

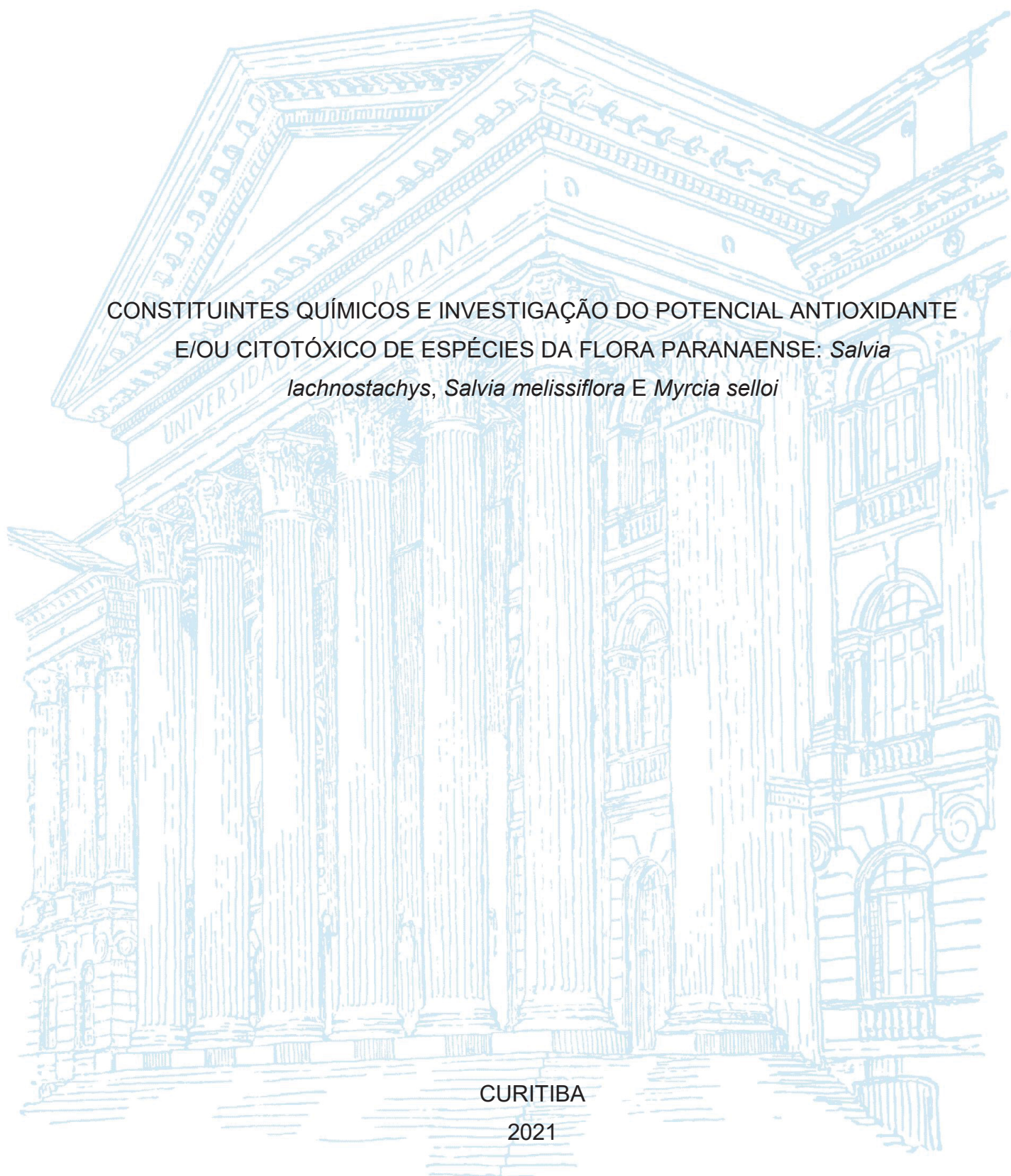
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE
E/OU CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FLORA PARANAENSE: *Salvia*
lachnostachys, *Salvia melissiflora* E *Myrcia selloi*

CURITIBA

2021



CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE
E/OU CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FLORA PARANAENSE: *Salvia*
lachnostachys, *Salvia melissiflora* E *Myrcia selloi*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

O48c Oliveira, Cristhian Santos

Constituintes químicos e investigação do potencial antioxidante e/ou citotóxico de espécies da flora paranaense: *Salvia lachnostachys*, *Salvia melissiflora* e *Myrcia selloi* [recurso eletrônico] / Cristhian Santos Oliveira – Curitiba, 2021.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

1. Produtos naturais. 2. Química. 3. *Salvia lachnostachys*. 4. *Salvia melissiflora*. 5. *Myrcia selloi*. I. Stefanello, Maria Élide Alves. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 543.8

Bibliotecária: Vilma Machado CRB-9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CRISTHIAN SANTOS OLIVEIRA** intitulada: **Constituintes químicos e investigação do potencial antioxidante e/ou citotóxico de espécies da flora paranaense: *Salvia lachnostachys*, *Salvia melissiflora* e *Myrcia selloi***, sob orientação da Profa. Dra. MARIA ÉLIDA ALVES STEFANELLO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Novembro de 2021.

MARIA ÉLIDA ALVES STEFANELLO
Presidente da Banca Examinadora

ANDERSSON BARISON
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JOAO HENRIQUE GHILARDI LAGO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

JORGE MAURÍCIO DAVID
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)

DANIEL DA SILVEIRA RAMPÓN
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Élide Alves Stefanello expresso meus sinceros agradecimentos por todos esses anos de orientação, incluindo mestrado e doutorado. Obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Certamente pra mim foram anos intensos e de muito crescimento pessoal e profissional. Obrigado pelas histórias, experiências e incentivos. Não há dúvidas que sempre será uma referência de professora e pesquisadora! Obrigado pela paciência, ensinamentos e por toda confiança depositada em mim durante todos esses anos.

Aos professores do Departamento de Química da UFPR que auxiliaram na minha formação como doutor, em especial aos professores Prof. Dr. Leandro Piovan, Prof. Dr. Claudiney Cordeiro, Prof. Dr. Daniel Rampon e Prof. Dr. Andersson Barison por participarem das bancas de qualificação e defesa.

Aos professores da banca externa Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago (UFABC) e Prof. Dr. Jorge Maurício David (UFBA). Obrigado pelo aceite do convite, disponibilidade e pelas ricas contribuições para esse trabalho.

Ao laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR e Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, pela realização dos espectros de RMN e disponibilidade dos equipamentos.

A todos técnicos responsáveis pelos laboratórios multiusuários do DEQUI-UFPR.

Ao excelente programa de Pós-Graduação em Química da UFPR (PPQQ) por todo suporte e por toda estrutura que proporciona.

À Universidade Federal do Paraná, pela estrutura.

Ao complexo de Centrais de Apoio à pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM) sob supervisão da professora Dra. Maria Helena Sarragiotto, e a Dra. Flávia Lada Degout Pontes técnica do Laboratório de Cromatográfica e Espectrometria de Massas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR pela disponibilidade e por realizar os espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela disponibilidade e realização dos ensaios das atividades antioxidante e citotóxica.

À Profa. Dra. Élide Pereira dos Santos e ao Prof. Dr. Armando Carlos Cervi (em memória), ambos do Departamento de Botânica da UFPR, pela coleta e identificação dos materiais botânicos.

À Prof. Dra. Caroline Calomeno do Departamento de Design da UFPR pelas fotos concedidas da espécie *Salvia lachnostachys*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida (processo: 88882.344249/2019-01).

À Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo apoio financeiro (processo: 38394/2014).

À minha família, em especial a minha mãe Eilice, por todo suporte, por estar sempre do meu lado, me auxiliando e confiando no meu potencial. Sou imensamente grato por me proporcionar a melhor educação e vibrar comigo a cada etapa alcançada. Tenha certeza que sem você nada disso seria possível.

Às amigas que desenvolvi no DEQUI-UFPR durante esse tempo, em especial a Dra. Maria Helena Verdan e Dra. Magali Silva de Amorim, que mesmo estando distantes nos últimos anos, sempre se fizeram presentes e dispostas a ajudar no que fosse preciso. A Dra. Yane Honorato pela amizade, conversas, cafezinhos e almoços. A Dra. Tassya Matos e Dra. Mayara Fornari, pela amizade e auxílio em alguns experimentos. Todas vocês foram essenciais nesse processo.

À Dra. Vanessa Winiewski, amiga que me acompanha desde o ensino médio. Agradeço por todos esses anos de amizade e por todos os momentos divididos. Obrigado pelo companheirismo tanto profissional quanto pessoal. Obrigado por dividir comigo as angústias, alegrias e ouvir minhas bobagens e por nunca medir esforços para me ajudar no que fosse preciso. Tenho certeza que a nossa amizade durará por anos. Serei eternamente grato por isso!

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo Igor Baptista, por toda compreensão durante esses últimos meses. Obrigado por me ajudar a manter o equilíbrio,

principalmente nos momentos de incerteza, insegurança e angústia, com toda a sua paciência, calma, carinho e muito amor. Obrigado por ser esse cara fantástico e único. Agradeço por apoiar meus sonhos e compartilhar minhas esperanças, e por sempre torcer pela minha felicidade. Obrigado!

Aos meus amigos Edson, Claudio e Laudo pelos momentos compartilhados. Obrigados pelo apoio e pelas palavras de conforto quando eu achava que tudo estava perdido. Obrigado por torcerem pelo meu sucesso!

As minhas queridas amigas Amanda e Vic por todas as palavras de conforto e apoio nesse processo.

Enfim, tenho consciência que sozinho jamais conseguiria realizar todo esse trabalho. Por isso, exponho o meu profundo e sincero agradecimento a todos aqueles que se envolveram de forma direta ou indireta.

Obrigado!

“O cavaleiro jogou a cabeça para trás, rindo de pura alegria. Ele podia ver o topo da montanha. O caminho parecia muito mais íngreme do que tinha sido até aquele ponto, mas não importava. Ele sabia que nada poderia detê-lo agora.”

(O Cavaleiro Preso na Armadura, Robert Fisher, 2021, p.104)

RESUMO

O estudo fitoquímico de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (**Capítulo 1**) resultou no isolamento de 20 constituintes químicos, sendo 14 diterpenoides (10 derivados do abietano e quatro derivados do clerodano), cinco triterpenoides e uma substância fenólica. Os diterpenóides isolados de *S. lachnostachys* foram identificadas como: fruticulina A (**SV1**), demetilfruticulina A (**SV2**), isofruticulina A (**SV3**), demetilisofruticulina A (**SV4**), 20-hidroxi-isofruticulina A (**SV5**), 20-hidroxi-demetilisofruticulina A (**SV6**), 6-hidroxi-isofruticulina A (**SV7**), fruticulina B (**SV8**), demetilfruticulina B (**SV9**), e 20-hidroxi-demetilfruticulina B (**SV10**). Em *S. melissiflora* foram identificados: melissiflorina A (**SV11**), 7,8 α -diidrosalviacoccina (**SV12**), melissiflorina B (**SV13**), e 7-*epi*-salviadulina A (**SV14**). Os triterpenoides ácido oleanólico (**SV15**), ácido maslínico (**SV16**), ácido 11 α -hidroxi-oleanólico (**SV17**), e ácido ursólico (**SV19**) foram isolados de *S. lachnostachys*, enquanto que **SV15** e **SV19** foram encontrados também em *S. melissiflora*. O ácido rosmarínico (**SV20**) foi a substância fenólica encontrada nas duas espécies de *Salvia*. As substâncias **SV4**, **SV5**, **SV6**, **SV7**, **SV9**, **SV10**, **SV12**, **SV13** e **SV17** são inéditas na literatura. Os extratos etanólicos de *S. lachnostachys* e *S. melissiflora* apresentaram elevada atividade antioxidante, medida como μmol de trolox equivalente por grama do extrato seco ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$), pelo método ORAC-FL (2.845-2.991 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Algumas frações obtidas do extrato etanólico de *S. lachnostachys* também apresentaram forte atividade antioxidante (2.422-2.861 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Os diterpenoides **SV1**, **SV2**, **SV8** e **SV9** também revelaram atividade antioxidante (1,20-2,42 TE relativo). Já o estudo fitoquímico de *Myrcia selloi* (**Capítulo 2**) levou ao isolamento de 13 substâncias fenólicas, sendo cinco derivados do ácido quínico, seis flavonoides e um tanino. Estas substâncias foram identificadas como: ácido clorogênico (**MS1**), clorogenato de metila (**MS2**), clorogenato de etila (**MS3**), *neo*-clorogenato de etila (**MS4**), criptoclorogenato de etila (**MS5**), quercetina (**MS6**), hiperosídeo (**MS7**), isoquercitrina (**MS8**), 3-O- β -(6"-galoil)-galactosilquercetina (**MS9**), canferol (**MS10**), astragalina (**MS11**), 3-O- β -glucosilramnocitrina (**MS12**) e eugeniina (**MS13**). O extrato etanólico de *M. selloi* apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas de leucemia, pelo método da sulforrodamina B. A concentração necessária para inibição total do crescimento celular (TGI) foi de 11,76 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

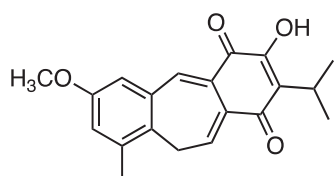
Palavras-chave: *Salvia*. *Myrcia*. Terpenoides. Substâncias fenólicas. Atividades biológicas.

ABSTRACT

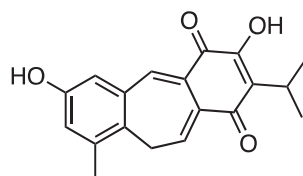
The phytochemical study of *Salvia lachnostachys* and *S. melissiflora* (**Chapter 1**) yielded 20 compounds, of which 14 diterpenoids (ten abietane-derivatives and four clerodane-derivatives), five triterpenoids, and one phenolic compound. The diterpenoids of *S. lachnostachys* were identified as: fruticuline A (**SV1**), demethylfruticuline A (**SV2**), isofruticuline A (**SV3**), demethylisofruticuline A (**SV4**), 20-hydroxy-isofruticuline A (**SV5**), 20-hydroxy-demethylisofruticuline A (**SV6**), 6-hydroxy-isofruticuline A (**SV7**), fruticuline B (**SV8**), demethylfruticuline B (**SV9**), e 20-hydroxy-demethylfruticuline B (**SV10**). In *S. melissiflora* were identified: melissiflorine A (**SV11**), 7,8 α -dihydrosalviacoccine (**SV12**), melissiflorine B (**SV13**), e 7-*epi*-salviaduline A (**SV14**). The triterpenoids oleanolic acid (**SV15**), maslinic acid (**SV16**), 11 α -hydroxyoleanolic acid (**SV17**), and ursolic acid (**SV19**) were isolated of *S. lachnostachys*, while **SV15** and **SV19** were found also in *S. melissiflora*. Rosmarinic acid (**SV20**) was isolated from both *Salvia* species. The compounds **SV4**, **SV5**, **SV6**, **SV7**, **SV9**, **SV10**, **SV12**, **SV13** and **SV17** are new. The ethanolic extracts of *S. lachnostachys* and *S. melissiflora* displayed high antioxidant activity, measured as μmol of trolox equivalent per gram of dried extract ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$), by ORAC-FL assay (2.845-2.991 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Some fractions, obtained from ethanolic extract of *S. lachnostachys*, also showed antioxidant activity (2.422-2.861 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). The diterpenoids **SV1**, **SV2**, **SV8** and **SV9** also exhibited antioxidant activity (1.20-2.42 relative TE). On the other hand, the phytochemical study of *Myrcia selloi* (**Chapter 2**) furnished 13 phenolic compounds: five caffeoylphenyl quinic acid derivatives, six flavonoids and one tannin. These compounds were identified as: chlorogenic acid (**MS1**), methyl chlorogenate (**MS2**), ethyl chlorogenate (**MS3**), ethyl *neo*-chlorogenate (**MS4**), ethyl cryptochlorogenate (**MS5**), quercetin (**MS6**), hyperoside (**MS7**), isoquercitrin (**MS8**), 3-O- β -(6''-galoil)-galactosylquercetin (**MS9**), kaempferol (**MS10**), astragalin (**MS11**), 3-O- β -glucosylrhamnocitrin (**MS12**) and eugenin (**MS13**). The ethanolic extract of *M. selloi* showed cytotoxic activity against leukemia human tumor cell lines (K562) by sulforodamine B assay. The concentration for total growth inhibition (TGI) was 11.76 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: *Salvia*. *Myrcia*. Terpenoids. Phenolic compounds. Biological activities.

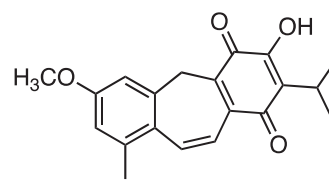
ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBTÂNCIAS ISOLADAS



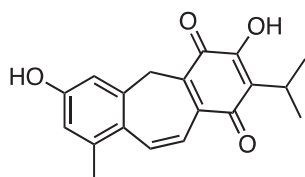
SV1



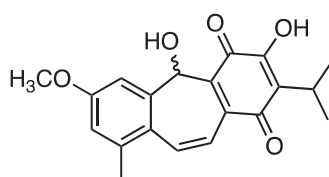
SV2



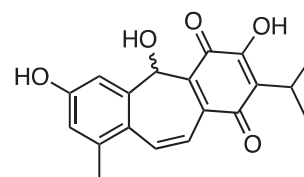
SV3



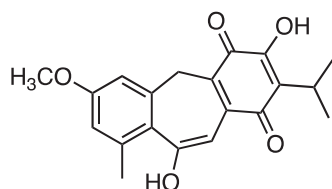
SV4 (inérita)



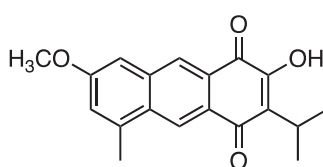
SV5 (inérita)



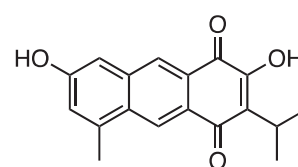
SV6 (inérita)



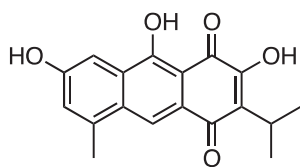
SV7 (inérita)



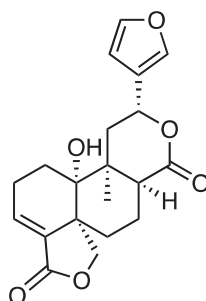
SV8



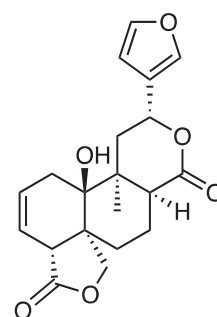
SV9 (inérita)



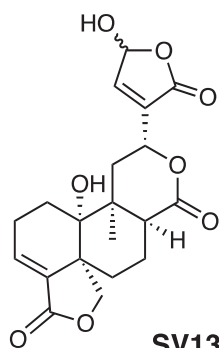
SV10 (inérita)



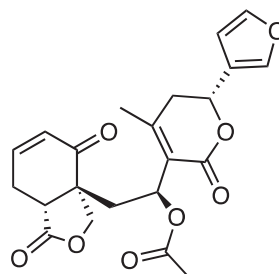
SV11



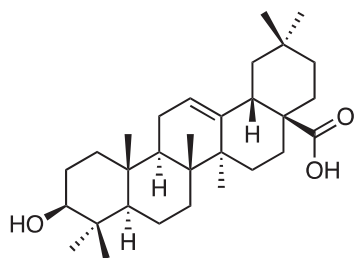
SV12 (inérita)



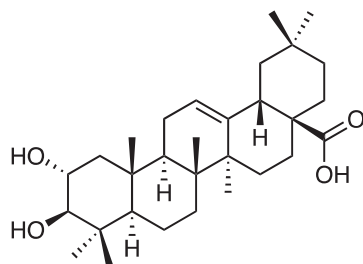
SV13 (inérita)



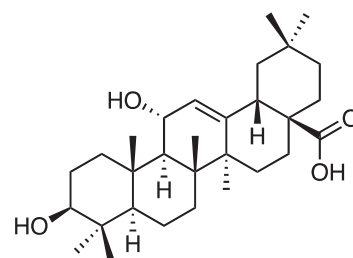
SV14



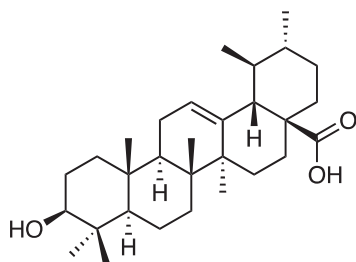
SV15



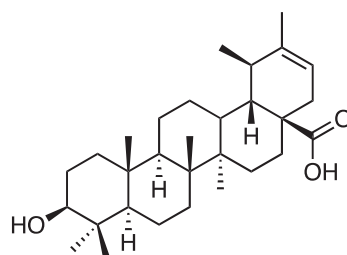
SV16



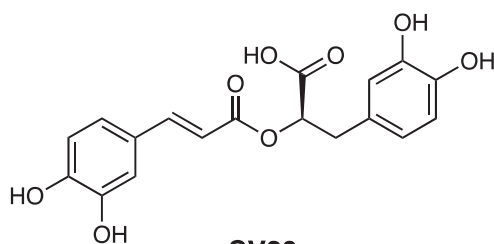
SV17



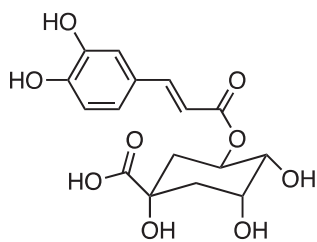
SV18



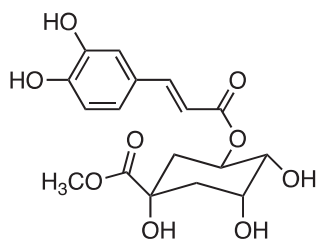
SV19



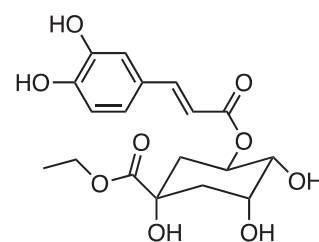
SV20



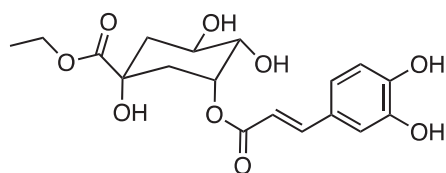
MS1



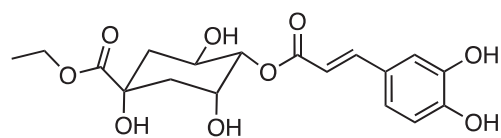
MS2



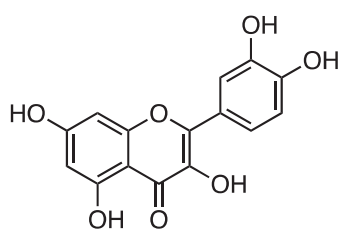
MS3



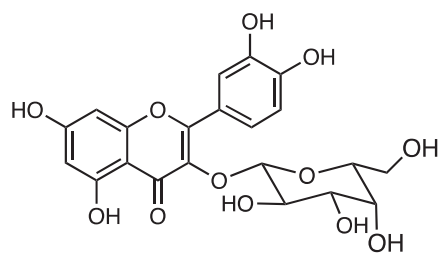
MS4



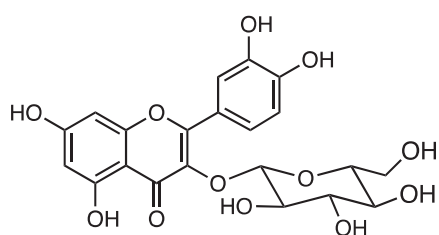
MS5



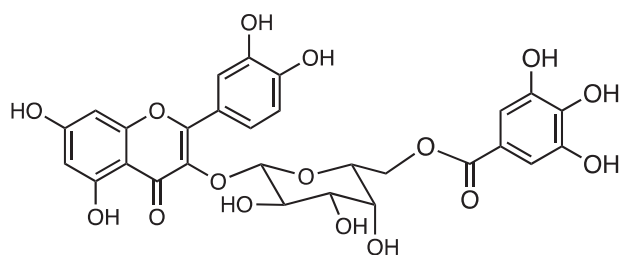
MS6



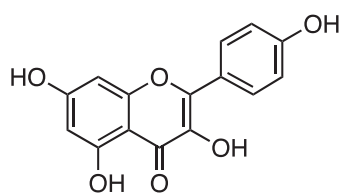
MS7



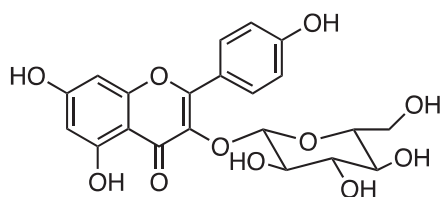
MS8



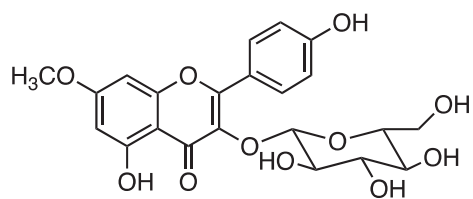
MS9



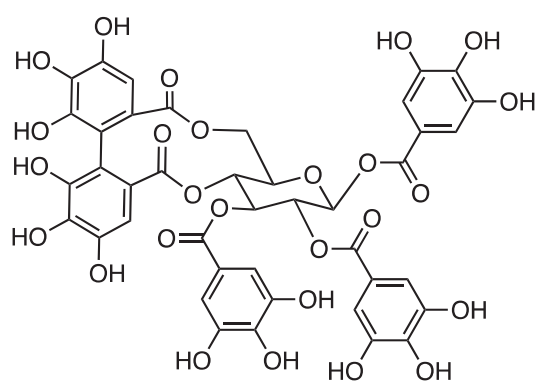
MS10



MS11



MS12



MS13

**OS RESULTADOS PARCIAIS DESTA PESQUISA FORAM DESCRITOS NOS
SEGUINTE ARTIGOS:**

OLIVEIRA, C. S.; ALVAREZ, C. J.; CABRAL, M. R. P.; SARRAGIOTTO, M. H.; SALVADOR, M. J.; STEFANELLO, M. E. A. Three new diterpenoids from the leaves of *Salvia lachnostachys*. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2022668>

CORSO, C. R.; STIPP, M. C.; MARIOTT, M.; RAMOS, E. A. S.; KASSEN, G.; QUEIROZ-TELLES, J. E.; **OLIVEIRA, C. S.**; STEFANELLO, M. E. A.; VERHOEVEN, A.; ELFERICK, R.; ACCO, A.; SILVA, L. Fruticuline A, a chemically defined diterpene, exerts antineoplastic effects *in vitro* and *in vivo* by multiple mechanisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 16477, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73432-2>

CORSO, C. R.; STIPP, M. C.; ADAMI, E. R.; SILVA, L. M.; MARIOTT, M.; ANDRADE, S. F.; RAMOS, E. A. S.; KLASSEN, G.; BELTRAME, O. C.; QUEIROZ-TELLES, J. E.; **OLIVEIRA, C. S.**; STEFANELLO, M. E. A.; ACCO, A. *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. **Molecular Biology reports**, v. 46, p. 4827-4841, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04931-3>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGEM DAS ESPÉCIES <i>Salvia officinalis</i> (A) E <i>Salvia divinorum</i> (B) COM DETALHES DAS FOLHAS E FLORES	47
FIGURA 2 – REGIÕES DO BRASIL COM OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>Salvia</i>	48
FIGURA 3 – IMAGEM DA ESPÉCIE <i>Salvia splendens</i> UTILIZADA NO PAISAGISMO EM PONTOS TURÍSTICOS DA CIDADE DE CURITIBA-PR	49
FIGURA 4 – MONOTERPENOS MAJORITÁRIOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS ESPÉCIES <i>Salvia officinalis</i> E <i>S. triloba</i>	50
FIGURA 5 – SESQUITERPENOS MAJORITÁRIOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS ESPÉCIES <i>Salvia officinalis</i> , <i>S. borjensis</i> , <i>S. cordata</i> , <i>S. aurea</i> , <i>S.</i> <i>judaica</i> E <i>S. viscosa</i>	51
FIGURA 6 – DITERPENOS ABIETANOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES <i>Salvia</i> <i>corrugata</i> e <i>S. officinalis</i>	52
FIGURA 7 – DITERPENOS ABIETANOS COM ESQUELETO ICETEXANO ISOLADOS DAS ESPÉCIES <i>Salvia ballatiflora</i> , <i>S. giliensis</i> , <i>S.</i> <i>przewalki</i> E <i>S. corrugata</i>	53
FIGURA 8 – DITERPENOS <i>neo</i> -CLERODANOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES <i>Salvia</i> <i>divinorum</i> e <i>S. splendens</i>	54
FIGURA 9 – TRITERPENOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>Salvia argentea</i>	55
FIGURA 10 – ALGUNS ESQUELETOS BÁSICOS DOS DITERPENOS EM ESPÉCIES DE <i>Salvia</i>	56
FIGURA 11 – ALGUMAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS ISOLADAS EM ESPÉCIES DE <i>Salvia</i>	63
FIGURA 12 – FOTOS DA ESPÉCIE <i>Salvia lachnostachys</i>	64
FIGURA 13 – ALGUNS ÁCIDOS GRAXOS E SESQUITERPENOS PRESENTE NO OLÉO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE <i>Salvia</i> <i>lachnostachys</i>	65
FIGURA 14 – TRITERPENOS E DITERPENOS ISOLADOS NAS FRAÇÕES MENOS POLARES DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>S.</i> <i>lachnostachys</i>	66
FIGURA 15 – FOTOS DA ESPÉCIE <i>Salvia melissiflora</i>	69

FIGURA 16 – ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ALIFÁTICAS E SESQUITERPENOS PRESENTES NO OLÉO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. melissiflora</i>	70
FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH (FONTE DE RADICAIS LIVRES) E TROLOX (PADRÃO) USADOS NO MÉTODO ORAC-FL.....	89
FIGURA 18 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO CONTROLE POSITIVO NO ENSAIO ORAC-FL	89
FIGURA 19 – ESTRUTURA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO NO ENSAIO CITOTÓXICO (MTT)	90
FIGURA 20 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SV1 E SV2	99
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE SV1 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz)	100
FIGURA 22 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE SV1	101
FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C{ ¹ H} DE SV1 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 100 MHz)	102
FIGURA 24 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL A DE SV1	103
FIGURA 25 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ¹ H- ¹³ C (HSQC) DE SV1 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	103
FIGURA 26 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ¹ H- ¹³ C (HMBC) DE SV1 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	104
FIGURA 27 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL B DE SV1	105
FIGURA 28 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL C DE SV1	105
FIGURA 29 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DE SV2 (A , CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) COM SV1 (B , CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	108
FIGURA 30 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE SV2	109
FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ¹ H- ¹³ C (HSQC) DE SV2 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz)...	110

FIGURA 32 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV2 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) ...	110
FIGURA 33 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV2	111
FIGURA 34 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SV3 E SV4	112
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz)	113
FIGURA 36 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV3	114
FIGURA 37 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz).....	115
FIGURA 38 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV3	116
FIGURA 39 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz).....	116
FIGURA 40 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE SV4 (A, CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) COM SV3 (B, CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	118
FIGURA 41 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV4	118
FIGURA 42 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELO HMBC DE SV4	119
FIGURA 43 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV4 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ...	119
FIGURA 44 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV4 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS de METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	120
FIGURA 45 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE SV4	121
FIGURA 46 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE SV4 (MeOH)	122
FIGURA 47 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SV5 E SV6	122
FIGURA 48 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz)	123
FIGURA 49 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV5	124
FIGURA 50 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV5	124
FIGURA 51 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	125

FIGURA 52 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	125
FIGURA 53 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SV5 E FRUTICULINA C	126
FIGURA 54 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV6 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	128
FIGURA 55 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV6	129
FIGURA 56 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE SV6	129
FIGURA 57 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)....	130
FIGURA 58 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV6 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)....	130
FIGURA 59 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV7	132
FIGURA 60 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV7 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz)	133
FIGURA 61 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV7	133
FIGURA 62 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA (HSQC) ^1H - ^{13}C DE SV7 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	135
FIGURA 63 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA (HMBC) ^1H - ^{13}C DE SV7 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz).....	135
FIGURA 64 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV7	136
FIGURA 65 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE SV7	138
FIGURA 66 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE SV7	139
FIGURA 67 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO IV DE SV7	139
FIGURA 68 – ESTRUTURA QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SV8 E SV9	141
FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV8 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz)	141
FIGURA 70 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV8	142
FIGURA 71 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE SV8 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 150 MHz)	143
FIGURA 72 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV8	144

FIGURA 73 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV8 (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz).....	144
FIGURA 74 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV8 (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz).....	145
FIGURA 75 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE SV9 (A, ACETONA- d_6 , 400 MHz) COM SV8 (B, CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)	147
FIGURA 76 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV9	147
FIGURA 77 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV9	148
FIGURA 78 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV9 (ACETONA- d_6 , 400 MHz)	148
FIGURA 79 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV9 (ACETONA- d_6 , 400 MHz)	149
FIGURA 80 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE SV9	150
FIGURA 81 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE SV9 (MEOH).....	151
FIGURA 82 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO IV DE SV9	152
FIGURA 83 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV10	152
FIGURA 84 – ESPECTRO E RMN DE ^1H DE SV10 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)	153
FIGURA 85 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV10	154
FIGURA 86 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV10	154
FIGURA 87 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV10 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) .	155
FIGURA 88 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV10 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) .	155
FIGURA 89 – ESQUELETO BÁSICO DO C/S-CLERODANO E SECO-CLERODANO	159
FIGURA 90 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS SV11 e SV12	160
FIGURA 91 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV11 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)	161

FIGURA 92 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV11	161
FIGURA 93 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA H-12 E H-16 DE SV11	162
FIGURA 94 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA H-3 E H-19A E H-19B DE SV11	163
FIGURA 95 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC POR H-8 E C-20 DE SV11	164
FIGURA 96 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE SV11 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz)	164
FIGURA 97 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE SV11 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz)	165
FIGURA 98 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV12 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	167
FIGURA 99 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV12	167
FIGURA 100 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE SV12	169
FIGURA 101 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE SV12 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	169
FIGURA 102 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE SV12 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	170
FIGURA 103 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SV12 E 7,8 α -DIIDROSALVIACOCINA	171
FIGURA 104 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV13	173
FIGURA 105 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA SV13	174
FIGURA 106 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV13 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	174
FIGURA 107 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE SV13	175
FIGURA 108 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE SV13 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ 400 MHz)	175

FIGURA 109 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE SV13 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ 400 MHz).....	176
FIGURA 110 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO HMBC DE SV13	176
FIGURA 111 – ESTRUTURAS QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV14	177
FIGURA 112 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV14 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	178
FIGURA 113 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV14	179
FIGURA 114 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-2, H-3 E H-4 OBSERVADAS NO HMBC DE SV14	180
FIGURA 115 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-7 OBSERVADAS NO HMBC DE SV14	180
FIGURA 116 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-12 E H-20 OBSERVADAS NO HMBC DE SV14	181
FIGURA 117 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE SV14 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	181
FIGURA 118 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE SV14 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL - <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	182
FIGURA 119 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE SV14	183
FIGURA 120 – ESTRUTURAS BÁSICAS DOS TRITERPENOS COM ESQUELETOS DOS TIPOS OLEANANO E URSANO	185
FIGURA 121 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV15	185
FIGURA 122 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV15 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz)	186
FIGURA 123 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE SV15	187
FIGURA 124 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE SV15 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz)	188
FIGURA 125 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA SV15	189
FIGURA 126 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV15 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz).....	189
FIGURA 127 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV15 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz).....	190
FIGURA 128 – AMPLIAÇÃO SINAIS DO HMBC DE SV15	190

FIGURA 129 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV16	192
FIGURA 130 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV16 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz).....	193
FIGURA 131 – AMPLIAÇÃO DOS PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV16	193
FIGURA 132 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE SV16 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 100 MHz).....	194
FIGURA 133 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV16	195
FIGURA 134 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV16 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	195
FIGURA 135 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV16 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	196
FIGURA 136 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DE SV16 DOS HIDROGÊNIOS METILÊNICOS, METÍNICOS E METÍLICOS	196
FIGURA 137 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV17	198
FIGURA 138 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV17 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	199
FIGURA 139 – AMPLIAÇÃO DOS PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV17	199
FIGURA 140 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV17	200
FIGURA 141 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV17 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) .	201
FIGURA 142 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV17 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) .	201
FIGURA 143 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA SV18	203
FIGURA 144 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV18 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz).....	204
FIGURA 145 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAS DE SV18	204
FIGURA 146 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE SV18 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 100 MHz).....	205

FIGURA 147 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV18 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	206
FIGURA 148 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV18 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	206
FIGURA 149 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DE SV18	207
FIGURA 150 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA	209
FIGURA 151 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV19 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz).....	210
FIGURA 152 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE SV19	210
FIGURA 153 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV19 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	211
FIGURA 154 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV19 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) .	212
FIGURA 155 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO HMBC DE SV19	212
FIGURA 156 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV19	213
FIGURA 157 – ESTRUTURA QUÍMICA DE SV20	215
FIGURA 158 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE SV20 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) .	216
FIGURA 159 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAS DE SV20	216
FIGURA 160 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE SV20 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 150 MHz)	217
FIGURA 161 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE SV20 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	218
FIGURA 162 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE SV20	219
FIGURA 163 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE SV20 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	219
FIGURA 164 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SV15 , SV18 E SV20	221
FIGURA 165 – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS AVALIADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL)	222

FIGURA 166 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS CONTROLES POSITIVOS UTILIZADOS NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL)	223
FIGURA 167 – REGIÕES DO BRASIL COM OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>Myrcia</i>	227
FIGURA 168 – IMAGENS DA ESPÉCIE <i>Myrcia multiflora</i> COM DETALHES DOS FRUTOS (A), FLORES (B) E FOLHAS	228
FIGURA 169 – ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE MYRCIA.....	231
FIGURA 170 – TRITERPENOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>M. myrtifolia</i>	231
FIGURA 171 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS REPRESENTANTES DOS ÁCIDOS FENÓLICOS	232
FIGURA 172 – PRINCIPAIS ÁCIDOS ORGÂNICOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Myrcia</i>	233
FIGURA 173 – ESTRUTURA DO ESQUELETO BÁSICO DOS FLAVONOIDES E SUAS CLASSES.....	234
FIGURA 174 – FLAVONOIDES GLICOSILADOS ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>M.</i> <i>multiflora</i>	235
FIGURA 175 – FLAVONOIDES ISOLADOS DA ESPÉCIE <i>M. guianensis</i>	236
FIGURA 176 – FLAVONOIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>M. tomentosa</i>	236
FIGURA 177 – ALGUNS FLAVONOIDES IDENTIFICADOS EM <i>M. rubella</i>	237
FIGURA 178 – ANTOCIANINAS ISOLADAS DOS FRUTOS DE <i>M. eriopus</i>	238
FIGURA 179 - ELAGITANINOS IDENTIFICADOS EM <i>M. palustris</i> E <i>M. rubella</i>	239
FIGURA 180 – IMAGENS DA ESPÉCIE <i>M. selloi</i> NO LOCAL DE COLETA COM DETALHES DAS FLORES E FOLHAS	247
FIGURA 181 – PRINCIPAIS SESQUITERPENOS OXIGENADOS IDENTIFICADOS NAS FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE <i>M. selloi</i>	247
FIGURA 182 – ÁCIDOS ORGÂNICOS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	248
FIGURA 183 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS QUÍNICO E CAFÉICO .	263
FIGURA 184 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ¹ H E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO (J) DOS ACIDOS CAFEOLQUÍNICOS (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	264
FIGURA 185 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA SUBSTÂNCIA MS1	264

FIGURA 186 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) COM MS1 (B) (METANOL- d_4 , 600 MHz)	265
FIGURA 187 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DO GRUPO CAFEOILA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) E DE MS1 (B)	266
FIGURA 188 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO (J EM Hz) DO ÁCIDO QUÍNICO EM MS1	267
FIGURA 189 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DO ÁCIDO QUÍNICO NO ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) E MS1 (B)	267
FIGURA 190 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DO GRUPO CAFEÓILA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	268
FIGURA 191 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz)	268
FIGURA 192 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz)	269
FIGURA 193 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DO ÁCIDO QUÍNICO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	270
FIGURA 194 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS2	271
FIGURA 195 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE MS2 (A, CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) COM O ÁCIDO CLOROGÊNICO (B, METANOL- d_4 , 600 MHz)	272
FIGURA 196 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE MS2	273
FIGURA 197 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS2	274
FIGURA 198 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS2 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) ...	274
FIGURA 199 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS2 (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) ...	275
FIGURA 200 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS MS3 E MS4	276
FIGURA 201 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE MS3 (A, CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) COM O ÁCIDO CLOROGÊNICO (B, METANOL- d_4 , 600 MHz)	277

FIGURA 202 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA REGIÃO DO ÁCIDO QUÍNICO E DO GRUPO ETILA DE MS3	278
FIGURA 203 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE MS3	279
FIGURA 204 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> +GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ...	279
FIGURA 205 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> +GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ...	280
FIGURA 206 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS4 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ..	282
FIGURA 207 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS PRINCIPAIS SINAIS DE MS4	283
FIGURA 208 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE MS4	283
FIGURA 209 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS4 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	284
FIGURA 210 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS4 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	284
FIGURA 211 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DA REGIÃO DO ÁCIDO QUÍNICO DE MS4	285
FIGURA 212 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS5	286
FIGURA 213 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	287
FIGURA 214 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS PRINCIPAIS SINAS DE MS5	288
FIGURA 215 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS5	288
FIGURA 216 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ..	289
FIGURA 217 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) ..	289
FIGURA 218 – ESQUELETO BÁSICO DOS FLAVONÓIS	291
FIGURA 219 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS UNIDADES GLICOSÍDICAS DO GÊNERO <i>Myrcia</i>	292
FIGURA 220 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS6	292

FIGURA 221 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS6 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) ..	293
FIGURA 222 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS6	294
FIGURA 223 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS6 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	294
FIGURA 224 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS6 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	295
FIGURA 225 – REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DE RESSONÂNCIA RESPONSÁVEL PELOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE C-6, C- 8 E C-10 DO ANEL A DE MS6	296
FIGURA 226 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS MS7 E MS8	297
FIGURA 227 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS7 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) ..	297
FIGURA 228 – AMPLIAÇÃO DO DOS SINAIS DA AGLICONA QUERCETINA DE MS7	298
FIGURA 229 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIO DA β - GALACTOSE DE MS7	299
FIGURA 230 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DA β -GALACTOSE DE MS7	299
FIGURA 231 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE MS7 (ACETONA- d_6 , 50 MHz)	300
FIGURA 232 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS7	300
FIGURA 233 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS7 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	301
FIGURA 234 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS7 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	301
FIGURA 235 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS de MS7 (MEOH).....	302
FIGURA 236 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS7 + MS8 (METANOL- d_4 , 600 MHz)	304
FIGURA 237 – AMPLIAÇÃO DOS SINAS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS7 + MS8	305
FIGURA 238 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIO DA β - GLUCOSE DE MS8	306

FIGURA 239 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS8	306
FIGURA 240 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS7 + MS8 (METANOL- d_4 , 600 MHz)	307
FIGURA 241 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS7 + MS8 (METANOL- d_4 , 600 MHz)	307
FIGURA 242 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS9	308
FIGURA 243 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS9 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)	310
FIGURA 244 – AMPLIAÇÃO DO SINAS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS9	310
FIGURA 245 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS9	311
FIGURA 246 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS9 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)	312
FIGURA 247 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS9 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)	312
FIGURA 248 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS10	314
FIGURA 249 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS10 (METANOL- d_4 , 400 MHz)	315
FIGURA 250 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE MS10	316
FIGURA 251 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS10 (METANOL- d_4 , 400 MHz)	316
FIGURA 252 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS10 (METANOL- d_4 , 400 MHz)	317
FIGURA 253 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS11	318
FIGURA 254 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS11 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	319
FIGURA 255 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE MS11	319
FIGURA 256 – CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE MS11	320
FIGURA 257 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS11 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	321
FIGURA 258 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS11 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	321
FIGURA 259 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS12	322

FIGURA 260 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS DO HMBC DE MS12	323
FIGURA 261 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS12 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz).....	324
FIGURA 262 - AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS12	325
FIGURA 263 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS12 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz).....	325
FIGURA 264 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS12 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz).....	326
FIGURA 265 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS UNIDADES PRESENTES NOS TANINOS HIDROLISÁVEIS (ELAGITANINOS)	328
FIGURA 266 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA MS13	328
FIGURA 267 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE MS13 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	329
FIGURA 268 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H NA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DE MS13	329
FIGURA 269 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS DA β -GLUCOSE DE MS13	330
FIGURA 270 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE MS13 (ACETONA- d_6 , 150 MHz)	331
FIGURA 271 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DA β -GLUCOSE COM OS GRUPOS GALOÍLA DE MS13	332
FIGURA 272 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE MS13 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	332
FIGURA 273 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE MS13 (ACETONA- d_6 , 600 MHz)	333
FIGURA 274 – CORRELAÇÕES DO HMBC DO GRUPO HHDF DE MS13	334
FIGURA 275 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE MS13	335
FIGURA 276 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS (ACETONA)	335
FIGURA 277 – ESTRUTURA QUÍMICA DE MS9 ISOLADA DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	337

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – ROTA BIOSSINTÉTICA DO MEVALONATO (MEV).....	57
ESQUEMA 2 – ROTA BIOSSINTÉTICA VIA METILERITRITOL FOSFATO (MEP) ..	58
ESQUEMA 3 – FORMAÇÃO DO PRECURSOR DOS DITERPENOS (GPP) APARTIR DAS CONEXÕES DAS UNIDADES ISOPRÊNICAS (DMAPP E IPP).....	59
ESQUEMA 4 – ROTA BIOSSÍNTETICA DO ESQUELETO BÁSICO ABIETANO ...	60
ESQUEMA 5 – ETAPAS DA ROTA DE SÍNTESE DOS ICETEXANOS A PARTIR DO ABIETANO E FORMAÇÃO DO BARBATUSOL.....	61
ESQUEMA 6 – ETAPAS DE FORMAÇÃO DOS <i>neo</i> -CLERODANDOS E OS CLERODANOS A PARTIR DO PRECURSOR GGPP.....	61
ESQUEMA 7 – REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT EM AZUL DE FORMAZAN	90
ESQUEMA 8 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS ICETEXANOS A PARTIR DOS ABIETANOS	98
ESQUEMA 9 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS <i>nor</i> -ICETEXANOS A PARTIR DO ICETEXENO	99
ESQUEMA 10 – EFEITO DE DESLOCALIZAÇÃO ELETRÔNICA DO GRUPO α - HIDROXI- β -ISOPROPILBENZOQUINONA	106
ESQUEMA 11 – EFEITO DE DESLOCALIZAÇÃO ELETRÔNICA JUSTIFICANDO O DESLOCAMENTO QUÍMICOS DE C-7	134
ESQUEMA 12 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS <i>dinor</i> -ICETEXANOS A PARTIR DO ICETEXENO	140
ESQUEMA 13 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS <i>nor</i> -ICETEXANOS (SV1-SV7) A PARTIR DO PRECURSOR ICETEXANO	158
ESQUEMA 14 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS <i>dinor</i> -ICETEXANOS (SV8- SV10) A PARTIR DO DA DEMETILFRUTICULINA A	159
ESQUEMA 16 – ROTA BIOSSINTÉTICA DA FORMAÇÃO DO ÁCIDO CHIQÚIMICO, ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO QUÍNICO	240
ESQUEMA 17 – BIOSSÍNTESE DOS GALOTANINOS A PARTIR DO ÁCIDO GÁLICO E UDPGLC	241
ESQUEMA 18 – FORMAÇÃO DO GRUPO HEXAHIDRODIFENOÍLA (HHDF) A PARTIR DE DUAS UNIDADES GALOÍLA.....	242

ESQUEMA 19 – ROTA BIOSINTÉTICA DA FORMAÇÃO DO ÁCIDO CORÍSMICO A PARTIR DO ÁCIDO CHIQUÍMICO	243
ESQUEMA 20 – BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS (4- HIDROXIBENZÓICO E ÁCIDO CAFÉICO) A PARTIR DO ÁCIDO CORÍSMICO	244
ESQUEMA 21 – FORMAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DA REAÇÃO DO CAFEOIL-COA E ÁCIDO QUÍNICO	245
ESQUEMA 22 – BIOSÍNTESE DAS FLAVONAS A PARTIR DO 4- HIDROXICINAMOIL-COA E MALONIL-COA	246

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CLPR DO EXTRATO EM ETOH DAS FOLHAS DE <i>Salvia lachnostachys</i>	78
FLUXOGRAMA 2 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO LFA DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	80
FLUXOGRAMA 3 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO LFC DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	83
FLUXOGRAMA 4 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO MSD DAS PARTES AÉREAS <i>S. melissiflora</i>	87
FLUXOGRAMA 5 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ML DE <i>Myrcia selloi</i>	254
FLUXOGRAMA 6 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO MLA DE <i>Myrcia selloi</i>	257

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>in vitro</i> DO EXTRATO ETANÓLICO (LF) E SUBSTÂNCIAS PURAS DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i> CONTRA LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS	67
TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO DITERPENO FRUTICULINA A	68
TABELA 3 – MÉTODOS ISOCRÁTICOS UTILIZADOS NAS SEPARAÇÕES POR CLAE EM COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA	73
TABELA 4 – RELAÇÃO E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES <i>S. lachnostachys</i> E <i>S. melissiflora</i>	77
TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CLPR DO EXTRATO EM EtOH DAS FOLHAS DE <i>S. lachnoschys</i> (OLIVEIRA, 2017)	77
TABELA 6 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO LFC DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	81
TABELA 7 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO LFC 31 DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	82
TABELA 8 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO LFDA DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	84
TABELA 9 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DO EXTRATO ETANÓLICO DOS CAULES (LC) DE <i>S. lachnostachys</i>	84
TABELA 10 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DO EXTRATO MSD DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. melissiflora</i>	85
TABELA 11 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MSD13 DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. melissiflora</i>	86
TABELA 12 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DE MSB DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. melissiflora</i>	88
TABELA 13 – RELAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NAS ESPÉCIES <i>S. lachnostachys</i> E <i>S. melissiflora</i>	97
TABELA 14 – DADOS DE RMN DE SV1 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz) COMPARADOS COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA A (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz; BISIO et al., 2008)	107
TABELA 15 – DADOS DE RMN DE SV2 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) COMPARADOS COM OS DADOS DA	

LITERATURA PARA DEMETILFRUTICULINA A (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz; BISIO et al., 2008)	112
TABELA 16 – DADOS DE RMN DE SV3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ISOFRUTICULINA A (OLIVEIRA et al., 2016).....	117
TABELA 17 – DADOS DE RMN DE SV4 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz).....	121
TABELA 18 – DADOS DE RMN DE SV5 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA C (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 500 MHz; GIACOMELLI et al., 2016).....	127
TABELA 19 – DADOS DE RMN DE SV6 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)	131
TABELA 20 – DADOS DE RMN DE SV7 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz)	137
TABELA 21 – DADOS DE RMN DE SV8 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA B (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz; OLIVEIRA et al., 2016).....	146
TABELA 22 – DADOS DE RMN DE SV9 (ACETONA- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	150
TABELA 23 – DADOS DE RMN DE SV10 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	156
TABELA 24 – DADOS DE RMN DE SV11 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ENT-(5 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-15,16-EPOXI-10 <i>S</i> -HIDROXICLERODA-3,13(16),14-TRIENO-17,12 <i>S</i> ;18,19-DIOLÍDEO (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 200 MHz, ALMANZA et al., 1997)	166
TABELA 25 – DADOS DE RMN DE SV12 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 7,8β-DIIDROSALVIACOCINA (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz, ORTEGA et al., 2017; PIRIDINA- <i>d</i> ₅ , 90 MHz, SAVONA et al., 1982).....	172
TABELA 26 – DADOS DE RMN DE ¹ H DE SV13 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	177

TABELA 27 – DADOS DE RMN DE SV14 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 7- <i>epi</i> -SALVIANDULINA A (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 200 MHz, ALMANZA et al., 1997)	184
TABELA 28 – DADOS DE RMN DE SV15 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO OLEANÓLICO (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 400 MHz, DAIS et al., 2017)...	191
TABELA 29 – DADOS DE RMN DE SV16 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM O ÁCIDO MASLÍNICO (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 850 MHz, DAIS et al., 2017)	197
TABELA 30 – DADOS DE RMN DE SV17 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	202
TABELA 31 – DADOS DE RMN DE SV18 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO URSÓLICO (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> , 850 MHz, DAIS et al., 2017).....	208
TABELA 32 – DADOS DE RMN DE SV19 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO HETEROBETULÍNICO (PIRIDINA- <i>d</i> ₆ , 360 MHz, LOBO-ECHEVERRI et al., 2005)	214
TABELA 33 – DADOS DE RMN DE SV20 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO PARA O ÁCIDO ROSMARINÍCO (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz, KUHNT et al., 1994)	220
TABELA 34 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>S. lachnostachys</i>	222
TABELA 35 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) <i>in vitro</i> DE DITERPENOS ISOLADOS DE <i>S. lachnostachys</i>	223
TABELA 36 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DE <i>S. melissiflora</i>	224
TABELA 37 – ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>in vitro</i> DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>S. MELISSIFLORA</i> CONTRA LINHAGENS DE CELULAS TUMORAIS HUMANAS (CI ₅₀ µg mL ⁻¹)	225

TABELA 38 – RELAÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO SEQUENCIAL DO EXTRATO BRUTO (ML) DAS FOLHAS DE <i>Myrcia selloi</i>	251
TABELA 39 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO MLD DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	252
TABELA 40 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MLD21 DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	252
TABELA 41 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MLD35 DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	253
TABELA 42 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO MLA DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	255
TABELA 43 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MLA5 DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	255
TABELA 44 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MLA8 DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	256
TABELA 45 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO MLA13 DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	257
TABELA 46 – RELAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NA ESPÉCIE <i>M. selloi</i>	262
TABELA 47 – DADOS DE RMN DE MS1 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz, PAULI et al., 1998; METANOL- <i>d</i> ₄ 300 MHz, LEE et al., 2010)	270
TABELA 48 – DADOS DE RMN DE MS2 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O CLOROGENATO DE METILA (METANOL- <i>d</i> ₄ , 300 MHz, LEE, et al 2010)	276
TABELA 49 – DADOS DE RMN DE MS3 (CLOROFÓRMIO- <i>d</i> + GOTAS DE METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O CLOROGENATO DE ETILA (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz, YOUN et al., 2015)	281
TABELA 50 – DADOS DE RMN DE MS4 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O NEO-CLOROGENATO DE ETILA (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz, YOUN et al., 2015)	286
TABELA 51 – DADOS DE RMN DE MS5 (METANOL- <i>d</i> ₄ , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O	

CRIOCLOROGENATO DE ETILA (DMSO- d_6 , 400 MHz, GE et al., 2018).....	290
TABELA 52 – DADOS DE RMN DE MS6 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) COM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA QUERCETINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, ESPOSITO et al., 2013) .	296
TABELA 53 – DADOS DE RMN DE MS7 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O HIPEROSÍDEO (METANOL- d_4 , 600 MHz, RENDA et al., 2018)	303
TABELA 54 - DADOS DE RMN DE MS8 (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A ISOQUERCITRINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, FERNANDEZ et al., 2005).....	308
TABELA 55 – DADOS DE RMN DE MS9 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D ₂ O, 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A 3-O- β -(6''-GALOIL)-GALACTOSILQUERCETINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, KADOTA et al., 1990)	313
TABELA 56 – DADOS DE RMN DE M10 (METANOL- d_4 , 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O CANFEROL (METANOL- d_4 , 600 MHz, BAEK et al., 2015).....	318
TABELA 57 – DADOS DE RMN DE MS11 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A ASTRAGALINA (ACETONA- d_6 , 500 MHz, TUYEN et al., 2020).....	322
TABELA 58 – DADOS DE RMN DE MS12 (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D ₂ O, 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 3-O- β -GLICOSILRAMNOCITRINA (METANOL- d_4 , 400 MHz, NISHINA et al., 2017)	327
TABELA 59 – DADOS DE RMN DE MS15 (ACETONA- d_6 , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA EUGENIINA (ACETONA- d_6 , 100 MHz, NONAKA et al., 1980; DMSO- d_6 , 600 MHz, LIU et al., 2019)	336
TABELA 60 – ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>M. selloi</i>	338

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACN	-	Acetonitrila
AcOEt	-	Acetato de Etila
CC	-	Cromatografia líquida em coluna aberta
CCDA	-	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	-	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	-	Dupleto
dd	-	Duplo-dupleto
ddd	-	Duplo-duplo-dupleto
dddd	-	Duplo-duplo-duplo-dupleto
dt	-	Duplo tripleto
EM-AR	-	Espectrometria de massas de alta resolução
EP	-	Éter de petróleo
EtOH	-	Etanol
Hept	-	Hepteto
HEX	-	Hexano
HMBC	-	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (Correlação heteronuclear à múltiplas ligações)
HSQC	-	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i> (Correlação heteronuclear a uma ligação)
IV	-	Infravermelho
MeOH	-	Metanol
MTT	-	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ORAC	-	Oxygen Radical Absorbance Capacity
q	-	Quarteto
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
s	-	Simpleto
t	-	Tripleto
TMS	-	Tetrametilsilano
t _R	-	Tempo de retenção
UV-vis	-	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	43
CAPÍTULO 1 - ESTUDO DAS ESPÉCIES <i>Salvia lachnostachys</i> E <i>Salvia melissiflora</i>	45
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	45
1.1.1 A Família Lamiaceae.....	45
1.1.2 O gênero <i>Salvia</i>	46
1.1.3 Metabólitos especializados do gênero <i>Salvia</i>	49
1.1.3.1 Alguns terpenoides do gênero <i>Salvia</i>	49
1.1.3.2 Biossíntese dos diterpenos.....	56
1.1.3.3 Substâncias fenólicas do gênero <i>Salvia</i>	62
1.1.4 A espécie <i>Salvia lachnostachys</i>	64
1.1.5 A espécie <i>Salvia melissiflora</i>	69
1.2 JUSTIFICATIVA.....	70
1.3 OBJETIVOS.....	71
1.3.1 Objetivo geral.....	71
1.3.2 Objetivos específicos	71
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS	72
1.4.1 Procedimentos gerais.....	72
1.4.1.1 Cromatografia Líquida a Pressão Reduzida e Cromatografia Líquida em Coluna 72	
1.4.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Analítica e Preparativa	72
1.4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	73
1.4.1.4 Ressonância Magnética Nuclear	73
1.4.1.5 Solventes.....	74
1.4.1.6 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta/Visível.....	74
1.4.1.7 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	75
1.4.1.8 Rotação específica	75
1.4.1.9 Espectrometria de Massas de Alta Resolução.....	75
1.4.2 Materiais vegetais	76
1.4.3 Preparação dos extratos	76
1.4.4 Isolamento das substâncias de <i>Salvia lachnostachys</i> e <i>S. melissiflora</i>	77
1.4.4.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de <i>S. lachnostachys</i>	77

1.4.4.1.1	Isolamento dos constituintes químicos da fração LFA	78
1.4.4.1.2	Isolamento dos constituintes químicos da fração LFC	80
1.4.4.1.3	Isolamento dos constituintes químicos das frações LFD e LFE	83
1.4.4.2	Isolamento dos constituintes químicos dos caules de <i>S. lachnostachys</i>	84
1.4.4.3	Isolamento dos constituintes químicos das partes aéreas de <i>S. melissiflora</i>	85
1.4.5	Ensaio de atividade biológica	88
1.4.5.1	Ensaio de atividade antioxidante	88
1.4.5.2	Ensaio de atividade citotóxica	89
1.5	DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	92
1.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
1.6.1	Identificação dos diterpenos tipo <i>nor</i> -icetexanos	98
1.6.1.1	Identificação de SV1 e SV2	99
1.6.1.2	Identificação de SV3 e determinação estrutural de SV4	112
1.6.1.3	Determinação estrutural de SV5 e SV6	122
1.6.1.4	Determinação estrutural de SV7	132
1.6.2	Identificação dos diterpenos tipo <i>dinor</i> -icetexanos	140
1.6.2.1	Identificação de SV8 e determinação estrutural de SV9	141
1.6.2.2	Determinação estrutural de SV10	152
1.6.3	Proposta de biogênese para os icetexanos identificados (SV1-SV10)	157
1.6.4	Identificação dos diterpenos tipo clerodano	159
1.6.4.1	Identificação de SV11 e determinação estrutural de SV12	160
1.6.4.2	Determinação estrutural de SV13	173
1.6.4.3	Identificação de SV14	177
1.6.5	Identificação dos triterpenos	184
1.6.5.1	Identificação de SV15	185
1.6.5.2	Identificação de SV16	192
1.6.5.3	Identificação de SV17	198
1.6.5.4	Identificação de SV18	203
1.6.5.5	Identificação de SV19	209
1.6.6	Identificação da substância fenólica	215
1.6.6.1	Identificação de SV20	215
1.6.7	Ensaio de atividade antioxidante	221
1.6.8	Ensaio de atividade citotóxica	225

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA ESPÉCIE <i>Myrcia selloi</i>	226
2.1 REVISÃO DA LITERATURA	226
2.1.1 A família Myrtaceae	226
2.1.2 O gênero <i>Myrcia</i>	227
2.1.3 Metabolismo especializado do gênero <i>Myrcia</i>	229
2.1.3.1 Monoterpenos e sesquiterpenos	229
2.1.3.2 Triterpenos	231
2.1.3.3 Ácidos orgânicos	232
2.1.3.4 Flavonoides	233
2.1.3.5 Taninos	238
2.1.4 Biossíntese das substâncias fenólicas	239
2.1.5 A espécie <i>Myrcia selloi</i>	246
2.2 JUSTIFICATIVA	249
2.3 OBJETIVOS	249
2.3.1 Objetivo geral	249
2.3.2 Objetivos específicos	249
2.4 MATERIAS E MÉTODOS	250
2.4.1 Procedimentos gerais	250
2.4.2 Material vegetal	250
2.4.3 Preparação do extrato e frações	251
2.4.4 Isolamento das substâncias das folhas de <i>M. selloi</i>	251
2.4.4.1 Isolamento dos constituintes químicos da fração MLD	251
2.4.4.2 Isolamento dos constituintes químicos da fração MLA	254
2.4.5 Ensaio de atividade biológica	258
2.4.5.1 Ensaio de atividade citotóxica	258
2.5 DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	259
2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	262
2.6.1 Identificação dos ésteres do ácido quínico	262
2.6.1.1 Identificação de MS1	264
2.6.1.2 Identificação de MS2	271
2.6.1.3 Identificação de MS3 e MS4	276
2.6.1.4 Identificação de MS5	286
2.6.2 Identificação dos flavonoides	290

2.6.2.1 Identificação de MS6	292
2.6.2.2 Identificação de MS7 e MS8	297
2.6.2.3 Identificação de MS9	308
2.6.2.4 Identificação de MS10	314
2.6.2.5 Identificação de MS11	318
2.6.2.6 Identificação de MS12	322
2.6.3 Identificação do tanino	327
2.6.3.1 Identificação de MS13	328
2.6.4 Ensaios de atividade biológica	337
2.6.4.1 Ensaios de atividade citotóxica	337
CONCLUSÃO GERAL	339
REFERÊNCIAS	341

INTRODUÇÃO GERAL

Todos os organismos vivos metabolizam inúmeras substâncias orgânicas no decorrer de sua existência. As substâncias responsáveis pela sobrevivência, crescimento e reprodução são aquelas que são consideradas essenciais para a vida, como os carboidratos, as proteínas, as gorduras e os ácidos nucleicos, as quais são comuns para todos os organismos vivos. Essas substâncias são denominadas de metabólitos primários, e o conjunto de reações químicas que as produzem é denominado metabolismo primário (DEWICK, 2009). Já o metabolismo secundário ou especializado, o qual resulta na formação dos denominados produtos naturais, é aquele que não é essencial para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução do organismo. São aquelas substâncias orgânicas produzidas como defesa em resposta ao ataque de predadores, ou como adaptação às condições climáticas, taxa de nutrientes, dentre outros fatores ambientais. As fontes de metabólitos especializados são organismos vegetais, bactérias, fungos e organismos marinhos, sendo que os vegetais são a principal fonte dessas substâncias. Além disso, os produtos naturais que são produzidos variam de acordo com cada família e gênero. Essas substâncias podem ser classificadas em três grandes grupos, os quais incluem os terpenoides, substâncias fenólicas e nitrogenadas. Essa classificação é dada de acordo com as semelhanças estruturais e propriedades físico-químicas (DEWICK, 2009; GOBBONETO, 2007; VAISHNAV; DEMAINE, 2010).

De fato, é conhecido que os organismos vegetais são uma rica fonte de metabólitos secundários, que se reflete em diversos tipos de substâncias, com diferentes esqueletos carbônicos. Em função desta diversidade química e biológica que a natureza fornece, muitos dessas substâncias podem apresentar várias atividades biológicas relevantes, vindo a ser usadas para fins farmacológicos, como muitas que já são empregadas em terapias atuais (RIBEIRO et al., 2018).

Consequentemente, a área de química de produtos naturais vem constantemente buscando, principalmente, a descoberta destes fármacos promissores ou derivados de produtos naturais, bem como avaliar seus potenciais terapêuticos (BERNARDINI et al., 2018). Estima-se que 21 % das substâncias farmacêuticas incluídas na *The International Pharmacopeia* (PH. Int) são de origem natural ou derivados de produtos naturais (ZHANG et al., 2020). Outro exemplo da importância desses produtos naturais é que dos 38 medicamentos aprovados em

2019 pela *U. S Food and Drug Admintration* (FDA, EUA), nove eram de origem natural (TORRE; ALBERICIO, 2019).

Nesse contexto, o Brasil é uma importante fonte de produtos naturais, devido a sua grande biodiversidade. O Brasil abriga uma variedade de ecossistemas, incluindo a região amazônica, considerada a maior floresta tropical do mundo, além do cerrado, conhecido como a savana brasileira. De acordo com RIBEIRO et al (2018) o Brasil apresenta mais de 45.000 espécies vegetais, compreendendo cerca de 22 % do número total de espécies de plantas do mundo. Embora existam inúmeras espécies vegetais, muitas delas ainda não foram investigadas do ponto de vista químico e/ou biológico. Sendo assim, existe uma vasta flora a ser investigada, em busca de novos fármacos promissores.

Deste modo, o presente trabalho busca enriquecer o conhecimento químico da flora brasileira, bem como a busca de possíveis fármacos. Sendo assim, foram selecionadas três espécies de ocorrência natural no estado do Paraná para um estudo fitoquímico e avaliação de algumas atividades biológicas.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. O **Capítulo 1** irá abordar o estudo das espécies *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora* (Lamiaceae). Já o **Capítulo 2** descreverá os estudos com a espécie *Myrcia selloi* (Myrtaceae).

CAPÍTULO 1 - ESTUDO DAS ESPÉCIES *Salvia lachnostachys* E *Salvia melissiflora*

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 A Família Lamiaceae

A família Lamiaceae (conhecida antigamente por Labiatae) é uma das maiores famílias pertencentes ao grupo das Angiospermas (plantas com flores). É composta por aproximadamente 7.300 espécies, distribuídas em 236 gêneros, espalhadas ao redor do mundo (SITAREK et al., 2020; HARLEY et al., 2021). No Brasil, a família está representada por 70 gêneros e 589 espécies, sendo que 356 possui endemismo brasileiro. As lamiáceas variam desde ervas (anuais, bianuais ou perenes), subarbustos ou árvores. Suas espécies podem ser encontradas em todas as regiões do país em sistema de vegetação aberta, com climas tropicais e subtropicais (HARLEY et al., 2021).

As lamiáceas são plantas aromáticas, devido à presença marcante de óleos essenciais. Além disso, são frequentemente empregadas na conservação de alimentos e na medicina popular. Os representantes da família mais conhecidos no Brasil são: tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origamum vulgare*), manjerição (*Ocimum basilicum*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), hortelã (*Mentha piperita*) e sálvia (*Salvia officinalis*) que são utilizados como especiarias na culinária e na preparação de chás, para diversos tipos de enfermidade, mas principalmente para problemas respiratórios. É considerada economicamente importante, tanto pela sua grande diversidade e distribuição ao redor do mundo, como pelas propriedades aromáticas e medicinais de suas espécies (LORENZI; MATOS, 2002; SITAREK et al., 2020).

O perfil químico das espécies de Lamiaceae é muito diversificado, por compreender inúmeras espécies, cada uma delas produzindo seus próprios metabólitos secundários. Os principais constituintes químicos da família são substâncias fenólicas (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas, ligninas, cumarinas, antraquinonas e xantonas) e terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos e triterpenos). Os terpenóides podem ser voláteis, como os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados nos óleos essenciais, ou fixos como os

diterpenos e triterpenos, isolados a partir de extratos obtidos com solventes orgânicos (SITAREK et al., 2020). Muitas destas substâncias apresentam atividades biológicas relevantes, incluindo antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-inflamatória, antiviral, citotóxica e antitumoral (SITAREK et al., 2020).

Vários gêneros desta família, como *Hyptis*, *Lavandula*, *Leonotis*, *Leonurus*, *Marrubium*, *Melissa*, *Mentha*, *Ocimum*, *Origanum*, *Thymus* e *Salvia*, contêm espécies consideradas medicinais, cujas propriedades biológicas foram comprovadas por ensaios farmacológicos (LORENZI; MATOS, 2002).

1.1.2 O gênero *Salvia*

O gênero *Salvia* é considerado o maior gênero da família Lamiaceae, compreendendo cerca 1000 espécies, as quais são amplamente distribuídas nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais de todo o mundo. Os principais centros de diversidade são as regiões da América Central e América do Sul, Ásia Central e Mediterrâneo e Ásia Oriental. Algumas espécies do gênero são cultivadas em todo o mundo; entretanto muitas delas possuem uma distribuição restrita, sendo endêmicas de algumas regiões (MIRZAEI et al., 2017; DREW et al., 2017; SHARIFI-RAD et al., 2018; MOTA et al., 2020).

Espécies de *Salvia* podem apresentar uma grande diversidade morfológica, mas a grande maioria de suas espécies apresenta hábito herbáceo, perene, e com flores atraentes, de cores variadas. O gênero possui grande importância econômica, destacando-se o uso ornamental e, principalmente alimentício e medicinal, com aproximadamente 150 espécies sendo utilizadas para esse fim (TOPÇU, 2006; DIZKIRICI, 2015).

Em muitos países as plantas deste gênero são utilizadas na medicina popular para diversos tipos de enfermidades, como dores de cabeça e estômago, problemas pulmonares e urinários, diversos tipos de infecções, transtornos hepáticos e febre (WU et al., 2012; JASSBI et al., 2016). O nome *Salvia* provém da palavra latina “salvare” que significa “curar”, devido ao seu histórico de utilização desde os tempos antigos na medicina popular (RUSSO et al., 2016).

Dentre as inúmeras espécies do gênero, a espécie *Salvia officinalis* (FIGURA 1) merece um destaque especial, por ser amplamente conhecida no Brasil, e usada na culinária e na medicina popular. Conhecida popularmente com o nome de sálvia,

tem inúmeros estudos químicos e biológicos. *S. officinalis* é endêmica do Mediterrâneo, porém, atualmente é cultivada em todo o mundo, principalmente nos países da Europa e na América do Norte (GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017). No Brasil há ocorrência da espécie nas regiões Sul e Sudeste do país (OLIVEIRA et al., 2021). Na medicina popular a espécie *S. officinalis* é utilizada no tratamento de diferentes tipos de transtornos como: convulsões, úlceras, gota, reumatismo, inflamações, tonturas, tremores, paralisia, diarreia e hiperglicemia. Apresenta diversas atividades farmacológicas comprovadas, incluindo atividade citotóxica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana (GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017).

Outra espécie que é muito conhecida, devido aos seus efeitos psicoativos, é a *Salvia divinorum* (FIGURA 1). Esta espécie é endêmica do México, e seu nome significa “sálvia dos divinos”, devido a sua utilização em cerimônias religiosas pela população indígena mexicana da tribo Mazateca. Além do seu uso em rituais, também é empregada na medicina popular para o tratamento de diarreia, inflamações abdominais, dor de cabeça e reumatismo (HARDING et al., 2005).

FIGURA 1 – IMAGEM DAS ESPÉCIES *Salvia officinalis* (A) E *Salvia divinorum* (B) COM DETALHES DAS FOLHAS E FLORES



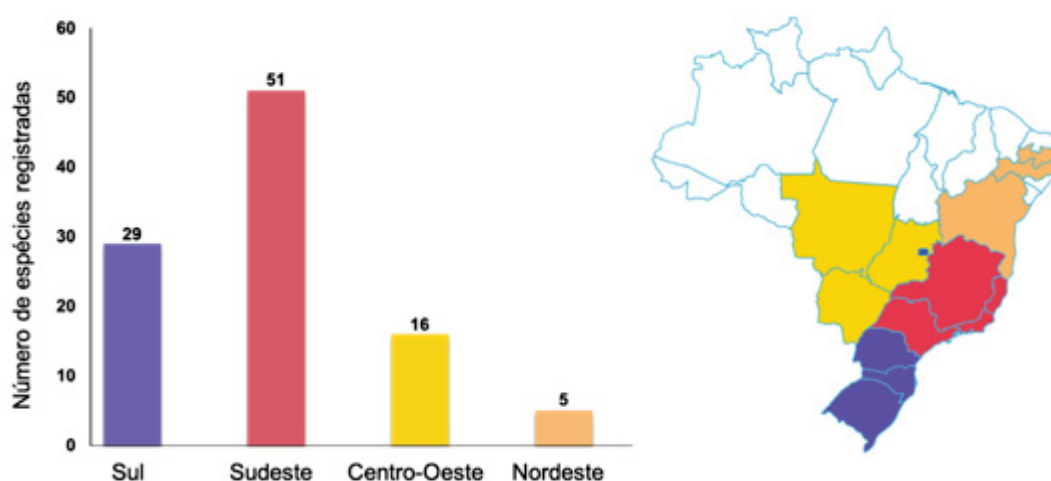
FONTE: OLIVEIRA et al., 2021 (A); www.volteface.me (B).

No Brasil são encontradas 70 espécies de *Salvia*, das quais oito são exóticas, ou seja, não ocorrem naturalmente no país: *S. coccinea*, *S. farinacea*, *S. hispanica*, *S. involucrata*, *S. leucantha*, *S. microphylla*, *S. officinalis* e *S. pratensis*. Estas são cultivadas em vários estados brasileiros devido ao seu uso na culinária, na medicina popular, e como ornamental (HARLEY et al., 2021). *Salvia* apresenta um grande grau

de endemismo no Brasil, pois dentre as 62 espécies nativas, 48 espécies são consideradas endêmicas.

As espécies de *Salvia* nativas já foram confirmadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do país, sendo que a região Sudeste apresenta a maior ocorrência de espécies de *Salvia*. Suas plantas podem se desenvolver em biomas do tipo cerrado, caatinga e principalmente na Mata Atlântica (FIGURA 2). No estado do Paraná ocorrem 17 espécies (HARLEY et al., 2021).

FIGURA 2 – REGIÕES DO BRASIL COM OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Salvia*



FONTE: Adaptado de HARLEY et al., 2021.

