

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola* e
Clusia lanceolata E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola* e
Clusia lanceolata E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

Sob a orientação do professor

Dr. MÁRIO GERALDO DE CARVALHO

e sob a co-orientação da professora

Dr.^a. TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Ciências**,
no curso de Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em Química
Orgânica.

SEROPÉDICA, RJ

JULHO DE 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

RAFAELA OLIVEIRA FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Doutora em Ciências* no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM _____ / _____ / _____

Dr. Mário Geraldo de Carvalho (PPGQ-UFRRJ, Presidente)
(Orientador)

Dr^a. Maria Helena Sarragiotto (Depto de Química, UEM)
(Membro Titular)

Dr. Fábio de Sousa Menezes Boylan (SPPS, TCD, Irlanda)
(Membro Titular)

Dr^a. Helena Regina Pinto de Lima (PPGQ-UFRRJ)
(Membro Titular)

Dr. Luciano Ramos Suzart (PPGQ-UFRRJ)
(Membro Titular)

Dr. Roberto Carlos Campos Martins (IPPN-UFRRJ)
(Membro Suplente)

Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (PPGQ-UFRRJ)
(Membro Suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adrivan M. Ferreira e Marileuze O. Ferreira, por sempre acreditarem nos meus sonhos e pelos ensinamentos essenciais para vida. A minha irmã Lorena e meus sobrinhos Afonso e o pequeno Bernardo, por me ensinarem que o amor pode crescer mesmo a longas distâncias. Amo vocês!

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, Almir, pelo amor, paciência e por ser meu melhor amigo. Obrigada por entrar e permanecer em minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos meus familiares e amigos da saudosa Bahia que sempre torceram por mim.

Ao prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pela orientação, ensinamentos, paciência e por ter me aceito em seu grupo de pesquisa.

À prof^a Dr^a. Tania Maria Sarmiento da Silva, pela orientação, confiança, amizade e por me apresentar ao gênero *Clusia*.

Ao Almir R. de Carvalho Junior pela ajuda na coleta da espécie *Clusia lanceolata* e nos ensaios antioxidantes, dentre outras contribuições.

À Telma M. G. da Silva (UFPE/UFRPE) pelas análises de CLAE-DAD e pela coleta da espécie *Clusia nemorosa*.

Aos professores do PPGQ-UFRJ pelos ensinamentos e outras contribuições, em especial, a prof^a Dr^a Rosane Nora Castro pelo auxílio nos ensaios antioxidantes.

Aos técnicos da central analítica da UFRRJ, em especial, ao Maurício, Frances e ao Carlão.

À prof^a. Dr^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz (FIOCRUZ) pelos ensaios inseticidas.

À prof^a. Dr^a. Daniela S. Alviano e a aluna Paula Monteiro (UFRJ) pela realização dos ensaios antimicrobianos.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais – LQPN, em especial, a Débora, Queli, Tereza, Mirza, Almir, Dayane, Geovany, Alisson, Ana Paula, Renata, Carlos e aos estagiários Thiago, Jéssica e Juliana pelo auxílio em alguns experimentos.

Aos colegas do PPGQ-UFRJ.

À Capes pela bolsa de doutorado.

Desde já, agradeço à banca examinadora, pelas críticas, sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que direta e indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“Coragem, coragem, se o que você quer é aquilo que pensa e faz.
Coragem, coragem, eu sei que você pode mais” Raul Seixas*

RESUMO

FERREIRA, RAFAELA OLIVEIRA. **Contribuição ao estudo químico de *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola* e *Clusia lanceolata* e avaliação de atividades biológicas.** 2015. 214 p. Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica –RJ.

Capítulo 1. O gênero *Clusia* (Clusiaceae) compreende cerca de 250 espécies encontradas desde o Sul da Florida até o Sul do Brasil. Várias espécies do gênero são usadas na medicina popular no tratamento de enfermidades, tais como reumatismo, problemas estomacais e como purgativos. Isto tem motivado diversos estudos relacionados à composição química e propriedades biológicas deste gênero. Este trabalho descreve o estudo químico e a avaliação das atividades antimicrobiana e inseticida dos frutos de *Clusia nemorosa* e *Clusia paralicola* e de folhas de *Clusia lanceolata*. O estudo químico resultou no isolamento e identificação da vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, vitexina-2''-O-rhamosídeo, isovitexina-2''-O-rhamnosídeo, apigenina, canferol, quercetina, GB1-7''-O-glicopiranosídeo, GB1a-7''-O-glicopiranosídeo, 1,7-dihidroxixantona, friedelina, α e β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, sitosterona, estigmasterona, β -sitosterol e estigmasterol glicosilados, ácido *cis*-cumárico, ácido protocatecuico, ácido cítrico e seus derivados, 13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a, 13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina a e o novo derivado de floroglucinol ácido nemorosínico. Os extratos e frações de *Clusia* foram inativos frente aos micro-organismos patogênicos testados, porém apresentaram moderada atividade inseticida frente à *Musca domestica*. **Capítulo 2.** O perfil químico de extratos de folhas saudáveis e com galhas de *C. lanceolata* foram avaliados por LC-ESI-MS/MS e quantificados o teor de fenólicos totais, flavonoides e taninos. Foram observadas diferenças significativas nos teores de metabólitos e no perfil químico que pode estar relacionado à interação inseto galhador-planta. O perfil químico do óleo essencial de folhas saudáveis e com galhas de *C. lanceolata* obtido por CG-EM foi similar, com predominância dos sesquiterpenos de núcleo cariofileno em ambos os óleos.

Palavras-chave: *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola*, *Clusia lanceolata*, cromatografia, floroglucinol, galhas.

ABSTRACT

FERREIRA, RAFAELA OLIVEIRA. **Contribuição ao estudo químico de *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola* e *Clusia lanceolata* e avaliação de atividades biológicas.** 2015. 214 p. Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica –RJ.

Chapter 1. The genus *Clusia* (Clusiaceae) comprises about 250 species found from Southern Florida to Southern Brazil. Several species of this genus are used in folk medicine to treat diseases such as rheumatism, stomach problems and as purgative. This has motivated several studies regarding both chemical composition and biological properties of this genus. This work describes the chemical composition and the evaluation of antimicrobial and insecticide activities of fruits of *Clusia nemorosa* and *Clusia paralicola*, as well as the leaves of *Clusia lanceolata*. The chemical study led to the isolation and identification of vitexin, isovitexin, orientin, isoorientin, vitexin-2 "-O-rhamoside, isovitexin-2" -O-rhamnoside, apigenin, kaempferol, quercetin, GB1 -7 "-O-glucopyranoside, GB1a-7" O-glucopyranoside, 1,7-dihydroxixanthone, friedelin, α and β -amyrin, β -sitosterol, stigmasterol, sitosterone, stigmasterone, β -sitosterol, stigmasterol-glucoside, cis-coumaric acid, protocatechuic acid, citric acid and its derivatives, 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin a, 13²-hydroxy-(13²-R)-phaeophytin a, and nemorosinic acid, a new phloroglucinol. The extracts and fractions of *Clusia* were inactive against the pathogenic micro-organisms tested, but showed promising insecticide activity against *Musca domestica*. **Chapter 2.** The chemical profile of healthy and galled leaves extracts of *C. lanceolata* were assessed by LC-ESI-MS / MS. Total phenolic, flavonoids and tannins contents were also evaluated. Significant differences between the levels of metabolites and chemical profile were observed, probably due to galler insect-plant interactions. The chemical profiles of essential oil obtained from healthy and galled leaves of *C. lanceolata* were similar, with predominance of sesquiterpenes of caryophyllene type in both oils.

Keywords: *Clusia nemorosa*, *Clusia paralicola*, *Clusia lanceolata*, chromatography, phloroglucinol, galls.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Clusia nemorosa</i>	30
Figura 2. Estruturas de substâncias isoladas de <i>C. nemorosa</i>	30
Figura 3. <i>Clusia lanceolata</i>	31
Figura 4. Benzofenonas isoladas de resinas florais de <i>C. lanceolata</i>	31
Figura 5. <i>Clusia paralicola</i>	32
Figura 6. Bifenilas isoladas de raízes de <i>C. paralicola</i>	32
Figura 7. Biossíntese de benzofenonas (Adaptado de BEERHUES; LIU, 2009).....	33
Figura 8. Xantonas isoladas de espécies de <i>Clusia</i>	34
Figura 9. Biflavonoides isolados de espécies de <i>Clusia</i>	36
Figura 10. Biossíntese de flavonas-C-glicosídeo em plantas (Adaptado de BRAZIER-HICKS et al., 2009).....	38
Figura 11. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas (TOF-ESI-MS/MS) da substância 1.....	57
Figura 12. Proposta biogenética para o ácido nemorosínico (1). DMAPP: dimetilalil pirofosfato; PT: preniltransferase; [O]: oxigenases.....	58
Figura 13. Espectro de IV (KBr) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	59
Figura 14. Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido por TOF-ESI-EM (-) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	59
Figura 15. Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 527 $[M-H]^-$ de FCN2 (ácido nemorosínico).....	60
Figura 16. Espectro de RMN de 1H em $CDCl_3$ (500 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	60
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C em $CDCl_3$ (125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	61
Figura 18. Espectro de COSY 1H - 1H em $CDCl_3$ (500 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	61
Figura 19. Espectro de HMQC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	62
Figura 20. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).....	62
Figura 21. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico). Expansão.....	63

Figura 22. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico). Expansão.....	63
Figura 23. Espectro de dicroísmo circular (CD) de 1 em MeOH.....	64
Figura 24. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL (Vitexina).....	68
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $DMSO-D_6$ (125 MHz) de FCL (Vitexina).....	68
Figura 26. Espectro de COSY 1H - 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL (Vitexina)...	69
Figura 27. Espectro de HMQC em $DMSO-D_6$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL (Vitexina).....	69
Figura 28. Espectro de HMBC em $DMSO-D_6$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL (Vitexina).....	70
Figura 29. Proposta mecanística para reação de derivatização da vitexina (2).....	72
Figura 30. Espectro de RMN de 1H em CD_3OD (400 MHz) de 4',7-dimetilvitexina (2a).....	72
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CD_3OD (100 MHz) de 4',7-dimetilvitexina (2a).....	73
Figura 32. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL1 (Isovitexina).....	76
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C em $DMSO-D_6$ (100 MHz) de FCL1 (Isovitexina).....	76
Figura 34. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL2.....	80
Figura 35. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL2. Expansão....	80
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $DMSO-D_6$ (125 MHz) de FCL2... ..	81
Figura 37. Espectro de COSY 1H , 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL2.....	81
Figura 38. Espectro de HMQC em $DMSO-D_6$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL2.....	82
Figura 39. Espectro de HMBC em $DMSO-D_6$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL2.....	82
Figura 40. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL3.....	89
Figura 41. Espectro de RMN de 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL3. Expansão....	89
Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $DMSO-D_6$ (125 MHz) de FCL3....	90
Figura 43. Espectro de COSY 1H , 1H em $DMSO-D_6$ (500 MHz) de FCL3.....	90
Figura 44. Espectro de HMQC em $DMSO-D_6$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL3.....	91

Figura 45. Espectro de HMBC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCL3.....	91
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (500 MHz) de FCN12.....	95
Figura 47. Espectro de COSY ¹ H, ¹ H em CD ₃ OD (500 MHz) de FCN12.....	95
Figura 48. Espectro de HMQC em CD ₃ OD (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCN12.....	96
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (500 MHz) de FCN5 (Canferol).....	98
Figura 50. Espectro de HMQC em CD ₃ OD (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCN5 (Canferol).....	99
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (400 MHz) de FCN6 (Quercetina)...	100
Figura 52. a. Espectro de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). b. Espectro de massas EM/EM do íon com <i>m/z</i> 721,4. c. Espectro de massas EM/EM do íon com <i>m/z</i> 559,2.....	104
Figura 53. Proposta de fragmentação de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Adaptada de JACKSON et al. 1971.....	105
Figura 54. a. Espectro de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). b. Espectro de massas EM/EM do íon com <i>m/z</i> 705,4. c. Espectro de massas EM/EM do íon com <i>m/z</i> 543,3.....	106
Figura 55. Proposta de fragmentação de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Adaptada de JACKSON et al. 1971.....	107
Figura 56. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	108
Figura 57. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (7,5 – 6,0 ppm).....	108
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (6,0 – 4,9 ppm).....	109
Figura 59. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (4,8 – 4,3 ppm).....	109
Figura 60. Espectro de COSY ¹ H, ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	110
Figura 61. Espectro de APT em DMSO- <i>D</i> ₆ (75 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	111
Figura 62. Espectro de HSQC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	111

Figura 63. Espectro de HSQC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	112
Figura 64. Espectro de HMBC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	113
Figura 65. Algumas correlações (^{2,3} <i>J</i> _{CH}) observadas no espectro de HMBC de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	114
Figura 66. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	116
Figura 67. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (7,4 – 6,1 ppm).....	116
Figura 68. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (6,0 - 4,4 ppm).....	117
Figura 69. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo). Expansão (3,8 – 2,6 ppm).....	117
Figura 70. Espectro de APT em DMSO- <i>D</i> ₆ (75 MHz) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	118
Figura 71. Espectro de CD e UV em MeOH de (a) 2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 2'' <i>R</i> , 3'' <i>R</i> -GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo e (b) 2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 2'' <i>R</i> , 3'' <i>R</i> -GB4 (FERRARI et al., 2003).....	118
Figura 72. Espectro de CD e UV em MeOH de (a) 2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 2'' <i>S</i> -GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo (13) e (b) <i>Ent</i> -naringeninil-(I-3 <i>α</i> , II-8)-4'- <i>O</i> -metilnaringenina (MBWAMBO et al., 2006).....	119
Figura 73. Espectro de RMN de ¹ H em acetona- <i>d</i> ₆ (500 MHz) de FCP1 (1,7-dihidroxixantona).....	122
Figura 74. Espectro de HMQC em acetona- <i>d</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz; RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCP1 (1,7-dihidroxixantona).....	122
Figura 75. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCP1 (1,7-diidroxixantona) obtido por CG-EM.....	123
Figura 76. Espectro de massas de FCP1 (1,7-diidroxixantona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	123
Figura 77. Espectro de RMN de ¹ H em CDCl ₃ (400 MHz) de FCN3 (friedelina).....	125
Figura 78. Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) em CDCl ₃ (100 MHz) de FCN3 (friedelina).....	125
Figura 79. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCN3 (friedelina) obtido por CG-EM.....	127
Figura 80. Espectro de massas de FCN3 (friedelina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	127

Figura 81. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL4 (α , β -amirina)...	129
Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL4 (α , β -amirina).....	129
Figura 83. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCL4 (α , β -amirina) obtido por CG-EM.....	131
Figura 84. Espectro de massas de FCL4, substância 16 (α -amirina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	131
Figura 85. Espectro de massas de FCL4, substância 17 (β -amirina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	131
Figura 86. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).....	133
Figura 87. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).....	133
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona).....	136
Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona).....	136
Figura 90. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona) obtido por CG-EM.....	138
Figura 91. Espectro de massas de FCL7, substância 21 (estigmasterona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	138
Figura 92. Espectro de massas de FCL7, substância 20 (sitosterona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).....	138
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H em piridina- d_5 (500 MHz) de FCN1 (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados).....	140
Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em piridina- d_5 (125 MHz) de FCN1 (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados).....	140
Figura 95. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).....	143
Figura 96. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (125 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).....	143

Figura 97. Espectro de HMQC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 500 MHz, RMN de ¹³ C: 125 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).....	144
Figura 98. Espectro de RMN de ¹ H em DMSO- <i>D</i> ₆ (400 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).....	146
Figura 99. Espectro de DEPTQ em DMSO- <i>D</i> ₆ (100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).....	146
Figura 100. Espectro de HMQC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 400 MHz, RMN de ¹³ C: 100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).....	147
Figura 101. Espectro de HMBC em DMSO- <i>D</i> ₆ (RMN de ¹ H: 400 MHz, RMN de ¹³ C: 100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).....	147
Figura 102. Espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (400 MHz) de FCN8 (Ácido protocatecuico + Citrato de trimetila).....	150
Figura 103. Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) em CD ₃ OD (100 MHz) de FCN8 (Ácido protocatecuico + Citrato de trimetila).....	150
Figura 104. Espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (500 MHz) de FCN12 (citrato de dietil metílico e citrato de dimetil etílico).....	153
Figura 105. Espectro de RMN de ¹³ C (DEPTQ) em CD ₃ OD (125 MHz) de FCN12 (citrato de dietil metílico e citrato de dimetil etílico).....	153
Figura 106. Espectro de RMN de ¹ H em CDCl ₃ (400 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).....	156
Figura 107. Espectro de RMN de ¹³ C em CDCl ₃ (100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).....	156
Figura 108. Espectro de HMQC em CDCl ₃ (RMN de ¹ H: 400 MHz, RMN de ¹³ C: 100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).....	157
Figura 109. Espectro de HMBC em CDCl ₃ (RMN de ¹ H: 400 MHz, RMN de ¹³ C: 100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).....	157
Figura 110. Viabilidade da fase larval de desenvolvimento de <i>M. domestica</i> em função do contato das larvas com diferentes concentrações de extrato e frações de espécies de <i>Clusia</i>	160
Figura 111. Viabilidade da fase neolarva a adulto de desenvolvimento de <i>M. domestica</i> em função do contato das larvas com diferentes concentrações de extratos e frações de espécies de <i>Clusia</i>	161
Figura 112. Teor de fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹) em extratos de <i>C. lanceolata</i>	192

Figura 113. Teor de flavonoides (mg EQ g ⁻¹) em extratos foliares de <i>C. lanceolata</i> ...	193
Figura 114. Proposta de reação entre a catequina e a vanilina em meio ácido.....	194
Figura 115. Teor de proantocianidinas (mg EC g ⁻¹) em extratos de <i>C. lanceolata</i>	195
Figura 116. Cromatogramas (CLAE-DAD) de extratos de folhas saudas (—) e galhadas (—) de <i>C. lanceolata</i> em 350 nm.....	196
Figura 117. Cromatograma de íons totais (LC-ESI-MS) do extrato metanólico das folhas de <i>C. lanceolata</i> no modo positivo: (1) orientina, (2) isoorientina, (3) vitexina-2''-O-ranmosídeo e (4) isovitexina-2''-O-ranmosídeo. *Substâncias não identificadas...	197
Figura 118. a. Espectro de massas obtido por ESI-MS/MS (modo negativo) da isoorientina. b. Espectro de massas EM/EM do íon 447.....	198
Figura 119. a. Espectro de massas obtido por ESI-MS/MS (modo negativo) da isovitexina-2''-O-ranmosídeo. b. Espectro de massas EM/EM do íon 431. c. Espectro de massas EM/EM do íon 577.....	199
Figura 120. Proposta de fragmentação para justificar a perda de água observada para flavonoides 6-C-glicosídeos envolvendo o grupo hidroxila da posição 2'' do resíduo de açúcar com os grupos hidroxilas das posições 5-ou-7 da aglicona.....	200
Figura 121. Atividade antioxidante de extratos de <i>C. lanceolata</i> no ensaio do DPPH'.....	202
Figura 122. Atividade antioxidante de extratos de <i>C. lanceolata</i> no ensaio do β-caroteno/ ácido linoleico.....	203
Figura 123. Cromatograma de íon totais (CG) do óleo essencial de folhas de <i>C. lanceolata</i>	204

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de FCN2 (ácido nemorosínico).....	65
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL (Vitexina).....	71
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de 4',7-dimetilvitexina (2a).....	74
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL1 (Isovitexina).....	77
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL2 (Isoorientina).....	83
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL2 (Orientina).....	83
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL3 (Isovitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo).....	92
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL3 (Vitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo).....	93
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN12.....	97
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN12.....	97
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H em CD_3OD (500 MHz) de FCN5 (Canferol).....	99
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H em CD_3OD (400 MHz) de FCN6(Quercetina).....	101
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCP2 (GB1-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	115
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCP3 (GB1a-7''- <i>O</i> -glicopiranosídeo).....	120
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (HMQC) em acetona- <i>d</i> ₆ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCP1 (1,7- diidroxixantona).....	123
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN3 (Friedelina).....	126
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL4 (α , β -amirina).....	130

Tabela 18. Dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).....	134
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL7 (β - sitosterona e estigmasterona).....	137
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em piridina- d_5 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN1 (β -sitosterol glicosilado).....	141
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN11 (ácido cítrico).....	144
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN7 (Citrato de dimetila).....	148
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN8 (Ácido protocatecuico).....	151
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN8 (Citrato de trimetila).....	151
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).....	158
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCLDM3 (Mistura de Feofitinas). Continuação (Cadeia fitol).....	159
Tabela 27: CIM dos extratos e frações de <i>C. nemorosa</i> e <i>C. lanceolata</i> sobre micro-organismos.....	162
Tabela 28. Identificação de compostos fenólicos das folhas de <i>C. lanceolata</i> por CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS.....	197
Tabela 29. Composição química do óleo essencial de folhas galhadas e sadias de <i>C. lanceolata</i>	204

LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema I.</i> Isolamento das substâncias do extrato em diclorometano de frutos de <i>C. nemorosa</i>	45
<i>Esquema II.</i> Isolamento das substâncias do extrato em metanol de frutos de <i>C. nemorosa</i>	46
<i>Esquema III.</i> Isolamento das substâncias do extrato em etanol de frutos de <i>C. nemorosa</i>	47
<i>Esquema IV.</i> Isolamento das substâncias do extrato em metanol de folhas de <i>C. lanceolata</i>	48
<i>Esquema V.</i> Isolamento das substâncias do extrato em diclorometano de folhas de <i>C. lanceolata</i>	49
<i>Esquema VI.</i> Isolamento das substâncias da fração em acetato de etila de frutos de <i>C. paralicola</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	duplete
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
D. O.	Densidade óptica
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
FT	Fenólicos Totais
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
COSY ^1H - ^1H	Homonuclear Correlated Spectroscopy
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
MHz	Megahertz
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	simpleto
<i>sl</i>	simpleto largo
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

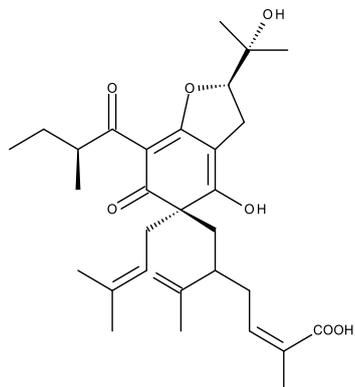
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ESQUEMAS.....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XX
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS EM ESPÉCIES DE <i>Clusia</i> ESTUDADAS NESTE TRABALHO.....	XXV
CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DE <i>Clusia</i> E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1.1 Família Clusiaceae.....	28
1.1.2 Gênero <i>Clusia</i>	28
1.1.2.1 <i>Clusia nemorosa</i> G. Meyer.....	29
1.1.2.2 <i>Clusia lanceolata</i> Cambess.....	31
1.1.2.3 <i>Clusia paralicola</i> G. Mariz Cunha.....	31
1.1.3 Benzofenonas e xantonas.....	32
1.1.4 Biflavonoides.....	34
1.1.5 Flavonas C-glicosídeos.....	37
1.1.6 Aspectos biológicos.....	38
1.1.6.1 Atividade antimicrobiana.....	38
1.1.6.2 Atividade inseticida.....	39
1.2 OBJETIVOS.....	41
1.2.1 Geral.....	41
1.2.2 Específicos.....	41
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
1.3.1 Material vegetal.....	42
1.3.2 Preparação dos extratos.....	42
1.3.2.1 Obtenção dos extratos e frações de <i>Clusia nemorosa</i> (1 ^o coleta).....	42
1.3.2.2 Obtenção dos extratos e frações de <i>Clusia nemorosa</i> (2 ^o coleta).....	42

1.3.2.3 Obtenção dos extratos e frações de <i>Clusia lanceolata</i>	42
1.3.3 Métodos Cromatográficos.....	43
1.3.3.1 Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	43
1.3.3.2 Cromatografia com fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM).....	43
1.3.3.3 Cromatografia Líquida (LC) - Espectrometria de Massas (MS).....	43
1.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	44
1.3.5 Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	44
1.3.6 Dicroísmo Circular (DC).....	44
1.3.7 Rotação Específica $[\alpha]$	44
1.3.8 Isolamento dos constituintes químicos.....	44
1.3.8.1 Fracionamento dos extratos e frações de frutos de <i>C. nemorosa</i> (1 ^o coleta).....	44
1.3.8.1.1 Estudo do extrato em diclorometano (FCNDCM).....	44
1.3.8.1.2 Estudo do extrato em metanol (FCNM).....	46
1.3.8.2.1 Estudo de extrato em etanol (FCNE).....	47
1.3.8.3 Fracionamento dos extratos e frações das folhas de <i>C. lanceolata</i>	48
1.3.8.3.1 Estudo do extrato em metanol (FCLM).....	48
1.3.8.3.2 Estudo do extrato em diclorometano (FCLDCM).....	49
1.3.8.4 Fracionamento dos extratos e frações dos frutos de <i>C. paralicola</i>	50
1.3.8.4.1 Estudo do extrato em etanol (FCPE).....	50
1.3.8 Preparação de derivados.....	51
1.3.8.1 Metilação da vitexina (2).....	51
1.3.9 Ensaio biológicos.....	51
1.3.9.1 Atividade antimicrobiana.....	51
1.3.9.2 Atividade inseticida.....	53
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
1.4.1 Determinação estrutural e identificação das substâncias isoladas.....	54
1.4.1.1 Derivado de floroglucinol.....	54
1.4.1.2 Flavonoides.....	66
1.4.1.2.1 Substância 2.....	66
1.4.1.2.2 Substância 3.....	75
1.4.1.2.3 Substâncias 3, 4 e 5.....	78

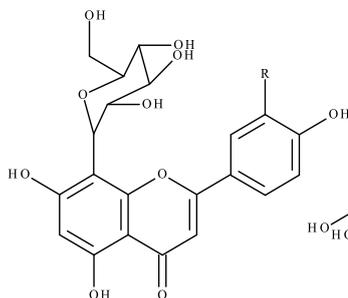
1.4.1.2.4 Substâncias 6 e 7.....	84
1.4.1.2.5 Substâncias 8 e 9.....	94
1.4.1.2.6 Substância 10.....	98
1.4.1.2.7 Substância 11.....	100
1.4.1.3 Biflavonoides.....	102
1.4.1.3.1 Substâncias 12 e 13.....	102
1.4.1.4 Xantona.....	121
1.4.1.4.1 Substância 14.....	121
1.4.1.5 Triterpenos.....	124
1.4.1.5.1 Substância 15.....	124
1.4.1.5.2 Substâncias 16 e 17.....	128
1.4.1.6 Esteroides.....	132
1.4.1.6.1 Substâncias 18 e 19.....	132
1.4.1.6.2 Substâncias 20 e 21.....	135
1.4.1.6.3 Substâncias 22 e 23.....	139
1.4.1.7 Ácido cítrico e derivados.....	142
1.4.1.7.1 Substância 24.....	142
1.4.1.7.2 Substância 25.....	145
1.4.1.7.3 Substâncias 26 e 27.....	149
1.4.1.7.4 Substâncias 28 e 29.....	152
1.4.1.8 Feofitinas.....	154
1.4.1.8.1 Substâncias 30 e 31.....	154
1.4.2 Avaliação do potencial biológico de espécies de <i>Clusia</i>	160
1.4.2.1 Atividade inseticida.....	160
1.4.2.2 Atividade antimicrobiana.....	162
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	163
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
CAPÍTULO 2. PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS SADIAS E GALHADAS DE <i>C. lanceolata</i> (CLUSIACEAE).....	181
2.1 INTRODUÇÃO.....	182
2.1.1 Compostos fenólicos e insetos galhadores.....	183
2.1.2 Insetos galhadores e o gênero <i>Clusia</i>.....	184
2.2 OBJETIVOS.....	186

2.2.1 Objetivo geral.....	186
2.2.2 Objetivos específicos.....	186
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	187
2.3.1 Reagentes químicos.....	187
2.3.2 Coleta do material vegetal.....	187
2.3.3 Preparação de extratos vegetais.....	187
2.3.4 Determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas..	187
2.3.5 Análises qualitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	188
2.3.6 Extração do óleo essencial.....	189
2.3.7 Análises de Cromatografia a Gás (CG).....	189
2.3.8 Atividade Antioxidante.....	189
2.3.8.1 Ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH.....	189
2.3.8.2 Ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	190
2.3.9 Análises estatísticas.....	191
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	192
2.4.1 Teor de fenólicos, flavonoides e proantocianidinas em extratos foliares de <i>C. lanceolata</i>	192
2.4.2 Perfil químico de extratos foliares de <i>C. lanceolata</i> por CLAE-DAD e LC-EM-MS/MS.....	195
2.4.3 Potencial antioxidante de extratos foliares de <i>C. lanceolata</i>	201
2.4.4 Perfil químico do óleo essencial de folhas de <i>C. lanceolata</i>	203
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	206
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	207

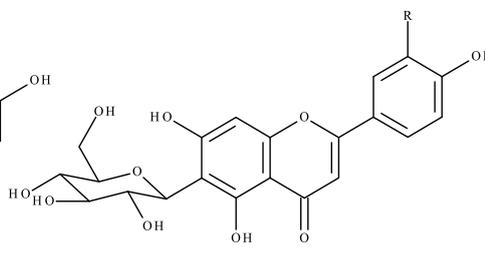
**SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS EM ESPÉCIES DE *Clusia*
ESTUDADAS NESTE TRABALHO**



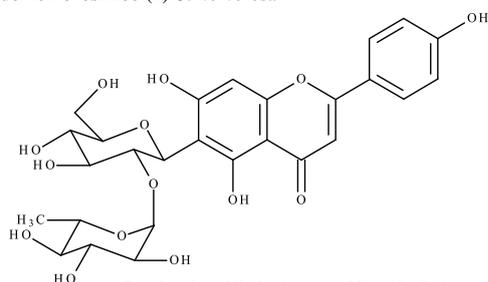
Ácido nemorosínico (1) *C. nemorosa*



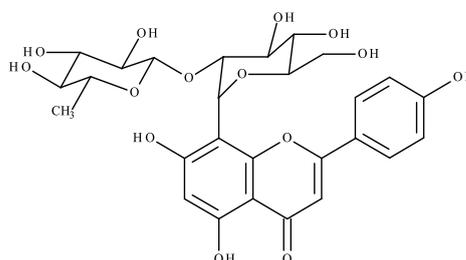
**Vitexina (2) R=H *C. lanceolata* e *C. parvicola*
Orientina (5) R=OH *C. lanceolata***



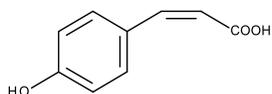
**Isovitexina (3) R=H *C. lanceolata*
Isoorientina (4) R=OH *C. lanceolata***



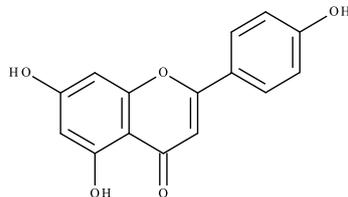
Isovitexina-2''-O-rhamnosídeo (6) *C. lanceolata*



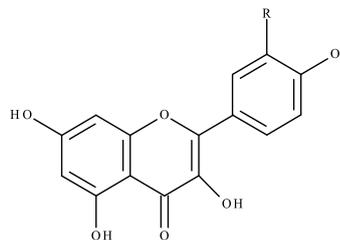
Vitexina-2''-O-rhamnosídeo (7) *C. lanceolata*



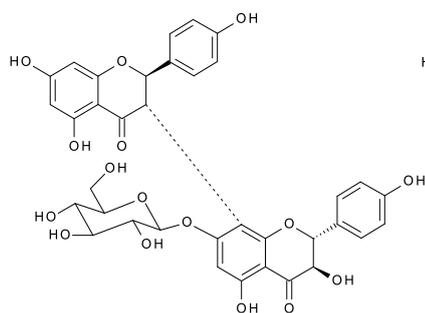
Ácido cis-cumárico (8) *C. nemorosa*



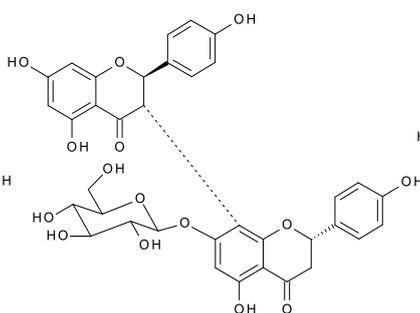
Apigenina (9) *C. nemorosa*



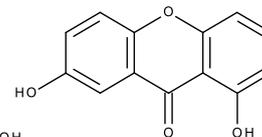
**Canferol (10) R=H *C. nemorosa*
Quercetina (11) R=OH *C. nemorosa***



GB1-7''-O-glicopiranosídeo (12) *C. parvicola*

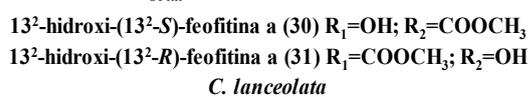
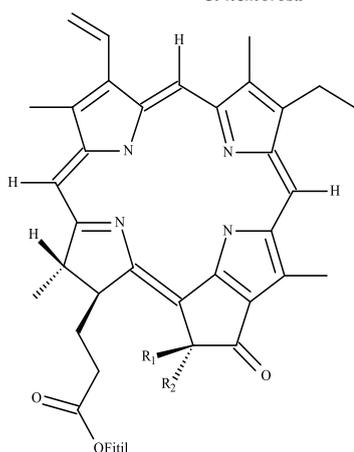
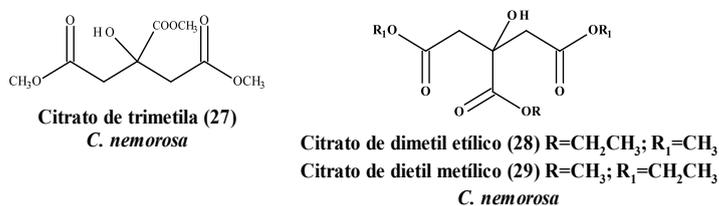
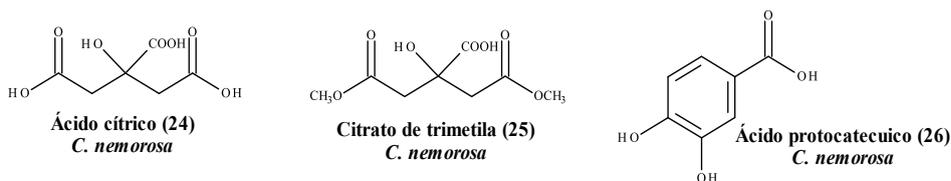
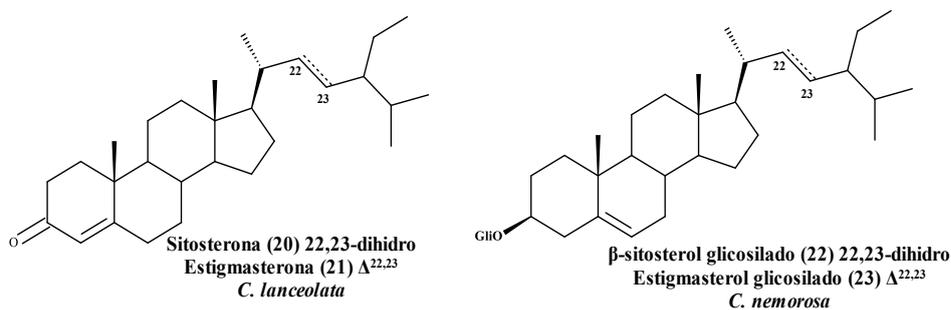
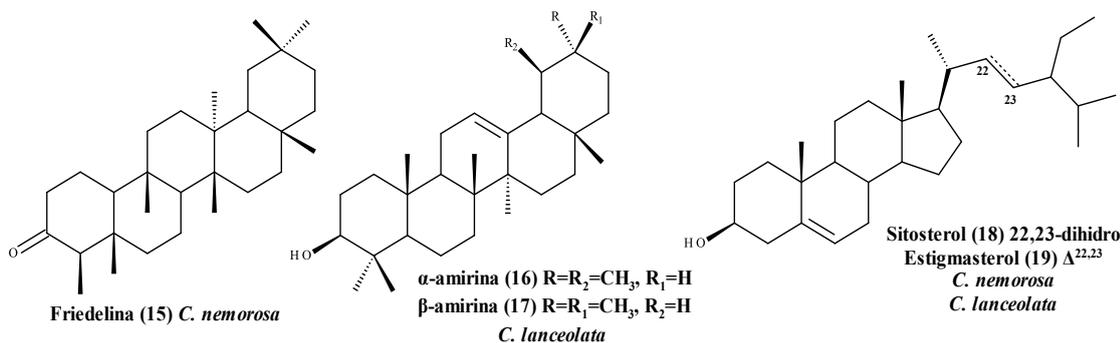


GB1a-7''-O-glicopiranosídeo (13) *C. parvicola*



1,7-dihidroxixantona (14) *C. parvicola*

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS EM ESPÉCIES DE *Clusia* ESTUDADAS NESTE TRABALHO



CAPÍTULO 1: ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DE *Clusia* E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS



1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Família Clusiaceae

Clusiaceae ou Guttiferae Juss. é uma família de plantas, de ocorrência principalmente tropical, que segundo o sistema Angiosperm Phylogeny Group (2009), APG III, compreende 14 gêneros e cerca de 595 espécies.

Esta família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras nobres, derivados químicos de interesse farmacêutico e industrial (GASPARATTO JUNIOR, 2005). Várias espécies são utilizadas com fins medicinais em todo o mundo, como para o tratamento do câncer, processos inflamatórios, infecções, como purgativos e controle da obesidade (HEMSHEKHAR et al., 2011; NOLDIN; ISAIAS; CHECHINEL FILHO, 2006; SALAMA et al., 1986). No Brasil, os gêneros mais importantes são *Platonia* R. Wight (bacuri), *Clusia* L. (abaneiro) e *Garcinia* ou *Rheedia* L. (mangostão).

As flores de Clusiaceae são geralmente vistosas, apresentando-se isoladas ou reunidas em inflorescência (JOLY, 1983). Suas folhas apresentam cavidades secretoras resiníferas, sendo algumas delas produtoras de resinas aromáticas que, somadas aos canais secretores, promovem o acúmulo de diversos tipos de metabólitos especiais, tais como xantonas e cumarinas (CARDONA et al., 1990; CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999). São caracterizadas pela produção de látex, muitas vezes coloridos. Costumam oferecer recompensas raras, como resinas (*Clusia*) e óleos aromáticos (*Tovomita*), com o intuito de atrair polinizadores, como abelhas, beija-flores e besouros (DA CAMARA, 2001).

As espécies de Clusiaceae apresentam a tendência de acumular metabólitos como as benzofenonas e acilfloroglucinois poliprenilados (BEERHEUS; LIU, 2009; CIOCHINA; GROSSMAN, 2006). A família caracteriza-se pela diversidade de metabólitos especiais, sendo registrados a presença de benzofenonas, xantonas, flavonoides, cumarinas, bifenilas, triterpenos e esteroides. Em termos quimiosistemáticos, xantonas, benzofenonas e biflavonoides têm sido relatados como potenciais marcadores taxonômicos da família Clusiaceae (WATERMAN; HUSSAIN, 1983).

1.1.2 Gênero *Clusia*

O gênero *Clusia* abrange cerca de 250 espécies distribuídas do sul da Florida até o sul do Brasil (DE OLIVEIRA et al., 1999), sendo conhecidas popularmente como “cebolas-das-matas” (ENGLER, 1888). A maioria das espécies é dioica e caracterizam-se por produzir

grande quantidade de látex na maioria dos seus órgãos e resinas florais ricas em benzofenonas polipreniladas (STEVENS, 2002). As resinas florais são oferecidas como recompensa aos polinizadores, como as abelhas, que as utilizam para a construção de seus ninhos devido às características de polimerização das benzofenonas polipreniladas (ARMBRUSTER, 1984; ROUBIK, 1989).

O uso popular de plantas deste gênero está relacionado à presença do látex e da resina, sendo utilizadas popularmente no tratamento de reumatismo, problemas estomacais e como purgativos (SALAMA, 1986). A resina extraída dos frutos de *C. rosea* é empregada na cicatrização de ferimentos por nativos da Venezuela (PITTER, 1970). As flores de *C. insignis*, popularmente conhecida como “apuí”, são empregadas como purgativas (BALBACH, 1986). Já o extrato aquoso das folhas de *C. coclensis* é usado na medicina popular no tratamento de hipertensão arterial (GARCÍA-GONZALEZ; MATAMOROS, 1998).

Diversas espécies têm sido estudadas do ponto de vista químico em termos de metabólitos especiais e atividades farmacológicas. Como por exemplo, as investigações fitoquímicas com *C. rosea* (GUSTAFSON et al., 1992), *C. nemorosa* (CERRINI et al., 1993) e *C. grandiflora* (LOKVAM et al., 2000) tem revelado a presença de benzofenonas polipreniladas nos frutos, raiz, folhas e látex. Substâncias pertencentes a esta classe de produto natural mostraram atividade inibitória sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GUSTAFSON et al., 1992; HUERTA-REYES et al., 2004). A atividade anticâncer mostrada também por *Clusia rosea* é atribuída à presença de benzofenonas polipreniladas e tem como alvo a enzima topoisomerase (DIAZ-CARBALLO et al., 2003). Clusianona e seus derivados também apresentaram atividade anticâncer e contra doenças virais, sendo inibidores da topoisomerase e telomerase (SEEBER; HILGER; DIAZ-CARBALLO, 2003a; 2003b). Estes fatos têm despertado o interesse pelo estudo de espécies de *Clusia* de diferentes habitats nos ecossistemas do Brasil.

Como citado acima, diversos são os constituintes relatados para as espécies de *Clusia*, verificando-se ampla ocorrência de benzofenonas e derivados de acilfloroglucinois poliprenilados (BEERHEUS; LIU, 2009; CIOCHINA; GROSSMAN, 2006). Também são encontrados compostos pertencentes à classe dos flavonoides, xantonas, bifenilas, triterpenos, esteroides, tocotrienóis, tocoferóis, dentre outros (COMPAGNONE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2011; TEXEIRA et al., 2006).

1.1.2.1 *Clusia nemorosa* G. Meyer

1.1.2.2 *Clusia lanceolata* Cambess

A espécie *C. lanceolata* (Figura 3) ocorre em áreas de restingas e poucos relatos foram encontrados acerca de investigações químicas e biológicas desta planta. Das resinas florais foram isolados os derivados metilados das benzofenonas clusianona, vedelianona A e lanceolatona (Figura 4) (PORTO et al., 2000).



Figura 3. *Clusia lanceolata*

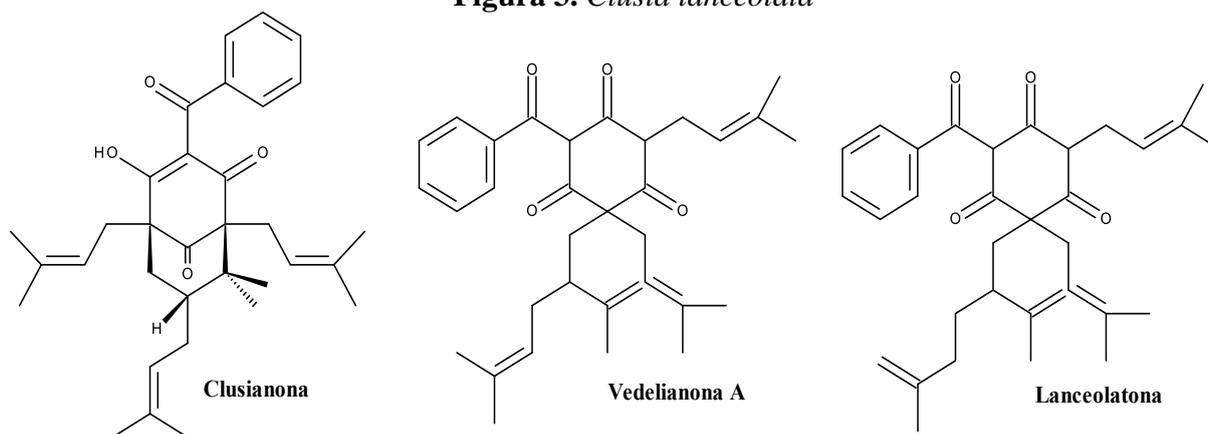


Figura 4. Benzofenonas isoladas de resinas florais de *C. lanceolata*.

1.1.2.3 *Clusia paralicola* G. Mariz Cunha

Clusia paralicola G. Mariz Cunha (Figura 5) tem ocorrência nas florestas nordestinas, especialmente nas florestas de altitude do semiárido ou brejos de altitude (ALCOFORADO-FILHO; SAMPAIO; RODAL, 2003). Caracteriza-se, como a maioria das espécies do gênero por ser dioica, apresentando flores grandes e vistosas (CAMPANA; MOURÃO; MARZINEK, 2010).

O estudo químico com *C. paralicola* mostra-se de grande importância, pois há poucos relatos na literatura envolvendo esta espécie. Investigações sobre o potencial biológico do extrato acetônico da raiz de *C. paralicola* revelaram significativa ação antimicrobiana. Estudos

fitoquímicos deste extrato levaram ao isolamento do fenantreno prenilado paralicolina A que, em testes “*in vitro*”, demonstraram promissora atividade citotóxica (DELLE MONACHE; CAVALCANTI, 1987). Também das raízes de *C. paralicola* foram isoladas três novas bifenilas com potente atividade citotóxica sobre linhagens de células KB (linfócitos B Killer) e atividade de cisão de fita do DNA (SEO et al., 1999). Além disso, DE OLIVEIRA et al. (1996) verificaram a presença de benzofenonas polipreniladas nos extratos etanólicos metilados das resinas florais desta espécie. As estruturas das substâncias identificadas em raízes de *C. paralicola* estão representadas na Figura 6.



Figura 5. *Clusia paralicola*.

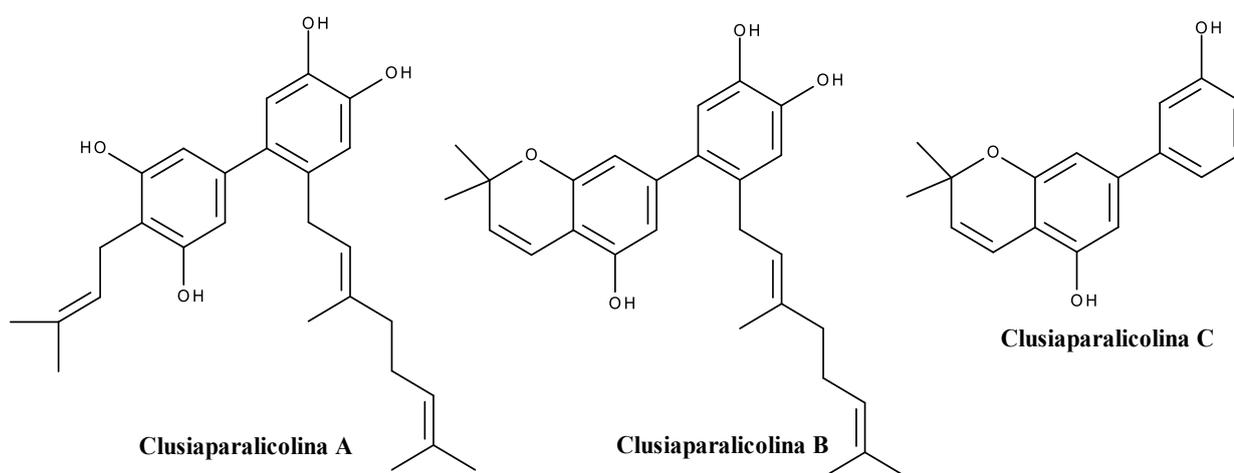


Figura 6. Bifenilas isoladas de raízes de *C. paralicola*.

1.1.3 Benzofenonas e xantonas

As benzofenonas são compostos cetônicos de origem natural e de distribuição restrita, ocorrendo principalmente na família Clusiaceae e Gentianaceae. A família Clusiaceae se destaca pelas suas benzofenonas geralmente substituídas por isoprenóides ou geranóides, que podem estar ciclizados ou não (KUSTER; ROCHA, 2000). As benzofenonas polipreniladas e derivados de acilfloroglucinois foram isolados dos gêneros *Garcinia* (= *Rheedia*) e *Clusia*, em diversos órgãos das plantas (DE OLIVEIRA et al., 1996; MACHADO, 2002; ITO et al., 2003).

As benzofenonas são compostos formados por síntese mista a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato (CUESTA-RUBIO et al., 1999; GROSSMAN; JACOBS, 2000). Esses compostos são produzidos nas plantas superiores pela benzofenona sintase (BPS), uma enzima poliketideo sintase (PKS), que cicliza o produto formado pela condensação de benzoil-CoA e três unidades de malonil-CoA. Dessa forma ocorre a formação do esqueleto C₁₃ das benzofenonas (Figura 7). O produto da reação da BPS e seus derivados hidroxilados podem sofrer prenilações utilizando unidades C₅ e C₁₀ de isoprenóides como doadores de prenilas. A reação de ciclização intramolecular das benzofenonas origina as xantonas (BEERHUES; LIU, 2009; HAMED et al., 2006).

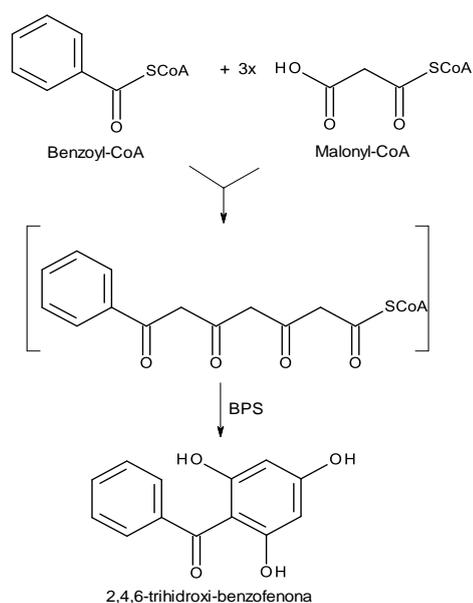


Figura 7. Biossíntese de benzofenonas (Adaptado de BEERHUES; LIU, 2009).

Recentemente, em uma revisão sobre aspectos quimiossistemáticos de benzofenonas isoladas a partir de espécies de *Clusia*, ANHOLETI et al. (2015) descreveram a ocorrência de cerca de 55 benzofenonas poliisopreniladas para este gênero. Apesar da similar origem biossintética, a ocorrência de xantonas não é tão comum no gênero *Clusia*.

O estudo químico do extrato etanólico de cascas do caule de *C. pernambucensis* conduziu ao isolamento de uma nova xantona denominada clusiaxantona. O extrato do caule e a xantona apresentaram promissora atividade leishmanicida, com valores de IC₅₀ de 65 µg mL⁻¹ e 66,9 µM, respectivamente (SILVA et al., 2013). O estudo químico do extrato etanólico das flores da espécie amazônica medicinal *C. insignis*, biomonitorado pela atividade de inibição da enzima tirosinase, conduziu ao isolamento de uma nova xantona conhecida como clusona (ISHIGURO; CHAUDHURI; KUBI, 1998). A brasilixantona foi isolada a partir de extratos do

caule de *C. burlemarxii* e *C. criuva* (FERRAZ, 2011; MARQUES, 2011). Ainda dos caules de *C. criuva*, foi isolada a nova xantona 1,5-dihidroxi-3,4-[3'-hidroxi-1-metiletil-dihidrofurano]-xantona e a deoxijacareubina (MARQUES, 2011). As estruturas das xantonas isoladas de espécies de *Clusia* estão representadas na Figura 8.

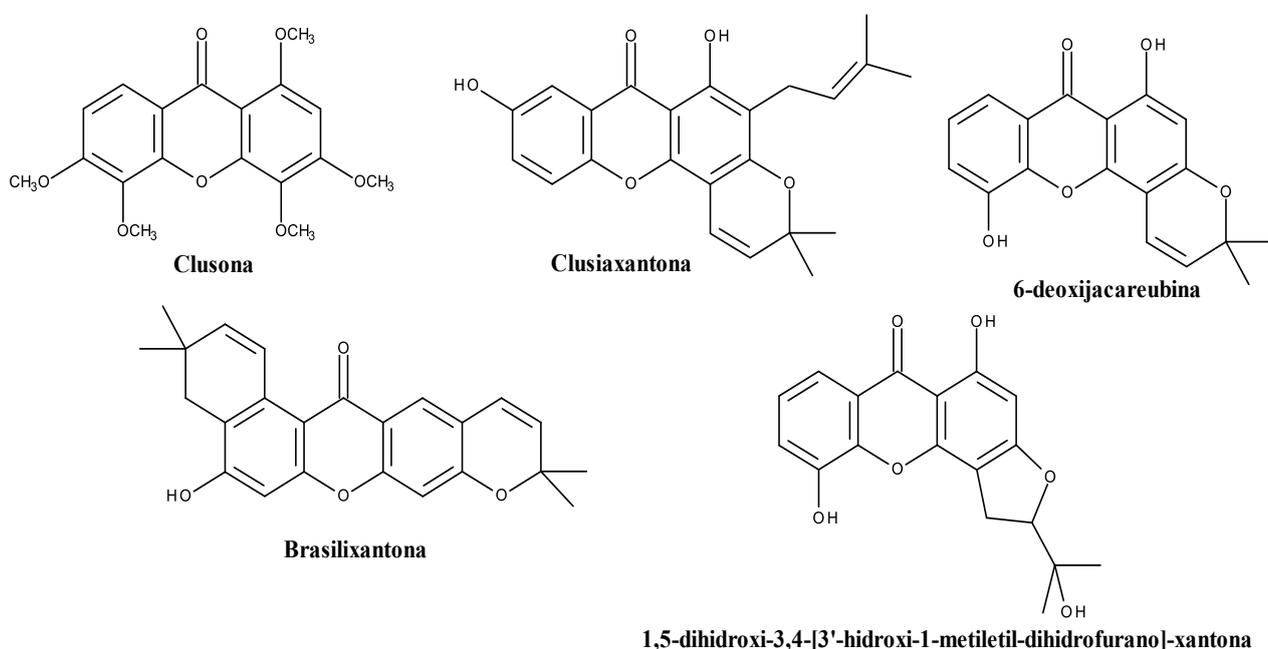


Figura 8. Xantonas isoladas de espécies de *Clusia*.

1.1.4 Biflavonoides

Os biflavonoides são compostos polifenólicos de ocorrência natural que são comumente isolados nas plantas vasculares e têm apresentado propriedades biológicas promissoras (LEE; PARK; RHEE, 1996; LOBSTEIN-GUTH et al., 1998). Os dímeros de flavonoides resultam da ligação de duas unidades de flavona, flavanona, flavanonol, flavonol ou auronas ou misturas destas, além de ocorrerem, menos comumente, os dímeros de chalconas e isoflavonas (SETYAWAN, 2011; SUZART et al., 2007). Esta classe de metabolitos foi originalmente encontrada por Furukawa em 1929 no extrato das folhas de *Ginkgo biloba*, na forma de um sólido amarelo, posteriormente denominado de ginentina (LIN et al., 1997).

Uma revisão sobre a ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae, fazendo parte deste trabalho de tese, foi realizada através de pesquisa em bases de dados bibliográficas, como Scopus, Chemical Abstracts e Science Direct. Nesta revisão, os termos de busca foram “Clusiaceae” e “Biflavonoides”. Foram encontradas cerca de 40 estruturas de diferentes

biflavonoides para a família Clusiaceae (FERREIRA; CARVALHO, SILVA, 2012), alguns destes dados serão descritos a seguir, dando ênfase ao gênero *Clusia*.

Os biflavonoides presentes em Clusiaceae foram agrupados em quatro grupos principais: GB1 (flavanona-(3→8'')-flavanonol), GB-1a (flavanona-(3→8'')-flavanona), morelloflavona (flavanona-(3→8'')-flavona) e amentoflavona (flavona-(3'→8'')-flavona). O biflavonoide GB1 (*Garcinia* Biflavonoid) é um dos principais constituintes de *G. kola*, uma das espécies mais estudadas do ponto de vista farmacológico do gênero *Garcinia* (HAN *et al.*, 2005). Os biflavonoides do tipo GB-1a, também denominados I-3,II-8-binaringenina (CHEN; LIN; HUANG, 1975), foram isolados em cerca de 20 espécies de Clusiaceae. A morelloflavona consiste no primeiro biflavonoide conhecido do tipo flavanona-(3→8'')-flavona e foi isolada a partir das sementes de *G. morella* em 1967 (LI *et al.*, 2002). Este tipo de substância, incluindo GB1 e GB1a, apresenta complexidade espectral à temperatura ambiente, devido à barreira rotacional em torno da ligação (C3→C8'') entre as unidades flavanona e flavona, resultando na formação uma mistura de atropoisômeros (HAN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2002).

Nos gêneros *Allanblackia*, *Clusia*, *Garcinia* (sinonímia *Rheedia*), *Pentadesma*, *Pentaphalangium* e *Symphonia* têm-se destacado a ocorrência de biflavonoides dos tipos GB1, GB-1a, morelloflavona e amentoflavona.

Uma característica marcante de *Garcinia* e dos demais gêneros da família Clusiaceae é o padrão de ligação entre os seus monômeros, sendo mais abundante o tipo (C-3→C-8''), com oxigenações frequentes em C-4', C-5', C-7', C-5'', C-7'' e C-4''', observando-se variações nas substituições em C-7'' como glicosilações e/ou sulfatações, metoxilações em C-4' e C-4''' e oxidação adicional em C-3' nos diferentes derivados.

O estudo químico dos extratos polares de galhos e folhas novas de *C. columnaris* conduziu ao isolamento de sete biflavonoides, são eles, GB-1a, GB-2a, GB-2a-7'''-O-glicopiranosídeo, morelloflavona, morelloflavona-7'''-O-glicopiranosídeo, volkensiflavona e volkensiflavona-7'''-O-glicopiranosídeo (COMPAGNONE *et al.*, 2008). Dos frutos de *C. guaviarensis* foram isolados a morelloflavona e a morelloflavona-7'''-O-glicopiranosídeo (MARTINEZ; MORENO; DELLE MONACHE, 1996). Já do extrato etanólico dos frutos de *C. paralicola* foram isolados GB1-7'''-O-glicopiranosídeo e GB1a-7'''-O-glicopiranosídeo (FERREIRA; CARVALHO; SILVA, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012a). Na Figura 9 são ilustradas as estruturas dos biflavonoides isolados a partir de espécies de *Clusia*.

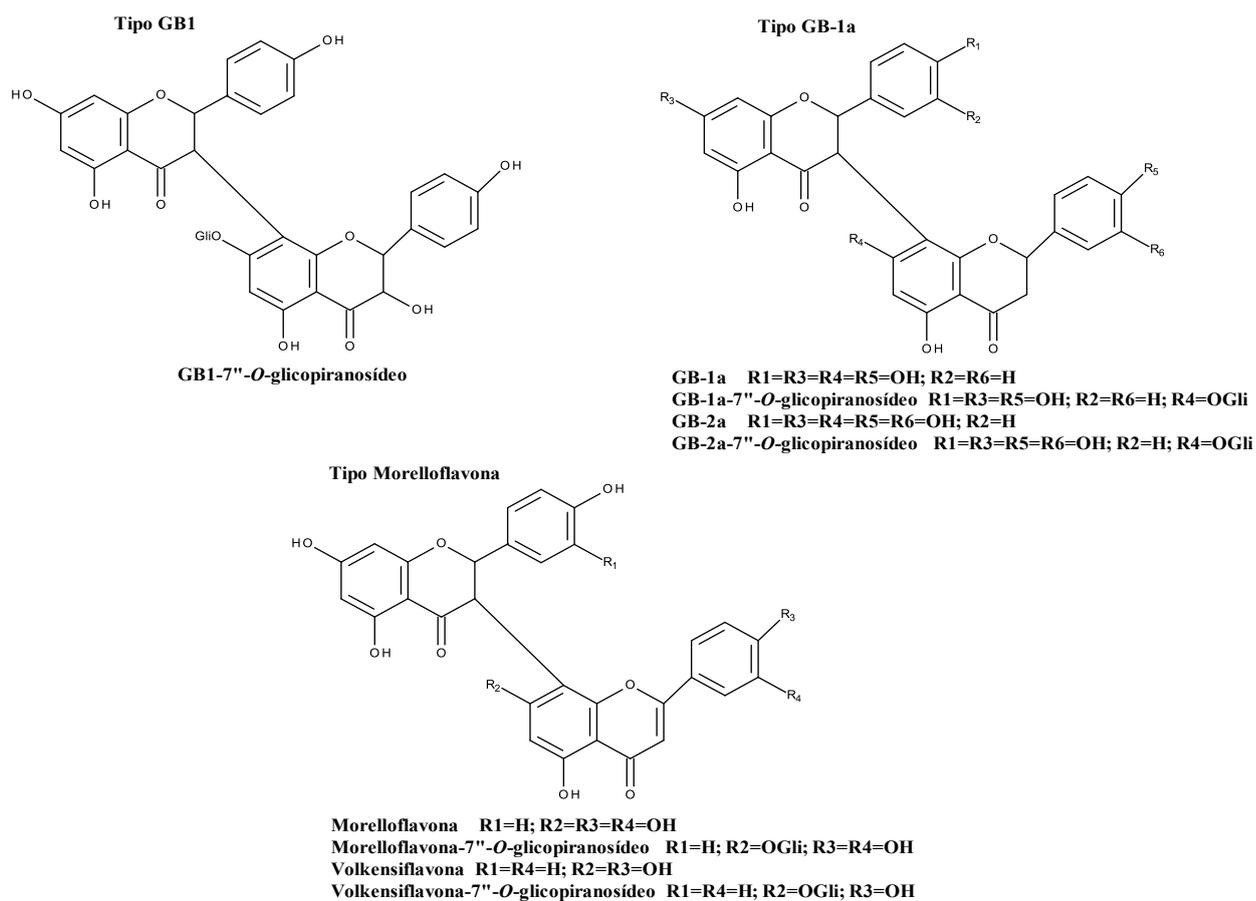


Figura 9. Biflavonoides isolados de espécies de *Clusia*.

Os biflavonoides da família Clusiaceae têm sido investigados quanto as suas ações antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, antiparasitária, antiviral, antitumoral, citotóxica, imunomoduladora e hipolipidêmica, com resultados promissores na maioria dos casos (GONTIJO et al., 2012; LIN et al., 1997; OLALEYE; FAROMBI, 2006; OTUKI et al., 2011; PANG et al., 2009; VERDI et al., 2004). Dentre os biflavonoides farmacologicamente ativos, merecem destaque a amentoflavona, morelloflavona, GB1 e Kolaviron (mistura dos biflavonoides GB1, GB2 e kolaflavanona na proporção 2:2:1), em razão do expressivo número de trabalhos científicos que demonstram seu potencial farmacológico.

Os biflavonoides GB-2a, morelloflavona, morelloflavona-7''-*O*-glicopiranosídeo e volkensiflavona demonstraram promissora atividade analgésica, sendo considerados os principais responsáveis pela ação analgésica da espécie *G. gardneriana* (LUZZI et al., 1997). CASTARDO et al. (2008) relataram que morelloflavona e GB-2a possuem atividade anti-inflamatória oral no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina.

Além das considerações acima, vale a pena ressaltar que os biflavonoides, incluindo os de *Garcinia*, são compostos farmacologicamente ativos com vantagens farmacocinéticas frente aos flavonoides monoméricos; dentre estas vantagens, pode-se citar a maior biodisponibilidade destes metabólitos em comparação aos flavonoides simples (IWU, 1985). De forma geral, pode-se estabelecer que o potencial farmacológico descrito para os biflavonoides contribui de maneira singular para as propriedades medicinais destas espécies.

1.1.5 Flavonas C-glicosídeos

Devido as suas diferenças estruturais e biogênicas em relação a outros flavonoides, as flavonas C-glicosídeos são consideradas como uma sub-classe excepcional e de ocorrência mais abundante na natureza quando em comparação a outras famílias de flavonoides C-glicosídeos (TALHI; SILVA, 2012). Historicamente, a primeira descoberta de flavonoides C-glicosídeo foi no século XIX, onde escoparina (1851), vitexina (1898) e saponarina (1906) foram isoladas e, muito posteriormente, caracterizadas (BANDYUKOVA; YUNGI, 1981). Flavonoides C-glicosídeos diferem de O-glicosídeos tendo o substituinte açúcar ligado via carbono anomérico diretamente ao esqueleto do flavonoide por uma ligação C-C, geralmente nas posições C-6 e C-8 do anel A. Isto resulta em maior resistência a hidrólise e novas propriedades biológicas (TALHI; SILVA, 2012).

Poucos dados estão disponíveis acerca da biogênese de flavonas C-glicosídeos (BRAZIER-HICKS et al., 2009). As flavanonas, que são intermediários na via dos flavonoides, são os precursores mais prováveis. Estudos em trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) demonstraram que a 2-hidroxi-flavanonas foram submetidas à catálise enzimática e atuaram como precursores diretos na biossíntese de flavonas C-glicosídeo (KERSCHER; FRANZ, 1988). Em cereais (Figura 10), a flavanona (A) também sofre conversão a 2-hidroxi-flavanona (B1), que existe em equilíbrio com a sua forma de cadeia aberta (B2), este último parece ser atacado pela enzima C-glicosiltransferase (CGT) para produzir 2-hidroxi-flavanonas C-glicosídeo (C, C1-C3). Em seguida, ocorre a desidratação para serem obtidas as flavonas 6C-glicosídeo (D) e 8C-glicosídeo (E) (BRAZIER-HICKS et al., 2009).

A ocorrência de flavonas C-glicosídeos no gênero *Clusia* foi verificada em cerca de cinco espécies vegetais, sendo estes metabólitos comumente isolados a partir de extratos de folhas destas plantas. De folhas de *C. sandiensis* foi isolada a nova flavona identificada como vitexina-2''-O-ramnosídeo-6''-acetato e vitexina-2''-O-ramnosídeo (DELLE MONACHE, 1991). De folhas de *C. columnaris* Engl. foram isoladas a vitexina, isovitexina e vitexina-2''-

xilosídeo (COMPAGNONE et al., 2008). Com o uso da técnica de cromatografia em contracorrente foram isoladas a partir de folhas de *C. criuva* Cambess a vitexina e a isovitexina (CHEDIER et al., 1999). De folhas de *C. fluminensis* foram isoladas a vitexina, isovitexina, orientina e isorientina (EL-SHARKAWY et al., 2007).

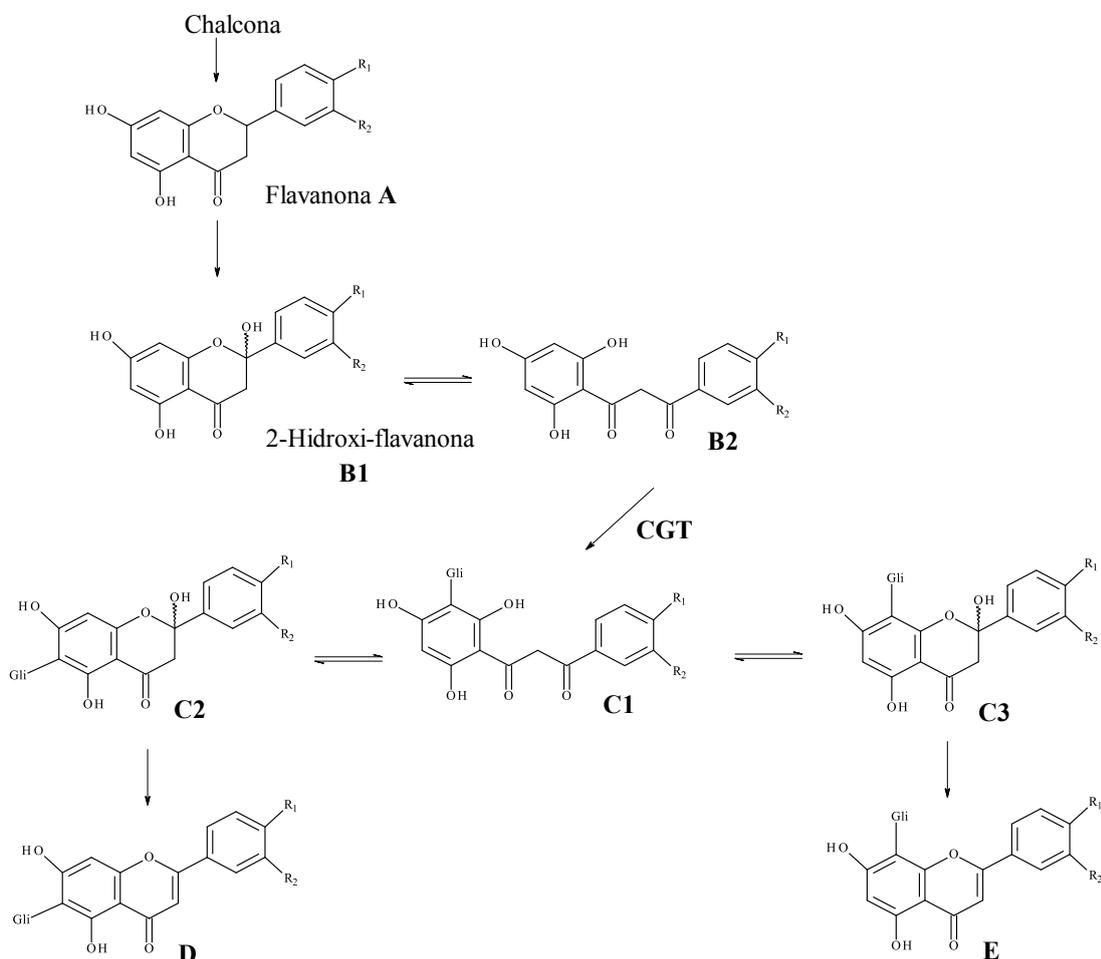


Figura 10. Biossíntese de flavonas-C-glicosídeo em plantas (Adaptado de BRAZIER-HICKS et al., 2009).

1.1.6 Aspectos biológicos

1.1.6.1 Atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente no que se refere às plantas para o uso farmacêutico, sendo que, na última década houve um significativo crescimento no uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010). O grande interesse nos produtos naturais é explicado em parte pelo uso indiscriminado de antibióticos que tem selecionado micro-organismos multirresistentes e

em decorrência da necessidade de se buscar novas substâncias antimicrobianas (ROZATTO, 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2009).

Diversos produtos de origem vegetal mostram ser potencialmente interessantes, no que se refere a sua atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2009). Na família Clusiaceae várias espécies já foram testadas em relação ao seu potencial antimicrobiano e resultados promissores têm sido relatados na literatura (ALMEIDA et al., 2008; MONZOTE et al., 2011; POLICEGODRA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2011; XU et al., 2013; KUETE et al., 2007). Extratos obtidos a partir da espécie *Garcinia kola* apresentaram promissora atividade antimicrobiana frente a bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Estudos fitoquímicos bioguiados destes extratos conduziram ao isolamento do biflavonoide GB1 que se revelou um promissor antibacteriano natural (XU et al., 2013). Extratos de diferentes partes vegetais da espécie *G. lancifolia* apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *S. mutans*, *Bacillus subtilis*, dentre outros micro-organismos (POLICEGODRA et al., 2012). As benzofenonas nemorosona, guttiferona A e 7-epiclusianona isoladas a partir de espécies de Clusiaceae apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *S. mutans*, revelando um promissor potencial desta família na busca de novos potenciais fármacos (ALMEIDA et al., 2008; MONZOTE et al., 2011). Com relação ao gênero *Clusia*, foi reportada a atividade antimicrobiana para a espécie vegetal *C. burlemarxii* (RIBEIRO et al., 2011).

1.1.6.2 Atividade inseticida

A *Musca domestica* Linn. (1758) (Diptera: Muscidae), é uma espécie de grande importância médico sanitária, pois atua como potencial vetor mecânico e/ou biológico de diversos agentes etiológicos, como vírus, bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos (BERNARDI et al., 2006). Elevados índices de infestação por *Musca domestica* causam sérios problemas em criações animais, pois atuam como agentes causadores de estresse e veiculadores de micro-organismos patogênicos, podendo levar animais a morte (BARBIERI JÚNIOR et al., 2007). Os impactos observados têm motivado a busca de métodos aplicáveis ao controle destes insetos.

O controle de *M. domestica*, feito basicamente com o uso de produtos químicos não seletivos, tem ocasionado diversos problemas, entre eles, prejuízos aos organismos benéficos, surgimento de populações resistentes e contaminação ambiental. Com base nesses fatores têm sido estudados novos métodos de controle, que sejam menos agressivos ao meio ambiente,

causem menor impacto ao ecossistema e garantam a manutenção de populações de insetos não alvo, como é o caso dos inimigos naturais (FREITAS, 2008).

Entre as alternativas estudadas destacam-se os inseticidas produzidos a partir de extratos vegetais. O uso de fitoextratos para o controle de insetos, por tratar-se de produtos naturais que fazem parte do ecossistema, pode ser uma estratégia viável, diminuindo o impacto sobre o meio ambiente (ROEL, 2001). Alguns trabalhos na literatura relatam a atividade inseticida de extratos vegetais e óleos essenciais frente a *M. domestica*. O óleo essencial das folhas de *Heliotropium stenophyllum* (Heliotropiaceae) apresentou significativa atividade inseticida frente a *M. domestica* com LC₅₀ igual a 1,09 mg dm⁻³ (URZUA et al., 2013). Já extratos foliares de *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) apresentaram valores de LC₅₀ 65,8 mg Kg⁻¹ para estágio larval e LD₅₀ igual a 0,112 µg/inseto para insetos adultos, demonstrando potente atividade inseticida. O estudo fitoquímico bioguiado desta espécie vegetal conduziu ao isolamento de dois potenciais novos inseticidas lactucopicri-15-oxalato e chicoralexina, que podem vir a atuar futuramente no controle de *M. domestica* (MANSOUR; IBRAHIM; ELGENGAIHI, 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

- Contribuir para o conhecimento da composição química e do potencial biológico de três espécies de *Clusia*.

1.2.2 Específicos

- Isolar e identificar metabólitos especiais de frutos de *C. nemorosa* e *C. paralicola* e folhas de *C. lanceolata* por técnicas cromatográficas e espectroscópicas;

- Avaliar a atividade de frações e extratos de *Clusia* como agentes antifúngicos e antibacterianos visando o controle de micro-organismos patogênicos;

- Avaliar a atividade de frações e extratos de *Clusia* como agentes inseticidas frente à *Musca domestica*.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Material vegetal

Os frutos de *Clusia nemorosa* foram coletados em janeiro de 2012 e, posteriormente, em janeiro de 2013 no campus da UFRPE, em Recife - PE, e uma exsicata encontra-se depositada no herbário desta instituição (PEUFR) sob o número 51474.

As folhas de *Clusia lanceolata* foram coletadas em abril de 2012, na restinga de Grumari no Rio de Janeiro – RJ. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RBR) sob o número 35424.

Os frutos de *Clusia paralicola* G. Mariz foram coletados em maio de 2010, no município de Cruz do Espírito Santo – PB, e uma exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal da Paraíba (JPB) sob o número 7455.

1.3.2 Preparação dos extratos

1.3.2.1 Obtenção dos extratos e frações de *Clusia nemorosa* (1° coleta)

O material coletado foi seco em estufa (50 °C) obtendo-se 130 g dos frutos secos que foram triturados em liquidificador e submetidos à extração em diclorometano até completa exaustão. Posteriormente, este material foi submetido à extração com metanol. O material extraído foi concentrado em rotaevaporador a 45 °C sob pressão reduzida e foram obtidos os extratos em diclorometano (15 g) e em metanol (27 g).

O extrato em metanol (20 g) foi solubilizado em uma mistura metanol:água e particionado com solventes de polaridade crescente dando origem as frações em clorofórmio (1,8 g), acetato de etila (9,0 g) e butanol (3,5 g).

