



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

**HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS**

**Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton*  
(Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e  
4-alkilcumarinas frente a células de glioblastoma humano**

Salvador

2016

HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS

**Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton*  
(Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e  
4-alkilcumarinas frente a células de glioblastoma humano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química – área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz

Salvador

2016

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Boness, Heiter Valverde Magalhães

Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton* (Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e 4-alquilcumarinas frente a células de glioblastoma humano / Heiter Valverde Magalhães Boness. -- Salvador, 2016.

155 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2016.

1. *Kielmeyera*. 2. 4-alquilcumarinas. 3. 4-fenilcumarinas. 4. xantonas. 5. atividade citotóxica. I. Cruz, Prof. Dr. Frederico Guaré. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

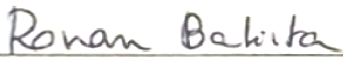
HEITER VALVERDE MAGALHÃES BONESS

“Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton* (Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e 4-alquilcumarinas frente a células de glioblastoma humano”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz   
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lourdes Cardoso de Souza Neta   
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Ronan Batista   
Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 07 de outubro de 2016.



A Hermínio (*in memoriam*)  
pela inspiração durante minha infância.

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e confiança depositados em mim, e em especial à Andressa, presente desde o início desta jornada.

Ao Prof. Dr. Frederico Guaré, pelas conversas e orientações.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nídia F. Roque por ter me encaminhado para a QPN.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Zênis Novais, pela amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Edson Marques, Prof. Dr. Ramon El-Bachá, Cintia e Isis pela realização dos ensaios biológicos no ICS.

Ao Prof. Dr. Paulo Daniel pelo suporte durante às atividades no IFBA.

À Prof.<sup>a</sup> Msc. Maria Lenise S. Guedes pela identificação das espécies.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela Boffo pela convivência diária no LABAREMN.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caline Ferraz, Dr. Mauricio Sforça e Dr.<sup>a</sup> Silvana Rocco por disponibilizar a infra-estrutura do laboratório de RMN do LNBio/CNPEM.

À Carina Hosana e Beni pela amizade, discussões e os trabalhos em conjunto durante todo o curso.

À Letícia, Mauricio e colegas do LBQM presentes no dia-a-dia no lab.

Aos demais colegas do GESNAT e do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPESB e FINEP.

***"A primeira condição para modificar a realidade  
consiste em conhecê-la."***

*As Veias Abertas da América Latina,*

*Eduardo Galeano*

BONESS, H. V. M. **Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton* (Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e 4-alquilcumarinas frente a células de glioblastoma humano.** 155 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo químico dos extratos hexânicos das raízes de *Kielmeyera argentea* e do caule de *Kielmeyera lathrophyton* (Calophyllaceae) e a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* de 4-fenil e 4-alquilcumarinas frente a linhagem de células U251 de glioblastoma humano. Através de sucessivos processos cromatográficos do extrato hexânico de *K. argentea*, isolaram-se pela primeira vez no gênero *Kielmeyera* as 4-alquilcumarinas mammea B/BA, mammea B/BA ciclo F e ferruol A e a 4-fenilcumarina mammea A/BB. Verificou-se também a presença das 4-alquilcumarinas mammea B/AB ciclo D e mammea B/AA ciclo D além das substâncias friedelina e  $\delta$ -tocotrienol. A partir do estudo do extrato hexânico de *K. lathrophyton*, relata-se pela primeira vez na família Calophyllaceae a presença das xantonas 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona e 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilxantona assim como a substância 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila. Adicionalmente, isolaram-se as substâncias 7-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metilbutanoil)-10-fenil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-8-ona, 1-hidroxi-7-metoxixantona, friedelina e epifriedelanol. A identificação destas substâncias foram realizadas com base nos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e comparação com a literatura. O ensaio biológico demonstrou que a 4-alquilcumarina mammea B/BA apresentou significativa citotoxicidade com um valor de  $\text{IC}_{50}$  correspondente a  $6,60\ \mu\text{M}$  enquanto que as 4-alquilcumarinas mammea B/BA ciclo F ( $\text{IC}_{50} = 52,26\ \mu\text{M}$ ) e ferruol A ( $\text{IC}_{50} = 37,07\ \mu\text{M}$ ) e a 4-fenilcumarina mammea A/BB ( $\text{IC}_{50} = 27,00\ \mu\text{M}$ ) apresentaram atividade citotóxica moderada frente às células de glioblastoma humano.

**Palavras-chave:** *Kielmeyera*, 4-alquilcumarinas, 4-fenilcumarinas, xantonas, atividade citotóxica.

BONESS, H. V. M. **Estudo químico das espécies *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton* (Calophyllaceae) e avaliação da atividade citotóxica de 4-fenil e 4-alkylcoumarinas frente a células de glioblastoma humano.** 155 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

The present work describes the chemical study of hexanic extract of the roots of *Kielmeyera argentea* and of the stems of *K. lathrophyton* (Calophyllaceae) as well as the evaluation of the cytotoxic activity *in vitro* of 4-phenyl and 4-alkylcoumarins against U251 cell line of human glioblastoma. The compounds mammea B/BA, mammea B/BA cycle F, ferruol A and mammea A/BB were isolated from hexanic extract of *K. argentea* through successive chromatographic processes for the first time in the genus *Kielmeyera*. The presence of 4-alkylcoumarins mammea B/AB cycle D and mammea B/AA cycle D were also observed in addition to the substances friedelin and  $\delta$ -tocotrienol. The xanthenes 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methylxanthone and 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-xanthenes as well as the compound methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate were isolated from the hexanic extract of *K. lathrophyton* and these is reported for the first time in the Calophyllaceae family. In addition, the compounds 7-methoxy-2,2-dimethyl-6-(2-methylbutanoyl)-10-phenyl-2H-8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipyran-8-one, 1-hydroxy-7-methoxystatin, friedelin and epifriedelanol were also isolated. Their structures were elucidated on the basis of 1D and 2D NMR spectroscopic analysis and by comparison with literature data. The biological assay showed that the 4-alkylcoumarin mammea B/BA exhibited significant activity with an  $IC_{50}$  value of 6.60  $\mu$ M while the compounds mammea B/BA cycle F ( $IC_{50}$  = 52,26  $\mu$ M), ferruol A ( $IC_{50}$  = 37,07  $\mu$ M) and mammea A/BB ( $IC_{50}$  = 27,00  $\mu$ M) showed moderate activity against the tumor cells.

**Keywords:** *Kielmeyera*, 4-alkylcoumarins, 4-phenylcoumarins, xanthenes, cytotoxic activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica (em vermelho) das plantas da família Calophyllaceae .....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema biossintético dos derivados de floroglucinol presente em espécies da família Calophyllaceae .....	28
<b>Figura 3.</b> Flor e frutos de um espécime de <i>Kielmeyera argentea</i> .....	37
<b>Figura 4.</b> Flores e frutos de um espécime de <i>Kielmeyera lathrophyton</i> .....	38
<b>Figura 5.</b> Espécime de <i>K. argentea</i> coletado para o estudo fitoquímico nas restingas do Parque Metropolitano do Abaeté, Salvador-Bahia .....	43
<b>Figura 6.</b> Espécime de <i>K. lathrophyton</i> coletado para o estudo fitoquímico na região do Morro do Pai Inácio, Palmeiras, Chapada Diamantina –Bahia .....	43
<b>Figura 7.</b> Procedimento experimental para obtenção do extrato hexânico (EH) e extrato acetato de etila (EAE) das raízes de <i>K. argentea</i> .....	44
<b>Figura 8.</b> Procedimento experimental para obtenção e fracionamento do extrato hexânico (EH) do caule de <i>K. lathrophyton</i> e metilação das frações KLH-03, 04 e 05 .....	45
<b>Figura 9.</b> Preparação da nitrosometiluréia a partir da acetamida .....	46
<b>Figura 10.</b> Preparação do diazometano a partir da nitrosometiluréia em um reator de destilação .....	47
<b>Figura 11.</b> Fracionamento do extrato hexânico das raízes de <i>K. argentea</i> .....	49
<b>Figura 12.</b> Esquema geral do estudo da fração KAH-A6 .....	50
<b>Figura 13.</b> Esquema geral do estudo da fração KAH-A5 .....	52
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S05. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 286$ nm .....	53
<b>Figura 15.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S06. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 286$ nm .....	53
<b>Figura 16.</b> Esquema geral do estudo das frações KLH-04 e 05 .....	55
<b>Figura 17.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S07. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 268$ nm .....	55
<b>Figura 18.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S08. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 257$ nm .....	56
<b>Figura 19.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S09. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 259$ nm .....	56

<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S10. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 254$ nm .....	57
<b>Figura 21.</b> Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S11. Coluna C18; fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção $\lambda = 433$ nm .....	57
<b>Figura 22.</b> Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>K. argentea</i> .....	60
<b>Figura 23.</b> Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>K. lathrophyton</i> .....	61
<b>Figura 24.</b> Estrutura química da substância S01 .....	62
<b>Figura 25.</b> Estrutura química parcial da substância S01 .....	63
<b>Figura 26.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S01 .....	64
<b>Figura 27.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S01 .....	64
<b>Figura 28.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S01 .....	64
<b>Figura 29.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S01 .....	65
<b>Figura 30.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S01 .....	65
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da substância S01 .....	66
<b>Figura 32.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (região entre $\delta$ 0,5 - 2,5) da substância S01..	67
<b>Figura 33.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (região entre $\delta$ 2,8 - 5,5) da substância S01..	67
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C [125 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da substância S01 .....	68
<b>Figura 35.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da substância S01 .....	69
<b>Figura 36.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da substância S01 .....	69
<b>Figura 37.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S01 .....	70
<b>Figura 38.</b> Estrutura química da substância S02 .....	72
<b>Figura 39.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S02 .....	73
<b>Figura 40.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S02 .....	74
<b>Figura 41.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e estrutura química parcial da substância S02 .....	74
<b>Figura 42.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (ppm) e correlações <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C ( <sup>2</sup> J <sub>CH</sub> e <sup>3</sup> J <sub>CH</sub> ) observadas no experimento de gHMBC da substância S02 .....	75
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H [500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ (ppm)] da substância S02 .....	76
<b>Figura 44.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (região entre $\delta$ 1,0-1,8) da substância S02 ...	77
<b>Figura 45.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (região entre $\delta$ 2,0-5,0) da substância S02 ...	77

<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S02 .....	78
<b>Figura 47.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S02 .....	79
<b>Figura 48.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S02 .....	79
<b>Figura 49.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S02 .....	80
<b>Figura 50.</b> Estrutura química da substância S03 .....	82
<b>Figura 51.</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) e estrutura química parcial da substância S03 .....	83
<b>Figura 52.</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) e estrutura química parcial da substância S03 .....	84
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S03 .....	85
<b>Figura 54.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 0,8-2,0) da substância S03.	86
<b>Figura 55.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 3,0-5,5) da substância S03.	86
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S03 .....	87
<b>Figura 57.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S03 .....	88
<b>Figura 58.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S03 .....	88
<b>Figura 59.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S03 .....	89
<b>Figura 60.</b> Estrutura química da substância S04 .....	91
<b>Figura 61.</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância S04 .....	92
<b>Figura 62.</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) e correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância S04 .....	93
<b>Figura 63.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S04 .....	94
<b>Figura 64.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 0,5 - 2,5) da substância S04 .....	95
<b>Figura 65.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 3,0 - 5,5) da substância S04 .....	95
<b>Figura 66.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S04 .....	96
<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN de DEPT 135 [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S04 ..	96
<b>Figura 68.</b> Espectro gHMQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S04 .....	97
<b>Figura 69.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S04 .....	97
<b>Figura 70.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S04 .....	98
<b>Figura 71.</b> Estruturas químicas das substâncias S05 e S06 .....	100



<b>Figura 72.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S05 .....	101
<b>Figura 73.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S06 .....	101
<b>Figura 74.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S05 .....	102
<b>Figura 75.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S06 .....	102
<b>Figura 76.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S05 .....	103
<b>Figura 77.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S06 .....	103
<b>Figura 78.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 0,5 - 4,0) da substância S05 .....	104
<b>Figura 79.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 0,5 - 4,0) da substância S06 .....	105
<b>Figura 80.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC das substâncias S05 e S06 .....	106
<b>Figura 81.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC das substâncias S05 e S06 .....	107
<b>Figura 82.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S05 .....	108
<b>Figura 83.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S06 .....	108
<b>Figura 84.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S05 .....	109
<b>Figura 85.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S06 .....	110
<b>Figura 86.</b> Estrutura química da substância S07 .....	112
<b>Figura 87.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substâncias S07 .....	113
<b>Figura 88.</b> Deslocamentos químicos dos grupos metílicos do anel pirânico em 4-fenilcumarinas isoladas em <i>K. reticulata</i> (CRUZ et al., 1998). Figura adaptada. ....	114
<b>Figura 89.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância S07 .....	114
<b>Figura 90.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [600 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S07 .....	115
<b>Figura 91.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 0,8-2,0) da substância S07 .....	116
<b>Figura 92.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 3,0 - 6,5) da substância S07 .....	116
<b>Figura 93.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [150 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S07 .....	117
<b>Figura 94.</b> Espectro de gHMBC [600 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S07 .....	118

<b>Figura 95.</b> Ampliações do espectro de gHMBC da substância S07 .....	119
<b>Figura 96.</b> Estrutura química da substância S08 .....	121
<b>Figura 97.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância S08 .....	122
<b>Figura 98.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S08 .....	123
<b>Figura 99.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S08 .....	124
<b>Figura 100.</b> Espectro gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S08 .....	125
<b>Figura 101.</b> Espectro gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S08 .....	125
<b>Figura 102.</b> Ampliações do espectro gHMBC da substância S08 .....	126
<b>Figura 103.</b> Estrutura química da substância S09 .....	128
<b>Figura 104.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e estrutura parcial da substância S09 .....	129
<b>Figura 105.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e estrutura parcial da substância S09 .....	129
<b>Figura 106.</b> Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância S09 .....	130
<b>Figura 107.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [600 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S09 .....	131
<b>Figura 108.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (região entre $\delta$ 6,7 - 7,7) da substância S09 .....	131
<b>Figura 109.</b> Espectro de gHMBC [600 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S09 .....	132
<b>Figura 110.</b> Ampliações do espectro de gHMBC da substância S09 .....	133
<b>Figura 111.</b> Estruturas químicas das substâncias S10 e S11.....	135
<b>Figura 112.</b> Estrutura química parcial das substâncias S10 e S11 .....	136
<b>Figura 113.</b> Estrutura química parcial das substâncias S10 e S11.....	137
<b>Figura 114.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S10.....	138
<b>Figura 115.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S11 .....	138
<b>Figura 116.</b> Espectro de gHSQC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S10 .....	139
<b>Figura 117.</b> Espectro de gHMBC [500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da substância S10 .....	139
<b>Figura 118.</b> Estrutura química da friedelina .....	141
<b>Figura 119.</b> Estrutura química do $\delta$ -tocotrienol .....	141
<b>Figura 120.</b> Estrutura química do epifriedelanol .....	142

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de metabólitos secundários isolados na família Calophyllaceae .....	25
<b>Tabela 2.</b> 4-Alquil e 4-fenilcumarinas isoladas no gênero Kielmeyera .....	32
<b>Tabela 3.</b> Citotoxicidade de 4-alkuil e 4-fenilcumarinas [IC <sub>50</sub> (μM)] frente a células da linhagem U251 de glioblastoma humano. Adaptada de REYES-CHILPA <i>et al.</i> (2004).....	40
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC da substância S01 .....	71
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC da substância S02 .....	81
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC da substância S03 .....	90
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC da substância S04 .....	99
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC das substâncias S05 e S06 .....	111
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e HMBC da substância S07 .....	120
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC e HMBC da substância S08 .....	127
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e gHMBC da substância S09 .....	134
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, HSQC e HMBC da substância S10 e dados de RMN de <sup>1</sup> H da substância S11 .....	140
<b>Tabela 13.</b> Citotoxicidade das substâncias S01 à S04 [IC <sub>50</sub> (μM)] frente a células U251 de glioblastoma humano .....	144

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt = acetato de etila  
APG = Angiosperm Phylogeny Group  
BFG = Brazil Flora Group  
BIS = bifenila sintase  
BPS = benzofenona sintase  
BUS = isobutilfenona sintase  
CC = cromatografia em coluna  
CCDC = cromatografia em camada delgada comparativa  
CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa  
CDCl<sub>3</sub> = clorofórmio deuterado  
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência  
COSY = Correlation Spectroscopy  
DCM = diclorometano  
DMSO = dimetilsulfóxido  
DEPT = Distortionless Enhancement by Polarization Transfer  
IC<sub>50</sub> = concentração da droga que induz metade do efeito máximo  
EH = extrato hexânico  
Hex = hexano  
HMBC= Heteronuclear Multiple Bond Correlation  
HMQC = Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation  
HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence  
*J* = constante de acoplamento  
MeOH = metanol  
MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
RMN = ressonância magnética nuclear  
RMN de <sup>13</sup>C = ressonância magnética nuclear de carbono-13  
RMN de <sup>1</sup>H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
QPN = química de produtos naturais  
SNC = sistema nervoso central  
TMS = tetrametilsilano  
UV = ultravioleta  
U251 = linhagem de células de glioblastoma humano

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.2 A família Calophyllaceae .....	23
1.2.1 A química da família Calophyllaceae .....	24
1.2.2 Biossíntese de derivados de floroglucinol presentes na família Calophyllaceae..	27
1.3 O gênero <i>Kielmeyera</i> .....	29
1.3.1 A química do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	30
1.3.2 A espécie <i>Kielmeyera argentea</i> .....	37
1.3.3 A espécie <i>Kielmeyera lathrophyton</i> .....	38
1.4 A busca por novas drogas para o tratamento do câncer .....	38
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>43</b>
3.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal .....	43
3.2 Preparação dos extratos orgânicos .....	44
3.2.1 Extratos orgânicos das raízes de <i>K. argentea</i> .....	44
3.2.2 Extrato orgânico do caule de <i>K. lathrophyton</i> .....	45
3.3 Metodologia para preparação do diazometano .....	46

3.4 Métodos cromatográficos .....	47
3.5 Fracionamento do extrato hexânico das raízes de <i>K. argentea</i> .....	49
3.5.1 Estudo da fração KAH-A6 .....	50
3.5.2 Estudo da fração KAH-A5 .....	51
3.6 Estudos das frações KLH-03 e KLH-04 de <i>Kielmeyera lathrophyton</i> .....	54
3.7 Métodos de caracterização .....	58
3.8 Avaliação da atividade citotóxica .....	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
4.1 Constituintes químicos isolados .....	60
4.1.1 Determinação estrutural da substância S01 .....	62
4.1.2 Determinação estrutural da substância S02 .....	72
4.1.3 Determinação estrutural da substância S03 .....	82
4.1.4 Determinação estrutural da substância S04 .....	91
4.1.5 Determinação estrutural da substância S05 e S06 .....	100
4.1.6 Determinação estrutural da substância S07 .....	112
4.1.7 Determinação estrutural da substância S08 .....	121
4.1.8 Determinação estrutural da substância S09 .....	128
4.1.10 Determinação estrutural da substância S10 e S11 .....	135
4.2 Outras substâncias isoladas de <i>Kielmeyera argentea</i> e <i>K. lathrophyton</i> .....	141
4.2.1 Friedelina .....	141
4.2.2 $\delta$ -Tocotrienol .....	141
4.2.3 Epifriedelanol .....	142
4.3. Aspectos quimiossistemáticos do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	143

4.4 Atividade citotóxica de 4-alquil e 4-fenilcumarinas isoladas de <i>K. argentea</i> .....	144
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	146
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	147

## 1. INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais corresponde ao estudo dos metabólitos secundários produzidos pelos organismos vivos. Inicialmente esta era uma área meramente descritiva, pois se restringia ao isolamento e identificação das substâncias biossintetizadas. Porém, a complexidade do papel exercido por estes compostos proporcionou a ampliação da Química de Produtos Naturais em várias vertentes incluindo o estudo das funções desempenhadas por estes metabólitos no próprio organismo assim como também nas interações com outros organismos e o ambiente (DEWICK, 2009; COOPER *et al.*, 2015).

A capacidade dos organismos vivos, em especial as plantas, em sintetizar uma infinidade de metabólitos provém de milhões de anos de evolução dos organismos na Terra. Esta diversidade química está intrinsecamente ligada à diversidade biológica, a qual foi promovida pela especiação e seleção natural no curso da evolução. A partir do século XIX, ampliou-se o entendimento da origem da biodiversidade para além das ideias de Darwin e Wallace, ao compreender que o evento evolutivo fundamental reside em mudanças ao nível dos genes (WILSON, 2012).

O metabolismo de um organismo vivo corresponde ao conjunto de transformações químicas pelas quais passam as substâncias que o constituem. Enquanto os metabólitos primários como, por exemplo, os ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos estão presentes em todos os organismos; os compostos oriundos do metabolismo secundário são característicos de determinados grupos biológicos. Por certo período, estes compostos eram considerados meramente subprodutos do metabolismo primário. Entretanto, compreendem-se atualmente as funções destes metabólitos tais como em um papel adaptativo ao meio, mecanismos de defesa e comunicação (DEWICK, 2009; COOPER *et al.*, 2015; POELMAN *et al.*, 2016).

A influência do ambiente circundante é um fator significativo na diversidade do metabolismo secundário. Um estresse provocado por fatores abióticos como temperatura, disponibilidade hídrica, umidade, salinidade do solo, radiação e até mesmo agentes poluentes como metais pesados, pesticidas e aerossóis pode afetar o crescimento e a produção de metabólitos secundários por parte dos organismos vivos (RAMAKRISHNA *et al.*, 2011). Várias espécies de plantas, por exemplo, estão adaptadas para resistir a uma alta incidência luminosa. Para isso, ocorre uma maior produção de compostos fenólicos



tais como flavonoides, taninos e antocianinas. Estes compostos, os quais caracterizam-se justamente por alta atividade antioxidante, são responsáveis por absorver e dissipar a energia solar e conseqüentemente proteger os tecidos mais internos da radiação ultravioleta (ANDERSEN, 2006; GOBBO-NETO *et al.*, 2007). Outro fator abiótico significativo é o estresse hídrico provocado por períodos de seca, baixa umidade do ar ou capacidade de absorção de água do solo, o qual pode ocasionar, por exemplo, a diminuição da produção de hiperforinas em *Hypericum perforatum* (GRAY *et al.*, 2003).

Uma vantagem evolutiva presente nas plantas para evitar a perda de água por transpiração foi a cutícula vegetal, a qual corresponde à uma camada lipofílica presente nas folhas. As ceras foliares são constituídas normalmente por alcanos, ésteres de ácidos graxos, alcoóis de cadeia longa e ácidos graxos livres, porém algumas espécies podem apresentar ainda triterpenos em sua composição. Uma deficiência hídrica pode ocasionar como resposta um aumento na deposição destas ceras para diminuir a perda de água por evapotranspiração como ocorre em diferentes espécies de café (KITAGAMI *et al.*, 2013). De modo alternativo, outras espécies como, por exemplo, algumas pertencentes ao gênero *Clusia*, apresentam um metabolismo distinto ao realizar a abertura dos estômatos durante a noite para absorção de CO<sub>2</sub>, fixando-o na forma de ácido málico nos vacúolos, para posterior consumo durante a fotossíntese na presença de luz solar (FRANCO, 1998).

A diversidade química do metabolismo secundário está também intrinsecamente ligada às interações existentes entre os organismos vivos. Na Biologia, a hipótese da Rainha Vermelha, proposta por Leigh Van Valen (1973) descreve situações na natureza em que duas espécies competitivas entre si mantêm um equilíbrio dinâmico ao longo da evolução. O termo Rainha Vermelha faz referência ao livro *Alice through the looking glass* de Lewis Carrol (1871), no qual a personagem Alice mostra-se cansada ao perceber que as coisas ao seu redor permaneciam imóveis mesmo estando continuamente em fuga. A Rainha a responde que naquele mundo "é preciso correr o máximo possível para permanecer no mesmo lugar". Ou seja, uma vantagem expressada por uma das espécies em um determinado momento será em seguida superada pelo competidor. Analisando esta hipótese, podem-se citar exemplos clássicos envolvendo uma "corrida armamentista" entre organismos como na relação planta-herbívoro (POELMAN *et al.*, 2016). As plantas desenvolveram um mecanismo de defesa contra herbívoros ao produzir compostos que provocam a morte e/ou afastamento por parte do predador. Em sentido contrário, os herbívoros apresentariam em seguida a capacidade de detoxificação destas substâncias. Pode-se citar como exemplo o papel desempenhado pelo látex na defesa química das

plantas. Esta secreção corresponde a uma emulsão aquosa produzida por células especializadas e é constituída por compostos tais como terpenos, alcaloides, ceras, taninos, proteínas e enzimas proteolíticas. O látex apresenta um papel não somente na defesa contra herbívoros, mas também em uma ação cicatrizante ao promover uma barreira contra infecções microbianas. Por sua vez, exemplificando esta "guerra armamentista", a borboleta monarca (*Danaus plexippus*) não somente contornou a ação deste mecanismo apresentado por plantas latescentes, como também se apropriou destas substâncias (neste caso em específico, os glicosídeos cardiotônicos) para utilizar como defesa contra seu próprio predador (*Cyanocitta cristata*) (LEWINSOHN *et al.*, 2000). Estes casos são exemplos do que a Biologia denomina de coevolução, ou seja, uma adaptação recíproca entre duas espécies em que cada espécie exerceria uma pressão seletiva sobre a outra.

O estudo das substâncias que intermediam as interações entre os organismos vivos corresponde ao campo da Ecologia Química. Ainda no século XVIII, C. K. Sprengel descreveu a importância das flores no processo de reprodução das plantas ao sugerir que o aroma e a coloração destes órgãos serviam para atrair polinizadores (TRIGO *et al.*, 2000). Espécies do gênero *Clusia*, por exemplo, oferecem uma resina como recompensa às abelhas durante o processo de polinização. Investigações fitoquímicas demonstraram a presença de benzofenonas polipreniladas nestas resinas (OLIVEIRA *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Adicionalmente, um estudo realizado por Castro (2009) também demonstrou a presença destas benzofenonas na própolis produzido pelas abelhas. Sugeriu-se que estes compostos, presentes na resina utilizada para a construção dos ninhos, forneçam uma proteção antimicrobiana e antiviral às larvas e provisões presentes na colmeia.

Antes mesmo da compreensão da complexidade do metabolismo secundário nos organismos vivos, os recursos naturais acessíveis ao homem tem sido utilizados para os mais diversos fins. Além do papel desempenhado na alimentação, outra utilidade tão antiga correspondeu ao uso das plantas para fornecimento de fibras naturais, as quais serviam para produção de roupas, redes e cordas. No Crescente Fértil, houve o cultivo inicial do linho (*Linum sp.*), enquanto cânhamo (*Cannabis sp.*) e algodão (*Gossypium sp.*) eram cultivados na China, Índia, Mesoamérica, África subsaariana e América do Sul (DIAMOND, 2013). Ademais, destaca-se uso das plantas no tratamento e prevenção de diversas doenças. Remonta a Hipócrates (460 a.C. - 370 a.C.), citado como o pai da medicina moderna, a indicação do uso das folhas e cascas do salgueiro (*Salix alba*) no

tratamento de febres. A aspirina®, o medicamento atualmente mais consumido do mundo, desenvolvido pela Bayer em 1897, é derivado do ácido salicílico, o qual foi isolado a partir da espécie *Salix alba* (CUNHA *et al.*, 2009; COOPER *et al.*, 2015). Registro ainda mais antigo, por exemplo, o Papiro de Ebers, no Antigo Egito, datado de aproximadamente 1.500 a. C., mostra a indicação de mais de 700 drogas para o tratamento de enfermidades. A medicina tradicional chinesa e o sistema indiano ayurveda também registram uma extensa lista contendo centenas de prescrições datadas desde aproximadamente 1.100 a. C.. Como citado por CRAGG *et al.* (2013), os estudos de *Artemisia annua*, a qual era indicada na medicina chinesa para o tratamento de febres, sintoma característico da malária, resultou no isolamento da artemisinina, a qual corresponde a um dos mais efetivos fármacos no tratamento da malária. De modo similar, a partir das raízes e folhas da espécie *Rauwolfia serpentina*, usada por sua vez na medicina indiana, resultou no isolamento do anti-hipertensivo reserpina.

Atualmente, a Química de Produtos Naturais proporciona inúmeros produtos para a sociedade. Vários compostos oriundos do metabolismo secundário ou derivados destes tem aplicações nas indústrias agroquímica, alimentícia, cosméticos, perfumaria e principalmente na indústria farmacêutica. Inúmeros avanços da biotecnologia e biologia molecular permitiram a possibilidade de se projetar novos fármacos baseado apenas nestes conhecimentos tendo como consequência uma diminuição na busca por novas substâncias produzidas pelos organismos vivos. Porém, nos últimos anos, retomou-se esta busca e o processo de desenvolvimento de novos medicamentos ainda depende muitas vezes da inspiração em produtos naturais. As indústrias farmacêuticas buscam a descoberta de "protótipos" na natureza e os utilizam como ponto de partida para projetar novas drogas (MONTANARI *et al.*, 2001). O impacto da QPN para a indústria farmacêutica pode ser atestado pelo levantamento realizado por Cragg e Newman (2013), o qual demonstra que cerca de 70% dos fármacos são oriundos ou inspirados em produtos naturais.

Visto a contribuição da QPN tanto para o entendimento do funcionamento da natureza quanto para a produção de diversos produtos para a sociedade, torna-se indiscutível a importância de preservação da atual biodiversidade. O Brasil, por exemplo, corresponde ao país detentor da maior biodiversidade de plantas do mundo. Botânicos já registraram um número superior a 40 mil espécies, e em média, cerca de 250 novas espécies são identificadas anualmente no país (BFG, 2015). A situação torna-se crítica ao perceber que os principais biomas do Brasil estão ameaçados devido a fatores como a

expansão agropecuária, queimadas, extração ilegal de madeira, crescimento urbano desordenado e frequentes desastres ambientais provocados por atividade antrópica. Como consequência, inúmeras espécies são extintas sem que tenhamos a chance de estudá-las. Desta forma, cabe continuamente incentivar os estudos abrangendo esta biodiversidade e levantar o debate acerca de uma economia e modo de produção sustentáveis.

## 1.2 A família Calophyllaceae

A família botânica Calophyllaceae é pertencente à ordem de plantas angiospérmicas Malpighiales e engloba aproximadamente 460 espécies, as quais tem ocorrência nas regiões tropicais e temperadas do planeta (**Figura 1**) (STEVENS, 2012). Anteriormente, a maioria dos gêneros incluídos nesta família era pertencentes à tribo Calophylleae da família Clusiaceae (Guttiferae) (NOTIS, 2004). Porém, após reclassificação baseada em estudos filogenéticos desenvolvidos pelo Angiosperm Phylogeny Group, o qual constituiu o sistema APG III, criou-se a família Calophyllaceae formada por 14 gêneros: *Calophyllum*, *Caraipa*, *Clusiella*, *Endodesmia*, *Haploclathra*, *Kayea*, *Kielmeyera*, *Lebrunia*, *Mahurea*, *Mammea*, *Marila*, *Mesua*, *Neotatea*, *Poeciloneuron* (APG III, 2009; RUHFEL, 2011).



**Figura 1.** Distribuição geográfica (em vermelho) das plantas da família Calophyllaceae (STEVENS, 2012)

Os espécimes pertencentes à família Calophyllaceae correspondem a árvores e arbustos, raramente ervas, com canais resinosos ou glândulas oleosas amareladas ou esverdeadas e com estípulas glandulares no talo; são plantas anuais ou perenes, latescentes ou não, apresentando folhas alternas ou opostas. As flores têm sépalas livres,

pétalas normalmente brancas ou rosas e numerosos estames; o androceu não é fasciculado, e as anteras às vezes têm glândulas grandes, apicais. O fruto, quando deiscente, abre ao longo do raio do septo; as sementes variam de pequeno a grande, e quando grande, eles são feitos quase inteiramente de duas enormes cotilédones (JOLY, 1983; BARROSO *et al.*, 2004; STEVENS, 2012).

A espécie *Calophyllum brasiliense*, conhecida popularmente como guanandi, foi largamente utilizada no século XIX como fonte de madeira para a construção naval (SOUZA, *et al.* 2008). Outra espécie com ocorrência no Brasil, *Mammea americana* (abricó-do-pará) fornece um fruto que pode chegar até dois quilogramas, o qual é consumido *in natura* ou usado em compotas, geleias e sucos (FERREIRA *et al.*, 2006). Enquanto que uma infusão preparada a partir das cascas e folhas da espécie *Caraipa densifolia* (camaçari) é usada pela medicina popular no tratamento de doenças de pele causada por fungos, no tratamento contra o reumatismo e até mesma picadas de insetos (SILVEIRA *et al.*, 2010).

### 1.2.1 A química da família Calophyllaceae

Do ponto de vista químico, as espécies da família Calophyllaceae destacam-se pela produção de metabólitos secundários como xantonas (GOTTILIEB *et al.*, 1968; CRUZ *et al.*, 1998; NASIR *et al.*, 2011), 4-alquil e 4-fenilcumarinas preniladas (CRUZ *et al.*, 2001; JOSHI *et al.*, 2013; DANG, *et al.*, 2015), benzofenonas polipreniladas, acilfloroglucinóis e ácidos 3-fenil-3-floroglucinilpropanóicos (CHATURVEDULA *et al.*, 2002; MASSIOT *et al.*, 2005; TAHER *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2011), bifenilas (CORTEZ *et al.*, 2003), xantolignoides (CASTELÃO *et al.*, 1997) (**Tabela 1**) além de triterpenos, esteroides e tocotrienóis (LI *et al.*, 2010; MESQUITA *et al.*, 2011). As xantonas, cuja ocorrência restringe-se a poucas famílias, têm sido utilizadas como marcadores quimiosistemáticos, sobretudo em espécies pertencentes à antiga família Guttiferae (REZENDE, *et al.* 1973; EL-SEEDI *et al.*, 2009). As 4-aquil e 4-fenilcumarinas também tem uma ampla ocorrência principalmente nos gêneros *Mammea* (OUAHOUE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005), *Calophyllum* (GUILLET *et al.*, 2001; GOMEZ-VERJAN *et al.*, 2016) e *Mesua* (AWANG *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Exemplos de metabólitos secundários isolados na família Calophyllaceae

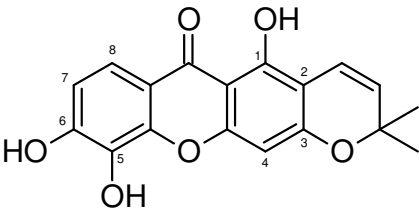
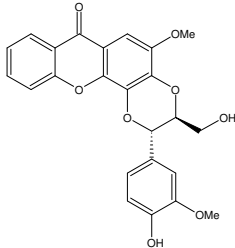
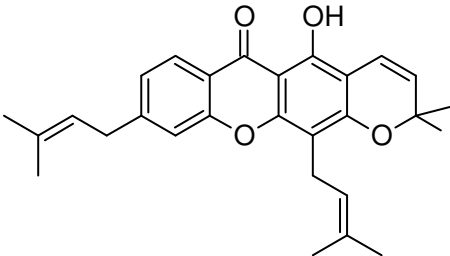
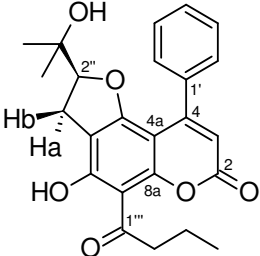
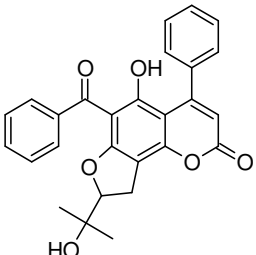
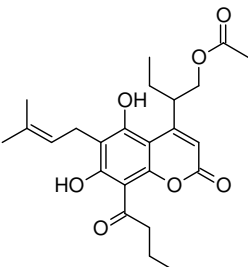
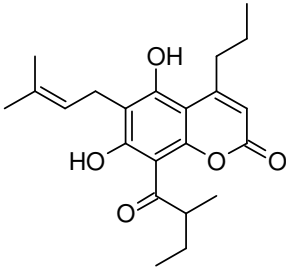
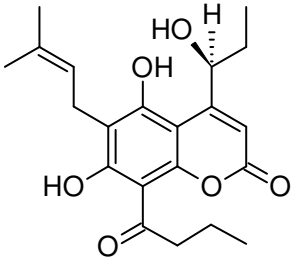
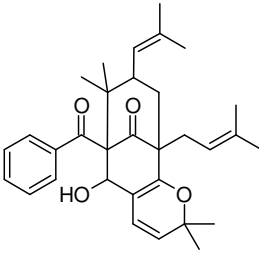
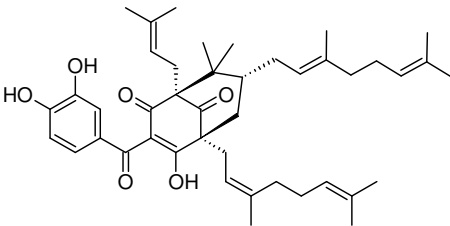
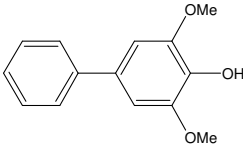
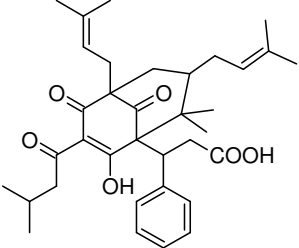
Espécie	Estrutura	Referência
<i>Calophyllum brasiliense</i>		GOTTILIEB <i>et al.</i> , 1968
<i>Caraipa densiflora</i>		CASTELÃO <i>et al.</i> , 1976
<i>Calophyllum nodusum</i>		NASIR <i>et al.</i> , 2011
<i>Calophyllum dispar</i>		GUILLET <i>et al.</i> , 2001
<i>Mammea neurophylla</i>		DANG, <i>et al.</i> , 2015
<i>Mammea americana</i>		YANG <i>et al.</i> , 2005

Tabela 1. Continuação

Espécie	Estrutura	Referência
<i>Mammea africana</i>		OUAHOUE <i>et al.</i> , 2004
<i>Kayaea assamica</i>		LEE <i>et al.</i> , 2003
<i>Ochrocarpos punctatus</i> ( <i>Mammea</i> L.)		CHATURVEDULA <i>et al.</i> , 2002
<i>Calophyllum nervosum</i>		TAHER <i>et al.</i> , 2005
<i>Kielmeyera coriacea</i>		CORTEZ <i>et al.</i> , 2003
<i>Mahurea palustris</i>		MASSIOT <i>et al.</i> , 2005

### 1.2.2 Biossíntese de derivados de floroglucinol presentes na família Calophyllaceae

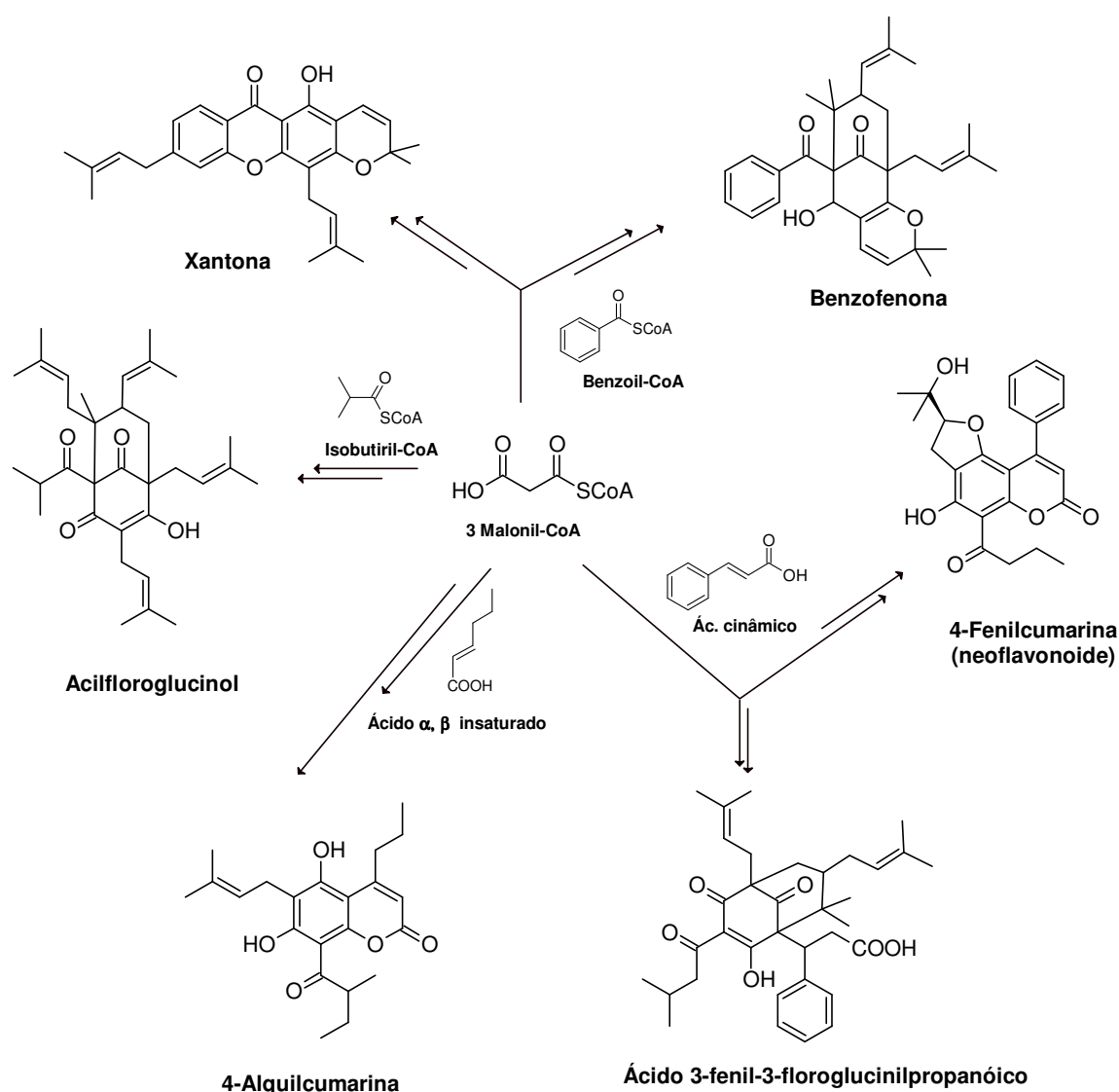
A biossíntese das xantonas, 4-fenil e 4-alquilmumarinas, benzofenonas, acilfloroglucínóis e ácidos 3-fenil-3-floroglucínolpropanóicos estão correlacionados entre si através de um ramo comum: pode-se verificar nestes compostos, a presença de um núcleo floroglucinol (benzeno-1,3,5-triol), cuja formação envolve o acoplamento de três unidades de malonil-CoA. Outro ponto em comum que se destaca nestes compostos é a presença de grupos prenilícos, os quais podem estar ou não ciclizados formando, por exemplo, anéis do tipo pirano ou furano (**Figura 2**).

Na biossíntese das xantonas e benzofenonas, três unidades de malonil-CoA formam o núcleo floroglucinol e acopla-se a uma unidade de benzoil-CoA ou um derivado deste substrato. Esta etapa da reação é catalisada pela enzima benzofenona sintase (BPS), a qual está inserida na classe de policetídeos sintase (PKS) do tipo III. Em um estudo realizado por Schmidt e Beerhues (1997), utilizando culturas de células de *Hypericum androsaemum*, demonstrou-se que há uma maior afinidade com o benzoil-CoA, levando inicialmente à formação da 2,4,6-trihidroxibenzofenona, e uma posterior oxidação a 2,3',4,6-trihidroxibenzofenona. Catalisada por enzimas P450, este substrato é um precursor na biossíntese das xantonas comumente encontrada também nas famílias Gentianaceae e Clusiaceae. Entretanto, Beerhues e Liu (2009) demonstraram que em culturas de células de *Centaurium erythraea* (Gentianaceae), a enzima BPS aceita preferencialmente o derivado 3-hidroxibenzoil-CoA como substrato inicial. Ademais, tanto este substrato quanto a unidade benzoil-CoA são provenientes da rota do chiquimato (WANG *et al.*, 2003). Por sua vez, em um caminho alternativo mediado pela enzima bifênica sintase (BIS), ocorre à formação das bifênicas (LIU *et al.*, 2007)

Na biossíntese das 4-fenilmumarinas, denominados usualmente de neoflavonoides, ocorre o acoplamento da porção floroglucinol com um derivado do ácido cinâmico. Esta proposta, sugerida por Eyton (1966) e colaboradores, envolveria um processo de alquilação do policetídeo por ação do grupo cinamoila. Com o objetivo de investigar a proposta envolvendo estes precursores, Kunesch e Polonsky (1967) realizaram experimentos com brotos de *Calophyllum inophyllum* utilizando [3-<sup>14</sup>C]fenilalanina e os resultados demonstraram uma grande especificidade da incorporação do C-3 da fenilalanina (precursor do ácido cinâmico) no C-4 do neoflavonoide calofilólido. Em um caminho biogênico alternativo envolvendo o acoplamento com o ácido cinâmico, pode não ocorrer a lactonização e assim formar-se os ácidos 3-fenil-3-



floroglucinilpropanóicos. Já na biossíntese das 4-alquilmumarinas, ocorre a alquilação da porção floroglucinol com um ácido  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado e subsequente, lactonização do sistema (EYTON *et al.*, 1966; OLLIS, 1966; RAMIANDRASOA *et al.*, 1983, SEIGLER, 1998). Enquanto que a biossíntese dos acilfloroglucinois ocorre via condensação de três unidades de malonil-CoA e uma unidade de isobutilil-CoA catalisada pela enzima isobutilfenona sintase (BUS). Posteriormente, ocorre sucessivas prenilações catalisadas por enzimas preniltransferases (BEERHUES, 2006).



**Figura 2.** Esquema biossintético dos derivados de floroglucinol presente em espécies da família Calophyllaceae

### 1.3 O gênero *Kielmeyera*

O gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul e reúne cerca de 45 espécies nativas do Brasil, as quais têm ocorrência principalmente nos biomas do Cerrado e da Mata Atlântica (JOLY, 1983; SANTOS *et al.*, 2015; BITTRICH, *et al.*, 2016). Anteriormente, o gênero pertencia à família Clusiaceae (Guttiferae) e juntamente com os gêneros *Marila*, *Mesua*, *Mammea* e *Calophyllum* constituíam a tribo Calophylleae (NOTIS, 2004). Porém, a partir do sistema APG III, o gênero *Kielmeyera* foi incluído na família Calophyllaceae (APG III, 2009; RUHFEL, 2011).

Espécies do gênero *Kielmeyera* têm sido utilizadas pela população no tratamento de diversas enfermidades. Cita-se, por exemplo, o uso de *K. variabilis*, denominada vulgarmente como malva-do-campo, no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas e até mesmo contra esquistossomose, leishmaniose e malária (PINHEIRO *et al.*, 2003). Enquanto que a espécie *K. coriacea*, conhecida popularmente por pau-santo, é usada contra dor de dentes e como emoliente (ARELLO *et al.*, 1993).

Estudos demonstram que extratos brutos de espécies de *Kielmeyera* apresentam significativas atividades biológicas. O extrato diclorometano do caule de *K. coriacea*, no qual Biesdorf e colaboradores (2012) verificaram a presença da bifenila aucuparina e das xantonas 2-hidroxi-1-metoxixantona, swertinina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, apresentou atividade anti-depressiva. O extrato hidroetanólico do caule *K. coriacea* também apresentou atividade anti-úlceras gástricas (GOULART, *et al.*, 2005) e atividades psicotrópicas (MARTINS *et al.*, 2004). O extrato metanólico dos galhos da *K. variabilis* apresentou atividade moluscicida frente a espécie de caramujo *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, o qual é causador de esquistossomose. Verificou-se também que o fracionamento biomonitorado do extrato resultou em uma diminuição da atividade moluscicida, cujo efeito pode estar relacionado a um sinergismo entre as substâncias presentes no extrato bruto (PINHEIRO *et al.*, 2003). Espécies de *Kielmeyera* podem ser fontes também de compostos com atividade frente a bactérias Gram-positivas como demonstrado por Sobral e colaboradores (2009), no qual o extrato diclorometano do caule de *K. cuspidata* apresentou atividade frente a *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

### 1.3.1 A química do gênero *Kielmeyera*

Investigações fitoquímicas em espécies de *Kielmeyera* tem proporcionado verificar a presença de metabólitos secundários que correlacionam o gênero *Kielmeyera* com os demais gêneros da família Calophyllaceae assim como também os estudos tem permitido o isolamento dos compostos responsáveis pela bioatividade dos extratos.

*K. coriacea*, por exemplo, corresponde à espécie com maior número de estudos. Cortez e colaboradores (2003), verificaram que a bifênica aucuparina e a 1,3,7-trihidroxí-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, isoladas a partir do extrato diclorometânico das folhas desta espécie, apresentam atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e que a aucuparina ainda mostrou-se ativa também frente a *Staphylococcus aureus*. Enquanto que a partir do extrato hexânico da casca das raízes, isolou-se um peróxi-dímero do  $\delta$ -tocotrienol, o qual apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células DA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (colón), HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma) (MESQUITA *et al.*, 2011).

A partir do estudo biomonitorado do extrato etanólico dos galhos de *K. variabilis*, obteve-se um novo acilfloroglucinol, o qual também apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina (COQUEIRO *et al.*, 2016). Já o estudo fitoquímico das cascas do caule de *K. albopunctata* resultou no isolamento de uma 4-alquilcumarina, nomeada 4-(1-metilpropil)-5,7-dihidroxí-8-(4-hidroxí-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)cromen-2-ona, a qual foi ativa *in vitro* frente a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, sendo responsável pela morte de 80% do parasita na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  (SCIO *et al.*, 2003).

O gênero *Kielmeyera* sempre foi reconhecido pela presença de xantonas, as quais podem ser consideradas marcadores quimiossistemáticos (REZENDE *et al.*, 1973; VIEIRA *et al.*, 2005). Há relatos também da presença de bifênicas simples (CORTEZ *et al.*, 2003; BIESDORF *et al.*, 2012), quinonas (CORRÊA *et al.*, 2012), tocotrienóis (MESQUITA *et al.*, 2011), triterpenos e esteroides (SOBRAL *et al.*, 2009) e em destaque, as 4-alquil e 4-fenilcumarinas (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Assim como citado anteriormente no tópico referente à biossíntese dos metabólitos secundários presentes na família Calophyllaceae, as xantonas e as 4-alquil e 4-fenilcumarinas são provenientes de uma via biossintética mista e em ambas as vias, a formação do núcleo floroglucinol ocorre a partir de três unidades de malonil-CoA. Revisando os estudos químicos no gênero *Kielmeyera*, verifica-se que além da

predominância de xantonas, a presença das 4-alquil e 4-fenilcumarinas preniladas também se destaca, as quais usualmente as cadeias prenilicas ciclizam e formam anéis do tipo furano (NAGEM *et al.*, 1988) e pirano (CRUZ *et al.*, 2001). De fato, em sete espécies de *Kielmeyera*, a presença das 4-alquil e 4-fenilcumarinas é predominante se comparada à presença de xantonas (**Tabela 2**). Os estudos das espécies *K. argentea* (CRUZ *et al.*, 1998), *K. albopunctata* (SCIO *et al.*, 2003), *K. reticulata* (CRUZ *et al.*, 2002) e *K. rugosa* (NOGUEIRA *et al.*, 2009) resultaram no isolamento de 4-alquil e 4-fenilcumarinas até então inéditas (**Tabela 2**). Observou-se que estes compostos apresentavam oxidações na cadeia acílica (*K. argentea*, *K. reticulata* e *K. rugosa*) ou na cadeia prenilica (*K. elata* e *K. rugosa*). Este fato também é observado em outros gêneros da família Calophyllaceae, incluindo oxidações nas cadeias alquílicas em C-4, como demonstrado por LEE *et al.* (2003) em *Kayea assamica*. Destaca-se ainda que as demais 4-alquil e 4-fenilcumarinas isoladas no gênero *Kielmeyera* estão largamente presentes em espécies dos gêneros *Mammea*, *Mesua* e *Calophyllum*, o que corrobora a proximidade filogenética entre os gêneros da família Calophyllaceae.