A quantidade de espécies no Brasil é relativamente pequena considerando o tamanho do gênero. Muitas delas são utilizadas como plantas ornamentais. Uma espécie amplamente utilizada para essa finalidade é a *Salvia splendens* (FIGURA 3). Conhecida popularmente como alegria-dos-jardins, possui floração avermelhada, que é uma característica marcante desta espécie. *S. splendens* é endêmica do Brasil e amplamente cultivada para o paisagismo (PIVETA et al., 2007). Na cidade de Curitiba-PR essa espécie é utilizada no paisagismo de pontos turísticos da cidade, principalmente na época natalina (FIGURA 3).

FIGURA 3 – IMAGEM DA ESPÉCIE *Salvia splendens* UTILIZADA NO PAISAGISMO EM PONTOS TURÍSTICOS DA CIDADE DE CURITIBA-PR



FONTE: www.curitiba.pr.gov.br.

Como já mencionado, as representantes do gênero *Salvia* possuem diversos usos na medicina popular. Devido a essa característica marcante do gênero, há diversos relatos de atividades biológicas, os quais estão relacionados aos metabólitos especializados presentes em suas espécies. A grande diversidade destes metabólitos, bem como o número elevado de espécies já estudadas, inviabiliza uma revisão completa de todos os estudos fitoquímicos e biológicos já realizados com espécies de *Salvia*. Sendo assim, foram selecionados os principais tipos de metabólitos secundários presentes em algumas espécies de *Salvia*, a fim de ilustrar o perfil químico do gênero, bem como as suas principais atividades biológicas.

1.1.3 Metabólitos especializados do gênero *Salvia*

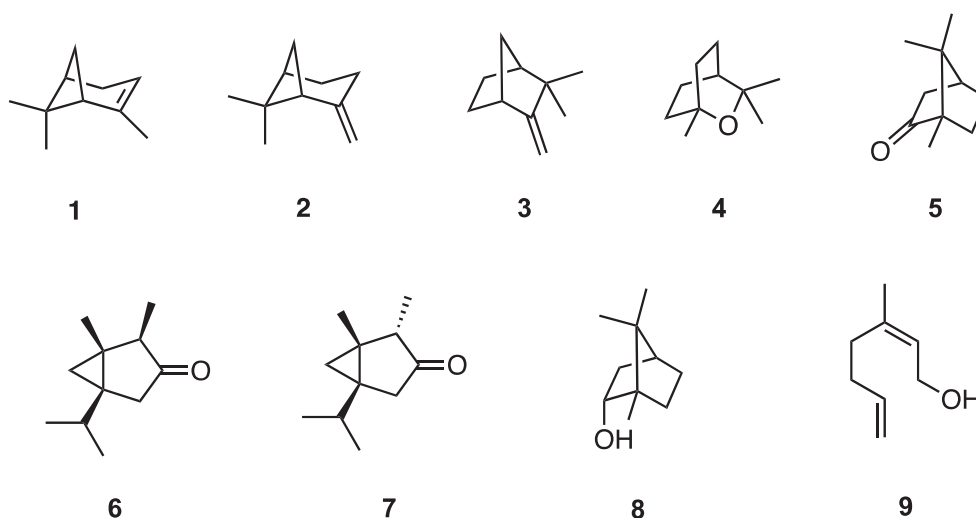
Os principais metabólitos especializados das espécies de *Salvia* são substâncias fenólicas, flavonoides e terpenoides voláteis (monoterpenos e sesquiterpenos) e fixos (diterpenos e triterpenos) (TOPÇU, 2006; CIOFFI et al., 2008). Dentre estes, os terpenóides se destacam, principalmente os diterpenos que são considerados o maior grupo de metabólitos secundários presente nas espécies do gênero *Salvia* (WU et al., 2012).

1.1.3.1 Alguns terpenoides do gênero *Salvia*

As espécies de *Salvia* são reconhecidas pelos seus óleos essenciais, os quais são constituídos principalmente por terpenoides das classes dos monoterpenos e sesquiterpenos. *Salvia officinalis* e *S. triloba*, duas espécies exóticas cultivadas no Rio

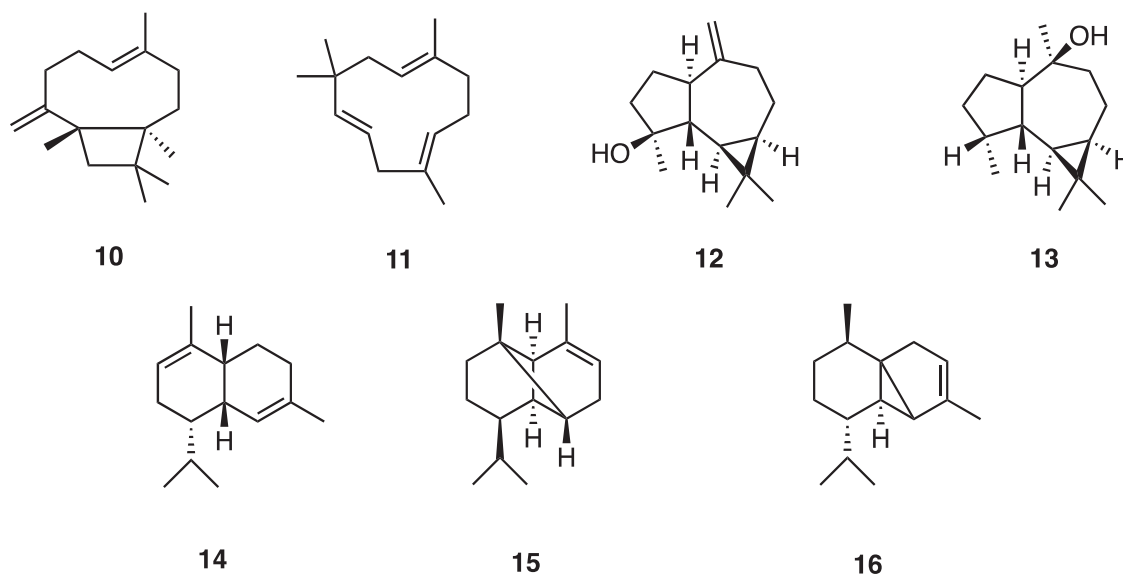
Grande do Sul revelaram a presença do vinte e sete monoterpenos na composição total do óleo essencial. Os principais monoterpenos foram os isômeros α -pineno (**1**) β -pineno (**2**), e canfeno (**3**), além dos monoterpenos oxigenados, eucaliptol (**4**), cânfora (**5**), α -tujona (**6**), β -tujona (**7**), barneol (**8**) e mirceno (**9**) (FIGURA 4). Nestas espécies, o monoterpeno **6** foi o representante majoritário, pois atingiu 24,8 % na composição total do óleo essencial de *S. officinalis* e 20,1% em *S. triloba* (DELAMARE et al., 2007).

FIGURA 4 – MONOTERPENOS MAJORITÁRIOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS ESPÉCIES *Salvia officinalis* E *S. triloba*

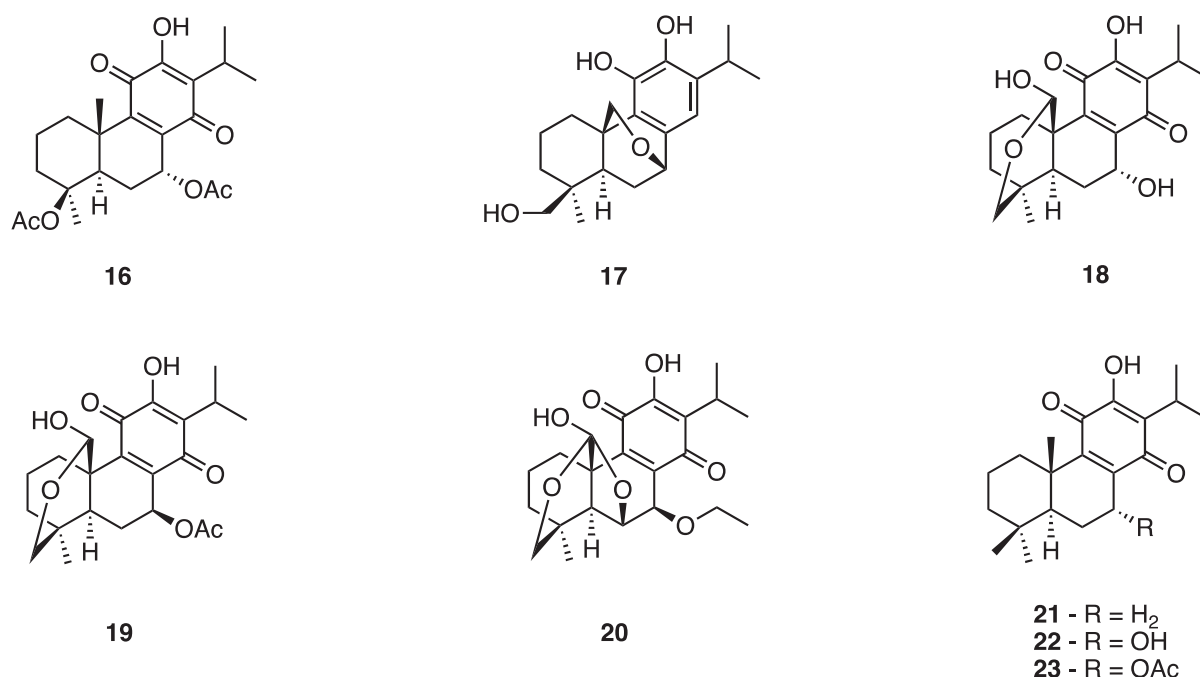


S. officinalis relevou também a presença de dois sesquiterpenos, *E*-cariofileno (**10**) e α -humuleno (**11**), sendo que ambos apresentaram atividade citotóxica contra adenocarcinoma renal (ACHN) e carcinoma de próstata (LNCaP) (LOIZZO et al., 2017; EL-HADRI et al., 2010). Já a espécie *S. borjensis*, nativa do Brasil, revelou que seu óleo essencial contém principalmente os sesquiterpenos espatulenol (**12**, 32,8 %) e **10** (15,5%). *S. cordata*, uma espécie endêmica do Brasil, revelou que seu óleo essencial é constituído principalmente de globulol (**13**, 32,3 %), acompanhado de **12** (11,6 %) (PINTO, 2012). As espécies *S. aurea*, *S. judaica* e *S. viscosa*, todas endêmica do Líbano, contém em seus óleos essenciais os seguintes sesquiterpenos majoritários: α -amorfeno (**14**, 12,0%), α -copaeno (**15**, 8,7 %) e α -cubeno (**16**, 8,3 %) (FIGURA 5) (RUSSO et al., 2016).

FIGURA 5 – SESQUITERPENOS MOJORITÁRIOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS ESPÉCIES *Salvia officinalis*, *S. borjensis*, *S. cordata*, *S. aurea*, *S. judaica* E *S. viscosa*



Os diterpenos são os principais constituintes químicos de espécies do gênero *Salvia*, incluído aqueles com esqueleto abietano. Um exemplo é a *Salvia corrugata*, uma espécie originária da América do Sul (encontrada na Colômbia, Peru e Equador) e cultivada na Europa. É uma planta amplamente utilizada como ornamental. O seu estudo fitoquímico revelou uma pequena fração com cinco diterpenos abietanos, identificados como: $7\alpha,19$ -diacetoxi-roileanona (**16**), $11,12,19$ -trihidroxiabieta- $8,11,13$ -trieno (**17**), conacitona (**18**), $7\beta,20$ -hidroxi- $19,20$ -epoxiroileanona (**19**) e $7\beta,20$ -epoxi- 7β -etoxi- $6\beta,20:19,20$ -diepoxiroileanona (**20**) (FIGURA 6). Todos esses abietanos apresentaram atividade antimicrobiana em diversas cepas multirresistentes, em concentrações baixas (BISIO et al., 2008). As raízes de *Salvia officinalis* contêm os diterpenos abietanos roialeanona (**21**), herminona (**22**) e 7-O-acetil-herminona (**23**) (FIGURA 6) que apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células tumorais do tipo cólon humano, carcinoma (Caco-2) e hepatoma (HepG2). Além disso, os diterpenos foram capazes de realizar a quebra da fita de DNA em todos os tipos de linhagens testadas, em concentrações muito baixas ($1,0 \cdot 10^{-7} - 1,0 \cdot 10^7 \text{ mol L}^{-1}$) (SLAMENOVA et al., 2004).

FIGURA 6 – DITERPENOS ABIETANOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES *Salvia corrugata* e *S. officinalis*

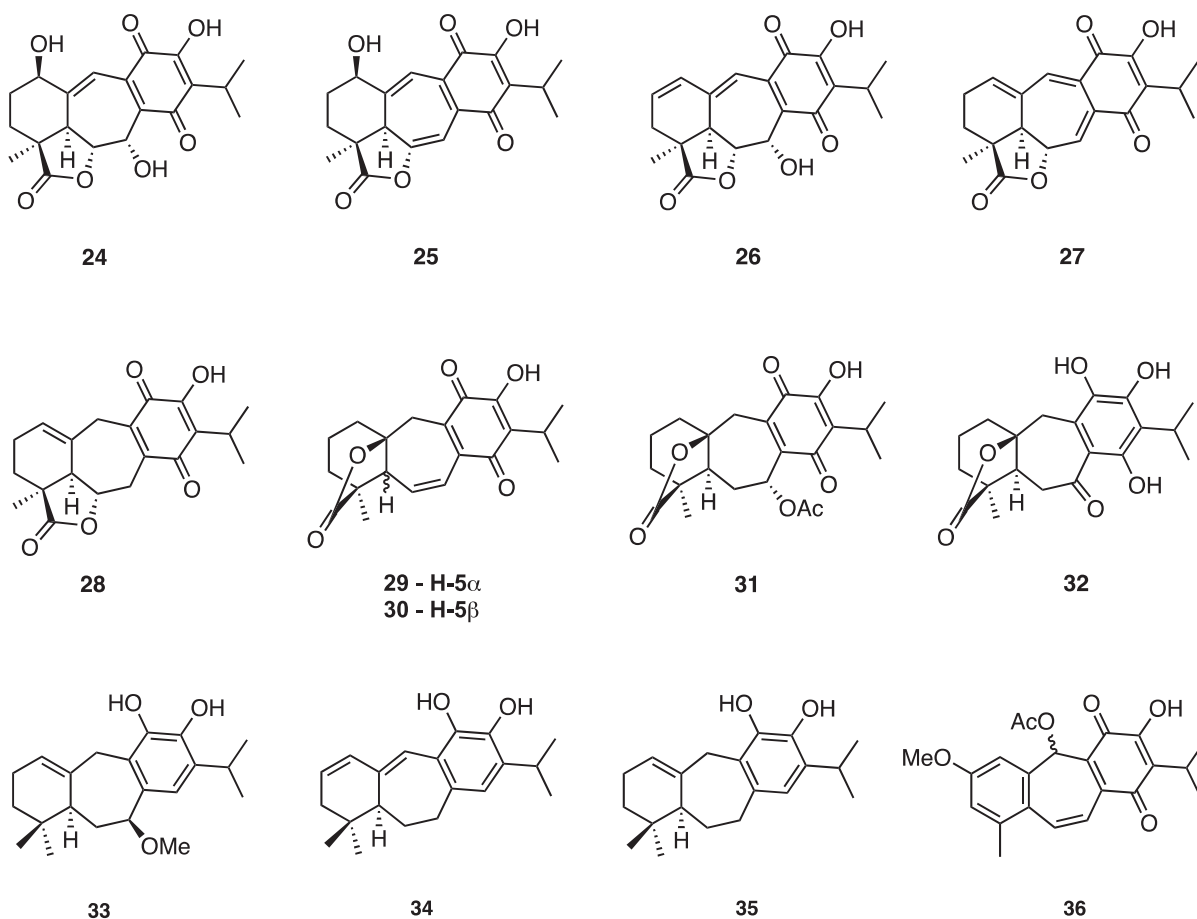
Os diterpenos abietanos podem sofrer rearranjos e originar outros esqueletos, como os icetexanos. As estruturas químicas dos icetexanos podem apresentar uma grande diversidade decorrente da presença de insaturações, além de grupos hidroxila, metoxila e carbonila nas mais diversas posições (SIMMONS; SARPONG, 2009). De maneira geral, os diferentes tipos de icetexanos apresentam inúmeras atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, anti-HIV, antimicrobiana, anti-inflamatória, hipotensiva, anti-hepatatóxica, antiviral e principalmente citotóxica (AHMAD et al., 2019).

As partes aéreas da espécie *Salvia ballatiflora*, nativa dos Estados Unidos e do México, revelaram a presença de oito diterpenos icetexanos: belotiquinona (**24**), 6,7-anidrobaloquinona (**25**), 1,2-anidrobaloquinona (**26**), anastomosina (**27**), 7,20-diidroanastomosina (**28**), icetexona (**29**), 7 α -acetoxi-6,7-diidroicetexona (**30**) e 6,7,11,14-tetraidro-7-oxo-icetexona (**31**) (FIGURA 7) (ESQUIVEL et al., 2017).

Destes, quatro icetexanos (**27**, **28**, **29** e **31**) foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica em quatro linhagens de células tumorais humanas (glioblastoma, U251; pulmão, SKLU-1; leucemia, COS-7; mama, K562). Todos os diterpenos avaliados apresentaram atividade citotóxica ($IC_{50} < 10,0 \mu M$). O maior potencial citotóxico foi registrado para os diterpenos **27** ($IC_{50} = 0,27 - 0,61 \mu M$) e **31** ($IC_{50} = 1,40 - 1,62 \mu M$) (ESQUIVEL et al., 2017). Adicionalmente, o icetexano 5-*epi*-icetexona

(epímero da icetexona, **30**) foi isolado das partes aéreas da espécie *S. giliensis* (nativa da Argentina). O estudo revelou que esse epímero exerce efeito antiproliferativo (*in vitro*) sobre os parasitas de *Tripanosoma cruzi* (responsável pela doença de Chagas) em concentrações baixas, atuando por múltiplos mecanismos (SANCHEZ et al., 2006). Estudos mais recentes indicam que **30** atua no mesmo sistema *in vivo* em camundongos, promovendo o aumento de vida dos roedores e diminuindo a proliferação do parasita, indicando que **30** pode ser um bom candidato para o uso terapêutico da doença de Chagas (RIBEIRO et al., 2020).

FIGURA 7 – DITERPENOS ABIETANOS COM ESQUELETO ICETEXANO ISOLADOS DAS ESPÉCIES *Salvia ballatiflora*, *S. giliensis*, *S. przewalski* E *S. corrugata*

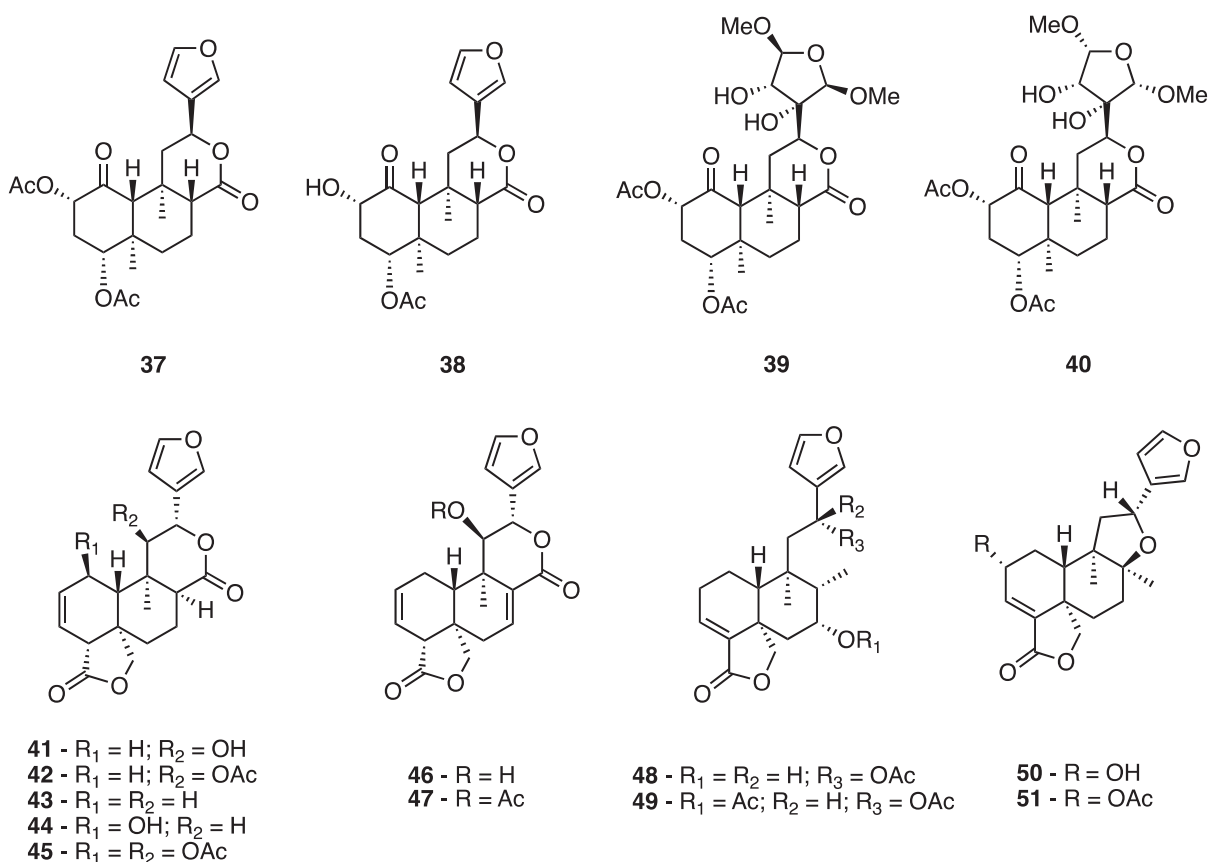


Salvia przewalski é amplamente distribuída na região norte da China. O extrato em acetona de suas partes aéreas revelou a presença de vários diterpenos, destacando-se os icetexanos przewalskina C (**33**), prewalkina D (**34**) e o barbatusol (**35**) (FIGURA 7) (XU et al., 2005). Outro icetexano chamado de fruticulina C (**36**) (FIGURA 7) foi isolado de *S. corrugata*, cujo estudo ainda revelou que esta substância

apresenta resposta quimiopreventiva (*in vivo*) em roedores em duas linhagens de células tumorais de hepatoma (Hepa1c1c7 e c35) (GIACOMELLI et al., 2013). Este estudo mais uma vez indica o potencial citotóxico dos diterpenos com esqueleto icetexano.

Diterpenos com esqueleto do tipo clerodano também são muito comuns em espécies de *Salvia*. A espécie *Salvia divinorum*, que já foi brevemente descrita, revelou a presença dos diterpenos, com esqueletos do tipo *neo-clerodano*, salvinorina A (**37**) e salvinorina B (**38**), além de seus derivados salvinicina A (**39**) e salvinicina B (**40**) (FIGURA 8). A substância responsável pelos efeitos psicoativos de *S. divinorum* é a salvinorina A (**37**), considerada a mais potente substância psicoativa natural. Por outro lado, a salvinorina B (**38**) não apresenta quaisquer efeitos psicoativos, apesar da semelhança estrutural com **37** (HARDING et al., 2005).

FIGURA 8 – DITERPENOS *neo*-CLERODANOS ISOLADOS DAS ESPÉCIES *Salvia divinorum* e *S. splendens*

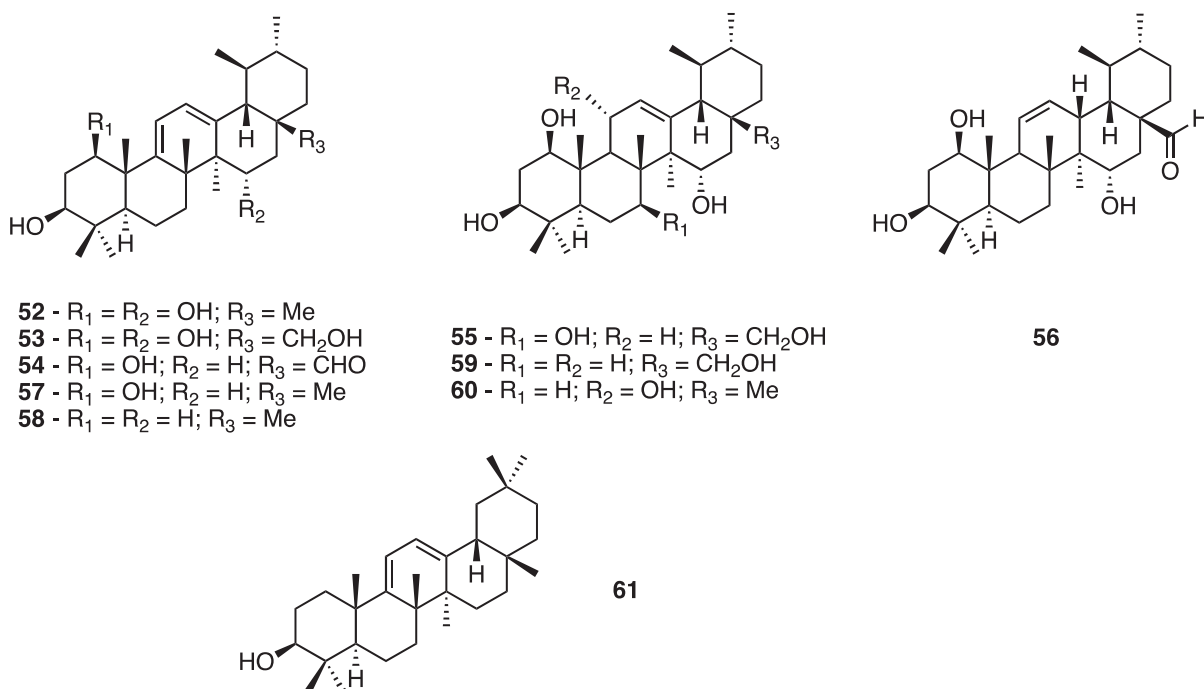


A espécie *Salvia splendens*, também revelou uma série de *neo-clerodanos*, presentes em suas flores, denominados salvisplendina A (**41**), splenolídeo B (**42**),

salviarina (**43**), splenolídeo A (**44**), splendina (**45**), salvisplendina B (**46**), 11-O-acetilsalvisplendina (**47**), salvisplendina C (**48**), 7-O-acetilsalvisplendina C (**49**), salvisplendina C (**50**) e 2-O-acetilsalvisplendina D (**51**) (FIGURA 8) (HU et al., 1997; FONTANA et al., 2006).

Outra classe de terpenoides muito comum no gênero *Salvia* são os triterpenos. O extrato em acetona das partes aéreas da espécie *S. argentea* (originária do Mediterrâneo) apresentou um total de dez triterpenos: 1 β ,3 β ,15 α -trihidroxi-ursan-9(11)-12-dieno (**52**), 1 β ,3 β ,15 α -tetrahidroxi-ursan-9(11),12-dieno (**53**), 1 β ,3 β ,15 α -dihidroxi-ursan-9(11),12-dieno-28-al (**54**), 1 β ,3 β ,7 β ,15 α ,28-pentahidroxi-ursan-12-eno (**55**), 1 β ,3 β ,15 α -trihidroxi-ursan-11-eno-28-al (**56**), 1 β ,3 β -dihidroxi-ursan-12-eno (**57**), 3 β -hidroxi-ursan-9(11),12-dieno (**58**), 1 β ,3 β ,7 β ,15 α ,28-tetrahidroxi-ursan-12-eno (**59**), 1 β ,3 β ,7 β ,11 α ,15 α -tetrahidroxi-ursan-12-eno (**60**) e 3 β -hidroxi-olean-9(11),12-dieno (FIGURA 9). E ainda, os triterpenos **53**, **54**, **56**, **59** e **60** revelaram atividade citotóxica moderada em duas linhagens de células tumorais humanas de leucemia (K592) e fibrosarcoma (HT1080). Além disso, os triterpenos **55** e **59** revelaram atividade antimicrobiana (BECHKRI et al., 2019).

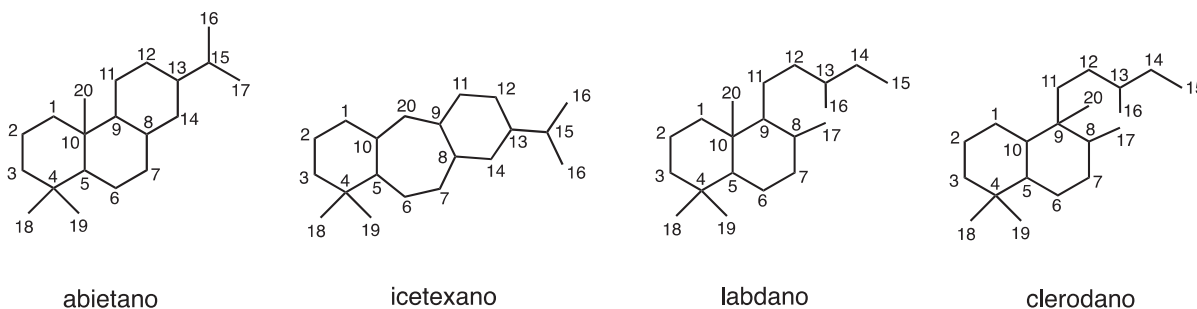
FIGURA 9 – TRITERPENOS ISOLADADOS DA ESPÉCIE *Salvia argentea*



1.1.3.2 Biossíntese dos diterpenos

Como já informado anteriormente, os diterpenos são os principais constituintes químicos em espécies de *Salvia*. São substâncias que possuem vinte átomos de carbono (C_{20}), e podem ser classificados de acordo com seu esqueleto básico, destacando-se os abietanos, labdanos e clerodanos (WU et al., 2012; JASSBI et al., 2016; BISIO et al., 2019). E ainda, esses esqueletos básicos podem sofrer diversos tipos de rearranjos estruturais originando outros esqueletos, como por exemplo, os icetexanos, que são formados através de um rearranjo do esqueleto abietano (FIGURA 10) (SIMMONS; SARPONG, 2009).

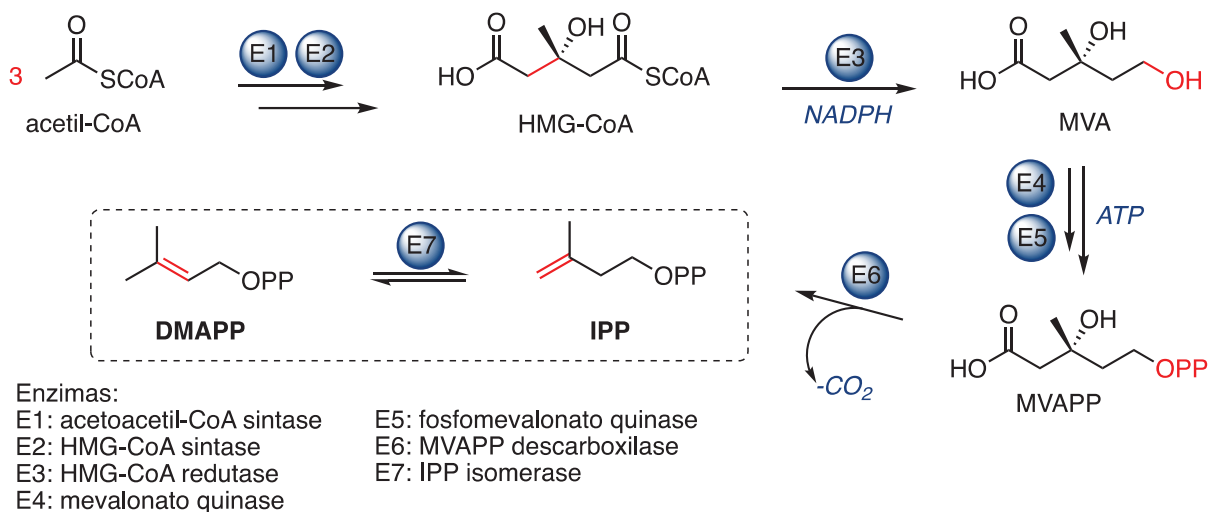
FIGURA 10 – ALGUNS ESQUELETOS BÁSICOS DOS DITERPENOS EM ESPÉCIES DE *Salvia*



No organismo vegetal os diterpenos são formados por meio de conexões de unidades isoprênicas, o difosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Os grupos isoprenoides são biossintetizados a partir de duas rotas principais, a rota do mevalonato (MEV) ou a via do metileritritol fosfato (MEP), sendo que ambas utilizam os isômeros IPP e DMAPP (DEWICK, 2009).

A rota do mevalonato (MEV) inicia-se através de condensações consecutivas de três moléculas de acetil-CoA, resultando no 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Posteriormente, o ácido mevalônico (MVA) é formado após a redução do tioéster (HMG-CoA) em um álcool primário, o qual é submetido a duas fosforilações sequenciais, e então, o ácido mevalônico-5-difosfato (MVAPP) é formado. Uma descarboxilação, seguida por uma desidratação fornece o IPP, que após uma isomerização específica, origina o DMAPP. As enzimas responsáveis por cada etapa estão representadas por E1-E7 (ESQUEMA 1) (DEWICK, 2009).

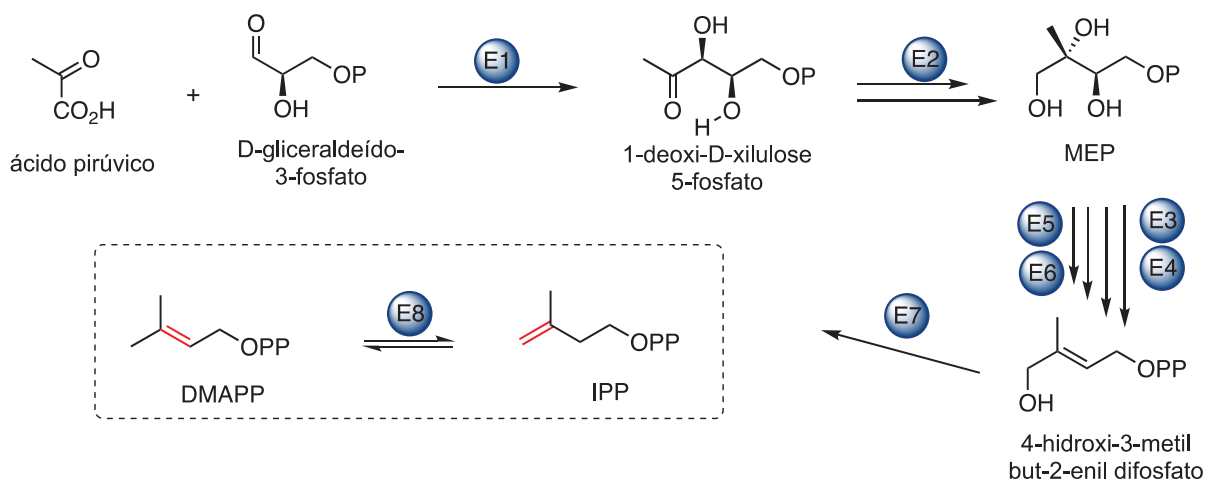
ESQUEMA 1 – ROTA BIOSINTÉTICA DO MEVALONATO (MEV)



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

A outra rota responsável pela biossíntese das unidades isoprênicas (IPP e DMAPP) é a via do metileritritol fosfato (MEP), a qual é iniciada com o ácido pirúvico. A biossíntese inicia-se com a condensação do ácido pirúvico com uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, originando o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Em seguida, ocorrem rearranjos estruturais, seguidos por uma redução para formar o 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Por sua vez, essa molécula pode sofrer uma série de reações, incluindo fosforilação e reduções, para formar a 4-hidroxi-3-metil-but-2-enil difosfato. E por fim, o grupo hidroxila é eliminado e os isômeros DMAPP e IPP são formados (ESQUEMA 2) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 2 – ROTA BIOSSINTÉTICA VIA METILERITRITOL FOSFATO (MEP)



Enzimas:

E1: 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXP sintase)

E2: 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (IspC)

E3: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintase (IspD)

E4: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinase (IspE)

E5: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (IspF)

E6: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase (IspG)

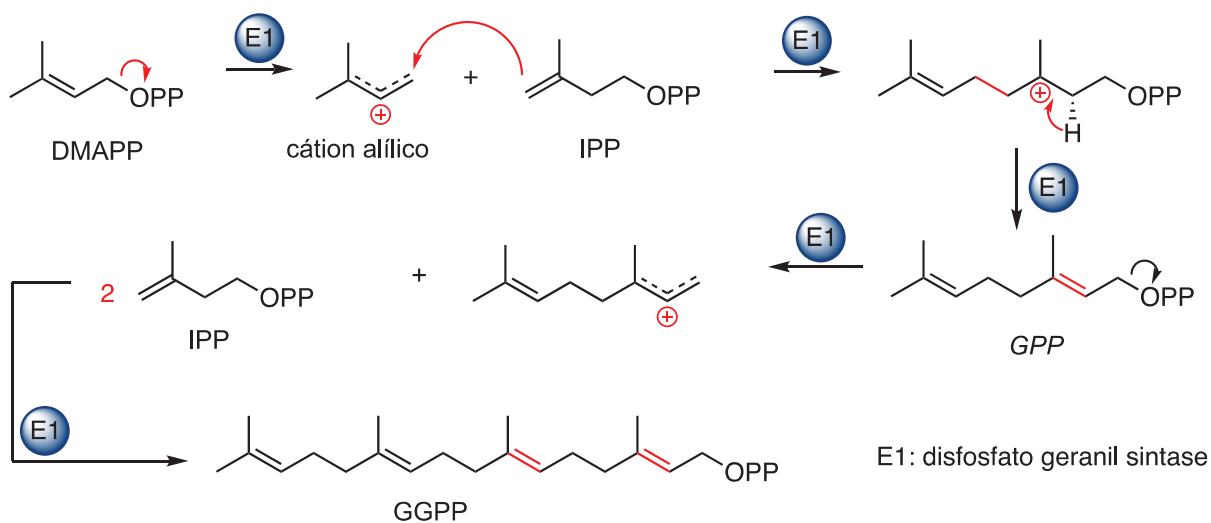
E7: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase (IspH)

E8: IPP isomerase

FONTE: Adaptado de DEWICK, 2009.

Após a formação dos isoprenoides, as cadeias mais longas dos diterpenos são originadas via conexões das unidades IPP e DMAPP (condensação “cabeça-cauda”). Esse processo de conexão entre os isoprenoides inicia-se com a formação de um carbocátion terciário, o qual é formado após a saída do grupo difosfato, presente no DMAPP. A espécie catiônica pode ser estabilizada via deslocalização eletrônica do cátion alílico. Já o IPP possui uma ligação dupla terminal, a qual atua como um nucleófilo. Na sequência, ocorre uma etapa de eliminação estereoespecífica, resultando no difosfato de geranila (GPP). Após a conexão de mais duas unidades de IPP ao GPP, é formado o difosfato de geranilgeranila (GGPP), que é o precursor dos diterpenos (ESQUEMA 3) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 3 – FORMAÇÃO DO PRECURSOR DOS DITERPENOS (GPP) APARTIR DAS CONEXÕES DAS UNIDADES ISOPRÊNICAS (DMAPP E IPP)

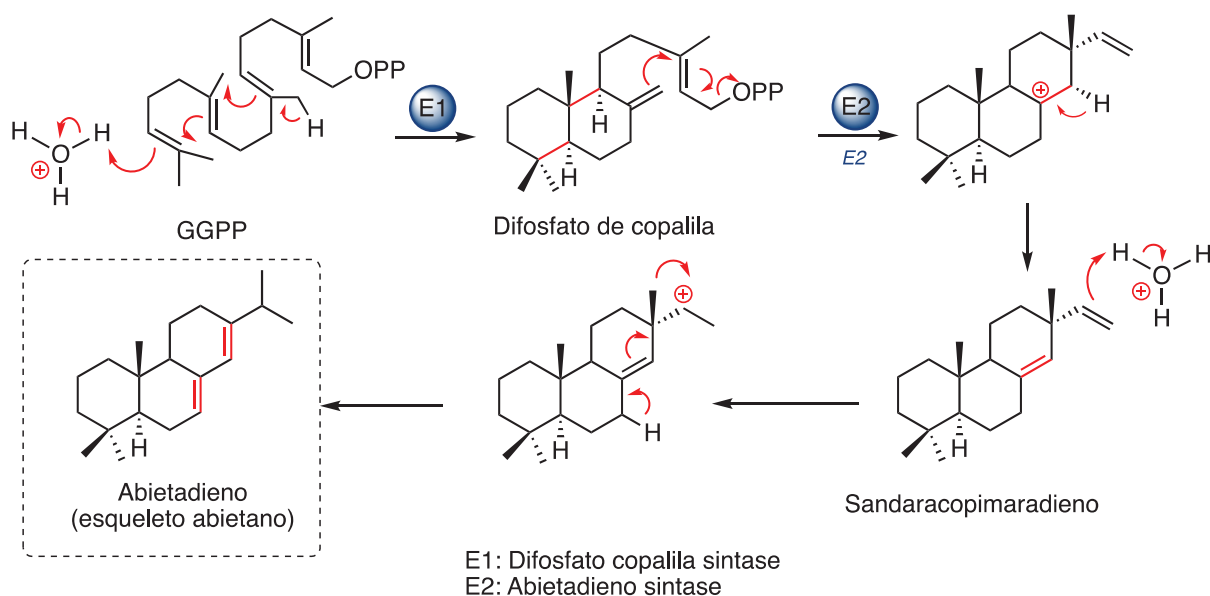


FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

A partir do GGPP os diterpenos são formados, e ainda podem sofrer diversos tipos de rearranjos e ciclizações, gerando os esqueletos básicos, como os abietanos, labdanos e clerodanos (FIGURA 10, p. 56) (JASSBI et al., 2016).

Os abietanos são formados a partir de uma ciclização eletrocíclica do GGPP, gerando o dissulfato de copalila. Em seguida, ocorre uma eliminação do grupo dissulfato, por um mecanismo E2 (eliminação bimolecular), e formação de um carbocátion terciário, favorecido pela perda de um átomo de hidrogênio, resultando no sandaracopimaradieno. Na sequência, um carbocátion é gerado, após a protonação da ligação dupla terminal. O cátion gerado é estabilizado pela migração de um grupo metila, gerando um grupo isopropila terminal, resultando então, no abietadieno, o qual apresenta o esqueleto básico dos abietanos (ESQUEMA 4) (DEWICK, 2009).

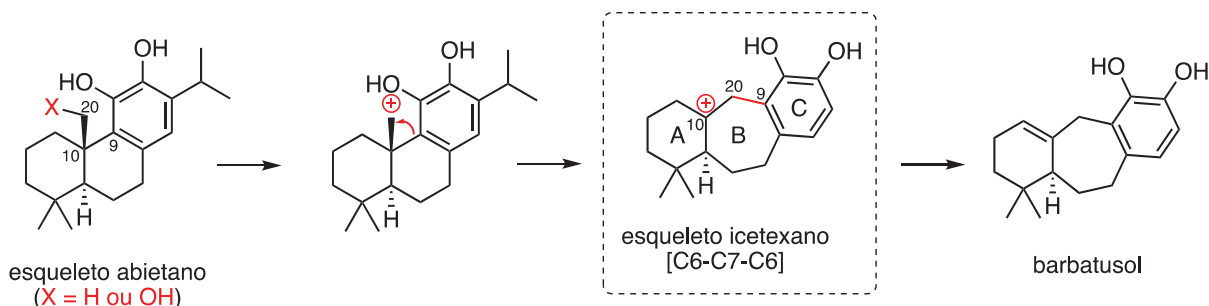
ESQUEMA 4 – ROTA BIOSSÍNTETICA DO ESQUELETO BÁSICO ABIETANO



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

Acredita-se que os diterpenos icetexanos são biossintetizados no organismo vegetal a partir de um rearranjo do esqueleto básico abietano. Diversas evidências sugerem que a biossíntese dos icetexanos ocorre a partir de um rearranjo do esqueleto básico abietano, originando uma estrutura fundida [C6-C7-C6], cujo nome sistemático é 9(10→20)-*abeo*-abietano. Segundo essa proposta, a biogênese dos icetexanos é iniciada pela ionização da posição C-20 do esqueleto abietano através da perda de um grupo hidroxila ou hidreto, formando um carbocátion primário, que é estabilizado pela migração da ligação C-10/C-20. Após a migração, um carbocátion terciário é formado, resultando na expansão do anel B para sete membros, que após uma desprotonação gera uma ligação dupla carbono-carbono. A hipótese desse rearranjo foi confirmada por meio da síntese do icetexano barbatusol, realizada por Kelecom (ESQUEMA 5) (KELECOM, 1983; SIMMONS; SARPONG, 2009).

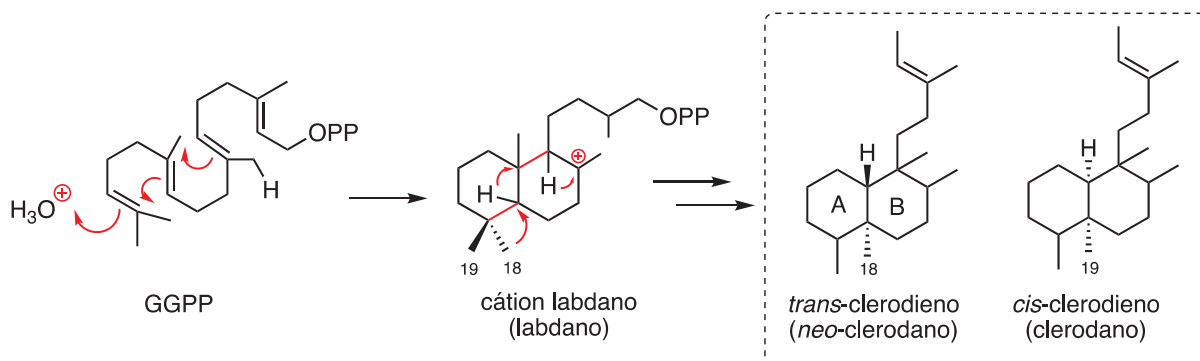
ESQUEMA 5 – ETAPAS DA ROTA DE SÍNTESE DOS ICETEXANOS A PARTIR DO ABIETANO E FORMAÇÃO DO BARBATUSOL



FONTE: adaptado de SIMMONS; SARPONG, 2009.

Semelhante aos abietanos, os clerodanos também são biossintetizados a partir do precursor GGPP. No entanto, a rota apresentada no ESQUEMA 6 está simplificada, pois muitas etapas são necessárias para formação dos clerodanos. Inicialmente, ocorre uma ciclização catiônica, iniciada por uma protonação, para gerar o cátion labdano. Posteriormente, ocorre um conjunto de rearranjos, envolvendo migrações de metila e hidretos neste intermediário. Esse processo pode originar os clerodanos com fusão *cis* ou *trans* entre os anéis. Os *trans*-clerodanos também chamados de *neo*-clerodanos são formados pela migração da metila na posição C-19, enquanto que os *cis*-clerodanos são formados pela migração da metila C-18. Aproximadamente 25 % dos clerodanos tem fusão *cis* entre os anéis A e B (ESQUEMA 6) (DEWICK, 2009; LI et al., 2016).

ESQUEMA 6 – ETAPAS DE FORMAÇÃO DOS *neo*-CLERODANDOS E OS CLERODANOS A PARTIR DO PRECURSOR GGPP

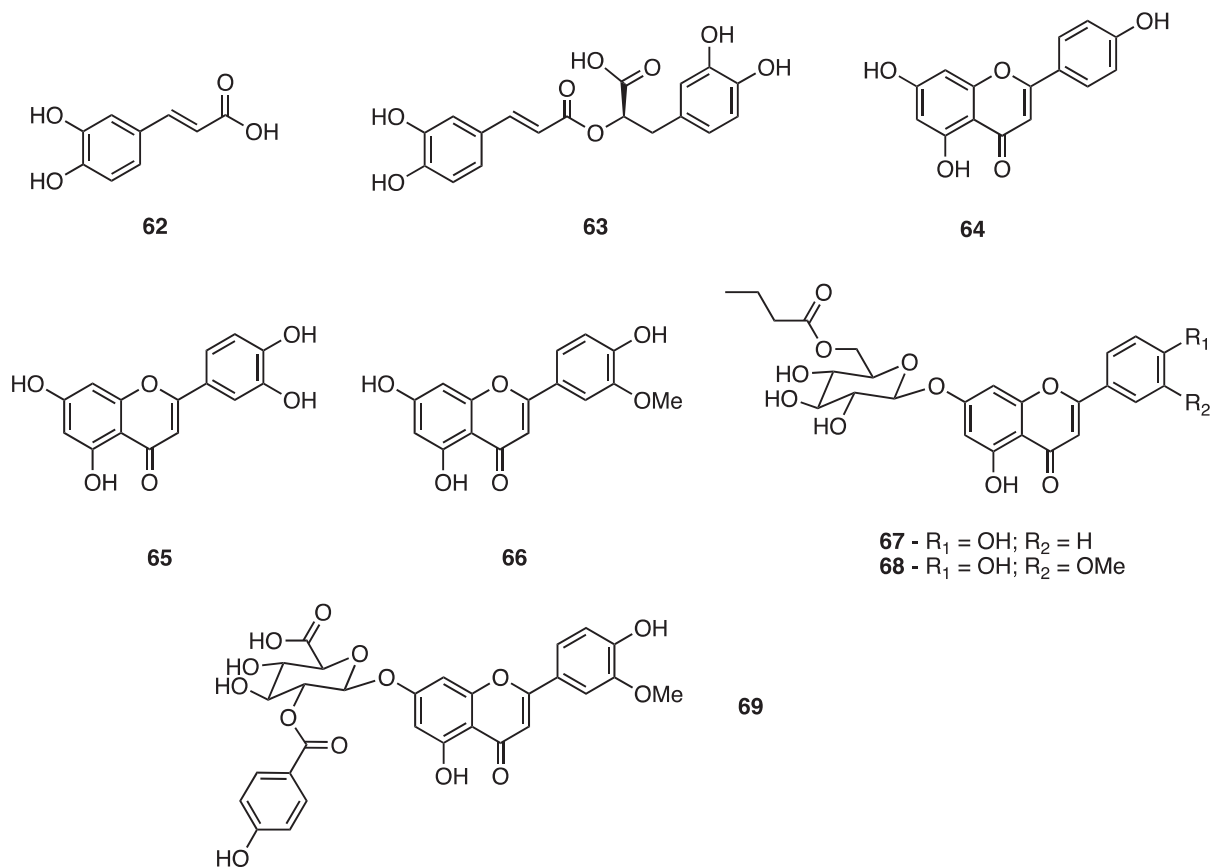


FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

Os novos esqueletos recebem prefixos em seus nomes comuns, como *ent* (inversão em todos os centros esteriogênicos), *seco* (quebra de alguma ligação carbono-carbono no esqueleto cíclico) e *nor* (um carbono a menos no esqueleto químico) (MACIEL et al., 2006).

1.1.3.3 Substâncias fenólicas do gênero *Salvia*

Grande parte das espécies de *Salvia*, e de outros gêneros da família Lamiaceae, apresenta em seus extratos de maior polaridade a presença marcante de ácidos fenólicos, geralmente aqueles que são derivados do ácido cafeico (**62**). O ácido cafeico serve de bloco de construção de uma variedade de metabólitos especializados de *Salvia*. Uma substância fenólica muito comum, até mesmo considerada marcadora da família Lamiaceae, é o ácido rosmarínico (**63**), que é um éster do ácido cafeico encontrado em diversas espécies do gênero, incluindo *S. officinalis* (FIGURA 11). O ácido rosmarínico (**63**) possui diversos relatos de atividade biológica, principalmente antioxidante e citotóxica, e sua presença pode justificar algumas das atividades biológicas de espécies do gênero (LU; FOO, 2002; GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017).

FIGURA 11 – ALGUMAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS ISOLADAS EM ESPÉCIES DE *Salvia*

Flavonoides também são amplamente distribuídos em espécies de *Salvia*, presentes principalmente como flavonas, flavonóis e seus glicosídeos. A maioria dos flavonoides encontrados nas espécies de *Salvia* são flavonas como a apigenina (**64**) e a luteolina (**65**) (LU; FOO, 2002). Um exemplo dessa distribuição são os flavonóides da espécie *Salvia palaestina* (originária da Turquia), cujo extrato butanólico revelou a presença de luteolina-3-O-metil-éter (**66**), apigenina-7-O-(6"-butiril-β-glucopiranosídeo) (**67**), luteolina-3'-O-metil-7-O-(6"-butiril-β-glucopirosídeo) (**68**) e luteolina-7-O-(2"-*p*-hidroxibenzoil)-β-glucuronídeo (**69**) (FIGURA 11). E ainda, os flavonóides glicosilados **67-69** revelaram atividade antioxidante em ensaios utilizando DPPH (AL-QUDAH et al., 2014).

1.1.4 A espécie *Salvia lachnostachys*

Salvia lachnostachys Benth (FIGURA 12) é uma planta endêmica do Brasil, encontrada nas regiões Sul e Sudeste do país, especificamente na Mata Atlântica, nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. No estado do Paraná está distribuída nas regiões dos Campos Gerais, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Litoral do estado (JIMENA et al., 2009; HARLEY et al., 2021).

FIGURA 12 – FOTOS DA ESPÉCIE *Salvia lachnostachys*



FONTE: Carolina Calomeno (2018).

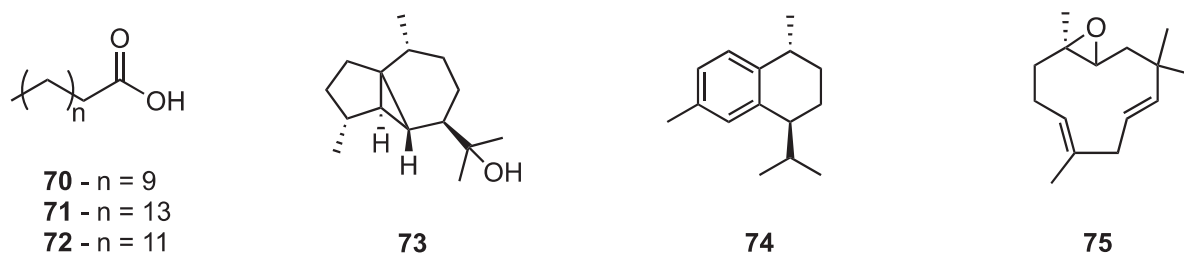
Morfológicamente, *S. lachnostachys* é caracterizada pelo hábito herbáceo ou subarborescente perene, podendo apresentar de 40 a 70 cm de altura. Suas folhas são simples, opostas e cruzadas, e revestidas por tricomas. A haste é tubulosa retangular, apresentando também tricomas glandulares. As flores possuem coloração azul e surgem no início de abril e vão até novembro (MARTINI et al., 2010; ERBANO, et al 2012; HARLEY et al., 2021).

S. lachnostachys é conhecida popularmente como melissa, e o chá de suas folhas é utilizado na medicina popular como antiespasmódico, antigripal e sonífero pela população rural do Paraná (NEGRELLE; FORNAZZARI, 2007). Além disso, é

considerada uma planta com potencial ornamental, devido ao seu porte e suas atraentes flores azuis (LEAL; BIONDI, 2006).

O primeiro estudo químico realizado com essa espécie revelou que suas folhas e flores contêm óleos essenciais. Estes óleos são constituídos principalmente por substâncias alifáticas saturadas de cadeia longa, incluindo ácidos graxos, acompanhados de uma pequena fração sesquiterpênica. Os principais ácidos graxos identificados foram o ácido dodecanóico (**70**, 61,6 %), ácido hexadecanóico (**71**, 7,9 %) e ácido tetradecanóico (**72**, 4,5 %). Já a fração minoritária sesquiterpênica foi constituída principalmente pelas substâncias cubeban-11-ol (**73**, 1,9 %), *trans*-calameneno (**74**, 1,4 %) e epóxido de humuleno (**75**, 1,1 %) (FIGURA 13) (KASSUYA et al., 2009).

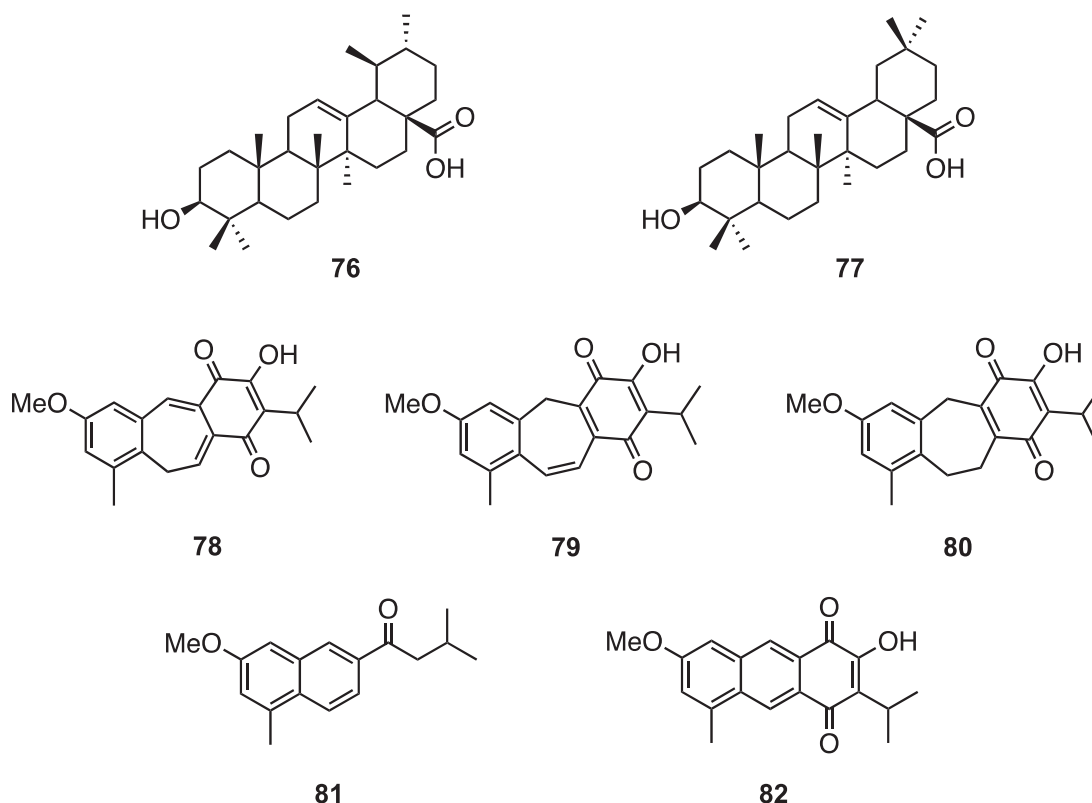
FIGURA 13 – ALGUNS ÁCIDOS GRAXOS E SESQUITERPENOS PRESENTE NO OLÉO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE *Salvia lachnostachys*



O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* foi iniciado anteriormente pelo nosso grupo. Inicialmente o extrato etanólico foi fracionado em gel de sílica, usando-se como eluentes os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, hexano:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, acetona e MeOH. Desse modo foram obtidas cinco frações principais, denominadas LFA, LFB, LFC, LFD e LFE, respectivamente. O estudo anterior foi conduzido com as frações de menor polaridade, obtidas pela eluição com hexano (LFA) e hexano:CH₂Cl₂ 1:1 (LFB). O estudo fitoquímico destas frações resultou no isolamento de terpenoides, incluindo dois triterpenos, ácido ursólico (**76**) e ácido oleanólico (**77**), além de cinco diterpenóides derivados do esqueleto abietano. Entre eles, três *nor*-diterpenoides com esqueleto icetexano, identificados como fruticulina A (**78**), isofruticulina A (**79**), e 7,20-diidrofruticulina A (**80**); um *tetranor*-diterpenoide denominado lachnostachyona (**81**); e um *dinor*-diterpenoide, identificado como fruticulina B (**89**) (FIGURA 14) (ERBANO et

al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016). Esse estudo ainda indicou que as substâncias fruticulina A, e os ácidos ursólico e oleanólico (OLIVEIRA, 2017) eram majoritários nas frações **LFA** e **LFB**, respectivamente. As frações de maior polaridade (**LFC**, **LFD** e **LFE**) não foram exploradas.

FIGURA 14 – TRITERPENOS E DITERPENOS ISOLADOS NAS FRAÇÕES MENOS POLARES DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*



Anteriormente, o extrato etanólico das folhas (**LF**), as frações do extrato (**LFA**, **LFB**, **LFC**, **LFD** e **LFE**) e os diterpenos fruticulina A (**78**), isofruticulina A (**79**), e fruticulina B (**82**) foram avaliados para a atividade citotóxica, *in vitro*, contra um conjunto de linhagens de células tumorais humanas, incluindo células de glioma (U251), mama (MCF-7), ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), rim (786.0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3; somente as substâncias puras), colón (HT-29; somente o extrato), ovário (OVCAR-3; somente as substâncias puras), e leucemia (K562).

O extrato inibiu o crescimento de todas as linhagens de células testadas, uma vez que os valores de concentração necessários para inibição de 50 % do crescimento (GI_{50}) foram inferiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. As frações do extrato também foram ativas contra

todas as linhagens de células. Entretanto, a maior atividade foi registrada para a fração LFA (eluída com hexano) que mostrou valores de GI_{50} entre 3,9-19,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta fração continha os cinco diterpenos descritos (**78-82**), sendo que o constituinte majoritário era a fruticulina A (**78**), que apresentou elevada atividade contra as linhagens de células testadas (GI_{50} 4,6-7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com exceção da linhagem de células de leucemia. Já a isofruticulina A (**79**) revelou atividade similar á da fruticulina A, sendo ligeiramente mais ativa (GI_{50} 3,7-5,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$), enquanto que a fruticulina B (**82**) foi a menos ativa, apresentando $GI_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, contra todas as linhagens testadas (OLIVEIRA et al., 2016) (TABELA 1).

TABELA 1 – ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro* DO EXTRATO ETANÓLICO (LF) E SUBSTÂNCIAS PURAS DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys* CONTRA LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Linhagens de células	^a GI_{50}			
	^b $\mu\text{g mL}^{-1}$		^c $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	LF	fruticulina A (78)	isofruticulina A (79)	fruticulina B (82)
Glioma	32,0	5,5	4,6	32,8
Mama	30,0	5,2	3,7	19,9
Ovário resistente	42,4	7,4	5,6	116,4
Rim	26,0	5,2	4,6	36,3
Pulmão	44,0	7,4	5,2	22,6
Próstata	-	4,6	3,7	37,1
Cólon	32,6	-	-	-
Ovário	-	4,9	3,8	16,4
Leucemia	25,0	380,0	300	28,5
HaCat	33,5	4,9	6,5	29,3

^a GI_{50} = concentração necessária para inibir em 50 % o crescimento celular. ^b Atividade citotóxica < 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (extrato e frações). ^c Atividade citotóxica < 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (substâncias puras).

FONTE: adaptado de OLIVEIRA et al., 2016.

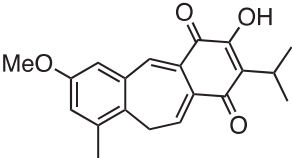
Em outros estudos anteriores *in vivo*, a espécie *S. lachnostachys* revelou várias propriedades biológicas. O extrato etanólico de suas folhas mostrou atividade anti-artrite (RADAI et al., 2018). Este extrato também apresentou outras atividades que foram relacionadas com a presença de fruticulina A (**78**), como as atividades anti-inflamatória, anti-hiperalgésica (PICCINELLI et al., 2014), antidepressiva e antinociceptiva (SANTOS et al., 2017).

Em estudos mais recentes, o efeito antitumoral do extrato etanólico das folhas foi avaliado contra o carcinoma de Ehrlich, mostrando resultados positivos na inibição do crescimento do tumor, bem como na prevenção do seu desenvolvimento (CORSO et al., 2019). Considerando que ensaios *in vitro* com linhagens de células tumorais

humanas mostrou que fruticulina A (**78**) tinha considerável efeito citotóxico (OLIVEIRA et al., 2016), este diterpeno também avaliado para a atividade antitumoral. Foi demonstrado que **78** inibiu o crescimento do carcinoma de Ehrlich sólido (similar ao tumor de mama humano) em ratos, e induziu a morte celular via mecanismos de apoptose e necroptose *in vitro*, enquanto que *in vivo* as células cancerosas sofreram necroptose por meio da redução do tumor. Além disso, foi comprovado que **78** atua nas células tumorais por meio de múltiplos mecanismos de morte celular (CORSO et al., 2020). A atividade antitumoral elevada através de diferentes mecanismos pode estar relacionada com o grupo *para*-quinona presente na estrutura química (anel C) (FIGURA 14, p. 66). Esse grupo presente em vários diterpenos é conhecido por induzir a apoptose por meio de enzimas redutases, que atuam diretamente na quimioprevenção do câncer (TABELA 2) (GIACOMELLI, et al 2013).

Além da atividade citotóxica e antitumoral, a fruticulina A (**78**) também revelou ação bacteriostática (*in vitro*) para diversas linhagens de bactérias (BISIO et al., 2008). Neste contexto, é perceptível que a fruticulina A possui grande relevância em termos de atividades biológicas, estando relacionada com as atividades do extrato etanólico de *S. lachnostachys*.

TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO DITERPENO FRUTICULINA A

Substância	Atividade biológica	Referência
	Bacteriostática*	BISIO et al., 2008
	Citotóxica*	OLIVEIRA, et al., 2016; CORSO et al., 2020
	Anti-inflamatória**	PICCINELLI et al., 2014
	Analgésica**	PICCINELLI et al., 2014
	Anti-hiperalgésica**	PICCINELLI et al., 2014
	Antiartítica**	SANTOS et al., 2017
	Antinociceptiva**	SANTOS et al., 2017
	Antidepressiva**	SANTOS et al., 2017
	Antitumoral**	CORSO et al., 2020

*ensaios realizados *in vitro* **ensaios realizados *in vivo*.

1.1.5 A espécie *Salvia melissiflora*

Salvia melissiflora (FIGURA 15) é uma espécie de Lamiaceae também endêmica do Brasil, distribuída na Mata Atlântica, nas regiões Sul do Paraná e Santa Catarina, e Sudeste de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2021). Morfologicamente apresenta características semelhantes às de *S. lachnostachys* (folhas opostas, haste tubulosa retangular e flores), diferenciando-se na coloração da haste, caule e flores, que são de um vermelho bem vivo.

FIGURA 15 – FOTOS DA ESPÉCIE *Salvia melissiflora*

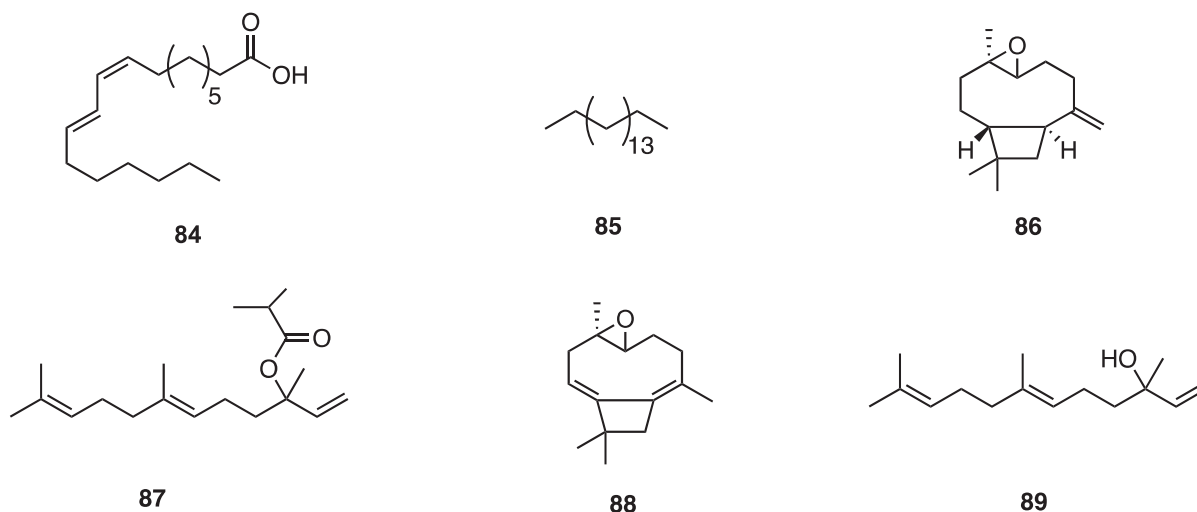


FONTE: o autor.

Há um único estudo químico com esta espécie, no qual foi analisada a composição do óleo essencial de suas folhas. O estudo revelou a presença de substâncias alifáticas de cadeia longa, principalmente o ácido linoleico (**83**) que atingiu 29,3 % da composição total do óleo, o ácido hexadecanóico (**84**, 11,3 %) e o *n*-heptadecano (**85**, 3,3 %). Uma pequena fração sesquiterpênica também foi identificada, composta principalmente pelo óxido de cariofileno (**86**, 9,6 %), isobutirato

de *E*-nerolidila (**87**, 5,1 %), epóxido de humuleno (**88**, 3,3 %) e *E*-nerolidol (**89**, 2,2 %) (FIGURA 16) (KASSUYA et al., 2009).

FIGURA 16 – ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ALIFÁTICAS E SESQUITERPENOS PRESENTES NO OLÉO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. melissiflora*



De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, não foi encontrado nenhum nome popular para essa espécie. Adicionalmente, nenhum estudo fitoquímico, ou seja, o isolamento de metabólitos especializados fixos presentes em seu extrato, foi realizado. Entretanto, o extrato etanólico de suas partes aéreas revelou, em estudos preliminares atividade antiedematogênica e anti-inflamatória, uma vez que os ensaios mostraram a redução do edema de pata em camundongos (PIORNEDO et al., 2009).

1.2 JUSTIFICATIVA

De acordo com os estudos anteriores, as espécies *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora* foram selecionadas pelo nosso grupo de pesquisa para uma investigação fitoquímica. *Salvia lachnostachys* é comprovadamente uma fonte de substâncias biologicamente ativas, e o seu estudo químico não havia sido finalizado. Por outro lado, a espécie *Salvia melissiflora* apresentou atividade anti-inflamatória, mas os seus constituintes químicos ainda não tinham sido identificados, tornando importante uma investigação química com esta espécie.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar algumas atividades biológicas das espécies *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora*, visando contribuir para o maior conhecimento químico das sálvias brasileiras e para descoberta de novos metabólitos especializados promissores para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Dar continuidade ao isolamento dos metabólitos especializados das folhas da *Salvia lachnostachys*, investigando frações obtidas anteriormente que estavam reservadas.
- Isolar os principais metabólitos especializados dos caules de *S. lachnostachys*.
- Purificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) frações ricas em fruticulina A, de modo a obter maior quantidade deste diterpeno para ensaios biológicos.
- Preparar os extratos e isolar os principais metabólitos especializados das partes aéreas (folhas e caules) de *Salvia melissiflora*.
- Identificar os metabólitos especializados isolados das duas espécies utilizando métodos físicos, principalmente a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), e outras técnicas que forem necessárias, como espectrometria de massas de alta resolução (EM-AR), espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV-TF) e medidas de rotação específica.
- Realizar ensaios de atividade citotóxica via método MTT *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas com os extratos de *S. melissiflora*.
- Realizar ensaios de atividade antioxidante *in vitro* através do método ORAC-FL com os extratos, frações e substâncias isoladas das duas espécies.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Procedimentos gerais

1.4.1.1 Cromatografia Líquida a Pressão Reduzida e Cromatografia Líquida em Coluna

Nas separações cromatográficas utilizando cromatografia líquida a pressão reduzida (CLPR) e cromatografia em coluna clássica aberta (CC), foram utilizadas colunas de vidro de diâmetros e tamanhos variados, preenchidas com a fase estacionária gel de sílica 60 Å (Vetec ou Macherey-Nagel). A proporção de sílica utilizada para o preenchimento das colunas foi de aproximadamente vinte vezes a massa da amostra a ser purificada para CC e cinco vezes para CLPR.

1.4.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Analítica e Preparativa

Para as análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas placas comerciais recobertas por gel de sílica, com indicador de fluorescência, na espessura de 0,25 mm (Macherey-Nagel). As frações obtidas por coluna (CLV e CC) foram comparadas por CCDA, em diferentes sistemas de solventes, e reunidas por similaridade.

As placas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas utilizando uma suspensão de gel de sílica 60 PF₂₅₄ (Vetec ou Macherey-Nagel) em água destilada, e uma proporção de 15 g de sílica para 30 mL de água, sobre placas de vidro (20 x 20 cm), com o auxílio de um espalhador que forneceu uma espessura de 1,00 mm de fase estacionária. As placas foram secadas em temperatura ambiente, e depois ativadas em estufa (110 °C por 1 h). Após a secagem, as placas foram mantidas a temperatura constante de 40 °C. Nas separações, até 20 mg de amostra foram aplicadas em uma placa. Amostras com maior massa foram distribuídas em duas ou mais placas preparativas.

As substâncias foram reveladas sobre as placas cromatográficas (CCDP e CCDA) por meio da visualização sob a luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm). Adicionalmente, as placas de CCDA foram reveladas por meio de aspersão sobre as placas de uma solução de H₂SO₄ (5,0 % v/v) em etanol, seguida de aquecimento das placas até o aparecimento das manchas.

1.4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram conduzidas em um cromatógrafo Waters, composto por uma bomba quaternária, injetor automático, e com detecção ótica por arranjo de diodos (PDA 2998). Os cromatogramas foram obtidos pelo sistema de aquisição Epower Software. Para as fases móveis foram utilizados os solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN), além de água ultra pura (Mili-Q®). Os solventes foram filtrados em membrana de nylon 0,45 µm (Milipore) e desgaseificados durante 30 min em banho de ultrassom, antes de serem utilizados. As purificações foram realizadas em coluna semi-preparativa com octadesilsilano (C18) como fase estacionária (Phenomenex Nucleosil® 100-A), com diâmetro de partícula de 5 µm e com dimensões de 250 x 10 mm. As análises foram conduzidas utilizando-se quatro métodos isocráticos, descritos na TABELA 3. A detecção dos metabólitos secundários foi monitorada na faixa de 215 a 400 nm e as frações foram coletadas manualmente. O equipamento está localizado no Departamento de Química da UFPR (DAQUI-UFPR).

TABELA 3 – MÉTODOS ISOCRÁTICOS UTILIZADOS NAS SEPARAÇÕES POR CLAE EM COLUNA C18 SEMI-PREPARATIVA

Método	Tempo (min)	Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	% H ₂ O-Mili-Q (v/v)	% ACN (v/v)	MeOH
1	20	2,0	-	50	50
2	20	2,0	10	-	90
3	20	2,0	20	-	80
4	20	1,5	40	-	60
5	20	2,0	60	40	-

1.4.1.4 Ressonância Magnética Nuclear

As substâncias isoladas foram identificadas principalmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os experimentos foram conduzidos em três equipamentos, em diferentes frequências. Os espectros foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 200 com campo magnético de 4,7 Tesla (200 MHz), e/ou Bruker AVANCE III de 9,4 Tesla (400 MHz) e/ou Bruker AVANCE III de 14,1 Tesla (600 MHz). Foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais. Nos unidimensionais foram obtidos os espectros de RMN de hidrogênio (RMN de ¹H; 200, 400 e/ou 600

MHz) e de carbono totalmente desacoplado ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; 50, 100 e/ou 150 MHz). Os experimentos bidimensionais realizados foram os mapas de correlação a ligação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC). Os experimentos foram realizados utilizando-se aproximadamente 0,5 mL de solvente deuterado (acetona- d_6 , clorofórmio- d , metanol- d_4 ou D_2O), com tetrametilsilano (TMS, 0,05 % v/v) como referência interna, e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) em relação ao TMS ($\delta = 0$ ppm). As constantes de acoplamentos (J) foram expressas em Hertz (Hz). Os espectros foram processados com o software TopSpin (versão 4.0.8, Bruker Biospin).