1.3.2.2 Obtenção dos extratos e frações de *Clusia nemorosa* (2° coleta)

O material coletado foi seco em estufa (50 °C) obtendo-se 500 g dos frutos secos que foram triturados em liquidificador e submetidos à extração em hexano até completa exaustão. Posteriormente, este material foi submetido à extração com etanol. O material extraído foi concentrado em rotaevaporador a 45 °C sob pressão reduzida e foram obtidos os extratos em hexano (97,0 g) e em etanol (110,7 g).

O extrato em etanol (37 g) foi solubilizado em uma mistura metanol:água e particionado com solventes de polaridade crescente dando origem as frações em hexano (9,2 g), clorofórmio (8,6 g), acetato de etila (13,6 g) e butanol (5,2 g).

1.3.2.3 Obtenção dos extratos e frações de *Clusia lanceolata*

O material coletado foi seco a temperatura ambiente obtendo-se 230 g folhas secas que foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração em diclorometano e, posteriormente, em metanol. O material extraído foi concentrado em rotaevaporador (45 °C) resultando no extrato em diclorometano (23 g) e em metanol (20 g).

O extrato em metanol (17 g) foi solubilizado em uma mistura metanol:água e particionado com solventes de polaridade crescente dando origem as frações em hexano (1,6 g), clorofórmio (1,5 g), acetato de etila (3,5 g) e butanol (2,0 g).

O procedimento de obtenção do extrato e frações de frutos de *C. paralicola* foi realizado pela autora durante seu curso de mestrado e a metodologia pode ser encontrada em FERREIRA, 2011.

1.3.3 Métodos Cromatográficos

1.3.3.1 Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

A cromatografia em coluna foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia) e sílica gel (230-400 mesh e 70-230 mesh, Vetec). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck) e como reveladores foram utilizados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), soluções de cloreto férrico, sulfato cérico e vanilina.

1.3.3.2 Cromatografia com fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa GC/EM-QP2010 Plus Shimadzu acoplado a espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV. A programação utilizada foi a seguinte:

Temp. Forno	Temp. Injetor	Fluxo na Col.	Gás de Arraste	Rampa (r)	Temp. Corrida
50- 240 °C	260 °C	1 mL/min.	Hélio	5 °C/min.	68.5 min.

1.3.3.3 Cromatografia Líquida (LC) - Espectrometria de Massas (MS)

As análises em LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica), modelo Esquire 3000 Plus, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador *ion trap*, operando no modo positivo.

1.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos bidimensionais), foram registrados em espectrômetros Bruker, modelos Advance II, operando com frequências 400 e 500 MHz para ^1H e 125 e 100 MHz para ^{13}C . Como referência interna foi usado tetrametilsilano ou resíduo de solvente como acetona, CHCl_3 , DMSO, MeOH e piridina, nos respectivos solventes deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram expressos em Hertz (Hz).

1.3.5 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em filme sobre cela de KBr ($6000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) e ATR, empregando-se um espectrômetro VERTEX-70 com transformada de Fourier.

1.3.6 Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos empregando-se um espectrômetro UV/VIS J-815, da JASCO, usando solução com metanol em célula de $1\times 1\times 3\text{ cm}$.

1.3.7 Rotação Específica $[\alpha]$

A rotação específica foi medida em um polarímetro KRUSS OPTRONIC GERMANY.

1.3.8 Isolamento dos constituintes químicos

1.3.8.1 Fracionamento dos extratos e frações de frutos de *C. nemorosa* (1^o coleta)

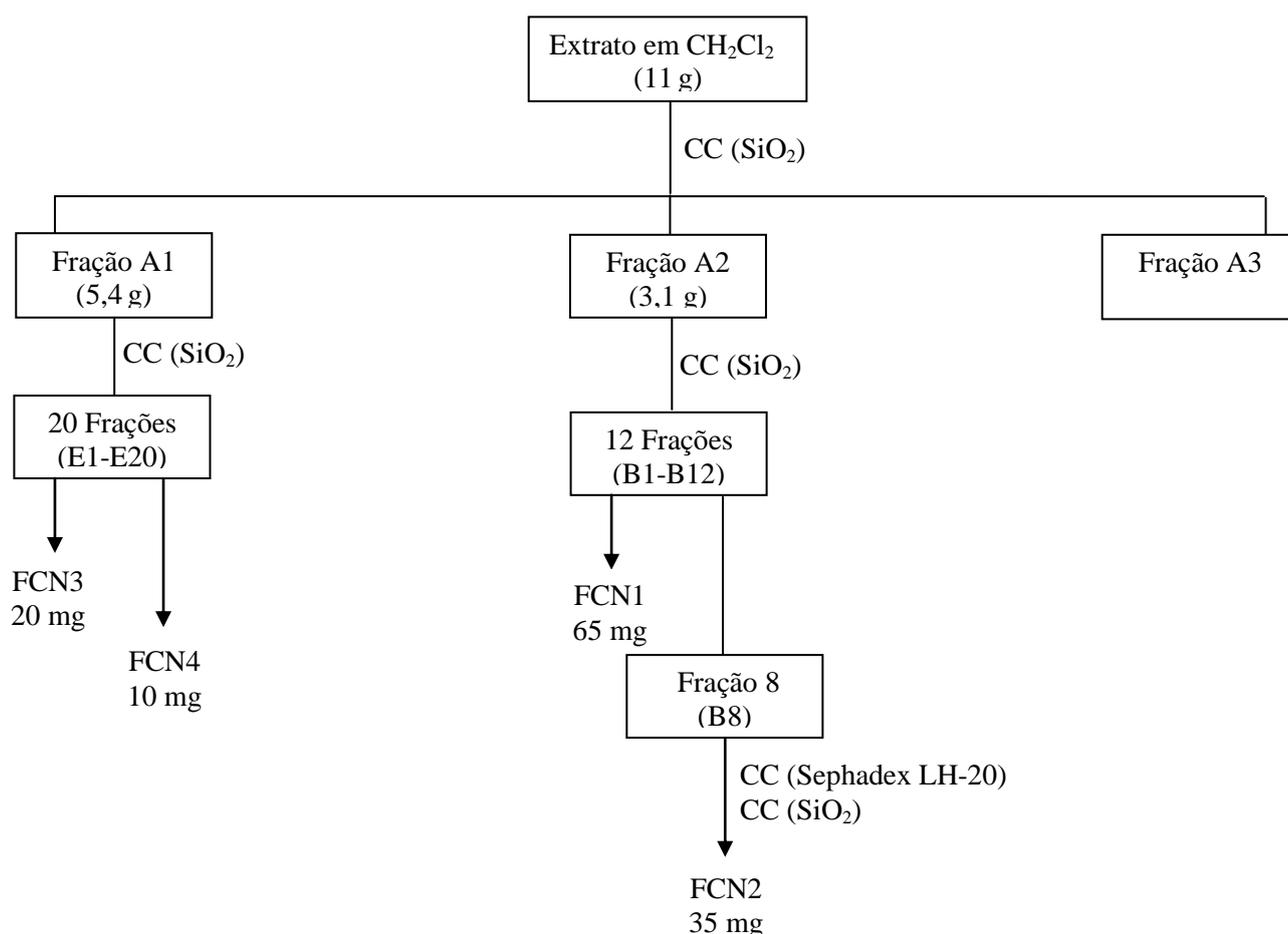
1.3.8.1.1 Estudo do extrato em diclorometano (FCNDCM)

O extrato em diclorometano (11 g) foi fracionado (Coluna A) utilizando-se sílica gel 70-230 Mesh como fase estacionária e como fase móvel, eluição em modo isocrático, foram utilizados os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol. Após remoção do solvente a vácuo, foram obtidas 3 frações (A1-A3).

A fração A2 (3,1 g), que foi eluída com acetato de etila, foi submetida a novo fracionamento (Coluna B) em sílica gel. Os eluentes usados foram as misturas de Hexano:Diclorometano DCM (0 \rightarrow 100%) e DCM:AcOEt (0 \rightarrow 100%) com gradiente crescente de polaridade, finalizando com metanol (MeOH). Das 12 frações (B1-B12) obtidas, após análise de CCDA, foi isolada uma substância pura denominada **FCN1** (65,0 mg), que se apresentou como um sólido amorfo branco.

A oitava fração (B8) foi submetida à nova CC (Coluna C) utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária e MeOH como fase móvel, fornecendo 6 frações (C1-C6). A fração C3 (75,0 mg) foi submetida a novo fracionamento (Coluna D) em sílica gel empregando-se como eluente a mistura de Hexano:AcOEt (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, finalizando com MeOH. Das 6 frações (D1-D6) obtidas foi isolada uma substância pura denominada **FCN2** (35,0 mg), que se apresentou como um sólido viscoso amarelo.

A fração A1 (5,4 g), eluída com diclorometano, foi submetida a novo fracionamento em sílica gel (Coluna E). Os eluentes usados foram as misturas de Hexano:DCM (0→100%) e DCM:AcOEt (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, finalizando com MeOH. Das 20 frações (E1-E12) obtidas, após análise de CCDA, foram isoladas duas substâncias puras denominadas **FCN3** (20,0 mg) e **FCN4** (10,0 mg), que se apresentaram como cristais brancos. Ver representação do procedimento no *Esquema I*.

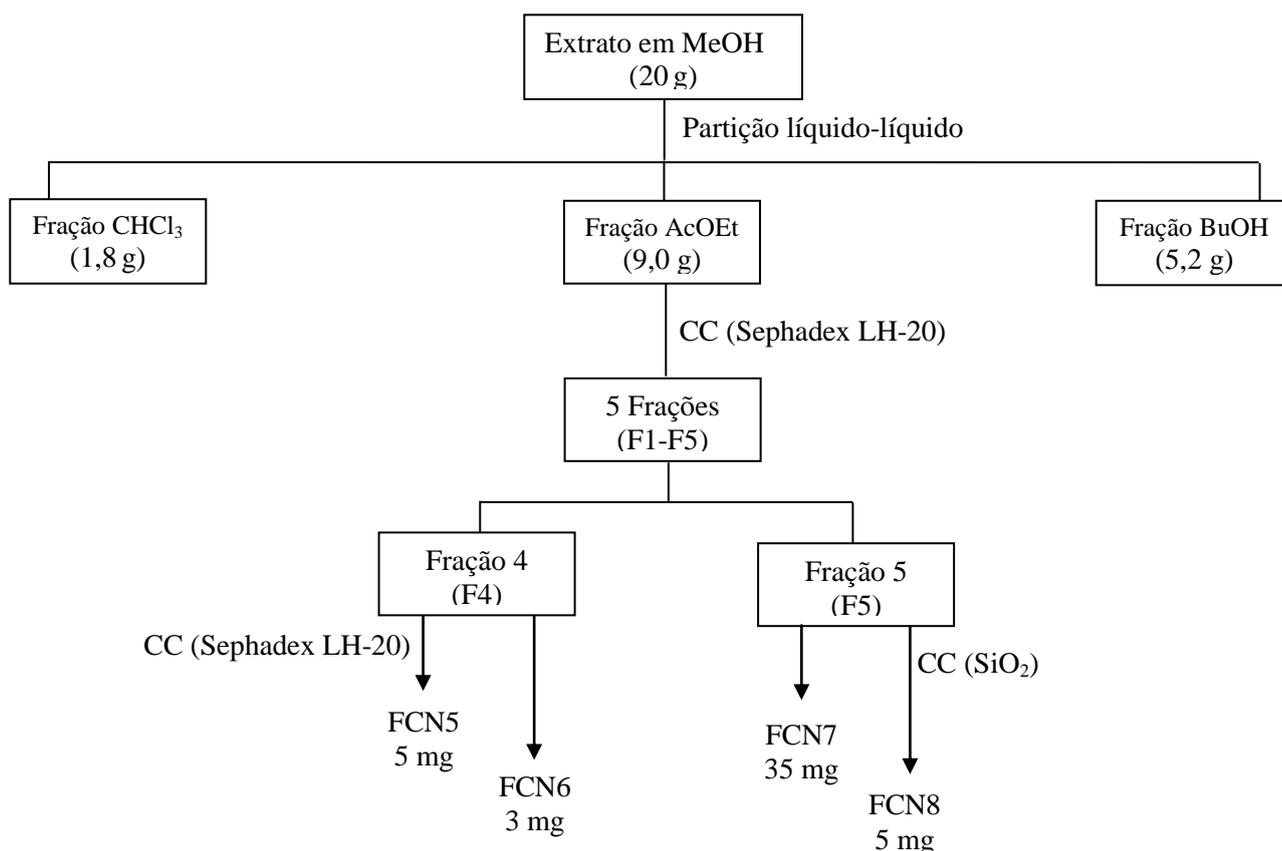


Esquema I. Isolamento das substâncias do extrato em diclorometano de frutos de *C. nemorosa*.

1.3.8.1.2 Estudo do extrato em metanol (FCNM)

O extrato metanólico foi fracionado através de partição com solventes orgânicos como apresentado no esquema II. A fração em acetato de etila de frutos de *C. nemorosa* **FCNAE**, proveniente da partição, foi fracionada em Sephadex LH-20 (Coluna F) usando como eluente MeOH, resultando em 5 frações (F1-F5). A fração F4 foi fracionada em Sephadex LH-20 (Coluna G) usando MeOH. Das 9 frações (G1-G9) obtidas, foram isoladas duas substâncias puras denominadas **FCN5** (5,0 mg) e **FCN6** (5,0 mg), que foram obtidas como um sólido marrom e como um sólido amorfo amarelo, respectivamente.

A fração F5 foi submetida à nova CC (Coluna H) em sílica gel usando como fase móvel uma mistura de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (0→100%) com gradiente crescente de polaridade. Das 12 frações (H1-H12) obtidas, após análise de CCDA, foram isoladas a substância **FCN7** (35,0 mg) na forma de cristais brancos e **FCN8** (5,0 mg) na forma de um sólido cristalino marrom. Ver representação do procedimento no *Esquema II*.



Esquema II. Isolamento das substâncias do extrato em metanol de frutos de *C. nemorosa*.

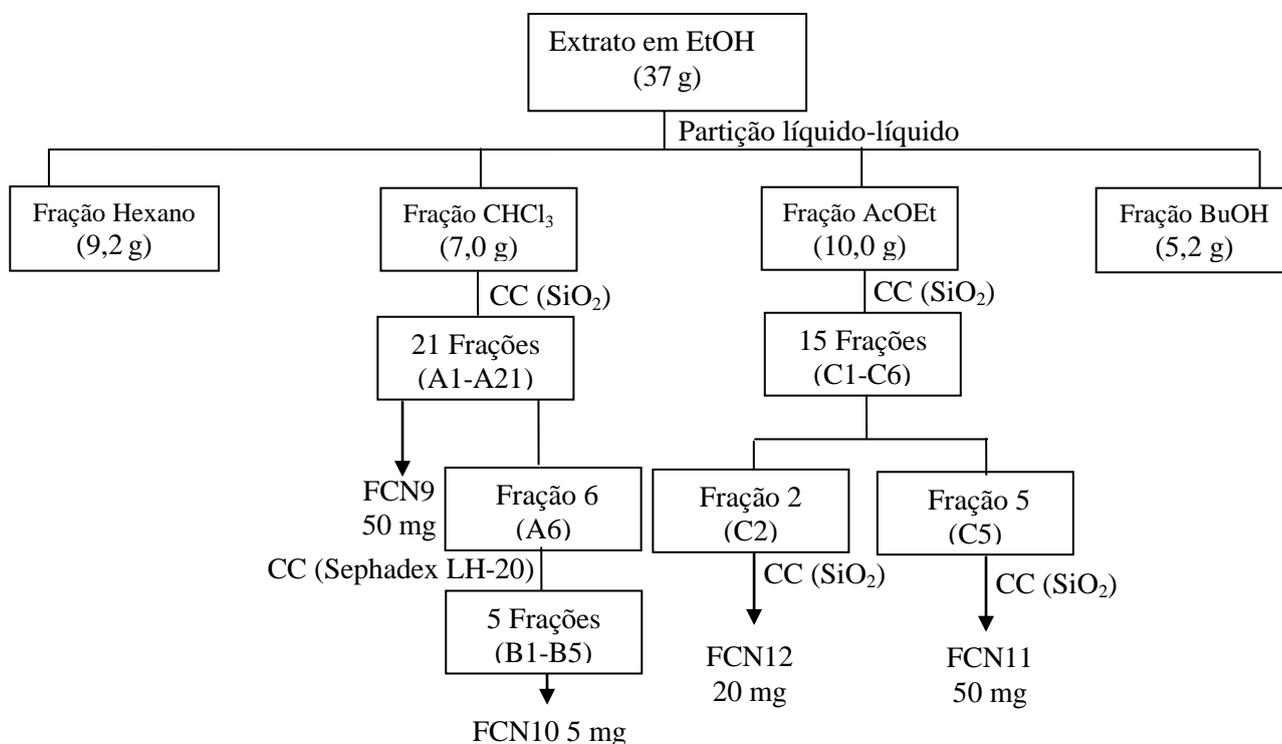
1.3.8.2 Fracionamento dos extratos e frações dos frutos de *C. nemorosa* (2^o coleta)

1.3.8.2.1 Estudo de extrato em etanol (FCNE)

O extrato obtido com etanol foi fracionado através de partição com solventes conforme apresentado no esquema III. A fração em clorofórmio **FCNC2** (7,0 g), proveniente da partição, foi fracionada (Coluna A) em sílica gel usando como fase móvel a mistura de solventes Hexano:CHCl₃ (0→100%), CHCl₃:AcOEt (0→100%) e AcOEt:MeOH (0→100%) com gradiente crescente de polaridade. Das 21 frações (A1-A21) obtidas, após análise de CCDA, foi isolada a substância **FCN9** (50,0 mg) na forma de um sólido branco.

A fração A6 foi submetida à nova CC (Coluna B) em Sephadex LH-20 usando como eluente a mistura de CHCl₃:MeOH (1:1). Das 5 frações (B1-B5) obtidas, foi isolada a substância **FCN10** (5,0 mg) obtida na forma de um sólido amarelo.

A fração em AcOEt **FCNAE2** (10,0 g), proveniente do extrato em etanol, foi fracionada (Coluna C) em sílica gel usando como fase móvel a mistura dos solventes CHCl₃: MeOH (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, fornecendo 15 frações (C1-C15). A fração C2 foi submetida à nova CC (coluna D) em sílica gel tipo flash empregando como eluente misturas de CHCl₃:MeOH (0→100%), fornecendo duas frações (D1-D2). A fração D1 forneceu **FCN12** (20,0 mg) na forma de cristais brancos. A fração C5 foi fracionada (Coluna E) em sílica gel, fase móvel CHCl₃:MeOH (0→100%), fornecendo 4 frações (E1-E4). A fração E2 forneceu **FCN11** (50,0 mg) na forma de cristais brancos. Ver o procedimento no *Esquema III*.



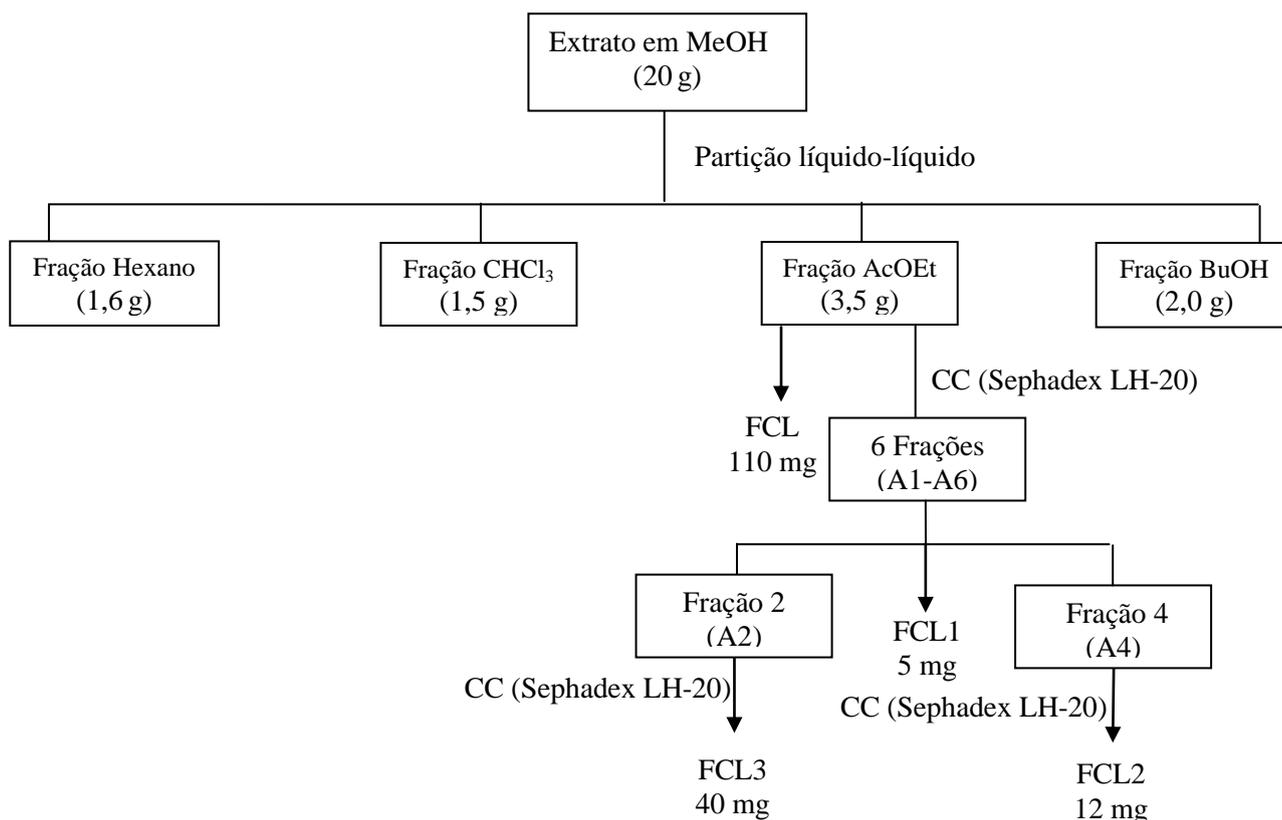
Esquema III. Isolamento das substâncias do extrato em etanol de frutos de *C. nemorosa*.

1.3.8.3 Fracionamento dos extratos e frações das folhas de *C. lanceolata*

1.3.8.3.1 Estudo do extrato em metanol (FCLM)

O extrato obtido com metanol de folhas de *C. lanceolata* foi submetido à partição com solventes orgânicos conforme apresentado no esquema IV. A fração em acetato de etila **FCLAE**, proveniente da partição, forneceu 110 mg de um sólido amarelo pouco solúvel em MeOH denominado substância **FCL**.

A fração **FCLAE** foi fracionada (Coluna A) em Sephadex LH-20 usando como eluente MeOH, fornecendo 6 frações (A1-A6). A fração A5 forneceu uma substância pura **FCL1** (5,0 mg), que se apresentou como um sólido amarelo. A fração A4 foi submetida à nova CC (Coluna B) em Sephadex LH-20 com MeOH. Das 4 frações (B1-B4) obtidas, a fração B3 forneceu **FCL2** (12,0 mg) na forma de um sólido amarelo amorfo. A fração A2 foi fracionada (Coluna C) em Sephadex LH-20 usando como eluente MeOH. Das 10 frações (C1-C10) obtidas, a fração C4 forneceu **FCL3** (40,0 mg) na forma de um sólido amarelo. Ver o procedimento no *Esquema IV*.



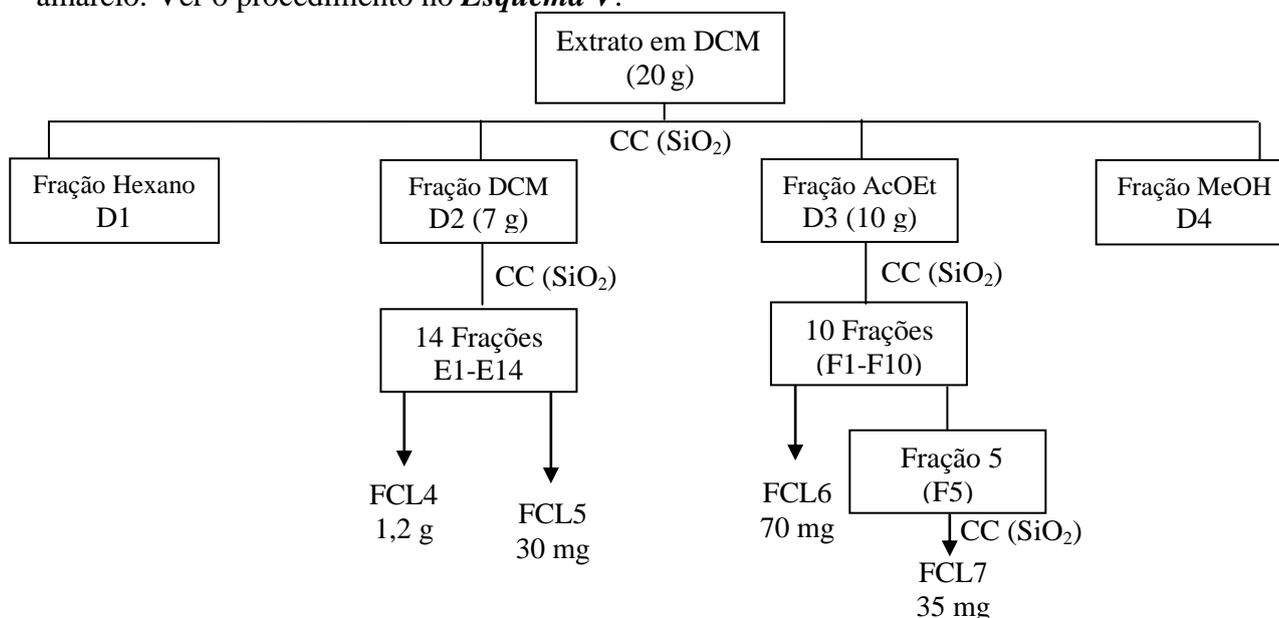
Esquema IV. Isolamento das substâncias do extrato em metanol de folhas de *C. lanceolata*.

1.3.8.3.2 Estudo do extrato em diclorometano (FCLDCM)

O extrato em diclorometano (20 g) foi fracionado (Coluna D) utilizando-se sílica gel 70-230 Mesh como fase estacionária e como fase móvel, eluição em modo isocrático, foram utilizados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Após remoção do solvente a vácuo, foram obtidas 4 frações (D1-D4), conforme apresentado no esquema V.

A fração D2 (7,0 g), eluída com diclorometano, foi submetida a novo fracionamento em sílica gel (Coluna E). Os eluentes usados foram as misturas de Hexano:DCM (0→100%) e DCM:AcOEt (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, finalizando com MeOH. Das 14 frações (E1-E14) obtidas, após análise de CCDA, foram obtidas, após lavagem em MeOH, as substâncias denominadas **FCL4** (1,2 g) e **FCL5** (30,0 mg), que se apresentaram como cristais brancos.

A fração D3 (10,0 g), eluída com acetato de etila, foi submetida a novo fracionamento em sílica gel (Coluna F). Os eluentes usados foram as misturas de DCM:AcOEt (0→100%) e AcOEt:MeOH (0→100%) com gradiente crescente de polaridade. Das 10 frações (F1-F10) obtidas, após análise de CCDA, foi obtida a substância denominada **FCL6** (70,0 mg), que se apresentou na forma de um sólido amorfo verde. A fração F5 foi submetida à nova CC (Coluna G) em sílica gel e como fase móvel foi utilizada a mistura de DCM:AcOEt (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, finalizando com MeOH. Das 4 frações (G1-G4) obtidas, foi isolada a substância denominada **FCL7** (35,0 mg), que se apresentou como um sólido viscoso amarelo. Ver o procedimento no *Esquema V*.



Esquema V. Isolamento das substâncias do extrato em diclorometano de folhas de *C. lanceolata*.

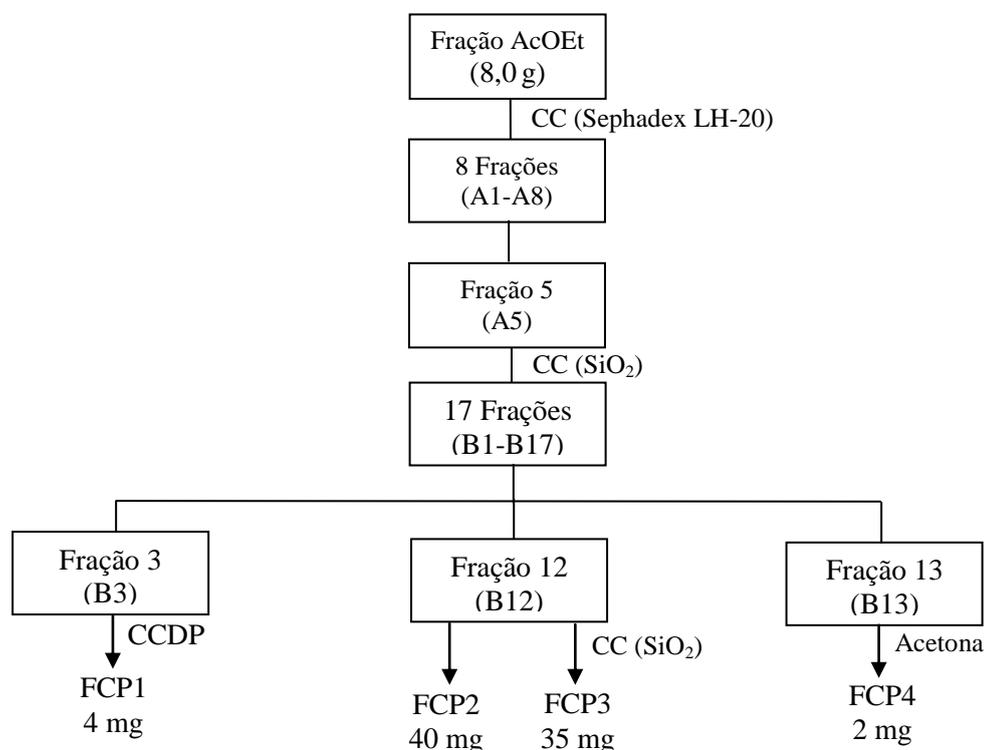
1.3.8.4 Fracionamento dos extratos e frações dos frutos de *C. paralicola*

1.3.8.4.1 Estudo do extrato em etanol (FCPE)

O extrato obtido com etanol foi submetido à partição com solvente e obtiveram-se as frações FCPH (12 g) e FCPAE (9 g). A fração **FCPAE** (8,0 g), fração em acetato de etila, foi fracionada (Coluna A) em Sephadex-LH20 usando a mistura de CHCl_3 :MeOH (1:1) como eluente, resultando em 8 frações (A1-A8). A fração A5 foi submetida à nova CC (Coluna B) em sílica gel tendo como fase móvel a mistura de Hexano:AcOEt (0→100%) e AcOEt:MeOH (0→100%) com gradiente crescente de polaridade, fornecendo 17 frações (B1-B17). A fração B3 foi submetida à Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) empregando-se como eluente uma mistura de DCM: MeOH (95:5) resultando na obtenção de cristais amarelos em forma de agulhas, substância FCP1 (4,0 mg).

A fração B12 foi submetida a fracionamento em CC (Coluna C) em sílica gel tendo como fase móvel a mistura de CHCl_3 :MeOH (0→100%) com gradiente crescente de polaridade. Das 10 frações (C1-C10) obtidas, após análise de CCDA, foram obtidas as substâncias puras **FCP2** (40,0 mg) e **FCP3** (35,0 mg), que se apresentaram na forma de um sólido amarelo. A fração B13 foi parcialmente dissolvida em acetona fornecendo um precipitado amarelo, denominado substância **FCP4** (2,0 mg). Ver o procedimento no *Esquema VI*.

VI.



Esquema VI. Isolamento das substâncias da fração em acetato de etila de frutos de *C.paralicola*.

1.3.8 Preparação de derivados

1.3.8.1 Metilação da vitexina (2)

A preparação do diazometano foi realizada adicionando-se 2,14 g de n-metil-n-nitroso-sulfonamida (Diazald) em um balão em banho de gelo. Em seguida, acrescentou-se 30,0 mL de éter etílico para solubilização do reagente. Posteriormente, foram acrescentados, gota a gota, 10,0 mL de uma solução 4,0% de KOH em etanol. Tampou-se o balão em agitação magnética leve até homogeneização. Adaptou-se o balão ao kit de destilação Diazald com aquecimento brando. Após destilação, o diazometano foi condensado em solução etérea resfriada em banho de gelo. O produto foi mantido em geladeira até a utilização do mesmo (CARVALHO et al., 2006).

A reação de metilação do composto **2** foi realizada adicionando-se 10 mg do composto **2** e 10 mL de solução etérea de diazometano, em um recipiente de 30 mL, observando-se desprendimento gasoso (N₂), que é um indício de reação. Ao final do procedimento, obteve-se 10,5 mg do composto **2a**.

1.3.9 Ensaios biológicos

1.3.9.1 Atividade antimicrobiana

Amostras dos extratos e frações de frutos de *C. nemorosa* e de folhas de *C. lanceolata* foram enviadas para avaliação da atividade antimicrobiana, esta parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com a professora Dr^a. Daniela Sales Alviano no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos na UFRJ.

Os micro-organismos e condições de cultivo empregados nos ensaios foram:

➤ Bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB 9393), cepa clínica isolada no Hospital Clementino Fraga Filho, UFRJ e cultivada em ágar infusão de cérebro e coração bovinos (BHI) e crescido por 24 h a 37°C;

➤ Fungos leveduriformes - *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* T₁-444 Sorotipo A – formas clínicas obtidas da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-SP. Todos foram cultivados em ágar Sabouraud e crescidos por 48 h em temperatura ambiente;

➤ Fungo filamentoso – *Rhizopus oryzae* cedido pela Universidade Católica de Pernambuco (UCP 1506), foi cultivado em ágar batata dextrose (PDA) e crescido por 5 dias em temperatura ambiente.

As soluções dos extratos e frações foram preparados dissolvendo-se 10 mg de cada amostra em 100 µL de DMSO (concentração final igual a 100 mg/mL).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e das frações capaz de inibir 100% do crescimento microbiano foi realizada com base na metodologia internacional padrão do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, 2008*) descrita para cada um dos micro-organismos listados para serem testados (CLSI Normas M27-A3 para leveduras, M38-A2 para fungo filamentosos, M11-A6 e M7-A4 para bactérias). Anfotericina B (AMB) e Ciprofloxacina (CIP) foram utilizadas como padrões de agentes antifúngico e antibacteriano, respectivamente.

Para observação da CIM, foram adicionados inicialmente 5µL dos extratos e frações em placas de 96 poços, foram feitas microdiluições seriadas das substâncias em meio de cultivo RPMI-MOPS (pH 7,2) para fungos e Mueller-Hinton para bactérias.

A cepa de MRSA foi crescida em ágar BHI por 24 horas à 37°C. O inoculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar uma D.O. entre 0,08– 0,1 em 625 nm (1×10^8 UFC). Foram feitas diluições desta suspensão (1:20 de meio) para obtenção do inoculo final de 5×10^6 UFC/mL. Foi adicionado em cada poço 10 µL do inoculo em um volume final de 110µL de meio adicionado com amostra teste em suas respectivas diluições, obtendo-se uma suspensão de 5×10^5 UFC/mL.

Os fungos leveduriformes foram crescidos em ágar Sabouraud por 24 horas à 37°C e o filamentosos por 3 dias, em ágar dextrose batata (PDA), em temperatura ambiente. O inoculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar uma D.O. entre 0,8 – 0,1 em 530 nm. Foram feitas diluições do inoculo 1:50 (10 µL em 500 µL de meio) e, deste, 1:20 (100 µL em 2000 µL de meio). Foi adicionado em cada poço 100µL do inoculo, em um volume final de 200 µL de meio adicionado com amostra teste em suas respectivas diluições, obtendo uma suspensão de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para os fungos leveduriformes e $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 para fungos filamentosos.

A CIM, tanto para os fungos como para a bactéria, foi determinada, após incubação, visualmente pela turvação e pela adição do corante de viabilidade resazurina (0,005% em PBS pH 7,2), que quando metabolizado pelas células, é reduzido a rezorufina mudando a cor de roxa para rosa (*Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, 2008*).

1.3.9.2 Atividade inseticida

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Transmissores de Leishmanioses Setor de Entomologia Médica e Forense IOC/FIOCRUZ pelo aluno do curso de especialização em Entomologia Médica, Vítor dos Santos Baía Ferreira e sob a orientação da professora Dr^a Margareth Maria de Carvalho Queiroz.

O estudo envolveu a avaliação da bioatividade de extratos e frações de folhas de *C. lanceolata* e frutos de *C. paralicola* nas concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5 mg/mL, respectivamente, sobre larvas de *Musca domestica*. Para o bioensaio foram utilizadas larvas de primeiro estágio.

Após contato com as concentrações dos extratos e frações, as larvas foram submetidas à dieta a base de carne bovina putrefada e farelo de trigo na proporção de 1,0 g de dieta por larva, foram empregados 5,0 g de carne para cada 1,0 g de farelo. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram feitos dois controles (DMSO e puro), cada um com 50 larvas. As observações foram realizadas diariamente até a pupação das larvas. Após abandonarem a dieta, as larvas foram pesadas em balança analítica. Os parâmetros utilizados para avaliação foram à viabilidade do desenvolvimento, duração de estágio da larva e peso das pupas.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Determinação estrutural e identificação das substâncias isoladas

1.4.1.1 Derivado de floroglucinol

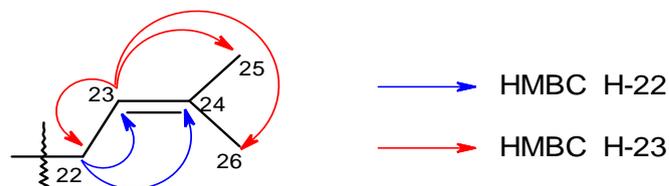
A amostra FCN2 (35,0 mg), substância **1**, foi obtida na forma de um sólido amarelo viscoso opticamente ativo, $[\alpha]_D = -5,34$ (MeOH, 0,16), a partir do fracionamento do extrato em diclorometano dos frutos de *C. nemorosa*. A proposta de elucidação estrutural de FCN2 foi realizada a partir da análise dos dados de UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), EM, CD e comparação com dados de análogos estruturais descritos na literatura (DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; GACS-BAITZ, 1991; HOLTZEL et al., 1996; ZHONG; CHEN; YANG, 2008).

As absorções de IV (Figura 13) sugerem a presença de grupos OH (3435 cm^{-1}), carboxila (1708 cm^{-1}) e carbonila conjugada (1638 cm^{-1}). A fórmula molecular foi deduzida como $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_7$ considerando o pico do íon pseudo-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 527,3220, observado no espectro de TOF-ESI-MS (Figura 14), em conjunto com os dados dos espectros de RMN de ^1H e DEPTQ (Figuras 16 e 17).

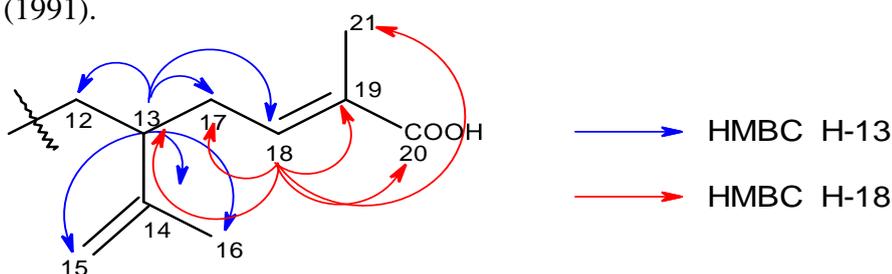
O espectro de RMN de ^1H (Figura 16) mostrou sinais entre δ_{H} 0,86 e 1,80 característicos de grupos metílicos, sinais entre δ_{H} 2,1 a 3,50 que podem ser correlacionados a hidrogênios alílicos e ligados a carbonos oxigenados e sinais em δ_{H} acima de 4,0 ppm que podem estar representando hidrogênios de sistemas olefínicos. Considerando a frequência de compostos contendo derivados de floroglucinol com grupos prenilados em espécies de *Clusia* (DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; GACS-BAITZ, 1991) fez-se análise do espectro de RMN ^{13}C e comparação com modelos da literatura. A análise desses espectros [RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ)] (Figuras 16 e 17) permitiu fazer correlação de **1** com derivado de floroglucinol. Estas substâncias geralmente são isoladas como mistura de tautômeros, apresentando equilíbrio ceto-enólico e, inclusive, com epímeros em diferentes estereocentros tornando os espectros de RMN com característica de mistura. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de carbono: CH_3 , CH_2 , CH e carbonos quaternários com valores próximos, característicos das propriedades estruturais relacionadas acima. A estrutura foi proposta com base em análises detalhadas dos espectros de RMN 2D [COSY ^1H - ^1H (Figura 18), HMQC (Figura 19) e HMBC (Figuras 20, 21 e 22)] e comparação destes dados com os das substâncias conhecidas como adlupulona, ácido nemorosínico B e garcinenona F (DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; GACS-BAITZ, 1991; HOLTZEL et al., 1996; ZHONG; CHEN; YANG, 2008). A comparação dos dados de RMN de ^{13}C da substância **1** com adlupulona, isolada de *Humulus lupulus* L., revelou que **1**

continha átomos de carbono de um grupo C=O em δ_C 205,5 (C-1), 191,9 (C-5) e δ_C em 170,4 (C-3) compatível com um sistema dienônico contendo equilíbrio ceto-enólico. Os sinais de carbonos quaternários em δ_C 109,6 (C-4), 103,3 (C-2) e 60,9 (C-6), permitiu propor a unidade ciclohexa-2,4-dien-1-ona na estrutura.

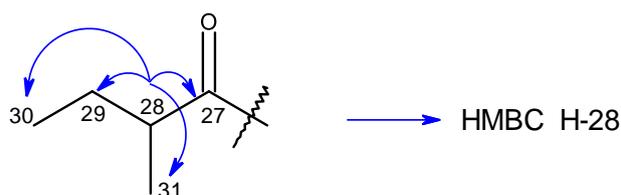
A análise do mapa de correlações de HMQC (Figura 19) e de HMBC (Figura 20) sugeriu a presença de duas unidades preniladas na substância **1**. No espectro de HMQC verificaram-se correlações dos hidrogênios em δ_H 2,53 (*d*, $J=7,3$ Hz, 2H, H-22), δ_H 4,83-4,75 (*m*, sobreposição, 1H, H-23), δ_H 1,48 (*s*, 3H, H-25) e δ_H 1,51 (*s*, 3H, H-26) com os carbonos em δ_C 42,2 (C-22), δ_C 116,8 (C-23), δ_C 25,8 (C-25) e δ_C 17,8 (C-26), respectivamente. No HMBC destacam-se as correlações observadas entre o sinal em δ_H 2,53 (H-22) com os sinais em δ_C 116,8 (C-23) e δ_C 135,6 (C-24), e entre o sinal em δ_H 4,83-4,74 (H-23) com os sinais em δ_C 42,2 (C-22), δ_C 135,6 (C-24), δ_C 25,8 (C-25) e δ_C 17,8 (C-26), caracterizando uma unidade 3-metilbut-2-en-1-il (C₂₂-C₂₆) na substância **1**.



A segunda unidade prenilada foi caracterizada como um grupo lavandolil oxidado (C₁₂-C₂₁). No espectro de HMQC (Figura 19) verificaram-se correlações dos hidrogênios em δ_H 2,26 (*dl*, $J= 10$ Hz, 1H, H-12a) e δ_H 2,08 (*m*, sobreposição, 1H, H-12b), δ_H 2,14 (*m*, sobreposição, 1H, H-13), δ_H 4,51 (*sl*, 1H, H-15a) e δ_H 4,52 (*sl*, 1H, H-15b), δ_H 1,48 (*s*, 3H, H-16), δ_H 2,14 (*m*, sobreposição, 2H, H-17), δ_H 6,68 (*t*, $J= 6,6$ Hz, 1H, H-18) e δ_H 1,77 (*s*, 3H, H-21) com os carbonos em δ_C 40,6 (C-12), δ_C 44,4 (C-13), δ_C 114,2 (C-15), δ_C 17,3 (C-16), δ_C 33,3 (C-17), δ_C 142,5 (C-18) e δ_C 11,3 (C-21). No espectro de HMBC destacam-se as correlações observadas entre o sinal em δ_H 2,14 (H-13) com os sinais em δ_C 40,6 (C-12), δ_C 145,8 (C-14), δ_C 114,2 (C-15), δ_C 17,8 (C-16), δ_C 33,3 (C-17) e δ_C 142,5 (C-18), e entre o sinal em δ_H 6,68 (H-18) com os carbonos em δ_C 44,4 (C-13), δ_C 33,3 (C-17), δ_C 127,5 (C-19), δ_C 172,2 (C-20) e δ_C 11,3 (C-21), entre outros sinais descritos na Tabela 1, justificando a presença do lavandolil na estrutura **1**, como no ácido nemorosínico B descrito por DELLE MONACHE, DELLE MONACHE e GACS-BAITZ (1991).



Ainda no mapa de correlações de HMQC foram observadas as correlações dos hidrogênios em δ_H 3,53 (*sext.*, $J=6,8$ Hz, 1H, H-28), δ_H 1,75 (*m*, sobreposição, 1H, H-29a) e δ_H 1,45-1,50 (*m*, sobreposição, 1H, H-29b), δ_H 0,93/0,89 (*t*, $J=7,3$ Hz, 3H, H-30) e δ_H 1,18/1,15 (*d*, $J=6,8$ Hz, 3H, H-31) com os carbonos em δ_C 40,7 (C-28), δ_C 26,6 (C-29), δ_C 11,9 (C-30) e δ_C 17,2 (C-31), respectivamente. Esses sinais próximos tanto para hidrogênio como para carbonos justificam a presença de epímero em C-28. No HMBC destacam-se as correlações observadas entre o sinal em δ_H 3,53 (H-28) com os sinais em δ_C 196,5 (C-27), δ_C 26,6 (C-29), δ_C 11,9 (C-30) e δ_C 17,2 (C-31), sugerindo a presença do grupo 2-metilbutanoil na substância 1.



A posição desses substituintes foi deduzida pela análise dos dados de HMBC (Tabela 1, Figura 20). As correlações observadas no espectro de HMBC entre $CH_2(22)$ e $CH_2(12)/\delta_C$ 205,5 (C-1), δ_C 191,5 (C-5) e δ_C 60,9 (C-6), permitiram localizar os grupos 3-metilbut-2-en-1-il e lavandulil ligados ao C-6. A correlação entre o H-28 e os carbonos em δ_C 196,5 (C-27) e 103,5 (C-2) permitiu localizar o grupo 2-metil-butanoil na posição 2 da dienona. Os demais sinais envolvendo os carbonos em δ_C 26,6 (C-7), δ_C 92,4 (C-8) e δ_C 71,8 (C-9) e dois grupos metílicos em δ_C 24,8 (C-10) e δ_C 24,6 (C-11) com os sinais de hidrogênios em δ_H 2,87-3,01 (*m*, 2H, H-7), δ_H 4,83-4,75 (*m*, H-8), δ_H 1,32 (*s*, 3H, H-10), e δ_H 1,26 (*s*, 3H, H-11) revelaram semelhança com o grupo presente na estrutura da garcinenona F descrita por ZHONG, CHEN e YANG (2008), correspondente ao 1'-hidroxiisopropil-etileno-1',2'/3,4-diidrofurano na estrutura. Os sinais observados no espectro de HMBC de ${}^{2,3}J_{H,C}$ de $CH_2-7/$ δ_C 109,6 (C-4), δ_C 170,3 (C-3), δ_C 92,4 (C-8) e δ_C 71,9 (C-9), e a comparação dos dados de RMN de ${}^{13}C$ da substância **1** com o composto conhecido citado acima (ZHONG; CHEN; YANG, 2008), confirmaram a localização deste grupo na dienona. Como discutido por DELLE MONACHE, DELLE MONACHE e GACS-BAITZ (1991) e outros autores sobre as propriedades destas substâncias, propõem-se a possibilidade de ocorrência de epímeros no C-28 e equilíbrio ceto-enólico formando tautômeros com possíveis mudanças conformacionais mudando o ambiente químico dos núcleos. Isto faz com que os espectros de RMN 1H e ${}^{13}C$ apresentem sinais com multiplicidade mais complexas do que as esperadas. Entretanto, a análise das propriedades quirais descritas a seguir justificam a proposta deste composto como majoritário na fração analisada. A proposta de elucidação da

substância **1** como o novo composto nomeado como ácido nemorosínico foi confirmada pela análise detalhada de EM (Figuras 11, 14 e 15).

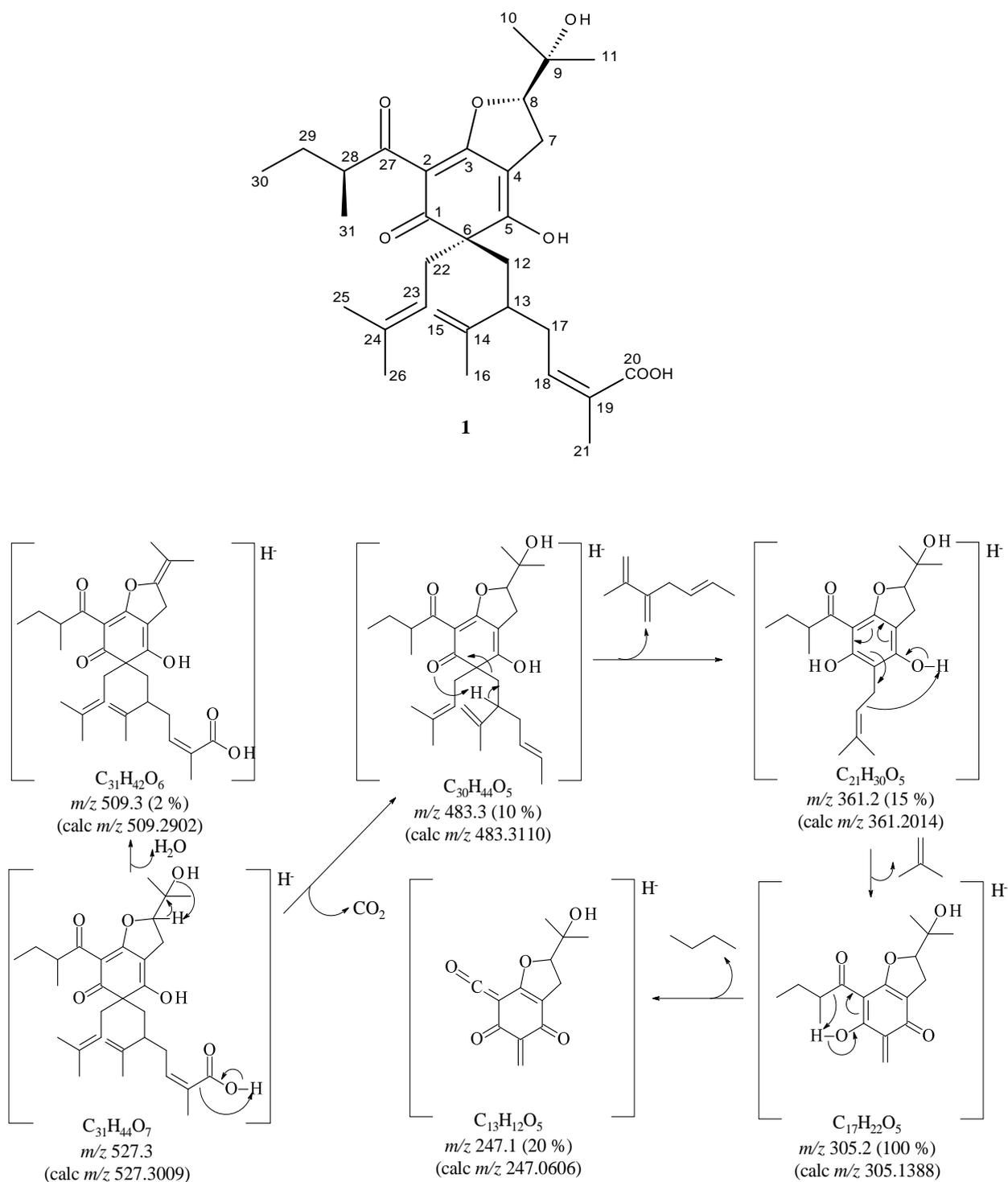


Figura 11. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas (TOF-ESI-MS/MS) da substância **1**.

Vários derivados de floroglucinol poliprenilados têm sido isolados a partir do gênero *Clusia* (DELLE MONACHE; DELLE MONACHE e GACS-BAITZ, 1991). A maioria deles pertence a um sistema de anel biciclononano, como no caso de nemorosonol (CERRINI *et al.*, 1993), enquanto que o ácido nemorosínico (**1**), tem uma porção ciclo-hexa-2,4-dien-1-ona, sendo semelhante ao ácido nemorosínico B e lupulona, que ocorre no *Humulus lupulus* (ZHAO *et al.*, 2005). Derivados de lupulona possuem um ou mais centros estereogênicos, mas estes compostos apresentaram-se na forma racêmica ($[\alpha]_D = 0$) (ZHAO *et al.*, 2005). No entanto, a substância **1** é opticamente ativa ($[\alpha]_D = -5,34^\circ$), e a curva de DC é apresentada na Figura 23. Por conseguinte, a configuração de **1** foi proposta como 6*S*, 8*S* e 28*S* de acordo com o Efeito Cotton (EC) negativo e positivo a 340 e 300 nm, respectivamente (Figura 23), similar ao (-)-nemorosonol (OYA *et al.*, 2015) e marmesinina, com EC negativo e positivo em 250 e 230 nm, contendo um idêntico sistema furano com configuração *S* (LEMNICH; HAVELUND; THASTRUP, 1983). O 6*S*, 8*S*, 28*S*-ácido nemorosínico (**1**) é um derivado de floroglucinol adicional descrito pela primeira vez na literatura.

Considerando a importância das noções de biossíntese de produtos naturais na proposta de elucidação estrutural de substâncias propomos uma rota de biogênese para a substância **1** (Figura 12), que consiste em um derivado prenilado de acilfloroglucinol.

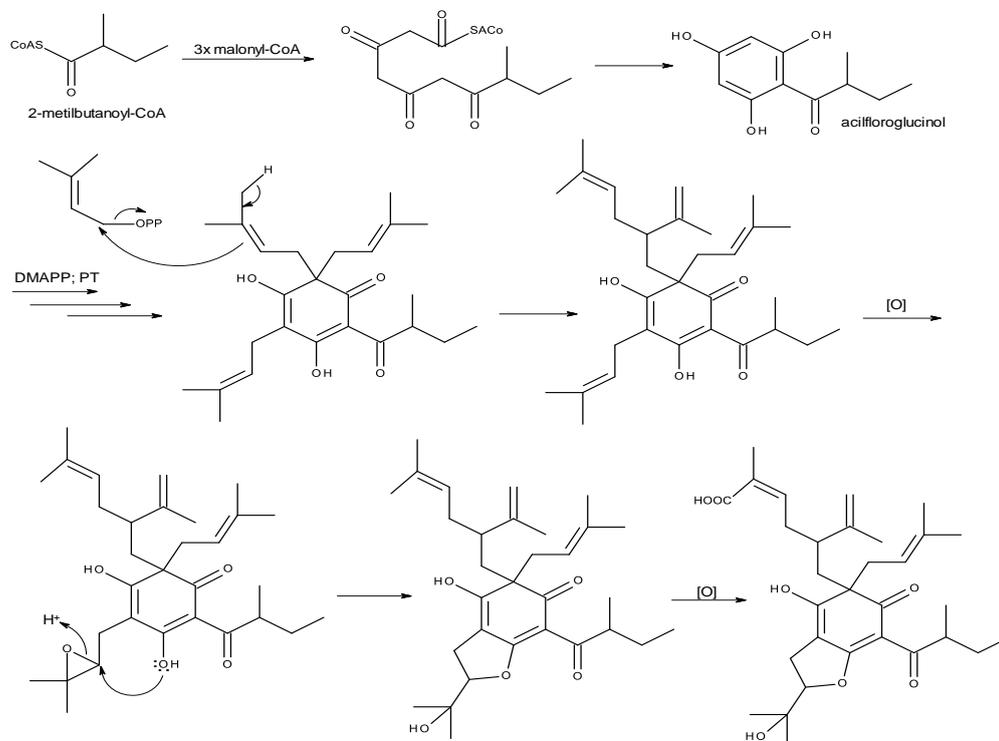


Figura 12. Proposta biogênica para o ácido nemorosínico (**1**). DMAPP: dimetilalil pirofosfato; PT: preniltransferase; [O]: oxigenases.

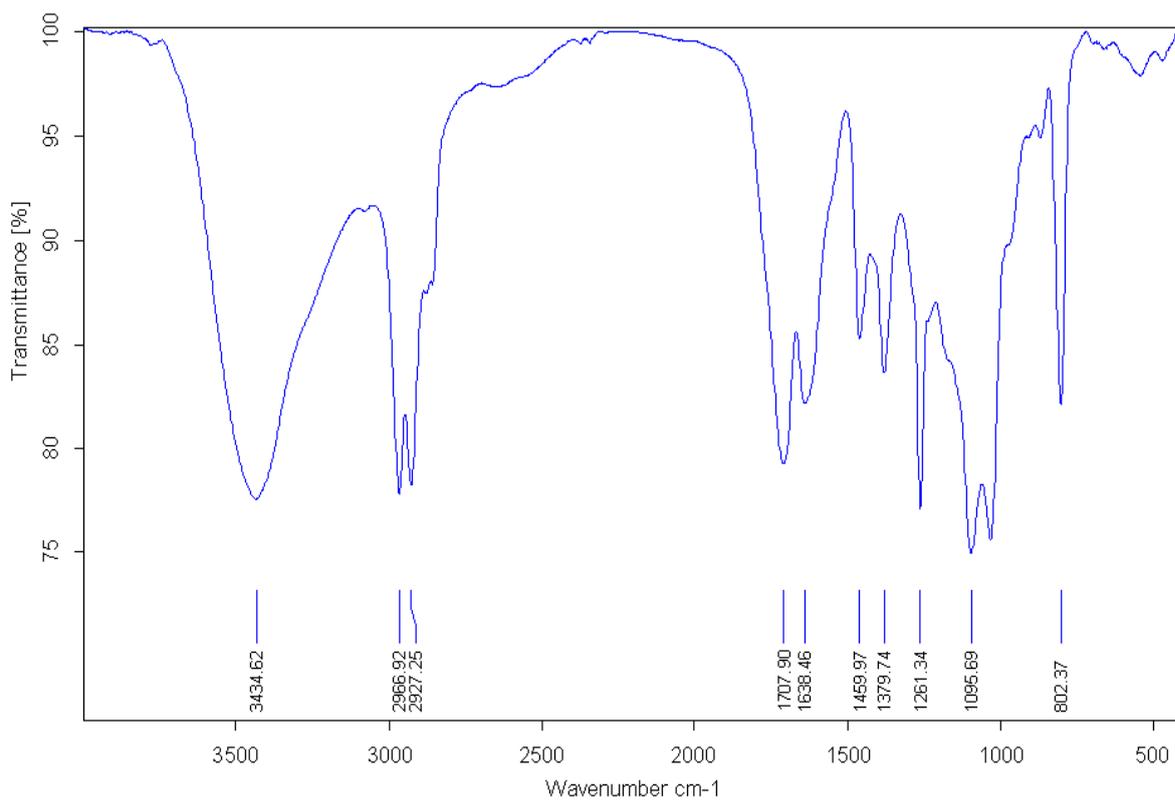


Figura 13. Espectro de IV (KBr) de FCN2 (ácido nemorosínico).

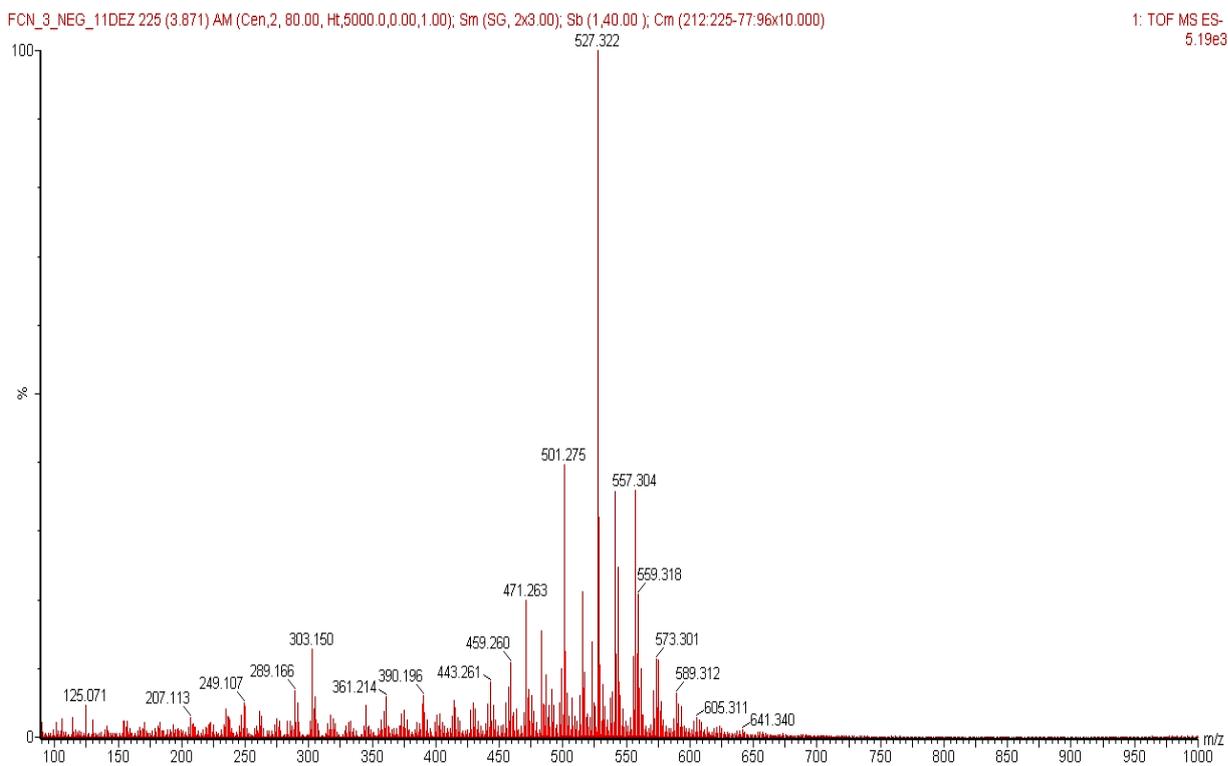


Figura 14. Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido por TOF-ESI-EM (-) de FCN2 (ácido nemorosínico).

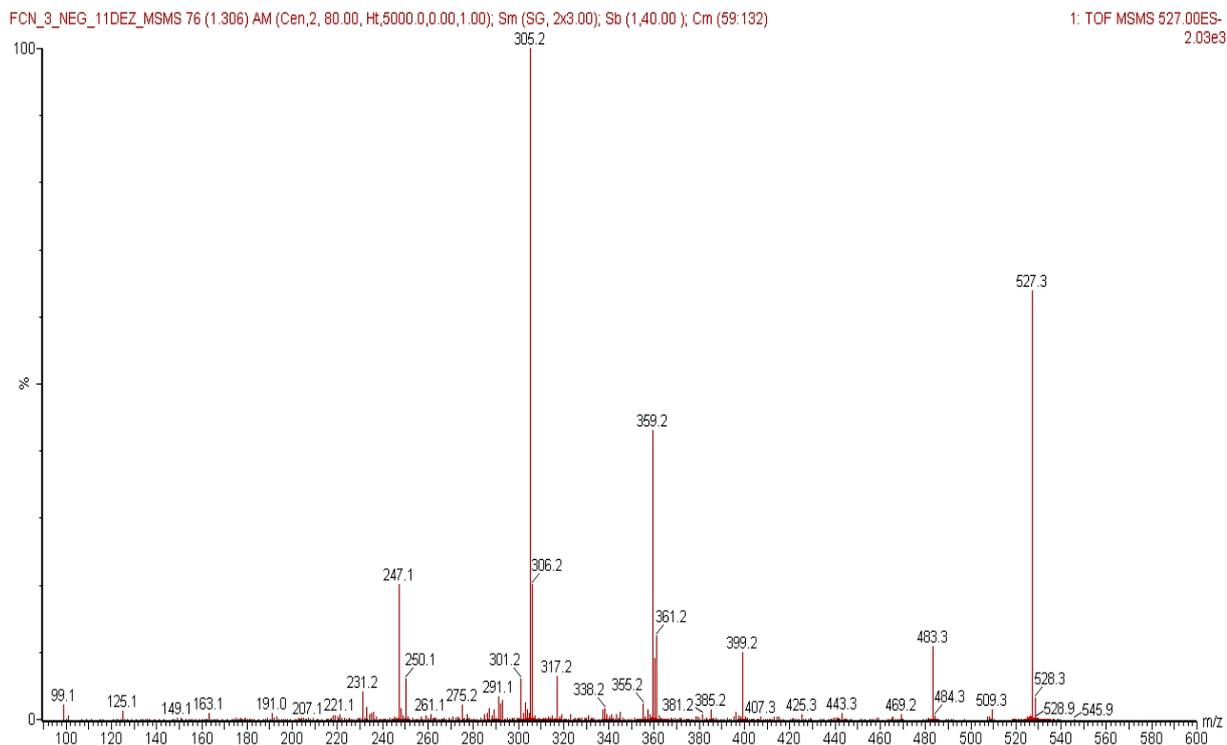


Figura 15. Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 527 $[M-H]^-$ de FCN2 (ácido nemorosínico).

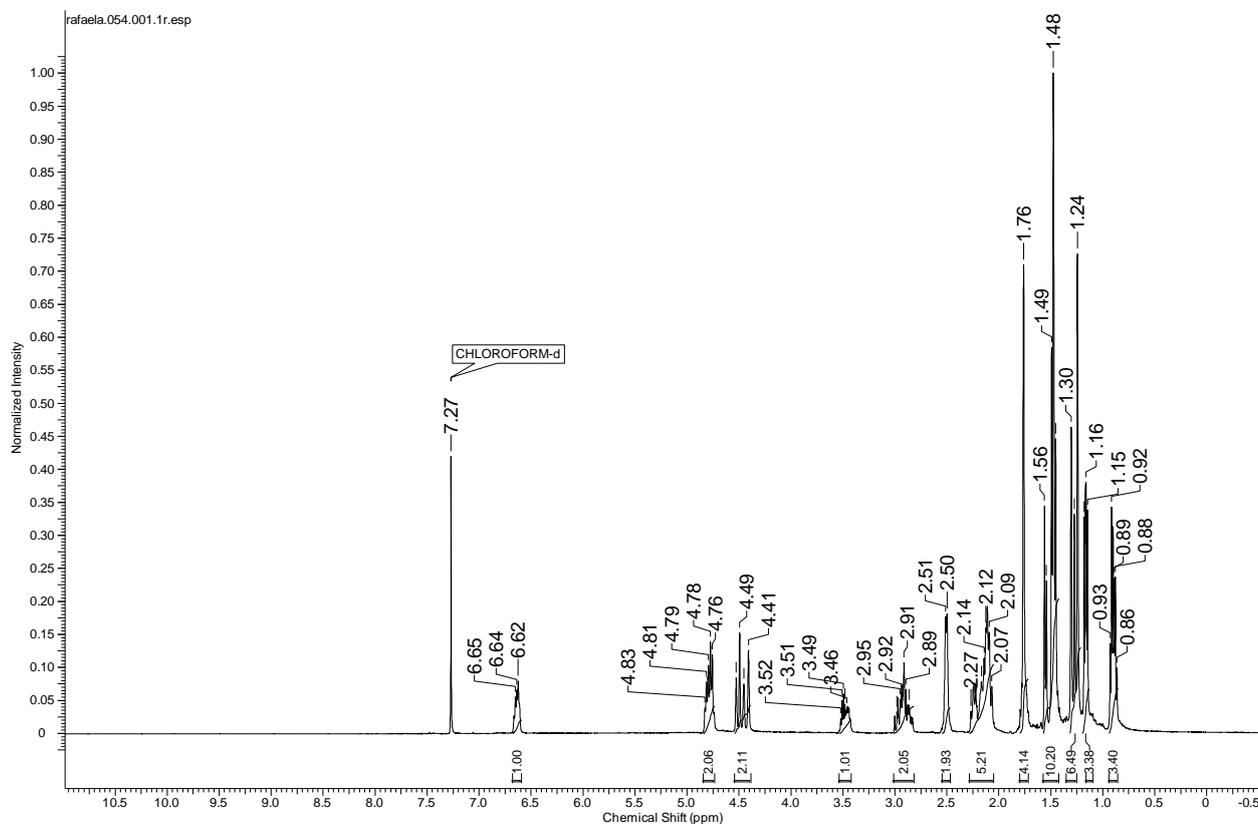


Figura 16. Espectro de RMN de 1H em $CDCl_3$ (500 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).

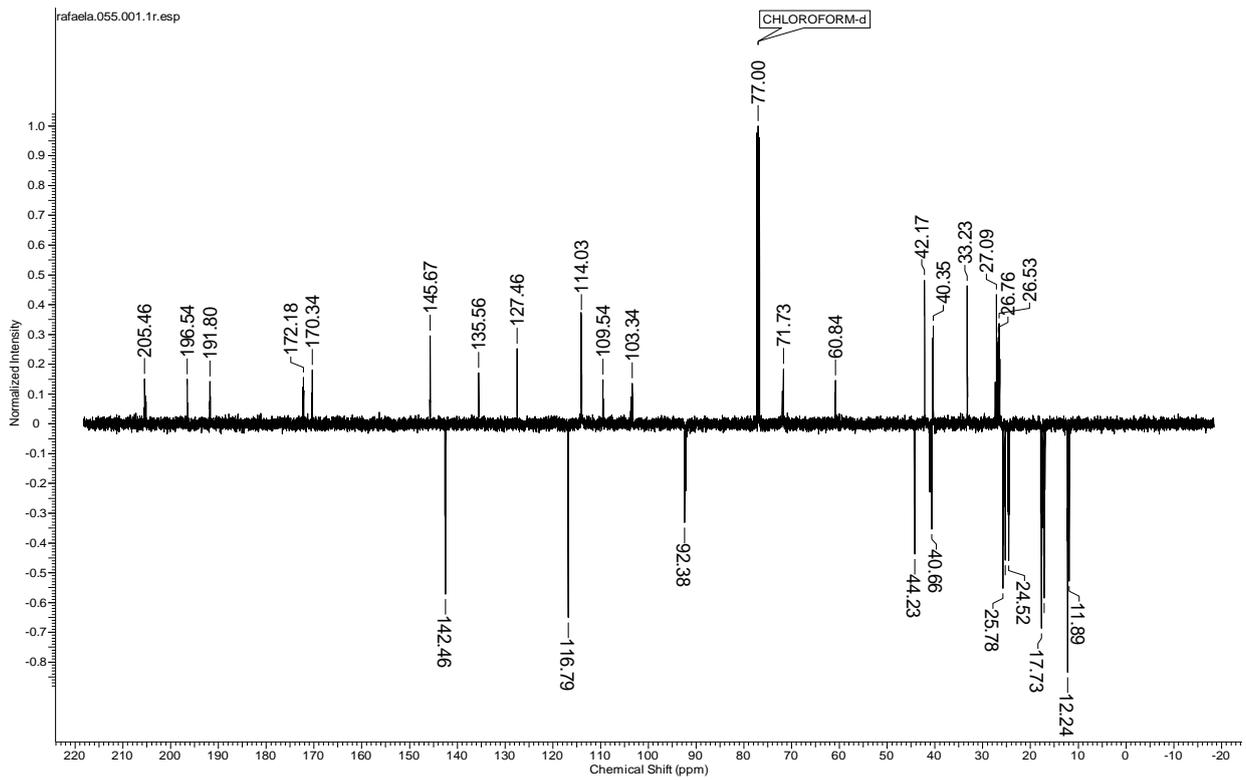


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).

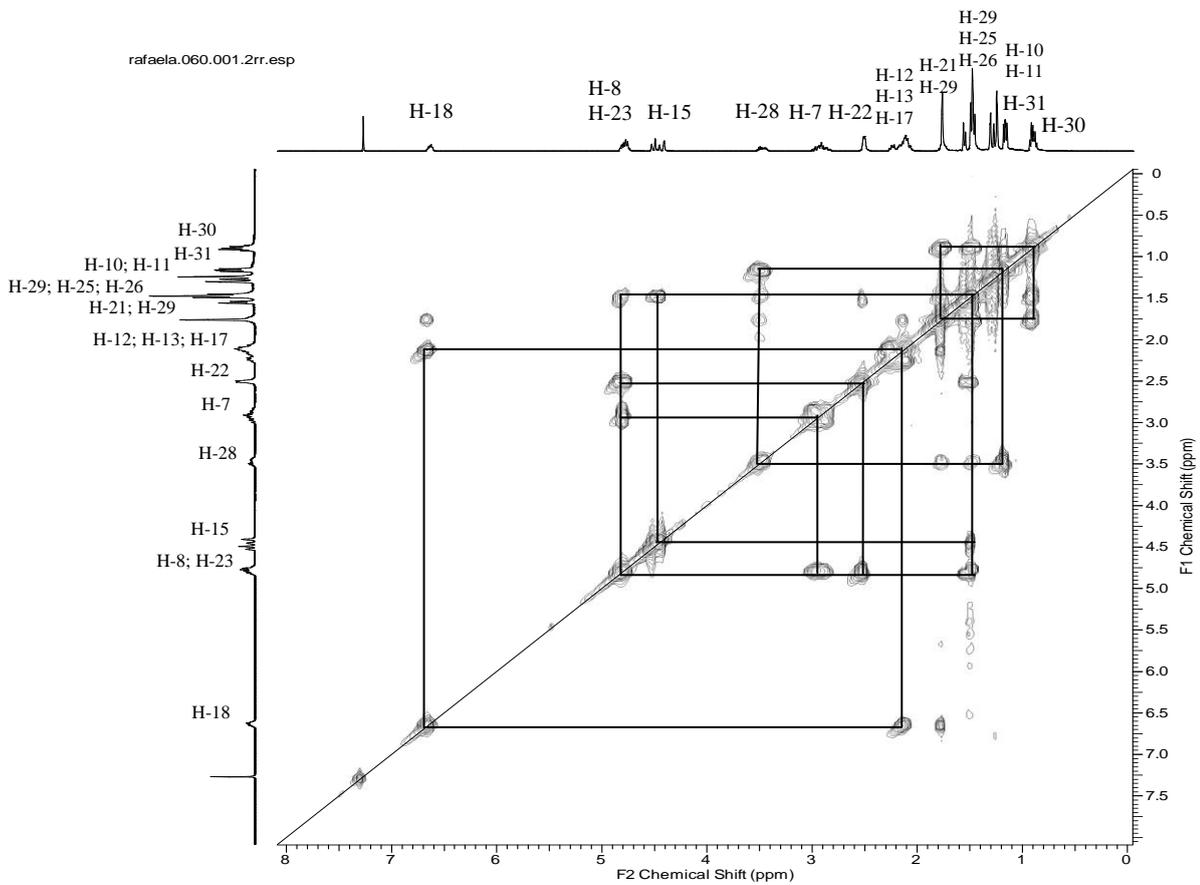


Figura 18. Espectro de COSY ^1H - ^1H em CDCl_3 (500 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).

