



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Química



**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Clusia burlemarxii***

PAULO ROBERTO RIBEIRO

Salvador

2011

PAULO ROBERTO RIBEIRO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Clusia burlemarxii***

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química do Instituto de
Química da Universidade Federal da Bahia,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz

Salvador

2011

Dedico este trabalho aos meus pais e heróis, Ana Lúcia e Almir, e a minha querida e amada avó Odynéia pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Lúcia e Almir, exemplos de força, caráter e determinação, com os quais aprendi valores que carregarei até o fim.

À minha amadíssima avó, Odynéia, cujas histórias vividas sempre me encantaram.

Aos meus queridos irmãos, Ana Paula e Douglas, com os quais aprendi grandes lições de companheirismo e amizade.

Aos meus familiares que tanto me deram apoio.

Ao Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz, exemplo de ética, paciência e sabedoria.

À minha querida amiga e parceira Caline Ferraz, com a qual aprendi os primeiros passos desta jornada.

Em especial, aos meus grandes amigos pelo mútuo aprendizado de vida, durante nossa convivência, no campo profissional e pessoal.

Aos colegas do GESNAT que tanto me deram suporte no início desta jornada.

Aos colegas do LBQM pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Dirceu Martins, à Profa. Dra. Nídia Roque, à Profa. Dra. Luzimar Gonzaga, à Profa. Dra. Maria de Lourdes Botelho e à Profa. Dra. Soraia Brandão, meus sinceros agradecimentos e admiração.

À Prof. Dra. Regina Geris, à Profa. Dra. Zênis Novaes e ao Prof. Dr. José Roque Carvalho, pelo apoio e torcida.

A todos os queridos amigos e professores que tanto torceram por mim durante esta jornada.

Ao colegiado de Pós-graduação em Química, do qual fui membro como Representante Estudantil. Certa vez, uma sábia professora me disse que aprendemos muito com as experiências boas, entretanto aprendemos imensuravelmente mais com as experiências não tão boas.

À Profa. Dra. Lourdes Cardoso, pelos preciosos ensinamentos e paciência durante a realização dos ensaios antimicrobianos.

À Prof. Dra. Regina Geris e à Prof. Dra. Maria de Fátima Vanderlei por aceitar o convite para compor a banca e pelas preciosas contribuições.

À botânica Profa. Msc. Maria Lenise Guedes, curadora do herbário Alexandre Leal Costa, pela identificação do espécime.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da FFARP-USP pela obtenção do espectro de massa.

Ao Prof. Dr. Walmir da Silva Garcez da UFMS pela obtenção dos dados de rotação óptica.

A CAPES, CNPq, FAPESB e FINEP pelo apoio financeiro.

**Chorei. Não procurei esconder todos
viram, fingiram.
Pena de mim não precisava.
Ali onde eu chorei qualquer um chorava.
Dar a volta por cima que eu dei
quero ver quem dava.**

**Volta por cima
(Paulo Vanzolini)**

**Um lugar deve existir, uma
espécie de bazar, onde os
sonhos extraviados vão parar.**

**A moça do sonho
(Edu Lobo/Chico Buarque)**

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e substâncias obtidas da espécie vegetal *Clusia burlemarxii*, coletada nos municípios de Rio de Contas e Mucugê, Chapada Diamantina - Bahia. Da fase em acetato de etila, obtida por partição do extrato etanólico das folhas, foram isoladas cinco substâncias, a friedelina, o ácido 2Z- δ -tocotrienolóico, a 4-hidroxi-5,5-dimetildi-hidrofuran-2-ona, a quercetrina e a afzelina. Da fase em acetato de etila, obtida por partição do extrato metanólico do caule foram isoladas quatro substâncias, o ácido protocatechuico, a lignana (+)-lioniresinol, o ácido betulínico e o bifênilo 2,2-dimetil-3,5-di-hidroxi-7-(4-hidroxifenil)cromano. Da fase em diclorometano, obtida por filtração em coluna de gel do extrato metanólico do caule foram isoladas quatro substâncias, as xantonas 6-desoxiisójacareubina, burlemarxiixantona e brasilixantona B, bem como, o ácido betulônico. A elucidação estrutural das substâncias baseou-se nos dados obtidos através de experimentos como IES-EM, RMN ^1H e RMN ^{13}C , NOEDIF, DEPT 135, HMBC, HMQC.

A atividade antimicrobiana dos extratos e substâncias isoladas foi avaliada frente a quatro bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e três Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*), bem como, frente a dois fungos (*Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*). O extrato etanólico das folhas mostrou atividade frente *S. aureus* ($62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *B. subtilis* ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A fase obtida com hexano mostrou atividade, em menor grau, frente *S. aureus* ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *B. subtilis* ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A fase obtida com acetato de etila mostrou atividade frente *S. aureus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *M. luteus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O extrato metanólico do caule apresentou atividade frente *S. mutans* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *B. subtilis* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *M. luteus* ($31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Das substâncias isoladas, o bifênilo inédito apresentou atividade frente um maior número de micro-organismos: *B. subtilis* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. aureus* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. mutans* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *M. luteus* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Palavras-chave: *Clusiaceae*, *bifenila*, *bioprospecção*, *xantonas*, *lignana*

ABSTRACT

The present work describes the phytochemical and antimicrobial activity evaluation of the extracts and secondary metabolites isolated from *Clusia burlemarxii*. From leaves were isolated two flavonoids named quercetrin and azfelin, the lactone 4-hydroxy-5,5-dimethyldihydrofuran-2-one, 2Z- δ -tocotrienoloic acid and the triterpene friedelin. Two new metabolites a xanthone named burlemarxiixanthone, and the biphenyl 2,2-dimethyl-3,5-dihydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)chromane were isolated from trunk in addition to the known triterpenes betulinic and betulonic acids, protocatechuic acid, lyoniresinol, and two xanthenes 6-deoxiisojacareubin and brasilixanthone B. Their structures were determined on the basis of $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HMQC, HREIMS, and comparison with literature data.

Minimal inhibitory concentration (MIC) against bacteria (*S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*) and fungi (*A. niger* and *C. cladosporioides*) were also evaluated. The ethanolic extract of leaves showed activity against *S. aureus* ($62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and *B. subtilis* ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), while the hexane phase showed activity to a lesser extent against *S. aureus* ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and *B. subtilis* ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The phase obtained with ethyl acetate showed activity against *S. aureus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and *M. luteus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The methanolic extract of trunk showed activity against *S. mutans* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *B. subtilis* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), and *M. luteus* ($31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Among the secondary metabolites isolated, the biphenyl showed activity against a wide range of microorganisms; *B. subtilis* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. aureus* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. mutans* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), and *M. luteus* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos capsulares de <i>Calophyllum inophyllum</i> L. ^a , e de <i>Garcinia gardineira</i> ^b e botão da flor de <i>Vismia baccifera</i> ^c .	22
Figura 2. Flores de <i>Clusia hilariana</i> ^d e <i>Kielmeyera reticulata</i> (Pau-santo).	22
Figura 3. <i>Clusia fluminensis</i> ^e .	23
Figura 4. Folhas, flor e frutos de <i>Clusia rosea</i> Jacq. ^f	24
Figura 05. Esquema de obtenção do extrato etanólico e fases hexânica e em acetato de etila a partir das folhas de <i>C. burlemarxii</i> .	32
Figura 06. Esquema de obtenção dos extratos hexânico e metanólico e das fases em diclorometano e acetato de etila a partir do caule de <i>C. burlemarxii</i> (Mucugê).	33
Figura 07. Esquema de obtenção dos extratos hexânico e metanólico e das fases em DCM e acetato de etila a partir do caule de <i>C. burlemarxii</i> (Rio de Contas).	34
Figura 08. Esquema de obtenção das substâncias CB01 e CB02 .	36
Figura 09. Estrutura da friedelina (CB01).	36
Figura 10. Estrutura do ácido 2Z- δ -tocotrienolóico (CB02).	36
Figura 11. Esquema de obtenção das substâncias CB02 e CB03 .	37
Figura 12. Estrutura da 4-hidroxi-5,5-dimetildi-hidrofuran-2-ona (CB03).	37
Figura 13. Esquema de obtenção das substâncias CB04 e CB05 .	38
Figura 14. Estrutura da quercetrina (CB04).	38
Figura 15. Estrutura da afzelina, 3-O- α -L-ramnopiranosilkaempferol (CB05).	38
Figura 16. Esquema de obtenção das substâncias CB06 e CB07 .	40
Figura 17. Estrutura do ácido protocatechuico (ácido 3,4-di-hidroxibenzóico) (CB06).	40
Figura 18. Estrutura da lignana 9,9'-dihidroxiariltetralina denominada (+)-lioniresinol (CB07).	41
Figura 19. Esquema de obtenção das substâncias CB08 e CB09 .	41
Figura 20. Estrutura do ácido betulínico, ácido 3- β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (CB08).	42

Figura 21. Estrutura do 2,2-dimetil-3,5-di-hidroxi-7-(4-hidroxifenil)cromano (CB09).	42
Figura 22. Estrutura da 6-desoxiisojacareubina (CB10).	44
Figura 23. Estrutura da burlemarxiixantona (CB11).	44
Figura 24. Estrutura da brasilixantona B (CB12).	45
Figura 25. Estrutura do ácido betulônico, ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-óico (CB13).	45
Figura 26. Esquema do fracionamento da fração CBCR03.	46
Figura 27. Esquema do fracionamento da fração CBCRA05.	47
Figura 28. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB01.	48
Figura 29. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB01, região entre 1,6 e 2,4 ppm.	49
Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB01, região entre 0,7 e 1,8 ppm.	50
Figura 31. Estrutura planar e conformação da substância CB01.	51
Figura 32. Estrutura da substância CB02.	52
Figura 33. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB02.	54
Figura 34. Estrutura da substância CB03.	55
Figura 35. Obtenção da 5,5-dimetil-4-hidroxi-butirolactona a partir da ozonólise da cumarina (+)-toddalolactona.	57
Figura 36. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB03.	58
Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CB03.	59
Figura 38. Estrutura da substância CB04 e CB05.	60
Figura 39. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB04.	60
Figura 40. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB05.	61
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB04, região entre 5,0 e 13,0 ppm.	62

Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB05 , região entre 5,4 e 7,5 ppm.	62
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB04 , região entre 0,5 e 4,5 ppm.	65
Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB05 , região entre 0,75-1,0 ppm e 12,60-12,80 ppm.	65
Figura 45. Estrutura das substâncias CB04 (R = H) e CB05 (R = OH).	67
Figura 46. Estrutura da substância CB06 .	68
Figura 47. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB06 .	70
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB06 .	71
Figura 49. Estrutura da substância CB07 .	72
Figura 50. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância CB07 .	73
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 2,0 e 7,0 ppm.	73
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 3,5 e 6,5 ppm.	74
Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 33 e 70 ppm.	75
Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 100 e 150 ppm.	75
Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 30 e 70 ppm.	76
Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância CB07 , região entre 100 e 150 ppm.	76
Figura 57. Espectro de DEPT 135 da substância CB07 .	77
Figura 58. Estrutura parcial A.	78
Figura 59. Estrutura parcial B.	78
Figura 60. Estrutura parcial C.	79
Figura 61. Correlações observadas no espectro de HMBC substância CB07 .	79
Figura 62. Correlações observadas no espectro de NOEDIF substância CB07 .	80

Figura 63. Estrutura da substância CB07 .	80
Figura 64. Espectro de HMBC [piridina-d ₅ , $J = 9$ Hz] da substância CB07 .	82
Figura 65. Espectro de HMQC [piridina-d ₅ , $J = 140$ Hz] da substância CB07 .	83
Figura 66. Estrutura da substância CB08 .	84
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H da substância CB08 .	84
Figura 68. Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB08 , região entre 0,5 e 1,9 ppm.	86
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB08 , região entre 2,0 e 4,5 ppm.	87
Figura 70. Espectro de RMN ¹³ C da substância CB08 .	88
Figura 71. Espectro de RMN ¹³ C da substância CB08 , região entre 14 e 36 ppm.	89
Figura 72. Espectro de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB08 , região entre 36 e 58 ppm.	89
Figura 73. Estrutura da substância CB09 .	90
Figura 74. Correlação no espectro de HMBC da substância CB09 .	91
Figura 75. Possíveis estruturas da substância CB09 .	92
Figura 76. Correlações no espectro de HMBC da substância CB09 .	92
Figura 77. Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB09 .	93
Figura 78. Expansão do espectro de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB09 , região entre 1,0 e 1,5 ppm.	93
Figura 79. Expansão do espectro de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB09 , região entre 1,0 e 4,0 ppm.	94
Figura 80. Expansão do espectro de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB09 , região entre 6,4 e 7,6 ppm.	94
Figura 81. Espectro de RMN ¹³ C [75 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB09 .	95
Figura 82. Espectro de HMQC da substância CB09 .	96
Figura 83. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB09 .	96

Figura 84. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB09 .	97
Figura 85. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB09 .	97
Figura 86. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB09 .	98
Figura 87. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB09 .	98
Figura 88. Espectro de massas de alta resolução da substância CB09 .	99
Figura 89. Estrutura da substância CB10 .	101
Figura 90. Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB10 .	103
Figura 91. Espectro de RMN ¹³ C [75 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB10 .	104
Figura 92. Espectro de NOEDIF [13,06 ppm, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB10 .	105
Figura 93. Estrutura da substância CB11 .	106
Figura 94. Estrutura das substâncias CB11 e outras xantonas.	107
Figura 95. Espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB11 .	108
Figura 96. Expansão do espectro de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB11 , região entre 5,0 e 7,8 ppm.	109
Figura 97. Estrutura da substância CB12 .	110
Figura 98. Correlações observadas no espectro de HMBC da substância CB12 .	111
Figura 99. Espectro de RMN ¹ H [500 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB12 .	113
Figura 100. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB12 .	114
Figura 101. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB12 .	114
Figura 102. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB12 .	115
Figura 103. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB12 .	115

Figura 104. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d ₆ , $J = 9$ Hz] da substância CB12 .	116
Figura 105. Estrutura da substância CB13 .	117
Figura 106. Expansão do espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB13 , região entre 0,8 e 1,8 ppm.	119
Figura 107. Expansão do espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB13 , região entre 2,8 e 5,4 ppm.	120
Figura 108. Expansão do espectro de RMN ¹ H [125 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB13 , região entre 110 e 220 ppm.	120
Figura 109. Expansão do espectro de RMN ¹ H [125 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB13 , região entre 15 e 58 ppm.	121
Figura 110. Formação do benzoil-CoA a partir do ácido cinâmico.	122
Figura 111. Formação de um tetracetídeo pelas enzimas BIS e BPS.	122
Figura 112. Formação da 3,5-dihidroxibifenila e da florobenzofenona.	123
Figura 113. Formação da 1,3,5-trihidroxixantona e 1,3,7-trihidroxixantona.	124
Figura 114. Proposta biossintética da formação da substância CB09 .	124
Figura 115. Proposta biossintética da formação da substância CB11 .	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Algumas substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Clusia</i> .	25
Tabela 02. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento da fase em acetato de etila das folhas de <i>C. burlemarxii</i> .	35
Tabela 03. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>C. burlemarxii</i> .	39
Tabela 04. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>C. burlemarxii</i> .	43
Tabela 05. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB01 .	51
Tabela 06. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB02 .	53
Tabela 07. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] e RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB03 .	56
Tabela 08. Dados de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] dos resíduos de ramnose das substâncias CB04 e CB05 .	64
Tabela 09. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] e RMN ¹³ C [75 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] das substâncias CB04 e CB05 .	66
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] e RMN ¹³ C [75 MHz, acetona-d ₆ , δ (ppm)] da substância CB06 .	69
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H [300 MHz, C ₅ D ₅ N, δ (ppm)] e RMN ¹³ C [75 MHz, C ₅ D ₅ N, δ (ppm)] da substância CB07 .	81
Tabela 12. Dados de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB08 .	85
Tabela 13. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN ¹ H e deslocamentos de RMN ¹³ C da substância CB09 .	100
Tabela 14. Deslocamentos químicos e multiplicidade no espectro de RMN ¹ H da substância CB11 .	107
Tabela 15. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN ¹ H e deslocamentos de RMN ¹³ C da substância CB12 .	112
Tabela 16. Dados de RMN ¹³ C [75 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)] da substância CB13 .	118
Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e fases obtidas das folhas e do caule de <i>C. burlemarxii</i> .	134
Tabela 18. Concentração Inibitória Mínima (CIM) ^{a,b} das substâncias isoladas de <i>C. burlemarxii</i> .	134

LISTA DE SIGLAS

ACP – Proteína Carregadora de Grupo Acila
ATCC - American Type Culture Collection
BIS - Bifenilo Sintase
BPS - Benzofenona Sintase
CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DEPT 135° - Distortionless Enhanced Polarization Transfer
DMSO - dimetilsulfóxido
DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EM – Espectrometria de Massa
IES-EM - Espectro de Massa de Alta Resolução com Ionização por “Electrospray”
NOEDIF - Nuclear Overhauser Effect Difference Spectroscopy
PKS - Policetídeo Sintase
ppm – partes por milhão
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS – tetrametilsilano

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Clusia burlemarxii*

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 FAMÍLIA CLUSIACEAE	21
1.1.1 Gênero <i>Clusia</i>	23
1.1.2 Metabólitos isolados no Gênero <i>Clusia</i>	24
2. OBJETIVOS	30
3. PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	31
a) Material vegetal	
b) Espectrometria de massas	
c) Ressonância magnética nuclear	
d) Ponto de fusão	
e) Análises cromatográficas	
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FASES	32
3.2.1 Obtenção dos extratos e fases a partir das folhas de <i>C. burlemarxii</i>	32
3.2.2 Obtenção dos extratos e fases a partir do caule de <i>C. burlemarxii</i> (Mucugê)	33
3.2.3 Obtenção dos extratos e fases a partir do caule de <i>C. burlemarxii</i> (Rio de Contas)	33
3.3 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>C. burlemarxii</i>	34
3.3.1 Fracionamento da fase em acetato de etila	34
3.3.1.1 Estudo da fração CBF01	35
3.3.1.2 Estudo da fração CBF02	36
3.3.1.3 Estudo das frações CBF14 a CBF17	37
3.4 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS A PARTIR DO CAULE DE <i>C. burlemarxii</i>	39
3.4.1 Fracionamento da fase em acetato de etila (Mucugê)	39
3.4.1.1 Estudo das frações CBC13 a CBC15	39

3.4.1.2 Estudo das frações CBC16 a CBC21	41
3.4.2 Fracionamento da fase em diclorometano (Rio de Contas)	42
3.4.2.1 Estudo da fração CBCR02	43
3.4.2.2 Estudo da fração CBCR02-15 a CBCR02-23	43
3.4.2.3 Estudo da fração CBCR02-14	44
3.4.2.4 Estudo da fração CBCR03	45
3.5.3 Fracionamento da fase em acetato de etila (Rio de Contas)	46
3.5.3.1 Estudo da fração CBCRA05	46
3.5.3.2 Estudo da fração CBCRA05-15-27 a CBCRA05-15-35	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>C. burlemarxii</i>	48
4.1.1 Elucidação estrutural da substância CB01	48
4.1.2 Elucidação estrutural da substância CB02	52
4.1.3 Elucidação estrutural da substância CB03	55
4.1.4 Elucidação estrutural das substâncias CB04 e CB05	60
4.1.5 Elucidação estrutural da substância CB06	68
4.1.6 Elucidação estrutural da substância CB07	72
4.1.7 Elucidação estrutural da substância CB08	84
4.1.8 Elucidação estrutural da substância CB09	90
4.1.9 Elucidação estrutural da substância CB10	101
4.1.10 Elucidação estrutural da substância CB11	106
4.1.11 Elucidação estrutural da substância CB12	110
4.1.12 Elucidação estrutural da substância CB13	117
5. PROPOSTAS BIOGÊNICAS/BIOSINTÉTICAS DA XANTONA E DO BIFENILO ISOLADOS DE <i>Clusia burlemarxii</i>	122
6. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS SUBSTÂNCIAS CB01 A CB13	126
CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS E CAULE DE <i>Clusia burlemarxii</i>	
1. INTRODUÇÃO	129
2. OBJETIVOS	131
3. PARTE EXPERIMENTAL	132
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	132

3.2 BIOENSAIO: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	132
3.3 BIOENSAIO: MICRO-ORGANISMOS TESTADOS	133
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
PUBLICAÇÕES RESULTANTES	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

CAPÍTULO 1: ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE E DAS FOLHAS DE *Clusia burlemarxii*

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA CLUSIACEAE

A família Clusiaceae possui cerca de 40 gêneros e aproximadamente 1200 espécies (OLIVEIRA, 1996). O nome da família foi empregado pela primeira vez pelo médico e botânico francês Antoine Laurent de Jussieu em 1789, em sua obra intitulada “*Genera Plantarum, secundum ordines naturales disposita juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exarata*”. A família apresenta-se principalmente como árvores, arbustos, lianas e ervas, sendo que seus frutos e madeira apresentam relevante importância econômica (JUNIOR, 2005).

Dentre os gêneros da família Clusiaceae os que agrupam um maior número de espécies são os gêneros *Clusia*, *Calophyllum* e *Garcinia* com 200 espécies cada (JUNIOR, 2005). Outros gêneros pertencentes a esta família são: *Neotatea*, *Marila*, *Mahurea*, *Clusiella*, *Kielmeyera*, *Caraipa*, *Haploclathra*, *Poeciloneuron*, *Mesua*, *Kayea*, *Mammea*, *Endodesmia*, *Chrysopia*, *Eliea*, *Rheedia*, *Thornea*, *Triadenum*, *Santomasia*, *Harungana*, *Psorospermum*, *Lebrunia*, *Dystovomita*, *Tovomita*, *Tovomitopsis*, *Chrysochlamys*, *Allanblackia*, *Pentadesma*, *Moronobea*, *Platonia*, *Montrouziera*, *Lorostemon*, *Thysanostemon* e *Shymphonia*.

Todas as espécies da família produzem látex cuja coloração varia do branco (principalmente no gênero *Clusiella*) a amarelo, podendo ainda ser alaranjado, avermelhado ou até mesmo incolor e resinoso (gênero *Caraipa*) (RIBEIRO, 1999), geralmente em cavidades ou canais secretores.

As folhas são opostas ou verticiladas, freqüentemente carnosas, glabras ou pilosas, com indumento ferrugíneo presente em muitas espécies de *Vismia*. Os frutos são tipo baga ou cápsula e as sementes possuem freqüentemente arilo de cor vistosa, fig. 1 (p.22) (RIBEIRO, 1999). As espécies da família Clusiaceae são dificilmente confundidas com as espécies das demais famílias, justamente pelo fato de produzir látex colorido e de apresentar as folhas opostas.



Figura 1. Frutos capsulares de *Calophyllum inophyllum* L.^a, e de *Garcinia gardineira*^b e botão da flor de *Vismia baccifera*^c.

As espécies desta família apresentam tanto flores unissexuadas quanto hermafroditas, sendo bastante vistosas, fig. 2. A grande diversidade floral das espécies que compõe esta família atrai um grande número de polinizadores, incluindo abelhas, moscas, besouros e, mais recentemente descoberto, a polinização da *Moronobea coceinea* por periquitos (RIBEIRO, 1999).



Figura 2. Flores de *Clusia hilariana*^d e *Kielmeyera reticulata* (Pau-santo).

Algumas espécies são importantes fontes de madeira como a jacareúba (*Calophyllum brasiliense*, *Calophyllum lucidum* e *Calophyllum calaba*), as quais possuem uma madeira muito resistente. Outras espécies são cultivadas por apresentar frutos comestíveis, como o bacuri (*Platonia insignis* Mart.) cujos frutos são apreciados na forma de suco, creme, sorvete, geléia, doces, pudim, torta, iogurte, picolé e fermentados. O látex de algumas espécies é utilizado pela medicina popular, principalmente por comunidades indígenas no tratamento de eczemas, vírus do herpes e outros problemas de pele (RIBEIRO, 1999; SHANLEY, 2005).

As espécies da família Clusiaceae apresentam diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, o extrato em diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense* que apresentou atividade antileishmania, inibindo o crescimento tanto da forma amastigota quanto da forma promastigota (BRENZAN, 2007). Sanchez-Mateo e colaboradores relatam o efeito neurofarmacológico e antidepressivo dos extratos metanólicos de quatro espécies do gênero *Hypericum* (SANCHEZ-MATEO, 2002). Extratos de outras espécies apresentaram atividade antiinflamatória (CASTARDO, 2008), vasodilatadora (DONGMO, 2007), antimicrobiana (KUETE, 2007; TANE, 2009) e anti-HIV (GUSTAFSON, 1992 *apud* TEIXEIRA, 2005).

Diversos estudos vem demonstrando o grande potencial anticâncer dos extratos e substâncias isoladas de espécies desta família, principalmente atuando como poderosos agentes citotóxicos como, por exemplo, o extrato obtido do caule de *Calophyllum brasiliense* e *Vismia guianensis* que apresentaram forte ação citotóxica frente a linhagens de células do cólon (SUFFREDINI, 2007).

1.1.1 Gênero *Clusia*



Figura 3. *Clusia fluminensis*^e.

O gênero *Clusia* compreende cerca 200 a 300 espécies (BARROSO, 2002; MOURA, 2008; BITTRICH, 1996 *apud* HOCHWALLNER, 2006) com ocorrência limitada a regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e América Central (BARROSO, 2002), caracterizando-se por apresentar uma grande diversidade de morfologia, biologia da polinização, adaptações ecológicas e usos na medicina popular.

Algumas espécies de *Clusia* possuem flores com resinas atradoras e, entre as angiospermas, a produção dessas resinas é extremamente rara, fig. 3. Em todo o mundo apenas cinco gêneros produzem resinas florais, sendo eles os gêneros *Clusia*, *Clusiella*, *Chrysochlamys* e *Tovomitopsis* pertencentes à família Clusiaceae e o gênero *Dalechampia* pertencente a família Euphorbiaceae (HOCHWALLNER, 2006).

Dentre os usos na medicina popular podemos citar a *Clusia insignis*, uma planta medicinal da Amazônia conhecida como “apuí”, cujas flores frescas são utilizadas como purgantes (BALBACH, 1986 *apud* ISHIGUROA, 1998), sendo que em laboratório demonstrou-se que o extrato metanólico dessas flores apresentaram atividade inibitória da enzima tirosinase (KUBO, 1992; 1994), responsável pela oxidação de fenóis em plantas e em animais. Outras espécies deste gênero são utilizadas no tratamento da leprose, cauterização de ferimentos e no tratamento de dor de cabeça (SALAMA, 1986 *apud* ANDRADE, 1998), bem como, apresentam atividade anti-HIV e antimicrobiana (GUSTAFSON, 1992 *apud* TEIXEIRA, 2005).

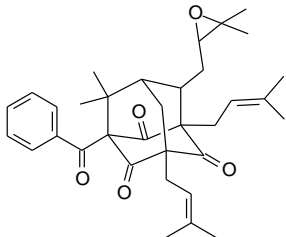
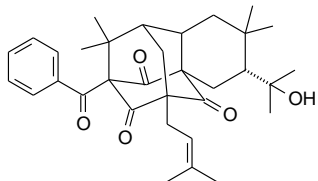
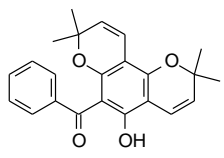
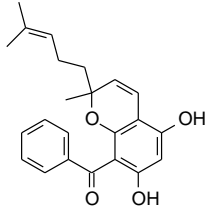
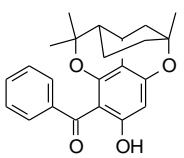


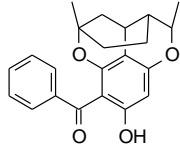
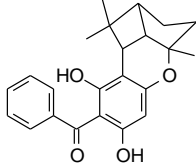
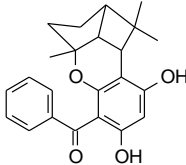
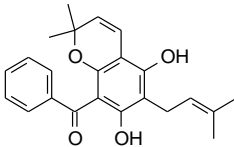
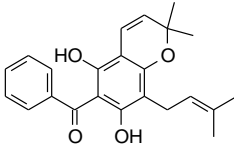
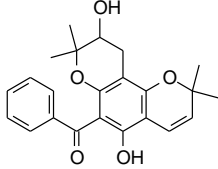
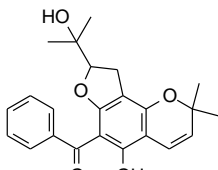
Figura 4. Folhas, flor e frutos de *Clusia rosea* Jacq.^f.

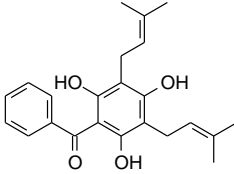
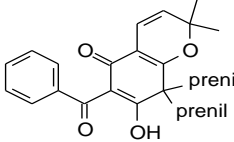
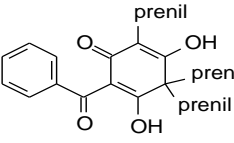
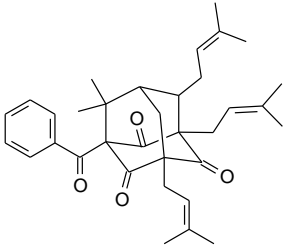
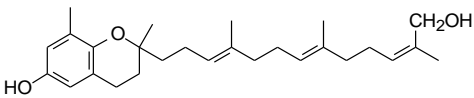
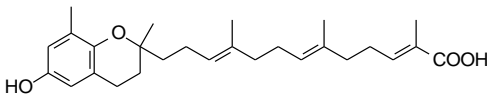
1.1.2 Metabólitos isolados no Gênero *Clusia*

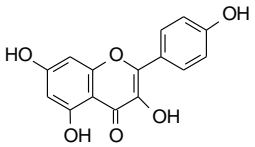
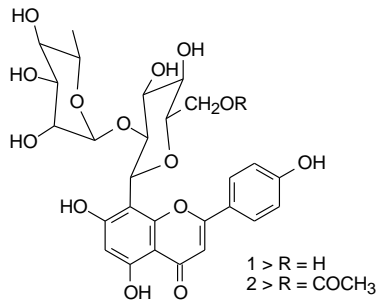
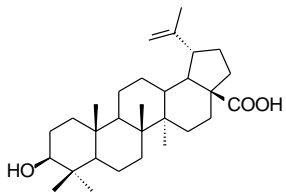
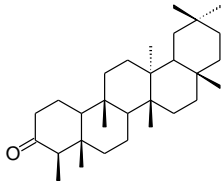
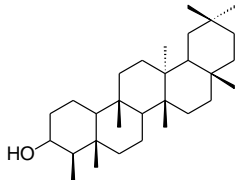
As espécies do gênero *Clusia* são conhecidas como fontes de benzofenonas poliisopreniladas verdadeiras e modificadas, além de triterpenos (TEIXEIRA, 2005; OLIVEIRA, 1999; LOKVAM, 2000; PORTO, 2000). Mais raramente apresentam bifenilas (DELLE MONACHE, 2002; TEIXEIRA, 2006), quinonas (NAGEM, 1993) e tocotrienóis (MONACHE, 1984). Bifenilas em *Clusia* são raras e na literatura há relatos do isolamento de apenas cinco de *C. paralicola* (SEO, 1999; DELLE MONACHE, 2002) e uma de *C. melchiorii* (TEIXEIRA, 2006). Lignanas são ainda mais raras em espécies da família e apenas duas, siringaresinol isolada das raízes de *Vismia guaramirangae* (MONACHE, 1983) e kaerofilina isolada de *Montrouziara sphaeroidea* (ITO, 2000) estão descritas na literatura. A tabela 01 (p.25) traz alguns metabólitos isolados de espécies do gênero *Clusia*.

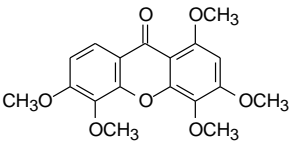
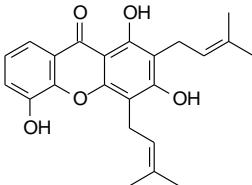
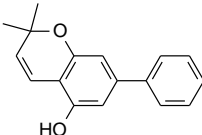
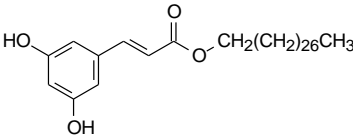
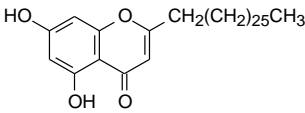
Tabela 01. Algumas substâncias isoladas de espécies do gênero *Clusia*.

BENZOFENONAS			
Substância	Estrutura	Espécie	Referência
1		<i>C. obdeltifolia</i>	TEIXEIRA, 2005
2		<i>C. obdeltifolia</i>	TEIXEIRA, 2005
3		<i>C. ellipticifolia</i> <i>C. sandiensis</i>	BAGGETT, 2005
4		<i>C. multiflora</i>	GONZALEZ, 1995
5		<i>C. multiflora</i>	GONZALEZ, 1995

6		<i>C. multiflora</i>	BAGGETT, 2005
7		<i>C. multiflora</i>	GONZALEZ, 1995
8		<i>C. multiflora</i>	GONZALEZ, 1995
9		<i>C. ellipticifolia</i>	BAGGETT, 2005
10		<i>C. ellipticifolia</i>	BAGGETT, 2005
11		<i>C. ellipticifolia</i>	BAGGETT, 2005
12		<i>C. ellipticifolia</i>	BAGGETT, 2005

13		<i>C. sandiensis</i>	BAGGETT, 2005
14		<i>C. sandiensis</i>	BAGGETT, 2005
15		<i>C. grandiflora</i>	BAGGETT, 2005
16		<i>C. plukeneii</i>	HENRY, 1999
DERIVADOS DO TOCOTRIENOL			
17		<i>C. obdeltifolia</i>	TEIXEIRA, 2006
18		<i>C. grandiflora</i>	MONACHE, 1984

FLAVONÓIDES			
19		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998
20	 <p>1 > R = H 2 > R = COCH₃</p>	<i>C. sandienseis</i>	DELLE MONACHE, 1991
TERPENOS			
21		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998
22		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998
23		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998

XANTONAS			
24		<i>C. insignis</i>	ISHIGURO, 1998
25		<i>C. nemorosa</i>	OLIVEIRA, 1999
BIFENILAS			
26		<i>C. melchiorii</i>	TEIXEIRA, 2006
MISCELÂNIA			
27		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998
28		<i>C. nemorosa</i>	ANDRADE, 1998

2. OBJETIVOS

- Estudar a composição química, em termos de metabólitos secundários, da espécie vegetal *Clusia burlemarxii* que ocorre na Chapada Diamantina-BA;
 - Isolar, purificar e determinar as estruturas desses metabólitos.
-

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

a) Material vegetal

Dois espécimes de *Clusia burlemarxii* foram coletados, um no município de Mucugê e outro no município de Rio de Contas, regiões de campo rupestre, Chapada Diamantina, Bahia. Uma exsicata dos espécimes coletados foi depositada no herbário “Alexandre Leal Costa”, sob o número ALCB – 61584, pela Prof^a. Maria Lenise Silva Guedes do Instituto de Biologia da UFBA.

b) Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C (desacoplado), NOEDIF, DEPT 135° e os experimentos de RMN bidimensionais foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Gemini 2000 operando a 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono-13. Utilizou-se como solventes acetona-d₆, DMSO-d₆ e clorofórmio-d₁ e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de δ (ppm).

c) Espectrometria de massas

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro HP 5973 operando a 70 eV, todos obtidos por inserção direta com impacto de elétrons.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em modo positivo em espectrômetro UtrO-TOF Bruker Daltonics (Billa Rica, USA)

d) Ponto de fusão

As medidas dos pontos de fusão foram realizadas em um aparelho AAICER, modelo FISATOM 430D.

e) Análises cromatográficas

Na separação dos constituintes químicos por cromatografia em coluna, foi utilizada gel de sílica 60 (70 – 230 mesh, 0,040-0,063 mm) da Merck. Na

cromatografia em camada delgada comparativa e preparativa (CCDC e CCDP) foram utilizados como adsorvente gel de sílica 60 HF_{254 + 366} e GF_{254 + 366} da Merck, respectivamente. A suspensão de sílica em água destilada foi distribuída sobre placas de vidro de tamanho 2,5 x 7,0 cm e 20,0 x 20,0 cm na cromatografia em camada delgada comparativa e preparativa, respectivamente. As cromatoplasacas foram reveladas inicialmente com radiação UV (254 e 366 nm) e posteriormente expostas a vapores de iodo numa câmara fechada.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FASES

3.2.1 Obtenção dos extratos e fases a partir das folhas de *C. burlemarxii*

As folhas da espécie *C. burlemarxii*, depois de secadas à temperatura ambiente, foram trituradas em um moinho de facas (Thomas Wiley Laboratory Mill – Modelo 4) obtendo-se 1,62 kg de serragem que foi extraída por maceração com etanol na temperatura ambiente durante três dias, sendo este procedimento repetido por três vezes. O extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo BUCHI modelo R-3000. O extrato etanólico concentrado (10,33 g) foi dissolvido em uma mistura de etanol e água (8:2) e foram realizadas extrações líquido-líquido: três vezes com hexano, que rendeu 2,54 g de extrato e, posteriormente, três vezes com acetato de etila, que rendeu 3,52 g de extrato, fig. 05.

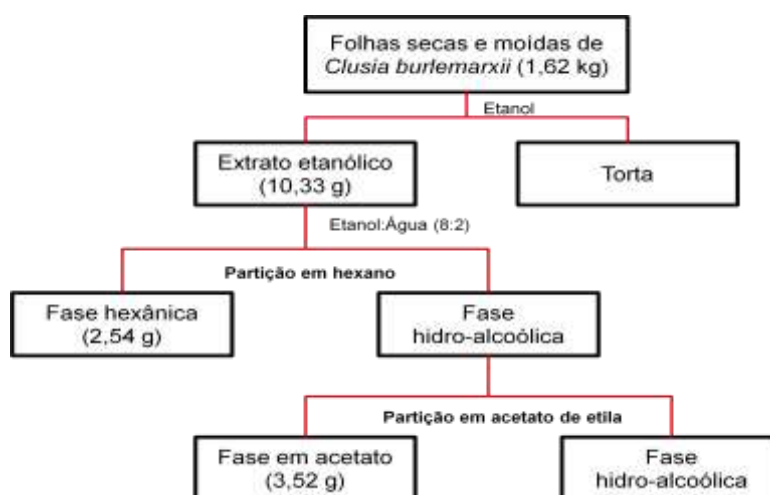


Figura 05. Esquema de obtenção do extrato etanólico e fases hexânica e em acetato de etila a partir das folhas de *C. burlemarxii*.

3.2.2 Obtenção dos extratos e fases a partir do caule de *C. burleamarxii* (Mucugê)

O caule do espécime estudado foi dividido em pequenos fragmentos e depois de secado à temperatura ambiente foi triturado em um moinho, obtendo-se 3,91 kg de serragem que foi submetida a uma extração por maceração com hexano e, em seguida, com metanol. Ao extrato metanólico concentrado (25,22 g) foi adicionada uma mistura de metanol e água (8:2) e a solução final foi submetida a uma extração líquido-líquido: três vezes com diclorometano que rendeu 3,63 g de extrato e três vezes com acetato de etila que rendeu 12,61 g de extrato, fig. 06.

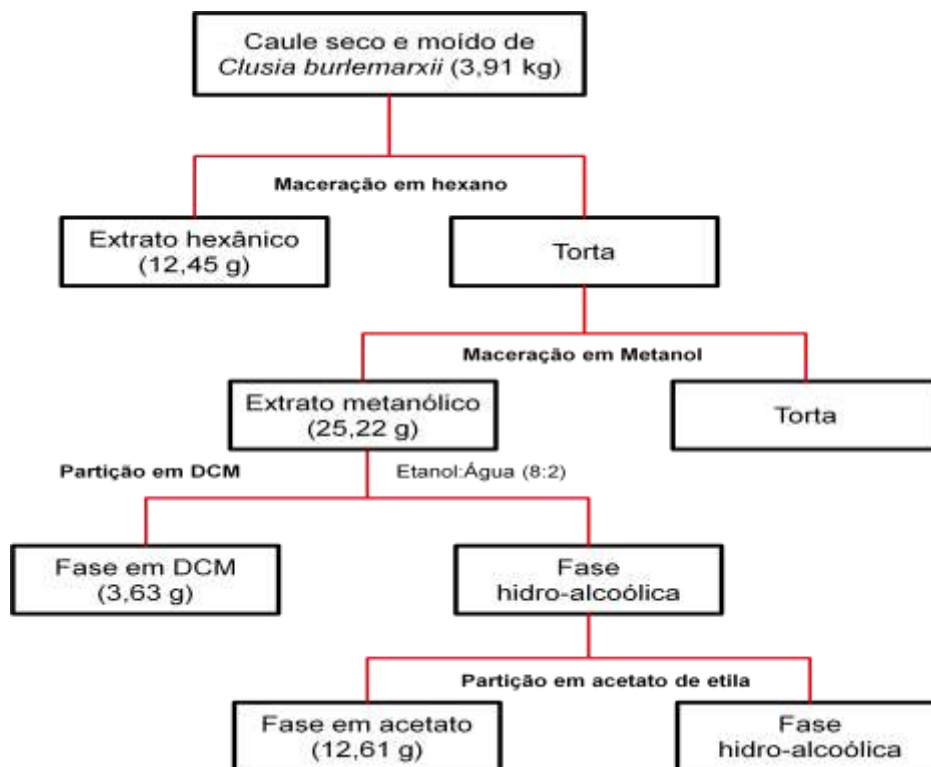


Figura 06. Esquema de obtenção dos extratos hexânico e metanólico e das fases em diclorometano e acetato de etila a partir do caule de *C. burleamarxii* (Mucugê).

3.2.3 Obtenção dos extratos e fases a partir do caule de *C. burleamarxii* (Rio de Contas)

O caule do espécime estudado foi dividido em pequenos fragmentos e depois de secado à temperatura ambiente foi triturado em um moinho, obtendo-se 10,2 kg de serragem que foi submetida a uma extração por maceração com

hexano e, em seguida, com metanol. Ao extrato metanólico concentrado (297,2 g) foi adicionada uma mistura de metanol e água (8:2) e a solução final foi submetida a uma extração líquido-líquido: três vezes com diclorometano que rendeu 69,8 g de extrato e três vezes com acetato de etila que rendeu 18,0 g de extrato, fig. 07.

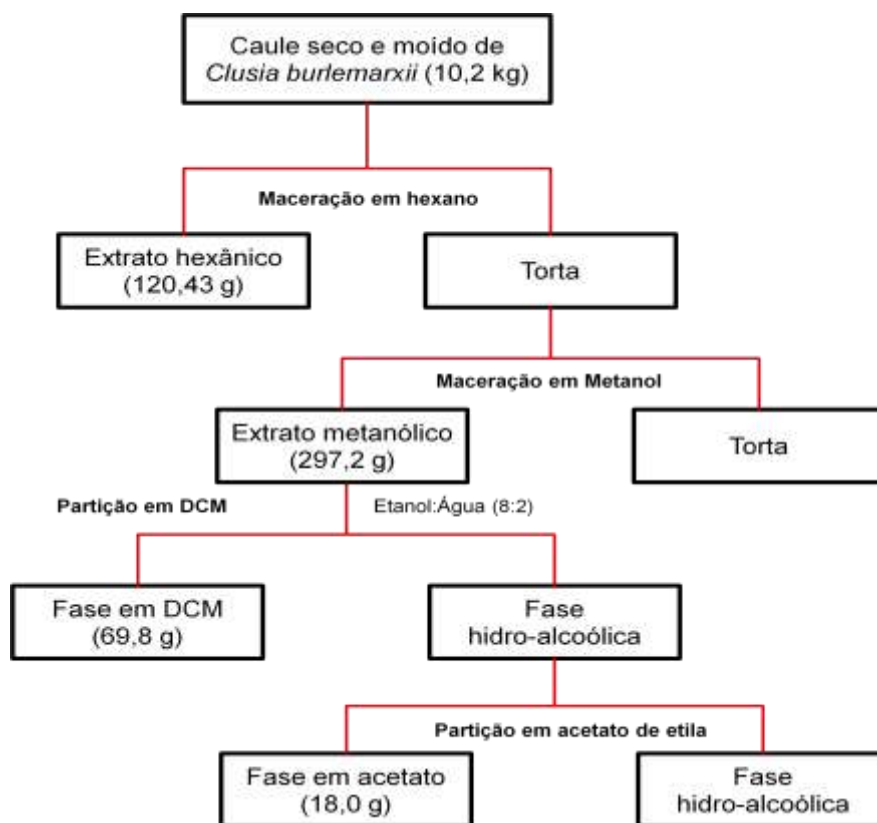


Figura 07. Esquema de obtenção dos extratos hexânico e metanólico e das fases em DCM e acetato de etila a partir do caule de *C. burleamarxii* (Rio de Contas).

3.3 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *C. burleamarxii*

3.3.1 Fracionamento da fase em acetato de etila

A fase em acetato de etila ($m = 3,52$ g) obtida a partir do extrato etanólico das folhas foi submetida a uma filtração em coluna de gel de sílica 230-400 mesh, usando como eluentes misturas de clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 18 frações, denominadas CBF01 a CBF18, que após eliminação da mistura de solventes foram

analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa CCDC, tabela 02.

Tabela 02. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento da fase em acetato de etila das folhas de *C. burlemarxii*.

Frações	Sistema de solvente CHCl ₃ :MeOH (% CHCl ₃)	Massa (g)
CBF01	100%	0,102
CBF02	95%	0,120
CBF03	95%	0,074
CBF04	95%	0,066
CBF05	95%	0,034
CBF06	90%	0,030
CBF07	90%	0,042
CBF08	90%	0,044
CBF09	90%	0,015
CBF10	85%	0,067
CBF11	85%	0,033
CBF12	85%	0,022
CBF13	80%	0,040
CBF14	80%	0,067
CBF15	70%	0,023
CBF16	70%	0,108
CBF17	50%	0,152
CBF18	MeOH (100%)	2,23
Total	-	3,269
Perda		0,251

3.3.1.1 Estudo da fração CBF01

A fração CBF01 (tabela 02) foi submetida à uma recristalização em metanol obtendo-se um sólido cristalino branco o qual foi identificado como sendo a substância **CB01**, fig. 09 (p.36). A porção solúvel em metanol (sobrenadante) foi submetida a uma análise por CCDC e, posteriormente, obteve-se o espectro de RMN ¹H da amostra que revelou a presença majoritária da substância **CB02**, fig. 08 e fig. 10 (p.36).

