



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DOUTORADO EM QUÍMICA
UFG/UFMS/UFU

MARIA JOSÉ DE CAMARGO

ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO CERRADO:
***OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ - LAURACEAE**

Campo Grande/MS
Setembro-2011



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE DOUTORADO EM QUÍMICA
UFG/UFMS/UFU

MARIA JOSÉ DE CAMARGO

ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS DO CERRADO:
***OCOTEA LANCIFOLIA* (SCHOTT) MEZ - LAURACEAE**

Tese apresentada como um dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Química pelo
Programa Multiinstitucional de Doutorado em
Química – UFG/UFMS/UFU, sob orientação do
Prof. Dr. Walmir Silva Garcez.

Campo Grande/MS
Setembro-2011

*“O homem que realmente sabe o que quer da vida
já percorreu um longo caminho para lá chegar.”*

(Napolean Hill)

Dedico este trabalho aos meus pais José de Camargo (*in
memorian*) e Maria F. Aparecida de Camargo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pois me escolheu para desenvolver este trabalho.

Ao professor Dr. Walmir Silva Garcez, pela orientação, ensinamentos e oportunidade.

À professora Dra. Fernanda Rodrigues Garcez pelos ensinamentos.

À professora Dra Edilene Rodrigues Delphino pelos espectros de RMN uni- e bidimensionais, amizade, convivência e colaboração para a conclusão do trabalho.

Ao Dr. Joaquim Corsino, MSc. Luciana Marçal Ravaglia pelos espectros de RMN uni- e bidimensionais e ao Luis Leonardo pela obtenção dos espectros de IV e espectros de massas.

Ao MSc. Flávio Macedo Alves pela identificação da espécie.

Ao MSc. Fábio de Lima, do laboratório LP5, pelo espectro de UV.

A aluna Camila Kagamida pela amizade e colaboração no desenvolvimento do trabalho experimental.

À minha amiga Ana Francisca Gomes da Silva pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos, Luzinátia Ramos Soares e Aloízio de Oliveira Soares pela colaboração, convivência e amizade em todos estes anos de vida acadêmica.

Aos amigos Mayker Lázaro D. Miranda e Cristiane Nascimento pela sincera amizade e companheirismo.

A todos meus colegas de laboratório pela agradável convivência.

Ao Celestino Gonçalves pela competência no desempenho de suas funções.

Aos funcionários do Departamento de Química pela colaboração.

Aos meus familiares, pelo apoio na realização deste trabalho.

À FUNDECT, CAPES, CNPq, CPq/PROPP/UFMS, pelo apoio financeiro e bolsa concedidos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ESPECTROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 FAMÍLIA LAURACEAE.....	3
2.2 GÊNERO <i>OCOTEA</i>	5
2.3 SESQUITERPENOS	7
2.4 <i>OCOTEA LANCIFOLIA</i>	20
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	22
4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	23
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>O. lancifolia</i>	23
4.4 FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA DAS FOLHAS DE <i>O. lancifolia</i>	24
4.4.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OL-03, OL-04, OL-05	25
4.4.1.1 – Fração OL-03	25
4.4.1.3 – Fração OL-05	25
4.4.1.3.1 Coluna Cromatográfica Sephadex LH-20 da Fração 25-27	26
4.4.1.3.2 Coluna Cromatográfica Sephadex LH-20 da Fração 50-51	26
4.5 FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA DAS FOLHAS DE <i>O. lancifolia</i>	28
4.5.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OLH-1, OLH-2, OLH-3, OLH-4, OLH-6.	29
4.5.1.1 Fração OLH-01	29
4.5.1.2 Fração OLH-02	29
4.5.1.3 Fração OLH-03	29

4.5.1.3.1	Estudo da Fração OLH-03 (27-31)	30
4.5.1.3.2	Estudo da Fração OLH-03 (35-37)	30
4.5.1.3.3	Extração Ácido-Base.....	31
4.5.1.3.4	Metilação dos Sesquiterpenos (1) e (2).....	31
4.5.1.3.5	Estudo da Fração OLH-03 (35-37) Metilada	31
4.5.1.4	Fração OLH-04	32
4.5.1.5	Fração OLH-06	32
4.6	FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA DOS GALHOS DE <i>O. lancifolia</i>	34
4.7	FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA DOS GALHOS DE <i>O. lancifolia</i>	34
4.7.1	Fração OLGH-08	35
4.7.2	Fração OLGH-11	35
4.7.3	Fração OLGH-22	36
4.7.3.1	Fração 06 – 22.....	36
4.7.4	Fração OLGH-28	36
4.8	SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CLAE	38
4.8.1	CLAE das frações de OL-03	38
4.8.2	CLAE das frações de OL-04.....	39
4.8.3	CLAE das frações de OL-05.....	41
4.8.4	CLAE da fração de OLH-03	42
4.8.5	CLAE da fração de OLGH-11	42
4.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	43
4.9.1	Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS)	43
4.9.2	Ensaio de atividade antimicrobiana	44
4.9.3	Avaliação da atividade antirradicalar através do ensaio com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)	44
4.9.4	Ensaio de atividade genotóxica.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Sesquiterpenos	47
5.1.1	Substância 1	47
5.1.2	Substância 2	62
5.1.3	Substância 3	74
5.1.4	Substância 4	88
5.1.5	Substância 5	100

5.1.6	Substância 6	114
5.1.7	Substância 7	126
5.1.8	Substância 8	129
5.2	Flavonoides	138
5.2.1	Substância 9	138
5.2.2	Substâncias 10 e 11	142
5.3	Diterpenos	157
5.3.1	Substância 12	157
5.3.2	Substância 13	158
5.4	Tocoferóis	164
5.4.1	Substância 14	164
5.5	Poliprenol	168
5.5.1	Substância 15	168
5.6	Esteroides	173
5.6.1	Substância 16	173
5.6.2	Substância 17	176
5.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	180
5.7.1	Avaliação da atividade antimicrobiana	180
5.7.2	Avaliação da toxicidade para <i>Artemia salina</i>	181
5.7.3	Avaliação da atividade antirradicalar	181
5.7.4	Atividade genotóxica	182
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.- Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae.	9
Tabela 2: Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.	16
Tabela 3: Fracionamento da fase hidrometanólica das folhas de <i>O. lancifolia</i> [Coluna OL]	24
Tabela 4: Fracionamento da fase hexânica das folhas de <i>O. lancifolia</i> [Coluna OLH]	28
Tabela 5: Fracionamento da fase hexânica dos galhos de <i>O. lancifolia</i> [Coluna OLGH]	34
Tabela 6: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75MHz, CDCl_3) e correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno 1 .	53
Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno 2 e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 1 .	65
Tabela 8: Dados de RMN ^1H e ^{13}C , atribuídos com base no experimento HSQC e correlações observadas no experimento HMBC de (2) (300/75 MHz, CDCl_3	65
Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C 3 (300/75 MHz, CDCl_3) e dados de RMN ^{13}C de 2 (75 MHz, CDCl_3)	77
Tabela 10: Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de (3) (300/75 MHz, CDCl_3)	78
Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de (4) e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de (1)	91
Tabela 12: Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de (4) (300/75 MHz, CDCl_3)	92
Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) do sesquiterpeno 5 e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de (4)	103
Tabela 14: Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de (5) (300/75 MHz, CDCl_3)	104
Tabela 15: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de (6) (300/75 MHz, CDCl_3) e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de (1)	117
Tabela 16: Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de (6) (300/75 MHz, CDCl_3)	118
Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 7 e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de $\Delta^{11(12)}$ -eremofilen-10 β -ol (ITOKAWA <i>et al.</i> 1987).	128

Tabela 18: Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de (7) (300/75 MHz, CDCl ₃)	128
Tabela 19: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) do sesquiterpeno espatulenol (8) e dados do espatulenol da literatura (LAGO <i>et al.</i> , 2000).	131
Tabela 20: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz) e RMN de ¹³ C (75 MHz) em CD ₃ OD da Epicatequina (LOBO <i>et al.</i> , 2008)	139
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz) e RMN de ¹³ C (75 MHz) em CD ₃ OD da substância 10 e 11	149
Tabela 22: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) de 12 e do <i>ent</i> -caur-16-eno [25 MHz, CDCl ₃] (HANSON <i>et al.</i> , 1976).	157
Tabela 23: Dados de RMN de ¹³ C de 13 obtido de <i>O. lancifolia</i> [75 MHz, CDCl ₃] e do 8 α -isopimara-9(11)-15-dien [25 MHz, CDCl ₃] (HAYAMAN <i>et al.</i> , 1986)	159
Tabela 24: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) de 14 e do α -tocoferol [75 MHz, CDCl ₃] (URANO, S. <i>et al.</i> , 1980)	165
Tabela 25: Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) da substância (15) e do ficaprenol - 12 [500/ 125 MHz, C ₆ D ₆] (REYNOLDS <i>et al.</i> , 1999).	170
Tabela 26: Dados de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 16 e do β -sitosterol (SAXENA & ALBERT, 2005) [75 MHz, CDCl ₃]	173
Tabela 27: Dados de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 17 e do 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol (SILVA <i>et al.</i> , 2005) [75 MHz, CDCl ₃]	177
Tabela 28: Dados de atividade antibacteriana do extrato bruto e das fases hexânica e hidrometanólica das folhas de <i>O. lancifolia</i>	180
Tabela 29: Dados de atividade antirradicalar do extrato bruto e das fases hexânica e hidrometanólica e da mistura de biflavonoides das folhas de <i>O. lancifolia</i>	181

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN ^1H de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3).....	54
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl_3).....	54
Espectro 3. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl_3)	55
Espectro 4. Espectro DEPT 135° de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl_3).....	55
Espectro 5. Experimento HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3).....	56
Espectro 6. Expansão do HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)	56
Espectro 7. Expansão do HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl_3)	57
Espectro 8. Expansão do HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)	57
Espectro 9. Experimento HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)	58
Espectro 10. Expansão do HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)	58
Espectro 11. Expansão do HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)	59
Espectro 12. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)	59
Espectro 13. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)	60
Espectro 14. Experimento NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)	60
Espectro 15. Experimento NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)	61
Espectro 16. Expansão do NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)	61
Espectro 17. Espectro de Infravermelho de OLGH11-5 (Substância 1) (CDCl_3)	62
Espectro 18. Espectro de EIMS (70 eV) de OLGH11-5 (Substância 1) (CDCl_3)	62
Espectro 19. Espectro de RMN ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)	66
Espectro 20. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)	66
Espectro 21. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)	67
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)	67
Espectro 23. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)	68
Espectro 24. Espectro DEPT 135° de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)	68

Espectro 25. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl ₃)	69
Espectro 26. Experimento HSQC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl ₃)	69
Espectro 27. Experimento HSQC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl ₃)	70
Espectro 28. Experimento HMBC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl ₃)	70
Espectro 29. Expansão do HMBC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl ₃)	71
Espectro 30. Expansão do HMBC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl ₃)	71
Espectro 31. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl ₃)	72
Espectro 32. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl ₃)	72
Espectro 33. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl ₃)	73
Espectro 34. Expansão do NOESY de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl ₃)	73
Espectro 35. Espectro EIMS (70 eV) de OLGH11-4 (Substância 2) (CDCl ₃)	74
Espectro 36. Espectro de RMN ¹ H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	79
Espectro 37. Expansão do espectro de RMN ¹ H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	79
Espectro 38. Espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl ₃)	80
Espectro 39. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl ₃)	80
Espectro 40. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl ₃)	81
Espectro 41. Espectro DEPT 135° de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl ₃)	81
Espectro 42. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl ₃)	82
Espectro 43. Experimento HSQC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl ₃)	82
Espectro 44. Expansão do HSQC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl ₃)	83
Espectro 45. Experimento HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl ₃)	83
Espectro 46. Expansão do HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl ₃)	84
Espectro 47. Expansões do experimento HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75MHz, CDCl ₃)	84
Espectro 48. Experimento COSY ¹ H – ¹ H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	85
Espectro 49. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	85

Espectro 50. Experimento NOESY de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	86
Espectro 51. Expansão do NOESY de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl ₃)	86
Espectro 52. Espectro de Infravermelho de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl ₃)	87
Espectro 53. Dados do EIMS (70 eV) de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl ₃)	87
Espectro 54. Espectro UV/Visível de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl ₃)	88
Espectro 55. Espectro de RMN ¹ H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)	92
Espectro 56. Expansão do espectro de RMN ¹ H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)	93
Espectro 57. Espectro de RMN ¹³ C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl ₃)	93
Espectro 58. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl ₃)	94
Espectro 59. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl ₃)	94
Espectro 60. Espectro DEPT 135° de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl ₃)	95
Espectro 61. Experimento HSQC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl ₃)	95
Espectro 62. Expansão do HSQC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl ₃)	96
Espectro 63. Expansão do HMBC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl ₃).....	96
Espectro 64. Expansão do HMBC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl ₃)	97
Espectro 65. Experimento COSY ¹ H – ¹ H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)	97
Espectro 66. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)	98
Espectro 67. Experimento NOESY de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)	98
Espectro 68. Expansão do NOESY de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl ₃)...	99
Espectro 69. Espectro de Infravermelho de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (CDCl ₃).....	99

Espectro 70. Espectro EIMS (70 eV) de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (CDCl ₃)	100
Espectro 71. Espectro de RMN ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃).....	105
Espectro 72. Expansão espectro de RMN ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	105
Espectro 73. Expansão espectro de RMN ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	106
Espectro 74. Espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl ₃).....	106
Espectro 75. Expansão espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl ₃)	107
Espectro 76. Expansão espectro de RMN ¹³ C de OLGH11-2 (Substância 5) 5 (75 MHz, CDCl ₃).....	107
Espectro 77. Espectro DEPT 135° de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl ₃)	108
Espectro 78. Experimento HSQC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl ₃)	108
Espectro 79. Expansão do HSQC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl ₃)	109
Espectro 80. Experimento HMBC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl ₃)	109
Espectro 81. Correlações observadas no experimento HMBC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl ₃)	110
Espectro 82. Experimento COSY ¹ H - ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	110
Espectro 83. Expansão do COSY ¹ H - ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃) .	111
Espectro 84. Expansão do COSY ¹ H - ¹ H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃) .	111
Espectro 85. Experimento NOESY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	112
Espectro 86. Expansão do NOESY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	112
Espectro 87. Experimento TOCSY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl ₃)	113
Espectro 88. Espectro de Infravermelho de OLGH11-2 (Substância 5) (CDCl ₃)	113
Espectro 89. Espectro de EIMS (70 eV) de OLGH11-2 (Substância 5) (CDCl ₃)	114
Espectro 90. Espectro de RMN ¹ H de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl ₃)	118
Espectro 91. Expansão do espectro de RMN ¹ H de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl ₃)	119

Espectro 92. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)	119
Espectro 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)	120
Espectro 94. Espectro DEPT 135° de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)	120
Espectro 95. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)	121
Espectro 96. Experimento HSQC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	121
Espectro 97. Expansão do HSQC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	122
Espectro 98. Experimento HMBC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	122
Espectro 99. Expansão do HBMC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	123
Espectro 100. Expansão do HMBC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	123
Espectro 101. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)	124
Espectro 102. Expansão do COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH22-112 (Substância 6) (300MHz, CDCl_3)	124
Espectro 103. Experimento NOESY de OLGH22-112 (Substância 6) (300MHz, CDCl_3)	125
Espectro 104. Expansão do NOESY de OLGH22-112 (Substância 6) (300MHz, CDCl_3)	125
Espectro 105. Espectro de EIMS (70 eV) de OLGH22-112 (Substância 6) (CDCl_3)	126
Espectro 106. Espectro de RMN ^1H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3).....	132
Espectro 107. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3).....	132
Espectro 108. Espectro de RMN ^{13}C de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl_3).....	133
Espectro 109. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl_3)	133
Espectro 110. Espectro DEPT 135° de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl_3).	134
Espectro 111. Experimento HSQC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl_3)	134

Espectro 112. Expansão do HSQC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl ₃).....	135
Espectro 113. Experimento HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl ₃)	135
Espectro 114. Expansão do HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl ₃)	136
Espectro 115. Expansão do HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl ₃)	136
Espectro 116. Experimento COSY ¹ H – ¹ H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl ₃)	137
Espectro 117. Expansão do COSY ¹ H – ¹ H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl ₃)	137
Espectro 118. Espectro de RMN ¹ H de OL4-S38-40 (Substância 9) (300MHz, CDCl ₃)	140
Espectro 119. Espectro de RMN ¹³ C de OL4-S38-40 (Substância 9) (75 MHz, CDCl ₃)	140
Espectro 120. Espectro DEPT 135° de OL4-S38-40 (Substância 9) (75 MHz, CDCl ₃)	141
Espectro 121. Experimento HSQC de OL4-S38-40 (Substância 9) (300/75 MHz, CD ₃ OD) ...	141
Espectro 122. Experimento HMBC de OL4-S38-40 (Substância 9) (300/75 MHz, CD ₃ OD)	142
Espectro 123. Espectro de RMN ¹ H de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300 MHz, CD ₃ OD).....	150
Espectro 124. Expansão do espectro de RMN ¹ H de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300 MHz, CD ₃ OD)	150
Espectro 125. Espectro de RMN ¹³ C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300 MHz, CD ₃ OD).....	151
Espectro 126. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300MHz, CDCl ₃).....	151
Espectro 127. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300MHz, CDCl ₃).....	152
Espectro 128. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300MHz, CD ₃ OD)	153
Espectro 129. Expansão do espectro de RMN ¹³ C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300MHz, CD ₃ OD)	153

Espectro 130. Experimento HSQC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD ₃ OD).....	154
Espectro 131. Experimento HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD ₃ OD).....	154
Espectro 132. Expansão do HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD ₃ OD)	155
Espectro 133. Expansão do HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD ₃ OD).	155
Espectro 134. Espectro de RMN de ¹ H de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) - (300 MHz, CDCl ₃)	160
Espectro 135. Expansão do espectro de RMN de ¹ H de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (300 Hz, CDCl ₃)	160
Espectro 136. Espectro de RMN de ¹³ C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl ₃)	161
Espectro 137. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl ₃)	161
Espectro 138. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) 12 e 13 (75 MHz, CDCl ₃)	162
Espectro 139. Espectro DEPT 135° de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl ₃)	62
Espectro 140. Expansão do espectro DEPT 135° de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl ₃)	163
Espectro 141. Espectro de RMN de ¹ H de OLH3-23 (Substância 14) (300 MHz, CDCl ₃)	166
Espectro 142. Espectro de RMN de ¹³ C de OLH3-23 (Substância 14) (75 MHz, CDCl ₃)	166
Espectro 143. Espectro de RMN ¹ H de OLH-A51 (Substância 15) (300 MHz, DCl ₃)	171
Espectro 144. Espectro de RMN ¹³ C de OLH-A51 (Substância 15) (75 MHz, CDCl ₃)	171
Espectro 145. Espectro de RMN ¹ H de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (300 MHz, CDCl ₃)	174
Espectro 146. Espectro de RMN ¹³ C de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (75 MHz, CDCl ₃)	174
Espectro 147. Espectro DEPT 135 ° de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (75 MHz, CDCl ₃)	175

Espectro 148. Espectro de RMN ^1H de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (300MHz, CDCl_3).....	178
Espectro 149. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (75 MHz, CDCl_3)	178
Espectro 150. Espectro DEPT 135° de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (75 MHz, CDCl_3).....	179

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Fracionamento Cromatográfico de OL-03, OL-04 e OL-05 provenientes da fase hidrometanólica do extrato etanólico das folhas de <i>O. lancifolia</i>	27
Esquema 2 - Fracionamento das frações OLH-01, OLH-02, OLH-03, OLH-04 e OLH-06 provenientes da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>O. lancifolia</i>	33
Esquema 3- Fracionamento da fase hexânica provenientes do extrato etanólico dos galhos de <i>O. lancifolia</i>	37

LISTA DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1: Fração OL-03 (41).Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm....	40
Cromatograma 2 – Fração OL04-S38-40. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.	41
Cromatograma 3 – Fração OL04-S42-44. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (14: 86); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.	41
Cromatograma 4 – Fração OL05-S50-51. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (14: 86); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bioma Cerrado no Brasil.	2
Figura 2: Alguns compostos presentes nas espécies da família Lauraceae.	4
Figura 3: Formação de cátions precursores dos sesquiterpenos.	7
Figura 4: Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae.	12
Figura 5: Folhas, frutos e galhos de <i>O. lancifolia</i> (Schott) Mez Lauraceae.	20
Figura 6: Alguns esqueletos de sesquiterpenos bicíclicos de ocorrência comum em plantas....	48
Figura 7: Estrutura da Substância 1.	51
Figura 8: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7, para a substância 1.	52
Figura 9: Estrutura da substância 2.	64
Figura 10: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7 , para a substância 2.	64
Figura 11: Estrutura da substância 3.	76
Figura 12: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7, para a substância 3.	77
Figura 13: Estrutura da substância 4.	90
Figura 14: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7, para a substância 4.	91
Figura 15: Estrutura da substância 5.	102
Figura 16: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7, para a substância 5.	102
Figura 17: Estrutura da substância 6.	115
Figura 18: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa <i>PC-Model for Windows</i> – versão 7, para a substância 5: a) H – 9 com H-8ax e H-8eq ($J = 1,17$ e $7,30$ Hz); b) H – 9 com H-8a e H-8b ($J = 1,29$ e $5,78$ Hz).	116
Figura 19: Estrutura da substância 7.	127
Figura 20: Estruturas gerais possíveis para 8: ledol (1), globulol (2), e espatulenol (3).	130
Figura 21: Estrutura do espatulenol.	130
Figura 22: Estrutura da epicatequina.	138

- Figura 23:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos aromáticos oxigenados não vicinais e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 143
- Figura 24:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos aromáticos oxigenados vicinais e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 143
- Figura 25:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos aromáticos metínicos e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 144
- Figura 26:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos aromáticos metínicos situados entre dois carbonos oxigenados e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 144
- Figura 27:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos aromáticos não ligados a hidrogênios e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 145
- Figura 28:** Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) referentes aos carbonos alifáticos das unidades catequina e estruturas parciais correspondentes ($\rightarrow$). 146
- Figura 29:** Estrutura preliminar possível para os compostos **10** e **11**. 147
- Figura 30:** Estrutura dos biflavonoides majoritário (**10**) e minoritário (**11**).. 148
- Figura 31:** Estrutura da substância **12**. 156
- Figura 32:** Estrutura da substância **13**. 158
- Figura 33:** Estrutura do α -tocoferol. 164
- Figura 34:** Estrutura geral de um poliprenol. 168
- Figura 35:** Estrutura do poliprenol-12. 169
- Figura 36:** Estrutura do β -sitosterol. 172
- Figura 37:** Estrutura de 3(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol. 176

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
ax	Axial
<i>c</i>	Concentração
CC	Cromatografia em coluna (à pressão atmosférica)
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterato
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlation spectroscopy
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
<i>ddl</i>	Duplo dubleto largo
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
EM	Espectrometria de massas
eq	Equatorial
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Lit.	Literatura
<i>m</i>	Multiplete
m	Multiplicidade
MeOH	Metanol

Me	Metila
MHz	Megahertz
m/z	Relação massa/carga
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
<i>qui</i>	Quinteto
Ref.	Referência
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>tl</i>	Tripleto largo
UV	Ultravioleta
V	Volume
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\emptyset$	Diâmetro interno
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ν máx	Frequência máxima
λ máx	Comprimento de onda máximo

RESUMO

Entre as Lauráceas brasileiras, as do gênero *Ocotea* são em maior número e apresentam uma grande diversidade de metabólitos secundários principalmente alcaloides aporfinícos e benziltetraidroisoquinolínicos, além de benzopiranos, lignanas, neolignanas, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Muitas espécies deste gênero são empregadas na medicina popular como anti-reumáticas, depurativas, tônicas, estomáquicas e contra abscessos. Anteriormente, de um espécime de *O. lancifolia* coletado no Paraguai foram isolados treze alcaloides e suas atividades contra a forma promastigota da *Leishmania* e do *Trypanosoma cruzi* foram avaliadas. Esta espécie, popularmente conhecida como “canela pilosa”, é usada na medicina popular paraguaia como antiparasita. No presente trabalho foi investigada a composição química das folhas e galhos de um espécime *O. lancifolia* coletado na região do rio Garíroba, em Campo Grande - Mato Grosso do Sul. Os extratos etanólicos das fases hexânicas e hidrometanólicas das folhas e galhos de *O. lancifolia* foram submetidos a procedimentos cromatográficos resultando no isolamento e caracterização de dezessete substâncias. Os compostos obtidos da fase hexânica das folhas consistiram de cinco sesquiterpenos, sendo três eremofilenos inéditos, o ácido 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-9-en-12-oico, o ácido 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-1(10)-en-12-oico e o 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-9-en-12,8 β -olido, o eremofileno inédito na família Lauraceae denominado 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-11-en-10 α -ol e o aromadendrano espatulenol, de ocorrência comum em Lauraceae. Desta fase, ainda, obteve-se uma mistura dos diterpenos caureno e pimareno, o α -tocoferol, o poliprenol ficaprenol-12 e o esteroide β -sitosterol. Da fase hidrometanólica das folhas foram obtidos três flavonoides, sendo a epicatequina e uma mistura de duas proantocianidinas inéditas. Os dois eremofilenos ácidos citados também foram identificados na fase hexânica dos galhos. Esta fase apresentou, também, outros sesquiterpenos inéditos, o ácido 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-9-en-8-oxo-12-oico, o 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-9-en-12,8 α -olido e o ácido 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-9 α ,10 α -epóxi-12-oico, o esteroide glicosilado e acilado 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol. As determinações estruturais foram realizadas com base em dados espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais e na comparação com dados descritos na literatura.

ABSTRACT

Among the Brazilian Lauraceae, the genus *Ocotea* has the highest number of species and a wide diversity of secondary metabolites, especially aporphine and benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids, lignans, neolignans, monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids. Many of these species are used in folk medicine as anti-rheumatic, purgative, tonic, stomachic and against abscesses. In a previous work on the chemical constitution of a specimen of *O. lancifolia* collected in Paraguay, thirteen alkaloids have been isolated and their activities against the promastigote form of *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* have been evaluated. This species is popularly known as “canela pilosa” and is used in Paraguayan folk medicine as antiparasitic. In the present work, we have investigated the chemical composition of the leaves and branches of a specimen of *O. lancifolia* occurring in the region of Guariroba River in Campo Grande – Mato Grosso do Sul – Brazil. From hexane phase of ethanol extract of the leaves were obtained five sesquiterpenes, three new eremophilenes, 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-9-en-12-oic acid, 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-1(10)-en-12-oic and 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-9-en-12,8 β -olide, the eremophylene 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-11-en-10 α -ol, which is being described by first time in in Lauraceae. From this phase also were obtained a mixture of the diterpenes called kaurene and pimarene, o α -tocopherol, the ficaprenol-12 and the steroid β -sitosterol. From hydromethanolic phase of the leaves were isolated from the flavonoid epicatechin and a mixture of two new proanthocyanidins. The acid derivated from eremophylene also obtained from hexane phase of the ethanol extract of branches. This phase presented other new sesquiterpenes 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-9-en-8-oxo-12-oic acid, o 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-9-en-12,8 α -olide and 4 β ,5 β ,7 β -eremophil-9 α ,10 α -epoxy-12-oic acid, in addition to the acylated and glycosylated steroid 3-(6'-O-acyl-O- β -D-glucopyranosyl)-sitosterol. This is the first report of eremophilane sesquiterpenes from *Ocotea* genus. The structures were determined on basis of spectral data (MS, IR and NMR-1D and 2D) and comparison to literature data.

1 INTRODUÇÃO

O Mato Grosso do Sul possui no seu território dois biomas característicos: o Cerrado e o Pantanal ambos com uma biodiversidade muito rica. Estudos botânicos vêm sendo realizados, visando conhecer e caracterizar a flora presente nestes biomas. Além do conhecimento de quais plantas estão presentes, é importante, também, conhecer a composição química destas plantas, principalmente, em vista dos riscos de que estas informações se percam. O estudo químico de plantas tem relevância em virtude de se constituírem em fontes primárias de obtenção de substâncias biológica e farmacologicamente ativas e poder gerar fármacos ou moléculas protótipo, a partir das quais são geradas inúmeras drogas a serem utilizadas no tratamento de doenças (CRAGG & NEWMAN, 2009; NEWMAN et al., 2003; HOSTETTMANN et al., 2003; YUNES & CALIXTO, 2001).

Apesar da grande importância do Cerrado como fonte de biodiversidade, com o aumento da população e, conseqüentemente, da demanda por alimentos e outros bens de consumo, nos últimos 40 anos este bioma vem sendo ocupado e explorado de forma rápida e intensiva, principalmente para o desenvolvimento do setor agrícola (LIMA & SILVA, 2005). Queimadas provocadas durante a época seca podem resultar em mudanças significativas na estrutura e composição florística da vegetação e o uso pesado de agroquímicos entre outras atividades, reflete na fragmentação do ambiente natural, degradação da terra, erosão do solo, poluição da água e invasão de espécies exóticas, ocupando hoje uma área de 1.052.708 km², apresentando uma redução de mais de 48% (MIRANDA & SATO, 2005).

O Cerrado, inicialmente, se distribuiu por uma área superior a 2 milhões de km², cerca de 24% do território brasileiro e foi provavelmente a maior savana do mundo (ADÁMOLI et al., 1986). Originalmente constituiu-se numa área contínua no Brasil central e como áreas disjuntas em outros biomas, como na floresta Amazônica, Caatinga, floresta Atlântica, Pantanal e floresta de Pinheiro, do sul do Brasil (RIZZINI, 1979; COLE, 1986; FURLEY & RATTER, 1988; PRANCE, 1996).

Representa, ainda, o segundo maior bioma do País, superado apenas pela Floresta Amazônica, com extensa cobertura vegetal, sendo predominante a vegetação formada por uma mistura de fisionomias, como savanas, formações campestres e formações florestais, com

predominância de espécies arbóreas. As formações florestais são representadas por Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão (RIZZINI, 1979; COLE, 1986; EITEN, 1972; 1982).

Dentre oito grandes bacias hidrográficas brasileiras, seis têm nascentes na região do Cerrado, são elas: a bacia Amazônica, a bacia do Tocantins, a bacia Atlântico Norte/Nordeste, a bacia do São Francisco, a bacia Atlântico Leste e a bacia dos rios Paraná/Paraguai (LIMA & SILVA, 2005).

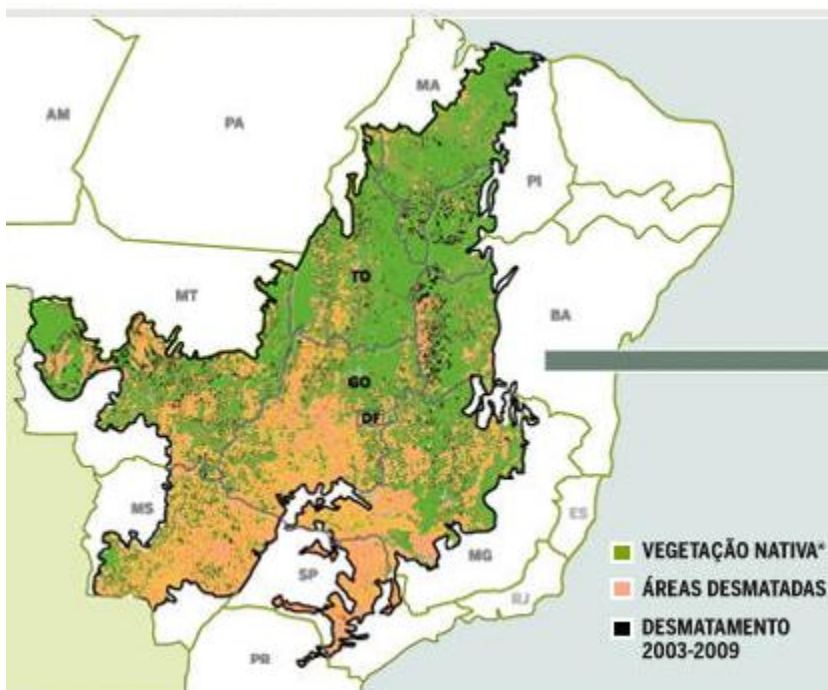


Figura 1 –Bioma Cerrado no Brasil .[<http://www.ecodebate.com.br/2009/11/27/mma>]

No Laboratório LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, desenvolve-se o projeto de pesquisa “Estudo Químico de Plantas do Cerrado”, o qual consiste na investigação dos metabólitos secundários acumulados pelas espécies de plantas do Cerrado. Estes estudos são realizados com espécies pertencentes a famílias selecionadas, particularmente, Lauraceae, Meliaceae, Combretaceae e Bignoniaceae, devido ao fato de que muitas das plantas pertencentes a estas famílias serem ricas em metabólitos secundários, muitos deles bioativos.

O presente trabalho insere-se neste contexto e visa contribuir para o conhecimento da composição química de plantas da família Lauraceae, através do estudo de um espécime de *Ocotea lancifolia*, que ocorre no Cerrado do Mato Grosso do Sul.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é composta por cerca de 2500-3000 espécies organizadas em 50 gêneros onde a grande maioria deste grupo de vegetais é constituída por árvores e arbustos, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, e está bem representada na América, Ásia, Austrália e poucos representantes no sul da África (ROHWER, 1993; WERFF & RICHTER, 1996; CHRISTOPHEL & ROWETT, 1996; JOLY, 1991; GOTTLIEB, 1972).

No Brasil, esta família é representada por 21 gêneros e aproximadamente 400 espécies, distribuídas em grande parte nas florestas pluviais, restingas e cerrados. Os principais gêneros são *Aiouea*, *Aniba*, *Cassytha*, *Cinamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea*, sendo o gênero *Ocotea* de maior número de espécies (BAITELLO & COE-TEIXEIRA 1987; GOTTLIEB, 1972; JOLY, 1991; CHRISTOPHEL & ROWETT, 1996; EVANS, 1996; SHEPHERD, 2000; ROHWER, 1986; BARROSO, 1978; SOUZA & LORENZI, 2008).

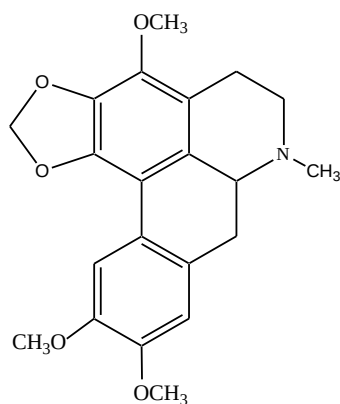
As Lauráceas destacam-se pela sua importância econômica, sendo algumas espécies utilizadas na culinária, em marcenaria e construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria e ainda na indústria química e medicina popular. As espécies arbóreas, em geral são conhecidas como “canelas” (*Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *C. cassia* (Nees) NEES & EBERT ex Blume), das quais se extrai a casca. (MARQUES, 2001; CANTE, 1988, RIZZINI & MORS, 1976).

Desde tempos remotos, conforme demonstrado por documentos da China de 2800 a.C., o potencial econômico das espécies dessa família é conhecido, como o uso do óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e de outras espécies do gênero na medicina (SANGIRARDI, 1984; BARROSO, 1978; COE-TEIXEIRA, 1980; BARROS *et al.*, 1997).

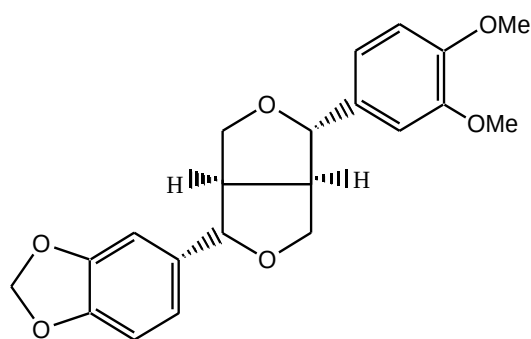
Na medicina popular, as substâncias das espécies da família Lauráceae apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças podendo-se destacar entre elas a cânfora (*Cinnamomum camphora*), utilizada como cardiotônico, anestésico e cicatrizante e o louro (*Laurus nobilis*) freqüentemente utilizado como estimulante nas afecções gástricas e reumáticas, além de apresentar atividade antiespasmódica. (MARQUES, 2001).

O óleo essencial, também muito encontrado nesta família, é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas na folha, na casca e no lenho. Algumas das principais espécies produtoras de óleos essenciais conhecidas, são *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. que possui utilização na indústria de perfumaria e medicamentos, devido ao odor agradável produzido pelo linalol e da espécie *Lindera benzoin* (L.) Blume reconhecida como a espécie da qual se extrai o óleo de benjoin (BARROS *et al.*, 1997; BRUNI *et al.*, 2004; SCORA & SCORA, 2001; DIAZ *et al.*, 1980).

Considera-se uma família rica em metabólitos secundários, destacando-se entre seus componentes os pertencentes às seguintes classes: neolignananas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos, e pironas (GARCEZ *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2010; GARCEZ *et al.*, 2005a; GARCEZ *et al.*, 2005b; BARBOSA FILHO, 2000; GARCEZ *et al.*, 1999; GARCEZ *et al.*, 1995; SAKAI *et al.*, 1989; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1989; GOTTLIEB, 1972).

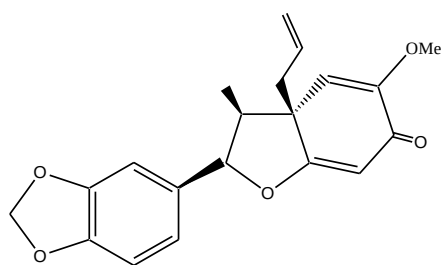
**Ocoteína**

Alcaloide aporfínico

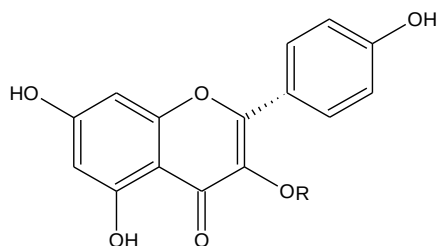
**Metil-piperitol**

Lignana

Figura 2. Alguns compostos presentes nas espécies da família Lauraceae.

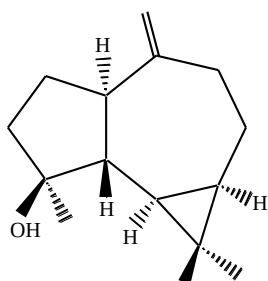


trans-burchelina
Neolignana

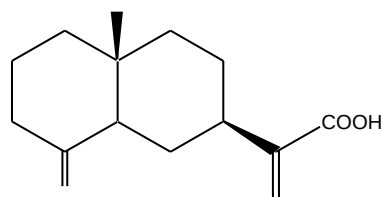


R= β -D-Glucose

Kaempferol-3-O- β -D-Glucopiranosídeo
Flavonoide



Espatulenol
Sesquiterpeno



Ácido cóstico
Sesquiterpeno

Figura 2. (continuação) Alguns compostos presentes nas espécies da família Lauraceae

2.2 GÊNERO OCOTEA

O gênero *Ocotea* Aubl., com aproximadamente 350 espécies, é o maior gênero da família Lauraceae e no Brasil, está representado por cerca de 160 espécies, com poucas espécies na África e em Madagáscar (ROHWER, 1993; BAITELLO, 2001).

Na medicina popular, é grande o número de espécies usadas como anti-reumáticas, depurativas, tônicas, estomáquicas, sudorífica e contra abscessos como, por exemplo, *O. aciphylla* (Nees) Mez é utilizada como tônico e estomáquico, fazendo-se infusões com as folhas, enquanto a casca é utilizada como anti-reumática e depurativa (MARQUES, 2001; RIZZINI & MORS, 1976).

Na indústria madeireira, muitas espécies do gênero *Ocotea* são úteis para a fabricação de postes, marcenaria e construções em geral. A madeira de *O. acutifolia* Mez, por exemplo, é adequada para o uso em marcenaria e construções, enquanto que a *O. aciphylla* (Nees) Mez, possui madeira amarela, aromática, resistente aos insetos, própria para a construção civil e taboados de assoalho (LORENZI, 2002; MARQUES, 2001). A exploração da madeira de boa qualidade, durante séculos, resultou na inclusão de três espécies na lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (MMA, 2008).

Muitos óleos essenciais presentes em espécies deste gênero têm importância econômica, inúmeras atividades biológicas, como antifúngica, antiinflamatória anticolinesterásica e analgésica, por exemplo, *O. indecora* Schott. é utilizada como sudorífica, anti-reumática e até antisifilítica, devido as propriedades do óleo essencial geralmente extraído do caule ou da raiz (EMMERICH & SENNA, 1985; MARQUES, 2001; LORENZI, 2002; MIYAZAWA *et al.*, 1998; RASOOLI & ABYANEH, 2004).

Quanto à composição química de representantes de *Ocotea*, destacam-se os alcaloides aporfínicos e benziltetraidroisoquinolínicos, benzopiranos e principalmente, neolignanas (ZANIN & LORDELLO, 2007; TELES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2002; LORDELLO & MASSAYOSHI, 1997; GARCEZ *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 1995; GUINAUDEAU *et al.*, 1994; BOTEGA *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1989; DODSON *et al.*, 1987; KHAN *et al.*, 1987; VECCHIETTI *et al.*, 1979).

2.3 SESQUITERPENOS

A formação dos compostos terpênicos ocorre através da condensação “cabeça-cauda” entre as unidades DMAP (3,3'- dimetilalil pirofosfato) e IPP (3-isopentenil pirofosfato), catalizada pela enzima prenil-transferase, originando a cadeia de geranyl pirofosfato (GPP), precursora dos monoterpenos (C₁₀). A condensação desta cadeia C₁₀ com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de farnesil pirofosfato, geranyl-geranyl pirofosfato e geranyl-farnesil pirofosfato, precursoras dos sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), e sesterterpenos (C₂₅), respectivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de farnesil pirofosfato, e a de duas cadeias de geranyl-geranyl pirofosfato, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e dos tetraterpenos (carotenoides), respectivamente (DEWICK, 2002; Man,).

Os sesquiterpenos, particularmente, são encontrados em vários sistemas vivos e principalmente em plantas superiores, e em geral, são menos voláteis que os monoterpenos. Compostos por três unidades isoprênicas adequadamente combinadas, formam o precursor farnesil pirofosfato, que vai originar os sesquiterpenos de cadeia linear e cíclica. Os variados processos de ciclizações que podem também estar associados à presença de ligações duplas, transformações oxidativas e em alguns casos, rearranjos, levam a uma extensa variedade de compostos sesquiterpênicos naturais (Figuras 3 e 5) (HAMPEL *et al.*, 2005; KAUFMAN *et al.*, 1999).

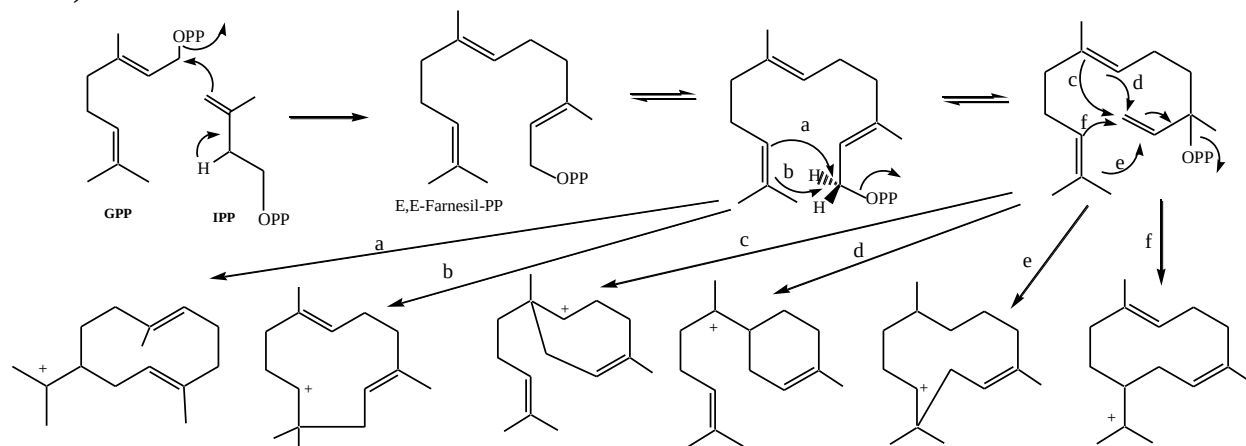


Figura 3. Formação de cátions precursores dos sesquiterpenos

Na **Tabela 1**, estão relacionados os sesquiterpenos cuja ocorrência é relatada em espécies de Lauraceae e suas respectivas estruturas são apresentadas na **Figura 5**, e na sequência encontram-se listados os sesquiterpenos (**Tabela 2**) em óleos essenciais presentes nas espécies da família Lauraceae.

Tabela 1. Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

Espécies	Sesquiterpenos (Estrutura)	Parte estudada	Referências
<i>Caryodaphnopsis tonkinensis</i>	3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decaidro-7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-1,4-dimethylazulene-3a,8a-diol (I)	Cascas	ANH, N. H. <i>et al.</i> , 1996
<i>Cinnamomum loureirii</i>	ar-curcumenol (II), α -bergamoteno (III), β -bisabolano (IV), β -cariofileno(V), α -copaeno (VI), δ -elemeno(VII)	Raízes	ASAKAWA, Y. <i>et al.</i> , 1971
<i>Laurus nobilis</i>	β -cariofileno (V), β -eudesmol (VIII), Costunolideo (X), β -óxido-cariofileno (IX), Decaidro-4-hidroxi- β -metil-3,8-bis(metileno)-5-Azuleno-etanol (XI), Eremantino (XIV), Desidrocostus lactona (XII), Diidro-desidrocostuslactona (XIII), Espirafolideo (XV), Gazaniolideo (XVI), Laurenobiolideo (XVII), Lauroxepina (XVIII), Piretrosina (XIX), Reinosina (XX), Santamarina (XXI), Zaluzanino C (XXII), Zaluzanino D (XXIII), 1 β ,15-Diidroxi-5 α H,7 α H-eudesma-3,11(13)-dien-12,6 α -olideo (XXIV), 3 β -cloro-desidrocostus lactona (XXV), 3,3a,4,5,5a,6,7,8-octaidro-5a,9-dimetil-3-metileno,2H-Azuleno[8a,1-b]furan-2-ona (XXVI), 5 α H,7 α H-Eudesman-4 α ,6 α ,11,12-tetraol (XVII), 8-(acetiloxi)-3a,4,5,5a,8,9,9a,9b-octaidro-5a-metil-3,9-bis-(metileno)-[3aS-(3 α ,5 α ,8 α ,9 α ,9b β)]-nafto[1,2-b]furan-2(3H)-ona (XVIII), 10-Epigazaniolideo (XXIX), 11-exo-Metileno-santonina (XXX)	Folhas e frutos	APPENDINO, G. <i>et al.</i> , 1992; BARLA, A. <i>et al.</i> , 2007; DALL'ACQUA, S. <i>et al.</i> , 2006; DE MARINO, S. <i>et al.</i> , 2005; FANG, F. <i>et al.</i> , 2005; HAM, A. <i>et al.</i> , 2010; TANAKA R., <i>et al.</i> , 2006; TADA, H. <i>et al.</i> , 1976; YOSHIKAWA, M. <i>et al.</i> , 2000
<i>Licaria macrophylla</i>	Elemol (XXXI), Nerolidol (XXXII)	Caule	FRANCA, N. C. <i>et al.</i> , 1974
<i>Lindera aggregata</i>	Acetato de Estricnistenolideo A (XXXIII), Acetato de Estricnistenolideo B (XXXIV), Atractilenolideo (XXXV), Estricnistenolideo A (XXXVI), Estricnistenolideo B (XXXVII), Lindenanolideo A (XL), Hidróxiisogermafurenolideo (XXXVIII), Lindereno (L), Linderano (XLI), Isolinderalactona (XXXIX), Lindenanolideo B (XLI), Lindenanolideo C (XLII), Linderagalactona A (XLIV), Linderagalactona B (XLV), Linderagalactona C (XLVI), Linderagalactona D (XLVII), Linderagalactona E (XLVIII), Linderalactona (XLIX), Neolindenenolactona (LI), Neo linderalactona (LII), 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octaidro-5-hidroxi- α , α ,4a,8-tetrametil, (2R,4aR,5R,8aS)- 2-Naftaleno methanol (LIII), 8-Hidroxi-lindestenolideo (LIV)	Raízes	GAN, L. <i>et al.</i> , 2009, CHENG, X. <i>et al.</i> , 2007, CHOU, G., <i>et al.</i> , 2000
<i>Lindera glauca</i>	Ácido gláucico (LV)	Raízes	NII, H. <i>et al.</i> , 1983
<i>Lindera strychnifolia</i>	Acetato de Estricnistenolideo (LVI), Acetato de Estricnistenolideo A (XXXIII), Acetato de Estricnistenolideo B (XXXIV), Estricnilactona (LVII), Estricnistenolideo (LVIII), Estricnistenolideo A (XXXVI), Estricnistenolideo B (XXXVII), Isolinderalactona (XXXIX), Linderalactona (XLIX), 10,11-dihidroxyeremophilan-3-ona,11-O- β -D-glucopyranosideo (LIX)	Raízes	KOUNO, I., <i>et al.</i> , 2001, IMURA, A. <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1 (continuação). Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

Espécies	Sesquiterpenos (número da estrutura)	Parte estudada	Referências
<i>Litsea cassiaefolia</i>	Isocurcumol (LX), Litseacassifolídeo (LXI)	Folhas e galhos finos	HAKIM, E. H. <i>et al.</i> , 1993
<i>Litsea excelsa</i>	Valenc-1(10)-en-8,11-diol (LXII)		HAKIM, E. H. <i>et al.</i> , 1993
<i>Litsea verticillata</i>	Afanamol II (LXIII), Decaidro-4a-metil-8-metileno-2-(1-methylethyl)-(1R,2R,4aR,5R,8aR)-1,5-Naftalenodiol (LXIV), Isolitseano A (LXV), Isolitseano B (LXVI), Isolitseano C (LXVII), Litseacromolaevane A (LXVIII), Litseacromolaevane B (LXIX), Litseagermacrano (LXX), Litseahumulano A (LXXI), Litseahumulano B (LXXII), Litseaverticillol A (LXXIII), Litseaverticillol B (LXXIV), Litseaverticillol C (LXXV), Litseaverticillol D (LXXVI), Litseaverticillol E (LXXVII), Litseaverticillol F (LXXVIII), Litseaverticillol G (LXXXIV), Litseaverticillol H (LXXXV), Octaidro-4-hidroxi-3a-metil-7-metileno- α -(1-metiletil)-(α S,1R,3aS,4S,7aR)-1H-Indeno-1-metanol (LXXIX), Verticilatol (LXXX), Volenol (LXXXI), 1,2,3,4-tetraidro-2,5-dimetil-8-(1-metiletil) (1R,2S)-1,2-Naftalenodiol (LXXXII), 2-[(1E,5R)-5-hydroxy-2,6-dimetil-1-heptenil]-4-methyl-, 4-Ciclopenteno-1,3-diona (LXXXIII), 7-epi-Eudesm-4(15)-eno-1 β ,6 β -diol (LXXXVI), 10 α -Hidroxi-cadin-4-en-15-al (LXXXVII)	Folhas e galhos	HOANG, V. D., <i>et al.</i> , 2002, ZHANG H., <i>et al.</i> , 2001, ZHANG H., <i>et al.</i> , 2002, ZHANG H., <i>et al.</i> , 2003
<i>Nectandra cissiflora</i>	Ácido cóstico (LXXXVIII), Ácido α -cóstico (LXXXIX), Ácido pterodônico (XC), Ácido viscico (XCI), Ácido 3a- acetil - 7a- α -metileno- 1H- indeno-5-acético (XCII), Ácido 3-acetil- octaidro – 3-hidroxi 7a-metil- α -metilene-1H-Indene-5-acetico (XCIII),	Casca do caule	GARCEZ, F.R. <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectandra cuspidata</i>	Ácido cóstico (LXXXVIII)	Casca do caule	BATISTA, A. L. <i>et al.</i> , 2001
<i>Nectandra grandiflora</i>	Ácido cóstico (LXXXVIII)	Casca do caule	MORENO, P.R.H. <i>et al.</i> , 1993
<i>Nectandra membranacea</i>	Ácido ilícico (XCIV), Ácido cóstico (LXXXVIII), Ácido 3-isocóstico (XCV)	Cascas	WU, X. <i>et al.</i> , 2006
<i>Neolitsea acciculata</i>	Aciculatalactona (XCVI), Ácido neolicínico (XCVII), Ácido Sericealactona carboxílico (XCVIII), Neoliacina (XCIX), Neoliacinolideo A (C), Neoliacinolideo B (CI), Neoliacinolideo C (CII), Pseudoneolinderano (CIII), Sericealactona (CIV)	Folhas	NOZAKI, H. <i>et al.</i> , 1983, TAKAOKA, D. <i>et al.</i> , 1987, TAKEDA, K. <i>et al.</i> , 1970
<i>Neolitsea dealbata</i>	Ácido Isofischerico (CV), Ácido Fischerico (CVI), Linderalactona (XLIX), Linderadino (CVII), Pseudoneolinderano (CIII)	Cascas	WU, X. <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1 (continuação). Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

Espécies	Sesquiterpenos (número da estrutura)	Parte estudada	Referências
<i>Neolitsea hiiranensis</i>	Hiiranepóxido (CVIII), Hiiranlactona A (CIX), Hiiranlactona B (CX), Hiiranlactona C (CXI), Hiiranlactona D (CXII), Isolinderalactona (XXXIX), Linderano (XLI), Linderadino (CVII), Linderalactona (XLIX), Pseudoneoliacina (CXIII), Pseudoneolinderano (CIII), Sericealactona (CIV), Villosina (CXIV)	Folhas e raízes	LIU, B. J. <i>et al.</i> , 2011, WU, S. & Li, W. <i>et al.</i> , 1995
<i>Neolitsea parvigemma</i>	Desacetil zeilanidina (CXV), Desacetil zeilanina (CXVI), Linderalactona (XLIX), Neolitrano (CXVII), Parvigemona (CXVIII), Parvigemonol (CXIX), Pseudoneolinderano A (CXX), Pseudoneolinderano B (CXXI), Zeilanicina (CXXII), Zeilanidina (CXXIII),	Caule	CHENG, K. <i>et al.</i> , 2005
<i>Neolitsea sericea</i>	Germacra – 3,6,9,11-tetraen-14-ol (CXXIV), Neosericenina (CXXV), Sericealactona (CIV), Sericenina (CXXVI), 4,5,6,7-tetrahidro-5 α -isopropil-3,6 α -dimetil-6-vinil-benzofurano (CXXVII), 5,9-epoxi- β -metil-1-vinil-p-menta-4,8-dien-2-etanol (CXXVIII)	Folhas e caule	HAYASHI, N. <i>et al.</i> , 1968, SHARMA, M. <i>et al.</i> , 1993, TAKEDA, K. <i>et al.</i> , 1970B
<i>Ocotea catarinensis</i>	Espatulanol (CXXIX), Humulanol (CXXX)	Folhas	FUNASAKI, M. <i>et al.</i> , 2009
<i>Ocotea corimbosa</i>	Decaidro-1,4-dimetil-6-(1-metiletenil)-, [1S-(1 α ,4 β ,4 α ,6 α ,8 α)]-1-Naftalenol (CXXXI), 4-H-metiletenil-2-(1-metil-4-oxopentil)-, [2S-[2 α (R*),4 α]] Ciclohexanona (CXXXII), 7-hidróxi-calameño (CXXXIII), 10-desmetil-10-hidróxi-1-metil-3-oxo-11-eudesmeno (CXXXIV), 10-desmetil-1-metil-eudesmeno (CXXXV) -(1R, 4S)-7-hidroxicalameneno (CXLV)	Frutos verdes	PEREIRA CHAVEZ, J. <i>et al.</i> , 1995, DAVID, J. P., 1998, BATISTA, A. N. L. <i>et al.</i> , 2010
<i>Ocotea odorifera</i>	1,2,3,4,6,7,8,8a-octaidro-5-metil-2-metileno-8-(1-metiletil), 1-Naphthalenol (CXXXVI)	Caule	LORDELLO, A. L. <i>et al.</i> , 2000, MARQUES, M. O. M. <i>et al.</i> , 1990
<i>Ocotea porosa</i>	(+) Oplopanona (CXXXVII)	Casca e caule	AIBA, C. J. <i>et al.</i> , 1973, DAVID, J.M. <i>et al.</i> , 1994
<i>Ocotea pulchella</i>	Selin-11-en-4 α -ol (CXXXVIII), 7,8,8a,9-tetrahidro-3,5,8a-trimethyl-, (8aR)- Naphtho[2,3-b]furan-4(6H)-ona (CXXXIX)	Casca	BOTEGA, C. <i>et al.</i> , 1993,
<i>Ocotea quianensis</i>	Ocotealactol (CXL)	Casca	ROQUE, N. F. <i>et al.</i> , 1978
<i>PPersea japonica</i>	Carissona (CXLI), Machikusanol(CXLII), γ -eudesmol (CXLIII), γ -selineno (CXLIV)	Xilema?	WANG, C. <i>et al.</i> , 1996

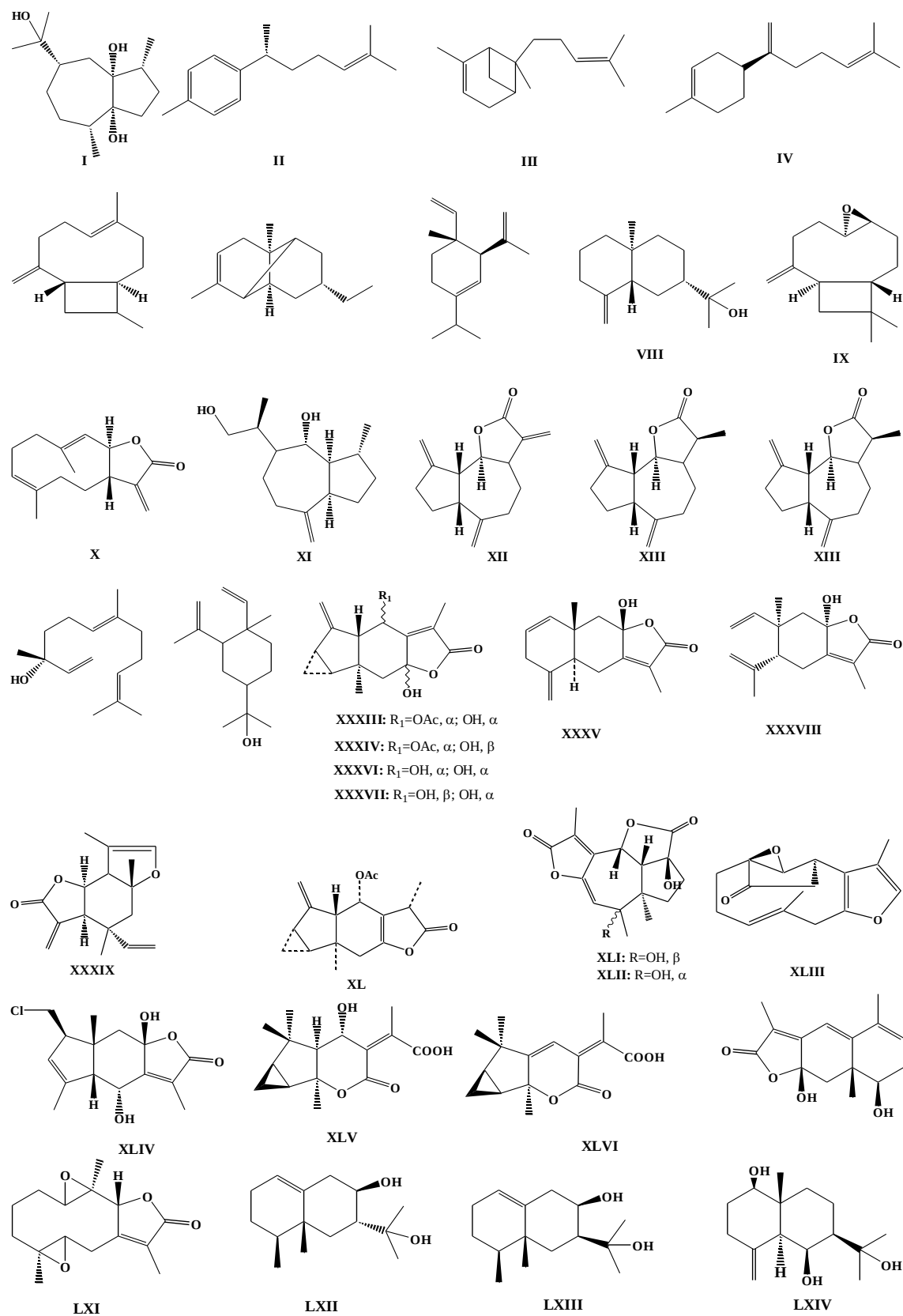


Figura 4 - Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

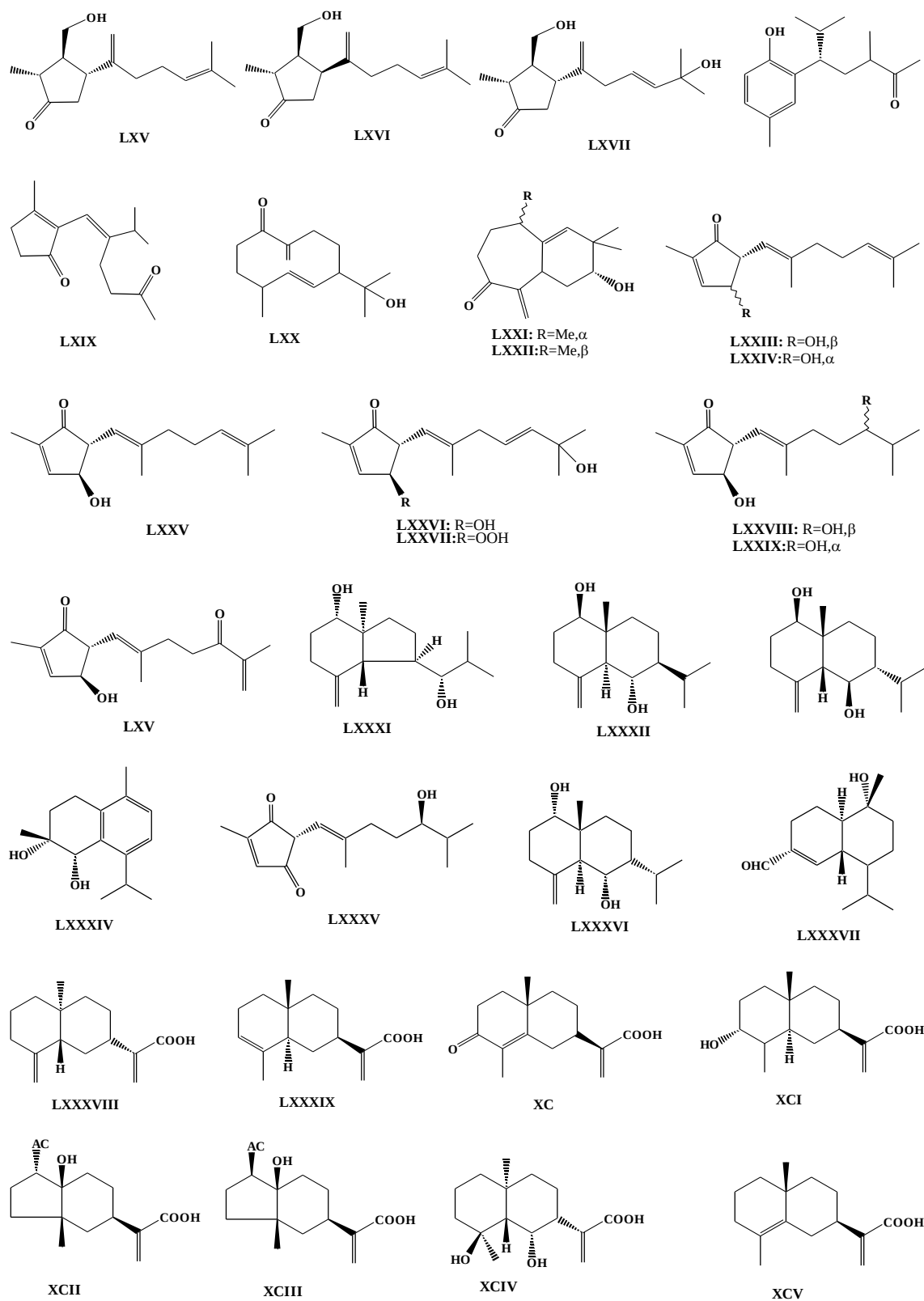


Figura 4 -(continuação) Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

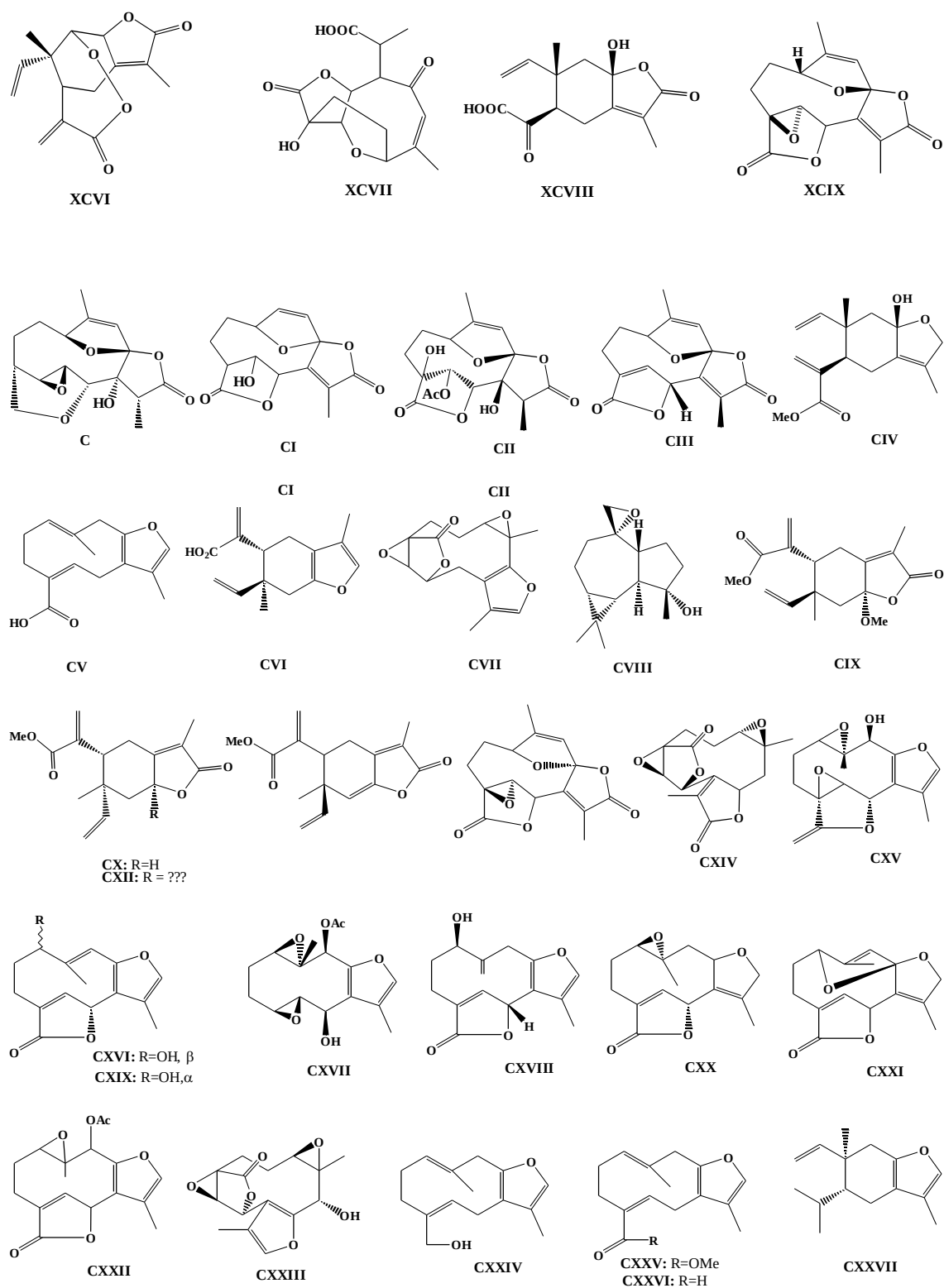


Figura 4 -(continuação) Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

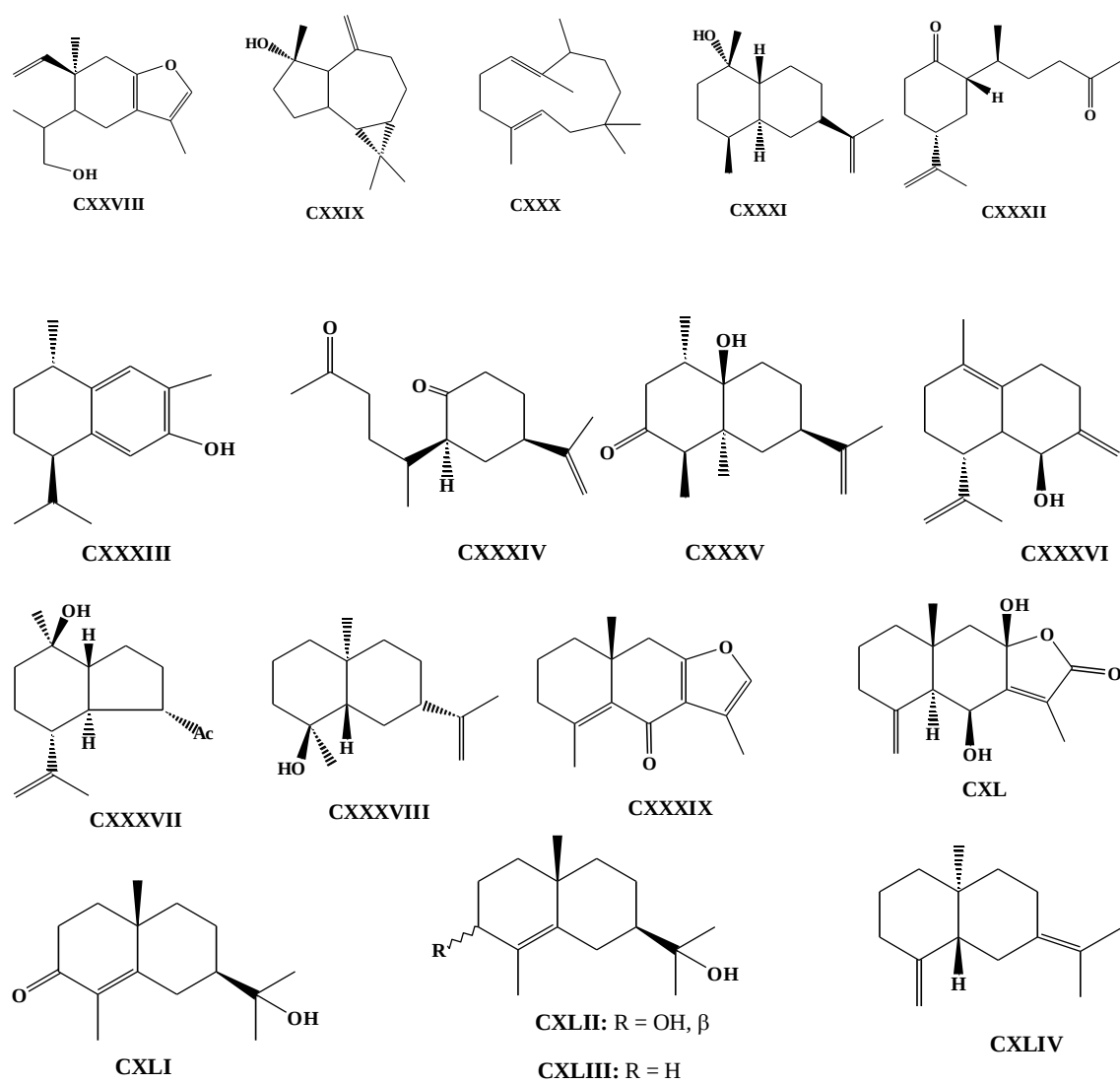


Figura 4 -(continuação) Sesquiterpenos isolados de espécies da família Lauraceae

Tabela 2- Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.

Espécies	Sesquiterpenos	Partes estudadas	Ref.
Aniba	α -cubebeno, α -copaeno, α -humulano, δ e α -cadinano, 1- <i>epi</i> -cubenol, α e β -selinano, cadina-1,4-dieno, calamenano, cubenol	Caule e cascas	TAVEIRA <i>et al.</i> , 2003
<i>Aniba canelilla</i>			
<i>Aniba puchury - minor</i>	β -Cariofilano, germacrano, humulano, β -bisabolano, β -farnesano, α e β -cubebeno, espatulenol, cipereno, α -bergamoteno, α -copaeno	Folhas	SILVA <i>et al.</i> , 1997
<i>Aniba. rosaeodora</i>	eudesmano		NAVES. & PIERRE, 1956
Beilschmiedia	Germacrano, <i>cis</i> e <i>trans</i> - β -ocimeno, α -pineno e Biciclogermacrano	Folhas	SETZER & HABER, 2007
<i>B. alloiophylla</i>			
<i>B. brenesii</i>	germacrano, β -cariofilano, α -copaeno, α -humuleno, δ -cadinano, 2-undecanona, <i>trans</i> -2-hexenal, e 2-tridecanona	Folhas	SETZER & HABER, 2007
<i>B. costaricensis</i>	α -Bisabolol	Folhas	SETZER .& HABER 2007
<i>B. tilaranensis</i>	germacrano , α -cariofilano, β -cadinano	Folhas	SETZER & HABER,, 2007
Cinnamomum	Guaiol, viridiflorol, bulnesol, α -bisabolol, β -bisabolol, β - eudesmol, δ -eudesmol, α -cubebeno , α -copaeno, β -elemeno, <i>cis</i> - α -bergamoteno, 23 (E)- β -cariofilano, <i>trans</i> - α -bergamoteno, guaia-6,9-dieno, aromadendreno, 4 α H,10 α H-guaia-1(5),6-dieno, α -humulano , <i>allo</i> -aromadendrano, 7 α H,10 β H-cadina-1(6),4-dieno, 5- <i>epi</i> --aristolochano, β -neoclovano, δ -humulano,eremofila-1(10),7-dieno, α -muuroleno, (E,E)- α -farnesano, γ -cadinano, calamenano, δ -cadinano, zonarano, cadina-1,4-dieno, α -calacorano,espatulenol , globulol, α -guaiol,1- <i>epi</i> -cubenol, T-muurolol, amorph-4-en-7-ol , α -cadinol, eudesm-4(15)-en-7-ol, 7- <i>epi</i> - α -eudesmol, bulnesol, cadalano,elemol.	Cascas e folhas	JANTAN <i>et al.</i> , 2003
<i>C. microphyllum</i>			
<i>C. altissimum,</i>			
<i>C. scortechinii</i>			

Tabela 2- (Continuação) Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.

Espécies	Sesquiterpenos	Partes estudadas	Ref.
<i>C. osmophloeum</i>	α -cubebeno, humuleno, α -cariofilano, β -cariofilano, aromadendrano, Tmurrolano, valencano, α -cadinano, murrolano, γ -murrolano, β -cadinano, elemeno, óxido de cariofileno, guaíol, α -guaiano, copaeno, T-cadinol, α -cadinol, azulol, β -cadinol	Folhas	CHAO <i>et al.</i> , 2005 CHENG <i>et al.</i> , 2004 CHENG <i>et al.</i> , 2006
<i>C. illicioides</i>	δ -Cadinano, α -copaeno, (E)- β -cariofilano, α -cadinol, α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, guaia-6,9-dieno, aromadendrano, 4 α H, 10 β H guaia-1(5),6-dieno, α -humulano, allo-aromadendrano, 7 α H, 10 β H- cadina-1(6),4-dieno, 5-epi-aristolocheno, β -eocloveno, γ -humulano, α -muurolano, (E,E)- α -farnesano, γ -cadineno, calamenano, δ -cadineno, zonareno, cadina-1,4-dieno, α -calacoreno, elemol,, espatulenol, globulol, α -guaíol, 1-epicubenol, T-muurolol, α -cadinol, eudesm-4(15)-en-7-ol, 7-epi-a-Eudesmol, amorf-4-en-7-ol, bulnesol, cadaleno.	Cascas	GIANG <i>et al.</i> , 2006
<i>C. subavenium</i>	β -cariofileno, α -humulano, α -bisabolano, (E)-P-farnesano, (E)-nerolidol, β -bisabolano, α -bisabolol, α -cadinol, α -cubebeno, α -copaeno, β -cubebeno, β -acoradieno, β -selinano, cis-calamenano, δ -cadinano, elemol, spatulenol, ciperona, α -cadinol, α -muurolol, cubenol, epi-globulol, α e β -cedrano, aromadendrano, γ -muuroleno, viridiflorol, cadalano, álcool patchouli, arcurcumeno, aristoleno	Cascas e das folhas	JANTAN <i>et al.</i> , 2005
<i>C. tamala</i>	germacrano, α -gurjuneno	Folhas	RANA & BLAZQUEZ., 2005
<i>C. zeylanicum</i>	β -cariofileno, γ -cadineno, α -muurolol.	Frutos	MIR <i>et al.</i> , 2004

Tabela 2- (Continuação) Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.

Espécies	Sesquiterpenos	Partes estudadas	Ref.
<i>C. camphora</i>	camferenona, camferenol, α -santaleno, 9-oxonarolidol (I), cis- and trans-3,7,11-trimetildodeca-1,7,10-trien-3-ol-9-ona, 9-oxofarnesol, e seu acetato, elemol, guaiol, α -cadinol, β -eudesmol, cânfora juniper, miristicina, kusunol, δ -quaiano, β -elemano, β -santalano, δ -cadinano, calamenano, 1,6-dimetil-4-isopropil-7,8-dihidronaftaleno, γ -patchouleno, cariofileno, α -humulano, cadina-9,11(12)-dieno, β -cariofileno, nerolidol, β -selinano, fumureno, β -elemeno, α -ylangano, humulano β -selinano, nerolidol		HIKINO <i>et al.</i> , 1967 HIKINO <i>et al.</i> , 1971 HIROI, M. 1967 IBRAHIM & GOH, 1992 SATTAR <i>et al.</i> , 1991 SHUICHI <i>et al.</i> , 1968
<i>Cryptocaria</i> <i>C. mandioccana</i>	β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, δ -cadinano, germacrano D, biciclogermacrano, β -cariofileno, germacrano D, α -humulano, aromamadendrano, 9-epi-E-cariofilano, γ -muuruleno	Folhas	TELASCREEA <i>et al.</i> , 2007
<i>Laurus</i> <i>L. nobilis</i>	β -cariofileno, óxido de espatulenol, δ -cadinano, germacrano D-4-ol, biciclogermacrano, β -cariofileno, germacrano D, α -humulano, γ -muuruleno, sabinano, hidrato de cis-sabinano, β e δ -elemano, cis e trans- γ -cadinano, δ -cadinano, α -guaino, cânfora, δ -elemano, δ -quaiano, β -santaleno, δ -cadinano, calamenano, 1,6-dimethyl-4-isopropyl-7,8-dihidronaftaleno, γ -patchoulano, cariofileno, α -humulano, cadina-9,11(12)-dieno, β -cariofileno, nerolidol, β -selinano, fumureno, aromadendrano		FLAMINI <i>et al.</i> , 2002 KILIC <i>et al.</i> , 2004 KILIC & ALTUNTAS, 2006

Tabela 2- (Continuação) Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.

Espécies	Sesquiterpenos	Partes estudadas	Ref.
Litsea	Bulnesol, β -cariofileno, β -elemano	Folhas	AHMAD, <i>et al.</i> , 2005
<i>L. resinosa</i>			
<i>L. gracilipes</i>	Ledeno, aromadendrano	Folhas	KANJILAL <i>et al.</i> , 2001
<i>L. paludosa</i>	Elemol, γ -cadinano, γ -eudesmol, selin-11-en-4-ol, α -cadinano, palustrol e selina-3,7(11)-dieno	Folhas	KANJILAL <i>et al.</i> , 2001
<i>L. kingii</i>	Sabinano, hidrato de <i>cis</i> -Sabinano	Folhas	KANJILAL, P. B., 2001
Ocotea	α -Copaeno	Folhas	SETZER <i>et al.</i> , 2006
<i>O. veraguensis</i>			
<i>O. sinuata</i>	β -Cariofileno	Folhas	SETZER <i>et al.</i> , 2006
<i>O. tonduzii</i>	óxido de cariofileno	Folhas	SETZER <i>et al.</i> , 2006
Persea	Sabinano, β -cariofileno, elemano, germacreno D, α -humulano, α -cubebeno, β -gurjuneno, γ -muroleno, α -copaeno	Folhas	SCORA & AHMED., 1993
<i>P. tolimanensis</i>			
<i>P. americana</i>	Sabinano, mirceno, óxido de cariofileno, β -cariofileno, α -humulano (α -cariofileno), car-3-ene, α -cubebeno, α -copaeno, α -cadinano, isômero de cadineno, óxido de cariofileno, acetato de farnesila, δ -elemano, β -cubebeno, bergamoteno, bisabolano, α -farneseno, α -cadinol	Mesocarpo do abacate	SINYINDA & GRAMSHAW, 1998
<i>P. indica</i>	β -cariofileno, germacrano-D	Folhas	WEYERSTAHL, P., 2003
Phoebe	α -Copaeno, δ e γ -cadinano, β -eudesmol, valerianol, α e β -bisabolol, eremoligenol, <i>epi</i> -sesquitujano, oreodaphnenol (6,8-cicloguaian-4-ol), <i>trans</i> - α -bergamot-2-en-10-ona, porosadienona [6 (7 $\rightarrow$ 8)-abeoeudesmadienona], Porosadienona, oreodafnenol	Caule	REYNOLDS & KITE, 1995 WEYERSTAHL <i>et al.</i> , 1994
<i>P. porosa</i>			

2.4 OCOTEA LANCIFOLIA

Ocotea lancifolia (Schott) Mez é uma espécie conhecida popularmente por canela pilosa ou canela sabão, que ocorre principalmente no Paraguai e Brasil e se estende da Bahia e Goiás até Paraná, nas regiões de cerrado e matas de galeria principalmente em altitudes de 800 a 1.600 m (MORAES, 2005; ROHWER, 1986).

