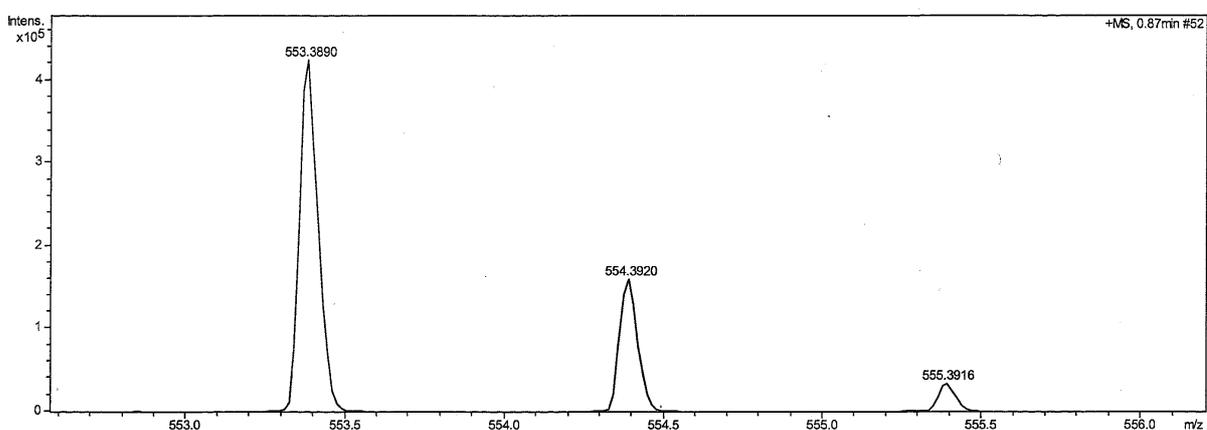


Figura 113: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **9a**.

As substâncias **8a** e **9a** apresentaram, além da mesma fórmula molecular, espectros de RMN ^1H e ^{13}C bastantes similares, o que permitiu inferir que ambas apresentam uma relação isomérica. Além disso, foram observadas algumas semelhanças entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C delas com a do éster derivado do ácido lathrophytóico D isolada de *K. lathrophyton*.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 115 e 116) das substâncias **8a** e **9a** exibiram sinais correspondentes a 35 átomos de carbonos sendo possível identificar, por comparação com os espectros de DEPT 135, dez carbonos metílicos, oito metilênicos, seis metínicos e 11 carbonos não hidrogenados.

Assim como no éster derivado do ácido lathrophytóico D (substância **5a**), o espectro de RMN ^1H das substâncias **8a** e **9a** (Fig. 117 e 118) exibiram um duplete em δ 7,22 (1H, $J = 0,9$ Hz) e δ 7,17 (1H, $J = 0,9$ Hz), respectivamente, que foi sugestivo de um hidrogênio com acoplamento a longa distância de uma olefina trissubstituída de um anel furânico. Para a substância **8a**, além desse sinal, observou-se dois dupletos característicos de grupos metílico em δ 1,24 (3H; $J = 6,9$) e 1,23 (3H; $J = 6,9$) e um septeto de dupletos em δ 3,16 (1H, $J = 0,9$ e 6,9 Hz) acoplado com os dois grupos metílicos e com o hidrogênio em δ 7,22.

Esses dados indicaram a presença de um grupo isopropil ligado a uma dupla trissubstituída compatível com um sistema isopropilfurano (Fig. 114) como o descrito para o ácido lathrophytóico B (DE ALMEIDA *et al.*, 2011). Na substância **9a**, esses sinais foram observados em δ 1,25 (3H; d ; $J = 6,9$) e 1,22 (3H; d ; $J = 6,9$), δ 3,19 (1H, *sept. d*; $J = 0,9$ e 6,9 Hz).

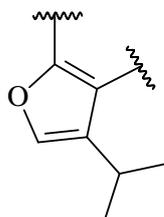


Figura 114: Sistema isopropilfurano.

Igualmente ao observado no espectro da substância **5a**, a presença dos sinais entre δ 5,35 – 5,27 (1H, *tl* 7,5 Hz) e δ 4,85 – 4,78 (1H, *tl* 7,5 Hz), quatro simpletos (típicos de grupos metílicos vinílicos) em δ 1,71, δ 1,66, δ 1,65 e δ 1,50 no espectro de RMN ^1H (Tab. 6) da substância **8a** e em δ 5,20 – 5,12 (1H, *tl* 7,0 Hz), δ 4,75 – 4,68 (1H, *tl* 7,0 Hz), δ 1,69 (3H, *s*), δ 1,68 (3H, *s*), δ 1,60 (3H, *s*), e δ 131 (3H, *s*) no espectro da substância **9a**, característicos de hidrogênios alílicos, indicaram a presença de dois grupos prenílicos em cada substância.

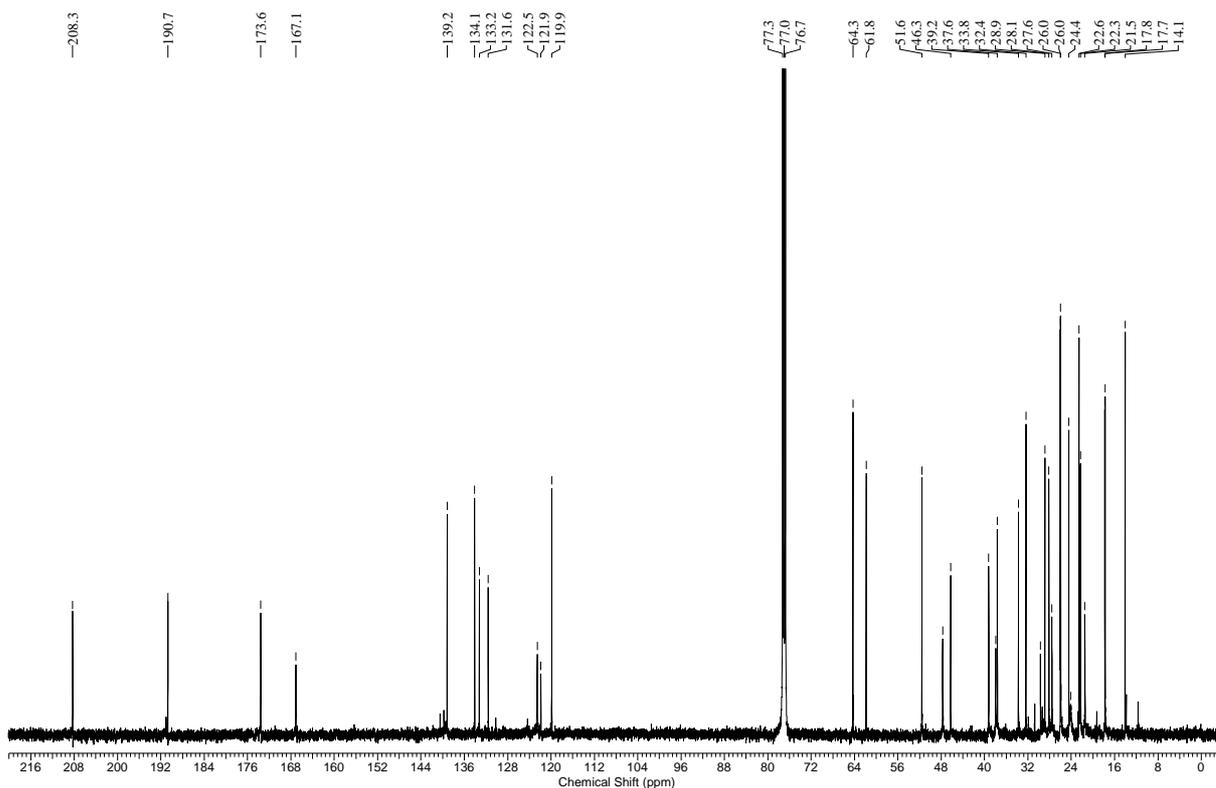


Figura 115: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 8a.

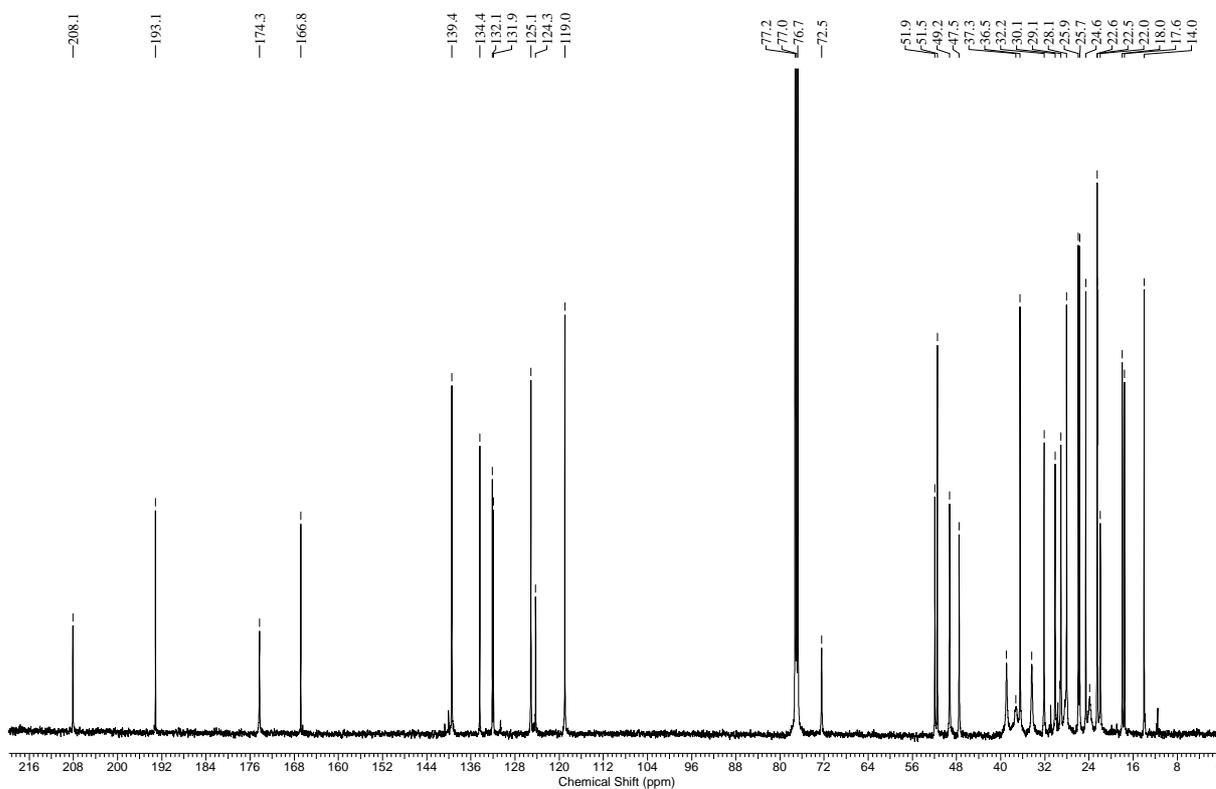


Figura 116: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância 9a.

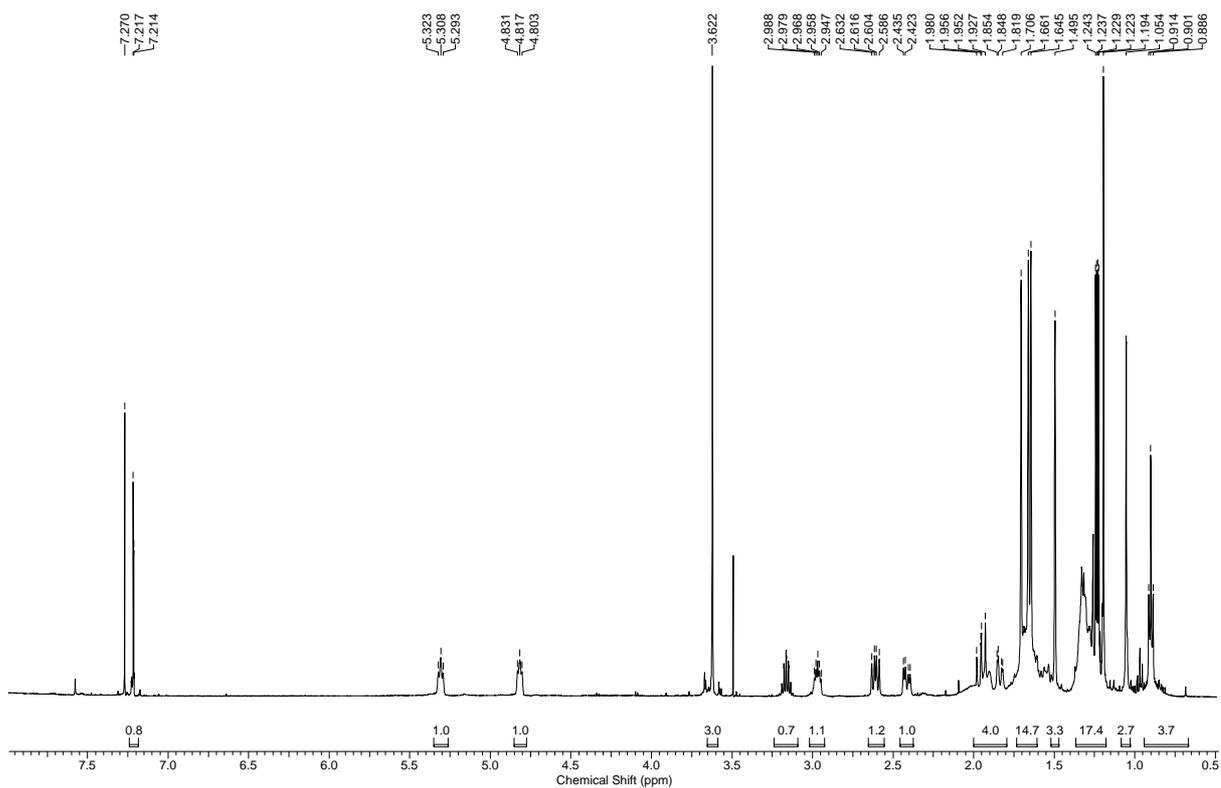


Figura 117: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **8a**.

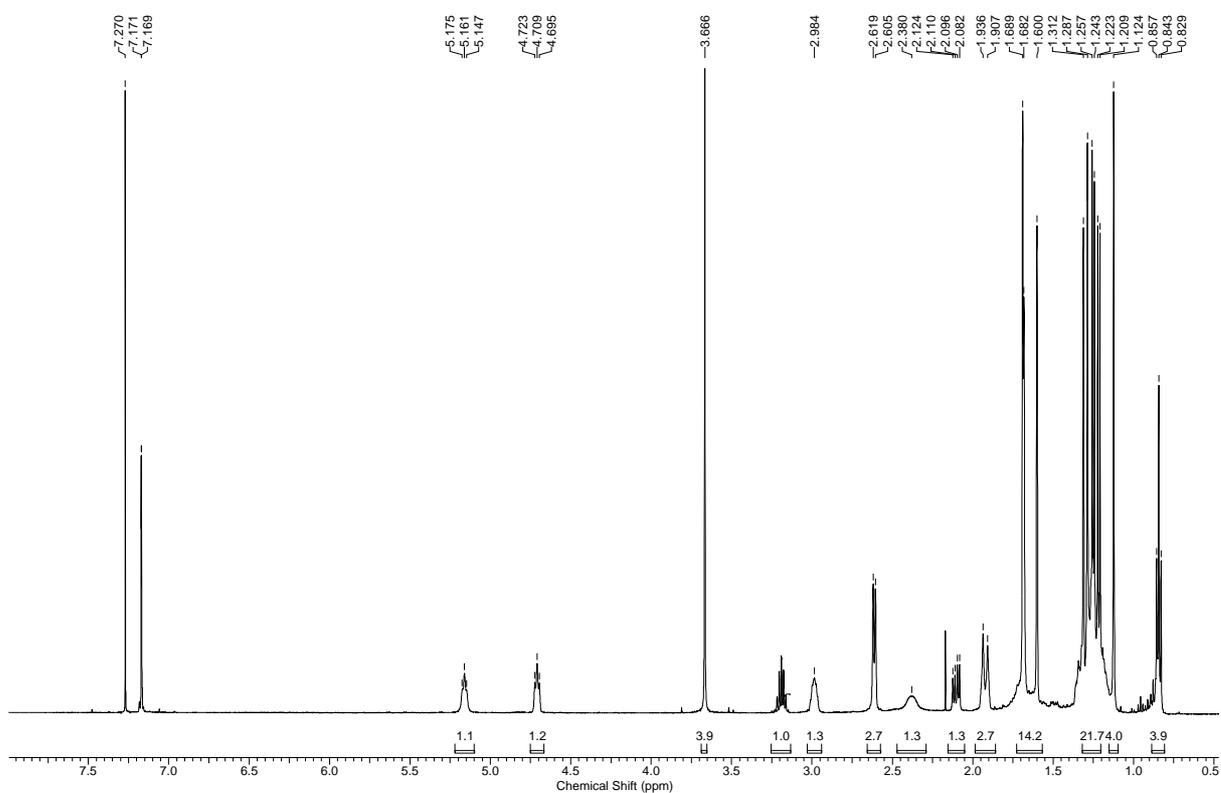


Figura 118: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **9a**.

Foram destacados ainda no espectro de RMN ^1H da substância **8a**, um simpleto em δ 3,62 (3H), atribuído a um grupo metoxílico, um multipeto entre δ 3,00 – 2,94 (1H), quatro duplos dupletos em δ 2,61 (1H; $J = 5,9$ e $14,2$ Hz), δ 2,41 (1H; $J = 5,9$ e $14,2$ Hz), δ 1,97 (1H; $J = 1,8$ e $14,2$ Hz), δ 1,83 (1H; $J = 3,2$ e $14,2$ Hz), e dois simpletos, integrando para três hidrogênios cada um, em δ 1,19, 1,05 e um triplete em δ 0,90 ($J = 6,4$ Hz) característicos de três grupos metílicos.

Para a substância **9a**, também foram observados sinais parecidos com esses sendo: um simpleto em δ 3,67 (3H), típico de um grupo metoxílico, um multipeto entre δ 3,02 – 2,95 (1H), um dupeto em δ 2,61 (2H; $J = 7,0$ Hz), um simpleto largo em δ 2,38 (2H), um duplo dupeto em δ 2,10 (1H; $J = 7,0$ e $14,4$ Hz), um dupeto largo δ 1,92 (3H; $J = 14,4$ Hz), dois simpletos, integrando para três hidrogênios cada um, em δ 1,29, 1,12, e um triplete em δ 0,84 ($J = 7,0$) característicos de três grupos metílicos.

A presença de duas prenilas em cada uma das substâncias foi reforçada pelas correlações observadas nos experimentos de $g\text{HMQC}$ de **8a** e **9a** (Fig. 120 e 121) juntamente com os sinais de RMN ^{13}C em: δ 17,7 (CH_3), 17,8 (CH_3), 26,0 (2CH_3), 27,6 (CH_2), 28,9 (CH_2), 119,0 (CH), 122,5 (CH), 133,1 (C) e 134,1 (C) no espectro da substância **8a** e δ 17,6 (CH_3), 18,0 (CH_3), 25,7 (CH_3), 25,9 (CH_3), 29,1 (CH_2), 30,1 (CH_2), 119,0 (CH), 125,1 (CH), 132,1 (C) e 134,5 (C) no espectro da substância **9a** conforme Fig. 119.

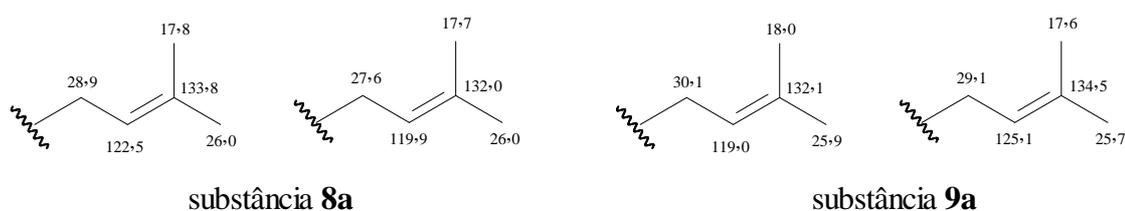


Figura 119: Dados de RMN ^{13}C dos grupos prenilicos das substâncias **8a** e **9a**.

A presença de um anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano na substância **8a** foi confirmada pela presença dos sinais de RMN ^{13}C em δ 61,8 (C-1), 167,1 (C-2), 121,9 (C-3), 190,7 (C-4), 64,3 (C-5), 37,6 (C-6), 47,7 (C-7), 46,3 (C-8) e 208,3 (C-9) e na substância **9a**, pelos sinais em δ 208,1 (C), 193,1 (C), 166,8 (C), 124,3 (C), 72,5 (C), 51,9 (C), 49,2 (CH), 47,5 (C) e 37,2 (CH_2).

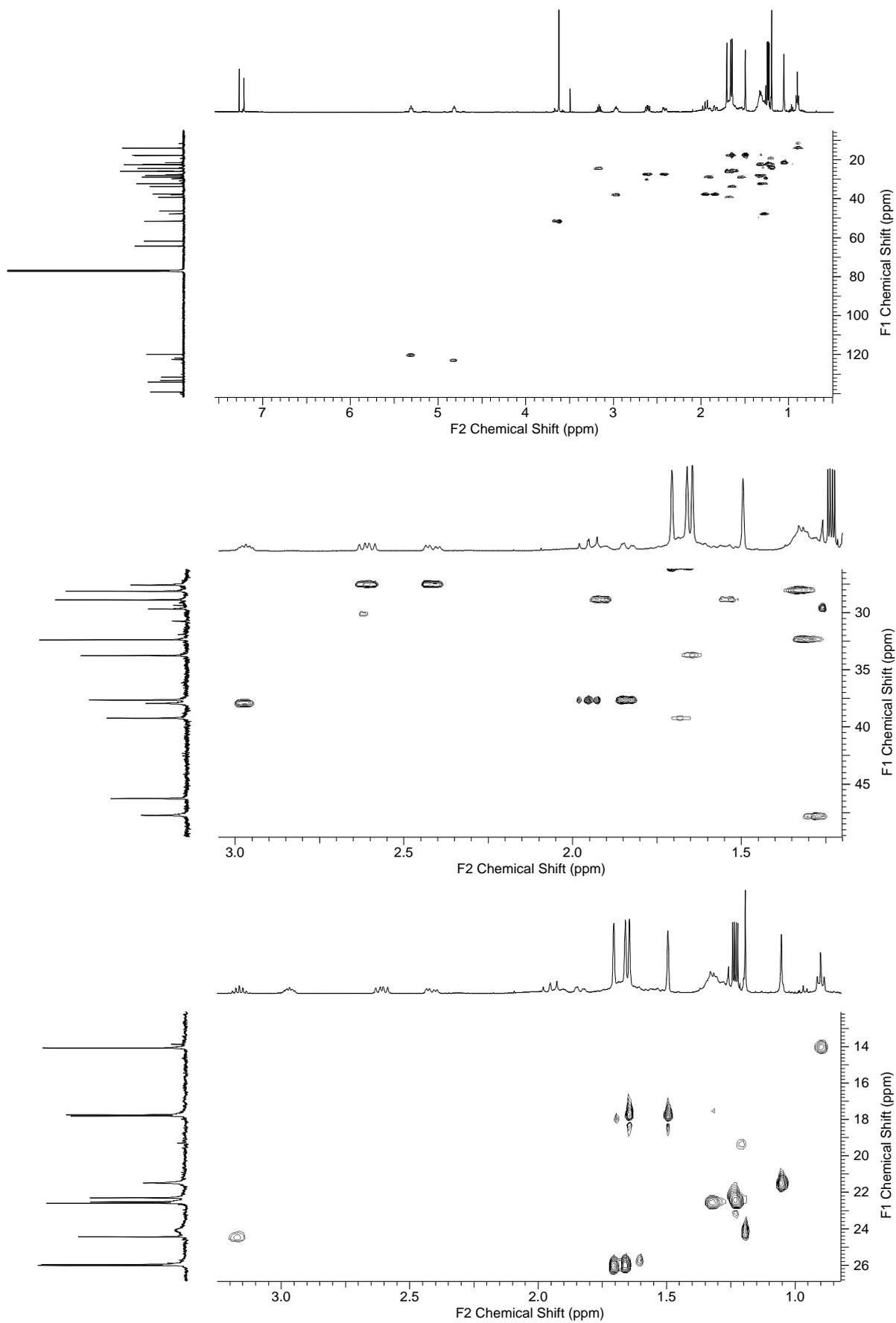


Figura 120: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl_3) da substância **8a**.

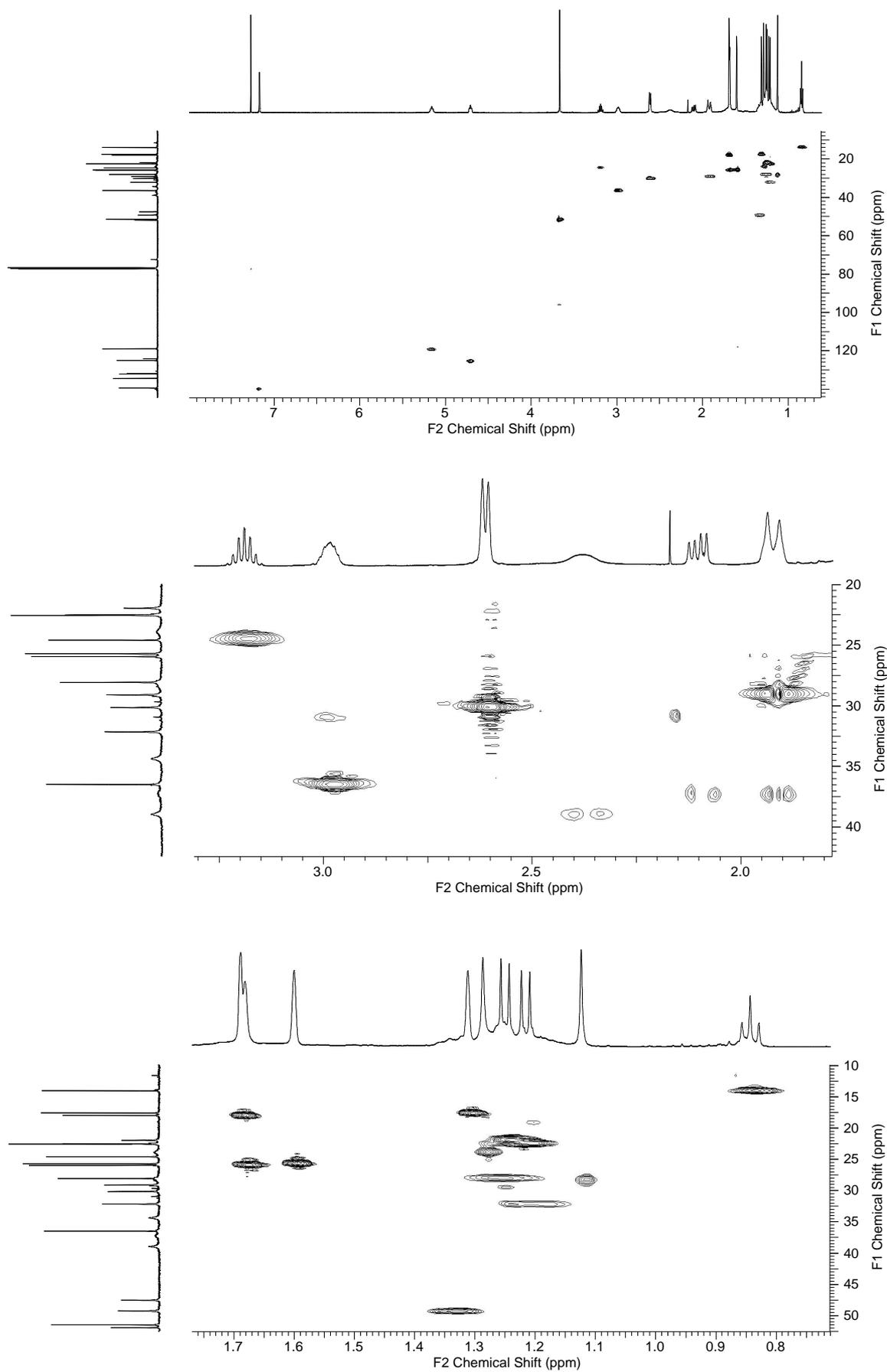


Figura 121: Correlações de H – C observadas no experimento de gHSQC (CDCl₃) da substância **9a**.

Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C da substância **8a** em δ 22,3 (CH_3), 22,5 (CH_3), 24,4 (CH), 139,2 (CH), 131,6 (C), 167,1 (C) e 121,9 (C) juntamente com as correlações observadas nos espectros de gHMBC (Fig. 123 a 126) do sinal δ 7,22 (1H; *d*; $J = 0,9$ Hz) com δ 167,1 (C), 121,9 (C) e 131,6 (C); do sinal δ 3,16 (1H, $J = 0,9$ e 6,9 Hz) com δ 139 (CH), 131,6, 121,9, 22,3 (CH_3), 22,4 (CH_3); do sinal δ 1,24 (3H, *d*; $J = 6,9$ Hz) com δ 131,6, 24,4 (CH) e 22,4 e do sinal δ 1,23 (3H, *d*; $J = 6,9$ Hz) com δ 131,6, 24,4 e 22,3 permitiram confirmar a presença do sistema isopropilfurano na molécula condensado ao anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano (Fig. 122). Sinais e correlações semelhantes também foram observadaa para a substância **9a** conforme Tab. 6.