As análises em 200 MHz foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN, DQUI-UFPR) como triagem para a seleção das amostras contendo metabólitos especializados. As amostras promissoras foram encaminhadas para realização dos experimentos em 400 e/ou 600 MHz, os quais foram realizados no Centro de Ressonância Magnética Nuclear localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

1.4.1.5 Solventes

Os solventes utilizados como fase móvel nas técnicas cromatográficas clássicas (CLPR, CC, CCDA e CCDP) foram obtidos comercialmente em grau analítico (Synth ou Vetec). Para as análises por CLAE foram utilizados solventes orgânicos ultrapuros, grau HPLC (Honeywell ou Panreac). Todas as frações foram concentradas utilizando evaporador rotativo à pressão reduzida. As misturas dos solventes são dadas em proporção volume/volume (v/v). Os solventes utilizados em RMN eram todos deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

1.4.1.6 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta/Visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) foram obtidos em solução, utilizando-se metanol ou clorofórmio (grau espectroscópico) como solvente. As amostras foram preparadas na faixa de concentração de 100 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os espectros foram registrados no espectrofotômetro Shimadzu UV 2401PC (DQUI-UFPR), utilizando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e faixa

de varredura de 200 a 800 nm. Os dados adquiridos foram processados utilizando o software OriginPro 8.0.

1.4.1.7 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF) foram obtidos no espectrofotômetro FTIR Bruker Vertex 70/70v[®] (DQUI-UFPR) em modo de transmitância, em faixa de 4000 a 500 cm⁻¹, com 32 scans e resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr. Os espectros foram processados pelo software OriginPro 8.0.

1.4.1.8 Rotação específica

As medidas de rotação específica foram realizadas no polarímetro JASCO P-200 POLARIMETER (DQUI-UFPR) com lâmpada de sódio (589 nm) e CHCl₃ ou MeOH como solventes, à temperatura de 20°C, com uma cela de 1,0 cm de caminho óptico.

1.4.1.9 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Os espectros de massas de alta resolução (EM-AR) foram obtidos no equipamento Bruker Q-TOF, Impact II, por infusão direta e ionização por “*spray*” de elétrons (ESI) no modo positivo ou negativo. O processamento dos dados foi através do software Data Analysis 4.3. Alguns espectros foram obtidos no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM) sob supervisão da Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto, enquanto outros foram obtidos pela Dra. Flávia Lada Degaut Pontes, técnica responsável pelo Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

1.4.2 Materiais vegetais

As **folhas** e **caules** da espécie *Salvia lachnostachys* Benth foram coletados de uma população natural na Cidade Industrial, Curitiba, PR (25° 30' 22.0" S, 49° 18' 30,0" O), em outubro de 2010. Já as **folhas** e **caules** de *Salvia melissiflora* Benth foram coletados em Quatro Barras, PR (25° 24' 29,0" S, 49° 59' 57,98" O), em outubro de 2018. As duas espécies foram coletadas e identificadas pela Profa. Dra. Élide Pereira dos Santos (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná) que depositou exsicatas no herbário da UFPR sob os números UPCB 85.285 (*S. lachnostachys*) e UPCB 85.281 (*S. melissiflora*).

1.4.3 Preparação dos extratos

Após a coleta das duas espécies foi realizada a preparação dos extratos brutos. Inicialmente o material botânico das duas espécies foi secado em estufa a 40°C, separadamente, e posteriormente pulverizado. A extração foi realizada a temperatura ambiente, utilizando a técnica de maceração, com diferentes solventes, em ordem crescente de polaridade, com renovação de solvente a cada 24 horas. O volume utilizado foi de aproximadamente 500 mL para cada 100 g de material botânico. Esse processo foi repetido por três vezes, para cada solvente. Após o período de maceração, os extratos foram filtrados em papel filtro. Os extratos previamente secos foram armazenados em um refrigerador até o início do estudo fitoquímico.

Na preparação dos extratos da espécie *Salvia lachnostachys* as **folhas** (415,2 g) e **caules** (288,0 g) foram extraídos, separadamente, com hexano (HEX), seguidos de etanol (EtOH). Após a eliminação do solvente extrator foram obtidos os extratos em HEX: **LFH** (11,3 g, folhas); **LCH** (0,685 g, caules) e os extratos em EtOH **LF** (47,6 g, folhas); **LC** (10,2 g, caules) (TABELA 4).

Para a preparação dos extratos de *Salvia melissiflora* caules e folhas foram reunidos, constituindo as **partes aéreas** (174,3 g) que foram extraídas com HEX, diclorometano (CH₂Cl₂) e EtOH, sucessivamente. Após a evaporação dos solventes foram obtidos os respectivos extratos em HEX (**MSH**, 1,67 g), CH₂Cl₂ (**MSD**, 1,72 g) e EtOH (**MSE**, 3,90 g) (TABELA 4).

TABELA 4 – RELAÇÃO E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS DAS ESPÉCIES *S. lachnostachys* E *S. melissiflora*

Espécie	Partes	Solvente extrator	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>S. lachnostachys</i>	Caules	HEX	LCH	0,685	0,23
		EtOH	LC	10,20	3,54
	Folhas	HEX	LFH	11,30	2,72
		EtOH	LF	47,60	11,46
<i>S. melissiflora</i>	Partes aéreas	HEX	MSH	1,67	0,95
		CH ₂ Cl ₂	MSD	1,72	0,98
		EtOH	MSE	3,90	2,24

1.4.4 Isolamento das substâncias de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora*

1.4.4.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas de *S. lachnostachys*

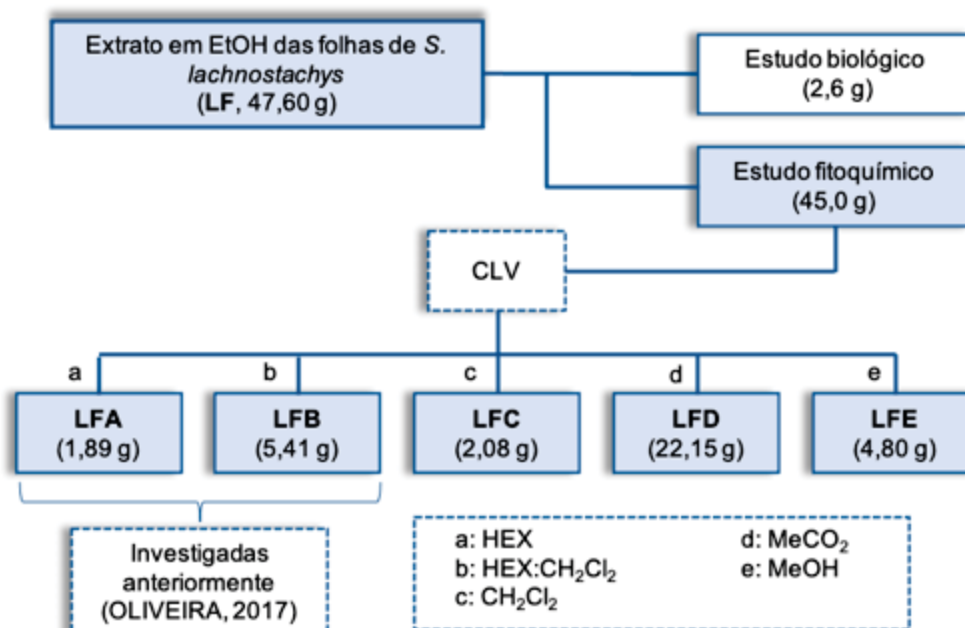
O extrato em EtOH das folhas de *S. lachnostachys* (**LF**) foi dividido em duas partes. Uma parte (2,6 g) foi reservada para estudos biológicos. O restante (45,0 g) foi fracionado anteriormente (OLIVEIRA, 2017) por CLPR (HEX, HEX:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, acetona (Me₂CO) e por fim MeOH). Após a evaporação dos solventes foram obtidas as seguintes frações: HEX: (**LFA**, 1,89 g), HEX: CH₂Cl₂ 1:1 (**LFB**, 5,41 g), CH₂Cl₂ (**LFC**, 2,07g), Me₂CO (**LFD**, 22,15 g) e MeOH (**LFE**, 4,80 g) (TABELA 5; FLUXOGRAMA 1). As frações **LFA** e **LFB** foram estudadas anteriormente (OLIVEIRA, 2017), mas algumas frações de **LFA**, que tinham sido reservadas, foram purificadas no presente estudo.

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CLPR DO EXTRATO EM EtOH DAS FOLHAS DE *S. lachnoschys* (OLIVEIRA, 2017)

Código	Solvente	Massa (g)	Rendimento (%)*
LFA	HEX	1,89	3,97
LFB	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	5,41	11,36
LFC	CH ₂ Cl ₂	2,08	4,37
LFD	Me ₂ CO	22,15	46,53
LFE	MeOH	4,80	10,01

* Para os rendimentos foi considerada a massa fracionada (45,0 g).

FLUXOGRAMA 1 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CLPR DO EXTRATO EM ETOH DAS FOLHAS DE *Salvia lachnostachys*



1.4.4.1.1 Isolamento dos constituintes químicos da fração **LFA**

A fração **LFA** (1,89 g) foi fracionada anteriormente (OLIVEIRA, 2017) por CC (HEX:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂: Me₂CO 98:2, 95:5, 9:1 e 1:1 e Me₂CO). O processo forneceu 71 frações, as quais foram reunidas em 14 subfrações após análise por CCDA. Destas, a subfração **LFA20** (478,4 mg) foi recristalizada em HEX, fornecendo um precipitado (**LFA20P**, 338,8 mg), e um sobrenadante (**LFA20S**, 117,6 mg). A subfração **LFA20S** foi fracionada por CC (HEX, HEX:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂:AcOEt 99:1, 8:2 e 1:1, AcOEt e MeOH). O fracionamento resultou em 51 subfrações, reunidas em 12 novas subfrações. Das frações resultantes, três foram selecionadas para uma nova investigação, sendo elas a **LFA20S8**, **LFA20S13** e **LFA20S15** (FLUXOGRAMA 2).

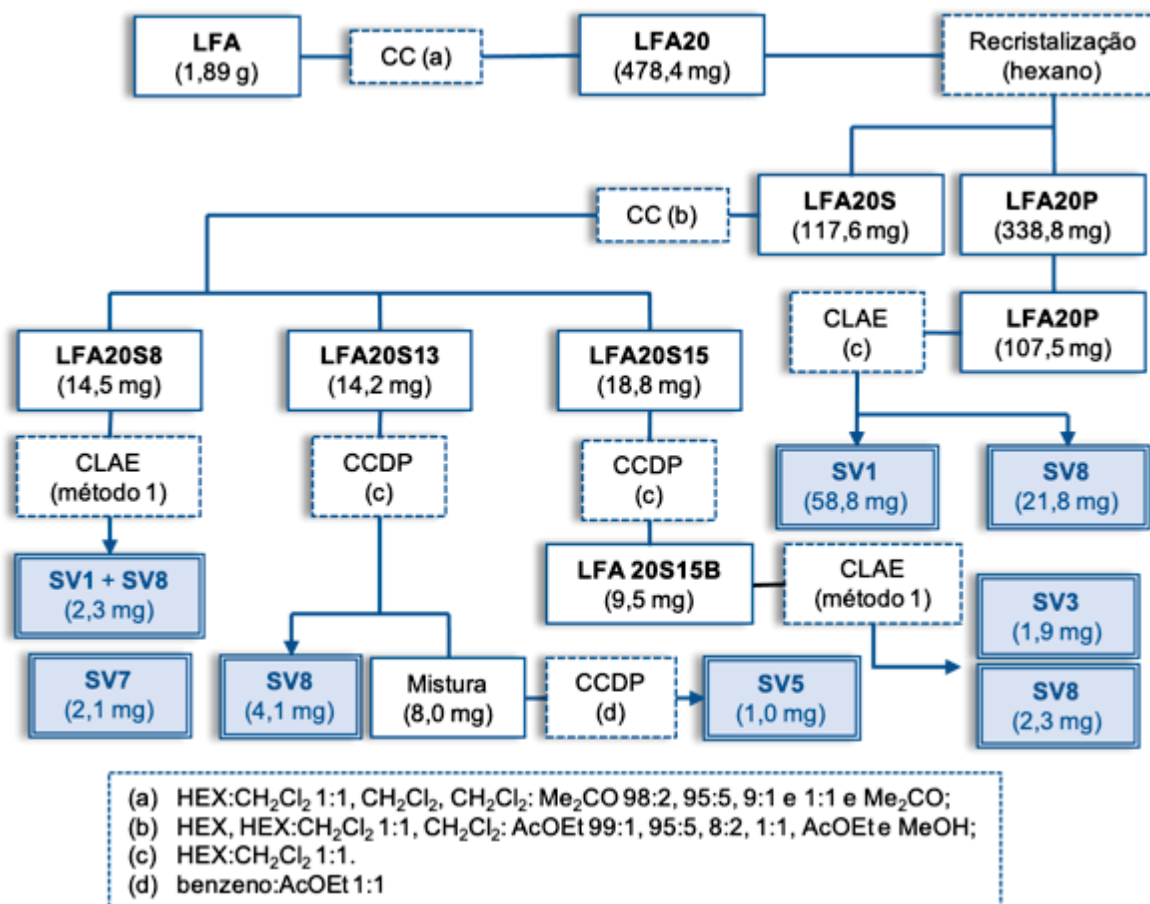
A subfração **LFA20S8** (14,5 mg) foi purificada por CLAE (método 1, TABELA 3). A subfração foi solubilizada em 2,0 mL de acetonitrila (ACN) e submetida à purificação utilizando o volume de injeção de 200 µL, com 10 repetições para cada análise. O cromatograma indicou dois picos, quais foram coletados, resultando no isolamento de **SV1 + SV8** (2,3 mg, tempo de retenção (t_R) = 8,30 min) e **SV7** (2,1 mg, t_R = 9,72 min) (FLUXOGRAMA 2).

A subfração **LFA20S-13** (14,2 mg) foi purificada por CCDP (HEX:CH₂Cl₂ 1:1), resultando no isolamento de **SV8** (4,1 mg) e uma mistura (8,0 mg), que foi submetida à uma nova purificação por CCDP (benzeno:AcOEt 99:1) fornecendo **SV5** (1,0 mg) (FLUXOGRAMA 2).

A subfração **LFA20S15** (18,8 mg) já havia sido anteriormente submetida à CCDP (HEX:CH₂Cl₂ 1:1), fornecendo uma mistura, **LFA20S15B** (9,5 mg) que foi purificada por CLAE (método 1, TABELA 3). A subfração foi dissolvida em 2,0 mL de ACN, o volume de injeção foi de 200 µL (8 vezes). O fracionamento resultou no isolamento da mistura de **SV3** (1,9 mg, t_R = 8,30 min) e **SV8** (2,3 mg, t_R = 10,45 min) (FLUXOGRAMA 2).

Parte da subfração **LFA20P** já havia sido purificada anteriormente. O restante (107,5 mg) foi submetido à CLAE (método 1, TABELA 3). A fração foi solubilizada em 9,0 mL de ACN, com volume de injeção de 250 µL (36 vezes). O processo de purificação forneceu o isolamento de **SV1** (58,8 mg, t_R = 9,20 min) e **SV8** (21,8 mg, t_R = 10,31 min) (FLUXOGRAMA 2).

FLUXOGRAMA 2 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO **LFA** DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*



1.4.4.1.2 Isolamento dos constituintes químicos da fração **LFC**

A fração **LFC** (2,07 g) foi submetida à CC (HEX:AcOEt 8:2, 7:3, 1:1 e AcOEt). Nesse processo foram recolhidas 79 subfrações (15 mL), as quais foram agrupadas em 11 novas subfrações, após análise por CCDA (TABELA 6; FLUXOGRAMA 3).

TABELA 6 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO **LFC** DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LFC1	1-5	HEX:AcOEt 8:2	16,8	-
LFC6	6-13	HEX:AcOEt 8:2	15,8	-
LFC14	14-16	HEX:AcOEt 8:2	7,0	-
LFC17	17-19	HEX:AcOEt 8:2	11,7	-
LFC20	20-22	HEX:AcOEt 8:2	15,5	SV4 + SV18, SV6 + SV17
LFC23	23-26	HEX:AcOEt 8:2	14,9	SV4, SV9
LFC27	27-30	HEX:AcOEt 8:2	71,9	SV2, SV4 + SV9
LFC31	31-40	HEX:AcOEt 7:3	190,0	SV2, SV9, SV15 + SV18
LFC41	41-47	HEX:AcOEt 7:3	64,8	SV2, SV9, SV10 + SV19
LFC48	48-73	HEX:AcOEt 7:3	1.088,5	SV15 + SV18
LFC74	74-79	AcOEt	32,4	SV18

A subfração **LFC20** (15,5 mg) foi purificada por CCDP (HEX:CH₂Cl₂:MeOH 10:89:1), resultando no isolamento de **SV4 + SV18** (2,1 mg) e **SV6 + SV17** (3,5 mg) (FLUXOGRAMA 3).

A subfração **LFC23** (14,9 mg) foi purificada por CLAE (método 3, TABELA 3). A subfração foi solubilizada em 4,0 mL de MeOH, sendo utilizado o volume de injeção de 250 µL (15 vezes). O cromatograma apresentou dois picos principais, os quais foram coletados, fornecendo o isolamento das substâncias **SV4** (1,6 mg, *t_R* = 17,65 min) e **SV9** (2,0 mg, *t_R* = 16,02 min) (FLUXOGRAMA 3).

Parte (44,5 mg) da subfração **LFC27** (71,9 mg) foi purificada por CCDP (HEX:Me₂CO 4:1), fornecendo uma subfração (**LFC27B**, 10,9 mg) que foi recristalizada em CH₂Cl₂, fornecendo **SV2** (4,8 mg). O restante da subfração **LFC27** (27,4 mg) foi purificada por CLAE (método 2, TABELA 3). A amostra foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH, e foram realizadas injeções de 200 µL (8 vezes). O procedimento forneceu o isolamento das substâncias **SV2** (5,8 mg, *t_R* = 9,10 min) e **SV4 + SV9** (2,9 mg, *t_R* = 10,51 min) (FLUXOGRAMA 3).

A subfração **LFC31** (190,0 mg) foi fracionada por CC (HEX:Me₂CO 3:2 e Me₂CO pura). Nesse processo foram recolhidas 26 subfrações (15 mL), as quais foram reunidas em 7 novas subfrações (TABELA 7; FLUXOGRAMA 3).

TABELA 7 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO **LFC 31** DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LFC311	1-3	HEX:Me ₂ CO 3:2	41,1	-
LFC314	4 e 5	HEX:Me ₂ CO 3:2	20,9	-
LFC316	6-10	HEX:Me ₂ CO 3:2	71,3	SV2, SV9, SV16 + SV17
LFC3111	11-14	HEX:Me ₂ CO 3:2	9,4	-
LFC3115	15-18	HEX:Me ₂ CO 3:2	11,5	-
LFC3119	19-24	Me ₂ CO	3,4	-
LFC3125	25-26	Me ₂ CO	2,9	-

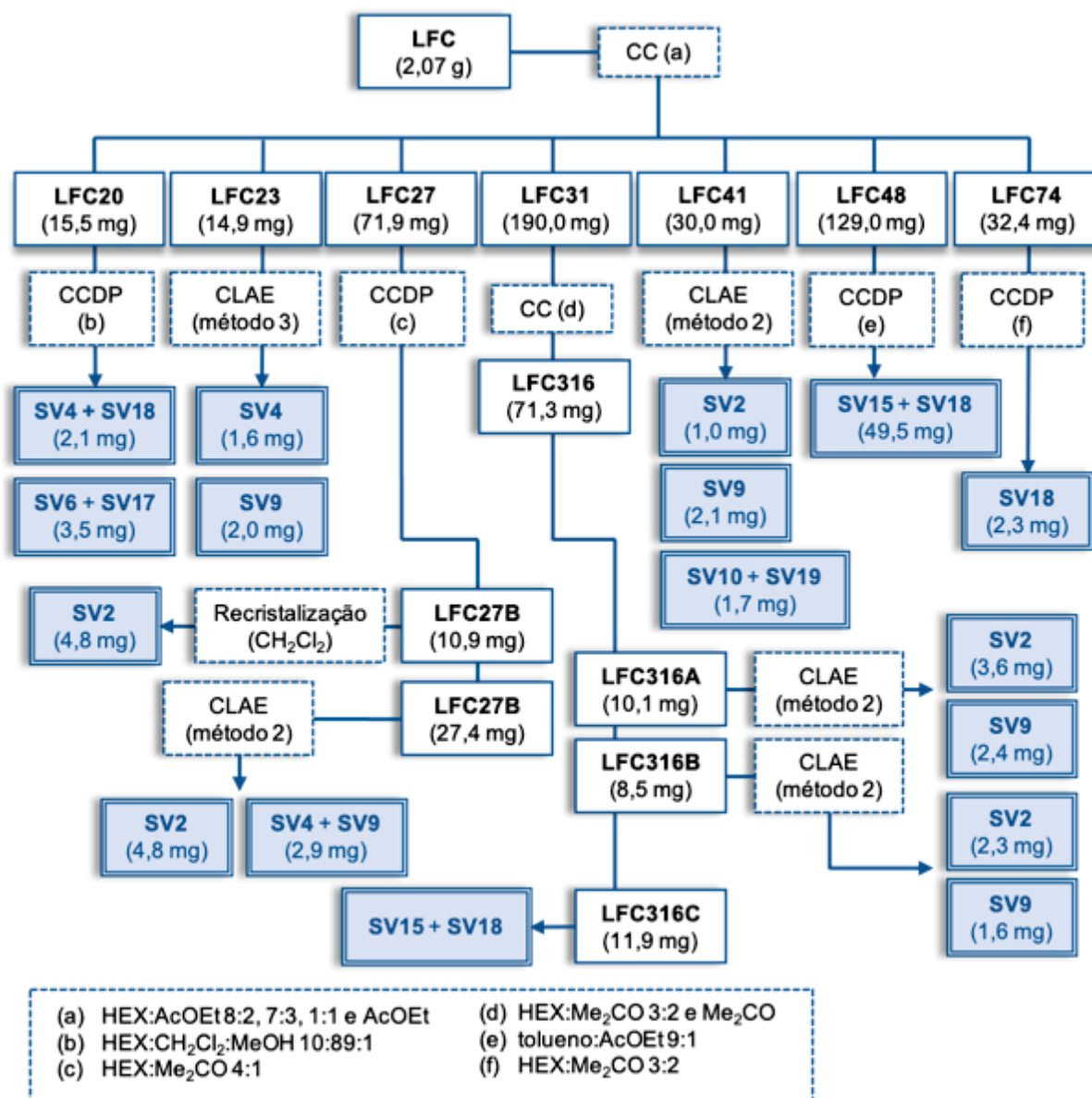
A subfração **LFC316** (71,3 mg) foi submetida à CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 99:1). O processo de fracionamento resultou em três subfrações **LFC316A** (10,1mg), **LFC316B** (8,5 mg) e **LFC316C** (11,9 mg). A subfração **LFC316A** foi purificada por CLAE (método 2, TABELA 3). A amostra foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH, e com volume de injeção de 200 µL (9 vezes). O procedimento resultou no isolamento de **SV2** (3,6 mg, *t_R* = 9,52 min) e **SV9** (2,4 mg, *t_R* = 10,64 min). A subfração **LFC316B** também foi purificada por CLAE, porém em um método diferente (método 3, TABELA 3). A subfração foi dissolvida em 1,5 mL de MeOH, com injeções de 200 µL (7 vezes). O procedimento resultou no isolamento de **SV2** (2,3 mg, *t_R* = 13,83 min) e **SV9** (1,6 mg, *t_R* = 19,42 min). Já a subfração **LFC 316C**, ao ser analisada qualitativamente por CCDA (tolueno:AcOEt 9:1) revelou conter **SV15 + SV18** (FLUXOGRAMA 3).

Parte (30,0 mg) da fração **LFC41** (64,8 mg) foi submetida à CLAE (método 2, TABELA 3). A subfração foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH, o volume de injeção foi de 200 µL (10 vezes). O processo resultou no isolamento de **SV2** (1,0 mg, *t_R* = 10,03 min), **SV9** (2,1 mg, *t_R* = 12,91 min) e **SV10 + SV19** (1,7 mg, *t_R* = 15,85 min) (FLUXOGRAMA 3).

Parte (129,0 mg) da subfração **LFC48** (1.088,5 mg) foi submetida à CCDP (tolueno:AcOEt 9:1) e forneceu o isolamento da mistura de **SV15 + SV18** (49,5 mg). O restante (959,5 mg) foi reservado. (FLUXOGRAMA 3).

A subfração **LFC74** (32,4 mg) forneceu o isolamento de **SV18** (2,3 mg), após CCDP em HEX:Me₂CO 3:2 (FLUXOGRAMA 3).

FLUXOGRAMA 3 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO **LFC** DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*



1.4.4.1.3 Isolamento dos constituintes químicos das frações **LFD** e **LFE**

As frações de maior polaridade, **LFD** (20,15 g) e **LFE** (4,80 g), revelaram-se semelhantes após análise qualitativa por CCDA (CH₃Cl:MeOH 8:2 + 5 % de H₂O). Devido a isto, somente uma parte de **LFD** foi investigada. Foram retirados 2,0 g de **LFD** que foram dissolvidas em 30 mL de H₂O:EtOH 9:1. A solução hidroalcoólica foi submetida à partição com AcOEt (3 x 10 mL), em um funil de separação. A fase em AcOEt foi recolhida, e secada com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro. Após a

evaporação do solvente obteve-se a subfração **LFDA** (1,01 g). A fase hidroalcoólica foi descartada. O restante das frações **LFD** e **LFE** foi armazenado em um refrigerador.

A subfração **LFDA** (1,01 g) foi fracionada por CC (AcOEt puro). Foram recolhidas 39 subfrações (50 mL), que após análise por CCDA foram reunidas em 5 subfrações (TABELA 8).

TABELA 8 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **LFDA** DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*

Código	Subfrações	Solvente	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LFDA1	1	AcOEt	21,1	-
LFDA2	2	AcOEt	91,0	-
LFDA3	3	AcOEt	91,7	SV16
LFDA4	4-18	AcOEt	509,6	SV20
LFDA19	19-39	AcOEt	122,7	-

Parte (45,0 mg) da subfração **LFDA3** (91,7 mg) foi submetida a CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 99:1), rendendo **SV16** (13,3 mg).

A subfração **LFDA4** continha **SV20** como único constituinte.

1.4.4.2 Isolamento dos constituintes químicos dos caules de *S. lachnostachys*

O extrato etanólico dos caules de *Salvia lachnostachys* (**LC**, 9,02 g), foi fracionado por CC (HEX:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH 9:1 e MeOH). Durante o processo de fracionamento foram recolhidas 59 subfrações (50 mL), as quais foram reunidas em 9 subfrações (TABELA 9).

TABELA 9 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DO EXTRATO ETANÓLICO DOS CAULES (LC) DE *S. lachnostachys*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
LC 1	1-3	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	151,8	-
LC 4	4-11	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	225,2	SV1 e SV8
LC 12	12-14	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	73,8	-
LC 15	15-22	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	93,6	-
LC 23	23-25	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	49,3	-
LC 26	26-45	CH ₂ Cl ₂	112,9	SV2 e SV9
LC 46	46-50	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	1.473,9	SV15 + SV18
LC 51	51-53	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	1.084,7	SV20
LC 54	54-59	MeOH	720,1	-

Parte (40 mg) da fração **LC4** (225,2 mg) foi submetida à CCDP (HEX:AcOEt 8:2) fornecendo o isolamento das substâncias **SV1** (6,6 mg) e **SV8** (1,9 mg). O restante foi armazenado em um refrigerador.

As subfrações **LC26** (112,9 mg), **LC46** (1.473,9 mg) e **LC51** (1.084,7 mg) foram submetidas a comparação qualitativa por CCDA com substâncias já isoladas presentes no extrato etanólico das folhas de *Salvia lachnostachys*. A análise revelou a presença de **SV2** + **SV9** na subfração **LC26**, **SV15** + **SV18** na subfração **LC46**, e por fim **SV20** em **LC51**.

1.4.4.3 Isolamento dos constituintes químicos das partes aéreas de *S. melissiflora*

O extrato **MSD** (1,72) foi inicialmente fracionado por CC (HEX, HEX:CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:Me₂CO 9:1, 8:2, 1:1 e MeOH puro). O fracionamento resultou em 32 frações (100 mL), as quais foram reunidas em 13 frações após análise por CCDA (TABELA 10; FLUXOGRAMA 4).

TABELA 10 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DO EXTRATO MSD DAS PARTES AÉREAS DE *S. melissiflora*

Código	Frações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MSD1	1-5	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	56,9	-
MSD6	6 e 7	HEX:CH ₂ Cl ₂ 1:1	29,4	-
MSD8	8 e 9	CH ₂ Cl ₂	91,1	-
MSD10	10	CH ₂ Cl ₂	81,4	-
MSD11	11	CH ₂ Cl ₂	60,5	-
MSD12	12	CH ₂ Cl ₂	2,9	-
MSD13	13	CH ₂ Cl ₂	256,0	SV12, SV13, SV14, SV15 + SV18,
MSD14	14	CH ₂ Cl ₂	120,9	SV11, SV12 + SV14, SV15 + SV18
MSD15	15	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 9:1	82,8	-
MSD16	16-18	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 9:1	50,0	SV11, SV13, SV15 +SV18,
MSD19	19	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 8:2	68,8	-
MSD20	20	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 8:2	126,0	-
MSD21	21 e 22	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 1:1	42,9	-
MSD23	23	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 1:1	42,6	SV18
MSD24	24-26	CH ₂ Cl ₂ :Me ₂ CO 1:1	87,2	-
MSD27	27-32	MeOH	347,3	-

A fração **MSD13** (256,0 mg) foi fracionada por CC (HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1 e AcOEt puro). Foram recolhidas 22 subfrações (15 mL), as quais foram reunidas em 7 subfrações após análise por CCDA (TABELA 11; FLUXOGRAMA 4).

TABELA 11 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MSD13** DAS PARTES AÉREAS DE *S. melissiflora*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MSD131	1-3	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	54,5	-
MSD134	4	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	8,3	-
MSD135	5 e 6	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	116,1	-
MSD137	7-11	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	55,2	SV15 + SV18, SV12 e SV14
MSD1312	12-14	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	20,3	SV13 + SV14
MSD1315	15 e 16	HEX:AcOEt:MeOH 5:4:1	4,3	-
MSD1317	17-22	AcOEt	16,6	-

A subfração **MSD137** (55,2 mg) foi submetida à CCDP (tolueno:AcOEt 3:2), resultando em **SV11** (1,5 mg), uma mistura de **SV15 + SV18** (2,5 mg), e outra mistura (19,3 mg) que foi submetida à CLAE (método 5, TABELA 3). A mistura foi solubilizada em 2,0 mL de ACN:H₂O 9:1, sendo que o volume de injeção foi de 200 µL (10 vezes). O processo de purificação resultou no isolamento de **SV12** (1,3 mg, t_R = 13,05 min) e **SV14** (2,3 mg, t_R = 17,15 min) (2,5 mg) (FLUXOGRAMA 4).

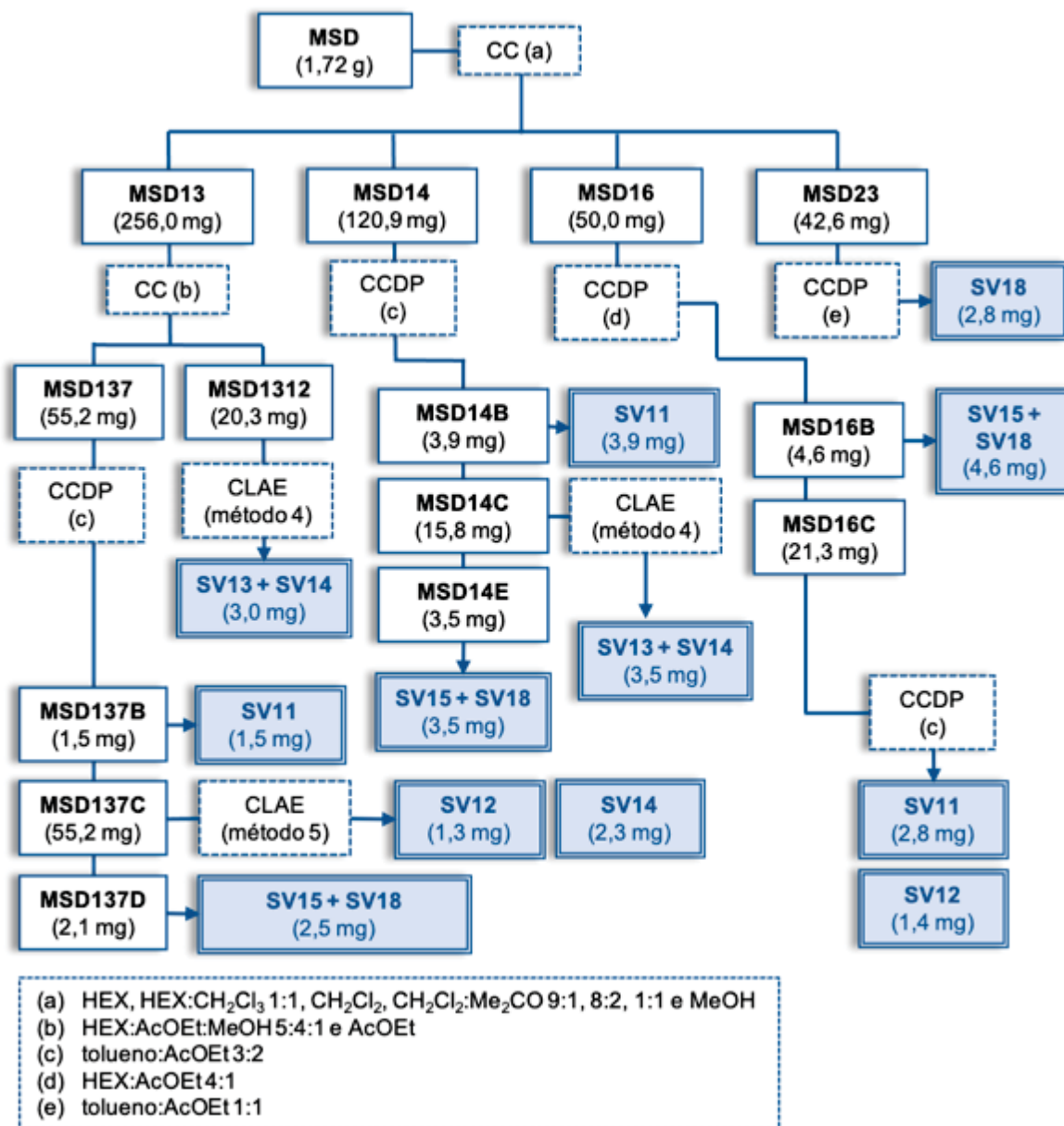
A subfração **MSD1312** (20,3 mg) foi submetida à CLAE (método 4, TABELA 3). A amostra foi dissolvida em 3,0 mL de MeOH, sendo realizadas 13 injeções de 200 µL. O fracionamento rendeu **SV13 + SV14** (3,0 mg, t_R = 17,61 min) (ESQUEMA 4).

A subfração **MSD14** (120,9 mg) foi submetida à CCDP (tolueno:AcOEt 3:2), fornecendo **SV11** (3,9 mg), uma mistura de **SV15 + SV18** (3,2 mg), e outra mistura (15,8 mg) que foi purificada por CLAE (método 4, TABELA 3). A amostra foi dissolvida em 4,0 mL de MeOH, sendo realizadas injeções de 200 µL (19 vezes). O processo resultou no isolamento de **SV12 + SV14** (3,5 mg, t_R = 17,31 min) e **SV15 + SV18** (3,5 mg, t_R = 12,10 min) (FLUXOGRAMA 4).

A subfração **MSD16** (50,0 mg) foi submetida à CCDP (HEX:AcOEt 4:1), resultando em **SV15 + SV18** (4,6 mg), e uma mistura (21,3 mg) que foi purificada por CCDP (tolueno:AcOEt 3:2), resultando em **SV11** (2,8 mg) e **SV13** (1,4 mg) (FLUXOGRAMA 4).

A subfração **MSD23** (42,6 mg) foi submetida à CCDP (tolueno:AcOEt 1:1), fornecendo **SV18** (2,8 mg) (FLUXOGRAMA 4).

FLUXOGRAMA 4 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO **MSD** DAS PARTES
AÉREAS *S. melissiflora*



O extrato **MSE** (3,9 g) foi dissolvido em H₂O:EtOH 9:1 (100 mL) e submetido à partição sequencial com AcOEt e Butanol (1-BuOH) (50 mL), rendendo as respectivas frações em AcOEt (**MSA**, 1,99 g) e 1-BuOH (**MSB**, 298,7 mg).

A fração **MSB** foi submetida à CC (CH₂Cl₂:MeOH 8:2, 9:1 e MeOH). O fracionamento resultou em 25 subfrações (10 mL). Após comparação por CCDA foram reunidas em 5 novas subfrações (TABELA 12).

TABELA 12 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DE **MSB** DAS PARTES AÉREAS DE *S. melissiflora*

Código	subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MSB1	1-4	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	29,8	-
MSB5	5-10	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	36,6	-
MSB11	11-16	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	28,1	-
MSD17	17 e 18	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	39,9	-
MSB19	19-25	MeOH	98,7	SV20

A subfração **MSB19** (98,7 mg) foi submetida à CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 8:2 + 5% de H₂O) fornecendo **SV20** (23,3 mg).

1.4.5 Ensaios de atividade biológica

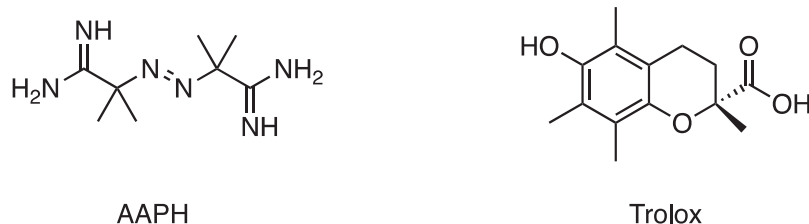
As atividades biológicas que foram investigadas no presente trabalho foram a avaliação do potencial antioxidante e citotóxico. Os ensaios foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e supervisionado pelo Prof. Dr. José Marcos Salvador.

1.4.5.1 Ensaios de atividade antioxidante

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados com o extrato etanólico das folhas de *S. lachnoschys* (**LF**), as frações provenientes deste extrato (**LFA**, **LFB**, **LFC**, **LFD** e **LFE**) e com substâncias puras (**SV1**, **SV2**, **SV8** e **SV9**), além dos extratos das partes aéreas de *S. melissiflora* (**MSD** e **MSE**).

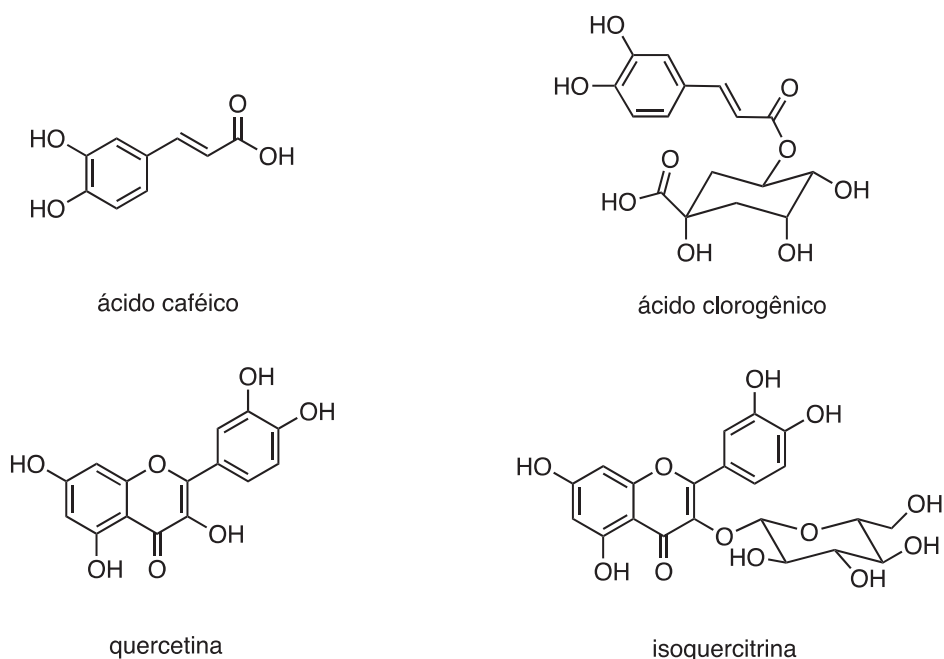
Nesse ensaio foi utilizado o método ORAC-FL (Capacidade de Absorção dos radicais Oxigenados, com Fluoresceína como sonda fluorescente), usando AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)] como fonte de radicais livres (PRIOR et al, 2003). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços (SALVADOR et al., 2006). Varias diluições das amostras foram preparadas (5-500 µg mL⁻¹) em tampão de fosfato:DMSO 99:1 v/v. Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (FIGURA 17) foi usado como padrão, sendo analisado nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µmol L⁻¹. Para a leitura foi usado um filtro fluorescente (excitação de 485 nm e emissão de 528 nm) em um leitor de microplacas, monitorando a reação a 37 °C a cada 2 min por um período de 70 min.

FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH (FONTE DE RADICAIS LIVRES) E TROLOX (PADRÃO) USADOS NO MÉTODO ORAC-FL



Foram utilizados o ácido caféico, o ácido clorogênico, a quercetina e a isoquercitrina como controles positivos (FIGURA 18), e como controle negativo utilizou-se o solvente (DMSO). Os resultados foram expressos em μmol de Trolox (TE) por grama de extrato seco ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) para os extratos, e como Trolox equivalente para as substâncias puras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

FIGURA 18 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS COMO CONTROLE POSITIVO NO ENSAIO ORAC-FL

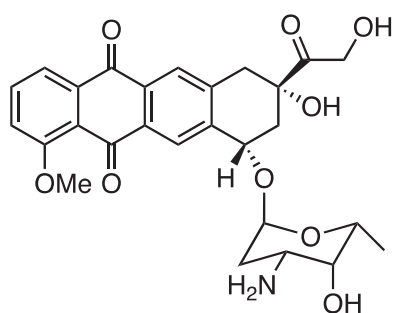


1.4.5.2 Ensaio de atividade citotóxica

Os ensaios de atividade citotóxica *in vitro* foram realizados com os extratos **MSD** e **MSE** das partes aéreas de *Salvia melissiflora*. Foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas PC-3 (próstata humano metastático) e MCF-7 (mama), e a

linhagem controle, célula não tumoral 3T3 (linhagens de fibroblastos). Foi empregado o método MTT (MOSMANN, 1993). As células tumorais foram distribuídas em placas de 96 poços (100 μL de células/poço), e tratadas com quatro concentrações diferentes dos extratos (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, foi adicionado o solvente (DMSO, 0,1% em solução aquosa), e as células foram incubadas a 37 °C, com 5 % de CO_2 , em ambiente úmido, por 48 h. A concentração final de DMSO (1 %) não afetou a viabilidade celular. Como controle positivo foi usado doxorrubicina (0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (FIGURA 19).

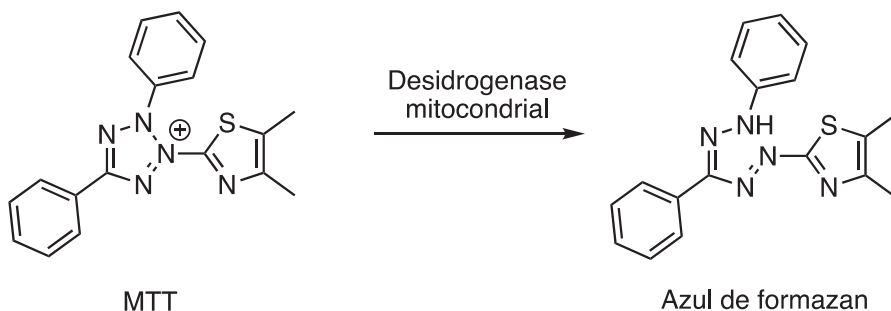
FIGURA 19 – ESTRUTURA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO NO ENSAIO CITOTÓXICO (MTT)



doxorubicina

Foi utilizado como controle negativo o solvente (DMSO, 1 %). A proliferação celular foi quantificada pela capacidade das células vivas reduzirem o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), corante amarelo, a um produto denominado azul de formazan (ESQUEMA 7).

ESQUEMA 7 – REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT EM AZUL DE FORMAZAN



Após a incubação de 48 horas, o meio foi substituído por um meio fresco contendo $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MTT. Após três horas, o produto azul de formazan foi dissolvido em DMSO e a densidade óptica foi medida por espectrofotometria a 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração necessária para atingir 50 % da inibição da viabilidade celular (CI_{50}) foi calculada em $\mu\text{g mL}^{-1}$ por regressão não-linear, utilizando o software Graphpad.

1.5 DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

• SV1

Fruticulina A: sólido amarelo; CLAE: t_R : 9,20 min (método 1) TABELA 3 (p. 73); fórmula molecular: $C_{20}H_{20}O_4$ (massa exata: 324,1362); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC: FIGURA 21-FIGURA 26 (p. 100-104); TABELA 14 (p. 107) (BISIO et al., 2018).

• SV2

Demetilfruticulina A: sólido amarelo; CLAE: t_R : 9,10 min (método 2) e t_R : 13,83 min (método 3) TABELA 3 (p. 73); fórmula molecular: $C_{19}H_{18}O_4$ (massa exata: 310,1205); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC: FIGURA 29-FIGURA 32 (p. 108-110); TABELA 15 (p. 112) (BISIO et al., 2018).

• SV3

Isofruticulina A: sólido vermelho; CLAE: t_R : 8,30 min (método 1) TABELA 3 (p. 73); fórmula molecular: $C_{20}H_{20}O_4$ (massa exata: 324,1362); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 35-FIGURA 39 (p. 113-116); TABELA 16 (p. 117) (OLIVEIRA et al., 2017).

• SV4

Demetilisofruticulina A: sólido vermelho; CLAE: t_R : 17,65 min (método 3) TABELA 3 (p. 73); EM-AR: m/z 311,1333 $[M+H]^+$, FIGURA 45 (p. 121); fórmula molecular: $C_{19}H_{18}O_4$ (massa exata: 310,1205); UV-vis (MeOH) λ_{max}/nm (log ϵ): 207 (4,16), 286 (3,64), 472 (2,86) FIGURA 46 (p. 122); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 40-FIGURA 44 (p. 118-120); TABELA 17 (p. 117).

• SV5

20-hidroxi-isofruticulina A: sólido vermelho; fórmula molecular: $C_{20}H_{22}O_5$ (massa exata: 342,1467); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 48-FIGURA 51 (p. 123-125); TABELA 18 (p. 127).

- **SV6**

20-hidroxi-demetilisofruticulina A: sólido vermelho; fórmula molecular: $C_{19}H_{20}O_5$ (massa exata: 328,131); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 54-FIGURA 58 (p. 128-130); TABELA 19 (p. 131).

- **SV7**

6-hidroxi-isofruticulina A: sólido vermelho; CLAE: t_R : 9,72 min (método 1) (p. 73); EM-AR: m/z 339,1289 $[M-H]^-$, FIGURA 65 (p. 138); fórmula molecular: $C_{20}H_{20}O_5$ (massa exata: 339,1232); UV-vis (MeOH) λ_{max}/nm ($\log \epsilon$): 212 (2,56), 278 (4,14), 319 (3,93) e 509 (3,57) FIGURA 66 (p. 139); IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3479, 3399, 2919, 2844, 1649, 1642, 1419, 1291, FIGURA 67 (p. 139); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 60- FIGURA 63 (p. 133-135); TABELA 20 (p. 137).

- **SV8**

Fruticulina B: sólido alaranjado; CLAE: t_R : 10,45 min (método 1), TABELA 3 (p. 73); fórmula molecular: $C_{19}H_{18}O_4$ (massa exata: 310,1205); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$; HSQC, HMBC: FIGURA 69-FIGURA 74 (p. 141-145); TABELA 21 (p. 146) (OLIVEIRA et al., 2016).

- **SV9**

Demetilfruticulina B: sólido alaranjado; CLAE: t_R : 10,64 min (método 2) e t_R : 19,42 min (método 3) TABELA 3 (p. 73), EM-AR: m/z 295,0984 $[M-H]^-$, FIGURA 80 (p. 150); fórmula molecular: $C_{18}H_{16}O_4$ (massa exata: 296,1049); UV-vis (MeOH) λ_{max}/nm ($\log \epsilon$): 227 (4,13), 303 (3,19), 352 (2,98), FIGURA 81 (p. 151); IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3392, 3338, 2916, 2836, 1653, 1609, 1386, 1268, 1188, 971, 748, FIGURA 82 (p. 152); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 75-FIGURA 79 (p. 147-149); TABELA 22 (p. 150).

- **SV10**

20-hidroxi-demetilfruticulina B: sólido alaranjado; fórmula molecular: $C_{18}H_{16}O_5$ (massa exata: 312,0998); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 84-FIGURA 88 (p. 153-155); TABELA 23 (p. 156).

- **SV11**

Ent-(5*R*,9*R*)-15,16-epoxi-10*S*-hidroxiclerodan-3,13(16),14-trieno17,12*S*;18,19-diolídeo (melissiflorina A): sólido incolor; fórmula molecular: $C_{20}H_{22}O_6$ (massa exata: 358,1416); $[\alpha]_D^{20}$: -104,12 (c: 0,3 mg mL⁻¹, CHCl₃), valor reportado.: $[\alpha]_D^{25}$ -115 (c: 0,03 mg mL⁻¹, CHCl₃); RMN de ¹H, HSQC, HMBC: FIGURA 91-FIGURA 97 (p. 161-165); TABELA 24 (p. 166) (ALMANZA et al., 1997).

- **SV12**

7,8α-diidosalviacoccina: sólido incolor; CLAE: t_R: 9,20 min (método 5) (TABELA 3) (p. 73); fórmula molecular: $C_{20}H_{22}O_6$ (massa exata: 358,1416); RMN de ¹H, HSQC, HMBC: FIGURA 98-FIGURA 102 (p. 167-170); TABELA 25 (p. 172).

- **SV13**

Melissiflorina B: sólido incolor; fórmula molecular: $C_{20}H_{22}O_8$ (massa exata: 390,1315); RMN de ¹H, HSQC, HMBC: FIGURA 106-FIGURA 110 (p. 174-176); TABELA 26 (p. 177).

- **SV14**

7-epi-salviandulina A: sólido cristalino incolor; CLAE: t_R: 17,15 min (método 5) TABELA 3 (p. 73); EM-AR: *m/z* 437,1219 [M+Na] e *m/z* 453,0967 [M+K], FIGURA 119 (p. 183); fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_8$ (massa exata: 414,1315); $[\alpha]_D^{20}$: +52,90 (c: 0,2 mg mL⁻¹, CHCl₃), valor reportado: $[\alpha]_D^{25}$ +46,87 (c: 0,32 mg mL⁻¹, CHCl₃); RMN de ¹H, HSQC, HMBC, FIGURA 112-FIGURA 118 (p. 178-182); TABELA 27 (p. 184) (ORTEGA et al., 1991; ALMANZA et al. 1997).

- **SV15**

Ácido oleanólico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$ (massa exata: 456,3603); RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, HSQC, HMBC, FIGURAS 122-FIGURA 128 (p. 186-190); TABELA 28 (p. 191) (DAIS et al., 2017).

- **SV16**

Ácido maslínico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_4$ (massa exata: 472,3553); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC, FIGURA 130-FIGURA 136 (p. 193-196); TABELA 29 (p. 197) (DAIS et al., 2017).

- **SV17**

Ácido 11 α -hidroxioleanólico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_4$ (massa exata: 472,3553); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 139-FIGURAS 142 (p. 199-201); TABELA 30 (p. 202).

- **SV18**

Ácido ursólico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$ (massa exata: 456,3603); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC, FIGURA 144-FIGURA 149 (p. 204-207); TABELA 31 (p. 208) (DAIS et al., 2017).

- **SV19**

Ácido heterobetulínico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$ (massa exata: 456,3603); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 161-FIGURAS 166 (p. 204-206); TABELA 32 (p. 285) (LOBO-ECHEVERRI et al., 2005).

- **SV20**

Ácido rosmarínico: sólido branco; fórmula molecular: $C_{18}H_{16}O_8$ (massa exata: 360,0845); $[\alpha]_D^{20}$: + 27,7 (c: 0,3 mg mL⁻¹, MeOH), valor reportado: $[\alpha]_D^{25}$: +22,9 (c: 0,2 mg mL⁻¹, MeOH); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC: FIGURA 158-FIGURA 163 (p. 216-219); TABELA 33 (p. 220) (KUHN et al., 1994; SUWANCHAİKASEM et al., 2014).

1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas e caules de *Salvia lachnostachys* e partes aéreas de *Salvia melissiflora* forneceram o isolamento/identificação de 20 constituintes químicos no total (TABELA 13).

O extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* foi fracionado em um estudo anterior (OLIVEIRA, 2017). Esse fracionamento inicial resultou em cinco frações, eluídas por ordem crescente de polaridade: **LFA**, **LFB**, **LFC**, **LFD** e **LFE**. No entanto, algumas subfrações de **LFA** que ainda estavam armazenadas, foram reavaliadas no presente estudo, em adição às frações de maior polaridade (**LFC**, **LFD** e **LFE**), as quais não haviam sido investigadas anteriormente.

A continuidade do estudo fitoquímico permitiu o isolamento de 16 substâncias, as quais estavam presentes nas frações **LFA**, **LFC**, **LFD** e **LFE**. Destas, 10 substâncias foram classificadas como diterpenos derivados do abietano (sete *nor*-icetexanos: **SV1-SV7**, e três *dinor*-icetexanos: **SV8-SV10**), cinco triterpenos (três oleananos: **SV15-SV17**, e dois ursanos: **SV18** e **SV19**) e uma substância fenólica derivada do ácido caféico (**SV20**). As substâncias **SV1**, **SV3**, **SV8**, **SV15** e **SV18** já haviam sido isoladas no estudo anterior (OLIVEIRA, 2017), enquanto que **SV4**, **SV5**, **SV6**, **SV7**, **SV9** e **SV10** são inéditas na literatura, e as demais estão sendo descritas pela primeira vez na espécie *S. lachnostachys*.

O isolamento dos constituintes químicos dos caules de *S. lachnostachys* permitiu a identificação de sete substâncias, as quais também estavam presentes nas folhas: **SV1**, **SV2**, **SV3**, **SV8**, **SV9**, **SV15**, **SV18** e **SV20**.

Já o estudo fitoquímico das partes aéreas de *S. melissiflora* rendeu o isolamento de sete substâncias, sendo quatro clerodanos (dois *cis*-clerodanos, **SV11** e **SV13**; um *trans*-clerodano, **SV12**; e um *seco*-clerodano, **SV14**). Destas as substâncias **SV12** e **SV13** são inéditas na literatura. Além destes, foram também isoladas as substâncias **SV15**, **SV18** e **SV20**, as quais também estavam presentes nas folhas e caules de *S. lachnostachys*.

A identificação dessas substâncias será discutida a seguir. A escolha da ordem de identificação foi determinada por similaridade estrutural ao invés de isolamento cromatográfico.

TABELA 13 – RELAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NAS ESPÉCIES *S. lachnostachys* E *S. melissiflora*

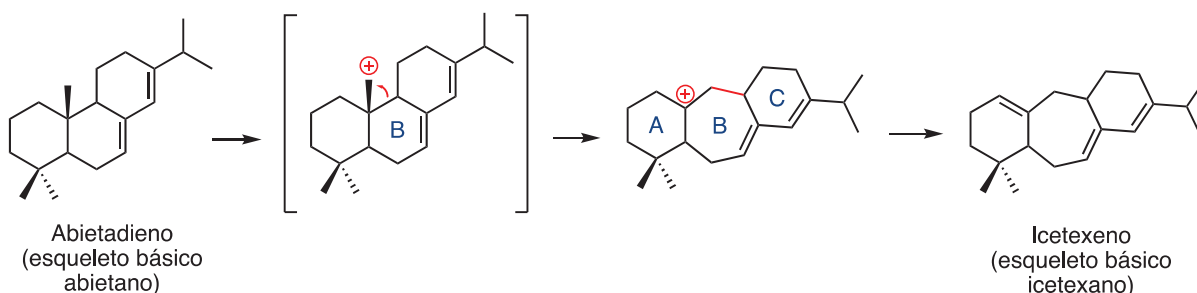
Classe	<i>S. lachnostachys</i>	<i>S. melissiflora</i>	Código	Substância identificada
Diterpenos derivados do abietano	F, C	-	SV1	Fruticulina A
	F, C	-	SV2	Demetilfruticulina A
	F, C	-	SV3	Isofruticulina A
	F	-	SV4*	Demetilisofruticulina A
	F	-	SV5*	20-hidroxi-isofruticulina A
	F	-	SV6*	20-hidroxi-demetilisofruticulina A
	F	-	SV7*	6-hidroxi-demetilisofruticulina A
	F, C	-	SV8	Fruticulina B
	F, C	-	SV9*	Demetilfruticulina B
	F	-	SV10*	20-hidroxi-demetilfruticulina B
Diterpenos derivados do clerodano	-	PA	SV11	Melissiflorina A
	-	PA	SV12*	7,8 α -diidrosalviacoccina
	-	PA	SV13*	Melissiflorina B
	-	PA	SV14	7- <i>epi</i> -salviandulina A
Triterpenos tipo oleanano	F, C	PA	SV15	Ácido oleanólico
	F	-	SV16	Ácido maslínico
	F	-	SV17*	Ácido 11 α -hidroxi-oleanólico
Triterpenos tipo ursano	F, C	PA	SV18	Ácido ursólico
	F	-	SV19	Ácido heterobetulínico
Substância fenólica	F, C	PA	SV20	Ácido rosmarínico

- substância não isolada na espécie; F = folhas; C = caules; PA = partes aéreas; *substâncias inéditas na literatura.

1.6.1 Identificação dos diterpenos tipo *nor*-icetexanos

Os icetexanos pertencem à classe dos diterpenos (substâncias com vinte átomos de carbono), sendo formados a partir dos abietano (ESQUEMA 6, p. 61). Possuem uma estrutura tricíclica do tipo C6-C7-C6, com o nome sistemático 9(10→20)-*abeo*-abietano. A biogênese dos icetexanos pode ocorrer a partir de um rearranjo do precursor abietadieno (ESQUEMA 4, p. 60), o qual apresenta o esqueleto básico dos abietanos. Nesse contexto, o esqueleto básico dos icetexanos pode ser atingido a partir da formação de um intermediário contendo um carbocátion primário e migração da metila em C-20, resultando na expansão do anel B para sete membros, que após desprotonação gera uma ligação dupla carbono-carbono (ESQUEMA 8) (SIMMONS; SAPORG, 2009).

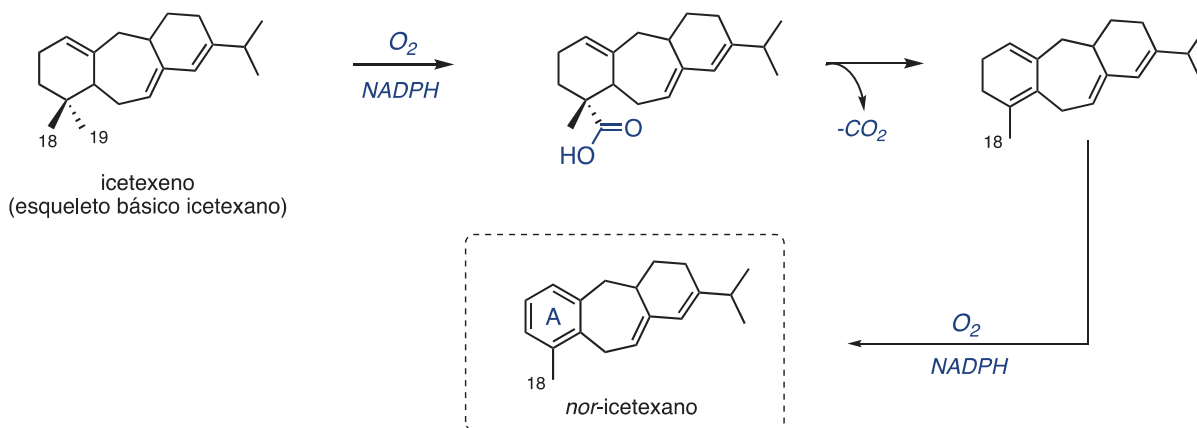
ESQUEMA 8 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS ICETEXANOS A PARTIR DOS ABIETANOS



FONTE: adaptado de SIMMONS; SAPORG, 2009.

Uma vez formado o esqueleto icetexeno, ocorre uma oxidação com auxílio de NADPH na posição C-19, originando um ácido carboxílico, de tal modo a favorecer a perda desse grupo metila por meio de uma descarboxilação, catalisada por uma enzima específica (descarboxilase). Na sequência uma segunda oxidação levaria a aromatização do anel A, formando o esqueleto *nor*-icetexano (ESQUEMA 9). De modo geral, as estruturas químicas dos icetexanos variam entre si pela presença de insaturações e diferentes graus de oxidação nas mais diversas posições, geralmente apresentando grupos hidroxila, metoxila e carbonila, comumente nas posições C-2, C-11, C-14 e C-19 (SIMMONS; SAPORG, 2009). Essa variedade estrutural se reflete muito nas inúmeras atividades biológicas apresentadas por esses diterpenos (AHMAD et al., 2019).

ESQUEMA 9 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS *nor*-ICETEXANOS A PARTIR DO ICETEXENO



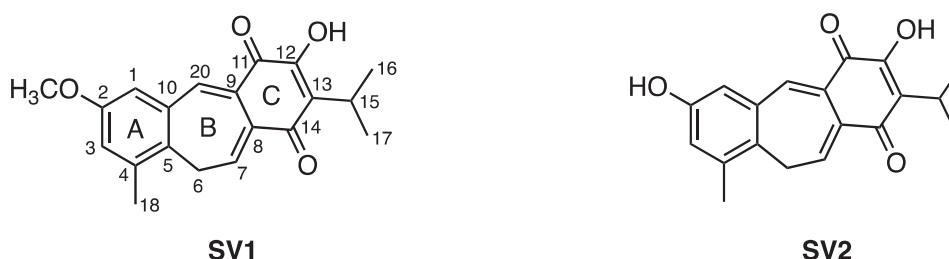
FONTE: o autor.

O presente estudo fitoquímico forneceu a identificação de sete diterpenos *nor*-icetexanos codificados como **SV1-SV7**. Esses *nor*-icetexanos apresentaram semelhanças nos dados obtidos nos espectros de RMN e nos mapas de correlações. A identificação dos diterpenos icetexanos isolados será discutida a seguir.

1.6.1.1 Identificação de **SV1** e **SV2**

As substâncias **SV1** e **SV2** (FIGURA 20) foram isoladas com aspecto de sólidos, ambas de cor amarela. **SV1** e **SV2** diferem na polaridade, visto que foram obtidas nas frações **LFA** (obtida por eluição com HEX) e **LFC** (eluída com CH₂Cl₂), respectivamente. Os espectros de RMN de ¹H revelaram uma grande similaridade entre essas duas substâncias.

FIGURA 20 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **SV1** E **SV2**



Observando o espectro de RMN de ¹H (FIGURAS 21 e 22) de **SV1** foi possível identificar dois hidrogênios aromáticos como dois dupletos com a mesma constante de acoplamento e a mesma integração para um hidrogênio cada, em δ_H 6,86 e 6,98

(1H, $J = 2,6$ Hz, H-1, H-3). O sinal em δ_H 6,98 (H-3) apresentou estar parcialmente sobreposto a um tripleto (δ_H 6,97), mas isto não interferiu em sua atribuição. A constante de acoplamento observada ($J = 2,6$ Hz) é típica de padrão de acoplamento *meta*, indicando a presença de um anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído (anel A).

O espectro ainda revelou sinais de dois hidrogênios mais desblindados, representados por dois singletos em δ_H 8,16 (1H, H-20) e 7,65 (1H, 12-OH), os quais foram atribuídos a um hidrogênio olefínico próximo a uma região de desproteção gerado por um grupo carbonila, e a um grupo hidroxila, respectivamente. Foi observado também um conjunto de sinais com a mesma constante de acoplamento, sendo um tripleto em δ_H 6,97 (1H, $J = 7,6$ Hz, H-7) e um duplete em δ_H 3,14 (2H, $J = 7,6$ Hz, H-6), correspondentes a um hidrogênio olefínico e um grupo metileno, respectivamente. Esse conjunto de sinais indica a presença de um grupo alila em **SV1**.

FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV1** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)

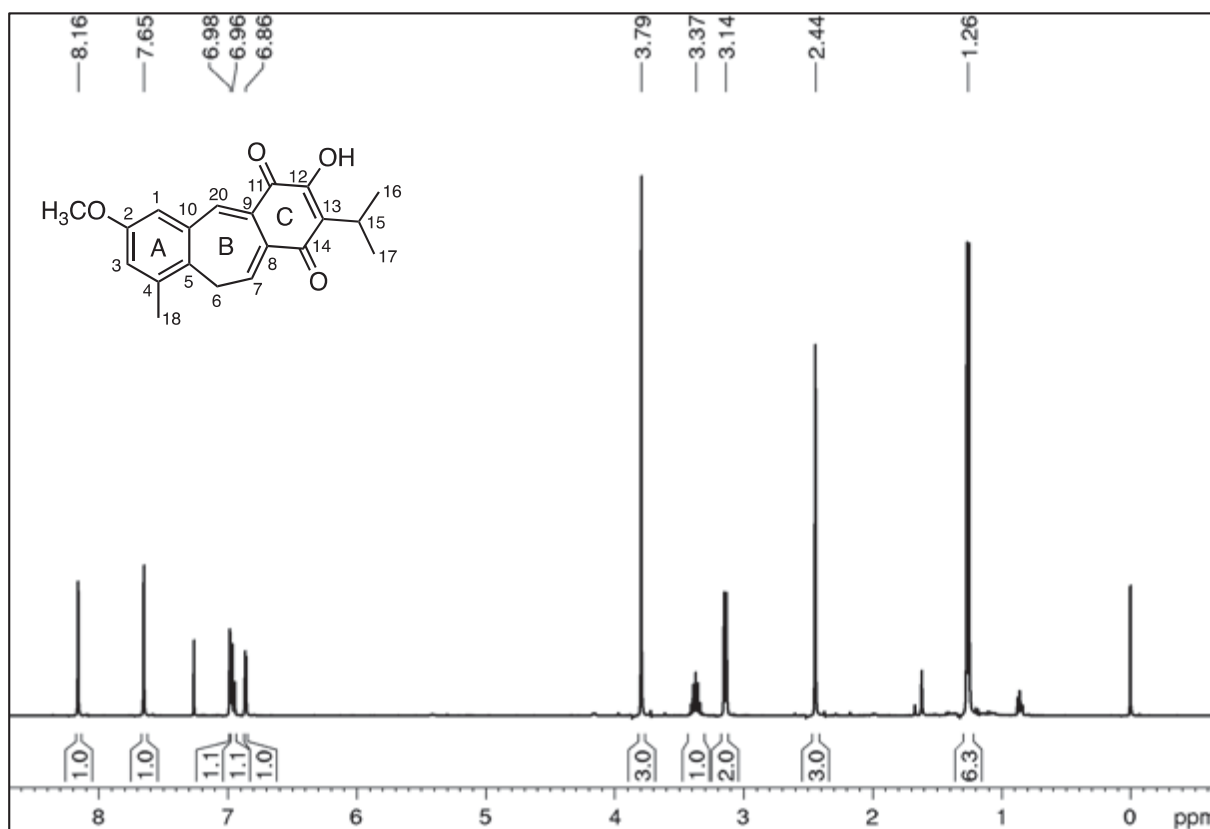
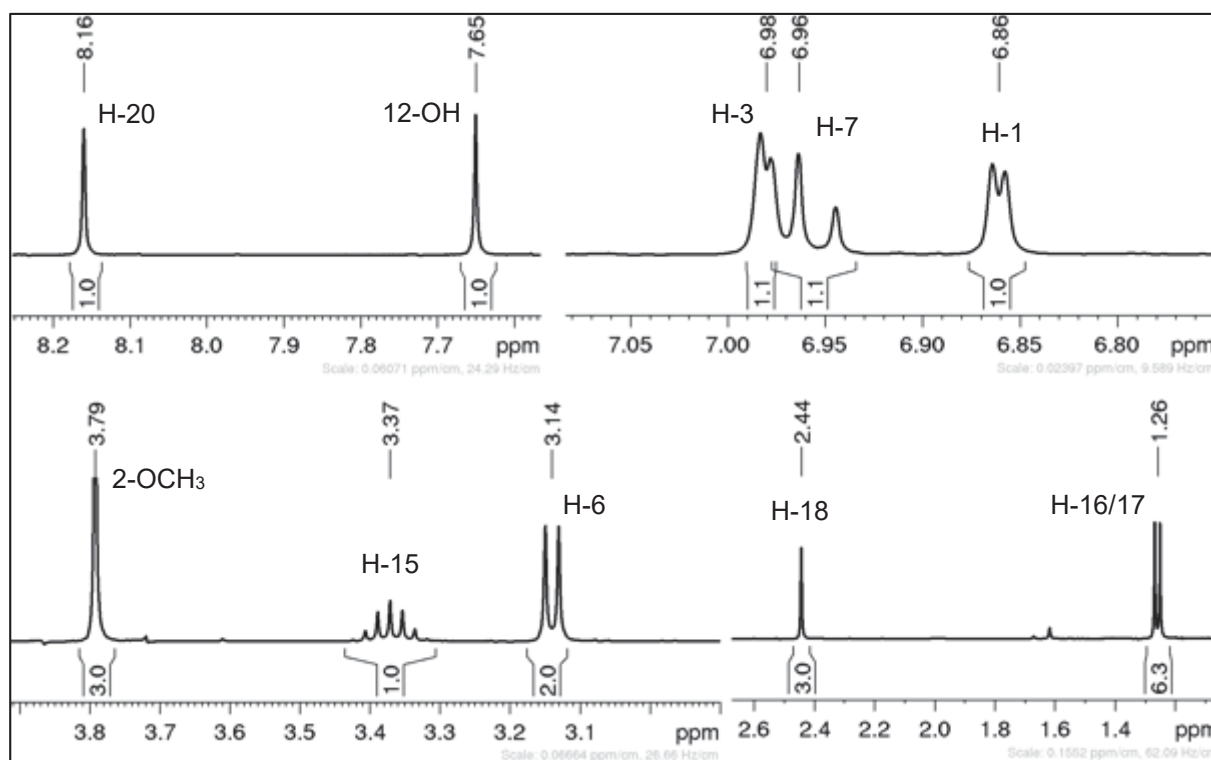


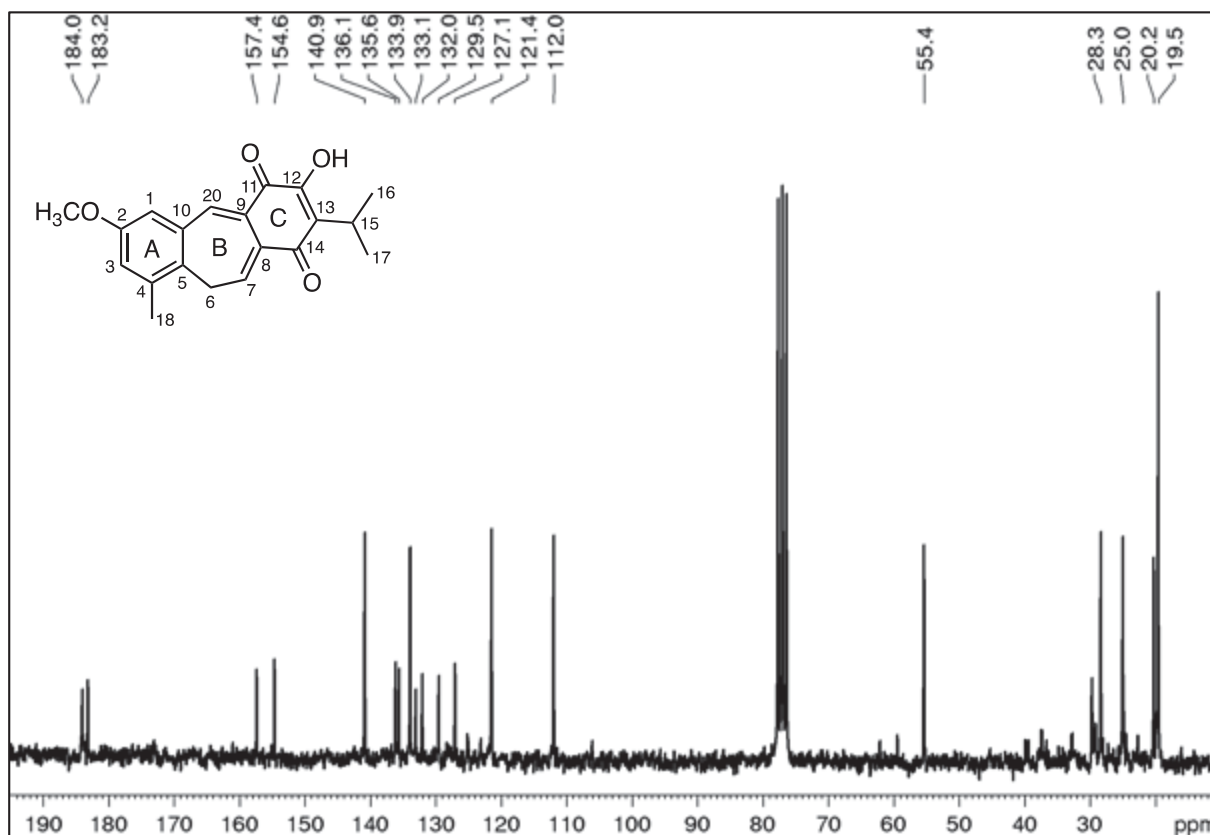
FIGURA 22 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV1**

Foi observado também um hepteto em δ_{H} 3,37 (1H, $J = 7,0$ Hz, H-15), correspondente a um hidrogênio metínico; a mesma constante de acoplamento foi observada para um duplete, integrando para seis hidrogênios em δ_{H} 1,26 (1H, $J = 7,0$ Hz, H-16, H-17), indicando se tratar de dois grupos metila quimicamente equivalentes. Esses dados indicam a presença de um grupo isopropila. Uma metila ligada a um anel aromático também foi observada como um simpleto em δ_{H} 2,44 (3H, H-18). **SV1** também apresenta um grupo metoxila, que pode ser confirmado por um simpleto em δ_{H} 3,79 (2-OMe), com integração para três hidrogênios.

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 23) revelou um total de 19 átomos de carbonos. Destes, o sinal em δ_{C} 55,4 (2-OMe) confirma a presença do grupo metoxila. Além disso, o sinal em δ_{C} 19,5 (C-16, C-17) foi atribuído às duas metilas equivalentes do grupo isopropila. Sendo assim, pode-se concluir que **SV1** possui um esqueleto básico com 19 átomos de carbono, correspondente a um *nor*-diterpeno. Foi também observada a presença de 12 sinais de carbonos do tipo sp^2 , dos quais dois eram oxigenados em δ_{C} 157,4 (C-2) e 154,6 (C-12), e seis que foram considerados não hidrogenados em δ_{C} 136,1 (C-4), 127,0 (C-5), 133,1 (C-8), 129,5 (C-9), 135,6 (C-10) e 132,0 (C-13). Os demais foram designados a carbonos hidrogenados visto a

presença de correlações no HSQC (FIGURA 25). Observou-se também a presença de sinais de um carbono metínico em δ_C 25,0 (C-15) e de uma metila em δ_C 20,2 (C-18). Além destes, dois grupos carbonila também foram observados em δ_C 184,0 (C-14) e 183,2 (C-11), sugerido um grupo quinona. Esses dados, em conjunto com os observados no espectro de RMN de 1H , indicam que **SV1** é um *nor*-diterpeno abietano rearranjado com esqueleto icetexano (C6-C7-C6).

FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}C\{^1H\}$ DE **SV1** (CLOROFÓRMIO-*d*, 100 MHz)



A posição dos grupos substituintes observados nos espectros de RMN de 1H e $^{13}C\{^1H\}$ foi determinada através dos mapas de correlações à ligação direta 1H - ^{13}C (HSQC, FIGURA 25) e a longa distância 1H - ^{13}C (HMBC, FIGURA 26).

Os hidrogênios de anel aromático em δ_H 6,86 (H-1) e 6,98 (H-3) revelaram no HSQC correlação direta com os carbonos em δ_C 112,0 (C-1) e 121,5 (C-3), respectivamente. Já no HMBC o H-1 revelou correlações com os carbonos do anel aromático em δ_C 121,5 (C-3), 127,0 (C-5) e 157,4 (C-2), além de um olefínico desprotegido em δ_C 140,8 (C-20). Já o H-3 correlacionou com C-1, C-2 e com a metila em C-18. A metila em δ_H 2,44 (H-18) correlacionou com C-3, C-5 e C-10, confirmando

sua posição em C-4. E ainda, a metoxila em δ_H 3,79 apresentou uma única correlação no HMBC com C-2, confirmando sua localização no anel A (FIGURA 24).

FIGURA 24 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL A DE **SV1**

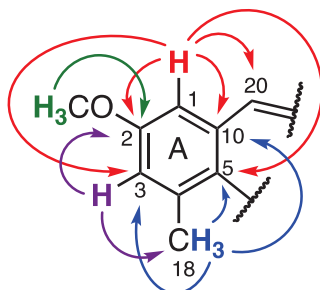


FIGURA 25 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV1** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)

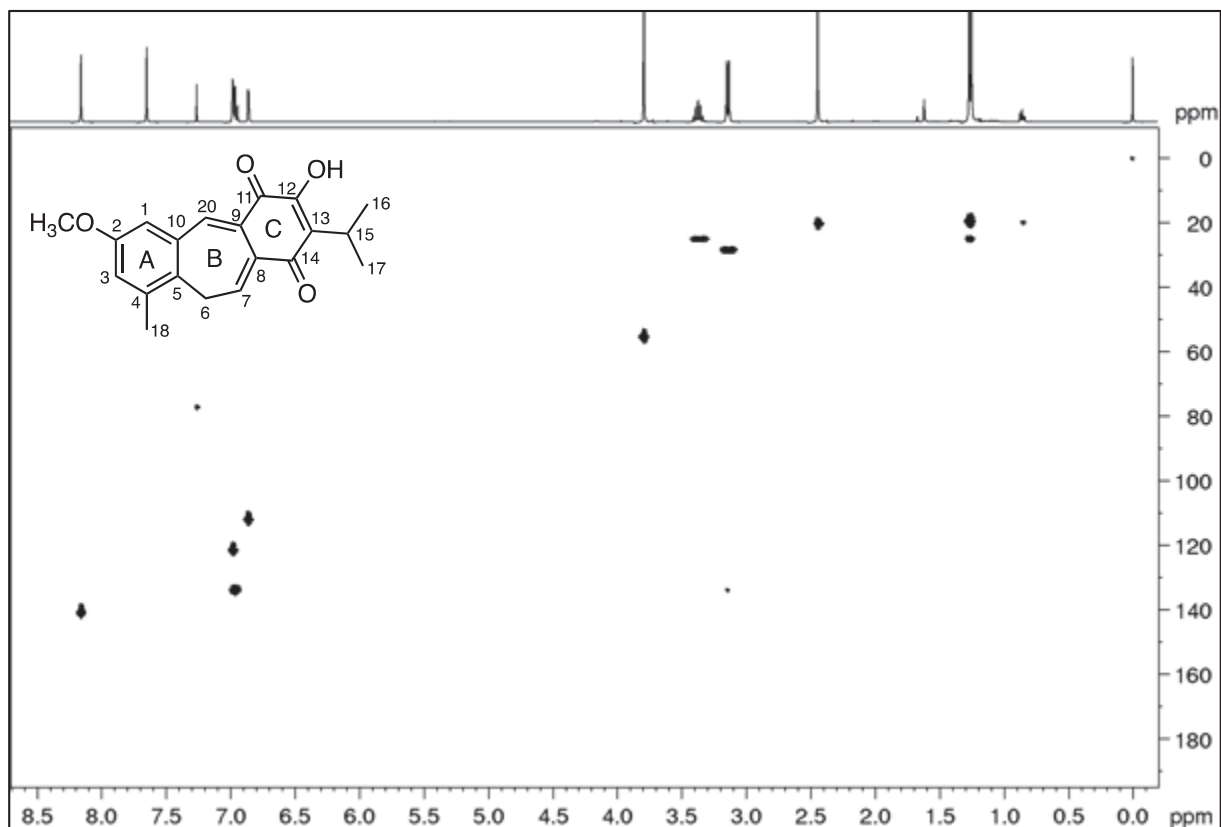
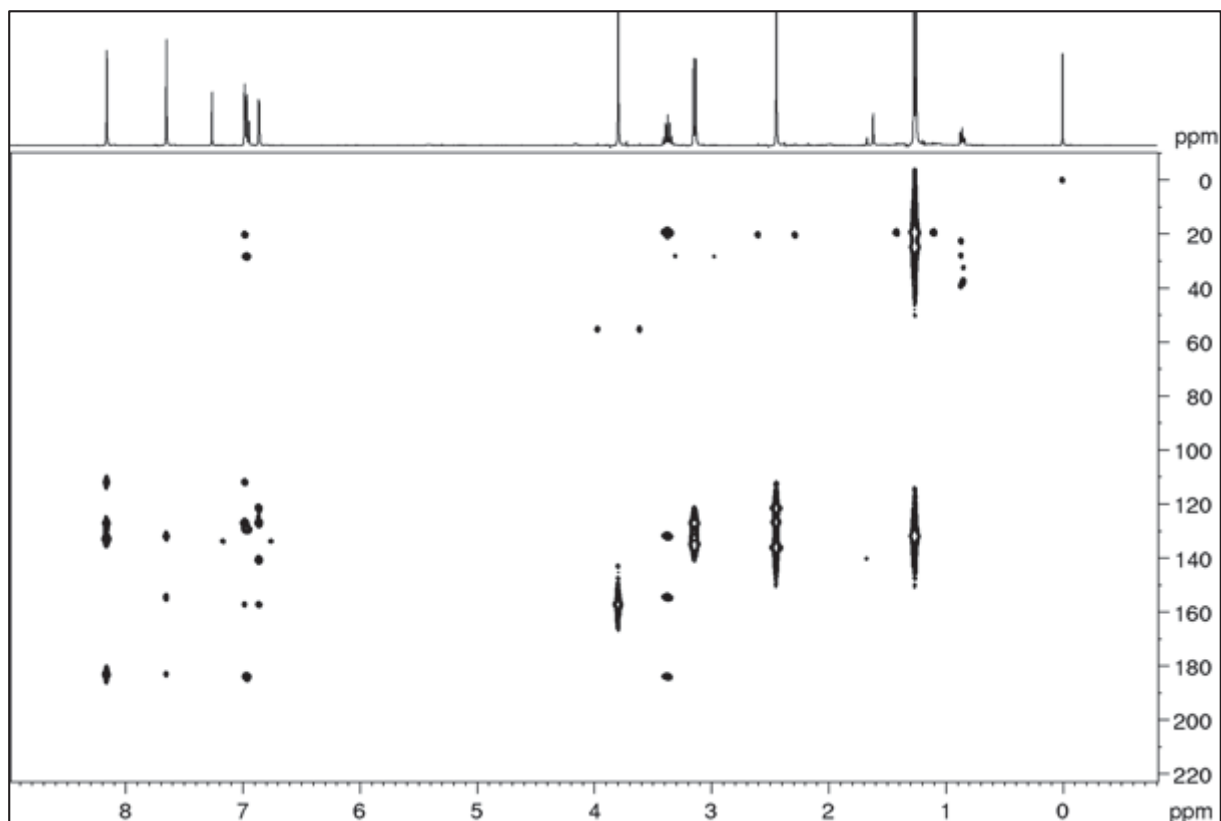
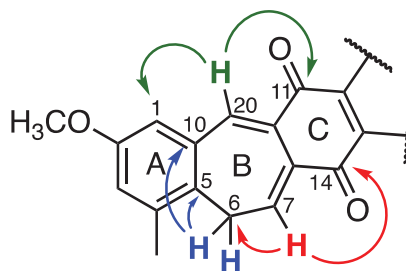


FIGURA 26 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV1** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)



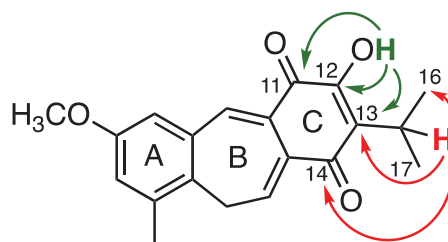
O sinal em δ_{H} 8,16 (H-20) revelou no HSQC estar ligado ao carbono olefínico em δ_{C} 140,8 (C-20). O HMBC revelou as correlações deste hidrogênio com os carbonos C-1, C-5, C-8 e com a carbonila em C-11. A correlação com C-11 justifica o deslocamento químico de H-20, uma vez que está próximo a região de desproteção gerada pelo grupo carbonila. A posição do grupo alila, correspondente aos sinais em δ_{H} 6,97 (H-7) e 3,14 (H-6), foi determinada pelas suas correlações. O hidrogênio H-6 correlacionou com C-5 e C-10, enquanto que H-7 correlacionou com C-6, C-9 e C-14. Esse conjunto de sinais foi atribuído ao anel de sete membros (anel B) presente em **SV1** (FIGURA 27).

FIGURA 27 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL B DE **SV1**



Os sinais referentes aos grupos carbonila em C-11 e C-14 foram atribuídos a um grupo *para*-quinona. O sinal em δ_H 3,37 (H-15), que foi atribuído ao hidrogênio metínico do grupo isopropila, mostrou no HMBC, correlações com as duas metilas equivalentes em C-16 e C-17, com C-13, com o carbono olefínico hidroxilado em C-12, e com a carbonila em C-14. Adicionalmente, o sinal em δ_H 7,65 não apresentou correlações no HSQC, confirmando tratar-se de um grupo hidroxila que ainda apresentou correlações no HMBC com C-11, C-12 e C-13. Diante disso, pode-se afirmar que o grupo hidroxila está na posição C-12 e o grupo isopropila em C-13, confirmando um grupo α -hidroxi- β -isopropilbenzoquinona (anel C) (FIGURA 28).

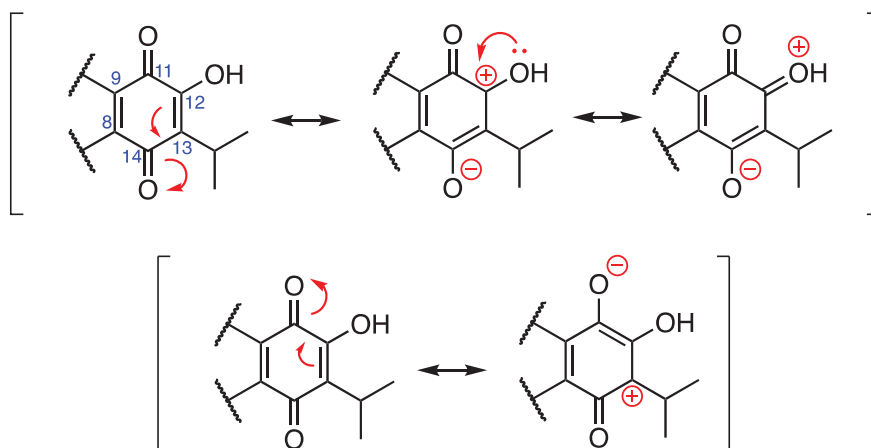
FIGURA 28 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DOS SINAIS DO ANEL C DE **SV1**



A localização dos grupos carbonila da *para*-quinona foi determinada por meio das correlações obtidas pelos mapas de correlação. Existe uma diferença nos deslocamentos químicos de C-11 (δ_C 183,2) e C-14 (δ_C 184,2) que é consequência do efeito de deslocalização eletrônica que ocorre no grupo α -hidroxi- β -isopropilbenzoquinona. Considerando a *para*-quinona sem substituintes os deslocamentos químicos das carbonilas seriam equivalentes. Nos híbridos de deslocalização eletrônica representados no ESQUEMA 10 é possível notar cargas parciais positivas nas posições C-12 e C-13. Porém, um grupo hidroxila em C-12, faz com que os pares de elétrons não ligantes do oxigênio migrem para ligação C-O,

estabilizando parcialmente essa carga positiva em C-12. Por outro lado, quando se tem uma carga parcial positiva em C-13 não há grupos que estabilizem essa carga. Essa carga gerada em C-13 diminui a densidade eletrônica da carbonila em C-14, consequentemente, aumentando seu deslocamento químico. Diante disso, é possível prever a localização de cada grupo carbonila no grupo *para*-quinona através do seu deslocamento químico (ESQUEMA 10). Vale enfatizar que essa abordagem não está considerando efeitos de grupos hidroxila em C-20 e C-7, os quais poderiam se associar com a carbonila através de ligação intramolecular de hidrogênio, causando maior desproteção do grupo carbonila associado.

ESQUEMA 10 – EFEITO DE DESLOCALIZAÇÃO ELETRÔNICA DO GRUPO α -HIDROXI- β -ISOPROPILBENZOQUINONA



FONTE: o autor.

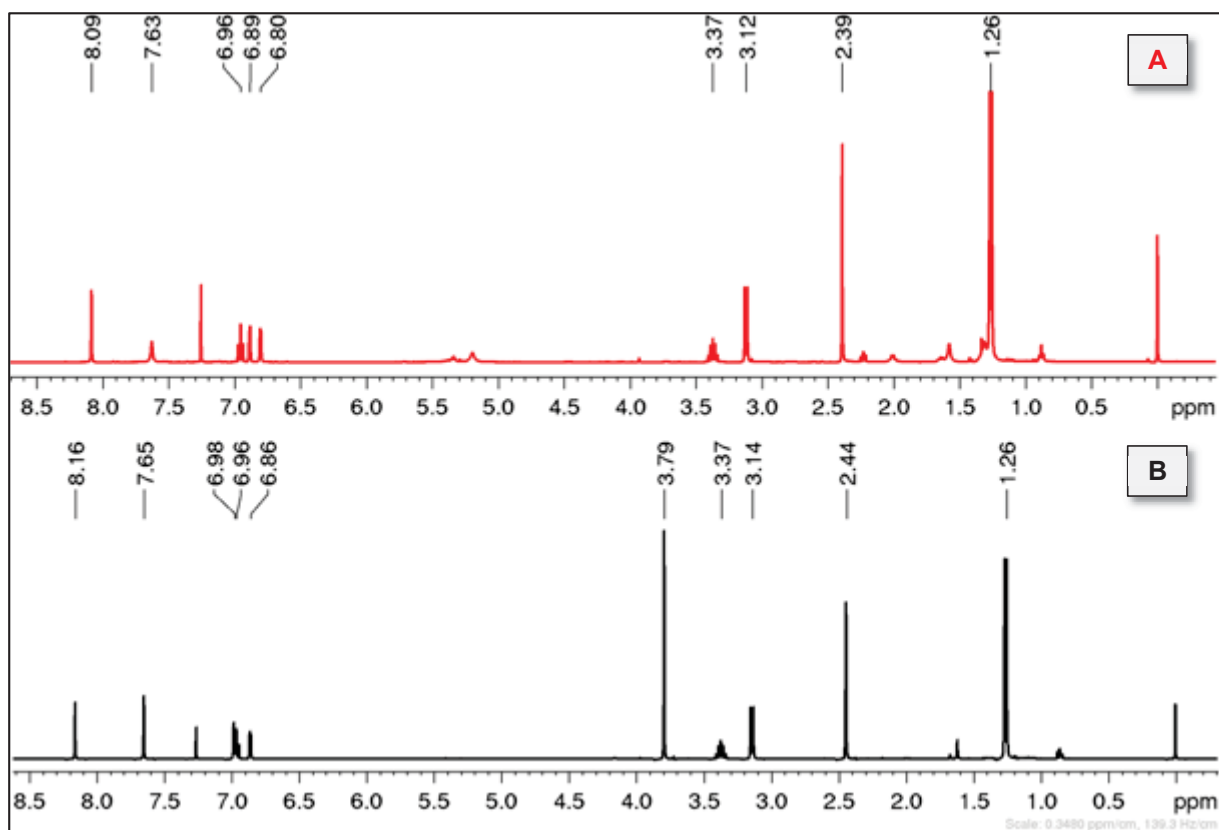
As correlações apresentadas e as demais observadas no HSQC e HMBC (TABELA 14) confirmam a estrutura da substância **SV1**, como um *nor*-diterpeno abietano com esqueleto icetexano, conhecido como fruticulina A (FIGURA 20, p. 99). Os dados obtidos estão de acordo com aqueles da literatura (BISIO et al., 2008). Além disso, **SV1** já havia sido isolada e identificada no estudo anterior realizado com a fração **LFA** das folhas de *Salvia lachnostachys* (OLIVEIRA, 2017).

TABELA 14 – DADOS DE RMN DE **SV1** (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz) COMPARADOS COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA A (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz; BISIO et al., 2008)

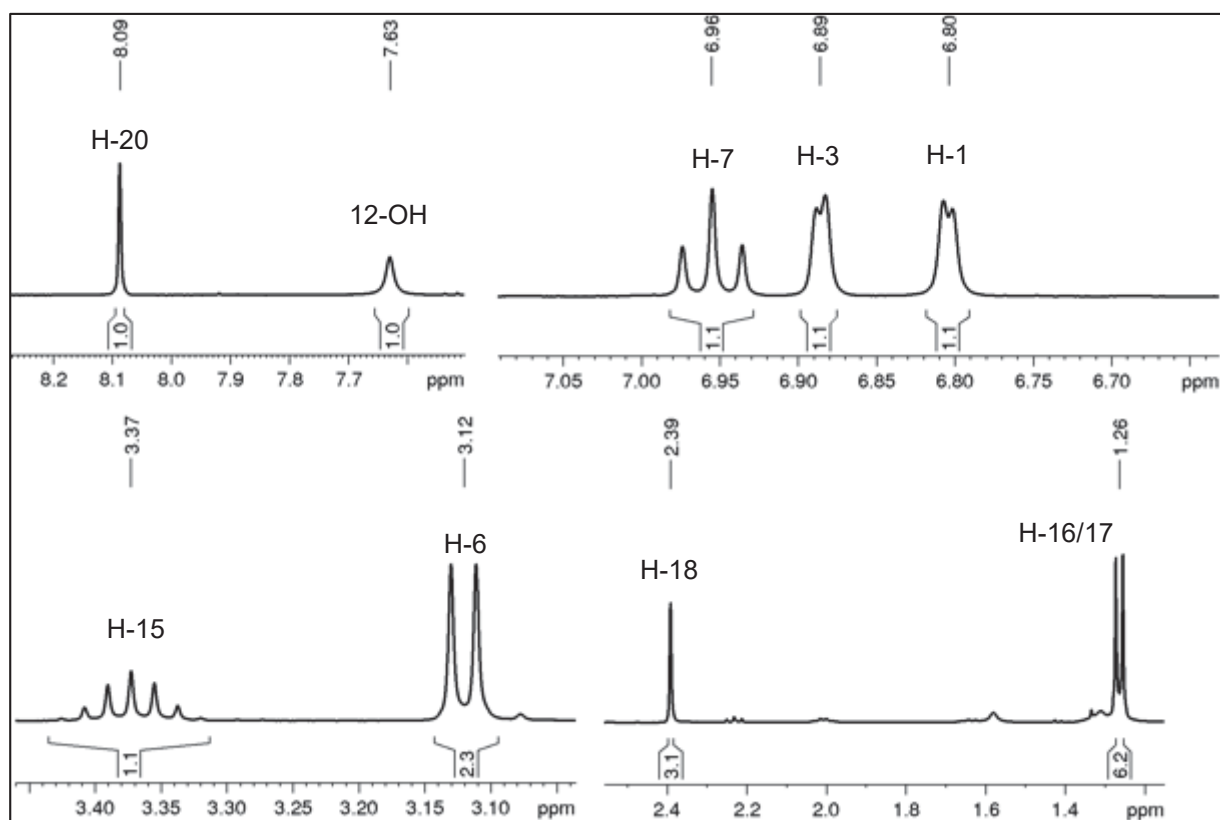
Posição	SV1			Fruticulina A	
	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	112,0	6,86 <i>d</i> (2,6)	2,3,5,20	112,0	6,89 <i>d</i> (1,8)
2	157,4	-	-	157,4	-
3	121,5	6,98 <i>d</i> (2,6)	1,2,18	121,5	7,0 <i>d</i> (1,8)
4	136,1	-	-	135,6	-
5	127,0	-	-	127,1	-
6	28,3	3,14 <i>d</i> (7,6)	5,10	28,3	3,17 <i>d</i> (7,6)
7	133,9	6,97 <i>t</i> (7,6)	6,9,14	134,0	6,98 <i>t</i> (7,6)
8	133,1	-	-	133,1	-
9	129,5	-	-	129,5	-
10	135,6	-	-	136,2	-
11	183,2	-	-	183,2	-
12	154,6	-	-	154,7	-
13	132,0	-	-	132,0	-
14	184,0	-	-	184,1	-
15	25,0	3,37 <i>hept</i> (7,0)	12,13,14,16,17	25,0	3,39 <i>m</i>
16	19,5	1,26 <i>d</i> (7,0)	13,15,17	19,6	1,28 <i>d</i> (7,0)
17	19,5	1,26 <i>d</i> (7,0)	13,15,16	19,6	1,28 <i>d</i> (7,0)
18	20,2	2,44 <i>s</i>	3,5,10	20,3	2,47 <i>s</i>
20	140,8	8,16 <i>s</i>	1,5,8,11	140,9	8,19 <i>s</i>
12-OH	-	7,65 <i>s</i>	11,12,13	-	-
2-OCH₃	55,3	3,79 <i>s</i>	2	55,4	3,82 <i>s</i>

A substância **SV2** revelou em seu espectro de RMN de 1H quase o mesmo conjunto de sinais presentes no espectro de RMN de 1H da substância **SV1**. Entretanto, observando a sobreposição dos dois espectros (FIGURA 29) é possível notar a ausência do sinal do grupo metoxila na região de δ_H 3,79 em **SV2**.

FIGURA 29 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE **SV2** (A, CLOROFÓRMIO- d , + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz) COM **SV1** (B, CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)



Ampliando os sinais de **SV2** (FIGURA 30) foi possível determinar a presença dos três anéis A, B e C, como foi atribuído para **SV1**. O anel A foi identificado por dois dupletos em δ_{H} 6,89 e 6,80 (1H, $J = 2,3$ Hz, H-3 e H-1), os quais agora não apresentam sobreposição, além de um simpleto em δ_{H} 2,39 (3H, H-18), típico da metila ligada em C-4. Os sinais característicos do anel B também estavam presentes no espectro, vistos como um simpleto desprotegido em δ_{H} 8,09 (1H, s, H-20), além dos sinais do grupo alila que foram observados como um tripleto em δ_{H} 6,95 (1H, $J = 7,6$ Hz, H-7) e um duplete em δ_{H} 3,12 (2H, $J = 7,6$ Hz, H-6). E por fim, o espectro também revelou os substituintes do anel C: um simpleto em δ_{H} 7,63 (12-OH) e o conjunto de sinais em δ_{H} 3,37 (1H, *hept*, $J = 7,1$ Hz, H-15) e δ_{H} 1,26 (6H, *d*, $J = 7,1$ Hz, H-16 e H-17), confirmando os grupos hidroxila e isopropila, que são os substituintes do anel C.

FIGURA 30 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV2**

Observando o mapa de correlação à longa distância de **SV2** (HMBC, FIGURA 32) foram verificadas as correlações do sinal em δ_{H} 6,80 (H-1) com os carbonos do anel aromático em δ_{C} 122,3 (C-3) e δ_{C} 126,2 (C-5) do anel A, com o carbono olefínico típico de C-20 em δ_{C} 141,1, além de um olefínico oxigenado em δ_{C} 154,7, o qual foi atribuído para C-2. Devido à ausência de grupamento metoxila foi atribuído a presença de um grupo hidroxila nesta posição.

FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV2**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

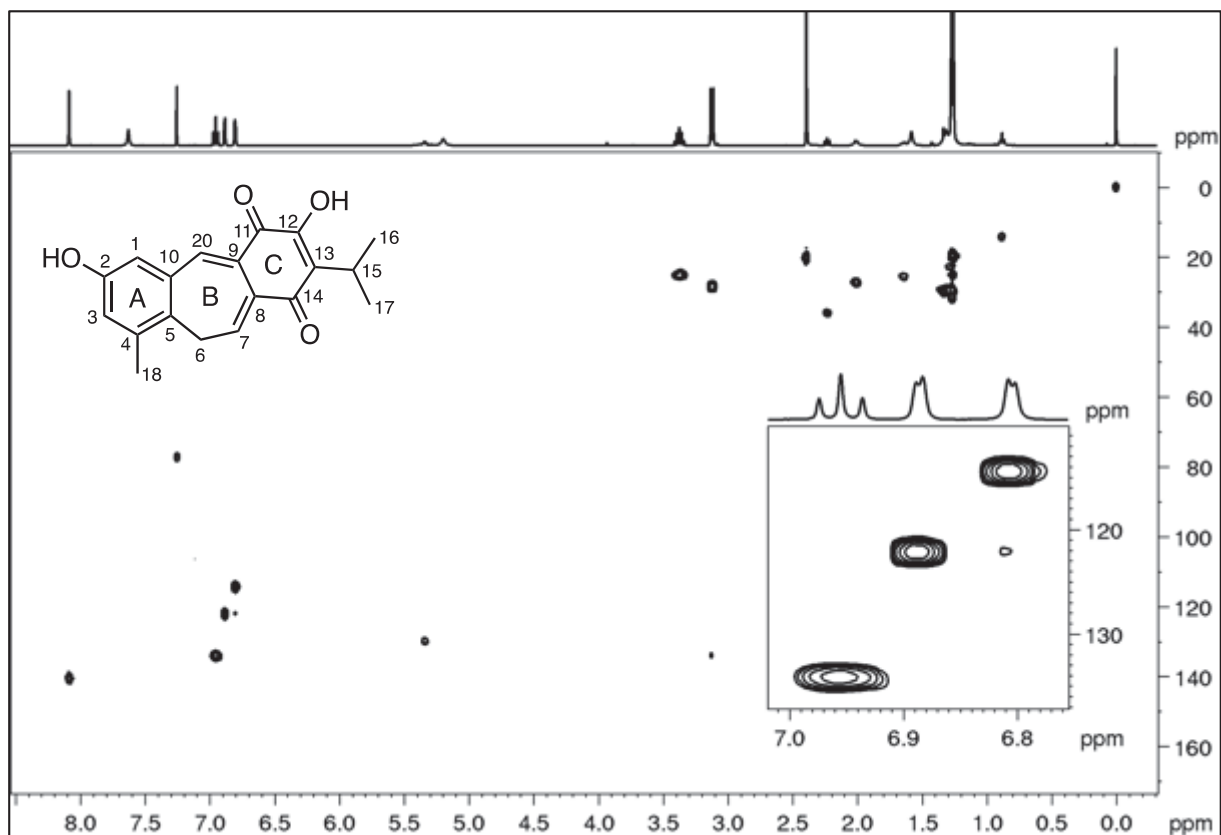
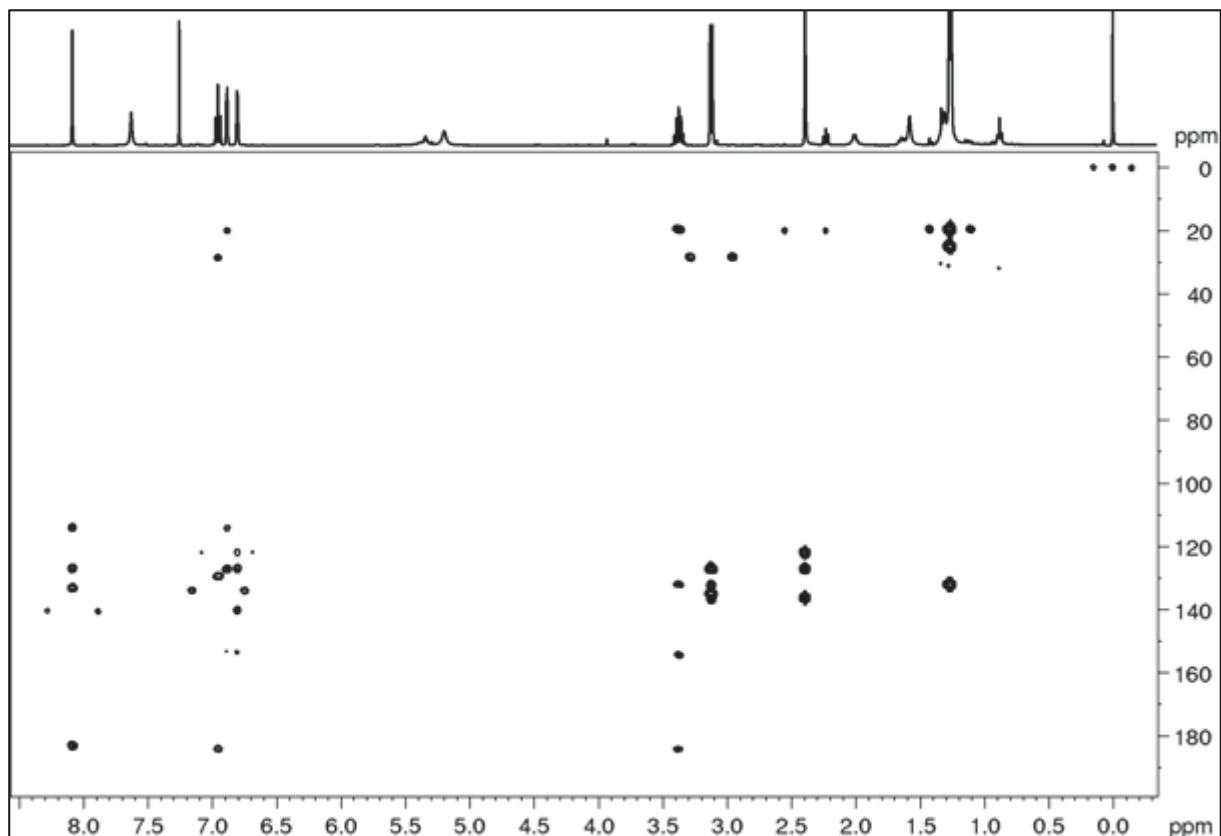
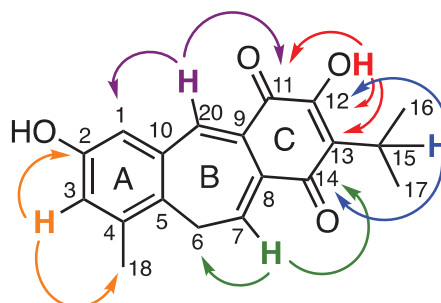


FIGURA 32 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV2**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)



O grupo *para*-quinona (anel C) também pode ser confirmado através das correlações apresentada pelos sinais em δ_H 6,95 (H-7), 3,37 (H-15), 8,09 (H-20) e 7,63 (12-OH). Os sinais de H-20 e 12-OH correlacionaram com δ_C 183,4 (C-11), enquanto que os sinais de H-7 e H-15 correlacionaram com δ_C 184,5 (C-14), confirmando a presença do grupo *para*-quinona (FIGURA 33). Essas correlações também confirmam a posição do grupo hidroxila em δ_H 7,63, visto que exibiu correlação com C-11, confirmando sua posição em C-12 ao invés de C-2 que também está ligado a um grupo hidroxila.

FIGURA 33 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV2**



As correlações observadas no HSQC (FIGURA 31) e HMBC (TABELA 15) indicam que **SV2** é um derivado da fruticulina A (**SV1**), diferindo desta por apresentar um grupo hidroxila em C-2, ao invés de um grupo metoxila. **SV2** (FIGURA 20, p. 99) é uma substância conhecida como demetilfruticulina A, tendo sido isolada e identificada na espécie *Salvia corrugata* (BISIO et al., 2008), e que está sendo descrita pela primeira vez na espécie *S. lachnostachys*.

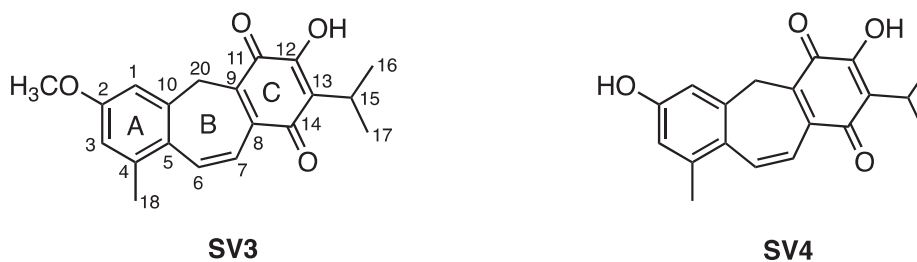
TABELA 15 – DADOS DE RMN DE **SV2** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz) COMPARADOS COM OS DADOS DA LITERATURA PARA DEMETILFRUTICULINA A (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz; BISIO et al., 2008)

Pos.	SV2			Demetilfruticulina A	
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
1	114,4	6,80 <i>d</i> (2,3)	2,3,5,20	114,2	6,83 <i>d</i> (2,0)
2	154,7	-	-	153,4	-
3	122,3	6,89 <i>d</i> (2,3)	1,2,18	122,0	6,90 <i>d</i> (2,0)
4	136,1	-	-	135,7	-
5	126,2	-	-	127,0	-
6	28,4	3,12 <i>d</i> (7,6)	10	28,3	3,14 <i>d</i> (7,6)
7	134,0	6,95 <i>t</i> (7,6)	6,9,14	134,1	6,99 <i>t</i> (7,6)
8	133,6	-	-	133,1	-
9	129,4	-	-	129,6	-
10	135,7	-	-	136,4	-
11	183,4	-	-	183,1	-
12	155,1	-	-	154,8	-
13	132,2	-	-	132,1	-
14	184,5	-	-	184,1	-
15	25,1	3,37 <i>hept</i> (7,1)	12,13,14,16,17	25,0	3,40 <i>m</i>
16	19,5	1,26 <i>d</i> (7,1)	13,15,17	19,5	1,29 <i>d</i> (7,0)
17	19,5	1,26 <i>d</i> (7,1)	13,15,16	19,5	1,29 <i>d</i> (7,0)
18	20,1	2,39 <i>s</i>	3,4,5	20,1	2,42 <i>s</i>
20	141,1	8,09 <i>s</i>	1,9,11	140,6	8,12 <i>s</i>
12-OH	-	7,63 <i>s</i>	11,12,13	-	-

1.6.1.2 Identificação de **SV3** e determinação estrutural de **SV4**

As substâncias **SV3** e **SV4** (FIGURA 34) que estavam presentes nas frações **LFA** e **LFC**, respectivamente, foram obtidas como sólidos de cor vermelha. Ambas revelaram similaridade nos dados obtidos por RMN.

FIGURA 34 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **SV3** E **SV4**



Iniciando por **SV3**, em seu espectro de RMN 1H (FIGURAS 35 e 36) foi observado um simpleto-largo com integração para dois hidrogênios em δ_H 6,70. Ao

observar as correlações a uma ligação (HSQC, FIGURA 37) foi comprovado que este sinal correspondia a dois hidrogênios não equivalentes, pois correlacionaram com dois carbonos em δ_c 110,3 (C-1) e δ_c 115,6 (C-3). Os deslocamentos químicos observados, similares àqueles obtidos para os *nor*-icetexanos **SV1** e **SV2**, sugeriram que esses dois hidrogênios eram H-1 e H-3 em orientação *meta* no anel A. O sinal de um grupo metila também foi observado em δ_H 2,40 (3H, s, H-18), além do sinal de um grupo metoxila em 3,82 (3H, s, 2-OCH₃). Foram também observados os sinais dos substituintes do anel C: um grupo isopropila em δ_H 3,20 (3H, *hept*, $J = 7,0$ Hz, H-15) e 1,20 (6H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-16 e H-17), e um grupo hidroxila como um simpleto largo δ_H 7,14 (12-OH). Através do HMBC foram observados os sinais de dois grupos carbonila da *para*-quinona em δ_c 181,8 (C-11) e 186,7 (C-14). Esses dados são condizentes com o anel C, como foi determinado anteriormente para **SV1** e **SV2**.

FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **SV3** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz)

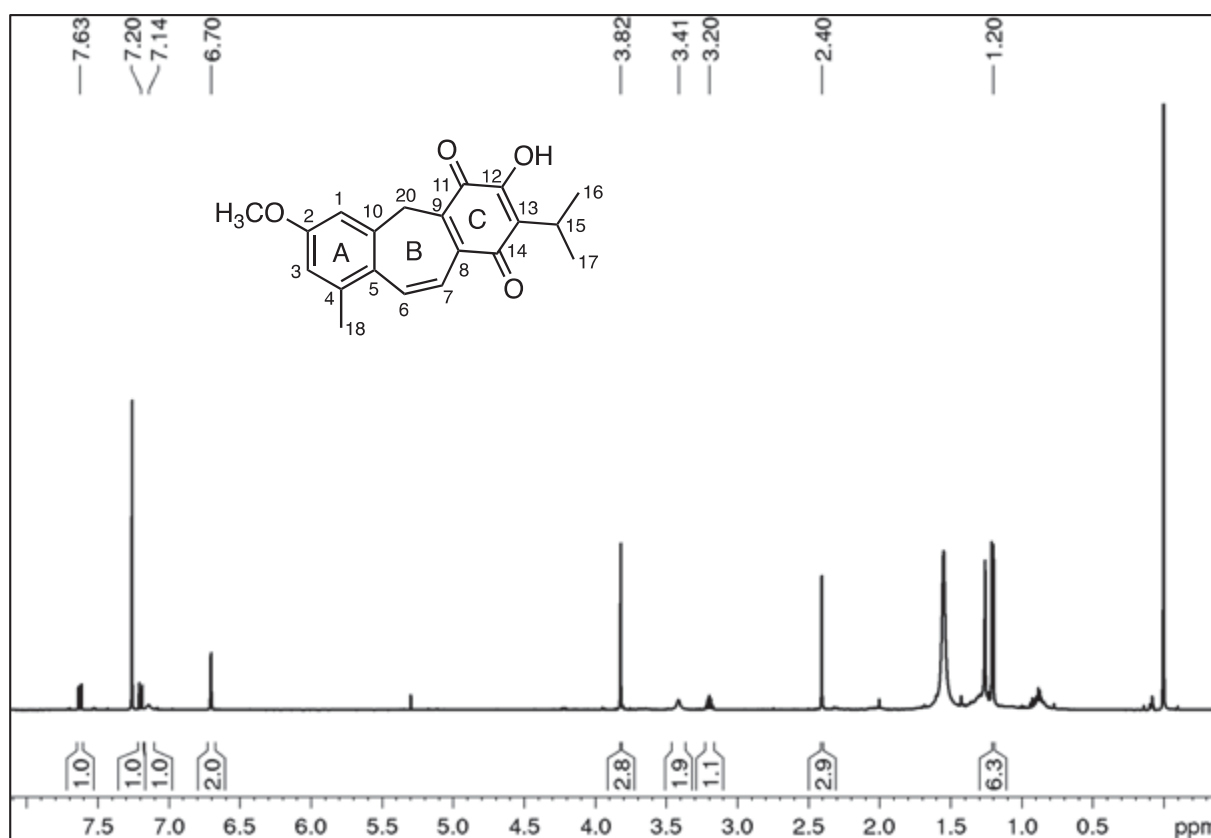
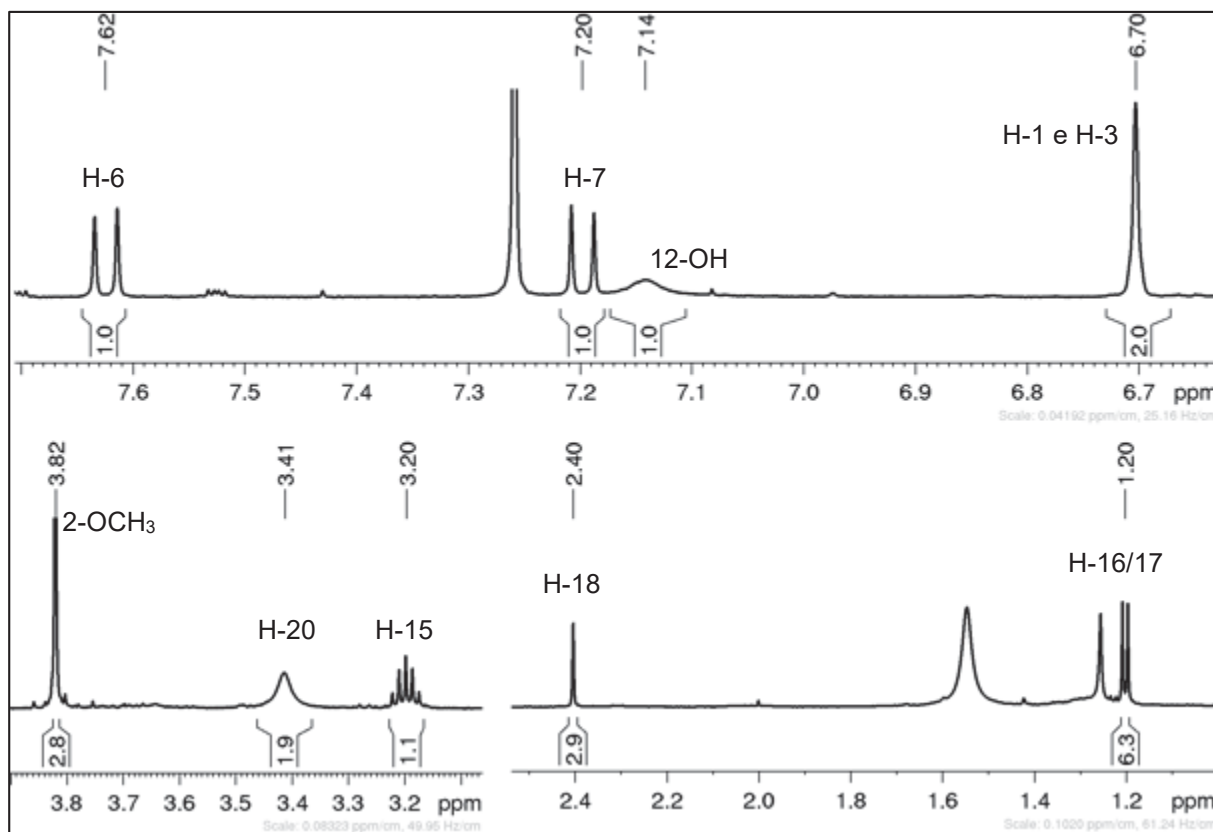
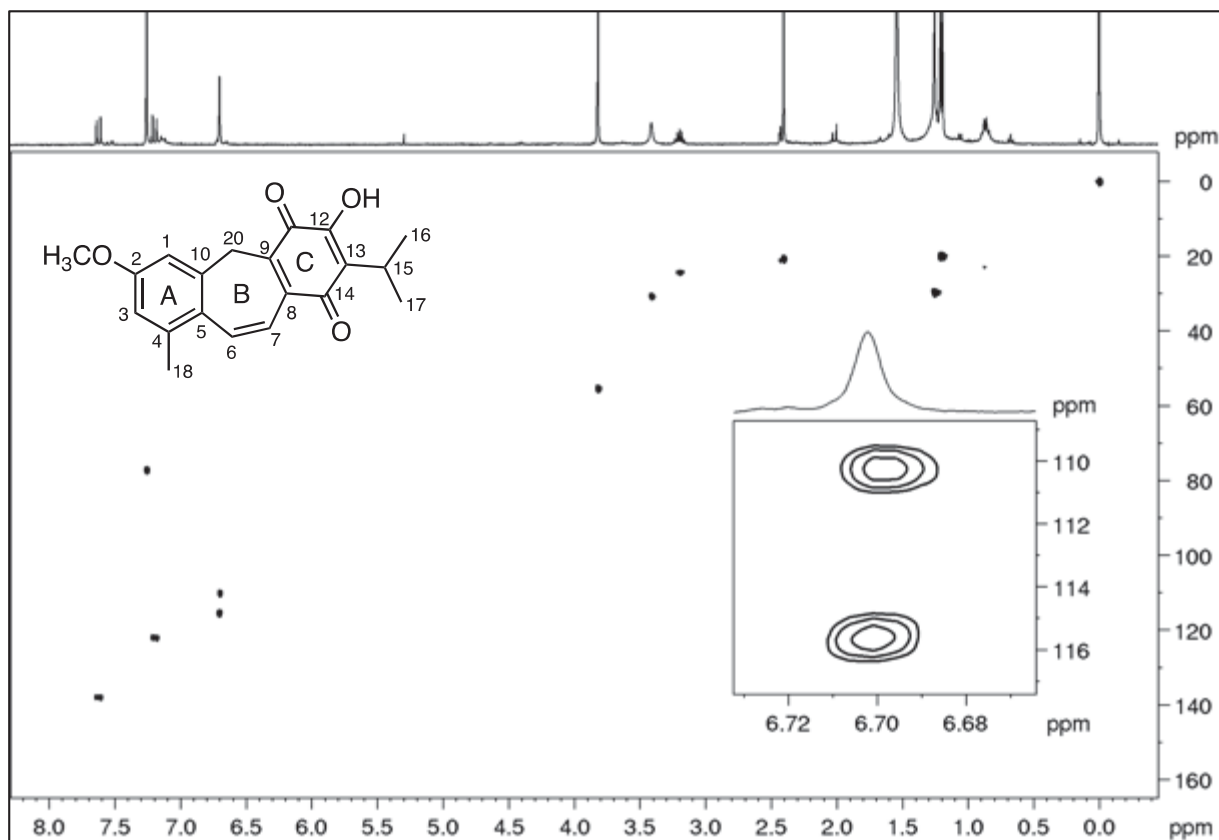


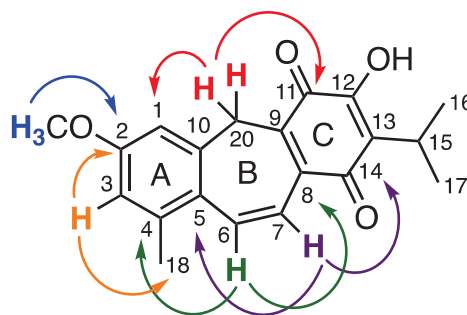
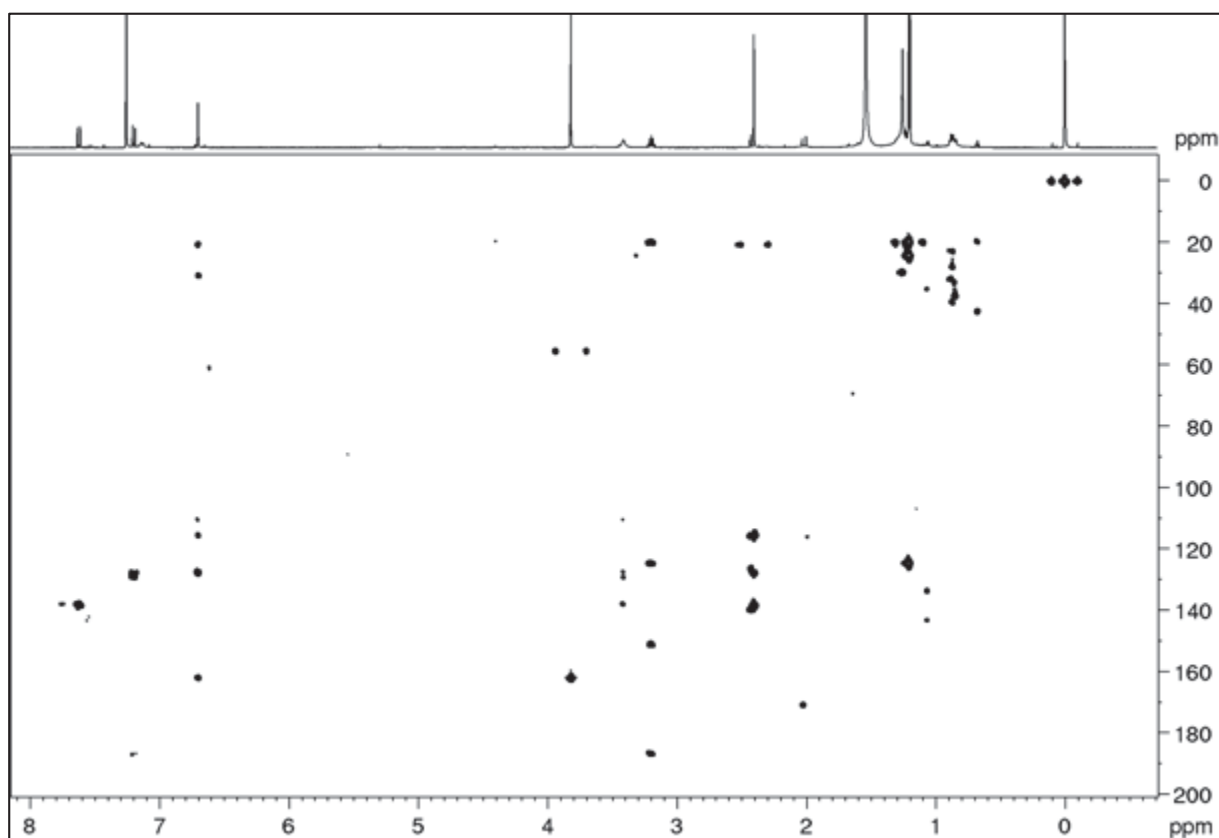
FIGURA 36 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV3**

Observando novamente o espectro de RMN de ^1H , foi possível distinguir **SV3** das demais pelos substituintes do anel B, visto que não foram observados os sinais característicos deste anel como em **SV1** e **SV2**. No espectro de RMN de ^1H de **SV3** foram observados dois dupletos, integrando para um hidrogênio cada, em δ_{H} 7,62 e 7,20 ($J = 12,1$ Hz), os quais foram atribuídos a dois hidrogênios olefínicos no anel B (H-6 e H-7). A constante de acoplamento observada está de acordo com hidrogênios vizinhos em um anel de sete membros. O valor elevado dessa constante de acoplamento pode ser justificado pela sobreposição lateral entre as ligações σ (C-H) uma vez que 3J aumenta quando essas ligações estão mais sobrepostas (paralelas). Devido a isto, os hidrogênios destes dois sinais foram localizados em C-6/C-7. O espectro ainda apresentou um simpleto em δ_{H} 3,41, com integração para dois hidrogênios, sugerindo a presença de um grupo metileno, que deve ser H-20.

FIGURA 37 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV3** (CLOROFÓRMIO- d , 600 MHz)



A confirmação da posição dos sinais do anel B pode ser comprovada pelas correlações observadas no HMBC (FIGURA 39). O sinal em δ_{H} 3,41 (H-20) revelou correlações com os carbonos do anel A em δ_{C} 110,3 (C-1) e 127,6 (C-5), com o carbono olefínico no anel C em δ_{C} 137,9 (C-8) e com a carbonila da *para*-quinona em δ_{C} 181,8 (C-11), confirmando a sua localização em C-20. Já o hidrogênio olefínico em δ_{H} 7,62 (H-6) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 138,4 (C-4) e 137,9 (C-8), enquanto que o sinal em δ_{H} 7,20 (H-7) correlacionou com os carbonos C-5, 128,8 (C-9) e com o grupo carbonila em C-14 (FIGURA 38).

FIGURA 38 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV3**FIGURA 39 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ¹H-¹³C (HMBC) DE **SV3** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz)

Estas e as demais correlações observadas nos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 16) permitiram propor a estrutura de **SV3** (FIGURA 34, p. 112) como um isômero da fruticulina A (**SV1**), diferindo pela posição das ligações duplas no anel B. Essa substância já foi isolada anteriormente das folhas de *Salvia lachnostachys* e denominada isofruticulina A (OLIVEIRA et al., 2016).

TABELA 16 – DADOS DE RMN DE **SV3** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ISOFRUTICULINA A (OLIVEIRA et al., 2016)

Pos.	SV3			Isofruticulina A	
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
1	110,3	6,69 s/*	2,3,5,20	110,3	6,69 s/
2	162,0	-	-	162,0	-
3	115,6	6,70 s/*	1,2,5,18	115,6	6,70 s/
4	138,4	-	-	138,4	-
5	127,6	-	-	127,6	-
6	138,1	7,62 <i>d</i> (12,1)	4,8	138,1	7,62 <i>d</i> (12,1)
7	122,4	7,20 <i>d</i> (12,1)	5,9,14	122,4	7,20 <i>d</i> (12,1)
8	137,9	-	-	137,9	-
9	128,8	-	-	128,8	-
10	137,9	-	-	137,9	-
11	181,8	-	-	181,8	-
12	151,1	-	-	151,1	-
13	124,5	-	-	124,5	-
14	186,7	-	-	186,7	-
15	24,4	3,20 <i>hept</i> (7,0)	12,13,14,16,17	24,4	3,20 <i>hept</i> (7,0)
16	20,0	1,20 <i>d</i> (7,0)	13,15,17	20,0	1,20 <i>d</i> (7,0)
17	20,0	1,20 <i>d</i> (7,0)	13,15,16	20,0	1,20 <i>d</i> (7,0)
18	20,6	2,40 <i>s</i>	3,4,5	20,6	2,40 <i>s</i>
20	30,6	3,41 <i>s/</i>	1,5,8,11	30,6	3,41 <i>s</i>
12-OH	-	7,12 <i>s</i>	-	-	7,12 <i>s</i>
2-OMe	55,4	3,82 <i>s</i>	2	55,4	3,82 <i>s</i>

*posição central dada pelo HSQC.

A substância **SV4** (FIGURA 34, p. 112) foi isolada com outros constituintes minoritários, mas apesar disso foi possível realizar a sua identificação. O seu espectro de RMN de 1H revelou um perfil muito semelhante ao obtido para **SV3**. Observando a sobreposição dos dois espectros de RMN de 1H (FIGURAS 40 e 41) é possível notar tal semelhança. Entretanto, eles diferem pela ausência de um simpleto referente ao grupo metoxila. Esse dado sugeriu que **SV4** teria o mesmo esqueleto básico de **SV3**, mas com um grupo hidroxila substituindo o grupo metoxila em C-2.

FIGURA 40 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE **SV4** (A, CLOROFÓRMIO- d , + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) COM **SV3** (B, CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)

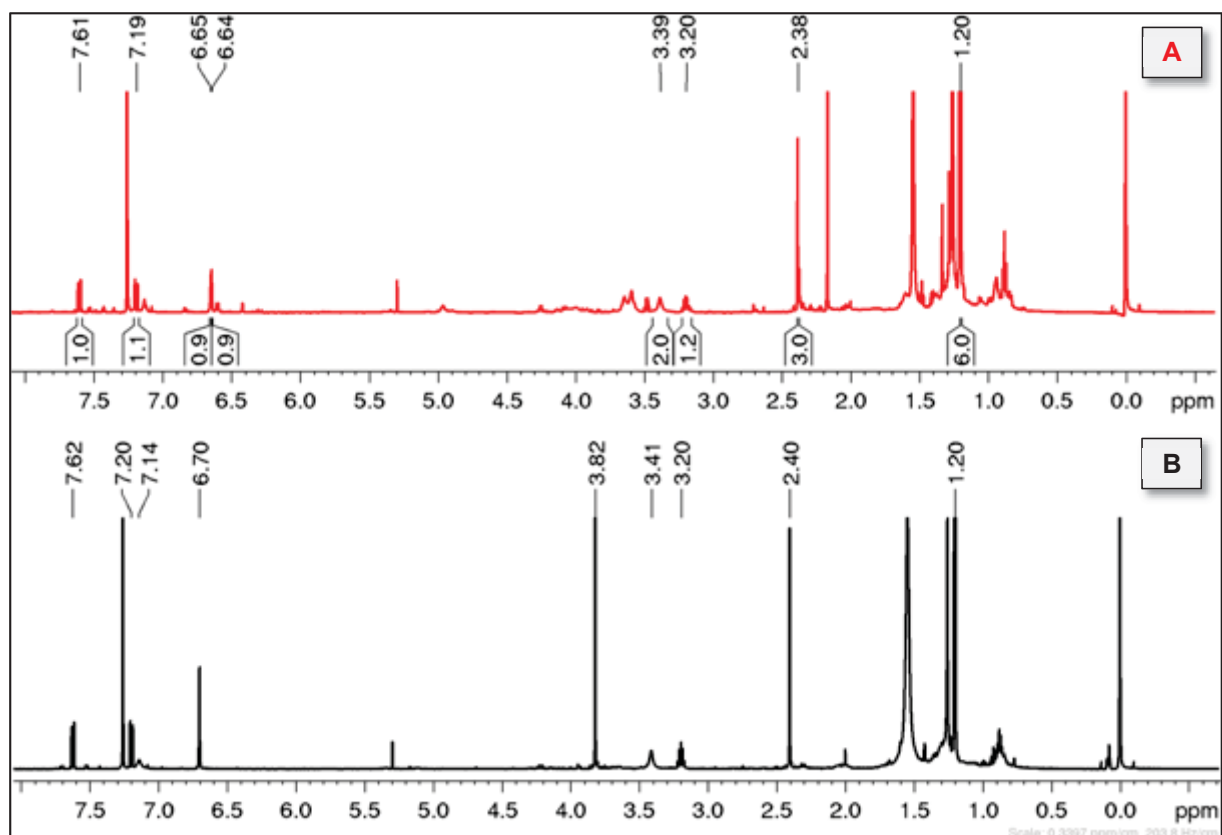
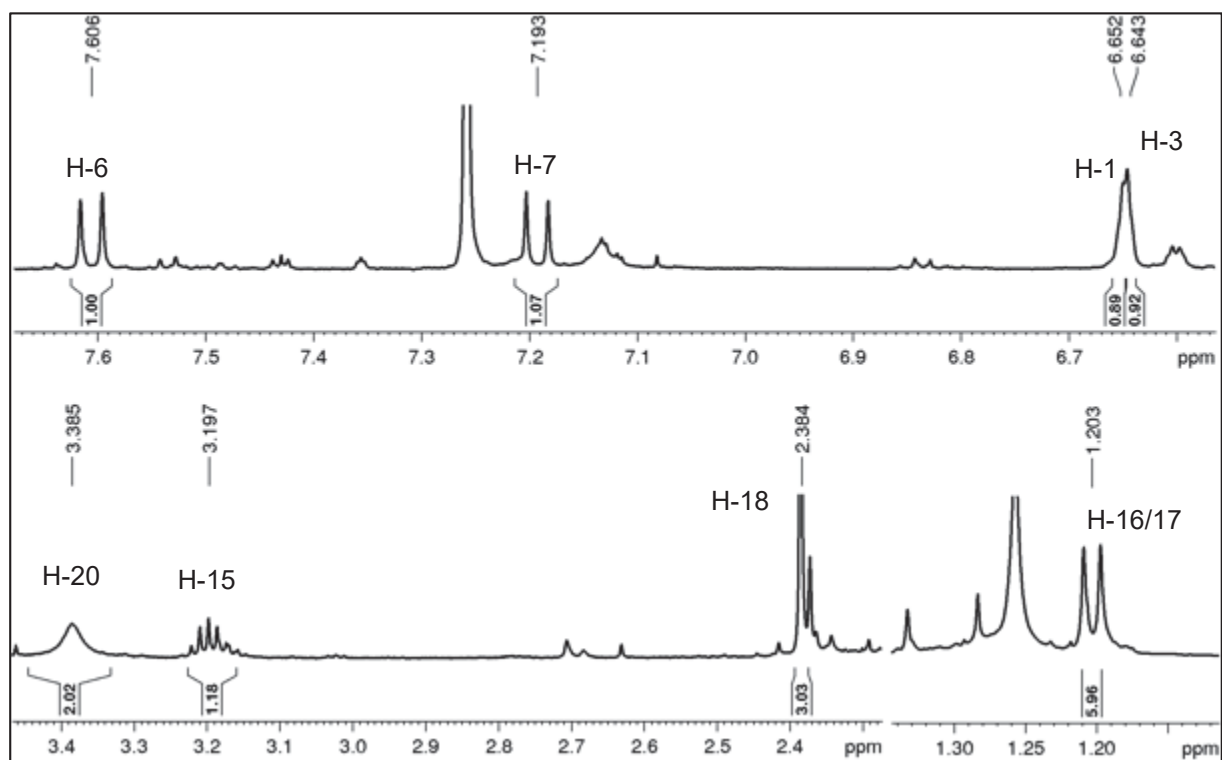


FIGURA 41 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV4**



Apesar do espectro de RMN de ^1H não apresentar quaisquer sinais de grupos hidroxila, foram observados através do HMBC (FIGURA 44) dois sinais em 158,1 e 151,2, cujos deslocamentos químicos são típicos de carbonos olefínicos oxigenados, sendo compatíveis com C-2 e C-12, respectivamente. De fato, no HMBC o hidrogênio metínico do grupo isopropila (δ_{H} 3,23, H-15) apresentou correlação com C-12. Por outro lado, os hidrogênios do anel A em δ_{H} 6,64 (H-3) e 6,65 (H-1) correlacionaram com C-2. Essas correlações justificam a presença de dois grupos hidroxila nessas posições (FIGURA 42).

FIGURA 42 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS PELO HMBC DE **SV4**

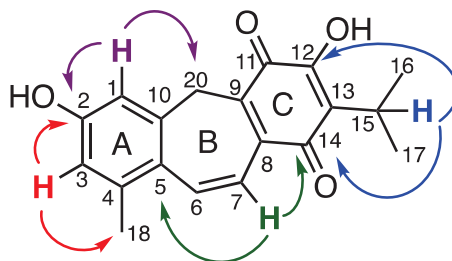


FIGURA 43 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV4**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

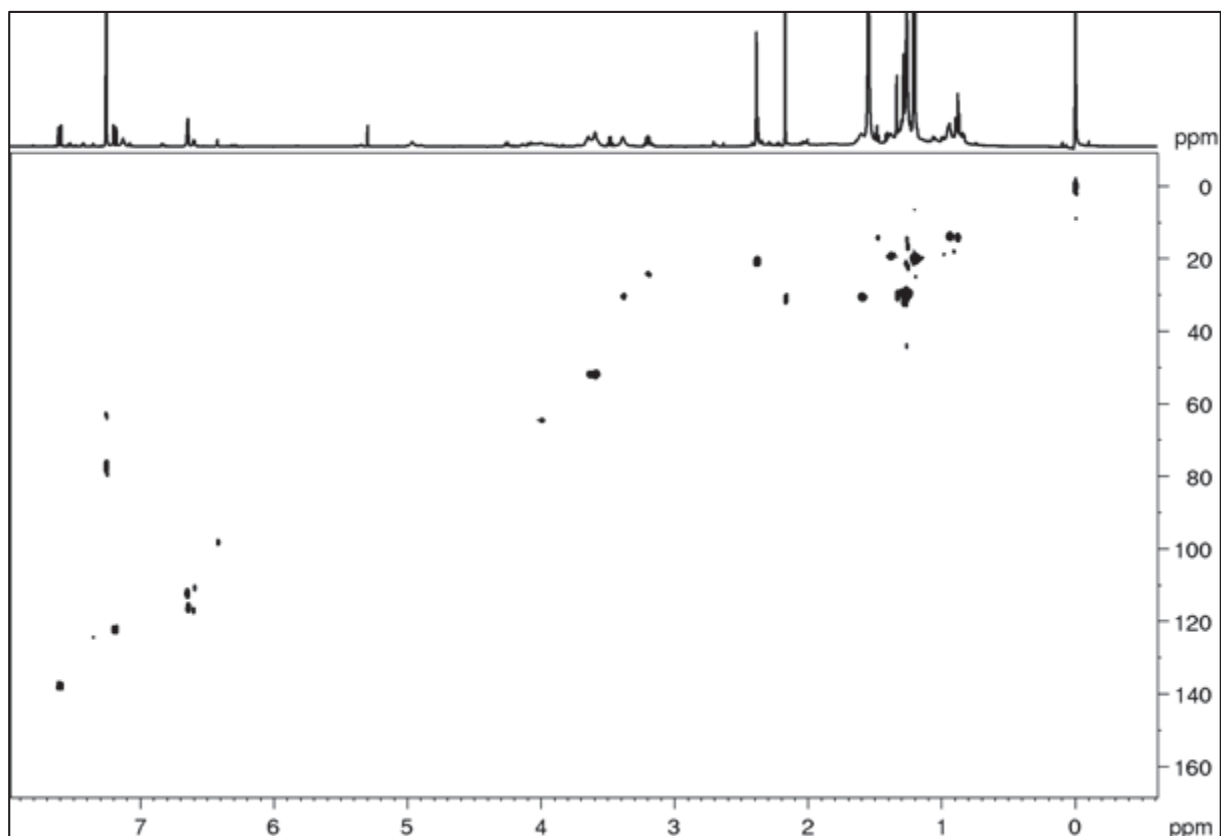
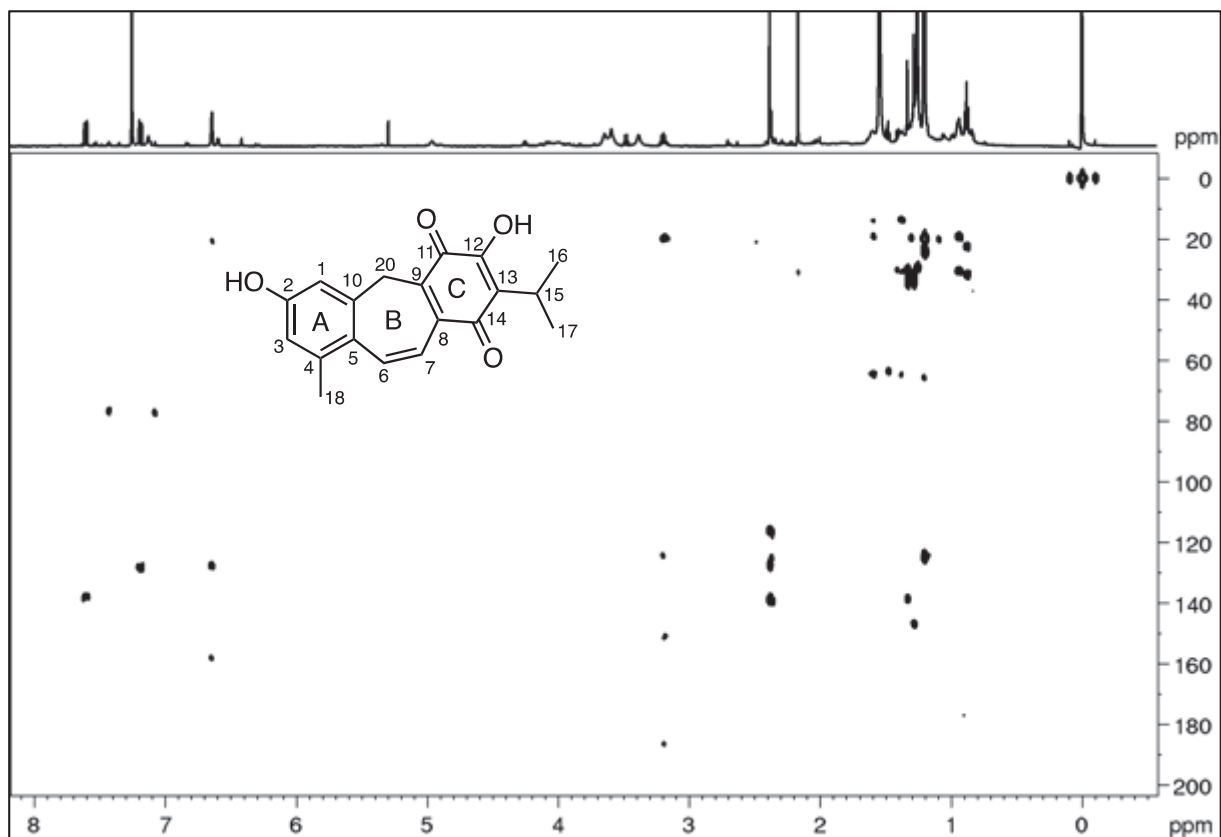


FIGURA 44 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV4**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS de METANOL- d_4 , 600 MHz)



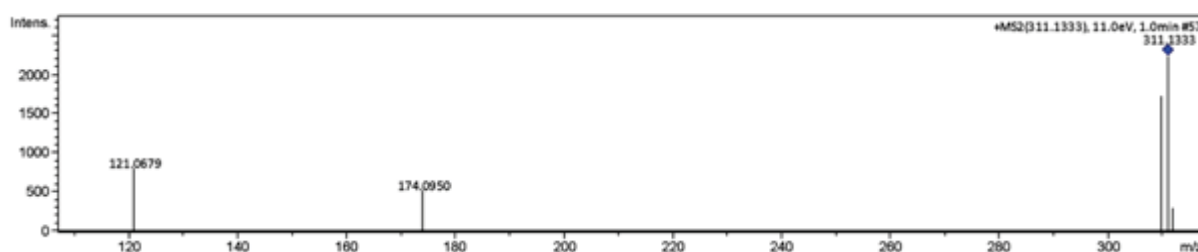
Esses e os demais sinais observados no espectro de RMN de ^1H , em conjunto com as correlações observadas nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 43) e HMBC (TABELA 17), confirmam a estrutura de **SV4** (FIGURA 34, p. 112), um *nor*-icetexano derivado da isofruticulina A (**SV3**), inédito, o qual recebeu o nome de demetilisofruticulina A.

TABELA 17 – DADOS DE RMN DE **SV4** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz)

Posição	SV4		
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	112,4	6,65 <i>d</i> (2,7)	2,3,5,20
2	158,1	-	-
3	116,3	6,64 <i>d</i> (2,7)	1,2,5,18
4	139,9	-	-
5	127,7	-	-
6	122,2	7,61 <i>d</i> (12,1)	10
7	135,0	7,19 <i>d</i> (12,1)	5,9,14
8	135,0	-	-
9	129,0	-	-
10	139,1	-	-
11	n.o	-	-
12	151,2	-	-
13	124,7	-	-
14	186,7	-	-
15	24,3	3,20 <i>hept</i> (7,1)	12,13,14,16,17
16	20,0	1,20 <i>d</i> (7,1)	13,15,17
17	20,0	1,20 <i>d</i> (7,1)	13,15,16
18	22,5	2,38 <i>s</i>	3,4,5
20	30,4	3,38 <i>sl</i>	n.o

n.o = não observado.

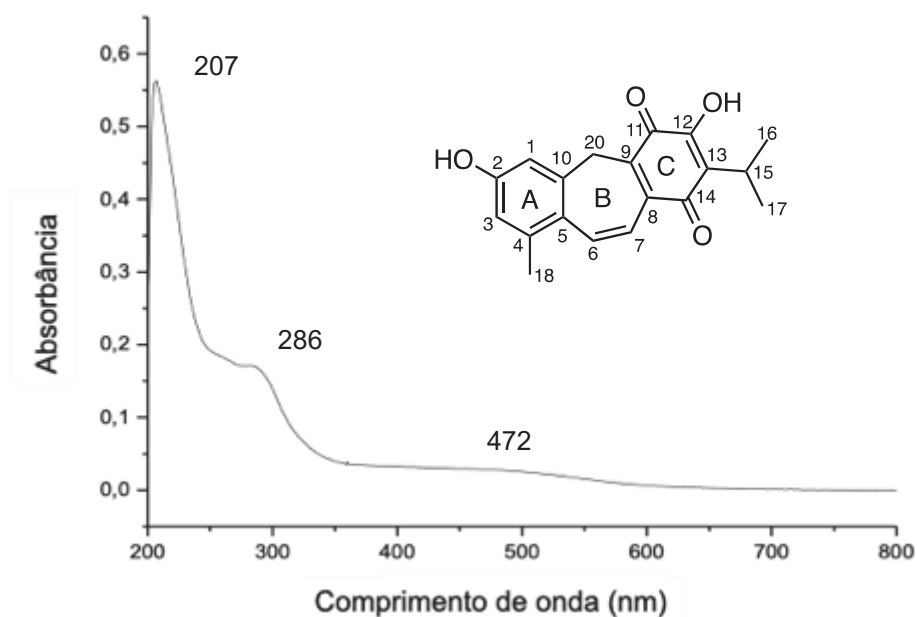
Por se tratar de uma substância inédita, outros experimentos são necessários, a fim de confirmar a estrutura química inicialmente atribuída por RMN. Diante disso, foi realizado o espectro de massas de alta resolução de **SV4** (FIGURA 45), no modo positivo, o qual revelou um pico em m/z 311,1333 $[M+H]^+$ (massa exata para $C_{19}H_{19}O_4$: 311,1283). Através desse dado foi possível atribuir a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_4$, a qual é compatível com a estrutura química determinada por RMN para **SV4**.

FIGURA 45 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE **SV4**

Foi realizado também o espectro de absorção na região do ultravioleta/visível de **SV4** (FIGURA 46). A varredura resultou em três bandas, características de transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Duas eram mais intensas, com máximos de

absorção em λ_{max} 207 e 286 nm, sendo características de anel aromático substituído. Outra menos intensa em λ_{max} 472 nm, corresponde a conjugação entre varias ligações duplas (C- sp^2) presentes no esqueleto carbônico de **SV4**, justificando a sua cor vermelha.

FIGURA 46 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE **SV4** (MeOH)



1.6.1.3 Determinação estrutural de **SV5** e **SV6**

As substâncias **SV5** e **SV6** (FIGURA 47) foram obtidas das frações **LFA** e **LFC**, respectivamente, como sólidos de cor vermelha. Ambas foram obtidas, separadamente, como majoritárias em mistura contendo outros constituintes minoritários. Porém isso não interferiu na determinação estrutural de cada uma.

FIGURA 47 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **SV5** E **SV6**



A substância **SV5** foi isolada como o constituinte majoritário em uma mistura com a isofruticulina A (**SV3**), além de outros constituintes não identificados. Foram observados os sinais típicos dos anéis A e C, como já descritos para os *nor*-icetexanos anteriores. Os principais sinais observados no espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 48 e 49) foram: δ_{H} 7,74 e 7,32 (*d*, $J = 12,2$ Hz, H-6 e H-7), os quais são característicos da ligação dupla no anel de sete membros entre C-6 e C-7; o sinal de um grupo metoxila em δ_{H} 3,82 (2-OCH₃), e o sinal de um grupo hidroxila em δ_{H} 7,23 (12-OH). Em relação aos demais, **SV5** se diferenciou principalmente por apresentar um simpleto em δ_{H} 5,95, o qual foi atribuído a um hidrogênio oximetínico, localizado em H-20 (anel B).

