



Instituto de Química  
Programa de Pós-graduação em Química  
Universidade Federal da Bahia

**NEOFLAVONÓIDES E XANTONAS de**  
***Kielmeyera coriacea* (CLUSIACEAE)**

TÂMARA VIEIRA REIS

Salvador  
2010

TÂMARA VIEIRA REIS

**NEOFLAVONÓIDES E XANTONAS de**  
***Kielmeyera coriacea* (CLUSIACEAE)**

Dissertação submetida ao Colegiado de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química na área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz

Salvador  
2010

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram em mim, em especial a minha mãe, meus tios e a meu gatinho amado  
Ciro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre iluminando meu caminho.

À minha mãe, meu irmão e meus tios pelo apoio incondicional e incentivo aos estudos.

Ao Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz, pela sua orientação, estímulo, apoio e generosidade durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa.

À prof<sup>a</sup> Maria L. S. Guedes que realizou a identificação da espécie vegetal estudada.

Ao prof<sup>o</sup> Marcos Vannier e Ciro Filadelfo pelos ensaios realizados na FIOCRUZ-BA.

À Érika Oliveira pela grande amiga que foi em todos os momentos, pelo companheirismo e trocas de conhecimentos.

À Lourdes pela amizade que construímos e inestimável ajuda.

Ao meu eterno amigo Sérgio Macedo que mesmo longe esteve sempre presente.

Aos meus amigos queridos Robson Mota e João Victor pelo eterno laço de amizade que nos une.

Ao Raildo Mota pelo grande incentivo e estímulo para enfrentar essa “jornada”.

Aos colegas do GESNAT, pela convivência agradável e companheirismo durante todo o trabalho experimental, especialmente a Miquéias, Edson, Vanessa e Daniel, por tornarem mais alegres os dias de trabalho e por me ajudarem na interpretação dos espectros.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente a Bruno, Jéferson, Juracir, Clayton e Rauldenis.

Ao Cristovão e a Paulo pelo apoio técnico.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os amigos (as) que acreditaram na concretização desse trabalho.

Em especial, ao meu marido Ciro, pelo amor e atenção dedicados e que por ter acreditado na minha capacidade possibilitou a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 A FAMÍLIA CLUSIACEAE E O GÊNERO <i>Kielmeyera</i> .....	4
1.2 A ESPÉCIE <i>Kielmeyera coriacea</i> .....	5
1.3 CHAPADA DIAMANTINA .....	7
1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GÊNERO <i>Kielmeyera</i> .....	9
1.5 NEOFLAVONÓIDES .....	13
1.5.1 BIOGÊNESE DE NEOFLAVONÓIDES .....	19
1.6 XANTONAS .....	20
1.7 TRITERPENOS .....	21
1.8 ESTERÓIDES .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	26
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE .....	26
3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	27
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	28
3.4 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HEXÂNICO .....	29
3.4.1 ESTUDO DA FRAÇÃO EHKC 2 .....	30
Constituintes da fração EHKC 2-D .....	31
Constituintes da fração EHKC 2-E .....	33
3.4.2 ESTUDO DA FRAÇÃO EHKC 4 .....	36
Constituintes da fração EHKC 4-C .....	37
Constituintes da fração EHKC 4-D .....	38
Constituintes da fração EHKC 4-E .....	38
Constituintes da fração EHKC 4-G .....	39

Constituintes da fração EHKC 4-H.....	39
<b>3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....</b>	<b>40</b>
3.5.1 Avaliação da toxicidade em esplenócitos através do método de Mosmann modificado.....	40
3.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> contra <i>S. mansoni</i> .....	41
3.5.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	42
3.5.4 Análise estatística .....	43
<b>4 ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Kiellmeyera coriacea</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>5 DADOS FÍSICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>Kiellmeyera coriacea</i> ..</b>	<b>46</b>
<b>6 IDENTIFICAÇÃO E/OU DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....</b>	<b>49</b>
6.1 NEOFLAVONÓIDES .....	49
6.1.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 1.....	49
6.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 2 .....	55
6.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 3.....	61
6.1.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS KC 4, KC 5 e KC 6 .....	66
6.2 XANTONAS.....	77
6.2.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 7 .....	77
6.2.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 8.....	81
6.3 TRITERPENOS .....	86
6.3.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 9.....	86
6.4 ESTERÓIDES.....	90
6.4.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 11 .....	90
6.4.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA KC 10 .....	93
<b>7 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>98</b>
7.1 RESULTADOS .....	98
7.1.1 Avaliação da toxicidade em esplenócitos através do método de Mosmann modificado.....	98
7.1.2 Análise <i>in vitro</i> do extrato sobre o <i>S. mansoni</i> .....	99
7.1.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	99
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>101</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Análise comparativa da venda de plantas medicinais mais populares nos E.U.A. entre 1997-1998.....	2
<b>Tabela 2:</b> Relação das espécies de <i>Kielmeyera</i> descritas na literatura brasileira, região de ocorrência e tipos de metabólitos secundários isolados.....	11
<b>Tabela 3:</b> Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero <i>Kielmeyera</i> . ..	15
<b>Tabela 4:</b> Massas das frações agrupadas, obtidas da coluna cromatográfica do extrato hexânico. ....	30
<b>Tabela 5:</b> Frações obtidas da CC de EHKC 2.....	30
<b>Tabela 6:</b> Frações obtidas da CC de EHKC 2-D.....	32
<b>Tabela 7:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-D4. ....	32
<b>Tabela 8:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E. ....	33
<b>Tabela 9:</b> Frações obtidas da CC de EHKC 2-E. ....	34
<b>Tabela 10:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E2. ....	34
<b>Tabela 11:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E3 ..... 35	35
<b>Tabela 12:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E6 ..... 35	35
<b>Tabela 13:</b> Frações obtidas da CC de EHKC 4..... 37	37
<b>Tabela 14:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 4-C ..... 37	37
<b>Tabela 15:</b> Frações obtidas da CCDP de EHKC 4-D. .... 38	38
<b>Tabela 16:</b> Massas das substâncias isoladas das frações estudadas do extrato hexânico ..... 40	40
<b>Tabela 17:</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias <b>KC 1, KC 2 e KC 3</b> [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]..... 64	64
<b>Tabela 18:</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C das substâncias <b>KC 1, KC 2</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]. . 65	65
<b>Tabela 19:</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias <b>KC 4, KC 5 e KC 6</b> [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]..... 75	75
<b>Tabela 20:</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C das substâncias <b>KC 4, KC 5 e KC 6</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ]..... 76	76
<b>Tabela 21:</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias <b>KC 7 e KC 8</b> [300 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO e CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)]..... 85	85
<b>Tabela 22:</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT 135° da substância <b>KC 9</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)]..... 89	89

<b>Tabela 23:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ da substâncias <b>KC 10</b> e <b>KC 11</b> [300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]. .....	96
<b>Tabela 24:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ da substâncias <b>KC 10</b> e <b>KC 11</b> [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]. .....	97
<b>Tabela 25:</b> Valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos hexânico e acetato do caule de <i>K. coriacea</i> . .....	100
<b>Tabela 26:</b> Valores de Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de <i>K. coriacea</i> . .....	100



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição de países com o uso de fitoterápicos regulamentado no ano de 2000.....	1
<b>Figura 2:</b> A espécie vegetal <i>Kielmeyera coriacea</i> .....	6
<b>Figura 3:</b> Mapa da Chapada Diamantina.....	7
<b>Figura 4:</b> Esqueleto básico de um neoflavonóide ou 4-fenilcumarina.....	13
<b>Figura 5:</b> Principais tipos estruturais de neoflavonóides.....	14
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do Calofilólideo.....	14
<b>Figura 7:</b> Proposta biogenética dos neoflavonóides via rota do acetato e do ácido chiquímico.....	20
<b>Figura 8:</b> Esqueleto básico das xantonas.....	21
<b>Figura 9:</b> Estrutura do 2,3 epóxido de esqualeno numa conformação favorável à ciclização.....	22
<b>Figura 10:</b> Tipos de sistemas de anéis dos triterpenos pentacíclicos.....	23
<b>Figura 11:</b> Esqueletos básicos de alguns triterpenos pentacíclicos.....	23
<b>Figura 12:</b> Sistema de anéis dos esteróides.....	24
<b>Figura 13:</b> Exsicata da espécie vegetal <i>Kielmeyera coriacea</i> com flor.....	26
<b>Figura 14:</b> Esquema do procedimento experimental para obtenção dos extratos hexânico e acetato de etila de <i>Kielmeyera coriacea</i> .....	29
<b>Figura 15:</b> Esquema de fracionamento de EHKC 2.....	31
<b>Figura 16:</b> Esquema de fracionamento de EHKC 2-E.....	36
<b>Figura 17:</b> Esquema de fracionamento de EHKC 4.....	39
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 1</b> [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), $\delta$ (ppm)]. .....	52
<b>Figura 19:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 1</b> [região de $\delta$ 7,5 a $\delta$ 5,0 (ppm)]......	53
<b>Figura 20:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 1</b> [região de $\delta$ 3,4 a $\delta$ 2,0 (ppm)]......	53
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 1</b> [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]. .....	54
<b>Figura 22:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 1</b> [região de $\delta$ 165 - 125 (ppm)]......	54

<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 2</b> [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), $\delta$ (ppm)]. .....	57
<b>Figura 24:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 2</b> [região de $\delta$ 5,2 a $\delta$ 6,8 (ppm)]......	58
<b>Figura 25:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 2</b> [região de $\delta$ 0,8 a $\delta$ 2,1 (ppm)]......	58
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 2</b> [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)]. .....	59
<b>Figura 27:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 2</b> [região de $\delta$ 210,0 a $\delta$ 126,0 (ppm)]......	59
<b>Figura 28:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 2</b> [região de $\delta$ 115,0 a $\delta$ 11,0 (ppm)]......	60
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN DEPT 135° da substância <b>KC 2</b> em $\text{CDCl}_3$ [75MHz].	60
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 3</b> [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), $\delta$ (ppm)]. .....	62
<b>Figura 31:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 3</b> [região de $\delta$ 5,2 a $\delta$ 6,8 (ppm)]......	63
<b>Figura 32:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 3</b> [região de $\delta$ 0,8 a $\delta$ 4,2 (ppm)]......	63
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), $\delta$ (ppm)]. .....	71
<b>Figura 34:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [região de $\delta$ 4,0 a $\delta$ 2,0 (ppm)]......	71
<b>Figura 35:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [região de $\delta$ 4,0 a $\delta$ 0,8 (ppm)]......	72
<b>Figura 36:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 3</b> [região de 5,2 $\delta$ a 6,8 $\delta$ (ppm)]. .....	69
<b>Figura 37:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 3</b> [região de 0,8 $\delta$ a 4,2 $\delta$ (ppm)]......	70
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ), $\delta$ (ppm)]. .....	70

<b>Figura 39:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [região de $\delta$ 4,0 a $\delta$ 2,0 (ppm)].	71
<b>Figura 40:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>KC 4</b> , <b>KC 5</b> e <b>KC 6</b> [região de 4,0 $\delta$ a 0,8 $\delta$ (ppm)].	71
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 7</b> [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)].	79
<b>Figura 42:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 7</b> [região de $\delta$ 0,7 a $\delta$ 2,0 (ppm)].	80
<b>Figura 43:</b> Espectro de NOEDIF da substância <b>KC 7</b> [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , $\delta$ (ppm)].	80
<b>Figura 44:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 8</b> [300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{gtsDMSO}$ , $\delta$ (ppm)].	83
<b>Figura 45:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 8</b> [região de $\delta$ 7,5 a $\delta$ 5,4 (ppm)].	84
<b>Figura 46:</b> Espectro de NOEDIF da substância <b>KC 8</b> [300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{gtsDMSO}$ , $\delta$ (ppm)].	84
<b>Figura 48:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 9</b> [região de $\delta$ 2,8 a $\delta$ 0,6 (ppm)].	88
<b>Figura 49:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 9</b> [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)].	88
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN DEPT 135° da substância <b>KC 9</b> [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)].	88
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 11</b> em $\text{CDCl}_3$ [300 MHz].	91
<b>Figura 52:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 11</b> [região de $\delta$ 2,0 a $\delta$ 0,7 (ppm)].	91
<b>Figura 53:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 11</b> em $\text{CDCl}_3$ [75MHz].	92
<b>Figura 54:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 11</b> [região de $\delta$ 30 a $\delta$ 10 (ppm)].	92
<b>Figura 55:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 10</b> em $\text{CDCl}_3$ [300 MHz].	94
<b>Figura 56:</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>KC 10</b> [região de $\delta$ 0,6 a $\delta$ 2,6 (ppm)].	94
<b>Figura 57:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>KC 10</b> em $\text{CDCl}_3$ [75MHz].	95

<b>Figura 58:</b> Espectro de RMN DEPT 135° da substância <b>KC 10</b> em CDCl <sub>3</sub> [75MHz]. .....	95
<b>Figura 59:</b> Produção de formazan (método do MTT) em esplenócitos tratados com o extrato acetato (A) e hexânico (B) de <i>K. coriacea</i> , respectivamente. ....	98
<b>Figura 60:</b> Porcentagem da sobrevivência de casais de vermes adultos tratados em diferentes concentrações do extrato acetato durante 5 dias. ....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
$\delta$	Deslocamento químico.
d	dubleto
dd	duplo dubleto
dl	dubleto largo
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer (Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização)
GESNAT	Grupo de Estudos de Substâncias Naturais Orgânicas
Hex	Hexano
J	Constante de acoplamento
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
m	múltiplo
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
NOEDIFF	NOE difference
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN DE de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN DE de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	singleto
sl	singleto largo
t	tripleto
tl	tripleto largo
TMS	Tetrametilsilano

## RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento e a identificação estrutural de metabólitos secundários do extrato hexânico obtido do caule da espécie de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae) (pau-santo) - coletada na Chapada Diamantina, entre os municípios de Mucugê e João Correia (fevereiro de 2006) – bem como a avaliação antibacteriana dos extratos hexânico e acetato e, das substâncias isoladas; avaliação helminticida do extrato acetato e avaliação da citotoxicidade dos extratos hexânico e acetato. Os caules foram submetidos a extrações com hexano e em seguida com acetato de etila. O fracionamento do extrato hexânico e o isolamento das substâncias foram realizados através de cromatografia em coluna de sílica. As identificações das substâncias foram realizadas através de métodos espectrométricos, tais como Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (incluindo DEPT 135° e NOEDIF). Os extratos hexânico e acetato do caule foram avaliados quanto às suas propriedades antibacterianas contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus* e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*, e helminticida contra *Schistosoma mansoni*. Do extrato hexânico foram isoladas e identificadas as seguintes substâncias: os neoflavonóides ponalídeo, isomammeigina e isomesuagina; uma mistura contendo os neoflavonóides mammea A/AB ciclo D (MAB), mammeigina e mesuagina; as xantonas 6-desidroxiiisocareubina e nigrolinea F; o triterpeno lupenona e os esteróides  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitostenona. Apenas os neoflavonóides mesuagina e ponalídeo ainda não tinham sido isolados no gênero *Kielmeyera* e, o neoflavonóide isomesuagina ainda não havia sido encontrado como produto natural, tendo sido relatado apenas como produto de síntese. Os extratos exibiram baixa atividade frente às bactérias Gram positivas e o extrato acetato exibiu alto efeito helminticida e baixo valor para a ED<sub>50</sub>. As substâncias isoladas não exibiram atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

**Palavras-chave:** *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae), 4-fenilcumarinas, neoflavonóides.

## ABSTRACT

This paper describes the isolation and structural identification of secondary metabolites present in hexane extract obtained from *Kielmeyera coriacea* Mart. (Clusiaceae) (pau-santo) stem species - collected in Chapada Diamantina, in between Mucugê and João Correia towns (February 2006) – as well as the antibacterial evaluation of acetate and hexane extracts and the isolated compounds; helminthocidal evaluation of acetate extract and cytotoxicity evaluation of hexane and acetate extracts. The stems underwent extraction with hexane followed by ethyl acetate. The hexane extract cracking and compounds isolation was achieved by means of column chromatography using silica as stationary phase. Identification of compounds was performed by the use of spectrometric methods such as NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  (including DEPT 135° and NOEDIF). The hexane and acetate extracts were evaluated as to their antibacterial properties against Gram-positive *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus* as well as Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* and helminthocidal against *Schistosoma mansoni*. From hexane extract the following compounds were isolated and identified: the neoflavonoids ponnalide, isomammeigin and isomesuagin; a mixture containing mammea A / AB cyclo D (MAB), mammeigin and mesuagin neoflavonoids; the xanthones 6-desidroxiisojacareubin and nigrolinea F; lupenone triterpene and the steroids  $\beta$ -sitostenone and  $\beta$ -sitosterol. Mesuagin and ponnalide neoflavonoids were the only ones which had not been isolated in the genus *Kielmeyera* and isomesuagin neoflavonoids had not been found as natural products yet, which have been reported as a synthesis product, only. The extracts showed low activity against Gram positive bacteria while acetate extract showed high helminthocidal activity and low ED<sub>50</sub> values. The compounds did not show any antibacterial activity for evaluation concentrations.

**Keywords:** *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae), 4-phenylcoumarins, neoflavonoids.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana e, por um longo tempo, minerais, produtos vegetais e animais foram as principais fontes de medicamentos. A Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultaram em um interesse por produtos sintéticos para o tratamento de várias enfermidades (RATES, 2001).

As plantas medicinais são importantes para a investigação farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, não só quando os componentes da planta são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese de drogas ou como modelos para os compostos farmacologicamente ativos. Como a maioria das plantas medicinais ainda precisa ser estudada cientificamente, os países têm procurado realizar a identificação segura e eficaz de medicamentos oriundos de plantas (fitoterápicos) para uso em seus sistemas nacionais de saúde, seguindo orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998). O número de países, membros da OMS, que regulamentaram o uso de fitoterápicos aumentou de 52 em 1994 para 64 em 2000 (Figura 1) (OMS, 2002).



**Figura 1:** Distribuição de países com o uso de fitoterápicos regulamentado no ano de 2000.  
Fonte: OMS, 2002.



Cerca de 25% das drogas prescritas mundialmente vêm de plantas, sendo tais compostos ativos de uso frequente. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, como por exemplo, analgésicos e antitérmico, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais. Exemplos de drogas importantes obtidas de plantas são a digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, atropina da *Atropa belladonna* e morfina e a codeína de *Papaver somniferum* (RATES, 2001).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, uma grande parte da população nos países em desenvolvimento ainda depende de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para os cuidados primários (OMS, 1998). Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente do uso terapêutico de produtos naturais, especialmente àqueles derivados de plantas (RATES, 2001), o que leva a um crescimento no mercado mundial de medicamentos fitoterápicos. Durante as últimas décadas, o interesse público em terapias naturais tem aumentado consideravelmente nos países industrializados (OMS, 1998).

Nos E.U.A., a venda de ervas aumentou 101% nos principais mercados, entre 1996 e 1998 (Tabela 1). Os produtos mais populares incluem ginseng, *Ginkgo biloba*, alho, Equinácea (OMS, 2002). O reconhecimento de seu valor clínico, farmacêutico e econômico ainda está crescendo, embora isso varie muito entre os países.

**Tabela 1:** Análise comparativa da venda de plantas medicinais mais populares nos E.U.A. entre 1997-1998.

Planta medicinal	Vendas em milhões de US\$		% aumento em vendas
	1997	1998	
Total de suplementos de plantas medicinais	292	587	101
Equinácea ( <i>Echinacea</i> spp.)	33	64	96
Alho ( <i>Allium sativum</i> )	66	81	24
<i>Ginkgo biloba</i>	52	126	143
Ginseng ( <i>Panax</i> sp.)	76	96	26
Erva de São João ( <i>Hypericum perforatum</i> )	1	103	102
Outras plantas medicinais	64	118	85

Fonte: adaptado de OMS, 2002.

Segundo Newman & Cragg (2007) desde o ano de 1981 até 2006, as fontes para os novos fármacos foram: 30% sintéticos, 23% derivados de produtos naturais com alguma modificação sintética, 14% de origem biológica (proteínas ou peptídeos com mais de 45 resíduos extraídas de organismos e/ou linhagem de células produzidas por biotecnologia), 14% sintéticos com o grupo farmacofórico derivado de um produto natural, 10% sintéticos miméticos de produto natural, 5% produtos naturais e 4% vacinas. Podemos perceber que um pouco mais que a metade (52%) dos novos fármacos produzidos nos últimos 25 anos, tem relação com produtos naturais, seja direta ou indireta.

Segundo a OMS (2010), as doenças parasitárias causadas por helmintos e protozoários são as principais causas das patologias humanas que ocorrem na maioria dos países tropicais. Esses parasitos infectam bilhões e matam milhões de pessoas anualmente.

A esquistossomose é uma doença infecciosa causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, e só perde para a malária em importância para a saúde pública. Estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, e que 20.000 mortes estão associadas com as graves consequências da infecção, incluindo câncer de bexiga ou insuficiência renal (*Schistosoma haematobium*) e fibrose hepática e hipertensão portal (*S. mansoni*) (OMS, 2008).

Estima-se que cerca de 4% da população brasileira apresente esta doença. Em estudos epidemiológicos realizados pelo Ministério da Saúde foi demonstrado que a transmissão da esquistossomose ocorre em 19 estados, sendo os mais endêmicos Minas Gerais e Bahia. Os municípios que têm os mais elevados índices de prevalência estão distribuídos por toda a região costeira do Nordeste e parte no interior da Bahia, como também no sudeste de Minas Gerais. Para o tratamento são utilizados o praziquantel e a oximniquina, que apesar de uma alta eficácia, estão associados a freqüentes casos refratários e efeitos colaterais (FILADELFO, 2009).

Para reverter este quadro, é de extrema necessidade investigar novas substâncias que possam ser usadas como quimioterápicos, com o intuito de reduzir o custo do tratamento, diminuir a dose (visando reduzir efeitos colaterais), aumentar a eficácia clínica e evitar o surgimento de novas cepas resistentes. Uma das estratégias para a busca de novas substâncias para o tratamento da esquistossomose é a pesquisa com produtos naturais.

A realização de estudos fitoquímicos juntamente com ensaios biológicos vem confirmando mais uma vez que os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta de novos rumos para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças humanas.

O Brasil apresenta um grande potencial para a pesquisa de produtos naturais por possuir a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o que lhe confere uma flora muito rica em números e diversidade (PINTO et al., 2002). Apesar da grande biodiversidade existente, é pequeno o número de relatos de estudos químicos das espécies vegetais, havendo ainda muito a ser descoberto.

### 1.1 A FAMÍLIA CLUSIACEAE E O GÊNERO *Kielmeyera*

A família botânica Clusiaceae (Guttiferae) comporta cerca de 50 gêneros e mais de 1.000 espécies que ocorrem nas regiões tropicais do globo, com exceção do gênero *Hypericum* que é encontrado em regiões temperadas. Segundo Barroso (1978) citado por Cruz (1998a), no Brasil, são conhecidos 21 gêneros e 183 espécies, com ampla distribuição. Essa família dividi-se em nove tribos pertencentes a cinco subfamílias, todas com representantes no Brasil: *Kielmeyeroideae*, *Callophylloideae*, *Clusioideae*, *Moronoboideae* e *Hypericoideae*. A subfamília *Kielmeyeroideae* compreende três gêneros e cerca de 40 espécies. Dentre esses três gêneros, encontra-se o gênero *Kielmeyera* que é endêmico da América do Sul (SULTANBAWA, 1980).

Do ponto de vista fitoquímico, as espécies dessa família são reconhecidas principalmente como fontes de xantonas, que são consideradas os marcadores quimiosistemáticos da família Clusiaceae, além de benzofenonas, terpenos e esteróides (BENNET, et al., 1989; GOTTLIEB & GABRIEL, 1972; MONACHE, et al., 1984).

O gênero *Kielmeyera* Mart. & Zucc. compreende 47 espécies, ocorrendo principalmente no Brasil (SADDI, 1982 *apud* BARROS, 2002). A faixa geográfica de distribuição do gênero compreende as cinco regiões naturais. Entretanto, a região Norte e Sul apresentam pouquíssimas espécies. Evidências geográficas indicam que o endemismo é muito alto em *Kielmeyera*, estando as espécies de *Kielmeyera*

maciçamente concentradas no Brasil central. Somente algumas espécies exibem amplas distribuições, como a *K. coriacea* e *K. rubriflora* (GRAMACHO, 1997).

O gênero *Kielmeyera* ocorre principalmente nos cerrados, sendo facilmente encontrado em Minas Gerais. Contudo, em determinadas áreas, quase foram extintas, devido à exploração não sustentada, sem que houvesse cultivos ou estudos sobre sua biologia (ARELLO, 1991 *apud* RIOS, 2007).

## 1.2 A ESPÉCIE *Kielmeyera coriacea*

A série Coriaceae (Wawra) Saggi distingue-se das demais principalmente pelas folhas coriáceas e pelo hábito arbóreo/arbustivo. Em sua nova circunscrição, a série apresenta apenas duas espécies, *Kielmeyera coriacea*, com duas subespécies e sete variedades, e *K. grandiflora*, que antes estava incluída na primeira espécie como variedade. Apesar da recente revisão, a circunscrição taxonômica das espécies ainda é muito problemática. *K. coriacea* é amplamente conhecida como um dos principais componentes do Cerrado, enquanto *K. grandiflora* é pouquíssimo conhecida (CADDAM, 2009).

É um arbusto da subfamília Kielmeyeroideae - Clusiaceae. Ocorrendo no Planalto Central e Chapada Diamantina. Apresenta altura de 1 a 4 m, com folhas obovais, coriáceas e espatulares de 20 a 60 cm<sup>2</sup>. As flores são carnosas e possuem de 6 a 8 cm de diâmetro e passam do branco ao rosa à medida que senescem. Os frutos também são carnosos, alongados e ásperos, mas, à medida que amadurecem, tornam-se lenhosos. A época de floração da espécie ocorre de outubro a dezembro, início da estação chuvosa, frutificando de novembro a setembro (RIOS, 2007). As sementes não possuem mecanismo de dormência. Os representantes da espécie, assim como a maioria das espécies de cerrado, apresentam suas partes subterrâneas muito mais desenvolvidas que as aéreas (ARELLO, 1991).



Figura 2: A espécie vegetal *Kielmeyera coriacea*.

Sua classificação botânica compreende (WORLDLINGO, 2010):

Reino: Plantae  
Divisão: Magnoliophyta  
Classe: Magnoliopsida  
Ordem: Malpighiales  
Família: Clusiaceae  
Subfamília: Kielmeyeroideae  
Tribo: Calophylleae  
Gênero: *Kielmeyera*  
Espécie: ***Kielmeyera coriacea***

A espécie em estudo, *Kielmeyera coriacea*, conhecida como pau-santo, têm sido usada pela população para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras (ALVES *et al.*, 2000) e, na produção de cortiça (RIOS, 2007).

### 1.3 CHAPADA DIAMANTINA

A Chapada Diamantina ainda não é considerada uma região totalmente conhecida pelo Ministério de Meio Ambiente sendo prioritária para investigação científica (MMA, 2002). A ecorregião Chapada Diamantina engloba uma área de 50.610 km, é alongada no sentido N-S. A Chapada Diamantina ocupa uma posição central no Estado da Bahia e inclui 58 municípios (Figura 3). Essa região é a parte setentrional da Cadeia do Espinhaço, um conjunto de montanhas disjuntas, que se estende desde o Estado de Minas Gerais, em direção ao Norte, até alcançar a calha do Rio São Francisco (MISI & SILVA, 1994; ROCHA *et al.*, 2005).

A Chapada Diamantina tem sido considerada uma região de extrema importância biológica. Até o presente foram delimitadas apenas nove unidades de conservação, representando 8,1% de sua área. Destas, somente três são de proteção integral, equivalente a 3,9% do total de sua extensão. Mesmo estando regulamentadas, muitas destas áreas encontram-se desprotegidas e constantemente depredadas por ações antrópicas severas (HARLEY *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Mapa da Chapada Diamantina.  
Fonte: <http://fazendabonito.com/Mapa%20Chapada%20GIF>

Em seu prolongamento pelo estado da Bahia, a Chapada constitui um divisor de águas entre a bacia do São Francisco e os rios que se dirigem diretamente para o Oceano Atlântico. Seus limites são explicados principalmente pelas mudanças de relevo, altitude e tipo de solo. A Chapada Diamantina apresenta-se, em geral, como um planalto extenso, com altitude média entre 800 e 1000 metros acima do nível do mar, ocorrendo picos isolados com maiores elevações a exemplo do Pico do Barbado, com 2.033 m. O relevo é bastante acidentado, com grandes maciços residuais, topos rochosos, encostas íngremes, vales estreitos e profundos, grandes superfícies planas de altitude e serras altas, estreitas e alongadas (MMA, 2005).

Na Chapada Diamantina, os diversos tipos de vegetação estão associados com as características fisiográficas. A vegetação inclui cerrados, campos rupestres, florestas e caatingas com grande diversidade. Em geral, acima de 1.000 m de altitude, onde existem mais afloramentos rochosos, predominam os campos rupestres (ligados a quartzitos) e os cerrados, onde o solo é mais arenoso (solo Argissolo) (MMA, 2005). Deve-se atentar, no entanto, que a vegetação atual é produto da longa história das lavras na Chapada Diamantina que remonta ao século XIX, trabalhando intensivamente a paisagem da região (MMA, 2005).

Os cerrados da Chapada Diamantina encontram-se geralmente nas encostas das serras e podem ser chamados cerrados de altitude. Ao contrário dos cerrados do Brasil Central com considerável potencial de retenção de água e ricos em alumínio, a maioria dos cerrados da Chapada Diamantina, ocorre em solos arenosos, por vezes compostos por areia fina e cascalho e com pouco poder de retenção hídrica. Enquanto nas áreas mais ao Sul, como Caetité e Rio de Contas os cerrados variam de arbóreos a arbustivos, mais para o Norte tornam-se mais arbustivo-herbáceos (SCARIOT *et al.*, 2005).

Além dos recursos de biodiversidade, a Chapada Diamantina possui recursos minerais, destacando-se o diamante, cuja atividade garimpeira foi responsável pelo surgimento das principais cidades da região, incluindo três cidades tombadas como Patrimônio Histórico Nacional (Lençóis, Mucugê e Igatu) (HARLEY *et al.*, 2005). Destacam-se como ameaças à biodiversidade da região ações do homem como o uso intenso por atividades agro-pecuárias, por turismo, por lavra de diamantes e outros minérios, e por extrativismo de espécies ornamentais (sempre-vivas, orquídeas e cactáceas) (MMA, 2005).

#### 1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GÊNERO *Kielmeyera*

As espécies do gênero *Kielmeyera* são conhecidas por apresentarem em sua composição substâncias como xantonas, 4-alkilcumarinas e neoflavonóides (GRAMACHO *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 1998a,b; CRUZ *et al.*, 2001a), além de triterpenos (CORTEZ, 1998; GOTTLIEB, 1970; LOPES, 1977; NAGEM, 1988).

Um levantamento bibliográfico sobre metabólitos secundários de *Kielmeyera* revelou o estudo fitoquímico no Brasil de vinte espécies. Sendo oito encontradas na região de cerrado, principalmente do Planalto Central, e cinco encontradas em restingas. Das vinte espécies de *Kielmeyera* estudadas, a *K. rosea* (SILVA *et al.*, 1968) constituiu a primeira espécie do gênero onde não foram encontradas xantonas. Lembrando que o estudo químico de *K. rosea* restringiu-se apenas ao extrato benzênico dos caules. Das espécies *K. pumila*, *K. latrophyton*, *K. elata*, *K. argentea* e *K. reticulata* foram isolados uma outra classe de metabólitos secundários, conhecidos como neoflavonóides. Um sumário com as espécies de *Kielmeyera* estudadas no Brasil está apresentado na Tabela 2 (p.11), juntamente com os tipos de metabólitos secundários isolados e região de ocorrência das mesmas.

Muito dos metabólitos secundários encontrados em plantas desse gênero apresentam atividades biológicas, tais como: atividade anticancerígena, anti-HIV e inseticida. São atribuídas às xantonas algumas atividades biológicas, dentre elas podemos citar: inibidor alérgico, ação broncodilatadora no tratamento da asma, atividade tuberculostática, antidepressiva, antiinflamatória e antiviral (SULTANBAWA, 1980; HOSTETTMANN, 2003). O extrato metanólico bruto do caule de *Kielmeyera variabilis* Mart pode ser empregado satisfatoriamente como moluscicida natural (PINHEIRO *et al.*, 2003).

A espécie *Kielmeyera coriacea* tem sido bastante estudada ao longo dos anos. O primeiro estudo químico relatado foi realizado por Pimenta e colaboradores em 1964. Da espécie *K. coriacea* já foram isoladas xantonas, triterpenos, bifenilas (PIMENTA *et al.*, 1964; GOTTLIEB *et al.*, 1966b; CORTEZ *et al.*, 1998; SOUZA, 1999 e 2005), tocotrienóis (CORTEZ *et al.*, 1998; SOUZA, 1999 e 2005), esteróides e derivados de floroglucinol (SOUZA, 2005).

Xantonas e um composto bifenílico isolados de *K. coriacea* apresentaram atividade antifúngica sobre *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans* (CORTEZ *et al.*, 1998). A osajaxantona isolada desta espécie exibiu proteção contra



a infecção das cercárias do *Schistosoma mansoni*, quando aplicada na pele de animais (LOPES *et al.*, 1977). A fração diclorometânica obtida a partir do caule e o extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* apresentaram atividade ansiolítica (ALMEIDA *et al.*, 2007), e a fração obtida a partir das folhas apresentou atividade antiproliferativa *in vitro* em cultura de células tumorais humanas e atividade antifúngica (FOGLIO *et al.*, 2007; AUDI *et al.*, 2002).

**Tabela 2:** Relação das espécies de *Kielmeyera* descritas na literatura brasileira, região de ocorrência e tipos de metabólitos secundários isolados.

<b>Espécie</b>	<b>Região de Ocorrência</b>	<b>Metabólitos secundários isolados</b>	<b>Referências</b>
<i>K. coriacea</i>	Cerrado - MG	Xantonas Triterpenos Bifenilas	PIMENTA <i>et. al.</i> , 1964. GOTTLIEB <i>et. al.</i> , 1966b. CORTEZ <i>et al.</i> , 1998.
	Campo rupestre (Chapada Diamantina) – BA	Xantonas derivados do floroglucinol Triterpenos Esteróides Tocotrienol	SOUZA, 1999 e 2005.
<i>K. petiolaris</i>	Cerrado - MG	Xantonas	GOTTLIEB <i>et. al.</i> , 1966a.
<i>K. corymbosa</i>	Cerrado - MG	Xantonas Bifenilas	CORRÊA <i>et. al.</i> , 1966.
<i>K. rosea</i>	Cerrado - MG	Triterpenos Esteróides Álcool alifático	SILVA <i>et al.</i> , 1968.
<i>K. rupestris</i>	Campo rupestre - ES	Xantonas	DUARTE <i>et. al.</i> , 1968.
		Quinonas Esteróides	CORRÊA <i>et. al.</i> , 1970.
<i>K. ferruginea</i>	Cerrado - MG	Xantonas	GOTTLIEB <i>et. al.</i> , 1969.
<i>K. excelsa</i>	Floresta Atlântica - RJ	Xantonas Esteróides	GOTTLIEB & STEFANI, 1970.
<i>K. speciosa</i>	Cerrado - MG	Xantonas Triterpenos	GOTTLIEB <i>et. al.</i> , 1970.
<i>K. candidissima</i>	Litoral entre Linhares e São Mateus (ES)	Xantonas Esteróides	FERREIRA <i>et. al.</i> , 1972.
<i>K. rubiflora</i>	Cerrado – MG	Xantonas	GOTTLIEB <i>et. al.</i> , 1971.
<i>K. pumila</i>	Ouro Preto - MG	Xantonas	NAGEM & SILVA, 1988.
		4-fenilcumarina Triterpenos Esteróides	
<i>K. elata</i>	Restinga (Mata Atlântica) – Ilhéus	Xantonas	GRAMACHO, 1997.
	–BA	4-fenilcumarina Triterpenos Esteróides	OLIVEIRA <i>et. al.</i> , 1999.

**Tabela 2:** Relação das espécies de *Kielmeyera* descritas na literatura brasileira, região de ocorrência e tipos de metabólitos secundários isolados (continuação).

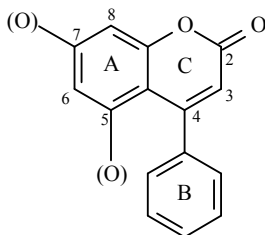
<i>K. argentea</i>	Restinga (Parque metropolitano do	4-fenilcumarina	CRUZ <i>et. al.</i> , 1998b.
	Abaeté) - Salvador (BA)	4-alquilcumarina	SANTOS, 2005.
<i>K. lathrophyton</i>	Campo rupestre – Chapada Diamantina (BA)	Xantonas	SILVA-NETO, 1998;
		4-fenilcumarinas	CRUZ <i>et. al.</i> , 2001;
		4-alquilcumarina	ALMEIDA, 2008.
		Triterpenos	
		Esteróides	
		Tocotrienol	
		Derivados do floroglucinol	
<i>K. marauensis</i>	Restinga (Mata Atlântica) – Ilhéus (BA)	Xantonas	LUCAS <i>et. al.</i> , 1999.
		4-alquilcumarina	
		Triterpenos	
		Esteróides	
<i>K. reticulata</i>	Restinga (Parque metropolitano do Abaeté) – Salvador (BA)	Xantona	CRUZ <i>et al.</i> , 1998a;
		4-fenilcumarina	MOREIRA, 1999.
		4-alquilcumarina	CRUZ <i>et al.</i> , 2002.
		Triterpenos	
		Esteróides	
Tocotrienol			
<i>K. albopunctata</i>	Reserva florestal de Linhares - ES	4-alquilcumarina	SCIO <i>et al.</i> , 2003.
		4-fenilcumarina	
		Triterpenos	
<i>K. rugosa</i>	Restinga - SE	4-alquilcumarina	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009.
		4-fenilcumarina	
		Triterpenos	
<i>K. cuspidata</i>	Campo rupestre (Chapada Diamantina) – BA	Xantona	SOBRAL <i>et al.</i> , 2009.
		Triterpenos	
		Esteróides	
		Esteróides	
<i>Kielmeyera cf.</i> <i>neglecta</i>	Reserva Biológica de Una - BA	Triterpenos	SOUZA <i>et al.</i> , 2002.
		Esteróides	PASSOS <i>et al.</i> , 2009.
		Ácido 3,4- diidroxibenzóico	

\*adaptado de Souza, 2005.