Tabela 2. 4-Alquil e 4-fenilcumarinas isoladas no gênero *Kielmeyera*

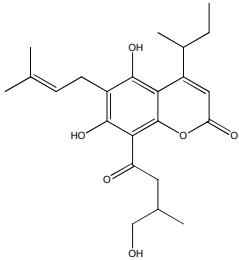
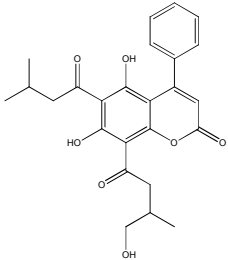
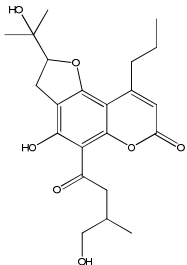
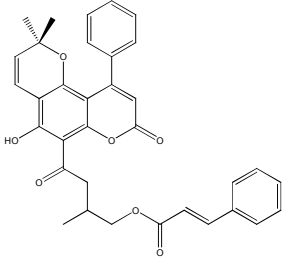
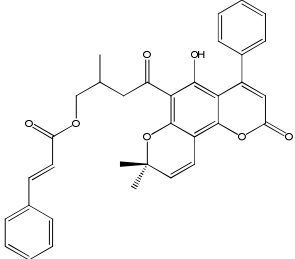
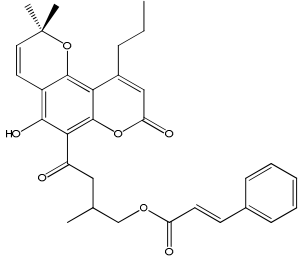
Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. albopunctata</i>		Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo, Brasil	SCIO <i>et al.</i> , 2003
<i>K. albopunctata</i>		Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo, Brasil	SCIO <i>et al.</i> , 2003
<i>K. albopunctata</i>		Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo, Brasil	SCIO <i>et al.</i> , 2003
<i>K. argentea</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. argentea</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. argentea</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998

Tabela 2. Continuação

Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. argentea</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. elata</i>		Ilhéus, Bahia, Brasil	GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999
<i>K. elata</i>		Ilhéus, Bahia, Brasil	GRAMACHO <i>et al.</i> , 1999
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001

Tabela 2. Continuação

Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>K. lathrophyton</i>		Parque Nacional da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>K. pumila</i>		Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	NAGEM <i>et al.</i> , 1988
<i>K. pumila</i>		Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	NAGEM <i>et al.</i> , 1988
<i>K. pumila</i>		Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil	NAGEM <i>et al.</i> , 1988

Tabela 2. Continuação

Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2002
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2002
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 2002
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998



Tabela 2. Continuação

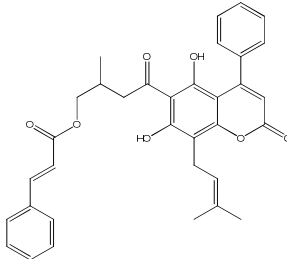
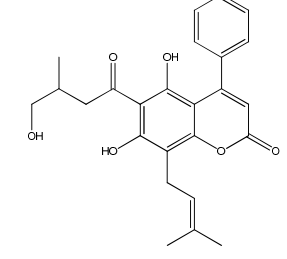
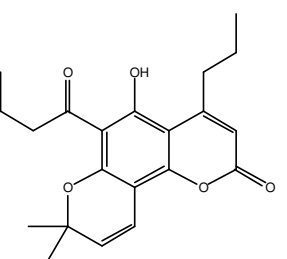
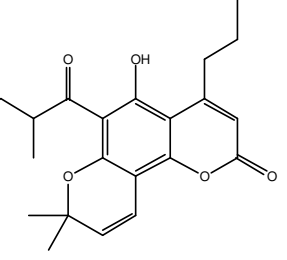
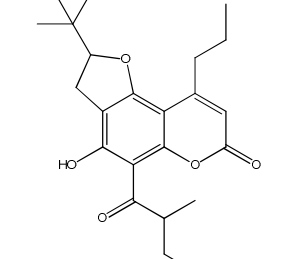
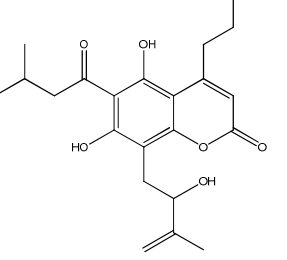
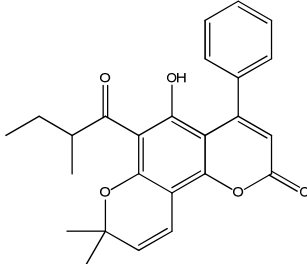
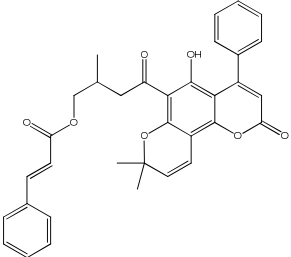
Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. reticulata</i>		Lagoa do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil	CRUZ <i>et al.</i> , 1998
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009

Tabela 2. Continuação

Espécie	Estrutura	Local de coleta	Referência
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>K. rugosa</i>		Santo. Amaro das Brotas, Sergipe, Brasil	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2009

### 1.3.2 A espécie *Kielmeyera argentea*

A espécie *K. argentea* é um arbusto que pode alcançar até 3,0 m de altura, tronco e ramos acinzentados, apresenta látex de cor amarelo-alaranjada nos ramos, folhas discoloradas, flores de pétalas brancas enquanto os frutos são cápsulas lenhosas deiscentes de cor marrom (**Figura 3**). O florescimento e frutificação podem ocorrer durante todo o ano. A ocorrência desta espécie restringe-se às regiões de dunas e restingas da costa do Estado da Bahia. (MAIA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015). Estudo anterior levou ao isolamento e identificação de 4-*n*-propil e 4-fenilcumarinas a partir do extrato hexânico do caule de *K. argentea* (CRUZ *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Flor e frutos de um espécime de *Kielmeyera argentea*

### 1.3.3 A espécie *Kielmeyera lathrophyton*

A espécie *K. lathrophyton* é um arbusto que pode atingir até 8 m de altura, apresenta látex branco a amarelado, inflorescências corimbosas em cimeira, sépalas externas, pétalas brancas e sementes com núcleo seminífero e alas. O florescimento ocorre no período de agosto a março e a frutificação no período de abril e janeiro. Tem ocorrência nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Distrito Federal em regiões de cerrado e campos rupestres (SANTOS *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram principalmente a ocorrência de xantonas, 4-fenil e alquilcumarinas (SILVA-NETO, 1998; CRUZ *et al.*, 2001) e mais recentemente, a presença de derivados poliprenilados do floroglucinol (ALMEIDA *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Flores e frutos de um espécime de *Kielmeyera lathrophyton*

### 1.4 A busca por novas drogas para o tratamento do câncer

Câncer corresponde a um conjunto de mais de cem doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado das células que invadem os tecidos e órgãos circunvizinhos, podendo disseminar-se para outras regiões do corpo (WHO, 2014). Os diferentes tipos de câncer são correspondentes aos diferentes tipos de células presente no organismo. Por exemplo, a pele é formada por diferentes tipos de células; se o câncer inicia-se em tecidos epiteliais, este é denominado de carcinoma. Por sua vez, caso se inicie em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2015).

O relatório elaborado pela Organização Mundial de Saúde indicou que houve 8,2 milhões de mortes no mundo devido ao câncer em 2012. Os cânceres de pulmão, mama, colo-retal, estômago e fígado são responsáveis por mais de metade destas mortes. O

aumento populacional e da expectativa de vida levará também a um aumento na proporção e no número de casos da doença. As projeções indicam que em 2030, ocorrerão 12,6 milhões de mortes provocadas pelo câncer. A estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos (WHO, 2014; INCA, 2015).

O tratamento dos diversos tipos de câncer envolve frequentemente o uso de agentes quimioterápicos. O paclitaxel ou taxol®, por exemplo, isolado das cascas do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) em 1967 tornou-se um dos fármacos mais promissores no tratamento de diversos tipos de câncer. A obtenção da droga atualmente ainda ocorre por meio de semi-síntese em função da complexidade estrutural assim como do baixo rendimento do taxol obtido a partir das cascas da planta. Cragg e Newman (2013) indicam que 75% das drogas utilizadas atualmente no tratamento do câncer são derivados ou inspirados em produtos naturais.

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são relativamente raros, pois correspondem a cerca de 2% entre os tumores malignos, porém contribuem de forma significativa para a mortalidade no mundo. Os gliomas ou glioblastomas são o tipo histológico mais frequente e representam de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC (INCA, 2015). Estes tumores são classificados pela Organização Mundial de Saúde como sendo do tipo astrocitoma grau IV. A conduta terapêutica adotada para o tratamento é multidisciplinar, geralmente consistindo na combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Atualmente, o uso do quimioterápico temozolomida (Temodal®) tem permitido um aumento da sobrevida dos pacientes apesar de sua eficiência nem sempre ser garantida (DEANGELIS, 2001; OMURO *et al.*, 2013).

Neste contexto, justifica-se a busca por novas drogas capazes de agir com maior eficácia contra tumores do SNC. A partir de espécies da família Calophyllaceae, por exemplo, tem sido isoladas 4-fenil e 4-alkilcumarinas com potencial atividade citotóxica frente a diversas linhagens de células tumorais. As cumarinas mammea A/BA e mammea B/BA apresentaram uma inibição do crescimento celular frente a células da linhagem KB (carcinoma oral humano) superior a 70% na concentração de 1 µM (OUAHOUO *et al.*, 2004). Guilet e colaboradores (2001) também demonstraram a citotoxicidade de 4-*n*-propil e 4-fenilcumarinas isoladas de *Calophyllum dispar* frente a células KB. Em continuidade ao estudo com esta espécie, verificou-se adicionalmente uma maior atividade citotóxica das 4-fenilcumarinas que apresentavam adicionalmente um anel furano (GUILLET *et al.*, 2001). Os neoflavonoides mammea A/BA e mammea A/BB

também apresentaram significativa atividade citotóxica frente às linhagens de células KB (carcinoma oral humano), P-388 (leucemia), Col-2 (câncer de colón), Lu-1 (câncer de pulmão), BCA-1 (câncer de mama). A partir de *Kayea assamica*, por sua vez, foram isoladas 4-alkilcumarinas que apresentaram citotoxicidade frente células tumorais humanas das linhagens Col2 e LNCaP além da linhagem KB (LEE *et al.*, 2003).

Reyes-Chilpa e colaboradores (2004) estudaram, por sua vez, a citotoxicidade de 4-fenil e 4-alkilcumarinas obtidas de *Calophyllum brasiliense* frente a células tumorais da linhagem U251 (sistema nervoso central), K562 (linfoma) e PC3 (próstata). As substâncias mammea A/BA e as misturas das cumarinas mammea A/BA + A/BB, mammea B/BA + B/BB e mammea C/OA + C/OB apresentaram IC<sub>50</sub> inferiores a 4,05 µM enquanto que a substância mammea B/BA ciclo F apresentou um valor superior a 25 µM (**Tabela 3**). Adicionalmente, Gomez-Verjan e colaboradores (2016) realizaram análises toxicogênicas com as misturas das cumarinas mammea A/BA + A/BB. Verificou-se que estes compostos atendem a um perfil de segurança, apoiando a utilização destas cumarinas do tipo mammea em estudos pré-clínicos para determinar o seu potencial farmacêutico.

**Tabela 3.** Citotoxicidade de 4-alkil e 4-fenilcumarinas [IC<sub>50</sub> (µM)] frente a células da linhagem U251 de glioblastoma humano. Adaptada de REYES-CHILPA *et al.* (2004)

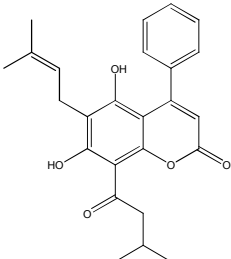
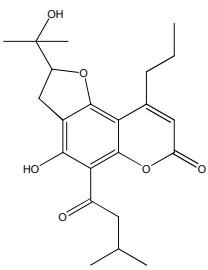
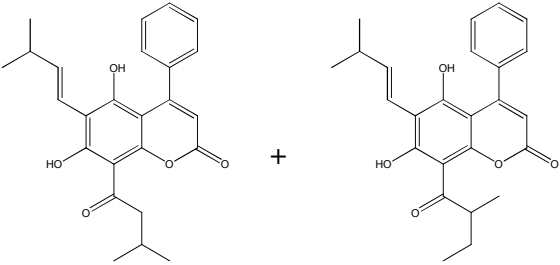
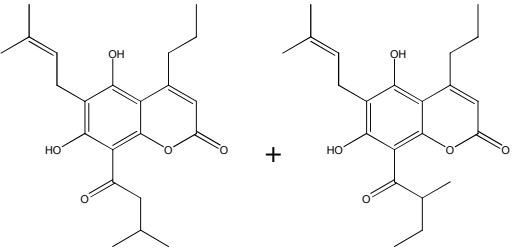
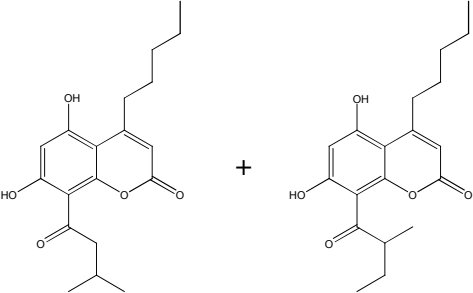
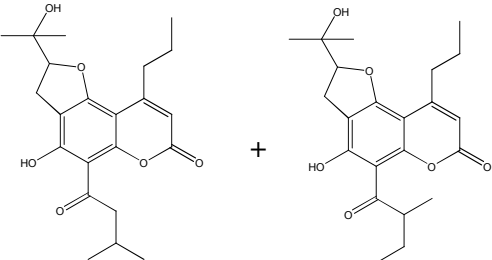
Estruturas químicas	IC <sub>50</sub> (µM)
 mammea A/BA	0,59 ± 0,10
 mammea B/BA ciclo F	> 25

Tabela 3. Continuação

Estruturas químicas	IC <sub>50</sub> (μM)
 <p>The image shows two chemical structures of flavonoid compounds, mammea A/BA and A/BB, separated by a plus sign. Both structures consist of a central chromone ring system. The A/BA structure has a 3-hydroxy-4-(3-methylbut-3-enyl)chromone core with a 6-phenyl group and a 7-isopropyl group. The A/BB structure is identical to A/BA but with a different substituent at the 7-position, which is a 3-methylbutyl group.</p>	1,92 ± 0,17
mammea A/BA + A/BB	
 <p>The image shows two chemical structures of flavonoid compounds, mammea B/BA and B/BB, separated by a plus sign. Both structures consist of a central chromone ring system. The B/BA structure has a 3-hydroxy-4-(3-methylbut-3-enyl)chromone core with a 6-propyl group and a 7-isopropyl group. The B/BB structure is identical to B/BA but with a different substituent at the 7-position, which is a 3-methylbutyl group.</p>	1,47 ± 0,10
mammea B/BA + B/BB	
 <p>The image shows two chemical structures of flavonoid compounds, mammea C/OA and C/OB, separated by a plus sign. Both structures consist of a central chromone ring system. The C/OA structure has a 3-hydroxy-4-(3-methylbut-3-enyl)chromone core with a 6-pentyl group and a 7-isopropyl group. The C/OB structure is identical to C/OA but with a different substituent at the 7-position, which is a 3-methylbutyl group.</p>	1,85 ± 0,30
mammea C/OA + C/OB	
 <p>The image shows two chemical structures of flavonoid compounds, mammea B/BA ciclo F and B/BB ciclo F, separated by a plus sign. Both structures consist of a central chromone ring system with a 5-hydroxy-7-isopropylchromone core. The B/BA ciclo F structure has a 6-propyl group and a 4-(3-methylbut-3-enyl) group. The B/BB ciclo F structure is identical to B/BA ciclo F but with a different substituent at the 6-position, which is a 3-methylbutyl group.</p>	9,4 ± 1,03
mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F	

## 2. OBJETIVOS

- Estudar a composição química das espécies *Kielmeyera argentea* e *Kielmeyera lathrophyton*;
- Purificar e determinar as estruturas químicas dos metabólitos secundários;
- Comparar a composição química das espécies *K. argentea* e *K. lathrophyton* com as investigações realizadas anteriormente no gênero *Kielmeyera*;
- Avaliar a citotoxicidade de 4-fenil e 4-alkilcumarinas frente a células da linhagem U251 de glioblastoma humano.



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

Um espécime de *Kielmeyera argentea* (Calophyllaceae) foi coletado em 04 de agosto de 2009 nas restingas do Parque Metropolitano do Abaeté em Salvador - Bahia (**Figura 5**), identificado pela botânica Prof.<sup>a</sup> Msc. Maria Lenise S. Guedes (Instituto de Biologia - UFBA) e registrada no herbário Alexandre Leal Costa, do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o número 026392.



**Figura 5.** Espécime de *K. argentea* coletado para o estudo fitoquímico nas restingas do Parque Metropolitano do Abaeté, Salvador-Bahia

Um espécime de *Kielmeyera lathrophyton* foi coletada nas proximidades do Morro do Pai Inácio no município de Palmeiras na região do Parque Nacional da Chapada Diamantina – Bahia, em 27 de fevereiro de 2009 (**Figura 6**). A identificação do mesmo também foi realizada pela botânica Prof.<sup>a</sup> Msc. Maria Lenise S. Guedes e registrada no herbário Alexandre Leal Costa sob o número 35942.



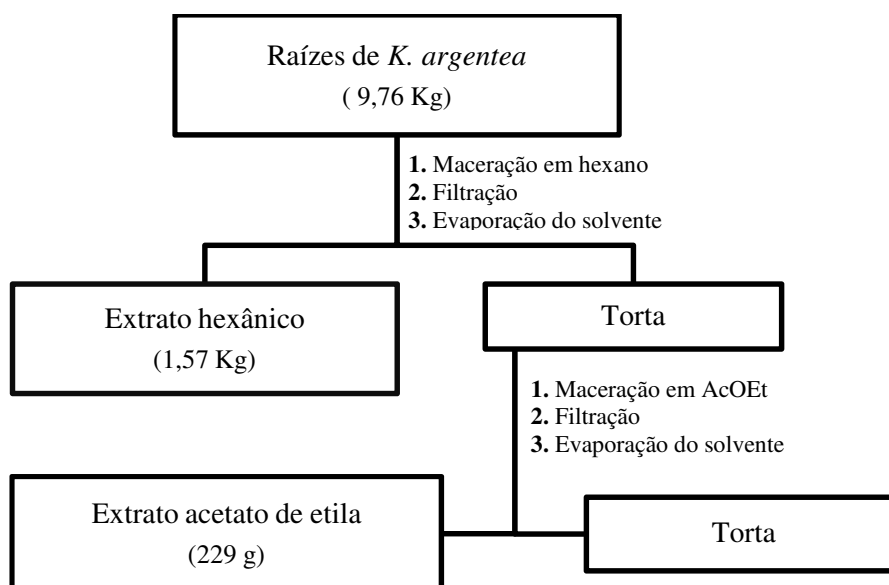
**Figura 6.** Espécime de *K. lathrophyton* coletado para o estudo fitoquímico na região do Morro do Pai Inácio, Palmeiras, Chapada Diamantina -Bahia



### 3.2 Preparação dos extratos orgânicos

#### 3.2.1 Extratos orgânicos das raízes de *K. argentea*

As raízes do espécime de *K. argentea* foram lavadas com água corrente, secadas em estufa e em seguida trituradas em um moinho de facas Thomas Wily Laboratory Mill-Model 4, obtendo-se 9,76 Kg de material moído. O material vegetal pulverizado foi submetido a três extrações sucessivas por maceração à temperatura ambiente, durante três dias cada extração, utilizando hexano. Após a filtração e eliminação do solvente em evaporador rotatório a pressão reduzida em um banho de 35°C, obteve-se o extrato hexânico (EH) das raízes de *K. argentea* (1,57 Kg). Posteriormente, repetiu-se este mesmo procedimento com a torta residual obtida a partir da extração com hexano utilizando como solvente acetato de etila, obtendo-se o extrato em acetato de etila (EAE) (229 g) (Figura 7). Ambos os extratos apresentaram um aspecto oleoso, sendo o EH de coloração amarela enquanto que o EAE apresentou uma coloração castanha-escura.

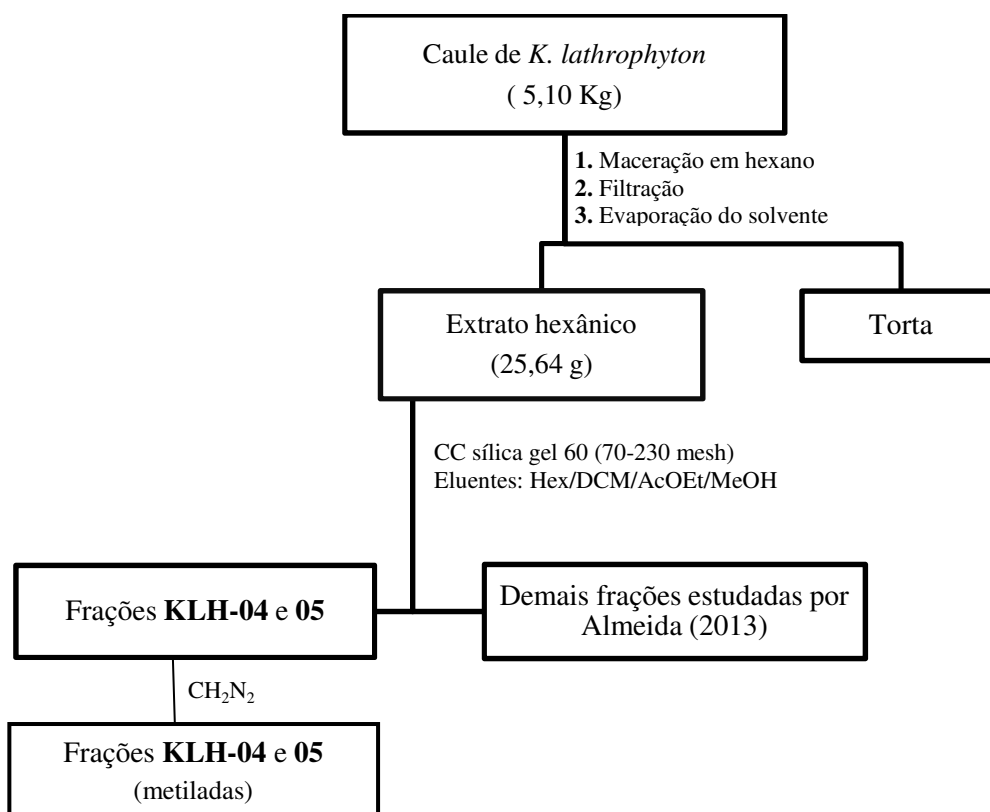


**Figura 7.** Procedimento experimental para obtenção do extrato hexânico (EH) e extrato acetato de etila (EAE) das raízes de *K. argentea*

### 3.2.2 Extrato orgânico do caule de *K. lathrophyton*

O extrato do caule de *Kielmeyera lathrophyton* foi preparado em um trabalho realizado por Almeida (2013). O material vegetal coletado foi secado à temperatura ambiente e em seguida triturado em um moinho de facas. O material moído (5,10 Kg) foi submetido a três extrações sucessivas por maceração à temperatura ambiente, durante três dias cada extração, utilizando hexano. Após a filtração e eliminação do solvente em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a aproximadamente 35°C, obteve-se o extrato hexânico (EH) do caule de *K. lathrophyton* (25,64 g) (Figura 8).

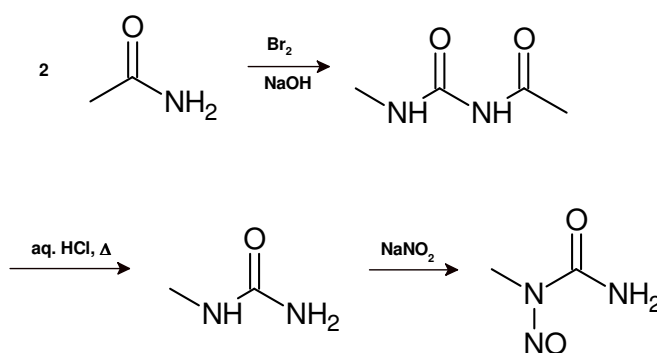
O estudo do extrato hexânico foi iniciado por Almeida (2013). Deste modo, o trabalho atual desenvolveu-se a partir dos estudos das frações **KLH-03**, **04** e **05** obtidas a partir do fracionamento do extrato hexânico em sílica gel usando como fase móvel hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 13 frações no total após análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). As frações **KLH-04** (3,8 g) e **KLH-05** (2,5 g) foram em seguida submetidas a uma reação com diazometano.



**Figura 8.** Procedimento experimental para obtenção e fracionamento do extrato hexânico (EH) do caule de *K. lathrophyton* e metilação das frações **KLH-03**, **04** e **05**

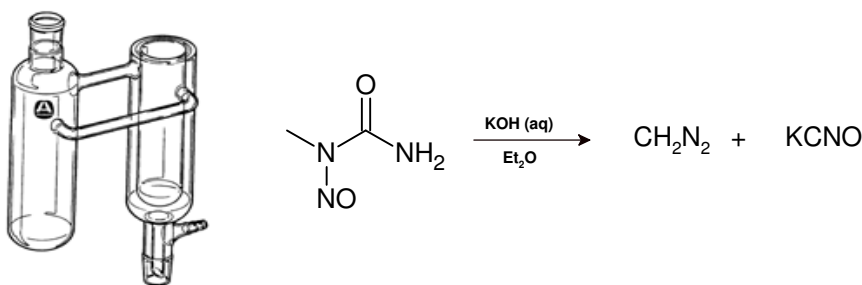
### 3.3 Metodologia para preparação do diazometano

O diazometano foi gerado a partir da nitrosometiluréia seguindo a metodologia descrita por Arndt (1943). A primeira etapa correspondeu à preparação da acetilmetiluréia a partir da acetamida (**Figura 9**) (AMSTUTZ E MYERS, 1943). A um béquer de 1000 mL, equipado com agitação magnética, contendo 25 g de  $\text{Br}_2$  e 16,78 g de acetamida, adicionou-se lentamente uma solução de hidróxido de sódio a 38,5% (40 mL) sob suave aquecimento. Após a mistura reacional atingir a efervescência, manteve-se o aquecimento durante três minutos e em seguida, resfriou-se o sistema em um banho de gelo por cerca de 2 horas. Após este período, verificou-se a cristalização de um sólido, realizou-se então uma filtração a vácuo e secagem ao ar para obtenção de acetilmetiluréia (11,6 g, 70% de rendimento).



**Figura 9.** Preparação da nitrosometiluréia a partir da acetamida

Os cristais da acetilmetiluréia foram dissolvidos em uma solução de ácido clorídrico concentrado (12,50 mL) sob aquecimento, mantendo-se o sistema em ebulição por um período total de 12 minutos. O meio reacional foi diluído adicionando-se água destilada gelada (12,50 mL). A esta solução, adicionou-se uma solução gelada de  $\text{NaNO}_2$  a 43% (volume mL) e manteve-se o sistema em banho de gelo por vários minutos até verificar a precipitação do produto. Após filtração a vácuo e secagem ao ar, obteve-se um sólido amarelo pálido, a nitrosometiluréia (9,0 g).



**Figura 10.** Preparação do diazometano a partir da nitrosometiluréia em um reator de destilação

Em um reator similar ao representado na **Figura 10**, o qual possuía um condensador lateral para possibilitar um banho de gelo, adicionou-se a nitrosometiluréia, 50,00 mL de éter etílico e uma solução aquosa de KOH 50% (50,0 mL) no compartimento A. A mistura foi submetida a um aquecimento suave utilizando uma fonte de ar quente, obtendo-se uma solução etérea de diazometano (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>). Em seguida, adicionou-se lentamente esta solução às amostras, solubilizadas em clorofórmio, **KLH-04** (3,8 g) e **KLH-05** (2,5 g) até não perceber-se o desprendimento de gás, indicando excesso de diazometano.

### 3.4 Métodos cromatográficos

#### ▪ Cromatografia de adsorção em coluna e camada delgada

Nas separações cromatográficas em coluna (CC) foram utilizadas gel de sílica flash F60 230 – 400 mesh (40 - 63 µm) e 65 –250 mesh (63-200 µm) da marca SiliCycle; gel de sílica 60H (15 µm), gel de sílica Si60 (40-63 µm), gel de sílica 60F 60 – 230 mesh (63-200 µm), gel de sílica 230 – 400 mesh (40-63 µm) e gel de sílica LiChroprep® RP-18 (25-40 µm) da marca Merck. Os solventes utilizados foram das marcas Tedia Brazil, VETEC, CHEMIS e QUIMEX, todos de grau analítico. Nas separações cromatográficas em coluna sob pressão, utilizou-se nitrogênio gasoso com grau de pureza de 99,99%. A evaporação dos solventes presente em extratos e frações foi realizada sob pressão reduzida utilizando evaporador rotatório da marca BUCHI modelo R-3000 e da marca Heidolph modelo Laborota 4000.

Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi utilizado gel de sílica HF<sub>254+366</sub> enquanto que na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

foi utilizado gel de sílica PF<sub>254+366</sub>, ambas da marca Merck. As placas cromatográficas foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica em água destilada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico Heidelberg, obtendo-se placas com espessuras de 0,5 e 1,00 mm (CCDC) e 1,00 mm (CCDP). Todas as placas foram ativadas em estufa a 100°C por um período mínimo de 1h. A revelação das placas cromatográficas foi realizada pela exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, assim como também utilizando vapores de iodo.

#### ▪ **Cromatografia líquida de média pressão**

As separações cromatográficas de média pressão foram realizadas no sistema de cromatografia flash Sepacore® *flash* X10 da BUCHI equipado com dois módulos para bombeamento da fase móvel modelo C-601, um detector UV-Vis modelo C-640 e um coletor de frações automático modelo C-660. Utilizou-se uma coluna de vidro 15/230 empacotada manualmente com sílica de fase reversa LiChroprep® RP-18 (25-40 µm) da marca Merck e como eluentes um sistema binário água/metanol.

#### ▪ **Cromatografia líquida de alta eficiência**

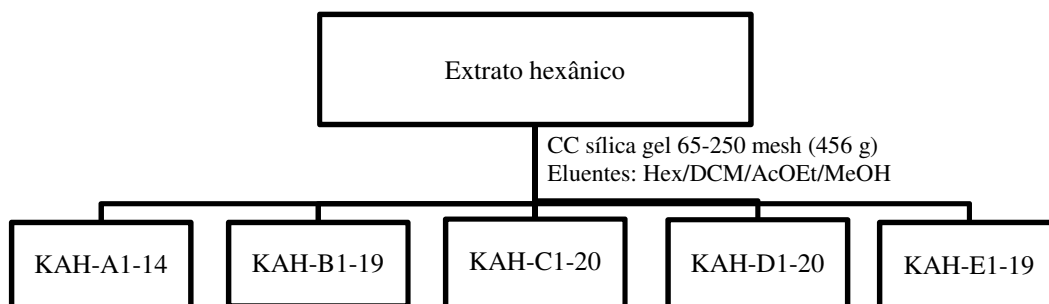
As análises e separações usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um aparelho SHIMADZU modelo LC-20A Prominence equipado com um sistema binário de bombas modelo LC-20AR, um detector UV-visível com arranjo de diodos modelo SPD-M20A e um injetor automático modelo SIL-10AF. As injeções em modo analítico foram realizadas utilizando o injetor automático enquanto que em modo semipreparativo através de um injetor manual.

Nas separações em escala analítica utilizou-se uma coluna da marca Supelco Analytical Ascentis® C18 (25 cm x 4,6mm, 5 µm) enquanto que em escala semipreparativa, utilizou-se uma coluna Supelco Analytical Ascentis® C18 (25 cm x 10mm, 5 µm). Utilizou-se como eluentes MeOH e acetonitrila grau HPLC das marcas Merck, Baker e Tedia Brazil e água Milli-Q, os quais foram filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm e degaseificados por sonicação durante 15 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 µm.

### 3.5 Fracionamento do extrato hexânico das raízes de *K. argentea*

Submeteu-se o extrato hexânico a uma coluna cromatográfica a vácuo empacotada a seco utilizando como adsorvente gel de sílica 65 – 250 mesh (63-200 µm) (456 g) e como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Este procedimento foi realizado cinco vezes devido à massa obtida deste extrato (1,57 Kg), a qual impossibilitou o fracionamento em uma única etapa (**Figura 11**).

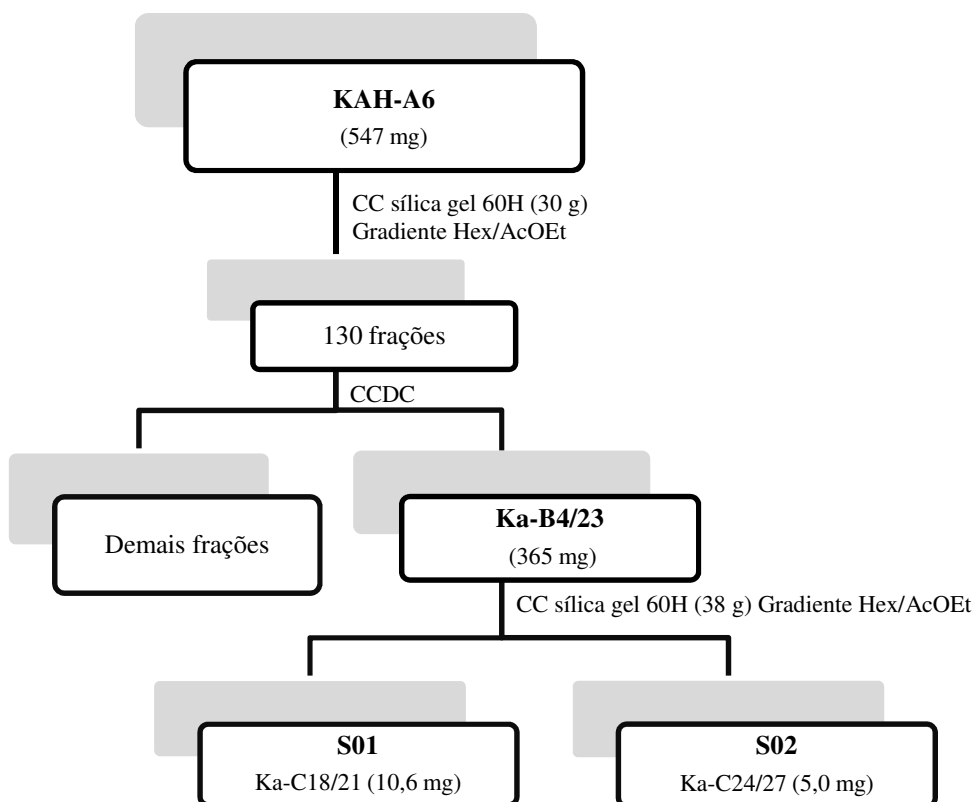
Na primeira etapa do fracionamento do extrato hexânico (119 g), obteve-se 14 frações de aproximadamente 500 mL cada, denominadas **KAH-A1** a **A14**. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotatório, todas as frações desta coluna foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando como eluentes misturas de hexano/acetato de etila e hexano/diclorometano em diferentes proporções, sendo que as frações similares (**A7** até **A9**) foram agrupadas. Na segunda etapa, o extrato (138 g) foi submetido a uma CC nas mesmas condições anteriores. Obteve-se 19 frações, de aproximadamente 500 mL cada, denominadas **KAH-B1** a **B19**. Após análise por CCDC, as frações semelhantes foram agrupadas em novas 13 frações. Na terceira etapa, o extrato (126 g) foi submetido novamente a uma CC, obtendo-se 20 frações, aproximadamente 500 mL cada, denominadas **KAH-C1** à **C20**, sendo que as frações similares foram agrupadas. Verificou-se também a presença de um sólido branco nas frações oleosas **KAH-C6** e **KAH-C7**. Na quarta etapa, após fracionamento do extrato hexânico (146 g) obteve-se novamente 20 frações de aproximadamente 500 mL cada, denominadas **KAH-D1** a **D20**. Na quinta etapa, seguindo os mesmos procedimentos anteriores, o extrato hexânico (176 g) foi novamente submetido a uma CC e obteve-se 19 frações, 500 mL cada, denominadas **EH-E1** a **E19**.



**Figura 11.** Fracionamento do extrato hexânico das raízes de *K. argentea*

### 3.5.1 Estudo da fração KAH-A6

Submeteu-se a fração **KAH-A6** (547 mg) a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel 60H, 15  $\mu\text{m}$  (30 g) e como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em gradiente. Obteve-se 130 frações, sendo agrupadas as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes após análise por CCDC. Entre estas, as frações **KAH-B4** à **B23** (365 mg) foram novamente submetidas a uma coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60H, 15  $\mu\text{m}$  (38 g) e misturas de hexano e acetato de etila em gradiente. A partir deste processo, e após análise por CCDC, as frações **KAH-C18/21** forneceram a substância **S01** (10,6 mg) e as frações **KAH-C24/27** forneceram a substância **S02** (5,0 mg) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Esquema geral do estudo da fração **KAH-A6**

### 3.5.2 Estudo da fração KAH-A5

Submeteu-se a fração **KAH- A5** (49,65 g) a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica flash 60F, 40-63  $\mu\text{m}$  (162 g) e como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em gradiente (**Figura 13**). Obteve-se nove frações da aproximadamente 500 mL cada, as quais foram analisadas por CCDC, sendo agrupadas as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (**Ka-A01 a Ka-A03**).

A fração **Ka-A01/03** (1,35 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60F, 63-200  $\mu\text{m}$  (65g) e misturas de hexano e acetato de etila em gradiente, obtendo-se 80 frações. Verificou-se que a amostra **Ka-B57** correspondia a uma mistura de um sólido branco e um óleo amarelado. A partir de uma lavagem a frio utilizando-se éter de petróleo, obteve-se o sólido branco, o qual era correspondente à substância **S03** (8,2 mg). Adicionalmente, verificou-se que o sólido presente nas frações **Ka-B31 a B42** correspondia ao triterpeno friedelina (**Figura 118, p. 141**). Em continuidade ao trabalho, submeteu-se a fração **Ka-A05** (27,5 g) a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica flash F60, 40-63  $\mu\text{m}$  (187 g) e misturas de hexano e acetato de etila em gradiente, obtendo-se 35 frações de aproximadamente 200 mL cada. As frações foram analisadas por CCDC e agrupadas com base no perfil cromatográfico em vinte e cinco frações codificadas como **Ka-G1 à G25**.

A fração **Ka-G09/10** (533 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente gel de sílica Si60, 40-63  $\mu\text{m}$  (65 g) e utilizando como fase móvel novamente hexano/acetato de etila em gradiente. A partir das análises de CCDC, agrupou-se as frações **Ka-I90 a Ka-I130** (300 mg) oriundas deste procedimento, e submeteu-se esta fração novamente a uma coluna cromatográfica utilizando gel de sílica Si60, 40-63  $\mu\text{m}$  (95 g) usando como fase móvel uma mistura de tolueno e clorofórmio em gradiente. As frações **Ka-i03 a Ka-i18** foram agrupadas com base no perfil cromatográfico em CCDC. De modo similar a isolamento de **S03**, esta fração correspondia a um sólido branco em conjunto com um óleo de coloração amarela. Repetindo o procedimento realizado, uma lavagem a frio com éter de petróleo permitiu a obtenção do sólido branco correspondente a **S04** (11,2 mg). Em seguimento aos estudos com as frações oriundas da coluna G, analisou-se o perfil cromatográfico da fração **Ka-G18** (836 mg) no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna de fase reversa C18 e como eluentes uma mistura de metanol/água. A partir do procedimento em escala preparativa, em um sistema isocrático metanol/água (93:07) e



fluxo de 5 mL/min, através de sucessivas injeções, isolou-se as substâncias **S05** (5,1 mg) e **S06** (8,2 mg) assim como o  $\delta$ -tocotrienol (**Figura 119, p. 141**). Adicionalmente, as **Figuras 14 e 15** correspondem aos cromatogramas de **S05** e **S06**.

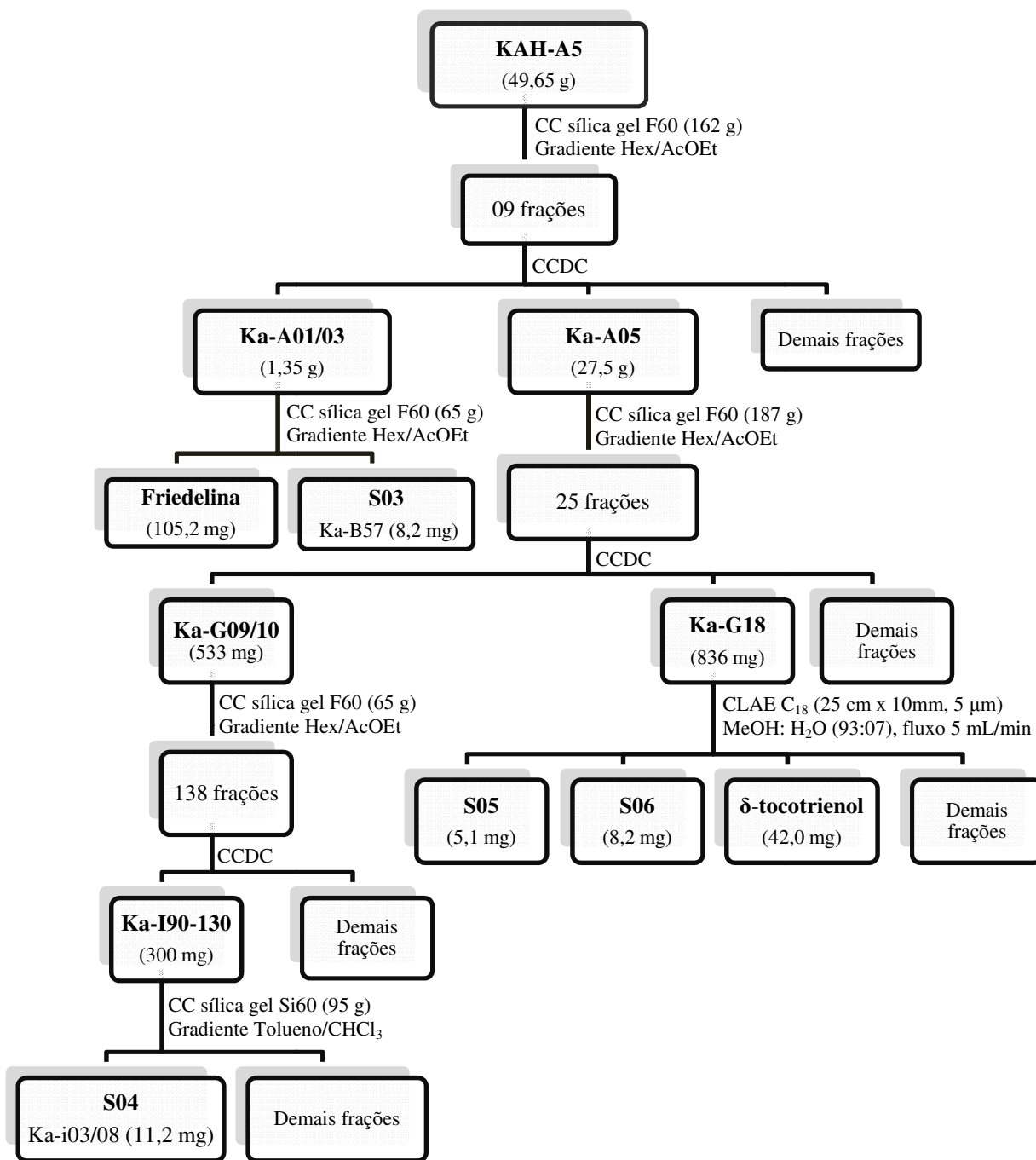
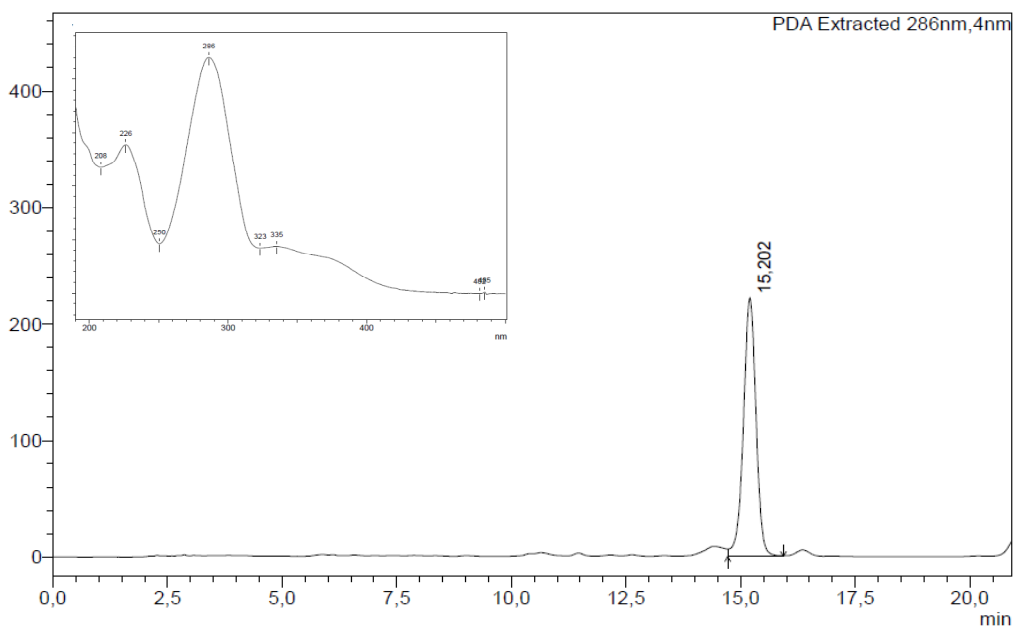
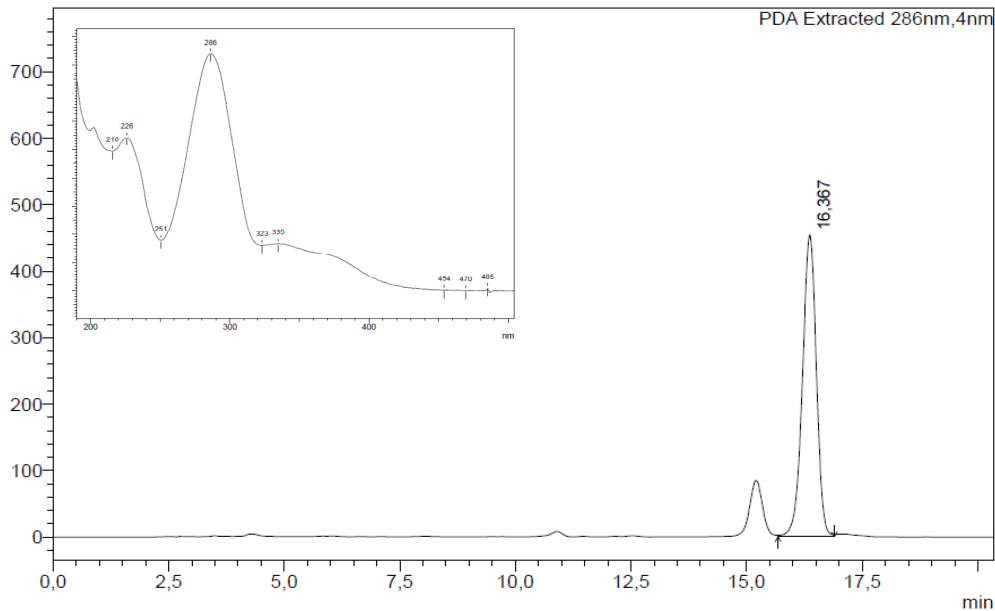


Figura 13. Esquema geral do estudo da fração KAH-A5



**Figura 14.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância **S05**. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 286$  nm



**Figura 15.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância **S06**. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 286$  nm

### 3.6 Estudos das frações **KLH-04** e **KLH-05** de *Kielmeyera lathrophyton*

Submeteu-se a fração **KLH-05** (2,5 g) a uma coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel Si60, 40-63  $\mu\text{m}$  (100 g) e como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em gradiente (**Figura 16**). Obtiveram-se trinta e cinco frações, sendo agrupadas as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes após análise por CCDC. Entre estas, analisou-se o perfil cromatográfico das frações **KI-E22/25** (213 mg) no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna de fase reversa C18 e como eluentes uma mistura de metanol/água. A partir do procedimento em escala preparativa, em um sistema isocrático metanol/água (80:20) e fluxo de 5 mL/min, através de sucessivas injeções, isolou-se as substâncias **S07** (4,4 mg) e **S08** (3,1 mg) (**Figura 16**), cujos cromatogramas em uma análise por CLAE utilizando uma coluna C18, fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10) e um fluxo de 1,0 mL/min correspondem, respectivamente, às **Figuras 17** e **18**. De modo similar, analisou-se o perfil cromatográfico no sistema de CLAE das frações **KI-E06/08** (252,0 mg), e a partir do procedimento em escala preparativa, utilizando também um sistema isocrático metanol/água (80:20) durante 0 - 15 min e fluxo de 5 mL/min, através de sucessivas injeções, isolou-se a substância **S09** (1,6 mg) (**Figuras 16** e **19**). A partir da **E14/17** (300 mg), utilizando um sistema metanol/água (85:15) de 0 a 60 min e metanol (100%) de 60 a 80 min em um fluxo de 5,0 mL/min, obteve-se **S11** (1,2 mg). Adicionalmente, a partir da fração **KLH-04** (3,8 g), através de uma coluna cromatográfica utilizando sílica gel F60, 230-400 mesh (110,0 g) como adsorvente e misturas de hexano e diclorometano em gradiente como fase móvel, obteve-se a fração **KI-A10-12** (5,8 mg), e após purificação por cromatografia em camada delgada preparativa, obteve-se **S10** (1,0 mg). Adicionalmente, a partir da fração **KLH-04**, isolou-se também os triterpenos friedelina (**Figura 118, p. 141**) e epifriedelanol (**Figura 119, p. 142**). (**Figura 16**). As Figuras 17, 18, 19, 20 e 21 correspondem aos cromatogramas, respectivamente, das amostras **S07**, **S08**, **S09**, **S10** e **S11**.

