

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo químico das flores de *Hortia oreadica*  
(Rutaceae)**

**Marina Cristina Zequin\***

Dissertação apresentada como  
parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA  
ORGÂNICA.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Fátima das Graças Fernandes da  
Silva**

**\*Bolsista CAPES**

**São Carlos – SP**

**2018**

Zequin, Marina Cristina

Estudo Químico das flores de Hortia oreadica (Rutaceae) / Marina Cristina Zequin. -- 2018. 82 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Banca examinadora: Profª Drª Vânia Gomes Zuin, Profª Drª Isabele

Rodrigues Nascimento

Bibliografia

1. Hortia oreadica. 2. Hortia. 3. Rutaceae. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia Programa de Pós-Graduação em Química

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Marina Cristina Zequin, realizada em 27/07/2018:



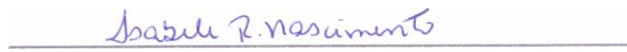
---

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva  
UFSCar



---

Profa. Dra. Vânia Gomes Zuin  
UFSCar



---

Profa. Dra. Isabelle Rodrigues Nascimento  
UNESP

Dedico esse trabalho aos meus pais, Inês e Luis Carlos, que sempre me apoiaram e ajudaram para possibilitar que eu atingisse meus objetivos.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação e confiança em mim desde o começo, e pelas enormes contribuições após cada conversa;

Aos meus pais que sempre me apoiaram e se esforçaram muito para que eu conseguisse atingir meus objetivos e também por entenderem minha ausência na maioria do tempo;

A todos do Laboratório de Produtos Naturais, por todas as conversas e ideias que me ajudaram muito no desenvolvimento desse trabalho; assim como por todos os momentos de descontração na cozinha, que ajudaram a levar essa jornada de uma forma mais leve;

A todos os professores do DQ-UFSCar, que de forma direta ou indireta contribuíram com minha formação;

A todos meus amigos, em especial: Luciano Rodrigues, Romário, Jéssica, Marília, Júlia, Bruno, Walleria, Welma, Cleiton, Laura e Larissa que me deram muita força, me incentivaram e acreditaram sempre em mim;

Ao meu amigo Luciano Silva, por estar sempre disposto a me ajudar, fosse com conselhos, com conversas à toa que me distraíssem nos momentos mais difíceis, até mesmo com me ajudando de forma direta no desenvolvimento do trabalho;

Ao Laboratório de RMN, em especial ao Prof. Gilberto Ferreira e a técnica Luciana por estarem sempre disponíveis para realizar os experimentos que fossem pedidos;

Ao laboratório SEPARARE, em especial a Prof<sup>a</sup> Quezia e a Prof<sup>a</sup> Regina pela disponibilidade e pela permissão de utilizar os equipamentos do laboratório;

A minha irmã por estar sempre disponível para me ouvir, assim como por todo o apoio que me deu durante todo esse percurso;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com esse trabalho;

A CAPES pela bolsa concedida;

É com muito carinho que lhes digo:

Muito obrigada!

## Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em camada delgada
GC-MS massas	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
<i>d</i>	dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
<i>dd</i>	duplo dubleto
E.A	Extrato da fração acetato de etila das flores de <i>H. oreadica</i>
E.H	Extrato da fração hexânica das flores de <i>H. oreadica</i>
E.M	Extrato da fração metanólica das flores de <i>H. oreadica</i>
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
nm	Nanômetro
ppm	partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
SPE	Solid Phase Extraction
<i>t</i>	tripleto
UV	Ultra-violeta

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 4.1</b> -Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T).....	32
<b>Tabela 4.2</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T) .....	41
<b>Tabela 4.3</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	46
<b>Tabela 4.4</b> – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	54



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Flores de Hortia oreadica .....	2
<b>Figura 1.2</b> - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em Hortia ssp .....	3
<b>Figura 1.3</b> - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em Hortia ssp .....	4
<b>Figura 1.4</b> - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em Hortia ssp .....	5
<b>Figura 1.5</b> – Limonoides encontrados em Hortia ssp .....	6
<b>Figura 1.6</b> - Limonoides encontrados em Hortia ssp .....	7
<b>Figura 1.7</b> - Limonoides encontrados em Hortia ssp .....	8
<b>Figura 1.8</b> – Cumarinas encontradas em Hortia ssp .....	9
<b>Figura 1.9</b> – Alcalóides encontrados em Hortia ssp .....	9
<b>Figura 4.1</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.H ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 Tesla) .....	18
<b>Figura 4.2</b> - Cromatograma da análise de E.H. em diferentes comprimentos de onda (nm).....	18
<b>Figura 4.3</b> - Cromatograma da análise por CG-MS do E.H. ....	19
<b>Figura 4.4</b> - Porcentagem dos compostos identificados em E.H a partir de CG-MS.....	20
<b>Figura 4.5</b> - Compostos identificados no E.H. por análise de CG-MS.....	20
<b>Figura 4.6</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 Tesla).....	21
<b>Figura 4.7</b> – Cromatograma da análise de E.A. em CLAE-UV a 254 nm .....	21
<b>Figura 4.8</b> - Cromatograma da separação de E.A-13 em HPLC-Preparativo a 250 nm .....	22
<b>Figura 4.9</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.M. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	23
<b>Figura 4.10</b> - Cromatograma da análise de E.M. por CLAE-DAD.....	24
<b>Figura 4.11</b> - Cromatograma das bandas "trapeadas" por CLAE-DAD-SPE..	24
<b>Figura 4.12</b> – Estrutura enumerada da substância 1 .....	25
<b>Figura 4.13</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T) .....	26
<b>Figura 4.14</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	27
<b>Figura 4.15</b> - Expansão do RMN de $^1\text{H}$ da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T) .....	27
<b>Figura 4.16</b> - Acoplamentos vicinais de H-3 da substância 1 .....	28
<b>Figura 4.17</b> - Mapa de contornos COSY da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T) .....	29
<b>Figura 4.18</b> - Interações observadas no mapa de contornos COSY da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	29
<b>Figura 4.19</b> - Mapa de contornos HSQC da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T) .....	30
<b>Figura 4.20</b> - Expansão do mapa de contornos HSQC da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	30
<b>Figura 4.21</b> - Mapa de contornos HMBC da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	31
<b>Figura 4.22</b> - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	31
<b>Figura 4.23</b> - Estrutura enumerada da substância 2.....	33
<b>Figura 4.24</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T) .....	34
<b>Figura 4.25</b> – Espectro de RMN de DEPT 135 da substancia 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T) .....	34
<b>Figura 4.26</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substancia (2), ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T) .....	35

<b>Figura 4.27</b> - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>(2)</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T).....	36
<b>Figura 4.28</b> - Acoplamentos vicinais de H-3 da substância <b>(2)</b> .....	36
<b>Figura 4.29</b> - Mapa de contornos COSY da substância <b>(2)</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)....	37
<b>Figura 4.30</b> - Interações observadas no mapa de contornos COSY da substância <b>2</b> .....	38
<b>Figura 4.31</b> – Mapa de contornos HSQC da substância <b>2</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T) ....	38
<b>Figura 4.32</b> - Expansão do mapa de contornos HSQC da substância <b>2</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T).....	39
<b>Figura 4.33</b> – Mapa de contornos HMBC da substância <b>2</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)....	39
<b>Figura 4.34</b> – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância <b>2</b> .....	40
<b>Figura 4.35</b> - Efeitos da glicosilação em diferentes posições na molécula de quercetina.....	43
<b>Figura 4.36</b> - Estrutura enumerada da substância <b>3</b> .....	43
<b>Figura 4.37</b> - Espectro de $^1\text{H}$ da substância <b>(3)</b> , ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	44
<b>Figura 4.38</b> – Mapa de contornos de COSY da substância <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	45
<b>Figura 4.39</b> – Estrutura química da Limonina .....	47
<b>Figura 4.40</b> - Proposta de estrutura para a substância <b>4</b> .....	48
<b>Figura 4.41</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T).....	49
<b>Figura 4.42</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	50
<b>Figura 4.43</b> - Proposta de biogênese para limonoides (PETROSKI e MCCORMICK, 1992).....	50
<b>Figura 4.44</b> - Mapa de contornos de COSY da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) 51	
<b>Figura 4.45</b> - Mapa de contornos de HSQC da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) 52	
<b>Figura 4.46</b> - Mapa de contornos de HMBC da substância <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) 52	
<b>Figura 47 - A-</b> Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC de <b>4</b>	
<b>B</b> – Interações observadas no mapa de contornos de COSY de <b>4</b> .....	53
<b>Figura 48</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T).....	61
<b>Figura 49</b> - - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	61
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	62
<b>Figura 51</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	62
<b>Figura 52</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	63
<b>Figura 53</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	63
<b>Figura 54</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	64
<b>Figura 55</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	64
<b>Figura 56</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	65
<b>Figura 57</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 11 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	65
<b>Figura 58</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A - 13 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	66
<b>Figura 59</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 14 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	66
<b>Figura 60</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de E.A – 15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) .....	67
<b>Figura 61</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de F13-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T) .....	67
<b>Figura 62</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de F13-3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	68
<b>Figura 63</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de F13-4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T).....	68
<b>Figura 64</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de F13-5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T).....	69
<b>Figura 65</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de F13-6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T).....	69

## RESUMO

“ESTUDO QUÍMICO DAS FLORES DE *Hortia oreadica* (RUTACEAE)”. O presente trabalho descreve a análise de extratos apolares e polares das flores de *Hortia oreadica*, uma espécie da família Rutaceae. Uma vez que essas flores não haviam sido amplamente estudadas, e devido ao valor quimiosistemático dessa espécie na taxonomia do gênero *Hortia* foi decidido realizar esse estudo na intenção de isolar metabolitos secundários que auxiliassem em uma melhor classificação do gênero. Foram realizadas análises dos extratos por CG-EM, CLAE-DAD e RMN <sup>1</sup>H; após isolados, os compostos foram analisados por RMN 1D e 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC, HSQC) afim de elucidar as estruturas químicas. Seis compostos majoritários foram identificados por GC-MS no extrato hexânico (E.H.) das flores, sendo esses: trans-muurola-4-(4),5-dieno, cupareno, β-bisaboleno, (Z)-nerolidol, 1H-cicloprop(e)azulen-7-ol e guaiol. A partir de E.H. ainda foram isolados e identificados dois triterpenos: ácido 3α-hidroxytirucalla-7,24-dien-21-oico e Tirucalla-7,24-dien-3β-ol, sendo esses inéditos no gênero *Hortia*. Do extrato metanólico (E.M.) foi possível isolar e identificar o flavonoide: quercetin-3-β-D-glicosídeo, e a partir do extrato acetato de etila (E.A.) foi possível isolar seis limonoides, ainda no processo de elucidação. A partir desse estudo foi possível observar a existência de precursores e de limonoides nas flores de *H. oreadica*, resultado que ainda não havia sido reportado na literatura.

## ABSTRACT

"CHEMICAL STUDY OF THE FLOWERS OF *Hortia oreadica* (RUTACEAE)". The present work describes the analysis of apolar and polar extracts from flowers of *Hortia oreadica*, a species of the family Rutaceae. Since these flowers had not been widely studied, and due to the chemosystematic value of this species in the taxonomy of the genus *Hortia*, it was decided to carry out this study in order to isolate secondary metabolites that would aid in a better classification of the genus. The extracts were analyzed by GC-MS, HPLC-DAD and  $^1\text{H}$  NMR; after isolated, the compounds were analyzed by 1D and 2D NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC, HSQC) in order to elucidate the chemical structures. Six major compounds were identified by GC-MS in the hexane extract (EH) of the flowers: trans-muurolo-4-(4), 5-diene, cuparene,  $\beta$ -bisabolene, (Z) -holidolol, 1H-cycloprop(e) azulen-7-ol and guaiol. From the E.H., two triterpenes were identified: 3 $\alpha$ -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid and tirucalla-7,24-dien-3 $\beta$ -ol, being these unpublished in the genus *Hortia*. From the methanolic extract (E.M.) it was possible to isolate and identify the flavonoid: quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside, and from the ethyl acetate extract (E.A.) it was possible to isolate six limonoids, still in the elucidation process. From this study it was possible to observe the existence of precursors and limonoids in *H. oreadica* flowers, an outcome that had not yet been reported in the literature.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviações .....	VI
Lista de Tabelas .....	VII
Lista de Figuras .....	VIII
Resumo .....	X
Abstract .....	XI
1. Introdução .....	1
1.1. Classificação taxônomica de <i>Hortia oreadica</i> .....	1
1.1.1. Família Rutaceae .....	1
1.1.2. Classificação do gênero <i>Hortia</i> .....	1
1.1.3. Perfil químico do gênero <i>Hortia</i> .....	2
2. Objetivos .....	10
2.1. Objetivo geral .....	10
2.2. Objetivos específicos .....	10
3. Materiais e métodos .....	10
3.1. Materiais .....	10
3.2. Equipamentos .....	11
3.3. Metodologia .....	12
3.3.1. Coleta do material vegetal.....	12
3.3.2. Preparo dos extratos vegetais .....	12
3.3.3. Fracionamento do extrato hexânico (E.H.) .....	13
3.3.4. Fracionamento do extrato acetato de etila (E.A.) .....	14
3.3.5. Análise do extrato metanólico (E.M.) .....	16
3.3.6. Análise de E.H. por cromatografia gasosa .....	16
4. Resultados e discussões .....	17
4.1. Análise dos extratos vegetais .....	17
4.1.1. Análise do extrato hexânico (E.H.) .....	17
4.1.1.1. Análise de E.H. por CG-MS.....	19
4.1.2. Análise do extrato acetato de etila (E.A.) .....	20
4.1.3. Análise do extrato metanólico (E.M.) .....	23
4.2. Elucidação dos metabólitos isolados .....	25
4.2.1. Elucidação estrutural de triterpenos .....	25

<b>4.2.1.1. Elucidação da substância (1)</b> .....	25
<b>4.2.1.2. Elucidação da substância (2)</b> .....	33
<b>4.2.2. Elucidação estrutural de flavonoides</b> .....	41
<b>4.2.2.1. Elucidação da substância (3)</b> .....	43
<b>4.3. Elucidação estrutural de limonoides</b> .....	46
<b>4.3.1. Proposta de elucidação da substância (4)</b> .....	48
<b>5. Conclusões</b> .....	55
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	56
<b>Apêndice</b>	

## **1. Introdução**

### **1.1. Classificação taxonômica de *Hortia oreadica***

#### **1.1.1 Família Rutaceae**

A família Rutaceae apresenta uma grande diversidade, sendo essa composta por aproximadamente 160 gêneros e 2070 espécies, estando entre esses o gênero *Hortia* (Britannica Academic, 2016). Os gêneros desta família são conhecidos por compreenderem uma grande variedade de metabólitos secundários como limonóides, alcaloides, cumarinas e flavonoides (Groppo et al., 2008). Esses metabólitos tem atividades biológicas já reportadas na literatura, como por exemplo, atividade anti-inflamatória (Herath et al., 2016), atividade antibiótica (Madeiro et al., 2017), propriedades citotóxicas (Tahsin et al., 2017) e propriedades antitumorais (Ostrowska et al., 2017).

#### **1.1.2 Classificação do gênero *Hortia***

Devido a variedade de gêneros e espécies, a família Rutaceae foi subdivida por Engler (1931) em sete subfamílias: Rhabdodendroideae, Aurantioideae, Flindersioideae, Spathelioideae, Dictyolomatoideae, Rutoideae e Toddalioideae. Entretanto, devido à grande variedade que esta família apresenta os botânicos tem tentando realizar novas classificações, como Thorne (1992) que reúne as subfamílias Rutoideae e Toddalioideae. A abordagem de Thorne está de acordo com os dados do estudo químico realizado por Da Silva, Gottlieb e Ehrendofer (1988) que sugeriu a partir da biossíntese dos metabólitos secundários característicos das subfamílias, que Rutoideae e Toddalioideae deveriam ser classificados apenas como Rutoideae (Chase, Morton, & Kallunki, 1999).

Como ainda não havia um consenso sobre a subdivisão da família Rutaceae, Groppo et al. (2008) realizaram um estudo genético buscando melhor classificar os diferentes gêneros e espécies dessa família. Este estudo sugeriu que a melhor forma de correlacionar os diferentes gêneros seria a partir distribuição geográfica ao invés de correlacioná-los pelo tipo de fruto como foi feito por Engler (1931) (Groppo et al., 2008).

*Hortia* é um gênero neo-tropical encontrado principalmente na Amazônia, classificado de acordo com a caracterização de Engler (1931) na subfamília Toddalioideae (Groppo et al., 2008). Esse gênero apresenta dez espécies diferentes, sendo elas: *H. brasiliiana* Vand. ex DC., *H. coccínea* Spruce ex Engl., *H. excelsa*

Ducke, *H. longifolia* Spruce ex Engl., *H. neblinenses* Maguire & Boom, *H. nudipetala* Groppo, *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *H. regia* Sandwith, *H. superba* Ducke, *H. vandelliana* Groppo (Severino, 2011).

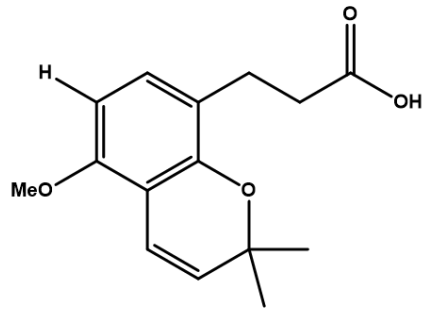


**Figura 1.1** - Flores de *Hortia oreadica*

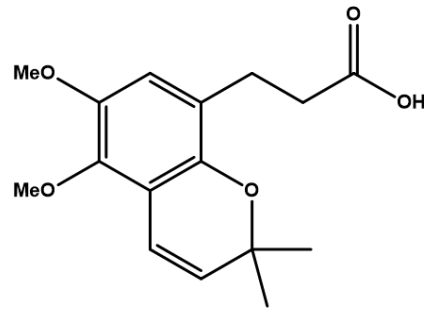
### **1.1.3 Perfil químico de *Hortia***

A partir de um levantamento de dados realizado em Outubro de 2018, na plataforma SciFinder as principais classes de substâncias isoladas no gênero *Hortia* são: derivados do ácido dihidrocinâmico, limonóides, cumarinas e alcaloides. A seguir se encontram algumas das principais substâncias isoladas e em qual parte da planta elas foram encontradas (Figuras 1.2 – 1.9) (Severino et al., 2009; Severino et al., 2012; Braga et al., 2012; Severino et al., 2015; Queiroz et al., 2013; Suarez, Menichini e Monache, 2002; Severino et al., 2014).

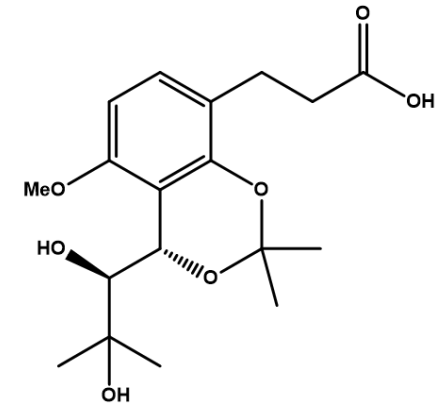




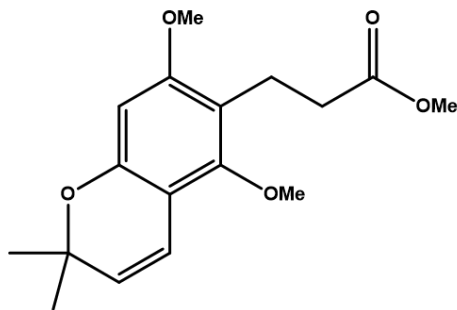
5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-8-propanoic acid  
Tronco *H. brasiliana*



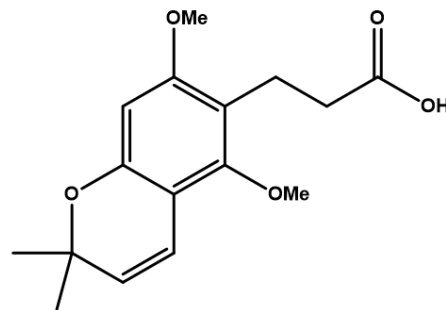
5,6-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-8-propanoic acid  
Tronco *H. oreadica*  
Tronco *H. brasiliana*



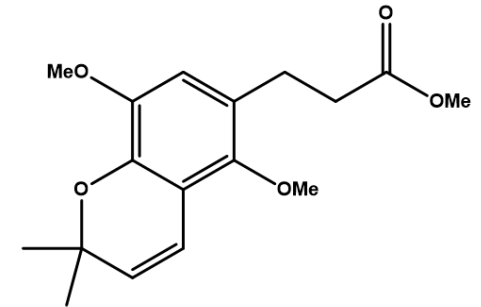
Erythro-5-methoxy-2,2-dimethyl-4-(1,2-dihydroxy-2-methylpropyl)-4H-1,3-benzodioxin-8-propanoic acid  
Casca do caule *H. brasiliana*



Methyl 5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoate  
Folhas *H. oreadica*  
Raiz primaria *H. oreadica*

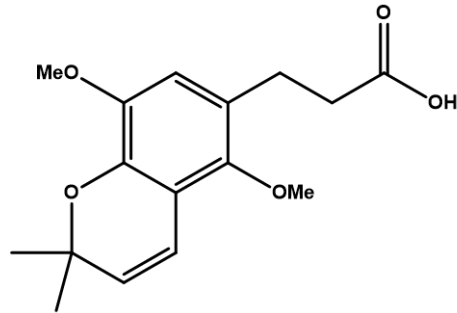


5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoic acid  
Raiz primaria *H. oreadica*  
Folhas *H. brasiliana*

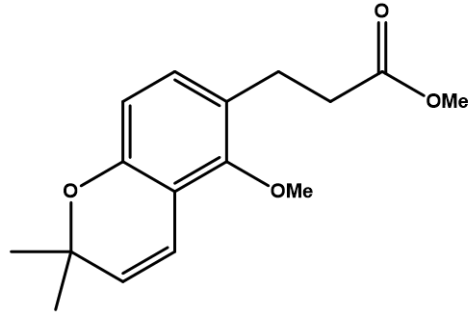


Methyl 5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoate  
Raiz primaria *H. oreadica*  
Folhas *H. brasiliana*  
Tronco *H. superba*

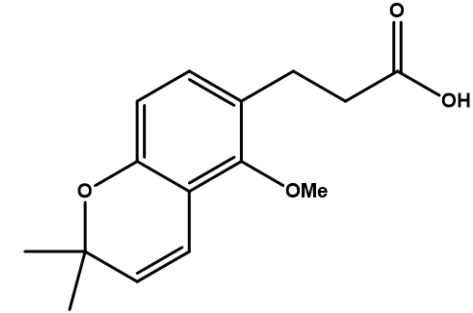
**Figura 1.2** - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em *Hortia ssp*



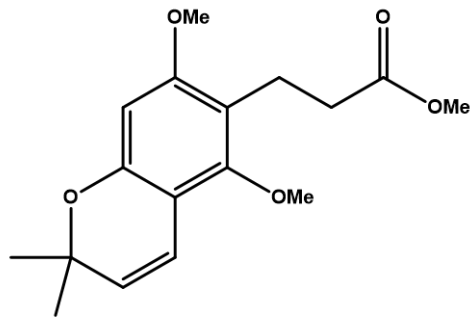
5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoic acid  
**Raiz primaria *H. oreadica* Tronco *H. oreadica* Folhas *H. brasiliana* Tronco *H. superba***



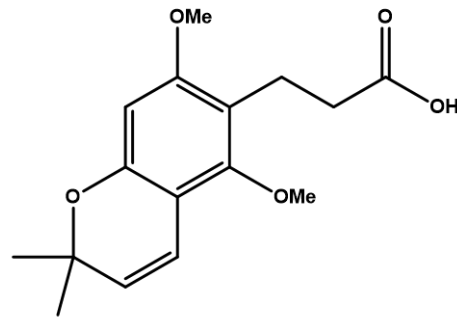
Methyl 5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoate  
**Raiz primaria *H. oreadica***



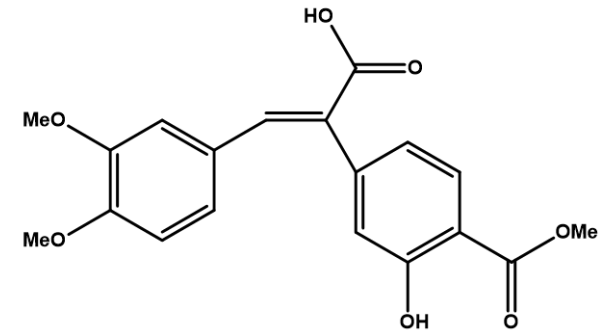
5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoic acid  
**Raiz primaria *H. oreadica***



Methyl 5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoate  
**Folhas *H. oreadica***

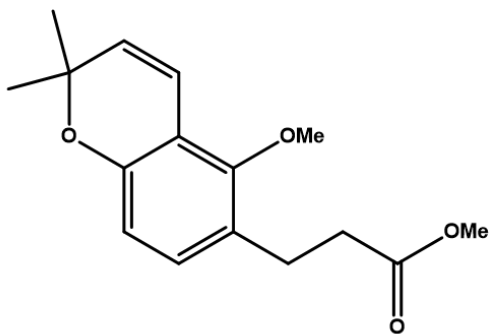


5,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-propanoic acid  
**Folhas *H. oreadica***

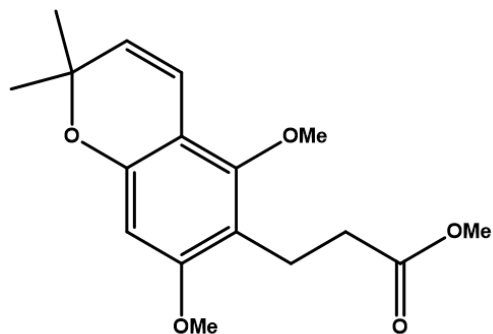


*E*-3,4-dimethoxy-(3-hydroxy-4-carbomethoxyphenyl) cinnamic acid  
**Folhas *H. oreadica***

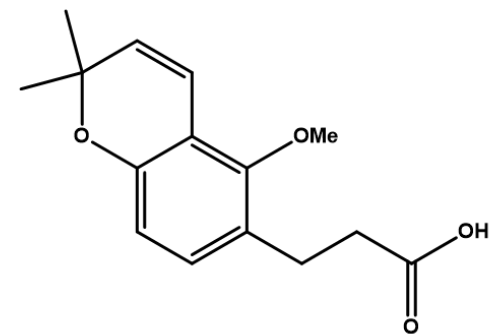
**Figura 1.3** - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em *Hortia ssp*



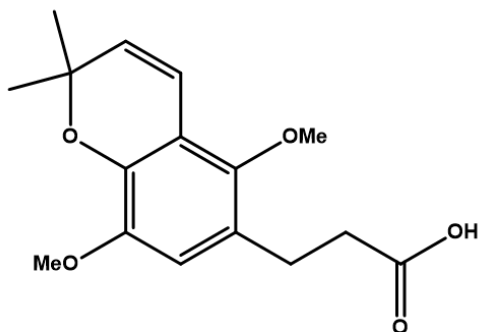
Methyl 3-[2-methoxy-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,4)-phenyl]-propionate  
Tronco de *H. colombiana*



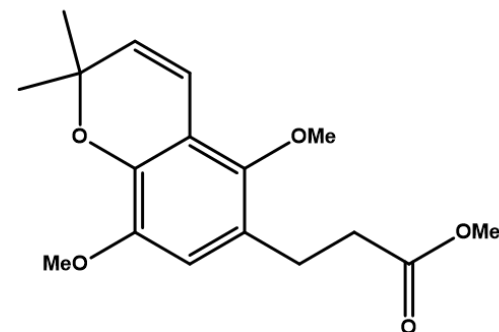
Methyl 3-[2,6-dimethoxy-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,4)-phenyl]-propionate  
Tronco de *H. colombiana*



3-[2,6-dimethoxy-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,4)-phenyl]-propionic acid  
Tronco de *H. colombiana*

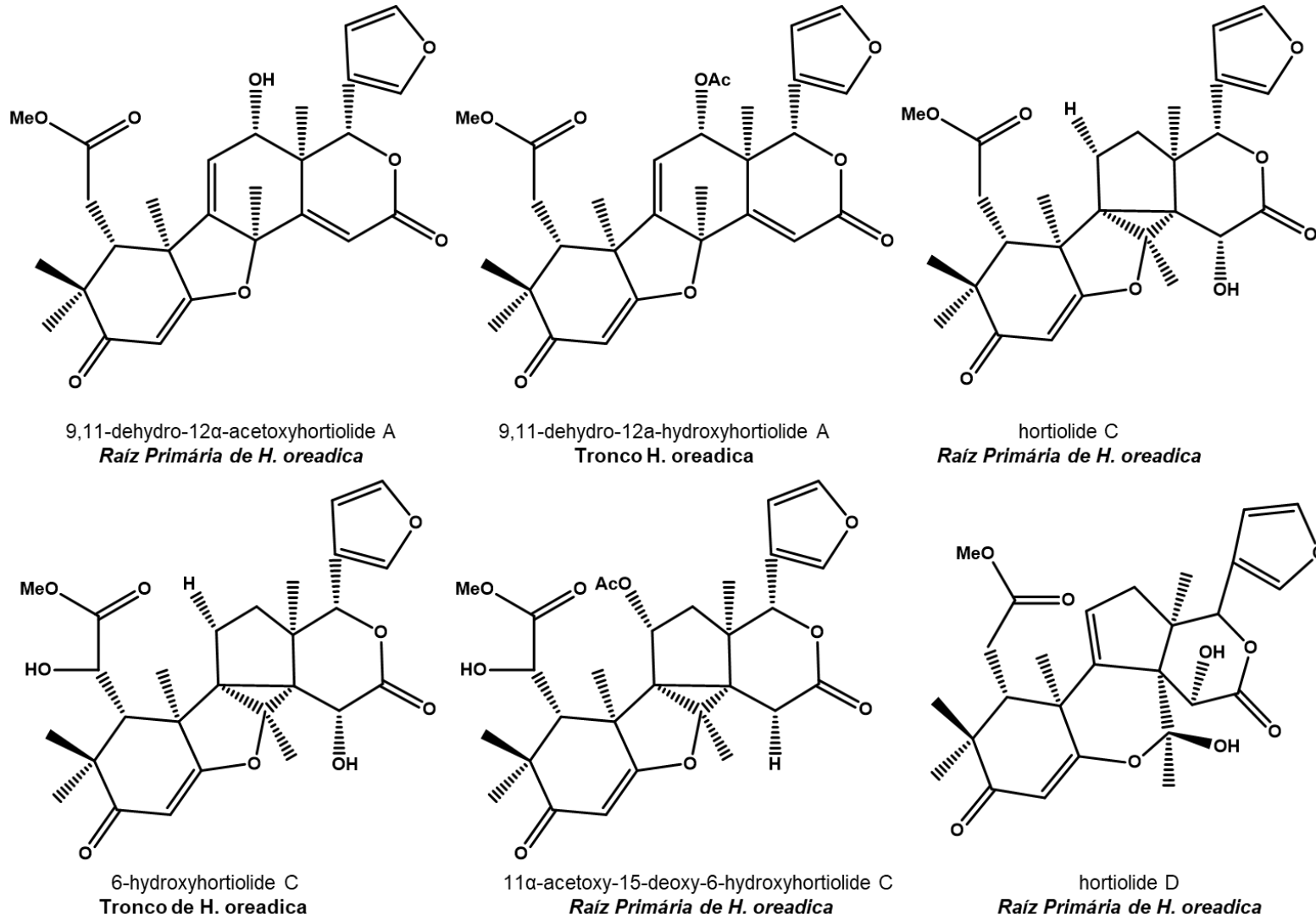


3-[2,5-dimethoxy-6',6'-dimethylpyrano(3',2':3,4)-phenyl]-propionic acid  
Tronco de *H. colombiana*

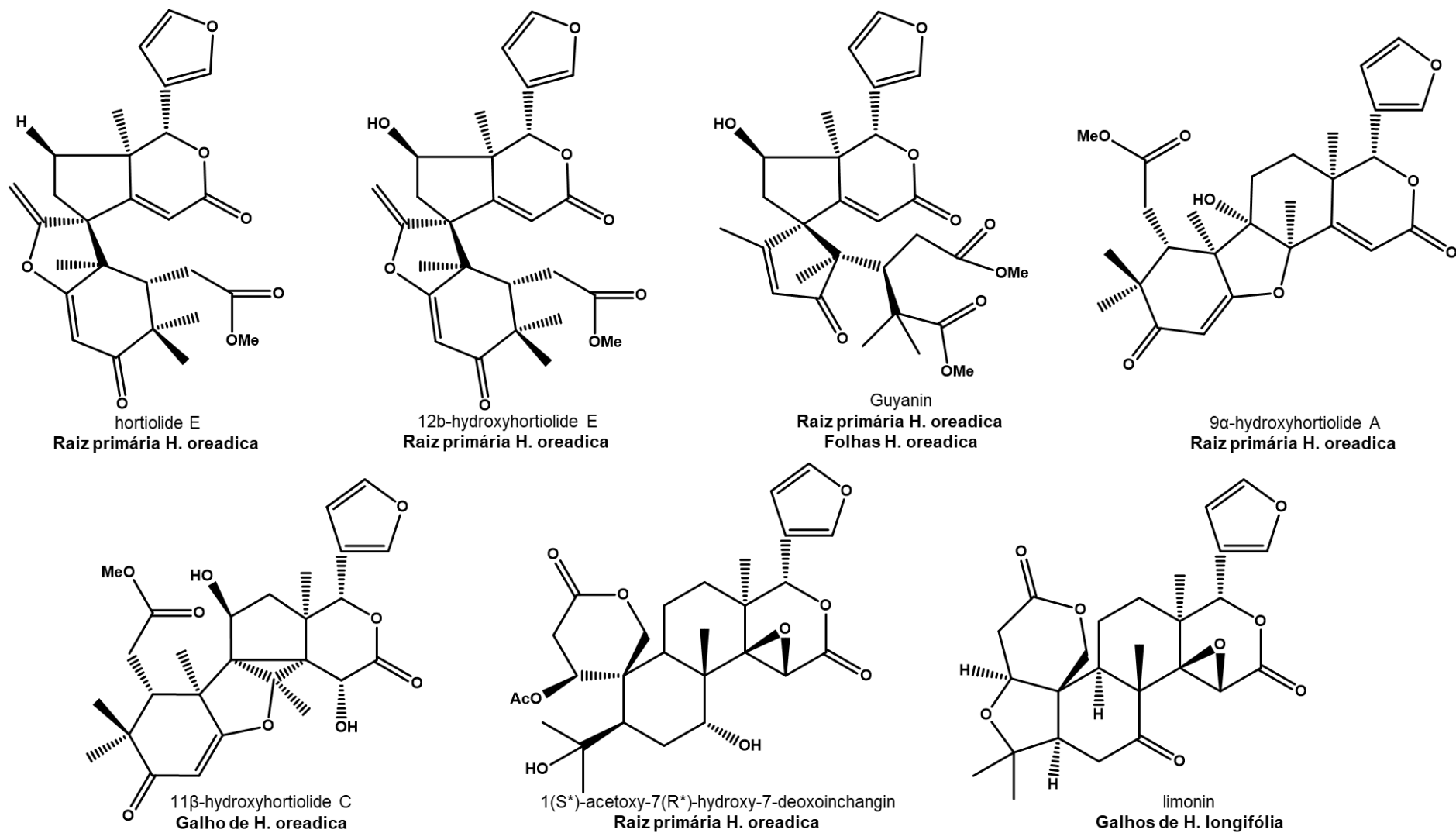


Methyl 3-[2,5-dimethoxy-6',6'-dimethylpyrano(3',2':3,4)-phenyl]-propionate  
Tronco de *H. colombiana*