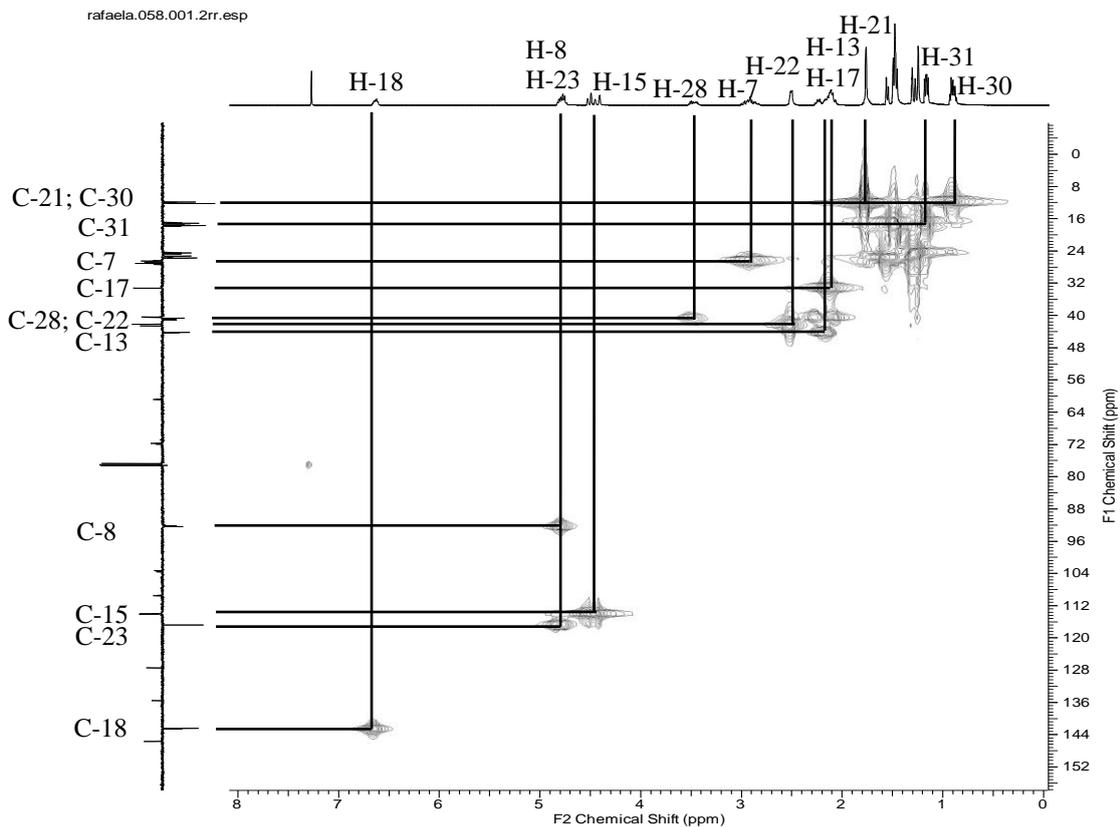


Figura 19. Espectro de HMQC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).

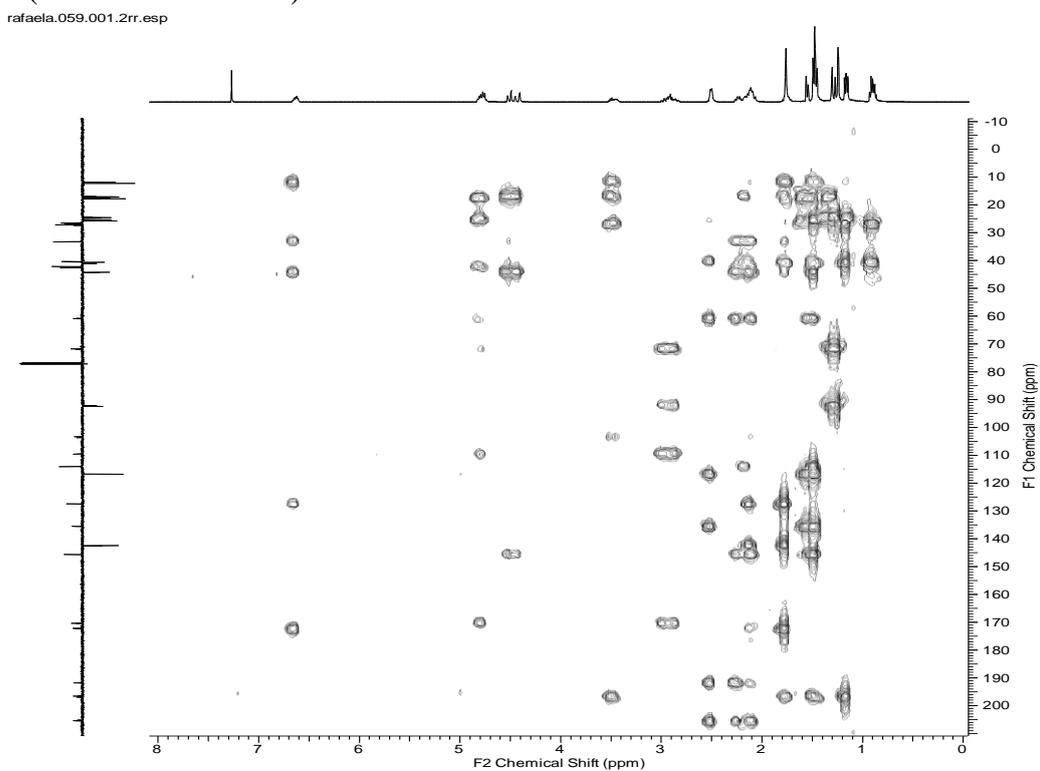


Figura 20. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico).

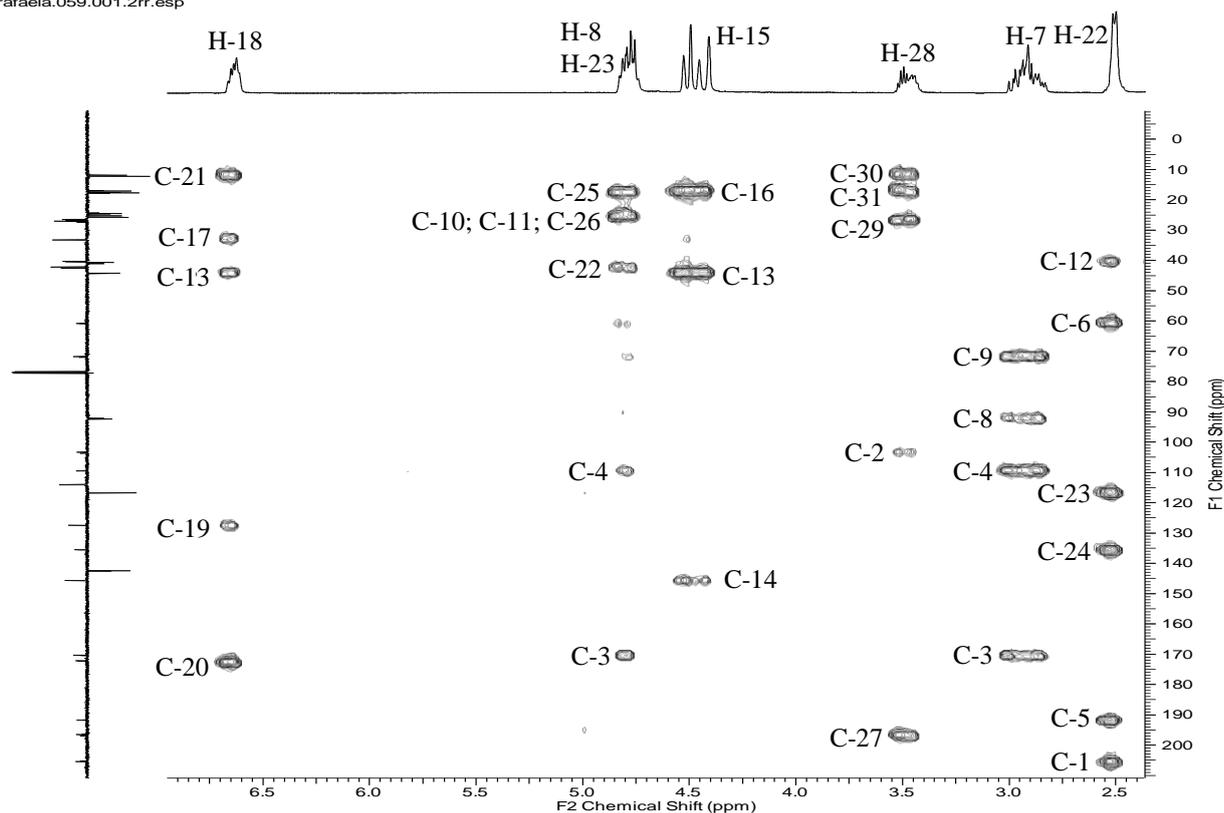


Figura 21. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico). Expansão.

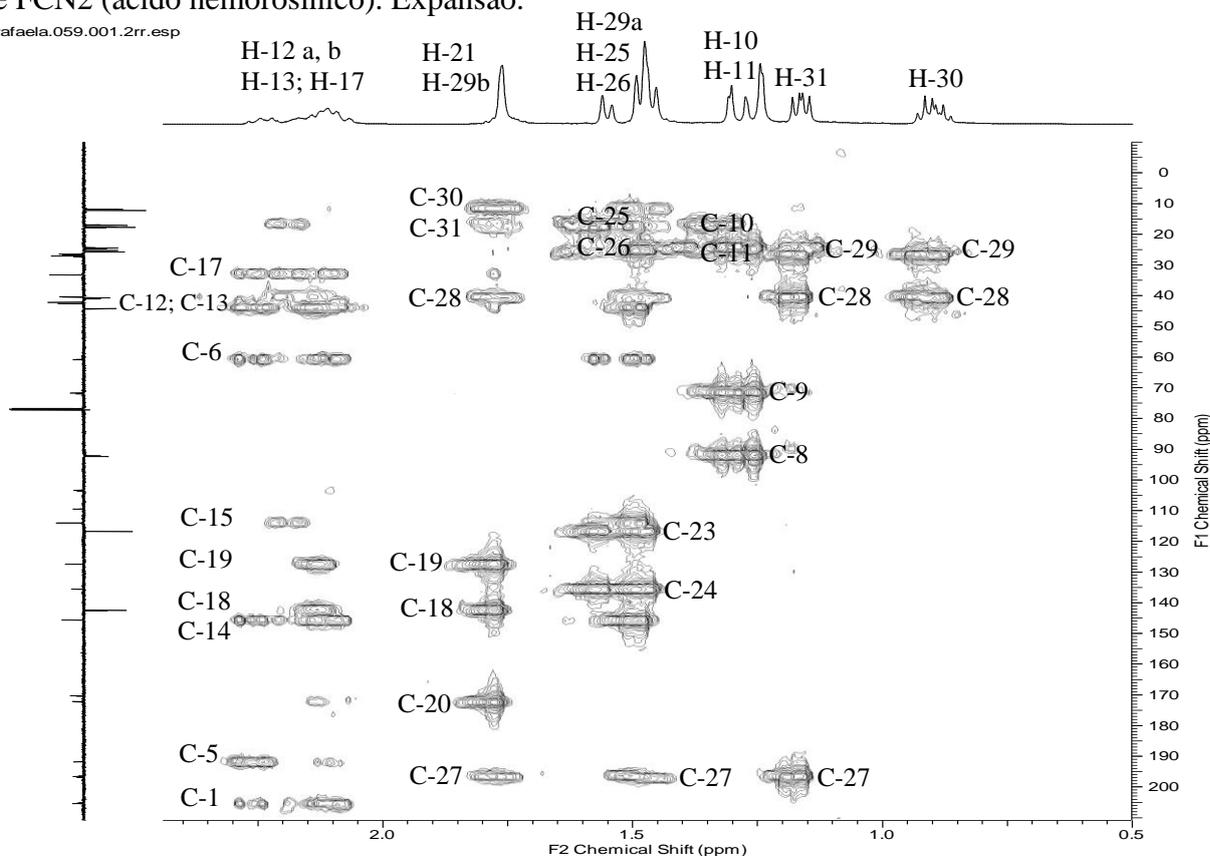


Figura 22. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN2 (ácido nemorosínico). Expansão

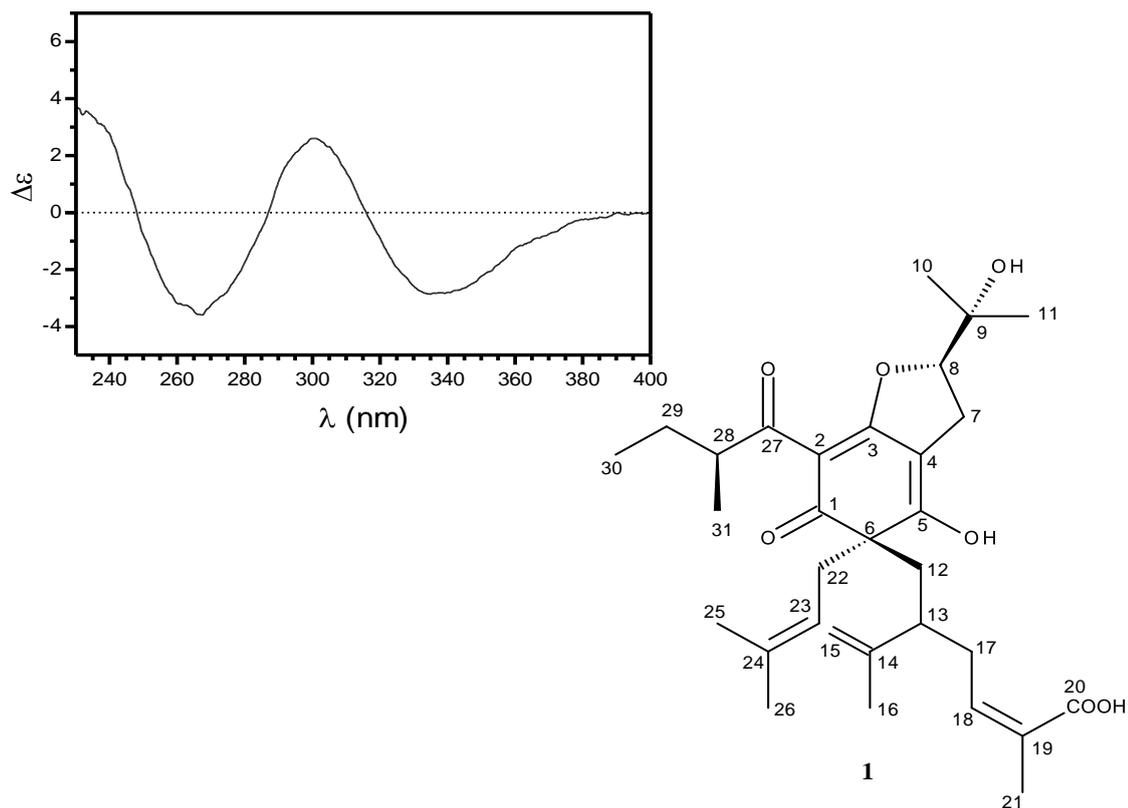


Figura 23. Espectro de dicroísmo circular (DC) de **1** em MeOH.

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de FCN2 (ácido nemorosínico).

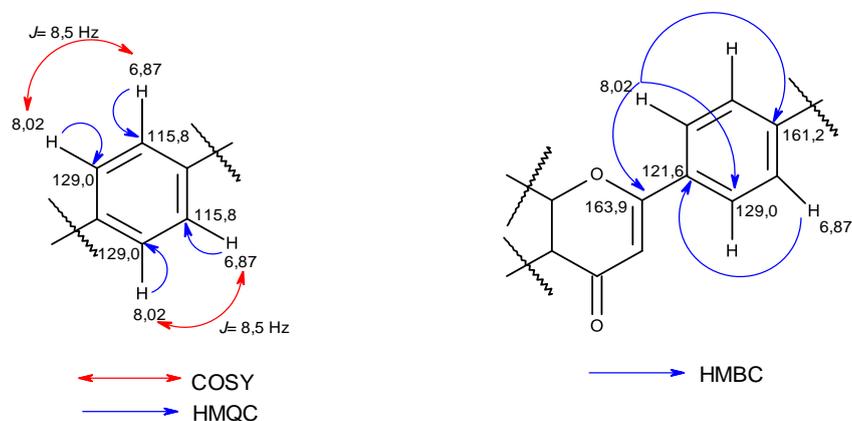
Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC($^{2,3}J_{\text{H-C}}$)
1	-	205,6	-
2	-	103,5	-
3	-	170,4	-
4	-	109,3	-
5	-	191,9	-
6	-	60,9	-
7	2,87-3,01(<i>m</i>)	26,6	C-3; C-4; C-5; C-8; C-9
8	4,75-4,83(<i>m</i>)	92,4	C-3; C-4; C-10; C-11
9	-	71,8	-
10	1,32 (<i>s</i>)	24,8	C-8; C-9; C-11
11	1,26 (<i>s</i>)	24,6	C-8; C-9; C-10
12	2,26(<i>d</i> , 10 Hz, H-12a), 2,08 (<i>m</i> , H-12b)	40,4	C-1; C-5; C-6; C-13; C-14; C-17
13	2,14(<i>m</i>)	44,4	C-6; C-14; C-15; C-17
14	-	145,7	-
15	4,51(<i>sl</i> , H-15b); 4,52(<i>sl</i> , H-15a)	114,1	C-13; C-14; C-16
16	1,48(<i>s</i>)	17,8	C-13; C-14; C-15
17	2,14(<i>m</i>)	33,3	C-12; C-14; C-18; C-19
18	6,68(<i>t</i> , 6,6 Hz)	142,5	C-13; C-17; C-19; C-20; C-21
19	-	127,5	-
20	-	172,2	-
21	1,77(<i>s</i>)	12,0	C-18; C-19; C-20
22	2,53 (<i>d</i> , 7,3Hz)	42,2	C-1; C-5; C-6; C-12; C-23; C-24
23	4,75-4,83(<i>m</i>)	116,8	C-22; C-25; C-26
24	-	135,6	-
25	1,48(<i>s</i>)	17,6	C-23; C-24; C-26
26	1,51(<i>s</i>)	25,7	C-23; C-24; C-25
27	-	196,5	-
28	3,53 (<i>sext.</i> , 6,8 Hz)	40,7	C-2; C-27; C-29; C-30; C-31
29	1,45-1,50 (<i>m</i> , H-29a); 1,75(<i>m</i> , H-29b)	27,4	C-27; C-28; C-30; C-31
30	0,93 (<i>t</i> , 7,3 Hz)	11,9	C-28; C-29
31	1,18(<i>d</i> , 6,8 Hz)	17,2	C-27; C-28; C-29

1.4.1.2 Flavonoides

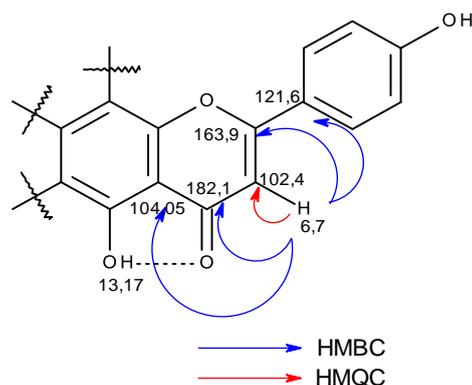
1.4.1.2.1 Substância 2

A amostra FCL (110 mg) e FCP4 (2,0 mg), substância 2, foi obtida na forma de um sólido amarelo a partir de extratos de folhas de *C. lanceolata* e de extratos de frutos de *C. paralicola*, respectivamente, a qual foi identificada a partir da análise de espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (DEPTQ), ^1H - ^1H -COSY, HMQC e HMBC e comparação com dados da literatura (ZHOU et al., 2005).

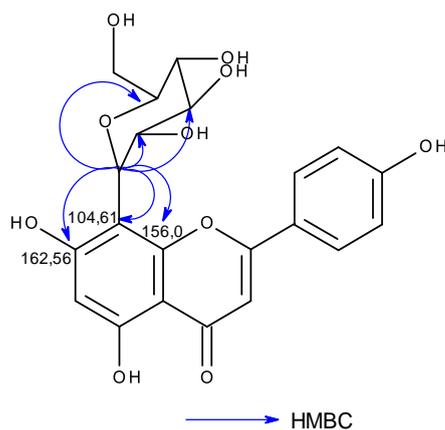
Os dois dubletos em δ_{H} 8,02 (*d*, $J= 8,5$ Hz, 2H) e δ_{H} 6,87 (*d*, $J= 8,5$ Hz, 2H) observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 24) representam dois pares de hidrogênios acoplando entre si, interação esta que foi confirmada pela correlação apresentada no espectro de COSY (Figura 26), atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', H-3' e H-5', quimicamente equivalentes, caracterizando o padrão de substituição do anel B *para*-substituído. No espectro de HMQC (Figura 27) verificaram-se correlações dos hidrogênios δ_{H} 8,02 (H-2'/H-6') e δ_{H} 6,87 (H-3'/H-5') com os carbonos δ_{C} 129,0 e δ_{C} 115,81, respectivamente. No espectro de HMBC (Figura 28) foi observada a correlação do sinal δ_{H} 8,02 (H-2'/H-6') com o sinal em δ_{C} 161,16 referente à C-4'; com o carbono em δ_{C} 163,95 corresponde ao C-2 e δ_{C} 129,0 (C-2'/C-6') e também o sinal para o hidrogênio em δ_{H} 6,87 (H-3'/H-5') com o carbono em δ_{C} 121,61 (C-1').



No espectro de RMN de ^1H (Figura 24) observou-se um sinal em δ_{H} 13,17 (s, 1H) característico de hidroxila quelada na posição C-5 e a presença de um simpleto em δ_{H} 6,79 (s, 1H) característico do H-3 do anel C de flavonas. Este simpleto (H-3) se correlaciona com os carbonos δ_{C} 102,46 (HMQC, Figura 27); δ_{C} 163,9; δ_{C} 182,12; δ_{C} 104,05 e δ_{C} 121,6 (C-2, C-4, C-10 e C-1'); HMBC, Figura 28).



Ainda no espectro de RMN de ^1H (Figura 24) foi observada a presença de um hidrogênio de carbono anomérico ($\text{H-1}''$) de glicosídeos, sendo que este sinal em δ_{H} 4,73 (d , $J=9,8$ Hz) se correlaciona com o carbono em δ_{C} 73,38 no espectro de HMQC (Figura 27), sugerindo a presença de um flavonoide C-glicosilado. A localização deste glicosídeo foi definida através de correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 28), no qual o $\text{H-1}''$ se correlaciona com os carbonos em δ_{C} 70,82; δ_{C} 78,65; δ_{C} 81,87; δ_{C} 104,61; δ_{C} 156,0 e δ_{C} 162,56 correspondentes a C-2'', C-3'', C-5'', C-8, C-9 e C-7. Além disto, a presença do sinal em δ_{H} 6,27 (s, 1H) atribuído ao H-6 do anel A e a ausência do sinal referente ao H-8 permitiu sugerir a presença do substituinte nesta posição. A comparação dos deslocamentos químicos observados para a substância 2 (Tabela 2) com aqueles da literatura (ZHOU et al., 2005) permitiram identifica-la como a vitexina. Este é o primeiro relato da ocorrência desta flavona nas espécies *C. lanceolata* e *C. paralicola*.



A vitexina (**2**), também conhecida como apigenina-8-C-glicopiranosídeo, possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, antiespasmódica e antioxidante (AFIFI; SHERVINGTON; DARWISH, 1997; PRABHAKAR et al., 1981; KIM et al., 2005). A presença desta substância nas espécies de *Clusia* pode contribuir para seu potencial medicinal.

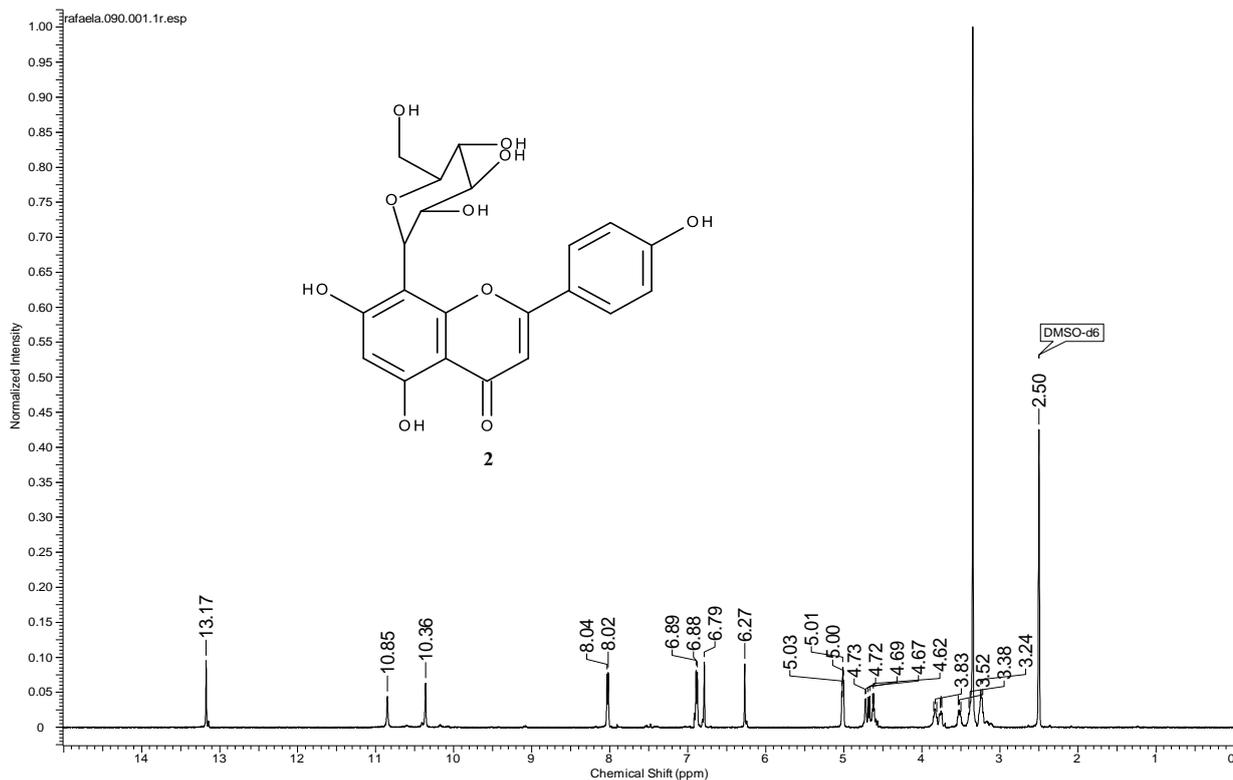


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL (Vitexina).

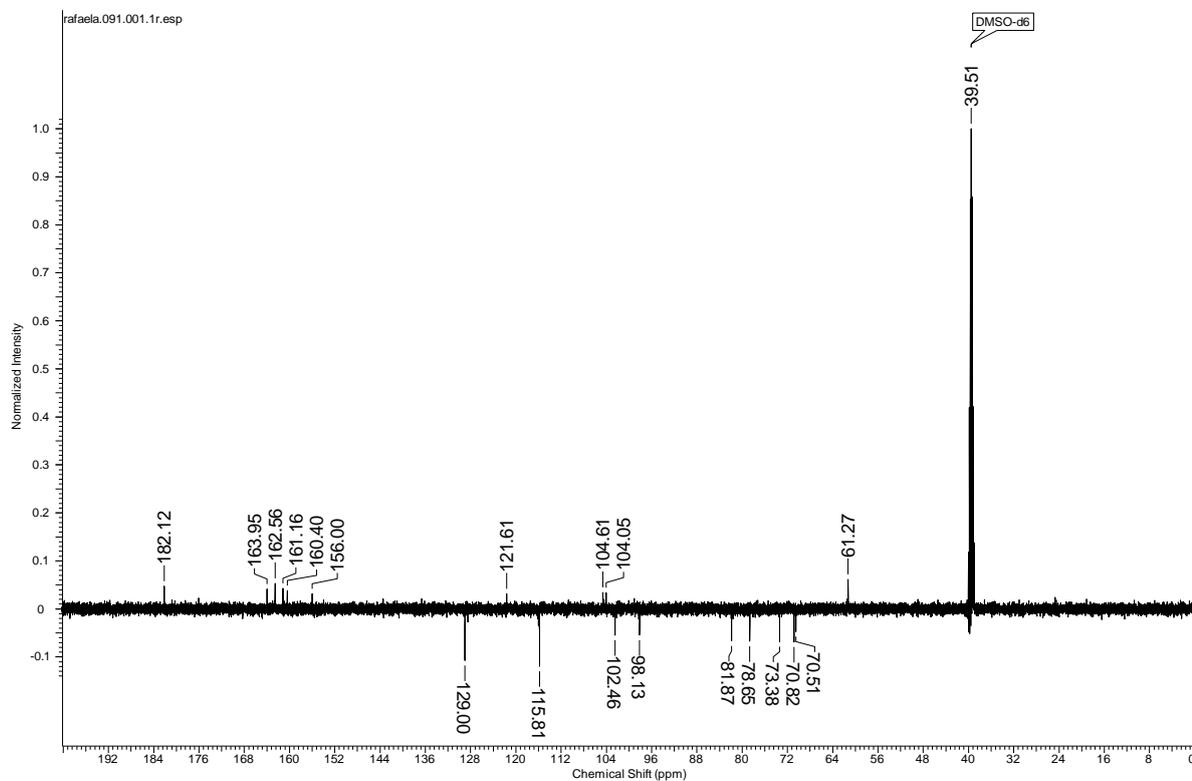


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (125 MHz) de FCL (Vitexina).

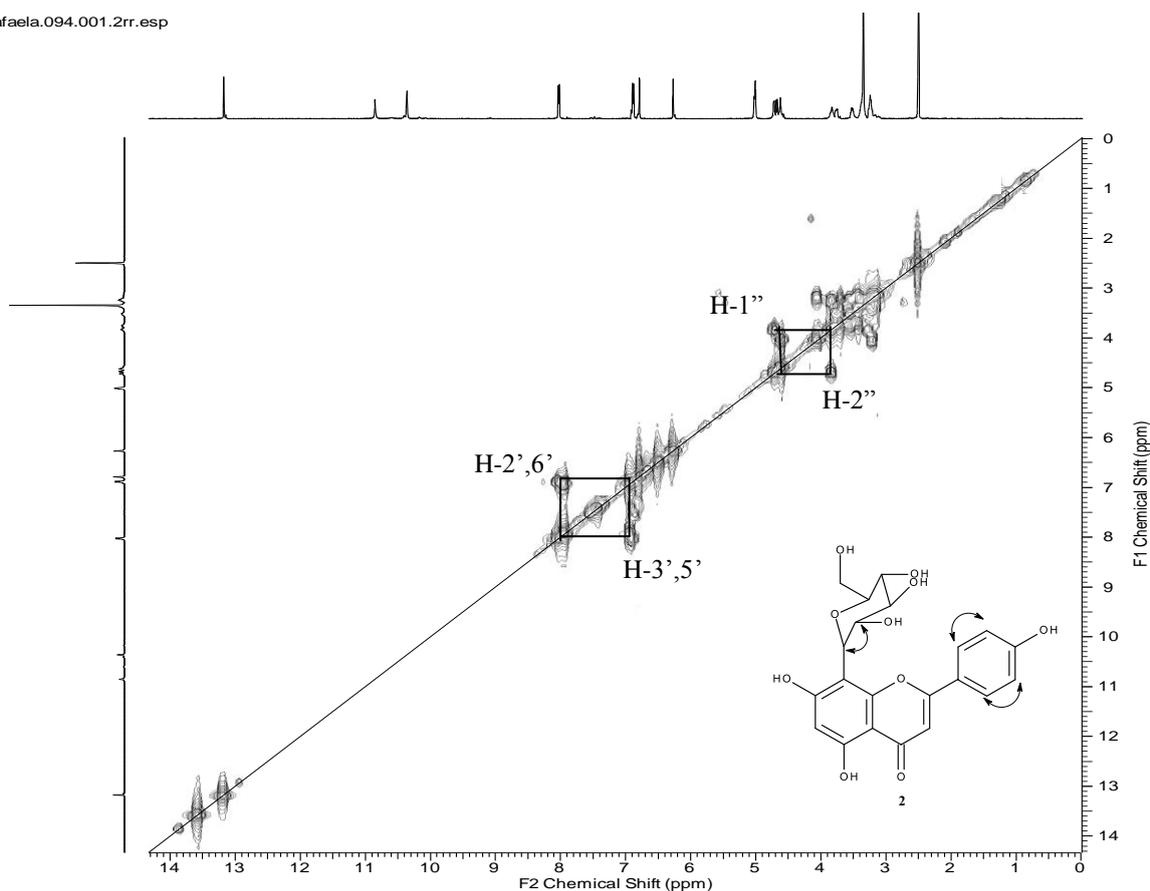


Figura 26. Espectro de COSY ^1H - ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL (Vitexina).

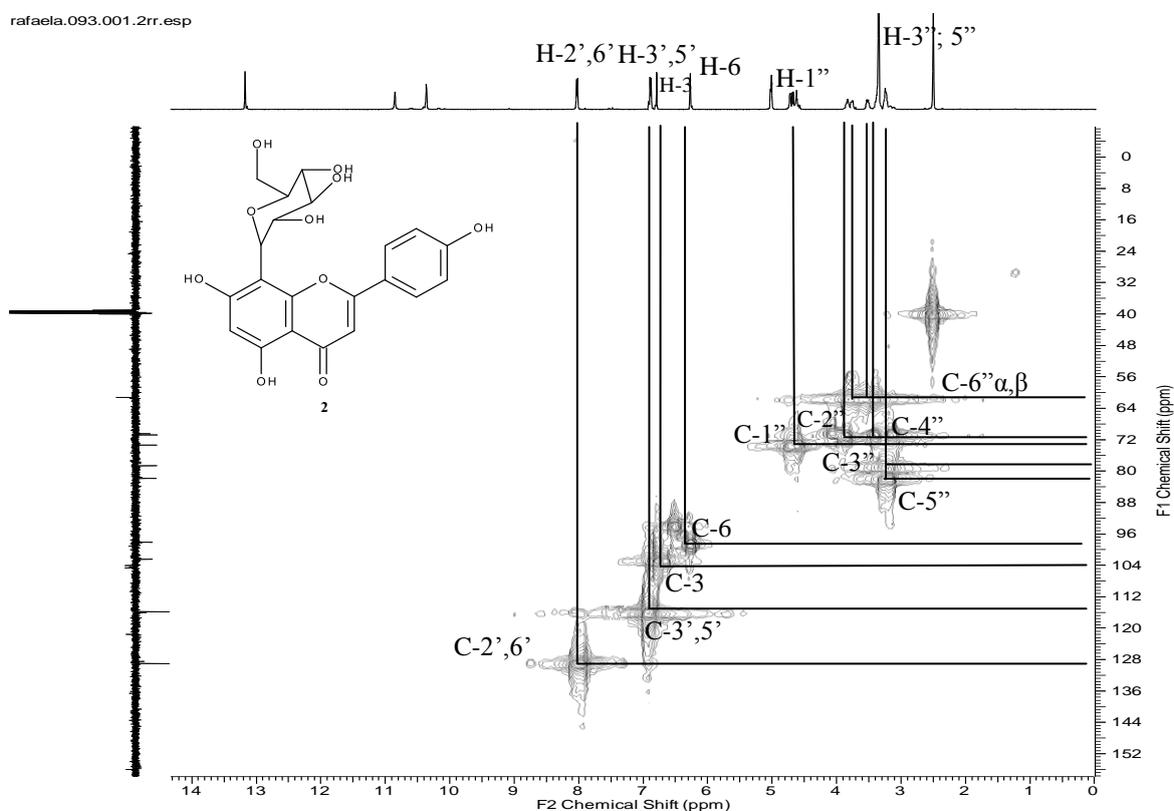


Figura 27. Espectro de HMBC em $\text{DMSO-}D_6$ (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL (Vitexina).

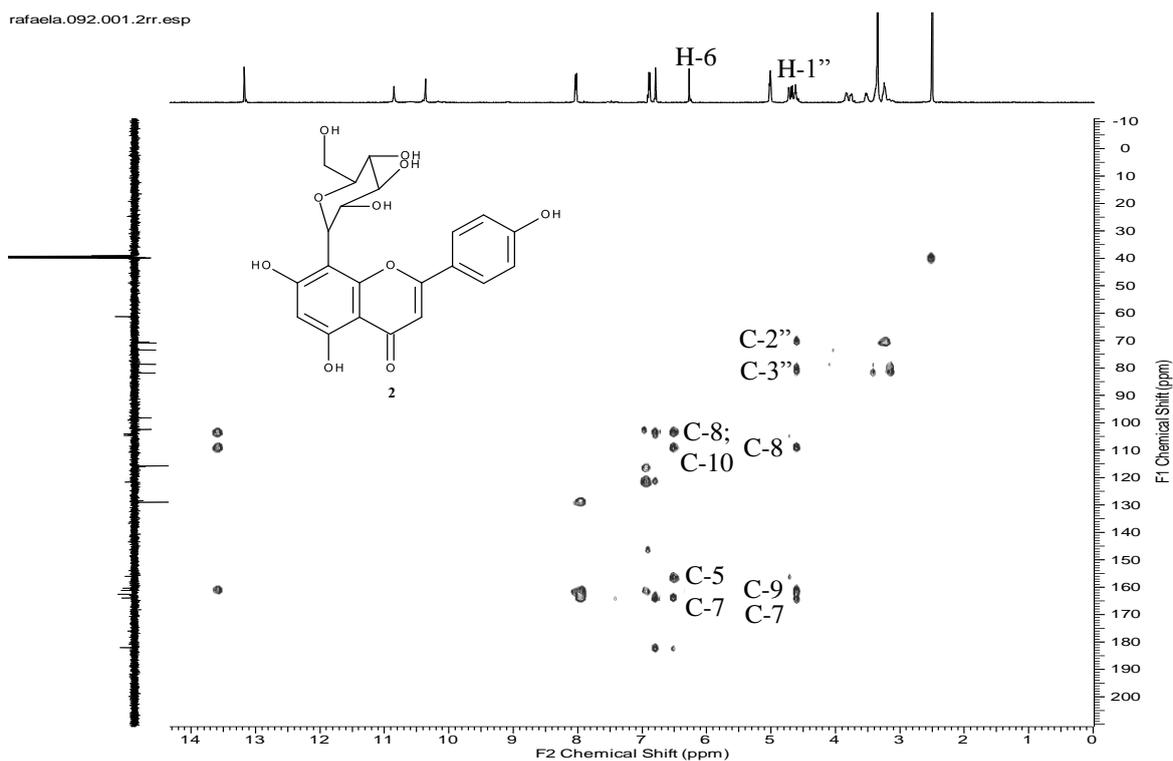


Figura 28. Espectro de HMBC em DMSO-*D*₆ (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FCL (Vitexina).

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- D_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL (Vitexina).

C	Vitexina (2)		Literatura (DMSO- D_6)*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	163,95	-	164,98	-
3	102,46	6,79 (<i>s</i>)	102,51	6,94 (<i>s</i>)
4	182,12	-	182,73	-
5	160,40	13,17 (<i>s</i> , OH)	160,28	13,17 (<i>s</i> , OH)
6	98,13	6,27 (<i>s</i>)	98,45	6,44 (<i>s</i>)
7	162,56	-	162,31	-
8	104,61	-	104,56	-
9	156,0	-	155,64	-
10	104,05	-	104,07	-
1'	121,61	-	122,07	-
2'	129,0	8,02 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	128,99	8,26 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)
3'	115,81	6,87 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)	115,01	7,05 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)
4'	161,16	-	161,32	-
5'	115,81	6,87 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)	115,01	7,05 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)
6'	129,0	8,02 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	128,99	8,26 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)
1''	73,38	4,73 (<i>d</i> , $J=9,8$ Hz)	73,93	4,94 (<i>d</i> , $J=9,8$ Hz)
2''	70,82	3,81-3,85 (<i>m</i>)	71,03	
3''	78,65	3,22-3,27 (<i>m</i>)	79,01	
4''	70,51	3,39 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	70,20	
5''	81,87	3,22-3,27 (<i>m</i>)	81,29	
6''	61,27	α 3,75 (<i>dd</i> , $J=10$ e $2,0$ Hz) β 3,52 (<i>m</i>)	61,36	

*ZHOU et al., 2005

Adicionalmente, para auxiliar na confirmação de elucidação estrutural, a substância 2 foi submetida a reação de metilação com diazometano (Figura 29) fornecendo o derivado 4',7-dimetilvitexina (**2a**), identificado a partir da análise dos deslocamentos químicos (Tabela 3) de RMN de ^1H (Figura 30) e DEPTQ (Figura 31).

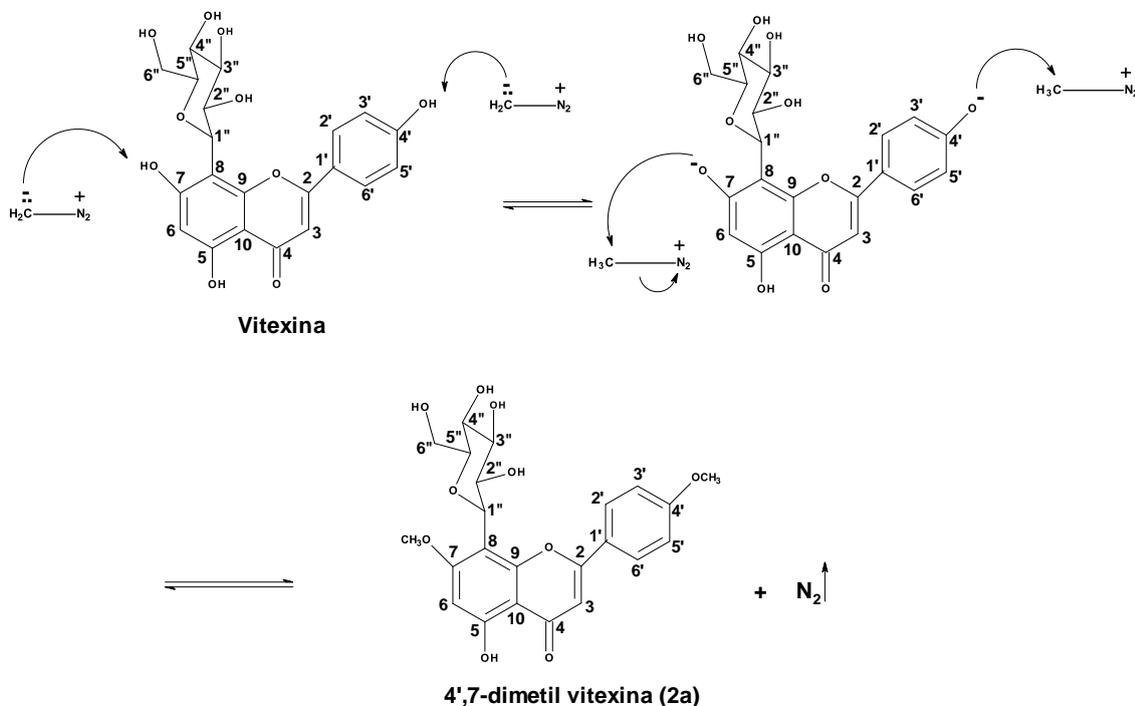


Figura 29. Proposta mecanística para reação de derivatização da vitexina (2).

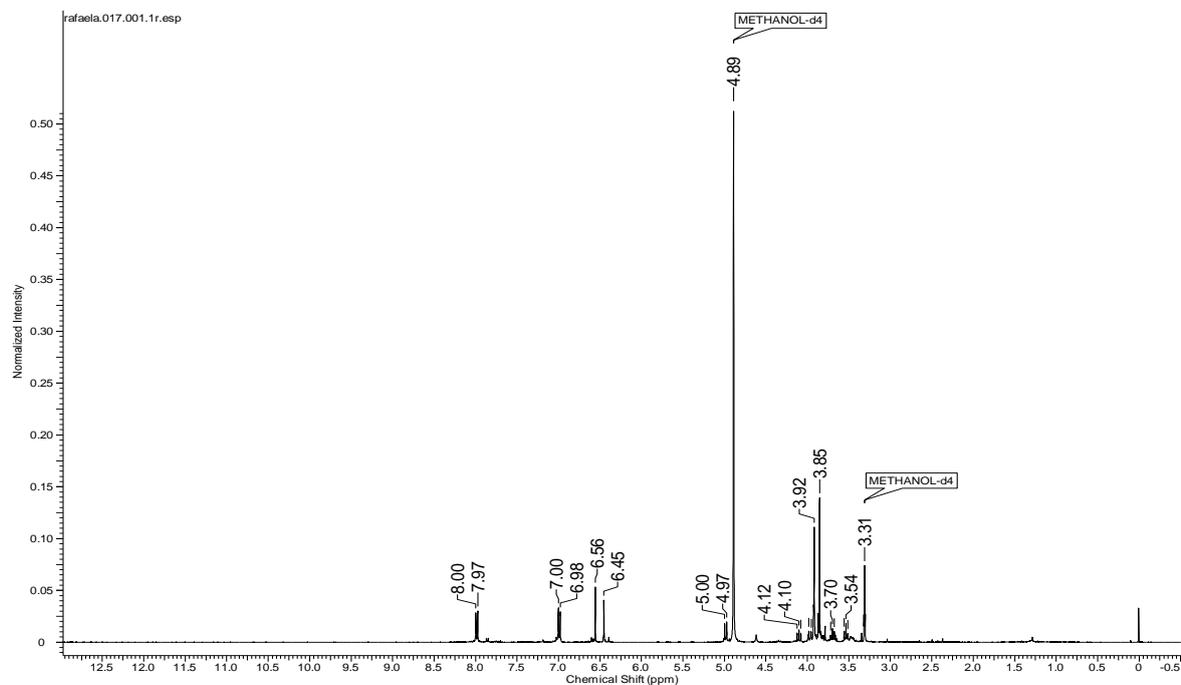


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (400 MHz) de 4',7-dimetilvitexina (**2a**).

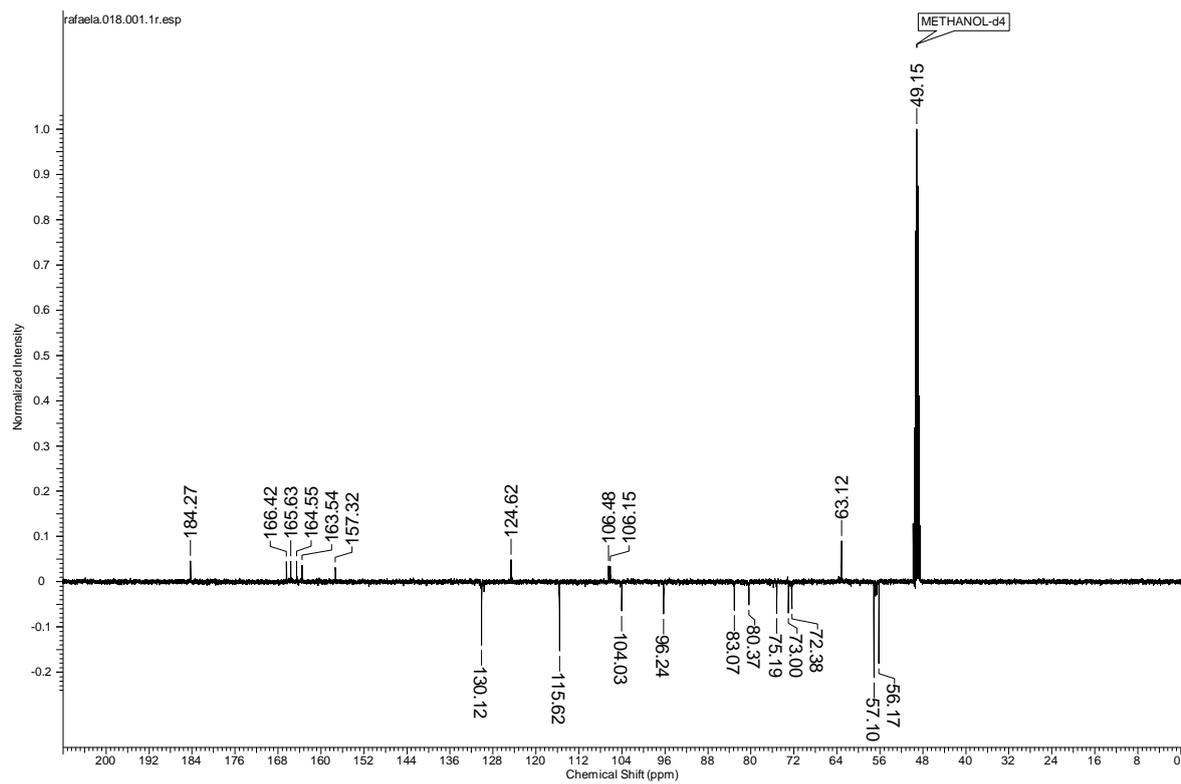


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CD_3OD (100 MHz) de 4',7-dimetilvitexina (2a).

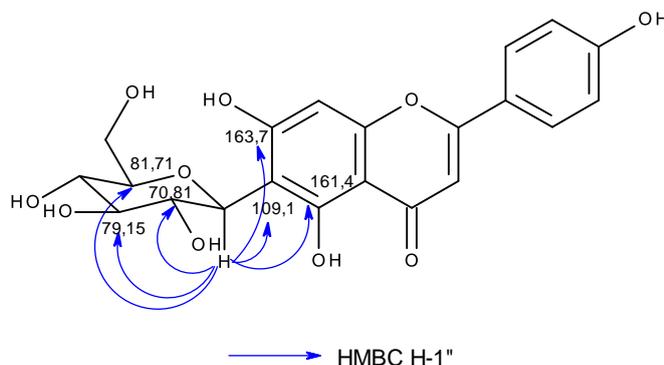
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de 4',7-dimetilvitexina (2a).

4',7-dimetilvitexina (2a)		
C	δ_{C}	δ_{H}
2	166,42	-
3	104,03	6,54 (s)
4	184,27	-
5	163,54	-
6	96,24	6,43 (s)
7	165,63	-
8	106,48	-
9	157,32	-
10	106,15	-
1'	124,62	-
2'	130,12	7,97 (d, $J=8,5$ Hz)
3'	115,62	6,97 (d, $J=8,5$ Hz)
4'	164,55	-
5'	115,81	6,97 (d, $J=8,5$ Hz)
6'	130,12	7,97 (d, $J=8,5$ Hz)
1''	75,19	4,98 (d, $J=9,8$ Hz)
2''	73,0	
3''	80,37	
4''	72,38	
5''	83,07	
6''	63,12	
7-OMe	57,10	3,92 (s)
4'-OMe	56,17	3,85 (s)

1.4.1.2.2 Substância 3

A amostra FCL1 (5,0 mg), substância 3, foi obtida na forma de um sólido amarelo a partir da fração em acetato de etila de folhas de *C. lanceolata*. A elucidação estrutural de FCL1 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (DEPTQ), COSY, HMQC, HMBC e comparação com dados descritos na literatura (PENG et al., 2008).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 32) de FCL1 (**3**) apresentou padrão de deslocamento químico típico de flavonoides, com um simpleto em δ 6,66 ppm característico de H-3 do anel C de flavonas. Adicionalmente, foi observado um par de dupletos em δ 7,88 (d , $J=8,5$ Hz, 2H, H-2' e H-6') e 6,90 (d , $J=8,5$ Hz, 2H, H-3' e H-5') característico de anel B *para*-substituído. Ainda na região de hidrogênios aromáticos, foi observado um simpleto em δ 6,32 ppm atribuído ao H-8 do anel A desta flavona. A presença de um duplete em δ 4,57 (d , $J=9,8$ Hz, H-1'') e dos demais sinais na região de 4,09-3,11 ppm e a ausência de sinal característico para H-6 permitiu sugerir a presença de um glicosídeo nesta posição. A posição da ligação entre o carboidrato e a aglicona foi confirmada através das correlações observadas no HMBC, na qual o H-1'' se correlaciona com os carbonos em δ_{C} 70,81; δ_{C} 79,15; δ_{C} 81,71; δ_{C} 109,05; δ_{C} 161,41 e δ_{C} 163,70 correspondentes a C-2'', C-3'', C-5'', C-6, C-5 e C-7, respectivamente. A ligação C-glicopiranosídeo foi evidenciada pelo baixo deslocamento de C-6 (δ_{C} 109,05) para ser um *O*-glicosídeo, e muito alto para ser uma ligação C-H que é esperado estar entre δ_{C} 94,0 e 99,0 como discutido no item 1.4.1.2.1.



A análise dos dados de RMN de ^1H (Figura 32) e DEPTQ (Figura 33), em conjunto com os dados de RMN 2D (COSY, HMQC e HMBC) e comparação com dados da literatura (PENG et al., 2008) (Tabela 4) permitiram identificar a substância 3 como isovitexina. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez em *C. lanceolata*.

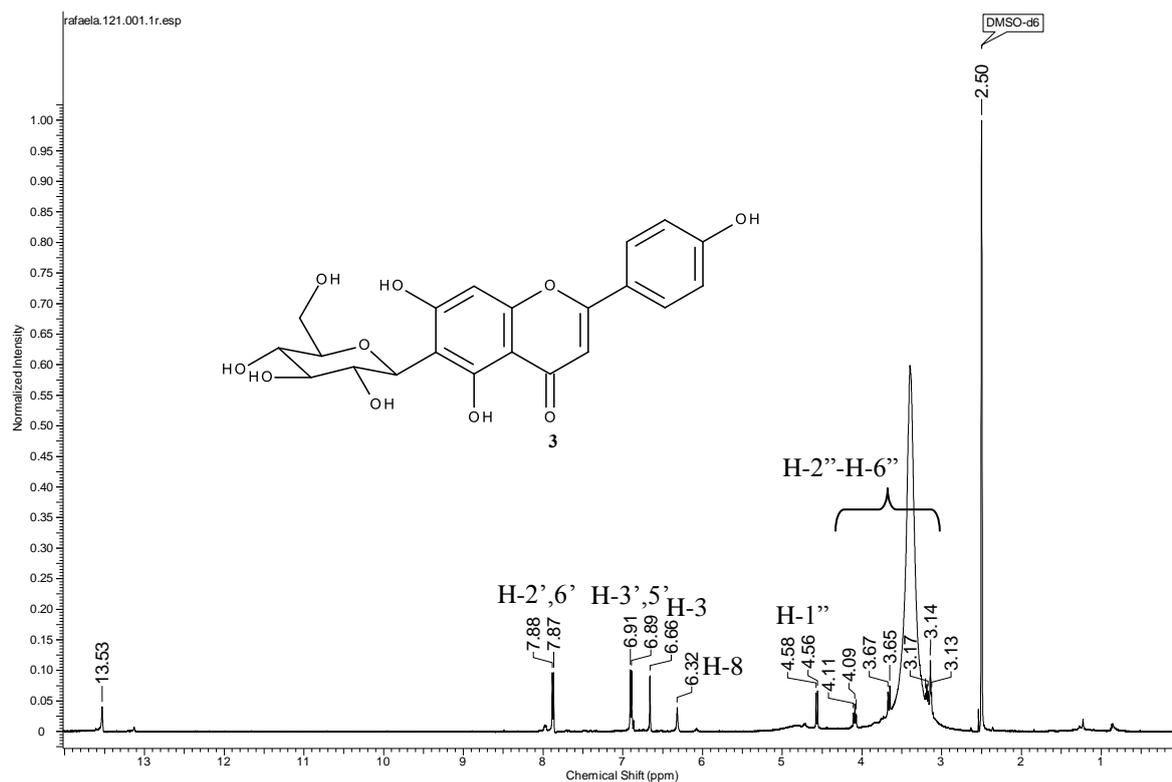


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL1 (Isovitexina).

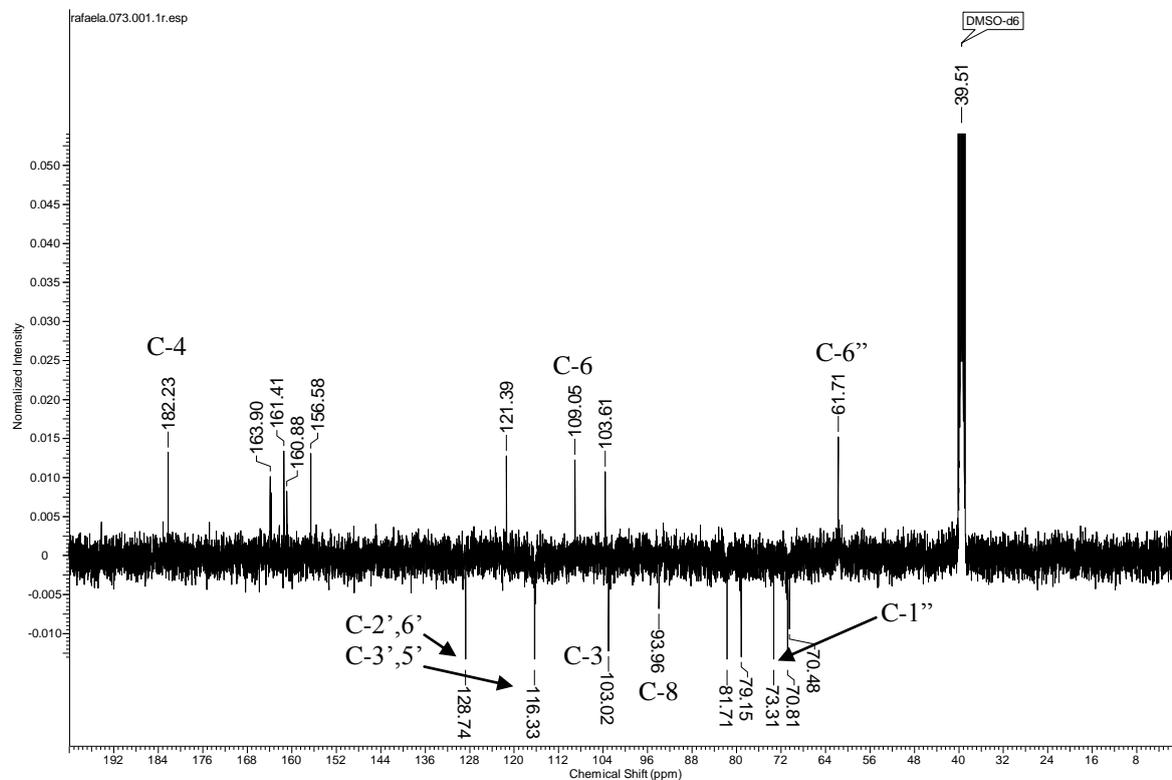


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (100 MHz) de FCL1 (Isovitexina).

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL1 (Isovitexina).

C	Isovitexina (3)		Literatura ($\text{DMSO-}D_6$)*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	163,90	-	163,5	-
3	103,02	6,66 (s)	102,8	6,78 (s)
4	182,23	-	181,9	-
5	161,41	13,53 (s, OH)	161,2	13,55 (s, OH)
6	109,00	-	108,9	-
7	163,70	-	163,3	-
8	93,96	6,32 (s)	93,6	6,51 (s)
9	156,58	-	156,2	-
10	103,61	-	103,4	-
1'	121,39	-	121,1	-
2'	128,74	7,88 (d, $J=8,5$ Hz)	128,5	7,91 (d, $J=8,8$ Hz)
3'	116,33	6,90 (d, $J=8,5$ Hz)	116,0	6,91 (d, $J=8,8$ Hz)
4'	160,88	-	160,7	-
5'	116,33	6,90 (d, $J=8,5$ Hz)	116,0	6,91 (d, $J=8,8$ Hz)
6'	128,74	7,88 (d, $J=8,5$ Hz)	128,5	7,91 (d, $J=8,8$ Hz)
1''	73,31	4,57 (d, $J=10,0$ Hz)	73,6	4,58 (d, $J=9,0$ Hz)
2''	70,81	4,09 (t, $J=10,0$ Hz)	71,2	
3''	79,15	3,13 – 3,20 (m)	78,9	
4''	70,48	3,13 – 3,20 (m)	70,6	
5''	81,71	3,13 – 3,20 (m)	81,6	
6''	61,71	3,64 (d, $J=10,0$ Hz)	61,5	

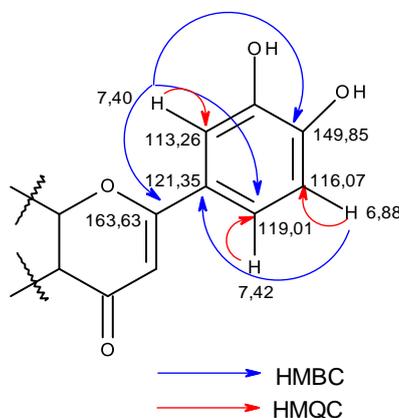
*PENG et al., 2008

1.4.1.2.3 Substâncias 3, 4 e 5

A amostra FCL2 (13,0 mg), substâncias **3**, **4** e **5**, foi obtida na forma de um sólido amarelo a partir da fração em acetato de etila de folhas de *C. lanceolata*. A elucidação estrutural de FCL2 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (DEPTQ), COSY, HMQC, HMBC e comparação com dados descritos na literatura (PENG et al., 2005; ZHOU et al., 2005).

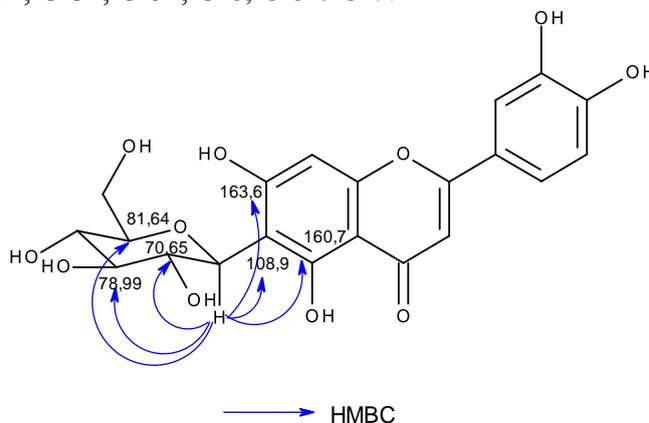
A análise preliminar do espectro de RMN de ^1H permitiu sugerir a presença de uma mistura de substâncias de natureza flavonoídica, sendo um componente majoritário (**4**) e outros dois componentes minoritários (**3** + **5**). A seguir, serão discutidos os dados de RMN referentes ao componente majoritário da mistura (**4**).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 34 e 35) foram observados sinais em δ_{H} 7,42 (*dd*, $J=9,0$ e $2,0$ Hz, 1H), 7,40 (*sl*, 1H) e 6,88 (*d*, $J=9,0$ Hz, 1H) que caracterizam um anel B trissubstituído sendo atribuídos aos H-6', H-2' e H-5', respectivamente. No espectro de HMQC (Figura 38) verificam-se correlações dos hidrogênios em δ_{H} 7,42 (H-6'), δ_{H} 7,40 (H-2') e δ_{H} 6,88 (H-5') com os carbonos em δ_{C} 119,01 δ_{C} 113,26 e δ_{C} 116,07, respectivamente. No espectro de HMBC (Figura 39) foi observada a correlação do sinal δ_{H} 7,40 (H-2') com o sinal em δ_{C} 149,85 atribuído ao C-4', com o carbono em δ_{C} 163,63 correspondente ao C-2 e δ_{C} 119,01 (C-6') e do sinal em δ_{H} 6,88 (H-5') com o carbono em δ_{C} 121,35 (C-1').



No espectro de RMN de ^1H observou-se um sinal em δ_{H} 13,57 (*s*, 1H) característico de hidroxila quelada na posição C-5 e a presença de um simpleto em δ_{H} 6,67 (*s*, 1H) atribuído ao H-3 do anel C desta flavona. Adicionalmente, foi observada a presença de hidrogênio de carbono anomérico (H-1'') de carboidrato, sendo que este sinal em δ_{H} 4,58 (*d*, $J=10$ Hz) se correlaciona ao carbono em δ_{C} 73,06 no mapa de correlações do HMQC, sugerindo a presença de um flavonoide C-glicosilado. A presença do sinal em δ_{H} 6,47 (*s*, 1H) foi atribuído ao H-8 do anel A e a ausência de sinal característico de H-6 permitiu sugerir a presença do substituinte

nesta posição. A confirmação da posição na qual o carboidrato esta ligada a aglicona foi realizada pelas correlações observadas no espectro de HMBC, na qual o H-1'' se correlaciona com os carbonos em δ_C 70,65, δ_C 78,99, δ_C 81,64, δ_C 108,92, δ_C 160,74 e δ_C 163,63 correspondentes a C-2'', C-3'', C-5'', C-6, C-5 e C-7.



A comparação dos deslocamentos químicos desta substância (Tabela 5 e 6) com dados da literatura (PENG et al., 2005) permitiram sugerir que FCL2 possui como componente majoritário a **isoorientina** (4). A análise dos demais sinais observados no espectro de RMN de ^1H em conjunto com a comparação com dados da literatura (ZHOU et al., 2005) permitiram sugerir que os componentes minoritários na mistura são a **orientina** (5) e a **isovitexina** (3). Estas três flavonas-C- glicosiladas estão sendo descritas pela primeira vez em *C. lanceolata*.

A isoorientina (4) apresentou atividade anti-inflamatória em ratos no modelo de edema de pata induzido por carragenina (KUPELI et al., 2004). ABRAHAM et al. (2010) relataram potente capacidade antioxidante das flavonas isoorientina (4) e orientina (5) nos ensaios do DPPH e β -caroteno. Além disso, a orientina (4) apresentou atividades antiviral (LI et al., 2002) e antifúngica (ALI; DIXIT, 2012).

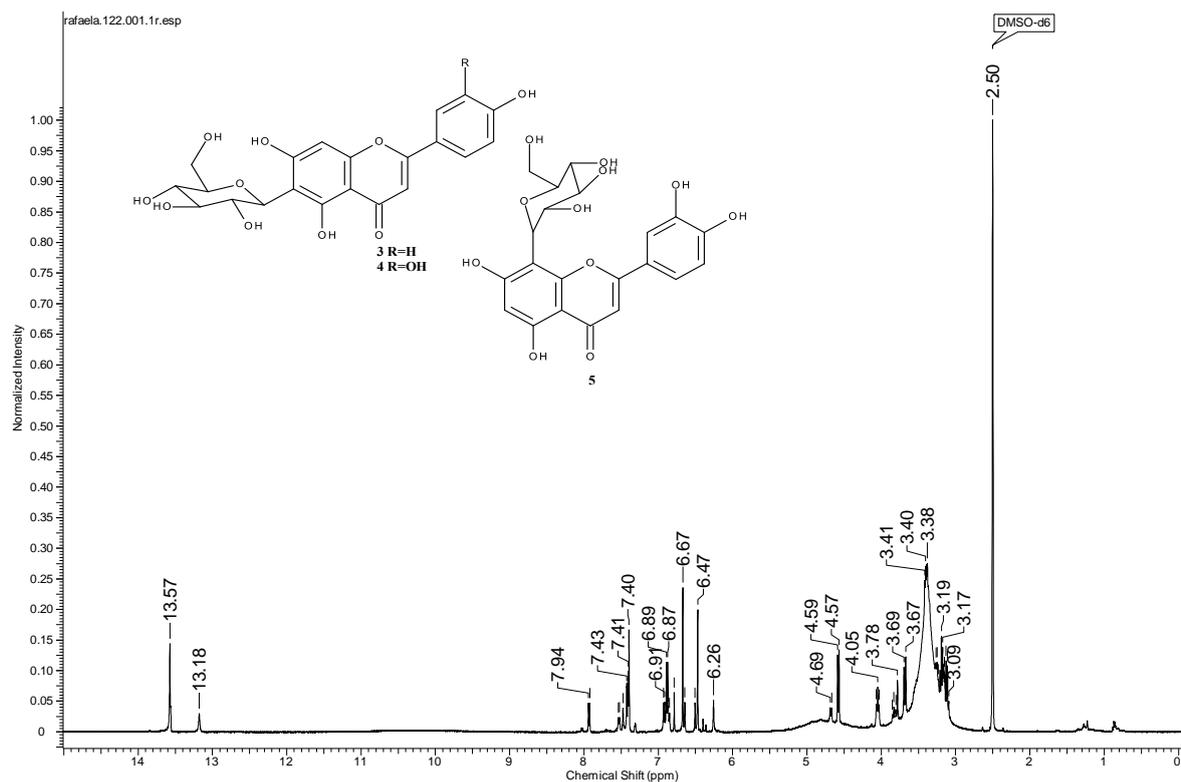


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL2.

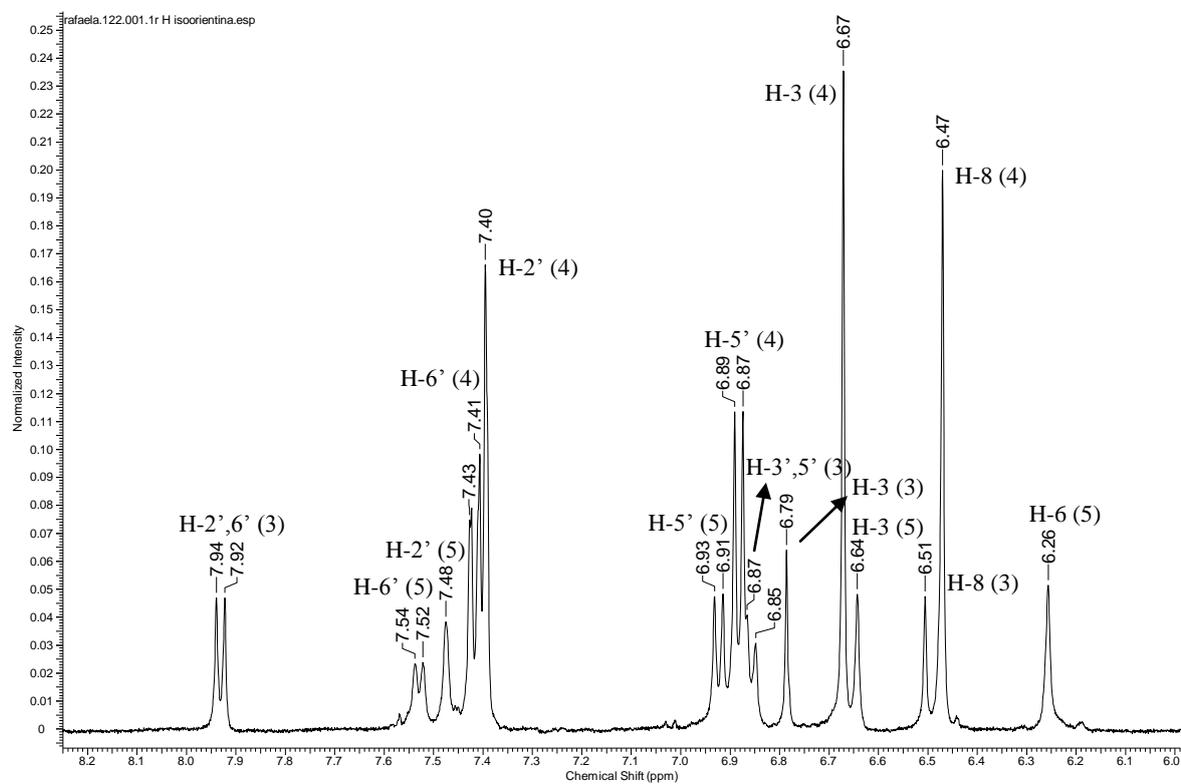


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL2. Expansão.