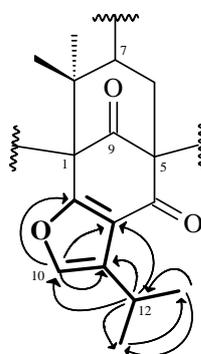


Figura 122: Correlações selecionadas de gHMBC da estrutura parcial da substância **8a**.

O espectro de gHMBC da substância **8a** exibiu correlação dos sinais em δ 2,41 (1H; *dd*; $J = 5,9$ e 14,2 Hz) e δ 2,61 (1H; *dd*; $J = 5,9$ e 14,2 Hz), com os sinais δ 190,7 (C-4), 208,3 (C-9), 64,3 (C-5) e 37,6 (C-6); dos sinais em δ 1,83 (H_a -6) e 1,97 (H_b -6) com os sinais em δ 190,7, 208,3, 64,3, 47,7 (C-7), 46,3 (C-8), 28,9 (C-20) e 27,6 (C-15); do sinal δ 1,05 com δ 61,8, 47,7, 46,3 e 24,1; do sinal em δ 1,19 com δ 61,8, 47,7, 46,3 e 24,5. Essas correlações permitiram posicionar as unidades prenílicas em C-5 e C-7 e confirmar a presença da estrutura parcial mostrada na Fig. 127.

Correlações semelhantes foram encontradas ao analisar o espectro de gHMBC da substância **9a** (Tab. 6), porém as seguintes diferenças foram observadas: o sinal atribuído a H-15 (δ 2,61), bem como, os sinais de H_a -6 (δ 1,92) e H_b -6 (δ 2,10) mostraram correlação com os sinais δ 51,9 (C-5) e 166,8 (C-4), ao contrário da substância **8a**, quando os hidrogênios correspondentes apresentaram correlação com um sinal característico de carbonila α,β -insaturada. Além disso, os sinais em δ 1,29 (H-25) e 1,12 (H-25) exibiram correlação com o sinal em δ 72,5 e 193,1. Desta forma foi possível definir a estrutura parcial revelada na Figura 127 para a substância **9a**.

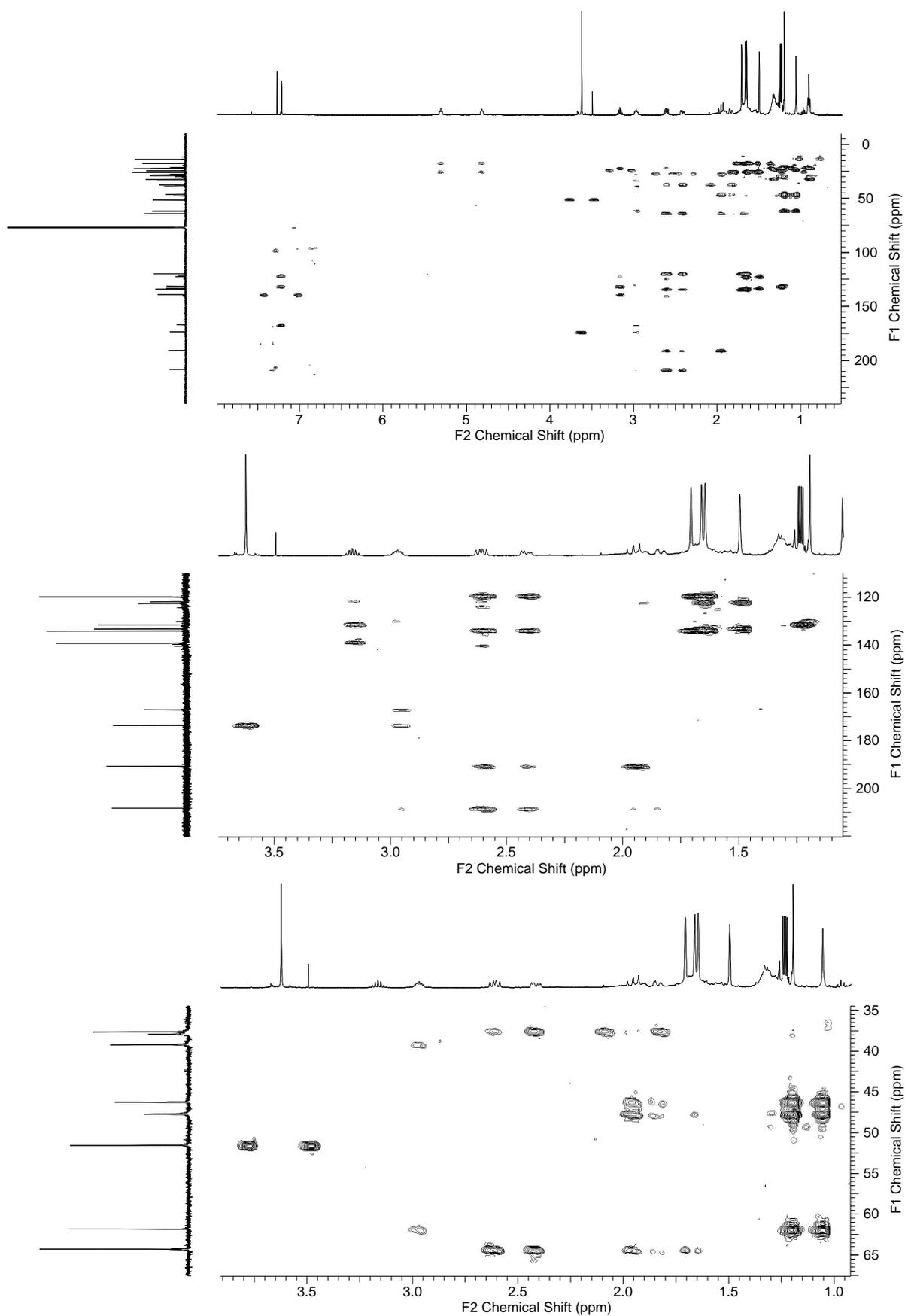


Figura 123: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **8a**.

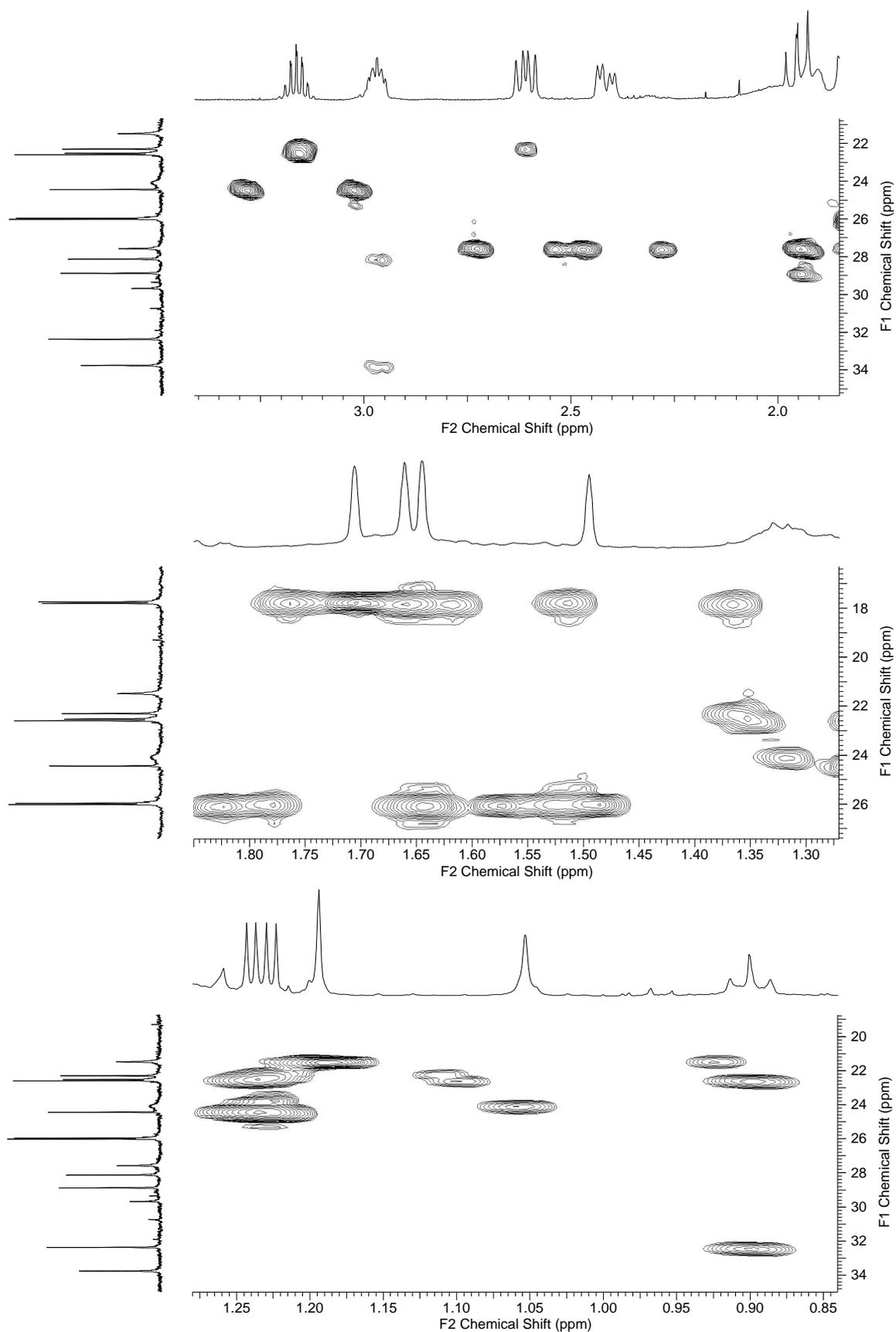


Figura 124: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da substância **8a**.

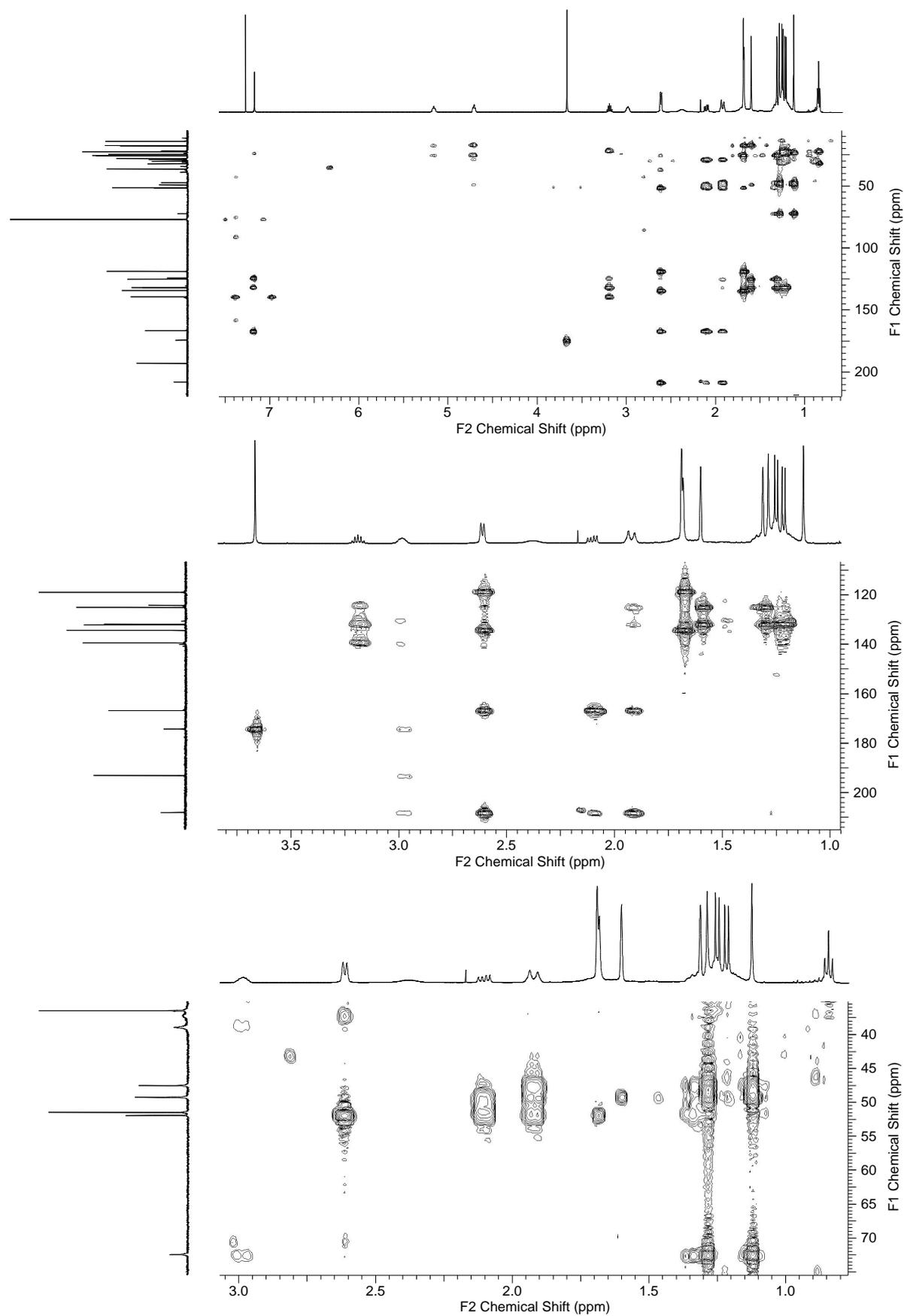


Figura 125: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da substância **9a**.

Diferentemente da substância **5a**, pode-se verificar que as substâncias **8a** e **9a** não apresentaram anel aromático, devido à ausência de sinais correspondentes a hidrogênios de sistema aromático, sugerindo então a presença de outro grupo condensado a C-1.

O espectro de gHMBC da substância **8a** exibiu correlação do sinal atribuído a metoxila em δ 3,62 (*s*) com o sinal δ 173,6 [atribuído a carboxila de éster: absorção forte em 1750 cm^{-1} no espectro no IV (vide Figuras 128 e 129)], relativo ao estiramento da ligação C=O) e do sinal entre δ 3,00 – 2,94 (1H; *m*) com os sinais δ 173,6 (C), 39,2 (CH₂), 33,8 (CH₂), 28,1 (CH₂). Esse conjunto de informações, juntamente com a presença de um sinal em δ 14,1 (CH₃), característico de carbono metílico primário e de dois carbono metilênicos em δ 32,4 e 22,6, observados no espectro de RMN ¹³C, permitiram deduzir a presença do grupo octanoato de metila substituído na posição 3 como apresentado na Fig. 130.

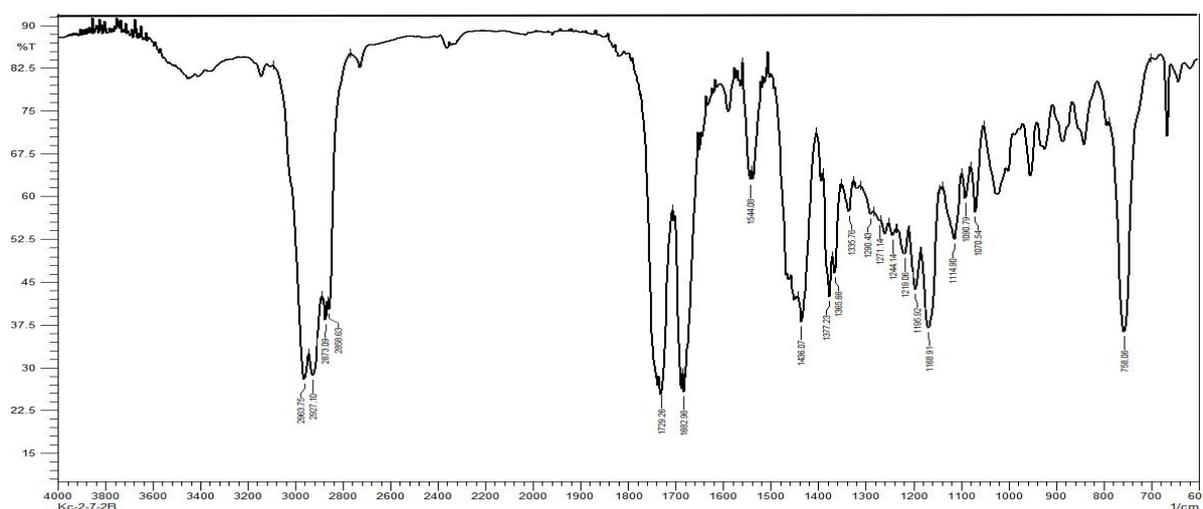


Figura 128: Espectro no infravermelho (filme com CDCl_3) da substância **8a**.

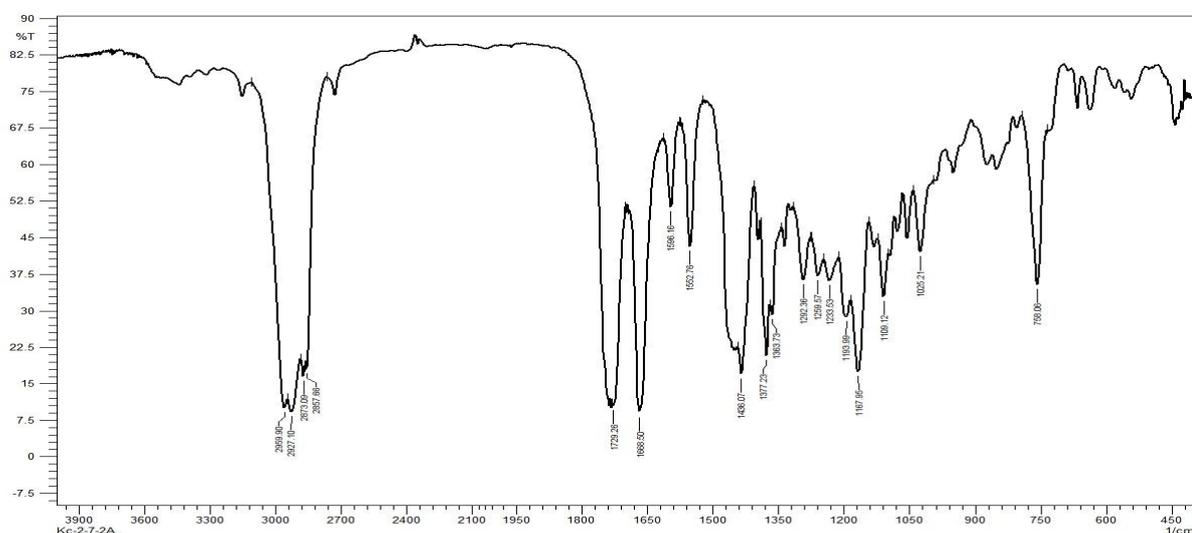


Figura 129: Espectro no infravermelho (filme com CDCl_3) da substância **9a**.

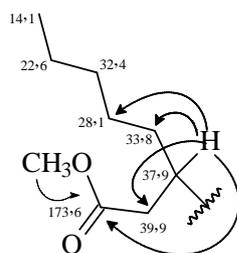


Figura 130: Correlações de gHMBC do grupo octanoato de metila.

O grupo octanoato de metila, descrito anteriormente foi conectado ao carbono C-1 (δ 61,8) devido às correlações do sinal entre δ 3,00 – 2,94 (1H; *m*) com C-1 (δ 61,8), C-2 (δ 167,1) e C-9 (δ 208,3). Assim foi possível determinar a estrutura da substância **8a** como sendo a exposta na Fig. 131, denominado de ácido kielmeyeróico A. Comparando-se os dados obtidos para a substância **8a** e observando-se as correlações obtidas do espectro de gHMBC da substância **9a** (vide Tab. 7), foi possível determinar a estrutura desta substância denominada de ácido kielmeyeróico B.

Os deslocamentos químicos de C-7 em **8a** e **9a** apareceram no espectro de RMN ^{13}C em 47,7 e 49,2 ppm, respectivamente e, segundo Ciochina e Grossman (2006), esse é o valor esperado quando o substituinte nesse carbono assume a posição pseudo axial. Assim, a provável estereoquímica desses compostos é a mostrada na Fig. 131.

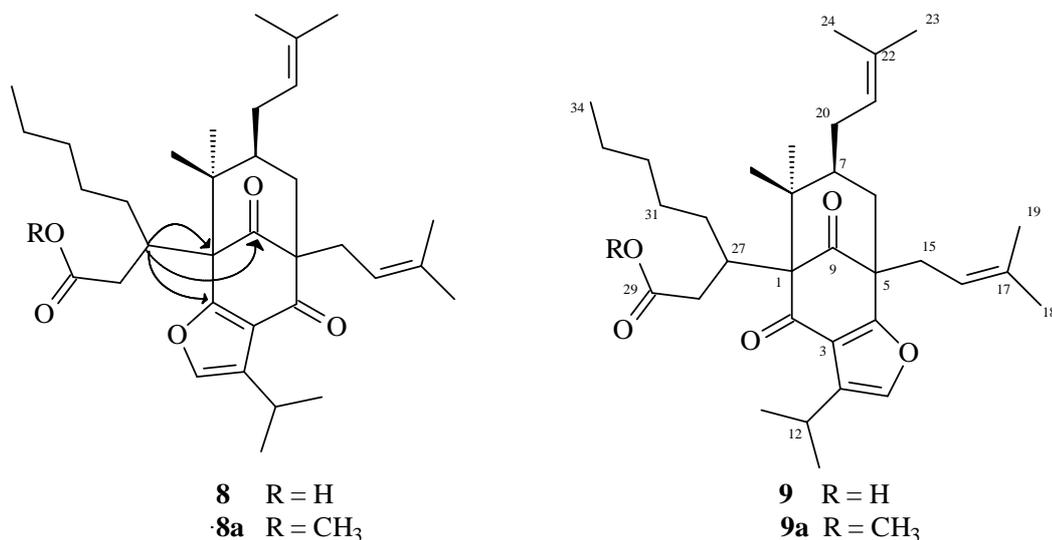


Figura 131: Fórmula estrutural das substâncias **8a** e **9a**, isoladas de *K.cuspidata*.

Esses derivados poliprenilados do floroglucinol são inéditos, visto ser este o primeiro relato da sua obtenção.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, das substância **8a** e **9a**.

Nº	substância 8a			substância 9a		
	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		61,8 (C)			72,5 (C)	
2		167,1 (C)			193,1 (C)	
3		121,9 (C)			124,3 (C)	
4		190,7 (C)			166,8 (C)	
5		64,3 (C)			51,9 (C)	
6	1,83 (dd; 3,5; 14,0) 1,97 (dd; 12,5; 14,0)	37,6 (CH ₂)	4, 5, 7, 8, 9, 15, 20	1,92 (d; 14,4) 2,10 (dd; 14,4; 7,0)	37,2 (CH ₂)	4, 5, 7, 8, 9, 15, 20
7	1,28**	47,7 (CH)		1,34**	49,2 (CH)	1, 5, 8
8		46,3 (C)			47,5 (C)	
9		208,3 (C)			208,1 (C)	
10	7,22; (d; 0,9)	139,2 (CH)	2, 3, 11	7,17; (d; 0,9)	139,4 (CH)	2, 3, 4, 11
11		131,6 (C)			131,9 (C)	
12	3,16; (sept d; 6,9; 0,9)	24,4 (CH)	3, 10, 11, 13, 14	3,19; (sept d; 6,9; 0,9)	24,6 (CH)	3, 10, 11, 12, 14
13	1,23; (d; 6,9)	22,5 (CH ₃)	11, 12, 14,	1,25; (d; 6,9)	22,0 (CH ₃)	11, 12, 14,
14	1,24; (d; 6,9)	22,3 (CH ₃)	11, 12, 14	1,22; (d; 6,9)	22,5 (CH ₃)	11, 12, 14
15	2,41 (dd; 14,0; 6,0) 2,61 (dd; 14,0; 6,0)	27,6 (CH ₂)	4, 5, 9, 16, 17	2,61; (d; 7,0)	30,1 (CH ₂)	4, 5, 9, 16, 17
16	5,31; (tl; 7,5)	119,9 (CH)	18, 19	5,16; (tl; 7,0)	119,0 (CH)	18, 19
17		134,1 (C)			134,4 (C)	
18	1,71; s	26,0 (CH ₃)	16, 17, 19	1,69*; s	25,9 (CH ₃)	16, 17, 19
19	1,65; s	17,7 (CH ₃)	16, 17, 18	1,68*; s	17,6 (CH ₃)	16, 17, 18
20	1,57** 1,92**	28,9 (CH ₂)		1,92 (d; 14,5)	29,1 (CH ₂)	7, 8
21	4,82; (tl; 7,5)	122,5 (CH)	20, 23, 24	4,71; (tl; 7,0)	125,1 (CH)	20, 23, 24
22		133,1 (C)			132,1 (C)	
23	1,66; s	26,0 (CH ₃)	21, 22, 24	1,60*; s	25,7 (CH ₃)	21, 22, 24
24	1,50; s	17,8 (CH ₃)	21, 22, 23	1,31; s	17,6 (CH ₃)	21, 22, 23
25	1,19 s	24,1 (CH ₃)	1, 7, 8, 26	1,12 s	28,2 (CH ₃)	1, 7, 8, 26
26	1,05; s	21,5 (CH ₃)	1, 7, 8, 25	1,29; s	23,9 (CH ₃)	1, 7, 8, 25
27	2,97; m	37,9 (CH)	1, 2, 9, 28; 29, 30, 31	2,98; m	36,5 (CH)	1, 2, 28; 29, 30, 31
28	1,68*	39,9 (CH ₂)		2,38	38,9 (CH ₂)	
29		173,6 (C)			174,3 (C)	
30	1,66**	33,8 (CH ₂)			34,4 (CH ₂)	
31	1,34**	28,1 (CH ₂)		1,28**	28,1 (CH ₂)	
32	1,33**	32,4 (CH ₂)			32,2 (CH ₂)	
33	1,31**	22,6 (CH ₂)			22,5 (CH ₂)	
34	0,90; (t; 6,4)	14,1 (CH ₃)		0,84; (t; 6,4)	14,0 (CH ₃)	
OCH ₃	3,62	51,6 (CH ₃)		3,67	51,5 (CH ₃)	

*sinais podem estar trocados

**multiplicidade não observada

4.2.2 Determinação estrutural da substância 10a

A substância **10a** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. cuspidata*, após reação de metilação, na forma de um óleo amarelo viscoso, opticamente ativa $\{[\alpha]_D^{20} - 171 (c 1,0, CHCl_3)\}$ e a sua determinação estrutural foi feita com base nos experimentos de IV, RMN 1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMQC, gHMBC, gCOSY e HR-ESI-TOF.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplados (Figura 132) e DEPT 135 (Tab. 8) indicaram a presença de onze carbonos metílicos, oito carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos, dos quais dois do tipo sp^2 e onze carbonos não-hidrogenados, sendo três deles referentes a carbonos carbonílicos e um carbono carboxílico, totalizando 35 carbonos e cinquenta e quatro hidrogênios.

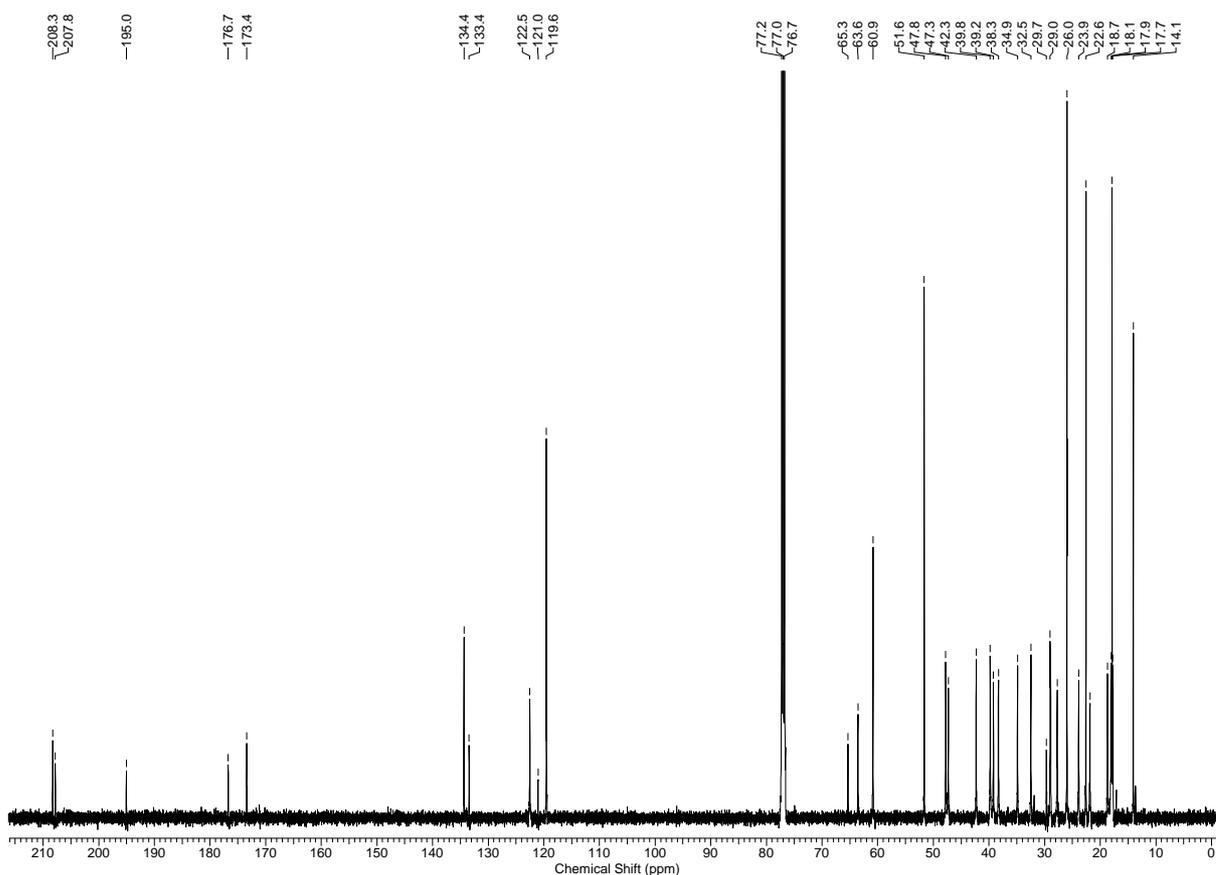


Figura 132: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) da substância **10a**.