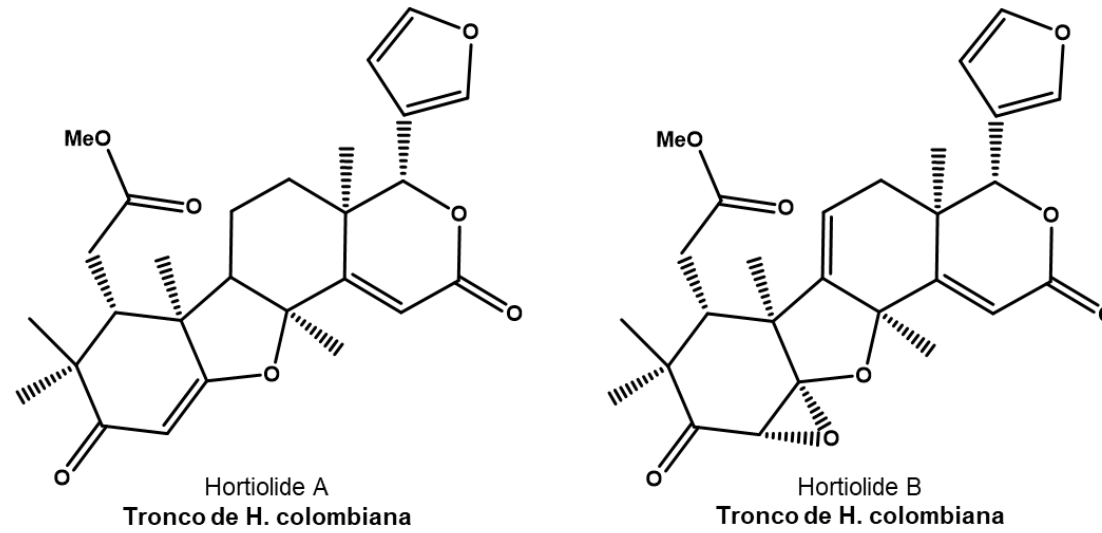
**Figura 1.4** - Substâncias derivadas do ácido di-hidrocinâmico encontradas em *Hortia ssp*



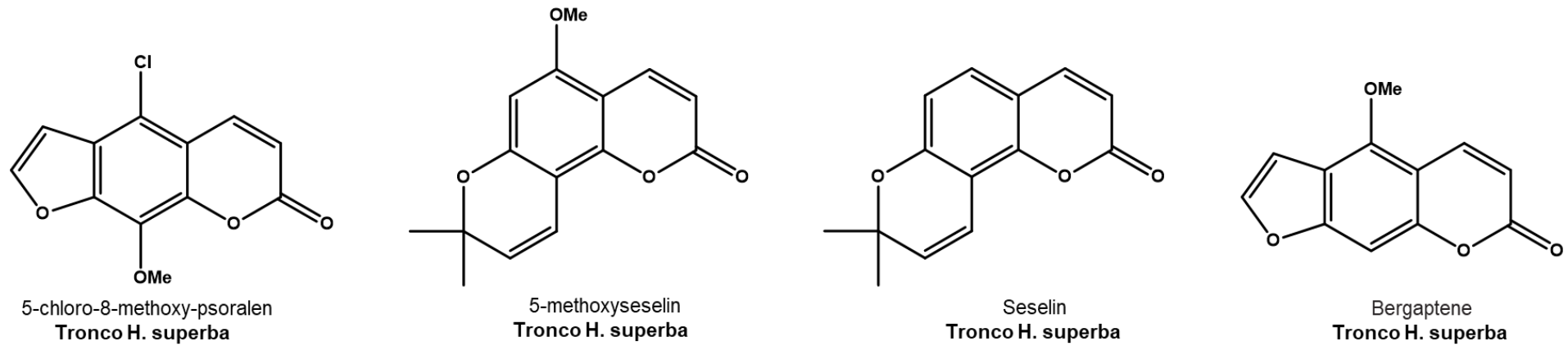
**Figura 1.5** – Limonoides encontrados em *Hortia* ssp



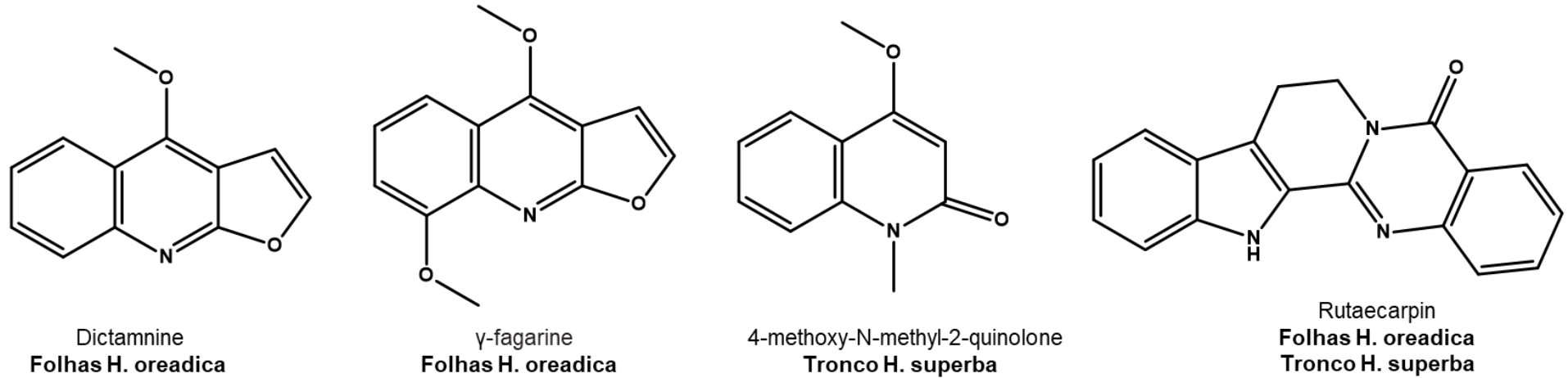
**Figura 1.6** - Limonoides encontrados em *Hortia ssp*



**Figura 1.7-** Limonoides encontrados em *Hortia ssp*



**Figura 1.8** – Cumarinas encontradas em *Hortia ssp*



**Figura 1.9** – Alcalóides encontrados em *Hortia ssp*

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Diante do fato que espécies da família Rutaceae apresentam riqueza em diversidade de metabólitos secundários, e ainda que as flores de *Hortia oreadica* foram pouco estudadas pelo ponto de vista químico, tem-se como objetivo central estudar a composição química visando identificar substâncias para contribuir para uma melhor classificação do gênero *Hortia* para a quimiosistemática de Rutaceae.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolamento de metabólitos secundários por cromatografia em coluna e por HPLC-UV;
- Análise das frações obtidas por CCD, HPLC-UV, HPLC-DAD e RMN;
- Elucidação estrutural dos metabólitos isolados a partir de experimentos por RMN 1D e 2D;
- Análise do perfil químico de compostos semi- e voláteis por CG-MS;

## 3. Materiais e métodos

### 3.1. Materiais

- Solventes destilados no DQ-UFSCar para preparo das amostras vegetais e para uso em cromatografia em coluna;
- Solventes grau HPLC (Merck, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac, Tedia);
- Solventes Deuterados (Merck e Aldrich);
- Água ultrapura: Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka);
- Sílica gel 60 (70-230 e 230-340 mesh) da Merck®;
- Sílica gel 60 F254, com suporte em folhas de alumínio (Merck®);
- Radiação UV (254 e 365 nm);
- Solução de Vanilina Sulfúrica preparada no laboratório de Produtos Naturais – UFSCar;
- Micropipetas Eppendorf 1-10µL; 20-200 µL e 200-1000 µL;
- Filtro de seringa (PVDF e PTFE), não estéril, 250 x 0,45 µm (Millipore)
- Papel de filtro INLAB Tipo, 3,0 µm de porosidade;
- Coluna cromatográfica analítica Gemini C 18 Phenomenex (250 x 4,60 mm, partículas de 5 µm)



- Coluna cromatográfica preparativa Shim-pack PREP-ODS Shimadzu (25 cm x 20 mm, partículas de 10 µm)

### 3.2. Equipamentos

- Rotaevaporador BUCHI, R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Rotaevaporador BUCHI, R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Balança analítica Shimadzu Corporation modelo AUW220D
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1329A, detector de UV-Vis (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A e amostrador automático G1329B; Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, e detector de UV-Vis (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A; Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;
- Detector Agilent G1315D DAD;
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas CG-MS Shimadzu QP 2010 baixa resolução, fonte de ionização: impacto eletrônico;
- Espectrômetro de massas Synapt G2-S (water Technologies), fonte de ionização: ESI, analisador híbrido Q-TOF (Quadrupole – Time Of Flight);
- RMN Brucker DRX – 9,8 Tesla, equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®);
- RMN Brucker Avance III – 14,1 Tesla, equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI de 5 mm (ATMA®), sonda de 5mm BBI (ATMA®);
- Unidade de extração em fase sólida (SPE) Brucker/Spark Prospect II unit (Brucker BioSpin, Rheinstetten, Germany), utilizados para aprisionamento de banda cromatográficas, visando a concentração dos analitos. Os cartuchos empregados foram do tipo HySphere C-18 end capped sílica (2 mm i.d., 10 m);
- Moinho de facas tipo Willye – Tecnal, utilizado para moer as flores de *H. oreadica*;

### 3.3. Metodologia

#### 3.3.1. Coleta do material vegetal

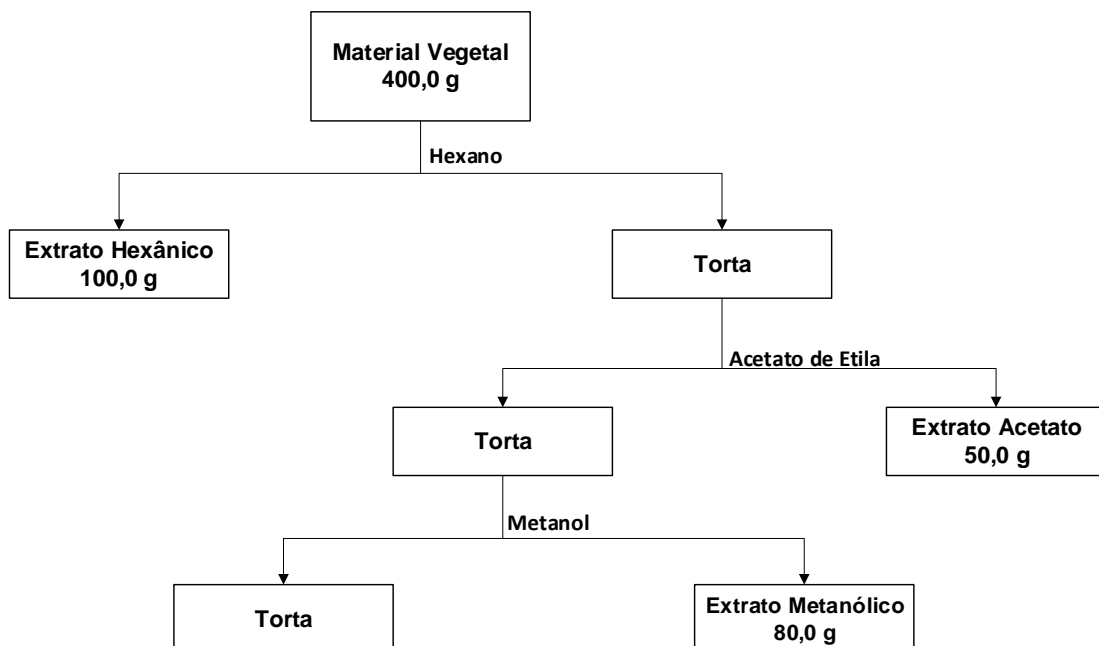
O material vegetal foi coletado em maio de 2016 na região de Minas Gerais pela Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva.

Após a coleta o material foi seco naturalmente durante 10 dias e, posteriormente, seca em estufa climatizada à uma temperatura de 40 °C. Após seco, o material vegetal foi moído utilizando o moinho de facas.

#### 3.3.2. Preparo dos extratos vegetais

Os extratos das flores de *Hortia oreadica* foram preparados no período de junho de 2016. O material seco e triturado foi submetido a extração com solventes de ordem crescente de polaridade (Hexano → Acetato de Etila → Metanol) a temperatura ambiente. Para cada extração foi realizada a troca de solvente a cada três dias, sendo o processo repetido três vezes, totalizando assim 27 dias. O **fluxograma 1** ilustra o procedimento de extração.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador, analisados comparativamente por RMN de <sup>1</sup>H e em seguida pesados e conservados em refrigerador para evitar a degradação e contaminação dos mesmos.

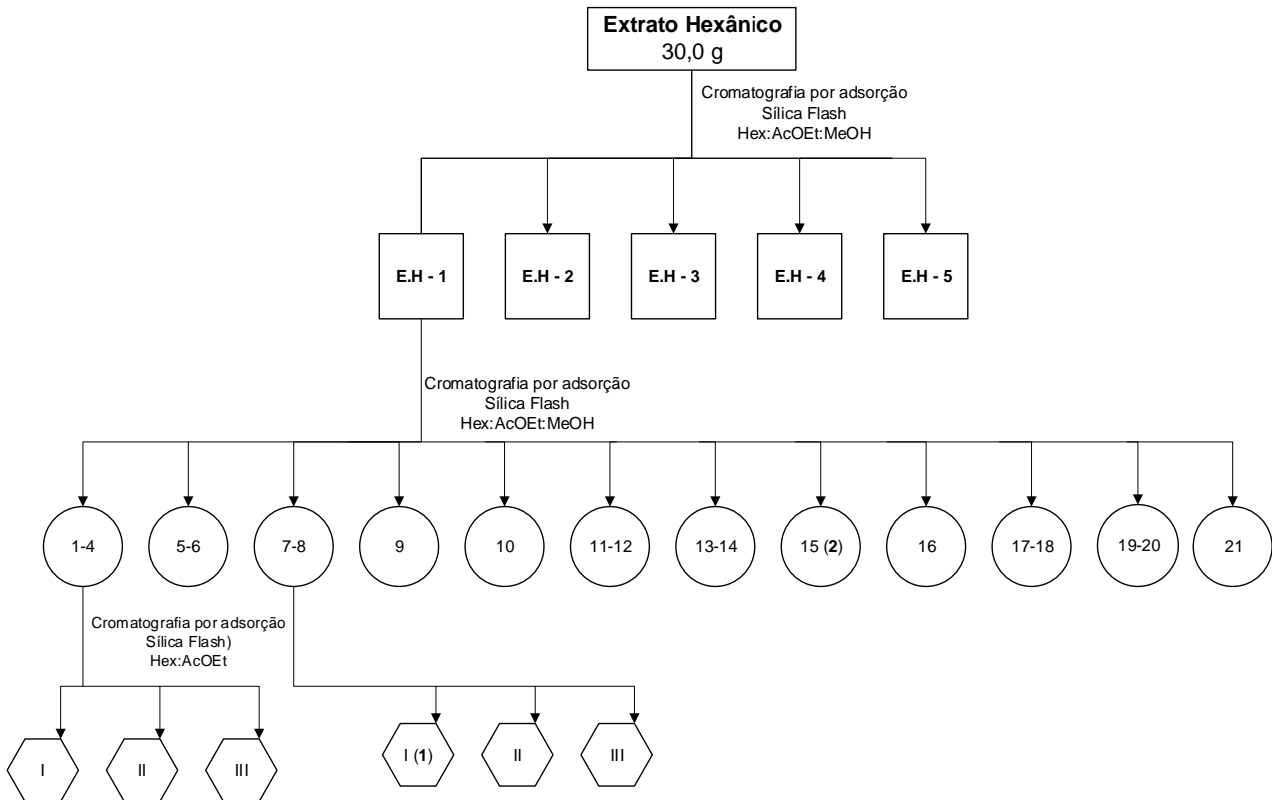


**Fluxograma 1-** Preparo dos extratos vegetais

### 3.3.3. Fracionamento do extrato hexânico

O extrato hexânico das flores de *H. oreadica* (E. H) foi fracionado utilizando cromatografia em coluna e as frações obtidas foram posteriormente analisadas comparativamente por CCD e por RMN de  $^1\text{H}$ . Sendo assim, no intuito de isolar substâncias de interesse, realizou-se mais um fracionamento por cromatografia em coluna de fase estacionária Sílica Flash ( $\Phi= 3,5$  cm h= 33cm) conforme descrito no **fluxograma 2**. Com esse processo foi possível isolar as substâncias **1** (15 mg) e **2** (30 mg).

Esse extrato foi também analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) no modo analítico para verificar o comportamento cromatográfico do perfil químico deste extrato. Essa análise foi realizada em coluna de fase reversa C-18, à temperatura de 40 °C e vazão de 0,6 mL/min. O gradiente iniciou-se com 10-90% de ACN-H<sub>2</sub>O, indo até 30% de ACN em 10 minutos; aos 60 minutos atingiu-se 100% de ACN sendo mantido por 5 minutos. As amostras foram preparadas na concentração de 5,0 mg/mL, filtradas em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20  $\mu\text{m}$ . O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$ .



**Fluxograma 2** – Fracionamento do extrato hexânico das flores de *H. oreadica*

### 3.3.4. Fracionamento do extrato acetato de etila

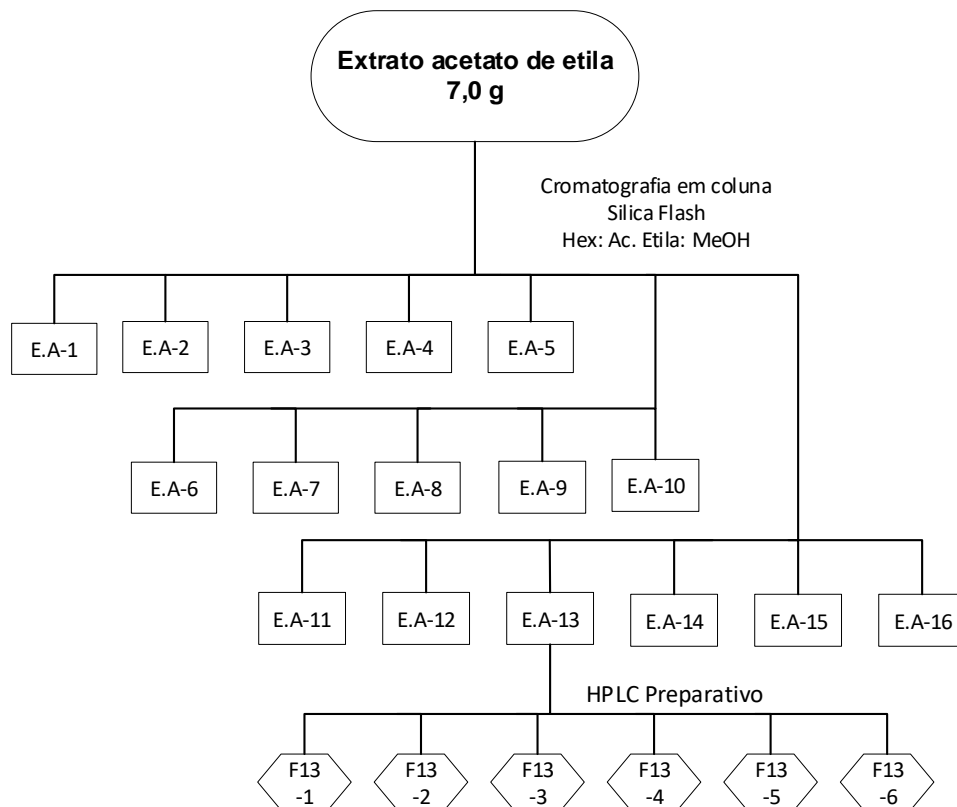
O extrato de acetato de etila das flores de *H. oreadica* (E.A) foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) no modo analítico. O gradiente iniciou em 35% ACN alcançando 65% de solvente orgânico em 25 minutos, aos 29 minutos atingiu-se 100% de ACN que foi mantido durante 3 minutos. As análises foram realizadas à 40 °C com vazão de 1,0 mL/min; utilizando uma coluna analítica de fase reversa C-18. As amostras foram preparadas na concentração de 5,0 mg/mL, e então sendo filtradas em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 µm. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL.

O extrato E-A foi inicialmente fracionado por cromatografia em coluna ( $\phi = 7,5$  cm  $h = 13$  cm) variando a força dos solventes em ordem crescente de polaridade e as frações foram analisadas por CCDC para unir as de maior similaridade

de tempos de R<sub>f</sub>. Posteriormente essas frações foram analisadas RMN de <sup>1</sup>H, sendo possível a escolha da fração que apresentou uma maior quantidade de sinais de interesse. Essa fração (E.A – 13) foi então analisada por CLAE-UV no modo preparativo.

O gradiente iniciou-se com 40-60% de ACN-H<sub>2</sub>O, indo até 100% de ACN em 40 minutos sendo mantido durante 4 minutos. As análises foram realizadas à 40 °C com vazão de 6,0 mL/min; utilizando uma coluna preparativa de fase reversa C-18. As amostras foram preparadas na concentração de 50,0 mg/mL, e então filtradas em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 µm. O volume de injeção utilizado foi de 200 µL.

Na intenção de isolar os metabólitos provenientes deste extrato, coletou-se bandas cromatográficas que em seguida foram analisadas por RMN uni e bidimensionais. Dessa forma foi possível identificar a substância **4** (5 mg). Esse processo está demonstrado no **fluxograma 3**.



**Fluxograma 3** - Fracionamento do extrato acetato de etila

### 3.3.5. Análise do extrato metanólico

O extrato metanólico foi analisado por CLAE-DAD no modo analítico. O gradiente iniciou-se com 5-95% de ACN-H<sub>2</sub>O, indo até 38% de ACN em 30 minutos; aos 32 minutos atingiu 100% de ACN sendo mantido por 5 minutos. As análises foram realizadas à 40 °C com vazão de 0,6 mL/min; utilizando uma coluna de fase reversa C-18. As amostras foram preparadas na concentração de 5,0 mg/mL, e então filtradas em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,20 µm. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL.

Por ter apresentado uma baixa quantidade de bandas cromatográficas, essas bandas foram coletadas e analisadas por RMN possibilitando então, isolar e identificar a substância **3** (1 mg).

### 3.3.6. Análise por Cromatografia Gasosa

No intuito de conhecer o perfil químico dos compostos semi e voláteis da flor de *H. oreadica* foram feitas análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. A análise foi realizada em uma solução de 1000 ppm do extrato hexânico.

Para realizar a identificação desses compostos, os dados de tempo de retenção assim como a comparação com os espectros de massas da literatura foram consultados (Adams, 2007).

A fim de obter uma comparação mais precisa entre os tempos de retenção dos compostos frente aos dados da literatura, foi utilizado o índice de retenção de Kováts. Para o cálculo desse, um padrão de alcanos saturados de cadeia normal (C5 a C29) foi analisado nas mesmas condições cromatográficas da análise da amostra, para evitar diferenças nos tempos de retenção que poderiam ser causadas por mudanças de temperatura e fluxo. Os índices calculados foram, então, comparados com dados da literatura (SANDRA & BICCHI, 1987; COLLINS & BRAGA, 1988). O índice de retenção de Kovats foi calculado a partir da seguinte equação:

$$I = [100z + 100(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ})] \div (\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})$$

Onde:

I = índice de Kovats

Z = nº de átomos de carbono com menor peso molecular

t'<sub>RX</sub> = tempo de retenção do composto x

$t'RZ$  e  $t'R(Z+1)$  = tempos de retenção ajustados dos alcanos de cadeia normal

Uma solução de 1000 ppm do extrato hexânico foi injetada no equipamento, tendo o injetor (com divisão de fluxo) programado a 250 °C (split 20) com temperatura inicial de 120 °C e final de 280 °C com aumento de 6 °C/min. O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 49,5 KPa e velocidade linear de 29,3 cm por segundo. Com a temperatura da fonte de íons sendo 290 °C e o corte do solvente em 4 minutos.

## **4. Resultados e discussões**

### **4.1. Análise dos extratos vegetais**

#### **4.1.1. Análise do extrato hexânico (E.H.)**

A análise do perfil químico do extrato hexânico deu-se a partir do estudo dos sinais do espectro de RMN de  $^1H$  (9,4 T,  $CDCl_3$ ), o que levou a detectar sinais com deslocamentos químicos característicos de triterpenos, que auxiliam na classificação taxonômica da planta.

A partir do espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 4.1**) foi possível verificar vários sinais na região das metilas ( $\delta$  0,7 a 1,5 ppm), o que indica a presença de triterpenos nesse extrato. Também pode ser observado sinais na região dos hidrogênios olefínicos, e de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos.

A partir da análise por CLAE-DAD foi possível obter o cromatograma demonstrado na **Figura 4.2**.

Como a análise por CLAE-DAD não se mostrou eficiente para a separação desses metabolitos, decidiu-se então separar os metabolitos por cromatografia em coluna, onde a força dos solventes variou de 100% hexano até 100% metanol, levando a uma separação desse extrato por polaridade das moléculas.

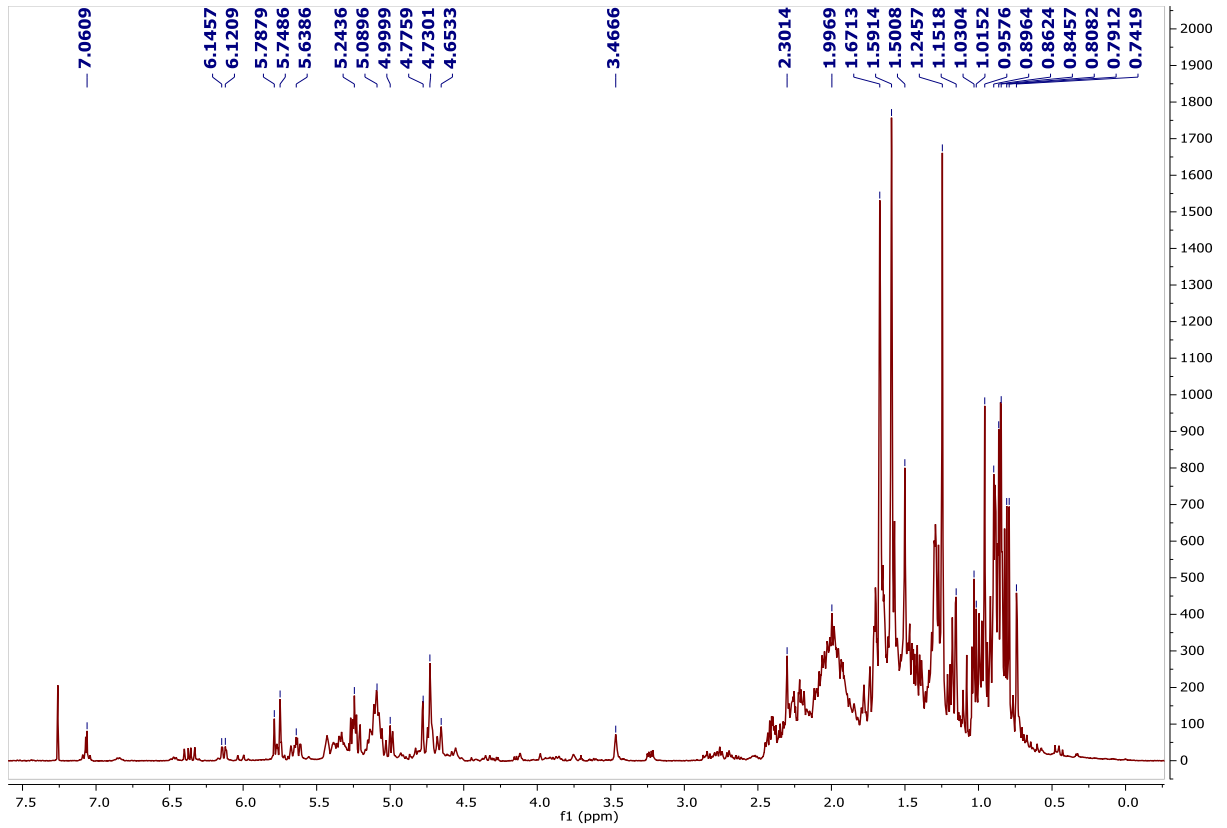


Figura 4.1 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de E.H (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 Tesla)

Signal 2: DAD (254)  
 Signal 3: DAD (280)  
 Signal 4: DAD (310)  
 Signal 5: DAD (350)

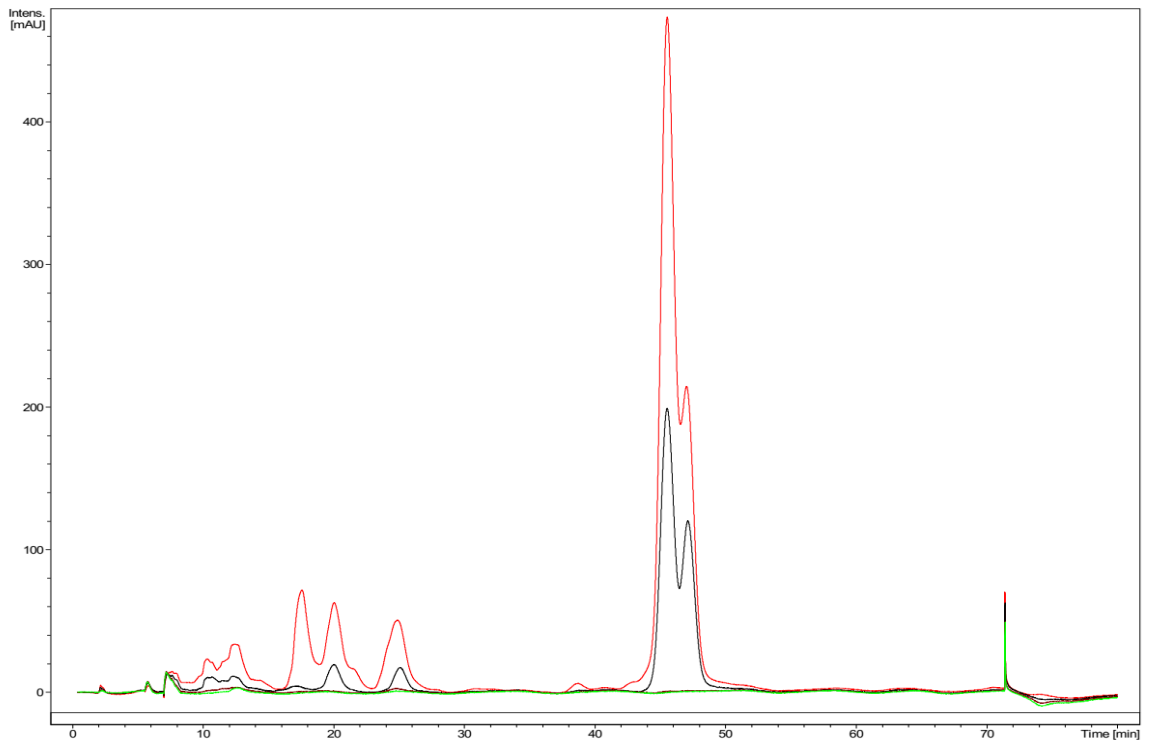


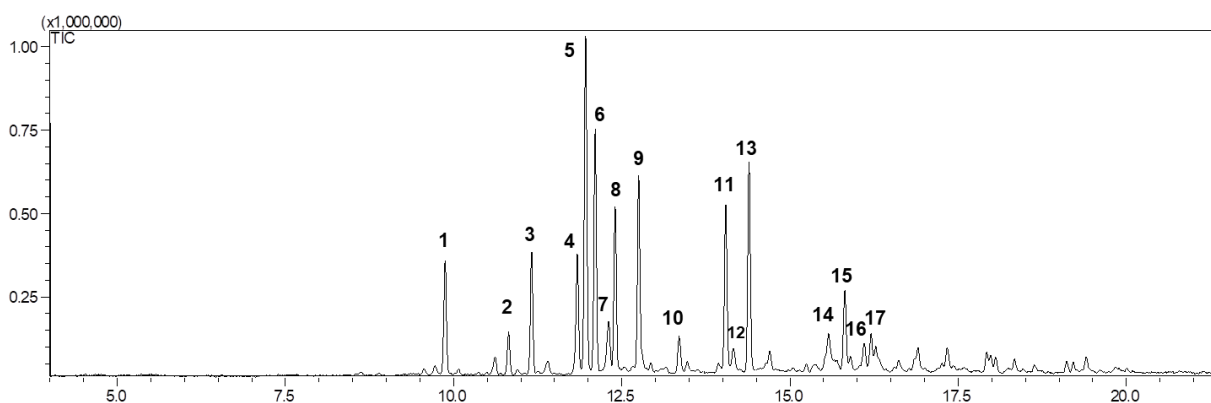
Figura 4.2 - Cromatograma da análise de E.H. em diferentes comprimentos de onda (nm)



Inicialmente o E.H. foi separado em 5 frações (E.H-1 a E.H-5), as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCDC). A partir dessas análises, a fração que demonstrou a maior quantidade de bandas após a revelação da cromatoplaça com Vanilina Sulfúrica foi a E.H-1. Dessa forma, deu-se início a segunda etapa de separação por cromatografia em coluna, que resultou no isolamento e posteriormente elucidação estrutural de dois triterpenos **1** e **2**.

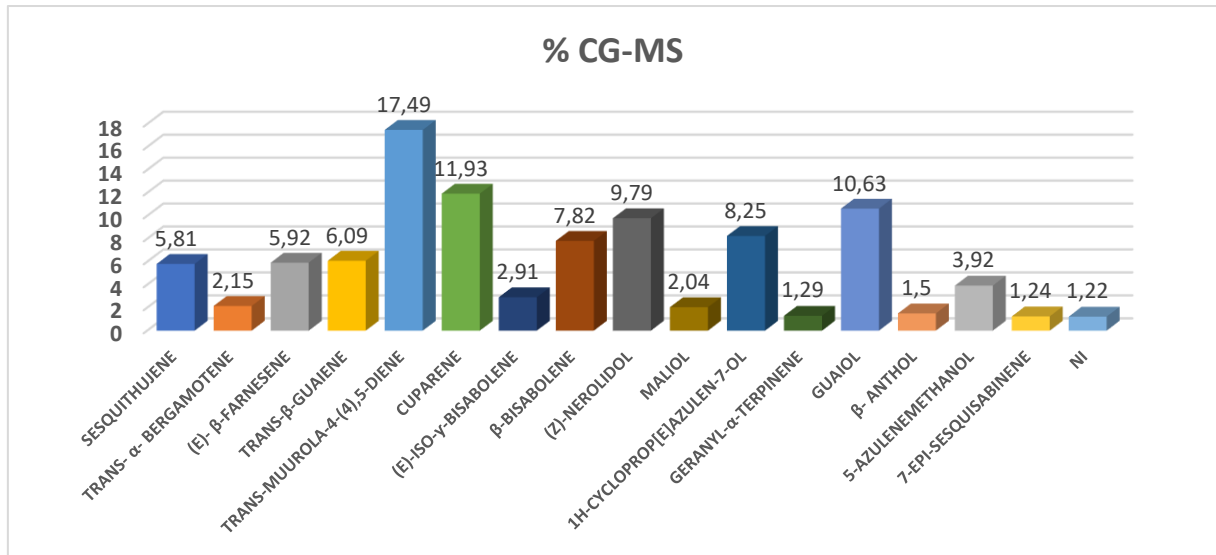
#### 4.1.1.1. Análise de E.H por CG-MS

A partir da análise desse extrato por CG-MS foi possível obter o cromatograma dessa análise (**Figura 4.3**), que demonstrou a existência de 16 bandas onde foi possível identificar os compostos.