A forma das folhas varia de quase orbicular a estreito-lanceolada, com o comprimento geralmente de 5 – 8 cm, apresentando inflorescências pubérulas; receptáculo piloso internamente; cúpula plana, margem engrossada e dupla, ondulada. Floresce em janeiro, abril, maio, setembro; frutifica em novembro (MORAES, 2005; ROHWER, 1986). Encontra-se descrito na literatura apenas um relato sobre a atividade *in vitro* contra a forma promastigota da *Leishmania* e do *Trypanosoma cruzi*, bem como, o isolamento de treze alcaloides isoquinolínicos conhecidos (FOURNET *et al.*, 2007).

Portanto, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento da composição química de plantas da família Lauraceae, através do isolamento e caracterização de substâncias presentes em um espécime de *O. lancifolia*, que ocorre no Cerrado de Mato Grosso do Sul.



Figura 5 – Folhas, frutos e galhos de *O. lancifolia* (Schott) Mez Lauraceae.

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a ocorrência de diversos metabólitos secundários no gênero *Ocotea* o presente trabalho teve como objetivos:

- Isolar e identificar os metabólitos secundários acumulados por *O. lancifolia* (Schott) Mez (Lauraceae), através dos métodos cromatográficos;
- Submeter os extratos brutos, frações e/ou metabólitos secundários obtidos a ensaios de atividades biológicas, particularmente os de toxicidade para *Artemia salina*, antimicrobiana, antirradicalar e genotóxica.
- Desenvolver metodologia, visando estabelecer as condições de purificação dos componentes isolados, empregando processos de partição, cromatografias em sílicas de fase normal e fase reversa, e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

As folhas e galhos de *O. lancifolia* foram moídas em moinho de facas tipo Wiley.

Foram utilizadas para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas (exceto para CLAE) solventes do grau PA (Merck, Vetec, QM e Synth). Em análises por CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico (Merck e Tedia).

Nos processos cromatográficos foram utilizados:

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 63-200 μm e 40-63 μm (Merck ou Aldrich) e Sephadex LH-20, partículas de 25-100 μm (Sigma), para cromatografia em coluna.

- gel de sílica do tipo 60 G e/ou 60GF₂₅₄ (5-40 μm , Merck ou Vetec) em camadas de 0,25 mm de espessura para cromatografia em camada delgada analítica.

Nas análises por CLAE foram utilizadas:

- Cromatógrafo líquido Shimadzu LC 6AD, com detector UV-Visível variável Shimadzu SPD 6 AV, para condições analíticas e semi-preparativas.

- Cromatógrafo líquido Watters 2489, com detector UV-Visível variável SPD 6 AV, para condições analíticas e semi-preparativas.

Coluna de fase reversa C-18 (base de sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 μm , dimensões de 4,6 Ø x 250 mm (analítica) e 14 Ø x 250 mm (semi-preparativa) [Phenomenex Luna].

A revelação em CCDA foi feita através de inspeção à luz UV (Monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura e/ou empregando-se a solução a 2% de sulfato cérico em H₂SO₄ 2N ou solução de vanilina 10% m/v (H₂O/MeOH/H₂SO₄ 45:45:10 v/v/v) sob chapa de aquecimento em temperaturas variadas.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker DPX-300, a 300 MHz e 75 MHz para RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de ¹H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de ¹³C. As amostras foram solubilizadas em CDCl₃ e CDOD₃ das marcas Merck e CIL (Cambridge Isotope Laboratories).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Bomem-Hartmann & Braum, modelo Michelson MB Series, FT-IR, utilizando-se pastilha de KBr, em janelas de NaCl. Os espectros de absorção na região do Ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro, modelo U-3000 da marca Hitachi, utilizando-se clorofórmio como solvente. Os espectros de massas foram obtidos em EIMS [70eV], modelo QP2010 – Plus – Shimadzu, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado pelo Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, em setembro de 2006, na região do Rio Guariroba em Campo Grande - Mato Grosso do Sul. A identificação da planta foi realizada pelo MSc. Flávio Macedo Alves, excicata nº 3670, depositada no herbário da UFMS (CGMS).

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS E GALHOS DE *O. lancifolia*

As folhas (1000 g) e galhos (600 g) de *O. lancifolia* foram submetidos à secagem ao ar, moídos e posteriormente extraídos com etanol, a temperatura ambiente. A solução foi concentrada sob pressão reduzida até obtenção de um produto de consistência xaroposa.

Os extratos etanólicos obtidos das folhas (486 g) e galhos (190 g) foram, então, transferidos para um funil de separação, sendo particionados em volumes de 200 ml de hexano e 200 ml de metanol/água (9:1). Após agitação, repouso, separação das fases e concentração sob pressão reduzida, obteve-se quatro fases: a hexânica (111,0 g) e a hidrometanólica (340,5 g) das folhas e a hexânica (75 g) e a hidrometanólica (104 g) dos galhos.

4.4 FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA DAS FOLHAS DE *O. lancifolia*

Parte da fase hidrometanólica (25 g) foi submetida inicialmente a uma filtração em coluna, denominada OL, utilizando-se 250 g de sílica gel de fase reversa C-18. O sistema foi eluído com H₂O e H₂O/MeOH, em gradiente de polaridade decrescente. Foram coletadas 10 frações de 1000 ml cada que foram analisadas por CCDA no eluente CHCl₃/MeOH em proporções variadas [Tabela 3].

Tabela 3. Fracionamento da fase hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia* [Coluna OL]

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA(g)
H ₂ O 100%	OL-01	3,69
H ₂ O /MeOH 5%	OL-02	0,106
H ₂ O /MeOH 10%	OL-03	0,807
H ₂ O /MeOH 20%	OL-04	2,55
H ₂ O /MeOH 40%	OL-05	7,79
H ₂ O /MeOH 60%	OL-06	2,23
H ₂ O /MeOH 80%	OL-07	5,10
MeOH 100%	OL-08	0,857
MeOH /AcOET 50%	OL-09	1,92
AcOET 100%	OL-10	0,025

Após a análise em CCDA e em função dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, observou-se que algumas frações continham substâncias de natureza flavonoídica, sendo estas selecionadas

para estudo, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários. As frações selecionadas foram **OL-03, OL-04, OL-05**.

4.4.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OL-03, OL-04, OL-05

4.4.1.1 – Fração OL-03

Parte da fração OL-03 (100 mg), proveniente da filtração em sílica gel de fase reversa da fase hidrometanólica das folhas, foi submetida à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 eluída em MeOH, obtendo-se um total de 101 frações com volume entre 5 a 10 ml cada. Estas frações foram analisadas por CCDA no eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2 ou 7:3), reveladas em solução de sulfato cérico e agrupadas conforme critério de semelhança. De acordo com o aspecto cromatográfico em CCDA as frações 13-17, 22-30 e 41 foram selecionadas e posteriormente submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência [descrita em **4.8.1**, p. 38].

4.4.1.2 – Fração OL-04

Parte da fração OL-04 (400 mg), proveniente da filtração em sílica gel de fase reversa da fase hidrometanólica, foi submetida à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 eluída em MeOH, obtendo-se um total de 62 frações com volume de 5 mL cada. Estas frações foram analisadas por CCDA no eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2 ou 7:3) e reveladas em solução de vanilina. Por critérios de semelhança as frações 38-40 (69 mg) e 42-44 (16,0 mg) foram reunidas, selecionadas e posteriormente submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência [descrita em **4.8.2**, p. 39].

4.4.1.3 – Fração OL-05

Parte da fração OL-05 (300 mg), proveniente da filtração em sílica gel de fase reversa da fase hidrometanólica, foi submetida à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 eluída em MeOH, obtendo-se um total de 130 frações com aproximadamente 5 mL cada. Estas frações foram analisadas por CCDA no eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) e reveladas em solução de vanilina. Reunidas as frações de aspectos semelhantes, as frações 25-27 (57,6 mg) e 50-51 (53,9 mg), foram submetidas a cromatografia em coluna Sephadex LH-20.

A fração reunida 20-23 (48 mg), denominada OL-05 (20-23), foi submetida diretamente à cromatografia líquida de alta eficiência [descrita em **4.8.3**, p.41].

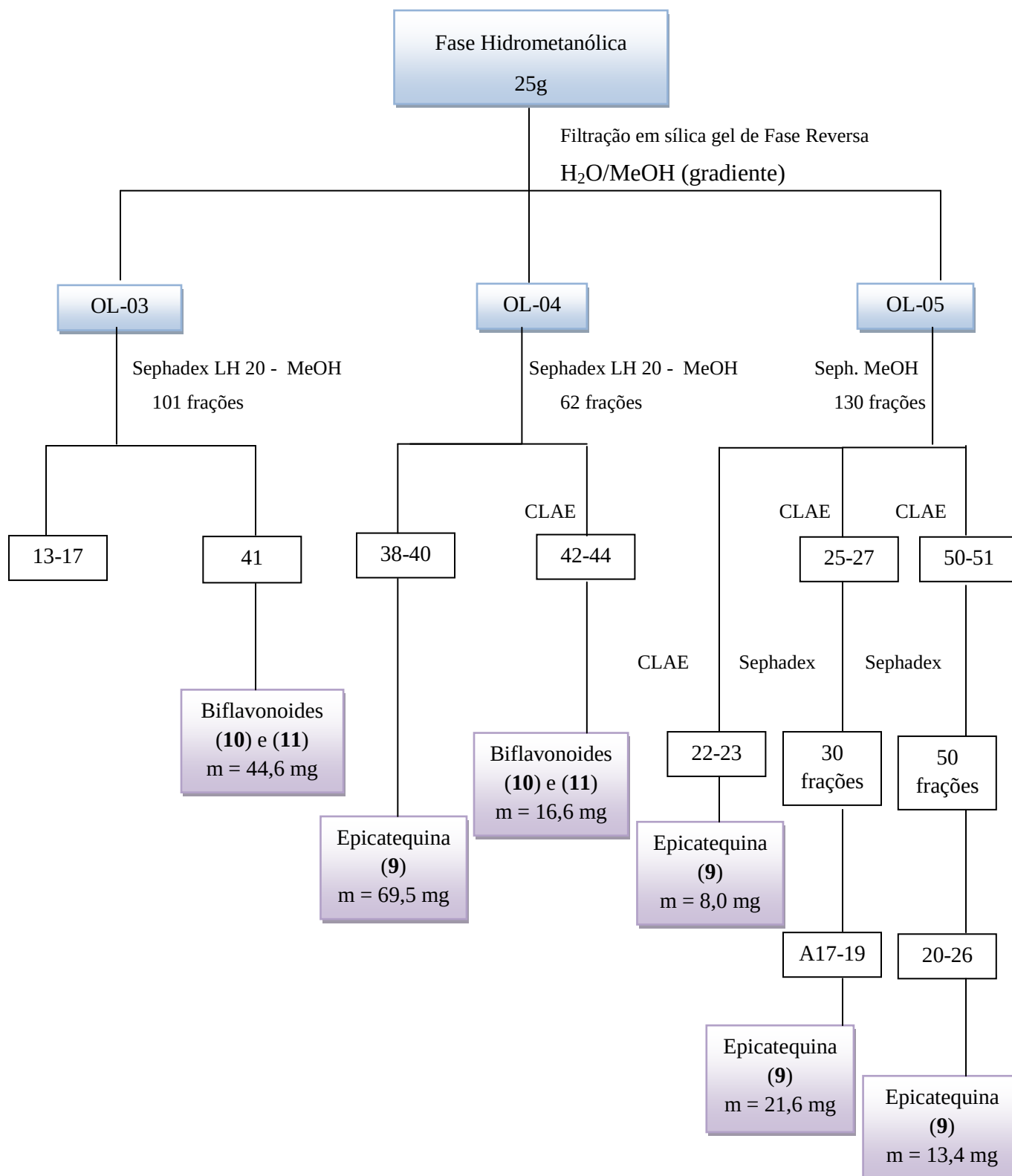
4.4.1.3.1 Coluna Cromatográfica Sephadex LH-20 da Fração 25-27

A fração 25-27 (57,6 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20 em MeOH, obtendo-se um total de 30 frações de aproximadamente 3 a 5 mL, analisadas em CCDA no eluente CHCl₃/MeOH (8:2). Destas obteve-se, ainda, uma mistura de compostos, fração 17-19 (21,6 mg), denominada A17-19. Posteriormente esta fração foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência [descrita em **4.8.3**, p. 41].

4.4.1.3.2 Coluna Cromatográfica Sephadex LH-20 da Fração 50-51

A fração 50-51 (53,9 mg) foi submetida à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 em MeOH, obtendo-se um total de 50 frações com aproximadamente 3 a 5 mL, analisadas por CCDA no eluente CHCl₃/MeOH (8:2). Após análise, reuniram-se as frações semelhantes, e destas obteve-se, ainda, uma mistura de compostos de natureza flavonoídica, a fração 20-26 (13,6 mg) que foi submetida à análise em CLAE [descrita em **4.8.3**, p. 41].

Esquema 1- Fracionamento Cromatográfico de OL-03, OL-04 e OL-05 provenientes da fase hidrometanólica do extrato etanólico das folhas de *O. lancifolia*



4.5 FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA DAS FOLHAS DE *O. lancifolia*

Parte da fase hexânica (25 g) das folhas foi submetida inicialmente a uma filtração em coluna, denominada OLH, utilizando-se 250 g de sílica gel 200-400 Mesh. O sistema foi eluído com Hexano e Hex/AcOEt, em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 10 frações de 1000 mL cada, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas [Tabela 4].

Tabela 4. Fracionamento da fase hexânica das folhas de *O. lancifolia* [Coluna OLH]

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA(g)
Hexano 100%	OLH-01	1,33
Hex /AcOEt 5%	OLH-02	5,79
Hex /AcOEt 10%	OLH-03	5,52
Hex /AcOEt 20%	OLH-04	2,72
Hex /AcOEt 40%	OLH-05	3,15
Hex /AcOEt 60%	OLH-06	1,40
Hex /AcOEt 80%	OLH-07	0,80
AcOEt 100%	OLH-08	0,266
AcOEt / MeOH 50%	OLH-09	0,455
MeOH 100%	OLH-10	0,025

Após a análise em CCDA e em função dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , observou-se que algumas frações continham substâncias de natureza terpênica, sendo estas selecionadas para estudo, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários. As frações selecionadas foram **OLH-01, OLH-02, OLH-03, OLH-04, OLH-06**.

4.5.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OLH-1, OLH-2, OLH-3, OLH-4, OLH-6.

4.5.1.1 Fração OLH-01

A fração OLH-01 (1,33 g), proveniente da filtração em coluna de sílica 200-400 Mesh, foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (200-400 Mesh; coluna: Ø 2,5 cm; h = 60 cm) eluída em Hex 100% e Hex/AcOEt em gradiente de polaridade crescente, obteve-se um total de 120 frações com volume entre 10 mL e 20 mL, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas. Das frações OLH-A01 e A1 obteve-se o composto **12**, um diterpeno (esqueleto caurano) em mistura ao **13** (diterpeno-esqueleto pimarano), nas frações OLH1-51 e OLH1-61, o poliprenol, ficaprenol-12 (**15**) e na fração OLH1-57 isolou-se o α -tocoferol (**14**).

4.5.1.2 Fração OLH-02

Parte da fração OLH-02 (2,5 g), proveniente da filtração em coluna de sílica 200-400 Mesh, foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (200-400 Mesh; coluna: Ø 2,5 cm; h = 60 cm) eluída em Hex 100% e Hex/AcOEt em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se um total de 76 frações com volume entre 25 e 50 mL, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas. Após esta análise, as frações de aspectos semelhantes foram reunidas e obteve-se nas frações OLH2-11 e OLH2-18 o composto ficaprenol-12 (**15**) um tipo de poliprenol.

4.5.1.3 Fração OLH-03

Parte da fração OLH-03 (3,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (80-230 Mesh; coluna: Ø 2,5cm; h=45cm) eluída em Hex 100% e Hex/AcOEt em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se um total de 60 frações com aproximadamente 25 mL, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas. Após a análise foram reunidas as frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante.

Da fração 16-18 (495 mg) foi obtido o poliprenol, ficaprenol-12 (**15**), na fração 23 (175,2 mg) o composto **14** (α -tocoferol) em mistura a um glicerídeo, a fração 27-31 (613,6 mg)

foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20 [descrito abaixo **4.5.1.3.1**], obteve-se na fração 33 o composto **8** (espatulenol) em mistura ao composto **15** (ficaprenol-12). Isolou-se, ainda, nas frações 35-37 (597,2 mg) [descrito abaixo **4.5.1.3.2**], 39-41 (267,6 mg) e 45 o composto **1** em mistura ao composto **2**, sesquiterpenos isômeros ácidos de esqueleto eremofilano em mistura a glicerídeos, portanto, devido a quantidade de massa, utilizou-se a fração 35-37 nos processos de separação destes isômeros.

4.5.1.3.1 Estudo da Fração OLH-03 (27-31)

Parte da fração OLH-03 (27-31) (150 mg), proveniente da coluna OLH-03, foi submetida a coluna cromatográfica Sephadex LH-20 (coluna: Ø 2,5 cm; h=30 cm) em Hex/DCM (1:4), denominada OLH-03 (27-31), coletando um total de 70 frações, com o volume de 5 mL cada. Após a análise em CCDA no eluente Hex/AcOET (8:2), foram reunidas as frações semelhantes e obteve-se na fração 5-10, o poliprenol, ficaprenol-12 (**15**), o composto **4** (sesquiterpeno) nas frações 14-17 (10,0 mg), o composto **7** (sesquiterpeno) nas frações 18-19 (19,4 mg) e na fração 33 o composto **8** (espatulenol).

4.5.1.3.2 Estudo da Fração OLH-03 (35-37)

Foi identificado na fração OLH-03 (35-37), através da análise em CCDA e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , uma mistura de sesquiterpenos (**1** e **2**). Parte da fração reunida 35-37 (140 mg), proveniente da coluna de sílica 80-230 Mesh da fração OLH-03, foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (80 – 230 Mesh, ϕ 4,0 cm, h = 60 cm), denominada OLH3-F, no eluente Hex/AcoEt (96:4 + 2 %Ác.Fórmico) coletando-se 135 frações, com volume de aproximadamente 5 mL cada, analisadas em CCDA, para tentar a separação dos sesquiterpenos de características ácidas (**1**) e (**2**). Observou-se, após a análise das frações coletadas, a presença da mistura dos sesquiterpenos (**1**) e (**2**) nas frações 70 a 80 (4,0 mg). Foi, então, realizada uma extração ácido-base, a fim de se obter a separação dos produtos ácidos das demais impurezas.

4.5.1.3.3 Extração Ácido-Base

À fração 70 - 80 (4 mg) proveniente da coluna de sílica 200 – 400 Mesh (OLH03-F), citada acima, foram adicionados 15 mL NaOH 4M em um erlenmeyer, sendo a solução mantida sob agitação por 2h. Em seguida, o material foi transferido para um funil de separação e extraído com três porções de 15 mL de DCM. A fase aquosa foi neutralizado com HCl 6M, e extraída com três porções de 15 mL de DCM. Após a evaporação deste solvente, analisou-se a fração em CCDA e espectros de RMN de ^1H , observando-se que o resíduo era constituído de uma mistura com maior teor de **1** e **2**.

4.5.1.3.4 Metilação dos Sesquiterpenos (1) e (2)

Em um erlenmeyer de 125 mL, dissolveu-se 0,2 g de KOH em 5 mL de etanol. Em uma vidraria apropriada (destilador para Diazometano, imerso em banho de gelo) dissolveu-se 1,7 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald) em 20 mL de éter etílico.

A solução alcoólica de KOH foi adicionada à solução de Diazald. Esta mistura, em seguida, foi aquecida cuidadosamente com auxílio de um secador de cabelo. Como um sistema de destilação, os vapores produzidos foram resfriados e a solução etérea diazometano foi recolhido, gota a gota, no frasco coletor.

A solução de diazometano recém-preparada foi adicionada, sob gotejamento, a 50 mg da fração OLH-03 (35-37), proveniente da coluna de sílica 80–230 Mesh, solubilizada em CHCl_3 . A solução resultante foi deixada em repouso alguns minutos e o éter foi removido por evaporação em capela. Analisou-se a fração metilada em CCDA no eluente Hex/AcOEt (8:2) através de comparação aos sesquiterpenos ácidos.

4.5.1.3.5 Estudo da Fração OLH-03 (35-37) Metilada

A fração metilada (50 mg) foi submetida à coluna cromatográfica de sílica gel (80 – 230 Mesh), denominada OLH3-35FM, eluída com Hex/AcOEt em gradiente crescente de polaridade (de 2% a 30%) a fim de se tentar a separação dos sesquiterpenos metilados. Obteve-se um total de 75 frações, que foram analisadas em CCDA no eluente Hex/AcOEt (9:1 e 8:2) identificando-se os sesquiterpenos **(1)** e **(2)**, ainda, em mistura na fração OLH3-35F (16 - 20), com massa de 9,0 mg.

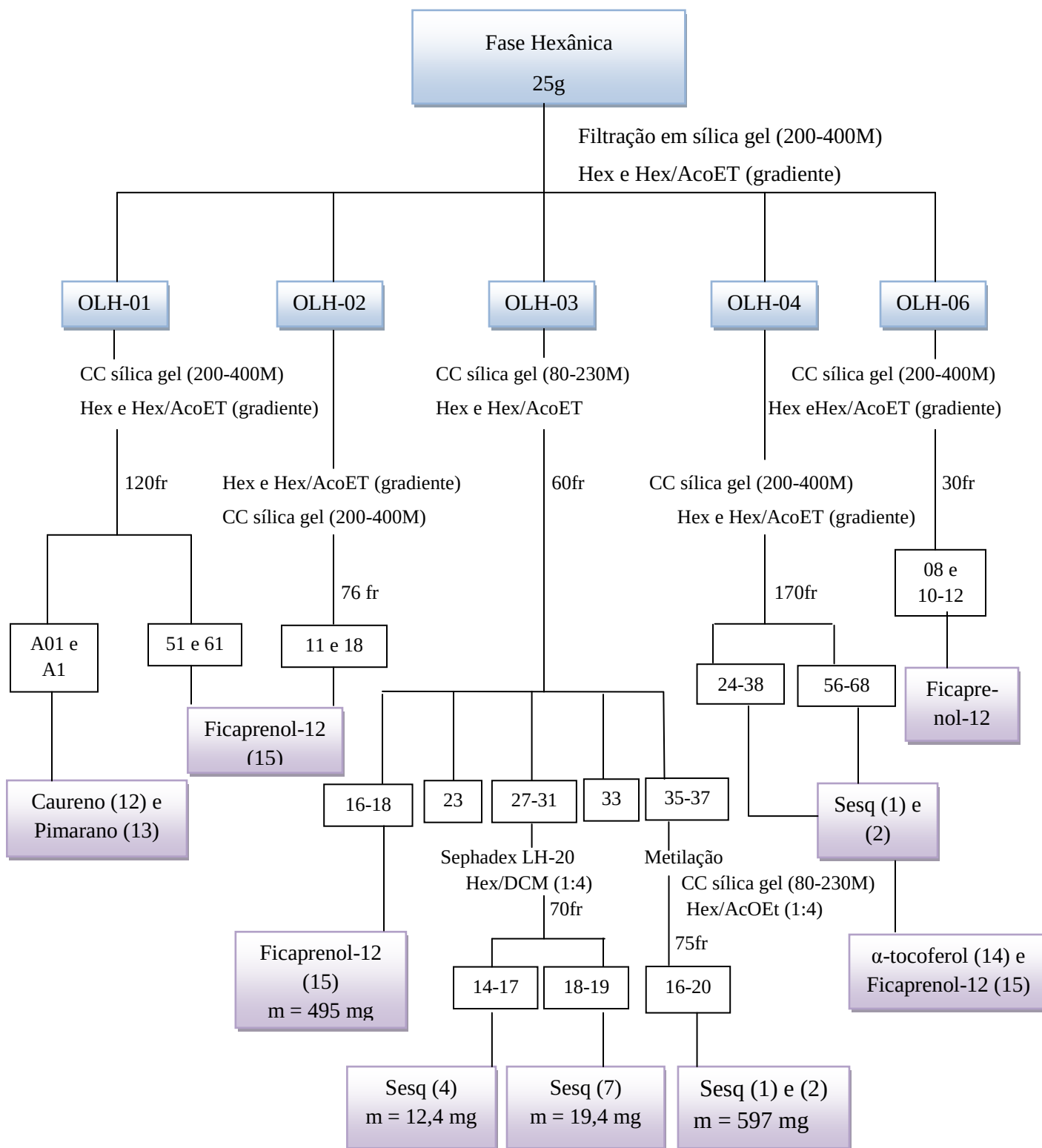
4.5.1.4 Fração OLH-04

Parte da fração OLH-0-04 (1,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (200 - 400 Mesh; coluna: Ø 2,5 cm; h=45cm) eluída em Hex/AcOEt 98:2, 97:3 e 96:4, obtendo-se um total de 170 frações entre 5 e 10 ml cada, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt (9:1 e 8:2). De acordo com a análise reuniu-se as frações de aspectos semelhantes e obteve-se na fração OLH-04 (24-38) uma mistura dos sesquiterpenos **1** e **2**, na fração OLH-04 (56-68), o composto **14** (α -tocoferol) em mistura ao poliprenol, tipo ficaprenol-12 (**15**), nas frações OLH -04 (120-134), o esteroide β -sitosterol (**16**).

4.5.1.5 Fração OLH-06

Parte da fração OLH-06 (2 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (80-230 Mesh; coluna: Ø 2,5 cm; h=60 cm) eluída em Hex 100% e Hex/AcOEt em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se um total de 30 frações com volume de 100 ml cada, analisadas por CCDA no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas e após a análise foram reunidas as frações de perfis cromatográficos semelhantes. Foi identificado o poliprenol, ficaprenol-12 (**15**), nas frações OLH-06 (08) e OLH-06 (10-12).

Esquema 2 - Fracionamento das frações OLH-01, OLH-02, OLH-03, OLH-04 e OLH-06 provenientes da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *O. lancifolia*



4.6 FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA DOS GALHOS DE *O. lancifolia*

Parte da fase hidrometanólica (2,0 g) dos galhos foi submetida a uma cromatografia em coluna Sephadex LH-20, denominada OLGm. O sistema foi eluído em MeOH. Foram coletadas 63 frações com 5 mL cada e do conjunto de frações obtidas foi feita análise por CCDA no eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1).

Após a análise em CCDA e dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , foi observada uma grande concentração de açúcar nas frações 38 – 54 (42,4 mg) e na fração 81 (131,5 mg).

4.7 FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA DOS GALHOS DE *O. lancifolia*

Parte da fase hexânica (2,5 g) dos galhos foi submetida a uma cromatografia em coluna, denominada OLGh, utilizando-se para tal 120 g de sílica gel 80-230 Mesh. O sistema foi eluído com Hexano e Hex/AcOEt, em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 30 frações com 200 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida no eluente Hex/AcOEt em proporções variadas [Tabela 5].

Tabela 5 - Fracionamento da fase hexânica dos galhos de *O. lancifolia* [Coluna OLGh]

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA(mg)
Hexano 100 %	OLGH-01	24,2
	OLGH-02	26,7
	OLGH-03	6,1
Hex /AcOEt 2 %	OLGH-04	5,0
	OLGH-05	3,4
	OLGH-06	137
	OLGH-07	21,7
Hex /AcOEt 4 %	OLGH-08	33,7
	OLGH-09	193,3
	OLGH-10	290,7
Hex /AcOEt 5 %	OLGH-11	315,3
	OLGH-12	273,9
	OLGH-13	147,4
Hex /AcOEt 10 %	OLGH-14	67,4
	OLGH-15	36,9

Tabela 5 – (continuação) Fracionamento da fase hexânica dos galhos de *O. lancifolia* [Coluna OLGH]

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA(mg)
Hex /AcOEt 10 %	OLGH-16	104,8
Hex /AcOEt 20 %	OLGH-17	98,8
	OLGH-18	6,5
	OLGH-19	75,3
Hex /AcOEt 30 %	OLGH-20	24,5
	OLGH-21	81,6
	OLGH-22	156,2
Hex /AcOEt 50 %	OLGH-23	38,0
	OLGH-24	66,4
	OLGH-25	38,5
AcOEt 100%	OLGH-26	45,0
	OLGH-27	38,0
	OLGH-28	35,7
MeOH 100%	OLGH-29 a 30	54,0

Após a análise em CCDA e em função dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , observou-se que algumas frações continham substâncias de natureza terpênica sendo estas selecionadas para estudo, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários. As frações selecionadas foram **OLGH-8, OLGH-11, OLGH-22 e OLGH-28**.

4.7.1 Fração OLGH-08

A fração OLGH - 08 (33,7 mg), proveniente da coluna OLGH em sílica gel 80-230 Mesh, analisada por CCDA no eluente Hex/AcOEt (8:2), apresentou aspecto semelhante aos compostos terpênicos. Após a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desta fração, constatou-se uma mistura dos sesquiterpenos **1** e **2** com a matéria graxa.

4.7.2 Fração OLGH-11

A fração OLGH-11 (180 mg), proveniente da coluna OLGH em sílica gel 80-230 Mesh, analisada em CCDA, no eluente Hex/AcOEt (8:2), apresentou características semelhantes aos compostos de natureza terpênica. Após a análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desta fração,

observou-se uma mistura de sesquiterpenos. Esta fração foi separada e posteriormente submetida à análise em cromatografia líquida de alta eficiência [descrito em 4.8.5, p. 42].

4.7.3 Fração OLGH-22

A fração OLGH-22 (60,0 mg), proveniente da coluna OLGH em sílica gel 80-230 Mesh, após analisada em CCDA, no eluente Hex/AcOEt (8:2), foi submetida em coluna Sephadex LH-20 no eluente Hex/DCM 2:8, coletando-se 70 frações. Estas frações após analisadas em CCDA, foram reunidas segundo critérios de semelhanças. Dentre as frações reunidas, a fração 06-22 (23,9 mg) foi submetida a cromatografia em coluna Sephadex LH-20.

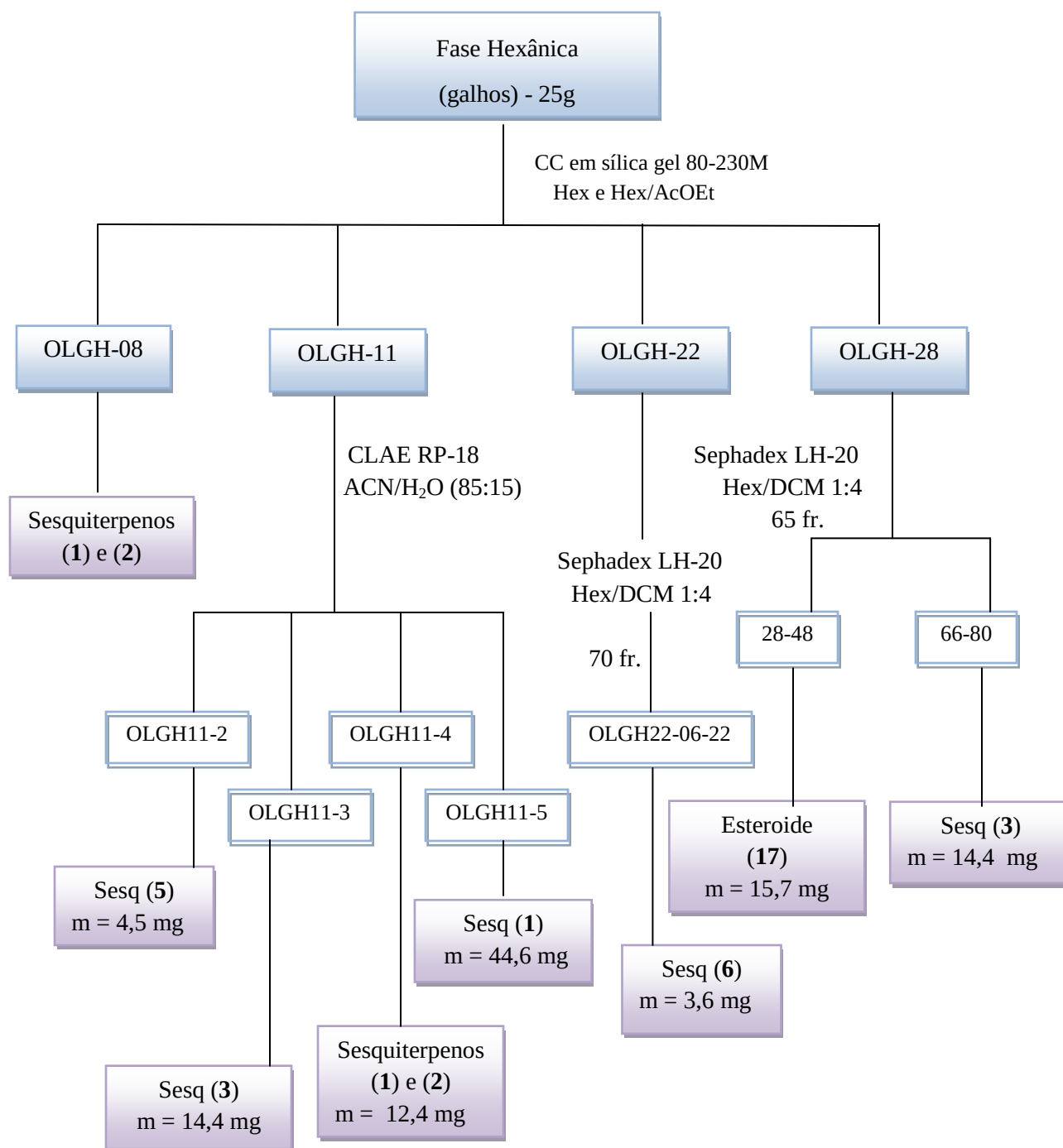
4.7.3.1 Fração 06 – 22

A fração 06-22 (23,9 mg), denominada OLGH22 (06-22), proveniente da coluna OLGH-22 em Sephadex LH-20, foi submetida em coluna Sephadex LH-20 no eluente Hex/DCM 1:4, coletando-se 130 frações com volume entre 3 e 5 mL cada. Estas frações após analisadas em CCDA, foram reunidas segundo critérios de semelhanças. Dentre as frações reunidas, pode identificar o sesquiterpeno **6**, nas frações 82-110 e 112-122.

4.7.4 Fração OLGH-28

A fração OLGH-28 (35,7 mg), proveniente da coluna OLGH em sílica gel 80-230 Mesh, após analisada em CCDA, no eluente Hex/AcOEt (8:2), foi submetida em coluna Sephadex LH-20 no eluente Hex/DCM 1:4, coletando-se 65 frações com volume entre 5 e 10 mL cada. Estas frações após analisadas em CCDA, foram reunidas segundo critérios de semelhanças. Dentre as frações reunidas, obteve-se a substância (**17**) identificada como sendo o esteroide 3(6'-O-acil-O-β-D-glucopiranosil)-sitosterol na fração 48-58, denominada, OLGH28 (48-58), e o sesquiterpeno **3** na fração 68-80.

Esquema 3- Fracionamento da fase hexânica provenientes do extrato etanólico dos galhos de *O. lancifolia*



4.8 SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES POR CLAE

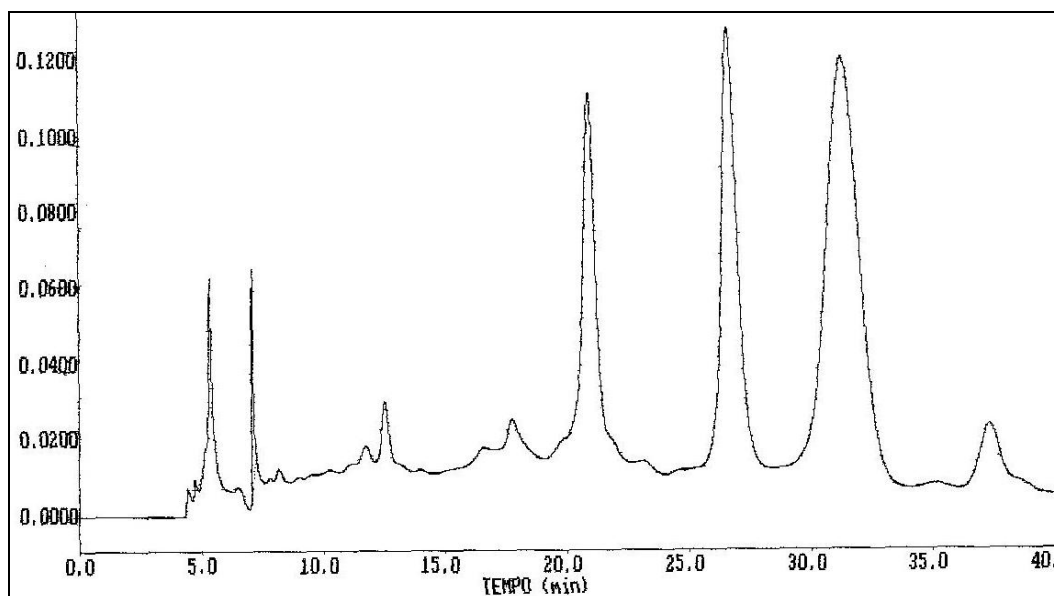
De acordo com seus perfis cromatográficos analisados em CCDA, algumas das frações provenientes do Sephadex LH-20, foram selecionadas para estudo, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários em CLAE por coluna analítica e semi-preparativa utilizando-se as condições de análise mais apropriadas para os compostos em estudo, através do gradiente exploratório.

4.8.1 CLAE das frações de OL-03

As frações 13-17, 22-30, 41 provenientes do Sephadex LH-20 da fração OL-03 [descrita em 4.4.1.1, p. 25], foram selecionadas, de acordo com seus perfis cromatográficos, e aplicadas em CLAE em gradiente exploratório. De acordo com a análise do cromatograma, foi determinada a condição mais apropriada para a aplicação das frações em CLAE analítica, utilizando-se as seguintes condições: Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 µm, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

Foi observado nas frações 13-17 e 22-30, uma mistura de substâncias com quantidade de amostra insuficiente para prosseguir a purificação em CLAE semi-preparativa.

A fração 41, denominada OL-03 (41), também foi aplicada nas mesmas condições acima. Nesta fração foi observada a presença a epicatequina (**9**) (tempo de retenção, 26 min) e uma mistura de biflavonoides (**10** e **11**) (tempo de retenção, 31 min). Não foi possível a separação dos compostos por CLAE semi-preparativa, devido a quantidade insuficiente de amostra [Cromatograma 1].

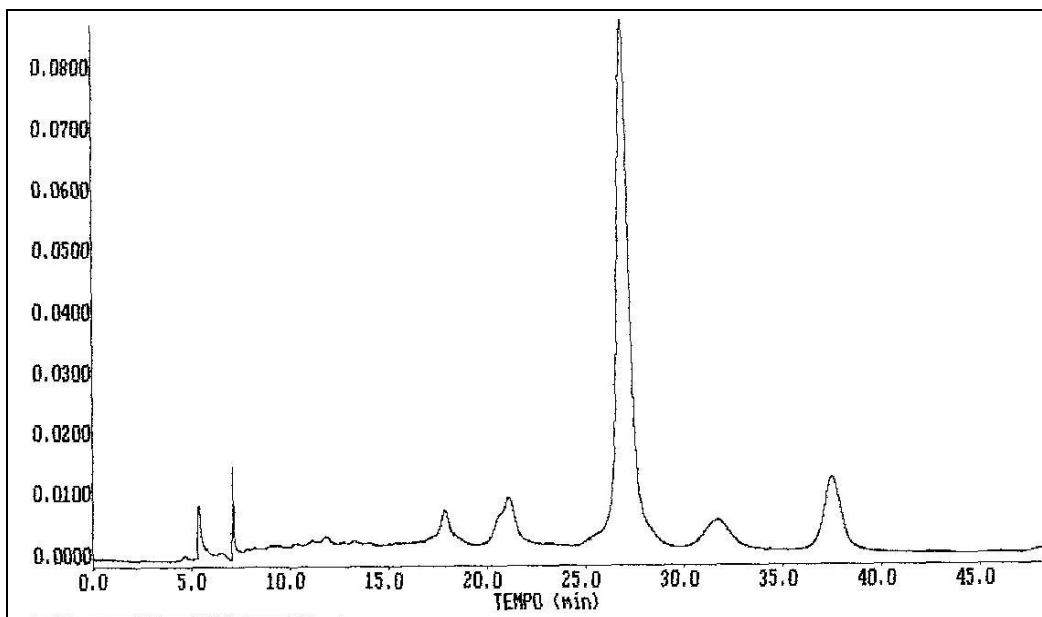


Cromatograma 1: Fração OL-03 (41). Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

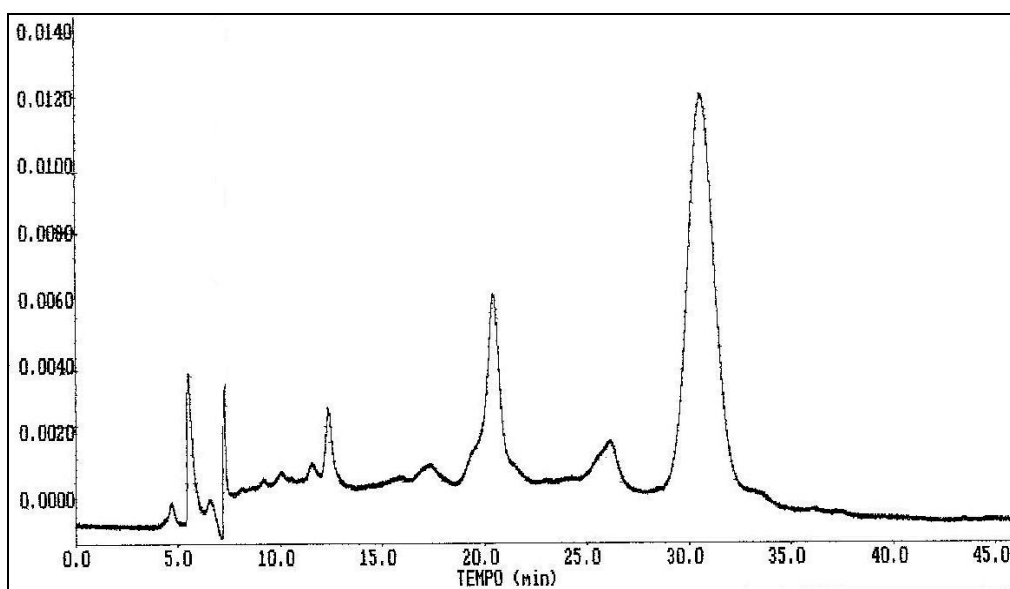
4.8.2 CLAE das frações de OL-04

As frações 38-40 (69mg) e 42-44 (16mg), 48-50 (8mg), proveniente do Sephadex LH-20 da fração OL-04 [descrita em 4.4.1.2, p.25], após analisadas por CCDA foram selecionadas e aplicadas em CLAE em gradiente exploratório. As frações 38-40 e 42-44 foram aplicadas em CLAE, utilizando-se das condições mais apropriadas para estas frações: Coluna Phenomenex RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

A partir dos cromatogramas obtidos da coluna analítica foi possível a aplicação das frações 38-40 na CLAE semi-preparativa nas condições citadas acima e fluxo de 10 ml/min. Foi obtido na fração 38-40 (69mg) a substância **9** [Cromatograma 2] e na fração 42-44 (16mg) uma mistura dos biflavonoides, identificado como substâncias **10** e **11** (tempo de retenção ~ 31 min). [Cromatograma 3].



Cromatograma 2 – Fração OL04-S38-40. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

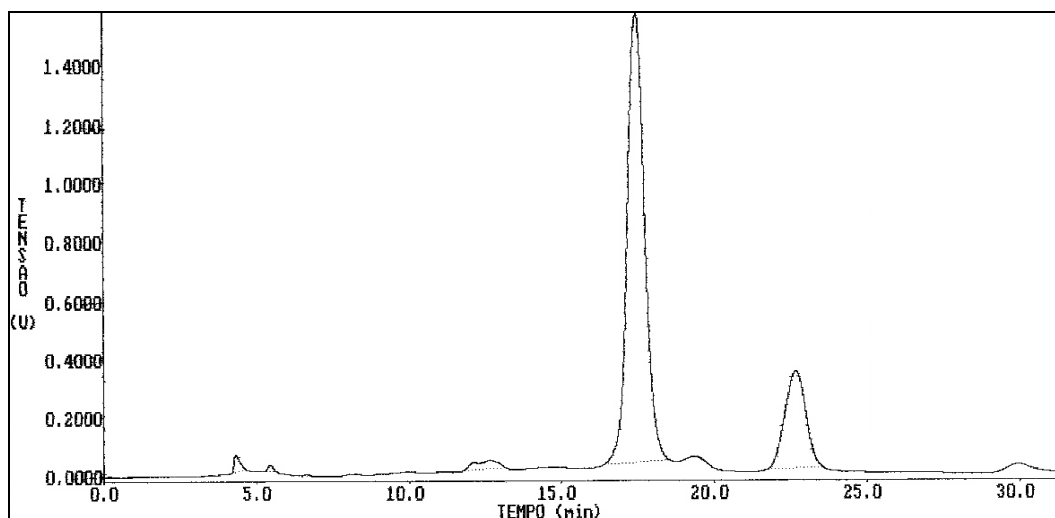


Cromatograma 3 – Fração OL04-S42-44. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (14: 86); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

4.8.3 CLAE das frações de OL-05

A fração 20-23, proveniente do Sephadex LH-20 da fração OL-05 [descrita em 4.4.1.3, p.25], e ainda as frações 17-19 [do Sephadex LH-20 de OL-05 (20-23)] e 20-26 [do Sephadex LH-20 de OL-05 (50-51)], após analisadas por CCDA foram selecionadas e aplicadas em CLAE analítica utilizando-se das condições mais apropriadas.

Para estas frações foi utilizada a seguinte condição: Coluna Phenomenex RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (15: 85); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm. Após a obtenção dos cromatogramas, foi possível identificar a epicatequina nas frações 20-23, 17-19 e 20-26. [Cromatograma 4]



Cromatograma 4 – Fração OL05-S50-51. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (14: 86); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 254 nm.

4.8.4 CLAE da fração de OLH-03

A fração 35-37, proveniente da coluna de sílica 80-230 Mesh da fração OLH-03 [descrita em 4.5.1.3.2, p. 30], foi aplicada em CLAE em gradiente exploratório, para determinação das condições apropriadas de eluição. Na tentativa de separação dos compostos sesquiterpenos isômeros identificados em análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , a fração 35-37 foi aplicada em CLAE analítica, nas seguintes condições: Coluna Phenomenex RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (80:20); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 210 nm.

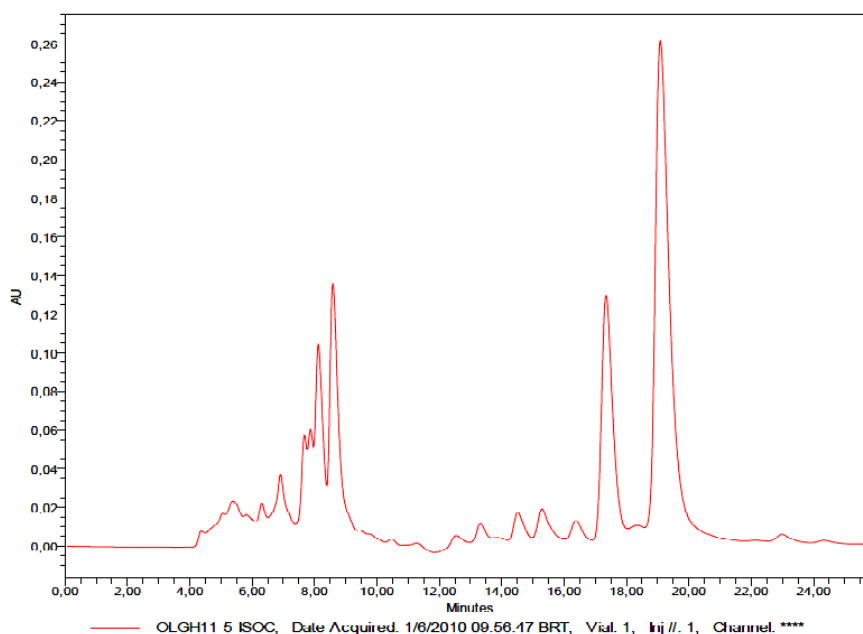
Não foi possível a separação total dos picos dos isômeros utilizando-se as condições acima.

4.8.5 CLAE da fração de OLGH-11

Parte da fração OLGH-11 (180 mg) proveniente da fase hexânica dos galhos aplicada em coluna de sílica gel 80-230Mesh [descrita em 4.7.2, p. 35], após ser analisadas por CCDA, foi selecionada e aplicada em CLAE analítica, nas seguintes condições: Coluna Phenomenex RP-18, 5 μm , 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H_2O (80:20); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 210 nm.

Na tentativa de separação dos componentes, com características de compostos sesquiterpênicos identificados em análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , a fração OLGH-11 foi aplicada em CLAE semi-preparativa nas condições acima e fluxo de 10 mL/min.

Foram obtidos o sesquiterpeno **1** (44,5 mg) na fração OLGH11-5, uma mistura dos sesquiterpenos **1** e **2** (43,2 mg) na fração OLGH11-4, o sesquiterpeno **3** (14,4 mg) na fração OLGH11-3 e o sesquiterpeno **5** (4,5 mg) na fração OLGH11-2 [Cromatograma 6].



Cromatograma 6 – Fração OLGH11. Coluna Phenomenex-Luna RP-18, 5 μ m, 4,60 x 250 mm; eluente ACN: H₂O (80: 20); fluxo de 0,5 mL/min; detector UV, 210 nm.

4.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos brutos, as fases hexânica e hidrometanólica obtidas das folhas de *O. lancifolia* foram submetidos aos seguintes bioensaios: toxicidade para *Artemia salina*, atividade antimicrobiana, atividade antirradicalar atividades genotóxica (teste SMART) e antifúngica.

4.9.1 Teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de acordo com a metodologia descrita na literatura (MEYER *et al.*, 1982).

As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 100 e 10 g/mL, todas em triplicata. A cada amostra adicionou-se 5 mL de solução salina (3,8 g/L) contendo 10 microcrustáceos (*A. salina*). Após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. Os dados obtidos foram analisados no programa Probitos e são demonstrados por LD₅₀ (dose necessária para provocar a morte de 50% dos indivíduos submetidos à análise).

Foram testados o extrato bruto, bem como as fases hexânicas e hidrometanólicas das folhas de *O. lancifolia*.

4.9.2 Ensaio de atividade antimicrobiana

O teste antimicrobiano foi realizado no extrato bruto e fases hexânica e hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia* com as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), utilizando placas contendo 96 compartimentos, sendo cada compartimento denominado de poço.

O inóculo é realizado em placas de petri com agar Müller-Hinton, incubadas por 20 horas em estufa a 35° C. Após este período é realizado o teste de susceptibilidade antibacteriana pelo método de microdiluição de acordo com o protocolo CLSI /NCCLS M-7-A6 (2005).

As diluições variaram de 1000 µg/mL a 8,32 µg/mL para os extratos e as fases hexânica e hidrometanólica, e de 32 µg/mL a 0,25 µg/mL para o controle positivo. As placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 35° C por 20 horas. A leitura foi feita considerando o menor CMI (Concentração Mínima Inibitória).

Foram utilizadas três placas para verificar cada atividade antibacteriana do extrato bruto e das fases das folhas de *O. lancifolia*, uma para cada espécie de bactéria, juntamente com o respectivo antibacteriano padrão Cloranfenicol, utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29218).

Este ensaio foi realizado no Departamento de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a responsabilidade da Dra Ana Lúcia Batista.

4.9.3 Avaliação da atividade antirradicalar através do ensaio com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

Para verificar a atividade antirradicalar do extrato etanólico, fases hexânicas e metanólicas e mistura de duas proantocianidinas das folhas e de *O. lancifolia*, utilizou-se o 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), através do ensaio espectrofotométrico (resposta qualitativa e/ou quantitativa) (ZHANG *et al.*, 2007).

A capacidade antirradicalar das substâncias pode ser avaliada espectrofotometricamente através da facilidade com que o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) recebe um átomo de hidrogênio de uma substância potencialmente antirradicalar.

Neste ensaio uma solução de DPPH 0,004% (2 mL) foi adicionada às soluções das amostras teste, em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 80 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), do controle positivo (ácido caféico) em microplaca de 96 poços, e o etanol foi usado como branco, após 30 minutos fez-se a leitura da absorvidade molar destas soluções a 517 nm. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antirradicalar da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar (ΔA). A expressão dos resultados foi dada pelo IC_{50} , calculado com base na análise de regressão linear.

4.9.4 Ensaio de atividade genotóxica

O ensaio de atividade genotóxica foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da UFMS, sob a responsabilidade da Dra. Zaira da Rosa Guterres.

Realizado de acordo com metodologia descrita na literatura (GRAF *et al.*, 1984), o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (“Somatic Mutation And Recombination Test – “SMART”) baseia-se em mutações encontradas nos tricomas que revestem as asas de *D. Melanogaster*. Durante as sucessivas mitoses das células que originarão as asas, podem ocorrer alterações genéticas, levando ao aparecimento de manchas mutantes. Estas regiões são detectadas ao se analisar a diferente forma dos pêlos ou tricomas que expressam fenotipicamente os genes *mwh* ou *flr*³.

Pode-se contabilizar o número total de manchas ou o tipo de mancha encontrada, através da análise das lesões induzidas, sendo que o primeiro aspecto fornece dados quantitativos, enquanto que o segundo elucida o tipo de lesão ocorrida. Dois tipos de manchas são possíveis, simples e gêmeas que permitem detectar agentes causadores de mutações pontuais, alterações cromossômicas, recombinações, deleções, rearranjos, aneuploidias, entre outros (GRAF *et al.*, 1984).

Foi utilizado para este ensaio o Cruzamento padrão (ST) [fêmeas + *flr*³/TM3, *Bd*^s cruzadas com machos *mwh/mwh*], portando os marcadores para a forma dos pêlos das asas. Os indivíduos foram previamente reproduzidos e as larvas no terceiro estágio de desenvolvimento foram transferidas para frascos de vidros contendo meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) e tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico e fase hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia*.

Como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina (DXR) nas concentrações 0,125 e 0,2 mg/mL e como controle negativo – solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol). Os adultos emergentes [*mwh* + / + *flr*³ (MH) e *mwh* + / + TM3, *Bds* (BH)] foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400x.

A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas e dos indivíduos BH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de KASTENBAUM & BOWMAN, 1970 e as frequências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com as frequências dos respectivos controles negativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico da espécie *O. lancifolia*, resultou no isolamento e caracterização de dezessete substâncias. Foram estudadas as folhas e galhos da planta, iniciando com a preparação dos extratos etanólicos, os quais foram fracionados mediante partição, originando as fases hexânica e hidrometanólica. O material resultante destas fases, após a evaporação dos solventes, foi submetido a processos cromatográficos que levaram ao isolamento das substâncias.

A determinação estrutural destas substâncias foi realizada com base nos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C (DEPT 135°), incluindo técnicas bidimensionais homo (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY) e heteronucleares (HSQC e HMBC). As substâncias conhecidas tiveram suas identidades confirmadas por comparação dos dados de espectrais obtidos com os existentes na literatura.

A seqüência referente à determinação estrutural ou identificação das substâncias obtidas neste trabalho foi organizada de acordo com a classe a que pertence cada composto [sesquiterpenos, flavonoides, biflavonoides, diterpenos, tocoferol, poliprenol e esteroides].

5.1 Sesquiterpenos

5.1.1 Substância 1

A substância **1**, de aspecto oleoso e incolor, foi obtida da fração OLGH11-5, originada do fracionamento cromatográfico da fase hexânica dos galhos de *O. lancifolia* [descrita em Materiais e Métodos 4.7.2, p. 35 e 4.8.5, p.42].

Esta substância foi identificada também em mistura com o composto **2** na fração OLH-03 (35-37), obtida da fase hexânica das folhas de *O. lancifolia* [descrita em Materiais e Métodos 4.5.1.3.2, p.30].

O espectro de RMN de ^{13}C [Espectros 2 - 3; Tabela 6, p.53] apresentou um sinal relativo a carbono de uma carboxila (δ 182,6), confirmando tratar-se de um ácido carboxílico. A listagem dos sinais de RMN de ^{13}C levou a um conjunto de quinze sinais, permitindo definir os seguintes grupos: uma carboxila, três metilas, cinco metilenos, dois carbonos não ligados a

hidrogênios, sendo um deles quaternário e outro olefínico, e três metinos (sendo um deles olefínico). Estes sinais permitem propor para esta substância a fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_2$, confirmada pelo espectro de massas, a qual sugeriu que **1** pertence à classe dos sesquiterpenos.

A relação carbono/hidrogênio constante nesta fórmula molecular levou à proposta de que se trata de um sesquiterpeno bicíclico, cujo esqueleto carbônico (desprovido de funções) possui quatro metilas, seis metilenos, quatro metinos e um carbono quaternário.

Os sesquiterpenos se constituem na classe de metabólitos secundários com maior diversidade de esqueletos. Considerando-se os esqueletos de sesquiterpenos bicíclicos de ocorrência mais freqüente na natureza, podemos selecionar os listados na **Figura 7**.

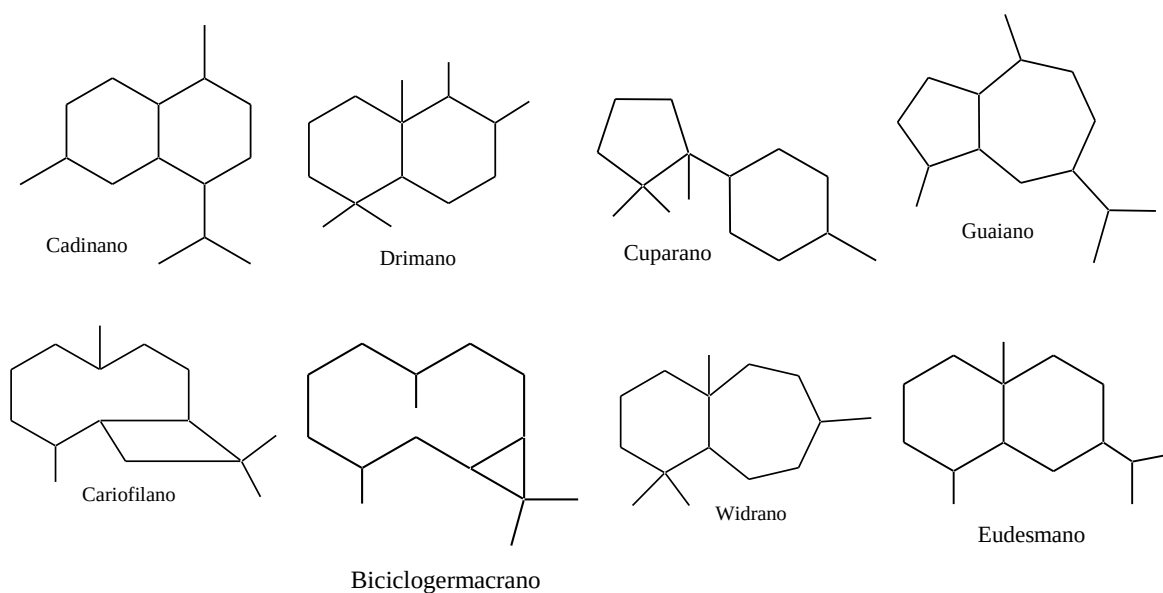
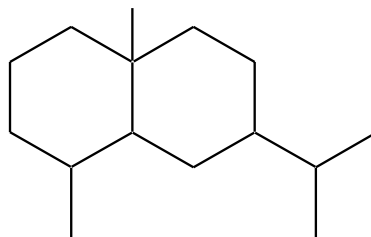


Figura 6. Alguns esqueletos de sesquiterpenos bicíclicos de ocorrência comum em plantas.

Dentre estas possibilidades, considerando as características do esqueleto carbônico de **1**, mencionadas anteriormente, foram pré-selecionados os esqueletos eudesmano e cariofilano como possibilidades. Este último foi eliminado pela análise dos experimentos bidimensionais, que demonstraram a ausência de um sistema gem-dimetila em carbono quaternário e da presença de um grupo isopropila.

Desta forma, levando-se em conta os aspectos acima mencionados e as classes de sesquiterpenos que ocorrem em Lauraceae, foi admitida a possibilidade esqueleto eudesmano para a substância **1**.

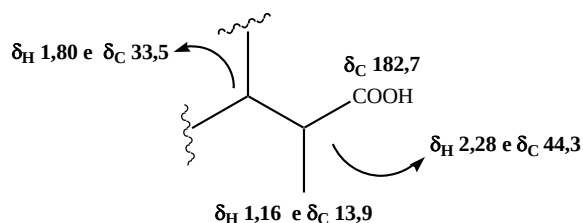
**Esqueleto eudesmano**

No espectro infravermelho [p. 62] de **1** foi observada uma banda larga, com máximo em 3440 cm^{-1} , com características relativas de estiramento de O-H de ácido carboxílico, uma banda intensa em 2931 cm^{-1} , referente a estiramento C – H de carbono sp^3 , e uma banda em 1708 cm^{-1} , relativa a estiramento C = O de ácido carboxílico .

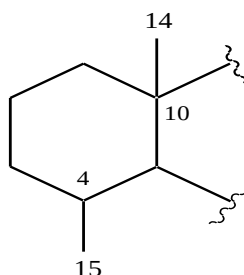
O espectro de RMN ^1H de **1** [Espectro 1; Tabela 6; p.53] apresentou dois dubletos em δ 0,76 e δ 1,16, referentes a duas metilas ligadas a carbonos metínicos e um singlete a δ 0,89, correspondente a uma metila ligada a carbono quaternário; a quarta metila do esqueleto encontra-se sob a forma de carboxila.

O experimento HSQC [Espectros 5 – 8; Tabela 6; p.53] permitiu efetuar as atribuições mostradas na Tabela 6.

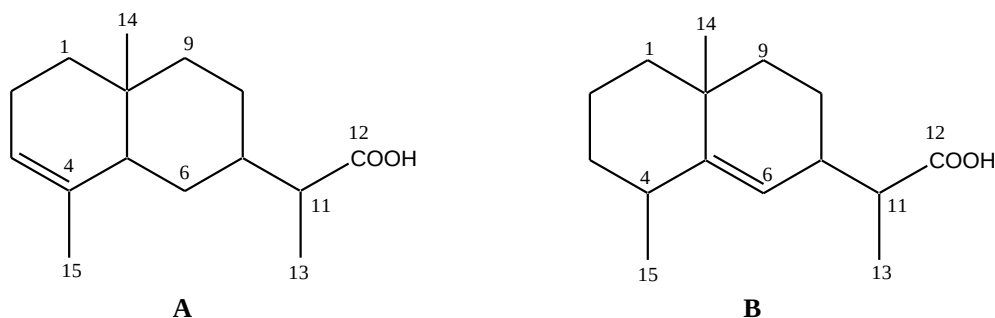
A análise do experimento HMBC [Espectro 9 - 11; Tabela 6; p. 53] mostrou que os hidrogênios da metila a δ_{H} 1,16 acoplam com o carbono metínico a δ_{C} 44,3 e com o carbono da carboxila a δ_{C} 182,7; por outro lado, o hidrogênio referente ao sinal a δ 2,28 acopla com o carbono da carboxila (δ 182,7), com o carbono da metila a δ 13,9 (δ_{H} 1,16) e com o carbono metínico a δ 33,5. Este conjunto de dados leva à estrutura parcial abaixo:



Ou seja, este conjunto de sinais evidencia que a carboxila se localiza num dos carbonos de um grupo originalmente isopropílico, ligado a um carbono metínico. Constatou-se também, a presença de outras duas metilas, sendo uma ligada a carbono metínico e a outra ligada a carbono quaternário, que é compatível com a estrutura parcial a seguir.

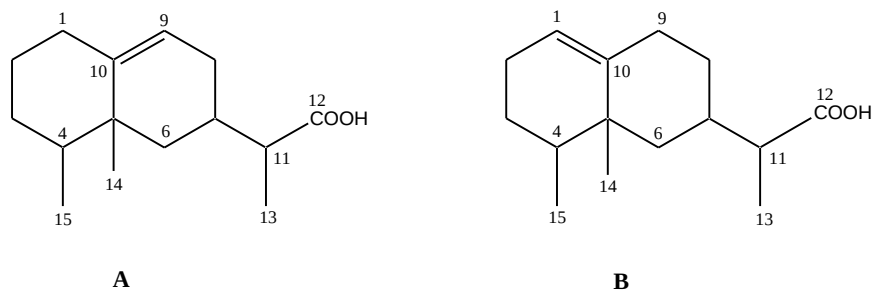


Considerando-se a estrutura do esqueleto eudesmano, a ligação dupla gerando um carbono sem hidrogênio e outro metínico e o envolvimento da isopropila na função ácido carboxílico (vide estrutura parcial acima), poderíamos propor as estruturas abaixo:

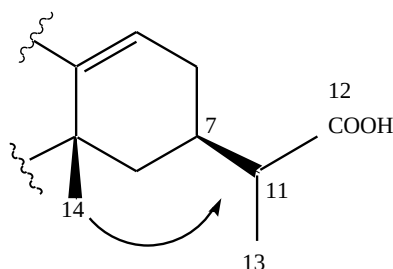


No caso da estrutura **A**, a metila se encontra ligada a carbono de dupla, o que não é constatado nos espectros de RMN; no caso da estrutura **B**, o hidrogênio metínico da ligação dupla não acoplaria de maneira significativa com um carbono metilênico, como foi observado nos experimentos de RMN bidimensionais. Desta forma, constata-se que não é possível compatibilizar uma estrutura com esqueleto eudesmano com os dados de RMN observados para a substância **1**.

Uma possibilidade considerada foi a de que se trate de um esqueleto eudesmano rearranjado, correspondente ao esqueleto eremofilano. Neste caso, a localização da ligação dupla entre os carbonos **C-1** e **C-10** ou entre **C-9** e **C-10** seria compatível com os dados espectroscópicos mencionados.



No experimento NOESY [Espectro 14-16, p.60-61] de **1** foram observadas correlações espaciais entre os hidrogênios a δ 0,89 (C-14) e o hidrogênio a δ 2,28 (H-11), indicando que ambos estão do mesmo lado (*cis*).



O experimento HSQC permitiu constatar que o carbono metilênico com deslocamento químico em δ 32,1 se correlaciona com os hidrogênios referentes aos sinais a δ_{H} 2,14 *m* e δ_{H} 1,85 *m*, compatíveis com um metileno alílico. O experimento HMBC mostrou a correlação destes hidrogênios com os carbonos da ligação dupla e com C-7, indicando que o referido metileno corresponde a C-8 e que, portanto, a ligação dupla na estrutura da substância **1** se localiza em C-9/C-10 (possibilidade A).

Além da análise da configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model* (versão 7) para **1**, foi possível verificar o acoplamento entre o H – 7 e H – 11 com $J = 12,2$ Hz, apontando um acoplamento *trans* entre esses H.

O deslocamento químico de C-8 é compatível com os efeitos de desproteção dos dois grupos vizinhos, fundamentando assim a proposta estrutural para o composto **1** [Figura 8].

Reunindo-se as informações obtidas no conjunto de espectros [RMN de ^1H e ^{13}C , experimentos HMBC e HMQC] foi possível realizar as atribuições e constatar as correlações mostradas na Tabela 6.

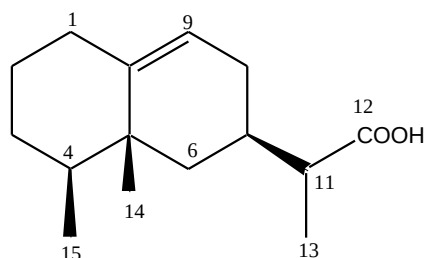


Figura 7. Estrutura da Substância **1**

O espectro de massas de **1** [Espectro 18, p. 62], obtido por EIMS, apresentou um íon a m/z 236,0 $[M]^+$ relativo à fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_2$, compatível com a proposta supracitada.

O sesquiterpeno **1**, caracterizado como sendo o ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12-oico, está sendo descrito pela primeira vez na literatura [Figura 7].

Esta substância também foi identificada em mistura com o composto **2**, apresentando-se como produto majoritário nas frações OLH3-27, OLH3-35, OLH3-39 e OLH4-42-44, provenientes das folhas, e na fração OLGH11-4, dos galhos, todas originárias das fases hexânicas.

Embora comum em espécies de Asteraceae e em algumas famílias vegetais (GUINAUDEAU *et al.*, 1975; GUINAUDEAU *et al.*, 1979; GUINAUDEAU *et al.*, 1983; GUINAUDEAU *et al.*, 1988), sesquiterpenos eremofilanos são inéditos em *Ocotea* e encontra-se apenas um relato na literatura em um espécime pertencente à família Lauraceae, *Lindera strychnifolia* (MIMURA *et al.*, 2010).

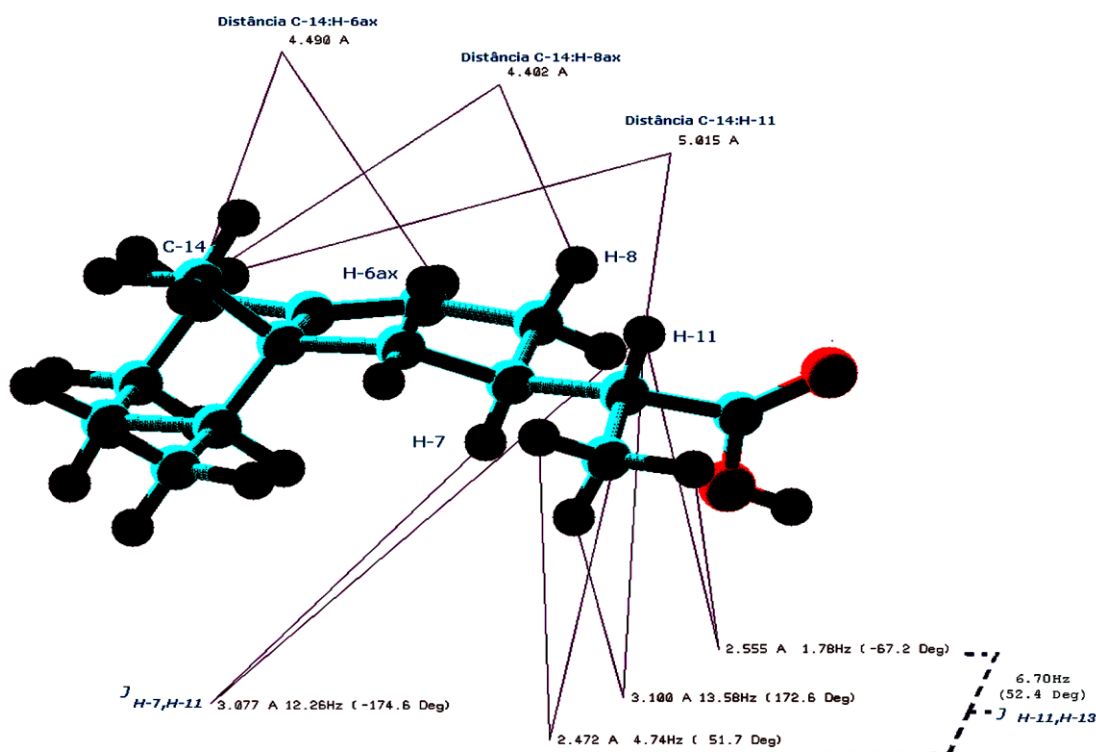
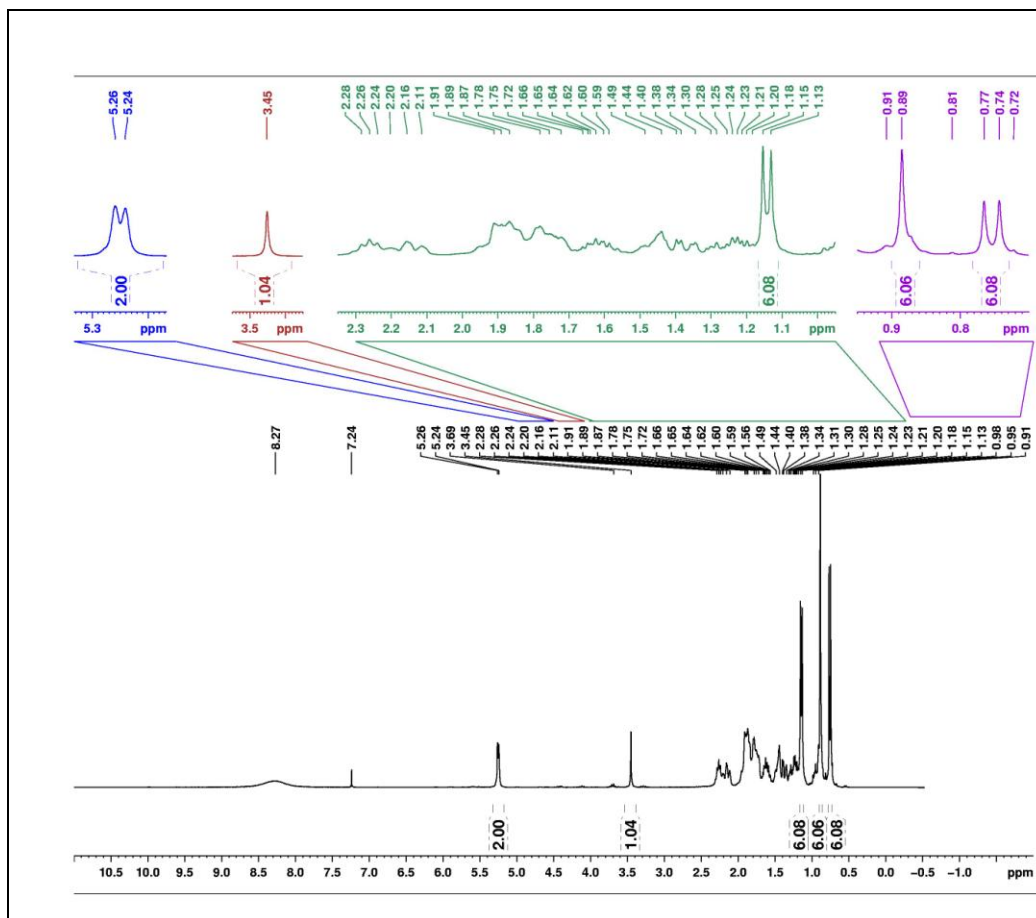


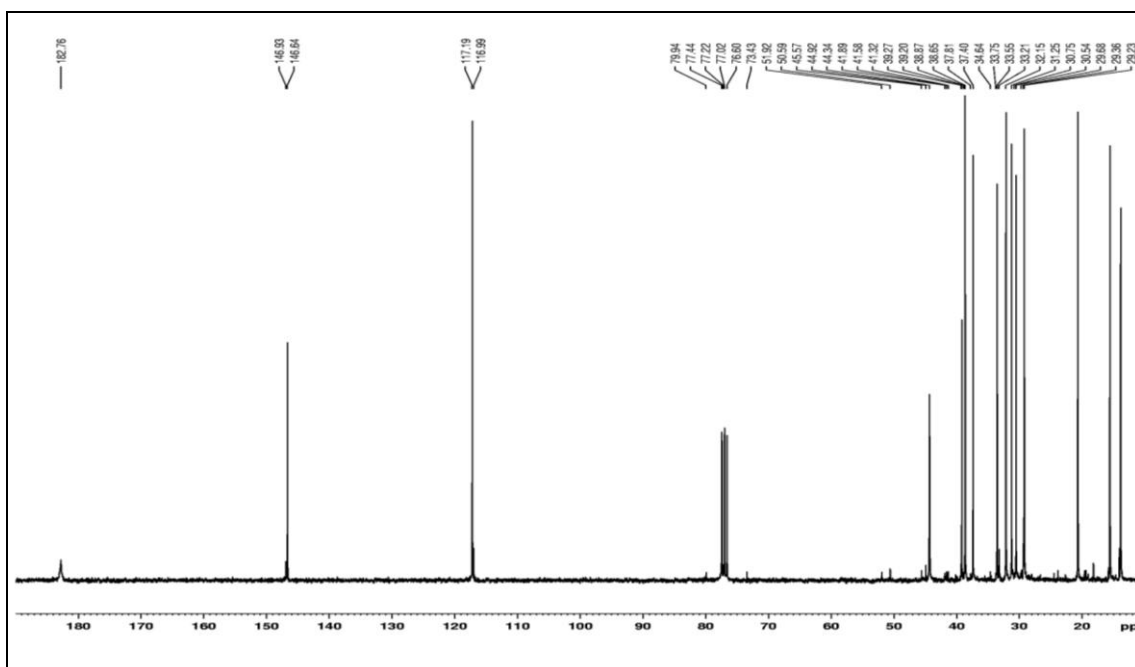
Figura 8. Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **1**.

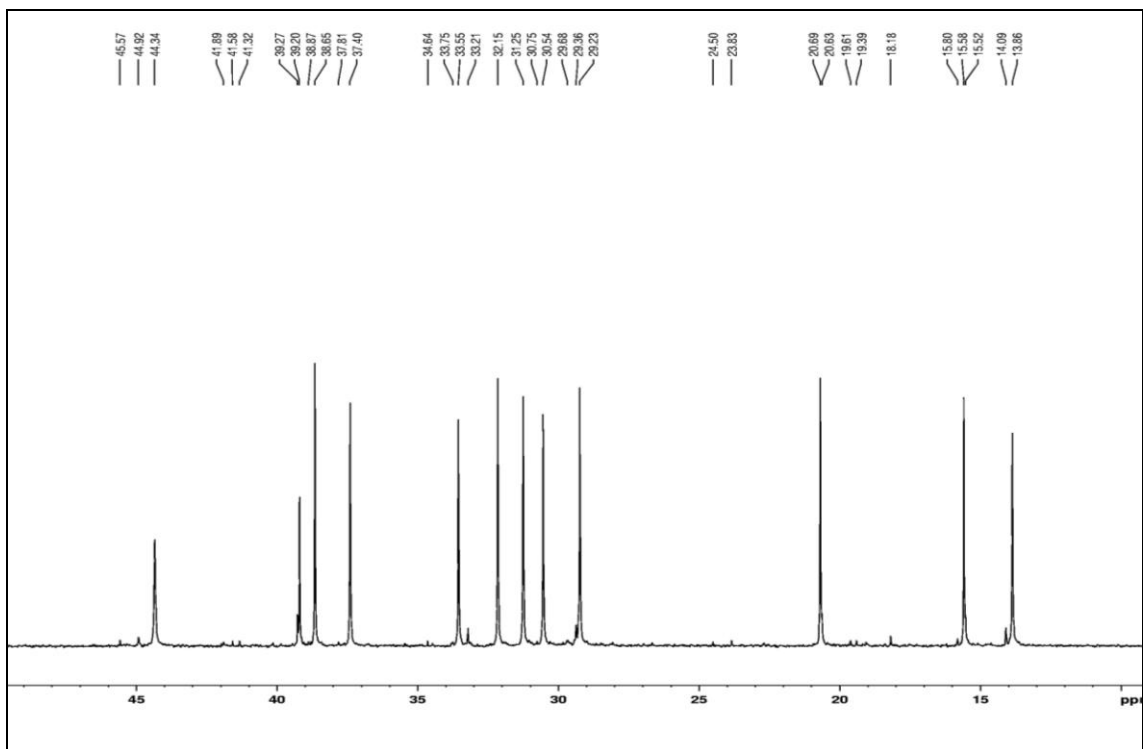
Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75MHz, CDCl_3) e correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno **1**.