O espectro de massas de alta resolução dessa substância [ESI (+)] (Figura 133), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em $593,3691 [M + Na]^+$. Assim, foi deduzida a fórmula molecular como sendo $(C_{35}H_{54}O_6)$, apresentando IDH igual a nove.

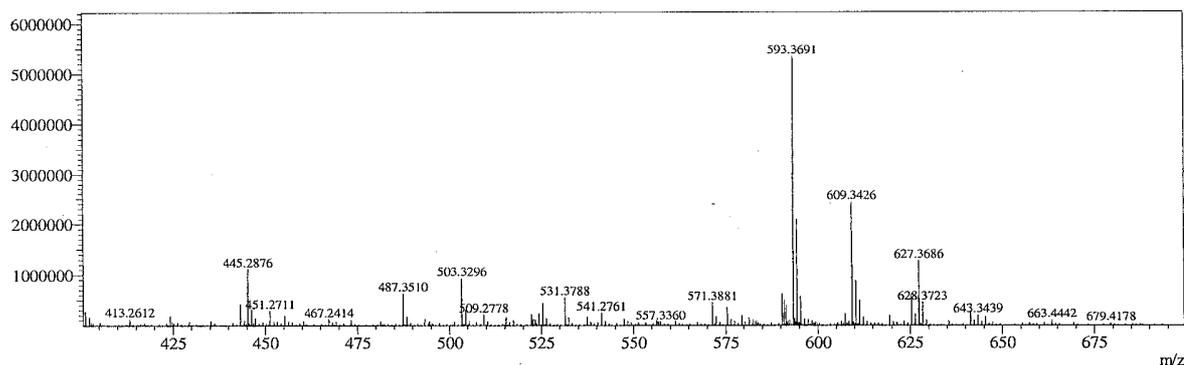


Figura 133: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância **10a**.

O espectro de RMN ^1H (Figura 134) exibiu dois simpletos largos em δ 5,26 (1H) e 4,83 (1H), atribuídos a dois hidrogênios olefínicos, quatro simpletos (típicos de grupos metílicos vinílicos) em δ 1,68, 1,67, 1,62 e 1,54. Esses dados, em conjunto com as correlações observada no experimento de $g\text{HMOC}$ (Fig. 135) e com os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (Tab. 7) em: δ 17,7 (CH_3), 17,9 (CH_3), 26,0 (2CH_3), 27,7 (CH_2), 29,1 (CH_2), 119,6 (CH), 122,5 (CH), 133,4 (C) e 134,4 (C) indicaram a presença de dois grupos prenilícos na substância.

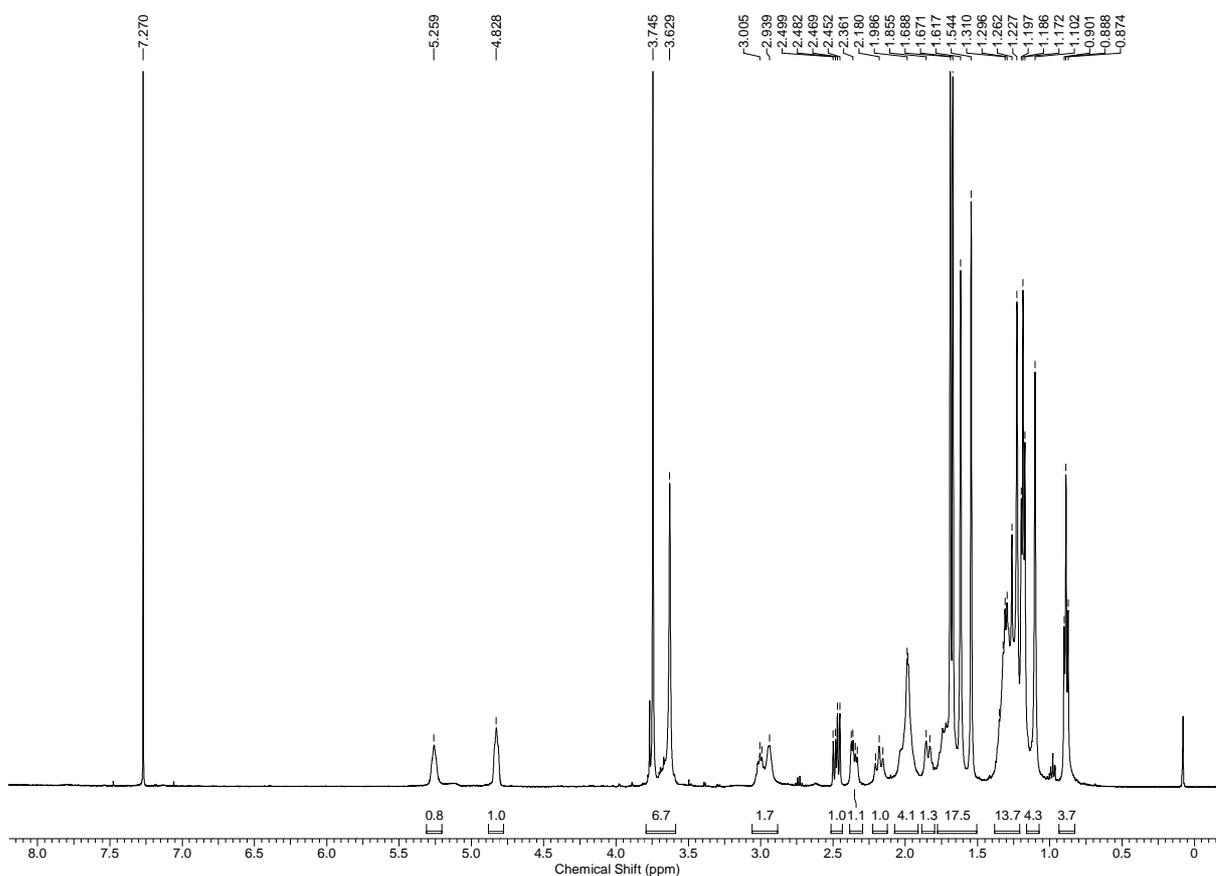


Figura 134: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da substância **10a**.

Foram observados ainda, dois simpletos em δ 3,75 (3H) e 3,63 (3H), atribuídos a dois grupos metoxílicos, dois multipletos entre δ 3,05 – 2,96 (1H) e δ 2,90 – 2,97 (1H), dois duplos dupletos em δ 2,48 (1H; $J = 8,5$ e $14,0$ Hz), δ 2,35 (1H; $J = 6,0$ e $14,0$ Hz), um triplete largo δ 2,18 (1H, $J = 12,5$ Hz), um multipletto entre δ 2,06 – 1,91 (4H), um dupletto largo em δ 1,84 (1H; $J = 12,5$ Hz), além de dois simpletos, dois dupletos e um triplete em: δ 1,23 (3H), 1,10 (3H), 1,19 (3H, $J = 6,7$ Hz), 1,18 (3H, $J = 6,7$ Hz), 0,89 (3H, $J = 6,7$ Hz), respectivamente.

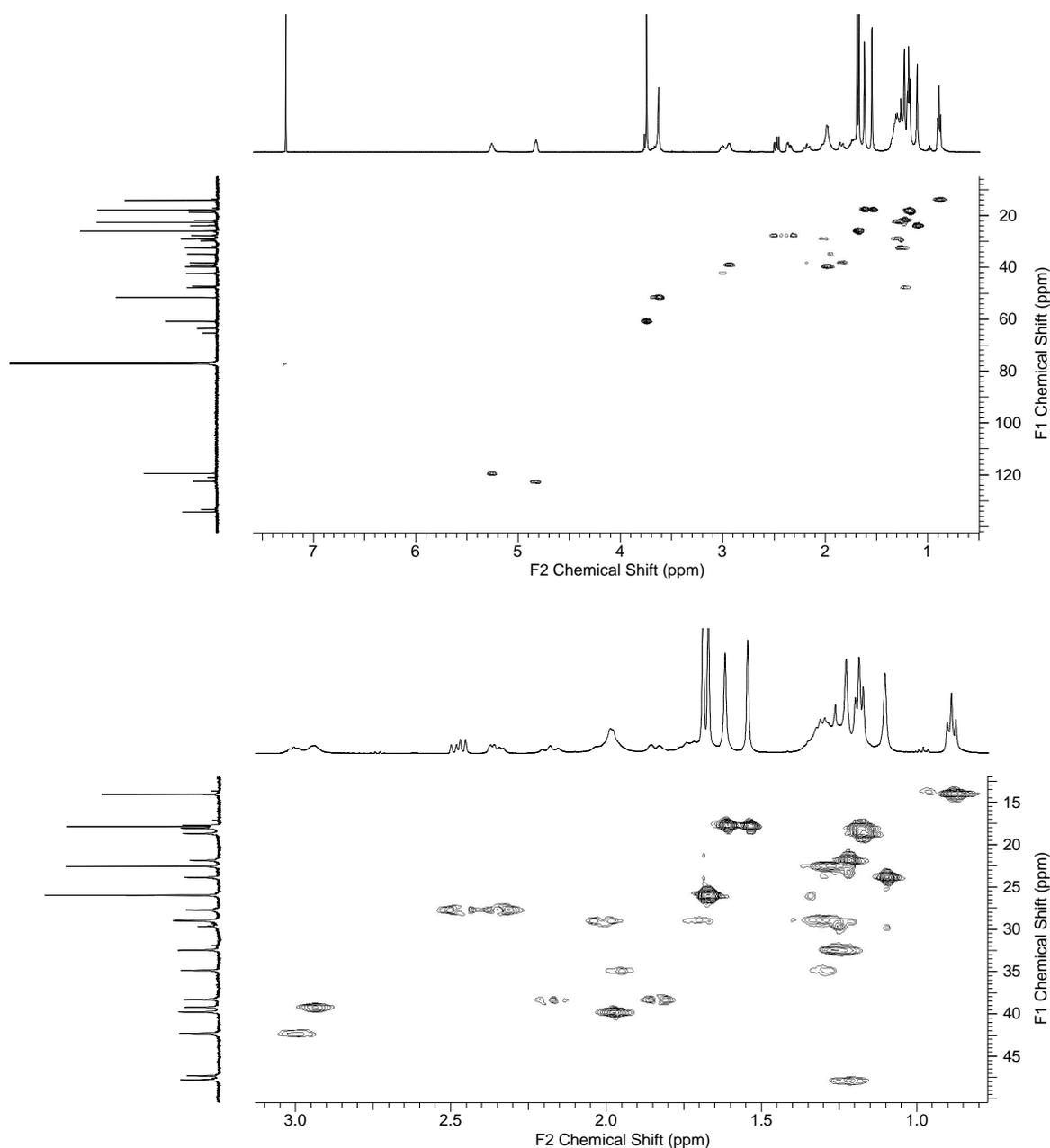


Figura 135: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl_3) da substância **10a**.

O experimento de gHMBC (Fig. 136 e 137) mostrou correlações do sinal δ 1,10 (s, 3H) com os sinais: δ 21,9 (CH₃) 47,3 (C), 47,8 (CH) e 65,3 (C); do sinal δ 1,23 (s, 3H) com δ 23,9, 47,3, 47,8 e 65,3; dos sinais δ 2,18 (1H, $J = 12,5$ Hz), e δ 1,84 (1H; $J = 12,5$ Hz), com δ 195,0 (atribuído a carbono carbonílico de cetona α,β -insaturado: absorção em 1662 cm^{-1} no espectro no IV, relativo ao estiramento da ligação C=O – Fig. 138); dos sinais δ 2,48 (1H; $J = 8,5$ e $14,0$ Hz) e δ 2,35 (1H; $J = 6,0$ e $14,0$ Hz), com δ 63,6 (C), 38,3 (CH₂), 195,0 e 207,8 (atribuído a carbono carbonílico de cetona não conjugada); do sinal atribuído a um grupo metoxílico, δ 3,75, com δ 176,7 e do sinal δ 1,22 com 29,1 (CH₂).

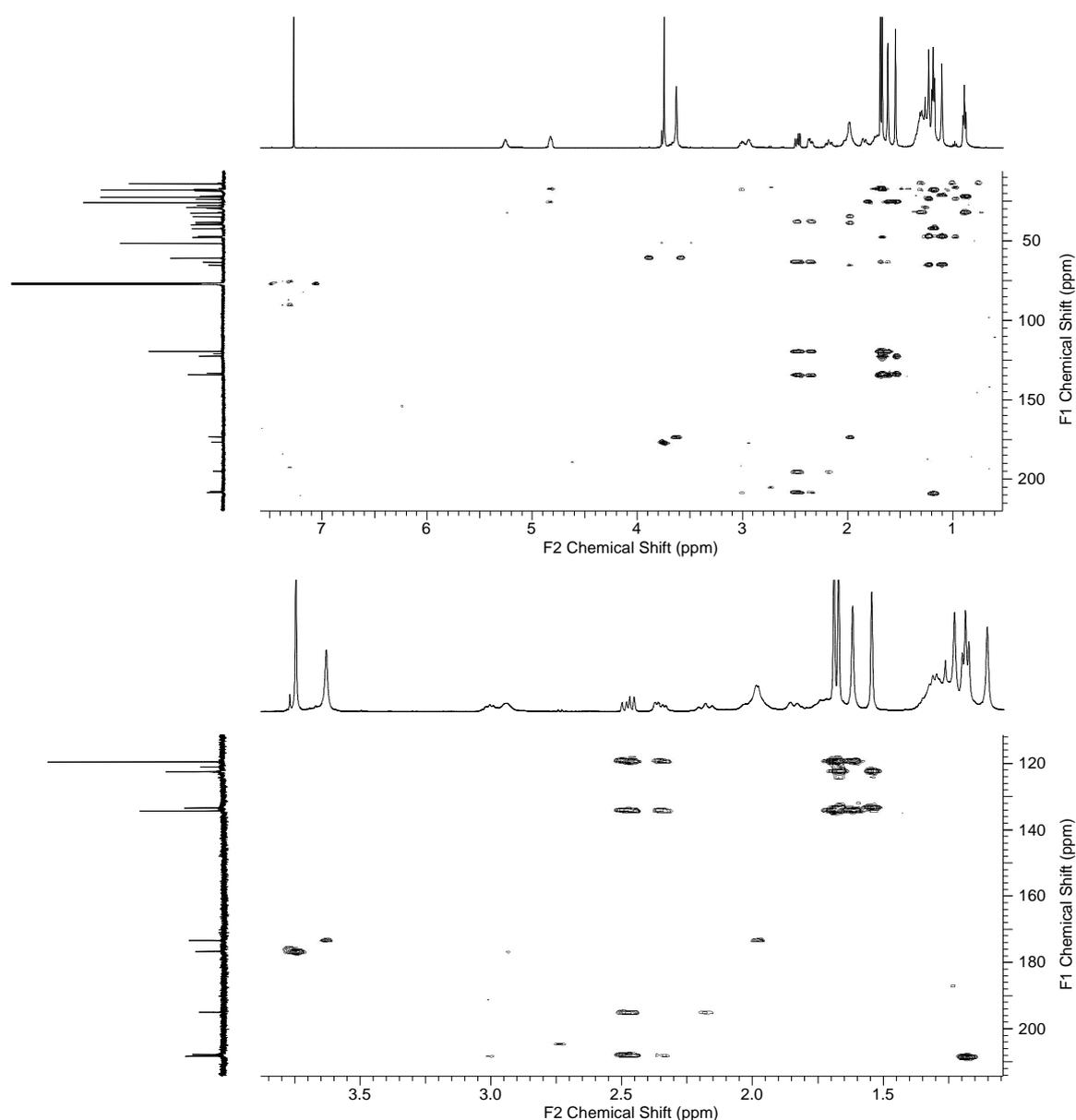


Figura 136: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da substância **10a**.

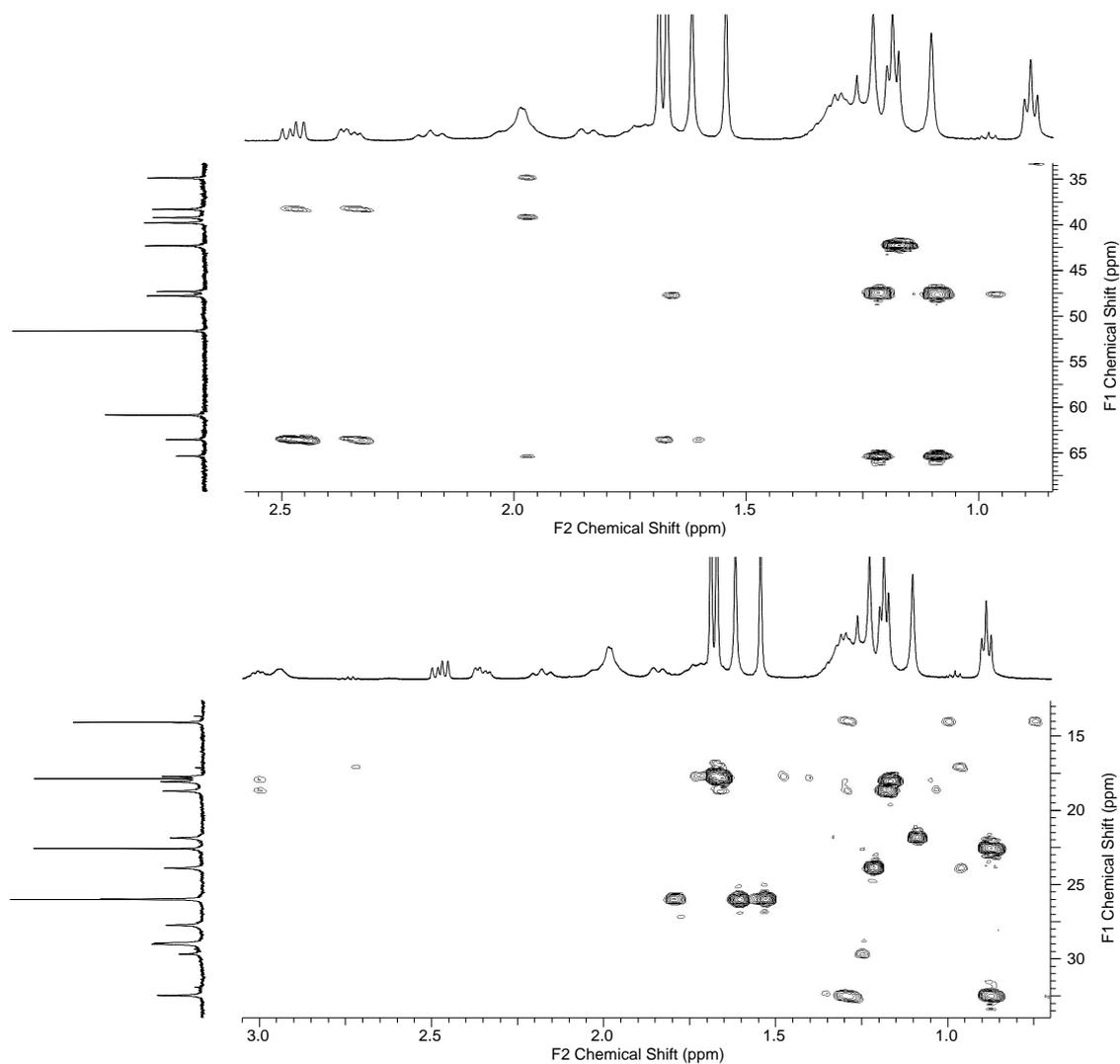


Figura 137: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 10a.

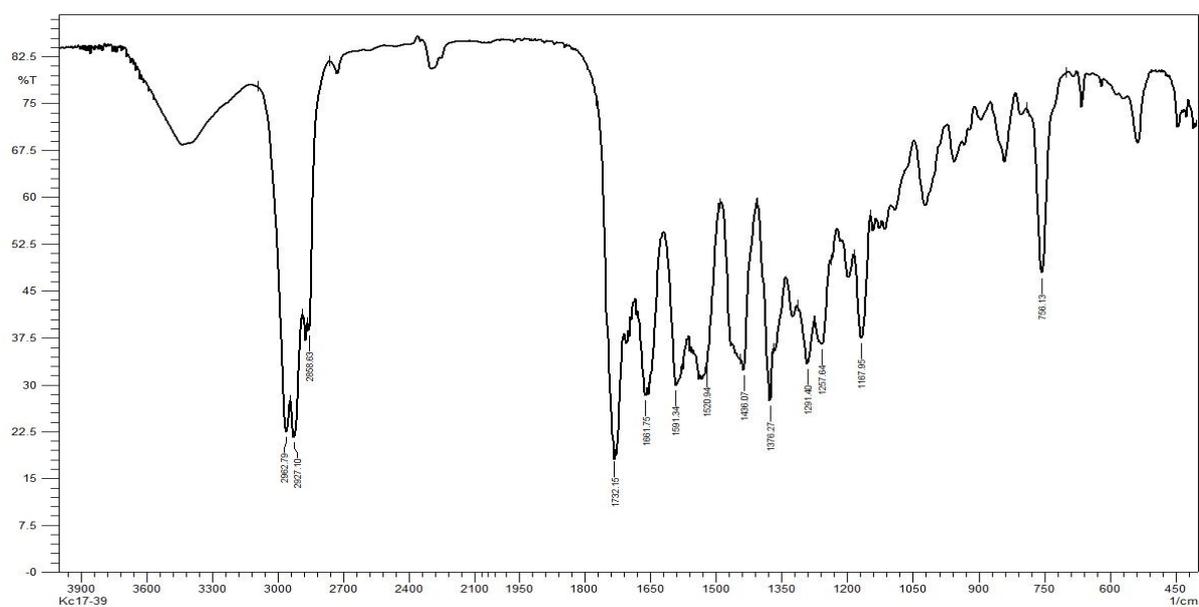


Figura 138: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da mistura da substância 10a.

Aqueles dados juntamente com o sinal δ 121,0 (C) observado no espectro de RMN ^{13}C e a comparação com os dados dos ácidos kiemeieróicos A e B, permitiram deduzir a presença de um anel bicyclo do tipo [3.3.1]nonano, substituído com duas metilas geminais em C-8 e duas prenilas ligadas aos carbonos C-5 e C-7, conforme Fig. 139.

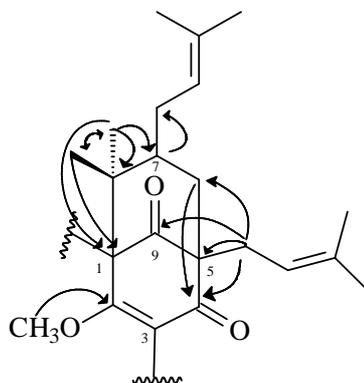


Figura 139: Correlações de gHMBC e fórmula estrutural parcial da substância **10a**

O espectro de gHMBC exibiu ainda, correlação do sinal atribuído a metoxila (δ 3,62), com o sinal δ 173,4 (atribuído a carbono carboxílico de éster: absorção em 1732 cm^{-1} no espectro no IV, relativo ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$); do sinal entre δ 2,06 – 1,91 com δ 173,4, 34,9, (CH_2), 39,2 (CH) e 65,3 (C-1); do sinal entre δ 2,97 – 2,90 (1H, *m*) com os sinais δ 173,4 e 176,7 (C-2); de δ 0,89 (3H, *J* = 6,7) com δ 32,7 (CH_2), e 22,9 (CH_2). Esse conjunto de informações, juntamente com a presença de um sinal em δ 14,1, característico de carbono metílico primário e de um carbono metilênico em δ 29,2, observados no espectro de RMN ^{13}C , permitiram deduzir a presença do grupo octanoato e ligá-lo ao carbono C-1, conforme Fig. 140.

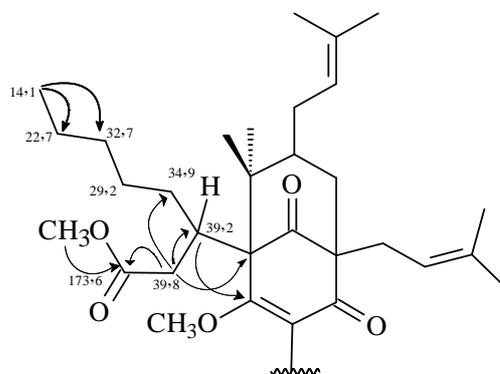


Figura 140: Correlações de gHMBC e estrutura parcial da substância **10a**.

Assim, dos 35 átomos de carbonos deduzidos a partir dos espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplados, DEPT 135 e espectrometria de massas, 30 já foram atribuídos e

justificado um IDH igual a oito, restando apenas fazer a atribuição de quatro átomos de carbonos sendo eles: um carbono de cetona (δ 208,3), um carbono metínico (δ 42,3) e dois carbonos metílicos (δ 18,7 e δ 18,1). Desta forma, o substituinte da posição 3 do anel biciclo[3.3.1]nonano foi definido a partir destes dados.

O experimento de gHMBC mostrou correlação do sinal entre δ 3,05 – 2,96 (1H, *m*) com δ 208,3, 18,7 e 18,1; de δ 1,19 (3H, *d*; $J = 6,7$) com δ 208,3, 42,3, e 18,7 e de δ 1,18 (3H, *d*; $J = 6,7$) com δ 208,3, 42,3, e 18,1. Esse conjunto de dados permitiram definir o substituinte da posição 3 do anel biciclo[3.3.1]nonano como sendo o grupo 2-metil-1-propanona e definir **10a** (Fig. 141) como sendo a estrutura da substância em análise, denominada de ácido kielmeyeróico C, sendo este o primeiro relato de seu isolamento.

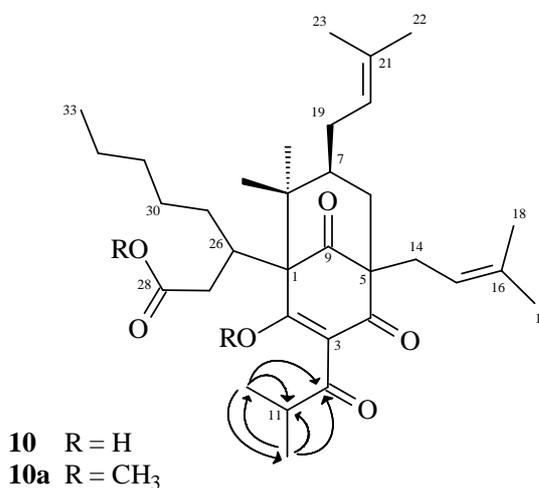


Figura 141: Estrutura do ácido kielmeyeróico C.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], DEPT 135, gHMQC, gHMBC, da substância **10a**.

Nº	δ ^1H (mult.; J em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		65,3 (C)	
2		176,7 (C)	
3		121,0 (C)	
4		195,0 (C)	
5		63,6 (C)	
6	1,84 (dt; 12,5) 2,18 (t; 12,5)	38,3 (CH ₂)	4
7	1,22*	47,8 (CH)	19
8		47,3 (C)	
9		207,8 (C)	
10		208,3 (C)	
11	3,05 – 2,96; (m)	42,3 (CH)	10; 12; 13
12	1,19; (d; 6,7)	18,1 (CH ₃)	10; 11; 13
13	1,18; (d; 6,7)	18,7 (CH ₃)	10; 11; 12
14	2,35 (dd; 6,0; 14,0) 2,48 (dd; 8,5; 14,0)	27,7 (CH ₂)	4; 5; 6; 9
15	5,26; sl	119,6 (CH)	
16		134,4 (C)	
17	1,68; s	26,0 (CH ₃)	16; 18
18	1,62; s	17,7 (CH ₃)	16; 17
19	2,01*	29,1 (CH ₂)	
20	4,83; sl	122,5 (CH)	22; 23
21		133,4 (C)	
22	1,67; s	26,0 (CH ₃)	21; 23
23	1,54; s	17,9 (CH ₃)	21; 22
24	1,10; s	23,9 (CH ₃)	1; 7; 8; 25
25	1,23; s	21,9 (CH ₃)	1; 7; 8; 24
26	2,97 – 2,90; (m)	39,2 (CH)	2; 28
27	1,99**	39,8 (CH ₂)	1; 26; 28; 29
28		173,4 (C)	
29		34,9 (CH ₂)	
30		29,2 (CH ₂)	
31		32,7 (CH ₂)	
32		22,9 (CH ₂)	
33	0,89; (t; 6,7)	14,1 (CH ₂)	
2-OCH ₃	3,75	60,9 (CH ₃)	2
28-OCH ₃	3,63	51,6 (CH ₃)	28

*multiplicidade não observada

4.2.3 Determinação estrutural da substância 11a

A substância **11a** foi obtida do extrato hexânico do caule de *K. cuspidata* contendo uma pequena impureza, após reação de metilação, na forma de um óleo amarelo, viscoso, opticamente ativo $\{[\alpha]_D^{20} - 126 (c 1,0, \text{CHCl}_3)\}$ e a determinação estrutural foi feita com base nos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gCOSY, gHMQC, gHMBC e HR-ESI-TOF.