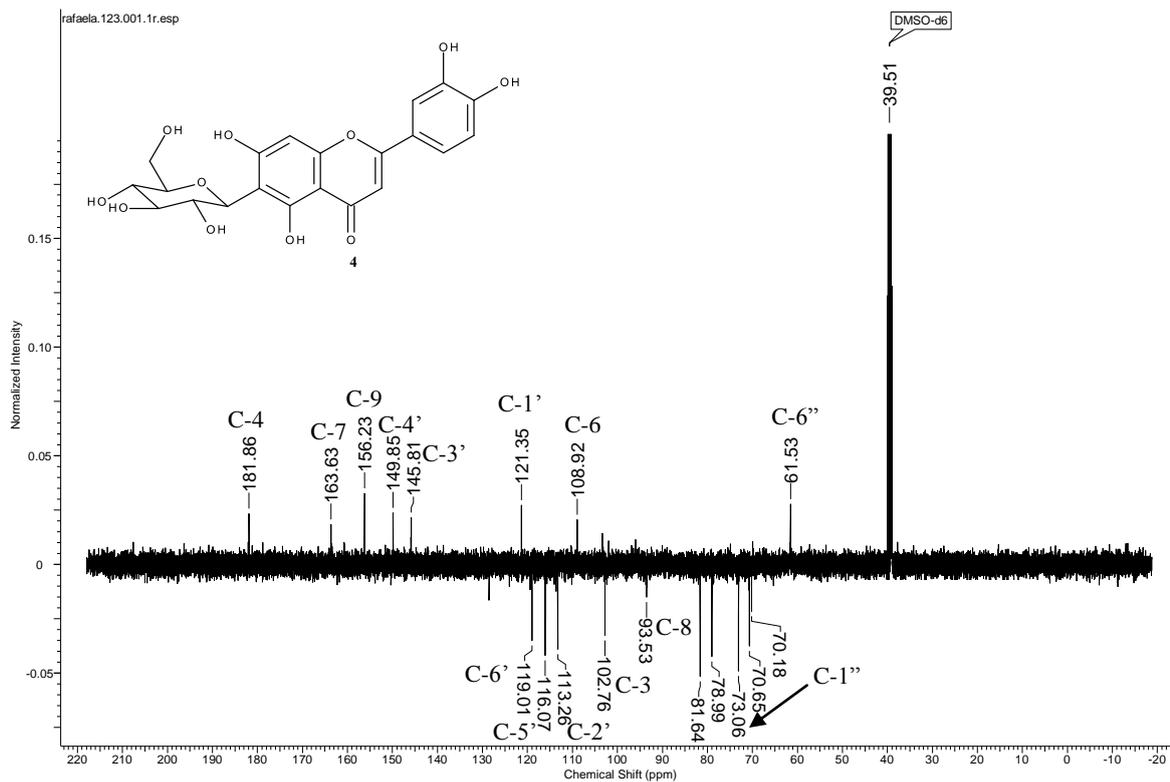


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (125 MHz) de FCL2.

rafaela.126.001.2rr.esp

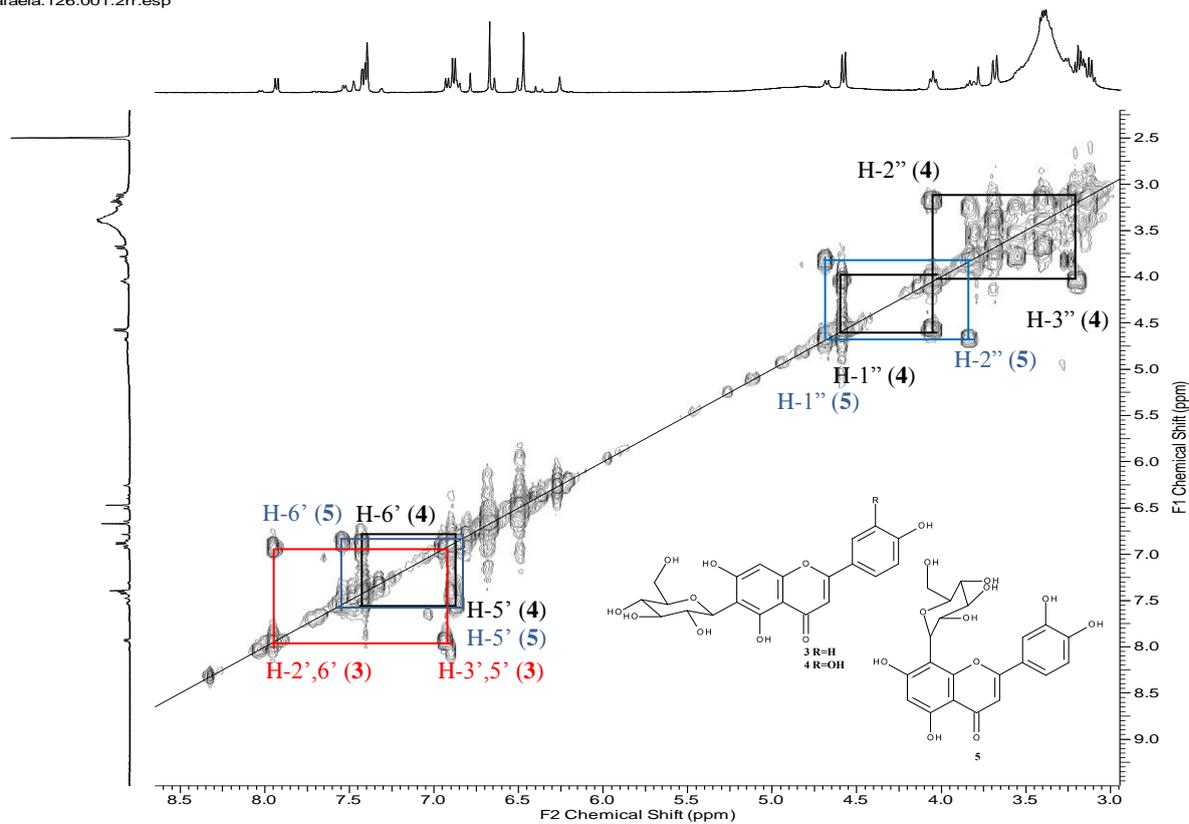


Figura 37. Espectro de COSY ^1H , ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL2.

rafaela.127.001.2rr.esp

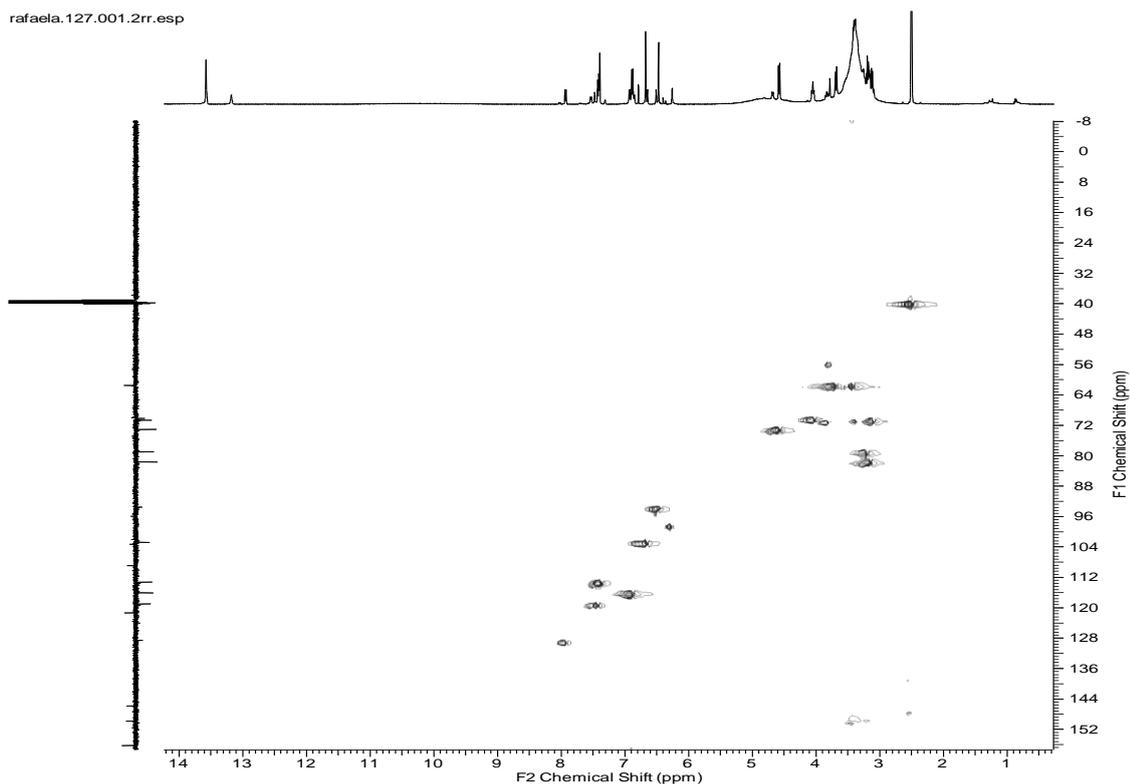


Figura 38. Espectro de HMQC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL2.

rafaela.128.001.2rr.esp

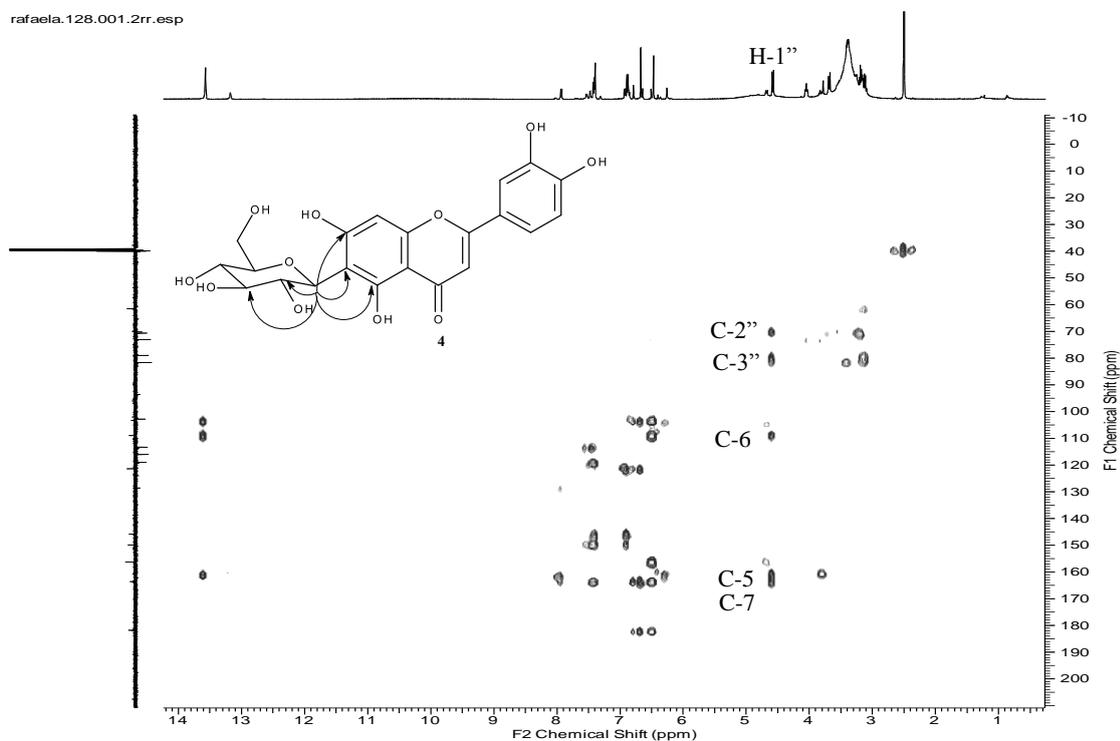


Figura 39. Espectro de HMBC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL2.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL2 (Isoorientina).

C	Isoorientina (4)		Literatura ($\text{DMSO-}D_6$)*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	163,63	-	163,44	-
3	102,76	6,67 (s)	102,38	6,64 (s)
4	181,86	-	181,45	-
5	160,74	13,57 (s, OH)	160,59	13,55 (s, OH)
6	108,92	-	108,88	-
7	163,63	-	163,44	-
8	93,53	6,47 (s)	93,73	6,47 (s)
9	156,23	-	156,27	-
10	103,33	-	102,79	-
1'	121,35	-	121,56	-
2'	113,26	7,40 (d, $J=2,5$ Hz)	112,92	7,38 (d, $J=2,5$ Hz)
3'	145,81	-	145,95	-
4'	149,85	-	150,44	-
5'	116,07	6,88 (d, $J=9,0$ Hz)	116,00	6,90 (d, $J=9,0$ Hz)
6'	119,01	7,42 (dd, $J=9,0$ e $2,5$ Hz)	118,82	7,44 (dd, $J=9,0$ e $2,5$ Hz)
1''	73,06	4,58 (d, $J=10,0$ Hz)	73,18	4,58 (d, $J=9,8$ Hz)
2''	70,65	4,05 (t, $J=10,0$ Hz)	70,50	
3''	78,99	3,22 – 3,11 (m)	78,95	
4''	70,18	3,22 – 3,11 (m)	70,19	
5''	81,64	3,22 – 3,11 (m)	81,35	
6''	61,53	α 3,68 (d, $J=10,0$ Hz) β 3,41 – 3,37 (m)	61,34	

* PENG et al., 2005

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL2 (Orientina).

H	Orientina (5)	Literatura ($\text{DMSO-}D_6$) *
	δ_{H}	δ_{H}
3	6,64 (s)	6,65 (s)
5	13,18 (s)	13,15 (s)
6	6,26 (s)	6,25 (s)
2'	7,48 (sl)	7,44 (d, $J=2,1$ Hz)
5'	6,92 (d, $J=8,0$ Hz)	6,90 (d, $J=8,2$ Hz)
6'	7,53 (dd, $J=8,0$ e $2,0$ Hz)	7,50 (dd, $J=8,2$ e $2,1$ Hz)
1''	4,68 (d, $J=9,0$ Hz)	4,72 (d, $J=9,0$ Hz)

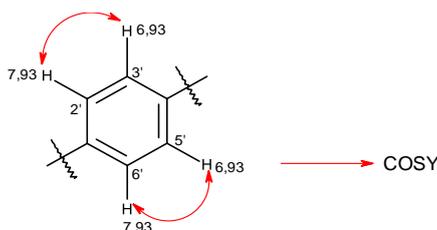
*ZHOU et al., 2005

1.4.1.2.4 Substâncias 6 e 7

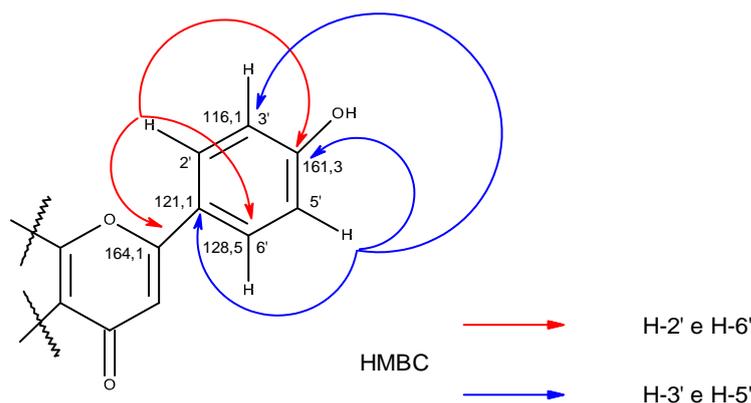
A fração FCL3 (40,0 mg) foi obtida como um sólido amarelo a partir do fracionamento da fração em acetato de etila de folhas de *C. lanceolata*. FCL3, contendo as substâncias **6** e **7**, foi obtida na forma de mistura de isômeros de posição (6-*C* e 8-*C*-glicosídeos), sendo que, o componente majoritário da mistura apresentou sinais duplicados no RMN de ^1H e ^{13}C devido a apresentar-se na forma de dois isômeros conformacionais em solução de $\text{DMSO-}D_6$, fato já reportado na literatura para esta substância (CAMARGO et al., 2012; PRINZ et al., 2007; RAYYAN et al., 2005).

De acordo com CAMARGO et al. (2012) os sinais alargados e duplicados observados nos espectros de RMN sugerem a presença de dois conformeros rotaméricos. Rotameros são estereoisômeros resultantes da rotação restrita em torno da ligação simples, para o qual a barreira de rotação é elevada o suficiente para observa-se as espécies isoméricas. No caso de flavonoides, esse fenômeno pode ser observado nas flavonas-6-*C*-glicosil onde a rotação livre no $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-C}(\text{sp}^2)$ da ligação glicose-flavona é impedida pela presença de grupos volumosos (impedimento estérico) (CAMARGO et al., 2012).

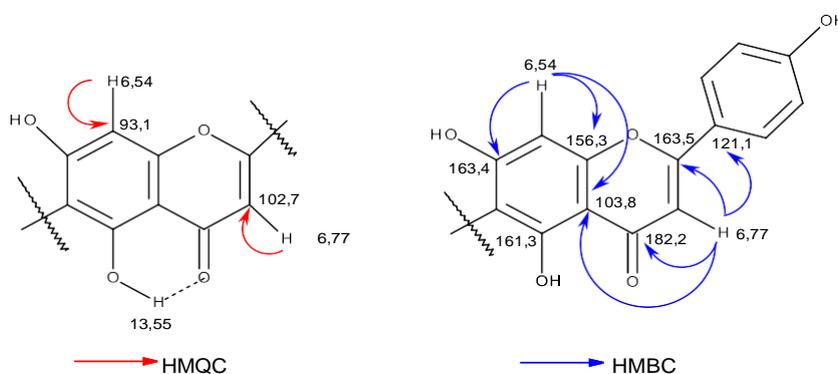
Considerando o composto majoritário da mistura FCL3, denominado conformero A, o espectro de RMN de ^1H (Figura 40 e 41) apresentou para o isômero **6** dupletos em δ_{H} 7,92 (d , $J= 10$ Hz) e em 6,93 (d , $J= 10$ Hz) cuja constante indica acoplamento *orto* entre os hidrogênios H-2' e H-6' com H-3' e H-5', respectivamente. A correlação entre estes hidrogênios foi confirmada pelo espectro de COSY (Figura 43).



Através da análise do mapa de correlações HMQC (Figura 44) verificou-se a correlação do sinal em δ_{H} 6,93 com o carbono em δ_{C} 116,1 (C-3' e C-5') e do duplete em δ_{H} 7,93 com o carbono em δ_{C} 128,5 (C-2' e C-6'). O mapa de correlações HMBC (Figura 45) mostra a correlação do hidrogênio em δ_{H} 7,93 (H-2') com os carbonos em δ_{C} 128,5 (C-2' e C-6'); 163,5 (C-2) e 159, 97 (C-4'), e o hidrogênio em δ_{H} 6,93 (H-3') com os carbonos em δ_{C} 116,1 (C-3' e C-5'); 159,97 (C-4') e 121,1 (C-1'), respectivamente.

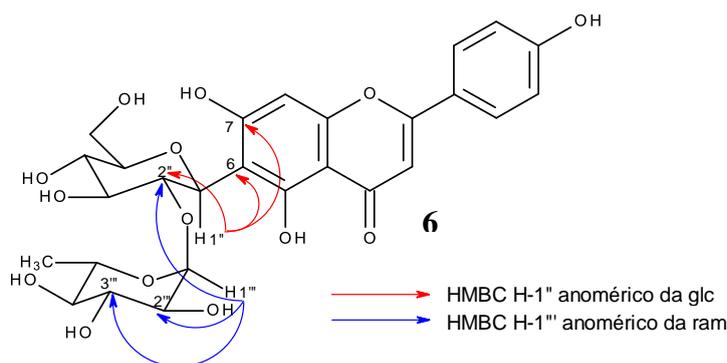


Ainda no espectro de RMN de ^1H (Figura 40 e 41) observou-se a presença de três simpletos referentes ao isômero **6** (confôrmero A) com sinais em δ_{H} 13,55 relativo ao hidrogênio da hidroxila quelada na posição C-5 do esqueleto flavonoídico, em δ_{H} 6,77 característico de hidrogênio H-3 de flavonas e em δ_{H} 6,54 atribuído ao H-8, o que sugere a presença de um substituinte no C-6 do anel A. Através do mapa de correlações HMQC (Figura 44) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 6,77 com o carbono em δ_{C} 102,7 e de δ_{H} 6,54 com δ_{C} 93,1 e através do mapa de correlações HMBC (Figura 45) observou-se a correlação de H-3 (δ_{H} 6,77) com os carbonos δ_{C} 103,8 (C-10); 121,1 (C-1'); 163,5 (C-2) e 182,2 (C-4) e o sinal correspondente a H-8 (δ_{H} 6,54) se correlaciona com os carbonos δ_{C} 103,8 (C-10); 109,1 (C-6); 156,3 (C-9) e 163,4(C-7).



A presença de sinais na região entre δ_{H} 3,0 e 5,0 no espectro de RMN de ^1H (Figura 40 e 41) sugere a presença de unidades de açúcar na substância, os quais foram confirmados para o confôrmero A do isômero **6** pela presença de dois sinais característicos de prótons de carbonos anoméricos em δ_{H} 5,08 (*sl*) e 4,66 (*d*, $J=10,0$ Hz) que sugerem uma unidade de ramnose e outra de glicose. Adicionalmente, a presença do duplete referente a uma metila em δ_{H} 0,52 (*d*, $J=5,0$ Hz) é característico da presença de ramnose neste tipo de substância.

A configuração das unidades de açúcares foi determinada de acordo com as constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (HARBONE, 1994), sendo determinadas como uma β -D-glicose e uma α -ramnose. O mapa de correlações HMQC (Figura 44) mostra a correlação do sinal em δ_H 4,66 referente à β -D-glicose com o carbono em δ_C 71,6 característico de um flavonoide C-glicosilado e o sinal em δ_H 5,08 se correlaciona com o carbono δ_C 100,4 o que sugere uma ligação O-glicosídeo. Para se determinar a posição na qual os glicosídeos estão ligados na aglicona utilizou-se as correlações do espectro de HMBC (Figura 45) e observou-se que o hidrogênio em δ_H 4,66 (H-1'') se correlaciona com os carbonos em δ_C 74,6 (C-2''), 109,1 (C-6) e 163,4 (C-7), sugerindo que a β -D-glicose está ligada diretamente a aglicona via ligação com o C-6 do anel A da estrutura. Já o hidrogênio em δ_H 5,08 (H-1''') se correlaciona com os sinais em δ_C 75,6 (C-2''); 71,2 (C-2''') e 70,9 (C-3'''), sugerindo que a α -ramnose está ligada a β -D-glicose via uma ligação 1''' \rightarrow 2'', caracterizando a presença do dissacarídeo conhecido como neohesperidosídeo na substância.



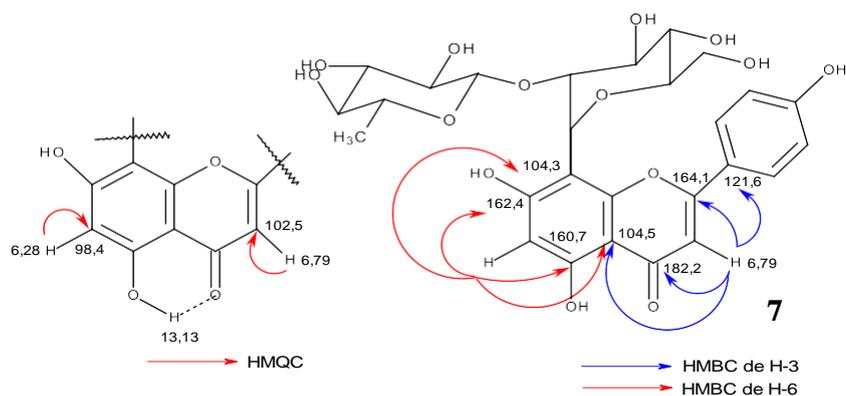
Em condições usuais, a metila (6'''-CH₃) de uma unidade de ramnose apresenta o sinal em RMN de ¹H com um deslocamento químico em torno de δ_H 1,0 ppm (*d*, *J*= 6,0 Hz) (HARBONE, 1994). É importante ressaltar, que os valores observados neste trabalho relacionados aos deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos em C-6''' e metínico em C-5''' do resíduo da ramnose (H-6''' e H-5''') ocorreram em uma região mais blindada do espectro com relação ao esperado. Foram observados os valores não usuais de sinais em δ_H 2,11 (H-5''') e 0,51 (H-6'''), respectivamente. De acordo com LARIONOVA et al. (2010), estes valores são resultado da ação de efeitos anisotrópicos do anel aromático da porção aglicona decorrentes da conformação adotada pelos isômeros **6** e **7**. Este fato já foi descrito para vários C-8 e C-6-glicosilflavonoides. Segundo estes autores, a duplicação de sinais observados no espectro de RMN devido a presença de dois diferentes rotâmeros está relacionada a interação entre o anel B e o açúcar substituinte em C-8 e/ou C-6. Estudos de

RMN combinados com cálculos teóricos permitiram propor uma conformação dobrada estável para o composto 2''-*O*-ramnosil- 4'-*O*-metilvitexina em que o ambiente químico na porção final do açúcar (principalmente H-5''' e H-6''') poderiam ser afetados, o que justificaria os valores de deslocamento químicos observados para esta estrutura e seus análogos estruturais, sendo que esta conformação seria mantida por forças intramoleculares fracas (LARIONOVA et al., 2010).

Através dos experimentos de RMN 1D e 2D foi possível atribuir todos os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbono-13 (Tabela 7) dos confômeros A e B da substância **6** e por comparação com dados da literatura (PRINZ et al., 2007; CAMARGO et al., 2012) foi identificada como isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo ou apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo. No capítulo 2 será discutida a análise por LC-MS/MS dos flavonoides **6** e **7**. Esta flavona está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Clusia* e na família Clusiaceae.

Além dos sinais referentes aos confômeros A e B da substância **6** foram observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C sinais referentes a uma outra substância denominada **7**, a análise dos dados permitiu sugerir a presença de um isômero de posição da isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo (**6**). A única diferença estrutural entre as duas substâncias seria a posição do dissacarídeo no anel A destas flavonas isoméricas.

Considerando o composto minoritário da mistura FCL3, denominado substância **7**, o espectro de RMN de ¹H (Figura 40 e 41) apresentou três simpletos com sinais em δ_H 13,13 relativo ao hidrogênio da hidroxila quelada na posição C-5 do anel A, em δ_H 6,79 característico de hidrogênio H-3 de flavonas e em δ_H 6,28 atribuído ao H- 6, o que sugere a presença de um substituinte no C-8 do anel A. Através do mapa de correlações HMQC (Figura 41) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_H 6,79 com o carbono em δ_C 102,5 e de δ_H 6,28 com δ_C 98,4 e através do mapa de correlações HMBC (Figura 42) observou-se a correlação de H-3 (δ_H 6,79) com os carbonos δ_C 104,5 (C-10); 121,6 (C-1'); 164,1 (C-2) e 182,2 (C-4) e o sinal correspondente a H-6 (δ_H 6,28) se correlaciona com os carbonos δ_C 104,3 (C-8); 104,5 (C-10); 160,7 (C-5) e 162,4 (C- 7). Para confirmar a posição do dissacarídeo na substância utilizou-se as correlações de HMBC (Figura 42) e observou-se a correlação do hidrogênio em δ_H 4,76 (H-1'') com os carbonos em δ_C 75,1 (C-2''); 104,3 (C-8); 155,9 (C-9) e 162,4 (C-7), sugerindo a ligação do dissacarídeo neohesperidosídeo no C-8 do anel A da substância **7**.



A análise dos espectros de RMN de 1D e 2D permitiu o completo assinalamento dos valores de deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos (Tabela 8) da substância **7** e através da comparação com dados da literatura (DOYAMA et al., 2005) permitiu identificá-la como a vitexina-2-*O*-ramnosídeo ou apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo. Esta flavona já havia sido isolada das folhas da espécie *Clusia sandiensis* (DELLE MONACHE, 1991), porém está sendo relatada pela primeira vez em *C. lanceolata*.

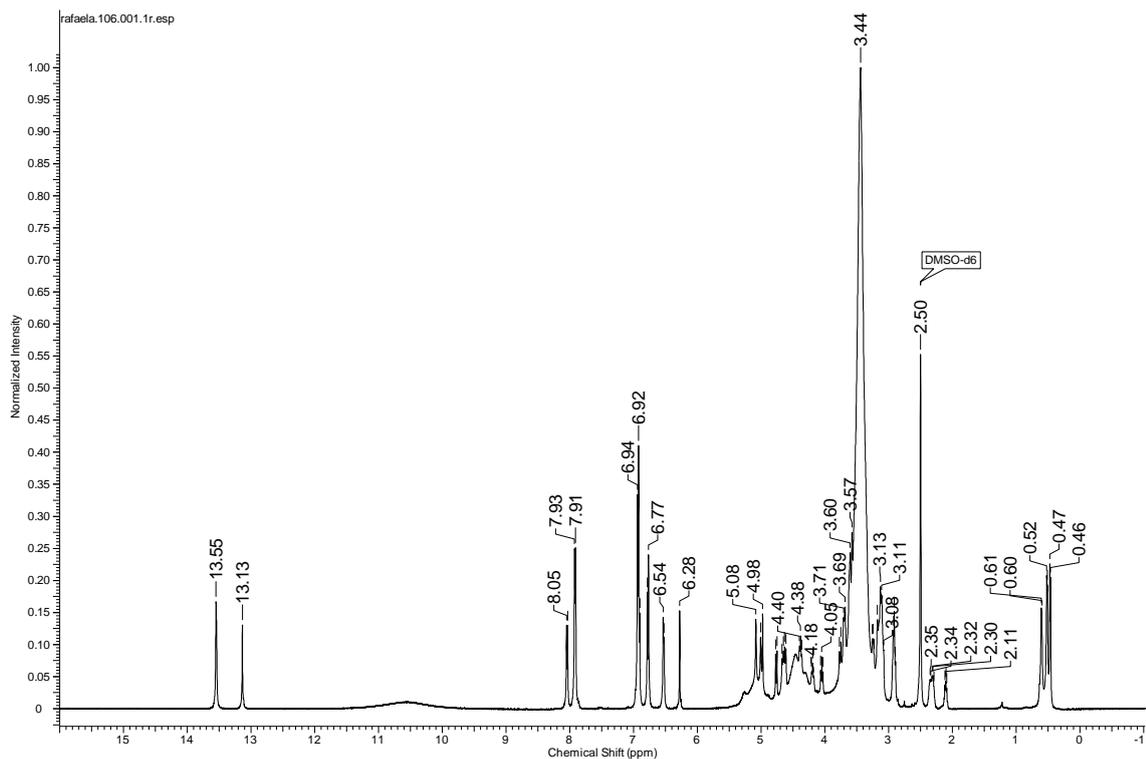


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL3.

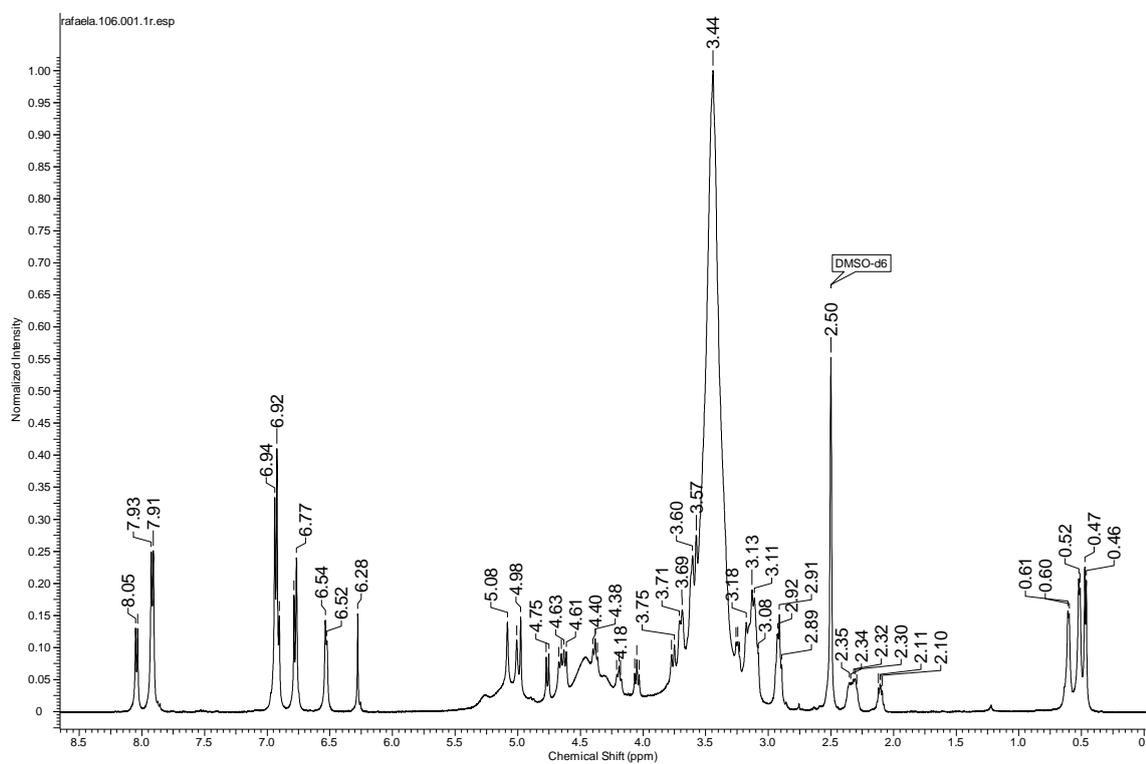


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL3. Expansão.

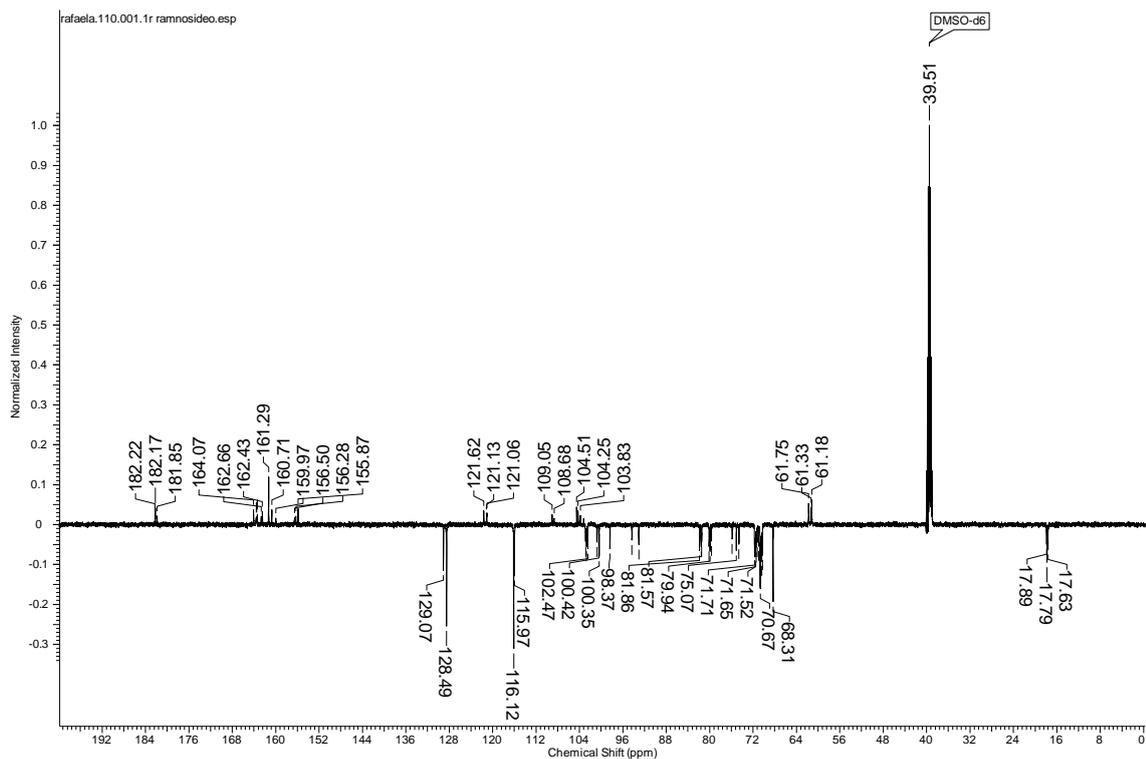


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em $\text{DMSO-}D_6$ (125 MHz) de FCL3.

rafaela.107.001.2rr.esp

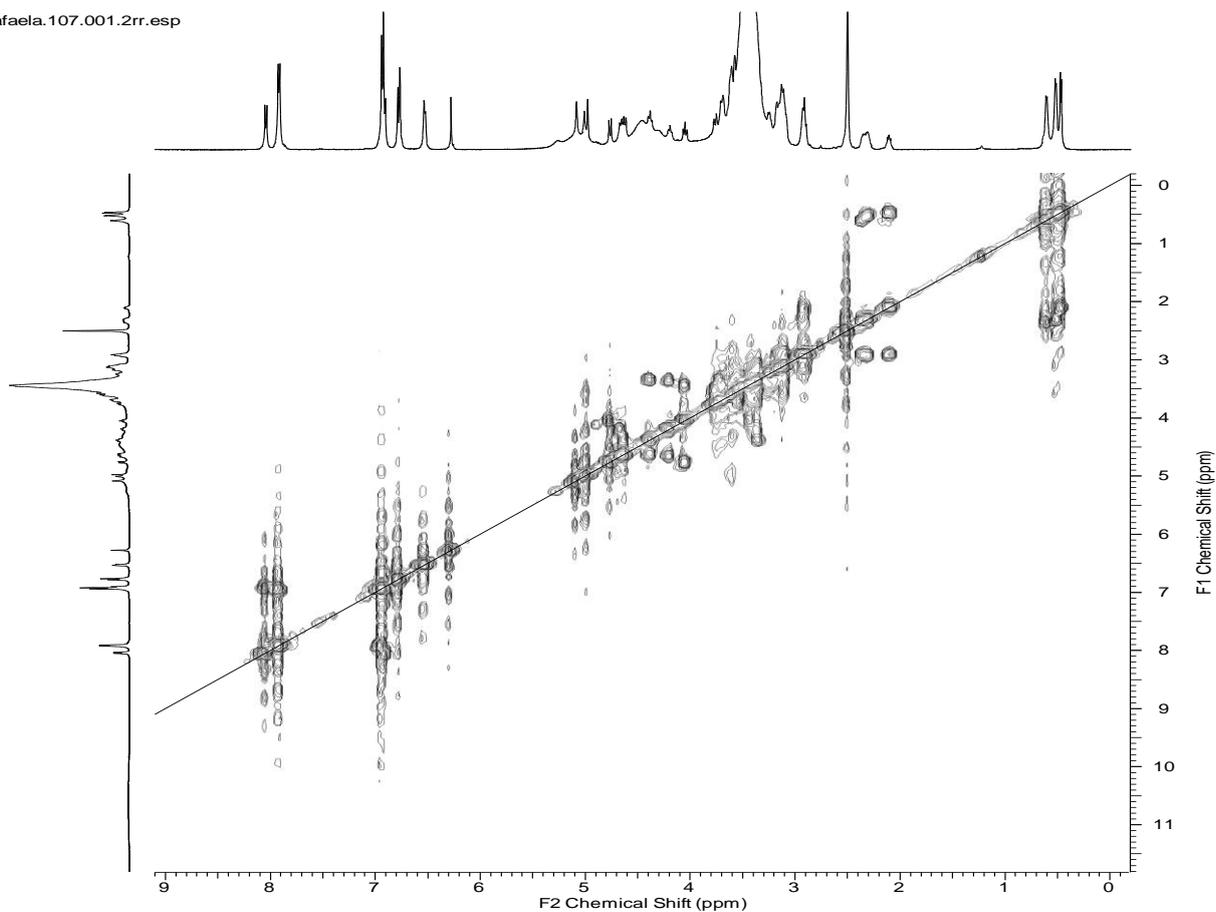


Figura 43. Espectro de COSY ^1H , ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCL3.

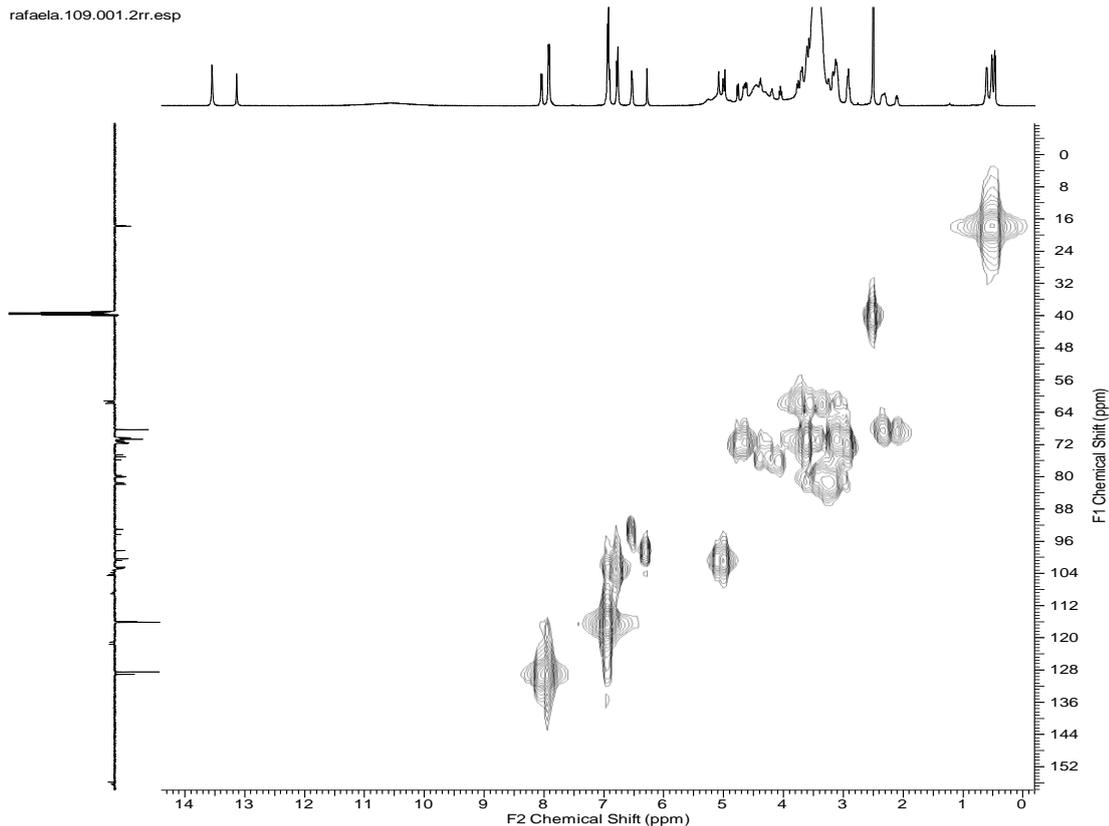


Figura 44. Espectro de HMQC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL3.

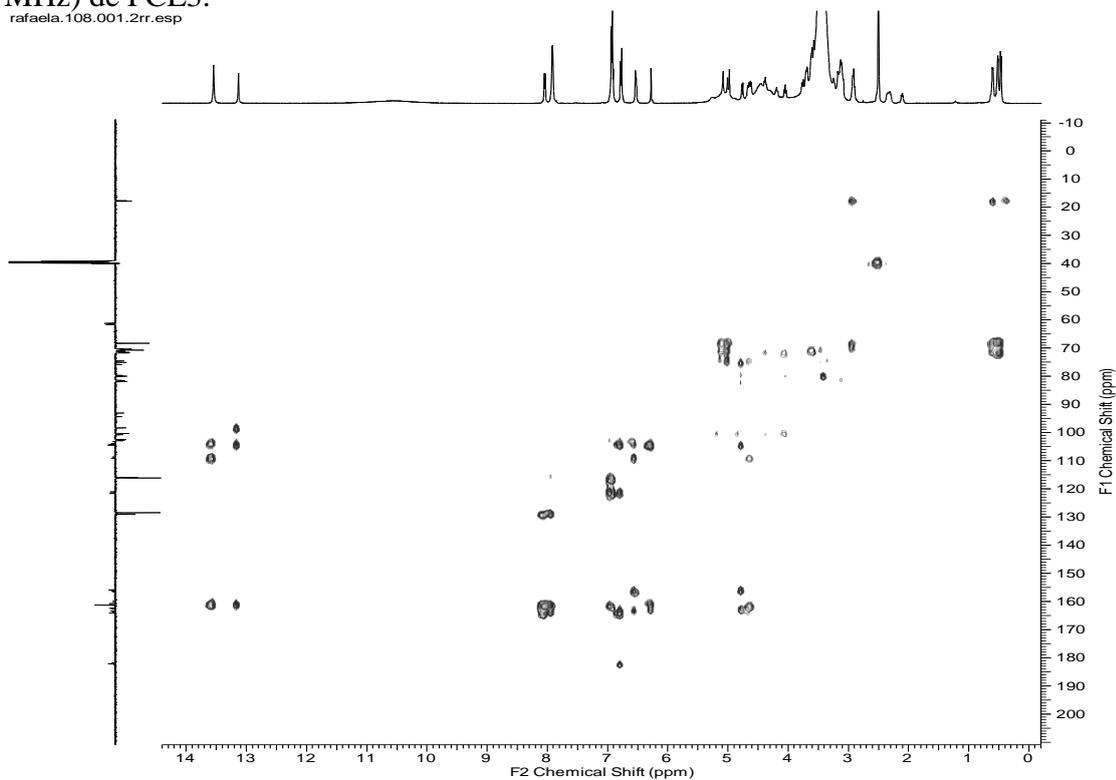


Figura 45. Espectro de HMBC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCL3.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- D_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL3 (Isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo).

C	Isovitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo (6)		Literatura (DMSO- D_6)*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	163,52; <i>163,60</i>	-	163,9	-
3	102,70; <i>102,86</i>	6,77 (s)	103,2	6,75 (s)
4	182,22; <i>181,85</i>	-	182,7; <i>182,3</i>	-
5	161,3	13,53 (s, OH)	161,8	13,55 (s, OH)
6	109,05; <i>108,68</i>	-	109,6; <i>109,2</i>	-
7	163,40	-	163,40	-
8	93,06; <i>94,33</i>	6,54; <i>6,52</i> (s)	93,60; <i>94,80</i>	6,50 (s)
9	156,30; <i>156,50</i>	-	156,80; <i>157</i>	-
10	104,25; <i>103,80</i>	-	103,3; <i>104,3</i>	-
1'	121,06; <i>121,13</i>	-	121,6	-
2'	128,49	7,92 (d, $J=8,5$ Hz)	129,0	7,91 (d, $J=8,6$ Hz)
3'	116,12	6,93 (d, $J=8,5$ Hz)	116,6	6,92 (d, $J=8,6$ Hz)
4'	161,29	-	160,5	-
5'	116,12	6,93 (d, $J=8,5$ Hz)	116,6	6,92 (d, $J=8,6$ Hz)
6'	128,49	7,92 (d, $J=8,5$ Hz)	129,0	7,91 (d, $J=9,6$ Hz)
1''	71,59; <i>71,40</i>	4,66; <i>4,62</i> (d, $J=10,0$ Hz)	71,90; <i>71,50</i>	4,64 (d, $J=9,7$ Hz)
2''	74,60; <i>75,84</i>	4,37; <i>4,18</i> (t, $J=10,0$ Hz)	75,6; <i>76,4</i>	
3''	80,08; <i>79,68</i>	3,08-3,26 (m)	80,6; <i>80,2</i>	
4''	70,41; <i>70,39</i>	3,08-3,26 (m)	70,9	
5''	81,57; <i>81,46</i>	3,08-3,26 (m)	82,0	
6''	61,75; <i>61,33</i>	3,70; <i>3,76</i> (d, $J=10$ Hz)	62,3; <i>61,8</i>	
1'''	100,42; <i>100,78</i>	5,08; <i>5,01</i> (s)	100,9; <i>101,3</i>	5,07; <i>5,00</i> (s)
2'''	70,98	3,66 (m)	71,20	
3'''	70,67	3,08-3,18 (m)	70,90	
4'''	71,65	2,91 (m)	72,10	
5'''	68,31	2,29-2,35 (m)	68,80	
6'''	17,63; <i>17,89</i>	0,53; <i>0,61</i> (d, $J=5,0$ Hz)	18,1; <i>18,3</i>	0,51 (d, $J=5,5$); <i>0,59</i> (d, $J=5,2$)

Observação: Os números em itálico são referentes ao confômero B

*CAMARGO et al., 2012

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCL3 (Vitexina-2''-*O*-ramnosídeo).

C	Vitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo (7)		Literatura (DMSO- D_6)*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	164,10	-	164,0	-
3	102,47	6,79 (s)	102,5	6,78 (s)
4	182,17	-	182,1	-
5	160,71	13,13 (s, OH)	160,7	13,13 (s, OH)
6	98,37	6,28 (s)	98,30	6,25 (s)
7	162,43	-	162,4	-
8	104,25	-	104,2	-
9	155,90	-	155,9	-
10	104,51	-	104,5	-
1'	121,6	-	121,6	-
2'	129,07	8,04 (d, $J=8,5$ Hz)	129,0	8,04 (d, $J=9,0$ Hz)
3'	115,97	6,91 (d, $J=8,5$ Hz)	115,9	6,89 (d, $J=9,0$ Hz)
4'	161,30	-	161,2	-
5'	115,97	6,91 (d, $J=8,5$ Hz)	115,9	6,89 (d, $J=9,0$ Hz)
6'	129,07	8,04 (d, $J=8,5$ Hz)	129,0	8,04 (d, $J=9,0$ Hz)
1''	71,52	4,76 (d, $J=10,0$ Hz)	71,50	4,76 (d, $J=10,0$ Hz)
2''	75,07	4,05 (d, $J=10,0$ Hz)	75,10	
3''	79,94	3,08-3,26 (m)	79,90	
4''	70,28	3,08-3,26 (m)	70,30	
5''	81,86	3,08-3,26 (m)	81,80	
6''	61,18	3,70 (d, $J=10,0$ Hz)	61,20	
1'''	100,35	4,98 (s)	100,30	4,97 (s)
2'''	70,51	3,60 (m)	70,50	
3'''	70,67	3,08-3,18 (m)	70,70	
4'''	71,71	2,91 (m)	71,70	
5'''	68,31	2,12-1,09 (m)	68,30	
6'''	17,79	0,47 (d, $J=5,0$ Hz)	17,80	0,46 (d, $J=6,0$ Hz)

*DOYAMA et al., 2005

1.4.1.2.5 Substâncias 8 e 9

A amostra FCL12 (5,0 mg), formada pelas substâncias **8** e **9**, foi obtida na forma de um sólido amarelo a partir da fração obtida com clorofórmio da partição do extrato em etanol de frutos de *C. nemorosa* (2^o coleta). A identificação das substâncias desta fração foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ¹H, RMN de ¹³C (DEPTQ), COSY, HMQC, HMBC e comparação com dados descritos na literatura (FAIDI et al., 2014; KORT et al., 1996).

A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 46) e COSY (Figura 47) de FCN12 revelou um conjunto de dupletos em δ_H 5,88 (*d*, 11 Hz, 1H) e 8,00 (*d*, 11 Hz, 1H) acoplando entre si, o valor da constante de acoplamento é característico de um sistema α,β -insaturado com posicionamento *cis* entre seus hidrogênios. A análise do mapa de correlações do HMQC (Figura 48) de FCN12 mostrou as correlações entre os sinais em δ_H 5,88 e 8,0 com os sinais em δ_C 132 e 120,2, respectivamente, caracterizando a ligação dupla *cis* do ácido (**8**). O anel aromático *para*-substituído de **8** estão representados pelos sinais em δ_H 7,35 (*d*, 8,5 Hz, 2H) e 7,80 (*d*, 8,5 Hz, 2H), sugerindo a presença de derivado de ácido cinâmico (**8**) na amostra FCN12. Ainda no mapa de correlações do HMQC, os sinais em δ_H 6,93 (*d*, 8,5 Hz, 2H) e 7,80 (*d*, 8,5 Hz, 2H) estão correlacionados aos sinais em δ_C 115,9 e 133,7, respectivamente, caracterizando o sistema *para*-substituído do flavonoide (**9**). Os demais sinais de **9** foram observados em δ_H 6,14 (*d*, 2,0 Hz, 1H), 6,25 (*d*, 2,0 Hz, 2H) e 6,75 (*s*, 1H), ligados aos carbonos em δ_C 98,8, 94,3 e 103,8, representam os núcleos 6,8 e 3, respectivamente, da 4',5,7-trihidroxi-flavona ou apigenina (**9**). Este é o primeiro relato da ocorrência destas substâncias nos frutos de *C. nemorosa*.

Embora existam relatos na literatura sobre a ocorrência dos isômeros *cis* de fenilpropanoides como produtos naturais (WONG et al., 2005), acredita-se que a substância **8** tenha sido formada a partir da isomerização por luz do ácido *trans*-cumárico.

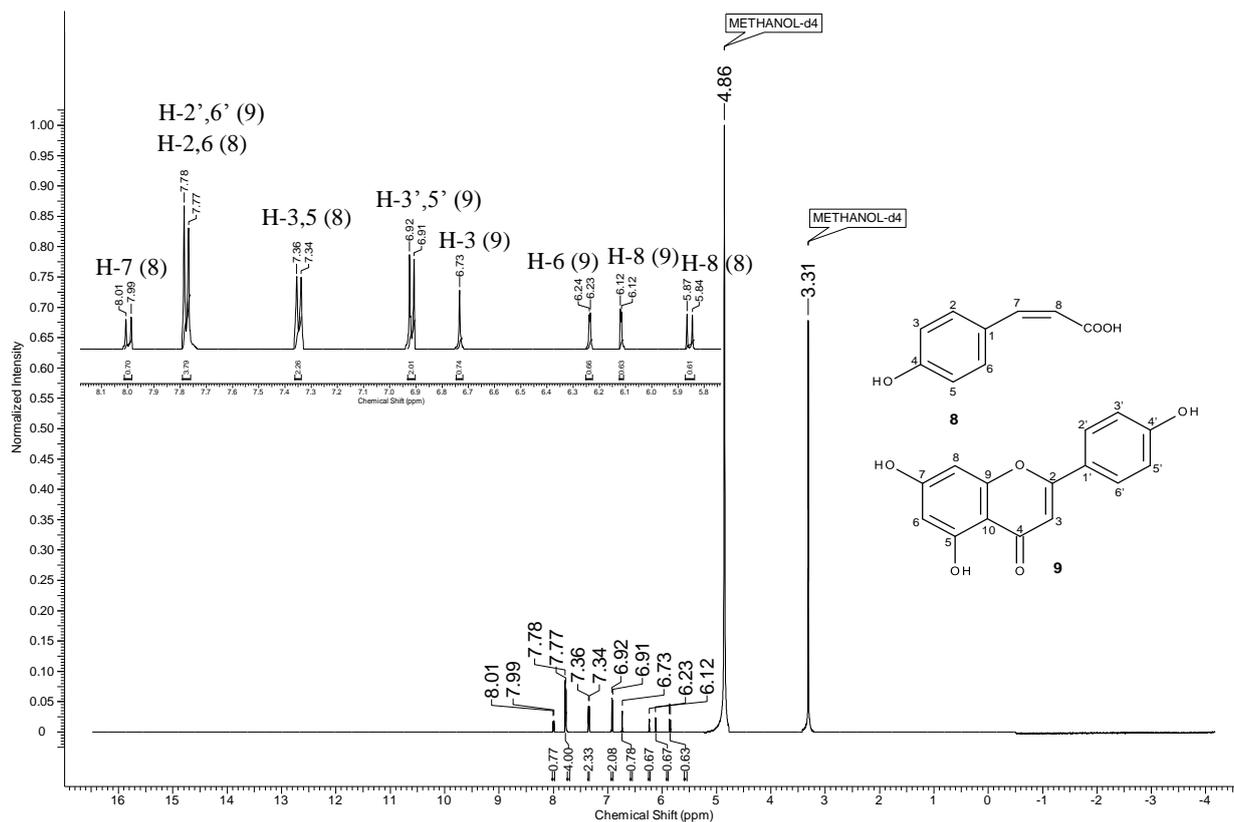


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (500 MHz) de FCN12.

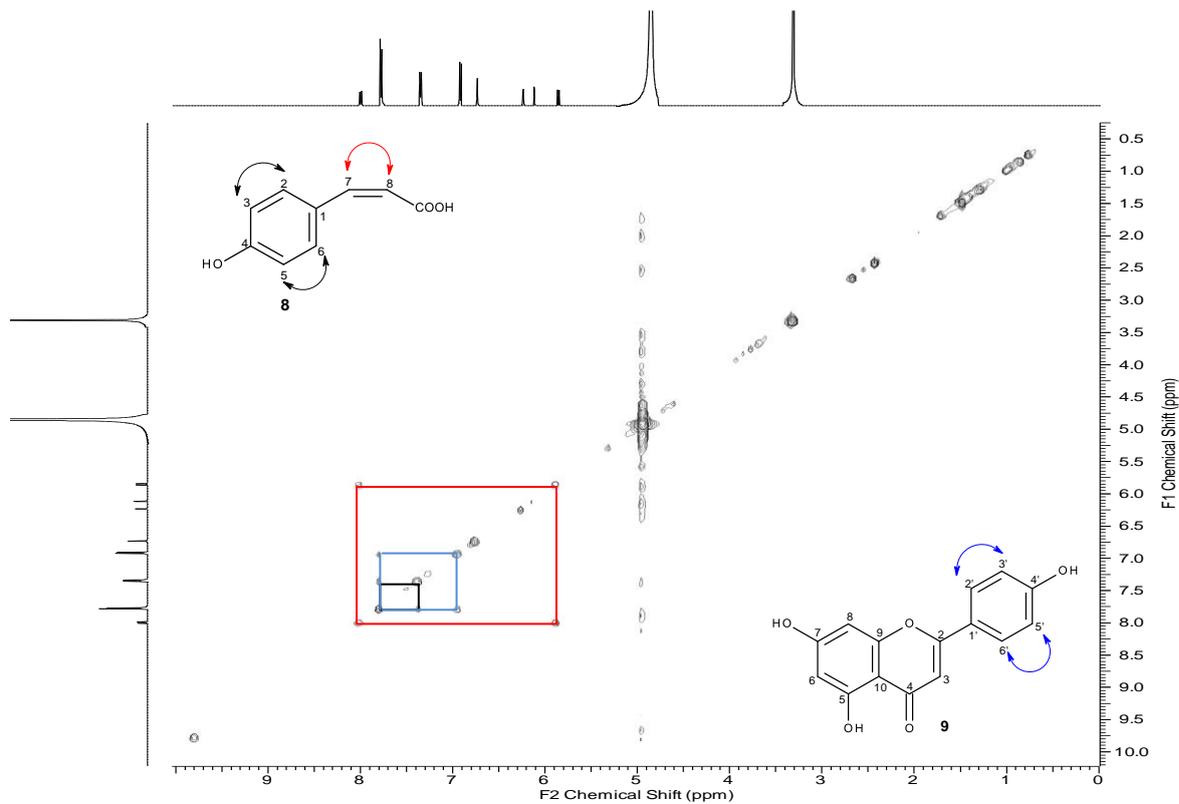


Figura 47. Espectro de COSY ^1H , ^1H em CD_3OD (500 MHz) de FCN12.

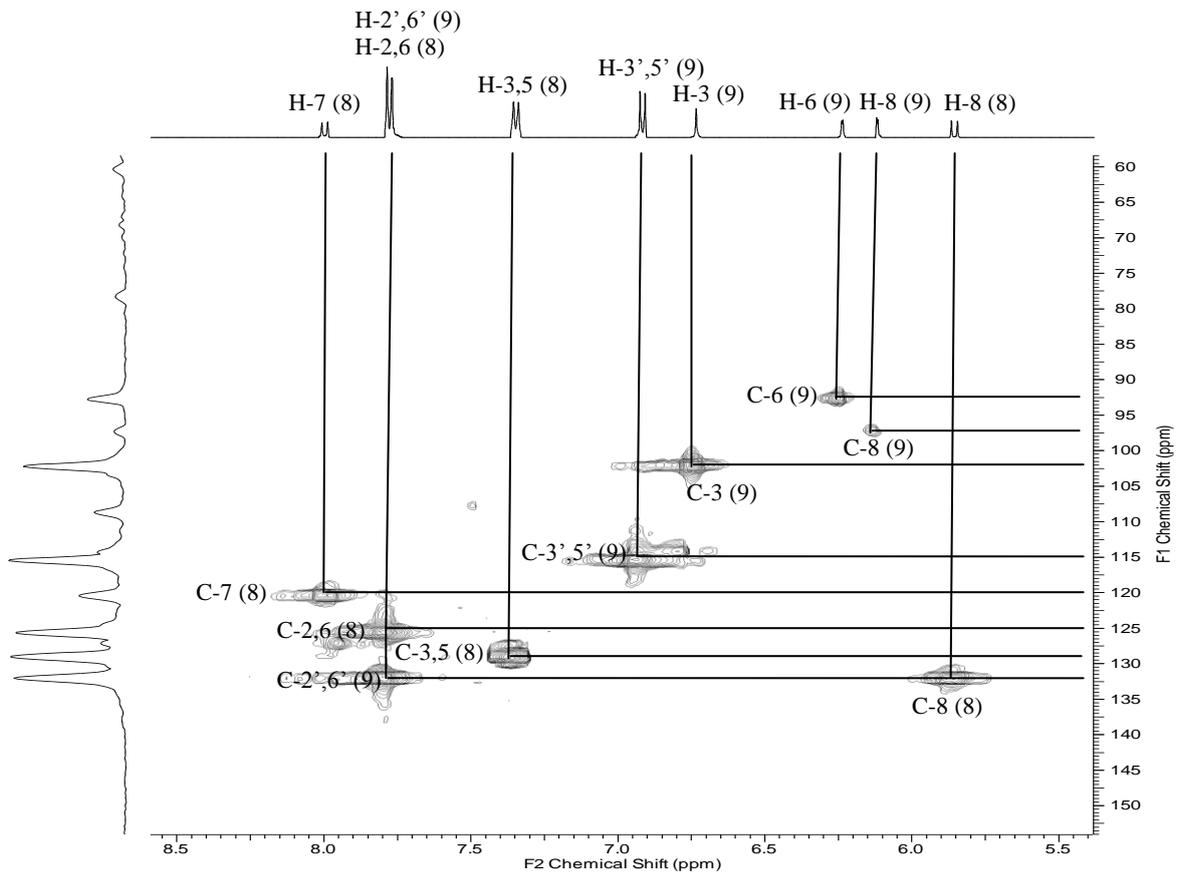


Figura 48. Espectro de HMQC em CD_3OD (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN12.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN12.

Ácido <i>cis</i>-cumárico (8)		
C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	121,6
2	7,80 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	130,7
3	7,35 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	117,0
5	7,35 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	117,0
6	7,80 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	130,7
7	8,00 (<i>d</i> , 11 Hz)	120,4
8	5,88 (<i>d</i> , 11 Hz)	132,2
9	-	172,6

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN12.

Apigenina (9)		
C	δ_{H}	δ_{C}
2	-	166,2
3	6,75 (<i>s</i>)	103,8
4	-	183,6
5	-	165,4
6	6,25 (<i>d</i> , 2,0 Hz)	94,3
7	-	166,2
8	6,14 (<i>d</i> , 2,0 Hz)	98,9
9	-	158,8
10	-	104,2
1'	-	121,6
2'	7,80 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	133,7
3'	6,93 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	115,9
4'	-	164,7
5'	6,93 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	115,9
6'	7,80 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	133,7

1.4.1.2.6 Substância 10

A amostra FCN5 (5,0 mg), substância **10**, foi obtida na forma de um sólido marrom a partir da fração em acetato de etila dos frutos de *C. nemorosa* (1^o coleta). A elucidação estrutural de FCN5 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ¹H, COSY, HMQC, HMBC e comparação com dados descritos na literatura (HADIZADEH et al, 2003).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 49) demonstrou um padrão de deslocamento químico característico de 4',5,7-triidroxiflavonol. O espectro de RMN de ¹H de FCN5 apresentou um par de dupletos em δ_H 8,09 (*d*, *J*=8,5 Hz, H-2' e H-6') e 6,90 (*d*, *J*=8,0 Hz, H-3' e H-5') com constante de acoplamento de hidrogênios *ortho* relacionados e integrando dois hidrogênios cada, caracterizando o padrão de substituição do anel B *para*-substituído, o qual foi confirmado pelos acoplamentos observados no espectro de COSY. Ainda na região de aromáticos, os dupletos em δ_H 6,40 (*d*, *J*=1,5 Hz, 1H) e 6,18 (*d*, *J*=1,5 Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios *meta* relacionados H-6 e H-8 do anel A. No mapa de correlações do HMQC (Figura 50) foram observadas as seguintes correlações em δ_H 6,18 (H-6) com o carbono em δ_C 97,6 (C-6), δ_H 6,40 (H-8) com o carbono em δ_C 93,1 (C-8), δ_H 8,09 (H-2',6') com o carbono em δ_C 129,35 e do sinal em δ_H 6,90 (H-3',5') com o carbono em δ_C 114,74. Comparando os dados obtidos (Tabela 11) com os da literatura (HADIZADEH et al., 2003) foi possível propor para FCN5 a estrutura do canferol (**10**), que esta sendo descrito pela primeira vez nos frutos de *C. nemorosa*.

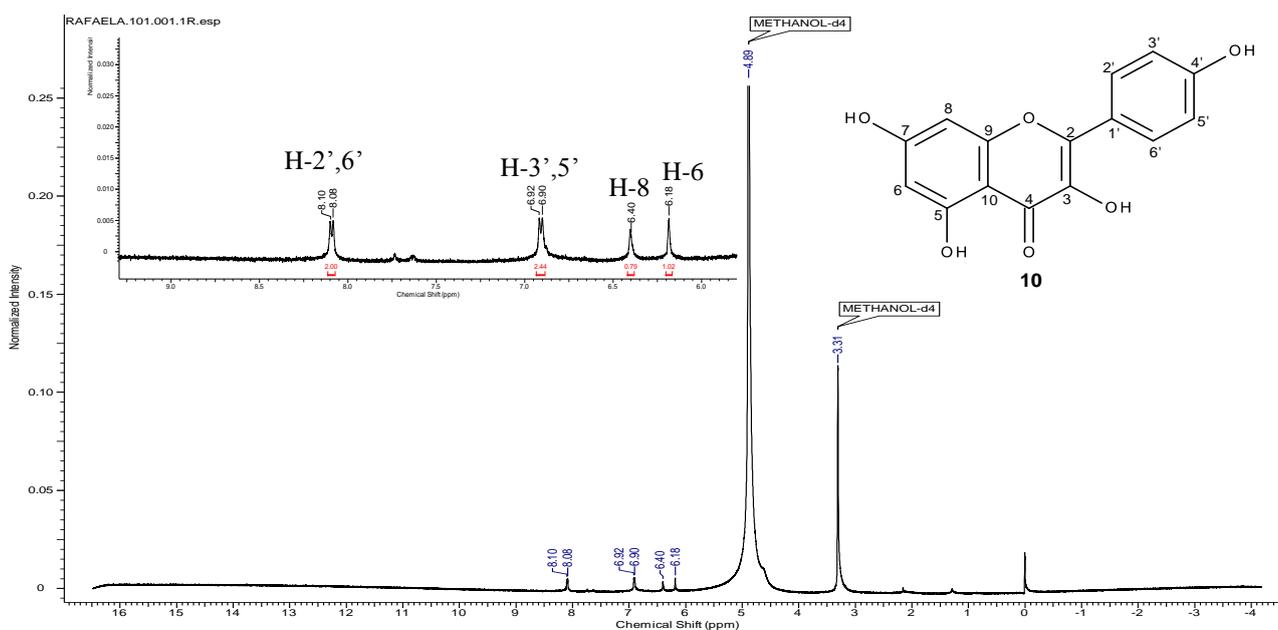


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H em CD₃OD (500 MHz) de FCN5 (Canferol).

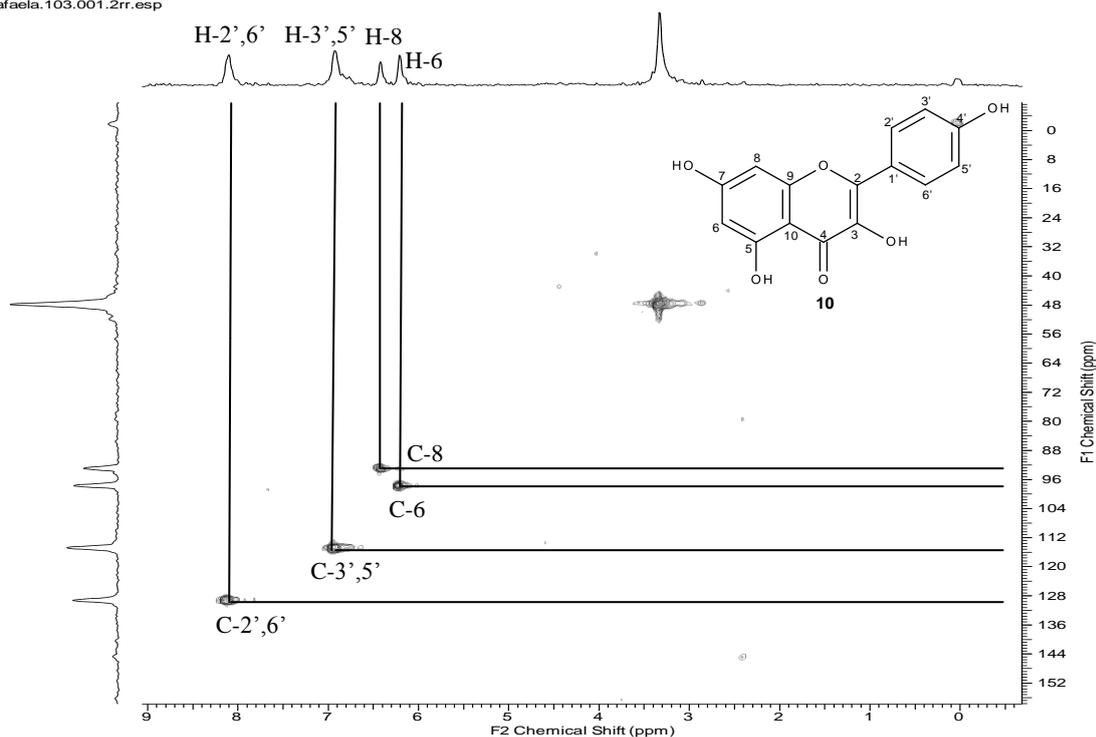


Figura 50. Espectro de HMBC em CD_3OD (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN5 (Canferol).

Tabela 11. Dados de RMN de 1H em CD_3OD (500 MHz) de FCN5 (Canferol).

H	Canferol (10)	Literatura (CD_3OD)*
	δ_H	δ_H
6	6,18 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz)	6,28 (<i>d</i> , $J=2,0$ Hz)
8	6,40 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz)	6,48 (<i>d</i> , $J=2,0$ Hz)
2'	8,09 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)	8,05 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)
3'	6,90 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	6,95 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)
5'	6,90 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	6,95 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)
6'	8,09 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)	8,05 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)

*HADIZADEH et al., 2003

1.4.1.2.7 Substância 11

A amostra FCN6 (3,0 mg), substância **11**, foi obtida na forma de um sólido amarelo a partir da fração em acetato de etila de frutos de *C. nemorosa* (1^o coleta). A elucidação estrutural de FCN6 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ¹H e comparação com dados descritos na literatura (KALEGARI et al., 2011).

As informações que permitiram a proposta de elucidação estrutural de FCN6 (**11**) foram fornecidas pela análise do espectro de RMN de ¹H, que demonstrou um padrão de deslocamentos químicos característicos de 4',5',5,7-tetrahidroxiflavonol. O espectro de RMN de ¹H (Figura 51) de FCN6 revelou sinais entre δ_H 7,73 e 6,17 que são típicos de sistemas aromáticos. Os sinais em δ_H 7,73 (*d*, *J*=2,0 Hz, 1H), 7,63 (*dd*, *J*=8,5 e 2,0 Hz, 1H) e 6,88 (*d*, *J*=8,5 Hz, 1H) foram atribuídos aos H-2', H-6' e H-5' do anel B trissubstituído, respectivamente, de um flavonoide. Os dupletos observados em δ_H 6,38 (*d*, *J*=2,0 Hz, 1H) e δ_H 6,18 (*d*, *J*=2,0 Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios meta relacionados H-6 e H-8 do anel A. Estes dados (Tabela 12) e a comparação com dados prescritos na literatura (KALEGARI et al., 2011) sugerem que FCN6 seja o flavonol conhecido como quercetina (**11**), este flavonoide esta sendo relatado pela primeira vez nos frutos de *C. nemorosa*.

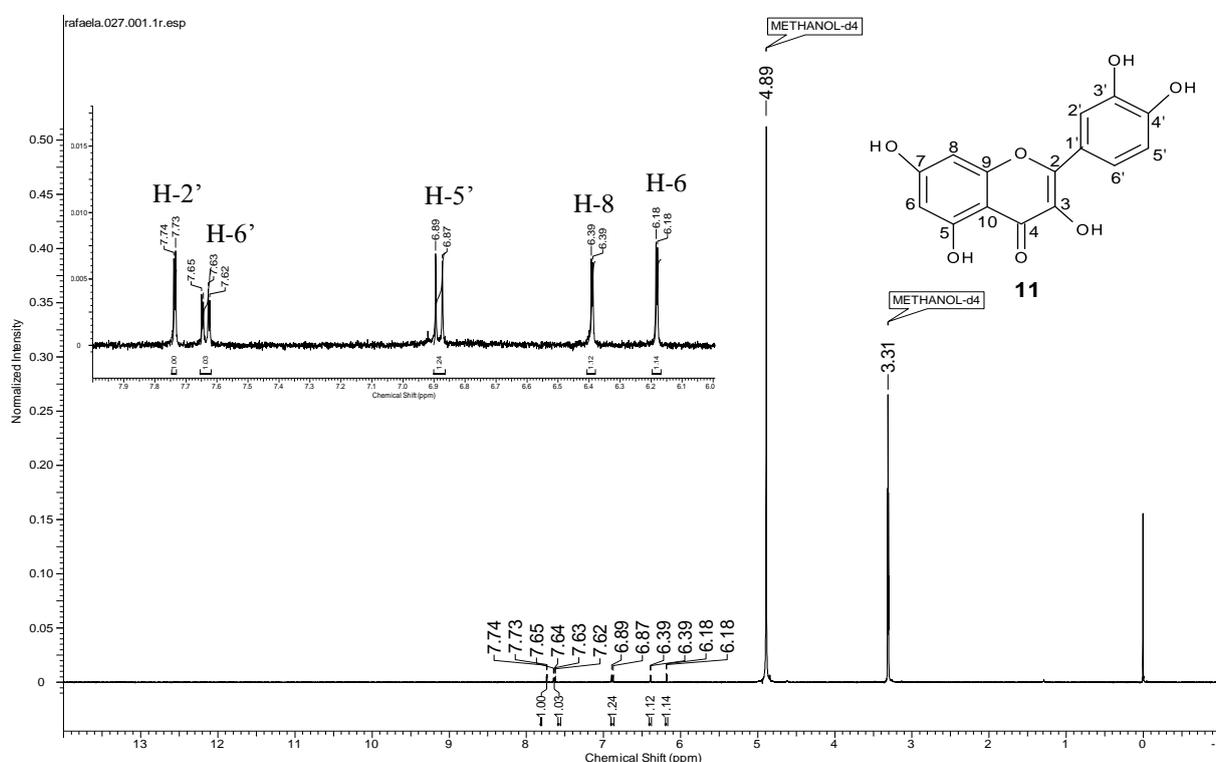


Figura 51. Espectro de RMN de ¹H em CD₃OD (400 MHz) de FCN6 (Quercetina).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H em CD_3OD (400 MHz) de FCN6(Quercetina).

H	Quercetina (11)	Literatura (CD_3OD)*
	δ_{H}	δ_{H}
6	6,18 (<i>d</i> , $J=2,0$ Hz)	6,17 (<i>d</i> , $J=2,1$ Hz)
8	6,38 (<i>d</i> , $J=2,0$ Hz)	6,36 (<i>d</i> , $J=2,1$ Hz)
2'	7,73 (<i>d</i> , $J=2,0$ Hz)	7,72 (<i>d</i> , $J=2,1$ Hz)
5'	6,88 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)	6,8 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz)
6'	7,63 (<i>dd</i> , $J=8,5$ e $2,0$ Hz)	7,6 (<i>dd</i> , $J=8,7$ e $2,1$ Hz)

*KALEGARI et al., 2011

1.4.1.3 Biflavonoides

1.4.1.3.1 Substâncias 12 e 13

A amostra FCP2 (40,0 mg), substância **12**, e FCP3 (35,0 mg), substância **13**, foram obtidas na forma de um sólido amarelo a partir da fração em acetato de etila obtida da partição do extrato em etanol de frutos de *C. paralicola*. A elucidação estrutural de FCP2 e FCP3 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), EM, CD e comparação com dados descritos na literatura (CHEN et al., 1975).

Os espectros de UV dos compostos FCP2 (**12**) e FCP3 (**13**) são típicos de flavonoides com máximo de absorbância em 290 nm de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguido de um ombro em 334 nm de transição $n \rightarrow \pi^*$ (MABRY et al., 1970), enquanto que na análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) em modo positivo (Figura 52 e Figura 54, respectivamente) observou-se o pico referente ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 721 e 705 correspondentes a fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$ e $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$, respectivamente. Adicionalmente, em ESI-MS/MS foram observados os picos com m/z 559 e 543 para FCP2 e FCP3, sugerindo a perda de glicose, além de outros fragmentos característicos de Retro-Diels-Alder (RDA) (Figura 53; Figura 55). As estruturas foram propostas por análises detalhadas dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 56-59; Figura 61; Figuras 66-69; Figura 70) em conjunto com experimentos de RMN bidimensionais (^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 56-59) de FCP2 exibiu simpletos referentes a hidrogênios de grupos OH, sendo dois sinais em δ_{H} 12,20 e 11,66 característicos de hidroxilas queladas com carbonila OH-C(5) e OH-C(5''), dois sinais em δ_{H} 9,49 e 9,44 atribuídos a hidroxilas livres, e ainda um duplete em δ_{H} 5,85 ($J=6,5$ Hz) referente a OH em carbono metínico (HO-3''). A presença desses sinais e considerando que espécies da família Clusiaceae produzem biflavonoides, serviram para direcionar a análise dos espectros para propor a estrutura de FCP2 como um dímero de flavonoide. Os dupletos observados em δ_{H} 7,23, 7,18, 6,68 e 6,60 ($J=8,5$ Hz) podem ser atribuídos ao sistema de spins do tipo AA'BB' correspondentes aos anéis B *para*-substituídos H-2'''/6'', H-2'/6', H-3'''/5'' e H-3'/H-5', respectivamente. Dois dupletos referentes a dois hidrogênios em δ_{H} 5,89 e 5,76 ($J=2,0$ Hz) foram atribuídos aos H-6 e H-8. O H-6'' exibiu um simpleto em δ_{H} 6,21. Similarmente, os três dupletos remanescentes observados em δ_{H} 5,45 ($J=12$ Hz), 5,06 ($J=12$ Hz), 5,03 ($J=11$ Hz) e um duplo duplete em δ_{H} 4,30 ($J_1=11$ e $J_2=6$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, foram atribuídos aos H-2, H-2'', H-3 e H-3'', respectivamente. A constante de acoplamento vicinal (11-12 Hz) J (H-C(2), H-C(3)) e J (H-C(2''), H-C(3'')) estabelece um arranjo trans-diaxial para

estes pares. Os sinais para a β -D-glicose foram bem característicos. O hidrogênio de carbono anomérico apareceu em δ_{H} 4,72 (*d*, $J = 7,5$ Hz) e os demais hidrogênios se concentraram na região de δ_{H} 3,15 – 3,48. O espectro de APT (Figura 61) exibiu sinais em δ_{C} 198,21 e 196,91, típicos de grupos carbonilas de flavanonas substituídas em C-3. Os sinais em δ_{C} 129,76, 128,32, 114,95 e 114,80 podem ser atribuídos aos carbonos 2',6',2'',6'',3',5',3''' e 5''' dos anéis IB e IIB do sistema AA'BB', respectivamente. Os sinais em δ_{C} 72,43 e 46,70 são referentes aos carbonos alifáticos das unidades 3-hidroxi-flavanona e flavanona, respectivamente. Similarmente, os sinais em δ_{C} 82,75 e 82,07 foram atribuídos ao C-2'' e C-2, respectivamente. Os sinais de RMN de ^1H (Figuras 66-69) e ^{13}C (Figura 70) para o composto FCP3 são similares aos de FCP2, exceto pelos sinais observados em δ_{H} 5,48 (1H, *dd*, $J = 12,5$ e 3 Hz), 3,05 (1H, *dd*, $J = 17,5$ e 13 Hz) e 2,75 (1H, *dd*, $J = 17,5$ e 3 Hz) e δ_{C} 42,12. Este é o segundo relato sobre o biflavonoide GB1-7''-O-glicopiranosídeo (FCP2) (Tabela 13) que foi previamente identificado em *Garcinia kola* (Clusiaceae) (OKUNJI et al., 2002), já 3,8''-binaringenina-7''-O-glicopiranosídeo ou GB1a-7''-O-glicopiranosídeo (FCP3) (Tabela 14) foi previamente isolado de *Garcinia multiflora* (Clusiaceae) (CHEN et al., 1975).