C/H	(1)		HMBC
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	(H→C)
1	30,5	1,90 m; 1,73 m	
2	29,2	1,72 m; 1,21 m	
3	31,2	1,30 m; 1,41 m	C-4; C-5
4	38,7	1,62 m	C-5; C-14; C-15
5	39,2	-	
6	37,4	1,87 m; 0,90 m	C-5; C-7
7	33,5	1,80 m	C-9; C-11
8	32,1	2,14 m; 1,85 m	C-1; C-7; C-9; C-10
9	117,2	5,24 dd (5,8; 1,3 Hz)	C-1; C-5; C-7; C-8
10	146,6	-	
11	44,3	2,28 dq (12,2; 7,1 Hz)	C-6; C-7; C-12; C-13
12	182,7	-	
13	13,9	1,16 d (7,1 Hz)	C-7; C-11; C-12
14	20,7	0,89 s	C-5; C-6; C-10
15	15,5	0,76 d (6,7 Hz)	C-5

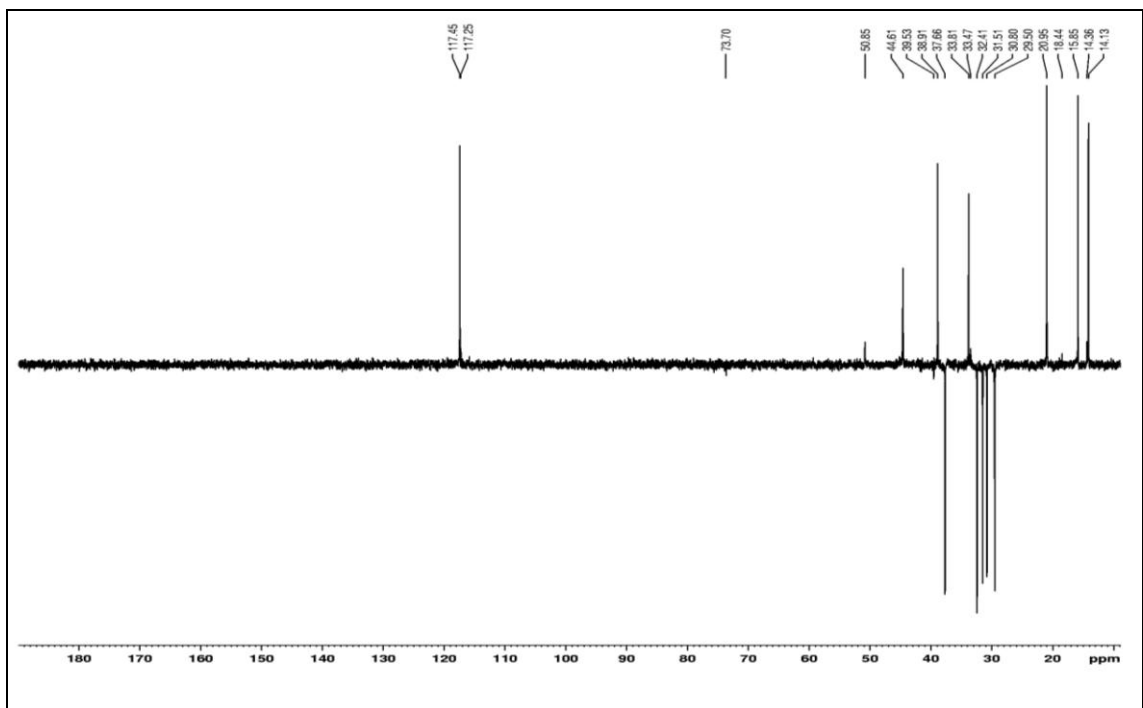


Espectro 1. Espectro de RMN ¹H de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl₃)

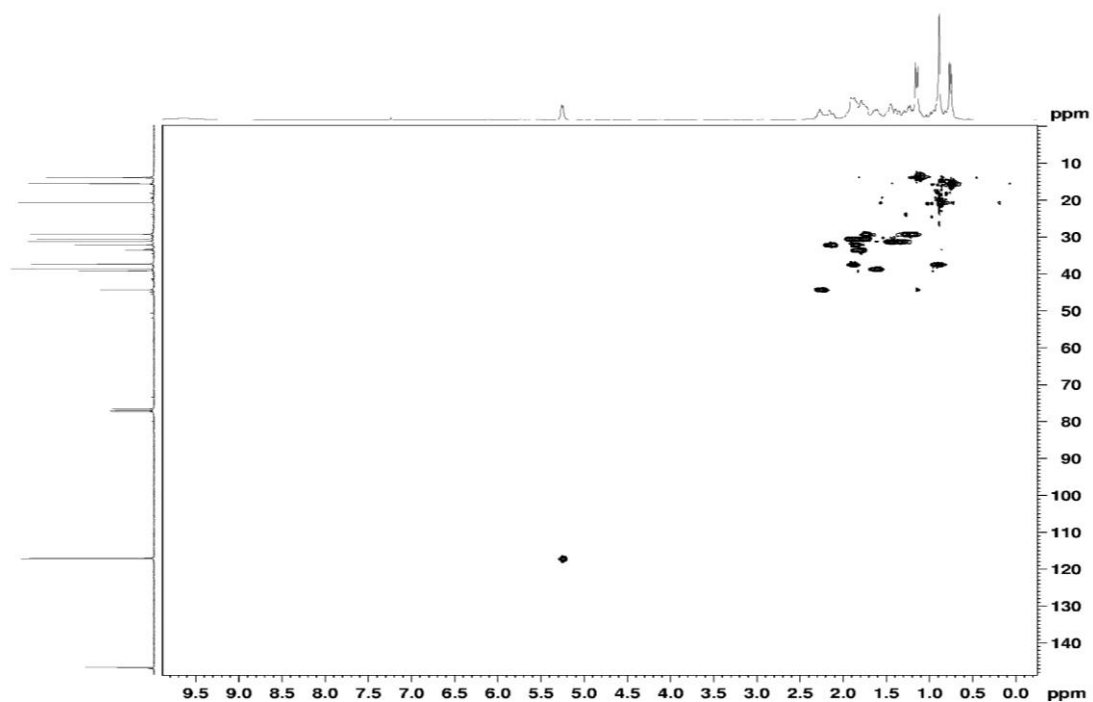




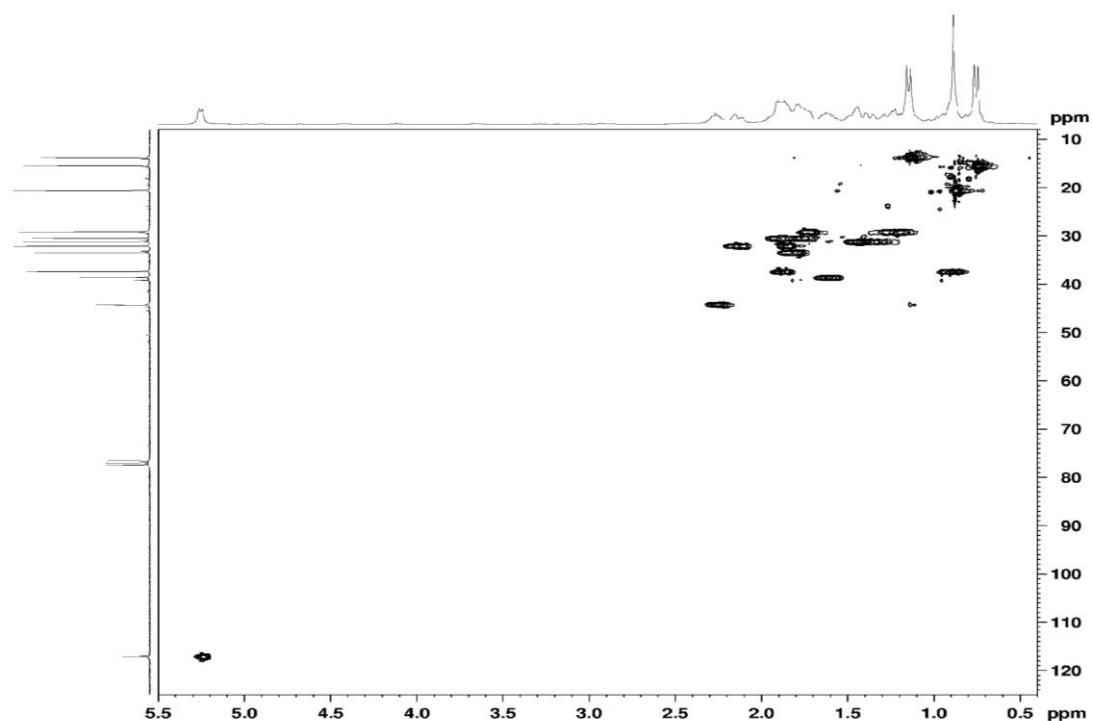
Espectro 3. Expansão do espectro de RMN ¹³C de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl₃)



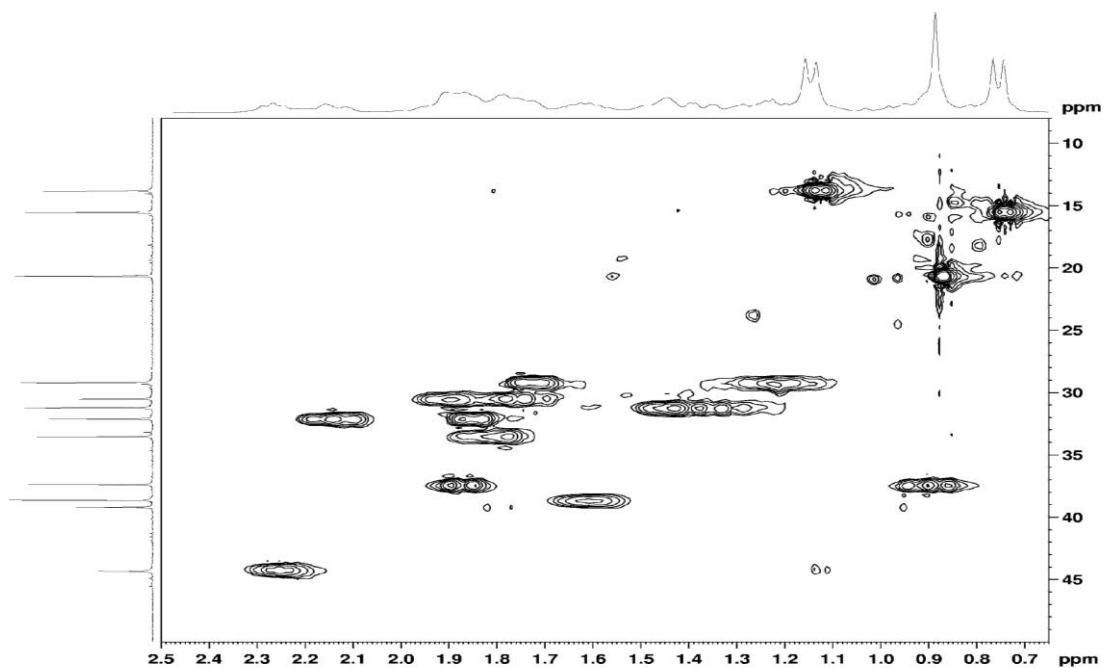
Espectro 4. Espectro de DEPT 135° de OLGH11-5 (Substância 1) (75 MHz, CDCl₃)



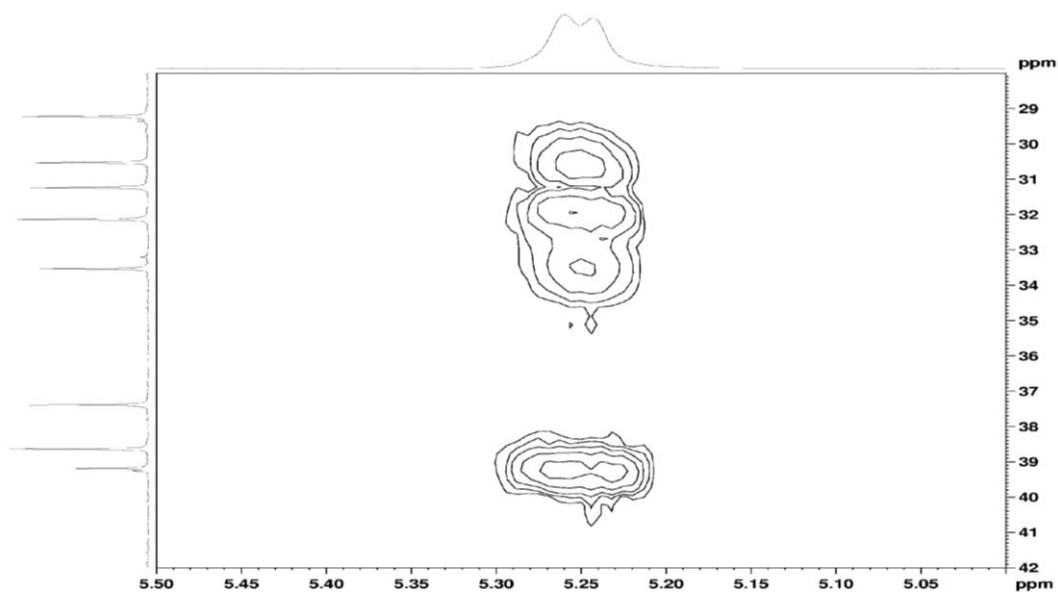
Espectro 5. Experimento HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



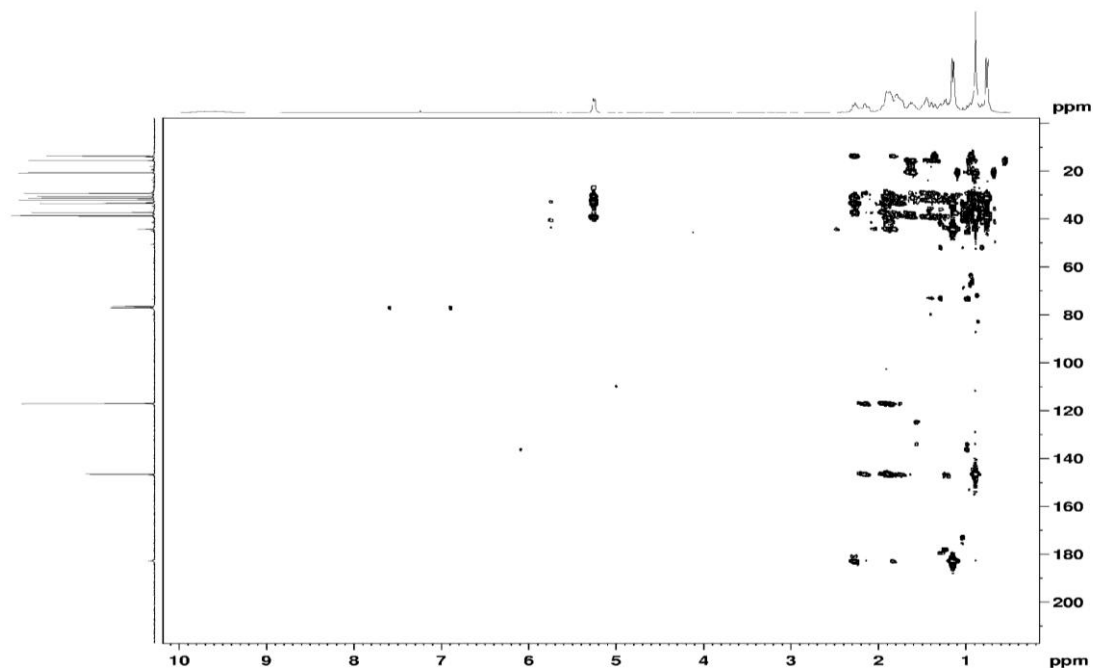
Espectro 6. Expansão do experimento de HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



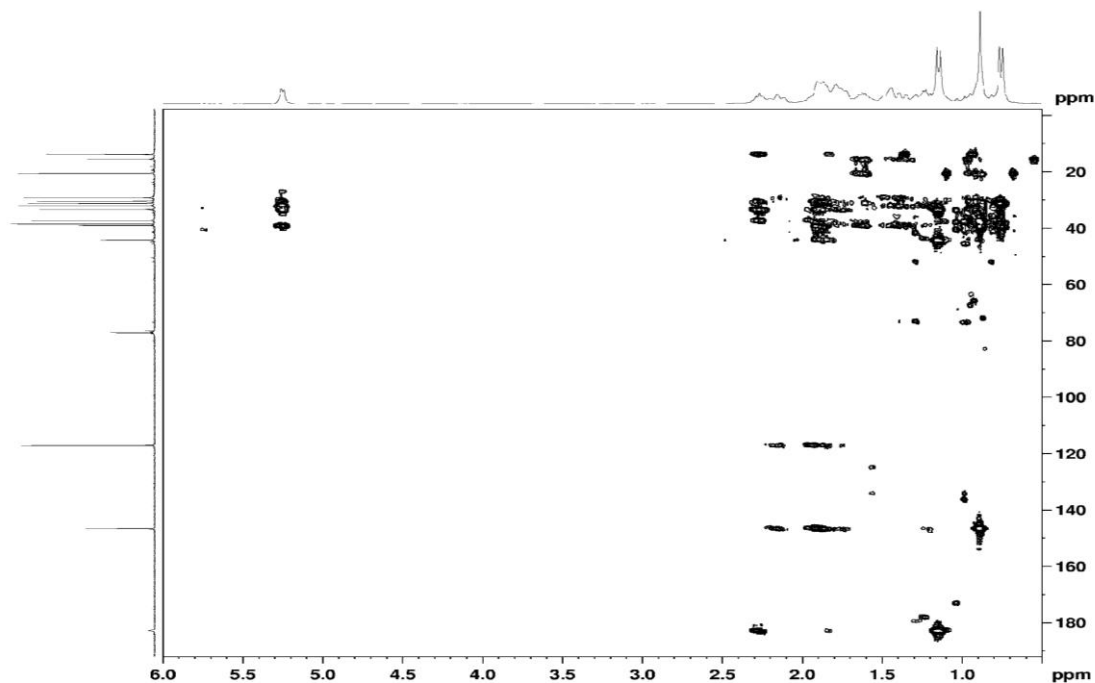
Espectro 7. Expansão do HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



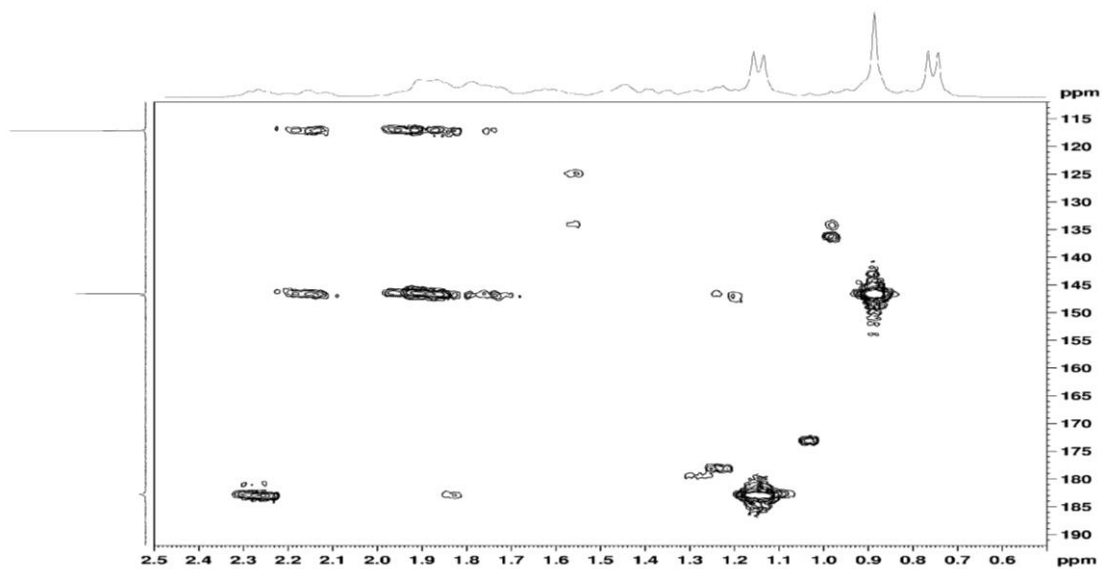
Espectro 8. Expansão do HSQC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



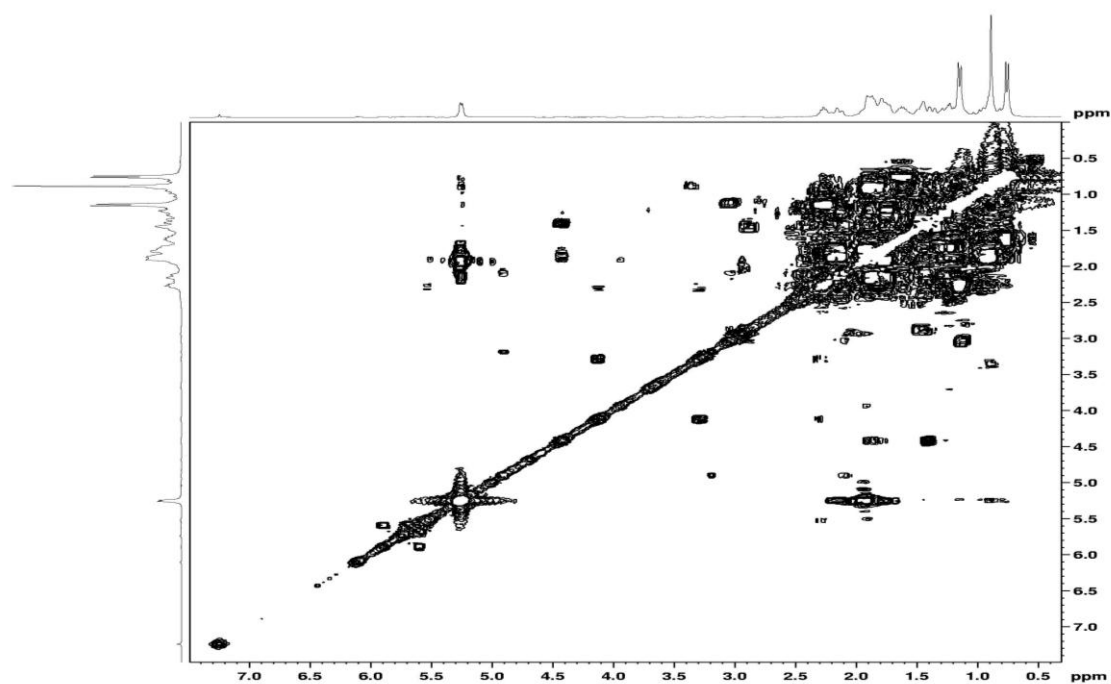
Espectro 9. Experimento HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



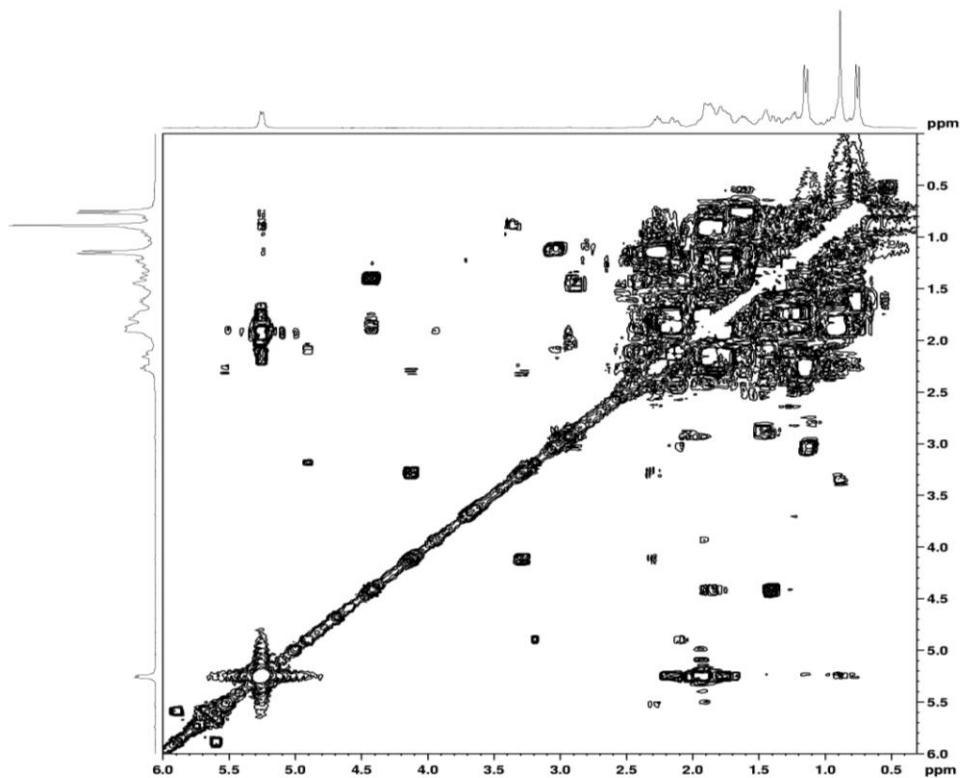
Espectro 10. Expansão do HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl_3)



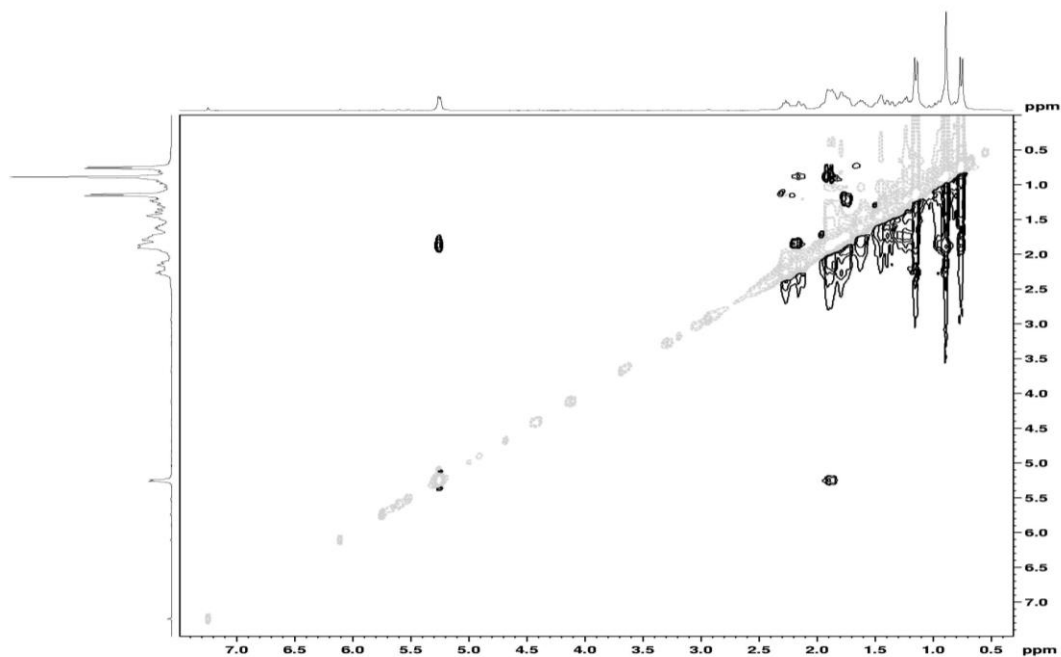
Espectro 11. Expansão do HMBC de OLGH11-5 (Substância 1) (300/75 MHz, CDCl₃)



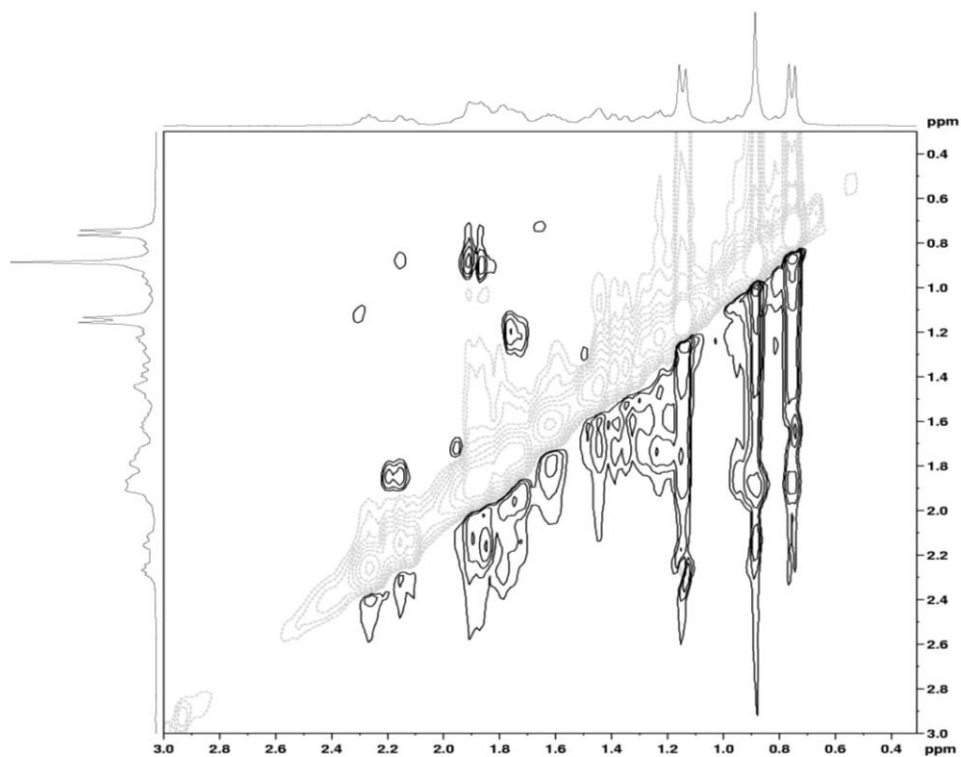
Espectro 12. Experimento COSY ¹H – ¹H de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl₃)



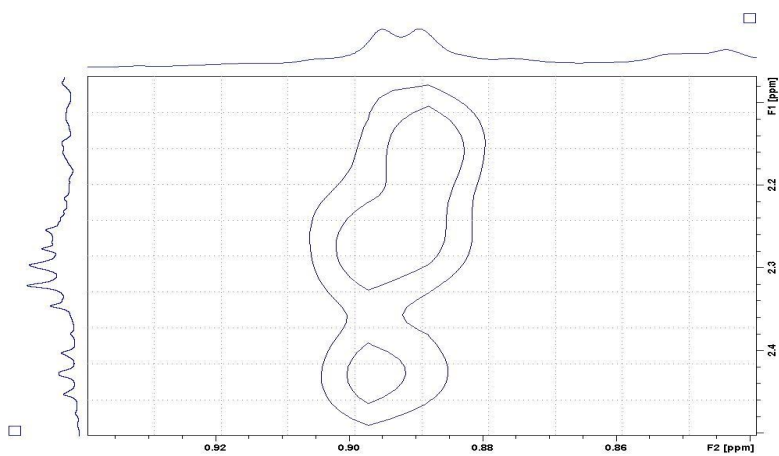
Espectro 13. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)



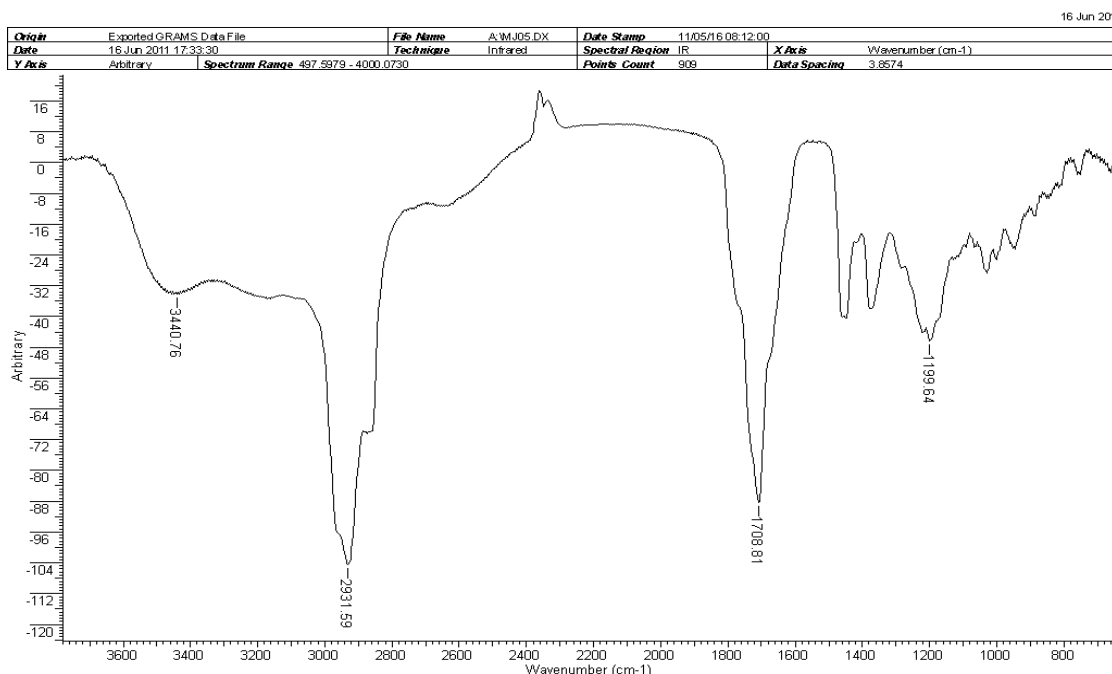
Espectro 14. Experimento NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)



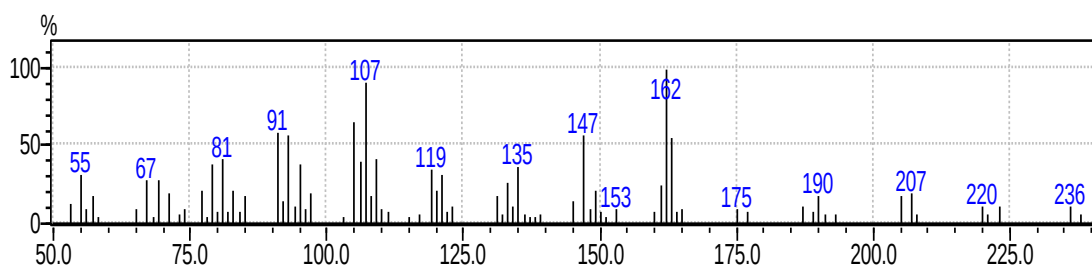
Espectro 15. Experimento NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 16. Expansão do experimento NOESY de OLGH11-5 (Substância 1) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 17. Espectro de Infravermelho de OLGH11-5 (Substância 1) (CDCl₃)



Espectro 18. Espectro EIMS (70 eV) de OLGH11-5 (Substância 1) (CDCl₃)

5.1.2 Substância 2

A substância **2**, de aspecto oleoso e esverdeada, foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos realizados com a fase hexânica proveniente do extrato etanólico dos galhos e caracterizada em mistura com o composto **1** na fração OLGH11-4, como produto majoritário [descrito em Materiais e Métodos **4.8.5**, p. 42].

Esta substância também foi caracterizada em mistura com o composto **1** em material proveniente das folhas [fase hexânica], na fração denominada OLH-03 (35-37), sendo que **2**

apresenta-se como um componente minoritário [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.3.2, p. 30].

Os sinais listados para o composto **2** nos espectros RMN de ^{13}C e DEPT 135° [Espectros 22-25; Tabela 7, p. 65] compõem um conjunto de quinze sinais, os quais mostraram valores de deslocamento químico muito semelhantes aos observados para o composto **1**. Da mesma forma que para este, os sinais foram relativos a uma carboxila, três metilas, cinco metilenos, dois carbonos não ligados a hidrogênio, sendo um quaternário e outro olefínico, e quatro metinos (sendo um deles olefínico).

O espectro de massas de **2** [Espectro 35, p. 74], indicou a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, a qual, juntamente com os dados de RMN sugerem tratar-se de um isômero do composto **1**, possuindo, portanto, esqueleto eremofilano.

O experimento HMBC [Espectros 28-29; Tabela 8, p. 65] mostrou que os hidrogênios da metila a δ 1,14 acoplam com os carbonos metínicos a δ 34,8 e δ 43,3 e com a carboxila a δ 182,8, indicando uma estrutura parcial idêntica à observada na estrutura do composto **1**, correspondente a uma isopropila onde uma das metilas foi oxidada a uma carboxila.

Estas considerações levaram à proposta de que **1** e **2** possuem estruturas isoméricas, diferindo apenas na localização da ligação dupla. A proposta imediata foi a de que **1** corresponde à possibilidade **B** [p.50] formulada durante o estudo da estrutura da substância **1**. Sendo assim, a estrutura da substância **2** teria a ligação dupla em C1-C10.

O experimento HSQC [Espectros 26-27; Tabela 8, p. 65] do composto **2** permitiu listar as atribuições mostradas na Tabela 8, enquanto o experimento HMBC evidenciou as correlações do hidrogênio a δ 5,3 (H-1) com o carbono a δ 26,9 (C-2) e do hidrogênio a δ 1,95 (H-9) com o carbono a δ 120,8 (C-1) e dos hidrogênios da metila a δ 1,14 (H-13) com os carbonos metínicos a δ 33,84 (C-7) e δ 43,25 (C-11).

O experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ [Espectros 31-33, p.72] apresentou correlações coerentes com as atribuições realizadas com base nos experimentos HMBC e HSQC. O experimento NOESY [Espectros 34, p.73] mostrou, entre outras, a correlação dos hidrogênios da metila 14 (δ 0,90) com o hidrogênio H-11 (δ 2,43), permitindo assim definir a relação *cis* entre os mesmos. O sesquiterpeno **2** está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

Além da análise da configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model* (versão 7) para **2**, foi possível verificar o acoplamento entre o H – 7 e H – 11 com $J = 12,3$ Hz, apontando um acoplamento *trans* entre esses hidrogênios [Figura 10].

Desta forma, foi possível determinar que a estrutura da substância **2** correspondente ao ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-1(10)-en-12-oico [Figura 9]

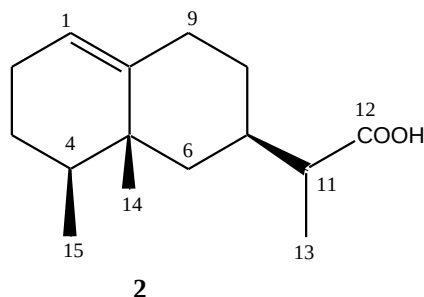


Figura 9. Estrutura da substância **2**

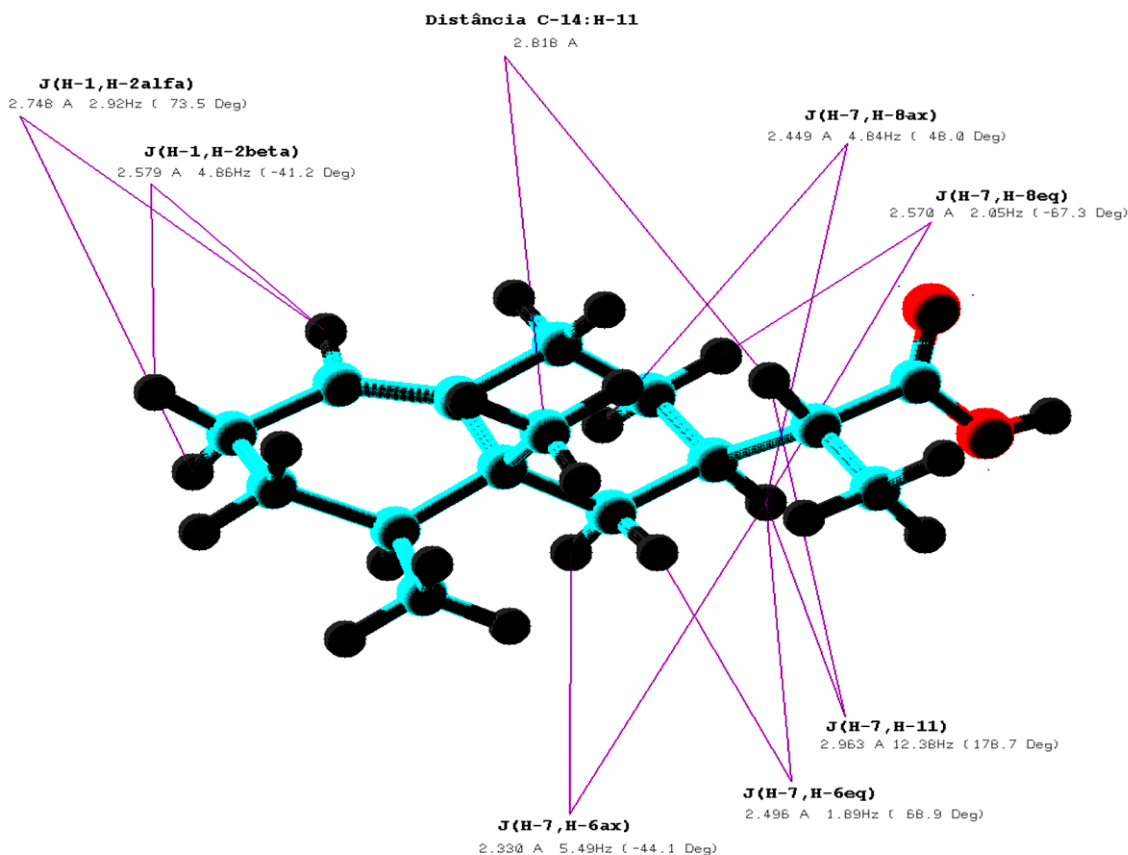


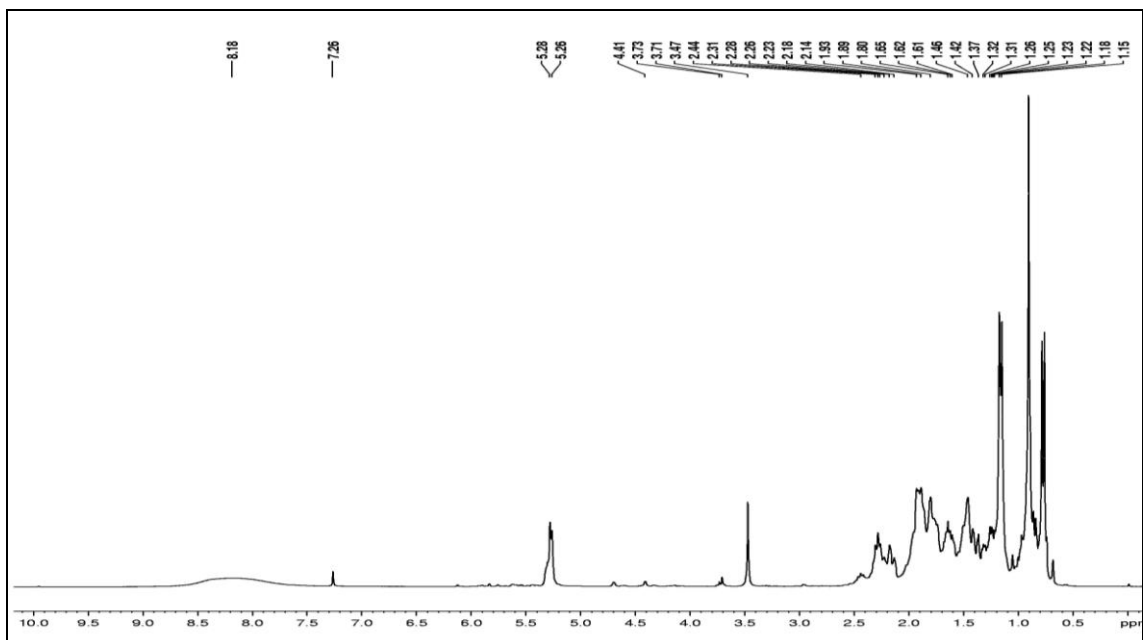
Figura 10: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **2**.

Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno **2** e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **1**.

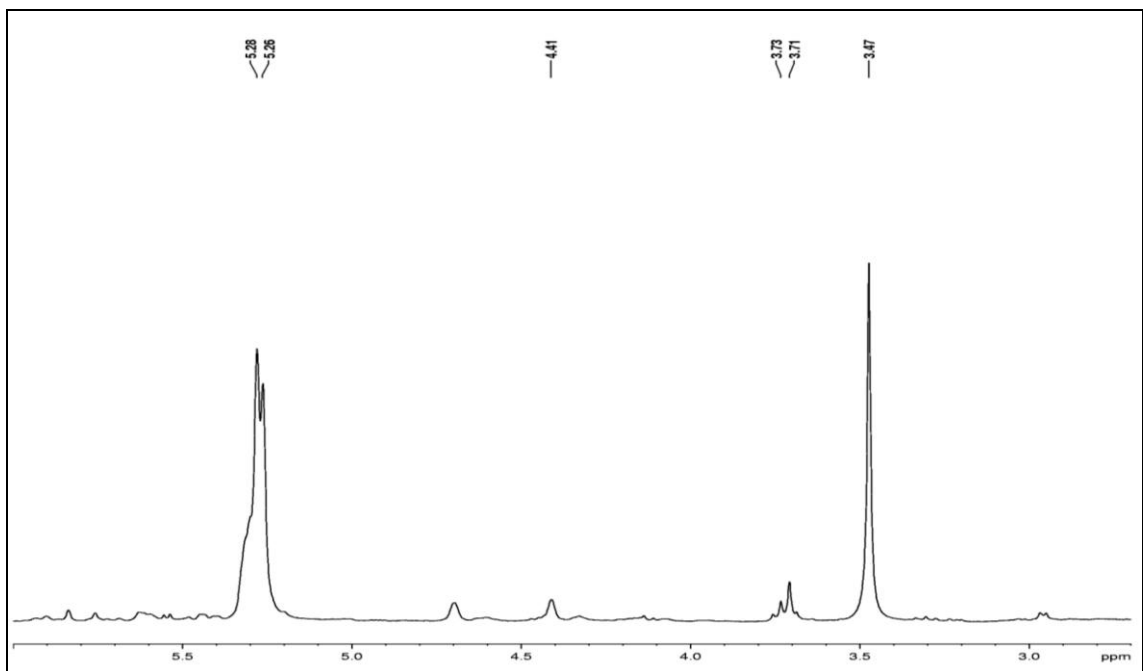
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(2) $\delta^1\text{H}$ m, J(Hz)	(1) $\delta^{13}\text{C}$
1	120,8	5,30 dd (5,4;1,5)	30,5
2	28,0	1,93 m; 2,29 m	29,2
3	26,9	1,22 m; 1,43 m	31,2
4	36,7	1,50 m	38,7
5	37,6	-	39,2
6	37,8	1,30 m; 1,50 m	37,4
7	34,8	1,71 m	33,5
8	29,5	1,48 m; 1,61 m	32,1
9	25,2	1,95 m	117,2
10	143,2	-	146,6
11	43,3	2,43 m	44,3
12	182,8	-	182,7
13	15,8	1,14 d (7,1)	13,9
14	15,9	0,90 s	20,7
15	14,1	0,87 d (7,1)	15,5

Tabela 8 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C , atribuídos com base no experimento HSQC e correlações observadas no experimento HMBC de (**2**) (300/75 MHz, CDCl_3)

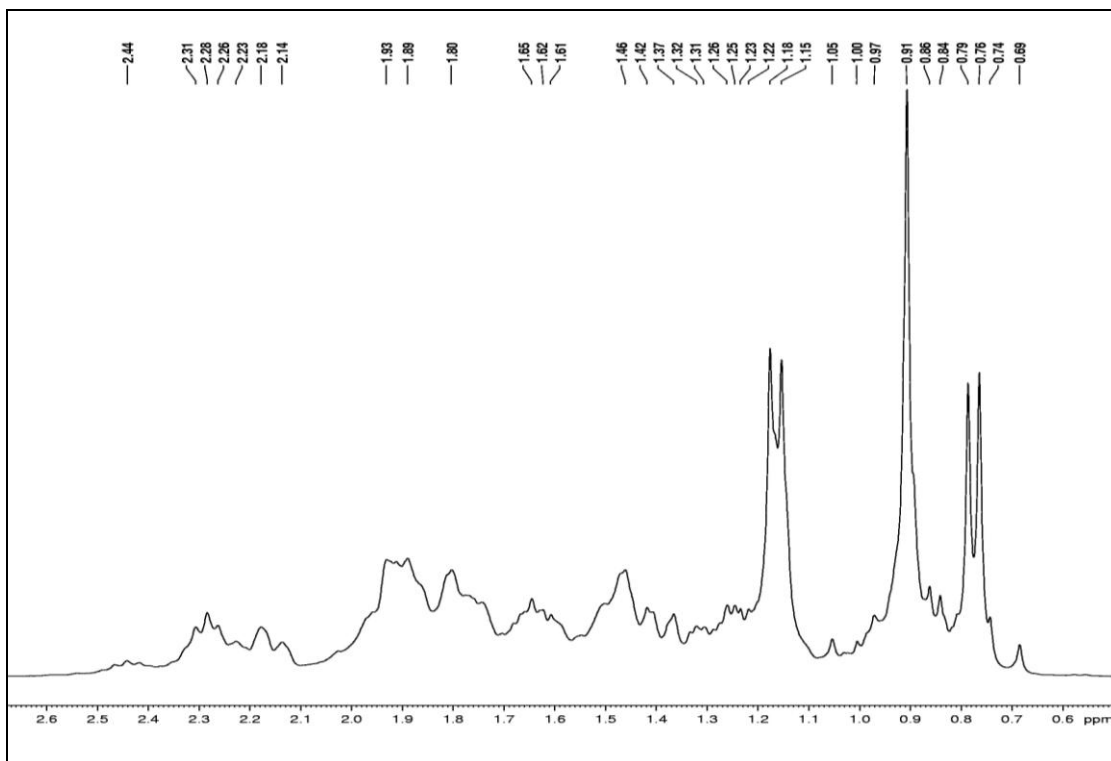
C/H	HSQC (2) $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ m, J(Hz)	HMBC (2) (H $\rightarrow$ C)
1	120,8	5,30 dd (5,4;1,5)	C-3
2	28,0	1,93 m; 2,29 m	
3	26,9	1,22 m; 1,43 m	
4	36,7	1,50 m	
5	37,6	-	
6	37,8	1,30 m; 1,50 m	C-10
7	34,8	1,71 m	C-5
8	29,5	1,48 m; 1,61 m	
9	25,2	1,95 m	C-1; C-10
10	143,2	-	
11	43,3	2,43 m	C-7; C-12; C-13
12	182,8	-	
13	15,8	1,14 d (7,1)	C-7; C-12
14	15,9	0,90 s	C-6
15	14,1	0,87 d (7,1)	C-2; C-3; C-4; C-14



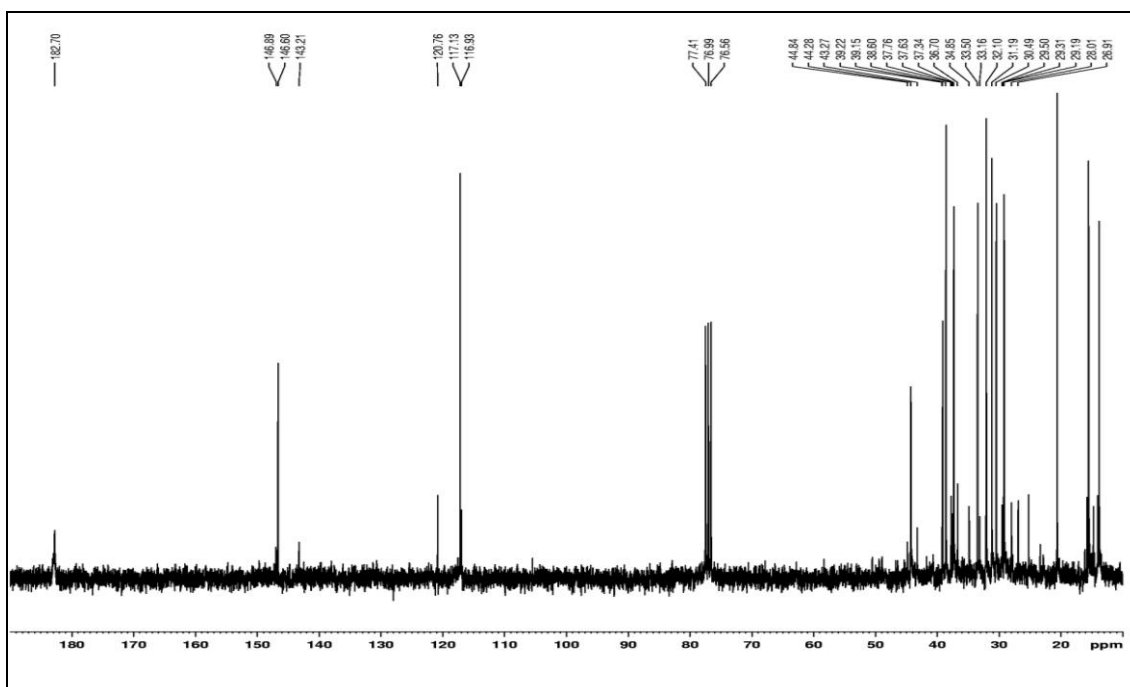
Espectro 19. Espectro de RMN ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)



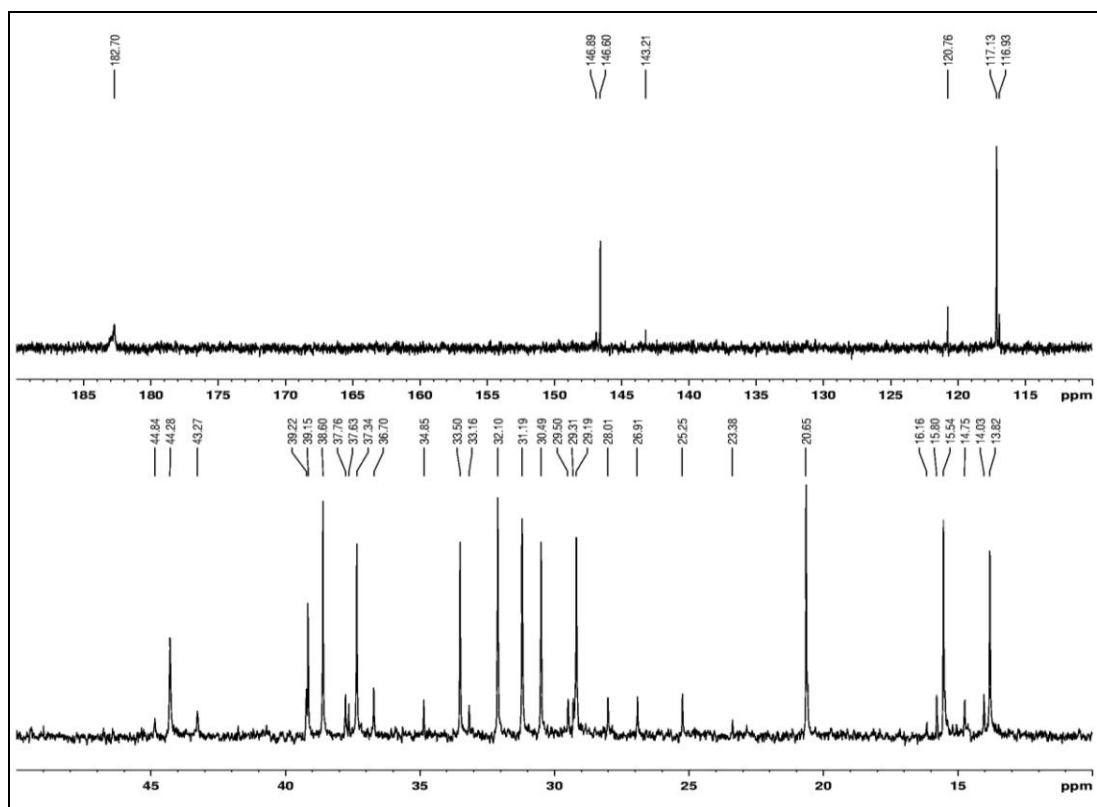
Espectro 20. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)



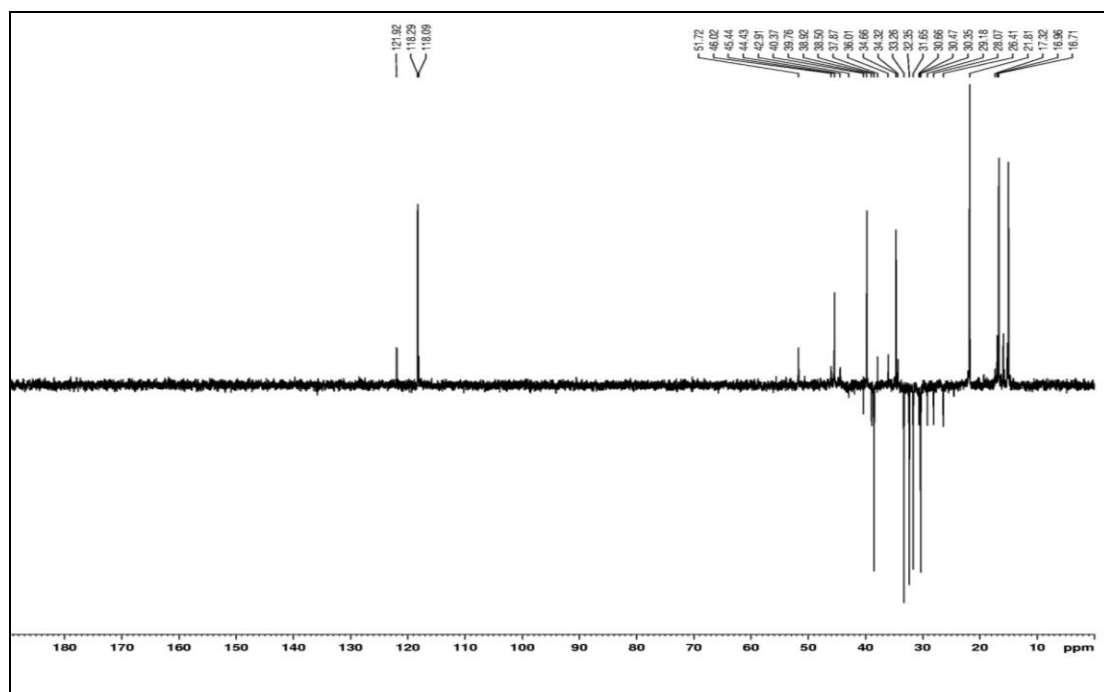
Espectro 21. Expansão do espectro de RMN ^1H da fração OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)



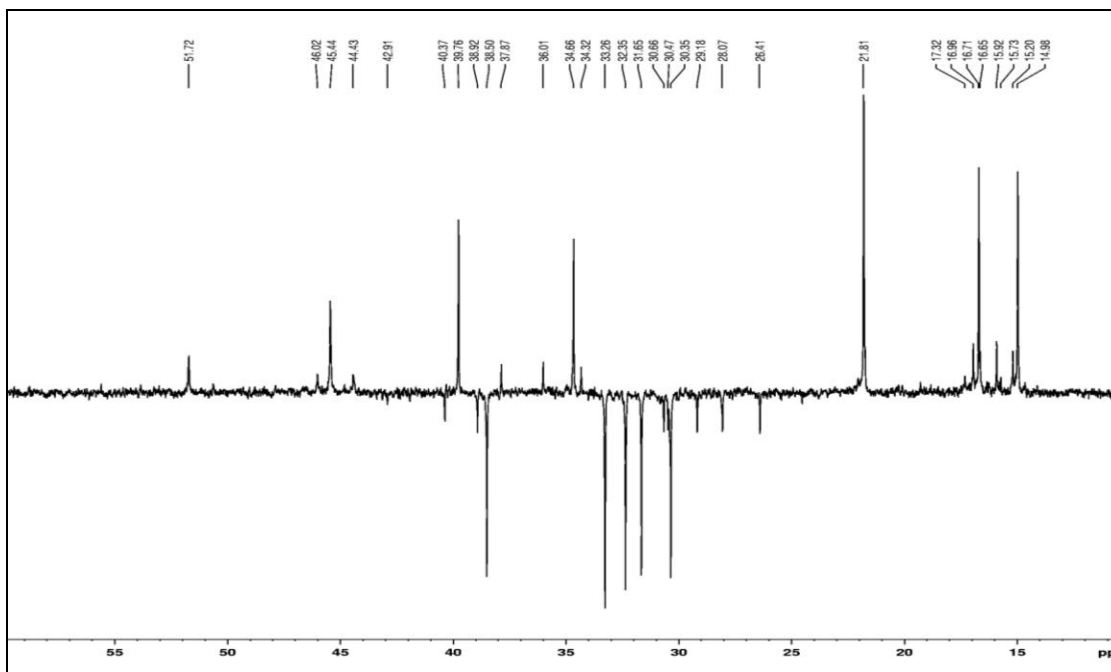
Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)



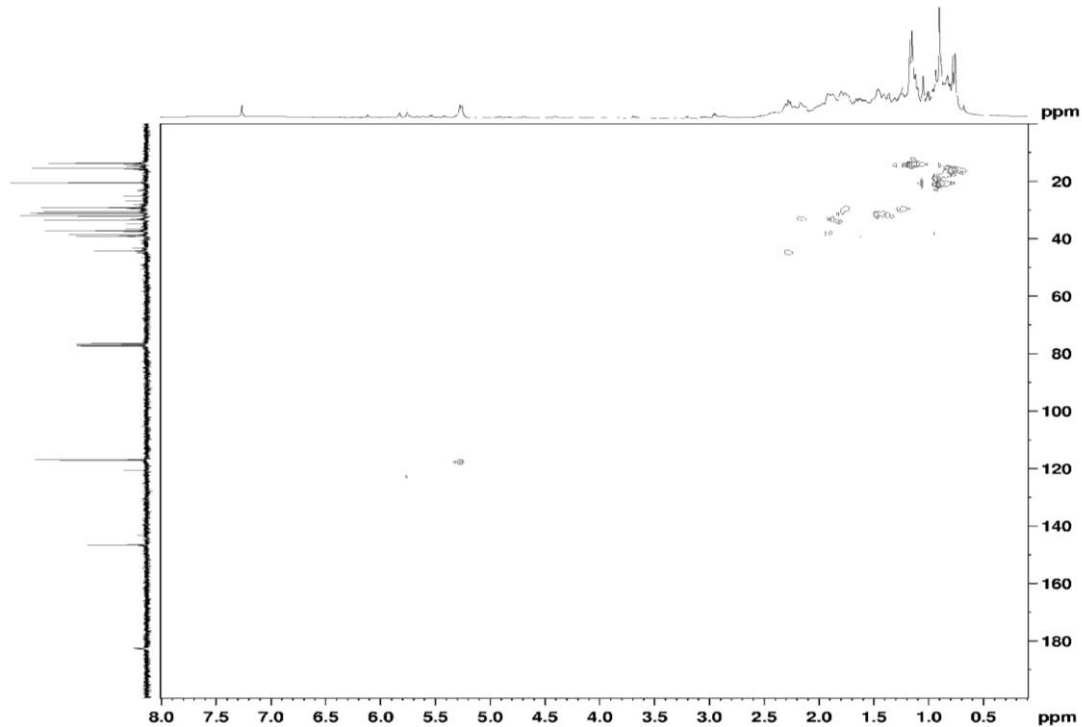
Espectro 23. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)



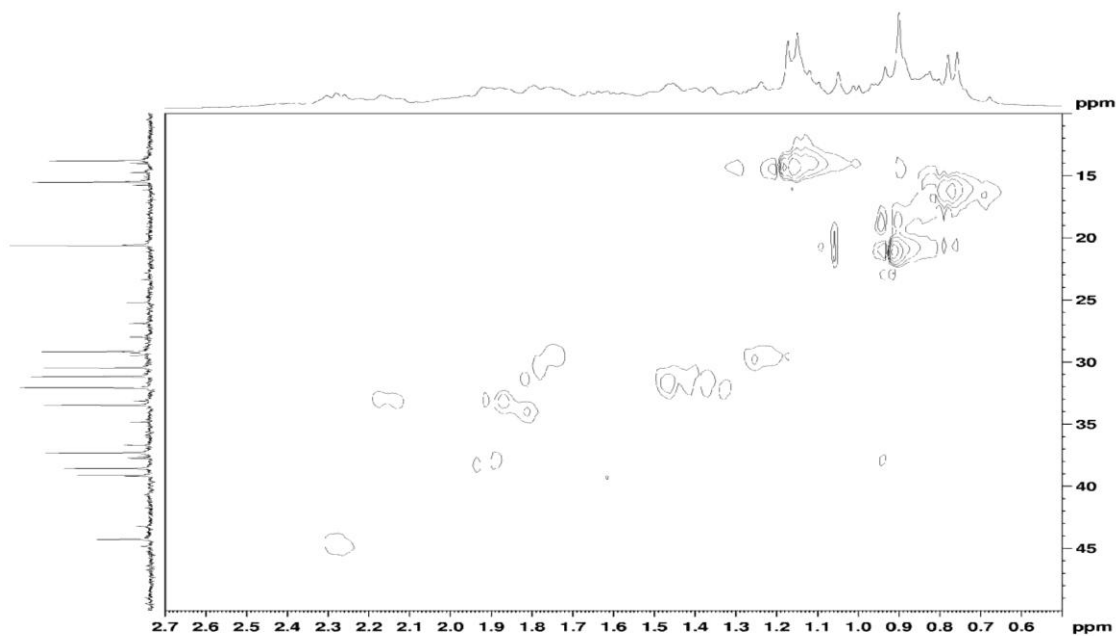
Espectro 24. Espectro DEPT 135° de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)



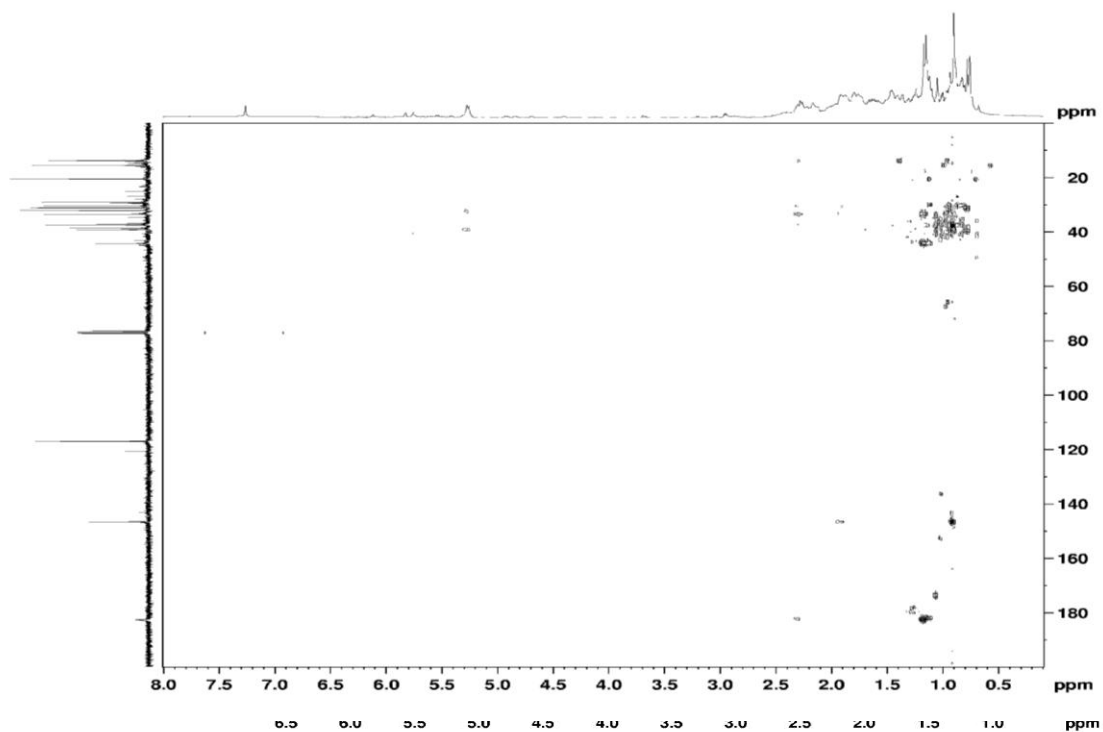
Espectro 25. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH11-4 (Substância 2) (75 MHz, CDCl_3)



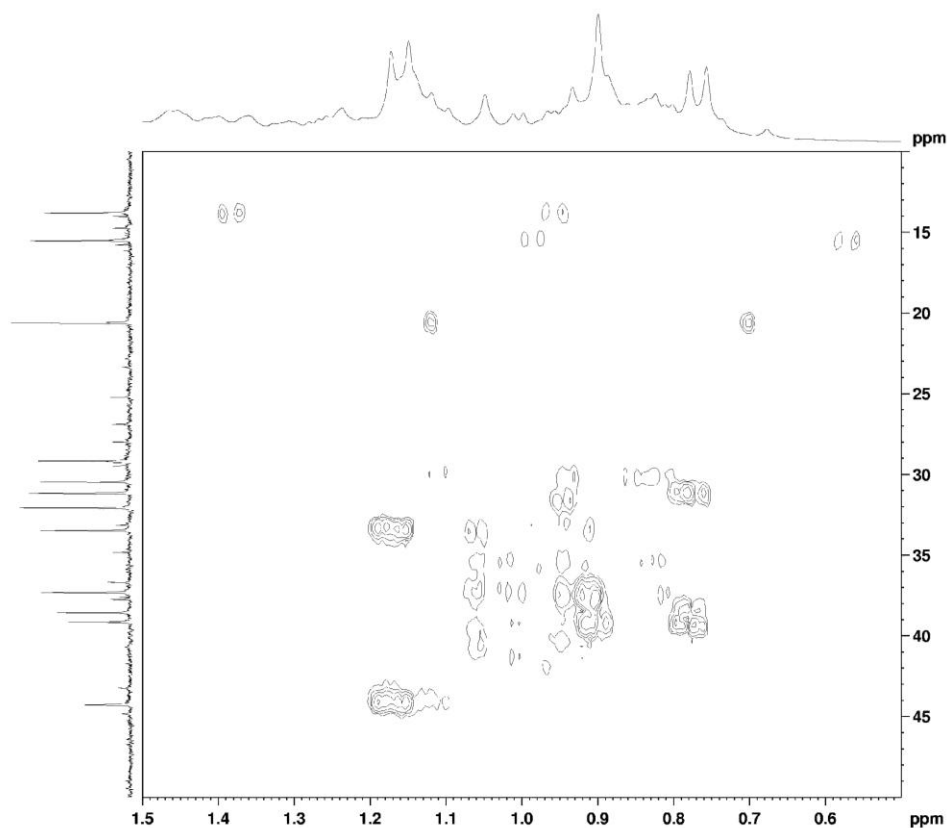
Espectro 26. Experimento HSQC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl_3)



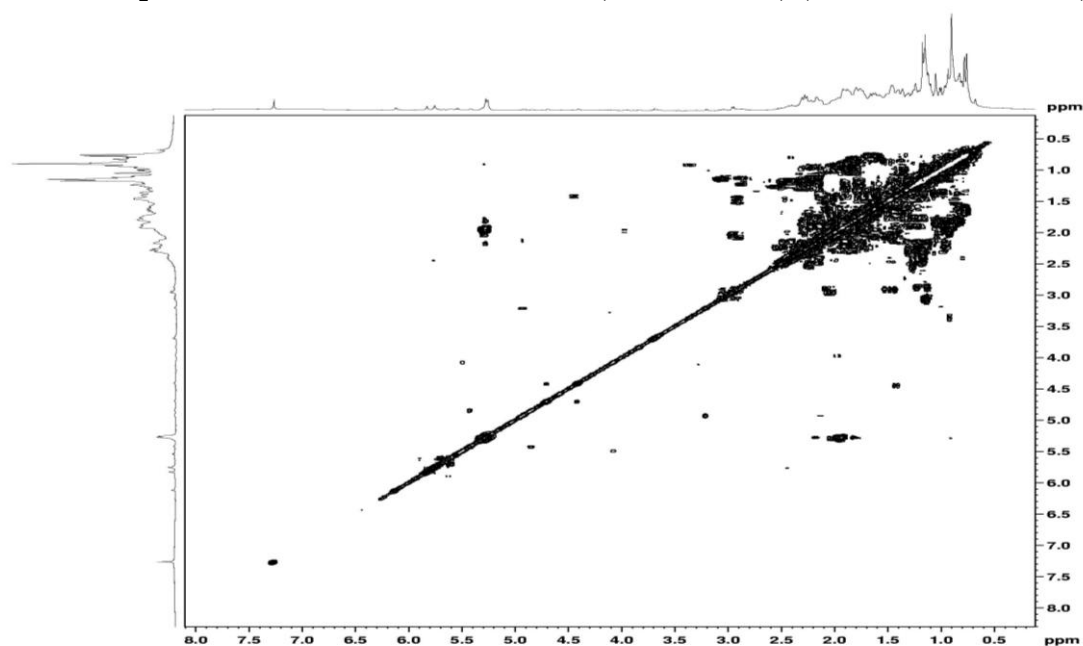
Espectro 27. Experimento HSQC da fração OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl₃)



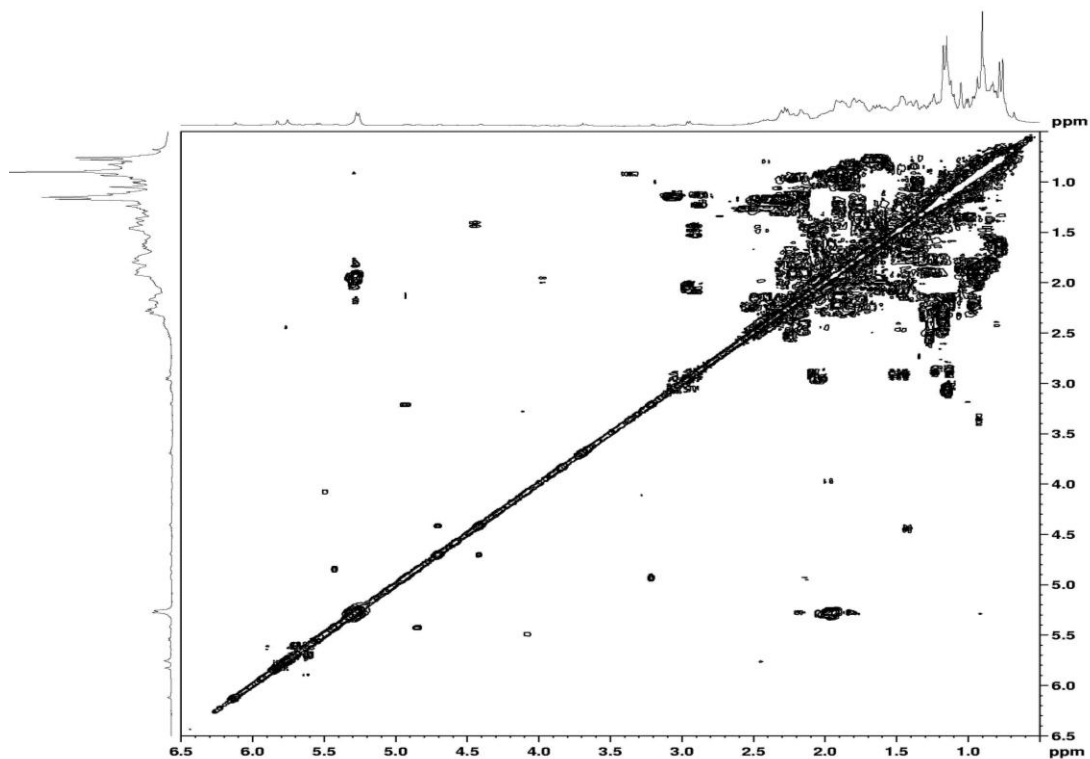
Espectro 28. Experimento HMBC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl₃)



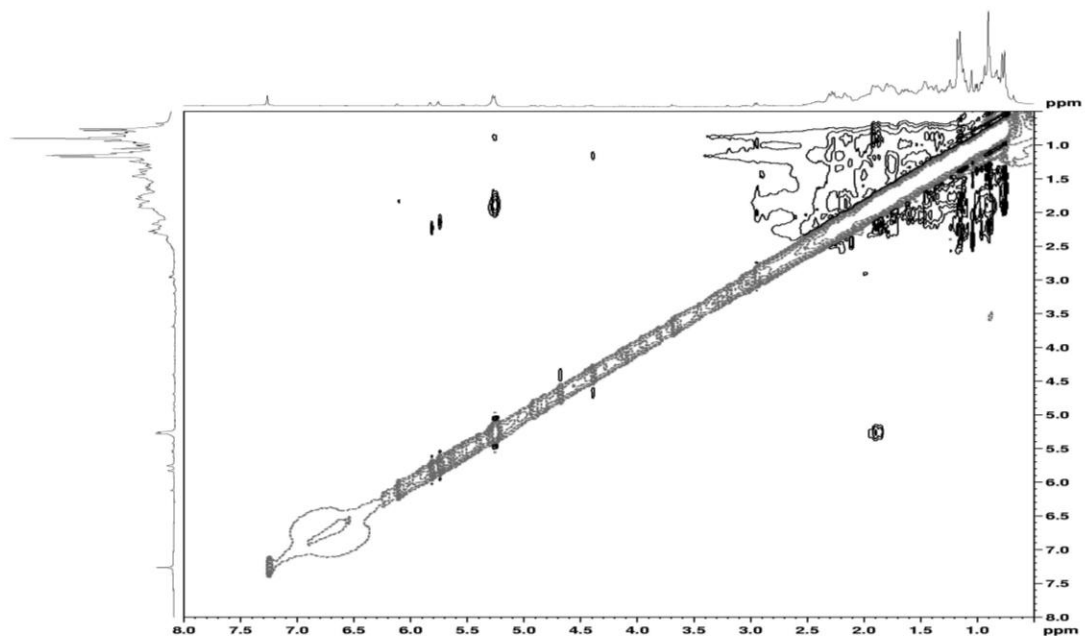
Espectro 29. Expansão do HMBC de OLGH11-4 (Substância 2) (300/75 MHz, CDCl₃)



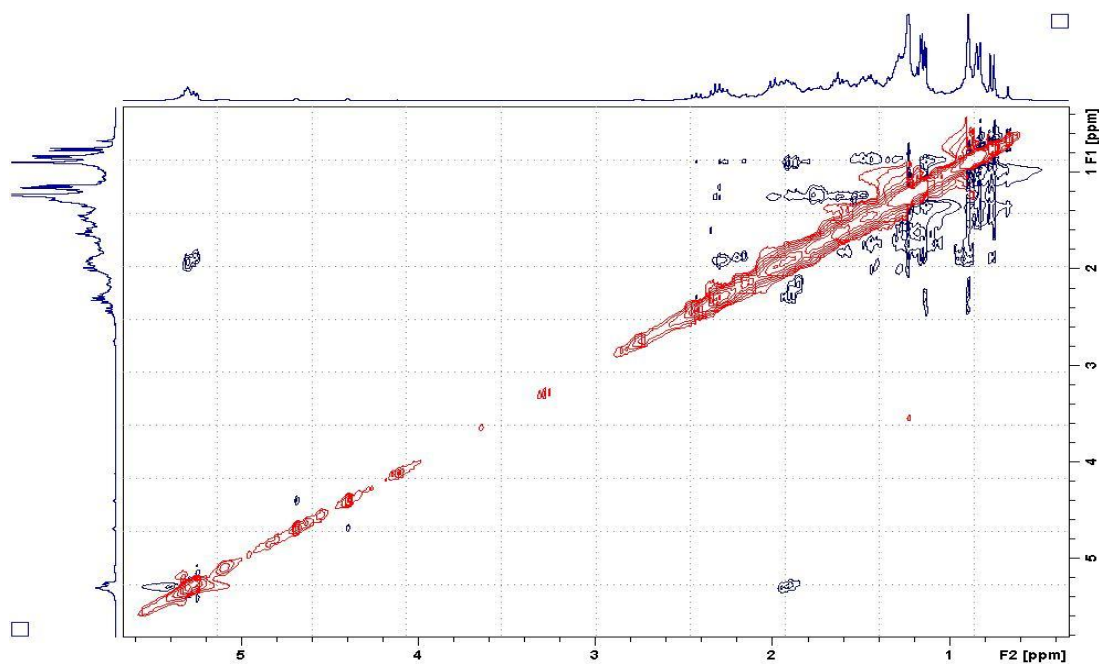
Espectro 30. Experimento COSY ¹H – ¹H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl₃)



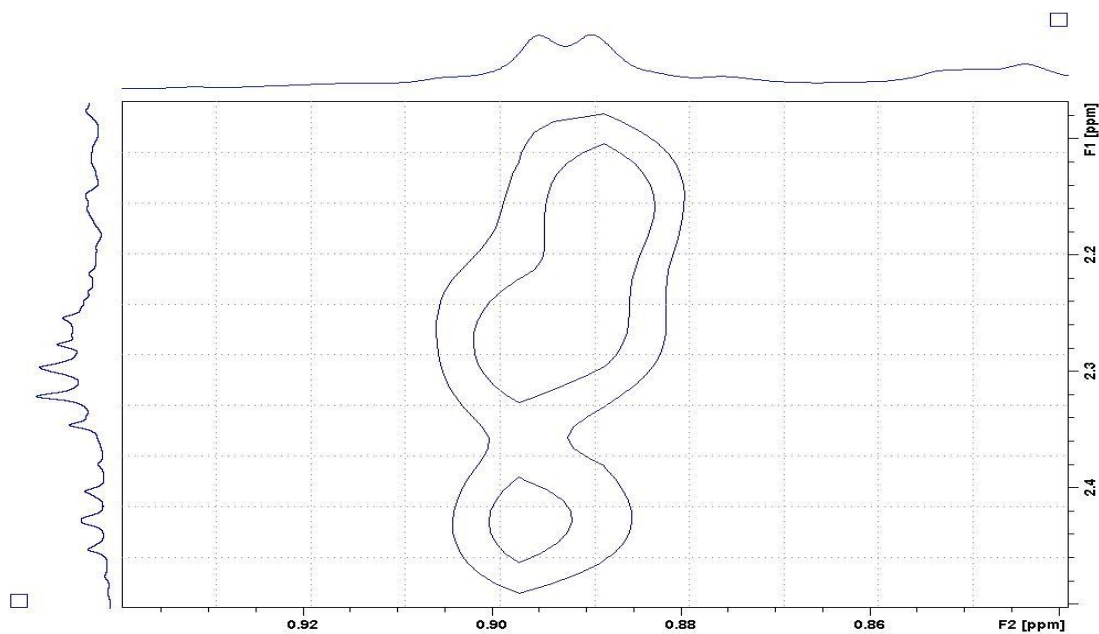
Espectro 31. Expansão do COSY ^1H – ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)



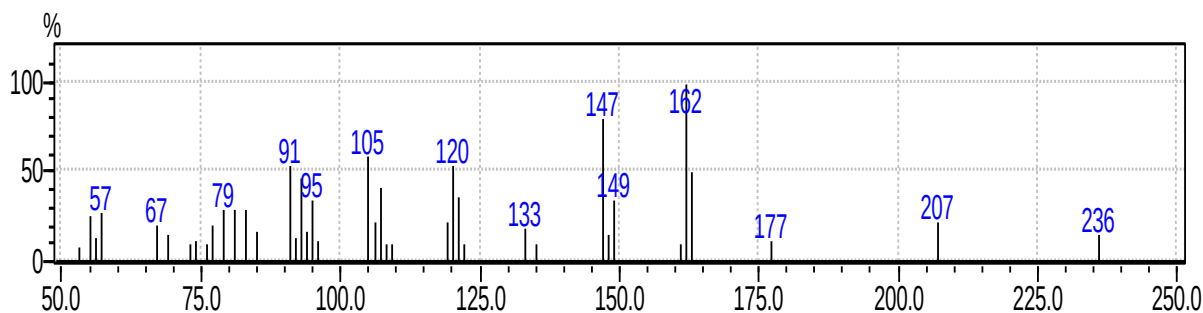
Espectro 32. Expansão do COSY ^1H – ^1H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 33. Expansão do COSY ¹H – ¹H de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl₃)



Espectro 34. Expansão do NOESY de OLGH11-4 (Substância 2) (300 MHz, CDCl₃)



Espectro 35. Espectro EIMS (70 eV) de OLGH11-4 (Substância 2) (CDCl₃)

5.1.3 Substância 3

A substância **3**, de aspecto oleoso e amarelada, foi obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos realizados com a fase hexânica proveniente do extrato etanólico dos galhos, sendo encontrada nas frações OLGH11-3 e OLGH28-6680. A substância **3** foi purificada a partir da fração OLGH11-3, através de CLAE [descrito em Materiais e Métodos 4.7.4, p. 36 e 4.8.5, p. 42].

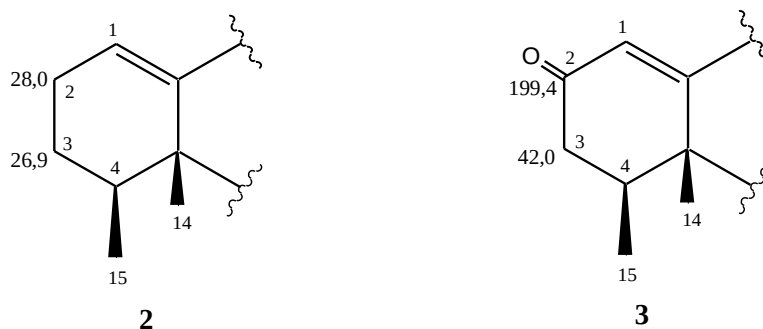
Os espectros de RMN ¹H e ¹³C de **3** [Espectros 36 - 40, Tabela 9, p. 79-81] mostraram características de sesquiterpenos. No espectro de RMN ¹H [Espectros 36 - 37, Tabela 9, p. 77] destacam-se três sinais relativos a metilas (δ 0,94 e δ 1,14 - dubletos e δ 1,04 - singleto), sendo esta última ligada a carbono quaternário, e um sinal em δ 5,80, singleto largo, correspondente a um hidrogênio olefínico.