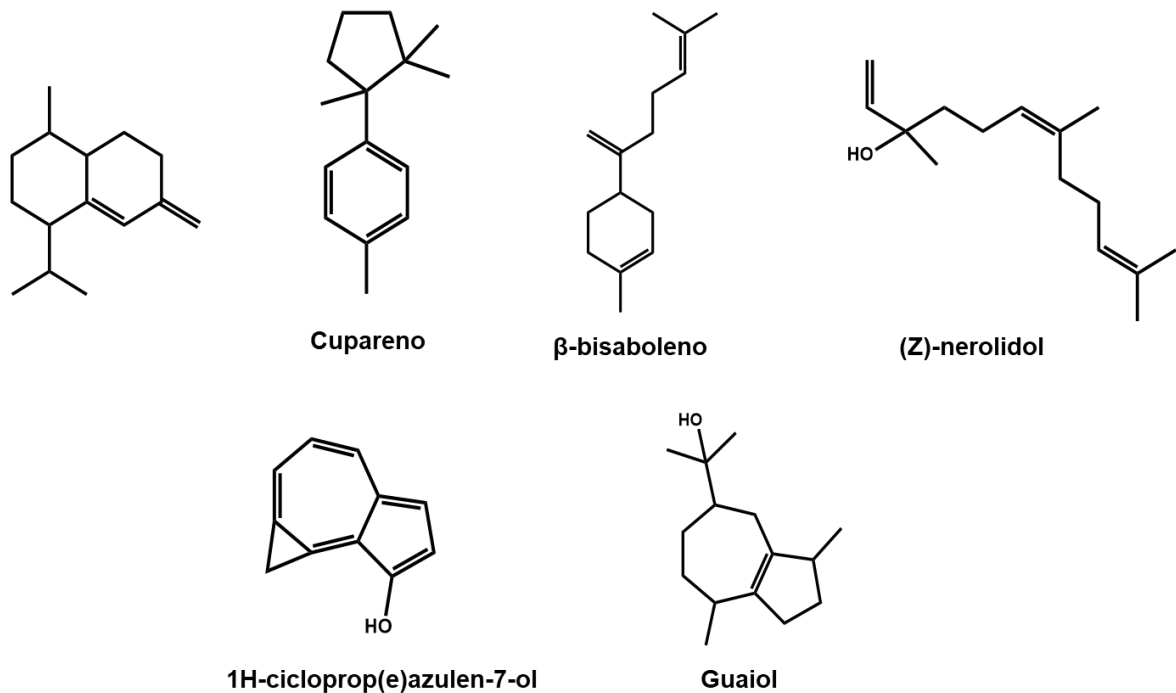


**Figura 4.3** - Cromatograma da análise por CG-MS do E.H.

A partir do cálculo do índice de retenção de Kóvats, e posterior comparação com dados da literatura, foi possível identificar 16 compostos (**Figura 4.4**). A partir do cálculo da área de cada banda foi possível observar a presença de 6 compostos majoritários nessa análise, sendo esses os terpenos: *trans*-muuro-la-4-(4),5-dieno, cupareno,  $\beta$ -bisaboleno, (Z)-nerolidol, 1H-cicloprop(e)azulen-7-ol e guaiol (**Figura 4.5**).



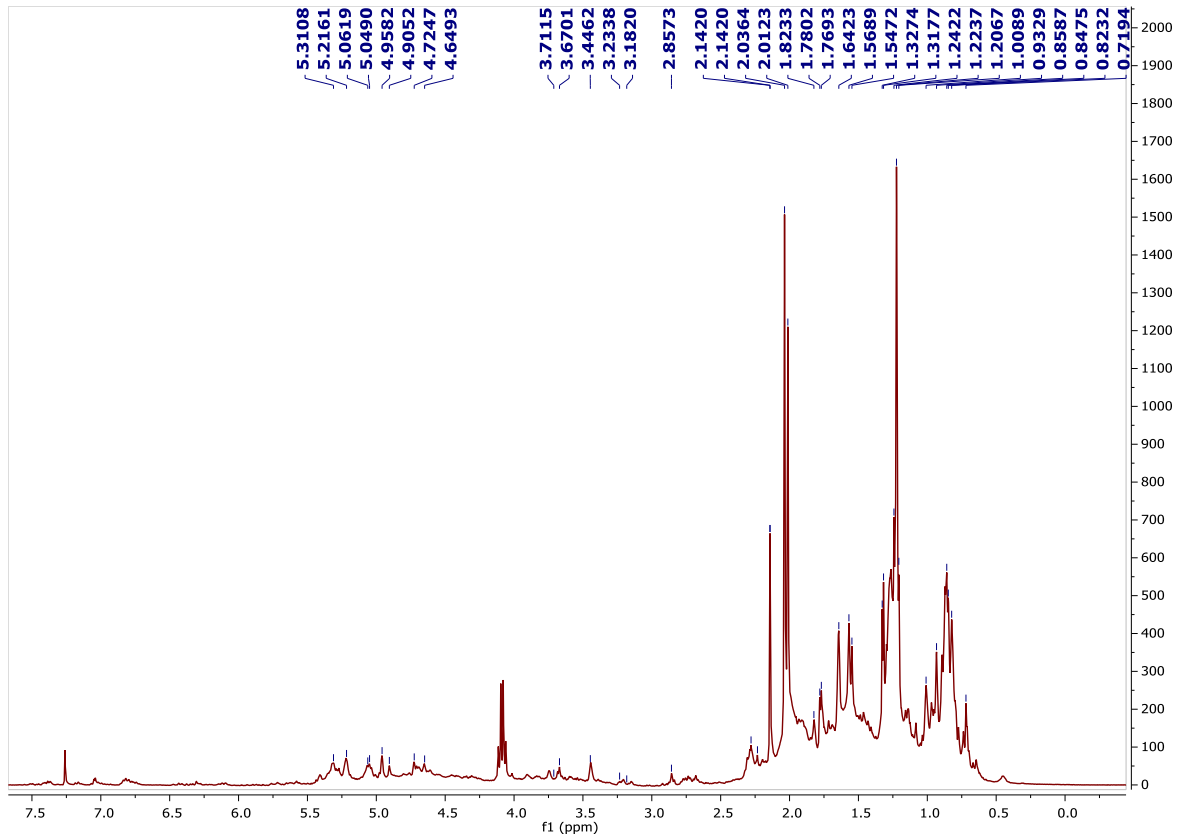
**Figura 4.4** - Porcentagem dos compostos identificados em E.H a partir de CG-MS



**Figura 4.5** - Compostos identificados no E.H. por análise de CG-MS

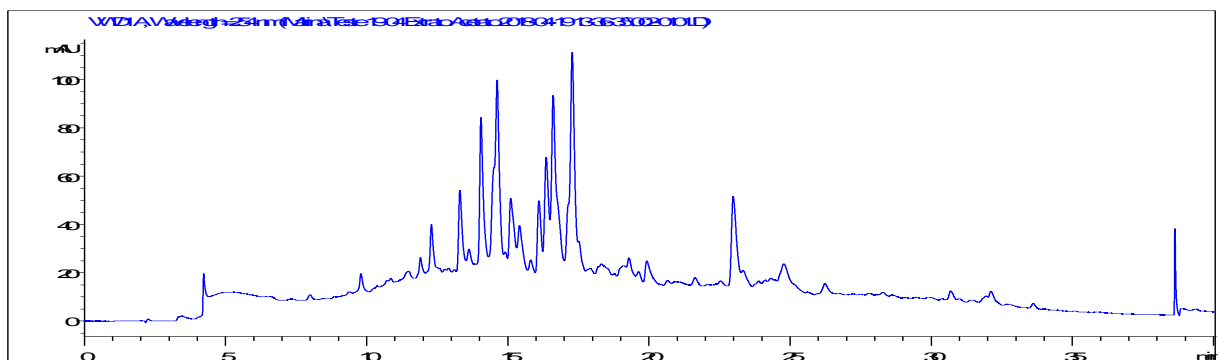
#### 4.1.2. Análise do extrato acetato de etila (E.A.)

O E.A. foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T). A partir deste espectro, **Figura 4.6**, pode-se perceber alguns sinais que demonstravam a presença de metabólitos de interesse taxonômico nesse extrato, como por exemplo, a região referente as metilas com diversos sinais, indicando substâncias terpênicas. Pode-se notar sinais na região de hidrogênios olefínicos, e na região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, confirmando a possibilidade de moléculas terpênicas.



**Figura 4.6** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 Tesla)

Esse extrato ainda foi analisado por CLAE-DAD, onde o comprimento de onda que demonstrou ter a maior absorção foi em 254 nm. O cromatograma dessa análise está demonstrado na **Figura 4.7**.



**Figura 4.7** – Cromatograma da análise de E.A. em CLAE-UV a 254 nm

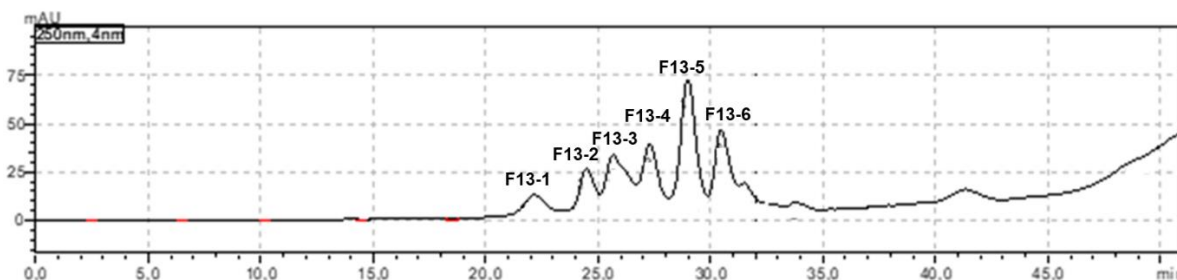
Como esse cromatograma apresentou uma grande complexidade de bandas, o que dificultaria a purificação das substâncias e de modo a resultar em métodos cromatográficos para separação dos metabólitos mais rápidos e menos dispendiosos, optou-se por fracionar o E.A em CC de sílica gel no modo gradiente, dando início com 100% de hexanos, e chegando até 100% de metanol.

A partir do fracionamento acima descrito, foi possível obter 16 frações (E.A-1 – E.A-16), que foram analisadas comparativamente por RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T) (**Apêndice – Figuras 48 – 65**). A partir dessas análises, a E.A-13 demonstrou uma maior quantidade de sinais de interesse no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 58 – Apêndice**).

A análise criteriosa dos sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 13 (**Figura 58 – Apêndice**) evidenciou metilas características de triterpenos, conforme já descrito anteriormente para as substâncias **1** e **2**. Contudo, ainda foi possível verificar a presença de sinais com constantes de acoplamento referentes a hidrogênio geminais de grupos metilênicos isolados, bem como sinais com deslocamentos químicos entre 4,0 e 7,0 ppm, o que sugere a presença de triterpenos que sofreram algumas oxidações como lactonização, epoxidação, oxidação de duplas ligações, dentre outras.

Dessa forma decidiu-se analisar essa fração por CLAE-UV, na intenção de coletar as bandas cromatográficas, buscando confirmar a proposta de triterpenos modificados (limonoides). A partir dessa análise percebeu-se que a coleta dessas bandas seria possível, e assim partiu-se para a separação por CLAE-UV na escala semi-preparativa, que possibilitou maior quantidade de amostra a ser inserida na coluna, reduzindo assim a quantidade de análises necessárias para obter massa o suficiente para serem analisadas por RMN 1D e 2D.

O cromatograma dessa análise está demonstrado na **Figura 4.8**.



**Figura 4.8** - Cromatograma da separação de E.A-13 em HPLC-Preparativo a 250 nm

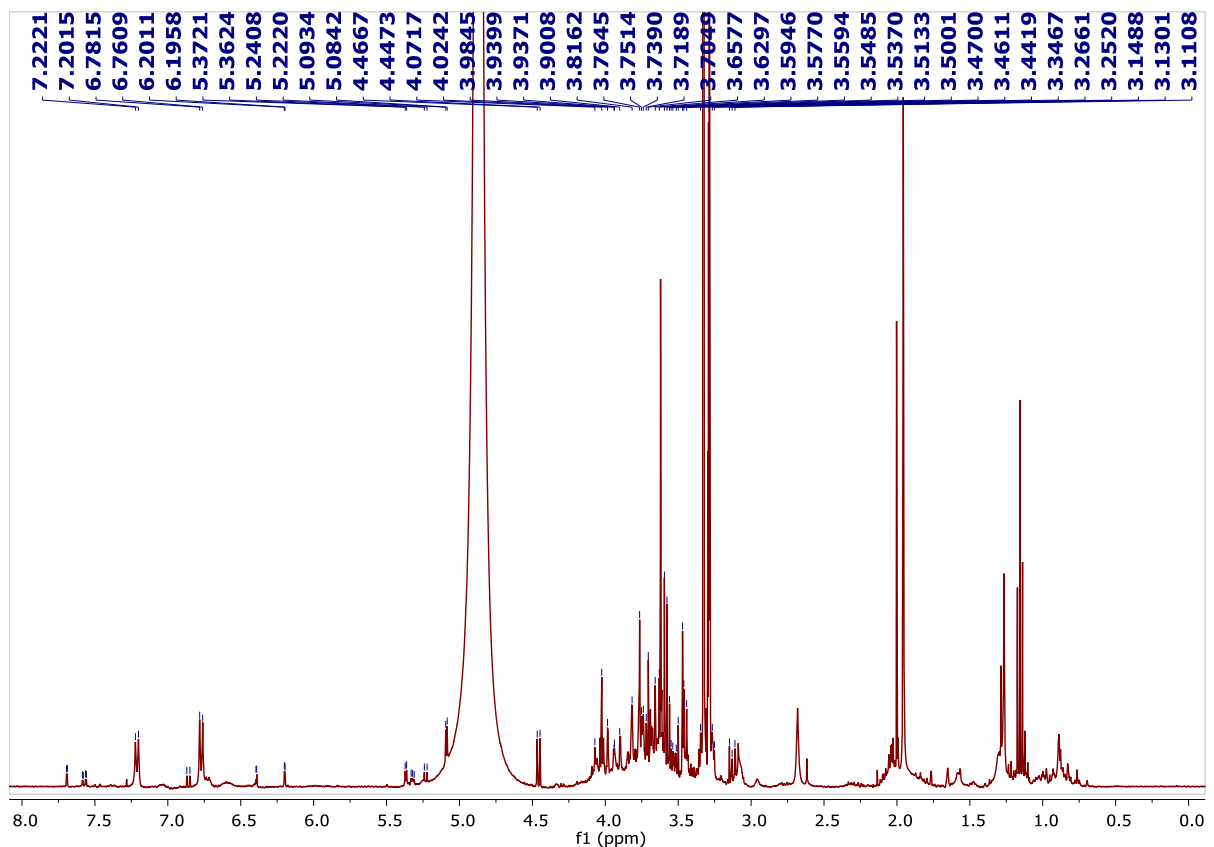
Essas frações foram então coletadas e posteriormente analisadas por RMN 1D e 2D, sendo possível, a partir de F13-1, identificar a substância (**4**). As demais frações demonstraram em seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Apêndice – Figuras 61 – 65**) sinais característicos de limonoides, que estão em processo de elucidação estrutural.

### 4.1.3. Análise do extrato metanólico (E.M.)

Para realizar a análise do E.M, foi feito um experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), onde foi possível observar sinais na região dos hidrogênios aromáticos, assim como diversos sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, que poderia indicar a presença de substâncias glicosiladas nesse extrato **Figura 4.9**.

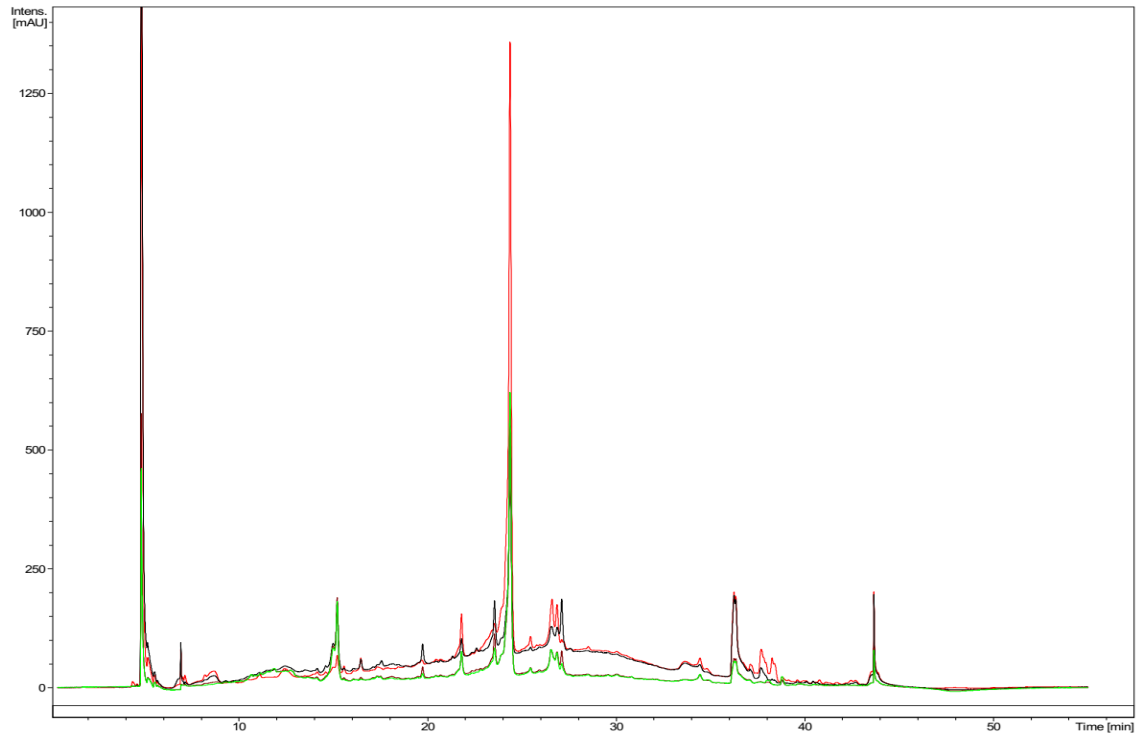
Esse extrato ainda foi analisado por CLAE-DAD em diferentes comprimentos de onda, onde foi possível obter uma boa separação entre as bandas **Figura 4.10**.

Devido a boa resolução na separação das bandas decidiu-se realizar o “trapeamento” dessas bandas por HPLC-DAD-SPE-NMR, sendo realizadas 20 análises onde foram injetados 20  $\mu\text{L}$  de uma amostra de 30 mg/mL por corrida. A **Figura 4.11** demonstra quais bandas foram coletadas.



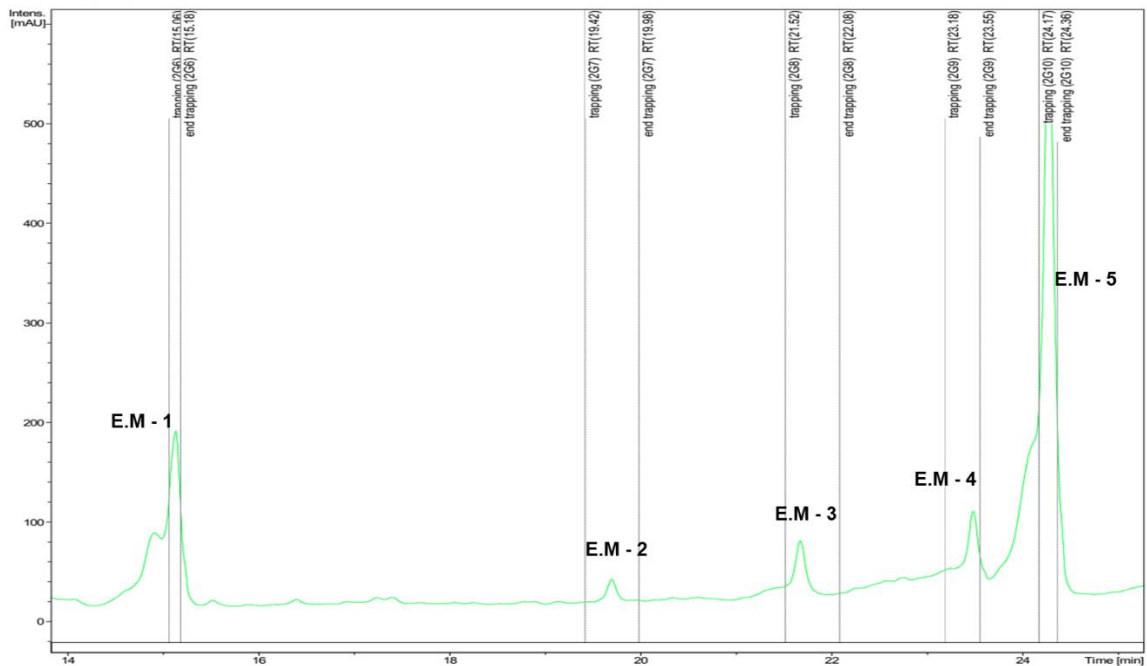
**Figura 4.9** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.M. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

Signal 2: DAD (254)  
 Signal 3: DAD (280)  
 Signal 4: DAD (300)  
 Signal 5: DAD (310)



**Figura 4.10** - Cromatograma da análise de E.M. por CLAE-DAD

Signal 1: DAD (300)



**Figura 4.11** - Cromatograma das bandas "trapeadas" por CLAE-DAD-SPE

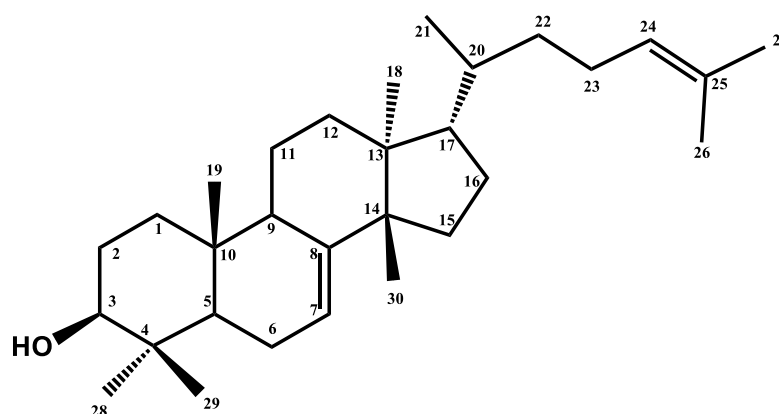
Após a coleta dessas bandas, notou-se que a E.M-5 foi a única em que se obteve massa suficiente para que os experimentos de RMN 1D e 2D fossem realizados. Nos permitindo assim a identificação da substância **3**.

## 4.2. Elucidação dos metabólitos isolados

### 4.2.1. Elucidação de triterpenos

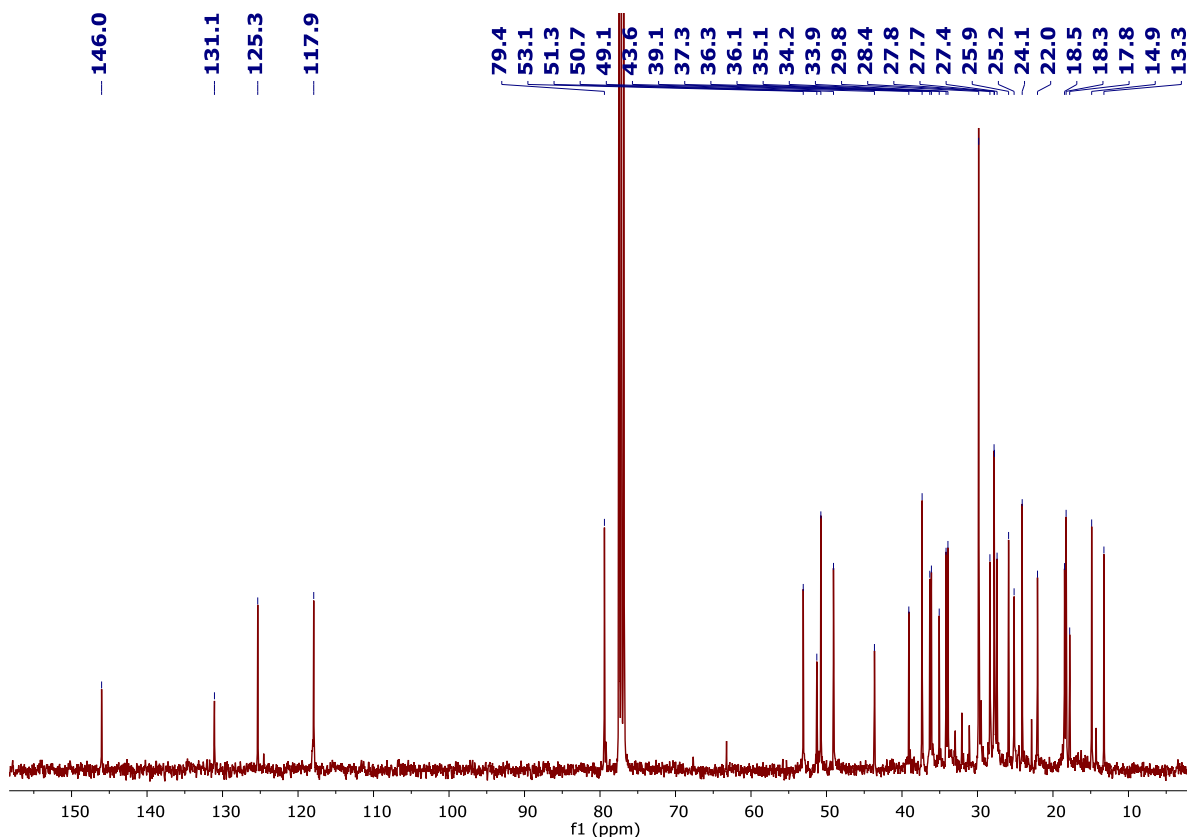
#### 4.2.1.1. Elucidação da substância (1)

A identificação da substância (1) como sendo o triterpeno tirucalla-7,24-dien-3 $\beta$ -ol (**Figura 4.12**), foi feita principalmente a partir da análise dos dados de RMN 1D e 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC), assim como a comparação desses com os dados reportados para essa substância na literatura (Kushiro, Shibuya, Masuda, & Ebizuka, 2000; Zergainoh et al., 2018).



**Figura 4.12** – Estrutura enumerada da substância 1

A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 4.13**) pode-se observar 30 carbonos. Uma vez que essa quantidade de carbonos é característica de triterpenos, determinou-se que essa poderia ser a classe de 1. A análise desse espectro torna possível identificar algumas características estruturais da molécula, como: quatro carbonos com deslocamento entre  $\delta$  150 e 110 ppm referentes a sistemas olefínicos; assim com um carbono com  $\delta$  79,4 ppm característico de carbono carbinólico.



**Figura 4.13** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** (**Figura 4.14**) fornece algumas informações de extrema importância para a elucidação dessa substância. Por exemplo, na região entre  $\delta$  0,5 e 2 nota-se 8 sinais, que integram para 3 hidrogênios cada, sugerindo então 8 grupos metila nessa substância.

É possível observar ainda dois sinais em  $\delta$  5,25 e 5,09, cada um integrando para 1 hidrogênio, demonstrando a presença de dois hidrogênios olefínicos; assim como um sinal em  $\delta$  3,24 ppm indicando um hidrogênio ligado a carbono carbinólico.



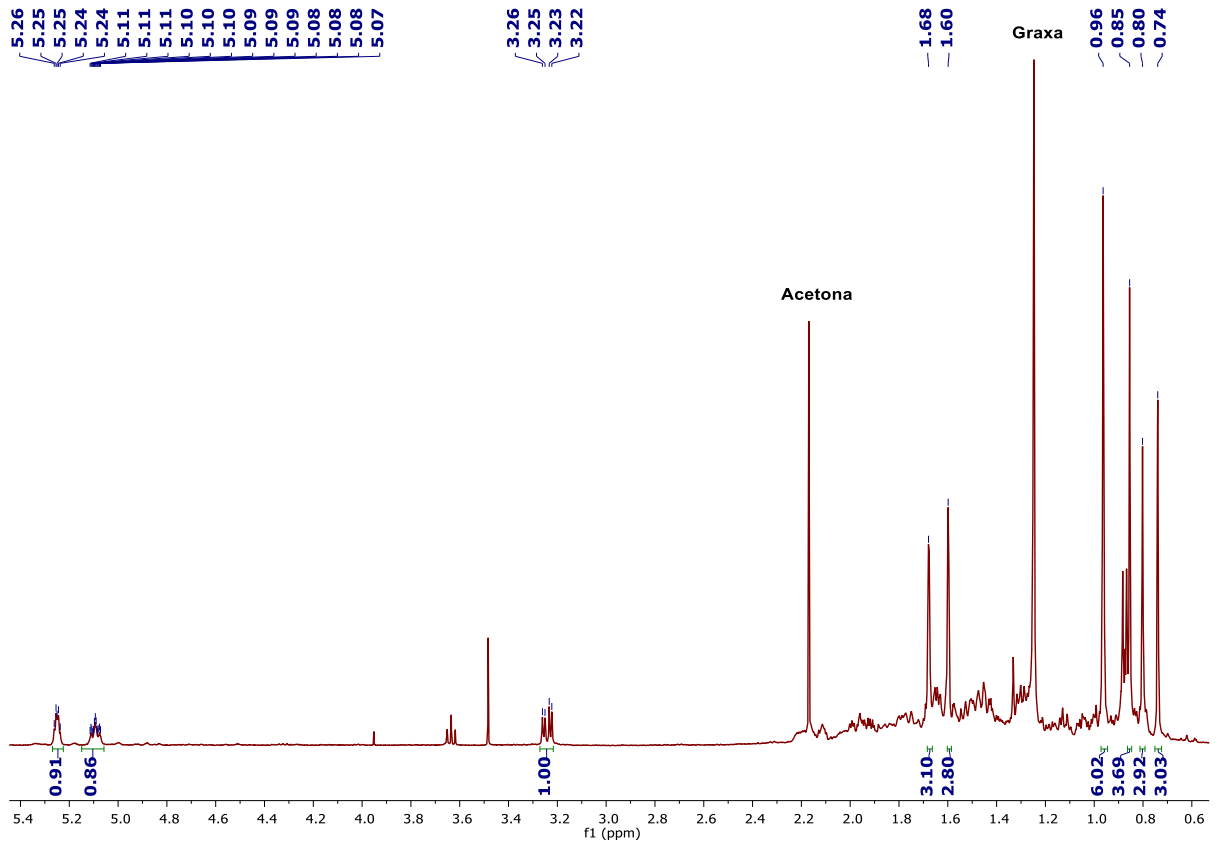


Figura 4.14 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)

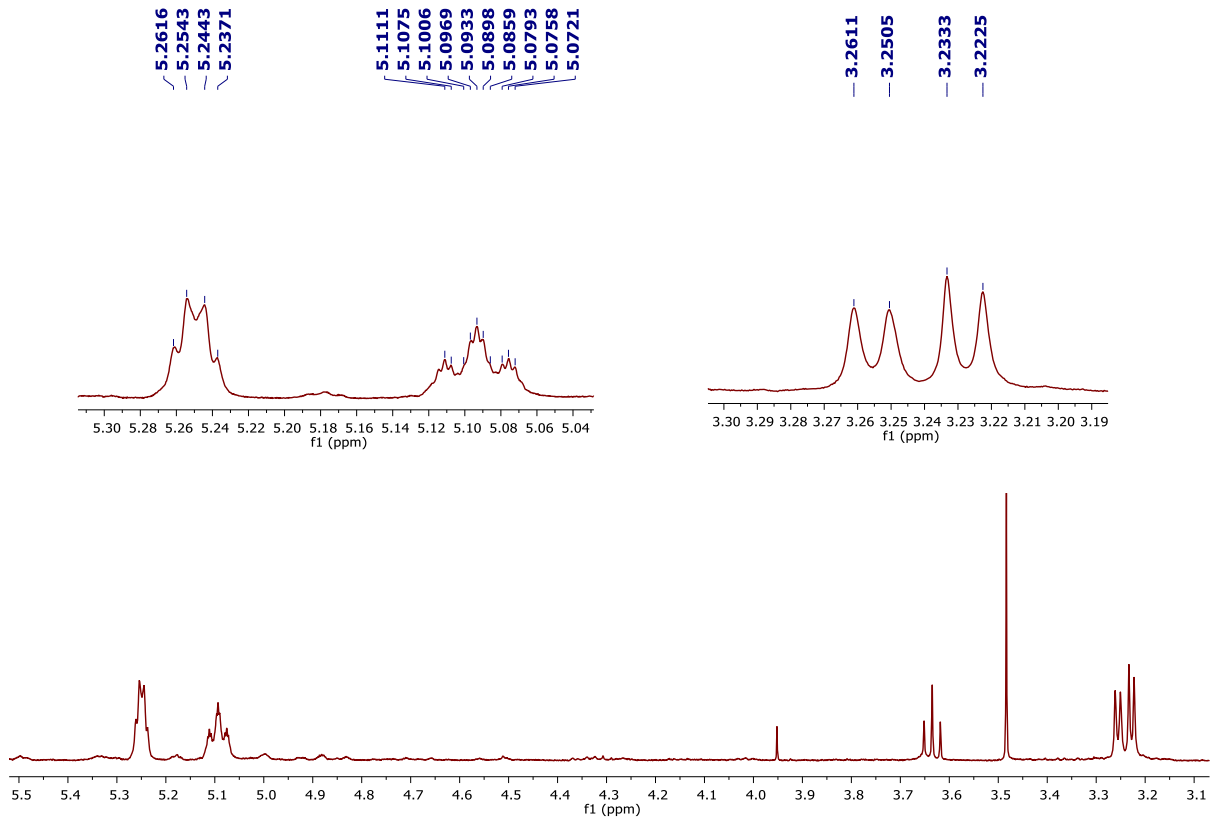
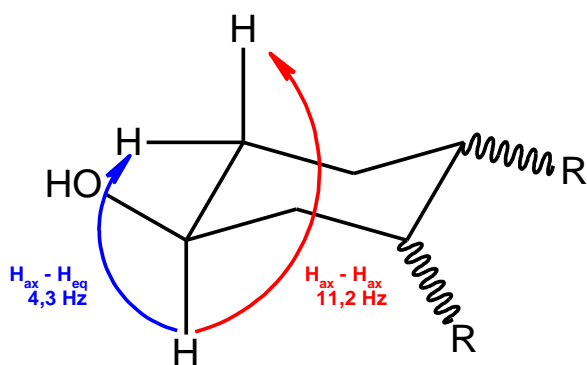


Figura 4.15 - Expansão do RMN de <sup>1</sup>H da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)

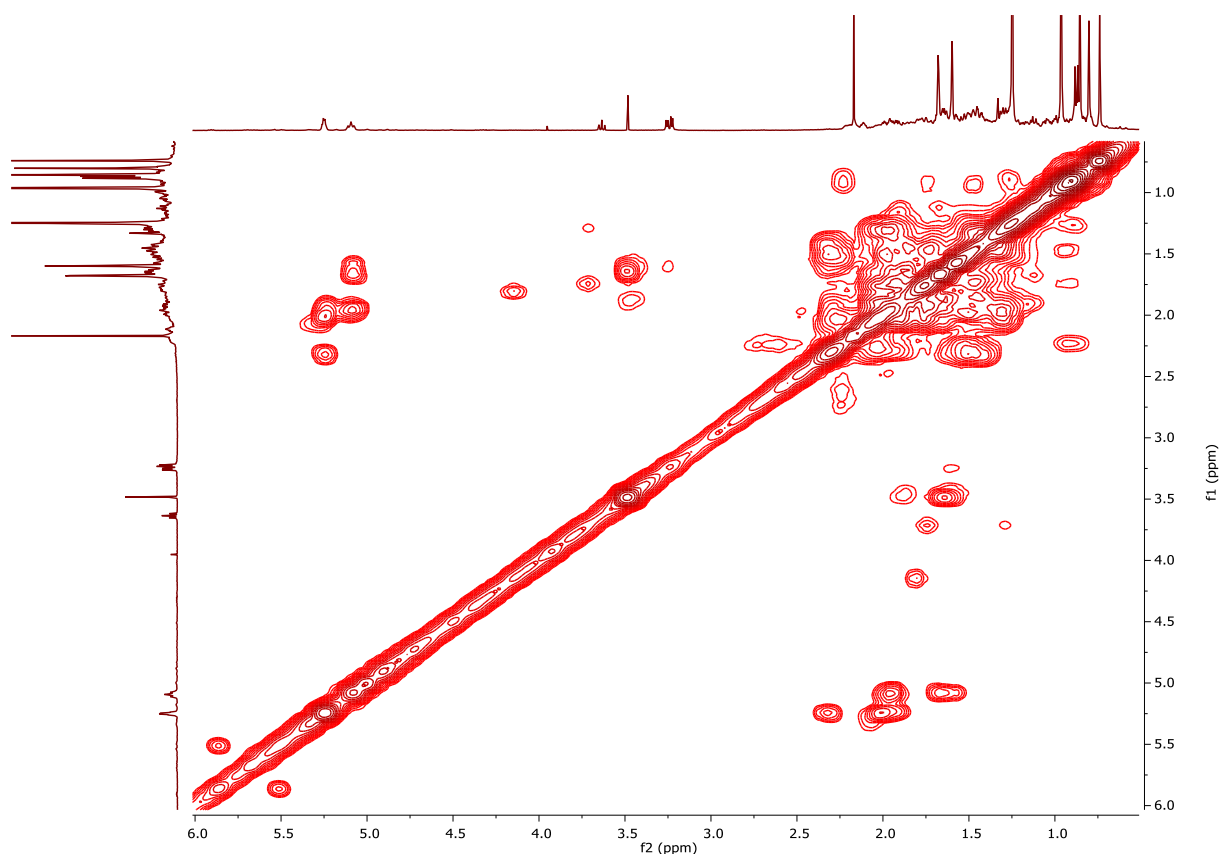
A partir da expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.15**) é possível observar a multiplicidade dos sinais, assim como calcular as constantes de acoplamento desses. Sendo assim, nota-se que o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico, H-3, tem como multiplicidade um duplo dubleto ( $dd$ ) com suas constantes de acoplamento 11,2 e 4,3 Hz. A partir dessas informações é possível confirmar a posição desse como sendo em axial, como está demonstrado na (**Figura 4.16**).