## 1.5 NEOFLAVONÓIDES

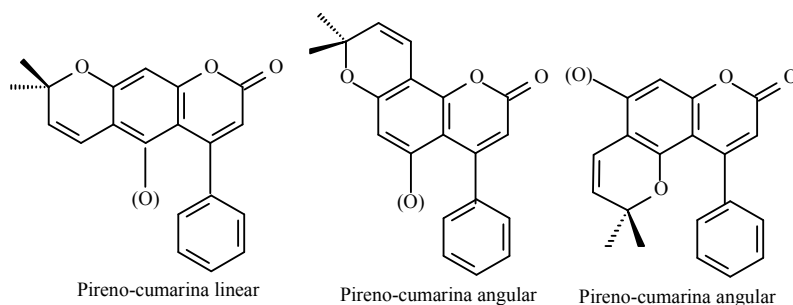
Neoflavonóides representam um grupo de compostos naturais, os quais são estrutural e biogeneticamente relacionados aos flavonóides e isoflavonóides e é um dos grupos de compostos fenólicos mais amplamente distribuídos no reino vegetal. São metabólitos secundários que possuem um esqueleto básico contendo 15 átomos de carbono em um arranjo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Podem ser descritos como 4-fenilcumarinas, porque são estruturalmente semelhantes às cumarinas mas são diferentes na sua biogênese (KUNESCH & POLONSKY, 1967; DONNELLY & BOLAND, 1993).

Um neoflavonóide possui o esqueleto cumarínico e um grupo fenílico ligado ao C-4 (Figura 4). Geralmente as posições 5 e 7 dos neoflavonóides são oxigenadas, sendo que esse padrão de oxidação tem origem na biossíntese desses compostos (MANN, 1994).



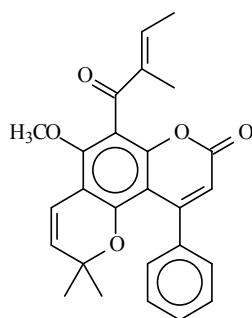
**Figura 4:** Esqueleto básico de um neoflavonóide ou 4-fenilcumarina.

Os neoflavonóides isolados de algumas espécies da família Clusiaceae e também de outras famílias, apresentam alguns tipos de substituintes associados ao esqueleto básico. Os substituintes oxigenados mais freqüentemente encontrados nesses neoflavonóides são hidroxila e metoxila. É muito comum a presença de substituintes como o grupo 2,2-dimetilpireno que pode ser encontrado em posição linear ou angular ao anel cumarínico (Figura 5, p.14) (MOREIRA, 1999).



**Figura 5:** Principais tipos estruturais de neoflavonóides.

O primeiro neoflavonóide isolado de uma fonte natural foi o calofilólídeo (Figura 6). Ele foi isolado em 1951 do extrato das sementes de *Calophyllum inophyllum* e sua estrutura foi estabelecida em 1957. Até 2004 foram isolados cerca de 130 neoflavonóides de 58 espécies vegetais das famílias Clusiaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Asteraceae, Thelypteridaceae, Passifloraceae e Rutaceae (GARAZD *et al.*, 2003; SCIO, 2004).



**Figura 6:** Estrutura química do Calofilólídeo.

Os neoflavonóides tornaram-se altamente interessantes para seu isolamento e síntese devido à sua estrutura única, amplamente difundida em plantas medicinais tradicionais, e suas propriedades farmacológicas valiosas. Em 1992, foi relatada uma série de dipiranocumarinas, e o (+)-calanolídeo apresentou atividade anti-HIV (McKEE *et al.*, 1998). Do óleo das sementes de *Mesua ferrea L* foram isolados o mesuol, que é um antibiótico amargo, e a mesuagina, que apresenta atividade bactericida fraca contra *Staphylococcus aureus* (CHAKRABORTY & CHATTERJI, 1969). As 4-alkil e 4-fenilcumarinas isoladas do gênero *Mammea* apresentaram consideráveis propriedades inseticida, bactericida e inibiram o crescimento das células do Sarcoma 180 (FINNEGAN *et al.*, 1972).

Cerca de 30 neoflavonóides já foram isolados de espécies do gênero *Kielmeyera* e estão listados na Tabela 3 (p. 15).

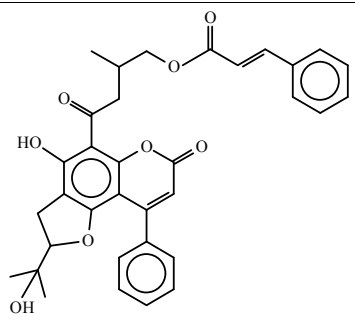
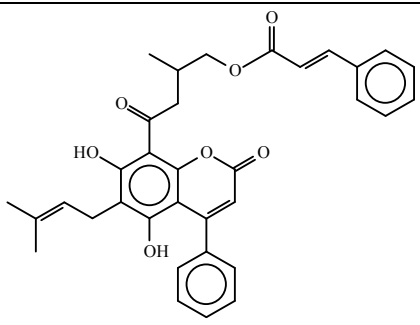
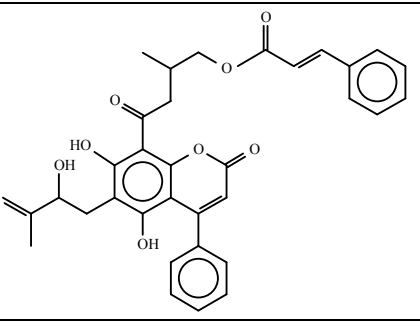
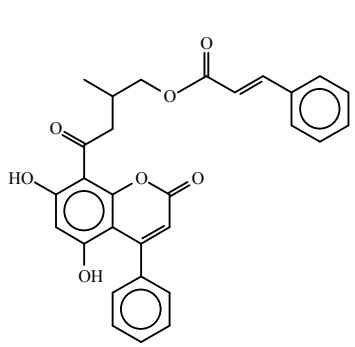
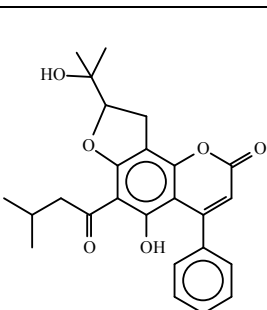
**Tabela 3:** Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero *Kielmeyera*.

Estrutura	Espécie	Referência
	<i>K. pumila</i>	NAGEM & SILVA, 1988.
	<i>K. pumila</i>	NAGEM & SILVA, 1988.
	<i>K. pumila</i>	NAGEM & SILVA, 1988.
	<i>K. pumila</i>	NAGEM & SILVA, 1988.
	<i>K. pumila</i> <i>K. elata</i> <i>K. lathrophyton</i>	NAGEM & SILVA, 1988 GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999 CRUZ, <i>et al.</i> , 2001a.
	<i>K. pumila</i>	NAGEM & SILVA, 1988.

**Tabela 3:** Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero *Kielmeyera* (continuação).

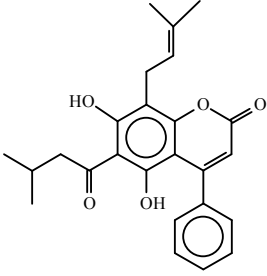
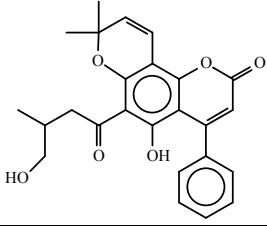
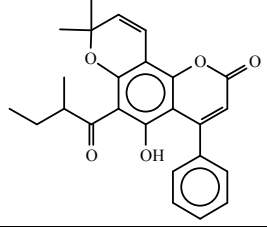
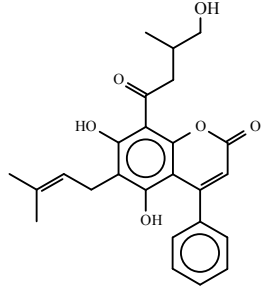
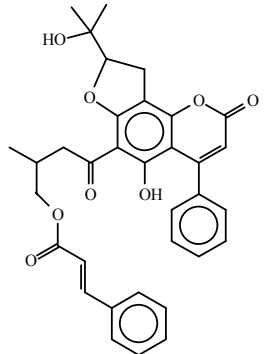
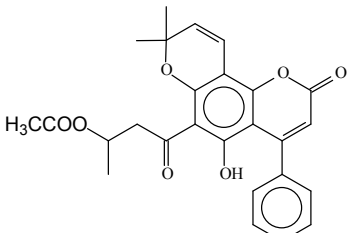
	<i>K. reticulata</i>	CRUZ <i>et al.</i> , 1998a. MOREIRA, 1999;
	<i>K. reticulata</i>	CRUZ <i>et al.</i> , 1998a MOREIRA, 1999;
<i>K. argentea</i>	CRUZ, <i>et al.</i> , 1998b	
<i>K. rugosa</i>	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009.	
	<i>K. reticulata</i>	MOREIRA, 1999; CRUZ <i>et al.</i> , 1998a;
<i>K. argentea</i>	CRUZ <i>et al.</i> , 1998b.	
	<i>K. reticulata</i>	CRUZ, <i>et al.</i> , 1998a; MOREIRA, 1999.
<i>K. reticulata</i>	CRUZ, <i>et al.</i> , 1998a MOREIRA, 1999.	

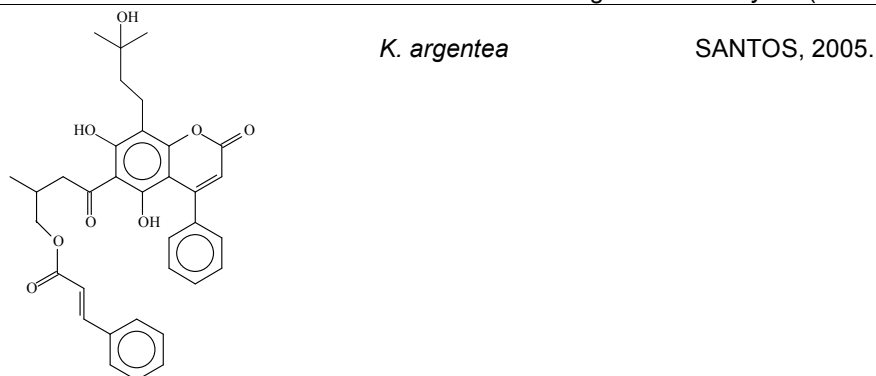
**Tabela 3:** Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero *Kielmeyera* (continuação).

	<i>K. reticulata</i>	MOREIRA, 1999. CRUZ, 2002.
	<i>K. reticulata</i>	CRUZ, <i>et al.</i> , 1998a; MOREIRA, 1999.
	<i>K. reticulata</i>  <i>K. argentea</i>	MOREIRA, 1999; CRUZ <i>et al.</i> , 2002; SANTOS, 2005.
	<i>K. reticulata</i>	MOREIRA, 1999; CRUZ <i>et al.</i> , 2002.
	<i>K. elata</i>	GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999.



**Tabela 3:** Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero *Kielmeyera* (continuação).

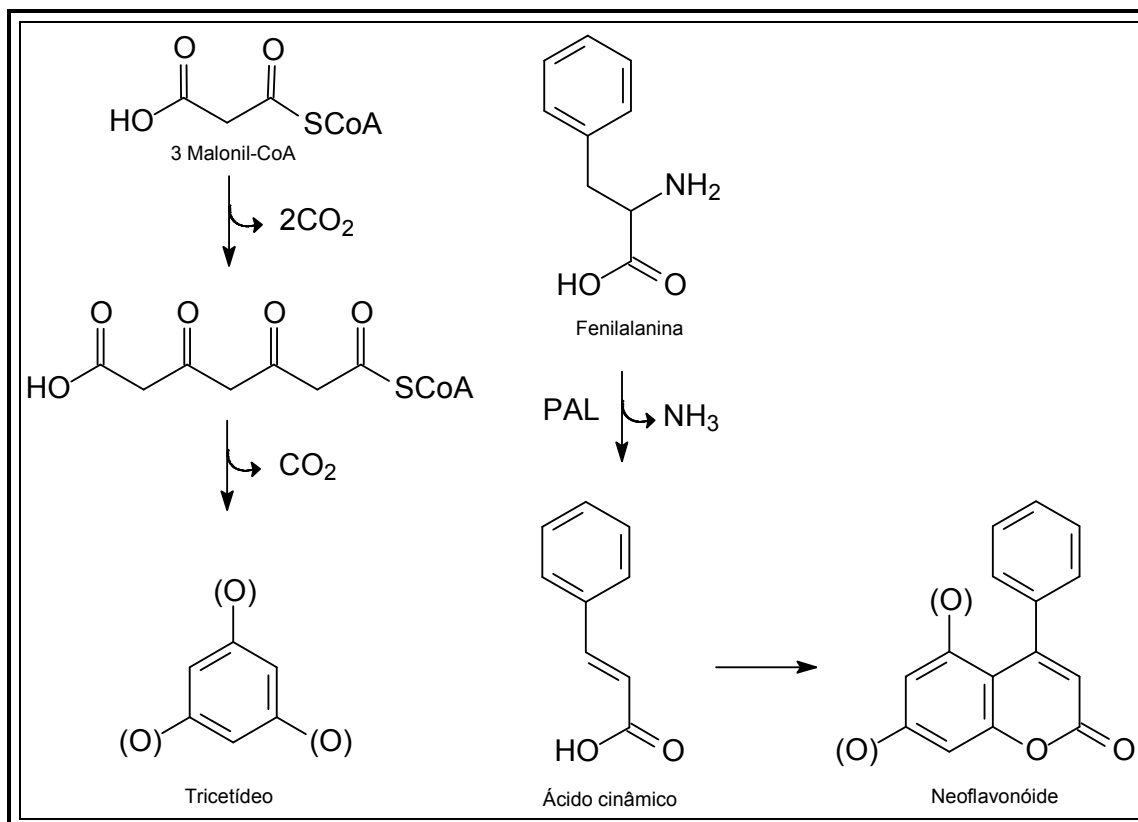
	<i>K. elata</i>	GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999
	<i>K. elata</i>	GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999
	<i>K. lathrophyton</i>	CRUZ, <i>et al.</i> , 2001a.
	<i>K. albopunctata</i>	SCIO <i>et al.</i> , 2003.
	<i>K. argentea</i>	SANTOS, 2005.
	<i>K. argentea</i> <i>K. rugosa</i>	SANTOS, 2005; NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009.

**Tabela 3:** Estruturas e fontes de neoflavonóides isolados do gênero *Kielmeyera* (continuação).

\*adaptado de Souza, 2005.

### 1.5.1 BIOGÊNESE DE NEOFLAVONÓIDES

Os neoflavonóides são metabólitos secundários derivados da rota do ácido chiquímico, a mesma que dá origem aos flavonóides e isoflavonóides. A proposta de biogênese dos neoflavonóides tem sido bastante estudada e indica que são biossintetizadas por uma via mista (ácido chiquímico e acetato) através da condensação do ácido cinâmico com uma unidade fenólica ou seu policetídeo equivalente, formado a partir de três unidades de acetato (CARPENTER *et al.*, 1971; KUNESCH & POLONSKY, 1967; HERBERT, 1989) (Figura 7, p.20) em virtude do padrão de oxigenação alternado do anel aromático do esqueleto cumarínico que é encontrado apenas na família Clusiaceae. Das espécies pertencentes à família Rubiaceae foram isolados neoflavonóides que possuem um átomo de oxigênio extra ligado ao anel A. Estes neoflavonóides 5, 7, 8 - trioxigenados são de ocorrência limitada (Donnelly & Boland, 1993). O ácido cinâmico, um composto fenólico simples contendo nove átomos de carbono, é também conhecido como fenilpropanóide porque contém um anel aromático e 3 átomos de carbono formando uma cadeia lateral (HERBERT, 1989; MANN, 1994).



**Figura 7:** Proposta biogênica dos neoflavonóides via rota do acetato e do ácido chiquímico.

Na biogênese de neoflavonóides, logo após a condensação, ocorre uma lactonização.

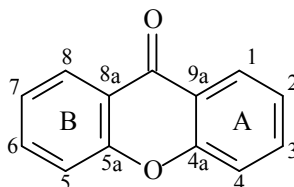
## 1.6 XANTONAS

Xantonas são metabólitos secundários comumente encontrados em plantas superiores, em fungos e em líquens. Suas propriedades farmacológicas têm despertado grande interesse no meio científico (CARDONA *et al.*, 1990).

O termo xantona designa o composto químico dibenzo- $\gamma$ -pirona, esqueleto básico formado por treze átomos de carbono em um arranjo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 8, p.21). Ligados a esse esqueleto básico encontram-se substituintes oxigenados (hidroxila, metoxila e metilendioxí) e resíduos isoprenóides ou poliisoprenóides (SULTANBAWA, 1980; OLLIS, 1970).

A natureza simétrica do núcleo da xantona em plantas necessita que os carbonos estejam numerados de acordo com uma convenção biossintética. Os

carbonos 1-4 são atribuídos ao anel A derivado do acetato, e os carbonos 5-8 ao anel B derivado do chiquimato (BENNETT & LEE, 1989). O sistema de numeração é baseado em xanten-9-ona como o esqueleto básico (GOTTLIEB, 1968), e nos casos onde somente o anel B é oxigenado os números menores são usados, à exceção das discussões biossintéticas (BENNETT & LEE, 1989).



**Figura 8:** Esqueleto básico das xantonas

As xantonas são encontradas em plantas superiores pertencentes às famílias Clusiaceae, Gentianaceae, Moraceae e Polygalaceae (SULTANBAWA, 1980; OLLIS, 1970).

Ensaio farmacológico com xantonas naturais mostraram diferentes atividades, como antiinflamatória, antileucêmica, antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, antiviral (herpes), antifúngica, inibidor alérgico, ação broncodilatadora no tratamento da asma e atividade tuberculostática (SULTANBAWA, 1980), estimulante do miocárdio e do sistema nervoso central, hipertensora, antimicrobiana, analgésica, bactericida e imunossupressora, o que evidencia o potencial desses metabólitos especiais como agentes medicinais (BENNET & LEE, 1989).

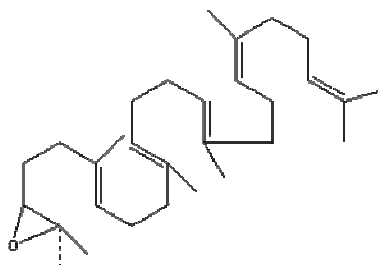
## 1.7 TRITERPENOS

A bibliografia sobre triterpenos é muito vasta e mostra um grande número destas substâncias de ocorrência vegetal. Constituem talvez o grupo mais importante dos terpenos. São metabólitos secundários amplamente difundidos no reino vegetal. Alguns deles são substâncias alifáticas totalmente saturadas e muitos têm caráter olefínico, possuindo uma, duas ou até três ligações duplas, acompanhado na maioria dos casos de grupos funcionais oxigenados como: -OH, -OR, -OAc, -COOH, -COOR, =O (SILVA *et al.*, 1992).

Muitos triterpenos apresentam atividades biológicas, o que lhes confere uma importância terapêutica e comercial (MAHATO & SEN, 1997). Como exemplo tem-se

o ácido betulínico e o ácido morônico, os quais são utilizados no tratamento anti-HIV (FUJIOKA *et al*, 1994; ITO *et al*, 2001).

Os triterpenos possuem esqueleto derivado do 2,3-epóxido de esqualeno (Figura 9) - que possui 30 átomos de carbono. O epóxido de esqualeno pode adotar várias conformações (*pseudo* cadeira ou barco) das quais resultam diferentes estruturas cíclicas. Uma ampla diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização predominantemente oxigenada, leva a mais de quatro mil estruturas já isoladas e identificadas. Devido a sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (MAHATO & SEN, 1997).



**Figura 9:** Estrutura do 2,3 epóxido de esqualeno numa conformação favorável à ciclização.

Dentro dessa ampla variedade de triterpenos existem alguns que ocorrem com frequência maior nos vegetais. Estes apresentam apenas um grupo funcional no C-3 e são pentacíclicos ou tetracíclicos que contêm no máximo uma ou duas ligações duplas respectivamente (OLEA e ROQUE, 1990).

A estrutura policíclica, (abordando apenas os pentacíclicos), pode ter cinco anéis de seis membros (oleanano e ursano) ou quatro anéis de seis membros e um de cinco (lupano) (Figura 10-11, p.23). É possível distinguir dois sistemas de anéis (SILVA *et al.*, 1992). Os triterpenos do tipo I se encontram amplamente distribuídos nos vegetais, especialmente nas dicotiledôneas. A posição C-3 do anel A encontra-se geralmente substituída por um grupo hidroxílico ou acetato. Os triterpenos do tipo II são encontrados em bactérias, líquens e plantas superiores. Este esqueleto básico apresenta geralmente uma cadeia isopropílica no átomo de carbono 19 ou 21 (SILVA *et al.*, 1992).

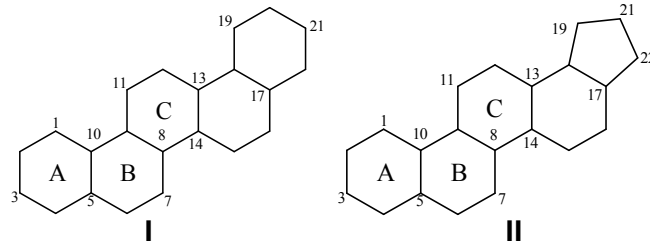


Figura 10: Tipos de sistemas de anéis dos triterpenos pentacíclicos.

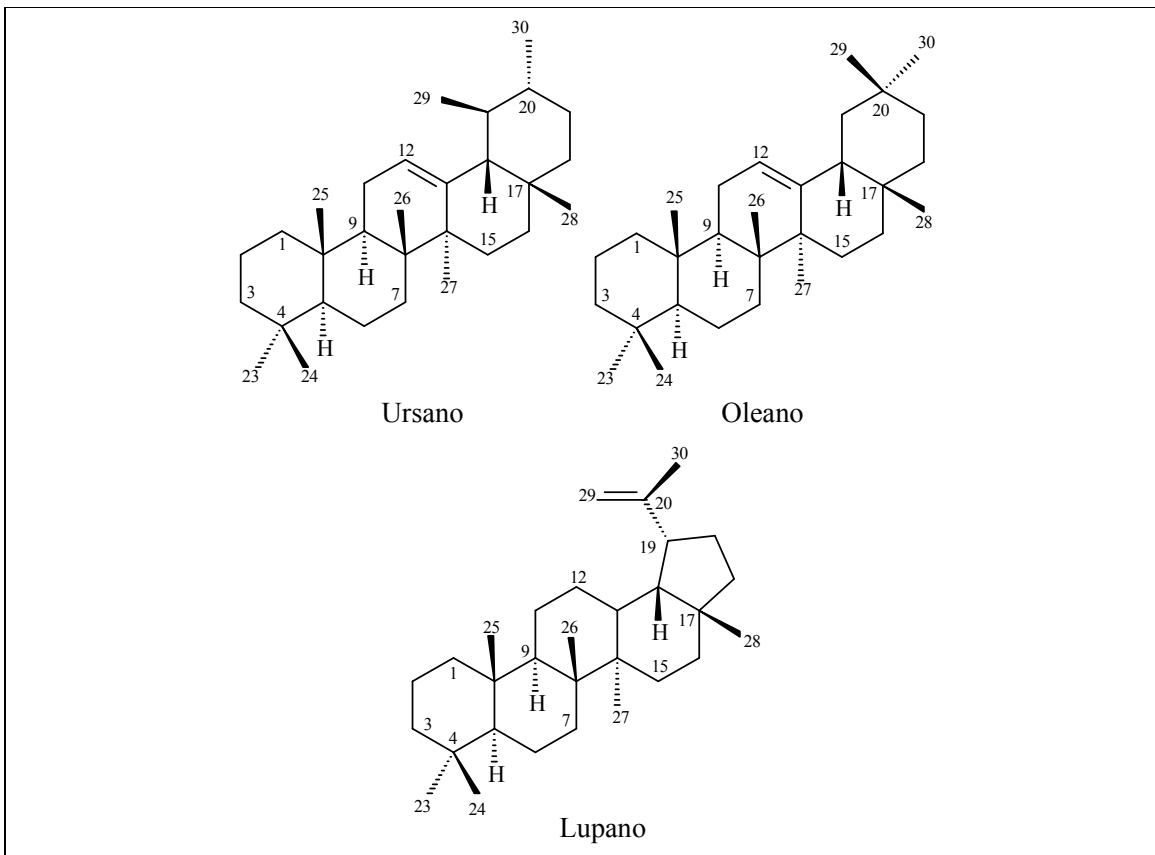
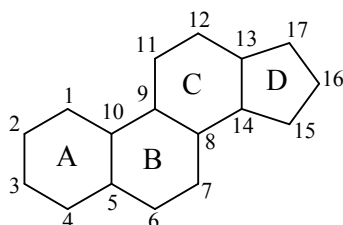


Figura 11: Esqueletos básicos de alguns triterpenos pentacíclicos.

## 1.8 ESTERÓIDES

Os esteróides são compostos tetracíclicos (quatro anéis) de alta massa molecular e formam uma grande classe de compostos solúveis em gordura. Todos os esteróides apresentam em comum uma estrutura química básica de 17 átomos de carbono denominada ciclopentanoperidrofenantreno: um núcleo cíclico semelhante ao núcleo do fenantreno (anéis A, B e C), que são ligados a um anel ciclopentano (D) (Figura 12) (HARPER, 2002).



**Figura 12:** Sistema de anéis dos esteróides.

Os esteróides possuem um esqueleto que contém de 27 a 29 átomos. Apresentam cadeias laterais de metilas que ocorrem tipicamente nas posições 10 e 13 (constituindo um átomo de C-19 e C-18). Geralmente a posição 17 do anel D encontra-se substituída por uma cadeia lateral que pode conter de 7 a 10 átomos de carbono e geralmente, nos que são encontrados em planta, a posição 3 do anel A pode estar substituída por grupos funcionais, como por exemplo: -OH e C=O (MANN, 1994).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Realizar o estudo químico do caule da espécie *Kielmeyera coriacea* e avaliar as atividades biológicas dos extratos e das substâncias isoladas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a composição química, em termos de metabólitos secundários, do extrato hexânico do caule com cascas da espécie vegetal *Kielmeyera coriacea*;
- Purificar, determinar e/ou identificar as estruturas desses metabólitos secundários;
- Contribuir para o conhecimento químico e biológico do gênero *Kielmeyera*;
- Avaliar as atividades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC 5175, e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (Gram-positivas) e *Salmonella typhimurum* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ATCC 94863 (Gram-negativas), dos extratos hexânico e acetato e das substâncias isoladas;
- Avaliar as atividades helmintíca sobre o *Schistosoma mansoni* do extrato acetato;
- Avaliar a toxicidade dos extratos hexânico e acetato através da dosagem da produção de formazan em esplenócitos.



### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

O espécime de *Kielmeyera coriacea*, foi coletado na Chapada Diamantina, entre os municípios de Mucugê e João Correia, Bahia, em fevereiro de 2006, pela equipe do GESNAT coordenada pelo Prof. Dr. Frederico G. Cruz.

A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lenise S. Guedes e a exsicata está catalogada sob o n<sup>o</sup> 75134 (Figura 13), no herbário “Alexandre Leal Costa”, do Instituto de Biologia da UFBA.

De todo o material coletado, separamos os caules com cascas que foram submetidos à secagem em temperatura ambiente durante o período de uma semana.



Figura 13: Exsicata da espécie vegetal *Kielmeyera coriacea* com flor.

### 3.2 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

A moagem do material vegetal foi realizada utilizando-se moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.

Os solventes empregados no preparo dos extratos, nas eluições das cromatografias em placa e coluna foram de grau analítico das marcas Merck, Vetec e Quimex.

A evaporação dos solventes orgânicos utilizados na obtenção dos extratos hexânico e acetato e das frações foi realizada sob pressão reduzida no evaporador rotatório da marca BUCHI modelo R-3000, com temperatura em geral entre 35 e 50 °C.

Nos processos de separação através por CC utilizamos sílica gel 60-230 mesh (ASTM/0,063-0,200 mm), 230-400 mesh (0,040-0,063 mm) da Merck.

Nas análises por CCDC foi utilizado gel de sílica GF<sub>254</sub> da marca Merck como fase estacionária. As cromatoplasmas para CCDC foram preparadas espalhando-se a suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro de 2,5 X 7,0 cm, 5,0 X 20,0 cm através do espalhador mecânico Heidelberg, obtendo-se placas com 0,5 mm de espessura. Depois de secas ao ar livre todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufa a 100 °C por 1 h.

Nas análises por CCDP foi utilizado gel de sílica PF<sub>254</sub> da marca Merck como fase estacionária. Preparamos as placas cromatográficas espalhando-se uma suspensão de sílica gel descrita, em água destilada sobre placas de vidro de 20,0 X 20,0 cm. Depois de secas ao ar livre todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufa a 100 °C por 1 h.

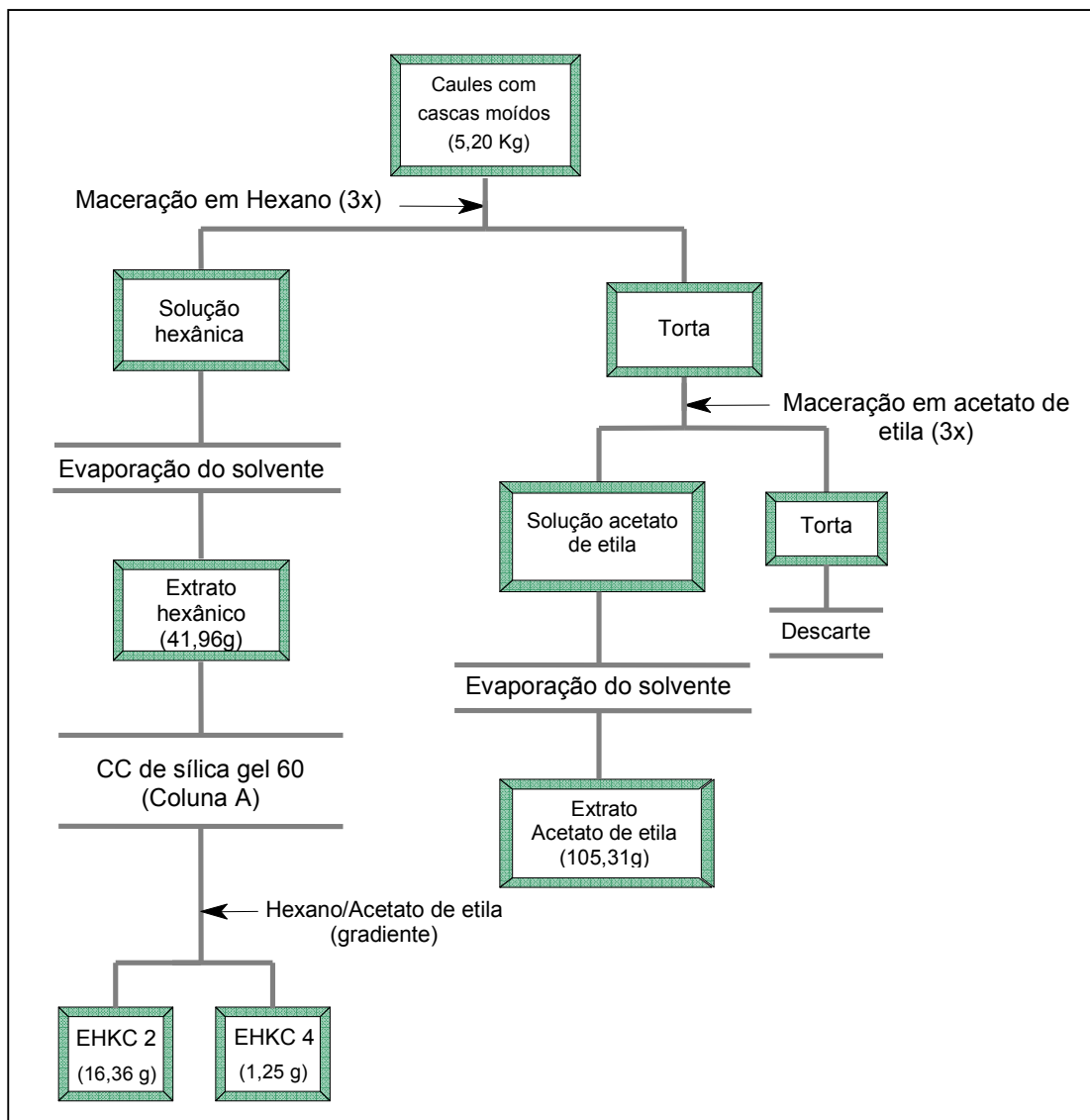
Os cromatogramas em CD foram revelados através de irradiação de lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, assim como vapores de iodo.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135 e NOEDIF foram registrados em espectrômetro da Varian (GEMINI 2000), operando a 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono e Varian (INOVA 500) operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono utilizando TMS como referência interna e utilizando-se CDCl<sub>3</sub>, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO e DMSO-d<sub>6</sub> como solventes.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O caule com casca da *K. coriacea* foi triturado em moinho obtendo-se 5,20 kg de material, que foi submetido à extração com hexano. Foram feitas três extrações sucessivas. Após a filtração o extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida a aproximadamente 50 °C, utilizando um evaporador rotativo, obtivemos 41,96 g (0,81 %) conforme esquema proposto na Figura 15 (p.29) e Tabela 4 (p.30).

À torta obtida depois da extração com hexano, foi adicionado acetato de etila e repetimos o procedimento anteriormente descrito. O extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida a aproximadamente 50 °C, utilizando um evaporador rotativo, obtivemos 105,31g (2,04%) (Figura 14, p.29) (Tabela 4, p.30). Não foi realizado o estudo químico deste extrato, sendo utilizado apenas para ensaios biológicos. Esse extrato foi conservado em refrigerador.



**Figura 14:** Esquema do procedimento experimental para obtenção dos extratos hexânico e acetato de etila de *Kielmeyera coriacea*.

### 3.4 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HEXÂNICO

O extrato hexânico (41,96 g) foi fracionado através de cromatografia em coluna filtrante de sílica gel 60, utilizando como fase móvel o sistema hexano/acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 60 frações de 500 mL, que após evaporação do solvente foram reunidas em 8 grupos através da análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo. Na Tabela 4 (p.30) são apresentadas as frações agrupadas, obtidas do fracionamento do extrato hexânico com as suas respectivas massas.

**Tabela 4:** Massas das frações agrupadas, obtidas da coluna cromatográfica do extrato hexânico.

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Eluente</b>	<b>Substâncias isoladas</b>
EHKC 1	1-13	0,30	Hexano	Não trabalhada
EHKC 2	14-15	16,36	Hexano/Acetato 9:1	<b>KC 1, KC 2, KC 3 e KC 9</b>
EHKC 3	16-18	6,29	Hexano/Acetato 9:1	Não trabalhada
EHKC 4	19	1,25	Hexano/Acetato 8:2	<b>KC 4, KC 5, KC 6, KC 7, KC 8, KC 10 e KC 11</b>
EHKC 5	20-28	3,93	Hexano/Acetato 8:2	Não trabalhada
EHKC 6	29-42	1,11	Hexano/Acetato 8:2	Não trabalhada
EHKC 7	43-44	0,27	Acetato de etila	Não trabalhada
EHKC 8	45-60	0,82	Metanol	Não trabalhada

### 3.4.1 ESTUDO DA FRAÇÃO EHKC 2

A fração EHKC 2 (16,36 g) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando como adsorvente gel de sílica 60 eluída com gradiente de misturas de hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade crescente (Figura 15, p.31). Foram coletadas 128 frações, que foram reunidas em 10 grupos após análise por CCDC (Tabela 5). As frações EHKC 2-D (331 mg) e EHKC 2-E (788,9 mg) foram selecionadas para posteriores fracionamentos, tendo como base seus comportamentos em CCDC e seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Tabela 5:** Frações obtidas da CC de EHKC 2.