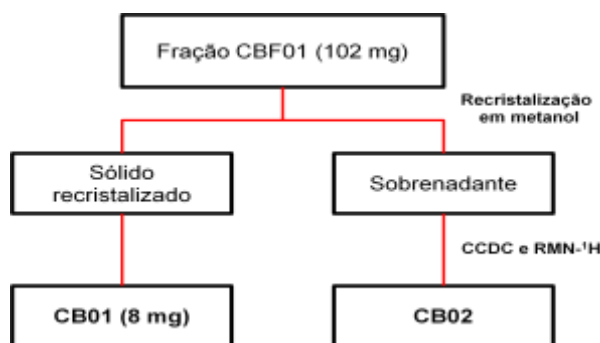
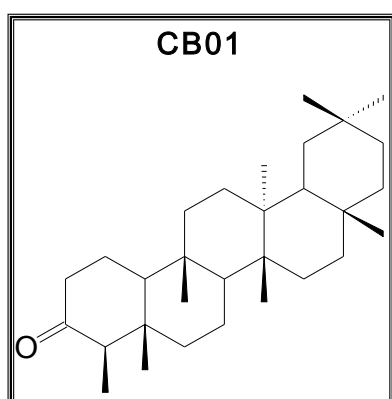


Figura 08. Esquema de obtenção das substâncias CB01 e CB02.

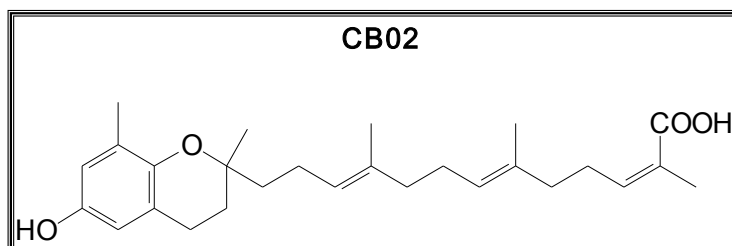


Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$

Massa molecular: 426.72

Aspecto físico: Sólido branco em forma de agulhas

Figura 09. Estrutura da friedelina (**CB01**).



Fórmula molecular: $C_{27}H_{38}O_4$

Massa molecular: 426.59

Aspecto físico: Óleo

Figura 10. Estrutura do ácido 2Z-δ-tocotrienolico (**CB02**).

3.3.1.2 Estudo da fração CBF02

A fração CBF02 (tabela 02, p.35) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes acetato de etila e metanol, em misturas de polaridade crescente, obtendo-se 10 frações denominadas CBF02-01 a CBF02-10. Todas as frações obtidas foram submetidas a análise por CCDC. A fração CBF02-03 e a fração CBF02-07(fig. 11, p.37) foram

identificadas como sendo as substâncias **CB03** (fig. 12, p.37) e **CB02** (fig. 10, p.36), respectivamente.

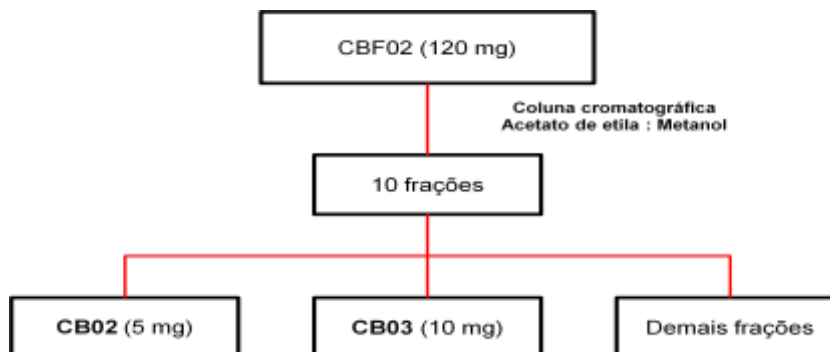
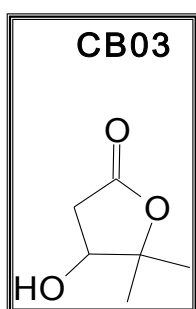


Figura 11. Esquema de obtenção das substâncias CB02 e CB03.



Fórmula molecular: $C_6H_{10}O_3$

Massa molecular: 130.14

Aspecto físico: Óleo

Figura 12. Estrutura da 5,5- dimetil-4-hidroxi-dihidrofuran-2-ona (**CB03**).

3.3.1.3 Estudo das frações CBF14 a CBF17

Após a análise por CCDC as frações CBF14 a CBF17 foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária gel de sílica e como eluentes clorofórmio e metanol em misturas de polaridade crescente obtendo-se 18 frações denominadas CBF14-01 a CBF14-18, sendo todas as frações obtidas submetidas a análise por CCDC. A fração CBF14-13 e a fração CBF14-14 (fig. 13, p.38) foram identificadas como sendo as substâncias **CB04** (fig. 14, p.38) e **CB05** (fig. 15, p.38), respectivamente.

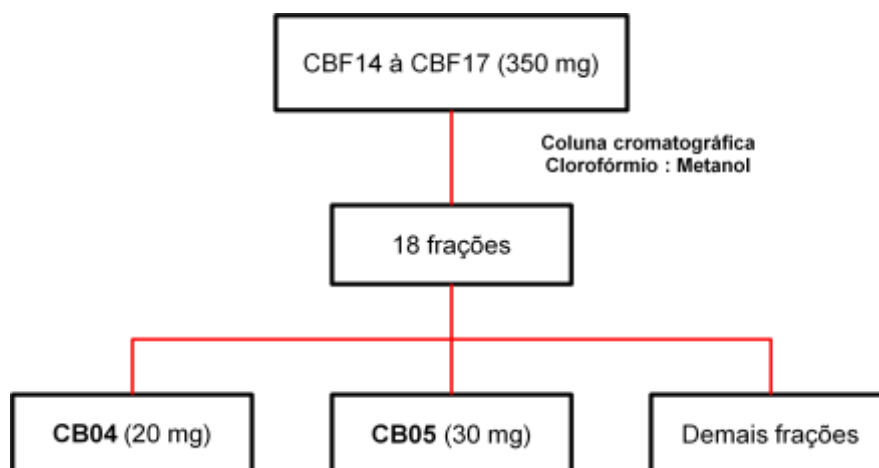
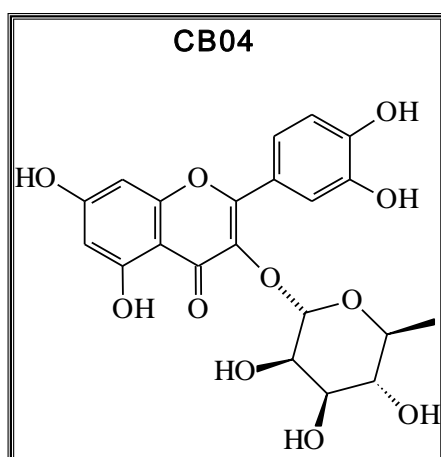


Figura 13. Esquema de obtenção das substâncias CB04 e CB05.



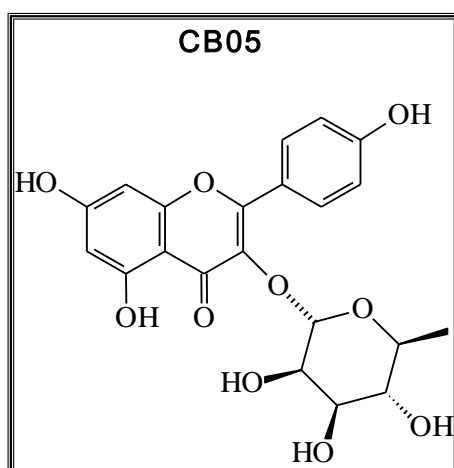
Fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{11}$

Massa molecular: 448.38

Aspecto físico: Sólido amarelo

Temp. Fusão: 180-182°C

Figura 14. Estrutura da quercetrina, 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina (**CB04**).



Fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{10}$

Massa molecular: 432.38

Aspecto físico: Sólido amarelo

Figura 15. Estrutura da afzelina, 3-O- α -L-ramnopiranosilkaempferol (**CB05**).

3.4 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS A PARTIR DO CAULE DE *C. burlemarxii*

3.4.1 Fracionamento da fase em acetato de etila (Mucugê)

A fase em acetato de etila (fig.06, p.33) obtida por partição do extrato metanólico do caule de *C. burlemarxii* foi submetida a uma filtração em coluna de gel de sílica 70-230 mesh, usando como eluentes misturas de diclorometano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Efetuou-se também uma eluição utilizando-se etanol e, posteriormente, metanol. Foram obtidas 17 frações, denominadas CBC01 a CBC17, que após eliminação dos solventes foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa CCDC, tabela 03 (p.39).

Tabela 03. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico das folhas de *C. burlemarxii*.

Frações	Sistema de solvente DCM:Acetato de etila (% DCM)	Massa (g)
CBC01	100%	0,091
CBC02	95%	0,263
CBC03	95%	0,225
CBC04	95%	0,218
CBC05	95%	0,091
CBC06	90%	0,078
CBC07	90%	0,045
CBC08	90%	0,226
CBC09	90%	0,412
CBC10	85%	0,139
CBC11	85%	0,125
CBC12	70%	0,643
CBC13	70%	0,195
CBC14	50%	0,473
CBC15	Acetato de etila (100%)	0,379
CBC16	Etanol (100%)	8,325
CBC17	Metanol (100%)	0,151
Total		12,079
Perda	-	0,531

3.4.1.1 Estudo das frações CBC13 a CBC15

Após a análise por CCDC as frações CBC13 a CBC15 foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária gel

de sílica 70-230 mesh e como eluentes diclorometano e acetato de etila em misturas de polaridade crescente obtendo-se 53 frações denominadas CBC13-01 a CBC13-53, fig. 16, p.40.

Após a análise por CCDC as frações CBC13-36 a CBC13-40 foram reunidas e identificadas como sendo a substância **CB06** (fig. 17, p.40). As frações CBC13-42 à CBC13-46 (fig. 16, p.40) foram submetidas a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com uma mistura de clorofórmio:metanol (85:15) isolando-se a substância **CB07** (fig. 18, p.41).

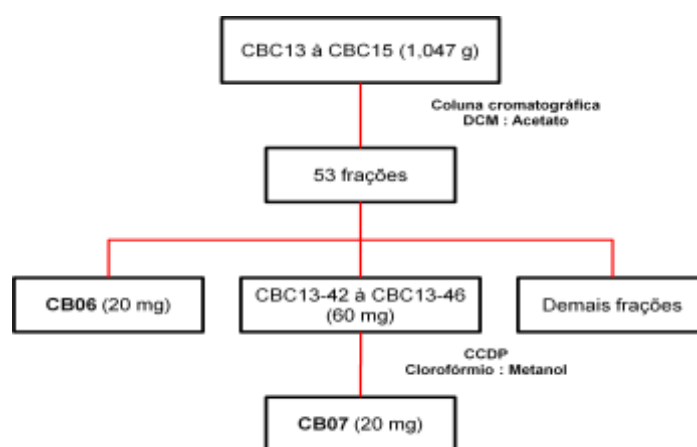


Figura 16. Esquema de obtenção das substâncias CB06 e CB07.

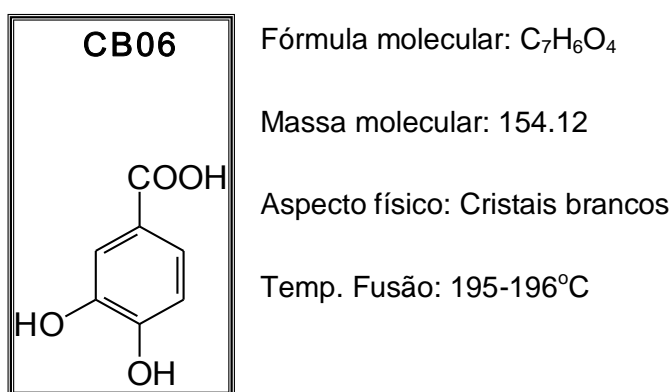
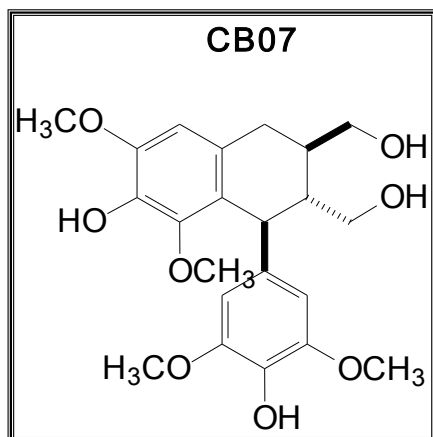


Figura 17. Estrutura do ácido protocatechuíco (ácido 3,4-dihidroxi-benzóico) (**CB06**).



Fórmula molecular: $C_{22}H_{28}O_8$

Massa molecular: 420.45

Aspecto físico: sólido amorfo

Figura 18. Estrutura da lignana 9,9'-di-hidroxiariltetralina denominada (+)-lioniresinol (CB07).

3.4.1.2 Estudo da fração CBC16

A fração CBC16 (tabela 03, p.39) foi submetida a extrações líquido-líquido: três vezes com diclorometano e, posteriormente, três vezes com acetato de etila, fig. 19 p.41. A fase em diclorometano (2,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 70-230 mesh e como eluentes diclorometano e acetona em misturas de polaridade crescente obtendo-se 25 frações denominadas CBC16-01 a CBC16-25, sendo todas as frações obtidas submetidas à análise por CCDC, fig. 19 p.41. A fração CBC16-06 e a fração CBC16-14 foram identificadas como sendo as substâncias **CB08** (fig. 20 p.42) e **CB09** (fig. 21 p.42), respectivamente.

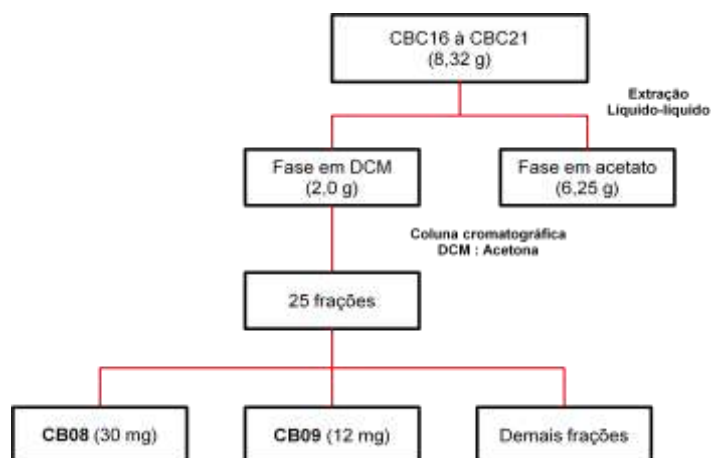
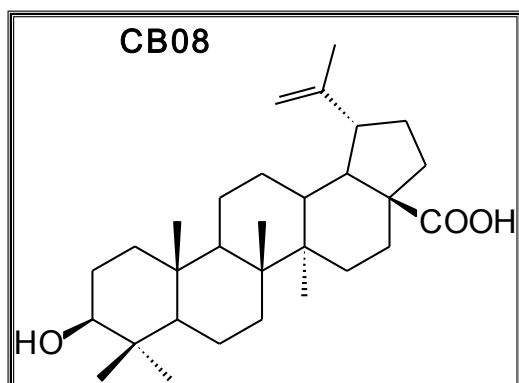


Figura 19. Esquema de obtenção das substâncias CB08 e CB09.

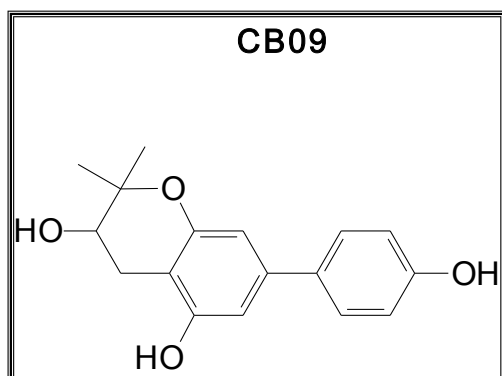


Fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$

Massa molecular: 456.70

Aspecto físico: Sólido branco

Figura 20. Estrutura do ácido betulínico, ácido 3-β-hidroxilup-20(29)-en-28-óico (**CB08**).



Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}O_4$

Massa molecular: 309,1153 (M + Na⁺)

Aspecto físico: óleo

Figura 21. Estrutura do 2,2-dimetil-3,5-di-hidroxi-7-(4-hidroxifenil)cromano (**CB09**).

3.4.2 Fracionamento da fase em diclorometano (Rio de Contas)

A fase em diclorometano (fig. 07 p.34) obtida a partir do extrato metanólico do caule foi submetida a uma filtração em coluna de gel de sílica 230-400 mesh. Efetuou-se eluições utilizando-se hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Foram obtidas 5 frações, denominadas CBCR01 a CBCR05, que após eliminação do solvente foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa, tabela 04 (p.43).

Tabela 04. Frações, sistema de solvente e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico do caule de *C. burlemarxii*.

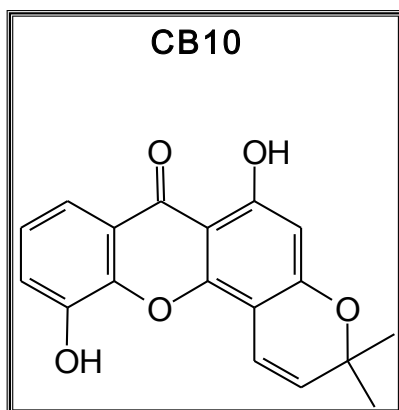
Frações	Sistema de solvente CH ₃ Cl:MeOH	Massa (g)
CBCR01	HEXANO	0,57
CBCR02	DCM	6,06
CBCR03	ACETATO DE ETILA	50,24
CBCR04	ACETONA	0,75
CBCR05	METANOL	7,43
Total	-	65,17

3.4.2.1 Estudo da fração CBCR02

A fração CBCR02 (tabela 04 p.43) foi submetida a uma filtração em coluna de gel de sílica 70-230 mesh, usando como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 32 frações, denominadas CBCR02-01 a CBCR02-32, que após eliminação da mistura de solventes foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa CCDC.

3.4.2.2 Estudo da fração CBCR02-15 a CBCR02-23

As frações CBCR02-15 a CBCR02-23 apresentaram-se como um sólido amarelo em forma de agulhas. O sólido foi recristalizado em clorofórmio e identificado como a substância **CB10** (30 mg, fig. 22 p.44).



Fórmula molecular: $C_{18}H_{14}O_5$

Massa molecular: 310.30

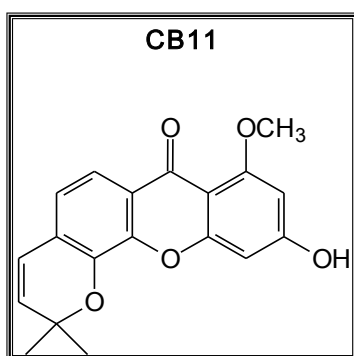
Aspecto físico: Sólido amarelo

Temp. Fusão: 252-253°C

Figura 22. Estrutura da 6-desoxiisojacareubina (**CB10**).

3.4.2.3 Estudo da fração CBCR02-14

A fração CBCR02-14 (40 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa em sílica, utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2). Efetou-se duas corridas e a cromatoplaça apresentou três manchas denominadas CBCR02-14-01, CBCR02-14-02 e CBCR02-14-03. As frações CBCR02-14-01, CBCR02-14-02 e CBCR02-14-03 foram identificadas como sendo as substâncias **CB11** (fig. 23 p.44), **CB12** (fig. 24 p.45) e **CB13** (fig. 25 p.45), respectivamente.



Fórmula molecular: $C_{19}H_{16}O_5$

Massa molecular: 324.33

Aspecto físico: óleo

Figura 23. Estrutura da burlemarxiixantona (**CB11**).

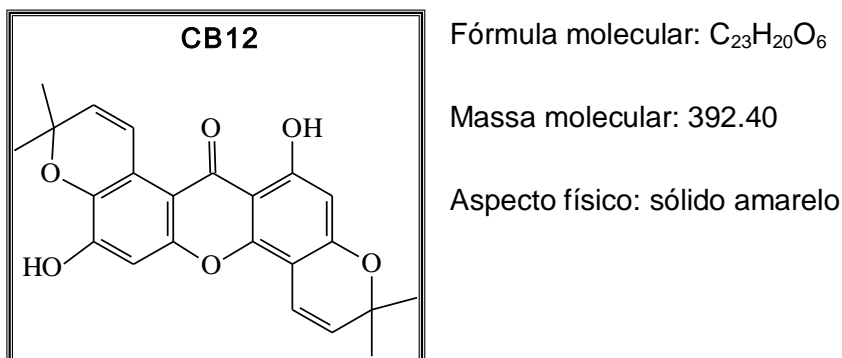


Figura 24. Estrutura da brasilixantona B (**CB12**).

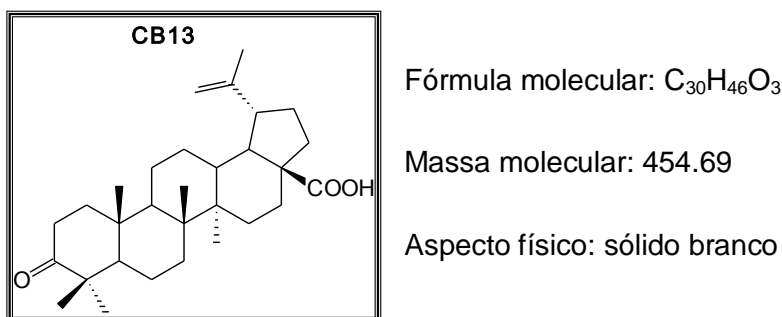


Figura 25. Estrutura do ácido betulônico, ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-óico (**CB13**).

3.4.2.4 Estudo da fração CBCR03

A fração CBCR03 (fig. 26 p.46) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes clorofórmio e metanol em misturas de polaridade crescente obtendo-se 3 frações denominadas CBCR03A, CBCR03B, CBCR03C. A análise em CCDC revelou um padrão similar de manchas na placa cromatográfica e ao adicionar metanol à fração CBCR03C foi observado a formação de um precipitado branco. Este precipitado foi sucessivamente “lavado” com metanol e monitorado por CCDC até a obtenção de um grau de pureza satisfatório. A partir da análise do espectro de RMN 1H do referido sólido pode-se concluir que se tratava da substância **CB08**, fig. 20 (p.42). A porção solúvel em metanol foi também analisada por RMN 1H e observou-se que o componente majoritário tratava-se da substância **CB02**, fig. 10 (p.36).

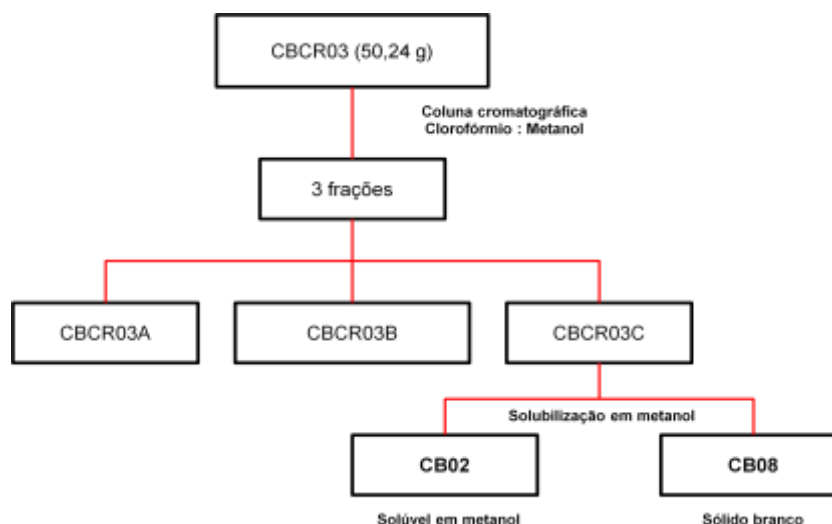


Figura 26. Esquema do fracionamento da fração CBCR03.

3.4.3. Fracionamento da fase em acetato de etila (Rio de Contas)

A fase em acetato de etila (fig. 07 p.34) foi submetida a uma filtração em coluna de gel de sílica 70-230 mesh, utilizando-se como eluentes clorofórmio e metanol em misturas de polaridade crescente obtendo-se 24 frações denominadas CBCRA01 a CBCRA24, que após eliminação da mistura de solventes foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa CCDC.

3.4.3.1 Estudo da fração CBCRA05

A fração CBCRA05 foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes clorofórmio e metanol em misturas de polaridade crescente obtendo-se 24 frações denominadas CBCRA05-01 à CBCRA05-24, fig. 27 (p.47). Posteriormente, a fração CBCRA05-15 foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes hexano e acetato de etila em misturas de polaridade crescente obtendo-se 40 frações denominadas CBCRA05-15-01 a CBCRA05-15-40.

As frações CBCRA05-15-10 a CBCRA05-15-13 foram identificadas como sendo a substância **CB03**, fig. 12 (p.37).

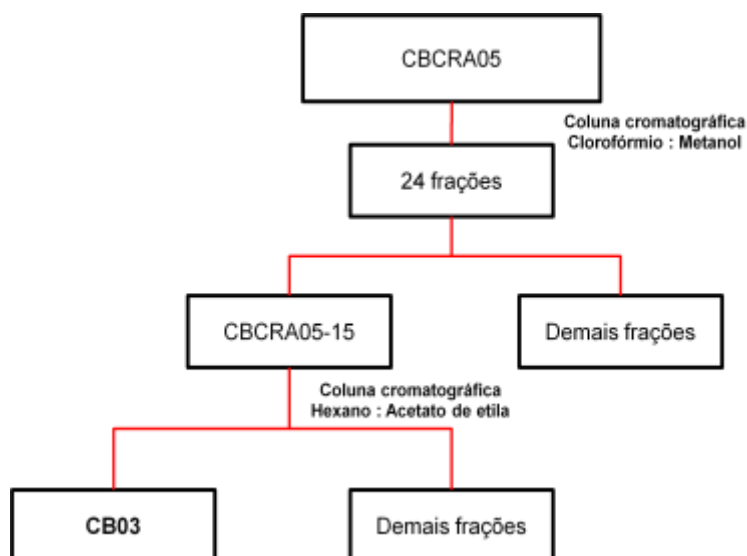


Figura 27. Esquema do fracionamento da fração CBCRA05.

3.4.3.2 Estudo da fração CBCRA05-15-27 a CBCRA05-15-35

As frações CBCRA05-15-27 a CBCRA05-15-35 após análise por CCDC foram reunidas e submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando como fase estacionária sílica e como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (6:4). Efetuou-se três corridas e a cromatoplaça apresentou duas manchas denominadas CBCRA05-15-27A e CBCRA05-15-27B. A fração CBCRA05-15-27A foi identificada como a substância **CB02**, fig. 10 (p.36).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *C. burlemarxii*

4.1.1 Elucidação estrutural da substância CB01

A determinação estrutural da substância CB01, obtida a partir do fracionamento da fase em acetato de etila das folhas de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H , figuras 28, 29 e 30, além da comparação com os descritos na literatura (DRAKE, 1935), (COREY, 1956), (SHAMA, 1962), (MOREIRA, 1999), (TEIXEIRA, 1999), (FERRAZ, 2005), (Li, 2006), (TEIXEIRA, 2006), (OLIVEIRA, 2007).

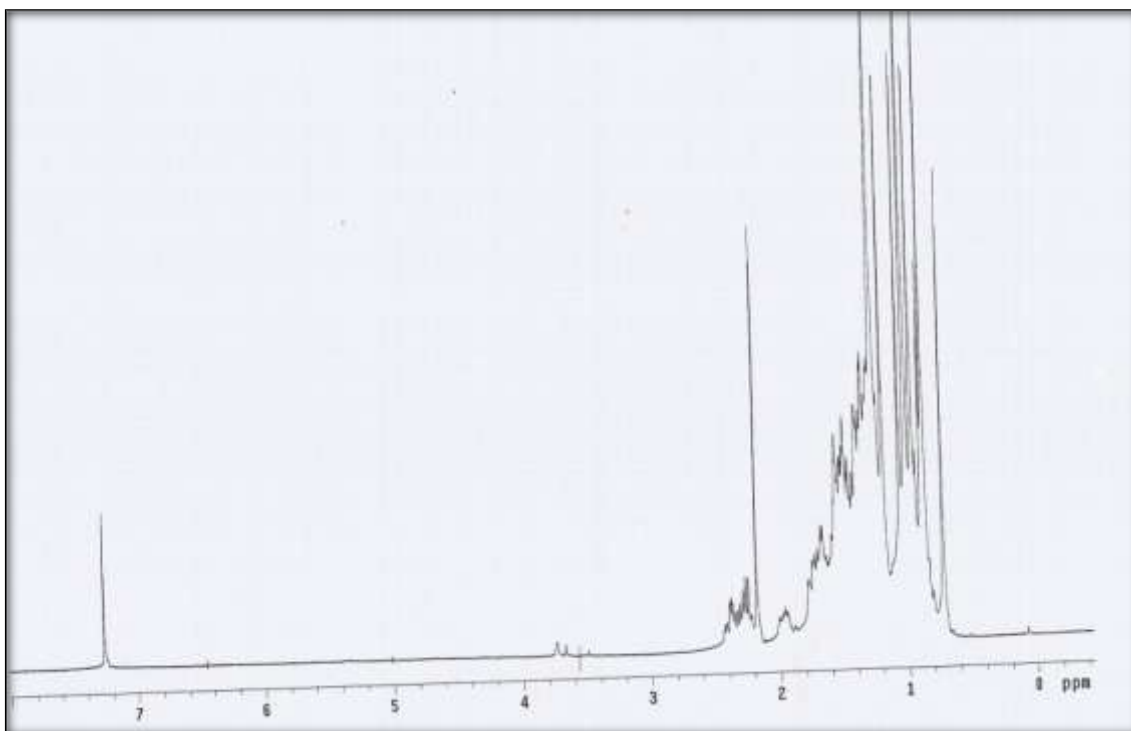


Figura 28. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB01**.

O espectro de RMN ^1H , fig. 28, realizado em clorofórmio deuterado (CDCl_3), apresentou um conjunto de sinais entre δ_{H} 0,73 e δ_{H} 2,42, sendo tal região característica de grupamentos metílicos, metilênicos e metínicos.

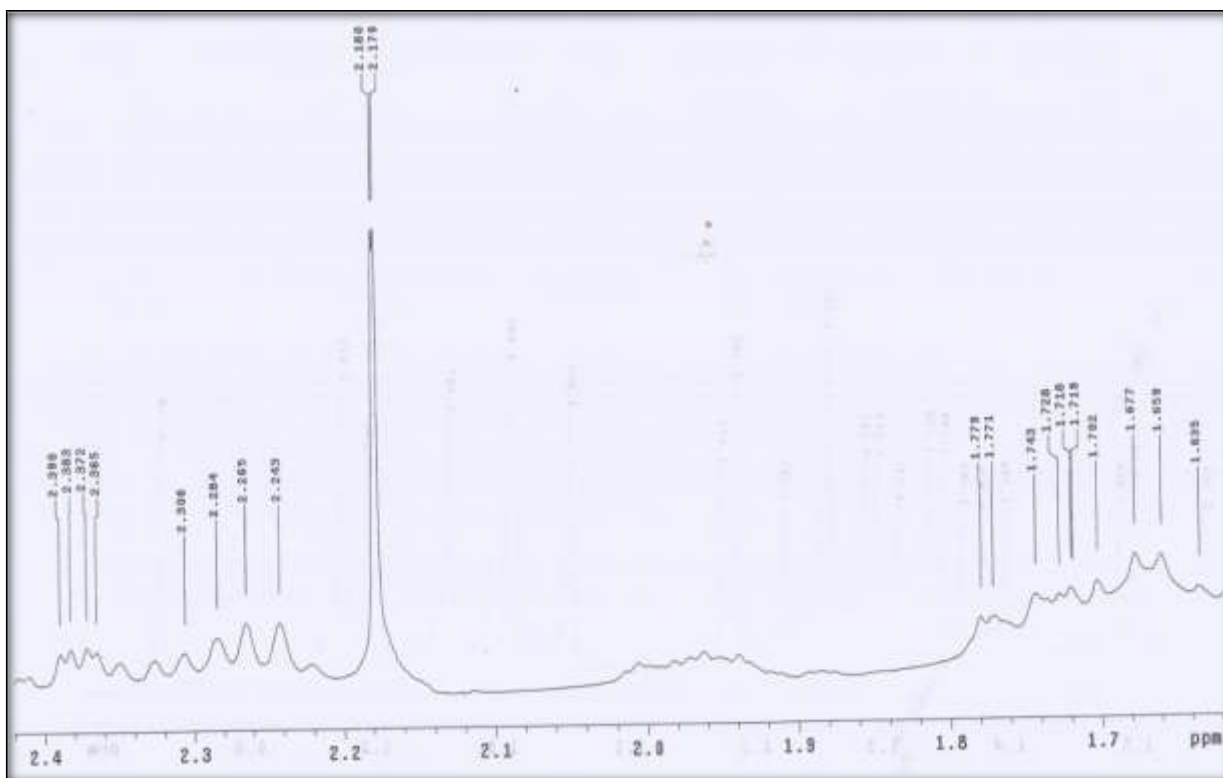


Figura 29. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB01**, região entre 1,6 e 2,4 ppm.

O espectro de RMN ^1H apresentou sete sinais característicos de grupamentos metílicos, fig. 29 e 30, dos quais seis singletos em δ_{H} 0,73 (s, H-24, $\beta\text{-CH}_3$), δ_{H} 0,87 (H-25, $\beta\text{-CH}_3$), δ_{H} 0,89 (H-23, $\beta\text{-CH}_3$), δ_{H} 0,96 (s, H-30, $\beta\text{-CH}_3$), δ_{H} 1,05 (s, H-27, $\alpha\text{-CH}_3$) e δ_{H} 1,18 (s, H-28, $\beta\text{-CH}_3$) que integram para três átomos de hidrogênio cada, além de apresentar um singlete largo relativo a seis átomos de hidrogênio em δ_{H} 1,01 (s, H-26, $\beta\text{-CH}_3$, H-29, $\alpha\text{-CH}_3$). Comparando os deslocamentos químicos dos oito grupamentos metílicos com os descritos na literatura, e aliado ao histórico de substâncias comumente isoladas no gênero *Clusia* (FERRAZ, 2005), (TEIXEIRA, 1999), (TEIXEIRA, 2006), pode-se inferir que a substância **CB01** tratava-se do triterpeno pentacíclico 3-oxo-friedelina.

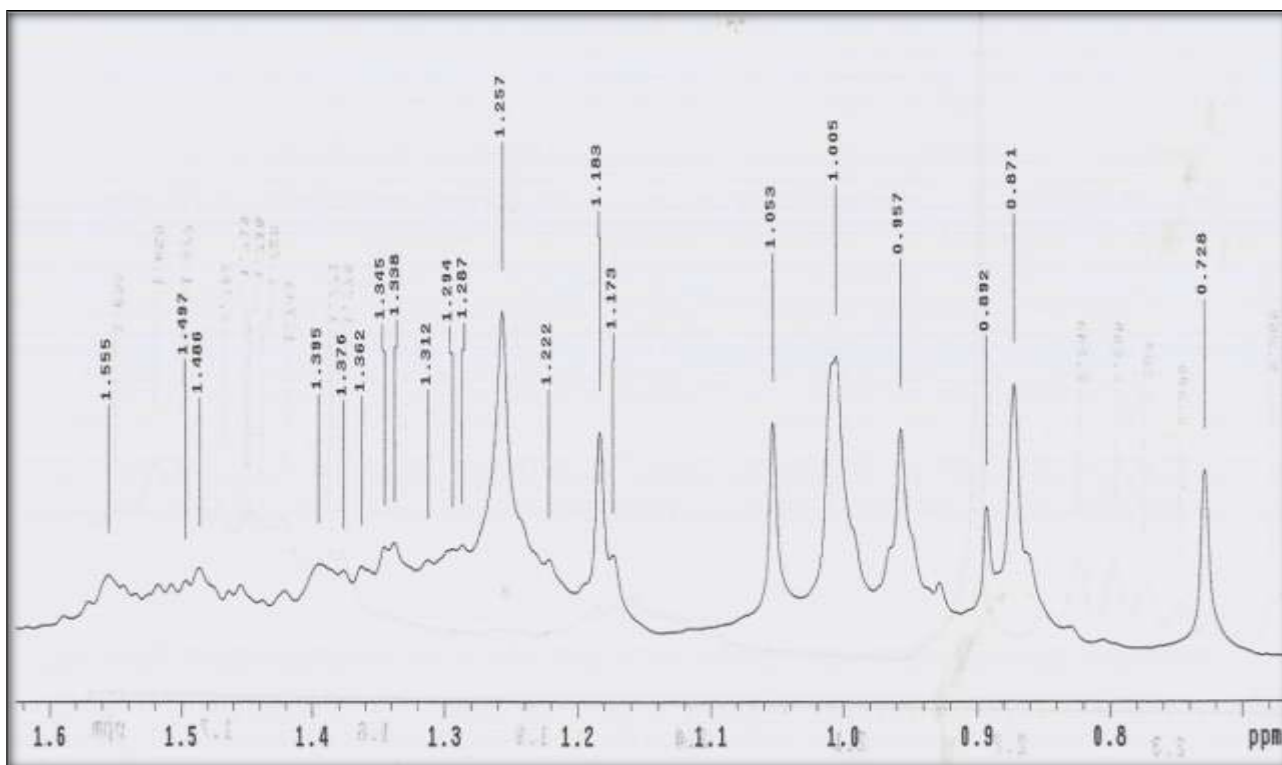


Figura 30. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB01**, região entre 0,7 e 1,8 ppm.

Shama e colaboradores propõem a identificação de triterpenos baseada no deslocamento químico do grupamento metílico mais protegido (SHAMA, 1962), sendo o deslocamento igual a 0,73 ppm para o triterpeno **CB01**. Assim, através da estratégia proposta por Shama, juntamente com o histórico de substâncias comumente isoladas no gênero *Clusia* e os dados descritos na literatura foi possível confirmar a identidade do triterpeno **CB01** como sendo a 3-oxo-friedelina, também denominado de friedelina, fig. 31 (p.51).

Analisando a conformação da friedelina apresentada na fig. 31 p.51 (COREY, 1956) e com base na análise de modelos moleculares, verifica-se que o grupamento metílico em δ_{H} 0,73 (s, H-24, $\beta\text{-CH}_3$) encontra-se no cone de proteção gerado pelo efeito anisotrópico dos elétrons π da carbonila em C-3, enquanto que a metila em δ_{H} 0,89 (H-23, $\beta\text{-CH}_3$) encontra-se no plano da ligação C=O, região de desproteção e, portanto, justificando o deslocamento químico maior do que a metila C-23.

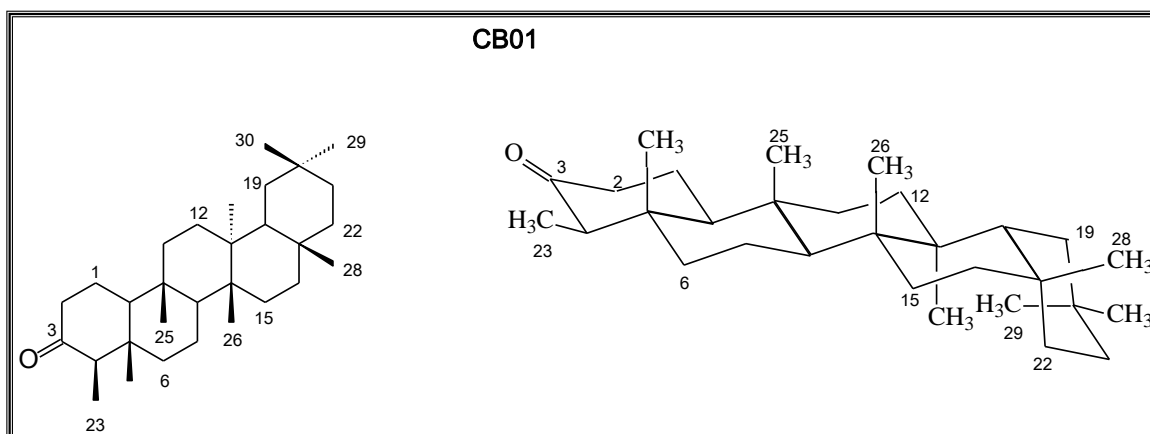


Figura 31. Estrutura planar e conformação da friedelina.

Os dados de RMN ^1H da substância **CB01**, bem como, as respectivas atribuições e configurações relativas dos grupamentos metílicos são apresentados na tabela 05.

Tabela 05. Dados de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB01**.

Posição	CB01 (δ_{H})	Friedelina* (δ_{H})	Multiplicidade e integração	Estereoquímica
23	0,89	0,88	(d, 6,3 Hz, 3H)	β -CH ₃
24	0,73	0,72	(s, 3H)	β -CH ₃
25	0,87	0,86	(s, 3H)	β -CH ₃
26 e 29	1,01	1,00	(s, 6H)	β -CH ₃ e α -CH ₃
27	1,05	1,06	(s, 3H)	α -CH ₃
28	1,18	1,18	(s, 3H)	β -CH ₃
30	0,96	0,95	(s, 3H)	β -CH ₃

* Li, L.; Huang, X.; Sattler, I.; Fu, H.; Grabley, S.; Lin, W.: *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 624-628.

4.1.2 Elucidação estrutural da substância CB02

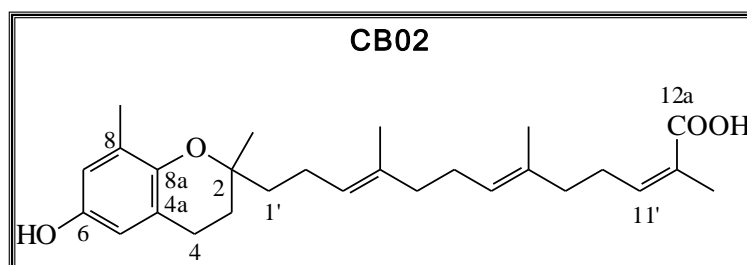


Figura 32. Estrutura da substância **CB02**.

A determinação estrutural da substância **CB02**, ácido 2-Z-δ-tocotrienolóico, obtido a partir do fracionamento da fase em acetato de etila das folhas de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H , fig. 33 (p.54), e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (DELLE MONACHE, 1984), (TERASHIMA, 1997), (TEIXEIRA, 2006).

O espectro de RMN ^1H , fig. 33, realizado em clorofórmio deuterado, apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,40 e δ_{H} 6,50, com integração relativa a um átomo de hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-5 e H-7 do sistema aromático 1,2,3,5 tetrassubstituído.

O espectro de RMN ^1H apresentou um tripleto em δ_{H} 6,10 com integração relativa a um átomo de hidrogênio, atribuído ao hidrogênio olefínico β carbonílico H-11'. Apresentou também um singlete largo em δ_{H} 5,19 ppm, com integração relativa a dois átomos de hidrogênio, atribuído aos hidrogênios olefínicos H-3' e H-7'. Apresentou ainda um multipletto entre δ_{H} 2,55 e δ_{H} 2,75 com integração relativa a quatro átomos de hidrogênio, atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-4 e H-10', e por fim, uma série de singletos em δ_{H} 1,27, δ_{H} 1,60, δ_{H} 1,92 e δ_{H} 2,14. Com base na análise do espectro de RMN ^1H , bem como, na comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura, confirma-se a identidade da substância **CB02** como sendo o ácido 2-Z-δ-tocotrienolóico ou ácido 13-(6-hidroxi-2,8-dimetil-2-cromanil)-2,6,10-trimetiltrideca-(2Z,6E,10E)-trienóico.

Delle Monache e colaboradores descreveram o isolamento e determinação estrutural de dois novos ácidos tocotrienolólicos, os ácidos *E* e *Z*- δ -tocotrienolólico, a partir dos frutos verdes de *Clusia grandiflora*, entretanto não discrimina os valores relativos aos hidrogênios aromáticos e metílicos (DELLE MONACHE, 1984).

Sendo assim, a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos e metílicos baseou-se na comparação com os dados do álcool δ -tocotrienílico isolado por Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA, 2006). O sinal em δ_H 2,14 (s, 3H) foi atribuído aos hidrogênios do grupo metílico ligado ao anel aromático H-8b, relativamente mais desprotegidos devido ao efeito anisotrópico dos elétrons π do anel. O sinal em δ_H 1,60 (s, 6H) foi atribuído as metilas H-4'a e H-8'a, e o sinal em δ_H 1,92 (s, 3H) foi atribuído a metila β carbonílica C-13'. O ácido 2-*Z*- δ -tocotrienolólico é raramente encontrado em plantas sendo mais comum na família o isômero *E*. As demais atribuições são apresentadas na tabela 06.

Tabela 06. Dados de RMN 1H [300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)] da substância **CB02**.

Posição	δ_H (álcool)*	δ_H (ácido)
2a-CH ₃	1,26	1,27
8b-CH ₃	2,13	2,14
4'a-CH ₃	1,59	1,60
8'a-CH ₃	1,59	1,60
13'-CH ₃	1,91	1,92
5	6,38	6,40
7	6,48	6,50

*Teixeira, J.S.R.; Moreira, L.M.; Guedes, M. L. S.; Cruz, F. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 812.