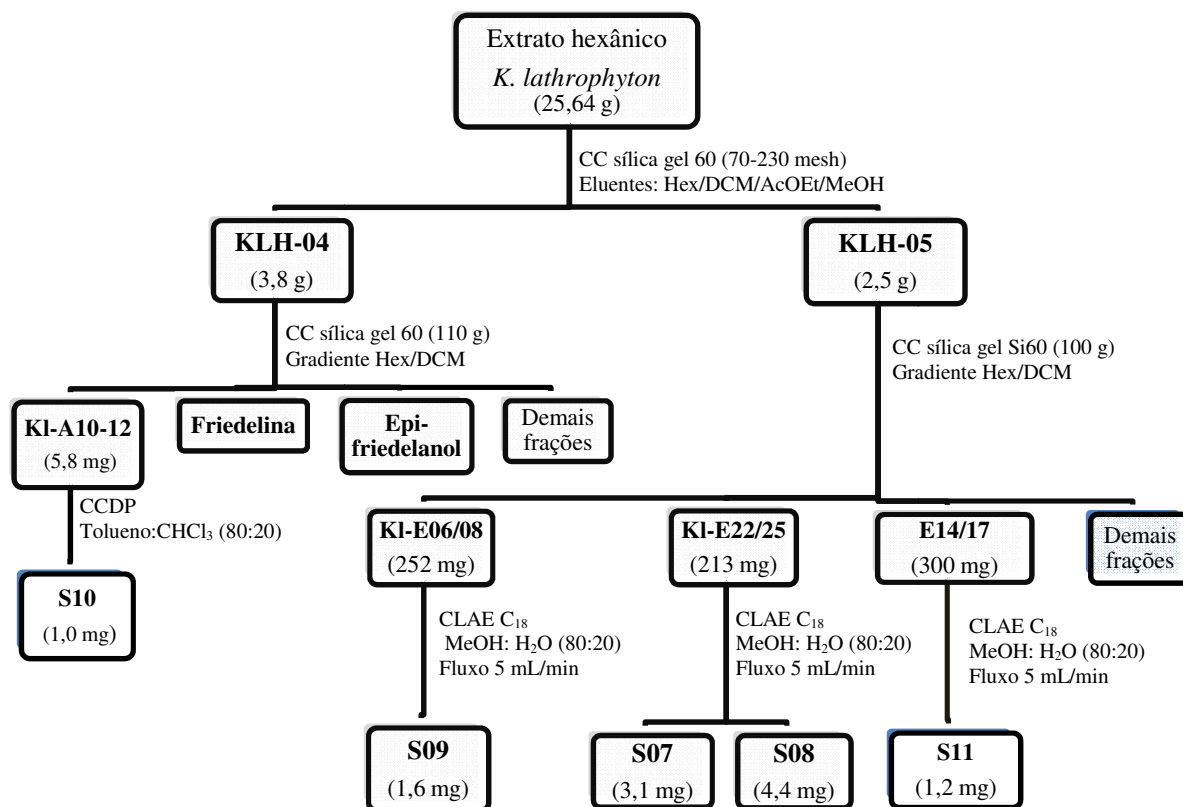


Figura 16. Esquema geral do estudo das frações KLH-04 e 05

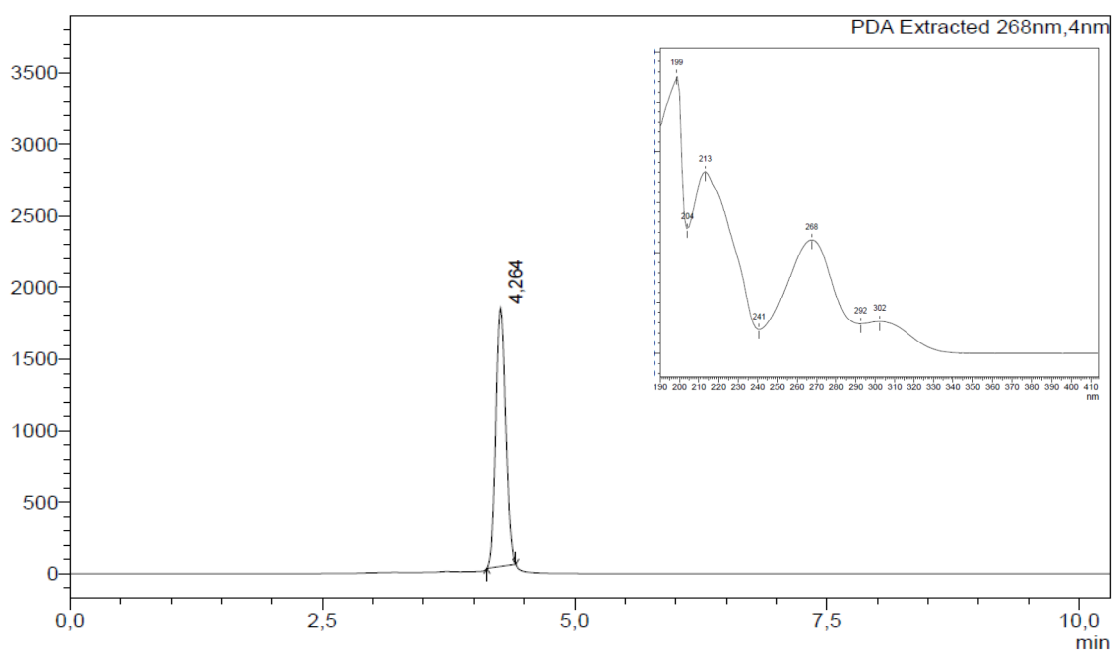
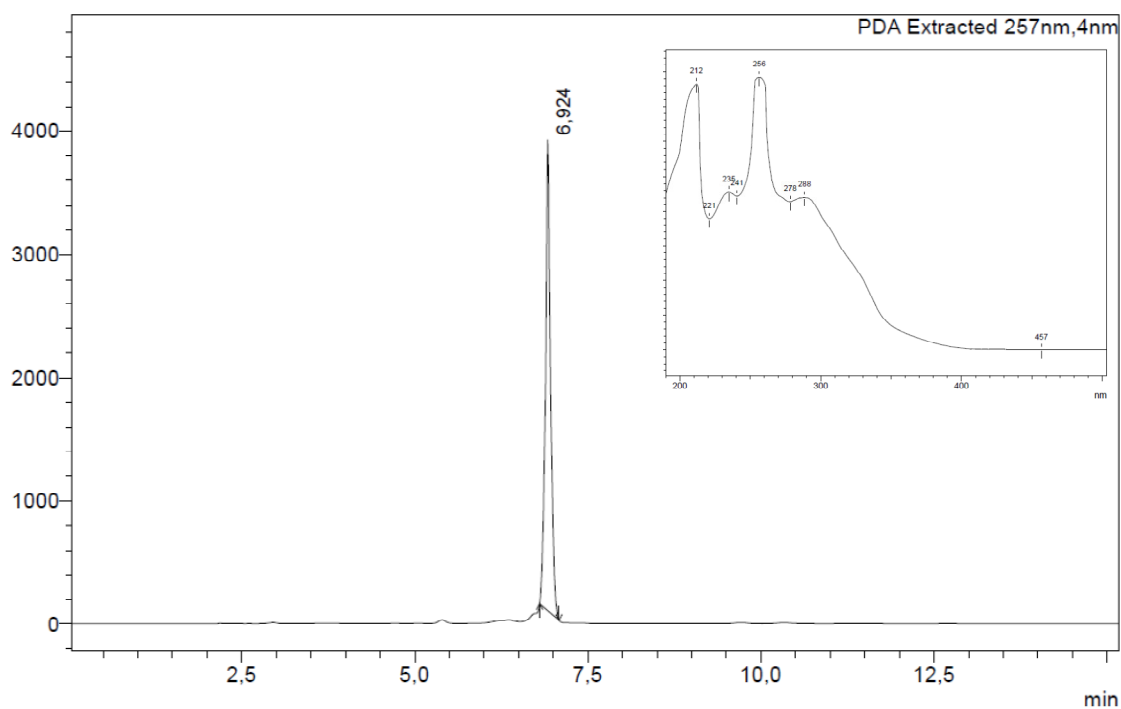
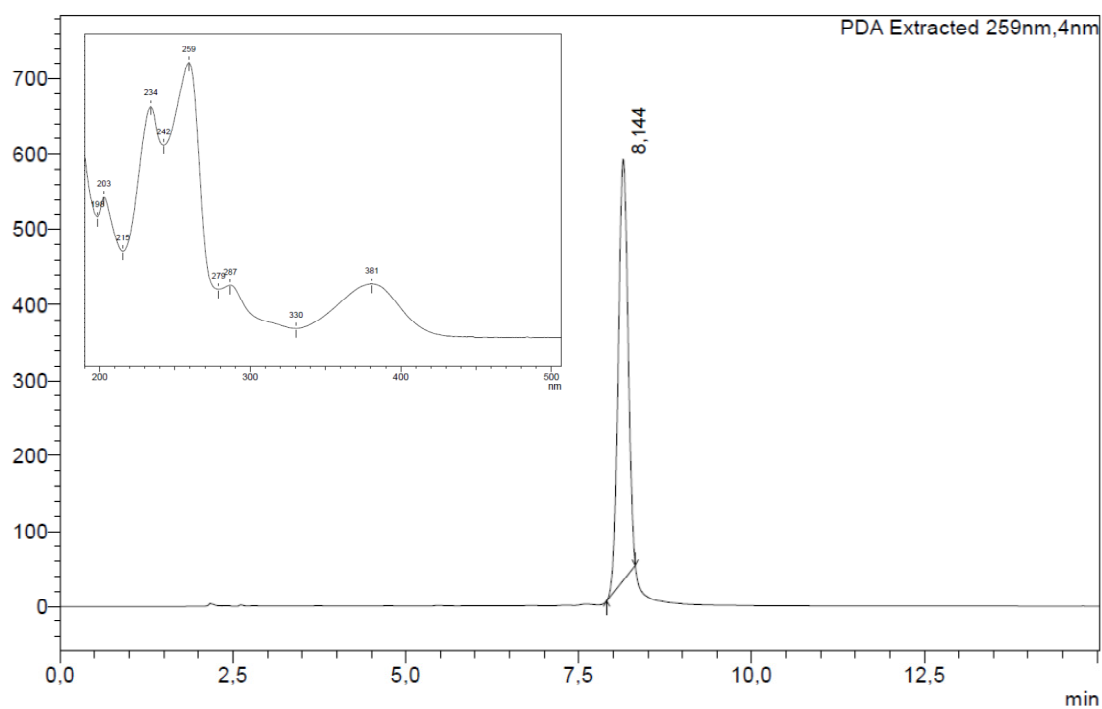


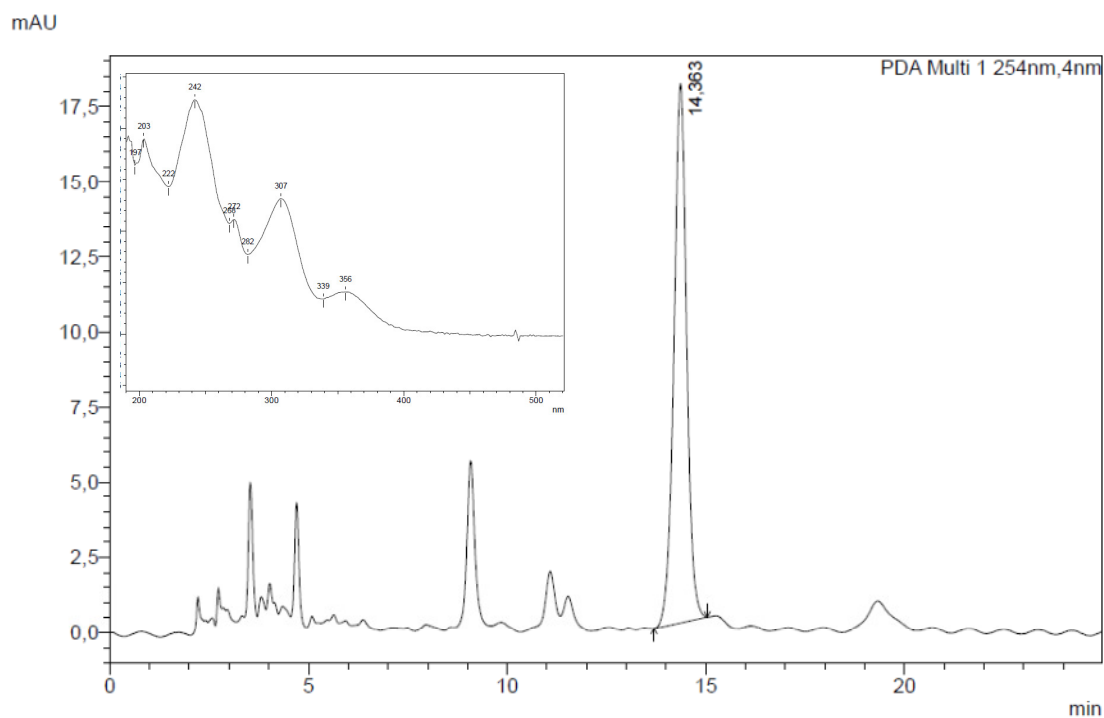
Figura 17. Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S07. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção λ = 268 nm



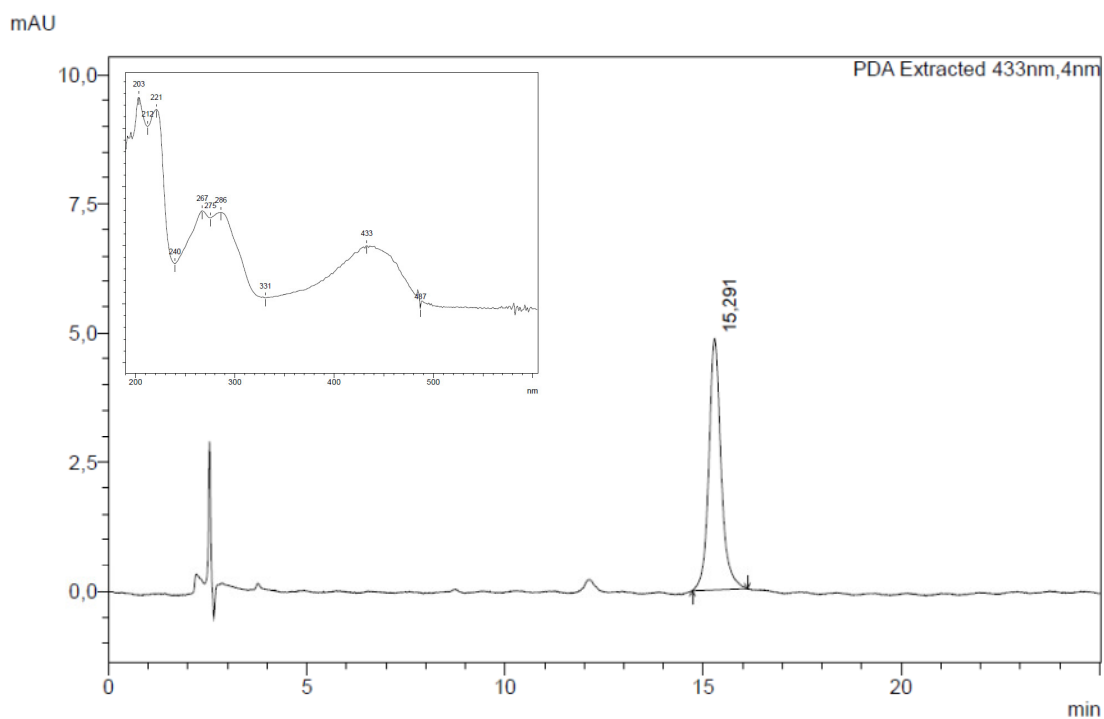
**Figura 18.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S08. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 257$  nm



**Figura 19.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância S09. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 259$  nm



**Figura 20.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da amostra **S10**. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 254$  nm



**Figura 21.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD e espectro no ultravioleta da substância **S11**. Coluna C18; fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10); fluxo: 1,0 mL/min; detecção  $\lambda = 433$  nm

### 3.7 Métodos de caracterização

#### ▪ Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais foram realizados em um espectrômetro Varian Inova 500 de 11,7 Tesla (operando com frequência de 500 MHz para  $^1\text{H}$  e de 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) e nos espectrômetros Varian Inova 500 e Varian Inova 600 de 14,1 Tesla (600 MHz para  $^1\text{H}$  e de 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm). Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna e clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) da marca Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL)® para solubilização das amostras. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais foram processados usando o software gratuito ACD Labs versão 12.0.

#### ▪ Rotação específica

As medidas de rotação ópticas foram realizadas em um polarímetro Perkin-Elmer modelo 343 usando uma microcela de 10 cm. Utilizou-se metanol e clorofórmio (Merck) para solubilização das amostras.

#### ▪ Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho digital de ponto de fusão da marca Microquímica, modelo MQAPF-301.

### 3.8 Avaliação da atividade citotóxica

As substâncias **S01**, **S02**, **S03** e **S04**, isoladas a partir das raízes de *K. argentea* foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico *in vitro* frente a células da linhagem U251 de glioblastoma humano. Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de

Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia.

A partir das substâncias, foram preparadas soluções estoques de cada amostra utilizando dimetilsulfóxido (DMSO). As células de glioblastoma humano da linhagem U251 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibiótico (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml estreptomicina) e mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72h. As células foram cultivadas em placas com 100 mm de diâmetro contendo 10 mL de meio trocado a cada dois dias. Todas as células usadas encontraram-se no máximo na décima passagem, as que atingirem passagens superiores foram descartadas, a fim de garantir a homogeneidade dos grupos e máxima reprodutibilidade dos resultados.

Após este período, o meio de cultura foi removido, em condições estéreis, e as células foram tratadas com as amostras. A avaliação da atividade citotóxica foi realizada através do ensaio colorimétrico com base no nível de redução do corante brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium (MTT). A absorbância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro BIO-RAD 550PLUS no comprimento de onda de 492 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados foram tratados estatisticamente. A partir da resolução da equação logarítmica disponível na biblioteca do software GraphPadPrism, versão 5.00 para Windows, obteve-se o valor da concentração de cada substância necessária para induzir metade do efeito máximo (IC<sub>50</sub>).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Constituintes químicos isolados

Sucessivos processos cromatográficos do extrato hexânico das raízes de *Kielmeyera argentea* resultaram no isolamento e identificação das substâncias: mammea B/BA (S01), mammea B/BA ciclo F (S02), ferruol A (S03), mammea A/BB (S04), mammea B/AB ciclo D (S05) e mammea B/AA ciclo D (S06), friedelina e  $\delta$ -tocotrienol (Figura 22). Enquanto que a partir do extrato hexânico do caule de *K. lathrophyton*, obtiveram-se as substâncias 7-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metilbutanoil)-10-fenil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-8-ona (S07), 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (S08), 1-hidroxi-7-metoxixantona (S09), 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (S10), 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilxantona (S11), friedelina e epifriedelanol (Figura 23).

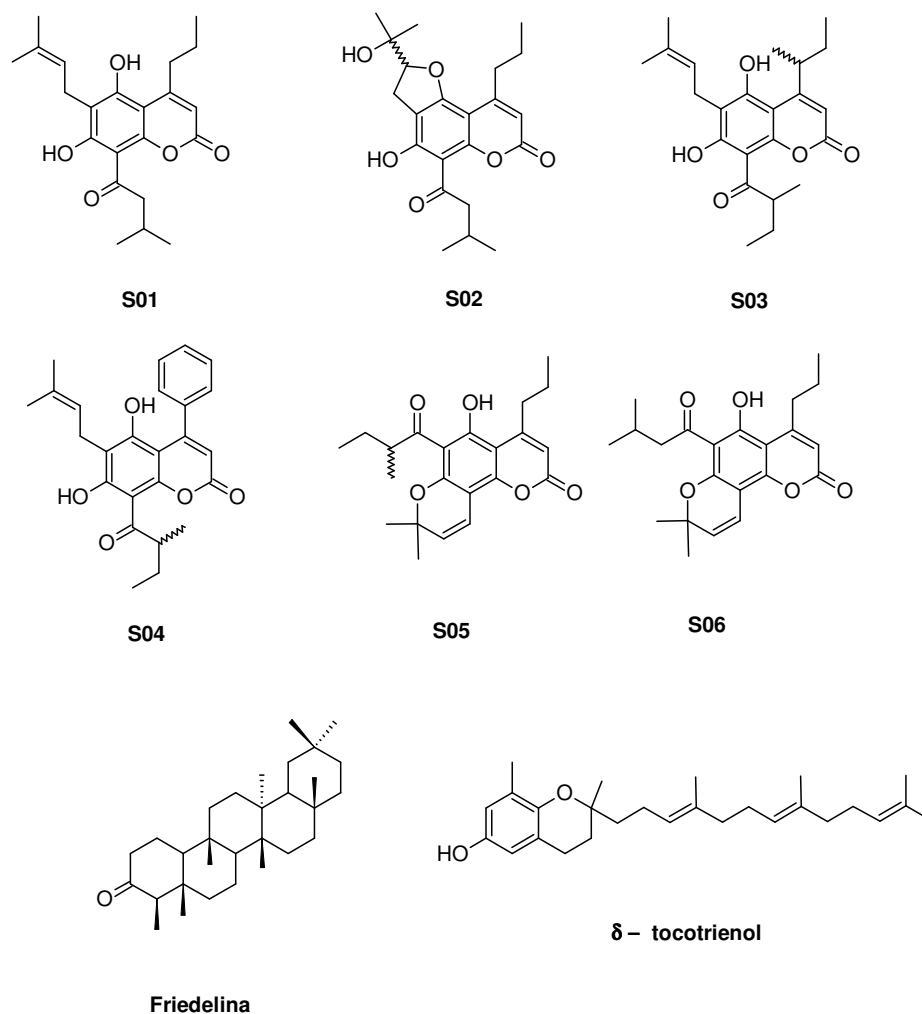
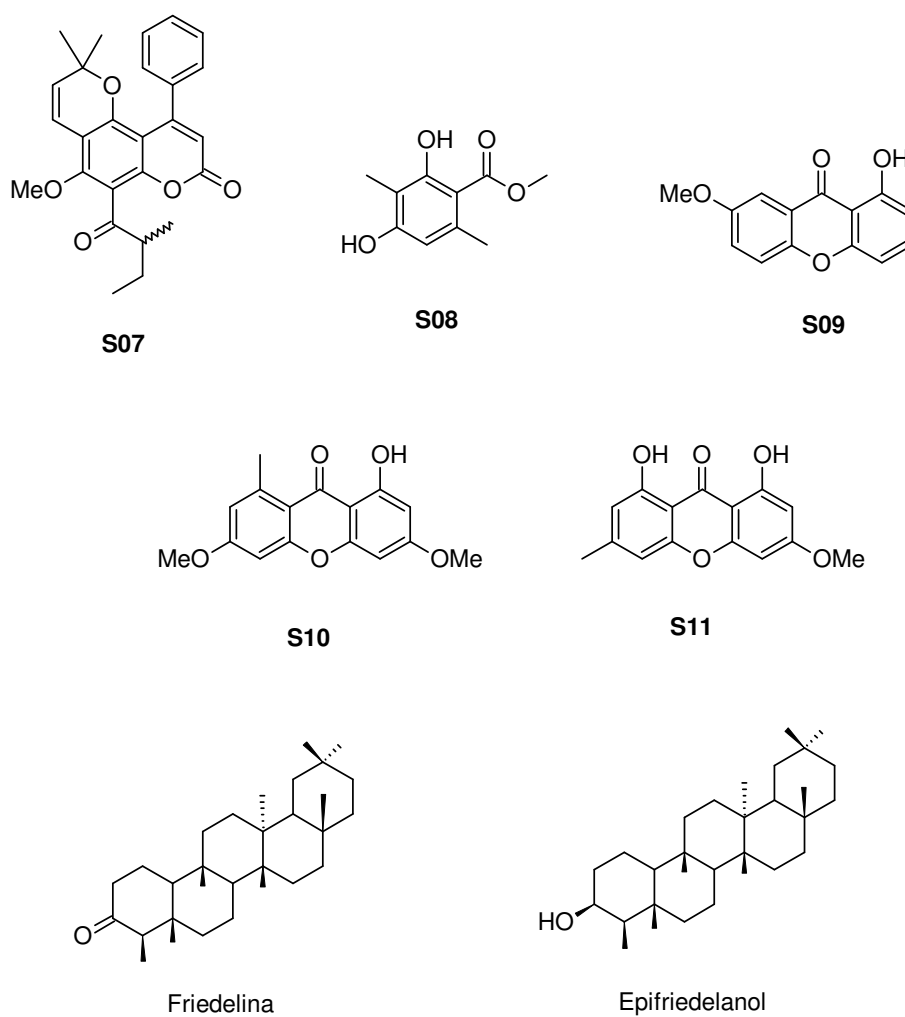
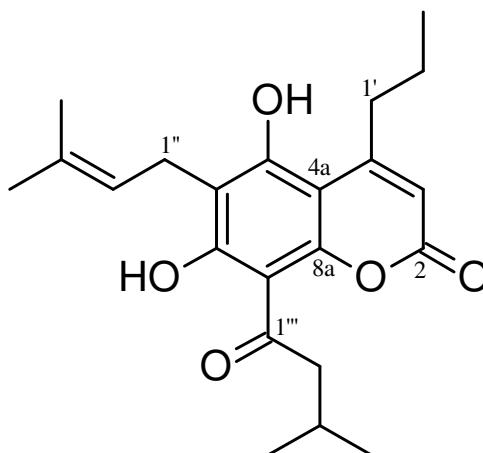


Figura 22. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *K. argentea*



**Figura 23.** Estruturas químicas das substâncias isoladas de *K. lathrophyton*

#### 4.1.1 Determinação estrutural da substância S01



**Figura 24.** Estrutura química da substância **S01**

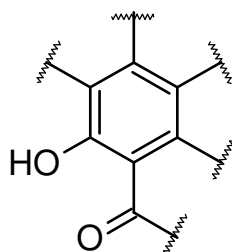
A substância **S01** (10,6 mg) foi isolada na forma de um sólido branco, solúvel em clorofórmio, a partir do extrato hexânico das raízes de *K. argentea* por meio de sucessivos processos cromatográficos (**Figura 12, p. 50**). A identificação da substância foi realizada com base nos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHSQC e gHMBC.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (**Figura 34, p. 68**) apresentou 21 sinais referentes à substância **S01** e, complementado com os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 31, p. 66**) e gHSQC (**Figura 35, p. 69**), sensível a fase, verificou-se que estes sinais correspondiam a cinco grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), quatro grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), três grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e dez carbonos não-hidrogenados.

A análise da região entre 0 – 2,5 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 32, p. 67**) permitiu verificar a presença de um tripleto em  $\delta$  1,03 com constante de acoplamento ( $J$ ) igual a 7,5 Hz e cuja integração correspondeu a três átomos de hidrogênios (3H). A partir do espectro de gHSQC, observou-se a correlação destes com o sinal em  $\delta$  13,9 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e sendo correspondente a um grupo metílico. Em continuidade, observou-se um dubleto em  $\delta$  1,04 com  $J = 6,7$  Hz e integração correspondente a seis hidrogênios correlacionado ao carbono em  $\delta$  22,6 caracterizando a presença de dois grupos metílicos magneticamente equivalentes e dubletos em  $\delta$  1,83 ( $\delta$  25,9) e  $\delta$  1,89 ( $\delta$  18,1) com  $J = 0,75$  e 1,3 Hz, respectivamente,

caracterizando outros dois grupos metílicos. Assim como se verificou também a presença de um multipletto na região entre  $\delta$  1,62 - 1,69 ( $\delta$  22,7) correspondente a um grupo metilênico. Na região entre 2,5 - 6,0 ppm (**Figura 33, p. 67**), observou-se um hepteto em  $\delta$  2,28 ( $\delta$  25,6) com  $J = 6,7$  Hz correspondente a um grupo metínico; um tripleto em  $\delta$  2,93 ( $\delta$  38,6) com  $J = 6,7$  Hz correspondente a um grupo metilênico; dubletos em  $\delta$  3,17 com  $J = 6,7$  Hz e  $\delta$  3,50 com  $J = 7,2$  Hz também correspondentes a grupos metilênicos correlacionados, respectivamente, com os sinais em  $\delta$  53,6 e 21,5; e um tripleto em  $\delta$  5,24 ( $\delta$  120,1) com  $J = 7,2$  Hz correspondente a um grupo metínico. Adicionalmente, observou-se um singletto em  $\delta$  6,02 ( $\delta$  110,2) correspondente a um grupo metínico; e dois singletos, respectivamente, em  $\delta$  6,87 (1H) e  $\delta$  14,69 (1H), os quais não estão ligados diretamente a um átomo de carbono.

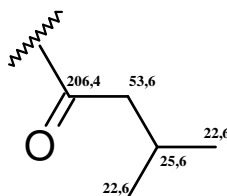
Analisando o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observou-se sinais na região entre 100 a 165 ppm, os quais caracterizam a presença de um anel aromático e grupos olefínicos. Em conjunto com os dados visualizados no espectro de gHSQC, pode-se inferir que o hidrogênio referente ao singletto em  $\delta$  14,69 esteja ligado a um heteroátomo como, por exemplo, um átomo de oxigênio, sendo assim correspondente a um grupo hidroxílico. A partir do experimento de gHMBC (**Figuras 36 e 37, p. 69 e 70**), observou-se que o hidrogênio correlaciona-se a longa distância com os carbonos em  $\delta$  104,5, 109,6, 156,4, 159,2, e 165,4, os quais podem ser atribuídos a um anel aromático; assim como correlaciona-se também com o carbono em  $\delta$  206,4. Este sinal pode ser atribuído a um grupo carbonílico, o qual estaria em uma posição vizinha ao grupo hidroxílico no anel aromático e cuja proximidade permite a formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular (**Figura 25**).



**Figura 25.** Estrutura química parcial da substância **S01**

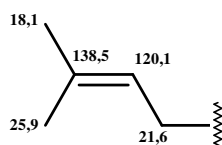
Informações adicionais obtidas a partir do experimento bidimensional demonstraram também as correlações do grupo metilênico em  $\delta$  3,17 ( $\delta$  53,6) com o carbono em  $\delta$  206,3 e com o grupo metínico em  $\delta$  2,28 ( $\delta$  25,6). Este grupo por sua vez

correlaciona-se com os grupos metílicos correspondentes ao sinal em  $\delta$  1,04 ( $\delta$  22,6). Deste modo, os dados indicaram a presença de uma cadeia acíclica ligada ao anel aromático: o grupo 3-metil-1-oxobutílico (**Figura 26**).



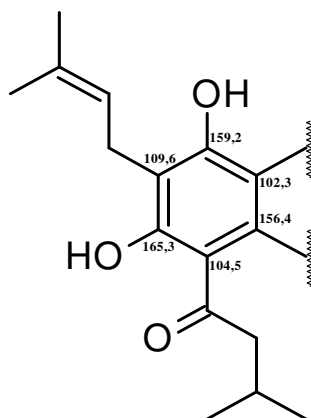
**Figura 26.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S01**

Em continuidade, observou-se as correlações do grupo metilênico em  $\delta$  3,50 ( $\delta$  21,5) com o grupo metínico em  $\delta$  5,24 ( $\delta$  120,1). Este por sua vez, correlaciona-se com o carbono não-hidrogenado em  $\delta$  138,5 e os grupos metílicos em  $\delta$  1,84 ( $\delta$  25,9) e 1,89 ( $\delta$  18,1), caracterizando a presença de um grupo prenílico (2-metil-but-2-enil). A partir das correlações do grupo metilênico com os sinais em  $\delta$  109,6, 159,2 e 165,3, pode-se concluir que o grupo prenílico está ligado ao anel aromático (**Figura 27**).



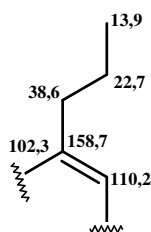
**Figura 27.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S01**

O sinal em  $\delta$  6,87, referente ao grupo hidroxílico, também está ligado ao anel aromático ao correlacionar-se com os sinais em  $\delta$  102,3, 109,6 e 159,2. Deste modo, a partir das correlações a longa distância observadas, pôde-se propor as localizações dos diferentes grupos ligados ao anel aromático (**Figura 28**).



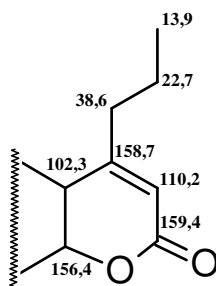
**Figura 28.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S01**

Em continuidade às análises do espectro de gHMBC, observou-se que o hidrogênio em  $\delta$  6,02 ( $\delta$  110,2) está correlacionado com os carbonos em  $\delta$  38,6, 102,3, 158,7 e 159,4. O grupo metilênico cujo deslocamento corresponde a  $\delta$  2,93 ( $\delta$  38,6) também apresenta correlações com os carbonos em  $\delta$  102,3 e 158,7 além das correlações com o carbono em  $\delta$  22,7 e 110,2. O sinal em  $\delta$  1,65 ( $\delta$  22,7) correspondente a outro grupo metilênico, e por sua vez, está correlacionado com o grupo metílico em  $\delta$  1,03 (13,9). A partir destas correlações, pode-se propor a presença de uma cadeia *n*-propílica ligada ao sistema olefínico (**Figura 29**).

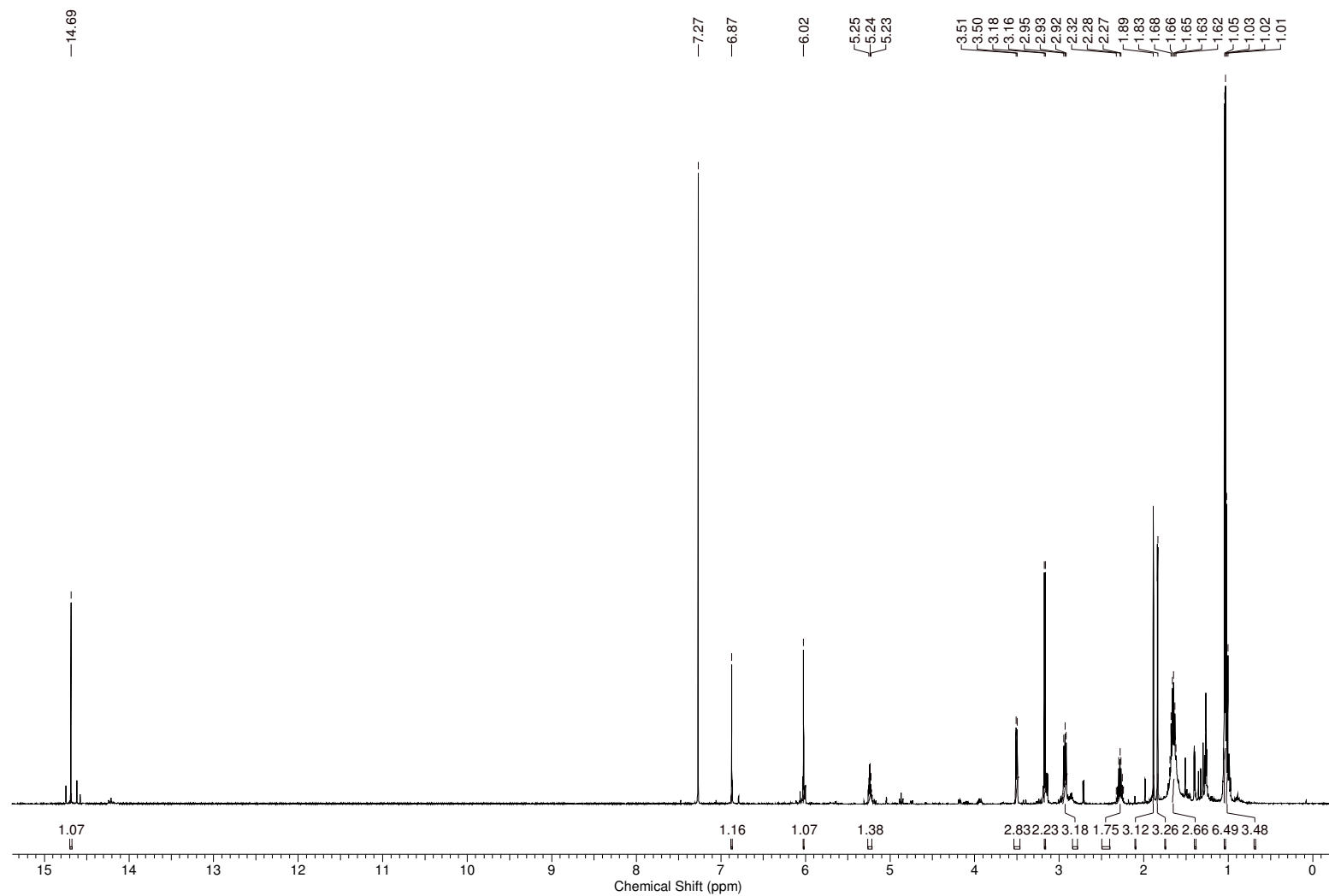


**Figura 29.** Dados de RMN de <sup>13</sup>C (ppm) e estrutura química parcial da substância **S01**

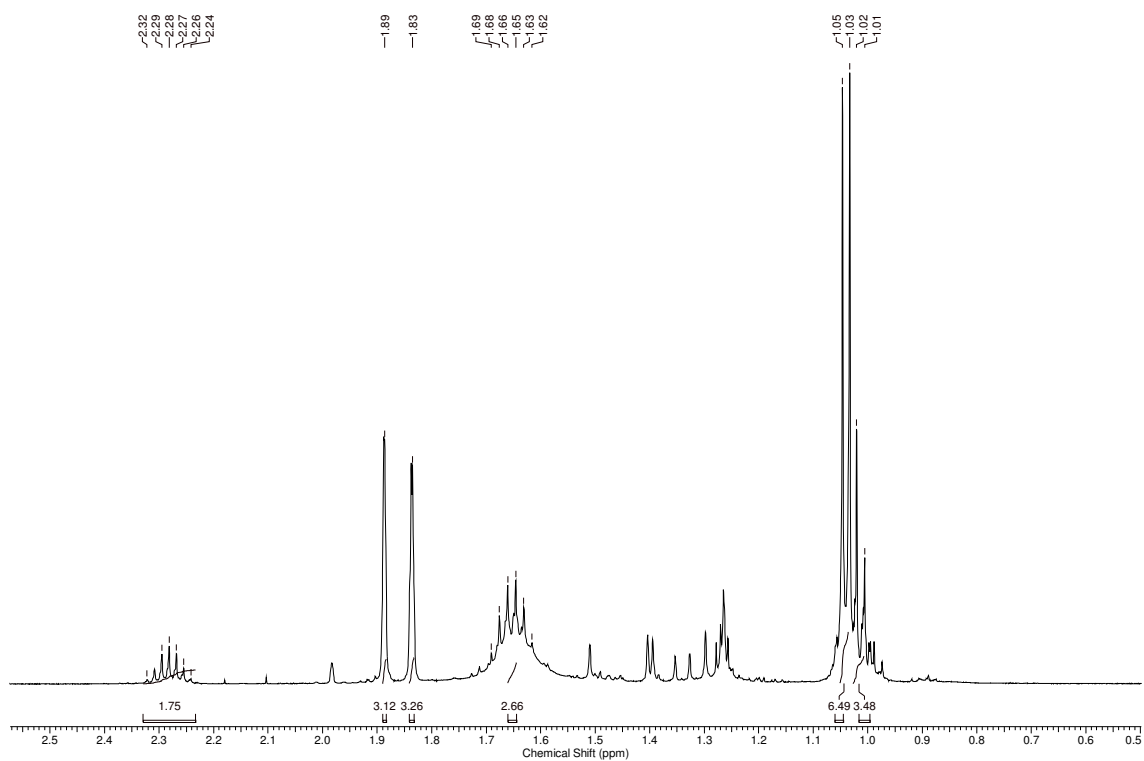
Ademais, observa-se um átomo de carbono não-hidrogenado com deslocamento químico em  $\delta$  159,4. Pode-se inferir que este carbono esteja oxigenado e corresponda a um grupo carbonílico, o qual justifica também a desproteção por efeito de ressonância do carbono olefínico localizado em uma posição  $\beta$  ao grupo carbonílico. O deslocamento do grupo carbonílico em  $\delta$  159,4, por sua vez, o qual apresenta-se relativamente blindado para grupos desta natureza, pode ser correspondente a um éster cíclico, ou seja, uma lactona (**Figura 30**). A presença do heteroátomo no anel justifica também o deslocamento do carbono em  $\delta$  156,4, o qual é pertencente ao anel aromático vizinho. Deste modo, a estrutura da substância **S01** apresenta um núcleo cumarínico, proposta esta de acordo com os dados espectroscópicos presentes na literatura (PATRA *et al.*, 1991) e corresponde à 4-alkilcumarina mammea B/BA (YANG *et al.*, 2005).



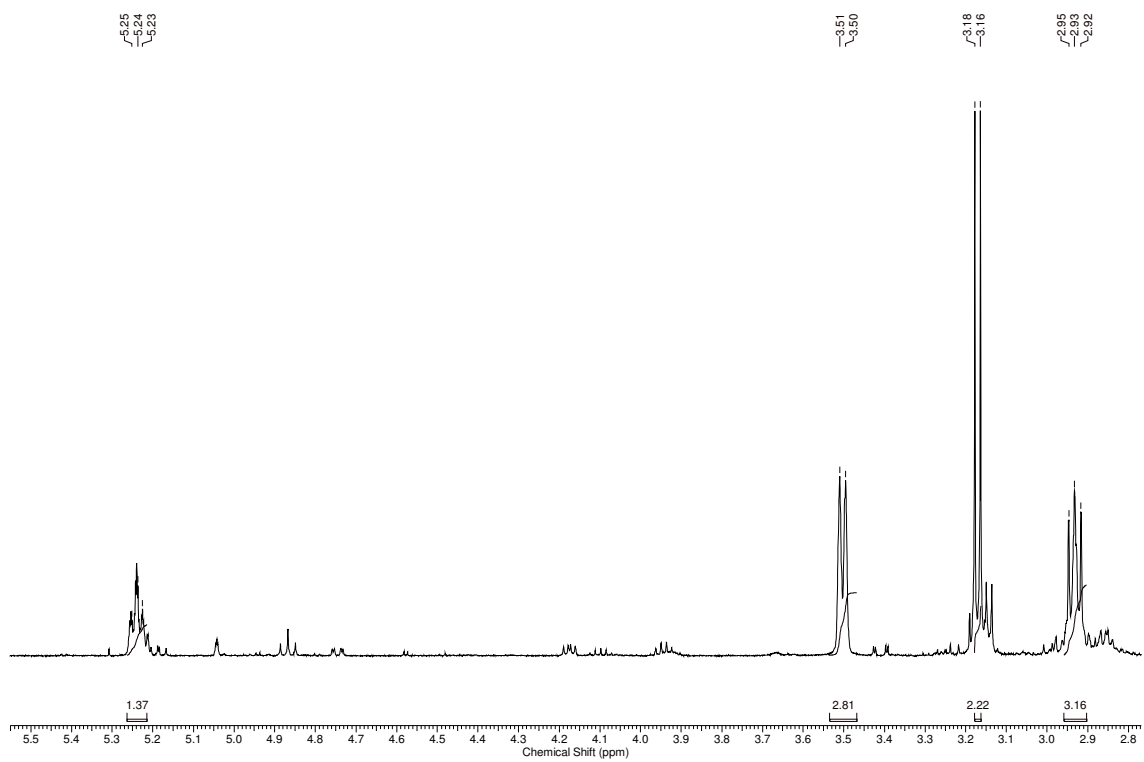
**Figura 30.** Dados de RMN de <sup>13</sup>C (ppm) e estrutura química parcial da substância **S01**



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S01**

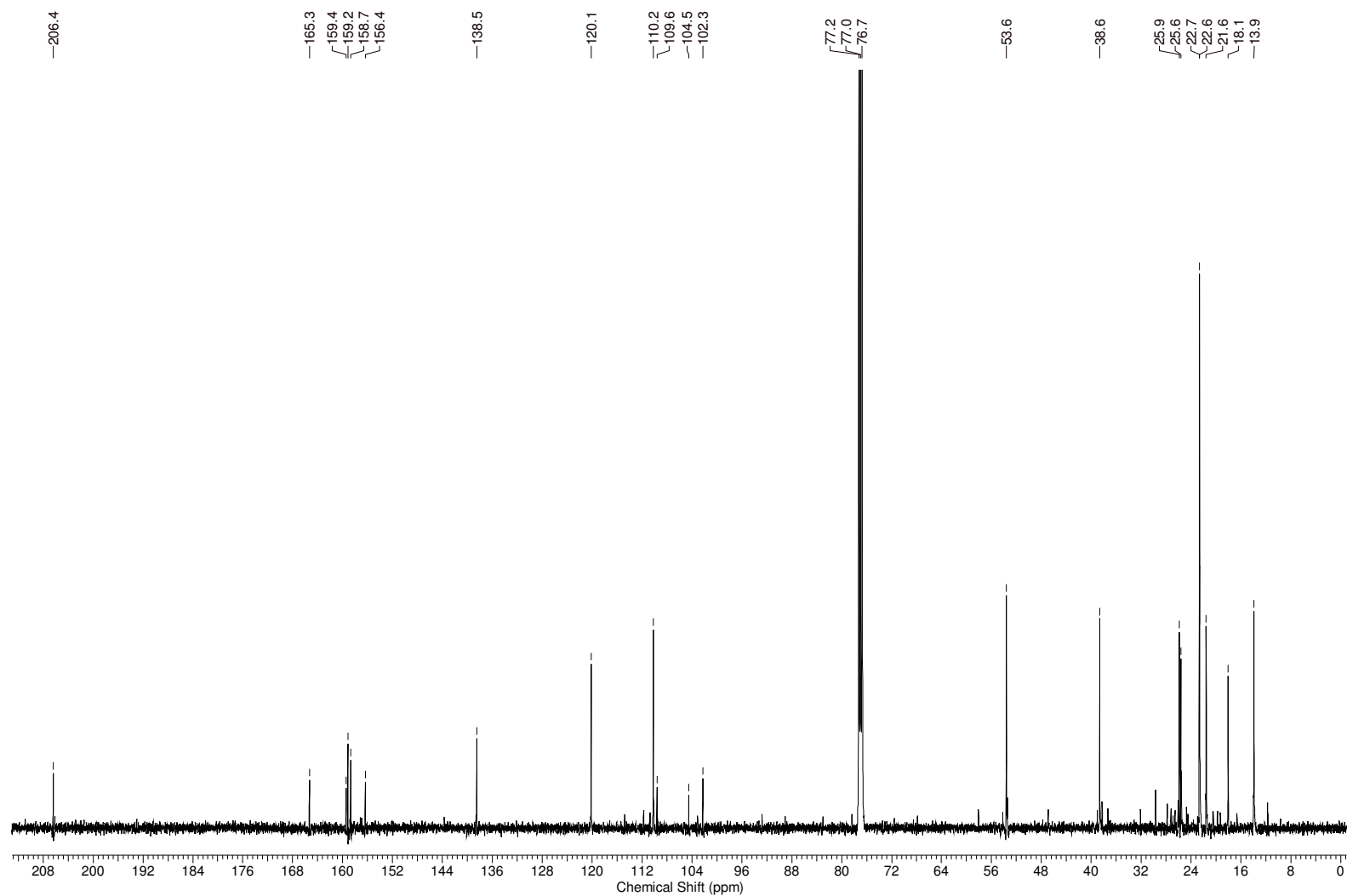


**Figura 32.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,5 - 2,5) da substância S01

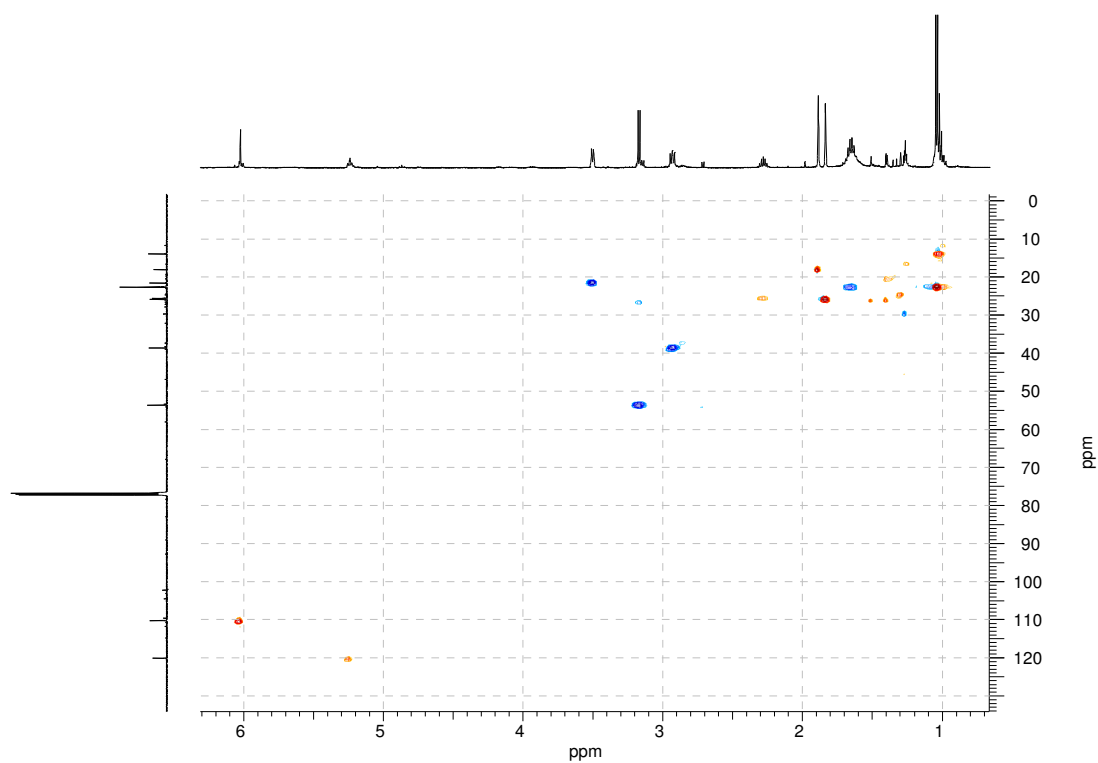


**Figura 33.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  2,8 - 5,5) da substância S01

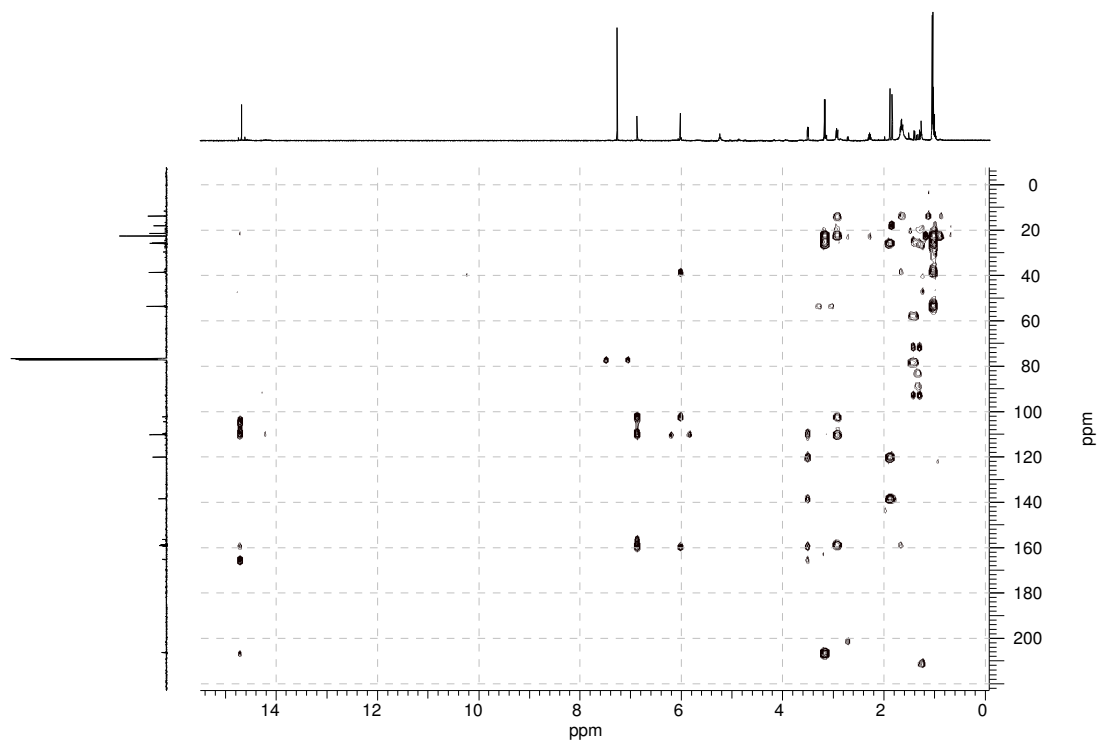




**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S01



**Figura 35.** Espectro gHSQC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S01



**Figura 36** Espectro gHMBC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S01

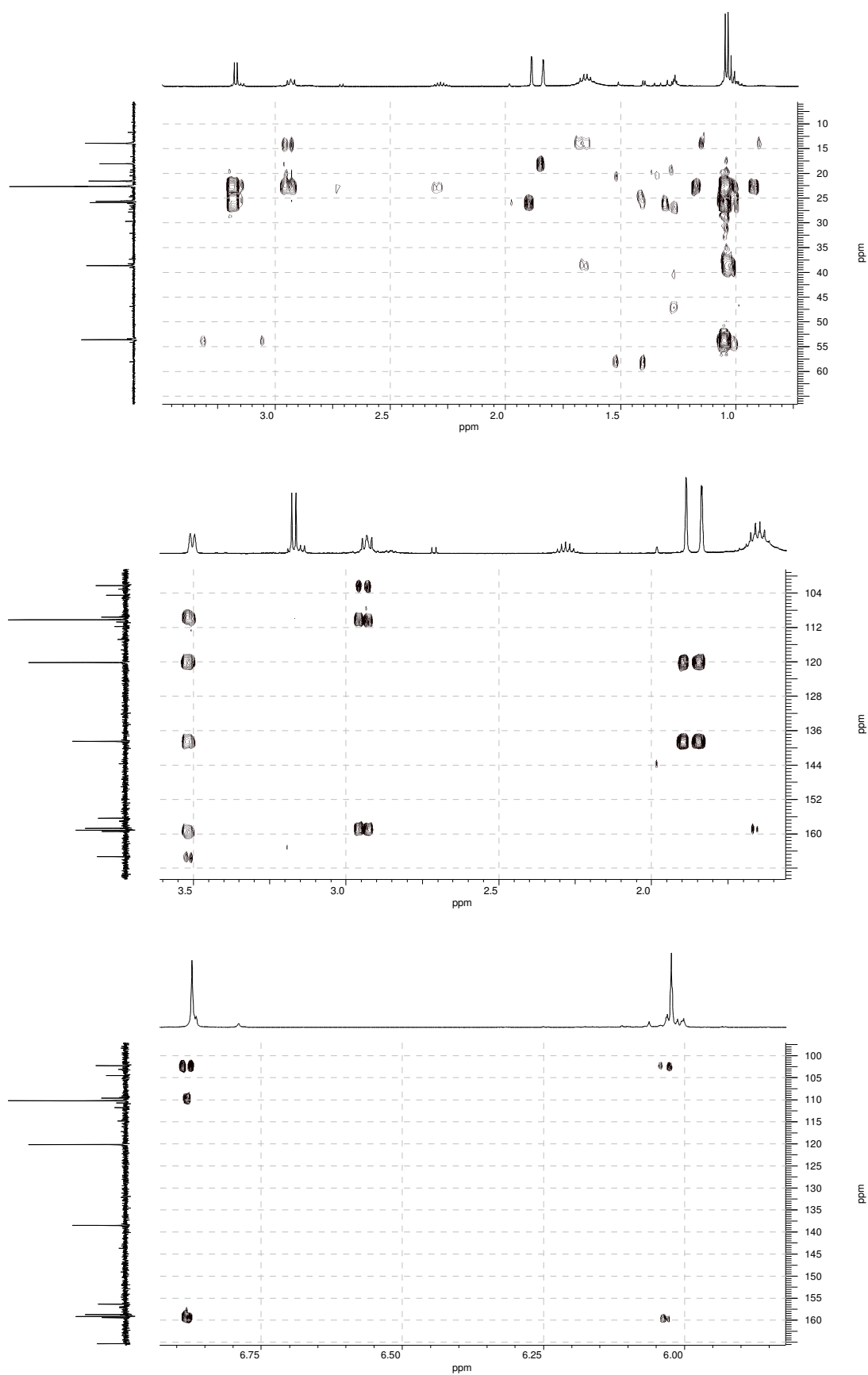


Figura 37. Ampliações do espectro gHMBC da substância S01

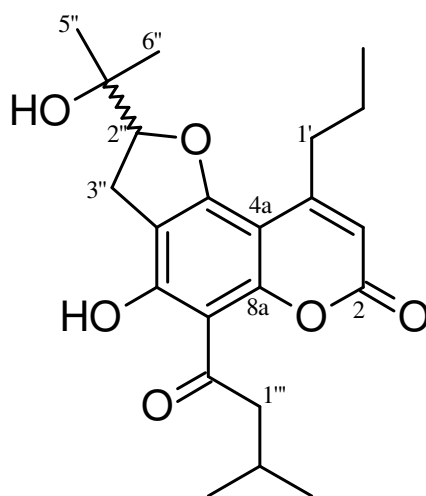
**Tabela 4.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC da substância **S01**<sup>a,b</sup>

N <sup>o</sup>	$\delta$ $^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integração]	$\delta$ $^{13}\text{C}$ /HSQC	HMBC (HC)
<b>2</b>	-	159,4	-
<b>3</b>	6,02 (s; 1H)	110,2	38,6; 102,3; 158,7; 159,4
<b>4</b>	-	158,7	-
<b>4a</b>	-	102,3	-
<b>5</b>	-	159,2	-
<b>6</b>	-	109,6	-
<b>7</b>	-	165,3	-
<b>8</b>	-	104,5	-
<b>8a</b>	-	156,4	-
<b>1'</b>	2,93 ( <i>t</i> ; 6,7; 2H)	38,6	22,7; 102,3; 110,2; 158,7
<b>2'</b>	1,65 ( <i>m</i> ; 2H)	22,7	13,9; 38,6; 158,7
<b>3'</b>	1,03 ( <i>t</i> ; 7,5; 3H)	13,9	22,7; 38,6
<b>1''</b>	3,50 ( <i>d</i> ; 7,2; 2H)	21,6	109,6; 120,1; 138,5; 159,2
<b>2''</b>	5,24 ( <i>t</i> ; 7,2; 1H)	120,1	-
<b>3''</b>	-	138,5	-
<b>4''</b>	1,83 ( <i>d</i> ; 0,75; 3H)	25,9	18,1; 120,1; 138,5
<b>5''</b>	1,89 ( <i>d</i> ; 1,3; 3H)	18,1	25,8; 120,1; 138,5
<b>1'''</b>	-	206,4	-
<b>2'''</b>	3,17 ( <i>d</i> ; 6,7; 2H)	53,6	22,6; 25,6; 206,4
<b>3'''</b>	2,28 ( <i>hept</i> ; 6,7; 1H)	25,6	22,6
<b>4'''</b>	1,04 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	22,6	22,6; 25,6; 53,6
<b>5'''</b>	1,04 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	22,6	22,6; 25,6; 53,6
<b>5-OH</b>	6,87 (s; 1H)	-	102,3; 109,6; 159,2
<b>7-OH</b>	14,69 (s; 1H)	-	104,5; 109,6; 156,4; 159,2; 165,4; 206,4

<sup>a</sup> Dados de RMN de acordo com o descrito por YANG *et al.* (2005).

<sup>b</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.1.2 Determinação estrutural da substância S02



**Figura 38.** Estrutura química da substância **S02**

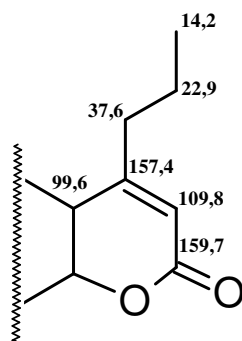
A substância **S02** (5,0 mg), um óleo amarelo-marrom, solúvel em clorofórmio e opticamente inativa  $[\alpha]_D^{25} = \pm 0,00$  ( $c$  0,014,  $\text{CHCl}_3$ ), foi isolada a partir do extrato hexânico de *K. argentea* (**Figura 12, p. 50**). A identificação da substância foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHSQC e gHMBC.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (**Figura 46, p. 78**) apresentou 21 sinais referentes à **S02** e, complementado com os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 43, p. 76**) e gHSQC (**Figura 47, p. 79**), verificou-se que estes sinais correspondiam a cinco grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), quatro grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), três grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e dez carbonos não-hidrogenados.