O espectro de massas de alta resolução dessa substância (Figura 142), obtido através da técnica de ionização por electrospray (modo positivo), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em 607,3819 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

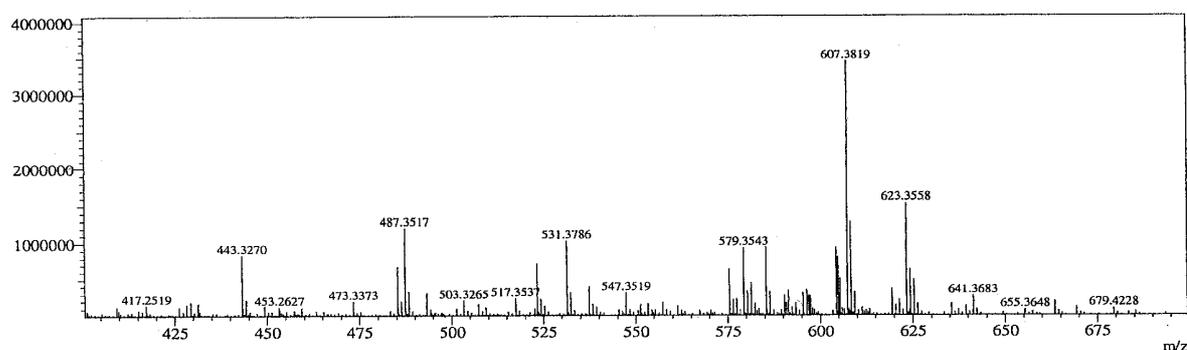


Figura 142: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da substância 11a.

O espectro de infravermelho mostrou bandas em 1729, 1666 cm^{-1} característico de carbonila de éster e de cetona conjugada, respectivamente (Fig. 143).

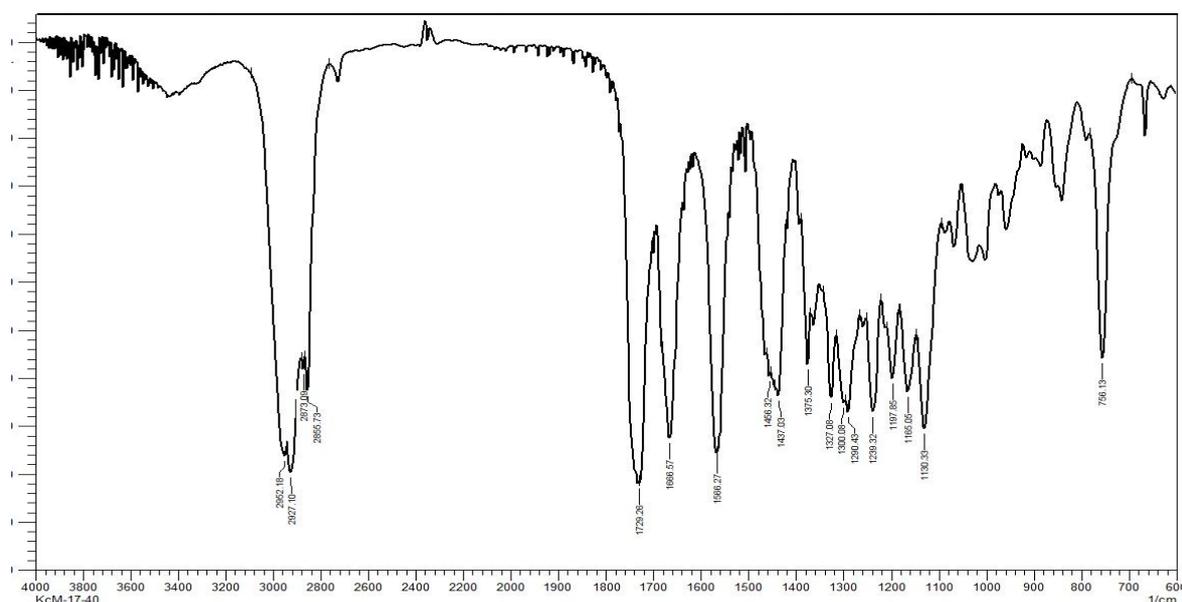


Figura 143: Espectro de infravermelho (filme CHCl_3) da substância 11a.

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 144) e DEPT 135 (Tab. 9) indicaram a presença de doze carbonos metílicos, oito carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos, dos quais, dois do tipo sp^2 , e doze carbonos não-hidrogenados, sendo dois deles referentes a carbonos carbonílicos e um carbono carboxílico. Assim, foi deduzida a fórmula molecular como sendo $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_6$, apresentando IDH igual a nove.

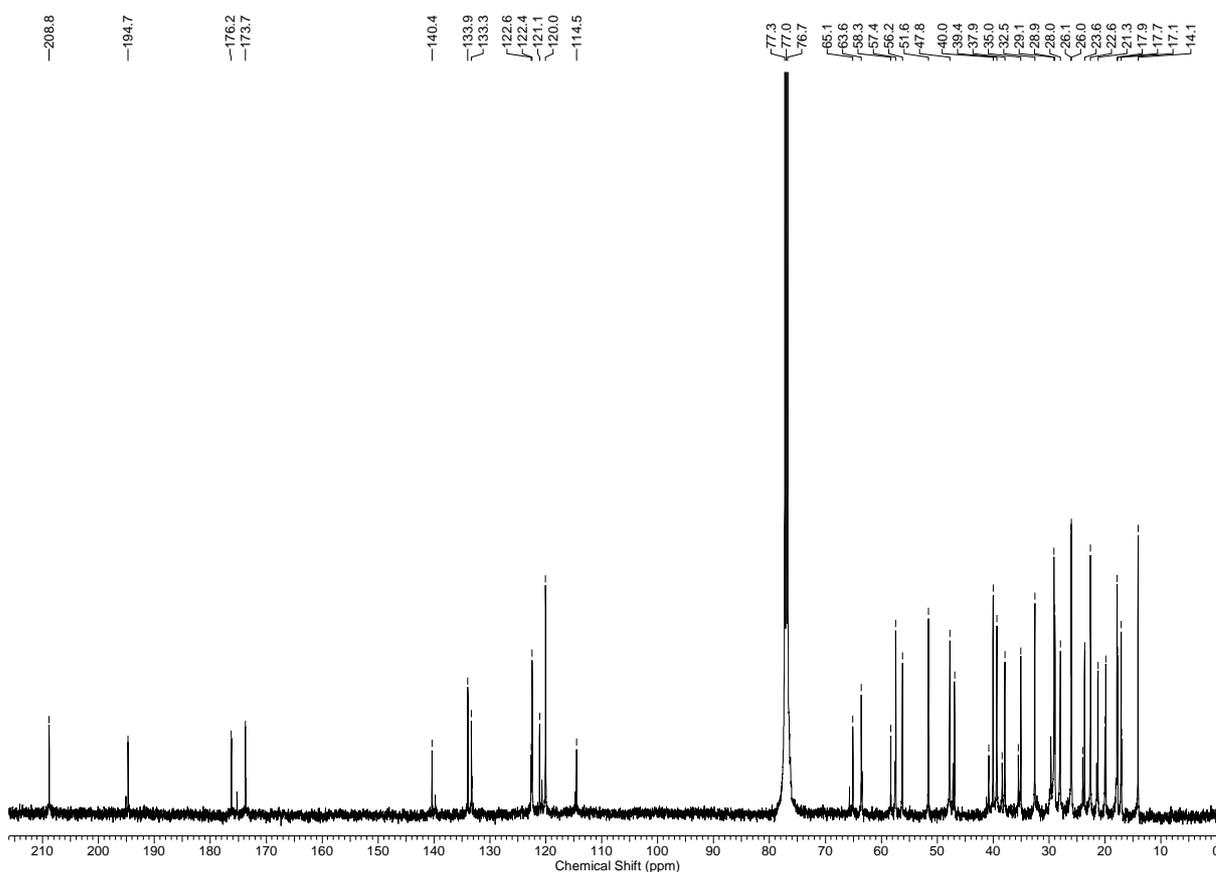


Figura 144: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **11a**.

O espectro de RMN ^1H (Figura 145) exibiu um conjunto de sinais muito parecido com o do ácido kiemyrónico C. Foram observados dois tripletos largos em δ 5,33 (1H; $J = 7,5$ Hz) e δ 4,85 (1H; $J = 5,5$ Hz), atribuídos a dois hidrogênios olefínicos, que em conjunto com quatro simpletos, atribuídos a quatro grupos metílicos vinílicos, em δ 1,70, 1,68, 1,63 e 1,54, bem como os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (Tab. 9) em: δ 17,7 (CH_3), 17,9 (CH_3), 26,0 (CH_3), 26,1 (CH_3), 28,0 (CH_2), 28,9 (CH_2), 120,0 (CH), 122,4 (CH), 133,3 (C) e 133,9 (C), atribuídos a partir do experimento de gHMQC (Fig. 146 e 147), indicaram a presença de dois grupos prenílicos na substância.

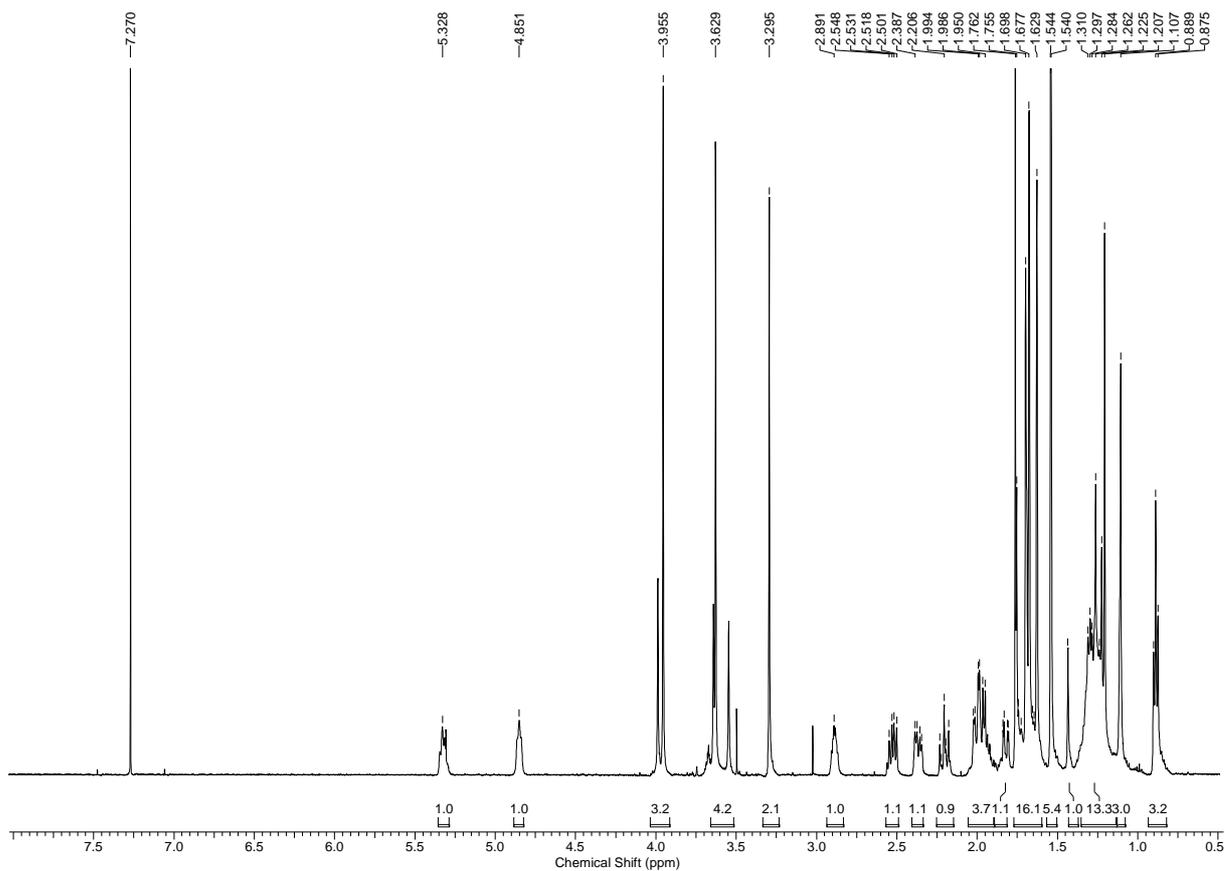


Figura 145: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da substância **11a**.

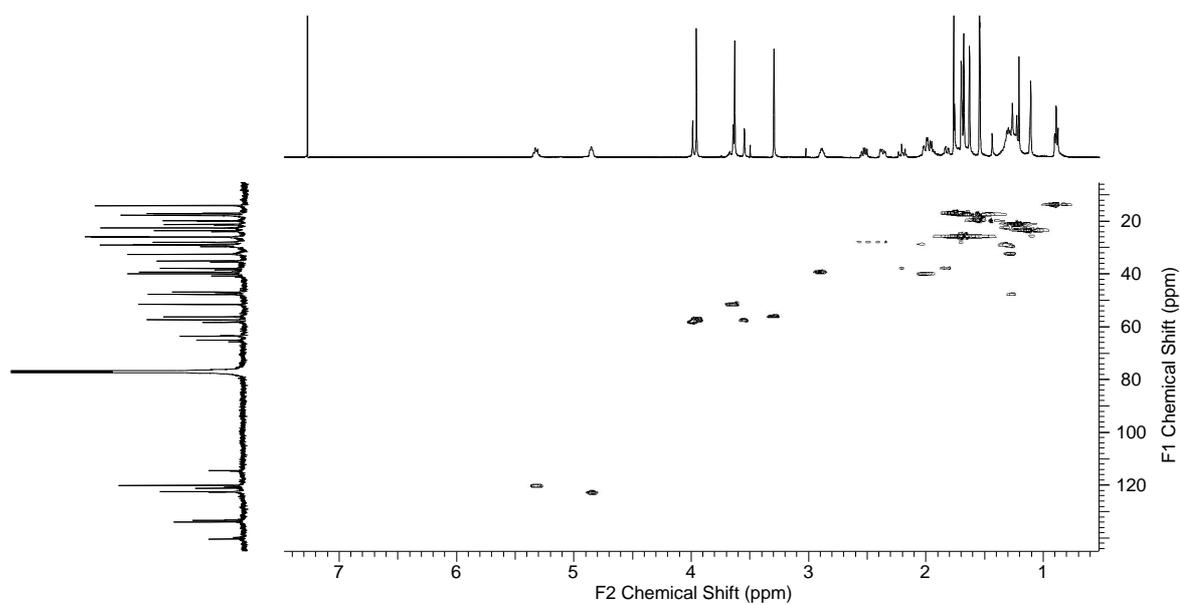


Figura 146: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **11a**.

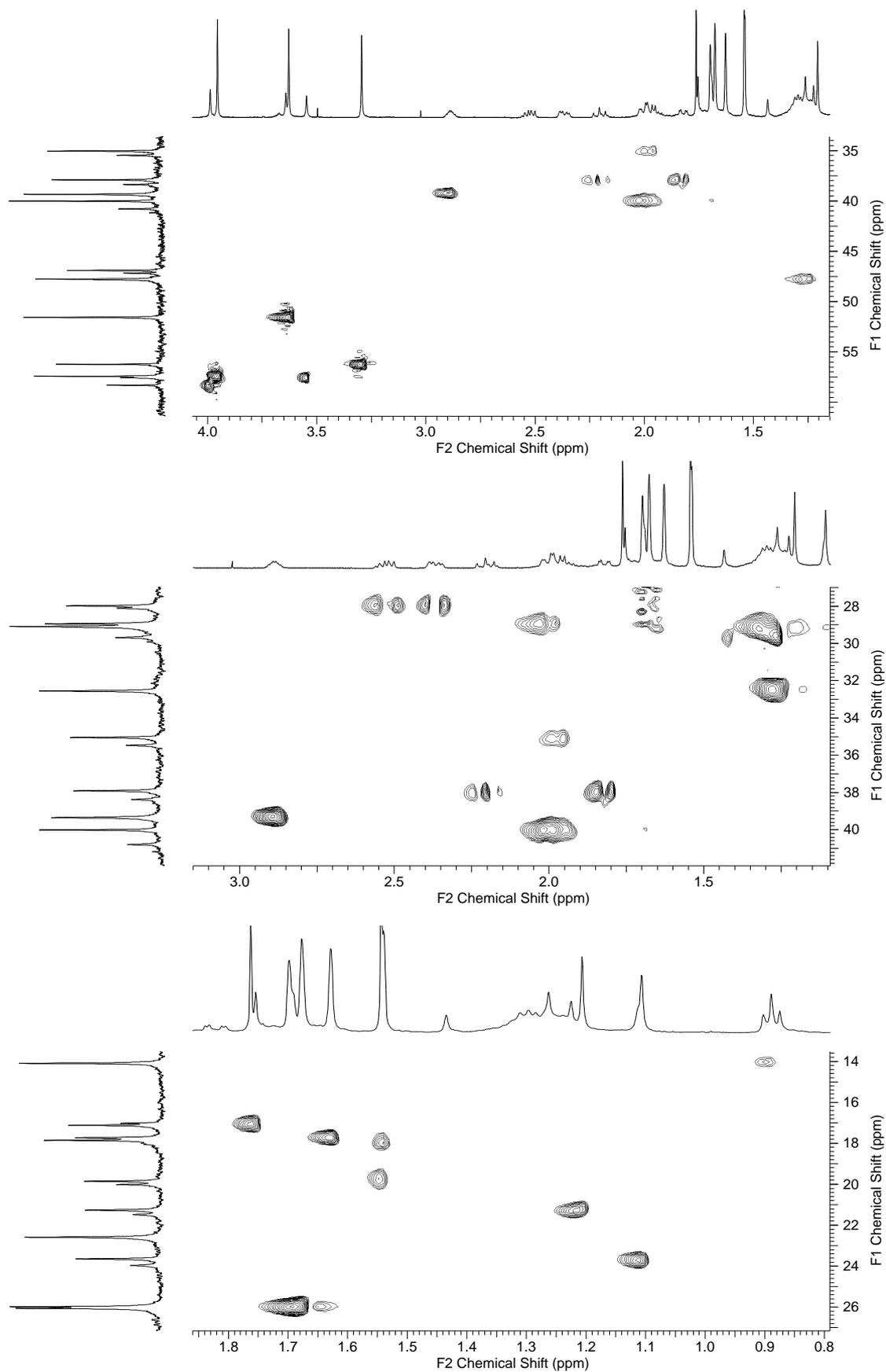


Figura 147: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl_3) da substância **11a**.

A substância **11a** apresentou, na região entre δ 4,00 – 3,00, alguns sinais que evidenciaram a presença de um contaminante, principalmente pela presença de 3 sinais característicos de três metoxilas em δ 3,99 (s), 3,64 (s) e 3,55 (s), provavelmente de um isômero de **11a**. Excluindo-se esses sinais, pode-se verificar um simpleto a mais que o ácido Kiemeyróico C, sendo observados três simpletos – cada um deles integrando para três hidrogênios em: δ 3,96, 3,63 e 3,29 e foram atribuídos a três grupos metoxílicos. Na região entre δ 3,00 – 1,78 (como pode ser visto na Fig. 148), destacaram-se um multipletto entre δ 2,85 – 2,95 (1H), seis duplos dupletos em δ 2,52 (1H; $J = 8,3$ e $14,6$ Hz), δ 2,37 (1H; $J = 6,3$ e $14,6$ Hz), δ 2,21 (1H; $J = 5,4$ e $13,7$ Hz), δ 2,00 (1H; $J = 4,0$ e $14,0$ Hz), δ 1,95 (1H; $J = 7,5$ e $14,0$ Hz) e δ 1,82 (1H; $J = 2,9$ e $13,7$ Hz). Além desses sinais, o espectro de RMN ^1H apresentou quatro simpletos em δ 1,76 (3H), 1,55 (3H), 1,21 (3H), 1,10 (3H) e um triplete em δ 0,89 (3H, $J = 6,5$).

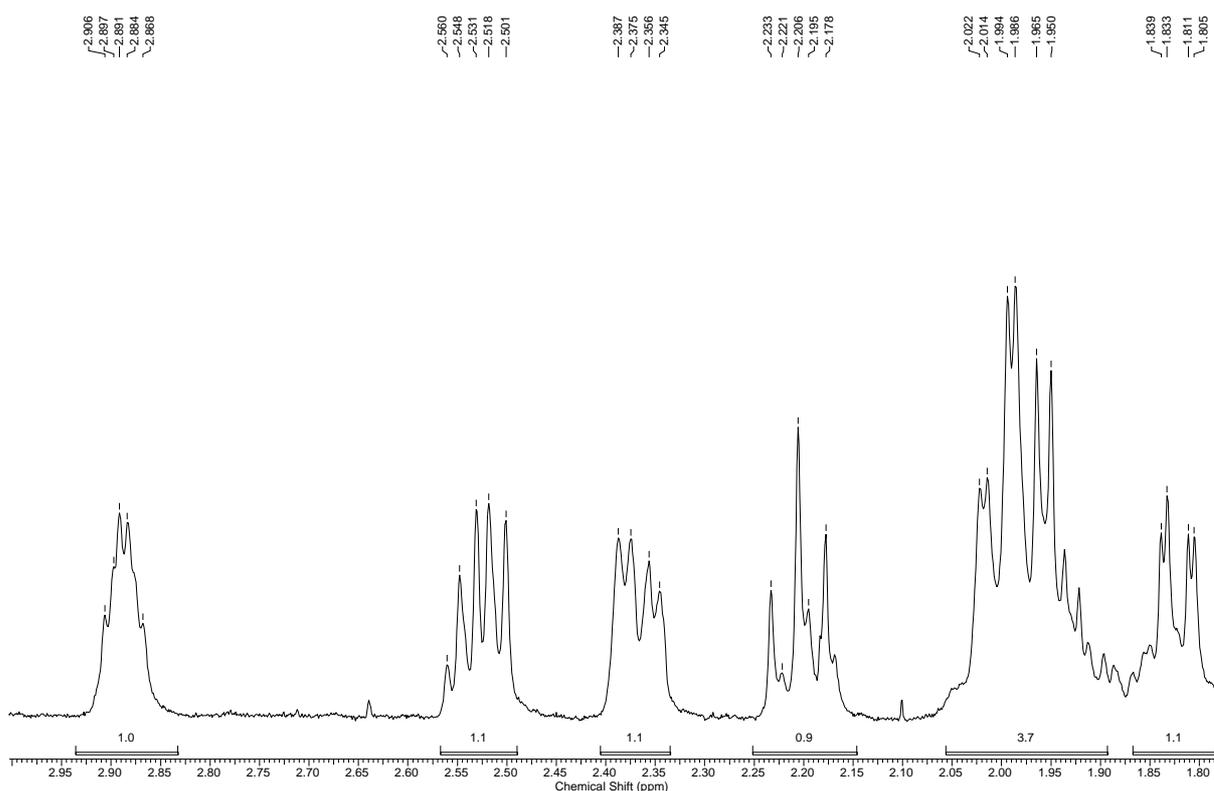


Figura 148: Ampliação da região entre δ 3,00 – 1,78 do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **11a**.

O experimento de gHMBC (Fig. 150 – 152) mostrou correlações do sinal δ 1,10 (3H, s) com os sinais δ 65,1 (C), 47,8 (CH), 47,2 (C) e 21,3 (CH_3); do sinal δ 1,21 (3H, s) com δ 23,6 (CH_3), 65,1, 47,8 e 47,2. Do sinal δ 1,82 (1H; $J = 2,9$ e $13,7$ Hz) com δ 208,8 (atribuído a uma carbonila não conjugada); de δ 2,21 (1H; $J = 5,4$ e $13,7$ Hz) com δ 194,7 (atribuído a uma carbonila α,β -insaturada), δ 63,6 (C), 47,8 (CH) e 47,2 (C). Também foi

observada correlação do sinal atribuído a um grupo metoxílico (δ 3,96) com δ 176,2 – atribuído a um carbono de ligação dupla ligado a oxigênio. Esse conjunto de dados juntamente com a presença de um sinal em δ 114,5 no espectro de RMN ^{13}C e a comparação com os dados do ácido kiameyróico C, permitiram deduzir a presença de um anel biciclo do tipo [3.3.1] e chegar à estrutura parcial mostrada na Fig. 150.

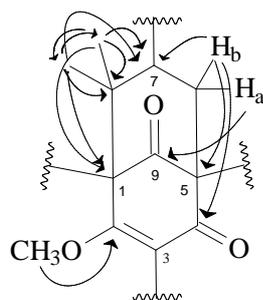


Figura 149: Correlações de gHMBC e estrutura parcial da substância **11a**.

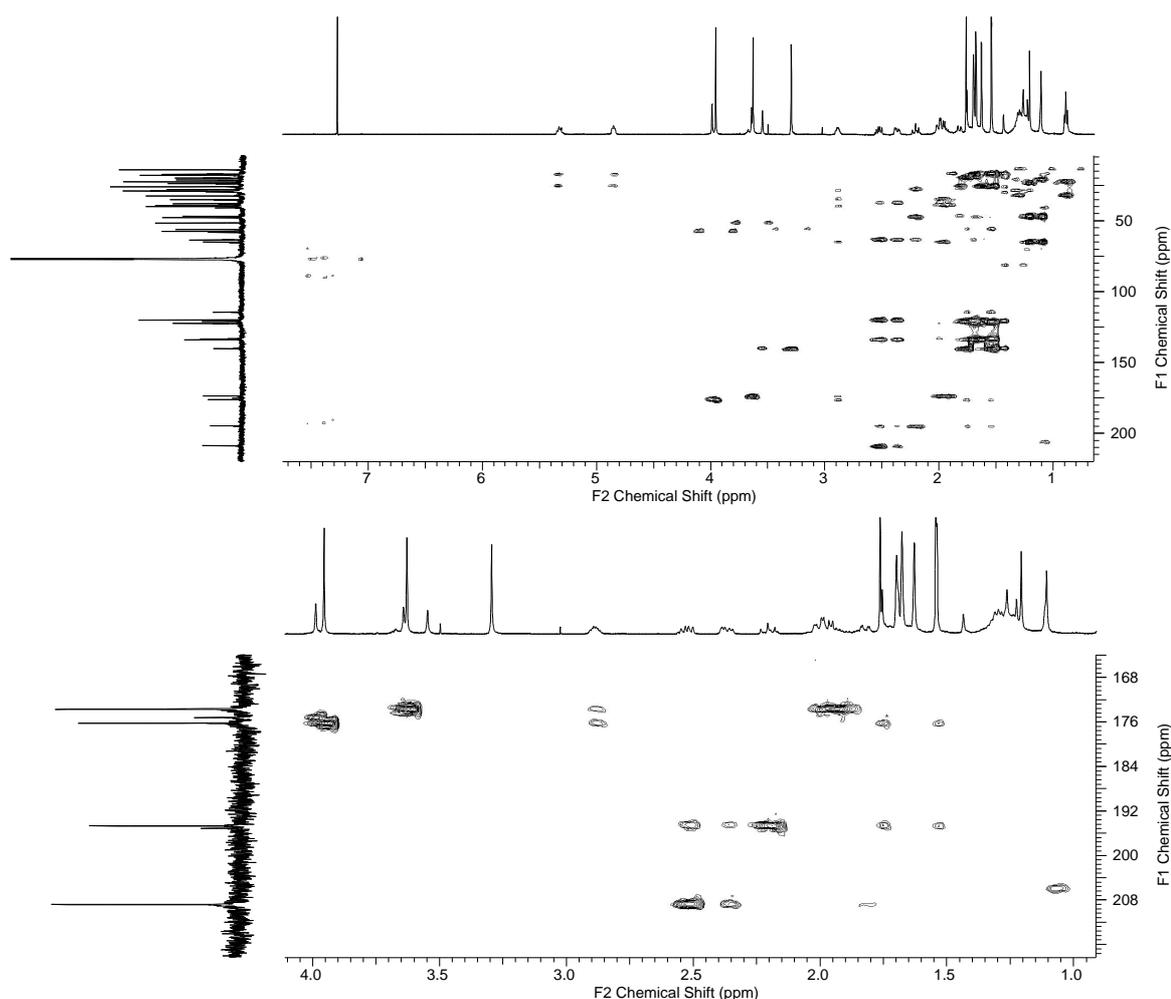


Figura 150: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **11a**.