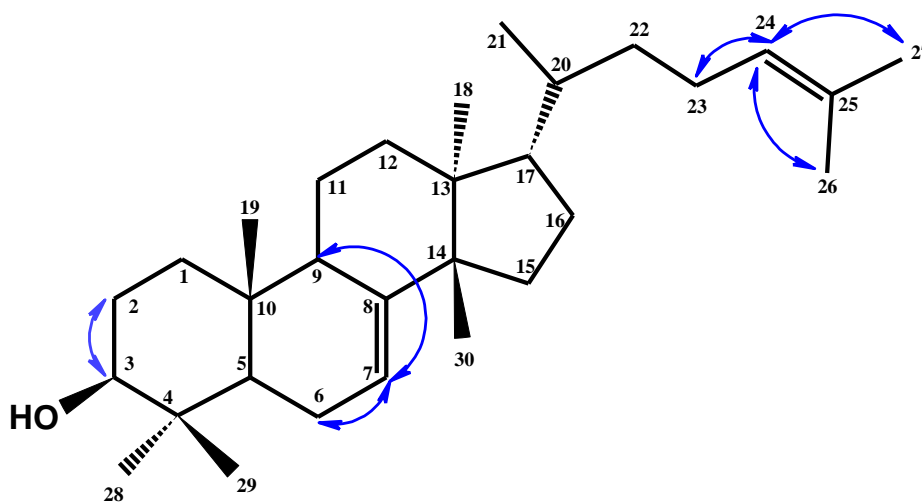
**Figura 4.16** - Acoplamentos vicinais de H-3 da substância 1

Ainda observando a multiplicidade dos hidrogênios (**Figura 4.15**), pode-se notar multiplicidades diferentes nos hidrogênios olefínicos. O sinal em  $\delta$  5,09 é um tripleto aparente, indicando um acoplamento com diversos hidrogênios. A partir dessa informação, juntamente com a existência de duas metilas mais desblindadas em  $\delta$  1,60 e 1,68 ppm, pode-se concluir que essas duas metilas estão acoplando com esse hidrogênio olefínico, sendo esse H-24. O sinal em  $\delta$  5,25 é um duplo dubleto ( $dd$ ) com constantes de acoplamento de 2,7 e 4,2 Hz, sendo esse o H-7.

A partir do experimento de COSY **Figura 4.17** foi possível observar as interações de H-24 com H-23, H-26 e H-27; H-3 com H-2; H-7 com H-5 e H-9, como está demonstrado na **Figura 4.18**.

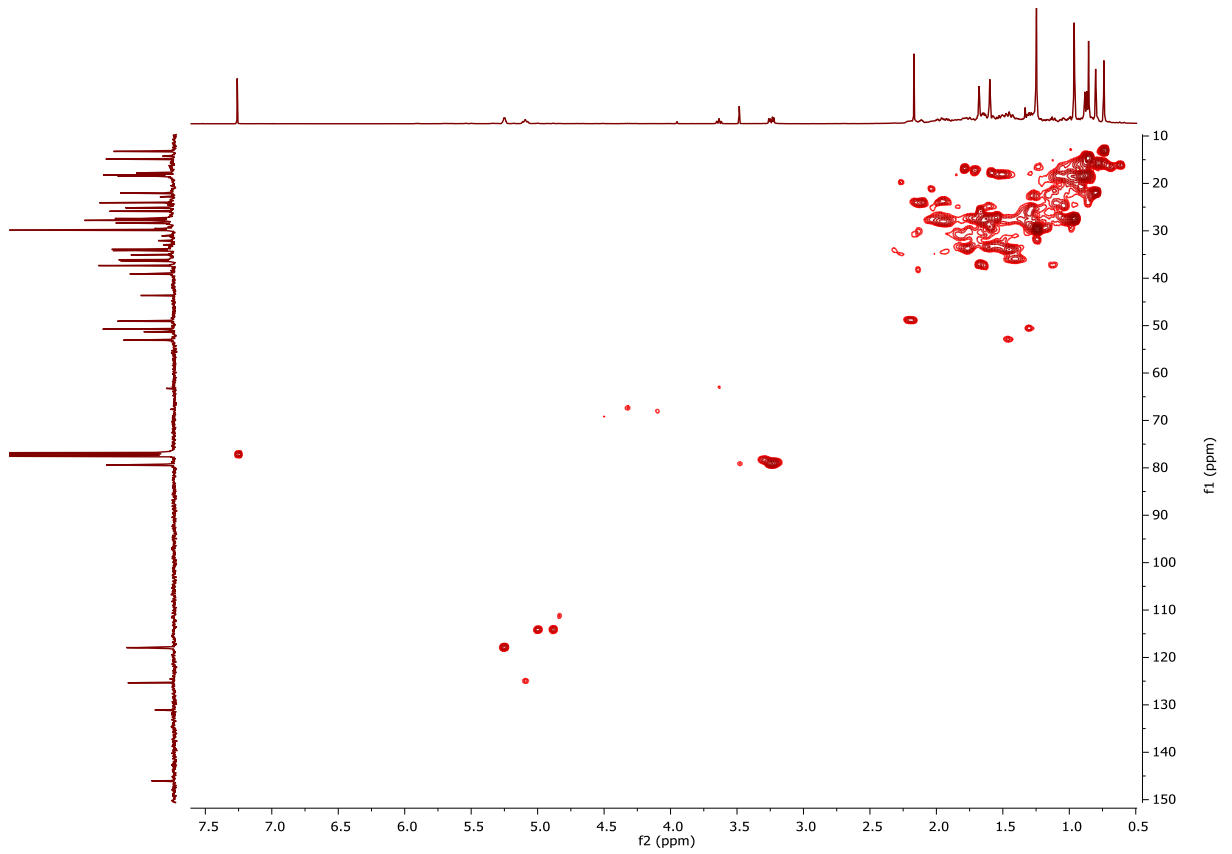


**Figura 4.17** - Mapa de contornos COSY da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T)

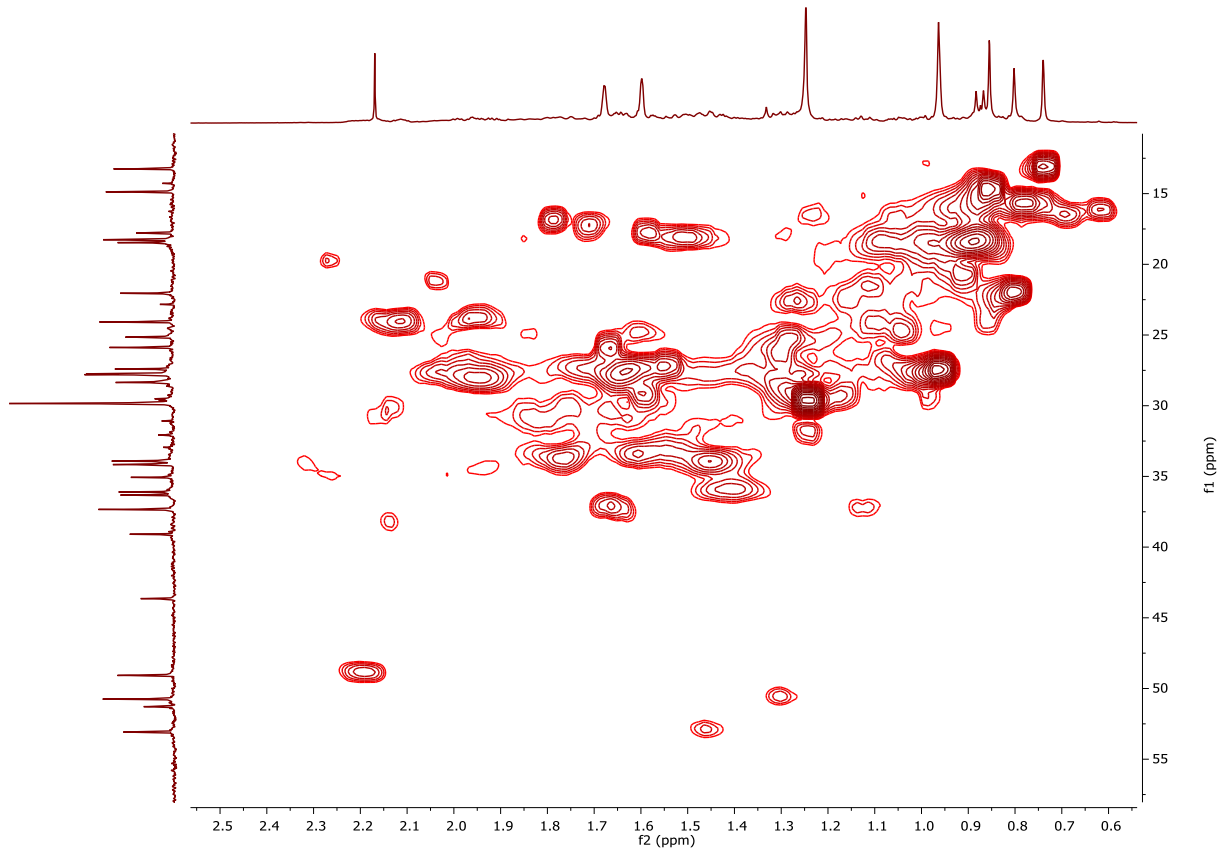


**Figura 4.18** - Interações observadas no mapa de contornos COSY da substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T)

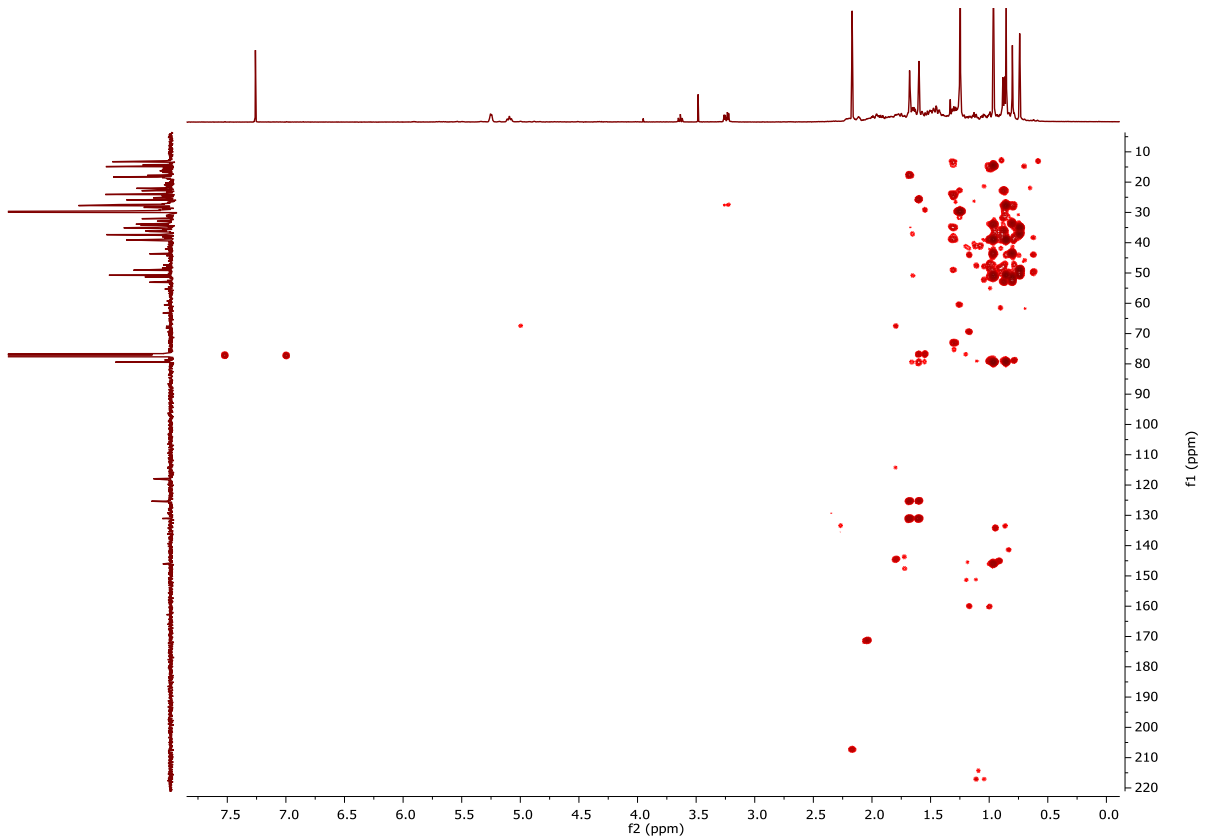
A partir dos experimentos de HSQC (**Figura 4.19**) e de HMBC (**Figura 4.21**) pode-se identificar os hidrogênios diretamente ligados aos carbonos, assim como determinar as correlações entre os carbonos e hidrogênios da molécula em até 3 ligações de distância. As correlações observadas pelo mapa de contornos de HMBC se encontram na **Figura 4.22**.



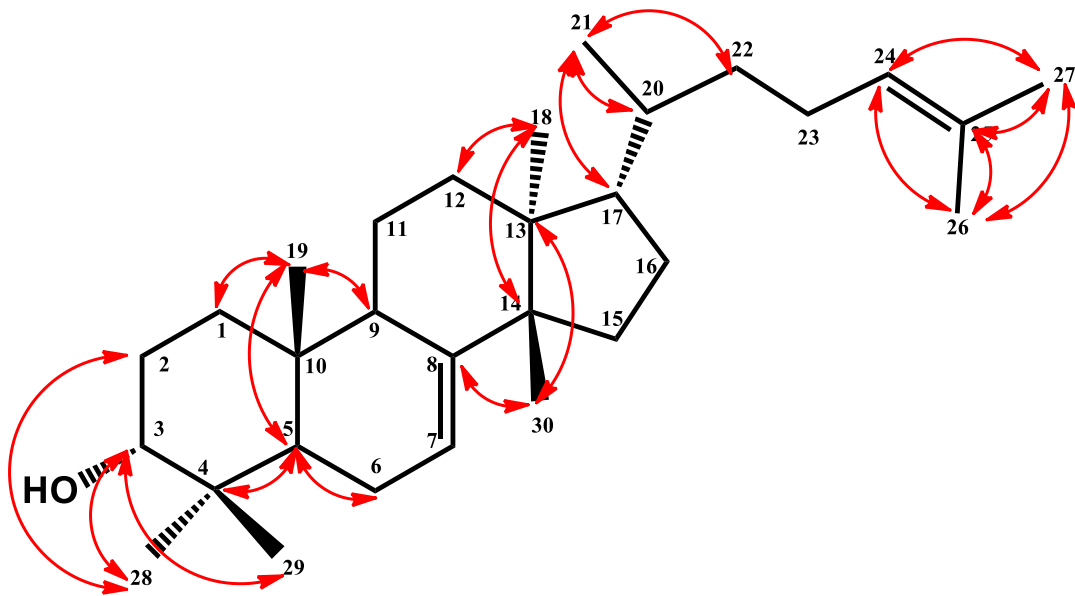
**Figura 4.19** - Mapa de contornos HSQC da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)



**Figura 4.20** - Expansão do mapa de contornos HSQC da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)



**Figura 4.21** - Mapa de contornos HMBC da substância **1** (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)



**Figura 4.22** - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância **1** (CDCl<sub>3</sub>, 9,4 T)

A partir das correlações observadas e a comparação com os dados da literatura foi possível então confirmar a substância **1** como sendo Tirucalla-7,24-dien-

3 $\beta$ -ol, sendo a primeira vez que essa é isolada nesse gênero. Os dados obtidos pelos experimentos, assim como os dados da literatura se encontram na **Tabela 4.1**.

**Tabela 4.1** -Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)

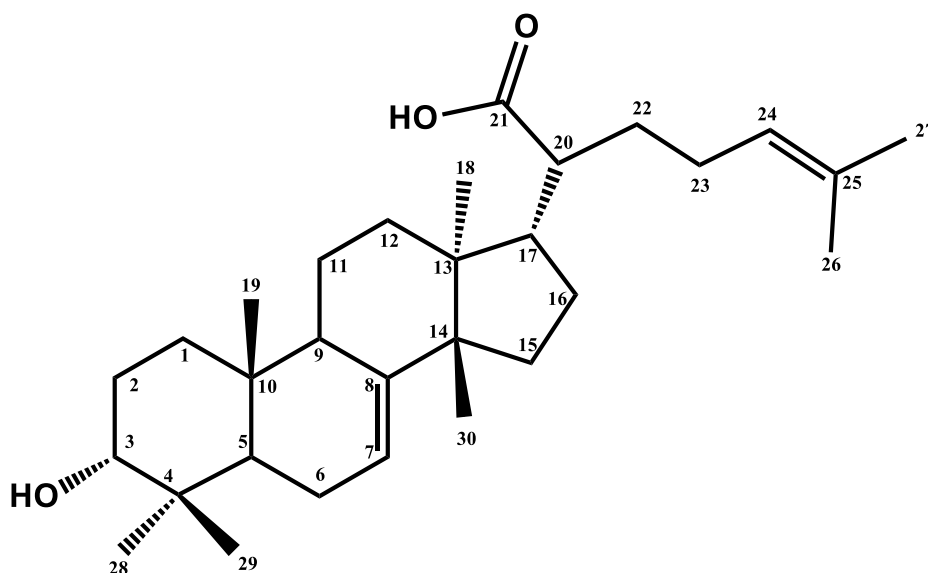
	$\delta$ $^1\text{H}$ de (1)	$\delta$ de $^1\text{H}$ *	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de (1)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ *
1	1,66 e 1,12	1,67 e 1,14	37,3	37,2
2	1,63 e 1,54	1,7 e 1,61	27,4	25,3
3	3,24 ( <i>dd</i> , $J= 4,3$ e $11,2$ Hz, 1H)	3,24 ( <i>dd</i> , $J= 11,2$ e $3,9$ Hz, 1H)	79,4	78,9
4	-	-	39,1	38,0
5	1,30	1,30	50,7	50,3
6	2,11 e 1,9	2,15 e 1,97	24,1	23,7
7	5,25 ( <i>dd</i> , $J= 2,67$ e $4,20$ Hz, 1H)	5,25 ( <i>brs</i> , 1H)	117,9	117,9
8	-	-	146,0	145,9
9	2,16	2,19	49,1	49,0
10	-	-	35,1	34,4
11	1,50	1,50	18,3	18,0
12	1,76	1,80 e 1,25	33,9	33,6
13	-	-	43,6	43,0
14	-	-	51,3	48,1
15	1,44	1,79 e 1,45	34,2	33,5
16	1,94	1,93 e 1,30	28,4	28,6
17	1,46	1,47	53,1	52,8
18	0,80 ( <i>s</i> , 3H)	0,80 ( <i>s</i> , 3H)	22,0	21,0
19	0,74 ( <i>s</i> , 3H)	0,74 ( <i>s</i> , 3H)	13,3	13,4
20	1,40	1,43	36,1	34,1
21	0,87 ( <i>d</i> , $J=6,3$ Hz, 3H)	0,84 ( <i>d</i> , $J= 6,2$ Hz, 3H)	18,3	18,9
22	1,40	1,58	36,3	33,8
23	1,83	2,04 e 1,86	25,2	25,2
24	5,09 ( <i>m</i> , 1H)	5,10 ( <i>m</i> , 1H)	125,3	124,8
25	-	-	131,1	130,7
26	1,68 ( <i>brs</i> , 3H)	1,68 ( <i>s</i> , 3H)	25,9	25,6
27	1,60 ( <i>brs</i> , 3H)	1,60 ( <i>s</i> , 3H)	17,8	17,4

28	0,85 (s, 3H)	0,86 (s, 3H)	14,9	14,3
29	0,95 (s, 6H)	0,97 (s, 6H)	27,7	27,3
30	0,95 (s, 6H)	0,97 (s, 6H)	27,8	27,3

\* (Zergainoh et al., 2018) (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)

#### 4.2.1.2. Elucidação da substância 2

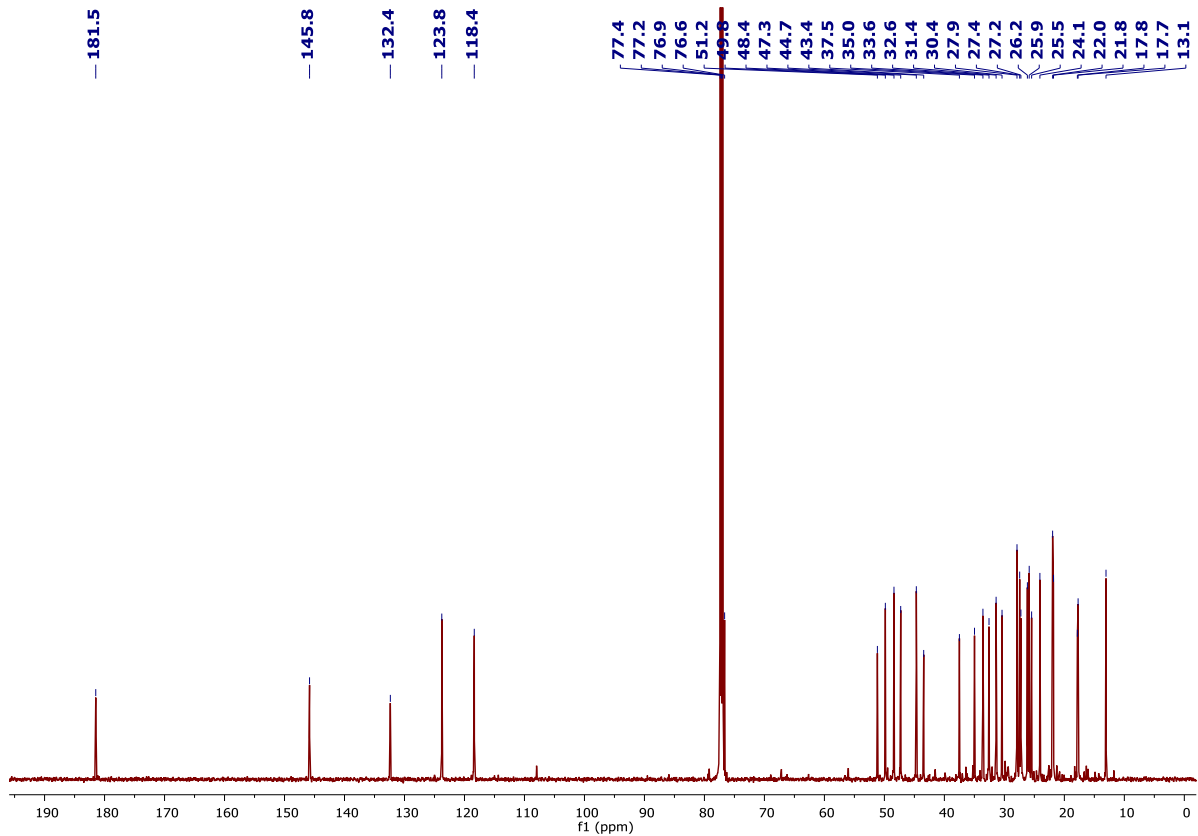
A identificação da substância **2** como sendo o triterpeno ácido 3 $\alpha$ -hidroxitirucalla-7,24-dien-21-óico (**Figura 4.23**), foi feita principalmente pela análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135, COSY, HSQC e HMBC, assim como com a comparação destes com aqueles reportados para essa substância na literatura (VERHOFF et al., 2014).



**Figura 4.23** - Estrutura enumerada da substância **2**

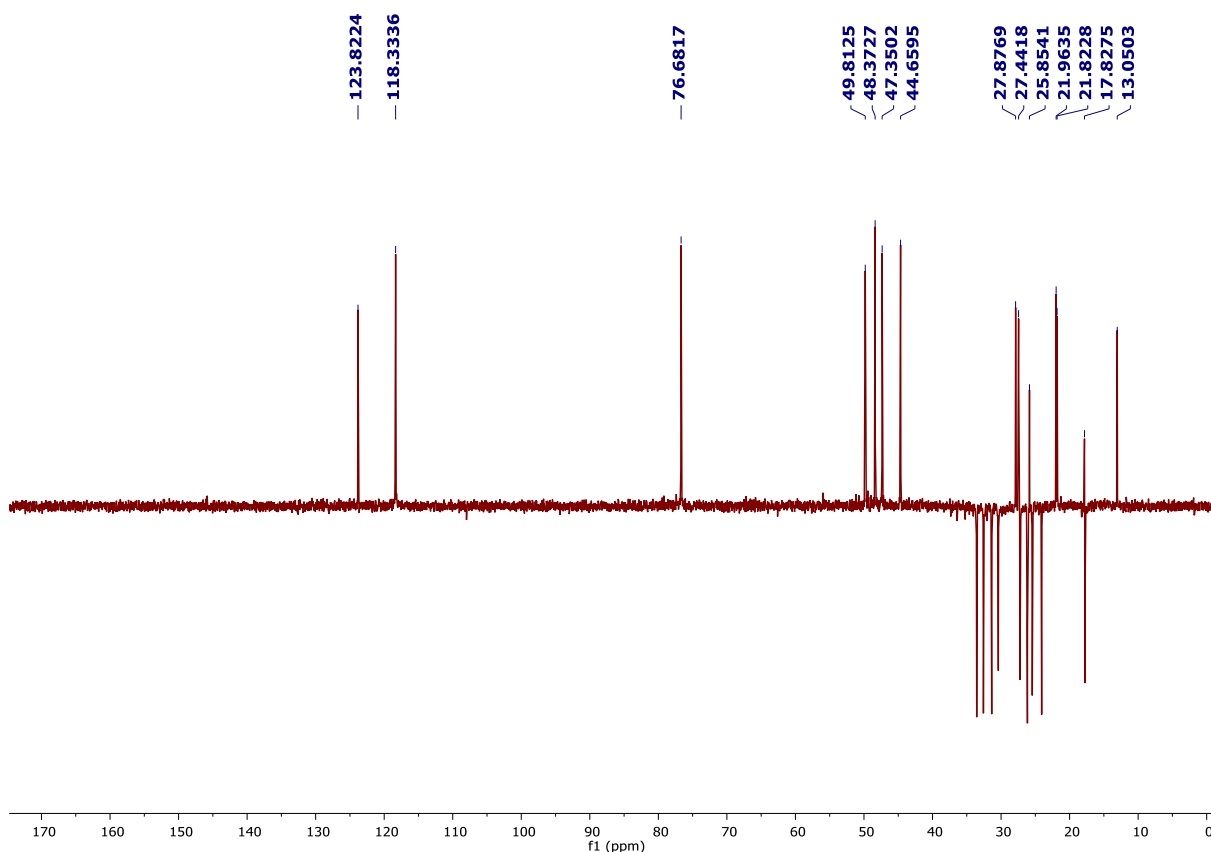
A partir da análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (**Figura 4.24**) pode-se identificar 30 carbonos, o que demonstrou a possibilidade de a substância **2** ser um triterpeno. A partir dos deslocamentos desses carbonos pode-se definir algumas características dessa molécula, como: um carbono acila com  $\delta$  181,5; quatro carbonos com deslocamento entre  $\delta$  150 e 110 referentes a sistemas olefínicos; assim com um carbono com  $\delta$  76,6 característico de carbono carbinólico.

A partir da análise dos espectros de RMN de DEPT 135 (**Figura 4.25**), foi possível observar 23 carbonos. Ao sobrepor os dois espectros de RMN ( $^{13}\text{C}$  + DEPT 135) foi possível diferenciar os tipos de carbonos, definindo então: sete não hidrogenados, nove metilênicos e 14 metínicos ou metílicos.



**Figura 4.24** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)





**Figura 4.25** – Espectro de RMN de DEPT 135 da substância **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)

Através da análise espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.26**) dessa substância observa-se sete sinais entre  $\delta$  0,5 e 2, com integração para três hidrogênios cada, atribuídos a grupos metílicos. Ainda, pode-se observar dois sinais em  $\delta$  5,06 e 5,25, com integração de 1 hidrogênio cada, referentes a dois hidrogênios olefínicos e um sinal em  $\delta$  3,49 referente a um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico. A presença de sete grupos metílicos, assim como o sinal com deslocamento em  $\delta$  3,49, auxiliaram na identificação da molécula como sendo um triterpeno, uma vez que são sinais característicos dessa classe.

A partir da expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.27**), pode-se observar o sinal em  $\delta$  3,49 é um duplo dubleto referente ao H-3 ligado a um carbono carbinólico, na posição equatorial, como demonstrado na **Figura 4.28**. Podemos concluir a posição desse hidrogênio analisando as constantes de acoplamento do mesmo, 2,2 Hz e 3,2 Hz, que são correspondentes ao acoplamento vicinal entre  $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{eq}}$  e  $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{ax}}$ , respectivamente. Acoplamento comprovado juntamente pelo experimento de COSY que apresenta uma interação de H-3<sub>eq</sub> com H-2<sub>ax/eq</sub> tendo deslocamentos de 1,63 e 1,69 ppm.