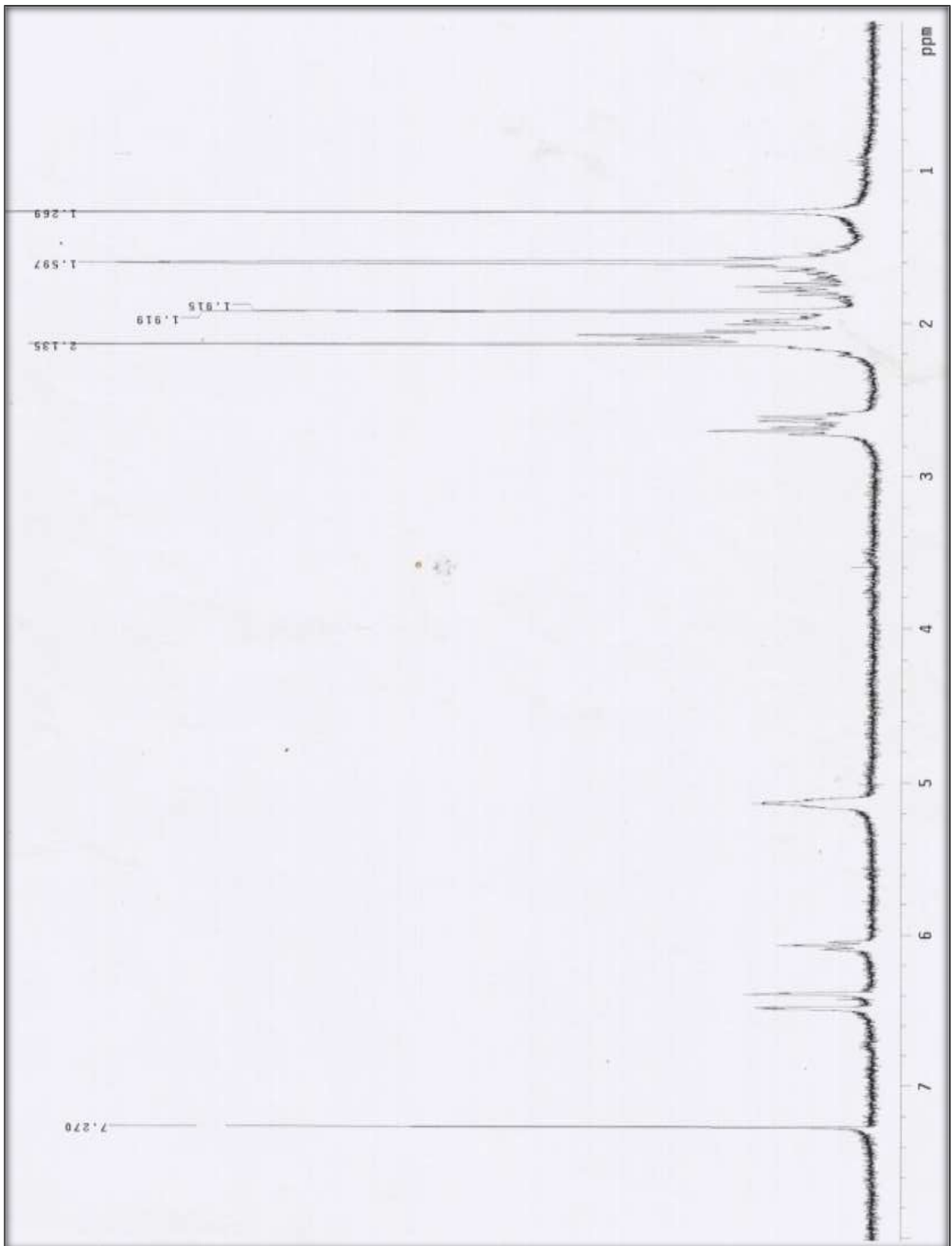


Figura 33. Espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB02**.

4.1.3 Elucidação estrutural da substância CB03

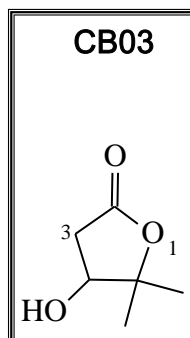


Figura 34. Estrutura da substância **CB03**.

A determinação estrutural da substância **CB03**, a 5,5-dimetil-4-hidroxi- γ -lactona, isolada da fase em acetato de etila das folhas e do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C , fig. 36 e 37 (p.58 e p.59), e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (MATSUMOTO, 1974), (DOYLE, 1991), (ISHII, 1992), (JAIME, 1993), (AHMED, 2004).

O espectro de RMN ^1H , fig. 36 (p.58), realizado em clorofórmio deuterado, apresentou dois singletos, um em δ_{H} 1,37 (s, 3H, -CH₃) e outro em δ_{H} 1,44 (s, 3H, -CH₃) com integração relativa a três átomos de hidrogênio cada, os quais foram atribuídos aos hidrogênios das duas metilas geminais em C-4. O átomo de oxigênio ligado ao carbono C-4 provoca, por efeito indutivo, uma leve desproteção dos hidrogênios dos grupos metílicos.

O espectro de RMN ^1H apresentou ainda três duplos dubletos em δ_{H} 2,55 (dd, 1H, $^3J = 6 \text{ Hz}$, $^2J = 18 \text{ Hz}$, H-2a), δ_{H} 2,94 (dd, 1H, $^3J = 3 \text{ Hz}$, $^2J = 18 \text{ Hz}$, H-2b), δ_{H} 4,20 (dd, 1H, $^3J = 3 \text{ Hz}$, $^3J = 6 \text{ Hz}$, H-3) cada um com integração relativa a um átomo de hidrogênio. Esses três duplos dubletos sugerem a presença de um grupamento metilênico vizinho a um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico (IINUMA, 1996), (MOREL, 2000), (LINDSEY, 2002), (CUI, 2008). Assim o sinal em δ_{H} 4,20 foi atribuído ao hidrogênio H-3, enquanto que os sinais em δ_{H} 2,55 e δ_{H} 2,94 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos em C-2.

Devido à presença do estereocentro em C-3, não existem elementos de simetria na molécula e, conseqüentemente, tanto os hidrogênios metilênicos quanto os grupos metílicos são diastereotópicos e, portanto, quimicamente não equivalentes.

O espectro de RMN ^{13}C , fig. 37 (p.59), realizado em clorofórmio deuterado, apresentou sinais em δ_{C} 20,9 e δ_{C} 25,9 através dos quais se confirmou a presença de dois grupos metílicos diastereotópicos em C-4. Além desses, o sinal em δ_{C} 75,5 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. Dois sinais adicionais observados indicaram a presença de carbonos não hidrogenados, o primeiro em δ_{C} 87,7, atribuído ao carbono C-4, e o segundo em δ_{C} 174,9, região característica de carbonos carbonílicos de ésteres, atribuído ao carbono C-1. Os dados RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância **CB03** são apresentados na tabela 07.

Tabela 07. Dados de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] e RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB03**.

Posição	δ_{H}	Multiplicidade e Integração	δ_{C}	δ_{C}^*
1	-	-	174,9	174,2
2a	2,55	(dd, 1H, $^3J = 6\text{Hz}$, $^2J = 18\text{Hz}$)	38,1	38,2
2b	2,94	(dd, 1H, $^3J = 3\text{Hz}$, $^2J = 18\text{Hz}$)	38,1	38,2
3	4,20	(dd, 1H, $^3J = 3\text{Hz}$, $^2J = 6\text{Hz}$)	73,5	73,8
4	-	-	87,7	87,6
-CH ₃	1,37 e 1,44	(s, 3H)	20,9 e 25,9	21,0 e 26,1

*Ahmed, A.A.; Hussein, T.A.; Mahmoud, A.A.; Farag, M.A.; Pare, P.W.; Wojcinska, M.; Karchesy, J.; Mabry, T.J.: *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2539–2543.

Com base na análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , bem como, na comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura, confirma-se a identidade da substância **CB03** como sendo a 5,5-dimetil-4-hidroxi- γ -lactona, também denominada de 5,5-dimetil-4-hidroxi-butirolactona. A 5,5-dimetil-4-hidroxi-butirolactona é conhecida como produto de degradação de cumarinas, fig. 35 (p.57) (MATSUMOTO, 1974), (ISHII, 1992) e apresenta ocorrência rarríssima em plantas (AHMED, 2004), sendo este o primeiro relato desta substância como produto natural na família Clusiaceae.

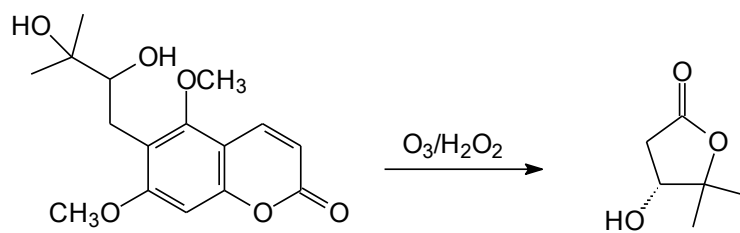


Figura 35. Obtenção da 5,5-dimetil-4-hidroxi-butirolactona a partir da ozonólise da cumarina (+)-toddalolactona.

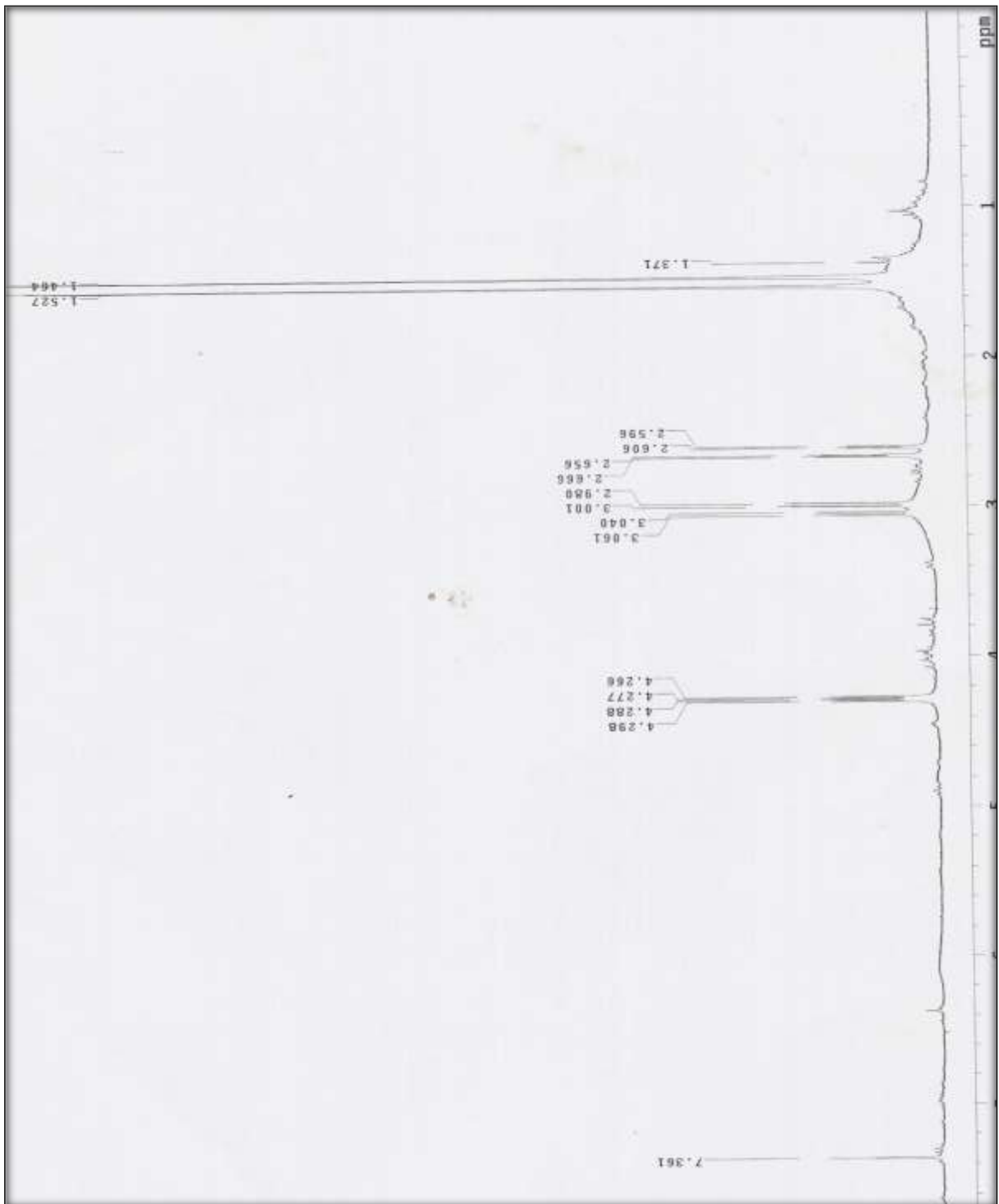


Figura 36. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB03**.

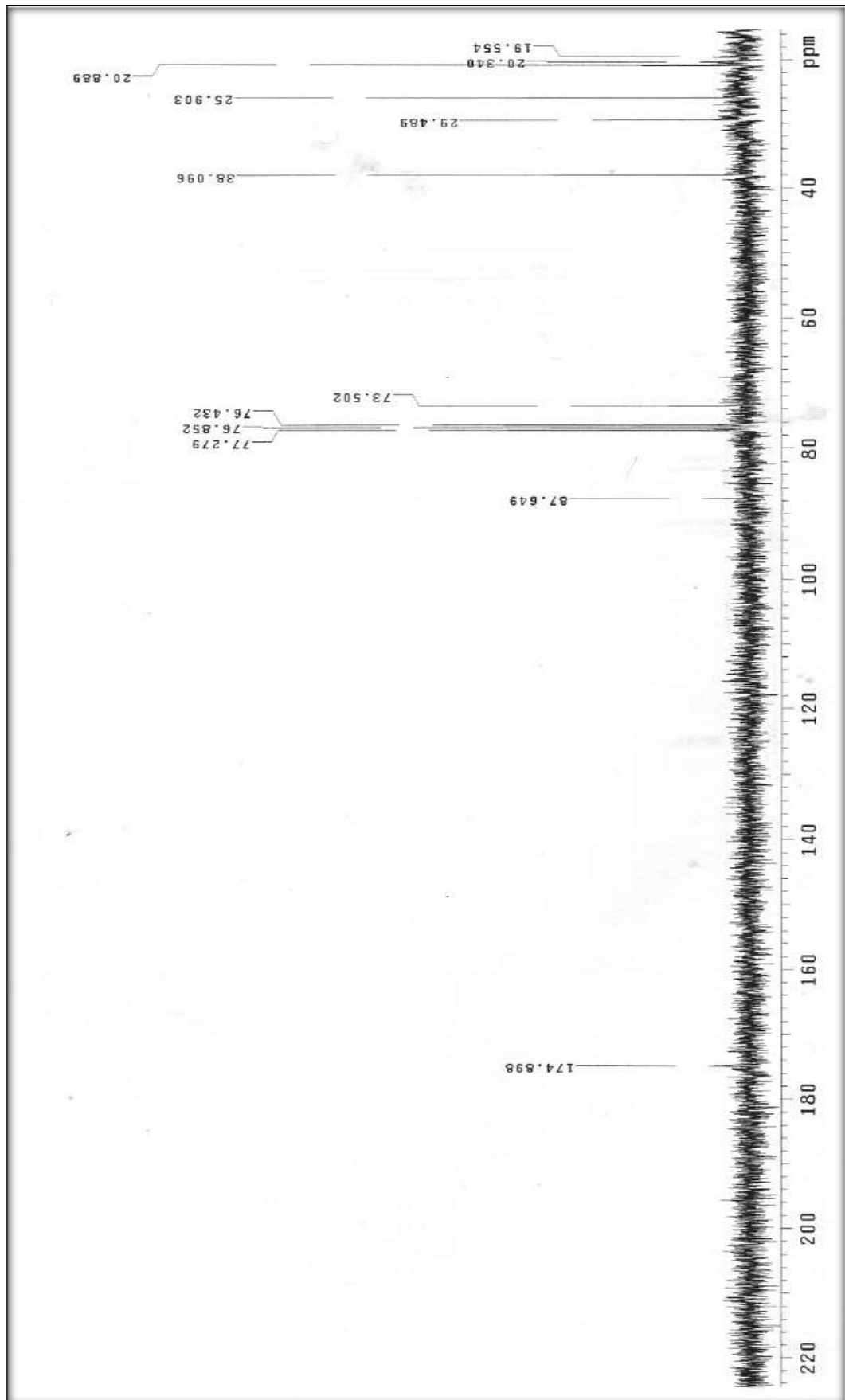


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB03**.

4.1.4 Elucidação estrutural das substâncias **CB04** e **CB05**

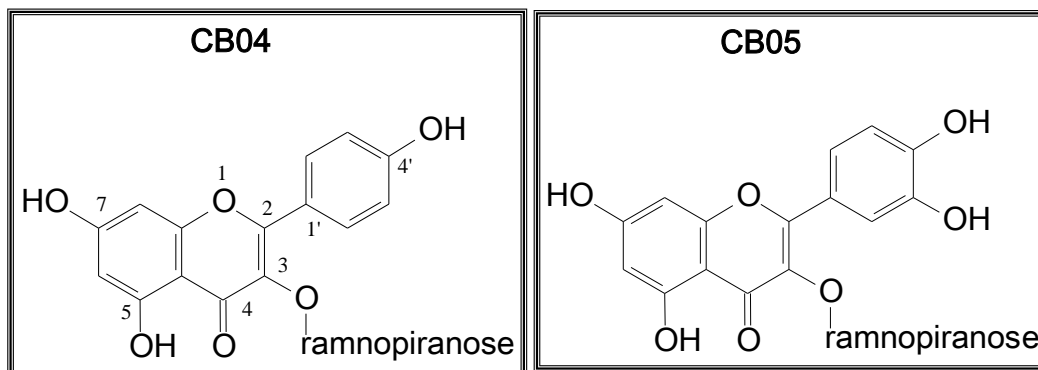


Figura 38. Estrutura da substância **CB04** e **CB05**.

A determinação estrutural das substâncias **CB04** e **CB05**, isoladas da fase em acetato de etila das folhas de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , figuras 39 a 44, e por comparação dos dados com os descritos na literatura (KING, 1950), (HARBONE, 1982), (SOLTIS, 1982), (ROSS, 1984), (CHEN, 2008).

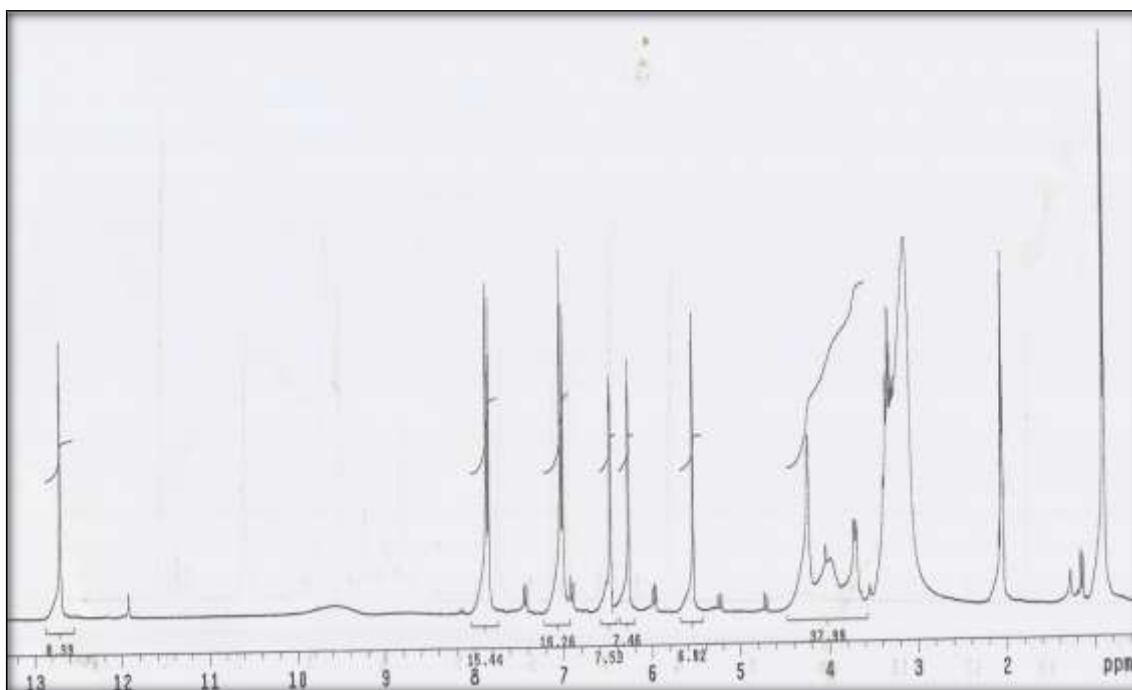


Figura 39. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB04**.

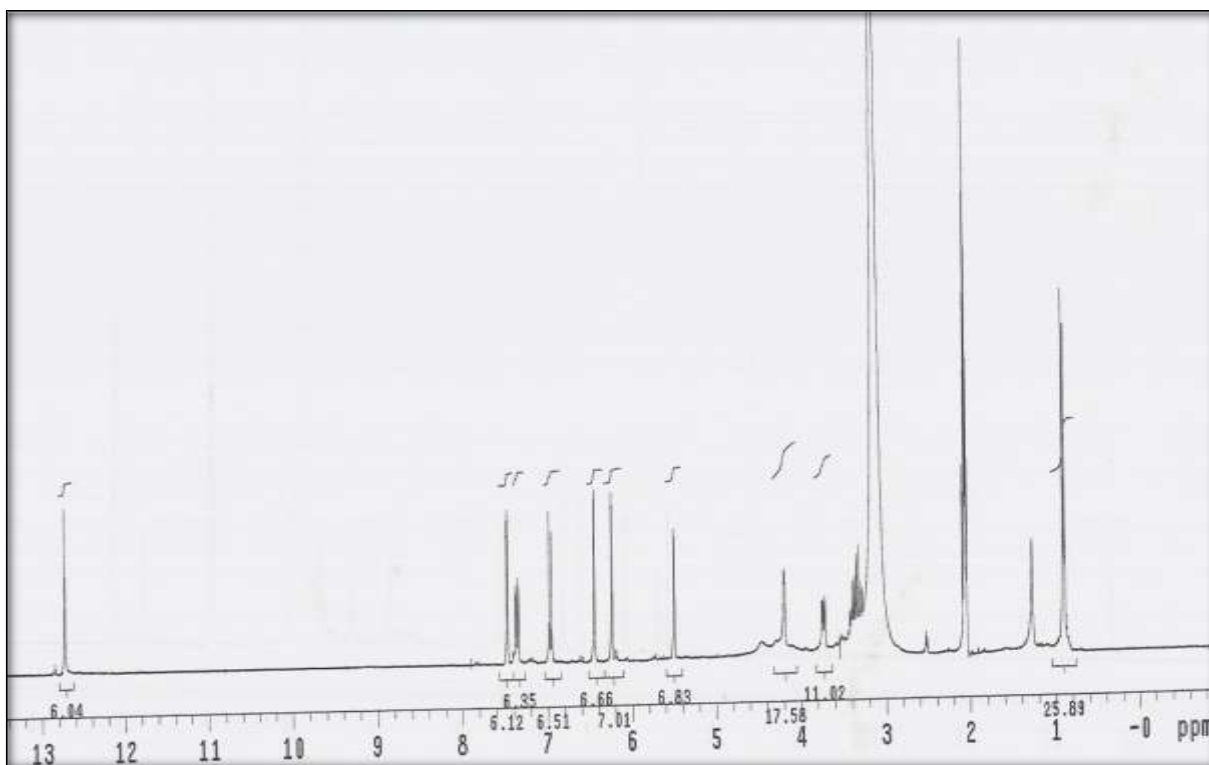


Figura 40. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB05**.

As substâncias **CB04** e **CB05** apresentaram algumas similaridades em seus espectros de RMN ^1H , fig. 39 a 42. Inicialmente, observou-se no espectro de RMN ^1H da substância **CB04** dois dubletos na região característica de hidrogênios aromáticos, um em δ_{H} 6,27 e outro em δ_{H} 6,47, cada um com uma integração correspondente a um átomo de hidrogênio e apresentando constante de acoplamento de 1,5 Hz, característico de hidrogênios com acoplamento *meta*. Analogamente, o espectro de RMN ^1H da substância **CB05** apresentou dois dubletos nessa mesma região, um em δ_{H} 6,24 e outro em δ_{H} 6,45, cada um com uma integração correspondente a um átomo de hidrogênio e apresentando constante de acoplamento de 1,8 Hz. Esses conjuntos de sinais sugerem fortemente a presença de um anel aromático 1,2,3,5 tetrasubstituído, compatível com o anel A dos flavonóides.

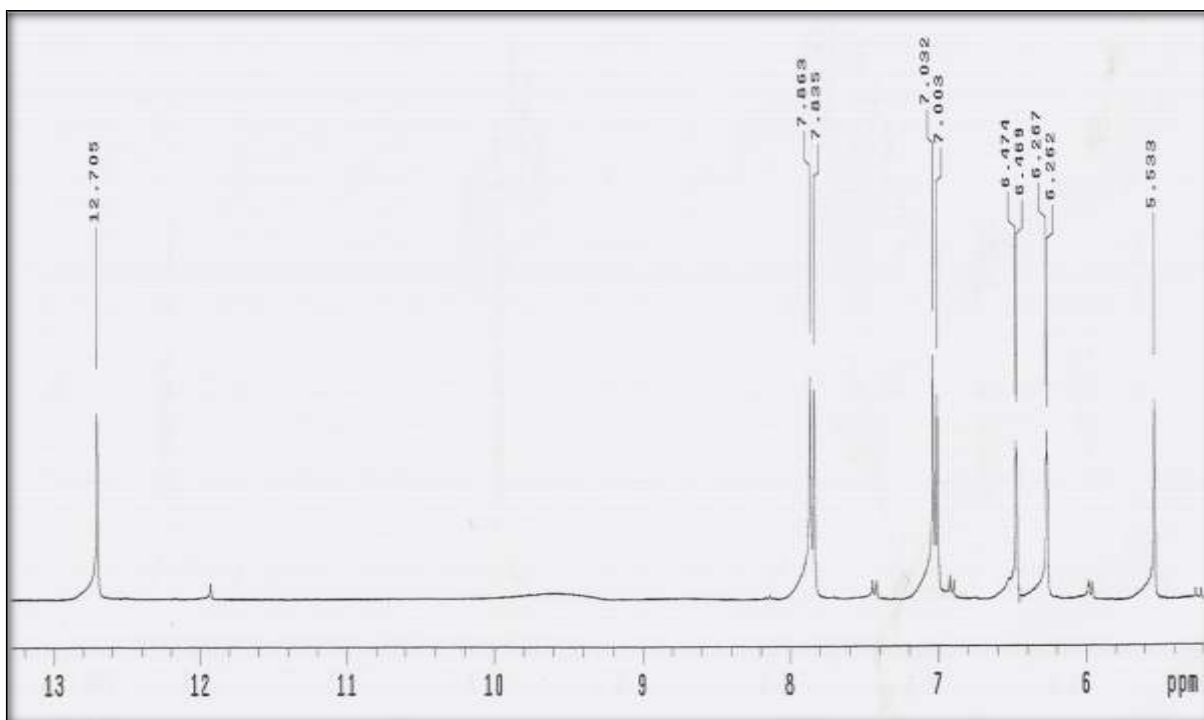


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB04**, região entre 5,0 e 13,0 ppm.

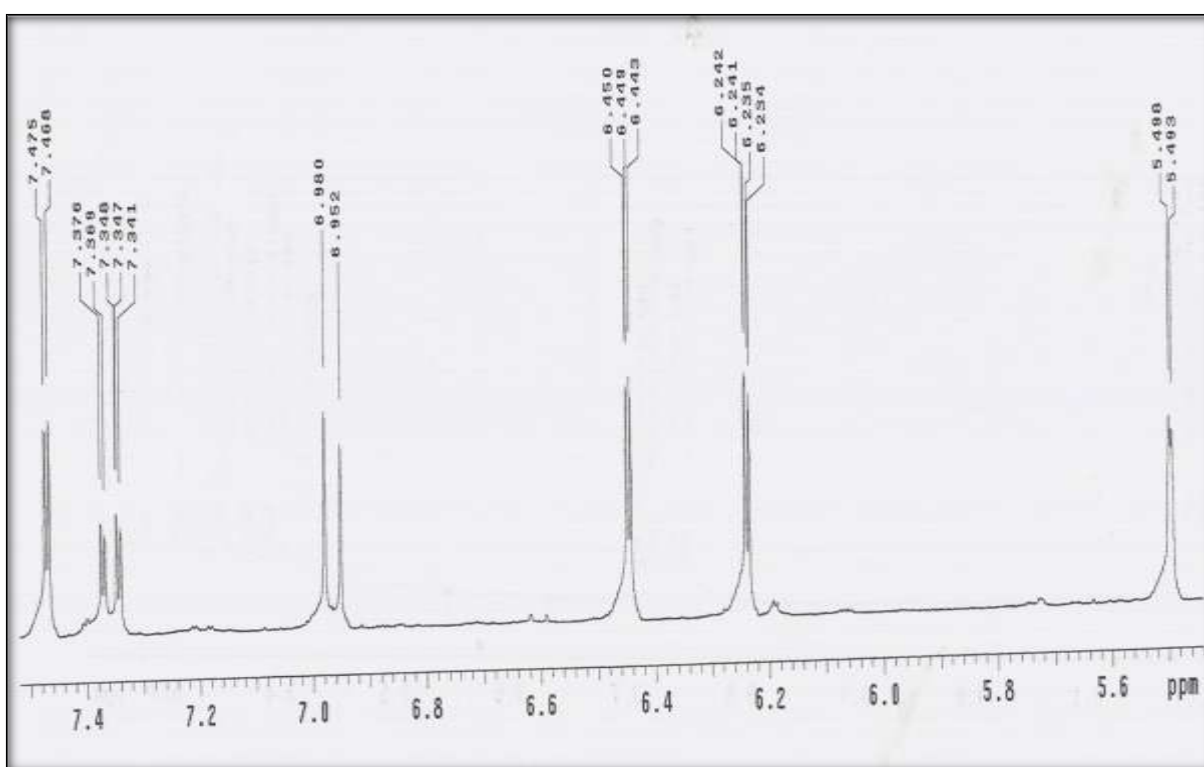


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB05**, região entre 5,4 e 7,5 ppm.

Observou-se ainda no espectro de RMN ^1H de ambas as substâncias um dubleto em δ_{H} 0,89, com constante de acoplamento de 5,7 Hz e outro em δ_{H} 3,72, com constante de acoplamento de 2,4 Hz. Em flavonóides esses sinais são um forte indicativo da presença de um resíduo de carboidrato ligado ao flavonóide, fig. 43 e 44.

A distinção nos espectros das substâncias **CB04** e **CB05** surge quando se analisa o conjunto de sinais pertencentes ao anel B dos flavonóides. No espectro de RMN ^1H da substância **CB04**, fig. 41, observa-se dois dubletos, um em δ_{H} 7,28 (d, 1H, 8,4 Hz) e outro em δ_{H} 7,00 (d, 1H, 8,4 Hz), os quais possuem constante de acoplamento característico de hidrogênio com acoplamento em *orto*, sugerindo a presença de um anel 1,4-dissubstituído. No espectro de RMN ^1H da substância **CB05**, fig. 42, observa-se dois dubletos, um em δ_{H} 6,99 (d, 1H, 8,4 Hz) e outro em δ_{H} 7,82 (d, 1H, 1,5 Hz), o primeiro com constante característica de acoplamento em *orto* e o segundo com acoplamento em *meta*, além de um duplo dubleto em δ_{H} 7,38 (dd, 1H, 1,5 e 8,4 Hz) com constantes que sugerem que os três sinais estão relacionados entre si, sugerindo a presença de um anel do tipo 1,2,4-trissubstituído.

Os dados de RMN ^{13}C da substância **CB04** (tabela 09, p.66) indicaram a presença de seis carbonos aromáticos não hidrogenados, sendo três deles ligados a átomos de oxigênio em δ_{C} 160,3, δ_{C} 162,4 e δ_{C} 165,6 e a presença de quatro sinais de carbonos aromáticos hidrogenados, sendo dois deles, aqueles em δ_{C} 115,6 e δ_{C} 130,9, correspondentes a dois carbonos metínicos cada um, confirmando a presença de um anel 1,4-dissubstituído. O sinal em δ_{C} 178,4 sugeriu a presença de uma carbonílica de cetona α,β -insaturada. Na porção alifática do espectro encontramos sinais em δ_{C} 101,9 (CH), δ_{C} 72,3 (C), δ_{C} 71,4 (CH), δ_{C} 70,8 (CH), δ_{C} 70,6 (CH) e δ_{C} 17,1 (CH₃), confirmando a presença de um resíduo de açúcar na estrutura.

Os dados de RMN ^{13}C da substância **CB05** (tabela 09, p.66) indicaram a presença de sete carbonos aromáticos não hidrogenados, sendo quatro deles ligados a átomos de oxigênio em δ_{C} 145,9, δ_{C} 149,2, δ_{C} 162,4 e δ_{C} 165,2 e a presença de cinco sinais de carbonos aromáticos hidrogenados. O sinal em δ_{C} 178,7 sugeriu a presença de um grupo carbonílico na estrutura. Na porção

alifática do espectro encontramos sinais em δ_c 102,4 (CH), δ_c 72,3 (C), δ_c 71,2 (CH), δ_c 70,9 (CH), δ_c 70,6 (CH) e δ_c 17,8 (CH₃), confirmando a presença de um resíduo de açúcar na estrutura.

Harbone traz os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono de alguns resíduos de monossacarídeos comumente encontrados em flavonóides. Comparado os dados das substâncias **CB04** e **CB05** com os descritos na literatura (HARBONE, 1982) confirmou-se a presença de resíduo de ramnose, na forma cíclica piranose, também chamado de 6-desoxi-L-manose, nas substâncias **CB04** e **CB05**, tabela 08.

Tabela 08. Dados de RMN ¹³C [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] dos resíduos de ramnose das substâncias **CB04** e **CB05**.

Posição	δ_c (CB04)	δ_c (CB05)	δ_c * (quer-3-O-ram)
1''	101,94	102,43	101,9
2''	70,59	70,94	70,4
3''	70,76	71,15	70,6
4''	71,41	71,55	71,5
5''	72,27	72,32	70,1
6''	17,05	17,77	17,3

*Harbone, J.B.; Mabry, T.J.: The flavonoids: Advances in Research, Editora Chapman and Hall: New York, 1982.

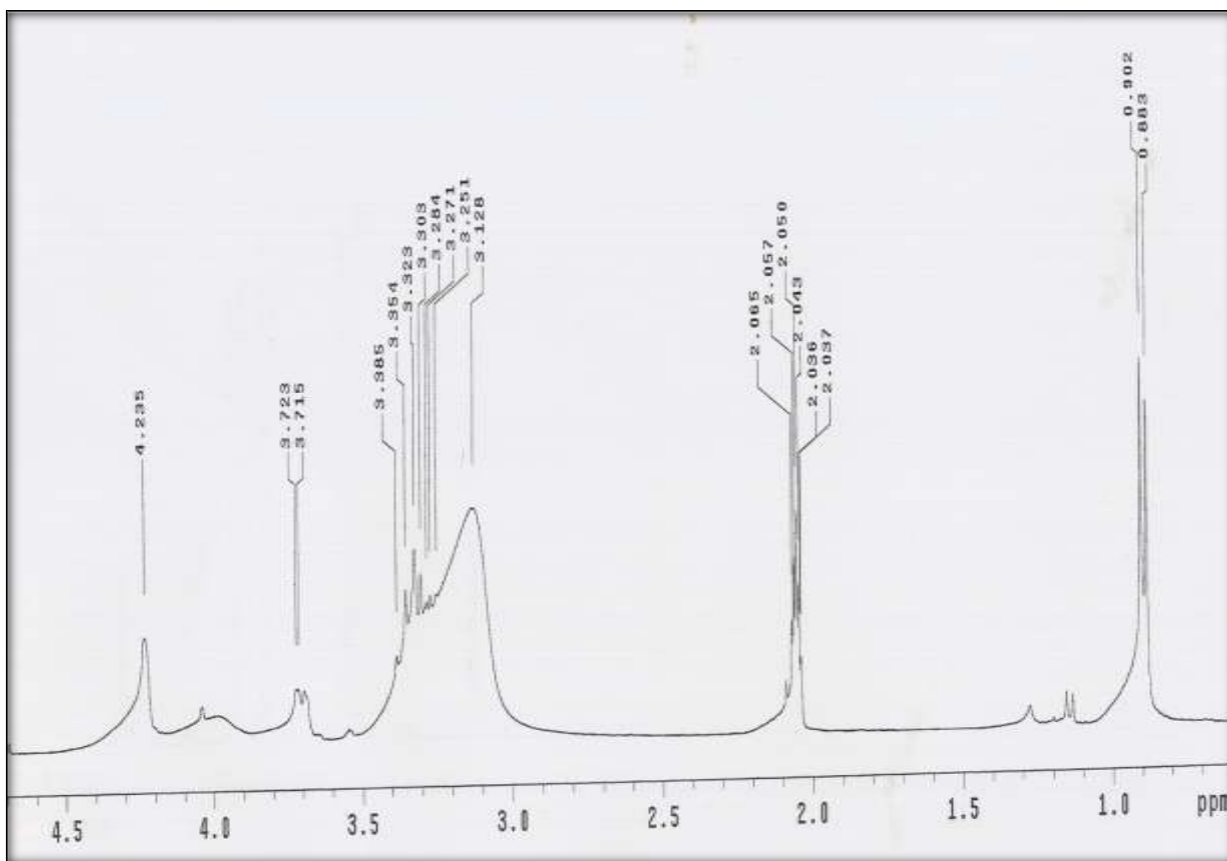


Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB04**, região entre 0,5 e 4,5 ppm.

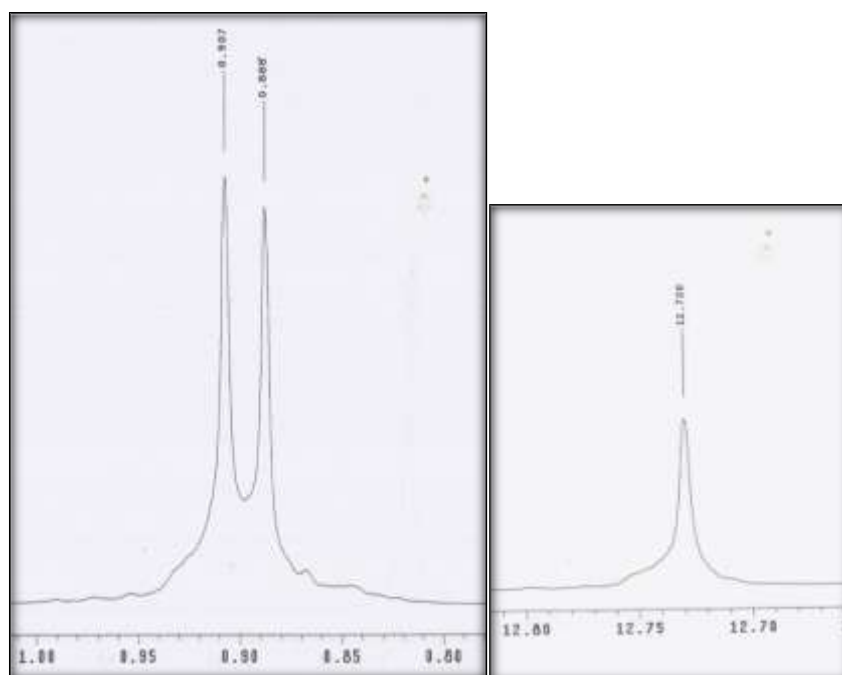


Figura 44. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB05**, região entre 0,75-1,0 ppm e 12,60-12,80 ppm.

Tabela 09. Dados de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] e RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] das substâncias **CB04** e **CB05**.

Posição	CB04 (R = H)		CB05 (R = OH)		RMN ^{13}C * (quer-3-O-ram)
	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN ^1H	RMN ^{13}C	
2	-	157,4	-	158,0	157,5
3	-	134,9	-	135,1	134,6
4	-	178,4	-	178,7	178,0
5	-	162,4	-	162,4	161,6
6	6,27 (d, 1H, 1,5 Hz)	99,2	6,24 (d, 1H, 1,5 Hz)	99,3	99,0
7	-	165,6	-	165,2	164,4
8	6,47 (d, 1H, 1,5 Hz)	94,0	6,45 (d, 1H, 1,5 Hz)	94,2	93,9
9	-	157,5	-	157,4	156,7
10	-	104,6	-	104,9	104,5
1'	-	121,7	-	121,8	121,4
2'	7,28 (d, 1H, 8,4 Hz)	130,9	7,82 (d, 1H, 1,5 Hz)	116,1	116,1
3'	7,00 (d, 1H, 8,4 Hz)	115,6	-	145,9	145,4
4'	-	160,3	-	149,2	148,7
5'	7,00 (d, 1H, 8,4 Hz)	115,6	6,99 (d, 1H, 8,4 Hz)	116,1	115,9
6'	7,28 (d, 1H, 8,4 Hz)	130,9	7,38 (dd, 1H, 1,5 e 8,4 Hz)	131,2	121,2
1''	5,50 (d, 1H, 1,5 Hz)	101,9	5,50 (d, 1H, 1,5 Hz)	102,4	102,2
2''	4,20 (dd, 1H, 1,5 e 3,3 Hz)	70,6	4,20 (dd, 1H, 1,5 e 3,3 Hz)	70,9	70,4
3''	3,72 (d, 2,4 Hz)	70,8	3,72 (d, 2,4 Hz)	71,2	70,6
4''	3,2-3,4 (m)	71,4	3,2-3,4 (m)	71,6	71,5
5''	3,2-3,4 (m)	72,3	3,2-3,4 (m)	72,3	70,1
6''	0,87 (d, 3H, 5,7 Hz)	17,1	0,87 (d, 3H, 5,7 Hz)	17,8	17,3
5-OH	12,8	-	12,8	-	-

*Harbone, J.B.; Mabry, T.J.: The flavonoids: Advances in Research, Editora Chapman and Hall: New York, 1982.

Após comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C das substâncias **CB04** e **CB05** com os dados descritos na literatura [(King, F. E.; 1950), (Harbone, J.B.; 1982), (Soltis, D. E.; 1982), (Ross, S. A.; 1984), (Chen, Z.; 2008)] confirmou-se a identidade das substâncias como sendo a 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina e o 3-O- α -L-ramnopiranosilkaempferol. Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C das substâncias **CB04** e **CB05**, bem como a atribuição dos sinais são descritos na tabela 09.

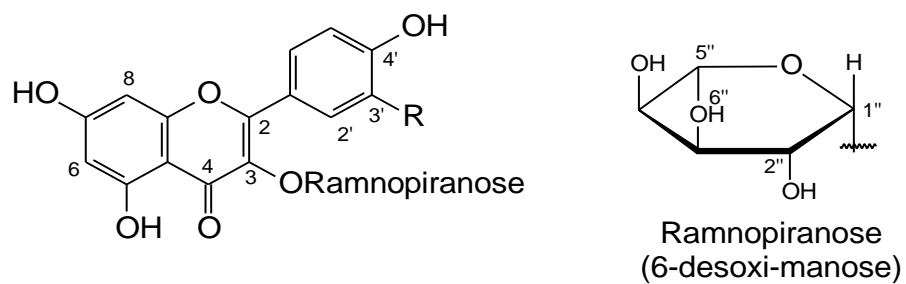


Figura 45. Estrutura das substâncias **CB04** (R = H) e **CB05** (R = OH).

4.1.5 Elucidação estrutural da substância **CB06**

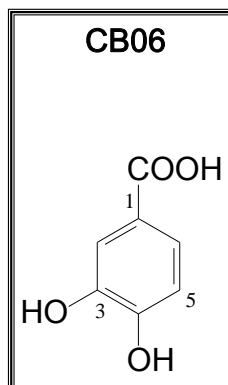


Figura 46. Estrutura da substância **CB06**.

A determinação estrutural da substância **CB06**, isolada da fase em acetato de etila do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da interpretação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , figuras 47 e 48 (p.70 e 71), e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (SCOTT, 1972), (TENG, 2005).

O espectro de RMN ^1H , fig. 47, apresentou dois dubletos, um em δ_{H} 6,89 (1H, $^4J = 2,1$ Hz, H-2) com constante característica de acoplamento em *meta*, e outro em δ_{H} 7,53 (1H, $^3J = 8,4$ Hz, H-5) com constante característica de acoplamento em *orto*. Apresentou ainda um duplo dubleto em δ_{H} 7,48 (1H, $^4J = 2,1$ e $^3J = 8,4$ Hz, H-6). Este conjunto de sinais e o padrão de acoplamento sugerem a presença de um anel do tipo 1,3,4 trissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C da substância **CB06**, fig. 48, apresentou sete sinais, dos quais seis na região característica de carbonos aromáticos, reforçando a proposta da presença de um anel aromático na estrutura. Desses, quatro foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, dos quais dois oxigenados, um em δ_{C} 145,5 (C-3) e outro em δ_{C} 150,7 (C-4) e um atribuído a um carbono carbonílico em δ_{C} 167,6.

O espectro de massas de baixa resolução da substância **CB06**, obtido por inserção direta a 70 eV, apresentou o pico do íon molecular em m/z 154 (82,8%) compatível com a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, confirmando a presença

de sete átomos de carbonos na estrutura. Apresentou também o pico base em m/z 137 (100%). Observou-se ainda um pico em m/z 109 (18,6%). A partir da análise do pico em m/z 137 (100%), perda de $\cdot\text{OH}$ (m/z 17), juntamente com a fórmula molecular proposta é possível inferir a presença de um grupo carboxílico. O pico em m/z 109,20 confirma a presença deste grupo.

Com base na análise do espectro de RMN ^1H , RMN ^{13}C e EM, bem como, na comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura, confirma-se a identidade da substância **CB06** como sendo o ácido 3,4-dihidroxibenzóico ou ácido protocatechuico. Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] e RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB06**.

Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN $^{13}\text{C}^*$
1	-	123,1	122,4
2	6,89 (d, 1H, $^4J = 2,1$ Hz)	115,6	117,5
3	-	145,5	145,3
4	-	150,7	150,8
5	7,53 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz)	117,4	115,7
6	7,48 (dd, 1H, $^4J = 2,1$ e $^3J = 8,4$ Hz)	123,6	123,9
1-COOH	-	167,6	169,4

*Scott, K. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 8564–8568.