As configurações absolutas dos biflavonoides foram determinadas com o auxílio de análises de Dicroísmo Circular (CD) (Figuras 71 e 72) e por comparação com dados descritos na literatura para análogos estruturais (FERRARI et al., 2003; MBWAMBO et al., 2006). Os biflavonoides foram identificados como 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*-GB1-7''-O-glicopiranosídeo (**12**) e 2*R*, 3*S*, 2''*S*-GB1a-7''-O-glicopiranosídeo (**13**).

Os biflavonoides do tipo 3→8'', além de atuarem como verdadeiros marcadores quimiosistemáticos da família Clusiaceae, apresentam importantes atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como, analgésicos, anticancerígenos e antioxidantes (GONTIJO et al, 2012; ITO et al., 1999; LIN et al., 1997).

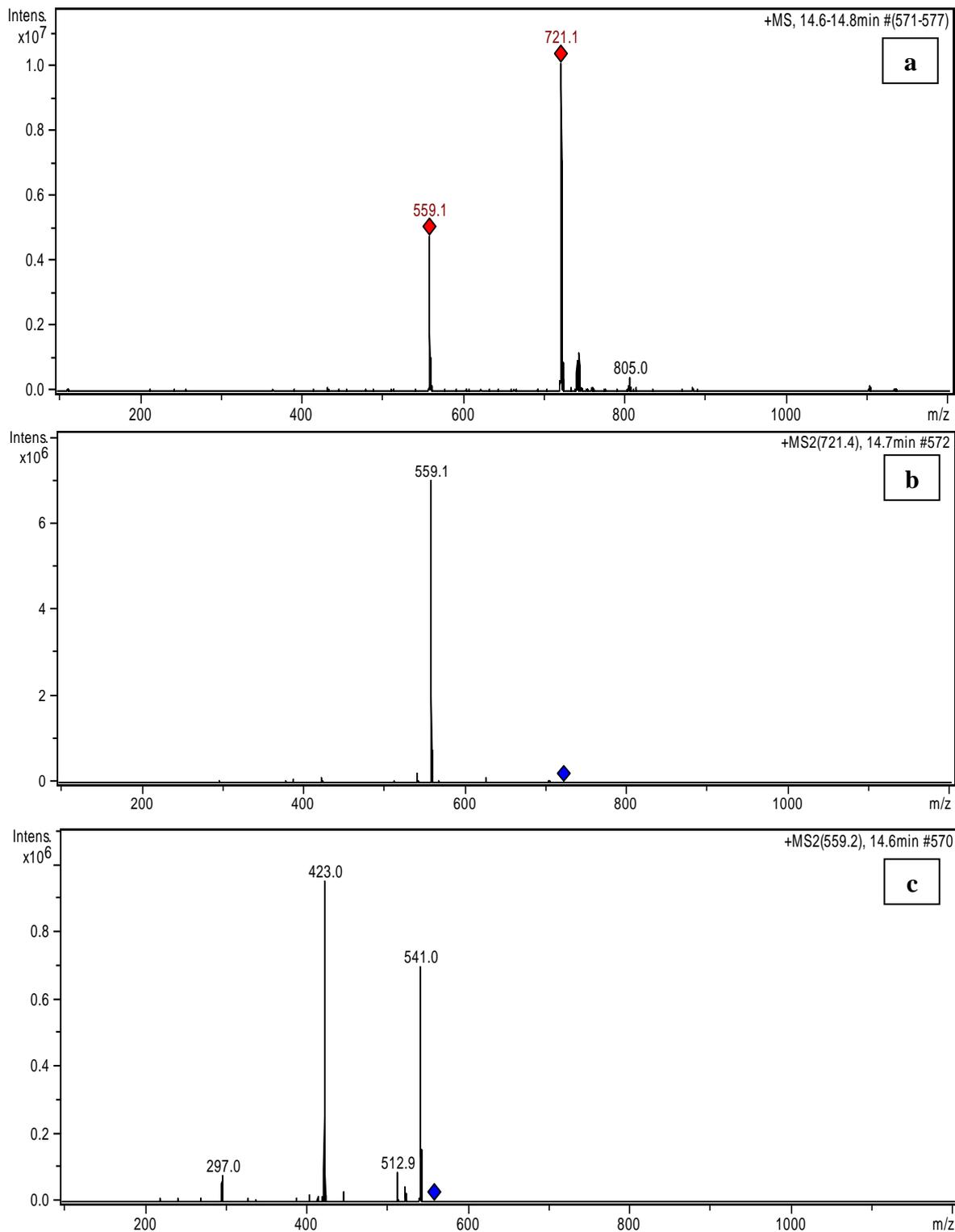


Figura 52. a. Espectro de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo). **b.** Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 721,4. **c.** Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 559,2.

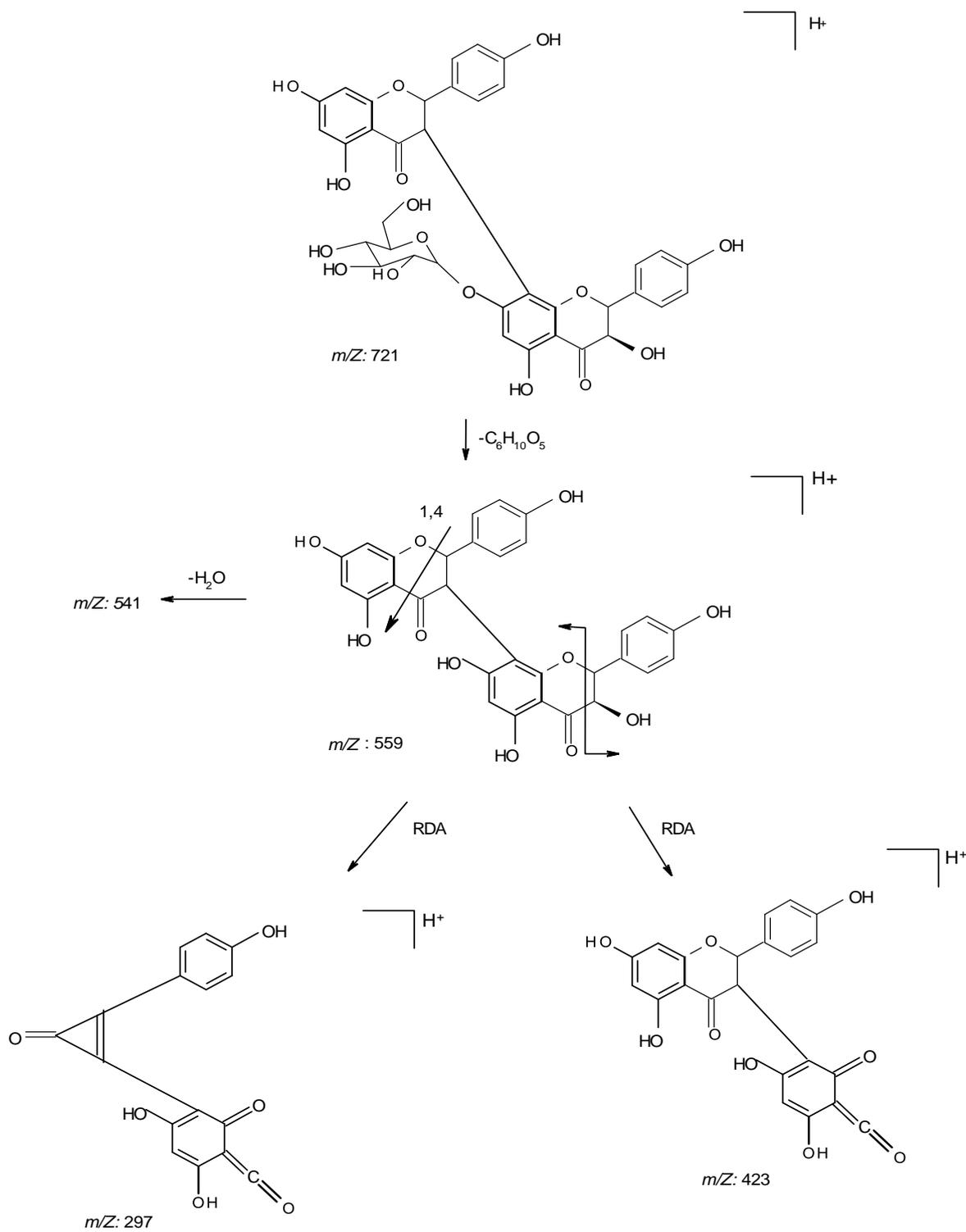


Figura 53. Proposta de fragmentação de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo). Adaptada de JACKSON et al. 1971.

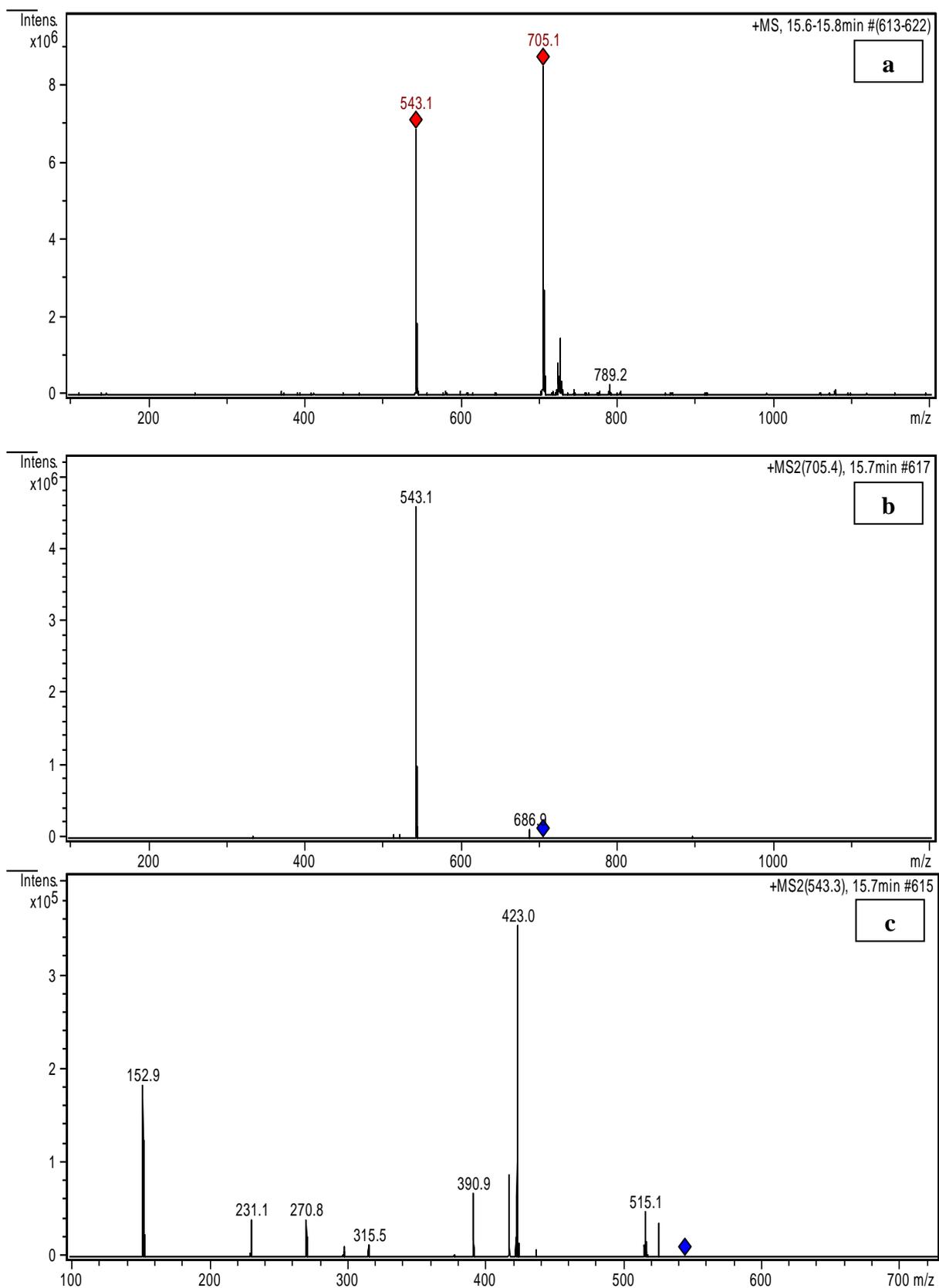


Figura 54. **a.** Espectro de massas por ionização em eletrospray (LC-ESI-MS/MS) de FCP3 (GB1a-7^{''}-*O*-glicopiranosídeo). **b.** Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 705,4. **c.** Espectro de massas EM/EM do íon com m/z 543,3.

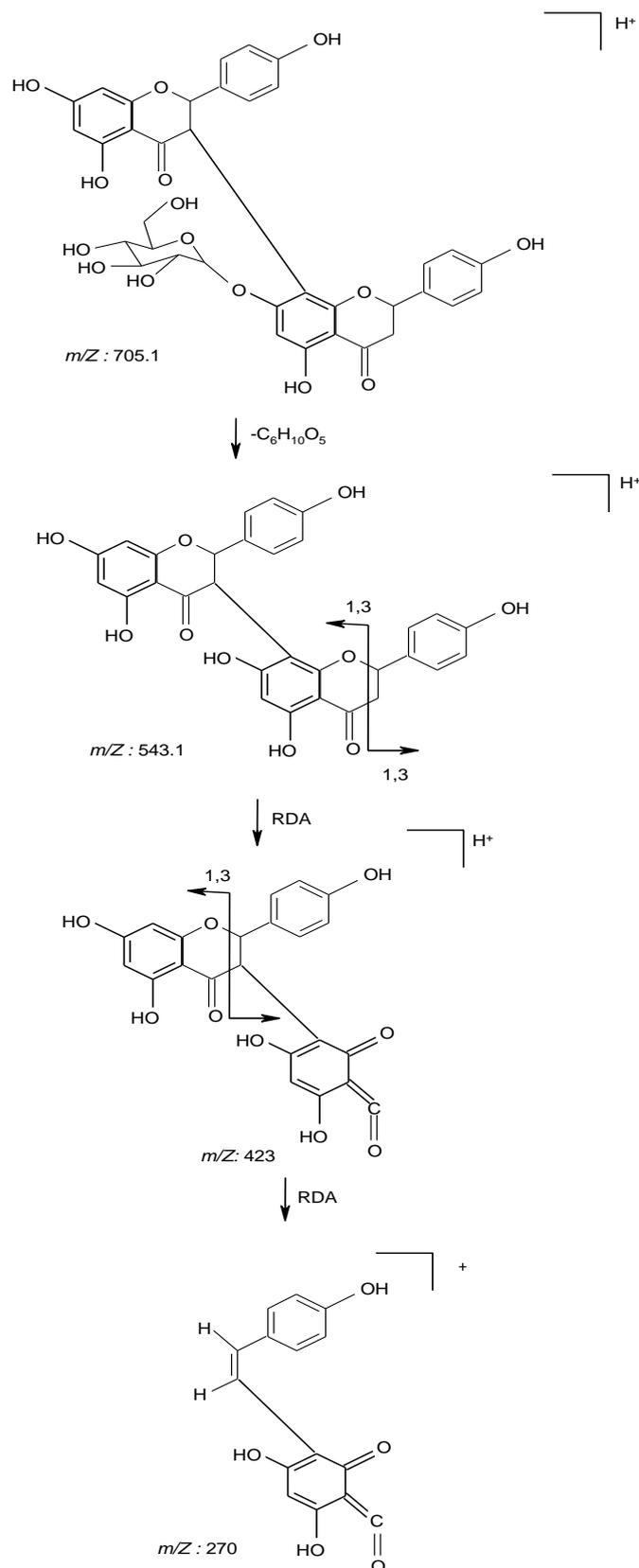


Figura 55. Proposta de fragmentação de FCP3 (GB1a-7^{''}-O-glicopiranosídeo). Adaptada de JACKSON et al. 1971.

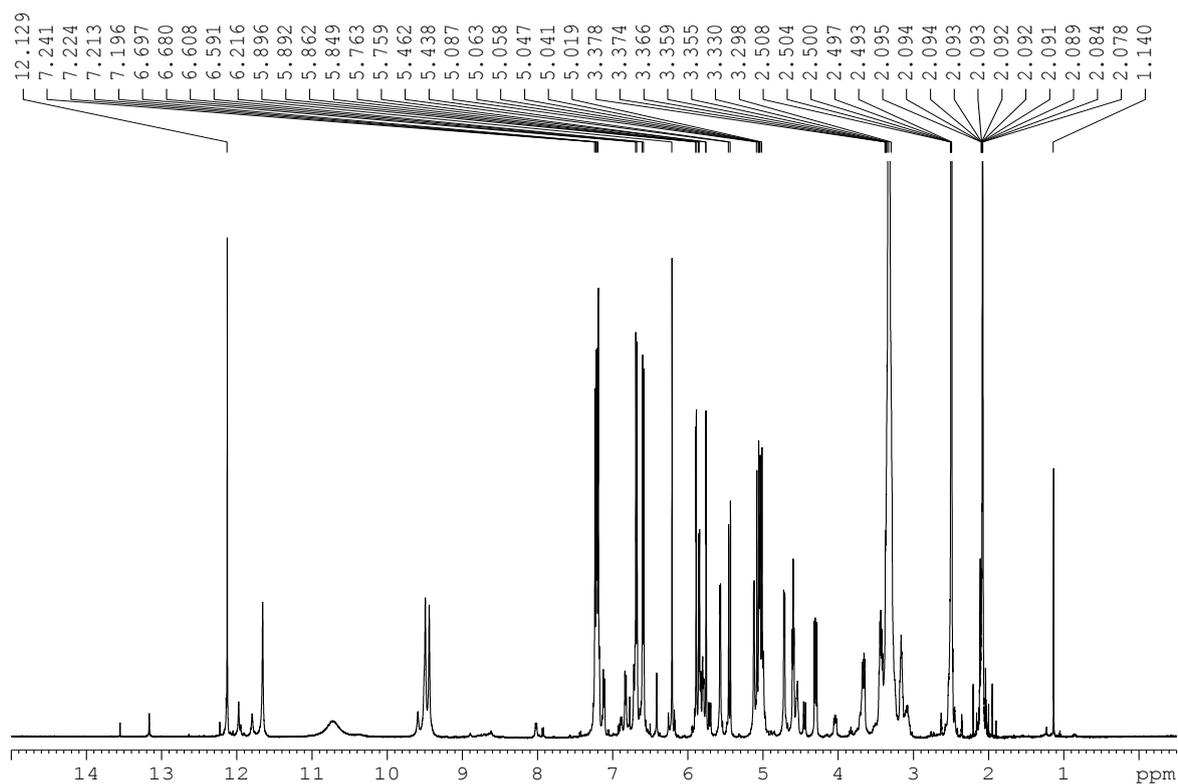


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo).

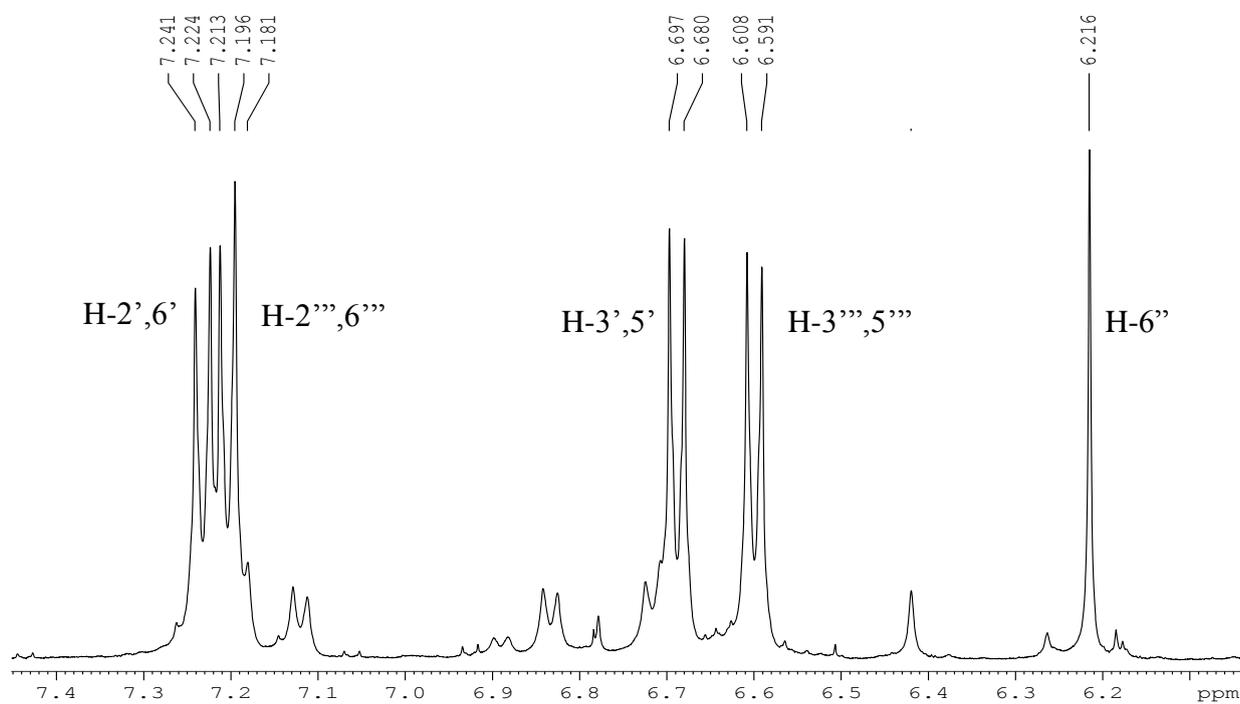


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (7,5 – 6,0 ppm).

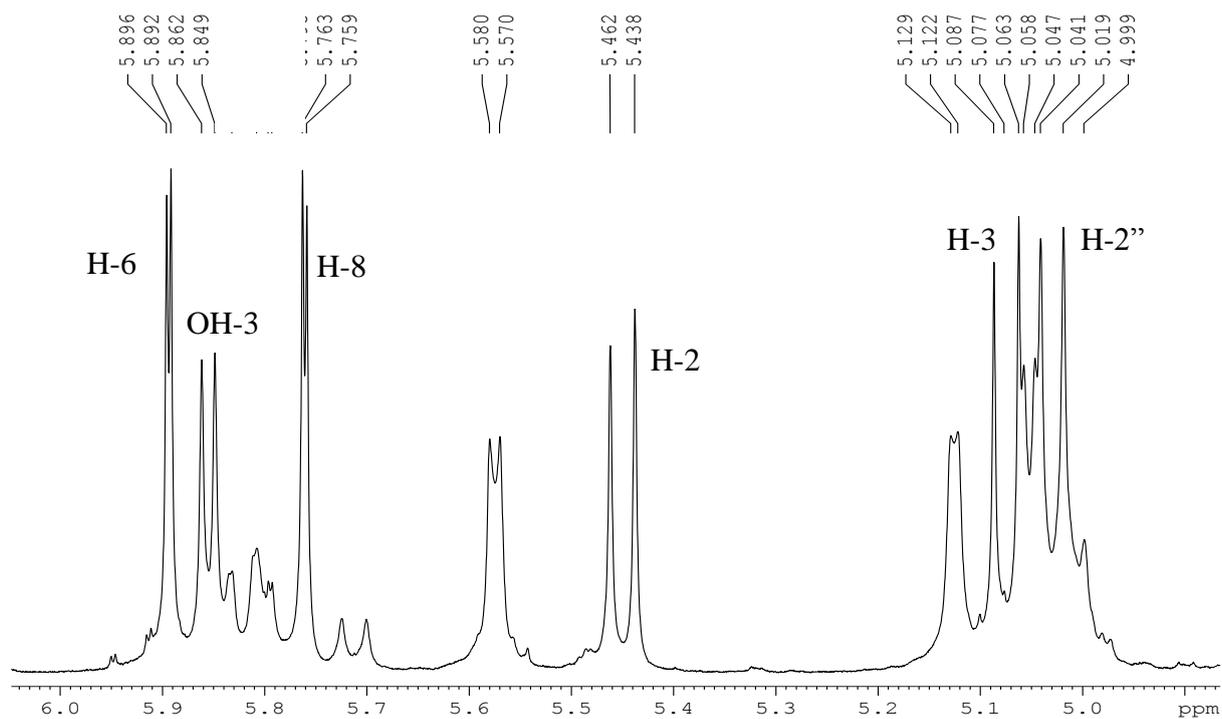


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (6,0 – 4,9 ppm).

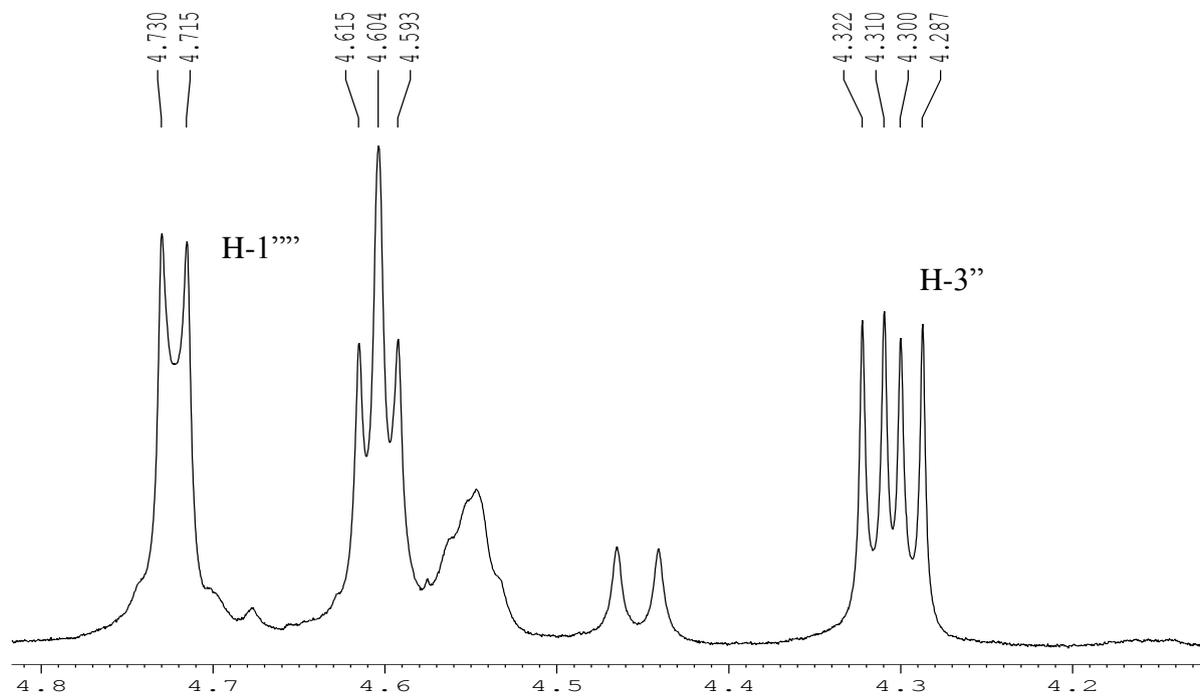


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (4,8 – 4,3 ppm).

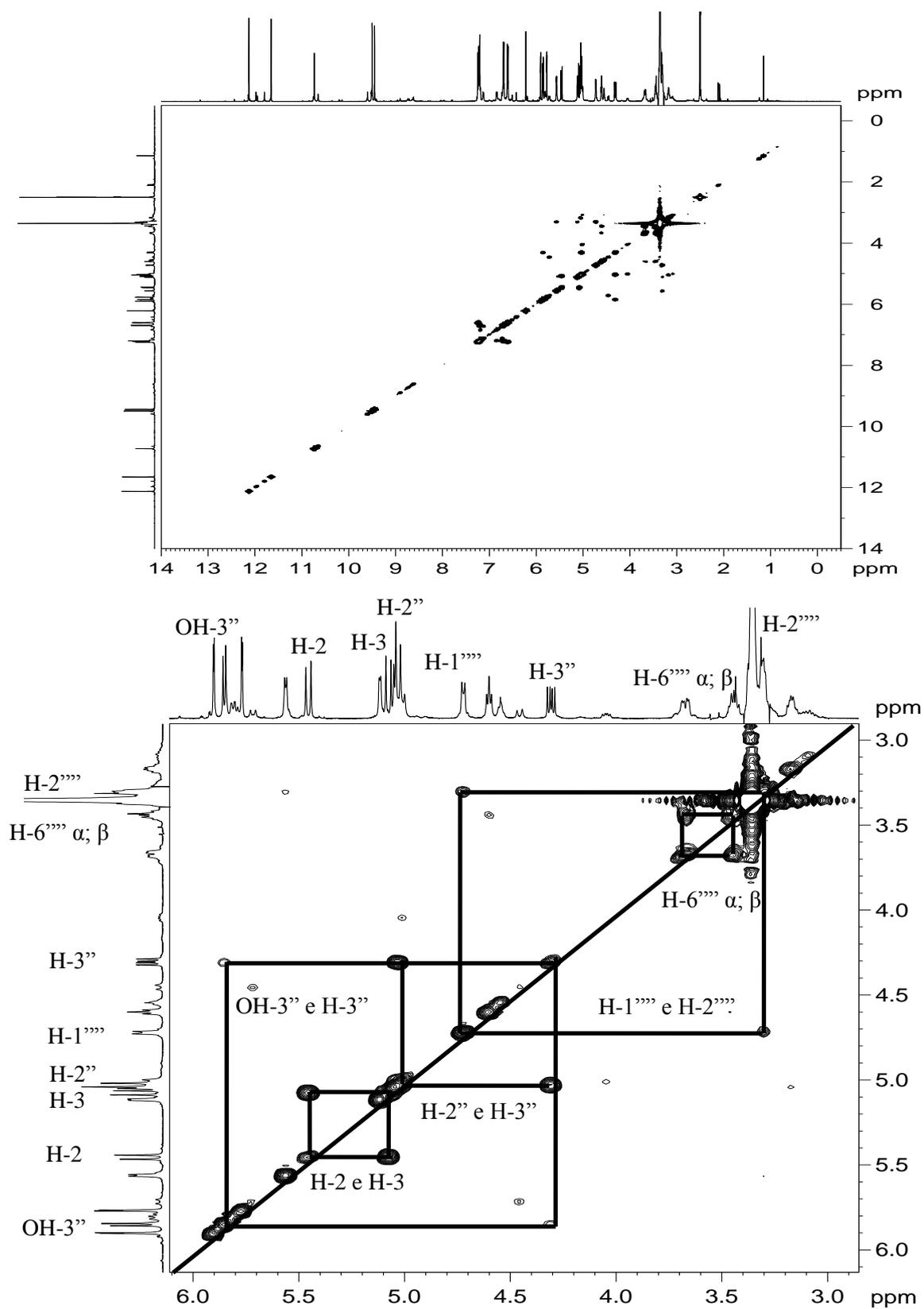


Figura 60. Espectro de COSY ^1H , ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo).

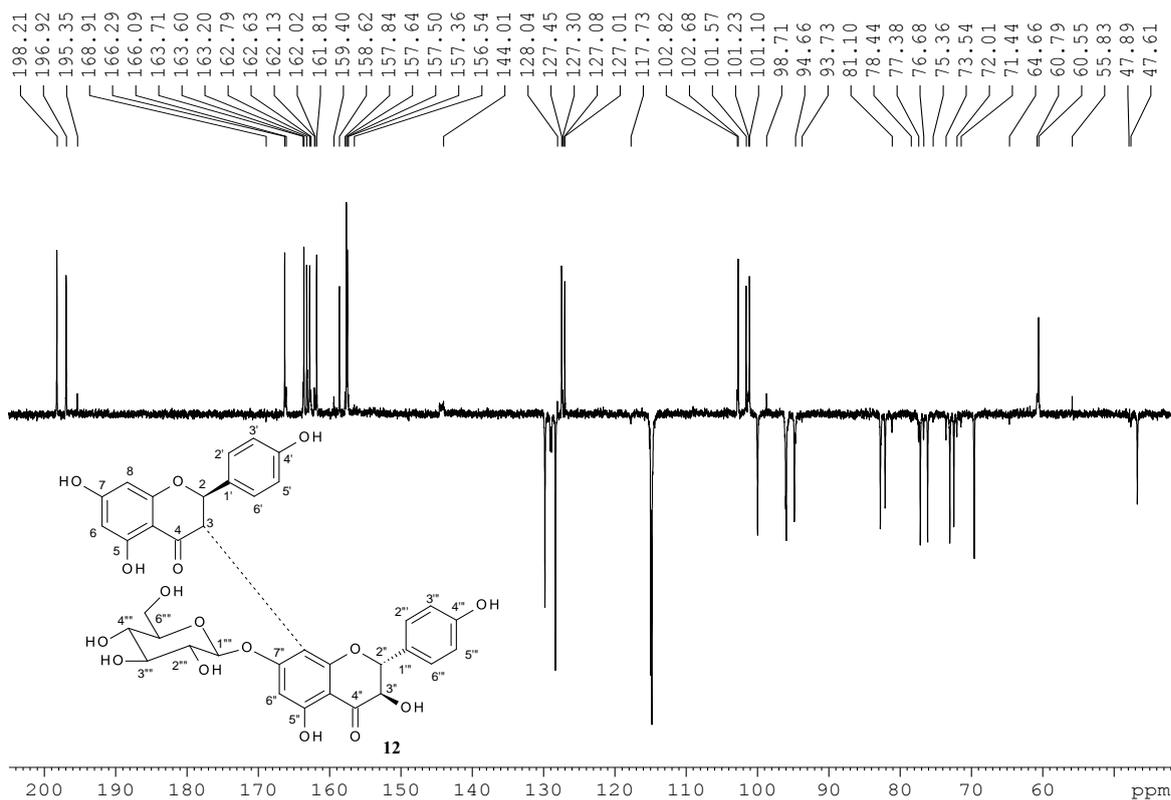


Figura 61. Espectro de APT em DMSO- D_6 (75 MHz) de FCP2 (GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo).

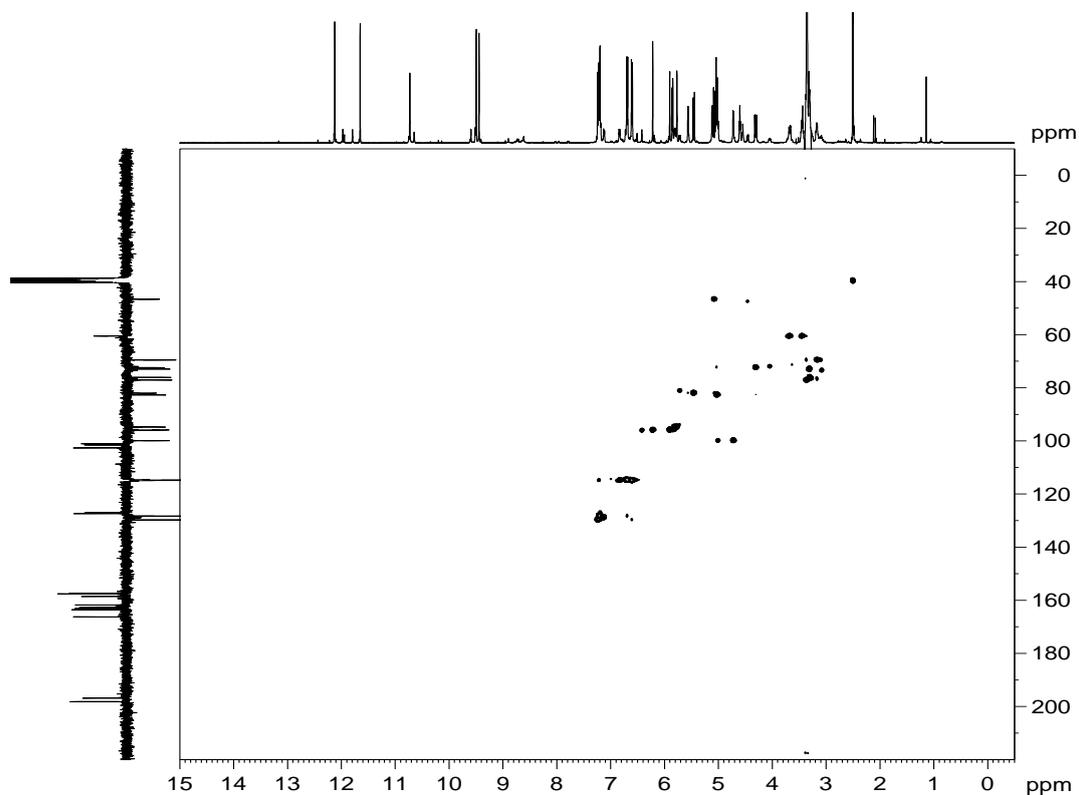


Figura 62. Espectro de HSQC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo).

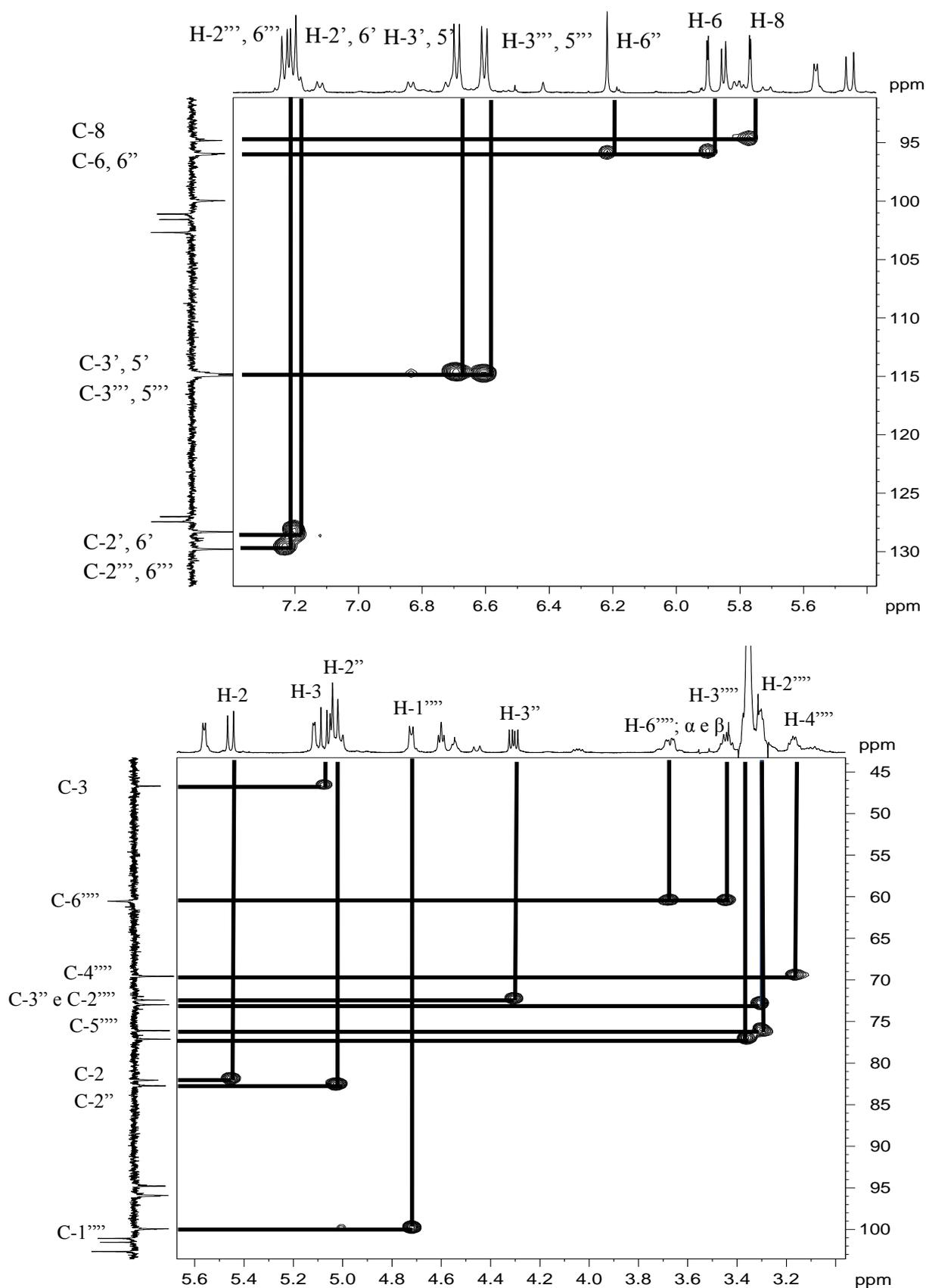


Figura 63. Espectro de HSQC em DMSO-*D*₆ (RMN de ¹H: 500 MHz, RMN de ¹³C: 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo).

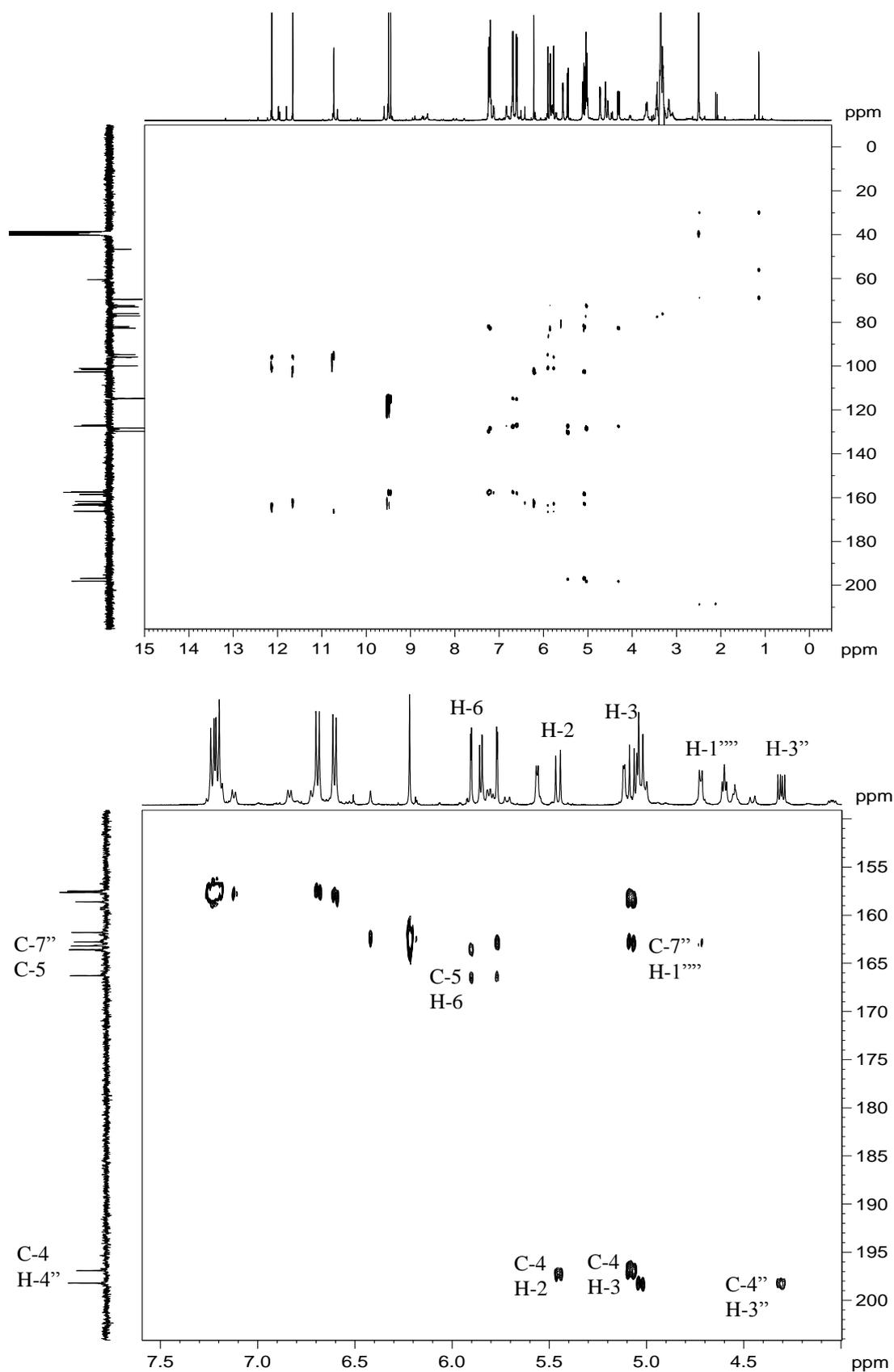


Figura 64. Espectro de HMBC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo).

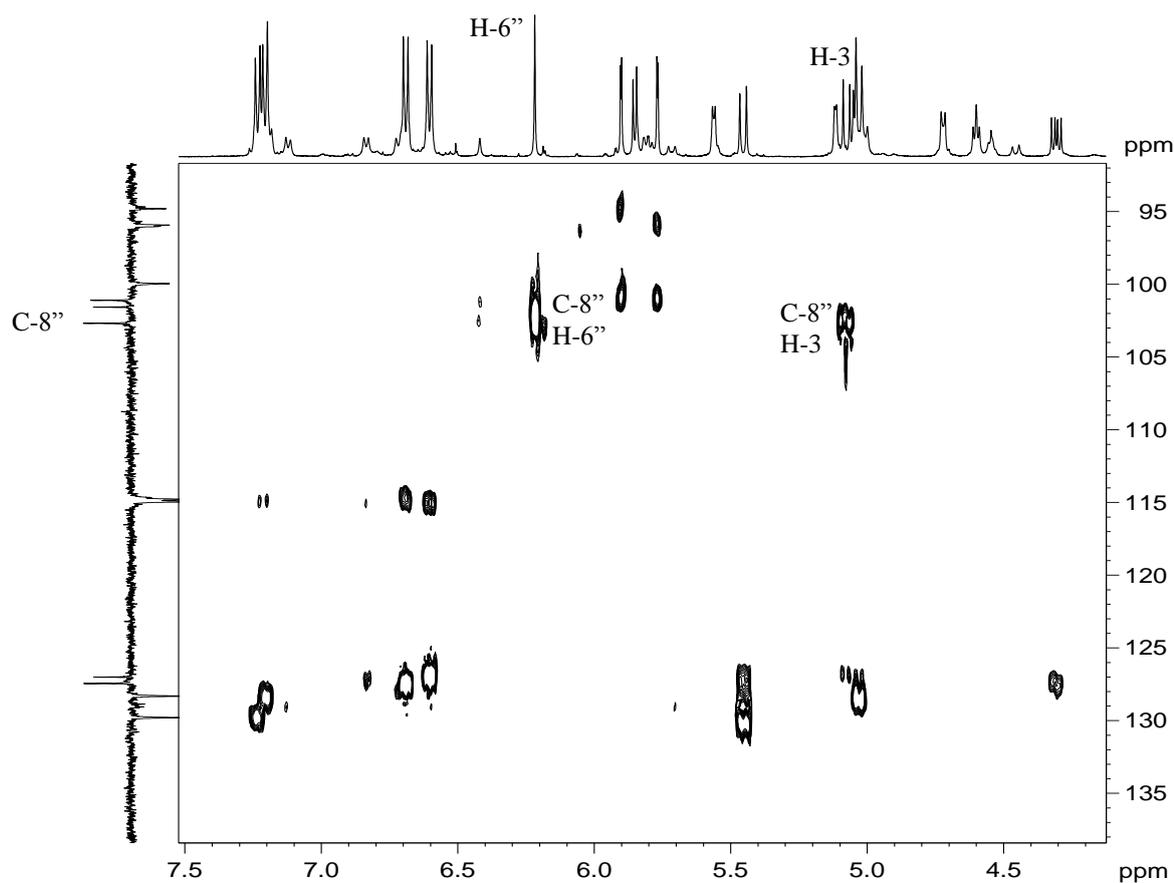


Figura 64. Espectro de HMBC em DMSO- D_6 (RMN de 1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCP2 (GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo).

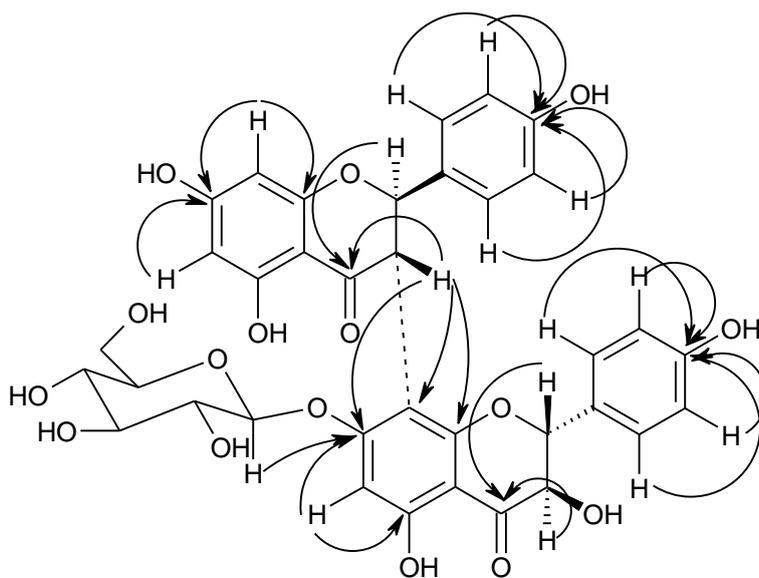


Figura 65. Algumas correlações ($^{2,3}J_{CH}$) observadas no espectro de HMBC de FCP2 (GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCP2 (GB1-7''-O-glicopiranosídeo).

C	$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMQC-}^1J_{\text{CH}}$		$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC-}^nJ_{\text{CH}}$	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
4	196,92	-	H-3	H-2
5	163,60	-	H-6	
7	168,91	-	H-6, H-8	
9	163,20	-	H-8	
10	101,10	-		H-6, H-8
1'	127,01	-		H-3';5'
4'	157,64	-	H-3'; 5'	H-2'; 6'
1''	127,45	-	H-2''	H-3''',5'''
4''	198,21	-	H-3''	H-2''
5''	161,81	-	H-6	
7''	162,79	-	H-6''	H-1''', H-3
8''	102,68	-	H-3	H-6''
9''	158,62	-		H-3
10''	101,57	-		H-6''
4'''	157,50	-	H-3''';5'''	H-2''';6''
CH				
2	82,07	5,45 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12)		H-4
3	46,70	5,06 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12)	H-8'', H-4	H-7'', H-9''
6	95,93	5,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2)		H-8, H-10
8	94,81	5,75 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2)	H-7, H-9	H-6, H-10
2',6'	129,76	7,23 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)		H-2, H-4'
3',5'	114,80	6,60 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	H-4'	H-1'
2''	82,75	5,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11)	H-1''	H-4''
3''	72,43	4,3 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11 e 6)	H-4''	
6''	96,02	6,22 (<i>s</i>)	H-7''	H-8'', H-10''
2''',6'''	128,32	7,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)		H-4'''
3''',5'''	114,95	6,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	H-4'''	H-1'''
1''''	99,95	4,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,5)	H-7''	
2''''	73,00			
3''''	77,14			
4''''	69,57			
5''''	76,11			
6'''' α	60,55	3,7 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 10,5 e 5)		
β		3,44 (<i>m</i>)		

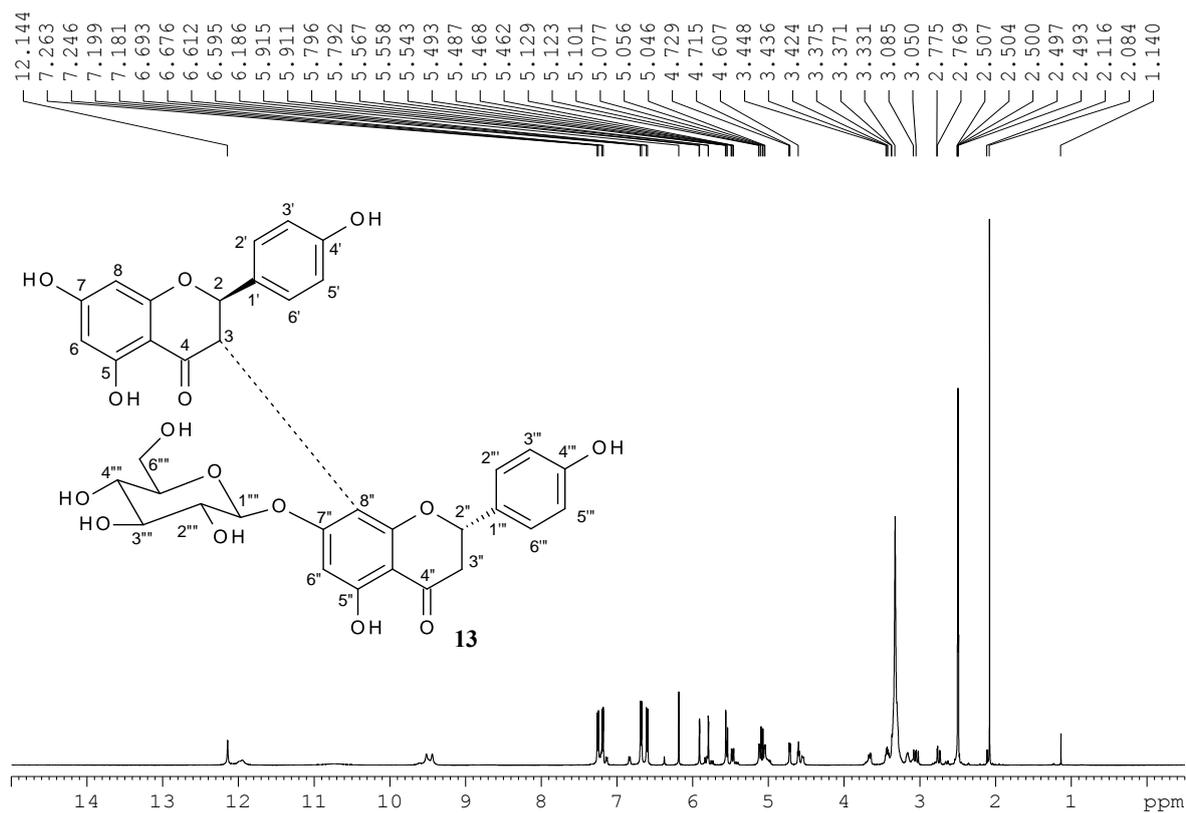


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo).

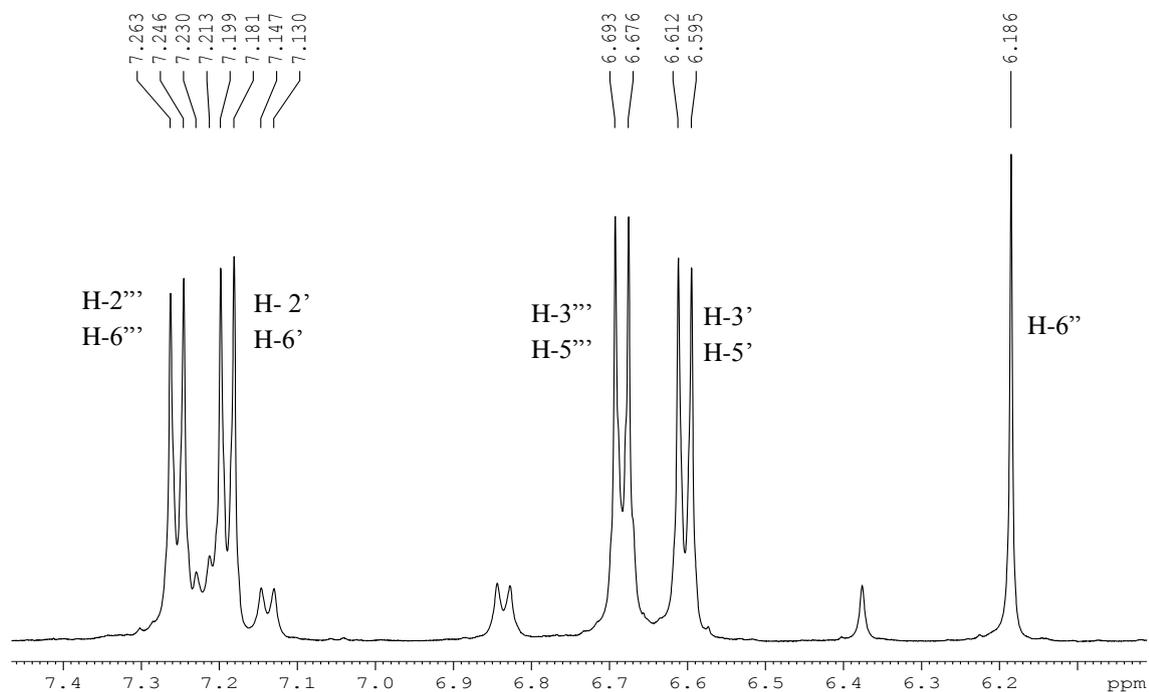


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (7,4 – 6,1 ppm).

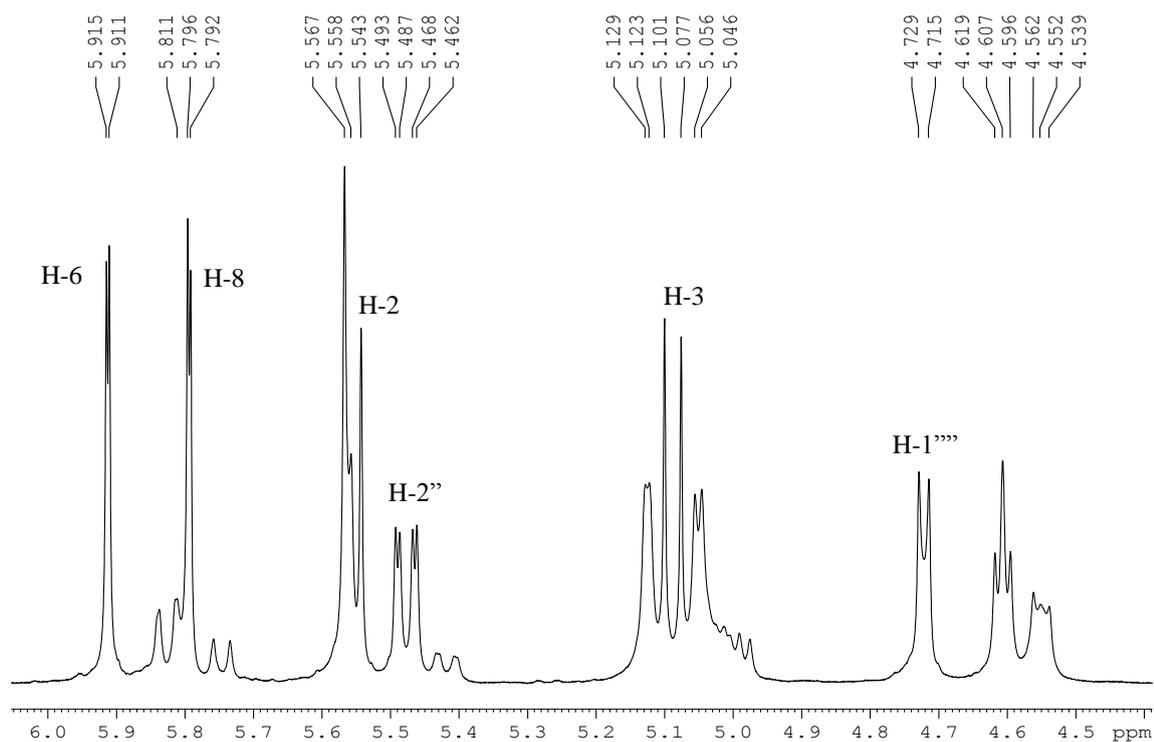


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (6,0 - 4,4 ppm).

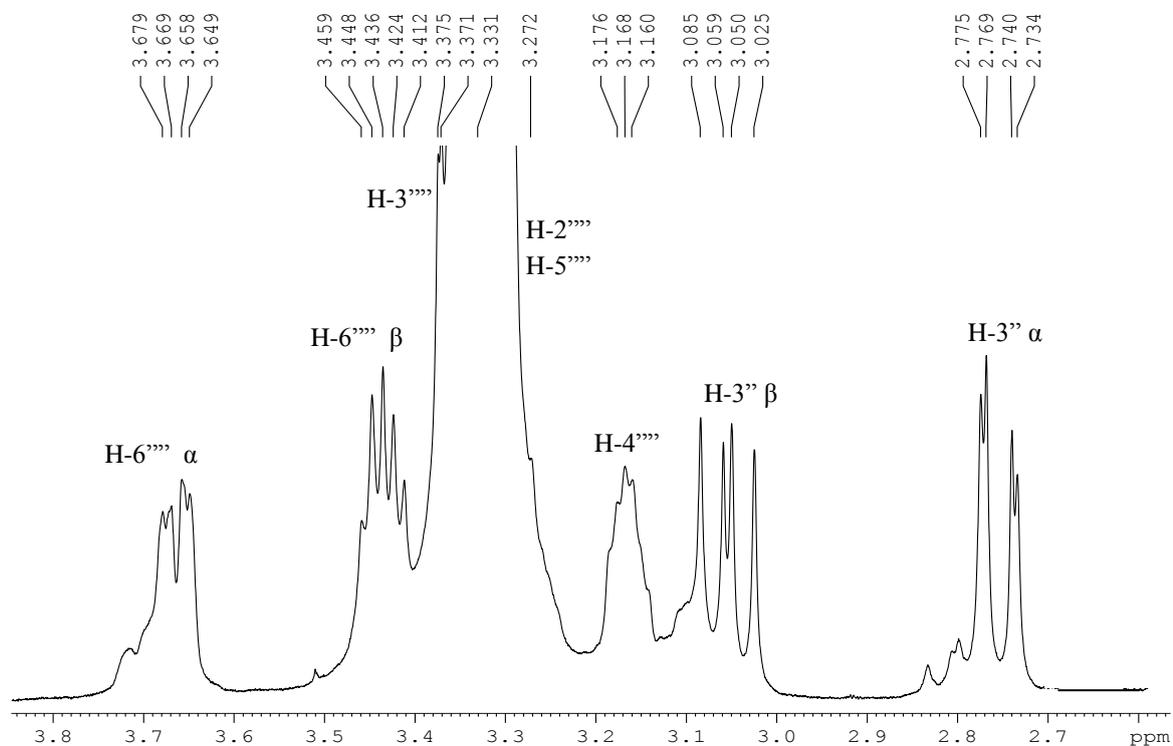


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (500 MHz) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo). Expansão (3,8 – 2,6 ppm).

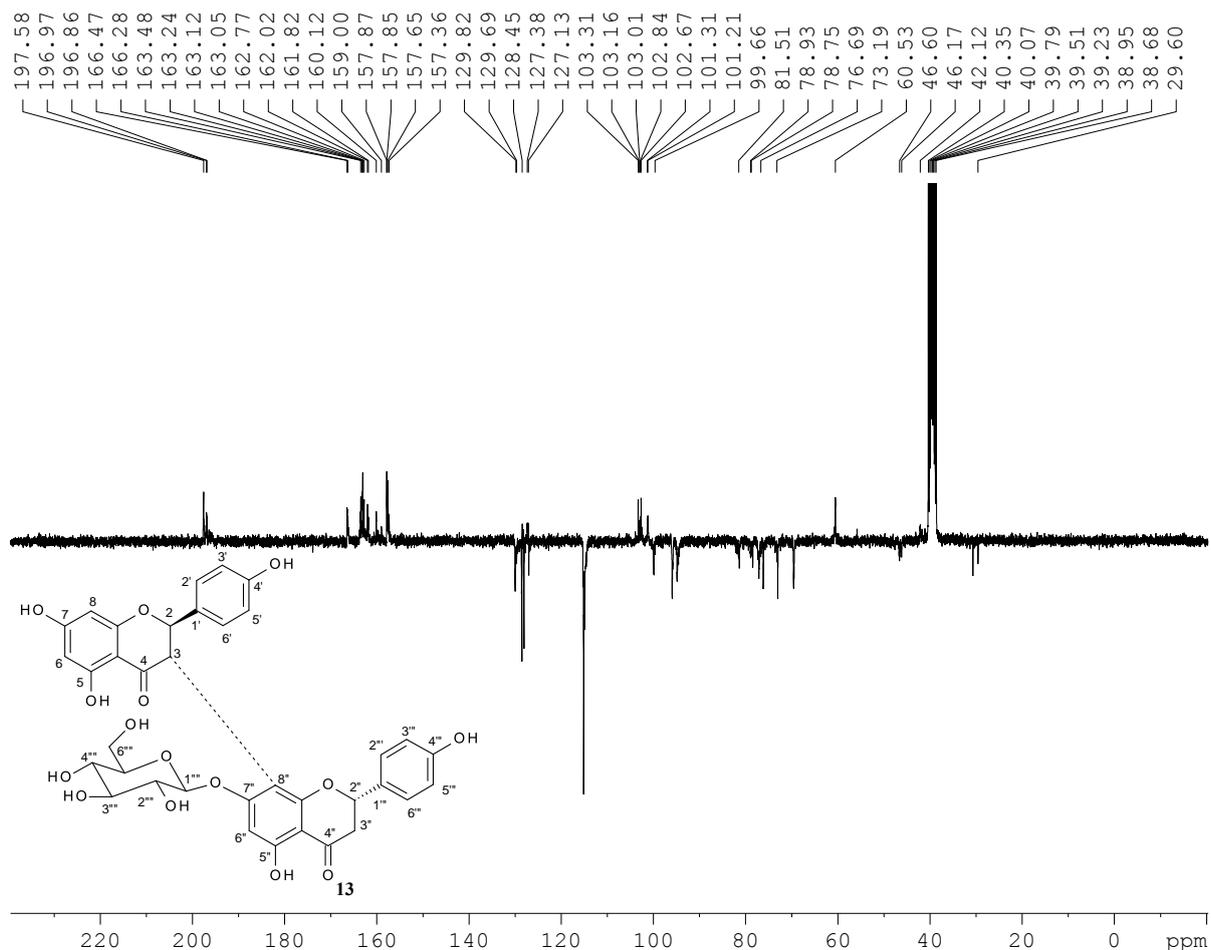


Figura 70. Espectro de APT em DMSO- D_6 (75 MHz) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo).

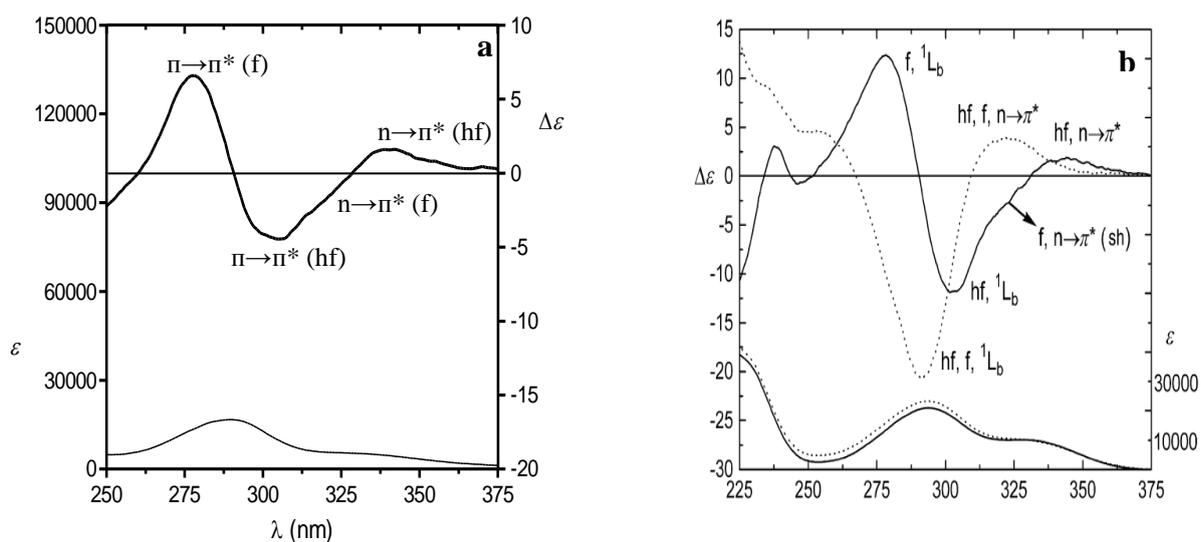


Figura 71. Espectro de CD e UV em MeOH de (a) 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*-GB1-7''-O-glicopiranosídeo e (b) 2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*-GB4 (FERRARI et al., 2003).

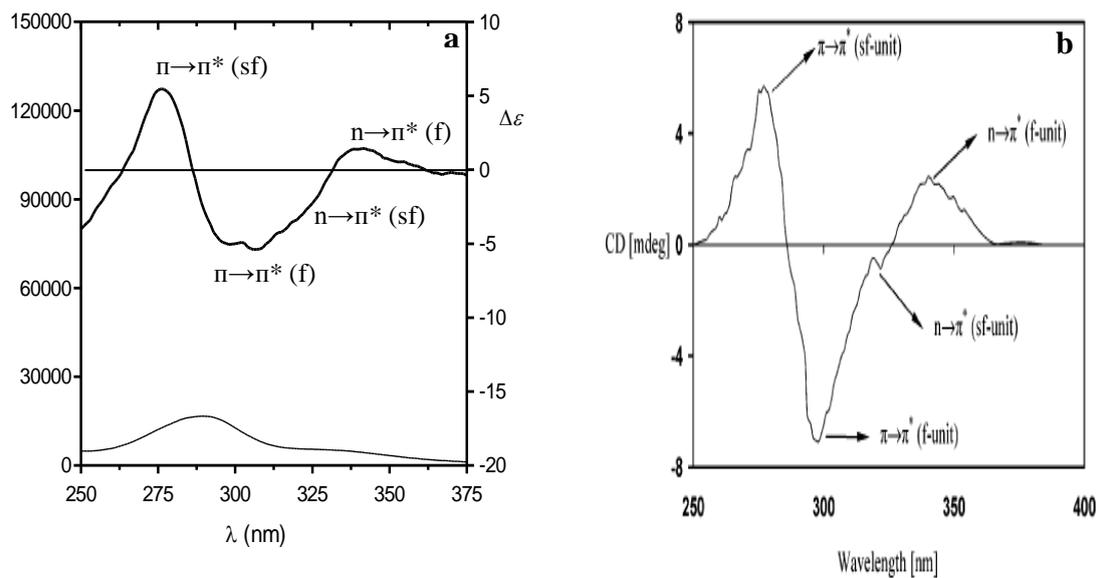


Figura 72. Espectro de CD e UV em MeOH de (a) 2R, 3S, 2''S-GB1a-7''-O-glicopiranosídeo (13) e (b) Ent-naringeninil-(1-3 α , II-8)-4'-O-metilnaringenina (MBWAMBO et al., 2006).

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (500 e 75 MHz, respectivamente) de FCP3 (GB1a-7''-O-glicopiranosídeo).

C	δ_{C}	δ_{H} (multi)
4	196,97	-
5	163,48	-
7	166,47	-
9	163,12	-
10	101,21	-
1'	128,09	-
4'	157,87	-
1''	127,13	-
4''	197,58	-
5''	162,02	-
7''	162,77	-
8''	103,31	-
9''	160,12	-
10''	101,31	-
4'''	157,65	-
CH		
2	81,36	5,55 (d, $J=12$)
3	46,60	5,09 (d, $J=12$)
6	95,93	5,91 (d, $J=2$)
8	94,87	5,80 (d, $J=2$)
2',6'	130,0	7,25 (d, $J= 8,5$)
3',5'	114,93	6,60 (d, $J= 8,5$)
2''	78,44	5,48 (dd, $J=12,5$ e 3)
6''	78,44	6,19 (s)
2''',6'''	128,53	7,19 (d, $J= 9,0$)
3''',5'''	115,15	6,68 (d, $J= 8,5$)
1''''	99,90	4,72 (d, $J= 7,0$)
2''''	73,02	
3''''	77,13	
4''''	69,58	3,14 (m)
5''''	76,17	
6'''' α	60,53	3,66 (dd, $J= 10,5$ e 5)
β		3,44 (m)
CH₂		
3'' α	42,12	3,05 (dd, $J= 17,5$ e 13)
β		2,75 (dd, $J= 17,5$ e 3)

1.4.1.4 Xantona

1.4.1.4.1 Substância 14

A amostra FCP1 (4,0 mg), substância **14**, foi obtida na forma de cristais amarelos em forma de agulhas a partir da fração em acetato de etila obtida da partição do extrato em etanol de frutos de *C. paralicola*. A elucidação estrutural de FCP1 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de ^1H (1D e 2D), EM e comparação com dados descritos na literatura (NAGEM; OLIVEIRA, 1997).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 73) de FCP1 (**14**) permitiu caracterizar um conjunto de sinais participando de um sistema de acoplamento do tipo ABC em δ_{H} 7,72 (*t*, $J = 8,0$ Hz, H-3), 7,03 (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-4) e 6,79 (*dd*, $J = 1,0$ e $8,25$ Hz, H-2), integrando um hidrogênio cada, caracterizando o anel A da **1,7-dihidroxixantona** (euxantona). O espectro de RMN de ^1H mostra ainda três sinais de hidrogênios aromáticos participando de um sistema de acoplamento ABX em δ_{H} 7,55 (*d*, $J = 9,0$ Hz, H-5), 7,46 (*dd*, $J = 9$ e $3,0$ Hz, H-6) e 7,63 (*d*, $J = 3,0$ Hz, H-8) caracterizando o anel B desta xantona. A análise do espectro de ^1H , em conjunto com os espectros bidimensionais COSY ^1H - ^1H , HMQC (Figura 74) e HMBC, bem como a comparação com dados da literatura (Tabela 15) (NAGEM; OLIVEIRA, 1997), permitiu sugerir que FCP1 é a 1,7-dihidroxixantona. Dados adicionais de CG/EM (Figura 75) foram obtidos para confirmar a massa molecular desta xantona. No espectro de massas (Figura 76) foi possível observar o pico do íon molecular em m/z 228 ($[\text{M}]^+$), que esta de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_4$. A euxantona (**14**) está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Clusia* e na espécie *C. paralicola*.