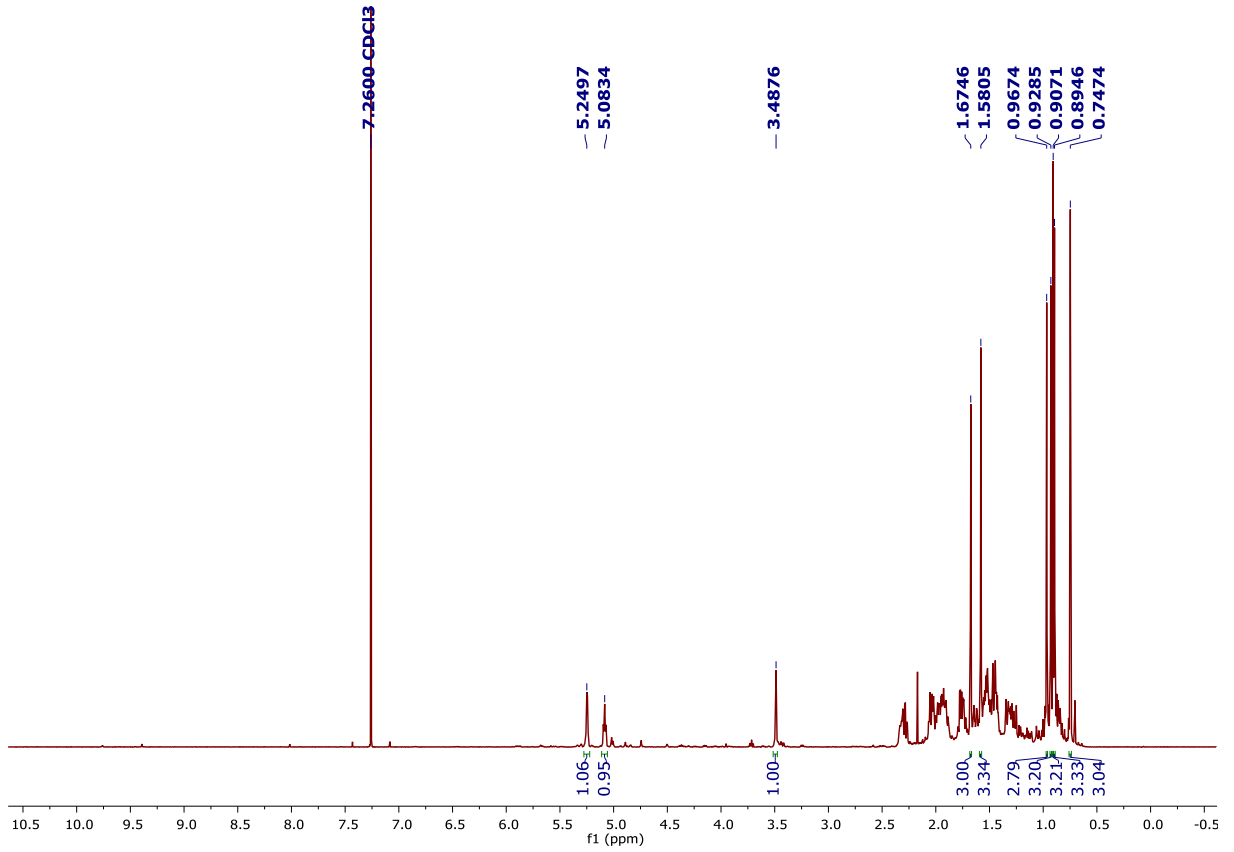


Figura 4.26 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância (2), (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)

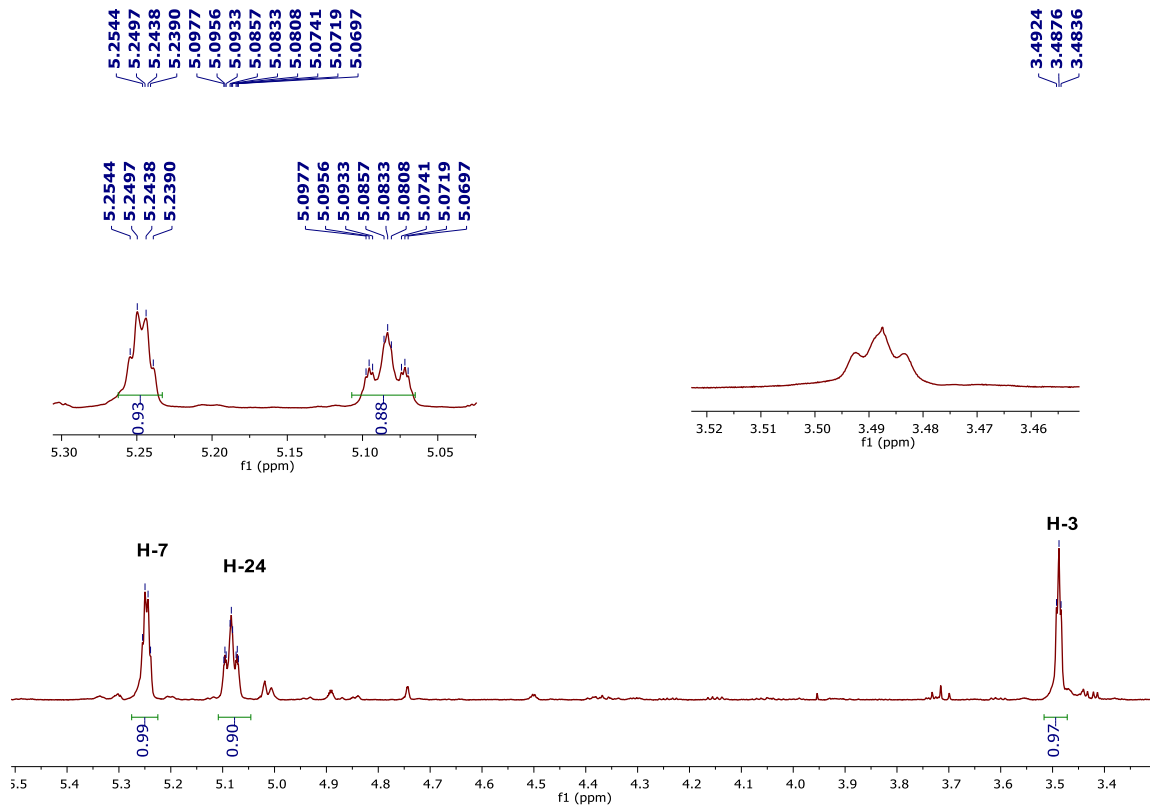
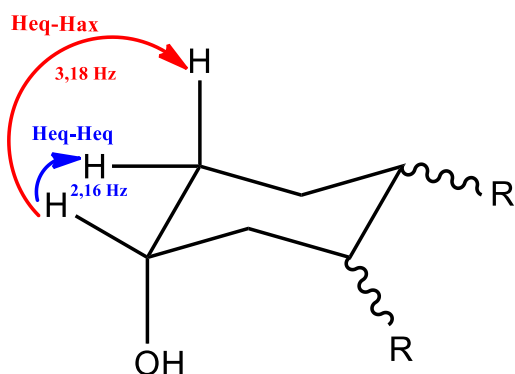


Figura 4.27 - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância (2), (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)



**Figura 4.28** - Acoplamentos vicinais de H-3 da substância (2)

O hidrogênio olefínico com sinal em  $\delta$  5,25 é um quadrupeto referente ao H-7 com constante de acoplamento de 3,3 Hz. A partir dos dados obtidos a partir do espectro de RMN de COSY (**Figura 4.29**), pode-se concluir que os três hidrogênios que apresentam interação com o H-7 são o H-6 de deslocamentos  $\delta$  2,04 e 1,93 e o H-9 com deslocamento  $\delta$  2,32.

O hidrogênio olefínico com sinal em  $\delta$  5,06 é um tripleto aparente referente ao H-24. Com base nos dados obtidos pelo espectro de RMN de COSY conseguiu-se observar uma interação com os hidrogênios referentes a duas metilas, H-26 e H-27 ( $\delta$  1,58 e 1,68, respectivamente), assim como uma interação com os dois hidrogênios referentes ao H-23 ( $\delta$  1,96).



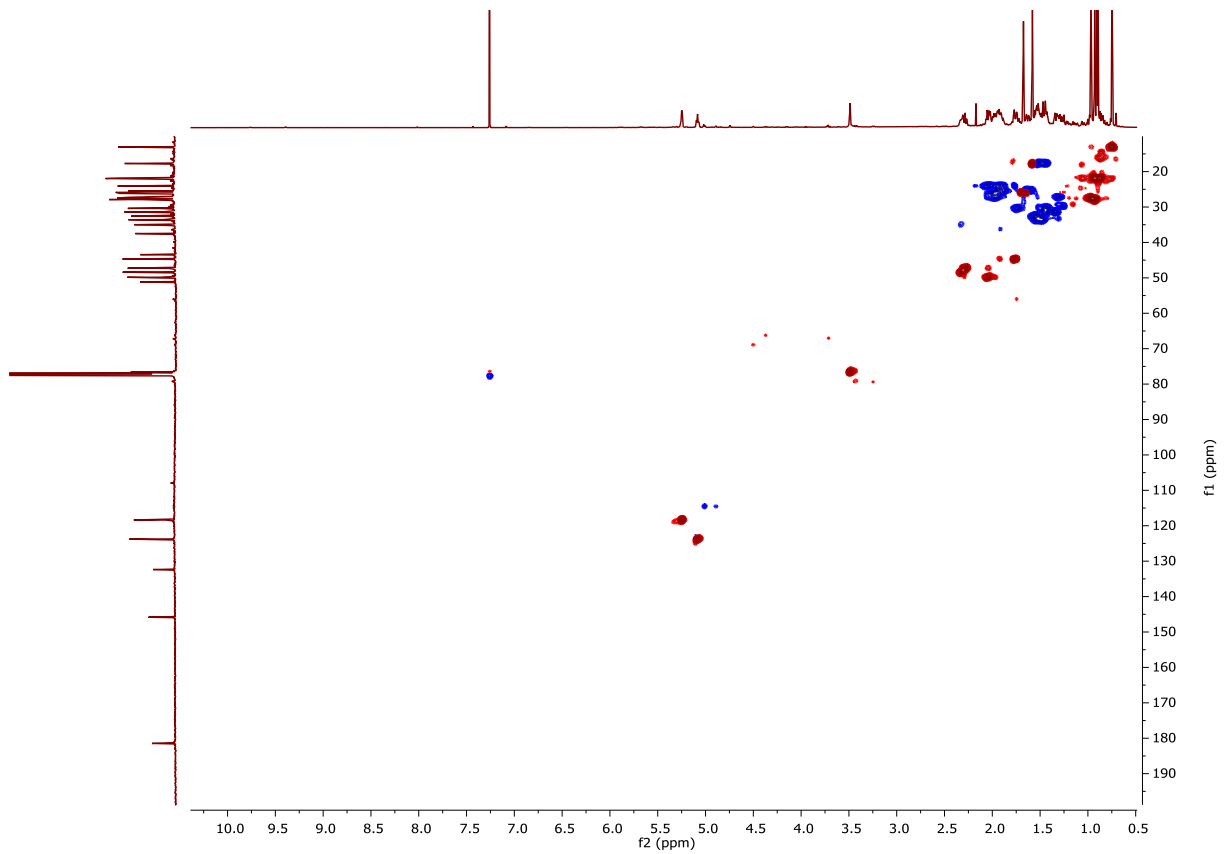


Figura 4.31 – Mapa de contornos HSQC da substância 2, (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)

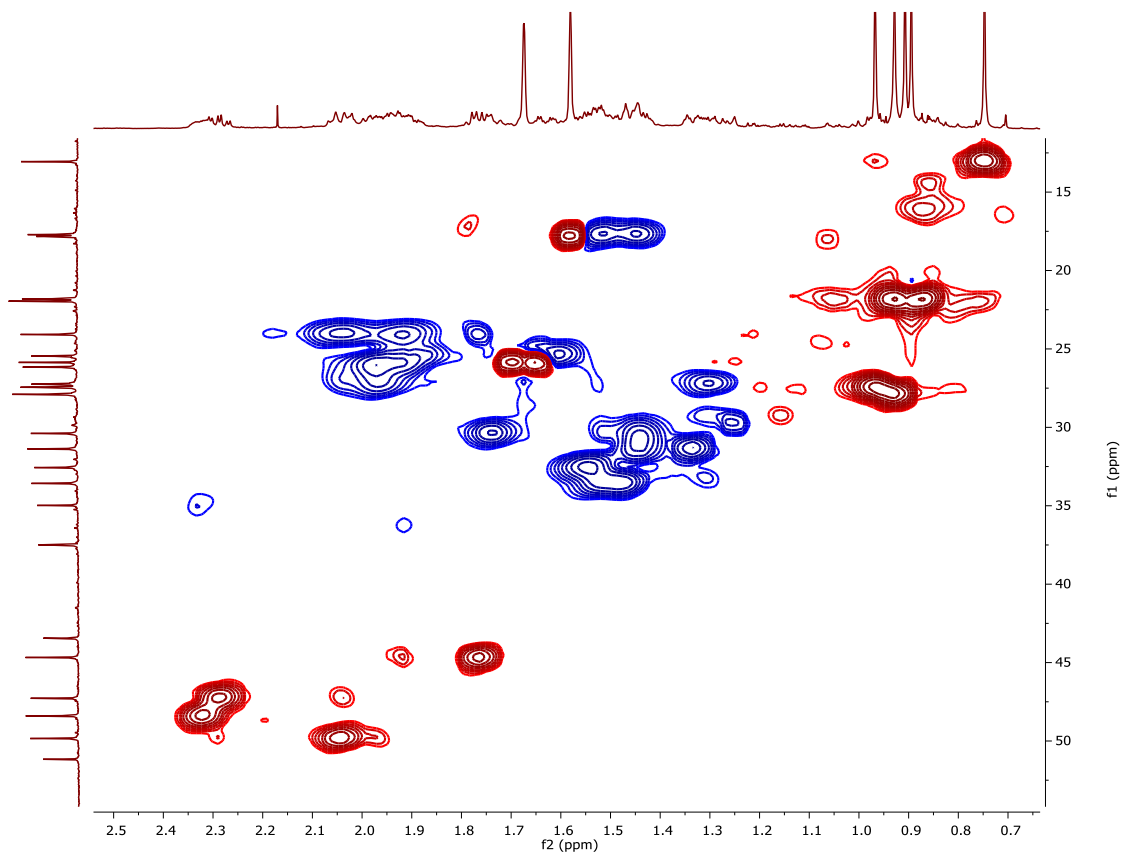
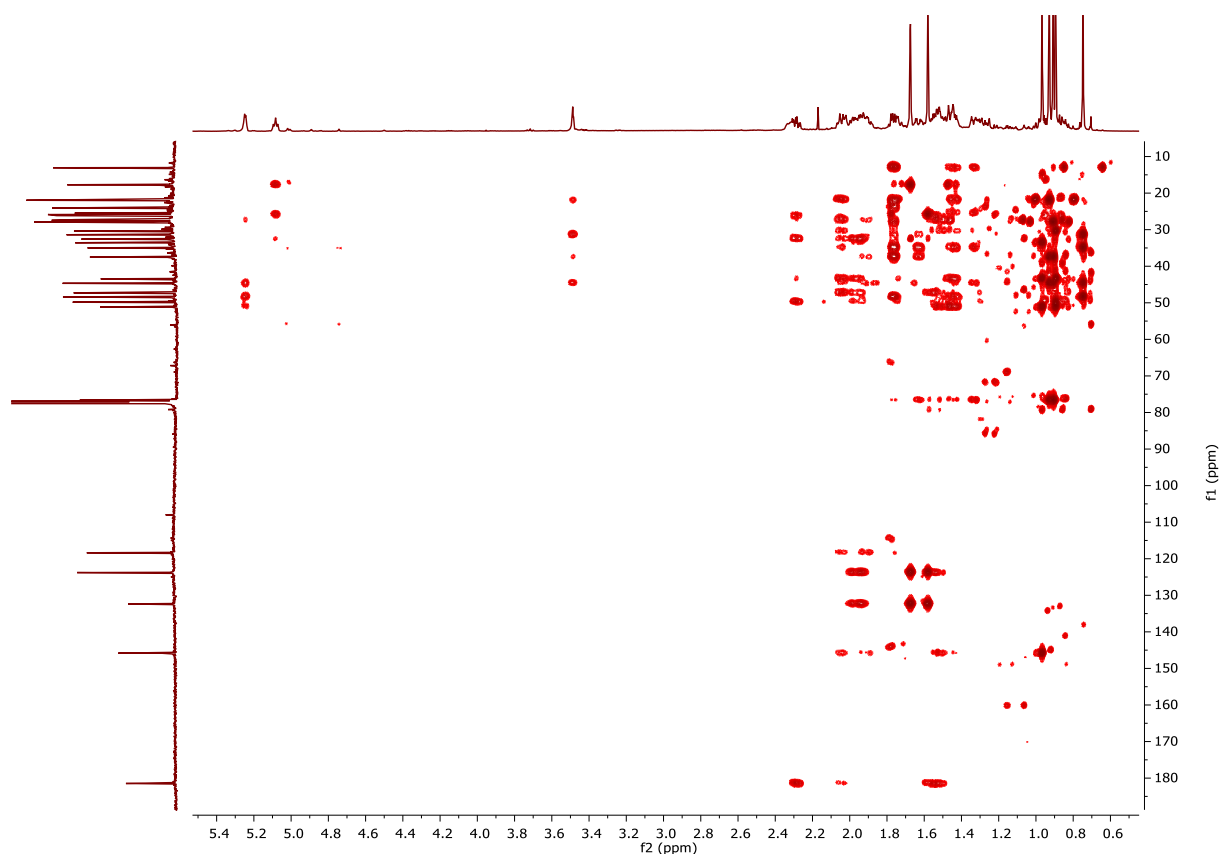
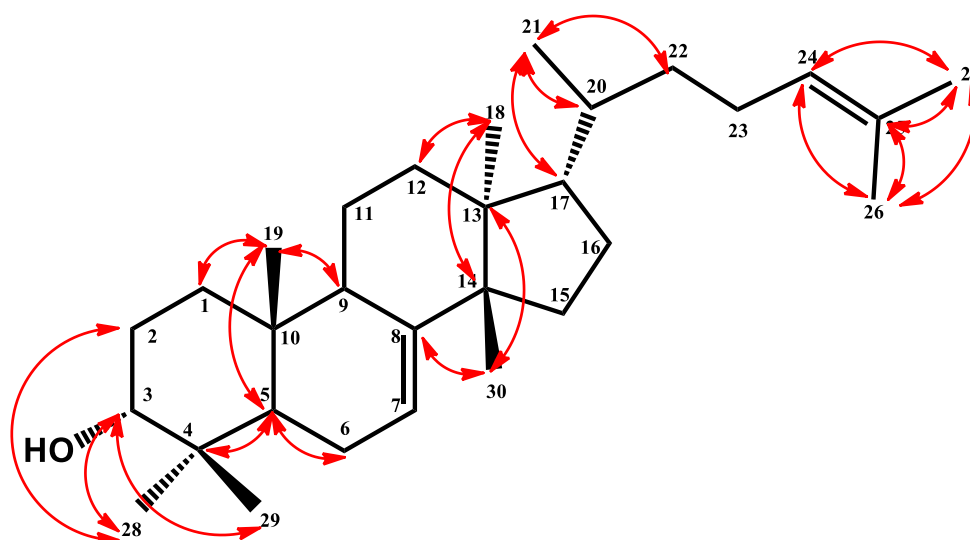


Figura 4.32 - Expansão do mapa de contornos HSQC da substância 2, (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)



**Figura 4.33** – Mapa de contornos HMBC da substância **2**, (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)

A partir dos experimentos de RMN de HSQC (**Figura 4.31**) e HMBC (**Figura 4.33**) foi possível identificar quais os hidrogênios ligados a cada carbono, assim como observar as vizinhanças desses carbonos em até 4 ligações. As correlações observadas pelo experimento HMBC estão demonstradas na **Figura 4.34**.



**Figura 4.34** – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância **2**

Portanto, foi possível determinar a estrutura dessa molécula, assim como determinar os deslocamentos químicos de seus carbonos e hidrogênios como demonstrado na **Tabela 4.2**.

**Tabela 4.2** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)

	$\delta$ $^1\text{H}$ de (2)	$\delta$ de $^1\text{H}$ *	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de (2)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ *
<b>1</b>	1,33 e 1,46	1,64 – 1,60 ( <i>m</i> )	31,3	33,1
<b>2</b>	1,63 e 1,69	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	26,2	27,5
<b>3</b>	3,48 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,16 e 3,18 Hz)	4 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	77,6	76,7
<b>4</b>	-	-	37,4	39,1
<b>5</b>	1,76	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	44,5	46,2
<b>6</b>	2,04 e 1,93	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	24,1	25,7
<b>7</b>	5,25 (1H, <i>q</i> , <i>J</i> = 3,3 Hz)	,28 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,9 e 6,4 Hz)	118,4	120,2
<b>8</b>	-	-	145,8	147,7
<b>9</b>	2,32	2,26 – 2,35 ( <i>m</i> )	48,4	50,4
<b>10</b>	-	-	34,9	36,5
<b>11</b>	1,51 e 1,44	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	17,6	19,1
<b>12</b>	1,73	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	30,4	32,3
<b>13</b>	-	-	43,4	45,1
<b>14</b>	-	-	51,2	52,8
<b>15</b>	1,50	1,49 – 1,56 ( <i>m</i> )	33,6	35,3
<b>16</b>	1,30	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	27,2	28,8
<b>17</b>	2,06	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	49,9	51,5
<b>18</b>	0,75 (3H, <i>s</i> )	0,80 (3H, <i>s</i> )	13,0	14,5
<b>19</b>	0,88 (3H, <i>s</i> )	0,93 (3H, <i>s</i> )	22,0	23,1
<b>20</b>	2,28	2,26 – 2,35 ( <i>m</i> )	47,3	49,2
<b>21</b>	-	-	181,6	178,2
<b>22</b>	1,54 e 1,45	1,49 – 1,56 ( <i>m</i> )	32,6	34,3
<b>23</b>	1,60 e 1,96	1,70 – 2,02 ( <i>m</i> )	25,5	27,8
<b>24</b>	5,08 (1H, <i>m</i> )	5,12 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	123,8	125,8
<b>25</b>	-	-	132,3	133,2
<b>26</b>	1,68 (3H, <i>brs</i> )	1,66 (3H, <i>s</i> )	25,9	26,8
<b>27</b>	1,58 (3H, <i>brs</i> )	1,56 (3H, <i>s</i> )	17,8	18,7
<b>28</b>	0,90 (3H, <i>s</i> )	0,90 (3H, <i>s</i> )	21,8	23,3
<b>29</b>	0,92 (3H, <i>s</i> )	0,91 (3H, <i>s</i> )	27,8	29,5
<b>30</b>	0,96 (3H, <i>s</i> )	1,01 (3H, <i>s</i> )	27,5	

\* (VERHOFF et al., 2014) ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 11,7 T)

#### 4.2.2. Elucidação estrutural de flavonoides

Levando em consideração a riqueza de estudos até o momento relatados na forma de artigos científicos publicados em periódicos, assim como aqueles compiladas em livros exclusivamente dedicados aos flavonoides, classe de metabólitos secundários que apresentam grande riqueza para a química de produtos naturais, atualmente a comparação de seus dados de RMN tem sido uma ferramenta

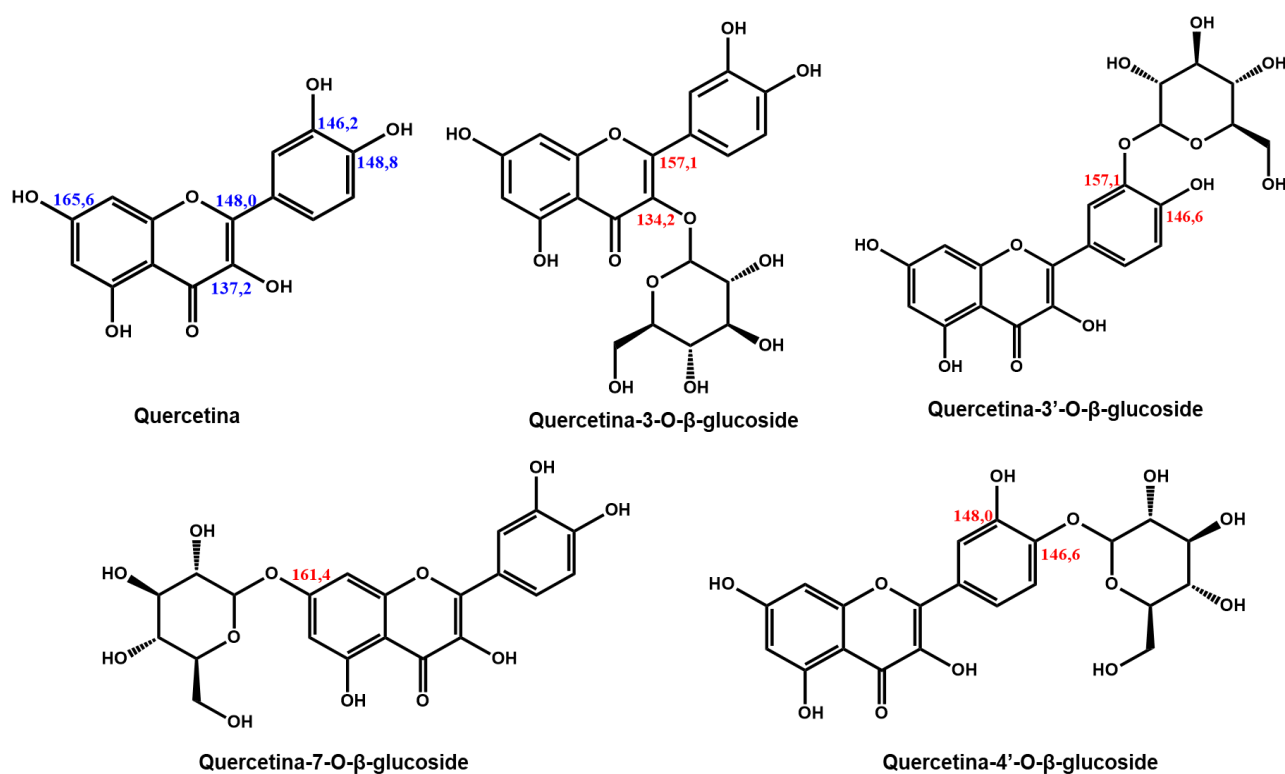
extremamente fidedigna para a distinção entre seus pares (DIRKS-HOFMEISTER et al., 2015; KAJJOUT e ROLANDO, 2011; KWON e BAE, 2013; NGUELEFACK et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013; PARK et al., 2014; SUKITO e TACHIBANA, 2014).

O efeito da glicosilação de uma hidroxila fenólica em flavonoides altera os valores de deslocamento químico do sinal de  $^{13}\text{C}$ . A partir do caráter doador de elétrons do açúcar, nota-se o efeito  $\beta$  de desblindagem do carbono onde ocorre a glicosilação, enquanto os carbonos em se tornam mais blindados devido ao mesmo efeito (MARKHAM et al., 1978; AGRAWAL e THAKUR, 1978; SILVERSTEIN et al., 2014).

Quando a glicosilação ocorre no anel C de um flavonol, observa-se um efeito de blindagem no carbono ligado ao açúcar (C-3) e uma desblindagem no carbono (C-2). Devido a delocalização de carga que ocorre nessa molécula, intensificada pela existência de uma carbonila, com efeito retirador de elétrons, o C-2 torna-se mais deficiente em elétrons, tornando-se assim mais desblindado. (CREWS, RODRIGUEZ e JASPARS, 1998; SILVERSTEIN et al., 2014).

O efeito de delocalização de carga na molécula influencia também os valores de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  quando a glicosilação ocorre no anel B do flavonoide; essa substituição ocorre nos carbonos C-3' ou C-4'. Os efeitos observados são opostos nesses dois casos. No primeiro o efeito  $\beta$  prevalece, desblindando o carbono onde se ligou o açúcar (C-3') e blindando o carbono vizinho C-4'; já no segundo caso prevalece o efeito de delocalização de carga, a qual é favorecida pela maior linearidade na conjugação dessa carga, dessa forma ocorre uma blindagem localizada no carbono C-4' e uma desblindagem no carbono vizinho C-3' (AGRAWAL, 1989; ANDERSEN e MARKHAM, 2006; MARKHAM e TERNAL, 1976; NGUELEFACK et al., 2011; SILVERSTEIN et al., 2014; KAJJOUT e ROLANDO, 2011). Um resumo desses efeitos está ilustrado na **Figura 4.35**.

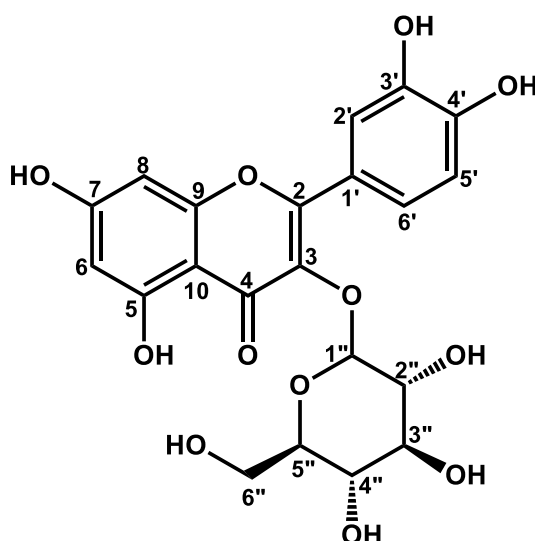




**Figura 4.35** - Efeitos da glicosilação em diferentes posições na molécula de quercetina

A partir das considerações realizadas acima percebe-se que a posição do açúcar na molécula pode ser sugerida a partir de uma análise dos valores de  $^{13}\text{C}$  dessa molécula.

#### 4.2.2.1. Elucidação da substância 3

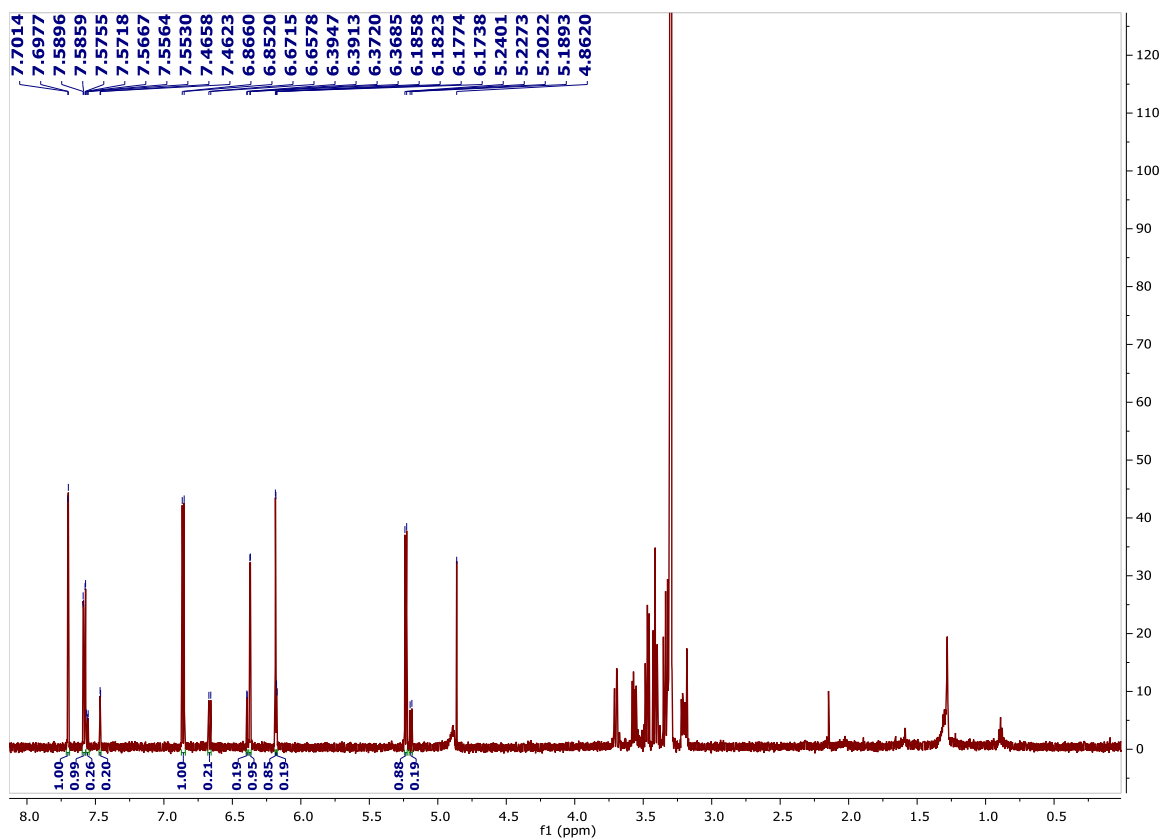


**Figura 4.36** - Estrutura enumerada da substância 3

Após a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **3** (Figura 4.36) foi possível verificar duas regiões de sinais bem distintas. Aquela que contempla hidrogênios de

anéis aromáticos e/ou olefínicos, bem como aquela que representa hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos.

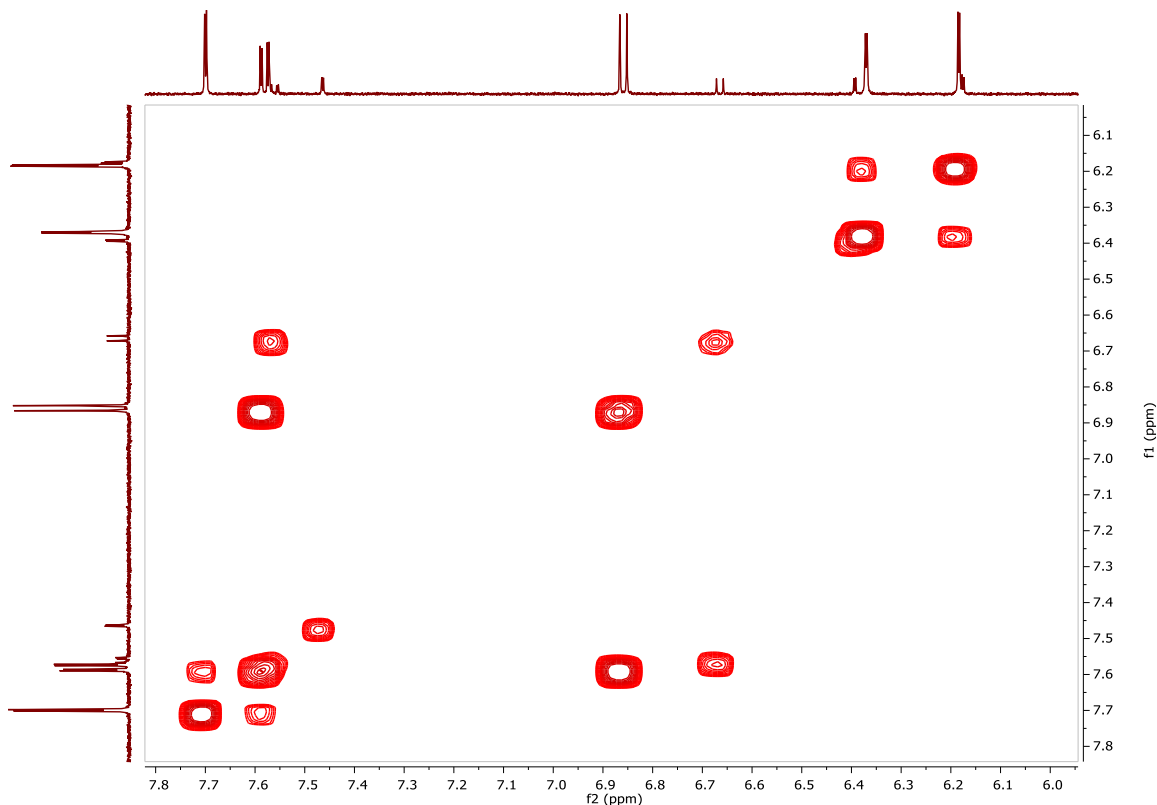
A análise das constantes de acoplamento da região mais desblindada associada às integrais desta mesma região, sugerem que a molécula possui dois anéis aromáticos. O anel **A** possui dois sinais com constantes de acoplamento *meta*  $\delta$  6,38 (*d*,  $J = 2.1$  Hz) e 6,19 (*d*,  $J = 2.0$  Hz). Enquanto, o anel **B** possui constantes de acoplamento *orto* e *meta*  $\delta$  6,87 (*d*,  $J = 8.4$  Hz), 7,59 (*dd*,  $J = 2.2$  e 8.4 Hz) e 7,71 (*d*,  $J = 2.2$  Hz).



**Figura 4.37** - Espectro de  $^1\text{H}$  da substância (**3**), ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

A partir da análise do mapa de contornos COSY da substância **3** (**Figura 4.37**), pode-se confirmar as interações previstas a partir dos valores de constantes de acoplamento.

A análise das informações da região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos apresentou um padrão de açúcar com um sinal anomérico  $\delta$  5,24 (*d*,  $J = 7.7$  Hz) e de hidrogênios oximetínicos e oximetilênico atribuído pelo deslocamento químico e pelas integrais. A relação das integrais com todas as multiplicidades de cada sinal pode ser verificada na **Tabela 4.3**.