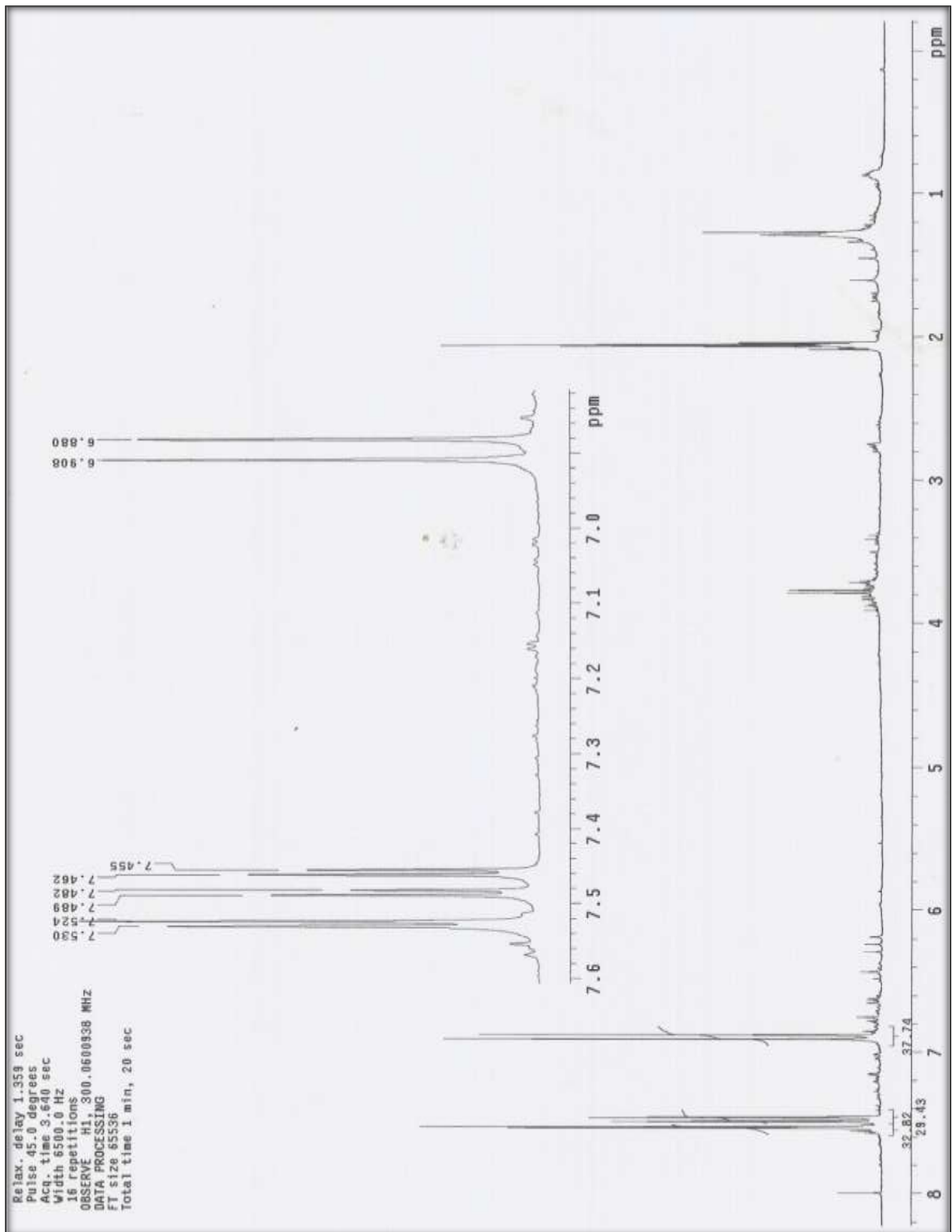


Figura 47. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB06**.

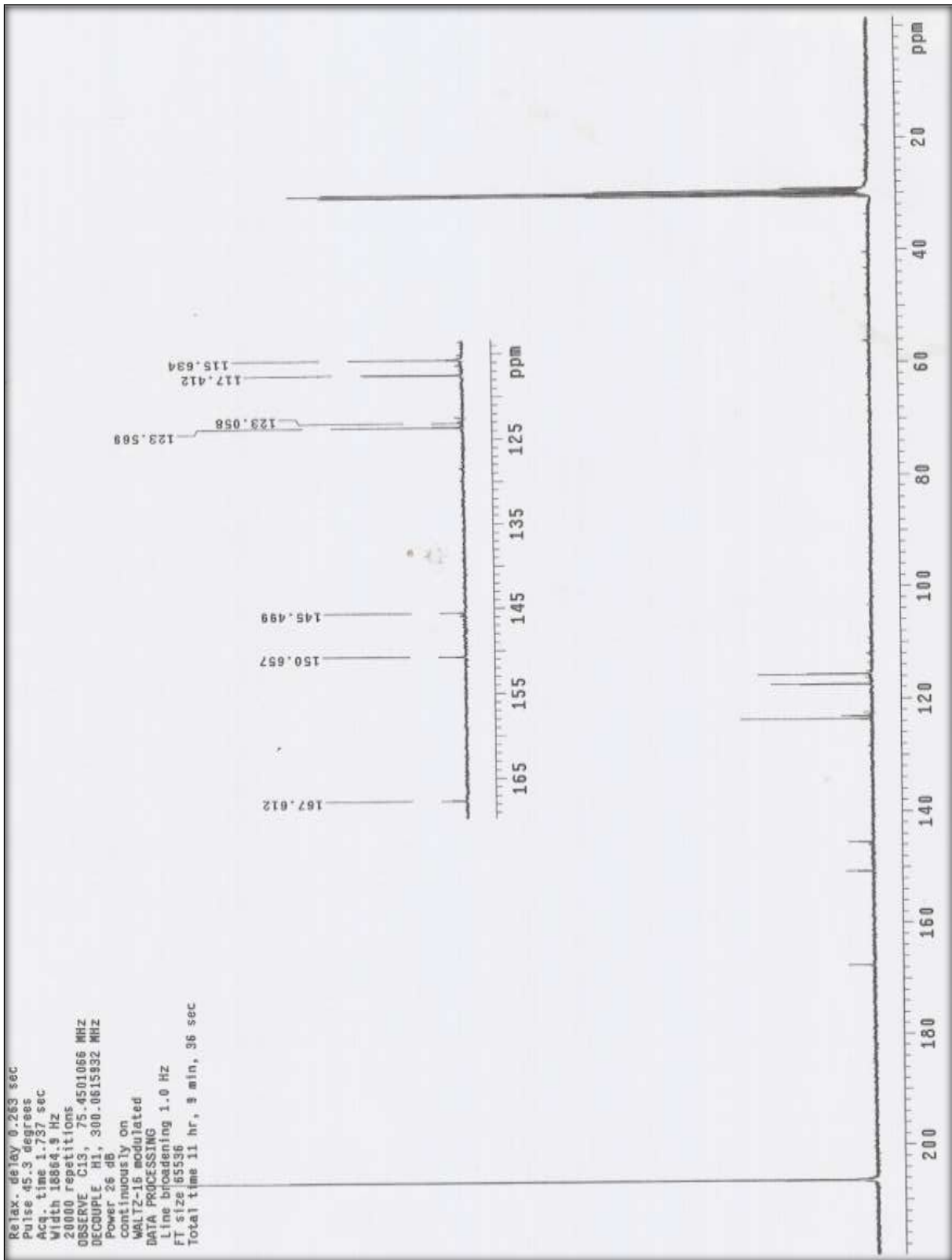


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB06**.

4.1.6 Elucidação estrutural da substância **CB07**

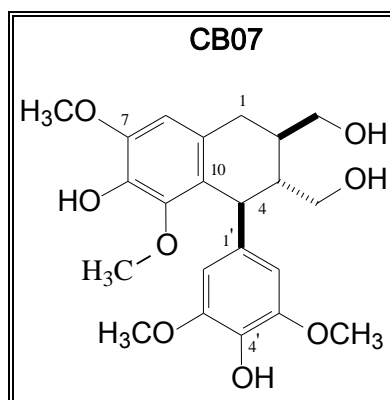


Figura 49. Estrutura da substância **CB07**.

A determinação estrutural da substância **CB07**, isolada da fase em acetato de etila do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da interpretação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , DEPT 135, NOEDIF, bem como, a partir da análise dos experimentos bidimensionais HMBC e HMQC, figuras 50 a 57, 64 e 65, além da comparação dos seus dados com os descritos na literatura (HANAWA, 1997), (KANCHANAPOOM, 2001), (KIM, 2002), (THONGPHASUK, 2004), (CHOI, 2009).

Os espectros de RMN ^1H da substância **CB07**, fig. 50 a 52, foram realizados em piridina e acetona deuteradas. O espectro de RMN ^1H realizado em piridina deuterada apresentou dois singletos na região característica de hidrogênios ligados a carbono aromático, sendo um deles em δ_{H} 6,80 (s, 1H, H-8) e o outro em δ_{H} 6,94 (s, 2H, H-21). A partir destes sinais foi possível sugerir duas possibilidades, primeiramente a presença de um anel 1,3,5-trissubstituído, ou então, a presença de dois anéis, um pentasubstituído e outro 1,3,4,5-tetrasubstituído. No espectro obtido em piridina observou-se um dubleto em δ_{H} 5,08 (d, 1H, H-4) com constante de acoplamento de 5,7 Hz, entretanto, este sinal estava sobreposto com o sinal da água residual. No espectro obtido em acetona deuterada o sinal foi deslocado para δ_{H} 4,27 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-4) e apresentou uma integração relativa a um átomo de hidrogênio. Apesar da presença do sinal na região típica de hidrogênios olefínicos essa possibilidade

foi descartada uma vez que como o sinal apresentava-se como um dubleto fazia-se necessário a presença no espectro do sinal relativo ao segundo hidrogênio olefínico que acoplasse com o sinal observado em δ_H 4,27, o que não foi verificado.

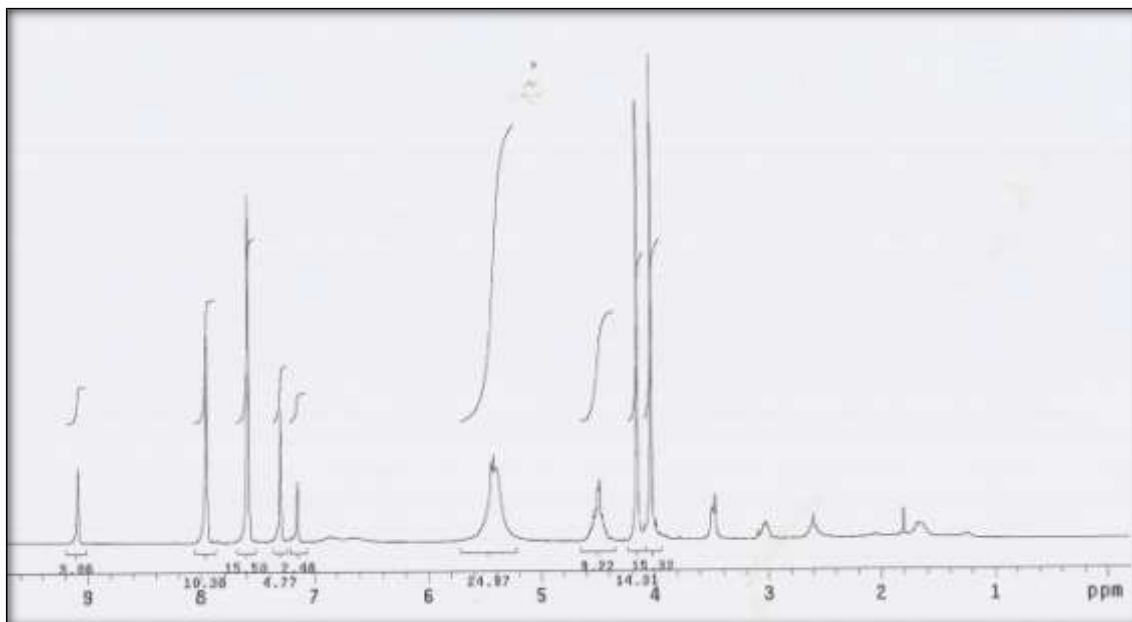


Figura 50. Espectro de RMN 1H [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância **CB07**.

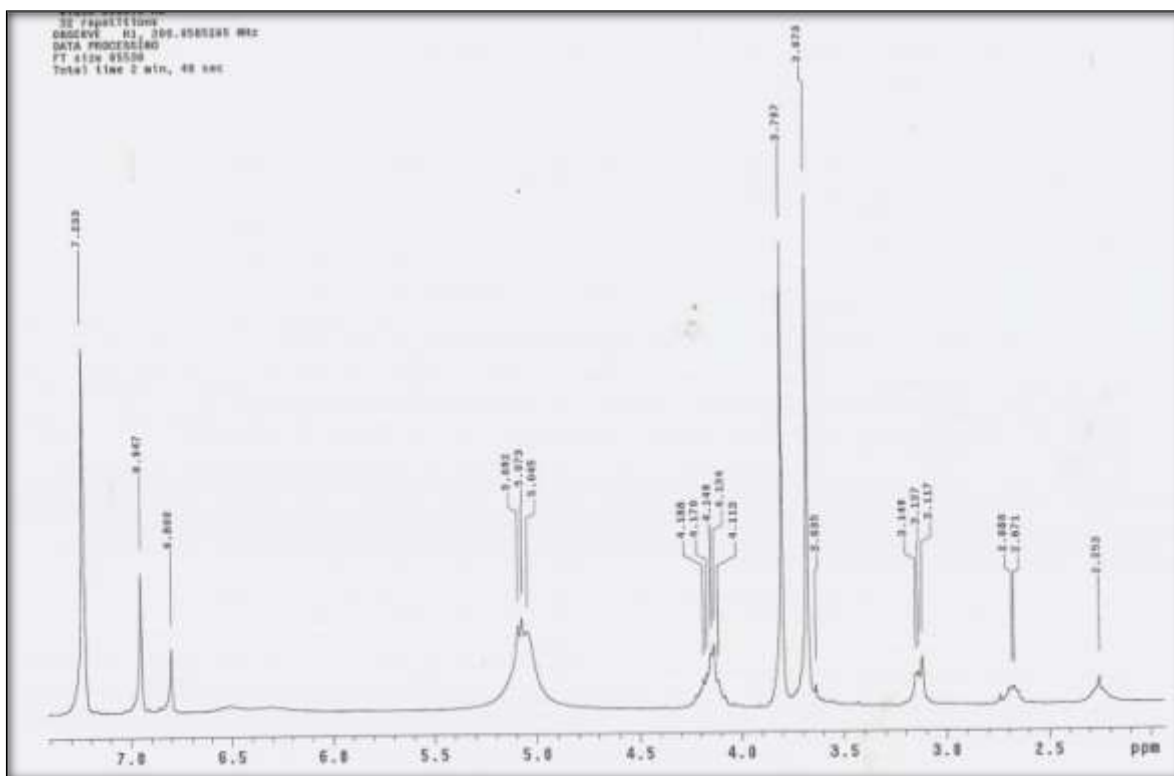


Figura 51. Expansão do espectro de RMN 1H [300 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 2,0 e 7,0 ppm.

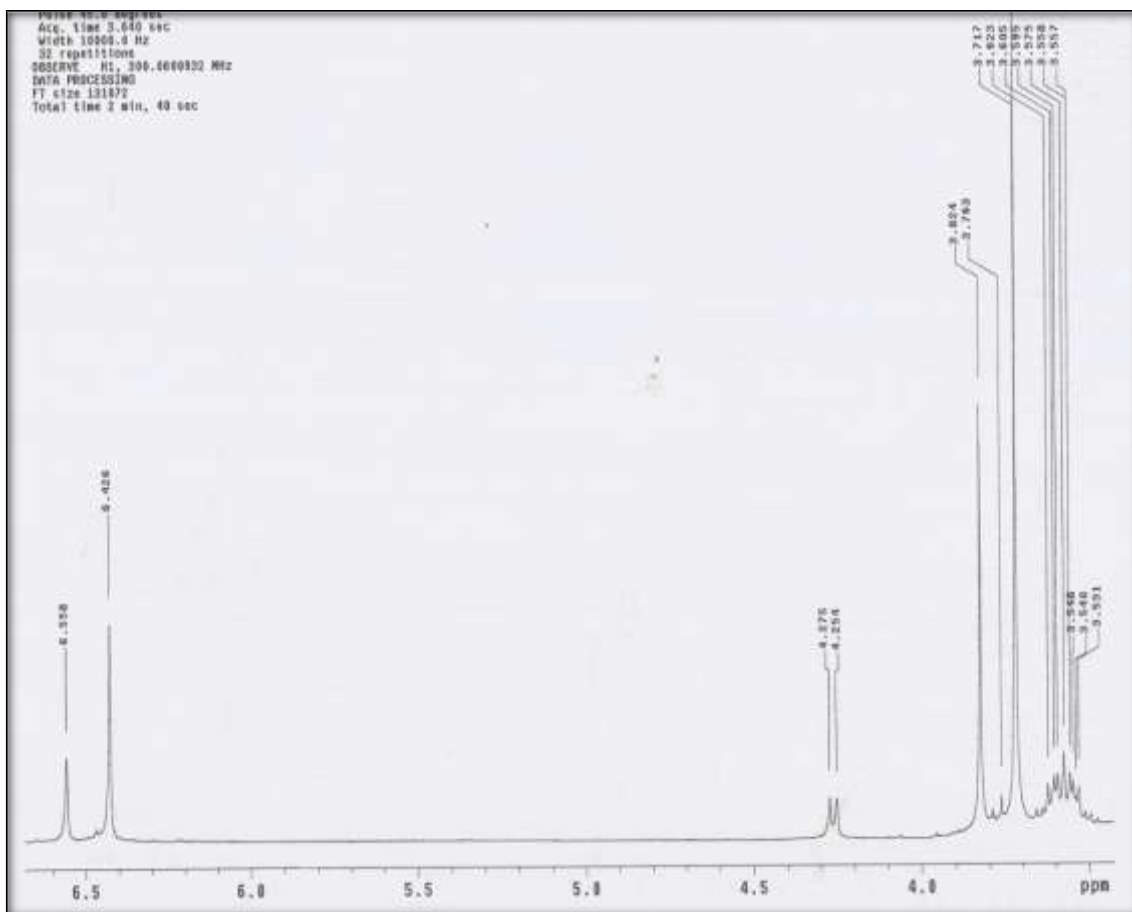


Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 3,5 e 6,5 ppm.

O espectro de RMN ^1H da substância **CB07** apresentou dois singletos um em δ_{H} 3,68 (3H, MeO-3') e outro em δ_{H} 3,80 (6H, MeO-5 e MeO-7), cada um com integração relativa a seis átomos de hidrogênio, sugerindo a presença de quatro grupamentos metoxílicos. Apresentou ainda sinais em δ_{H} 2,25 (m, 1H, H-2), δ_{H} 2,68 (m, 1H, H-3), δ_{H} 3,14 (m, 2H, H-1) e δ_{H} 4,15 (m, 4H, H-2a e H-3a).

O espectro de RMN ^{13}C da substância **CB07** apresentou 19 sinais, fig. 53 a 56, dos quais nove na região característica de carbonos sp^3 e dez na região de carbonos sp^2 . A partir da análise desses dados pode-se reforçar-se a hipótese da presença de dois anéis aromáticos, um pentasubstituído e outro 1,3,4,5-tetrasubstituído.

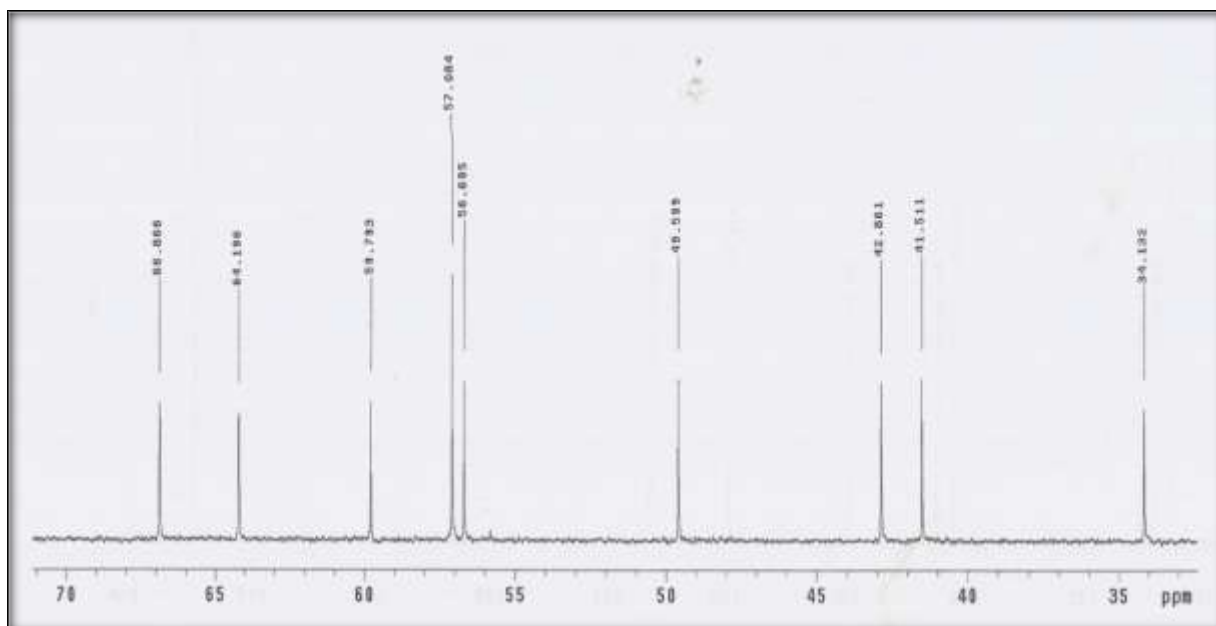


Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 33 e 70 ppm.

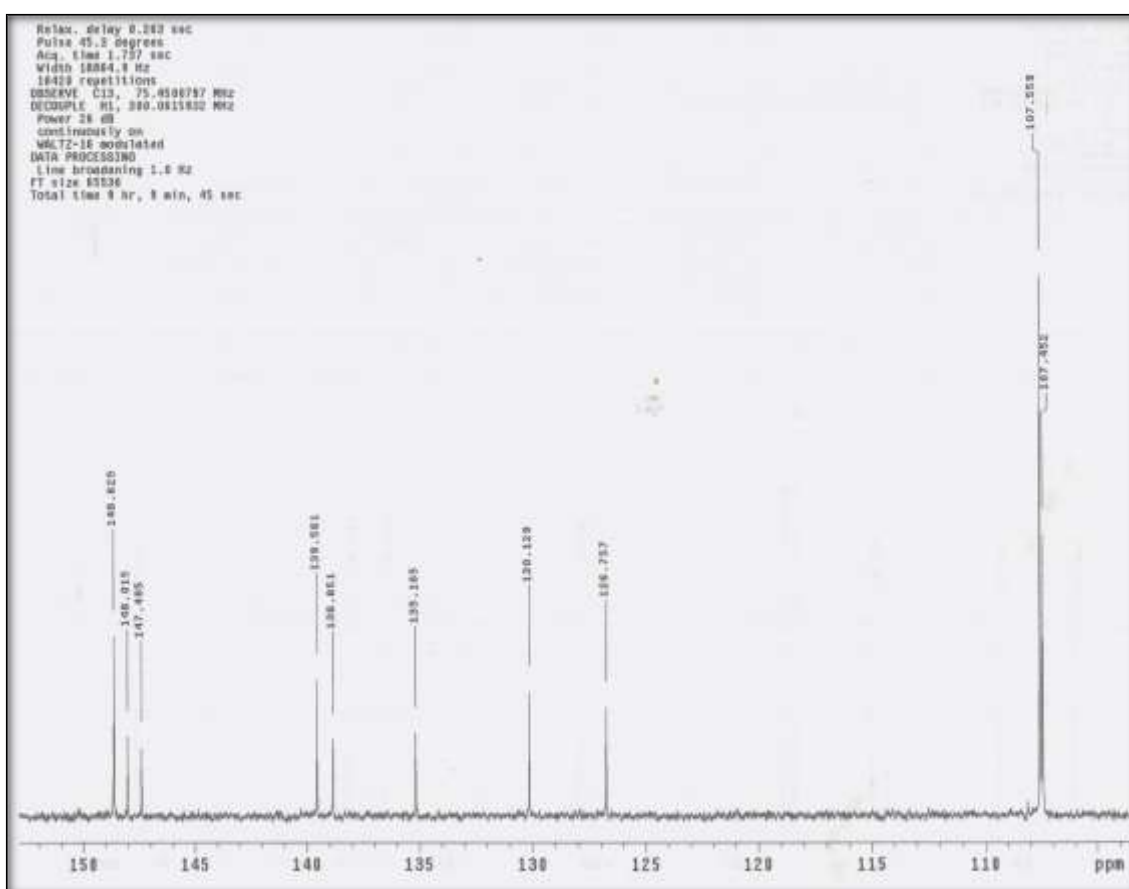


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 100 e 150 ppm.

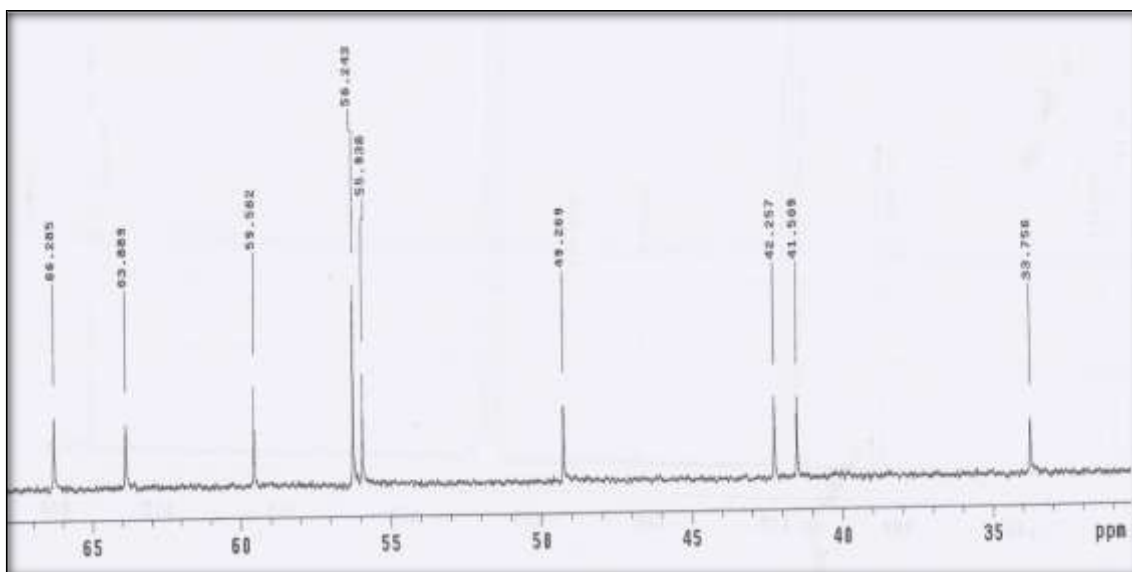


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 30 e 70 ppm.

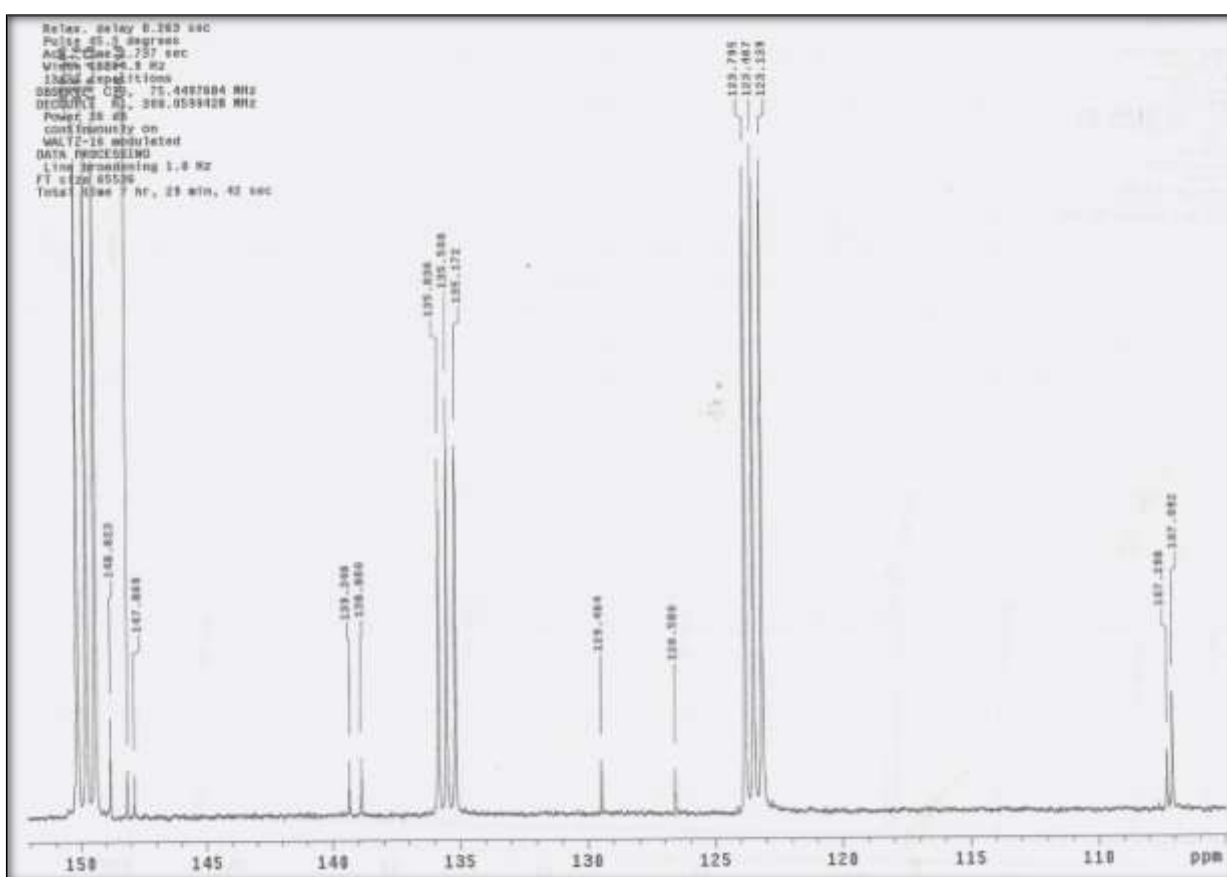


Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância **CB07**, região entre 100 e 150 ppm.

A partir do experimento DEPT 135, fig. 57, obteve-se informações a respeito da natureza dos sinais observados no espectro de RMN ^{13}C . Os sinais observados em δ_{C} 126,6 (C-10), δ_{C} 129,5 (C-9), δ_{C} 135,1 (C-4'), δ_{C} 138,9 (C-1'), δ_{C} 139,3 (C-6), δ_{C} 147,9 (C-5), δ_{C} 148,0 (C-7) e δ_{C} 148,8 (C-3') foram atribuídos a carbonos sp^2 aromáticos não-hidrogenados, sendo os cinco últimos sinais atribuídos a átomos de carbono ligados a oxigênio.

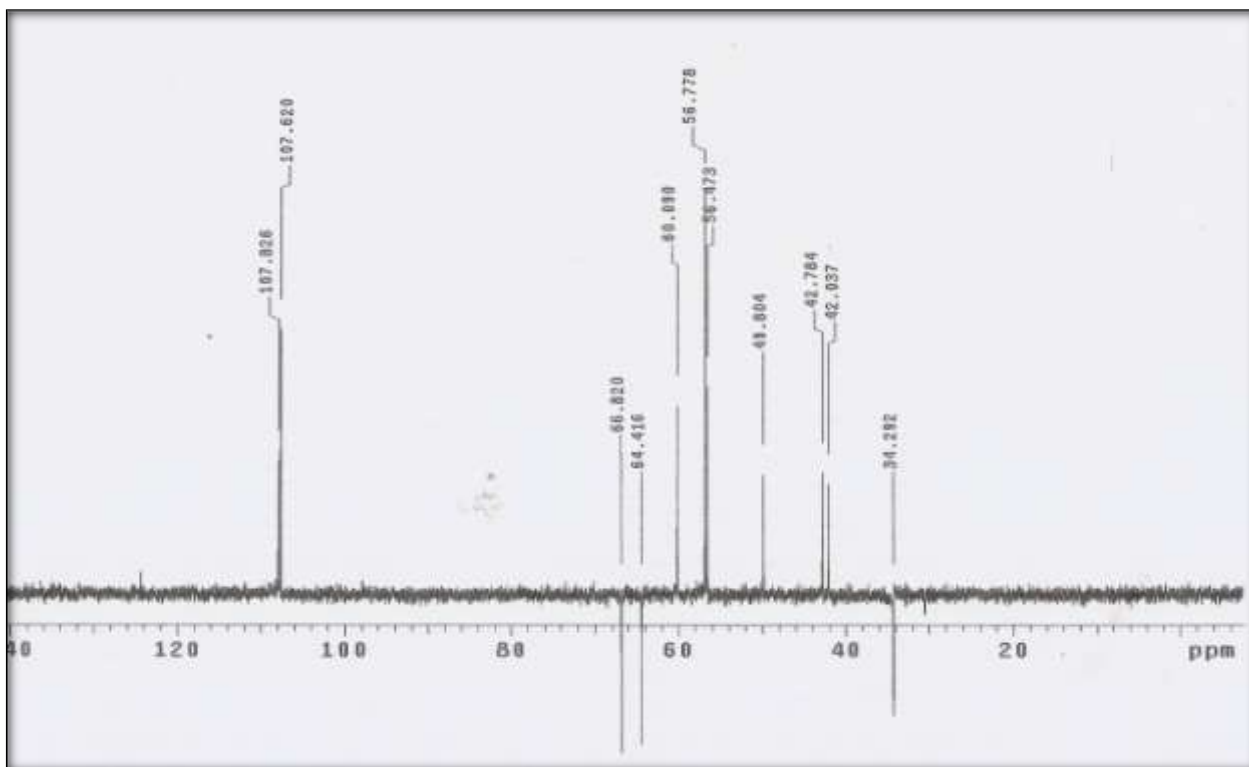


Figura 57. Espectro de DEPT 135 [piridina- d_5 , δ (ppm)] da substância **CB07**.

A construção do esqueleto da substância **CB07** iniciou-se a partir do hidrogênio em δ_{H} 5,08 (d, 5,7 Hz, 1H, H-4), uma vez que foi o átomo de hidrogênio que apresentou um maior número de correlações no espectro de HMBC, fig. 64. Segundo o espectro de HMQC, fig. 65, este átomo de hidrogênio encontra-se ligado ao átomo de carbono em δ_{C} 42,3. O sinal em δ_{H} 5,08 correlaciona-se com os sinais observados em δ_{C} 41,5 (CH), δ_{C} 49,3 (CH), δ_{C} 63,9 (CH_2), δ_{C} 107,1 (CH), δ_{C} 126,6 (C), δ_{C} 129,5 (C), δ_{C} 138,9 (C) e δ_{C} 147,9 (C).

A partir das correlações observadas pode-se sugerir a presença de dois anéis aromáticos, bem como, uma porção alifática na vizinhança do sinal em δ_{H}

5,08. Assim sendo sugere-se como vizinhança do sinal em δ_H 5,08 a estrutura parcial A, fig. 58.

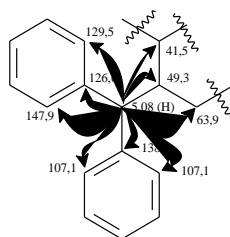


Figura 58. Estrutura parcial A.

Os singletos em δ_H 6,80 (s, 1H, H-8) e δ_H 6,94 (s, 2H, H-2') mostraram-se através do espectro de HMQC ligados aos carbonos cujos em δ_C 107,3 (C-8) e δ_C 107,1 (C-2'), respectivamente. A ausência de correlações entre os sinais em δ_H 6,80 (s, 1H) e δ_H 6,95 (s, 2H), bem como, o fato dos átomos não acoplarem entre si no espectro de RMN 1H sugere que os respectivos átomos encontram-se em anéis distintos. Sendo assim, pode-se concluir que o anel aromático que contém o átomo de hidrogênio em δ_H 6,80 (s, 1H, H-8) apresenta-se pentassubstituído, enquanto que o anel aromático que contém o átomo de hidrogênio com δ_H 6,94 (s, 2H, H-2') apresenta-se 1,3,4,5-tetrassubstituído permitindo assim propor, inicialmente, que os anéis estejam substituídos como mostrado na estrutura parcial B, fig. 59.

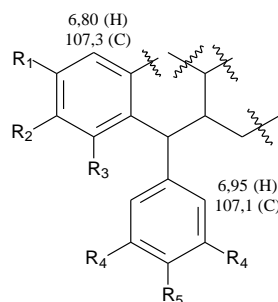


Figura 59. Estrutura parcial B.

O sinal em δ_H 4,15 (m, 4H, H-2a e H-3a) mostrou-se ligado aos átomos de carbono δ_C 63,9 (C-3a) e δ_C 66,3 (C-2a), e foram atribuídos aos átomos de hidrogênio metilênicos dos grupos $-CH_2OH$. Com base nesta informação e a partir da correlação observada no espectro de HMBC entre o átomo de hidrogênio com deslocamento δ_H 3,14 (m, 2H, H-1) e os átomos de carbono δ_C

107,3 (C-8), δ_C 126,6 (C-10) e δ_C 129,5 (C-9) pode-se construir o esqueleto da substância **CB07** como indicado na fig. 60.

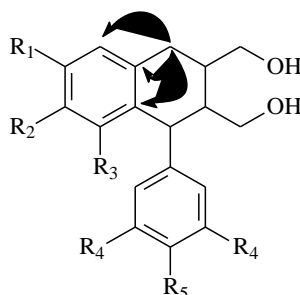


Figura 60. Estrutura parcial C.

A partir da construção deste esqueleto concluiu-se que a substância **CB07** trata-se de uma lignana do tipo ariltetralina oxigenada nos carbonos 9 e 9'. A origem biossintética dessa classe de metabólitos se dá pelo acoplamento radicalar de duas unidades fenil-propanoidicas (C6-C3), sendo geralmente as posições representadas pelos grupos R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 substituídas por grupos metoxílicos ou hidroxílicos.

O espectro de HMBC mostrou uma correlação entre o sinal em δ_H 3,68 e o sinal em δ_C 148,8 (C-3'), tal correlação permite concluir a qual átomo do anel aromático o grupo metoxílico está ligado. A partir da correlação observada entre o hidrogênio em δ_H 5,08 (H-4) e o carbono em δ_C 147,9 (C-5), da correlação entre o hidrogênio δ_H 3,80 (MeO-5 e MeO-7) e o átomo de carbono em δ_C 147,9 (C-5), bem como, entre o sinal em δ_H 3,68 e o sinal em δ_C 148,8 (C-3'), foi possível sugerir a estrutura representada na fig. 61, onde os R_1 e R_2 não puderam ser identificados, sendo um grupo metoxílico e outro um grupo hidroxílico.

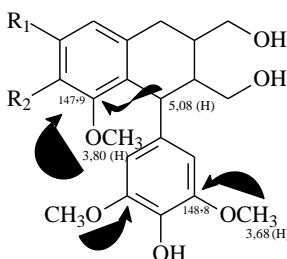


Figura 61. Correlações observadas no espectro de HMBC substância **CB07**.

Observou-se no espectro de NOEDIF da substância **CB07** que ao irradiar o hidrogênio δ_H 6,80 (H-8) houve um incremento no sinal relativo aos hidrogênios metoxílicos δ_H 3,80 (MeO-5 e MeO-7), fig. 62. Além disso, ao irradiarmos os hidrogênios metoxílicos δ_H 3,80 (MeO-5 e MeO-7) houve um incremento de sinais dos hidrogênios aromáticos δ_H 6,80 (H-8) e δ_H 6,94 (H-2').

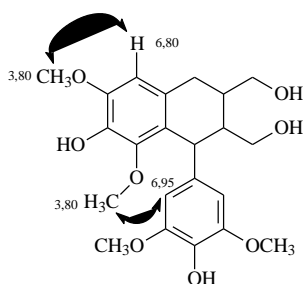


Figura 62. Correlações observadas no espectro de NOEDIF substância **CB07**

Após comparação dos dados de RMN 1H e RMN ^{13}C da substância **CB07** com os dados descritos na literatura (SHIBUYA, 1992) confirmou-se sua identidade como sendo o (+)-lioni-resinol fig 63. A estereoquímica da substância foi estabelecida comparando-se o valor de $[\alpha]_D^{25} +57,14$ ($1,75 \times 10^{-3}$ g.mL $^{-1}$, CHCl $_3$) com o descrito na literatura $[\alpha]_D^{25} +54,5$ (MeOH) (SHIBUYA, 1992).

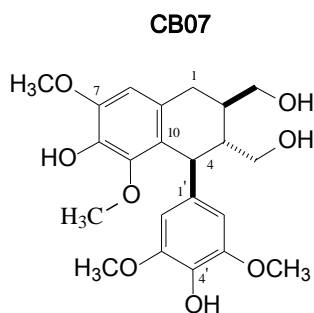


Figura 63. Estrutura da substância **CB07**.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **CB07** são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H [300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ (ppm)] e RMN ^{13}C [75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ (ppm)] da substância **CB07**.

Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C	RMN $^{13}\text{C}^{\text{a,b,c}}$	RMN HMBC	
				2J	3J
1	3,14 (m, 2H)	33,8	33,7	41,5; 129,5	49,3; 107,3; 126,6
2	2,25 (m, 1H)	41,5	40,6	-	-
2a	4,15 (m, 4H) ^d	66,3	65,4	-	-
3	2,68 (m, 1H)	49,3	46,1	-	-
3a	4,15 (m, 4H) ^d	63,9	71,1	-	-
4	5,08 (d, 1H, 5,7 Hz)	42,3	42,3	49,3; 126,6; 138,9; 147,9	41,5; 107,1
5	-	147,9	148,0	-	-
6	-	139,3	139,4	-	-
7	-	148,0	148,2	-	-
8	6,80 (s, 1H)	107,3	107,4	-	-
9	-	129,5	129,4	-	-
10	-	126,6	126,5	-	-
1'	-	138,9	138,6	-	-
2'	6,94 (s, 2H)	107,1	107,2	138,9; 148,8	42,3; 135,5
3'	-	148,8	148,9	-	-
4'	-	135,1 ^b	b	-	-
MeO-5	3,80 (s, 6H) ^d	59,6	59,6	-	-
MeO-7	3,80 (s, 6H) ^d	55,9	56,0	-	-
MeO-3'	3,68 (s, 6H)	56,2	56,4	148,8	-

^aScott, K. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 8564–8568. ^bValor coincide com o deslocamento do carbono da piridina em δ 135,0.

^cDerivado 3a-O-glicosilado. ^dDeslocamentos coincidentes.

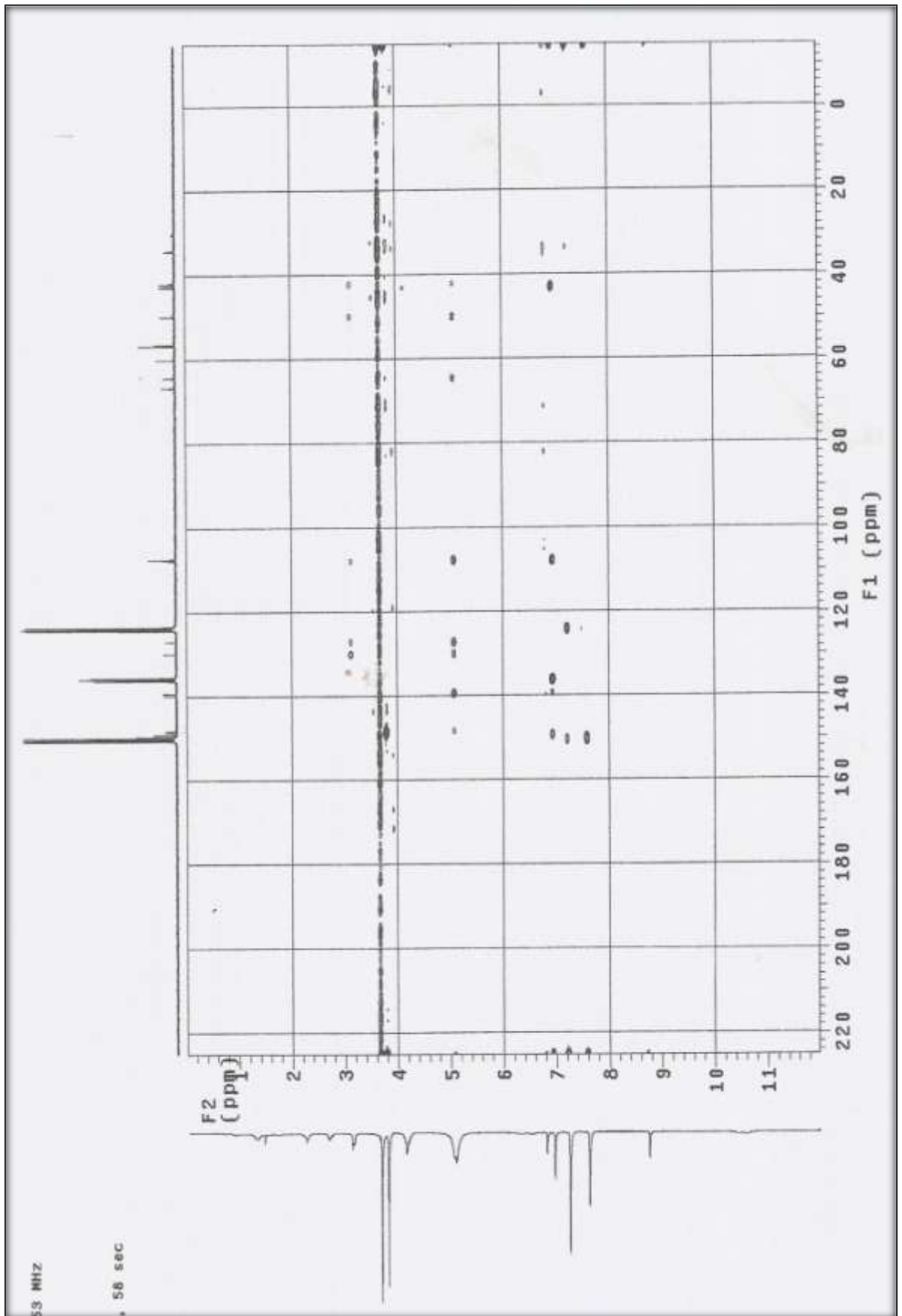


Figura 64. Espectro de HMBC [piridina-d₅, $J = 9$ Hz] da substância **CB07**.