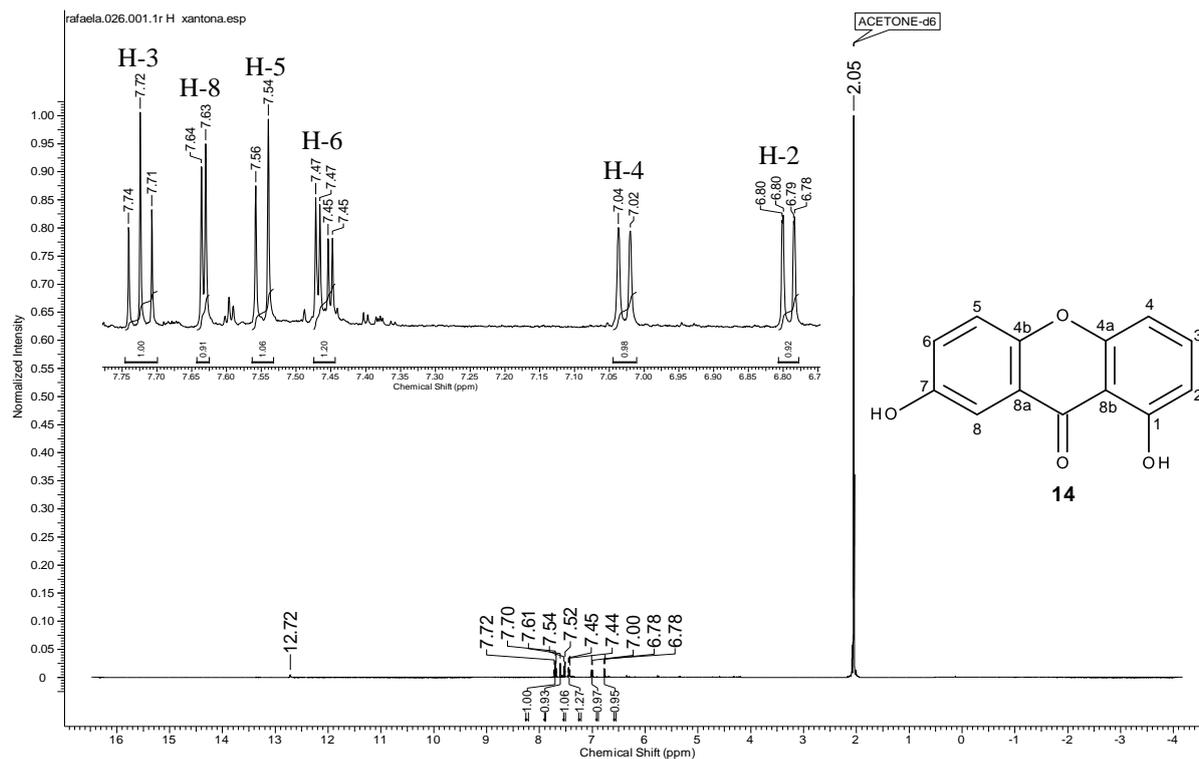


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (500 MHz) de FCP1 (1,7-dihidroixantona).

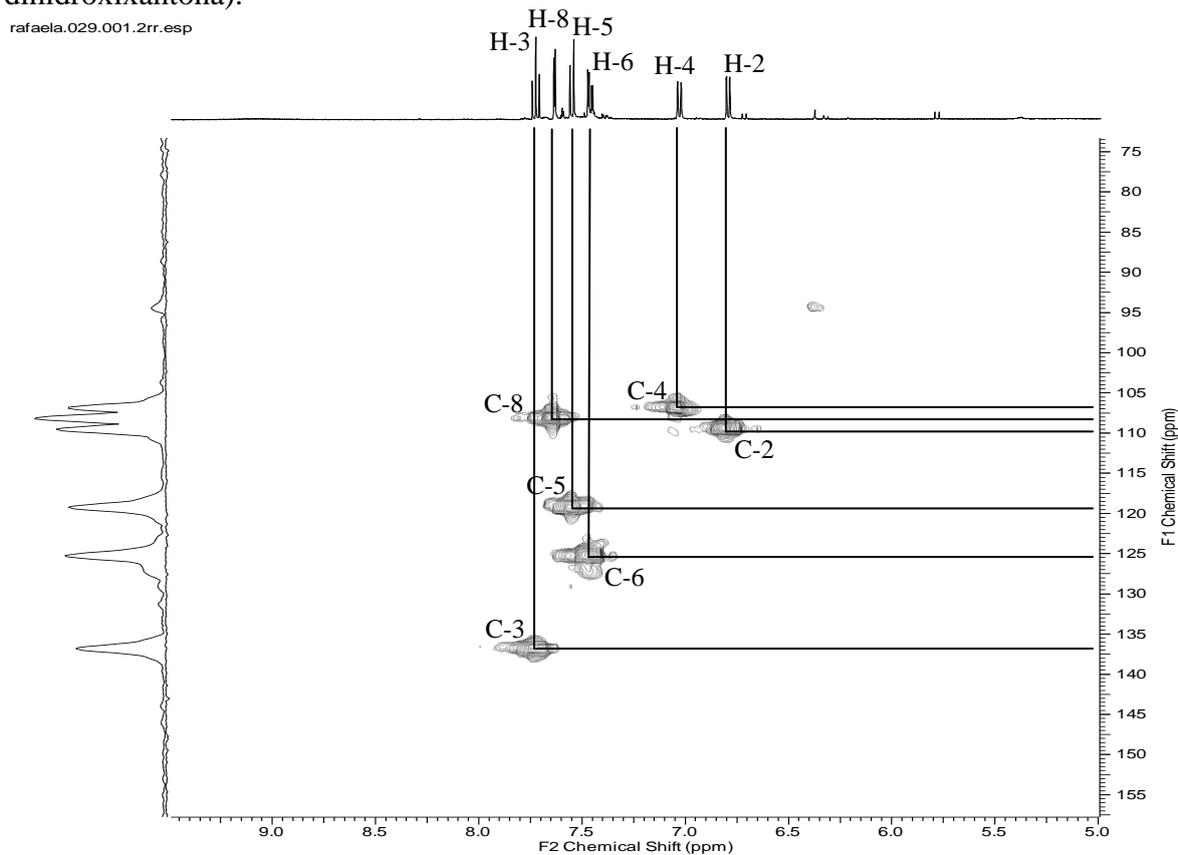


Figura 74. Espectro de HMQC em acetona- d_6 (RMN de ^1H : 500 MHz; RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCP1 (1,7-dihidroixantona).

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (HMQC) em acetona- d_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCP1 (1,7-diidroxixantona).

1,7-diidroxixantona (14)			Literatura (ACETONA- D_6)*
H	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1		-	-
2	109,5	6,79 (<i>dd</i> , 1,0 e 8,25 Hz)	6,75 (<i>dd</i> , 1,0 e 8,1 Hz)
3	136,8	7,72 (<i>t</i> , 8,0 Hz)	7,68 (<i>t</i> , 8,1 Hz)
4	106,8	7,03 (<i>d</i> , 8,0 Hz)	6,97 (<i>dd</i> , 1,0 e 8,1 Hz)
4a		-	-
4b		-	-
5	125,3	7,55 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	7,50 (<i>d</i> , 8,8 Hz)
6	125,2	7,46 (<i>dd</i> , 3,0 e 9,0 Hz)	7,40 (<i>dd</i> , 2,7 e 8,8 Hz)
7		-	-
8	108,0	7,63 (<i>d</i> , 3,0 Hz)	7,57 (<i>d</i> , 2,7 Hz)
8a		-	-
8b		-	-
9		-	-
10		-	-
OH		12,74 (<i>s</i>)	12,57 (<i>s</i>)

*NAGEM; OLIVEIRA, 1997

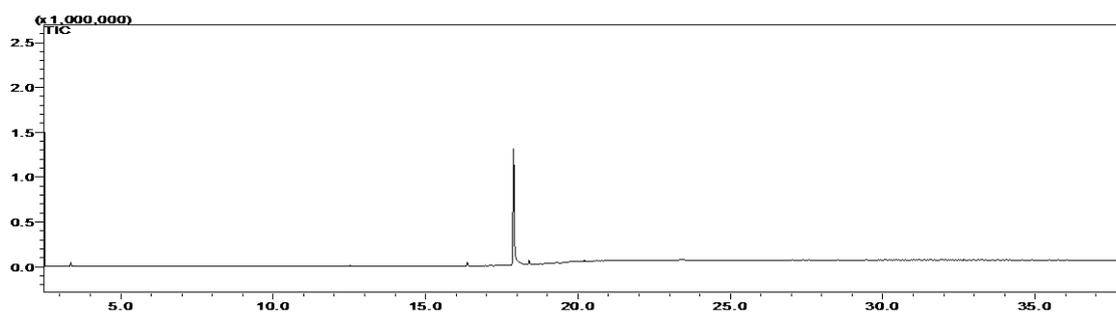


Figura 75. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCP1 (1,7-diidroxixantona) obtido por CG-EM.

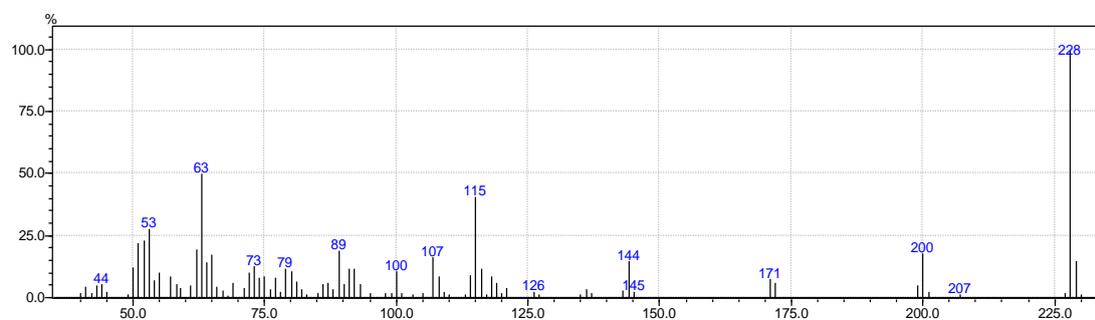


Figura 76. Espectro de massas de FCP1 (1,7-diidroxixantona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

1.4.1.5 Triterpenos

1.4.1.5.1 Substância 15

A amostra FCN3 (20,0 mg), substância **15**, foi obtida na forma de cristais brancos a partir do extrato em diclorometano de frutos de *C. nemorosa* (1° coleta). A elucidação estrutural de FCN3 foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e CG-EM, seguido da comparação com dados descritos na literatura (ABREU et al., 2011).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 77) obtido para a substância **15** apresentou sete simpletos na região de δ_{H} 1,18 a 0,73, indicando a presença de sete grupos metílicos. O duplete em δ_{H} 0,88 ($J= 5,0$ Hz) foi atribuído aos prótons metílicos ligados ao carbono C-23, característicos de triterpenos da classe friedelano (ABREU et al., 2011). Adicionalmente, destaca-se os sinais característicos de hidrogênios metilênicos (CH_2 -2) e metínico (CH -4) em posição alfa a carbonila em δ_{H} 2,30 e 2,39 ppm, respectivamente. Um total de 30 carbonos foi assinalado no espectro de DEPTQ (Figura 78, Tabela 16) da substância **15**, sendo oito metílicos, onze metilênicos, quatro metínicos e seis carbonos quaternários. O sinal em δ_{C} 213,2 ppm foi atribuído à carbonila da cetona (C-3), enquanto, os sinais em δ_{C} 14,7 (C-24) e 6,80 (C-23) foram correlacionados aos grupo metila que são particularidades da série friedelano.

O cromatograma de íon totais (TIC) da amostra FCN3 obtido por CG-EM apresentou um pico (Figura 79), cujos fragmentos (Figura 80) foram característicos de substância triterpênica (FELIU, 2011). O íon fragmento de m/z 426 foi identificado como sendo o íon molecular $[\text{M}]^+$ que foi atribuído à fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, sugerindo seis equivalentes de deficiência de hidrogênio (IGOLI; GRAY, 2008), sendo proposto a presença de um dupla ligação e cinco anéis de seis membros, típicos de estrutura pentacíclica. O espectro de massas apresentou como pico base o íon fragmento de m/z 69. O íon fragmento de m/z 411 foi atribuído à perda de uma metila (M^+-CH_3). A clivagem nos anéis A, B e D resultou na formação dos íons fragmentos de m/z 341, 273 e 123, respectivamente. A cisão entre os carbonos C-13 e C-14 originou os fragmentos de m/z 218 e 191, enquanto que a quebra da ligação entre C-8 e C-14 no anel C forneceu o fragmento de m/z 205. Estes íons observados são característicos de triterpenos pentacíclicos da série friedelano (SHIOJIMA et al., 1992).

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C e do padrão de fragmentação de massas com os descritos na literatura (ABREU et al., 2011) permitiu a identificação da substância **15** como friedelina. Este triterpeno está sendo descrito pela primeira vez nos frutos de *C. nemorosa*.

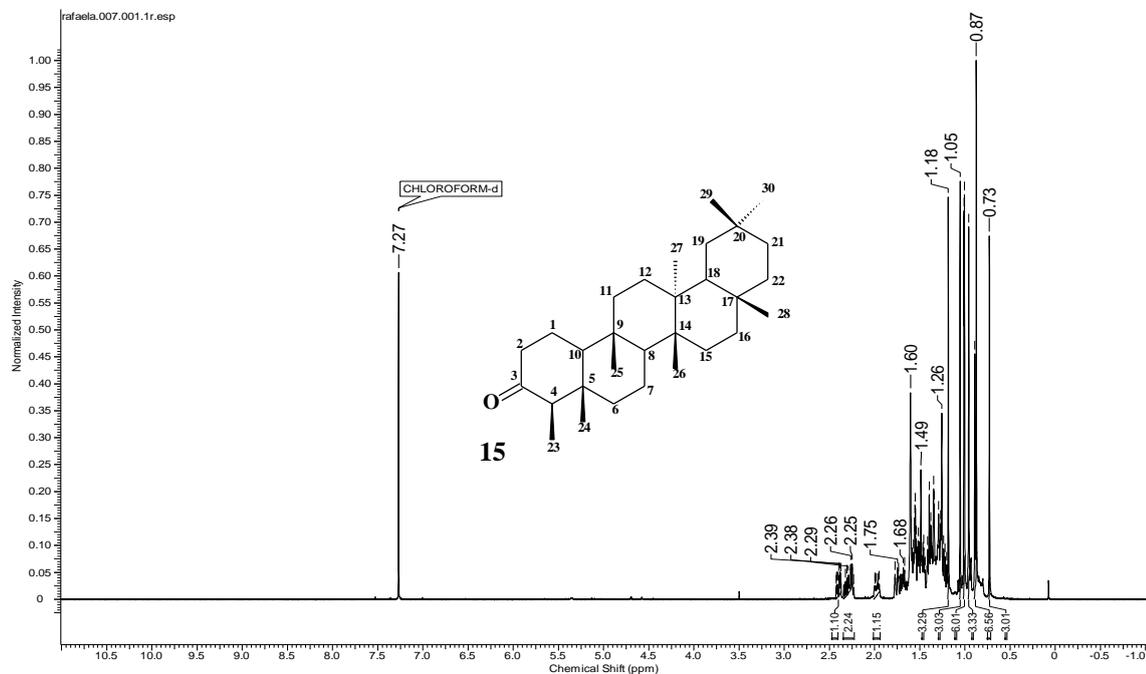


Figura 77. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCN3 (friedelina).

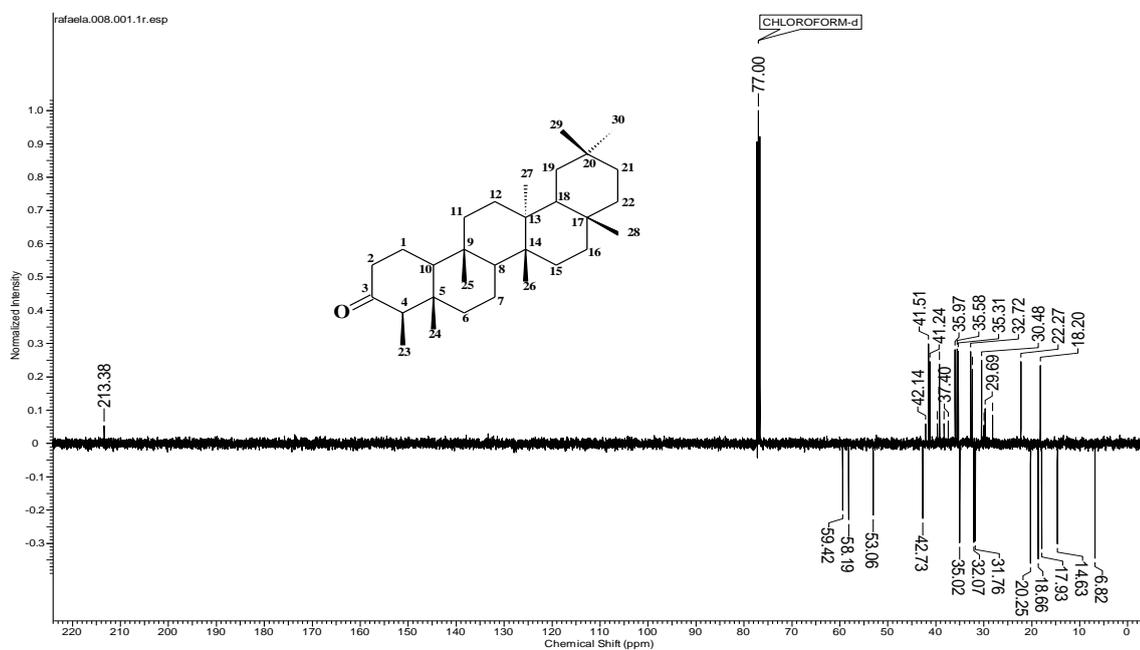


Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCN3 (friedelina).

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN3 (Friedelina).

C	Friedelina (15)	Literatura *	Friedelina (15)	Literatura*
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1	22,3	22,3		
2	41,5	41,5	2,33 (ddd; $J_1 = 13,8$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, $J_3 = 1,9$ Hz, 1H)	2,39 (ddd; $J_1 = 13,7$, $J_2 = 5,1$, $J_3 = 1,9$ Hz, 1H)
3	213,2	213,2		
4	58,2	58,2	2,26 (q; $J = 6,0$ Hz, 1H)	2,24 (q; $J = 6,5$ Hz, 1H)
5	42,1	42,1		
6	41,3	41,3		
7	18,2	18,2		
8	53,1	53,3		
9	37,4	37,5		
10	59,5	59,5		
11	35,6	35,6		
12	30,5	30,5		
13	39,7	39,7		
14	38,3	38,3		
15	32,4	32,8		
16	36,0	36,0		
17	30,0	30,0		
18	42,8	42,8		
19	35,6	35,4		
20	28,1	28,2		
21	32,8	32,4		
22	39,2	39,3		
23	6,8	6,8	0,88 (d, $J = 6$ Hz, 3H)	0,87 ($J = 6,5$, 3H)
24	14,7	14,7	0,74 (s, 3H)	0,73 (s, 3H)
25	17,9	17,9	0,89 (s, 3H)	0,88 (s, 3H)
26	20,2	20,3	1,03 (s, 3H)	1,01 (s, 3H)
27	18,7	18,7	1,07 (s, 3H)	1,05 (s, 3H)
28	32,1	32,1	1,20 (s, 3H)	1,18 (s, 3H)
29	31,8	31,8	1,02 (s, 3H)	1,00 (s, 3H)
30	35,0	35,0	0,97 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)

*ABREU et al., 2011

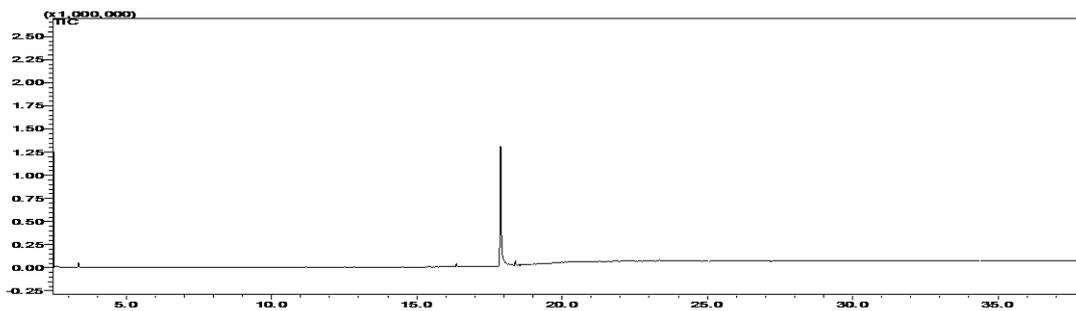


Figura 79. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCN3 (friedelina) obtido por CG-EM.

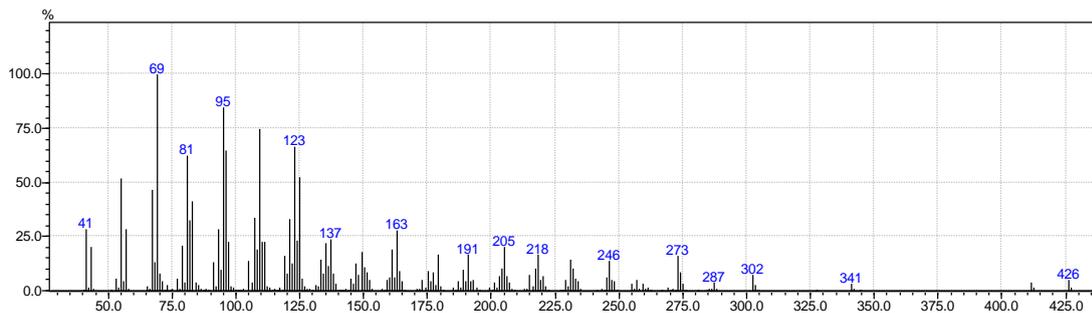


Figura 80. Espectro de massas de FCN3 (friedelina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

1.4.1.5.2 Substâncias 16 e 17

A amostra FCL4 (1,2 g), contendo as substâncias **16** e **17**, foi obtida na forma de cristais brancos a partir do extrato em diclorometano de folhas de *C. lanceolata*. A elucidação estrutural de FCL4 foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM, seguido da comparação com dados descritos na literatura (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 81) de FCL4 apresentou um padrão característico de triterpenos, confirmado pela presença de vários simpletos na região δ_{H} 0,8 e 1,3. Destacando-se também, um multiplete em δ_{H} 3,23, característico de H-3 em triterpenos do tipo $3\beta\text{-OH}$ e dois tripletos em δ_{H} 5,19 (**16**) e 5,13 (**17**) pertencentes a hidrogênios olefínicos em C-12. A duplicidade dos sinais observada sugere a presença da mistura de duas substâncias isoméricas. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 82) foi observado um sinal em δ_{C} 79,01, atribuído ao carbono carbinólico em C-3. Na região das olefinas foram observados dois pares de sinais em δ_{C} 145,2 (C-13) e 121,7 (CH-12) atribuídos à substância **17** e em δ_{C} 139,6 (C-13) e 124,4 (CH-12), correspondentes à substância **16**.

No cromatograma (Figura 83) obtido por CG-EM de FCL4 foi possível observar dois picos em t_{R} de 25,0 (substância **16**) e 25,8 (substância **17**) min., sendo a proporção entre eles de 62:38 (verificadas pelas áreas dos picos). Os espectros de massas (Figuras 84 e 85) foram muito semelhantes, diferindo apenas na intensidade de alguns picos, principalmente o pico em m/z 203. Ambos mostraram picos em m/z 426, correspondentes aos íons moleculares dos dois isômeros. Picos oriundos da fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder do anel C, típicos de olean-12-enos (substância **17**) e ursan-12-enos (substância **16**), foram observados em m/z 218; 203 e 189 (MORITA et al., 2000).

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 17) e do padrão de fragmentação de massas com os descritos na literatura (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011) permitiram a identificação das substâncias **16** e **17** como α -amirina e β -amirina, respectivamente. Estes triterpenos estão sendo descritos pela primeira vez nas folhas de *C. lanceolata*.

A mistura de α e β -amirina já foi bastante investigada do ponto de vista farmacológico e apresentaram atividades antinociceptiva (OTUKI et al., 2005), hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2004) e antimicrobiana (VILLASENOR et al., 2004).

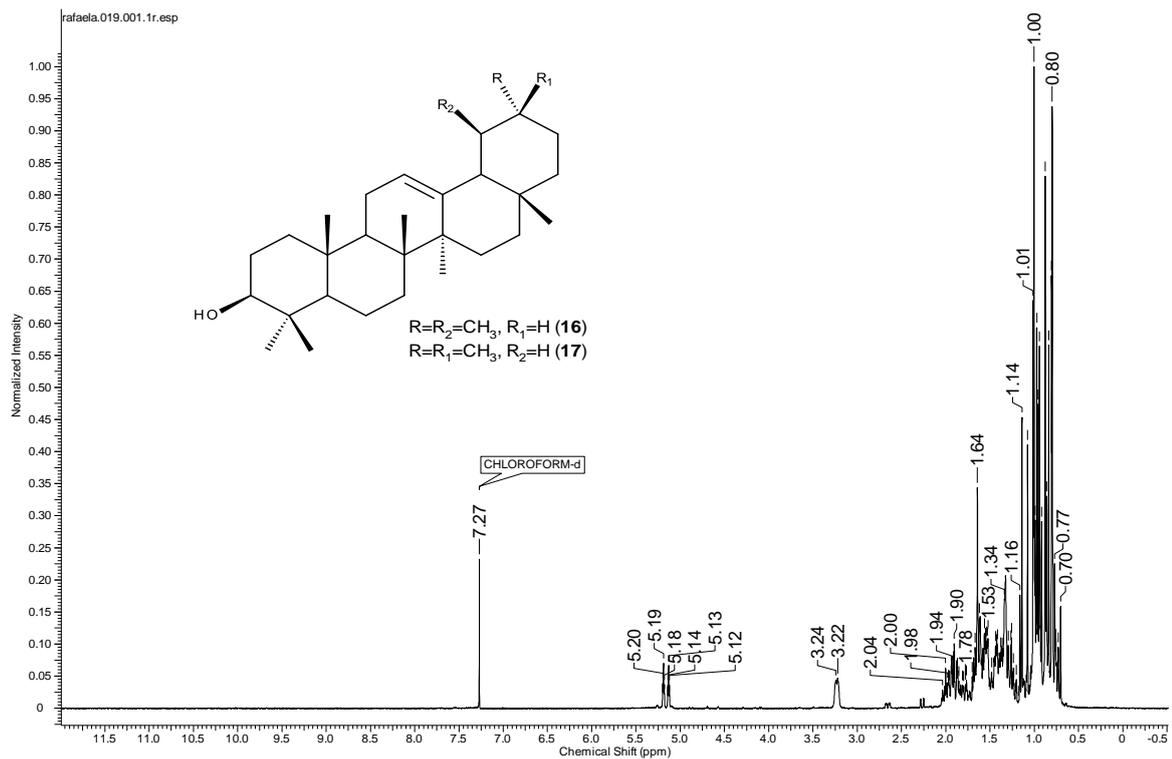


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL4 (α , β -amirina).

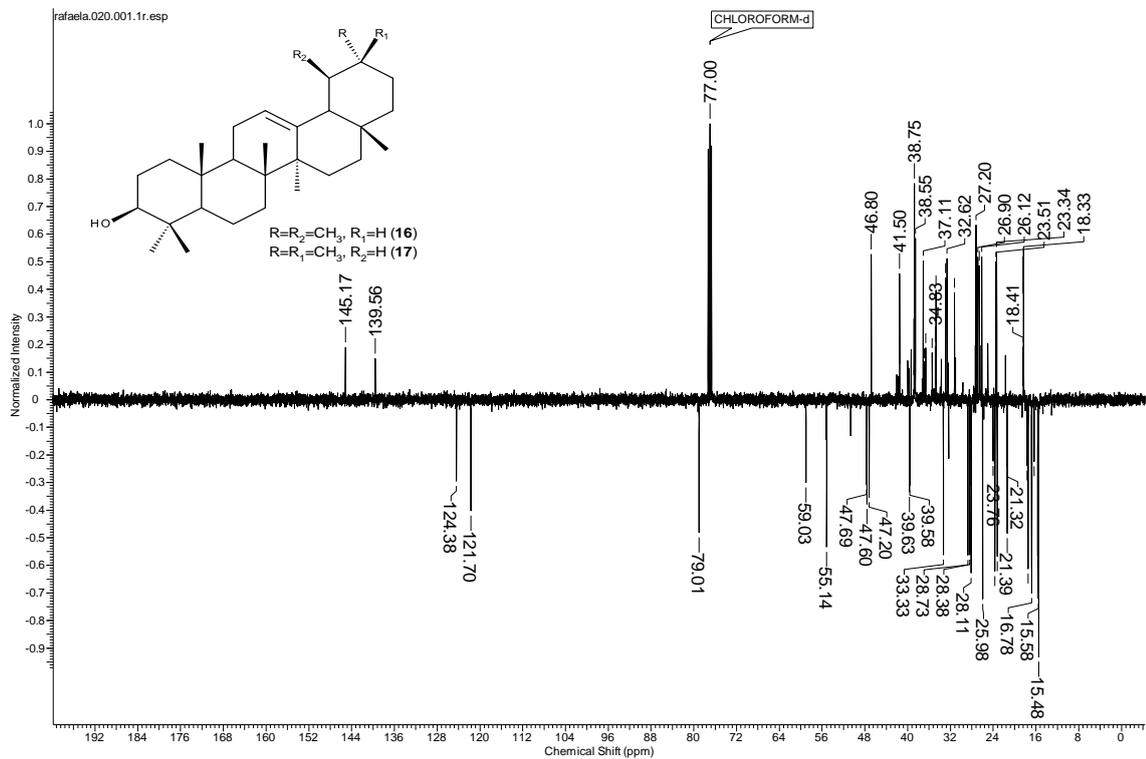


Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL4 (α , β -amirina).

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL4 (α , β -amirina).

C	α -amirina		Literatura*	β -amirina		Literatura*
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		38,7	38,7		38,5	38,7
2		29,5	28,7		27,4	27,2
3	3,23 (m, 1H)	79,0	79,6	3,23 (m, 1H)	79,0	79,3
4		38,7	38,7		38,5	38,5
5		55,1	55,1		55,1	55,1
6		18,4	18,4		18,4	18,6
7		32,6	32,2		32,9	32,4
8		40,0	40,0		39,8	39,8
9		47,7	47,7		47,6	47,6
10		37,1	36,9		37,1	36,9
11		23,3	23,3		23,5	23,6
12	5,19 (m, 1H)	124,4	124,4	5,13 (m, 1H)	121,7	121,7
13		139,6	139,5		145,2	145,2
14		41,5	42,0		41,5	41,7
15		27,2	27,2		26,1	26,2
16		26,6	26,6		26,1	26,1
17		34,1	33,7		32,8	32,6
18		59,0	59,0		47,6	47,2
19		39,8	39,6		47,2	46,8
20		39,8	39,6		31,2	31,0
21		31,2	31,2		34,7	34,7
22		41,5	41,5		37,1	37,1
23	0,98 (s)	28,1	28,1	0,79 (s)	28,0	28,0
24	0,78 (d)	15,7	15,6	0,78 (d)	15,5	15,4
25	0,78 (d)	15,7	15,6	0,78 (d)	15,5	15,4
26	0,90 (s)	16,8	16,8	0,98 (s)	16,9	16,8
27	0,99 (s)	23,2	23,2	1,12 (s)	26,0	25,9
28	0,96 (s)	28,4	28,1	1,06 (s)	28,7	28,4
29	0,86 (d)	17,5	17,4	0,86 (d)	33,3	33,8
30	0,78 (d)	21,4	21,4	0,82 (s)	23,7	23,7

* DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011.

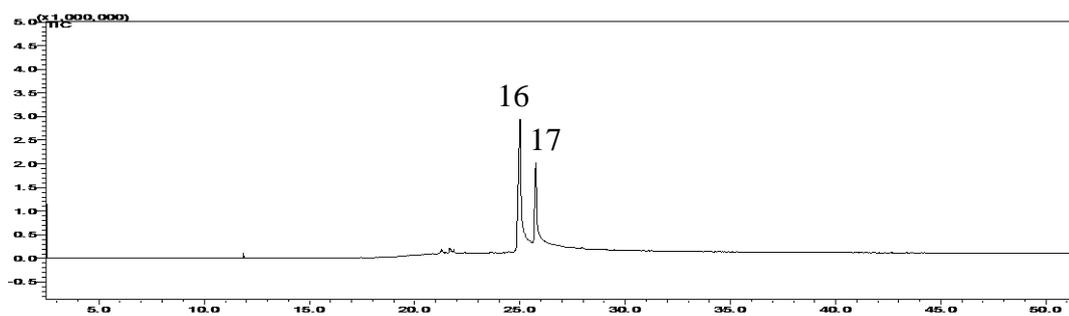


Figura 83. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCL4 (α,β -amirina) obtido por CG-EM.

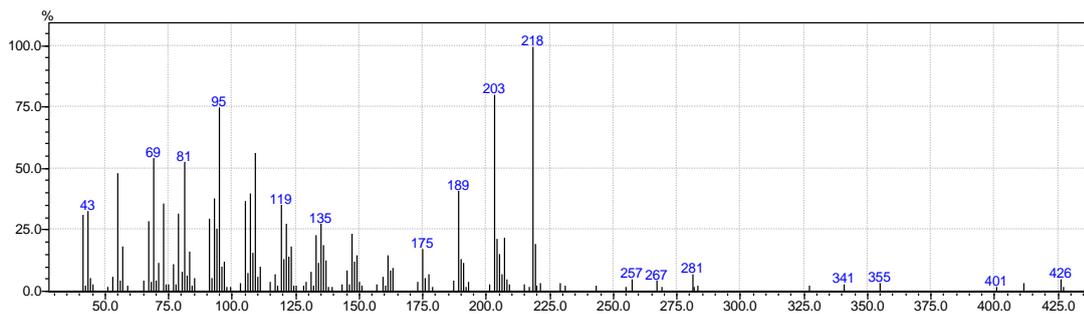


Figura 84. Espectro de massas de FCL4, substância **16** (α -amirina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

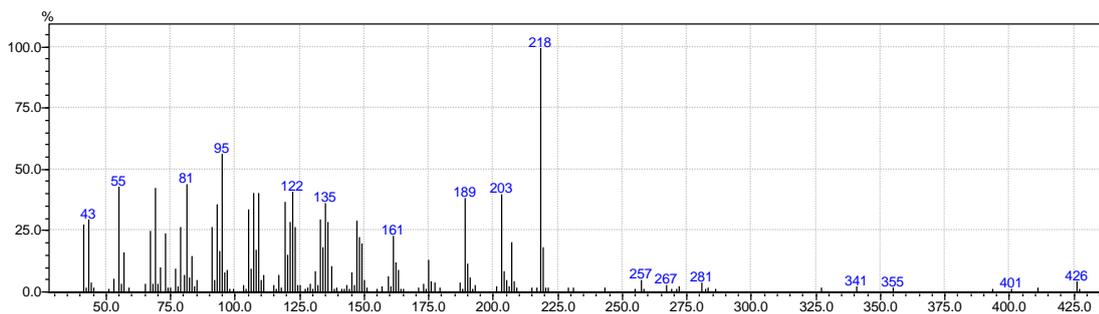


Figura 85. Espectro de massas de FCL4, substância **17** (β -amirina), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

1.4.1.6 Esteroides

1.4.1.6.1 Substâncias 18 e 19

As frações FCN4 (10,0 mg) e FCL5 (30,0 mg), substâncias **18** e **19**, foram obtidas na forma de cristais brancos a partir do extrato em diclorometano de frutos de *C. nemorosa* e das folhas de *C. lanceolata*, respectivamente. A elucidação estrutural de FCN4 e FCL5 foi realizada a partir das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (LIMA, 2000).

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 86) de FCN4 e FCL5 (**18** + **19**) apresentaram sinais entre δ_{H} 0,8 e 2,0 ppm referentes a grupos metínicos, metilênicos e metílicos, um multiplete em δ_{H} 3,53 que pode ser de hidrogênio ligado a carbono carbinólico (H-3) e um duplete em δ_{H} 5,35 de hidrogênio olefínico (H-6). O conjunto destes dados, mais a presença de dois duplos-dupletos em δ_{H} 5,16 ($J= 8,5$ e 15 Hz, H-22) e em 5,02 ($J= 8,5$ e 15 Hz, H-23), levam a sugerir que a amostra é uma mistura de esteroides comumente isolados no reino vegetal, β -sitosterol (**18**) e estigmasterol (**19**). No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 87) destacam-se os sinais referentes aos carbonos olefínicos comuns aos dois esteroides em δ_{C} 140,72 (C-5) e em 121,71 (C-6), além do carbono oximetínico em δ_{C} 71,79 para C-3. O estigmasterol apresenta ainda sinais referentes aos carbonos olefínicos da ligação dupla em sua cadeia lateral em δ_{C} 138,31 (C-23) e 129,23 (C-22). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 18) estão de acordo com o da literatura (LIMA, 2000). Estes esteroides estão sendo relatados pela primeira vez nos frutos de *C. nemorosa* e nas folhas de *C. lanceolata* Cambess.

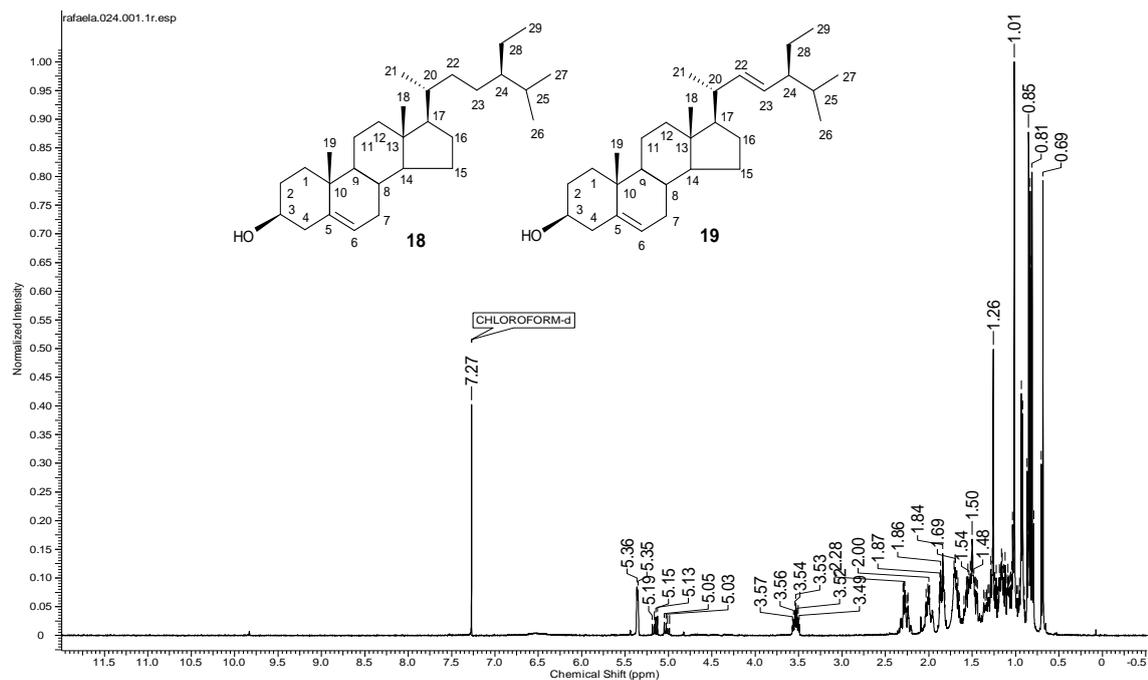


Figura 86. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).

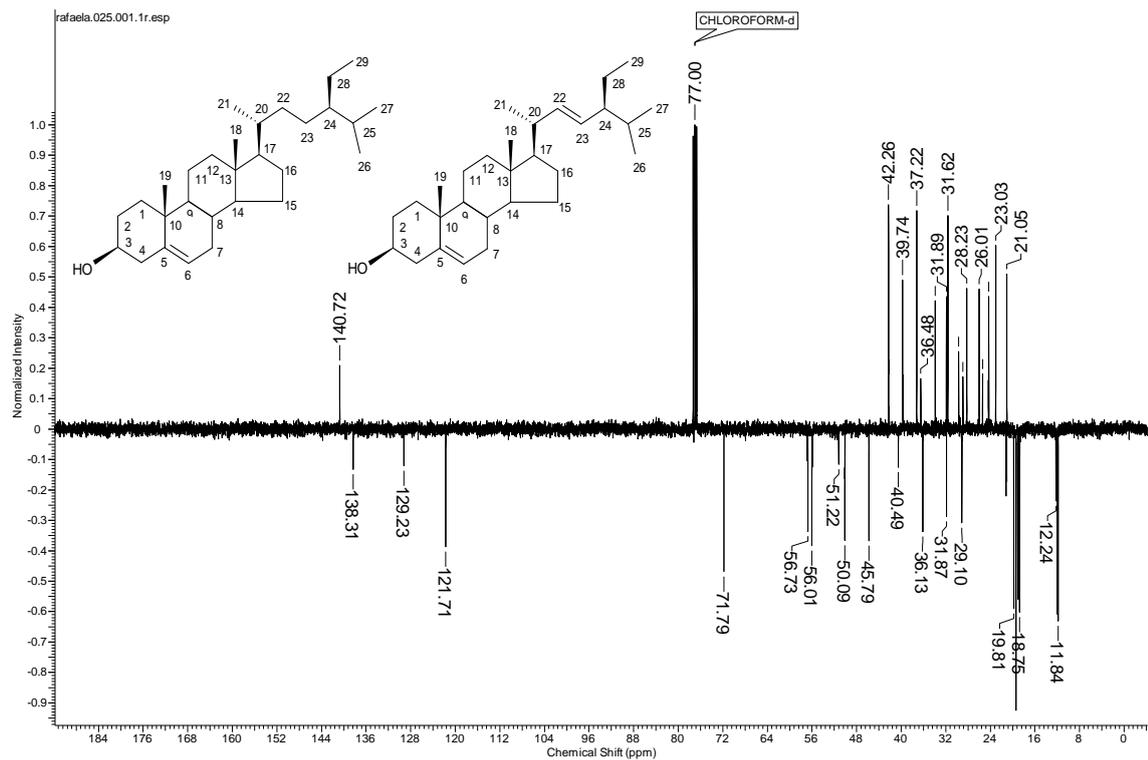


Figura 87. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).

Tabela 18. Dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) de FCL5 (β -sitosterol e estigmasterol).

C	β – Sitosterol (18)		Estigmasterol (19)	
	δ_{C}	Literatura*	δ_{C}	Literatura*
5	140,79	140,73	140,79	140,73
10	36,53	36,49	36,53	36,98
13	42,25	42,28	42,25	42,28
CH				
3	71,83	71,78	71,83	71,78
6	121,73	121,69	121,73	121,69
8	31,90	31,88	31,92	31,88
9	50,17	50,11	50,20	50,11
14	56,80	56,74	56,90	56,74
17	56,09	56,05	55,99	56,05
20	36,17	36,12	40,49	40,48
22	-		138,32	138,32
23	-		129,31	129,27
24	45,88	45,83	51,26	51,23
25	28,93	29,14	29,72	31,44
CH₂				
1	37,28	37,24	37,28	37,24
2	31,70	31,64	31,70	31,64
4	42,34	42,28	42,34	42,19
7	31,93	31,88	31,94	31,88
11	21,11	21,07	21,07	21,07
12	39,81	39,76	39,71	39,76
15	24,32	24,28	24,38	24,34
16	29,20	28,22	29,20	28,90
22	33,98	33,93	-	-
23	26,13	26,05	-	25,39
28	23,10	23,04	25,42	25,39
CH₃				
18	11,88	11,84	12,00	12,03
19	19,41	19,38	19,41	19,38
21	18,80	18,75	21,23	21,19
26	19,83	19,80	19,83	21,07
27	19,06	19,01	19,00	18,95
29	12,07	11,95	12,26	12,23

* LIMA, 2000

1.4.1.6.2 Substâncias 20 e 21

A fração FCL7 (35,0 mg), substâncias **20** e **21**, foi obtida na forma de um sólido viscoso amarelo a partir do extrato em diclorometano de folhas de *C. lanceolata*. A elucidação estrutural de FCL7 foi realizada a partir das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e EM e comparação com dados descritos na literatura (DELLA GRECA et al., 1990).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 88) da mistura **20** e **21** apresentaram sinais semelhantes aos descritos anteriormente para a mistura **18** e **19**, um conjunto de sinais na região mais blindada do espectro em δ_{H} 2,4 – 0,7 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do núcleo esteroidal. No espectro de RMN de ^1H das substâncias **20** e **21** foi observado um sinal na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,73 (*sl*, 1H), o qual foi atribuído ao H-4 e a ausência de hidrogênio carbinólico em C-3 sugeriu uma oxidação nessa posição. O sinal em δ_{C} 199,76 referente a carbono carbonílico, observado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 89) de FCL7 indicou ser uma carbonila. A comparação com dados da literatura (Tabela 19) confirmou ser a sitosterona a substância **20**. Ainda no espectro de RMN de ^1H , a presença dos sinais de menor intensidade em δ_{H} 5,15 e 5,02 referentes a hidrogênios olefínicos (H-22 e H-23, respectivamente) sugeriu que a sitosterona encontrava-se em mistura. Esses dados foram confirmados pela análise de CG-EM (Figuras 90, 91 e 92), onde se pode observar a presença da sitosterona **20** (m/z 412) e da estigmasterona **21** (m/z 410). Estes esteroides estão sendo registrados pela primeira vez em *C. lanceolata*.

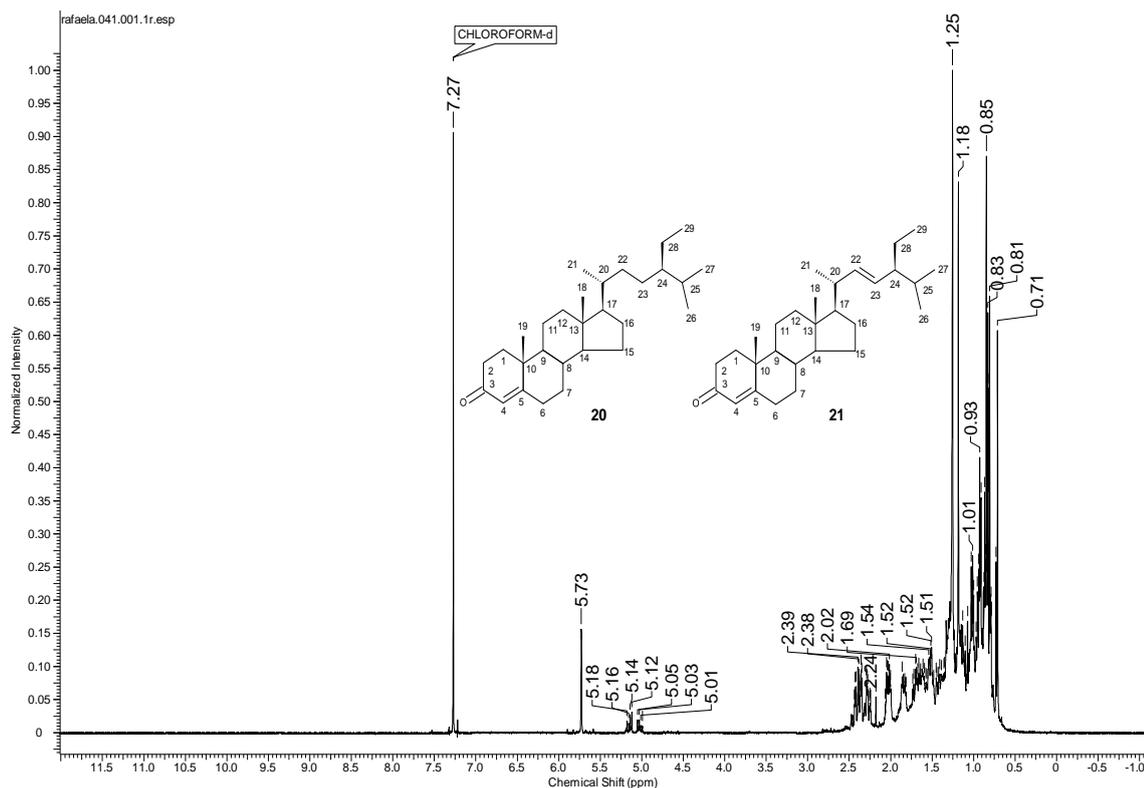


Figura 88. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona).

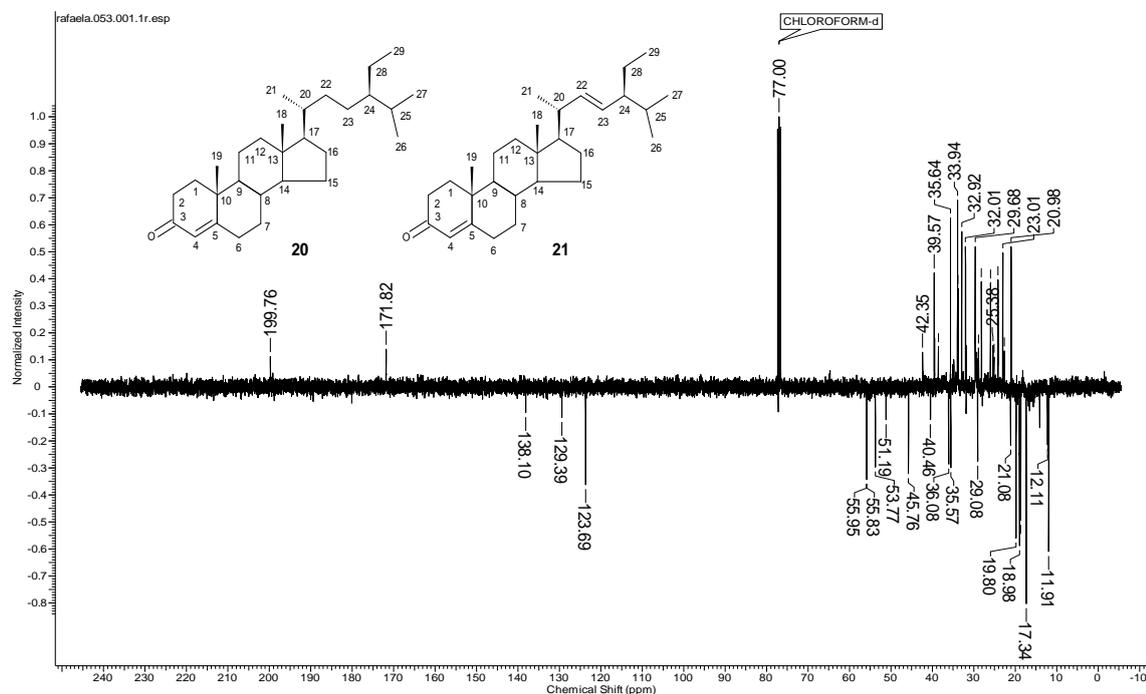


Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CDCl_3 (100 MHz) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona).

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL7 (β - sitosterona e estigmasterona).

C	β -sitosterona (20)	Literatura*	β -sitosterona
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	35,57	35,6	
2	33,82	33,9	
3	199,76	198,2	
4	123,69	123,6	5,73 (sl)
5	171,82	171,0	
6	32,93	32,8	
7	32,01	32,0	
8	35,64	35,7	
9	53,77	53,8	
10	38,57	38,5	
11	20,98	21,0	
12	39,57	39,4	
13	42,35	42,3	
14	55,83	55,9	
15	24,15	24,1	
16	28,17	28,1	
17	55,95	56,0	
18	11,94	11,9	0,71 (s)
19	19,35	17,3	1,19 (s)
20	36,08	36,1	
21	18,67	18,7	0,92 (d)
22	33,94	34,0	
23	23,01	22,9	
24	45,76	45,8	
25	29,68	29,1	
26	19,70	19,8	0,84 (sl)
27	18,98	19,1	0,83 (d)
28	23,01	23,1	
29	11,91	11,1	0,83 (d)

*DELLA GRECA et al., 1990

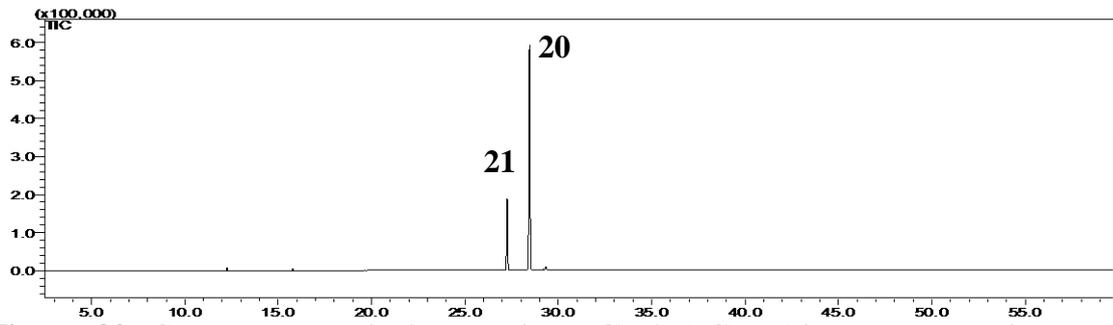


Figura 90. Cromatograma de íons totais (TIC) de FCL7 (sitosterona e estigmasterona) obtido por CG-EM.

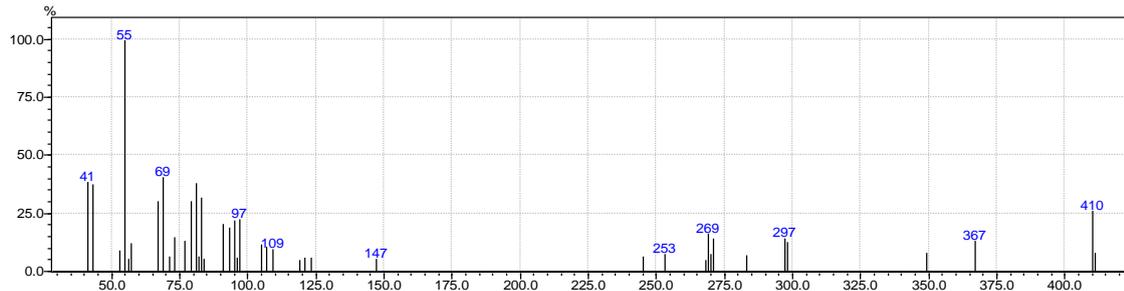


Figura 91. Espectro de massas de FCL7, substância **21** (estigmasterona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

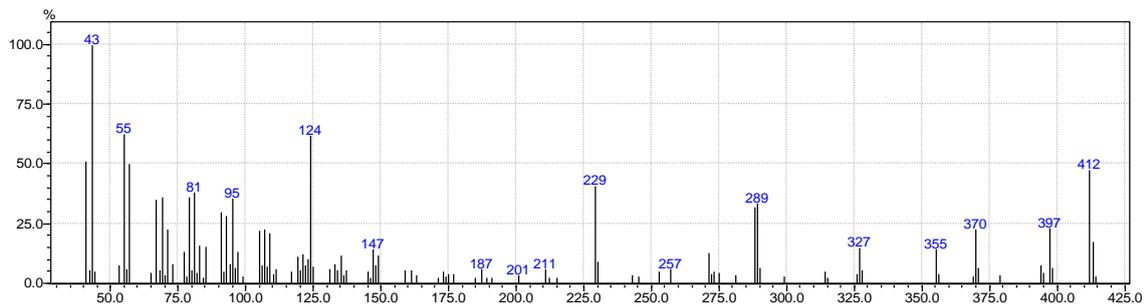
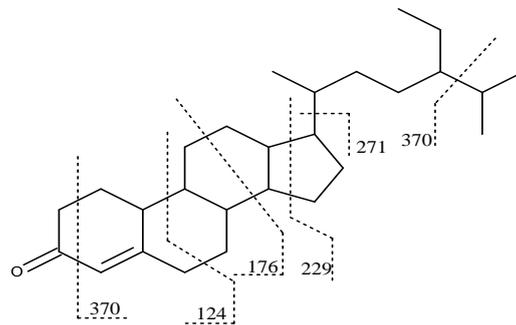


Figura 92. Espectro de massas de FCL7, substância **20** (sitosterona), obtido por CG-EM (IE 70 eV).

1.4.1.6.3 Substâncias **22** e **23**

As frações FCN1 (65,0 mg) e FCN9 (50,0 mg), substâncias **22** e **23**, foram obtidas na forma de um sólido amorfo branco a partir do extrato em diclorometano (1° coleta) e do extrato em etanol (2° coleta) de frutos de *C. nemorosa*, respectivamente. A elucidação estrutural de FCN1 e FCN9 foi realizada a partir das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (MONTRUCCHIO et al., 2005).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 93) da mistura **22** e **23** apresentaram sinais semelhantes aos descritos anteriormente para a mistura **18** e **19**, um conjunto de sinais na região mais blindada do espectro em δ_{H} 2,4 – 0,7 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos do núcleo esteroidal. No espectro de RMN de ^1H das substâncias **22** e **23** foi observado um sinal na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,37 (*sl*, 1H), o qual foi atribuído ao H-6. Ainda no espectro de RMN de ^1H pôde-se observar um acúmulo de sinais na região de hidrogênios carbinólicos sugerindo a presença de açúcar na estrutura. O espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) de **22** e **23** (Figura 94) apresentou cinco sinais referentes a carbonos carbinólicos entre δ_{C} 72,07 – 79,01, um sinal em δ_{C} 102,96 referente ao carbono anomérico em C-1' e um carbono metilênico em δ_{C} 63,22 caracterizando uma glicose ligada ao esqueleto esteroidal. A comparação com dados da literatura (Tabela 20) confirmou ser o β -sitosterol glicosilado a substância **22**. Ainda no espectro de RMN de ^1H , a presença dos sinais de menor intensidade em δ_{H} 5,15 e 5,02 referentes a hidrogênios olefínicos (H-22 e H-23, respectivamente) sugeriu que β -sitosterol glicosilado encontrava-se em mistura com o estigmasterol glicosilado **23**. Estes esteroides estão sendo descritos pela primeira vez nos frutos de *C. nemorosa*.

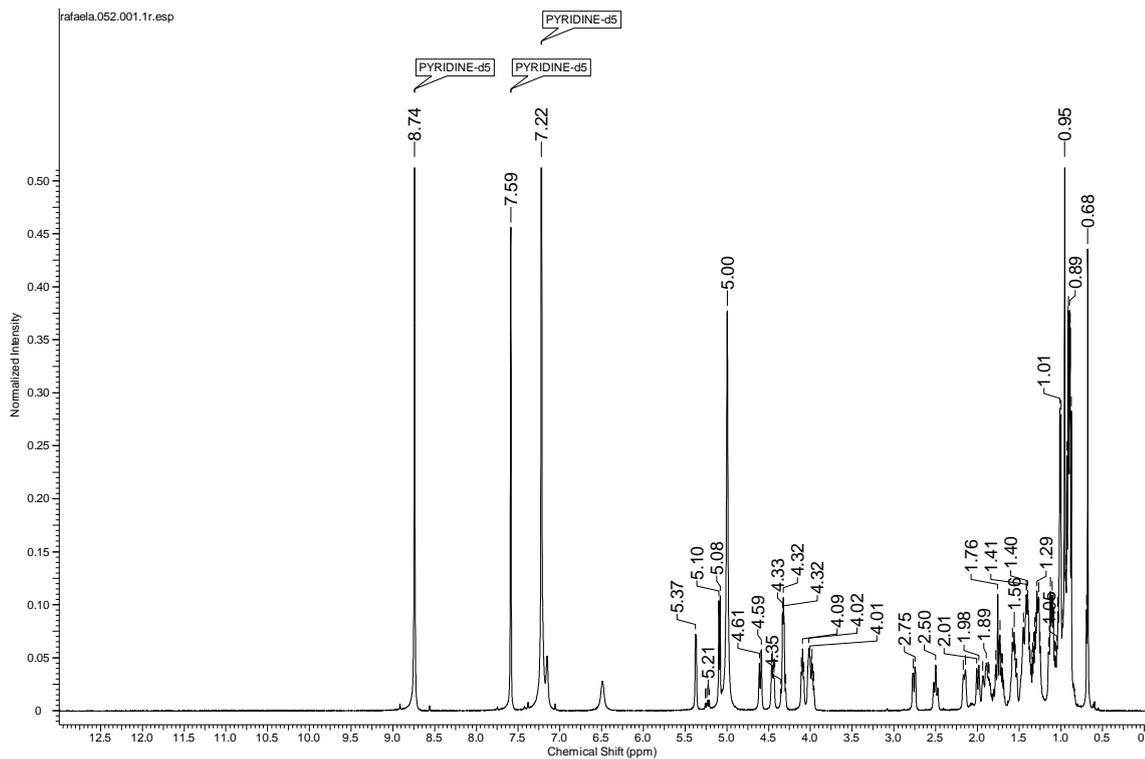


Figura 93. Espectro de RMN de ^1H em piridina- d_5 (500 MHz) de FCN1 (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados).

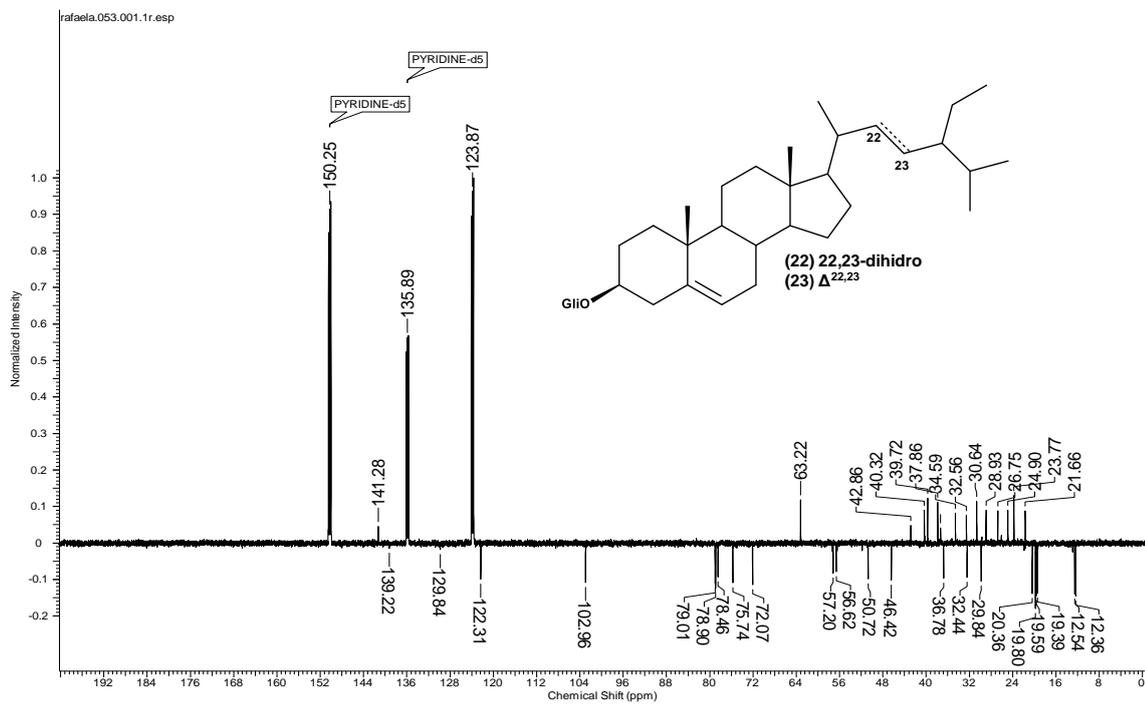


Figura 94. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em piridina- d_5 (125 MHz) de FCN1 (β -sitosterol e estigmasterol glicosilados).

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em piridina- d_5 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN1 (β -sitosterol glicosilado).

β -sitosterol glicosilado		Literatura*	β -sitosterol glicosilado
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,6	37,2	
2	29,6	29,3	
3	78,7	78,5	3,90 (m)
4	39,5	39,1	
5	141,1	140,9	
6	122,1	121,9	5,37 (sl)
7	32,4	31,8	
8	32,2	31,9	
9	50,5	50,2	
10	36,6	36,7	
11	21,5	21,1	
12	40,1	39,8	
13	42,6	42,3	
14	56,4	56,7	
15	24,7	24,3	
16	28,7	28,3	
17	57,0	56,9	
18	12,1	11,7	0,64 (s, 3H)
19	19,4	19,2	0,92 (s, 3H)
20	36,5	36,2	
21	19,2	18,8	0,98 (d, 3H)
22	34,4	34,0	
23	26,5	26,2	
24	46,2	45,8	
25	30,4	30,1	
26	19,4	18,9	0,88 (d, 3H)
27	19,6	19,7	0,86 (d, 3H)
28	23,5	23,2	
29	12,3	11,9	0,84 (d, 3H)
1'	102,8	102,5	
2'	75,5	75,2	
3'	78,2	77,9	
4'	71,9	71,5	
5'	78,7	78,4	
6'	63,0	62,7	

*MONTRUCCHIO et al., 2005

1.4.1.7 Ácido cítrico e derivados

1.4.1.7.1 Substância 24

A fração FCN11 (50,0 mg), substância **24**, foi obtida na forma de cristais brancos a partir do extrato em etanol de frutos de *C. nemorosa* (2^o coleta). A elucidação estrutural de FCN11 foi realizada a partir das análises dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C e comparação com dados descritos na literatura (SAGNER et al., 1998).

O espectro de RMN de ¹H da substância **24** (Figura 95) apresentou dois dupletos em δ_H 2,75 (*d*, *J*= 15,7 Hz, 2H) e 2,63 (*d*, *J*= 15,7 Hz, 2H), sugerindo a presença de dois grupos metílenos com hidrogênios diastereotópicos, o valor da constante de acoplamento é típico de acoplamento geminal em sistemas alifáticos acíclicos (PAVIA et al., 2010). O espectro de RMN de ¹³C (Figura 96) de FCN11 apresentou quatro sinais no total. Os sinais observados em δ_C 174,78 e 171,43 são compatíveis a grupos carboxílicos e a intensidade de um sinal permite sugerir a presença de dois grupos carboxílicos equivalentes; em δ_C 72,50 sugere a presença de carbono quaternário oxigenado, e em δ_C 42,88 caracteriza a presença de grupo metileno ligado a grupos retirados de elétrons (HAWRANIK; SORENSEN, 2010). Através do mapa de correlações HMQC (Figura 97) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_H 2,75 (2-CH₂) e 2,63 (4-CH₂) com o carbono δ_C 42,88 (C-2 e C-4).

Com base no grau de simetria observado no espectro de RMN de ¹H e ¹³C (DEPTQ) (Tabela 21) e por comparação com dados da literatura (SAGNE et al., 1998) propomos a identificação estrutural de FCN11 como o ácido cítrico (**24**). Esta substância está sendo relatada pela primeira vez em *C. nemorosa*.

Algumas propriedades farmacológicas são descritas para o ácido cítrico, tais como, antioxidante (ARAÚJO, 2004) e cardioprotetora (TANG et al., 2013).

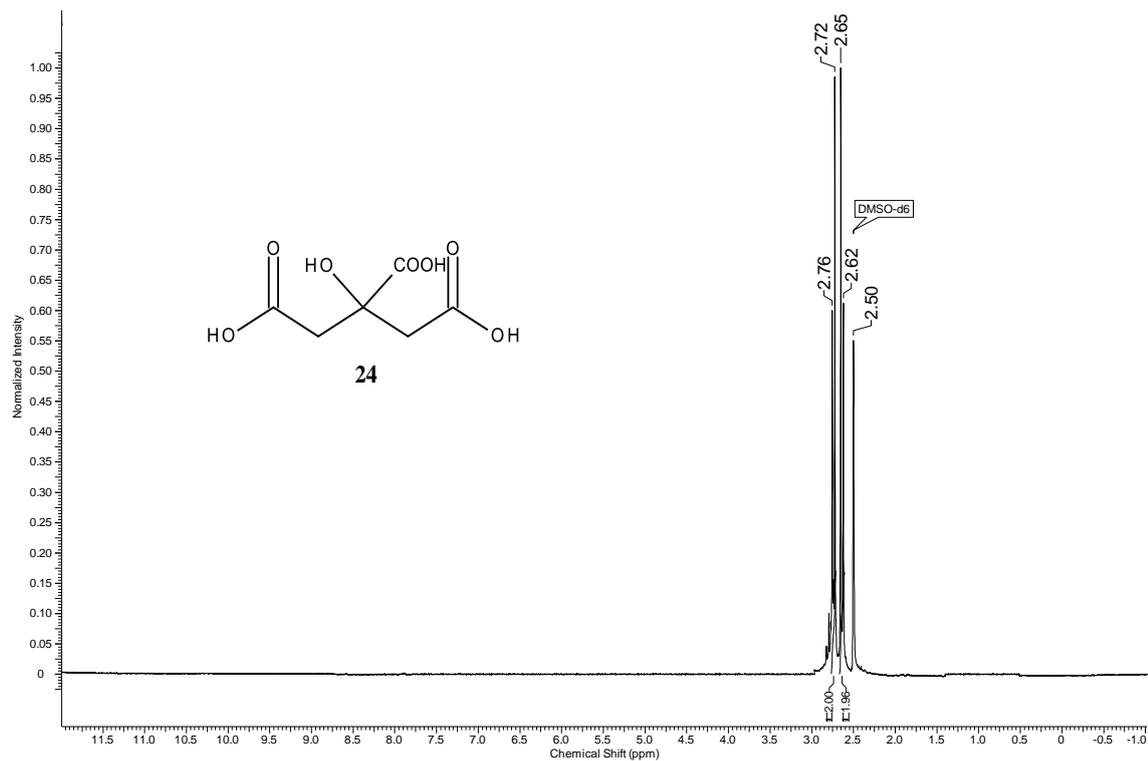


Figura 95. Espectro de RMN de ¹H em DMSO-*D*₆ (500 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).

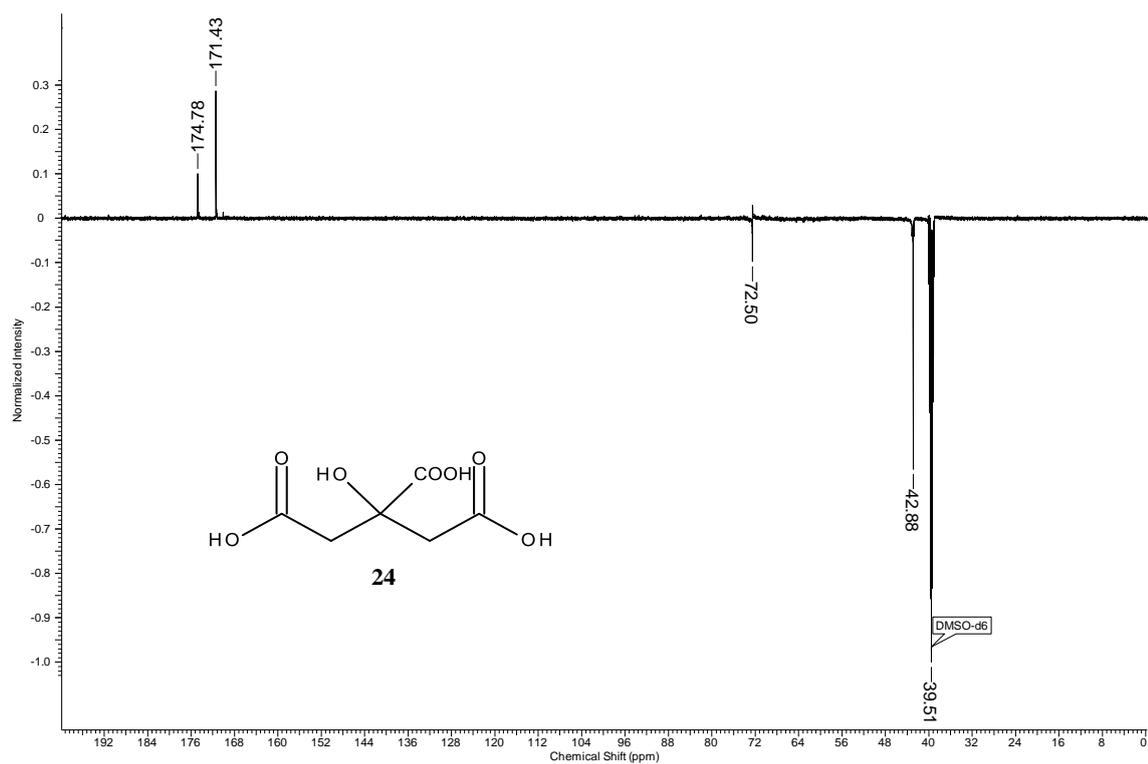


Figura 96. Espectro de RMN de ¹³C (DEPTQ) em DMSO-*D*₆ (125 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).

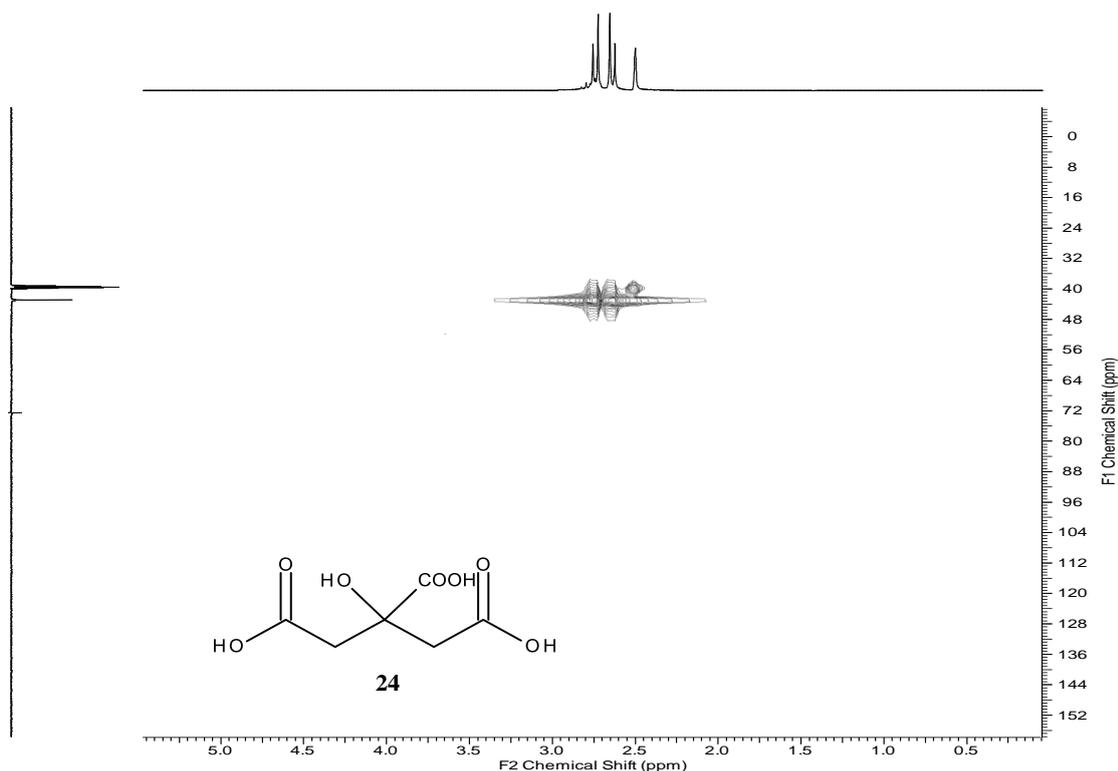


Figura 97. Espectro de HMQC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 500 MHz, RMN de ^{13}C : 125 MHz) de FCN11 (ácido cítrico).

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- D_6 (500 e 125 MHz, respectivamente) de FCN11 (ácido cítrico).