**Figura 4.38** – Mapa de contornos de COSY da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)

A partir dessas informações é possível identificar a estrutura base do flavonoide como sendo a quercetina, e o açúcar adicionado a molécula como sendo o  $\beta$ -D-glicopiranosídeo. Avaliando o espectro de HMBC de **3** é possível observar dois sinais referentes uma correlação a  $J^3$  do C-2 com os H-2' e H-6', a partir da qual é possível identificar o  $\delta$  do C-2 como sendo 157,6 ppm, um valor que demonstra um forte efeito de desblindagem nesse carbono. Ainda por esse espectro é possível observar uma correlação entre o H-1" (anomérico), com um carbono em 134,5 ppm, demonstrando uma blindagem nesse carbono.

A partir desses dados é possível concluir a posição do açúcar, determinando a substância **3** como sendo: Quercetina-3-O- $\beta$ -glucosídeo. Seus valores de deslocamento de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  assim como os encontrados na literatura estão demonstrados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

	$\delta$ $^1\text{H}$ de ( <b>3</b> )	$\delta$ de $^1\text{H}^*$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de ( <b>3</b> )	$\delta$ de $^{13}\text{C}^*$
<b>2</b>			157,6	157,1
<b>3</b>			134,5	134,2
<b>4</b>				178,1
<b>5</b>				161,6
<b>6</b>	6,18 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz, 1H)	6,23 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz, 1H)	99,8	98,5
<b>7</b>				164,6
<b>8</b>	6,37 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz, 1H)	6,42 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz, 1H)	94,6	93,3
<b>9</b>			156,9	157,5
<b>10</b>			104,1	104,3
<b>1'</b>			121,5	121,5
<b>2'</b>	7,70 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, 1H)	7,73 ( <i>d</i> , $J = 2,6$ Hz, 1H)	112,2	114,6
<b>3'</b>				144,5
<b>4'</b>				148,4
<b>5'</b>	6,86 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	6,90 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	115,7	116,2
<b>6'</b>	7,58 ( <i>dd</i> , $J = 2,2$ e 8,5 Hz, 1H)	7,60 ( <i>dd</i> , $J = 2,6$ e 8,4 Hz, 1H)	122,8	121,8
<b>1''</b>	5,24 ( <i>d</i> , $J = 7,7$ Hz, 1H)	5,24 ( <i>d</i> , $J = 7,4$ Hz, 1H)	104,1	102,9
<b>2''</b>	3,48 ( <i>dd</i> , $J = 7,7$ e 9,2 Hz, 1H)	3,49 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ Hz, 1H)	75,4	74,3
<b>3''</b>	3,42 ( <i>dd</i> , $J = 8,9$ e 9,2 Hz, 1H)	3,44 ( <i>t</i> , $J = 9,0$ Hz, 1H)	77,8	76,9
<b>4''</b>	3,35 ( <i>ddd</i> , $J = 0,7, 8,9$ e 9,2 Hz, 1H)	3,35 ( <i>t</i> , $J = 9,0$ Hz, 1H)	71,0	69,8
<b>5''</b>	3,22 ( <i>ddd</i> , $J = 2,4, 5,4$ e 9,7 Hz, 1H)	3,25 ( <i>m</i> , 1H)	78,1	76,7
<b>6a''</b>	3,71 ( <i>dd</i> , $J = 2,4$ e 11,9 Hz, 1H)	3,72 ( <i>dd</i> , $J = 2,0$ e 12,0 Hz, 1H)	62,4	61,2
<b>6b''</b>	3,58 ( <i>dd</i> , $J = 5,4$ e 11,9 Hz, 1H)	3,58 ( <i>dd</i> , $J = 5,5$ e 12,0 Hz, 1H)		

\* (Park et al., 2014) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 11,7 T)

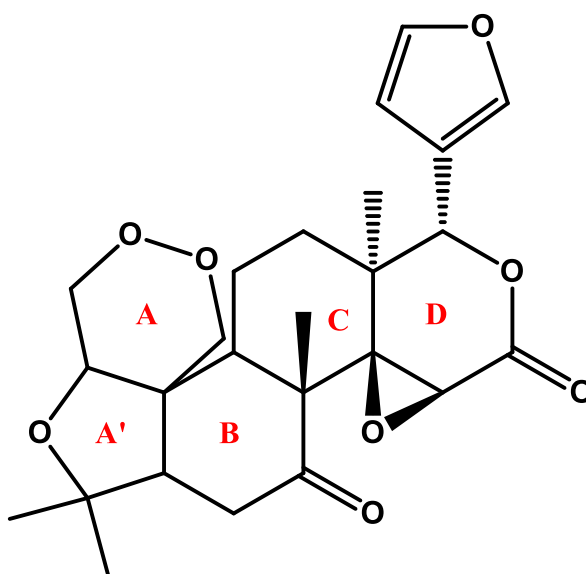
### 4.3. Elucidação estrutural de limonoides

O interesse pelos limonoides se deu a partir da busca ao causador do sabor amargo dos citrus. Essa denominação surgiu da limonina, o primeiro limonoide isolado, por definição, os limonoides são triterpenos altamente oxigenados, tetranorterpenoides. Existem centenas de limonoides reportados na literatura, porém sua ocorrência se limita a ordem Rutales, principalmente em Meliaceae e Rutaceae (DEVAKUMAR, C. et.al, 1996; WATERMAN, P. G., 2001).

Os limonoides de ocorrência natural apresentam um anel furano ligado ao anel D no C-17, assim como grupos oxigenados em C-3, C-4, C-7, C-16 e C-17. A degradação oxidativa na cadeia lateral leva a perda de quatro átomos de carbonos e a formação do furano  $\beta$ - substituído. Ainda podem ocorrer oxidações e rearranjos em um ou mais dos quatro anéis (A, B, C e D) (SOMRUTAI, J., et al., 2005; ROY, A. e SARAF, S., 2006).

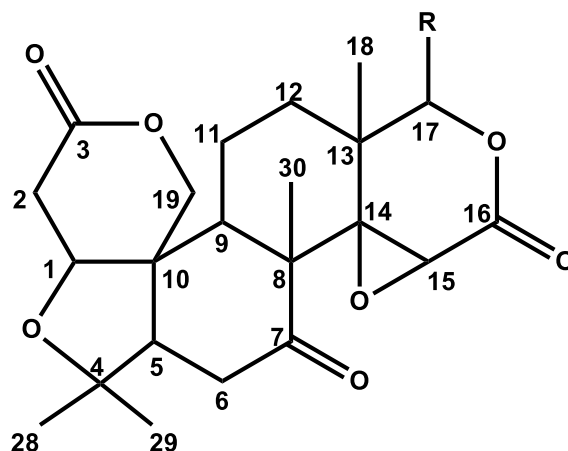
A partir da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração (E.A – 13-7) foi possível verificar a presença de menos metilas quando comparado a um triterpeno, além de sinais na região de hidrogênios metilênicos e metínicos oxidados.

Como os triterpenos já identificados (**1** e **2**) pertencem a biossíntese dos tirucalanos, espera-se que os limonoides sigam a mesma via. Diante disso, tomou-se como base a limonina para a análise comparativa dos espectros (**Figura 4.39**).



**Figura 4.39** – Estrutura química da Limonina

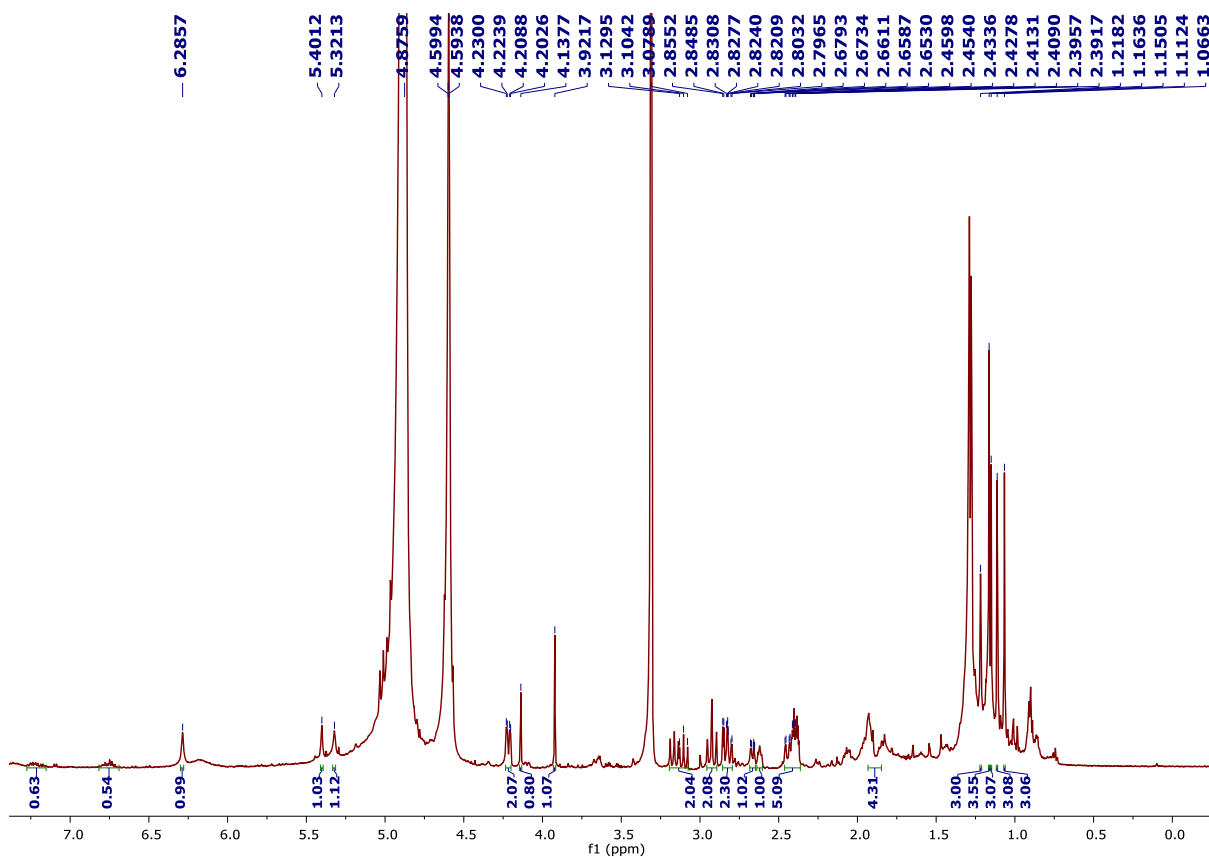
### 4.3.1. Proposta de elucidação da substância 4



**Figura 4.40** - Proposta de estrutura para a substância 4

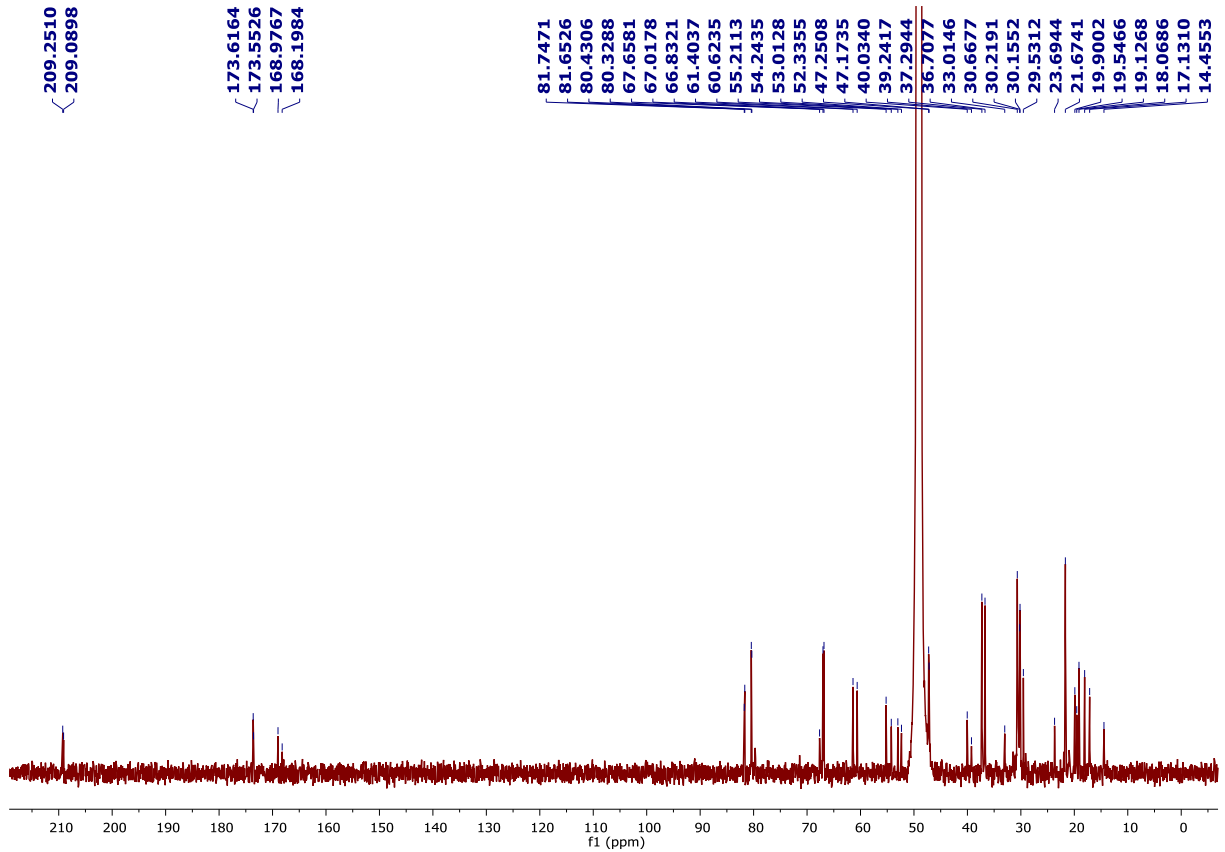
A partir da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 4.41**) da substância 4 foi possível verificar a presença de 4 metilas entre 1,05 a 1,25 ppm. Ainda foi possível verificar a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos bem desblindados com deslocamento acima de 1,80 ppm. A análise das integrais dos sinais e de suas respectivas constantes de acoplamento, evidenciou a possível presença de grupos metilênicos isolados,  $\delta$  4,60 (*m*), porém esse sinal não é facilmente identificado por se encontrar no mesmo deslocamento que o sinal do solvente ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e 5,00 (*d*,  $J = 13,0$  Hz).

Ainda, analisando a multiplicidade dos sinais e suas respectivas integrais, verificou-se outros sinais que possivelmente poderiam ser pontos estratégicos para a determinação estrutural, o sinal em  $\delta$  2,82 (*dd*,  $J = 2,0$  e  $17,0$  Hz, 1H) e 2,92 (*dd*,  $J = 4,0$  e  $17,0$  Hz, 1H) apresentaram constantes de acoplamento características de  $J^2$  e  $J^3$  (geminal e vicinal respectivamente). Outro sinal importante para a análise da estrutura foi em  $\delta$  4,21 (*d*,  $J = 4,0$  Hz, 1H), com uma constante que sugeriu que este CH, estaria acoplado com o  $\text{CH}_2$  diastereotópico acima citado.



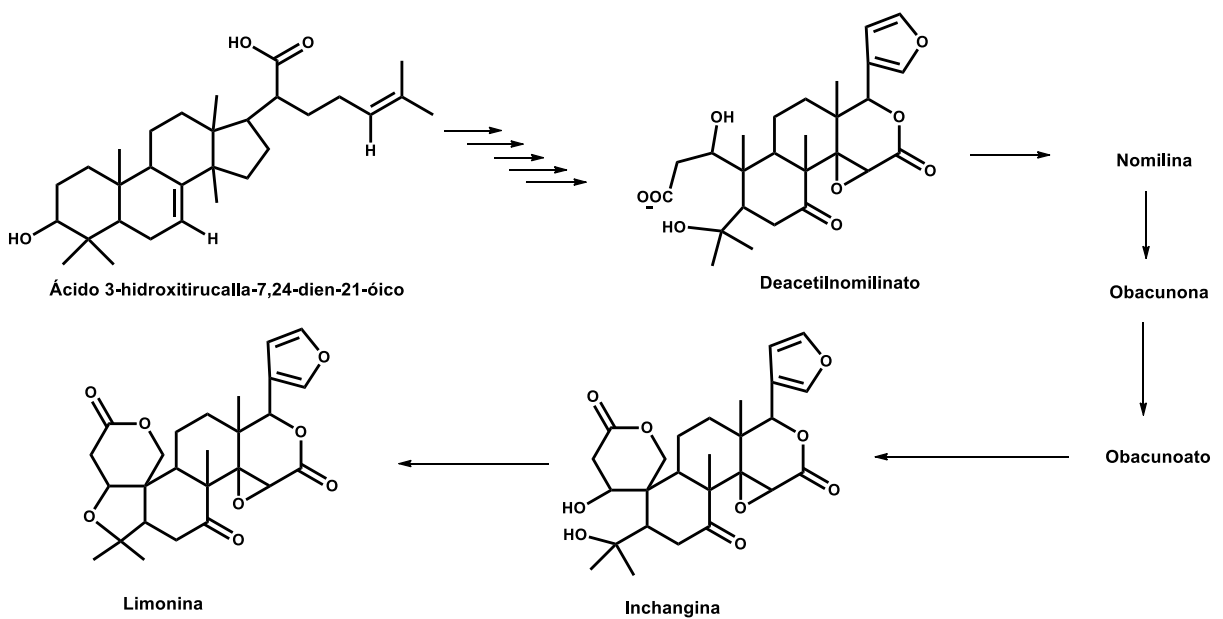
**Figura 4.41** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 4.42**) gerou uma inquietação quando observado a aparição de alguns sinais com uma possível duplicação. Como se existissem duas substâncias em mistura com esqueletos muito próximos com algumas informações que coalesciam, por exemplo um mesmo esqueleto, mas com estereoquímica diferentes.



**Figura 4.42** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

Diante de tamanho desafio que seria trabalhar com um espectro não tão puro e com possibilidade de estereoquímicas divergentes, optou-se por iniciar pela proposta de biogênese partindo do esqueleto base de triterpenos já isolados para chegarmos a possíveis propostas estruturais (**Figura 4.43**).



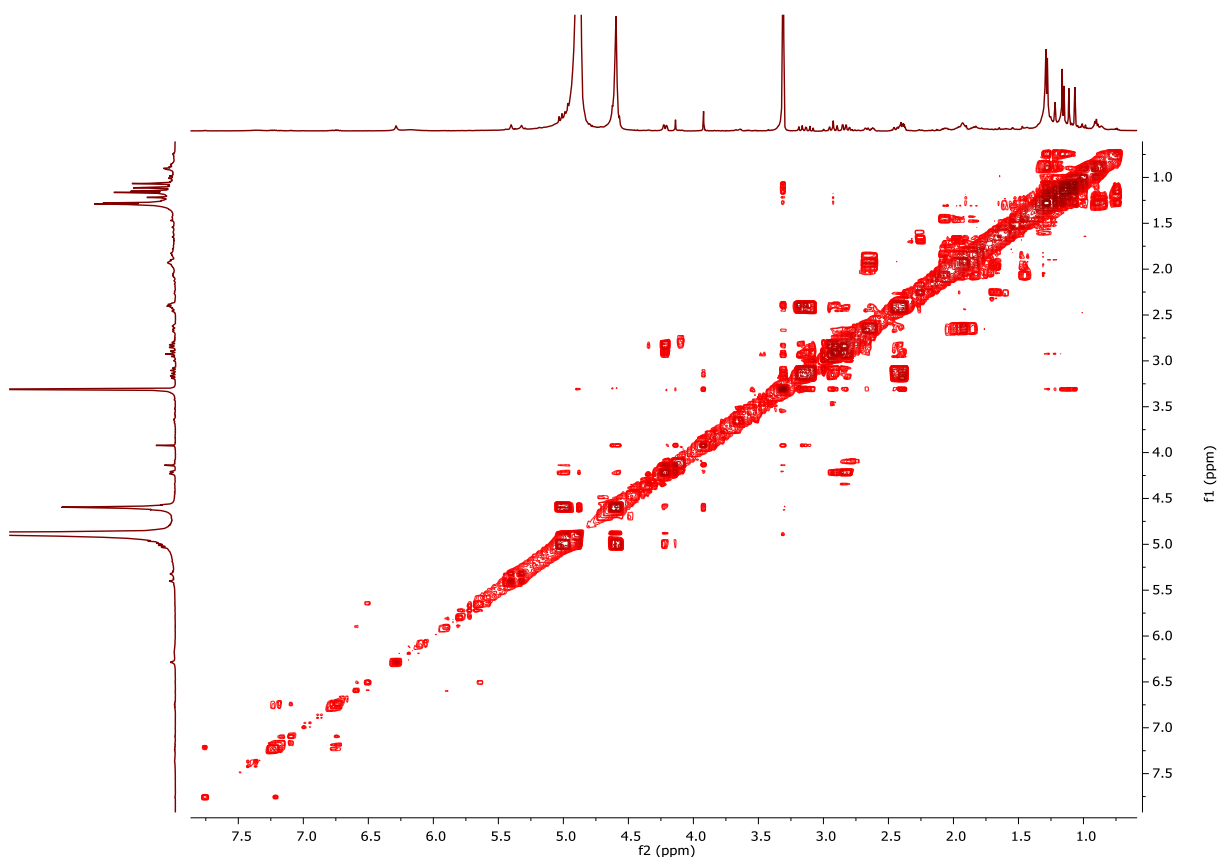
**Figura 4.43** - Proposta de biogênese para limonoides (PETROSKI e MCCORMICK, 1992)



Como pode ser observado e já foi discutido anteriormente (Item 4.3), os núcleos estruturais A, B e C normalmente são mantidos com poucas alterações/perdas de carbono (**Figura 4.43**). Com essa informação, foi possível com os espectros de RMN uni e bidimensionais (**Figuras 4.41, 4.42, 4.44-4.46**), estabelecer uma proposta de estrutura para um limonóide.

Uma vez verificado que o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais de carbonos acila ( $\delta$  207,9, 172,0 e 166,2), carbonos carbinólicos ( $\delta$  77,0, 80,1 e 66,8) evidencia uma molécula altamente oxigenada. Além disso, foi possível verificar carbonos alifáticos ( $\delta$  60,7, 36,6, 30,6, 31,5 e 19,4) e ainda, carbonos não hidrogenados ( $\delta$  51,5, 45,9 e 38,7) além de carbonos metílicos.

Além disso, foram analisados os espectros de RMN bidimensional (COSY, HSQC e HMBC) (**Figuras 4.44 – 4.46**) que possibilitaram a construção do esqueleto da estrutura. As principais correlações (HMBC) e interações (COSY) estão apresentadas na **Figura 4.47**.



**Figura 4.44** - Mapa de contornos de COSY da substância **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

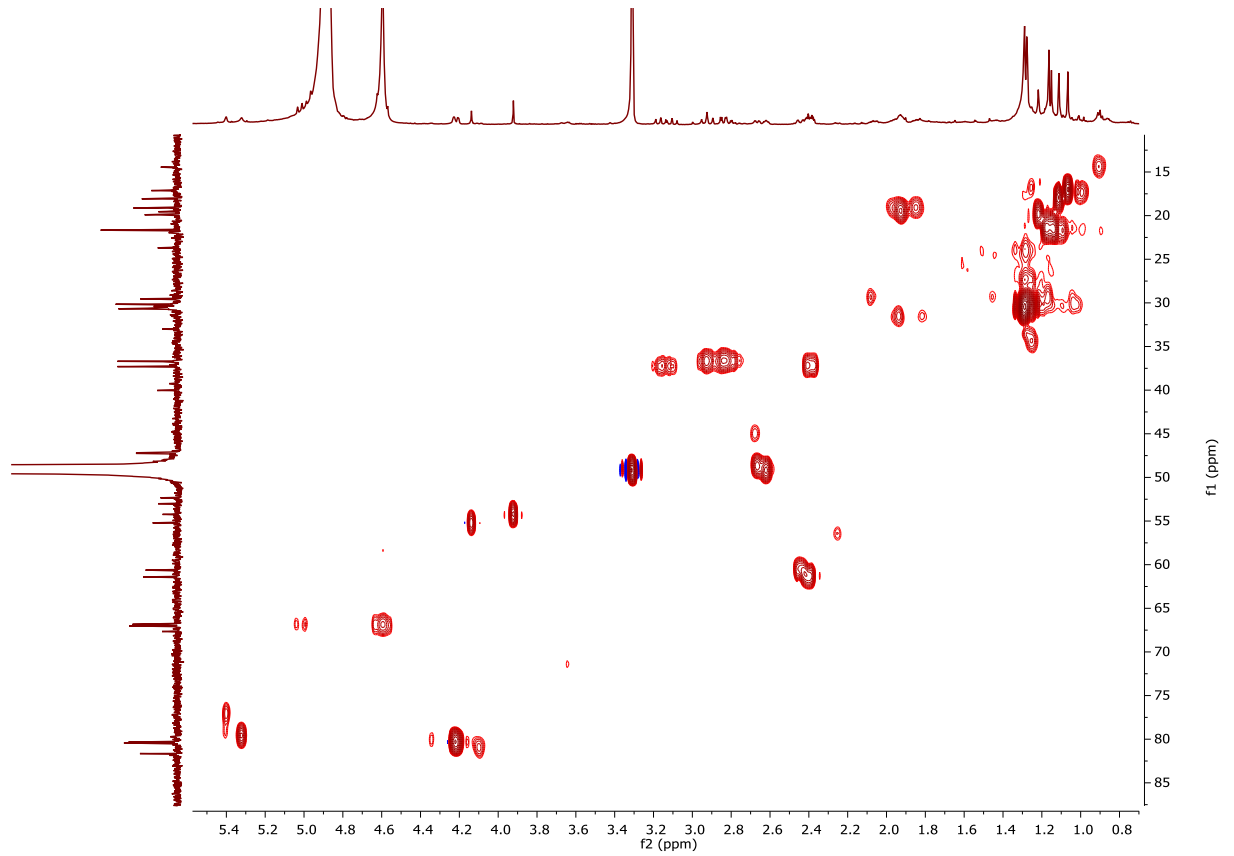


Figura 4.45 - Mapa de contornos de HSQC da substância 4 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)

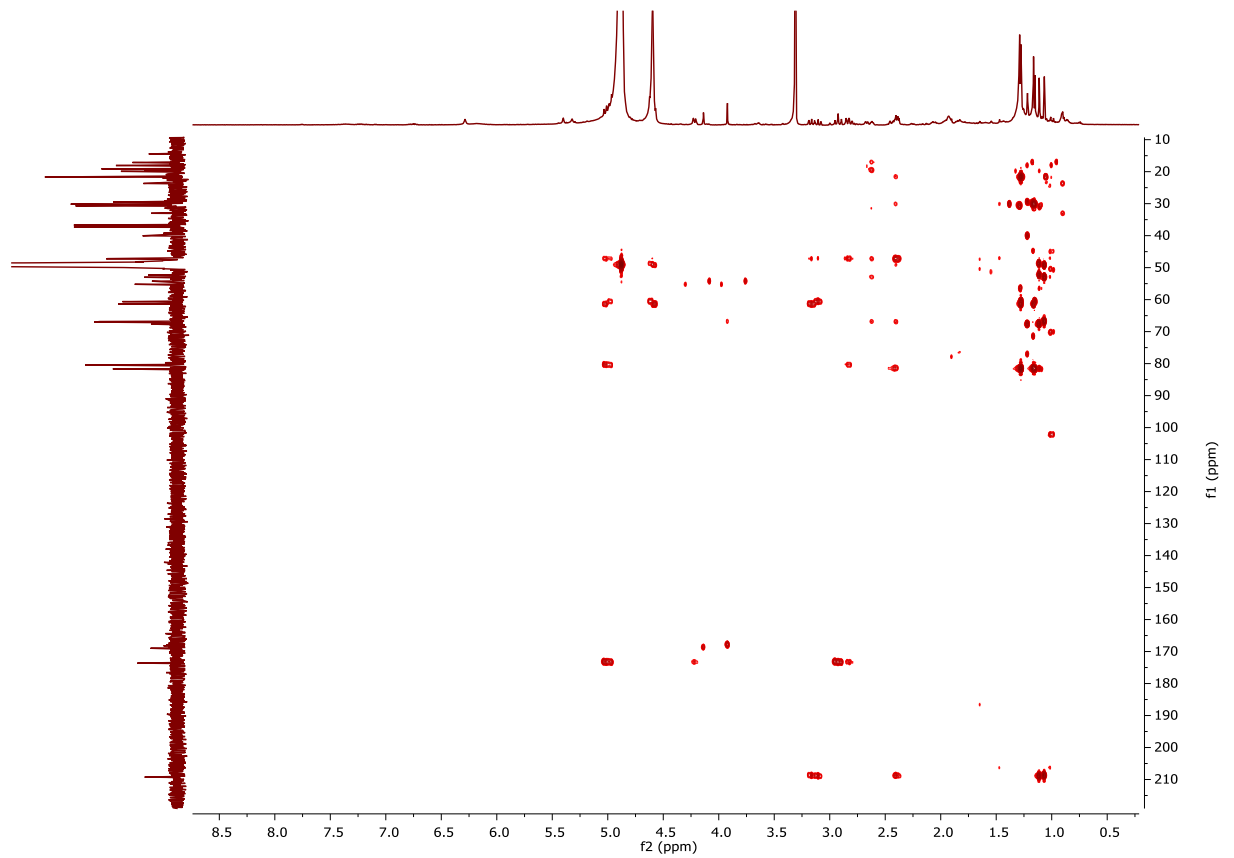
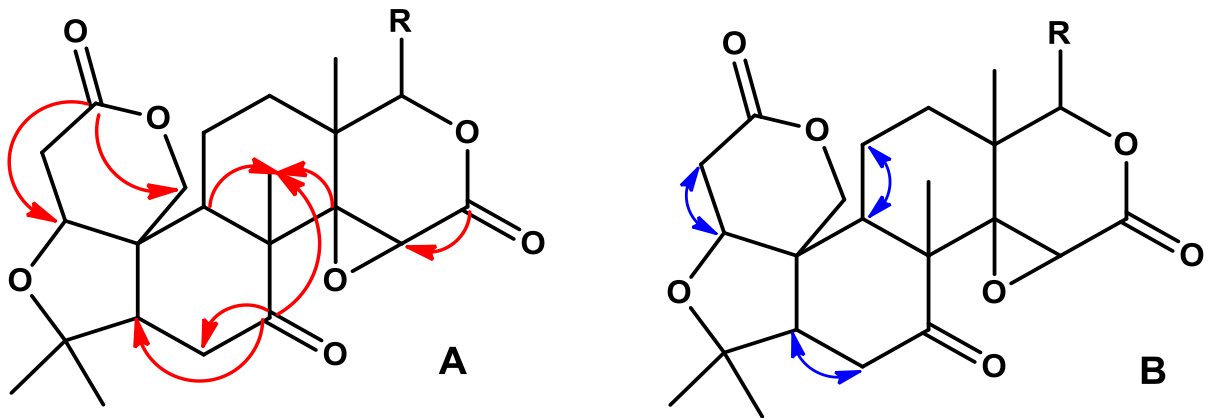


Figura 4.46 - Mapa de contornos de HMBC da substância 4 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



**Figura 47 - A-** Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC de **4**  
**B** – Interações observadas no mapa de contornos de COSY de **4**

Os dados com as respectivas atribuições e comparação com os dados da literatura está apresentado na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ de ( <b>4</b> )	$\delta$ de $^1\text{H}$ da limonina	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de ( <b>4</b> )	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ limonina
1	4,20 ( <i>d</i> , $J = 4,0$ Hz)	4,04 ( <i>s</i> )	79,0	79,2
2a	2,82 ( <i>dd</i> , $J = 4,0$ e 15,0 Hz)	2,68 ( <i>dd</i> , $J = 2,0$ e 17,0 Hz)	36,6	35,7
2b	2,92 ( <i>dd<sub>ap</sub></i> , $J = 1,0$ e 15,0 Hz)	2,98 ( <i>dd</i> , $J = 4,0$ e 17,0 Hz)	-	-
3	-	-	171,0	169,1
4	-	-	80,1	80,4
5	2,43 ( <i>dd</i> , $J_{ap} = 3,5$ e 15,7 Hz)	2,23 ( <i>dd</i> , $J = 3,0$ e 15,0 Hz)	60,7	60,7
6a	3,10 ( <i>t</i> , $J = 15,1$ Hz)	2,47 ( <i>dd</i> , $J = 3,0$ e 14,0 Hz)	37,3	36,5
6b	3,16 ( <i>dd</i> , $J = 1,0$ e 15,0 Hz)	2,86 ( <i>dd</i> , $J = 14,0$ e 15,0 Hz)	-	-
7	-	-	207,9	206,1
8	-	-	51,5	51,4
9	2,67 ( <i>dd</i> , $J = 3,5$ e 12,3 Hz)	2,55 ( <i>dd</i> , $J = 3,0$ e 12,0 Hz)	48,3	48,2
10	-	-	45,9	46,0
11	1,80-2,00 ( <i>m</i> )	1,78-1,90 ( <i>m</i> )	19,4	19,0
12a	1,80-2,00 ( <i>m</i> )	1,84 ( <i>m</i> )	31,5	30,9
12b	1,80-2,00 ( <i>m</i> )	1,51 ( <i>m</i> )	-	-
13	-	-	38,7	38,0
14	-	-	65,3	65,7
15	3,92 ( <i>s</i> )	4,04 ( <i>s</i> )	65,5	53,9
16	-	-	166,2	166,0
17	5,40 ( <i>s</i> )	4,47 ( <i>s</i> )	77,0	77,9
18	1,11 ( <i>s</i> )	1,18 ( <i>s</i> )	18,0	20,8
19a	4,60 ( <i>m</i> )	4,47 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz)	66,8	65,4
19b	5,00 ( <i>d</i> , $J = 13,0$ Hz)	4,77 ( <i>dd</i> , $J = 13,0$ e 0,6 Hz)	-	-
28	1,28 ( <i>s</i> )	1,30 ( <i>s</i> )	30,1	30,2
29	1,16 ( <i>s</i> )	1,19 ( <i>s</i> )	21,6	21,5
30	1,11 ( <i>s</i> )	1,30 ( <i>s</i> )	18,1	17,7

\* (ISIDORO et al., 2012) ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T)

## 5. Conclusão

Foi realizado o estudo fitoquímico dos extratos hexânico (E-H), acetato de etila (E-A) e metanólico (E-M) das flores de *Hortia oreadica*, sendo esse pouco reportado na literatura para esta parte da planta.

Assim, foram identificadas por CG-MS 16 substâncias a partir do extrato hexânico (E-H) das quais, trans-muurola-4-(4),5-dieno, cupareno,  $\beta$ -bisaboleno, (Z)-nerolidol, 1H-cicloprop(e)azulen-7-ol e guaiol foram aquelas em maior concentração.