Os espectros de RMN ¹³C de **3** [Espectros 38 - 40, Tabela 9, p.77] apresentaram um conjunto de 15 sinais, referentes a uma carbonila, uma carboxila, três metilas, quatro carbonos metilênicos, quatro metínicos e dois carbonos não ligados a hidrogênios, sendo um olefínico e um quaternário. Estes dados, aliados ao pico do íon molecular do espectro de massas a *m/z* 250 [Espectro 53, p.87], permitiram propor para esta substância a fórmula molecular C₁₅H₂₂O₃.

Considerando os grupos citados e o IDH igual a 5 resultante da relação carbono/hidrogênio constante nesta fórmula molecular pôde-se admitir como proposta inicial que a substância **3** seja um sesquiterpeno bicíclico. O conjunto de dados de RMN tem grande semelhança como o observado para a substância **2** e a comparação destes dados permitiu avançar na proposta de que a substância **3** possui esqueleto eremofilano, diferenciando-se daquela substância apenas por apresentar uma carbonila adicional.

A análise mais detalhada dos dados de RMN ^{13}C mostrou diferenças significativas entre os valores dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos do anel A, indicando que a carbonila em **3** se encontra neste anel. Preliminarmente, as possibilidades para a localização deste grupo funcional seriam C-2 e C-3. O valor de deslocamento químico do carbono cetônico (δ 199,4) indicou que esta carbonila está conjugada e, portanto, deve se localizar em C-2, o que foi confirmado pelo $\lambda_{\text{máx}}$ em 255 nm no espectro UV/Visível de **3**, característico de uma cetona α,β -insaturada [Espectro 54, p.88] .

Os deslocamentos químicos dos carbonos do anel A, particularmente as desproteções significativas em C-1, C-2, C-3 e C-10 quando comparados com os de **2**, mostraram-se compatíveis com a presença do carbono carbonílico no C-2. Da mesma forma, a multiplicidade do sinal do H-1 passou de multipletto em **2** para singlete em **3**.



O experimento HSQC [Espectro 43-44, p.82-83] com o composto **3** permitiu listar as atribuições mostradas na Tabela 10, enquanto o experimento HMBC [Espectros 45 - 47; Tabela 10, p.78] evidenciou as correlações constantes na Tabela 10, destacando-se que os hidrogênios da metila a δ 1,14 (H-13) acoplam com a carboxila a δ 181,25 (C-12) e com os carbonos metínicos a δ 33,84 (C-7) e δ 43,25 (C-11). Da mesma maneira que para os compostos **1** e **2**, estas correlações indicam a existência em **3** de um grupo “isopropílico” contendo uma carboxila e uma metila. Observou-se, através do experimento HMBC também, que hidrogênio a δ 5,82 (H-1) acopla com os carbonos a δ 39,94 (C-5) e δ 42,07 (C-3).

No experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ [Espectros 48 - 49, p. 85] foi possível confirmar o acoplamento vicinal entre os hidrogênios em δ 2,39 e δ 1,72 atribuídos a H-11 e H-7, respectivamente, assim como dos hidrogênios a δ 1,14 e δ 2,39 atribuídos a H - 13 e H-11, respectivamente, compatível com a localização do grupo isopropila em C-7.

No espectro de infravermelho de **3** [Espectro 52, p. 87] foi observada uma banda larga em $3448,4\text{ cm}^{-1}$ relativa ao estiramento O-H de ácido, banda intensa em $2958,5\text{ cm}^{-1}$, relativa a estiramento C – H, além de uma banda em 1704 cm^{-1} relativa às carbonilas do ácido e da cetona conjugada, consideravelmente mais intensa que a banda em $1654,8\text{ cm}^{-1}$, relativa à ligação dupla carbono-carbono. A estereoquímica de **3** segue conforme a apresentada para o composto **1**, onde o espectro resultante do experimento NOESY [Espectro 50 – 51, p.86] mostrou a correlação dos hidrogênios da metila 14 com o hidrogênio H-11, permitindo assim definir a relação *cis* entre os mesmos.

O sesquiterpeno **3**, caracterizado como sendo ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-1(10)-en-2-oxo-12-oico, está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

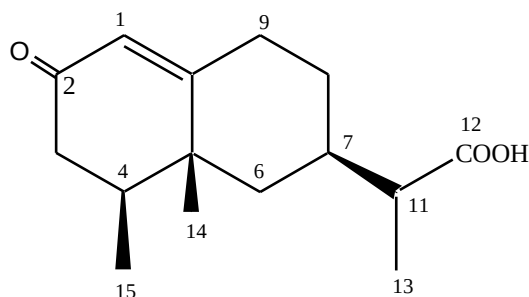


Figura 11. Estrutura da substância **3**.

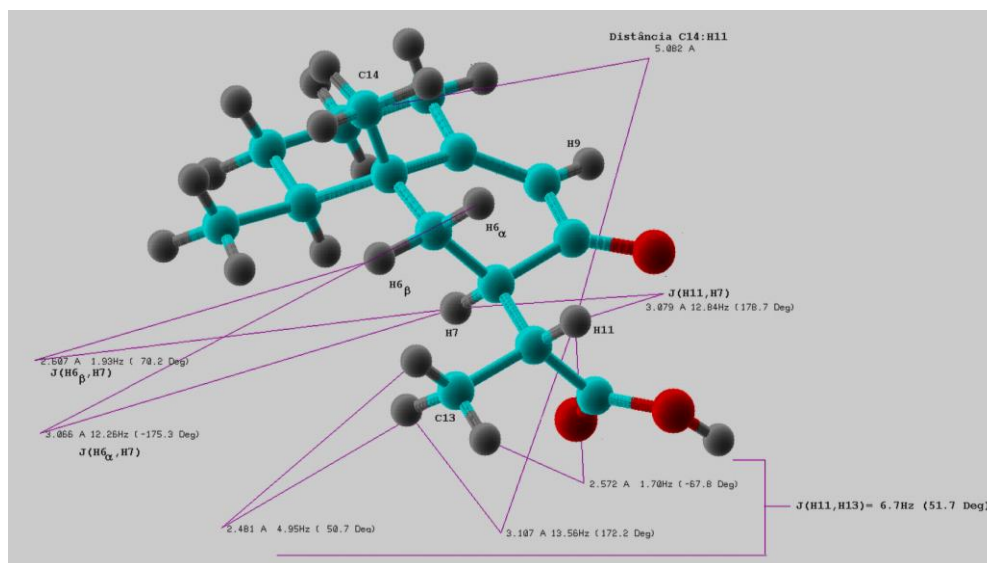


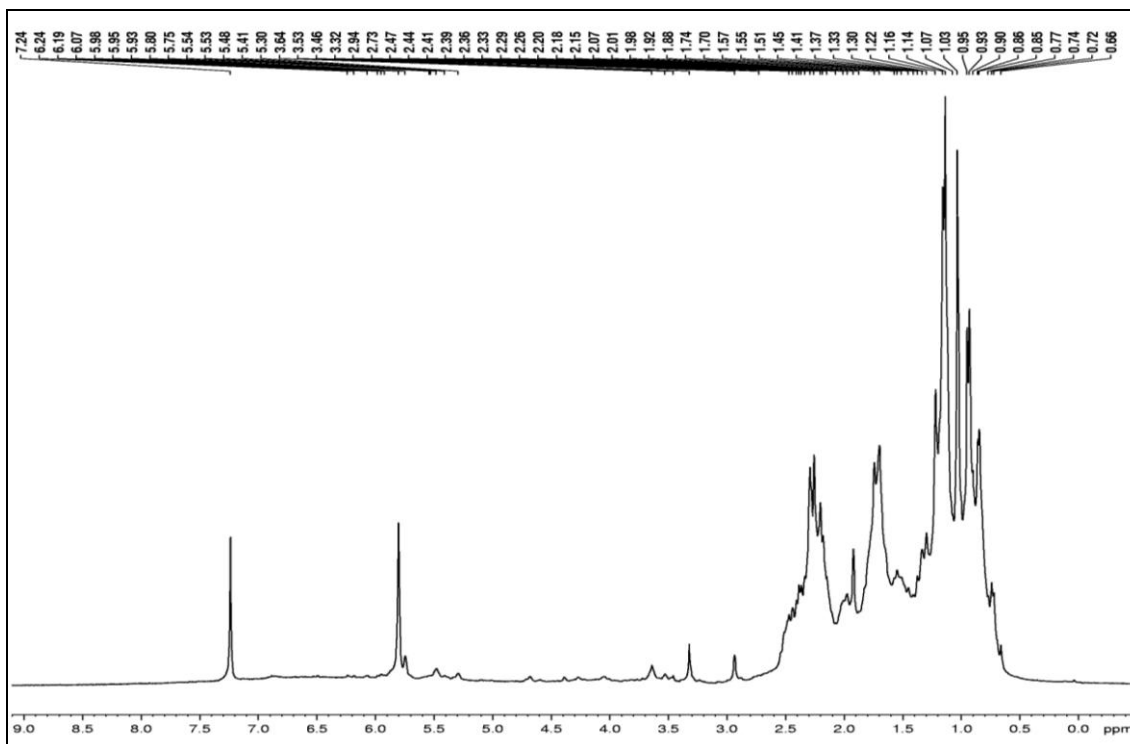
Figura 12: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **3**.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H e ^{13}C **3** (300/75 MHz, CDCl_3) e dados de RMN ^{13}C de **2** (75 MHz, CDCl_3)

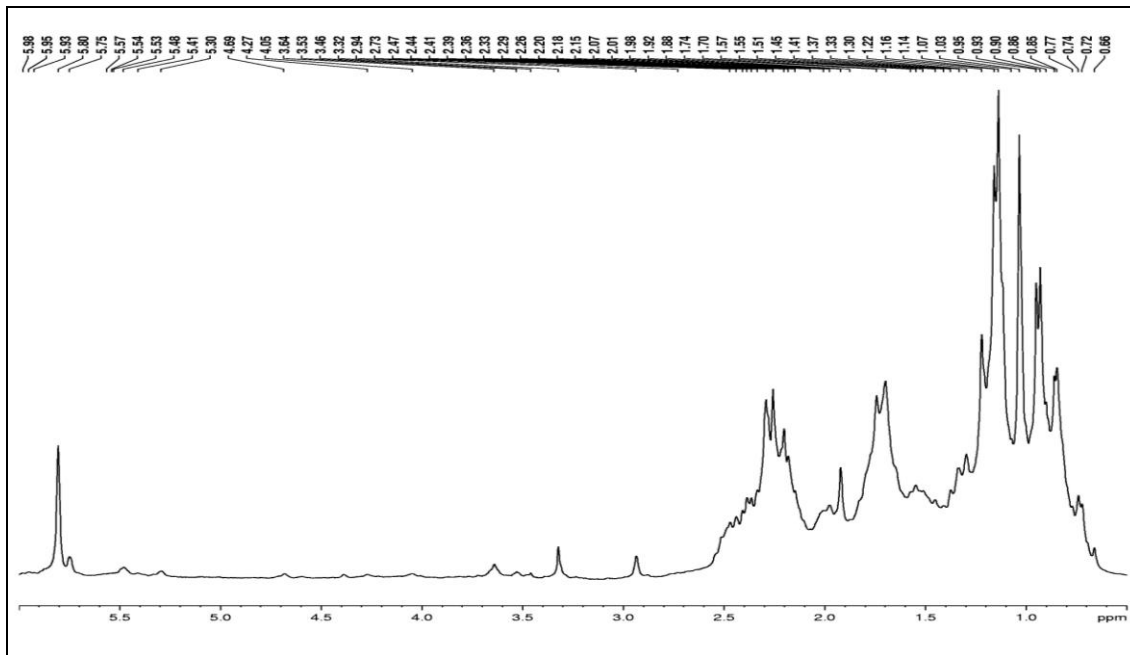
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(3)	(2)
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	125,4	5,80 s	120,8
2	199,4	-	28,0
3	42,0	2,1 – 2,3 m	26,9
4	35,9	2,17 m	36,7
5	39,9	-	37,6
6	36,6	2,20 m; 2,48 m	37,8
7	33,8	1,72 m	34,8
8	27,9	1,6 – 1,8 m	29,5
9	28,8	1,73 m; 1,33 m	25,2
10	173,9	-	143,2
11	43,2	2,39 m	43,3
12	181,2	-	182,8
13	14,0	1,14 d (6,6)	15,8
14	19,1	1,04 s	15,9
15	15,2	0,94 d (6,6)	14,1

Tabela 10 - Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de **(3)** (300/75 MHz, CDCl₃)

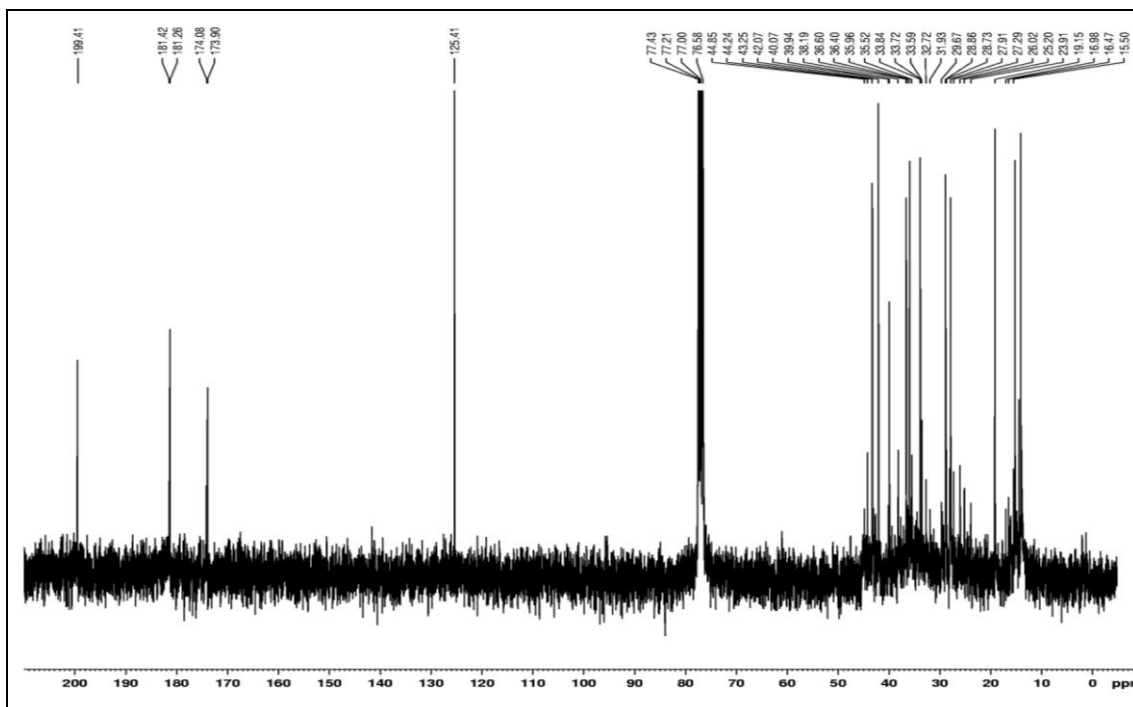
C/H	HSQC (3)		HMBC (3)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , <i>J</i> (Hz)]	H→C
1	125,4	5,80 <i>s</i>	C-3; C-5
2	199,4	-	
3	42,0	2,1 – 2,3 <i>m</i>	C-4; C-5; C-2
4	35,9	2,17 <i>m</i>	
5	39,9	-	
6	36,6	2,20 <i>m</i> ; 2,48 <i>m</i>	
7	33,8	1,72 <i>m</i>	
8	27,9	1,6 – 1,8 <i>m</i>	
9	28,8	1,73 <i>m</i> ; 1,33 <i>m</i>	
10	173,9	-	
11	43,2	2,39 <i>m</i>	C-7; C-12
12	181,2	-	
13	14,0	1,14 <i>d</i> (6,6)	C-7; C-11; C-12
14	19,1	1,04 <i>s</i>	C-4; C-5; C-10
15	15,2	0,94 <i>d</i> (6,6)	C-4; C-5; C-6



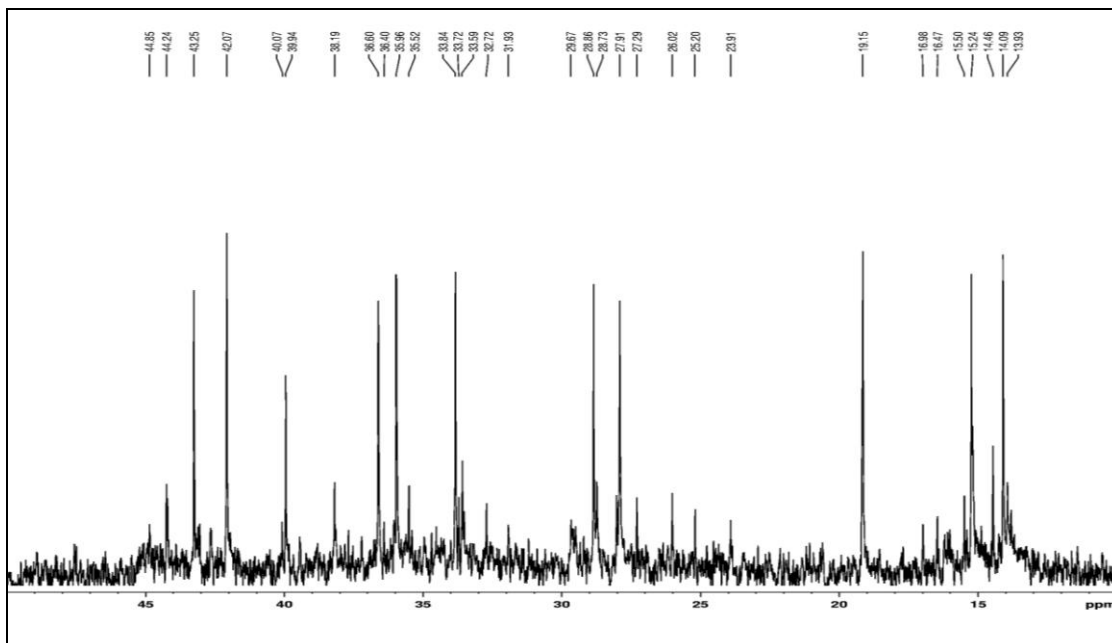
Espectro 36. Espectro de RMN ^1H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



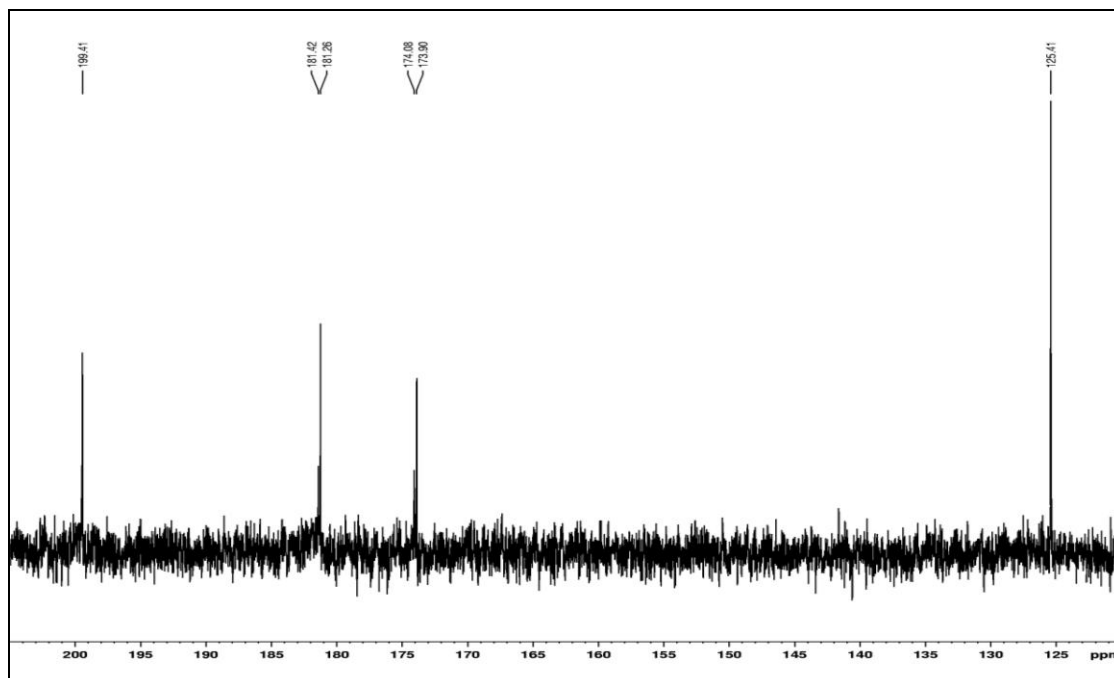
Espectro 37. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



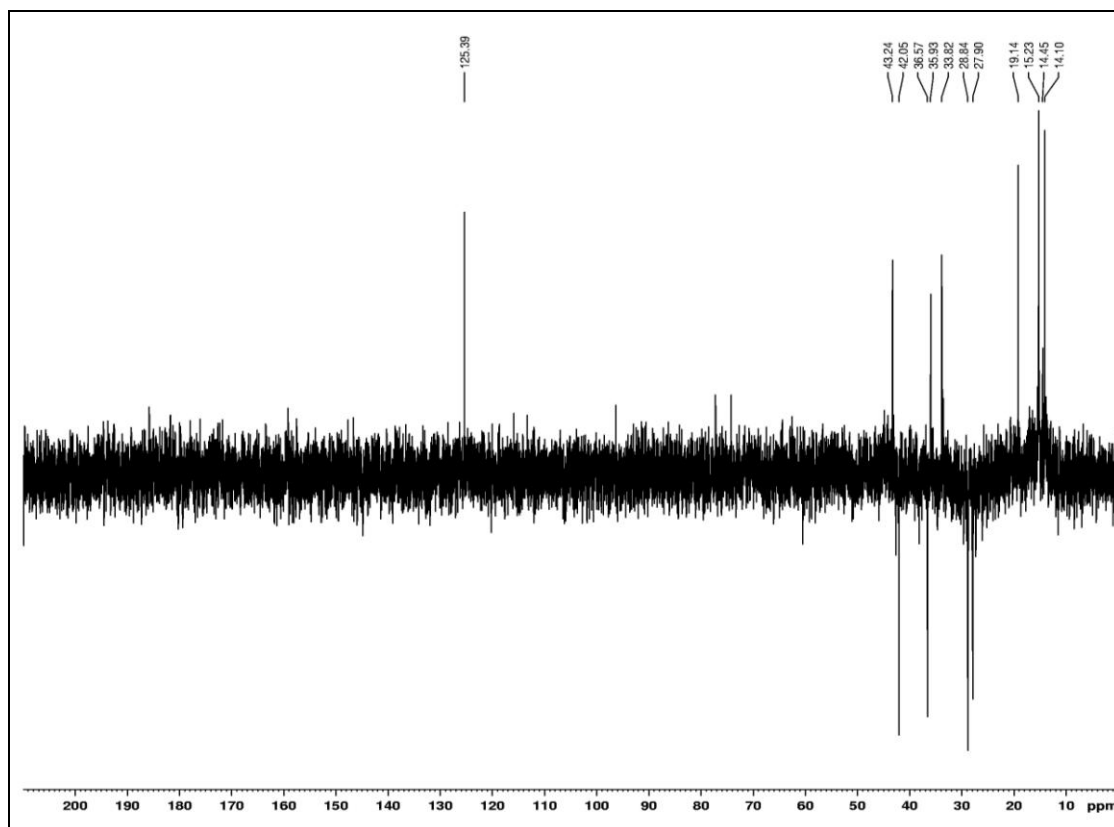
Espectro 38. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl_3)



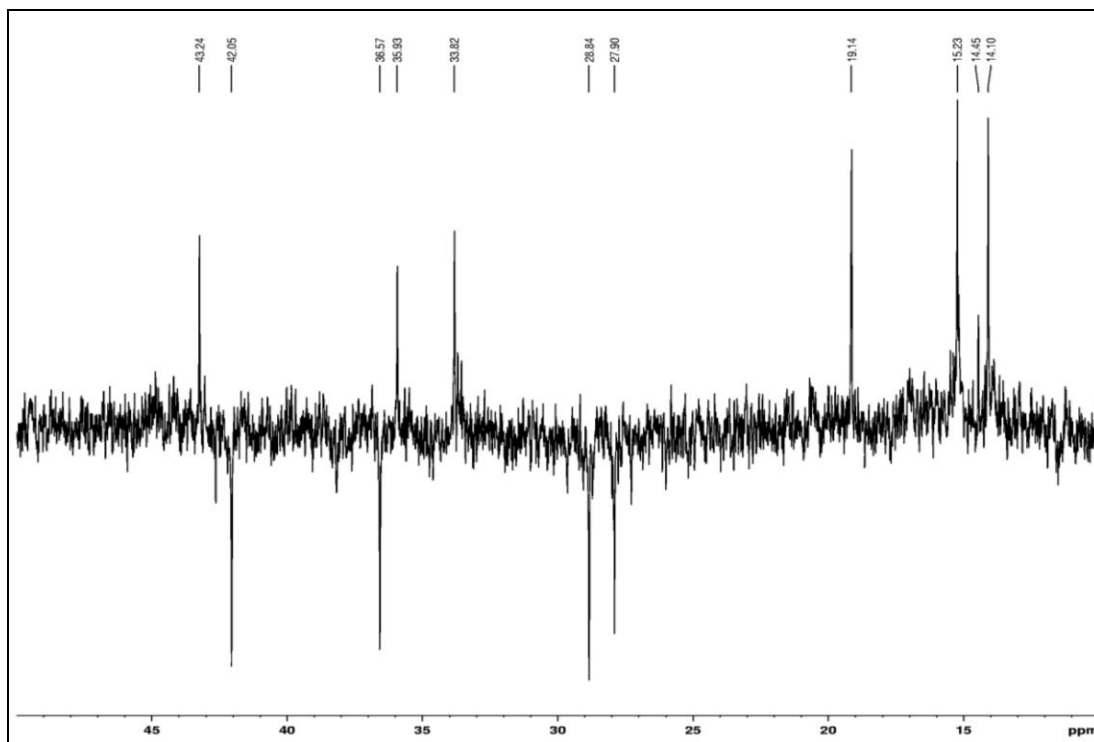
Espectro 39. Expansão espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl_3)



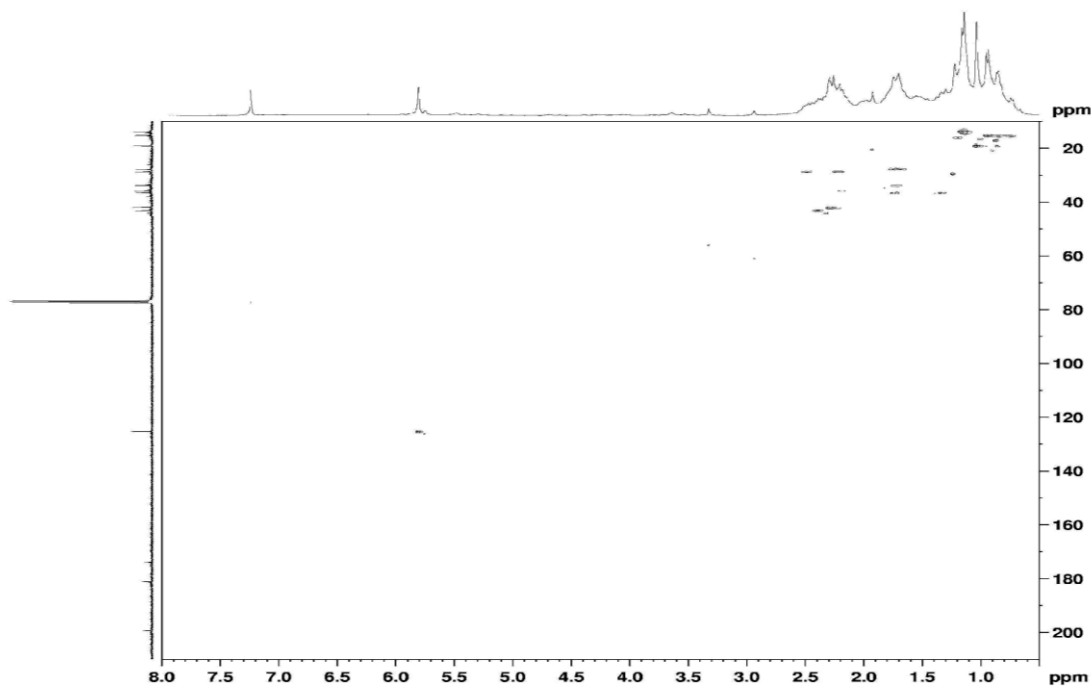
Espectro 40. Expansão espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl_3)



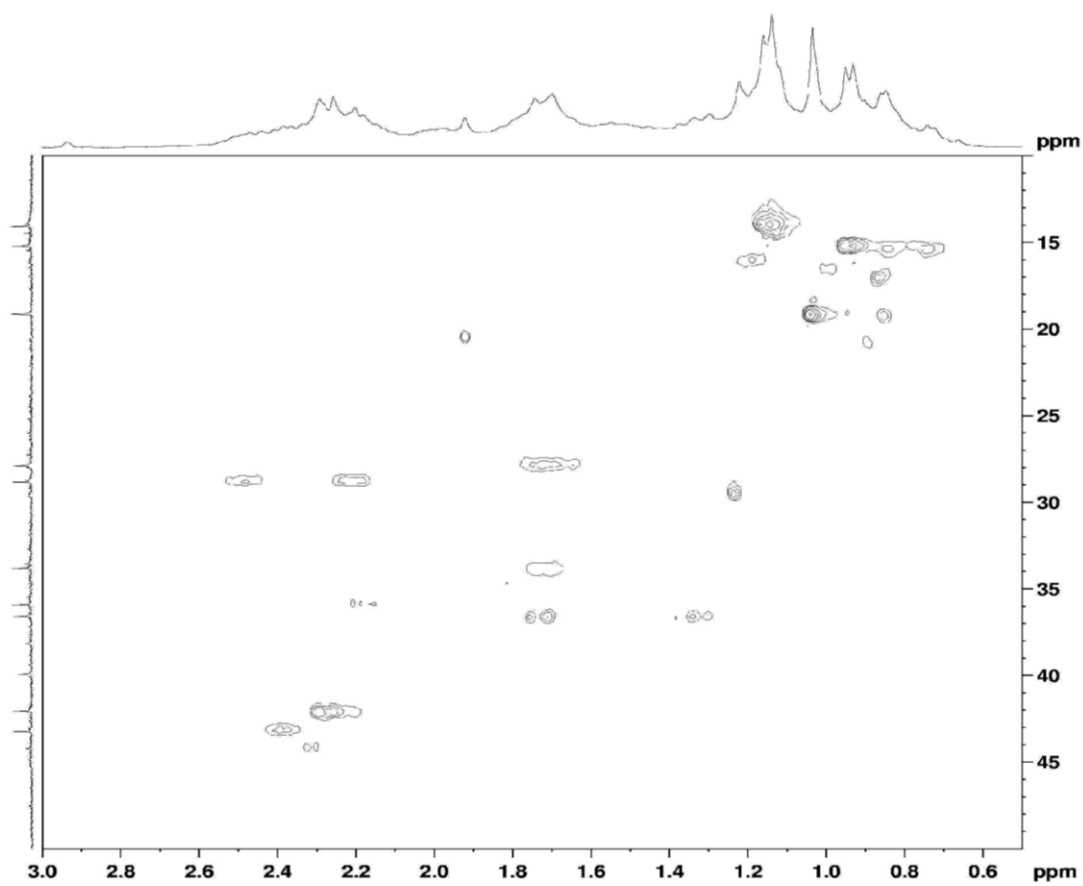
Espectro 41. Espectro DEPT 135° de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl_3)



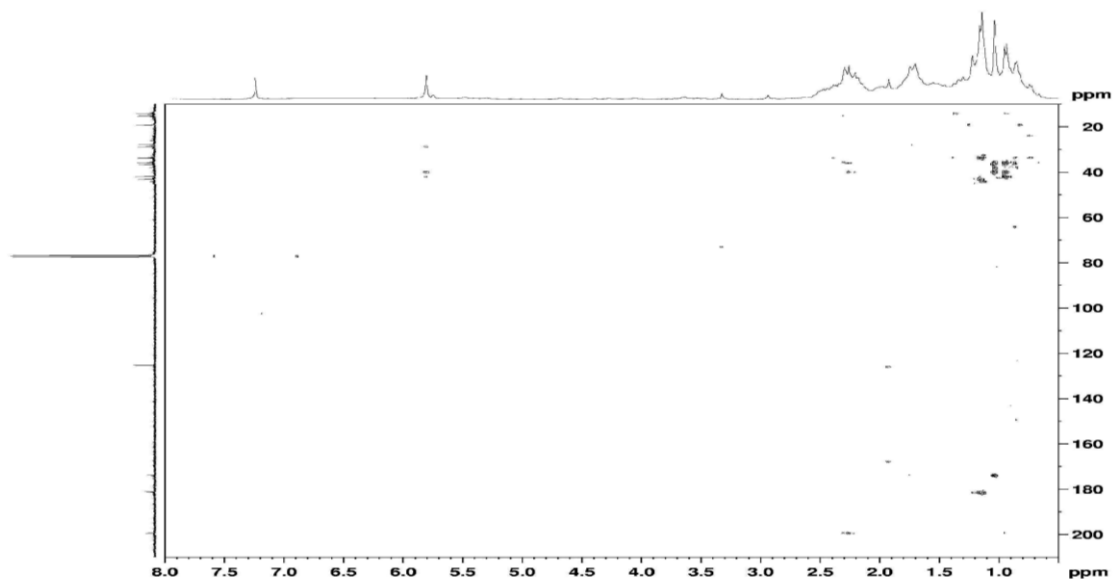
Espectro 42. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH11-3 (Substância 3) (75 MHz, CDCl₃)



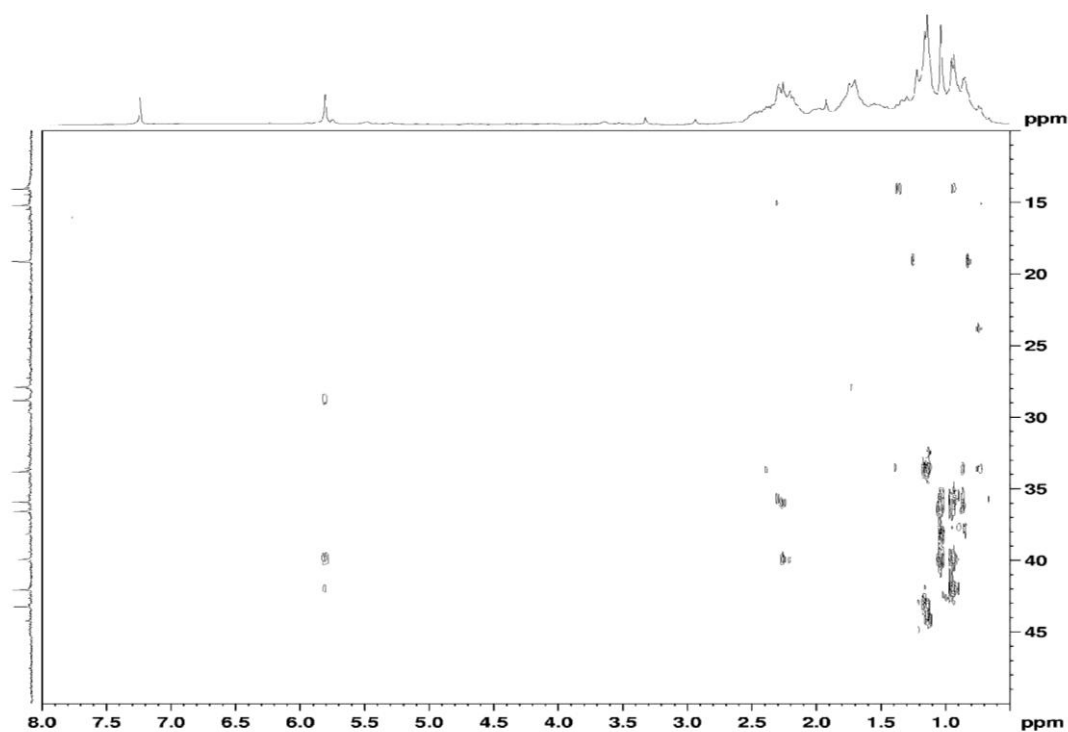
Espectro 43. Experimento HSQC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl₃)



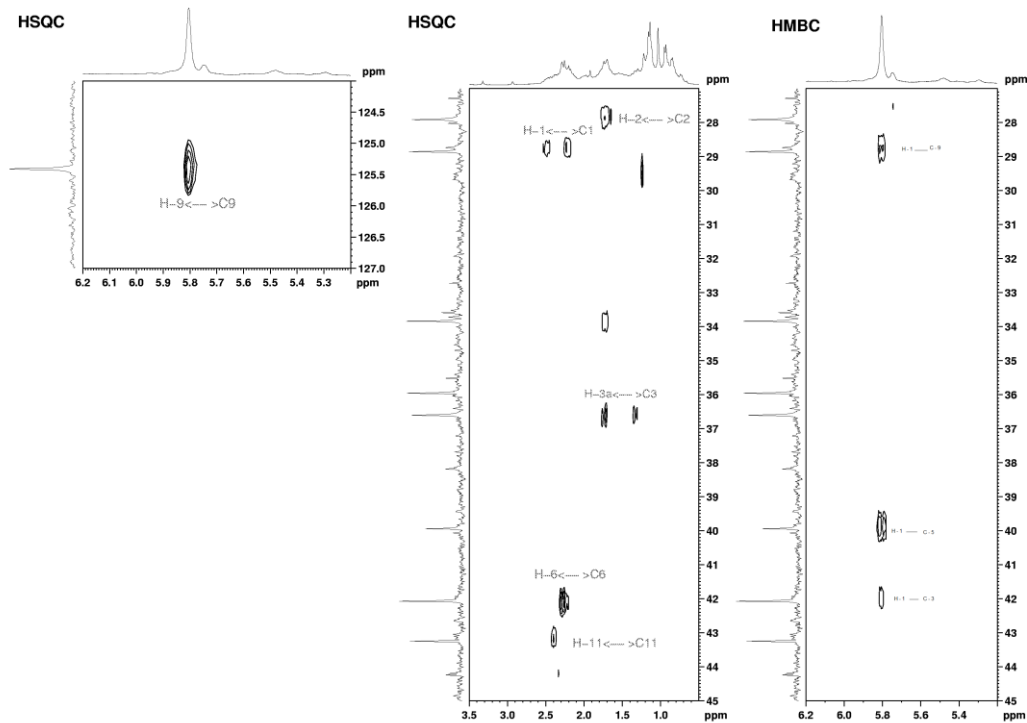
Espectro 44. Expansão do HSQC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl₃)



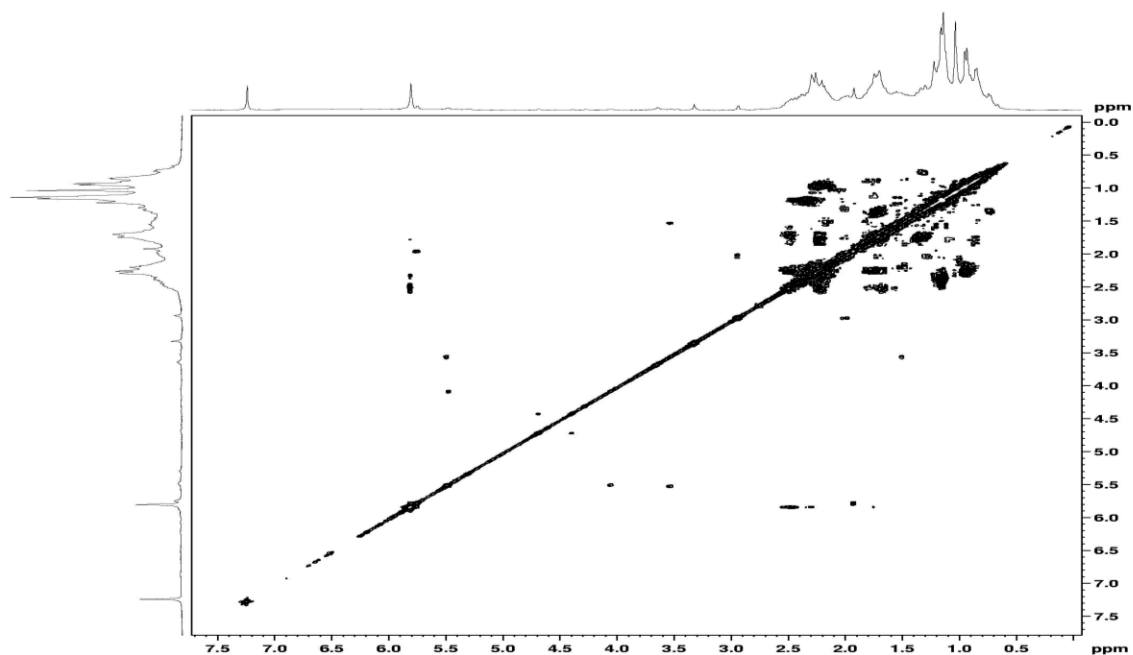
Espectro 45. Experimento HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl₃)



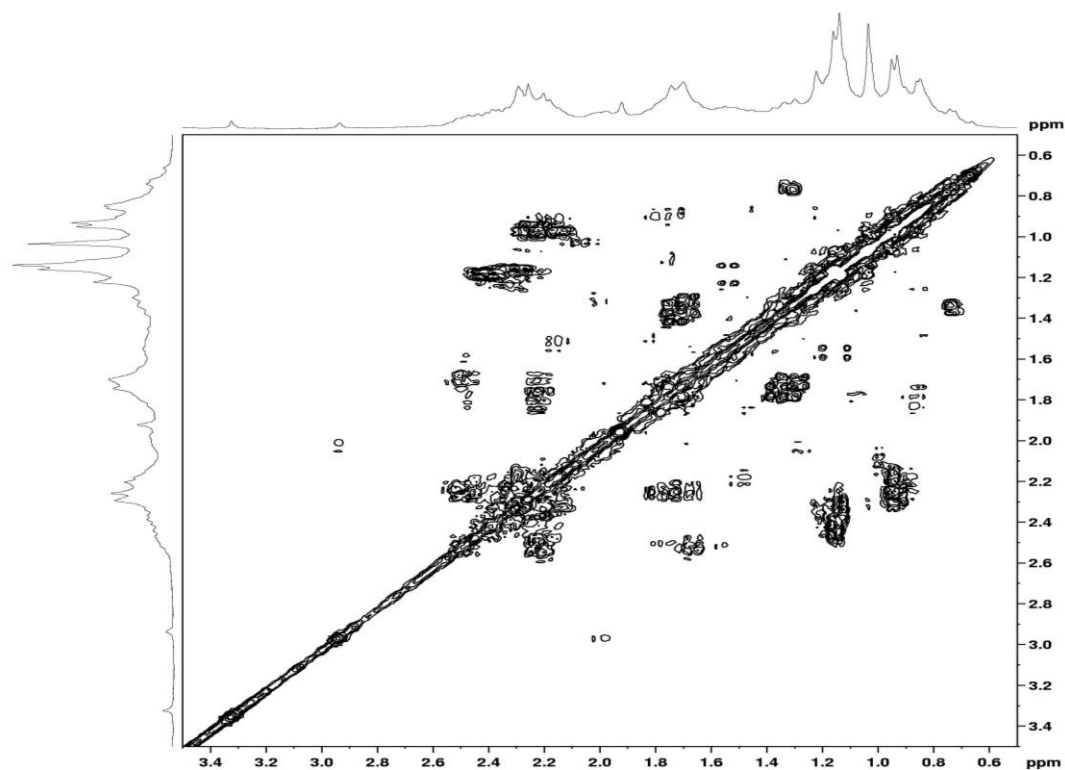
Espectro 46. Expansão do HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75 MHz, CDCl_3)



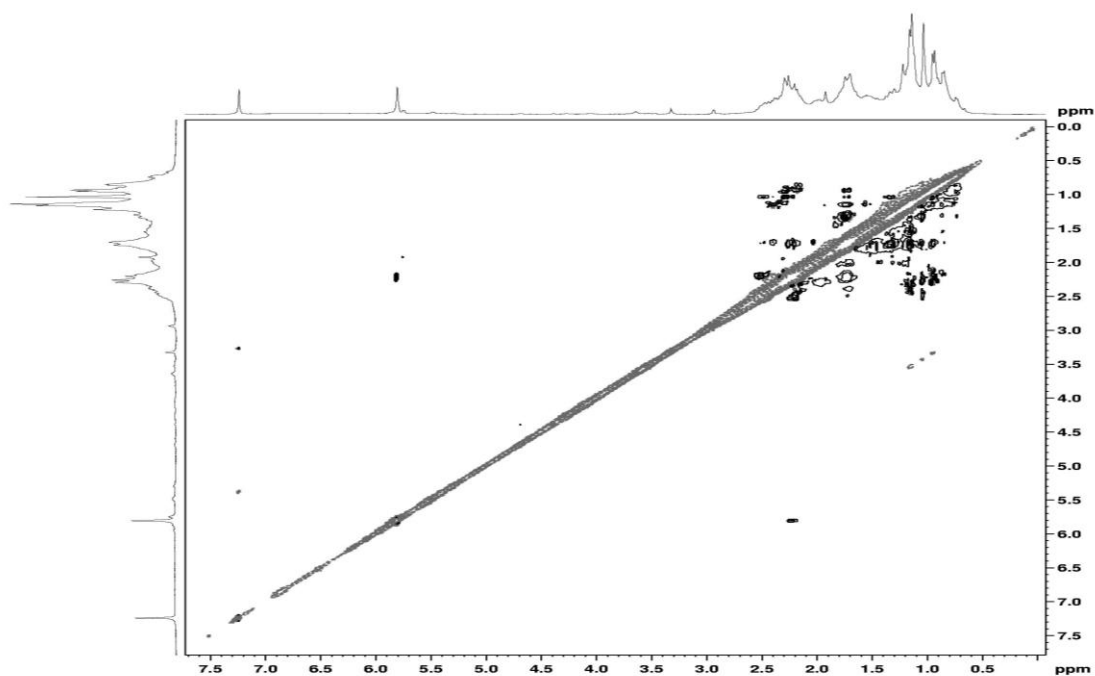
Espectro 47. Expansões do experimento HMBC de OLGH11-3 (Substância 3) (300/75MHz, CDCl_3)



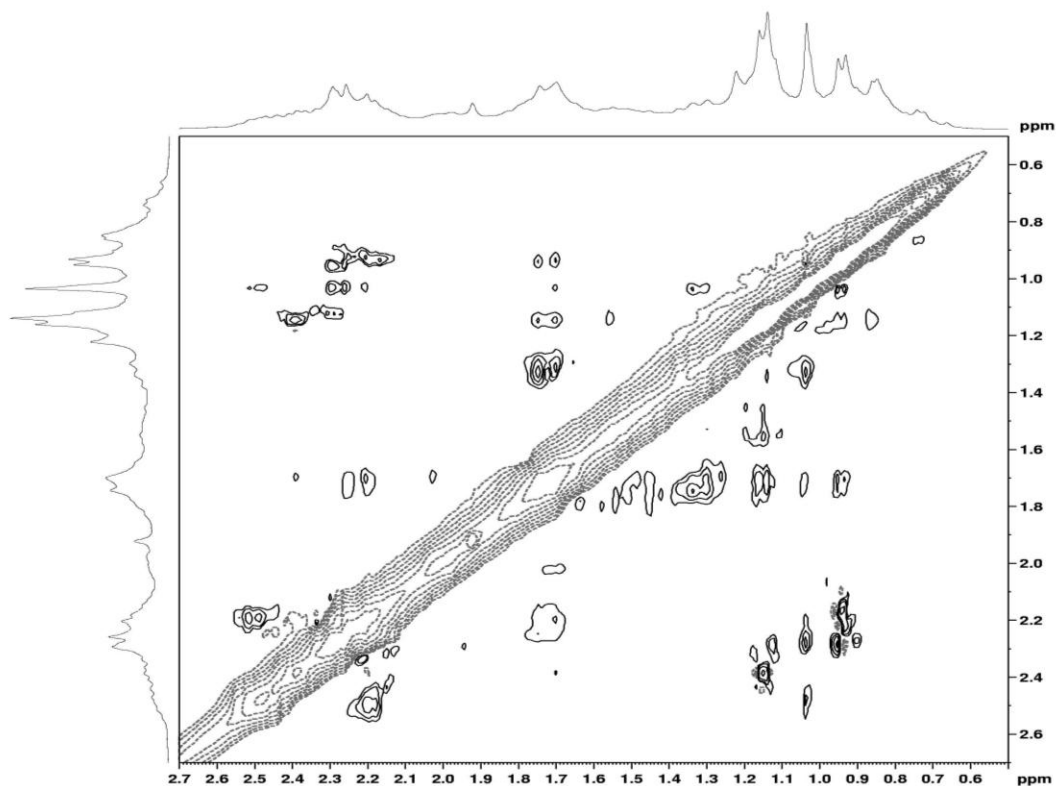
Espectro 48. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



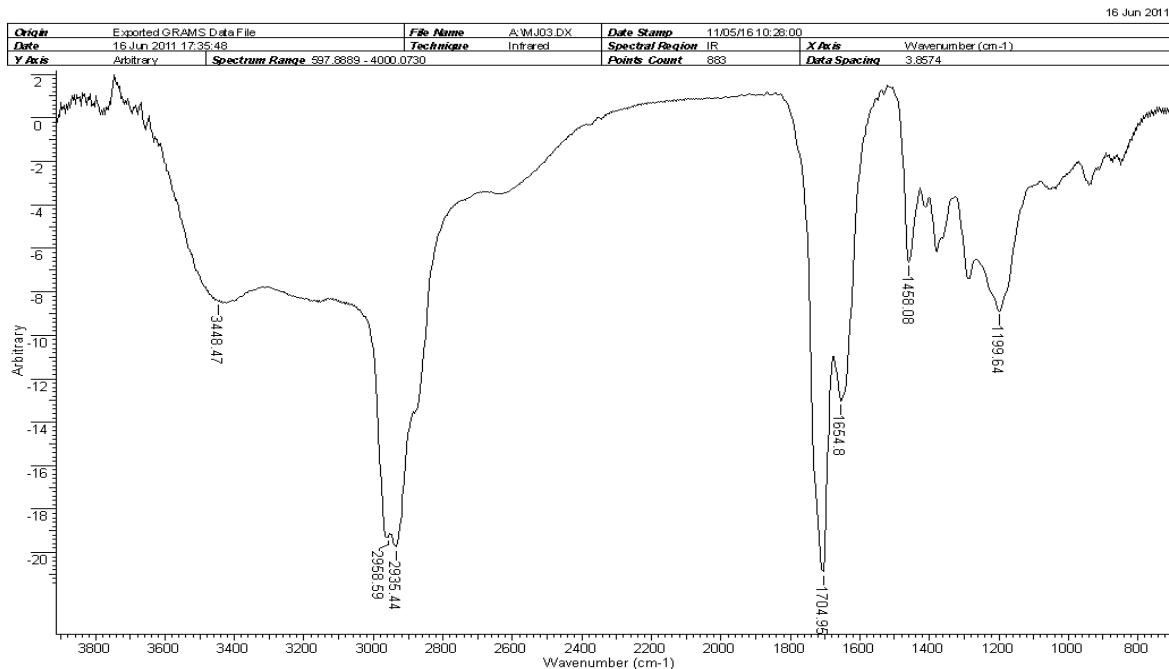
Espectro 49. Expansão do COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



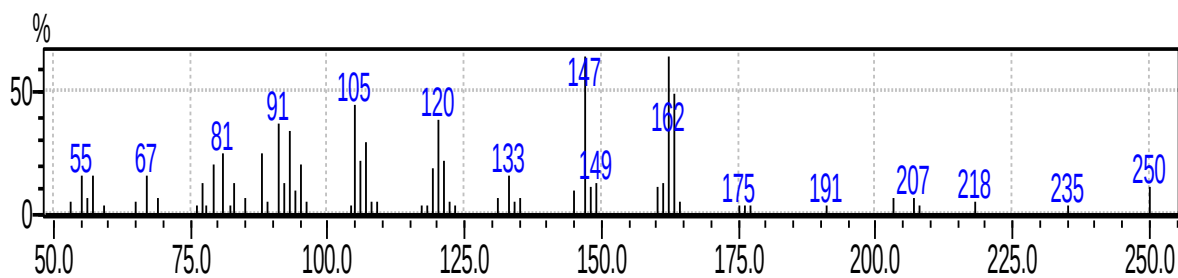
Espectro 50. Experimento NOESY de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



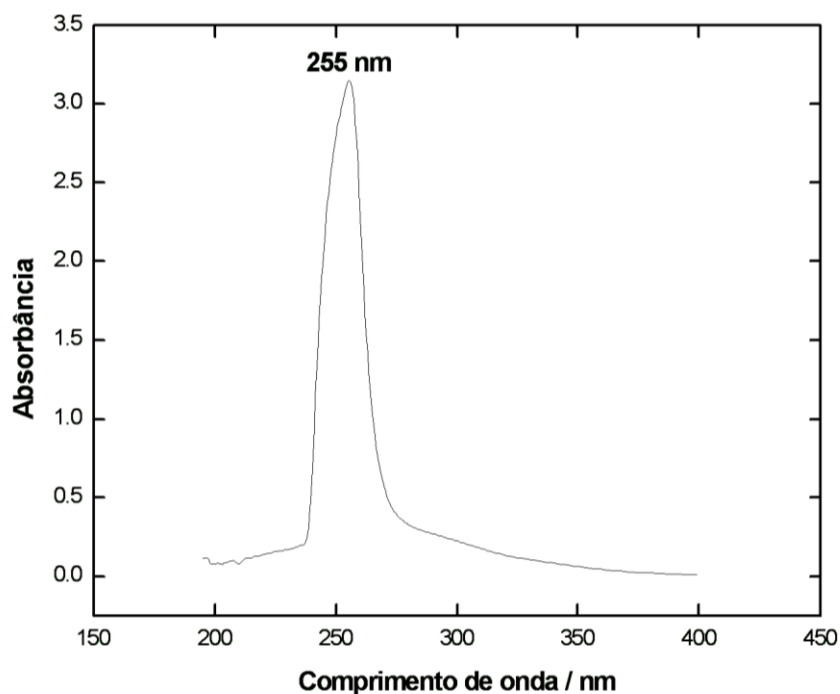
Espectro 51. Expansão do NOESY de OLGH11-3 (Substância 3) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 52. Espectro de Infravermelho de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl₃)



Espectro 53. Espectro EIMS (70 eV) de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl₃)



Espectro 54. Espectro UV/Visível de OLGH11-3 (Substância 3) (CDCl₃)

5.1.4 Substância 4

Processos cromatográficos realizados com a fase hexânica das folhas levaram à obtenção da fração OLH3 – 3749 – 14, na qual foi caracterizada a substância **4**, em mistura com outros componentes minoritários [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.3.1, p. 30].

O espectro de RMN ¹H de **4** [Espectros 55 – 56; Tabela 11, p. 91] apresentou três sinais relativos a metilas, sendo dois dubletos (δ 0,82 6,6 Hz e δ 1,25 7,4 Hz) referentes aos hidrogênios de duas metilas ligadas a carbonos metínicos, e um singlete (δ 0,99), atribuído aos hidrogênios de uma metila ligada a carbono quaternário. Mostrou também um dubleto a δ 5,41, relativo a hidrogênio ligado a carbono olefínico, e um duplo dubleto em δ 4,82.

Os espectros de RMN ¹³C e DEPT 135° de **4** [Espectros 57 – 60; Tabela 11, p. 91] apresentaram um conjunto de 15 sinais, correspondentes a uma carboxila, três metilas, quatro carbonos metilênicos, cinco metínicos e dois carbonos não ligados a hidrogênios, sendo um olefínico e um carbono quaternário. Entre os sinais de carbonos metínicos foi observado um em δ_C 75,0, indicando que o sinal no espectro de RMN ¹H a δ 4,82 corresponde a um hidrogênio carbinólico.

No espectro infravermelho [Espectros 69, p. 99] de **4** foram observadas duas bandas em 2920 e 2850 cm^{-1} , relativas ao estiramento C-H, e banda em 1770 cm^{-1} , compatível com estiramento C = O de um grupo γ -lactona.

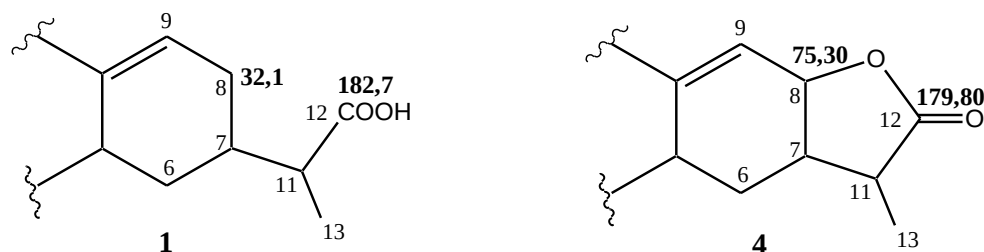
A relação carbono/hidrogênio, que leva a um IDH igual a 5, a multiplicidade e deslocamentos químicos dos carbonos, aliados ao pico do íon molecular do espectro de massas [Espectros 70, p. 100] a m/z 234, nos permitem propor para esta substância a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$.

A reunião destes dados com a definição da presença de uma ligação dupla carbono-carbono e uma carboxila, indica que **4** se trata de um sesquiterpeno com esqueleto carbônico bicíclico, possuindo um anel lactônico, possivelmente de esqueleto eremofilano. Admitindo-se esta possibilidade, o composto **4** difere dos compostos **1-2** pela presença de um oxigênio ligado a carbono metínico sp^3 . O deslocamento químico do hidrogênio ligado ao referido carbono (δ 4,82) indica uma desproteção compatível com uma localização alílica e com a participação num sistema lactônico.

O experimento HMBC [Espectros 63 - 64; Tabela 12, p. 92] com o composto **4** mostrou que os hidrogênios da metila a δ 1,25, atribuídos a H-13, acoplam com o carbono metínico a δ 43,0 (C-7) e com o carbono da carboxila a δ 179,80 (C-12), evidenciando o grupo “isopropílico” idêntico aos observados nos compostos **1-3**. No experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ [Espectros 65 - 66, p. 97] foi possível observar o acoplamento entre os hidrogênios referentes aos sinais em δ 5,41 e δ 4,82, indicando a localização vicinal destes hidrogênios.

Estes dados, aliados às considerações sobre os compostos **1-3**, e o fato de que o deslocamento químico do carbono carboxílico de **4** é menor (carbono mais protegido) em relação ao observado naqueles compostos, leva à proposição de que **4** se trata de um sesquiterpeno com esqueleto eremofilano com uma ligação dupla C9-C10 e uma γ -lactona entre C-12 e C-8.

O hidrogênio referente ao sinal a δ 4,82, atribuído a H-8, apresentou correlação com o carbono metilênico a δ_{C} 35,56 (C-6), da mesma forma que o hidrogênio a δ_{H} 5,4, atribuído a H-9, se correlaciona com o carbono em δ 43,0 (C-7).



A atribuição inequívoca dos valores de deslocamento químico para os carbonos de **4**, principalmente os valores relativos aos sinais do anel B e carbono carbinólico, foi realizada com o auxílio das informações fornecidas pelos espectros HSQC e/ou HMBC [Tabela 12, p.92].

A definição da estereoquímica da junção do anel γ -lactona pôde ser definida pelas constantes de acoplamento dos hidrogênios envolvidos: o duplo dubleto em δ 4,82 (7,35 e 3,6 Hz), atribuído a H-8, o dubleto em δ 5,41 (3,5 Hz), atribuído a H-9. Estes dados informam que o valor da constante de acoplamento de H-8/H-7 é 7,5 Hz, o qual é compatível com uma relação *trans*-pseudo diaxial. Admitindo-se que o composto **4** tem a mesma configuração no C-7 que os compostos precedentes (**1-3**), pode-se definir, então, a estereoquímica da referida junção como sendo *trans*, conforme mostrado na **Figura 13**, confirmada pela configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **4**.

O sesquiterpeno **4** caracterizado como ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12,8 α -olido está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

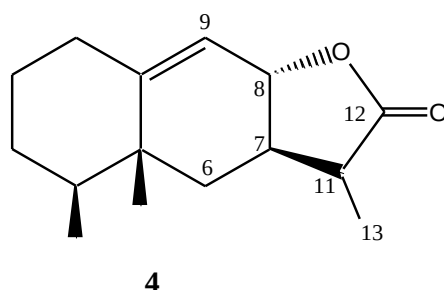


Figura 13. Estrutura da substância **4**.

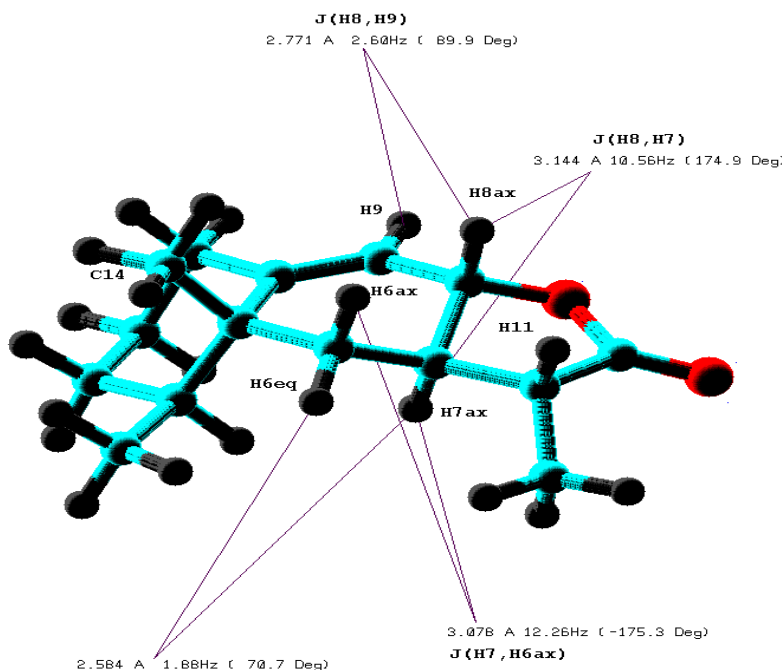


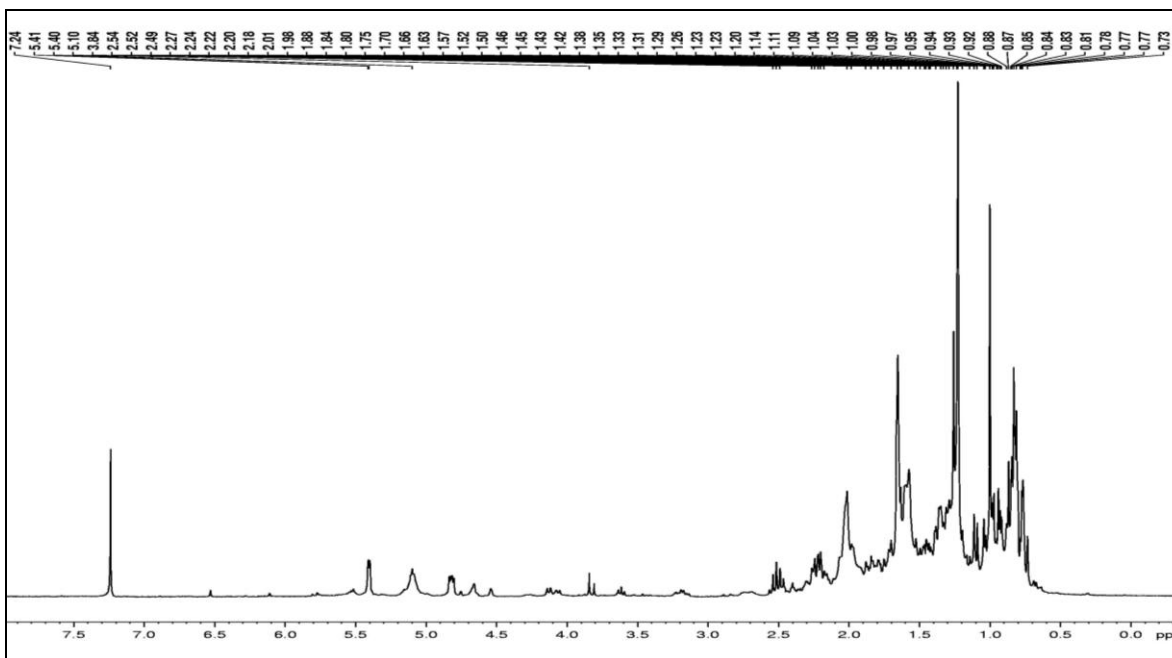
Figura 14: Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **4**.

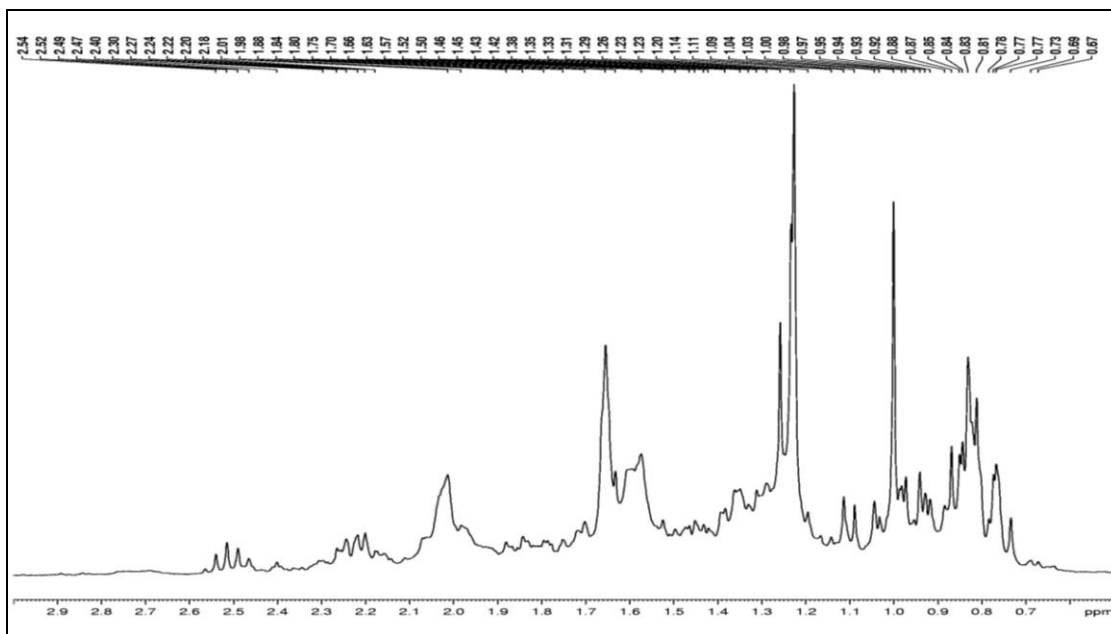
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **(4)** e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **(1)**

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(4)	(1)
		$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	30,5	2,0 m; 1,90 m	30,5
2	28,3	1,79 m; 1,22 m	29,2
3	32,5	1,35 m; 1,45 m	31,2
4	39,5	2,22 m	38,7
5	37,2	-	39,2
6	35,5	1,64 m	37,4
7	43,0	2,50 q (7,4)	33,5
8	75,3	4,82 dd (7,3; 3,5)	32,1
9	115,0	5,41 d (3,5)	117,2
10	152,4	-	146,6
11	39,8	1,37 m	44,3
12	179,8	-	182,7
13	13,5	1,25 d (7,4)	13,9
14	19,8	0,99 s	20,7
15	15,2	0,82 d (6,6)	15,5

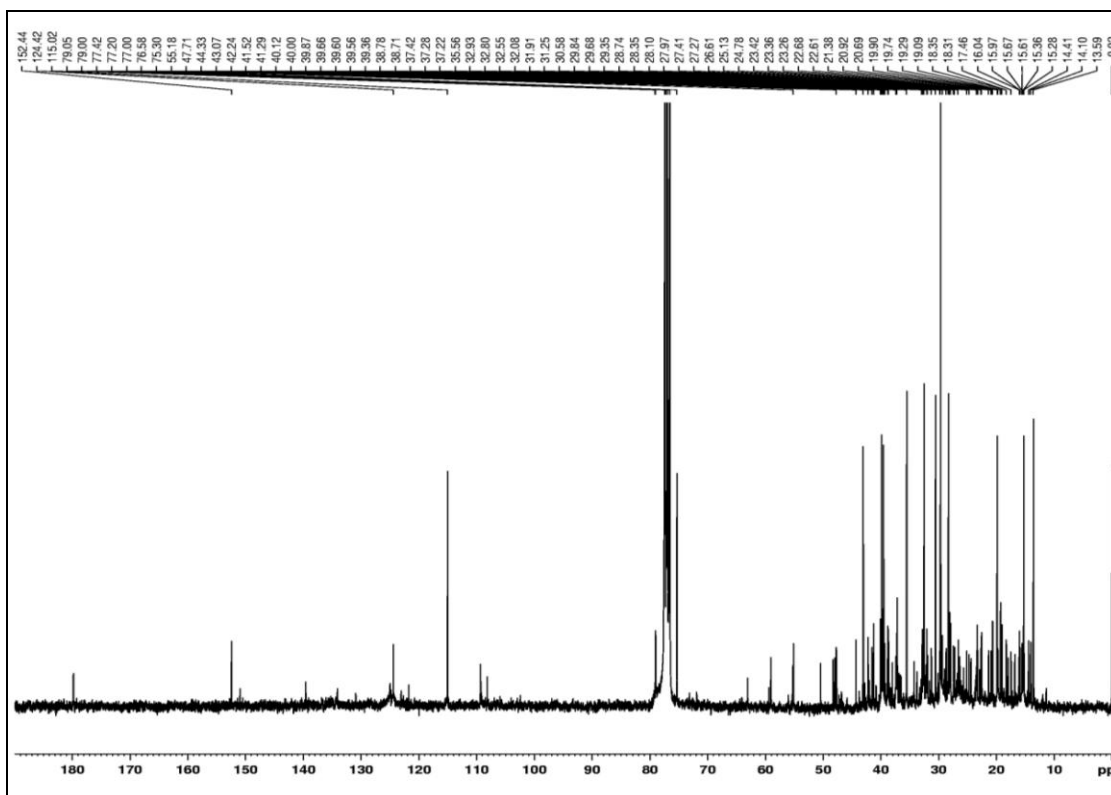
Tabela 12. Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de **(4)** (300/75 MHz, CDCl₃)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (4)	HMBC (4)
		$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	(H→C)
1	30,5	2,0 m; 1,90 m	C-2
2	28,3	1,79 m; 1,22 m	
3	32,5	1,35 m; 1,45 m	
4	39,5	2,22 m	
5	37,2	-	
6	35,5	1,64 m	C-4; C-5; C-7; C-10; C-11; C-14
7	43,0	2,50 q (7,4)	C-12; C-13
8	75,3	4,82 dd (7,3; 3,6)	C-6
9	115,0	5,41 d (3,5)	C-5; C-7
10	152,4	-	
11	39,8	1,37 m	
12	179,8	-	
13	13,5	1,25 d (7,4)	C-7; C-12
14	19,8	0,99 s	C-5; C-6; C-10
15	15,2	0,82 d (6,6)	C-4; C-5

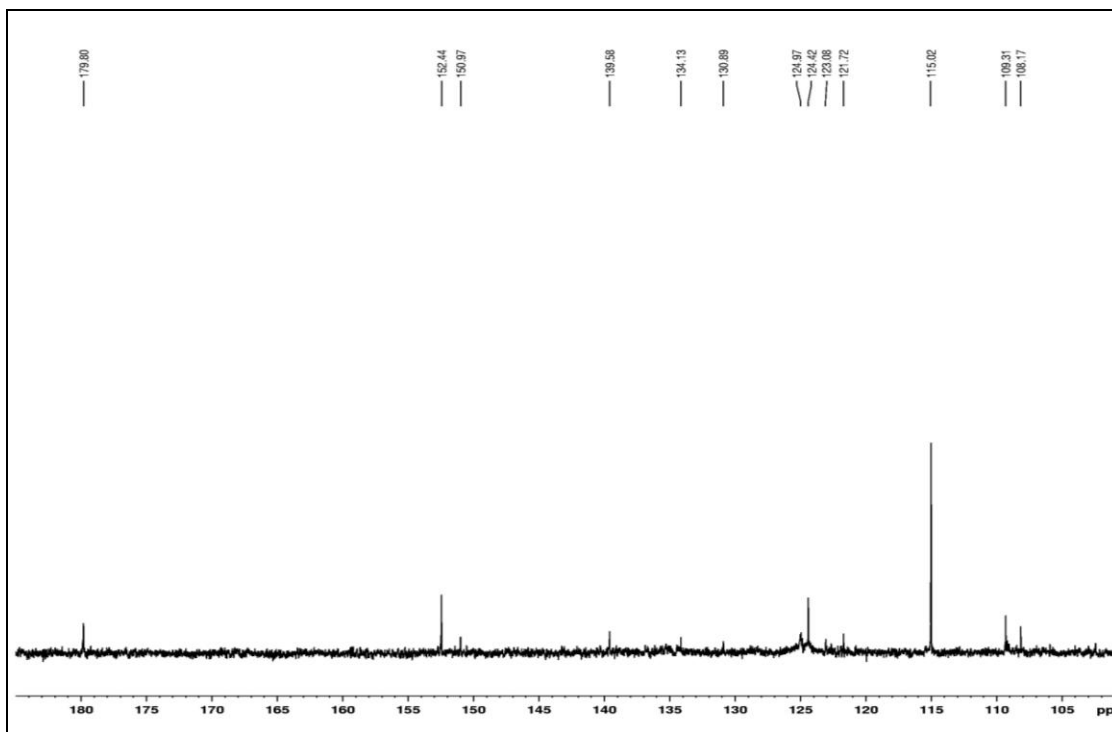
**Espectro 55.** Espectro de RMN ¹H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl₃)



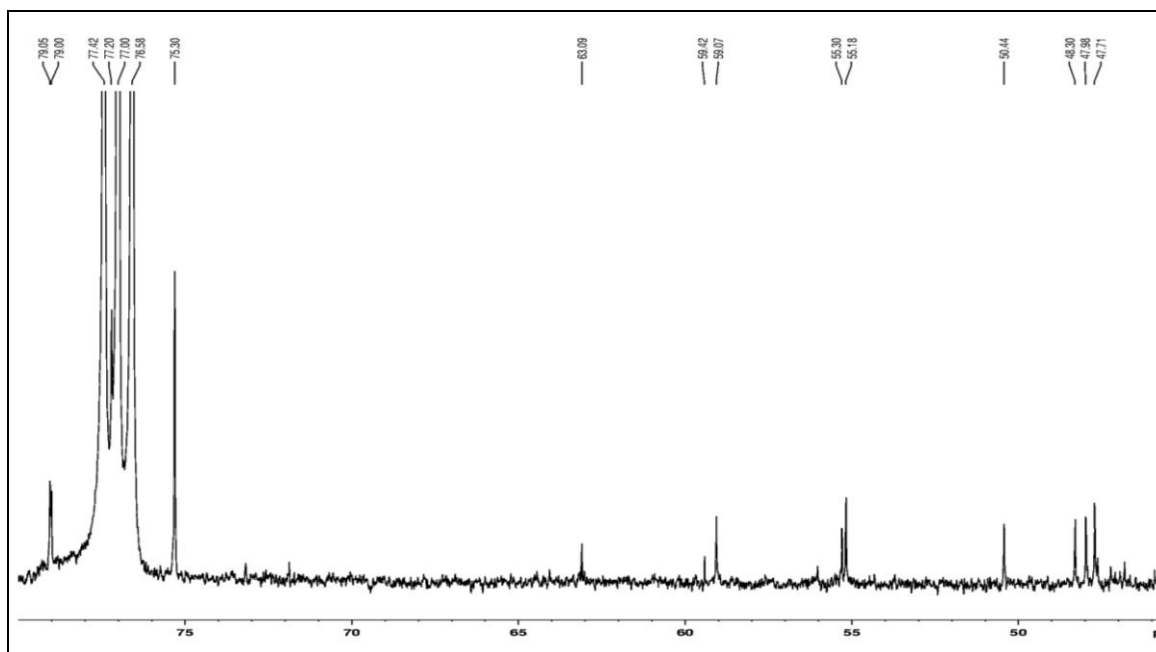
Espectro 56. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl_3)



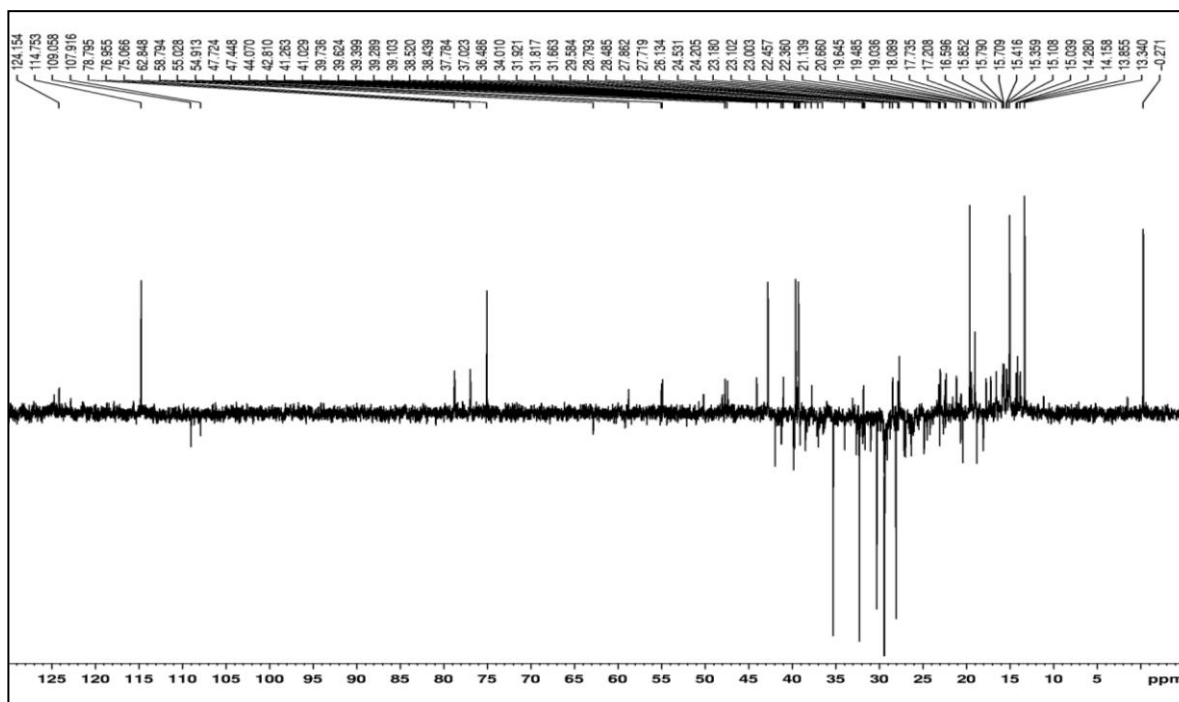
Espectro 57. Espectro de RMN ^{13}C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl_3)



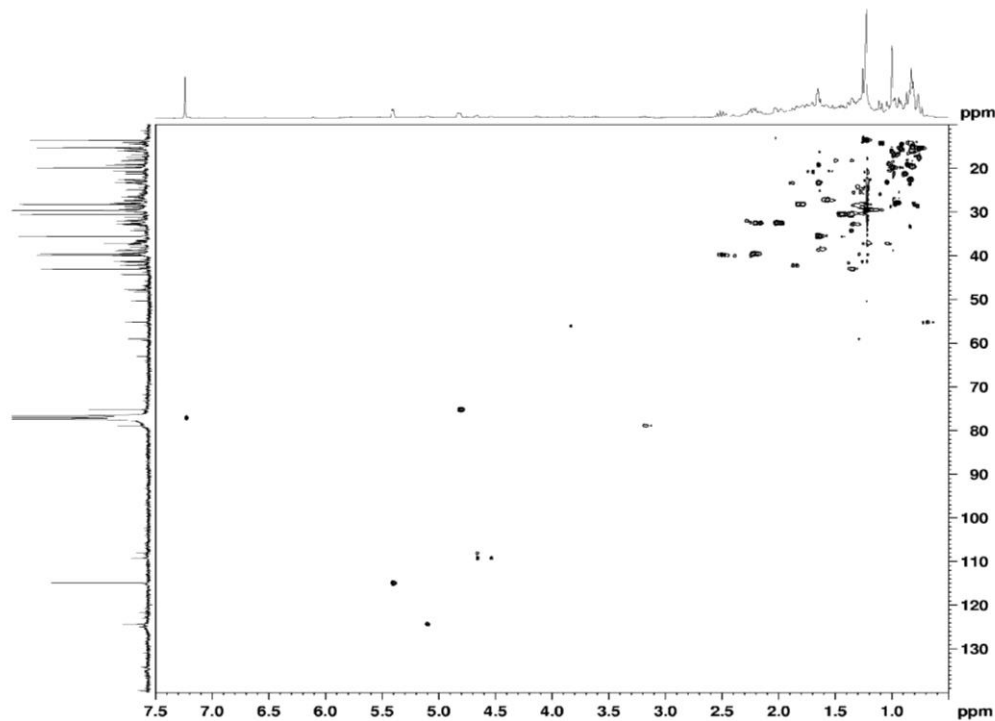
Espectro 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl_3)



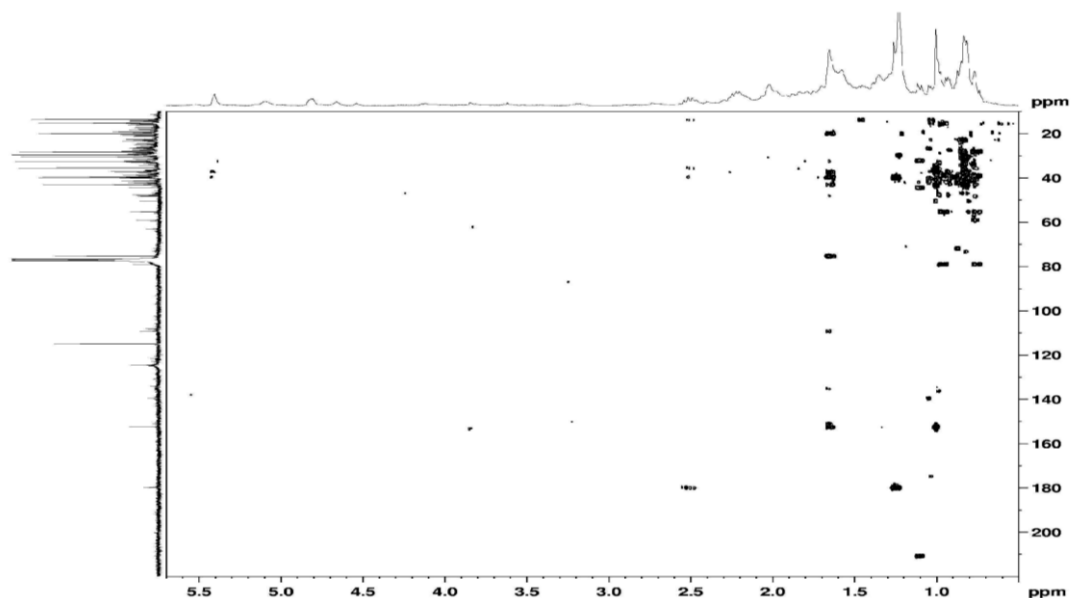
Espectro 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl_3)