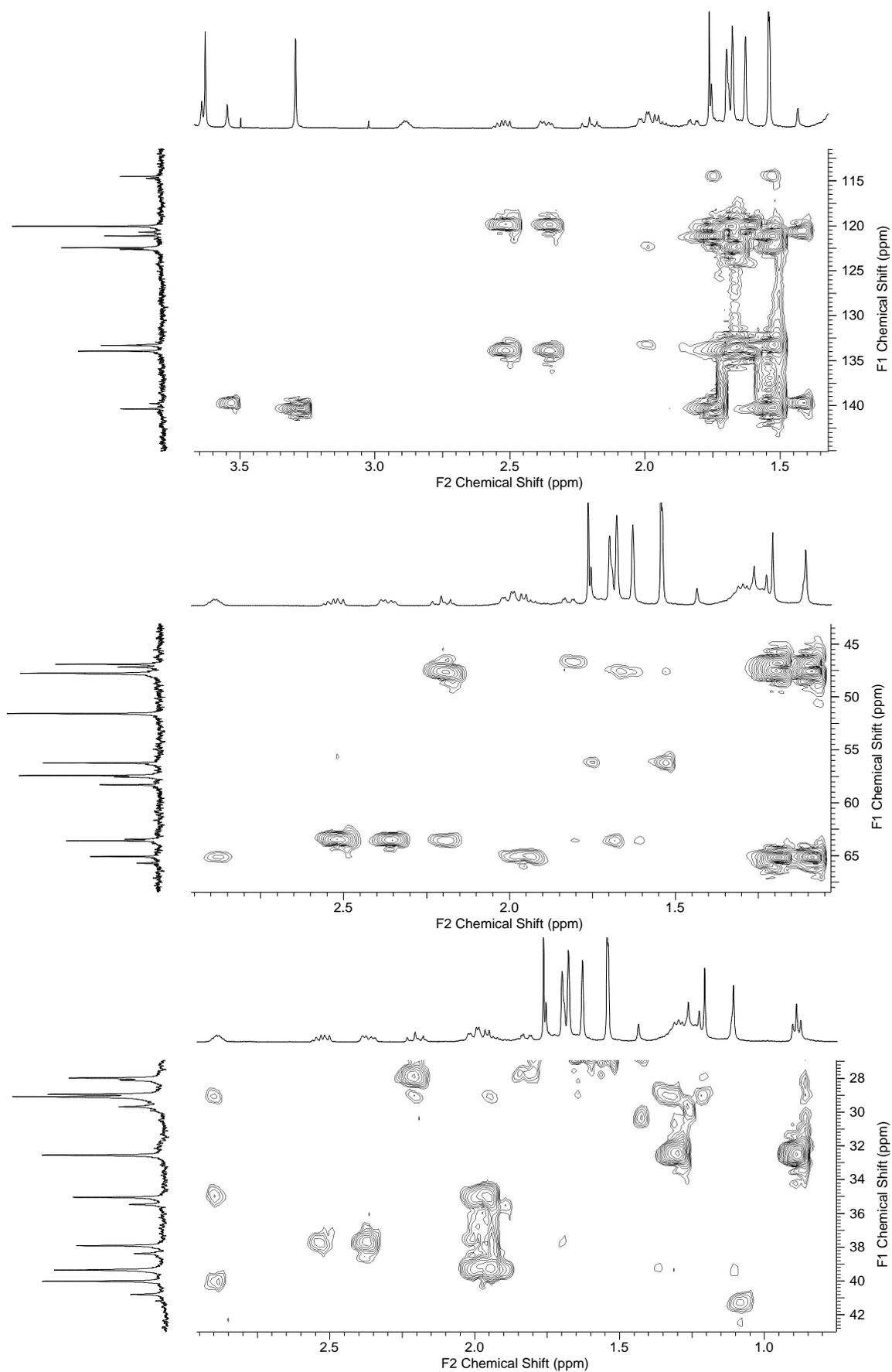


Figura 151: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância 11a.

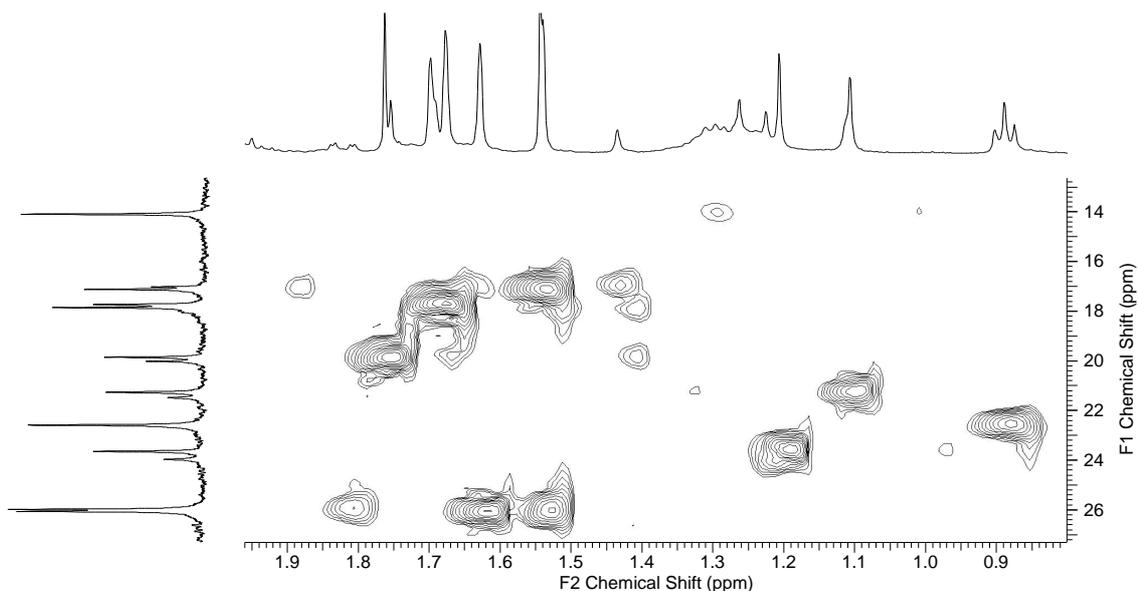


Figura 152: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da substância **11a**.

O experimento de gCOSY (Fig. 153), mostrou correlação do sinal entre δ 2,85 – 2,95 (1H, *m*) com os sinais δ 2,00 (1H; $J = 4,0$ e $14,0$), δ 1,95 (1H; $J = 7,5$ e $14,0$) e com um conjunto de sinais entre δ 1,35 – 1,25, característico de hidrogênios metilênicos. Observou-se também correlação destes sinais com o tripleto em δ 0,89 (3H, $J = 6,5$) – Fig. 154.

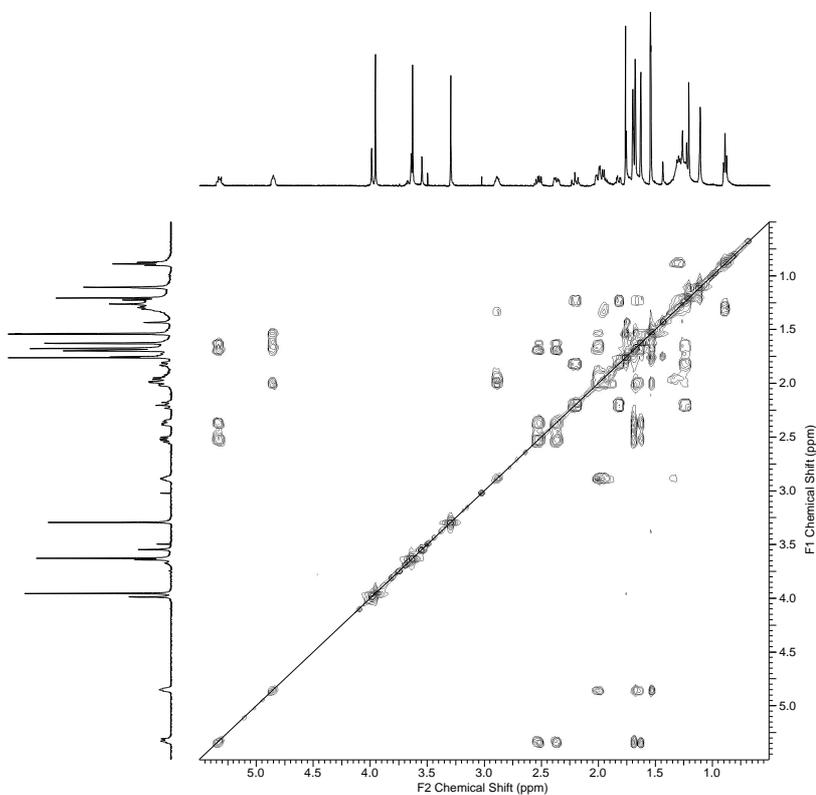


Figura 153: Correlações de H – H observadas no experimento de gCOSY (CDCl_3) da substância **11a**.

Foram observadas correlações de gHMBC do sinal entre δ 2,85 – 2,95 (1H, *m*) com o sinal atribuído a carboxila de éster em δ 173,7 e com os sinais de carbonos metilênicos: δ 40,0, 35,1 e 29,1; dos sinais δ 2,00 (1H; $J = 4,0$ e $14,0$) e δ 1,95 (1H; $J = 7,5$ e $14,0$) com δ 173,7, 39,3 (CH) e 35,1; de δ 0,89 (3H, $J = 6,5$) com δ 32,5 e 22,5 (CH₂), além de uma correlação do sinal δ 3,63 com 173,7. Assim, foi possível deduzir a presença de um grupo octanoato de metila conforme Fig. 154.

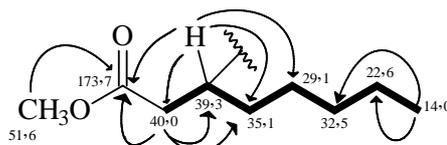


Figura 154: Correlações de gCOSY (—) e gHMBC (---) e dados de RMN ¹³C (ppm) do grupo octanoato de metila.

O sinal entre δ 2,85 – 2,95 também mostrou correlação com os sinais δ 65,1 e 176,2. Essas correlações permitiram posicionar o grupo octanoato de metila no carbono C-1 (δ 65,1). Também foi observada correlação de δ 2,22 (H_b-6) com δ 28,9 (atribuído ao carbono metilênico do grupo prenílico) e dos sinais δ 2,52 (1H; $J = 8,3$ e $14,6$ Hz) e δ 2,37 (1H; $J = 6,3$ e $14,6$ Hz) – atribuídos aos hidrogênios metilênico de um dos grupos prenílicos – com os sinais das carbonila δ 208,8 e 194,7. Essas correlações permitiram posicionar os grupos prenílicos nos carbonos C-5 e C-7 e deduzir a estrutura parcial da Fig 155.

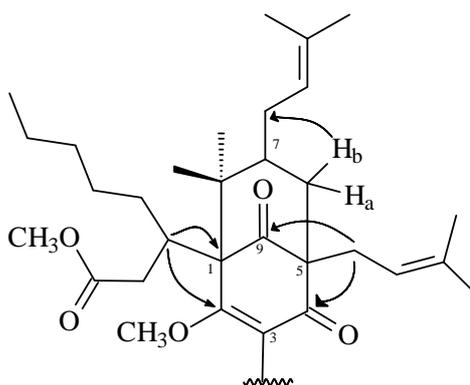


Figura 155: Correlações de gHMBC e fórmula estrutural parcial da substância **11a**.

O substituinte da posição 3 do anel biciclo foi determinado a partir das correlações observadas no experimento de gHMBC. Este exibiu correlações do sinal atribuído a uma metoxila em δ 3,29 com um sinal de carbono olefínico não hidrogenado em δ 140,4; do

sinal δ 1,55 (CH_3) com os sinais δ 140,4, 121,1 e 17,1; do sinal δ 1,76 (CH_3) com os sinais δ 140,4, 121,1 e 19,9. Também foram observadas correlações a quatro e cinco ligações ($J_{\text{C,H}} n > 3$) dos sinais referentes a hidrogênios metílicos (δ 1,55 e 1,76) com os sinais δ 176,2, 114,5 e 194,7, conforme mostrado na Fig. 156.

Araya-Maturama e colaboradores (2005) relatam que esses tipos de correlações não padronizadas podem aparecer no espectro de HMBC padrão ou modificado certos parâmetros ao realizar este experimento e que elas geralmente são descartadas devido à grande quantidade de informação estrutural que pode ser obtido com um maior número de correlação de longo alcance.

As correlações supracitadas permitiram determinar o substituinte da posição 3 do anel biciclo[3.3.1]nonano como sendo o grupo 1-metoxi-2-metilprop-1-enil e definir **11a** (Fig. 156) como sendo a estrutura da substância em análise, denominada de ácido kielmeyeróico D, sendo este o primeiro relato de seu isolamento.

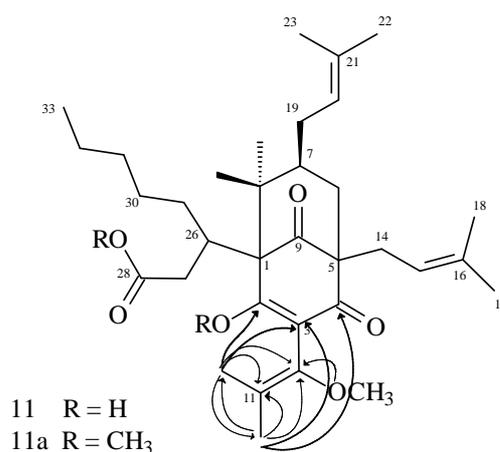


Figura 156: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido kielmeyeróico D.

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC, da substância **11a**.

Nº	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ $^{13}\text{C}/\text{DEPT 135}$	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		65,1 (C)	
2		176,2 (C)	
3		114,5 (C)	
4		194,7 (C)	
5		63,6 (C)	
6	1,82 (dd; 2,9; 13,7) 2,21 (dd; 5,4; 13,7)	37,9 (CH_2)	4, 5, 7, 9, 19
7	1,23*	47,8 (CH)	
8		47,2 (C)	
9		208,8 (C)	
10		140,4 (C)	
11		121,1 (C)	
12	1,55 (s)	19,9 (CH_3)	2, 3, 4, 10, 11, 13
13	1,76 (s)	17,1 (CH_3)	2, 3, 4, 10, 11, 12
14	2,37 (dd; 6,3; 14,6) 2,52 (dd; 8,3; 14,6)	28,0 (CH_2)	4, 9, 15, 16
15	5,33 <i>tl</i>	120,0 (CH)	
16		133,9 (C)	
17	1,70 (s)	26,1 (CH_3)	15, 18, 18
18	1,63 (s)	17,7 (CH_3)	15, 16, 17
19	2,00* 1,65*	28,9 (CH_2)	
20	4,85	122,4 (CH)	22, 23
21		133,3 (C)	
22	1,68 (s)	26,0 (CH_3)	20, 21, 23
23	1,54 (s)	17,9 (CH_3)	20, 21, 22
24	1,10 (s)	23,6 (CH_3)	1, 7, 8, 25
25	1,21 (s)	21,3 (CH_3)	1, 7, 8, 24
26	2,93-2,85 (m) 1,95 (dd; 7,5; 14,0) 2,00 (dd; 4,0; 14,0)	39,4 (CH)	1, 2, 27, 28, 29, 30
27		40,0 (CH_2)	1, 26, 28, 29
28		173,7 (C)	
29	1,95* 1,30*	35,0 (CH_2)	
30		29,1 (CH_2)	
31	1,29*	32,5 (CH_2)	
32		22,6 (CH_2)	
33	0,89 (t; 6,5)	14,1 (CH_3)	31, 32
28-OCH ₃	3,63 (s)	51,6 (CH_3)	28
2-OCH ₃	3,96 (s)	57,4 (CH_3)	2
10-OCH ₃	3,29 (s)	56,2 (CH_3)	10

*multiplicidade não observada

4.2.4 Determinação estrutural da substância 12a

A fração KcM-17-15 foi obtida do extrato hexânico do caule de *K. cuspidata*, após reação de metilação, na forma de um óleo amarelo viscoso. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , indicaram que essa fração era constituída por uma mistura de pelo menos três componentes com estruturas muito semelhantes.

O componente majoritário foi denominado substância **12a** e sua estrutura pode ser determinada após cuidadosa análise dos dados obtidos dos experimentos de IV, RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135, gHMQC, gHMBC e HR-ESI-TOF. Para a determinação estrutural foram selecionados os sinais de maior intensidade nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN ^{13}C totalmente desacoplados (Figura 157) e DEPT 135 (Tab. 10) indicaram a presença de dez carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, sendo um deles do tipo sp^2 , quatro carbonos metínicos, dos quais, do tipo sp^2 e doze carbonos não-hidrogenados, sendo dois deles referentes a carbonos carbonílicos e um carbono carboxílico e outros cinco do tipo sp^2 , totalizando 35 carbonos e cinquenta e dois hidrogênios.

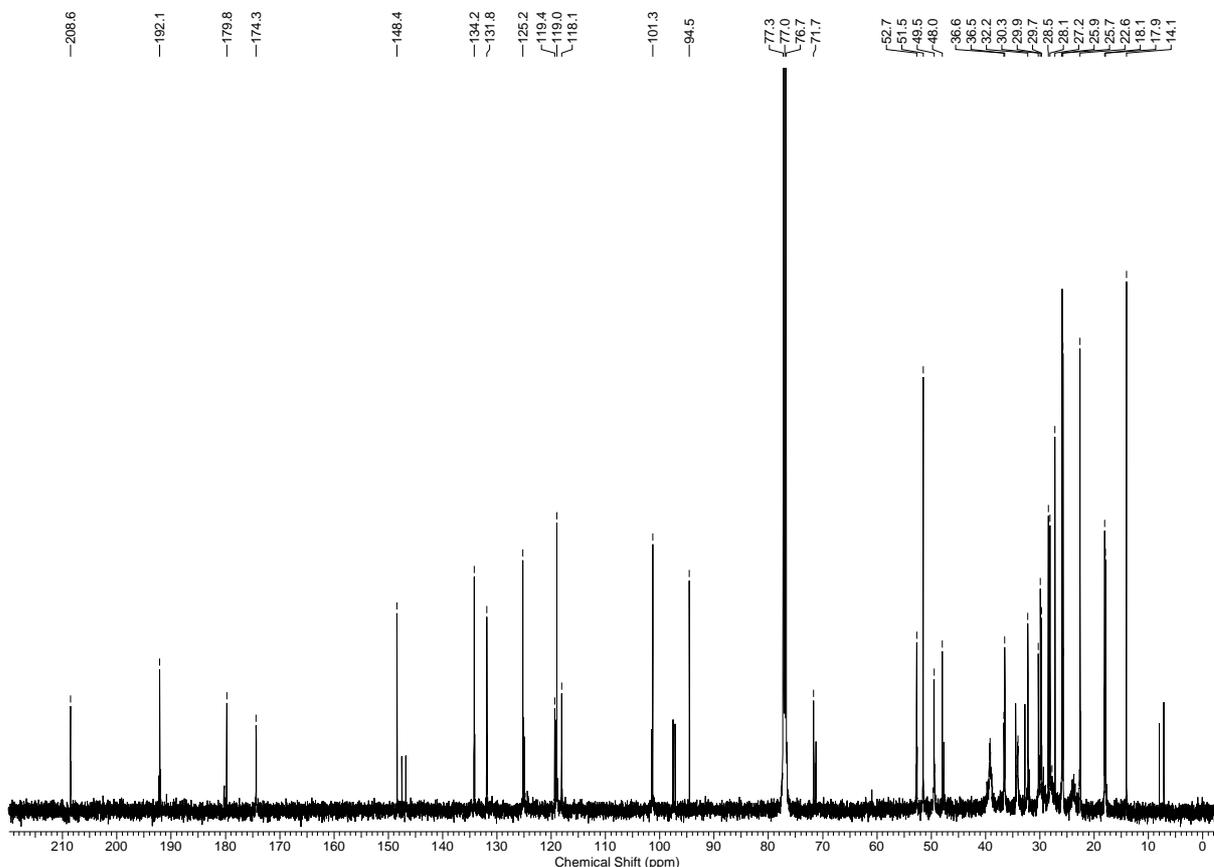


Figura 157: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração KcM-17-15.

O espectro de massas de alta resolução da mistura (Figura 158), obtido através da técnica de ionização por electrospray (modo positivo), exibiu pico relativo à presença de molécula cationizada em 575,3613 $[M + Na]^+$ (calculado para $C_{35}H_{52}O_5Na$: 575,3712). Assim, foi deduzida a fórmula molecular como sendo ($C_{35}H_{52}O_5$), apresentando IDH igual a dez.

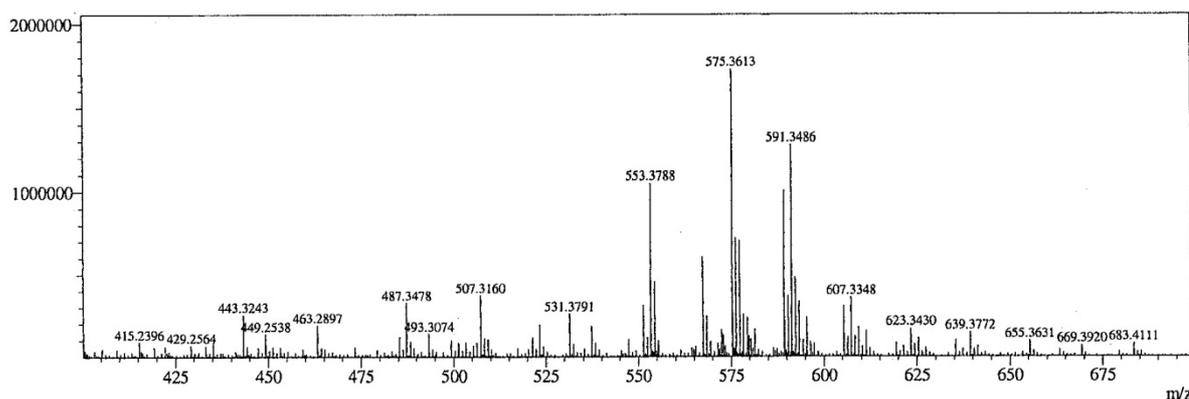


Figura 158: Espectro de massa de alta resolução [ESI (+)] da fração KcM-17-15.

No espectro de RMN 1H (Fig. 159) foram selecionados quatro sinais característicos de hidrogênios olefínicos, sendo dois simpletos em δ 5,78 e 4,71 e dois tripletos largos em δ 5,02 e 4,95, cada um integrando para um hidrogênio. Os dois simpletos, juntamente com a presença de um carbono metilênico do tipo sp^2 em δ 101,3, observado no espectro de RMN ^{13}C , sugeriram a presença de uma ligação dupla terminal. Já os dois tripletos largos, juntamente com a presença de outros quatro simpletos – típicos de grupos metílicos vinílicos – em δ 1,66, 1,64, 1,64 e 1,51, indicaram a presença de duas duplas olefínicas trissubstituídas.

Observou-se também um simpleto em δ 3,67 (3H), atribuído a um grupo metoxílico, um multipeto entre δ 2,98 – 2,92 (1H) e um conjunto de sinais entre δ 2,55 – 1,95 integrando para oito hidrogênios. Destes, foi possível identificar dois duplos dupletos em δ 2,41 (1H; $J = 8,5$ e $14,5$ Hz) e δ 2,05 (1H; $J = 2,0$ e $14,0$ Hz) e um dupeto em δ 2,11 (1H; $J = 6,5$ Hz). Os demais sinais foram relatados com multipletos, pois, devido à sobreposição dos sinais não foi possível determinar a multiplicidade dos mesmos, sendo eles: δ 2,51 – 2,44, 2,37 – 2,30 e 2,27 – 2,21, conforme ampliação exibida na Fig. 160.

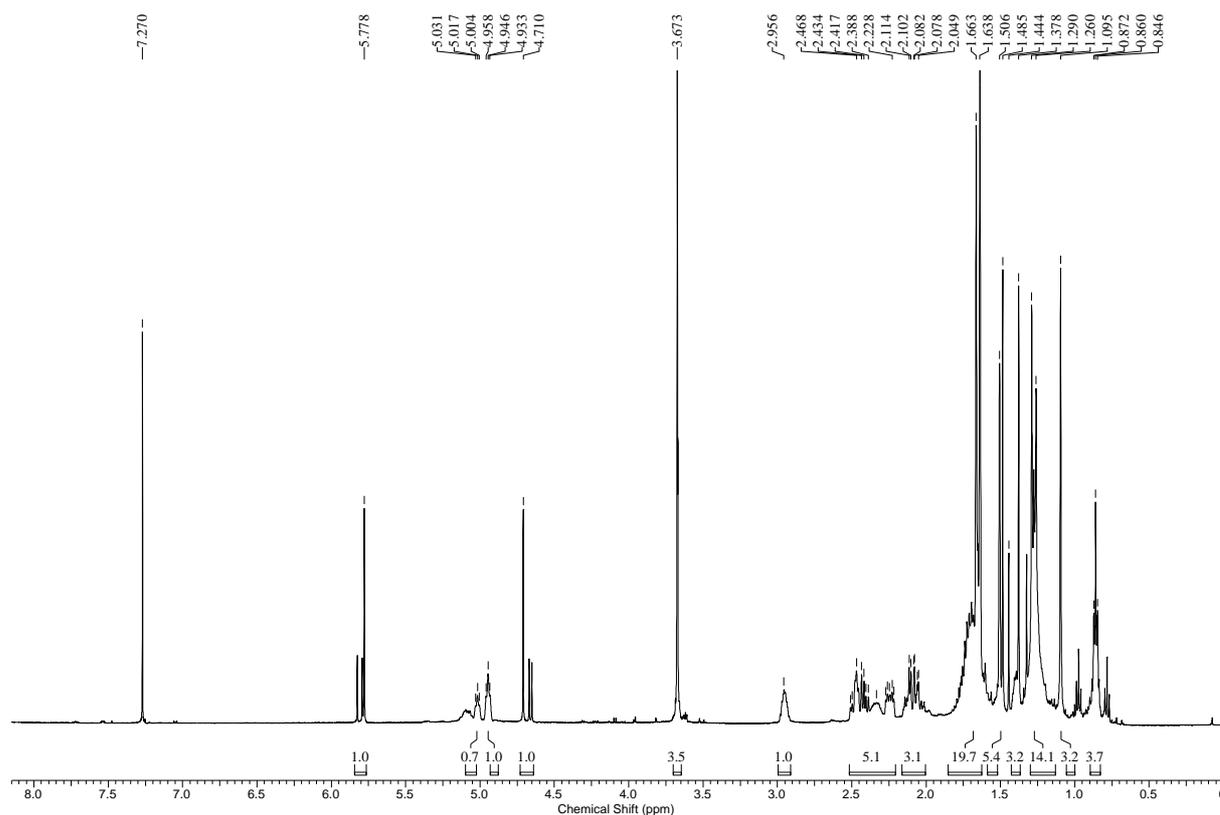


Figura 159: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração KcM-17-15.

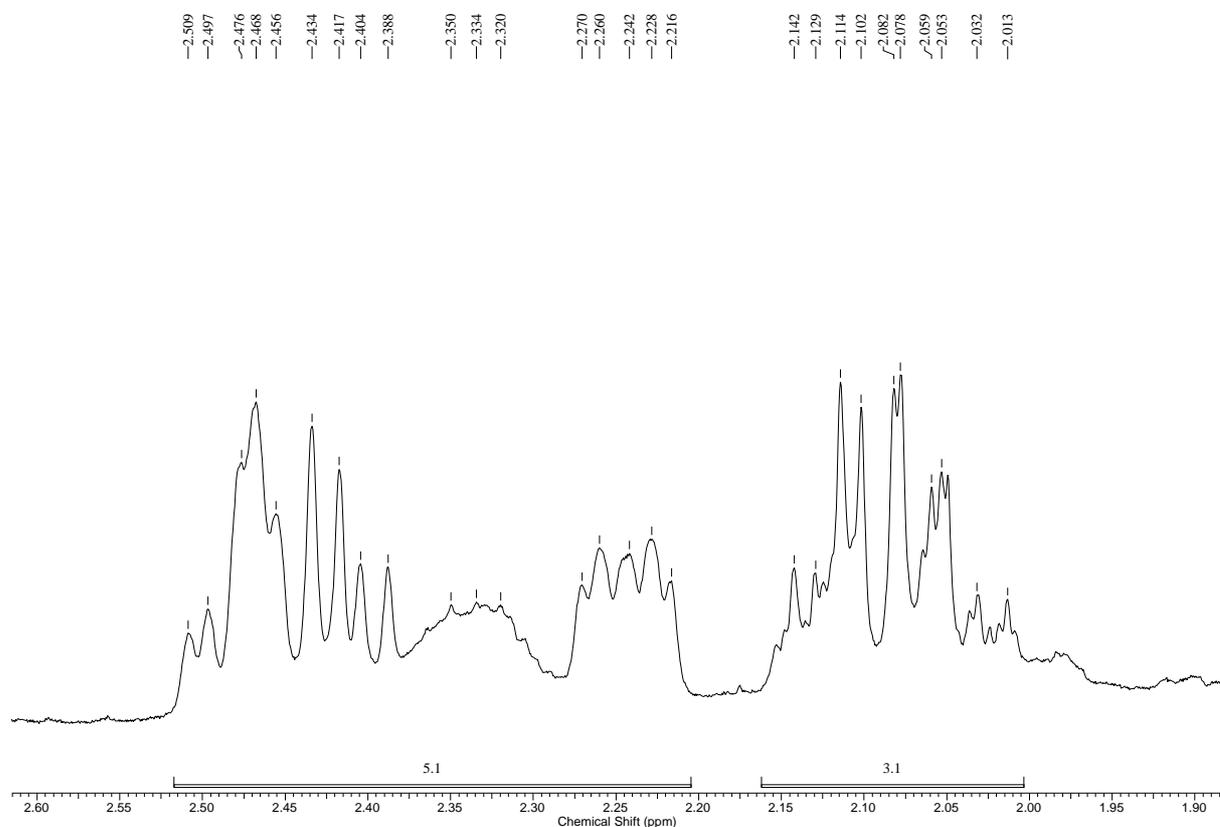


Figura 160: Ampliação (2,60 – 1,90 ppm) do espectro de RMN (500 MHz, CDCl_3) da fração KcM-17-15.