FIGURA 48 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV5** (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)

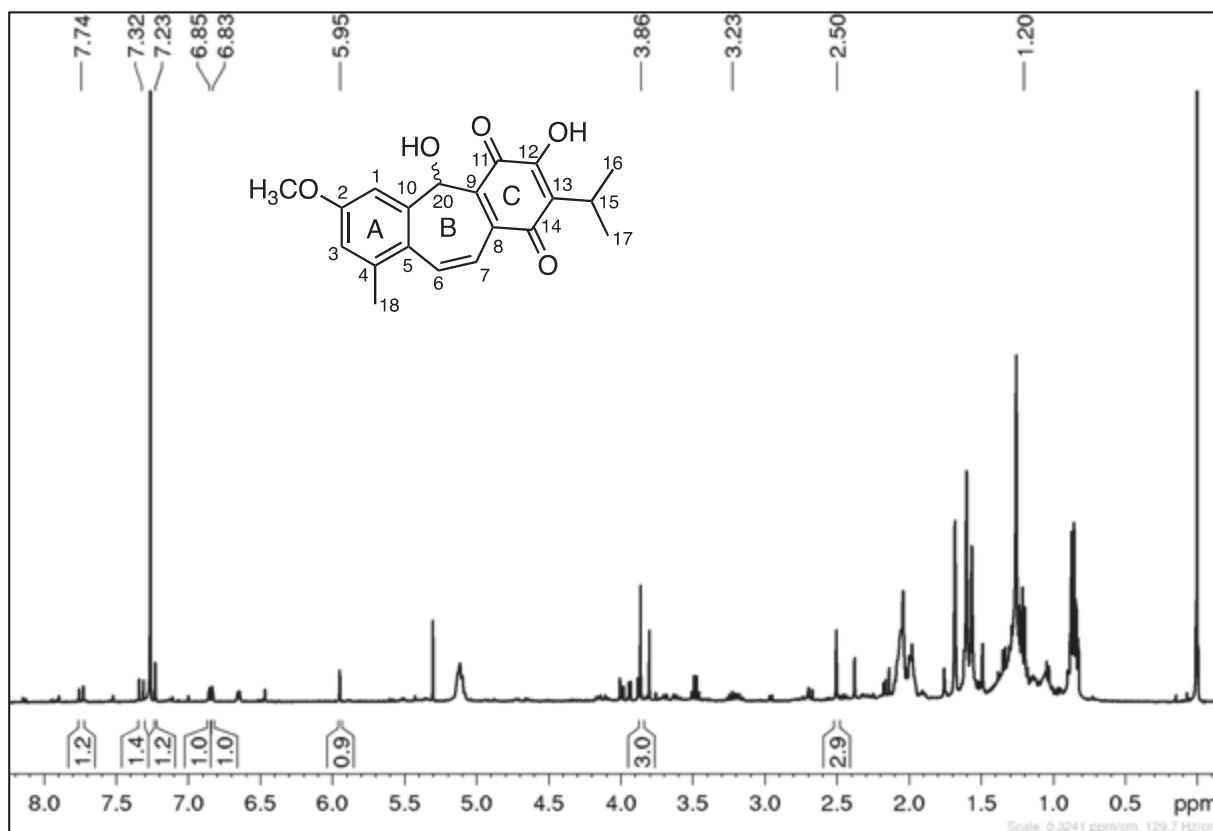
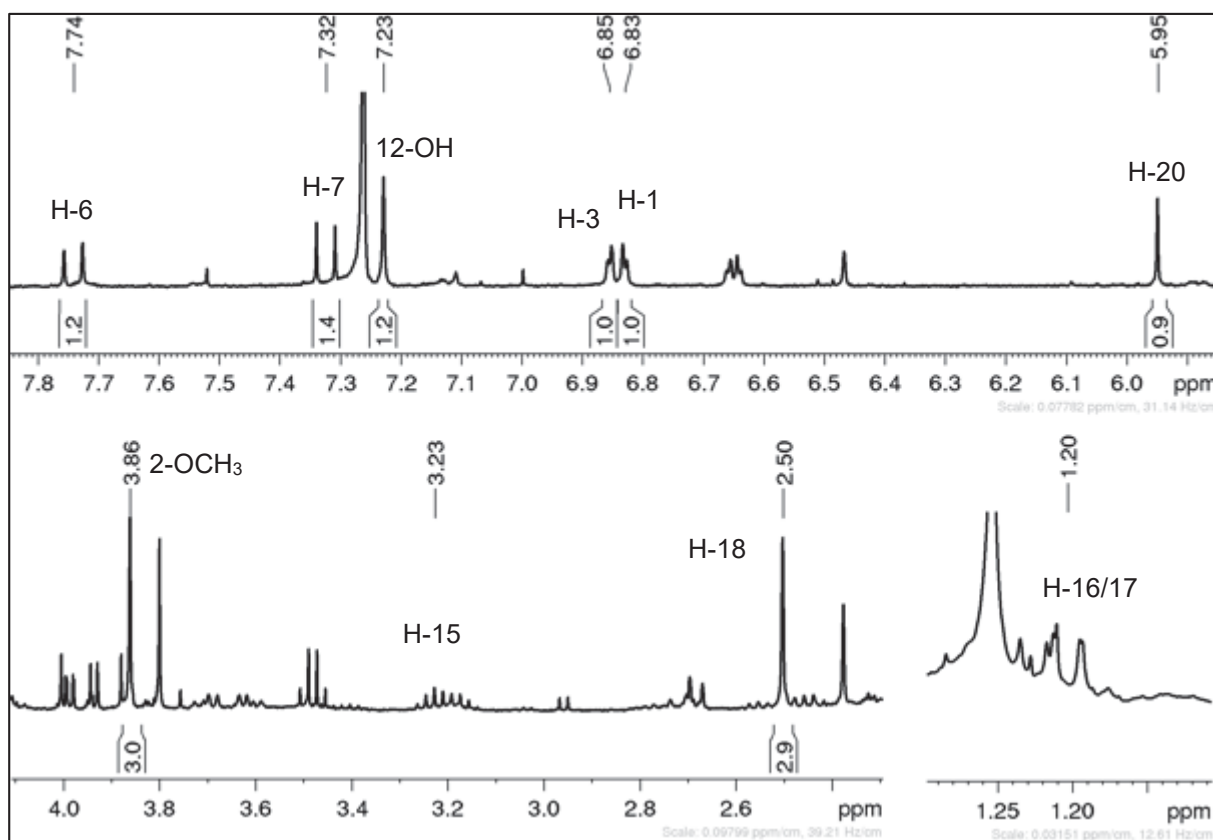


FIGURA 49 - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV5**

A localização do sinal em δ_{H} 5,95 foi determinada por meio de suas correlações. Este sinal revelou no HSQC (FIGURA 51) estar ligado ao carbono em δ_{C} 72,1 (C-20), e no HMBC (FIGURA 52) mostrou correlações com os carbonos olefínicos em δ_{C} 111,5 (C-1), 126,7 (C-5), 128,1 (C-9), 137,3 (C-10), 138,0 (C-8) além de um grupo carbonila em δ_{C} 182,5 (C-11). Foi ainda observada no HMBC uma correlação entre H-1 (δ_{H} 6,83) e o carbono em δ_{C} 72,1. Diante disso, foi possível determinar a sua localização em C-20. O deslocamento químico de C-20 é típico de um carbono alifático oxigenado (FIGURA 50).

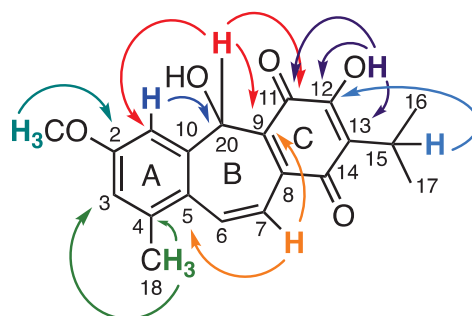
FIGURA 50 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV5**

FIGURA 51 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV5**
(CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)

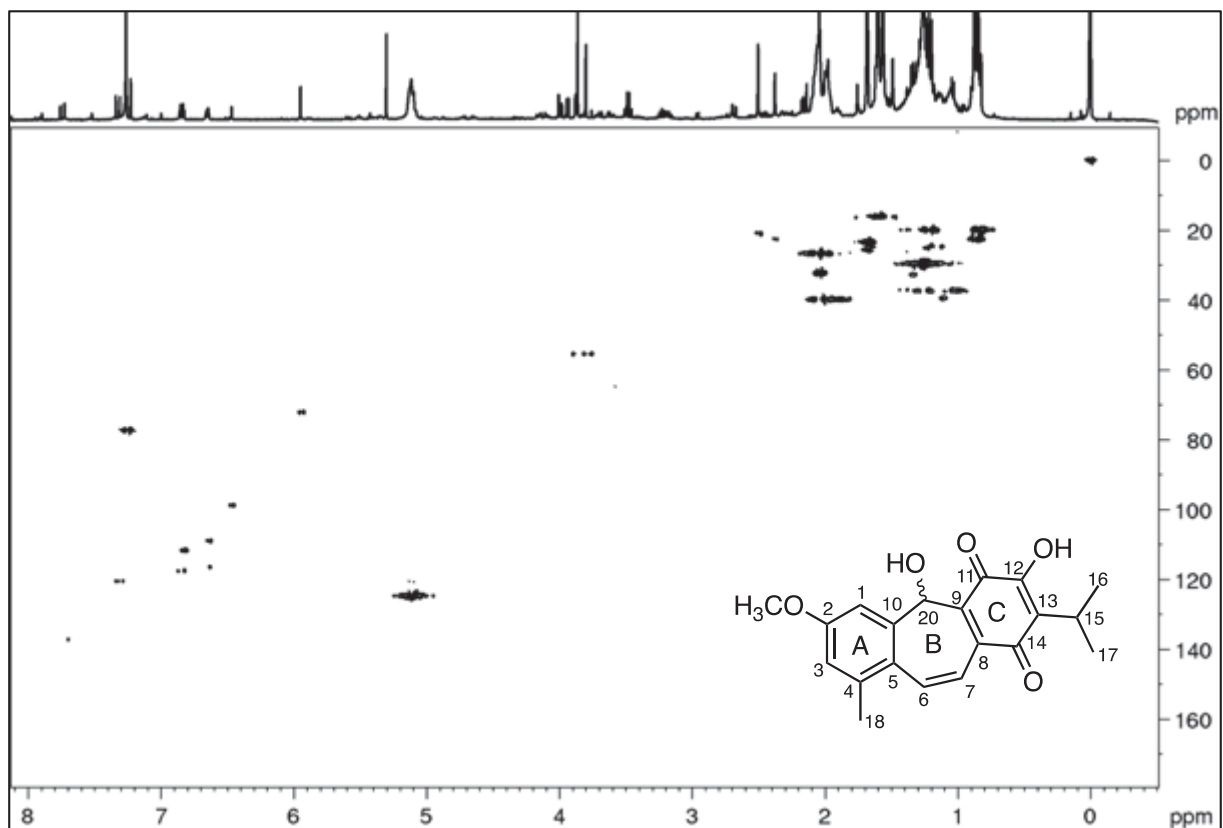
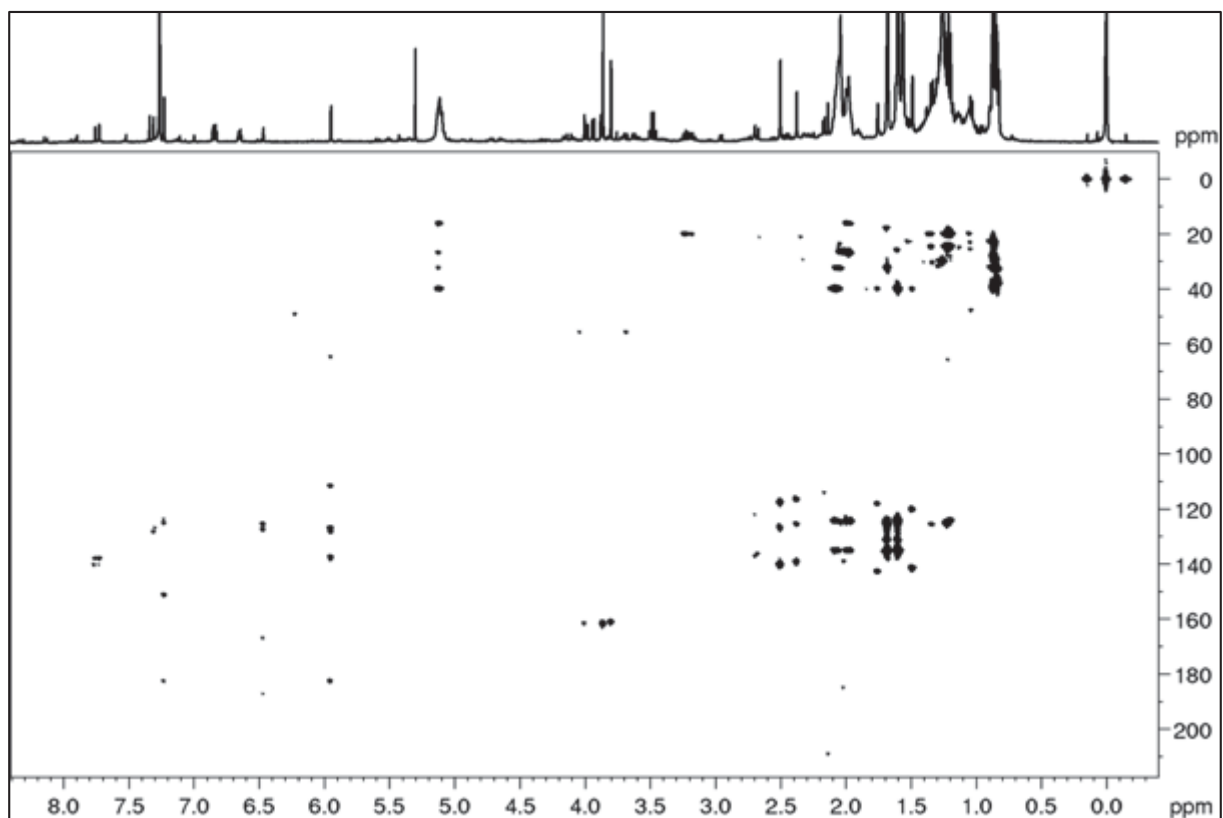
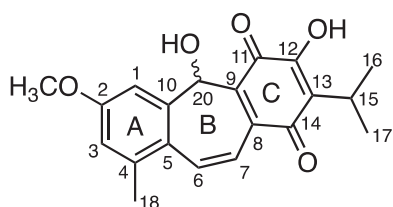


FIGURA 52 – MAPA DE CORRELAÇÕES À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV5**
(CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)

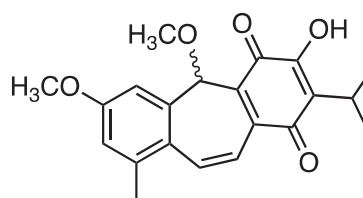


Estes e os demais dados de RMN de ^1H , bem como as correlações observadas no HSQC e HMBC (TABELA 18) confirmaram a estrutura química de **SV5** (FIGURA 53) como um derivado da isofruticulina A (**SV3**). De acordo com a revisão bibliográfica esse diterpeno é inédito na literatura, sendo nomeado 20-hidroxi-isofruticulina A. Apesar de não encontrar relatos dessa substância, foi encontrado um diterpeno com um esqueleto similar, mas com um grupo metoxila em C-20, o qual foi isolado da espécie *Salvia corrugata*, e denominado fruticulina C (GIACOMELLI et al., 2013) (FIGURA 53). Os dados de RMN de **SV5** são bastante similares aos da fruticulina C, confirmando a estrutura proposta (TABELA 18).

FIGURA 53 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE **SV5** E FRUTICULINA C



SV5



fruticulina C

TABELA 18 – DADOS DE RMN DE **SV5** (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA C (CLOROFÓRMIO-*d*, 500 MHz; GIACOMELLI et al., 2016)

Posição	SV5			Fruticulina C	
	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	116,6	6,83 <i>d</i> (2,6)	20	111,8	6,86 <i>d</i> (2,6)
2	161,7	-	-	162,2	-
3	117,4	6,86 <i>d</i> (2,6)	n.o	117,7	6,87 <i>d</i> (2,6)
4	140,1	-	-	140,5	-
5	126,1	-	-	126,7	-
6	137,1	7,74 <i>d</i> (12,2)	4,8	137,3	7,75 <i>d</i> (12,3)
7	120,6	7,32 <i>d</i> (12,2)	5,9	120,3	7,33 <i>d</i> (12,3)
8	138,0	-	-	137,6	-
9	128,1	-	-	127,5	-
10	137,3	-	-	137,6	-
11	182,5	-	-	182,9	-
12	151,5	-	-	151,1	-
13	124,9	-	-	125,3	-
14	n.o	-	-	187,1	-
15	24,3	3,23 <i>m</i>	12, 13, 16, 17	24,6	3,23 <i>hept</i> (7,1)
16	19,8	1,20 <i>d</i> (7,0)	13, 15, 17	20,0	1,21 <i>d</i> (7,0)
17	19,8	1,20 <i>d</i> (7,1)	13, 15, 16	20,0	1,23 <i>d</i> (7,0)
18	21,1	2,50 <i>s</i>	3, 4, 5	21,2	2,51 <i>s</i>
20	72,1	5,95 <i>s</i>	1,5,8,9,10,11	74,6	5,81 <i>s</i>
12-OH	-	7,22 <i>sl</i>	11,12,13	-	7,24 <i>s</i>
2-OCH₃	55,5	3,86 <i>s</i>	2	55,6	3,87 <i>s</i>
20-OCH₃	-	-	-	56,0	3,02 <i>s</i>

n.o = não observado.

A substância **SV6** (FIGURA 34, p. 112) também foi obtida como majoritária em uma mistura contendo várias substâncias não identificadas. O espectro de RMN de 1H (FIGURAS 54 e 55) indicou sinais muito similares aos obtidos para **SV5**. Os sinais típicos dos anéis A, B e C estavam presentes. Entretanto, não foi observado o sinal de um grupo metoxila (2-OCH₃), sugerindo um grupo hidroxila em seu lugar. O sinal do hidrogênio oximetínico ligado a C-20 foi observado como um simpleto em δ_H 6,40 (H-20).

O sinal atribuído a H-20 (δ_H 6,40) correlacionou no HSQC (FIGURA 57) com o carbono em δ_c 76,4, confirmando tratar-se de um hidrogênio oximetínico, e indicando um grupo hidroxila em C-20, como em **SV5**. No HMBC (FIGURA 58), H-20 correlacionou com os carbonos em δ_c 114,7(C-1), 127,4 (C-5), 138,0 (C-8) e 182,6 (C-11), estabelecendo a sua posição em C-20. E por fim, o hidrogênio do anel A em δ_H

6,81 (H-3) revelou correlação com um carbono olefínico oxigenado em δ_c 157,7, o qual é compatível com a presença de um grupo hidroxila em C-2 (FIGURA 56).

FIGURA 54 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV6** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

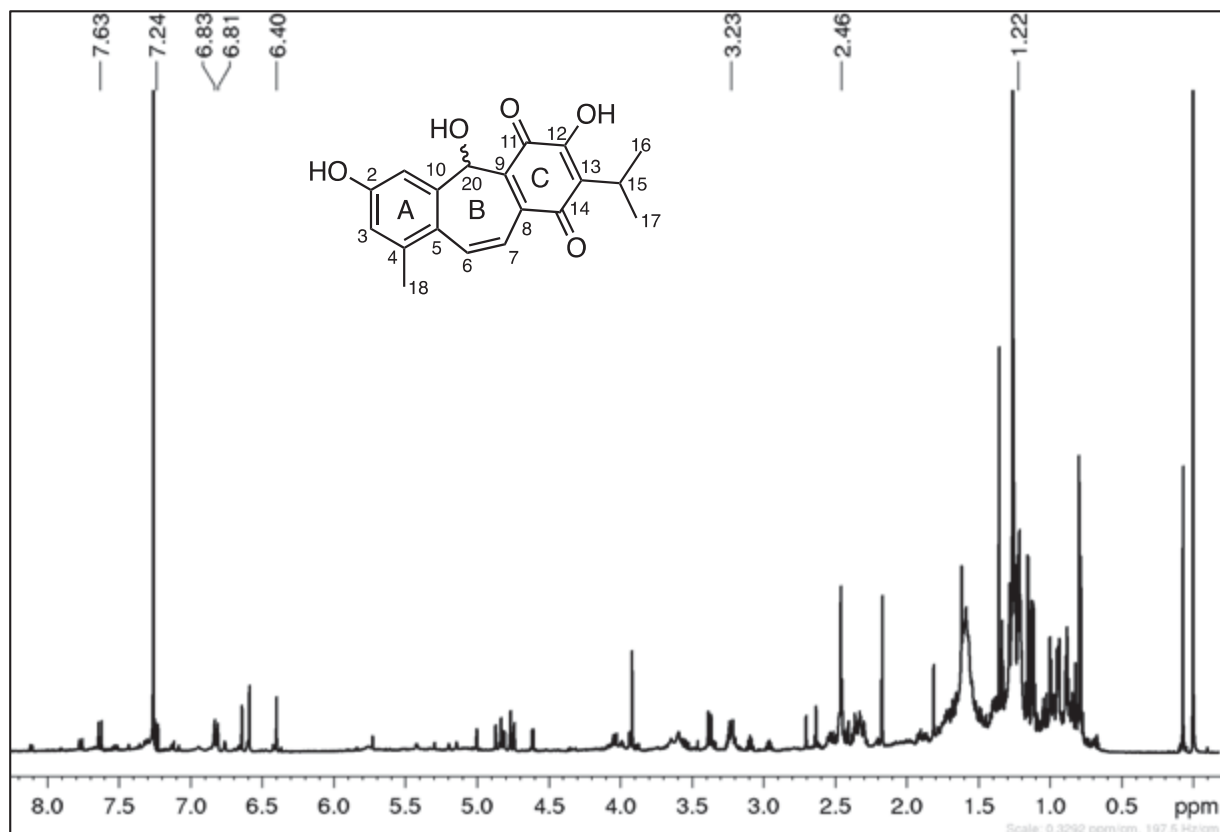


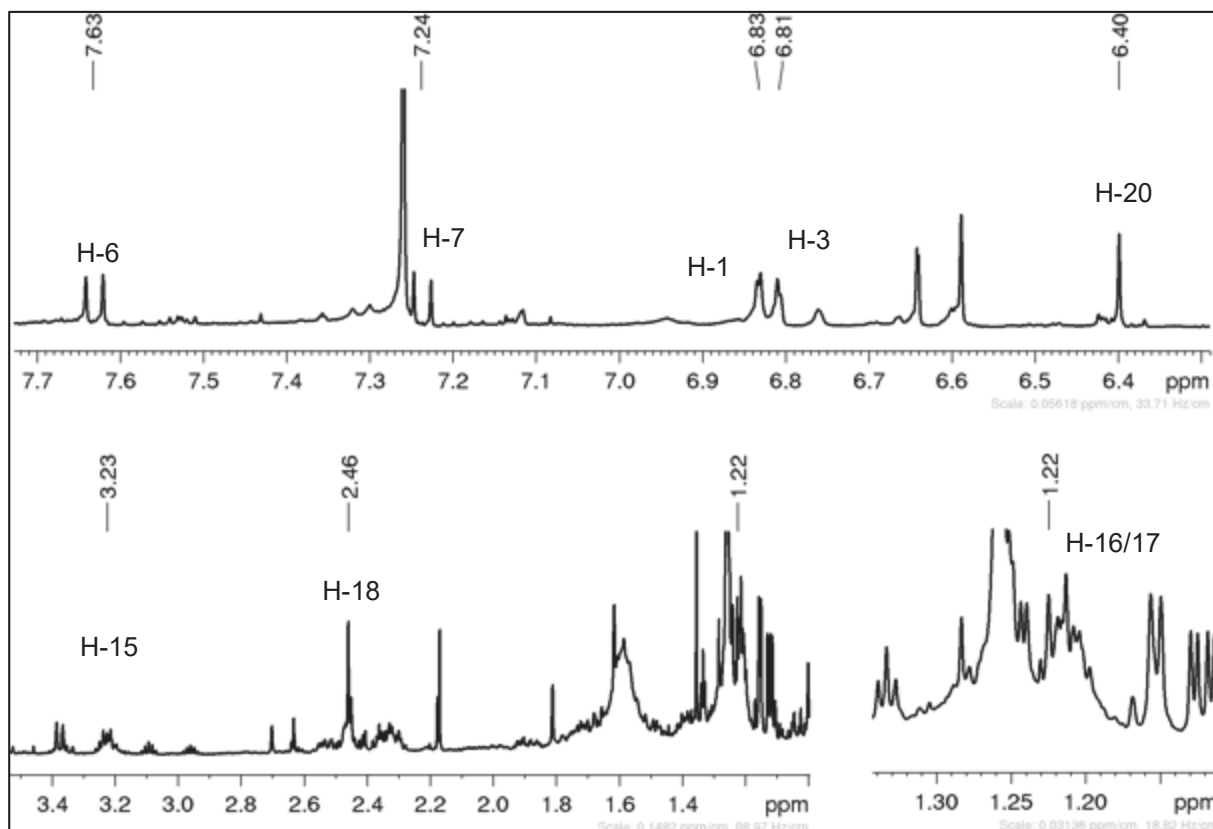
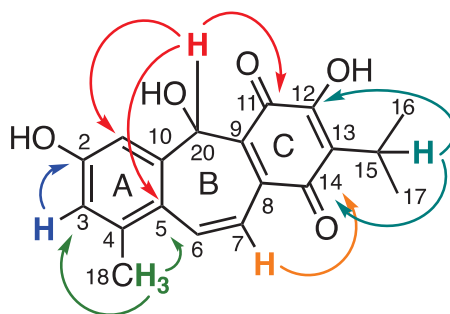
FIGURA 55 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV6**FIGURA 56 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE **SV6**

FIGURA 57 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV5**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

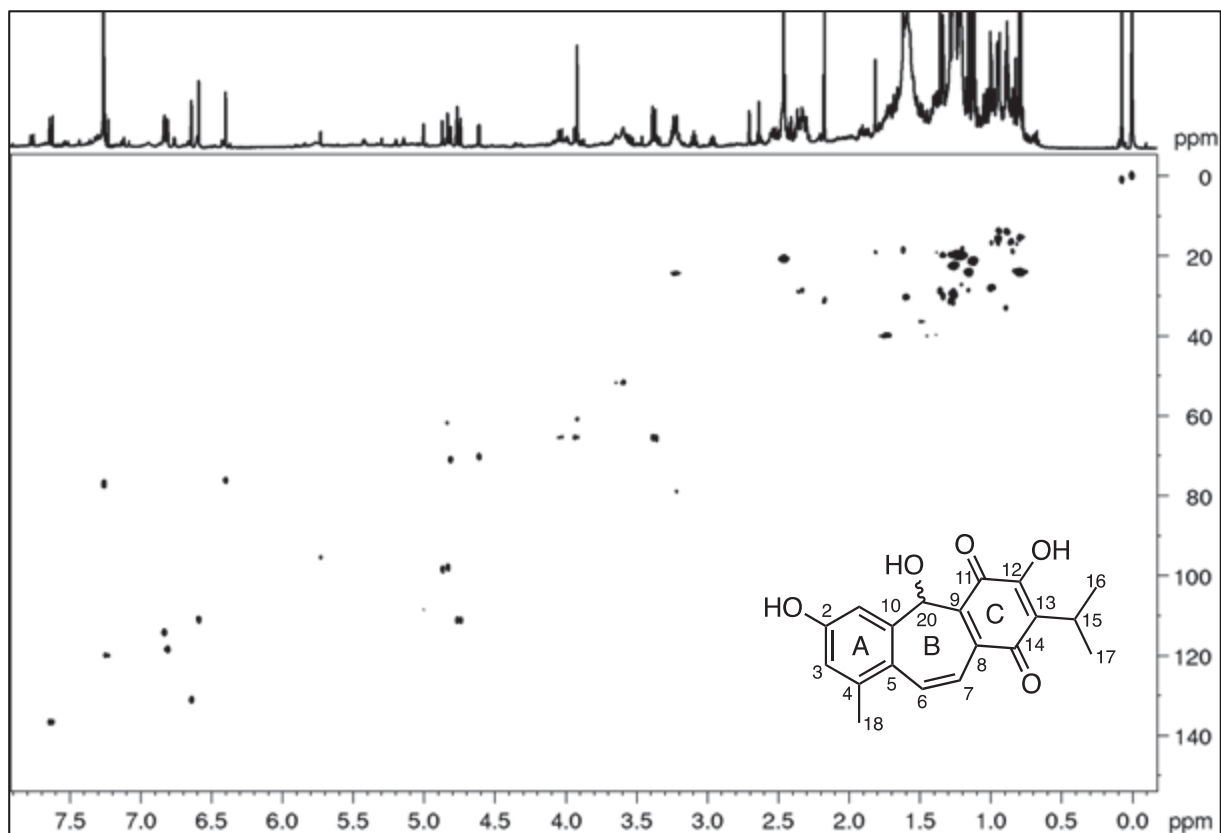
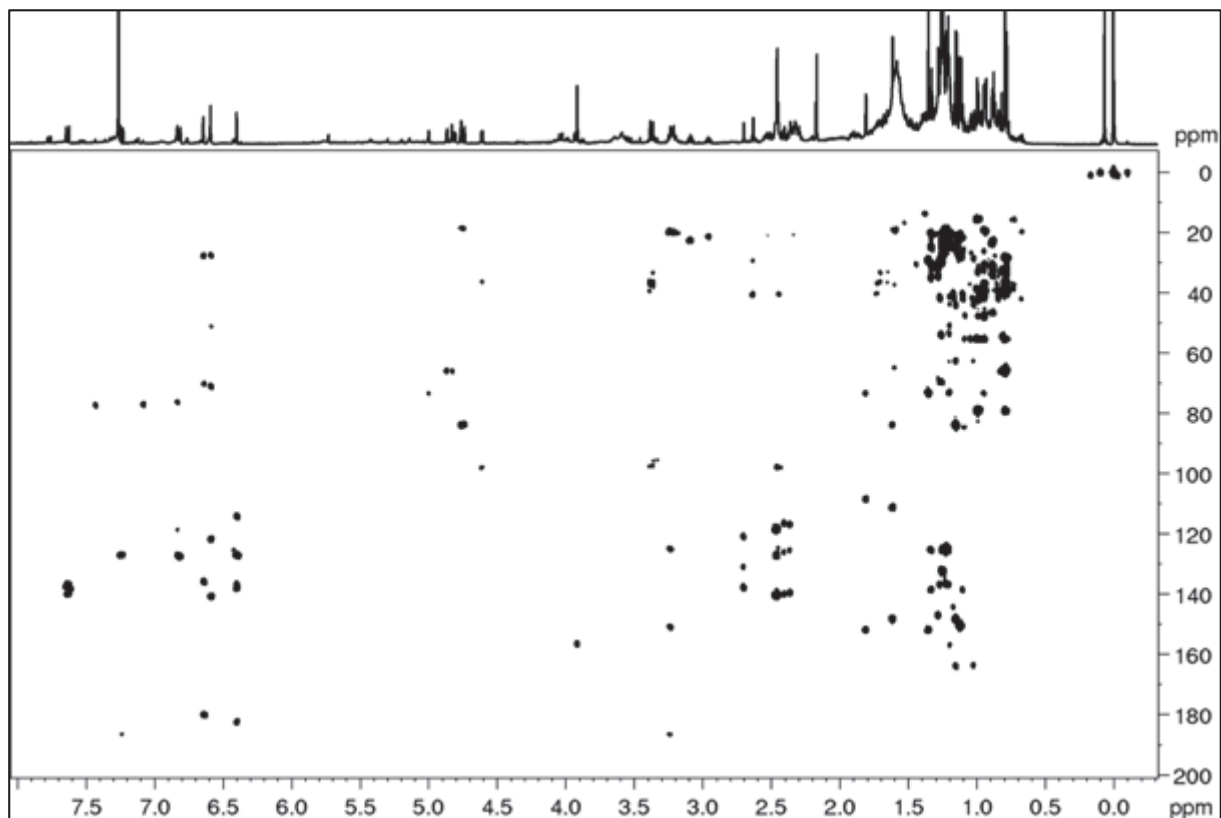


FIGURA 58 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV6**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)



Por meio dos dados de RMN de ^1H , em conjunto com os dados obtidos dos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 19), foi possível confirmar a estrutura química de **SV6** como 20-hidroxi-demetilsofruticulina, inédita na literatura.

TABELA 19 – DADOS DE RMN DE **SV6** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

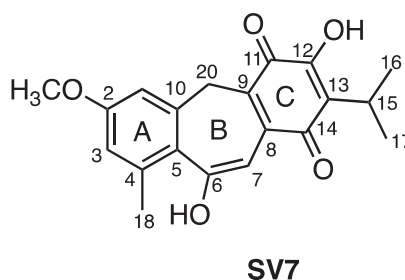
Posição	SV6		
	δ_{C}	δ_{H} mult (J em Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	114,7	6,83 d (2,3)	3,5,20
2	157,7	-	-
3	118,7	6,81 d (2,3)	2,5
4	140,0	-	-
5	127,4	-	-
6	136,8	7,63 d (12,5)	4,10
7	120,2	7,24 d (12,5)	5,14
8	138,0	-	-
9	127,0	-	-
10	137,0	-	-
11	182,6	-	-
12	151,1	-	-
13	125,0	-	-
14	186,7	-	-
15	23,4	3,23 m	12,13,14,16,17
16	19,7	1,22 d (7,0)	13,15,17
17	19,7	1,22 d (7,0)	13,15,16
18	20,9	2,46 s	3,4,5
20	76,4	6,40 s	1,5,8,11

n.o = não observado.

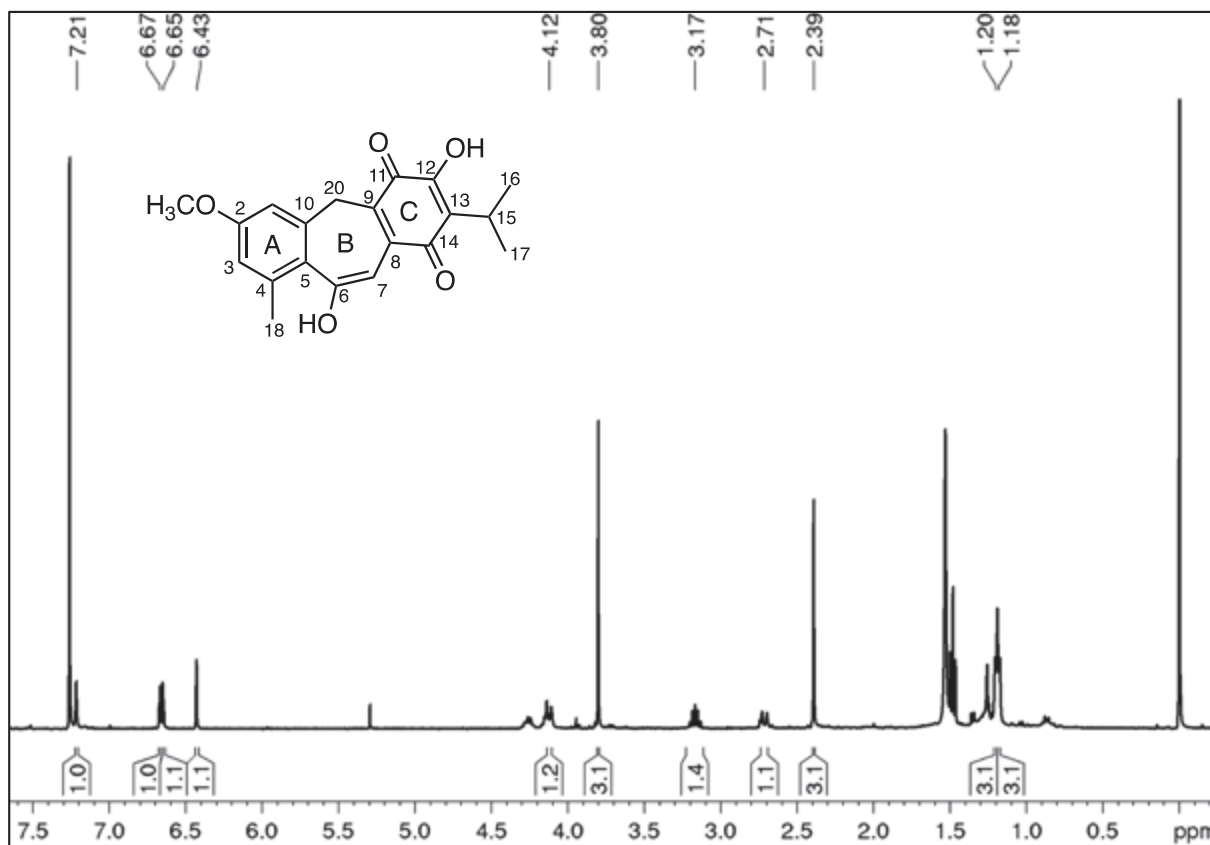
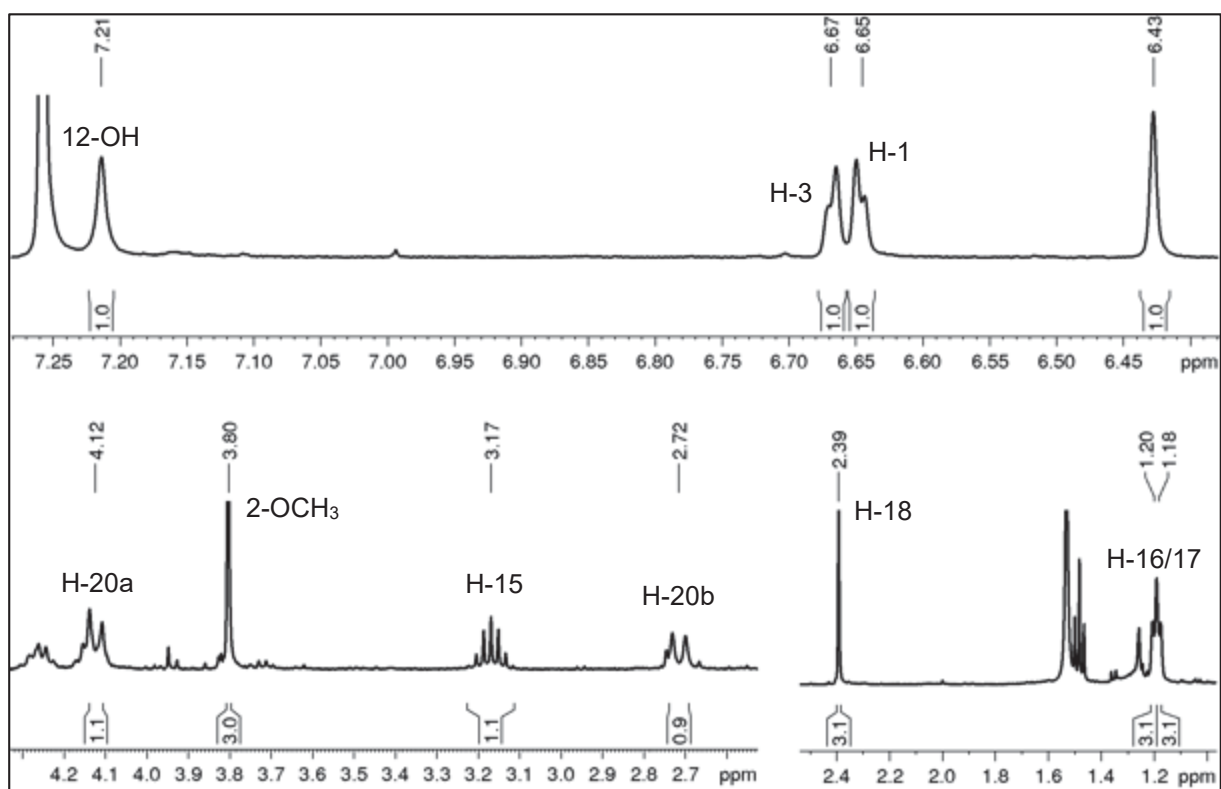
1.6.1.4 Determinação estrutural de **SV7**

A substância **SV7** (FIGURA 59) foi isolada a partir da fração **LFA** como um sólido de cor vermelha. O seu espectro de RMN de ^1H revelou similaridade com as demais substâncias já descritas neste capítulo, sugerindo que **SV7** tem o mesmo esqueleto *nor-icetexano*.

FIGURA 59 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV7**



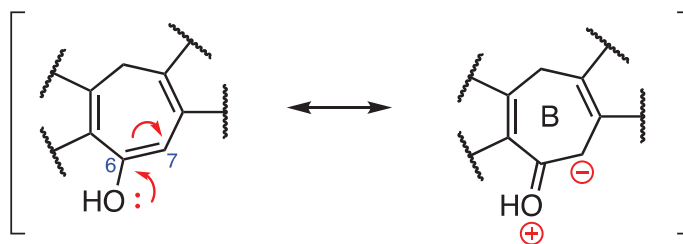
Observando o espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 60 e 61) foi possível identificar o anel A através dos sinais de dois hidrogênios de anel aromático, com acoplamento *meta*, em δ_{H} 6,67 e 6,65 (H-3 e H-1); de um grupo metila ligado a anel aromático em δ_{H} 2,39 (H-18), e de um grupo metoxila em δ_{H} 3,80 (2-OCH₃). Além destes, também foi observada a presença dos sinais dos substituintes do anel C, ou seja, um simpleto-largo em δ_{H} 7,21, referente à hidroxila em C-12; um quarteto-quarteto em δ_{H} 3,17 (1H, $J = 7,1$ Hz, H-15), e dois dupletos, com a mesma constante de acoplamento, integrando para três hidrogênios cada, em δ_{H} 1,20 e 1,18 ($J = 7,1$ Hz, H-16 e H-17), indicando um grupo isopropila. Neste caso, **SV7** difere das substâncias anteriores por apresentar grupos metila não equivalentes no espectro de RMN de ^1H .

FIGURA 60 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV7** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)FIGURA 61 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV7**

As principais diferenças observadas no espectro de RMN de ^1H de **SV7** em relação aos demais icetexanos já descritos foram atribuídas aos substituintes do anel B. Deste modo, os sinais propostos para este anel foram um simpleto em δ_{H} 6,43 (1H, H-7), típico de hidrogênio olefínico, e dois dupletos com a mesma constante de acoplamento, integrando para um hidrogênio cada em δ_{H} 4,12 e 2,71 ($J = 12,1$ Hz; H-20a e H-20b); a constante de acoplamento é característica de dois hidrogênios metilênicos geminais diastereotópicos.

Observando o HSQC (FIGURA 62) foi confirmado que o simpleto em δ_{H} 6,43 está ligado ao carbono em δ_{C} 98,2. No HMBC (FIGURA 63) este hidrogênio revelou correlações com os carbonos olefínicos em δ_{C} 125,8 (C-5), 141,0 (C-8), 126,7 (C-9), com um carbono olefínico oxigenado em δ_{C} 167,2 (C-6) e com um grupo carbonila da *para*-quinona em δ_{C} 187,7 (C-14). Esses dados confirmam a sua posição em C-7. O deslocamento químico de C-7 está abaixo do esperado para um carbono olefínico, o que pode ser explicado por estar vizinho a um carbono ligado a um grupo hidroxila. Os pares de elétrons não ligantes no átomo de oxigênio da hidroxila podem migrar para a ligação C-O por efeito de deslocalização eletrônica, originando uma carga parcialmente negativa em C-7. A carga negativa implica no aumento da densidade eletrônica em C-7, causando proteção desse carbono, diminuindo o seu deslocamento químico. (ESQUEMA 11).

ESQUEMA 11 – EFEITO DE DESLOCALIZAÇÃO ELETRÔNICA JUSTIFICANDO O DESLOCAMENTO QUÍMICOS DE C-7



FONTE: o autor.

FIGURA 62 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA (HSQC) ^1H - ^{13}C DE **SV7**
(CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)

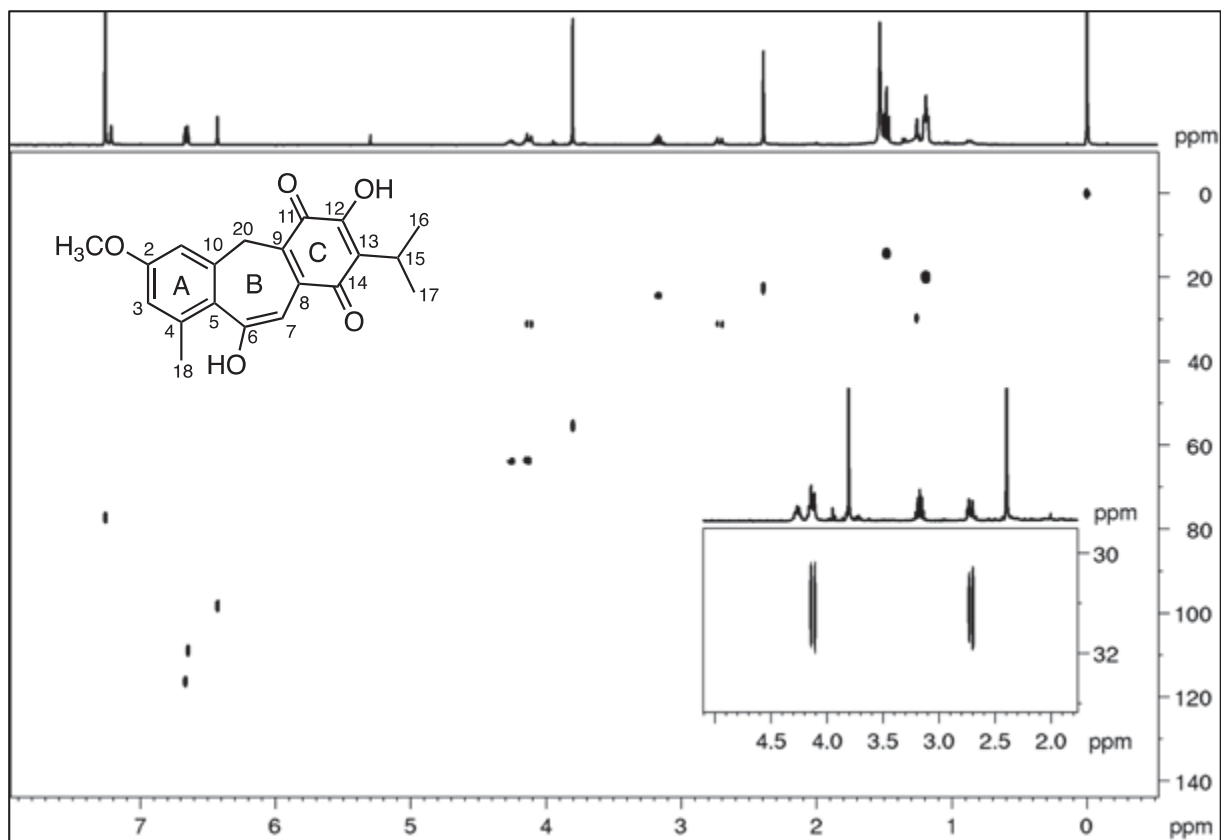
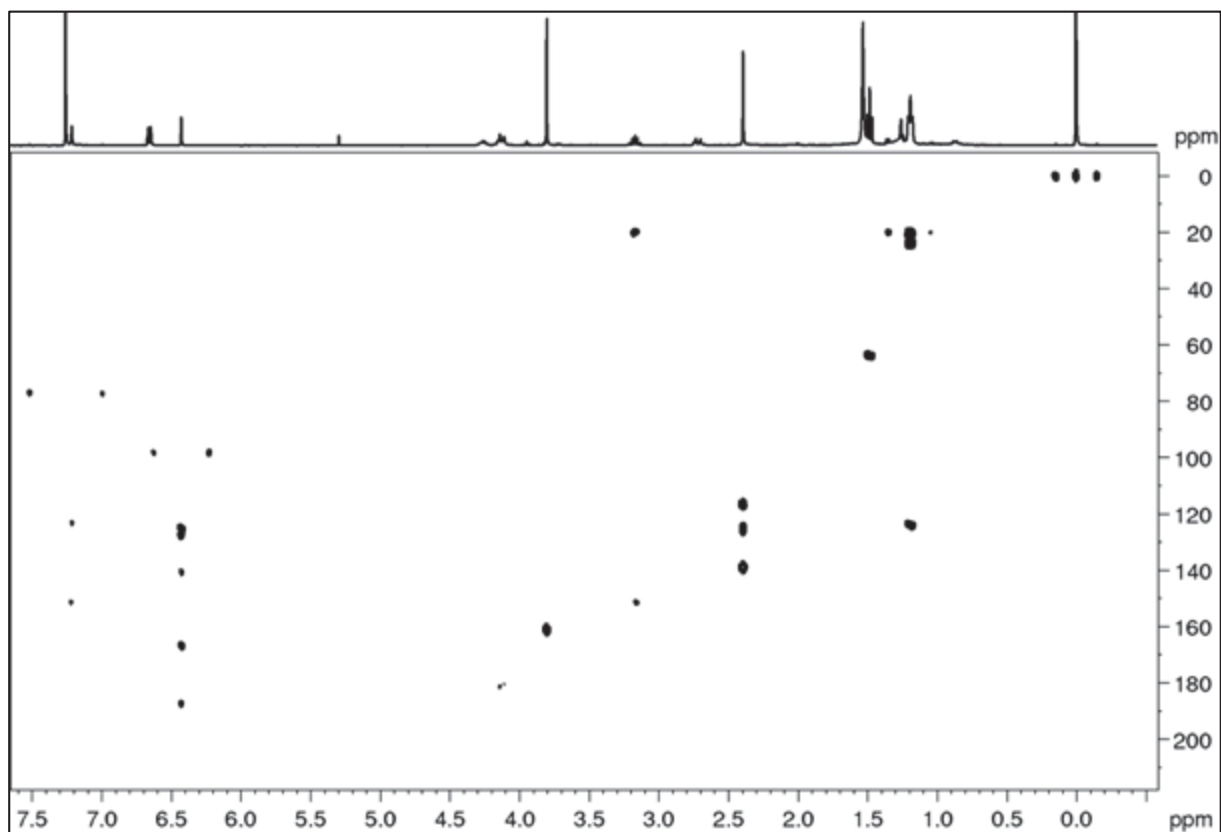
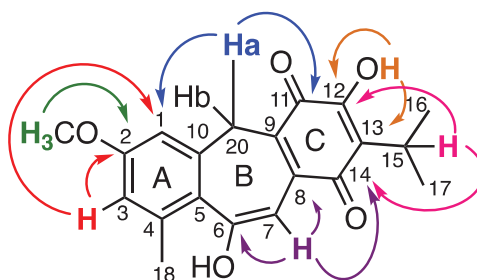


FIGURA 63 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA (HMBC) ^1H - ^{13}C DE **SV7**
(CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)



Os sinais em δ_H 4,12 e 2,71 revelaram no HSQC correlação com o mesmo carbono em δ_C 31,1, confirmando tratar-se de um grupo metileno. No HMBC o sinal em δ_H 4,12 correlacionou com os carbonos em δ_C 108,9 (C-1), C-9, além do grupo carbonila em δ_C 181,5 (C-11). Esses dados confirmam a posição destes hidrogênios em C-20 (FIGURA 64). A não equivalência desses hidrogênios pode ser explicada pela conformação adotada pelo anel B, que deve deixar um dos hidrogênios do grupo metileno (H-20a) na região de desblindagem do grupo carbonila. Essa conformação pode ser consequência da hidroxila em C-6. A proximidade entre essa hidroxila e o grupo metila em C-4 levaria o anel B a assumir uma conformação que diminuiria as interações estéricas entre esses dois grupos. Esse efeito também é visto nos grupos metila do grupo isopropila, que também não são equivalentes, diferentemente das demais substâncias já descritas que não possuem substituição em C-6.

FIGURA 64 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV7**



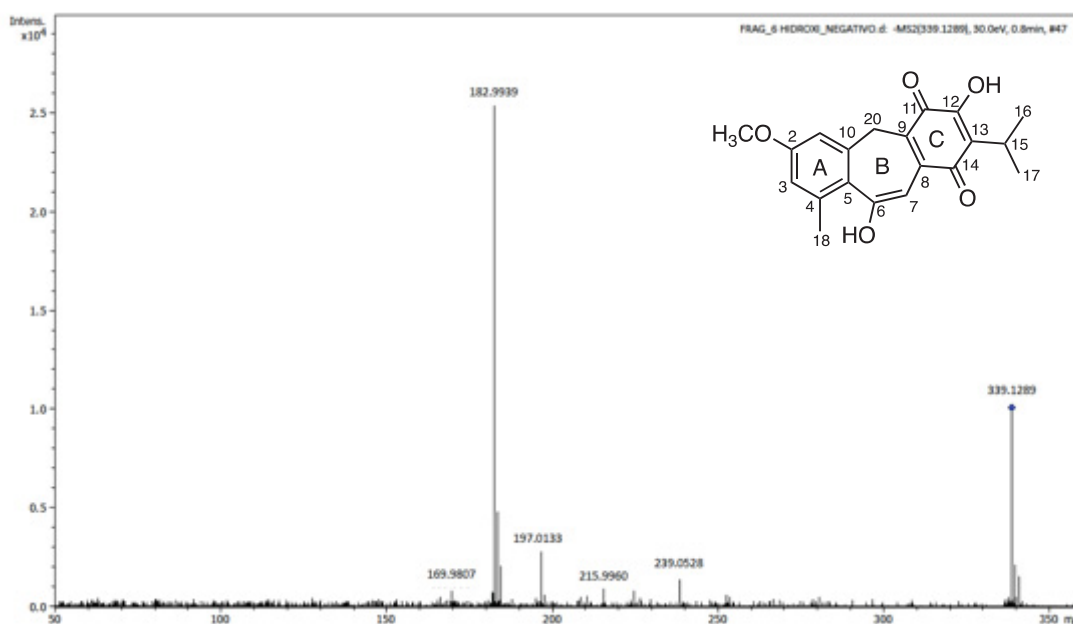
Diante destes e dos demais sinais observados no espectro de RMN de 1H , bem como das correlações no HSQC e HMBC (TABELA 20) a estrutura de **SV7** (FIGURA 59, p. 132) foi proposta como um derivado da isofruticulina A, um *nor*-icetexano inédito na literatura, para o qual foi sugerido o nome de 6-hidroxi-isofruticulina A.

TABELA 20 – DADOS DE RMN DE **SV7** (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz)

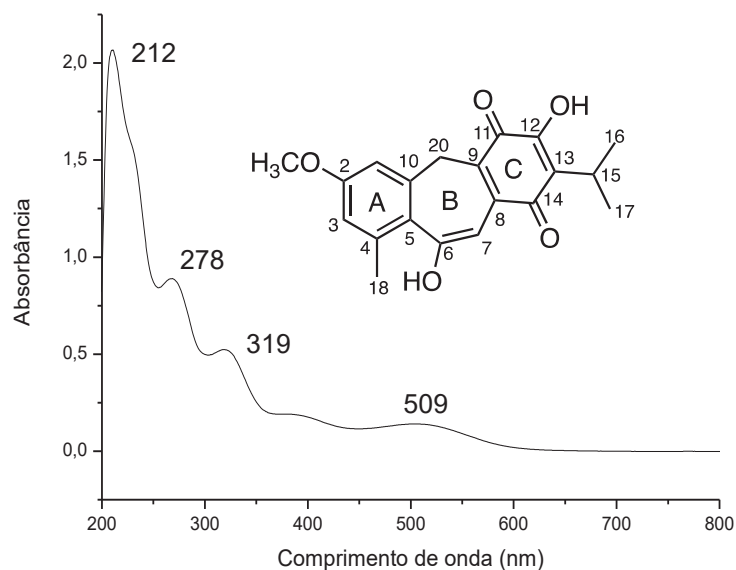
Posição	SV7		
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	108,9	6,65 <i>d</i> (2,3)	1,3,5,20
2	161,2	-	-
3	116,7	6,67 <i>d</i> (2,3)	1,2,5
4	139,1	-	-
5	125,8	-	-
6	167,2	-	-
7	98,2	6,43 <i>s</i>	5,6,8,9,14
8	141,0	-	-
9	127,6	-	-
10	125,3	-	-
11	181,5	-	-
12	151,8	-	-
13	123,8	-	-
14	187,7	-	-
15	24,2	3,37 qq (7,1)	12,13,14,16,17
16	20,1	1,20 <i>d</i> (7,1)	13,15,17
17	20,1	1,18 <i>d</i> (7,1)	13,15,16
18	22,6	2,39 <i>s</i>	3,4,5
20	31,1	4,12 <i>d</i> (12,2) ^a	1,9,11
		2,71 <i>d</i> (12,2) ^b	1,8
12-OH	-	7,21 <i>s/l</i>	11,12,13
2-OCH₃	55,3	3,80 <i>s</i>	2

^aHa, ^bHb.

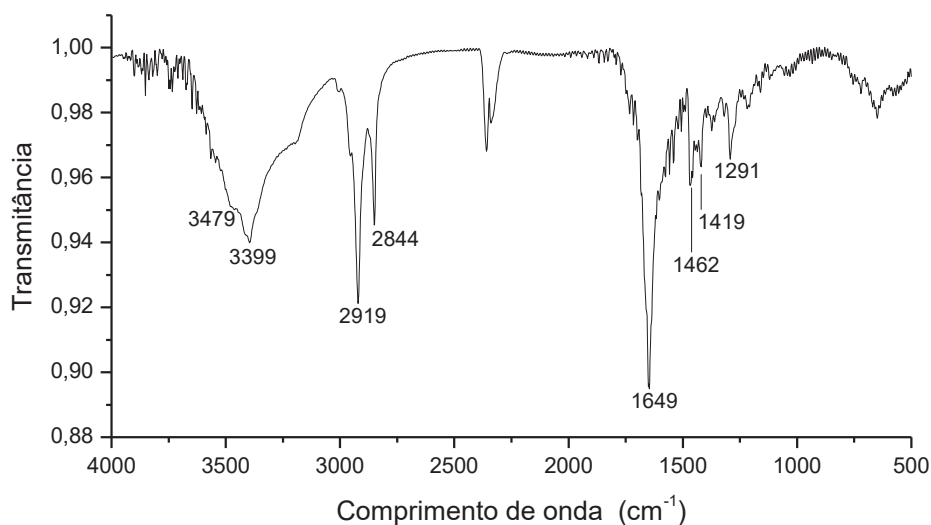
O espectro de massas de alta resolução (FIGURA 65) confirmou a estrutura de **SV7**. Foi observado um pico em *m/z* 339,1289 para um íon [M-H]⁻ (massa exata: 339,1232 para C₂₀H₁₉O₅), o que permitiu atribuir a fórmula molecular C₂₀H₂₀O₄ para **SV7**, confirmando a estrutura proposta por RMN.

FIGURA 65 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE **SV7**

O espectro de absorção na região do UV-Vis (FIGURA 66) revelou um perfil similar ao obtido para **SV4** (demetilsofruticulina A, FIGURA 46, p. 122), confirmando tratar-se de um derivado. O espectro forneceu quatro bandas de absorção (transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$). Três mais intensas na região do ultravioleta com máximos de absorção em λ_{max} 212, 278 e 319 nm, indicativos de ligações duplas de anel aromático substituído, e outra banda menos intensa na região do visível em λ_{max} 509 nm, característico de conjugação entre varias ligações duplas ($C-sp^2$), o que está coerente com cor vermelha de **SV7**.

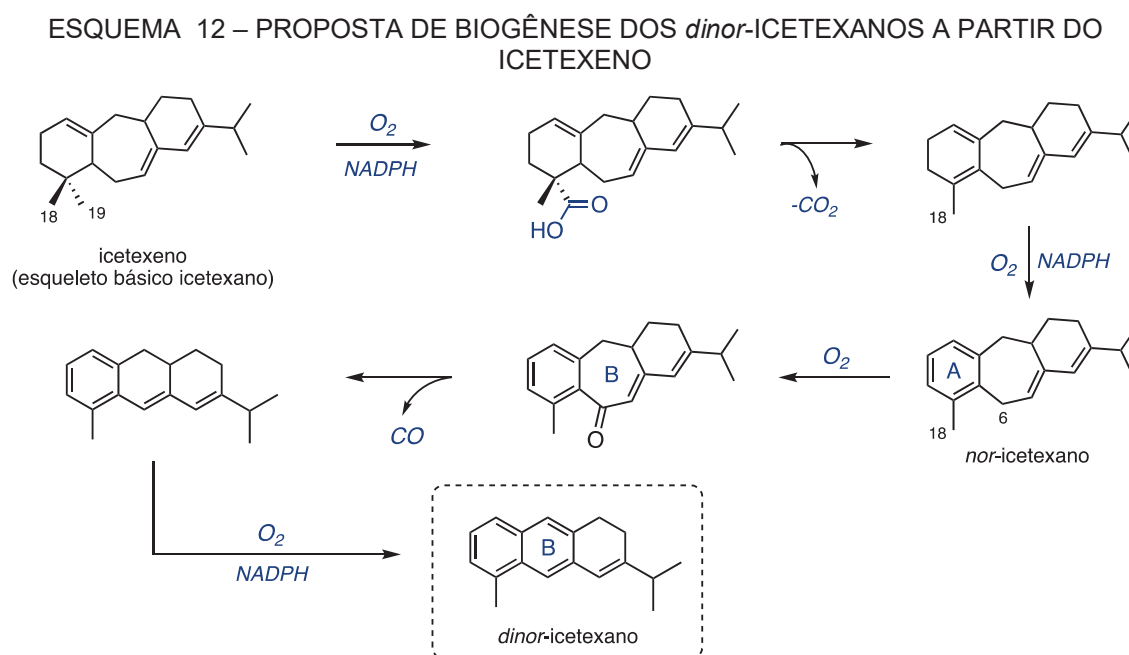
FIGURA 66 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE **SV7**

O espectro de absorção na região do infravermelho (FIGURA 67) indicou a presença de grupos hidroxila com bandas em 3479 e 3399 cm^{-1} , referente aos grupos hidroxila em C-6 e C-12. Há também duas bandas em 2919 e 2844 cm^{-1} , características da deformação axial das ligações C-H de grupos metila, metilênicos e metínicos; uma banda em 1649 cm^{-1} típica de vibrações de grupos carbonila da *para*-quinona; duas bandas em 1462 e 1419 cm^{-1} , resultantes da deformação angular de ligações C-H; e finalmente, uma banda em 1291 cm^{-1} , típica de deformação axial de ligação C-O.

FIGURA 67 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO IV DE **SV7**

1.6.2 Identificação dos diterpenos tipo *dinor*-icetexanos

Nesse tópico serão descritos três diterpenos *dinor*-icetexanos (**SV8-SV10**). Esses diterpenos apresentam um esqueleto carbônico tricíclico (C6-C6-C6), em um arranjo linear, similar ao antraceno. Acredita-se, que estes diterpenos são formados a partir dos icetexanos, que sofreriam rearranjo e perda de dois carbonos (C-6 e C-19) (SORIANO-GARCÍA et al., 1987). Deste modo, sugere-se que a biogênese desses diterpenos pode ocorrer a partir do icetexeno. Similar ao descrito anteriormente para os *nor*-icetexano (ESQUEMA 9, p. 99), os *dinor*-icetexanos podem ser obtidos inicialmente pela descarboxilação em C-19 e perda dessa mestila. Em seguida uma oxidação pode ocorrer em C-6, originando um grupo cetona nessa mesma posição, de tal modo a favorecer uma reação de eliminação (perda de grupo CO), resultando na contração do anel B de sete para seis membros (ESQUEMA 12) (OLIVEIRA, 2017).



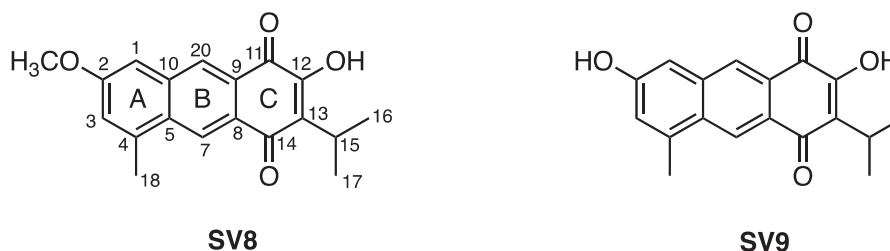
FONTE: adaptado de OLIVEIRA, 2017.

Além disso, há poucos relatos na literatura desses diterpenos, o que os torna raros na natureza. Os dados obtidos nos espectros de RMN de 1H revelaram similaridade com os icetexanos isolados e identificados nesse trabalho (**SV1-SV7**), como será discutido a seguir.

1.6.2.1 Identificação de **SV8** e determinação estrutural de **SV9**

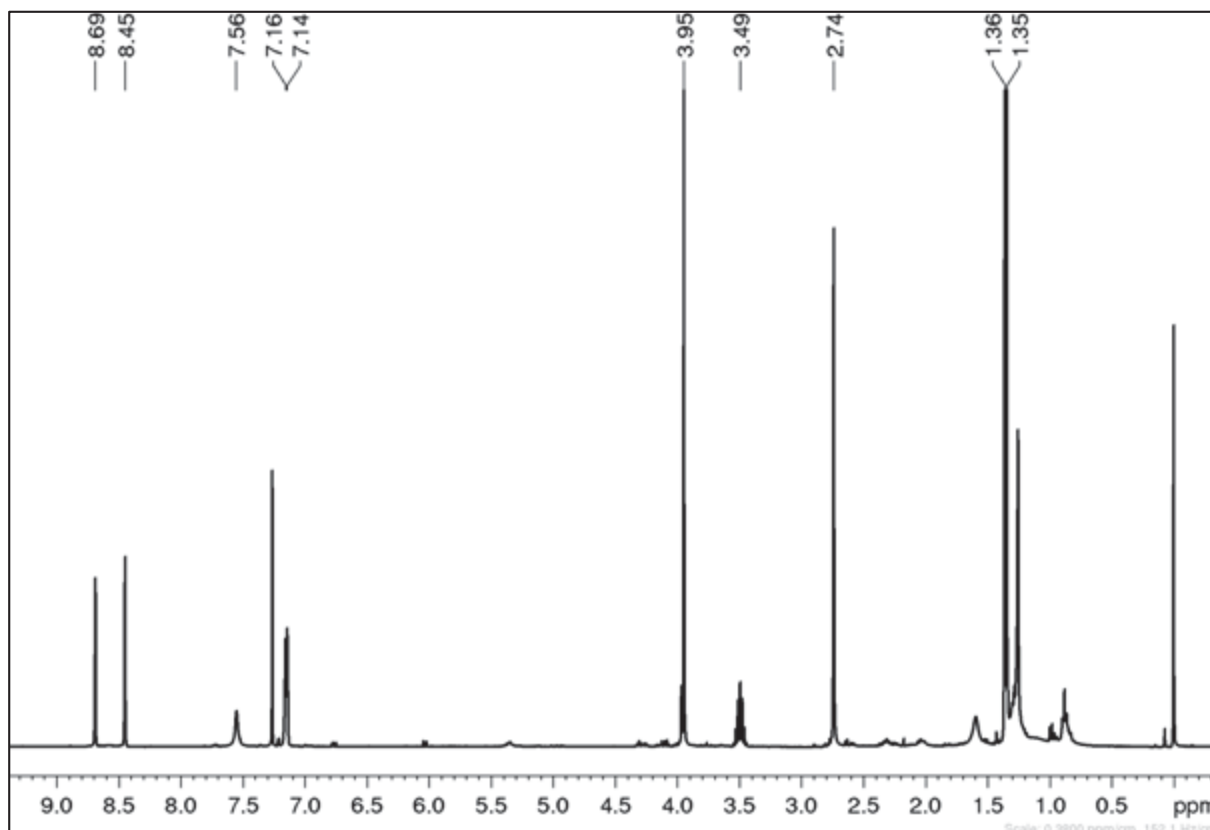
As substâncias **SV8** e **SV9** (FIGURA 68) foram isoladas, separadamente, como sólidos de coloração laranja. Os dados obtidos de RMN de ^1H revelaram valores de deslocamentos químicos muito próximos para as duas substâncias.

FIGURA 68 – ESTRUTURA QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **SV8** E **SV9**



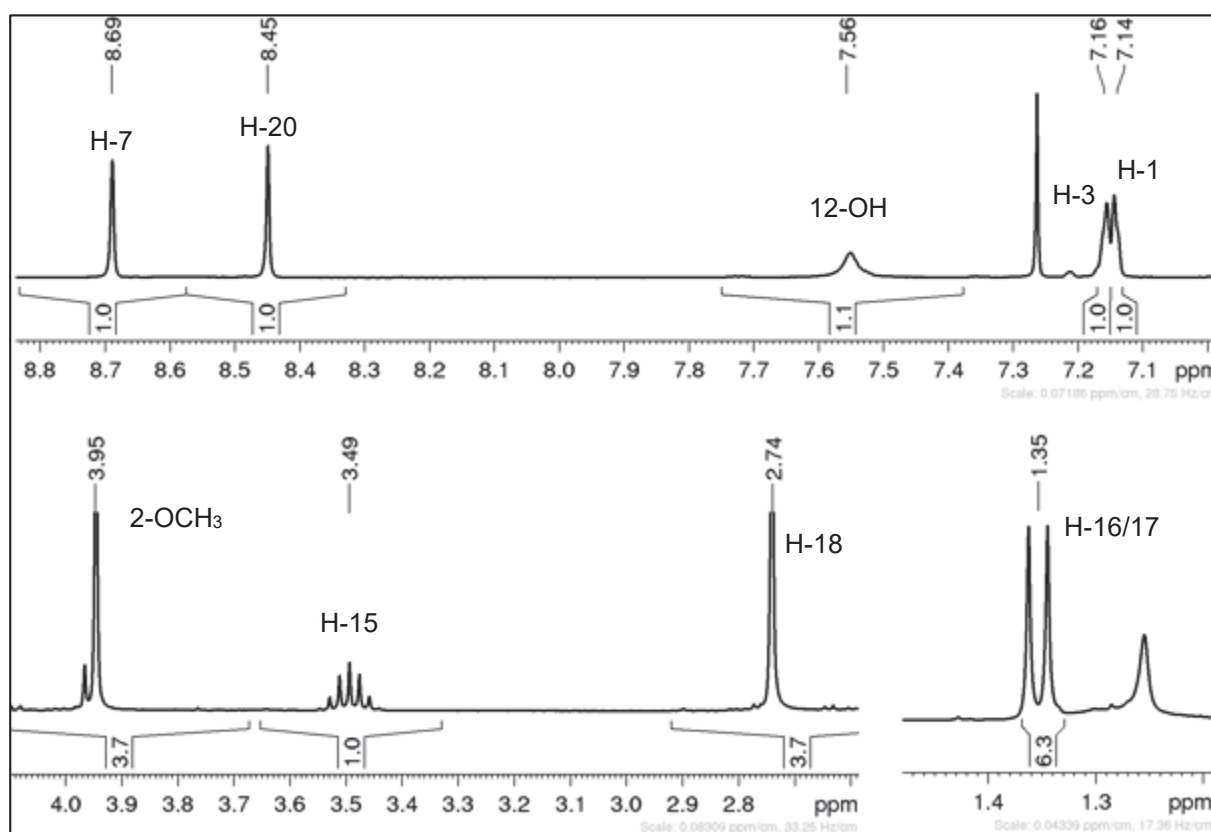
Iniciando por **SV8**, o seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 69 e 70) mostrou sinais característicos dos substituintes dos anéis A e C já descritos nesse trabalho para as substâncias anteriores, mas com deslocamentos químicos maiores.

FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV8** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)



Os sinais típicos dos sinais do anel A foram identificados por dois dupletos em δ_H 7,16 e 7,14 (1H, $J = 2,4$ Hz, H-3 e H-1), típico dos hidrogênios em acoplamento *meta*; um simpleto de um grupo metila em δ_H 2,74 (3H, H-18); e outro simpleto de um grupo metoxila em δ_H 3,95 (3H, 2-OCH₃). Já os substituintes do anel C também estavam mais desprotegidos. Foi observada a presença do grupo isopropila como um hepteto em δ_H 3,49 (1H, $J = 7,2$ Hz, H-15) e um duplete em δ_H 1,35 (6H, $J = 7,2$ Hz, H-16 e H-17). O sinal de um grupo hidroxila foi observado como um simpleto-largo em δ_H 7,55 (1H, 12-OH). E ainda, foram observados dois simpletos, integrando para um hidrogênio cada, em δ_H 8,70 e 8,45. Os seus valores de deslocamento químico indicam que os dois estão próximos a uma região de desblindagem, como aquela causada pelos grupos carbonila da *para*-quinona (anel C).

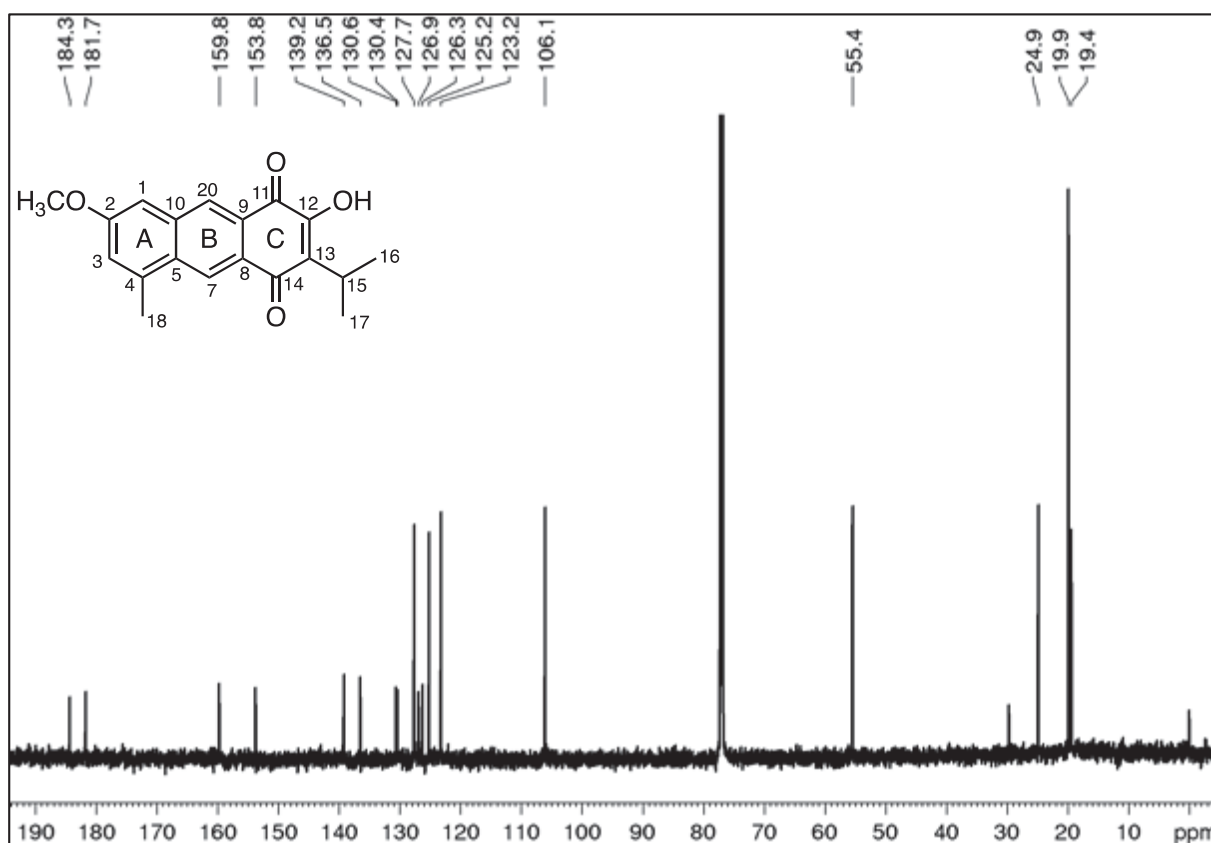
FIGURA 70 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **SV8**



O espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ (FIGURA 71) revelou o total de 18 sinais, dos quais o sinal em δ_C 55,5 pode ser atribuído ao grupo metoxila em C-2. Considerando a equivalência dos grupos metila C-16 e C-17, esses dados apontam que **SV8** possui em seu esqueleto básico 18 átomos de carbono, ou seja, trata-se de um *dinor*-

diterpeno. Além do sinal característico das duas metilas equivalentes do grupo isopropila em δ_C 19,9 (H-16 e H-17), também foram observados os sinais de um grupo metila ligado ao anel aromático em δ_C 19,4 (C-18); de um carbono alifático em δ_C 24,9 (C-15) e das duas carbonilas do grupo *para*-quinona em δ_C 184,3 (C-14) e 181,7 (C-11). Os sinais restantes foram atribuídos a carbonos sp^2 : dois oxigenados em δ_C 159,7 (C-2) e 153,7 (C-12), seis não hydrogenados em δ_C 139,2 (C-4), 130,5 (C-5), 126,8 (C-8), 126,2 (C-9), 136,5 (C-10) e 130,3 (C-13), e os demais foram atribuídos a carbonos hydrogenados visto a presença de correlações no HSQC (FIGURA 73).