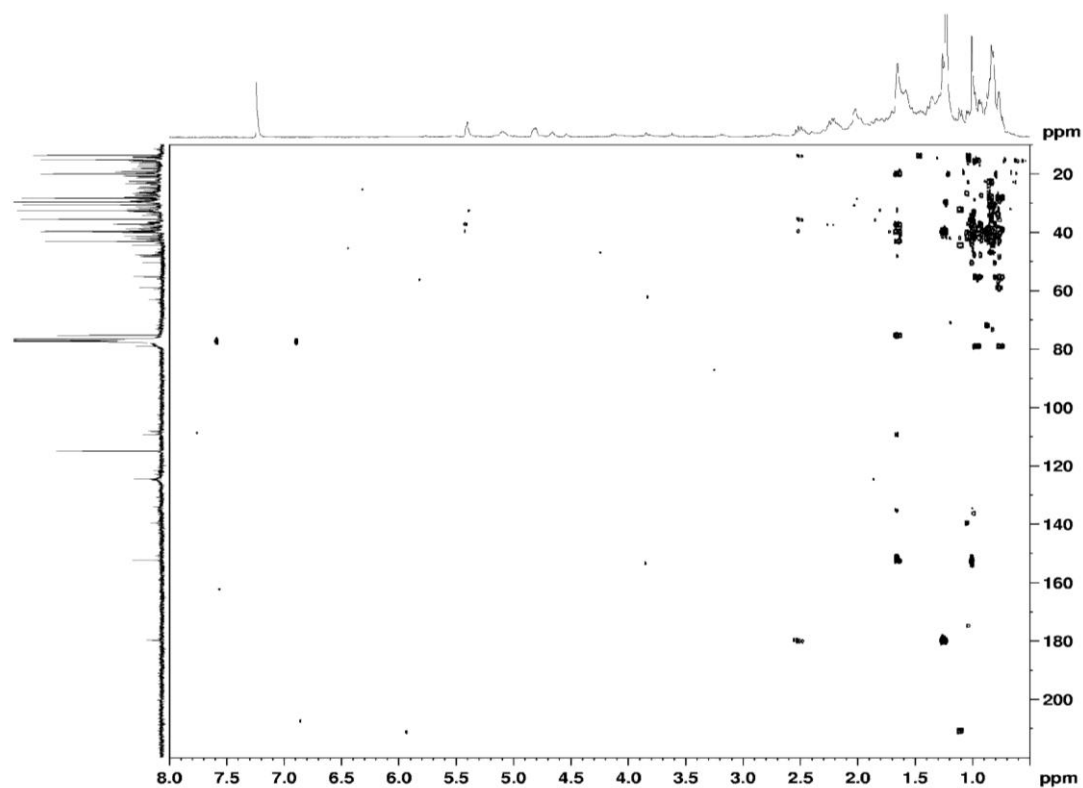
Espectro 60. Espectro DEPT 135° de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (75 MHz, CDCl₃)



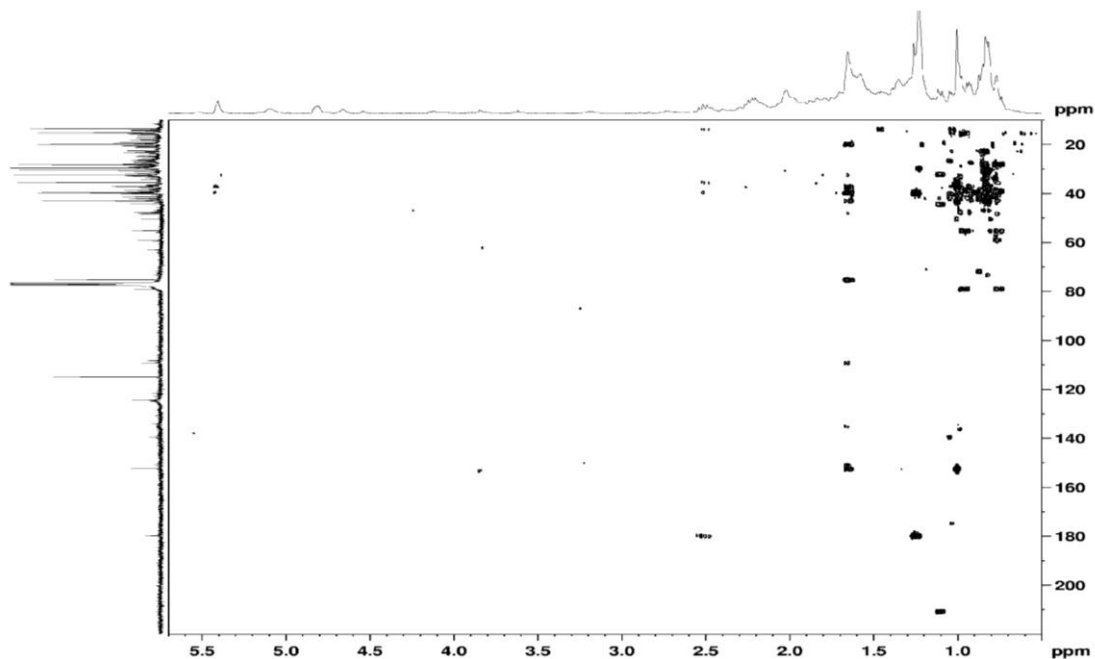
Espectro 61. Experimento HSQC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl₃)



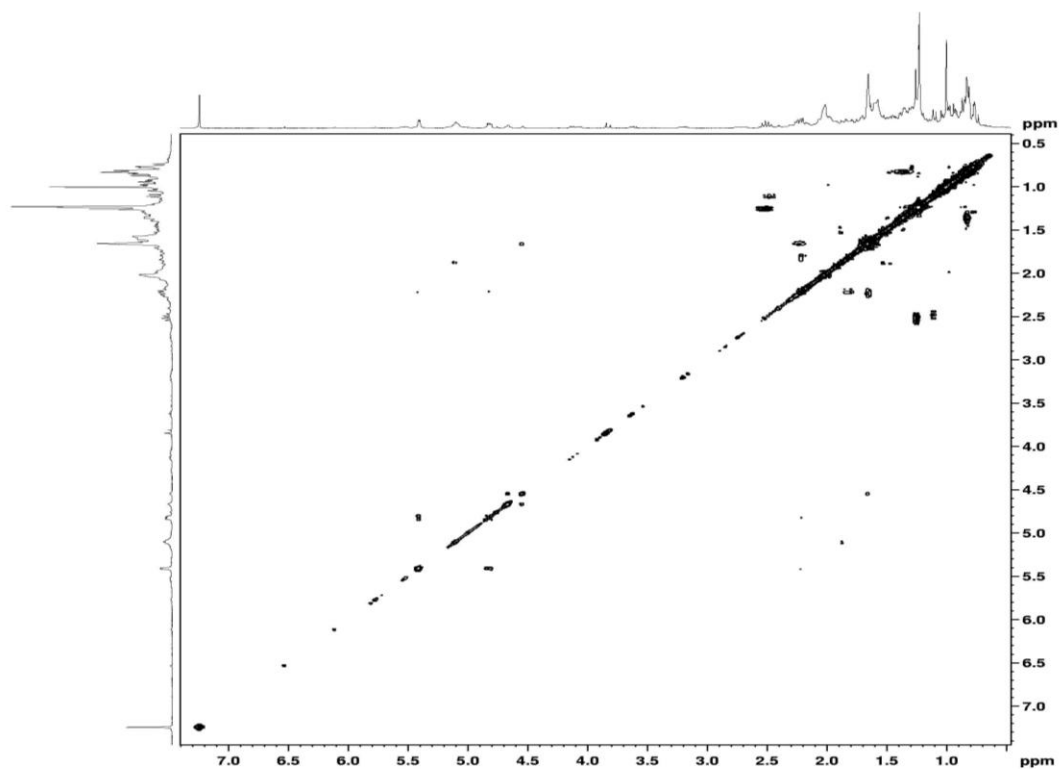
Espectro 62. Expansão do HSQC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl₃)



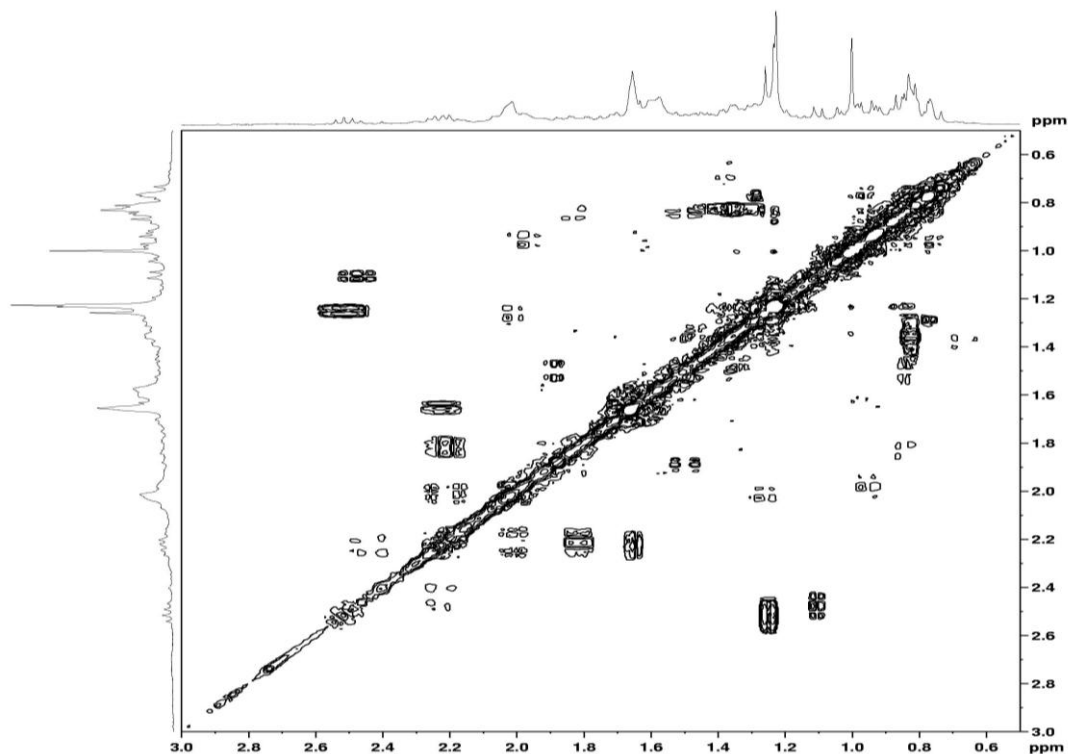
Espectro 63. Expansão do HMBC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl₃)



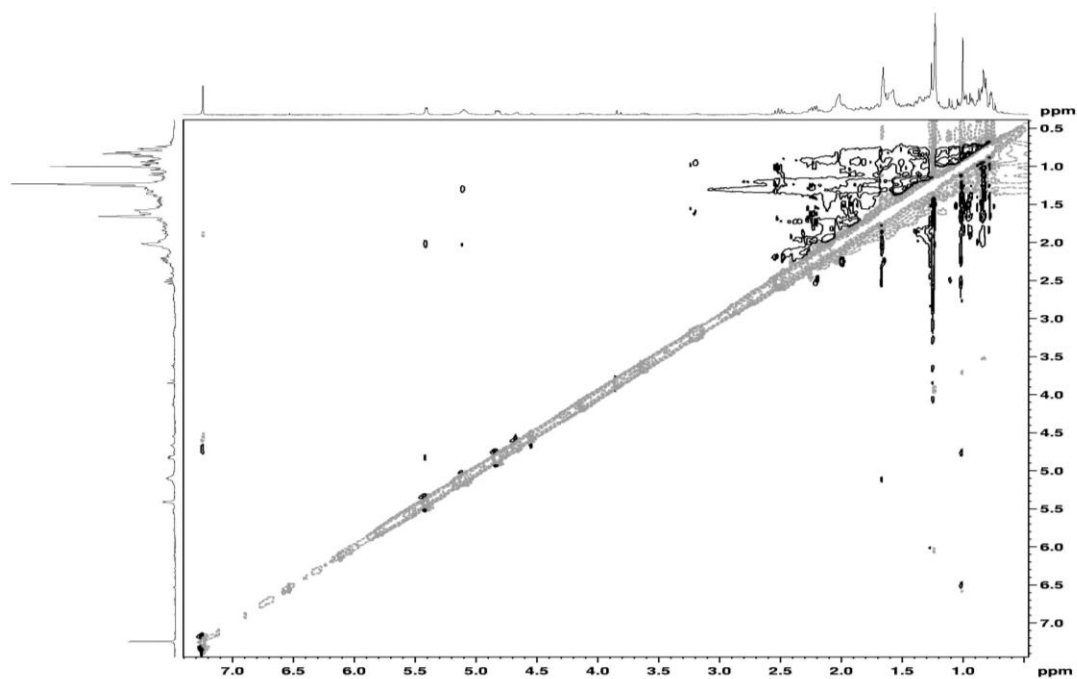
Espectro 64. Expansão do HMBC de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300/75 MHz, CDCl_3)



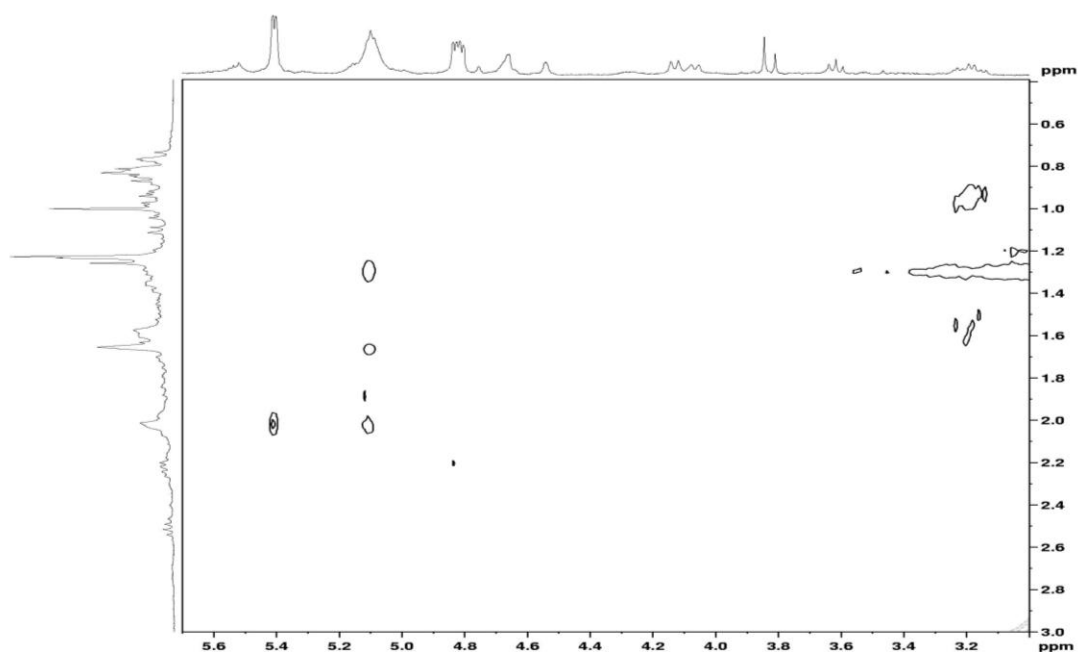
Espectro 65. Experimento COSY ^1H – ^1H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl_3)



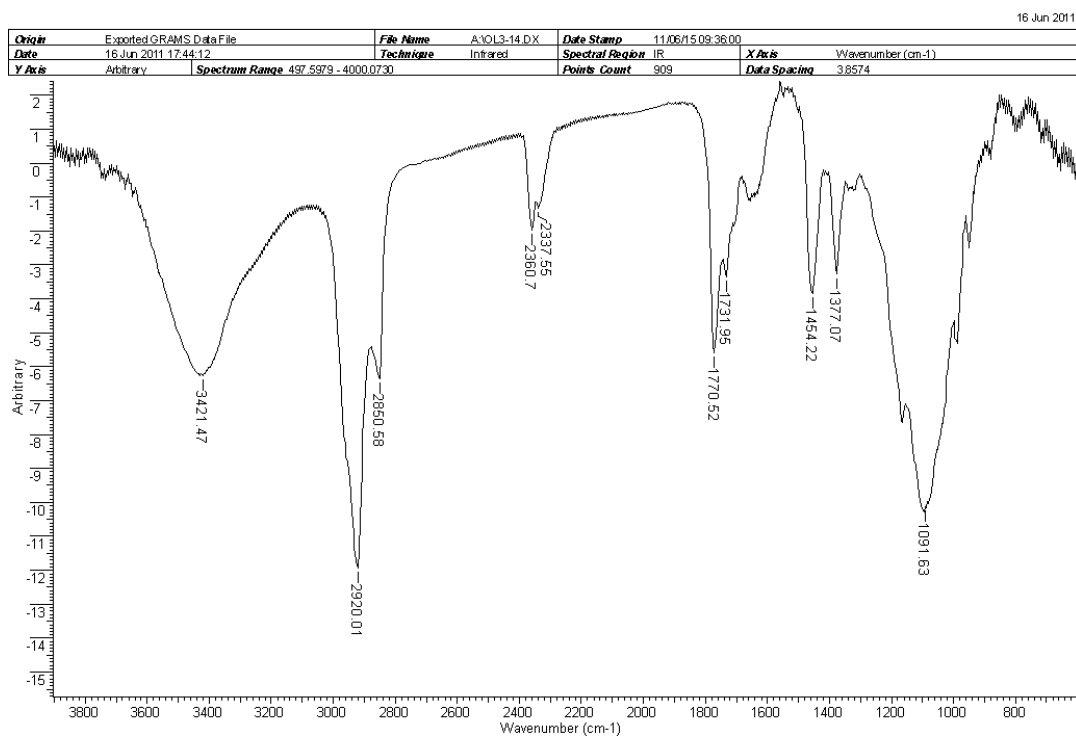
Espectro 66. Expansão do COSY ^1H – ^1H de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl_3)



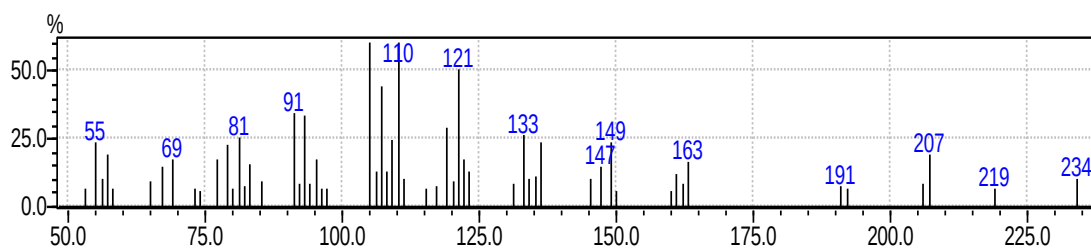
Espectro 67. Experimento NOESY de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 68. Expansão do NOESY de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (300 MHz, CDCl₃)



Espectro 69. Espectro de Infravermelho de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (CDCl₃)



Espectro 70. EIMS (70 eV) de OLH3 – 3749 – 14 (Substância 4) (CDCl₃)

5.1.5 Substância 5

A substância 5 foi caracterizada na fração OLGH11-2, originada dos processos cromatográficos realizados com a fase hexânica do extrato etanólico dos galhos, e purificada por CLAE [descrito em Materiais e Métodos 4.8.5, p. 42].

No espectro infravermelho [Espectros 88, p. 113] de 5 foram observadas bandas em 2920 e 2858 cm⁻¹, relativas a estiramento C-H, em 1766 cm⁻¹, relativa a estiramento C=O de anel γ -lactônico.

O espectro de RMN de ¹H de 5 [Espectros 71 – 73; Tabela 13, p.103] possibilitou observar sinais muito semelhantes aos apresentados para o composto 4, com três sinais relativos a três metilas (δ 0, 93, s; δ 0,81, d; δ 1,17, d), um dubleto em δ 5,54, relativo a hidrogênio olefínico e um duplo dubleto em δ 4,55.

O espectro de RMN de ¹³C [Espectros 74 – 76 ; Tabela 13, p. 103] apresentou um conjunto de 15 sinais, os quais, com auxílio do DEPT 135° [Espectros 77, p. 108], foram atribuídos a uma carboxila em δ 179,24, três metilas, quatro carbonos metilênicos, cinco metínicos dos quais um é carbinólico (δ 74,7) e outro é olefínico (δ 112,8), dois carbonos não ligados a hidrogênios, sendo um olefínico (δ 157,6).

Os dados de RMN e de infravermelho de 5 indicam que esta substância é um sesquiterpeno que possui também na sua estrutura uma γ -lactona e a fórmula molecular C₁₅H₂₂O₂. Considerando estas características, a relação carbono/hidrogênio constante nesta fórmula molecular leva à um IDH igual a 5, e, conseqüentemente à definição de se trata de uma lactona sesquiterpênica com esqueleto carbônico tricíclico.

Os experimentos HMBC e HSQC [Espectros 78 – 81, p. 108-110] levaram às atribuições e correlações constantes na Tabela 14.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **5** e do sesquiterpeno **4** indicou grande semelhança estrutural e que estes compostos são isômeros. A análise mais detalhada destes dados mostrou uma sutil diferença estrutural entre os dois compostos, a qual resulta em pequenas diferenças de deslocamento químico nos carbonos C-7, C-6, C-19, C-11 e da metila C-13.

O experimento HMBC [Espectros 80 - 81, Tabela 14, p. 104] permitiu observar o acoplamento do hidrogênio olefínico H-9 (δ 5,54) com os carbonos em δ 32,2 (C-1), δ 34,2 (C-7), δ 38,5 (C-5) e δ 74,7 (C-8), e do hidrogênio carbinólico (δ 4,55, H-8) com C-6 (δ 29,9) e C-9 (δ 112,8).

O experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ [Espectros 82 – 84, p.110-111] mostrou os acoplamentos entre os hidrogênios vizinhos H-9 (δ 5,54) e H-8 (δ 4,5) e entre H-8 (δ 4,5) e H-7 (δ 2,37). Estas correlações são coerentes com as atribuições realizadas com base nos experimentos HMBC e HSQC e fundamentam a proposta de que **5**, da mesma forma que **4**, possui o anel γ -lactônico entre C-7 e C-8.

O espectro de massas de **5** [Espectro 89, p. 114] obtido por EIMS (70 eV) apresentou íon molecular a m/z 234,0 [(M^+)], compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$.

Da mesma maneira que para a substância **4**, a definição da estereoquímica da junção anel γ -lactona pode ser definida pelas constantes de acoplamento dos hidrogênios H-8 (δ 4,55 *dd* 5,3 e 4,5 Hz) e H-9 (δ 5,54 *d*, 5,3 Hz) e, conseqüentemente, da constante de acoplamento H-8/H-7 (4,5 Hz). Este valor de constante de acoplamento informa que a relação entre H-8/H-7 é *cis*. Admitindo-se que o composto **5** tem a mesma configuração no C-7 que os compostos precedentes (**1-4**), pode-se definir, então, a estereoquímica da referida junção como sendo *cis*, que corresponde à estrutura mostrado na **Figura 15**.

A estereoquímica proposta para **5**, que se constitui na diferença em relação ao composto **4**, pôde ser definida pela presença de um duplo dubleto em δ 4,55 (5,3 e 4,5 Hz) atribuído ao H-8, e um dubleto em δ 5,54 (5,3 Hz) atribuído ao H-9, conferindo uma relação pseudo axial-axial (5,3 Hz) entre esses hidrogênios (H-8/H-9) e uma relação pseudo axial-equatorial (4,5 Hz) entre os hidrogênios H-8/H-7, confirmada pelo cálculo para configuração de

energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância 5.

Desta forma, a substância foi definida como sendo o 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12,8 β -olido, possuindo a estrutura a seguir (**Figura 15**), a qual não consta ainda na literatura.

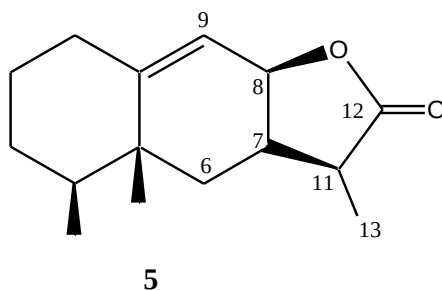


Figura 15. Estrutura da substância 5

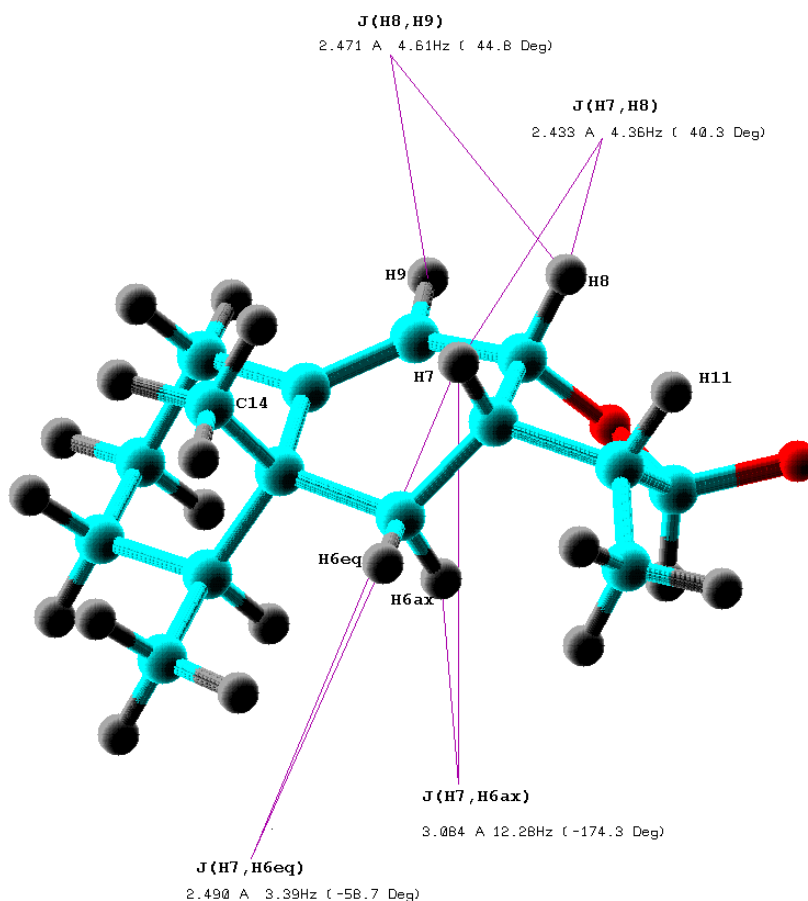


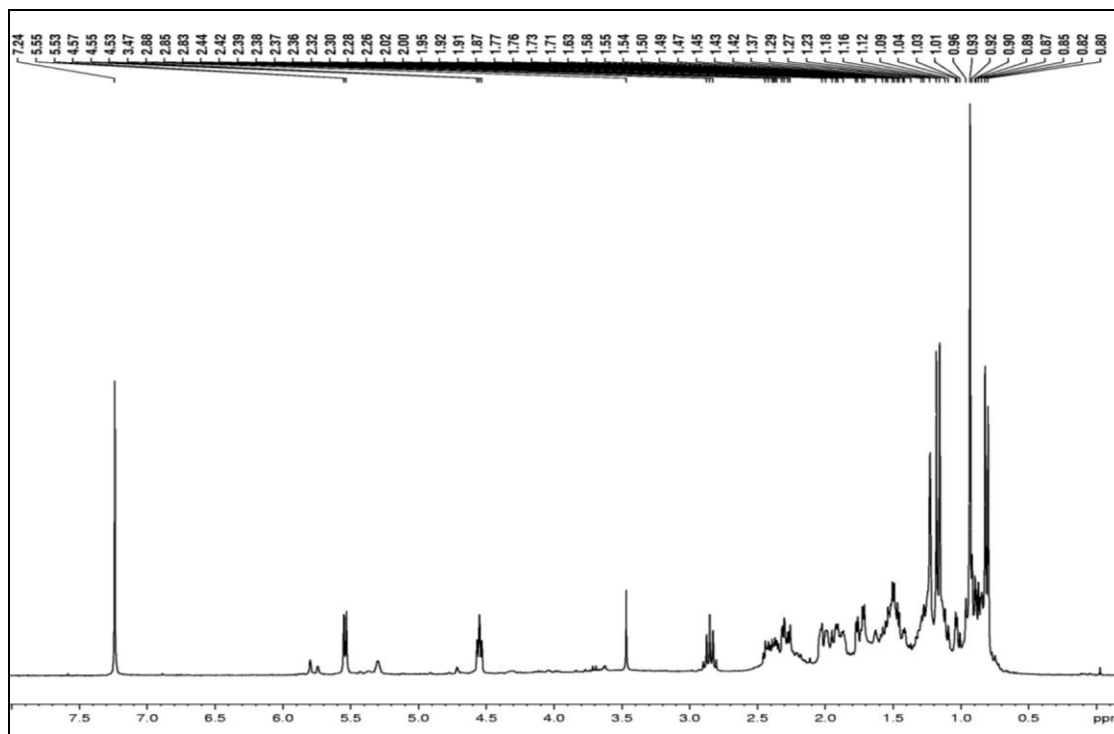
Figura 16 – Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância 5.

Tabela 13 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno **5** e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de **(4)**

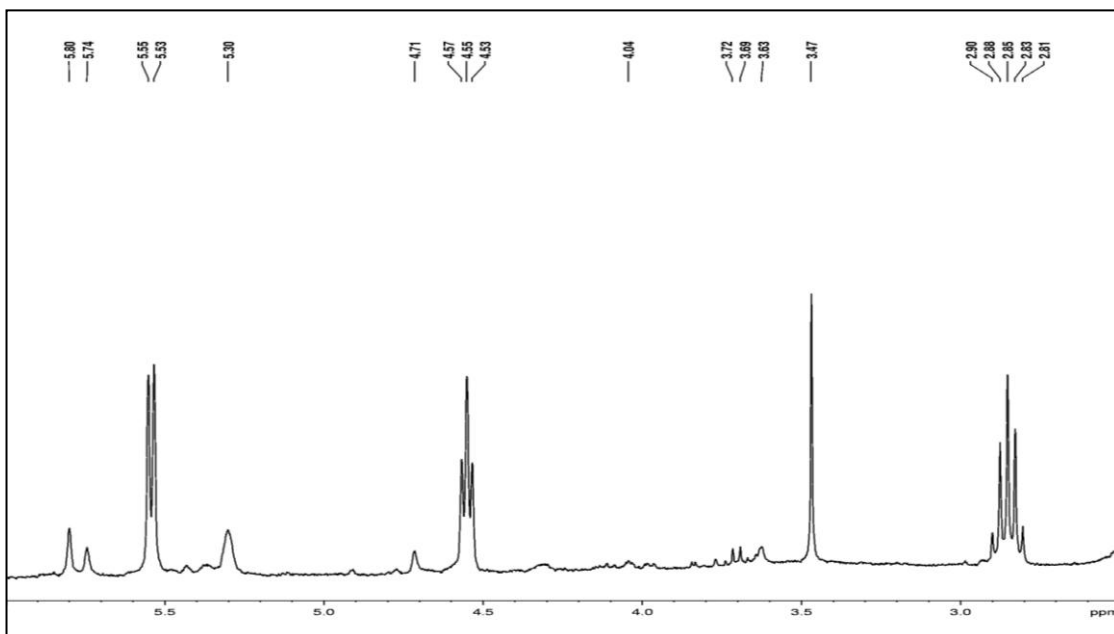
C/H	(5) $\delta^{13}\text{C}$	(5) $\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	(4) $\delta^{13}\text{C}$
1	32,2	2,29 dd (12,7; 4,7); 2,02 ddd (12,4; 4,7; 7,3)	30,5
2	29,6	1,88 m	28,3
3	30,7	1,49 ddd (11,3; 7,7; 4,0); 1,41 m	32,5
4	38,4	1,52 ddd (11,0; 6,4; 4,0)	39,5
5	38,5	-	37,2
6	29,8	1,74 dd (14,0; 4,3); 0,92 dd (14,0; 9,2)	35,5
7	34,2	2,37 m	43,0
8	74,7	4,55 dd (5,3; 4,5)	75,3
9	112,8	5,54 d (5,3)	115,0
10	157,6	2,85 qui (7,1)	152,4
11	40,4	-	39,8
12	179,2	1,17 d (7,3)	179,8
13	9,3	0,93 s	13,5
14	20,1	0,81 d (6,4)	19,8
15	15,5		15,2

Tabela 14. Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de **(5)** (300/75 MHz, CDCl₃)

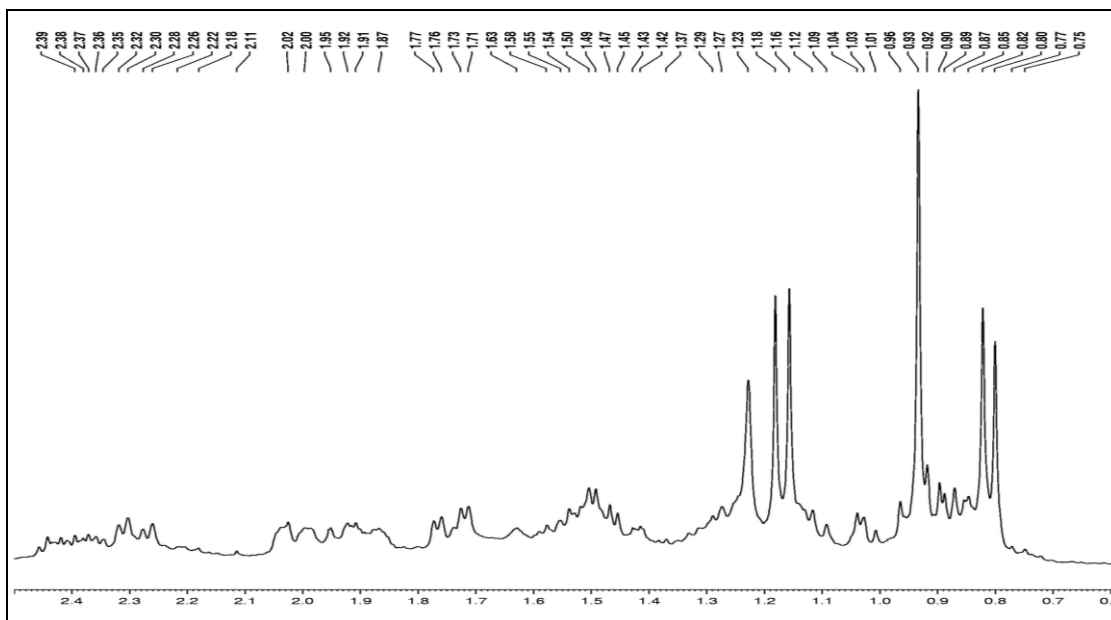
C/H	HSQC (5)		HMBC (5) (H → C)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	
1	32,2	2,29 <i>dd</i> (12,7; 4,7); 2,02 <i>ddd</i> (12,4; 4,7; 7,3)	
2	29,6	1,88 <i>m</i>	
3	30,7	1,49 <i>ddd</i> (11,3; 7,7; 4,0); 1,41 <i>m</i>	C-4
4	38,4	1,52 <i>ddd</i> (11,0; 6,4; 4,0)	C-5
5	38,5	-	
6	29,8	1,74 <i>dd</i> (14,0; 4,3); 0,92 <i>dd</i> (14,0; 9,2)	C-4; C-5; C-7; C-8; C-14
7	34,2	2,37 <i>m</i>	
8	74,7	4,55 <i>dd</i> (5,3; 4,5)	C-6
9	112,8	5,54 <i>d</i> (5,3)	C-1; C-5; C-7
10	157,6	-	
11	40,4	2,85 <i>qui</i> (7,1)	C-6; C-12
12	179,2	-	
13	9,3	1,17 <i>d</i> (7,3)	C-7; C-12
14	20,1	0,93 <i>s</i>	C-7; C-6; C-10; C-15
15	15,5	0,81 <i>d</i> (6,4)	C-3



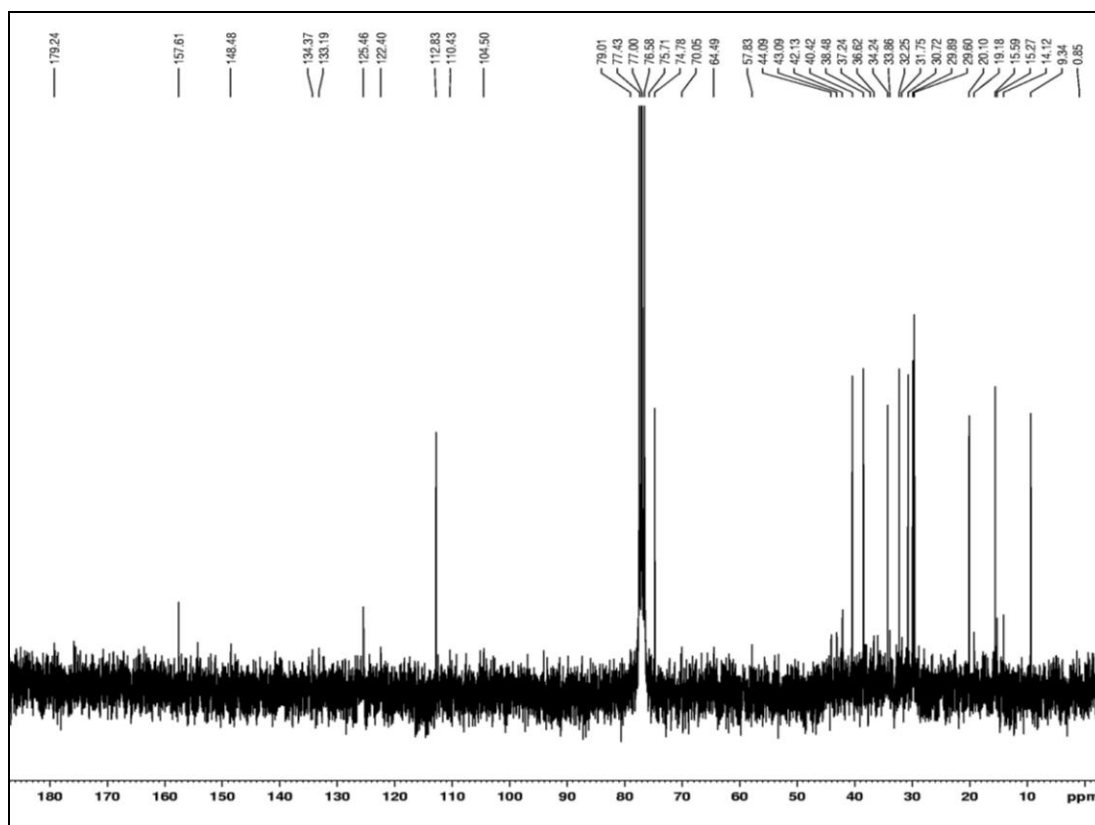
Espectro 71. Espectro de RMN ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



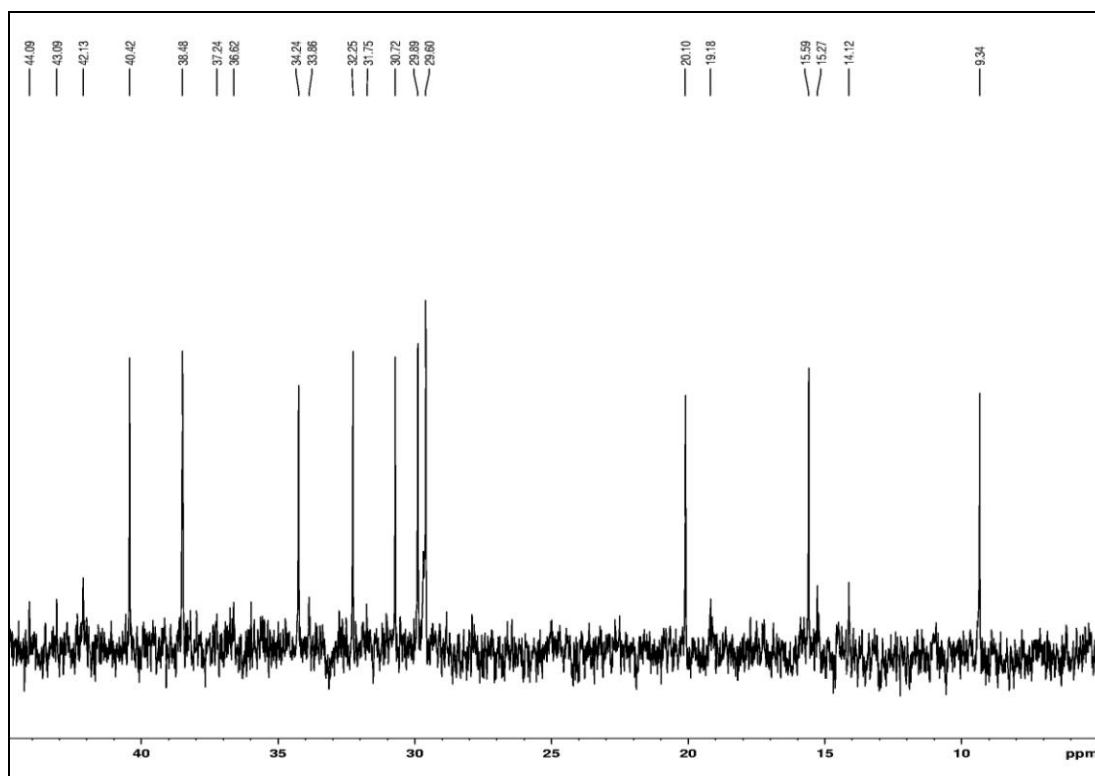
Espectro 72. Expansão espectro de RMN ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



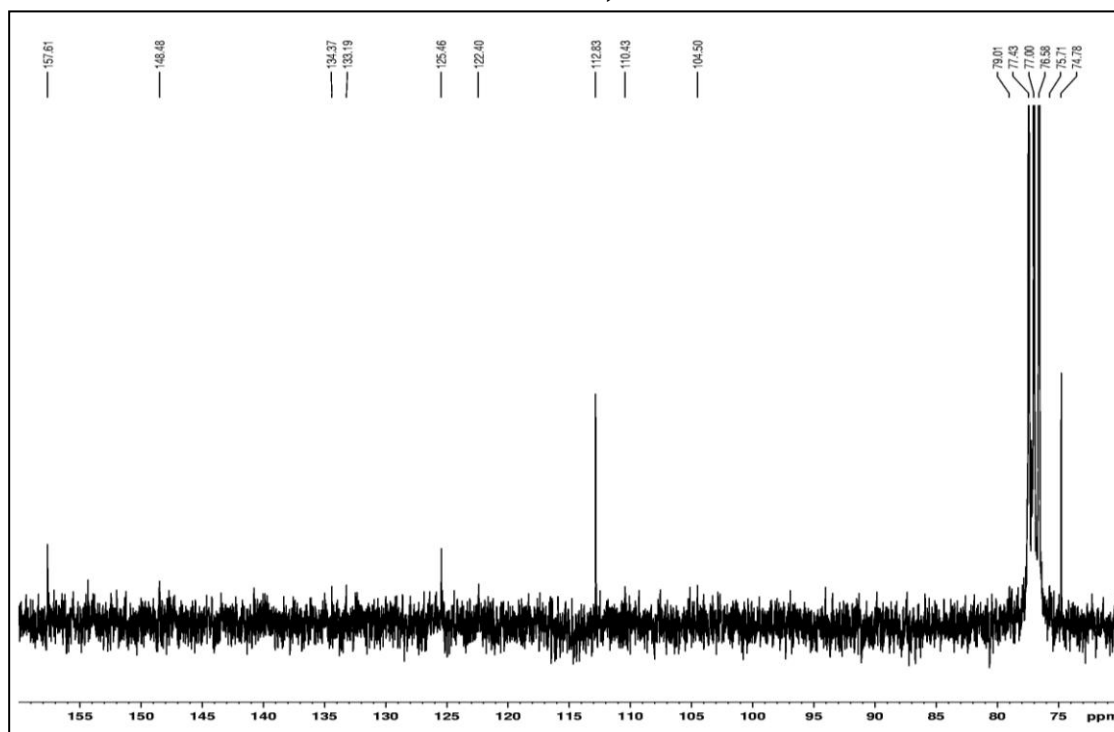
Espectro 73. Expansão espectro de RMN ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



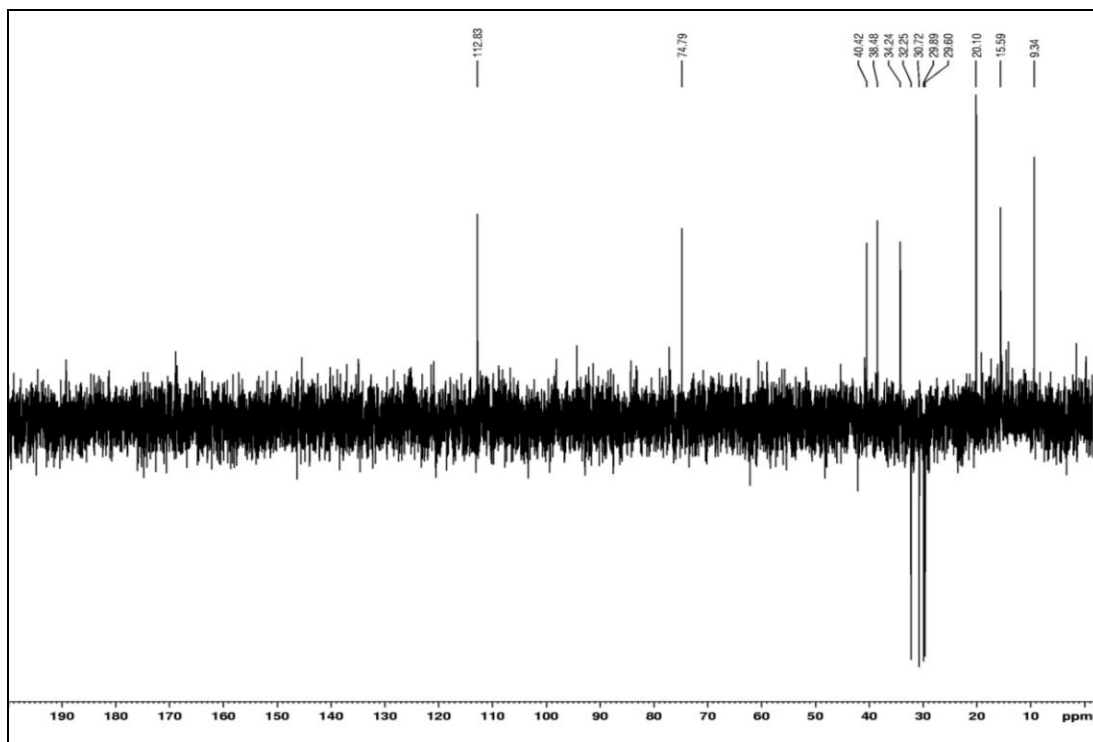
Espectro 74. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl_3)



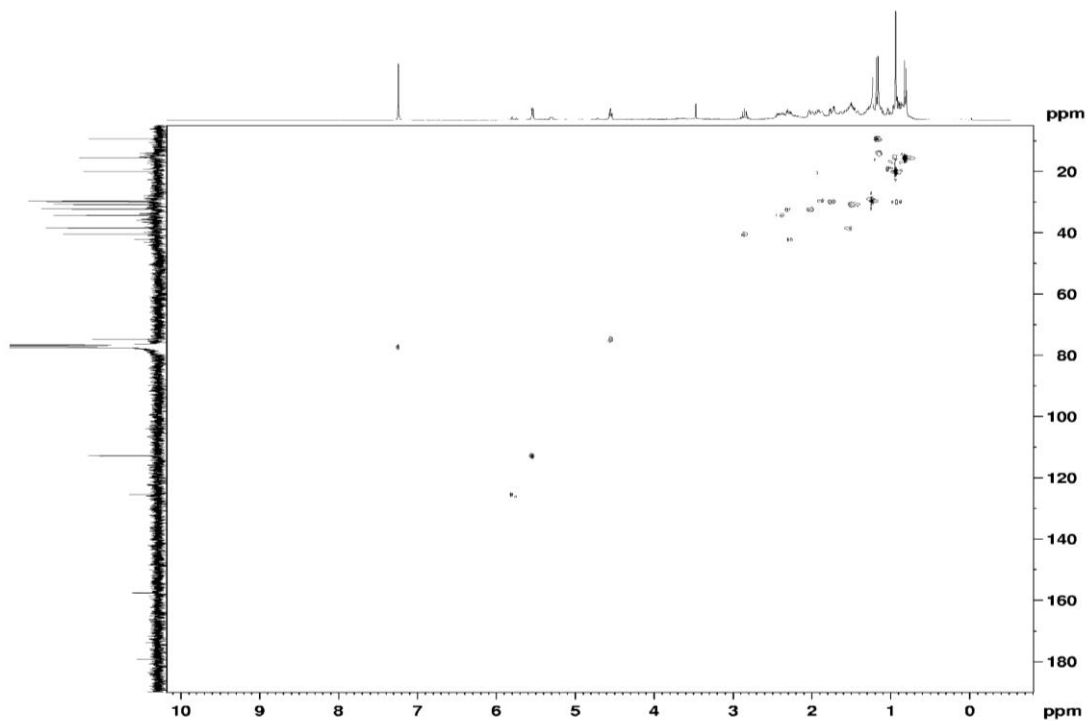
Espectro 75. Expansão espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl_3)



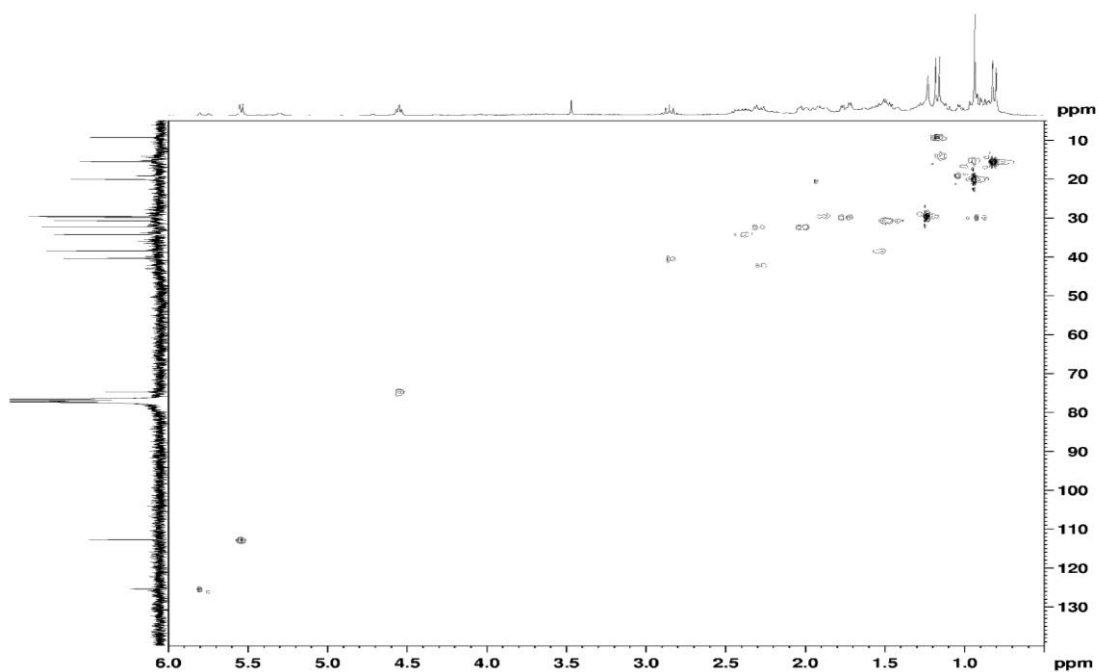
Espectro 76. Expansão espectro de RMN ^{13}C de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl_3)



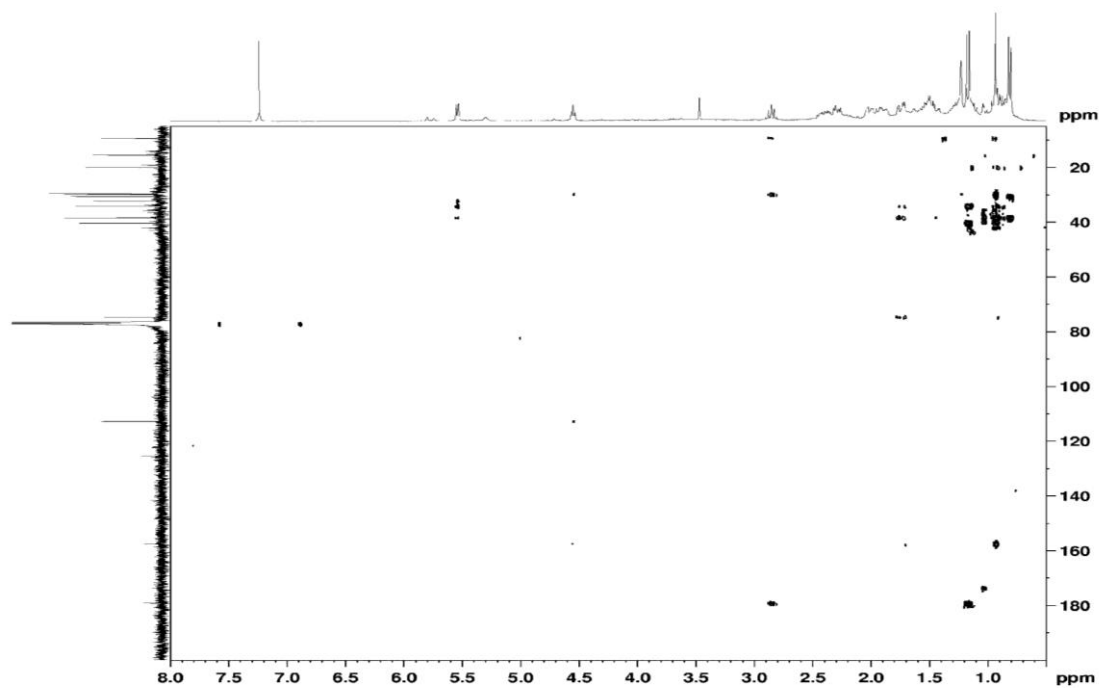
Espectro 77. Espectro DEPT 135° de OLGH11-2 (Substância 5) (75 MHz, CDCl₃)



Espectro 78. Experimento HSQC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl₃)

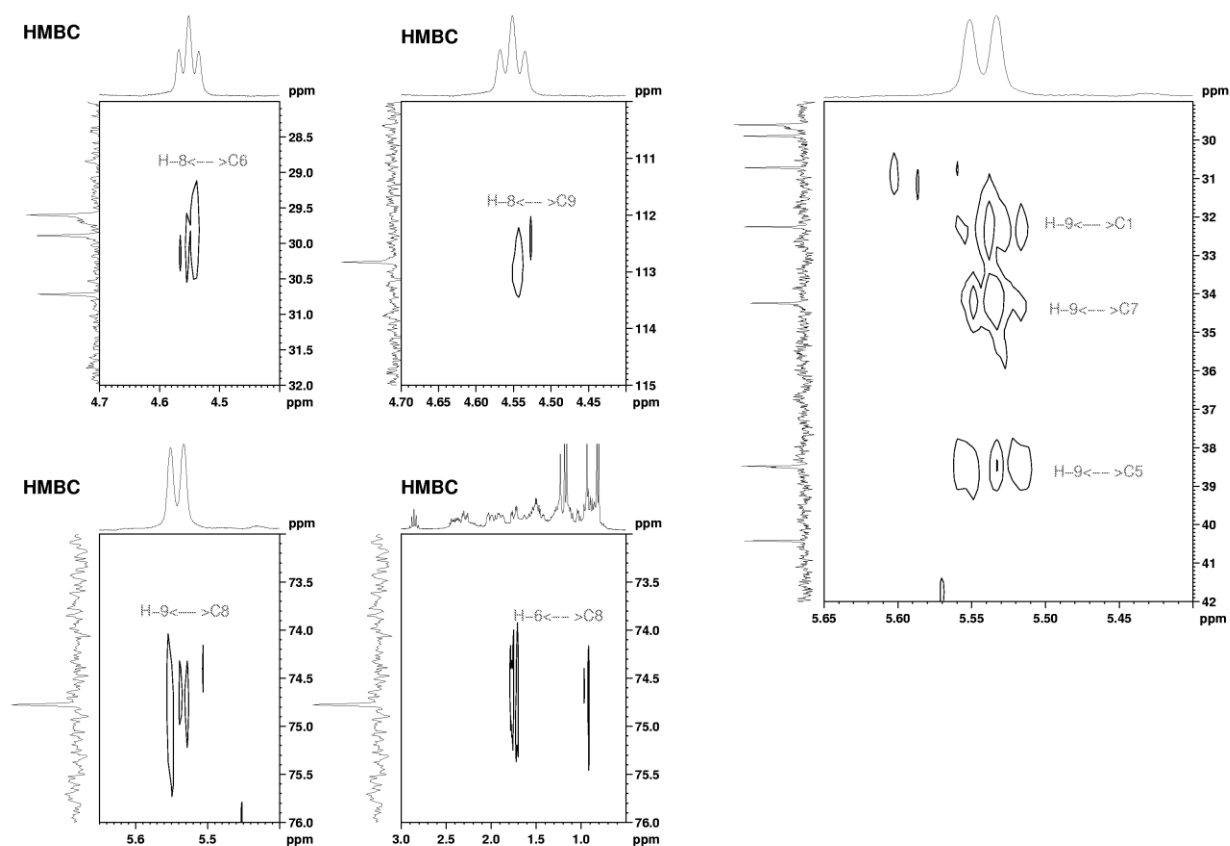


Espectro 79. Expansão do HSQC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl₃)

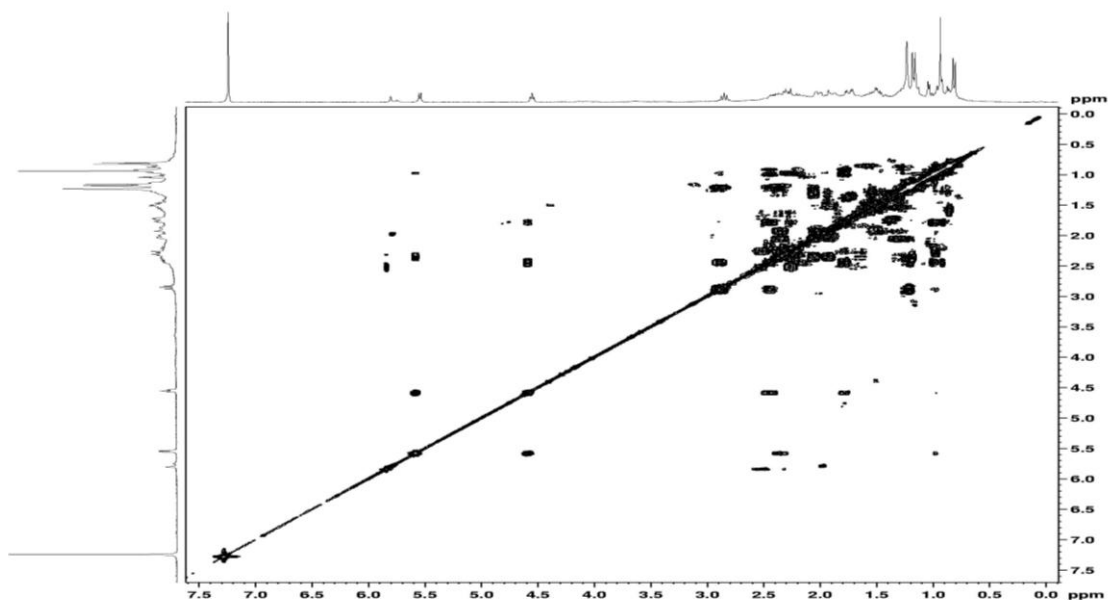


Espectro 80. Experimento HMBC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl₃)

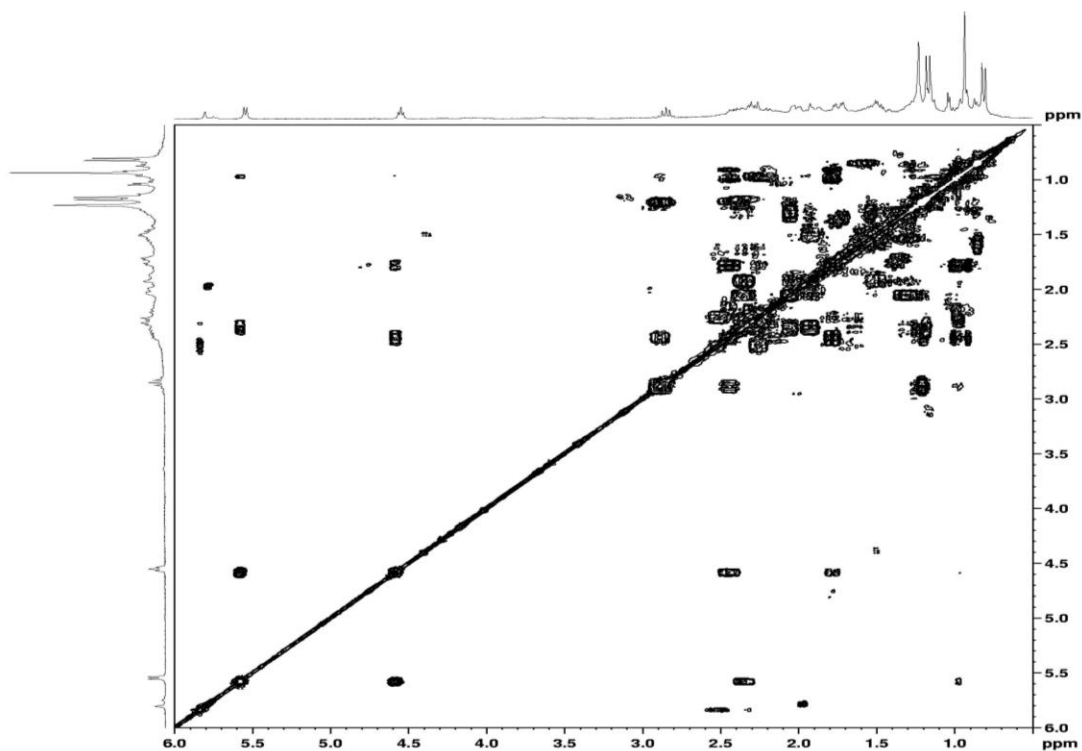
5. Resultados e Discussão



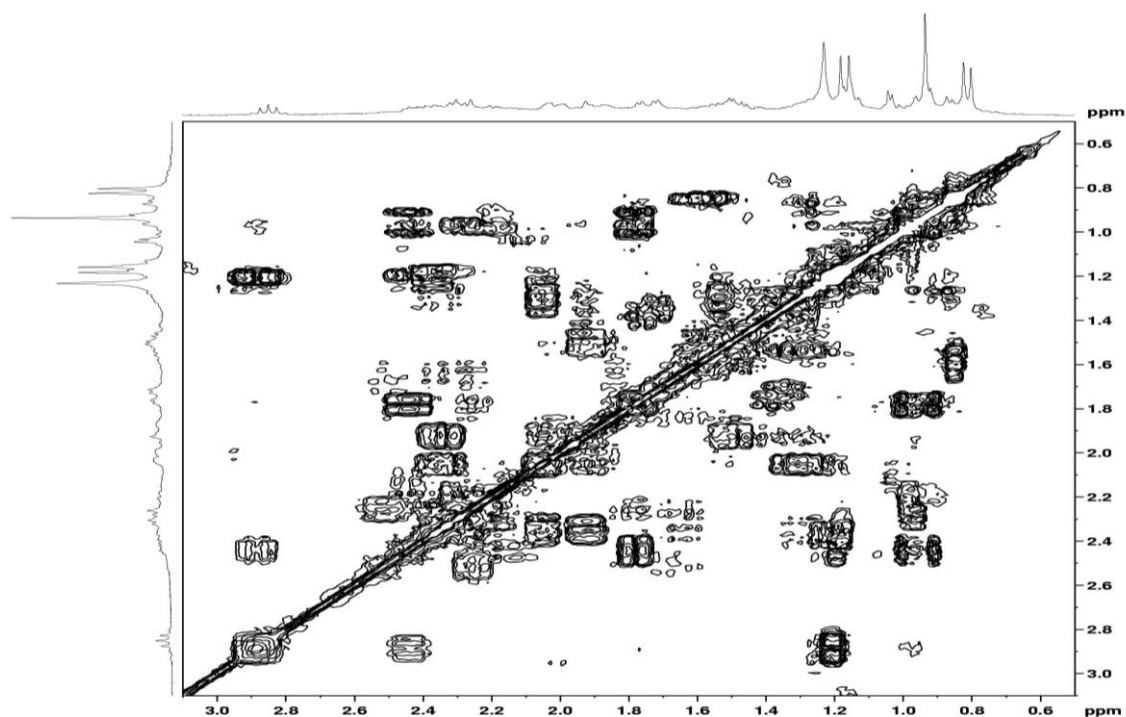
Espectro 81. Correlações observadas no experimento HMBC de OLGH11-2 (Substância 5) (300/75 MHz, CDCl_3)



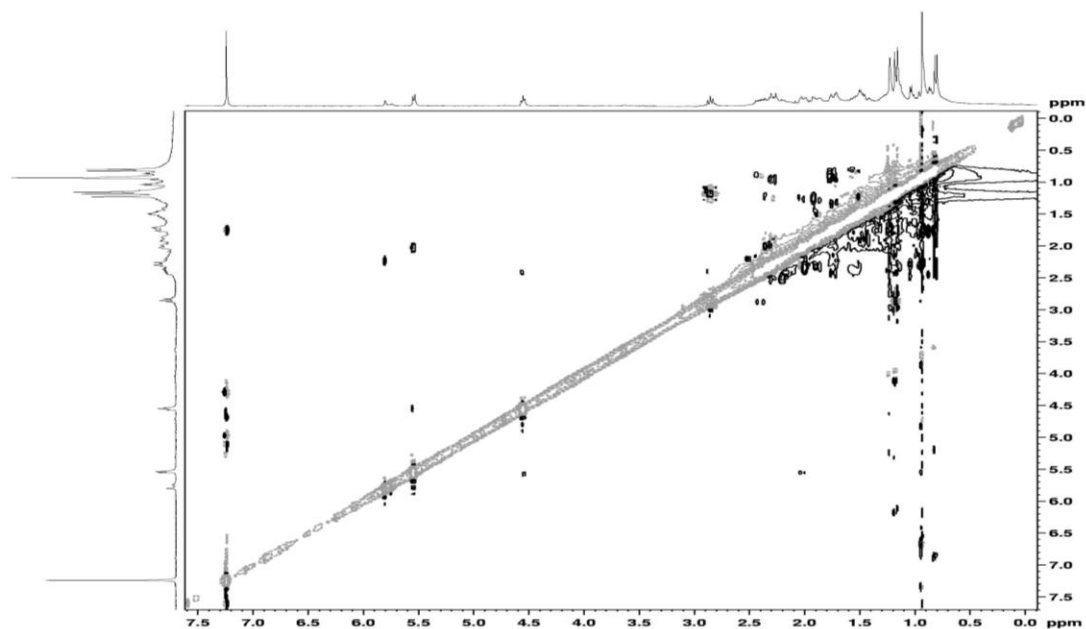
Espectro 82. Experimento COSY ^1H - ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



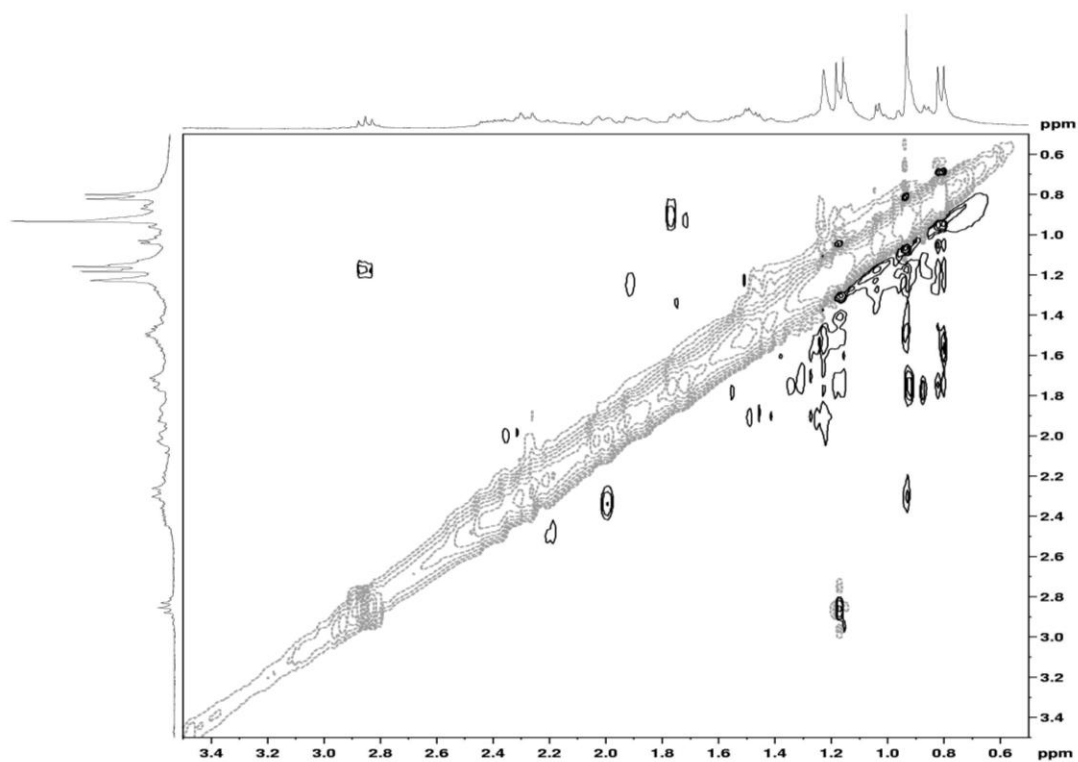
Espectro 83. Expansão do COSY ^1H - ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



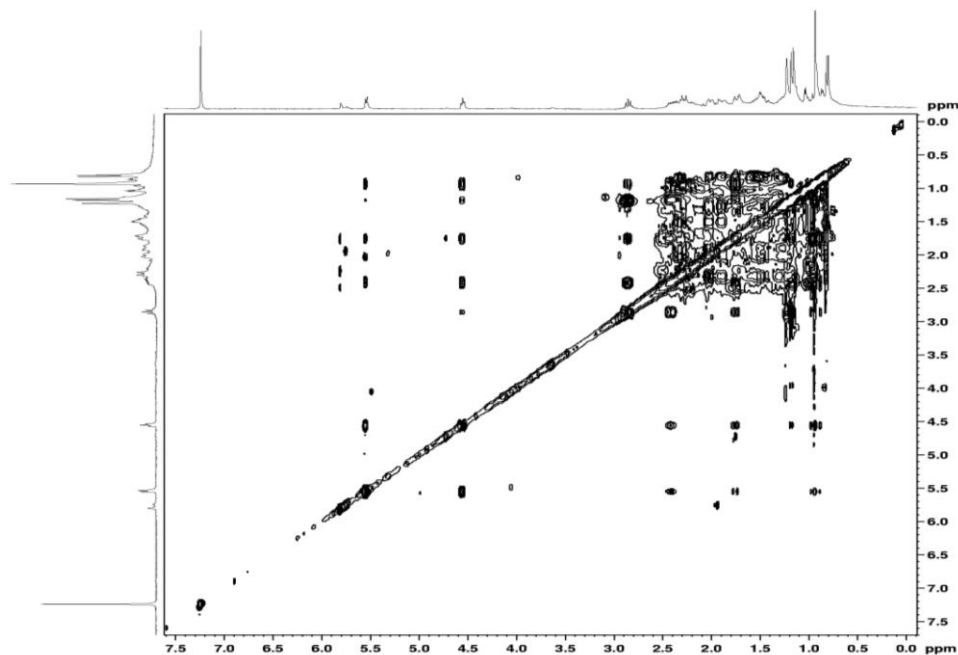
Espectro 84. Expansão do COSY ^1H - ^1H de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



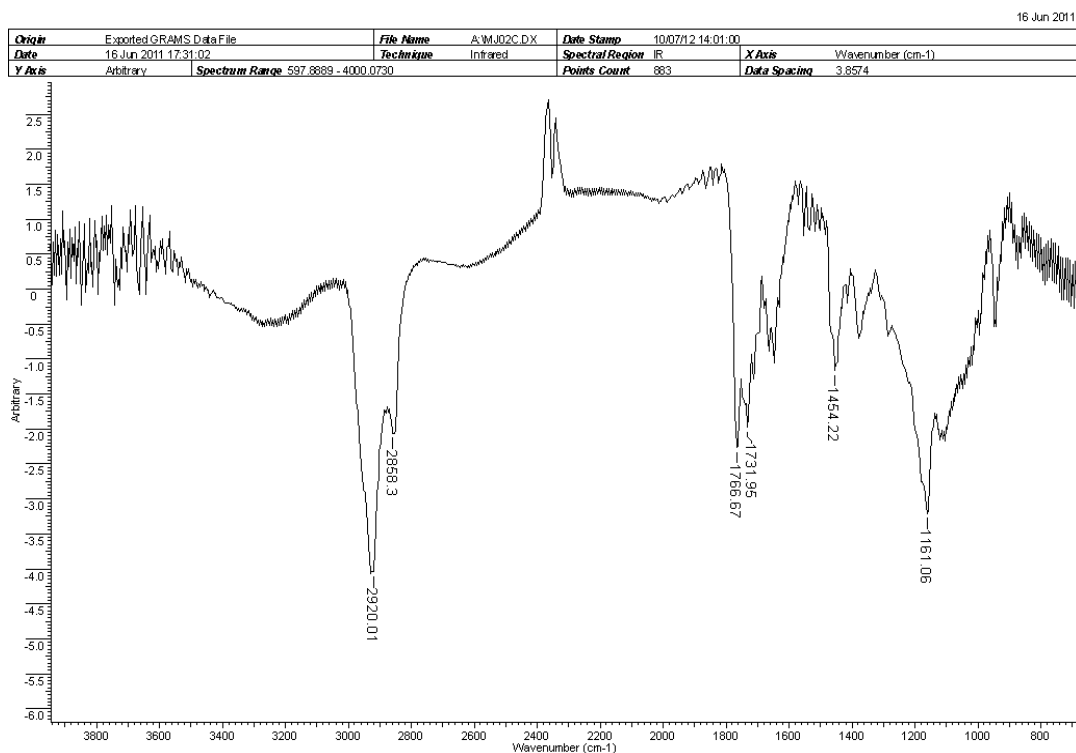
Espectro 85. Experimento NOESY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



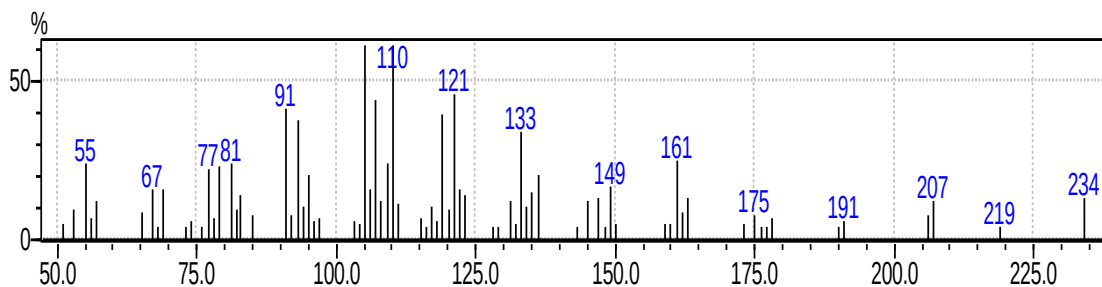
Espectro 86. Expansão do NOESY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 87. Experimento TOCSY de OLGH11-2 (Substância 5) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 88. Espectro de Infravermelho de OLGH11-2 (Substância 5) (CDCl_3)



Espectro 89. EIMS (70 eV) de OLGH11-2 (Substância 5) (CDCl₃)

5.1.6 Substância 6

A substância codificada como **6**, de aspecto oleoso e incolor, foi identificada nas frações OLGH22-112, originada a partir dos fracionamentos cromatográficos realizados com o extrato etanólico da fase hexânica dos galhos [descrito em Materiais e Métodos **4.7.3.1**, p. 36].

O espectro de RMN de ¹H [Espectros 90 – 91; Tabela 15, p. 117] apresentou três sinais relativos a metilas, sendo dois dubletos e um singlete, com deslocamentos químicos em δ 0,78; δ 1,12 e δ 0,93, respectivamente, e ainda, um sinal em δ 2,92, além de outros sinais.

O espectro de RMN de ¹³C e DEPT 135° [Espectros 92 – 95; Tabela 15, p. 117] apresentou um conjunto de 15 sinais, sendo estes atribuídos a três metilas, uma carboxila, cinco carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos, destacando um deles em δ 61,0 e dois carbonos quaternários, sendo um destes em δ 65,5.

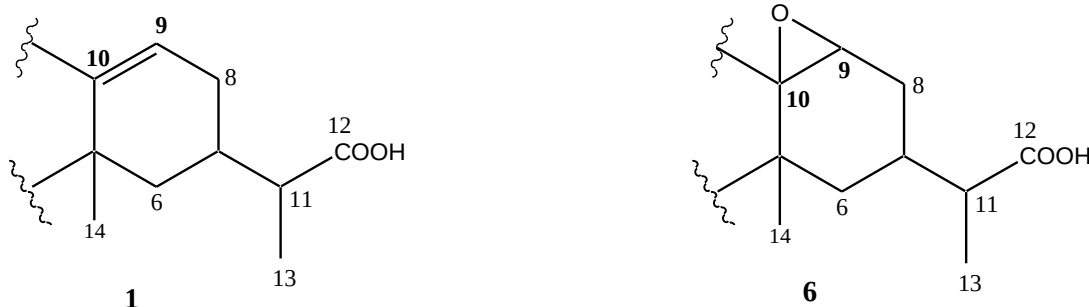
A relação carbono/hidrogênio constante nesta fórmula molecular leva a um IDH igual a 4, apresentando sinais no espectro de RMN de ¹H em regiões semelhantes aos apresentados em **1**, exceto pela ausência de hidrogênio ligado a carbono olefínico, porém, sugerindo ainda tratar-se de um composto com características de pertencer à classe dos sesquiterpenos de esqueleto eremofilano.

O conjunto de dados obtidos nos espectros de RMN ¹³C e DEPT 135° e experimentos bidimensionais HSQC e HMBC [Espectros 96 – 100; Tabela 16, p. 118] inclui a presença de sinais em δ 61,0 (CH) e em δ 65,5 (C), indicando a presença de um grupo epóxido.

O experimento HMBC para o composto **6** [Espectro 98 - 100; Tabela 16, p. 118] mostrou que os hidrogênios da metila a δ 1,12 (H-13) se correlacionam com os carbonos a δ 30,0 (C-7), a δ 43,7 (C-11) e com a carboxila em δ 179,2 (C-12), correspondendo a uma “isopropila”

contendo carboxila; mostra ainda, que o hidrogênio em δ 2,92 (H-9) acopla com os carbonos a δ 28,6 (C-8) e δ 30,0 (C-7) e que a metila a δ 17,7 (H-15) acopla com os carbonos a δ 37,6 (C-5) e a δ 65,5 (C-10), com 3J e 4J , respectivamente, compatíveis com a presença de um grupo epóxido localizado nos carbonos C-9 e C-10.

Estes dados, ao serem comparados com os do composto **1**, verificando-se a ausência de carbonos olefínicos, sugere que a diferença estrutural entre os dois compostos reside na presença de um grupo epóxido na estrutura de **6**, localizado no C-9 e C-10, permitindo propor para esta substância a fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_3$.



O espectro de massas de **6** [Espectro 105, p.126] obtido por CG/EM de apresentou um íon a $[(M^+)]$ m/z 252,0 relativo à fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_3$, mostrou-se compatível com a proposta supracitada (**Figura 17**).

A estereoquímica segue conforme a apresentada para o composto **1**, onde o espectro resultante do experimento NOESY mostrou a correlação dos hidrogênios da metila 14 com o hidrogênio H-11, permitindo assim definir a relação *cis* entre os mesmos. A estereoquímica para o grupo epóxido, foi proposta devido ao deslocamento químico em 17,7 δ para a metila – 14, indicando uma relação *trans* na junção dos anéis (C-5 e C-10).

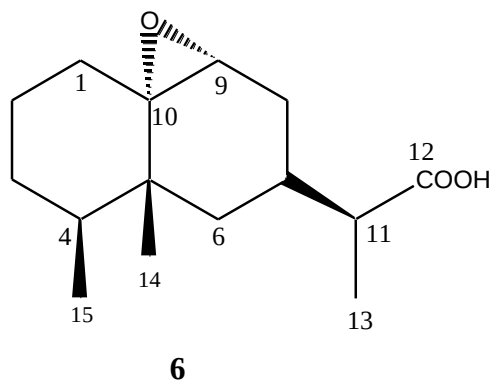


Figura 17 - Estrutura da substância **6**.

Desta forma, o sesquiterpeno **6**, está sendo caracterizado como ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofilan-9,10-epóxi-12-oico (**Figura 17**), ainda não relatado na literatura.