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-A	1-6	1,4
EHKC 2-B	7-25	55,6
EHKC 2-C	26-50	182,1
EHKC 2-D	51-71	331
EHKC 2-E	72-81	788,9
EHKC 2-F	82-102	4.490
EHKC 2-G	103-113	7.026
EHKC 2-H	114-115	2.027
EHKC 2-I	116-126	405,2
EHKC 2-J	127-128	32,3

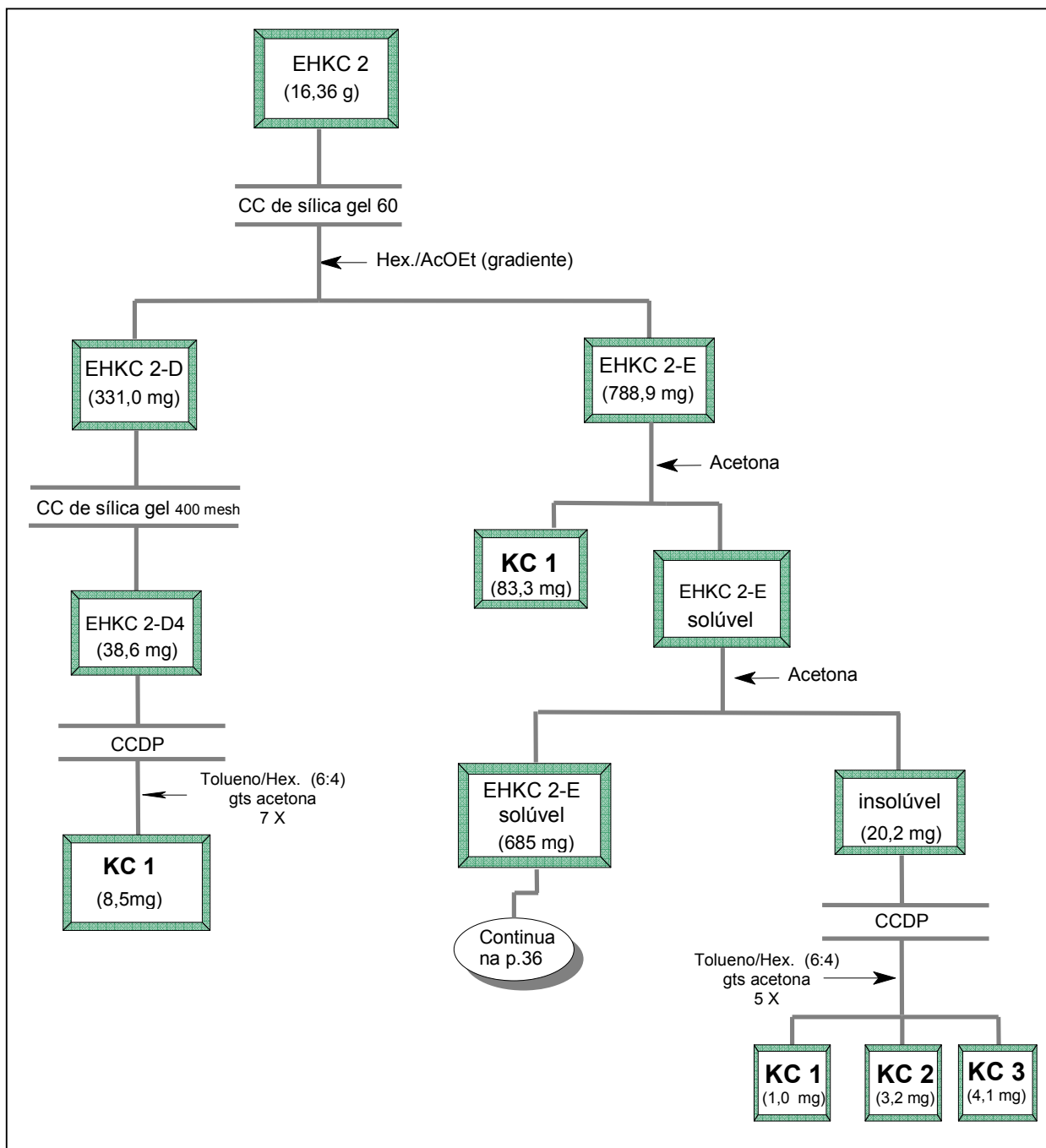


Figura 15: Esquema de fracionamento de EHKC 2.

### Constituintes da fração EHKC 2-D

A fração EHKC 2-D (331 mg) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando como adsorvente sílica gel 400 mesh, e como fase móvel misturas de

hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade crescente (Figura 15, p.31). Foram coletadas 95 frações, que após análise por CCDC, foram reunidas em 6 grupos (Tabela 6). A fração EHKC 2-D4 (38,6 mg) foi selecionada para posterior fracionamento, após a análise de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Tabela 6:** Frações obtidas da CC de EHKC 2-D.

Código	Frações reunidas	Massa (mg)
EHKC 2-D1	1-12	6,9
EHKC 2-D2	13-41	23,3
EHKC 2-D3	42-52	106,2
EHKC 2-D4	53-64	38,6
EHKC 2-D5	65-90	20,9
EHKC 2-D6	91-95	34,2

A fração EHKC 2-D4 (38,6 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída sete vezes com sistema Tolueno/Hexano (6:4) com adição de 10 gotas de acetona, sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 7).

**Tabela 7:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-D4.

Código	Massa (mg)
EHKC 2-D4A	graxa
EHKC 2-D4B	1,8
EHKC 2-D4C	8,5
EHKC 2-D4D	graxa

A subfração EHKC 2-D4C foi identificada como a substância **KC 1**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração EHKC 2-D4B indicou que a mesma era constituída de uma mistura complexa de vários neoflavonóides em pequena quantidade que não foram trabalhadas. O restante das subfrações indicou que o mesmo era constituído de material de natureza graxa.

### Constituintes da fração EHKC 2-E

Inicialmente a fração EHKC 2-E (788,9 mg) foi submetida a uma recristalização em acetona (Figura 15, p.31). O precipitado obtido, um cristal amarelo esverdeado, foi identificado como sendo a substância **KC 1** (83,3 mg).

A fração EHKC 2-E foi submetida novamente a uma recristalização em acetona (Figura 15, p.31). O precipitado obtido, um sólido amarelo esverdeado, foi identificado como uma mistura das substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3** (20,2 mg) que foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída cinco vezes consecutivas com sistema Tolueno/Hexano (6:4) com adição de 10 gotas de acetona, sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 8).

**Tabela 8:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E.

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-EA	graxa
EHKC 2-EB	4,1
EHKC 2-EC	1,0
EHKC 2-ED	3,2

A subfração EHKC 2-EB foi identificada como a substância **KC 3**, as subfrações EHKC 2-EC e EHKC 2-ED foram identificadas como as substâncias **KC 1** e **KC 2** respectivamente.

O restante da fração EHKC 2-E foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando como adsorvente sílica gel 400 mesh, e como fase móvel misturas de hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade crescente (Figura 16, p.36). Foram coletadas 230 frações, que após análise por CCDC, foram reunidas em 10 grupos (Tabela 9, p.34). A fração EHKC 2-E4 (56,6 mg) foi identificada como a substância **KC 2**, a fração EHKC 2-E5 (25,9 mg) foi identificada como uma mistura das substâncias **KC 1** e **KC 2**. As frações EHKC 2-E2 (32,5 mg), EHKC 2-E3 (29,9 mg) e EHKC 2-E6 (41,0 mg) foram selecionadas para posteriores fracionamentos (Figura 16, p. 36), após as análises de seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H.



**Tabela 9:** Frações obtidas da CC de EHKC 2-E.

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-E1	1-39	37,2
EHKC 2-E2	40-51	32,5
EHKC 2-E3	52-56	29,9
EHKC 2-E4	57-70	56,6
EHKC 2-E5	71-79	25,9
EHKC 2-E6	80-112	41,0
EHKC 2-E7	113-134	110,1
EHKC 2-E8	135-139	140,7
EHKC 2-E9	140-206	128,3
EHKC 2-E10	207-230	135,5

A fração EHKC 2-E2 (32,5 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída duas vezes consecutivas com sistema Hexano/Acetato de etila (9:1), sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 10) (Figura 16, p.36).

**Tabela 10:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E2.

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-E2A	2,9
EHKC 2-E2B	19,5
EHKC 2-E2C	3,5
EHKC 2-E2D	1,8

A subfração EHKC 2-E2B foi identificada como a substância **KC 9**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  do restante das subfrações de EHKC 2-E2 indicou que as mesmas eram constituídas exclusivamente de material de natureza graxa.

A fração EHKC 2-E3 (29,9 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída duas vezes consecutivas com sistema Hexano/Acetato de etila (9:1), sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 11, p.35) (Figura 16, p.36).

**Tabela 11:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E3

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-E3A	2,0
EHKC 2-E3B	22,4
EHKC 2-E3C	3,6
EHKC 2-E3D	0,9

A subfração EHKC 2-E3B foi identificada como a substância **KC 2** e a subfração EHKC 2-E3C foi identificada como a substância **KC 9**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  do restante das subfrações de EHKC 2-E3 indicou que as mesmas eram constituídas exclusivamente de material de natureza graxa.

A fração EHKC 2-E6 (41,0 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída oito vezes consecutivas com sistema Tolueno/Hexano (6:4) com adição de 10 gotas de acetona, sendo recolhidas 5 subfrações (Tabela 12) (Figura 16, p.36).

**Tabela 12:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 2-E6

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 2-E6A	graxa
EHKC 2-E6B	7,4
EHKC 2-E6C	6,0
EHKC 2-E6D	10,0
EHKC 2-E6E	graxa

A subfração EHKC 2-E6C foi identificada como sendo a substância **KC 1** e a subfração EHKC 2-E6D foi identificada como sendo a substância **KC 2**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração EHKC 2-E6B indicou que a mesma era uma mistura complexa de neoflavonóides que em pequena quantidade não foram trabalhadas. O restante das subfrações indicou que as mesmas eram constituídas de material de natureza graxa.

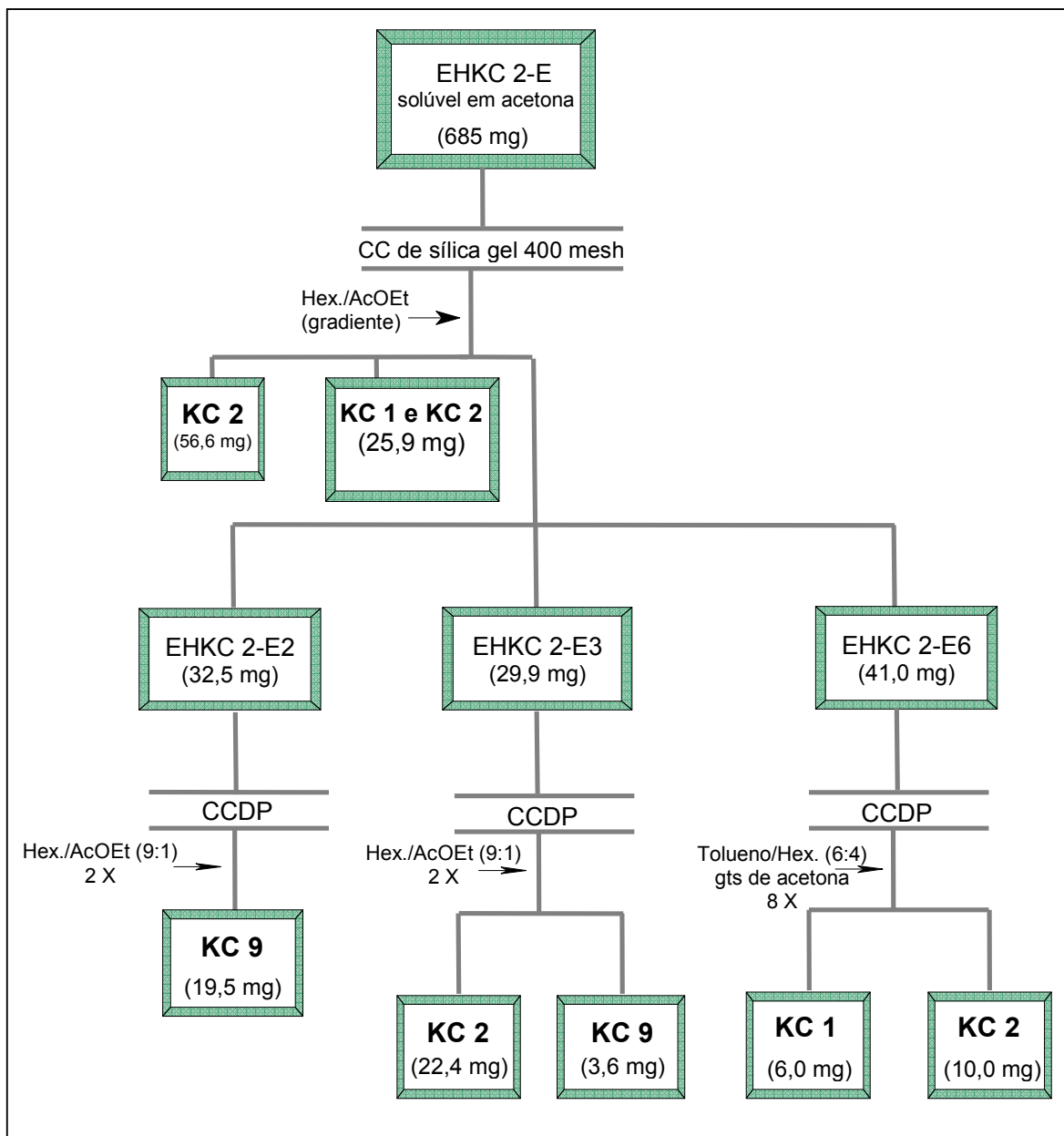


Figura 16: Esquema de fracionamento de EHKC 2-E.

### 3.4.2 ESTUDO DA FRAÇÃO EHKC 4

A fração EHKC 4 (1,25 g) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando como adsorvente gel de sílica 60 utilizando como fase móvel o sistema hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade crescente (Figura 17, p.39). Foram coletadas 132 frações, que foram reunidas em 13 grupos após análise por CCDC (Tabela 13, p.37). As frações EHKC 4-C (33,2 mg), EHKC 4-D (49,9 mg),

EHKC 4-E (132,6 mg), EHKC 4-G (59,9 mg) e EHKC 4-H (149,8 mg) foram selecionadas para posteriores fracionamentos (Figura 17, p.39), após as análises dos comportamentos em CCDC e seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Tabela 13:** Frações obtidas da CC de EHKC 4.

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 4-A	1-5	48,3
EHKC 4-B	6-24	46,7
EHKC 4-C	25-35	33,2
EHKC 4-D	36-49	49,9
EHKC 4-E	50-82	132,6
EHKC 4-F	83	136,3
EHKC 4-G	84	59,9
EHKC 4-H	85-86	149,8
EHKC 4-I	87-101	376
EHKC 4-J	102-103	64,2
EHKC 4-L	104-109	79,9
EHKC 4-M	110-129	8,2
EHKC 4-N	130-132	31,3

### Constituintes da fração EHKC 4-C

A fração EHKC 4-C (33,2 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída três vezes consecutivas com clorofórmio 100%, sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 14) (Figura 17, p.39).

**Tabela 14:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 4-C

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 4-C1	1,1
EHKC 4-C2	3,0
EHKC 4-C3	5,6
EHKC 4-C4	20,0

A subfração EHKC 4-C2 foi identificada como sendo a substância **KC 10** e a subfração EHKC 4-C4 foi identificada como uma mistura das substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  do restante das subfrações de EHKC 4-C indicou que as mesmas eram constituídas de material de natureza graxa.

#### Constituintes da fração EHKC 4-D

A fração EHKC 4-D (49,9 mg) foi submetida a um novo fracionamento através de CCDP em sílica gel de 60 PF eluída quatro vezes consecutivas com clorofórmio 100%, sendo recolhidas 4 subfrações (Tabela 15) (Figura 17, p.39) .

**Tabela 15:** Frações obtidas da CCDP de EHKC 4-D.

<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
EHKC 4-D1	12,0
EHKC 4-D2	4,2
EHKC 4-D3	7,1
EHKC 4-D4	26,6

A subfração EHKC 4-D2 foi identificada como sendo a substância **KC 10** e a subfração EHKC 4-D4 foi identificada como uma mistura contendo as substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6**. A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  do restante das subfrações de EHKC 4-D indicou que as mesmas eram constituídas de material de natureza graxa.

#### Contituintes da fração EHKC 4-E

A fração EHKC 4-E (132,6 mg) foi submetida a uma recristalização em hexano (Figura 17, p.39). O material recristalizado obtido foi identificado como sendo a substância **KC 11** (113,5 mg). A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  do restante da fração EHKC 4-E indicou que o mesmo era constituído quase exclusivamente de material de natureza graxa.

### Constituintes da fração EHKC 4-G

A fração EHKC 4-G (59,9 mg) foi submetida a uma recristalização em clorofórmio (Figura 17, p.39). O material recristalizado obtido foi identificado como sendo a substância **KC 7** (10,7 mg).

### Constituintes da fração EHKC 4-H

A fração EHKC 4-H (149,8 mg) foi submetida a uma recristalização em acetato de etila (Figura 17). O material recristalizado obtido foi identificado como sendo a substância **KC 8** (55,8 mg).

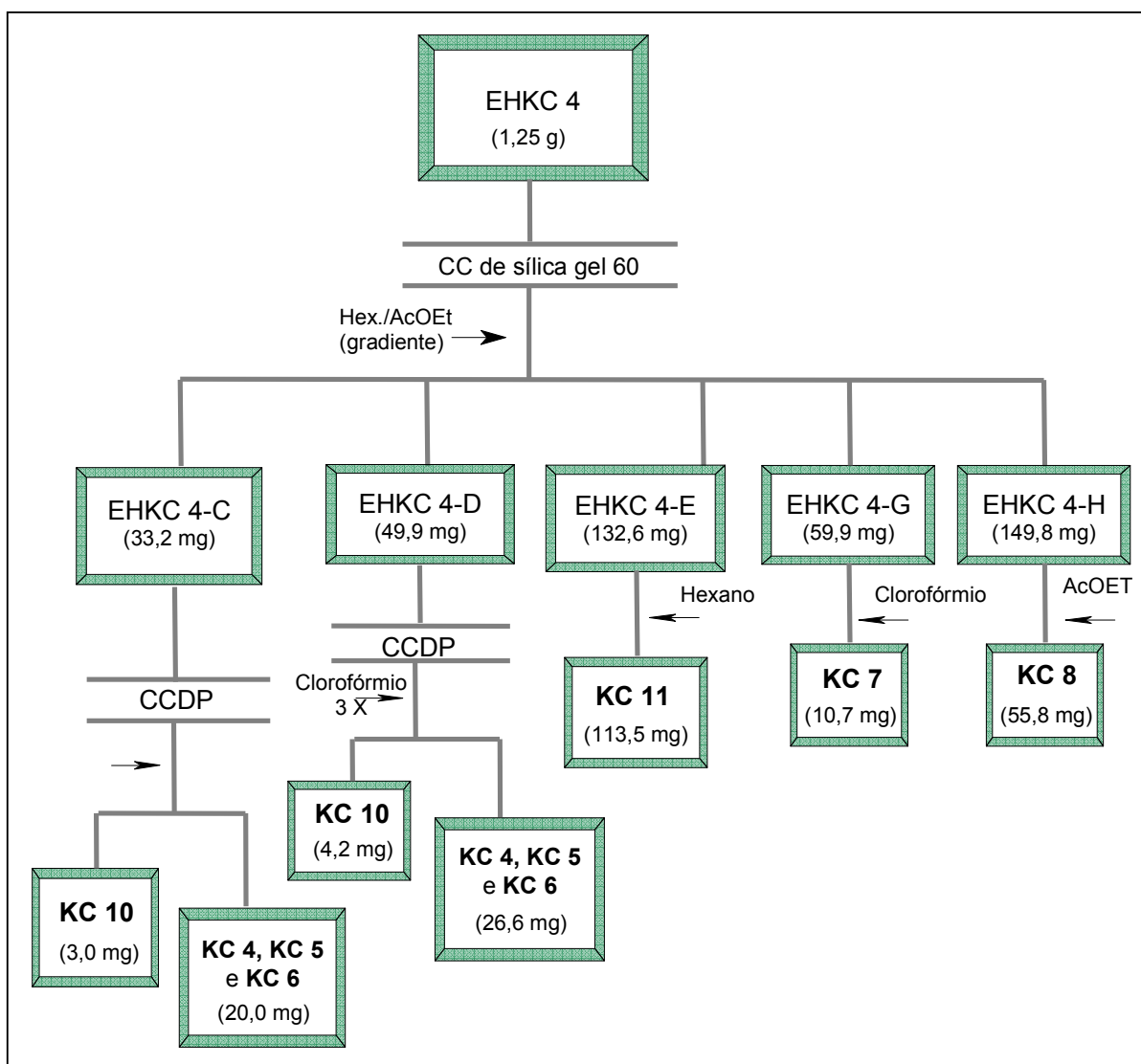


Figura 17: Esquema de fracionamento de EHKC 4.

As massas das substâncias isoladas do extrato hexânico encontram-se reunidas na tabela 16.

**Tabela 16:** Massas das substâncias isoladas das frações estudadas do extrato hexânico

<b>Substância</b>	<b>Massa (mg)</b>
KC 1	98,8
KC 2	92,2
KC 3	4,1
KC 4, KC 5 e KC 6	46,6
KC 7	10,7
KC 8	55,8
KC 9	23,1
KC 10	7,2
KC 11	113,5

### 3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 3.5.1 Avaliação da toxicidade em esplenócitos através do método de Mosmann modificado

Este ensaio foi realizado por Ciro Ribeiro Filadelfo no Laboratório de Biomorfologia Antiparasitária e Centro de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA.

Para determinar se os extratos hexânico e acetato são citotóxicos foi necessário utilizar o método de Mosmann (1983), com algumas alterações. Esplenócitos ( $1 \times 10^7$ ) foram incubados por 24 horas em diferentes concentrações dos extratos, diluídos em DMSO a 20%, em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 0,08% de gentamicina, 10 unidades/mL de penicilina e 0,01% de estreptomicina. Em seguida foi adicionada a solução de MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium 10% em PBS, pH = 7,4, na proporção de 1/10 e as amostras foram incubadas ao abrigo da luz. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm e por fim, adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de 1:1. A produção de formazan pela redução do MTT foi determinada pela absorbância do sobrenadante, em espectrofotômetro VersaMax a 570 nm.

### 3.5.2 Avaliação *in vitro* contra *S. mansoni*

Este ensaio foi realizado por Ciro Ribeiro Filadelfo no Laboratório de Biomorfologia Antiparasitária e Centro de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA.

O extrato acetato foi testado frente ao helminto *Schistosoma mansoni* em sua forma adulta (macho e fêmea).

Todos os métodos de infecção e monitoramento *in vitro*, foram realizados segundo Ramirez et al. (2007) com algumas modificações. Cercárias de *S. mansoni*, da cepa Feira de Santana, foram inoculadas (200/200  $\mu$ L) no quadrante abdominal, próximo à pata esquerda traseira dos camundongos. Após aproximadamente 45 dias, foram sacrificados os camundongos infectados, com retirada de sangue do ventrículo esquerdo do coração, para posterior alimentação dos vermes *in vitro*, extraíndo os vermes manualmente dos vasos mesentéricos, e imersos em meio RPMI 1640 (10,4g/L) com: 2% de glutamina, 5,26% de soro fetal bovino, 0,2% de bicarbonato de sódio, 0,48% de HEPES e o dobro da concentração utilizada de antibióticos (10 unidades/mL-penicilina/0,01%estreptomicina e 0,05%-gentamicina).

Terminada a retirada, os vermes foram lavados com o mesmo meio, realizando uma troca de meio gradativa para meio com a concentração de antibióticos indicada pelo fabricante (5 unidades/mL-penicilina/0,005% estreptomicina e 0,025%-gentamicina). Enquanto isso, o sangue retirado foi centrifugado uma vez com citrato de sódio a 0,89% e mais três com citrato de sódio a 12%, sendo estas centrifugações a 1500 rpm por 15 minutos, resultando em uma solução contendo hemácias. Segundo Pica-Mattocia & Cioli (2004), foi utilizado como controle positivo o praziquantel, com uma concentração final de 5,15  $\mu$ M (ED<sub>50</sub> – Dose efetiva capaz de matar 50% dos parasitos - quando é utilizado para casais).

Durante o tratamento *in vitro* os vermes foram colocados em placas de 24 poços contendo o meio RPMI 1640 com diferentes concentrações do extrato. A concentração estoque foi preparada em DMSO a 20%. O extrato acetato foi testado em diferentes concentrações.

O teste foi realizado com no mínimo três casais de vermes adultos para cada situação. Após todo o procedimento, os vermes foram mantidos na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C.

Para avaliação dos efeitos das drogas, por no mínimo 5 dias de monitoramento, foram observados nos vermes, a diminuição da motilidade e



mudanças morfológicas, tendo sido convencionada uma escala de 0 – 4 (4 = normalmente ativo; 3 = pouca motilidade; 2 = mínima motilidade, com movimentos raros das partes posterior e anterior; 1 = apresentando motilidade apenas de fluidos internos; 0 = total ausência de motilidade), utilizando para representação dos ensaios a escala de zero.

### 3.5.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Grupo de Estudos de Substâncias Naturais Orgânicas (GESNAT), da UFBA.

A técnica utilizada foi a microdiluição em caldo conforme descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, (ELLOF, 1998; KUSUCU *et al.*, 2004).

Para realização dos testes foi utilizado microplaca de Elisa com 96 poços. Inicialmente foram distribuídos 100 µL do meio de cultivo em cada poço. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução estoque do extrato a ser testado numa concentração de 2.000 µg/mL e 100 µL da solução estoque da substância a ser testada numa concentração de 400 µg/mL. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o extrato numa proporção a substância numa proporção 1:1 (v/v) água/DMSO para o extrato acetato e 1:1 (v/v) tween/DMSO para o extrato hexânico, e dissolvendo-se a substância numa proporção a substância numa proporção 1:1:3 (v:v) twenn/DMSO/água para as xantonas e numa proporção de 1:1:4 (v:v) twenn/DMSO/água para as demais substâncias. Logo após, foi realizada uma microdiluição seriada de razão dois. Como controle do solvente utilizou-se 100 µL nas mesmas proporções utilizadas na preparação das soluções estoques e para o controle positivo 100 µL do antibiótico padrão Cloranfenicol (para bactérias Gram-positivas) numa concentração de 2.000 µg/mL para os extratos e de 400 µg/mL para as substâncias e, Gentamicina (para bactérias Gram-negativas) numa concentração de 1.000 µg/mL para os extratos e de 200 µg/mL para as substâncias. Finalmente, foram adicionados em cada poço 100 µL de uma suspensão de crescimento recente do microrganismo testado, obedecendo a escala 0,5 de Mcfarland ( $1,8 \times 10^8$  ufc/mL). A placa de Elisa contendo o experimento foi levada para incubação por 24 horas em estufa a 35° C para bactérias.

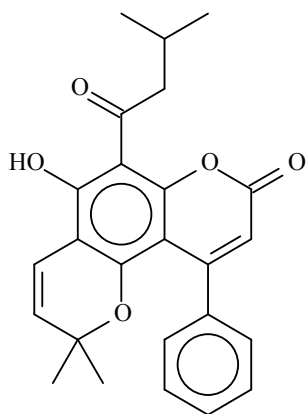
O meio de cultivo utilizado para os ensaios com bactérias foi caldo nutriente. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado a 121°C/ 1,0 atm por vinte minutos. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **3.5.4 Análise estatística**

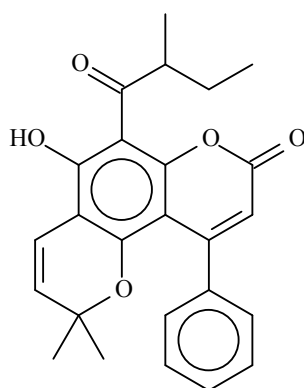
O teste estatístico utilizado foi o de Tukey-Kramer de múltipla comparação, para verificar se as diferenças entre as médias do resultado da técnica do MTT eram significativas considerando o desvio padrão, ou seja, se  $p < 0,05$ , empregando o programa GraphPad© Prism 4.0 e 5.0. A curva de sobrevivência também foi construída utilizando o mesmo programa.

Foi calculada a dose efetiva capaz de matar 50% dos vermes tratados com o extrato acetato ( $ED_{50}$ ), através da análise de sobrevivência Probit (método de Finney-distribuição/lognormal), disponível no programa BioStat© 2008.

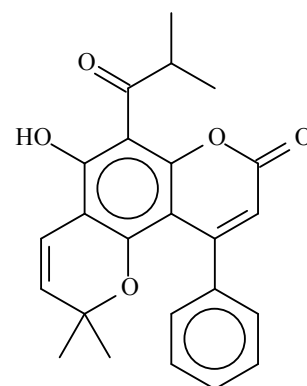
4 ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Kielmeyera coriacea*.



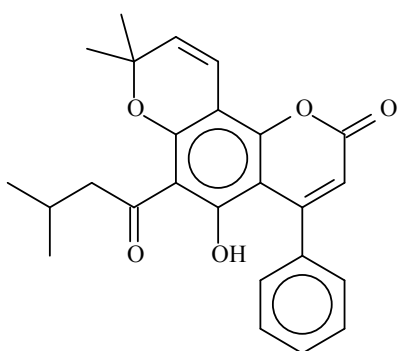
KC 1



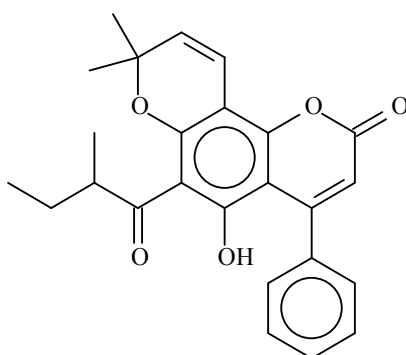
KC 2



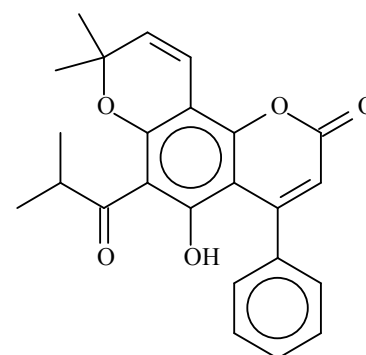
KC 3



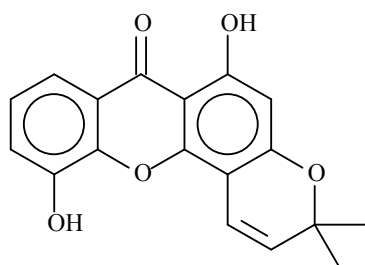
KC 4



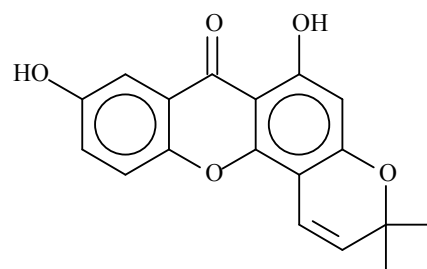
KC 5



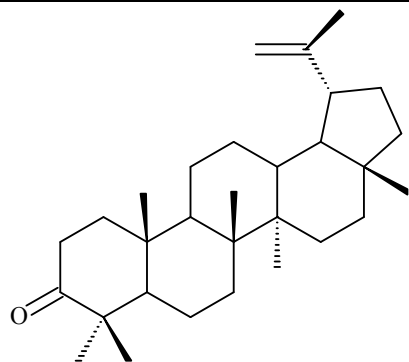
KC 6



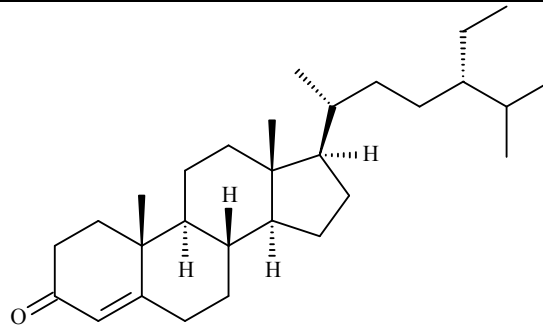
KC 7



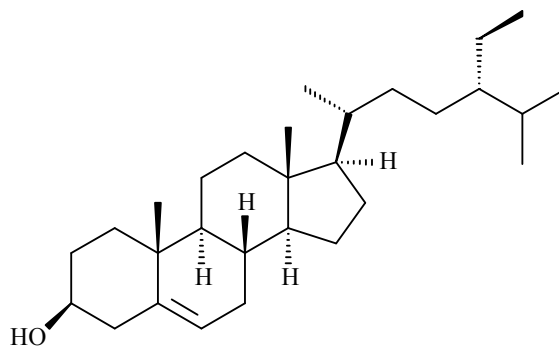
KC 8



**KC 9**

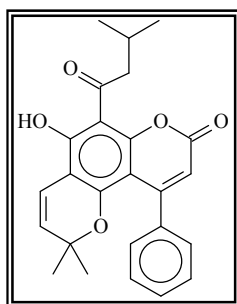


**KC 10**



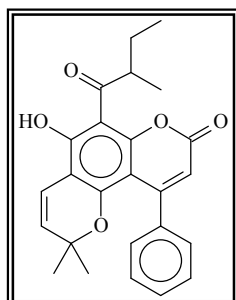
**KC 11**

---

**5 DADOS FÍSICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Kielmeyera coriacea***Substância **KC 1**Fórmula molecular:  $C_{25}H_{24}O_5$ 

PF: 167-169,5 °C.

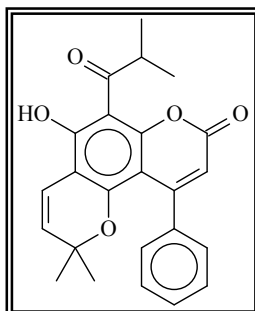
Aspecto físico: sólido cristalino amarelo esverdeado.

RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 18-20, p.52-53; Tabela 17, p.64.RMN de  $^{13}C$  [125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 21-22, p.54; Tabela 18, p.65.Substância **KC 2**Fórmula molecular:  $C_{25}H_{24}O_5$ 

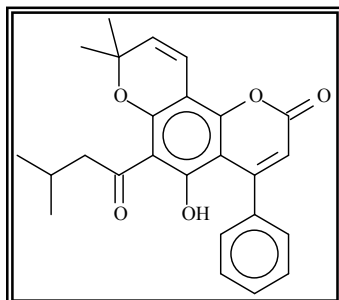
Aspecto físico: sólido amorfo amarelo esverdeado.

RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 23-25, p.57-58; Tabela 17, p.64.RMN de  $^{13}C$  [75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 26-28, p.59-60; Tabela 18, p.65.

DEPT 135°: Figura 29, p.60.

Substância **KC 3**Fórmula molecular:  $C_{24}H_{22}O_5$ 

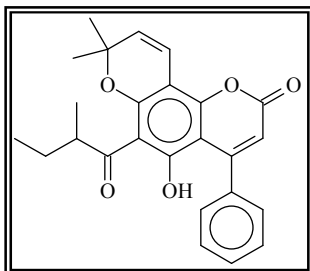
Aspecto físico: sólido amorfo amarelo esverdeado

RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 30-32, p.62-63; Tabela 17, p.64.Substância **KC 4**Fórmula molecular:  $C_{25}H_{24}O_5$ 

Aspecto físico: sólido amorfo amarelo esverdeado

RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 33-35, p.71-72; Tabela 19, p.75.RMN DE  $^{13}C$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 36-39, p.72-74; Tabela 20, p.76.

DEPT 135°: Figura 40, p.74.

**Substância KC 5**Fórmula molecular:  $C_{25}H_{24}O_5$ 

Aspecto físico: sólido amorfo amarelo esverdeado

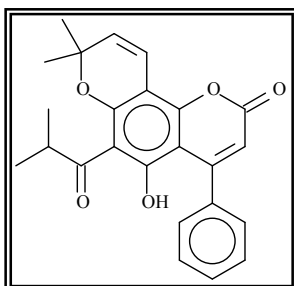
RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 33-35, p.71-72;

Tabela 19, p. 75.

RMN DE  $^{13}C$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 36-39, p.72-74;

Tabela 20, p. 76.

DEPT 135°: Figura 40, p.74.

**Substância KC 6**Fórmula molecular:  $C_{25}H_{22}O_5$ 

Aspecto físico: sólido amorfo amarelo esverdeado

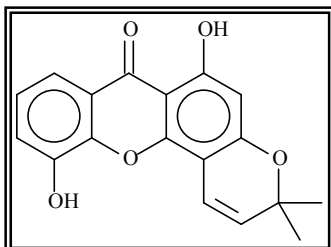
RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 33-35, p.71-72; Tabela

19, p.75.

RMN DE  $^{13}C$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 36-39, p.72-74; Tabela

20, p.76.

DEPT 135°: Figura 40, p.74.

**Substância KC 7**Fórmula molecular:  $C_{18}H_{14}O_5$ 

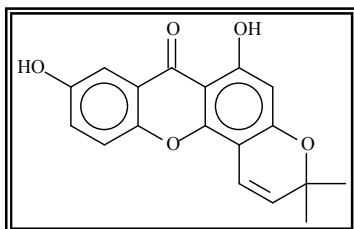
PF: 208-209 °C.

Aspecto físico: sólido cristalino amarelo esverdeado.

RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $(CD_3)_2CO$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 41-42, p.79-80;

Tabela 21, p.85,

NOEDIF: Figura 43, p.80.

**Substância KC 8**Fórmula molecular:  $C_{18}H_{14}O_5$ 

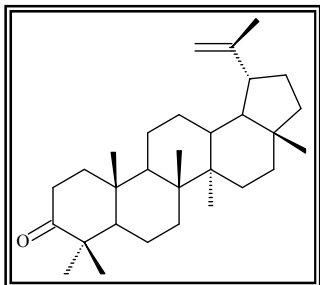
PF: 242 °C.

Aspecto físico: sólido cristalino amarelo

RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3/gtsDMSO$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 44-45,

p.83-84; Tabela 21, p.85.

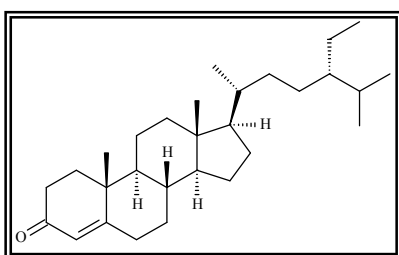
NOEDIF: Figura 46, p.84.

**Substância KC 9**Fórmula molecular:  $C_{30}H_{48}O_1$ 

Sólido amorfo amarelo

RMN de  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 47-48, p.87-88;RMN de  $^{13}C$  [75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figura 49, p.88; Tabela 22, p.89.

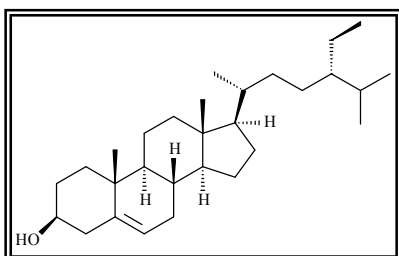
DEPT 135°: Figura 50, p.88.

**Substância KC 10 -**

Sólido cristalino incolor

Fórmula molecular:  $C_{29}H_{48}O_1$ RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 55-56, p.94, Tabela 23, p.96.RMN DE  $^{13}C$ : [75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figura 57, p.95; Tabela 24, p.97.

DEPT 135°: Figura 58, p.95.

**Substância KC 11**Fórmula molecular:  $C_{29}H_{49}O_1$ 

Aspecto físico: sólido cristalino incolor

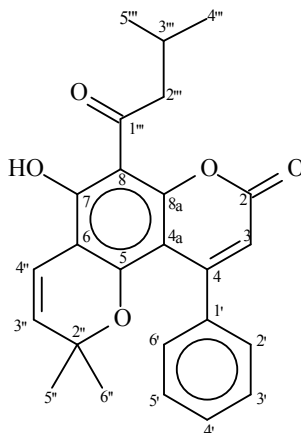
PF: 126,5 °C

RMN DE  $^1H$  [300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 51-52, p.91; Tabela 23, p.96.RMN DE  $^{13}C$ : [75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: Figuras 53-54, p.92; Tabela 24, p.97.