A partir dos extratos hexânico (E-H), acetato de etila (E-A) e metanol (E-M), foram isoladas e identificadas as substâncias tirucalla-7,24-dien-3 $\beta$ -ol (**1**), 3 $\alpha$ -hidroxitirucalla-7,24-dien-21-óico (**2**), quercetina-3-O- $\beta$ -glucosídeo (**3**) e um limonóide não totalmente elucidado (**4**).

A partir dos resultados obtidos pode-se observar pela primeira vez a presença de precursores da biossíntese de limonoides nas flores do gênero *Hortia*, assim como identificar a existência de limonoides nas flores de *H. oreadica*.

Esse estudo foi um bom indício de que ainda existem novos resultados, mesmo para um gênero bem estudado, demonstrando que a continuidade do trabalho pode levar a uma contribuição maior para a quimiosistemática do gênero *Hortia*.

## 6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, R.P. "Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry". 4.ed. Carol Stream, U.S.A, 2007.
- AGRAWAL, P. K. "Carbon-13 NMR of flavonoids: studies in organic chemistry 39". Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, 1989.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. "Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications". CRC Press, U.S.A, 2006.
- BRAGA, P. A. C., SEVERINO, V. G. P., FREITAS, S. D. L., DA SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., PIRANI, J. R., GROPPPO, M. " Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia* species and their Chemotaxonomic Value in the Rutaceae", *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 43, p. 142–151, 2012
- CHASE, M. W.; MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. "Phylogenetic relationships of rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies using evidence from rbcL and atpB sequence variation". *American Journal of Botany*, v. 86, n. 8, p. 1191–1199, 1999.
- DA SILVA, M. F. D. G. F.; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDOFER, F. "Chemosystematics of the Rutaceae : suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". *Plant Systematics and Evolution* v. 161, n. 1978, p. 97–134, 1988.
- DAYRIT, F. M.; DIOS, A. C. "1H and 13C NMR for the profiling of natural product extracts: theory and applications". *Spectroscopic Analyses - Developments and Applications*, cap. 5, INTECH, 2017. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/spectroscopic-analyses-developments-and-applications/1h-and-13c-nmr-for-the-profiling-of-natural-product-extracts-theory-and-applications>>.
- DEVAKUMAR, C., SUKH, Dev, "Chemistry," ed. by RANDHAWA, N. S., PARMAR, B. S., *Neem Research and Development*, Society of Pesticide Science, New Delhi, India, 1996, pp. 63—99
- DIRKS-HOFMEISTER, M. E.; VERHAEGHE, T.; DE WINTER, K.; DESMET, T. "Creating space for large acceptors: rational biocatalyst design for resveratrol glycosylation in an aqueous system". *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 54, n. 32, p. 9289–9292, 2015.

EISSEN, M. E METZGER, J. O. "Environmental Performance Metrics for Daily Use in Synthetic Chemistry", *Chem. Eur. J.*, v. 8, p. 3581-3585, 2002.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R.; SALATINO, M. L. F.; BLANCO, S. R.; KALLUNKI, J. A. "Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA". *American Journal of Botany*, v. 95, n. 8, p. 985–1005, 2008.

HERATH, K. H. I. N. M.; BING, S. J.; CHO, J.; KIM, A.; KIM, G. O.; LEE, J. C.; JEE, Y. "*Citrus hallabong* [(*Citrus unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] exerts potent anti-inflammatory properties in murine splenocytes and TPA-induced murine ear oedema model". *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 12, p. 2939–2950, 2016.

ISIDORO, M. M.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNADES, J. B.; VIEIRA, P. C. "Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)". *Quim. Nova*, v. 35, n. 11, p. 2119-2124, 2012.

KAJJOUT, M.; ROLANDO, C. "Regiospecific synthesis of quercetin O-β-d-glucosylated and O-β-d-glucuronidated isomers". *Tetrahedron*, v. 67, n. 25, p. 4731–4741, 2011.

KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; MASUDA, K.; EBIZUKA, Y. "Mutational studies on triterpene synthases: Engineering lupeol synthase into β-amyrin synthase". *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 29, p. 6816–6824, 2000.

KWON, D. J.; BAE, Y. S. "Flavonols from the stem bark of *Acer komarovii*". *Chemistry of Natural Compounds*, v. 49, n. 1, p. 131–132, 2013.

MADEIRO, S. A. L.; BORGES, N. H. P. B.; SOUTO, A. L.; DE FIGUEIREDO, P. T. R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; TAVARES, J. F. "Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species". *Microbial Pathogenesis*, v. 104, p. 151–154, 2017.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. "<sup>13</sup>C NMR of flavonoids-II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones". *Tetrahedron*, v. 32, n. 21, p. 2607–2612, 1976.

NGUELEFACK, T. B.; MBAKAM, F. H. K.; TAPONDJOU, L. A.; WATCHO, P.; NGUELEFACK-MBUYO, E. P.; PONOU, B. K.; KAMANYI, A.; PARK, H. J. "A dimeric triterpenoid glycoside and flavonoid glycosides with free radical-scavenging activity isolated from *Rubus rigidus var. camerunensis*". *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, n. 4, p. 543–550, 2011.

NOGUEIRA, T. B. D. S. D. S.; NOGUEIRA, R. B. D. S. D. S.; SILVA, D. A. E.; TAVARES, J. F.; LIMA, E. D. O.; PEREIRA, F. D. O.; FERNANDES, M. M. M. D. S.; DE MEDEIROS, F. A.; SARQUIS, R. D. S. F. R.; BRAZ FILHO, R.; MACIEL, J. K. D. S.; DE SOUZA, M. D. F. V. "First chemical constituents from *Cordia exaltata* Lam and antimicrobial activity of two neolignans". *Molecules*, v. 18, n. 9, p. 11086–11099, 2013.

OSTROWSKA, K.; OLEJARZ, W.; WRZOSEK, M.; GŁUSZKO, A.; NOWICKA, G.; SZCZEPAŃSKI, M.; MATEREK, I. B.; KOZIOŁ, A. E.; STRUGA, M. "Anticancer effects of O-aminoalkyl derivatives of alloxanthoxyletin and seselin". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 95, p. 1412–1424, 2017.

PARK, S. H.; KIM, H. J.; YIM, S. H.; KIM, A. R.; TYAGI, N.; SHEN, H.; KIM, K. K.; SHIN, B. A.; JUNG, D. W.; WILLIAMS, D. R. "Delineation of the role of glycosylation in the cytotoxic properties of quercetin using novel assays in living vertebrates". *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 11, p. 2389–2396, 2014.

PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. "Structural analysis of flavonoids and related compounds: a review of spectroscopic applications". *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, cap. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/structural-analysis-of-flavonoids-and-related-compounds-a-review-of-spectroscopic-applications>>.

QUEIROZ, D. P. K., FERREIRA, A. G., LIMA, A. S., LIMA, E. S., LIMA, M. P. "Isolation and Identification of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and Lipase Inhibitors from *Hortia longifolia*" *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 5, Issue 3, 2013

REYNOLDS, W. F. "Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy", cap. 29, *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, Canada, 2016.

ROY, A. and SARAF, S. - *Biol. Pharm. Bull.* 29(2) 191—201 (2006)

SEVERINO, V. G. P.; CAZAL, C. M.; FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. "Isolation of Secondary Metabolites From *Hortia oreadica* (Rutaceae) Leaves Through High-Speed Counter-Current Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 4275-4281, 2009



- SEVERINO, V. G. P. "Estudo químico de plantas do gênero *Hortia*, do fungo *Guignardia citricarpa* e avaliação de seus potenciais efeitos biológicos". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2011. Tese de Doutorado, 433p.
- SEVERINO, V. G. P., BRAGA, P. A. C., DA SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., THEODORO, J. E., ELLENA, J. A. "Cyclopropane- and Spirolimonoids and Related Compounds From *Hortia oreadica*", *Phytochemistry*, v. 76, p. 52-59, 2012
- SEVERINO, V. G. P., FREITAS, S. D. L., BRAGA, P. A. C., FORIM, M. R., DA SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VENÂNCIO, T. " New Limonoids from *Hortia oreadica* and Unexpected Coumarin from *H. superba* Using Chromatography over Cleaning Sephadex with Sodium Hypochlorite", *Molecules*, v. 19, p. 12031-12047, 2014
- SEVERINO, V. G. P., MONTEIRO, A. F., DA SILVA, M. F. G. F., LUCARINI, R., MARTINS, C. H. G. " Chemical Study of *Hortia superba* (Rutaceae) and Investigation of the Antimycobacterial Activity of Crude Extracts and Constituents Isolated from *Hortia* species" *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 1, 42-45, 2015
- SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D.; BRYCE, D. "Spectrometric Identification of Organic Compounds" 7 ed., John Wiley & Sons, U.S.A, 2014.
- SOMRUTAI J., CHANTACHUM S., RATANAPHAN A., CHANTRAPROMMA K., Available at: [http://ejeafche.uvigo.es/4\(3\)2005/432005.pdf](http://ejeafche.uvigo.es/4(3)2005/432005.pdf);
- SUAREZ, L. E. C., MENICHINI, F., MONACHE, F. D. "Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*" *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 13, No. 3, 339-344, 2002
- SUKITO, A.; TACHIBANA, S. "Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *camellia sasanqua* as antioxidant agents" *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 17, n. 8, p. 999 - 1006, 2014.
- TAHSIN, T.; WANSI, J. D.; AL-GROSHI, A.; EVANS, A.; NAHAR, L.; MARTIN, C.; SARKER, S. D. "Cytotoxic properties of the stem bark of *Citrus reticulata Blanco* (Rutaceae)". *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 8, p. 1215–1219, 2017.
- VERHOFF, M.; SEITZ, S.; PAUL, M.; NOHA, S. M.; JAUCH, J.; SCHUSTER, D.;

WERZ, O. "Tetra- and pentacyclic triterpene acids from the ancient anti-inflammatory remedy frankincense as inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1".

Journal of Natural Products, v. 77, n. 6, p. 1445–1451, 2014.

WATERMAN P. G., "Evolution of Secondary Plant Metabolism," Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, 2001, Available at: [www.els.net](http://www.els.net);

ZERGAINOH, N.; CIAVATTA, M. L.; CARBONE, M.; BITAM, F.; ABERKANE, M. C.; GAVAGNIN, M. "Exploring the chemical diversity of algerian plants: Three new pentacyclic triterpenoids from *launaea acanthoclada* roots". Molecules, v. 23, n. 1, p.1210 - 1222, 2018.

## APÊNDICE

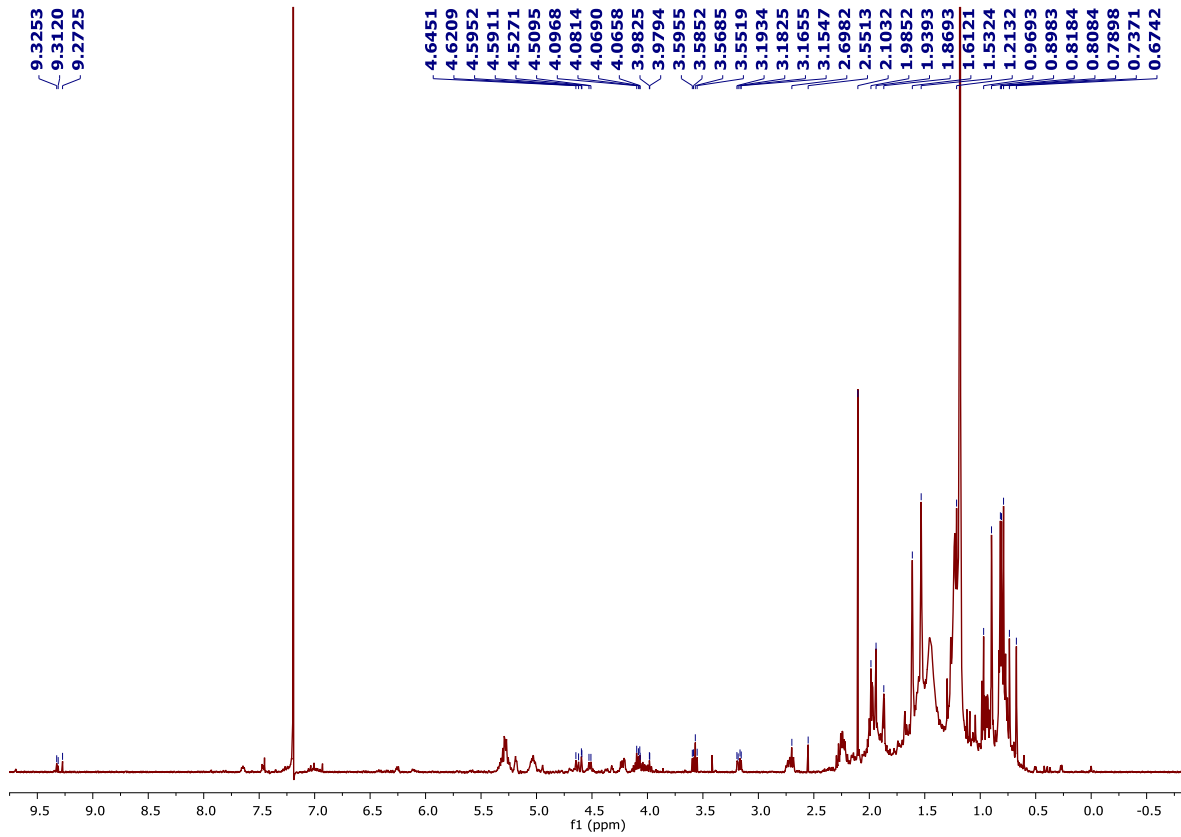


Figura 48 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 1 ( $\text{CDCl}_3$ , 9,4 T)

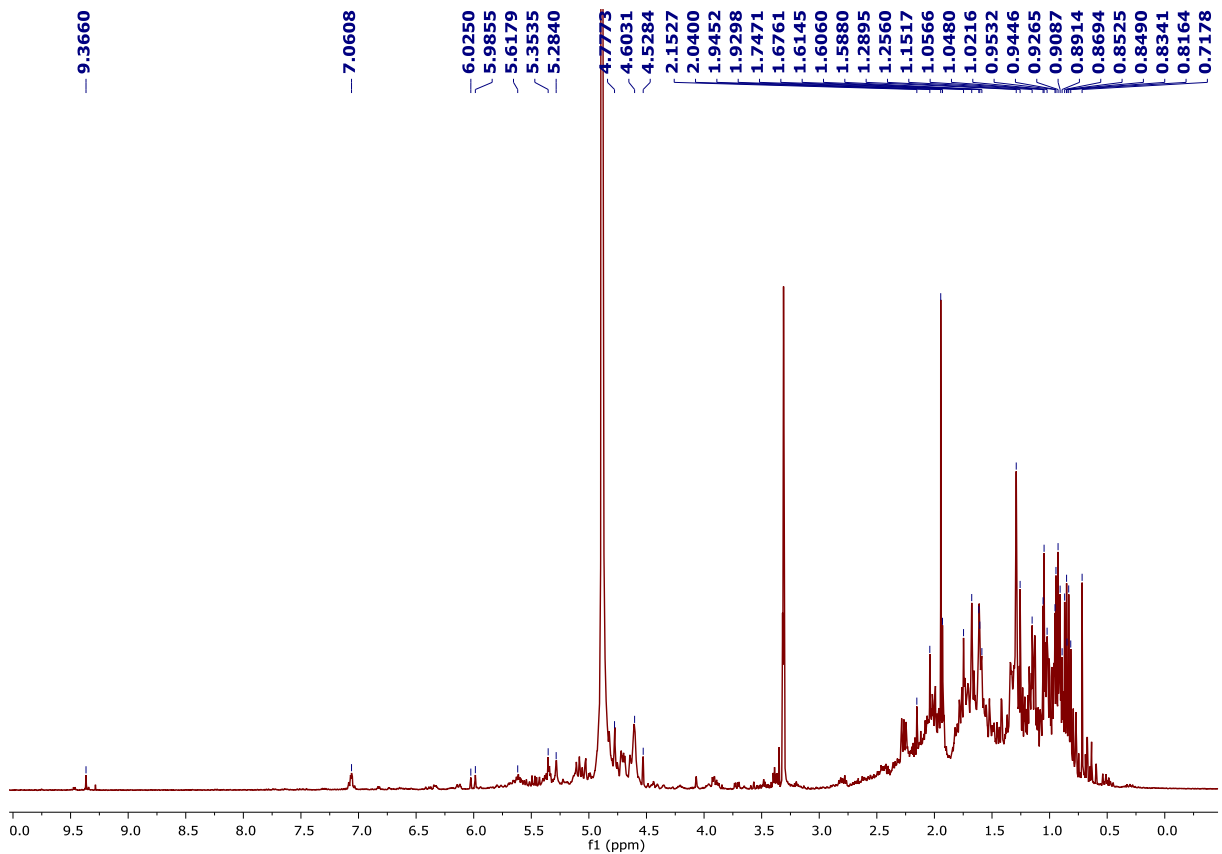


Figura 49 - - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

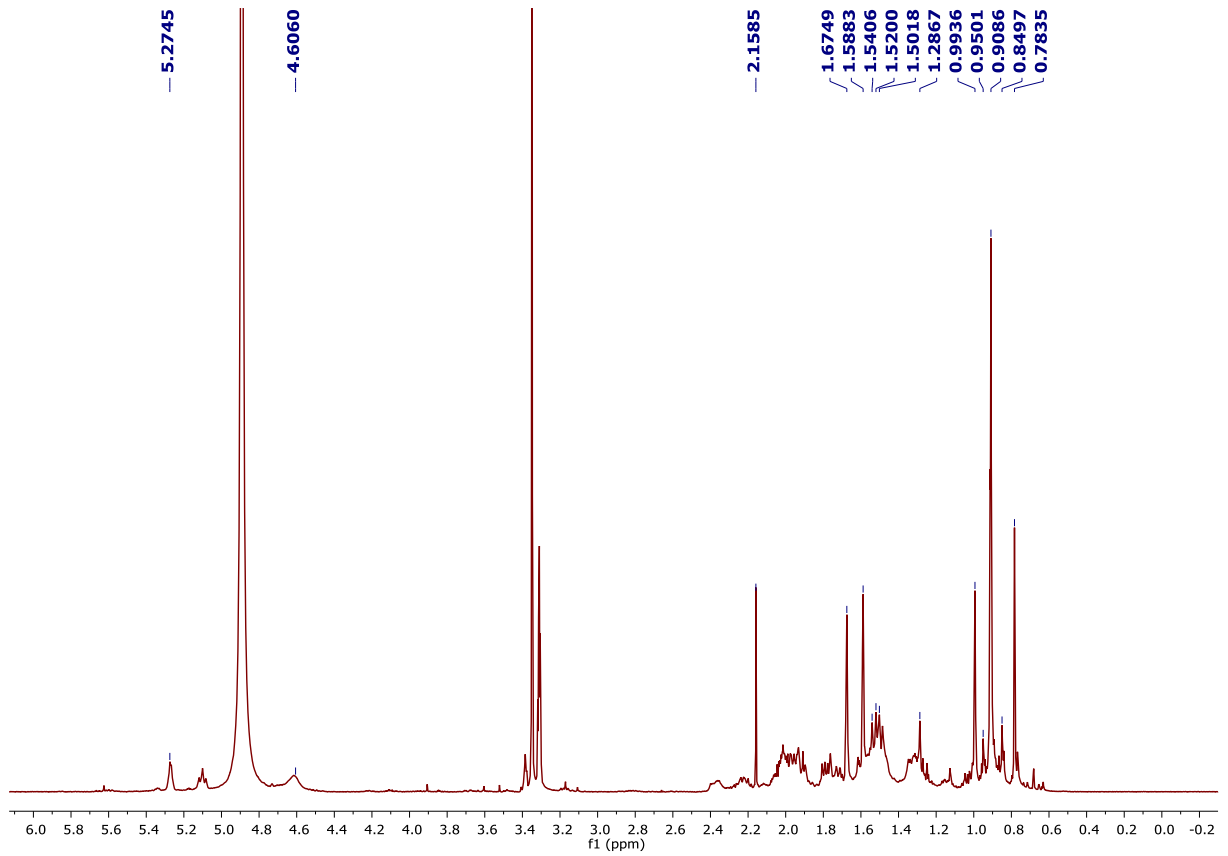


Figura 50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

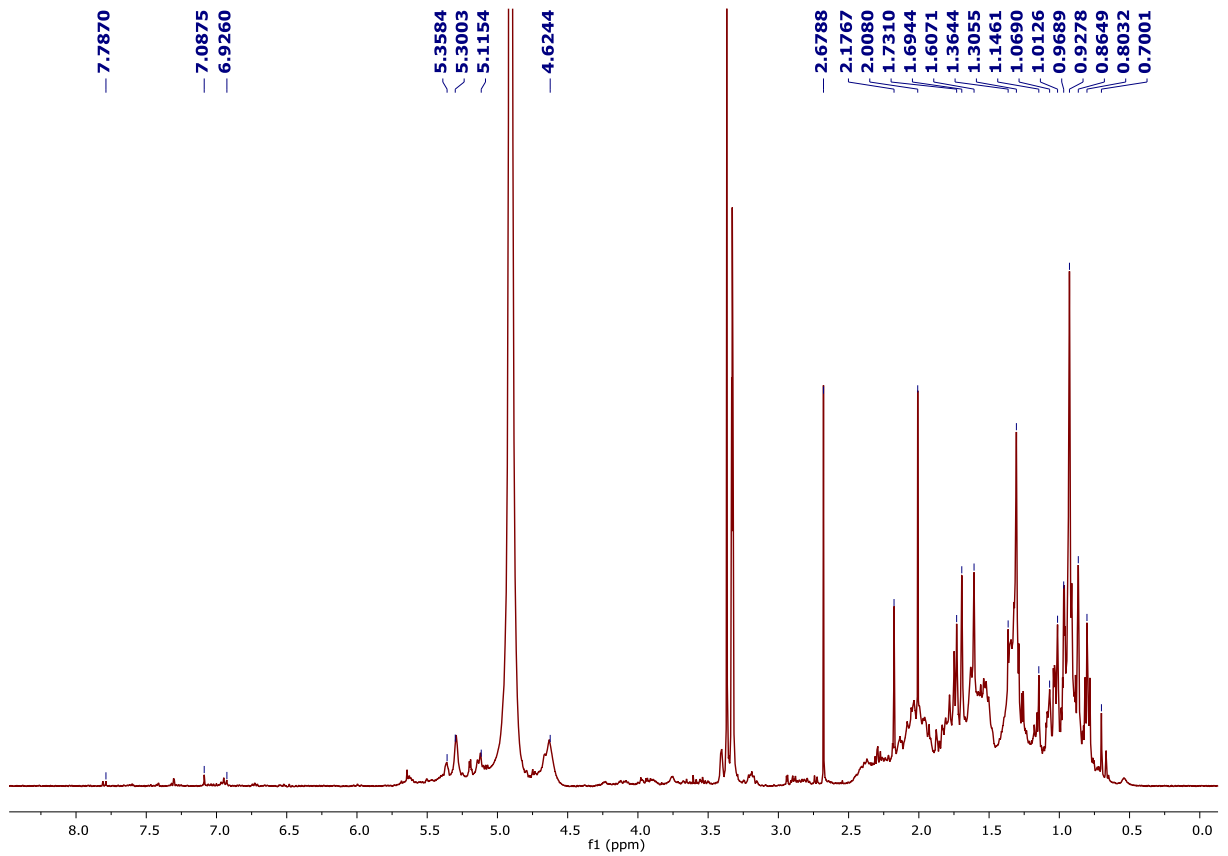


Figura 51 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

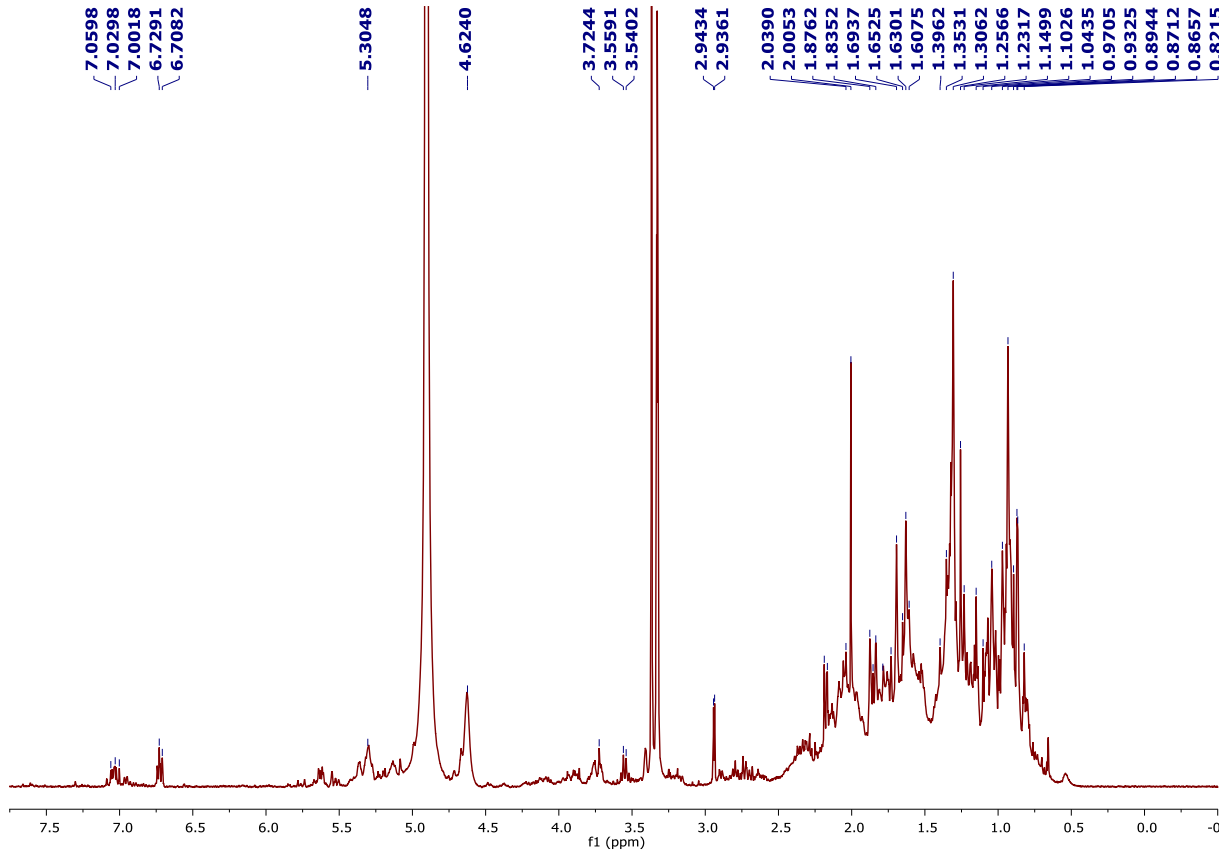


Figura 52 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 5 (CD $_3$ OD, 9,4 T)

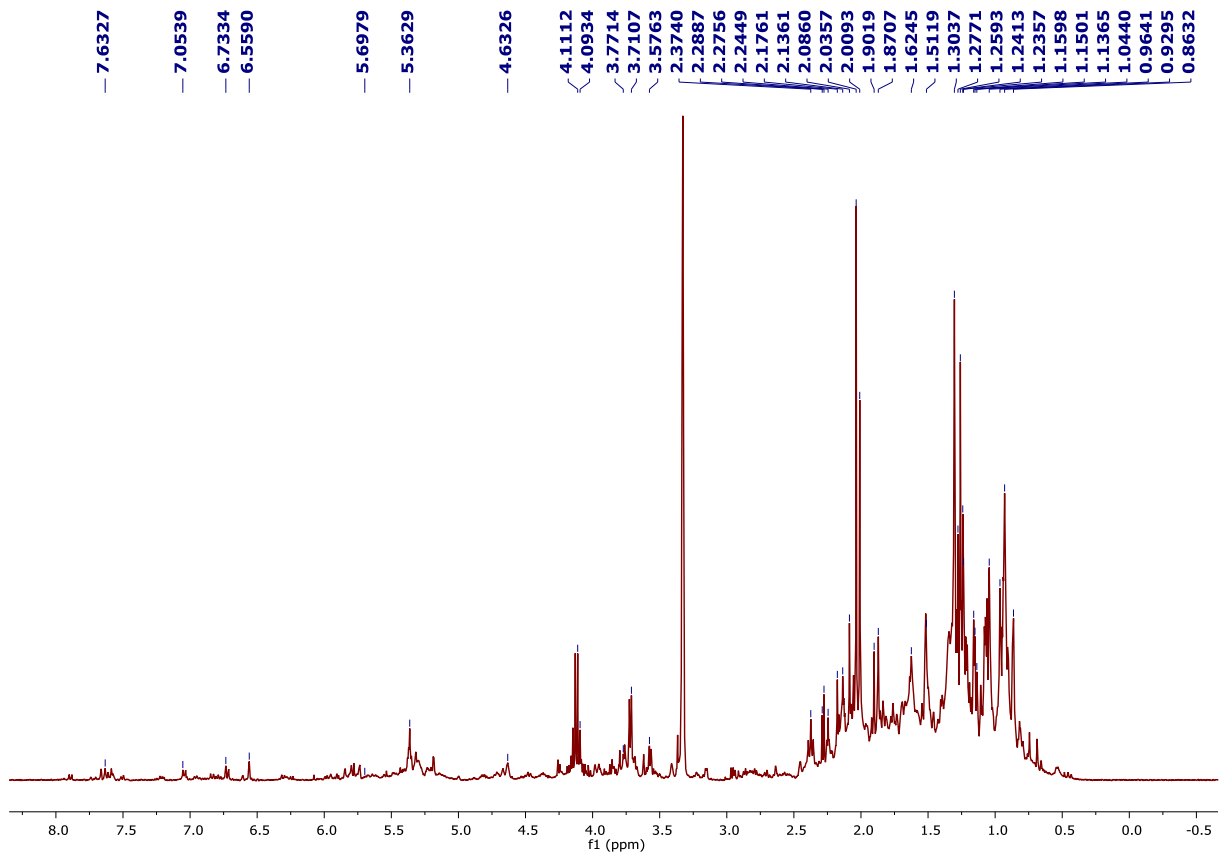


Figura 53 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 6 (CD $_3$ OD, 9,4 T)

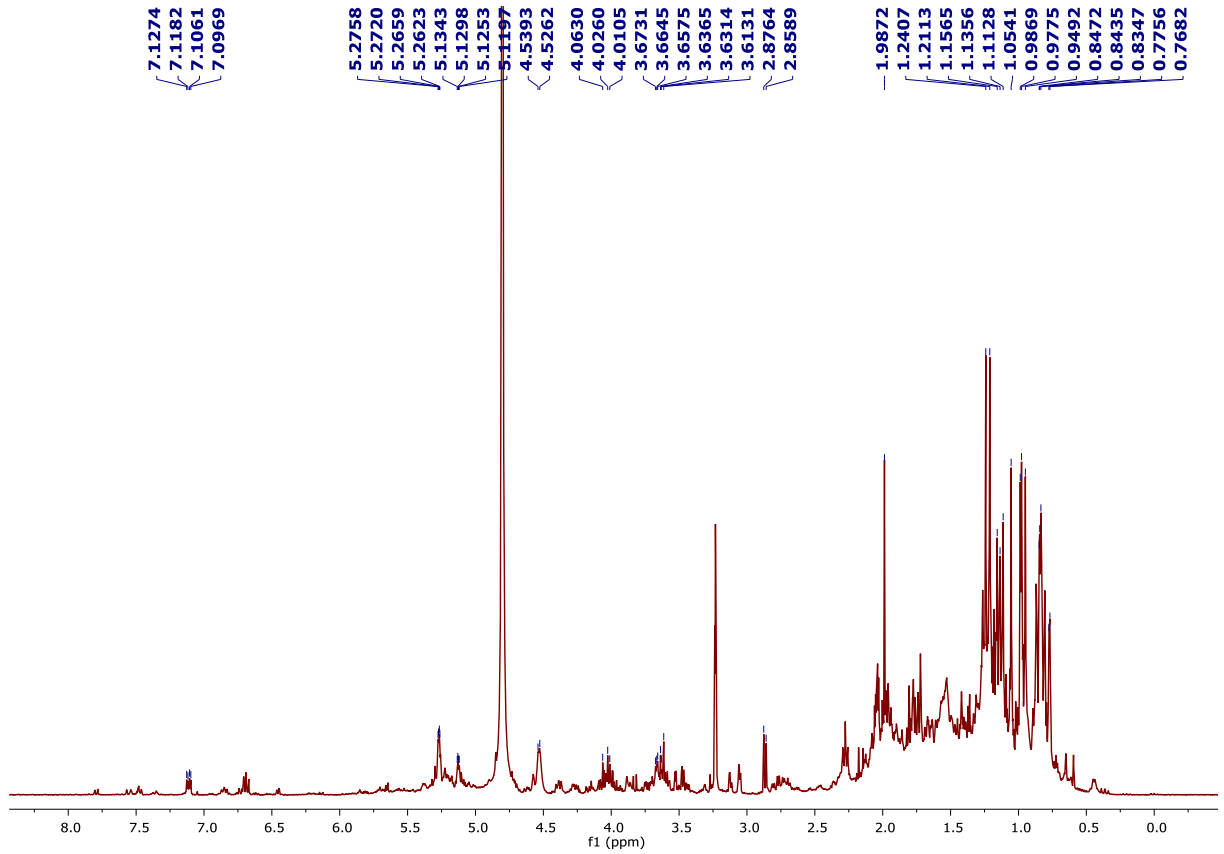


Figura 54 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 8 (CD $_3$ OD, 9,4 T)

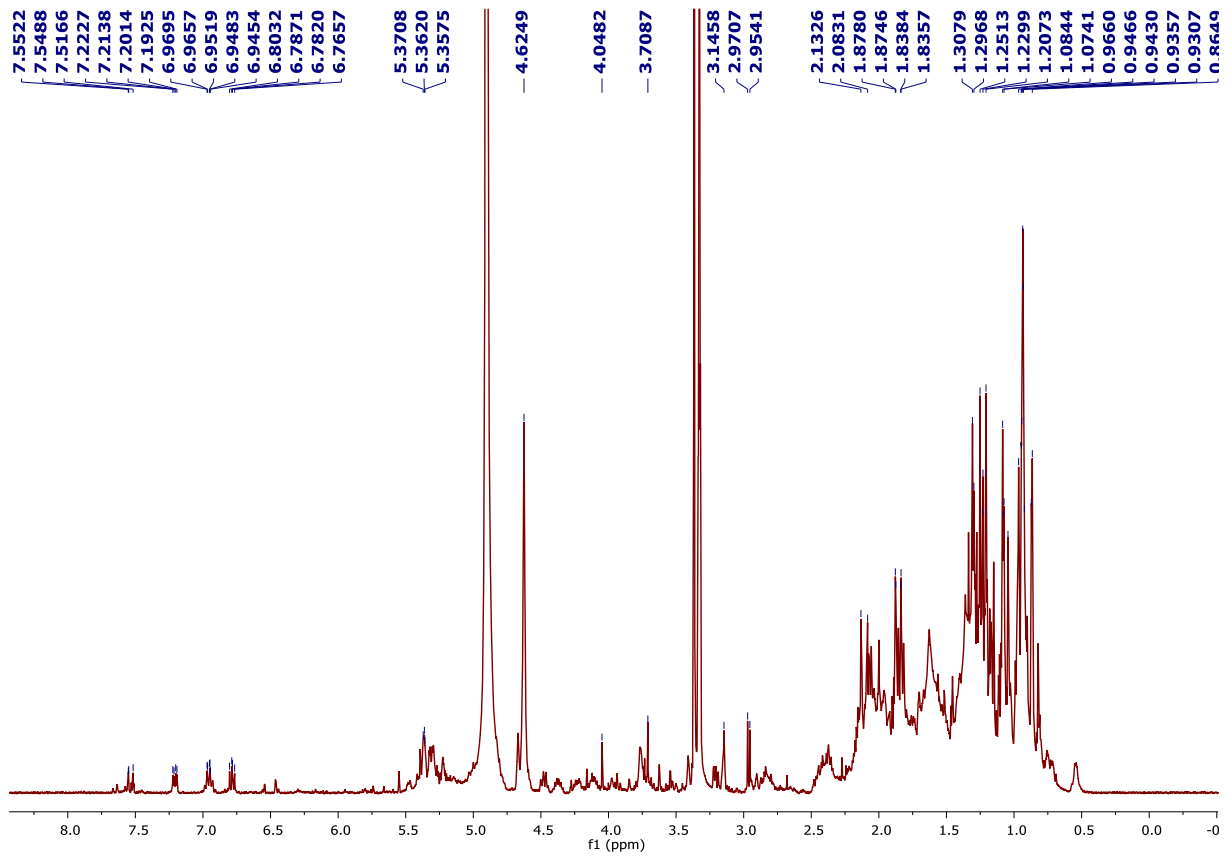


Figura 55 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 9 (CD $_3$ OD, 9,4 T)