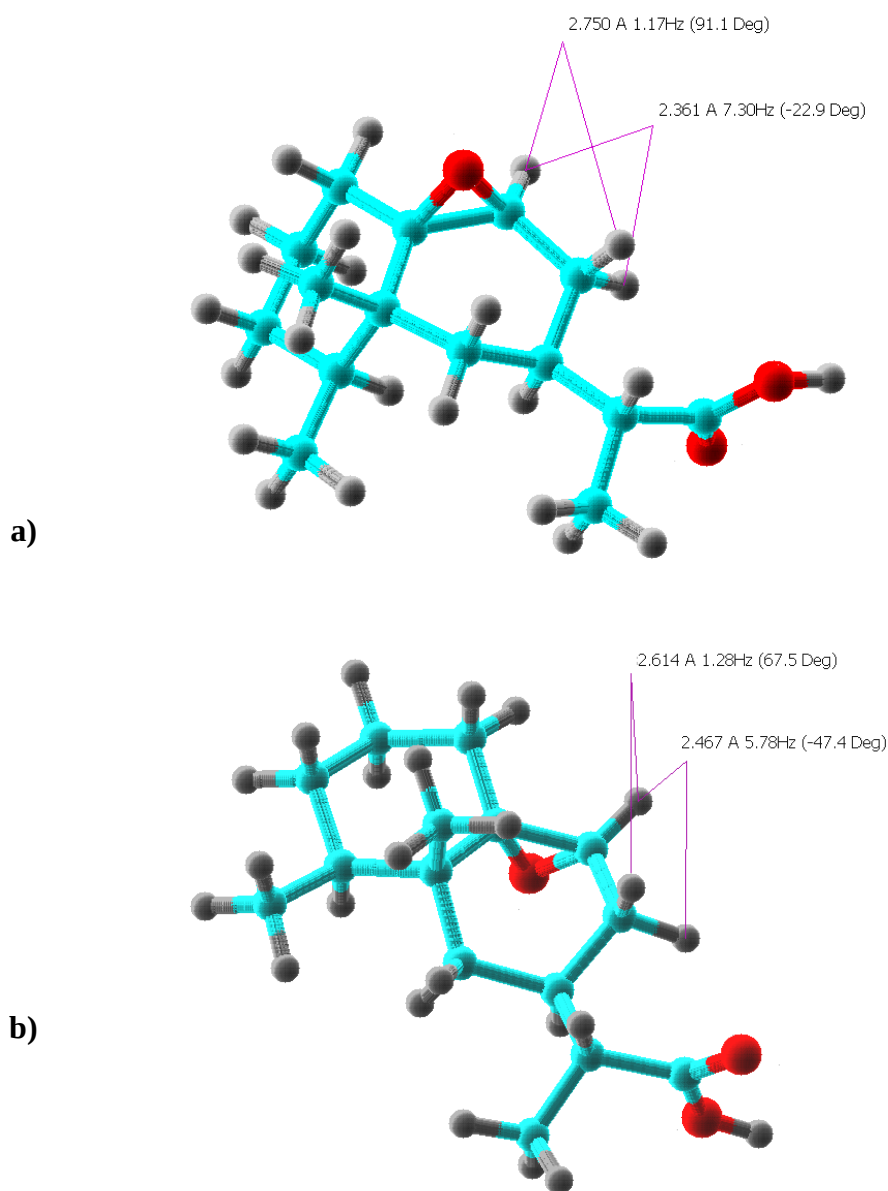


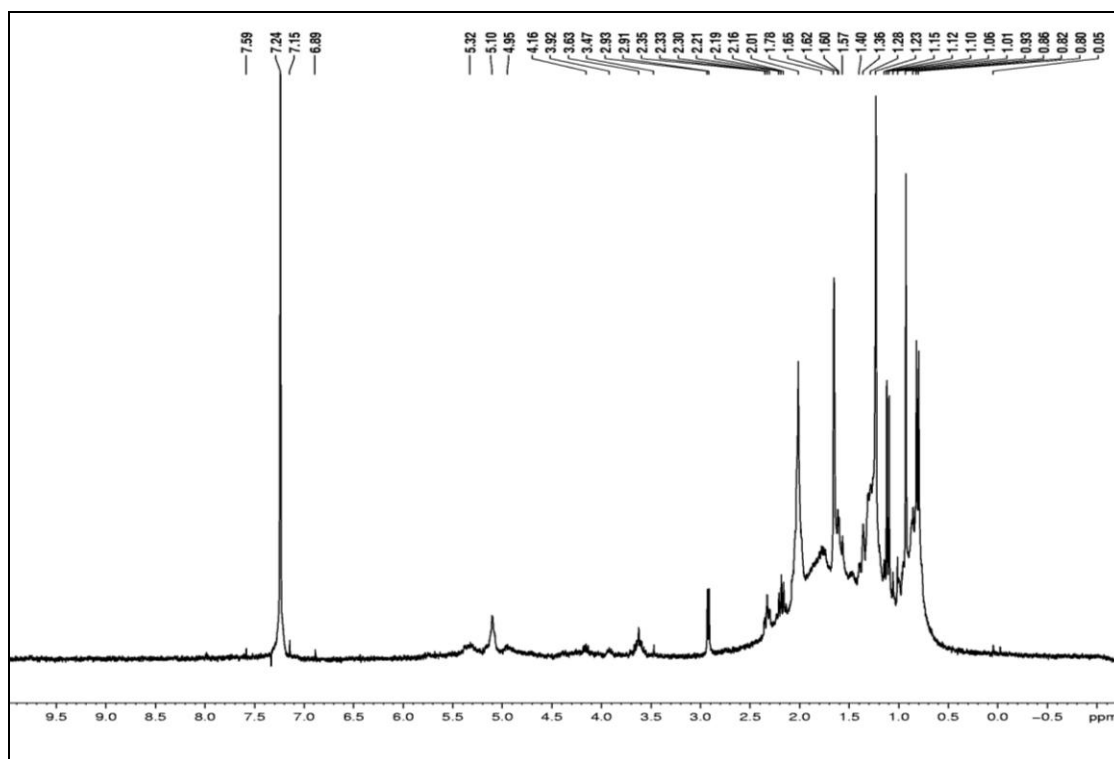
Figura 18 – Configuração de energia mínima por MMX obtida pelo programa *PC-Model for Windows* – versão 7, para a substância **5**: **a)** H – 9 com H-8ax e H-8eq ($J = 1,17$ e $7,30$ Hz); **b)** H – 9 com H-8a e H-8b ($J = 1,29$ e $5,78$ Hz)

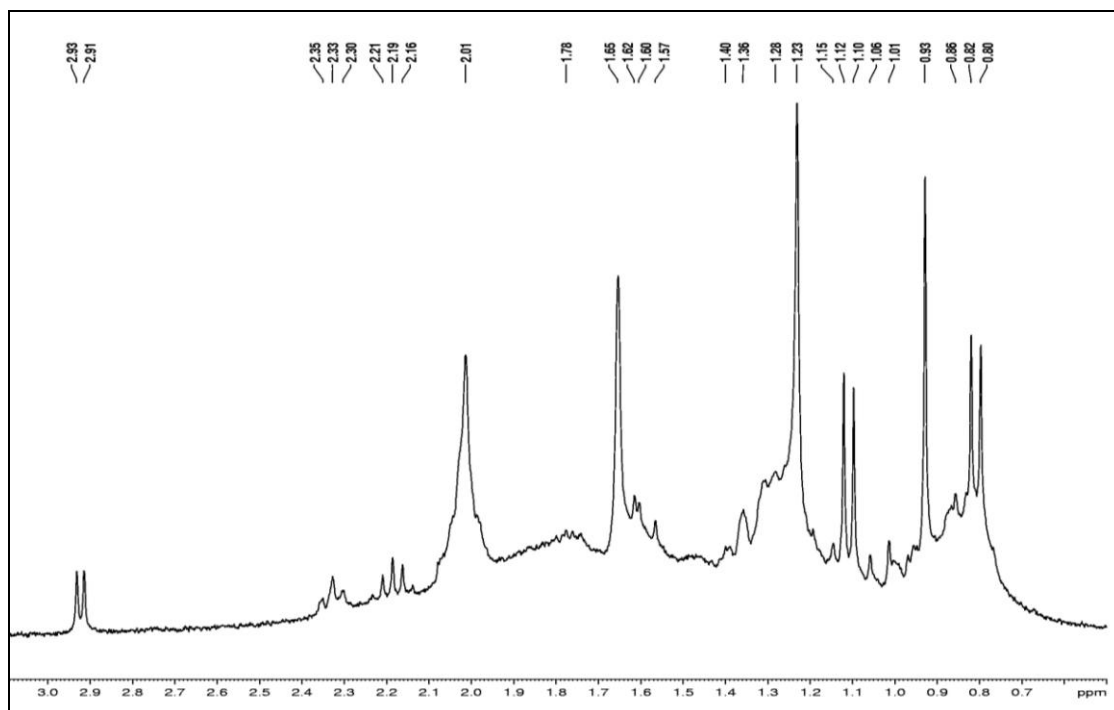
Tabela 15 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **6** (300/75 MHz, CDCl_3) e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de **(1)**

C/H	(6)		(1)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J]	$\delta^{13}\text{C}$
1	30,1	1,48 m; 1,83 m	30,5
2	24,9	1,61 m; 1,75 m	31,2
3	31,3	0,94 m; 0,99 m	29,8
4	35,4	1,79 ddd (11,79; 7,00, 4,49)	38,6
5	37,6	-	39,2
6	31,8	1,31 m; 1,36 m	37,4
7	30,0	1,47 m	33,5
8	28,6	1,61 m	32,2
9	61,0	2,92 dd (5,06;1,07)	117,2
10	65,5	-	146,5
11	43,7	-	44,2
12	179,2	-	182,6
13	13,6	1,12 d (7,02)	13,8
14	17,7	0,93 s	20,7
15	15,1	0,78 d (7,06)	15,5

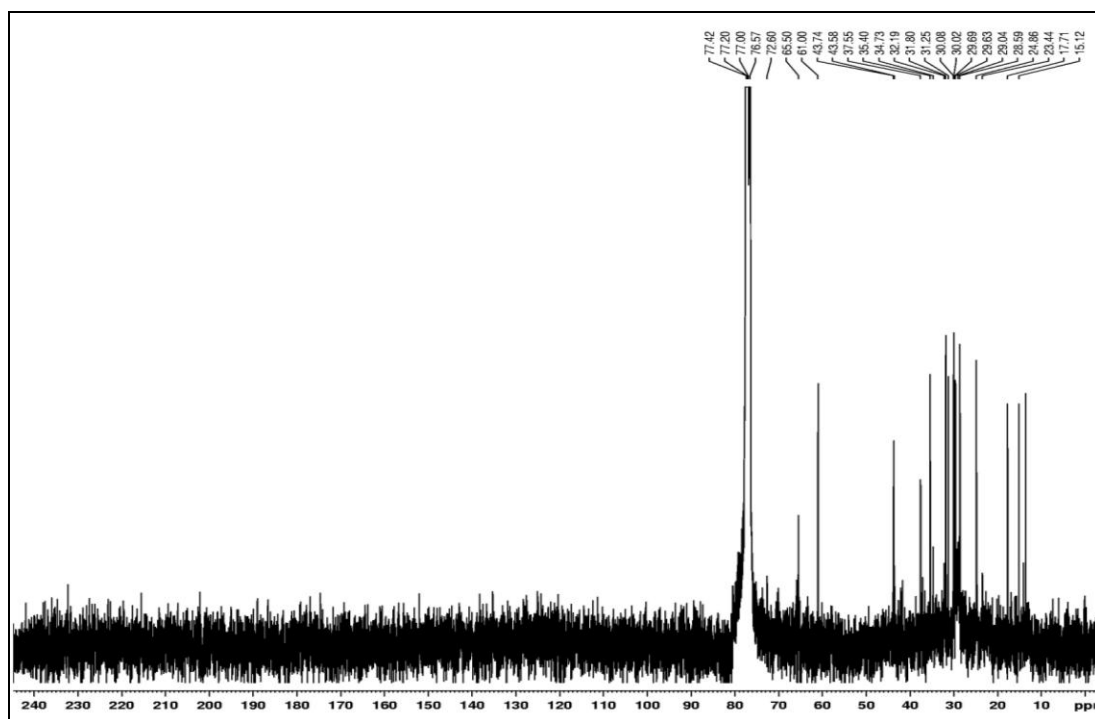
Tabela 16. Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de **(6)** (300/75 MHz, CDCl₃)

C/H	HSQC (6)		HMBC (6) (H → C)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	
1	30,1	1,48 m; 1,83 m	
2	31,3	0,94 m; 0,99 m	
3	24,9	1,61 m; 1,75 m	
4	35,4	1,79 ddd (11,79; 7,00, 4,49)	
5	37,6	-	
6	31,8	1,31 m; 1,36 m	
7	30,0	1,47 m	C-9
8	28,6	1,61 m	
9	61,0	2,92 dd (5,06;1,07)	C-1; C-8
10	65,5	-	
11	43,7	-	
12	179,2	-	
13	13,6	1,12 d (7,02)	C-7; C-11; C-12
14	17,7	0,78 d (7,06)	C-1; C-4; C-5
15	15,1	0,93 s	C-4; C-5; C-6; C-10

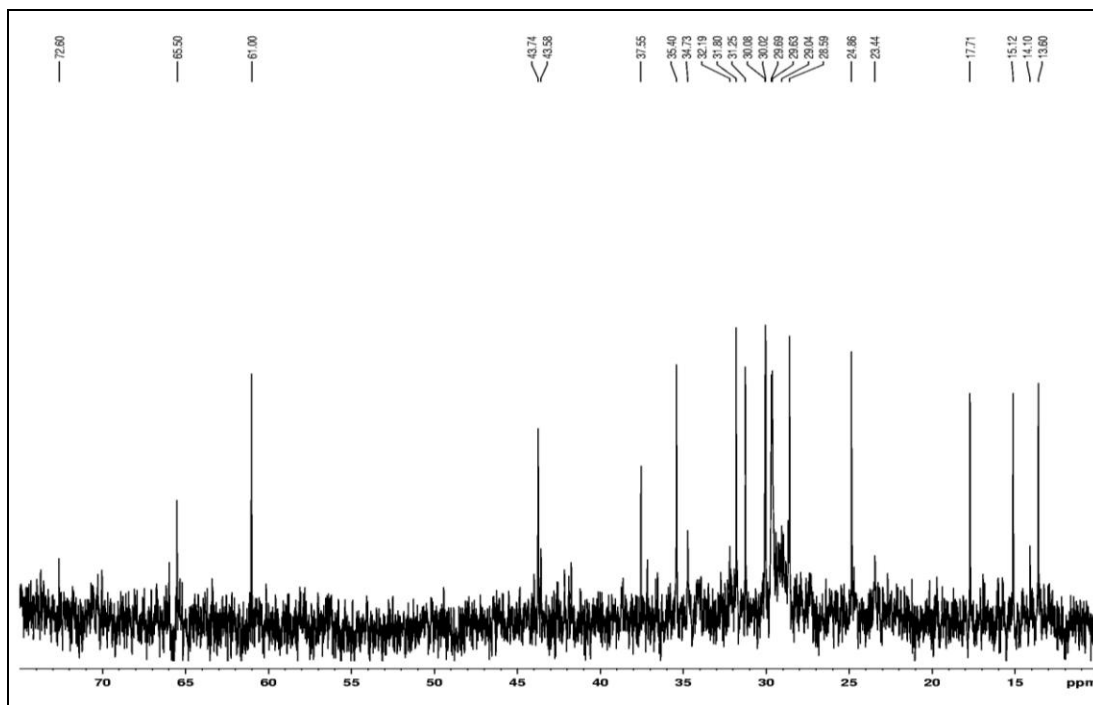
**Espectro 90.** Espectro de RMN ¹H de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl₃)



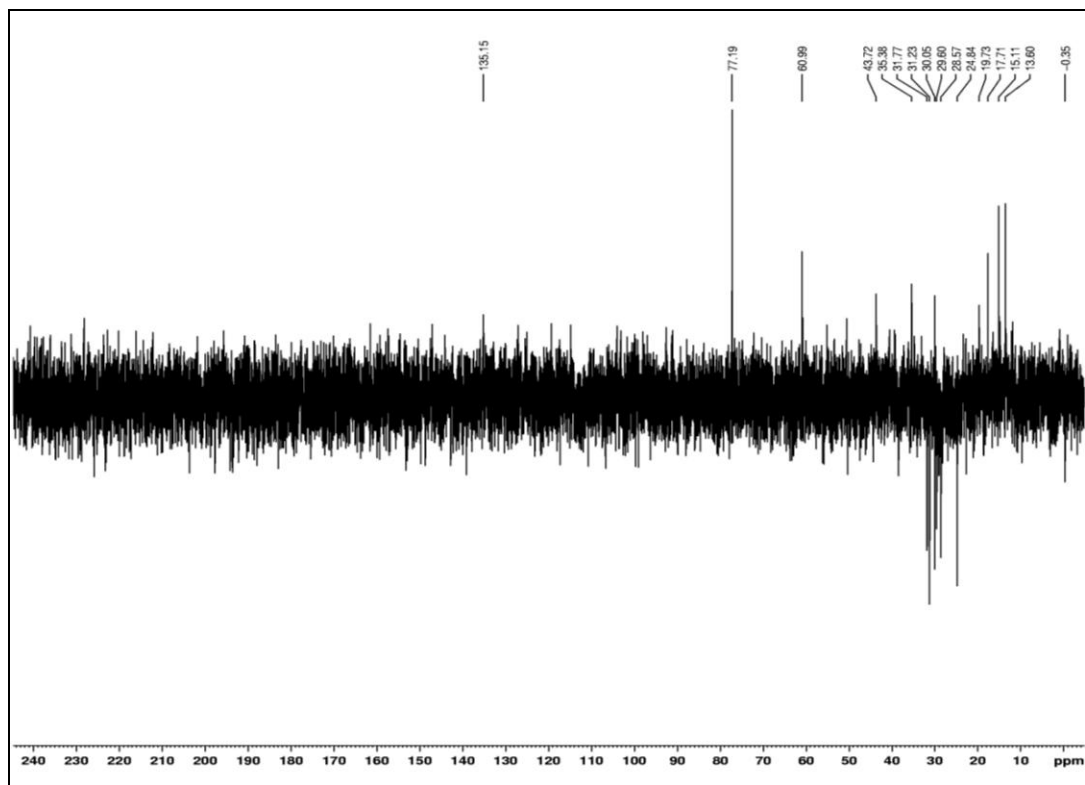
Espectro 91. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl_3)



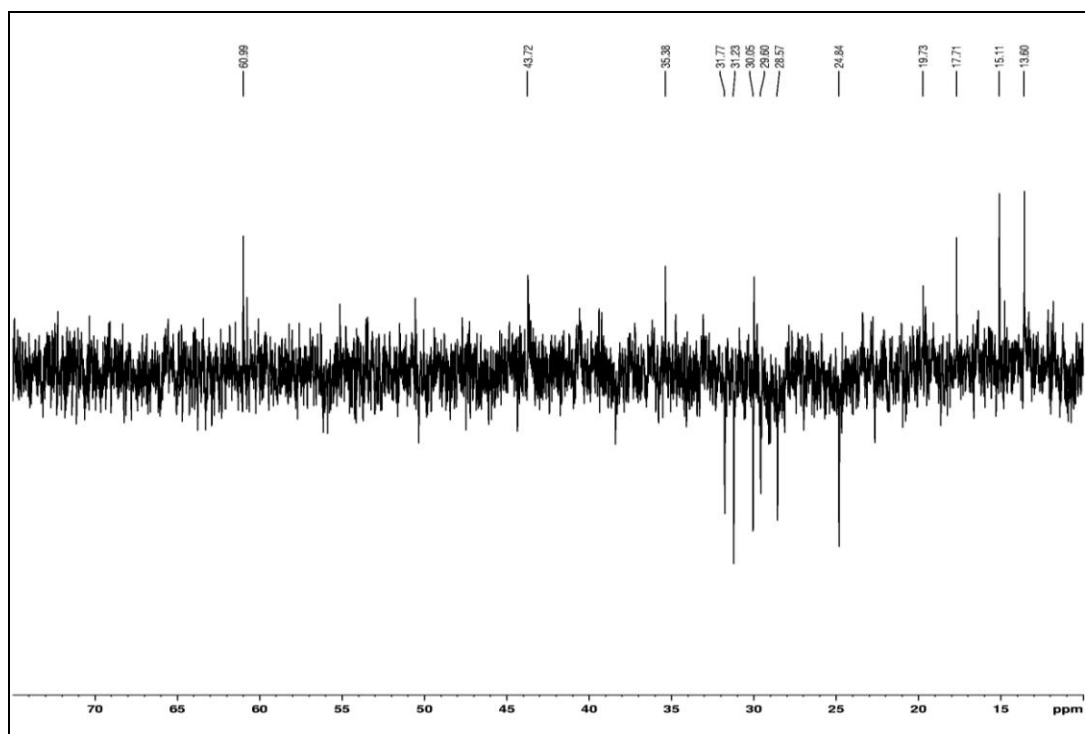
Espectro 92. Espectro de RMN ^{13}C de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)



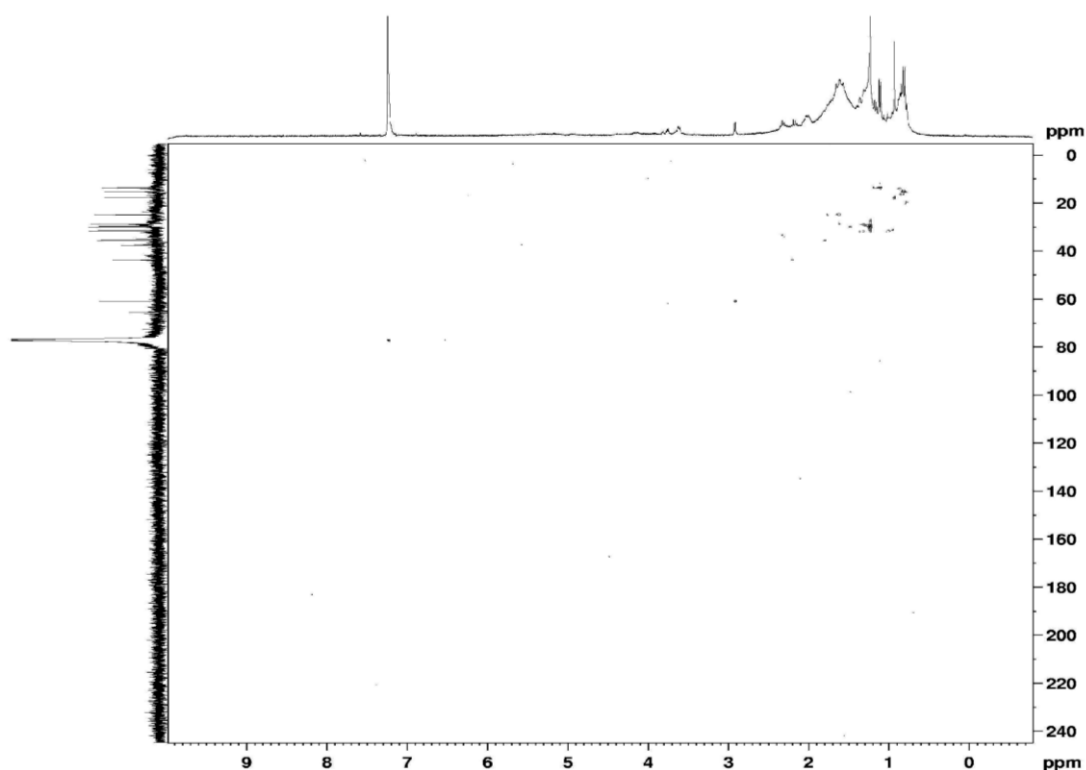
Espectro 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)



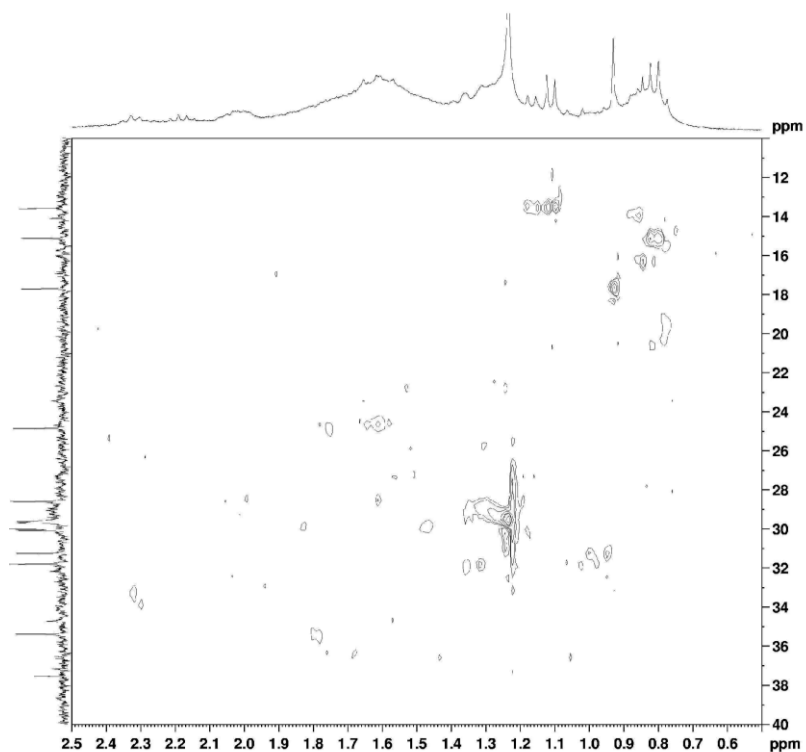
Espectro 94. Espectro DEPT 135° de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl_3)



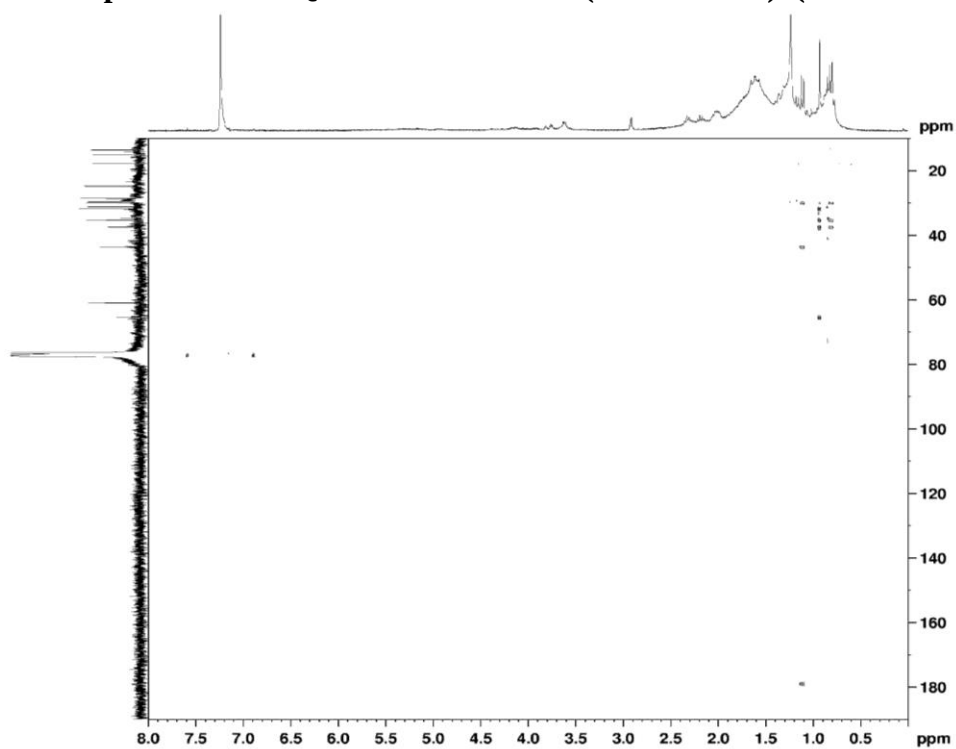
Espectro 95. Expansão do espectro DEPT 135° de OLGH22-112 (Substância 6) (75 MHz, CDCl₃)



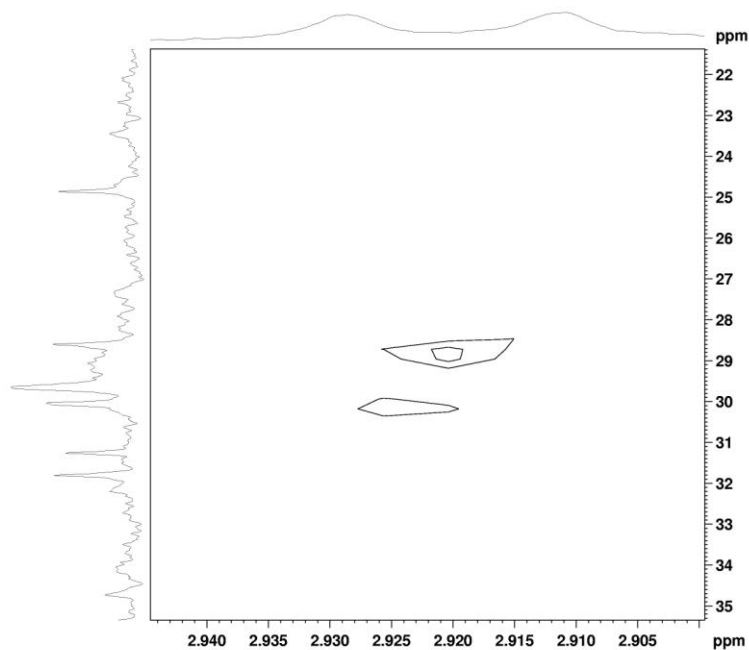
Espectro 96. Experimento HSQC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl₃)



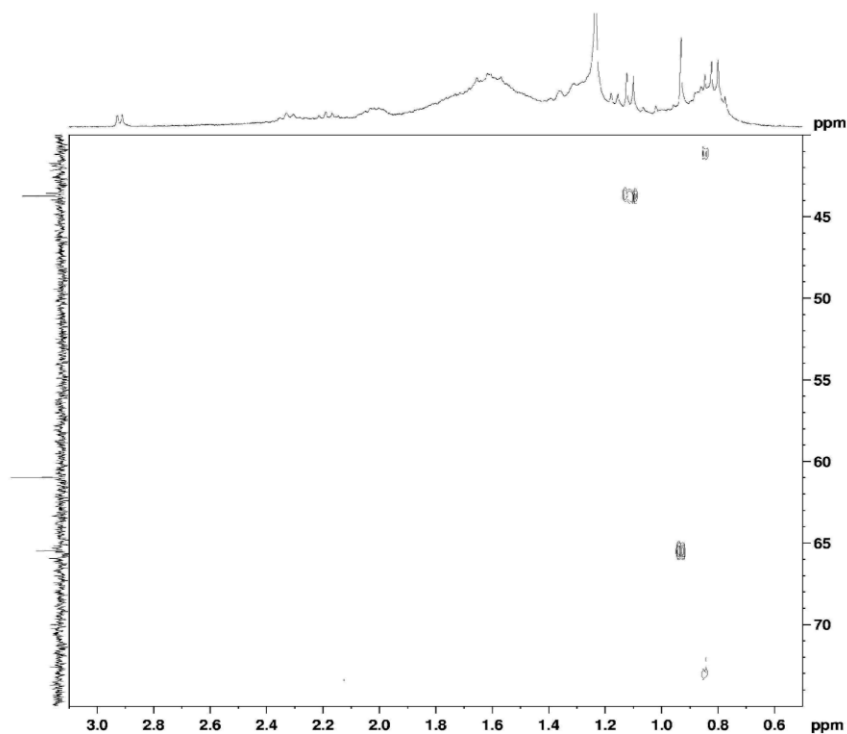
Espectro 97. Expansão do HSQC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl₃)



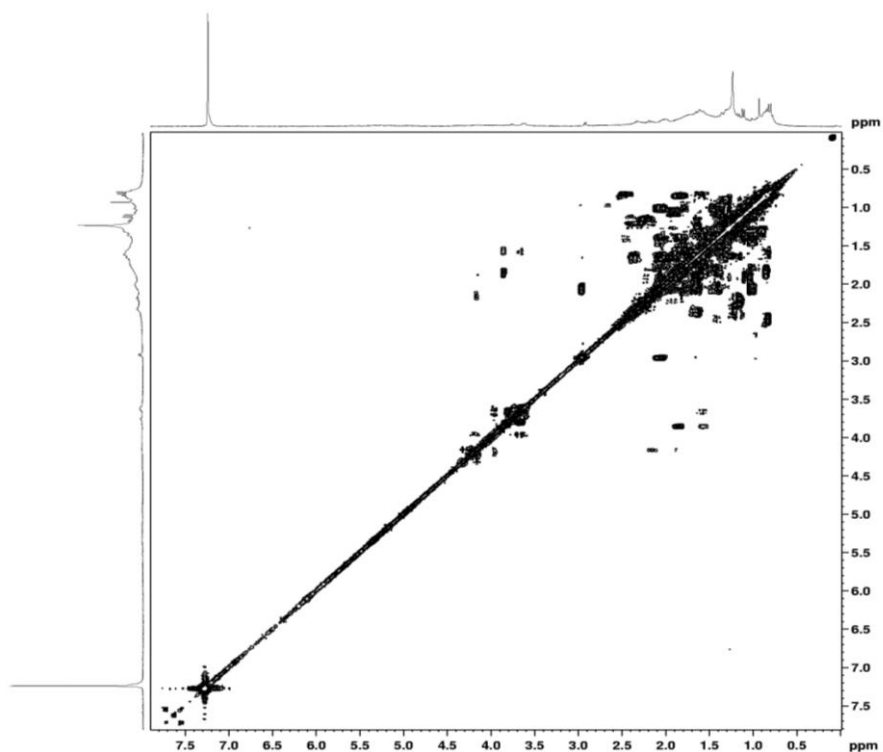
Espectro 98. Experimento HMBC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl₃)



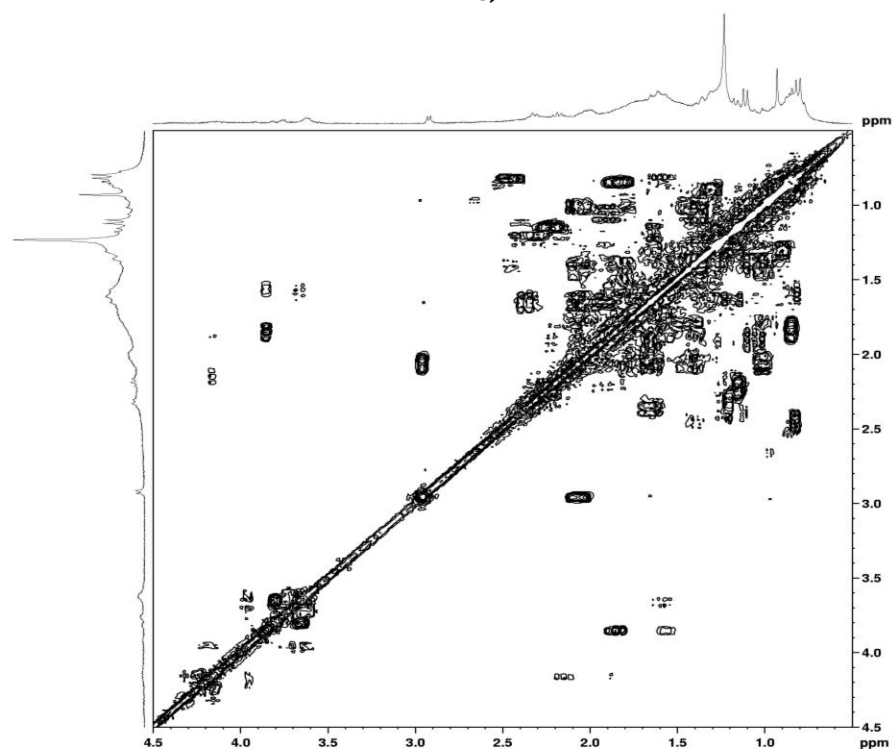
Espectro 99. Expansão do HBMC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)



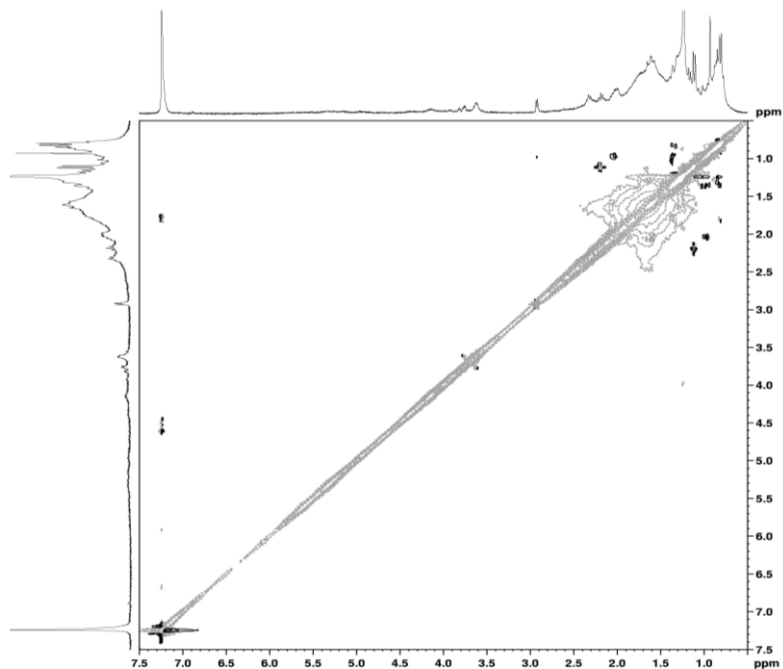
Espectro 100. Expansão do HMBC de OLGH22-112 (Substância 6) (300/75 MHz, CDCl_3)



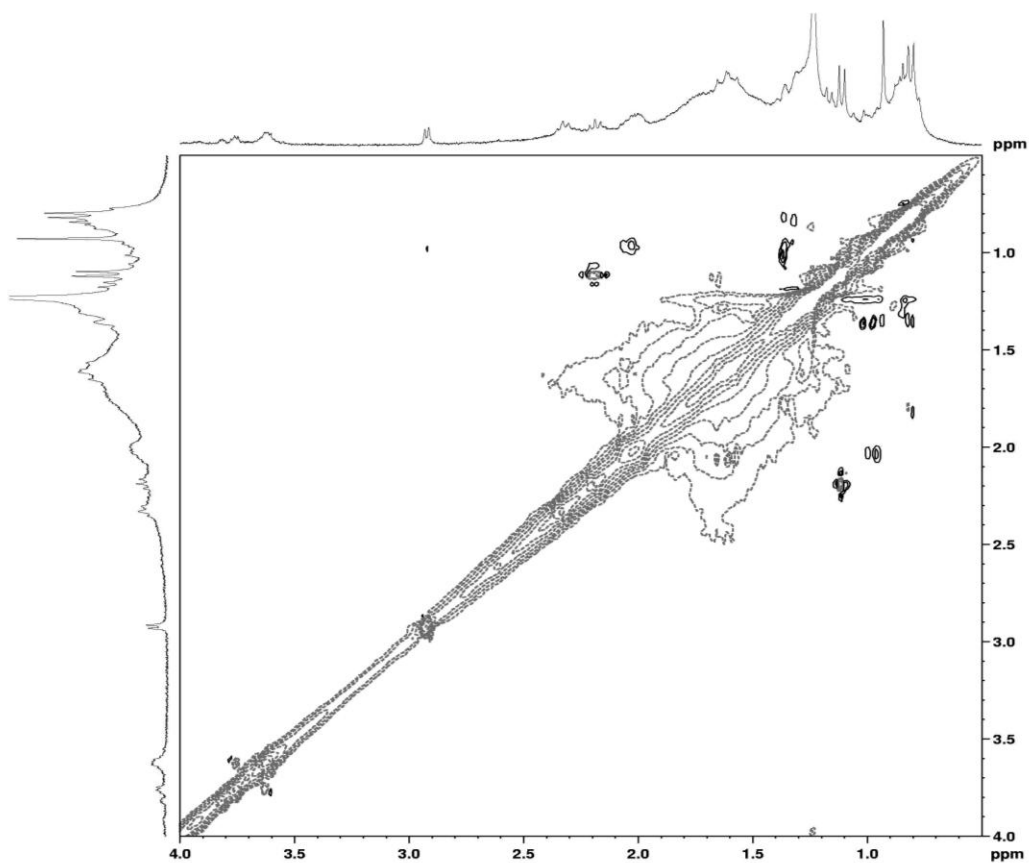
Espectro 101. Experimento COSY ^1H - ^1H de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl_3)



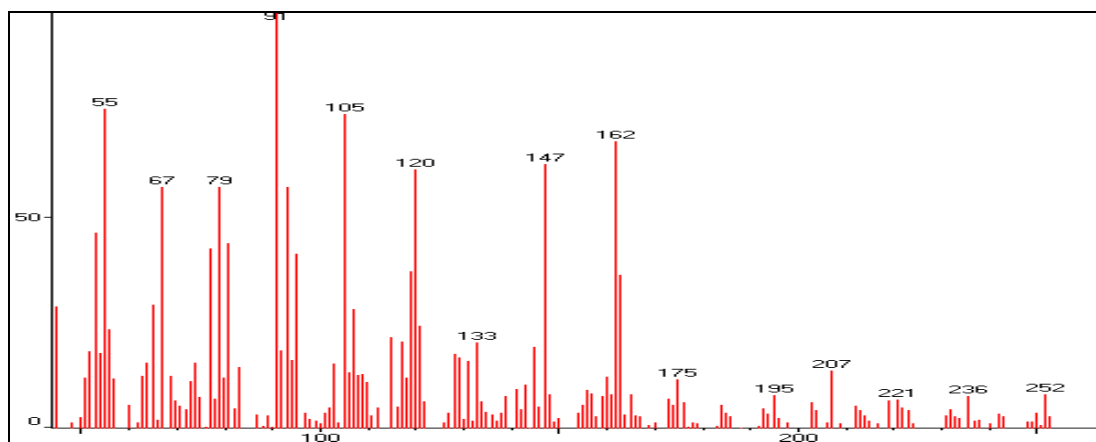
Espectro 102. Expansão do COSY ^1H - ^1H de OLGH22-112 (Substância 6) (300MHz, CDCl_3)



Espectro 103. Experimento NOESY de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 104. Expansão do NOESY de OLGH22-112 (Substância 6) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 105. EIMS (70 eV) de OLGH22-112 (Substância 6) (CDCl_3)

5.1.7 Substância 7

O composto **7** foi obtido na fração OLGH3-3749 (18), originada de fracionamentos cromatográficos da fase hexânica das folhas, obtida do extrato etanólico, como componente minoritário em mistura com o sesquiterpeno Epatulenol (**8**).

O espectro de RMN de ^1H de **7** [Espectros 106 - 107; Tabela 17, p.128] apresentou três sinais relativos a metilas, dos quais dois são singletos (δ 0,82 e δ 1,70) referentes a uma metila ligada a carbono quaternário e outra ligada a carbono olefínico, e um dubleto (δ 0,77); observou-se, também, sinais em δ 4,64 e δ 4,67, relativos a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos.

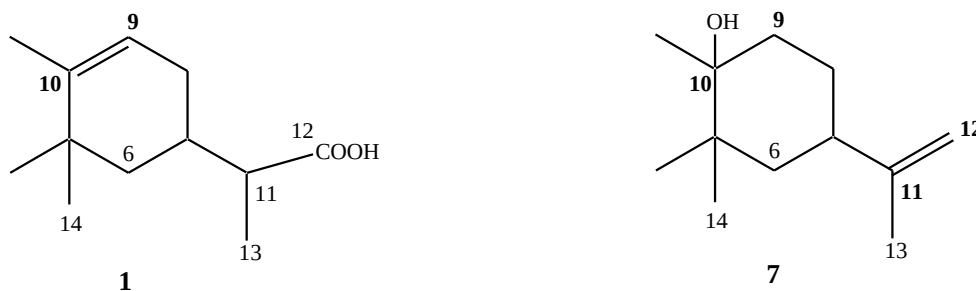
Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° de **7** [Espectros 108 - 110; Tabela 17, p.128] apresentaram um conjunto de 15 sinais, sendo estes atribuídos a três metilas, sete carbonos metilênicos, sendo um deles de ligação dupla, dois carbonos metínicos e três carbonos não ligados a hidrogênios, sendo um olefínico e outro ligado a oxigênio. Estes dados levam à proposição inicial da fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ e, portanto, de que se trata de um sesquiterpeno bicíclico (IDH igual a 3) onde o carbono de uma das metilas originais do esqueleto está na forma de ligação dupla.

Tendo em vista que os dados de RMN de **7** são compatíveis com um esqueleto eremofilano, admitiu-se esta possibilidade para o mesmo. Os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos são compatíveis com a ligação dupla na “isopropila”. Esta proposta foi confirmada pelo experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ [Espectro 116 -117, p.137], que mostrou o acoplamento entre os hidrogênios a δ 1,70 (Me – 13) e os hidrogênios a δ 4,64 e δ 4,67 (H – 12).

As possibilidades para a localização da hidroxila são C-4, C-7 e C10. A presença de sinal de uma metila como dubleto no espectro de RMN ^1H inviabiliza a possibilidade da mesma se encontrar em C-4 e a correlação no experimento HMBC [Espectro 113- 115, Tabela 18, p.128] dos hidrogênios da metila a δ 0,82 (H-14) com o carbono em δ 73,1 (C-10) possibilitou definir a estrutura de **7** como sendo a do 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-11-en-10 α -ol.

Os dados observados nos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC [Espectros 111 – 115, p.134-136] permitiram efetuar as atribuições constantes na Tabela 18.

A proposta formulada pôde ser confirmada pelo experimento HMBC observando-se a correlação dos hidrogênios em δ 0,84 (Me-14) com o carbono em δ 73,2 (C-10), confirmando a posição da hidroxila em C-10 e, ainda, a correlação dos hidrogênios a δ 1,70 (Me-13) com os carbonos em δ 150,5 (C-11) e δ 108, 2 (C-12).



A estereoquímica da junção dos anéis foi proposta com base no deslocamento químico da metila C-14, observada em 15,4 δ , o que é compatível com uma junção *trans*.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C desta substância caracterizada para a substância **7** como sendo 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-11-en-10 α -ol (**Figura 19**) apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para o $\Delta^{11(12)}$ eremofil-10 β -ol (ITOKAWA *et al.*, 1987).

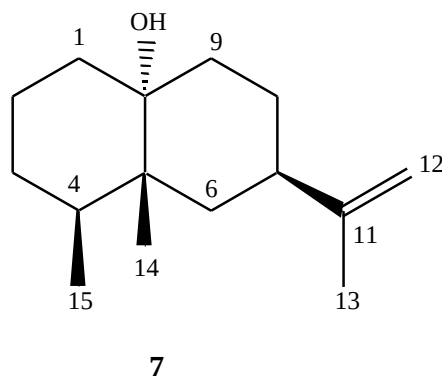


Figura 19 - Estrutura da substância **7**.

Tabela 17 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **7** e dados de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) de $\Delta^{11(12)}$ eremofilen-10 β -ol (ITOKAWA *et al.* 1987).

	(7)	(7)	Literatura (ITOKAWA <i>et al.</i> 1987).
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J]	^{13}C
1	36,7	1,27 m; 1,40 m	36,6
2	22,9	1,46 m	23,0
3	32,7	1,25 m; 1,32 m	32,9
4	38,7	2,38 dd (6,9; 1,9)	38,8
5	41,1	-	41,2
6	36,7	0,91 m	36,8
7	33,0	2,20 dddd (11,7; 4,7)	33,1
8	26,7	1,58 m	26,8
9	30,1	1,32 m; 1,41 m	30,2
10	73,1	-	73,2
11	150,5	-	150,5
12	108,2	4,64 sl; 4,67 sl	108,2
13	20,9	1,70 sl	21,0
14	15,4	0,84 sl	15,4
15	15,3	0,77 (6,9)	15,4

Tabela 18. Correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC de **(7)** (300/75 MHz, CDCl_3)

	HSQC (7)		HMBC (7)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	(H $\rightarrow$ C)
1	36,7	1,27 m; 1,40 m	
2	22,9	1,46 m	
3	32,7	1,25 m; 1,32 m	
4	38,7	2,38 dd (6,9; 1,9)	
5	41,1	-	
6	36,7	0,91 m	
7	33,0	2,20 dddd (11,7; 4,7)	
8	26,7	1,58 m	
9	30,1	1,32 m; 1,41 m	
10	73,1	-	
11	150,4	-	
12	108,1	4,64 sl; 4,67 sl	
13	20,9	1,70 sl	C-11; C-12
14	15,4	0,84 sl	C-1; C-5; C-7; C-10
15	15,3	0,77 (6,9)	C-3; C-5

5.1.8 Substância 8

Nas frações OLH3-B30 e OLH3-3749(18) foi caracterizado a substância **8**, em mistura com a substância **7**, porém como produto principal [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.3.1, p. 30].

Pode-se observar no espectro de RMN ^{13}C desta substância [Espectro 108 - 109; Tabela 19, p.131] um conjunto de quinze sinais relacionados a três metilas, cinco carbonos metilênicos (sendo um deles olefínico), quatro metínicos e três carbonos não ligados a hidrogênios. Entre os sinais listados, observou-se sinais deslocamentos químicos atribuídos a carbonos oxigenados (δ 80,8), indicando um álcool terciário, e a carbonos olefínicos δ 153,2 (C) e δ 106,2 (CH_2) e um carbono quaternário em δ 20,5. Este conjunto de sinais permitiu definir a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, compatível com uma estrutura tricíclica e com características de pertencer à classe dos sesquiterpenos.

O espectro de RMN ^1H desta fração [Espectro 106 - 107, Tabela 19, p.131], apresentou os seguintes sinais relativos a substância **8**: três singletos, em δ 1,02 e δ 1,03, referentes a grupos metila ligados a carbonos quaternários, e δ 1,25, provavelmente referente a grupo metila ligado a carbono carbinólico terciário. Apresentou também, os singletos largos em δ 4,64 e δ 4,66 relativos a sinais de hidrogênios metilênicos de ligação dupla, além de um tripleto em δ 0,44 (10,4 Hz) e um multipeto em δ 0,70. Estes últimos são sugestivos de hidrogênios ligados a carbonos de um anel ciclopropânico, o que é compatível com o carbono quaternário com deslocamento químico de δ 20,5.

Sesquiterpenos tricíclicos contendo anel ciclopropânico levam à hipótese de tratar-se de um composto com esqueleto aromadrendano. Admitindo-se estruturas com este esqueleto, possuindo um álcool terciário e uma ligação dupla $\text{C}=\text{CH}_2$, só podem originar duas possibilidades (**Figura 20**). Entre as estruturas possíveis para **8**, considerando-se as de ocorrência mais frequentes em plantas e as variações estereoquímicas pode-se listar três substâncias: ledol, globulol e espatulenol.

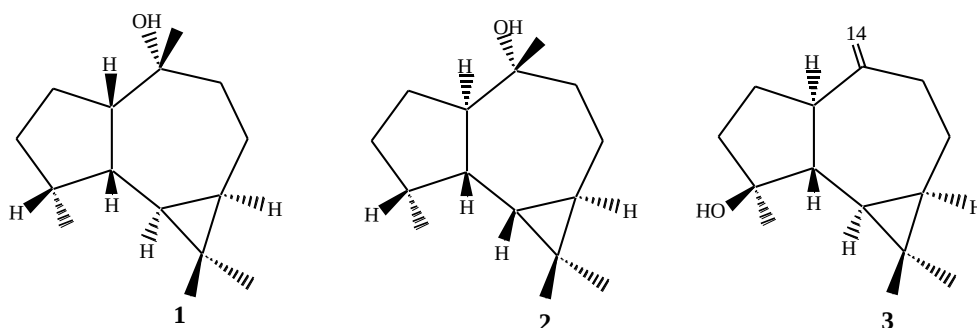


Figura 20. Estruturas gerais possíveis para **8**: ledol (1), globulol (2), e espatulenol (3).

A comparação dos dados de RMN de ^{13}C da substância presente da fração OLH3-B30 com os sesquiterpenos possuindo os arranjos estruturais acima permitiu verificar uma boa correlação com os dados do espatulenol, levando à definição da identidade da substância **8** (Figura 21).

A literatura mostra que o espatulenol possui atividades antibacteriana e repelente contra formigas (*Atta cephalotes*) (ULUBELEN *et al.*, 1994; HUBERT & WIEMER, 1985) e que este composto já havia sido isolado de plantas da família Lauraceae (FARAGO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005).

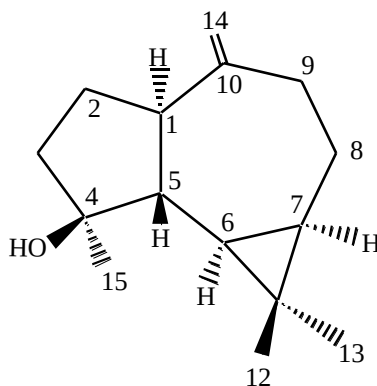
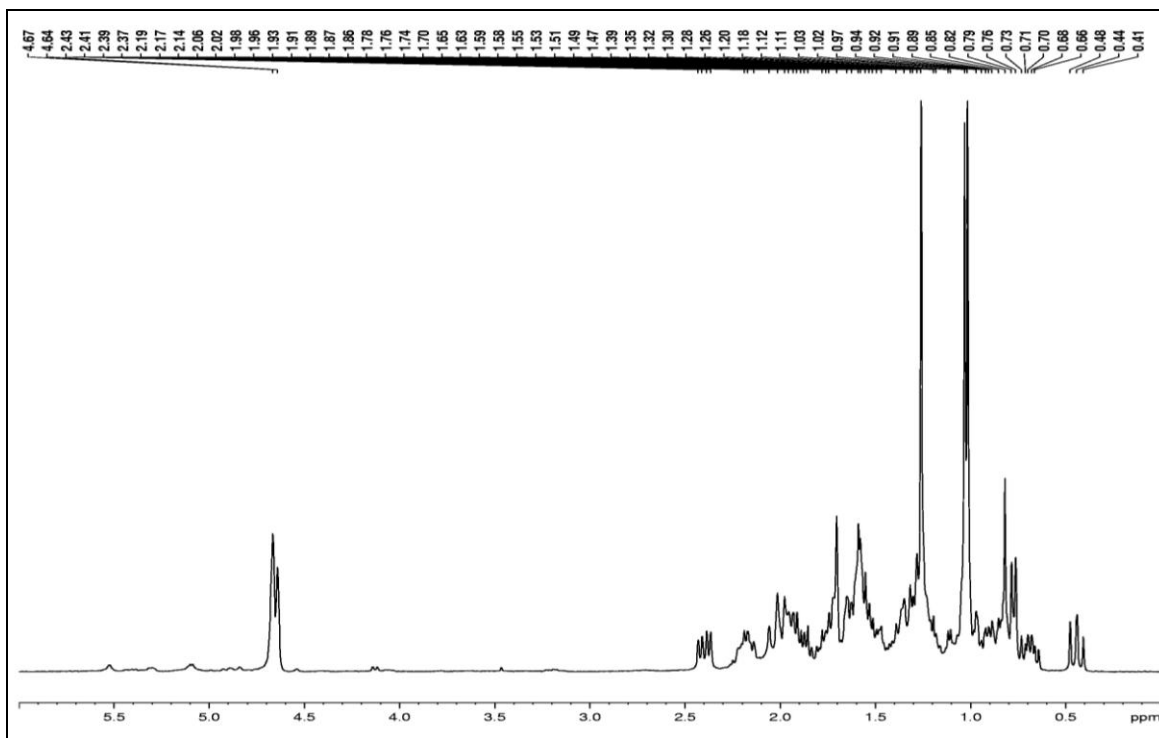


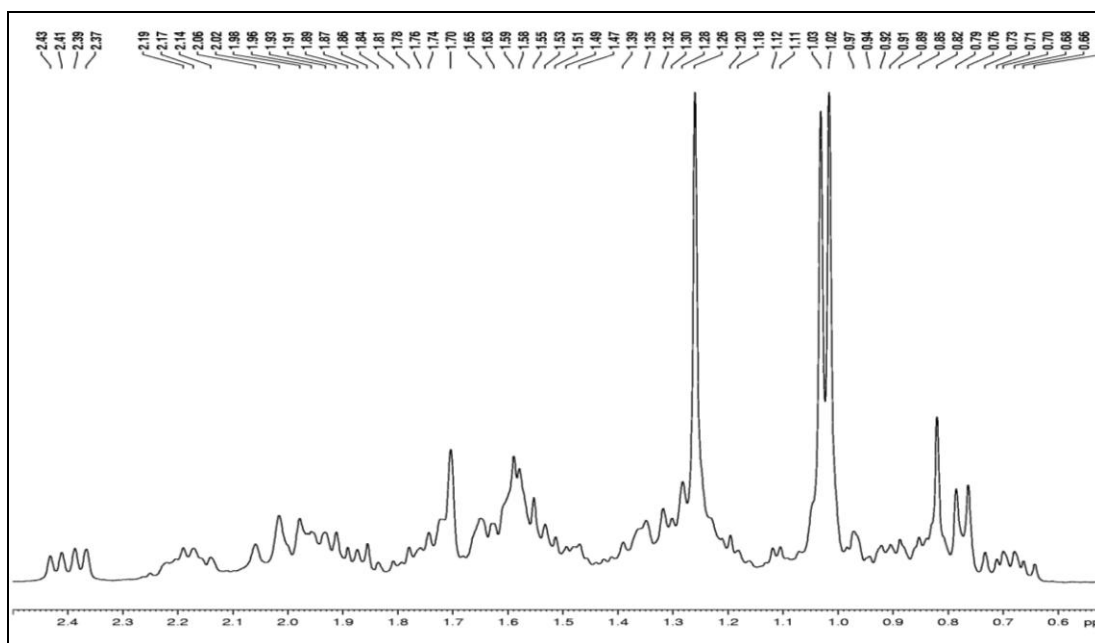
Figura 21 - Estrutura do espatulenol.

Tabela 19. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno espatulenol (**8**) e dados do espatulenol da literatura (LAGO *et al.*, 2000)

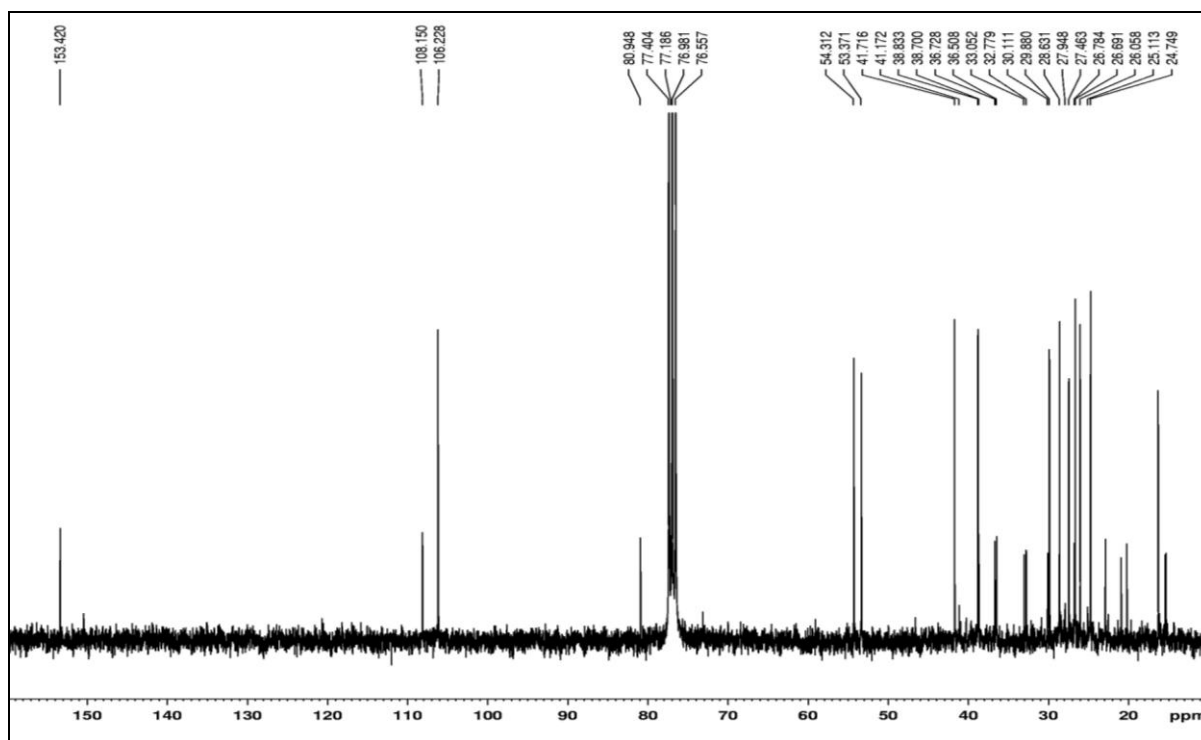
C/H	$\delta ^1\text{H}$ [<i>m</i> , <i>J</i> (Hz)]	(8) $\delta ^{13}\text{C}$	Literatura LAGO <i>et al.</i> , 2000
1		53,3	54,3
2		26,7	26,7
3		41,6	41,7
4		80,8	80,9
5		54,2	53,3
6		29,8	29,9
7	0,44 <i>t</i> (10,4)	27,0	27,4
8	0,69 <i>m</i>	25,0	24,8
9		38,8	38,8
10		153,2	153,4
11		20,5	20,2
12	1,02 <i>s</i>	16,2	16,2
13	1,03 <i>s</i>	28,6	28,6
14	4,67 <i>sl</i> ; 4,64 <i>sl</i>	106,2	106,6
15	1,25 <i>s</i>	25,6	26,0



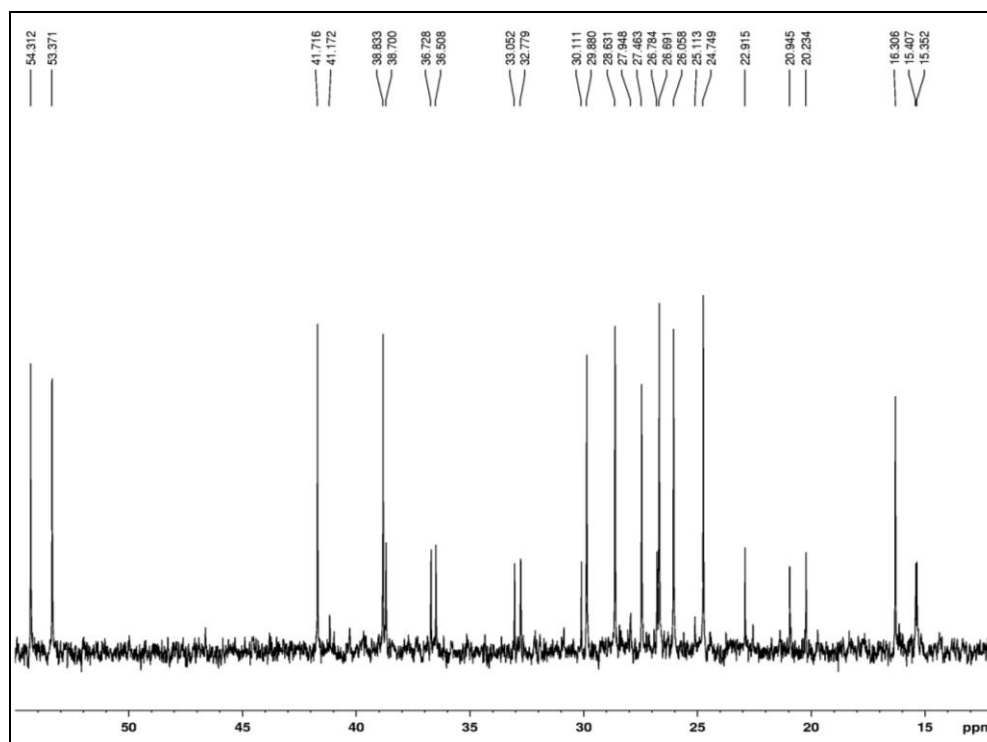
Espectro 106. Espectro de RMN ^1H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3)



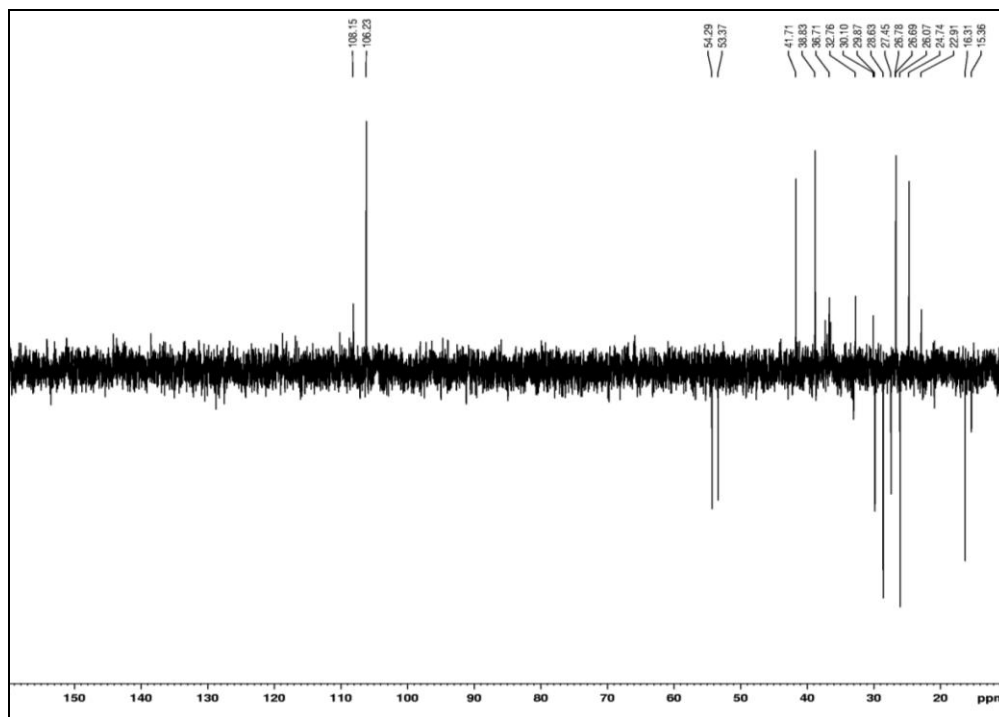
Espectro 107. Expansão do espectro de RMN ^1H de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3)



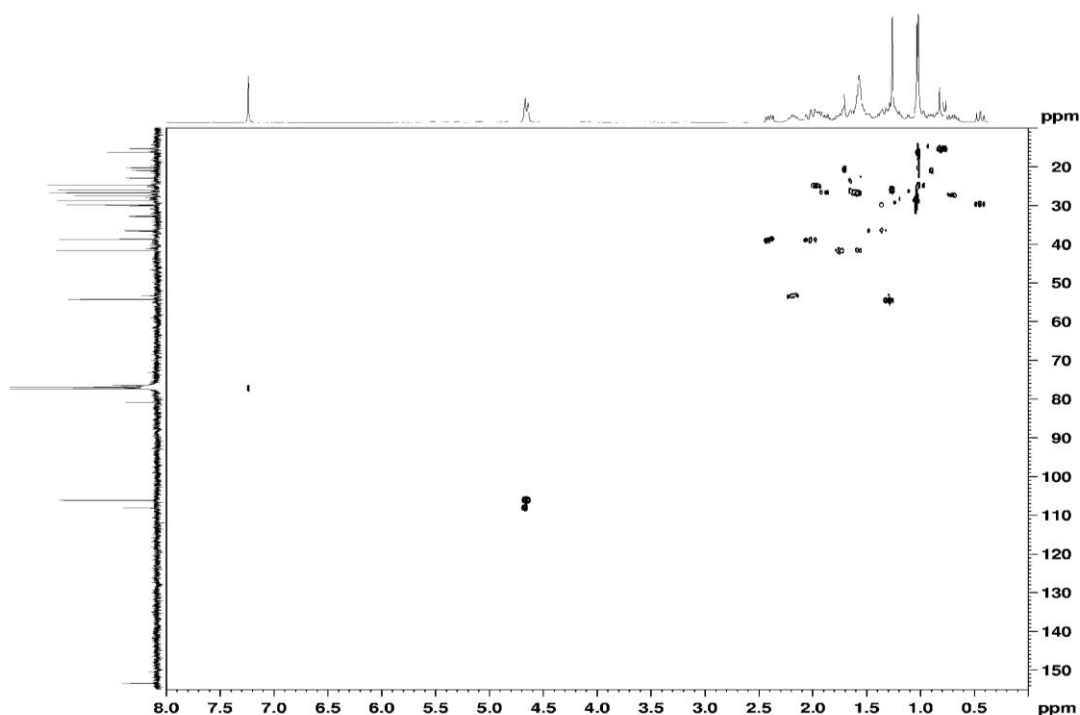
Espectro 108. Espectro de RMN ^{13}C de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl_3)



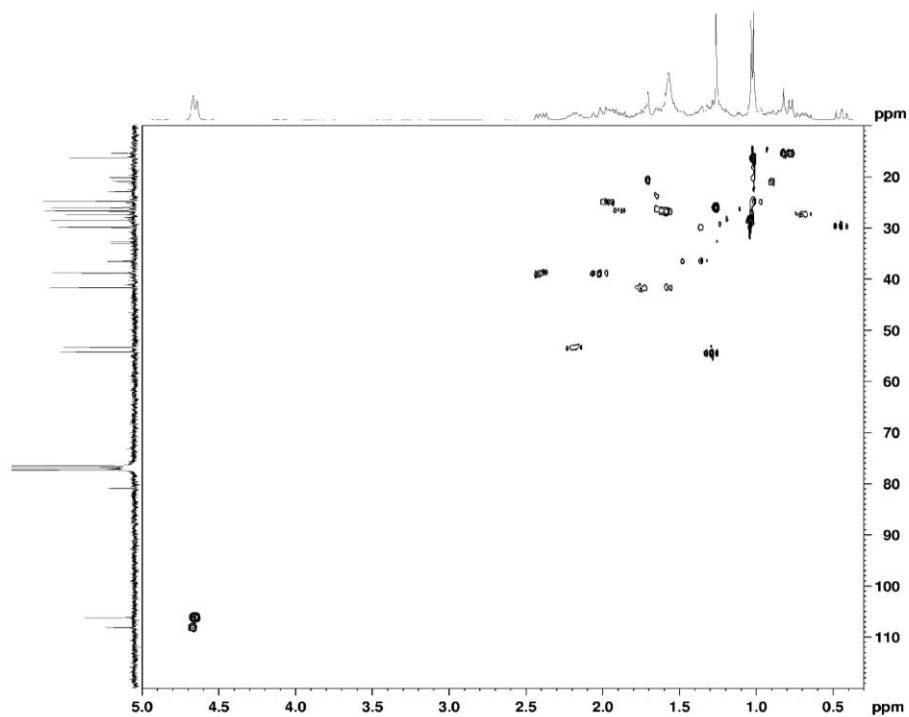
Espectro 109. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl_3)



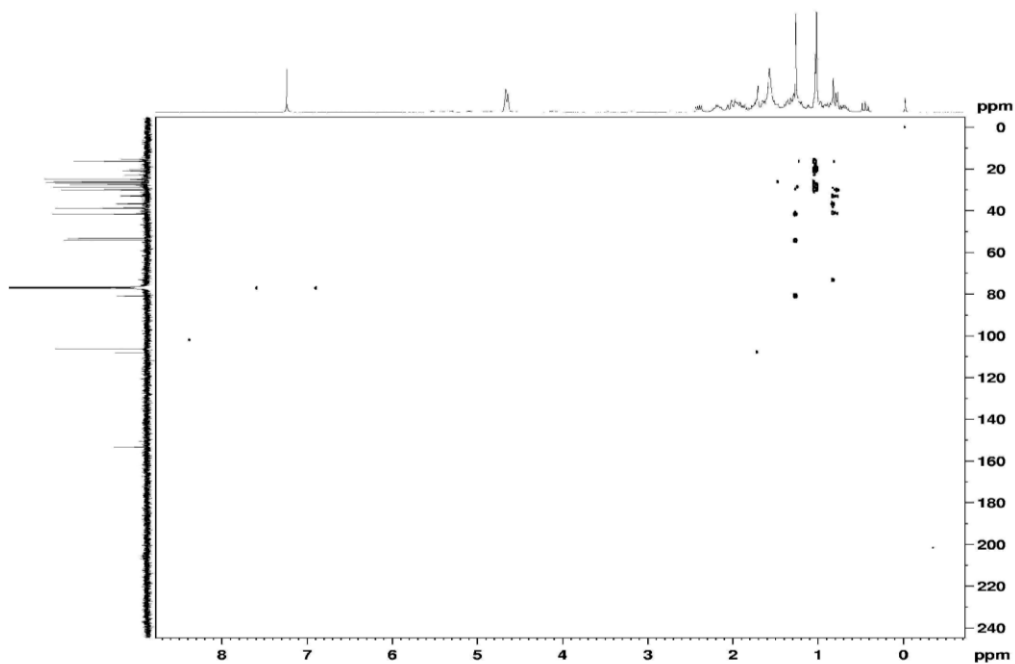
Espectro 110. Espectro DEPT 135° de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (75 MHz, CDCl₃)



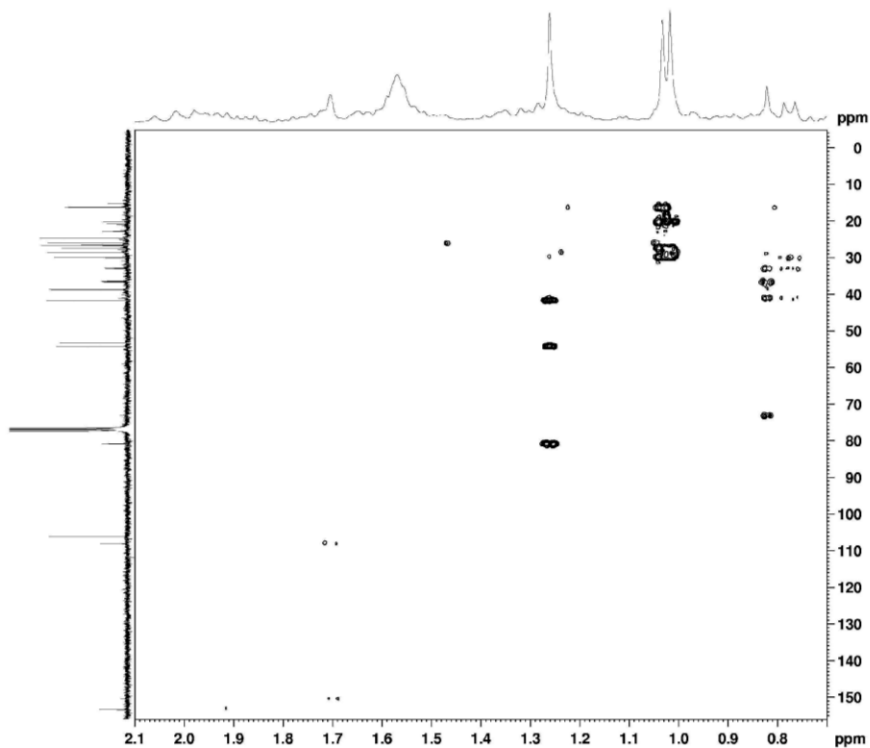
Espectro 111. Experimento HSQC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl₃)



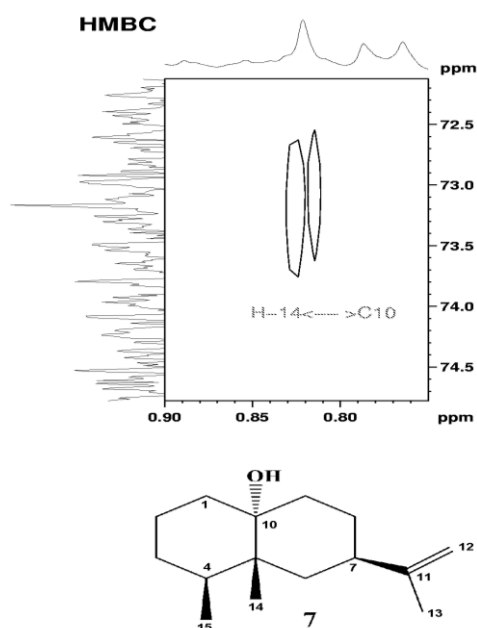
Espectro 112. Expansão do HSQC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl_3)



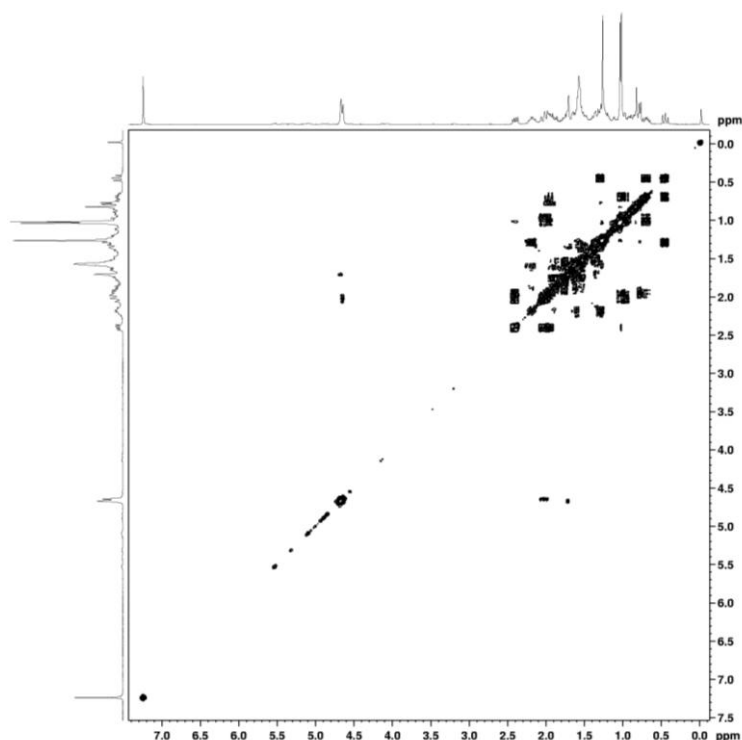
Espectro 113. Experimento HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl_3)



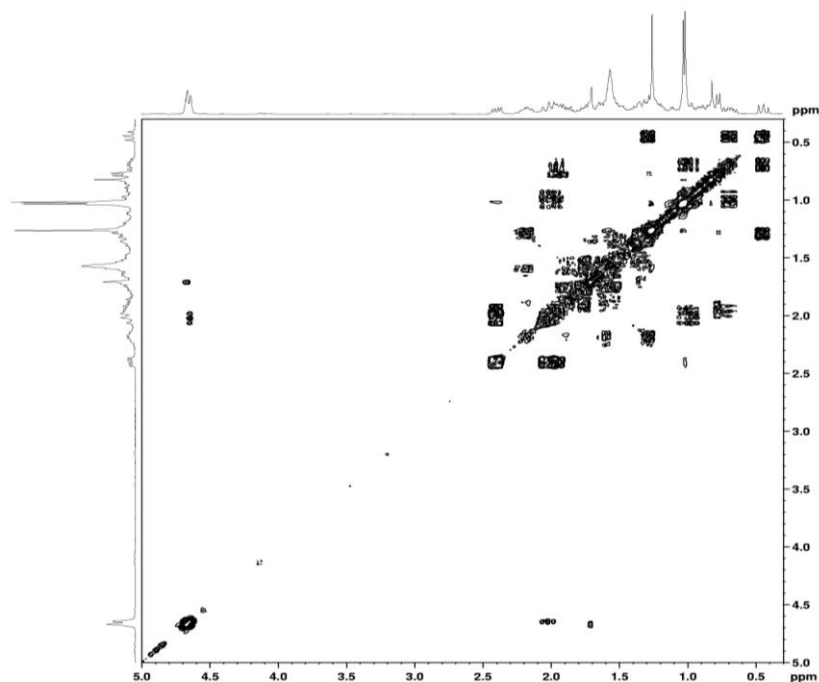
Espectro 114. Expansão do HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl₃)



Espectro 115. Expansão do HMBC de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300/75 MHz, CDCl₃)



Espectro 116. Experimento COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 117. Expansão do COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de OLH3-3749(18) (Substâncias 7 e 8) (300 MHz, CDCl_3)

5.2 Flavonoides

5.2.1 Substância 9

O composto **9** foi isolado por CLAE semi-preparativa - fase reversa (C-18) das frações OL4-S38-40 e OL5-S50-51, originárias da fase hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia* [descritas em Materiais e Métodos **4.4.1.2**, p.25; **4.8.2**, p. 39].

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 ° [Espectros 119 - 120; Tabela 20, p.139] de **9** foi observada a presença de sinais relativos a quinze carbonos, sendo um sinal de carbono metilênico saturado em δ 28,3, dois sinais de carbonos metínicos oxigenados em δ 67,5 e δ 79,4 e doze sinais na região de carbonos de anéis aromáticos, entre δ 95,6 e δ 157,6.

No espectro de RMN ^1H [Espectro 118; Tabela 20, p.139] pôde-se observar a presença de sinais característicos de hidrogênios ligados a anel aromático, entre δ 5,81 e δ 7,02, indicando a presença de dois anéis aromáticos. Observou-se, também, um sinal em δ 4,17 relativo a hidrogênio carbinólico e sinais em δ 2,67 e δ 2,85, relativos aos hidrogênios de um grupo metilênico.

O conjunto de sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicou que o composto **9** pertence à classe dos flavonoides com um esqueleto do tipo catequina. A comparação com os dados descritos na literatura levou à identificação deste composto como sendo a epicatequina (**Figura 22**). Este composto é de ocorrência comum em plantas e se constitui num dos precursores dos taninos condensados (LOBO *et al.*, 2005; AGRAWAL, 1989).