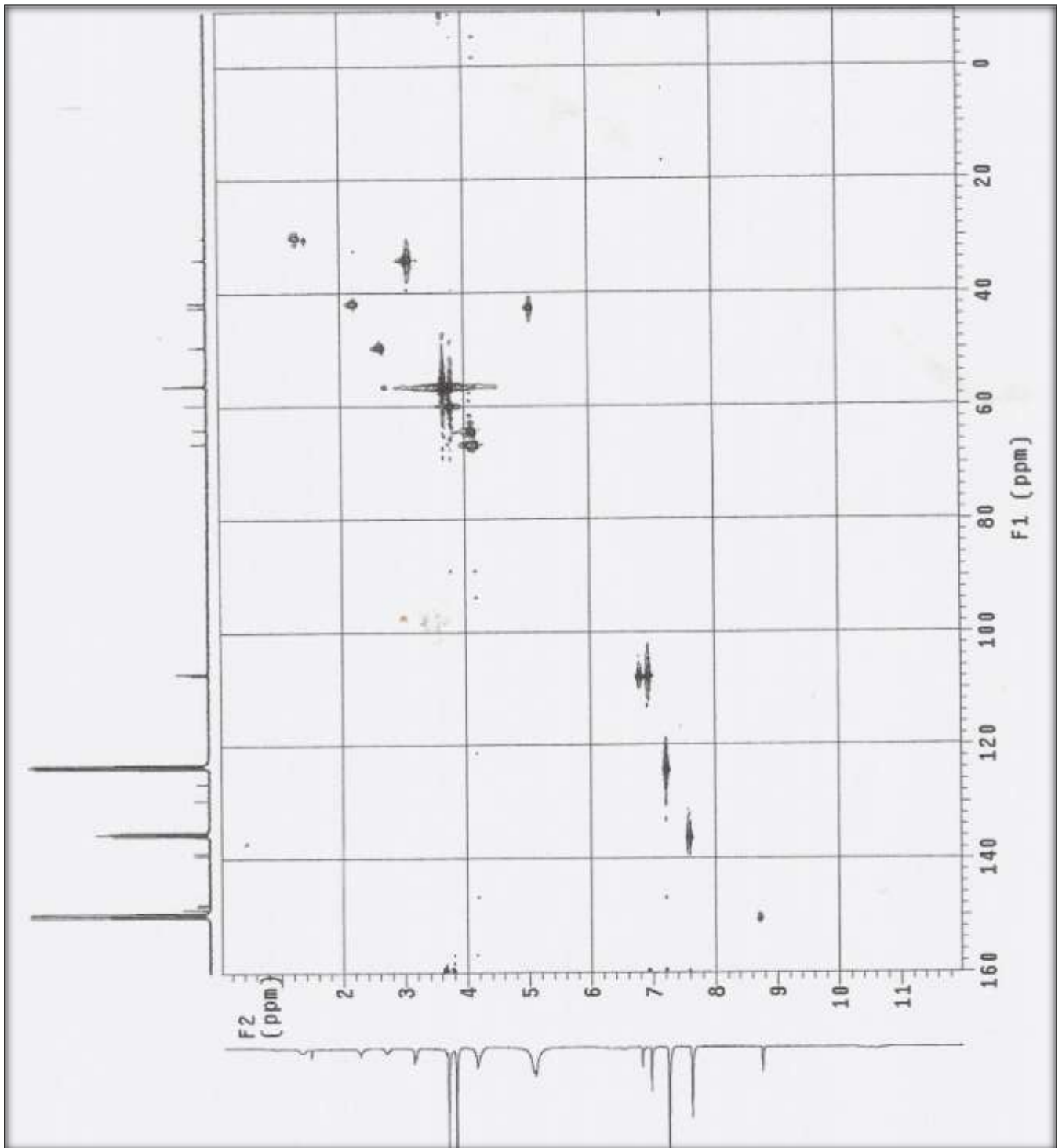


Figura 65. Espectro de HMQC [piridina-d₅, $J = 140$ Hz] da substância **CB07**.

4.1.7 Elucidação estrutural da substância **CB08**

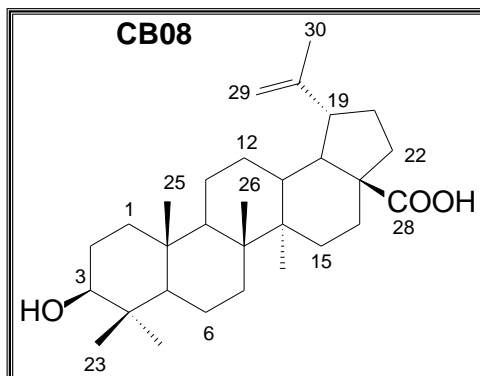


Figura 66. Estrutura da substância **CB08**.

A determinação estrutural da substância **CB08**, isolada da fase em acetato de etila do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C , fig. 67 a 72, e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (DJERASSI, 1954), (DJERASSI, 1955), (DJERASSI, 1956), (CHE, 1980), (GUNASEKERA, 1983), (PATRA, 1988), (PENG, 1998).

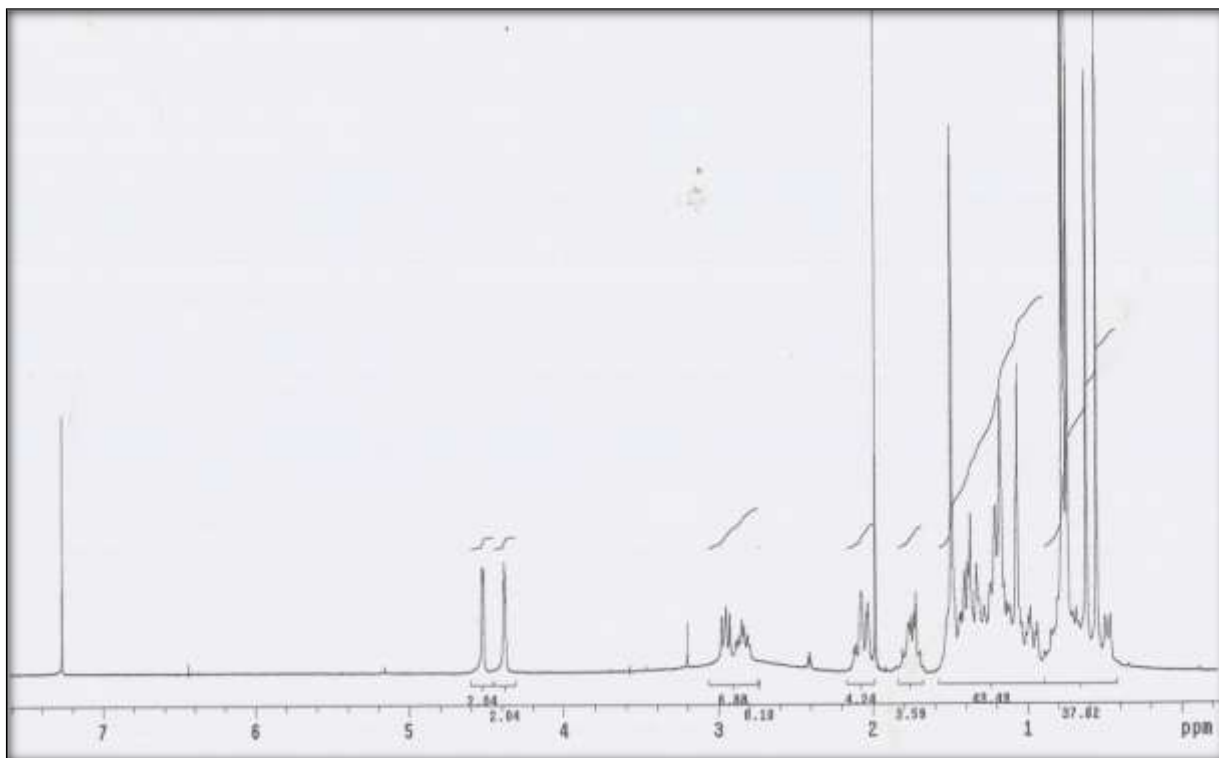


Figura 67. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB08**.

O espectro de RMN ^1H da substância **CB08**, fig. 67, realizado em clorofórmio deuterado, apresentou um conjunto de sinais entre δ_{H} 0,40 e δ_{H} 3,03, sendo tal região característica de grupamentos metílicos, metilênicos e metínicos. Apresentou ainda dois sinais em δ_{H} 4,38 e δ_{H} 4,52 o que sugere a presença de hidrogênios olefínicos.

O espectro de RMN ^1H , fig. 68, apresentou seis singletos característicos de grupamentos metílicos em δ_{H} 0,55, δ_{H} 0,62, δ_{H} 0,74, δ_{H} 0,76, δ_{H} 0,78 e δ_{H} 1,49. O espectro de RMN ^{13}C da substância **CB08**, fig. 70, realizado em clorofórmio deuterado, apresentou um conjunto de 30 sinais, a partir destes dados foi possível inferir que a substância **CB08** se tratar de um triterpeno (TEIXEIRA, 1999), (FERRAZ, 2005), (TEIXEIRA, 2006). Os sinais observados em δ_{C} 14,8 (CH_3), δ_{C} 15,8 (CH_3), δ_{C} 16,1 (CH_3), δ_{C} 16,3 (CH_3), δ_{C} 19,5 (CH_3) e δ_{C} 28,2 (CH_3) confirmam a presença de seis grupos metílicos na substância **CB08**. Foram observados dois sinais relativos a átomos de carbono olefínicos em δ_{C} 109,5 (CH_2) e em δ_{C} 150,8 (C) e um sinal em δ_{C} 178,4 (C), atribuído a um carbono carbonílico, fig. 70 a 72.

Tabela 12. Dados de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB08**.

Posição	δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Posição	δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$
1	38,9	39,3	16	32,4	32,9
2	27,5	28,3	17	56,1	56,6
3	78,2	78,1	18	49,2	49,8
4	39,0	39,5	19	46,9	47,8
5	55,4	56,0	20	150,8	151,3
6	18,4	18,8	21	30,7	31,2
7	34,4	34,9	22	37,2	37,6
8	40,8	41,1	23	28,2	26,1
9	50,6	51,1	24	15,8	16,3
10	37,1	37,5	25	16,1	16,4
11	20,9	21,2	26	16,3	16,4
12	25,6	26,1	27	14,8	14,9
13	38,2	38,6	28	178,4	178,8
14	42,5	42,9	29	109,5	109,9
15	29,8	30,3	30	19,5	19,5

^a Peng, C.; Bodenhausen, G.; Qiu, S.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Yuan, S.; Zheng, C.: *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, 267-278.

^b Espectro obtido em piridina deuterada.

A partir da comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C com os dados descritos na literatura e, juntamente com o histórico de substâncias comumente isoladas no gênero *Clusia* foi possível identificar o triterpeno **CB08** como sendo o ácido 3- β -hidroxilup-20(29)-em-28-óico, também chamado de ácido betulínico.

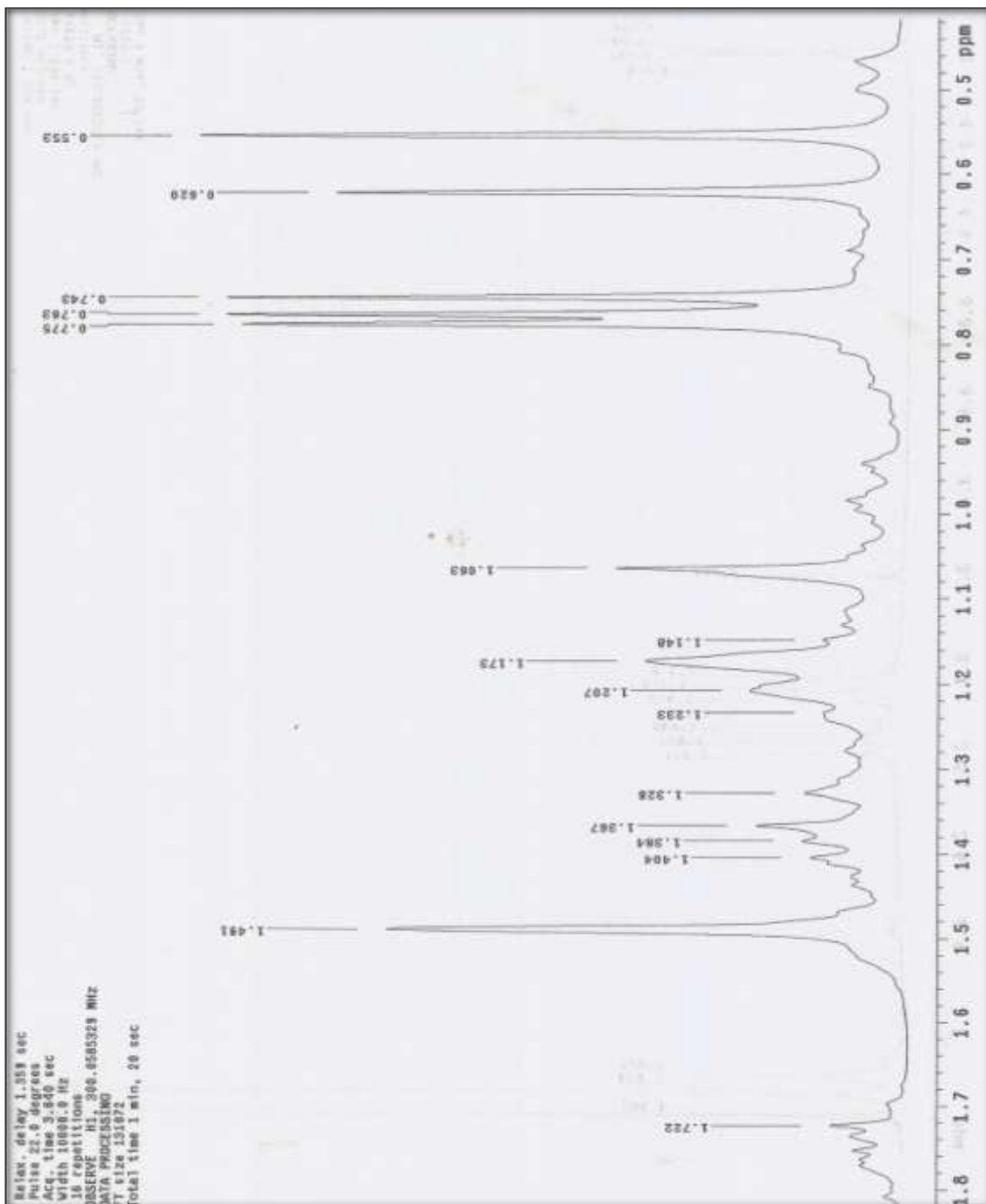


Figura 68. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3, δ (ppm)] da substância **CB08**, região entre 0,5 e 1,9 ppm.

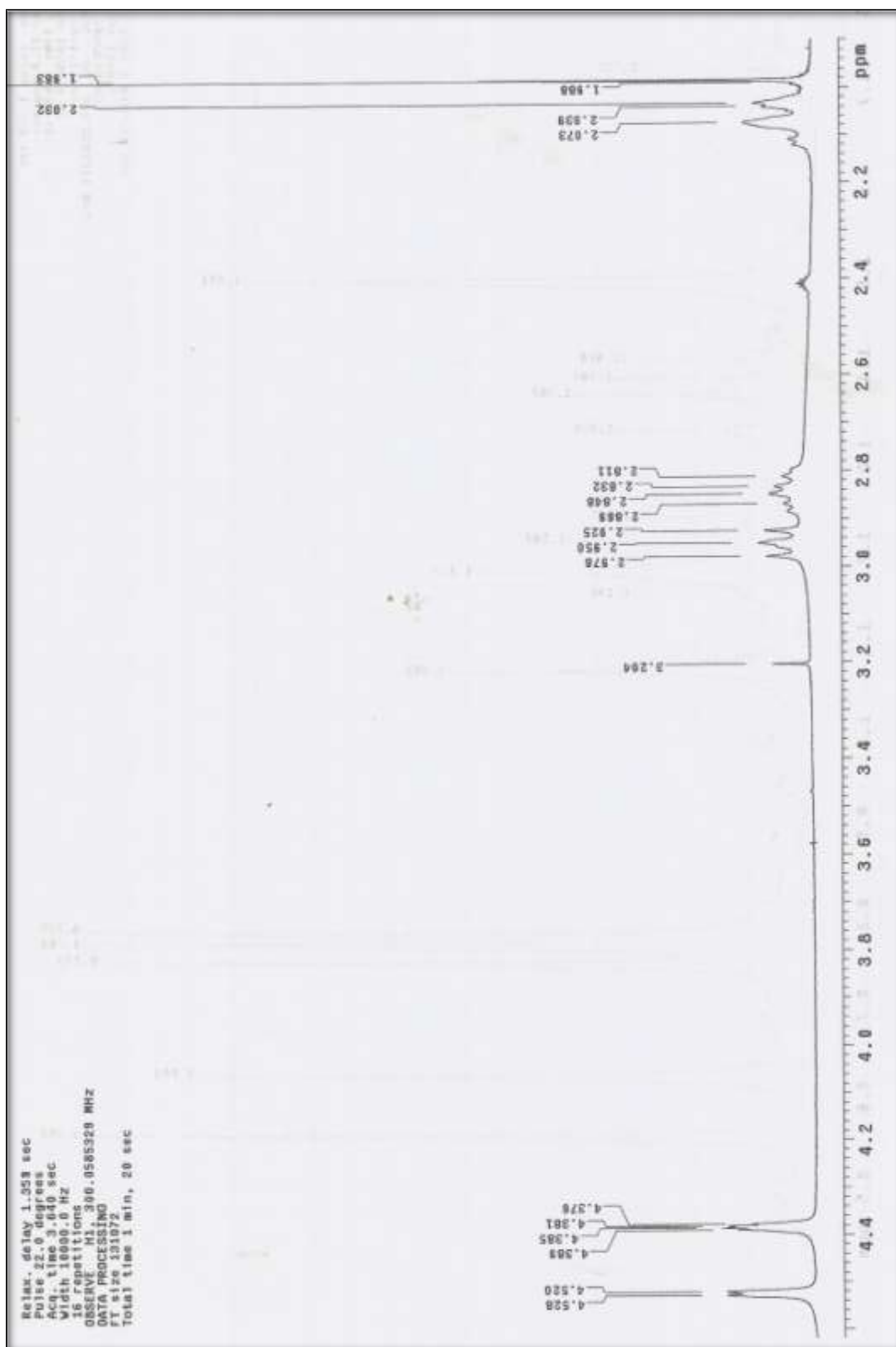


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB08**, região entre 2,0 e 4,5 ppm.

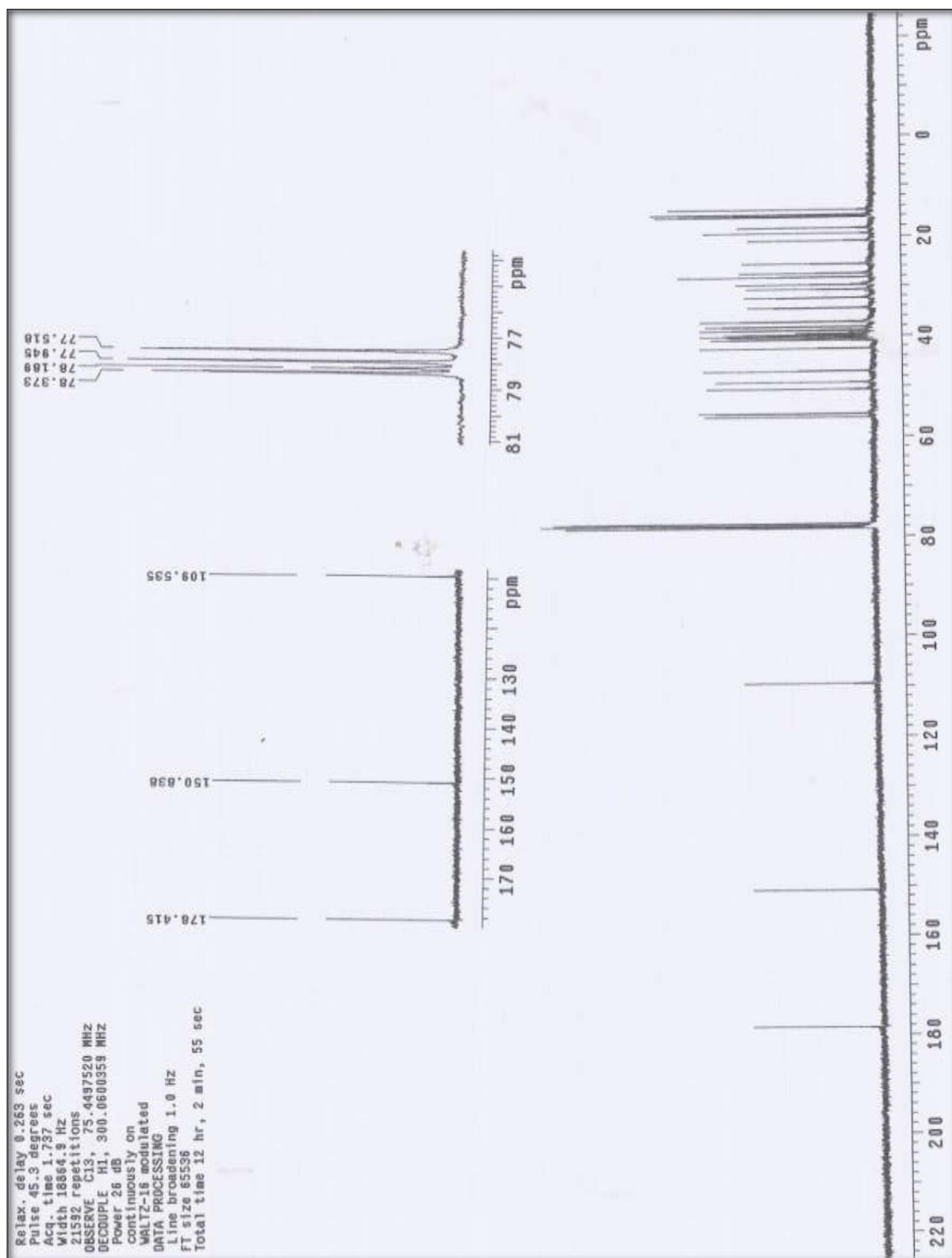


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB08**.

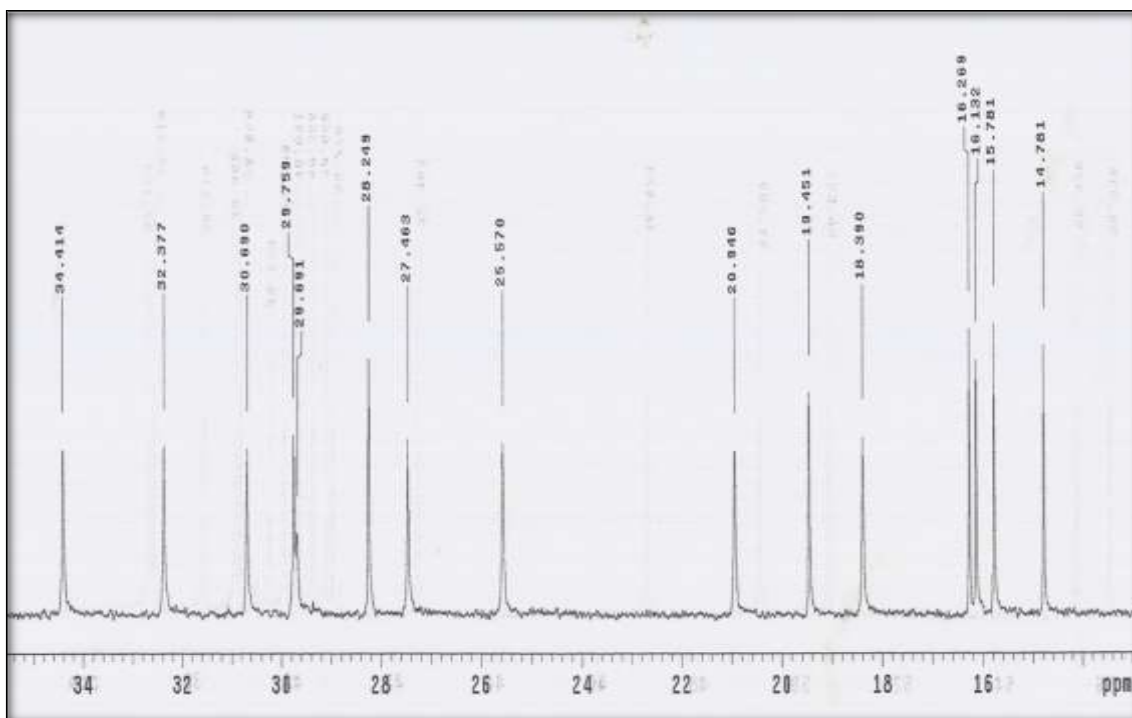


Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB08**, região entre 14 e 36 ppm.

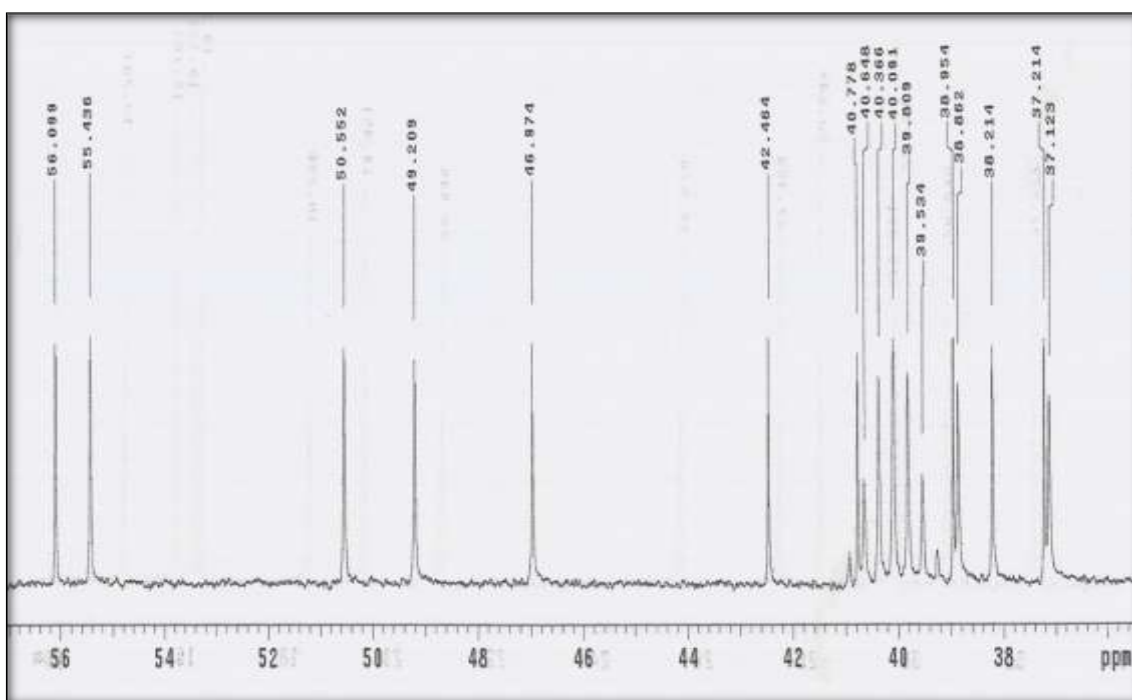


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB08**, região entre 36 e 58 ppm.

4.1.8 Elucidação estrutural da substância CB09

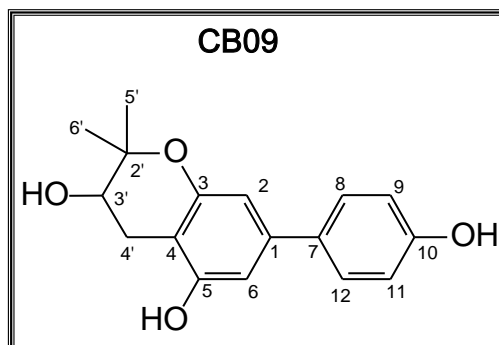


Figura 73. Estrutura da substância **CB09**.

A determinação estrutural da substância **CB09**, isolada da fase em acetato de etila do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C , NOEDIF, IES-EM, bem como, a partir da análise dos experimentos bidimensionais HMBC e HMQC, figuras 77 a 88, e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura para outras substâncias da mesma classe (SEO, 1999), (CHEN, 2005).

O espectro de RMN ^1H apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,47 (H-2) e δ_{H} 6,62 (H-6), região característica de hidrogênios ligados a carbono sp^2 aromático, com integrações correspondentes a um átomo de hidrogênio cada e constantes de acoplamento, $^4J = 1,5$ Hz, característico de acoplamento *meta*, sugerindo a presença de um anel aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído.

O espectro apresentou também dois dubletos em δ_{H} 6,87 (H-9 e H-11) e δ_{H} 7,39 (H-8 e H-12) cada um com integração correspondente a dois átomos de hidrogênios e constantes de acoplamento, $^3J = 8,7$ Hz, característico de acoplamento *orto*, sugerindo a presença de um segundo anel aromático, desta vez 1,4-dissubstituído. Foram observados ainda dois singletos em δ_{H} 1,23 e δ_{H} 1,35, cada um com integração correspondente a três átomos de hidrogênio, sugerindo a presença de dois grupos metílicos. Foi observado um duplo dubleto em δ_{H} 3,78 (8,1 e 5,7 Hz, H-3') com integração correspondente a um átomo de hidrogênio, sendo compatível com um hidrogênio ligado a carbono carbinólico, vizinho a um grupo metilênico. Apresentou ainda outros dois duplos dubletos em δ_{H} 2,54 (17,1 e 8,1 Hz, H-4'a) e δ_{H} 2,94 (17,1 e 5,7 Hz, H-4'b),

cada qual integrando para um hidrogênio, característico de hidrogênios diastereotópicos de um grupo metilênico.

Os dados de RMN ^{13}C , fig. 81, indicaram a presença de seis carbonos aromáticos não hidrogenados, sendo três deles ligados a átomos de oxigênio em δ_{C} 157,8 (C-10), δ_{C} 156,8 (C-5) e δ_{C} 155,2 (C-3) e a presença de quatro sinais de carbonos aromáticos hidrogenados, sendo dois deles, aqueles em δ_{C} 128,4 (C-8 e C-12) e δ_{C} 116,3 (C-9 e C-11), correspondentes a dois CH cada um, reforçando a presença de um anel 1,4-dissubstituído. Na porção alifática do espectro encontramos sinais em δ_{C} 77,4 (C), δ_{C} 69,9 (C), δ_{C} 27,1 (CH_2), δ_{C} 26,1 (CH_3) e δ_{C} 20,2 (CH_3) compatíveis com a presença de um grupo 2,2-dimetilpirano hidroxilado em C-3'.

As correlações observadas entre o átomo de hidrogênio em δ_{H} 6,47 presentes no primeiro anel, com o átomo de carbono em δ_{C} 133,1 (C-7) do segundo anel permitiram concluir que os anéis estavam unidos através de ligação covalente realizada entre os átomos de carbono dos anéis e assim propor que a substância **CB09** tratava-se de um bifenilo.

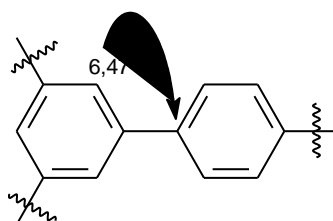


Figura 74. Correlação observada no espectro de HMBC da substância **CB09**.

O espectro de massa de alta resolução (IES-EM) que apresentou um íon quasi-molecular em 309,1153 ($\text{M} + \text{Na}^+$), juntamente com os dados de RMN, permitiram estabelecer para a substância **CB09** a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4$.

A partir deste conjunto de informações pode-se sugerir para a substância **CB09** duas possíveis estruturas, fig. 75, onde a diferença entre elas reside no posicionamento do grupamento 2,2-dimetilpirano.

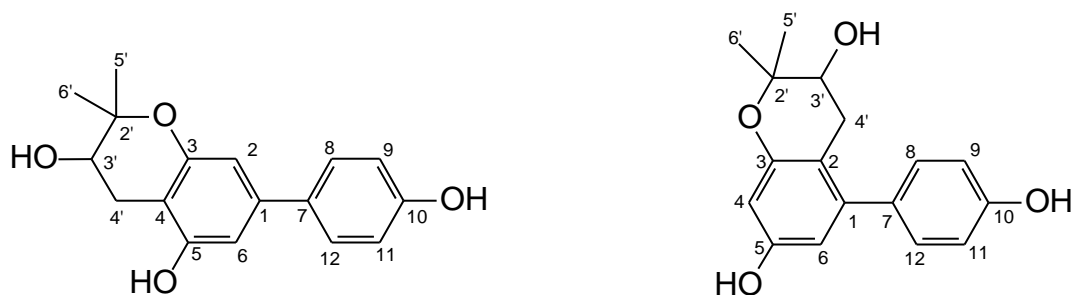


Figura 75. Possíveis estruturas da substância **CB09**.

As correlações observadas no espectro de HMBC entre o hidrogênio H-2 com C-3 e C-7, as correlações entre H-6 com C-5 e C-7, as correlações entre H-9 com C-7 e C-10 e as correlações entre H-4' com C-3 e C-4 determinaram o posicionamento inequívoco do anel pirano, fig. 76.

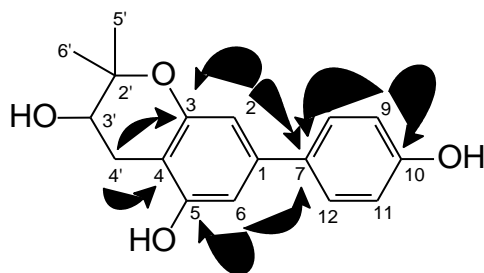


Figura 76. Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **CB09**.

Está descrito na literatura uma bifênica com o mesmo padrão de substituição da substância **CB09**, entretanto C-5 encontra-se ligado a um grupo metoxílico (CHEN, 2005). Os dados de RMN ^{13}C da bifênica isolada encontram-se descritos na tabela 13 (p.100). Após análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C percebe-se que os valores apresentados por Chen e colaboradores são compatíveis com os valores de deslocamento químicos apresentados pela substância **CB09**. O valor de rotação óptica específica para a substância **CB09** foi $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -103,45$ ($2,9 \times 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$, CHCl_3).

Este é o primeiro relato da substância **CB09**, 2,2-dimetil-3,5-dihidroxi-7-(4-hidroxifenil)cromano, portanto, tratando-se de uma substância inédita.

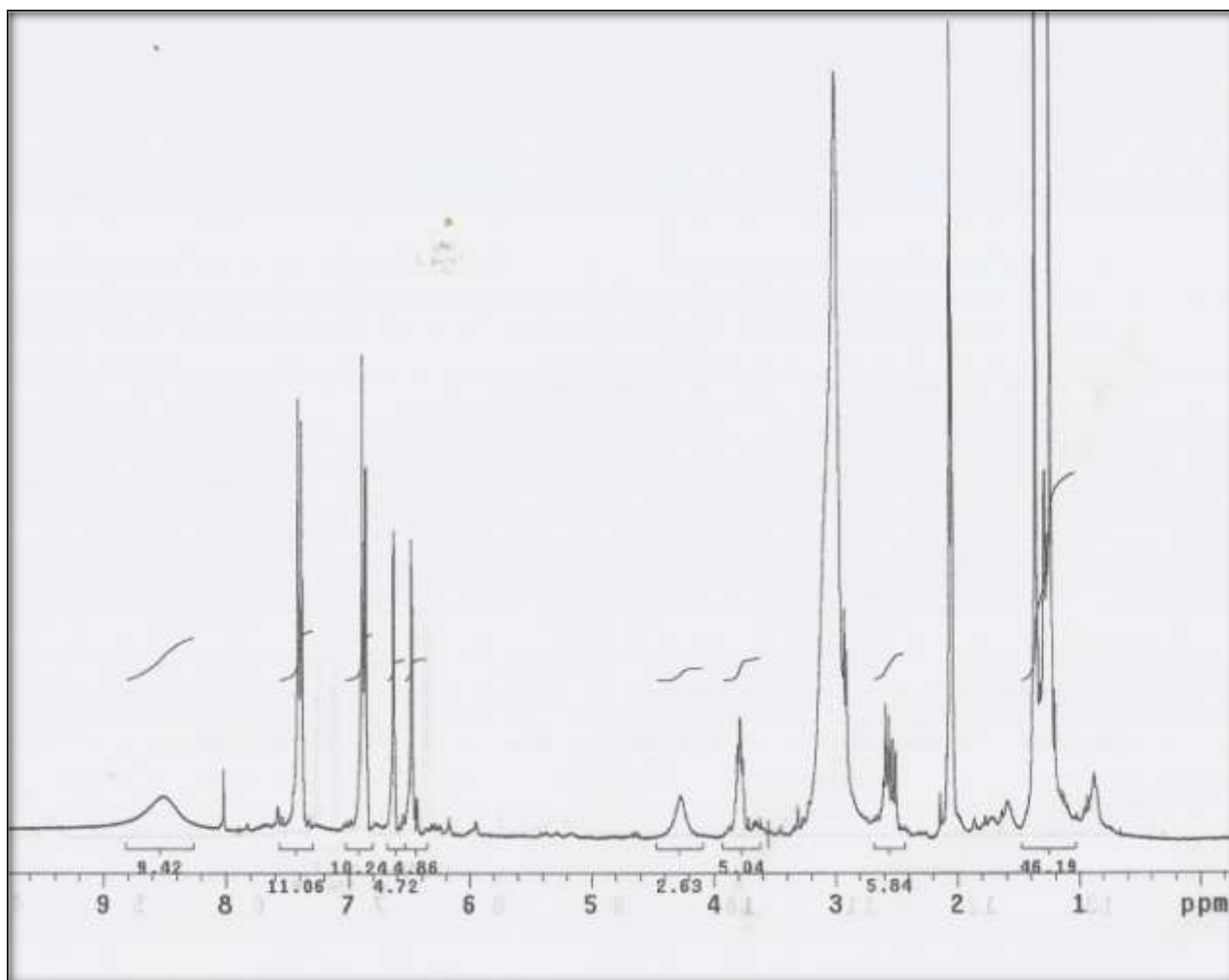


Figura 77. Espectro de RMN ¹H [300 MHz, acetona-d₆, δ (ppm)] da substância **CB09**.

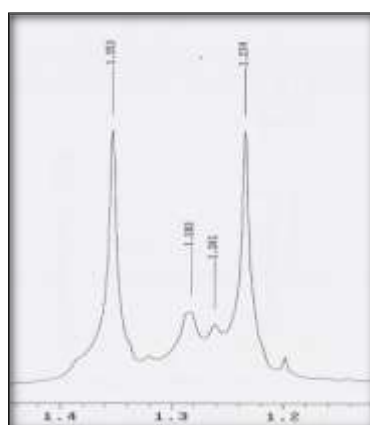


Figura 78. Expansão do espectro de RMN ¹H [300 MHz, acetona-d₆, δ (ppm)] da substância **CB09**, região entre 1,0 e 1,5 ppm.

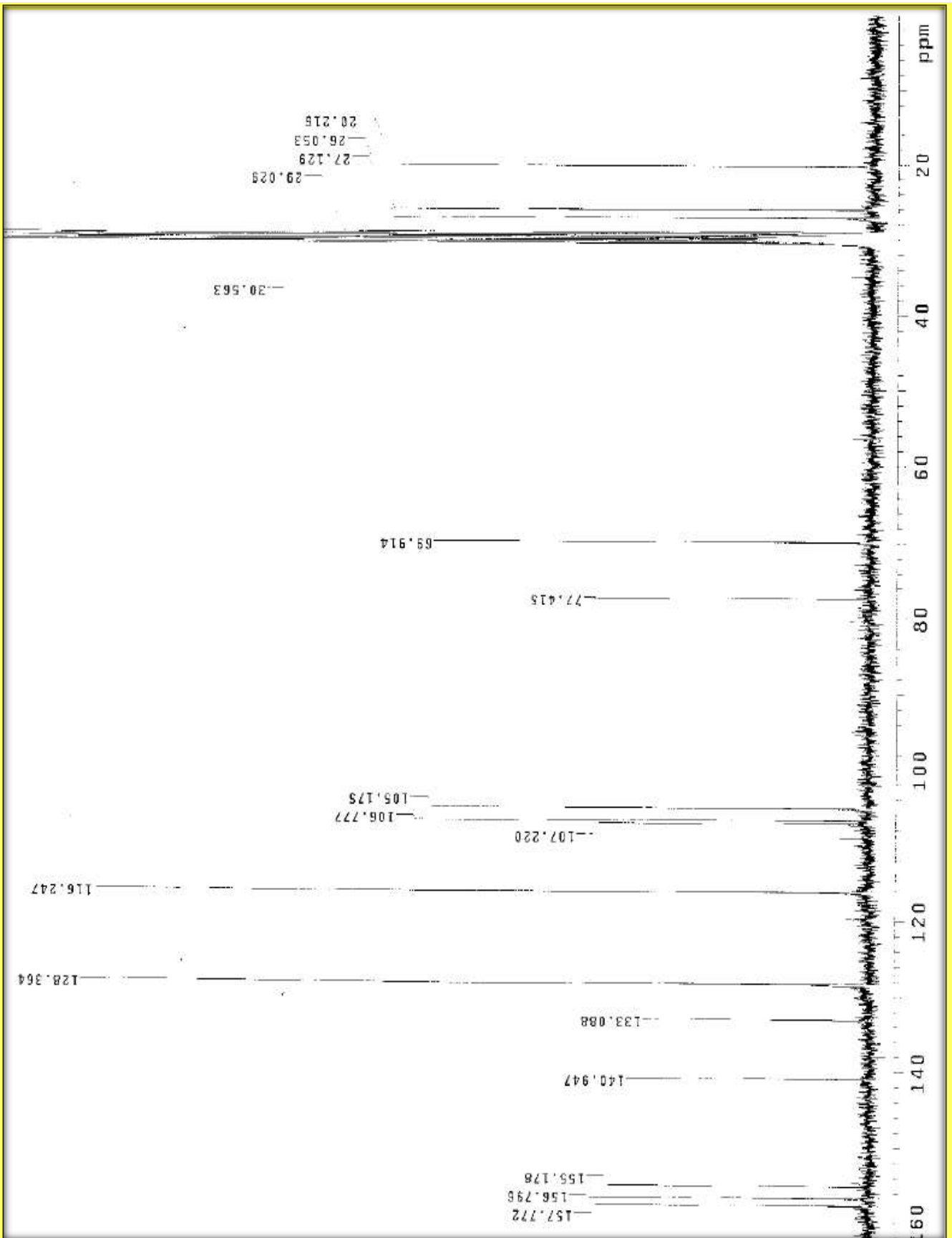


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C [75 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB09**.

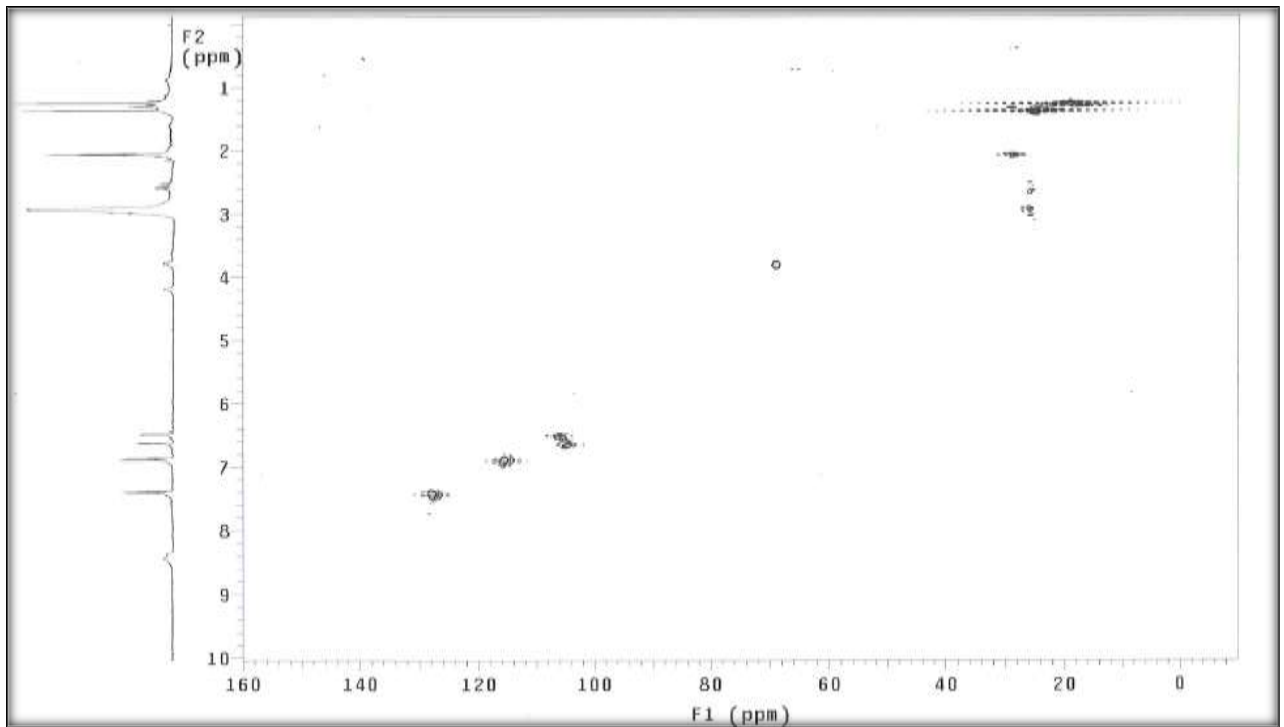


Figura 82. Espectro de HMQC [acetona-d₆, $J = 140$ Hz] da substância **CB09**.