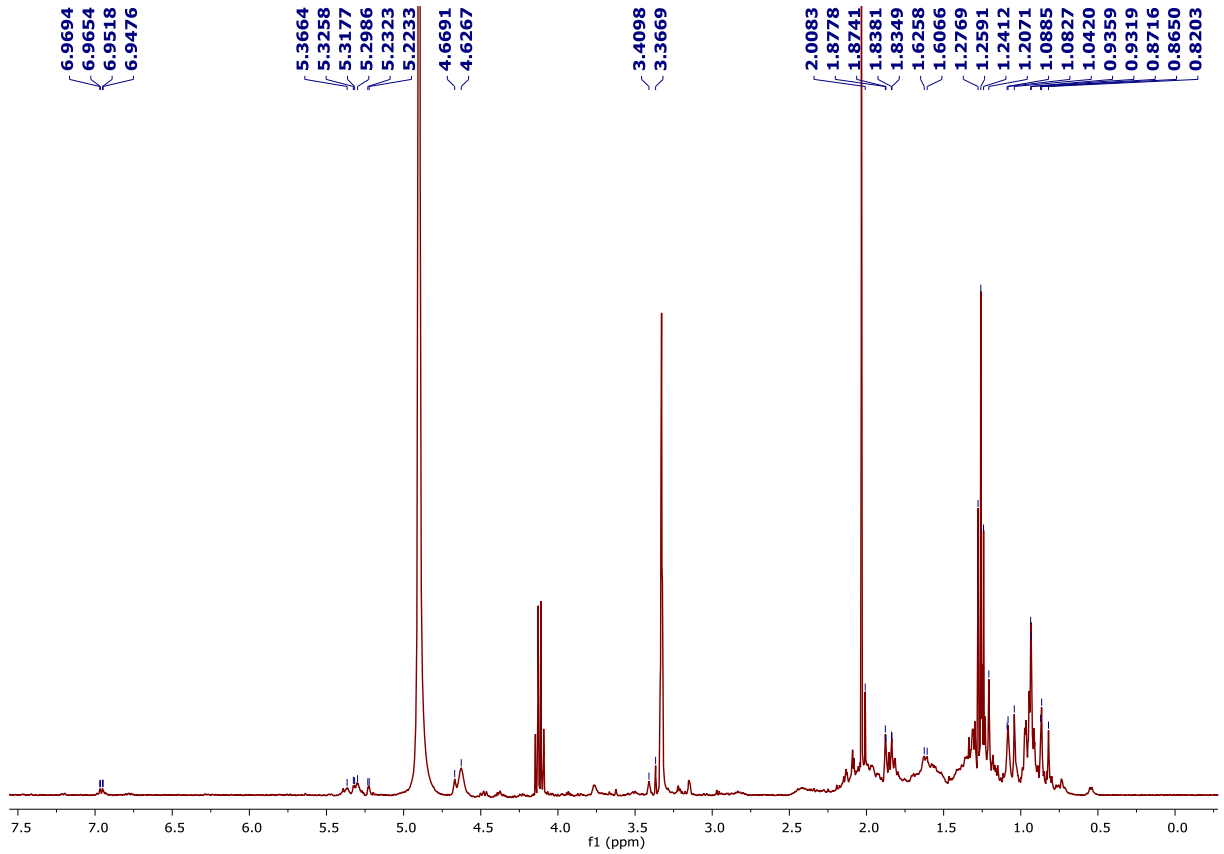


Figura 56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

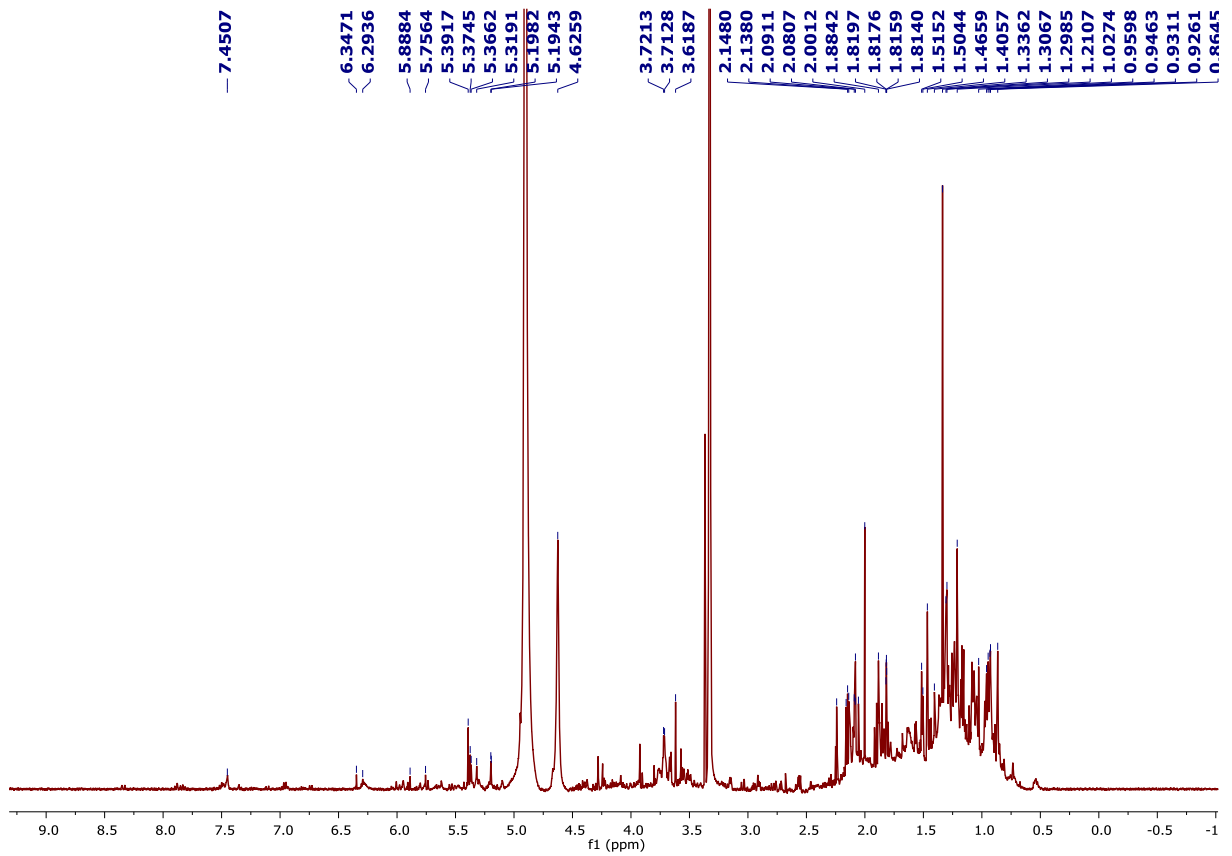


Figura 57 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 11 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

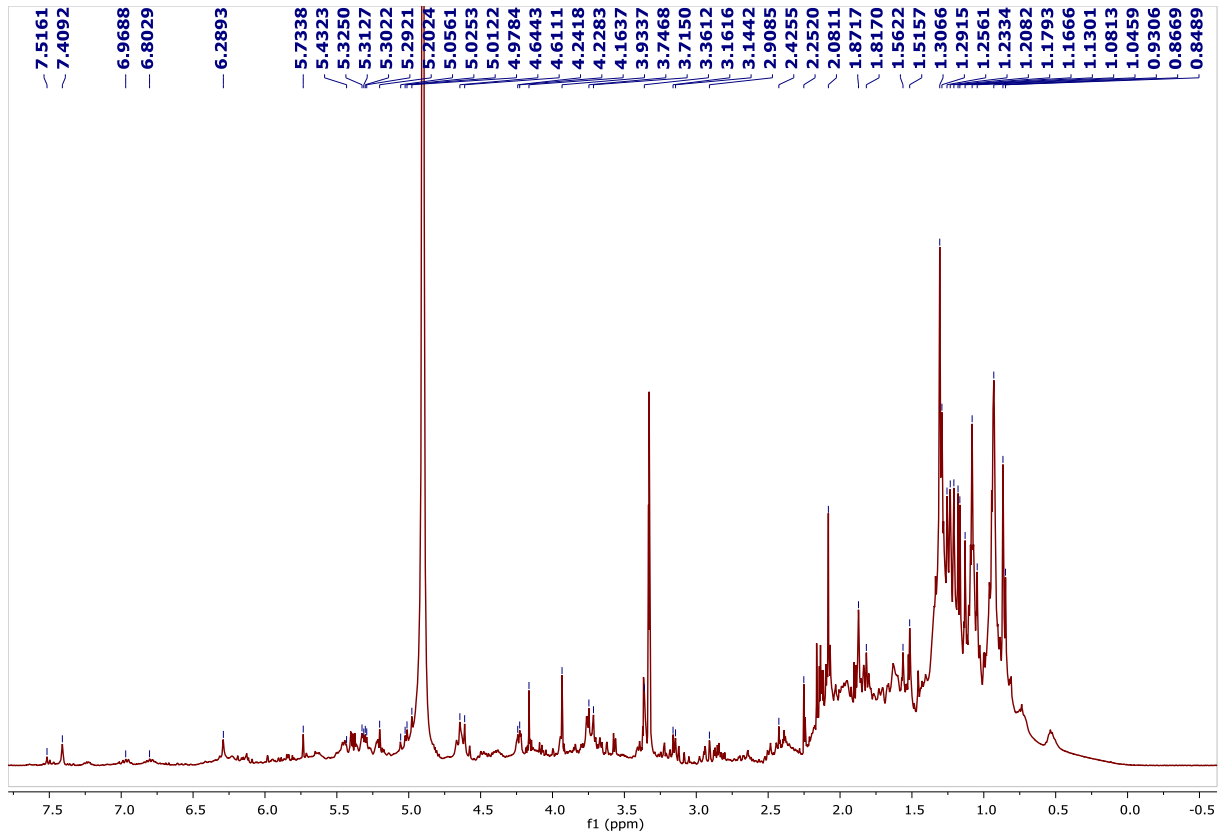


Figura 58 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 13 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

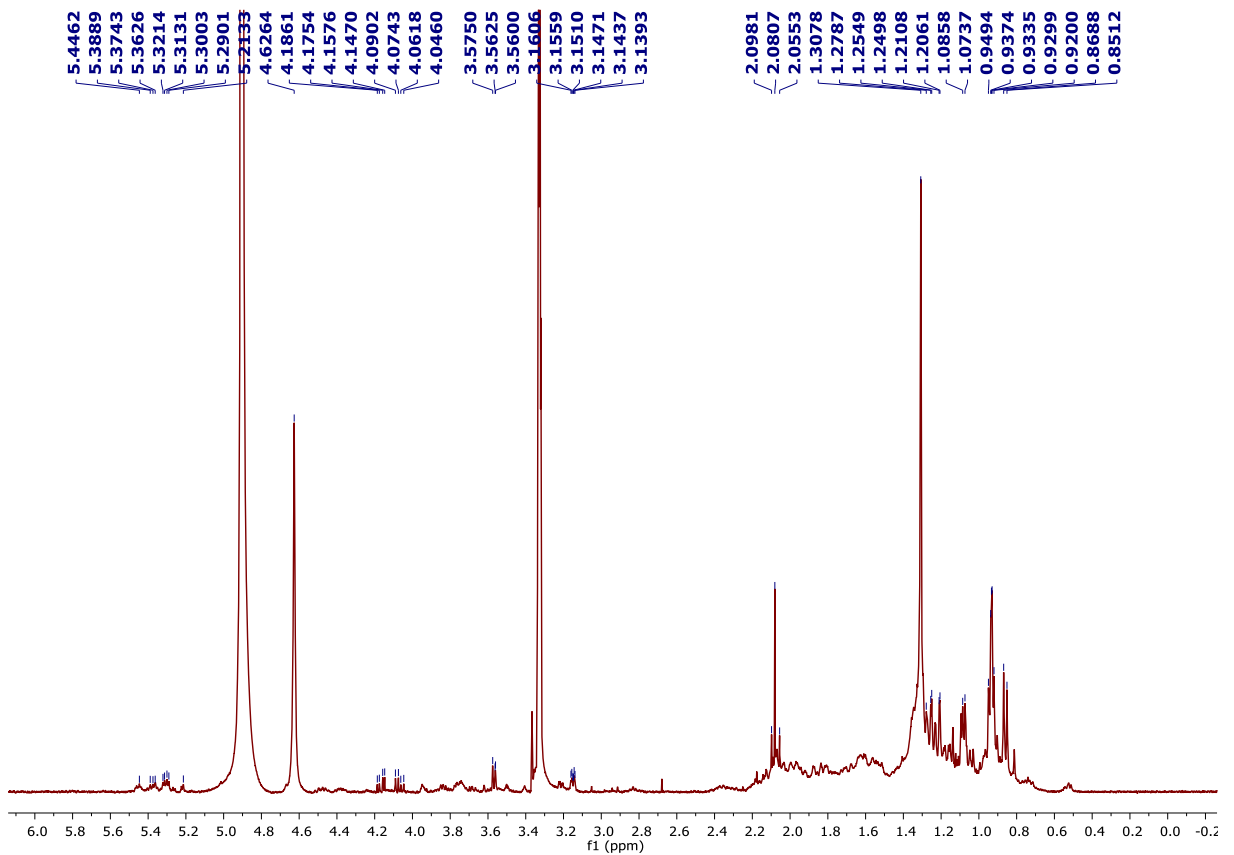


Figura 59 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A - 14 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)



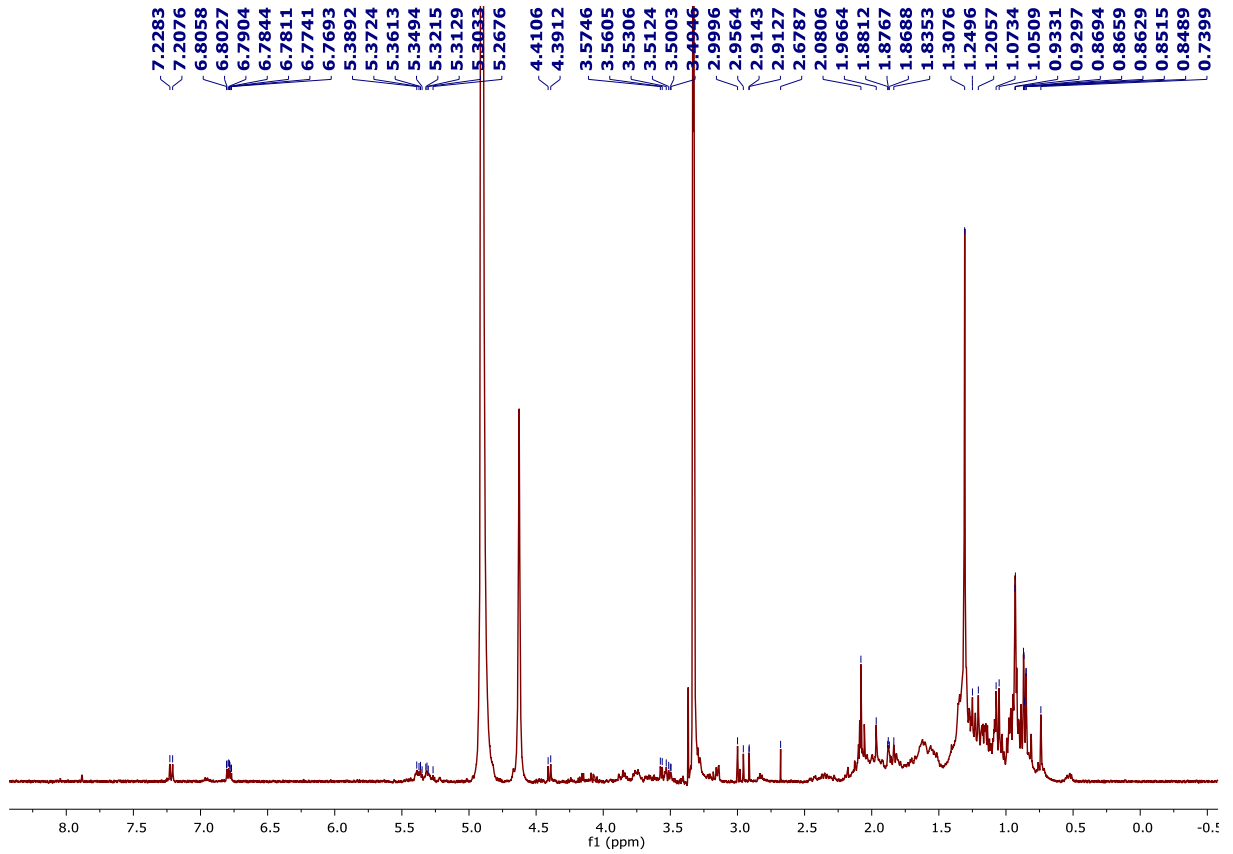


Figura 60 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de E.A – 15 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

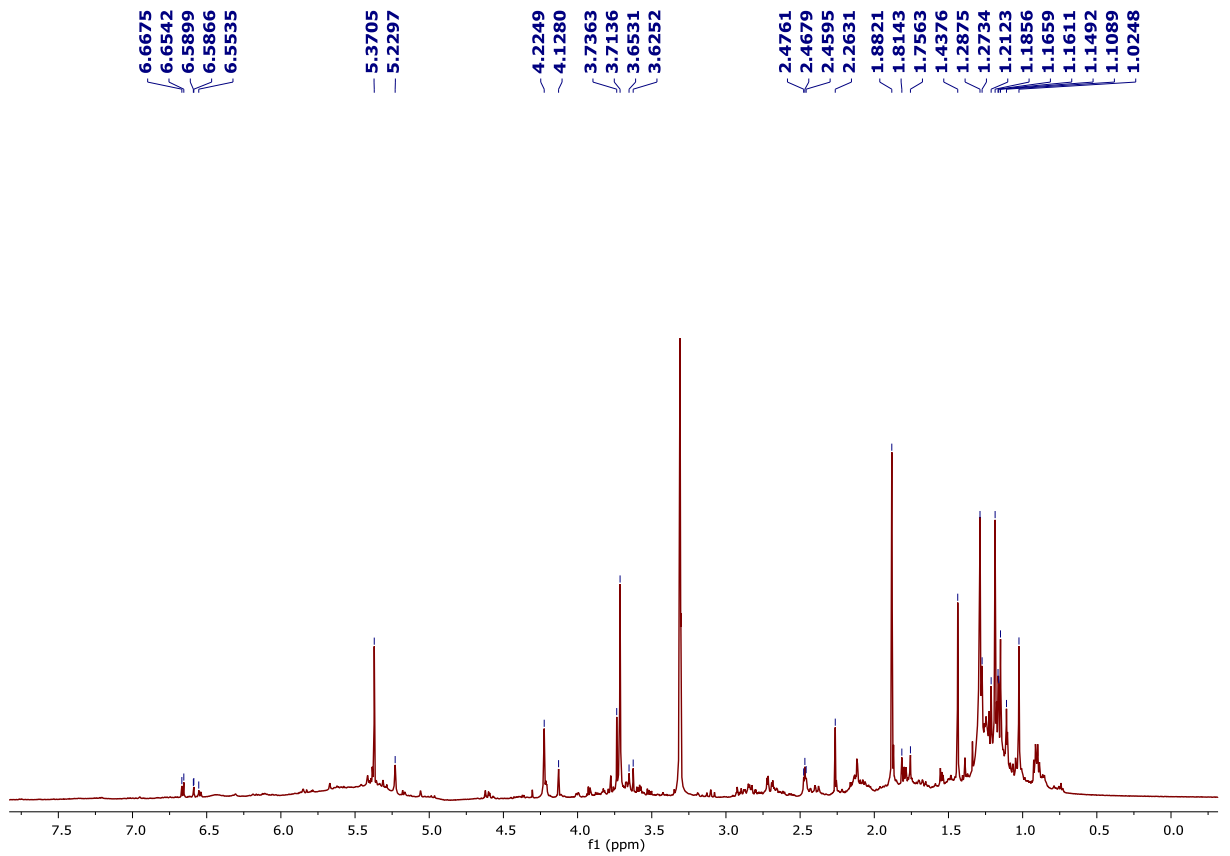


Figura 61 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F13-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

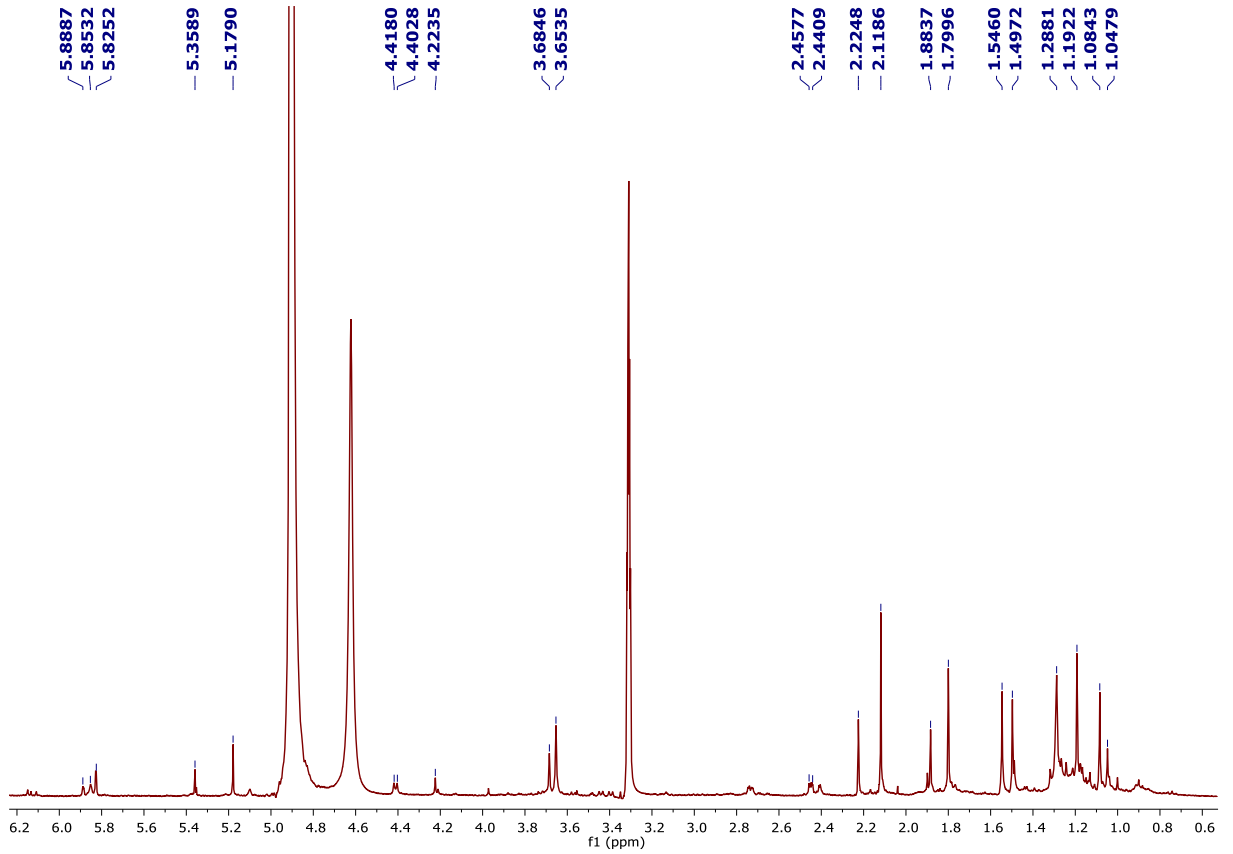


Figura 62 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F13-3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

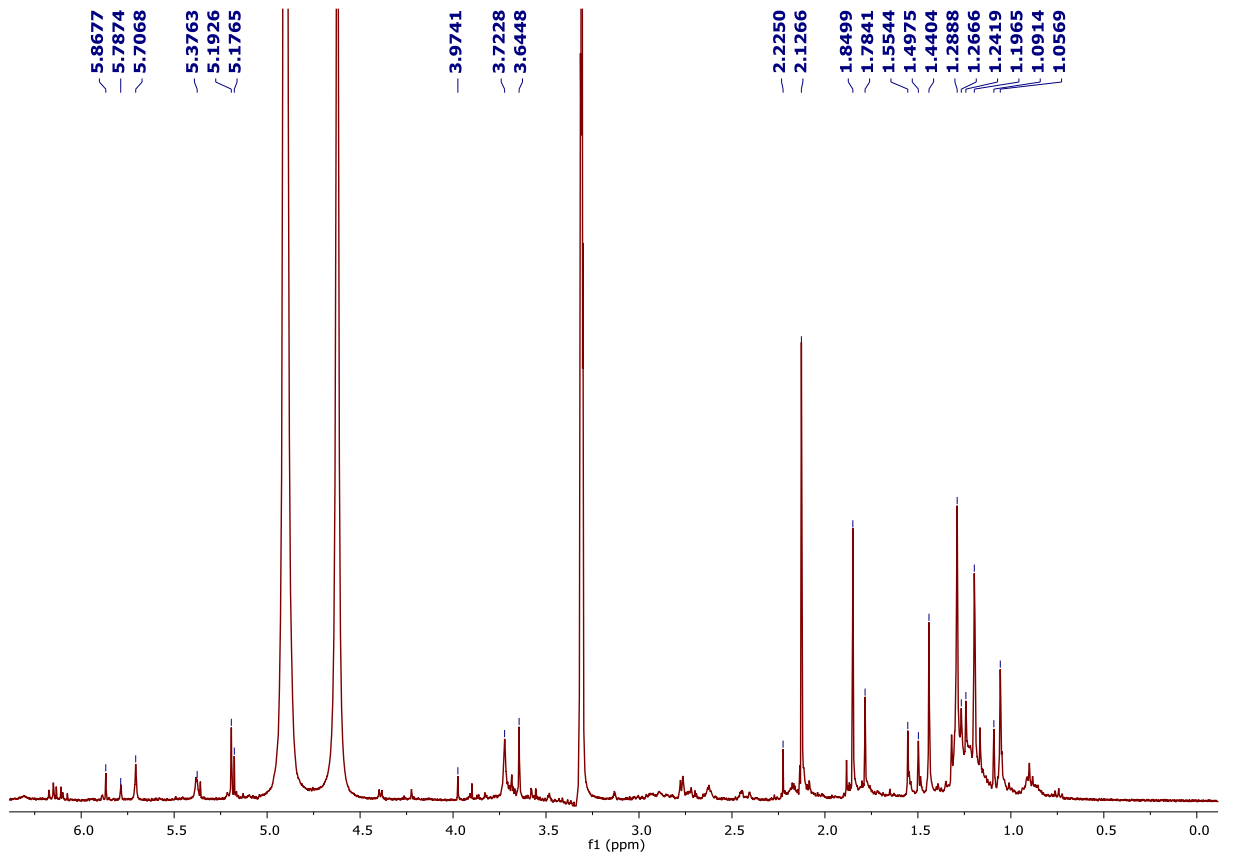


Figura 63 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F13-4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 9,4 T)

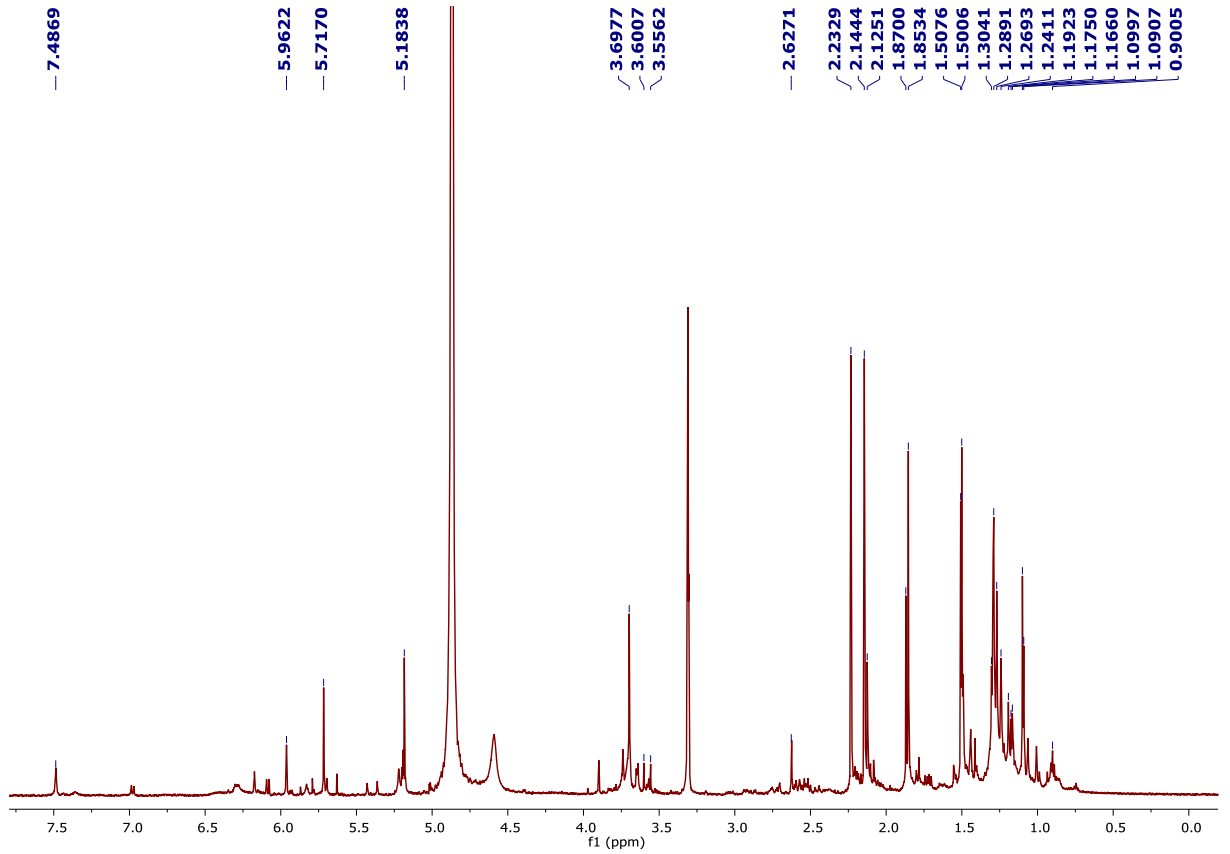


Figura 64 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F13-5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)

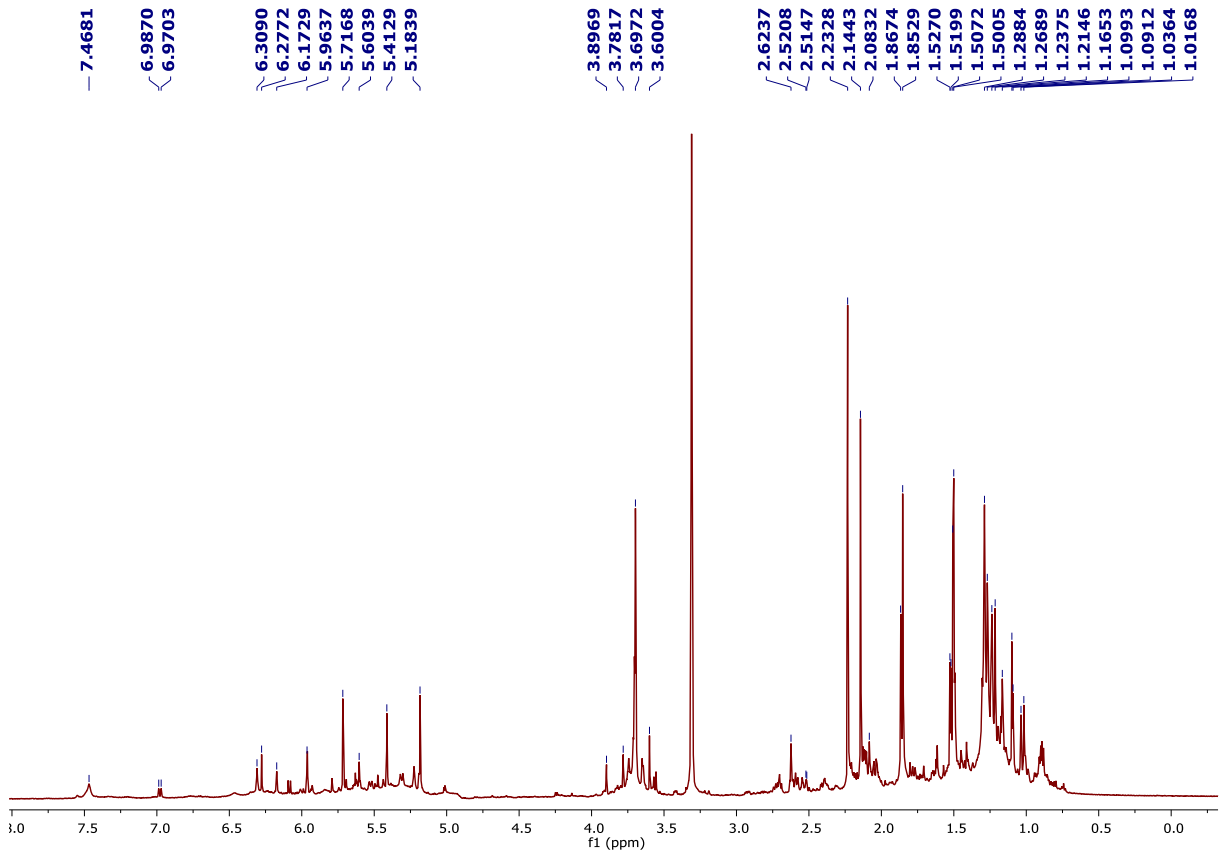


Figura 65 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F13-6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)