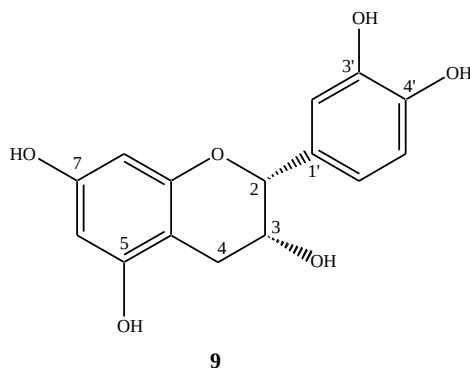
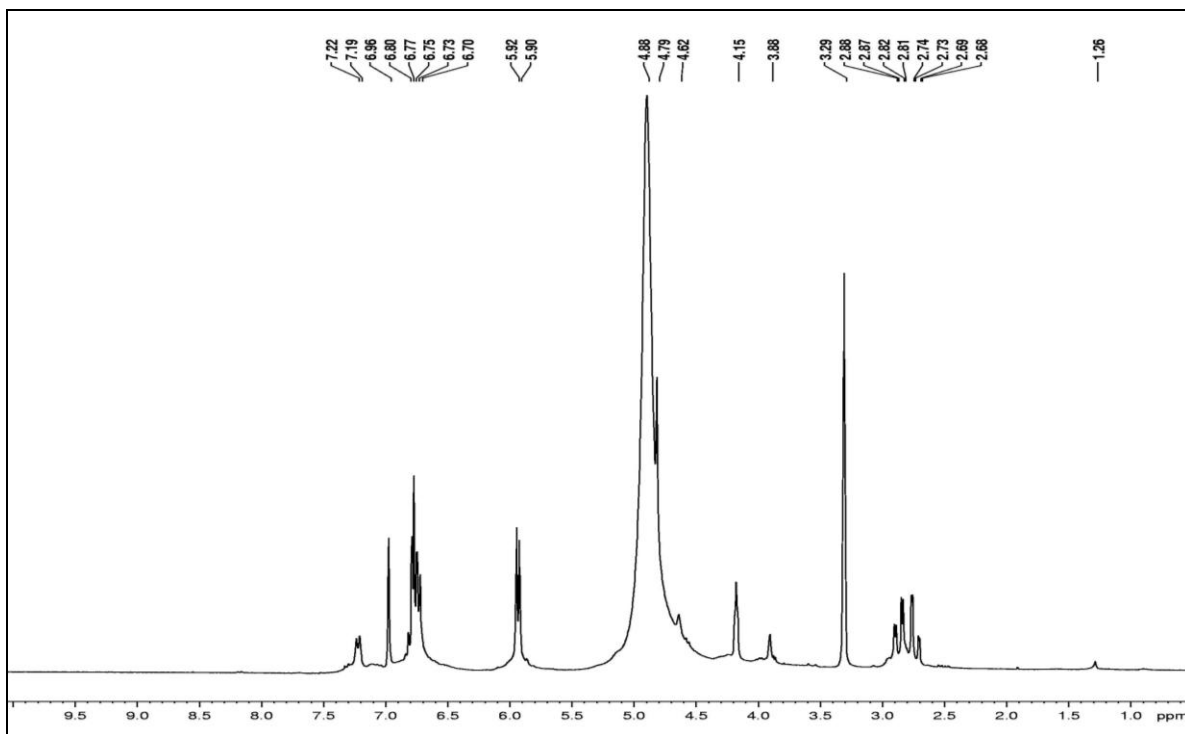


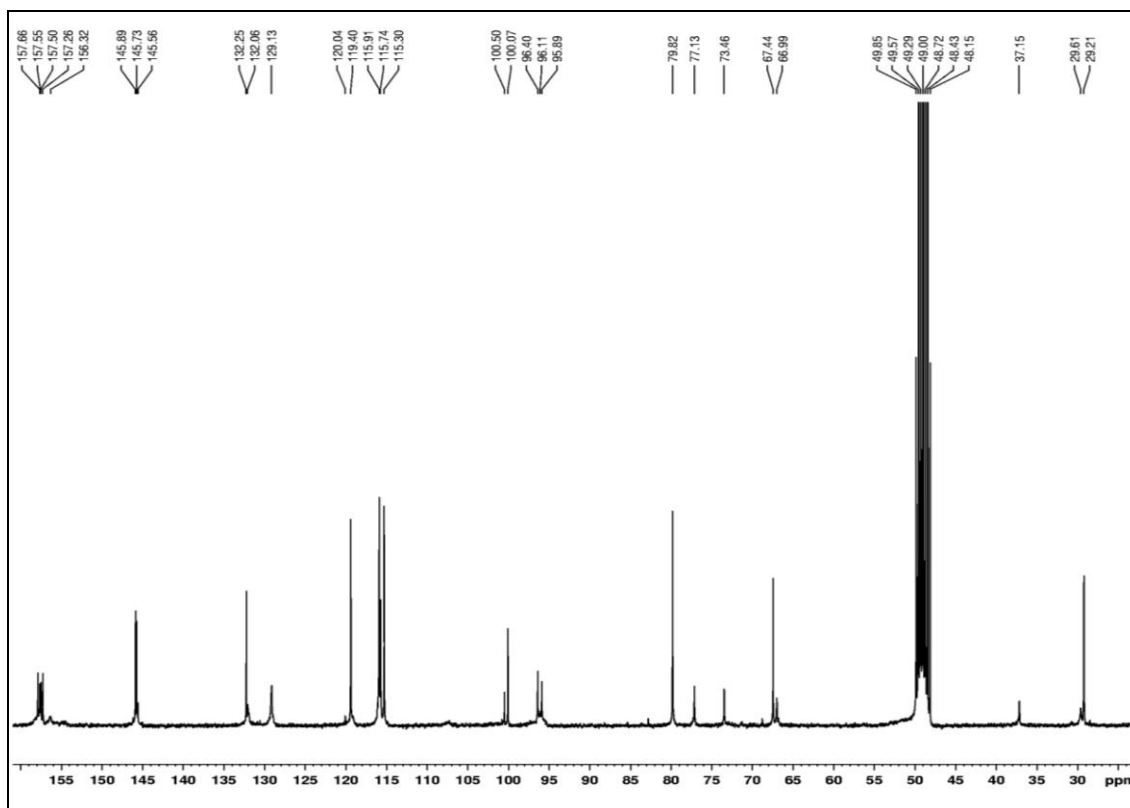
Figura 22. Estrutura da epicatequina.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300/75 MHz) e RMN de ^{13}C (75 MHz) em CD_3OD da Epicatequina (LOBO *et al.*, 2008)

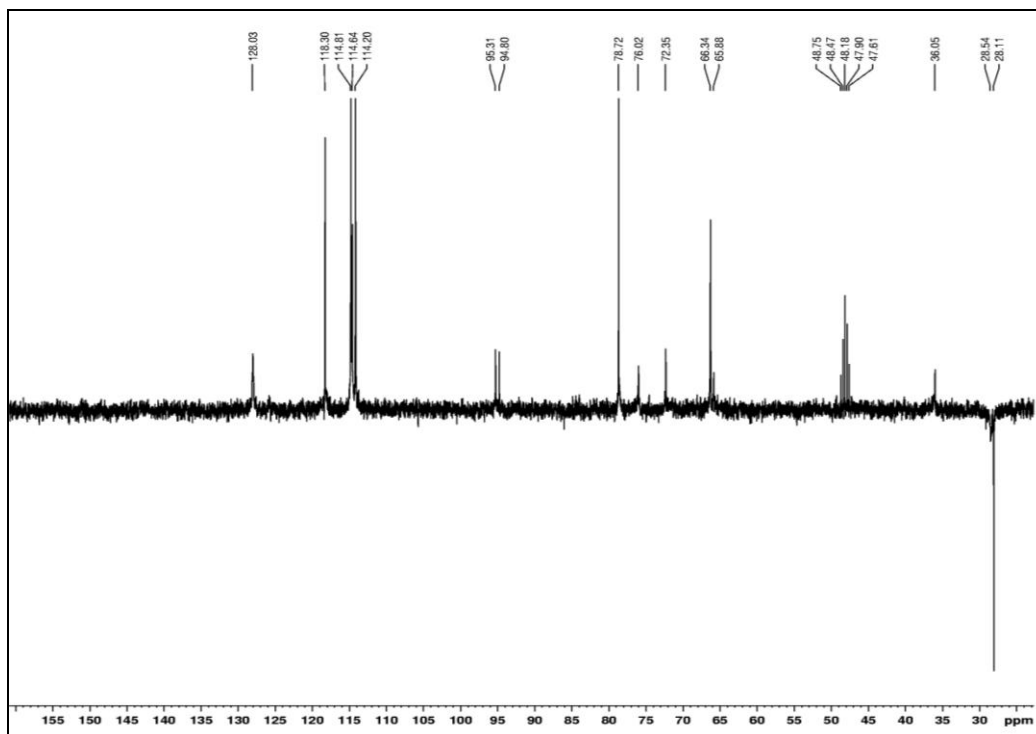
(9)			Literatura (LOBO <i>et al.</i> , 2008)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	79,1	4,78 m	79,1
3	66,8	4,14 m	66,6
4	28,6	2,72 <i>dd</i> (3,1; 16,4 Hz) e 2,86 <i>dd</i> (4,3; 16,3 Hz)	28,5
5	157,3		157,3
6	95,9	5,90 <i>d</i> (2,1 Hz)	96,0
7	157,5		156,7
8	94,7	5,92 <i>d</i> (2,1 Hz)	95,3
9	157,9		157,1
10	100,1		99,5
1'	132,2		131,7
2'	115,8	6,96 <i>d</i> (1,8 Hz)	115,0
3'	145,7		145,0
4'	145,8		145,1
5'	115,9	6,73 <i>d</i> (8,1 Hz)	115,4
6'	119,4	6,76 <i>dd</i> (8,1 e 1,8 Hz)	119,5



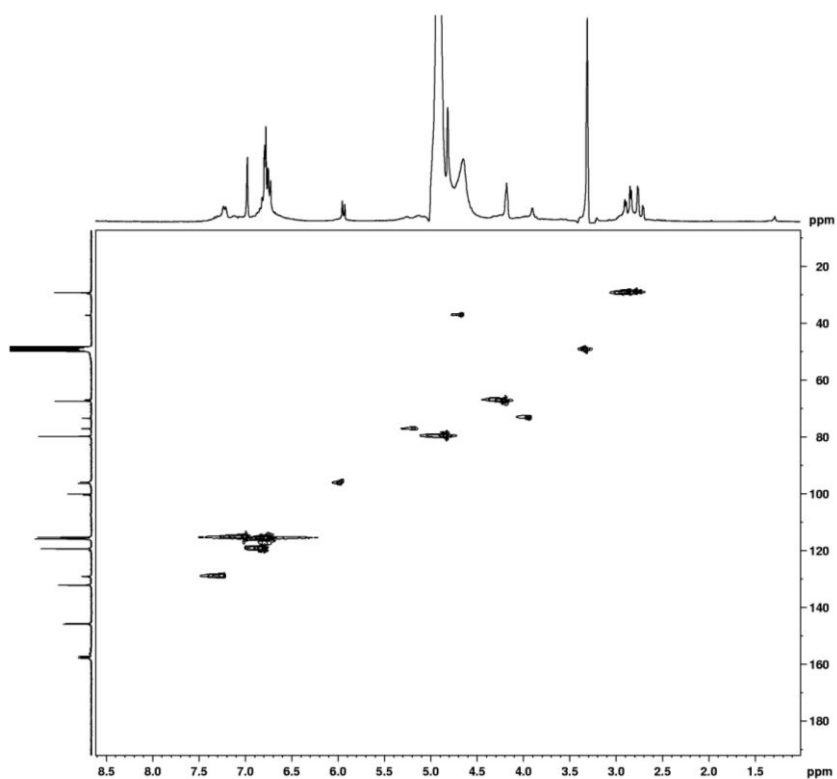
Espectro 118. Espectro de RMN ¹H de OL4-S38-40 (Substância 9) (300 MHz, CD₃OD)



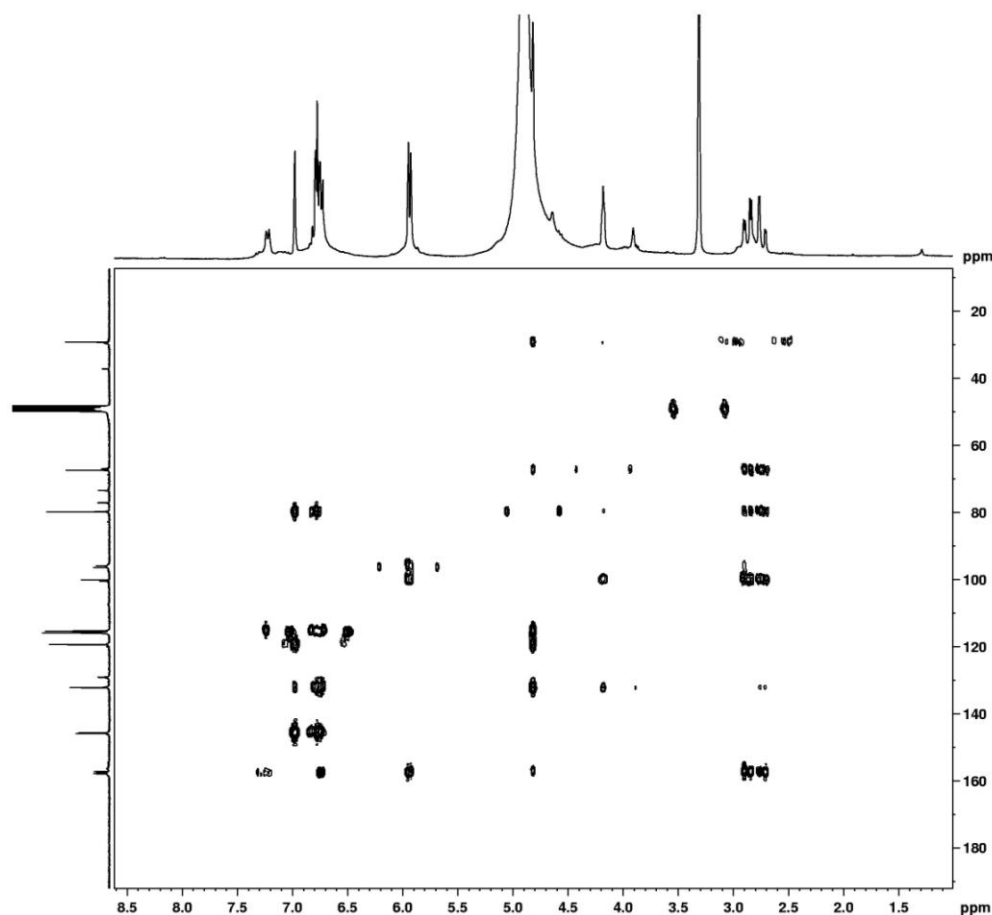
Espectro 119. Espectro de RMN ¹³C de OL4-S38-40 (Substância 9) (75 MHz, CD₃OD)



Espectro 120. Espectro DEPT 135° de OL4-S38-40 (Substância 9) (75 MHz, CD₃OD)



Espectro 121. Experimento HSQC de OL4-S38-40 (Substância 9) (300/75MHz, CD₃OD)



Espectro 122. Experimento HMBC de OL4-S38-40 (Substância 9) (300/75 MHz, CD₃OD)

5.2.2 Substâncias 10 e 11

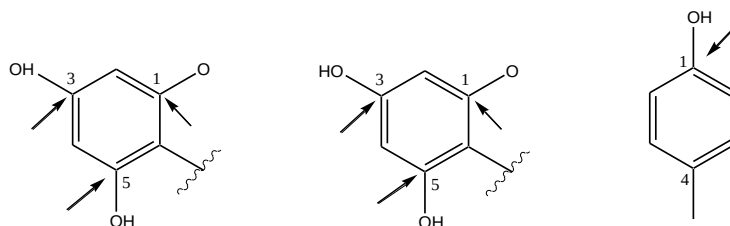
Da fração OL4-S42-44, originada dos procedimentos cromatográficos realizados com a fase hidrometanólica das folhas, foram obtidos os compostos **10** e **11**, em mistura. Estas substâncias foram, também, obtidas de outras frações, utilizando cromatografia em coluna de sílica, Sephadex LH-20 e CLAE [descritos em Materiais e Métodos **4.4.1.2**, p. 25 e **4.8.2**, p.39].

O espectro de RMN ¹H [Espectros 123 – 124, Tabela 21, p.149] apresentou sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos, entre δ 5,5 e 7,5, e outros sinais na região de δ 2,5 a 5,0.

Observou-se no espectro de RMN ¹³C [Espectros 125 – 129, p.151-153] dois conjuntos de trinta sinais de intensidades diferentes, com deslocamentos químicos muito aproximados. Dos trinta sinais apresentados, vinte e quatro estão relacionados a carbonos de anéis aromáticos, que poderiam ser, portanto, quatro anéis.

Dentre estes vinte e quatro sinais, sete estão na região de δ 158-155, próprios de carbonos aromáticos oxigenados, porém não vicinais. Estes sinais estão listados **Figura 23** e foram racionalizados nas estruturas mostradas nesta Figura.

¹³ C majoritário	¹³ C minoritário
158,4	158,6
157,9	158,5
157,2	157,7
157,1	157,5
157,1	157,4
156,2	156,2
155,5	155,3



Carbonos aromáticos 1,3,5 e 1,4 oxigenados

Figura 23 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos aromáticos oxigenados não vicinais e estruturas parciais correspondentes (→).

Foram observados, também, dois sinais na região de δ 145, relativos a carbonos aromáticos oxigenados vicinais, conforme mostrado na **Figura 24**.

¹³ C majoritário	¹³ C minoritário
145,8	145,6
145,6	145,5

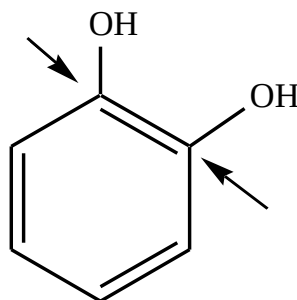


Figura 24 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos aromáticos oxigenados vicinais e estruturas parciais correspondentes (→).

Considerando-se o padrão de oxidação, tem-se um conjunto de quatro anéis aromáticos para cada composto. Como foram listados trinta carbonos para cada composto e, até o momento foram mencionados nove sinais, há ainda vinte e um sinais a serem atribuídos. Destes, dez sinais correspondem a carbonos metínicos, sendo que quatro se referem a um anel aromático *para*-substituído (δ 115,9 e δ 130,0 - 2 CH cada) e outros três são de uma anel aromático 1,3,4 trissubstituído (δ 115,2, δ 116,0 e δ 119,0), conforme mostrado na **Figura 25**.

¹³ C majoritário	¹³ C minoritário
130,0 (2)	130,4 (2)
119,1	120,3
116,0	115,8
115,9 (2)	115,6 (2)
115,2	115,0

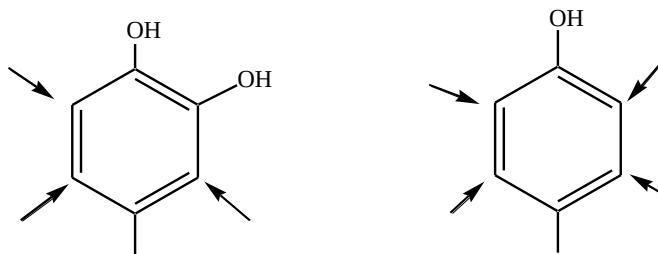


Figura 25 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos aromáticos metínicos e estruturas parciais correspondentes (→).

Os outros três sinais de carbonos metínicos se situam na região de δ 96 (Figura 26), que são típicos de carbonos de anéis aromáticos que se situam entre dois carbonos oxigenados. Tendo em vista que os argumentos até agora elencados sugerem uma natureza flavonoídica para as substâncias **10** e **11** e os anéis aromáticos oxigenados mencionados no início da discussão, os valores de deslocamento químico dos carbonos listados na **Figura 26** (aproximadamente δ 96) poderiam ser atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 do esqueleto da referida classe de substâncias. Os dois anéis aromáticos (um para cada substância) requerem quatro sinais, porém observa-se apenas três sinais, conforme mostrado **Figura 26**.

¹³ C majoritário	¹³ C minoritário
97,0	96,4
96,4	96,4
96,1	95,8

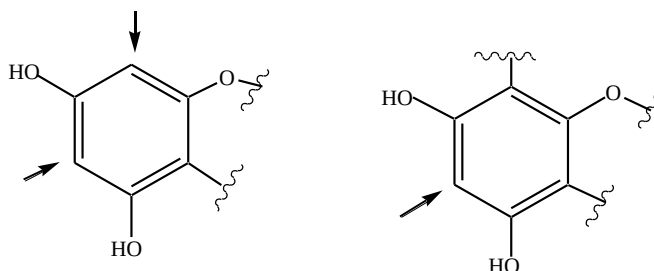


Figura 26 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos aromáticos metínicos situados entre dois carbonos oxigenados e estruturas parciais correspondentes (→).

Dos vinte e quatro carbonos de anéis aromáticos iniciais, os cinco não atribuídos ainda, correspondem a carbonos não ligados a hidrogênios (**Figura 27**). Admitindo estruturas flavonoídicas para as substâncias **10** e **11**, dois destes sinais poderiam ser atribuídos a C-1'

(aproximadamente δ 132) e um está na faixa normal para C-10 (aproximadamente δ 100), permanecendo dois, na faixa de δ 108, sem atribuição até o momento.

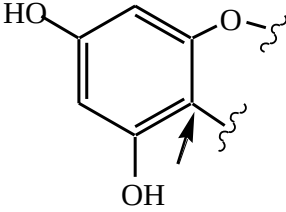
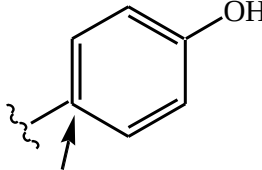
¹³ C majoritário	¹³ C minoritário		
132,1	132,4		
131,7	131,6		
108,6	108,7		
107,5	107,2		
101,8	99,4		

Figura 27 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos aromáticos não ligados a hidrogênios e estruturas parciais correspondentes (→).

Os sinais de carbonos alifáticos mostram dois conjuntos constituídos de: quatro metinos oxigenados (δ 67 a 83), um metino (δ 38, aproximadamente) e um metileno em aproximadamente δ 30 (**Figura 28**).

Relacionando os dados referentes a carbonos aromáticos e alifáticos, podemos racionalizá-los como duas unidades do tipo catequina ligadas. A ligação seria entre C-4 da unidade I (metino em δ 38, aproximadamente) e C-8 da unidade II. Esta proposição estaria de acordo com os dois sinais de carbonos aromáticos sem hidrogênios não atribuídos (**Figura 27**, na faixa de δ 108), que poderiam corresponder a C-10 e C-8 do anel A substituído (unidade II).

5. Resultados e Discussão

¹³ C majoritário	¹³ C minoritário
83,7	83,6
80,1	79,9
73,9	73,8
67,8	67,3
38,5	38,8
29,6	30,0

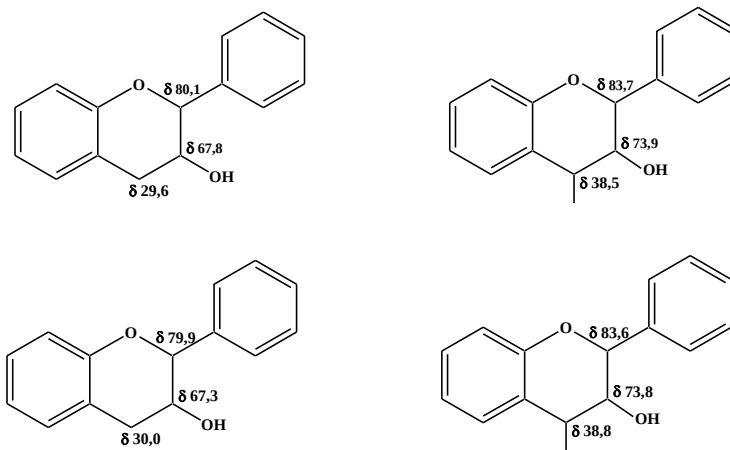


Figura 28 – Dados de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) referentes aos carbonos alifáticos das unidades catequina e estruturas parciais correspondentes (→).

Quanto às configurações dos carbonos dos anéis C, os valores de deslocamento químico dos carbonos destes anéis da unidade II, de ambas as substâncias, são compatíveis com os da epicatequina ou da epiafzelechina, ou seja, uma relação *cis* entre os substituintes de C-2 e C-3 (AGRAWAL, 1989).

Os anéis C das unidades I possuem três carbonos quirais (C-2, C-3 e C-4). Observa-se na literatura que os valores de deslocamento químico dos carbonos C-2 e C-4 desta unidade são determinados pelas configurações relativas dos mesmos. Os valores observados para C-2 e C-4 do composto **10** (δ 83,7 e 38,5) e do composto **11** (δ 83,6 e 38,8) são compatíveis com uma relação *cis* entre os mesmos e incompatíveis com uma relação *trans*, que neste caso seriam da ordem de δ 75 e 36 (AGRAWAL, 1989).

Desta forma, uma estrutura preliminar possível para os compostos **10** e **11** é a mostrada na **Figura 29**.

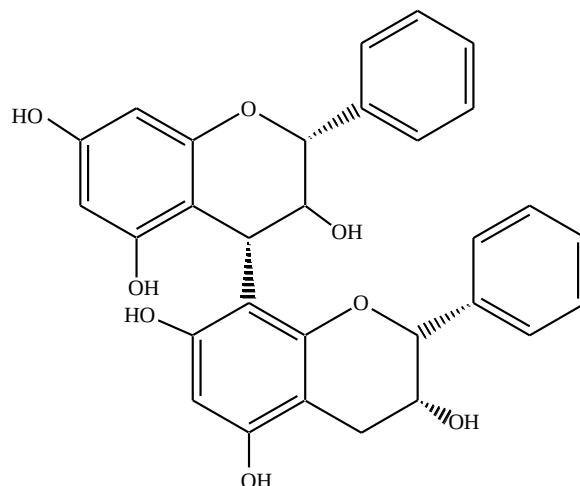


Figura 29: Estrutura preliminar possível para os compostos **10** e **11**.

Nesta proposta permanecem indefinidas as unidades I e II (epicatequina ou epiafzelechina) e as configurações de C-3 para unidade I.

Quanto às configurações de C-3I, não há na literatura relato do isolamento de proantocianidinas com a hidroxila de C-3I α -orientada. Os valores de deslocamento químico para C-2, C-3 e C-4 com os respectivos substituintes em α - β - α são compatíveis com os das substâncias **10** e **11**. A constante de acoplamento H-3 α -H4 β é da ordem de 7 Hz neste sistema. O valor observado para este acoplamento nas substâncias **10** e **11** é de 6,9 Hz. Estes dados, aliados à semelhança entre os deslocamentos químicos dos carbonos, levam à proposta de que os substituintes se encontrarem como C-2 α , C-3 β e C-4 α nas substâncias **10** e **11**.

Foram realizados experimentos HSQC e HMBC [Espectro 130 – 133, p.154-155], os quais permitiram efetuar as atribuições mostradas na Tabela 21 e as correlações para os compostos **10** e **11**. Estas correlações mostram que o H-4 para unidade II em δ 2,74 (CH₂) do composto majoritário **10** correlaciona-se com o C-2II em δ 80,1 e que o hidrogênio deste, em δ 4,78 (H-2II), correlaciona-se com o C-2'II (δ 119,1) do anel B trissubstituído. Correlações análogas a estas foram observadas para a substância **11**. Estas correlações indicam que ambas as substâncias (**10** e **11**) tem como unidades **II** a epicatequina e, conseqüentemente, que as unidades **I** correspondem à afzelechina.

A comparação dos dados de RMN de ¹³C do composto **10** com os do composto minoritário **11** mostrou grande semelhança. Conforme mencionado, as configurações dos carbonos dos anéis C são idênticas. As mesmas correlações observadas nos experimentos HMBC

referentes ao composto **10** foram observadas no composto **11**, indicando que as unidades I e II são as mesmas. Portanto, as diferenças estruturais entre as substância **10** e **11** não estão nas configurações dos carbonos dos anéis C ou nas unidades I e II.

Uma diferença entre os dados espectrais de **10** e **11**, constatado através dos experimentos HSQC e HMBC, foi uma importante diferença no deslocamento químico dos hidrogênios do anel B da unidade I. Observou-se que no composto majoritário **10** os hidrogênios H-1'/H-6' da unidade I estão significativamente mais protegidos em relação aos mesmos hidrogênios do composto **11**. Nestes, os hidrogênios possuem o deslocamento químico de δ 7,30; enquanto no composto **10**, os hidrogênios H-1'/H-6' da unidade I estão em δ 6,80. Estes dados, de acordo com a literatura (MARKAM & GEIGER, 1996), indicam que quando a ligação entre as unidades é do tipo C-4-C-8 há uma interação do anel B da unidade II com os hidrogênios H-1'/H-6' da unidade I, exercendo uma proteção sobre os mesmos. Esta interação encontra-se ausente quando a ligação entre as unidades é do tipo C-4-C-6. Desta forma, estes dados permitem definir que no composto majoritário **10** a ligação entre as unidades é do tipo C-4-C-8, enquanto no composto minoritário **11** a ligação entre as unidades é do tipo C-4 - C-6 (**Figura 30**). Assim, foi possível propor para os biflavonoides **10** e **11** as estruturas constantes na **Figura 30**. Estas estruturas correspondem a duas proantocianidinas, cujas estruturas não constam na literatura e, portanto, são inéditas.

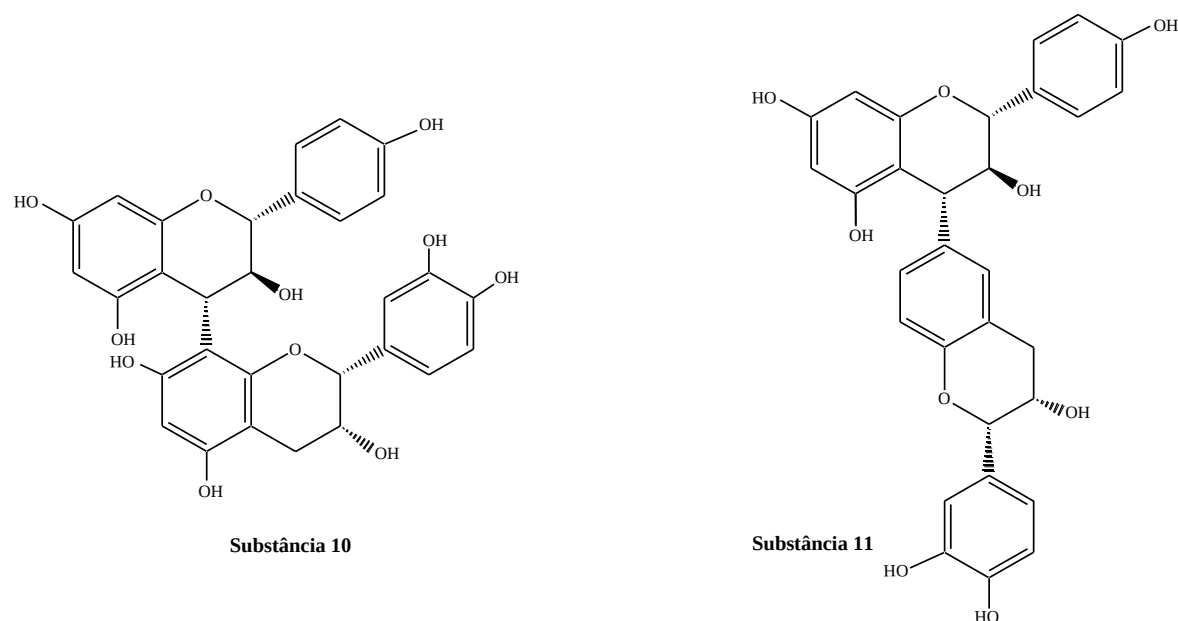
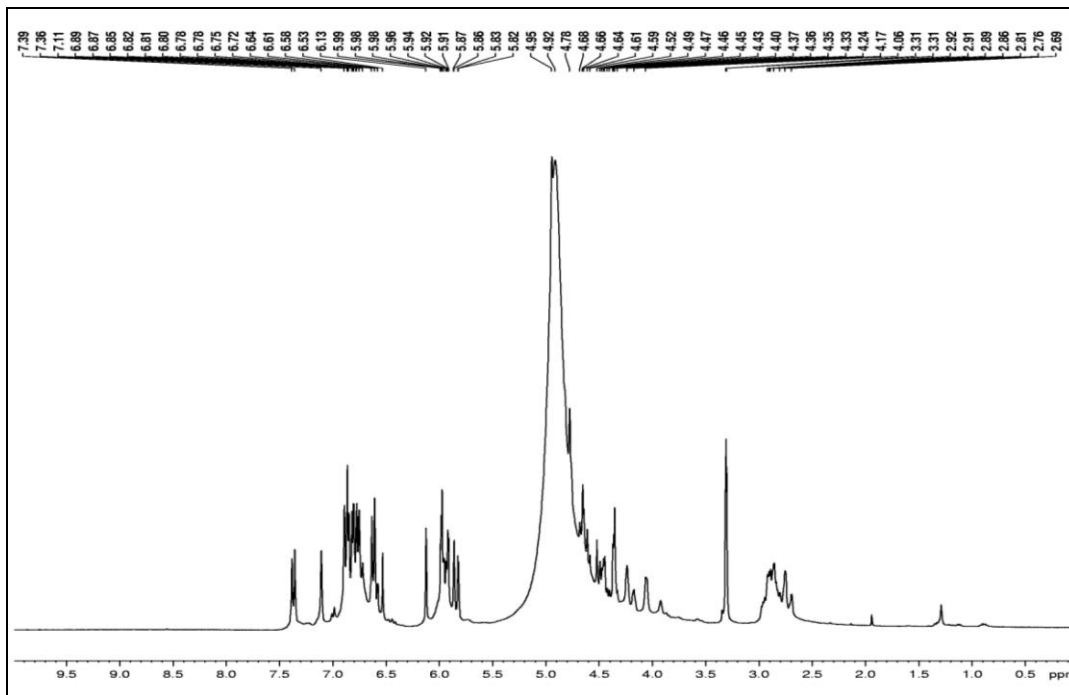
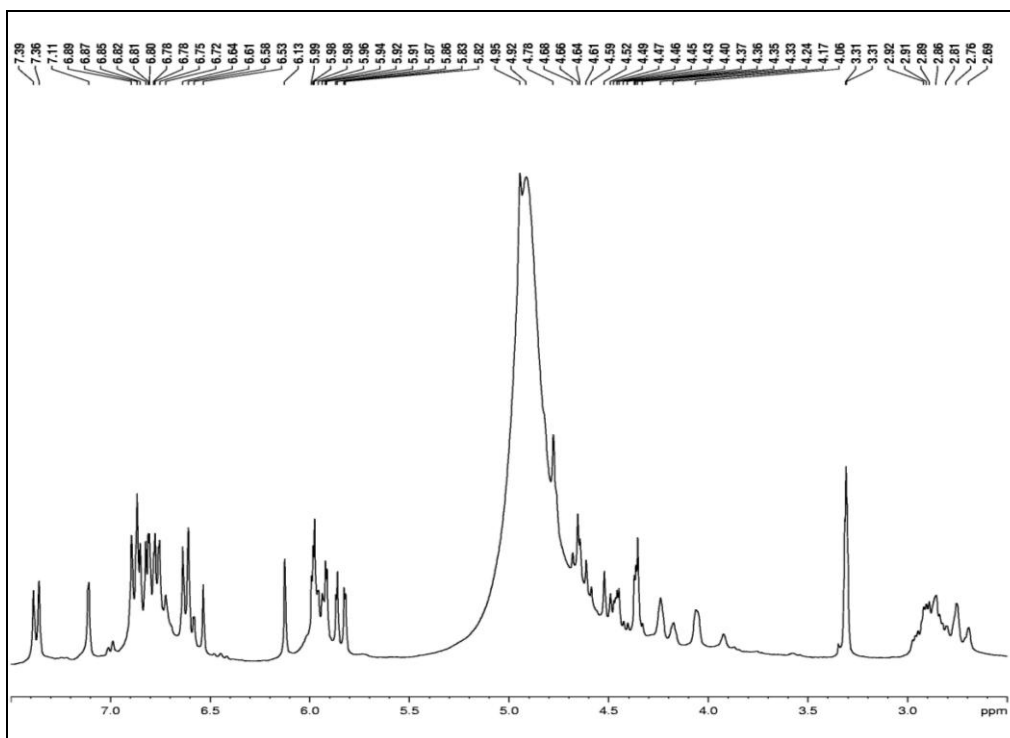


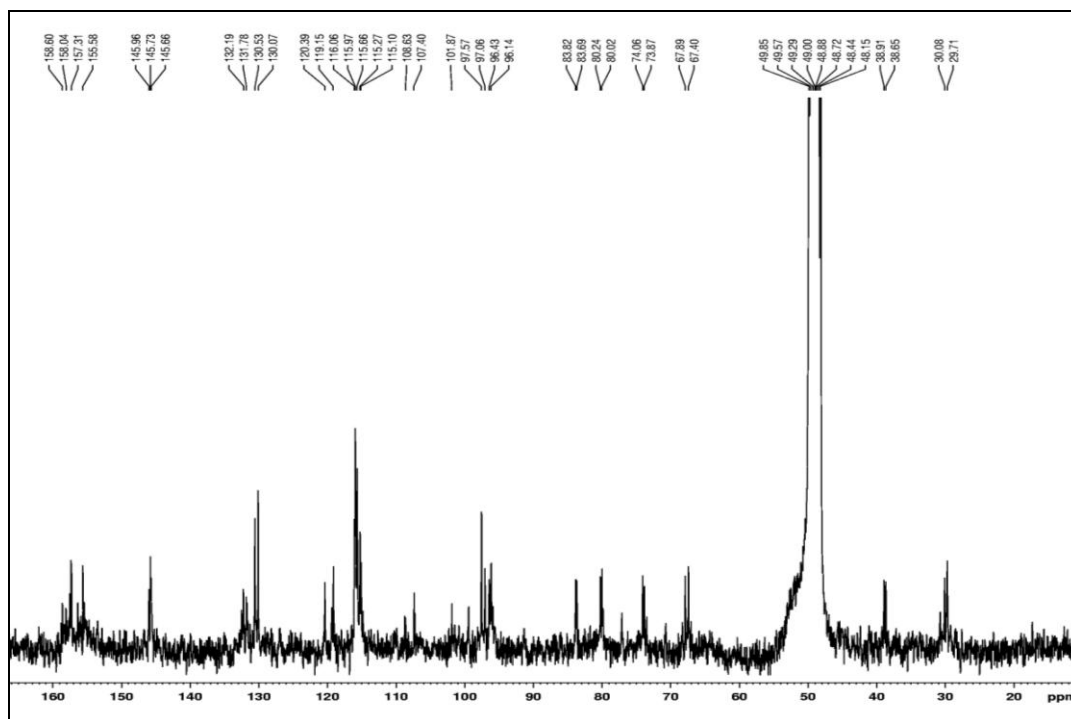
Figura 30. Estrutura dos biflavonoides majoritário (**10**) e minoritário (**11**).

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300/75 MHz) em CD_3OD da substância **10** e **11**

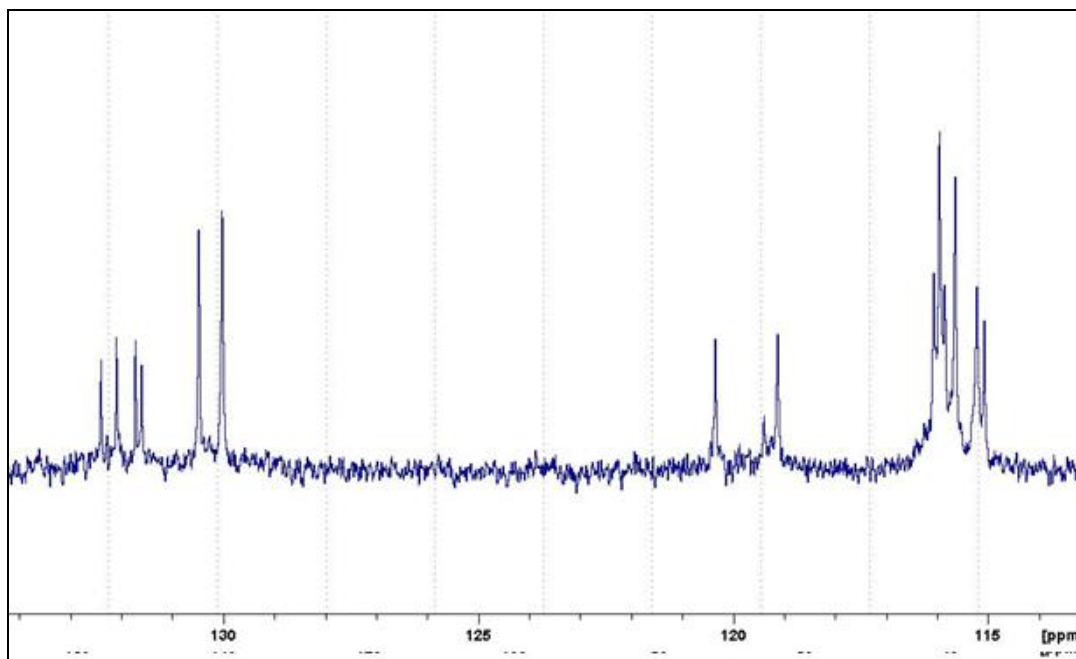
C/H		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}[m, \text{J (Hz)}]$	(11) $\delta^{13}\text{C}$
2	4,36	83,7	4,50	83,6
3	4,35	73,9	4,60	73,8
4	4,46	38,5	4,66	38,8
5		158,4		158,6
6	6,12	96,4		96,4
7		157,1		157,4
8	5,95	96,1		95,8
9		157,2		157,7
10		101,8		99,4
1'		132,1		132,4
2'		115,9		115,6
3'		130,0		130,4
4'		155,5		155,3
5'		130,0		130,4
6'		115,9		115,6
2''	4,78	80,1	4,95	79,9
3''	4,06	67,8	4,25	67,3
4''	2,74 dl (14,7); 2,77 dd (14,7Hz; 1,8Hz)	29,6	2,87	30,0
5''		157,1		157,4
6''		97,0		96,4
7''		156,2		156,2
8''		108,6		108,7
9''		157,9		158,5
10''		107,5		107,2
1'''		131,7		131,6
2'''	6,8	116,0	7,3	115,8
3'''		145,8		145,6
4'''		145,6		145,5
5'''		115,2		115,6
6'''	6,8	119,1	7,3	120,3

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300/75 MHz) em CD_3OD da substância **10** e **11****Espectro 123.** Espectro de RMN ^1H de OL4-S42-44 (Substâncias **10** e **11**) (300 MHz, CD_3OD)

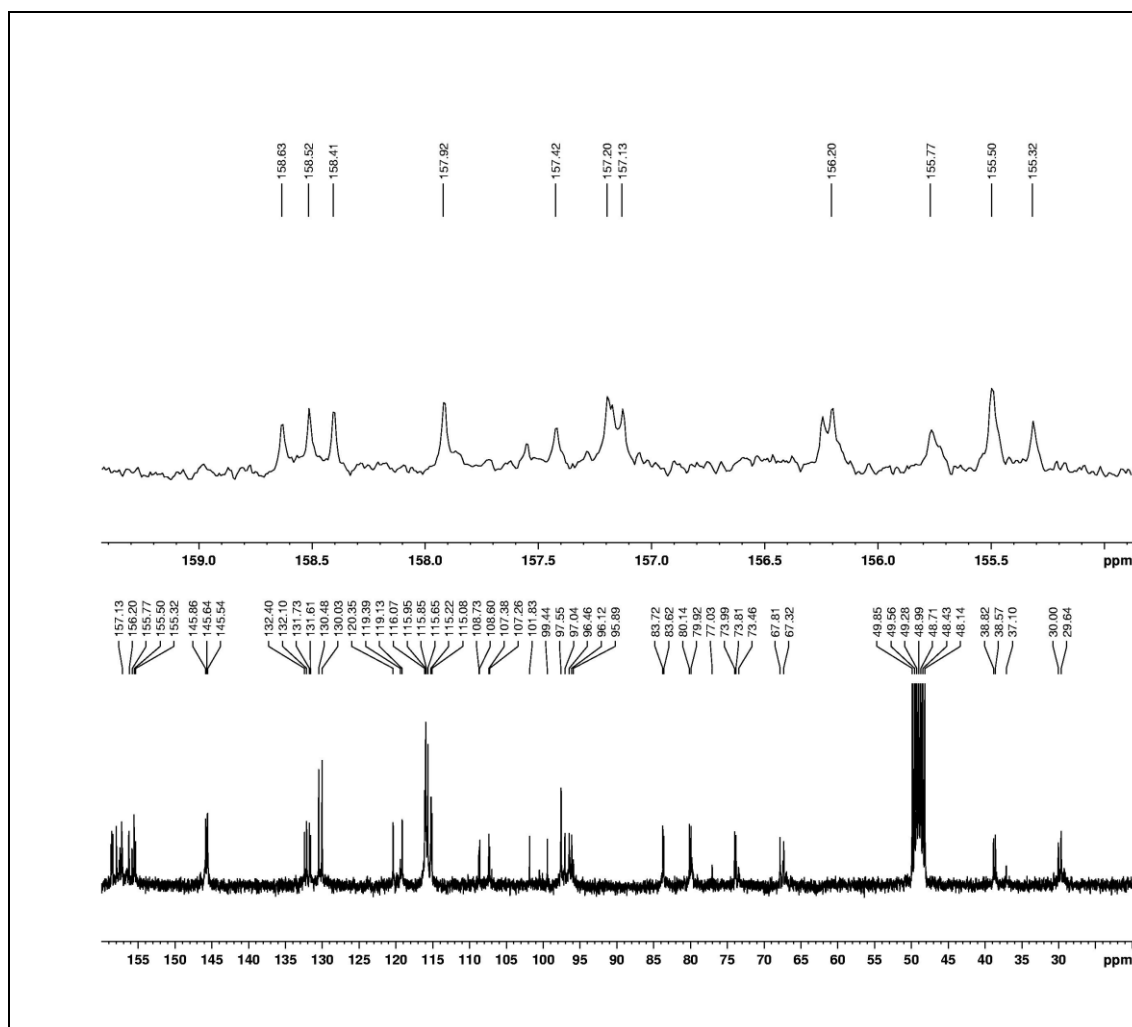
Espectro 124. Expansão do espectro de RMN ^1H de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300 MHz, CD_3OD)



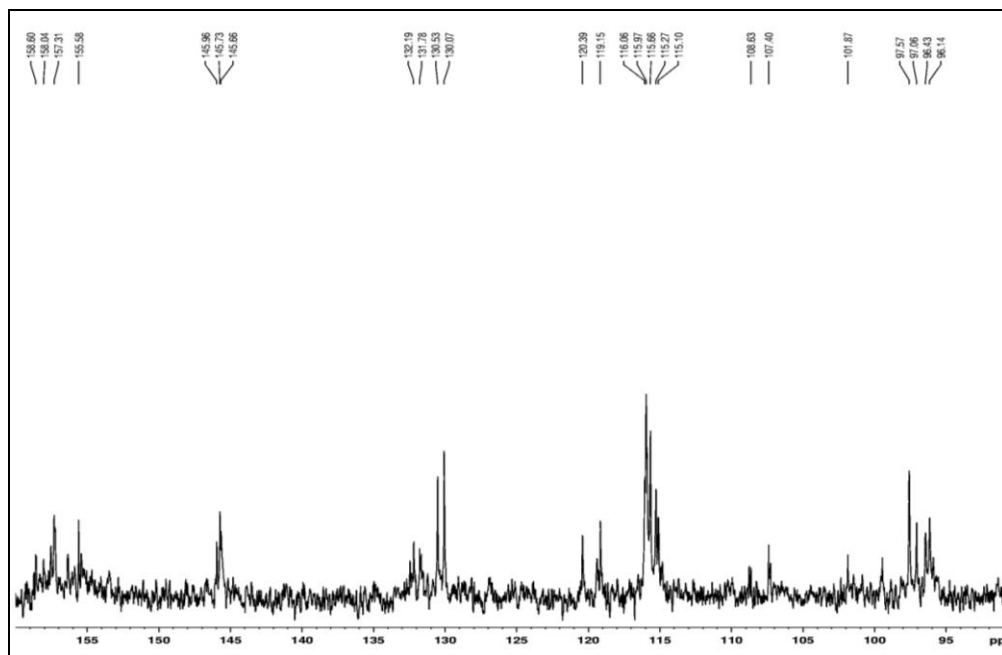
Espectro 125. Espectro de RMN ^{13}C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (75 MHz, CD_3OD)



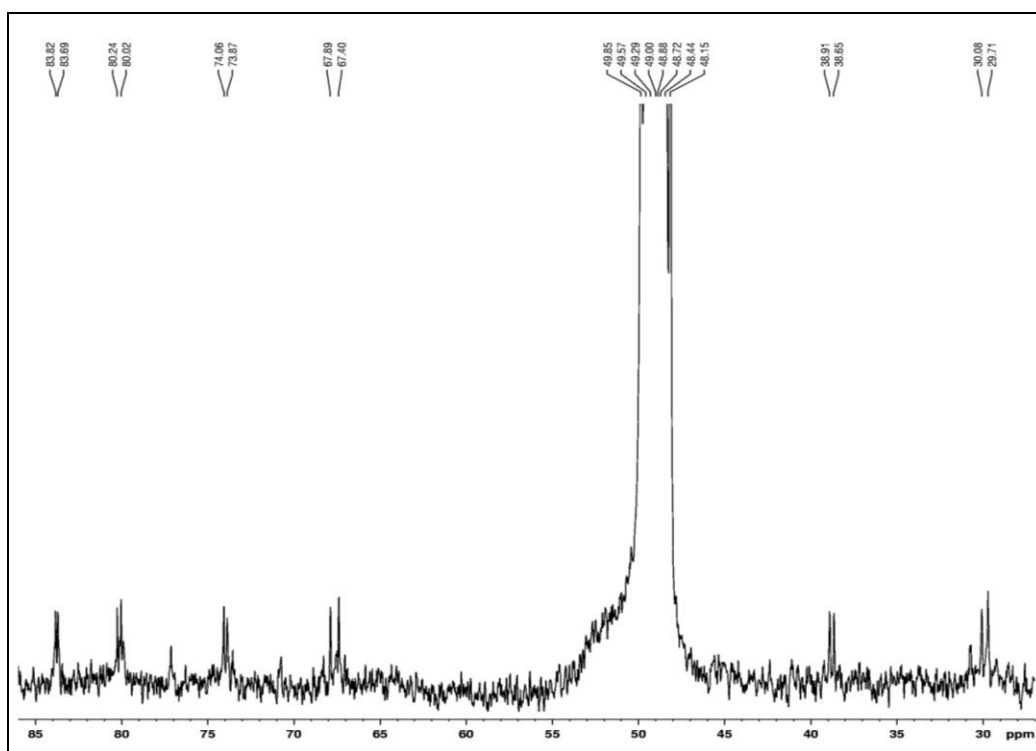
Espectro 126. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (75 MHz, CD_3OD)



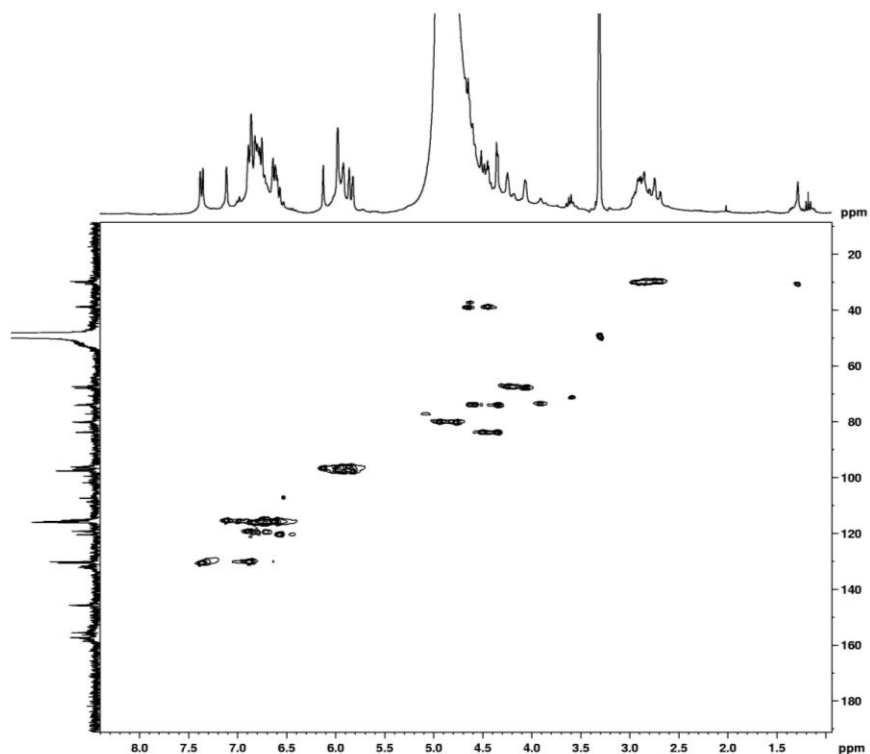
Espectro 127. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (75 MHz, CD_3OD)



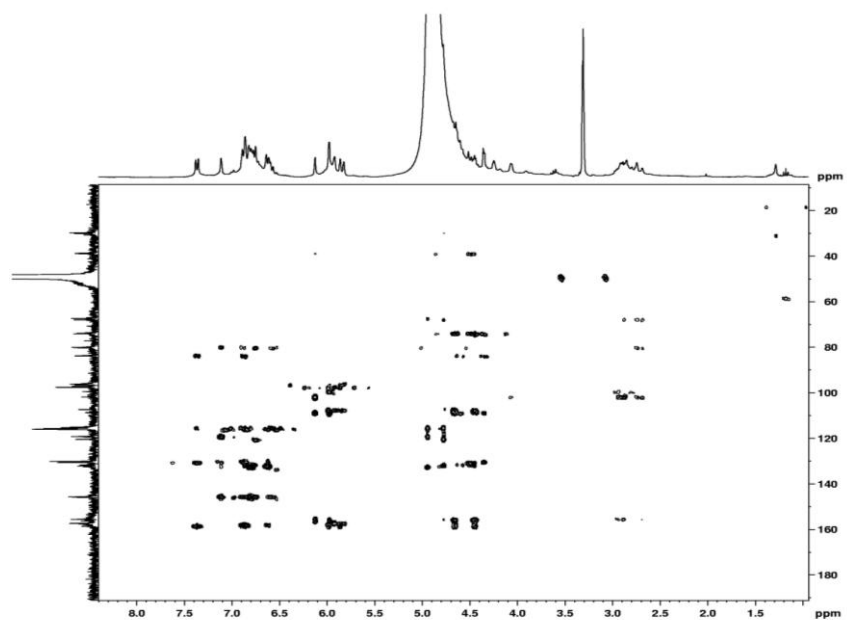
Espectro 128. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (75 MHz, CD_3OD)



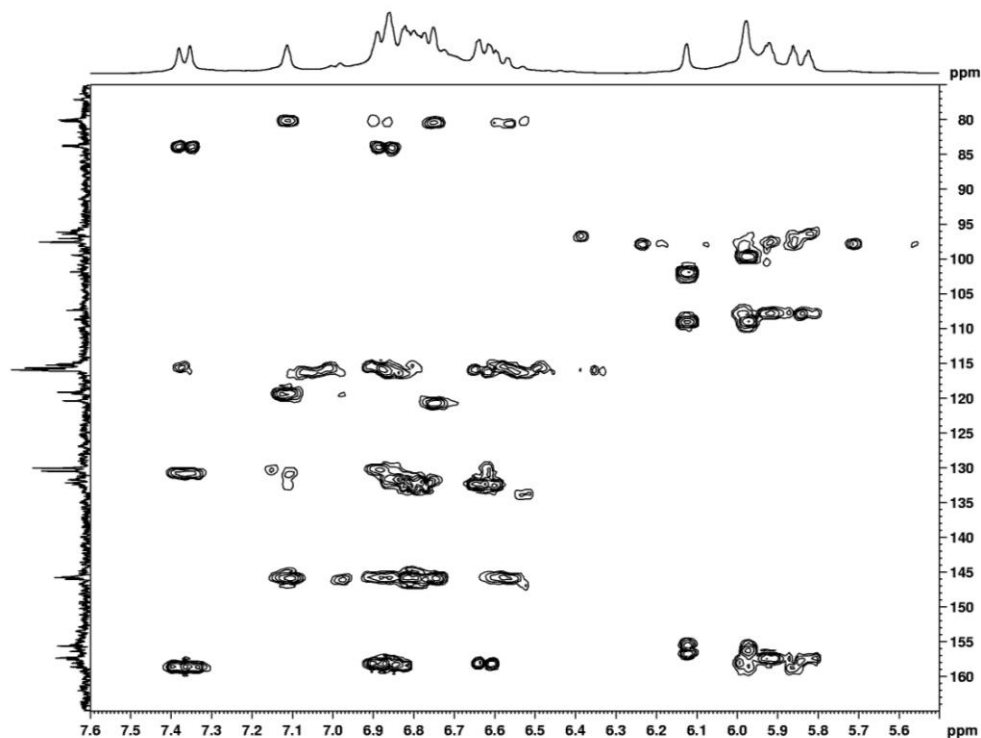
Espectro 129. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (75 MHz, CD_3OD)



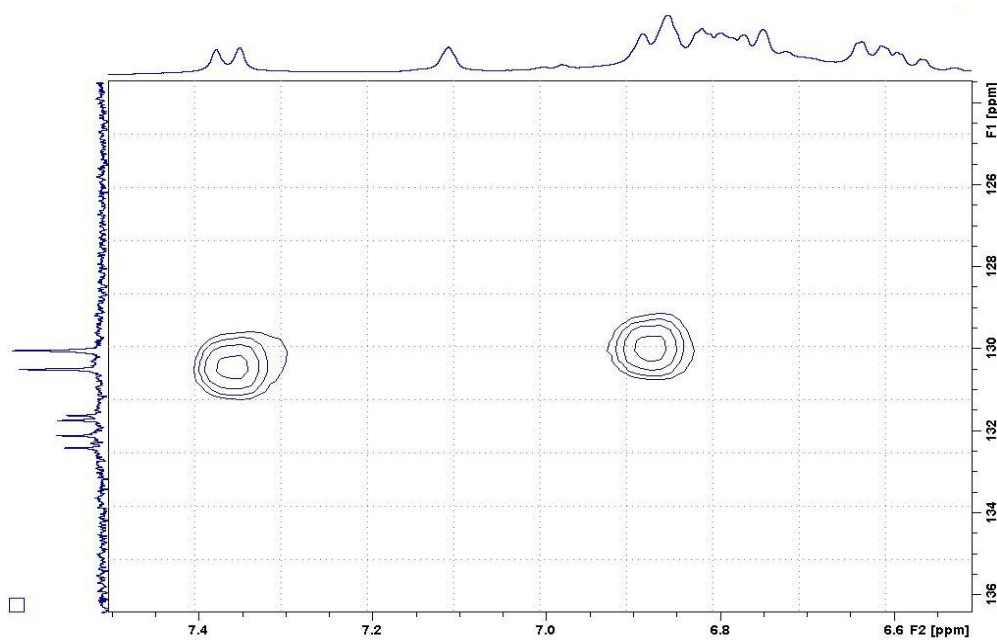
Espectro 130. Experimento HSQC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD₃OD)



Espectro 131. Experimento HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz, CD₃OD)



**Espectro 132. Expansão do experimento de HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11)
(300/75 MHz, CD₃OD)**



**Espectro 133. Expansão do HMBC de OL4-S42-44 (Substâncias 10 e 11) (300/75 MHz,
CD₃OD)**

5.3 Diterpenos

5.3.1 Substância 12

Nas frações OLH-A01 e OLH-A1, obtida a partir dos procedimentos cromatográficos com o extrato etanólico da fase hexânica das folhas, foi verificada por RMN a presença de uma mistura de diterpenos apolares. O componente majoritário desta mistura foi codificado como substância **12** [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.1, p.29]

No espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° da referida mistura [Espectro 136 - 140; Tabela 22, p.157] observou-se sinais para vinte carbonos relativos ao diterpeno majoritário **12**. Estes se constituíram de três carbonos metínicos, quatro carbonos não ligados a hidrogênio, sendo três quaternários e um de ligação dupla, três grupos metílicos e dez metilênicos, sendo um de ligação dupla. Tendo em vista que os dados de RMN indicaram que o composto **12** é constituído apenas de carbono e hidrogênio e considerando a listagem acima, pôde-se propor para o mesmo a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$. O IDH cinco relativo a esta fórmula molecular, juntamente com a constatação da presença de uma ligação dupla, indica que **12** é um diterpeno tetracíclico. Os sinais relativos ao grupo metileno em δ 102,8 e ao carbono sem hidrogênio em δ 156,2 são compatíveis com uma ligação dupla exocíclica. Estas características levaram à proposição de que **12** seja um diterpeno com esqueleto caurano, onde, em função da rota biossintética, é muito freqüente ligação dupla C-16-C-17. A comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **12** com os dados descritos na literatura para o diterpeno *ent*-caur-16-eno, confirmou tratar-se do mesmo composto (ou seu enantiômero) (CONNOLLY, 1991). A Tabela 22 contém os dados de RMN de ^{13}C da substância **12** (Figura 31) e os dados relativos a esta substância publicados na literatura (HANSON *et al.*, 1976).

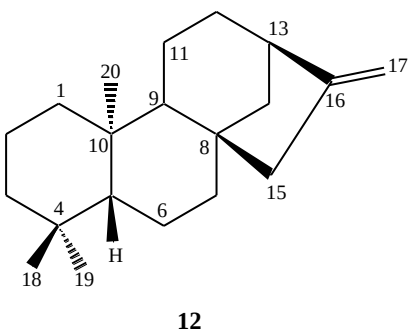


Figura 31. Estrutura da substância **12**

Tabela 22. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **12** e do *ent-caur-16-eno* [25 MHz, CDCl_3] (HANSON *et al*, 1976).

C/H	(12) $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	Literatura
			(HANSON <i>et al</i> , 1976) $\delta^{13}\text{C}$
1	42,4		41,3
2	18,4		18,6
3	42,8		42,0
4	33,7		33,3
5	56,3		56,1
6	20,2		20,3
7	40,7		40,4
8	44,2		44,2
9	56,0		56,1
10	39,3		39,3
11	18,1		18,1
12	33,3		33,3
13	44,0	2,61 <i>sl</i>	44,2
14	39,8		39,9
15	49,2		49,2
16	156,2		156,0
17	102,8	4,77 <i>sl</i> (H-17a); 4,71 <i>sl</i> (H-17b)	102,8
18	33,7	0,83 <i>s</i>	33,7
19	21,6	0,79 <i>s</i>	21,7
20	17,6	1,00 <i>s</i>	17,6

5.3.2 Substância 13

A substância **13** foi obtida como um produto minoritário em mistura com o diterpeno *ent-caur-16-eno* (**12**) nas frações OLH-A01 e OLH-A1 a fase hexânica das folhas, conforme descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.1 p. 29.

No espectro de RMN de ^1H da fração [Espectros 134 -135, p. 160] observou-se um conjunto de sinais na região entre δ 5,5 - 6,5, que é típico de vinila. Este dado, aliado à

caracterização de outro diterpeno na mesma fração, foi sugestivo de um diterpeno de esqueleto pimarano.

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° [Espectro 136 – 140, Tabela 23, p.159] permitiram listar um conjunto de vinte sinais, entre os quais se destacam quatro relativos a carbonos de ligação dupla: δ 111,2 (CH), δ 114,9 (CH), δ 144,1 (CH_2) e δ 155,9 (C). Os valores de δ 111,2 e δ 144,1 são característicos de um grupo vinila. A listagem dos demais sinais obtidos [Tabela 23] levaram à fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$, compatível com um diterpeno tricíclico com duas ligações duplas. Comparando-se os valores de RMN de ^{13}C listados para a substância **13** com os descritos na literatura, pôde-se verificar uma boa correlação com os dados do diterpeno de esqueleto pimaradieno mostrado na **Figura 32**. Desta forma, foi possível identificar **13** como sendo o 8 α -isopimara-9(11)-15-dieno. (HAYAMAN *et al.*, 1986).

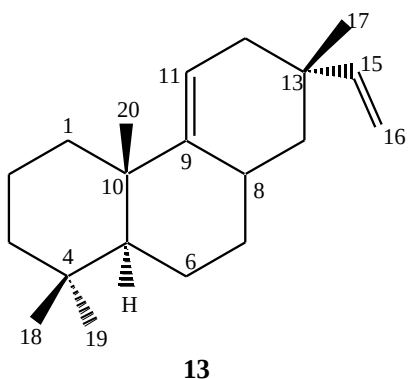
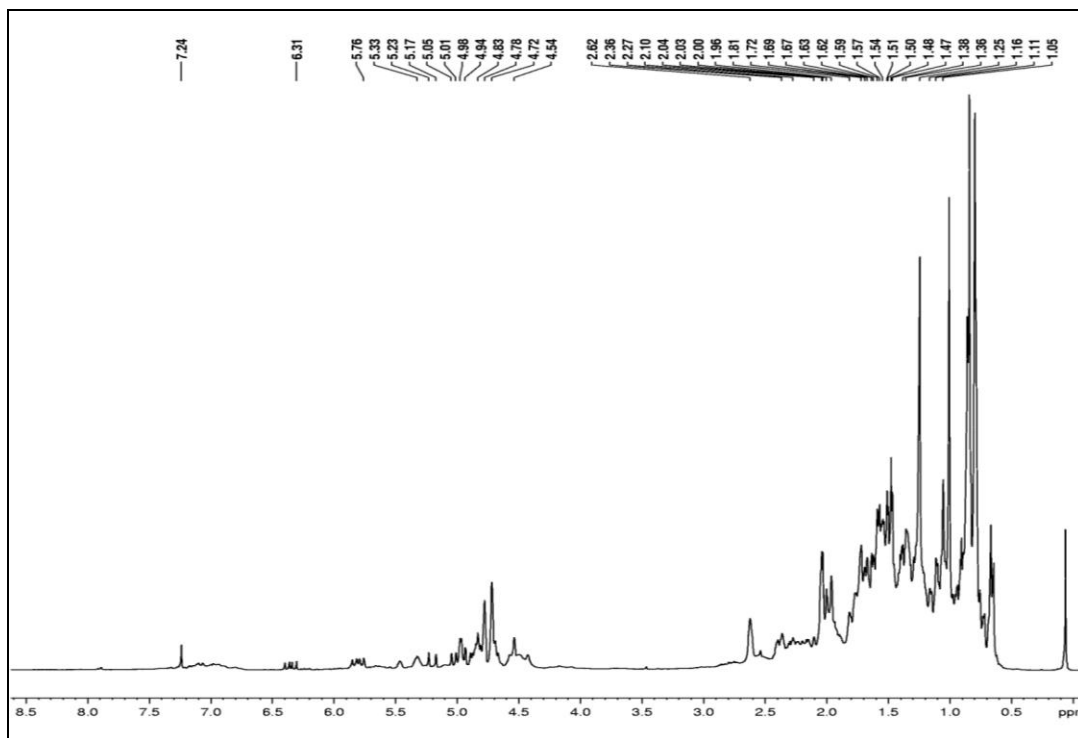


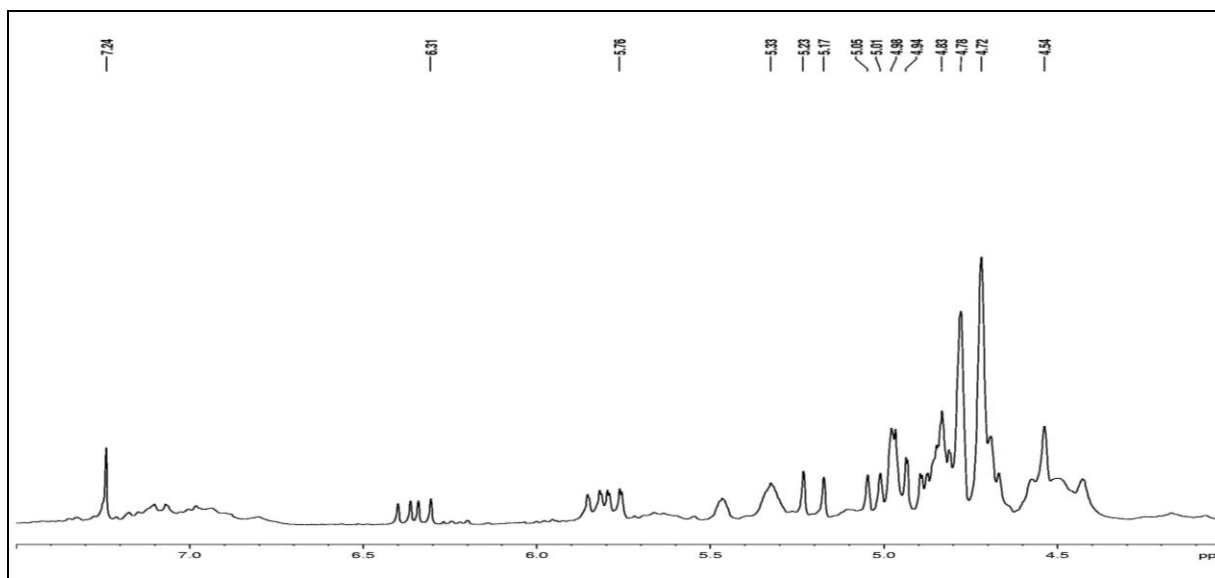
Figura 32. Estrutura da substância **13**.

Tabela 23. Dados de RMN de ^{13}C de **13** obtido de *O. lancifolia* [75 MHz, CDCl_3] e do 8 α -isopimara-9(11)-15-dien [25 MHz, CDCl_3]

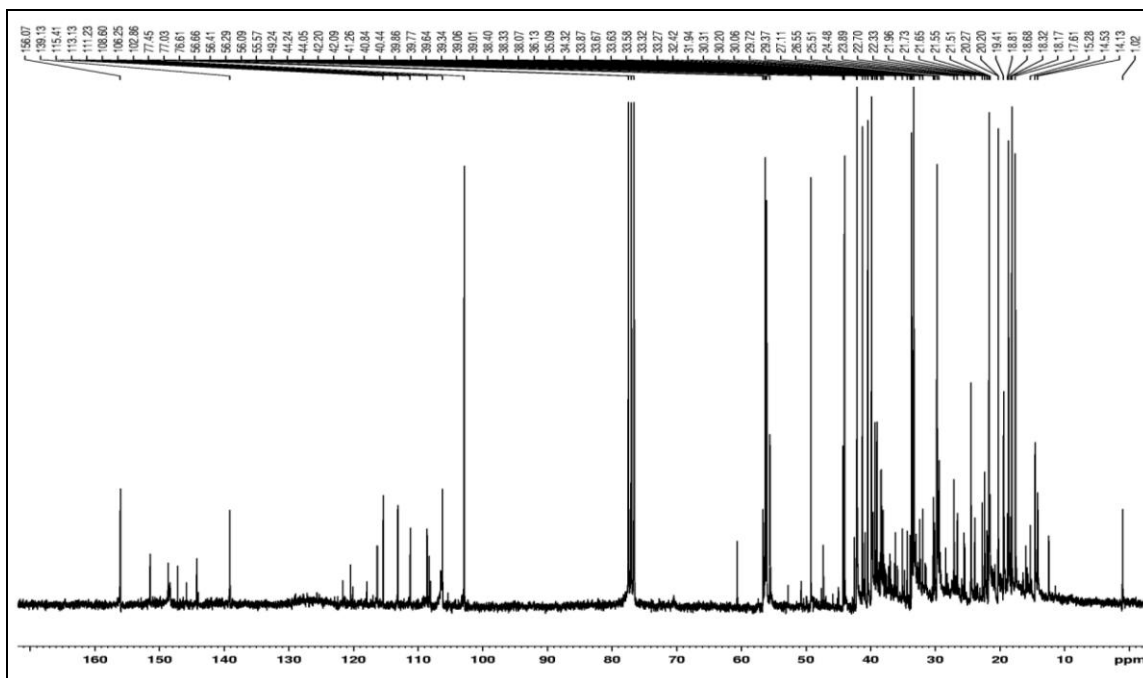
C	(13) $\delta^{13}\text{C}$	Literatura (HAYAMAN <i>et al.</i> , 1986) $\delta^{13}\text{C}$
1	38,1	37,4
2	18,3	18,9
3	41,2	42,6
4	33,3	33,6
5	47,2	45,6
6	19,7	19,6
7	27,4	27,0
8	30,2	30,4
9	151,4	152,9
10	39,4	38,1
11	114,9	115,6
12	41,2	41,3
13	36,1	35,5
14	44,06	43,9
15	144,1	145,9
16	111,2	110,9
17	29,4	29,6
18	33,0	33,2
19	21,9	21,9
20	24,5	25,3



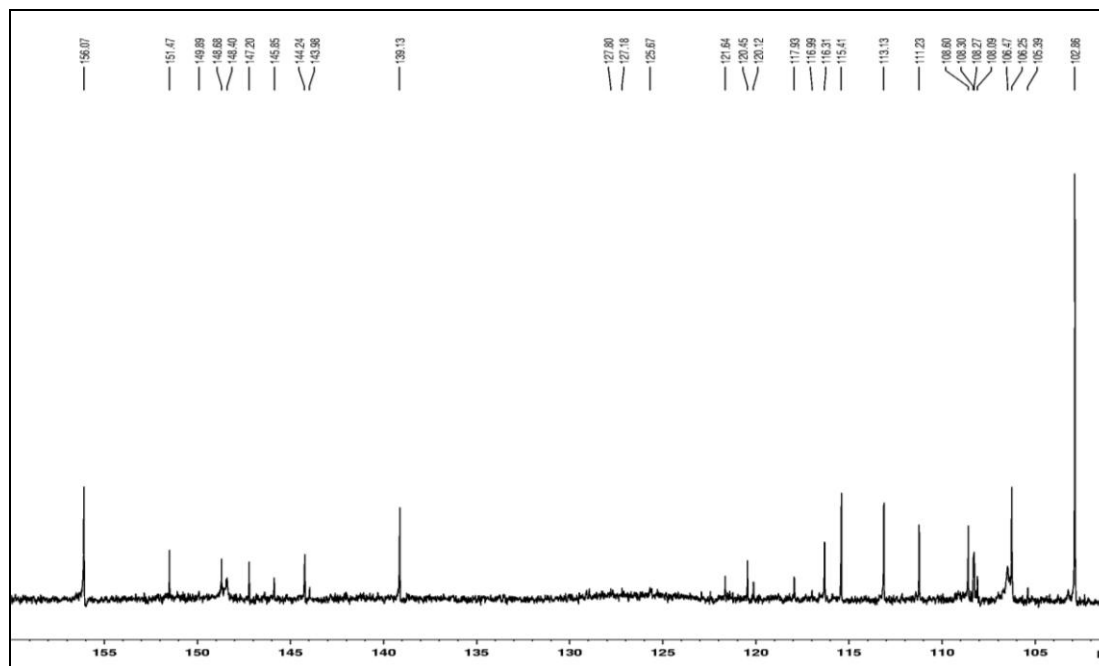
Espectro 134. Espectro de RMN de ^1H de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (300 MHz, CDCl_3)



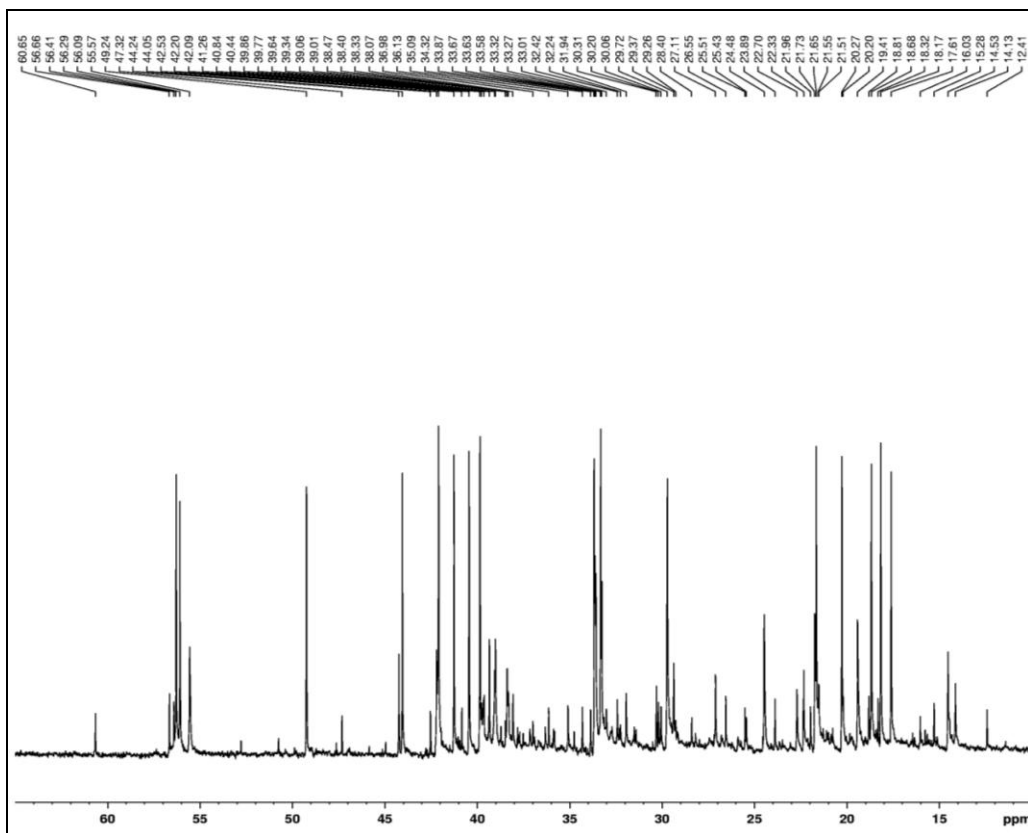
Espectro 135. Expansão do espectro de RMN de ^1H de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (300 MHz, CDCl_3)



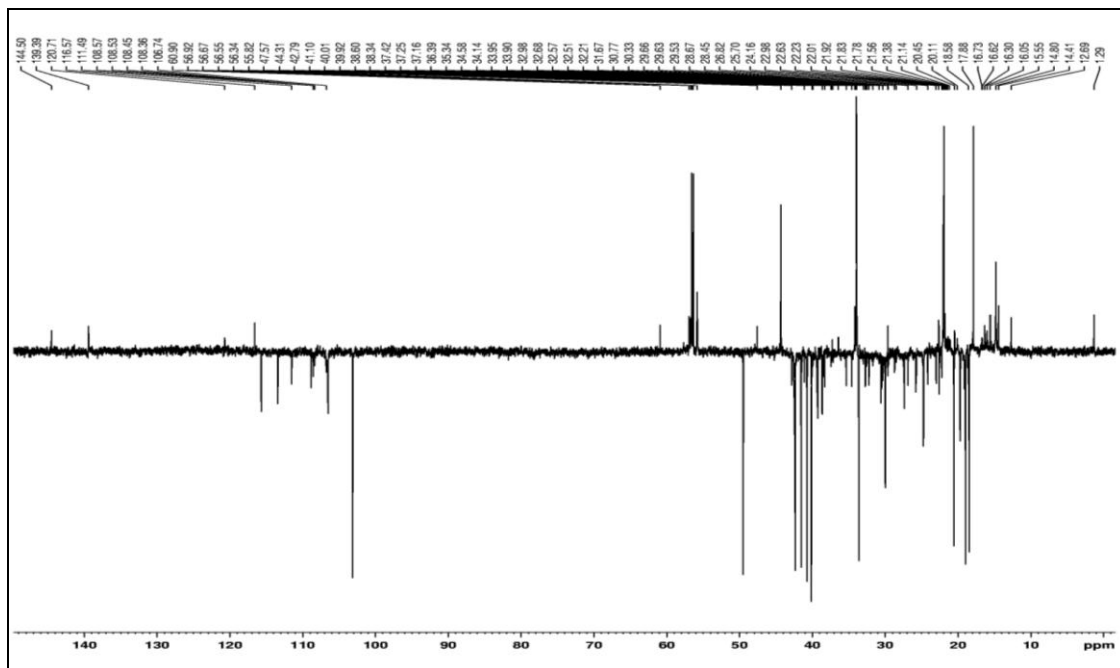
Espectro 136. Espectro de RMN de ^{13}C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl_3)



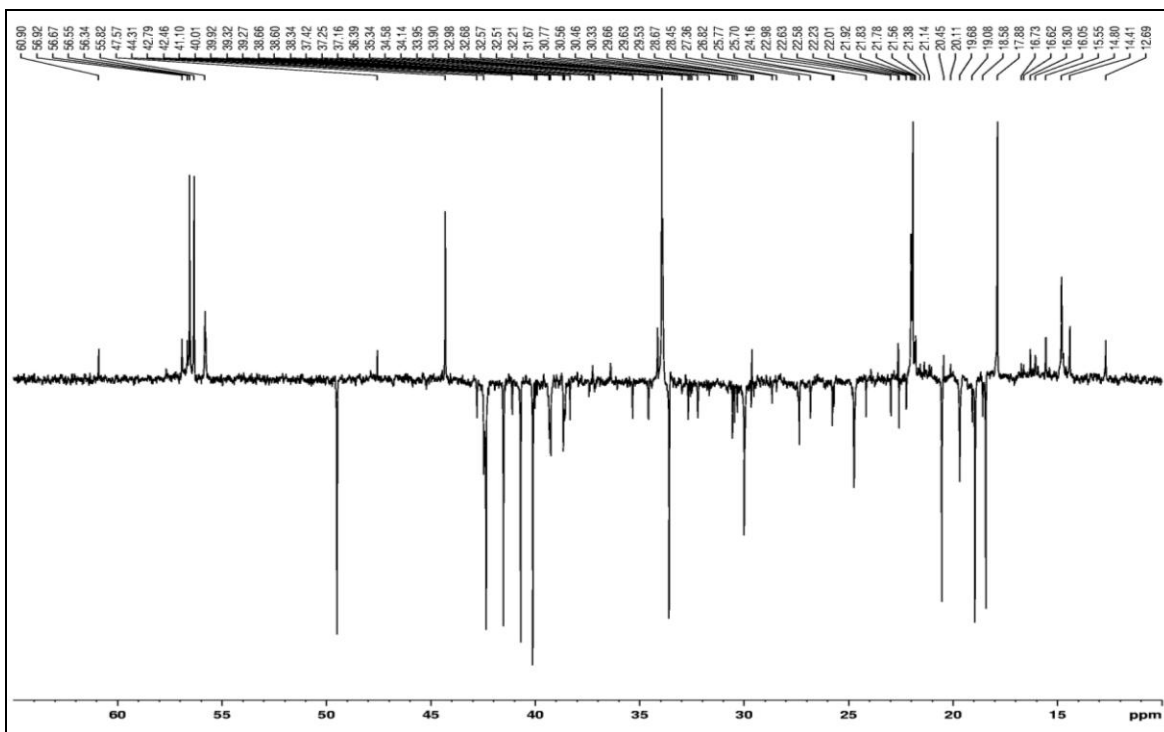
Espectro 137. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 138. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 139. Espectro DEPT 135° de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 140. Expansão do espectro DEPT 135° de OLH-A01 (Substâncias 12 e 13) (75 MHz, CDCl₃)

5.4 Tocoferóis

5.4.1 Substância 14

A substância **14** foi identificada nas frações OLH3-23 e OLH4-126, originadas dos procedimentos cromatográficos com a fase hexânica proveniente do extrato etanólico das folhas [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.3, p. 29].