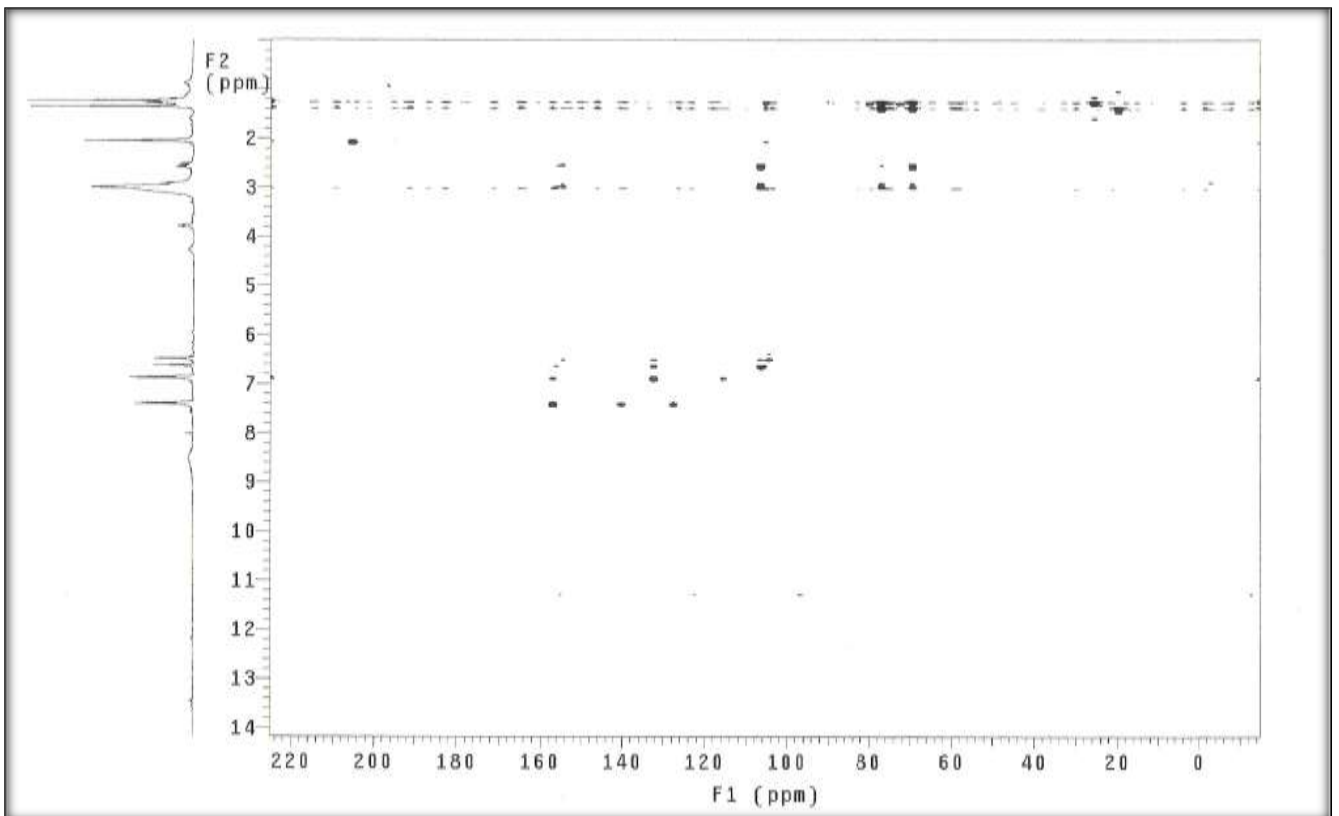


Figura 83. Espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB09**.

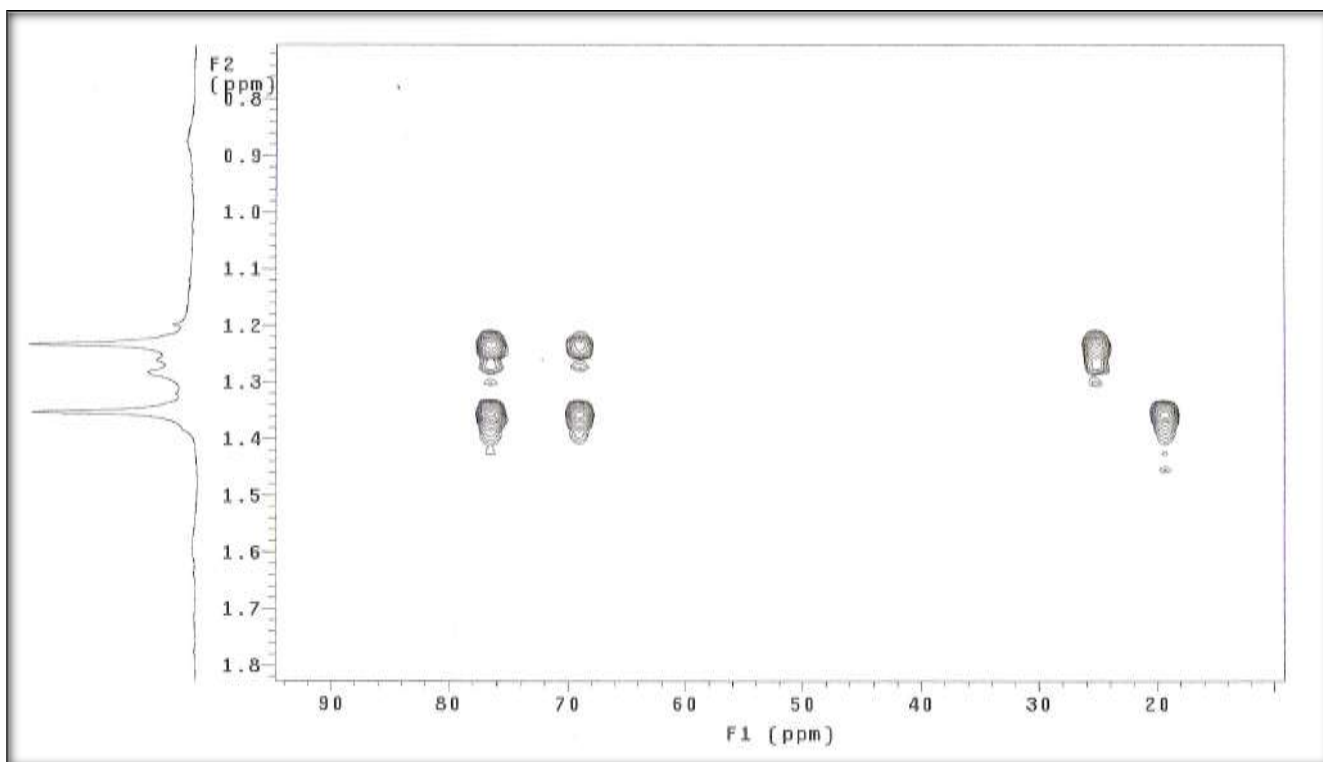


Figura 84. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB09**.

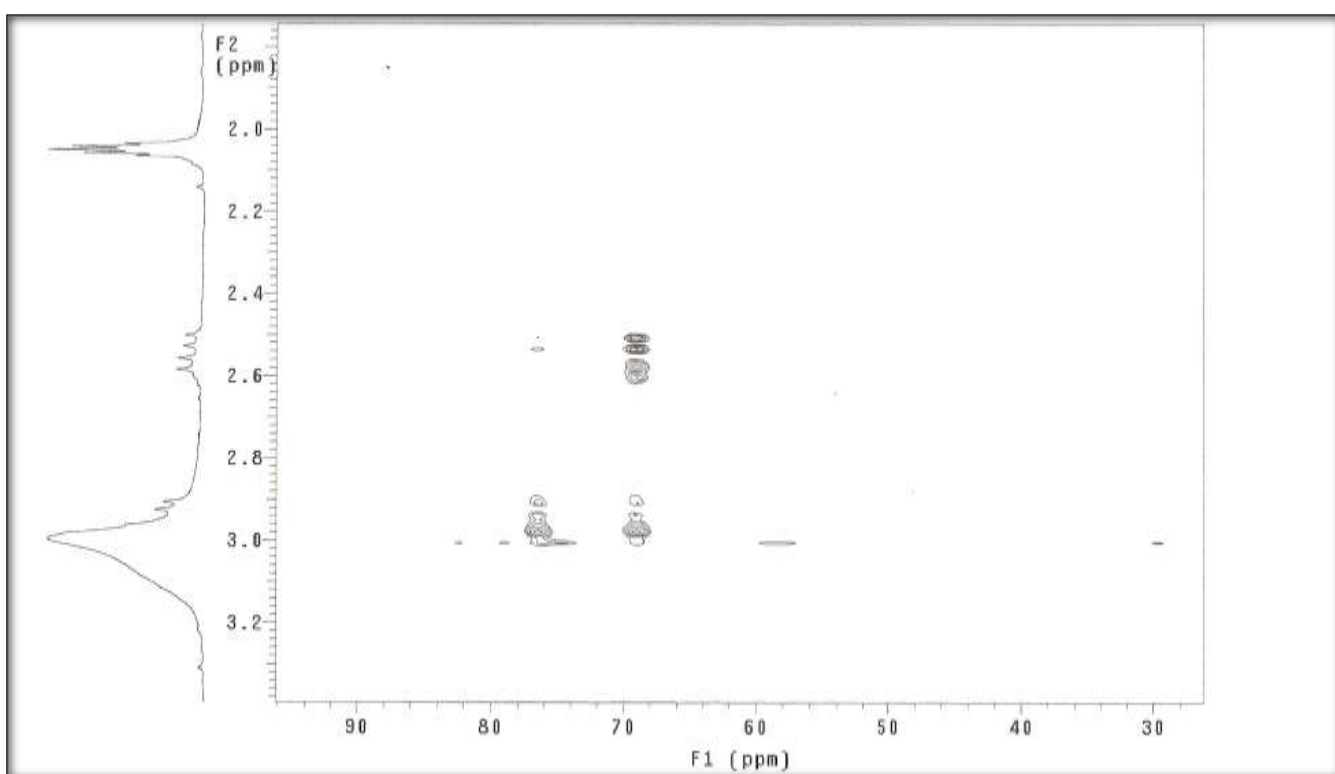


Figura 85. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB09**.

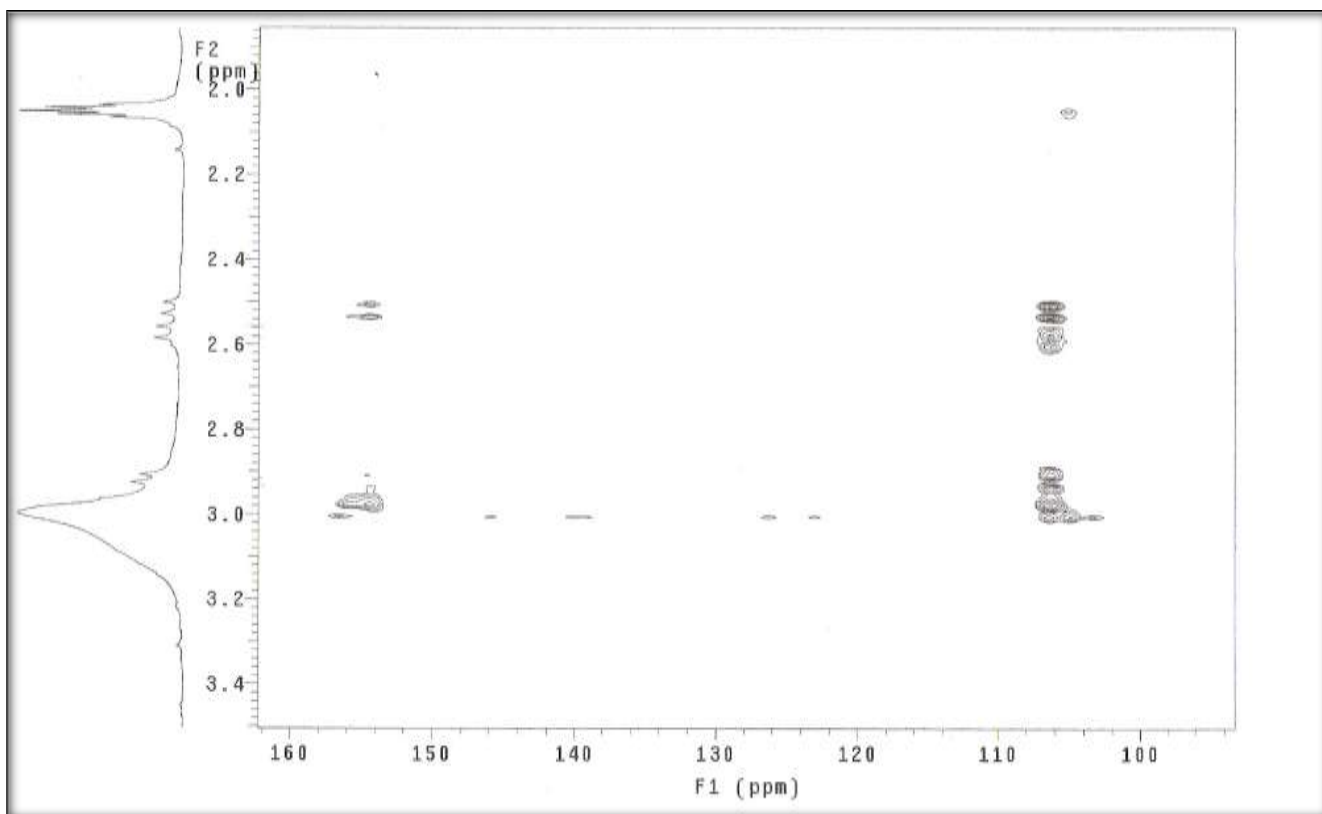


Figura 86. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB09**.

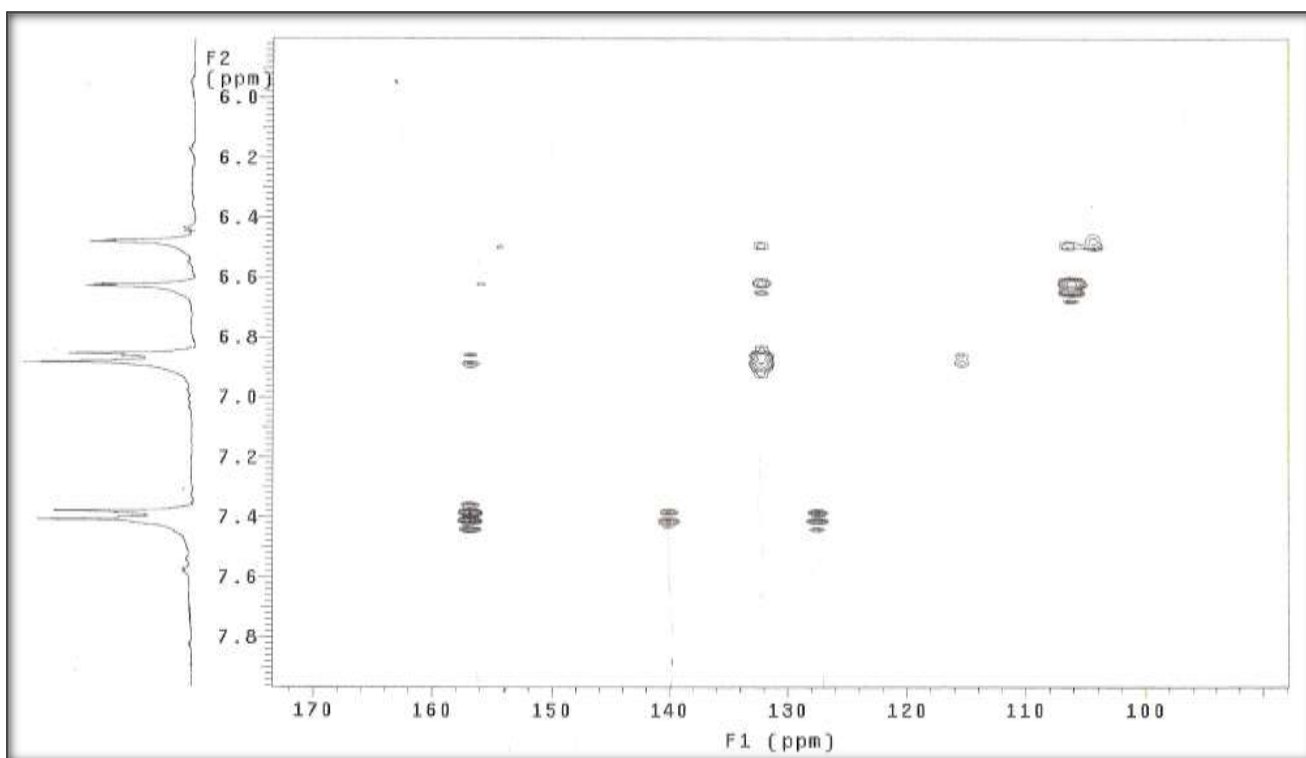


Figura 87. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB09**.



Figura 88. Espectro de massas de alta resolução da substância **CB09**.

Tabela 13. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN ^1H e deslocamentos de RMN ^{13}C da substância **CB09**.

Posição	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)	HMBC
1	-	140,9	
2	6,47 (d, 1H, 1,5 Hz)	106,8	C-3, C-6, C-7
3	-	155,2	
4	-	107,2	
5	-	156,8	
6	6,62 (d, 1H, 1,5 Hz)	105,2	C-2, C-5, C-7
7	-	133,1	
8, 12	7,39 (d, 2H, 8,7 Hz)	128,4	C-1, C-10
9, 11	6,87 (d, 2H, 8,7 Hz)	116,3	C-7, C-10
10	-	157,8	
2'	-	77,4	
3'	3,78 (dd, 1H, 8,1 e 5,7 Hz)	69,9	
4'	2,54 (dd, 1H, 17,1 e 8,1 Hz)	27,1	C-3, C-4, C-2', C-3'
	2,94 (dd, 1H, 17,1 e 5,7 Hz)		
5'	1,23 (s, 3H)	20,2	C-2', C-3', C-6'
6'	1,35 (s, 3H)	26,1	C-2', C-3', C-5'
5-OH	8,60 (sl)	-	
10-OH	8,60 (sl)	-	
3'-OH	4,27 (sl, 1H)	-	

4.1.9 Elucidação estrutural da substância **CB10**

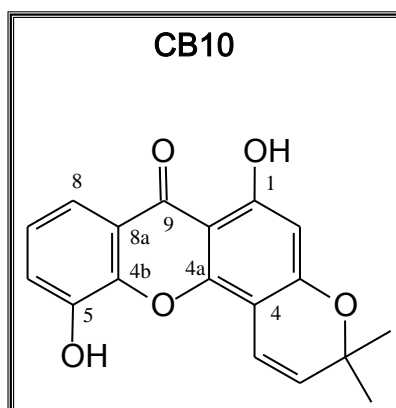


Figura 89. Estrutura da substância **CB10**.

A determinação estrutural da substância **CB10**, 6-desoxiisocajareubina, isolada da fase em diclorometano do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C , 90 a 92, e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (WU, 1998), (NGUYEN, 2003).

O espectro de RMN ^1H , figura 90 (p.103), da substância **CB10**, realizado em acetona deuterada, exibiu um singleto em δ_{H} 13,08 (1H, 1-OH) indicando a presença de uma hidroxila quelada. Apresentou também um singleto em δ_{H} 6,19 (1H, H-2) indicando a presença de um anel aromático pentasubstituído. Ainda na região de hidrogênios aromáticos apresentou sinais em δ_{H} 7,32 (t, 1H, 7,8 Hz, H-7), δ_{H} 7,39 (dd, 1H, 1,8 e 7,8 Hz, H-6) e δ_{H} 7,68 (dd, 1H, 1,8 e 7,8 Hz, H-8) indicando a presença de um anel aromático 1,2,3 trissubstituído. O espectro de hidrogênio exibiu ainda dois dubletos em δ_{H} 5,76 (d, 1H, 10,2 Hz) e em δ_{H} 7,05 (d, 1H, 10,2 Hz) indicando a presença de dois hidrogênios olefínicos com configuração *cis*. Apresentou também um singleto em δ_{H} 1,49 (s, 6H) indicando a presença de dois grupamentos metílicos. O espectro de RMN ^{13}C , fig. 91, da substância **CB10**, realizado em acetona deuterada, exibiu um conjunto de dezessete sinais. Os sinais observados em δ_{C} 28,2 (CH_3), δ_{C} 78,9 (C), δ_{C} 115,3 (CH) e δ_{C} 127,8 (CH) juntamente com os sinais observados no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 1,49, δ_{H} 5,76 e em δ_{H} 7,05 confirmam a presença de um grupo 2,2-dimetilpirano. O sinal em δ_{C} 181,5 (C) foi atribuído

ao carbono carbonílico C-9. Os sinais observados em δ_C 163,4 (C), δ_C 101,7 (CH), δ_C 161,1 (C), δ_C 107,8 (C), δ_C 152,4 (C) e em δ_C 103,7 (C) confirmam a presença de um anel aromático pentasubstituído. Os sinais observados em δ_C 147,2 (C), δ_C 121,7 (CH), δ_C 124,8 (CH), δ_C 115,5 (CH), δ_C 145,7 (C), e em δ_C 121,7 (C) confirmam a presença de um anel aromático 1,2,3-trisubstituído.

Observou-se no espectro de NOEDIF da substância **CB10**, fig. 92, que ao irradiar o hidrogênio δ_H 13,08 houve um incremento no sinal relativo ao hidrogênio aromático em δ_H 6,19, confirmando o posicionamento do anel 2,2-dimetilpirano.

A partir da comparação dos dados de RMN 1H e RMN ^{13}C com os dados descritos na literatura foi possível identificar a xantona **CB10** como sendo a 6-desoxiisojacareubina.

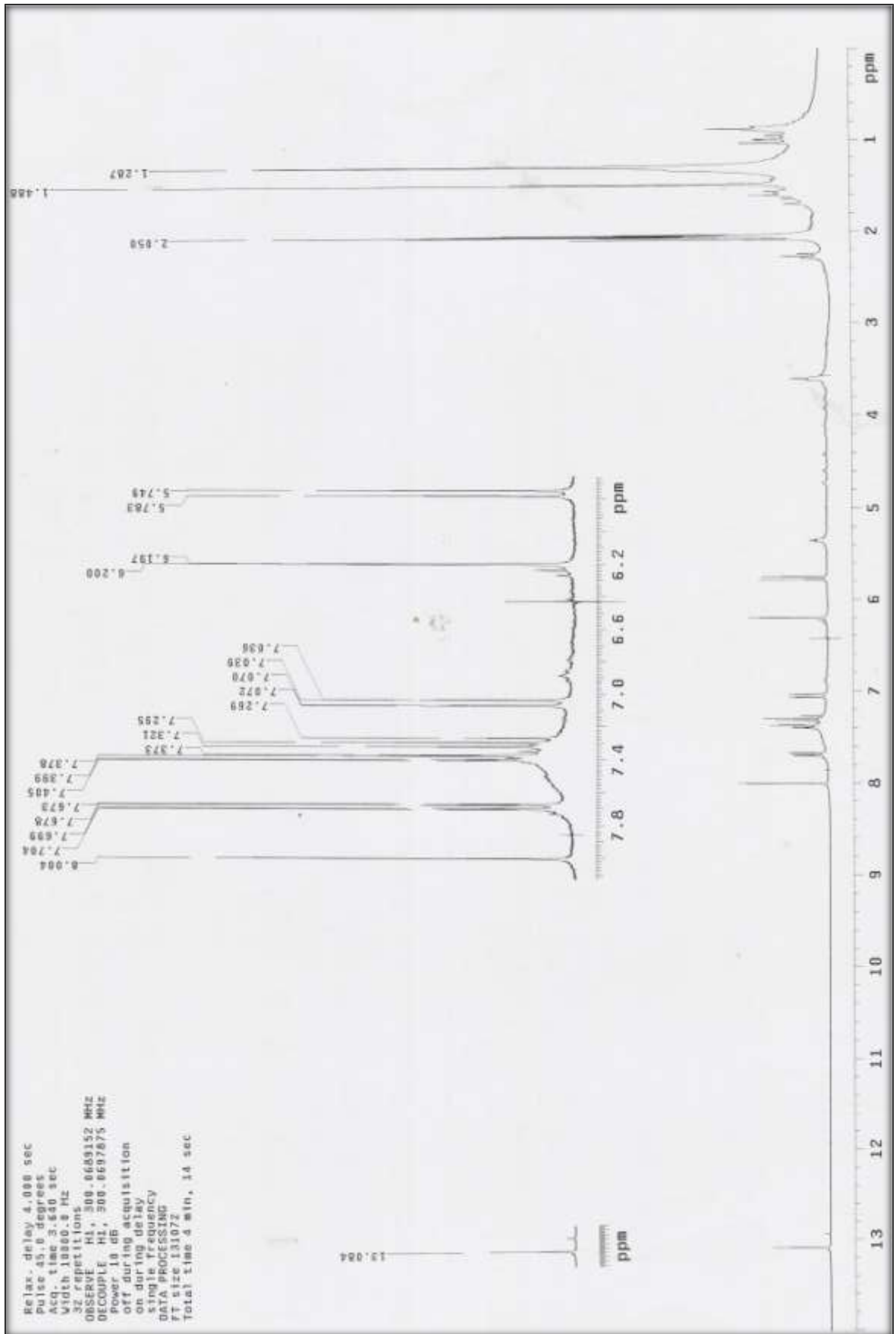


Figura 90. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, acetona- d_6 , δ (ppm)] da substância **CB10**.

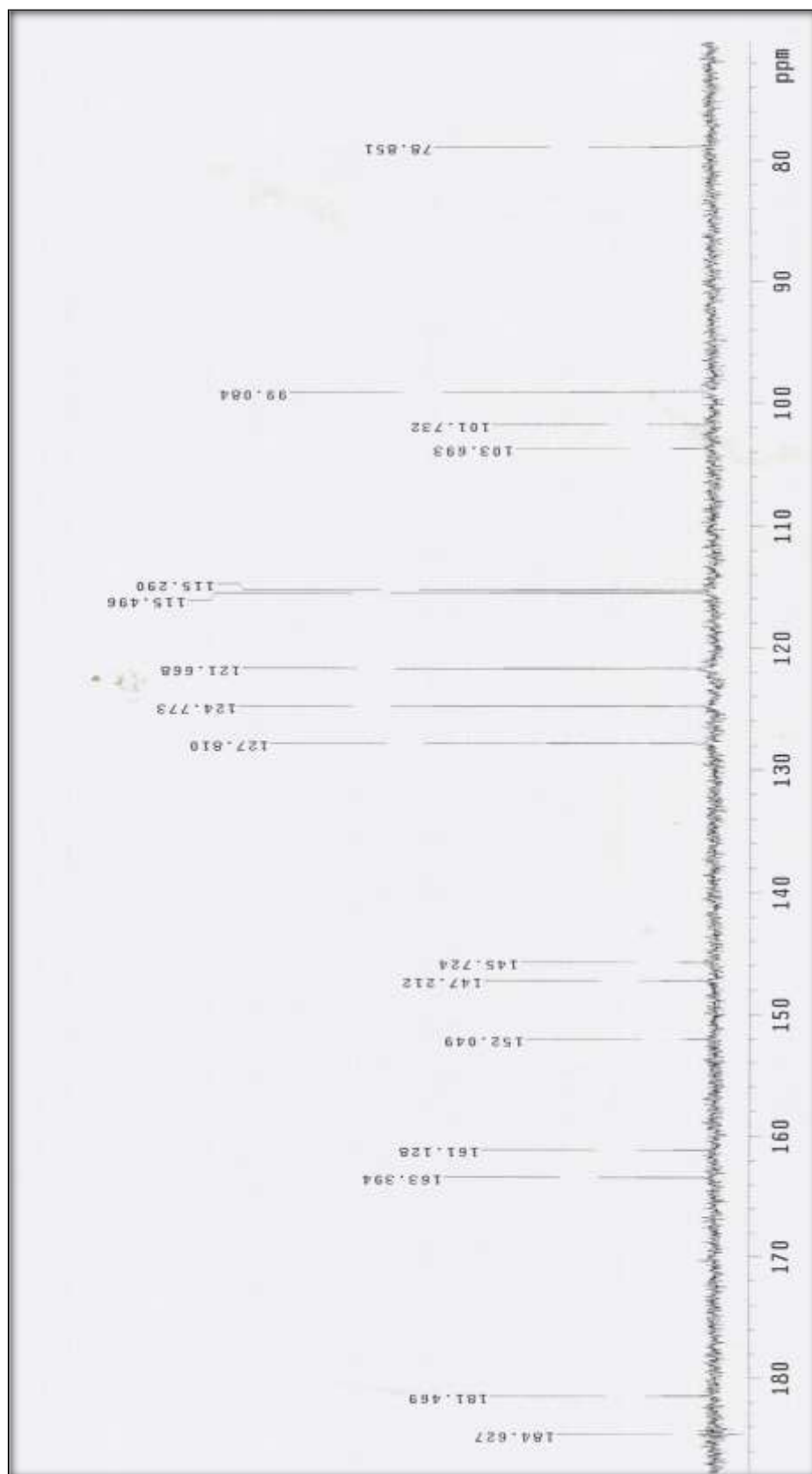


Figura 91. Espectro de RMN ¹³C [75 MHz, acetona-d₆, δ (ppm)] da substância **CB10**.

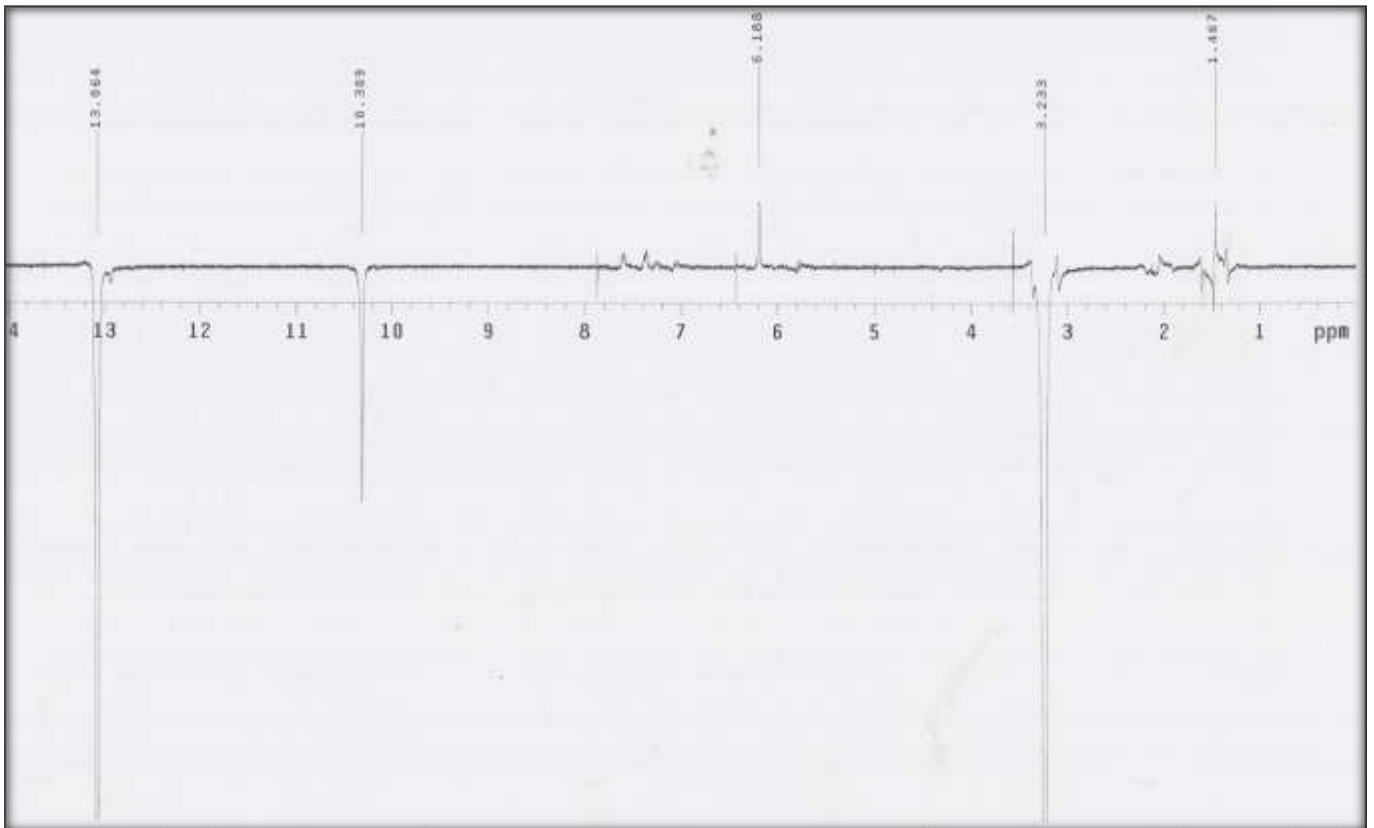


Figura 92. Espectro de NOEDIF [13,06 ppm, acetona-d₆, δ (ppm)] da substância **CB10**.

4.1.10 Elucidação estrutural da substância **CB11**

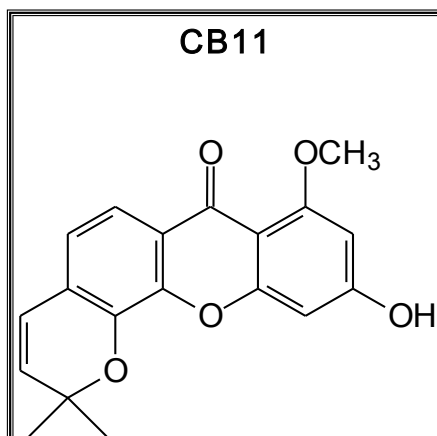


Figura 93. Estrutura da substância **CB11**.

A determinação estrutural da substância **CB11**, isolada da fase em diclorometano do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H , fig. 95 e 96, e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura para outras xantonas (AZEBAZE, 2008), (GUNASEKERA, 1975).

O espectro de RMN ^1H da substância **CB11**, realizado em clorofórmio deuterado, exibiu um singlete em δ_{H} 3,85 (1H, MeO-1) indicando a presença de um grupo metoxílico. Apresentou dois dubletos um em δ_{H} 6,58 (1,8 Hz, H-2) e outro em δ_{H} 6,66 (1,8 Hz, H-4) sugerindo a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *meta*. Apresentou também dois dubletos um em δ_{H} 6,88 (8,7 Hz, H-7) e outro em δ_{H} 7,47 (8,7 Hz, H-8) sugerindo a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*. Ainda na região de hidrogênios olefinícos apresentou dois dubletos um em δ_{H} 5,57 (9,9 Hz) e outro em δ_{H} 6,71 (9,9 Hz), os quais em conjunto com o sinal observado em δ_{H} 1,45 (6H) sugerem a presença de um grupo 2,2-dimetilpireno. Os dados de RMN ^1H estão sumarizados na tabela 14. Comparando os dados da substância **CB11** com os dados apresentados pelas substâncias **CB10** e **CB12** foi possível propor para a substância **CB11** a estrutura representada pela figura 93. A ausência de sinais relativos a um grupo hidroxílico quelado em C-1 permite concluir que nesta posição encontra-se o grupo metoxílico representado pelo sinal em δ_{H} 3,85 (s, 1H). Com base nos dados descritos não foi encontrado

relato algum da substância **CB11** na literatura, sendo esta inédita.

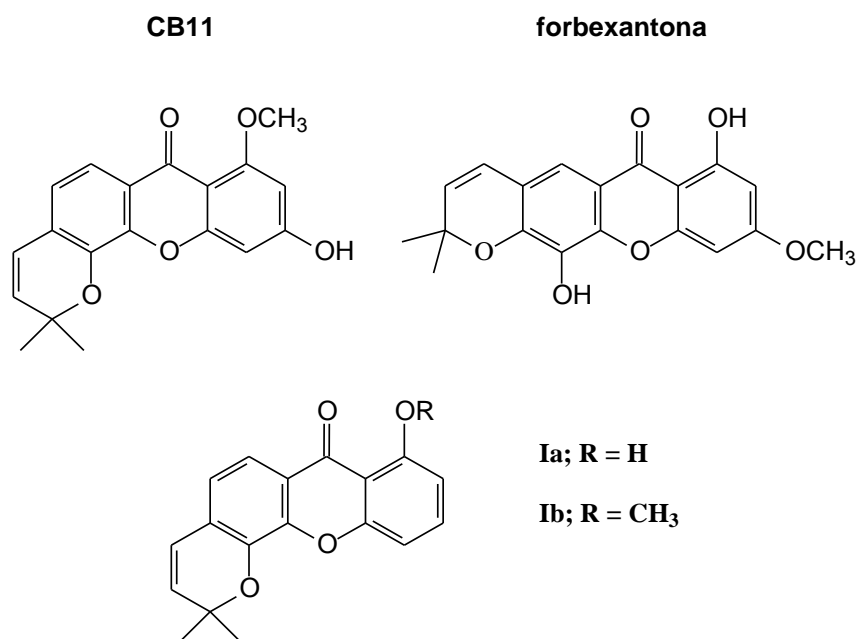


Figura 94. Estrutura das substâncias **CB11** e outras xantonas.

Tabela 14. Deslocamentos químicos e multiplicidade no espectro de RMN ¹H da substância **CB11**.

Posição	RMN ¹ H CB11	RMN ¹ H ^a forbexantona	RMN ¹ H ^b Ia	RMN ¹ H ^b Ib
1	-	-	-	-
2	6,58 (d, 1,8 Hz)	6,79 (d, 2,6 Hz)	-	-
3	-	-	-	-
4	6,66 (d, 1,8 Hz)	6,70 (d, 2,6 Hz)	-	-
4a	-	-	-	-
4b	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	6,88 (d, 8,7 Hz)	-	7,00 (d, 9 Hz)	7,10 (d, 9 Hz)
8	7,47 (d, 8,7 Hz)	-	7,76 (d, 9 Hz)	7,63 (d, 9 Hz)
8a	-	-	-	-
8b	-	-	-	-
9	-	-	-	-
2'	-	-	-	-
3'	6,71 (d, 1H, 9,9 Hz)	-	-	-
4'	5,57 (d, 1H, 9,9 Hz)	-	-	-
MeO-1	3,85 (s) ^a	-	-	-
Me-2'	1,45 (s) ^a	-	-	-

^a Gunasekera, S. P.; Selliah, S. S.; Sultanbawa, M. U. S.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, **1975**, 1539. ^b Azebaze, A. G. B.; Ouahouo, B. M. W.; Vardamides, J. C.; Valentin, A.; Kuete, V.; Acebey, L.; Beng, V. P.; Nkengfack, A. E.; Meyer, M.: *Chemistry of Natural Compounds* **2008**, *44*, 582.

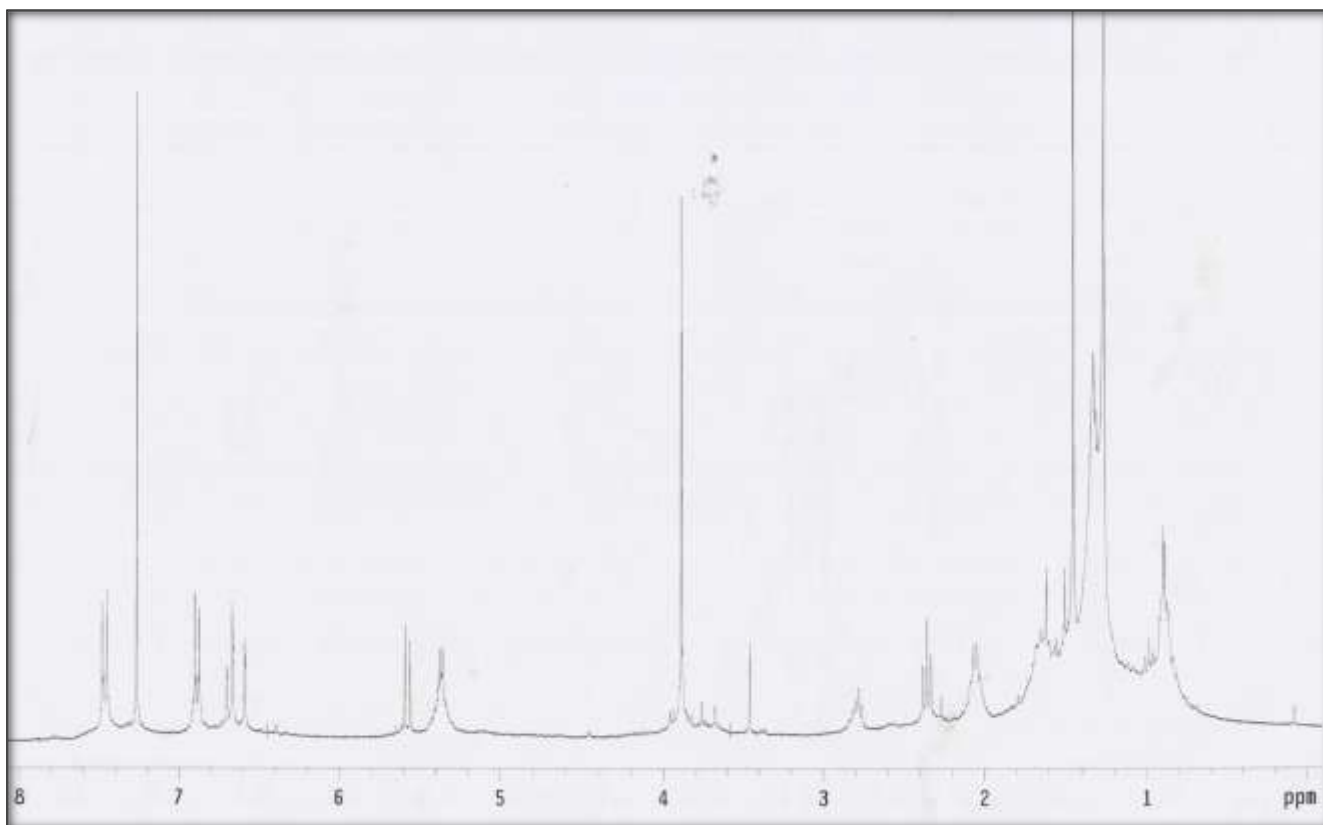


Figura 95. Espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB11**.

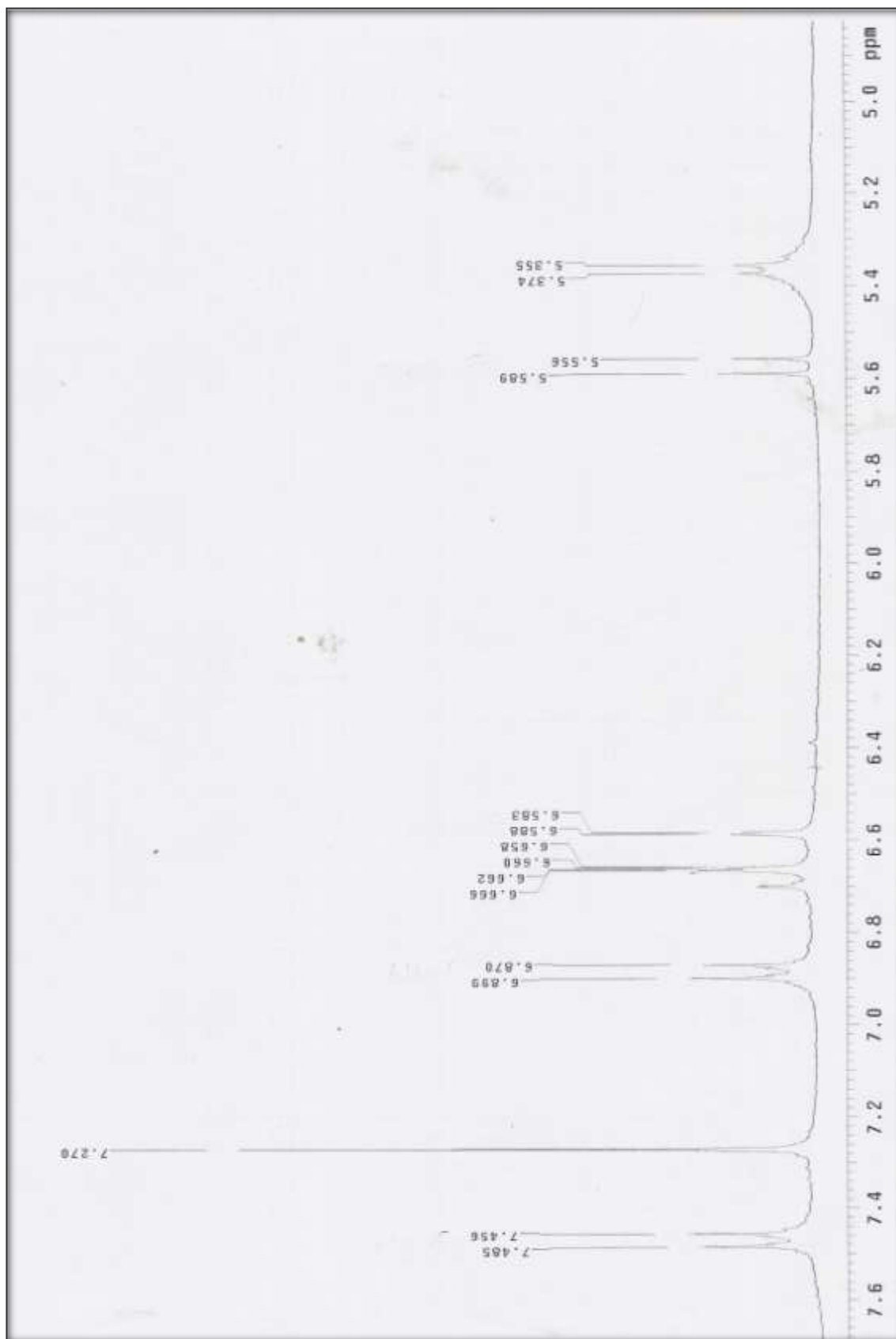


Figura 96. Expansão do espectro de RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB11**, região entre 5,0 e 7,8 ppm.