## 6 IDENTIFICAÇÃO E/OU DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 6.1 NEOFLAVONÓIDES

#### 6.1.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 1**



7-hidroxi-2'',2''-dimetil-8-(3''''-metil-1''''-oxobutil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

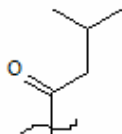
A substância **KC 1** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de cristais amarelo esverdeado, PF 167-169,5 °C e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , além da comparação com dados disponíveis na literatura (GARAZD *et al.*, 2003).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18-20, p.52-53) (Tabela 17, p.64) da substância **KC 1** apresentou um singlete em  $\delta$  14,63 (1H, s). A interpretação desse dado sugeriu a presença de um hidrogênio hidroxílico e o fato desse sinal apresentar um valor alto de deslocamento químico sugeriu que esse hidrogênio está participando de uma ligação de hidrogênio intramolecular com um átomo de oxigênio carbonílico, evidenciando um grupo hidroxílico quelado. Na região dos hidrogênios de anel aromático foi observada a presença de dois multipletos, um em  $\delta$  7,40 e outro em  $\delta$  7,25. Estes dados indicaram a presença de um anel aromático monossustituído. Apresentou um par de dubletos em  $\delta$  6,64 (1H; d;  $J = 9,9$  Hz) e  $\delta$  5,40 (1H; d;  $J = 10,2$  Hz) relativo a dois hidrogênios olefínicos em configuração *cis*, além de um singlete em  $\delta$  0,97 (6H; s) indicando a presença de dois grupos metílicos



ligados a um carbono não-hidrogenado. A comparação desse conjunto de dados permitiu deduzir que esse conjunto de sinais corresponde aos hidrogênios do grupo 2,2-dimetilpireno. Apresentou ainda um singlete em  $\delta$  6,01 (1H, s), relativo a outro hidrogênio olefínico.

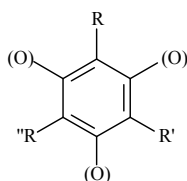
Este espectro mostrou também, um dubleto em  $\delta$  3,19 (2H; d;  $J = 6,9$  Hz) relativo a dois hidrogênios metilênicos  $\alpha$ -carbonílicos. Um hepteto em  $\delta$  2,33 (1H, hept,  $J = 6,6$  Hz) relativo a um hidrogênio metínico. Outro dubleto em  $\delta$  1,08 (6H, d,  $J = 6,6$  Hz) relativo a seis hidrogênios, sugerindo a presença de dois grupos metílicos ligado a um grupo metínico. Após a análise desses dados foi possível propor a existência de uma cadeia acíclica na molécula, como a que está delineada abaixo:



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 21-22, p.54) (Tabela 18, p.65) foi possível distinguir um total de 21 sinais. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmou a presença de todos os grupos observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

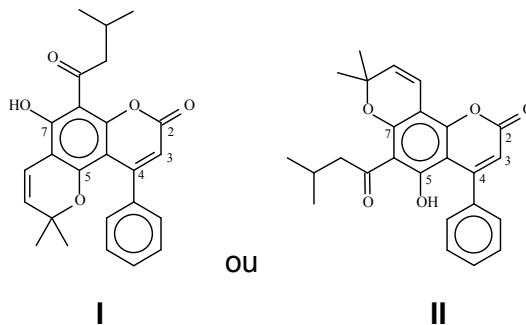
Este espectro apresentou sinais em  $\delta$  206,3 característico de carbono carbonílico de cetona,  $\delta$  53,5 correspondente a um carbono metilênico  $\alpha$ -carbonílico,  $\delta$  25,6 correspondente a um carbono metínico, e em  $\delta$  22,7 correspondente a dois carbonos metílicos, que confirmaram a presença da cadeia acíclica. Apresentou também um sinal em  $\delta$  79,3, correspondente a um carbono não hidrogenado, ligado a um átomo de oxigênio, sinal em  $\delta$  27,6 atribuídos a dois grupos metílicos geminados na molécula, e sinais em  $\delta$  126,9 e  $\delta$  115,5 correspondentes a dois carbonos olefínicos, que confirmaram a presença do anel 2,2-dimetilpireno.

A presença de anel aromático monossustituído foi reforçada pelos sinais em  $\delta$  140,2,  $\delta$  127,8,  $\delta$  127,3,  $\delta$  127,9. Os sinais em  $\delta$  163,9,  $\delta$  156,4 e  $\delta$  156,2 foram atribuídos a três carbonos aromáticos oxigenados, e os sinais em  $\delta$  106,0,  $\delta$  104,3 e  $\delta$  102,4, foram atribuídos a três carbonos aromáticos quaternários não oxigenados, sendo que cada um deles está entre dois átomos oxigênio. Esses dados indicaram a presença de outro anel aromático totalmente substituído e trioxigenado, como o que está delineado abaixo:



Os sinais em  $\delta$  159,1 atribuído a um carbono carbonílico de uma lactona conjugada, em  $\delta$  112,1 atribuído a um carbono olefínico  $\alpha$ -carbonílico, e em  $\delta$  157,2 correspondente a um carbono olefínico não-hidrogenado permitiu sugerir que a substância **KC 1** é um neoflavonóide. De acordo com dados da literatura pode se estabelecer de forma inequívoca a estrutura de neoflavonóides. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dessas substâncias apresentam sinais de C-2, C-3 e C-4 nas regiões  $\delta$  159-162,  $\delta$  109-113 e  $\delta$  155-157 ppm, respectivamente, e espectros de RMN  $^1\text{H}$  normalmente têm um singlete relativo a um hidrogênio na posição H-3 no intervalo de  $\delta$  5,70-6,15 ppm, devido à presença de um substituinte fenila na posição C-4 do anel cumarínico que é confirmado pela presença de dois multipletos em 7,3-7,4 e 7,4-7,5 ppm (GARAZD *et al.*, 2003). Estes sinais característicos foram observados para esta substância o que nos permitiu identificar a sua estrutura e posicionar os grupos na molécula.

Nos neoflavonóides o grupo fenila é posicionado no carbono C-4. O alto valor de deslocamento químico para o sinal do hidrogênio em  $\delta$  14,63 evidencia um grupo hidroxílico quelado com um átomo de oxigênio carbonílico. O grupo hidroxílico pode ser posicionado nos carbonos C-5 ou C-7, devido ao padrão de oxigenação do anel cumarínico. Logo, foi possível propor as duas possibilidades abaixo:



A proposta estrutural **II** foi descartada, pois o baixo valor de deslocamento para os hidrogênios metílicos do anel 2,2-dimetilpireno ( $\delta$  0,97; 6H; s) evidencia que esteja próximo do grupo fenílico no núcleo cumarínico uma vez que os hidrogênios

metílicos aí localizados sofrem proteção decorrente do efeito anisotrópico diamagnético do anel aromático (CRUZ *et al.*, 1998; GRAMACHO *et al.*, 1999; CHAKRABORTY & CHATTERJI, 1969).

A substância **KC 1** conhecida como isommameigim, já foi isolada da espécie *Kielmeyera pumila* (NAGEM & SILVA, 1988).

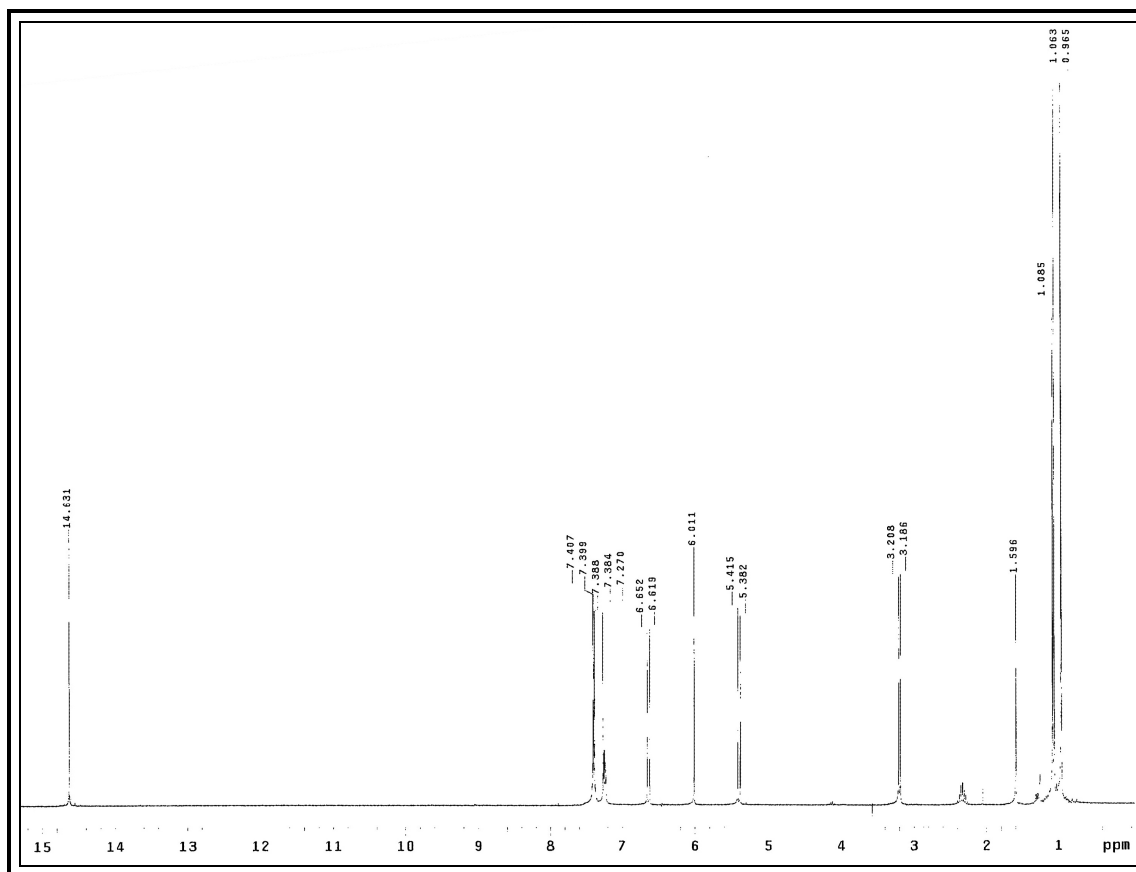


Figura 18: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 1** [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)].

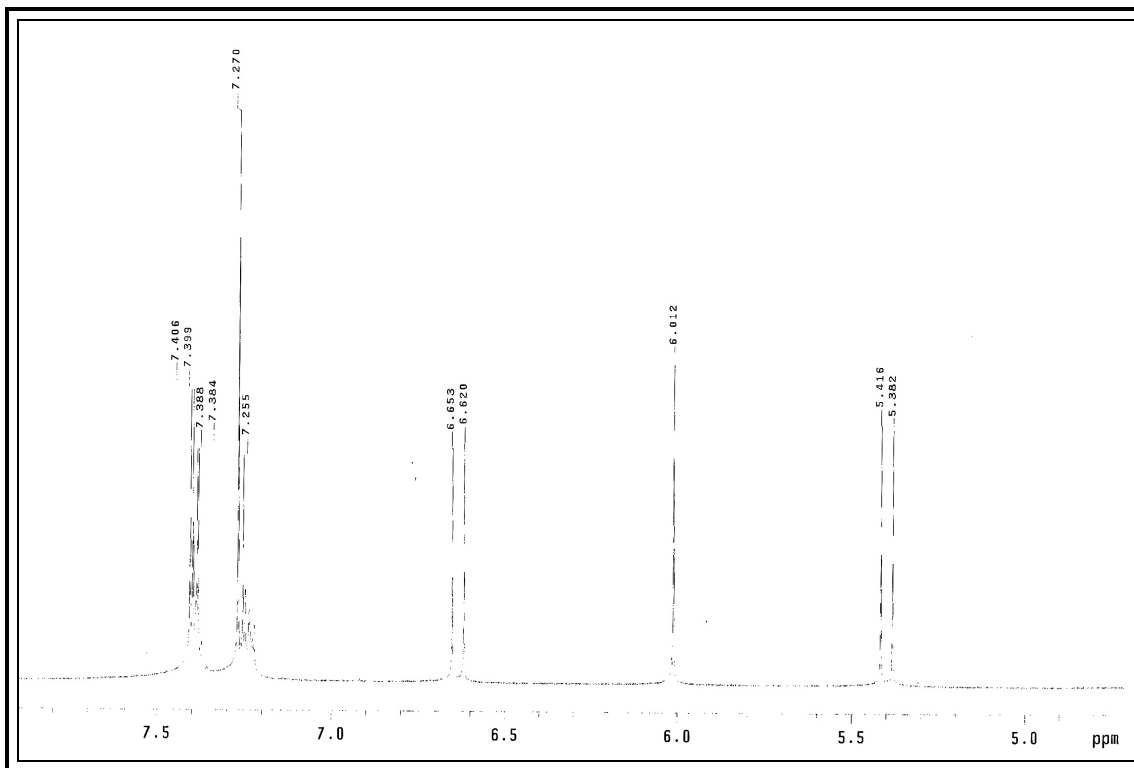


Figura 19: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância KC 1 [região de  $\delta$  7,5 a  $\delta$  5,0 (ppm)].

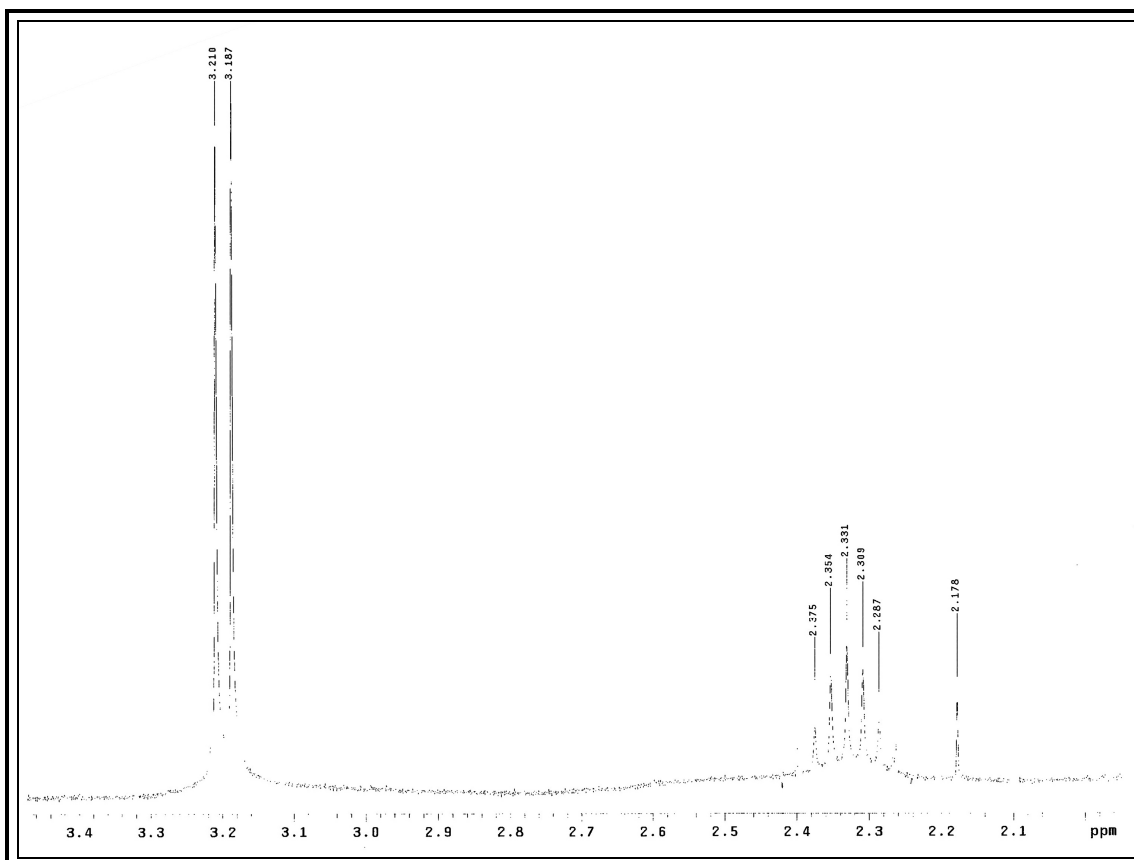


Figura 20: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância KC 1 [região de  $\delta$  3,4 a  $\delta$  2,0 (ppm)].

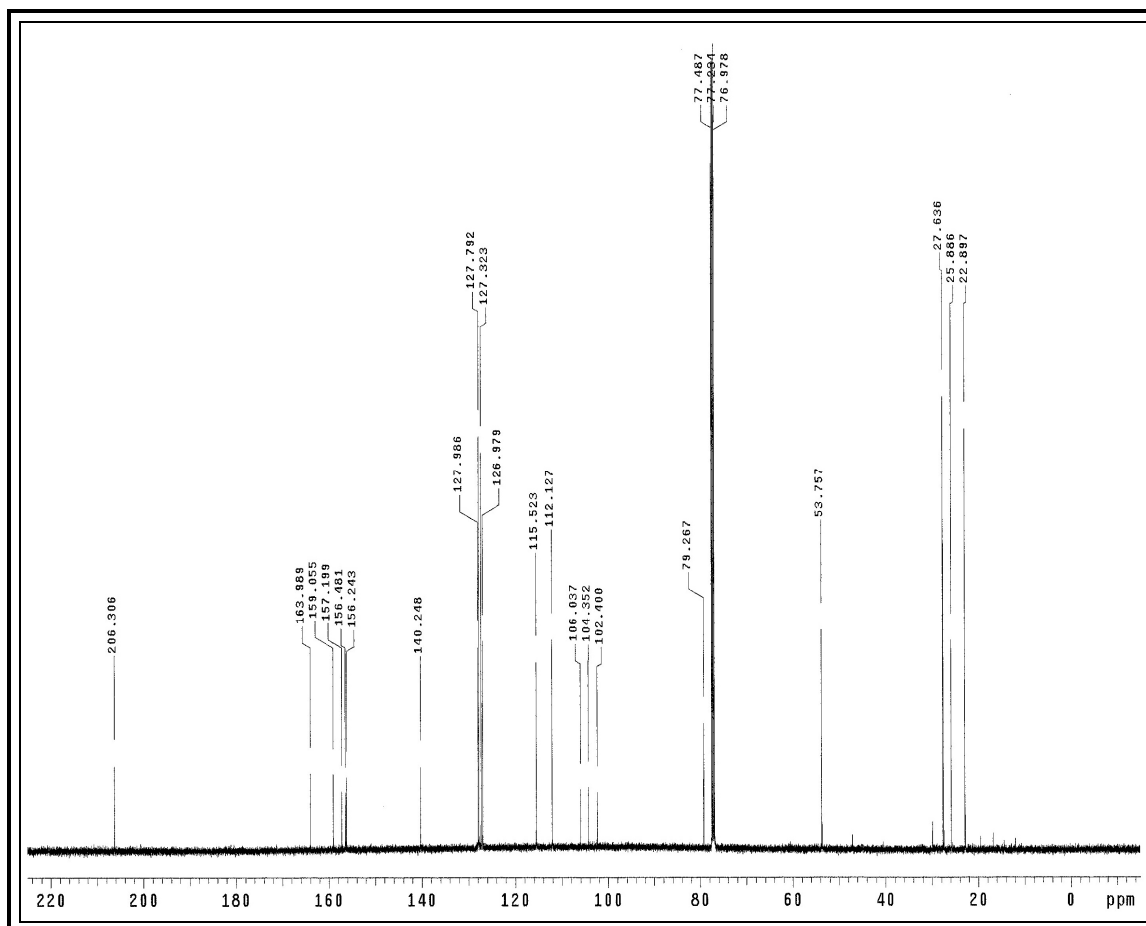


Figura 21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância KC 1 [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

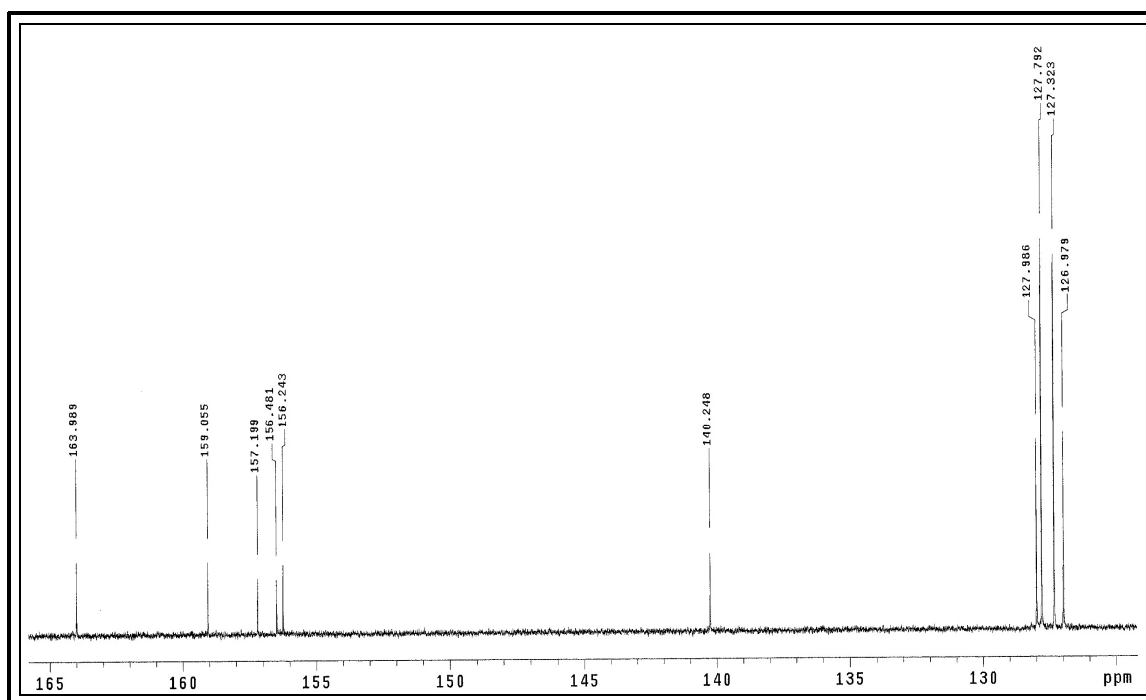
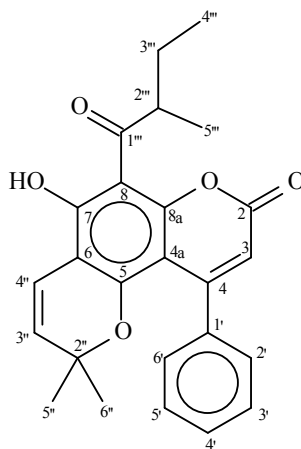


Figura 22: Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância KC 1 [região de  $\delta$  165 - 125 (ppm)].

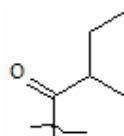
6.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 2**

7-hidroxi-2'',2''-dimetil-8-(2''''-metil-1''''-oxobutil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

A substância **KC 2** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de um sólido amorfo amarelo esverdeado e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$ , além da comparação com dados disponíveis na literatura (VEROTTA *et al.*, 2004; GARAZD *et al.*, 2003).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 23-25, p.57-58) (Tabela 17, p.64) da substância **KC 2** apresentou sinais semelhantes para os encontrados na substância **KC 1** diferenciando-se apenas aos sinais atribuídos à cadeia acíclica. Um singlete em  $\delta$  14,61 (1H; s), relativo a um hidrogênio hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular com um átomo de oxigênio carbonílico. Um par de dubletos em  $\delta$  6,63 (1H; d;  $J = 10,2$  Hz) e  $\delta$  5,39 (1H; d;  $J = 10,2$  Hz), relativo a dois hidrogênios olefínicos em uma configuração *cis* e dois singletos em  $\delta$  0,97 (3H; s) e  $\delta$  0,96 (1H; s), indicando a presença de dois grupos metílicos. A comparação desse conjunto de dados àqueles encontrados para a substância **KC 1** permitiu deduzir que esse conjunto de sinais corresponde aos hidrogênios do grupo 2,2-dimetilpireno e que esse anel encontra-se paralelo ao grupo fenila e por isso também estariam sofrendo proteção decorrente do efeito anisotrópico do anel aromático. Na região dos hidrogênios aromáticos o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou dois multipletos em  $\delta$  7,40 e em  $\delta$  7,25 indicando a presença de um anel aromático monossustituído. Finalmente, o espectro apresentou um singlete em  $\delta$  6,01 (1H; s) correspondente a um hidrogênio olefínico em ligação dupla tri-sustituída.

Além desses sinais, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou um sexteto em  $\delta$  3,97 (1H; sext,  $J = 6,6$  Hz) correspondente a um hidrogênio metínico  $\alpha$ -carbonílico, outro multiplete entre  $\delta$  2,00 e  $\delta$  1,45 (2H; m) atribuídos aos hidrogênios metilênicos alifáticos, um tripleto em  $\delta$  1,03 (3H; t;  $J = 7,5$  Hz) correspondente a um grupo metílico vizinho a um grupo metilênico e um dubleto em  $\delta$  1,31 (3H; d;  $J = 6,6$  Hz), sugerindo a presença de um grupo metílico vizinho a um grupo metínico. Após a análise desse conjunto de dados foi possível propor a existência de uma cadeia acíclica diferente da encontrada na substância **KC 1**, como a que está delineada abaixo:



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 26-28, p.59-60) (Tabela 18, p.65) foi possível distinguir um total de 21 sinais. Pela análise do espectro DEPT-135° (Figura 29, p.61) foi possível identificar 4 sinais correspondentes a carbonos metílicos, 1 sinal correspondente a carbono metilênico e 9 sinais correspondentes a carbonos metínicos. Portanto os 7 sinais que não apareceram no espectro DEPT-135° correspondem aos carbonos não-hidrogenados. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também apresentou sinais semelhantes aos encontrados para a substância **KC 1** diferenciando apenas na cadeia acíclica. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmou a presença de todos os grupos observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

A presença da cadeia acíclica foi confirmada no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  através dos sinais em  $\delta$  210,4 (C) característico de carbono carbonílico de cetona,  $\delta$  46,9 (CH) correspondente a um carbono metínico  $\alpha$ -carbonílico,  $\delta$  16,5 ( $\text{CH}_2$ ) correspondente a um carbono metilênico,  $\delta$  11,7 ( $\text{CH}_3$ ) e  $\delta$  27,2 ( $\text{CH}_3$ ) correspondente dois carbonos metílicos que confirmaram a presença da cadeia acíclica proposta. A proposta estrutural **I** foi descartada, pois assim como na substância **KC 1** o baixo valor de deslocamento para os hidrogênios metílicos do anel 2,2-dimetilpireno ( $\delta$  0,97; 3H; s e  $\delta$  0,96; 3H; s) evidencia que esteja próximo do grupo fenílico no núcleo cumarínico uma vez que os hidrogênios metílicos aí

localizados sofrem proteção decorrente do efeito anisotrópico diamagnético do anel aromático.

A substância **KC 2** também conhecida como ponnalide já havia sido isolada das espécies *Mammea americana* (CROMBIE, 1987) e *Calophyllum inophyllum* (MURTI *et al*, 1972).

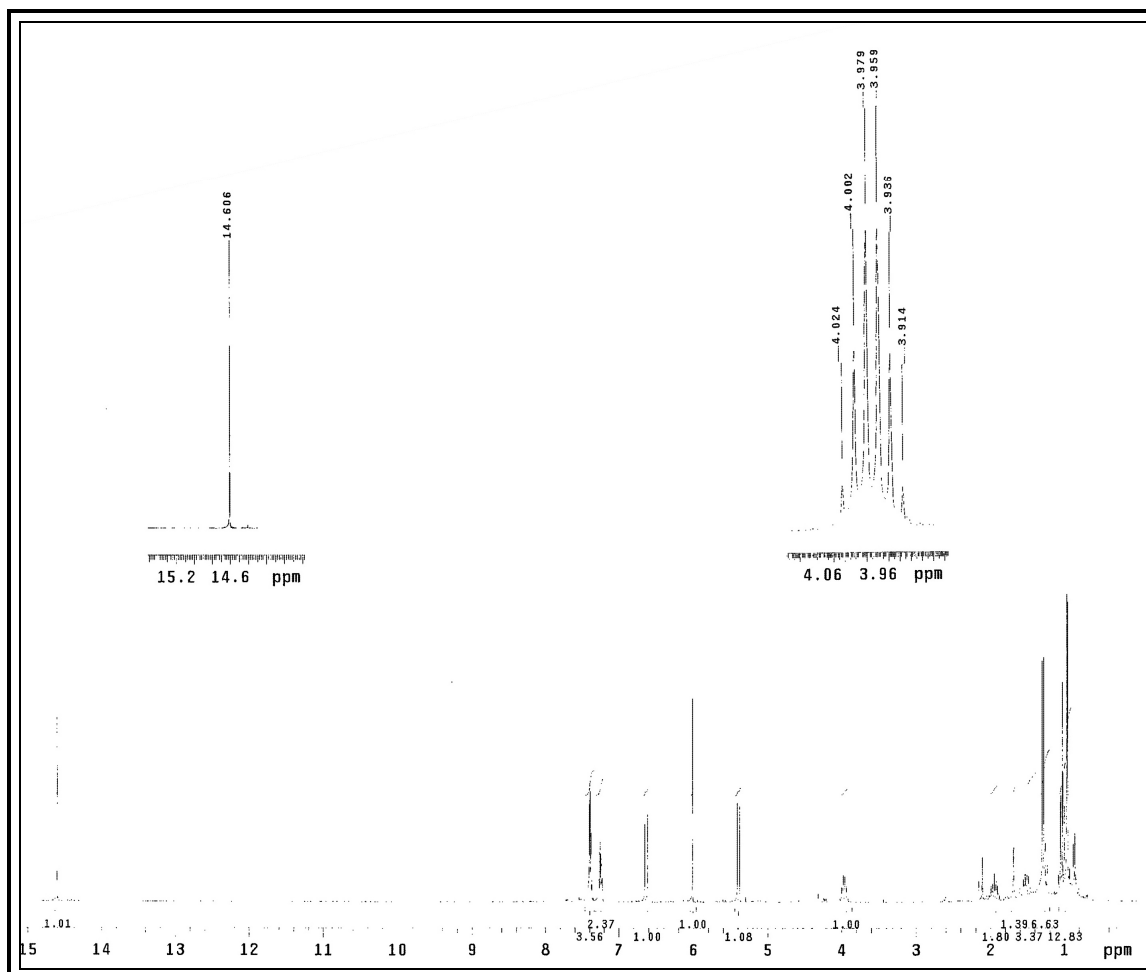


Figura 23: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 2** [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)].



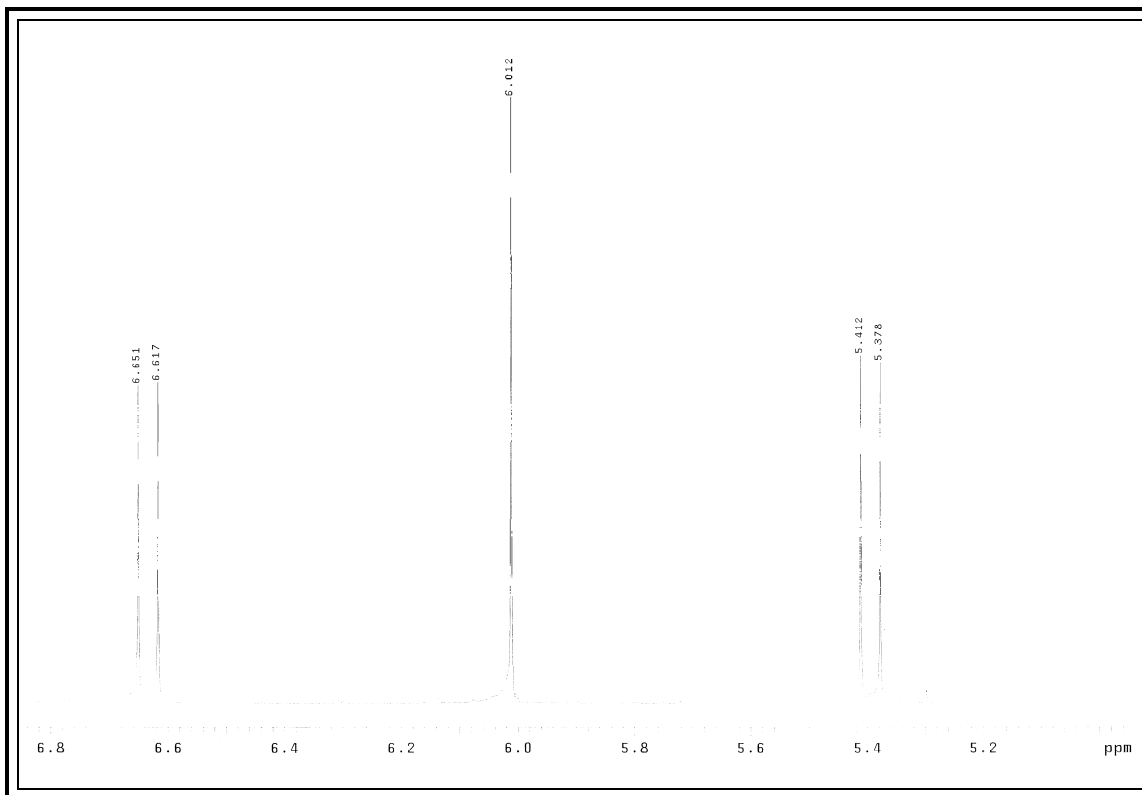


Figura 24: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 2 [região de  $\delta$  5,2 a  $\delta$  6,8 (ppm)].

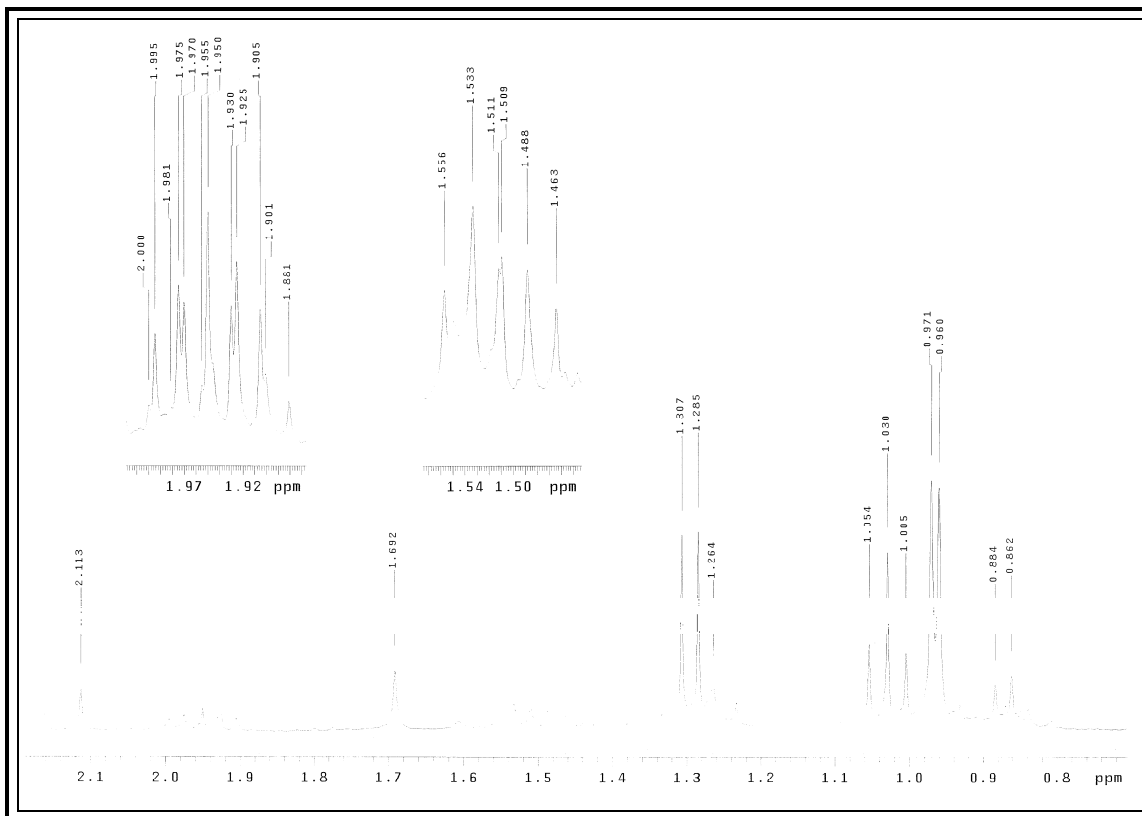


Figura 25: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 2 [região de  $\delta$  0,8 a  $\delta$  2,1 (ppm)].

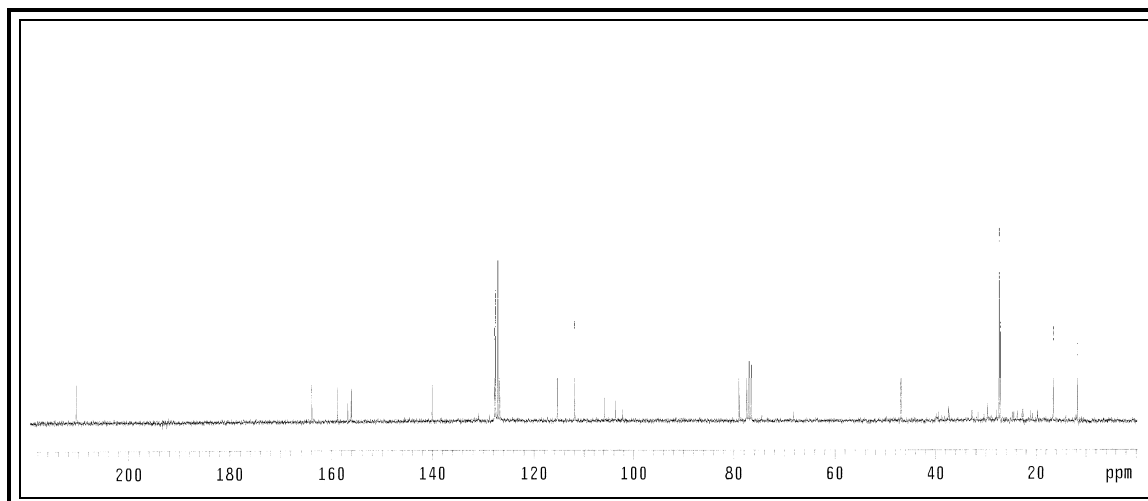


Figura 26: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância KC 2 [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)].