Foram observados ainda quatro simpletos em δ 1,48, δ 1,38, δ 1,29 e δ 1,10 e um tripleto em δ 0,86 ($J = 6,5$ Hz), cada um desses sinais integrando para três hidrogênios, o que indicou a presença de mais cinco metilas na molécula, além de um multipletto entre δ 1,42 – 1,38 (1H).

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com os dos ácidos kielmeyeróico A e B, bem como as correlações observadas no experimento de gHMQC (Fig 161 – 162) e gHMBC (Fig 163 – 165) e sumarizadas na Tab. 10, permitiram identificar a presença do grupo octanoato de metila e de dois grupos prenílicos na estrutura da substância **12a**. O primeiro grupo foi identificado pela presença do sinal em δ 174,3, que foi atribuído a uma carboxila de éster (absorção forte em 1739 cm^{-1} no espectro no IV, relativo ao estiramento da ligação C=O – Fig.166), de cinco carbonos metilênicos em δ 39,2, 34,4, 32,2, δ 28,1, e 22,6, um carbono metínico em δ 36,5 e uma metila em δ 14,1.

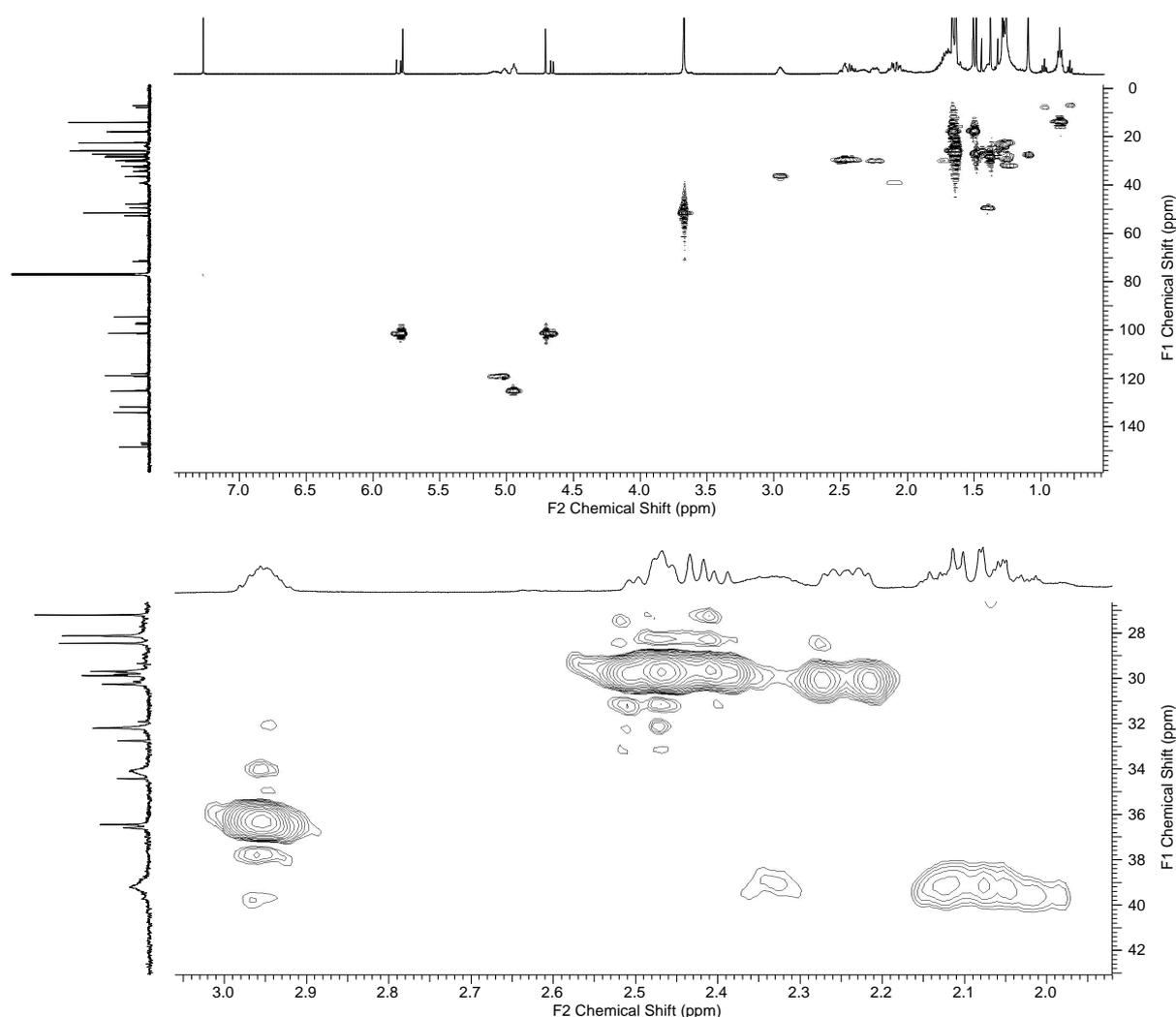


Figura 161: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMQC (CDCl_3) da fração KcM-17-15.

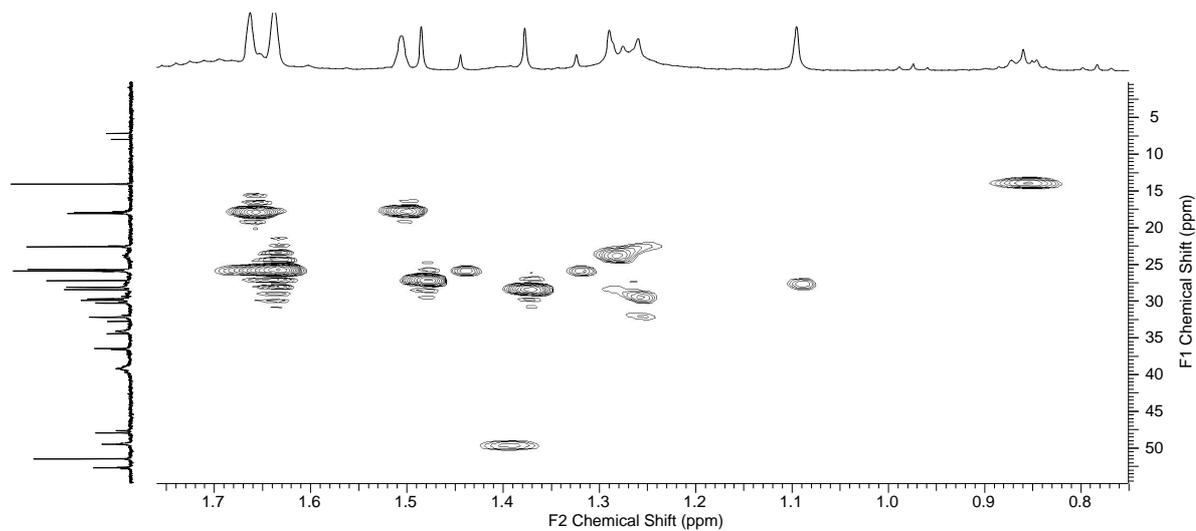


Figura 162: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da fração KcM-17-15.

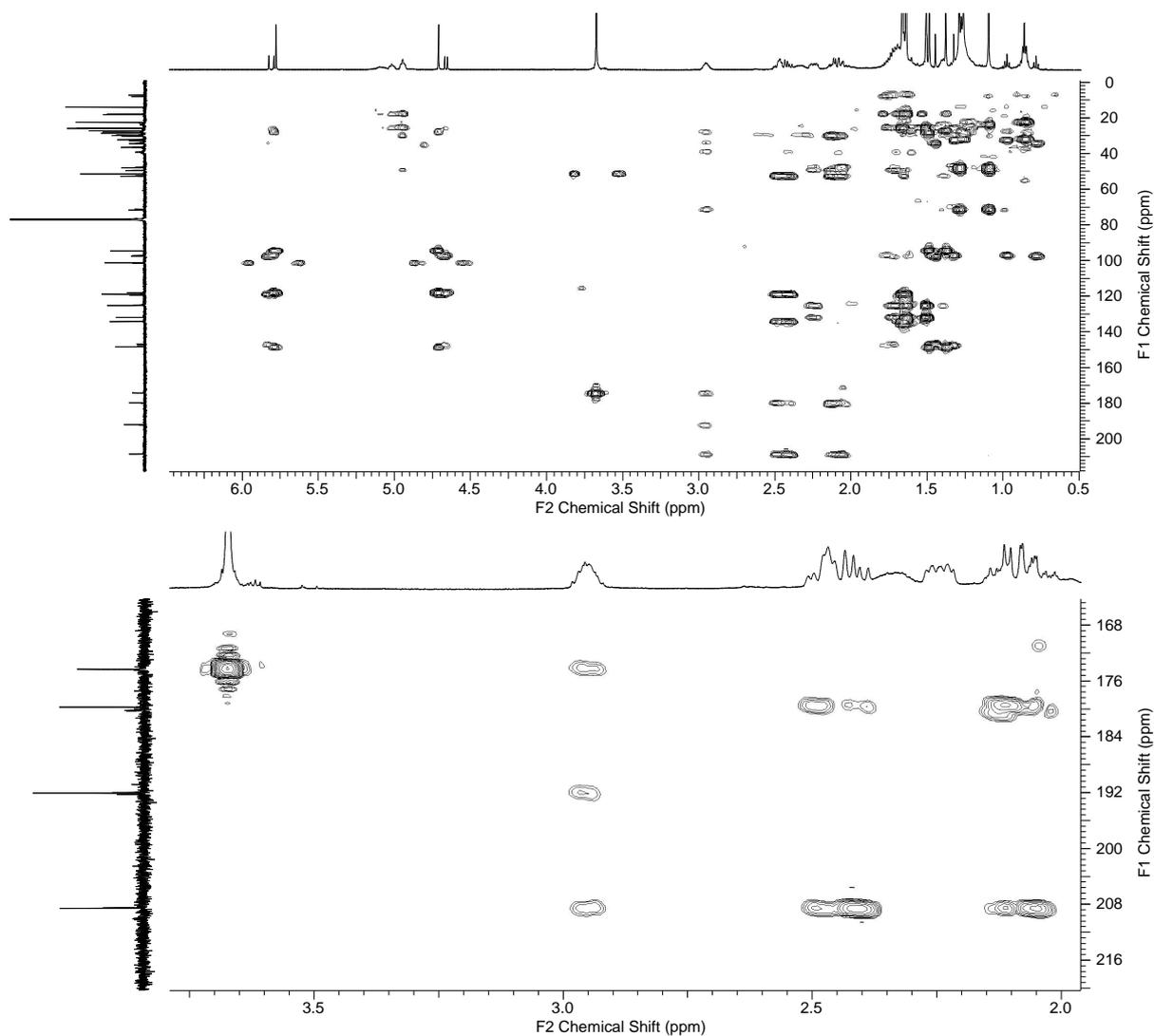


Figura 163: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da fração KcM-17-15.

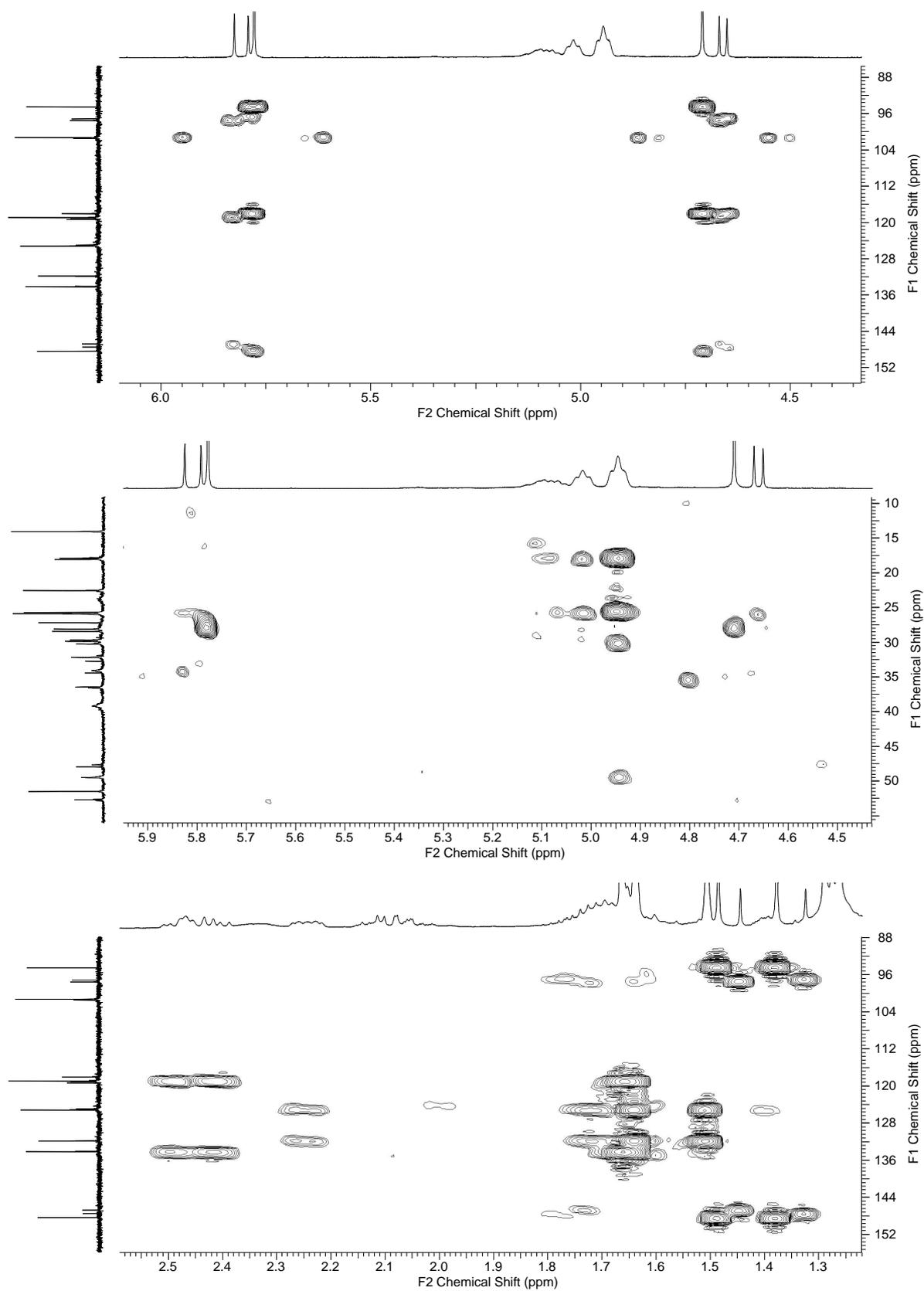


Figura 164: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl₃) da fração KcM-17-15.

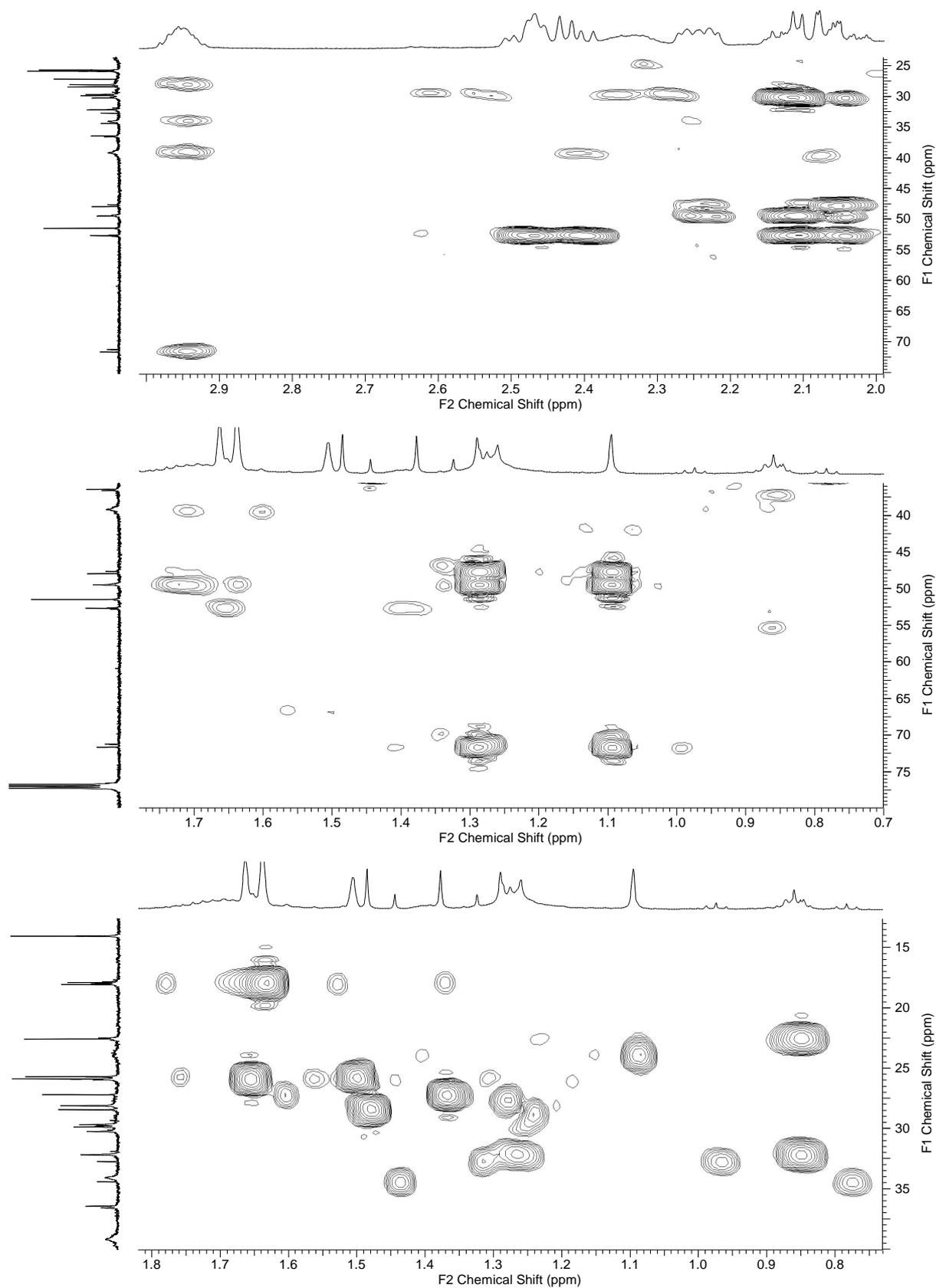


Figura 165: Correlações de H – C observadas no experimento de gHMBC (CDCl_3) da fração KcM-17-15.

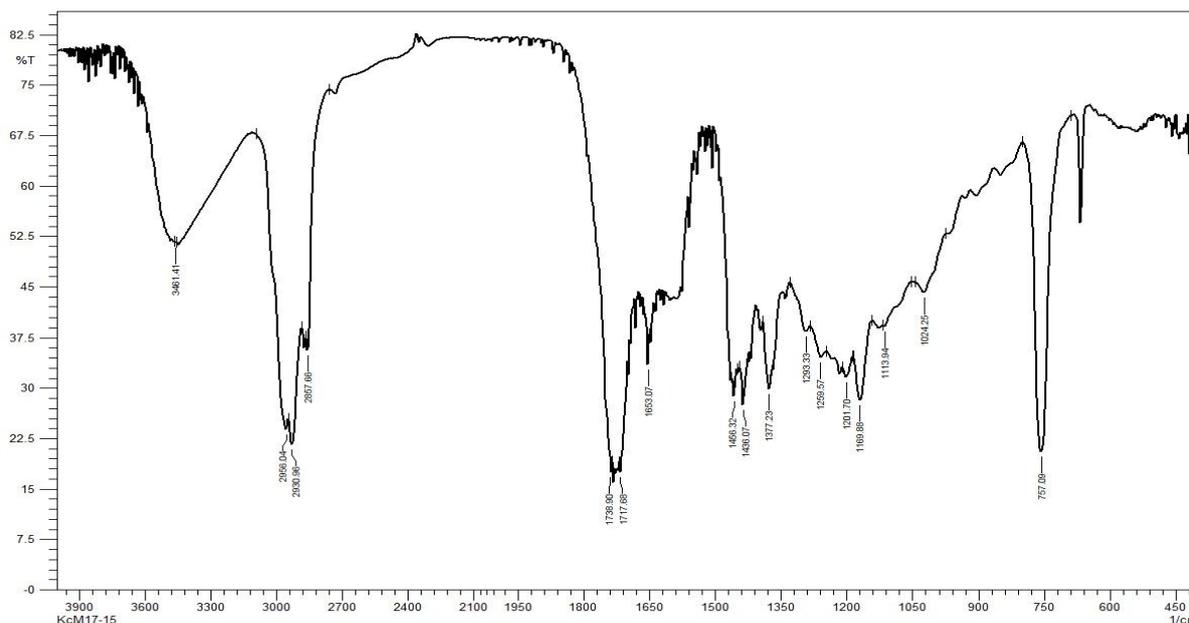


Figura 166: Espectro no infravermelho (filme com CHCl_3) da fração KcM-17-15.

Os grupos prenilicos foram confirmados pela presença dos sinais de RMN ^{13}C referentes a quatro carbonos metílicos em: δ 17,9, 18,0, 25,7 e 25,9; dois carbonos metilênicos em δ 29,7 e 30,3; dois carbonos metínicos hibridizados sp^2 em δ 119,0 e 125,2 e dois carbonos não hidrogenados também hibridizados sp^2 em δ 134,2 e 131,8, conforme Fig. 167.

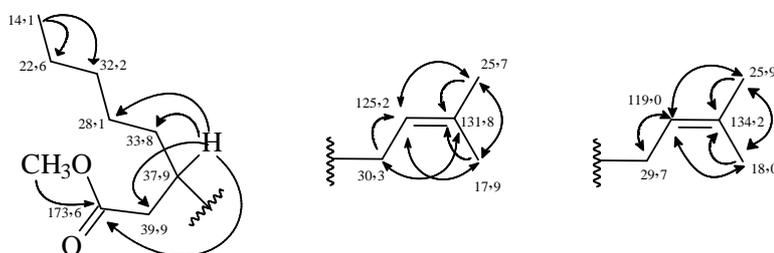


Figura 167: Dados de RMN ^{13}C (ppm) e correlações observadas no experimento de gHMBC que permitiram identificar a presença de dois grupos prenilicos e o grupo octanoato de metila substituído na posição 3.

A presença de dois sinais de carbonos carbonílicos de cetona não-conjugado e conjugado em δ 208,6 e 192,1, respectivamente, juntamente com os sinais de um carbono metínico (δ 49,5), um carbono metilênico (δ 39,0), cinco carbonos não hidrogenados, sendo três do tipo sp^3 : δ 71,7 (C-1), 52,7 (C-5) e 48,0 (C-8) e dois do tipo sp^2 : δ 118,1 (C-3) e 179,8 – ligado a oxigênio – C-4, indicaram a presença de um anel biciclo do tipo [3.3.1]nonano, substituído com duas metilas geminais em C-8 na substância **12a** (Fig. 168), semelhante ao descrito para os ácidos kielmeyeróico A e B.

Foram observadas correlações no experimento de gHMBC do multipeto entre δ 2,98 – 2,92, atribuído ao hidrogênio metínico do grupo octanoato de metila com os sinais δ 208,6, 192,1 e 71,7; do multipeto entre δ 2,55 – 1,95 e do sinal δ 2,41 (1H; $J = 8,5$ e $14,5$), atribuídos aos hidrogênios metilênicos de uma das prenilas com δ 208,6, 179,8 e 52,7; do multipeto entre δ 2,27 – 2,21, atribuído aos hidrogênios metilênicos da outra prenila, com δ 49,5. Essas correlações permitiram posicionar as duas unidades prenilicas nos carbonos C-5 e C-7 e o grupo octanoato de metila ao carbono C-1 do anel biciclo conforme Fig. 168.

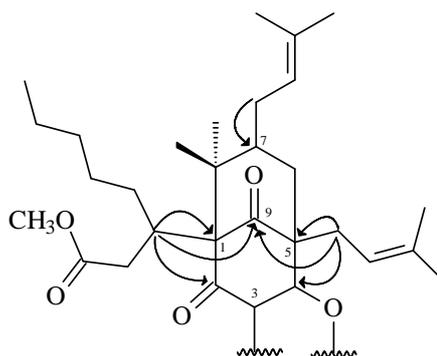


Figura 168: Correlações de gHMBC que permitiram posicionar o grupo octanoato de metila e as unidades prenilicas nos carbonos C-1, C-5 e C-7, respectivamente, do anel biciclo.

Os sinais atribuídos aos hidrogênios olefínicos em δ 5,78 e 4,71 mostraram correlações no experimento de gHMBC com dois carbonos não hidrogenados do tipo sp^2 : δ 118,1 (C-3) e 148,4 e com um carbono quaternário em δ 94,5. Além disso, foram observadas correlações do sinal δ 1,48 (CH₃) com δ 148,4, 94,5 e 28,6 e do sinal δ 1,38 (CH₃) com δ 148,4, 94,5 e 27,2. Essas correlações permitiram definir **12a** (Fig. 169) como sendo a estrutura da substância em análise, denominada de ácido kielmeyeróico E, sendo este o primeiro relato de seu isolamento.

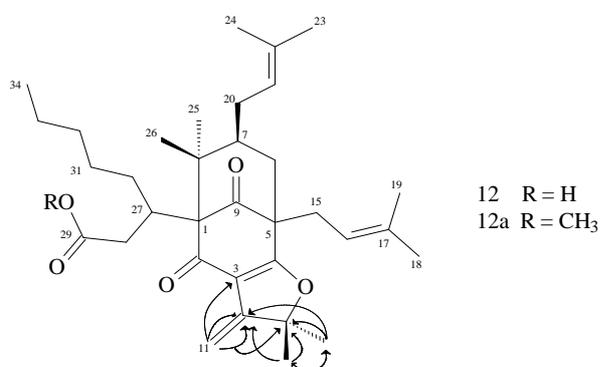


Figura 169: Fórmula estrutural do éster metílico derivado do ácido kielmeyeróico E.

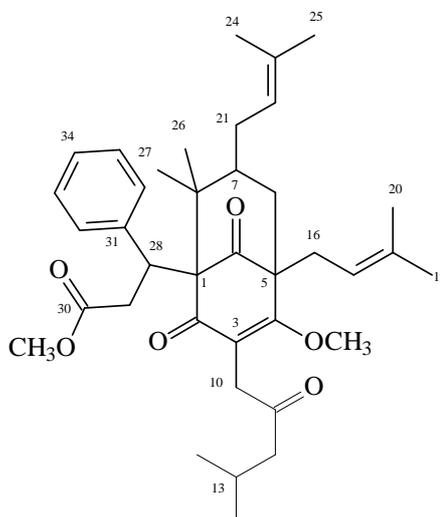
Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), CDCl_3], gHMQC, gHMBC, da substância **12a**.