C	Ácido cítrico (24)		*Literatura (Dioxano- d_8)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	171,43	-	174,41
2	42,88	2,75; 2,63 (<i>d</i> , $J=15,7$ Hz)	44,32
3	72,50	-	74,30
4	42,88	2,75; 2,63 (<i>d</i> , $J=15,7$ Hz)	44,32
5	171,43	-	174,41
COOH	174,78	-	177,75

*SAGNER et al., 1998

1.4.1.7.2 Substância 25

A fração FCN7 (35,0 mg), substância **25**, foi obtida na forma de cristais incolores a partir do fracionamento da fração em acetato de etila, extrato em metanol, de frutos de *C. nemorosa* (1^o coleta). A proposta de elucidação estrutural de FCN7 (**25**) foi feita com base nas análises dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, incluindo experimentos bidimensionais (2D). O espectro de RMN de ¹H (Figura 98) apresentou um simpleto em δ_H 3,56 (*s*, 6H) característico de grupo metoxilíco (-OCH₃) de éster e dois dupletos em δ_H 2,84 (*d*, *J*= 15,7 Hz, 2H) e 2,74 (*d*, *J*= 15,7 Hz, 2H), sugerindo a presença de dois grupos metilenos com hidrogênios diastereotópicos, o valor da constante de acoplamento é típico de acoplamento geminal em sistemas alifáticos acíclicos (PAVIA et al., 2010). O espectro de RMN de ¹³C (Figura 99) de FCN7 apresentou cinco sinais no total. Os sinais observados em δ_C 174,3 e 169,9 sugerem a presença de grupos carboxila, sendo um sinal compatível a duas carboxilas equivalentes, como no caso anterior. O sinal em δ_C 74,4 sugere a presença de carbono quaternário oxigenado, em δ_C 51,41 é característico de éster metílico e em δ_C 42,7 caracteriza a presença de grupo metileno ligado a grupos retirados de elétrons (HAWRANIK; SORENSEN, 2010). Através do mapa de correlações HMQC (Figura 100) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_H 3,56 (1,5-OCH₃) com o carbono em 51,41 (1,5-OCH₃), caracterizando a presença de duas metoxilas de éster simétricas na substância, e em δ_H 2,84 (2-CH₂) e 2,74 (4-CH₂) com o carbono δ_C 42,7 (C-2 e C-4). Através do mapa de correlações em HMBC (Figura 101) observou-se a correlação de 1,5-OCH₃ (δ_H 3,56) com o carbono em δ_C 169,9 (C-1 e C-5) e os sinais correspondentes aos hidrogênios metilênicos H₂-2 e H₂-4 (δ_H 2,84 e 2,74) com os carbonos em δ_C 174,3 (-COOH); 169,9 (C-1 e C-5); 74,4 (C-3) e 42,7 (C-2 e C-4).

Com base no grau de simetria observado no espectro de RMN de ¹H e DEPTQ (Tabela 22) e por comparação com dados da literatura (HJUNG-HYUM; DONG-UNG, 2008) fez-se a proposta estrutural do citrato de dimetila ou 1,5-dimetil-citrato (**25**) para FCN7. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez em *C. nemorosa*.

As substâncias **25**, **27**, **28** e **29**, ésteres do ácido cítrico, podem ser considerados como artefatos do procedimento de extração.

Alguns trabalhos relatam a atividade antitrombótica (MIYAZAWA; YAMADA;

UTSUNOMIYA, 2003) e inibitória da enzima monoamina oxidase A (HAN et al., 2001) do citrato de dimetila (**25**).

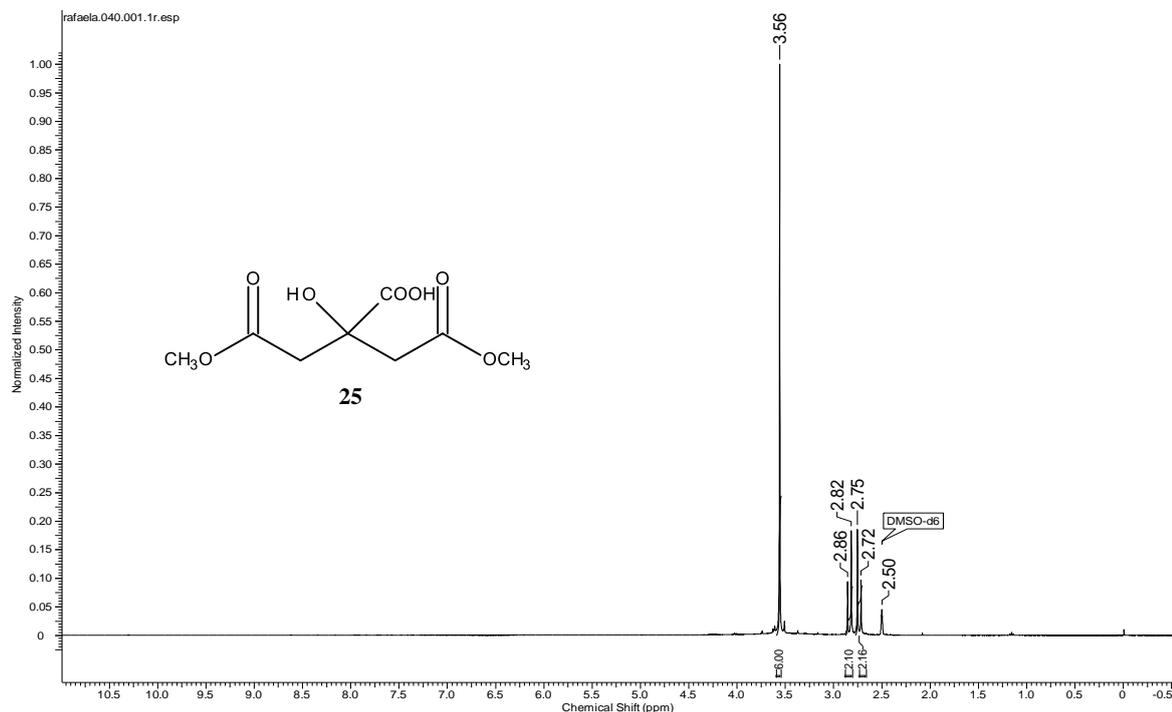


Figura 98. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}D_6$ (400 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).

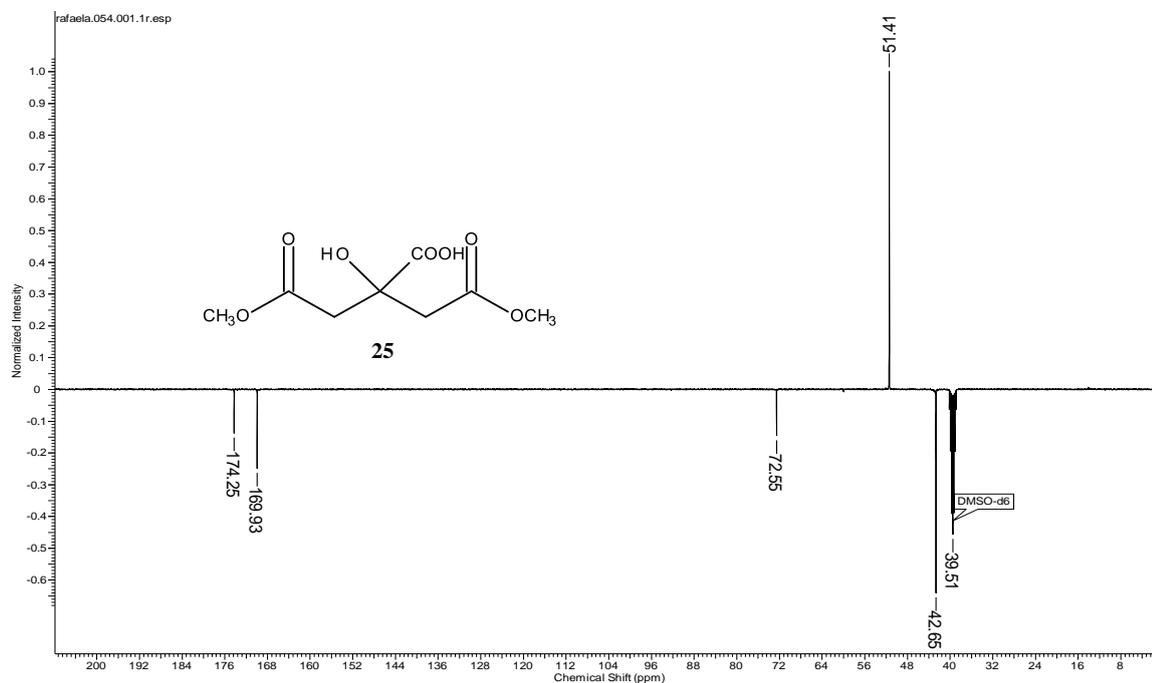


Figura 99. Espectro de DEPTQ em $\text{DMSO-}D_6$ (100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).

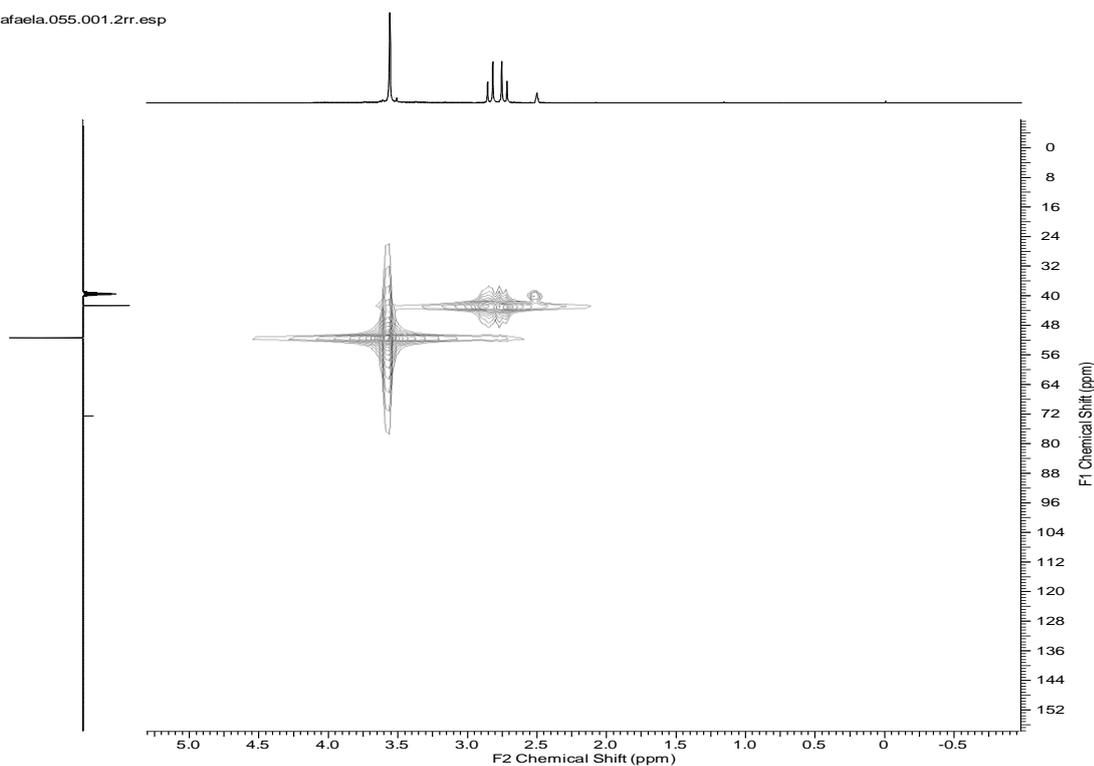


Figura 100. Espectro de HMQC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 400 MHz, RMN de ^{13}C : 100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).

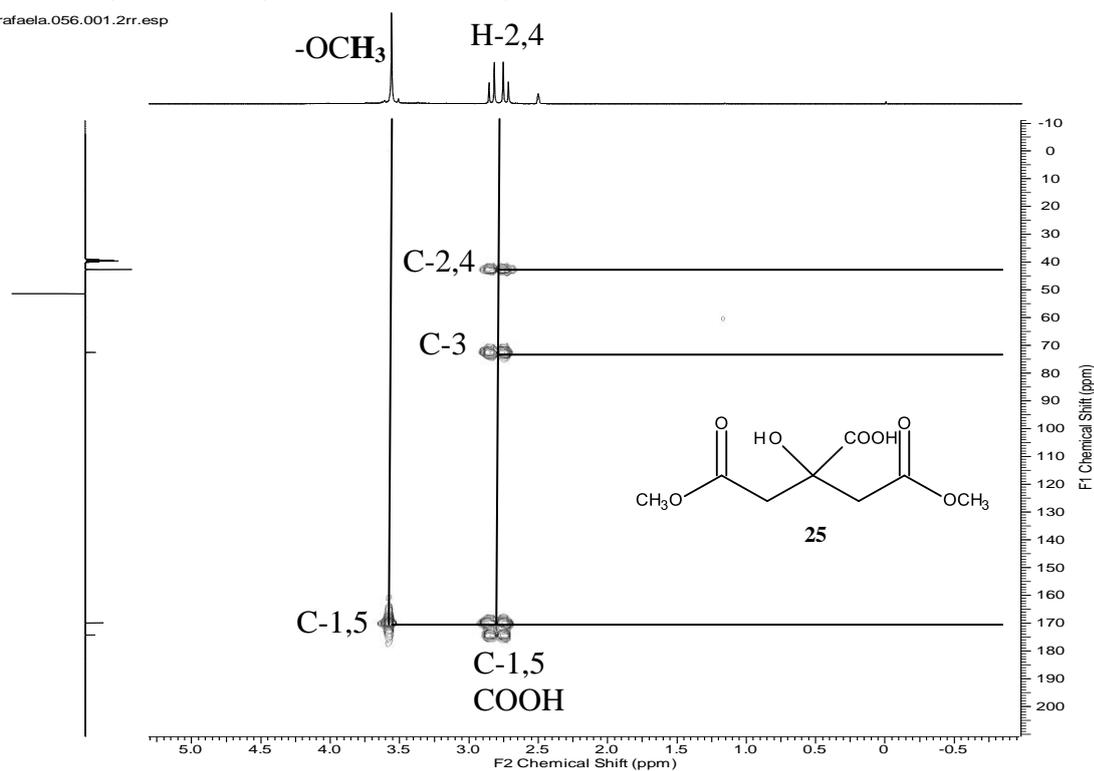


Figura 101. Espectro de HMBC em DMSO- D_6 (RMN de ^1H : 400 MHz, RMN de ^{13}C : 100 MHz) de FCN7 (Citrato de dimetila).

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}D_6$ (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN7 (Citrato de dimetila).

C	Citrato de dimetila (25)		Literatura*(CD_3OD)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	169,63	-	170,80	-
2	42,65	2,74; 2,84 (<i>d</i> , $J=15.7$ Hz)	43,50	2,81; 2,95 (<i>d</i> , $J=15.7$ Hz)
3	72,55	-	73,40	-
4	42,65	2,74; 2,84 (<i>d</i> , $J=15.7$ Hz)	43,50	2,81; 2,95 (<i>d</i> , $J=15.7$ Hz)
5	169,63	-	170,80	-
-OCH₃	51,41	3,56 (s)	51,50	3,66 (s)
	51,41	3,56 (s)	51,50	3,66 (s)
COOH	174,25	-	175,40	-

*JUNG-HYUM; DONG-UNG, 2008

1.4.1.7.3 Substâncias 26 e 27

A fração FCN8 (5,0 mg), substâncias **26** e **27**, foi obtida na forma de uma mistura de sólido marrom cristalino a partir do fracionamento da fração em acetato de etila de frutos de *C. nemorosa* (1^o coleta). A proposta de elucidação estrutural de FCN8 (**26** + **27**) foi feita com base nas análises dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, incluindo experimentos bidimensionais (2D). No espectro de RMN de ¹H (Figura 102) da substância **26** observou-se um padrão de substituição característico de anel aromático do tipo catecólico. Os sinais em δ_H 7,43 (*sl*, 1H, H-3), em δ_H 7,42 (*dd*, $J=8,0$ e $2,0$ Hz, 1H, H-7), que apresentaram constante de acoplamento de hidrogênios em relação *orto* e *meta*, e em δ_H 6,79 (*d*, $J=7,6$ Hz, 1H, H-6) com constante de acoplamento *orto*, levaram a propor um anel aromático com padrão de substituição do tipo ABC. A correlação entre esses hidrogênios foi confirmada pelo espectro de COSY.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 103) pode-se observar a presença de um sinal típico de carbono de grupo carboxila de ácido em δ_C 170,61 (C-1), e os sinais em δ_C 151,57 e 146,18 ppm referentes aos carbonos aromáticos oxigenados em C-5 e C-4, respectivamente. Através da análise de correlação em HMQC verificou-se a correlação do sinal em δ_H 7,43 (H-3) com o carbono em δ_C 117,86 (C-3), do duplo duplete em δ_H 7,42 (H-7) com o carbono em δ_C 123,98 (C-7), e do duplete em δ_H 6,79 (H-6) com o carbono em δ_C 115,86 (C-6). O mapa de correlações HMBC confirmou a proposta estrutural para **26**. Com base nos dados de RMN de ¹H e DEPTQ (Tabela 23) e por comparação com dados da literatura (XU et al., 2013) propomos a identificação estrutural de FCN8 como o ácido protocatecuico (**26**). Além desta substância, foram observados sinais adicionais nos espectros de RMN (1D e 2D) de um segundo componente em mistura (**27**), cujas intensidades dos sinais são diferentes se relacionadas com os de **26**. O espectro de RMN de ¹H (Figura 102) exibiu dois simpletos em δ_H 3,74 e 3,65 o que sugeriu a presença de metoxilas de éster. Foi observado um padrão semelhante de dupletos conforma visto para o citrato de dimetila (**25**), em δ_H 2,90 e 2,80 ($J=15,2$ Hz), o que permitiu sugerir a partir da avaliação destes dados e por comparação com dados da literatura (HAWRANIK; SORENSEN, 2010) que a substância **27** seja o citrato de trimetila (Tabela 24). Estas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez em *C. nemorosa*.

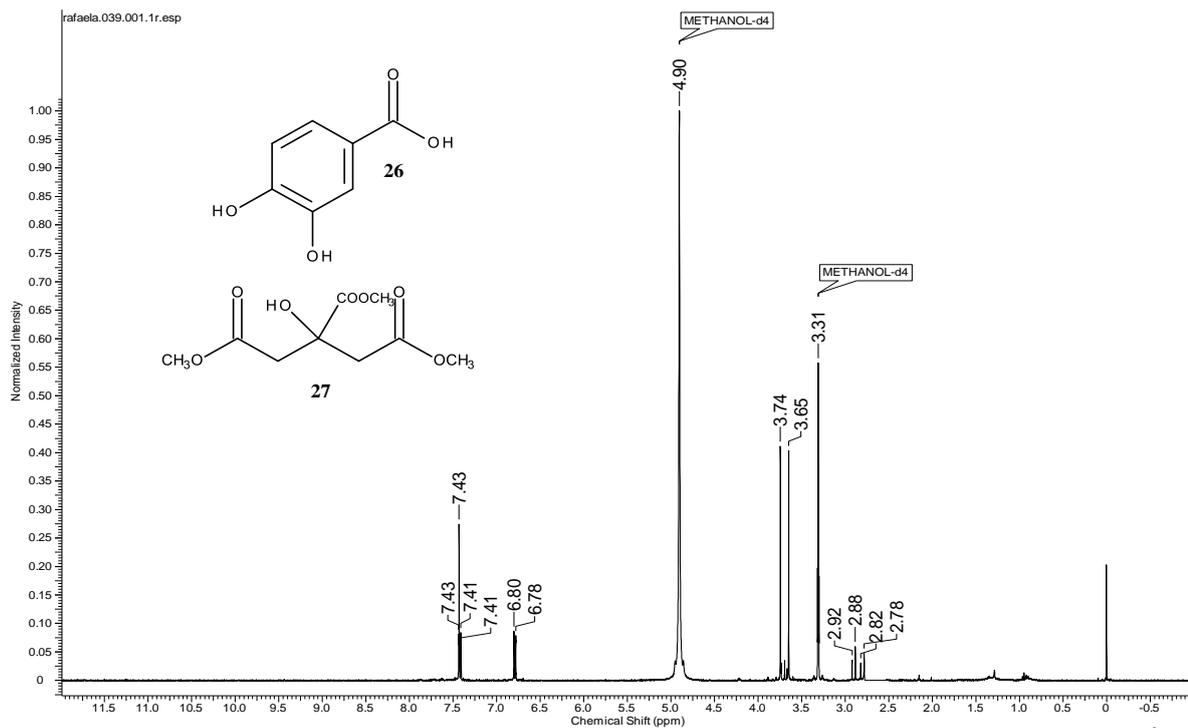


Figura 102. Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (400 MHz) de FCN8 (Ácido protocatecuico + Citrato de trimetila).

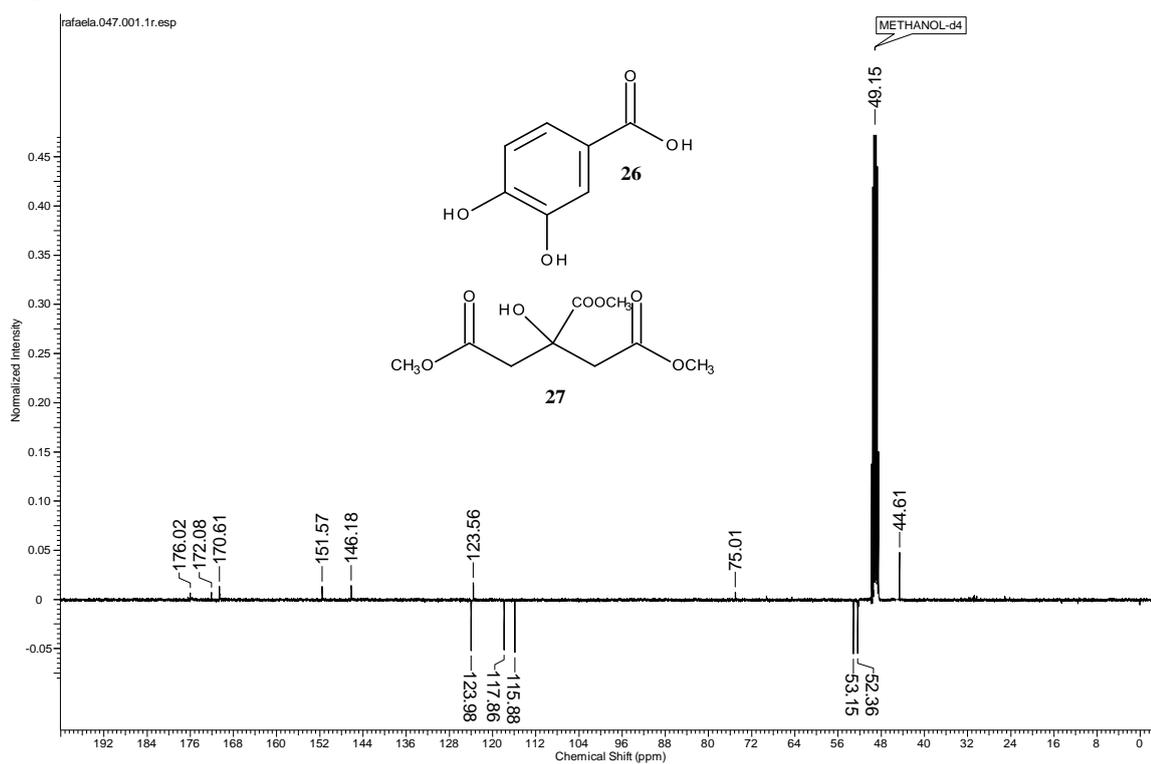


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CD_3OD (100 MHz) de FCN8 (Ácido protocatecuico + Citrato de trimetila).

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN8 (Ácido protocatecuico).

C	Ácido protocatecuico (26)		Literatura*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	170,6	-	170,3	-
2	123,6	-	123,2	-
3	117,9	7,43 (sl)	117,7	7,43 (s)
4	146,2	-	146,1	-
5	151,6	-	151,5	-
6	115,9	6,79 (dd, $J=7,6$ e $0,8$ Hz)	115,7	6,79 (d, $J=7,8$ Hz)
7	123,9	7,42 (dd, $J=8,0$ e $2,0$ Hz)	123,9	7,41 (s)

* XU et al., 2013

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CD_3OD (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCN8 (Citrato de trimetila).

C	Citrato de trimetila (27)		Literatura*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	172,1	-	171,8	-
2	44,6	2,80; 2,90 (d, $J=15,6$ Hz)	44,4	2,82; 2,94 (d, $J=15,3$ Hz)
3	75,0	-	74,8	-
4	44,6	2,80; 2,90 (d, $J=15,6$ Hz)	44,4	2,82; 2,94 (d, $J=15,3$ Hz)
5	172,1	-	171,8	-
1,5- <u>O</u> CH ₃	52,4	3,65 (s)	52,4	3,65 (s)
3- <u>O</u> CH ₃	53,2	3,74 (s)	53,3	3,76 (s)
3- <u>C</u> OOCH ₃	176,0	-	175,3	-

*HAWRANIK; SORENSEN, 2010

1.4.1.7.4 Substâncias 28 e 29

A fração FCN12 (30,0 mg), substâncias **28** e **29**, foi obtida na forma de cristais incolores a partir do fracionamento da fração em acetato de etila obtida da partição do extrato em etanol de frutos de *C. nemorosa* (2° coleta). A proposta de elucidação estrutural de FCN12 foi feita com base nas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais (2D). O espectro de RMN de ^1H (Figura 104) apresentou sinais característicos de grupos etoxílicos ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) em δ_{H} 4,29 (q , $J=7,0$ Hz) e 4,16 (q , $J=7,0$ Hz) de CH_2 e em 1,30 (t , $J=7,0$ Hz) e 1,26 (t , $J=7,0$ Hz) de CH_3 , apresentou simpletos em δ_{H} 3,83 e 3,70 característicos de grupos metoxílicos ($-\text{OCH}_3$) de éster e um pacote de sinais na região de δ_{H} 2,96-2,79, sugerindo a presença de grupos metilenos com hidrogênios diastereotópicos. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 105) da mistura **28** e **29** apresentou sinais de grupos carboxílicos de ésteres, de carbonos quaternários oxigenados e de carbonos metilênicos em δ_{C} 173,8-169,8, 73,2-73,0 e 43,2-43,0, respectivamente, além de sinais característicos de grupos etoxílicos em δ_{C} 62,5-61,1 de CH_2 e 14,0-13,9 de CH_3 e metoxílicos em δ_{C} 53,2-52,0. A análise dos espectros de COSY, HMQC e HMBC confirmaram as propostas de **28** e **29** como citrato de dietil metílico e citrato de dimetil etílico, respectivamente.

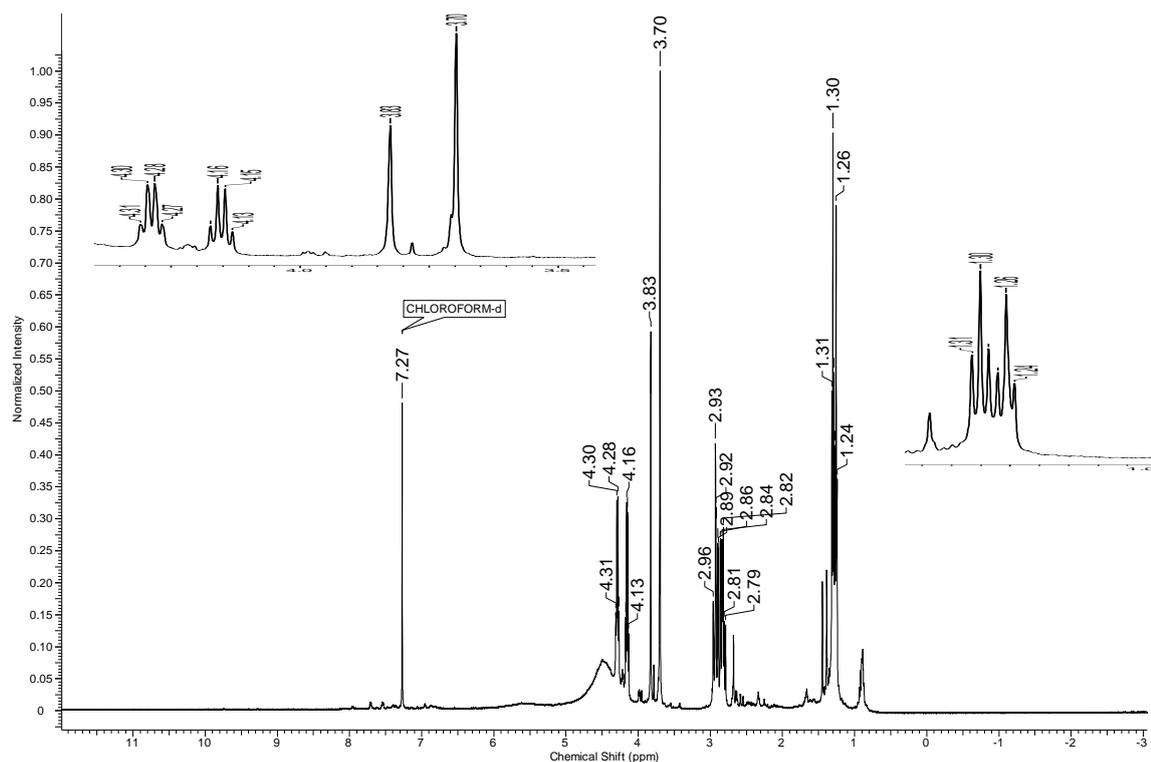


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (500 MHz) de FCN12 (citrato de dietil metílico e citrato de dimetil etílico).

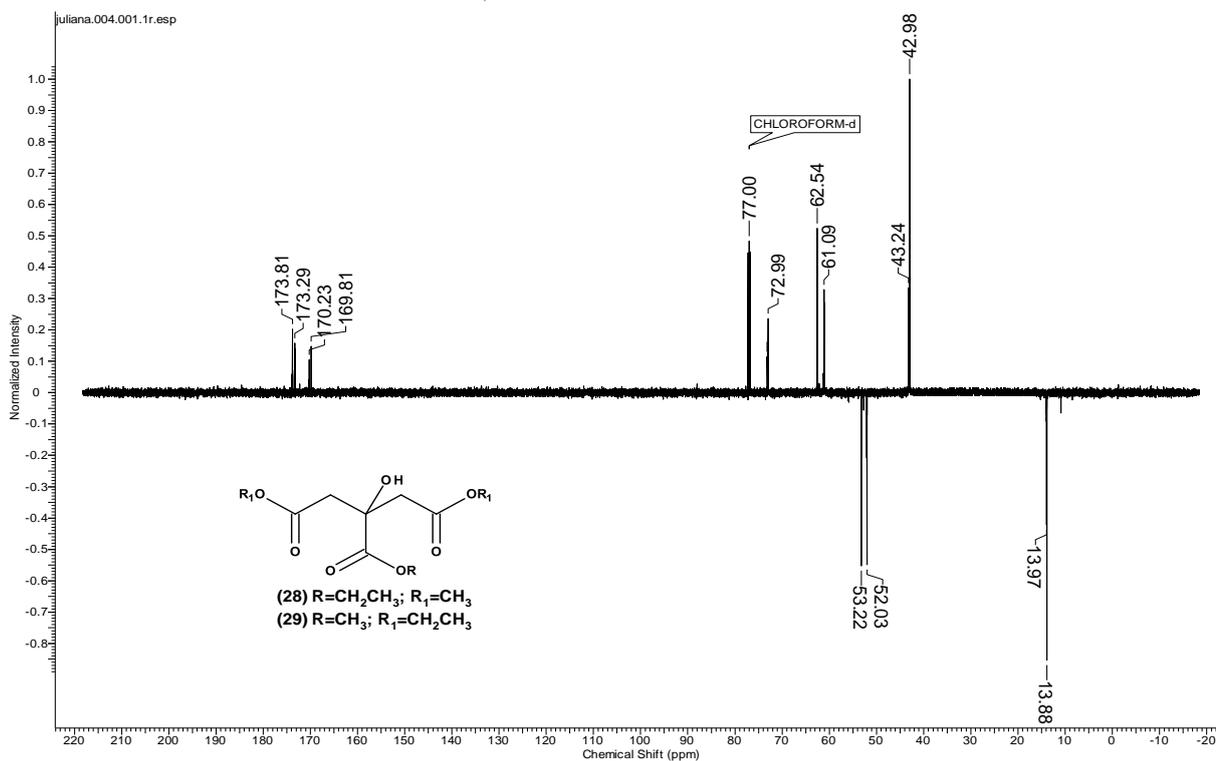


Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) em CD_3OD (125 MHz) de FCN12 (citrato de dietil metílico e citrato de dimetil etílico).

1.4.1.8 Feofitinas

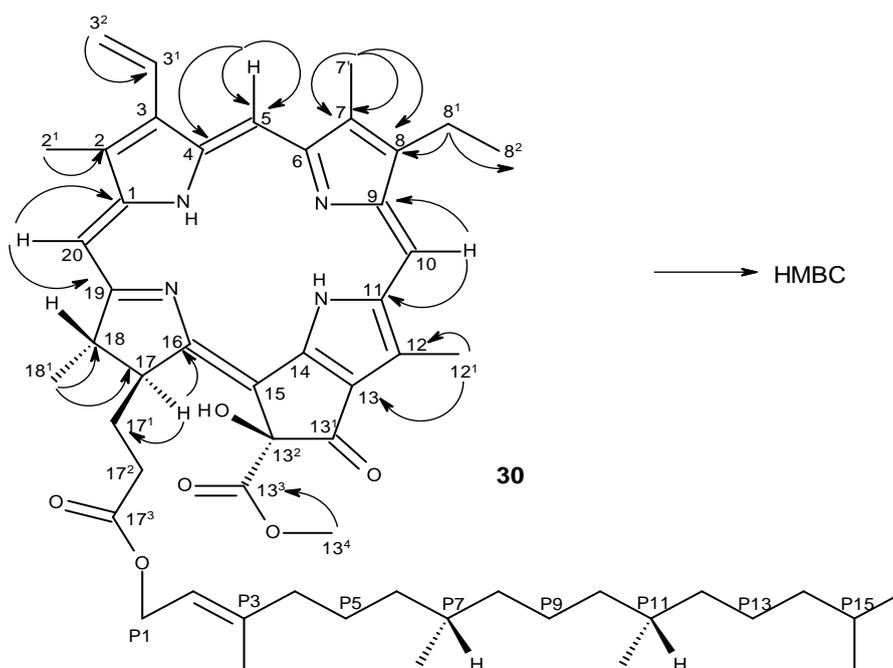
1.4.1.8.1 Substâncias 30 e 31

A fração FCL6 (70,0 mg), constituída das substâncias 30 e 31, foi obtida como um sólido amorfo verde a partir do fracionamento do extrato em diclorometano de folhas de *C. lanceolata*. A elucidação estrutural foi proposta com base na análise dos dados de UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e comparação com dados da literatura (MATSUO et al., 1996). A análise preliminar do espectro de RMN de ^1H permitiu sugerir a presença de uma mistura de substâncias estruturalmente relacionadas, possivelmente isômeros, devido à duplicidade dos sinais e a similaridade nos valores de deslocamento químico.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 106) para a substância FCL6 (componente majoritário, **30**) exibiu sinais referentes a três grupos metínicos aromáticos em δ_{H} 9,57 (1H, s, H-5), 9,42 (1H, s, H-10) e 8,64 (1H, s, H-20), um grupo vinila conjugado em δ_{H} 7,92 (1H, *dd*, $J=17,6; 11,6$ Hz, H-3¹), 6,28 (1H, *d*, $J=18$ Hz, H-3²) e em 6,17 (1H, *d*, $J=11,6$ Hz, H-3²) e três grupos metila aromáticos em δ_{H} 3,74 (3H, s, H-8¹), 3,42 (3H, s, H-2¹) e 3,21 (3H, s, H-7¹) sugerindo a presença do anel porfirínico característico da **feofitina a**. A ausência de um simpleto em δ_{H} 6,27 atribuído ao H-13² da feofitina a em conjunto com a presença de um sinal característico de carbono quaternário oxigenado em δ_{C} 88,96 (C-13²) sugerem a presença de um substituinte -OH nesta posição. Adicionalmente, a presença de um pacote de sinais referentes à hidrogênicos metílicos, metilênicos e metínicos entre δ_{H} 0,8 e 2,9 ppm sugerem a presença do grupo fitil éster em C-17³.

Através do mapa de correlações HMQC (Figura 108) foi possível atribuir os sinais aos carbonos hidrogenados da estrutura, podendo-se verificar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 9,57 (H-10) com o carbono em δ_{C} 104,19 (C-10), em δ_{H} 9,42 (H-5) com o carbono em δ_{C} 97,85 (C-5) e em δ_{H} 8,64 (H-20) com o carbono em δ_{C} 93,61 (C-20). Já no mapa de correlações HMBC (Figura 109) destacam-se as correlações observadas para as metilas ligadas a sistemas aromáticos em δ_{H} 3,21 (CH₃-7¹) com os carbonos em δ_{C} 155,28 (C-6), 145,14 (C-8) e 137,16 (C-7); em δ_{H} 3,42 (CH₃-2¹) com os carbonos em δ_{C} 141,99 (C-1), 136,36 (C-3) e 131,71 (C-2) e em δ_{H} 3,75 (CH₃-12¹) com

os carbonos em δ_C 129,34 (C-12) e 137,74 (C-13). A posição do substituinte etila em C-8 foi confirmada pelas correlações entre o hidrogênio em δ_H 3,64 ($\text{CH}_2\text{-}8^1$) com os carbonos em δ_C 145,14 (C-8) e 17,42 (C- 8^2). Adicionalmente, a metoxila do grupamento éster em δ_H 3,64 ($\text{OCH}_3\text{-}13^4$) se correlaciona com o carbono em δ_C 173,62 (C- 13^3). Outras correlações importantes observadas nos espectros de HMBC de **30** serão destacadas a seguir:



A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) da mistura FCL6 (Tabelas 25 e 26) em conjunto com a comparação com dados da literatura (MATSUO et al., 1996) permitiram identificar o componente majoritário como **13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a (30)** e o componente minoritário como **13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina a (31)**. A diferença estrutural entre estas duas feofitinas está na disposição espacial dos substituintes no C-13². Não foram encontrados na literatura relatos do isolamento de feofitinas no gênero *Clusia*, sendo este o primeiro relato da ocorrência destas substâncias em *C. lanceolata*.

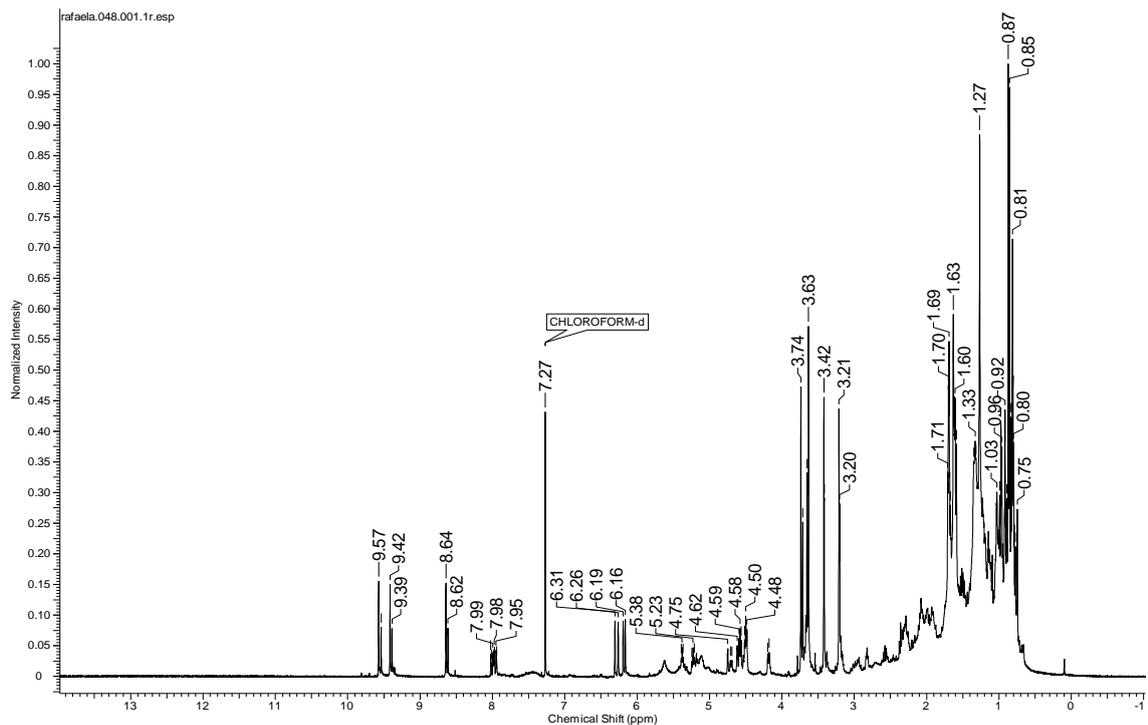


Figura 106. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).

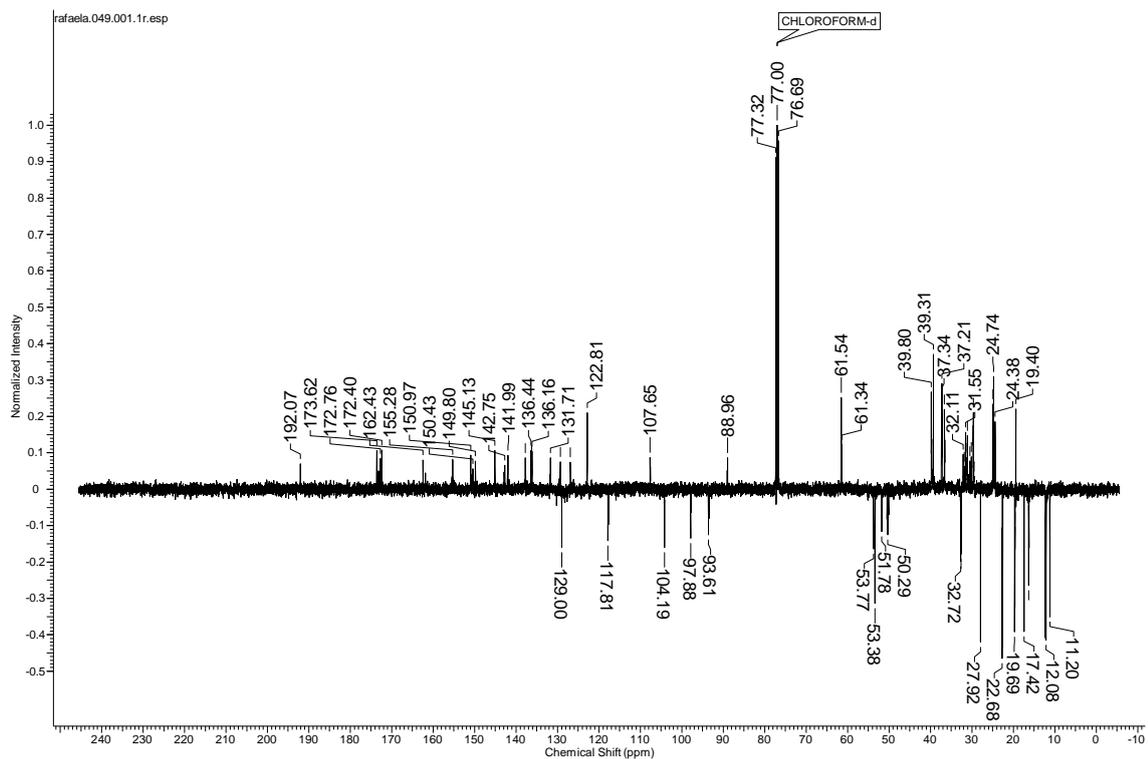


Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).

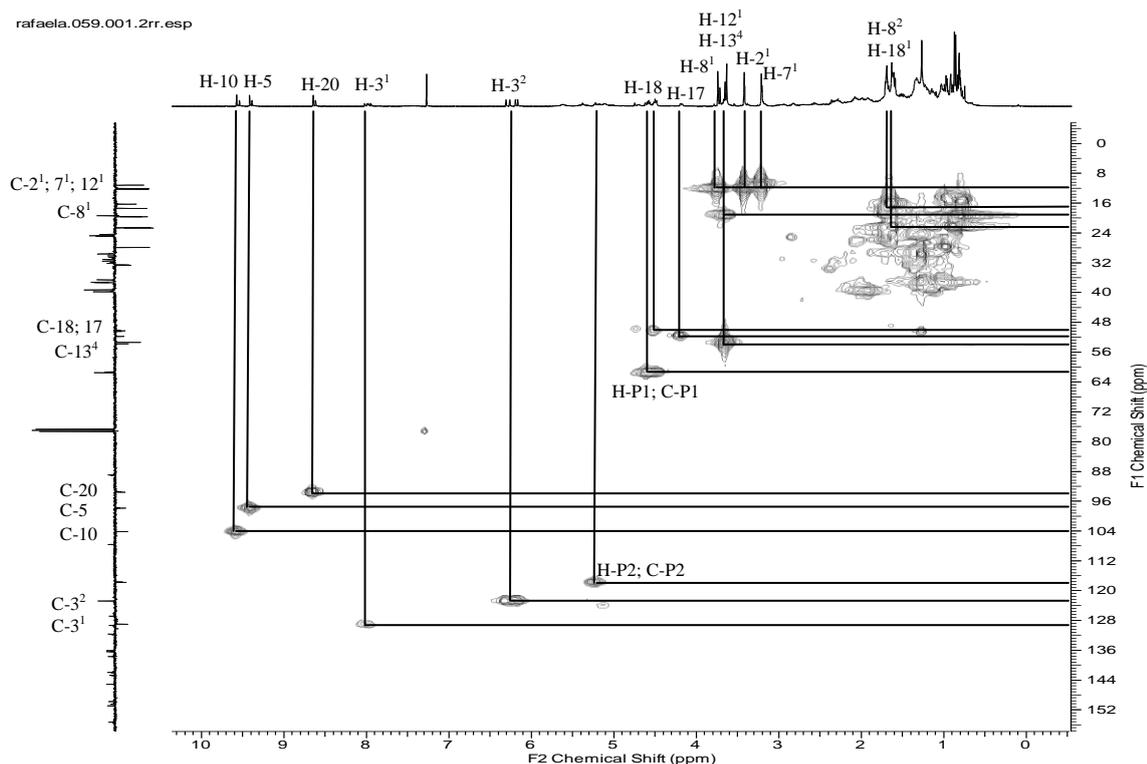


Figura 108. Espectro de HMQC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 400 MHz, RMN de ^{13}C : 100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).

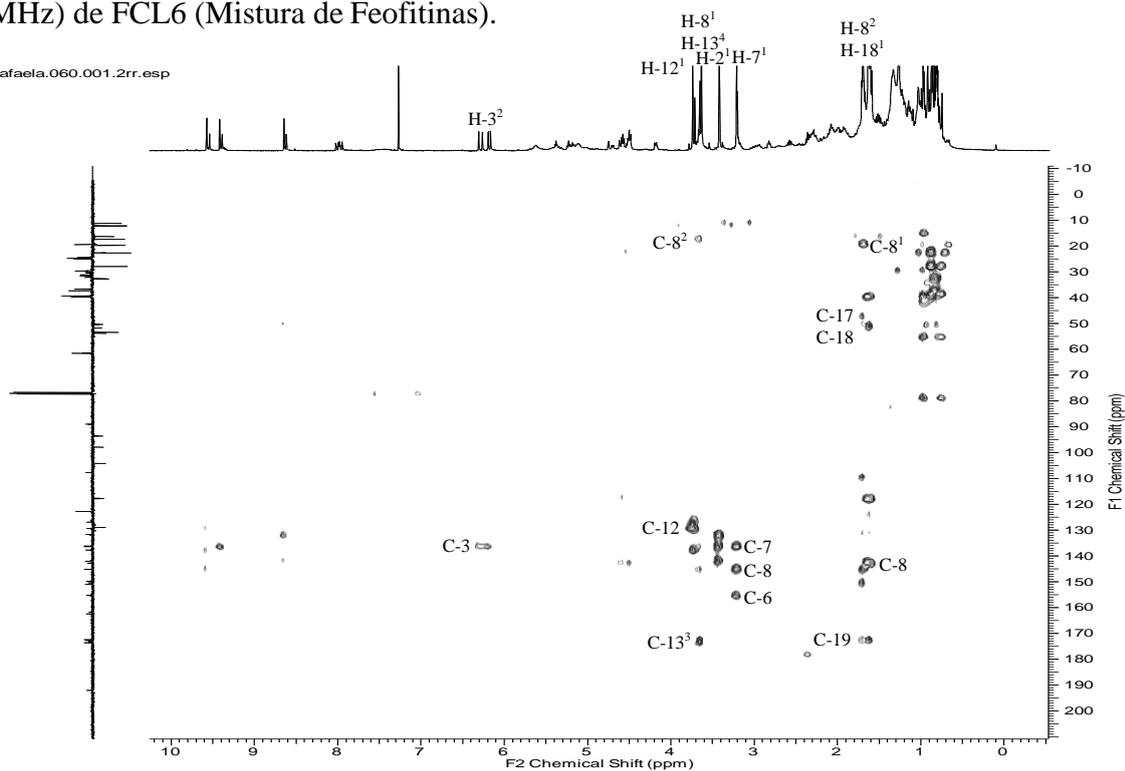


Figura 109. Espectro de HMBC em $CDCl_3$ (RMN de 1H : 400 MHz, RMN de ^{13}C : 100 MHz) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).

Tabela 25. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCL6 (Mistura de Feofitinas).

C	13 ² -hidroxi-(13 ² -S)-feofitina a (30)		13 ² -hidroxi-(13 ² -R)-feofitina a (31)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	141,99		142,86	
2	131,71		131,88	
2¹	12,08	3,42 (s)	12,10	3,41 (s)
3	136,36		136,42	
3¹	128,99	7,98 (<i>dd</i> , 17,6 e 11,6 Hz)	128,97	7,98 (<i>dd</i> , 17,6 e 11,6 Hz)
3²	122,81	6,28 (<i>d</i> , 18 Hz); 6,17 (<i>d</i> , 11,6 Hz)	122,81	6,28 (<i>d</i> , 18 Hz); 6,17 (<i>d</i> , 11,6 Hz)
4	136,44		136,25	
5	97,81	9,57 (s)	97,79	9,54 (s)
6	155,28		155,50	
7	136,16		136,20	
7¹	11,20	3,21 (s)	11,20	3,20 (s)
8	145,14		145,17	
8¹	19,39	3,74 (s)	19,40	3,71 (s)
8²	17,42	1,68 (m)	17,42	1,68 (m)
9	150,97		150,89	
10	104,19	9,42 (s)	104,19	9,39 (s)
11	137,74		137,67	
12	129,34		129,55	
12¹	12,27	3,74 (s)	12,20	3,71 (s)
13	126,88		126,86	
13¹	192,08		192,05	
13²	88,96		89,07	
13³	173,62		173,03	
13⁴	53,38	3,63 (s)	53,77	3,65 (s)
14	149,80		150,43	
15	107,66		107,62	
16	162,43		161,86	
17	51,78		50,45	
17¹	29,67		31,16	
17²	31,55		31,89	
17³	172,76		173,42	
18	50,29		50,11	
18¹	22,69	1,63 (m)	22,62	1,63 (m)
19	172,40		172,77	

20	93,61	8,64 (s)	93,41	8,62 (s)
-----------	-------	----------	-------	----------

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente) de FCLDM3 (Mistura de Feofitinas). Continuação (Cadeia fitol).

C	^{13}C-hidroxi-(^{13}C-S)-feofitina a (30)	^{13}C-hidroxi-(^{13}C-R)-feofitina a (31)
P1	61,54	61,34
P2	117,81	117,66
P3	142,75	142,75
P4	39,80	39,70
P5	24,97	24,94
P6	37,35	37,33
P7	32,72	32,70
P8	37,28	37,25
P9	24,74	24,74
P10	37,21	37,21
P11	32,59	32,56
P12	36,61	36,58
P13	24,38	24,36
P14	39,31	39,31
P15	27,93	27,92
P16	22,68	22,68
P17	22,59	22,62
P11 ¹	19,69	19,69
P7 ¹	19,63	19,63
P3 ¹	16,30	16,30

1.4.2 Avaliação do potencial biológico de espécies de *Clusia*

1.4.2.1 Atividade inseticida

Neste trabalho, foi avaliada a ação inseticida de extratos de folhas de *C. lanceolata* e de frutos de *C. paralicola* frente à mosca *M. domestica*, os parâmetros de avaliação da atividade inseticida foram viabilidade larval e viabilidade neolarva a adulto após contato das larvas com as amostras, conforme descrito na parte experimental.

Foi observado efeito do contato das larvas com extratos e frações de *C. lanceolata* e *C. paralicola* na viabilidade da fase larval de *M. domestica*. No geral, observou-se uma melhora na atividade inseticida com o aumento da concentração das amostras (Figura 110), que foram de 0,1, 0,3 e 0,5 mg/mL, respectivamente. O extrato em metanol de folhas de *C. lanceolata* (FCLM) apresentou moderada atividade em relação ao controle (96% de viabilidade), apresentando apenas 52% de viabilidade larval na concentração de 0,5 mg/mL. Em seguida, destaca-se a fração em acetato de etila de frutos de *C. paralicola* (FCPAE), que apresentou 60% de viabilidade larval na concentração de 0,5 mg/mL. Estes resultados sugerem efeito inseticida de espécies de *Clusia* frente a *M. domestica*. Os resultados da viabilidade larval (%) do controle, extratos e frações de espécies de *Clusia* estão representados na Figura 110.

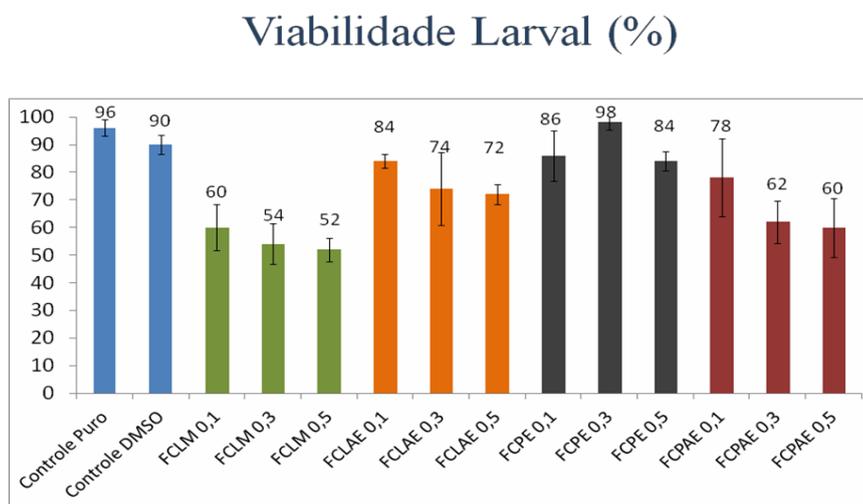


Figura 110. Viabilidade da fase larval de desenvolvimento de *M. domestica* em função do contato das larvas com diferentes concentrações de extrato e frações de espécies de *Clusia*.

Na avaliação da viabilidade neolarva a adulto, o contato da larva com a fração em acetato de etila de frutos de *C. paralicola* (FCPAE) nas concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5 mg/mL apresentou moderada atividade inseticida em relação ao controle (84,6%) com valores de 57,3%, 42,6% e 39,3%, respectivamente. Seguindo do extrato em metanol de folhas de *C. lanceolata* (FCLM) com valores de 55,3%, 53,3% e 43,3%. À medida que se aumentou a concentração dos extratos foi observado aumento no potencial inseticida. Os resultados da viabilidade neolarva a adulto (%) do controle, extratos e frações de espécies de *Clusia* estão representados na Figura 111.

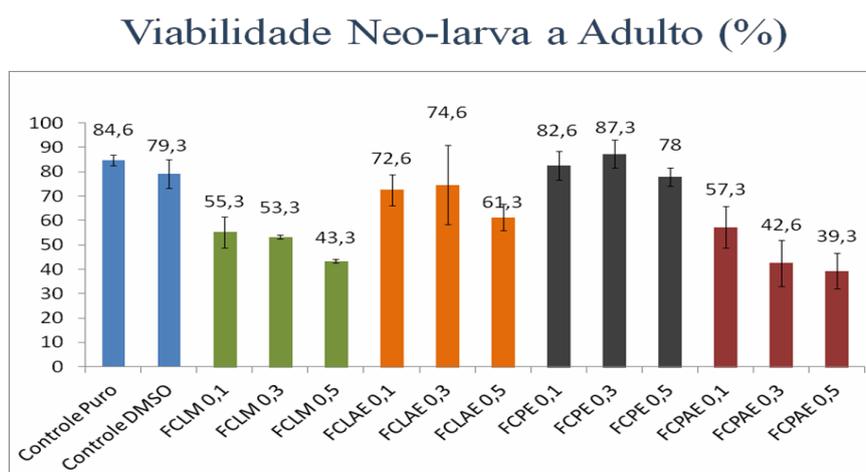


Figura 111. Viabilidade da fase neolarva a adulto de desenvolvimento de *M. domestica* em função do contato das larvas com diferentes concentrações de extratos e frações de espécies de *Clusia*.

Embora os resultados sejam positivos, há a necessidade de ampliar esses estudos, utilizando diferentes concentrações dos extratos e/ou frações ativas e realizar um estudo químico bioguiado pelo potencial inseticida visando identificar as substâncias responsáveis pela bioatividade dos extratos de *Clusia* frente a *M. domestica*.

1.4.2.2 Atividade antimicrobiana

A tabela 27 mostra que os extratos e as frações de *C. nemorosa* e *C. lanceolata* não foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *C. albicans*, *E.coli*, *C. neoformans* e *R. oryzae*, em concentrações diferentes até 2,5mg/mL.

Tabela 27: CIM dos extratos e frações de *C. nemorosa* e *C. lanceolata* sobre micro-organismos.

Concentração Inibitória Mínima (em µg/mL)					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>R. oryzae</i>
Frutos de <i>C. nemorosa</i>					
Extrato DCM	∅	∅	∅	∅	∅
Fração DCM	∅	∅	∅	∅	∅
Fração AcOEt	∅	∅	∅	∅	∅
Fração MeOH	∅	∅	∅	∅	∅
Extrato MeOH	∅	∅	∅	∅	∅
Folhas de <i>C. lanceolata</i>					
Extrato DCM	∅	∅	∅	∅	∅
Extrato MeOH	∅	∅	∅	∅	∅
Controles					
AMB	-	-	1,56	1,56	0,68
CIP	5	5	-	-	-

Os extratos e frações de frutos de *C. nemorosa* foram inativos frente aos micro-organismos testados. Resultado similar foi observado com extratos de folhas de *C. lanceolata*, apesar do estudo químico destes extratos revelarem a presença de substâncias bioativas como flavonoides e triterpenos, que apresentam potencial antimicrobiano descrito na literatura (CUSHNIE; LAMB, 2005; VILLASENOR et al., 2004).

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico dos frutos de *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) possibilitou o isolamento e identificação de **16** metabólitos especiais: ácido nemorosínico (**1**), friedelina (**15**), β -sitosterol (**18**), estigmasterol (**19**), β -sitosterol glicosilado (**22**), estigmasterol glicosilado (**23**), canferol (**10**), quercetina (**11**), apigenina (**9**), ácido *cis*-cumárico (**8**), ácido protocatecuico (**26**), ácido cítrico (**24**), citrato de dimetila (**25**), citrato de trimetila (**27**), citrato de dietil metílico (**28**) e citrato de dimetil etílico (**29**). Entre estes metabólitos, o derivado de floroglucinol (**1**) está sendo descrito pela primeira vez na literatura. Além disto, com exceção do β -sitosterol glicosilado, todos os demais metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez para os frutos desta espécie.

O estudo químico da fração em acetato de etila dos frutos de *C. paralicola* resultou no isolamento de **4** metabólitos especiais: dois biflavonoides, GB1-7''-*O*-glicopiranosídeo (**12**) e GB1a-7''-*O*-glicopiranosídeo (**13**), a euxantona (**14**) e vitexina (**2**). A ocorrência de biflavonoides do tipo 3 \rightarrow 8'' e xantonas nesta espécie pode contribuir em estudos de quimiosistemática dos gênero *Clusia*.

Neste estudo, podemos ressaltar a predominância de agliconas de flavonoides nos frutos de *C. nemorosa* e de heterosídeos nos frutos de *C. paralicola*. Estes resultados podem estar relacionados com o estado de maturação dos frutos na época de coleta do material vegetal.

O estudo fitoquímico de folhas de *C. lanceolata* conduziu ao isolamento de **14** metabólitos especiais: seis flavonas *C*-glicosiladas, vitexina (**2**), isovitexina (**3**), isoorientina (**4**), orientina (**5**), isovitexina-2''-*O*-rhamnosídeo (**6**) e vitexina-2''-*O*-rhamnosídeo (**7**), os triterpenos α -amirina (**16**) e β -amirina (**17**), os esteroides β -sitosterol (**18**), estigmasterol (**19**), β -sitosterona (**20**) e estigmasterona (**21**) e a mistura de feofitinas 13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina a (**30**) e feofitinas 13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina a (**31**). Este é o primeiro relato do estudo fitoquímico de folhas desta espécie vegetal. A presença de flavonas *C*-glicosiladas em folhas de espécies de *Clusia* tem sido descrita na literatura, desta forma, estes resultados podem contribuir com estudos de quimiosistemática. Além disto, este estudo é o primeiro a relatar a ocorrência da flavona isovitexina-2''-*O*-rhamnosídeo (**6**) e das feofitinas (**30** + **31**) no gênero *Clusia* e na família Clusiaceae.

Neste trabalho foram descritas **31** substâncias provenientes do metabolismo especial de espécies de *Clusia*, dentre estas, os biflavonoides, xantonas e um novo

derivado de floroglucinol que são considerados verdadeiros marcadores taxonômicos da família Clusiaceae.

A avaliação do potencial antimicrobiano de extratos e frações de frutos de *C. nemorosa* e folhas de *C. lanceolata* frente a micro-organismos patogênicos não revelaram resultados promissores e as amostras foram inativas nos ensaios realizados.

Já nos ensaios de atividade inseticida frente a *M. domestica*, os extratos e frações de frutos de *C. paralicola* e de folhas de *C. lanceolata* mostraram-se moderadamente ativos. Consideramos, entretanto, que estudos posteriores devem ser incentivados visando isolar os metabólitos que estejam relacionados a esta atividade inseticida.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V.G.C. et al. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 615-621, 2011.

ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. DE S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifolia espinhosa arbórea em Caruaru, Pernambuco. **Acta Botânica Brasílica**, v. 17, n. 2, p. 287-303, 2003.

ALI, H.; DIXIT, S. In vitro antimicrobial activity of flavanoids of *Ocimum sanctum* with synergistic effect of their combined form. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 396–398, 2012.

AFIFI, F. U.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. part 1: flavone C-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, v. 8, p.105–110, 1997.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v.15, p.886-91, 2008.

ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente, antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre micro-organismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n. 2, p. 222-224, 2009.

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

ANHOLETI, M. C. et al. Chemosystematic aspects of poliisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 289-301, 2015.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3° ed. Viçosa – MG: UFV, 2004, 478 p.

ARMBRUSTER, W. S. The Role of Resin in Angiosperm Pollination: Ecological and Chemical Considerations. **American Journal of Botany**, v. 71, n. 80, p. 1149-1160, 1984.

BANDYUKOVA, V. A.; YUNGI, V. A. Natural flavonoid C-glycosides. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 17, p. 5-24, 1981.

BARBIERI JÚNIOR, E. et al. Efeito inseticida de amidas naturais de Piper e do derivado sintético tetraidropiperina sobre *Lucilia cuprina* (Diptera: calliphoridae) e *Musca domestica* (Diptera: muscidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 87-91, 2007.

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

BERNARDI, E. et al. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, p.127-129, 2006.

BRAZIER-HICKS, M. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 17926-17934, 2009.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos – Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Santos, 2010, 416 p.

CAMARGO, L. M. M. et al. Flavonoids from *Mimosa xanthocentra* (Leguminosae: Mimosoideae) and molecular modeling studies for isovitexin-2"-O-alpha-L-rhamnopyranoside rotamers. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 427-431, 2012.

CAMPANA, R. C.; MOURÃO, K. S. M.; MARZINEK, J. Morfoanatomia e ontogênese dos frutos e sementes de *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 437-444, 2010.

CARDONA, M. L. et al. Xanthonas from *Hypericum refluxum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 3003-3006, 1990.

CARVALHO, M. G. et al. Determinação estrutural de flavonoides com análise de espectros de RMN de ^1H 1D e reação com diazometano. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 25, n. 1-2, p. 46-59, 2006.

CASTARDO, J.C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw edema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-11, 2008.

CERRINI, S. et al. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0^{3,7}]-Decane-7-hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1023-1028, 1993.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 9, p. 3963-3986, 2006.

CHEDIER, L. M. et al. Comparative methodology for isolation of flavonoid glycosides from *Clusia criuva* Cambess. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 9, p. 527-530, 1999.

CHEN, F-C.; LIN, Y-M.; HUNG, J-G. A new biflavanone glucoside from *Garcinia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 3, p. 818-820, 1975.

COMPAGNONE, R. S. et al. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2008.

CORTEZ, D. A. G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation of xanthonas and a biphenyl from *Kielmeyera coriaceae* by centrifugal partition chromatography. **Chromatographia**, v. 50, n. 1-2, p. 7-10, 1999.

CUESTA-RUBIO, O. et al. A polyisoprenilated benzophenone from cuban própolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1013-1015, 1999.

CUSHNIC, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, n. 5, p.343-56, 2005.

DA CAMARA, C. A. G. *Clusia – Cultura de Tecidos e Importância do Seu Látex na Sobrevivência das Espécies*. 2001, 233 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

DE ANDRADE, M. R.; ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1431-1433, 1998.

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

DE OLIVEIRA, C. M. A. et al. Floral resins of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6427-6430, 1996.

DELLA GRECA, M.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1430-1435, 1990.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CAVALCANTI, J. F. An unexpected dihydrophenanthrene from *Clusia paralicola*. **Tetraedron Letters**, v. 28, n. 5, p. 563-566, 1987.

DELLE MONACHE, F. Flavonoids C-glycosides from *Clusia sandiensis*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 22, p. 27-29, 1991.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; GACS-BAITZ, E. Two new polyisoprenylated ketones from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 703-705, 1991.

DIAS, M. M.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. Separação semipreparativa de α e β -amyrina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DIAZ-CARBALLO, D. et al. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 622-623, 2003.

DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371 – 374, 2005.

EL-SHARKAWY, I. et al. Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunussalicina* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3631–3643, 2007.

ENGLER, A. Guttiferae et Quinaceae. In: Von Martins, C. F. P. (Ed.). **Flora brasiliensis**. Munchen, Frid. Fleisher, 1888, v. 12, n.1, p. 381-486.

FAIDI, K. et al. Polyphenol derivatives from bioactive butanol phase of the Tunisian narrow-leaved asphodel (*Asphodelus tenuifolius* Cav., Asphodelaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 14, p. 550-557, 2014.

FARIAS, J. A. C. et al. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models. **Inflammation**, v. 35, p. 764-771, 2012.

FELIU, D.A. **Análise de terpenoides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull. Arg) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

FERRARI, J. et al. Isolation and on-line LC/CD analysis of 3,8"-linked biflavonoids from *Gnidia involucrate*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, n. 8, p. 2768-2778, 2003.

FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G.; SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: Aspectos químicos e farmacológicos. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012.

FERREIRA, R. O. et al. Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity. **Natural Products Communications**, v. 7, n.12, p. 1597-1600, 2012a.

FERREIRA, R. O. **Contribuição ao estudo químico e avaliação da atividade antioxidante dos frutos verdes de *Clusia paralicola* (Clusiaceae)**. 2011, 112 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE.

FERRAZ, C. G. **Derivados poliprenilados de benzofenonas, triterpenos, esteróides, bifenila e xantona de *clusia burlemarxii* e atividade citotóxica contra células GL-15, de glioblastoma humano**. 2011, 235 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA.

FREITAS, S. R. Q. **Bioatividade de extratos aquosos de *Eucalyptus sp.* L'Hér. (Myrtaceae) e *Melia azedarach* L. (Meliaceae) sobre *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae)**. 2008, 78 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MATAMOROS, O. M. Acción vaso-periférica Del extracto acuoso de las hojas de *Clusia coclensis* (Clusiaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 575-578, 1998.

GASPAROTTO-JÚNIOR, A. et al. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 371-76, 2005.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GROSSMAN, B. R.; JACOBS, B. On the structures of pluketiones B, D and E and their relationships to the other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Tetrahedron**, v. 41, p. 5165-5169, 2000.

HADIZADEH, F. et al. Kaempferol from Saffron Petals. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 251-252, 2003.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids—Advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994, 676 pp.

HAMED, W. et al. Obongifolins A-D, polyprenilated benzoyl-phloroglucinol derivatives from *Garcinia oblongifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 774-777, 2006.

HAN, Y. N. et al. Monoamine oxidase B inhibitors from the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Archives of Pharmacal Resources**, v. 24, p. 51–54, 2001.

HAN, Q. B. et al. Complete NMR assignments of the antibacterial GB1 from *Garcinia kola*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 1034-1036, 2005.

HAWRANIK, D. J.; SORENSEN, J. L. The isolation of citric acid derivatives from *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 306, n. 2, p. 122-126, 2010.

HEMSHEKHAR, M. et al. An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 325-351, 2011.

HOLTZEL, A. et al. Separation and characterisation of hop bitter acids by HPLC-¹H NMR coupling. **Chromatographia**, v. 2, p. 499-505, 1996.

HUERTA-REYES, M. et al. HIV-1 Inhibition by Extracts of Clusiaceae Species from Mexico. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 2004.

IGOLI, O. J.; GRAY, I. A. Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. **International Journal of Physical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 156-158, 2008.

ISHIGURO, K.; CHAUDHURI, S. K.; KUBO, I. A xanthone from *Clusia insignis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 2531-2532, 1998.

ITO, C. et al. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potencial cancer chemopreventive activities. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 206-209, 2003.

IWU, M. M. Antihepatotoxicity of *Garcinia kola* seeds. **Experimentia**, v. 41, p. 679-700, 1985.

JACKSON, B. et al. Extractives from Guttiferae. Part XXII. The isolation and structure of four novel biflavanones from the heartwoods of *Garcinia buchananii* Baker and *Garcinia eugeniifolia* Wall. **Journal of the Chemical Society C**, v. 1971, p. 3791–3804, 1971.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1983, p. 319-337.

JUNG-HYUM, C.; DONG-UNG, L. Practical Synthesis of Novel Citryl Glycoside, the Component of the Rhizomes of *Gastrodia elata*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2051-2053, 2008.

KERSCHER, F.; FRANZ, G. Isolation and some properties of an UDP-glucose: 2-hydroxyflavanone-6(or8)-C-glucosyl-transferase from *Fagopyrum esculentum* M. cotyledons. **Plant Physiology**, v. 132, p. 110–115, 1988.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KIM, J. H. et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 195-202, 2005.

KORT, R. et al. Evidence for *trans-cis* isomerization of the *p*-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. **FEBS Letters**, v. 382, p. 73-78, 1996.

KUPELI, E. et al. Evaluation of in vivo Biological Activity Profile of Isoorientin. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59 c, p. 787-790, 2004.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 372-379, 2007.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, xantonas e cromonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2° Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2000, p. 451-469.

LARIONOVA, M. et al. A C-Glycosylflavone from *Piper ossanum*, a Compound Conformationally Controlled by CH/ π and Other Weak Intramolecular Interactions. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 10, p. 1623-1627, 2010.

LEE, I. S.; PARK, S. H.; RHEE, I. J. Molecular-based sensitivity of human leukemia cell line U937 to antineoplastic activity in traditional medicinal plants (*Selaginella tamariscina*). **Journal of Food Hygiene and Safety**, v. 11, n. 1, p. 71-75, 1996.

LEMNICH, J.; HAVELUND, S.; THASTRUP, O. Dihydrofurocoumarin glucoside from *Angelica archangelica* and *Angelica silvestris*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 553-555, 1983.

LI, X-C. et al. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3,8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8709-8717, 2002.

LI, Y. L. et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 365-368, 2002.

LIMA, A. C. A. **Contribuição ao conhecimento químico da família Guttiferae. Constituintes químicos das raízes, caule e cascas de *Tovomita brevistaminea* Engl.** 2000. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL.

LIN, Y. M. et al. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.

LOBSTEIN-GUTH, A. et al. Isolation of amentoflavone from *Ginkgo biloba*. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 555-556, 1998.

LOKVAM, J. et al. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, v. 55, p. 29-34, 2000.

LOPES, A.V.; MACHADO, I.C. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 213, p. 71-90, 1998.

LUZZI, R. et al. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 141-144, 1997.

MACHADO, S. M. F. **Contribuições à química das recompensas florais de *Clusia e Tovomitopsis* (Guttiferae).** 2002, 233 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

MANSOUR, S.; IBRAHIM, R. M.; ELGENGAIHI, S. Insecticidal activity of chicory (*Cichorium intybus* L.) extracts against two dipterous insect-disease vectors: Mosquito and housefly. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 192-202, 2014.

MARQUES, E. de J. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica dos componentes de *Clusia criuva* em células GL-15 de glioblastoma humano.** 2011, 224 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA.

MARTINEZ, E. O.; MORENO, B. M.; DELLE MONACHE, F. Fukugetin y fugalosídeo, biflavonoides de *Clusia octopetala*. **Revista Colombiana de Química**, v. 25, p. 15-21, 1996.

MATSUO, A. et al. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic Activity of Some Xanthenes and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 369-372, 2006.

MIYAZAWA, M.; YAMADA, T.; UTSUNOMIYA, H. Suppressive effect of the SOS-inducing activity of chemical mutagen by citric acid esters from *Prunus mume* Sieb. Et Zucc. Using the *Salmonella typhimurium* TA1535/PSK1002 UMU test. **Natural Products Resources**, v. 17, p. 319–323, 2003.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Componentes químicos e atividade antimicrobiana de *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 48-52, 2008.

MONZOTE, L. et al. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone a. **Phytotherapy Resources**, v. 25, n. 3, p. 458-62, 2011.

MORITA, M. et al. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). New -amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 3453-3460, 2000.

NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Xanthenes and Other Constituents of *Vismia parviflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 505-508, 1997.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CHECHINEL FILHO, V. *Calophyllum* Genus: Chemical and pharmacological importance. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

OLALEYE, S. B.; FAROMBI, E. O. Attenuation of indomethacin-and HCl/ethanol-induced oxidative gastric mucosa damage in rats by Kolaviron, a natural biflavonoid of *Garcinia kola* seed. **Phytotherapy Resources**, v. 20, p. 14-20, 2006.

OLIVEIRA, F. A. et al. Pentacyclic triterpenoids, alpha, beta-amyrin, suppress the scratching behavior in mouse model of pruritus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 4, p. 719-725, 2004.

OKUNJI, C .O. et al. Capillary electrophoresis determination of biflavonones from *Garcinia kola* in three traditional African medicinal formulations. **Planta Medica**, v. 68, p. 440-444, 2002.

OTUKI, M. F. et al. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 1, p. 56-62, 2011.

OTUKI, M.F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253–259, 2005.

OYA, A. et al. Prenylated benzophenones from *Triadenum japonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 258-264, 2015.

PANG, X. et al. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting rho GTPases and extracellular signalregulated kinase signaling pathways. **Cancer Resources**, v. 69, n. 2, p. 518–25, 2009.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4^o ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010, 700 p.

PENG, X. et al. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. **Food Chemistry**, v. 106, p. 475-481, 2008.

PENG, X. et al. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 111–115, 2005.

POLICEGOUDRA, R. S. et al. Phenolic Content, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity and Phytochemical Composition of *Garcinia lancifolia*. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 3, p. 268-271, 2012.

PORTO, A. L. M. et al. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. **Phytochemistry**, v. 55, p. 755-768, 2000.

PRABHAKAR, M. C. et al. Pharmacological investigations on vitexin. **Planta Medica**, v. 43, n. 12, p. 396–403, 1981.

PRINZ, S. et al. 4'''-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 12, p. 2920-2931, 2007.

RAYYAN, S. et al. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug '*Crataegi folium cum flore*' (hawthorn). **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 334-41, 2005.

RIBEIRO, P. R. et al. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1237-1240, 2011.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.

ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. New York: Cambridge University Press, 1989.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012, 100 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara – SP.

SAGNER, S. et al. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 339–347, 1998.