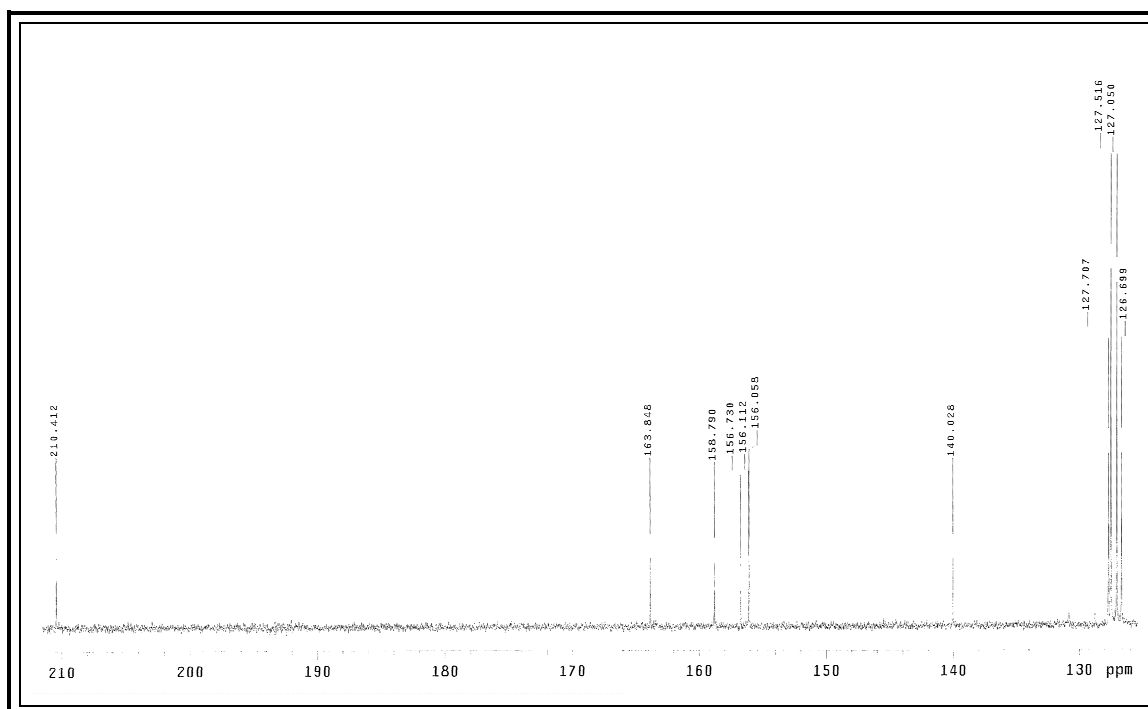
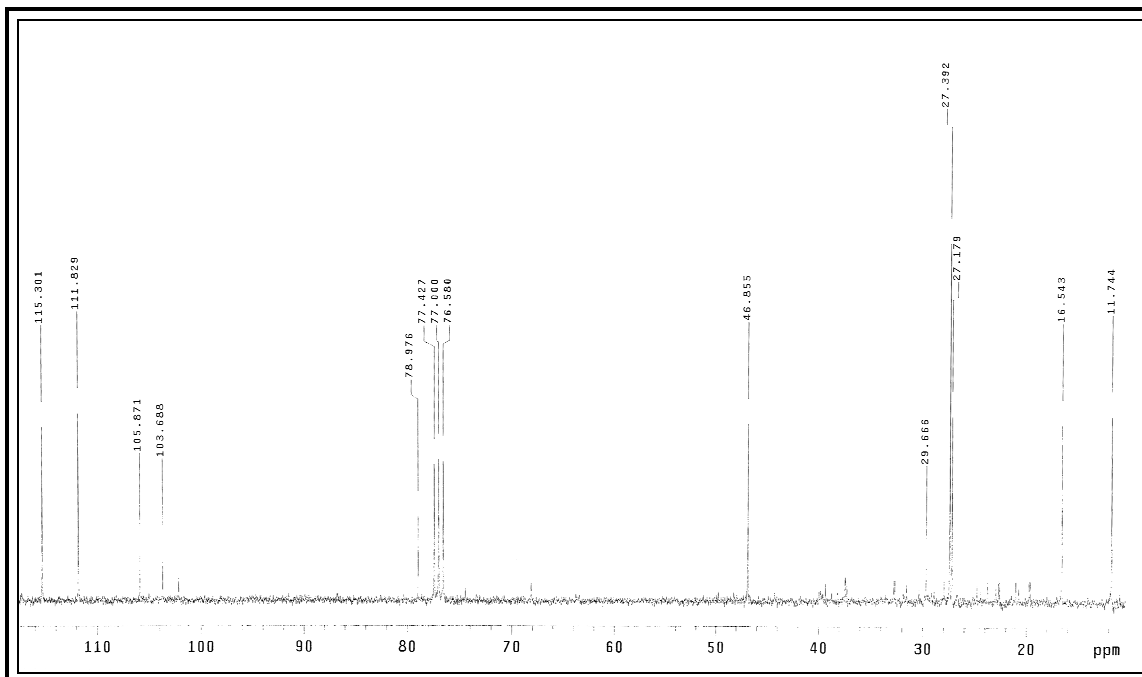
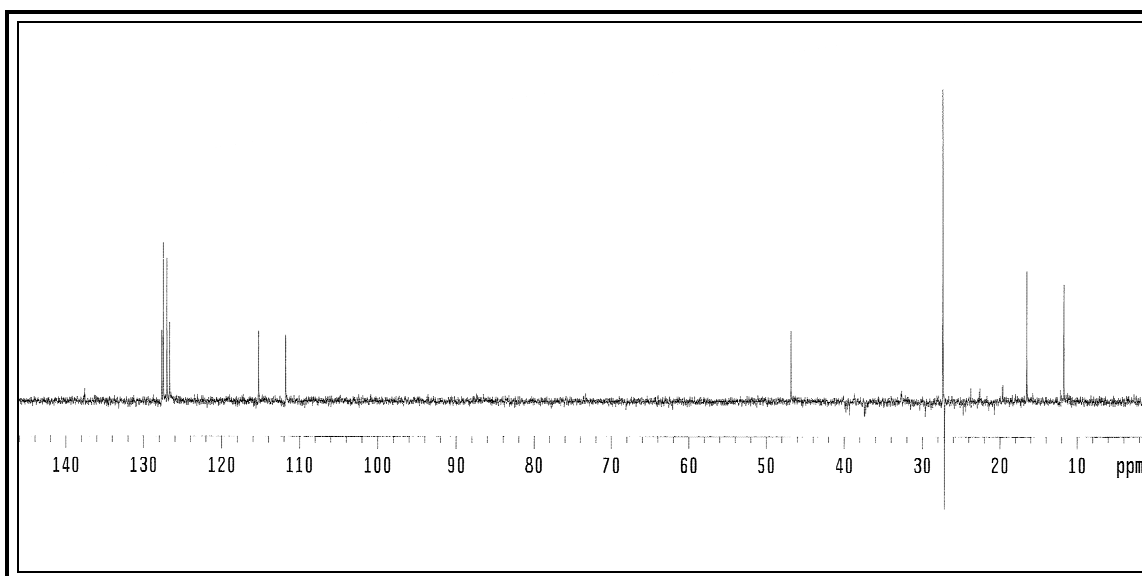


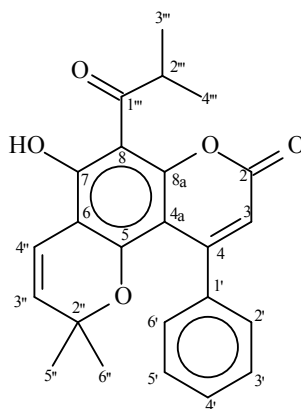
Figura 27: Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância KC 2 [região de δ 210,0 a δ 126,0 (ppm)].



**Figura 28:** Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **KC 2** [região de  $\delta$  115,0 a  $\delta$  11,0 (ppm)].



**Figura 29:** Espectro de RMN DEPT 135° da substância **KC 2** em  $\text{CDCl}_3$  [75MHz].

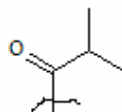
6.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 3**

7-hidroxi-2'',2''-dimetil-8-(2''-metil-1''-oxopropil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

A substância **KC 3** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de um sólido amorfo amarelo esverdeado e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$ , por comparação com dados obtidos das substâncias **KC 1** e **KC 2** além dos dados disponíveis na literatura (CHAKRABORTY *et al.*, 1985; GARAZD *et al.*, 2003).

De uma forma geral as substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3** têm os espectros de RMN  $^1\text{H}$  muito semelhantes (Figura 30-32, p.62-63) (Tabela 17, p.64), uma vez que as mesmas apresentam os mesmos grupos, diferenciando apenas a cadeia acíclica. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um singlete em  $\delta$  14,56 (1H; s) relativo a um hidrogênio hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular com um átomo de oxigênio carbonílico.

O sinal que se diferencia no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é um hepteto em  $\delta$  4,13 (1H; hept,  $J = 6,6$  Hz) correspondente a um hidrogênio metínico  $\alpha$ -carbonílico e um dubleto em  $\delta$  1,31 (6H; d;  $J = 6,6$  Hz), sugerindo a presença de um grupo metílico vizinho a um grupo metínico. Após a análise desses dados foi possível propor a existência de uma cadeia acíclica diferente das encontradas nas substâncias **KC 1** e **KC 2**, como a desenhada abaixo:



Através da comparação dos sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta substância com os sinais encontrados para as substâncias **KC 1** e **KC 2** foi possível propor a posição dos grupos encontrados na molécula.

Não foi possível realizar o experimento de RMN de  $^{13}\text{C}$  devido à pequena quantidade de massa isolada da substância.

A substância **KC 3** também chamada de isomesuagim, é inédita como produto natural tendo sido apenas relatada como produto de síntese em 1985 a partir do mesuol e isomesuol (CHAKRABORTY *et al.*, 1985).

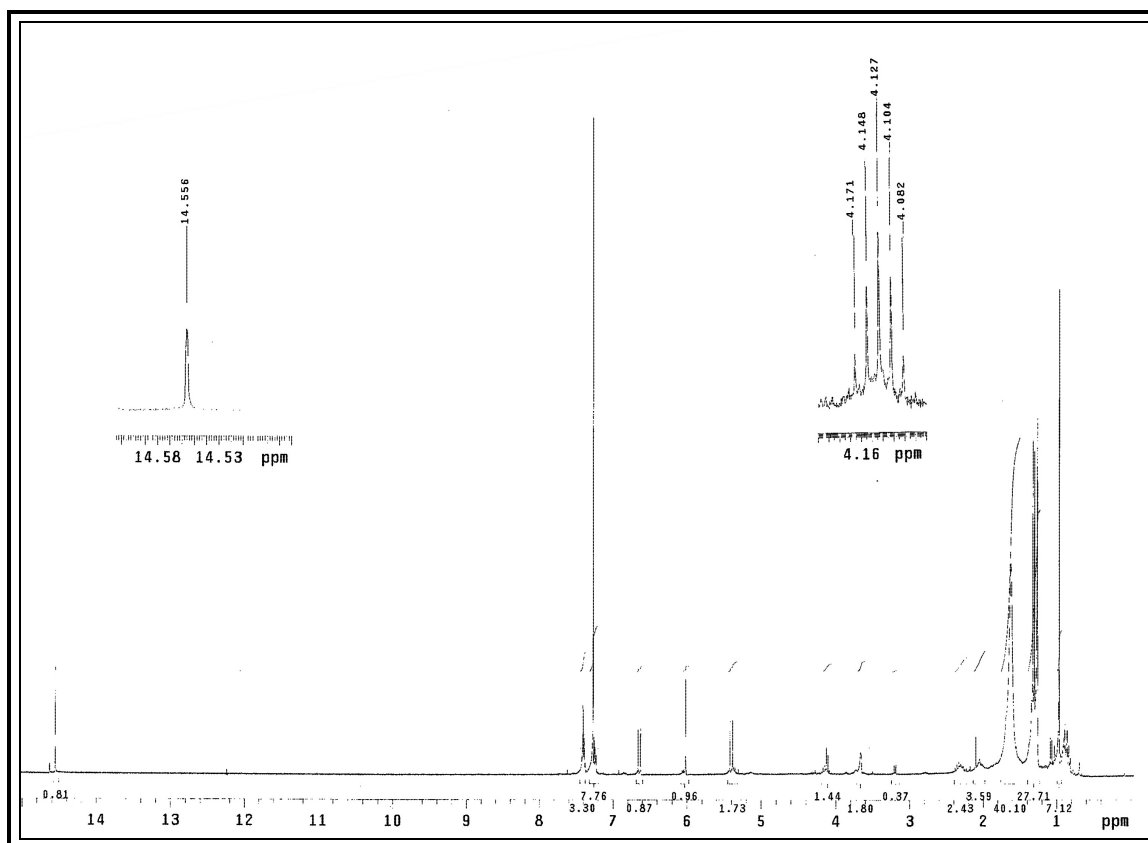


Figura 30: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 3** [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)].

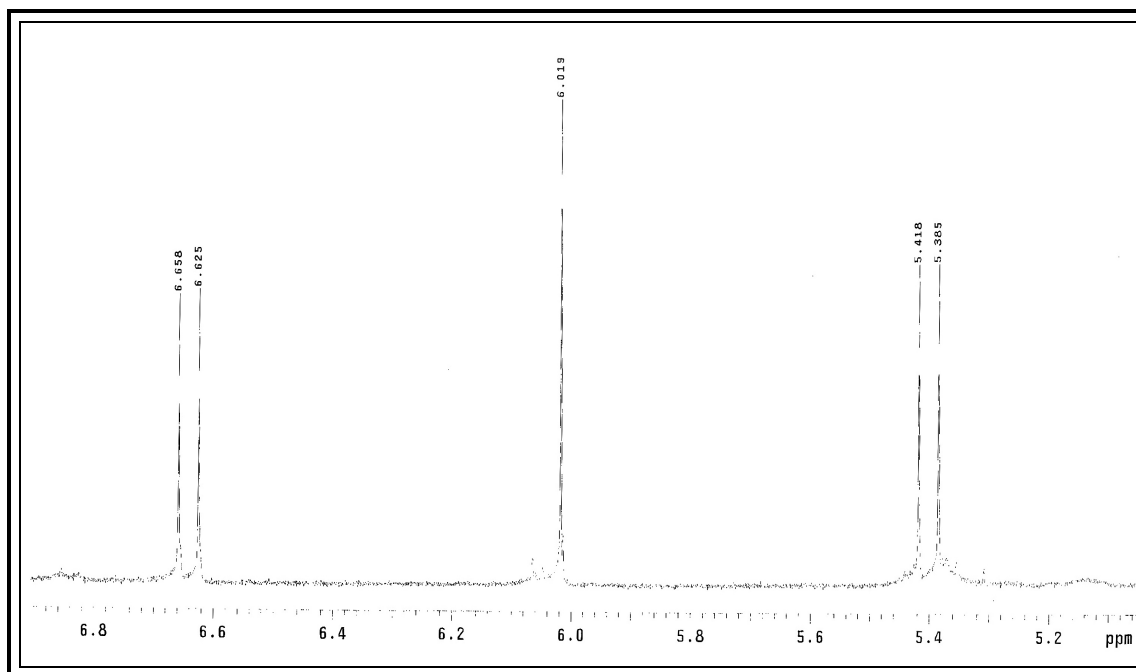


Figura 31: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 3** [região de  $\delta$  5,2 a  $\delta$  6,8 (ppm)].

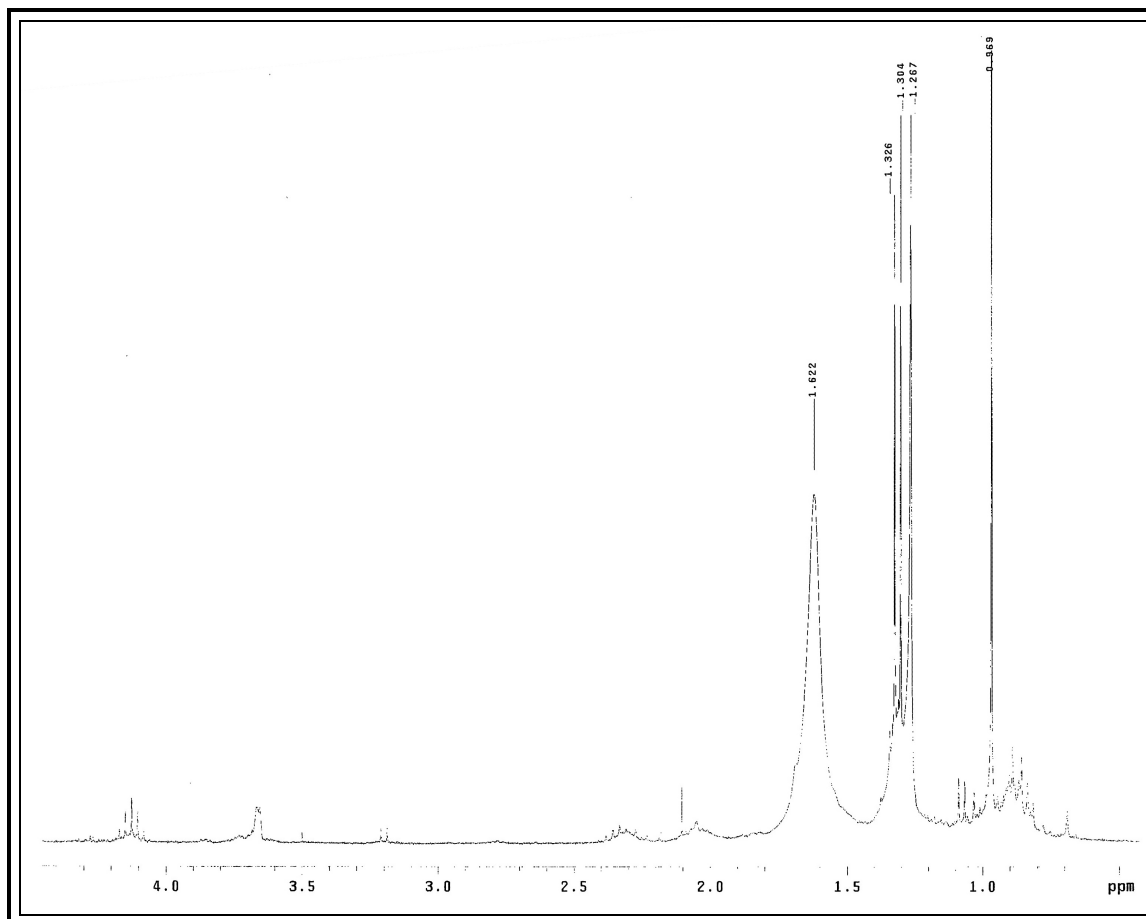


Figura 32: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 3** [região de  $\delta$  0,8 a  $\delta$  4,2 (ppm)].

**Tabela 17:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3** [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

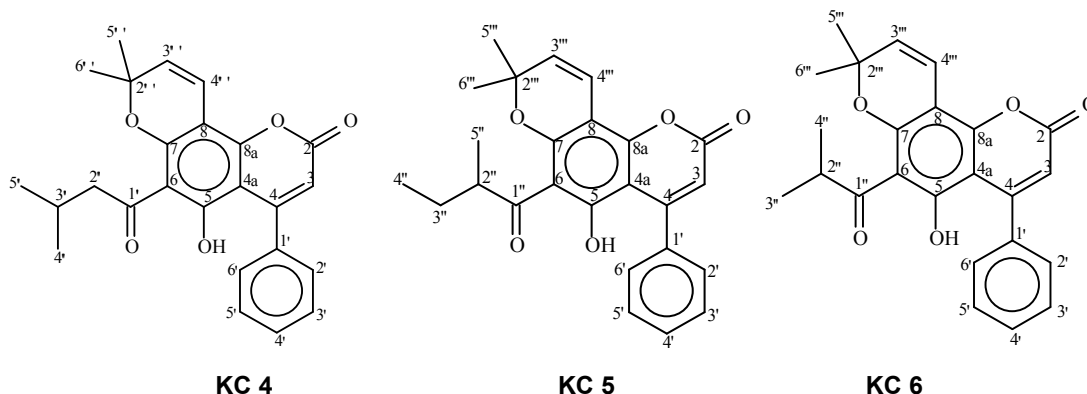
H	KC 1	KC 2	KC 3
2	-	-	-
3	6,01, 1H, s	6,01, 1H, s	6,02, 1H, s
4	-	-	-
4a	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	14,63, 1H, s, (OH)	14,61, 1H, s, (OH)	14,56, 1H, s, (OH)
8	-	-	-
8a	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m
3'	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m
4'	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m
5'	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m
6'	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m	7,23-7,40, 5H, m
2''	-	-	-
3''	5,40, 1H, d, (10.2)	5,39, 1H, d, (10.2)	5,40, 1H, d, (9.9)
4''	6,64, 1H, d, (9.9)	6,63, 1H, d, (10.2)	6,64, 1H, d, (9.9)
5''	0,97, 3H, s	0,97, 3H, s	0,97, 3H, s
6''	0,97, 3H, s	0,96, 3H, s	0,97, 3H, s
1'''	-	-	-
2'''	3,19, 2H, d, (6.9)	3,97, 1H, sext, (6.6)	4,13, 1H, hept, (6,6)
3'''	2,33, 1H, hept, (6,6)	2,00-1,45, 2H, m	1,31, 3H, d, (6,6)
4'''	1,08, 3H, d, (6.6)	1,03, 3H, t, (7.5)	1,31, 3H, d, (6,6)
5'''	1,08, 3H, d, (6.6)	1,31, 3H, d, (6.6)	-

\* $J$  = (Hz).

**Tabela 18:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **KC 1, KC 2** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

<b>C</b>	<b>KC 1</b>	<b>KC 2</b>
2	159,1	158,8
3	112,1	111,8
4	157,2	156,7
4a	102,2	102,1
5	156,2	156,1
6	105,8	105,8
7	163,7	163,8
8	104,1	103,7
8a	156,0	156,0
1'	140,2	140,0
2'	127,3	127,0
3'	127,8	127,5
4'	127,9	127,7
5'	127,8	127,5
6'	127,3	127,0
2''	79,0	79,0
3''	126,9	126,7
4''	115,3	115,3
5''	27,4	27,4
6''	27,4	27,4
1'''	206,3	210,4
2'''	53,5	46,9
3'''	25,6	16,5
4'''	22,7	11,7
5'''	22,7	27,2



6.1.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS **KC 4**, **KC 5** e **KC 6**

**KC 4**  
5-hidroxi-2'',2''-dimetil-6-(3''-metil-1''-oxobutil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

**KC 5**  
5-hidroxi-2'',2''-dimetil-6-(2''-metil-1''-oxobutil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

**KC 6**  
5-hidroxi-2'',2''-dimetil-6-(2''-metil-1''-oxopropil)-4-fenil-2H,8H-benzo[5'',6'':7,8]dipiren-2-ona

As três substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6** foram obtidas em mistura de difícil separação, do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de um sólido amorfo amarelo esverdeado. Sua identificação foi feita em mistura após análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$ , além da comparação com dados disponíveis na literatura (SILVA-NETO, 1998; VEROTTA *et al.*, 2004; GARAZD *et al.*, 2003).

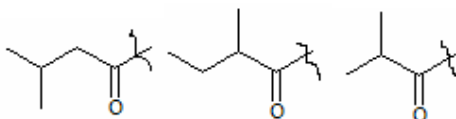
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33-35, p.71-72) (Tabela 19, p.75) da mistura apresentou três singletos bastante desprotegidos em  $\delta$  14,77,  $\delta$  14,65 e  $\delta$  14,63 referente a três grupos hidroxílicos em ligação de hidrogênio intramolecular com um átomo de oxigênio carbonílico, sugerindo a presença de três estruturas moleculares semelhantes.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura indicou a presença de sinais correspondentes aos mesmos grupos encontrados para as substâncias **KC 1**, **KC 2**, **KC 3**. Na região dos hidrogênios de anel aromático foi observada a presença de dois multipletos, um em  $\delta$  7,40 e outro em  $\delta$  7,32. Estes dados indicaram a presença de anel aromático monossustituído. Apresentou ainda um singleto em  $\delta$  5,99, relativo a outros hidrogênios olefínicos em ligação dupla tri-sustituída.

Além dos sinais descritos acima, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um par de dubletos em  $\delta$  6,91 (d;  $J = 9.9$  Hz) e  $\delta$  5,64 (d;  $J = 10.2$  Hz), e outro par em  $\delta$  6,90 (d;  $J = 10.2$  Hz) e  $\delta$  5,63 (d;  $J = 10.2$  Hz) relativos a hidrogênios olefínicos em configuração *cis*, além de um singleto intenso em  $\delta$  1,58 indicando a presença de

grupos metílicos ligados a carbono não-hidrogenado. A comparação desses dados sugeriu que esse conjunto de sinais corresponde aos hidrogênios do grupo 2,2-dimetilpireno comuns às três substâncias e também presentes nas substâncias **KC 1**, **KC 2**, **KC 3**.

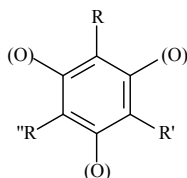
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou ainda um hepteto em  $\delta$  3,84 (hept,  $J = 6,6$  Hz) e um sexteto em  $\delta$  3,73 (sext,  $J = 6,6$  Hz) relativos a hidrogênios metínicos  $\alpha$ -carbonílicos, e hepteto em  $\delta$  2,24 (hept,  $J = 6,6$  Hz) relativo a outro hidrogênio metínico vizinho a hidrogênios metílicos. Outro multiplete entre  $\delta$  1,89 e  $\delta$  1,35 relativo a hidrogênios metilênicos e um dubleto em  $\delta$  2,97 (d;  $J = 6,6$  Hz), sugerindo a presença um grupo metilênico  $\alpha$ -carbonílicos vizinho a um grupo metínico e um dubleto em  $\delta$  0,97 (d;  $J = 6,9$  Hz) atribuídos a hidrogênios metílicos vizinhos a um hidrogênio metínico. Apresentou também dois dubletos semelhantes a um tripleto em  $\delta$  1,18 (d;  $J = 6,6$  Hz), correspondentes hidrogênios metílicos vizinhos a hidrogênios metínicos. Apresentou um tripleto em  $\delta$  0,91 (t;  $J = 7,5$  Hz) atribuídos a hidrogênios metílicos vizinho a um grupo metilênico. Após a análise desses dados foi possível propor a existência de três cadeias acílicas nas moléculas, as mesmas observadas para as substâncias **KC 1**, **KC 2**, **KC 3**:



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 36-39, p.72-74) (Tabela 20, p.76) foi possível distinguir um total de 28 sinais. Pela análise do espectro DEPT-135° (Figura 40, p.74) foi possível identificar 5 sinais correspondentes a carbonos metílicos, sendo o sinal em  $\delta$  29,7 atribuído a um material graxo, 2 sinais correspondentes a carbonos metilênicos e 9 sinais correspondentes a carbonos metínicos. Portanto os 10 sinais que não apareceram no espectro DEPT-135° correspondem aos carbonos não hidrogenados. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmou a presença de todos os grupos observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

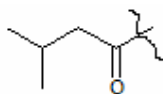
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais de grupos comuns às três substâncias, também presentes nas substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3**. Este espectro confirmou a presença de anel aromático monossustituído através dos seguintes

sinais:  $\delta$  139,3 (C),  $\delta$  127,6 (2x CH),  $\delta$  127,1 (2x CH),  $\delta$  128,2 (CH). Os sinais em  $\delta$  164,4 (C),  $\delta$  154,8 (C) e  $\delta$  158,1 (C) foram atribuídos a anel aromático totalmente substituído e trioxigenado. Os sinais em  $\delta$  106,9 (C)  $\delta$  101,5 (C) e  $\delta$  102,2 (C) foram atribuídos a três carbonos aromáticos não-hidrogenados e não-oxigenados, sendo que cada um deles está entre dois átomos oxigênio, como a estrutura desenhada abaixo:

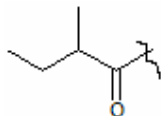


A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  também apresentou sinais em  $\delta$  79,9 (C), atribuído a carbono não hidrogenado ligado a um átomo de oxigênio,  $\delta$  28,3 (CH<sub>3</sub>) atribuído a grupos metílicos geminados na molécula, e sinais em  $\delta$  126,3 (CH) e 115,5 $\delta$  (CH) correspondentes a carbonos olefínicos, que confirmaram a presença do anel 2,2-dimetilpireno presentes nas três substâncias e também observado nas substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3**.

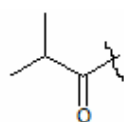
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais em  $\delta$  206,7 (C) característico de carbono carbonílico de cetona, em  $\delta$  53,6 (CH<sub>2</sub>) correspondente a um carbono metilênico  $\alpha$ -carbonílico, em  $\delta$  25,1 (CH) correspondente a um carbono metínico, em  $\delta$  22,6 (CH<sub>3</sub>) atribuído a dois carbonos metílicos, que confirmaram a presença da cadeia acíclica, como mostrada abaixo:



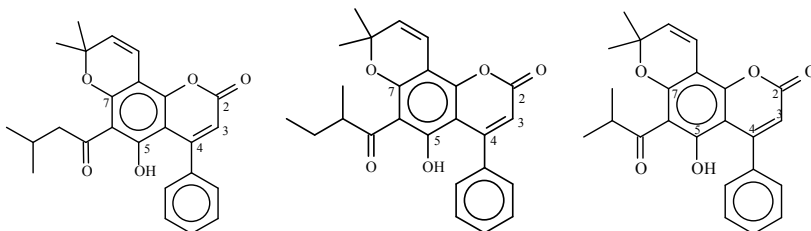
Este espectro apresentou sinais em  $\delta$  211,4 (C) característico de carbono carbonílico de cetona, em  $\delta$  46,6 (CH) correspondente a carbono metínico  $\alpha$ -carbonílico, em  $\delta$  26,7 (CH<sub>2</sub>) correspondente a carbono metilênico, em  $\delta$  11,8 (CH<sub>3</sub>) e  $\delta$  16,7 (CH<sub>3</sub>) atribuídos a carbonos metílicos, que confirmaram a presença da cadeia acíclica apresentada abaixo:



Este espectro também apresentou sinais em  $\delta$  206,7 (C) característico de carbono carbonílico de cetona, em  $\delta$  39,9 (CH) correspondente a um carbono metínico  $\alpha$ -carbonílico, em  $\delta$  19,3 (CH<sub>3</sub>) correspondente a dois carbonos metílicos que confirmaram a presença da cadeia acíclica, delineada abaixo:



Este espectro apresentou os sinais em  $\delta$  159,6 atribuído a um carbono carbonílico de lactona conjugada, em  $\delta$  112,7 correspondente a carbono olefínico  $\alpha$ -carbonílico e em  $\delta$  156,4 correspondente a carbono aromático não-hidrogenado que juntamente com o sinal observado no espectro de RMN de <sup>1</sup>H em  $\delta$  5,99 nos permitiu confirmar que se trata de um mistura de neoflavonóides. Estes sinais característicos nos permitiram identificar a sua estrutura e posicionar os grupos na molécula, como representado nas estruturas abaixo:



Essa proposta estrutural foi escolhida devido ao alto valor de deslocamento para os hidrogênios metílicos do anel 2,2-dimetilpireno. Quando este mesmo anel está em posição oposta ao grupo fenílico no núcleo cumarínico ocorre uma diferença significativa na região dos hidrogênios alifáticos relativos ao anel, desproporcionando a proteção decorrente do efeito anisotrópico diamagnético do anel aromático. Nas substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6** os singletos ocorrem em  $\delta$  1,58 (Tabela 19, p.75) em contrapartida aos singletos em  $\delta$  0,97 (Tabela 17, p.64) das substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3**.

Através da comparação dos dados observados para os singletos da hidroxila quelada aos encontrados na literatura, atribuímos o sinal em  $\delta$  14,77 para a substância **KC 4**, o sinal em  $\delta$  14,65 para substância **KC 5** e o sinal em  $\delta$  14,63 para a substância **KC 6**, observando que a ordem de desproteção da hidroxila é a mesma para as substâncias **KC 1**, **KC 2** e **KC 3**.

Nesses seis neoflavonóides identificados podemos observar três pares de isômeros de posição **KC 1** e **KC 4**, **KC 2** e **KC 5** e, **KC 3** e **KC 6**. Esses pares de isômeros apresentam os mesmos grupos, diferenciando apenas na cadeia acíclica. Os isômeros de posição podem ser facilmente diferenciados através da análise dos sinais para os grupos metílicos do anel 2,2-dimetilpireno no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

A substância **KC 4** conhecida como mammeigim, já havia sido isolada das espécies *Mammea americana* (FINNEGAN *et al.*, 1964 e 1965), *Mesua ferrea* (CHAKRABORTY & CHATTERJEE, 1969; BALA & SESHADRI, 1971; VEROTTA *et al.*, 2004), *M. thwaitesii* (BANDARANAYAKE *et al.*, 1975), *Kielmeyera pumila* (NAGEM *et al.*, 1988), *K. elata* (GRAMACHO *et al.*, 1999) e *K. lathrophyton* (CRUZ *et al.*, 2001a).

A substância **KC 5** já havia sido isolada das espécies *Mammea africana* (CARPENTER *et al.*, 1970 e 1971), *Mesua ferrea* (VEROTTA *et al.*, 2004) e *Kielmeyera lathrophyton* (CRUZ *et al.*, 2001a).

A substância **KC 6** conhecida como mesuagim, já havia sido isolada das espécies *Mesua ferrea* (CHAKRABORTY & CHATTERJEE, 1969; VEROTTA *et al.*, 2004), *M. thwaitesii* (BANDARANAYAKE *et al.*, 1975), *M. racemosa* (MOREL *et al.*, 1999) e *Mammea americana* (NIGAM *et al.*, 1968).

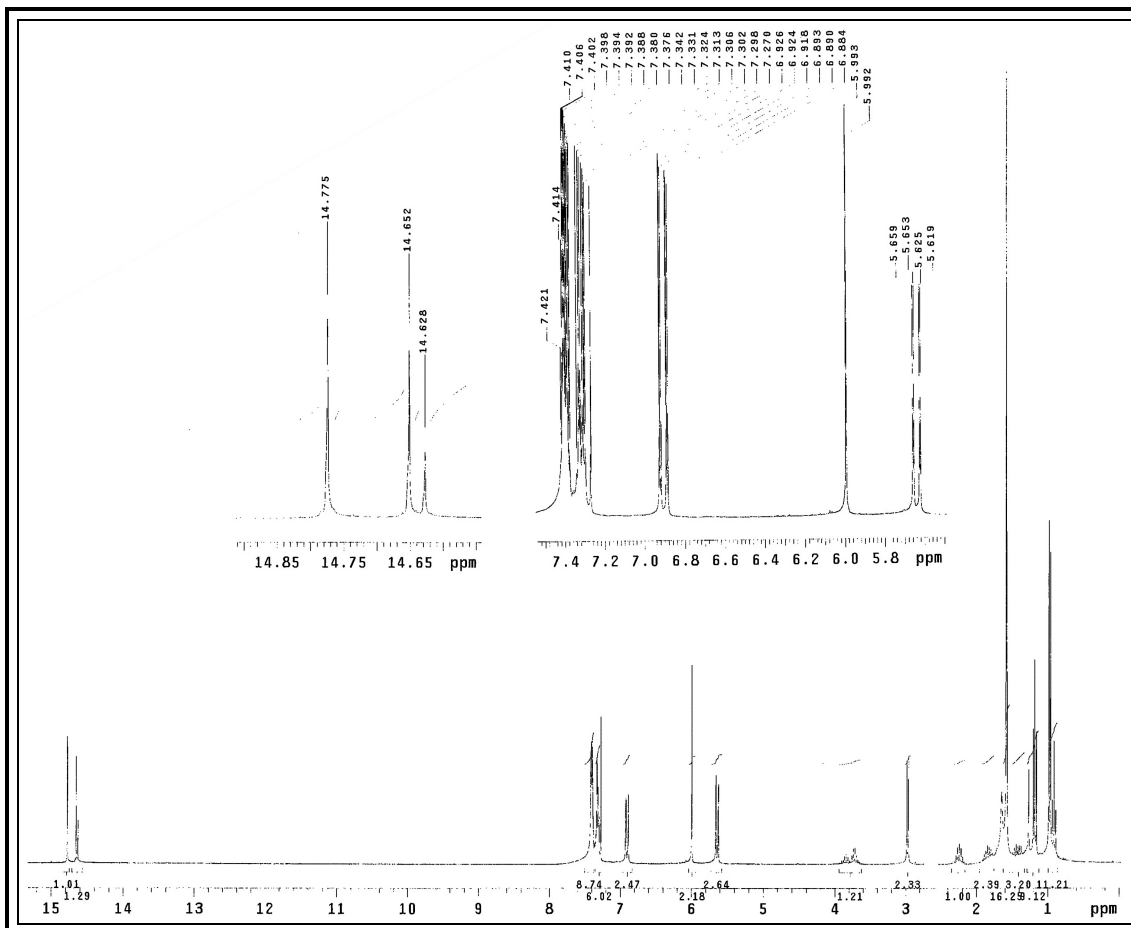


Figura 33: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [300 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)].