Nº	δ ^1H (mult., J em Hz)	δ ^{13}C /DEPT 135	HMBC ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$)
1		71,7 (C)	
2		192, 1(C)	
3		118,1 (C)	
4		179,8 (C)	
5		52,7 (C)	
6	2,05 (<i>dd</i> ; 2,0; 14,0) 2,11 (<i>d</i> ; 6,5)	39,0 (CH_2)	4, 5, 9
7	1,42-1,38 (<i>m</i>)	49,5 (CH)	21
8		48,0 (C)	
9		208,6 (C)	
10		148,4 (C)	
11	4,71 (<i>s</i>) 5,78 (<i>s</i>)	101,3 (CH_2)	3, 10, 12
12		94,5 (C)	
13	1,48 (<i>s</i>)	27,2 (CH_3)	10, 12, 14
14	1,38 (<i>s</i>)	28,6 (CH_3)	10, 12, 13
15	2,41 (<i>dd</i> ; 8,5; 14,5) 2,51-2,44 (<i>m</i>)	29,7 (CH_2)	4, 5, 9, 16, 17
16	5,02 (<i>tl</i>)	119,0 (CH)	18, 19
17		134,2 (C)	
18	1,64* (<i>s</i>)	25,9 (CH_3)	16, 17, 19
19	1,66* (<i>s</i>)	18,0 (CH_3)	16, 17, 18
20	2,27-2,21 (<i>m</i>)	29,7 (CH_2)	7,
21	4,95 <i>tl</i>	125,2 (CH)	7, 20, 22, 23, 24
22		131,8 (C)	
23	1,64* (<i>s</i>)	25,7 (CH_3)	21, 22, 24
24	1,51* (<i>s</i>)	17,9 (CH_3)	21, 22, 23
25	1,29; (<i>s</i>)	23,8 (CH_3)	1, 7, 8, 26
26	1,10 (<i>s</i>)	27,3 (CH_3)	1, 7, 8, 25
27	2,98-2,92 (<i>m</i>)	36,5 (CH)	1, 2, 28, 29 30, 31
28	2,37-2,30 (<i>m</i>)	39,2 (CH_2)	
29		174,3 (C)	
30		34,4 (CH_2)	
31		28,1 (CH_2)	
32		32,2 (CH_2)	
33		22,6 (CH_2)	
34	0,86 (<i>t</i> ; 6,5)	14,1 (CH_3)	32, 33
OCH_3	3,67 (<i>s</i>)	51,1 (CH_3)	29

*os sinais podem estar trocados **multiplicidade não observada

4.3 Outras substâncias isoladas de *Kielmeyera lathrophyton*

4.3.1 Ácido lathrophytóico C

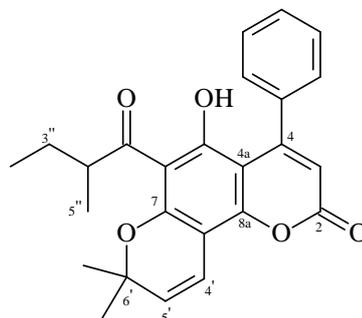


(13)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2,06 (2H; *d*; 3,5 Hz; H-6), δ 1,28 (1H; *m*; H-7), δ 3,63 (1H; *d*; 17,0 Hz; H_a-10), δ 3,26 (1H; *d*; 17,0 Hz; H_b-10), δ 2,44 (1H; *d*; 7,1 Hz; H_a-12), δ 2,40 (1H; *d*; 6,8 Hz; H_b-12), δ 2,20 (1H; *m*; H-13), δ 0,95 (3H; *d*; 6,6 Hz; H-14), δ 0,96 (3H; *d*; 6,6 Hz; H-15), δ 1,99 (2H; *m*; H-16), δ 4,86 (1H; *m*; H-17), δ 1,64 (3H; *s*; H-19), δ 1,50 (3H; *s*; H-20), δ 2,55 (2H; *m*; H-21), δ 5,11 (1H; *m*; H-22), δ 1,71 (3H; *s*; H-24), δ 1,68 (3H; *s*; H-25), δ 0,54 (3H; *s*; H-26), δ 1,08 (3H; *s*; H-27), δ 4,29 (1H; *dd*; 2,5 e 11,0 Hz; H-28), δ 2,60 (1H; *m*; H_a-29), δ 2,26 (1H; *m*; H_b-29), δ 7,68 (2H; *sl*; H-32 e H-36), δ 7,23 (2H; *m*; H-33 e H-35), δ 7,17 (1H; *m*; H-34), δ 3,86 (3H; *s*; 4-OCH₃), δ 3,44 (3H; *s*; 30-OCH₃). Dados de acordo com De Almeida (2008).

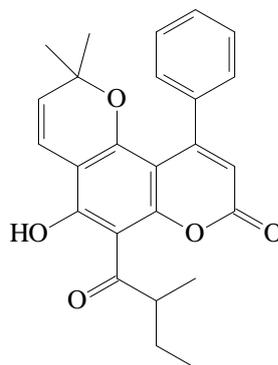
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 71,0 (C-1), δ 197,8 (C-2), δ 122,6 (C-3), δ 174,3 (C-4), δ 56,2 (C-5), δ 36,6 (C-6), δ 48,3 (C-7), δ 48,3 (C-8), δ 208,5 (C-9), δ 36,7 (C-10), δ 207,2 (C-11), δ 51,7 (C-12), δ 24,5 (C-13), δ 22,5 (C-14), δ 22,6 (C-15), δ 29,2 (C-16), δ 124,9 (C-17), δ 132,2 (C-18), δ 25,8 (C-19), δ 17,9 (C-20), δ 31,6 (C-21), δ 120,2 (C-22), δ 133,4 (C-23), δ 25,9 (C-24), δ 18,0 (C-25), δ 23,6 (C-26), δ 26,3 (C-27), δ 42,3 (C-28), δ 40,2 (C-29), δ 172,3 (C-30), δ 141,5 (C-31), δ 132,2 (C-32, C-36), δ 127,7 (C-33, C-35), δ 126,7 (C-34), δ 62,1 (4-OCH₃), δ 51,3 (30-OCH₃). Dados de acordo com De Almeida (2008).

4.3.2 4-fenilcumarinas



(14)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,91 (3H; *t*; 7,5 Hz; H-4''), δ 1,17 (3H; *d*; 6,5 Hz; H-5''), δ 1,40 (1H; *m*; H_a-3''), δ 1,57 (3H; *s*; H-7'), δ 1,58 (3H; *s*; H-8'), δ 1,84 (1H; *m*; H_b-3''), δ 3,72 (1H; *m*; H-2''), δ 5,99 (1H; *s*; H-3), δ 5,64 (1H; *d*; 10,0 Hz; H-5'), δ 6,91 (1H; *d*; 10,0 Hz; H-4'), δ 7,31 (1H; *m*; fenila), δ 7,40 (4H; *m*; fenila), δ 14,64 (1H; *s*; 5-OH). Dados de acordo com Cruz *et al.* (2001).

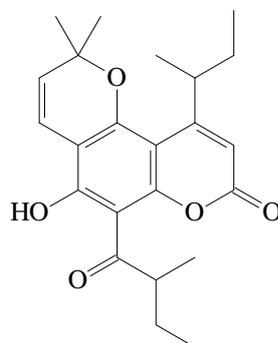


(15)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,96 (3H; *s*; H-7'), δ 0,97 (3H; *s*; H-8'), δ 1,03 (3H; *t*; 7,3 Hz; H-4''), δ 1,29 (3H; *d*; 6,6 Hz; H-5''), δ 1,50 (1H; *m*; H_a-3''), δ 1,95 (1H; *m*; H_b-3''), δ 3,97 (1H; *m*; H-2''), δ 6,00 (1H; *s*; H-3), δ 5,40 (1H; *d*; 10,2 Hz; H-5'), δ 6,64 (1H; *d*; 10,2 Hz; H-4'), δ 7,29 (1H; *m*; fenila), δ 7,40 (4H; *m*; fenila), δ 14,64 (1H; *s*; 7-OH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 159,0 (C-2), δ 112,1 (C-3), δ 157,0 (C-4), δ 102,4 (C-4a), δ 164,1 (C-5), δ 106,1 (C-6), δ 156,4 (C-7), δ 103,9 (C-8), δ 156,3 (C-8a), δ 115,3 (C-4'), δ 126,3 (C-5'), δ 79,2 (C-6'), δ 27,6 (C-7' e C-8'), δ 210,7 (C-1''), δ 47,1 (C-2''), δ 27,4 (C-3''), δ 11,7 (C-4''), δ 16,8 (C-5''), δ 140,0 (C-1'''), δ 127,0 (C-2''' e C-6'''), δ 127,5 (C-3''' e C-5'''), δ 128,1 (C-4'''). Dados de acordo com Cruz *et al.* (2001).

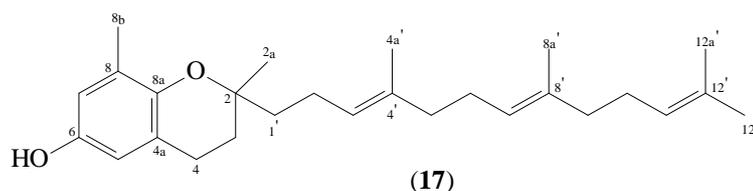
4.3.3 4-alkilcumarina



(16)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,99 (3H; *t*; 7,2 Hz; H-4'' e H-4'''), δ 1,25 (3H; *d*; 6,5 Hz; H-5'' e H-1'''), δ 1,40 (2H; *m*; H-3''), δ 1,53 (3H; *s*; H-7'), δ 1,54 (3H; *s*; H-8'), δ 1,69 (1H; *m*; H-3'''), δ 3,90 (1H; *m*; H-2''), δ 3,89 (1H; *m*; H-2'''), δ 3,90 (1H; *m*; H-2''), δ 6,14 (1H; *s*; H-3), δ 5,59 (1H; *d*; 10,0 Hz; H-5'), δ 6,75 (1H; *d*; 10,0 Hz; H-4'), δ 14,39 (1H; *s*; 5-OH).

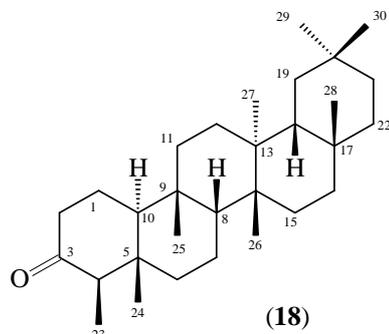
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 159,7 (C-2), δ 107,5 (C-3), δ 164,2 (C-4), δ 102,8 (C-4a), δ 156,5 (C-5), δ 106,3 (C-6), δ 162,9 (C-7), δ 104,2 (C-8), δ 157,0 (C-8a), δ 116,1 (C-4'), δ 126,4 (C-5'), δ 79,6 (C-6'), δ 28,1 (C-7'), δ 28,2 (C-8'), δ 20,0 (C-1'''), δ 37,5 (C-2'''), δ 29,5 (C-3'''), δ 11,8 (C-4'''). Dados de acordo com Verotta *et al.* (2004).

4.3.4 δ -tocotrienol

(17)

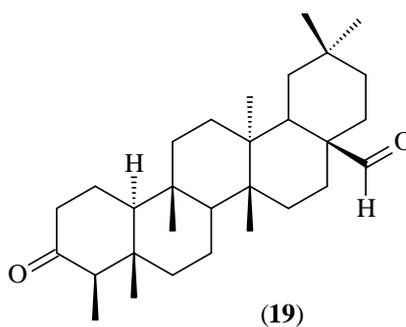
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 75,3 (C-2), δ 24,0 (C-2a), δ 31,3 (C-3), δ 22,4 (C-4), δ 121,2 (C-4a), δ 112,6 (C-5), δ 147,7 (C-6), δ 115,6 (C-7), δ 127,3 (C-8), δ 145,9 (C-8a), δ 15,8 (C-8b), δ 39,7 (C-1'), δ 22,1 (C-2'), δ 124,2 (C-3'), δ 134,9 (C-4'), δ 16,0 (C-4a'), δ 39,7 (C-5'), δ 26,7 (C-6'), δ 124,1 (C-7'), δ 135,1 (C-8'), δ 16,00 (C-8a'), δ 39,7 (C-9'), δ 26,6 (C-10'), δ 124,4 (C-11'), δ 131,2 (C-12'), δ 17,7 (C-12a'), δ 25,7 (C-12b'). Dados de acordo com Ohnmacht *et al.* (2008).

4.3.5 Friedelina



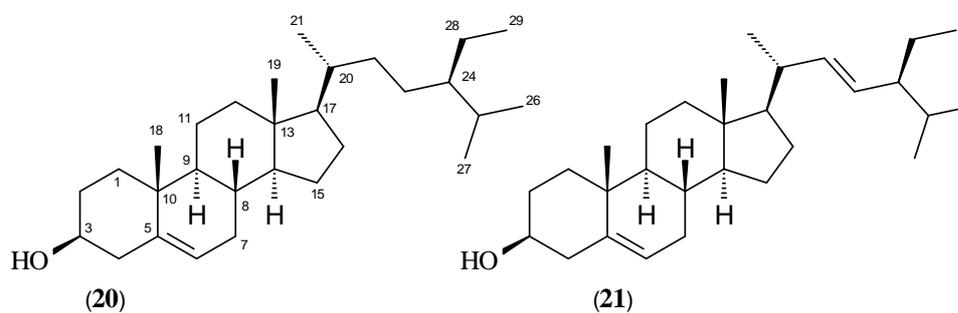
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 22,2 (C-1), δ 41,5 (C-2), δ 213,2 (C-3), δ 58,2 (C-4), δ 42,1 (C-5), δ 41,2 (C-6), δ 18,2 (C-7), δ 53,0 (C-8), δ 37,4 (C-9), δ 59,4 (C-10), δ 35,6 (C-11), δ 30,5 (C-12), δ 39,6 (C-13), δ 38,2 (C-14), δ 32,4 (C-15), δ 36,0 (C-16), δ 30,5 (C-17), δ 42,7 (C-18), δ 35,3 (C-19), δ 28,1 (C-20), δ 32,7 (C-21), δ 39,2 (C-22), δ 6,8 (C-23), δ 14,6 (C-24), δ 17,9 (C-25), δ 20,2 (C-26), δ 18,6 (C-27), δ 32,1 (C-28), δ 35,0 (C-29), δ (31,8C-30). De Almeida (2008).

4.3.6 Canofilal



RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 22,2 (C-1), δ 41,4 (C-2), δ 213,0 (C-3), δ 58,1 (C-4), δ 41,9 (C-5), δ 41,0 (C-6), δ 18,0 (C-7), δ 52,8 (C-8), δ 37,1 (C-9), δ 59,2 (C-10), δ 35,4 (C-11), δ 30,6 (C-12), δ 38,7 (C-13), δ 37,6 (C-14), δ 32,3 (C-15), δ 34,9 (C-16), δ 47,4 (C-17), δ 36,4 (C-18), δ 32,3 (C-19), δ 28,3 (C-20), δ 32,3 (C-21), δ 28,0 (C-22), δ 6,8 (C-23), δ 14,6 (C-24), δ 17,1 (C-25), δ 20,0 (C-26), δ 18,7 (C-27), δ 209,0 (C-28), δ 34,5 (C-29), δ 29,4 (C-30). Dados de acordo com Li *et al.* (2010) e Yang *et al.* (2006)

4.3.7 β -sitosterol (20) e estigmasterol (21)



Essas substâncias foram identificadas em mistura conforme descrito por Borges (2006), principalmente pela presença dos sinais:

- δ 140,7 e δ 121,7, atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 do β -sitosterol;
- δ 140,7, δ 121,7, δ 138,3 e δ 129,2, atribuídos aos carbonos olefínicos C-5, C-6, C-21 e C-22 do estigmasterol;
- δ 71,8, atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-3) do β -sitosterol e estigmasterol.

Nas lathrophytonas, além de uma reação de alquilação também ocorre uma lactonização, enquanto que na biogênese dos ácidos lathrofitóicos não ocorre a lactonização e o resíduo do ácido cinâmico é conservado. Tanto as lathrophytonas quanto os ácidos lathrophytóicos parecem ter um precursor comum – o ácido 3-fenil-3-floroglucinilpropanóico. Já nos ácidos kielmeyeróicos, a condensação da porção floroglucinol parece ocorrer com o ácido oct-2-enóico, gerando como precursor o ácido 3-florogluciniloctanóico.

5.1. Lathrophytonas

Analogamente aos neoflavonóides, as lathrophytonas têm sua biogênese a partir do ácido 3-fenil-3-floroglucinilpropanóico. Após a lactonização, ocorrem sucessivas reações de alquilação através da introdução de grupos prenílicos provenientes de unidades de pirofosfato de 3,3-dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para formar o intermediário **2'** (Fig. 171).

A ocorrência de anéis ciclobutânicos em estruturas de compostos naturais é rara e, sua biossíntese não foi ainda elucidada. A estratégia para a construção de anéis ciclobutânicos por síntese orgânica, pode ser feita através de reação fotoquímica de ciclo adição do tipo [2+2] intra ou intermolecular envolvendo duas ligações duplas (ADACHI *et al.*, 2009), entretanto, a literatura não aborda esse tipo de reação na biossíntese de produtos naturais.

Assim, propõe-se que o anel ciclobutânico encontrado na estrutura das lathrophytonas pode ser formado a partir do grupo lavandulil, através de uma reação de ciclização intramolecular, via adição eletrofílica do intermediário **3'**, como delineado na Fig. 171. Várias espécies de *Clusia* (gênero pertencente à família Clusiaceae e que tem relações filogenéticas próximas ao gênero *Kielmeyera*) apresentam compostos contendo o grupo lavandulil (LOKVAM *et al.*, 2000; CRUZ e TEIXEIRA, 2005). Assim, é possível imaginar que este grupo esteja envolvido na formação das lathrophytonas.

Após ciclização que conduz à formação do anel ciclobutânico, a etapa seguinte parece envolver uma condensação de um derivado da leucina com **5'**, formando **6'**. O passo seguinte parece envolver a redução da carboníla e hidroxilação da parte derivada da leucina, gerando **7'**. Um rearranjo do tipo pinacol seguida de uma ciclização intramolecular e uma desidratação conduz à formação do anel furano e, conseqüentemente da lathrophytona B. O seu isômero A, é formado a partir do tautômero de **8'** e segue os mesmos passos exibido na Fig. 171.

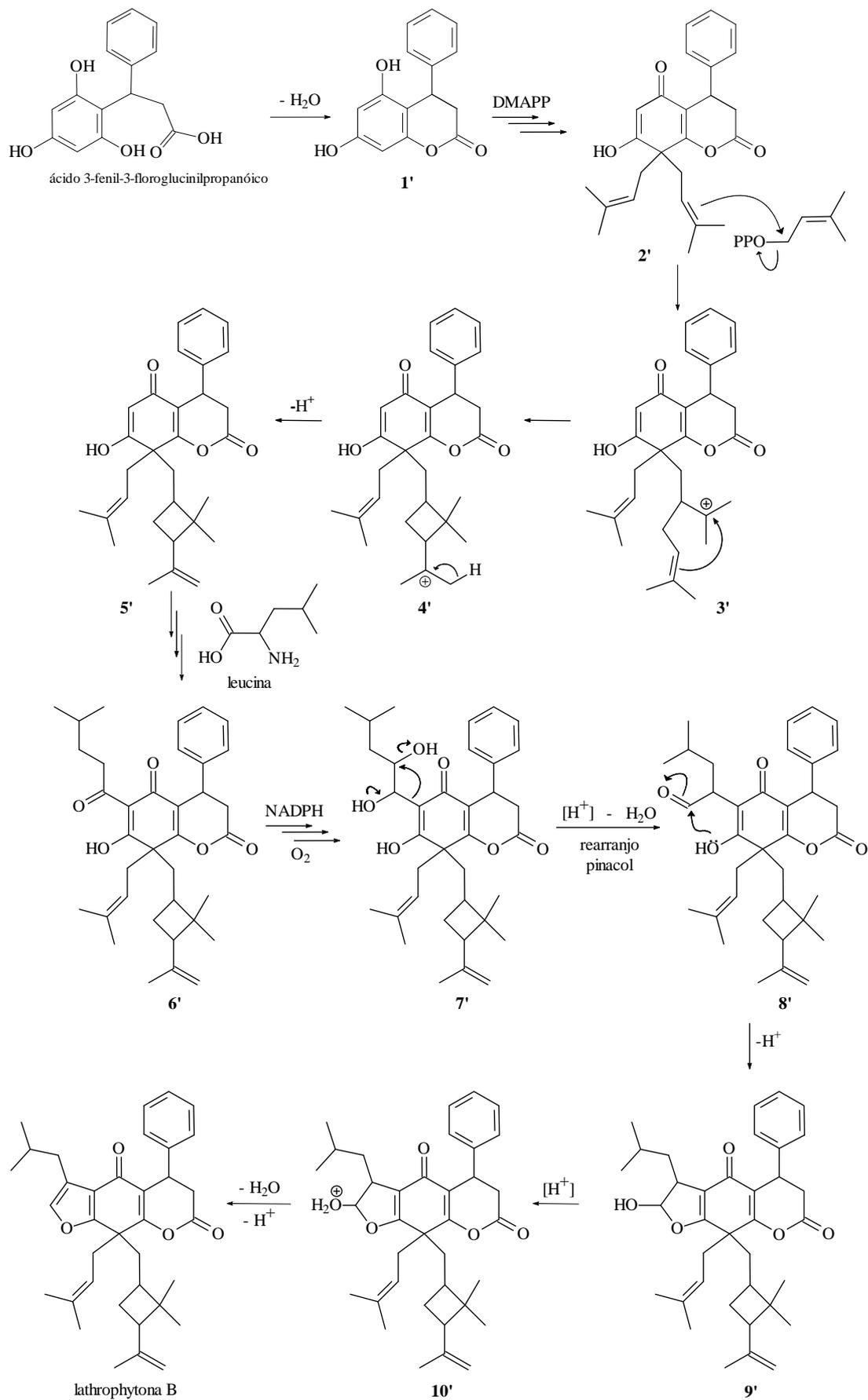


Figura 171: Proposta de biossíntese das lathrophytonas B.

5.2. Ácidos lathrophytólicos

O caminho biogenético proposto para os ácidos lathrophytólicos a seguir tem como precursor o ácido 3-fenil-3-floroglucinilpropanóico, resultante da condensação de três unidades de malonil-CoA com o ácido cinâmico. Por analogia com a biossíntese da hiperforina (ADAM *et al.*, 2002), propõe-se que o ácido 3-fenil-3-floroglucinilpropanóico sofre sucessivas reações de alquilação através da introdução de grupos prenilicos, provenientes de três unidades de pirofosfato de 3,3-dimetilalil (DMAPP), formando os tautômeros **11'** e **11'a** que apresentam esqueleto do tipo biciclo [3.3.1]nonano (Figura 172).

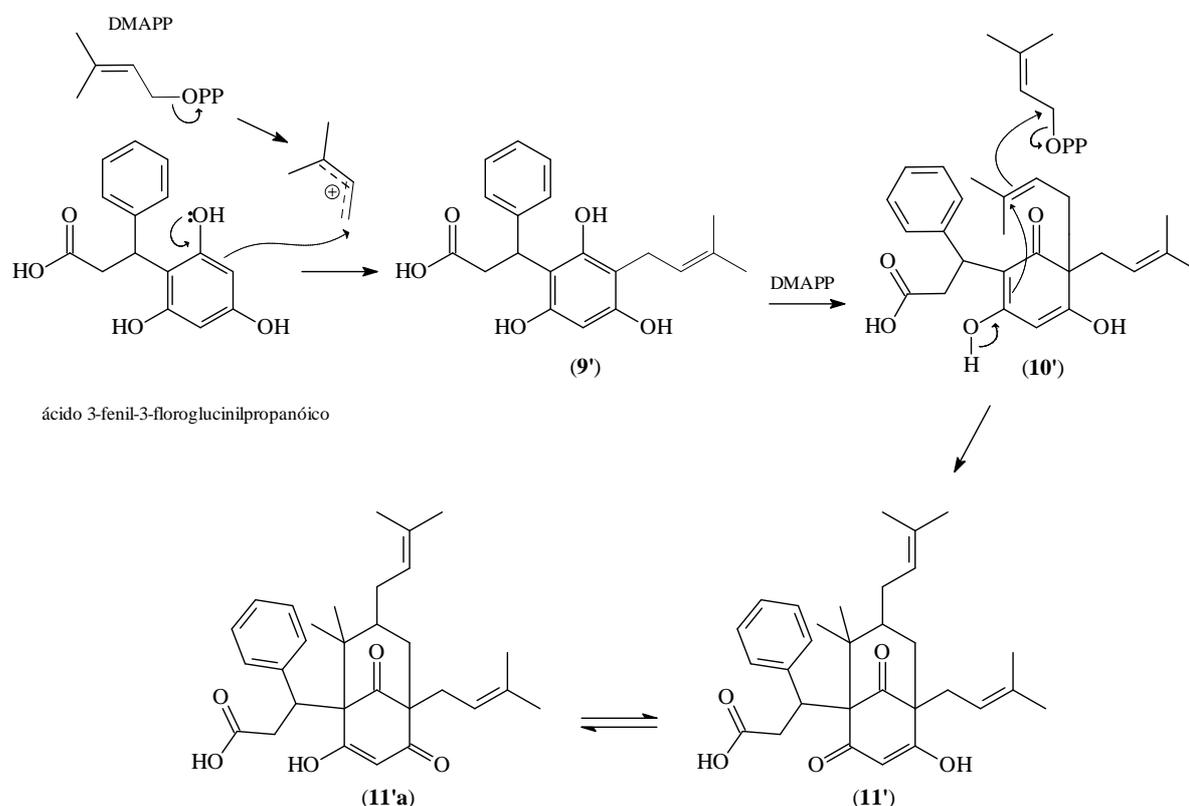


Figura 172: Proposta de biossíntese dos enóis precursors dos ácidos lathrophytólicos D – F.

O ácido lathrophytólico D tem como precursor o tautômero **11'a**. Os passos seguintes assemelham-se ao mesmo caminho biossintético proposto para a lathrophytona B, a partir do intermediário **5'** e envolve: condensação de um derivado da leucina com **11'a**, redução da carboníla e hidroxilação da parte derivada da leucina, rearranjo do tipo pinacol, ciclização intramolecular e uma desidratação – Fig 173.

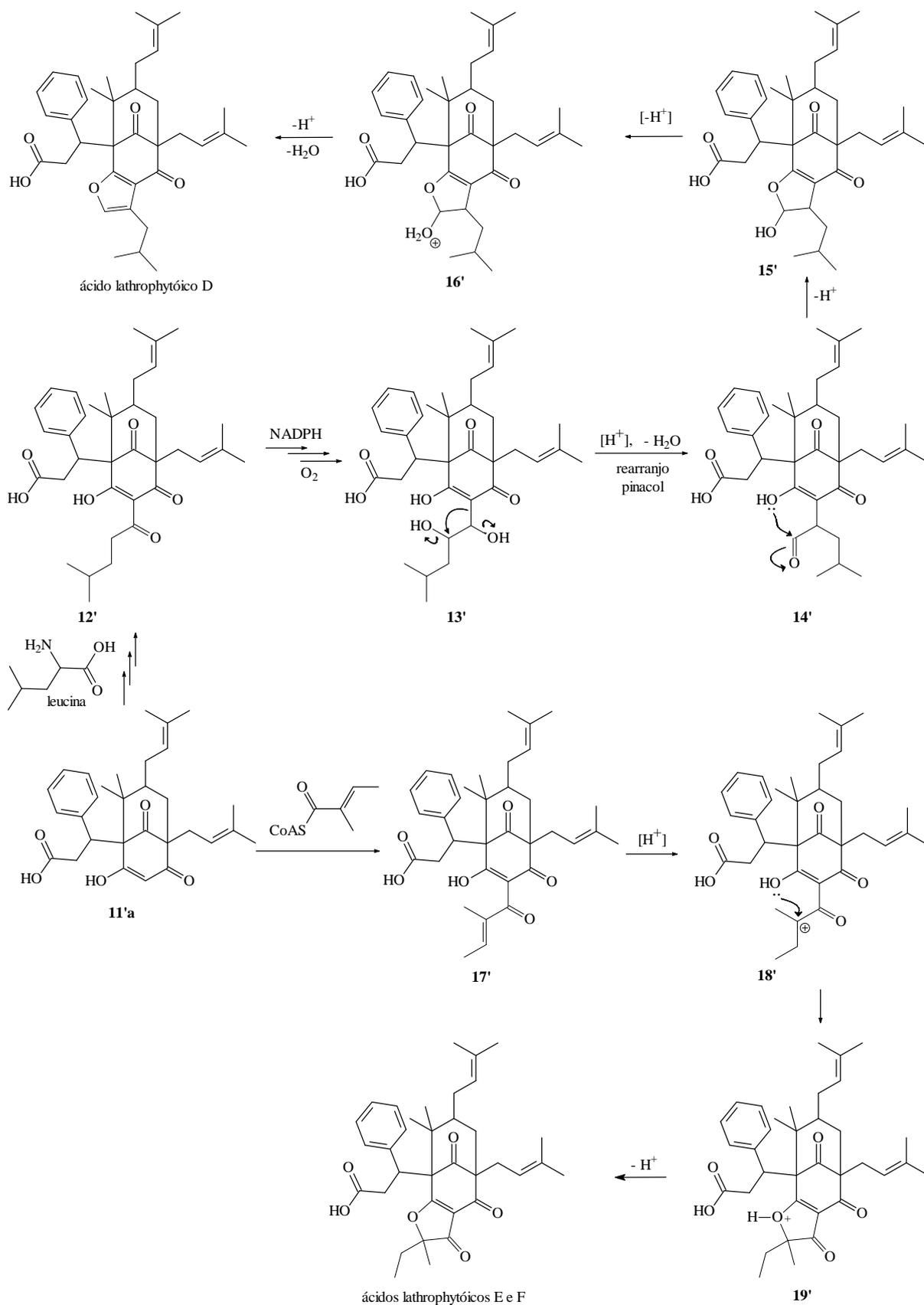


Figura 173: Proposta de biossíntese dos ácidos lathrophytóricos D – E.