SALAMA, A. M. Aislamiento de friedelina y friedelinol de la corteza de *Clusia ellipticifolia*. **Revista Colombiana de Ciencias Quimica e Farmaceutica**, v. 15, p. 99, 1986.

SANTOS-MENDONÇA, I. V. et al. Caracterização e distribuição espacial de galhas em *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) em uma área de Floresta Atlântica, Igarassu, PE. **Lundiana**, v. 8, n. 1, p. 49-52, 2007.

SEEBER, S.; HILGER, R. A.; DIAZ-CARBALLO, D. Clusianone isomers and use thereof for the treatment of tumors and viral diseases. **PCT Int. Appl.**, p. 64, CODEN: PIXXD2 WO 2003043966 A2 20030530, 2003a.

SEEBER, S.; HILGER, R. A.; DIAZ-CARBALLO, D. Substituted bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-triones as pharmaceutically active substances for the treatment of cancer and viral diseases. **Ger. Offen.**, p. 46, CODEN: GWXXBX DE 10157033 A1 20030528, 2003b.

SEO, EUN-K. et al. New biphenyl compounds with DNA strand-scission activity from *Clusia paralicola*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1484-1487, 1999.

SETYAWAN, A. D. Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Nusantara Bioscience**, v. 3, p. 44-58, 2011.

SHIOJIMA, K. et al. Mass Spectra of pentacyclic triterpenoids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 7, p. 1683-1690, 1992.

SILVA, E. M. et al. Clusioxanthone and tocotrienol series from *Clusia pernambucensis* and their antileishmanial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1314-1324, 2013.

SILVA JÚNIOR, I. E. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1b, p. 242-248, 2009.

STEVENS, P. F. Clusiaceae – Guttiferae. In: **The families and genera of vascular plants**. Biomedical and Life Sciences, Springer Berlin Heidelberg, v. 25, n. 3; p. 505-513, 2002.

SUZART, L. R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007.

TALHI, O.; SILVA, A. Advances in C-glycosylflavonoid research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, 859–896, 2012.

TEXEIRA, J. S. R. et al. A new biphenyl from *Clusia melchiorri* and a new tocotrienol from *C. obdeltifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 812-815, 2006.

URZÚA, A. et al. Insecticidal properties of *Heliotropium stenophyllum* essential oil on the House fly, *Musca domestica* L. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 12, p. 196 – 200, 2013.

VERDI, L. G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 360-363, 2004.

VILLASENOR, I. M. et al. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masan leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 53-56, 2004.

WATERMAN, P. G.; HUSSAIN, R. A. Systematic significance of Xanthonenes, benzophenones and flavonoids in *Garcinia*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 11, p. 21-30, 1983.

WONG, W. S. et al. Study of *cis*-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 43, p. 929-937, 2005.

XU, H. X. et al. Isolation and characterization of an antibacterial biflavonoid from an African chewing stick *Garcinia kola* Heckel (Clusiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 497–502, 2013.

XU, S. et al. Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and Their Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 18, p. 5265-5287, 2013.

ZHAO, F. et al. Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 43-49, 2005.

ZHONG, F.-F.; CHEN, Y.; YANG, G.-Z. Chemical constituents from bark of *Garcinia xantochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1695-1703, 2008.

ZHOU, X. et al. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius lebebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, p. 216-221, 2005.

CAPÍTULO 2. PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS SADIAS E GALHADAS DE *C. lanceolata* (CLUSIACEAE)

.....

2.1 INTRODUÇÃO

Células, tecidos e órgãos vegetais estão sujeitos a uma série de fatores, principalmente patológicos, que provocam mudanças no seu desenvolvimento e diferenciação (ROHFRITSCH; SHORTHOUSE, 1982). As galhas ou cecídias são estruturas que se originam através da hipertrofia e hiperplasia de tecidos, pela inibição do desenvolvimento ou modificação citológica em resposta ao ataque de organismos indutores que podem ser vírus, bactérias, fungos, nematódeos, ácaros ou insetos (DAMASCENO et al., 2010).

Plantas hospedeiras suprem as galhas com substância de reserva, pois estas funcionam como um dreno onde o fluxo de foto-assimilados é direcionado. Comumente, as galhas possuem alto conteúdo de nutrientes minerais, carbono e energia, além de acumularem substâncias do metabolismo especial (FORMIGA et al., 2009). O organismo indutor utiliza a galha como um ambiente seguro fora do alcance dos inimigos naturais, de variações ambientais e com nutrição especializada.

Os mecanismos de resistência de plantas em resposta ao ataque de insetos consistem uma série de eventos bioquímicos, incluindo o aumento da produção de compostos fenólicos (ANANTHAKRISHNAN; GOPICHANDRAN; GURUSUBRUMANIAN, 1992). O papel de alguns compostos fenólicos em defesa da planta contra herbívoros e agentes patogênicos tem sido documentado em uma ampla variedade de espécies (CAMPOS; ORIANI, 2006; SOARES et al., 2000). A sua ação defensiva específica depende do composto particular, mas os seus modos de ação incluem a toxicidade, a inibição do crescimento e redução de digestibilidade (BARBEHEEN; CONSTABEL, 2011). Além dos fenólicos, os compostos voláteis das plantas podem agir como sinais químicos para os herbívoros, e suas rotas biossintéticas podem ser alteradas como uma resposta à herbivoria (BANCHIO; ZYGADLO; VALLADARES, 2005; DAMASCENO et al., 2008; TORRES-GURROLA; DELGADO-LAMAS; ESPINOSA-GARCIA, 2011).

A presença de galhas nos vegetais é um fenômeno comum e desperta interesse biológico e ecológico e, em alguns casos, econômico. Entre exemplos de importância econômica podem-se destacar as galhas de algumas espécies de Carvalho (*Quercus spp.* – Fagaceae). Estas galhas podem apresentar elevado teor de ácido tânico, sendo por isso empregada na produção de tintas (FELT, 2001). Porém, a presença de galhas também pode representar desvantagem econômica, isso se a interação inseto-planta promover

alterações na composição química de substâncias que são responsáveis pela atividade biológica de plantas medicinais ou aromáticas (VALLADARES et al., 2002).

2.1.1 Compostos fenólicos e insetos galhadores

Tecidos e células vegetais respondem à injúria, tanto causada por um patógeno como por um agente químico ou mecânico, através de uma série de reações bioquímicas que parecem ser direcionadas para o isolamento do irritante e cicatrização de ferimentos. Estas reações estão associadas a maior produção de substâncias de defesa, tais como, compostos fenólicos, produtos da oxidação dos compostos fenólicos e as fitoalexinas, muitas das quais também são compostos fenólicos (AGRIOS, 2004).

Os fenólicos desempenham uma grande diversidade de atividades em plantas. Eles funcionam como doadores ou receptores de hidrogênio nas reações de oxi-redução, desempenhando um papel fundamental na lignificação. Alguns fenóis são ótimos inibidores do crescimento, enquanto outros agem como estimuladores. Substâncias fenólicas estão envolvidas na determinação do status de desenvolvimento de tecidos vegetais através da sua reatividade com proteínas e enzimas envolvidas na produção de hormônios (HARTLEY, 1998). Mesmo pequenas mudanças no metabolismo dos fenóis podem romper drasticamente muitos processos essenciais para o crescimento e o desenvolvimento vegetal (ISAIAS et al., 2000).

Alguns fenólicos implicados na resistência a doenças ocorrem amplamente em plantas e são encontrados tanto em plantas saudáveis como em doentes, mas sua síntese e acumulação parecem ser aceleradas após a infecção. O ataque de patógenos em plantas parece induzir alterações na síntese de certas enzimas vegetais nos tecidos doentes, tal como a PAL (fenilalanina-amônia liase) que é a enzima chave na produção da molécula base para a biossíntese da maioria dos fenólicos, incluindo as fitoalexinas e ligninas (AGRIOS, 2004).

Derivados fenólicos desempenham um papel importante como substâncias de defesa contra a herbivoria, como, por exemplo, os taninos hidrolisáveis e as proantocianidinas que são substâncias inibidoras de alimentação para espécies de insetos (HARBONE, 1994). Os taninos são efetivos como repelentes de predadores, por tornarem os tecidos menos palatáveis, devido à precipitação das proteínas salivares ou a imobilização de enzimas, impedindo a invasão de tecidos do hospedeiro pelo parasita (RHOADES; CATES, 1976).

Apesar da produção de fenólicos estar associada à função de defesa do vegetal, alterações no metabolismo dos derivados fenólicos do tecido vegetal predado parecem beneficiar o inseto galhador. O aumento na produção dessas substâncias na planta poderia, direta ou indiretamente, proteger esse inseto do ataque de parasitoides e predadores, além de reduzir a competição por alimento ao inibir o ataque de outros insetos fitófagos não adaptados ao ambiente químico dos tecidos vegetais (CORNELL, 1983; SOARES et al., 2000).

Fenólicos são sabidamente reguladores de AIA-oxidases, ácido indolacético-oxidases, enzimas que modulam a concentração de hormônios de crescimento. A presença de alguns fenólicos pode, por exemplo, inibir as AIA-oxidases, aumentando assim a ação das auxinas envolvidas no processo de hipertrofia celular que ocorre durante a formação da galha (FOSKET, 1994). Além disso, esses derivados fenólicos podem agir como inibidores das reações de hipersensibilidade ao minimizar a resposta aos radicais livres produzidos no sítio de oviposição (FERNANDES, 1998).

Diferenças no conteúdo e complexidade de compostos fenólicos em galhas têm sido examinadas (FERREIRA et al., 2014; FORMIGA et al., 2009; NYMAN; JULKUNEN-TITTO, 2000; KRAUS; SPITELLER, 1997). Alguns estudos apontam uma correlação positiva entre a resistência a insetos galhadores e o elevado teor de fenólicos na planta hospedeira, bem como, uma correlação negativa com a sobrevivência do inseto, sugerindo que altos níveis de fenólicos na planta hospedeira pode ser uma alternativa de defesa contra insetos galhadores (WESTPHAL; BRONNER; LE RET, 1981). Entretanto, o oposto também já foi proposto (NYMAN; JULKUNEN-TITTO, 2000).

Padrões gerais de composição química entre tecidos sadios e galhados são complexos de se estabelecer (HARTLEY, 1998) e há pouca informação disponível sobre mudanças no metabolismo secundário relacionadas à cecidogênese.

2.1.2 Insetos galhadores e o gênero *Clusia*

Muitos dos insetos indutores de galhas são altamente específicos para o órgão e para a planta hospedeira, ou seja, eles induzem galhas em apenas uma espécie ou grupo intimamente relacionado de espécies vegetais (MANI, 1992). Os galhadores constituem um grupo de herbívoros com um modo de nutrição altamente específico, sésseis e com uma relação particularmente próxima com seus hospedeiros. Portanto, essa guilda

alimentar constitui-se num modelo promissor para estudos sobre os aspectos químicos da interação entre plantas e seus herbívoros (HARTLEY, 1998).

A aceitabilidade da planta hospedeira envolve suas características químicas e/ou físicas, que são interpretadas ou não pelos insetos herbívoros como sinais para oviposição e de alimentação. A consequência dessa interação estrutura/química pode variar da alta resistência à alta susceptibilidade de plantas potencialmente hospedeiras (ABRAHAMSON et al., 1991).

Alguns trabalhos na literatura relatam a ocorrência de insetos galhadores em espécies do gênero *Clusia*. Tais relatos foram descritos para folhas de *C. nemorosa* (SANTOS-MENDONÇA et al., 2007), *C. arrudae* Planchon & Triana (FERNANDES; COELHO; LUTTGE, 2010) e *C. lanceolata* Cambess (CONSTANTINO; MONTEIRO; WILSON, 2009).

O inseto galhador *Clusiamyia nitida* (Diptera, Cecidomyiidae) frequentemente infesta o arbusto de *Clusia lanceolata* na vegetação Neotropical de restinga do Estado do Rio de Janeiro. CONSTANTINO; MONTEIRO e WILSON (2009) avaliaram possíveis variações morfofisiológicas decorrentes desta interação inseto-planta em folhas galhadas e sadias desta espécie, tais alterações, foram comprovadas nas folhas com galhas, porém não houve evidências suficientes que indicassem o impacto das galhas em parâmetros morfofisiológicos de folhas sadias. Considerando os poucos relatos sobre os impactos desta interação ecológica inseto galhador-planta no metabolismo secundário de espécies de *Clusia* propomos investigar o perfil químico dos extratos foliares com o uso de técnicas hifenadas e avaliar a atividade antioxidante destes extratos (FERREIRA et al., 2014).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Investigar as relações químico-ecológicas entre cecídio/folhas galhadas e folhas sadias de *Clusia lanceolata*, examinando se a presença de um inseto galhador altera o perfil químico e as propriedades antioxidantes dos extratos e óleo essencial das folhas de *C. lanceolata*.

2.2.2 Objetivos específicos

Preparar extratos metanólicos de folhas sadias e com galhas de *C. lanceolata* Cambess;

Quantificar o teor de fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas dos extratos de folhas de *C. lanceolata*;

Obter o perfil químico dos extratos com o uso das técnicas de CLAE-DAD e LC-MS/MS;

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de folhas de *C. lanceolata* pelos ensaios do DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico;

Obter os óleos essenciais de folhas de *C. lanceolata* e analisar por CG-FID e CG-EM.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Reagentes químicos

Reagente de Folin-Denis, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), ácido linoleico, ácido ascórbico, catequina, quercetina, β -caroteno e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) foram adquiridos pela SIGMA (St. Louis, MO, USA). Vanilina e cloreto de alumínio foram adquiridos pela VETEC (Brasil). Tween 20 foi adquirido pela MERCK (Alemanha).

2.3.2 Coleta do material vegetal

As folhas de *C. lanceolata* foram coletadas em setembro de 2012 na restinga de Barra de Maricá, Rio de Janeiro. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RBR), com o número 35424.

2.3.3 Preparação de extratos vegetais

Folhas sadias e galhadas foram secas separadamente à temperatura ambiente (25-30 °C) e pulverizadas em liquidificador. Amostras de 20 g de cada material vegetal foram submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com metanol PA até exaustão. Os extratos metanólicos foram concentrados em evaporador rotatório (50 °C).

2.3.4 Determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas

Para determinação do teor de fenólicos totais foi empregado o método de Folin-Dennis (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), com modificações. Neste ensaio, 0,5 mL do extrato metanólico (0,5 mg mL⁻¹ em metanol) foram misturados com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, após 5 minutos, 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) foram adicionados. Após duas horas de reação, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância da mistura reacional foi mensurada em espectrofotômetro Shimadzu (UV-mini-1240) em 760 nm, usando metanol como branco. A curva padrão foi construída usando ácido gálico (0,0-0,022 mg mL⁻¹) como substância de referência. O conteúdo de fenólicos totais, média de três repetições, foi expresso como equivalentes de ácido gálico (mg EAG g⁻¹ de extrato).

Para determinação do teor de flavonoides foi empregado um método colorimétrico previamente descrito (MEDA et al., 2005). Neste ensaio, 3,0 mL de uma solução metanólica de AlCl₃ a 2% foram adicionados a 2,0 mL de solução do extrato (0,25 mg mL⁻¹ em metanol). Após 30 minutos de incubação, a absorbância foi medida

em 415 nm empregando-se metanol como branco. A curva padrão foi construída empregando-se quercetina (0,0-0,020 mg mL⁻¹) como substância de referência. O conteúdo de flavonoides totais foi calculado como a média de três experimentos e expresso como equivalentes de quercetina (mg EQ g⁻¹ de extrato).

Os taninos foram determinados pelo método da vanilina descrito por PRICE; SCOYOC e BUTLER (1978), com pequenas modificações. Os taninos foram estimados empregando-se 2,0 mL de solução de extrato (1,0 mg mL⁻¹ em metanol) e 5,0 mL de uma solução de vanilina/HCl (preparada pela mistura de volumes iguais de solução de vanilina 2% em metanol e metanol/HCl 8%), após 20 minutos de reação a absorbância foi medida em 500 nm. A curva padrão foi construída utilizando a catequina (0,0-0,040 mg mL⁻¹) como substância de referência. O teor de taninos foi calculado como a média de três experimentos e expresso como equivalentes de catequina (mg EC g⁻¹ de extrato).

2.3.5 Análises qualitativas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) o sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 µL. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Phenomenex C-18 Luna (150 cm x 4,6 mm x 5µm), pré-coluna C-18 ODS SHIMADZU 4,0 mm, solvente (MeOH) da Tedia (Tedia Brazil) grau HPLC/Espectro UV-visível e ácido fórmico Tedia (Tedia Brazil). Foram usados cartuchos com membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (SUPELCO, USA) para filtração das amostras e solventes a serem analisados.

A análise dos extratos de folhas de *C. lanceolata* por CLAE-DAD em método analítico foi realizada com o seguinte sistema de eluição: Ácido fórmico (1%, solvente A) e metanol (solvente B) como fase móvel e gradiente crescente de 0-35 min. 10-100% de B e de 35-40 min. 100% de B, com o fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Para o monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 350 nm e temperatura de 35 °C.

As análises em CLAE-ESI-MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas da marca Bruker Daltonics (Billerica), modelo Esquire 3000 Plus, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador *ion trap*, operando nos modos positivo e negativo.

2.3.6 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de folhas sadias e folhas com galhas de *C. lanceolata* (200 e 100 g, respectivamente) foi obtido por hidrodestilação, usando aparelho tipo Clevenger modificado, por 2 h a contar do início da ebulição da água. Os óleos essenciais obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro e submetidos às análises cromatográficas.

2.3.7 Análises de Cromatografia a Gás (CG)

As análises de CG-FID foram realizadas em um cromatógrafo HP5890-Series II (Agilent Technologies, Califórnia, USA) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida modelo VF-5 MS Varian (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm). A programação de temperatura utilizada foi 60 °C por 2 min e depois 10 °C/min até 110 °C, depois 1,5 °C/min até 180 °C, depois 10 °C/min até 240 °C mantido por 10 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com o fluxo de 1 mL/min. Temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 250 °C, respectivamente. Alíquotas de 1 µL de óleo essencial foram injetadas, a porcentagem dos constituintes foi calculada por integração eletrônica das áreas dos picos no CG-FID.

As análises por CG-EM foram realizadas em um aparelho Shimadzu QP-2010, o espectrômetro de massa foi utilizado no modo de ionização eletrônica a 70 eV, com varredura de m/z de 40 a 550 Da, em uma frequência de 0,5 scan/s. As condições de análise do cromatógrafo foram análogas as empregadas no CG-FID. A identificação dos componentes do óleo foi baseada nos índices de retenção determinados de acordo com o método de VAN DEL DOOL e KRATZ (1963) para padrões de *n*-alcanos (C₈-C₂₆), e por comparação dos espectros de massas dos componentes com aqueles descritos na literatura (ADAMS, 2007).

2.3.8 Atividade Antioxidante

2.3.8.1 Ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH foi realizado de acordo com ZHANG e HAMAUZU (2004), com modificações. A um volume de 29 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mmol L⁻¹) foram adicionados 71 µL de diferentes concentrações de extratos (1,5 a 85 µg mL⁻¹ em metanol) ou padrão de ácido ascórbico (0,5 a 4 µg mL⁻¹ em metanol). A mistura reacional foi mantida por 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e, posteriormente, a absorbância do DPPH remanescente foi

mensurada em 517 nm usando leitor de microplacas. A mistura de 29 μL de metanol e 71 μL de extrato ou padrão foi utilizada como branco, e a mistura de 29 μL de solução de DPPH com 71 μL de metanol foi utilizada como controle negativo. A porcentagem de atividade sequestradora (AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução metanólica do radical DPPH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50 \pm \text{D.P.}}$, que representa a concentração efetiva da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH.

2.3.8.2 Ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante dos extratos no ensaio β -caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com LUIZ et al. (2009) com algumas modificações. Neste ensaio, 20 μL de solução de β -caroteno (20 mg mL^{-1} em clorofórmio) foram adicionadas a 40 μL de ácido linoleico e 400 μg de Tween 20. Esta mistura foi diluída com 100 mL de água destilada saturada em oxigênio com agitação para obtenção de uma emulsão. Posteriormente, 5 mL desta emulsão foi adicionada a 300 μL de extrato (1,0 mg mL^{-1} em metanol) ou ao padrão Trolox (0,1 mg mL^{-1} em metanol). Como controle foi utilizado uma mistura de 5 mL da emulsão com 300 μL de metanol. A mistura reacional foi mantida a 50 $^{\circ}\text{C}$ em Banho-maria durante 2 h. A absorbância dos extratos, padrão e controle foram mensuradas em 470 nm, usando espectrofotômetro UV-mini contra um branco que consistiu na emulsão sem β -caroteno. As medidas de absorbância foram realizadas no tempo inicial ($t=0$) e no tempo final ($t=2\text{h}$) da reação. Os ensaios foram realizados em três repetições. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno por:

$$\% \text{ Inibição} = (Abs^{t=2} \text{ amostra} - Abs^{t=2} \text{ controle}) / (Abs^{t=0} \text{ controle} - Abs^{t=2} \text{ controle}) \times 100$$

Onde $Abs^{t=2}$ é a absorbância da amostra ou controle no final da reação e $Abs^{t=0}$ é a absorbância do controle no tempo inicial de reação.

2.3.9 Análises estatísticas

O teste t-Student foi utilizado para avaliar as diferenças entre grupos, e o valor $p < 0,05$ foi aceito como significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5 DEMO.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Teor de fenólicos, flavonoides e proantocianidinas em extratos foliares de *C. lanceolata*

A herbivoria pode causar vários impactos negativos nas plantas, como dificultar seu desenvolvimento e alterar a alocação de recursos. Assim como outros tipos de herbivoria, as galhas podem enfraquecer as plantas hospedeiras, modificando sua arquitetura e alterando a alocação reprodutiva. Visando avaliar o impacto desta interação inseto-planta na alocação de metabólitos secundários de *C. lanceolata* foram quantificados o teor de fenólicos totais, flavonoides e proantocianidinas em extratos de folhas sadias e galhadas.

O teor de fenólicos totais foi quantificado pelo ensaio de Folin & Dennis que consiste em uma reação de oxidação-redução na qual o íon fenolato é oxidado sob condições alcalinas, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente, resultando numa solução de coloração azul (WATERMAN; MOLE, 1994).

O conteúdo de fenólicos nos extratos foliares sadios e com galhas de *C. lanceolata* foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), sendo maiores nas folhas galhadas (Figura 112). Além dos metabólitos primários, relacionados à nutrição do indutor, as galhas apresentam variações nos compostos do metabolismo secundário, dentre os quais os mais estudados são os compostos fenólicos. A presença destas substâncias é considerada como parte da estratégia de defesa da planta contra o ataque dos insetos herbívoros. Alguns estudos comprovam o estímulo à produção de derivados fenólicos associada à formação de galhas foliares induzidas por espécies de Cecidomyiidae (Diptera) (FORMIGA et al., 2009; ISAIAS, 1998; SCARELLI-SANTOS; VARANDA, 2009).

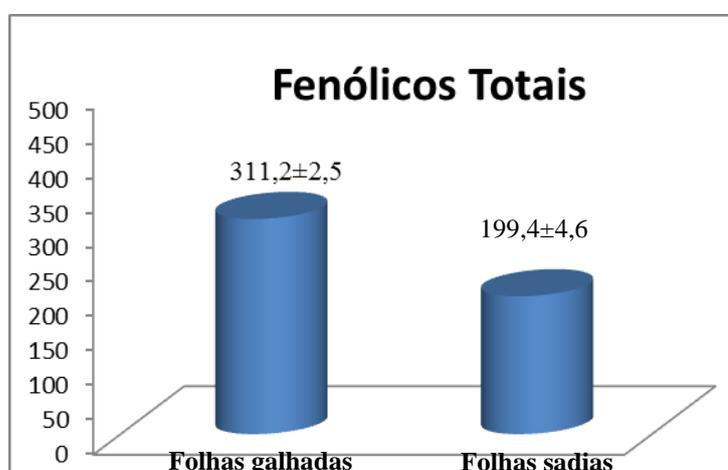


Figura 112. Teor de fenólicos totais (mg EAG g⁻¹) em extratos de *C. lanceolata*.

MOTTA et al. (2005) analisando o teor de fenólicos em galhas ($15,99\pm 0,15$) e folhas sadias ($11,34\pm 0,03$) de *Tibouchina pulchra* observou resultados similares, encontrando um maior teor de fenólicos nos tecidos com galhas. FORMIGA et al. (2009) monitoraram a relação entre o teor de fenólicos totais e o ciclo de desenvolvimento das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* durante 12 meses e notaram que o período onde foi quantificado o maior teor de fenólicos totais coincidiu com o menor nível de infestação por galhas. Este fato, segundo estes autores, indica um ambiente químico celular desestimulante à indução e/ou menos favorável a sobrevivência do indutor. Entretanto, o indutor de *A. spruceanum* superou a barreira química constituída pelos fenólicos totais, alterando os padrões morfogênicos dos tecidos vegetais, beneficiando-se tanto da estrutura da galha quanto da possível ação dos fenólicos na proteção química contra seus inimigos naturais.

O teor de flavonoides nos extratos foliares metanólicos de *C. lanceolata* foi quantificado utilizando-se o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3). Neste ensaio, o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, ocasionando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MARQUES et al., 2012).

Com relação aos flavonoides, foi observado um maior teor destes nas folhas sadias em comparação as folhas com galhas de *C. lanceolata* ($p < 0,05$) (Figura 113). Resultados similares foram reportados para *T. pulchra*, onde o teor de flavonoides nas folhas sadias ($1,26\pm 0,03$) foi maior que nas galhas ($0,31\pm 0,02$) (MOTTA et al., 2005).

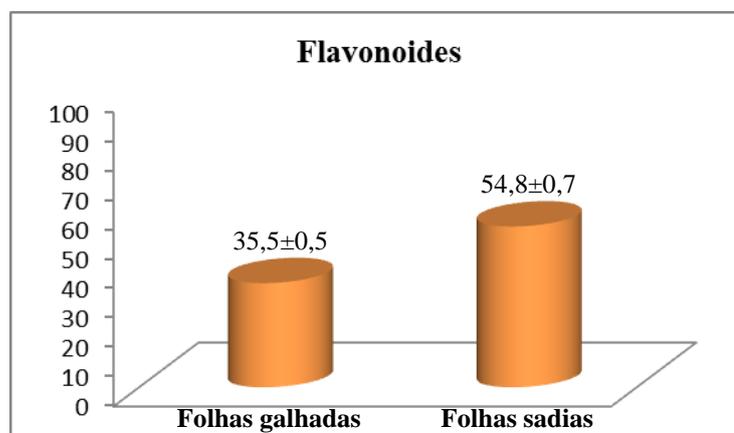


Figura 113. Teor de flavonoides (mg EQ g⁻¹) em extratos foliares de *C. lanceolata*.

ROSENTHAL e BERENBAUM (1991) relataram o envolvimento dos flavonoides em diversas interações inseto-planta e sua ação como sinalizadores químicos na polinização, dispersão de frutos e sementes, e na herbivoria. Entretanto, o papel dos flavonoides na sinalização entre insetos indutores de galhas e a suscetibilidade das espécies hospedeiras é praticamente desconhecido (OLIVEIRA et al., 2006).

O teor de taninos condensados (proantocianidinas) foi quantificado pelo ensaio da vanilina. Este método baseia-se na determinação de taninos pela formação de adutos coloridos a partir da reação entre taninos e aldeídos. O método da vanilina envolve a reação entre o aldeído aromático com o anel *meta* substituído por grupos hidroxila dos flavonóis produzindo um aduto vermelho com absorvância máxima a 500 nm, conforme demonstrado na Figura 114 (BROADHURST; JONES, 1978).

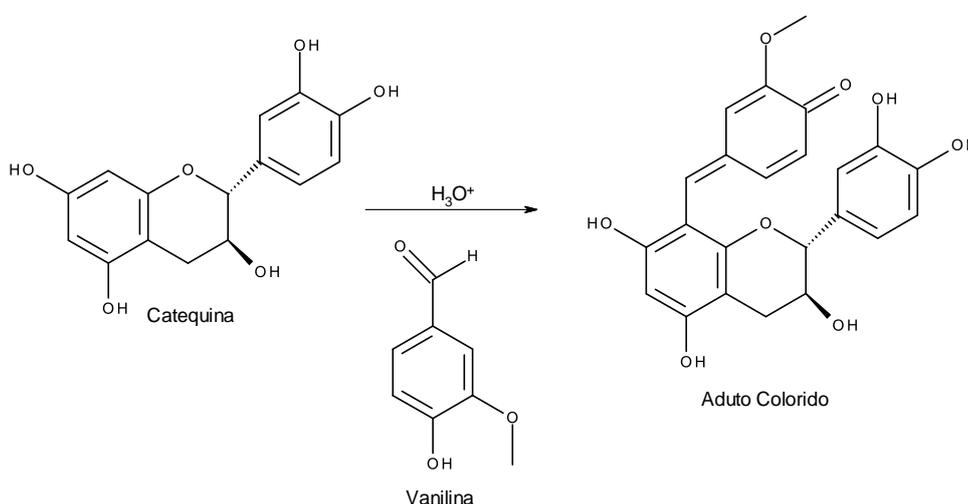


Figura 114. Proposta de reação entre a catequina e a vanilina em meio ácido.

Na determinação de proantocianidinas foi observado um maior teor destes fenólicos nos extratos de folhas galhadas de *C. lanceolata* (Figura 115). Em espécies sensíveis a taninos, a introdução de pequenas quantidades destas substâncias na dieta pode causar uma variedade de consequências adversas, desde a redução do crescimento ao desenvolvimento anormal (BARBEHEIN; MARTIN, 1994).

Sabe-se que muitos insetos picadores-sugadores de plantas produzem enzimas como as polifenol-oxidases (PPO) (MILES, 1969) e peroxidases (HORI, 1992). As PPOs presentes na saliva desses insetos podem agir para converter derivados fenólicos potencialmente tóxicos em produtos não tóxicos, sendo este mecanismo provavelmente utilizado em indutores de galhas. Desta forma, alguns autores sugerem que há um balanço delicado na interação fenol-PPO dos insetos e suas plantas hospedeiras, e que

este balanço determina se o ataque pelos insetos resultará em necrose ou em galhas (HORI, 1992; MILLES, 1968; SOARES et al., 2000).

Devido as suas propriedades antimicrobianas (SCARELLI-SANTOS; VARANDA, 2009), a alta concentração de taninos nas galhas pode favorecer a sobrevivência dos insetos galhadores, uma vez que diminui a eficácia dos seus inimigos naturais e a proliferação de fungos que poderiam eliminar o galhador.

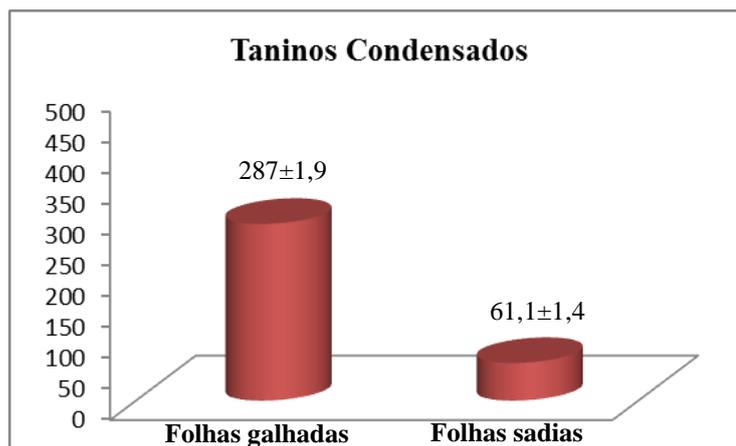


Figura 115. Teor de proantocianidinas (mg EC g⁻¹) em extratos de *C. lanceolata*

Os metabólitos secundários, especialmente os derivados fenólicos, são considerados como potentes antioxidantes. Apesar de não ser efetiva na proteção de *C. lanceolata* contra o ataque do inseto galhador, a maior produção de fenólicos e proantocianidinas no extrato de folhas com galhas pode ser uma resposta ao estresse oxidativo que ocorre durante a cecidogênese.

2.4.2 Perfil químico de extratos foliares de *C. lanceolata* por CLAE-DAD e LC-EM-MS/MS

Perfis cromatográficos obtidos por CLAE podem ser empregados na análise da diversidade química de espécies vegetais ou seus órgãos, tendo também importância no monitoramento da produção de substâncias bioativas. O perfil cromatográfico dos extratos em metanol de folhas sadias e folhas com galhas de *C. lanceolata* (Figura 112) revelou perfil químico similar, com um maior número de substâncias no extrato de folhas com galhas.

A presença de flavonoides foi observada na análise qualitativa dos extratos de folhas sadias e galhadas por CLAE-DAD em $\lambda=350$ nm. Os espectros de UV dos picos

majoritários exibiram duas bandas com máximos de absorção em 270 e 350 nm, característicos de núcleos de flavonas (Figura 116). A ocorrência de flavonas C-glicosiladas em extratos de folhas foi descrito para outras espécies do gênero *Clusia* (CHEDIER et al., 1999; COMPAGNONE et al., 2008; DELLE MONACHE, 1991), desta forma, estes resultados podem contribuir para estudos de quimiosistemática deste gênero.

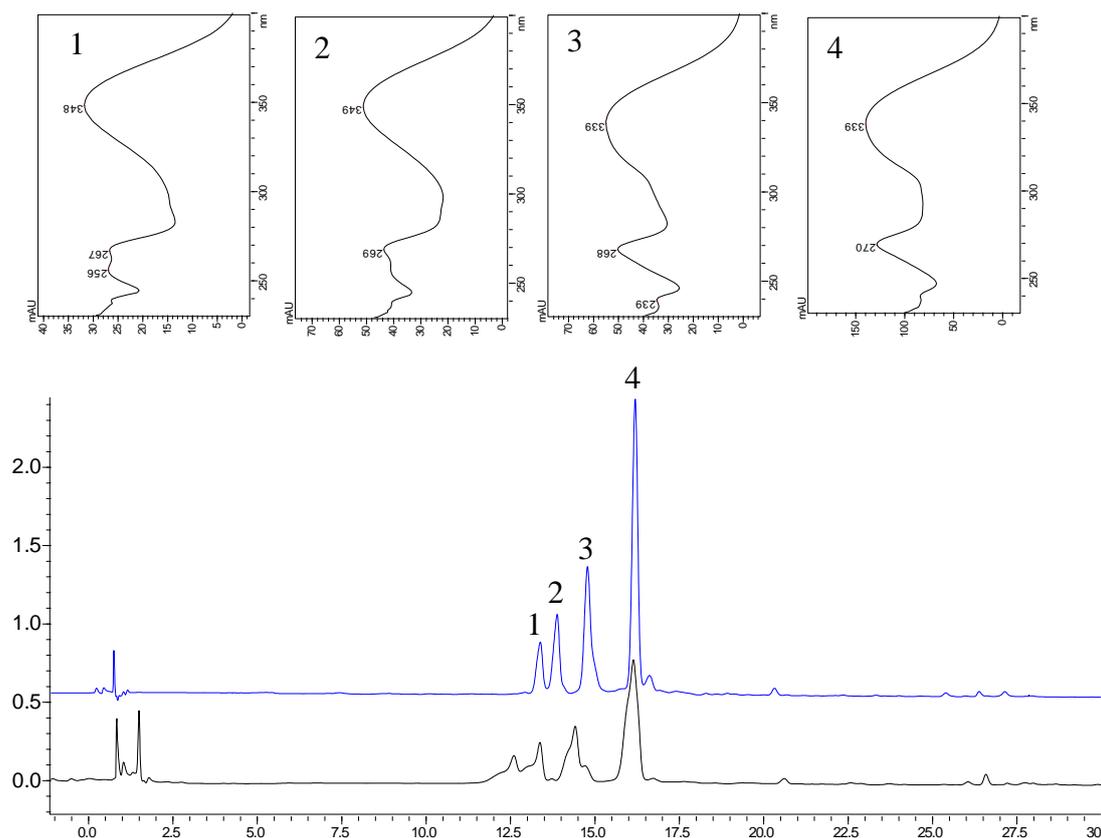


Figura 116. Cromatogramas (CLAE-DAD) de extratos de folhas saudáveis (—) e galdadas (—) de *C. lanceolata* em 350 nm.

Atualmente a desrepliação de produtos naturais é acelerada empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada com espectroscopia de UV e espectrometria de massas (MS) (BITZER et al., 2007). O sistema LC-MS/MS é uma combinação poderosa em que é possível obter o padrão de fragmentação característico de um composto e obter informação sobre sua estrutura química.

Neste estudo, a técnica de LC-DAD-ESI-MS/MS foi utilizada na identificação de flavonas em extratos foliares de *C. lanceolata* (Tabela 28). As quatro flavonas (picos 1, 2, 3 e 4 na figura 117) foram identificadas como orientina, isorientina, vitexina-2''-

O-ramnosídeo e isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo, respectivamente, por comparação dos espectros de UV, valores de massas dos íons pseudo-moleculares $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$, bem como, pelos perfis de fragmentação previamente descritos na literatura (NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; YAO et al., 2012; SUN et al., 2013).

Tabela 28. Identificação de compostos fenólicos das folhas de *C. lanceolata* por CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS.

Pico	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M+H]^+/[M-H]^-$	MS/MS (m/z) (ESI) ⁻	Substância
1	18,552	267, 348	449/447	357, 327	Orientina
2	18,907	269, 349	449/447	429, 357, 327	Isoorientina
3	20,170	268, 339	579/577	431, 413, 293	Vitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo
4	21,531	270, 339	579/577	457, 431, 413, 293	Isovitexina-2''- <i>O</i> -ramnosídeo

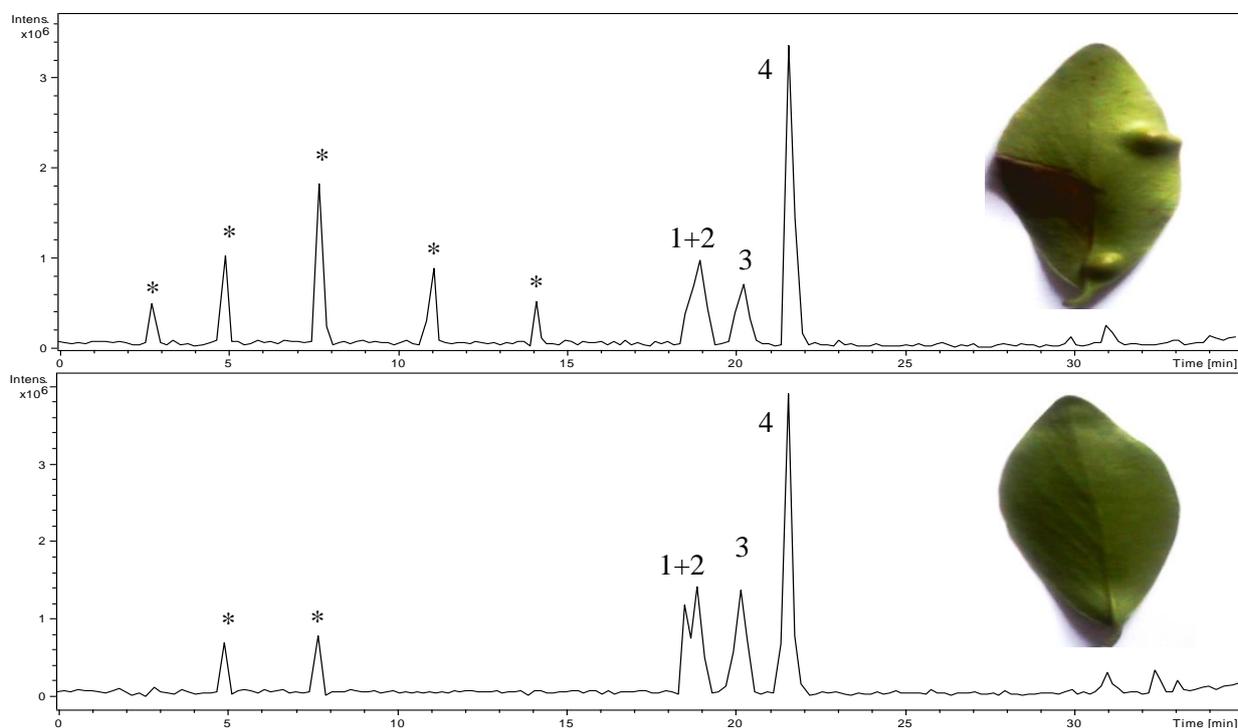


Figura 117. Cromatograma de íons totais (LC-ESI-MS) do extrato metanólico das folhas de *C. lanceolata* no modo positivo: (1) orientina, (2) isoorientina, (3) vitexina-2''-*O*-ramnosídeo e (4) isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo. *Substâncias não identificadas.

Os espectros de ESI-MS dos picos observados em 18,55 minutos (composto 1) e 18,91 minutos (composto 2) (Tabela 28, Figura 117) mostraram o mesmo valor para o íon pseudo-molecular em (+) e (-)-ESI-MS com m/z 449 e m/z 447, respectivamente, o que sugeriu que estes compostos eram isômeros. Os compostos 1 e 2 foram identificados como orientina e isoorientina de acordo com os dados de MS/MS (Tabela 28) e os padrões de fragmentação observados (Figura 118). O composto 2 mostrou íons fragmentos em m/z 429 [(M-H)-18]⁻, 357 [(M-H)-90]⁻ e 327 [(M-H)-120]⁻, respectivamente. O Composto 1 foi associada aos íons fragmentos em m/z 357 [(M-H)-90]⁻ e 327 [(M-H)-120]⁻. Entre estes íons fragmentos, o m/z 429 [(M-H)-18]⁻ foi encontrado apenas no MS/MS da isoorientina (2), não sendo detectado para a orientina (1). Assim, o íon fragmento [(M-H)-18]⁻ pode ser usado para distinguir flavonoides 6-C-glicosídeos de 8-C-glicosídeos (ABAD-GARCIA et al., 2008). Em geral, a fragmentação dos 6-C-isômeros é mais intensa, com relação ao íon correspondente a [(M-H)-18]⁻, provavelmente devido à formação de uma ligação de hidrogênio adicional entre a hidroxila na posição 2'' da unidade de açúcar e as hidroxilas nas posições 5-ou-7 da aglicona (Figura 120), que conferem rigidez adicional (NEGRI et al., 2012).

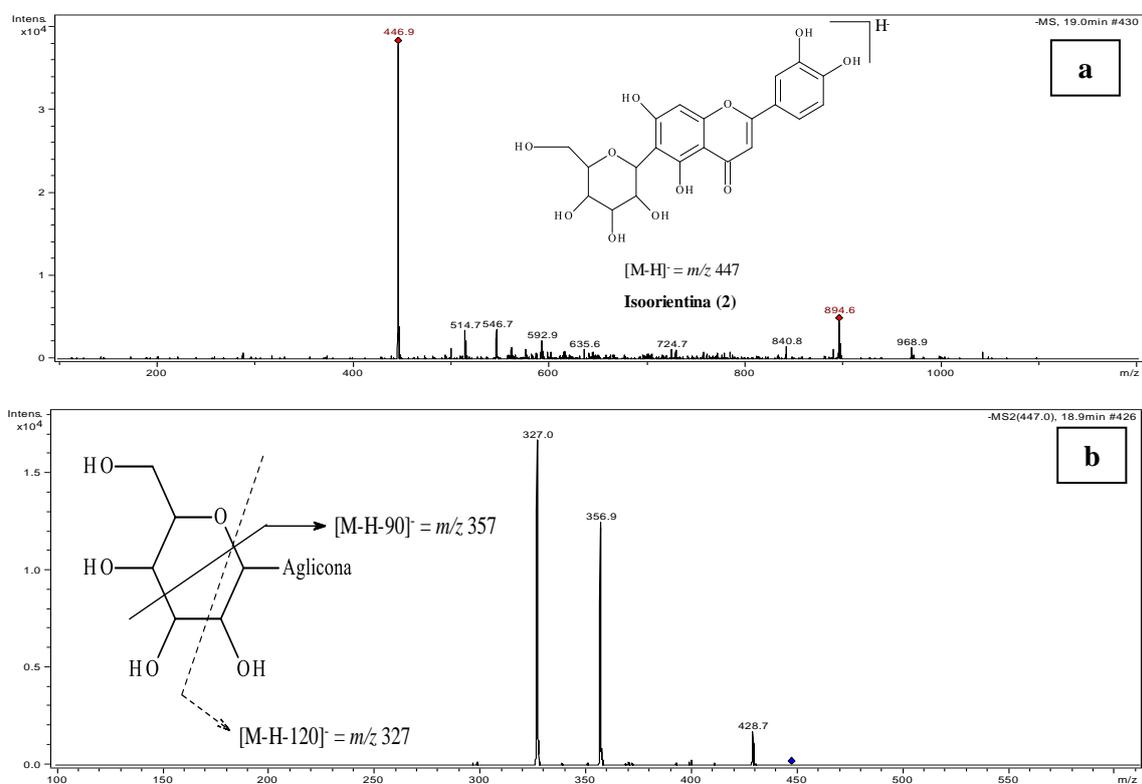


Figura 118. a. Espectro de massas obtido por ESI-MS/MS (modo negativo) da isoorientina. **b.** Espectro de massas EM/EM do íon 447.

Picos 3 (t_R 20,17 minutos) e 4 (t_R 21,53 min) exibiram um máximo de absorção de UV semelhante ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 270) e íon pseudo-molecular em m/z 577 $[M-H]^-$ e 579 $[M+H]^+$. Os picos 3 e 4 foram identificados como vitexina-2''-*O*-ramnosídeo e isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo de acordo com os dados de MS/MS (Tabela 28) e padrões de fragmentação (SUN et al., 2013). Pico 4 foi relacionado com íons fragmentos em m/z 457 $[(M-H)-120]^-$, 431 $[(M-H)-146]^-$, 413 $[(M-H)-146-18]^-$ e 293 $[(M-H)-284]^-$. Entre estes íons fragmentos, m/z 431 $[(M-H)-146]^-$ pode ser explicado pela perda de uma unidade de ramnose e, em seguida, a perda de uma molécula de água forma o íon em m/z 413 $[(M-H)-146-18]^-$. Além disso, m/z 457 $[(M-H)-120]^-$ resultou de uma clivagem cruzada do anel da porção *C*-glicosídeo e m/z 293 $[(M-H)-284]^-$ corresponde à combinação de ambas as fragmentações (Figuras 119 e 120). O composto associado ao pico 4 foi caracterizado como apigenina-6-*C*-glicosil-2''-*O*-ramnosídeo, também conhecido como isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo.

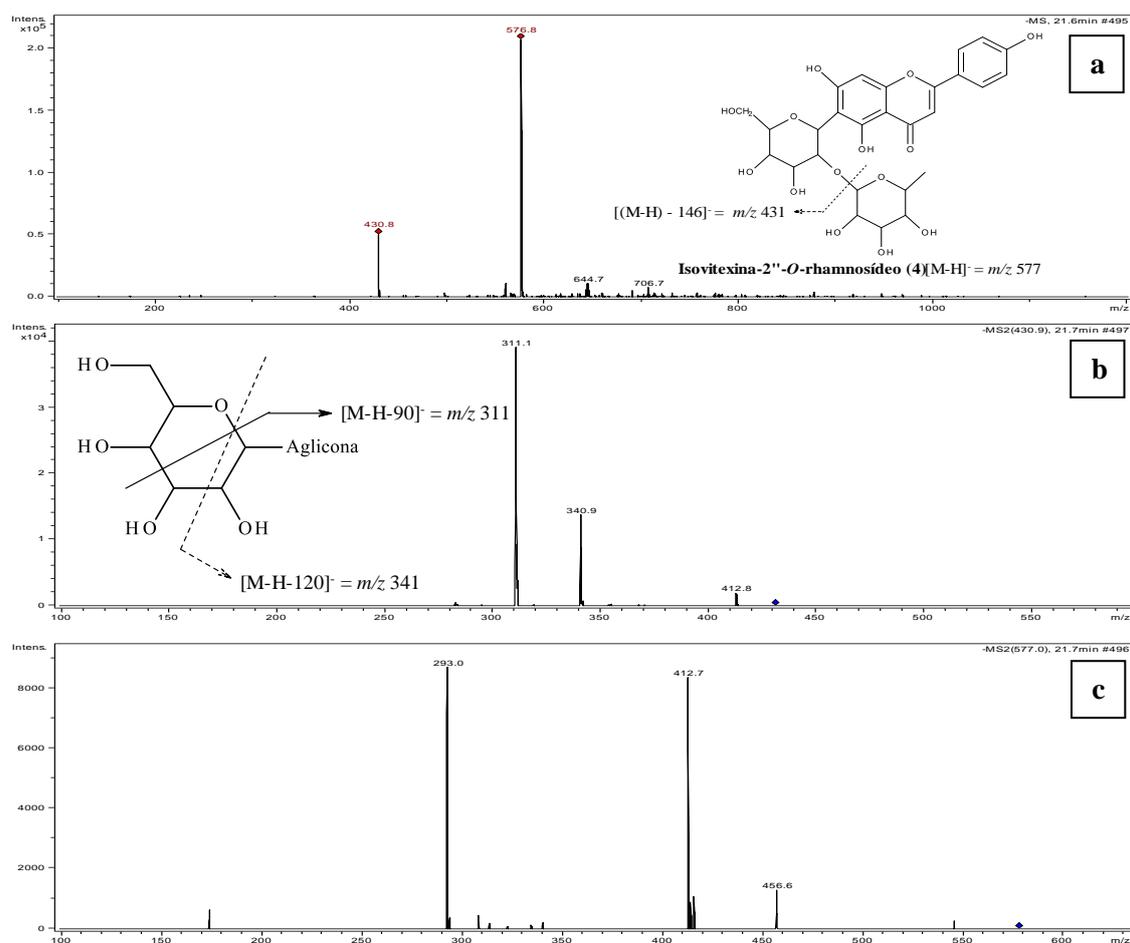


Figura 119. a. Espectro de massas obtido por ESI-MS/MS (modo negativo) da isovitexina-2''-*O*-ramnosídeo. b. Espectro de massas EM/EM do íon 431. c. Espectro de massas EM/EM do íon 577.

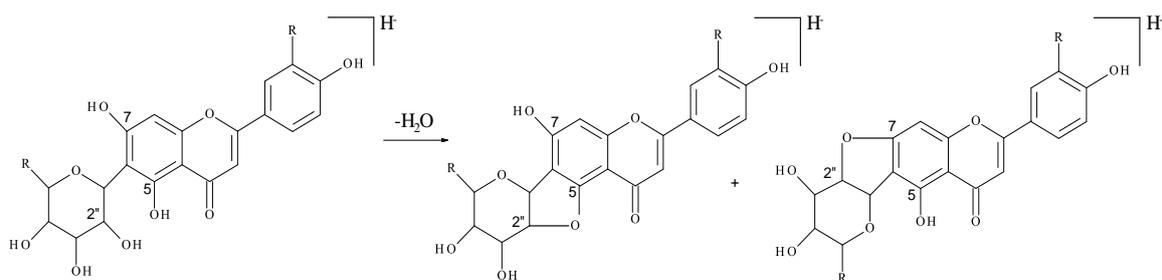


Figura 120. Proposta de fragmentação para justificar a perda de água observada para flavonoides 6-C-glicosídeos envolvendo o grupo hidroxila da posição 2'' do resíduo de açúcar com os grupos hidroxilas das posições 5-ou-7 da aglicona.

A análise LC-ESI-MS/MS (Figura 117) de extratos metanólicos de *C. lanceolata* forneceu dois perfis químicos que nos permitem distinguir entre as folhas galhadas e sadias. Folhas galhadas de *C. lanceolata* têm um maior número de compostos fenólicos detectáveis do que as folhas saudáveis. Estes resultados sugerem que esta interação inseto-plantas pode estar promovendo alterações no metabolismo e na distribuição de metabolitos nas folhas de *C. lanceolata* Cambess.

Alguns flavonoides apresentam atividade inseticida, pois podem atuar como inibidores de enzimas reguladoras, tais como a ATPase dependente de cálcio (SALUNKE et al., 2005). As ATPases, um importante alvo de inseticidas, são enzimas que hidrolisam o ATP e utilizam a energia liberada no processo para realizar algum tipo de trabalho celular (DIAS; COELHO, 2007). A isoorientina (2), um dos principais constituintes identificados nos extratos foliares de *C. lanceolata*, apresenta atividade larvicida (WIDSTROM; SNOOK, 1998). Alguns tipos de sedas de milho (*Zea mays* L.) apresentam genes que controlam a biossíntese desta flavona C-glicosilada que atua como antibiótico contra larvas de lagarta de espiga de milho (*Helicoverpa zea* Boddie).

Muito embora os derivados fenólicos sejam comumente relacionados à defesa das plantas contra herbivoria, a presença dessas substâncias não impediu a oviposição do indutor, nem o desenvolvimento das galhas. É possível que o aumento na produção de derivados fenólicos seja uma resposta ao estresse oxidativo provocado pelo processo cecidogênico (SOARES et al., 2000).

2.4.3 Potencial antioxidante de extratos foliares de *C. lanceolata*

As análises qualitativa e quantitativa das substâncias presentes em extratos de *C. lanceolata* sugeriram alterações no perfil químico de folhas saudas em comparação às folhas galhadas, conseqüentemente espera-se observar diferenças em propriedades farmacológicas relacionadas a estas substâncias. Neste sentido, foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos de folhas saudas e galhadas de *C. lanceolata*.

O DPPH[•] é um cromóforo estável que apresenta um pico de absorção em 520 nm em meio etanólico e sua solução apresenta coloração violeta intensa (ALVES et al., 2010). Por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH[•] é reduzido formando DPPH-H (hidrazina), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (HUANG et al., 2005). O fator determinante nesta reação é a acessibilidade estérica, neste caso, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparadas a moléculas maiores. Este método é considerado fácil, preciso e reprodutível na avaliação da atividade antioxidante de suco de frutos, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides (ALVES et al., 2010).

Os resultados da atividade sequestradora do radical livre DPPH[•] de extratos e padrão (ácido ascórbico) estão representados na Figura 121. O extrato de folhas galhadas apresentou maior atividade antiradicalar que o extrato de folhas saudas ($p < 0,05$), ambos os extratos foram considerados ativos ($CE_{50} \leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$) (CAMPOS et al., 2003). Muitos trabalhos indicam o efeito protetor dos compostos fenólicos contra danos oxidativos (ROBBINS, 2003), desta forma, parte da atividade antioxidante observada pode ser atribuída às flavonas C-glicosiladas identificadas nos extratos foliares de *C. lanceolata*. A atividade antioxidante de proantocianidinas demonstrou-se 50 vezes maior do que a vitamina C e 20 vezes maior que a vitamina E (MAJO et al., 2008). A maior atividade sequestradora radicalar de extratos de folhas galhadas em comparação a folhas saudas pode estar relacionada ao maior conteúdo de fenólicos e proantocianidinas. A variação na distribuição de metabólitos resultante desta interação inseto-planta pode ser responsável pela maior atividade antioxidante das folhas galhadas de *C. lanceolata*.

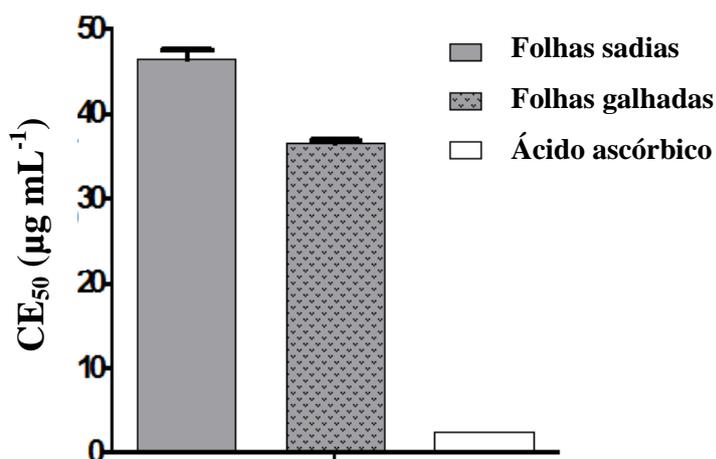


Figura 121. Atividade antioxidante de extratos de *C. lanceolata* no ensaio do DPPH*.

A avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais pelo ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico baseia-se na descoloração do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais, ou extratos naturais contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno (SOKMEN et al., 2004). A auto-oxidação do β -caroteno/ ácido linoleico é um ensaio que difere do outro método de avaliação da atividade antioxidante (DPPH*), pois sua matriz de reação é uma emulsão. O comportamento de muitos antioxidantes pode mudar ante o meio em que se encontram (MELO et al., 2011). Em emulsões, é relatada maior eficácia protetora de antioxidantes lipofílicos, já que se direcionam na interface óleo-água (ALVES et al., 2010).

Neste ensaio, verificamos resultados similares para ambos os extratos de folhas de *C. lanceolata* ($p < 0,05$) (Figura 122), sendo os dois extratos capazes de retardar a queda de absorvância do β -caroteno. Na quantificação de metabólitos secundários mais polares, como os compostos fenólicos, verificamos diferenças significativas entre os dois extratos de *C. lanceolata*, porém ao analisar a composição química lipofílica por CG-MS observamos perfis químicos similares para os óleos essenciais de folhas sadias e com galhas (ver item 2.4.4). Desta forma, como neste ensaio os antioxidantes lipofílicos são mais efetivos, poderíamos esperar os resultados similares observados, considerando que, está interação inseto galhador-planta parece ter promovido variações na composição química dos compostos fenólicos com características mais hidrofílicas.

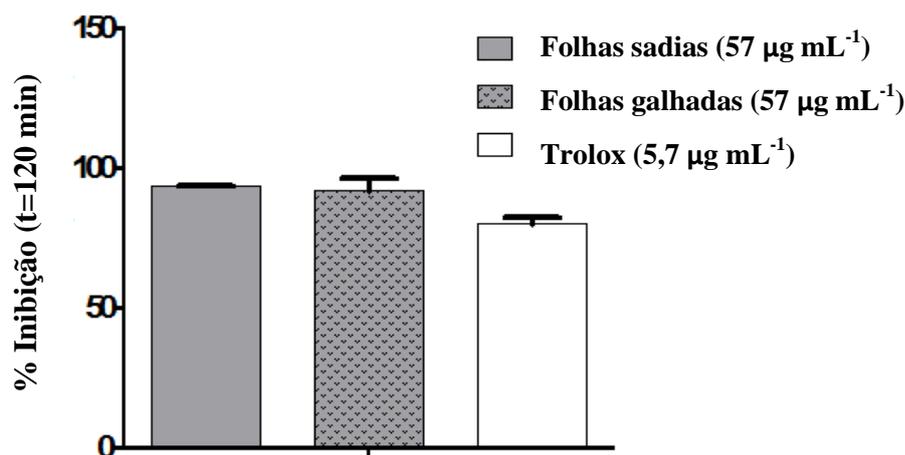


Figura 122. Atividade antioxidante de extratos de *C. lanceolata* no ensaio do β -caroteno/ ácido linoleico.

2.4.4 Perfil químico do óleo essencial de folhas de *C. lanceolata*

Sobre a análise por CG e CG-EM, um total de 28 e 26 componentes foram identificados no óleo essencial de folhas galhadas e sadias de *C. lanceolata*, totalizando 97,6 e 99,1% da composição química, respectivamente. A tabela 29 mostra a composição do óleo essencial extraído de folhas galhadas (amostra A) e sadias (amostra B). Ambos os óleos apresentaram composição similar, exceto por óxido de cariofileno (6,82% e 0,48%, 14 vezes maior na amostra A), 1,2-epóxido de humuleno (1,26%, somente na amostra A), eudesmol (1,07%, somente na amostra B) e outros componentes traços (<1,0%). Os componentes majoritários em ambos os óleos foram o β -cariofileno (51,62% e 57,16%), α -cariofileno (8,42% e 8,94%), germacreno D (4,33% e 6,91%), biciclogermacreno (2,58% e 2,94%) e viridifloreno (2,46% e 2,09%). As amostras foram caracterizadas pela abundância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, especialmente com o núcleo cariofilano. Estes resultados são similares aos relatados para o óleo essencial de outras espécies de *Clusia*, como *C. grandiflora*, *C. minor*, *C. nemorosa* e *C. sandiense* (GONZÁLES et al., 1993; OLIVEIRA; NEVES; CAMARA, 2008).

Terpenos cobrem uma ampla variedade de substâncias de origem vegetal e sua importância ecológica na defesa das plantas é bem estabelecida (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). É bem sabido que β -cariofileno, além de ser anti-inflamatório, também tem atividades fungicidas e inseticidas (ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983). Assim, podemos sugerir que a presença do β -cariofileno e outros sesquiterpenos, como

principais constituintes químicos no óleo essencial das folhas galhadas e sadias desta espécie, podem atuar como alternativa de defesa química para planta contra herbivoria promovida pelo inseto galhador.

Neste estudo não encontramos grande variação da composição química volátil do óleo essencial de folhas galhadas em comparação as folhas sadias de *C. lanceolata* (Tabela 29; Figura 123). Entretanto, na literatura são reportados alguns trabalhos que comprovam a influência deste tipo de interação ecológica entre inseto galhador-planta na variabilidade da composição química volátil dos óleos essenciais de espécies vegetais (DAMASCENO et al., 2008; TORRES-GURROLA et al., 2011).

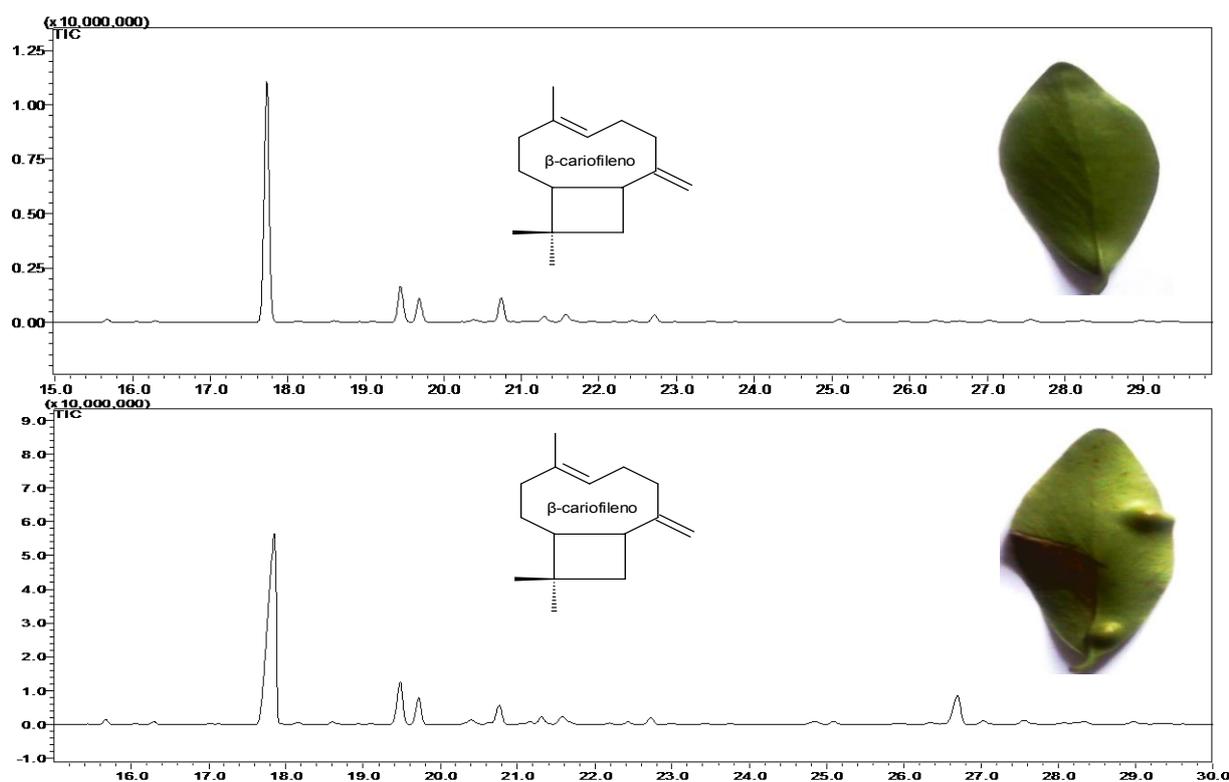


Figura 123. Cromatograma de íon totais (CG) do óleo essencial de folhas de *C. lanceolata*.

Tabela 29. Composição química do óleo essencial de folhas galhadas e sadias de *C. lanceolata*.

Area (%)				
Nº	KI ¹	Compostos	Folhas galhadas	Folhas sadias
1	856	(2E)-Hexenal	0,423	0,244
2	1338	δ-Elemeno	0,17	0,385
3	1381	α-Copaeno	1,074	0,881
4	1390	β-bourboneno	0,179	-

5	1395	β -Elemeno	0,689	0,433
6	1411	(Z)-Cariofileno	0,262	-
7	1423	β -Cariofileno	51,624	57,159
8	1436	β -Copaeno	0,286	0,134
9	1444	Aromadendreno	0,622	0,498
10	1454	Espirolepechineno	0,218	-
11	1463	α -Cariofileno	8,422	8,941
12	1467	allo-Aromadendreno	5,430	6,389
13	1480	γ -Muuroleno	1,183	1,006
14	1487	Germacreno D	4,333	6,906
15	1494	β -Selineno	-	0,331
16	1497	Viridifloreno	2,461	2,091
17	1502	Bicyclogermacreno	2,582	2,942
18	1510	δ -Amorpheno	-	0,343
19	1517	γ -Cadineno	0,671	0,563
20	1522	δ -Cadineno	1,817	2,299
21	1562	Germacreno B	0,815	0,974
22	1576	Álcool de cariofileno	-	0,316
23	1574	Palustrol	0,532	-
24	1583	Óxido de cariofileno	6,817	0,481
25	1591	Globulol	0,642	0,432
26	1601	Viridiflorol	0,833	-
27	1603	Ledol	0,542	0,952
28	1611	Eudesmol	-	1,065
29	1614	1,2-epóxido de Humuleno	1,263	-
30	1626	Junenol	1,269	1,172
31	1647	epi- α -Muurolol	0,899	0,905
32	1659	α -Cadinol	1,532	1,293
Total			97,60	99,13

¹Índice de retenção relativo a série de *n*-alcanos (C₈₋₂₆) na coluna capilar VF-5 MS.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação qualitativa e quantitativa do perfil químico de extratos de folhas saudáveis e com galhas revelou diferenças significativas, sugerindo que a interação inseto-galhador-planta pode estar promovendo alterações na distribuição dos metabólitos secundários da espécie *C. lanceolata*.

A presença de flavonas C-glicosiladas foi observada em ambos os extratos pelas análises de CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS, que permitiram identificar quatro flavonoides, são eles, orientina (1), isorientina (2), vitexina-2''-O-rhamnosídeo (3) e isovitexina-2''-O-rhamnosídeo (4). Outras substâncias foram detectadas no cromatograma de íons totais (TIC) obtido por LC-ESI-MS/MS destes extratos, porém os dados de massas não foram suficientes para propor a estrutura das mesmas.

A maior quantidade de compostos fenólicos detectadas em folhas galhadas não foi capaz de inibir o estabelecimento e desenvolvimento das larvas em folhas de *C. lanceolata*, pode-se sugerir que estas alterações dos derivados fenólicos no tecido vegetal predado estejam beneficiando o inseto galhador.

Extratos de folhas galhadas apresentaram maior atividade sequestradora de radicais livres em comparação aos extratos de folhas saudáveis, porém ambos os extratos foram capazes de retardar a oxidação do β -caroteno.

Com relação à composição volátil, foram identificados 28 e 26 componentes no óleo essencial de folhas galhadas e saudáveis de *C. lanceolata*, respectivamente, com predominância dos sesquiterpenos com núcleo cariofilano. O β -cariofileno foi o sesquiterpeno majoritário em ambos os óleos, dados similares foram relatados para outras espécies deste gênero.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-GARCÍA, B. et al. New features on the fragmentation and differentiation of C-glycoside flavones isomers by positive electrospray ionisation and triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1834-1842, 2008.

ABRAHAMSON, W. G. et al. The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 19, n. 8, p. 615-622, 1991.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4^o Ed. Illinois: Allured Publishing Corporation., 2007, 894 p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5^o Ed. San Diego: Academic Press, 2004. 922 p.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANANTHAKRISHNAN, T. N.; GOPICHANDRAN, R.; GURUSUBRUMANIAN, G. Influence of chemical profiles of host plants on the infestation of the infestation diversity of *Retithrips syriacus*. **Journal of Biosciences**, v. 17, n. 4, p. 483-489, 1992.

ARRHENIUS, J. H.; LANGENHEIM, L. Sesquiterpenes in leaf pocket resins of *Capaifera* species. **Phytochemistry**, v. 22, p. 471-472, 1983.

BANCHIO, E.; ZYGADLO, J.; VALLADARES, G. R. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 4, p. 719-727, 2005.

BARBEHENN, R. V.; MARTIN, M. M. Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): Roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1985-2001, 1994.

BARBEHENN, R. V.; CONSTABEL, C. P. Tannins in plant-herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1551-1565, 2011.

BITZER, J. et al. Accelerated dereplication of natural products, supported by reference libraries. **Chimia (Aarau)**, v. 61, p. 332–338, 2007.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 9, p. 788-794, 1978.

CAMPOS, M. G. et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CHEDIER, L. M. et al. Comparative methodology for isolation of flavonoid glycosides from *Clusia criuva* Cambess. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 527-530, 1999.

COMPAGNONE, R. S. et al. Flavonoids, benzophenone and a new euphane derivative from *Clusia columnaris*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 6-10, 2008.

CONSTANTINO, P. de A. L.; MONTEIRO, R. F., WILSON, M. D. Gall midge attack intensity and host-plant response in a Neotropical coastal ecosystem. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, p. 391-397, 2009.

CORNELL, H. V. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the *Cynipidae* (Hymenoptera): why and how? **American Midland Naturalist**, v. 110, p. 225-234, 1983.

DAMASCENO, F. C. et al. Analysis of volatile compounds of leaves and gall of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* by headspace solid-phase microextraction. **Analytical Letters**. v. 41, p. 1658-1673, 2008.

DAMASCENO, F. C. et al. Changes in the volatile profile of *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) and *Baccharis spicata* (Asteraceae) induced by galling psyllids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 556-563, 2010.

DELLE MONACHE, F. Chemistry of the *Clusia* genus. Part 7: flavonoid-C-glycosides from *Clusia sandiensis*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 22, p. 27-29, 1991.

DIAS, D. S.; COELHO, M. V. Efeito de íons Cu^{2+} e Zn^{2+} em atividade Ca-ATPásica isolada de larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p. 65-69, 2007.

FELT, E. P. **Plant galls and gall makers**. Updesh Purohit for Agrobios: Jodspur, 2001.

FERNANDES, G. W.; COELHO, M. S.; LUTTGE, U. Photosynthetic efficiency of *Clusia arrudae* leaf tissue with and without Cecidomyiidae gall. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 723-728, 2010.

FERNANDES, G. W. Hypersensitivity as a phenotypic basis of plant induced resistance against a galling insect (*Diptera*: Cecidomyiidae). **Environmental Entomology**, v. 27, p. 260-267, 1998.

FERREIRA, R. O. et al. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 617-625, 2014.

FORMIGA, A. T. et al. Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Mull. Arg. (Apocynaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 93-99, 2009.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. London: Academic Press, 1994.

GONZÁLEZ, J. et al. Hidrocarburos sesquiterpenicos presentes en especies del genero *Clusia*. **Revista Colombiana de Quimica**, v. 22, p. 81-84, 1993.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4^o Ed., New York: Academic Press., 1994, 318p.

HARTLEY, S. E. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? **Oecologia**, v. 113, p. 492-501, 1998.

HORI, K. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans, p. 157-170. *In*: SHORTHOUSE, J. D.; ROHFRICTSCH, O. **Biology of insect-induced galls**. New York: Oxford University Press. 1992, 296 p.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

ISAIAS, R. M. S. **Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica**. 1998. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

ISAIAS, R. M. dos S. et al. Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de *Aspidosperma australe* Muell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. (Apocynaceae) contra herbivoria. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n.1, p. 19-30, 2000.

KRAUS, C.; SPITELLER, G. Comparison of phenolic compounds from galls and shoots of *Picea glauca*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 59-67, 1997.

LUÍS, A. et al. Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. **Journal Medicinal Plants Resources**, v. 3, p. 886-893, 2009.

MAJO, D.D. et al. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, v. 111, p. 45-49, 2008.

MANI, M. S. **Introduction to Cecidology**. *In* SHORTHOUSE, J. D.; ROHFRICTSCH, O. **Biology of Insect-Induced Galls**. New York: Oxford University Press. 1992, p. 3-7.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. **Química Nova**, v.35, n.3, p. 517-522, 2012.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, P. S. et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Revista Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MILES, P.W. Effect of plant and insect hormones on the formation of the goldenrod gall. **Journal of the National Cancer Institute Monography**, v. 31, p. 487-491, 1969.

MOTTA, L. B. et al. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. **Biochemistry Systematic and Ecology**, v. 33, p. 971-981, 2005.

NEGRI, G.; SANTI, D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1024-1034, 2012.

NYMAN, T.; JULKUNEN-TIITO, J. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-induced sawflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13184-13187, 2000.

OLIVEIRA, D.C. et al. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 657-667, 2006.

OLIVEIRA, J. C. S.; NEVES, I. A.; CAMARA, C. A. G. Volatile constituents of the fruits of *Clusia nemorosa* G. Mey. from different region of Atlantic Coast restingas of Pernambuco (Northeast of Brasil). **Journal of Essential Oil Resources**, v. 20, p. 219-221, 2008.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1214-1218, 1978.

RHOADES, D. F.; CARES, R. G. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. In: Wallace J, Mansell RL (eds) Biochemical interactions between plants and insects. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 10, p. 168-213, 1976.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROHFRITSCH, O.; SHORTHOUSE, J. D. Insect gall. In: KAHL, G.; SCHELL, J. S. (eds.). **Molecular biology of plant tumours**. New York: Academic, 1982, p. 131-152.

ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. San Diego: Academic Press, 1991, 550 p.

SALUNKHE, P. et al. A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 4908–4920, 2005.

SANTOS-MENDONÇA, I. V. et al. Caracterização e distribuição espacial de galhas em *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) em uma área de Floresta Atlântica, Igarassu, PE. **Lundiana**, v. 8, p. 49-52, 2007.

SCARELI-SANTOS, C.; VARANDA, E. M. Interações nutricionais em dois sistemas inseto galhador-planta hospedeira no Cerrado. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 376-381, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of follin-ciocateu reagent. **Methods Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, G. L. G. et al. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (*Coccoidea*, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 2, n. 1, p. 103-116, 2000.

SOKMEN, A. et al. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627-634, 2004.

SUN, Y. et al. Quantitative and qualitative analysis of phenolics in *Tetrastigma hemsleyanum* and their antioxidant and antiproliferative activities. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10507-10515, 2013.

TORRES-GURROLA, G.; DELGADO-LAMAS, G.; ESPINOSA-GARCÍA, F. J. The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioxa anceps* (Triozidae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 102-111, 2011.

VALLADARES, G. R. et al. Phytochemical induction by herbivores could affect quality of essential oils aromatic plants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4059-4061, 2002.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WESTPHAL, E.; BRONNER, R.; LE RET, M. Changes in leaves of susceptible and resistant *Solanum dulcamara* infested by the gall mite *Eriophyes cladophthirus* (Acarina, Eriophyoidea). **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 875-882, 1981.

WIDSTROM, N. W.; SNOOK, M. E. A gene controlling biosynthesis of isoorientin, a compound in corn silks antibiotic to the corn earworm. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 89, p. 119–124, 1998.

YAO, H. et al. Screening and quantitative analysis of antioxidants in the fruits of *Livistona chinensis* R. Br using HPLC-DAD-ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2802-2807, 2012.

ZHANG, D.; HAMAZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v. 88, p. 503-509, 2004.