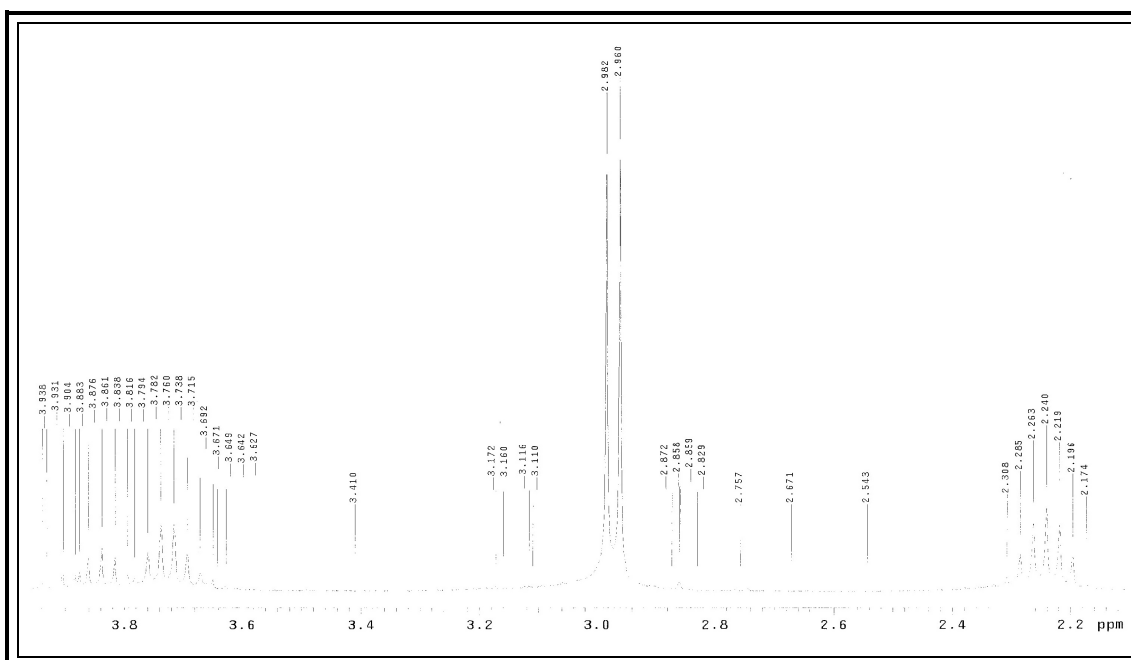
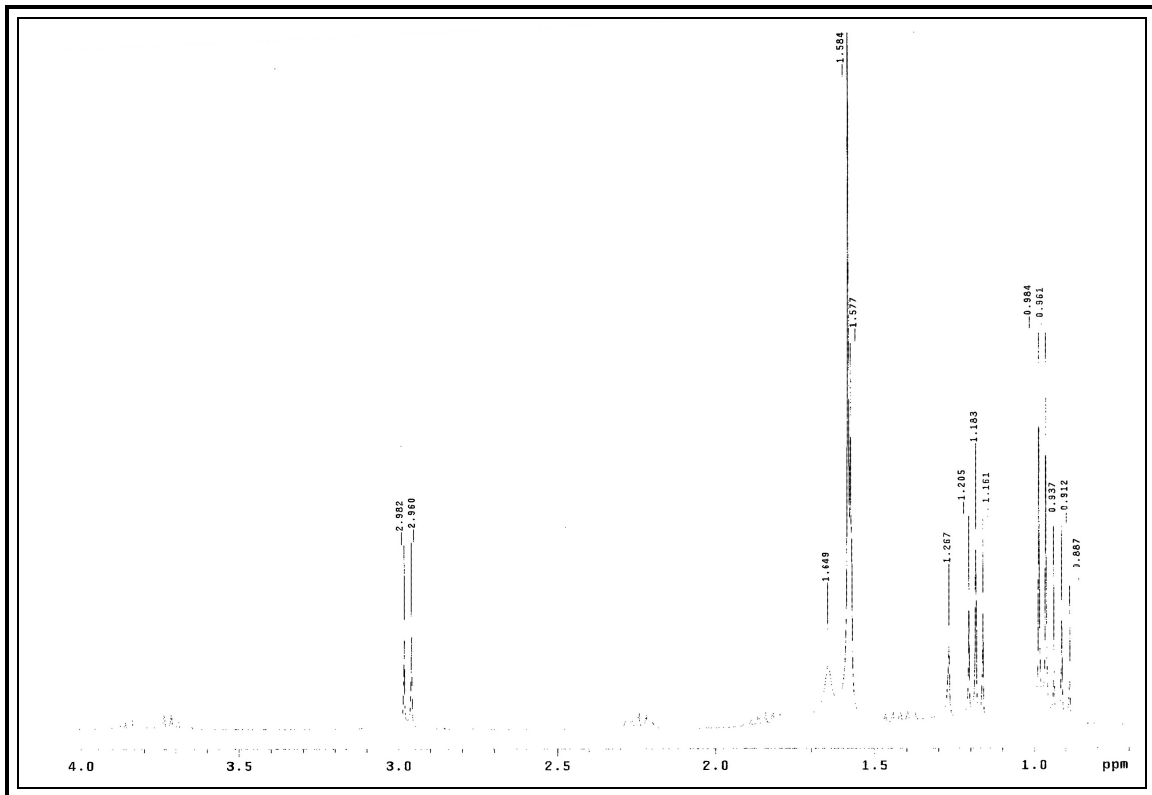
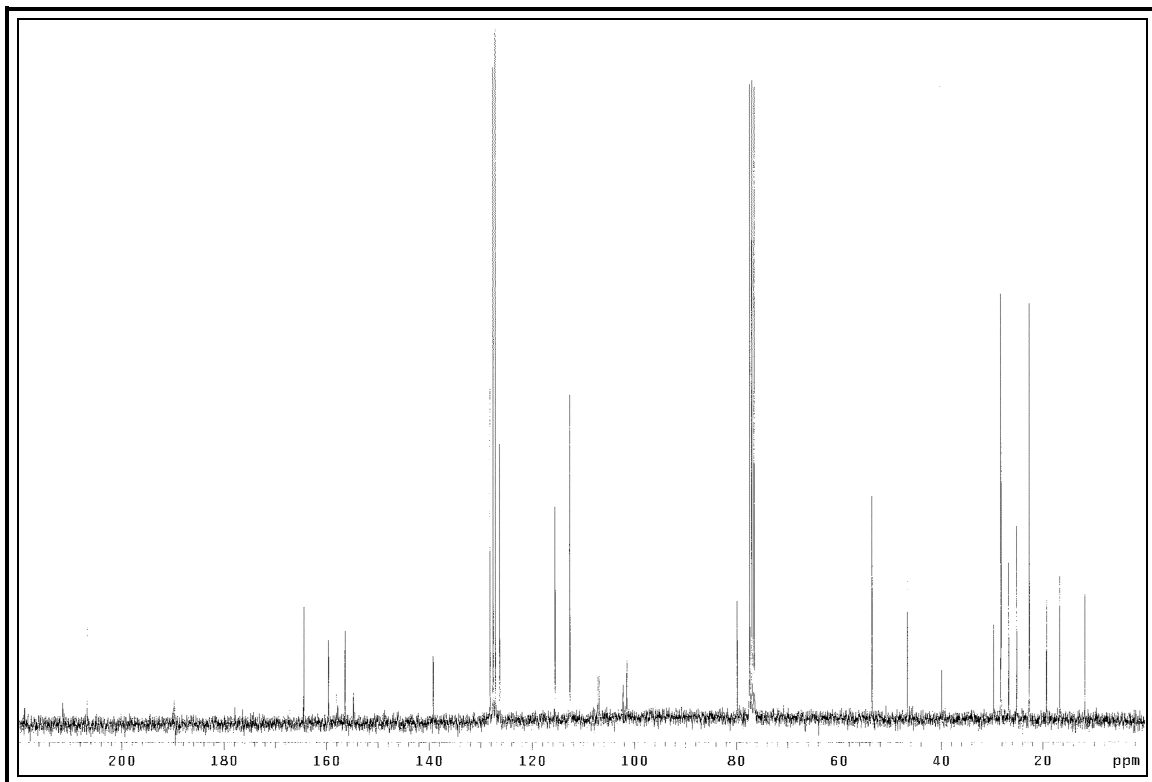


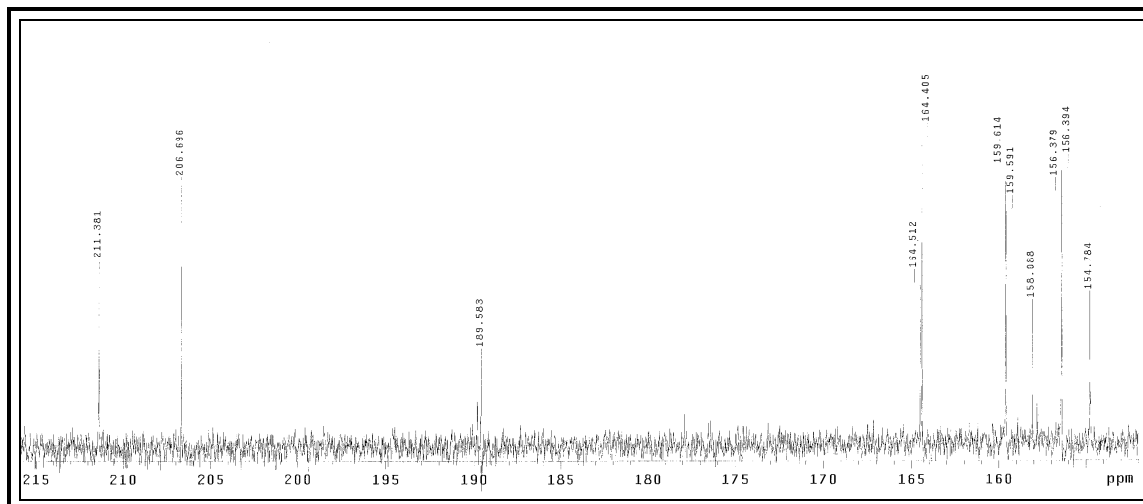
Figura 34: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [região de  $\delta$  4,0 a  $\delta$  2,0 (ppm)].



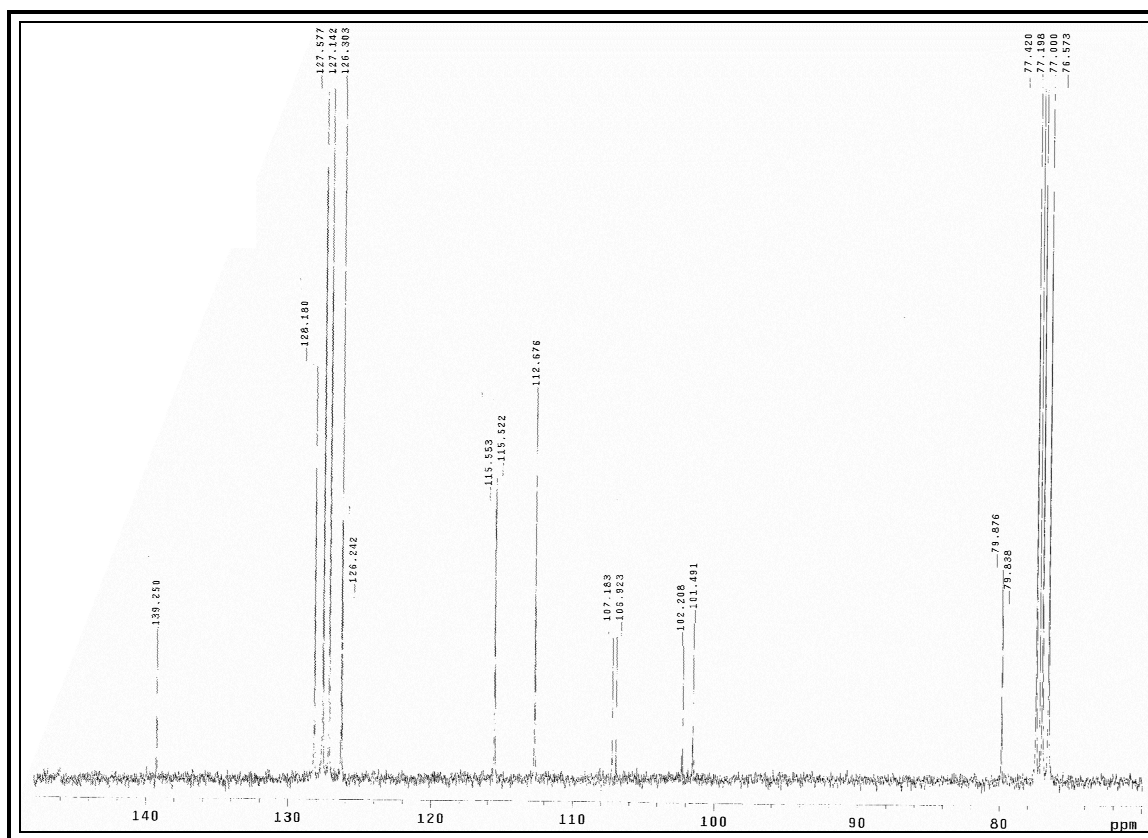
**Figura 35:** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [região de  $\delta$  4,0 a  $\delta$  0,8 (ppm)].



**Figura 36:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].



**Figura 37:** Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [região de  $\delta$  215 a  $\delta$  153 (ppm)].



**Figura 38:** Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [região de  $\delta$  140 a  $\delta$  75 (ppm)].



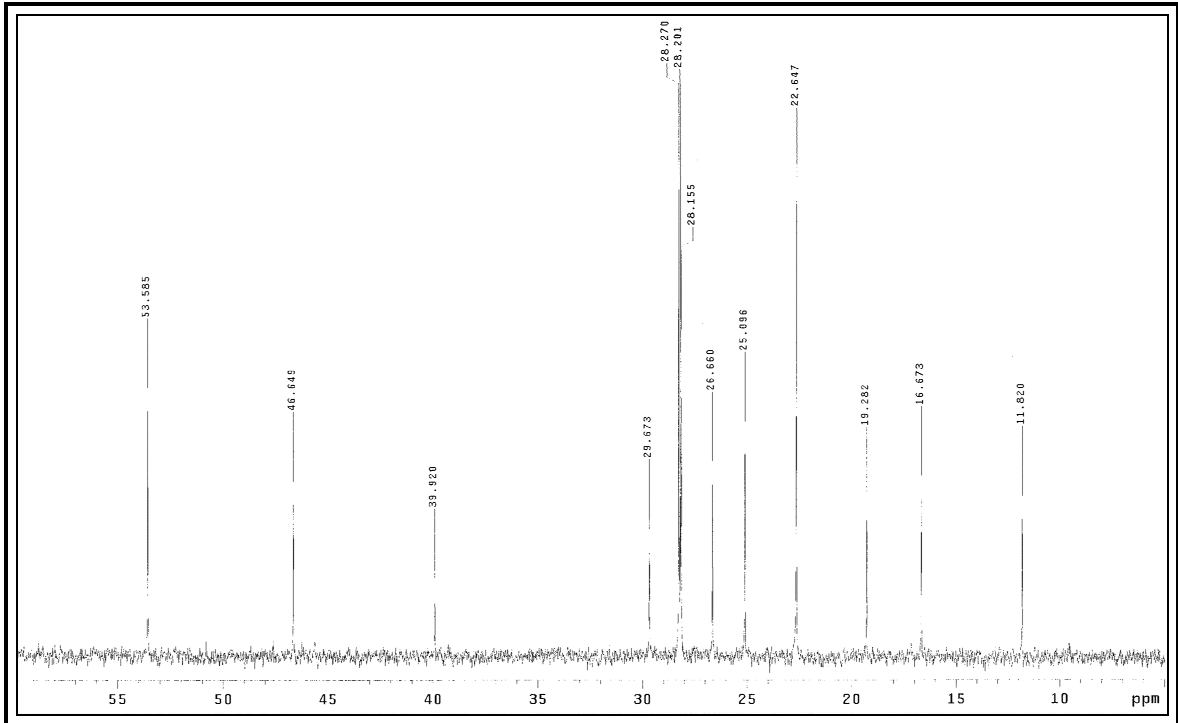


Figura 39: Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [região de  $\delta$  55 a  $\delta$  10 (ppm)].

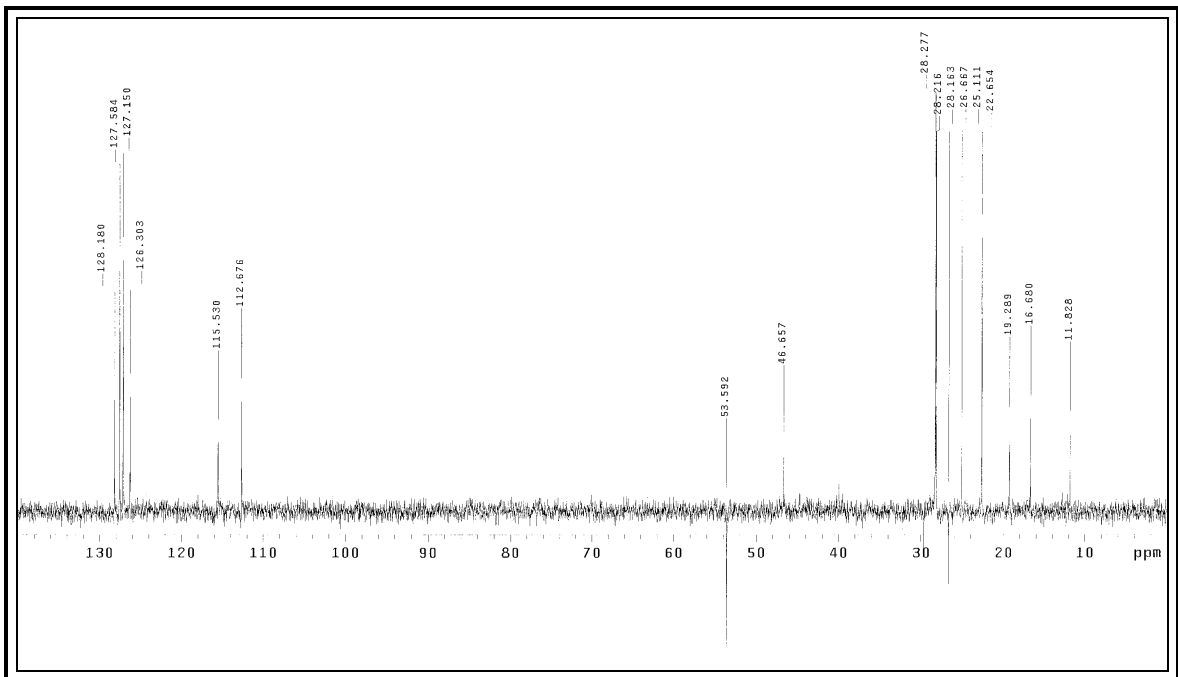


Figura 40: Espectro de RMN DEPT 135° da mistura das substâncias KC 4, KC 5 e KC 6 [75MHz].

**Tabela 19:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6** [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

H	KC 4	KC 5	KC 6
2	-	-	-
3	5,99, 1H, s	5,99, 1H, s	5,99, 1H, s
4	-	-	-
4a	-	-	-
5	14,77, 1H, s, (OH)	14,65, 1H, s, (OH)	14,63, 1H, s, (OH)
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
8a	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m
3'	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m
4'	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m
5'	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m
6'	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m	7,30-7,41, 5H, m
1''	-	-	-
2''	2,97, 2H, d, (6,6)	3,73, 1H, sext, (6,6)	3,84, 1H, hept, (6,6)
3''	2,24, 1H, hept, (6,6)	1,35-1,49, 1H, m 1,77-1,89, 1H, m	1,17, 3H, d, (6,6)
4''	0,97, 3H, d, (6,9)	0,91, 3H, t, (7,5)	1,17, 3H, d, (6,6)
5''	0,97, 3H, d, (6,9)	1,19, 3H, d, (6,6)	-
2'''	-	-	-
3'''	5,64, 1H, d, (9,9)	5,64, 1H, d, (10,2)	5,63, 1H, d, (10,2)
4'''	6,90, 1H, d, (10,2)	6,90, 1H, d, (10,2)	6,91, 1H, d, (10,2)
5'''	1,58, 3H, s	1,58, 3H, s	1,58, 3H, s
6'''	1,57, 3H, s	1,57, 3H, s	1,57, 3H, s

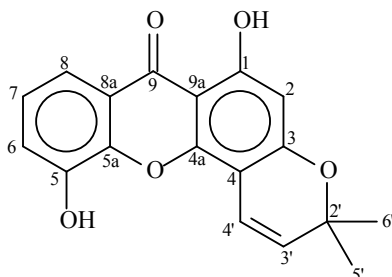
\*J = (Hz)

**Tabela 20:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **KC 4**, **KC 5** e **KC 6** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ].

<b>C</b>	<b>KC 4</b>	<b>KC 5</b>	<b>KC 6</b>
2	159,6	159,6	159,6
3	112,7	112,7	112,7
4	156,4	156,4	156,4
4a	102,2	102,2	102,2
5	164,4	164,4	164,4
6	106,9	106,9	106,9
7	154,8	154,8	154,8
8	101,5	101,5	101,5
8a	158,1	158,1	158,1
1'	139,3	139,3	139,3
2'	127,1	127,1	127,1
3'	127,6	127,6	127,6
4'	128,2	128,2	128,2
5'	127,6	127,6	127,6
6'	127,1	127,1	127,1
1''	206,7	211,4	211,4
2''	46,6	53,6	39,9
3''	26,7	25,1	19,3
4''	11,8	22,6	19,3
5''	16,7	22,6	-
2'''	79,9	79,9	79,9
3'''	126,3	126,3	126,3
4'''	115,5	115,5	115,5
5'''	28,3	28,2	28,2
6'''	28,3	28,2	28,2

## 6.2 XANTONAS

### 6.2.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 7**

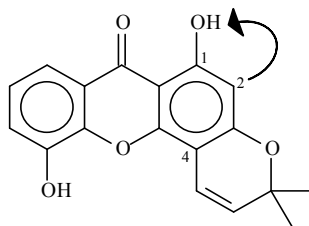


1,5-di-hidroxi-2',2'-dimetilpireno(6',5':3,4)xantona

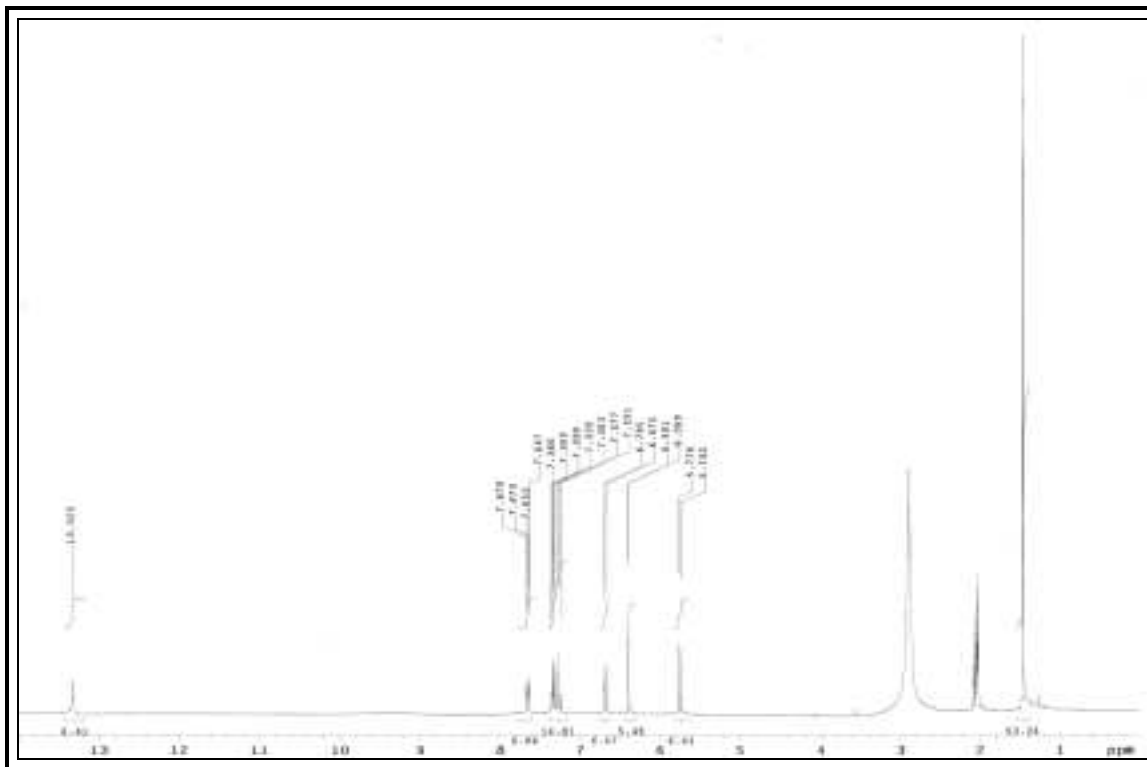
A substância **KC 7** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de cristais amarelo esverdeado, PF 208-209 °C e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e NOEDIF, além da comparação com dados disponíveis na literatura (OWEN & SCHEINMANN, 1974; GUJRAL & GUPTA, 1979).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 41-42, p.79-80) (Tabela 21, p.85) da substância **KC 7** apresentou um singlete  $\delta$  13,33 evidenciando um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular com um átomo de oxigênio carbonílico, característico de xantonas com hidroxila na posição C-1 ou C-8 (SOUZA, 2005). Um singlete largo em  $\delta$  9,20 relativo a um grupo hidroxílico fenólico não-quelado. Apresentou um duplo dubleto em  $\delta$  7,67 (1H; dd;  $J = 7,8$  e  $1,8$  Hz) e outro em  $\delta$  7,36 (1H; dd;  $J = 7,8$  e  $1,8$  Hz) característicos de hidrogênios aromáticos, indicando acoplamento desses hidrogênios em *orto* e em *meta* respectivamente com outros dois hidrogênios do anel. Apresentou ainda um tripleto em  $\delta$  7,28 (1H; t;  $J = 7,8$  Hz) relativo a um hidrogênio aromático, indicando acoplamento desse hidrogênio em *orto* com outros dois hidrogênios do anel. A comparação desses dados sugeriu a presença de um anel aromático com três hidrogênios consecutivos seguidos de uma hidroxila, característico de um anel xantônico 1,2,3-trissubstituído. O sinal em  $\delta$  7,67 quando comparado ao sinal em  $\delta$  7,36 indica que esse hidrogênio está sofrendo o efeito de desproteção do grupo carbonílico, pois se encontra em uma posição periplanar a esse grupo. Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-8 (resultado do acoplamento em *orto* desse hidrogênio com o H-7 e em *meta* com o H-





A substância **KC 7** é uma xantona conhecida e já foi anteriormente isolada de algumas espécies como *Pentaphalangium solomonse* Warb (OWEN & SCHEINMANN, 1974), *Hypericum japonicum* e *H. henry* (WU *et al.*, 1998), *Garcinia livingstonei* (DISERENS *et al.*, 1992), *G. nigrolineata* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2003), *G. merguensis* (NGUYEN *et al.*, 2003) e *Vismia laurentii* De Wild (KUETE *et al.*, 2007). A xantona com o anel 2,2-dimetilpireno em posição linear foi isolada da espécie *Kielmeyera coriacea* (SOUZA, 1999).



**Figura 41:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 7** [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)].

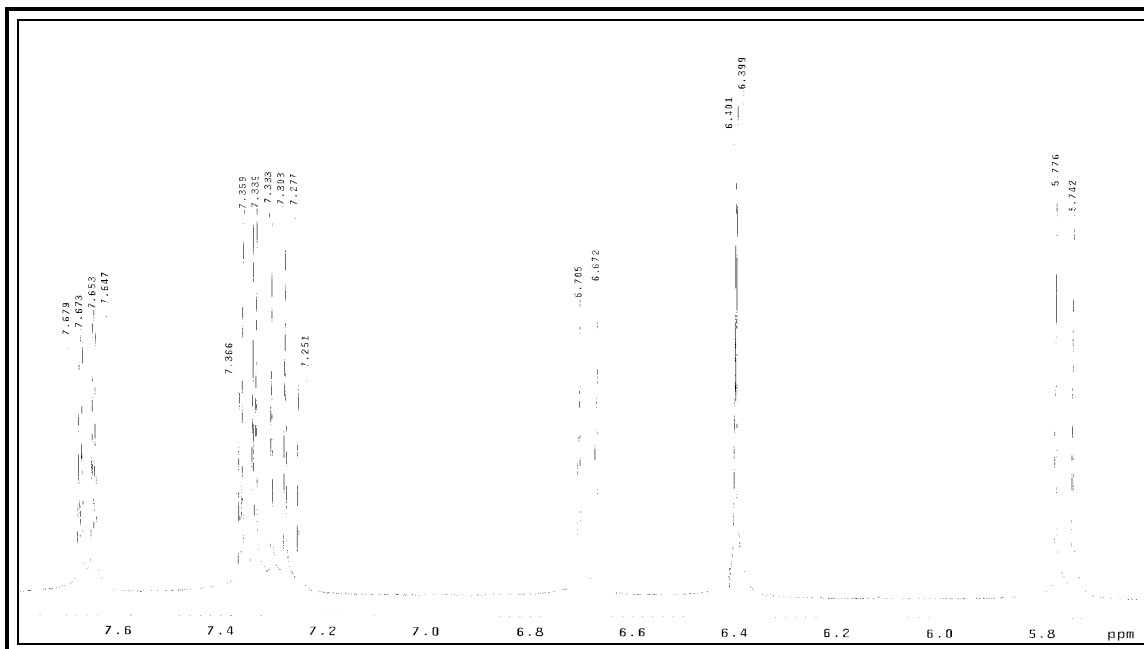


Figura 42: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 7 [região de  $\delta$  0,7 a  $\delta$  2,0 (ppm)].

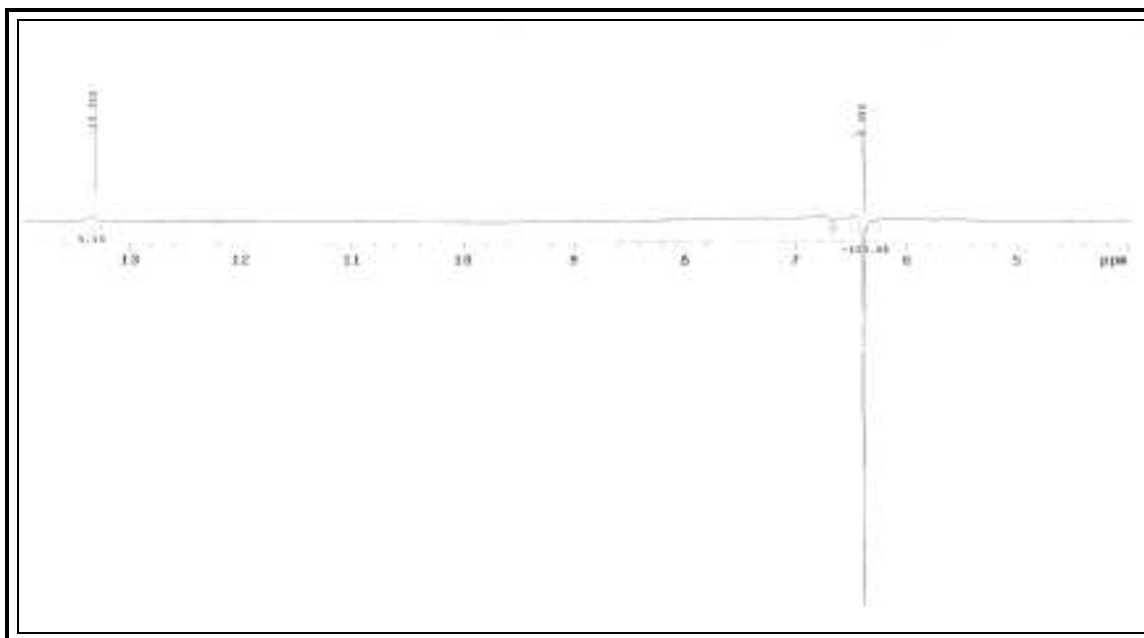
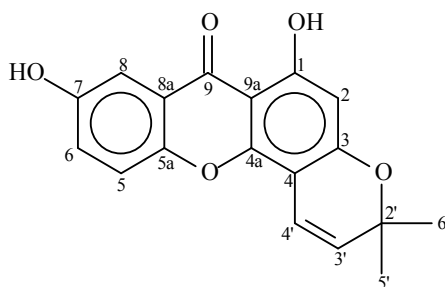


Figura 43: Espectro de NOEDIF da substância KC 7 [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  (ppm)].

6.2.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 8**

1,7-di-hidroxi-2',2'-dimetilpireno(6',5':3,4)xantona

A substância **KC 8** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* na forma de cristais amarelos, PF 242 °C e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e NOEDIF, além da comparação com dados disponíveis na literatura (RUKACHAISIRIKUL et al., 2003).

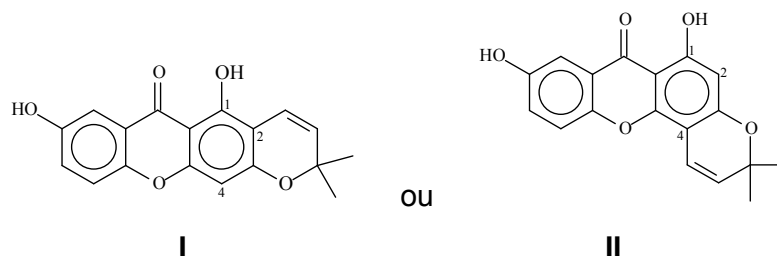
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 44-45, p.83-84) (Tabela 21, p.85) da substância **KC 8** apresentou sinais semelhantes aos observados na substância **KC 7**. Apresentou um singleto em  $\delta$  13,17 (1H; s) relativo a um hidrogênio de hidroxila quelada, um dubleto relativo a um hidrogênio aromático em  $\delta$  6,20 (1H; d;  $J = 0,6$  Hz). Este espectro apresentou também um duplo dubleto em  $\delta$  6,61 (1H; dd;  $J = 10,0$  e 0,6 Hz), um dubleto em  $\delta$  5,49 (1H; d;  $J = 10,0$  Hz) atribuídos a dois hidrogênios olefínicos em configuração *cis*, e um singleto em  $\delta$  1,37 (6H; s) atribuído a dois grupos metílicos ligados a um carbono não-hidrogenado, que sugerem a presença do anel 2,2-dimetilpireno. Este conjunto de sinais é característico de um anel xantônico pentassubstituído (anel A).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou três duplos dubletos em  $\delta$  7,48 (1H; dd;  $J = 3,0$  e 0,6 Hz), indicando acoplamento desse hidrogênio em *meta* e *para*, outro em  $\delta$  7,19 (1H; dd;  $J = 9,3$  e 0,6 Hz), indicando acoplamento em *orto* e *para* e outro em  $\delta$  7,14 (1H; dd;  $J = 9,3$  e 3,0 Hz), indicando acoplamento em *orto* e *meta* com outros dois hidrogênios do anel. Esse conjunto de sinais são característicos de um anel xantônico 1,2,5-trissubstituído (anel B). A análise destes sinais indica que o hidrogênio aromático em  $\delta$  7,48 está sofrendo o efeito de desproteção do grupo carbonílico, pois se encontra em uma posição periplanar a esse grupo. Esse sinal foi



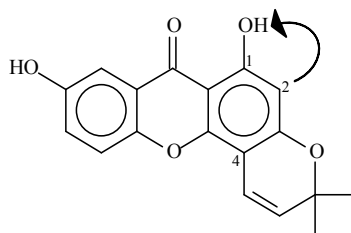
atribuído ao hidrogênio H-8 e é o resultado do acoplamento em *meta* com o hidrogênio H-6 e em *para* com o hidrogênio H-5. O sinal em  $\delta$  7,19 foi atribuído ao hidrogênio H-5 e é o resultado do acoplamento em *orto* com o hidrogênio H-6 e em *para* com o hidrogênio H-8. O sinal em  $\delta$  7,14 foi atribuído ao hidrogênio H-6 e é o resultado do acoplamento em *orto* com o hidrogênio H-5 e em *meta* com o hidrogênio H-8.

A partir da análise desses dados e do padrão de acoplamento dos hidrogênios na molécula foi possível sugerir duas estruturas relativas à posição do anel 2,2-dimetilpireno, linear ou angular como representada abaixo:



Nas duas estruturas propostas o hidrogênio aromático atribuído ao sinal em  $\delta$  6,20 está protegido por estar entre dois carbonos oxigenados. A diferença está proximidade deste hidrogênio com o grupo hidroxílico quelado.

A proposta estrutural I foi descartada após análise do espectro de NOEDIF (Figura 46, p.84) que permitiu propor a orientação angular do anel 2,2-dimetilpireno com relação ao núcleo da xantona. No experimento, a irradiação do hidrogênio olefínico do anel em  $\delta$  6,20 provocou incremento de 31,71% no sinal do hidrogênio hidroxílico em  $\delta$  13,17, como representada abaixo. Este sinal foi atribuído ao hidrogênio H-2. A posição angular do anel 2,2-dimetilpireno é a mesma encontrada para a substância **KC 7**.



A substância **KC 8** é uma xantona conhecida e já foi anteriormente relatada como um composto sintético (CLARKE *et al.*, 1974) e isolada da espécie de *Garcinia*

*nigrolineata* (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2003). A xantona com o anel 2,2-dimetilpireno em posição linear foi isolada da espécie *K. coriacea* (SOUZA, 1999).

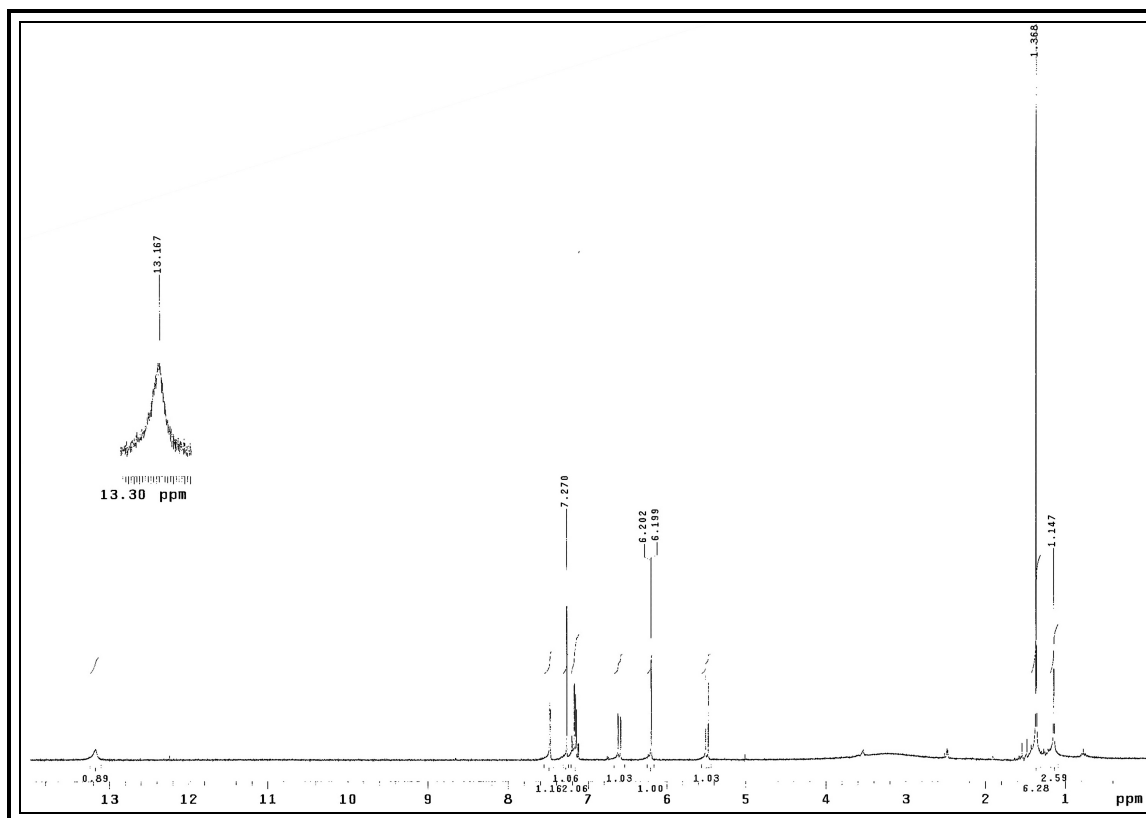


Figura 44: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 8 [300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{gtsDMSO}$ ,  $\delta$  (ppm)].