A formação dos ácidos lathrophytólicos E e F, como exibido na Figura 173, parece envolver o acoplamento do intermediário **11'a** com a tíglicil-CoA, formando o intermediário **17'**. Este é protonado gerando o carbocátion **18'** que é determinante para a formação dos epímeros E e F. A etapas seguintes envolvem uma ciclização intramolecular via reação de epoxidação, conduzindo à formação dos ácidos lathrophytólicos E e F.

5.3. Ácidos kielmeyeróicos

A proposta de biossíntese dos ácidos kielmeyeróicos assemelha-se à dos ácidos lathrophytólicos, entretanto, a β -condensação da porção floroglucinol ocorre com o ácido oct-2-enóico, produzindo o ácido 3-florogluciniloctanóico como foi exibido na Fig. 170. Logo após a condensação, ocorrem três prenilações assemelhando-se ao caminho biossintético proposto para a biogênese hiperforina (BEERHUES, 2006), formando os tautômeros **21'** e **21'a** – Fig. 174.

A formação dos ácidos kielmeyeróicos A, B e E tem como precursores os enóis **21'** e **21'a**. Este último enol, leva à formação do ácido kielmeyeróico A, enquanto que o enol **21'** é o precursor dos ácidos kielmeyeróicos B e E.

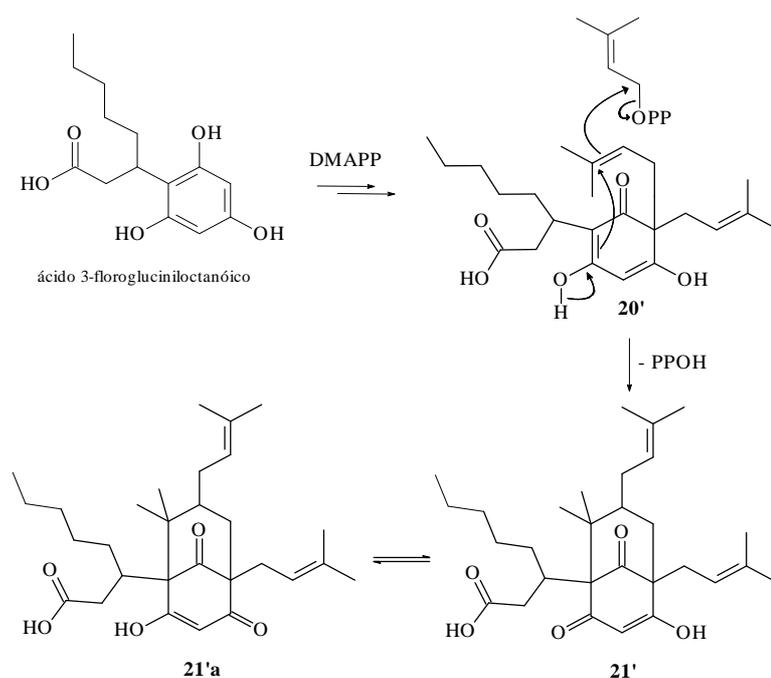


Figura 174: Proposta de biossíntese dos precursores dos ácidos kielmeyeróicos.

Para explicar a formação do sistema formado pelo anel isopropilfurano nos ácidos kielmeyeróicos A e B foi proposto o caminho análogo ao do ácido lathrophytóico B (DE ALMEIDA *et al*, 2011). Assim, propõe-se uma reação de substituição nucleofílica entre o enol e um grupo pirofosfato de isopentenila, formando uma cadeia lateral preniloxi, representado pelo intermediário **21'**. Nesta etapa, a substituição nucleofílica é quem determina a formação dos ácidos kielmeyeróicos B e E. Se o ataque do nucleófilo for ao carbono C-1 do grupo pirofosfato de isopentenila, conduz à formação do ácidos kielmeyeróicos E e, por outro lado, se o ataque for em C-3 forma-se o ácido kielmeyeróico B, conforme mostra a Fig. 175.

Após formação da cadeia preniloxi, as etapas seguintes que formam os três compostos são iguais e envolve: uma reação de oxidação, seguida de uma ciclização formando o intermediário (**23'**). Após protonação e desidratação de (**23'**) via mecanismo S_N1 ocorre a formação do carbocátion (**24'**). Este sofre um rearranjo do tipo Wagner-Meerwein – [1,2], com migração de um próton (PACHUAU e LYNGDOH, 2004), formando o intermediário (**25'**). Esse rearranjo pode ser favorecido pela formação de um carbocátion alílico. Uma posterior redução conduz à formação da do ácido kielmeiróico A – Fig. 175.

É presumível que os enóis **21'** e **21'a** também estejam envolvidos na formação dos ácidos kielmeyeróicos C e D. Estes são gerados pela condensação da isobutiril-CoA, derivada da valina, com **21'** e **21'a**, estabelecendo-se o equilíbrio ceto-enólico mostrado na Fig. 176, embora a literatura (BEERHUES, 2006) relate que o acilfloroglucinol seja formado primeiro para depois ocorrer as prenilações. Desprezando-se a ordem em que as reações ocorrem, é razoável aceitar que a biogênese dos ácidos kielmeyeróicos C e D também segue a via de um mecanismo policetídeo.

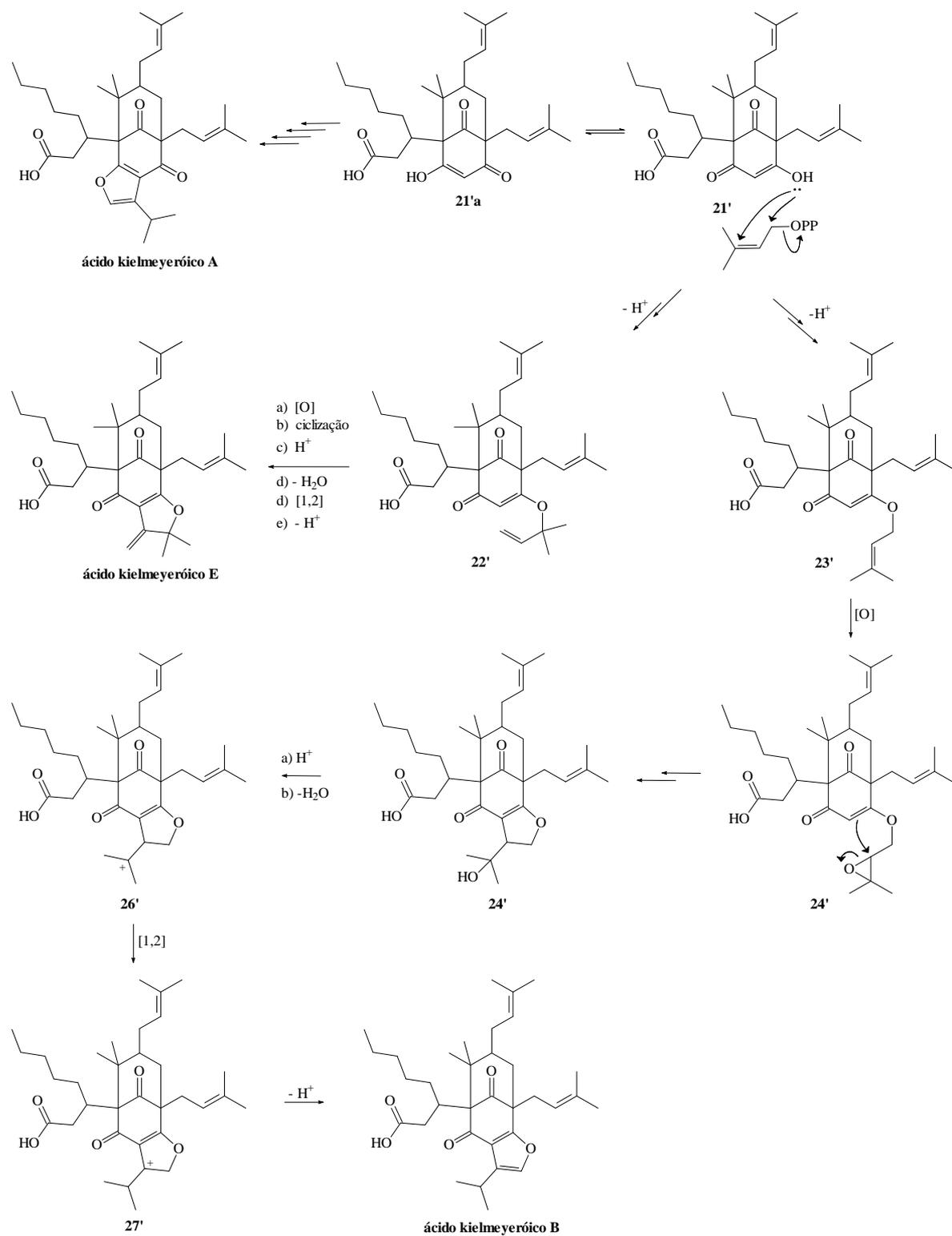


Figura 175: Proposta de biossíntese dos ácidos kielmeyeróicos A, B e E.

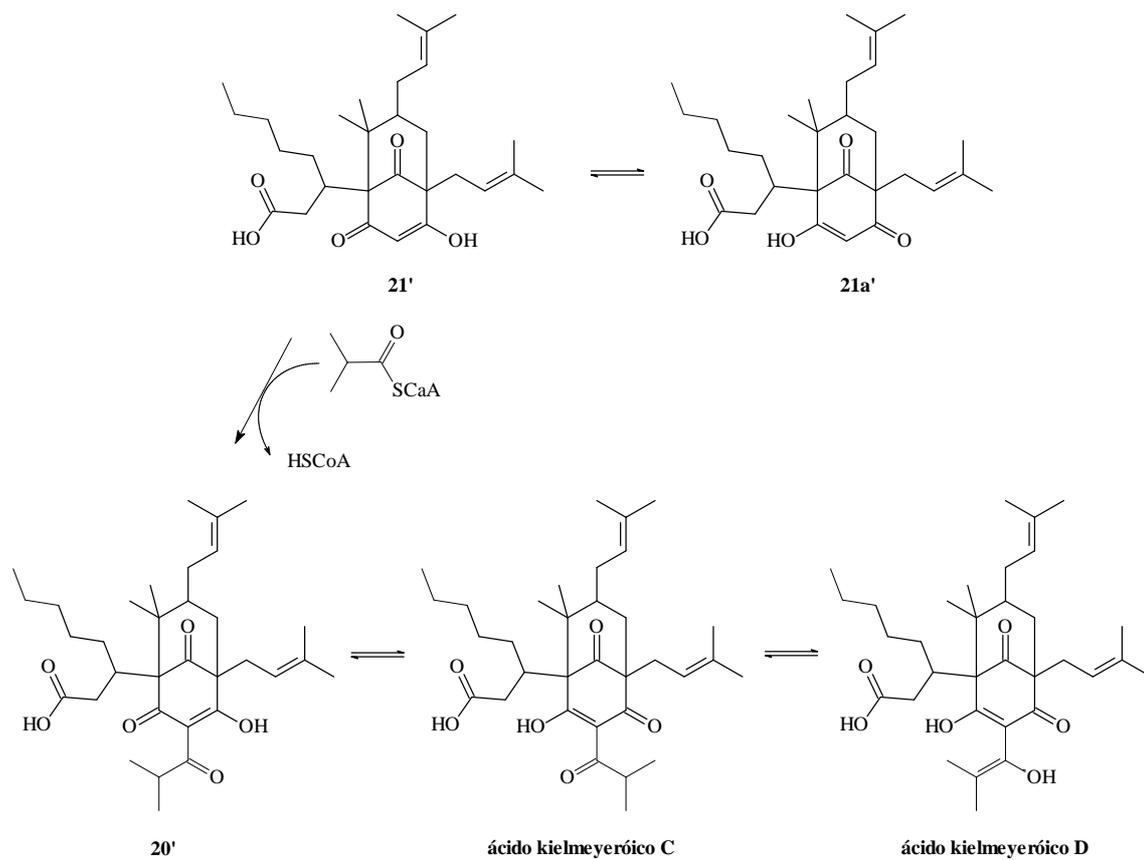


Figura 176: Proposta de biosíntese dos ácidos kielmeyeróicos C e D.

6. ENSAIO BIOLÓGICO

Dentre os compostos testados, destacaram-se os resultados obtidos com a substância **10a** (éster metílico do ácido kielmeiróico C) isolado de *Kielmeyera cuspidata*. As demais substâncias não apresentaram nenhuma inibição do crescimento dos micro-organismos testados. Na Tabela 11 é mostrada a concentração inibitória mínima das cinco substâncias testadas.

A substância **10a** exibiu moderada atividade contra as cepas das bactérias Gram positivas de *S. aureus* e *S. mutans*, inibindo o crescimento das mesmas nas concentrações mínimas de 6,3 e 1,6 µg/mL respectivamente.

Tabela 11: Concentração inibitória mínima (CIM) de substâncias isoladas de *K. cuspidata* e *K. lathrophyton*.

Micro-organismo	Substância (CIM, µg/mL)					C. P.*
	3a	8a	9a	10a	11a	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0,04
<i>S. aureus</i> ATCC 6638	> 100	> 100	> 100	6,3	> 100	0,02
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	> 100	> 100	> 100	1,6	> 100	0,08
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0,40
<i>E. coli</i> ATCC 94863	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0,78
<i>P. aeruginosa</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0,40
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	6,30
<i>A. niger</i> ATCC 16404	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	12,50
<i>C. cladosporioides</i> IMI 178517	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	6,30

*C.P. - Controle Positivo (Benzil penicilina benzatina 20 µg/mL para bactérias Gram positivas, Sulfato de Gentamicina 100 µg/mL para bactérias Gram negativas e Ciclopirox olamina 400 µg/mL para fungos).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho conduziu ao isolamento de 21 substâncias naturais, sendo cinco do extrato hexânico de *Kielmeyera cuspidata* e 16 do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton*. Destas, nove já tinham sido isoladas em estudos anteriores com esta espécie. Das 21 substâncias isoladas, 12 delas não tinham relatos na literatura e, portanto, são compostos naturais inéditos.

As cinco substâncias isoladas de *Kielmeyera cuspidata* e três das isoladas de *Kielmeyera lathrophyton* apresentaram esqueleto carbônico do tipo biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona, sendo denominadas de ácidos kielmeyeróicos A – E e ácidos lathrophytóicos E – F, respectivamente.

A substância isolada *Kielmeyera cuspidata* denominada ácido kielmeyeróico D exibiu moderada atividade contra as de *S. aureus* e *S. mutans*, inibindo o crescimento das mesmas nas concentrações mínimas de 6,3 e 1,6 µg/mL respectivamente.

Destacou-se também o fato de que os ácidos kielmeyeróicos A – E apresentaram um grupo ligado ao carbono C-1 do anel biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona, que parece ter origem a partir da condensação da malonil-CoA com o ácido oct-2-enóico, enquanto que os ácidos lathrophytóicos E – F, exibiram um grupo que parece ter sido gerado a partir da condensação da cinamoil-CoA (rota do ácido chiquímico) com o floroglucinol.

A ocorrência de substâncias que apresentam anel biciclo[3.3.1]nonano-2,4,9-triona em *Kielmeyera* é um fato novo, pois, mesmo com o estudo de cerca de 25 espécies deste gênero, sua ocorrência só havia sido relatada em um estudo recente realizado com o extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton*.

Do extrato hexânico de *Kielmeyera lathrophyton* foram isolados ainda quatro compostos que apresentaram esqueleto carbônico semelhante aos encontrados nos neoflavonóides, mas ao contrário destes, o anel oriundo da rota do acetato (porção floroglucinol – anel A) não apresentou aromaticidade e foram chamados de lathrophytonas A – E.

Para além disso, estes compostos apresentaram também a presença de um grupo 3-isopropenil-2,2-dimetilciclobutilmetilênico, fato não muito usual em compostos naturais e somente registrado em três espécies do gênero *Calophyllum*.

A presença das lathrophytonas traduz uma novidade na biossíntese de derivados do floroglucinol na família Calophyllaceae a qual o gênero *Kielmeyera* está agora

subordinado, pois, nesta família, é comum a presença de 4-fenil e 4-alkilcumarinas. Nestes compostos, o caráter aromático do anel A é preservado, enquanto que nas lathrophytonas relatadas neste trabalho, ocorre a perda do caráter aromático nesse anel.

Todos esses fatos incentivam ainda mais a continuidade dos estudos com as espécies do gênero *Kielmeyera* que ocorrem na Chapada Diamantina e em outras regiões do Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, M. *et al.* Novel Stereocontrolled Synthesis of Highly Functionalized Cyclobutanes by Epoxide Opening through a Carbanion Intermediate in Heteroconjugate Addition. **Synlett**, 7, 1157 – 1161, 2009.

ADAM, P. *et al.* Biosynthesis of Hyperforin in *Hypericum perforatum*. **J. Med. Chem.**, 45, 4786 – 4793, 2002.

ARAYA-MATURANA R. *et al.* Long-Range Correlations ($^nJ_{C,H} > 3$) in the HMBC Spectra of 3-(4-Oxo-4H-chromen-3-YL)-acrylic Acid Ethyl Esters. **J. Braz. Chem. Soc.**, 16, (3B), 657 – 661, 2005.

BAGGETT, S. *et al.* Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits **J. Nat. Prod.**, 68 (3), 354 – 360, 2005.

BARROSO, G. M., *et al.* **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. 1. São Paulo: EDUSP 1978, p. 139.

BEERHUES, L. Hyperforin. **Phytochemistry**, 67, 2201 – 2207, 2006.

BOKESCH, H. R. *et al.* Laxifloranone, a New Phloroglucinol Derivative from *Marila laxiflora*. **J. Nat. Prod.**, 62, 1197 – 1199, 1999.

BORGES, E. M. **Estudo fitoquímico de *Trichagonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae – Eupatorieae)**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado – Química) – USP. Ribeirão Preto, SP.

CAO, S. *et al.* Sundaicumones A and B, Polyprenylated Acylphloroglucinol Derivatives from *Calophyllum sundaicum* with Weak Activity against the Glucocorticoid Receptor. **J. Nat. Prod.**, 69 (4), 707 – 709, 2006.

- CADDAH, M. K. *et al.* Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 168, 101 – 115, 2012.
- CHEN, J. J. *et al.* Benzophenone Derivatives from the Fruits of *Garcinia multiflora* and Their Anti-inflammatory Activity. **J. Nat. Prod.**, 72 (2), 253 – 258, 2009.
- CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chem. Rev.**, 106, 3963 – 3986, 2006.
- COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*. **J. Nat. Prod.**, 67, 537 – 541, 2004.
- CRUZ, F. G.; TEIXEIRA, J. S. R. Polyprenylated Benzophenones with a Tricyclo [4.3.1.13,8] Undecane Skeleton from *Clusia obdeltifolia*. **J. Braz. Chem. Soc.**, 15(4), 504 – 508, 2004.
- CRUZ, F. G.; TEIXEIRA, J. S. R. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Clusia obdeltifolia*. **Tetrahedron Letters**, 46, 2813 – 2816, 2005.
- CRUZ, F. G. *et al.* Additional Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **J. Braz. Chem. Soc.**, 13, (5), 704 – 707, 2002.
- CRUZ, F. G.; SILVA NETO, J. T.; GUEDES, M. L. S. Xanthonés and Coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. **J. Braz. Chem. Soc.**, Brasil, 12(1), 117 – 122, 2001.
- CRUZ, F. G. *et al.* Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, 47 (7), 1363 – 1366, 1998.
- CUESTA-RUBIO, O. *et al.* Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. **Phytochemistry**, 57, 279 – 283, 2001.

DE ALMEIDA, M. F. **Derivados poliprenilados do floroglucinol e Xantonas de *Kielmeyera lathrophyton* – Clusiaceae.** 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado – Química) Instituto de Química – UFBA, Salvador, BA, 2008.

DE ALMEIDA, M. F.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Lathrophytoic acids A and B: two novel polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Kielmeyera lathrophyton*. **Tetrahedron Letters**, 52, 7108 – 7112, 2011.

DE OLIVEIRA, C. M.A. *et al.* Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, 50, 1073 – 1079, 1999.

DE OLIVEIRA, C. M.A. *et al.* Floral resins of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, Vol. 37(36), 6427 – 6430, 1996.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** 3 ed., New York: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DÍAZ, D. M. V. Multivariate analysis of morphological and anatomical characters of *Calophyllum*(*Calophyllaceae*) in South America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 171, 587 – 626, 2013.

FODULOVIC, K. S. *et al.* Hyperatomarin, an Antibacterial Prenylated Phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp. *Degenii*. **J. Nat. Prod.**, 66, 1236 – 1238, 2003.

FUKUYAMA, Y.; MINAMI, H.; KUWAYAMA, A. Garsubellins, polyisoprenylated phloroglucinol derivatives from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, 49(3), 853 – 857, 1998.

FULLER, R. W *et al.* M. R. Guttiferone F, the First Prenylated Benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. **J. Nat. Prod.**, 62, 130 – 132, 1999.

GARTNER, M. *et al.* Aristoforin, a Novel Stable Derivative of Hyperforin, is a Potent Anticancer Agent. **ChemBioChem**, 6, 171 – 177, 2005.

GLISIC, S. *et al.* Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide **J. of Supercritical Fluids**, 45, 332 – 337, 2008.

GRAMACHO, R. S. *et al.* Phenylcoumarins from *Kielmeyera elata*. **Phytochemistry**, 51, 579 – 581, 1999.

GROSSMAN, R. B.; JACOBS, H. On the structures of plukenetiones B, D, and E and their relationships to other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Tetrahedron Letters**, 41, 5165 – 5169, 2000.

HASHIDA, C. *et al.* Prenylated Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum perforatum* var. *Angustifolium*. **Chem. Pharm. Bull.** 56(8), 1164 – 1167, 2008.

HASHIDA, W. *et al.* Tomoeones A–H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. **Phytochemistry**, 69, 2225 – 2230, 2008

HENRY, G. E. *et al.* Acylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum prolificum*. **J. Nat. Prod.**, 69 (11), 1645 – 1648, 2006.

HENRY, G. E. *et al.* Prenylated benzophenone derivatives from Caribbean *Clusia* species (Guttiferae). Plukenetiones B-G and xerophenone A. **Tetrahedron**, 55, 1581 – 1596, 1999.

HENRY, G. E.; *et al.* Plukenetione A. An Unusual Adamantyl Ketone from *Clusia plukenetii* (Guttiferae). **Tetrahedron Lett.** 37 (8), 48, 8663 – 8666, 1996.

HILLWIG, M. L. Characterizing the Metabolic Fingerprint and Anti-inflammatory Activity of *Hypericum gentianoides*. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 4359 – 4366, 2008.

HU, L. H.; SIM, K., Y. Complex caged polyisoprenylated benzophenone derivatives, sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. **Tetrahedron Lett.**, 39, 7999 – 8002, 1998.

- HU, L. H.; SIM; K. Y. Sampsoniones C-H, a Unique Family of Polyprenylated Benzophenone. Derivatives with the Novel Tetracydo[7.3.1.1s'n.03'7]tetradecane-2,12,14-trione Skeleton, from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae) **Tetrahedron Letters**, 40, 759 – 762, 1999.
- HU, L. H.; SIM; K. Y. Cytotoxic Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives with an Unusual Adamantyl Skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). **Org. Lett.**, 1 (7), 879 – 882 1999.
- HUANG, S. H. *et al.* Bioassay-Guided Isolation of Xanthenes and Polycyclic Prenylated Acylphloroglucinols from *Garcinia oblongifolia*. **J. Nat. Prod.**, 72, 130 – 135. 2009,
- KARPPINEN, K. *et al.* Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, 68, 1038 – 1045, 2007.
- KLINGAUF, P. *et al.* Biosynthesis of hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum*. **Phytochemistry**, 66, 139 – 145, 2005.
- KUNESCH, G.; POLONS, J. On the Biosynthesis of Neoflavanoids : Calophyllolide (4 - Phenylcoumarin). **Chemical Communications**, 317 – 318, 1967.
- LI, Y. Z, *et al.* Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. **Fitoterapia**, 81, 586 – 589, 2010.
- LOKVAM, J.; *et al.* Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, 55, 29 – 34, 2000.
- MA, C. H. *et al.* Two Pyranocoumarins from the Seeds of *Calophyllum polyanthum*. **J. Nat. Prod.** 67, 1598 – 1600, 2004.
- MARTI, G. *et al.* Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, 70, 75–85, 2009.

MASSIOT, M. *et al.* Acylphloroglucinol Derivatives from *Mahurea palustris*. **J. Nat. Prod.** 68, 979 – 984, 2005.

OHNMACHT, S. *et al.* Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR of tocotrienols. **Magn. Reson. Chem.**, 46, 287 – 294, 2008.

PACHUAU, Z.; LYNGDOH, R. H. D. Molecular orbital studies on the Wagner–Meerwein migration in some acyclic pinacol–pinacolone rearrangements. **J. Chem. Sci.**, 116 (2), 83 – 91, 2004.

PAYTON, F.; SANDUSKY, P.; ALWORTH, W. L. NMR Study of the Solution Structure of Curcumin. **J. Nat. Prod.** 70 (2), 143 – 146, 2007.

PICCINELLI, A. L. *et al.* Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, 61, 8206 – 8211, 2005.

PINHEIRO, L. *et al.* Antibacterial Xanthenes from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98 (4): 549 – 552, 2003.

RAMIANDRAWA, F.; KWESCH N.; POISSON, J. Le Calofloride, Intermédiaire d'un Type Nouveau de la Biogenèse des Neoflavonoïdes **Tetrahedron**, 39 (23): 3923 – 3928, 1983.

RAVELONJATO, B.; KUNESCH, N.; POWON, J. E. Neoflavonoids from the stem bark of *Calophyllum verticillatum*. **Phytochemistry**, 26 (11), 2973 – 4916, 1987.

ROUX, D. *et al.* Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. **J. Nat. Prod.**, 63, 1070 – 1076, 2000.

RUHFEL, B. R. *et al.* Phylogeny of the clusioid clade (malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. **American Journal of Botany**, 98 (2), 306 – 325, 2011.

SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. 4ª ed., v. 2, Porto Alegre: Editora da universidade, 1984, 414 p.

SHEN, Y. C *et al.* Chromanones and Dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. **Chem. Pharm. Bull.** 52 (4), 402 – 405, 2004.

SILVA NETO, J. T. **Estudo químico de *Kielmeyera lathrophyton* (Guttirerae)**. 1998. 102 f. Dissertação (Mestrado – Química) UFBA, Salvador, BA.

SINGH, I. P.; BHARATE, S. B. Phloroglucinol compounds of natural origin. **Nat. Prod. Rep.**, 23, 558 – 591, 2006.

SOBRAL, I. S. Estudo Químico da *Kielmeyera cuspidata* (Clusiaceae). . 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química – UFBA, Salvador, BA. 2006.

SOUSA, V. R. **Triterpenos, xantonas, cumarinas, bifenilas e derivados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e de *Kielmeyera coriacea***. 2005. 195 f. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química – UFBA, Salvador, BA. 2005.

STOUT, G. H.; BRECK, G. D. *Calophyllum* products: VI. The sidechains of the *C. Inophyllum* acids. **Tetrahedron Letters**, 23, 1999 – 2002, 1970.

TANAKA, N. *et al.* Prenylated Benzophenones and Xanthenes from *Hypericum scabrum*. **J. Nat. Prod.**, 67, 1870 – 1875, 2004.

VEROTTA, L. *et al.* Hyperforin Analogues from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **J. Nat. Prod.**, 63, 412 – 415, 2000.

VEROTTA, L. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Hyperforin Analogues. Part I. Modification of the Enolized Cyclohexanedione Moiety. **J. Nat. Prod.**, 65, 433 – 438, 2002,

VEROTTA, L. *et al.* 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, 65, 2867 – 2879, 2004.

VOGUEL, A. I. Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa. Vol. 3, 3 ed., Rio de Janeiro: Ao livro Técnico S. A., 1971, p1018.

WINKELMANN, K. *et al.* New Prenylated Bi- and Tricyclic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. **J. Nat. Prod.**, 64, 701 – 706, 2001.

WINKELMANN, K. *et al.* New Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. **J. Nat. Prod.**, 63, 104 – 108, 2000.

WINKELMANN, K.; *et al.* Further Prenylated Bi- and Tricyclic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. **Helv. Chim. Acta**, 84, 3380 – 3392, 2001.

XIAO, Z. Y. *et al.* Polyisoprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*. **J. Nat. Prod.**, 70 (11), 1779 – 1782, 2007.

WU, C. C. *et al.* Phloroglucinols with Prooxidant Activity from *Garcinia subelliptica*. **J. Nat. Prod.**, 71 (2), 246 – 250 2008.

WU, J. *et al.* A phloroglucinol derivative with a new carbon skeleton from *Hypericum perforatum* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, 45, 9657 – 9659, 2004.

WURDACK, K. J.; DAVIS, C. C. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany**, 96 (8), 1551 – 1570, 2009.

YANG, J. H. *et al.* Triterpenes from *Tripterygium wilfordii* Hook. **Journal of Asian Natural Products Research**, 8 (5), 425 – 429, 2006.

YIN, S. *et al.* Harrisotones A–E, five novel prenylated polyketides with a rare spirocyclic skeleton from *Harrisonia perforata*. **Tetrahedron**, 65, 1147 – 1152, 2009.