FIGURA 71 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}C\{^1H\}$ DE **SV8** (CLOROFÓRMIO-*d*, 150 MHz)



Observando o HSQC foi possível definir que o hidrogênio em δ_H 8,70 está ligado ao carbono em δ_C 125,2. No HMBC (FIGURA 74), este hidrogênio correlacionou com os carbonos em δ_C 139,2 (C-4), 126,2 (C-9), 136,5 (C-10) e 184,3 (C-14), confirmando a sua localização em C-7 (anel B). Por outro lado, o sinal em δ_H 8,45 está ligado ao carbono em δ_C 127,6, e apresentou correlações no HMBC com os carbonos em δ_C 106,1 (C-1), 130,5 (C-5), 126,8 (C-8) e 181,7 (C-11), estando, portanto, em C-

20 (anel B). A posição desses dois hidrogênios (H-7 e H-20) está de acordo com os seus deslocamentos químicos, uma vez que ambos estão próximos aos grupos carbonila (C-11 e C-14) (FIGURA 72). E ainda, o espectro de RMN de ^1H não apresentou quaisquer sinais de hidrogênios alifáticos, além daqueles atribuídos ao grupo isopropila e ao grupo metila em C-4, indicando que **SV8** não contém um anel de sete membros (anel B) como nas demais substâncias já descritas.

FIGURA 72 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV8**

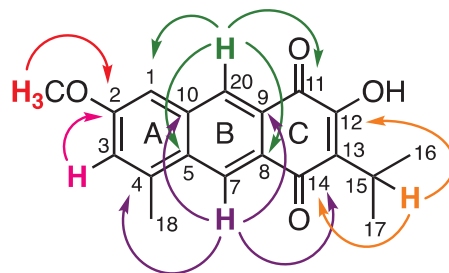


FIGURA 73 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV8**
(CLOROFORMIO-*d*, 400 MHz)

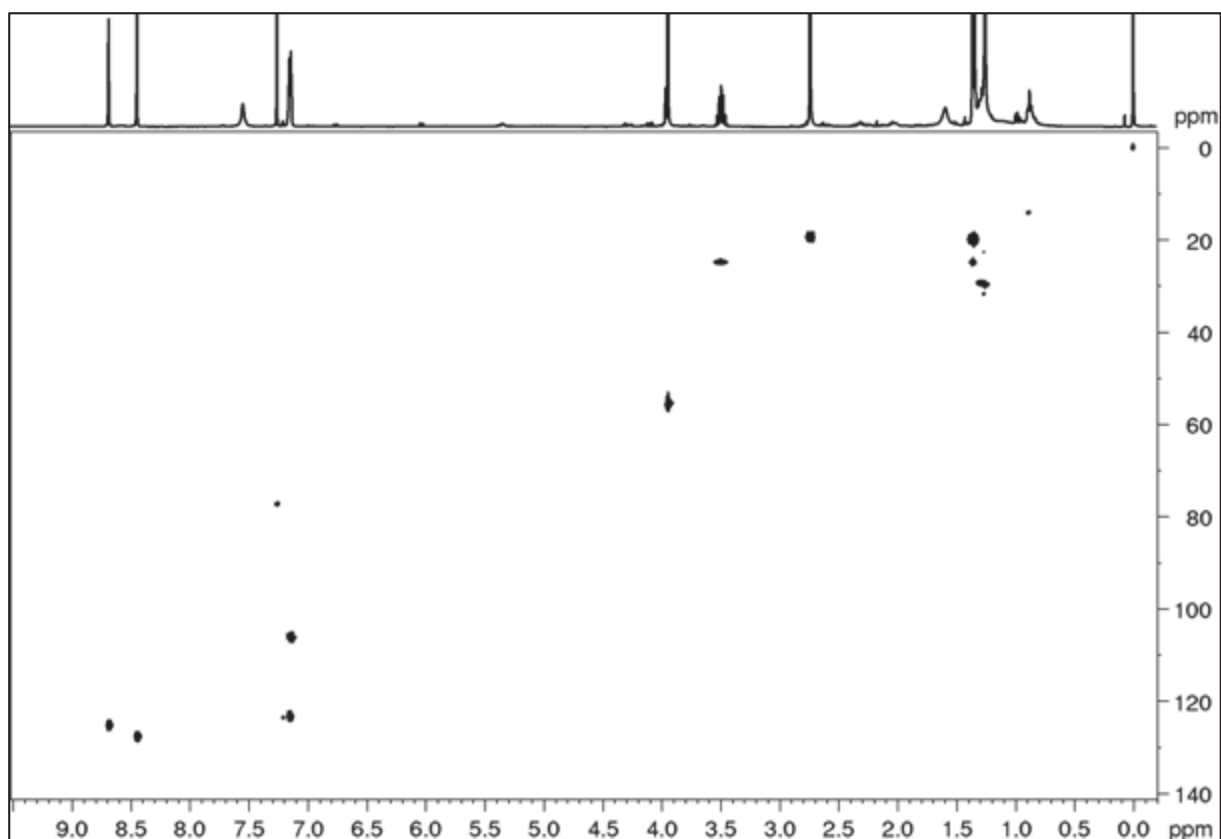
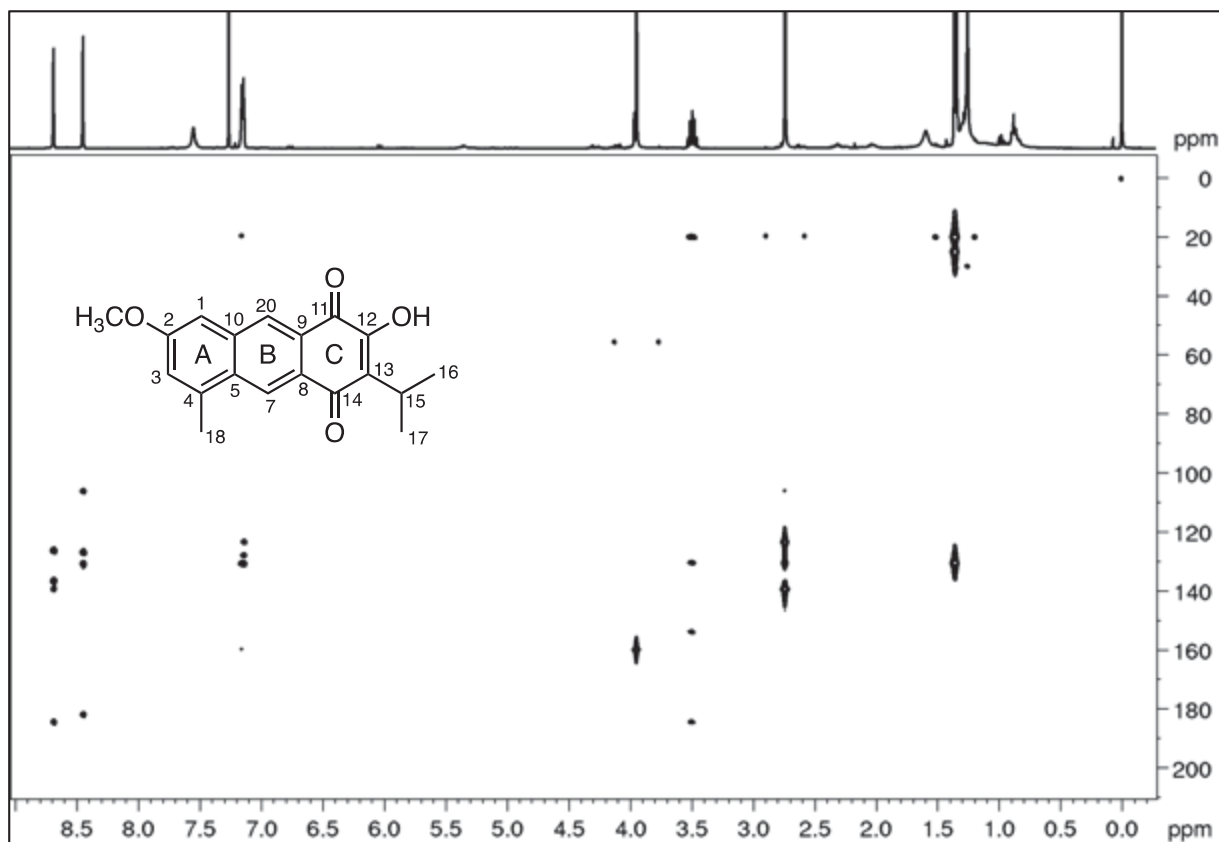


FIGURA 74 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV8** (CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)



Os dados descritos e os demais dados de RMN (TABELA 21) levaram a identificação de **SV8**, um diterpeno com esqueleto *dinor*-icetexano, conhecido por fruticulina B (FIGURA 68, p. 141). Esta é uma substância rara na natureza, com apenas dois relatos de ocorrência, tendo sido isolada pela primeira vez na espécie *Salvia fruticulosa* (RODRIGUEZ-HAHN et al., 1989), e encontrada anteriormente nas folhas de *S. lachnostachys* (OLIVEIRA et al., 2016).

TABELA 21 – DADOS DE RMN DE **SV8** (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz) COMPARADO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA FRUTICULINA B (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz; OLIVEIRA et al., 2016)

Posição	SV8			Fruticulina B	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	106,1	7,14 <i>d</i> (2,4)	1,3,5,20	106,1	7,14 <i>d</i> (2,4)
2	159,8	-	-	159,7	-
3	123,2	7,16 <i>d</i> (2,4)	1,2,5	123,2	7,16 <i>d</i> (2,4)
4	139,2	-	-	139,2	-
5	130,6	-	-	130,5	-
7	125,2	8,69 <i>s</i>	5,6,8,9,14	125,2	8,69 <i>s</i>
8	126,9	-	-	126,8	-
9	126,3	-	-	126,2	-
10	136,5	-	-	136,5	-
11	181,7	-	-	181,7	-
12	153,8	-	-	153,7	-
13	130,4	-	-	130,3	-
14	184,3	-	-	184,3	-
15	24,9	3,49 <i>hept</i> (7,2)	12,13,14,16,17	24,8	3,49 <i>hept</i> (7,2)
16	19,9	1,35 <i>d</i> (7,2)	13,15,17	19,9	1,35 <i>d</i> (7,2)
17	19,9	1,35 <i>d</i> (7,2)	13,15,16	19,9	1,35 <i>d</i> (7,2)
18	19,4	2,74 <i>s</i>	3,4,5	19,5	2,73 <i>s</i>
20	127,7	8,45 <i>s</i>	1,9,11	127,6	8,45 <i>s</i>
12-OH	-	7,55 <i>s/l</i>	11,12,13	-	7,55 <i>s/l</i>
2-OCH₃	55,4	3,95 <i>s</i>	2	55,4	3,94 <i>s</i>

A substância **SV9** (FIGURA 68, p. 141) apresentou no espectro de RMN de 1H sinais muito semelhantes aos obtidos para fruticulina B (**SV8**). Na sobreposição dos dois espectros de RMN de 1H de **SV8** e **SV9** (FIGURAS 75 e 76) é possível identificar os sinais característicos dos substituintes presentes nos anéis A, B e C. Entretanto, foi verificada a ausência em **SV9** do sinal do grupo metoxila em δ_H 3,94 (2-OCH₃), que havia sido observado em **SV8**, sugerindo a presença de um grupo hidroxila na posição C-2.

FIGURA 75 – SOBREPOSIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE **SV9** (A, ACETONA- d_6 , 400 MHz) COM **SV8** (B, CLOROFÓRMIO- d , 400 MHz)

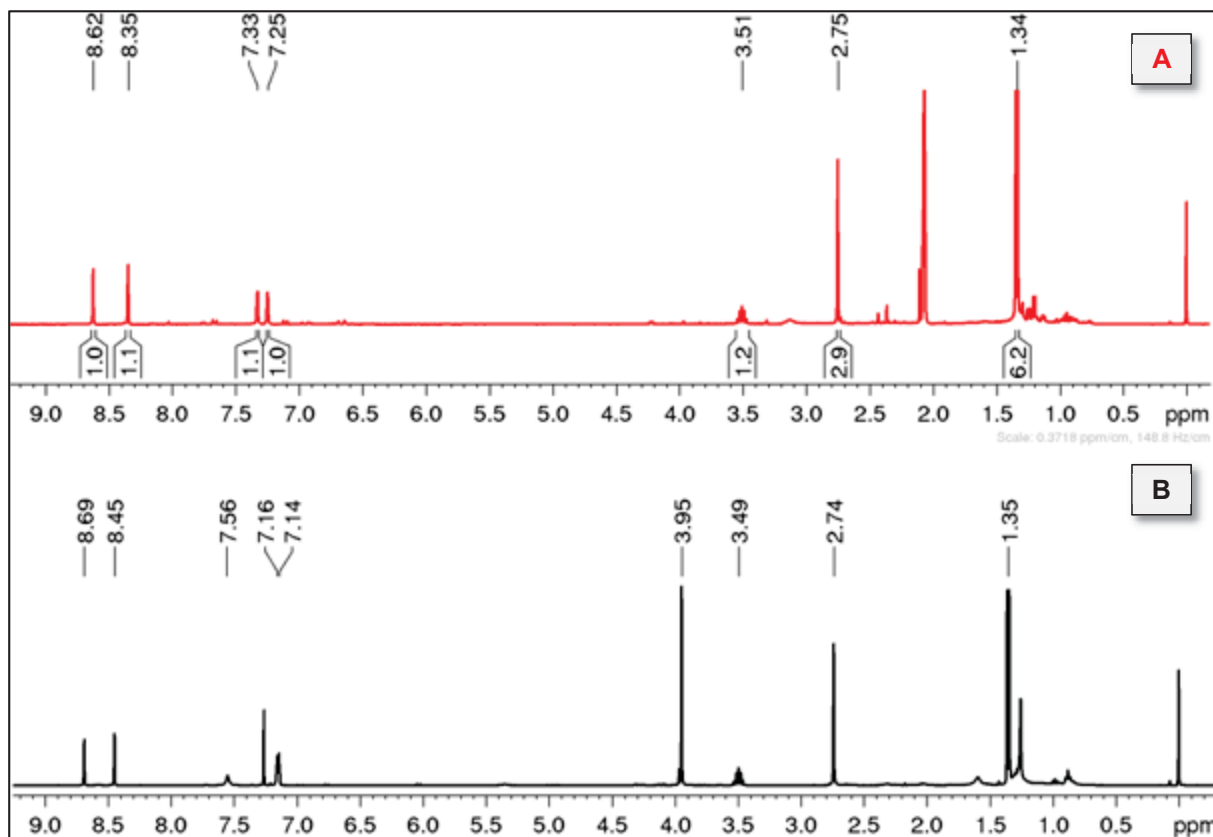
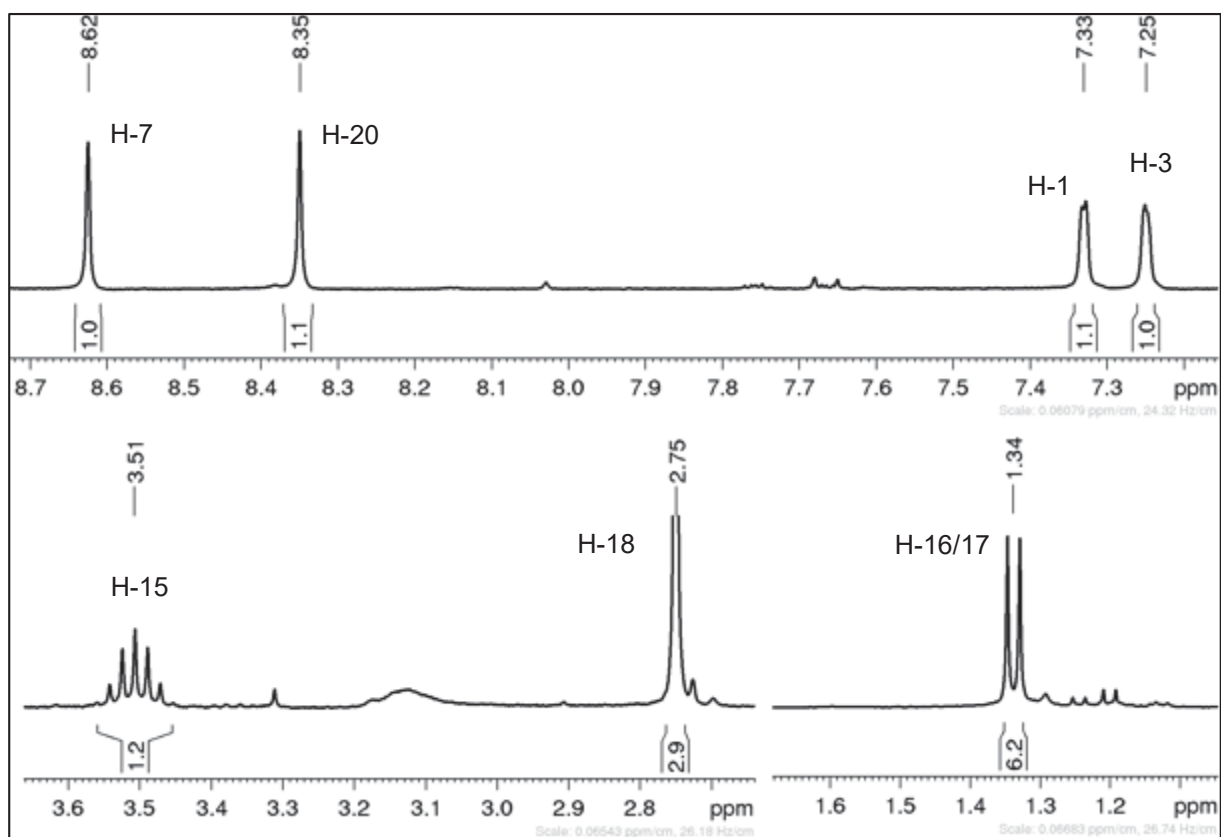


FIGURA 76 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV9**



Observando o HMBC (FIGURA 79) foi possível deduzir a presença dos dois grupos hidroxila nas posições em C-2 e C-12. O hepteto em δ_H 3,51 (H-15 do grupo isopropila, anel C) revelou correlação com um carbono olefínico oxigenado em 156,0, típico de C-12, como nas demais substâncias já identificadas nesse trabalho. Além disso, os dupletos em δ_H 7,33 e 7,25 (H-1 e H-3, hidrogênios do anel A) correlacionaram com o carbono em 158,6 (C-2), típico do carbono de anel aromático com um grupo hidroxila (FIGURA 77).

FIGURA 77 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV9**

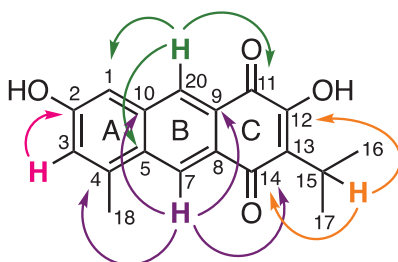


FIGURA 78 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV9** (ACETONA- d_6 , 400 MHz)

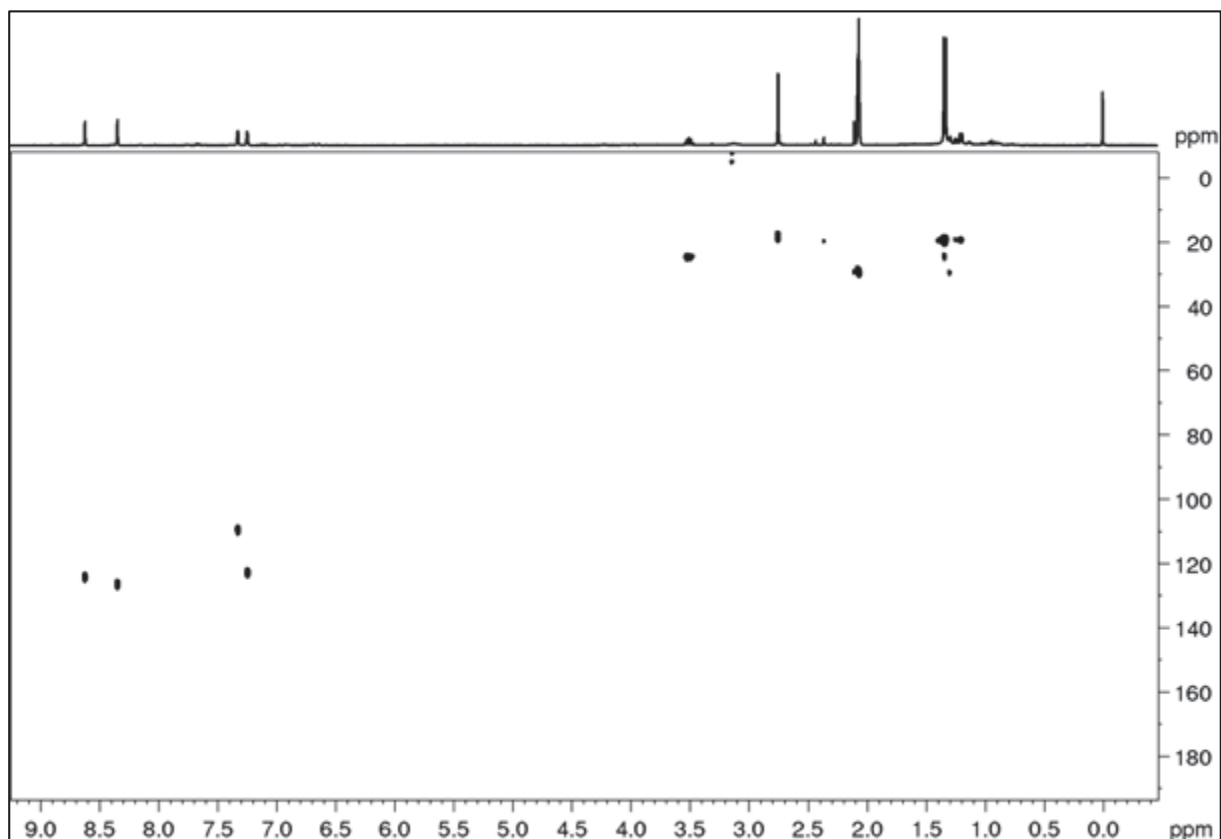
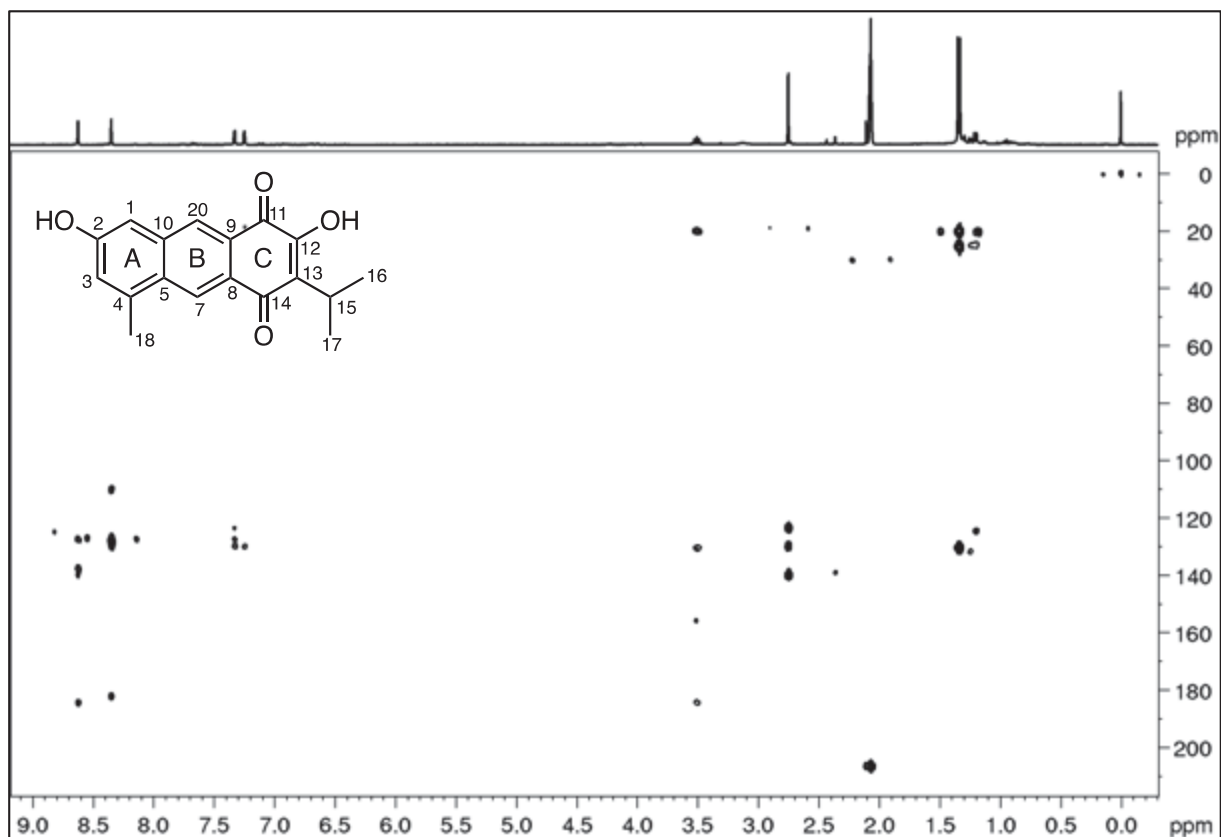


FIGURA 79 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV9** (ACETONA- d_6 , 400 MHz)

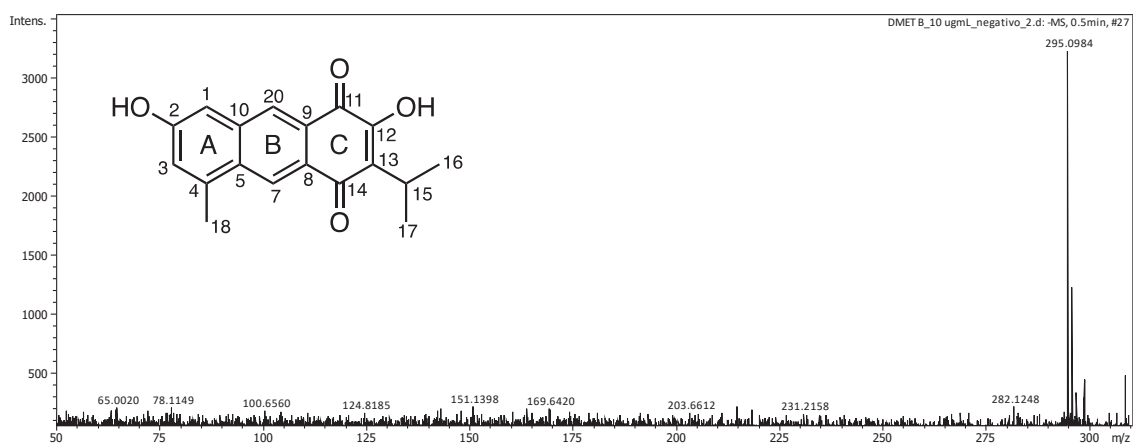


Diante dos sinais apresentados, em conjunto com os demais observados no espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 78) e HMBC (TABELA 22) foi possível atribuir a estrutura de **SV9** (FIGURA 68, p. 141), identificada como um derivado da fruticulina B (**SV8**), uma substância inédita na literatura, a qual foi nomeada como demetilfruticulina B.

TABELA 22 – DADOS DE RMN DE **SV9** (ACETONA-*d*₆, 400 MHz)

Posição	SV9		
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	110,4	7,33 <i>d</i> (1,9)	2,3,20
2	158,6	-	-
3	123,8	7,25 <i>d</i> (1,9)	5,18
4	140,1	-	-
5	130,0	-	-
7	125,2	8,62 <i>s</i>	4,9,10,14
8	128,4	-	-
9	127,5	-	-
10	137,8	-	-
11	182,4	-	-
12	156,0	-	-
13	130,8	-	-
14	184,6	-	-
15	25,4	3,51 <i>hept</i> (7,0)	12,13,14,16,17
16	20,2	1,34 <i>d</i> (7,0)	13,15,17
17	20,2	1,34 <i>d</i> (7,0)	13,15,16
18	19,2	2,75 <i>s</i>	3,4,5
20	126,2	8,35 <i>s</i>	1,5,11

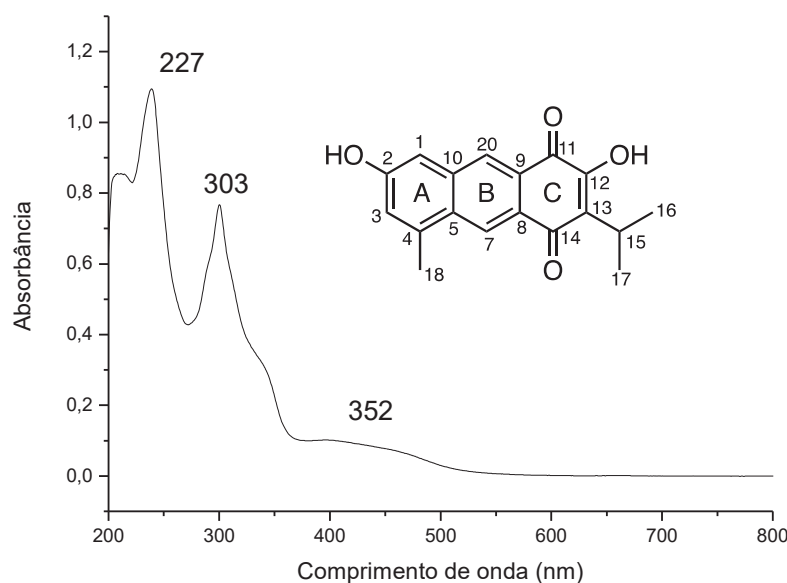
A fim de confirmar a estrutura atribuída a **SV9**, foi realizado o espectro de massas de alta resolução no modo negativo (FIGURA 80). Este forneceu um pico em m/z 295,0984 $[M-1]^-$, compatível com a fórmula $C_{18}H_{15}O_4$, (massa exata: 295,1112 g mol⁻¹) indicando que **SV9** possui a formula molecular $C_{18}H_{16}O_4$, estando de acordo com a estrutura proposta.

FIGURA 80 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE **SV9**

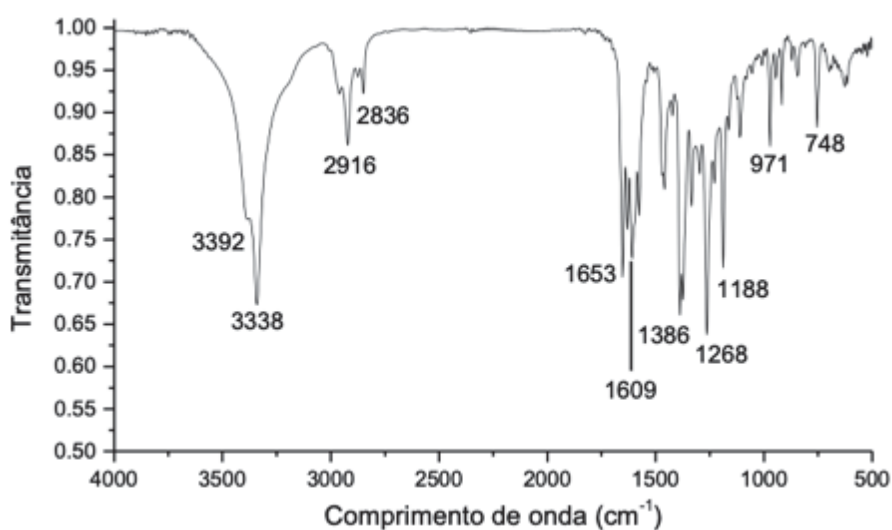
O espectro de absorção na região do UV-Vis (FIGURA 81) revelou um perfil diferente daqueles obtidos para os icetexanos anteriores. Foi possível identificar três

bandas, sendo duas bastante intensas, que podem ser atribuídas aos anéis aromáticos substituídos, com máximos de absorção em λ_{max} 227 e 303 nm, e outra banda menos intensa que foi observada em λ_{max} 452 nm, correspondente a conjugação de ligações duplas (C- sp^2), o que justifica a cor laranja apresentada por **SV9**.

FIGURA 81 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS DE **SV9** (MEOH)

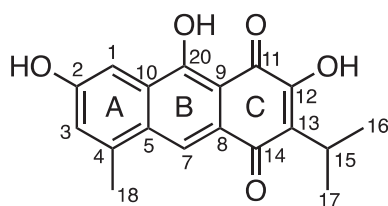


E por fim, foi realizado o espectro de absorção no IV (FIGURA 82), através do qual foi possível confirmar a presença dos dois grupos hidroxila em C-2 e C-12 correspondente as bandas em 3392 e 3388 cm^{-1} . Adicionalmente, foram observadas duas bandas, características de deformação axial de ligações C-H do grupo isopropila em 2916 e 2836 cm^{-1} . O grupo *para*-quinona (anel C) foi confirmando através da banda em 1653 cm^{-1} , enquanto que bandas típicas do anel aromático foram observadas em 1609 cm^{-1} (ligações duplas do anel), 971 e 748 cm^{-1} (deformação angular das ligações C-H do anel). Foram ainda observadas bandas em 1386 cm^{-1} , característica de deformação angular de ligações C-H do grupo isopropila, e em 1268 e 1188 cm^{-1} , que podem ser atribuídas á deformação axial das ligações C-O.

FIGURA 82 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO IV DE **SV9**

1.6.2.2 Determinação estrutural de **SV10**

A substância **SV10** (FIGURA 83) foi isolada como um sólido vermelho em mistura com **SV18**. Apesar disso, foi possível identificar os seus sinais. O espectro de RMN de ^1H revelou sinais em comum com os *dinor*-icetexanos descritos neste tópico, indicando o mesmo esqueleto carbônico básico.

FIGURA 83 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV10****SV10**

O espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 84 e 85) apresentou valores de deslocamento químico muito próximo aos obtidos para **SV9** (demetilfruticulina B, TABELA 22, p. 150). Foram observados os sinais característicos dos substituintes do anel A em δ_{H} 7,63 e 7,28 (*d*, $J = 2,5$ Hz, H-1 e H-3), característicos dos hidrogênios em acoplamento *meta* e o sinal de uma metila em 2,72 (*s*, H-18). O anel C também pode ser confirmado pela presença do grupo isopropila que apresentou sinais em δ_{H} 3,50 (*hept*, $J = 7,2$ Hz, H-15) e 1,33 (*d*, $J = 7,2$ Hz, H-16 e H-17). Entretanto, foi

observado somente um hidrogênio aromático referente ao anel B, um simpleto em δ_H 8,18. Adicionalmente, foi observado um sinal desprotegido em δ_H 12,91, o qual é típico do hidrogênio de um grupo hidroxila em ligação intramolecular de hidrogênio. Diante disso, foi possível sugerir a posição desta hidroxila (δ_H 12,91) em C-7 ou C-20 (anel B).

FIGURA 84 – ESPECTRO E RMN DE 1H DE **SV10** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

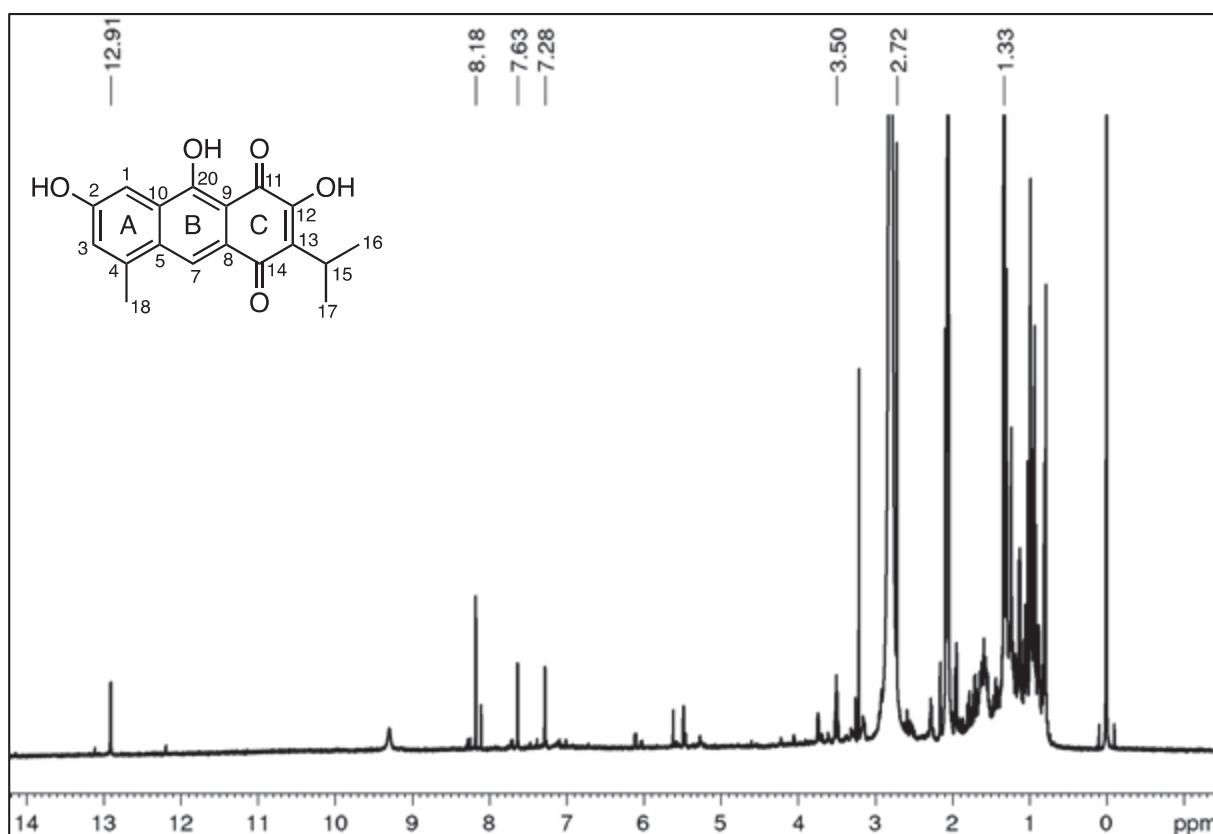
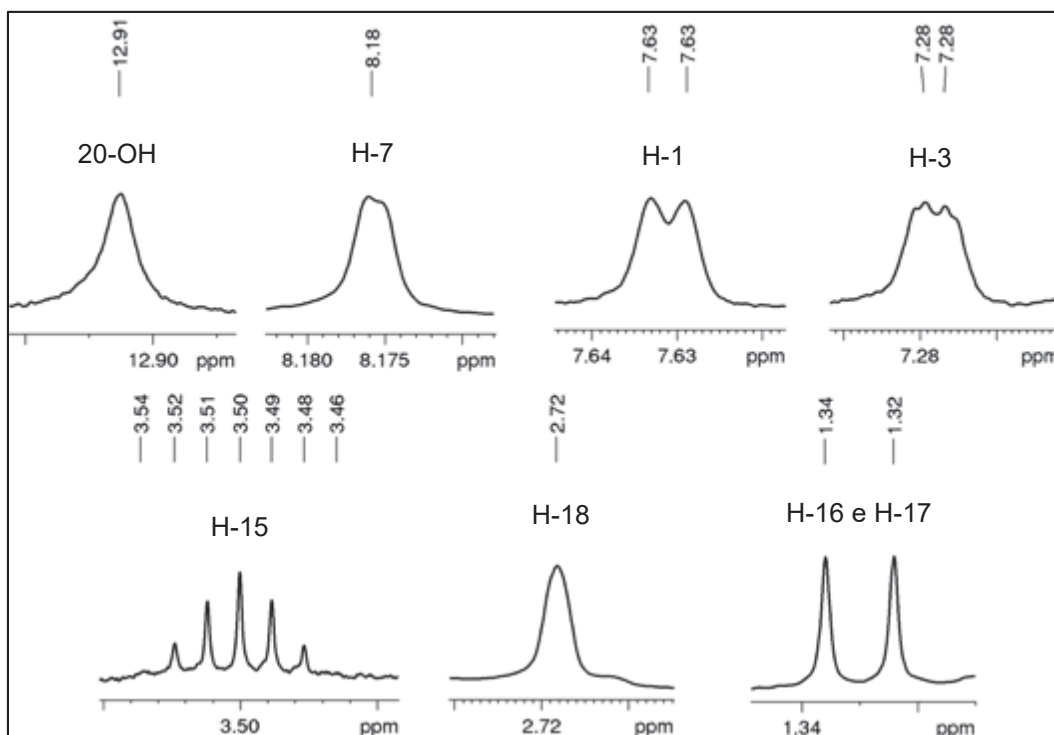


FIGURA 85 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV10**

Observando o HSQC (FIGURA 87) foi possível definir que o sinal em δ_{H} 8,17 está ligado ao carbono em δ_{C} 118,4. No HMBC (FIGURA 88) este hidrogênio apresentou correlações com os carbonos em δ_{C} 141,1 (C-4), 130,8 (C-5), 108,3 (C-9) e com a carbonila da *para*-quinona em δ_{C} 183,5 (C-14). Já a hidroxila em δ_{H} 12,91 (20-OH) correlacionou com os carbonos C-9, em δ_{C} 130,3 (C-10) e 161,7 (C-20). Diante dessas correlações pode-se confirmar que o hidrogênio em δ_{H} 8,17 estava na posição C-7 e a hidroxila em C-20 (FIGURA 86).

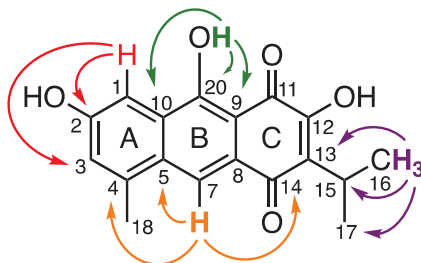
FIGURA 86 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV10**

FIGURA 87 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV10**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

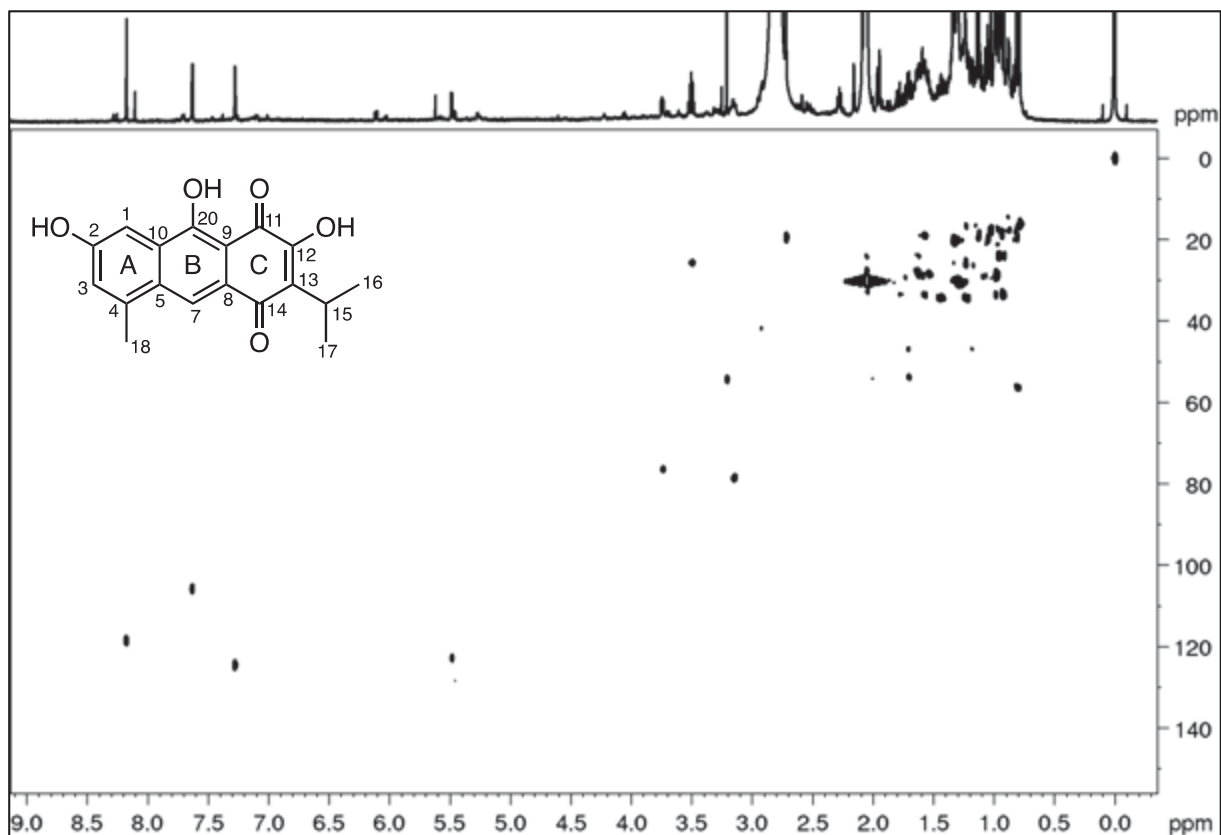
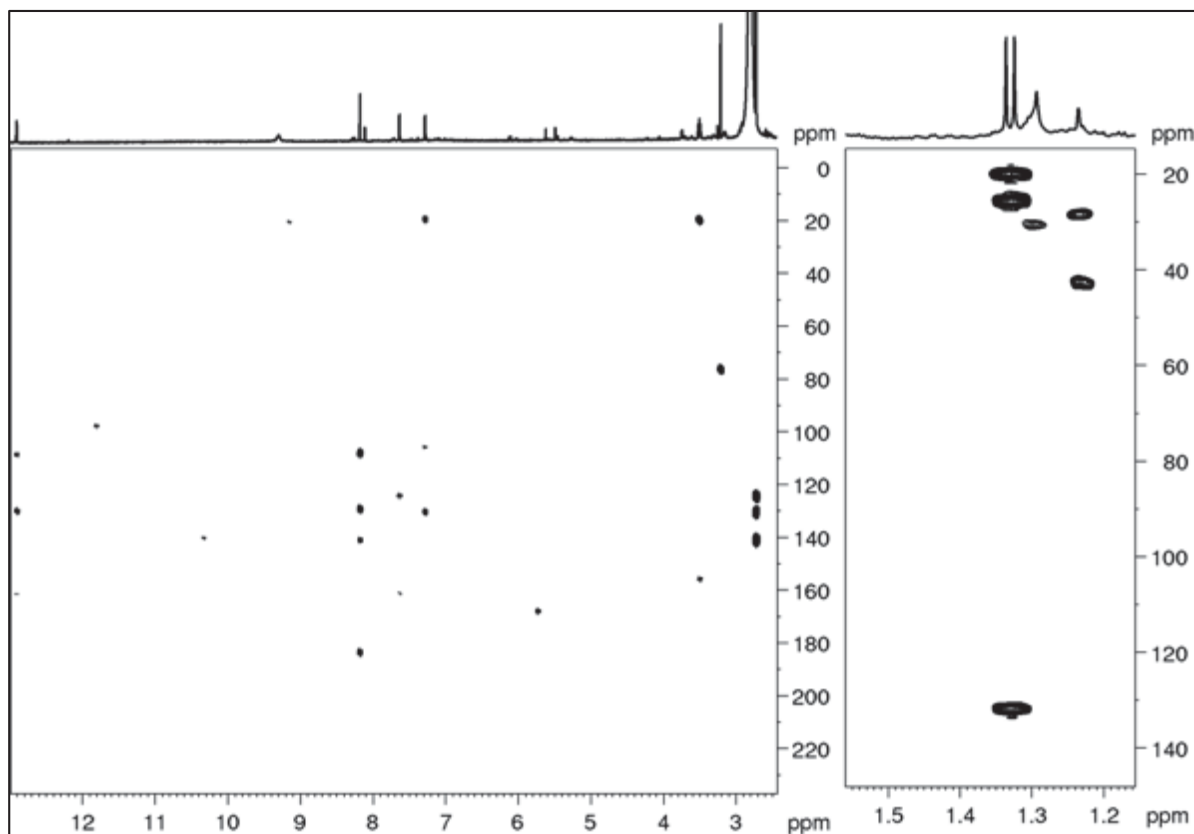


FIGURA 88 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV10**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)



Diante dos dados apresentados e os demais observados nos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 23) foi proposta a estrutura **SV10** (FIGURA 83, p. 152), uma substância inédita na literatura, a qual foi nomeada como 20-hidroxi-demetilfruticulina B.

TABELA 23 – DADOS DE RMN DE **SV10** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz)

Posição	SV10		
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	105,8	7,63 <i>d</i> (2,5)	2,3
2	162,3	-	-
3	124,3	7,28 <i>d</i> (2,5)	1,5
4	141,1	-	-
5	130,8	-	-
7	118,4	8,18 <i>s</i>	4,5,9,14
8	n.o	-	-
9	108,3	-	-
10	130,3	-	-
11	n.o	-	-
12	n.o	-	-
13	131,8	-	-
14	183,5	-	-
15	25,7	3,50 <i>hept</i> (7,2)	n.o
16	20,2	1,33 <i>d</i> (7,2)	13,15,17
17	20,2	1,33 <i>d</i> (7,2)	13,15,16
18	19,4	2,72 <i>s</i>	3,4,5
20	161,7	-	-
20-OH	-	12,91 <i>s</i>	9,10,20

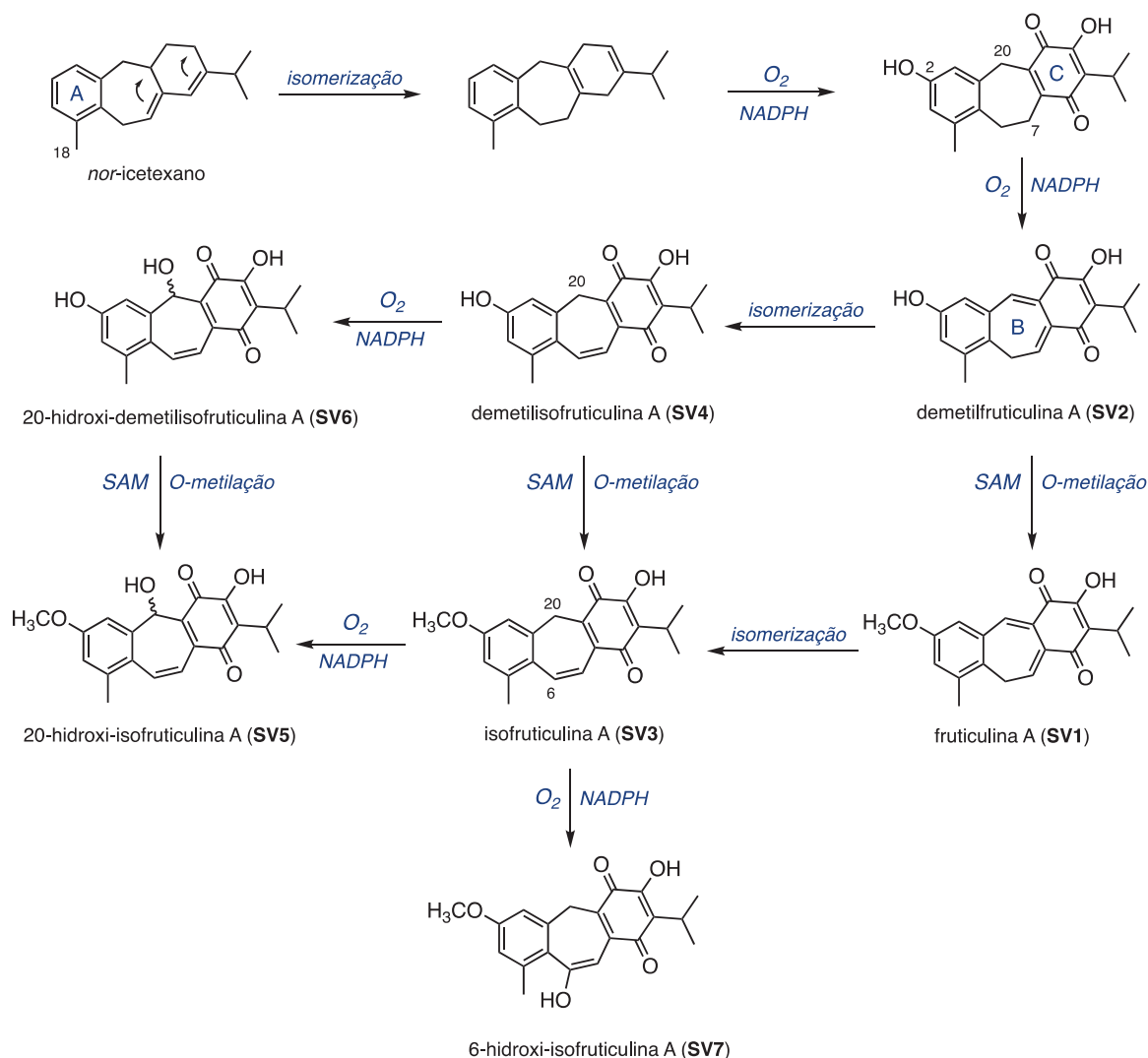
n.o = não observado.

1.6.3 Proposta de biogênese para os icetexanos identificados (**SV1-SV10**)

Como já mencionado anteriormente, os diterpenos com esqueleto carbônico icetexano podem ser originados a partir do esqueleto básico abietano. Estes são biossintetizados no organismo vegetal por meio de conexões de unidades isoprênicas, originadas a partir de duas rotas principais, a rota do mevalonato (MEV) e a rota do metileritritol fosfato (MEP) (ESQUEMAS 1-4, p. 57-60) (DEWICK, 2009).

A biogênese dos *nor*-icetexanos e dos *dinor*-icetexanos podem ocorrer a partir de um rearranjo do precursor abietadieno, o qual apresenta o esqueleto básico dos abietanos. Uma vez formado o esqueleto *nor*-icetexano podem ocorrer algumas reações envolvendo isomerizações e oxidações, as quais levariam a formação do grupo α -hidroxi- β -isopropil-benzoquinona (anel C), além da inserção de um grupo hidroxila em C-2. A substância **SV2** (demetilfruticulina A) poderá ser formada após oxidação em C-7 e C-20. Por outro lado, **SV1** (fruticulina A) pode ser derivada de **SV2**, após uma oxidação e O-metilação pela SAM (adenosina metionina) em C-2. Além disso, **SV4** (demetilsofruticulina A) também pode ser formada a partir de **SV2** após uma isomerização do anel B. E por sua vez, **SV4** poderá fornecer **SV6** (20-hidroxi-demetilsofruticulina A) mediante uma oxidação em C-20. A formação de **SV3** (isofruticulina A) poderia ocorrer através de uma isomerização de **SV1**. E por fim, os *nor*-icetexanos **SV5** (20-hidroxi-isofruticulina A) e **SV7** (6-hidroxi-isofruticulina A) poderão ser obtidos após oxidação nas posições C-20 e C-6, respectivamente (ESQUEMA 13) (OLIVEIRA, 2017).

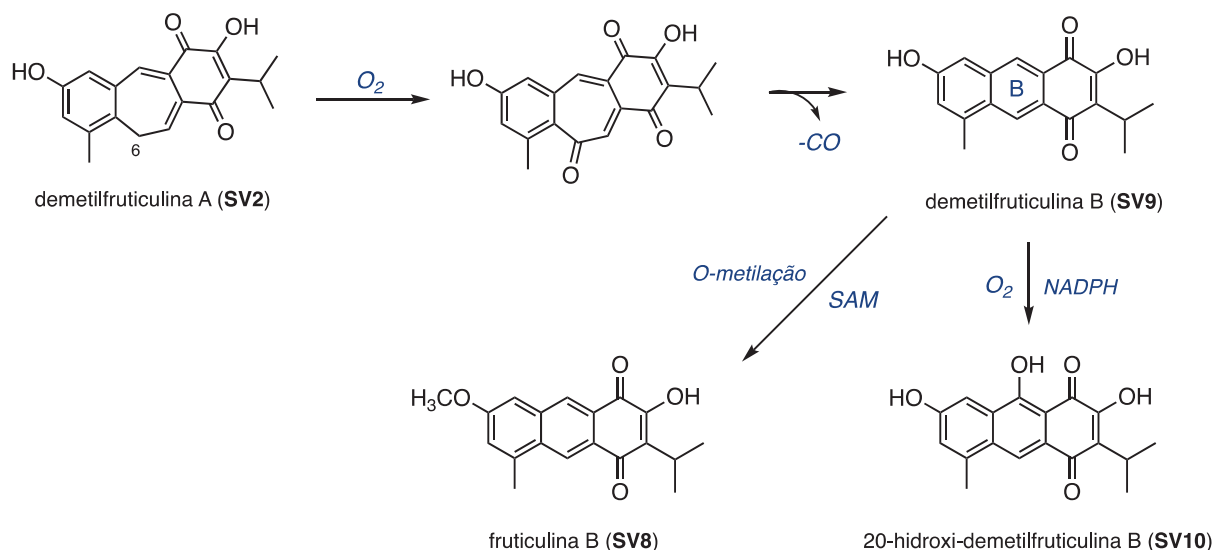
ESQUEMA 13 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS *nor*-ICETEXANOS (**SV1-SV7**) A PARTIR DO PRECURSOR ICETEXANO



FONTE: adaptado de OLIVEIRA, 2017.

Os demais icetexanos identificados, cujo esqueleto carbônico são do tipo *dinor*-icetexanos poderiam ser obtidos a partir do icetexeno, devidamente apresentado no ESQUEMA 12, p. 140. Entretanto, esses diterpenos poderiam ter sido formados a partir da demetilfruticulina A (**SV2**). Que por sua vez poderia sofrer uma oxidação em C-6, resultando em um grupo cetona nessa mesma posição, podendo favorecer uma reação de eliminação e aromatização do anel B, resultando na obtenção do *dinor*-icetexano **SV9** (demetilfruticulina B). Já a substância **SV8** (fruticulina B) poderia ser formada por meio de uma oxidação seguida por uma *O*-metilação. Por outro lado, **SV10** (20-hidroxi-demetilfruticulina B) deriva de **SV9**, podendo ser obtida após oxidação (ESQUEMA 14) (OLIVEIRA, 2017).

ESQUEMA 14 – PROPOSTA DE BIOGÊNESE DOS *dinor*-ICETEXANOS (**SV8-SV10**) A PARTIR DO DA DEMETILFRUTICULINA A

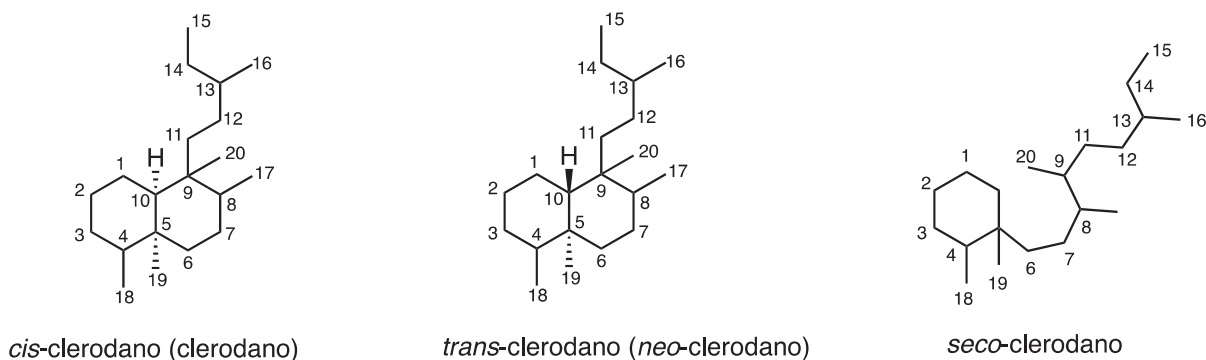


FONTE: adaptado de OLIVEIRA, 2017.

1.6.4 Identificação dos diterpenos tipo clerodano

Os diterpenos do tipo clerodano são constituintes muito comuns em espécies do gênero *Salvia*. Estes podem sofrer diversos tipos de rearranjos, levando a diferentes esqueletos carbônicos, incluindo uma fusão *cis* ou *trans* entre os anéis (C-5 e C-10) (LI et al., 2016). De *S. melissiflora* foram isolados quatro clerodanos. Destes, dois apresentaram uma fusão *cis* entre os anéis (**SV11** e **SV13**), e um apresentou a fusão *trans* (**SV12**). Já a substância **SV14** foi identificada como um *seco*-clerodano, pois houve a quebra da ligação carbono-carbono entre C-9 e C-10 (FIGURA 89). A identificação dessas substâncias será descrita a seguir.

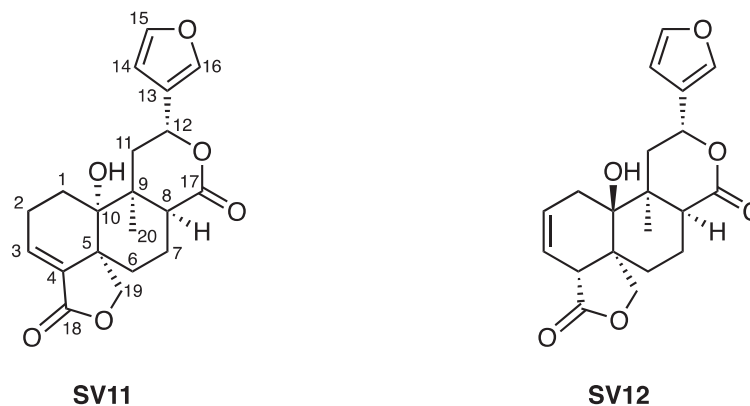
FIGURA 89 – ESQUELETO BÁSICO DO *CIS*-CLERODANO E *SECO*-CLERODANO



1.6.4.1 Identificação de **SV11** e determinação estrutural de **SV12**

As substâncias **SV11** e **SV12** (FIGURA 90) foram isoladas, separadamente, como sólidos incolores. Ao analisar os espectros de RMN de ^1H das duas substâncias foi possível determinar semelhanças entre eles.

FIGURA 90 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS **SV11** e **SV12**



Iniciando por **SV11**, o seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 91 e 92) revelou três sinais de hidrogênios olefínicos em um sistema de spins, sendo um tripleto em δ_{H} 7,45 (1H, $J = 1,6$ Hz, H-16), um duplo-duplete em δ_{H} 7,39 (1H, $J = 2,5$ e $1,6$ Hz, H-15) e um simpleto-largo em δ_{H} 6,40 (1H, H-14). Esse conjunto de sinais é característico de um anel furano monossustituído. Ainda na mesma região do espectro foi observado um tripleto em δ_{H} 6,90 (1H, $J = 3,6$ Hz, H-3) que foi atribuído a outro hidrogênio olefínico, vizinho a um grupo metileno.

FIGURA 91 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV11** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

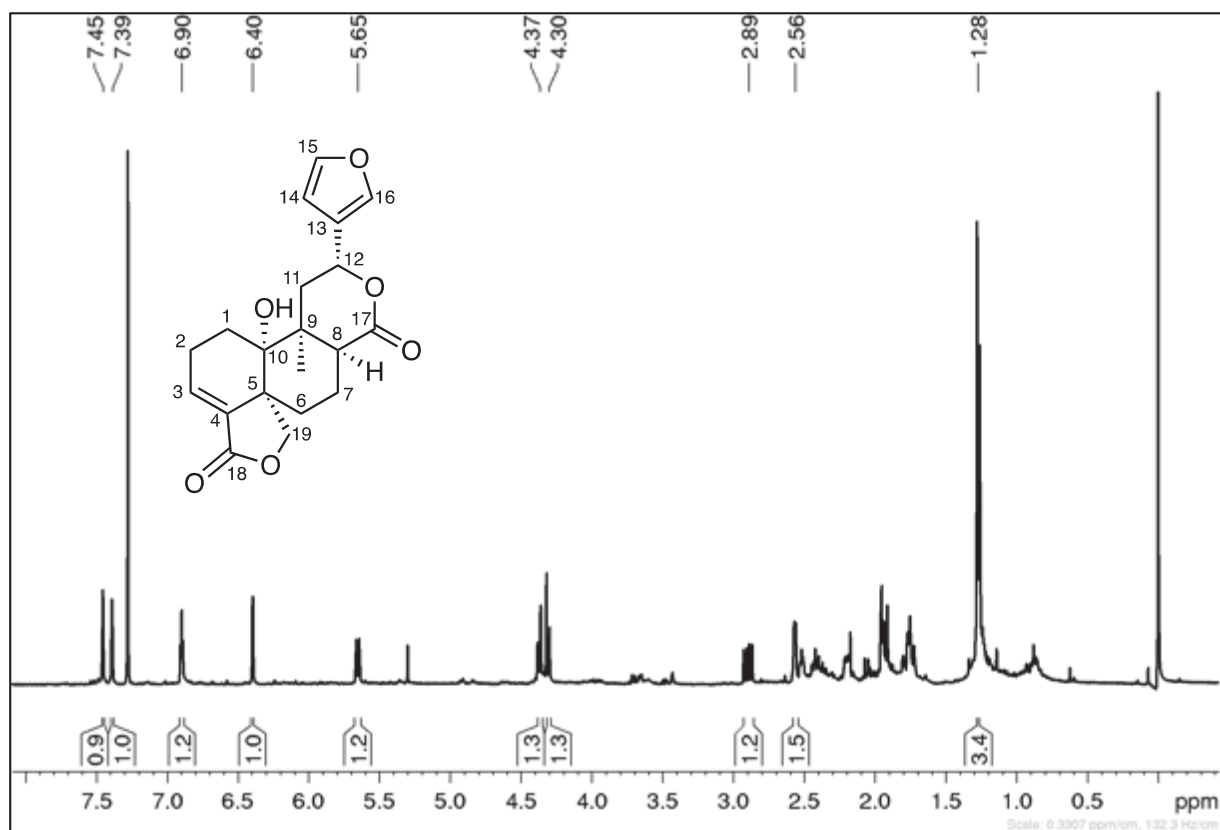
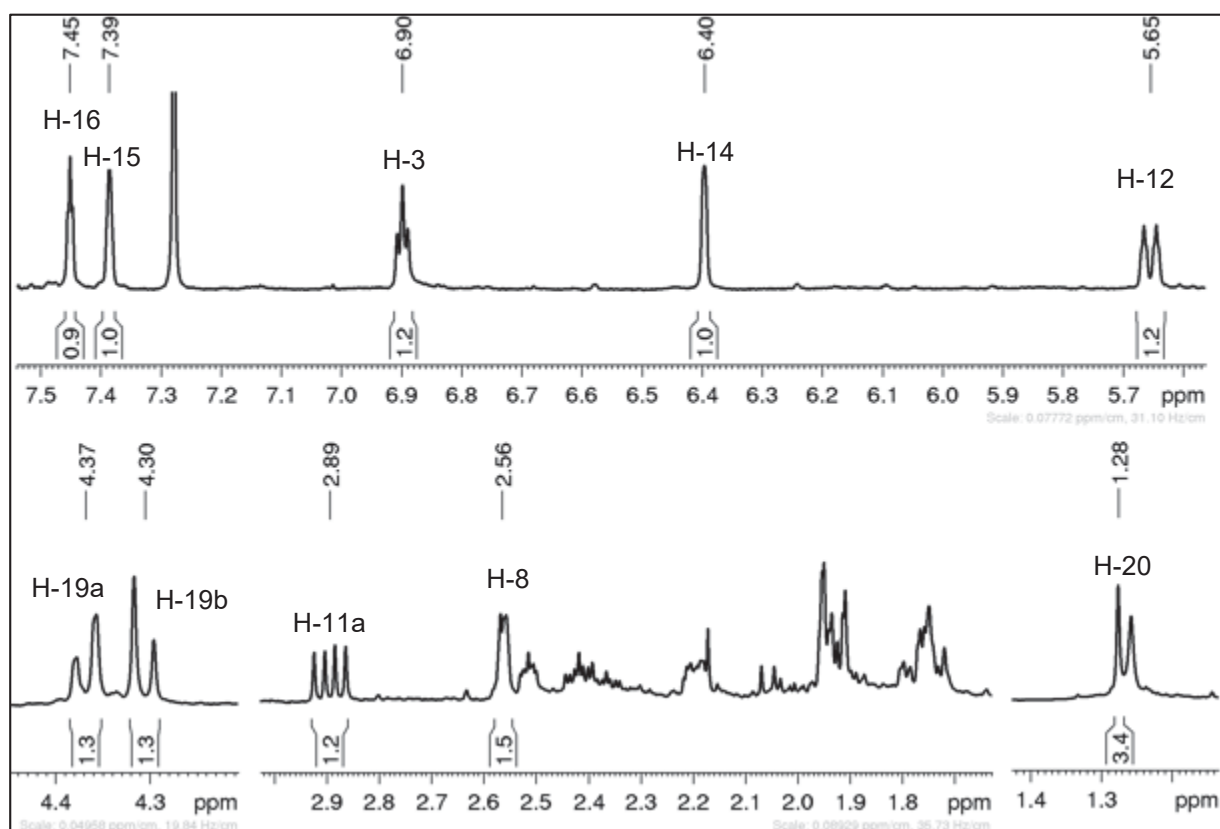


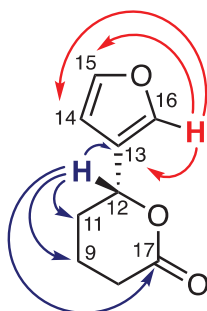
FIGURA 92 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV11**



O espectro de RMN de ^1H também revelou diversos sinais na região de hidrogênios oximetínicos, metínicos e metilênicos. Dentre estes destacam-se um duplo-triplete em δ_{H} 5,65 (1H, $J = 8,2$ e $1,8$ Hz, H-12), característico de um hidrogênio oximetínico vizinho a um grupo metilênico, o qual foi indentificado como um duplo-duplete em δ_{H} 2,89 (2H, $J = 15,9$ e $8,2$ Hz, H-11a). Ainda na mesma região, foi observado um duplo-duplete em δ_{H} 4,37 (1H, $J = 8,5$ e $1,3$ Hz, H-19a); a maior constante de acoplamento ($J = 8,5$ Hz) foi observada para um duplete em δ_{H} 4,30 (1H, $J = 8,5$ Hz, H-19b), indicando a presença de dois hidrogênios geminais; a menor constante observada ($1,3$ Hz) sugeriu um acoplamento em “W”, o qual ocorre através de quatro ligações (4J). Outro duplete em δ_{H} 2,56 (1H, $J = 4,3$ Hz, H-8) foi atribuído a um hidrogênio metínico. Já na região de hidrogênios metílicos foi observado um simpleto em δ_{H} 1,28 (3H, H-20), indicando um grupo metila. Esses dados apontam que **SV11** é um diterpeno do tipo clerodano, tendo um anel furano (ALMANZA et al., 1997).

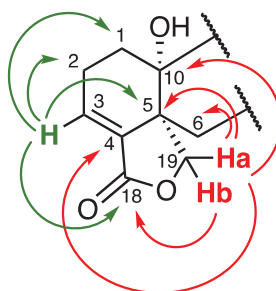
Uma vez determinado o esqueleto principal, os demais sinais puderam ser atribuídos com o auxílio dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURAS 96 e 97). O sinal em δ_{H} 5,65 (H-12) revelou através do HSQC estar ligado ao carbono em δ_{C} 71,7, e no HMBC correlacionou com um carbono quaternário em δ_{C} 42,4 (C-9), um carbono metilênico em δ_{C} 34,8 (C-11), com um carbono olefínico em δ_{C} 126,9 (C-13) e com uma carbonila de éster em δ_{C} 174,8 (C-17). A correlação com essa carbonila sugere a presença de um δ -lactona saturada, muito comum nesse tipo de diterpeno (ALMANZA et al., 1997). Os sinais em δ_{H} 7,45 (H-16, anel furano) também mostraram correlação com C-12, além dos outros carbonos olefínicos do anel furano em δ_{C} 108,5 (C-14) e 144,5 (C-15). Diante disso, foi possível atribuir a posição da carbonila da δ -lactona em C-17 e a do anel furano em C-12 (FIGURA 93).

FIGURA 93 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA H-12 E H-16 DE **SV11**



Os sinais em δ_H 4,37 (H-19a) e 4,31 (H-19b) apresentaram no HSQC correlação o mesmo carbono em δ_C 71,6 (H-19). No HMBC ambos os sinais correlacionaram com um carbono olefínico em δ_C 132,0 (C-4), um carbono quaternário em δ_C 47,3 (C-5), um carbono metilênico em δ_C 31,4 (C-6), um carbono quaternário oxigenado em δ_C 73,8 (C-10) e uma carbonila de éster em δ_C 170,5 (C-18). Já o hidrogênio olefínico em δ_H 6,90 (H-3) correlacionou no HSQC com o carbono em δ_C 136,3 (C-3), e no HMBC com os carbonos em δ_C 26,3 (C-1), 23,3 (C-2), C-5 e C-18. Em conjunto esses dados apontam para a presença de uma ligação dupla entre C-3/C-4, uma hidroxila em C-10, e o grupo carbonila da γ -lactona em C-18, estando o anel da γ -lactona vizinho a um grupo metileno. (FIGURA 94).

FIGURA 94 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA H-3 E H-19A E H-19B DE **SV11**



E por fim, a metila observada em δ_H 1,28 (H-20) apresentou correlações no HMBC com os carbonos em δ_C 42,4 (C-9), C-10 e com C-11, enquanto que o hidrogênio em 2,57 (H-8) revelou, pelo HSQC, estar ligado ao carbono em δ_C 43,6 (C-8), e mostrou no HMBC correlações com dois carbonos metilênicos em 31,4 (C-6) e 16,6 (C-7), com C-9, C-10 e com a carbonila de éster da δ -lactona em C-17. Por meio destas correlações foi possível determinar um segundo anel de seis membros em **SV11**, o qual está vizinho ao grupo δ -lactona (FIGURA 95).