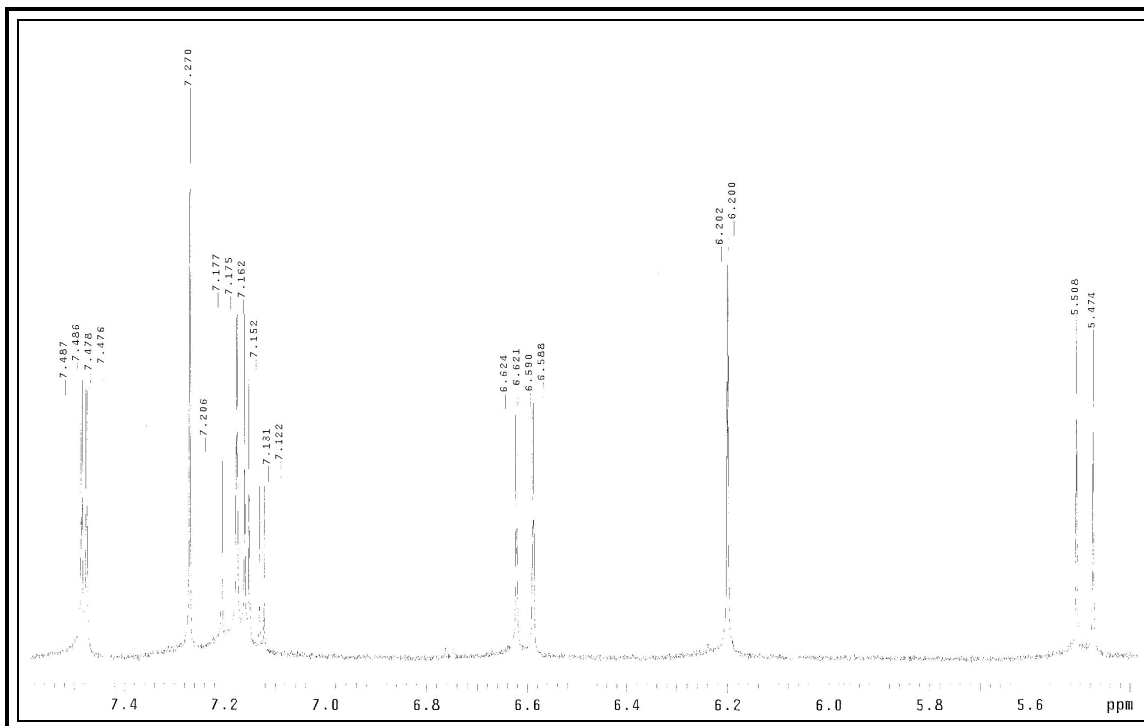


Figura 45: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **KC 8** [região de  $\delta$  7,5 a  $\delta$  5,4 (ppm)].

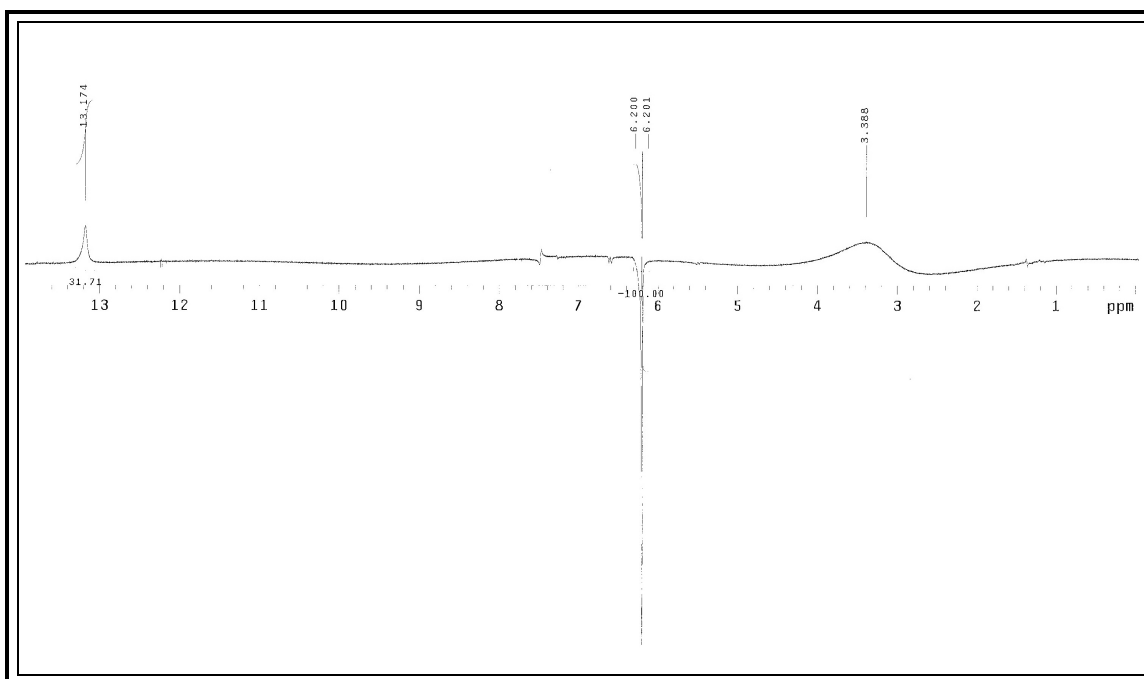


Figura 46: Espectro de NOEDIF da substância **KC 8** [300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{gtsDMSO}$ ,  $\delta$  (ppm)].

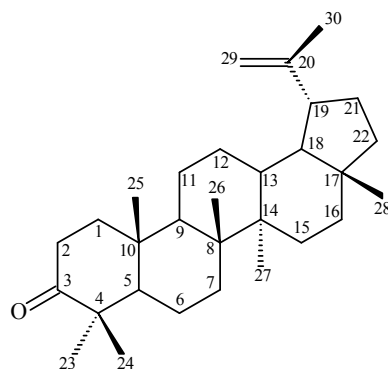
**Tabela 21:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **KC 7** e **KC 8** [300 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  e  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

<b>C</b>	<b>KC 7</b>	<b>KC 8</b>
1	13,33, 1H, s, (OH)	13,17, 1H, s, (OH)
2	6,40, 1H, d, (0,6)	6,20, 1H, d, (0,6)
3	-	-
4	-	-
4a	-	-
5a	-	-
5	9,20, 1H, sl, (OH)	7,19, 1H, dd, (9,3 e 0,6)
6	7,36, 1H, dd, (7,8 e 1,8)	7,14, 1H, dd, (9,3 e 3,0)
7	7,28, 1H, t, (7,8)	-
8	7,67, 1H, dd, (7,8 e 1,8)	7,48, 1H, dd, (3,0 e 0,6)
8a	-	-
9	-	-
9a	-	-
2'	-	-
3'	5,76, 1H, d, (10,2)	5,49, 1H, d, (10,0)
4'	6,69, 1H, dl, (9,9)	6,61, 1H, dd, (10,0 e 0,6)
5'	1,48, 3H, s	1,37, 3H, s
6'	1,48, 3H, s	1,37, 3H, s

\* $J$  = (Hz)

## 6.3 TRITERPENOS

### 6.3.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 9**



Lupenona

A substância **KC 9** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* como um sólido amorfo amarelo, e sua identificação foi feita com base nos dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$ , além da comparação dos dados disponíveis na literatura (OLEA & ROQUE, 1990; PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2010).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 47-48, p.87-88) apresentou 6 sinais correspondentes a hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,80 (3H),  $\delta$  0,94 (3H),  $\delta$  0,96 (3H),  $\delta$  1,03 (3H),  $\delta$  1,08 (6H) e  $\delta$  1,69 (3H) atribuído ao hidrogênio metílico ligado a um carbono olefínico. Este espectro apresentou multipletos na região de  $\delta$  1,27 e  $\delta$  2,40 atribuídos aos hidrogênios dos grupos metínicos e metilênicos da molécula. Apresentou dois singletos largos em  $\delta$  4,58 (1H; sl) e  $\delta$  4,69 (1H; sl) que foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos ligados ao carbono C-29.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 49, p.88) (Tabela 22, p.89) apresentou sinal em  $\delta$  218,1 (C) característico de carbono carbonílico de cetonas. Apresentou vários sinais, principalmente na região de  $\delta$  14 a  $\delta$  60. Através da análise dos espectros de DEPT  $135^\circ$  (Figura 50, p.88) foi possível identificar os sinais correspondentes aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos, e através da comparação com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível atribuir os sinais correspondentes aos carbonos não hidrogenados.

Os sinais que aparecem em  $\delta$  150,8 (C) e  $\delta$  109,4 ( $\text{CH}_2$ ) são característicos de triterpenos que possuem o esqueleto lupano, onde a dupla ligação

está localizada entre os carbonos C-20 e C-29 (OLEA & ROQUE, 1990). O triterpeno pentacíclico isolado dos caules de *Kielmeyera coriacea* é do tipo II (Figura 10, p.23) e pertence ao grupo do lupano. Através dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos, juntamente com o sinal em  $\delta$  218,1 foi possível confirmar que o triterpeno em análise é a Lupenona.

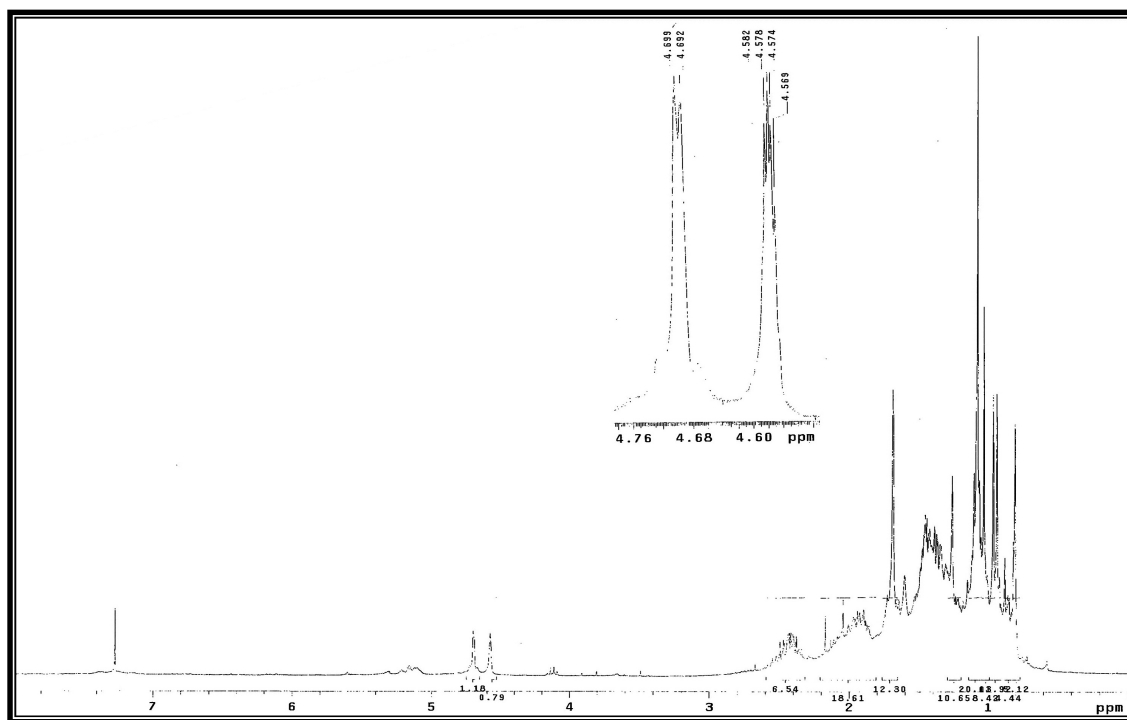


Figura 47: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 9 [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

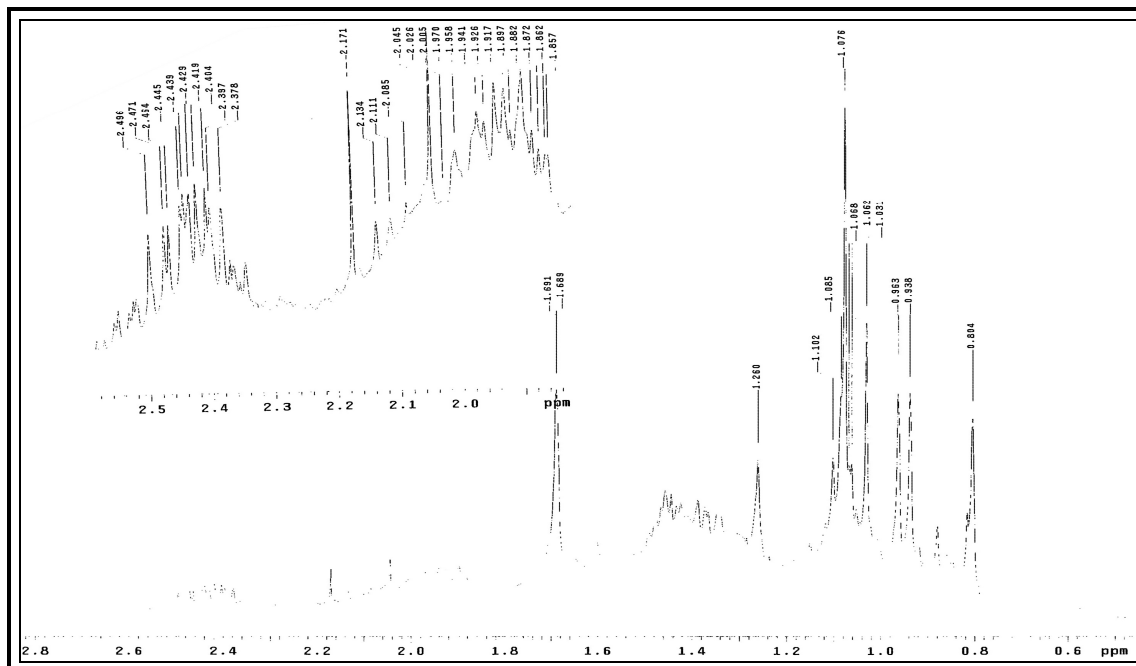


Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 9 [região de  $\delta$  2,8 a  $\delta$  0,6 (ppm)].

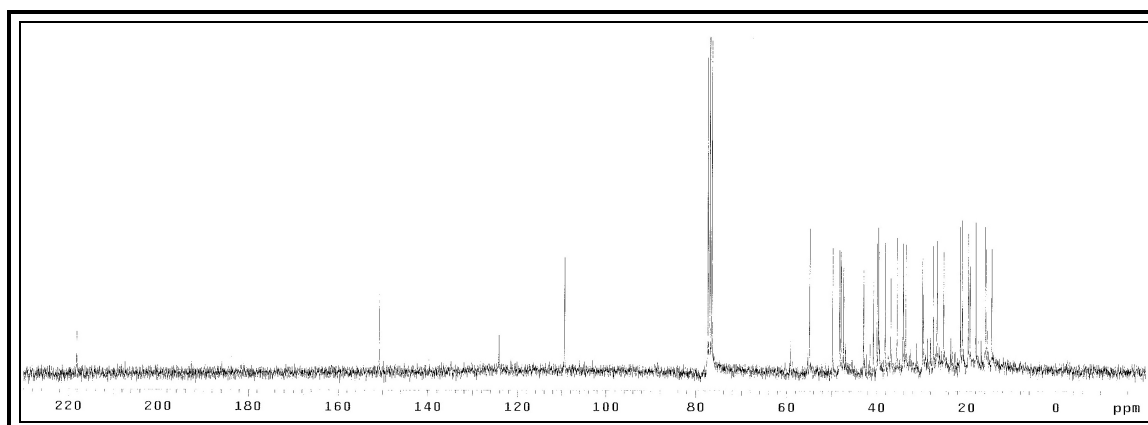


Figura 49: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância KC 9 [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

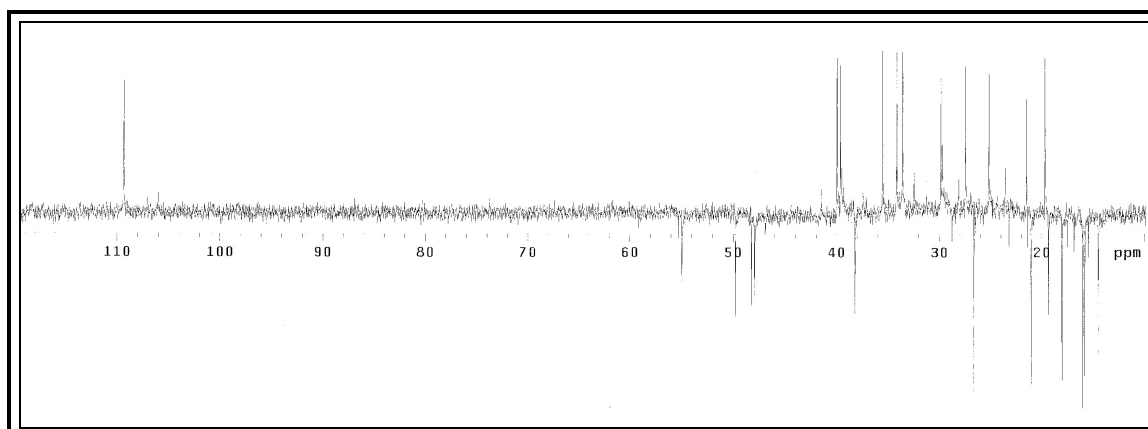


Figura 50: Espectro de RMN DEPT 135° da substância KC 9 [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

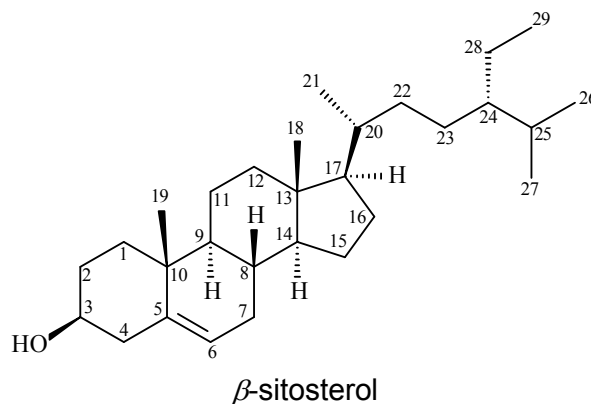
**Tabela 22:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135° da substância **KC 9** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

<b>C</b>	<b>KC 9</b>
1	39,6 (CH <sub>2</sub> )
2	34,1 (CH <sub>2</sub> )
3	218,1 (C)
4	47,3 (CH)
5	54,9 (CH)
6	19,7 (CH <sub>3</sub> )
7	33,5 (CH <sub>2</sub> )
8	40,8 (CH <sub>2</sub> )
9	49,8 (CH)
10	36,9 (C)
11	21,5 (CH <sub>2</sub> )
12	25,2 (CH <sub>2</sub> )
13	38,2 (CH)
14	42,9 (C)
15	27,4 (CH <sub>2</sub> )
16	35,5 (CH <sub>2</sub> )
17	43,0 (C)
18	48,3 (CH)
19	47,9 (CH)
20	150,8 (C)
21	29,8 (CH <sub>2</sub> )
22	40,0 (C)
23	26,6 (CH <sub>3</sub> )
24	21,0 (CH <sub>3</sub> )
25	15,9 (CH <sub>3</sub> )
26	15,8 (CH <sub>3</sub> )
27	14,5 (CH <sub>3</sub> )
28	18,0 (CH <sub>3</sub> )
29	109,4 (CH <sub>2</sub> )
30	19,3 (CH <sub>3</sub> )



## 6.4 ESTERÓIDES

### 6.4.1 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 11**



A substância **KC 11** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* como um sólido cristalino incolor, PF 126,5 °C.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 51-52, p.91) (Tabela 23, p.96) do  $\beta$ -sitosterol apresentou como sinais mais característicos singletos em  $\delta$  0,68 e  $\delta$  1,01 correspondentes aos hidrogênios metílicos dos anéis, dubletos em  $\delta$  0,84 e  $\delta$  0,92 e um tripleto em  $\delta$  0,83 correspondentes aos hidrogênios metílicos da cadeia lateral, um multiplete em  $\delta$  3,51 correspondente a um hidrogênio carbinólico e um dubleto em  $\delta$  5,34 correspondente a um hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 53-54, p.92) (Tabela 24, p.97) apresentou como mais característicos os sinais em  $\delta$  121,6 (CH) e  $\delta$  140,7 (C) relativos a dois carbonos olefínicos, um sinal em  $\delta$  71,7 (CH) referente a um carbono carbinólico e seis sinais correspondentes a grupos metílicos na região de  $\delta$  11 a  $\delta$  20.

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  com os valores encontrados na literatura (CARVALHO *et al.*, 1998; GOULART *et al.*, 1993) permitiu identificar o esteróide  $\beta$ -sitosterol.

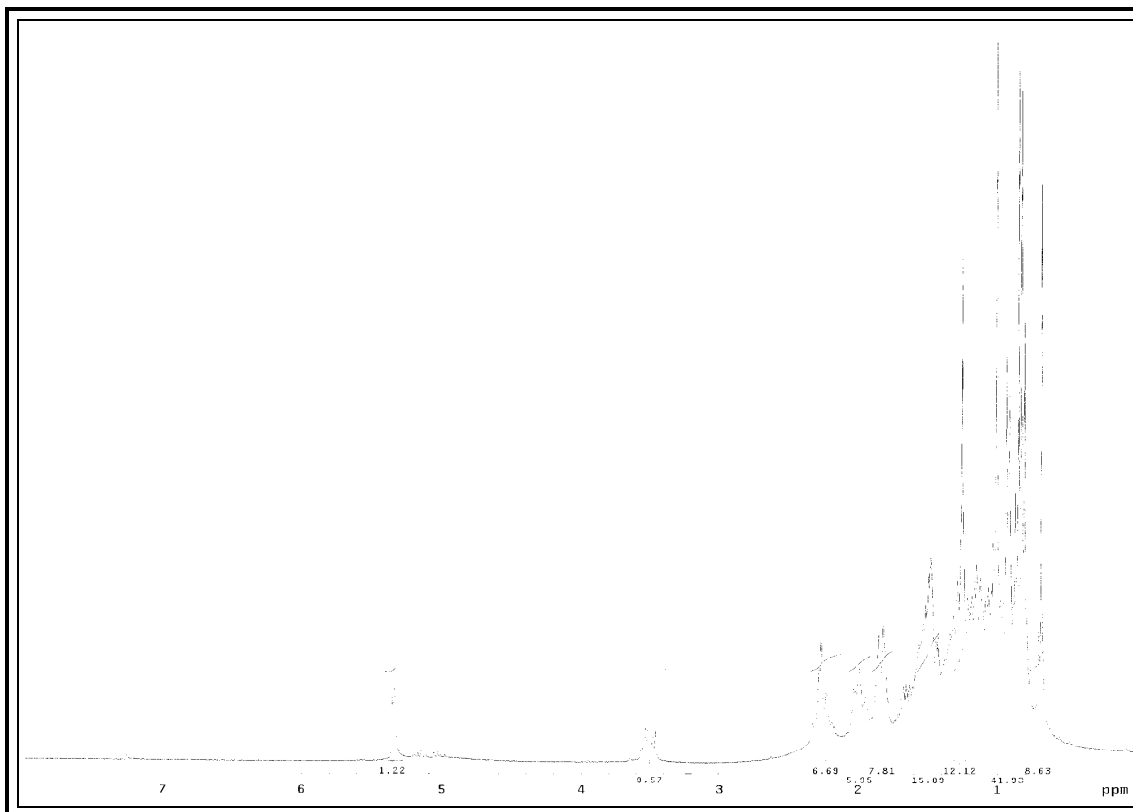


Figura 51: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância KC 11 em CDCl<sub>3</sub> [300 MHz].

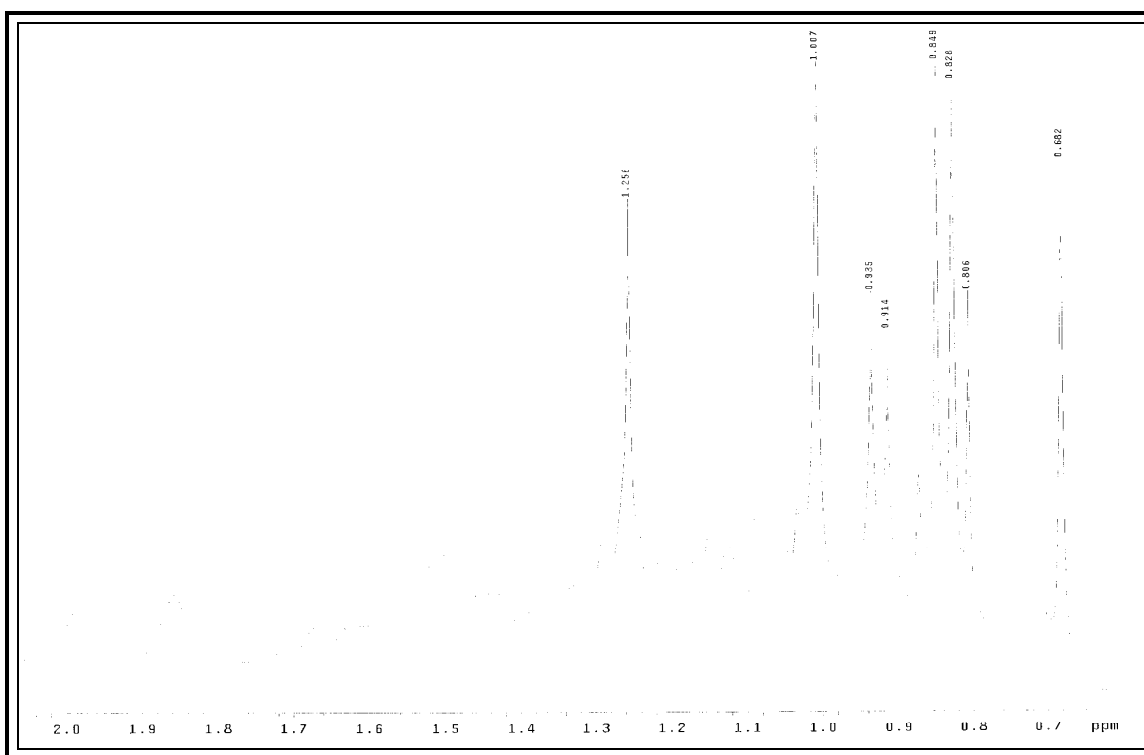


Figura 52: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância KC 11 [região de  $\delta$  2,0 a  $\delta$  0,7 (ppm)]

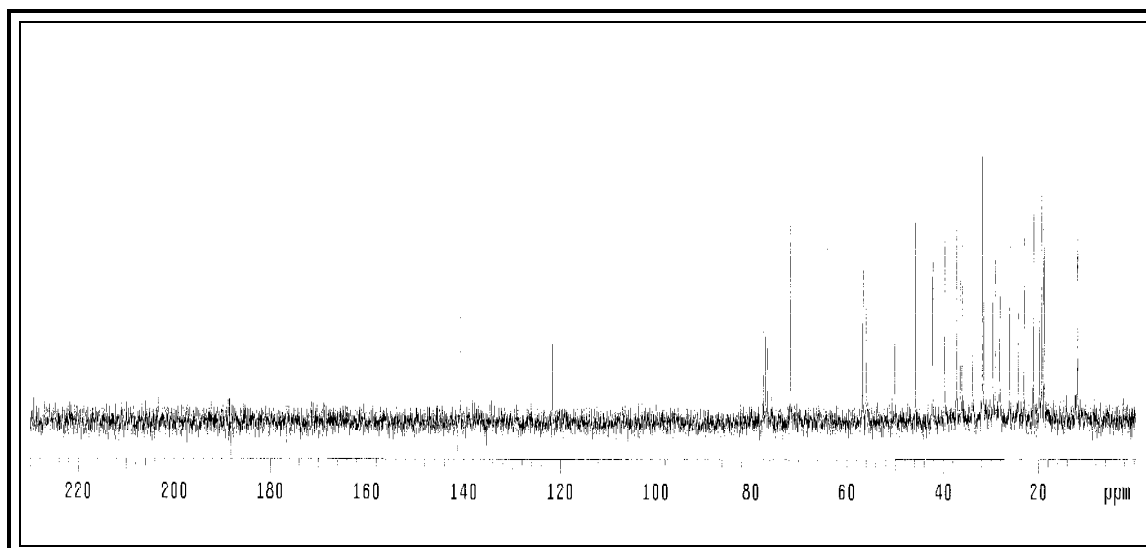


Figura 53: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância KC 11 em  $\text{CDCl}_3$  [75MHz].

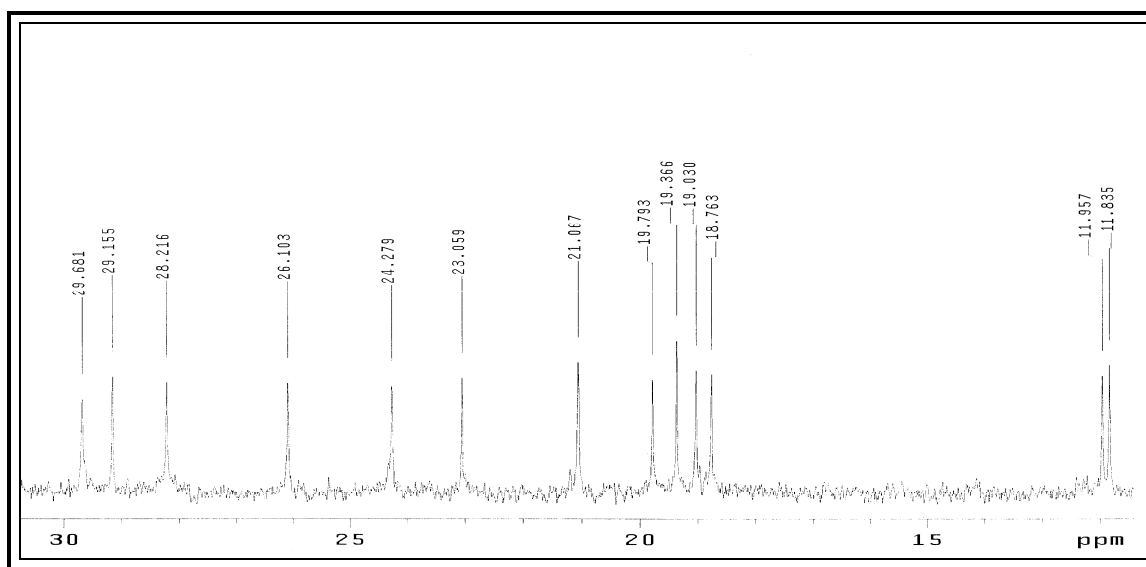
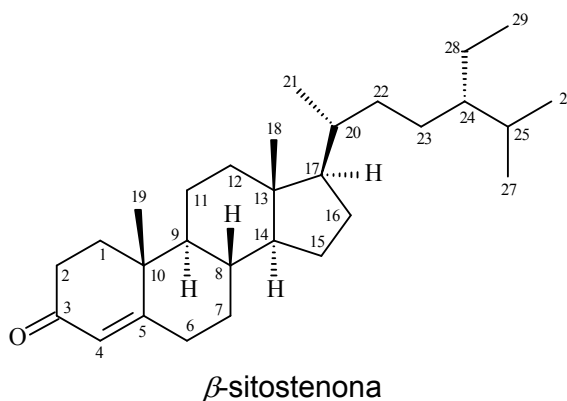


Figura 54: Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância KC 11 [região de  $\delta$  30 a  $\delta$  10 (ppm)].

6.4.2 IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA **KC 10**

A substância **KC 10** foi isolada do extrato hexânico do caule de *K. coriacea* como um sólido cristalino incolor.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 55-56, p.94) (Tabela 23, p.96) apresentou o mesmo padrão de sinais dos hidrogênios metílicos da substância **KC 11**, porém com um maior deslocamento. Apresentou singletos em  $\delta$  0,72 e  $\delta$  1,91 correspondentes aos hidrogênios metílicos, dubletos em  $\delta$  0,85 e  $\delta$  0,93 e um tripleto em  $\delta$  0,84 atribuídos aos hidrogênios metílicos da cadeia lateral e um singlete em  $\delta$  5,73 correspondente a um hidrogênio olefínico. A ausência do sinal correspondente a um hidrogênio carbinólico e o maior deslocamento do restante dos sinais sugeriu a existência de um grupo carbonila em C-3.

As análises dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 57, p.95) (Tabela 24, p.97) e DEPT-135° (Figura 58, p.95) confirmaram a presença da carbonila através do sinal em  $\delta$  199,7 (C) característico de carbono carbonílico de cetonas. Este espectro apresentou sinais em  $\delta$  123,7 (CH) e  $\delta$  171,8 (C) atribuídos a dois carbonos olefínicos em posição  $\alpha$ - $\beta$  a um grupo carbonílico, e seis sinais correspondentes a grupos metílicos na região de  $\delta$  11 a  $\delta$  20.

A comparação dos demais dados espectrais com os dados da substância **KC 11**, e aos obtidos na literatura, permitiu identificar a substância em análise como o esteróide  $\beta$ -sitostenona (GEORGES *et al.*, 2006).

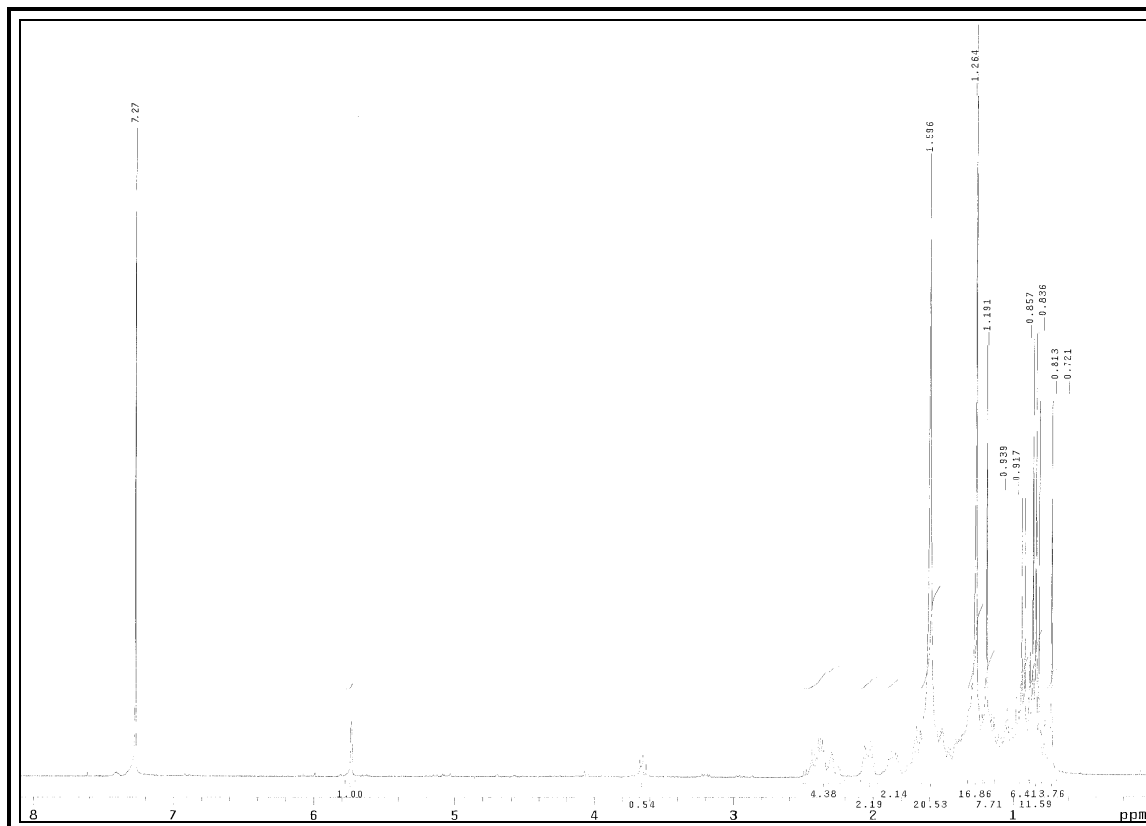


Figura 55: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 10 em  $\text{CDCl}_3$  [300 MHz].