Analisando a região entre 1,0 - 2,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 44, p. 77**), observou-se a presença de um dubleto em  $\delta$  1,04 com constante de acoplamento igual a 6,5 Hz e integração correspondente a seis átomos de hidrogênio. A partir do espectro de gHSQC, verificou-se a correlação destes hidrogênios com o sinal em  $\delta$  22,9 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sendo dessa forma correspondente a dois grupos metílicos magneticamente equivalentes. Em continuidade, observou-se um tripleto em  $\delta$  1,05 ( $J = 7,3$  Hz; 3H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  14,2 e singletos em  $\delta$  1,30 (3H) e 1,41 (3H) correlacionados, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  26,3 e 25,0, os quais são

correspondentes a grupos metílicos e um multipletto em  $\delta$  1,66 (2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  22,9 e correspondente a um grupo metilênico. Na região entre 2,0 - 5,0 ppm (**Figura 45, p. 77**), verificou-se um hepteto em  $\delta$  2,27 ( $J = 6,5$  Hz; 1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  25,8 correspondendo a um grupo metínico; um triplo em  $\delta$  2,85 ( $J = 6,0$  Hz; 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  37,6 correspondendo a um grupo metilênico; um dubleto em  $\delta$  3,14 ( $J = 6,5$  Hz; 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  53,6 e um duplo dubleto em  $\delta$  3,16 ( $J = 9,5$  e 1,0 Hz; 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  26,8, ambos correspondendo a grupos metilênicos. Assim como um triplo em  $\delta$  4,87 ( $J = 9,5$ ; 1H) correlacionado com o sinal em  $\delta$  93,0; um singlete  $\delta$  6,01 (1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  109,8, ambos correspondendo a grupos metínicos; além de um singlete em  $\delta$  14,20 (1H) não correlacionado com qualquer sinal do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

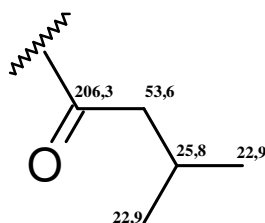
A partir desta análise inicial, observou-se uma similaridade entre os dados de RMN da substância **S02** e a substância **S01** como, por exemplo, a presença de um singlete em  $\delta$  6,01 referente ao H-3 do anel cumarínico com substituição em C-4 e a presença de uma hidroxila fenólica em  $\delta$  14,20 característica de uma ligação de hidrogênio intramolecular com um grupo carbonílico. A partir das correlações a longa distância no espectro de gHMBC (**Figuras 48 e 49, p. 79 e 80**), observou-se a presença de um grupo *n*-propílico assim como também as correlações de C-1' com os sinais em  $\delta$  99,6, 109,8 e 157,4 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os quais correspondem ao anel lactônico de uma 4-alkilcumarina (**Figura 39**).



**Figura 39.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S02**

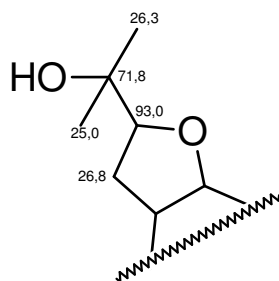
O sinal em  $\delta$  206,3 no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 46**), característico de grupos cetônicos, corrobora a proposta da presença de um grupo carbonílico, o qual havia sido sugerido anteriormente para justificar a desblindagem do hidrogênio do

grupo hidroxílico. Dados obtidos a partir do experimento gHMBC demonstraram as correlações do grupo metilênico em  $\delta$  3,14 ( $\delta$  53,6) com o carbono em  $\delta$  206,3 e com o grupo metínico em  $\delta$  2,27 ( $\delta$  25,8). Este grupo por sua vez está correlacionado com os grupos metílicos correspondentes aos sinais em  $\delta$  1,04 ( $\delta$  22,9). Deste modo, estes dados também indicaram a presença de um grupo 3-metil-1-oxobutil na estrutura da substância **S02** (Figura 40).



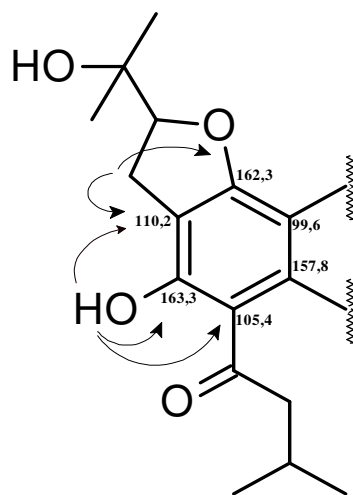
**Figura 40.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S02**

Adicionalmente, observou-se correlações do grupo metilênico em  $\delta$  3,16 ( $\delta$  26,8) com os átomos de carbono do anel aromático em  $\delta$  110,2 e 162,3 assim como correlações com o grupo metínico em  $\delta$  4,87 ( $\delta$  93,0) e o carbono não-hidrogenado  $\delta$  71,8. Verificou-se também as correlações dos grupos metílicos em  $\delta$  1,30 ( $\delta$  26,3) e 1,41 ( $\delta$  25,0) com estes sinais em  $\delta$  71,8 e 93,0. Diferentemente da substância **S01**, não verificou-se a presença de um sistema olefínico neste grupo da substância **S02** assim como também não foi observado o sinal referente a uma hidroxila fenólica em C-5. A partir destes dados, pode-se propor que o grupo prenílico observado na substância **S01** esteja ciclizado formando um anel do tipo diidrofurano, algo que é relativamente comum nas estruturas das 4-alkilcumarinas (**Figura 41**) (GUILLET *et al.*, 2001).



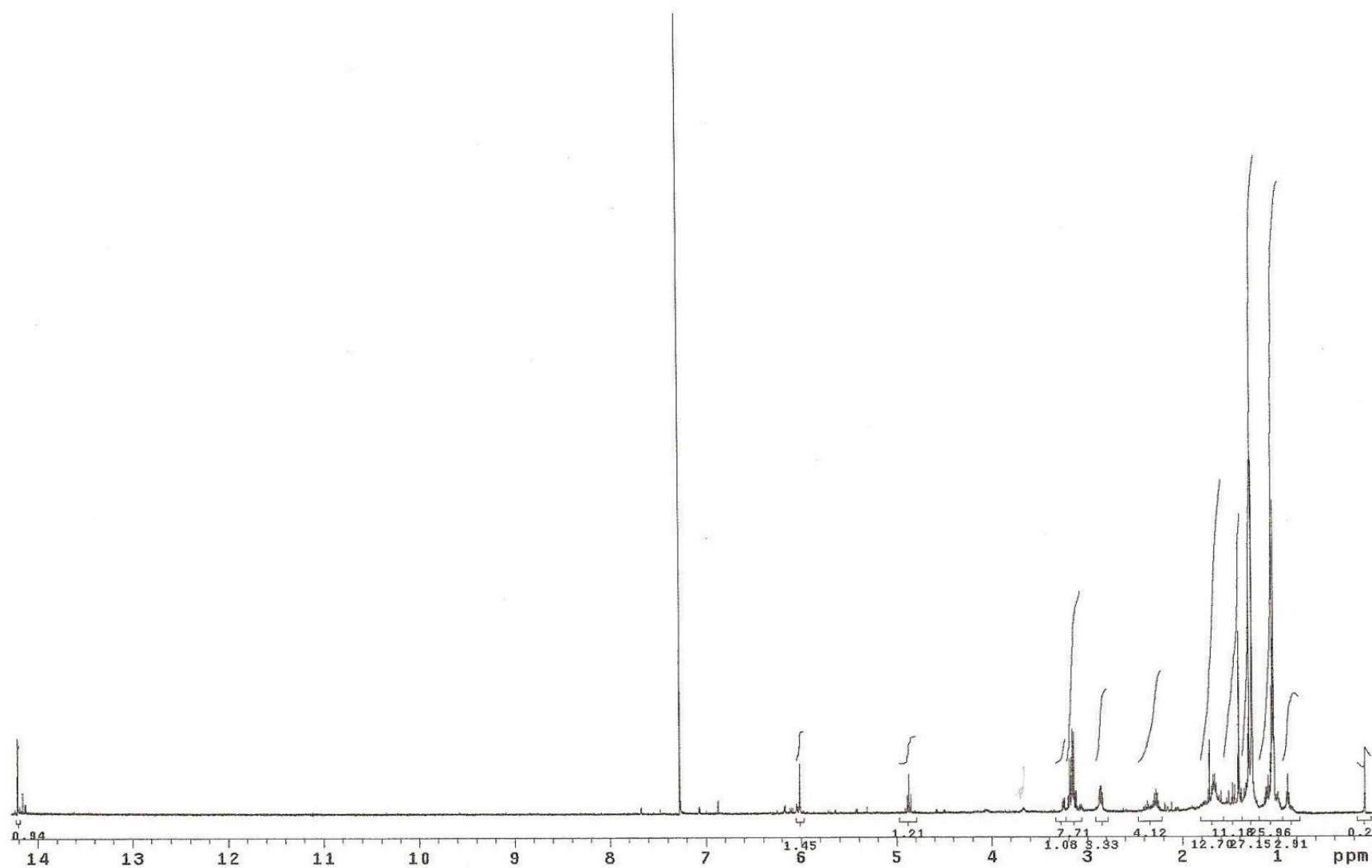
**Figura 41.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S02**

A partir das correlações observadas no espectro de gHMBC do grupo metilênico em C-3''' do anel diidrofurano com os sinais em  $\delta$  110,2 e 162,3 e das correlações do hidrogênio do grupo hidroxílico em  $\delta$  14,20 com os sinais em  $\delta$  105,4, 110,2 e 163,3, pode-se determinar a posição dos grupos no anel aromático (**Figura 42**) e confirmar que a substância **S02** corresponde à 4-alkilcumarina mammea B/BA ciclo F (YANG *et al.*, 2005). Adicionalmente, pode-se destacar o fato de que **S02** não apresentou um valor da rotação óptica significativo enquanto que Yang *et al.* (2005) indicaram que a mammea B/BA ciclo F apresentou um valor de  $[\alpha]_D^{25} = \pm 5,2^\circ$  ( $c$  0,0019, MeOH). Guilet *et al.* (2001) e Scio *et al.* (2003), por sua vez, destacaram que as 4-alkilcumarinas furânicas usualmente apresentam valores de atividade óptica relativamente baixos. Guilet *et al.* (2001) observaram também que os sinais referentes aos hidrogênios do núcleo furânico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mammea A/AA ciclo F ( $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c$  0,06,  $\text{CHCl}_3$ )) foram duplicados ao realizar o experimento de RMN usando o ácido R(-)- $\alpha$ -acetoxifenilacético como agente de solvatação quiral, e concluíram assim que o composto apresentava uma natureza racêmica. A partir destes dados, pode-se inferir que a ciclização da cadeia prenílica em 4-alkilcumarinas furânicas ocorra através de um processo não enzimático a partir dos correspondentes precursores prenílicos.

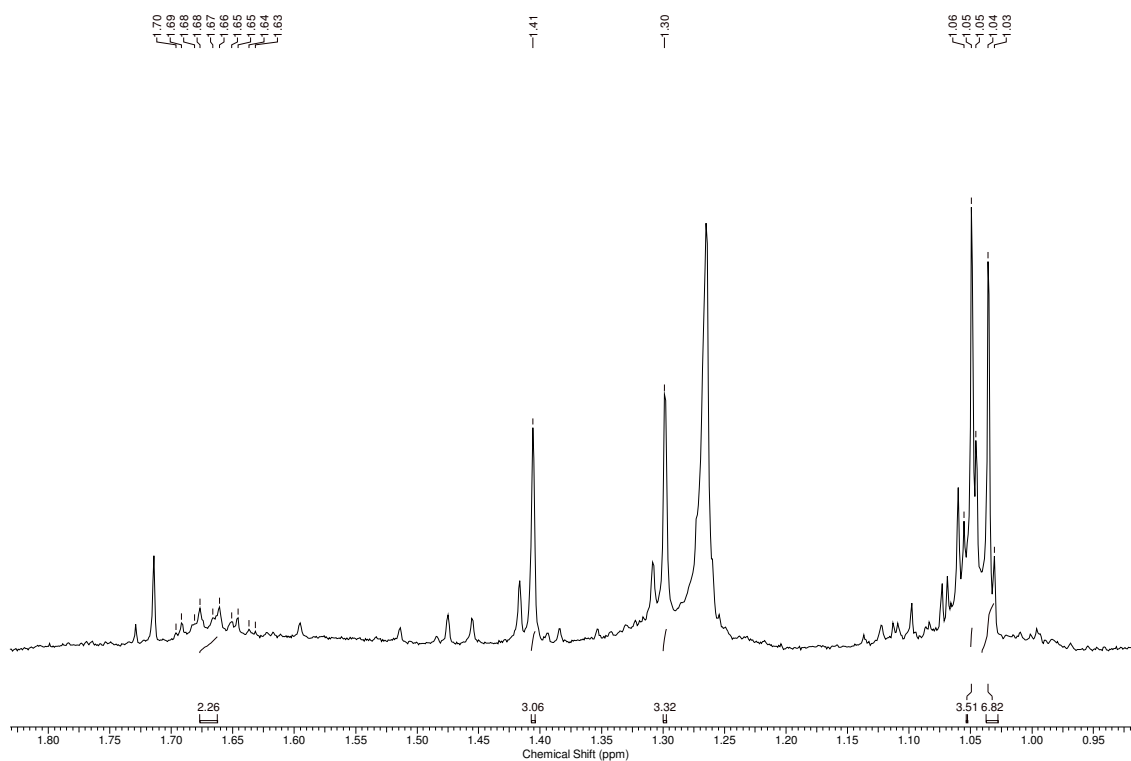


**Figura 42.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S02**

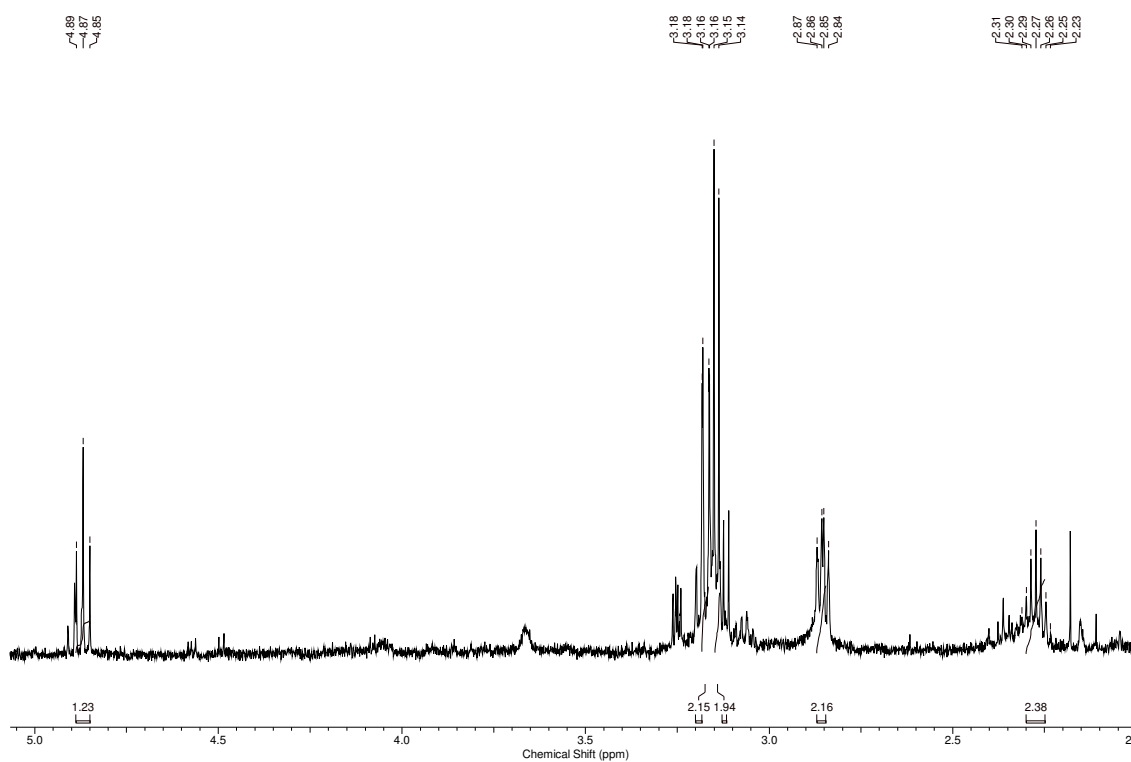




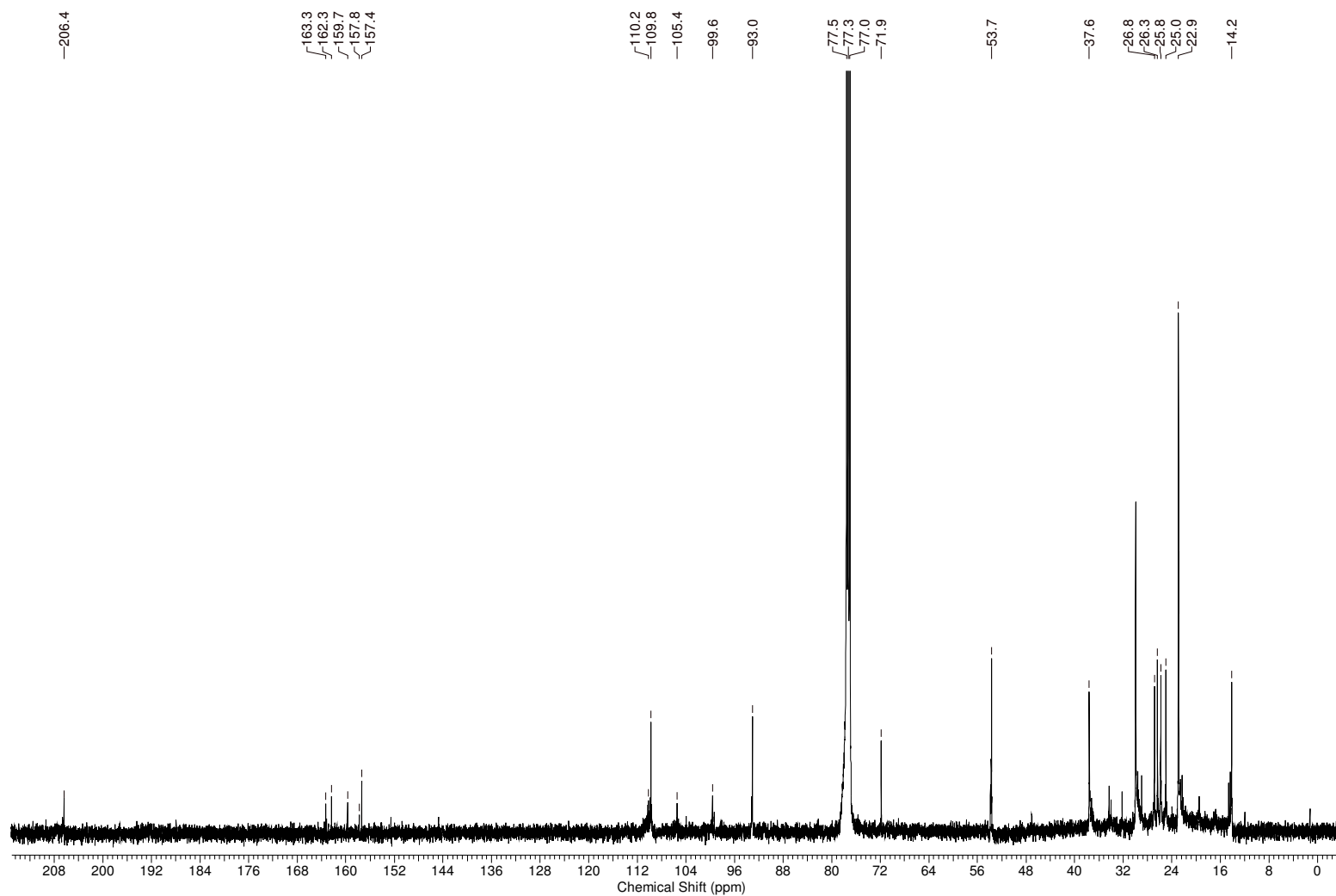
**Figura 43.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S02



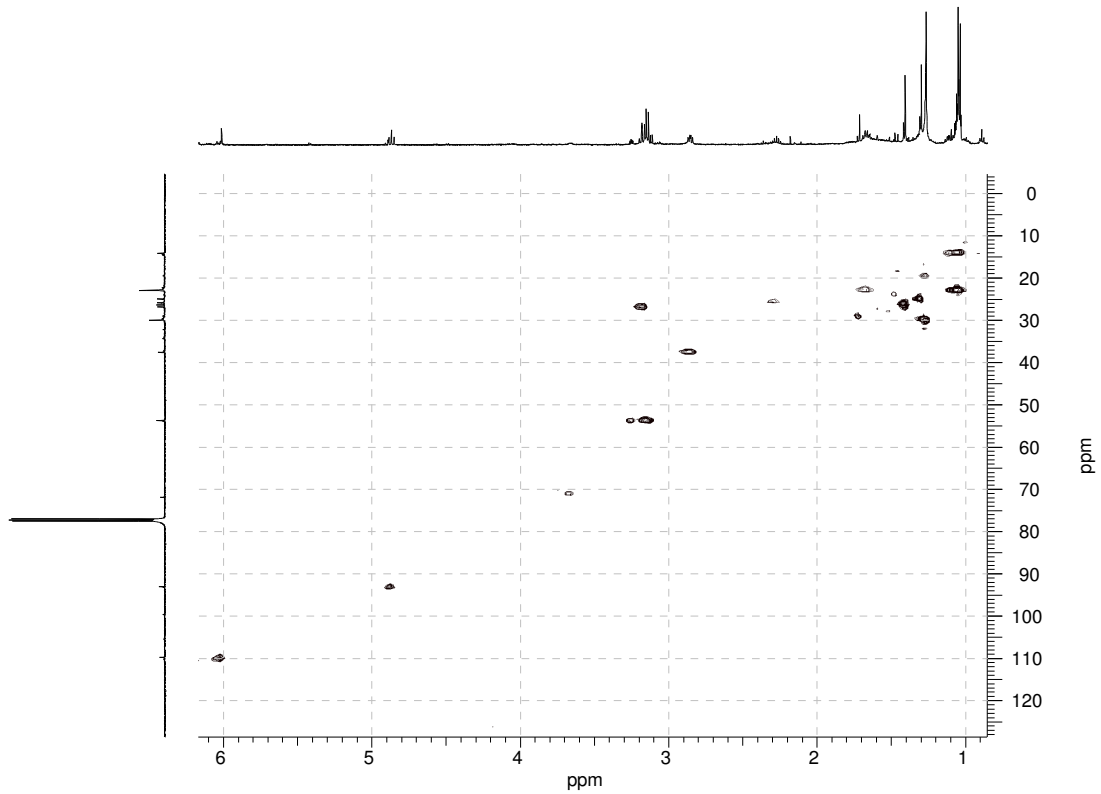
**Figura 44.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  1,0 - 1,8) da substância **S02**



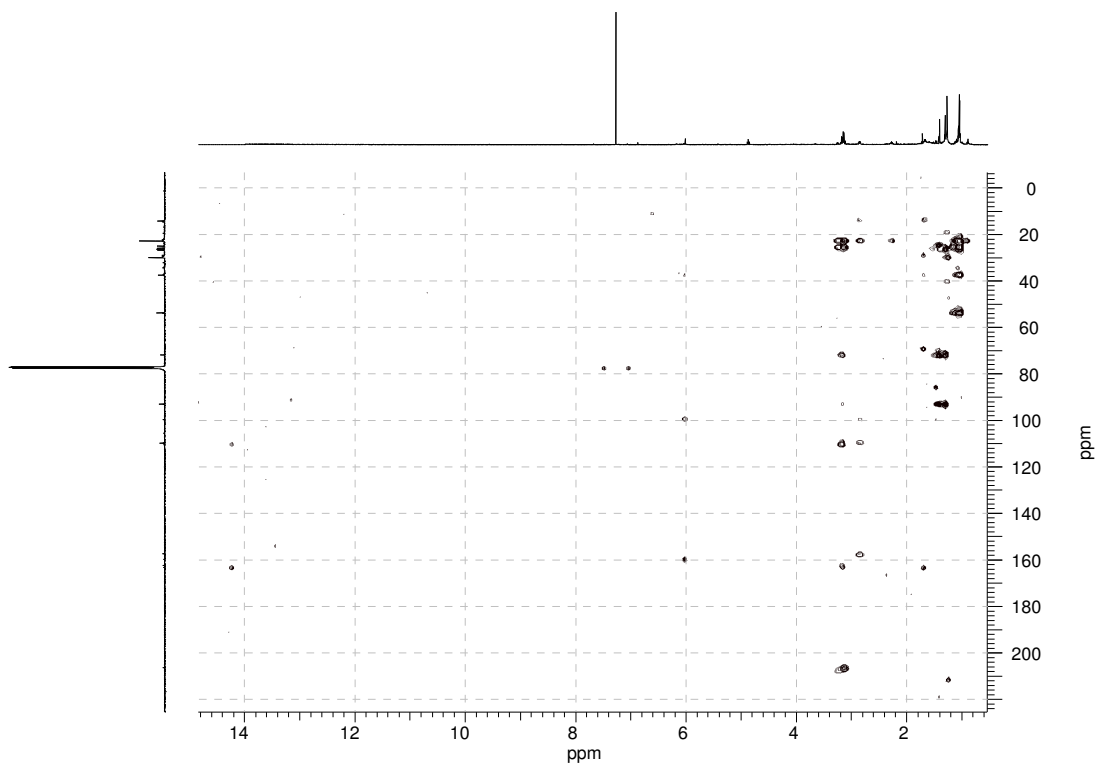
**Figura 45.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  2,0 - 5,0) da substância **S02**



**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S02**



**Figura 47.** Espectro gHSQC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S02



**Figura 48.** Espectro gHMBC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S02

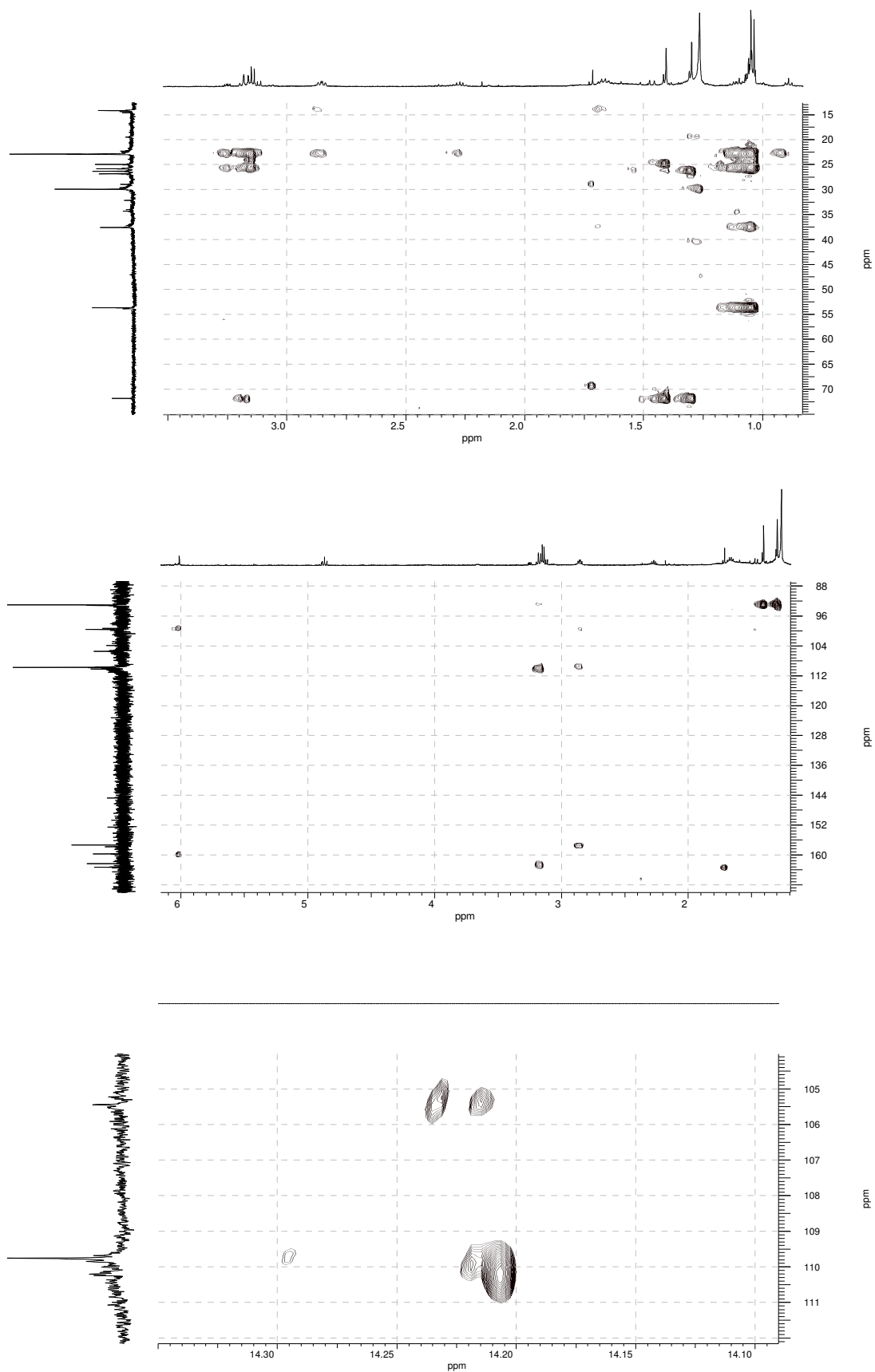


Figura 49. Ampliações do espectro gHMBC da substância S02

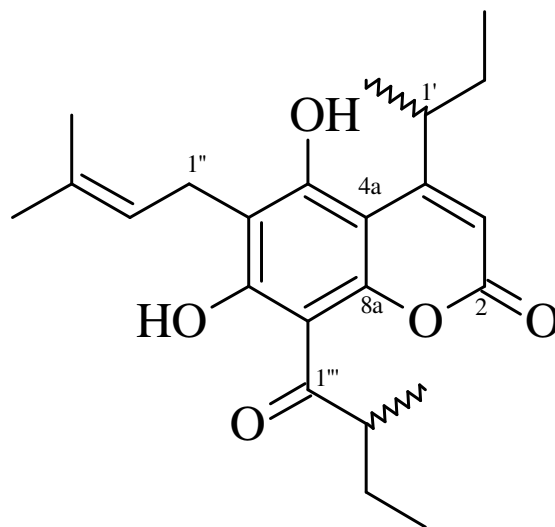
**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC da substância **S02**<sup>a, b</sup>

N <sup>o</sup>	$\delta$ $^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integração]	$\delta$ $^{13}\text{C}$ /HSQC	HMBC (HC)
2	-	159,7	-
3	6,01 ( <i>s</i> , 1H)	109,8	37,6; 99,6; 159,7
4	-	157,4	-
4a	-	99,6	-
5	-	162,3	-
6	-	110,2	-
7	-	163,3	-
8	-	105,4	-
8a	-	157,8	-
1'	2,85 ( <i>t</i> ; 6,0; 2H)	37,6	14,2; 22,9; 99,6; 109,8; 157,1
2'	1,66 ( <i>m</i> ; 2H)	22,9	14,2
3'	1,05 ( <i>t</i> ; 7,3; 3H)	14,2	37,6
2''	4,87 ( <i>t</i> ; 9,5; 1H)	93,0	-
3''	3,16 ( <i>dd</i> ; 9,5 e 1,0 Hz; 2H)	26,8	71,8; 93,0; 110,2; 162,3
4''	-	71,8	-
5''	1,30 ( <i>s</i> ; 3H)	26,3	25,0; 71,8; 93,0
6''	1,41 ( <i>s</i> ; 3H)	25,0	26,3; 71,8; 93,0
1'''	-	206,3	-
2'''	3,14 ( <i>d</i> ; 6,5; 2H)	53,6	22,9; 25,8; 206,3
3'''	2,27 ( <i>hept</i> ; 6,5; 1H)	25,8	22,9
4'''	1,04 ( <i>d</i> ; 6,5; 3H)	22,9	22,9; 25,8; 53,6
5'''	1,04 ( <i>d</i> ; 6,5; 3H)	22,9	22,9; 25,8; 53,6
7-OH	14,20 ( <i>s</i> ; 1H)	-	105,4; 110,2; 163,3

<sup>a</sup> Dados de RMN de acordo com o descrito por YANG *et al.* (2005).

<sup>b</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.1.3 Determinação estrutural da substância S03



**Figura 50.** Estrutura química da substância **S03**

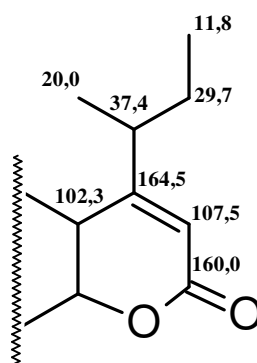
A substância **S03** (8,2 mg), um sólido branco, solúvel em clorofórmio e opticamente ativa cujo valor de  $[\alpha]_D^{25} = -0,20$  ( $c$  0,030, MeOH), foi isolada a partir do extrato hexânico de *K. argentea* (**Figura 13**, p. 52). A identificação da substância foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHSQC e gHMBC.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (**Figura 56**, p. 87) apresentou 23 sinais referentes à **S03** e, complementado com os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 53**, p. 85) e gHSQC (**Figura 57**, p. 88), sensível a fase, verificou-se que estes sinais correspondiam a seis grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), três grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), quatro grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e dez carbonos não-hidrogenados.

Ao analisar a região entre 0 – 2,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 54**, p. 86), observou-se a presença de tripletos em  $\delta$  0,96 ( $J = 7,5$  Hz, 3H) e  $\delta$  0,98 ( $J = 7,5$  Hz, 3H), e a partir do espectro gHSQC, verificou-se as correlações, respectivamente, com os sinais em  $\delta$  11,8 e 11,7 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sendo correspondentes a dois grupos metílicos. Em continuidade, observou-se multipletos em  $\delta$  1,44 (1H) e  $\delta$  1,47 (1H) assim como também nas regiões entre  $\delta$  1,71 - 1,76 (1H) e  $\delta$  1,90 - 1,93 (1H). As correlações observadas no espectro gHSQC indicaram que estes sinais correspondiam a grupo metilênicos; sendo que os sinais em  $\delta$  1,44 e  $\delta$  1,74 estão correlacionados ao carbono em  $\delta$  29,7, e os sinais em  $\delta$  1,47 e  $\delta$  1,90 correlacionam-se com o carbono em  $\delta$  27,3. Deste modo, verifica-se que estes hidrogênios são

diastereotópicos, logo não são magneticamente equivalentes. Observou-se também singletos em  $\delta$  1,83 (3H) e  $\delta$  1,88 (3H) correlacionados com os carbonos em  $\delta$  25,9 e  $\delta$  18,1 correspondendo a dois grupos metílicos. Na região entre 3,0 – 5,5 ppm (**Figura 55, p. 86**), observou-se a presença de um multiplete entre  $\delta$  3,50 - 3,52 (2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  21,7 correspondendo a um grupo metilênico; sextetos em  $\delta$  3,84 ( $J = 6,7$  Hz, 1H) e  $\delta$  3,93 ( $J = 6,7$  Hz, 1H) correlacionados, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  37,4 e  $\delta$  47,0; e um tripleto  $\delta$  5,23 ( $J = 7,0$  Hz, 1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  120,1. Verificou-se também um singlete em  $\delta$  6,14 (1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  107,5; e singletos em  $\delta$  6,91 (1H) e  $\delta$  14,55 (1H) não correlacionados com um átomo de carbono.

A partir desta análise, observou-se a similaridade entre os dados de RMN da substância **S03** e a substância **S01** como, por exemplo, a presença de um singlete em  $\delta$  6,14 ( $\delta$  107,5) referente ao H-3 do anel cumarínico com substituição em C-4. Observando as correlações a longa distância no espectro de gHMBC (**Figuras 58 e 59, p. 88 e 89**), verificou-se as correlações do H-3 com os sinais em  $\delta$  102,3, 160,0 e 164,5 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os quais são correspondentes ao anel lactônico. Em continuidade, observou-se também as correlações do sinal em  $\delta$  3,84 ( $\delta$  37,4) com os carbonos em  $\delta$  102,3, 107,5 e 164,5 e também com o grupo metilênico em  $\delta$  29,7 e os grupos metílicos em  $\delta$  11,8 e 20,0 caracterizando a presença de uma cadeia *sec*-butílica em C-4 (**Figura 51**).



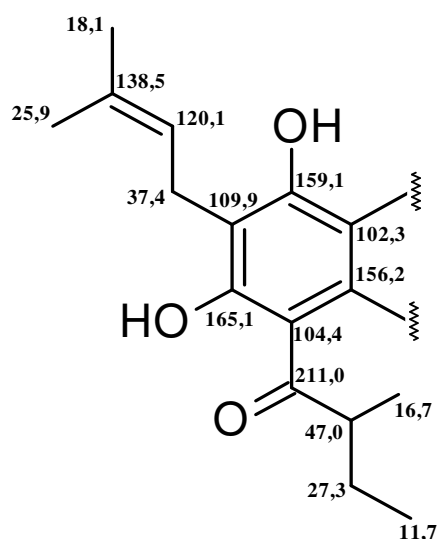
**Figura 51.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S03**

Verificou-se a correlação do hidrogênio em  $\delta$  6,91 com o carbono em  $\delta$  102,3, podendo assim inferir a presença de um grupo hidroxílico na posição C-5 do anel cumarínico sendo que este mesmo grupo correlaciona-se também com os carbonos em  $\delta$

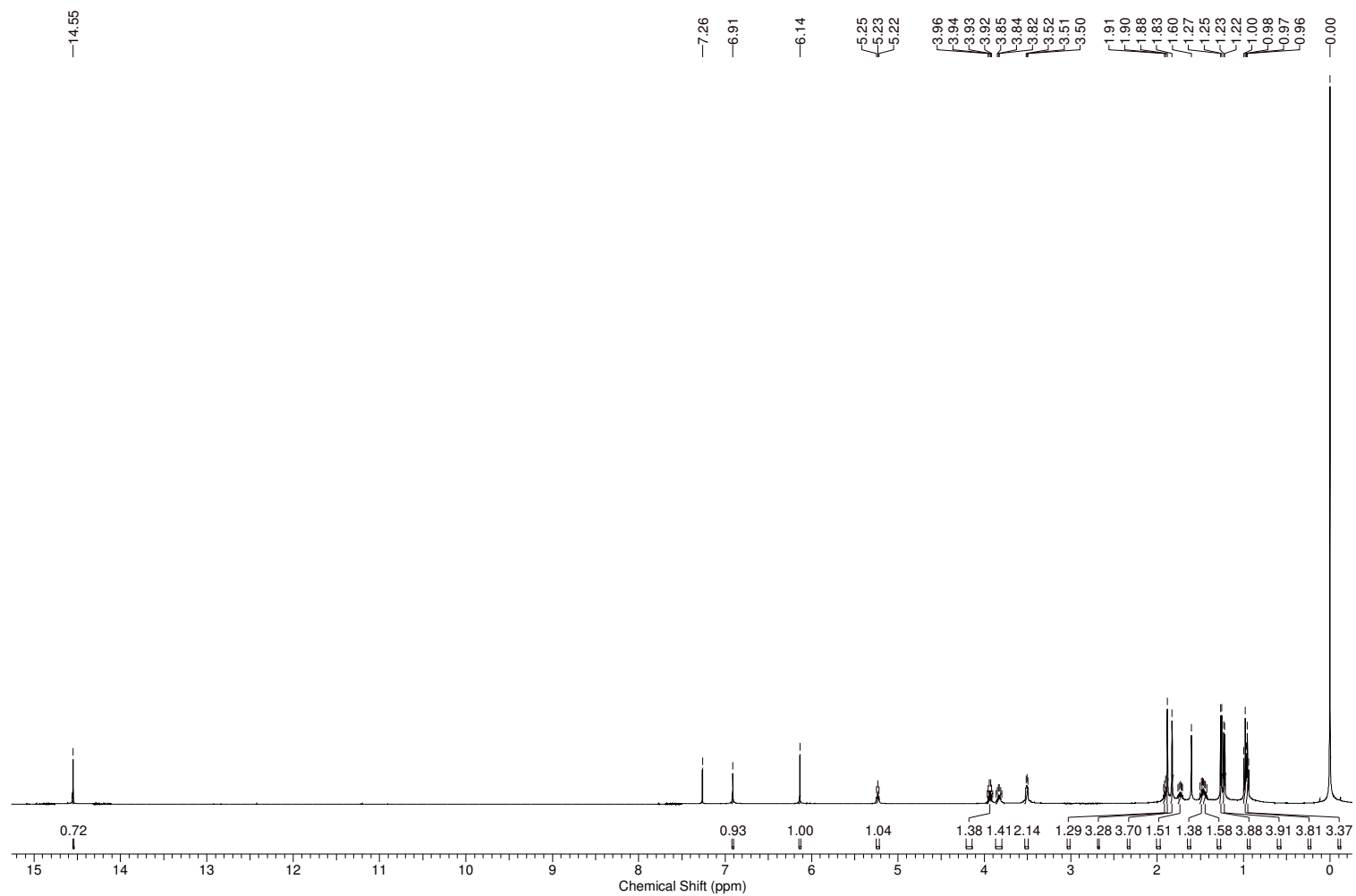


109,9, 159,1 e 165,1. De modo semelhante à estrutura da substância **S01**, observou-se os sinais característicos de uma cadeia prenífica como, por exemplo, os grupos metílicos ligados ao carbono olefínico em  $\delta$  138,5, o tripleto em  $\delta$  5,23 vizinho ao grupo metilênico em  $\delta$  3,51 ( $\delta$  21,7). Observou-se também a correlação deste grupo metilênico com os carbonos em  $\delta$  109,9, 159,1 e 165,0 do anel aromático, podendo dessa forma inferir a localização da cadeia prenífica em C-6.

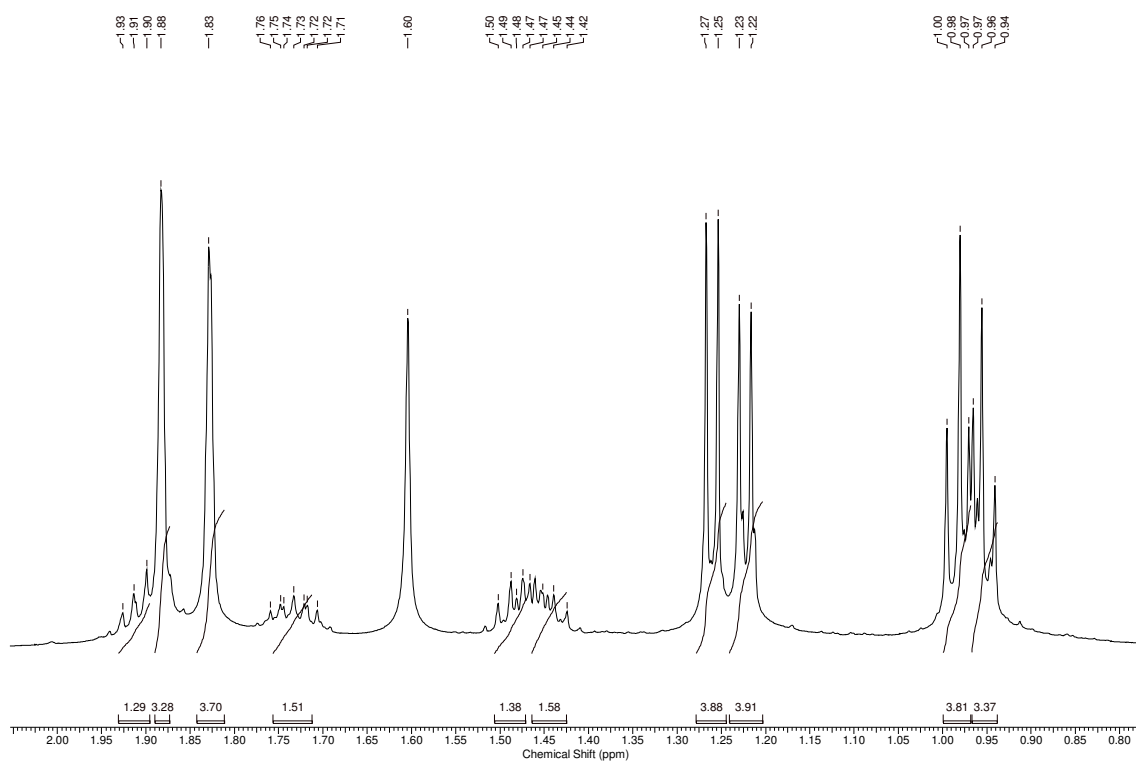
Assim como observado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **S01** e **S02**, o singlete em  $\delta$  14,55 pode ser atribuído ao grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular. A partir das correlações a longa distância com os sinais em  $\delta$  104,4, 109,9, 159,1 e 165,1, pode-se concluir a localização do grupo hidroxílico em C-7. Adicionalmente, observou-se a correlação também com o carbono em  $\delta$  211,0, o qual se pode inferir pertencer a uma cadeia acíclica em C-8. O sinal do grupo metínico em  $\delta$  3,93 ( $\delta$  47,0) também está correlacionado com o grupo carbonílico assim como com o grupo metilênico em  $\delta$  27,3 e com os grupos metílicos em  $\delta$  11,7 e  $\delta$  16,7 caracterizando a presença de uma cadeia 2-metil-1-oxobutílica (**Figura 52**). Deste modo, a substância **S03** corresponde à 4-alkilcumarina ferruol A (GOVINDACHARI *et al.*, 1967).



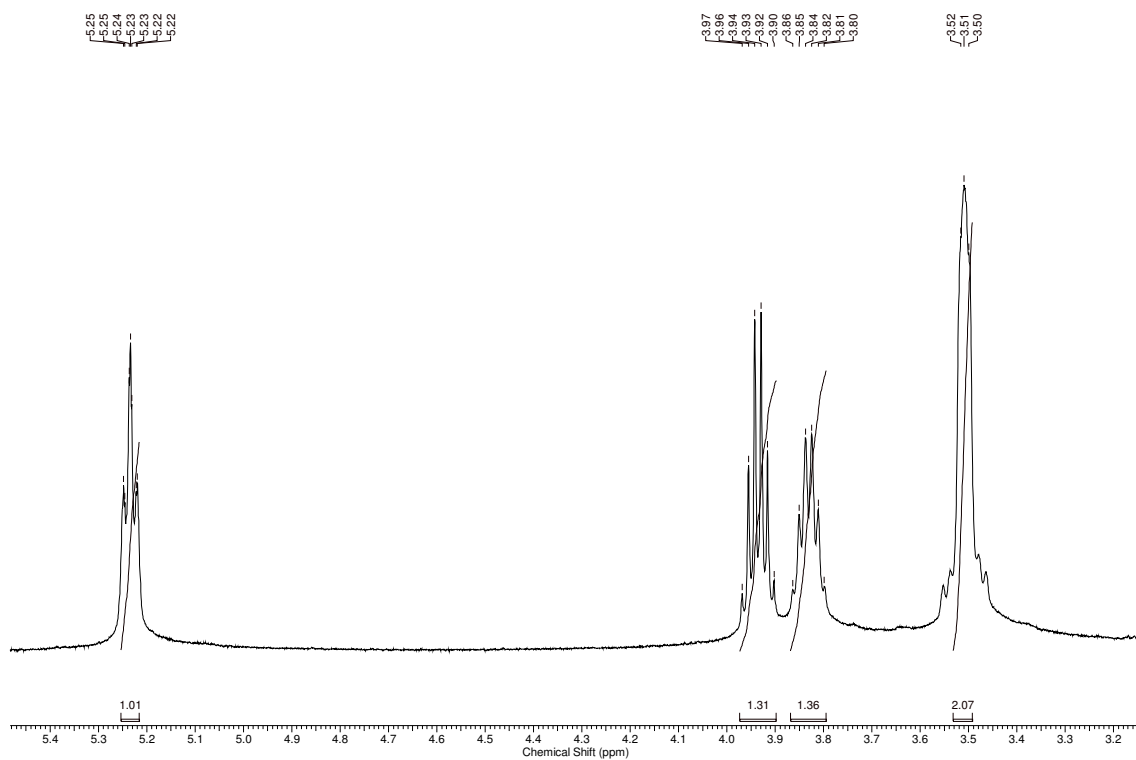
**Figura 52.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e estrutura química parcial da substância **S03**



**Figura 53.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S03**



**Figura 54.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,8 - 2,0) da substância **S03**



**Figura 55.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  3,0 - 5,5) da substância **S03**

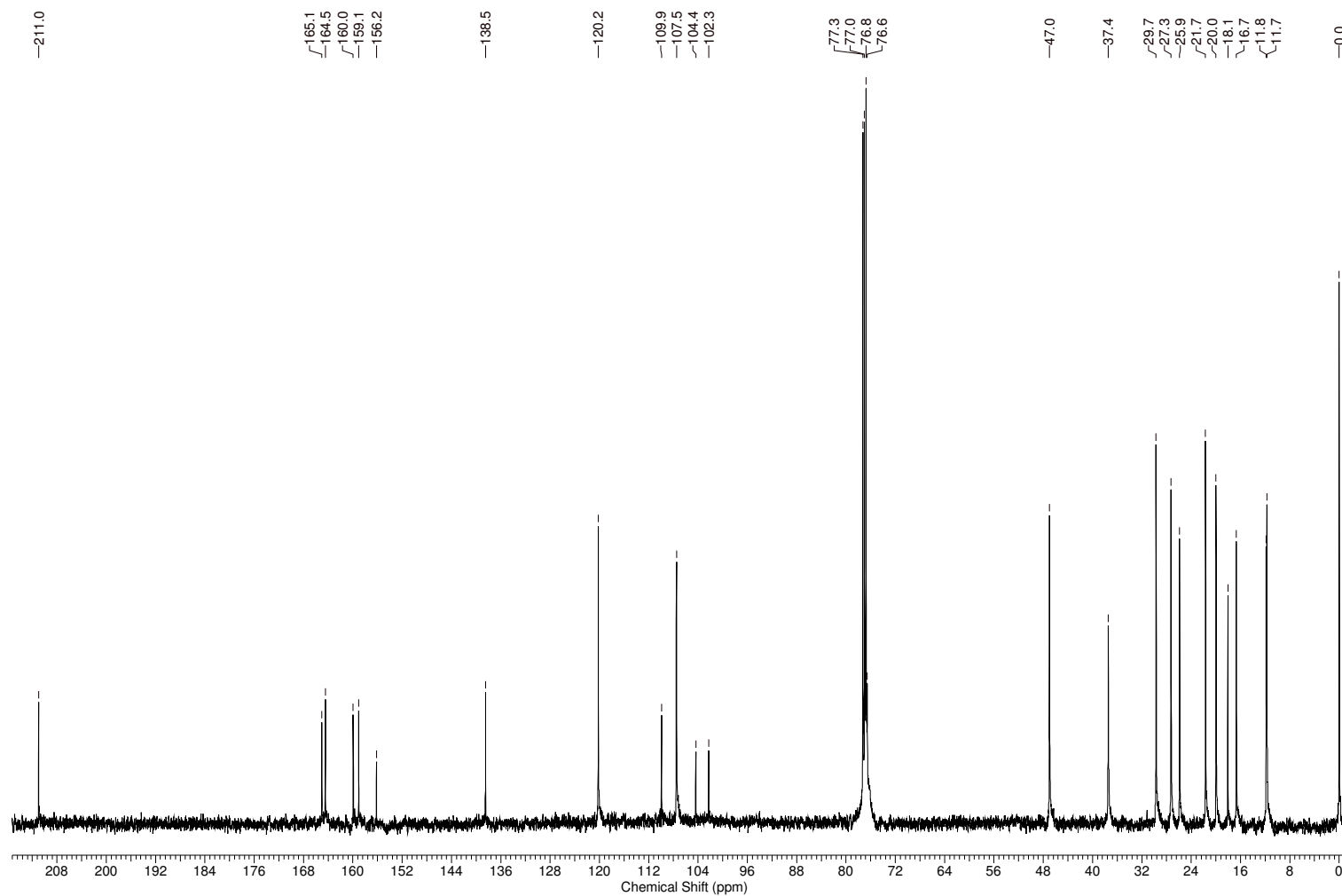


Figura 56. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S03

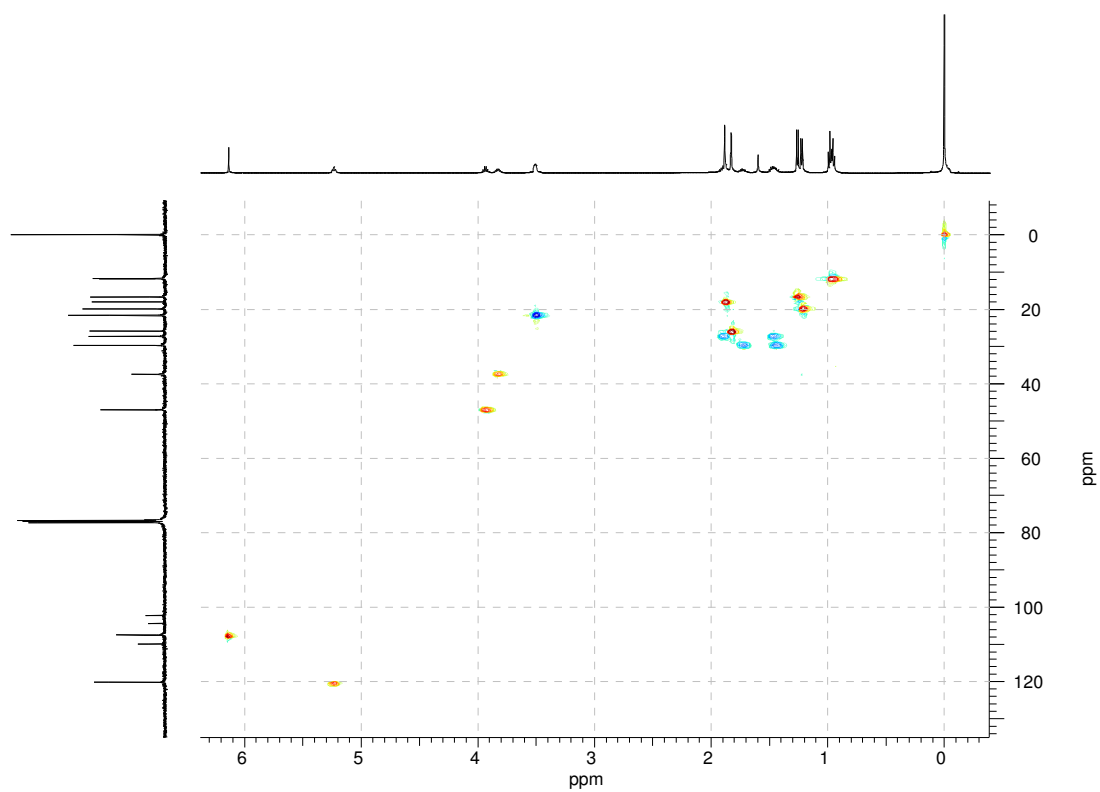


Figura 57. Espectro gHSQC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S03