4.1.11 Elucidação estrutural da substância **CB12**

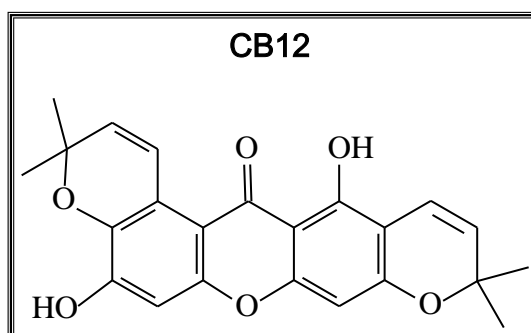


Figura 97. Estrutura da substância **CB12**.

A determinação estrutural da substância **CB12**, brasilixantona B, isolada da fase em diclorometano do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e HMBC, fig. 99 a 104, e por comparação dos seus dados com os descritos na literatura (MARQUES, 2000).

O espectro de RMN ^1H da substância **CB12**, fig. 99, realizado em acetona deuterada, exibiu um singlete em δ_{H} 13,81 (1H, 1-OH) indicando a presença de uma hidroxila quelada. Apresentou também dois singletos um em δ_{H} 6,27 (1H) e outro em δ_{H} 6,82 (1H) sugerindo a presença de dois anéis aromáticos pentasubstituído. Ainda na região de hidrogênios olefinicos apresentou quatro dubletos em δ_{H} 5,71 (1H, 10,2 Hz), δ_{H} 5,93 (1H, 10,2 Hz), δ_{H} 6,67 (1H, 10,2 Hz) e δ_{H} 8,01 (1H, 10,2 Hz), os quais em conjunto com o sinal observado em δ_{H} 1,50 (12H) sugerem a presença de dois grupos 2,2-dimetilpireno. Não foi efetuado o experimento de RMN ^{13}C para a substância **CB12**, entretanto a partir do espectro de HMBC foi possível identificar alguns sinais de ^{13}C da substância. Os dados de RMN estão sumarizados na tabela 15. Comparando os dados de RMN ^1H da substância **CB12** com os dados apresentados pela substância **CB10**, bem como com os dados descritos na literatura (MARQUES, 2000) foi possível identificar a substância **CB12** como sendo a brasilixantona B. As correlações observadas entre o sinal em δ_{H} 6,26 (s, 1H) e os sinais em δ_{C} 103 (C), δ_{C} 104 (C), δ_{C} 154 (C) e δ_{C} 157 (C), bem como entre o sinal em δ_{H} 6,67 (d, 1H, 10,2 Hz) e o sinal em δ_{C} 159 (C) confirmam o posicionamento linear do anel 2,2-dicromeno presente no anel A

proveniente da rota do acetato, fig. 98. O posicionamento do segundo anel 2,2-dicromeno baseou-se no descolamento químico apresentado pelo hidrogênio olefínico em δ_H 8,01 (1H, 10,2 Hz) periplanar ao grupo carbonílico, devido à sua acentuada desproteção.

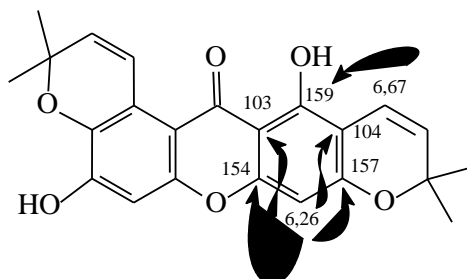


Figura 98. Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **CB12**.

Tabela 15. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN ^1H e deslocamentos de RMN ^{13}C da substância **CB12**.

Posição	RMN ^1H	RMN $^{13}\text{C}^{\text{a}}$	RMN $^{13}\text{C}^*$
1	-	159	159,6
2	-	104	104,5
3	-	157	158,6
4	6,27 (s, 1H)	NA	94,28
4a	-	154	155,1
4b	-	NA	152,5
5	6,82 (s, 1H)	NA	102,4
6	-	NA	151,0
7	-	137	135,8
8	-	NA	121,5
8a	-	108	110,4
8b	-	103	103,8
9	-	NA	182,1
2'	-	76	77,4
3'	5,71 (d, 2H, 10,2 Hz)	128	127,2
4'	6,67 (d, 2H, 10,2 Hz)	NA	115,7
2''	-	76	77,4
3''	8,01 (d, 2H, 10,2 Hz)	133	132,3
4''	5,93 (d, 2H, 10,2 Hz)	120	121,0
Me-2'	1,50 (s) ^a	28	28,4
Me-2''	1,50 (s) ^a	26	27,4

* Marques, V. L. L.; Oliveira, F. M.; Conserva, L. M.; Brito, R. G. L.; Guilhon, G. M. S. P.: *Phytochemistry* **2000**, 55, 815-818. ^a Dados obtidos a partir do espectro de HMBC. NA = não observado no experimento de HMBC.

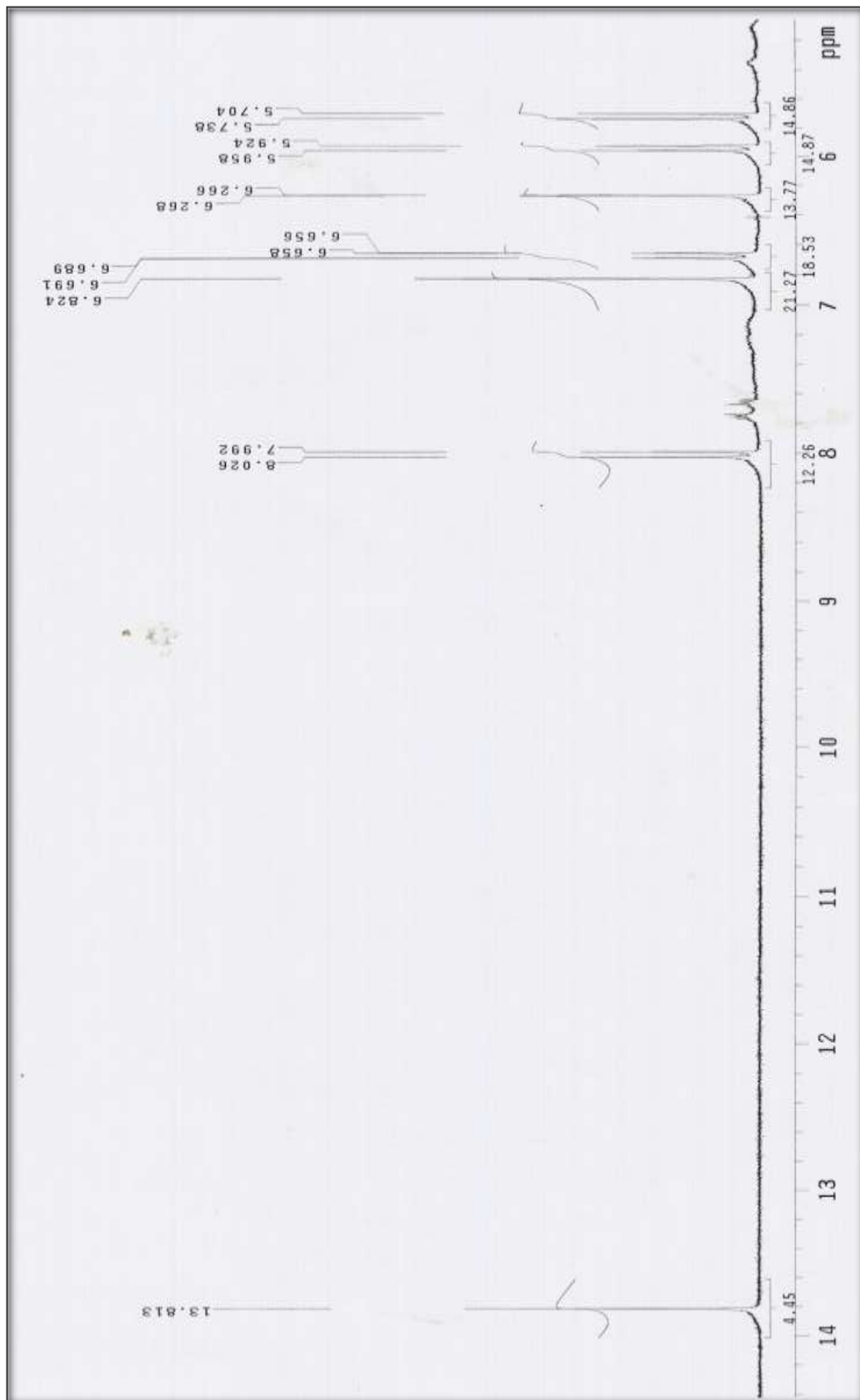


Figura 99. Espectro de RMN ¹H [300 MHz, acetona-d₆, δ (ppm)] da substância **CB12**.

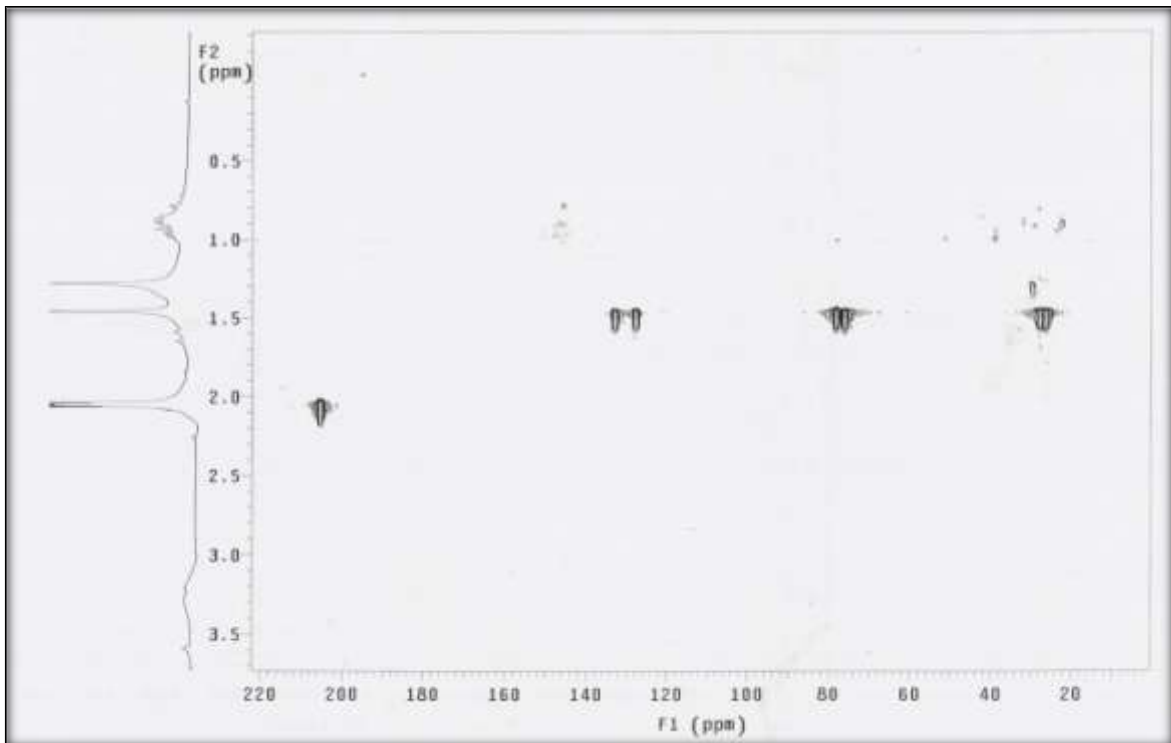


Figura 100. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB12**.

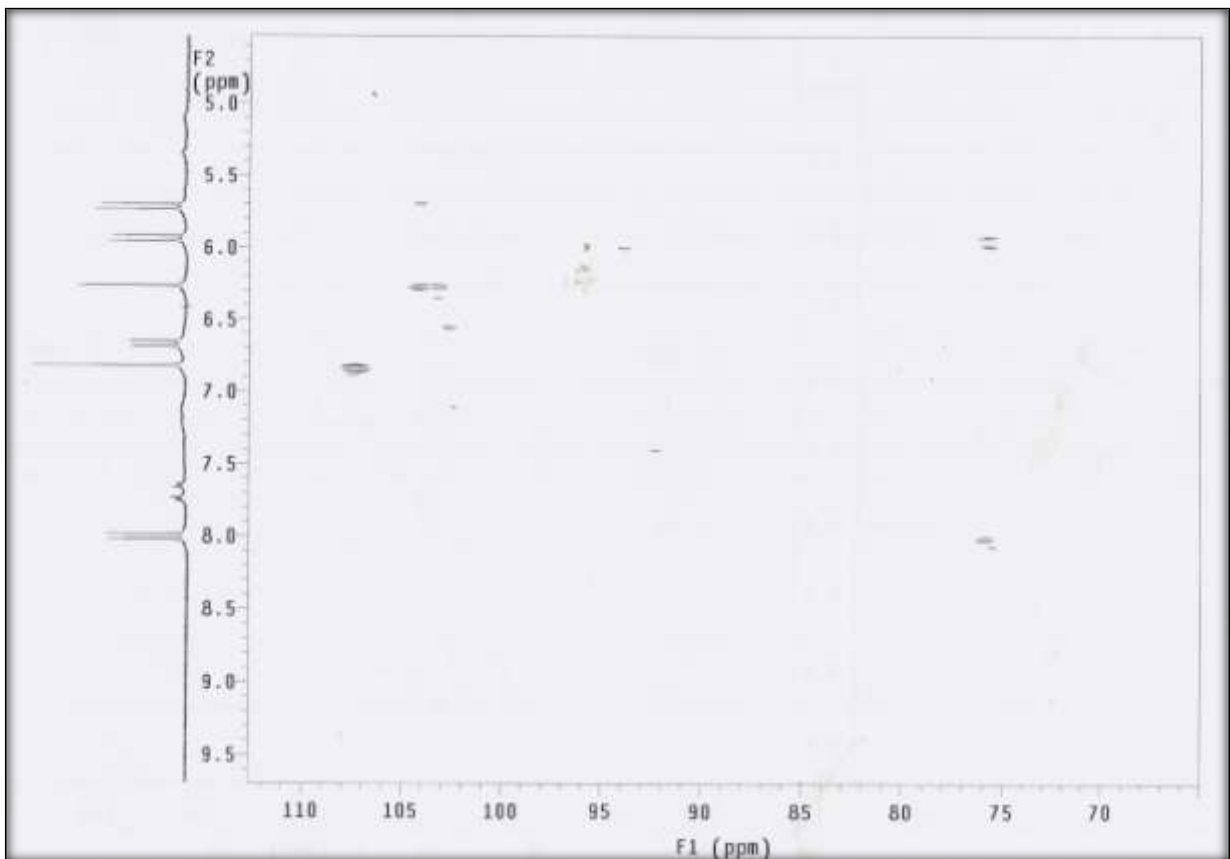


Figura 101. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB12**.

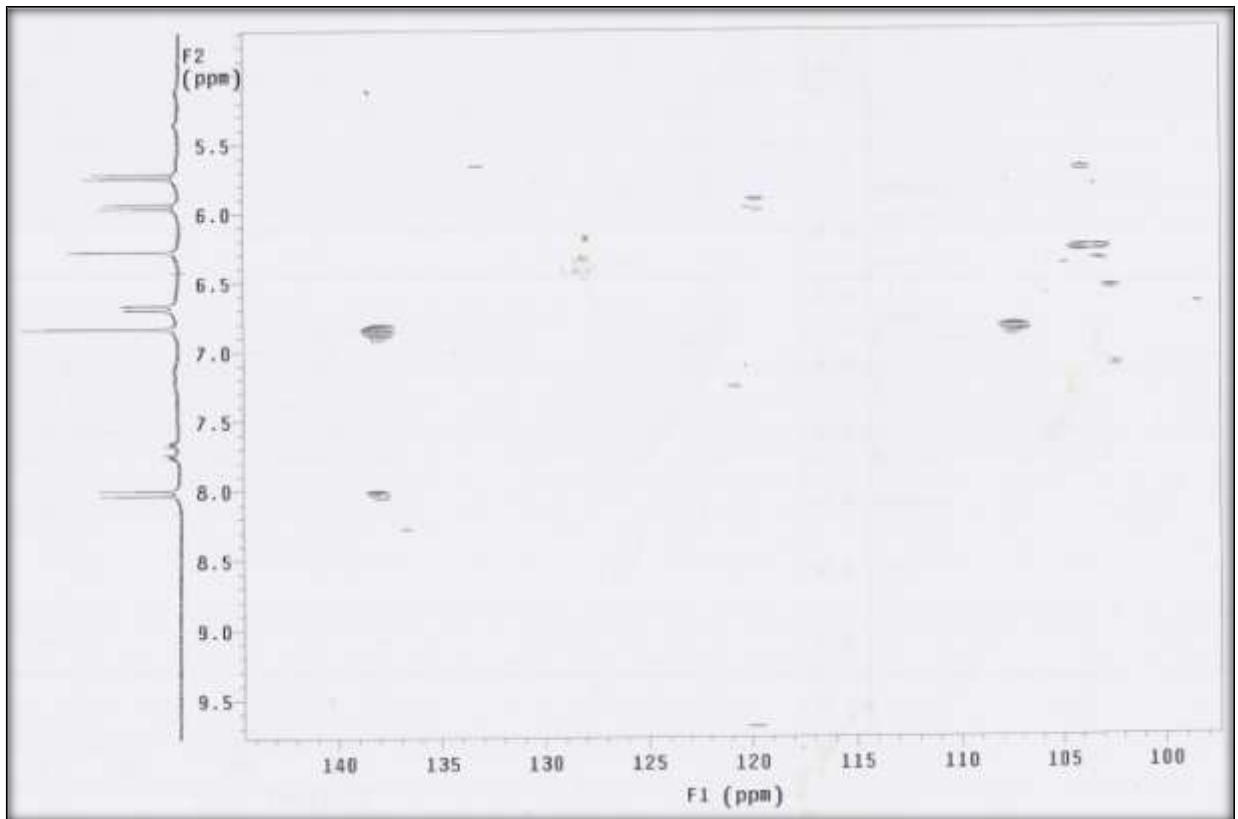


Figura 102. Expansão do espectro de HMBC [acetona- d_6 , $J = 9$ Hz] da substância **CB12**.

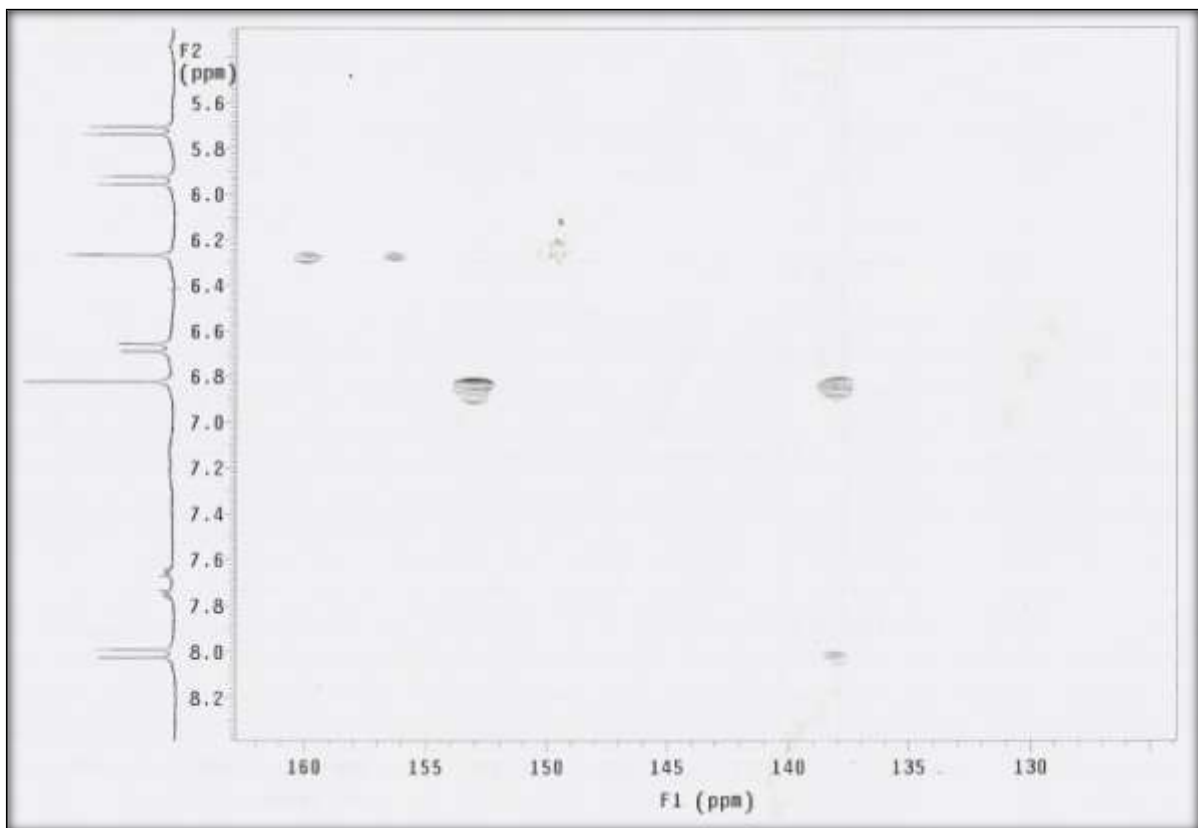


Figura 103. Expansão do espectro de HMBC [acetona- d_6 , $J = 9$ Hz] da substância **CB12**.

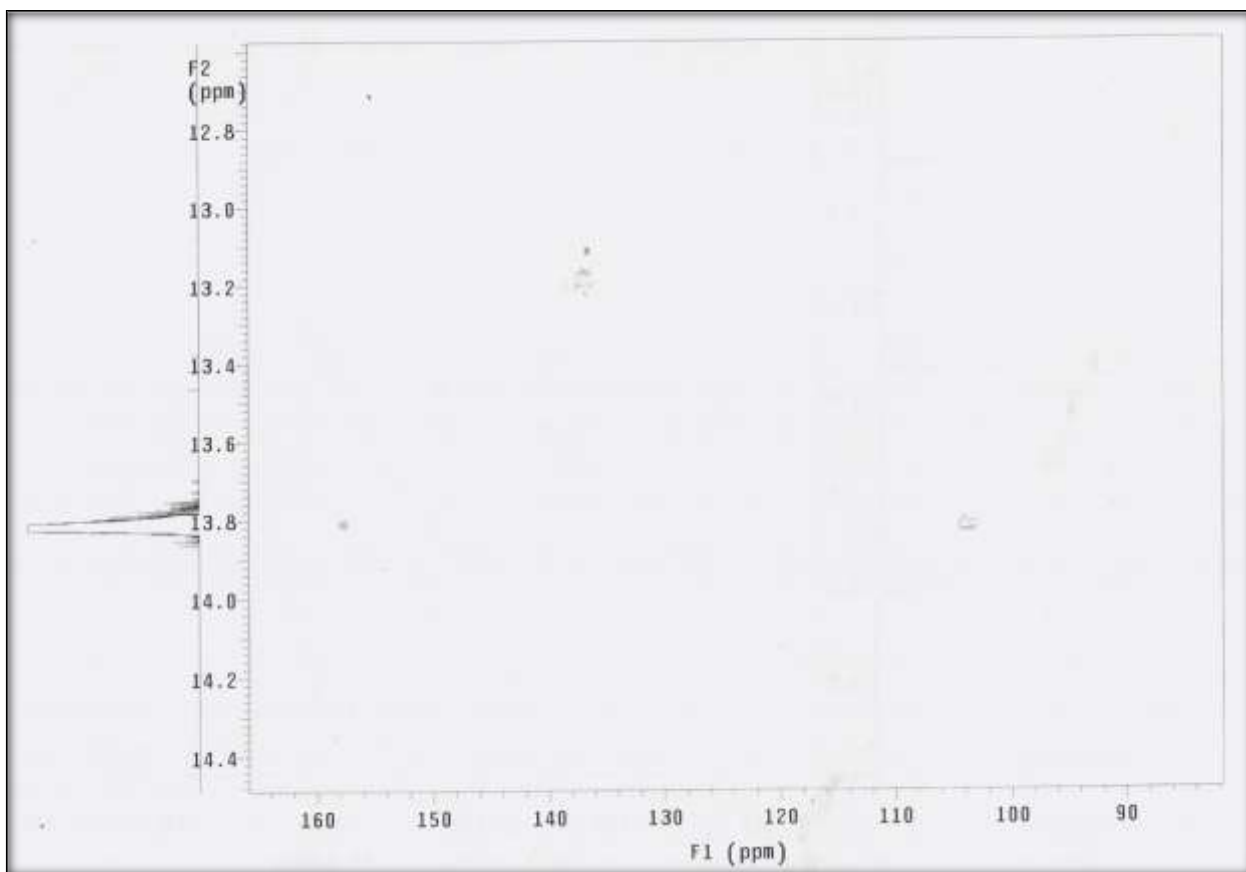


Figura 104. Expansão do espectro de HMBC [acetona-d₆, $J = 9$ Hz] da substância **CB12**.

4.1.12 Elucidação estrutural da substância **CB13**

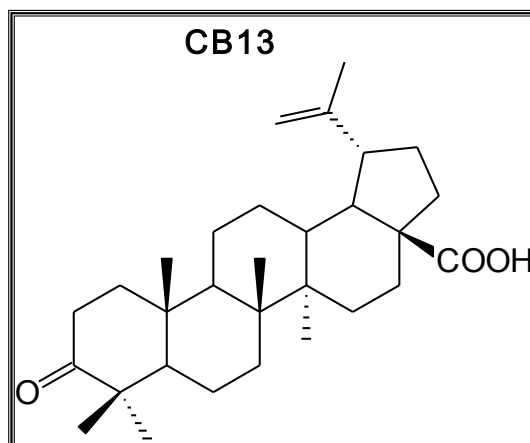


Figura 105. Estrutura da substância **CB13**.

A determinação estrutural da substância **CB13**, isolada do caule de *C. burlemarxii*, foi realizada através da análise do seu espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C , 106 a 109, e por comparação com os descritos na literatura para o ácido betulínico (DJERASSI, 1954), (DJERASSI, 1955), (DJERASSI, 1956), (CHE, 1980), (GUNASEKERA, 1983), (PATRA, 1988), (PENG, 1998).

O espectro de RMN ^1H mostrou o mesmo padrão de sinais do espectro do ácido betulínico (**CB08**), a saber, seis singletos atribuídos a grupamentos metílicos, dois dubletos atribuídos aos hidrogênios olefínicos terminais, entretanto todos os sinais encontram-se deslocados para região de desproteção, fig. 106 e 107.

O espectro de RMN ^1H da substância **CB13**, realizado em clorofórmio deuterado, apresentou um conjunto de sinais entre δ_{H} 0,40 e δ_{H} 3,03, sendo tal região característica de grupamentos metílicos, metilênicos e metínicos. Apresentou ainda dois sinais em δ_{H} 4,62 e δ_{H} 4,75 o que sugere a presença de hidrogênios olefínicos de uma dupla ligação terminal.

O espectro de RMN ^1H apresentou seis singletos característicos de grupamentos metílicos em δ_{H} 0,93, δ_{H} 0,98, δ_{H} 0,99, δ_{H} 1,03, δ_{H} 1,08 e δ_{H} 1,70. O espectro de RMN ^{13}C da substância **CB13**, fig. 108 e 109, realizado em clorofórmio deuterado, apresentou um conjunto de 30 sinais, a partir destes

dados e, aliado ao histórico de substâncias comumente isoladas no gênero *Clusia*, pode-se inferir que a substância **CB13** se tratar de um triterpeno (TEIXEIRA, 1999), (FERRAZ, 2005), (TEIXEIRA, 2006). Os sinais observados em δ_C 14,8 (CH₃), δ_C 16,0 (CH₃), δ_C 16,2 (CH₃), δ_C 19,6 (CH₃), δ_C 19,9 (CH₃) e δ_C 26,9 (CH₃) confirmam a presença de seis grupos metílicos na substância **CB13**. Foram observados dois sinais relativos a átomos de carbono olefínicos em δ_C 109,5 (CH₂) e em δ_C 150,5 (C) e dois sinais, um em δ_C 181,8 (C) e outro em 218,4 atribuídos a carbonos carbonílicos.

Tabela 16. Dados de RMN ¹³C [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB13**.

Posição	δ_C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$	Posição	δ_C	δ_C	$\delta_C^{a,b}$
	CB08	CB13			CB08	CB13	
1	38,9	39,8	39,3	16	32,4	32,9	32,3
2	27,5	34,4	28,3	17	56,1	56,6	56,6
3	78,2	218,4	78,1	18	49,2	49,8	49,4
4	39,0	47,6	39,5	19	46,9	47,8	47,1
5	55,4	55,2	56,0	20	150,8	151,3	150,5
6	18,4	19,6	18,8	21	30,7	31,2	29,9
7	34,4	33,8	34,9	22	37,2	37,6	37,3
8	40,8	40,9	41,1	23	28,2	26,1	26,9
9	50,6	50,1	51,1	24	15,8	16,3	19,6
10	37,1	37,1	37,5	25	16,1	16,4	16,0
11	20,9	21,6	21,2	26	16,3	16,4	16,2
12	25,6	25,7	26,1	27	14,8	14,9	14,8
13	38,2	38,7	38,6	28	178,4	178,8	181,8
14	42,5	42,7	42,9	29	109,5	109,9	109,9
15	29,8	30,8	30,3	30	19,5	19,5	19,9

^a Peng, C.; Bodenhausen, G.; Qiu, S.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Yuan, S.; Zheng, C.: *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, 267-278. ^b Espectro obtido em piridina deuterada.

A partir da comparação dos dados de RMN ¹H e RMN ¹³C com os dados descritos na literatura foi possível identificar o triterpeno **CB13** como sendo o ácido 3-oxo-lup-20(29)-en-28-óico, também chamado de ácido betulônico.

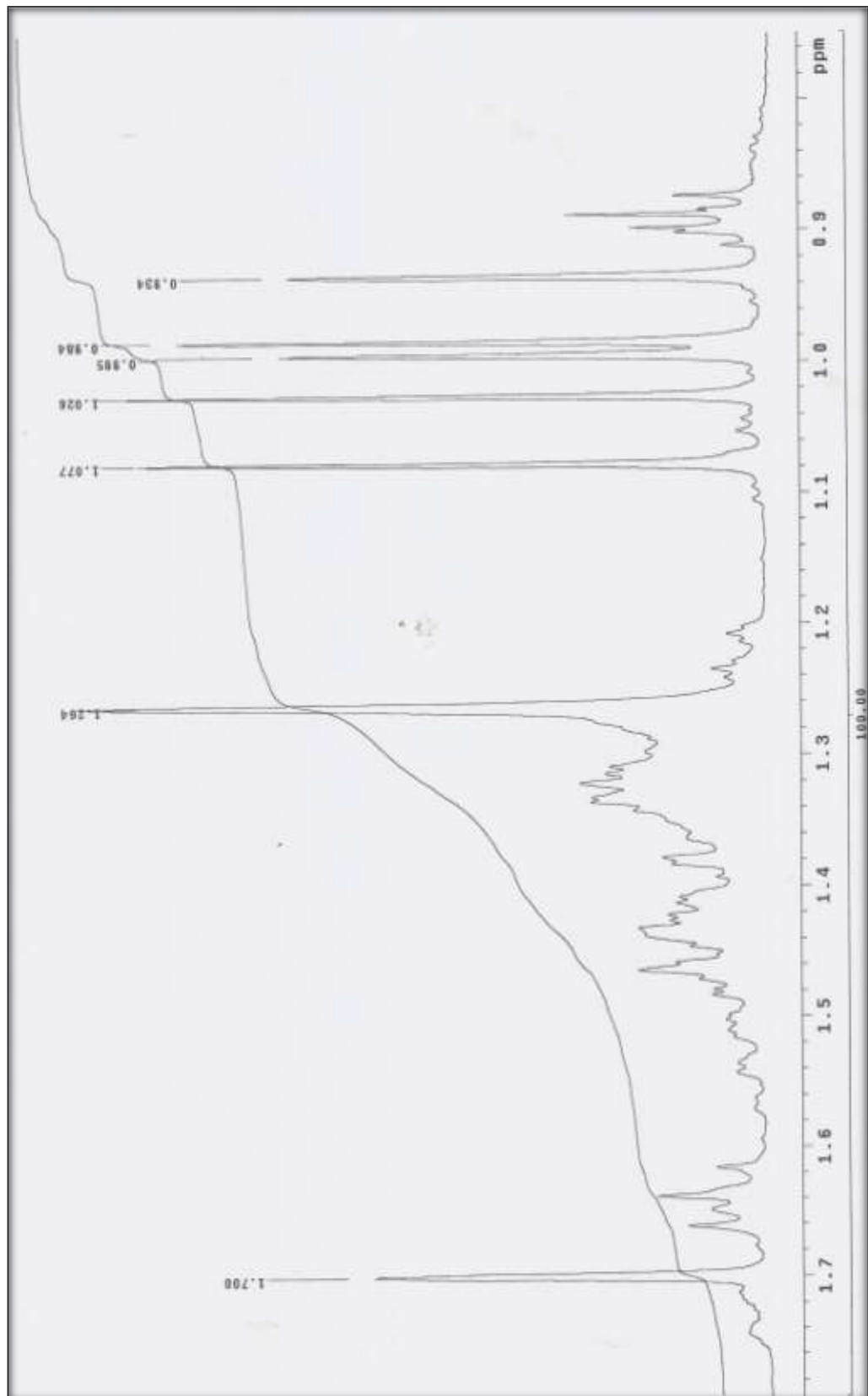


Figura 106. Expansão do espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB13**, região entre 0,8 e 1,8 ppm.

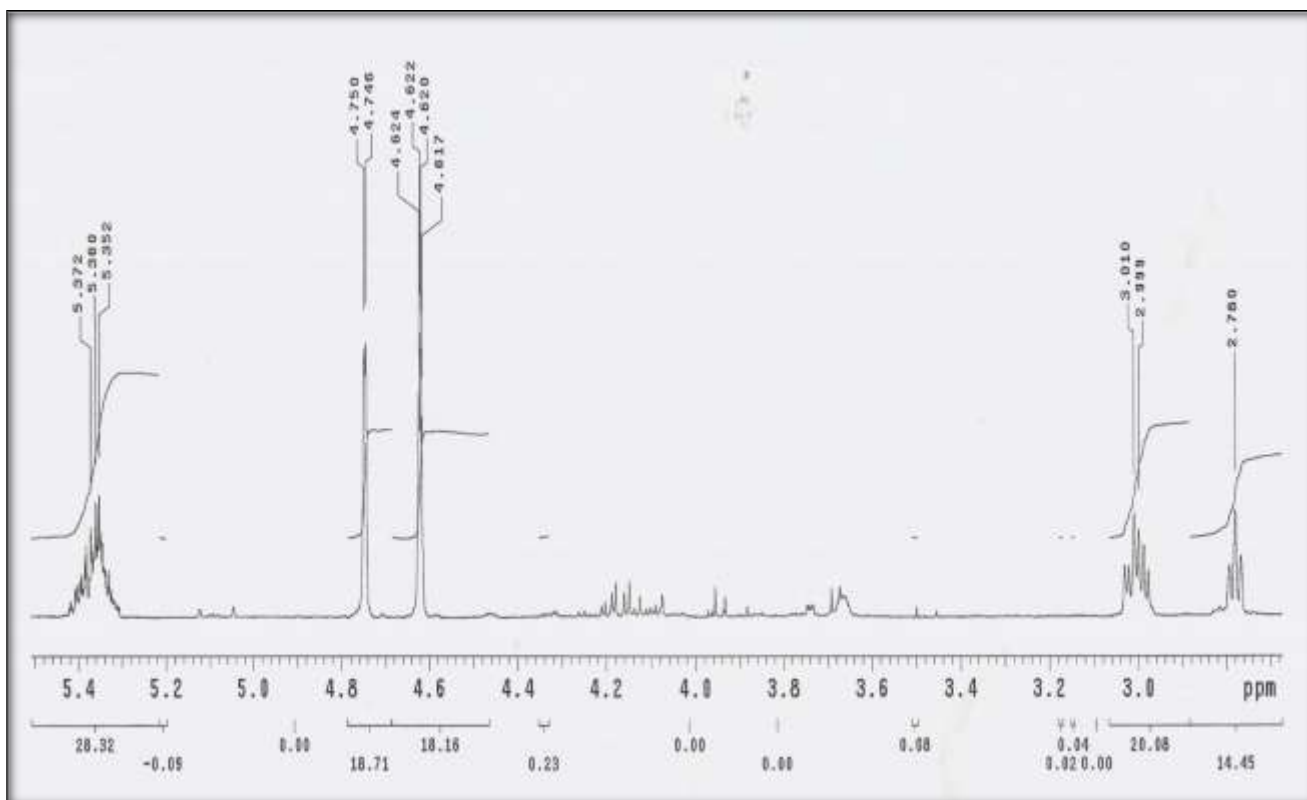


Figura 107. Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB13**, região entre 2,8 e 5,4 ppm.

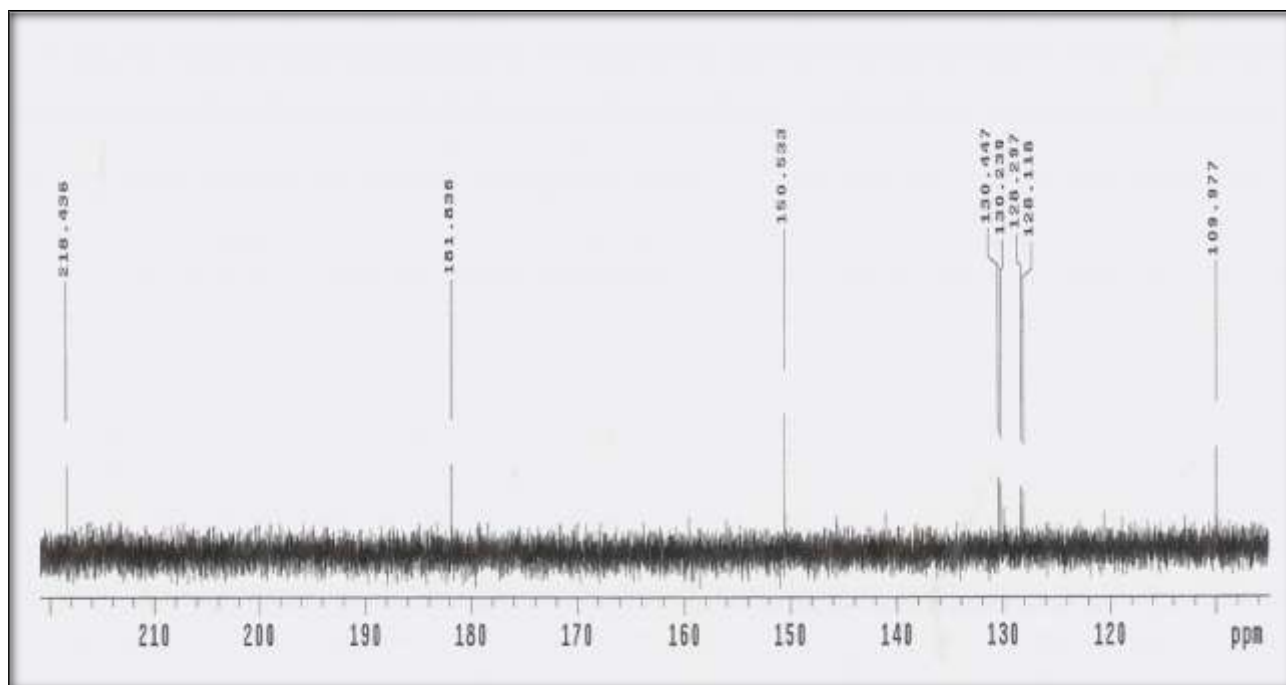


Figura 108. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância **CB13**, região entre 110 e 220 ppm.

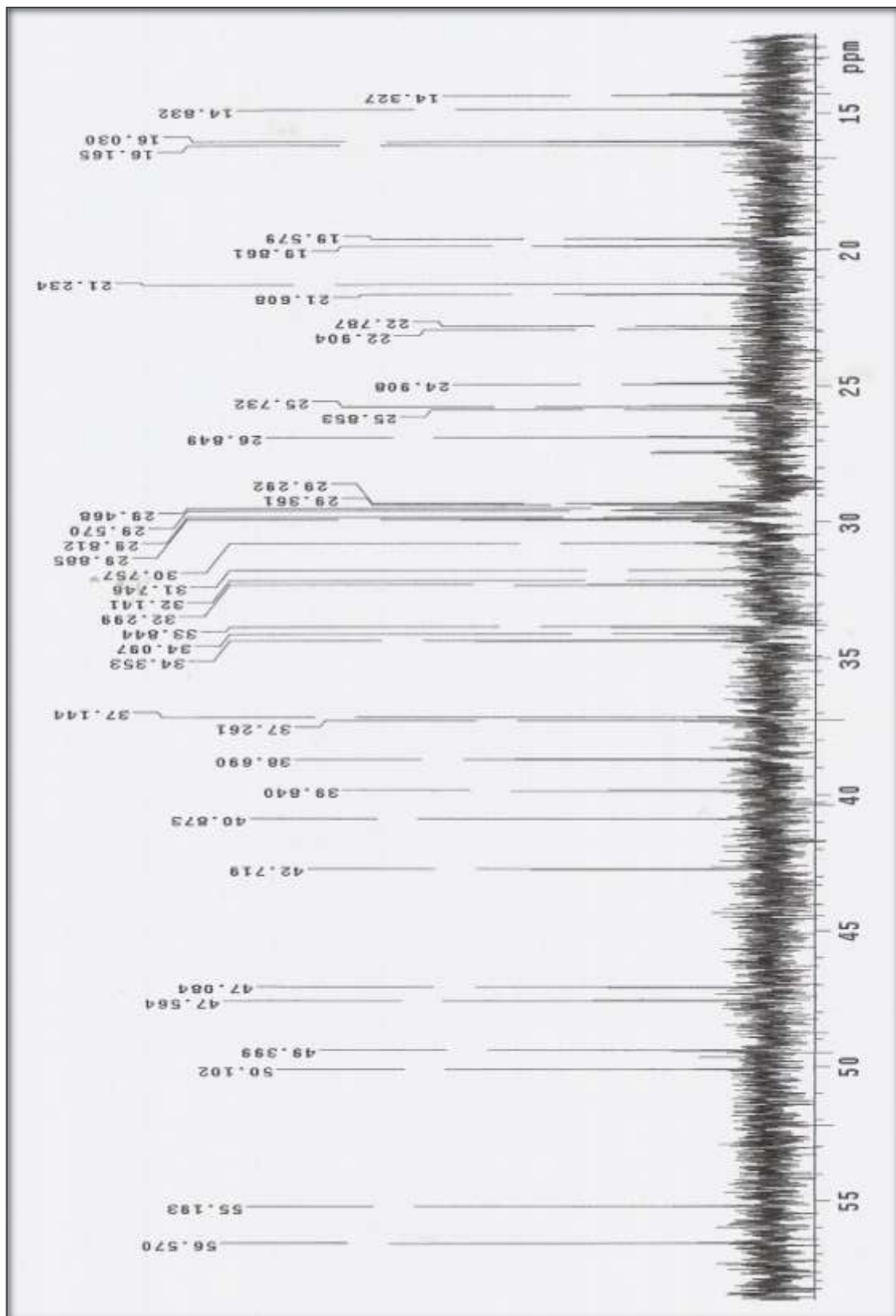


Figura 109. Expansão do espectro de RMN ¹H [125 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância **CB13**, região entre 15 e 58 ppm.

5. PROPOSTAS BIOGÊNICAS/BIOSSINTÉTICAS DA XANTONA E DO BIFENILO ISOLADOS DE *Clusia burlemarxii*

• Bifenilos, Benzofenonas e Xantonas

O esqueleto carbônico dos bifenilos, benzofenonas e xantonas são formados por enzimas do tipo policetídeo sintase (PKS). Estas enzimas orquestram uma série de reações de transferência de grupo acila, descarboxilação, condensação, ciclização e aromatização, sendo que utilizam como substrato inicial derivados do ácido benzóico (BEERHUES, 2009).

Durante a formação do benzoil-CoA o ácido cinâmico é inicialmente transformado no derivado tio-éster da coenzima A que, posteriormente, é hidratado. O derivado hidratado então sofre uma oxidação e o β -ceto éster formado perde uma unidade de acetilCoA através de uma reação de Claisen reversa, fig. 110 (DEWICK, 1997).

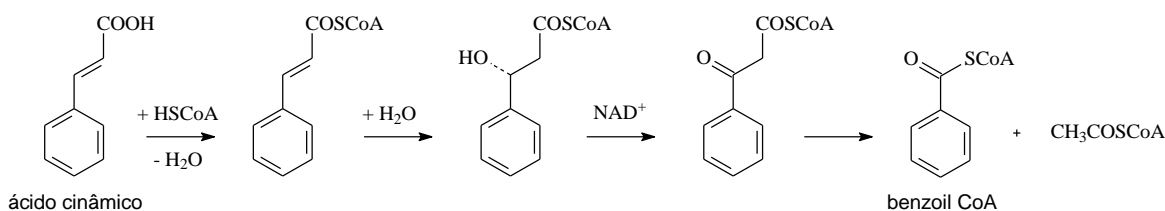


Figura 110. Formação do benzoil-CoA a partir do ácido cinâmico.

As enzimas bifenilo sintase (BIS) e benzofenona sintase (BPS), ambas do tipo policetídeo sintase, catalisam a adição de três unidades de acetil-CoA ao benzoilCoA, a partir da descarboxilação do malonil-CoA, obtendo-se como produto o mesmo tetracetídeo, fig. 111.