O espectro de RMN ¹H de **14** [Espectro 141; Tabela 24, p. 166] apresentou dois singletos em δ 2,14 (3H) e δ 2,09 (6H) relativos a três metilas ligadas a carbono de anel aromático, um singlete em δ 1,21 (3H) e um singlete largo (1H) em δ 4,17, um tripleto em δ 2,58 (2H; 6,7 Hz), um multipletto na região de δ 1,75-1,85 (2H), e ainda, sinais na região de δ 0,80-0,86. Os sinais de RMN de ¹H e ¹³C da parte alifática da estrutura sugerem uma natureza isoprênica para a mesma, compreendendo quatro unidades.

O espectro de RMN ^{13}C de **14** [Espectro 142; Tabela 24, p. 165] apresentou sinais para 29 carbonos, sendo que 22 sinais se encontravam entre δ 19,6 e δ 39,4. Foram observados, também, sinais para seis carbonos aromáticos, sendo quatro na região entre δ 117,4 e 122,6 e dois em δ 144,5 e δ 145,5. Todos os seis carbonos do anel aromático detectado são substituídos, ou seja, não há nenhum CH; outro aspecto a ser considerado são os sinais a δ 144,5 e δ 145,5, que são característicos de dois carbonos ligados a átomos de oxigênio em posição *orto* ou *para*.

O espectro de RMN ^{13}C em associação com o espectro DEPT 135° [Espectros 142; Tabela 24, p. 165] mostrou que a parte alifática da estrutura **14** é constituída de um carbono carbinólico terciário (δ 74,5), três metinos, onze metilenos e oito metilas.

A existência de uma cadeia isoprênica sugerida para a estrutura **14** no espectro de RMN ^1H , pôde ser confirmada em função dos sinais observados na região de δ 19,6 a 39,4 no espectro de RMN de ^{13}C .

Este conjunto de informações, obtidas nos espectros de ^{13}C e ^1H da fração OLH3-23 foram compatíveis com os dados observados na literatura para a estrutura do α -tocoferol (URANO *et al.*, 1980; MATSUO & URANO, 1976).

Este conjunto de informações, aliado à presença, ainda, de um sinal relativo a um carbono oxigenado tetrassubstituído em δ 74,5, e de uma metila em δ 23,8 mostrou-se compatível com a estrutura do α -tocoferol para **14**.

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de **14** com os relatados na literatura para o α -tocoferol confirmou a identidade entre as duas substâncias. Foi detectada em mistura com a substância **14** um triglicerídeo (URANO *et al.*, 1980).

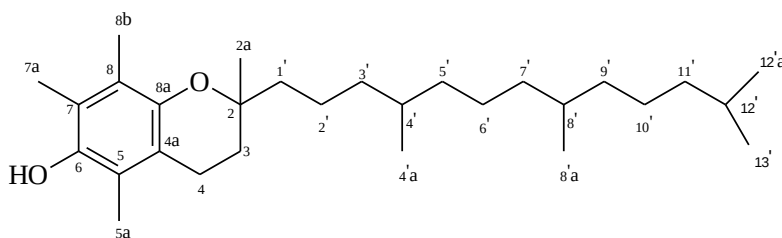
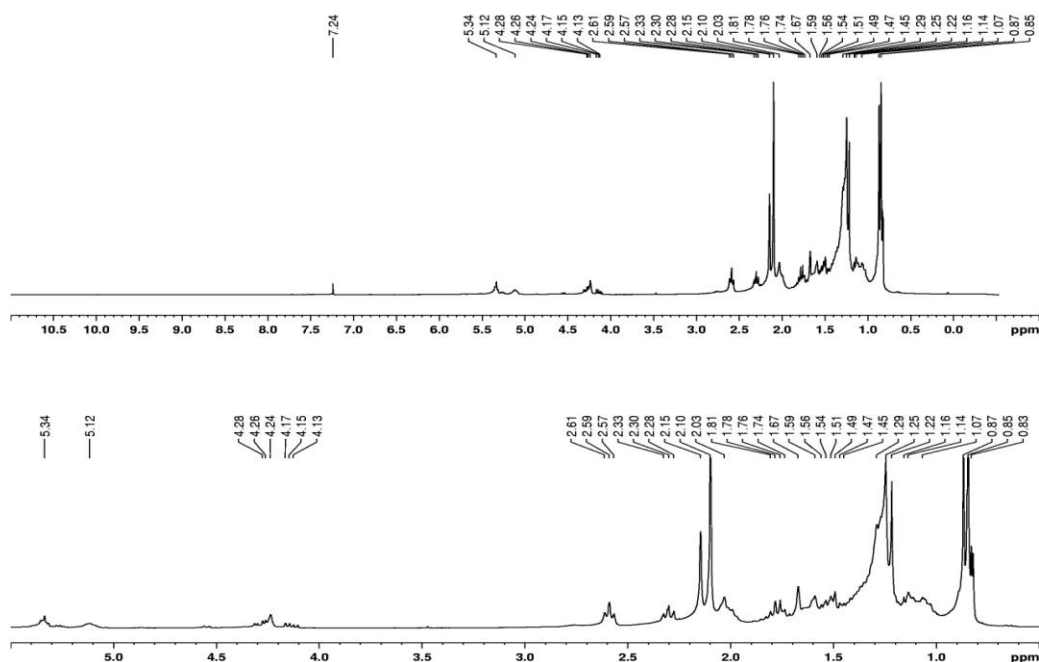


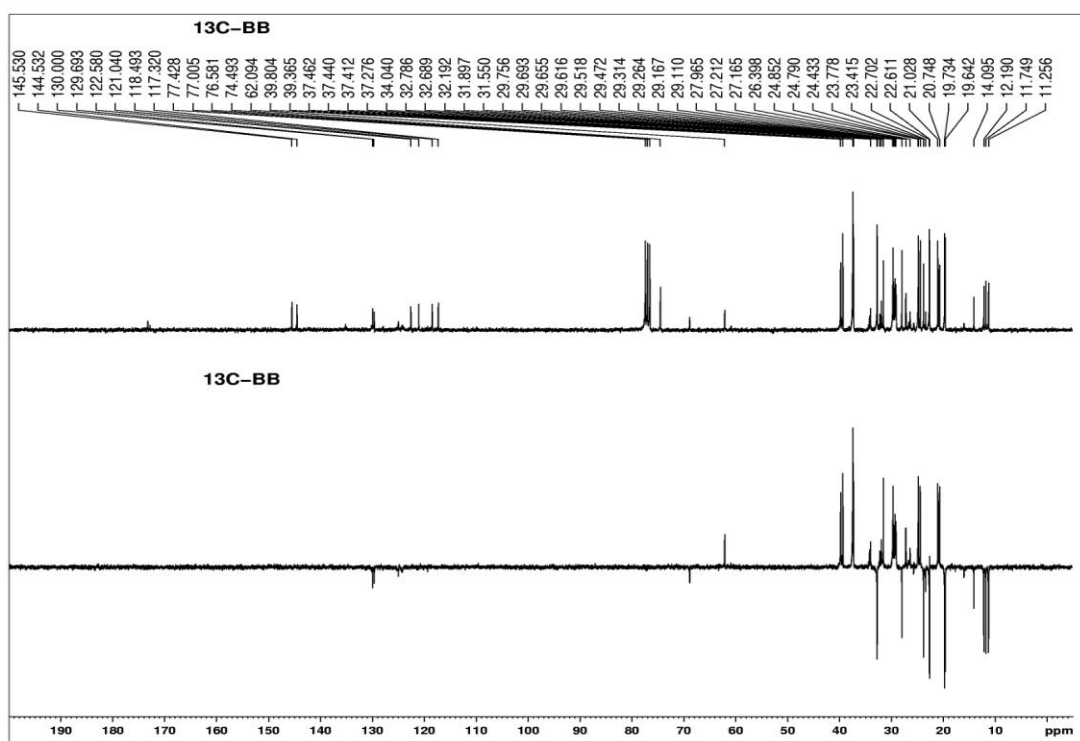
Figura 33. Estrutura do α -tocoferol.

Tabela 24. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **14** e do α -tocoferol (75 MHz, CDCl_3) (URANO, S. *et al.*, 1980)

C	(14)		Literatura
	$\delta ^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	(URANO, S. <i>et al.</i> , 1980) $\delta^{13}\text{C}$
8a		145,5	145,5
8		122,6	122,5
7		121,0	121,0
6		144,5	144,5
5		118,4	118,5
4a		117,4	117,3
4	2,58 <i>t</i> (6,7)	20,7	20,7
3	1,75-1,85 <i>m</i>	31,5	31,5
2		74,5	74,5
1'		39,8	39,3
2'		21,0	21,0
3'		37,3	37,2
4'		32,7	32,7
5'		37,4	37,4
6'		24,4	24,4
7'		37,4	37,4
8'		32,8	32,8
9'		37,4	37,4
10'		24,8	24,8
11'		39,4	39,3
12'		28,0	27,9
12'a		22,6	22,6
13'		22,7	22,7
8'a		19,6	19,6
4'a		19,7	19,7
2a	1,21 <i>s</i>	23,8	23,7
8b	2,14 <i>s</i>	11,8	11,7
7a	2,09 <i>s</i>	12,2	12,2
5a	2,09 <i>s</i>	11,3	11,2
OH	4,17 <i>sl</i>		



Espectro 141. Espectro de RMN de ^1H de OLH3-23 (Substância 14) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 142. Espectro de RMN de ^{13}C de OLH3-23 (Substância 14) (75 MHz, CDCl_3)

5.5 Poliprenol

5.5.1 Substância 15

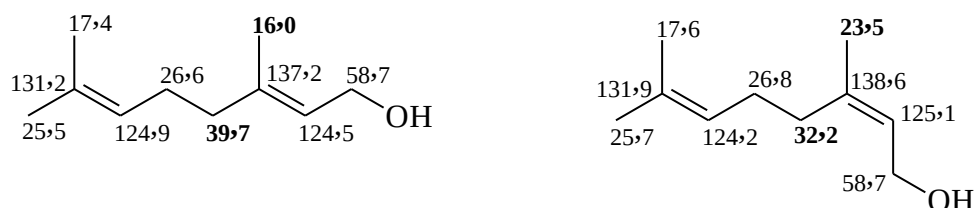
Da fração OLH-A61 e OLH-A51 foi isolada a substância **15**, a partir dos procedimentos cromatográficos com a fase hexânica proveniente do extrato etanólico das folhas. [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.1, p.29]

O espectro de RMN ^{13}C de **15** [Espectros 145; Tabela 25, p. 170] apresentou sinais com deslocamentos químicos entre δ 16,0 e δ 25,7 relativos a grupos metila ligadas a carbonos olefínicos, sinais em δ 26,3 e δ 39,7 de carbonos metilênicos, um sinal em δ 59,0 correspondente a um grupo metilênico carbinólico, e ainda, dois conjuntos de sinais relativos a carbonos olefínicos nas regiões de δ 124,1 a 125,0 (CH) e δ 131,2 a 139,9 (C).

O espectro de RMN ^1H de **7** [Espectro 144; Tabela 25, p. 170] apresentou dois singletos largos em δ 2,02 e δ 5,10, e três singletos em δ 1,72; δ 1,66 e δ 1,58, relativos a grupos metila ligados a carbonos olefínicos. Apresentou também um dubleto largo em δ 4,07 (2H; 7,1 Hz) e um tripleto em δ 5,42 (1H; 7,1 Hz).

Estas informações sugeriram para **15** uma estrutura isoprenoide acíclica.

Com relação à estereoquímica destas unidades isoprênicas, verificou-se que tanto ligações duplas trissubstituídas *Z* como *E* ocorriam na estrutura de **15**, uma vez que foram observados sinais para carbonos metílicos na região de δ 23 e para carbonos metilênicos alílicos vizinhos ao carbono metilado na região de δ 32 (indicativos de ligação dupla *Z*), como também metilas na região de δ 16 e carbonos metilênicos em torno de δ 39 (indicativos de ligação dupla *E*), conforme exemplificado pelos valores de deslocamento químico dos carbonos nos monoterpenos abaixo (WEHRLI & NISHIDA, 1979).



Com base, principalmente, no número de sinais de carbonos olefínicos, como também na integração dos sinais no espectro de RMN ^1H de **15**, concluiu-se que este composto possuía

em sua estrutura vários resíduos isoprênicos contendo ligações duplas (*Z*) e (*E*) e um grupo hidroximetilênico terminal.

Substâncias com este tipo de esqueleto são denominadas poliprenóis, os quais podem ser obtidos de plantas superiores e também de animais e microorganismos (SWIEZEWSKA *et al.*, 1994; TANAKA & TANGPAKDEE, 1998).

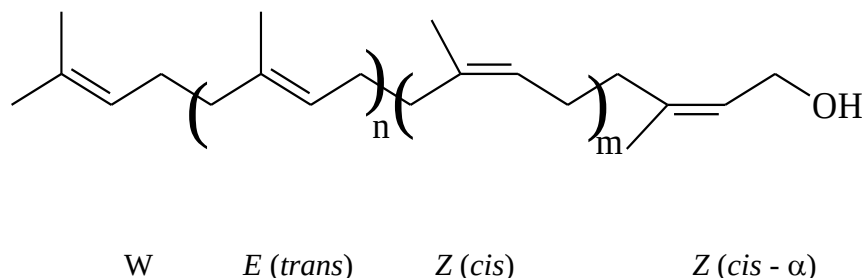


Figura 34: Estrutura geral de um poliprenol.

Poliprenóis de origem vegetal apresentam uma grande diversidade quanto ao tamanho da cadeia isoprenoide. Em geral, poliprenóis encontrados em folhas de angiospermas possuem cadeias com 8 a 15 ou até mais unidades isoprênicas, sendo os mais comuns os que contêm resíduos de 10 a 12 destas unidades (SWIEZEWSKA *et al.*, 1994).

Existem dois tipos principais de poliprenóis vegetais: os tri-*trans* poli-*cis* prenóis (**Figura 34**, $n = 3$) e os di-*trans* poli-*cis* prenóis (**Figura 34**, $n = 2$), originados a partir da incorporação de unidades isoprênicas (através do pirofosfato de isopentenila) a unidades de pirofosfato de tri-*trans* geranil-geranila e di-*trans* farnesila, respectivamente, pela ação de uma *cis*-preniltransferase (SWIEZEWSKA *et al.*, 1994; AOKI *et al.*, 1997; TANAKA & TANGPAKDEE, 1998).

No espectro de RMN ^1H de **15** observa-se que há uma predominância de resíduos isoprênicos com geometria *Z* em relação aos de geometria *E*, conforme demonstrado pela integração dos sinais em δ 1,58 e δ 1,66-1,72, referentes às metilas dos resíduos isoprênicos internos *E* e *Z*, respectivamente. Estes sinais também representam as metilas do resíduo isoprênico terminal W com orientação *cis* e *trans*, respectivamente, em relação à cadeia principal e a metila do resíduo isoprênico terminal α (δ 1,66).

As informações fornecidas pela integração destes e dos demais sinais presentes no espectro de RMN ^1H sugeriram a presença de 12 unidades isoprênicas na estrutura de **15**,

compreendendo: sete resíduos isoprênicos *Z* e três *E*, além de um resíduo terminal *W* e um terminal α (*Z*), contendo o grupo hidroximetilênico.

Esta substância conhecida como ficaprenol-12 ou poliprenol-12, tem sido obtida de folhas de várias espécies de angiospermas, incluindo representantes da família Meliaceae (*Toona ciliata*, *Dysoxylum binectariferum*, *Swietenia mahogany* e *Guarea jamaicensis*) (SWIEZEWSKA *et al.*, 1994; REYNOLDS *et al.*, 1999).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **15** apresentaram-se bastante semelhantes aos do ficaprenol-12 relatados na literatura (REYNOLDS *et al.*, 1999).

Foram identificados, poliprenóis do tipo ficaprenol-12 (**Figura 35**) em mistura com matéria graxa também nas frações OLH6-08, OLH2-11, OLH2-18, OLH4-B28 e OLH3-27-31.

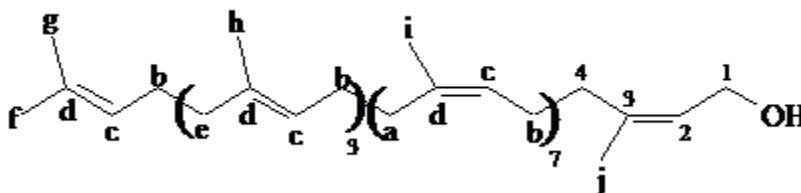
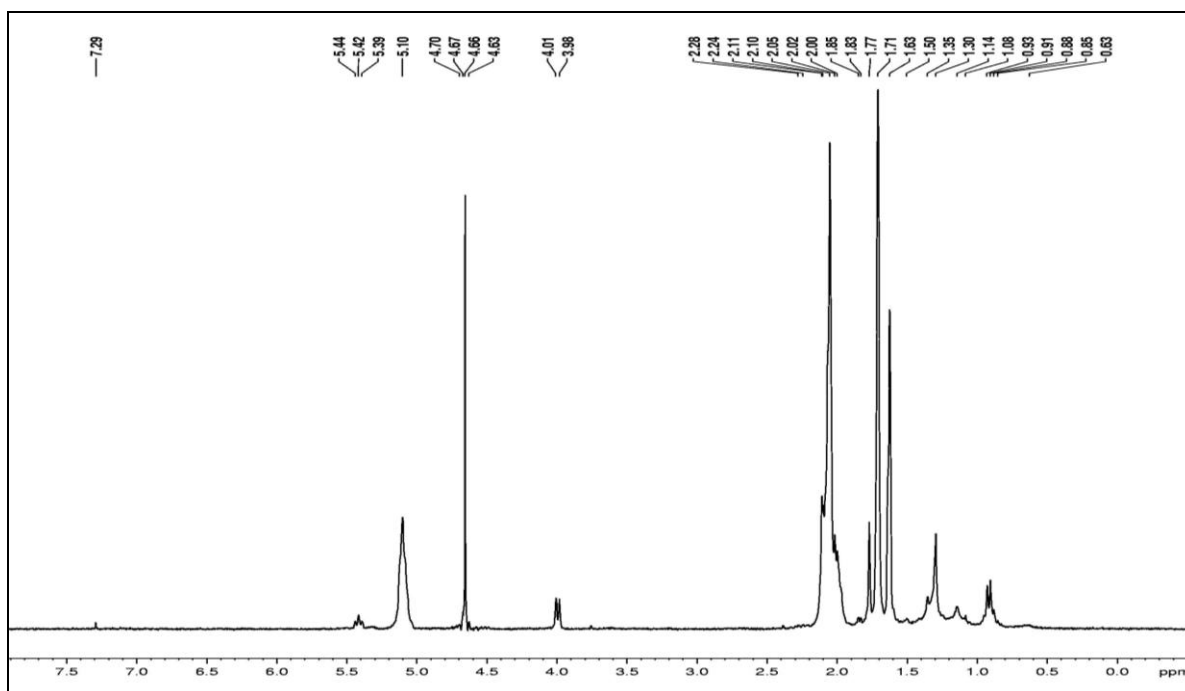


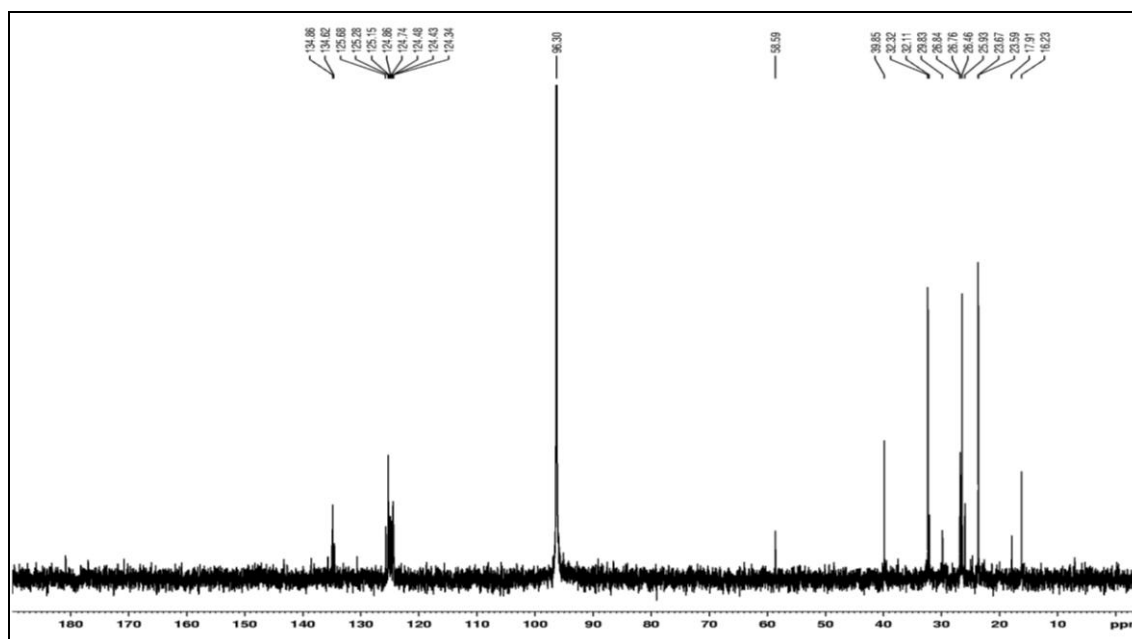
Figura 35. Estrutura do poliprenol-12.

Tabela 25. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) da substância **(15)** e do ficaprenol - 12 [500/125 MHz, C_6D_6] (REYNOLDS *et al.*, 1999).

C/H	(15)		Literatura (REYNOLDS <i>et al.</i> , 1999)	
	$\delta\ ^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}$ lit	$\delta^{13}\text{C}$
1	4,07 <i>dl</i> (7,1)	59,0	4,02	59,0
2	5,42 <i>t</i> (7,1)	126,0	5,41	125,0
3	-	138,4	-	139,9
4	2,02 <i>sl</i>	32,5	2,03	32,0
a	2,02 <i>sl</i>	32,4-32,6	2,11-2,18	32,2
b	2,02 <i>sl</i>	26,9-27,2	2,10-2,20	26,3-26,7
c	5,10 <i>sl</i>	124,7-125,6	5,16-5,31	124,1-125,0
d	-	131,1-135,8	-	131,2-136,1
e	2,02 <i>sl</i>	40,2	2,10-2,12	39,7
f	1,66 <i>s</i>	25,9	1,68	25,7
g	1,58 <i>s</i>	17,8	1,57	17,7
h	1,58 <i>s</i>	16,1	1,61-1,63	16,0
i	1,72 <i>s</i>	23,6-23,7	1,72-1,75	23,4
j	1,66 <i>s</i>	23,5	1,65	25,7



Espectro 143. Espectro de RMN ^1H de OLH-A51 (Substância 15) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 144. Espectro de RMN ^{13}C de OLH-A51 (Substância 15) (75 MHz, CDCl_3)

5.6 Esteroides

5.6.1 Substância 16

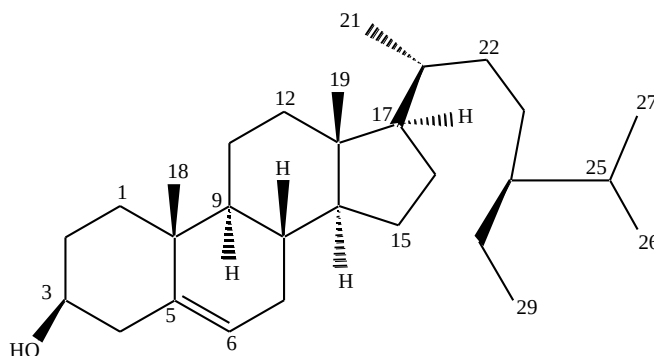
Foi obtida na fração OLH-04 (120-134) a substância **16**, originado a partir dos procedimentos cromatográficos da fase hexânica proveniente do extrato etanólico [descrito em Materiais e Métodos 4.5.1.4, p. 32].

O espectro de RMN de ^1H [Espectro 145, p. 174] apresentou um dubleto em δ 5,30, correspondente a um hidrogênio ligado a carbono olefínico, além de sinais na região entre δ 0,65 e 1,06.

No espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° [Espectro 146 – 147; Tabela 26, p.173] foram observados 29 sinais, incluindo os sinais de carbonos olefínicos do tipo C/CH em δ 140,8 e δ 121,7, respectivamente, e de um carbono carbinólico em δ 71,7, além dos sinais em δ 11,8 e δ 12,0, relativos às metilas (C-18 e C-29).

O perfil dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **16**, bem como os valores dos deslocamentos químicos, como a presença de uma ligação dupla, são sugestivos de compostos com esqueleto esteroidal.

Com base nas informações acima citadas, verifica-se que **16** (**Figura 36**) apresentou dados de RMN ^1H e ^{13}C compatíveis com os do β -sitosterol citados na literatura (WRIGHT *et al.*, 1978; SAXENA & ALBERT, 2005). O β -sitosterol também foi identificado na fração OLH4-150.

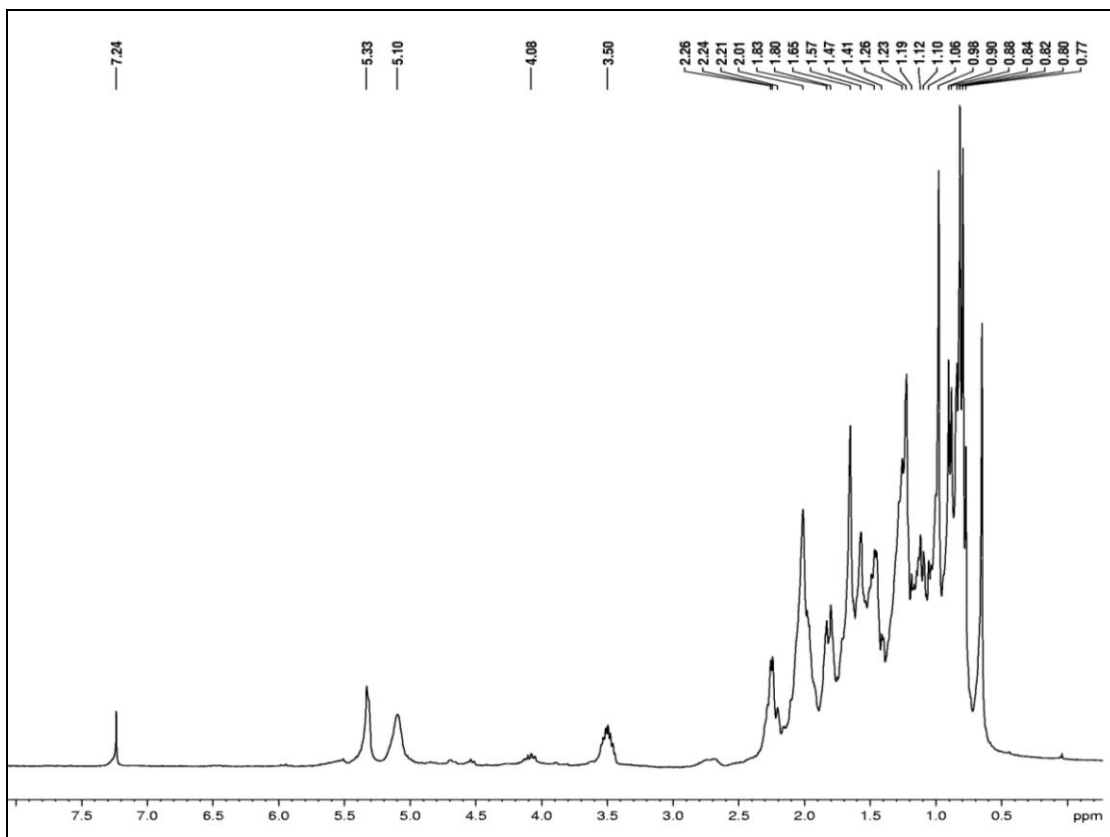


16

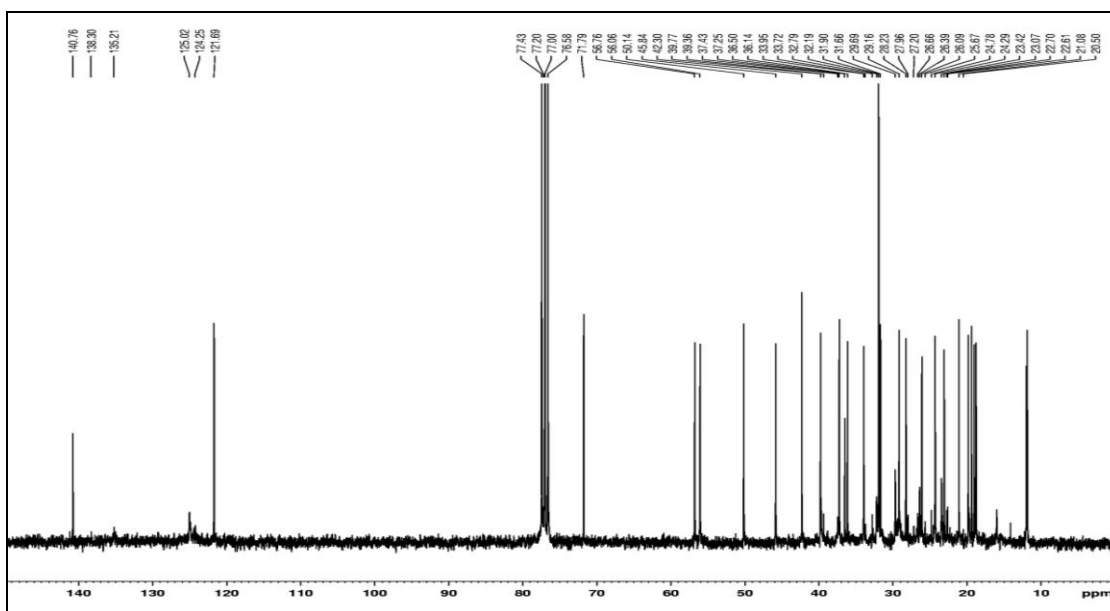
Figura 36. Estrutura do β -sitosterol.

Tabela 26. Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **16** e do β -sitosterol (SAXENA & ALBERT, 2005) [75 MHz, CDCl_3]

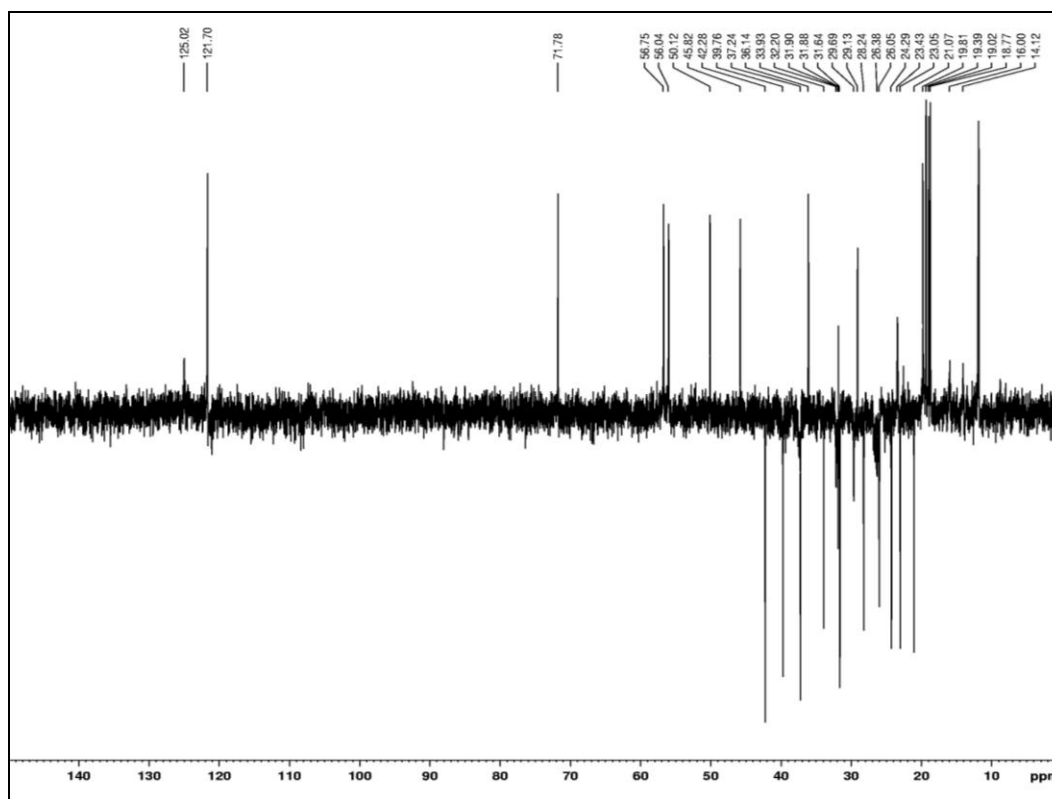
C	(16) $\delta^{13}\text{C}$	Literatura (SAXENA & ALBERT, 2005) $\delta^{13}\text{C}$
1	37,2	37,3
2	31,6	31,6
3	71,8	71,7
4	42,3	42,3
5	140,7	140,8
6	121,7	121,6
7	31,6	31,9
8	31,6	31,9
9	50,1	50,2
10	36,8	36,5
11	21,1	21,1
12	39,7	39,8
13	42,3	42,3
14	56,7	56,8
15	24,3	24,3
16	28,2	28,9
17	56,0	56,1
18	12,0	11,9
19	19,4	19,4
20	36,1	36,2
21	18,7	18,8
22	33,9	34,0
23	26,0	26,1
24	45,8	45,9
25	29,1	29,2
26	19,8	19,8
27	19,0	19,1
28	23,0	23,1
29	11,8	12,3



Espectro 145. Espectro de RMN ^1H de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 146. Espectro de RMN ^{13}C de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 147. Espectro DEPT 135 ° de OLH-04 (120-134) (Substância 16) (75 MHz, CDCl₃)

5.6.2 Substância 17

A substância **17** foi isolada da fração OLGH-28(48-58), originada dos fracionamentos cromatográficos da fase hexânica dos galhos provenientes do extrato etanólico [descrito em Materiais e Métodos 4.7.4, p.36].

O espectro de RMN ¹H [Espectro 149, p. 178] de **17** mostrou vários sinais na região de δ 0,65 a 2,75, um sinal múltiplo na região de δ 3,54 relativo a um hidrogênio carbinólico e um duplete largo a δ 5,34 (9,0 Hz) que indicou a presença de hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN ¹³C e DEPT 135° [Espectro 149 -150, Tabela 27, p. 177] apresentaram sinais mais intensos relativos a seis metilas (duas delas a δ 11,8 e δ 12,0), um carbono oxigenado a δ 79,6 e dois carbonos olefínicos a δ 140,3 δ (C tetrassubstituído) e δ 122,1 (CH), sugestivos de um esqueleto esteroidal (GARCEZ *et al.*, 1997; POUCHERT & BEHNKE, 1983). Além destes sinais relacionados no espectro de RMN ¹³C foram observados sinais adicionais na região de δ 14,1-34,2 e δ 128,1-130,2 e de um observado a δ 174,6. Nos espectros

de RMN ^1H e ^{13}C foram observados ainda, sinais na região entre δ 4,18 e δ 4,47 no espectro de RMN ^1H e seis sinais na região de δ 63,2-101,2, os quais foram sugestivos de um resíduo de açúcar. Foi determinado que tal resíduo era de β -glucopiranosila em função dos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ^{13}C (COLLINS & FERRIER, 1980). Estes dados sugeriram para **17** a estrutura do β -sitosterol glicosilado em C-3 contendo um resíduo de ácido graxo. No espectro de RMN ^{13}C de **17** a diferença significativa observada no valor de deslocamento do sinal correspondente ao carbono δ 79,5 em relação ao mesmo carbono no sitosterol (δ 71,7) (WRIGHT *et al.*, 1978) foi compatível com a presença do açúcar em C-3. Da mesma forma, a desproteção do carbon C-6' da glucose, assim como a proteção de C-5' (SOARES, 2006), foram compatíveis com a localização do resíduo de ácido graxo naquele carbono. O valor de δ 101,2 para o C-1' da unidade de glucose pôde ainda evidenciar a ligação do tipo de O-glucosídeo em C-3 entre a aglicona e o açúcar, uma vez que carbonos anomérios de O-glucosídeos são observados na região de δ 100, independentemente da natureza do resíduo de açúcar (BOYD & TURVEY, 1978).

Com base nos dados espectroscópicos obtidos e através do levantamento bibliográfico sobre outros esteroides (SILVA, 2005), pôde-se concluir que **17** tratava-se do 3(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol (**Figura 37**). Para estes tipos de compostos são atribuídos importantes atividades biológicas, tais como antitumoral (KIRIAKIDIS *et al.*, 1997) e piscicida (HASHIMOTO *et al.*, 1991).

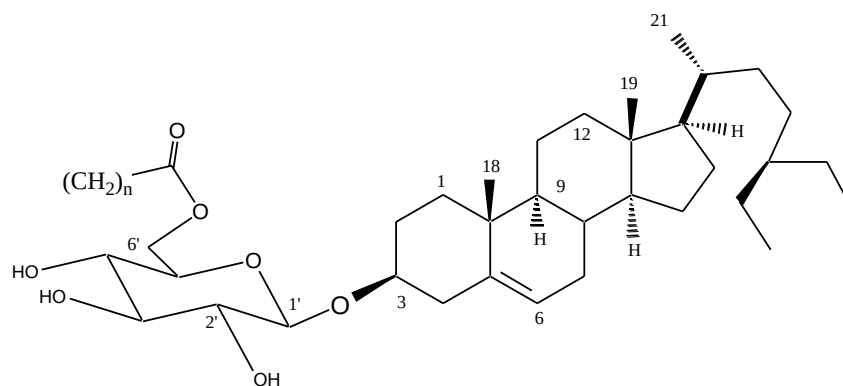
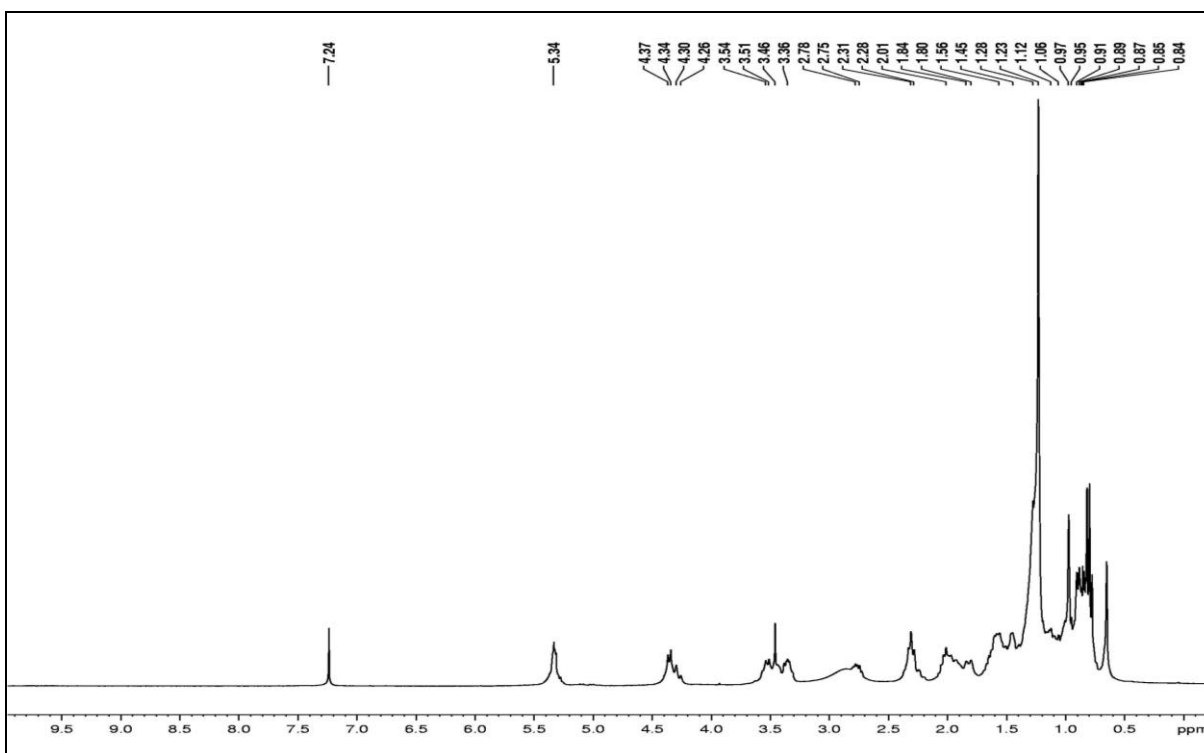


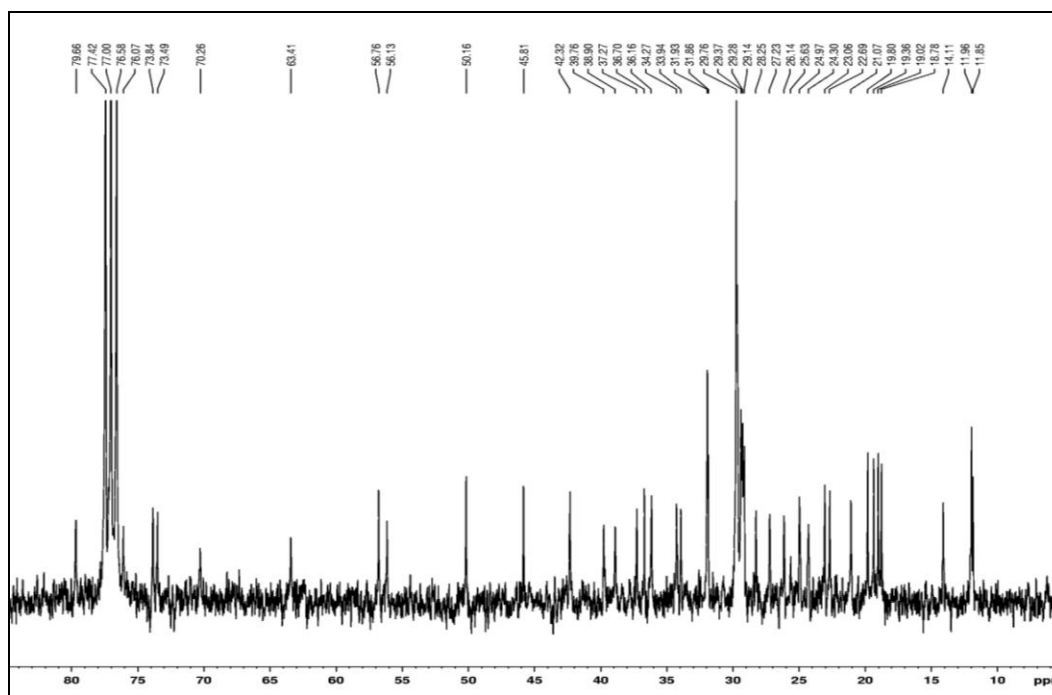
Figura 37. Estrutura de 3(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol.

Tabela 27. Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **17** e do 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol) [75 MHz, CDCl_3] [Silva *et al.*, 2005].

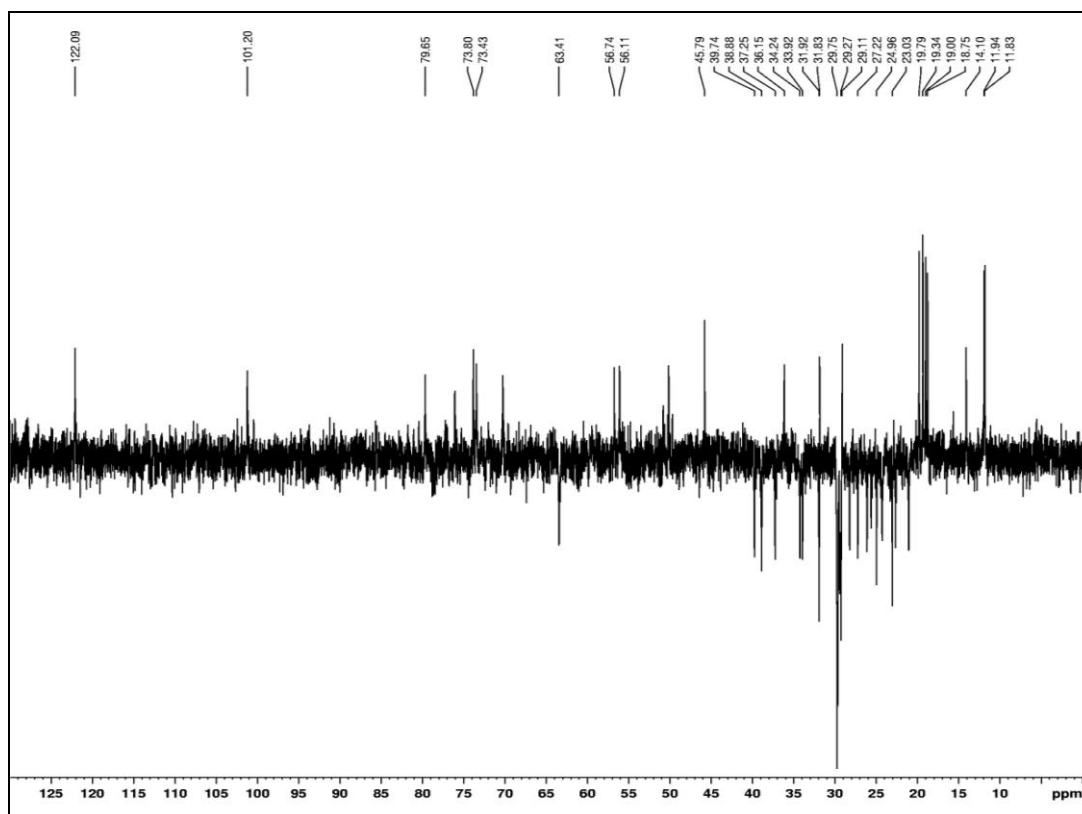
C	(17)	Literatura
	$\delta^{13}\text{C}$	(Silva <i>et al.</i> , 2005) $\delta^{13}\text{C}$
1	37,2	38,9
2	31,9	30,9
3	79,6	79,5
4	38,9	38,9
5	140,3	140,3
6	122,1	122,1
7	31,8	31,8
8	31,9	31,9
9	50,1	50,2
10	36,1	36,1
11	21,0	21,1
12	39,7	39,8
13	42,3	42,3
14	56,7	56,8
15	24,3	24,3
16	28,2	28,2
17	56,1	56,1
18	11,8	11,8
19	19,3	19,3
20	36,7	37,3
21	18,7	18,8
22	33,9	33,9
23	26,1	26,1
24	45,8	45,8
25	29,2	29,2
26	19,8	19,8
27	19,0	19,0
28	23,0	23,1
29	11,9	11,9



Espectro 148. Espectro de RMN ^1H de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (300 MHz, CDCl_3)



Espectro 149. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 150. Espectro de DEPT 135° de OLGH-28(48-58) (Substância 17) (75 MHz, CDCl_3)

5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para o extrato etanólico bruto e fases hexânicas e hidrometanólicas das folhas de *O. lancifolia*, foram realizados os seguintes ensaios: atividade antimicrobiana, toxicidade para *Artemia salina*, atividade antirradicalar e genotóxica.

5.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram testados o extrato etanólico bruto e as fases hexânica e hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia* frente aos microorganismos *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, utilizando como padrão o cloranfenicol.

A concentração mínima inibitória (CMI), apresentou-se inativa para o extrato bruto e fase hidrometanólica frente aos microorganismos testados e fraca para a fase hexânica frente ao *P. aeruginosa* (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 28. Dados de atividade antibacteriana do extrato bruto e das fases hexânica e hidrometanólica das folhas de *O. lancifolia*

Frações	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29218)
	CMI (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMI (µg/mL)
Extrato bruto	In.	In.	In.
Fase hexânica	In.	In.	In.
Fase hidrometanólica	In.	1000	In.

* CMI – concentração mínima inibitória; In. – inativo

5.7.2 Avaliação da toxicidade para *Artemia salina*

Os extratos etanólicos bruto, hexânico e hidrometanólico das folhas de *O. lancifolia* apresentaram –se inativos para a toxicidade em *Artemia salina*, uma vez que extratos brutos vegetais são considerados bioativos quando apresentam um valor de DL50 abaixo de 1000 mg/ml (MEYER *et al.*, 1982).

5.7.3 Avaliação da atividade antirradicalar

O extrato bruto, as fases hexânica e hidrometanólica, e a mistura de biflavonoides das folhas de *O. lancifolia* tiveram suas atividades antirradicalares testadas utilizando o método do seqüestro de radical livre com DPPH.

A atividade é expressa através do valor de IC₅₀ (dado em µg/mL), quanto menor esse valor mais antirradicalar é a substância. As frações analisadas apresentaram atividade antirradicalar, porém a fase hidrometanólica e a mistura de biflavonoides apresentaram atividade antirradicalar significativa.

Tabela 29. Dados de atividade antirradicalar do extrato bruto, das fases hexânica e hidrometanólica e da mistura de biflavonoides das folhas de *O. lancifolia*.

Frações	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato bruto	2,45
Fase hidrometanólica	1,65
Fase hexânica	5,92
Mistura de biflavonoides	1,06
Ácido cafeico*	1,53
*Controle Positivo	

5.7.4 Atividade genotóxica

No presente trabalho foi também avaliada a atividade genotóxica: a) do extrato etanólico (EE) e a fase hidrometanólica (FHOL) das folhas utilizando-se como modelo biológico o teste SMART, em asas de *Drosophila melanogaster*. Foram realizados experimentos independentes, utilizando-se cruzamento padrão (ST) para as amostras.

Observou-se para o extrato etanólico (EE) e fase hidrometanólica (FHOL) das folhas de *O. lancifolia* tratados com três diferentes concentrações, que a frequência de manchas mutantes nos descendentes *trans*-heterozigotos do cruzamento ST, variou de zero a 0,45, prevalecendo manchas simples pequenas. Resultados similares foram encontrados com o controle negativo (0,40).

No cruzamento ST, os valores das frequências de manchas mutantes, do extrato etanólico (EE) e fase hidrometanólica (FHOL) estão abaixo do valor obtido no controle negativo, indicando que os mesmos não apresentam, nestas condições experimentais, atividade genotóxica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico das fases hexânica e hidrometanólica provenientes da partição do extrato etanólico das folhas e galhos de *Ocotea lancifolia* coletados na região do rio Guariroba em Campo Grande/MS resultou no isolamento e caracterização de dezessete substâncias, compreendendo: oito sesquiterpenos, sendo sete de esqueleto eremofilano e um aromadendrano, duas proantocianidinas e um flavonoide, dois diterpenos, um caureno e um pimarano, o α -tocoferol, o poliprenol ficaprenol-12, e dois esteroides, o β -sitosterol e o 3(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol.

Merecem destaque, seis sesquiterpenos inéditos caracterizados como sendo o ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12-oico (**1**), ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-1(10)-en-12-oico (**2**), ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-8-oxo-12-oico (**3**), 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12,8 β -olido (**4**), 4 β , 5 β , 7 β -eremofil-9-en-12,8 α -olido (**5**) e ácido 4 β , 5 β , 7 β -eremofilan-9,10-epóxi-12-oico (**6**). Além do sesquiterpeno 4 β ,5 β ,7 β -eremofil-11-en-10 α -ol (**7**) aqui relatado pela primeira vez em Lauraceae.

A importância da obtenção destes compostos reside no fato de que esta é o primeiro relato da ocorrência de eremofilanos no gênero *Ocotea*. Além disso, ainda não há relatos na literatura sobre a ocorrência das proantocianidinas **10** e **11**.

Deve-se ressaltar também que na literatura, até o momento, só houve um relato sobre esta espécie. Nesse foi estudado quimicamente um espécime do Paraguai, resultando na obtenção de treze alcaloides isoquinolínicos (FOURNET *et al.*, 2007) e na avaliação das suas atividades contra a forma promastigota do *Tripanosoma cruzi*. Neste sentido, o presente trabalho, contribuiu para o conhecimento dos metabólitos secundários predominantes em um espécime de *O. lancifolia* brasileiro.

Pôde-se observar uma predominância de compostos terpênicos no espécime brasileiro. A ocorrência de uma variação na composição química, como a classe de compostos, pode estar relacionada à parte da planta estudada, e também em função da região onde são coletadas.

Quanto às atividades biológicas e antirradicais avaliadas, vale ressaltar que a fase hidrometanólica das folhas apresentou um resultado significativo frente ao ensaio de atividade antirradicalar, assim como duas das substâncias obtidas desta fase, as proantocianidinas **10** e **11**.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÂMOLI, J.; MACEDO, J.; AZEVEDO, L. G.; MADEIRA NETO, J. S.; Caracterização da região dos cerrados. In: *Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. Goedert, W.J. (Ed.) Planaltina: Embrapa-CPAC; São Paulo: Nobel, p. 33-74, 1986.

AGRAWAL, P. K.; Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, New York, 1989.

AIBA, C. J.; BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; Chemistry of Brazilian Lauraceae. XXI. Porosin. Neolignan from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **12**(2), 413-16, 1973.

AHMAD, F. B.; JANTAN, I. B.; BAKAR, B. A.; AHMAD, A. S. B.; A Comparative Study of the Composition of the Leaf Oils of Three *Litsea* species from Borneo. *Journal Essential Oil Research*. **17**, 323-26, 2005.

ANH, N. H.; RIPPERGER, H.; VANSUNG, T.; ADAM, G.; Neolignans and a sesquiterpene from *Caryodaphnopsis tonkinensis*. *Phytochemistry* **42**(4), 1167-69, 1996.

AOKI, T.; MATSUO, K.; SUGA, T.; OHTA, S.; Arachisprenols: polyprenols possessing a geranyl residue from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **46**, 715, 1997.

APPENDINO, G.; TAGLIAPIETRA, S.; NANO, G. M.; CISERO, M.; A Sesquiterpene Alcohol from the Fruits of *Laurus nobilis*. *Phytochemistry* **31**(7), 2537-38. 1992.

ASAKAWA, Y.; KOMATSU, T.; HAYASHI, S.; MATSUURA, T.; Chemical components of the benzene extract of *Cinnamomum loureirii* (Lauraceae). *Flavour Industry* **2**(2), 114-19, 1971.

BAITELLO, J.B. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. *Acta Botanica Brasilica* **15**, 445-50, 2001.

BARBOSA FILHO, J. M.; Lignananas, neo-lignananas e seu análogos. *In*: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O. *et al.* Eds., 2ª ed., Porto Alegre, Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 471-88, 2000.

BARLA, A.; TOPCU, G.; OEKSUEZ, S.; TUEMEN, G.; KINGSTON, D. G. I.; Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chemistry* **104**(4), 1478-84, 2007.

BARROS, C. F.; CALLADO, C. H.; COSTA, C. G.; PUGIALLI, H. R. L.; CUNHA, M.; MARQUETE, O.; *Madeiras da Mata Atlântica*, Vol I. 1a ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p.86, 1997.

BARROSO, G.M.; Sistemática de angiospermas do Brasil. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, **1**, 1978.

BATISTA, A. N. L.; BATISTA, J. M.; JR. LOPEZ, S. N.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; NUNOMURA, S. M.; YOSHIDA, M.; Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. *Quimica Nova* **33**(2), 321-23, 2010.

BATISTA, A. L.; Estudo Fitoquímico das Folhas e Casca de *Nectandra cuspidata* Nees. (Lauraceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, 2001.

BOTEGA, C.; PAGLIOSA, F. M.; BOLZANI, V.S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. *Phytochemistry* **32**, 1331-33, 1993.

BOYD, J.; TURVEY, J. R. Identification by N.M.R.-C-13 spectroscopy of oligosaccharides derived from alginic acid. *Carbohydrate Research* **61**, 223, 1978.

BRUNI, R.; MÉDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MARIAVITTORIA, M.; MARCO, D.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G.; Chemical composition and biological of Ishpingo

essencial oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* **85**, 415-21, 2004.

CANTE, T. ; O móvel do século XIX no Brasil. CGPM. Rio de Janeiro. p. 190, 1988.

CHAO, L. K.; HUA, K.; HSU, H.; CHENG, S.; LIU, J.; CHANG, S.; Study on the Antiinflammatory Activity of Essential Oil from Leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **53**, 7274-78, 2005.

CHEN, K.; HSIEH, P.; HWANG, T.; CHANG, F.; WU, Y.; Anti-inflammatory furanogermacrene sesquiterpenes from *Neolitsea parvigemma*. *Natural Product Research*, **19**(3), 283-86, 2005.

CHENG, X. L.; MA, S. C.; WEI, F.; WANG, G. L.; XIAO, X. Y.; LIN, R. C.; A new sesquiterpene isolated from *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **55**(9): 1390-92, 2007.

CHENG, S.; LIU, J.; HSUI, Y.; CHANG, S.; Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology* **97**, 306–312, 2006.

CHENG, S.; LIU, J.; TSAI, K.; CHEN, W.; CHANG, S.; Chemical Composition and Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from Leaves of Different *Cinnamomum osmophloeum* Provenances. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**, 4395-4400, 2004.

CHOU, G.; NAKAMURA, N.; MA, C.; WANG, Z.; HATTORI, M.; XU, L.; XU, G.; Seven new sesquiterpene lactones from *Lindera aggregata*. Seven new sesquiterpene lactones from *Lindera aggregata*. *Yaoke Daxue Xuebao* **31**, 339, 2000.

CHRISTOPHEL, D. C.; ROWETT, A. I.; The use of cuticular featura in the taxonomy of the Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **83**, 419-32, 1996.

COE-TEIXEIRA, B.; Lauráceas do gênero *Ocotea* do Estado de São Paulo. *Rodriguésia* **32** (52), 55-190, 1980.

COLE, M. M.; The savannas. Biogeography and geobotany. Academic Press, Harcourt Brace Javanovich Publishers, Publishers. London, UK, 1986.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J.; Monosacharides their chemistry and their roles in natural products. John Wiley & Sons, Chichester, 1980.

CONNOLLY, J. D.; HIEL, R. A.; Dictionary of Terpenoids. London, Chapman & Hall, **2**, 1991.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry* **8**, p. 313, 2009.

DALL'ACQUA, S.; VIOLA, G.; GIORGETTI, M.; LOI, M. C.; Innocenti, G. Two new sesquiterpene lactones from the leaves of *Laurus nobilis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **54**(8), 1187-89, 2006.

DAVID, J. PEREIRA; YOSHIDA, M.; Bicalamenenes from *Ocotea corymbosa*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **26**(3), 91-4, 1998.

DAVID, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **35**(2), 545-6, 1994.

DE MARINO, S.; BORBONE, N.; ZOLLO, F.; IANARO, A.; DI MEGLIO, P.; IORIZZI, M.; New sesquiterpene lactones from *Laurus nobilis* leaves as inhibitors of nitric oxide production. *Planta Medica* **71**(8): 706-10, 2005.

DEWICK, P.M.; Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach., 2° ed. John Wiley & Sons, LTD. Londres, 2002.

DIAZ, A. M. P.; GOTTLIEB, H. E.; GOTTLIEB, O. R.; Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry* **19**, 681-82, 1980.

DODSON, C. D.; STERMITZ, F. R.; CASTRO, C. O.; JANZEN, D. H.; Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry* **26**, 2037-40, 1987.

EITEN, G.; Brazilian “savanas”. In: *Ecology of tropical savanas*. Huntley, B. J.; Walker, B. H. (Eds). Springer Verlag, Berlim, p. 24 – 47, 1982.

EITEN, G.; The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* **38**, 201 – 341, 1972.

EMMERICH, M.; SENNA, L. M.; Estudos de etnobotânica no Parque indígena do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. *Bradea* **4**, p.170, 1985.

EVANS, W. C.; Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: EVANS, W. C. (Ed.) Trease and Evans’ pharmacognosy. 14th ed., Philadelphia: WB Saunders, **2**, 28-55, 1996.

FANG, F.; SANG, S.; CHEN, K. Y.; GOSSLAU, A.; HO, C.; ROSEN, R. T.; Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *Food Chemistry* **93**, 497–501, 2005.

FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA T.; Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **15**(3): 250-55, 2005.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; Differences in the Fragrances of Pollen and Different Floral Parts of Male and Female Flowers of *Laurus nobilis*. *Journal Agricultural Food Chemistry* **50**, 4647-52, 2002.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; GUY, I; GUINAUDEAEU, H.; HEINZEN, H.; Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* **78**, 382-84, 2007.

FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; Macrophyllin, a Neolignan from *Licaria Macrophylla* *Phytochemistry* **13**(12): 2839-42, 1974.

FUNASAKI, M.; LORDELLO, A. L. L.; VIANA, A. M.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; YOSHIDA, M.; KATO, M. J.; Neolignans and Sesquiterpenes from Leaves and Embryogenic Cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **20**(5): 853-59, 2009.

FURLEY, P. A.; RATTER, J. A.; Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography* **15**, 96-108, 1988.

GAN, L. S.; ZHENG, Y. L.; MO, J. X.; LIU, X.; LI, X. H.; ZHOU, C. X. Sesquiterpene Lactones from the Root Tubers of *Lindera aggregata*. *Journal of Natural Products* **72**(8): 1497-1501, 2009.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. F. G; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M.; Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Medica* **77**, 383-87, 2011.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIRANDA, A. C. D. M.; Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. *Química Nova* **33**, 1739-42. 2010.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T.; Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Medica* **71**, 923-27, 2005a.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA L. M. G. E., SHIMABUKURO, A. A.; Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 1382-86, 2005b.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; CRUZ, A. C.; A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Medica* **65**, 775, 1999.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; TSUTSUMI, M. T.; ROQUE, N. F.; Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry* **45**, 141, 1997.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; Benzylisoguinoline alkaloids and flavonol from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry* **39**, 815-16, 1995.

GIANG, P. M.; KÖNIG, W. A.; TONG, P. S.; Chemical constituents of the essential oil from the bark of *Cinnamomum illicioides* A. Chev. from Vietnam. *Journal of Natural Medicines* **60**, 248-50, 2006.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M.; Lignans. In: Natural Products of Woody Plants. ROWE, J. W. ed. I. Berlin, Springer-Verlag, 439-511, 1989.

GOTTLIEB, O. R.; Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* **11**(5), 1537-70, 1972.

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATS, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* **6**, 153, 1984.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; Aporphinoids alkaloids III. *Journal of Natural Products* **57**, 1033, 1994.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids III. *Journal of Natural Products* **46**, 389, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids IV. *Journal of Natural Products* **51**, 761, 1983.

GUNAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; Aporphinoids alkaloids II. *Journal of Natural Products* **42**, 325, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; Aporphinoids alkaloids I. *Lloydia* **38**, 275, 1975.

HAKIM, E. H.; ACHMAD, S. A.; EFFENDY; GHISALBERTI, E. L.; HOCKLESS, D. C. R.; WHITE, A. H.; Structural Studies Of 3 Sesquiterpenes From *Litsea* Spp (Lauraceae). *Australian Journal Of Chemistry* **46**(9): 1355-62, 1993.

HAM, A.; KIM, B.; KOO, U.; NAM, K. W.; LEE, S. J.; KIM, K. H.; SHIN, J.; MAR, W.; Spirafolide from Bay Leaf (*Laurus nobilis*) Prevents Dopamine-induced Apoptosis by Decreasing Reactive Oxygen Species Production in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Archives of Pharmacal Research* **33**(12): 1953-58, 2010.

HAMPEL, D.; MOSANDL, A.; WÜST, M.; Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry* **66**, 305–11, 2005.

HANSON, J. R.; SIVERNS, M.; PIOZZI, F.; SAVANA, G.; C-13 Nuclear magnetic resonance spectra of kauranoid diterpenes. *Journal of Chemical Society Perkin Trans.* **1**, 114-17, 1976.

HASHIMOTO, T.; TORI, M.; ASAKAWA, Y.; Piscidal sterol acylglucosides from *Edgeworthia-chrysantha*. *Phytochemistry* **30**, 2927, 1991.

HAYAMAN A. R., PERRY, B., WEAVERS R. T., *Phytochemistry* **25**(3), 649, 1986.

HAYASHI, N.; HAYASHI, S.; MATSUURA, T.; Structure of sericenine and sericenic acid, the new germacrane type sesquiterpenoids, isolated from *Neolitsea sericea*. *Tetrahedron Letters* **48**, 4957-60, 1968.

HIKINO, H.; SUZUKI, N.; TAKEMOTO, T.; Sesquiterpenoids. XXXVIII. Structure and absolute configuration of campherenone and campherenol, sesquiterpenoids of *Cinnamomum camphora*. *Chemical & Pharmacology Bulletin* **19**, 87-92, 1971.

HIKINO, H.; SUZUKI, N.; TAKEMOTO, T.; Structure of campherenone and campherenol. *Tetrahedron Letters* **50**, 5069-70, 1967.

HIROI, M.; Sesquiterpenoids in the leaf oil of the camphor tree. I. Sesquiterpenoids of *Cinnamomum camphora* (Japanese camphor tree). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **40**, 1003 - 4, 1967.

HOANG, V. D.; TAN, G. T.; ZHANG, H.; TAMEZ, P. A.; NGUYEN, V. H.; NGUYEN, M. C.; SOEJARTO, D. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; Natural anti-HIV agents-part I: (+)-demethoxyepiexcelsin and verticillatol from *Litsea verticillata*. *Phytochemistry* **59**(3), 325-29, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. EDUFSCAR, São Carlos, 2003.

HUBERT, T. D.; WIEMER, D. F.; Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry* **24**, 1197-98, 1985.

IBRAHIM, J. B.; GOH, S. H.; Essential oils of *Cinnamomum* species from Peninsular Malaysia. *Journal of Essential Oil Research* **4**(2), 161-71, 1992.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, K., IITAKA, Y.; Novel Sesquiterpenes from *Alpinia intermedia* GAGNEP. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **35** (7), 2860-68; 1987.

JANTAN, I.; MUHAMMAD, K.; NEE, C. C.; Constituents of the Leaf and Bark Oils of *Cinnamomum subavenium*. *Journal of Essential Oil Research* **17**, 281-83, 2005.

JANTAN, I.; LING, Y. E.; ROMLI, S. ; A Comparative Study of the Constituents of the Essential Oils of Three *Cinnamomum* Species from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research* **15**, 387-91, 2003.

JOLY, A. B.; Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo, Nacional, 777, 1991.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN K.; O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research* **9**, 527, 1970.

KANJILAL, P. B.; KOTOKY, RUMI; SINGH, R. S.; Composition of essential oil from leaf of *Litsea kingii* H.K. *Indian Perfumer* **45**(4), 253-56, 2001.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L.J.; DUKE, J. A.; Natural Products from Plants. CRC Press, New York, 1999.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G.; Neolignans from stem bark of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry* **26**(4), 1155-58, 1987.

KILIC, A.; ALTUNTAS, E.; Wood and bark volatile compounds of *Laurus nobilis*. *Holz und als Roh- Werkstoff* **64**, 317-20, 2006.

KILIC, A.; HAFIZOGLU, H.; KOLLMANNNSBERGER, H.; NITZ, S.; Volatile Constituents and Key Odorants in Leaves, Buds, Flowers, and Fruits of *Laurus nobilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(6), 1601-06, 2004.

KIRIAKIDIS, S.; STATHI, S.; JHA, H.C.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; Fatty acid esters of sitosterol 3 β -glucoside from soybeans and tempe (fermented soybeans) as antiproliferative substances. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **22**, 139, 1997.

KOUNO, I.; HIRAI, A.; FUKUSHIGE, A.; JIANG, Z. H.; TANAKA, T.; A novel rearranged type of secoeudesmane sesquiterpenoide from the root of *Lindera strychnifolia* (Sieb. et Zucc.) F. Villars. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **47**(7), 1056-57, 1999.

LAGO, J.H.G.; BROCHINI, C. B.; NÍDIA F. R.; Terpenes from leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Phytochemistry* **55**, 727-731, 2000.

LIMA, J. E. F.W.; SILVA, E. M.; Estimativa da Produção Hídrica Superficial do Cerrado Brasileiro, *In: Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Scariot, A.; Sousa-Silva, J. C.; Felfili, J. M.; Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.65, 2005.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S.; Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazônica* **35**(3), 363 – 66, 2005.

LIU, B. J.; CHANG, H. S.; WANG, G. J.; CHIANG, M. Y.; LIAO, C. H.; LIN, C. H.; CHEN, I. S.; Secondary metabolites from the leaves of *Neolitsea hiiranensis* and the anti-inflammatory activity of some of them. *Phytochemistry* **72**(4-5): 415-22, 2011.

LÔBO L. T., CASTRO K. C. F. ARRUDA M. S. P., SILVA M. N., ARRUDA A. C., MÜLLER A. H., ARRUDA G. M. S. P. , SANTOS A. S., FILHO, A. P. S. S. Allelopathic potential of catechins of the *Tachigali myrmecophylla* (Leguminosae). *Química Nova* **31**(3), 2008.

LORDELLO, A. L. L.; CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Revista Latinoamericana de Química* **28**(1), 35-39, 2000.

LORDELLO, A. L. L.; MASSAYOSHI, Y.; Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry* **46**, 741-44, 1997.

LORENZI H.; Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, 4a ed.; Instituto Plantarum: São Paulo-SP **1**, 143-44, 2002.

MARKHAM, K. R.; GEIGER, H; ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids and their Glycosides in Hexadeuterodimethylsulfoxide *In: The Flavonoids. Advances in Research Since 1986.* Harborne, J. B., Chapman e Hall, CRC; 1^a edição, p.462, 1993.

MARQUES, C. A.; Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl., *Floresta e Ambiente* **8**(1), 195-206, 2001.

MARQUES, M. O. M.; YOSHIDA, M.; Structure of propacin. *Quimica Nova* **13**(4), 245-6, 1990.

MATSUO, M.; URANO, S.; ^{13}C NMR spectra of tocopherols and 2,2-dimethylchromanols. *Tetrahedron* **32**, 229-31, 1976.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*. **45**, 31, 1982.

MIMURA, A.; SUMIOKA, H.; KATSUYOSHI, M.; OTSUKA, H.; Conjugates of an abscisic acid derivative and phenolic glucosides, and a new sesquiterpene glucoside from *Lindera strychnifolia*. *Journal of Natural Medicines* **64**, 153–60, 2010.

MIR, S. R.; ALI, M.; KAPOOR, R.; Chemical composition of essential oil of *Cinnamomum tamala* Nees et Eberm. leaves. *Flavour and Fragrance Journal* **19**(2), 112-14, 2004.

MIRANDA, H. S.; SATO, M.N.; Efeitos do fogo na vegetação lenhosa do Cerrado *In: Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação.* Scariot, A.; Sousa-Silva, J. C.; Felfili, J. M.; Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 2005.

MMA – Ministério do Meio Ambiente; Instrução Normativa Nº 6 de 23/09/2008.

MIYAZAWA M., WATANABE H, UMEMOTO K., KAMEOKA H.; Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **46**, 3431-34, 1998.

MORAES, P.L.R.; Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotropica* **5**, 2, 2005.

MORENO, P.R.H.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; SOUZA, I.A.; HENRIQUES, A.T.; Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. *International Journal of Pharmacognosy* **31**(3), 189-92,1993.

NAVES, R. Y.; PIERRE, A.; Volatile plant substances. CXXXIX. Sesquiterpenes of Brazilian rosewood oil (*Aniba rosaeodora* var. *amazonica*). *Bulletin de la Societe Chimique de France* 292-7,1956.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* **66**, p. 1022, 2003.

NII, HIROMICHI; FURUKAWA, KIYOSHI; IWAKIRI, MITSUO; KUBOTA, AKASHI ; A new sesquiterpene carboxylic acid from *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) blume. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **57**, 725-32,1983.

NOZAKI, H.; HIROI, M.; TAKAOKA, D.; NAKAYAMA, M.; Neoliacine, a Novel Germacranolide Sesquiterpene Dilactone from *Neolitsea acciculata* Koidz - X-Ray Crystal-Structure. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **19**: 1107-08. 1983.

PEREIRA CHAVEZ, J.; GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M.; The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part 104. 10-Desmethyl-1-methyl-eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*, **39**(4), 849-52, 1995.

- POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. The Aldrich library of ^{13}C and FT NMR spectra. Aldrich Chemical Company, Inc: Milwaukee, 1983.
- PRANCE, G. T.; Islands in Amazonia. *Philosophical Transactions of the Royal Society* . **351**, 823-33, 1996.
- RANA, V. S.; BLAZQUEZ, M. A.; GC-MS analysis of the essential oil of *Cinnamomum tamala* L. leaves. *India Perfumer* **49**(4), 475-78, 2005.
- REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S.; JACOBS, H.; HARDING, W. W.; Assignment of ^1H and ^{13}C spectra for polyprenol-12, a molecule with severe ^1H and ^{13}C spectral crowding with the aid of high-resolution, ^{13}C -detected, ^{13}C , ^{13}C - ^1H shift correlation spectra. *Canadian Journal of Chemistry* **77**, 1922, 1999.
- RASOOLI, I; ABYANEH, M.R.; Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **15**, 479-83, 2004.
- REYNOLDS, T.; KITE, G.; Volatile constituents of *Phoebe porosa* Mez. *Journal of Essential Oil Research* **7**, 415-18, 1995.
- RIZZINI, C. T.; *Tratado de Fitogeografia do Brasil*. Aspectos florísticos. Editora Hucitec & Editora da Universidade de São Paulo, SP, 1979.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; Botânica econômica brasileira. EPU/EDUSP, São Paulo, 1976.
- ROHWER, J. G.; Lauraceae. In: The families and genera of vascular plants. KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. Springer-Verlag, Berlin, **2**, 1993.
- ROHWER, J. S.; Prodromus einer monographie der gattung *Ocotea* Aublet (Lauraceae) sensu lato. Mitteilungen aus dem Institut für allgemeine Botanik in Hamburg, **20**, 164, 1986.

ROQUE, N. F.; FERREIRA, Z. S.; GOTTLIEB, O. R.; STEPHENS, R. L.; WENKERT, E.; The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part L. The structure of ocotealactol, a new eudesmanolide. *Revista Latinoamericana de Quimica* **9**(1), 25-7, 1978.

SANGIRARDI, JR.; Botânica fantástica: plantas da mitologia, religião, magia. Ed. Brasiliense, São Paulo. p.113, 1984.

SAKAI, S. I.; AIMI, N.; YAMANAKA, E.; YAMAGUCHI, K.; The alkaloids. *In: Natural Products of Woody Plants*, ROWE, J. W., ed. I. Berlin, Springer-Verlag, 200-57, 1989.

SATTAR, A.; GILANI, A. MUSTAFA; S., AKBAR, M.; Gas chromatographic examination of the essential oil of *Cinnamomum camphora*. *Journal of Scientific & Industrial Research* **34**, 135-6, 1991.

SAXENA, V. K.; ALBERT, S.; β -sitosterol-3-O- β -D- xylopiranoside from de flowers of *Tridax procumbens* Linn. *Journal of Chemical Sciences* **3**, 117, 2005.

SCORA, R. W.; SCORA, P. E.; Essential leaf oil of *Persea* subgenus *Eriodaphe* and clolsely realated *Perseoid* genera. *Journal of Essential Oil Research* **13**, 37-42, 2001.

SCORA, R. W.; AHMED, M.; Terpenes of *Persea tolimanensis* (Lauraceae), an Ancestor of the Guatemalan Avocados. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1971-73, 1993.

SETZER, W. N.; HABER, W. A.; Leaf essential oil composition of five species of *Beilschmiedia* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*. **2**, 79-83, 2007.

SETZER, W. N.; TAKAKU, S.; STOKES, S. L.; PENTON, A. F.; Inhibition of Cruzain by *Ocotea* Leaf Essential Oils. from Monteverde, Costa Rica. *Pharmacology* **3**, 785-93, 2006.

SHEPHERD G. J., Conhecimento de Diversidade de Plantas Terrestres do Brasil, Ed. Unicamp: São Paulo **19**, 2000.

SHUICHI, Y.; KATSUMI, H.; NANAO, M. T.; Sesquiterpene alcohols and a phenol ether from the essential oil of the kusunoki (*Cinnamomum camphora*). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **41**(6), 1465-6, 1968.

SHARMA, M. C.; OHIRA, T.; YATAGAI, M.; Extractives of *Neolitsea sericea* a new hydroxy steroidal ketone, and other compounds from the heartwood of *Neolitsea sericea*. *Mokuzai Gakkaishi*, **39**(8), 939-43, 1993.

SHEPHERD, G. J.; Conhecimento de Diversidade de Plantas Terrestres do Brasil, Ed. Unicamp: São Paulo-SP. **19**, 2000.

SILVA, L. M. G. E. Estudo Químico dos frutos, cascas do caule e cerne de um espécime de *Ocotea Minarum* (Meissn.) Mez. (Lauraceae). Campo Grande, 2005. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A.; Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology* **89**, 277-83, 2003.

SILVA G., BARBOSA FILHO J. M. , SILVA M. S., LACERDA C. D. G., CUNHA E. V. L.; Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**, 881-83, 2002.

SILVA, M. F.; T., F. S. N.; MAIA, J. G. S.; CONSERVA, L. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; The Chemistry of Brazilian Lauraceaet. Part 106. The natural occurrence of magnosalicin diastereomers. *Phytochemistry* **45**(7), 1527-28, 1997

SILVA, W. D.; BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. *Phytochemistry* **28**(2), 661-62, 1989.

SINYINDA, S.; GRAMSHAW, J. W.; Volatiles of avocado fruit. *Food Chemistry* **62** (4), 483-87, 1998.

SOARES, A. O.; Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de *Tabebuia caraíba* (Bignoniaceae) coletado na região do cerrado de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.; Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II., 2a ed., Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, 2008.

SILVA, M. F., *et al* . The Natural Occurrence of Magnosalicin Diastereomers. *Phytochemistry* **45**(7), 1527-8, 1997.

SWIEZEWSKA, E.; SAZAK, W.; MARIKOWSKI, T.; JANKOWSKI, T. V.; KRAJEWSKA, I.; HERTEL, J.; SKOCZLAS, E.; The search for polyprenol. *Acta Biochimica Polonica* **41**, 221, 1994.

TADA, H.; TAKEDA, K.; Sesquiterpenes of Lauraceae plants. IV. Germacranolides from *Laurus nobilis* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **24**(4), 667-71, 1976.

TANAKA, R.; SAKANO, Y.; SHIMIZU, K.; SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; GODA, Y.; Constituents of *Laurus nobilis* L. inhibit recombinant human lanosterol synthase. *Journal of Natural Medicines* **60**, 78–81, 2006.

TANAKA, Y.; TANGPAKDEE, J.; Log-chain polyprenols and rubber un young leaves of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **48**, 447, 1998.

TAKAOKA, D.; NOZAKI, H.; NAKAYAMA, M.; Structure of Neoliacinic Acid, a New Highly Oxidized Sesquiterpene from *Neolitsea acciculata* Koidz. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communication* **24**, 1861-62, 1987.

TAKEDA, K.; HORIBE, I.; TERAOKA, M.; MINATO, H.; Sesquiterpenes of Lauraceae plants. I. Components of *Neolitsea aciculate*. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* **7**, 973-80, 1970.

TAKEDA, K.; HORIBE, I.; MINATO, H.; Sesquiterpenes of Lauraceae plants. II. Neosericenine, a component of the leaf of *Neolitsea sericea*. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* **11**, 1547-9, 1970B.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**, 69–75, 2003.

TELASCREA, M.; ARAUJO, C. C.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; MORAES, P. L.R.; CAVALHEIRO, A. J.; Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. *Biochemical Systematics and Ecology* **35**, 222-32, 2007.

TELES, H. L.; SILVA, G. H.; GAMBOA I. C.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, J. O.; COSTA NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.; YOUNG, M. C.; ARAÚJO, A. R.; Benzopyrans from *Curvularia* sp. Na endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). *Phytochemistry* **66**, 2363-67, 2005.

ULUBELEN A., TOPCU G., ERIS C., SONMEZ U., KARTAL M., KURUCU S., JOHANSSON B.; Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* **36**, 971-74, 1994.

URANO, S.; HATTORI, Y.; YAMANOI, S.; MATSUO, M.; ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies on α -tocoferol and its derivatives. *Chemical Pharmacology Bulletin*. **28** (7), 1992-98, 1980.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI, R. G.; New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *Farmaco* **34**, 829-40, 1979.

WANG, C.; KUOH, C.; WU, T.; Constituents of *Persea japonica*. *Journal of Natural Products* **59**(4), 409-11, 1996.

WEHRLI, F. W.; NISHIDA, T.; The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. In: Fortschritte der chemie organischer naturstoffe/progress in the chemistry of organic natural products. HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G. W. Springer-Verlag, New York, p 36, 1979.

WERFF, H. VAN DER; RITCHER, H. G.; Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **83**, 409-18, 1996.

WEYERSTAHL, P.; WAHLBURG, H. C.; SPLITTGERBER, U.; MARSCHALL, H. ; Volatile constituents of Brazilian *Phoebe* oil. *Flavour and Fragrance Journal* **9**, 179-86, 1994.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SCORA, R. W.; Constituents of the leaf essential oil of *Persea indica* (L.) K. Spreng. *Flavour and Fragrance Journal* **8**, 201-7, 1993.

WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A.; IDLER, D.; KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry* **56**, 1898, 1978.

WU, X.; VOGLER, B.; JACKES, B. R.; SETZER, W. N.; Terpenoids from *Neolitsea dealbata*. *Natural Product Communications* **3**(2): 129-132. 2008.

WU, X.; VOGLER, B.; HABER, W. A.; SETZER, W. N.; A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications* **1**(6), 465-68, 2006.

WU, S.; LI, W.; Chemical constituents from the roots of *Neolitsea hiiranensis*, *Journal of the Chinese Chemical Society* **42**(3), 555-60, 1995.

YOSHIKAWA, M.; SHIMODA, H.; UEMURA, T.; MORIKAWA, T.; KAWAHARAB, Y.; MATSUDA, H.; Alcohol Absorption Inhibitors from Bay Leaf (*Laurus nobilis*): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8**, 2071-7, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1 ed. Argos, Chapecó, 2001.

ZANIN, S. M.; LORDELLO, A. L. L.; Alcaloides aporfinoides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova* **30**, 92, 2007.

ZHANG, H.; TAN, G. T.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A.D.; VAN HUNG, N.; CUONG, N. M.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; New Sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *Journal of Natural Products* **66**(5), 609-15, 2003.

ZHANG X., XU J., WANG J., WANG N., KURIHARA H., KITANAKA S. e YAO, X. J. Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. *Nat. Prod.* **70**, 24-8, 2007.

ZHANG, H.; TAN, G. T.; HOANG, V. D.; VAN HUNG, N.; CUONG, N. M.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; Natural anti-HIV agents. Part 3: Litseaverticillols A-H, novel sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *Tetrahedron* **59**(2), 141- 48, 2002.

ZHANG, H.; TAN, G. T.; HOANG, V. D.; VAN HUNG, N.; CUONG, N. M.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; Natural anti-HIV agents. Part 2: Litseaverticillol A, a prototypic litseane sesquiterpene from *Litsea verticillata*. *Tetrahedron Letters* **42**(49), 8587-91, 2001.