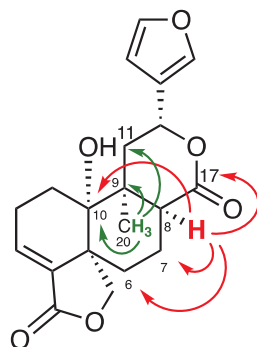
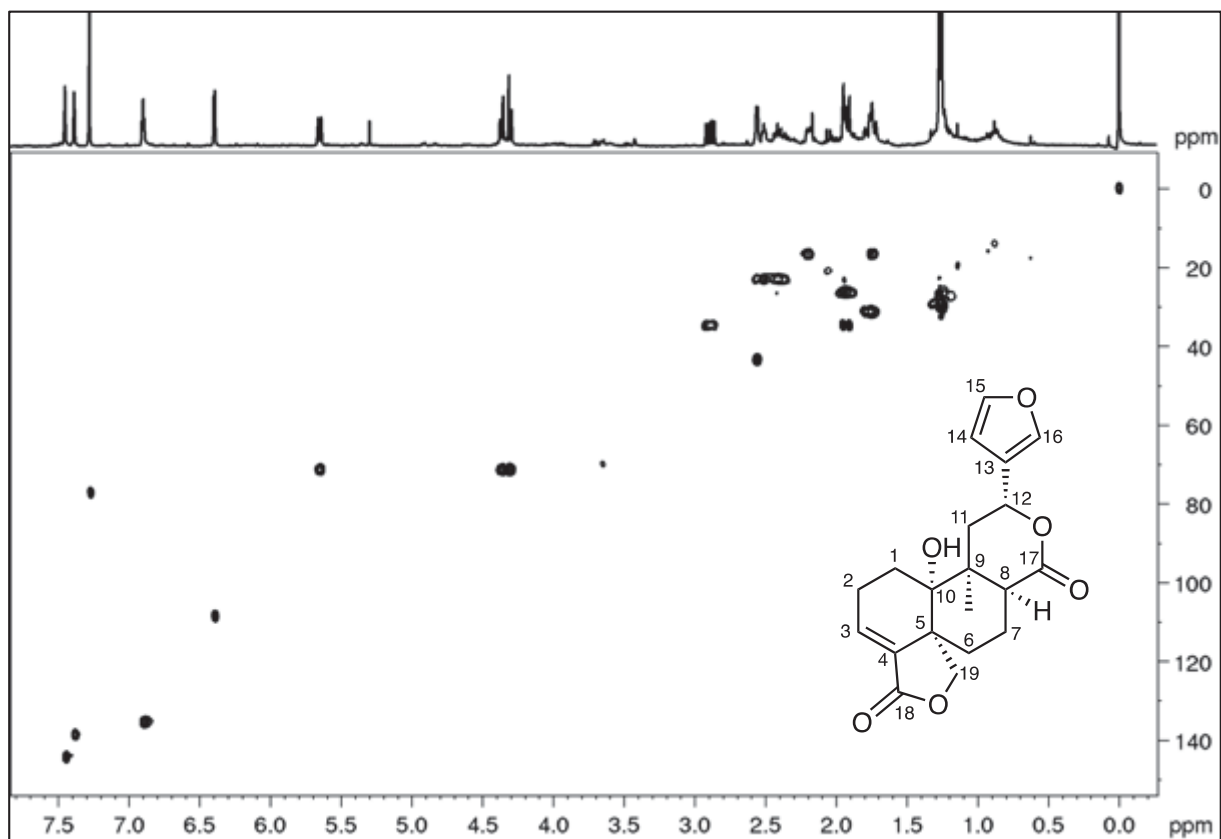
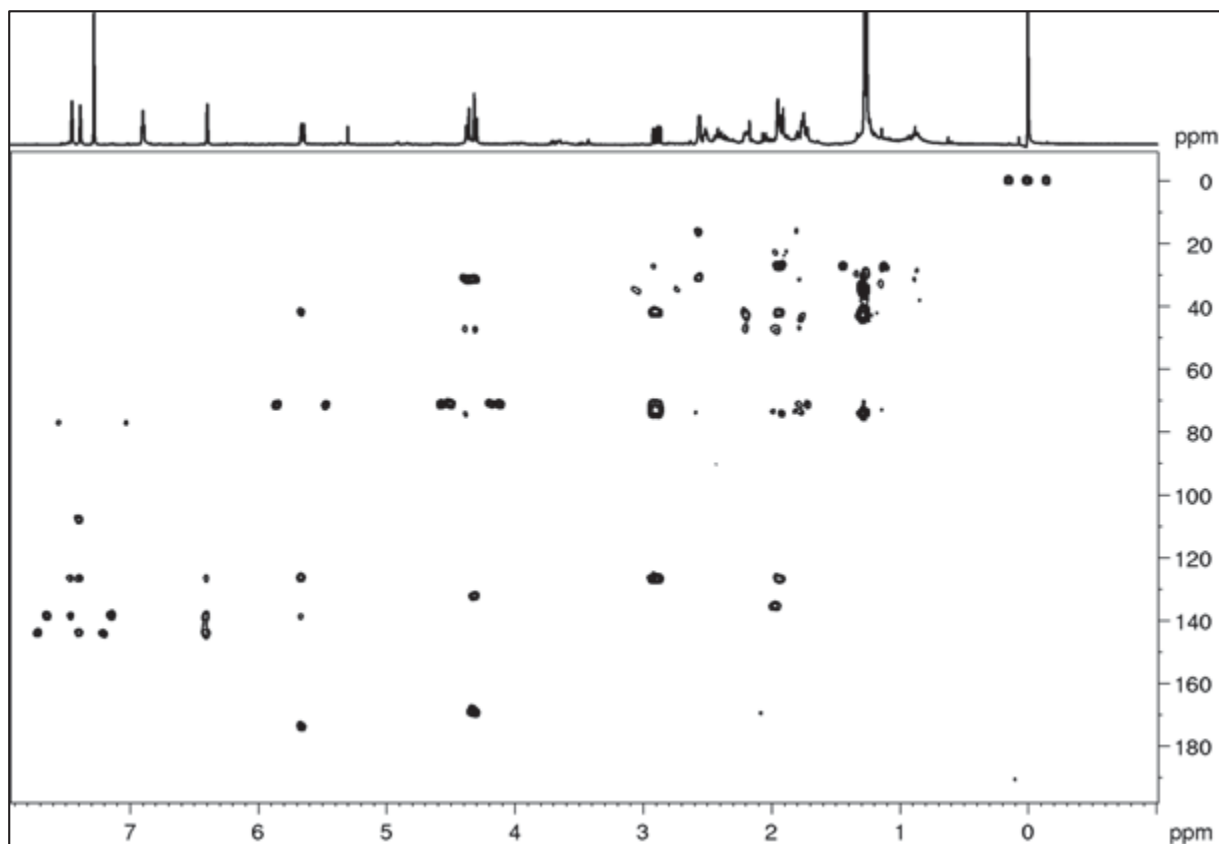
FIGURA 95 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC POR H-8 E C-20 DE **SV11**FIGURA 96 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE **SV11** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

FIGURA 97 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE **SV11** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)



Diante dos dados apresentados e dos demais observados no espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 24) foi possível identificar **SV11** (FIGURA 90, p. 160) como um diterpeno clerodano conhecido como *ent*-(5*R*, 9*R*)-15,16-epoxi-10*S*-hidroxicleroda-3,13(16),14-trieno-17,12*S*;18,19-diolídeo, para o qual sugerimos o nome comum de melissiflorina A. Embora conhecido, é um diterpeno raro na natureza, tendo sido isolado anteriormente somente de *Salvia haenkei* (ALMANZA et al., 1997).

Devido à presença de centros estereogênicos em **SV11** foi determinada a sua rotação específica. O valor encontrado foi de -104,12, estando próximo do valor da literatura para um enantiômero puro que foi de -115 (ALMANZA et al., 1997), confirmando a estereoquímica atribuída para o clerodano **SV11**.

TABELA 24 – DADOS DE RMN DE **SV11** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA ENT-(5*R*, 9*R*)-15,16-EPOXI-10S-HIDROXICLERÓDA-3,13(16),14-TRIEÑO-17,12S;18,19-DIOLÍDEO (CLOROFÓRMIO-*d*, 200 MHz, ALMANZA et al., 1997)

Pos.	SV11			Ent-(5 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)-15,16-epoxi-10S-hidroxicleroda-3,13(16),14-trieno-17,12S;18,19-diolídeo	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	26,3	1,93-1,70 <i>m</i>	2,3,5,10	26,1	1,70 <i>m</i> e 1,95 <i>m</i>
2	23,3	2,41 <i>m</i> *	1,3,4,10	23,2	2,36 <i>m</i> e 2,56 <i>m</i>
3	136,3	6,90 <i>t</i> (3,6)	1,2,5,18	135,7	6,90 <i>t</i> (3,6)
4	132,0	-	-	132,1	-
5	47,3	-	-	47,3	-
6	31,4	1,70-1,50 <i>m</i>	5,7,8,10	31,3	1,70-1,50 <i>m</i>
7	16,6	2,18-1,70 <i>m</i>	5,6	16,5	2,18-1,70 <i>m</i>
8	43,6	2,57 <i>d</i> (4,3)	6,7,9,10,17	43,3	2,56 <i>dl</i> (4,4)
9	42,4	-	-	42,1	-
10	73,8	-	-	73,8	-
11	34,8	2,89 <i>dd</i> (15,9; 8,2) ^a 1,94 <i>m</i> * ^b	9,10,12,13,20	34,6	2,88 <i>dd</i> (15,9; 8,2)
12	71,7	5,65 <i>dt</i> (8,2; 1,8)	9,11,13,17	71,3	5,65 <i>dt</i> (8,2; 1,7)
13	126,9	-	-	126,8	-
14	108,5	6,40 <i>sl</i>	13,15,16	108,5	6,39 <i>m</i>
15	144,5	7,39 <i>dd</i> (2,5; 1,6)	13,14,16	144,1	7,38 <i>m</i>
16	138,7	7,45 <i>t</i> (1,6)	13,14,15	138,5	7,45 <i>t</i> (1,7)
17	174,8	-	-	174,0	-
18	170,5	-	-	169,7	-
19	71,6	4,37 <i>dd</i> (8,5; 1,3) ^a 4,32 <i>d</i> (9,5) ^b	4,5,6,10,18	71,2	4,35 <i>d</i> (9,0) ^a 4,35 <i>d</i> (9,0) ^b
20	27,3	1,28 <i>s</i>	9,10,11	27,3	1,27 <i>s</i>

*posição central dada por HSQC; ^aHa, ^bHb.

A substância **SV12** (FIGURA 90, p. 160) revelou em seu espectro de RMN de ¹H (FIGURAS 98 e 99) muita similaridade com **SV11**, sugerindo tratar-se de um isômero. Foi verificado a presença do grupo furano monossustituído, devido à presença dos sinais em δ_H 7,49 (*dd*, *J* = 2,4 e 1,6 Hz, H-16), 7,43 (*t*, *J* = 1,6 Hz, H-15) e 6,45 (*dd*, *J* = 2,4 e 1,6 Hz, H-14). Foi também observado um conjunto de sinais apresentados no espectro como um duplo-dupeto em δ_H 5,84 (*J* = 11,4 e 1,4 Hz), um duplo-dupeto em δ_H 2,68 (*J* = 14,7 e 1,4 Hz) e um duplo-dupeto em δ_H 1,86 (*J* = 14,7 e 11,4 Hz). Esses sinais são compatíveis para um hidrogênio oximetínico vizinho a um grupo metileno, os quais devem ser os hidrogênios em H-12 e H-11a e H-11b, respectivamente. Esses sinais indicaram a presença do grupo δ -lactona, como foi observado para **SV11**.

FIGURA 98 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV12** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

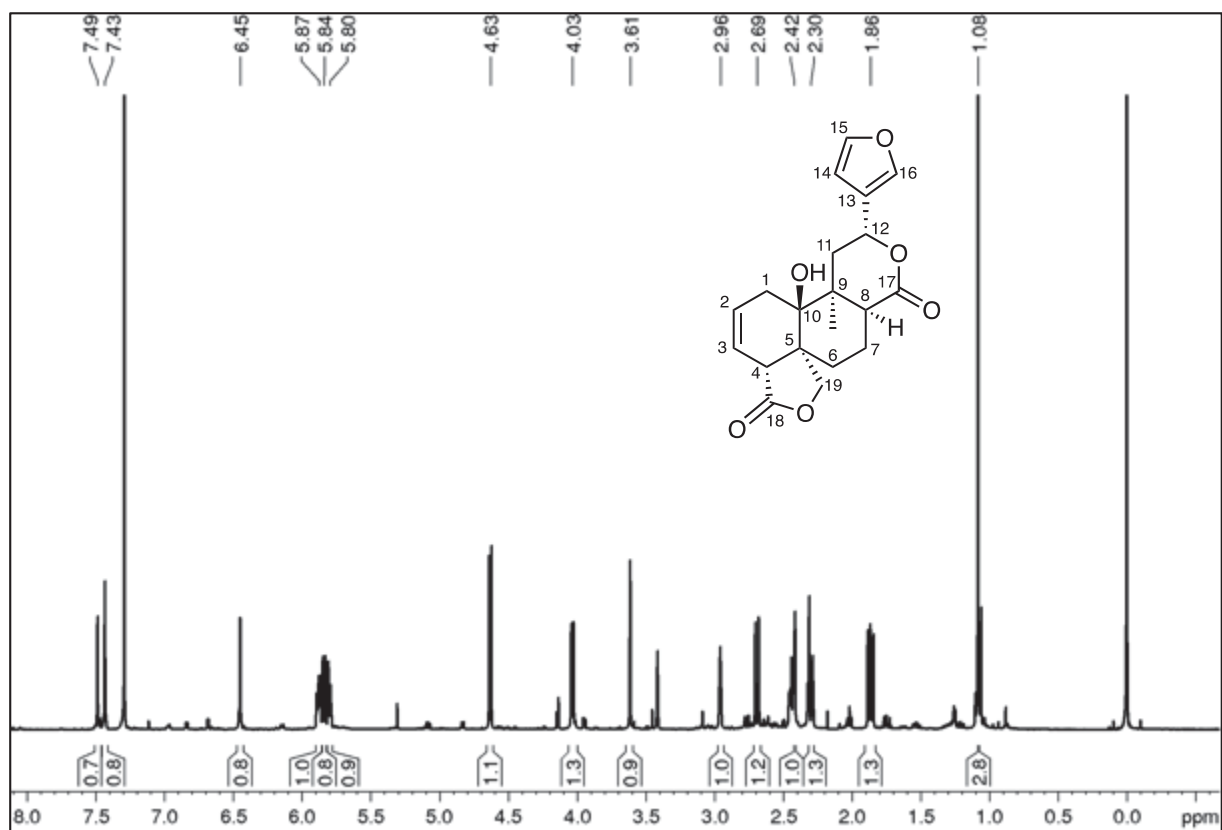
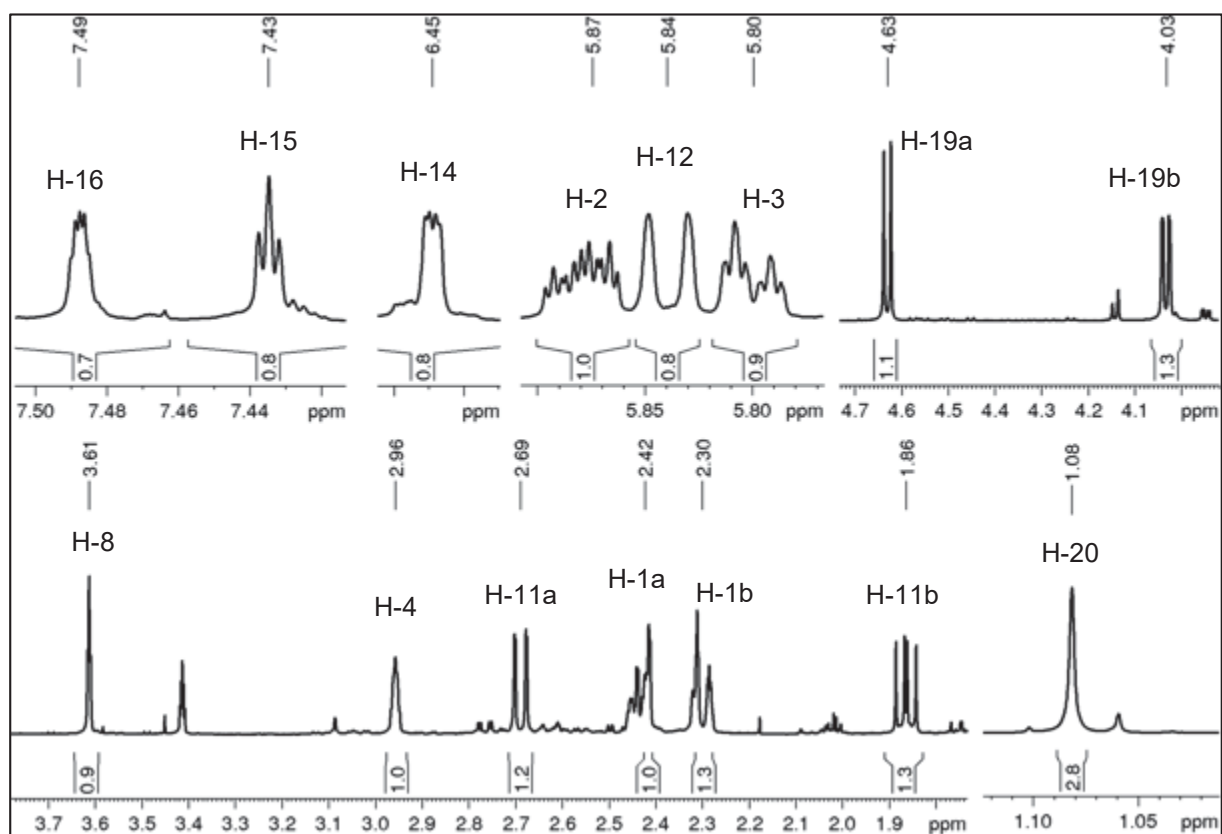


FIGURA 99 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV12**



Observando o HSQC (FIGURA 101), o sinal em δ_H 5,84 (H-12) revelou estar ligado ao carbono em δ_C 72,9 e a longa distância (HMBC, FIGURA 102) correlacionou com os carbonos olefínicos do grupo furano em δ_C 123,5 (C-13) e 140,0 (C-16), indicando que o grupo furano está ligado em C-12 do grupo δ -lactona. O espectro de RMN de 1H ainda revelou um duplete em δ_C 4,63 ($J = 9,0$ Hz, H-19a) e um duplo-duplete em δ_H 4,03 ($J = 9,0$ e $1,9$ Hz, H-19b). Esses dois sinais revelaram no HSQC estarem ligados ao mesmo carbono em δ_C 72,8 (C-19), indicando um grupo metileno. Por sua vez o hidrogênio H-19a correlacionou com os carbonos em δ_C 29,6 (C-6), 45,6 (C-5), 51,2 (C-4) e a carbonila de éster da γ -lactona em 175,3 (C-18) (FIGURA 100). Por meio desses dados foi possível predizer que não há uma ligação dupla entre C-3/C-4, devido a ausência de correlação com um carbono olefínico. Além desses, uma metila também foi observada como um simpleto em δ_H 1,08 (H-20).

A principal diferença entre **SV12** e **SV11** foi a presença de um conjunto de sinais, visto no espectro como dois duplos-duplos-dupletos em δ_H 5,87 ($J = 10,1$, $4,5$ e $2,2$ Hz, H-2) e 5,80 ($J = 10,1$, $5,6$ e $2,9$ Hz, H-3), e um duplo-duplete em δ_H 2,96 ($J = 5,6$ e $3,0$ Hz, H-4). Observando o HSQC foi possível verificar que os sinais em δ_H 5,87 e δ_H 5,80 estão ligados aos carbonos em δ_C 125,5 (C-2) e δ_C 121,9 (C-3), respectivamente, tratando-se de dois hidrogênios olefínicos. Diante disso, a constante de acoplamento em $J = 10,1$ Hz indicou um acoplamento vicinal, apontando para uma ligação dupla com configuração Z, em um anel de seis membros. Por outro lado, o sinal em δ_H 2,96 (H-4) revelou tratar-se de um hidrogênio metínico, devido à correlação direta com o carbono em δ_C 51,2 (C-4). No HMBC este hidrogênio correlacionou com C-2 e com a carbonila da γ -lactona (C-18), enquanto que o sinal em δ_H 5,87 (H-2) correlacionou com C-4 (FIGURA 100). Portanto, **SV12** difere de **SV11** na posição da ligação dupla no anel de seis membros, sendo agora entre C-2/C-3.

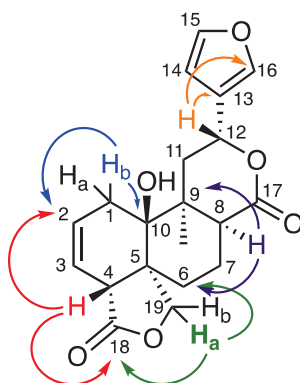
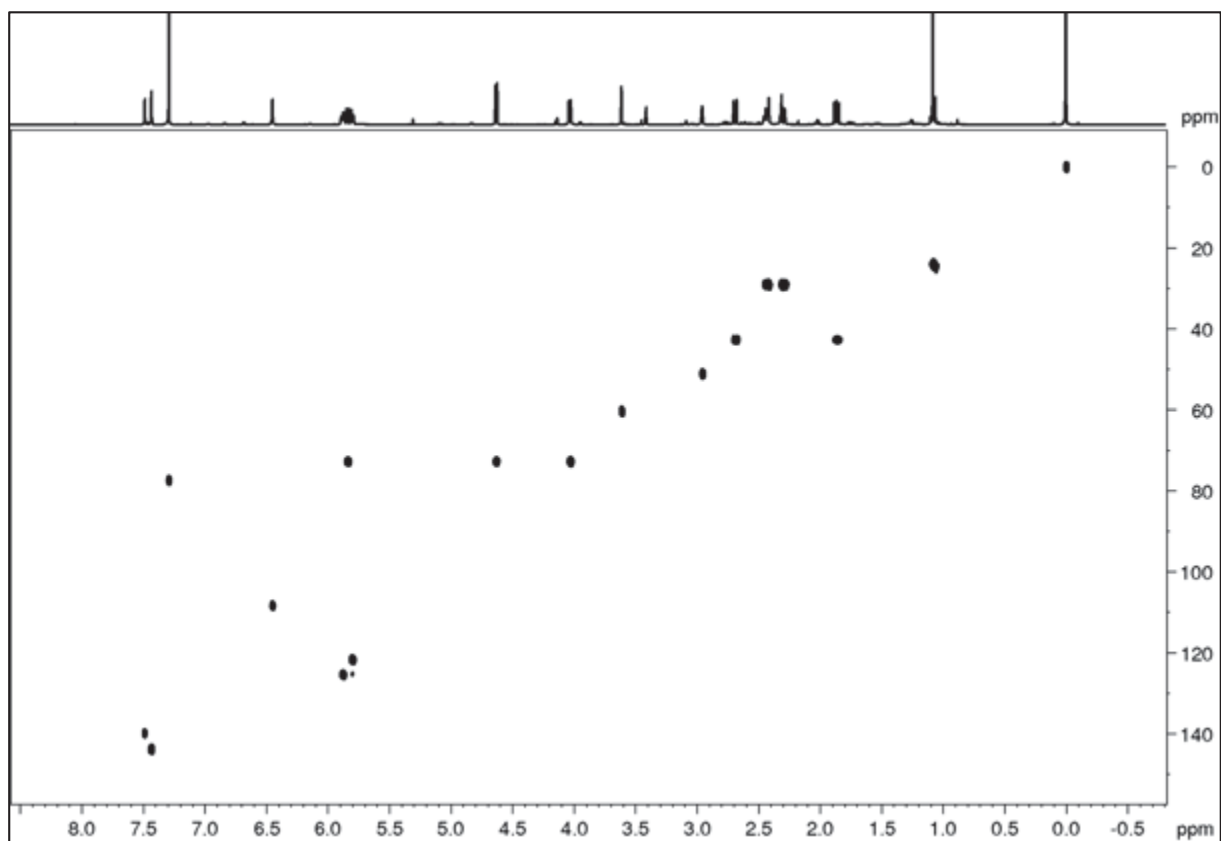
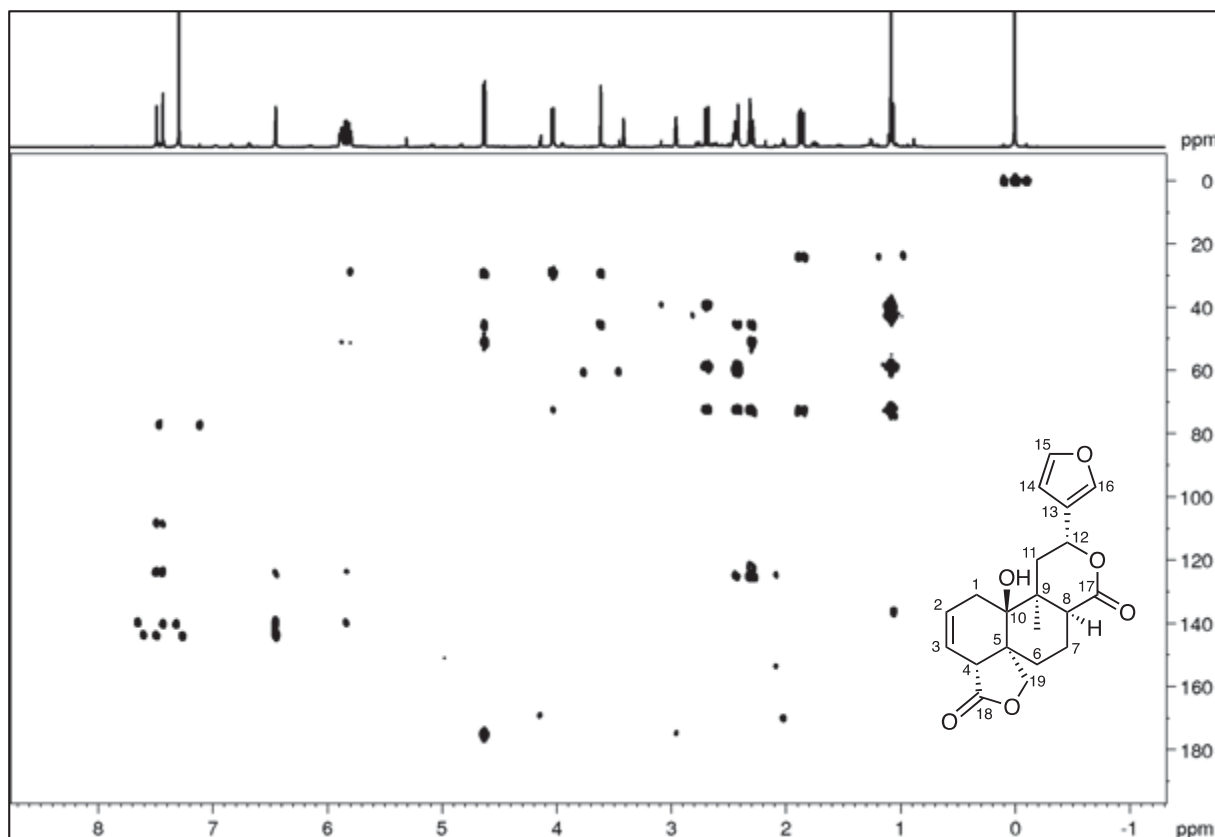
FIGURA 100 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE **SV12**FIGURA 101 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE **SV12** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

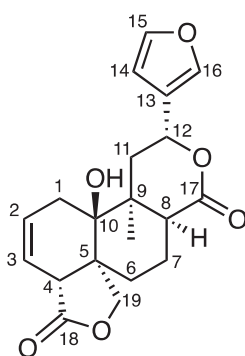
FIGURA 102 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE **SV12** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)



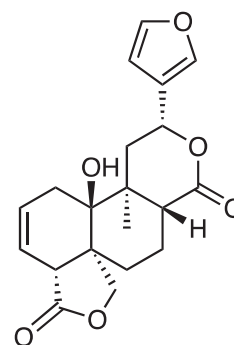
Diante do exposto, a substância **SV12** foi identificada como um isômero de **SV11** (melissiflorina A). De acordo com a revisão bibliográfica realizada é conhecida uma substância com a mesma estrutura plana proposta para **SV12**, chamada de 7,8 β -diidrodrosalviacoccina (FIGURA 103). Entretanto, ao comparar os dados de RMN foi observada uma divergência na constante de acoplamento do sinal atribuído a H-8. Para **SV12** o sinal atribuído para esta posição foi um tripleto em δ_{H} 3,61 ($J = 1,8$ Hz, H-8) com correlação direta com o carbono em δ_{C} 60,2 (C-8), enquanto que para a 7,8 β -diidrodrosalviacoccina o sinal de H-8 foi observado como um duplo-duplete em δ_{H} 3,61 ($J = 9,0$ e $6,0$ Hz), e o carbono correspondente estava em δ_{C} 41,2. Portanto, **SV12** deve ter uma inversão na stereoquímica de C-8, que agora apresenta o hidrogênio H-8 em α , como **SV11**. Por outro lado, a orientação do grupo hidroxila em C-10 foi considerada oposta à de **SV11**, em função do deslocamento químico de C-10 (δ_{C} 72,5) que é mais compatível com uma hidroxila em β (ORTEGA et al., 2017). Essa orientação da hidroxila torna **SV12** um *neo*-clerodano, ou seja, com a fusão *trans* entre C-5/C-10. Esta stereoquímica está de acordo com o deslocamento químico do

grupo metila em C-20 (δ_H 1,08), que está mais protegido do que o grupo metila de **SV11** (δ_H 1,28), que é um *cis*-clerodano. Em geral, o grupo metila é mais protegido nos *neo*-clerodanos do que nos *cis*-clerodanos (ALMANZA et al., 1997). Com estes e os demais dados de RMN (TABELA 25) **SV12** foi identificada como um epímero da 7,8 β -diidrodrosalviacoccina, sendo denominada 7,8 α -diidrodrosalviacoccina, uma substância inédita na literatura.

FIGURA 103 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE **SV12** E 7,8 α -DIIDROSALVIACOCINA



SV12



7,8 β -diidrodrosalviacoccina

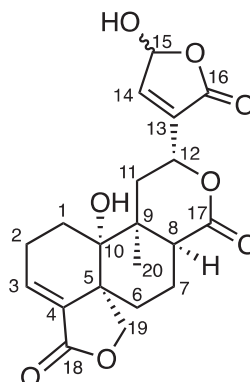
TABELA 25 – DADOS DE RMN DE **SV12** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 7,8β-DIIDROSALVIACOCCINA (DMSO-*d*₆, 500 MHz, ORTEGA et al., 2017; PIRIDINA-*d*₅, 90 MHz, SAVONA et al., 1982)

Posição	SV12			7,8β-diidrosalviacoccina	
	δ _C	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ _C **	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)***
1	29,2	2,42 <i>m</i> ^a 2,29 <i>dd</i> (15,5 e 2,2) ^b	2	29,1	n.o
2	125,5	5,87 <i>ddd</i> (10,1, 4,5 e 2,2)	1,3,4,10	127,6	5,96 <i>m</i>
3	121,9	5,80 <i>ddd</i> (10,1, 5,6 e 3,0)	1,2,5,18	120,5	5,80 <i>dd</i> (10,5 e 3,0)
4	51,2	2,96 <i>dd</i> (5,6 e 3,0)	-	51,1	3,20 <i>dd</i> (3,0 e 3,0)
5	45,6	-	-	45,9	-
6	29,6	1,25 <i>m</i> [*]	5,7,8,10	28,8	n.o
7	20,5	2,02 <i>m</i> [*]	5,6	17,9	n.o
8	60,7	3,61 <i>t</i> (1,8)	6,7,9,10,17	41,2	3,61 <i>dd</i> (9,0 e 6,0)
9	45,7	-	-	41,1	-
10	72,5	-	-	72,9	-
11	42,7	2,69 <i>dd</i> (14,7 e 1,4) ^a 1,86 <i>dd</i> (14,7 e 11,4) ^b	9,10,12,13,20	38,3	2,87 <i>dd</i> (14,0 e 4,5) ^a 1,70 <i>dd</i> (14,0 e 12,0) ^b
12	72,9	5,66 <i>dt</i> (8,2; 1,8)	9,11,13,17	70,3	5,57 <i>dd</i> (12,5 e 4,5)
13	123,5	-	-	124,5	-
14	108,4	6,45 <i>dd</i> (2,4 e 1,6)	13,15,16	109,3	6,65 <i>m</i>
15	143,9	7,43 <i>t</i> (1,6)	13,14,16	144,4	7,65 <i>m</i>
16	140,0	7,49 <i>dd</i> (2,4 e 1,6)	13,14,15	140,4	7,65 <i>m</i>
17	n.o	-	-	175,3	-
18	175,3	-	-	175,8	-
19	72,8	4,63 <i>d</i> (9,0) ^a 4,03 <i>dd</i> (9,0 e 1,9) ^b	4,5,6,10,18	71,2	4,40 <i>d</i> (9,0) ^a 4,17 <i>dd</i> (9,0 e 1,0) ^b
20	24,2	1,08 <i>s</i>	9,10,11	21,2	0,93 <i>s</i>

*posição central dada por HSQC; **piridina-*d*₅ (90 MHz), ***DMSO-*d*₆, 500 MHz); ^aHa, ^bHb; n.o = não observado.

1.6.4.2 Determinação estrutural de **SV13**

FIGURA 104 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV13**



A substância **SV13** (FIGURA 104) revelou grande similaridade no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 106 e 107) com **SV11**. Foram observados os sinais para uma ligação dupla entre C-3/C-4 (δ_{H} 6,88, m), bem como os sinais de H-12 (δ_{H} 5,43, *dd*, $J = 8,3$ e $8,3$ Hz), H-19 (δ_{H} 4,40, *d*, $J = 8,3$ e δ_{H} 4,31, *d*, $J = 8,3$ Hz) e H-20 (*s*, δ_{H} 1,19). A principal diferença residia na ausência dos sinais característicos do grupo furano. O espectro de RMN de ^1H revelou dois simpletos em δ_{H} 7,07 (H-14) e 6,15 (H-15), que apresentaram no HSQC (FIGURA 108) correlações com os carbonos em δ_{C} 145,7 e 97,3, respectivamente. A correlação com um carbono em δ_{C} 97,3 indicou um hidrogênio dioximetínico. Ao observar o HMBC (FIGURA 109 e 110), o sinal em δ_{H} 7,07 (H-14) revelou correlações com um carbono olefínico em δ_{C} 137,6 (C-13) e com uma terceira carbonila de éster em δ_{C} 168,9 que deve estar em C-16. Esses dados estão de acordo com a presença de uma γ -lactona insaturada no lugar do anel furano (SHIROTA et al., 2006) (FIGURA 118). A ausência de acoplamento entre H-14 e H-15 foi observada anteriormente em substâncias com esse grupo (SHIROTA et al., 2006) e pode ser consequência da orientação *pseudo*-axial de H-15, o que leva a um ângulo diedro de cerca de 90° entre H-14 e H-15.

Diante dos dados apresentados, em conjunto com os demais sinais observados no espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 26), bem como a comparação com os dados obtidos para **SV11** (melissiflorina A) foi proposta a estrutura química de **SV13**, como um derivado de **SV11**, com uma hidroxilactona insaturada em C-12 (FIGURA 104). Essa substância é inédita na literatura e foi denominada melissiflorina B.

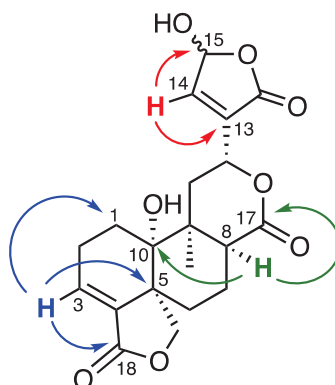
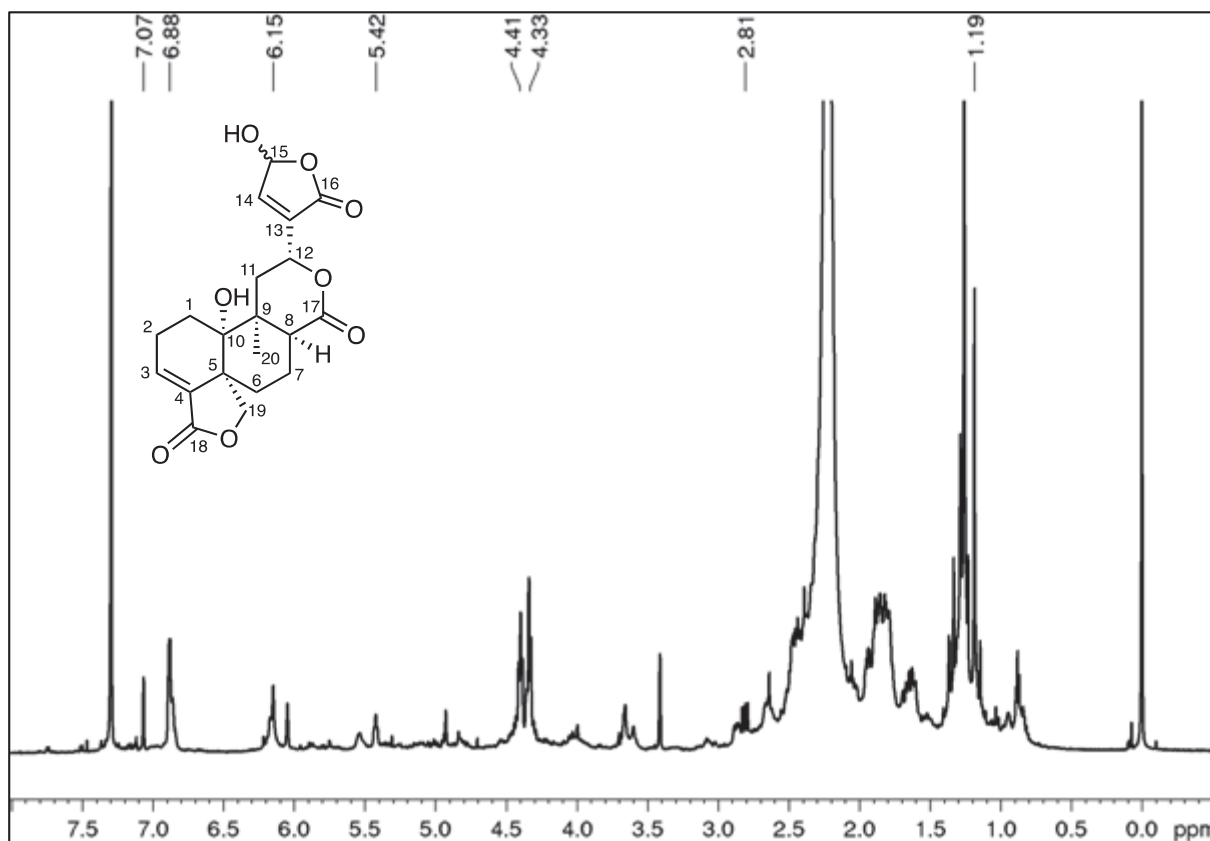
FIGURA 105 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA **SV13**FIGURA 106 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV13** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

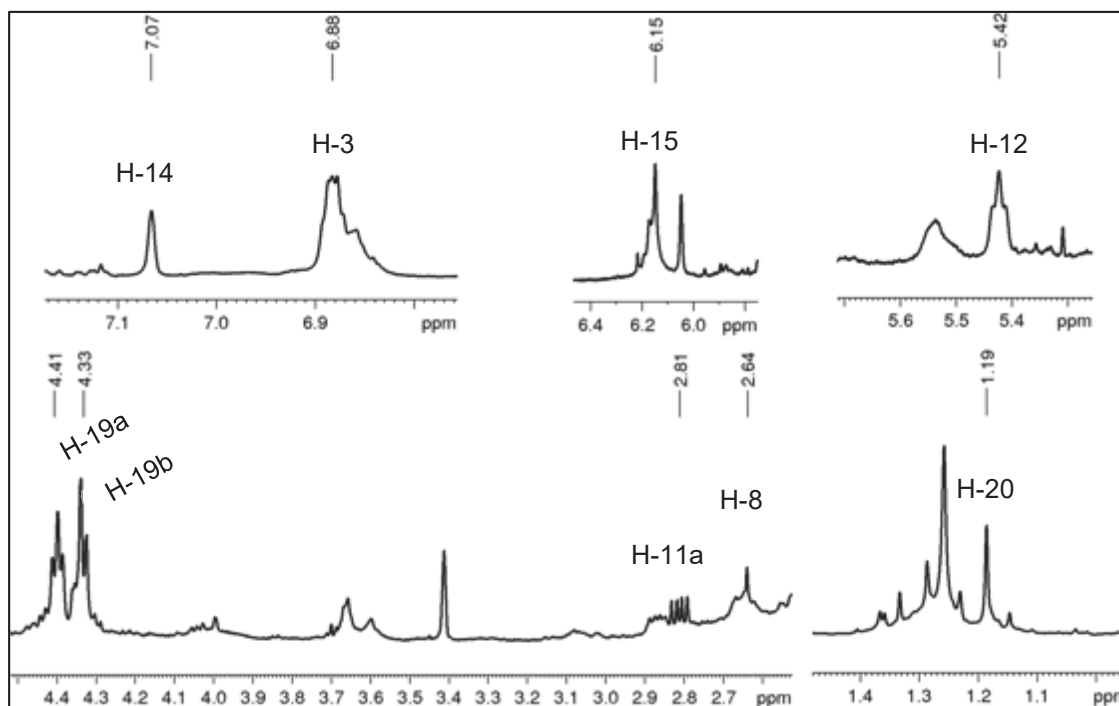
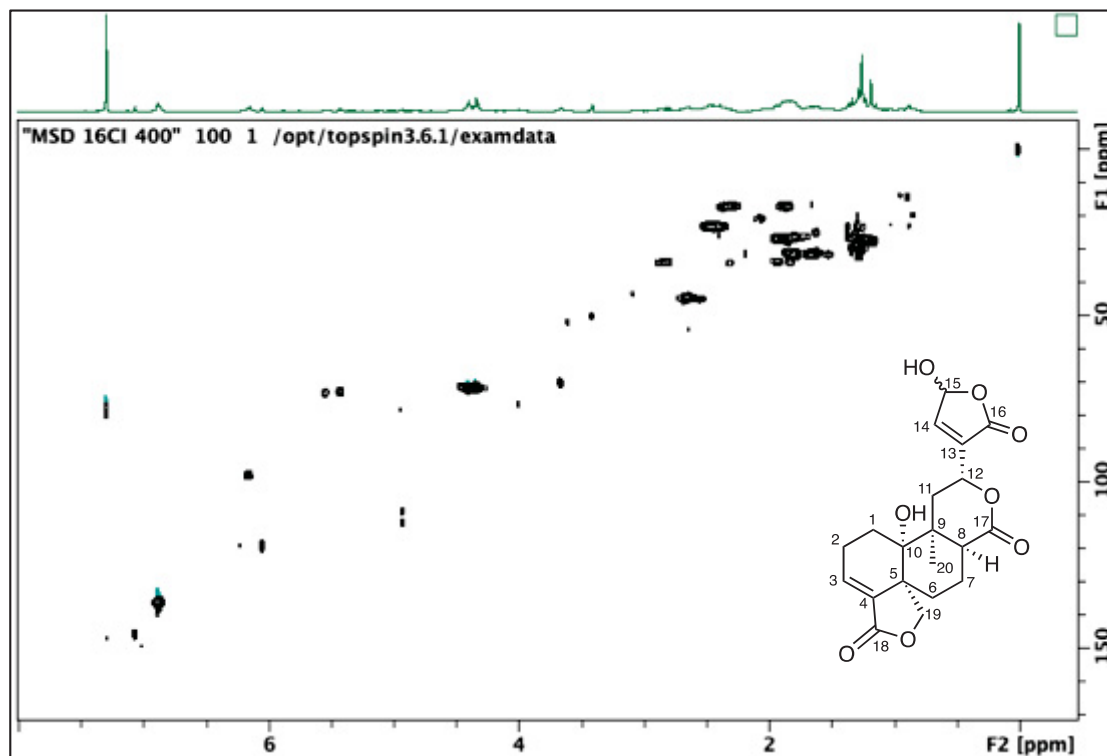
FIGURA 107 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE **SV13**FIGURA 108 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C DE **SV13** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 400 MHz)

FIGURA 109 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE **SV13** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 400 MHz)

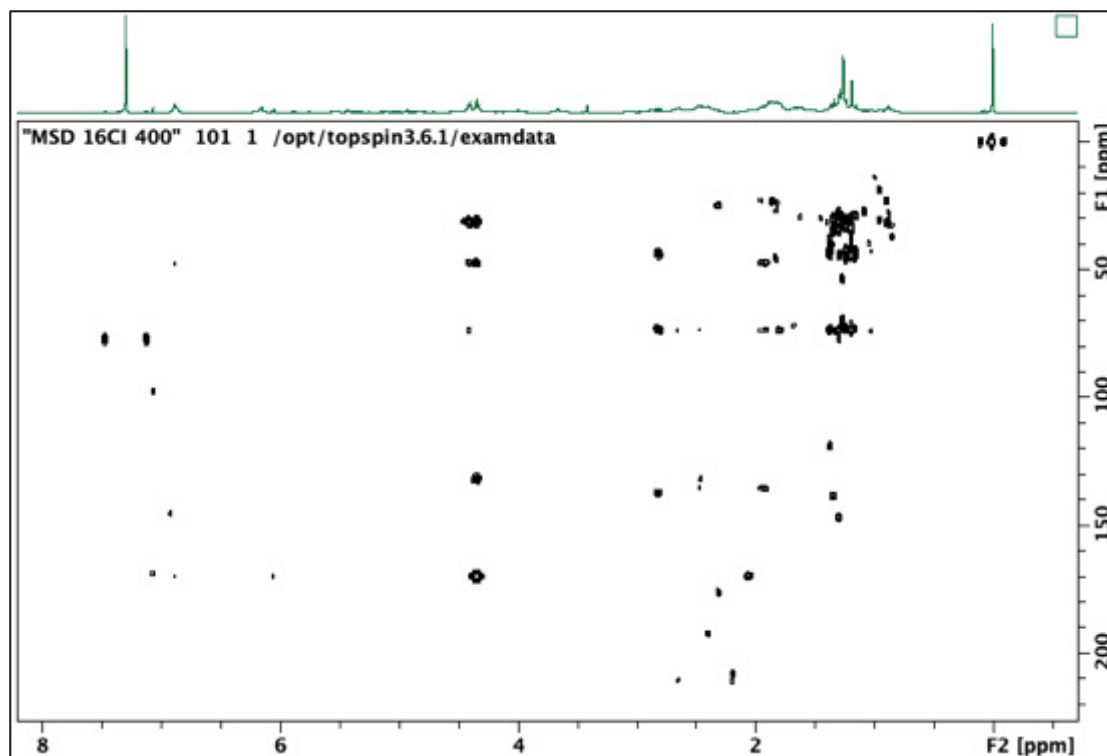


FIGURA 110 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO HMBC DE **SV13**

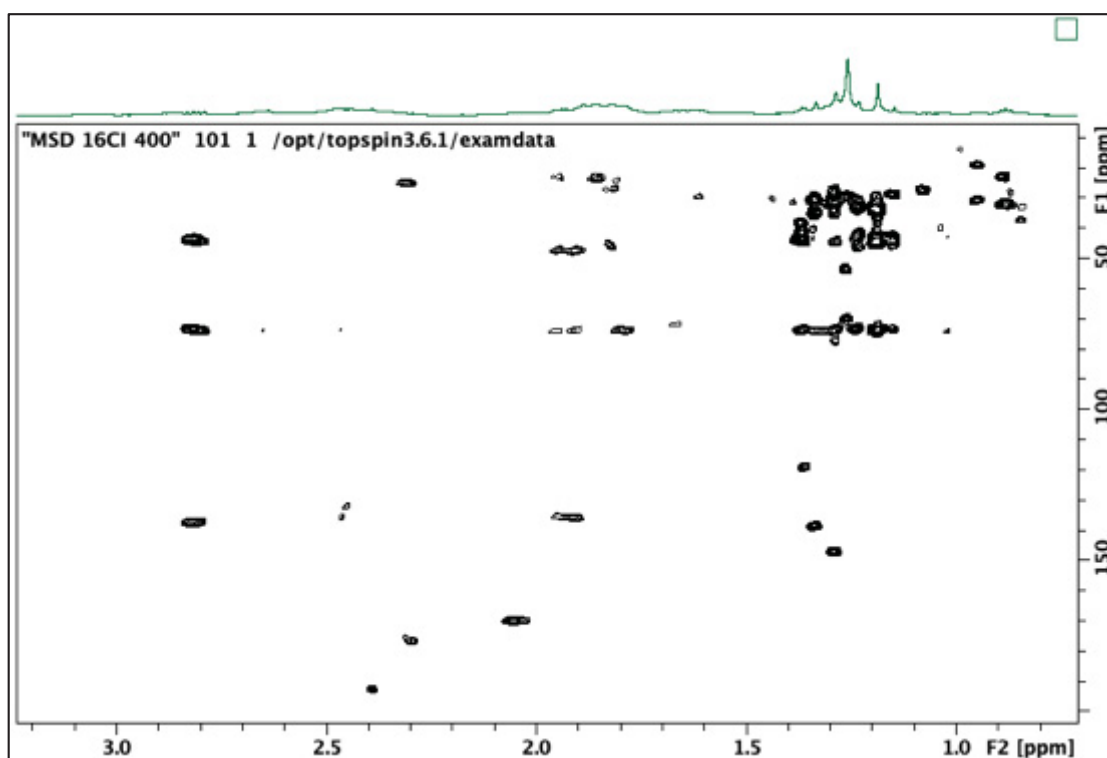
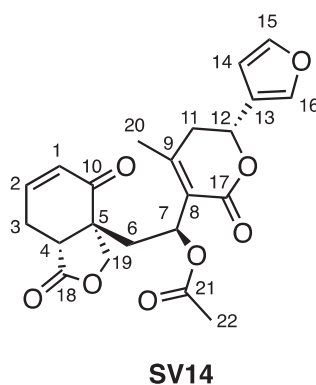


TABELA 26 – DADOS DE RMN DE ^1H DE **SV13** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

Posição	SV13		
	δ_{C}	δ_{H} mult (J em Hz)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	26,8	1,85-2,34 <i>m</i>	2
2	23,2	2,41 <i>m</i> *	4
3	135,3	6,88 <i>m</i>	1,5,18
4	132,2	-	-
5	47,4	-	-
6	31,3	1,62-1,80 <i>m</i>	9,10
7	16,3	1,85-2,34 <i>m</i>	8,10,17
8	43,9	2,64 <i>m</i> *	6,10,17
9	43,6	-	-
10	73,5	-	-
11	34,4	2,81 <i>dd</i> (15,9; 8,3) e 1,93 <i>m</i> *	9,10,13,20
12	72,0	5,42 <i>dd</i> (8,3)	13
13	137,6	-	-
14	145,7	7,06 <i>s</i>	14,15
15	97,3	6,15 <i>s</i>	n.o
16	168,8	-	-
17	174,2	-	-
18	170,2	-	-
19	71,1	4,37 <i>dd</i> (8,3) e 4,32 <i>d</i> (8,3)	4,5,6,18
20	26,9	1,18 <i>s</i>	6,8,10

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC. n.o = não observado.

1.6.4.3 Identificação de **SV14**

FIGURA 111 – ESTRUTURAS QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV14**

A substância **SV14** (FIGURA 111) foi isolada como um sólido branco, e seus dados de RMN foram similares aos obtidos para os diterpenos clerodanos descritos anteriormente.

O seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 112 e 113) revelou o conjunto de sinais característicos do anel furano monossustituído em δ_{H} 7,47 (*sl*, H-16), 7,42 (*t*, $J = 1,6$ Hz, H-15) e 6,42 (*sl*, H-14), bem como os dois dupletos em δ_{H} 4,83 e 4,02 ($J = 9,0$ Hz), típicos dos hidrogênios em C-19 do anel da γ -lactona, e os sinais de H-12 (δ_{H} 5,31, *dd*, $J = 11,8, 3,6$ Hz), como nas substâncias anteriores.

Em adição, a presença de dois hidrogênios olefínicos foi apontada por um duplete-largo em δ_{H} 6,14 ($J = 10,1$ Hz, H-1) e um duplo-duplo-duplete em δ_{H} 6,97 ($J = 10,1, 5,4, 2,5$ Hz, H-2). A maior constante de acoplamento ($J = 10,1$ Hz) é esperada para uma ligação dupla em um anel de seis membros. A multiplicidade e os valores das outras constantes indicam que os hidrogênios olefínicos estão vizinhos a um grupo metileno com hidrogênios não equivalentes. Este grupo metileno foi identificado pelos seguintes sinais: δ_{H} 2,80 (*ddd*, $J = 20,4, 7,1, 2,7$ Hz, H-3a) e δ_{H} 3,04 (*dd*, $J = 20,4, 5,4$ Hz, H-3b). Outro duplete foi observado em δ_{H} 3,13 ($J = 7,1$ Hz, H-4), indicando que este hidrogênio está em acoplamento vicinal com H-3a. Esses dados sugeriram a presença de uma ligação dupla entre C-1 e C-2.

FIGURA 112 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV14** (CLOROFÓRMIO- d_4 + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

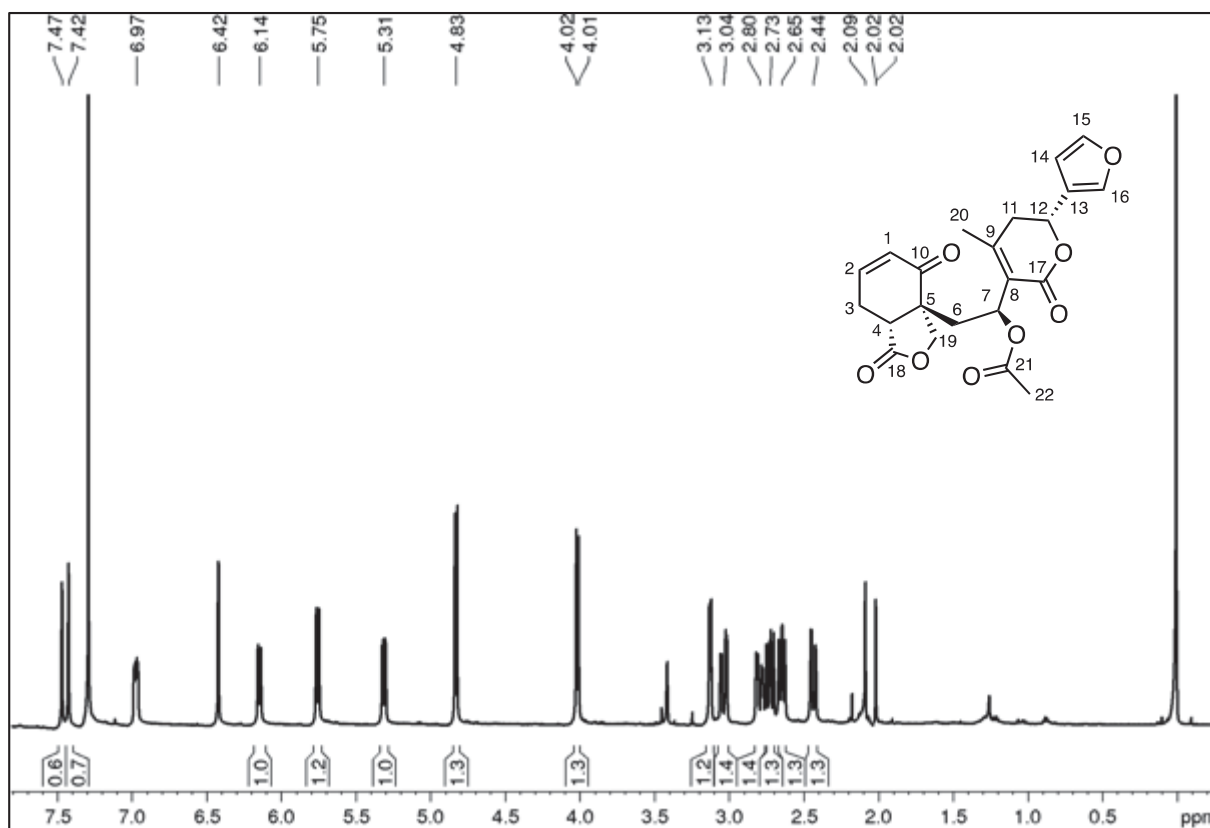
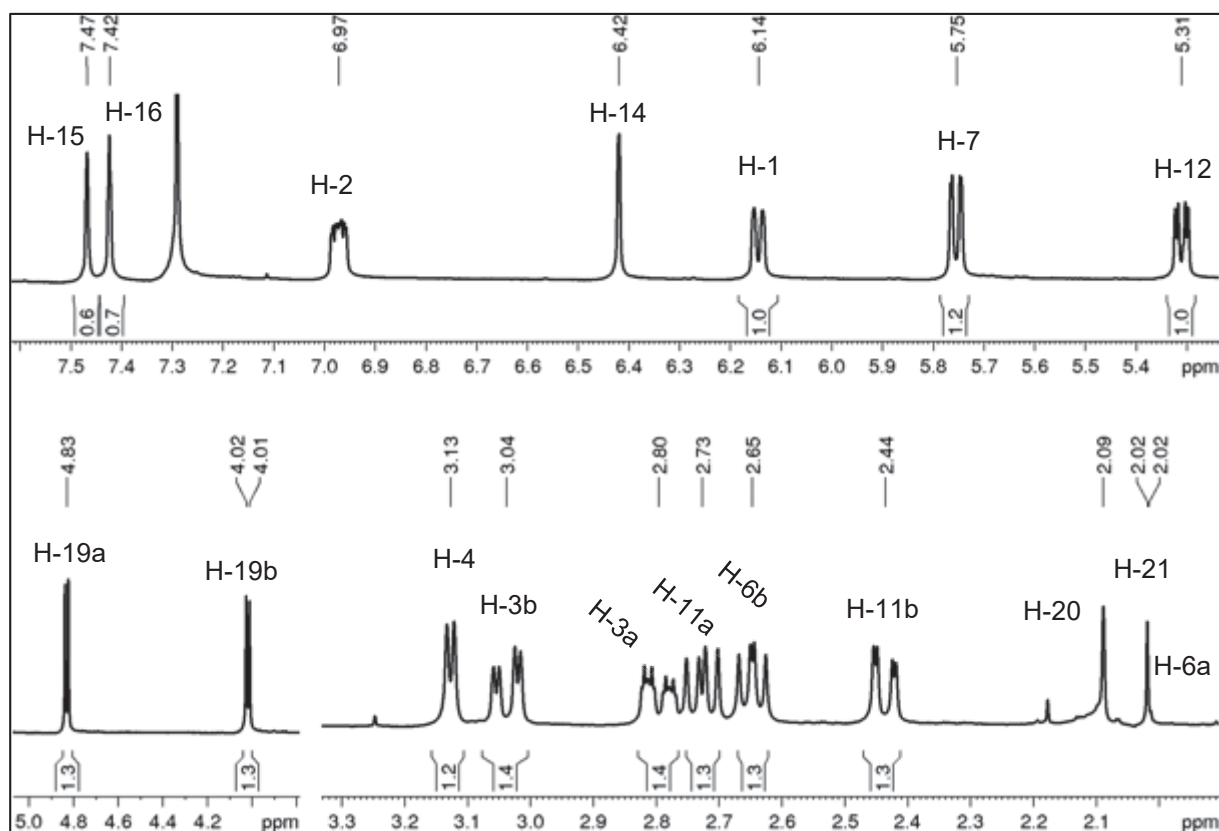


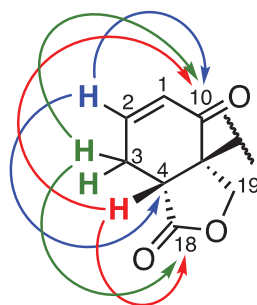
FIGURA 113 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV14**

Outros sinais no espectro de RMN de ^1H apontaram para uma estrutura diferente dos diterpenos anteriores. Estes foram: um duplo-duplete em δ_{H} 5,74 ($J = 11,0$; 2,3 Hz, H-7), característico de um hidrogênio oximetínico, vizinho a um grupo metileno com dois hidrogênios não equivalentes e dois simpletos em δ_{H} 2,02 e 2,09, integrando para três hidrogênios cada um, indicativo de dois grupos metila mais desprotegidos. Através da análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC foi determinado que o grupo metila em δ_{H} 2,02 estava ligado a um grupo carbonila em δ_{C} 169,5, indicando um grupo acetato, enquanto que o grupo metila em δ_{H} 2,09 estava ligado a um carbono olefínico em δ_{C} 153,3. Considerando o esqueleto básico dos clerodanos, esses dados apontam para uma ligação dupla entre C-8/C-9 e quebra da ligação entre C-9/C-10, formando um *seco*-clerodano (LI et al., 2016). Esse esqueleto básico foi confirmado pelas correlações observadas no HSQC e HMBC.

Os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6,14 (H-1) e 6,97 (H-2) apresentaram no HSQC (FIGURA 117) correlação com os carbonos em δ_{C} 129,5 (C-1) e 148,7 (C-2), respectivamente. Já no HMBC (FIGURA 118), H-2 correlacionou com os carbonos em δ_{C} 23,5 (C-3), 43,3 (C-4) e com uma carbonila α,β -insaturada em δ_{C} 197,5 (C-10),

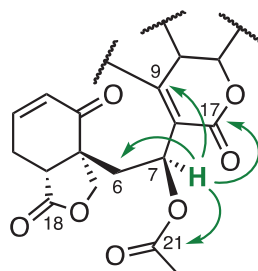
enquanto que os sinais em δ_H 3,04 (H-3b) e 2,80 (H-3a) correlacionaram no HSQC com o carbono em δ_C 23,5 (C-3), e no HMBC com C-1, C-2, C-4, δ_C 55,2 (C-5) e com as carbonilas em C-10 e C-18 (δ_C 176,2). Estas correlações confirmaram a posição da ligação dupla entre os carbonos C-1 e C-2. O sinal em δ_H 3,13 (H-4) apresentou no HMBC correlações com C-2, C-10 e C-18 (FIGURA 114) Portanto, esse hidrogênio deve estar em C-4. A presença de uma carbonila em C-10 confirma que **SV14** difere dos demais diterpenos descritos anteriormente, sendo um seco-clerodano (LI et al, 2006).

FIGURA 114 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-2, H-3 E H-4 OBSERVADAS NO HMBC DE **SV14**



Continuando a análise dos dados de HSQC e HMBC de **SV14**, foi observado que o sinal em δ_H 5,74 (H-7) apresentava correlação no HSQC com o carbono em δ_C 68,1 (C-7), e correlacionava no HMBC com os carbonos em δ_C 38,8 (C-6), 52,2 (C-5), 125,0 (C-8), 153,3 (C-9), 164,1 (C-17) e com a carbonila do grupo acetato (δ_C 169,5). Portanto este hidrogênio e o grupo acetato estão em C-7. O menor deslocamento químico da carbonila em C-17 (δ_C 164,1), em comparação com as substâncias anteriores, pode ser explicado pela conjugação com a ligação dupla entre C-8 C-9. (FIGURA 115).

FIGURA 115 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-7 OBSERVADAS NO HMBC DE **SV14**



E por fim, o grupo metila em δ_H 2,09 (H-20) mostrou no HMBC correlações com os carbonos em δ_C 153,3 (C-9), 125,0 (C-8) e 37,4 (C-11), confirmando a sua posição C-9 (FIGURA 116).

FIGURA 116 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE H-12 E H-20 OBSERVADAS NO HMBC DE **SV14**

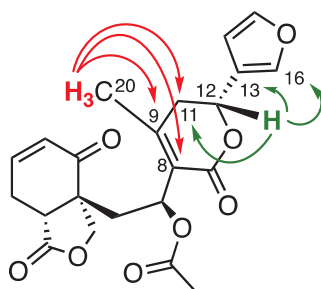


FIGURA 117 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C DE **SV14** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

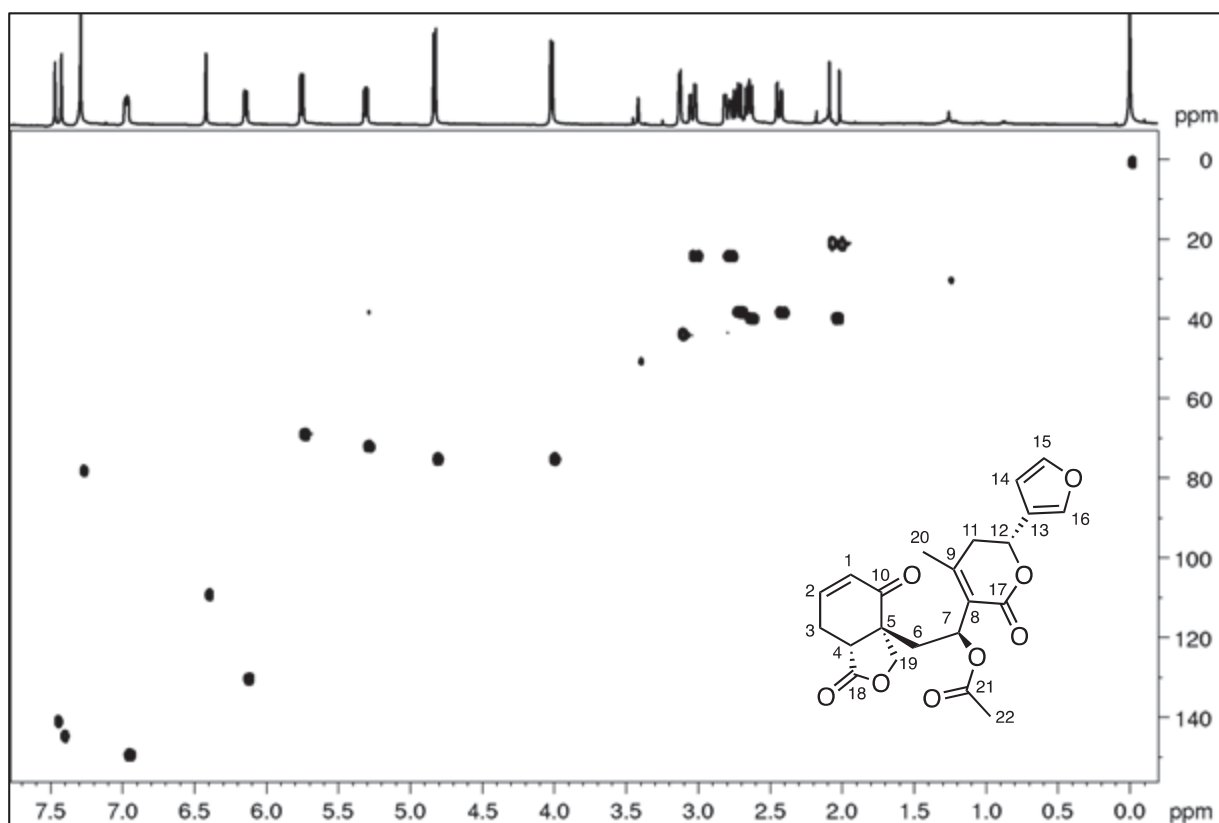
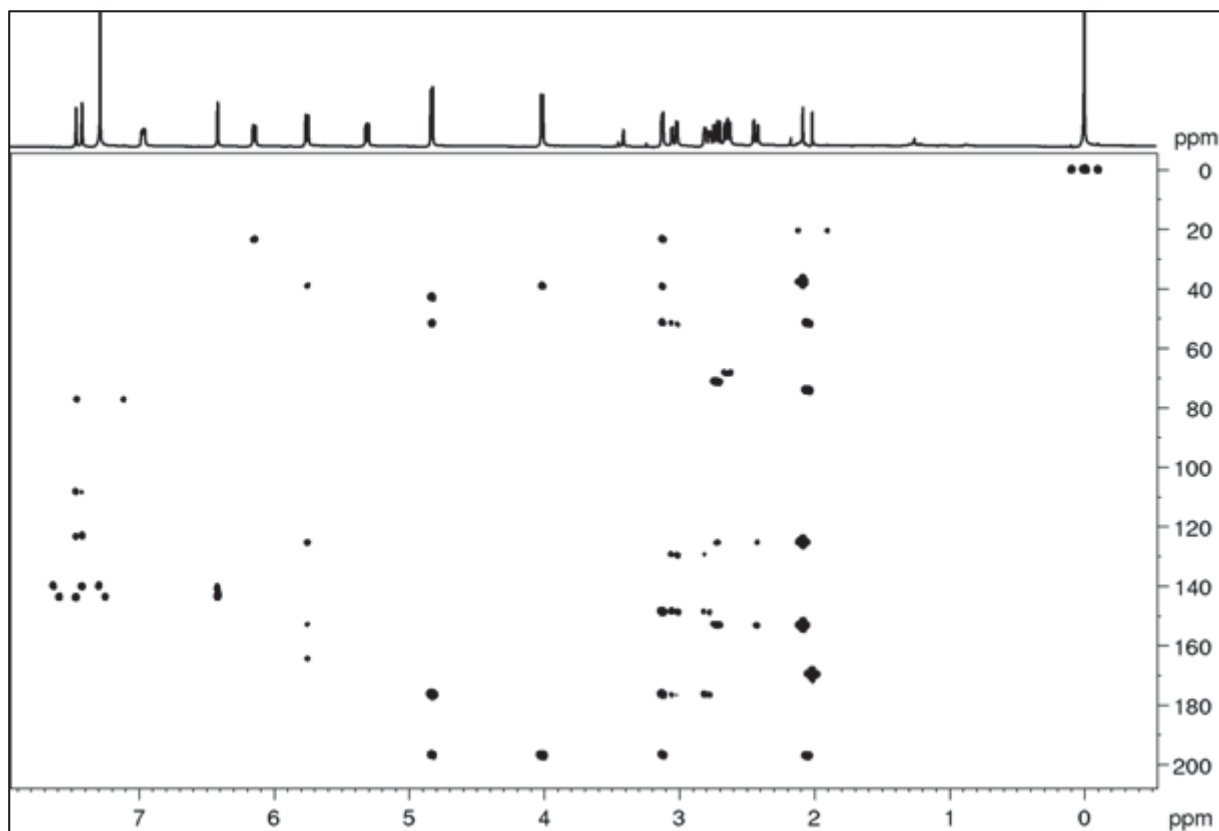
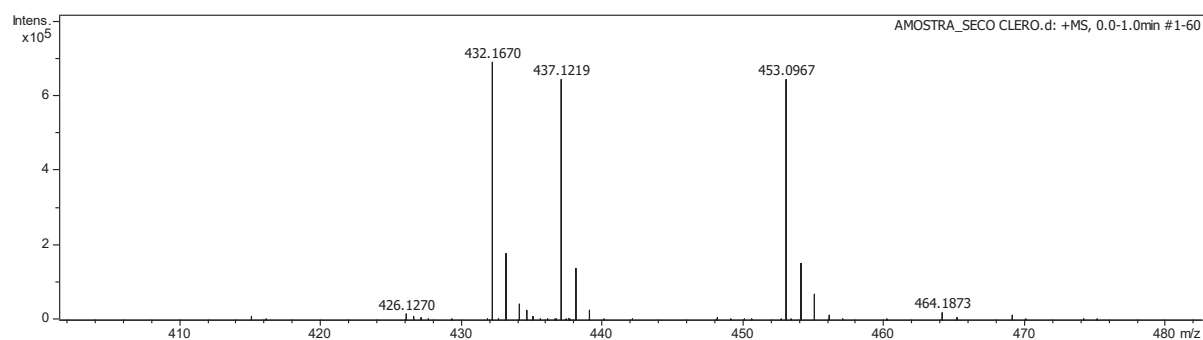


FIGURA 118 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C DE **SV14** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL $-d_4$, 600 MHz)



Os dados descritos e os demais observados no espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 27) permitiram propor a estrutura de **SV14** como o diterpeno 7-*epi*-salviandulina A (ORTEGA et al., 1991; ALMANZA et al. 1997). Embora conhecida, essa substância é rara na natureza, tendo sido isolada anteriormente apenas das espécies *Salvia lavanduloides* e *S. haenkei* (ALMANZA et al., 1997; ORTEGA et al., 1991).

A estrutura de **SV14** foi ainda confirmada pelo espectro de massas de alta resolução, no modo positivo (FIGURA 119). O espectro revelou um pico em m/z 437,1219 compatível com a fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{Na}$ (massa exata: 437,1212) e outro pico em m/z 453,0967, compatível com a fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{K}$ (massa exata: 453,0952), indicando que **SV14** tem a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$, estando de acordo com a estrutura proposta.

FIGURA 119 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE **SV14**

Além disso, foi determinada a rotação específica de **SV14**, cujo valor foi de + 52,90 ($c = 0,02$ CHCl₃), estando próximo ao encontrado para o diterpeno *7-epi-salviadulina A* ($[\alpha]_D^{20} + 46,87$ ($c = 0,32$, CHCl₃)) (ORTEGA et al., 1991), confirmando a estereoquímica indicada para **SV14**.

TABELA 27 – DADOS DE RMN DE **SV14** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 7-*epi*-SALVIANDULINA A (CLOROFÓRMIO-*d*, 200 MHz, ALMANZA et al., 1997)

Posição	SV14			7- <i>epi</i> -salviandulina A	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	129,5	6,14 <i>dl</i> (10,3)	3,5	129,4	6,08 <i>dq</i> (10,3; 1,1)
2	148,7	6,97 <i>ddd</i> (10,3; 2,5; 5,4)	3,4,10	148,7	6,92 <i>ddd</i> (10,3; 5,4, 2,3)
3	23,5	2,80 <i>ddd</i> (20,4, 7,1, 2,7) ^a	1,2,4,18	23,4	2,77 <i>ddd</i> (20,3; 7,0; 2,7) ^a
		3,04 <i>dd</i> (20,4; 5,4) ^b	1,2,4,5,10		2,97 <i>dd</i> (20,3; 5,3) ^b
4	43,3	3,13 <i>d</i> (6,9)	1,2,4,5,10,18	42,9	3,07 <i>d</i> (6,7)
5	52,4	-	-	51,5	-
6	39,2	2,02 <i>m</i> ^{*,a}	5,10,19	39,0	2,01 <i>dd</i> (14,7; 2,2) ^a
		2,65 <i>dd</i> (14,8; 11,0) ^b	4,5,8,10,19		2,59 <i>dd</i> (14,7; 11,0) ^b
7	68,1	5,74 <i>dd</i> (11,0; 2,3)	6,5,8,9,17	68,0	5,70 <i>dd</i> (11,0; 2,2)
8	125,0	-	-	125,1	-
9	153,3	-	-	153,0	-
10	197,5	-	-	197,6	-
11	37,8	2,44 <i>dd</i> (18,3; 3,6) ^a	8,9,20	37,5	2,38 <i>dd</i> (18,0; 3,6) ^a
		2,73 <i>dd</i> (18,3; 11,8) ^b	8,9,12		2,68 <i>dd</i> (18,0; 11,8) ^b
12	71,2	5,31 <i>dd</i> (11,8; 3,6)	11,13,14,16	71,0	5,25 <i>dd</i> (11,8; 3,6)
13	123,4	-	-	123,1	-
14	108,7	6,42 <i>sl</i> (1,5)	13,15,16	108,3	6,37 <i>d</i> (2,0)
15	143,7	7,43 <i>t</i> (1,5)	13,14,16	143,7	7,37 <i>t</i> (1,5)
16	140,7	7,47 <i>sl</i>	13,14,15	140,8	7,42 <i>sl</i>
17	164,1	-	-	163,9	-
18	176,2	-	-	172,2	-
19	74,2	4,83 <i>d</i> (9,0) ^a	4,5,18	74,2	4,78 <i>d</i> (9,0) ^a
		4,04 <i>d</i> (9,0) ^b	4,5,10,18		3,97 <i>d</i> (9,0) ^b
20	20,2	2,09 <i>s</i>	8,9,11,17	20,1	2,04 <i>s</i>
21	169,5	-	-	169,4	-
22	20,6	2,02 <i>s</i>	7	20,6	1,97 <i>s</i>

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC; ^aHa, ^bHb.

1.6.5 Identificação dos triterpenos

Os triterpenos pertencem ao grupo dos terpenoides e constituem uma grande classe de produtos naturais. Apresentam em seu esqueleto 30 átomos de carbono, podendo ser classificados como acíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos. Os triterpenos pentacíclicos apresentam uma ampla variedade de esqueletos carbônicos, geralmente oxigenados em C-3 e contendo uma ligação dupla. Os mais comuns, que foram identificados neste trabalho, são do tipo oleanano e ursano, os quais se diferenciam pela posição da metila C-29 que pode estar ligada em C-19 (ursano) ou em C-20 (oleanano) (FIGURA 120). Através dos deslocamentos químicos da ligação

hidrogênio em δ_H 0,73 (1H, $J = 11,6, 1,9$ Hz, H-5). Foram observados também vários multipletos na região de hidrogênios metínicos e metilênicos entre δ_H 0,7 a 2,0. E ainda, outros três sinais destacaram-se no espectro: um tripleto em δ_H 5,28 (1H, $J = 3,5$ Hz, H-12), típico de um hidrogênio olefínico, um duplo-duplete em δ_H 2,83 (1H, $J = 13,9$ e $3,6$ Hz, H-18), indicando um hidrogênio alílico e outro duplo-duplete em δ_H 3,21 (1H, $J = 12,0$ e $4,0$ Hz, H-3), correspondente a um hidrogênio oximetínico. Esses dados são condizentes com um triterpeno.