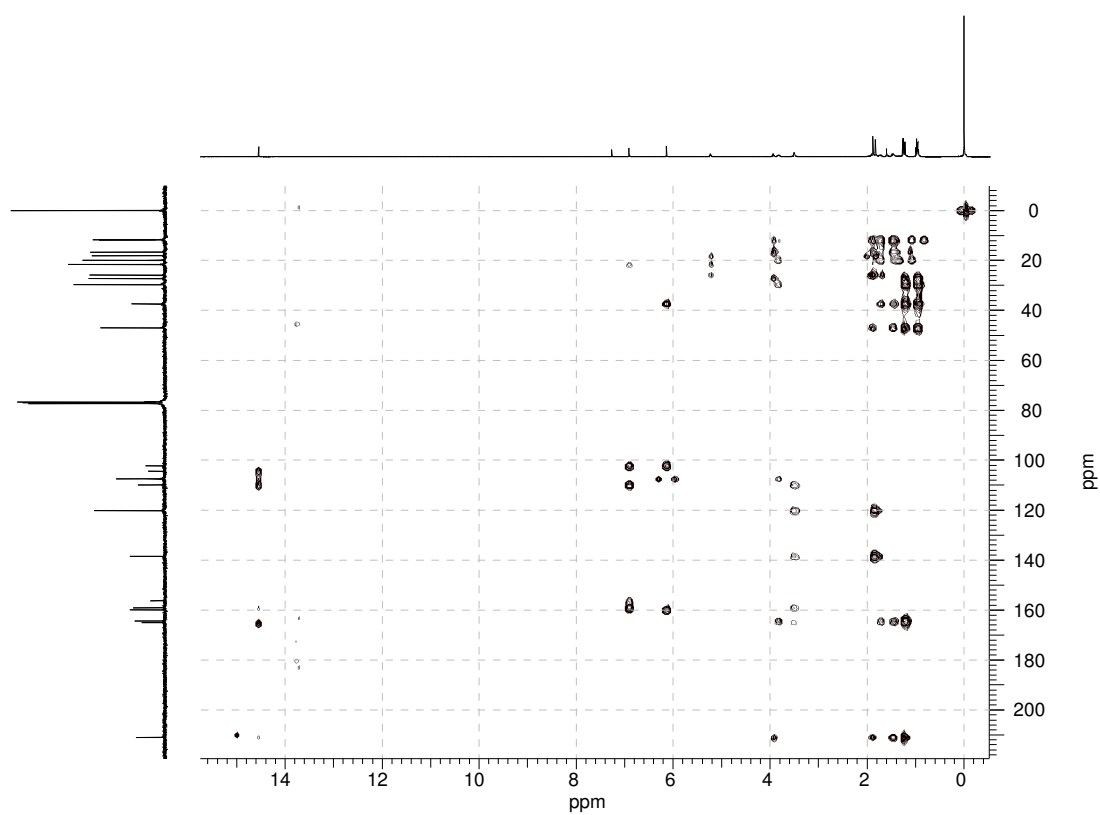


Figura 58. Espectro gHMBC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S03

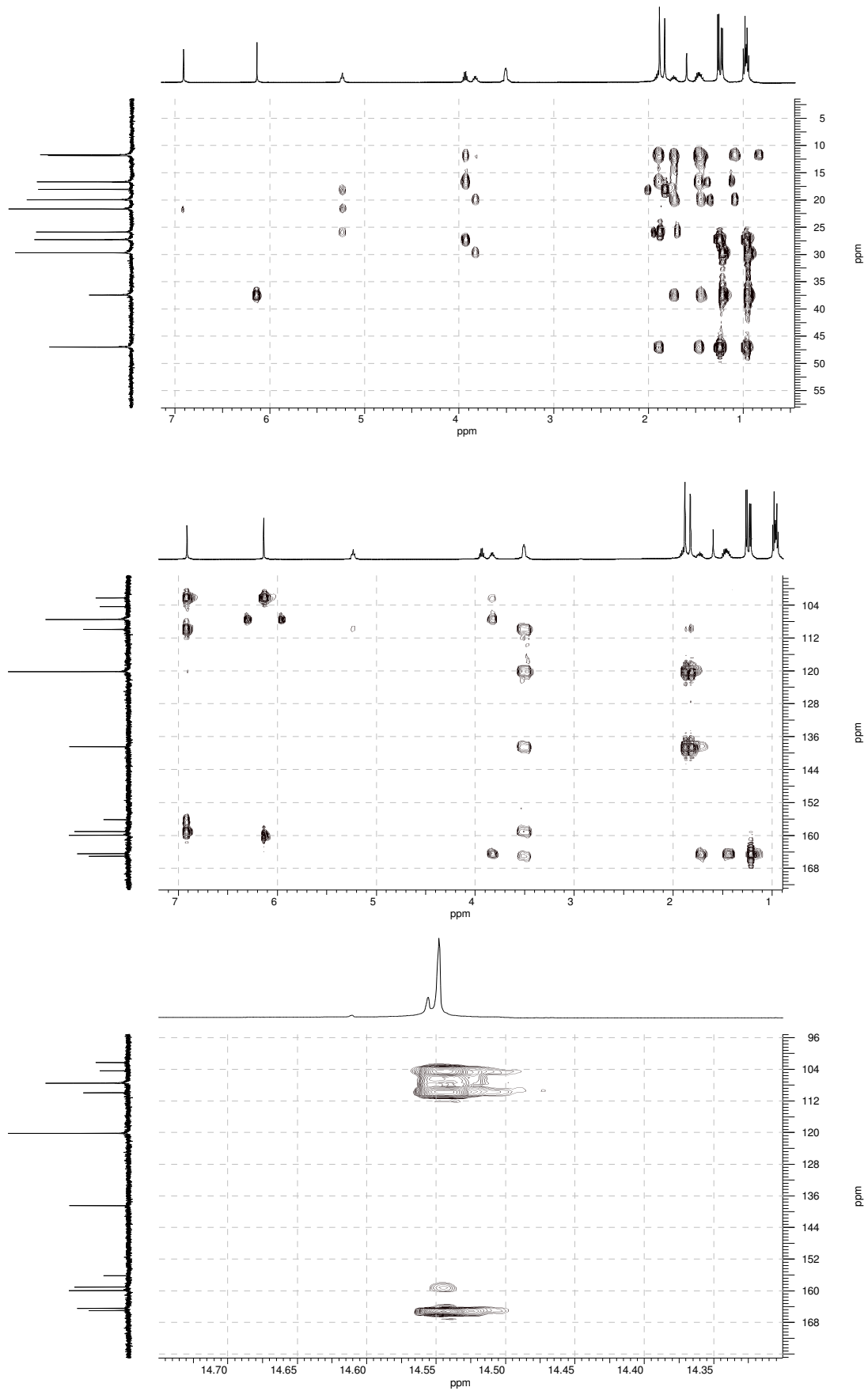


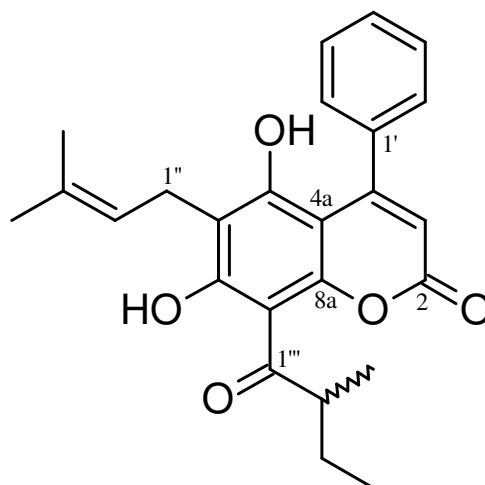
Figura 59. Ampliações do espectro gHMBC da substância S03

**Tabela 6.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC da substância **S03**<sup>a</sup>

N <sup>o</sup>	$\delta$ $^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integration]	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC (HC)
<b>2</b>	-	160,0	-
<b>3</b>	6,14 ( <i>s</i> ; 1H)	107,5	37,4; 102,3; 160,0; 164,5
<b>4</b>	-	164,5	-
<b>4a</b>	-	102,3	-
<b>5</b>	-	159,1	-
<b>6</b>	-	109,9	-
<b>7</b>	-	165,1	-
<b>8</b>	-	104,4	-
<b>8a</b>	-	156,2	-
<b>1'</b>	3,84 ( <i>sext</i> ; 6,7; 1H)	37,4	11,8; 20,0; 29,7; 102,3; 107,5; 164,5
<b>2'</b>	1,44 ( <i>m</i> ; 1H) 1,74 ( <i>m</i> ; 1H)	29,7	11,8; 20,0; 37,4; 164,5
<b>3'</b>	0,96 ( <i>t</i> ; 7,5; 3H)	11,8	29,7; 37,4
<b>4'</b>	1,22 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	20,0	29,7; 37,4; 164,5
<b>1''</b>	3,51 ( <i>m</i> ; 2H)	21,7	109,9; 120,2; 138,5; 159,1; 165,0
<b>2''</b>	5,23 ( <i>t</i> ; 7,0; 1H)	120,1	18,1; 21,7; 25,9
<b>3''</b>	-	138,5	-
<b>4''</b>	1,83 ( <i>s</i> ; 3H)	25,9	18,1; 120,2; 138,5
<b>5''</b>	1,88 ( <i>s</i> ; 3H)	18,1	25,9; 120,2; 138,5
<b>1'''</b>	-	211,0	-
<b>2'''</b>	3,93 ( <i>sext</i> ; 6,7; 1H)	47,0	11,7; 16,7; 27,3; 211,0
<b>3'''</b>	1,47 ( <i>m</i> ; 1H) 1,90 ( <i>m</i> ; 1H)	27,3	11,7; 16,7; 47,0; 211,0
<b>4'''</b>	0,98 ( <i>t</i> ; 7,5; 3H)	11,7	27,3; 47,0
<b>5'''</b>	1,25 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	16,7	27,3; 47,0; 211,0
<b>5-OH</b>	6,91 ( <i>s</i> , 1H)	-	102,3; 109,9; 159,1; 165,1
<b>7-OH</b>	14,55 ( <i>s</i> , 1H)	-	104,4; 109,9; 159,1; 165,1; 211,0

<sup>a</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.1.4 Determinação estrutural da substância S04



**Figura 60.** Estrutura química da substância S04

A substância S04 (11,2 mg), um sólido branco, opticamente ativa cujo valor de  $[\alpha]_D^{25} = -0,2$  ( $c$  0,039,  $\text{CHCl}_3$ ), foi isolada a partir do extrato hexânico das raízes de *K. argentea* (Figura 13, p. 52). A identificação da substância foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, gHMQC e gHMBC.

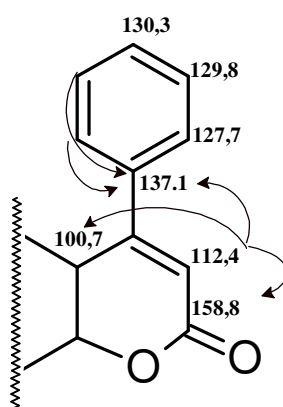
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (Figura 65, p. 96) apresentou 23 sinais e, complementado com os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 63, p. 94), DEPT 135 (Figura 67, p. 96) e gHMQC (Figura 68, p. 97), verificou-se que estes sinais correspondiam a quatro grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), dois grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), oito grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e onze carbonos não-hidrogenados.

Ao analisar a região entre 0,5 – 2,5 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 64, p. 95), observou-se a presença de um tripleto em  $\delta$  1,02 ( $J = 7,4$  Hz, 3H). A partir do espectro de gHMQC, verificou-se a correlação deste com o sinal em  $\delta$  12,0, e complementado com as informações obtidas através do DEPT 135, estes sinais correspondem a um grupo metílico. Em continuidade, observou-se um dubleto em  $\delta$  1,29 ( $J = 6,7$  Hz, 3H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  16,8 e correspondente a um grupo metílico; multipletos em  $\delta$  1,50 (1H) e  $\delta$  1,94 (1H), ambos correlacionados com o carbono em 27,4 também correspondente a um grupo metilênico e singletos em  $\delta$  1,66 (3H) e  $\delta$  1,70 (3H) correlacionados, respectivamente, com os carbonos em 25,9 e 18,1,



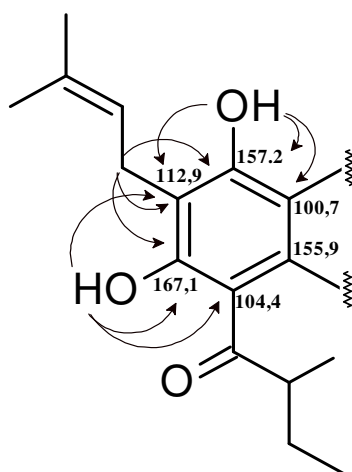
os quais correspondem a grupos metílicos. Na região entre 3,0 - 5,0 ppm (**Figura 65, p. 95**), observou-se um dubleto em  $\delta$  3,30 ( $J = 6,7$  Hz, 2H) correlacionado com o carbono em 21,8 e correspondente a um grupo metílico; um sexteto em  $\delta$  3,96 ( $J = 6,7$  Hz, 1H) correlacionado com o carbono em 47,2 e um tripleto em  $\delta$  5,10 ( $J = 6,7$  Hz, 1H), ambos correspondentes a grupos metínicos. Adicionalmente, verificou-se um singlete em  $\delta$  6,00 (1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  112,4; singletos em  $\delta$  5,94 (1H) e  $\delta$  14,56, os quais não apresentam correlação direta com um átomo de carbono e multipletos nas regiões entre  $\delta$  7,42 - 7,44 (2H), correlacionado com o carbono em  $\delta$  127,7, e outro entre  $\delta$  7,56 - 7,57 (3H) correlacionado com os carbonos em  $\delta$  129,8 e 130,3.

De modo similar às substâncias **S01**, **S02** e **S03**, verificou-se sinais característicos de um núcleo cumarínico como, por exemplo, o singlete em  $\delta$  6,00 (112,4), o qual pode ser referente ao H-3 do anel lactônico. A partir do espectro de gHMBC (**Figuras 69 e 70, p. 97 e 98**), verificou-se as correlações deste sinal com os carbonos em  $\delta$  100,7, 137,1 e 158,8. Em continuidade, observou-se que os multipletos em  $\delta$  7,43 ( $\delta$  127,7) e 7,56 ( $\delta$  129,8 e  $\delta$  130,3) são correspondentes a um grupo fenílico. A partir das correlações a longa distância entre os hidrogênios do anel aromático e o H-3 com o carbono quaternário em  $\delta$  137,1, pode-se inferir que o grupo fenílico esteja localizado em C-4. De modo distinto às substâncias anteriores, a substância **S04** corresponde a uma 4-fenilcumarina (neoflavonoide) (**Figura 61**).

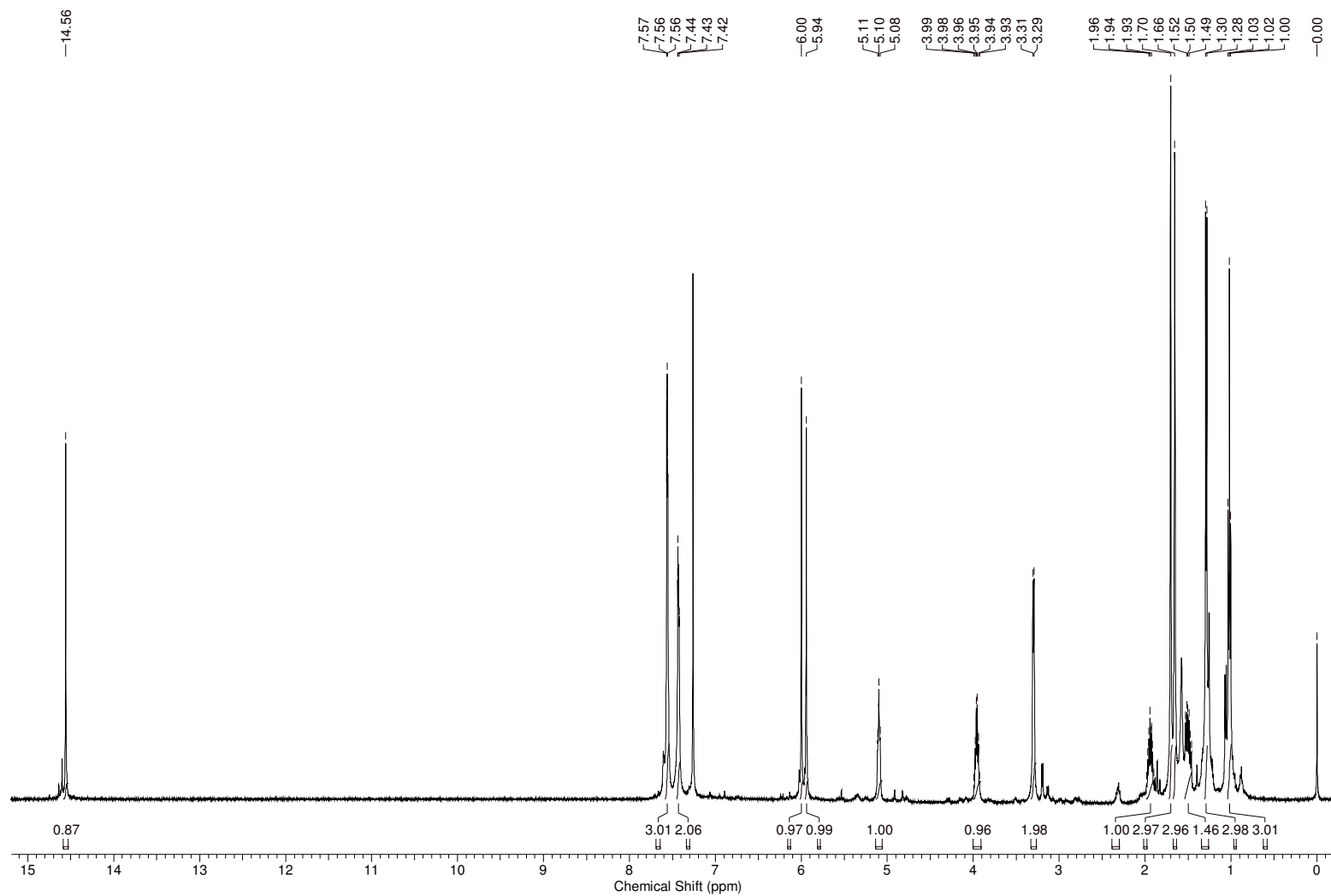


**Figura 61.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S04**

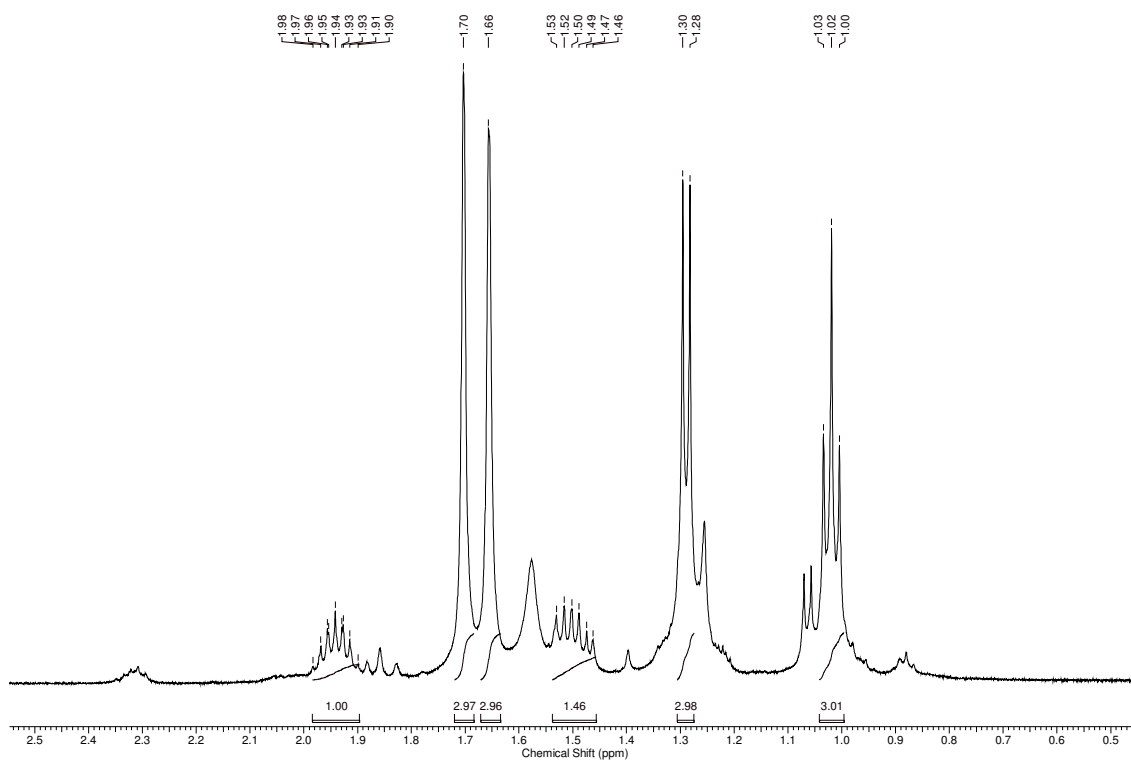
Em continuidade à análise das correlações a longa distância, observou-se a correlação do singlete em  $\delta$  5,94 com o carbono em  $\delta$  100,7; pode-se inferir dessa forma a presença de um grupo hidroxílico na posição C-5 do núcleo cumarínico. Verificou-se também as correlações do singlete com os carbonos em  $\delta$  112,9 e 157,2. O grupo metilênico em  $\delta$  3,30 (21,8) também apresentou correlações com os carbonos do anel aromático em  $\delta$  112,9, 157,2 e 167,1 assim como apresentou correlações com o grupo metínico em 5,10 ( $\delta$  121,0) e o carbono em 134,3. O tripleto  $\delta$  5,10, por sua vez, apresentou também correlações com o carbono em 134,3 e os grupos metílicos em  $\delta$  1,66 ( $\delta$  25,9) e  $\delta$  1,70 ( $\delta$  18,1), cujos sinais caracterizam a presença de uma cadeia prenílica na posição C-6. O singlete em  $\delta$  14,56 (1H), o qual é característico de um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular, apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  104,4, 112,9 e 167,1; e similarmente ao observado em **S01** e **S03**, pode-se inferir que esteja localizado na posição C-7. Na posição seguinte, pode-se propor a presença da cadeia acílica; a partir das correlações do sexteto em 3,97 (47,2) com o carbono do grupo carbonílico em  $\delta$  210,7 assim como também com o grupo metilênico em  $\delta$  27,4 e os grupos metílicos  $\delta$  12,0 e 16,8, pode-se propor que a posição C-8 seja ocupada pela cadeia 2-metil-1-oxobutílica (**Figura 62**). A partir destes dados, conclui-se que a substância **S04** corresponde ao neoflavonoide mammea A/BB (GASPAROTTO *et al.*, 2005).



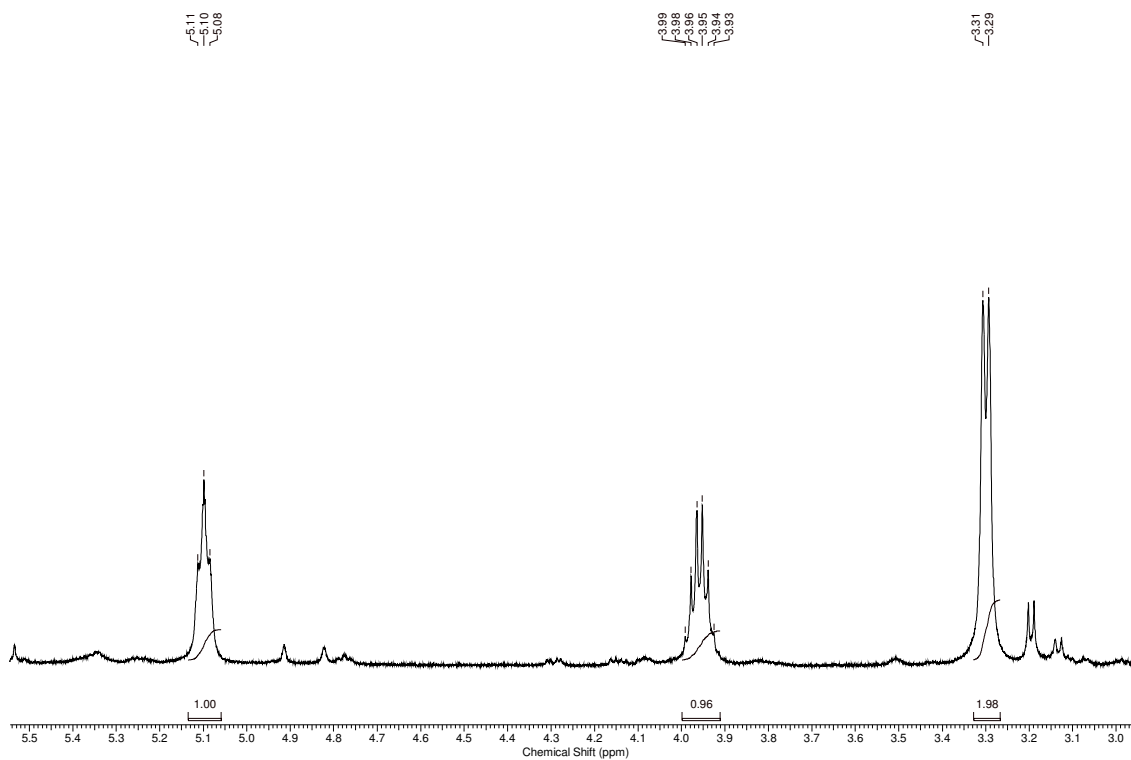
**Figura 62.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) e correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S04**



**Figura 63.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S04**



**Figura 64.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,5 - 2,5) da substância **S04**



**Figura 65.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  3,0 - 5,5) da substância **S04**

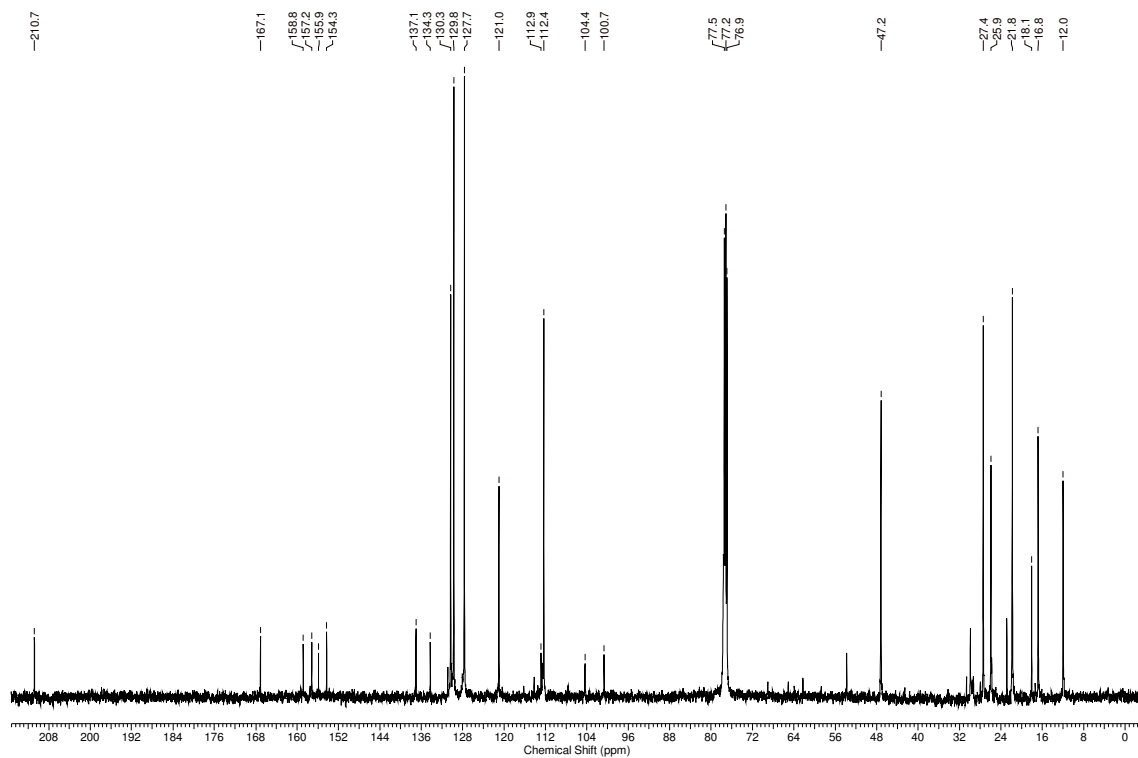


Figura 66. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S04

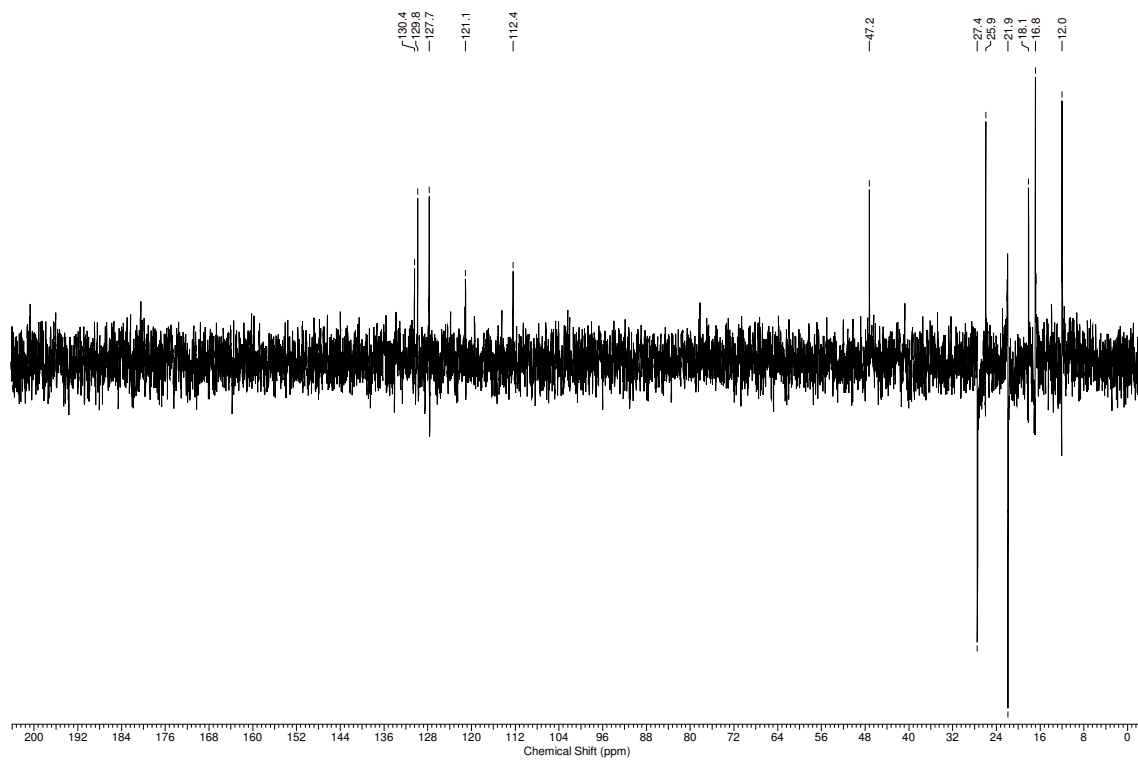
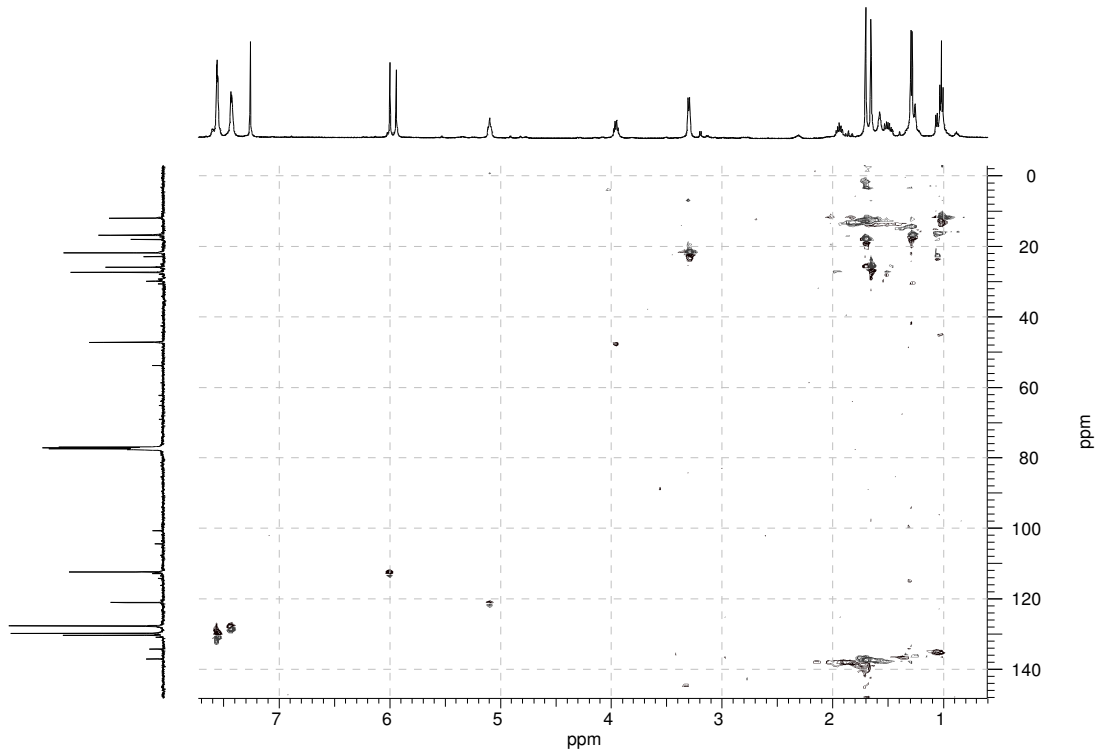
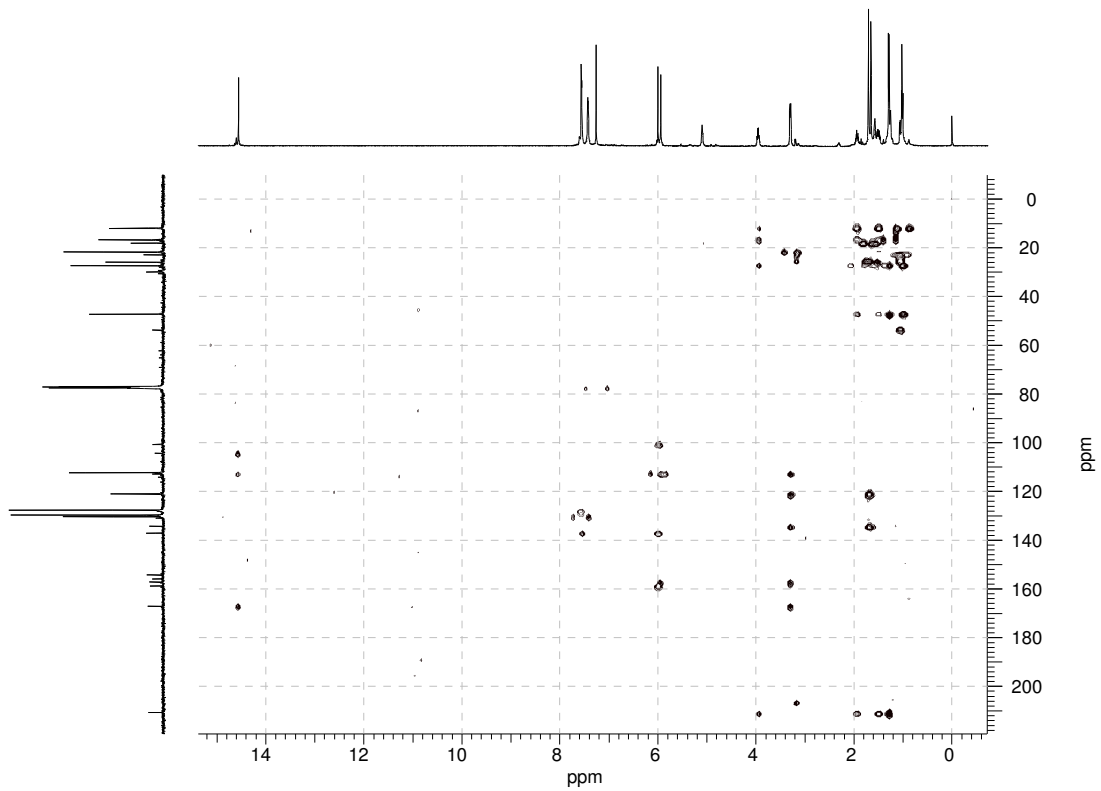


Figura 67. Espectro de RMN de DEPT 135 [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S04



**Figura 68.** Espectro gHMBC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S04



**Figura 69.** Espectro gHMBC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S04

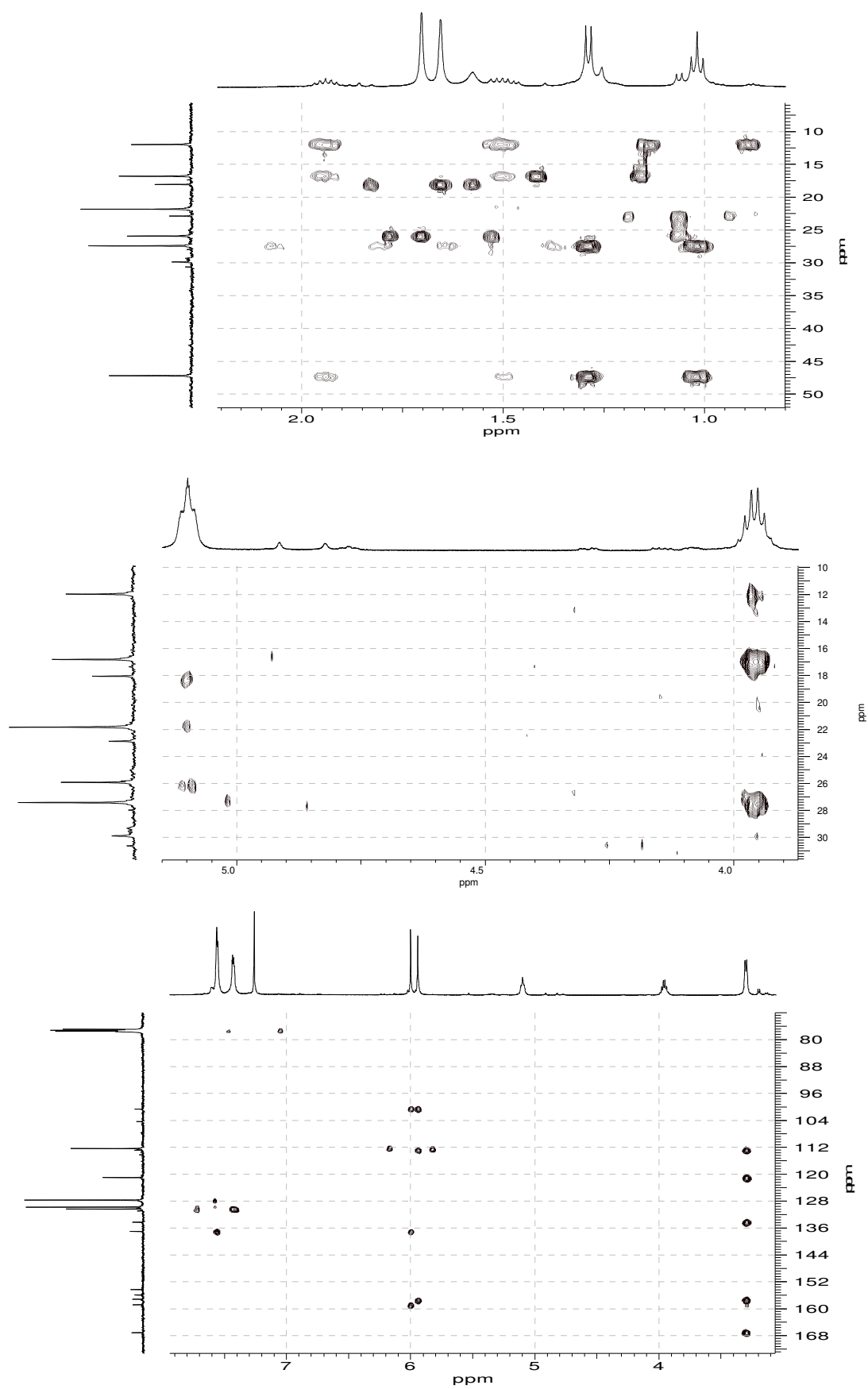


Figura 70. Ampliações do espectro gHMBC da substância S04

**Tabela 7.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC da substância **S04**<sup>a, b</sup>

N°	$\delta$ $^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integração]	$\delta$ $^{13}\text{C}$ /HMQC	HMBC (HC)
<b>2</b>	-	158,8	-
<b>3</b>	6,00 ( <i>s</i> ; 1H)	112,4	100,7; 137,1; 158,8
<b>4</b>	-	154,3 <sup>c</sup>	-
<b>4a</b>	-	100,7	-
<b>5</b>	-	157,2	-
<b>6</b>	-	112,9	-
<b>7</b>	-	167,1	-
<b>8</b>	-	104,4	-
<b>8a</b>	-	155,9 <sup>c</sup>	-
<b>1'</b>	-	137,1	-
<b>2' e 6'</b>	7,43 ( <i>m</i> ; 2H)	127,7	129,8; 130,3
<b>3' e 5'</b>	7,56 ( <i>m</i> ; 2H)	129,8	127,7; 130,3; 137,1
<b>4'</b>	7,56 ( <i>m</i> ; 1H)	130,3	127,7; 129,8; 137,1
<b>1''</b>	3,30 ( <i>d</i> ; 6,7; 1H)	21,8	112,9; 121; 134,3; 157,2; 167,1
<b>2''</b>	5,10 ( <i>t</i> ; 6,7; 1H)	121,0	18,1; 21,8; 25,9
<b>3''</b>	-	134,3	-
<b>4''</b>	1,70 ( <i>s</i> ; 1H)	18,1	25,9; 121,0; 134,3
<b>5''</b>	1,66 ( <i>s</i> ; 1H)	25,9	18,1; 121,0; 134,3
<b>1'''</b>	-	210,7	-
<b>2'''</b>	3,96 ( <i>sext</i> ; 6,7; 1H)	47,2	12,0; 16,8; 27,4; 210,7
<b>3'''</b>	1,50 ( <i>m</i> ; 1H) 1,94 ( <i>m</i> ; 1H)	27,4	12,0; 16,8; 47,2; 210,7
<b>4'''</b>	1,02 ( <i>t</i> ; 7,4; 3H)	12,0	27,4; 47,2
<b>5'''</b>	1,29 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	16,8	27,4; 47,2; 210,7
<b>5-OH</b>	5,94 ( <i>s</i> ; 1H)	-	100,7; 112,9; 157,2
<b>7-OH</b>	14,56 ( <i>s</i> ; 1H)	-	104,4; 112,9; 167,1

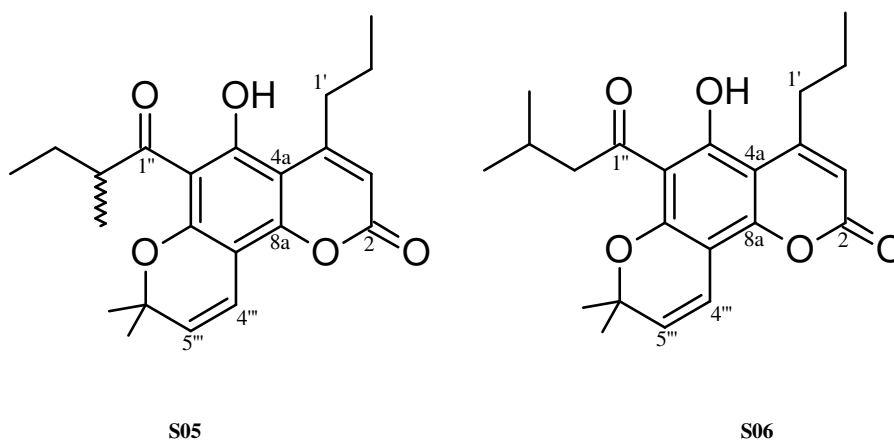
<sup>a</sup> Dados de RMN de acordo com o descrito por GASPAROTTO *et al.*, 2005).

<sup>b</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>c</sup> Sinais podem ser trocados.



#### 4.1.5 Determinação estrutural das substâncias S05 e S06



**Figura 71.** Estruturas químicas das substâncias **S05** e **S06**

As substâncias **S05** (5,1 mg) e **S06** (8,2 mg) foram isoladas a partir do extrato hexânico das raízes de *K. argentea* (**Figura 13, p. 52**) na forma de um sólido branco solúveis em clorofórmio. A identificação das substâncias foram realizadas com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHSQC e gHMBC.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **S05** e **S06** (**Figuras 72 e 73, p. 101**) apresentaram 21 sinais e, complementado com os dados dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 74 e 75, p. 102**) e gHSQC (**Figuras 76 e 77, p. 103**), verificou-se que estes sinais correspondiam a cinco grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), três grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), quatro grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e dez carbonos não-hidrogenados.

Na região entre 0 - 4,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **S05** (**Figura 78, p. 104**), observou-se a presença de tripletos em  $\delta$  0,94 ( $J = 7,5$  Hz, 3H) e  $\delta$  1,02 ( $J = 7,4$  Hz, 3H). A partir do espectro gHSQC, verificou-se que ambos correspondem a grupos metílicos correlacionados, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  11,9 e 14,0. Adicionalmente, observou-se um dubleto em  $\delta$  1,22 ( $J = 6,7$  Hz, 3H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  16,8 e singletos em  $\delta$  1,55 (3H) e  $\delta$  1,56 (3H) correlacionados com o carbono em  $\delta$  28,1 correspondentes a grupos metílicos. Verificou-se também a presença de multipletos correspondentes a grupos metilênicos em  $\delta$  1,46 (2H) e  $\delta$  1,65 (2H) correlacionados, respectivamente com os carbonos em  $\delta$  26,8 e 22,7; um tripleto em  $\delta$  2,96 ( $J = 7,5$  Hz, 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  38,5 e um sexteto em  $\delta$  3,77 ( $J = 6,7\text{Hz}$ , 1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  46,7, os quais são correspondentes, respectivamente, a um grupo metilênico e um grupo metínico.

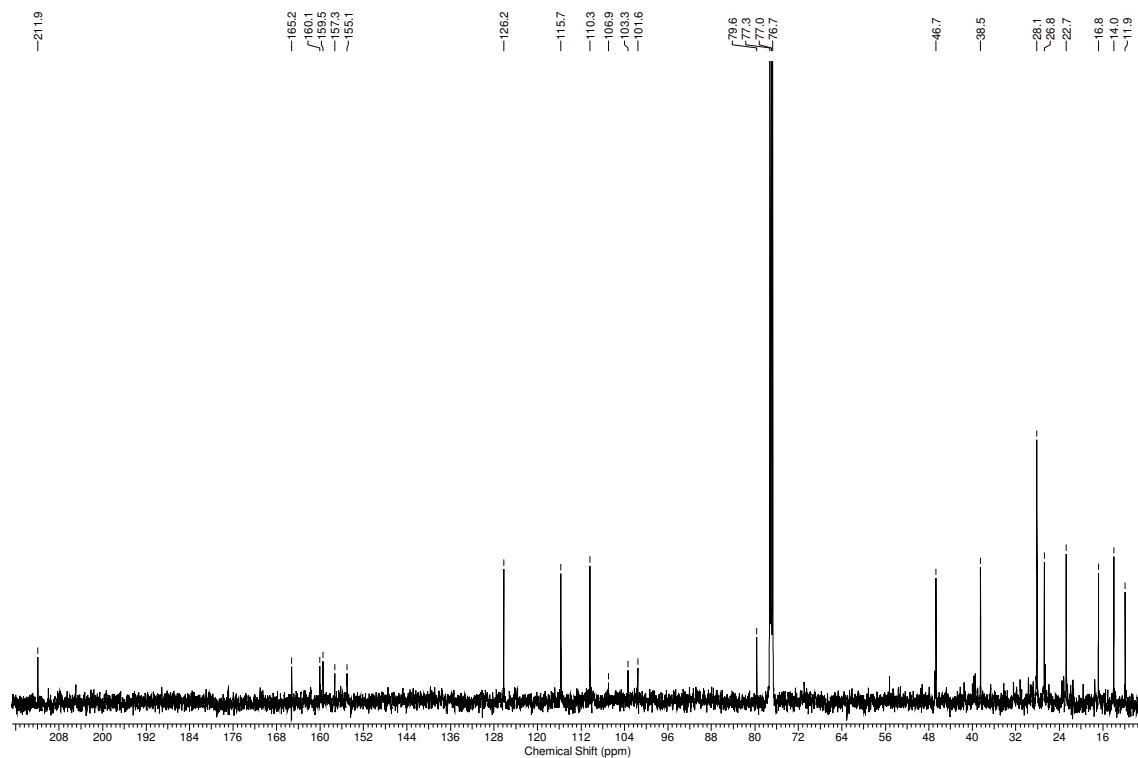


Figura 72. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S05

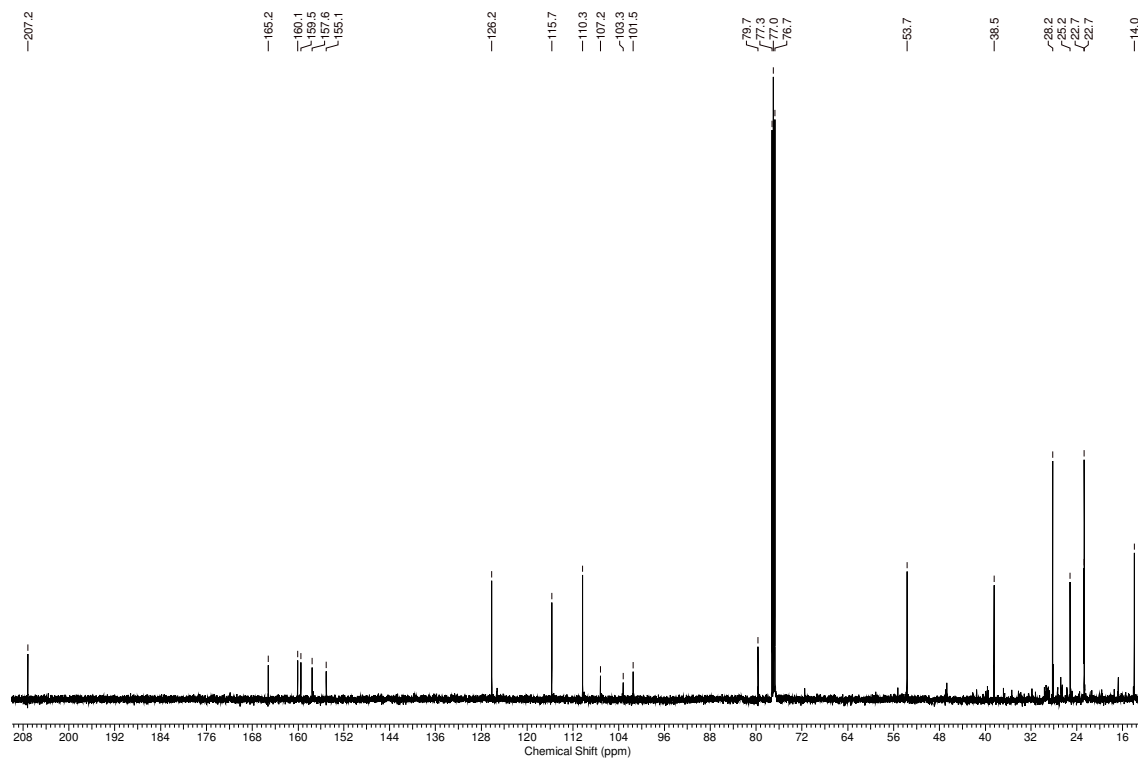


Figura 73. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S06

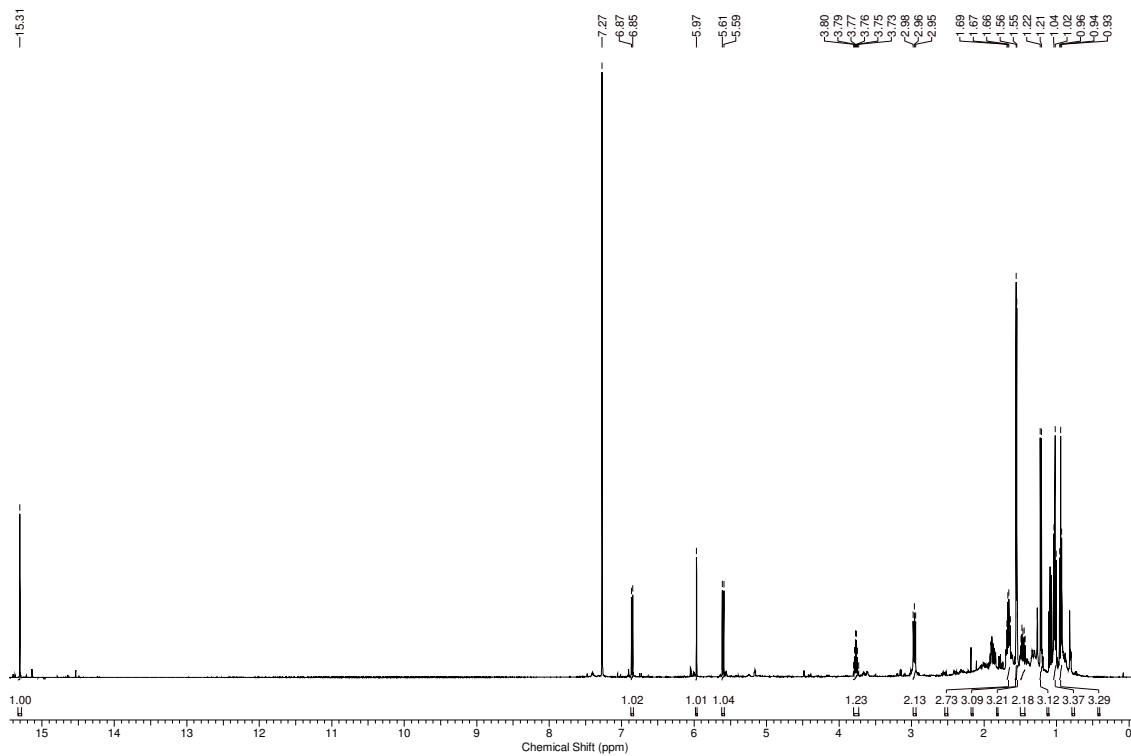


Figura 74. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S05

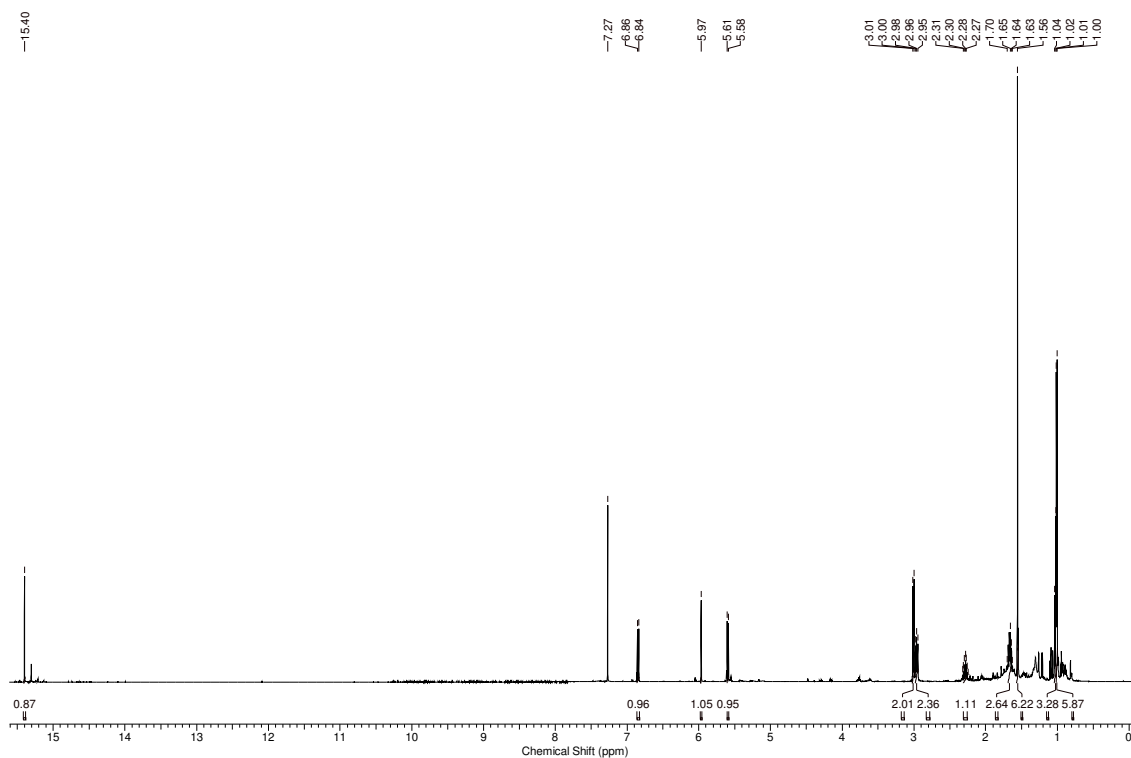
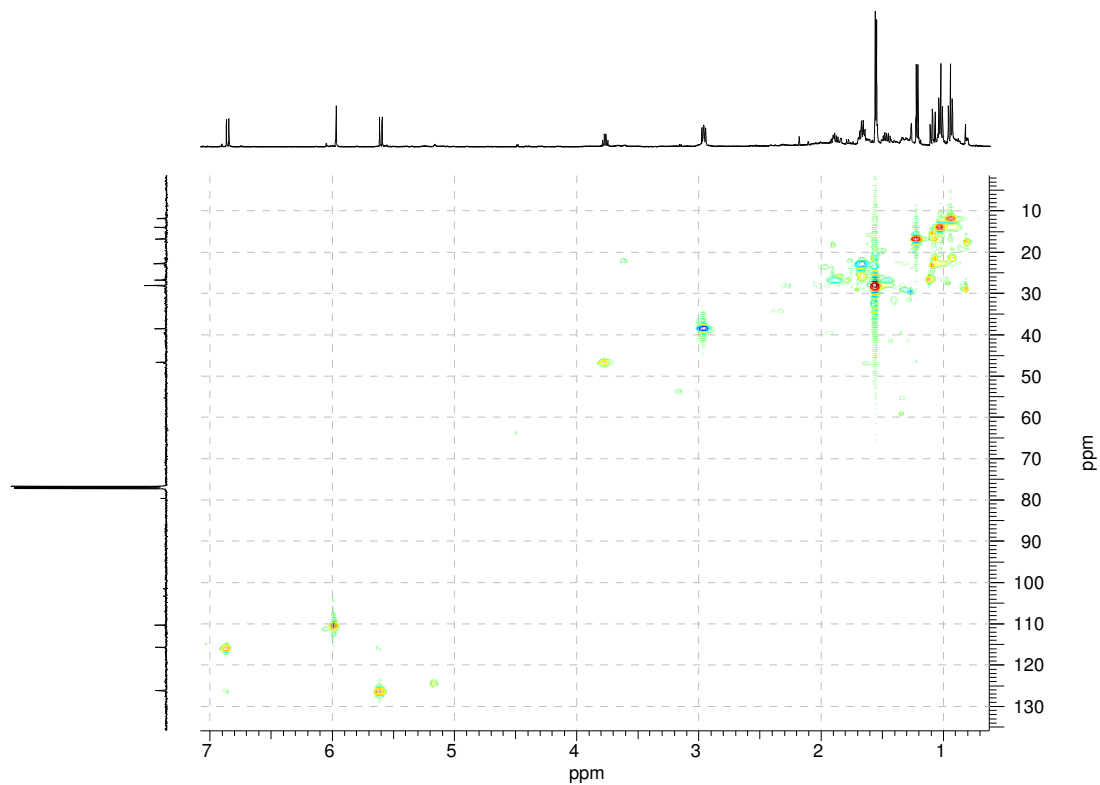
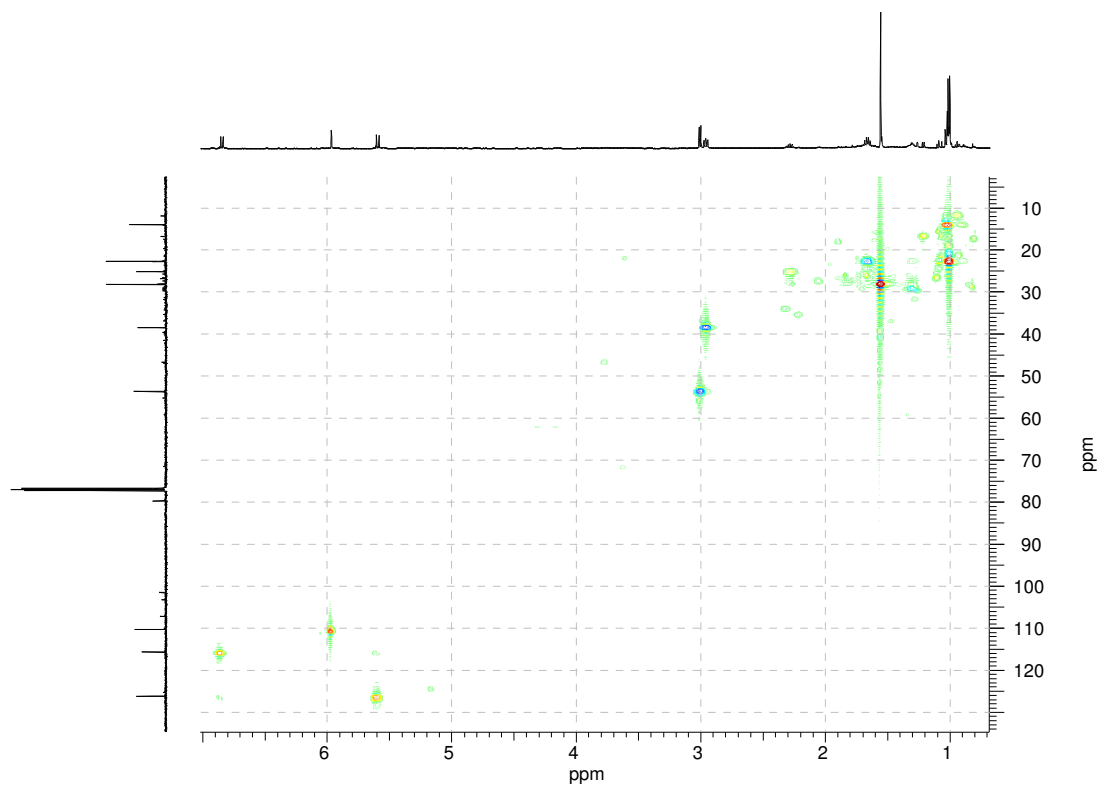