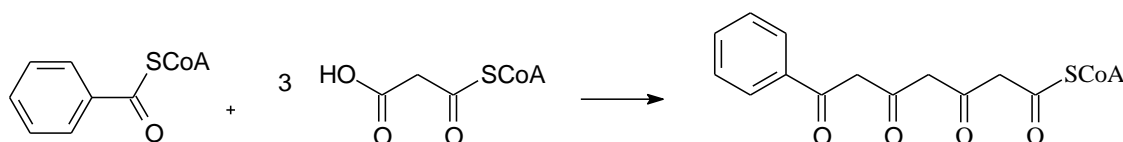


Figura 111. Formação do intermediário tetracetídeo pelas enzimas BIS e BPS.

Enquanto a enzima bifenilo sintase catalisa uma condensação aldólica intramolecular C2→C7 seguida de descarboxilação para formar a 3,5-dihidroxibifenila, a enzima benzofenona sintase promove uma condensação de Claisen C6→C1 para formar a 2,4,6-trihidroxibenzofenona (florobenzofenona), fig. 112.

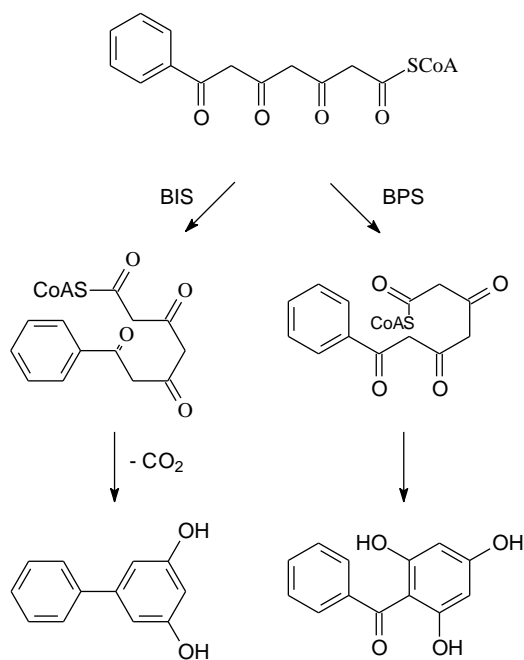


Figura 112. Formação da 3,5-dihidroxibifenila e da florobenzofenona.

Alternativamente, as plantas podem utilizar derivados do ácido benzóico para produzir bifenilos, benzofenonas e xantonas com diferentes padrões de oxidação. Nesse sentido os sistemas enzimáticos que levam a produção de xantonas a partir das benzofenonas preferem o ácido 3-hidroxibenzóico como substrato inicial. A benzofenona sintase catalisa reações semelhantes a aquelas representadas na figura 113, entretanto forma-se a 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona, a qual sofre um acoplamento fenólico oxidativo regioseletivo promovido pelo complexo enzimático P450, para produzir a 1,3,5- ou 1,3,7-trihidroxixantona, fig. 113.

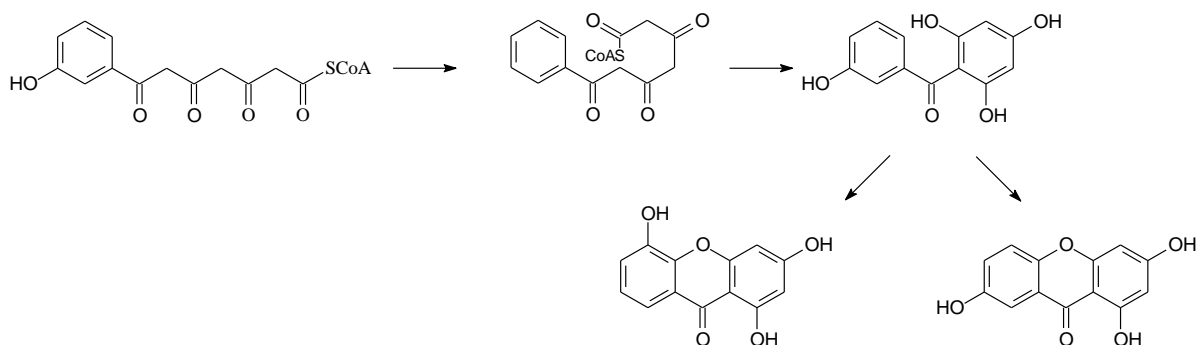


Figura 113. Formação da 1,3,5-trihidroxixantona e da 1,3,7-trihidroxixantona.

As bifenilas, benzofenonas e xantonas podem ainda sofrer uma série de reações de prenilação e ciclização intramolecular para dar origem a derivados policíclicos.

A seguir são mostrados os esquemas biossintéticos de formação das substâncias **CB09** e **CB11**, fig. 114 e 115.

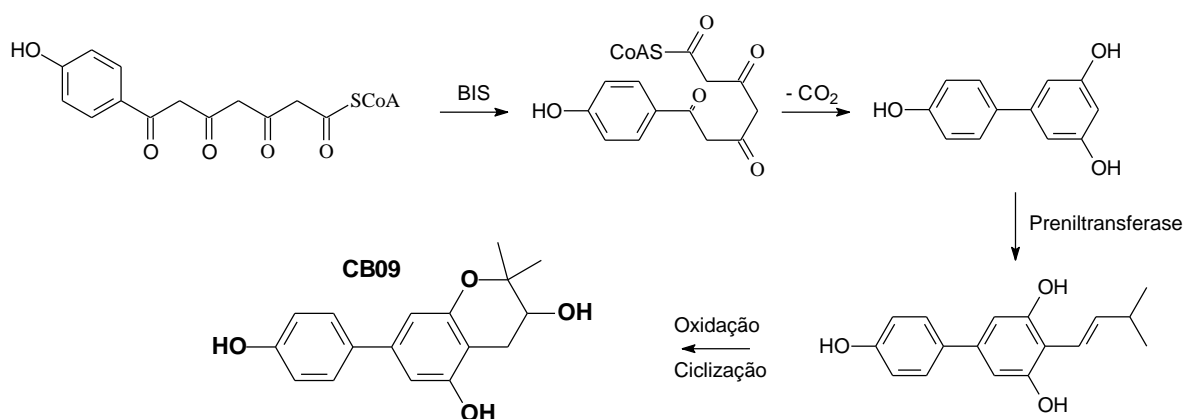


Figura 114. Proposta biossintética da formação da substância **CB09**.

Durante a biossíntese das substâncias **CB09** e **CB11**, a espécie *C. burlemarxii* utiliza diferentes derivados do ácido benzóico para produzir bifenilos e xantonas diferindo quanto o padrão de oxidação. Os sistemas enzimáticos que levam a produção da substância **CB09** utilizam o ácido 4-hidroxibenzóico como substrato inicial. A enzima bifenilo sintase catalisa uma condensação aldólica intramolecular C2→C7 seguida de descarboxilação para formar a 3,4',5-trihidroxibifenila. A seguir a bifenilo formada sofre uma série de reações que envolvem a prenilação em C4 com posterior oxidação e ciclização para formar a substância **CB09**.

Na produção da substância **CB11** os sistemas enzimáticos utilizam o ácido 3-hidroxibenzóico como substrato inicial. A enzima benzofenona sintase promove uma condensação de Claisen C6→C1 para formar a 2,4,6-trihidroxibenzofenona (florobenzofenona) a qual sofre um acoplamento fenólico oxidativo regioseletivo para produzir a 1,3,5-trihidroxixantona. A seguir a xantona formada sofre uma série de reações que envolvem a O-metilação em C1 e a prenilação em C6 com posterior oxidação e ciclização para formar a substância **CB11**.

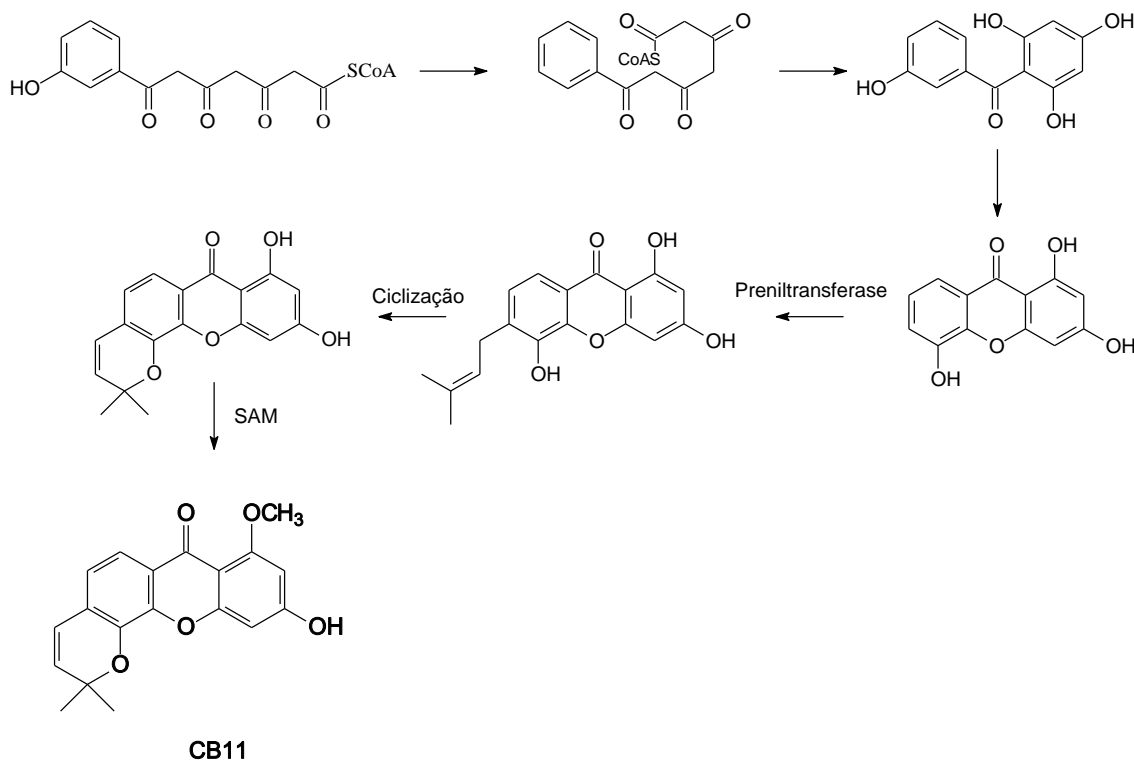


Figura 115. Proposta biossintética da formação da substância **CB11**.

6. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS SUBSTÂNCIAS CB01 A CB13

O interesse do homem pela utilização de substâncias orgânicas de origem vegetal teve seu início ainda na pré-história, uma vez que produtos de origem vegetal contribuem significativamente no fornecimento de substâncias que são aplicadas ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. Hoje as plantas estão sendo investigadas com o objetivo de descobrir substâncias químicas com relevantes atividades farmacológicas.

Atualmente, estudos relatam as diversas atividades farmacológicas dos extratos, substâncias puras e óleos essenciais obtidos a partir de fontes vegetais (MINAMI, 2003), (MAGALHÃES, 2000), (SANTIAGO, 2005), (ANDRADE, 2005), (VECHIA, 2009), (SIMMONDS, 2001), revelando o grande potencial da aplicação de plantas nativas das diversas regiões do mundo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Nesse trabalho, a partir do estudo fitoquímico das folhas e caule da espécie *Clusia burlemarxii* foram isolados treze metabólitos secundários: três triterpenos, três xantonas, o ácido protocatechuico, uma lignana, o ácido tocotrienolóico, dois flavonóis O-glicosilados, uma lactona e uma bifenila. Algumas dessas substâncias apresentam relevantes atividades farmacológicas já descritas na literatura.

Tane e colaboradores (2009) relatam a atividade antimicrobiana da friedelina e outros compostos isolados de *Vismia rubescens* (Clusiaceae), sendo a friedelina ativa frente as bactérias *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (TANE, 2009). Kuete e colaboradores (2007) descrevem ainda a atividade antimicrobiana da friedelina frente a dez bactérias Gram negativas, seis bactérias Gram-positivas e frente aos fungos *Candida albicans* e *Candida glabrata* (KUETE, 2007). Jain e colaboradores relatam a atividade antifúngica da friedelina frente a quatro outros micro-organismos (JAIN, 2001). A friedelina apresentou atividade antiplasmodial frente *P. falciparum* (LENTA, 2007). Tsao e colaboradores relatam a atividade anti-inflamatória da friedelina por meio da atuação frente as enzimas NADPH oxidase (NOX) e óxido nítrico sintase (NOS) (TSAO, 2008). A friedelina

também apresentou atividade inibitória frente à enzima α -glicosidase, *in vitro* (KHAN, 2008). A inibição da α -glicosidase reduz a absorção de carboidratos pelo organismo e, portanto, é um importante aliado no controle da diabetes.

A quercetrina, um flavonóide O-glicosilado, apresentou uma excelente atividade antioxidante frente o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrihidrazil) (ADEROGBA, 2005). Ribeiro e colaboradores também relatam uma significativa atividade antioxidante dos flavonóides afzelina e quercetrina, sendo a quercetrina um antioxidante mais poderoso do que a afzelina, provavelmente, devido ao seu sistema catecol no anel B (RIBEIRO, 2005). Chou e colaboradores relatam a atividade dos flavonóides quercetrina e azfelina via inibição da replicação do vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-1), sendo que a azfelina inibiu a replicação moderadamente, enquanto a quercetrina fracamente (CHOU, 2009). Frações ricas em quercetrina apresentaram importante atividade ansiolítica (RUIZA, 2008) e atividade antiviral contra a hepatite B (Anti-HBV) (Li, 2008). Os flavonóides azfelina e quercetrina também apresentaram atividade anti-leishmania (MUZITANO, 2006).

A xantona 6-desoxiisojacareubina apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-negativas *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* e frente aos fungos *Candida albicans* e *Candida grabata* (KUETE, 2007).

As lignanas são muito raras na família Clusiaceae sendo o (+)-lioniresinol a terceira lignana isolada em Clusiaceae. A lignana (+)-lioniresinol, isolado a partir da espécie *Salacia chinensis*, apresentou uma excelente atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (KISHI, 2003).

Lin e colaboradores descrevem as atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante e a capacidade de redução do conteúdo de triacilglicérides *in vivo* do ácido 3,4-dihidroxibenzoico, também conhecido como ácido protocatechuico, quando utilizado como suplemento na dieta de ratos (LIN,

2009). O ácido protocatechuico também apresentou atividade antibacteriana (FANG, 2008), ação neuroprotetora contra o mal de Alzheimer (MOOK-JUNG, 2002), anti-tumoral durante a fase da iniciação (WADA, 2009) além de apresentar inibição da replicação do vírus HIV e atividade antioxidante (CHOU, 2009).

O ácido betulínico apresenta inúmeras atividades farmacológicas importantes, tais como, inibição da replicação do vírus HIV em linhagens de células linfocitárias H9 (KILKUSKLE, 1994), antibacteriana (RIVERO-CRUZ, 2009), (KUETE, 2007), antifúngica (CHAUDHURI, 2004), antiplasmodial (LENTA, 2007), (LENTA, 2008), antitumoral (GAO, 2003), inibição da replicação alfa-vírus (POHJALA, 2009) e redução do acúmulo de gordura em abdômen de ratos quando suplementado na dieta (MELO, 2009).

CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS E CAULE DE *Clusia burlemarxii*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a descoberta de novas drogas que possam ser utilizadas no tratamento das mais variadas doenças que acometem o homem é realizada basicamente através dos ensaios biológicos quer das substâncias obtidas de fontes naturais, plantas, animais e micro-organismos, quer obtidas sintética ou semi-sinteticamente. A avaliação do potencial biológico de um organismo é realizada através de um “*screening*” in vitro, no qual apenas uma pequena quantidade de amostra é requerida (SOEJARTO, 1996).

Um grande aliado na busca de substâncias bioativas é o conhecimento da medicina popular, a etnomedicina, o qual provê, na maioria das vezes, um importante direcionamento nessa “jornada”. O sucesso do conhecimento etnomedicinal é comprovado pela grande quantidade de drogas em uso clínico derivadas de plantas com destacado uso por diversas comunidades. Estima-se que 74% das drogas em uso sejam obtidas diretamente de plantas (SOEJARTO, 1996). Podemos citar inúmeros exemplos da importância do conhecimento da medicina popular em diversos medicamentos utilizados em larga escala pelo homem. A aspirina foi desenvolvida a partir de estudos etnofarmacológicos com as cascas do salgueiro *Salix* spp., utilizada na medicina tradicional européia no tratamento de inflamações e da febre. O agente antimalárico artemether é produzido semi-sinteticamente da artemisina, um sesquiterpeno isolado a partir do estudo etnofarmacológico da espécie vegetal *Artemisia annua* L. (GERTSCH, 2009).

Os metabólitos obtidos a partir das plantas desempenham um importante papel nesse contexto, como destacado por Montanari e colaboradores, os quais afirmam que “*as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra*” fornecendo, de forma mais significativa, inúmeras

substâncias úteis ao tratamento das doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI, 2001).

A maior parte desses metabólitos é produzida como mecanismos de defesa dos vegetais às condições ambientais “hostis”, em geral devido à presença de micro-organismos, insetos e a condições de adaptação de fatores climáticos (MONTANARI, 2001). Uma grande parte dos metabólitos secundários com potencial de aplicação biológica é descoberta a partir da observação da interação entre os organismos, planta-microorganismo, planta-insetos e planta-planta. Como exemplo, podemos citar as observações realizadas em campo que indicaram a ausência de insetos predadores da espécie *Myrica gale* L., a partir da qual, através de estudos biomonitorados, foi possível isolar um novo flavonóide com aplicações antifúngicas, um derivado glicosilado (resíduo de ramnose) do canferol, também isolado neste trabalho a partir da *C. burlemarxii* (SOEJARTO, 1996).

Em virtude do contínuo desenvolvimento de resistência aos antibióticos utilizados clinicamente, bem como, devido à grande incidência de infecções oportunistas criou-se uma necessidade de busca de novos agentes antimicrobianos. Nesse sentido o *screening* para determinação do potencial biológico de extratos e substâncias obtidas a partir de fontes naturais (plantas e micro-organismos) tem sido o ponto de partida para o descobrimento de novas drogas.

Dentre as metodologias utilizadas no processo de avaliação rápida do potencial biológico de uma espécie destacam-se o teste de difusão em disco e a microdiluição em caldo nutritivo. Na avaliação por microdiluição em caldo os extratos são avaliados quanto ao potencial antimicrobiano utilizando-se agentes microbianos disponibilizados comercialmente pela American Type Culture Collection (ATCC).

2. OBJETIVOS

- Estabelecer as atividades antibacterianas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Micrococcus luteus* (Gram-positivas) e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa);

- Estabelecer as atividades antifúngicas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente os fungos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Candida albicans*;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

a) PREPARO DOS MATERIAS PARA O BIOENSAIO: ESTERILIZAÇÃO

Todos os materiais utilizados nos bioensaios foram esterilizados por calor úmido em autoclave. Para tanto, os materiais foram embalados com papel Graft e envolvidos em sacos plásticos para serem submetidos à autoclavação por 30 minutos a 121°C. Dentre os materiais autoclavados estão as placas de petri, tubos de ensaio, vidros de penicilina, ponteiras e frascos de Erlenmeyer contendo água destilada.

As placas de 96 poços são termosensíveis e, portanto, foram esterilizadas mediante a exposição à radiação UV durante 50 minutos.

3.2. BIOENSAIO: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e substâncias foi realizada através do teste de microdiluições sucessivas em placas com 96 poços, segundo a metodologia de Bicalho e colaboradores (2003).

Utilizou-se caldo nutriente e caldo de malte como meios de cultura para bactérias e fungos, respectivamente. As soluções estoque das amostras foram preparadas dissolvendo-se 2 mg da substância pura ou 8 mg do extrato em 5 mL de uma solução de dimetilsulfóxido em água (20% v/v). Os controles positivos utilizados foram Cloranfenicol e Ciclopirox Olamina (Loprox) para bactérias e fungos, respectivamente, com a mesma concentração da solução estoque das amostras testadas (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para substâncias puras e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato). As concentrações das amostras e dos controles positivos testados variaram de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para os extratos, e de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para as substâncias puras. O período de incubação foi de 24 horas para bactérias e de 72 horas para fungos. Após o período de incubação foi observada a ocorrência ou não de turvação dos caldos de culturas presentes nos poços para determinação da CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento de micro-organismos).

3.3. BIOENSAIO: MICRO-ORGANISMOS TESTADOS

Os extratos e substâncias isoladas foram testadas frente as bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans* (ATCC 5175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), frente as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* e frente aos fungos *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e *Cladosporium cladosporioides* (IMI 178517).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 17 e 18 ilustram os resultados obtidos para os ensaios antibacterianos dos extratos e substâncias isoladas de *C. burlemarxii*.

Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e fases obtidas das folhas e do caule de *C. burlemarxii*.

Micro-organismos	Extrato Etanólico Folhas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fase Hexânica Folhas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fase AcOEt Folhas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Extrato Metanólico Caule ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>S. aureus</i>	62,50	250	500	>500
<i>S. mutans</i>	>500	>500	>500	62,5
<i>B. subtilis</i>	31,25	125	>500	62,5
<i>M. luteus</i>	>500	>500	500	31,2
<i>E. coli</i>	>500	>500	>500	>500
<i>S. choleraesuis</i>	>500	>500	>500	>500
<i>P. aeruginosa</i>	>500	>500	>500	>500
<i>A. niger</i>	>500	>500	>500	>500
<i>C. cladosporioides</i>	>500	>500	>500	>500

Os experimentos foram feitos em triplicata. > 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: não ocorreu inibição em concentração menor que 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 18. Concentração Inibitória Mínima (CIM)^{a,b} das substâncias isoladas de *C. burlemarxii*.

Substância	PA	SC	EC	BS	SA	SM	ML	AN	CC
CB02	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
CB03	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB04	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100
CB05	>100	>100	>100	>100	25	>100	>100	>100	>100
CB06	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100
CB07	>100	>100	>100	>100	25	>100	>100	>100	>100
CB08	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB09	>100	>100	>100	100	50	100	25	>100	>100
cloranfenicol	62,5	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9	-	-
Loprox	-	-	-	-	-	-	-	3,9	3,9

^aOs experimentos foram feitos em triplicata. ^bConcentrações superiores à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas como não ativas. PA - *P. aeruginosa*, SC - *S. choleraesuis*, EC - *E. coli*, BS - *B. subtilis*, AS - *S. aureus*, SM - *S. mutans*, ML - *M. luteus*, AN - *A. niger*, CC - *C. cladosporioides*.

Foram testados o extrato etanólico das folhas e as fases obtidas por

partição com hexano e acetato de etila e o extrato metanólico do caule. O extrato etanólico das folhas mostrou uma maior atividade contra *S. aureus* ($62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *B. subtilis* ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A fase obtida com hexano também foi ativa, embora em menor grau, contra os mesmos micro-organismos apresentando CIM de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A fase obtida com acetato de etila mostrou uma pequena atividade contra *S. aureus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *M. luteus* ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O fato de o extrato etanólico apresentar uma maior atividade do que as fases hexânica e em acetato de etila poderia ser explicado, ou pela existência de um efeito sinérgico entre as substâncias presentes nessas fases, ou pela presença de substâncias com maior atividade na parte hidro-alcoólica do extrato que ainda não foi estudada. O extrato metanólico do caule apresentou atividade contra *S. mutans* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *B. subtilis* ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *M. luteus* ($31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

As substâncias **CB02** a **CB09** foram ensaiadas frente aos mesmos micro-organismos acima. O ácido betulínico e a lactona 4-hidroxi-5,5-dimetildihidrofuran-2-ona não apresentaram atividade. Das substâncias isoladas do extrato metanólico do caule, a lignana, **CB07**, apresentou atividade contra *S. aureus* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A bifenila, **CB09**, apresentou atividade contra um maior número de micro-organismos: *B. subtilis* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. aureus* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *S. mutans* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *M. luteus* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O ácido protocatechuico, **CB06**, foi pouco ativo apenas contra *B. subtilis*. É interessante notar que tanto **CB07** quanto **CB09** apresentaram atividade contra *S. aureus* enquanto que o extrato não, neste, provavelmente, a ação dessas substâncias pode ter sido mascarada pela presença de outras substâncias ou por estarem muito diluídas. Das substâncias isoladas do extrato etanólico das folhas, a quercetrina, **CB04**, e o ácido 2*E*- δ -tocotrienolóico apresentaram pequena atividade contra *B. subtilis*, já o 3-O- α -L-ramnopiranosilkaempferol, **CB05**, apresentou uma maior atividade contra *S. aureus* ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os resultados apresentados mostram que as substâncias isoladas possuem uma seletividade de atuação antimicrobiana, inibindo o crescimento de apenas algumas bactérias Gram positivas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e substâncias isoladas da espécie vegetal *C. burlemarxii*.

Das folhas foram obtidas cinco substâncias sendo a friedelina, a quercetrina e a azfelina comumente encontrados em plantas. Já a 4-hidroxi-5,5-dimetildi-hidrofuran-2-ona tem ocorrência raríssima em plantas, sendo este o primeiro relato para a família Clusiaceae. O ácido 2Z- δ -tocotrienólico também é raramente encontrado sendo mais comum na família o isômero *E*.

Do caule foram isoladas oito substâncias sendo os ácidos betulínico, betulônico e protocatechuico amplamente distribuídos em plantas. Já as lignanas são bastante raras na família sendo o (+)-lioniresinol a terceira lignana isolada em Clusiaceae. As bifenilas são mais comuns na família, no entanto, este é o primeiro relato do composto 2,2-dimetil-3,5-di-hidroxi-7-(4-hidroxifenil)cromano. As xantonas tem baixa ocorrência no gênero *Clusia* sendo neste trabalho isoladas as xantonas 6-desoxiisojacareubina, brasilixantona B, no entanto, este é o primeiro relato da substância burlemarxiixantona.

Pode-se concluir que a composição química das frações polares do espécimen estudado difere quanto à classe de substâncias orgânicas presentes quando comparados aquelas apresentadas nos trabalhos previamente publicados na literatura, os quais estudam os extratos menos polares, em especial aqueles obtidos com hexano. Em geral, as espécies do gênero *Clusia* são conhecidas como fontes de benzofenonas poliisopreniladas e triterpenos. Neste trabalho, isolaram-se substâncias pertencentes a classes pouco comuns no gênero *Clusia*, sendo algumas delas inclusive incomuns até mesmo na família Clusiaceae.

A presença de xantonas na espécie estudada sugere algum tipo de regulação especial da rota biossintética de produção dos bifenilos, benzofenonas e xantonas. Estas substâncias são formadas por enzimas do tipo policetídeos sintase (PKS) que orquestram uma série de reações de

transferência de grupo acila, descarboxilação, condensação, ciclização e aromatização, sendo que utilizam como substrato inicial derivados do ácido benzóico.

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana mostram que as substâncias isoladas possuem uma seletividade de atuação antimicrobiana, inibindo o crescimento de apenas algumas bactérias Gram positivas. Além disso, pode-se observar que a substituição de alguns grupos nas moléculas podem alterar significativamente a resposta da atividade antimicrobiana, como foi o caso dos flavonóides quercetrina e azfelina que diferem entre si apenas de um grupo hidroxila na posição 3' e que, entretanto, apresentaram seletividade microbiana e atividade distintas.

PUBLICAÇÕES RESULTANTES

Resumos publicados em anais de congressos

LIMA, R.M.F. ; CRUZ, E. ; FREITAS, V.S. ; MARQUES, E.J. ; **Ribeiro, P.R.** ; FERRAZ, C. G. ; Cruz, F.G. ; EL-BACHÁ, R.S. . Cytotoxicity of a Xanthone Extracted from *Clusia burlemarxii* to N2a Neuroblastoma Cells. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010.

Ribeiro, P.R. ; FERRAZ, C. G. ; Cruz, F.G. . A new xanthone from *Clusia burlemarxii*. In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products, 2009, São Pedro. Abstract Book Online, 2009.

Ribeiro, P.R. ; Cruz, F.G. ; FERRAZ, C. G. . A new biphenyl from *Clusia burlemarxii*. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro. A TRIBUTE TO PROF. OTTO R. GOTTLIEB (ABSTRACTS), available at http://dell.nossosite.com.br/bcnp2007/media/pub/abst_book.pdf, 2007.

Artigos Científicos

Paulo R. Ribeiro, Caline G. Ferraz, Maria L. S. Guedes, Dirceu Martins and Frederico G. Cruz. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. **(Submetido)**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R.J.; Loftus, P.: *Proton and Carbon-13 NMR Spectroscopy: An Integrated Approach*, 2nd Ed., Heyden and Son Ltd., Bristol, 1979.

Aderogba, M.A.; Okoh, E.K.; Idowu, T.O.: *Journal of Biological Sciences*, **2005**, *5*, 239.

Ahmed, A.A.; Hussein, T.A.; Mahmoud, A.A.; Farag, M.A.; Pare, P.W.; Wojcinska, M.; Karchesy, J.; Mabry, T.J.: *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 2539.

Andrade, M.T.; Lima, J.A.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Carvalho, M.P.; Epifanio, R.A.: *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4092.

Andrade, M.R.; Almeida E.X.; Conserva, L.: *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1431.

Azebaze, A. G. B.; Ouahouo, B. M. W.; Vardamides, J. C.; Valentin, A.; Kuete, V.; Acebey, L.; Beng, V. P.; Nkengfack, A. E.; Meyer, M.: *Chemistry of Natural Compounds* **2008**, *44*, 582.

Baggett, S.; Mazzola, E.P.; Kennelly, E.J.; *Studies in Natural Products Chemistry*, **2005**, *32*, 721.

Balbach, A.; *A Flora Nacional na Medicina Doméstica*, Edel, São Paulo, 1986, p. 466.

Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa C. G.; Peixoto, A. L.; *Sistemática de angiospermas do Brasil*, 2^a ed., Editora da UFV: Viçosa, 2002.

Beerhues, L.; Liu, B.: *Phytochemistry*, **2009**, *70*, 1719.

Bicalho, B.; Gonçalves, R.A.C.; Zibordi A.P.; Manfio G.P.; Marsaioli, A.; *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch* **2003**, *58*, 746.

Bittrich, V.; Amaral, M.C.E.; *Flower morphology and pollination biology of some Clusia species from the Gran Sabana (Venezuela)*. Kew Bull., **1996**, *51*, 681.

Brenzan, M.A.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D.; Ueda-Nakamura, T.; Young, M.C.M.; Cortez, D.A.G.; *Parasitol Res*, **2007**, *101*, 715.

Castardo, J.C.; Prudente, A.S.; Ferreira, J.; Guimarães, C.L.; Monache, F.D.; Filho, V.C.; Otuki, M.F.; Cabrini, D.A.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, *118*, 405.

Chaudhuri, P.K.; Srivastava, R.; Kumar, S.; Kumar, S.: *Phytother. Res.* 2004, *18*, 114.

Che, C. T.; Koike, K.; Cordell, G. A.; Fong, H. H. S.; Dobberstein, R. H.: *J. Nat. Prod.*, **1980**, *43*, 420.

Chen, J.; Peng, C.; Huang, H.; Chen, I.: *Planta Med.*, **2005**, *72*, 473.

Chen, Z.; Liu, Y. M.; Yang, S.; Song, B. A.; Xu, G. F.; Bhadury, P. S.; Jin, L. H.; Hu, D. Y.; Liu, F.; Xue W.; Zhou, X.: *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 1337.

Chevreur, *Ann. Chim.*, **1807**, 62, 323.

Choi, S.; Yoon, J.; Choi, H.; Le, M.: *Chemistry of Natural Products* **2009**, 45, 893.

Chou, C.H.; Su, C.R.; Ku, Y.C.; Wu, T.S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, 57, 1227.

Corey, E.J.; Ursprung, J.J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 5041–5051.

Cui, L.; Thuong, P.T.; Lee, H.S.; Ndinteh, D.T.; Mbafor, J.T.; Fomumc, Z.T.; Oh, W.K.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 10356.

Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Botta, B.; Gacs-Baitz, E.; *Heterocycles* **2002**, 56, 589.

Delle Monache, F.; Marta, M.; Mac-Quhae, M. M.; Nicoletti, M.: *Gazzetta Chimica Italiana*, **1984**, 114, 135.

Dewick, P. M.: *Medicinal Natural Products (A Biosynthetic Approach)*, John Wiley & Sons Ltd Ed.: Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England, 1997.

Djerassi, C.; Burstein, B. S.; Estrada, H.; Grossman, J.; Herrán, J.; Lemín, A. J.; Manjarrez, A.; Pakrashi, S. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2312.

Djerassi, C.; Lippman, A. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 5780.

Djerassi, C.; Liu, L. H.; Farkas, E.; Lippman, A. E.; Lemín, A. J.; Geller, L. E.; McDonald, R. N.; Taylor, B. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1200.

Dongmo, A.B.; Azebaze, A.G.B.; Nguenefack, T.B.; Ouahouo, B.M.; Sontia, B.; Meyer, M.; Nkengfack, A.E.; Kamanyi, A.; Vierling, W.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, 111, 329.

Doyle, M.P.; Oeveren, A.V.; Westrum, L.J.; Protopopova, M.N.; Clayton, T.W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8982.

Drake, N.L.; Jacobsen, R.P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 57, 1570.

Fang, J.J.; Ye, G.; Chen, W.L.; Zhao, W.M.: *Phytochemistry*, **2008**, 69, 1279.

Ferraz, C.G.: *Dissertação de Mestrado em Química*, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2005.

Gao, H.; Wu, L.; Kuroyanagi, M.; Harada, K.; Kawahara, N.; Nakane, T.; Umehara, K.; Hirasawa, A.; Nakamura, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 1318.

Gonzalez, J.G.; Olivares, E.M.; Delle Monache, F.: *Phytochemistry*, **2003**, 51, 1318.

- Gunasekera, S. P.; Selliah, S. S.; Sultanbawa, M. U. S.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, **1975**, 1539.
- Gunasekera, S. P.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R.: *J. Nat. Prod.*, **1983**, *46*, 118.
- Gustafson, K.R.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G.; Fuller, R.W.; McKee, T.C.; Cardelina, J.H.; McMahon, J.B.; Gragg, G.M.; Boyd, M.R.: *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10093.
- Hanawa, F.; Shiro, M.; Hayashi, Y.: *Phytochemistry* **1997**, *45*, 589.
- Harbone, J.B.; Mabry, T.J.: *The flavonoids: Advances in Research*, Editora Chapman and Hall: New York, 1982.
- Hochwallner, H.; Weber, A.: *Flora*, **2006**, *201*, 407.
- Iinuma, M.; Tosa, H.; Toriyama, N.; Tanaka, T.; Ito, T.; Chelladurai, V.: *Phytochemistry* **1996**, *43*, 681.
- Ishiguroa, K.; Chaudhuria, S.K.; Kubo, I.: *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2531.
- Ishii, H.; Kobayashi, J.; Sakurada, E.; Ishikawa, T.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1992**, 1681.
- Istrati e Ostrogovich; *Compt. rend.*, **1899**, *128*, 699.
- Ito, C.; Mishina, Y.; Litaudon, M.; Cosson, J. P.; Furukawa, H. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 1043.
- Jain, S.C.; Singh, B.; Jain, R.: *Fitoterapia*, **2001**, *72*, 666.
- Jaime, C.; Segura, C.; Dinarés, I.; Font, J.: *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 154.
- Junior, A.G.; Pereira, I.C.P.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D.; Jacomassi, E.; Young, M.C.M.; Cortez, D. A. G.; *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*, 371.
- Kanchanapoom, T.; Kamel, M. S.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Pheansoonthon, C.; Hiraga, Y.: *Phytochemistry* **2001**, *56*, 369.
- Khan, S.N.; Rahman, A.; Zareen, S.; Choudhary, M.I.; Akhtar, M.N.; *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 910.
- Kilkuskle, R.E.; Cosentino, L.M.; Ballas, L.M.; Jiang, J.B.; Janzen, W.P.; Chen, I.S.; Lee, K.W.: *Journal of Natural Products*, **1994**, *57*, 243.
- Kim, M.; Jung, H.; Min, B.; Oh, S.; Kim, C.; Ahn, K.; Kang, W.; Lee, H.: *Phytochemistry* **2002**, *59*, 861.
- King, F. E.; Acheson, R. M.: *J. Chem. Soc.*, **1950**, 168.
- Kishi, A.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.: *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1051.
-

- Kubo, I.; Yokokawa, Y.: *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1075.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Yokokawa, Y.: *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 545.
- Kuete, V.; Nguemaving, J.R.; Beng, V.P.; Azebaze, A.G.B.; Etoa, F.X.; Meyer, M.; Bodo, B.; Nkengfack, A.E.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, *109*, 372.
- Kuete, V.; Wabo, G.F.; Ngameni, B.; Mbaveng, A.T.; Metuno, R.; Etoa, F.X.; Ngadjui, B.T.; Beng, V.P.; Meyer, J.J.M.; Lall, N.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, *114*, 54.
- Lenta, B.N.; Ngouela, S.; Boyom, F.F.; Tantangmo, F.; Tchouya, G. R. F.; Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Magalhães, E. G.; Nogueira, M. A.; Queiroz, S. C. N.: *Phytochemistry* **2000**, *55*, 787.
- Lenta, B.N.; Ngouela, S.; Boyom, F.F.; Tantangmo, F.; Tchouya, G. R. F.; Tsamo, E.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Connolly, J.D.: *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 464.
- Lenta, B.N.; Devkota, K.P.; Ngouela, S.; Boyom, F.F.; Naz, Q.; Choudhary, M.I.; Tsamo, E.; Rosenthal, P.J.; Sewald, R.: *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 222.
- Lin, C.Y.; Huang, C.S.; Huang, C.Y.; Yin, M.C.: *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6661.
- Li, J.; Huang, H.; Zhou, W.; Feng, M.; Zhou, P.: *Biol. Pharm. Bull.*, **2008**, *31*, 743.
- Li, L.; Huang, X.; Sattler, I.; Fu, H.; Grabley, S.; Lin, W.: *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 624.
- Lindsey, C.C.; Gómez-Díaz, C.; Villalba, J.M.; Pettus, T.R.R.: *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 4559.
- Lokvam, J.; Braddock, J.F.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P.: *Phytochemistry* **2000**, *55*, 29.
- Marques, V. L. L.; Oliveira, F. M.; Conserva, L. M.; Brito, R. G. L.; Guilhon, G. M. S. P.: *Phytochemistry* **2000**, *55*, 815.
- Matsumoto, T.; Fukui, K.; Nanbu, M.: *Chemistry Letters*, **1974**, 603.
- Melo, C.L.; Queiroz, M.G.R.; Filho, A.C.V.A.; Rodrigues, A.M.; Sousa, D.F.; Almeida, J.G.L.; Pessoa, O.D.L.; Silveira, E.R.; Menezes, D.G.; Melo, T.S.; Santos, F.A.; Rao, V.S.: *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8776.
- Minami, M.; Kita, M.; Nakaya, T.; Yamamoto, T.; Kuriyama, H.; Imanishi, J.; *Microbiol. Immunol.* **2003**, *47*, 681.
- Monache, F. D.; Marta, M.; Mac-Quhae, M. M.; Nicoletti, M.; *Gazz. Chim. Ital.* **1984**, *114*, 135.
-

Monache, F. D.; Mac-Quhae, M. M.; Monache, G. D.; Bettolo, G. B. M.; De Lima, R. A.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 227.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.: *Quim. Nova* **2001**, *24*, 105.

Mook-Jung, I.; Kim, H.; Fan, W.; Tezuca, Y.; Kadota, S.; Nishijo, H.; Jung, M.W.: *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1101.

Moreira, L.M.; *Dissertação de Mestrado em Química*, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 1999.

Morel, C.; Seraphin, D.; Oger, J.M.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; Richomme, P.; Bruneton, J.: *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1471.

Moura, A.C.G.; Perazzo, F.F.; Maistro, E.L.: *Genetics and Molecular Research*, **2008**, *7*, 1360.

Muzitano, M.F.; Tinoco, L.W.; Guette, C.; Kaiser, C.R.; Bergmann, B.R.; Costa, S.S.: *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 2071.

Nagem, T. J.; Da Silva, M. C.; Mesquita, A. A. L.; Silva, R.; *Fitoterapia* **1993**, *64*, 87.

Nguyen, L. H. D.; Vo, H. T.; Pham, H. D.; Connolly, J. D.; Harrison, L.J.: *Phytochemistry* **2003**, *63*, 467.

Oliveira, C.M.A.; Porto, A.L.M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A. J.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1073.

Oliveira, C.M.A.; Porto, A.L.M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J.; *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 6427.

Oliveira, M.L.G.; Duarte, L.P.; Silva, G.D.F.; Filho, S.A.V.; Knupp, V.F.; Alves, F.G.P.: *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, *45*, 895.

Patra, A.; Chaudhuri, S. K.; Panda, S. K.: *J. Nat. Prod.*, **1988**, *51*, 217.

Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kris, G.S.: *Introduction to Spectroscopy*, 3rd Ed., Thomson Learning, USA, 2001.

Peng, C.; Bodenhausen, G.; Qiu, S.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Yuan, S.; Zheng, C.: *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, *36*, 267.

Pohjala, L.; Alakurtti, S.; Ahola, T.; Yli-Kauhaluoma, J.; Tammela, P.: *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1917-1926.

Porto, A.L.M.; Machado, S.M.F.; Oliveira, C.M.A.; Bittrich, V.; Amaral, M.C.E.; Marsaioli, M.J.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 755.

Ribeiro, A.B.; Bolzani, V.S.; Yoshidab, M.; Santos, L.S.; Eberlind, M.N.; Silva, D.H.S.: *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, *16*, 526.

Ribeiro, J.E.L. da S. [et al]. Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central, INPA: Manaus, 1999, página 244.

Rivero-Cruz, J.F.; Sánchez-Nieto, S.; Benítez, G.; Casimiro, X.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Rivero-Cruz, B.: *Rev. Latinoamer. Quím.* **2009**, *37*, 155.

Ross, S. A.; Abdel-Hafiz, M. A.: *J. Nat. Prod.*, **1984**, *47*, 735.

Ruiza, M.H.; Ramos, R.R.; Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Ferrer, J.E.J.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, *118*, 312.

Salama, M.: *Revista Colombiana de Ciências Química e Farmacêutica*, **1986**, *15*, 99.

Sanchez-Mateo, C.C.; Prado, B.; Rabanal, R.M.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, *79*, 119.

Santiago, G. M. P.; Viana, F. A.; Pessoa, O. D. L.; Santos, R. P.; Pouliquen, Y. B. M.; Arriaga, A. M. C.; Andrade-Neto, M.; Braz-Filho, R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 187.

Scott, K. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 8564.

Seo, E.; Huang, L.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.: *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1484.

Shama, M.; Glick, R.E.; Mumma, R.O.: *J. Org. Chem.*, **1962**, *27*, 4512.

Shanley, P.; Medina, G.: *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica*. Pará: Belém. 2005, p. 54.

Shibuya, H.; Takeda, Y.; Zhang, R.; Tanitame, A.; Tsai, Y.; Kitagawa, I.: *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2639.

Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro, 7^a Ed., LTC, Rio de Janeiro, 2006.

Simmonds, M. S. J.; Stevenson, P. C.; Porter, E. A.; Veitch, N. C.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1117.

Soltis, D. E.; Bohm, B. A.: *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 415.

Suffredini, I.B.; Paciencia, M.L.B.; Varella, A.D.; Younes, R.N.; *Fitoterapia*, **2007**, *78*, 223.

Thongphasuk, P.; Suttisri, R.; Bavovada, R.; Verpoorte, R.: *Fitoterapia*, **2004**, *75*, 623.

Tane, P.; Tamokou, J. De D.; Tala, M.F.; Wabo, H.K.; Kuate, J.R.: *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, 124, 571.

Teixeira, J.S.R.; *Dissertação de Mestrado em Química*, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 1999.

Teixeira, J.S.R.; Cruz, F.G.; *Tetrahedron Lett.* **2005**, 15, 504.

Teixeira, J.S.R.; Moreira, L.M.; Guedes, M. L. S.; Cruz, F. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 812.

Teng, R. W.; Wang, D. Z.; Wu, Y. S.; Lu, Y.; Zheng, Q. T.; Yang, C. R.: *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 92.

Terashima, K.; Shimamura, T.; Tanabayashi, M.; Aqil, M.; Akinniyi, J. A.; Niwa, M.: *Heterocycles*, **1997**, 45, 1559.

Tsao, C.C.; Shen, Y.C.; Su, C.R.; Li, C.Y.; Liou, M.J.; Dung, N.X.; Wu, T.S.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 9867.

Tsamo, E.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Connolly, J.D.: *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, 55, 464.

Wada, S.I.; Yasui, Y.; Tokuda, H.; Tanaka, R.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 6414.

Wu, Q. L.; Wang, S. P.; Du, L. J.; Yang, J. S.; Xiao, P. G.: *Phytochemistry* **1998**, 49, 1395.

Vechia, D.; Gnoatto, L.; Gosmann, G.: *Quím. Nova*, **2009**, 32, 1245.

Vickery, M. L. E.; Vickery, B.: *Secondary Plant Metabolism*, The Macmillan Press LTD: London, 1981.

Voet, D.; Voet, J. G.; PRATT, C.W.: *Fundamentos de Bioquímica*. Trad. A.G. Fett Neto. Porto Alegre: Artmed, **2000**.

^a<http://www.phytomania.com/2-betelnut.htm>, acessado em 20/03/2010.

^b<http://teixeiraecologia.blogspot.com/>, acessado em 20/03/2010.

^c© Copyright Smithsonian Tropical Research Institute, 2003-2006, acessado em 20/03/2010.

^d<http://www.fotothing.com/LuisBacher/photo/beb9b5ae94cb9c5c74f65eda527908ef/>, acessado em 20/03/2010.

^ehttp://siusi-siusi.blogspot.com/2009_01_01_archive.html, acessado em 20/03/2010.

^fhttp://www.cybertruffle.org.uk/vinales/eng/clusia_rosea_ok.htm, acessado em 20/03/2010.