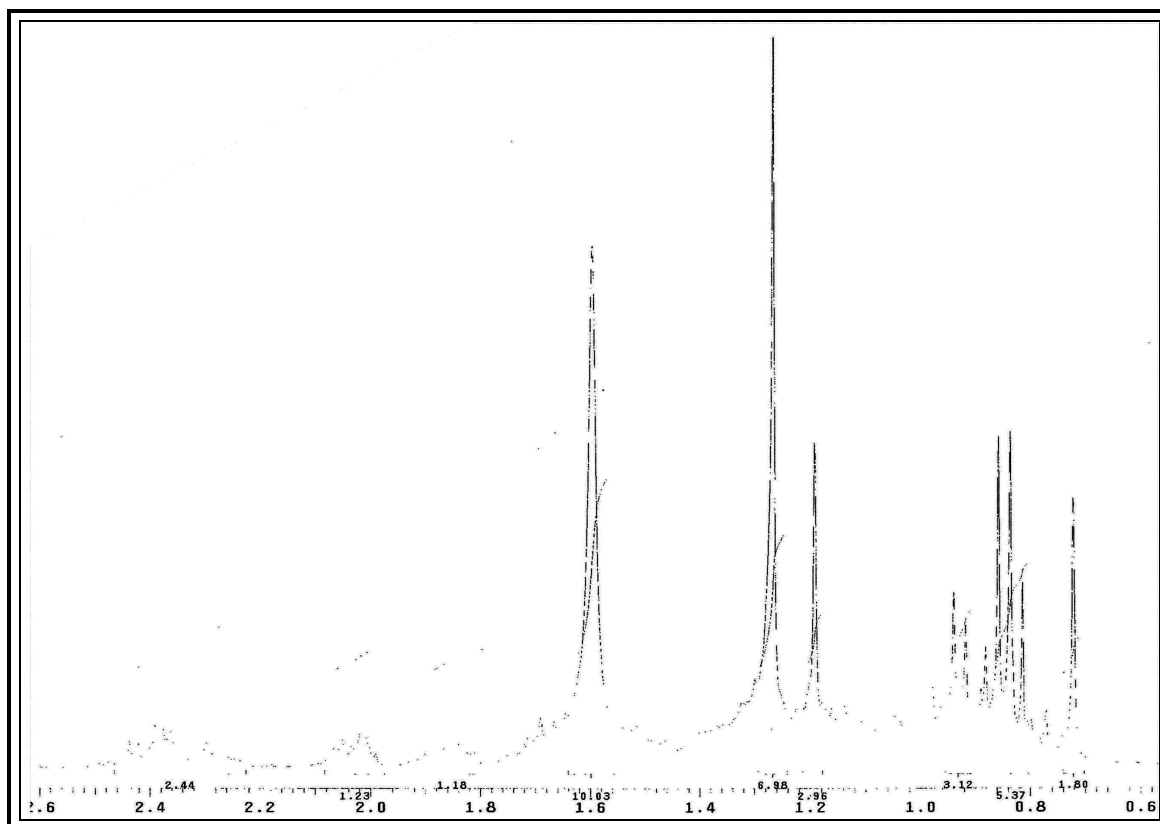


Figura 56: Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância KC 10 [região de  $\delta$  0,6 a  $\delta$  2,6 (ppm)].

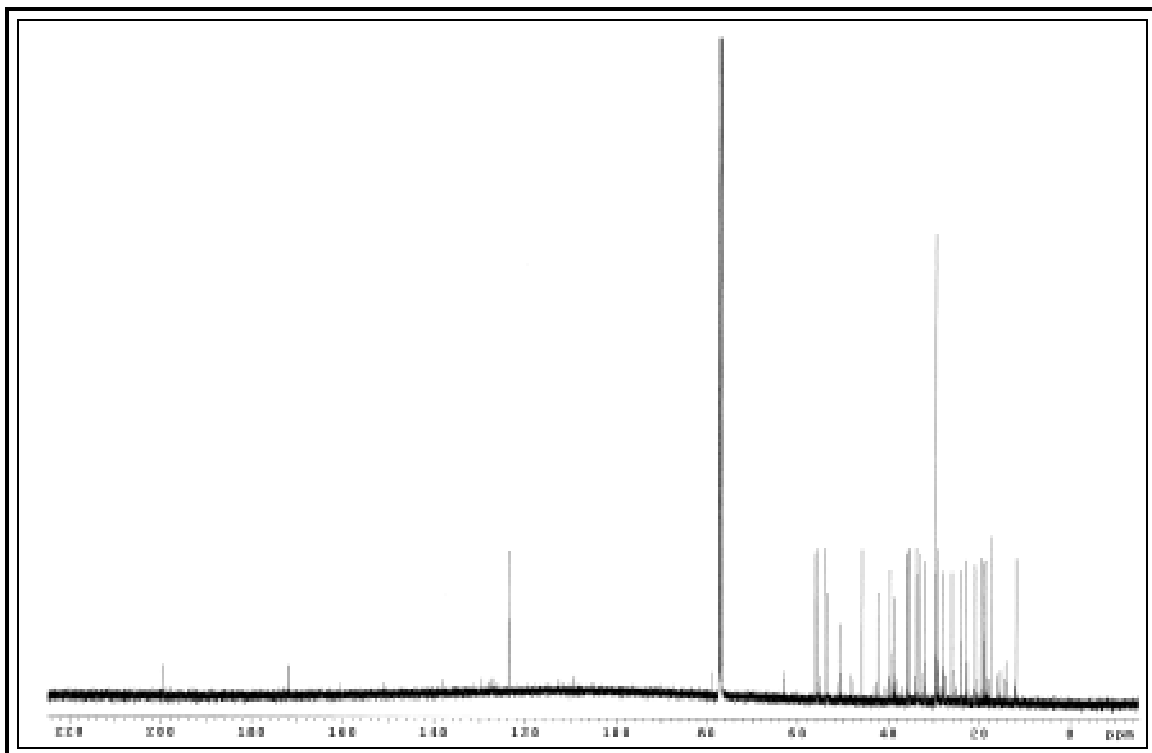


Figura 57: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **KC 10** em  $\text{CDCl}_3$  [75MHz].

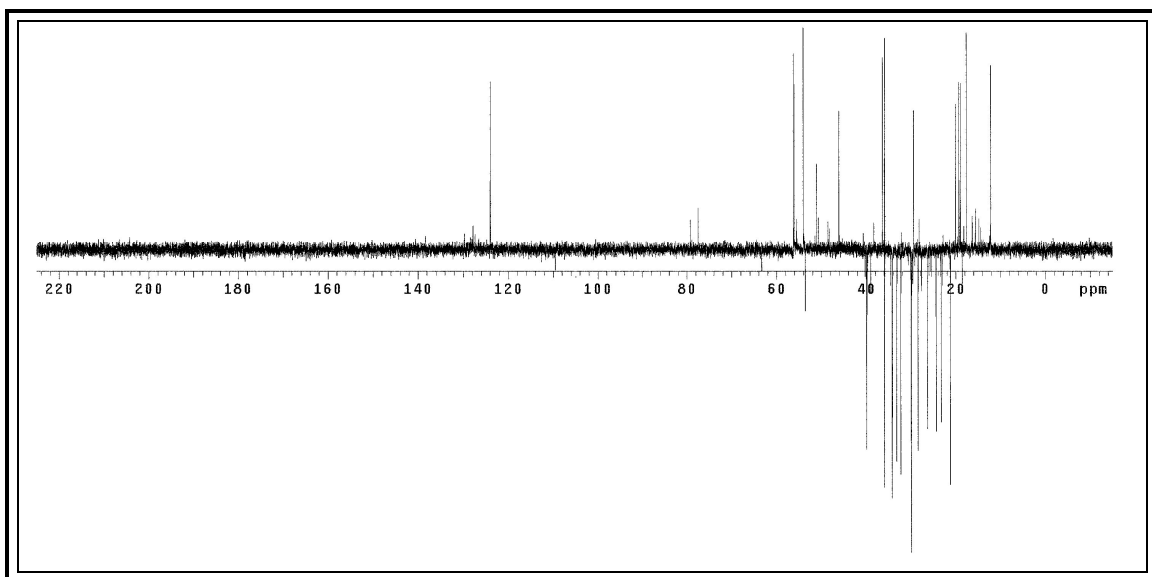


Figura 58: Espectro de RMN DEPT 135° da substância **KC 10** em  $\text{CDCl}_3$  [75MHz].

**Tabela 23:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da substâncias **KC 10** e **KC 11** [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

$^1\text{H}$ $\delta$	KC 10	KC 11
1	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
2	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
3	-	3,51, 1H, m
4	5,73, 1H, s	1,79 – 2,10, m
5	-	-
6	1,79 – 2,10, m	5,34, 1H, d, (4,8)
7	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
8	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
9	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
10	-	-
11	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
12	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
13	-	-
14	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
15	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
16	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
17	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
18	1,19, 3H, s	1,01, 3H, s
19	0,72, 3H, s	0,68, 3H, s
20	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
21	0,93, 3H, d, (6,3)	0,92, 3H, d, (6,3)
22	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
23	1,79 – 2,10, m	1,79 – 2,10, m
24	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
25	2,20 – 2,44, m	2,19 - 2,33, m
26	0,85, 3H, d, (6,3)	0,84, 3H, d, (6,3)
27	0,85, 3H, d, (6,3)	0,84, 3H, d, (6,3)
28	1,79 – 2,10, (m)	1,79 – 2,10, m
29	0,84, 3H, t, (6,6)	0,83, 3H, t, (6,6)

\*J = (Hz)

**Tabela 24:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substâncias **KC 10** e **KC 11** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)].

<b>C</b>	<b>KC 10</b>	<b>KC 11</b>
1	35,7 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )
2	33,9 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )
3	199,7 (C)	71,7 (CH)
4	123,7 (CH)	42,2 (CH <sub>2</sub> )
5	171,8 (C)	140,7 (C)
6	32,9(CH <sub>2</sub> )	121,6 (CH)
7	32,0(CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )
8	35,6 (CH)	31,9 (CH)
9	53,8 (CH)	50,1 (CH)
10	38,6 (C)	36,5 (C)
11	21,0 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )
12	39,6 (CH <sub>2</sub> )	39,8 (CH <sub>2</sub> )
13	42,4 (CH)	42,3 (C)
14	55,9 (CH)	56,7 (CH)
15	24,2 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )
16	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )
17	56,0 (CH)	56,1 (CH)
18	12,0 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )
19	17,4 (CH <sub>3</sub> )	19,4 (CH <sub>3</sub> )
20	36,1 (CH)	36,1 (CH)
21	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,1 (CH <sub>3</sub> )
22	34,0 (CH <sub>2</sub> )	33,9 (CH <sub>2</sub> )
23	26,1 (CH <sub>2</sub> )	26,1(CH <sub>2</sub> )
24	45,8 (CH)	45,8 (CH)
25	29,1 (CH)	29,2 (CH)
26	18,7 (CH <sub>3</sub> )	18,8 (CH <sub>3</sub> )
27	19,8 (CH <sub>3</sub> )	19,8 (CH <sub>3</sub> )
28	23,1 (CH <sub>2</sub> )	23,1 (CH <sub>2</sub> )
29	11,9 (CH <sub>3</sub> )	12,0 (CH <sub>3</sub> )

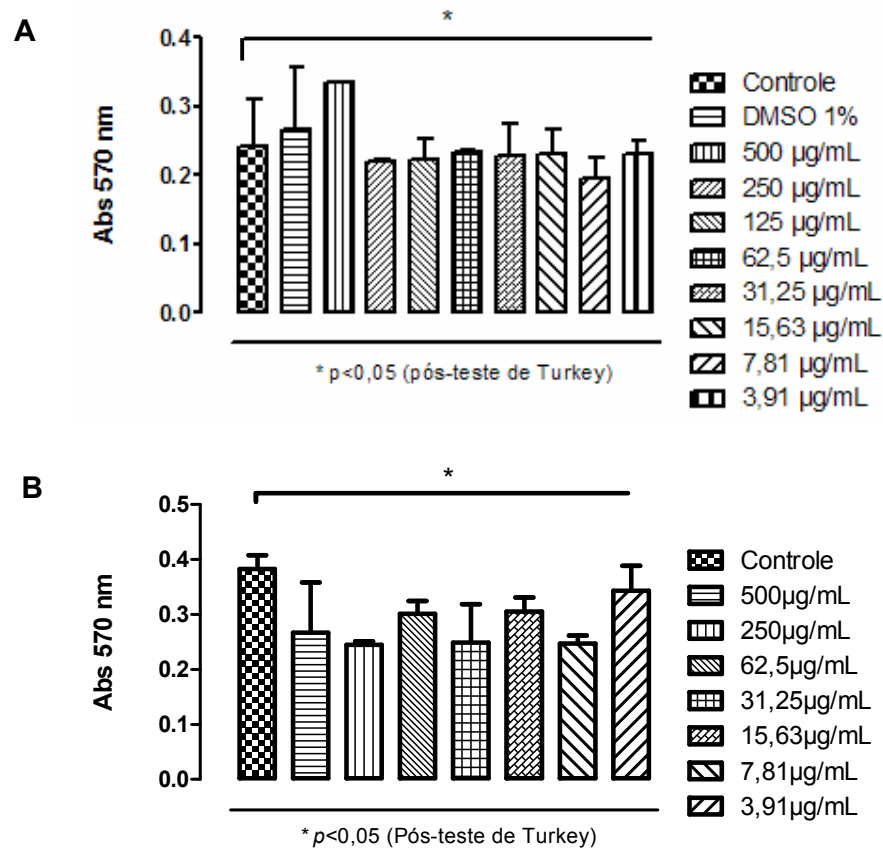


## 7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 7.1 RESULTADOS

#### 7.1.1 Avaliação da toxicidade em esplenócitos através do método de Mosmann modificado

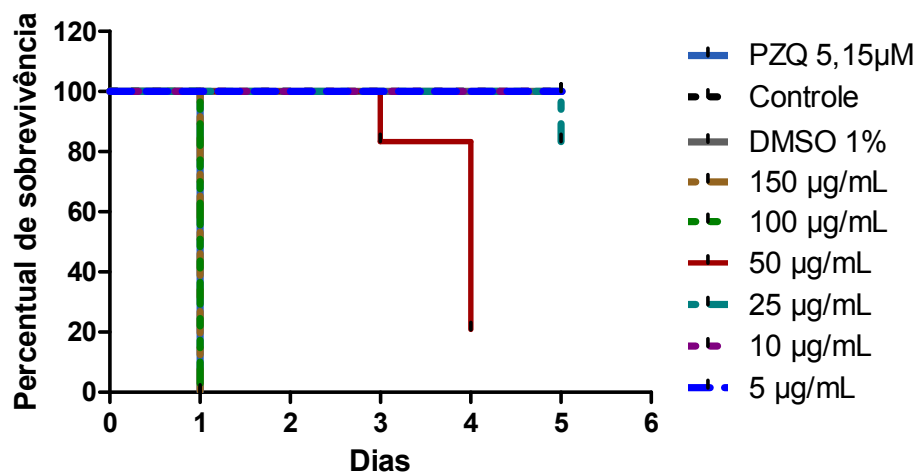
Os extratos em acetato e hexânico com 24 horas, não apresentaram toxicidade nas concentrações avaliadas em esplenócitos (Figura 59).



**Figura 59:** Produção de formazan (método do MTT) em esplenócitos tratados com o extrato acetato (A) e hexânico (B) de *K. coriacea*, respectivamente.

### 7.1.2 Análise *in vitro* do extrato sobre o *S. mansoni*

O extrato em acetato apresentou atividade esquistossomicida de 100% a partir da concentração de 100 µg/mL com apenas 1 dia de monitoramento (Figura 60). Além disso, a ED<sub>50</sub> calculada foi de 39,35 µg/mL, sendo uma concentração bastante reduzida quando comparada às avaliadas em esplenócitos.



**Figura 60:** Porcentagem da sobrevivência de casais de vermes adultos tratados em diferentes concentrações do extrato acetato durante 5 dias.

### 7.1.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O extrato hexânico mostrou baixa inibição frente a cepas de *M. luteus* e *S. aureus* nas concentrações de 250 e 500 µg/mL (Tabela 25, p.105). Para os demais microrganismos não se observou inibição nas concentrações testadas. O extrato acetato apresentou atividade moderada frente a cepas de *S. aureus* e *S. mutans* na concentração de 62,5 µg/mL (Tabela 25, p.105). Para os demais micro-organismos não se observou inibição nas concentrações testadas.

As substâncias isoladas do extrato hexânico não apresentaram atividade antimicrobiana frente às concentrações utilizadas (Tabela 26, p.105).

Tabela 25: Valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos hexânico e acetato do caule de *K. coriacea*.

Microorganismos	MIC (µg/mL)		Controle
	EHKC	EAKC	
<i>M. luteus</i>	250	> 500	3,9
<i>S. aureus</i>	500	62,5	3,9
<i>S. mutans</i>	> 500	62,5	3,9
<i>B. subtilis</i>	> 500	> 500	3,9
<i>E. coli</i>	> 500	> 500	1,9
<i>S. choleraesuis</i>	> 500	> 500	1,9
<i>P. aeruginosa</i>	> 500	> 500	1,9

\*Bactérias Gram-positivas: cloranfenicol; \*Bactérias Gram-negativas: gentamicina.

Tabela 26: Valores de Concentração Inibitória Mínima das substâncias isoladas de *K. coriacea*.

Microorganismos	MIC (µg/mL)											
	KC 1	KC 2	KC 1 e KC 2	KC 1, KC 2 e KC 3	KC 4, KC 5 e KC 6	KC 7	KC 8	KC 9	KC 10	KC 11	Controle	
<i>M. luteus</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9
<i>S. aureus</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9
<i>S. mutans</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9
<i>B. subtilis</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	3,9
<i>E. coli</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	1,9
<i>S. choleraesuis</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	1,9
<i>P. aeruginosa</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	1,9

\*Bactérias Gram-positivas: cloranfenicol; \*Bactérias Gram-negativas: gentamicina.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato hexânico do caule com cascas da espécie *Kielmeyera coriacea* levou a identificação de onze metabólitos secundários, sendo seis neoflavonóides, onde um deles é inédito como produto natural, de duas xantonas, do triterpeno lupenona e dois esteróides  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitostenona.

As xantonas encontradas já haviam sido isoladas em espécies dos gêneros *Pentapthalangium*, *Hypericum*, *Garcinia* e *Vismia*. Porém, este é o primeiro relato destas substâncias no gênero. Entretanto, as estruturas lineares das mesmas xantonas já foram descritas anteriormente na mesma espécie por Souza (1999).

Observamos que a espécie *K. coriacea* apresentou neoflavonóides como seus principais constituintes. Até este trabalho, não há nenhum registro sobre a ocorrência de neoflavonóides nessa espécie. Este fato levantou uma suspeita sobre a identidade botânica da espécie. Como a espécie *K. coriacea* apresenta duas subespécies e sete variedades, a classificação do espécime utilizado neste trabalho ainda está sob estudo. Dos seis neoflavonóides, três foram identificados em mistura. Os neoflavonóides isomammeigin e mesuagin ainda não tinham sido isolados no gênero *Kielmeyera*. E o neoflavonóide ponnalide foi encontrado apenas no gênero *Kielmeyera*. Os resultados apresentados mostraram a co-ocorrência de neoflavonóides e xantonas comum em espécies de *Kielmeyera* da Chapada Diamantina, uma região de fronteira entre o cerrado, na região sudoeste em que as espécies apresentaram predominantemente xantonas e a restinga no litoral baiano onde as espécies nativas apresentaram uma predominância de neoflavonóides.

O extrato hexânico mostrou baixa inibição frente a cepas de *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. O extrato acetato apresentou atividade moderada frente a cepas de *S. aureus* e *Streptococcus mutans*. As substâncias isoladas não apresentaram atividade antimicrobiana. O extrato acetato apresentou alta atividade esquistosomicida e um baixo valor para a ED<sub>50</sub> (39,35  $\mu$ g/mL). Os extratos hexânico e acetato não apresentaram citotoxicidade.

Como sugestões para futuros trabalhos ficam a continuação do estudo do extrato hexânico de *K. coriacea* assim como todo o extrato acetato obtido. Recomenda-se iniciar pelo estudo do extrato acetato e das possíveis atividades biológicas de suas substâncias, uma vez que o extrato apresentou boa atividade esquistosomicida e bactericida.

**9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, C.B. de; OBICI, S.; CARRARA, M.A.; CORTEZ, D.A.G.; BATISTA, M.R.; AUDI, E.A. Atividade da fração diclorometano de caule de *Kielmeyera coriacea* no metabolismo hepático de ratos: **dosagem de glicose, uréia, L-lactato e piruvato**. I CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ. 2007. Arq Mudi. 2007;11(Supl 1).

ALMEIDA, M.F. de. **Derivados poliprenilados do floroglucinol e xantonas de *Kielmeyera lathrophyton* – CLUSIACEAE**. 2008. 109 f. (Dissertação - Mestrado), UFBA, Salvador, BA.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA, Jr.A.; ZANI, C.L.; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367, 2000.

ARELLO, E.F. **Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* a Martius (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/UFLA, 1991, 148 f (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).

AUDI, E. A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J. V. C.; CORTEZ, D.A.G. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. **Fitoterapia**, 73: 517-519, 2002.

BALA, K.R. and SESHADRI, T.R., **Phytochemistry**, 1131, 1971. (BALA et al, 1971)

BANDARANAYAKE, W.M., SELLIAH, S.S., SULTANBAWA, M.U.S., and GAMES, D.E., **Phytochemistry**, 265, 1975.

BARROS, M.A.G. e. **Floração sincrônica e sistemas reprodutivos em quatro espécies de *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae)**. *Acta Bot. Bras.*, vol.16, n.1, pp. 113-122, 2002.

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

CADDAH, M.K. **Estudos taxonomicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Clusiaceae)**. Dissertação (mestrado em Biologia Vegetal). Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CARDONA, M.L., FERNANDEZ, M.I., PEDRO, J.R., SERRANO, A. **Phytochemistry** 29, 3003, 1990.

CARPENTER, I., MCGARRY, E.J., and SCHEIMANN, F., **Tetrahedron Lett.**, 3983, 1970.

CARPENTER, I., MCGARRY E.J., and SCHEIMANN, F., **J. Chem. Soc. C**, 3783, 1971.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; DE OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos Isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, 21, 6, 740-743, 1998.

CHAKRABORTY, D. P.; CHATTERJEE, D. Structure of Mesuagin. A New 4-Phenylcoumarin. **The Journal of Organic Chemistry**, 34, 12, p. 3784-3786, 1969.

CHAKRABORTY, D. P.; CHATTERJEE, D.; GUHA, S. "On mesuol and isomesuol. A regiospecific synthesis of isomesuagin. **Journal of the Indian Chemical society**. 62, 12, 993-998, 1985.

CIARKE, G.D., CROMBIE, L., Whiting, D.A. Conversion of phenols into chromenes: regiospecificity and scope. **J.C.S. Perkin**, I 3, 1007-1015, 1974.

CORRÊA, D. B; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Constituintes da *Kielmeyera corymbosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 1966, 38, 269.

CORRÊA, D. de B.; FONSECA e SILVA, L. G.; GOTTLIEB, O. R.; GONÇALVES, S. J. Quinone and xanthone constituents of *Kielmeyera rupestris*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 447 - 451, 1970.

CORTEZ, D. A. G.; YOUNG, M. C. M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Xanthonés, Triterpenes and Biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, 47, 7, p. 1367-1374, 1998.

CROMBIE, L., JONES, R.C.F., and PALMER, C.J., **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, 317, 1987.

CRUZ, F. G.; MOREIRA, L. M.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S.; CHÁVEZ, J. P. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1363 – 1366, 1998a.

CRUZ, F. G.; SANTOS, N. A. S.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S.; CHÁVEZ, J. P. Coumarins from *Kielmeyera argentea*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 703 – 706, 1998b.

CRUZ, F. G.; SILVA NETO; J. T.; GUEDES, M. L. S. Xanthonés and coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 117 – 122, 2001a.

CRUZ, F. G.; SANTOS, N. A. S.; SOUZA, V. R.; GUEDES, M. L. S. 4-Fenilcumarinas preniladas de *Kielmeyera argentea*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 24, 2001b, Poços de Caldas. **Livro de Resumos**. São Paulo: SBQ, 2001. PN – 115.

CRUZ, F. G.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, N. A. S.; GUEDES, M. L. S. Additional coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p. 704 – 707, 2002.

DISERENS, I.S.; ROGERS, C.; SORDAT, B. and HOSTETTMANN, K. **Phytochemistry**, 31, 313, 1992.

DONNELLY, D. M. X.; BOLAND, G. Neoflavonoids. In: **The Flavonoids Advances in Research since 1986**. Editado por Harbone, J. B. London: Chapman & Hall, 1993, p.238-257.

DUARTE, A. P.; CORRÊA, D. B.; SILVA, L. G. F.; JANOT, S.; GOTTLIEB, O. R. A química de Gutíferas Brasileiras. XVI- *Kielmeyera rupestris* n. sp.. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1968, 40, 307-311.

ELLOF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FERREIRA, G. A. L.; GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L. Xanthones from *Kielmeyera species*. **Phytochemistry**, 1972, 11, 1512-1513.

FILADELFO, C.R. **Avaliação *in vitro* de fármacos pró-oxidantes sobre o *Schistosoma mansoni***. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA.

FINNEGAN, R.A. and MUELLER, W.H., **Chem. Ind. (London)**, 1065, 1964.

FINNEGAN, R.A. and MUELLER, W.H., **J. Org. Chem.**, 2342, 1965.

FINNEGAN, R. A.; MENKEL, K. E.; BACK, N. *The Journal of Pharmaceutical Sciences* **1972**, 61, 1599.

FOGLIO, M.A.; OLIVEIRA, M.C.B.L. de; RODRIGUES, R.A.F.; SOUSA, I.M.O.; AMARAL, M.C.E. do; BITTRICH, V.; ALENCAR, S.M. de; CABRAL, E.; NIGRA, J.M. R.; EBERLIN, M.N.; CARVALHO, J.E. de. Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos e frações obtidos da *Kielmeyera coriacea* L. (Guttiferae). In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. **Livro de Resumos**. São Paulo: SBQ, 2007.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R.E.; COSENTINO, L.M.; BALLAS, L.M.; JIANG, J.B.; JANZEN, W.P.; CHAEN, I.S.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum* and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, **Journal of Natural Products**, 57: (2), 243-247, 1994.



GABRIEL, S.J., GOTTLIEB, O.R., 1972. Tovoxanthone from *Tovomita choisyana*. **Phytochemistry** 11, 3035–3036.

GARAZD, M.M.; GARAZD, Ya.L. and KHILYA, V.P. Neoflavones. Natural distribution and spectral and biological properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 1, 2003.

GEORGES, P.; SYLVESTRE, M.; RUEGGER, H.; BOURGEOIS, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. **Steroids**, 71, 647-652, 2006.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; STEFANI, G. M. 1,2,8-Trioxxygenated Xanthones from *Kielmeyera petiolaris*. **Tetrahedron**, v 22, 1785. 1966a.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; CAMEY, M.; MESQUITA, A. A. L.; CORRÊA, D.B. The chemistry of brazilian guttiferæ, v-2,3,4 and 1,3,5-trioxigenated xanthones from *Kielmeyera* species. **Tetrahedron**, v 22, 1777-1784, 1966b.

GOTTLIEB, O.R., **Phytochemistry**, 7, 411, 1968.

GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; SILVA, E. M.; MELO, M. T. Xanthones of *Kielmeyera ferruginea*. **Phytochemistry** 1969, 8, 665.

GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; NAGEM, T. J. Xanthones from *Kielmeyera rubiflora*. **Phytochemistry**, 10, 2253, 1971.

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

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G.; LIMA, R.A. de; CAVALCANTE, S.H.; CARVALHO, M.G. de; BRAZ-FILHO, R.; **Química Nova**, 16(2), 95 1993.

GRAMACHO, R. S., **Estudo Químico do Caule de *Kielmeyera elata* e Aplicações Biológicas de seus Constituintes Químicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

GRAMACHO, R. DA S.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T. DE; QUEIROS, E. M. DE L. R.; NEVES, A. A. and SADDI, N. **Phytochemistry**, 51, 579, 1999.

GUJRAL, V. and GUPTA, S.R. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, 52, 3679, 1979.

HARLEY, R.M., GIULIETTI, A.M., GRILO, A.S. et al. Cerrado, p. 123-152. In: *In: FA JUNCÁ, L FUNCH, W ROCHA (Orgs.). Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

HARPER et al. **Bioquímica**. Editora Atheneu: São Paulo, 2002. 9ª ed.

HEFTMANN, E. Functions of Steroids in Plants. **Phytochemistry**, 14, 891, 1975.

HERBERT, R. B. *The biosynthesis of secondary metabolites*; Champman & Hall: London, 1989, p. 96-119.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003, v. 4, p.43-146.

ITO, J.; CHANG, F.R.; WANG, H.K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 48.(1) anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from *Brazilian propolis*, **Journal of Natural Products**, 64: (10), 1278-1281, 2001.

KUETE, V.; NGUEMEVING, J.R.; BENG, V. P.; AZEBAZE, A.G.B.; ETOA, F.X.; MEYER, M.; BODO, B.; NKENGFAK, A.E. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, 109, 372–379, 2007.

KUNESCH, G.; POLONSKY, J. On the Biosynthesis of Neoflavanoids: Calophyllolide (4-phenylcoumarin). **Chemical Communications**, 1967, 317-319.

KUSUCU, C.; RAPINO, B.; McDERMOT, L.; HADLEY, S. Comparison of the Semisolid Agar Antifungal Susceptibility Test with the NCCLS M-38-P Broth Microdilution test for Screening of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, o. 1224-1227, 2004.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; GILBERT, B.; BONINI, S. E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1101, 1977.

LUCAS, E. M. F., NAGEM, T. J., OLIVEIRA, T. T., SAADI, N. 1,5,6-Triidroxi-7-metoxixantona: Um Novo Produto Natural Isolado de *Kielmeyera marauensis*. In: 22<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Livro de Resumos 2**. Poços de Caldas, MG, 1999, PN-185.

McKEE, T. C.; COVINGTON, C.D.; FULLER, R. W.; BOKESH, H. R.; YOUNG, S., CARDELLINA, J. H.; KADUSHIN, M. R.; SOEJARTO, D. D.; STEVENS, P. F.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Pyranocoumarins from Tropical Species of the Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts in the Nacional Cancer Institute Collection. **Journal of Natural Products**, 61, p. 1252-125, 1998.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some important features. **Phytochemistry**, 36,1517-1575, 1994.

MAHATO, S.B.; SEN, S. Review article number 18: advances in terpenóides research, 1990-1994, **Phytochemistry**, 44: (7), 1185-1236, 1997.

MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis**; Oxford University Press: Oxford, 1994; p. 40-50.

MISI, A. & SILVA, M.G. Chapada Diamantina Oriental Bahia: **geologia e depósitos**. Salvador. Secretaria da Indústria, Comércio e Recursos Minerais. Série Roteiros Geológicos, Salvador, SBG Núcleo BA-SE, 1994, p. 194.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Biodiversidade Brasileira: **avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002, p. 404.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina**. Brasília: MMA, 2005, p. 411.

MONACHE, F. D.; MARTA, M.; Mac-QUHAE, M. M.; NICOLETTI, M. Two New Tocotrienoloic Acids from Fruits of *Clusia grandiflora* Splith. **Gazzetta Chimica Italiana**, 1984, 114, 135.

MOREIRA, L. M. **Estudo químico de *Kielmeyera reticulata* (Guttiferae)**. 1999, 178 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química da UFBA, Salvador, BA.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Meth.**, Palo Alto, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOREL, C., GUILLET, D., OGER, J.M., SERAPHIN, D., SEVENET, T., WIART, C., HADI, A.H.A., RICHOMME, P., and BRUNETON, J., **Phytochemistry**, 50, 1243, 1999.

MURTI, V.V.S., SAMPATH KUMAR, P.S., and SESHADRI, T.R., **Indian J. Chem.**, 255, 1972.

NAGEM, T. J.; SILVA, M. A. Xanthonas e Phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila*. **Phytochemistry**, 27, 9, p. 2961-2962, 1988.

NEWMAN, D.J & CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, 70(3): p. 461-477, 2007.

NIGAM, S. and MITRA, C., **Planta Med.**, 450, 1968.

NOGUEIRA, P.C.L.; ANDRADE, M.S.; ANDRADE, L.M.; MORAES, V.R.S.; RIBEIRO, A.S.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. DO C.E.; FERREIRA, A.G.; ALCÂNTARA, G.B.; LEÃO, K.V.; ALVES, P.B. Chemical constituents from *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 36, 921–924, 2009.

NGUYEN, L.-H. D., VO, H.T., PHAM, H.D., CONNOLLY, J.D. and HARRISON, L.J. Xanthonenes from the bark of *Garcinia merguensis*. **Phytochemistry**, 63, 467–470, 2003.

OLEA, R.S.G.; ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de  $^{13}\text{C}$ . **Química Nova**, 13 (4), p. 278-281, 1990.

OLLIS, W. D. Xanthonenes, Polyisoprenilated Xanthonoids, and Polyisoprenilated “Benzophenones”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **1970**, *supl.* 42, 9-22.

OLIVEIRA, F. F.; NAGEM, T. J.; CASSINI, S. T. A.; MELO, T. M. S.; QUEIROZ, Y. S.; OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, T. T. Xantonas Isoladas das Raízes de *Kielmeyera elata* Saddi (GUTTIFERAE). In: *22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Livro de Resumos 2*. Poços de Caldas, MG, 1999. PN-198.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Regulatory situation of herbal medicines: **A worldwide Review**. World Health Organization, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Traditional Medicine Strategy 2002–2005**. Geneva, World Health Organization, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Parasitic diseases**. Disponível em: <[www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index1.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index1.html)>. Acessado em: 11-02-2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Schistosomiasis, countries or areas atrisk, 2008**. Disponível em:

<[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_ShistoPrevalence\\_ITHRiskMap.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_ShistoPrevalence_ITHRiskMap.png)>. Acesso em: 25 de nov. 2009.

OWEN, P.J. & SCHEINMANN, F. Extractives from Guttiferae. Part XXVI. t Isolation and Structure of Six Xanthones, a Biflavanoid, and Triterpenes from the Heartwood of *Pentaphalangium solomonse* Warb. **J.C.S. Perkin**, 1018-1021, 1974.

PASSOS, M.S.; JESUS, K. de; OLIVEIRA, F.F. de; OLIVEIRA, R.A. de. Ácido 3,4-diidroxibenzóico obtido do estudo químico preliminar do extrato clorofórmico das folhas de *Kielmeyera Cf. neglecta* SAADI. In: XV Seminário de Iniciação Científica e X Seman de Pesquisa e Pós-Graduação. 2009, **Livro de Resumos**. Ilhéus: UESC, 2009. n. 196.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, [S. l.], v. 34, p.527-533, 2004.

PIMENTA, A.; MESQUITA, A. A. L.; CAMEY, M.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Constituintes Xântonicos da *Kielmeyera coriacea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1964, 36, 39.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M.E.; FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* MART (CLUSIACEAE). **Química Nova**, 26, 2, p.157-160, 2003.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, Vol. 25, 1, p. 45-61, 2002.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SARABAN, P.; CHERDTRAKULKIAT, R.; RUCHIRAWAT, S.; V. PRACHAYASITTIKUL. New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *diospyros rubra* lec. **EXCLI Journal**, 9,1-10, 2010.

RAMIREZ, B. et al. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opin. Drug Discov.**, [S. l.], v. 2, p. 53-61, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39, p.603–613, 2001.

RIOS, P.D. **Caracterização tecnológica e produção de painéis de cortiça de *Kielmeyera coriacea* Mart. (pau-santo)**. 2007, 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RUKACHAISIRIKUL, V., RITTHIWIGROM, T., PINSA, A., SAWANGCHOTE, P., TAYLOR, W.C. Xanthones from the stem bark of *Garcinia nigrolineata*. **Phytochemistry**, 64, 1149–1156, 2003.

SADDI, N. 1982. **A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae)**. PhD thesis. Univ. of Reading. UK.

SANTOS, N.A.S. **Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie *Kielmeyera argentea* (Guttiferae): 4-fenil e 4-alkilcumarinas (neoflavonóides)**. 2005. 195 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UFBA, Salvador, BA.

SCARIOT, A.; SOUZA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. CERRADO: **Ecologia, Biodiversidade e Conservação** (Organizadores). Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005.

SILVA, L.G.F.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.A. A Química de Guttíferas Brasileiras XV-Constituintes de *K. rosea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.40, p.155-156, 1968.

SILVA, M.; BITTNER, M.; HOENEISEN, J.; BECERRA, J.; CAMPIS, V.; GONZALEZ, F.; CESPEDES, C.; MARAMBIO, O. **Química de los Triterpenos**; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos: Washington, D.C., 1992.

SILVA-NETO, J.T. **Estudo químico de *Kielmeyera lathrophyton* (Guttiferae)**. 1998, 102 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UFBA, Salvador.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.A.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **Journal Natural Products**, v.66, n.5, p.634-637, 2003.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae. **Rev. Bras. Farm.**, 85(1): 27-31, 2004.

SOBRAL, I.S.; SOUZA-NETA, L.C.; COSTA, G.A.N.; GUEDES, M.L.S.; MARTINS, D.; CRUZ, F.G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19, 3, p. 686-689, 2009.

SOUZA, V. R. **Estudo dos Constituintes Químicos de *Kielmeyera coriacea* e *Kielmeyera sp.*** 1999, 150 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química da UFBA, Salvador.

SOUZA, E.O. de; OLIVEIRA, F.F. de. Estudo químico preliminar das raízes de *Kielmeyera Cf. neglecta* SADDI. In: VIII Seminário de Iniciação Científica da UESC. 2002. **Livro de Resumos**. Ilhéus: UESC, 2002.

SOUZA, V.R. **Triterpenos, xantonas, cumarinas, bifenilas e derivados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e *Kielmeyera coriacea***. 2005. 195 f. (Tese-Doutorado), UFBA, Salvador, BA.

SULTANBAWA, M. S. U. Xanthonoids of Tropical Plants. **Tetrahedron**, 36, p. 1465-1506, 1980.

VEROTA, L.; LOVAGLIO, E.; VIDARI, G.; FINZI, V.P.; NERI, M.G.; RAIMONDI, A. ; PARAPINI, S.; TARAMELLI, D. ; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E. 4-Alkyl- and 4-



phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. **Phytochemistry**, 65, 2867-2879, 2004.

WORLDLINGO. Disponível em: <<http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/ptkielmeyera>>. Acessado em: 11-02-2010.

WU, Q.-L., WANG, S.-P., Du, L.-J., YANG, J.-S. and XIAO, P.-G. Xanthones from *Hypericum japonicum* and *H. henry*. **Phytochemistry**, vol 38, 4, 1395-1402, 1998.