Figura 75. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S06

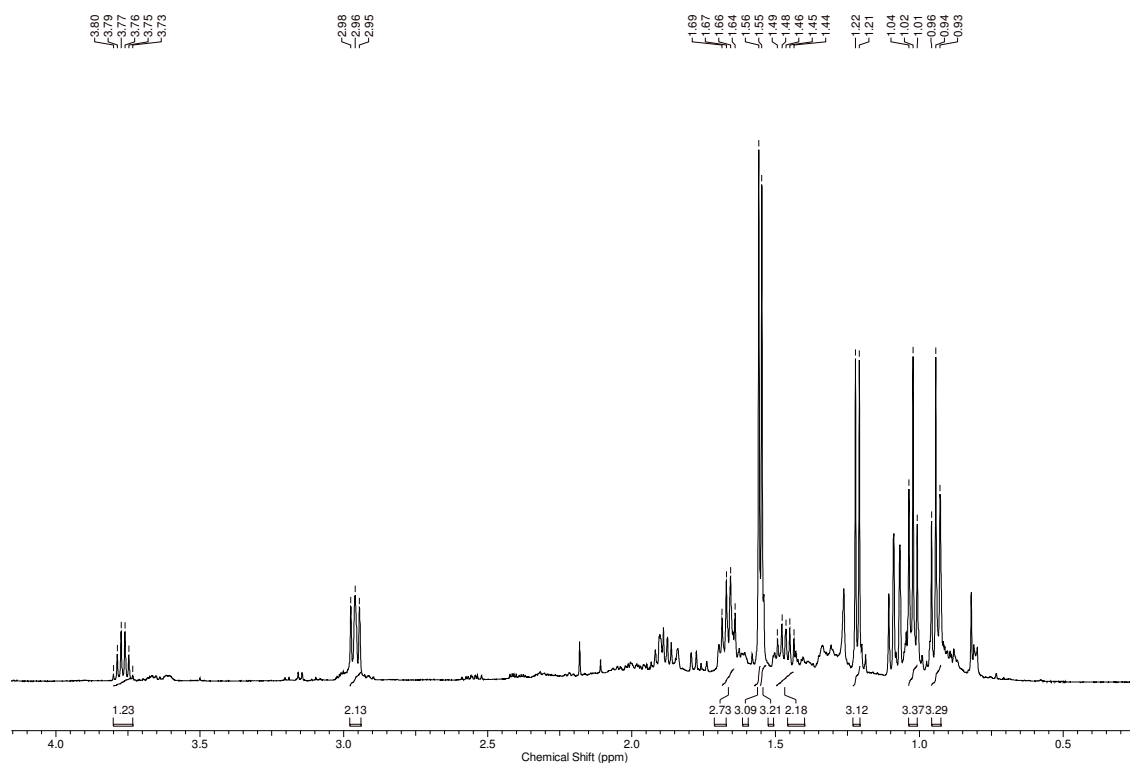


**Figura 76.** Espectro gHSQC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S05**

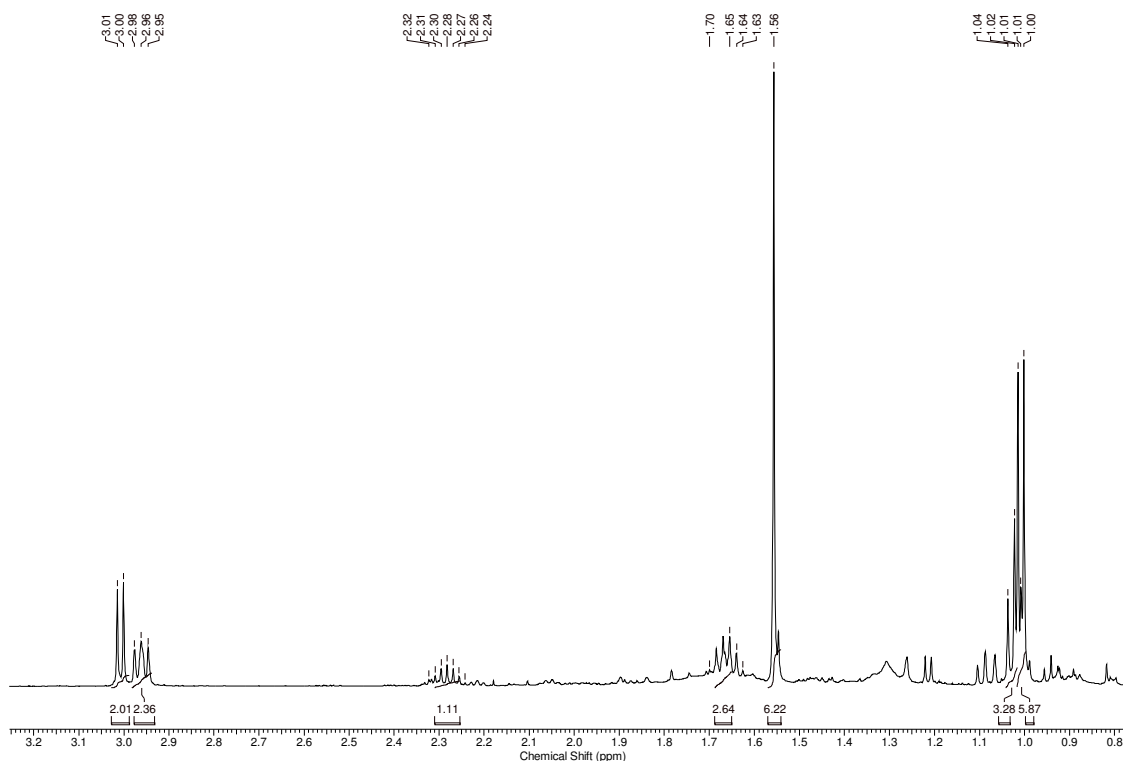


**Figura 77.** Espectro gHSQC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S06**

A partir da análise da mesma região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **S06** (Figura 79, p. 105), verificou-se um dubleto em  $\delta$  1,01 ( $J = 6,7$  Hz) cuja integração correspondia a seis átomos de hidrogênio. A partir do espectro de gHSQC, observou-se a correlação deste sinal com o carbono em  $\delta$  22,7 sendo assim correspondentes a dois grupos metílicos. Observou-se também um tripleto em  $\delta$  1,02 ( $J = 7,2$  Hz, 3H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  14,0 e um singleto em  $\delta$  1,56 (6H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  28,1, os quais são correspondentes a outros três grupos metílicos. Em continuidade, verificou-se um multipletto em  $\delta$  1,64 (2H) e outro em  $\delta$  2,28 (2H), ambos correspondentes a grupos metilênicos, apresentando correlação no espectro gHSQC, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  22,7 e  $\delta$  25,2. De modo idêntico à substância **S05**, observou-se um tripleto em  $\delta$  2,96 ( $J = 7,5$  Hz, 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  38,5 sendo correspondente a um grupo metilênico; além de um dubleto em  $\delta$  3,01 ( $J = 7,0$  Hz, 2H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  53,7 e correspondente a outro grupo metilênico.



**Figura 78.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,5 - 4,0) da substância **S05**

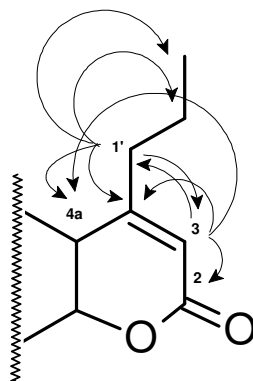


**Figura 79.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,5 - 4,0) da substância **S06**

Em continuidade, observou-se nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de ambas as substâncias, um duplete em  $\delta$  5,60 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  126,2; um singlete em  $\delta$  5,97 (1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  110,3; e outro duplete em  $\delta$  6,86 ( $J = 10,0$  Hz, 1H) correlacionado com o carbono em  $\delta$  115,7, os quais são correspondentes a grupos metínicos. Adicionalmente, observou-se um singlete em  $\delta$  15,31 para a substância **S05**, e em  $\delta$  15,70 para a substância **S06**, os quais não apresentaram correlação direta com um átomo de carbono no espectro de gHSQC.

Esta análise permitiu observar a similaridade entre os dados de RMN das substâncias **S05** e **S06** com a substância **S01** como, por exemplo, a presença de um singlete em  $\delta$  5,97 ( $\delta$  110,3) em ambos os espectros. Observando as correlações a longa distância no espectro de gHMBC (**Figuras 82 à 85, p. 108 à 110**), verificou-se as correlações deste singlete com os carbonos em  $\delta$  103,3, 159,5 e 160,1, para a substância **S05**, e as correlações com os carbonos em  $\delta$  103,2, 159,5 e 160,0, para a substância **S06**. Deste modo, pode-se inferir que estes sinais sejam correspondentes ao anel lactônico do sistema cumarínico com substituição em C-4. Em continuidade, observou-se as correlações do tripleto em  $\delta$  2,96 ( $\delta$  38,5) com os carbonos C-3, C-4 e C-4a; e

também com o grupo metilênico em 1,65 (22,7) e o grupo metílico em 1,02 (14,0). A partir destes dados, tornou-se possível confirmar a presença de uma cadeia *n*-propílica em C-4 nas substâncias **S05** e **S06** (**Figura 80**).

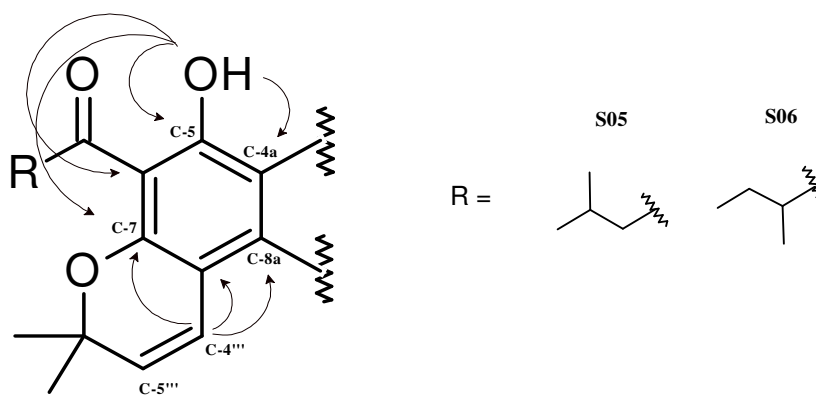


**Figura 80.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de *g*HMBC das substâncias **S05** e **S06**

A partir das **Figuras 82** e **83**, observa-se também a correlação a longa distância do singlete em  $\delta$  15,31, para a substância **S05**, e em  $\delta$  15,70, para a substância **S06**, com o carbono C-4a, e assim pode-se inferir que estes sinais sejam correspondentes a um grupo hidroxílico em C-5. De modo similar às estruturas anteriores, a desblindagem do grupo hidroxílico pode ocorrer em função de uma ligação de hidrogênio intramolecular com um grupo carbonílico. De fato, observaram-se as correlações, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  211,9, referente à **S05** e  $\delta$  207,2, referente à **S06**.

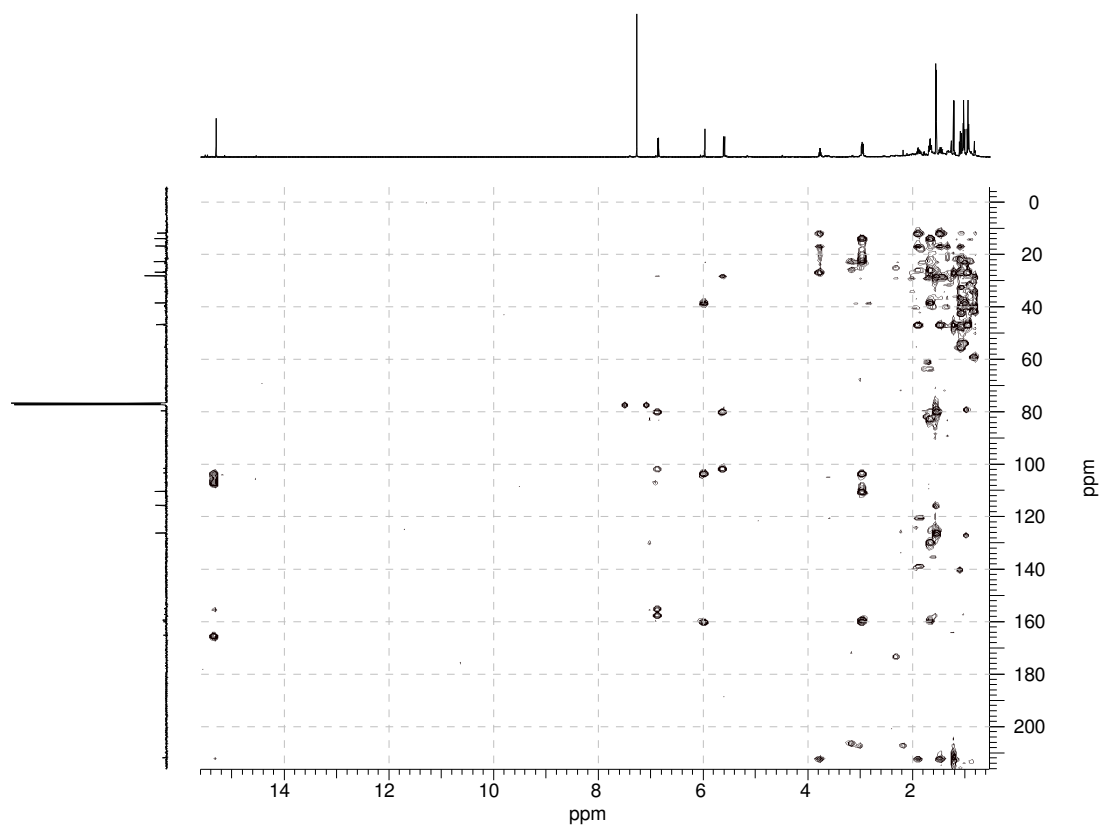
Analisando os espectros de *g*HMBC (**Figura 84**) da substância **S05**, observou-se também as correlações do grupo metílico em  $\delta$  1,22 ( $\delta$  16,8), o grupo metilênico em  $\delta$  1,46 ( $\delta$  26,8) e o grupo metínico em  $\delta$  3,77 ( $\delta$  46,7) com o carbono em  $\delta$  211,9; além da correlação do grupo metílico em  $\delta$  0,94 ( $\delta$  11,9) com os carbonos em  $\delta$  26,8 e 46,7. De modo similar à estrutura **S03**, observa-se a presença da cadeia 2-metil-1-oxobutílica, porém neste caso localizado na posição C-6. A análise do espectro de *g*HMBC da substância **S06** (**Figura 85**), por sua vez, permitiu observar a correlação do grupo metilênico em 3,01 ( $\delta$  53,7) com o carbono em  $\delta$  207,2. Ademais, verificou-se as correlações deste grupo metilênico com o grupo metínico em  $\delta$  2,28 ( $\delta$  25,2) e os grupos metílicos em  $\delta$  1,01 ( $\delta$  22,7). De modo similar às substâncias **S01** e **S02**, estes dados indicam então a presença de uma cadeia 3-metil-1-oxobutílica, porém neste caso localizada em C-6.

Em continuidade às análises, observou-se a presença de dubletos em  $\delta$  5,60 ( $\delta$  126,2) e  $\delta$  6,86 ( $\delta$  115,7) com uma constante de acoplamento igual a 10,0 Hz, o qual pode ser atribuído a um sistema olefínico com configuração *Z*. Adicionalmente, verificou-se as correlações do sinal em  $\delta$  6,86 com os carbonos em  $\delta$  101,6, 155,1 e 157,6 pertencentes ao anel aromático do núcleo cumarínico; e as correlações do sinal em  $\delta$  5,60 também com o carbono em  $\delta$  101,6 e com os grupos metílicos em  $\delta$  1,56 ( $\delta$  28,1) e o carbono não-hidrogenado em  $\delta$  79,6. A desproteção deste carbono não-hidrogenado pode ser justificada devido a uma oxigenação. De fato, observa-se também a desproteção dos carbonos do anel aromático ( $\delta$  155,1 e 157,6) correlacionados com este sistema. A partir destes dados, pode-se propor que estes sinais sejam correspondentes a um anel do tipo pirano. De modo similar à substância **S02**, ocorreu uma ciclização do grupo prenílico, porém neste caso formando o anel pirânico (**Figura 81**). Dessa forma, as substâncias **S05** e **S06** correspondem, respectivamente, às 4-alquilmumarinas mammea B/AB ciclo D e mammea B/AA ciclo D (GRAMACHO *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001).

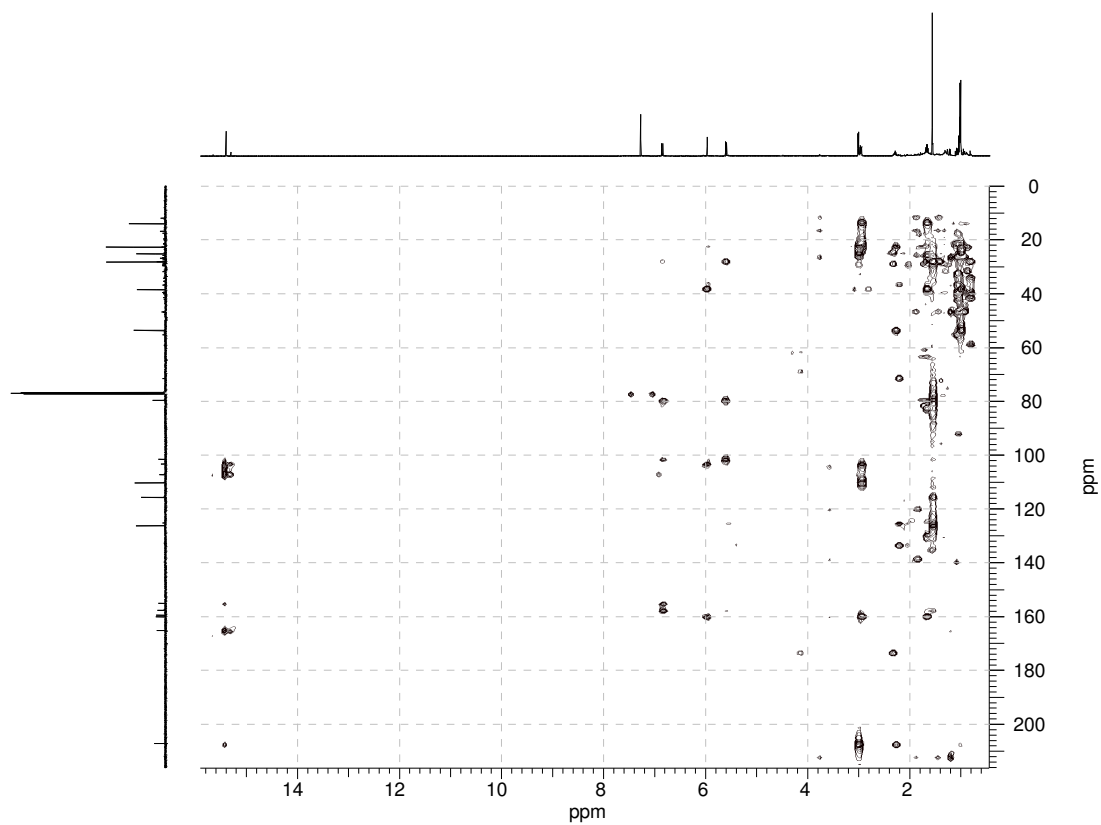


**Figura 81.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC das substâncias **S05** e **S06**





**Figura 82.** Espectro gHMBC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S05



**Figura 83.** Espectro gHMBC [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S06

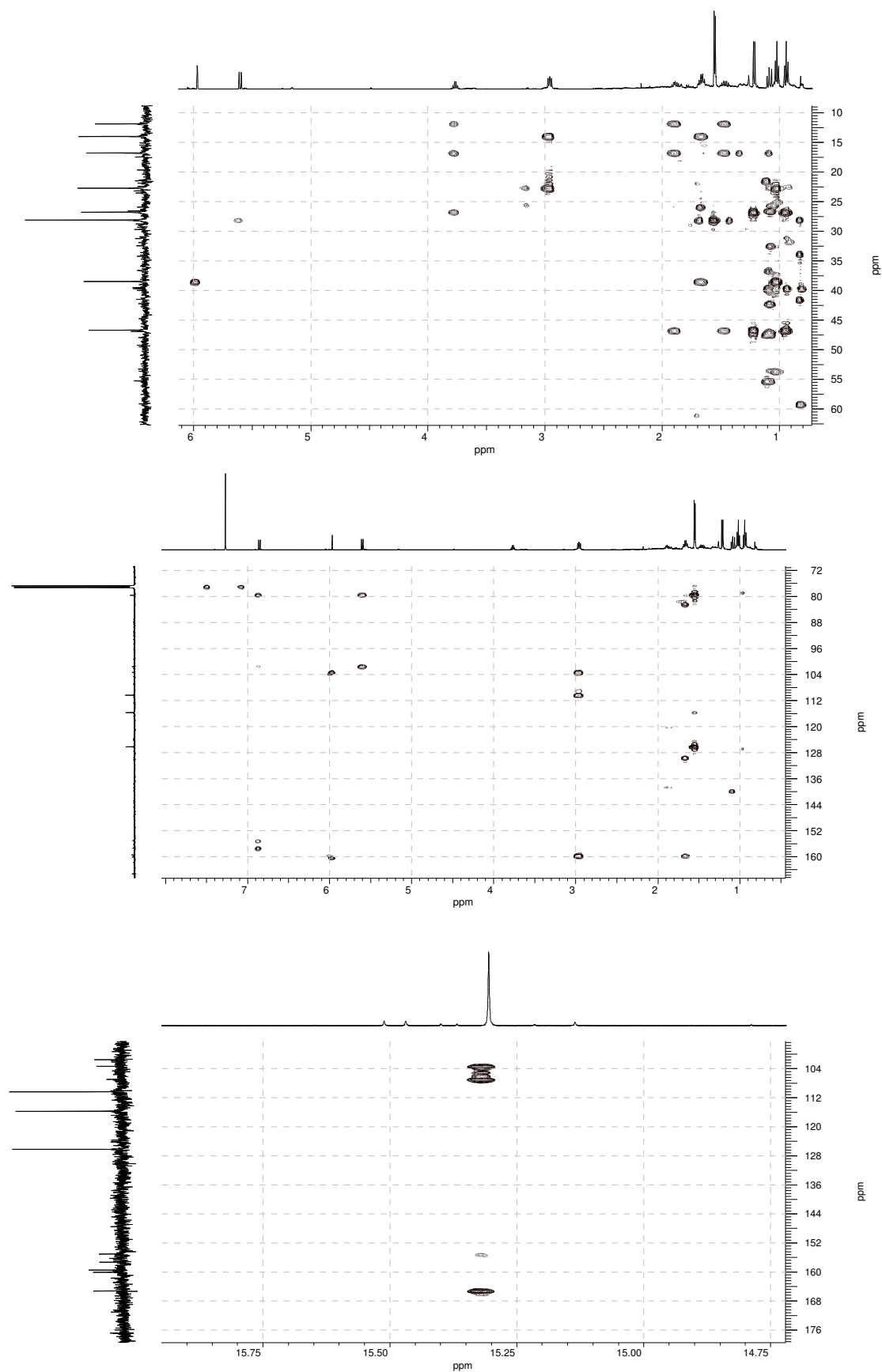


Figura 84. Ampliações do espectro gHMBC da substância S05

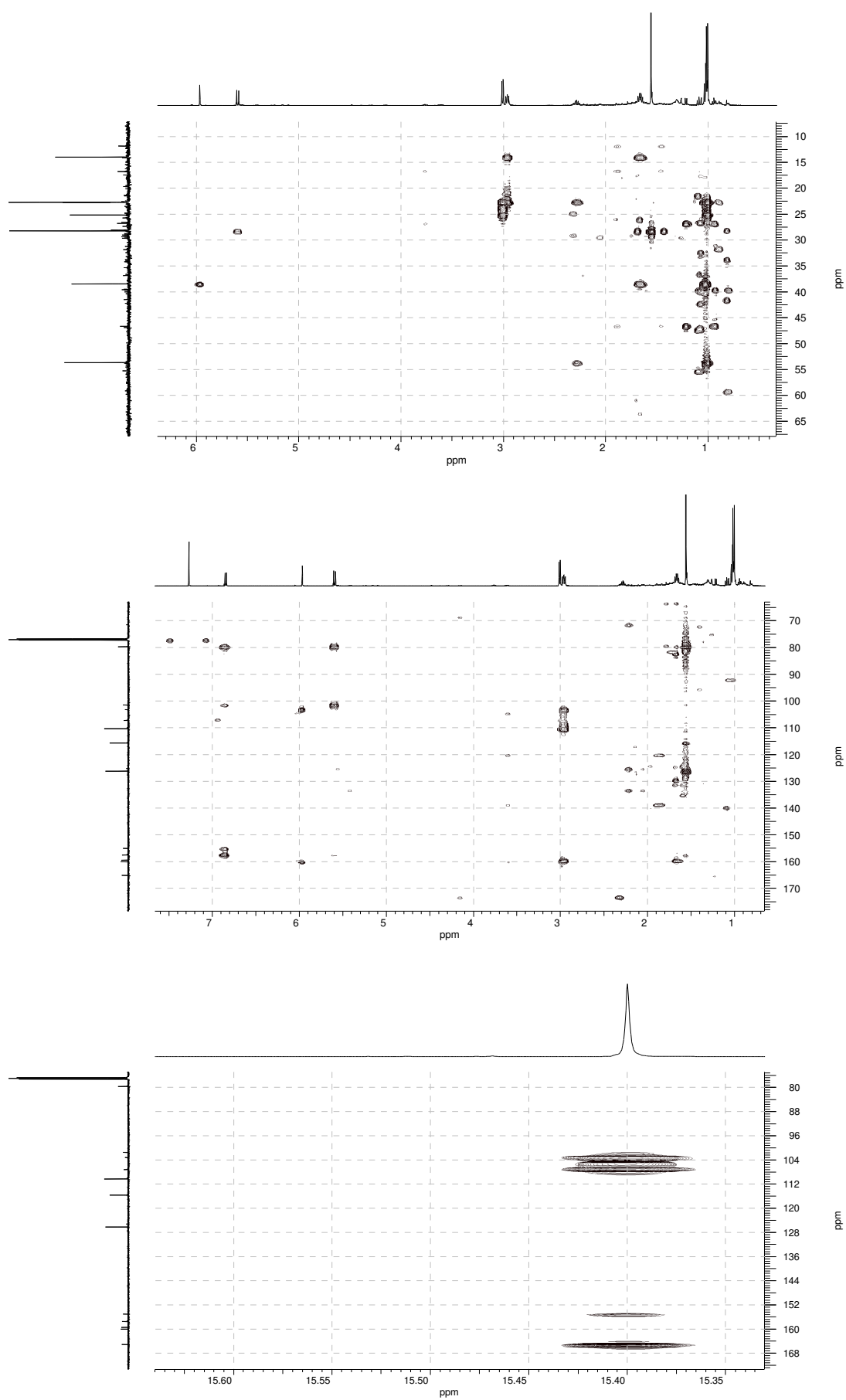


Figura 85. Ampliações do espectro gHMBC da substância S06

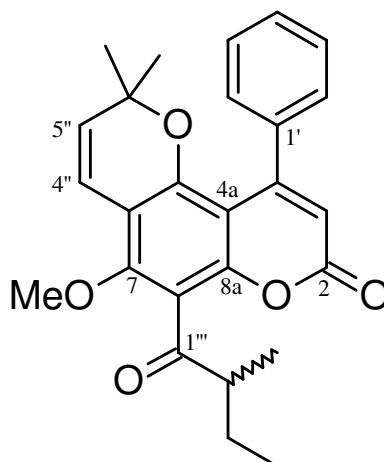
**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC das substâncias **S05** e **S06**<sup>a, b</sup>

Nº	S05			S06		
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC (HC)	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC (HC)
2	-	160,1	-	-	160,0	-
3	5,97 ( <i>s</i> , 1H)	110,3	C2; C4; C4a; C1'	5,97	110,3	C2; C4; C4a; C1'
4	-	159,5	-	-	159,5	-
4a	-	103,3	-	-	103,3	-
5	-	165,2	-	-	165,2	-
6	-	106,9	-	-	107,2	-
7	-	155,1	-	-	155,1	-
8	-	101,6	-	-	101,5	-
8a	-	157,6	-	-	157,6	-
1'	2,96 ( <i>t</i> ; 7,5; 2H)	38,5	C3; C4; C4a; C2'; C3'	2,96 ( <i>t</i> ; 7,5; 2H)	38,5	C3; C4; C4a; C2'; C3'
2'	1,65 ( <i>m</i> ; 2H)	22,7	C1'; C3'	1,64 ( <i>m</i> ; 2H)	22,7	C1'; C3'
3'	1,02 ( <i>t</i> ; 7,4; 3H)	14,0	C2'; C3'	1,02 ( <i>t</i> ; 7,2; 3H)	14,0	C2'; C3'
1''	-	211,9	-	-	207,2	-
2''	3,77( <i>sext</i> ; 6,7;1H)	46,7	C1''; C3''; C4''; C5''	3,01 ( <i>d</i> ; 7,0; 2H)	53,7	C1''; C3''; C4''; C5''
3''	1,46 ( <i>m</i> ; 2H)	26,8	C1''; C2''; C4''; C5''	2,28 ( <i>m</i> ; 1H)	25,2	C2''; C4''; C5'';
4''	0,94 ( <i>t</i> ; 7,5; 3H)	11,9	C-2''; C-3''	1,01 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	22,7	C2''; C3''; C5''
5''	1,22 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	16,8	C1''; C2''; C3''	1,01 ( <i>d</i> ; 6,7; 3H)	22,7	C2''; C3''; C4''
4'''	6,86 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	115,7	C7; C8; C8a; C6'''	6,86 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	115,7	C7; C8; C8a; C6'''
5'''	5,60 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	126,2	C8; C6'''; C7'''; C8'''	5,60 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	126,2	C8; C6'''; C7'''; C8'''
6'''	-	79,7	-	-	79,7	-
7'''	1,55 ( <i>s</i> ; 3H)	28,1	C5'''; C6'''; C8'''	1,56 ( <i>s</i> ; 3H)	28,1	C5'''; C6'''; C8'''
8'''	1,56 ( <i>s</i> ; 3H)	28,1	C5'''; C6'''; C8'''	1,56 ( <i>s</i> ; 3H)	28,1	C5'''; C6'''; C8'''
5-OH	15,31 ( <i>s</i> ; 1H)	-	C4a; C5; C6; C7; C1''	15,70 ( <i>s</i> ; 1H)	-	C4a; C5; C6; C7; C1''

<sup>a</sup> Dados de RMN de acordo com GRAMACHO *et al.* (1999) e CRUZ *et al.* (2001)

<sup>b</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.1.6 Determinação estrutural da substância S07



**Figura 86.** Estrutura química da substância S07

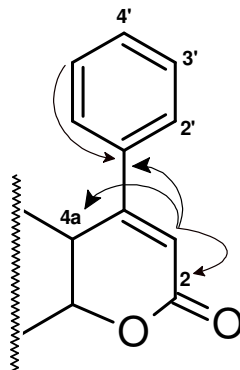
A substância S07 (3,1 mg), cristais em forma de agulha, solúvel em clorofórmio e bandas de absorção no UV em 213, 268 e 302 nm (**Figura 17, p. 55**), foi isolada a partir do extrato hexânico das raízes de *K. lathrophyton* (**Figura 16, p. 55**). A identificação da substância foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e gHMBC.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (**Figura 93, p. 117**) apresentou 24 sinais e, complementado com os dados obtidos a partir do experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 90, p. 115**), propôs-se que estes sinais correspondiam a cinco grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), um grupo metilênico ( $\text{CH}_2$ ), nove grupos metínicos ( $\text{CH}$ ) e onze carbonos não-hidrogenados.

Na região entre 0 - 2,0 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 91, p. 116**), observaram-se dois singletos, respectivamente, em  $\delta$  0,96 (3H) e  $\delta$  0,97 (3H); um tripleto em  $\delta$  1,00 ( $J = 7,5$  Hz; 3H); um dubleto em  $\delta$  1,24 ( $J = 7,0$  Hz; 3H); e multipletos na região entre  $\delta$  1,50 - 1,53 (1H) e  $\delta$  1,85 - 1,92 (1H). Entre  $\delta$  3,0 - 7,0 ppm (**Figura 92, p. 116**), observou-se um sexteto  $\delta$  3,05 ( $J = 7,0$  Hz, 1H); um singlete em  $\delta$  3,80 (3H); dubletos em  $\delta$  5,49 ( $J = 10,0$  Hz; 1H) e  $\delta$  6,44 ( $J = 10,0$  Hz; 1H); e um singlete em  $\delta$  6,05 (1H). Adicionalmente, verificou-se também multipletos na região entre  $\delta$  7,23 - 7,25 (2H) e entre  $\delta$  7,38 e 7,40 (3H).

Os espectros apresentaram sinais característicos de um núcleo cumarínico de modo similar à substância S04. A partir do espectro de gHMBC (**Figuras 94 e 95, p.**

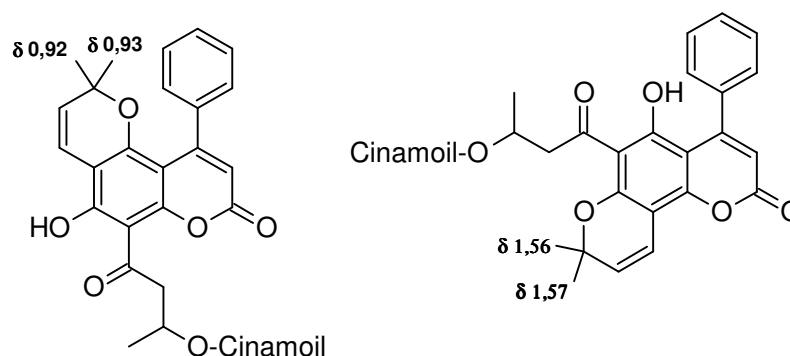
**118 e 119**), observaram-se as correlações do singlete em  $\delta$  6,05 com os carbonos  $\delta$  105,8, 139,5 e 159,2; assim como também se verificou as correlações dos multipletos em  $\delta$  7,24 e  $\delta$  7,40 com os carbonosm (**Figura 87**).



**Figura 87.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substâncias **S07**

Em continuidade, similarmente aos espectros das substâncias **S05** e **S06**, observaram-se os dubletos ( $\delta$  5,49 e  $\delta$  6,44) com  $J = 10,0$  Hz, os quais caracterizam uma ligação olefínica com configuração *Z*; as correlações a longa distância do sinal em  $\delta$  6,44 com os carbonos do anel aromático em  $\delta$  111,2, 152,5 e 156,1; assim como, verificou-se também as correlações destes dubletos e dos grupos metílicos em  $\delta$  0,96 e  $\delta$  0,97 com o carbono quaternário em  $\delta$  77,5. A partir destes dados, pode-se propor a presença de um anel pirânico em **S07**.

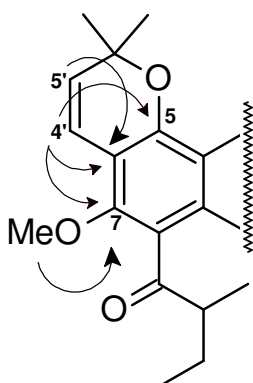
Ademais, pode-se inferir que este grupo esteja localizado nas posições C-5 e C-6 do núcleo cumarínico baseado nos valores dos deslocamentos químicos dos grupos metílicos. Cruz *et al.* (1998) demonstraram, por exemplo, que os grupos metílicos em 4-fenilcumarinas com anéis pirânicos envolvendo os carbonos C-5 e C-6 são protegidos através do efeito anisotrópico provocado pelo grupo fenílico em C-4; enquanto que os grupos metílicos em anéis pirânicos envolvendo os carbonos C-7 e C-8 não apresentam esta blindagem. De fato, observa-se também que os deslocamentos químicos dos grupos metílicos em **S05** e **S06**, cuja ciclização envolveu os carbonos C-7 e C-8, e não apresentam qualquer efeito de blindagem, correspondem a  $\delta$  1,56.



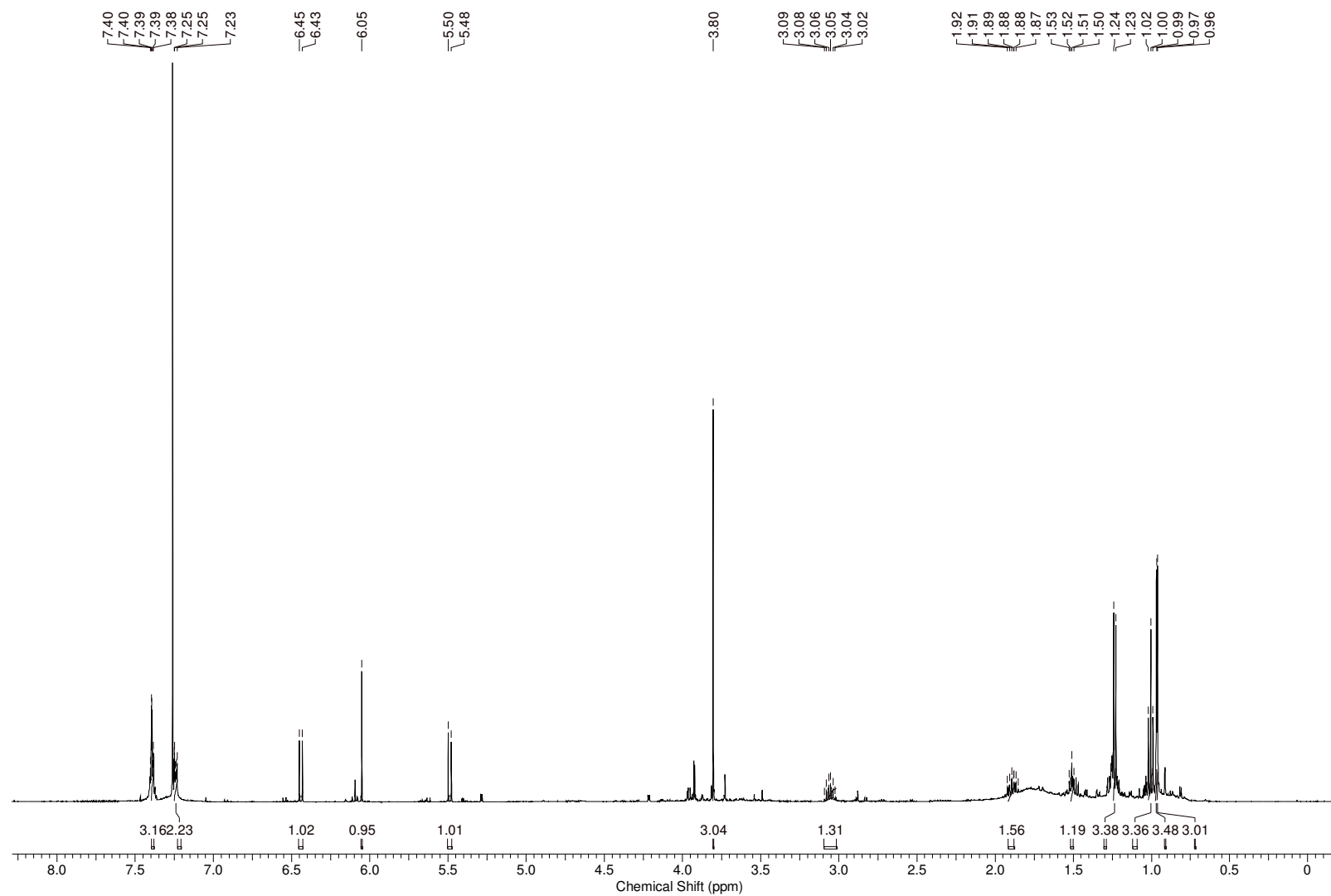
**Figura 88.** Deslocamentos químicos dos grupos metílicos do anel pirânico em 4-fenilcumarinas isoladas em *K. reticulata* (CRUZ *et al.*, 1998). Figura adaptada.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu observar a presença de um grupo metoxílico cujo deslocamento químico corresponde a  $\delta$  3,80, e ao qual podemos inferir correlacionar ao carbono em  $\delta$  64,0. Como a fração da qual foi isolada a substância **S07** foi submetida a uma reação com diazometano (**Figura 10, p. 47**), podemos inferir que ocorreu uma reação de metilação do grupo hidroxílico usualmente presente em C-7.

Similarmente ao espectro observado em **S03** e **S05**, observou-se a presença de uma cadeia 2-metil-1-oxobutílica caracterizada pela presença do grupo metínico em  $\delta$  3,05 ( $\delta$  49,2); os hidrogênios diastereotópicos do grupo metilênico correspondentes aos multipletos em  $\delta$  1,51 e 1,88 ( $\delta$  25,3); e os grupos metílicos referentes ao tripleto em 1,00 ( $\delta$  11,6) e ao dubleto em 1,24 ( $\delta$  15,0) (**Figura 89**). Deste modo, a substância **S07** corresponde a 7-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metilbutanoil)-10-fenil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-8-ona (PALMER *et al.* 1995).

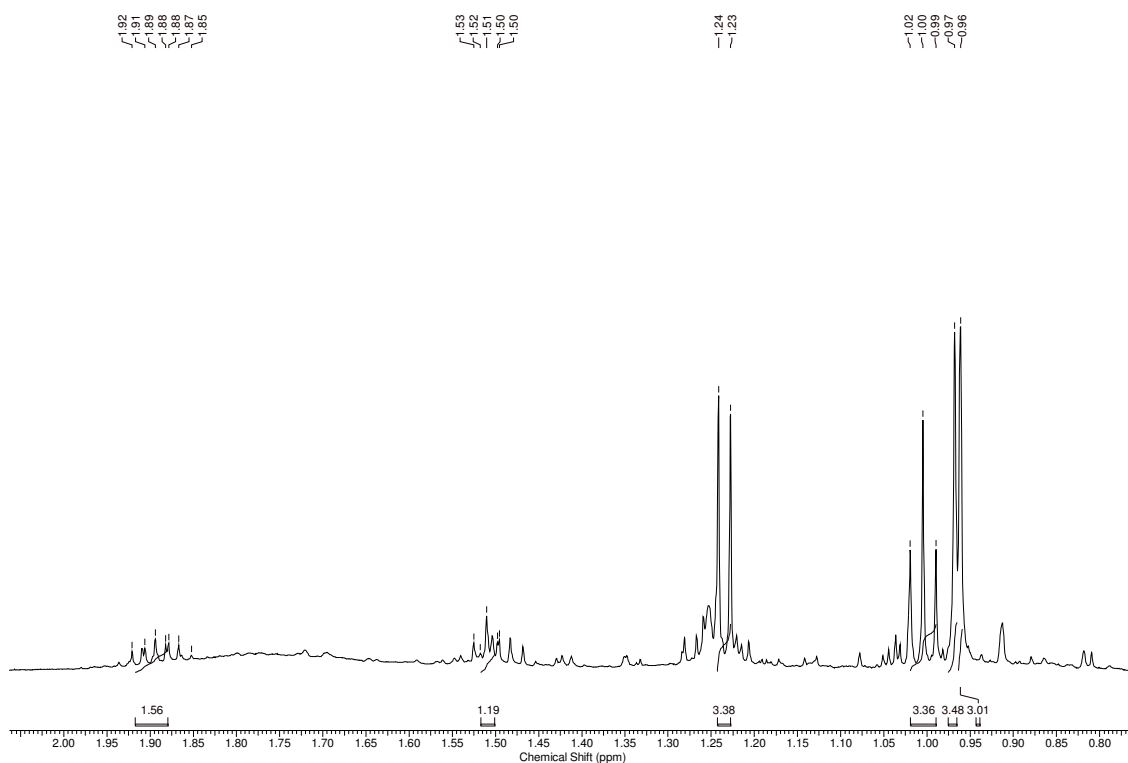


**Figura 89.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S07**

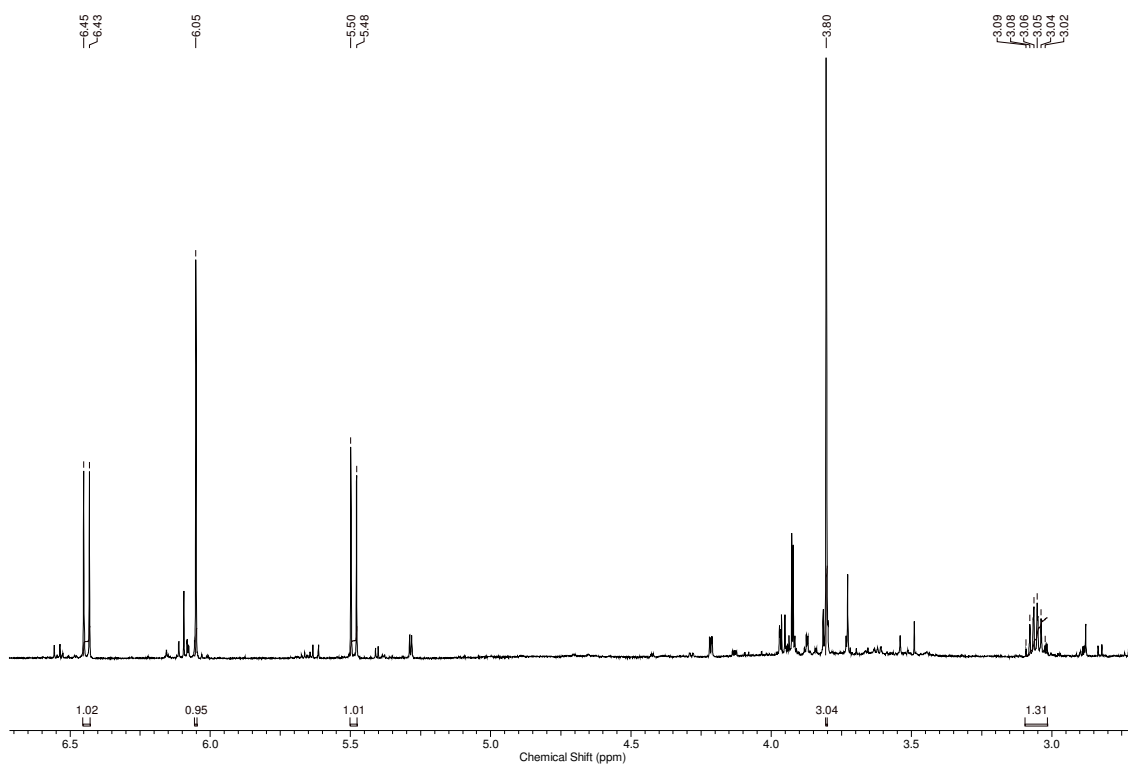


**Figura 90.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S07

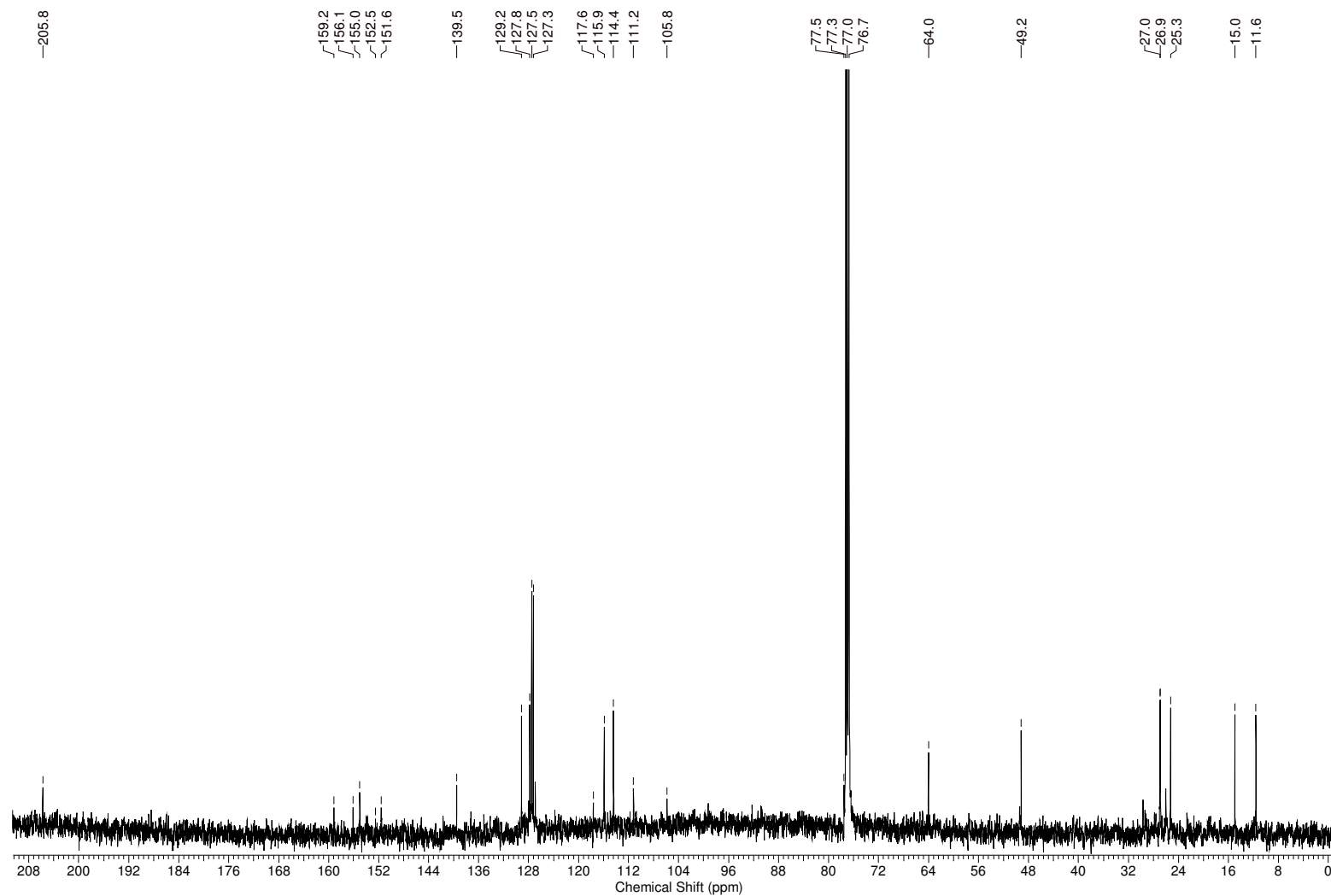




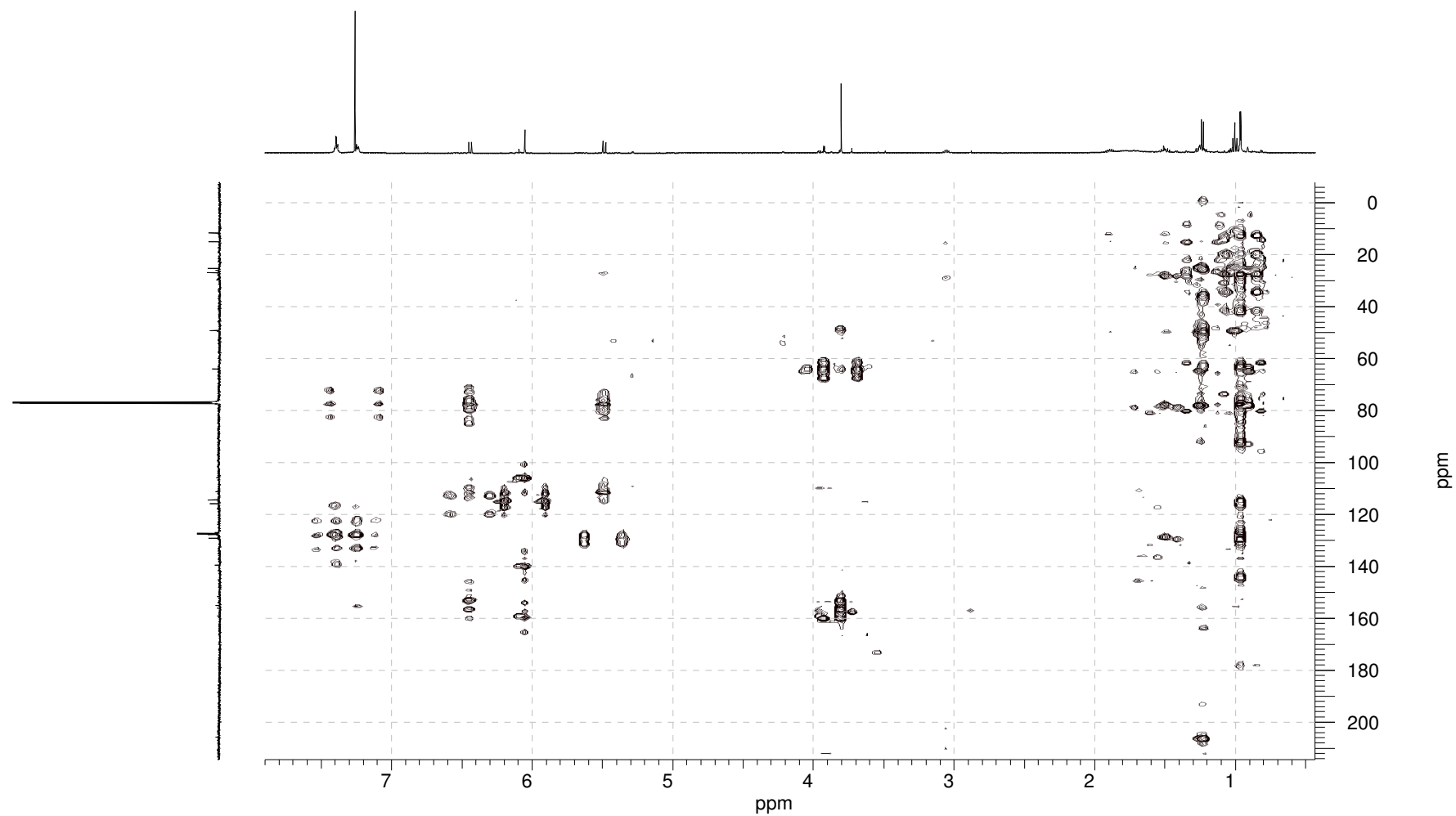
**Figura 91.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  0,8 - 2,0) da substância S07



**Figura 92.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  3,0 - 6,5) da substância S07



**Figura 93.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S07



**Figura 94.** Espectro de gHMBC [600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S07**

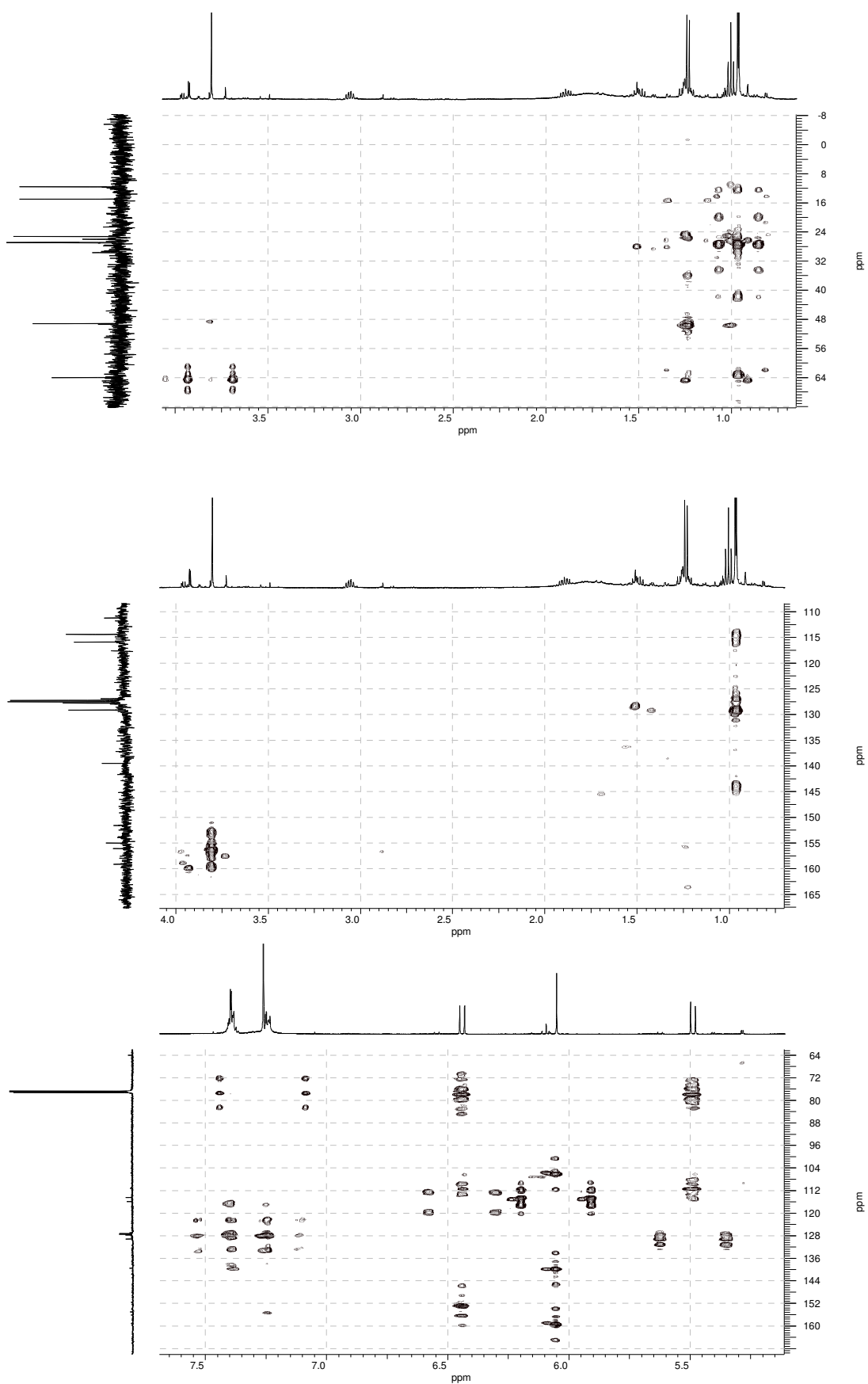


Figura 95. Ampliações do espectro de gHMBC da substância S07

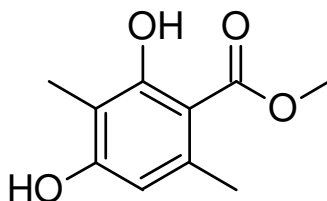
**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC da substância **S07**<sup>a, b</sup>

Nº	$\delta$ $^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integração]	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC (HC)
<b>2</b>	-	205,8	-
<b>3</b>	6,05 (s; 1H)	114,4	105,8; 139,5; 159,2
<b>4</b>	-	155,0	-
<b>4a</b>	-	105,8	-
<b>5</b>	-	152,5	-
<b>6</b>	-	111,2	-
<b>7</b>	-	156,1	-
<b>8</b>	-	117,6	-
<b>8a</b>	-	151,6	-
<b>1'</b>	-	139,5	-
<b>2' e 6'</b>	7,24 ( <i>m</i> ; 2H)	127,3	127,8
<b>3' e 5'</b>	7,40 ( <i>m</i> ; 2H)	127,5	127,8; 139,5
<b>4'</b>	7,40 ( <i>m</i> ; 1H)	127,8	127,8; 139,5
<b>4''</b>	6,44 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	115,9	77,5; 111,2; 152,5; 156,1
<b>5''</b>	5,49 ( <i>d</i> ; 10,0; 1H)	129,2	77,5; 111,2
<b>6''</b>	-	77,5	-
<b>7''</b>	0,96 ( <i>s</i> ; 3H)	26,9	27,0; 77,5
<b>8''</b>	0,97 ( <i>s</i> ; 3H)	27,0	26,9; 77,5
<b>1'''</b>	-	205,8	-
<b>2'''</b>	3,05 ( <i>sext</i> ; 7,0; 1H)	49,2	-
<b>3'''</b>	1,51 ( <i>m</i> ; 1H) 1,88 ( <i>m</i> ; 1H)	25,3	49,2
<b>4'''</b>	1,00 ( <i>t</i> ; 7,5; 3H)	11,6	25,3; 49,2
<b>5'''</b>	1,24 ( <i>d</i> ; 7,0; 3H)	15,0	25,3; 49,2
<b>7-OMe</b>	3,80 ( <i>s</i> ; 3H)	64,0	156,1

<sup>a</sup> Dados de RMN de acordo com PALMER *et al.* (1995)

<sup>b</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

#### 4.1.8 Determinação estrutural da substância S08



**Figura 96.** Estrutura química da substância S08

A substância **S08** (4,4 mg), um sólido branco, com bandas de absorção no UV em 212, 235, 256 e 288 nm (**Figura 18, p. 56**), foi isolada a partir do extrato hexânico do caule de *K. lathrophyton* (**Figura 16, p. 55**). A identificação desta substância foi realizada com base nos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , gHSQC e gHMBC.

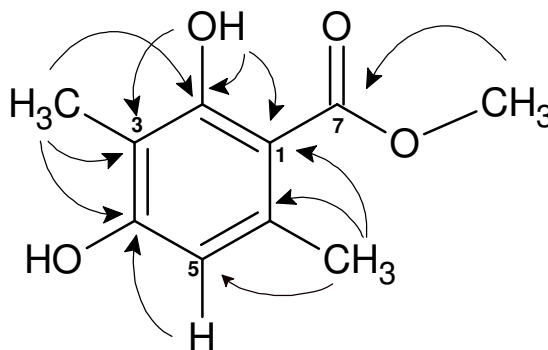
O espectro de  $^{13}\text{C}$  desacoplado (**Figura 99, p. 124**) apresentou dez sinais e, complementado com as informações obtidas a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 98, 123**) de gHSQC (**Figura 100, p. 125**), verificou-se que estes sinais correspondiam a três grupos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), um carbono metínico ( $\text{CH}$ ) e seis carbonos não-hidrogenados.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu verificar a presença de singletos em  $\delta$  2,11, 2,47 e 3,93, cujas integrações correspondem a três átomos de hidrogênios. Em conjunto com os dados do experimento de gHSQC, pode-se atribuir estes sinais aos grupos metílicos cujos deslocamentos químicos dos carbonos são, respectivamente,  $\delta$  7,6, 24,0 e 51,8. Adicionalmente, verificou-se um singlete em  $\delta$  6,22 cuja integração corresponde a um átomo de hidrogênio, e apresentando correlação direta com o carbono em  $\delta$  110,5; além de outro singlete em  $\delta$  12,03, o qual não apresentou correlação direta com um átomo de carbono, e que pode ser atribuído a um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular.

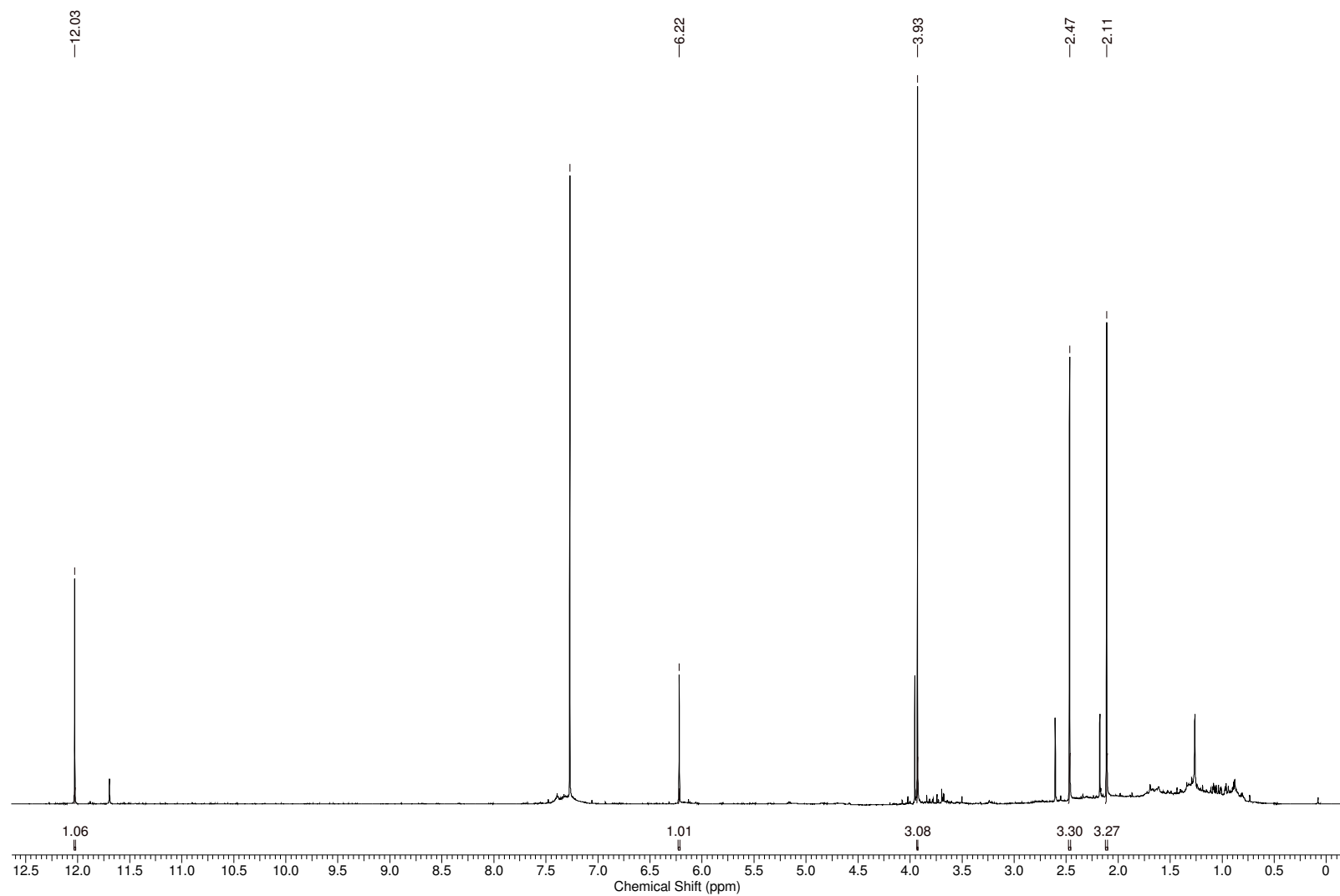
Verificando-se os demais dados de  $^{13}\text{C}$ , cujos deslocamentos correspondem a  $\delta$  105,2, 108,5, 140,1, 158,0 e 163,1, pode-se inferir a presença de um anel benzênico pentasubstituído e dioxigenado. O sinal no espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  172,6 pode ser atribuído a C-7, um grupo éster ligado ao anel aromático. A partir da correlação observada a longa distância dos hidrogênios em  $\delta$  3,92 com o átomo de carbono em  $\delta$

172,6, pode-se deduzir a presença de um grupo éster metílico. Deste modo, a substância **S08** corresponde a um derivado do benzoato de metila tendo como substituintes dois grupos metílicos, dois grupos hidroxílicos e um único átomo de hidrogênio ligado diretamente ao anel aromático.

A partir do sinal em  $\delta$  12,03, o qual é característico de um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular com um grupo carbonílico, pode-se inferir a presença deste grupo hidroxílico em posição *orto* ao grupo éster. Adicionalmente, observa-se no espectro de gHMBC (**Figuras 101 e 102, p. 125 e 126**), as correlações a longa distância deste hidrogênio com os carbonos em  $\delta$  105,2, 108,5, 158,0 e 163,1. Assim como as correlações dos hidrogênios do grupo metílico em  $\delta$  2,11 com os carbonos em  $\delta$  108,4, 158,0 e 163,1. Logo, pode-se propor que este grupo metílico esteja localizado na posição C-3 do anel aromático. A partir das correlações observadas com o carbono em  $\delta$  163,1, e o efeito de blindagem do carbono C-3 ao qual grupo metílico encontra-se diretamente ligado, pode-se inferir que a posição C-4 seja oxigenada, sendo correspondente a outro grupo hidroxílico, cujo sinal não é observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  realizado em  $\text{CDCl}_3$ . O sinal em  $\delta$  6,22, correspondente ao hidrogênio ligado diretamente ao anel aromático, está correlacionado com os carbonos em  $\delta$  105,2, 108,5 e 158,0. Deste modo, pode-se inferir que o hidrogênio esteja localizado em C-5. Logo, o grupo metílico correspondente ao sinal em  $\delta$  2,47 localiza-se em C-6, sendo possível observar as correlações à longa distância com os carbonos em  $\delta$  105,2, 110,5 e 140,1; e assim confirmar que **S08** corresponde a 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (Lee *et al.* 2001; Li, W. *et al.* 2013)

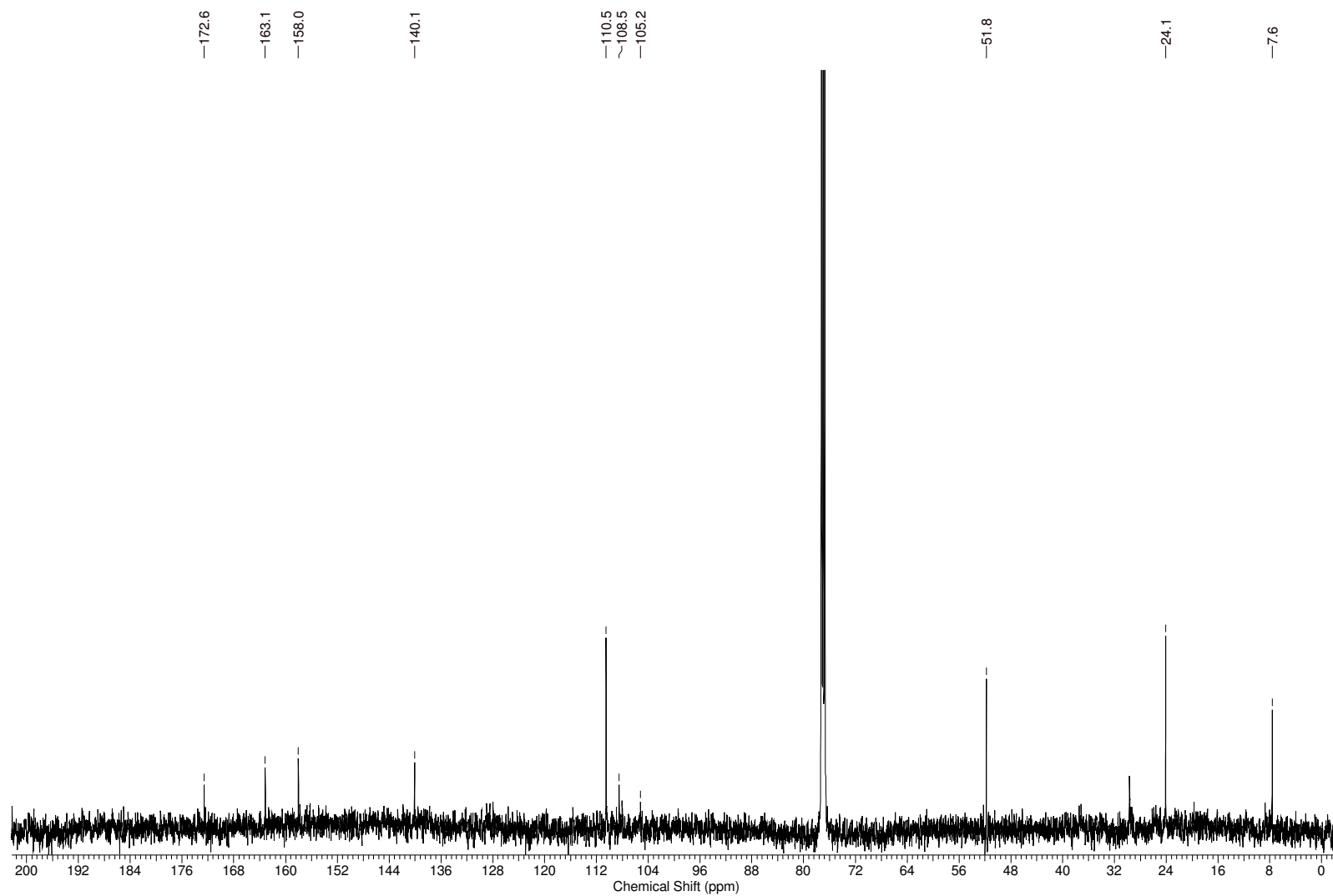


**Figura 97.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S08**

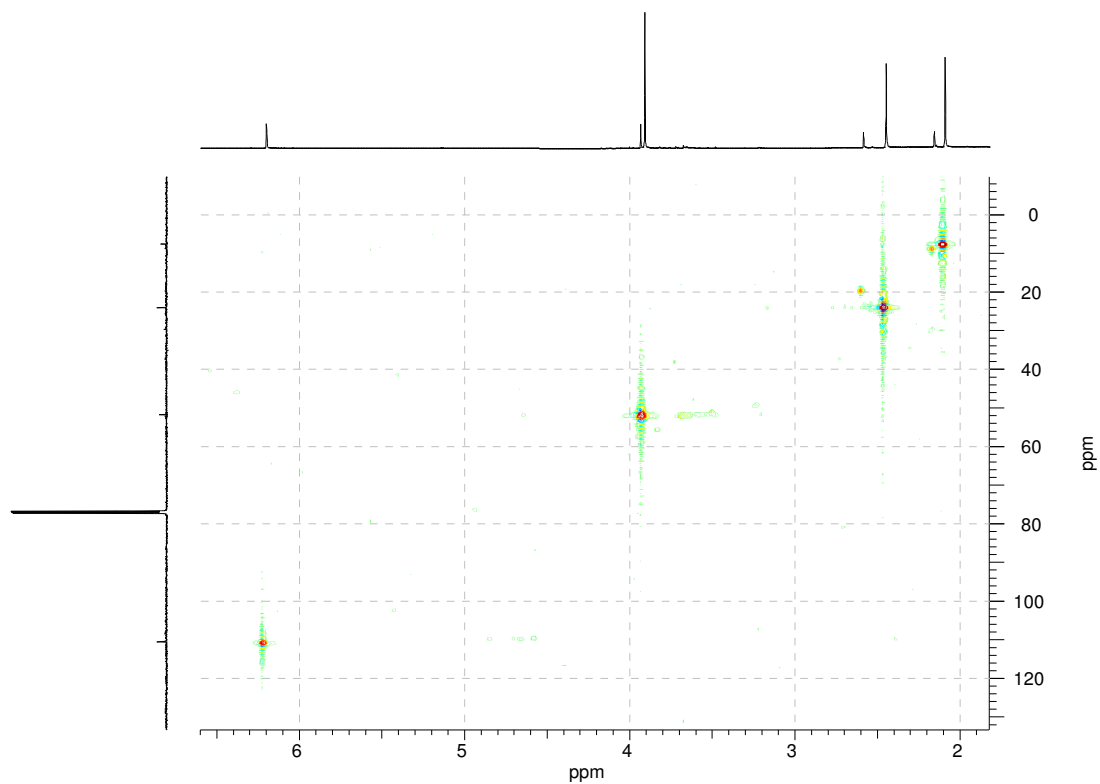


**Figura 98.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S08**

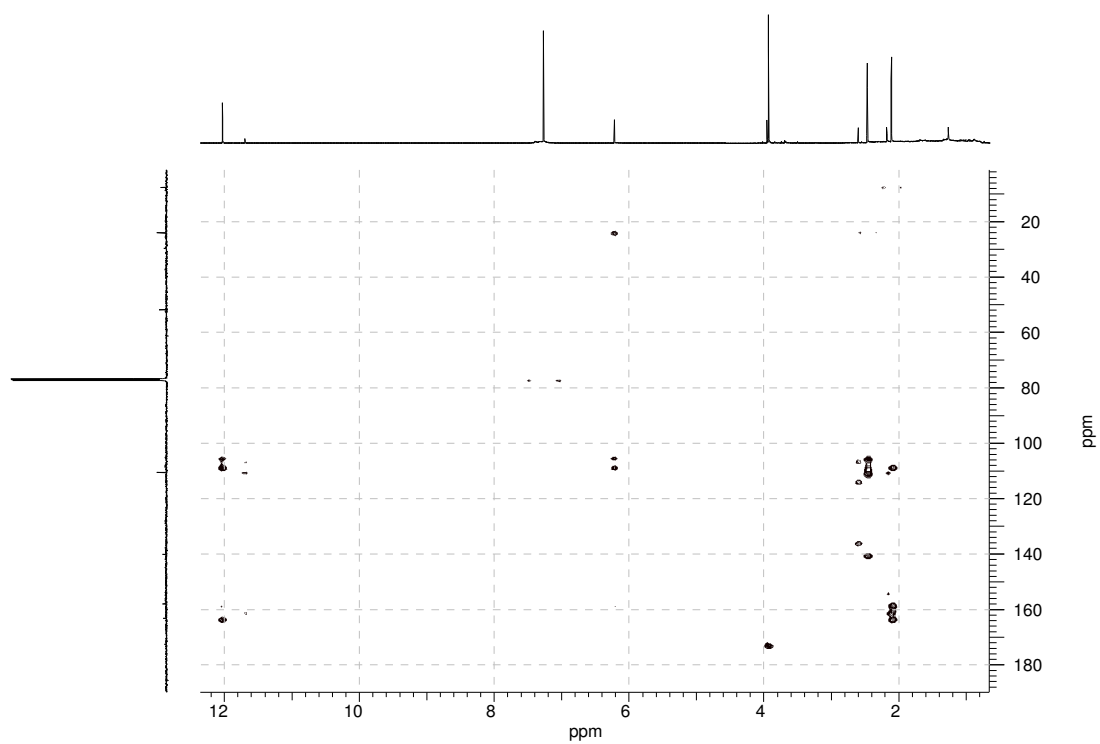




**Figura 99.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S08



**Figura 100.** Espectro gHSQC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S08



**Figura 101.** Espectro gHMBC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S08

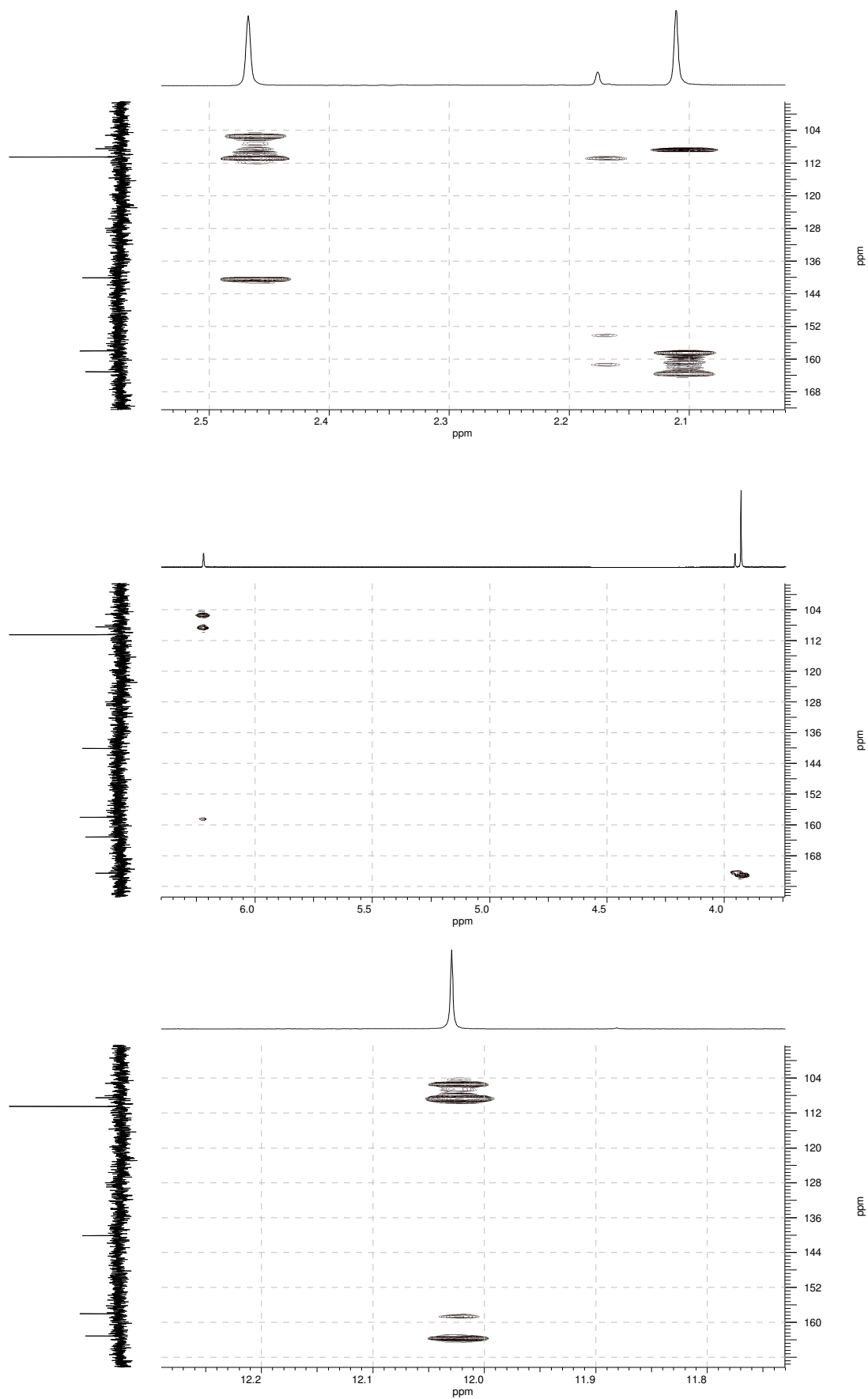


Figura 102. Ampliações do espectro gHMBC da substância S08

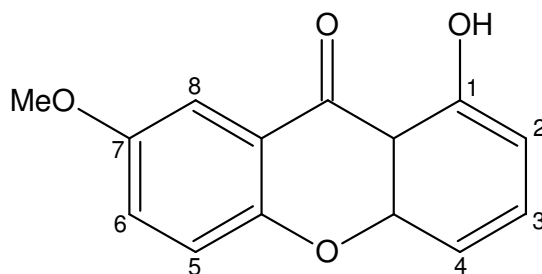
**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC da substância **S08**<sup>a, b</sup>

Nº	$\delta^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integração]	$\delta^{13}\text{C}$ /HSQC	HMBC (HC)
1	-	105,2	-
2	-	163,1	-
3	-	108,5	-
4	-	158,0	-
5	6,22 (s, 1H)	110,5	105,2; 108,5; 158,0
6	-	140,1	-
7	-	172,6	-
7-OCH <sub>3</sub>	3,93 (s, 3H)	51,8	172,6
2-OH	12,03 (s, 1H)	-	105,2; 108,5; 158,0; 163,1
3-CH <sub>3</sub>	2,11 (s, 3H)	7,6	108,5; 158,0; 163,1
6-CH <sub>3</sub>	2,47 (s, 3H)	24,1	105,2; 110,5; 140,1

<sup>a</sup>Dados de acordo com Lee *et al.* (2001) e Li, W. *et al.* (2013)

<sup>b</sup>Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em CDCl<sub>3</sub>.

#### 4.1.9 Determinação estrutural da substância S09



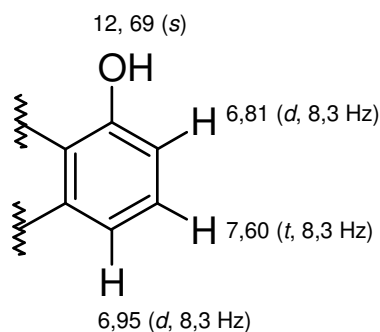
**Figura 103.** Estrutura química da substância S09

A substância **S09** (1,6 mg), um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio e bandas de absorção no UV em 234, 259, 287 e 381 nm (**Figura 19, p. 55**), foi isolada a partir do extrato hexânico das raízes de *K. lathrophyton* (**Figura 16, p. 54**). A identificação desta substância foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , gHMBC e comparação com os dados da literatura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 107 e 108, p. 131**) apresentou um singlete em  $\delta$  3,94 (3H); dupletos em  $\delta$  6,81 ( $J = 8,3$  Hz, 1H),  $\delta$  6,95 ( $J = 8,3$  Hz, 1H),  $\delta$  7,44 ( $J = 9,0$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,65 ( $J = 3,1$  Hz, 1H); um tripleto em  $\delta$  7,60 ( $J = 8,3$  Hz, 1H); um duplo duplete em  $\delta$  7,38 ( $J = 9,0$  e 3,1 Hz, 1H) e um singlete em  $\delta$  12,69 (1H). A análise do espectro de gHMBC (**Figuras 109 e 110, p. 132 e 133**), cujo objetivo principal é observar as correlações  $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ , permitiu verificar também as correlações do tipo  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ , ou seja, as informações que seriam obtidas em um experimento de gHSQC.

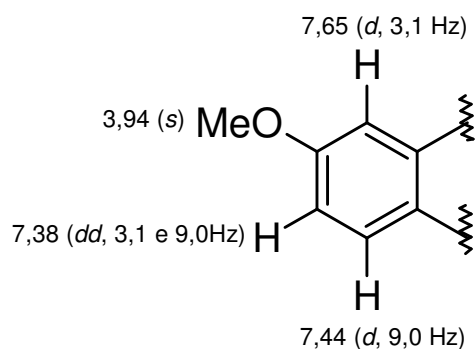
Os dupletos em  $\delta$  6,81 e  $\delta$  6,95 e o tripleto em  $\delta$  7,60 apresentam os mesmos valores de constante de acoplamentos, podendo-se inferir que corresponda ao mesmo sistema aromático. A partir do espectro de gHMBC, observou-se que o duplete em  $\delta$  6,81 ( $\delta$  109,0) se correlaciona com o carbono em  $\delta$  160,0; o tripleto em  $\delta$  7,60 ( $\delta$  136,2) se correlaciona com os carbonos em  $\delta$  106,8, 156,2 e 160,7; e o duplete em  $\delta$  6,95 ( $\delta$  106,8) correlaciona-se com o carbono em  $\delta$  156,2. Pode-se inferir também que o singlete em  $\delta$  12,69 seja correspondente a um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular, o qual também se encontra ligado ao anel visto que se correlaciona a longa distância com os carbonos em  $\delta$  109,0, 110,0 e 160,7. A partir

destes dados, pode-se propor a presença de um anel aromático trissubstituído como visualizado na **Figura 104**.



**Figura 104.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e estrutura parcial da substância **S09**

Em continuidade, observa-se as correlações do dubleto em  $\delta$  7,44 ( $\delta$  120,7) com os carbonos  $\delta$  150,7, 155,8; o duplo dubleto em  $\delta$  7,38 correlacionado com os carbonos em  $\delta$  104,8, 150,7 e 155,8 e o dubleto em  $\delta$  7,65 correlacionado com os carbonos em  $\delta$  125,0, 150,7, 155,8 e 181,7. Com estes dados, pode-se inferir a presença de outro anel aromático trissubstituído, porém com o padrão de substituição distinto. Observou-se também que o singlete em  $\delta$  3,94 está ligado ao carbono em  $\delta$  55,6 correspondendo assim a um grupo metoxílico, e correlacionado a longa distância com o sinal em  $\delta$  155,8 sendo assim um dos grupos ligado ao anel aromático (**Figura 105**).

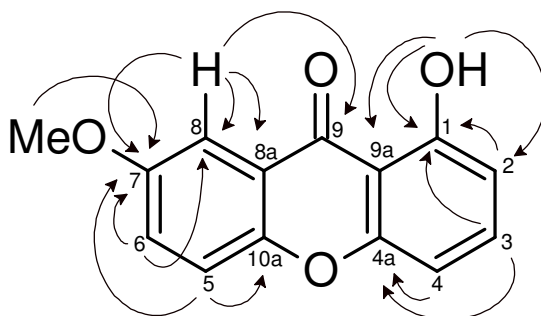


**Figura 105.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e estrutura parcial da substância **S09**

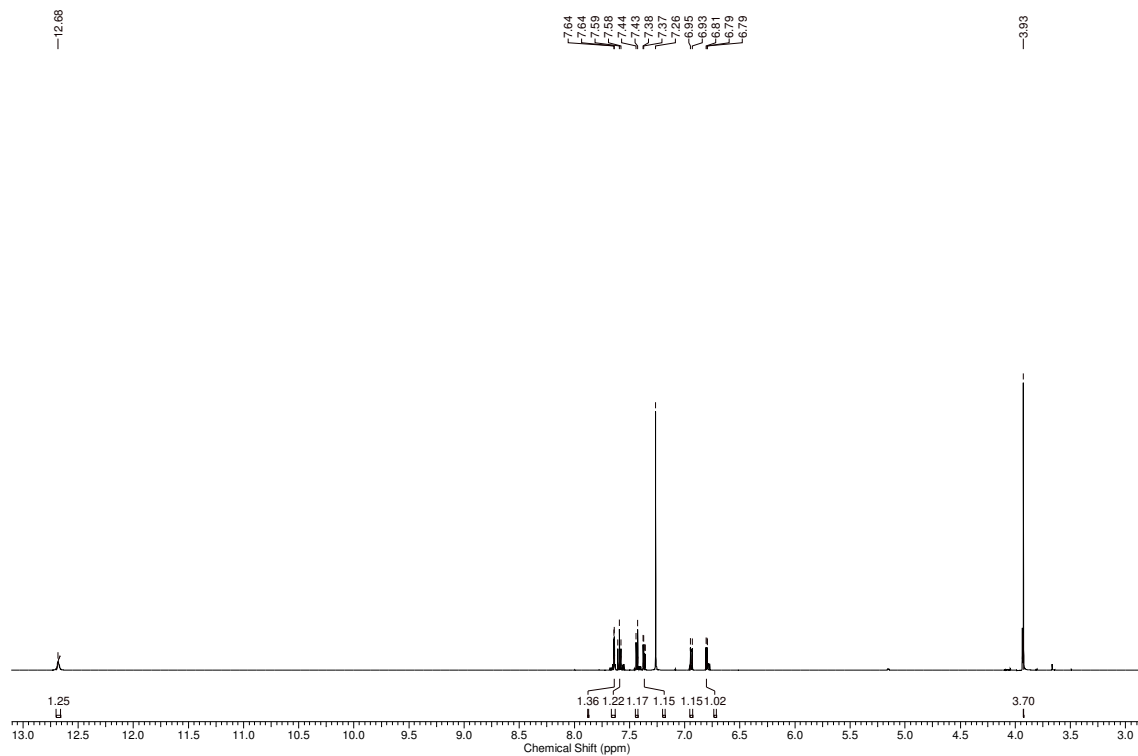
Em conjunto com os dados observados, verifica-se que o deslocamento químico do grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular é característico de

xantonas com o respectivo grupo em C-1 (GOTTILIEB *et al.*, 1968; CRUZ *et al.*, 2001). Adicionalmente, observou-se a correlação do hidrogênio em  $\delta$  7,65 com o carbono em  $\delta$  181,7, o qual também é característico do grupo carbonílico em um núcleo xantônico.

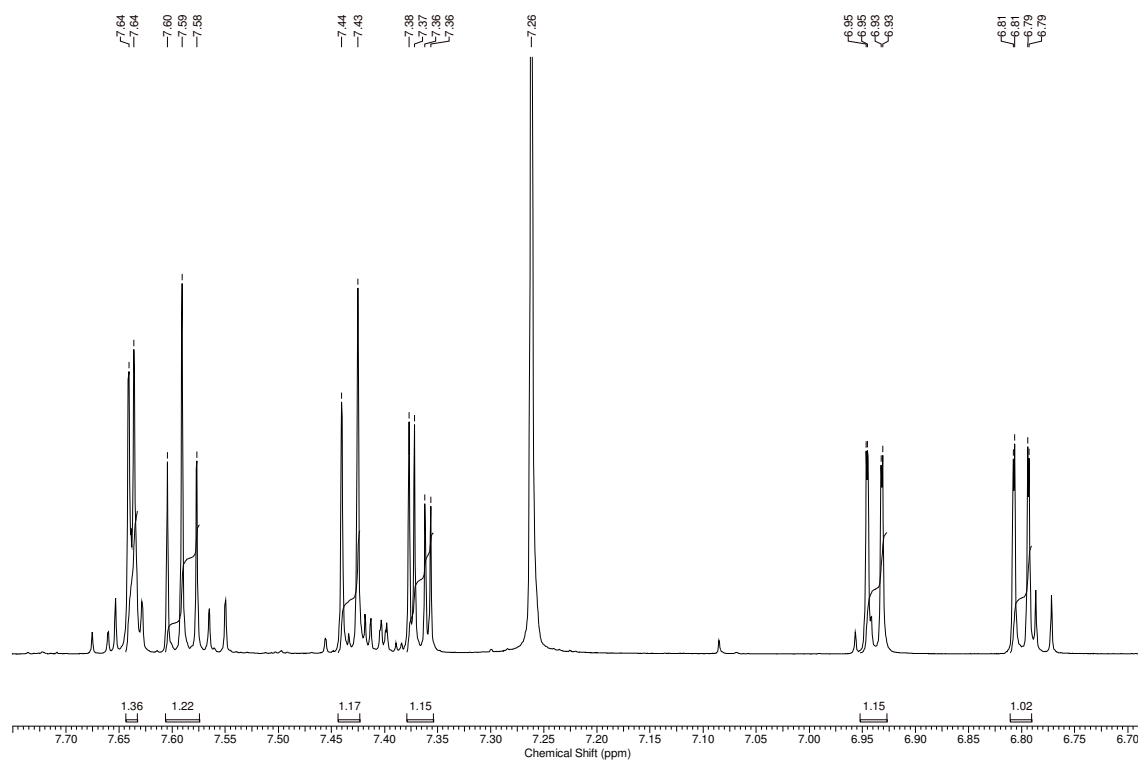
Deste modo, pode-se propor que **S09** corresponda à 1-hidroxi-7-metoxixantona ou 1-hidroxi-6-metoxixantona. Porém, caso o grupo metoxílico estivesse em C-6, o duplete com constante *meta* seria mais protegido por efeito de ressonância dos pares de elétrons do oxigênio do heterociclo. Ademais, como já destacado anteriormente, observou-se a correlação deste sinal com o grupo carbonílico em C-9. Comparação com os dados da literatura também permitiram confirmar a estrutura de **S09** como sendo a 1-hidroxi-7-metoxixantona (**Figura 106**) (WESTERMAN *et al.*, 1977; GUNATILAKA *et al.*, 1982).



**Figura 106.** Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$  e  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) observadas no experimento de gHMBC da substância **S09**

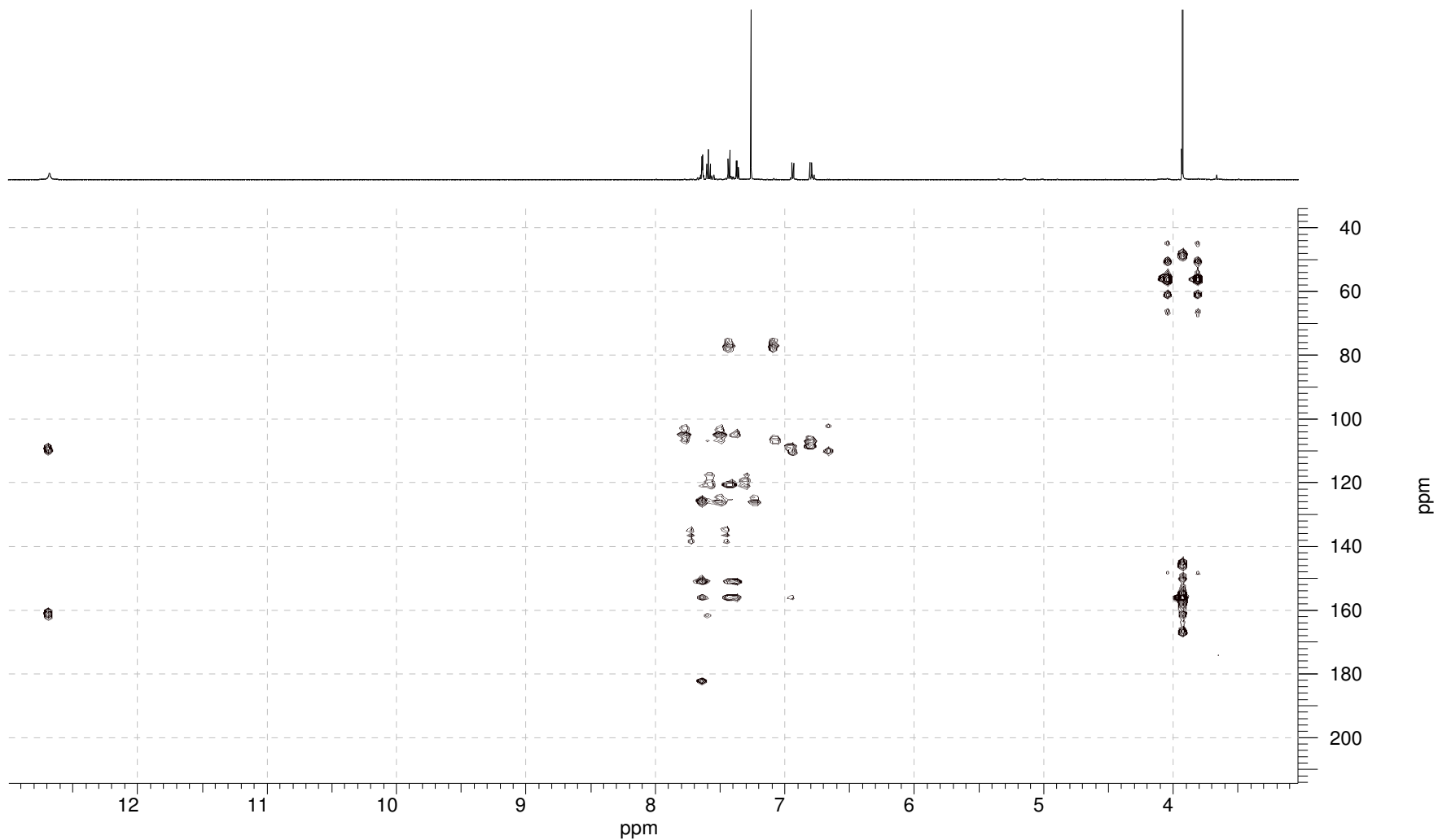


**Figura 107.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância **S09**

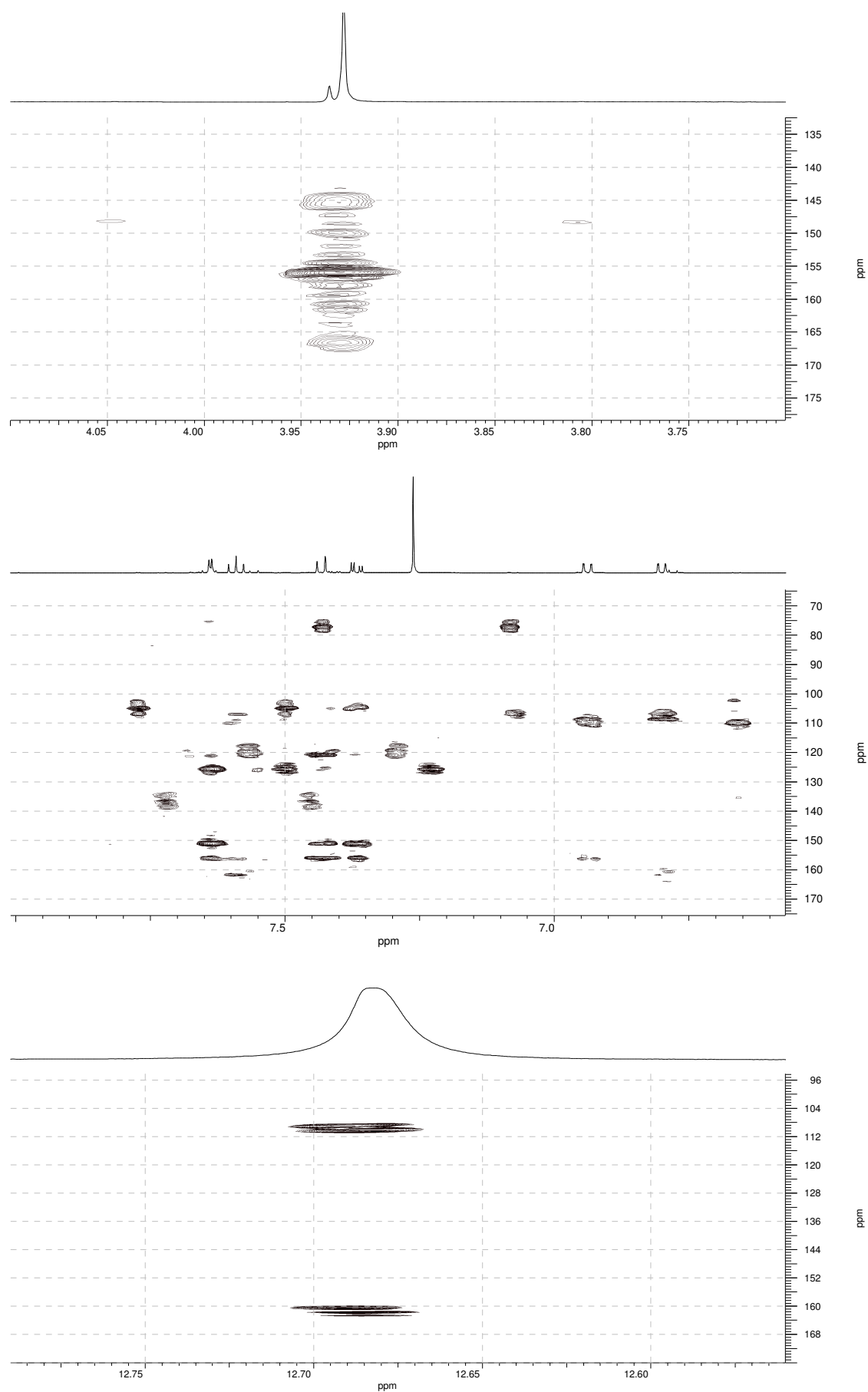


**Figura 108.** Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (região entre  $\delta$  6,7 - 7,7) da substância **S09**





**Figura 109.** Espectro de gHMBC [600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)] da substância S09



**Figura 110.** Ampliações do espectro de gHMBC da substância S09

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e gHMBC da substância **S09**<sup>a</sup>

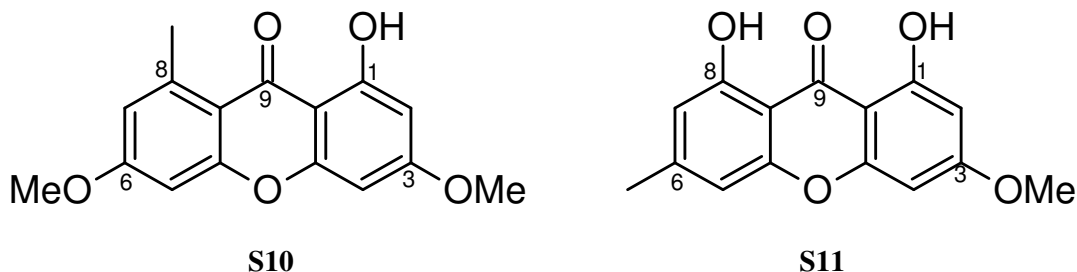
N°	$\delta^1\text{H}$ [mult; <i>J</i> (Hz); integr.] <sup>b</sup>	$^{13}\text{C}^{\text{b,c}}$	gHMBC	
			$^1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$
<b>1</b>	-	160,7	-	-
<b>2</b>	6,81 ( <i>d</i> ; 8,3; 1H)	109,0	109,0	160,7
<b>3</b>	7,60 ( <i>t</i> ; 8,3; 1H)	136,2	136,2	106,8; 156,2; 160,7
<b>4</b>	6,95 ( <i>d</i> ; 8,3; 1H)	106,8	106,8	156,2
<b>4a</b>	-	156,2	-	-
<b>5</b>	7,44 ( <i>d</i> ; 9,0; 1H)	120,7	120,7	150,7; 155,8
<b>6</b>	7,38 ( <i>dd</i> ; 9,0 e 3,1; 1H)	125,0	125,0	104,8; 150,7; 155,8
<b>7</b>	-	155,8	-	-
<b>8</b>	7,65 ( <i>d</i> ; 3,1; 1H)	104,8	104,8	129,9; 125,0; 150,7; 155,8; 181,7
<b>8a</b>	-	120,9	-	-
<b>9</b>	-	181,7	-	-
<b>9a</b>	-	110,0	-	-
<b>10a</b>	-	150,7	-	-
<b>1-OH</b>	12,69 ( <i>s</i> ; 1H)	-	-	109,0; 110,0; 160,9
<b>7-OMe</b>	3,94 ( <i>s</i> ; 3H)	55,6	55,6	155,8

<sup>a</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>b</sup> Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de acordo com WESTERMAN *et al.*, 1977; GUNATILAKA *et al.*, 1982

<sup>c</sup> Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  observados a partir das correlações  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  presentes no experimento de gHMBC

#### 4.1.10 Determinação estrutural das substâncias S10 e S11



**Figura 111.** Estruturas químicas das substâncias **S10** e **S11**

As substâncias **S10** (1,0 mg) e **S11** (1,2 mg) foram isoladas a partir do extrato hexânico das raízes de *K. lathrophyton* (**Figura 16, p. 55**). A identificação da substância **S10** foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , *g*HSQC, *g*HMBC e comparação com os dados da literatura (DIAZ *et al.*, 2010) e a identificação da substância **S11** foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com os dados descritos por SOB *et al.*, (2008).

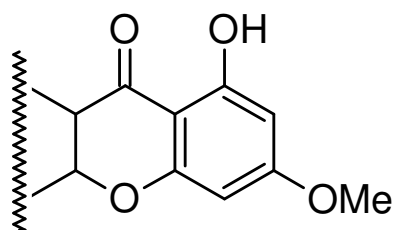
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **S10** (**Figura 114, p. 138**) apresentou um singleto em  $\delta$  2,86 (1H); outros dois singletos, respectivamente, em  $\delta$  3,88 (3H) e  $\delta$  3,91 (3H); dubletos em  $\delta$  6,31 (1H) e  $\delta$  6,34 (1H) ambos apresentando  $J = 2,3$  Hz; dubletos em  $\delta$  6,68 (1H) e  $\delta$  6,71 (1H) com  $J = 2,4$  Hz; e um singleto em 13,39 (1H). Enquanto que o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **S11** (**Figura 115, p. 138**) apresentou singletos em 2,46 (1H) e  $\delta$  3,95 (3H); dubletos em  $\delta$  6,70 (1H) e  $\delta$  7,39 (1H) com  $J = 2,4$  Hz; singletos largos em  $\delta$  7,10 (1H) e  $\delta$  7,65 (1H) e outro singleto em  $\delta$  12,14 (1H).

A partir destes dados de RMN, pode-se inferir que a estrutura química de ambas as substâncias apresentam dois anéis aromáticos tetrassubstituídos e baseado nos acoplamentos observados ( $\sim 2,0$  Hz), os hidrogênios localizam-se em posição *meta* entre si. De modo similar à substância **S09**, verifica-se também a presença de singletos relativamente desprotegidos ( $\sim 12 - 13$  ppm), os quais são característicos de grupos

hidroxílicos, localizados nas posições C-1 e/ou C-8, em ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonílico de xantonas.

A **Figura 116 (p. 139)** apresenta as únicas correlações observadas no espectro de *g*HSQC da substância **S10**; verifica-se que o singlete em  $\delta$  2,86 correlaciona-se com o carbono em  $\delta$  23,5 e corresponde a um grupo metílico. Assim como se observa as correlações a longa distância no espectro de *g*HMBC (**Figura 117, p. 139**) deste grupo com os carbonos em  $\delta$  113,1, 115,4 e 143,1, o que indica que o grupo metílico está diretamente ligado ao anel aromático. Verificou-se também no espectro de *g*HSQC que os singletos em  $\delta$  3,88 e  $\delta$  3,91 correlacionam-se, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  55,5 e  $\delta$  55,6; e a longa distância, respectivamente, com os carbonos em  $\delta$  164,4 e  $\delta$  165,7. Pode-se assim inferir que ambos correspondam a grupos metoxílicos também ligados ao anel aromático.

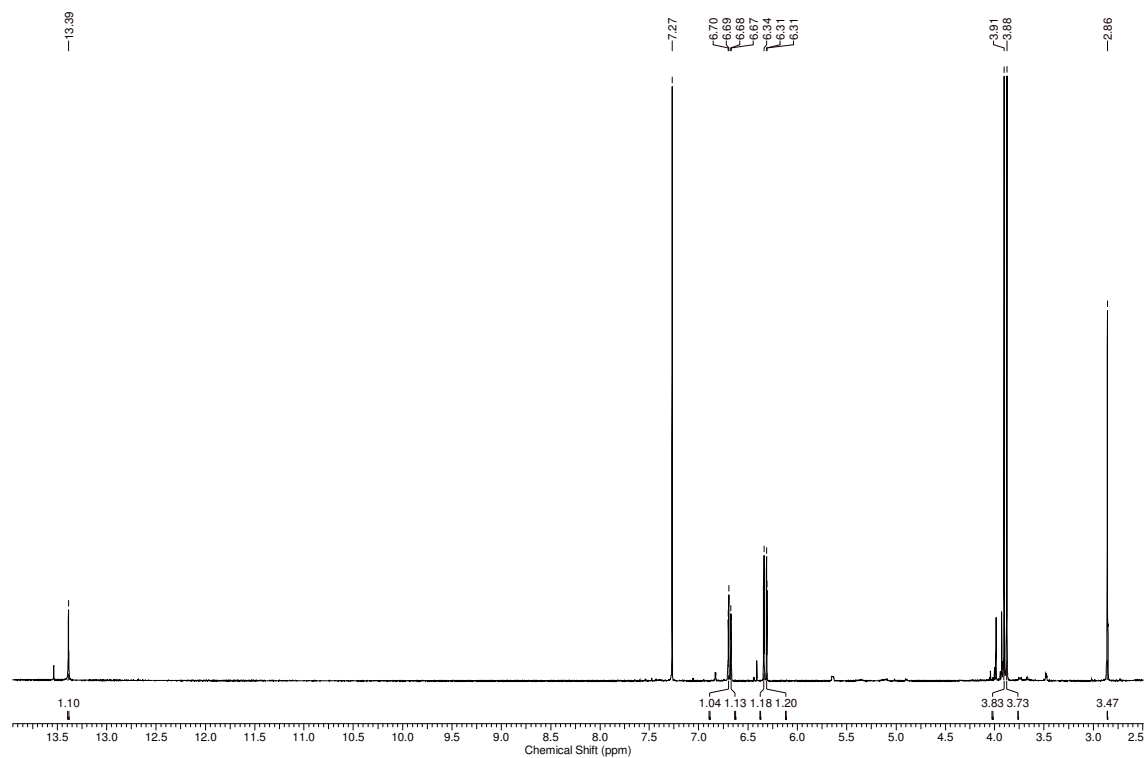
Ademais, em harmonia com a origem biossintética de um dos anéis aromáticos das xantonas, o qual é proveniente da rota do acetato, pode-se propor que paralelamente ao grupo hidroxílico em C-1, um dos grupos metoxílicos ocuparia a posição C-3 no anel aromático em **S10** e similarmente, observa-se o mesmo padrão para a substância **S11**, podendo-se propor que estejam localizadas nas posições C-1 e C-3, respectivamente, um grupo hidroxílico e um grupo metoxílico (**Figura 112**).



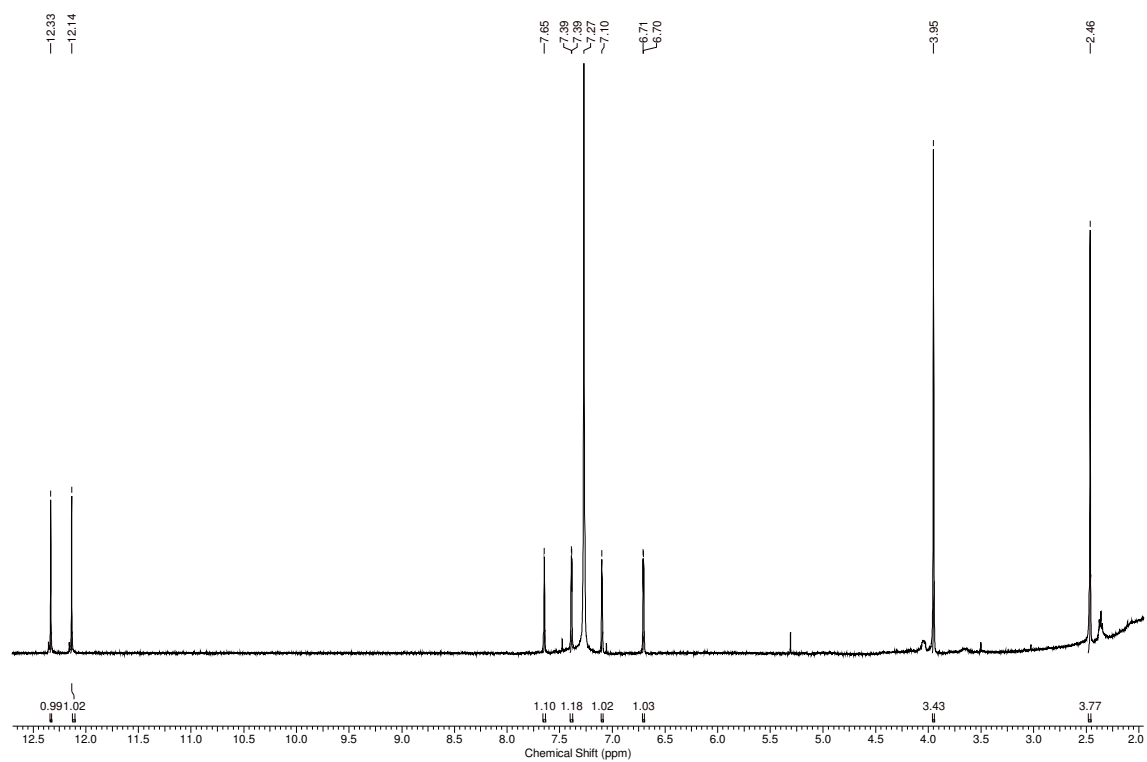
**Figura 112.** Estrutura química parcial das substâncias **S10** e **S11**

Em continuidade, reiterando a presença dos dois singletos na região de 12 – 14 ppm em **S11**, pode-se inferir que a posição C-8 na estrutura química deste composto também seja ocupada por um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonílico. Ademais, baseado no fato dos hidrogênios ligados ao anel aromático estarem em *meta* entre si, pode-se concluir que o grupo metílico

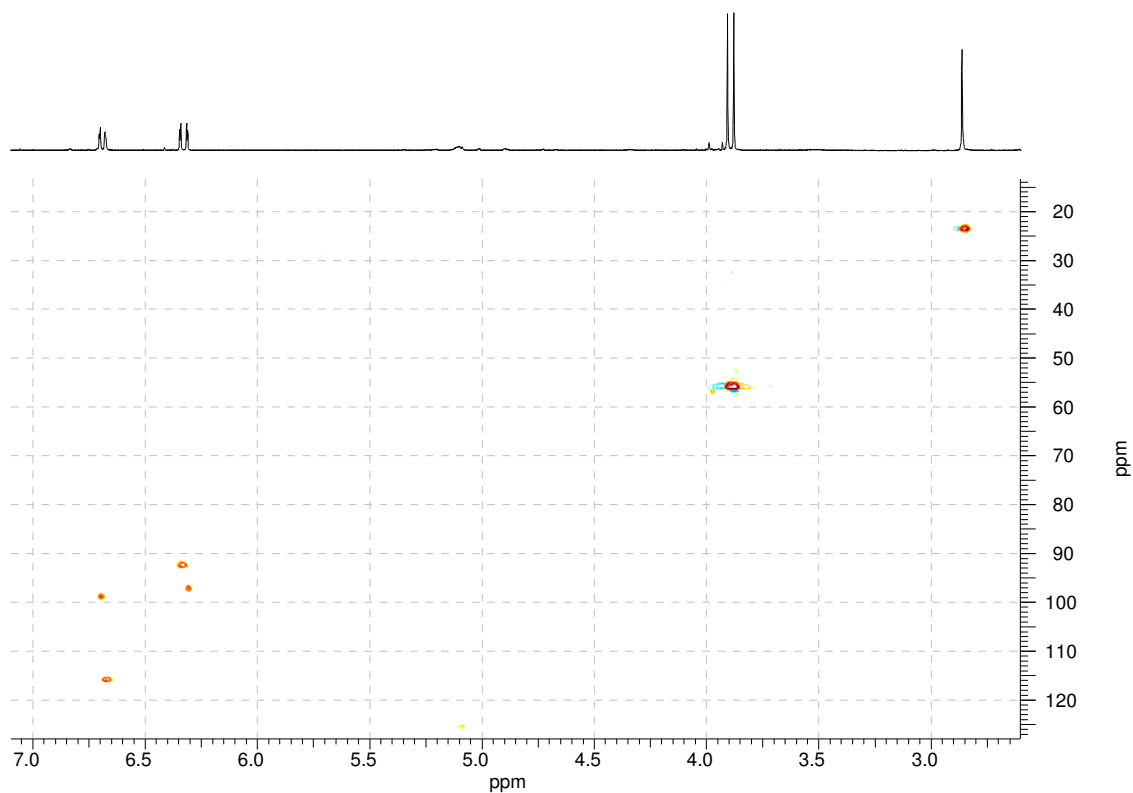




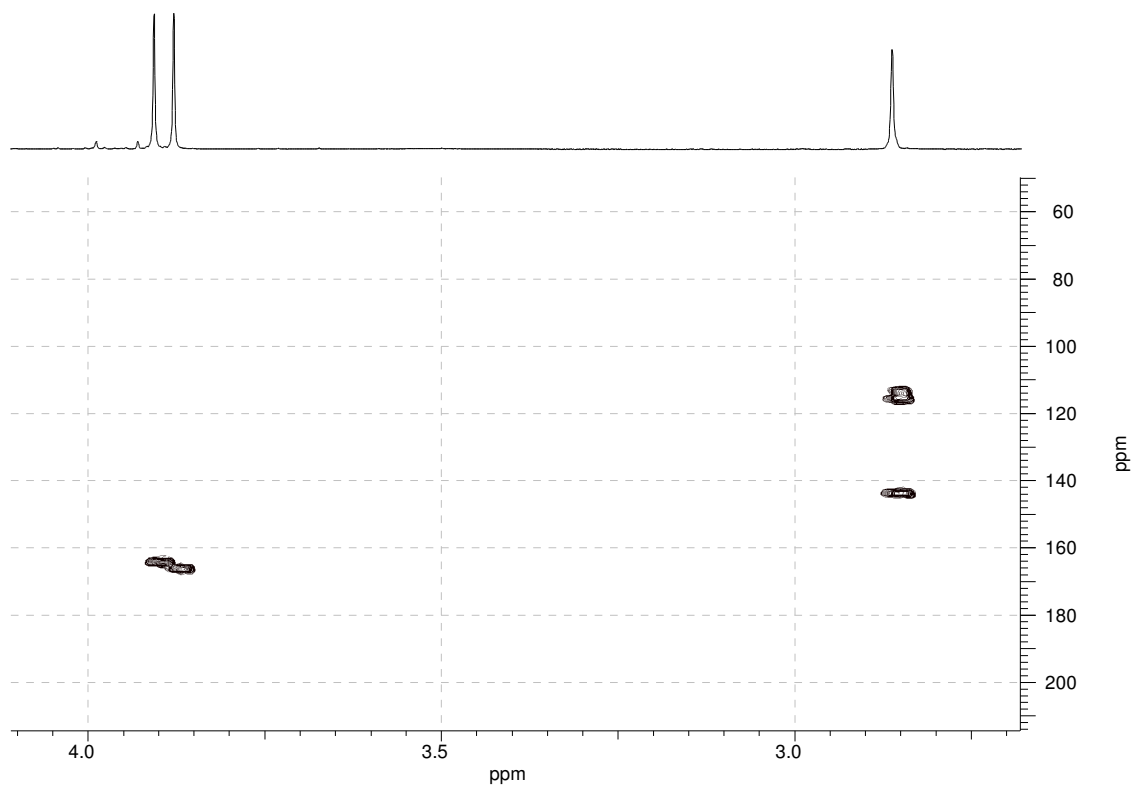
**Figura 114.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S10



**Figura 115.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S11



**Figura 116.** Espectro de gHSQC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S010



**Figura 117.** Espectro de gHMBC [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da substância S10



**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da substância **S10** e dados de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **S11**<sup>a</sup>

<b>S10</b> <sup>b</sup>				<b>S11</b> <sup>c</sup>	
<b>Nº</b>	<b><math>\delta</math> <math>^1\text{H}</math> (mult.; <math>J(\text{Hz})</math>; integ.)</b>	<b>HSQC</b>	<b>HMBC</b>	<b>Nº</b>	<b><math>\delta</math> <math>^1\text{H}</math> (mult.; <math>J(\text{Hz})</math>; integ.)</b>
<b>1</b>	-	-	-	<b>1</b>	-
<b>2</b>	6,31 ( <i>d</i> ; 2,3; 1H)	96,8	-	<b>2</b>	6,70 ( <i>d</i> ; 2,4; 1H)
<b>3</b>	-	-	-	<b>3</b>	-
<b>4</b>	6,34 ( <i>d</i> ; 2,3; 1H)	92,2	-	<b>4</b>	7,39 ( <i>d</i> ; 2,4; 1H)
<b>5</b>	6,68 ( <i>d</i> ; 2,4; 1H)	98,4	-	<b>5</b>	7,65 ( <i>sl</i> ; 1H)
<b>6</b>	-	-	-	<b>6</b>	-
<b>7</b>	6,71 ( <i>d</i> ; 2,4; 1H)	115,4	-	<b>7</b>	7,10 ( <i>sl</i> ; 1H)
<b>8</b>	-	-	-	<b>8</b>	-
<b>1-OH</b>	13,39 ( <i>s</i> )	-	-	<b>1-OH</b>	12,33 ( <i>s</i> )
<b>3-OMe</b>	3,88 ( <i>s</i> )	55,5	164,4	<b>3-OMe</b>	3,95 ( <i>s</i> )
<b>6-OMe</b>	3,91 ( <i>s</i> )	55,6	165,7	<b>6-Me</b>	2,46 ( <i>s</i> )
<b>8-Me</b>	2,86 ( <i>s</i> )	23,5	113,1; 115,4; 143,1	<b>8-OH</b>	12,14 ( <i>s</i> )

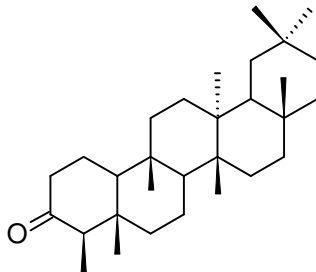
<sup>a</sup> Medidas realizadas a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>b</sup> Dados espectroscópicos de acordo com DIAZ *et al.* (2010)

<sup>c</sup> Dados espectroscópicos de acordo com SOB *et al.* (2008)

## 4.2 Outras substâncias isoladas de *Kielmeyera argentea* e *K. lathrophyton*

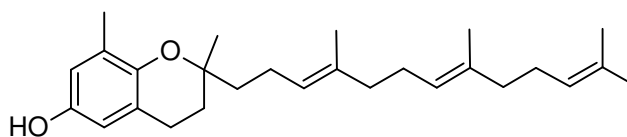
### 4.2.1 Friedelina



**Figura 118.** Estrutura química da friedelina

**PF:** 254 - 256 °C. **RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  0,73 (3H; *s*; H-24); 0,87 (3H; *s*; H-25); 0,89 (3H; *d*;  $J = 6,5$  Hz; H-23); 0,95 (3H; *s*; H-30); 1,00 (3H; *s*; H-29); 1,01 (3H; *s*; H-26); 1,05 (3H; *s*; H-27); 1,18 (3H; *s*; H-28); 1,26 - 1,40 (*m*); 1,47 - 1,50 (*m*); 1,67 - 1,77 (*m*); 1,94 - 1,99 (*m*); 2,23 - 2,31 (*m*); 2,37 - 2,41 (*m*). **RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  6,8 (C-23); 14,7 (C-24); 18,0 (C-25); 18,3 (C-7); 18,7 (C-27); 20,3 (C-26); 22,3 (C-1); 28,2 (C-20); 30,0 (C-17); 30,5 (C-12); 31,8 (C-30); 32,1 (C-28); 32,4 (C-15); 32,8 (C-21); 35,0 (C-29); 35,4 (C-19); 35,6 (C-11); 36,0 (C-16); 37,5 (C-9); 38,3 (C-14); 39,3 (C-22); 39,7 (C-13); 41,3 (C-6); 41,5 (C-2); 42,2 (C-5); 42,8 (C-18); 53,1 (C-8); 58,3 (C-4); 59,5 (C-10); 213,2 (C-3). Dados de acordo com Mann *et al.* (2011).

### 4.2.2 $\delta$ -Tocotrienol

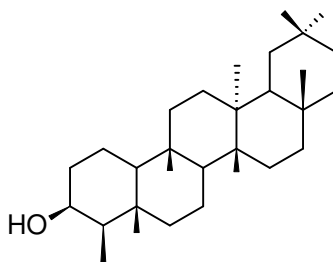


**Figura 119.** Estrutura química do  $\delta$ -tocotrienol

**RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  6,49 (1H; *d*;  $J = 2,8$  Hz; H-7); 5,16 (1H; *m*; H-7'); 5,16 (1H; *m*; H-3') ; 5,16 (1H; *m*; H-11'); 2,70 (2H; *t*;  $J = 6,9$  Hz; H-4) ; 2,13 (3H; *s*; 8- $\text{CH}_3$ ); 2,10 (2H; *m*; H-6'); 2,10 (2H; *m*; H-2'); 2,10 (2H; *m*; H-10'); 2,00 (2H; *m*; H-9') 2,00 (2H; *m*; H-5'); 1,76 (2H; *m*; H-3); 1,69 (3H; *s*; H-4'a); 1,69 (3H; *s*; H-12'b); 1,62

(2H; *m*; H-1'); 1,61 (3H; *s*; H-8'a); 1,61 (3H; *s*; H-12'a); 1,27 (3H; *s*; 2-CH<sub>3</sub>); 4,64 (1H; *sl*; -OH). **RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,7 (C-6); 145,8 (C-8a); 135 (C-4'); 134,9 (C-8'); 131,2 (C-12'); 127,3 (C-8); 124,3 (C-3'); 124,2 (C-7'); 124,1 (C-11'); 121,1 (C-4a); 115,6 (C-7); 112,5 (C-5); 75,2 (C-2); 39,6 (C-1'); 39,6 (C-5'); 39,6 (C-9'); 31,3 (C-3); 26,7 (C-6'); 26,5 (C-10'); 25,6 (C-12'b); 23,9 (2-CH<sub>3</sub>); 22,4 (C-4); 22,1 (C-2'); 17,6 (C-12'a); 16 (8-CH<sub>3</sub>); 15,9 (C-4'a); 15,8 (C-8'a). Dados de acordo com Ohnmacht *et al.* (2008).

#### 4.2.3 Epifriedelanol



**Figura 120.** Estrutura química do epifriedelanol

**PF:** 288 - 290 °C. **RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,86 (3H; *s*; H-24); 0,93 (3H; *J* = 7,8 Hz; H-23); 0,94 (3H; *s*; H-30); 0,97 (3H; *s*; H-26); 1,00 (3H; *s*; H-27); 1,00 (3H; *s*; H-25); 1,01 (3H; *s*; H-29); 1,17 (3H; *s*; H-28); 1,23 - 1,59 (*m*); 1,74 - 1,78 (*m*); 1,90 - 1,93 (*m*); 3,75 (*dd*; *J* = 5,0 e 2,5 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 11,6 (C-23); 15,8 (C-1); 16,4 (C-24); 17,6 (C-7); 18,2 (C-27); 18,6 (C-25); 20,1 (C-26); 28,2 (C-20); 30,0 (C-12); 30,6 (C-17); 31,8 (C-15); 32,1 (C-30); 32,4 (C-28); 32,9 (C-21); 35,0 (C-29); 35,2 (C-2); 35,4 (C-19); 35,6 (C-16); 36,1 (C-11); 37,1 (C-9); 37,9 (C-5); 38,4 (C-13); 39,3 (C-22); 39,7 (C-14); 41,8 (C-18); 42,9 (C-6); 49,2 (C-4); 53,2 (C-8); 61,4 (C-10); 72,7 (C-3). Dados de acordo com Kannathasan *et al.* (2015).

### 4.3 Aspectos quimiosistemáticos do gênero *Kielmeyera*

O gênero *Kielmeyera* está inserido atualmente na família Calophyllaceae, a qual foi recém-criada com base em estudos filogenéticos (APG III, 2009). Do ponto de vista químico, o gênero destaca-se pela presença de xantonas como principais constituintes (REZENDE, *et al.* 1973; EL-SEEDI *et al.*, 2009). Porém, análises recentes do perfil químico do gênero destacam também a presença de 4-alquil e 4-fenilcumarinas (**Tabela 2, p. 32**). Sendo ainda que a presença destes compostos tem sido largamente descritas nos gêneros *Mammea*, *Calophyllum* e *Mesua*, as quais também estão inseridas na família Calophyllaceae.

O presente estudo descreveu pela primeira vez o isolamento e identificação das 4-fenil e 4-alquilocumarinas mammea B/BA (**S01**), mammea B/BA ciclo F (**S02**), ferruol A (**S03**), mammea A/BB (**S04**) e a 7-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metilbutanoil)-10-fenil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-8-ona (**S07**), o qual corresponde ao derivado metoxilado de mammea A/BB ciclo D, no gênero *Kielmeyera*. Verificou-se também a presença das 4-alquilocumarinas mammea B/AB ciclo D (**S05**) e mammea B/AA ciclo D (**S06**) em *K. argentea*, as quais já haviam sido relatadas em *K. elata* (NOGUEIRA *et al.*, 2009) e *K. lathrophyton* (CRUZ *et al.*, 2001). Ademais, reitera-se a observação que a ocorrência destes compostos restringe-se às espécies de *Kielmeyera* presentes em regiões de restinga e campos rupestres visto que ainda não há relatos da presença de 4-alquil e 4-fenilcumarinas em espécies coletadas na região do Cerrado. A partir dos resultados obtidos, pode-se corroborar o fato que esta classe possa ser considerada, juntamente com as xantonas, marcadores quimiosistemáticos do gênero assim como também reiterar a proximidade do gênero *Kielmeyera* com os demais gêneros da família Calophyllaceae.

Como discutido anteriormente, as xantonas estão largamente presentes em espécies das famílias Clusiaceae, Calophyllaceae, Hypericaceae e Gentianaceae. Porém, a presença de C-metil xantonas como a 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona (**S10**) e 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilxantona (**S11**) verificadas em *K. lathrophyton* é relativamente incomum em plantas. Estudos recentes relatam a presença de C-metil xantonas como, por exemplo, o isolamento da 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona por Díaz *et al.* (2010) em *Vismia baccifera* (Hypericaceae) e o isolamento das xantonas 1,3,6-trihidroxi-8-metilxantona e 1,6-dihidroxi-3-metoxi-8-metilxantona por

Mutanyattaa *et al.* (2003) em uma cultura de tecidos de *Ledebouria graminifolia* (Hyacinthaceae). Os resultados assim obtidos a partir do estudo de *K. lathrophyton* contribuem para a ampliação do conhecimento da química das plantas superiores. A partir do estudo de *K. lathrophyton*, verificou-se também a presença do composto 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila (S08), o qual corresponde a um resultado incomum visto que até então não havia sido isolado na família Calophyllaceae assim como também há pouco relatos do isolamento deste metabólito em plantas superiores.

#### 4.4 Atividade citotóxica de 4-alquil e 4-fenilcumarinas isoladas de *K. argentea*

Após isolamento e identificação estrutural, realizou-se a avaliação da atividade citotóxica das substâncias S01, S02, S03 e S04 frente a células da linhagem U251 de glioblastoma humano. Os resultados demonstraram uma redução significativa da viabilidade celular principalmente com relação às células tratadas com concentrações iguais ou superiores a 50  $\mu\text{M}$  quando comparadas ao controle tratado apenas com o veículo de diluição, DMSO (0,5 %). A partir da resolução da equação logarítmica, obteve-se o valor da concentração de cada substância necessária para induzir metade do efeito máximo ( $\text{IC}_{50}$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Citotoxicidade das substâncias S01 à S04 [ $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )] frente a células U251 de glioblastoma humano

Compostos	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Mammea B/BA (S01)	6,60
Mammea B/BA ciclo F (S02)	52,26
Ferruol A (S03)	37,07
Mammea A/BB (S04)	27,00

Observa-se que a 4-*n*-propilcumarina mammea B/BA (S01) apresentou um valor de  $\text{IC}_{50}$  correspondente a 6,60  $\mu\text{M}$ . Pequenas diferenças estruturais podem ser destacadas entre os compostos avaliados como, por exemplo, a ciclização da cadeia

prenílca em C-6 formando o anel dihidrofurano na substância mammea B/BA ciclo F (S02), a qual não apresentou uma atividade tão significativa ( $IC_{50} = 52,26 \mu M$ ). De fato, Reyes-Chilpa *et al.* (2004) já haviam avaliado a citotoxicidade da mammea B/BA ciclo F (S02) frente a células U251 (Tabela 3, p. 40) e constatado a menor potência desta substância. A 4-*sec*-butilcumarina ferruol A (S03) e a 4-fenilcumarina mammea A/BB (S04), as quais apresentam diferenças estruturais nos grupos localizados em C-4 e na cadeia acíclica em C-8, também não apresentaram resultados satisfatórios quando comparadas à S01; porém os valores de  $IC_{50}$  ainda assim são inferiores quando comparado ao caso da cadeia prenílca ciclizada. Reyes-Chilpa *et al.* (2004) avaliaram também a citotoxicidade da 4-fenilcumarina mammea A/BA, a qual apresentou um valor de  $IC_{50}$  significativamente baixo ( $IC_{50} = 0,59 \mu M$ ), a diferença estrutural comparado a mammea A/BB resume-se a posição do grupo metílico na cadeia acíclica. Ademais, os resultados das 4-alkil e 4-fenilcumarinas realizados em misturas neste mesmo trabalho podem corresponder a algum efeito sinérgico justificando os baixos valores de  $IC_{50}$ . A temozolomida, a qual tem sido utilizada como principal droga no tratamento do glioblastoma, apresenta um  $IC_{50}$  correspondente a 200 mM. Entretanto a concentração do fármaco encontrada no plasma sanguíneo em seres humanos corresponde a 100  $\mu M$  segundo Spiro (2000, *apud* Shen *et al.* 2013). Deste modo, os resultados obtidos a partir da avaliação das 4-alkil e 4-fenilcumarinas em comparação com a temozolomida, ainda que realizados *in vitro*, podem ser considerados significativos.

Assim como constatado frente a diversas linhagens de células tumorais, verificou-se que as 4-alkil e 4-fenilcumarinas também apresentam citotoxicidade frente às células de glioblastoma humano. Face aos resultados obtidos, impulsiona-se a realização de novos ensaios envolvendo as demais 4-alkil e 4-fenilcumarinas isoladas de *K. argentea* e *K. lathrophyton* (S05, S06 e S07) assim como também uma avaliação da citotoxicidade frente a células normais e da capacidade destas substâncias atravessarem a barreira hematoencefálica. Deste modo, os resultados irão proporcionar uma avaliação aprofundada do potencial quimioterápico das 4-alkil e 4-fenilcumarinas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato hexânico das raízes de *Kielmeyera argentea* resultou no isolamento e identificação das substâncias mammea B/BA, mammea B/BA ciclo F, ferruol A, mammea A/BB, mammea B/AB ciclo D, mammea B/AA ciclo D, friedelina e  $\delta$ -tocotrienol. Apesar destas substâncias já terem sido reportados anteriormente em espécies da família Calophyllaceae, este trabalho é o primeiro relato da ocorrência das 4-alkilcumarinas mammea B/BA, mammea B/BA ciclo F e ferruol A e da 4-fenilcumarina mammea A/BB no gênero *Kielmeyera*. Enquanto que a partir do estudo do extrato hexânico do caule de *K. lathrophyton*, obteve-se a 4-alkilcumarina 7-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metilbutanoil)-10-fenil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-8-ona, as xantonas 1-hidroxi-7-metoxixantona, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-8-metilxantona, 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilxantona, o derivado do ácido benzoico 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila e os triterpenos friedelina e epifriedelanol. A presença de C-metil xantonas e a 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metila são relativamente incomuns em plantas e este trabalho corresponde ao primeiro relato da ocorrência destes compostos na família Calophyllaceae.

Os resultados da avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente a células U251 de glioblastoma humano demonstraram significativa citotoxicidade da 4-alkilcumarina mammea B/BA ( $IC_{50} = 6,60 \mu M$ ) enquanto que as 4-alkilcumarinas mammea B/BA ciclo F ( $IC_{50} = 52,26 \mu M$ ) e ferruol A ( $IC_{50} = 37,07 \mu M$ ) e a 4-fenilcumarina mammea A/BB ( $IC_{50} = 27,00 \mu M$ ) apresentaram citotoxicidade moderada frente às células tumorais. Face aos resultados obtidos, impulsiona-se a realização de novos ensaios envolvendo as demais 4-alkil e 4-fenilcumarinas isoladas a partir das espécies *K. argentea* e *K. lathrophyton* frente às células tumorais assim como também envolvendo células normais.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. F.; **Derivados poliprenilados do floroglucinol e xantonas de *Kielmeyera lathrophyton* – CLUSIACEAE**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Instituto de Química, UFBA, Salvador, 2008.

ALMEIDA, M. F.; **Derivados poliprenilados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e *K. cuspidata* (Calophyllaceae)**. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, 2013.

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

AMSTUTZ, E. D.; MYERS, R. R.; **Nitrosomethylurea**. Organic Syntheses, coll. v. 2, p. 461, 1943.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R.; **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.

APG III. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III**. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 161, p. 105-121, 2009.

ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. **Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea***. Pesquisa agropecuária brasileira, v. 28 (1), p. 25-31, 1993.

ARNDT, F.; **Diazomethane**. Organic Syntheses, coll. v. 2, p. 165, 1943.

AWANG, K.; CHAN, G.; LITAUDON, M.; ISMAIL, N. H.; MARTIN, T.; GUERITTE, F.; **4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity**. Bioorganic & Medicinal Chemistry v. 18, p. 7873–7877, 2010.

BARROSO, G. M. L.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2ª Ed., Viçosa, MG: UFV, 2004.

BEERHUES, L.; **Hyperforin**. Phytochemistry, v. 67, p. 2201-2207, 2006.

BEERHUES, L.; LIU, B.; **Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants**. Phytochemistry, v. 70, p. 1719-1727, 2009.

BFG, Brazil Flora Group; **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil**. Rodriguésia, v. 66 (4), p. 1085-1113, 2015.

BIESDORF, C.; CORTEZ, D. A. G.; AUDIA, E. A.; **Assessment of anxiolytic and panicolytic effects of dichloromethane fraction from stems of *Kielmeyera coriacea***. Phytomedicine, v. 19, p. 374-377, 2012.



BITTRICH, V.; TRAD, R. J.; CABRAL, F. N.; NASCIMENTO-JR, J. E.; SOUZA, V. C.; **Calophyllaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/florado-brasil/FB6855>> Acessado em 24 de maio de 2016.

CASTELÃO, J. F.; GOTTLIEB, O. R.; LIMA, R. A.; MESQUITA, A. A. L.; **Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species -  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of xanthenes**. *Phytochemistry*, v. 16, p. 735-740, 1977.

CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A. M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C. M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L.; **Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 5332–5335, 2009.

CARROL, L.; **Alice through the looking glass**. Digital Scanning Inc., 2007, p. 33.

CHATURVEDULA, V. S. P; SCHILLING, J. K.; KINGSTON, D. G. I.; **New Cytotoxic Coumarins and Prenylated Benzophenone Derivatives from the Bark of *Ochrocarpos punctatus* from the Madagascar Rainforest**. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 965-972, 2002.

COOPER, R.; NICOLA, H.; **Natural Products Chemistry. Sources, Separations and Structures**. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group, 2015.

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

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

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

COQUEIRO, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; GUPTA, K. B. S. S.; MIERI, M.; HAMBURGER, M.; YOUNG, M. C. M.; STAPLETON, P.; GIBBONS, S.; BOLZANI, V. S.; **Antistaphylococcal Prenylated Acylphoroglucinol and Xanthenes from *Kielmeyera variabilis***. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 470–476, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; **Natural products: a continuing source of novel drug leads**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830 (6), p. 3670-3695, 2013.

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

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

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 (5), p. 704-707, 2002.

CUNHA, A. P. (Coordenador); **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2<sup>a</sup> Ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

DANG, B. T.; GUITTON, Y; FREUZE, I.; GROVEL, O.; LITAUDON, M.; RICHOMME, P.; SÉRAPHIN, D.; DERBRE, S.; **Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins**. Phytochemistry Letters, v. 11, p. 61–68, 2015.

DEANGELIS, L. M.; **Brain tumors**. The New England Journal of Medicine, v. 344 (2), p. 114-123, 2001.

DEWICK, P. M.; **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3<sup>a</sup> Ed., West Sussex, John Wiley & Sons Ltd., 2009.

DIAMOND, J.; **Armas, germes e aço: os destinos das sociedades humanas**. 15<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro, Record, 2013.

DÍAZ, A. B.; VERA, J. R.; COTE, V.; BRUNO-COLMENÁREZ, J.; DELGADO, G. D.; **NMR elucidation and crystal structure analysis of 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9*h*-xanthen-9-one (lichexanthone) isolated from *Vismia baccifera* (Guttiferae)**. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9 (6), p. 470 – 474, 2010.

EL-SEEDI, H. R.; EL-GHORAB, D. M. H.; EL-BARBARY, M. A.; ZAYED, M. F.; GÖRANSSON, U.; LARSSON, S.; VERPOORTE, R.; **Naturally Occurring Xanthenes; Latest Investigations: Isolation, Structure Elucidation and Chemosystematic Significance**. Current Medicinal Chemistry, v. 16, p. 2581-2626, 2009.

EYTON, W. B.; OLLIS, W. D.; FINEBERG, M; GOTTLIEB, O. R.; GUIMARÃES, I. S. S.; MAGALHÃES, M. T.; **The neoflavanoid group of natural products - I**. Tetrahedron, v. 21, p. 2683-2696, 1966.

EYTON, W. B.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; JACKMAN, L.M.; **The neoflavanoid group of natural products-II**. Tetrahedron, v. 21, p. 2697-2705, 1966.

FERREIRA, M. G. R.; RIBEIRO, G. D.; **Coleção de fruteiras tropicais da Embrapa Rondônia**. Comunicado Técnico, 306, Porto Velho, RO, 2006.

FRANCO, A. C.; **The genus *Clusia* as an example of studies on plant responses to stress in tropical environments**. Oecologia brasiliensis, v. 4, p. 65-68, 1998.

GASPAROTTO JR., A.; BREZAN, M. A.; PILOTO, I. C.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, A.

- G.; **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* camb (CLUSIACEAE)**. Química Nova, v. 28 (4), p. 575-578, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, v. 30 (2), p. 374-381, 2007.
- GOMEZ-VERJAN, J. C.; ESTRELLA-PARRA, E.; VAZQUEZ-MARTINEZ, E. R.; GONZALEZ-SANCHEZ, I.; GUERRERO-MAGOS, G.; MENDOZA-VILLANUEVA, D.; ISUS, L.; ALFARO, A.; CERBON-CERVANTES, M.; ALOY, P.; REYES-CHILPA, R.; **Risk assessment of Soulatrolide and Mammea (A/BA+A/BB) coumarins from *Calophyllum brasiliense* by a toxicogenomic and toxicological approach**. Food and Chemical Toxicology, v. 91, p. 117-129, 2016.
- GOTTLEIB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; PEREIRA, M. O. S.; MESQUITA, A. A. L.; CORREA, D. B.; OLIVEIRA, G. G.; **The chemistry of brazilian Guttiferae - XII. Isopentenylated xanthenes from *Kielmeyera* and *Calophyllum* species**. Tetrahedron, v. 24, p. 1601- 1610, 1968.
- GOULART, Y. C. F.; SELA, V. R.; OBICI, S.; MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A.; **Evaluation of Gastric Anti-ulcer Activity in a Hydroethanolic Extract from *Kielmeyera coriacea***. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48 (1), p. 211-216, 2005.
- GOVINDACHARI, T. R.; PAI, B. R.; SUBRAMANIAM, P. S.; RAO, U. R.; MUTHUKUMARASWAMY; **Constituents of *Mesua Ferrea* L. - II: Ferruol A, A new 4-alkylcoumarin**. Tetrahedron, v. 23, p. 4161-4165, 1967.
- GRAY, D. E.; PALLARDY, S. G.; GARRETT, H. E.; ROTTINGHAUS, G. E.; **Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's Wort leaves and flowers**. Planta Medica, v. 69 (11), p. 1024-1030, 2003.
- GRAMACHO, R. S.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, A. T. T.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; SADDI, N.; **Phenylcoumarins from *Kielmeyera elata***. Phytochemistry, v. 51, p. 579-581, 1999.
- GUILLET, D.; SERAPHIN, D.; RONDEAU, D.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; **Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar***. Phytochemistry, v. 58, p. 571-575, 2001.
- GUILLET, D.; HELESBEUX, J. J.; SERAPHIN, D.; SEVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; **Novel cytotoxic 4-phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar***. Journal of Natural Products, v. 64, p. 563-568, 2001.
- GUNATILAK, A. A. L.; SILVA, A. M. Y. J.; SOTHEESWARAN, S.; **Minor xanthenes of *Hypericum mysorense***. Phytochemistry, v. 21 (7), p. 1751-1753, 1982.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

JOLY, A. B.; **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6ª Ed., São Paulo, Nacional, Biblioteca Universitária. Ciências puras, 1983.

JOSHI, S. P.; KULKARNI, S. R.; PHALGUNE, U. D.; PURANIK, V. G. **New dipyrano-coumarin from the leaves of *Calophyllum apetalum* Willd.** Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 2013.

KANNATHASAN, K.; SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V.; **Crystal structure and antibacterial evaluation of epifriedelinol isolated from *Vitex peduncularis* Wall. ex Schauer.** Arabian Journal of Chemistry. In Press, DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.02.013, 2015.

KITAGAMI, J. T.; SALATINO, A.; GUERREIRO-FILHO, O.; SALATINO, M. L. F.; **Foliar cuticular waxes of cultivated species and varieties of *Coffea*.** Biochemical Systematics and Ecology, v. 46, p. 116-119, 2013.

KUNESCH, G.; POLONSKY, J.; **On the Biosynthesis of Neoflavanoids : Calophyllolide (4 - Phenylcoumarin).** Chemical communications, 1967.  
LEE, S.; CHANG, S.; CHEN, C.; **Chemical Constituents from *Aleodaphne andersonii*.** Journal of Natural Products, v. 64, p. 1548-1551, 2001.

LEE, K. H.; CHAIA, H. B.; TAMEZA, P. A.; PEZZUTOA, J. M.; CORDELLA, G. A.; WING, K. K.; TIN-WAB, M.; **Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*.** Phytochemistry, v. 64, p. 535-541, 2003.

LEWINSOHN, T. M.; VASCONCELOS-NETO, J.; **Como insetos sabotam defesas de plantas: o caso do látex.** Oecologia Australis, v. 8, p. 281-298, 2000.

LI, Y.; LI, Z.; YIN, S.; SHI, G.; LIU, M.; JING, Y.; HUA, H.; **Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells.** Fitoterapia, v. 81, p. 586-589, 2010.

LI, W.; LIN, Y.; WU, P.; WEN, Z.; LIU, P.; CHEN, C.; WANG, H. **Biofunctional Constituents from *Liriodendron tulipifera* with Antioxidants and Anti-Melanogenic Properties.** International Journal of Molecular Sciences, v. 14, p. 1698-1712, 2013.

LIU, B.; RAETH, T.; BEUERLE, T.; BEERHUES, L.; **Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase.** Planta, v. 225, p. 1495-1503, 2007.

MASSIOT, G.; LONG, C.; DAVID, B.; SERRANO, M.; DAUBIE, F.; ALBY, F.; AUSSEIL, F.; KNIBIEHLER, M.; MORETTI, C.; HOFFMANN, J.; CAZAUX, C.; LAVAUDR, C.; **Acylphloroglucinol Derivatives from *Mahurea palustris*.** Journal of Natural Products, v. 68, p. 979-984 2005.

MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F. J.; SELA, V. R.; OBICI, S.; TROMBELLI, M. A.; CORTEZ, D. A. C.; AUDI, E. A.; **Activity of hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems on central nervous system in rats.** Acta Scientiarum Health Sciences, v. 26 (2), p. 365-368, 2004.

- MANN, A.; IBRAHIM, K.; OYEWALE, A. O.; AMUPITAN, J. O.; FATOPE, M. O.; OKOGUN, J. I.; **Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the root bark of *Terminalia avicennioides***. American Journal of Chemistry, v. 1 (2), p. 52-55, 2011
- MESQUITA, M. L.; ARAÚJO, R. M.; BEZERRA, D. P.; FILHO, R. B.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; ESPINDOLA, L. S. **Cytotoxicity of  $\delta$ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, p. 623-630, 2011.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. Química Nova, v. 24 (1), p. 105-111, 2001.
- MUTANYATTA, J.; MATAPA B. G.; SHUSHU, D. D.; ABEGAZ, B. M.; **Homoisoflavonoids and xanthenes from the tubers of wild and in vitro regenerated *Ledebouria graminifolia* and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids**. Phytochemistry, 62 (5), p. 797-804, 2003.
- NAGEM, T. J.; SILVA, M. D. A.; **Xanthenes and phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila***. Phytochemistry, v. 27 (9), p. 2961 - 2962, 1988.
- NASIR, N. M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; EE, G. C. L.; GO, R.; KASSIM, N. K.; MUHAMAD, S. N. K.; ISKANDAR, M. J.; **Two New Xanthenes from *Calophyllum nodosum* (Guttiferae)**. Molecules, v. 16, p. 8973-8980, 2011.
- NOGUEIRA, P. C. L.; ANDRADE, M. S. ; ANDRADE, L. M.; MORAES, V. R. S.; RIBEIRO, A. S.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. 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, v. 36, p. 921-924, 2009.
- NOTIS, C.; **Phylogeny and character evolution of Kielmeyeroideae (Clusiaceae) based on molecular and morphological data**. Master of Science, University of Florida, 2004.
- OHNMACHT, S.; WEST, R.; SIMIONESCU, R.; ATKINSON, J.; **Assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of tocotrienols**. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 46, p. 287-294, 2008.
- OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A.; BITTRICH, V. ; VENCATO, I. ; MARSAIOLI, A. J.; **Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function**. Tetrahedron Letters, v. 37 (36), p. 6427-6430, 1996.
- OLIVEIRA C. M. A; PORTO, A.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A. J.; **Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species**. Phytochemistry, v. 50, p. 1073-1079, 1999.
- OLLIS, W. D.; **The Neoflavanoids, a New Class of Natural Products**. Experientia, v. 22 (12), p. 777-783, 1966.

- OMURO, A.; DEANGELIS, L. M.; **Glioblastoma and Other Malignant Gliomas A Clinical Review**. Clinical Review & Education, v. 310 (17), p. 1842-1850, 2013.
- OUAHOUBO, B. M. W.; AZEBAZE, A. G. B.; MEYER, M.; BODO, B.; FOMUM, Z. T.; NKENGFAK, A. E.; **Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea africana***. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, v. 98 (7), p. 733-739, 2004.
- PALMER, C. J.; JOSEPHS, J. L.; **Synthesis of the *Calophyllum* coumarins. Part 2**. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, p. 3135-3152, 1995.
- PATRA, A.; MISRA, S. K.; **Carbon-13 NMR signals of some substituted indanones, tetralones and benzo- $\alpha$ -pyrones,  $\beta$ -substituted  $\beta$ -phenylpropionic acids and related compounds**. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 29, p. 749-752, 1991.
- PINHEIRO, L.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; FERREIRA, A. G.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. **Antibacterial Xanthonones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae)**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98, 4, 549-552, Junho, 2003.
- POELMAN, E. H.; KESSLER, A.; **Keystone Herbivores and the Evolution of Plant Defenses**. Trends in Plant Science, v. 21 (6), p. 477-485, 2016.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A.; **Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants**. Plant Signaling & Behavior, v. 6 (11), p. 1720-1731, 2011.
- RAMIANDRASOA, F.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; **Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogenèse des néoflavonoides**. Tetrahedron, v. 39 (23), p. 3923-3928, 1983.
- REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUNIZ, E.; APAN, T. R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C. K.; VAZQUEZ-TORRES, M.; **Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense***. Life Sciences, v. 75, p. 1635-1647, 2004.
- REZENDE, C. M. A. M.; GOTTLIEB, O. R.; **Xanthonones as Systematic Markers**. Biochemical Systematics, v. 1, p. 111-118, 1973.
- RUHFEL, B. R.; BITTRICH, V.; BOVE, C. P.; GUSTAFSSON, M. H. G.; PHILBRICK, C. T.; RUTISHAUSER, R.; XI, Z.; DAVIS, C. C.; **Phylogeny of the clusoid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes**. American Journal of Botany, v. 98 (2), p. 306-325, 2011.
- SANTOS, A. P. B.; SANTO, F. S. E.; RAPINI, A.; **Flora da Bahia: Calophyllaceae**. Sitientibus série Ciências Biológicas, v. 15, p. 15-27, 2015.
- SANTOS, N. A. S.; **Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie *Kielmeyera argentea* (Guttiferae): 4-fenil e 4-alkilcumarinas (neoflavonóides)**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Instituto de Química, UFBA, Salvador, 2005.

- SEIGLER, D. S.; **Plant Secondary Metabolism**. 2ª Ed., Ed. Kluwer Academic Publishers, USA, 1998.
- SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T. M.; ROMANH, A. J.; SHIN, Y. G.; CORDELL, G. A.; ZANI, C. L.; **New Bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata***. Journal of Natural Products, v. 66, p. 634-637, 2003.
- SCHMIDT, W.; BEERHUES, L.; **Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L.** Federation of European Biochemical Societies Letters, v. 420, p. 143-146, 1997.
- SILVA-NETO, J. T.; **Estudo químico de *Kielmeyera lathrophyton***. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal da Bahia, 1998.
- SILVEIRA, C. V.; TREVISAN, M. T. S. ; RIOS, J. B.; ERBEN, G.; HAUBNER, R.; PFUNDSTEIN, B.; OWEN, R. W.; **Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, p. 1597-1606, 2010.
- SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; PIERRE TANE, P.; NGADJUI, B. T.; MAC, D.; **A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae)**. Tetrahedron 64, p. 7999-8002, 2008.
- SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L. C.; COSTA, G. A. M.; GUEDES, M. L. S.; MARTNS, D.; CRUZ, F. G.; **Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19 (3), p. 686-689, 2009.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª Ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- SOUSA, V. R.; **Triterpenos, Xantonas, Cumarinas, Bifenilas e Derivados do Floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e de *Kielmeyera coriaceae***. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, 2005
- SPIRO, T.; LIU, L.; GERSON, S.; **New cytotoxic agents for the treatment of metastatic malignant melanoma: temozolomide and related alkylating agents in combination with guanine analogues to abrogate drug resistance**. Forum (Genova) v. 10, p. 274-285, 2000. **In: Shen, W.; HU, J.; ZHENG, J.; Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells**. Journal of International Medical Research, v. 0 (0), p. 1-9, 2013.
- STEVENS, P. F.; (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12, July 2012. Disponível em: < <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acessado em 03 de junho de 2016.
- TAHER, M.; IDRIS, M. S.; AHMA, F.; ARBAIN, D.; **A polyisoprenylated ketone from *Calophyllum enervosum***. Phytochemistry, v. 66, p. 723-726, 2005.

- TRIGO, J. R.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C.; MARSAIOLI, A. J.; **Ecologia Química**. Chemkeys, Licenciado sob Creative Commons (BY-NC-SA), p. 1-9, 2000.
- VALEN, L. V.; **A new evolutionary law**. Evolutionary Theory, 1, p. 1-30, 1973.
- VIEIRA, L. M. M.; KIJJOA, A.; **Naturally-Occurring Xanthones: Recent Developments**. Current Medicinal Chemistry, v. 12, p. 2413-2446, 2005.
- YANG, H.; PROTIVA, P.; GIL, R. R.; JIANG, B.; BAGGETT, S.; BASILE, M. I.; REYNERRSTEIN, K. A.; WEINTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J.; **Antioxidante and cytotoxic isoprenylated coumarins from *Mammea americana***. Planta Medica, v. 71, p. 852-860, 2005.
- WANG, C. Z.; MAIER, U. H.; KEIL, M.; ZENK, M. H.; BACHER, A.; ROHDICH, F.; EISENREICH, W.; **Phenylalanine-independent biosynthesis of 1,3,5,8-tetrahydroxyxanthone**. European Journal of Biochemistry, v. 270, p. 2950-2958, 2003.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases**. Switzerland, 2014.
- WESTERMAN, P. W.; GUNASEKERA, S. P.; UVAIS, M.; SULTANBAWA, S.; KAZLAUSKAS, R.; **Carbon-13 n.m.r. study of naturally occurring xanthones**. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 9 (11), p. 631-636, 1977.
- WILSON, E. O.; **Diversidade da Vida**. São Paulo: Companhia das Letras, 2012, p. 525.