FIGURA 122 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **SV15** (CLOROFÓRMIO- d , 600 MHz)

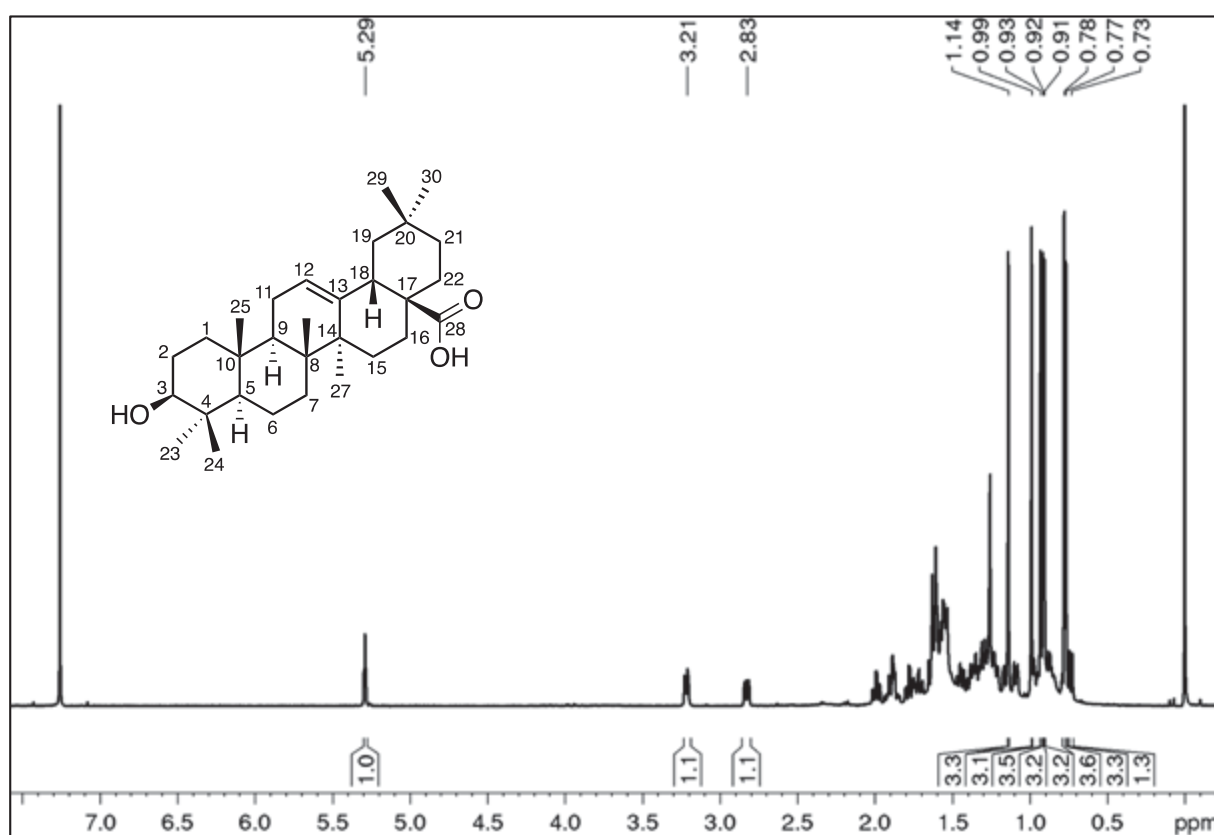
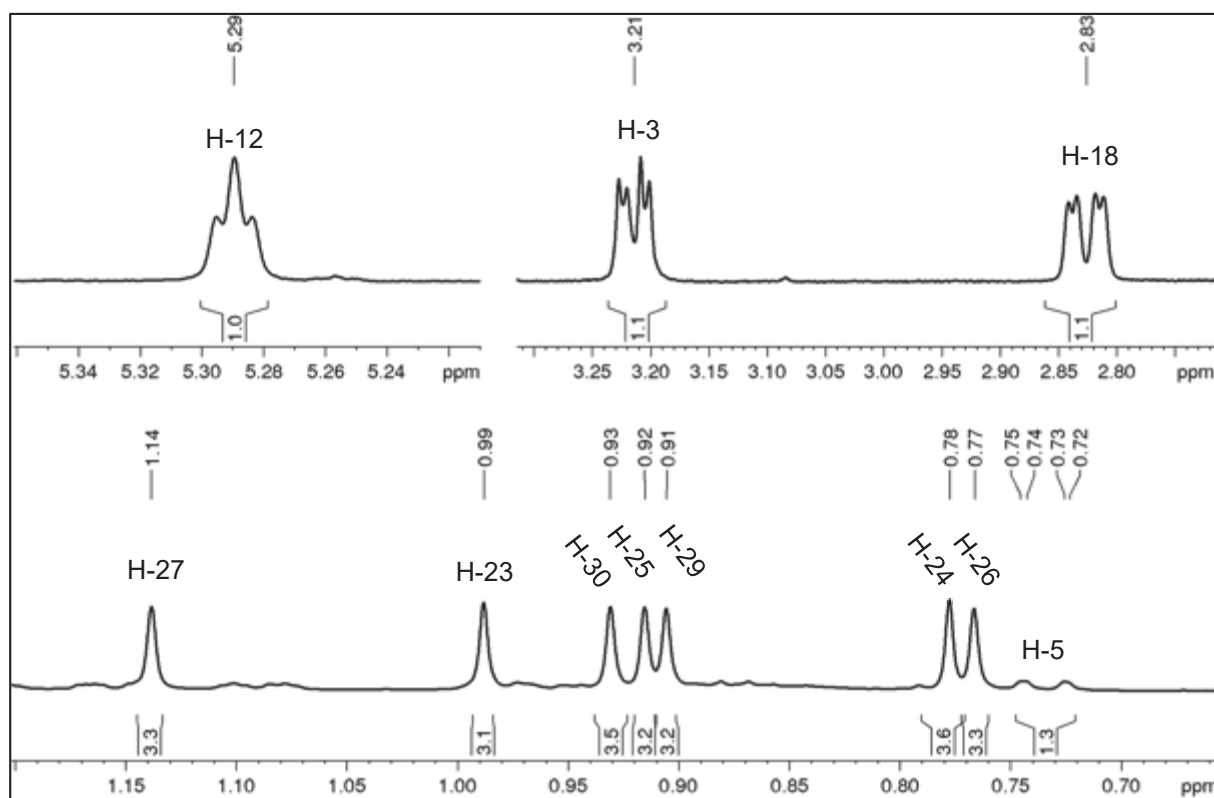
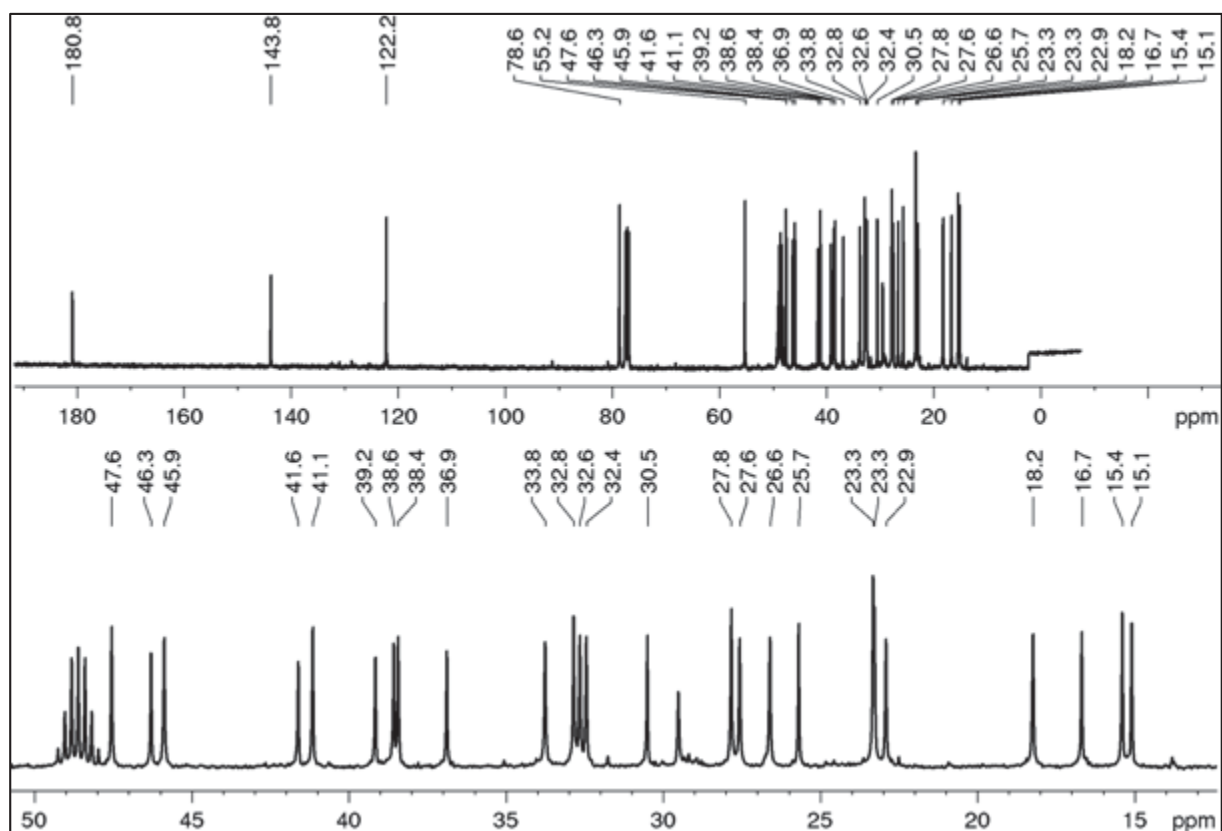
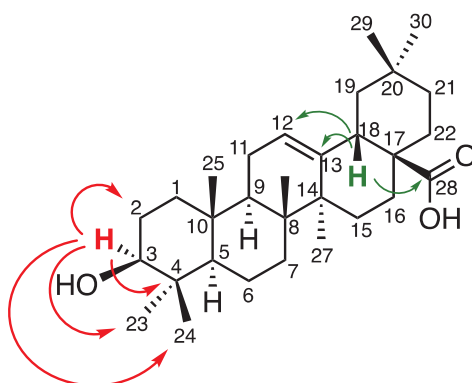


FIGURA 123 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE **SV15**

Observando o espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 124) foi possível identificar o total de 30 sinais. Destes, 26 sinais foram atribuídos a grupos metínicos, metilênicos e metílicos na região de δ_{C} 55,7 – 15,5. Foi observado também um sinal referente a um carbono oximetínico em δ_{C} 78,6 (C-3), e outro sinal referente a um grupo carboxila em δ_{C} 180,8 (C-28), indicando tratar-se de um ácido. Segundo OLEA; ROQUE (1990) o esqueleto básico dos triterpenos com uma ligação dupla pode ser identificado por meio do deslocamento químico desses carbonos. O espectro revelou os sinais dos carbonos olefínicos em δ_{C} 122,2 (C-12) e 143,8 (C-13), indicando um esqueleto do tipo olean-12-eno. Uma vez determinado o esqueleto de **SV15** os demais sinais podem ser identificados pela análise do HSQC e do HMBC (FIGURAS 126-128). Sendo assim, vários sinais que apresentaram sobreposição no espectro de RMN de ^1H puderam ser identificados por meio do HSQC. Diante disso, **SV15** apresenta sete grupos metila, ao invés de oito como no esqueleto básico, indicando que uma delas foi oxidada, além de um grupo hidroxila.

FIGURA 124 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE **SV15** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz)

A posição dos grupos hidroxila e carboxila foi determinada pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. O sinal em δ_{H} 2,83 (H-18) revelou estar ligado ao carbono em δ_{C} 41,1 e correlacionou com um carbono metínico em 47,6 (C-17), com os carbonos olefínicos C-12 e C-14, além da carbonila em δ_{C} 180,8 (C-28). As correlações indicam que o grupo carboxila está na posição C-17, o que é comum para ácidos triterpênicos com este tipo de esqueleto (OLEA; ROQUE 1990). Já o sinal em δ_{H} 3,21 revelou estar ligado ao carbono oximetínico em δ_{C} 78,6 (C-3), e no HMBC apresentou correlações com os carbonos em δ_{C} 38,6 (C-4), 27,8 (C-23) e 15,4 (C-24) confirmando a sua localização em C-3 (FIGURA 125).

FIGURA 125 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC PARA **SV15**

Por meio dos dados descritos e dos demais observados nos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 28) **SV15** foi identificada sendo o ácido oleanólico (DAIS et al., 2017), um triterpeno muito comum nas plantas que já havia sido isolado anteriormente das folhas de *S. lachnostachys* (ERBANO et al., 2012; OLIVEIRA, 2017).

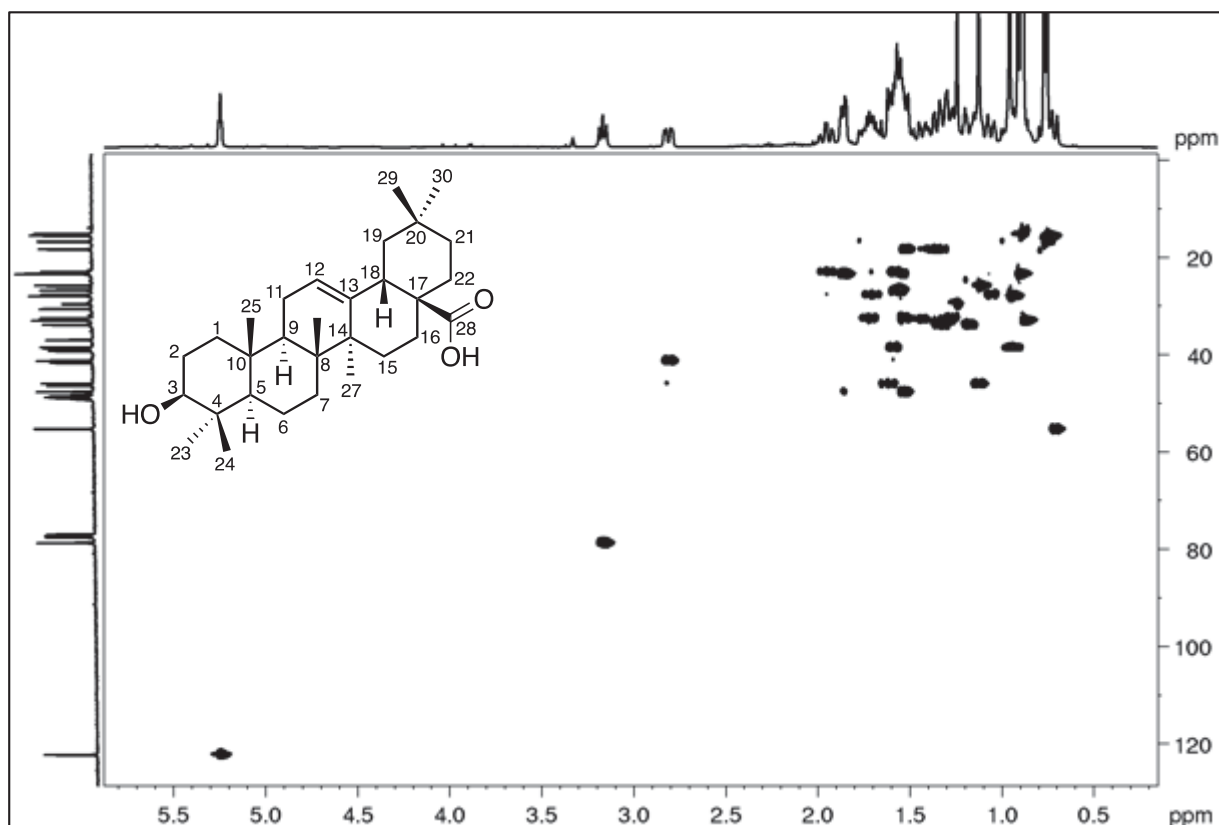
FIGURA 126 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV15** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz)

FIGURA 127 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV15**
(CLOROFÓRMIO- d , 600 MHz)

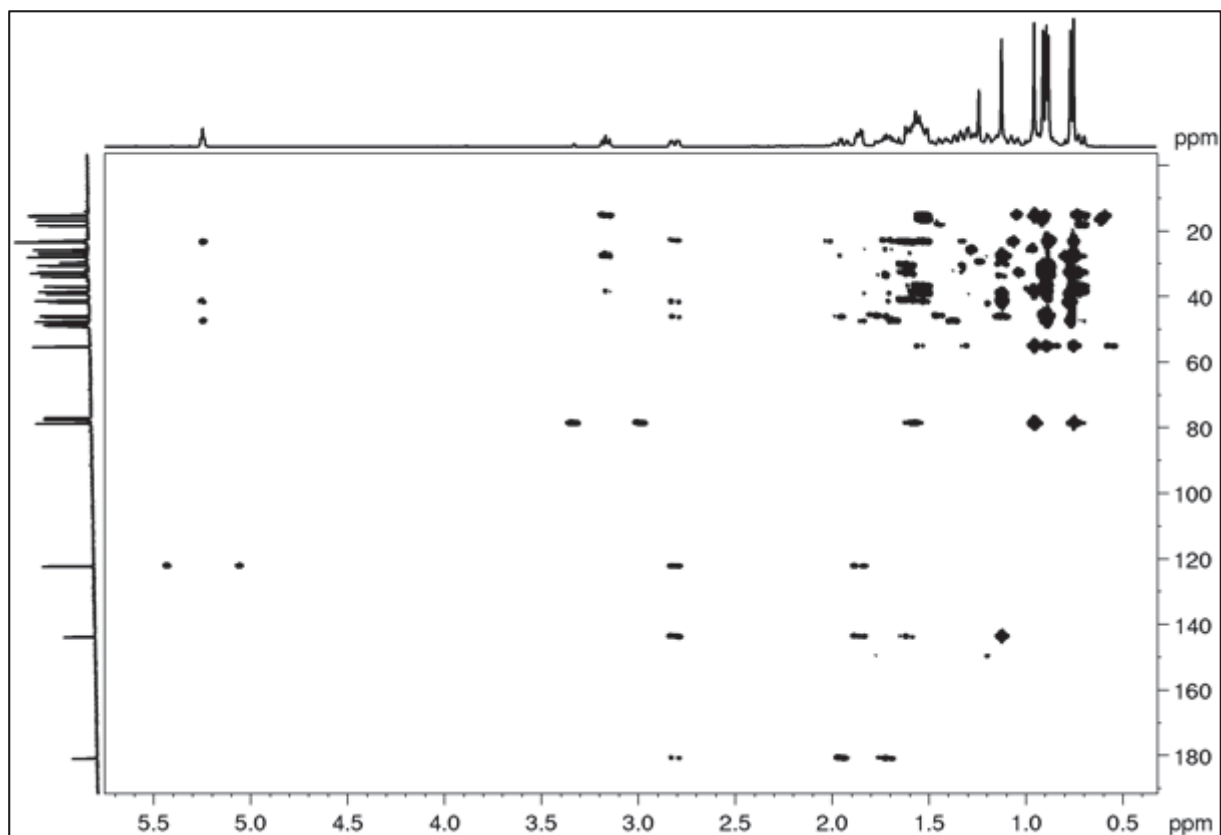


FIGURA 128 – AMPLIAÇÃO SINAIS DO HMBC DE **SV15**

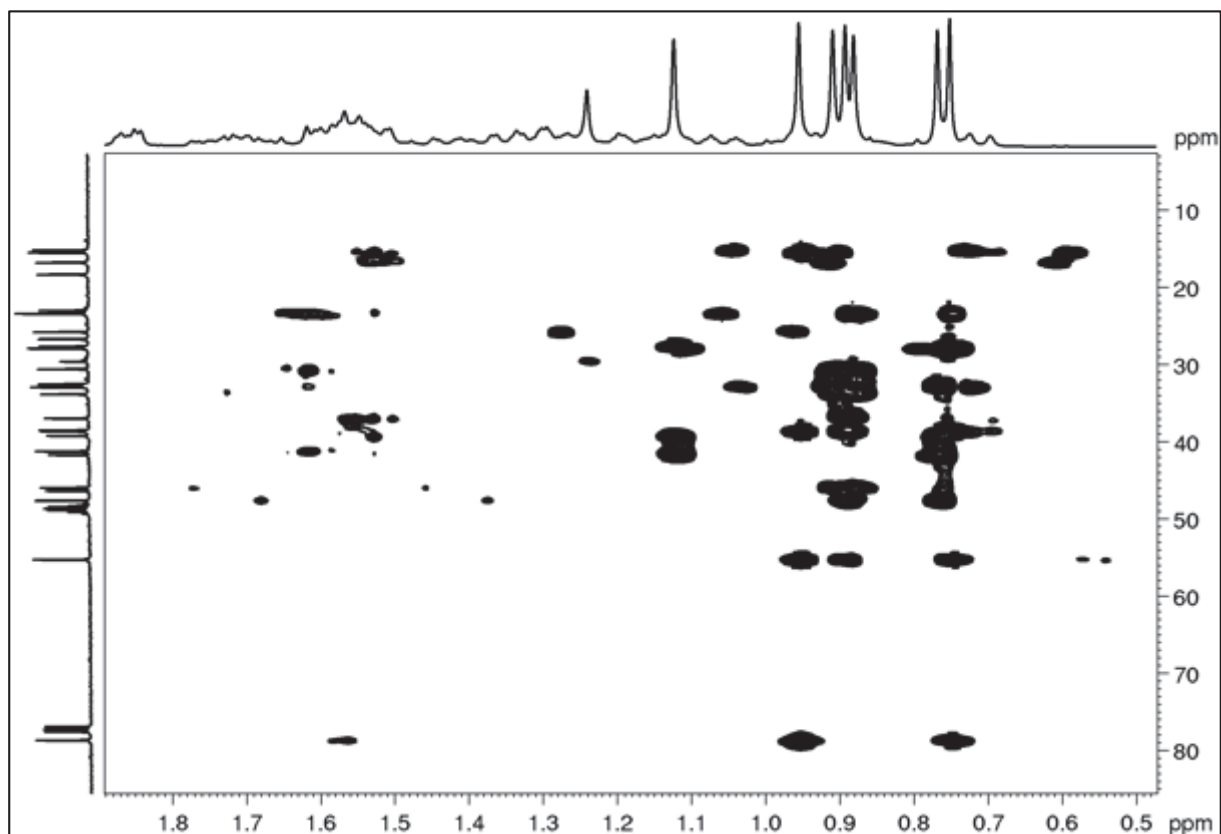
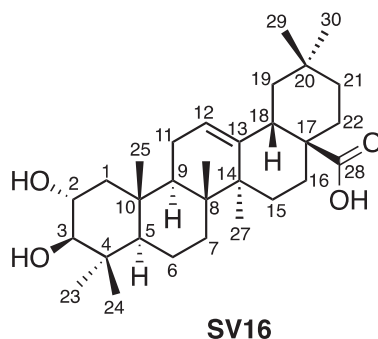


TABELA 28 – DADOS DE RMN DE **SV15** (CLOROFÓRMIO-*d*, 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO OLEANÓLICO (CLOROFÓRMIO-*d*, 400 MHz, DAIS et al., 2017)

Pos.	SV15			Ácido oleanólico	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	38,4	0,99 <i>m</i> * e 1,62 <i>m</i> *	3,4,10	38,4	0,97 <i>m</i> e 1,61 <i>m</i>
2	27,2	1,57 <i>m</i> * e 1,60 <i>m</i> *	3,4	27,2	1,57 <i>m</i> e 1,62 <i>m</i>
3	78,6	3,21 <i>dd</i> (12,0; 4,0)	2,4,23,24	79,0	3,21 <i>dd</i> (12,0; 4,3)
4	38,6	-	-	38,8	-
5	55,2	0,73 <i>m</i> *	3,8,10	55,2	0,73 <i>dd</i> (12,1; 1,6)
6	18,2	1,38 <i>m</i> * e 1,54 <i>m</i> *	5,8,10	18,3	1,38 <i>m</i> e 1,55 <i>m</i>
7	32,6	1,32 <i>m</i> * e 1,50 <i>m</i> *	8,10,26	32,6	1,30 <i>dt</i> (12,6; 3,0) e 1,45 <i>ddd</i> (14,1; 12,6; 3,9)
8	39,2	-	-	39,3	-
9	47,6	1,52 <i>m</i> *	5,7,11,25,26	47,6	1,54 <i>m</i>
10	36,9	-	-	37,2	-
11	23,3	1,86 <i>m</i> * e 1,89 <i>m</i> *	9	23,4	1,86 <i>ddd</i> (18,6; 6,2; 4,3) e 1,91 <i>ddd</i> (18,6; 11,2; 3,2)
12	122,2	5,28 (<i>t</i> , 3,6)	11	122,7	5,30 <i>t</i> (3,6)
13	143,8	-	-	143,5	-
14	41,6	-	-	41,7	-
15	27,8	1,08 <i>m</i> * e 1,72 <i>m</i> *	8,14,16	27,6	1,10 <i>dt</i> (14,1; 3,2) e 1,71 <i>ddd</i> (15,2; 14,1; 4,3)
16	23,3	1,60 <i>m</i> * e 2,00 <i>ddd</i> (15,0; 13,5; 4,3)	14,15,28	23,0	1,62 <i>m</i> e 2,00 <i>ddd</i> (15,2; 13,8; 4,3)
17	46,3	-	-	46,4	-
18	41,1	2,83 <i>dd</i> (13,9, 3,6)	12,13,28	41,1	2,82 <i>dd</i> (13,9; 4,1)
19	45,9	1,12 <i>m</i> * e 1,66 <i>m</i> *	18,20,30	45,9	1,16 <i>dd</i> (13,9; 4,1) e 1,63 <i>t</i> (14,1)
20	30,5	-	-	30,6	-
21	33,8	1,22 <i>m</i> * e 1,33 <i>m</i> *	17,18	33,8	1,22 <i>dt</i> (14,0; 3,6) e 1,35 <i>m</i>
22	32,4	1,59 <i>m</i> * e 1,78 <i>m</i> *	17,18,28	32,4	1,59 <i>m</i> e 1,78 <i>ddd</i> (15,1; 14,0; 4,4)
23	27,8	0,99 <i>s</i>	3,4,5	28,0	0,99 <i>s</i>
24	15,4	0,78 <i>s</i>	3,4,5	15,5	0,74 <i>s</i>
25	15,1	0,91 <i>s</i>	5,9,10	15,2	0,91 <i>s</i>
26	16,7	0,76 <i>s</i>	8	16,8	0,77 <i>s</i>
27	25,7	1,14 <i>s</i>	8,14,15	25,8	1,14 <i>s</i>
28	180,8	-	-	180,2	-
29	32,8	0,90 <i>s</i>	19,20,21,20	33,0	0,91 <i>s</i>
30	23,3	0,93 <i>s</i>	19,20,21	23,5	0,93 <i>s</i>

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC.

1.6.5.2 Identificação de **SV16**FIGURA 129 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV16**

O espectro de RMN de ^1H de **SV16** (FIGURAS 130 e 131) revelou um perfil muito similar ao do triterpeno anterior (ácido oleanólico, **SV15**), mostrando sinais de sete grupos metila entre δ_{H} 0,79 a 1,14, um tripleto em δ_{H} 5,26 (1H, $J = 3,5$ Hz), típico do hidrogênio olefínico em H-12, um duplo-duplete em δ_{H} 2,83 (1H, $J = 13,9$ e $4,4$ Hz), característico do hidrogênio alílico em H-18, além de vários multipletos de hidrogênios metilênicos e metínicos. A principal diferença no espectro de RMN de ^1H de **SV16** em relação à anterior foi a presença de sinais de dois hidrogênios oximetínicos, ao invés de um, observados como um multiplete em δ_{H} 3,68 (1H, H-2) e um duplete em δ_{H} 2,99 (1H, $J = 9,5$ Hz, H-3), sugerindo a presença de dois grupos hidroxila.

FIGURA 130 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV16** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

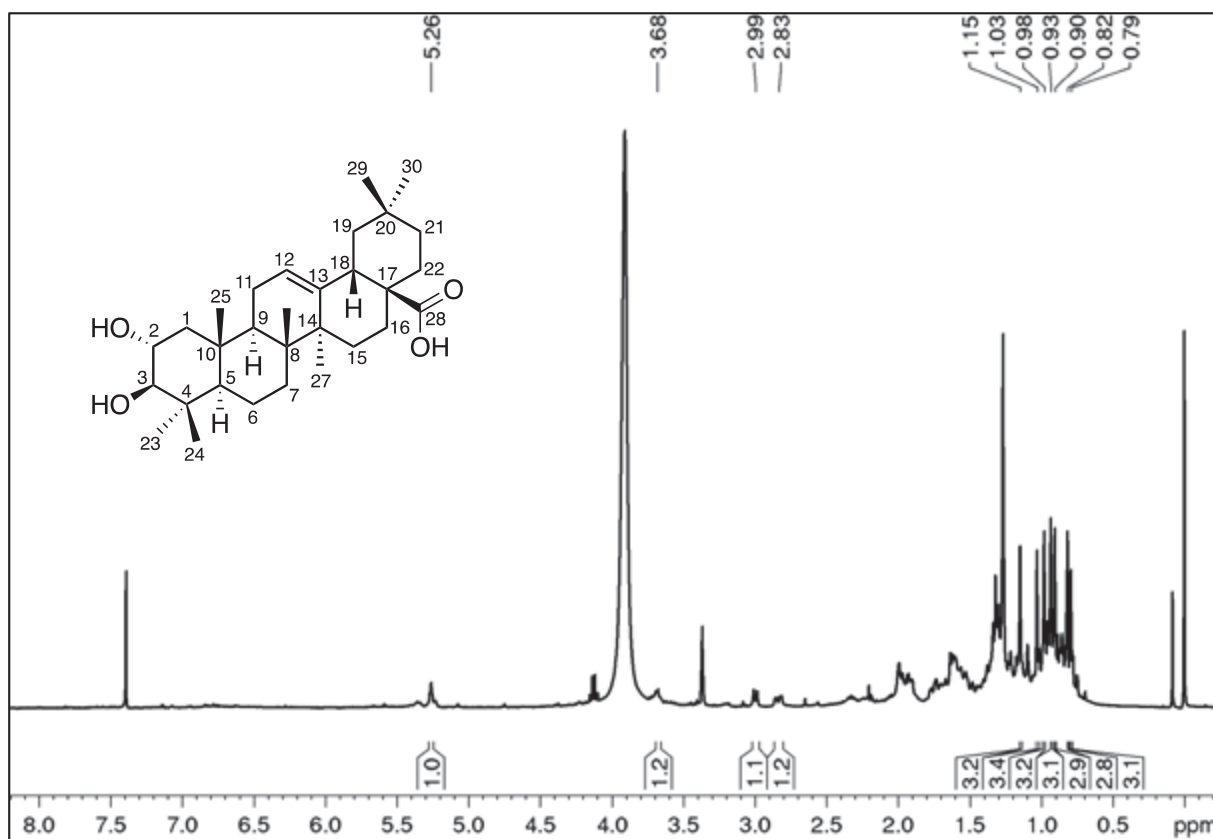
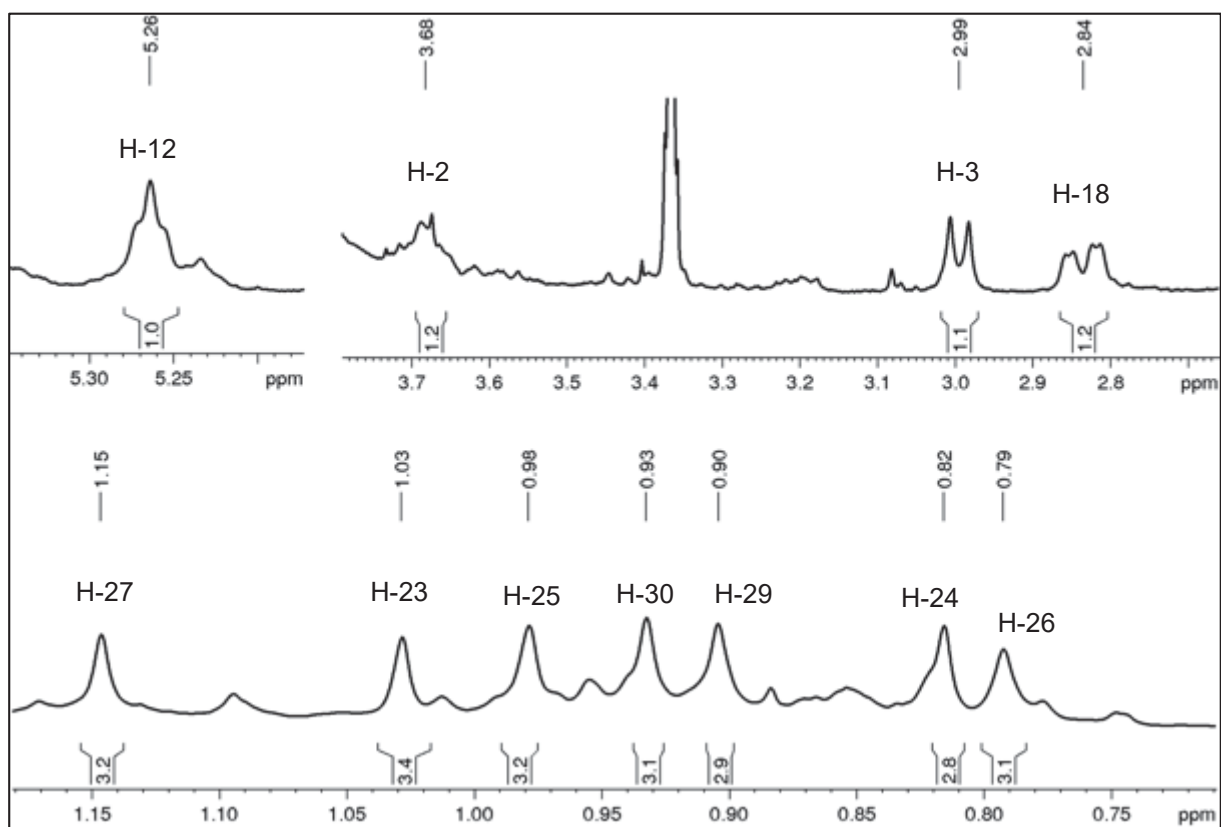
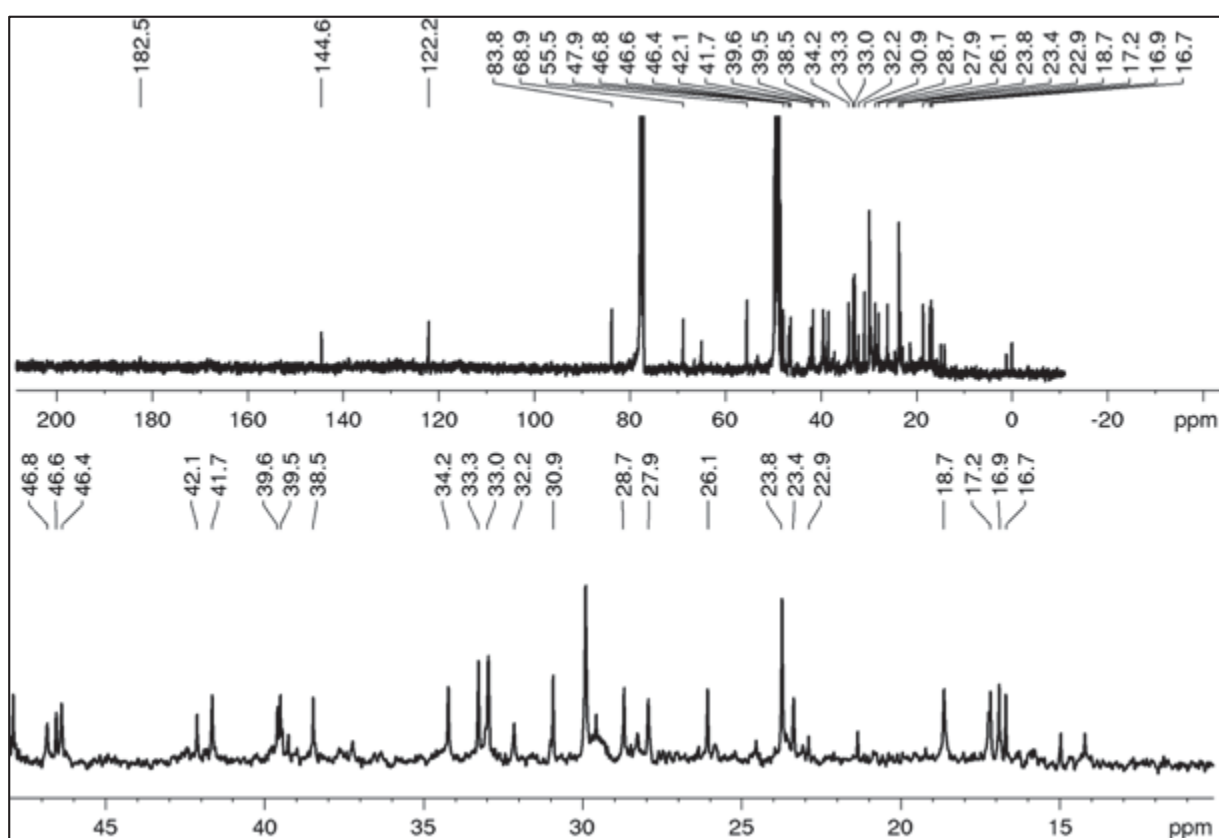


FIGURA 131 – AMPLIAÇÃO DOS PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV16**

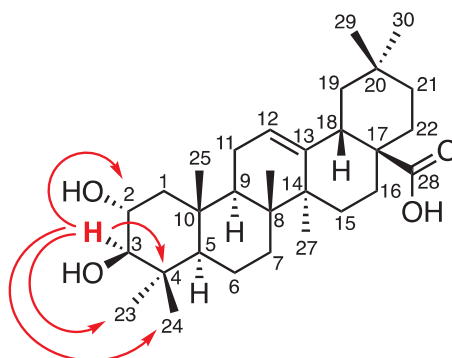


O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 132) revelou o total de 30 sinais, confirmando um triterpeno. Destes, sete foram atribuídos aos grupos metila, e dezoito aos grupos metilênicos e metínicos. Os demais, que se destacaram no espectro, foram os carbonos da ligação dupla em δ_{C} 144,6 (C-13) e 122,2 (C-12) (olean-12-eno), dois carbonos oxigenados em δ_{C} 83,8 (C-3) e 68,9 (C-2) e um grupo carboxila em δ_{C} 182,5, que é característico de C-28 nesse tipo de triterpeno.

FIGURA 132 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE **SV16** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 100 MHz)



A posição dos grupos hidroxila foi determinada pela análise das correlações no HSQC e HMBC (FIGURAS 134-136). O sinal em δ_{H} 2,99 (H-3) mostrou no HSQC correlação com um carbono em δ_{C} 83,8. A multiplicidade de H-3 (d, $J = 9,5$ Hz) indica que há um substituinte em C-2. No HMBC H-3 correlacionou com os carbonos em δ_{C} 16,9 (C-24), 28,7 (C-23), 39,4 (C-4) e 68,8 (C-2).

FIGURA 133 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV16**

A partir dos dados descritos e os demais observados no espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 29), bem como comparação com os dados da literatura (DAIS et al., 2017), **SV16** foi identificada com o ácido maslínico (FIGURA 129), um triterpeno conhecido no gênero *Salvia*, e que está sendo descrito pela primeira vez na espécie *Salvia lachnostachys*.

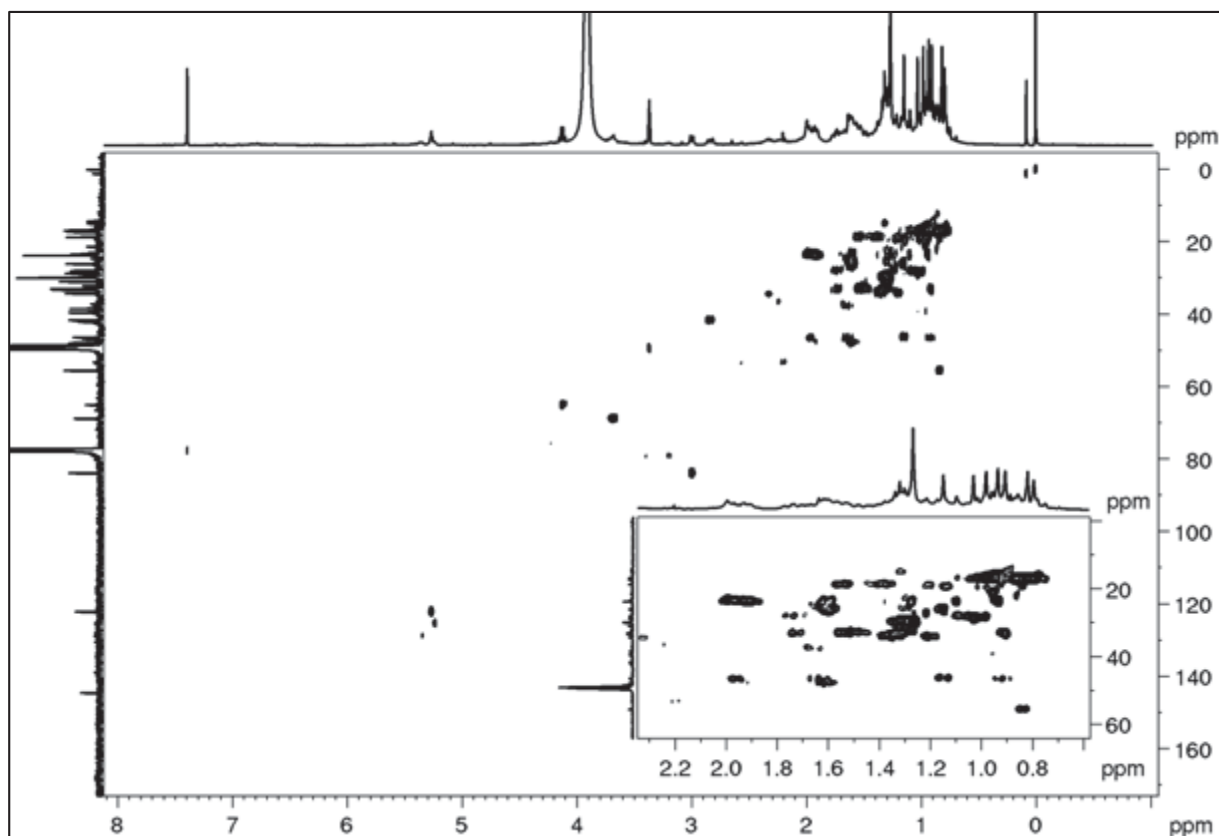
FIGURA 134 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV16**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

FIGURA 135 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV16**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

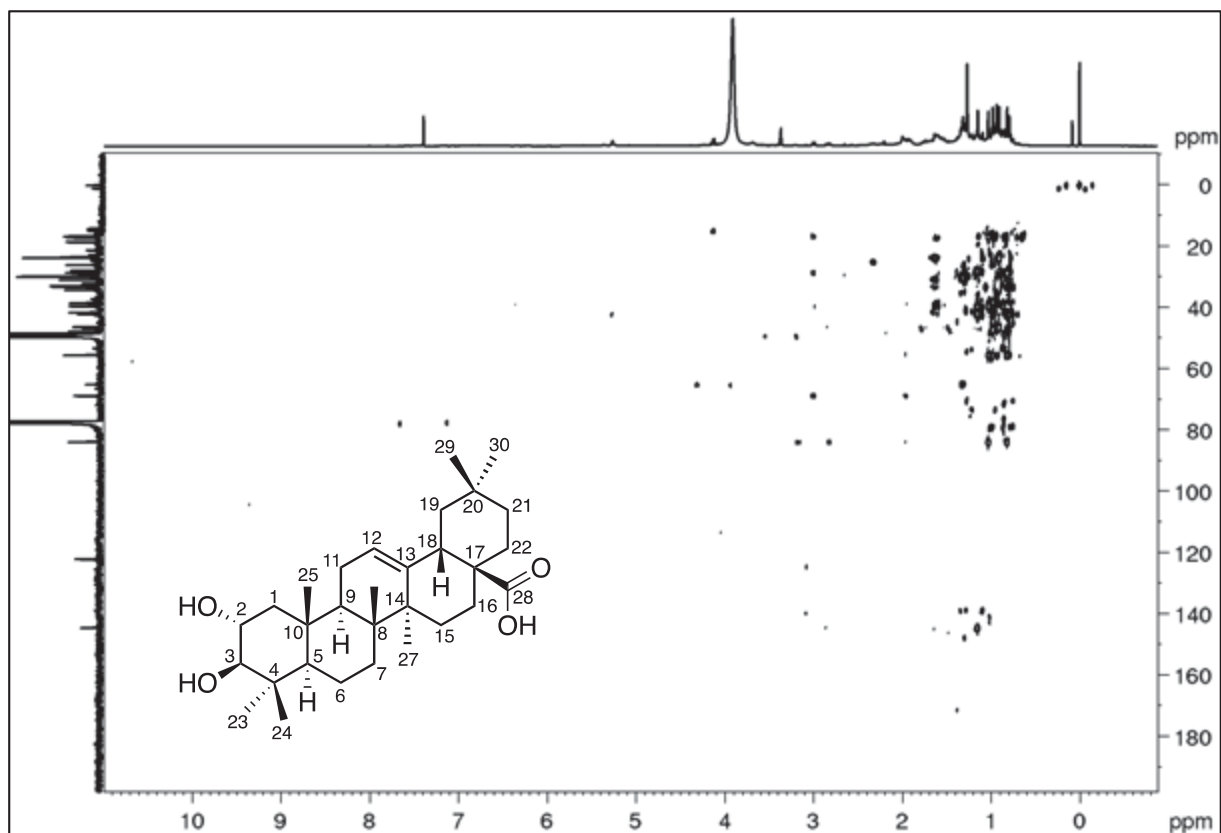


FIGURA 136 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DE **SV16** DOS HIDROGÊNIOS METILÊNICOS, METÍNICOS E METÍLICOS

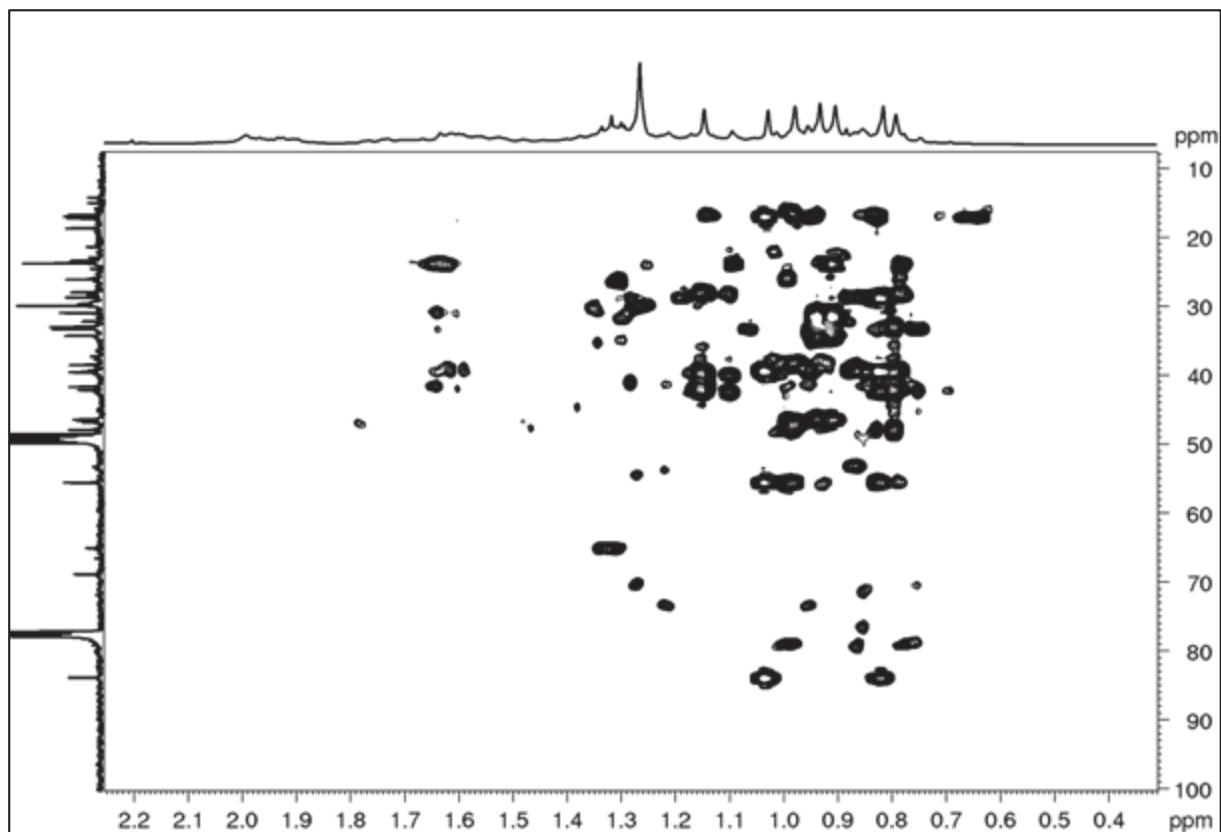


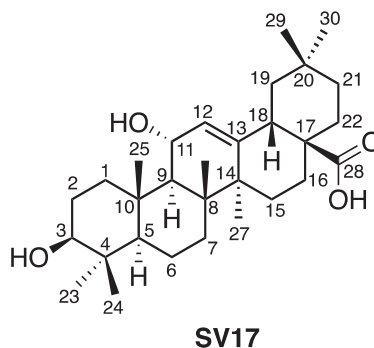
TABELA 29 – DADOS DE RMN DE **SV16** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM O ÁCIDO MASLÍNICO (CLOROFÓRMIO-*d*, 850 MHz, DAIS et al., 2017)

Pos.	SV16			Ácido maslínico	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	46,6	0,92 <i>m</i> * e 1,96 <i>m</i> *	n.o	46,3	0,91 t (12,9) e 1,98 dd (12,9; 5,1)
2	68,9	3,68 <i>m</i> *	n.o	68,9	3,69 m
3	83,8	3,00 <i>d</i> (9,5)	2, 23, 24	83,9	3,01 d (9,5)
4	39,6	-	-	39,1	-
5	55,5	0,81 <i>m</i> *	4	55,2	0,85 d (11,7)
6	18,7	1,53 <i>m</i> * e 1,37 <i>m</i> *	n.o	18,3	1,40 ddd (13,8; 12,3; 3,1) e 1,55 m
7	33,0	1,30 <i>m</i> * e 1,51 <i>m</i> *	6, 8, 26	32,5	1,32 dt (12,3; 3,0) e 1,46 ddd (13,6; 12,3; 3,9)
8	39,6	-	-	39,4	-
9	47,9	1,62 <i>m</i> *	7, 10, 11, 14	47,6	1,61 m
10	38,5	-	-	38,4	-
11	23,4	1,90 <i>m</i> * e 1,95 <i>m</i> *	8, 12, 13	23,4	1,90 ddd (18,4; 6,9; 3,6) e 1,95 ddd (18,4; 11,1; 3,6)
12	122,2	5,26 (<i>t</i> , 3,5)	8	122,5	5,30 t (3,6)
13	144,6	-	-	143,5	-
14	42,1	-	-	41,7	-
15	27,9	1,08 <i>m</i> * e 1,72 <i>m</i> *	14, 16	27,5	1,09 dt (14,0; 3,2) e 1,71 ddd (15,1; 14,0; 4,2)
16	22,9	1,96 <i>m</i> *	17	22,9	1,62 m e 1,99 dt (12,9; 5,1)
17	46,8	-	-	46,3	-
18	41,7	2,83 <i>dd</i> (13,9, 4,4)	12, 14, 16, 17	41,1	2,83 <i>dd</i> (13,9; 4,4)
19	46,4	1,14 <i>m</i> * e 1,62 <i>m</i> *	18, 21, 30	45,8	1,16 ddd (13,9; 2,0) e 1,62 m
20	30,9	-	-	30,7	-
21	34,2	1,22 <i>m</i> * e 1,35 <i>m</i> *	19, 22	33,7	1,22 m e 1,35 ddd (15,1; 13,7; 4,2)
22	32,2	1,59 <i>m</i> * e 1,78 <i>m</i> *	18, 20, 21, 30	32,3	1,59 m e 1,78 td (15,1; 13,7; 4,2)
23	28,7	1,03 <i>s</i>	4, 5, 24	28,5	1,03 <i>s</i>
24	16,9	0,81 <i>s</i>	4, 5, 23	16,7	0,82 <i>s</i>
25	16,7	0,98 <i>s</i>	1, 5, 9	16,6	0,98 <i>s</i>
26	17,2	0,79 <i>s</i>	8	17,1	0,77 <i>s</i>
27	26,1	1,14 <i>s</i>	8, 13, 14, 15	25,9	1,14 <i>s</i>
28	182,5	-	-	181,2	-
29	33,3	0,90 <i>s</i>	19, 20, 21	33,1	0,91 <i>s</i>
30	23,8	0,93 <i>s</i>	20	23,4	0,93 <i>s</i>

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC. n.o = não observado.

1.6.5.3 Identificação de **SV17**

FIGURA 137 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV17**



A substância **SV17** (FIGURA 137) foi isolada como o constituinte majoritário em uma mistura com **SV10** (20-hidroxidemetilfruticulina B). A parte alifática do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 138 e 139) revelou um perfil muito similar com os demais triterpenos já descritos nesse trabalho. Foram observados os simpletos típicos das sete metilas em δ_{H} 1,02 (H-8), 0,81 (H-10), 0,99 (H-23), 0,79 (H-24), 1,24 (H-27), 0,93 (H-29) e 0,96 (H-30). O hidrogênio olefínico foi observado como um duplete em δ_{H} 5,48 ($J = 4,0$ Hz, H-12), sendo que essa constante de acoplamento foi observada para um duplo-duplete em δ_{H} 3,74 ($J = 8,3$ e $4,0$ Hz, H-11), indicando um hidrogênio oximetínico. Já a constante em $J = 8,3$ Hz foi observada para um duplete em δ_{H} 1,71 ($J = 8,3$ Hz, H-9). Esses dados indicam que **SV17** apresenta um hidrogênio oximetínico entre um hidrogênio olefínico (H-12) e um metínico (H-9).

FIGURA 138 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV17** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

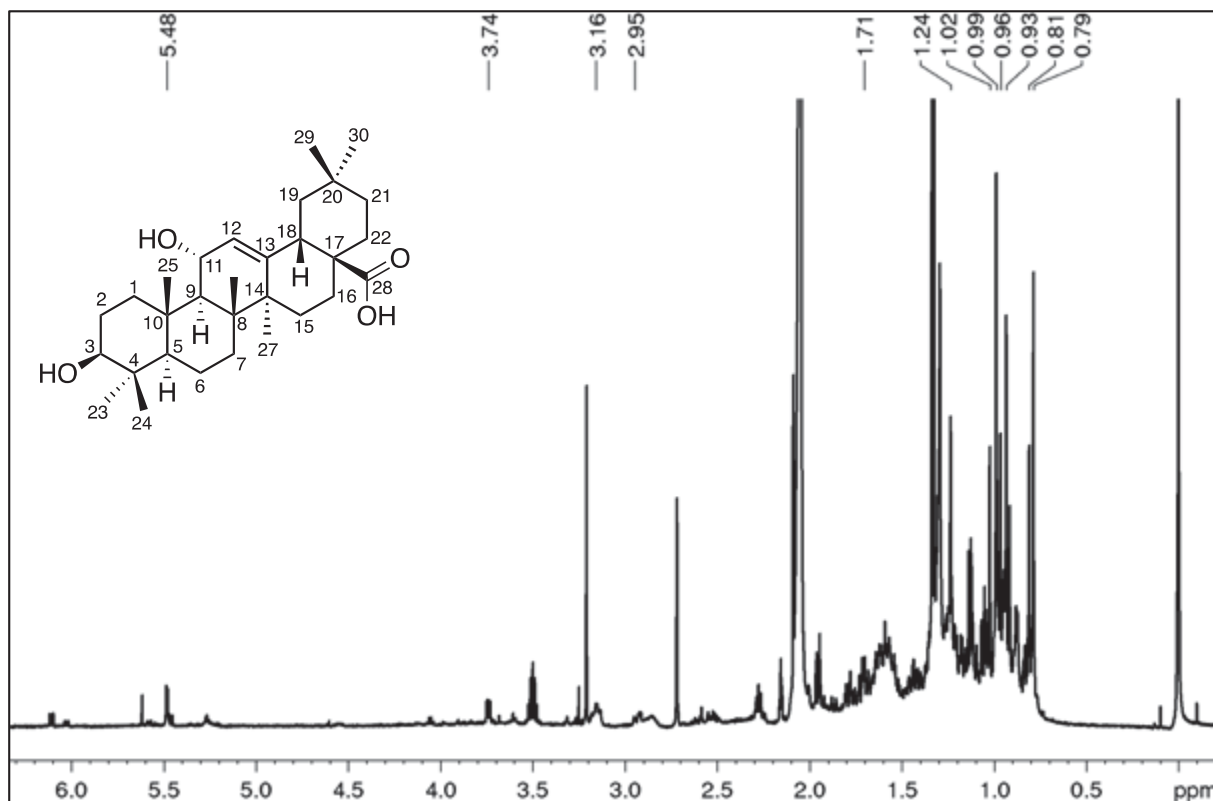
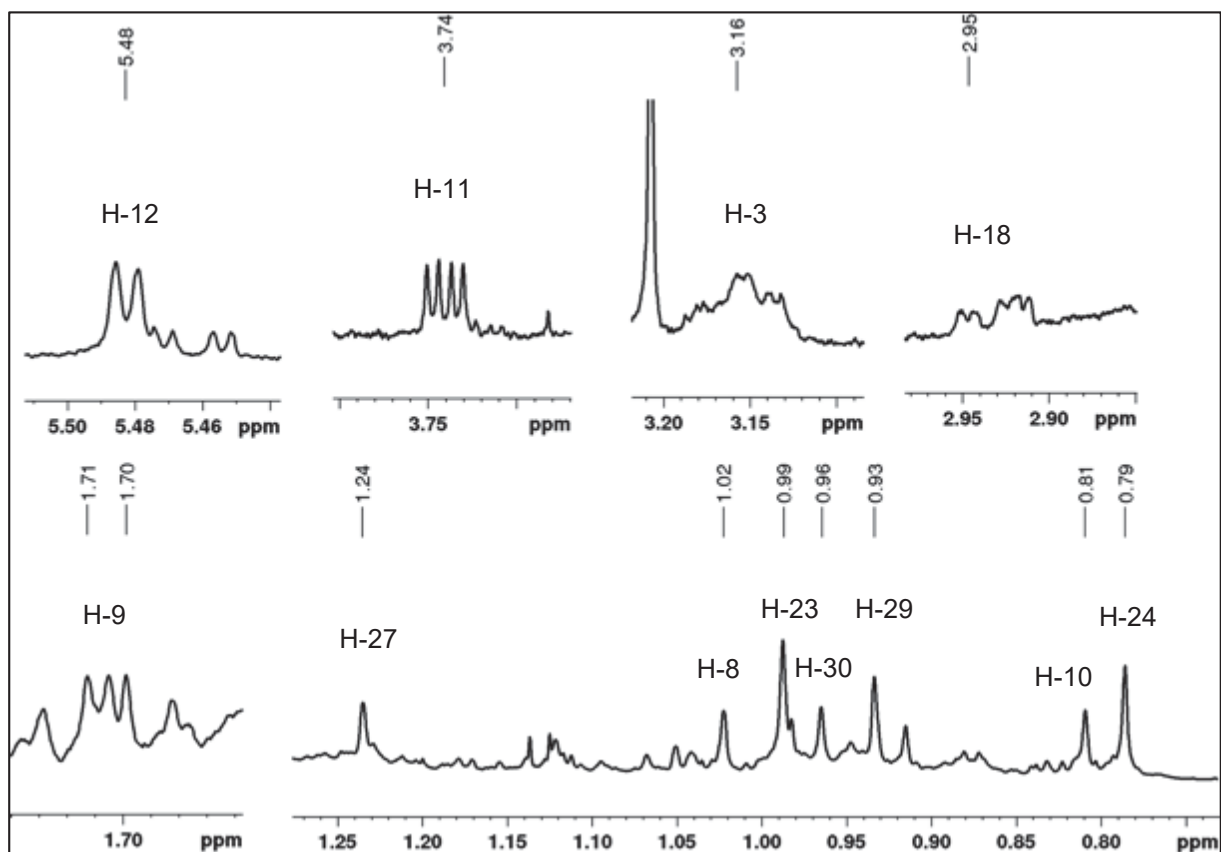
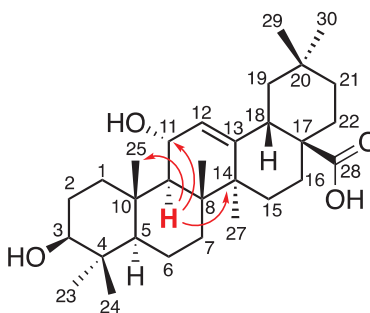


FIGURA 139 – AMPLIAÇÃO DOS PRINCIPAIS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV17**



Observando os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURAS 141 e 142) foi possível prever o tipo de esqueleto triterpênico de **SV17**. Os valores dos carbonos olefínicos observados foram de δ_C 122,9 (C-12) e 149,3 (C-13), indicando tratar-se de um esqueleto carbônico do tipo olean-12-eno. E ainda, foi observado um grupo carboxila em δ_C 182,5, que pode ser atribuído a C-28, como nos triterpenos anteriores. O sinal em δ_H 1,70 (H-9) apresentou no HSQC correlação com o carbono em δ_C 53,7, e no HMBC correlacionou com os carbonos em 19,2 (C-25), 42,7 (C-14) e com o oximetínico vizinho a ele em 76,4 (C-11), que por sua vez correlacionou no HSQC com o sinal em 3,74 (H-11). A presença deste sinal em 76,4 indica um grupo hidroxila em C-11 (FIGURA 140).

FIGURA 140 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV17**



Por meio dos dados apresentados e dos demais observados no HSQC e HMBC (TABELA 30) foi possível atribuir a estrutura química de **SV17**, como sendo um triterpeno derivado do ácido oleanólico, o qual apresenta uma hidroxila em C-11. A constante de acoplamento entre H-11 e H-9 ($J = 8,3$ Hz) sugere uma relação *trans* entre eles. Portanto, este triterpeno foi denominado ácido 11- α -hidroxioleanólico. Em uma revisão da literatura os dados espectrométricos dessa substância não foram encontrados, pois há apenas um relato de síntese em uma revista a qual não temos acesso. Portanto **SV17** pode ser considerada um novo produto natural.

FIGURA 141 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV17**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

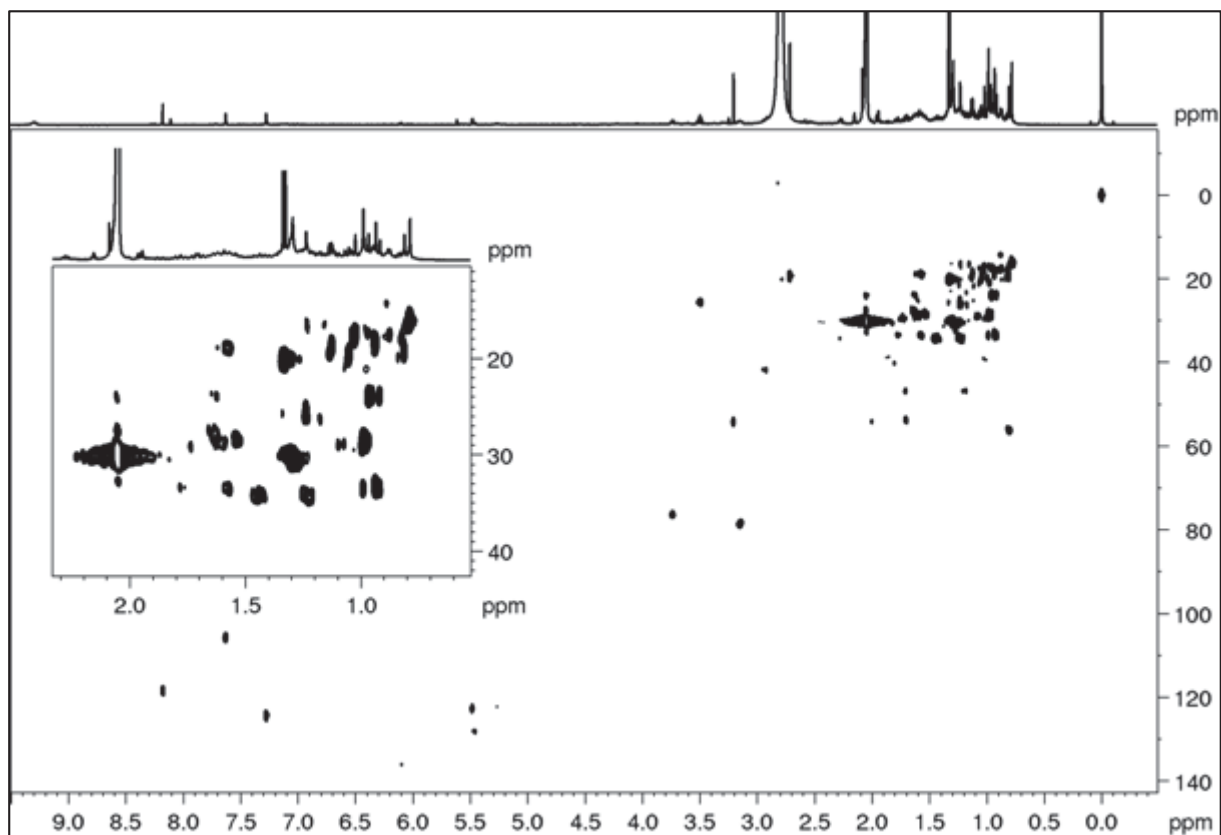


FIGURA 142 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV17**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

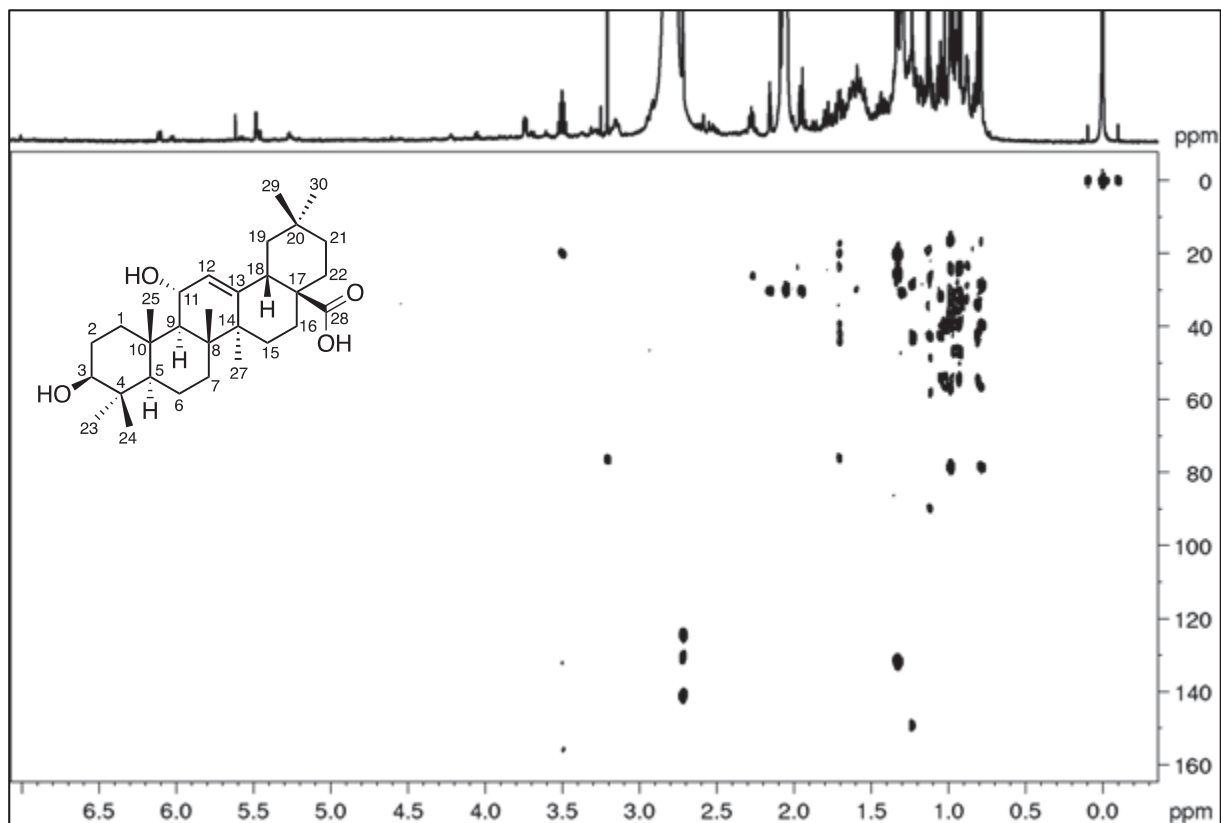


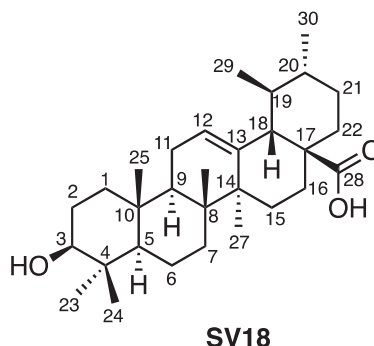
TABELA 30 – DADOS DE RMN DE **SV17** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz)

Posição	SV17		
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	n.o	n.o	n.o
2	28,6	1,08 <i>m</i> *	n.o
3	78,5	3,15 <i>m</i> *	n.o
4	39,9	-	-
5	56,3	0,81 <i>m</i> *	7,9
6	16,6	1,23 <i>m</i> *	n.o
7	33,4	1,57 <i>m</i> *	n.o
8	39,1	-	-
9	53,7	1,70 <i>d</i> (8,3)	11,14,25
10	33,8	-	-
11	76,4	3,74 <i>dd</i> (8,3, 4,0)	n.o
12	122,9	5,48 <i>d</i> (4,0)	n.o
13	149,3	-	-
14	42,7	-	-
15	28,4	1,53 <i>m</i> * e 1,63 <i>m</i> *	n.o
16	n.o	n.o	n.o
17	46,7	-	-
18	41,8	2,94 <i>m</i> *	19
19	46,7	1,70 <i>m</i> *	n.o
20	31,0	-	-
21	34,6	1,43 <i>m</i> * e 1,23 <i>m</i> *	n.o
22	n.o	n.o	n.o
23	28,8	0,99 <i>s</i>	3,4,24
24	16,3	0,78 <i>s</i>	2,3,4,5,6
25	19,2	0,81 <i>s</i>	8,9,10
26	17,6	1,02 <i>s</i>	8,9
27	25,7	1,23 <i>s</i>	13,14,15
28	177,5	-	-
29	33,4	0,93 <i>s</i>	18,21,30
30	23,9	0,96 <i>s</i>	19,21

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC. n.o = não observado.

1.6.5.4 Identificação de **SV18**

FIGURA 143 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **SV18**



A substância **SV18** (FIGURA 143) apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 144 e 145) diversos sinais na região de hidrogênios metilênicos, metínicos e metílicos, sugerindo tratar-se de um triterpeno como as demais descritas nesse tópico. Foi observada a presença de dois sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,28 ($J = 3,6$ Hz) e δ_{H} 5,24 ($J = 3,6$ Hz), com integração relativa de 1:2, respectivamente. Esses dados sugerem em uma mistura de triterpenos. Em comparação com os espectros anteriores foi possível distinguir **SV18** (majoritária) em mistura com **SV15** (ácido oleanólico). Foi observado também um duplo-duplete em δ_{H} 3,21 ($J = 11,5$ e $5,1$ Hz), típico do hidrogênio oximetínico (H-3), além de um duplo-duplete em δ_{H} 2,20 ($J = 11,5$ Hz) característico do hidrogênio alílico em C-18. Na região de hidrogênios metílicos foi observado um total de sete sinais, como nas anteriores. Entretanto, dois sinais foram observados como dupletos em δ_{H} 0,86 ($J = 6,4$ Hz, H-29) e δ_{H} 0,94 ($J = 6,2$ Hz, H-30), indicando que ambas as metilas estão ligadas a carbonos terciários.

FIGURA 144 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV18** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

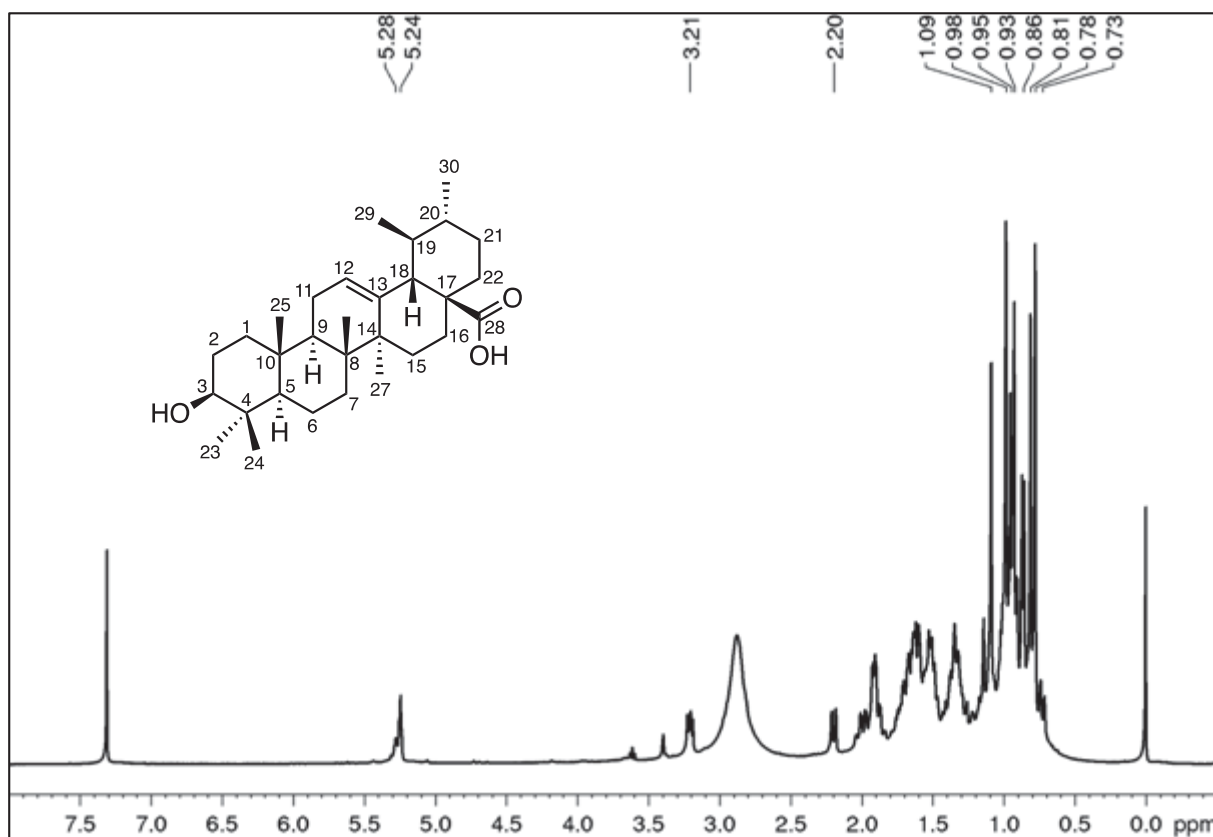
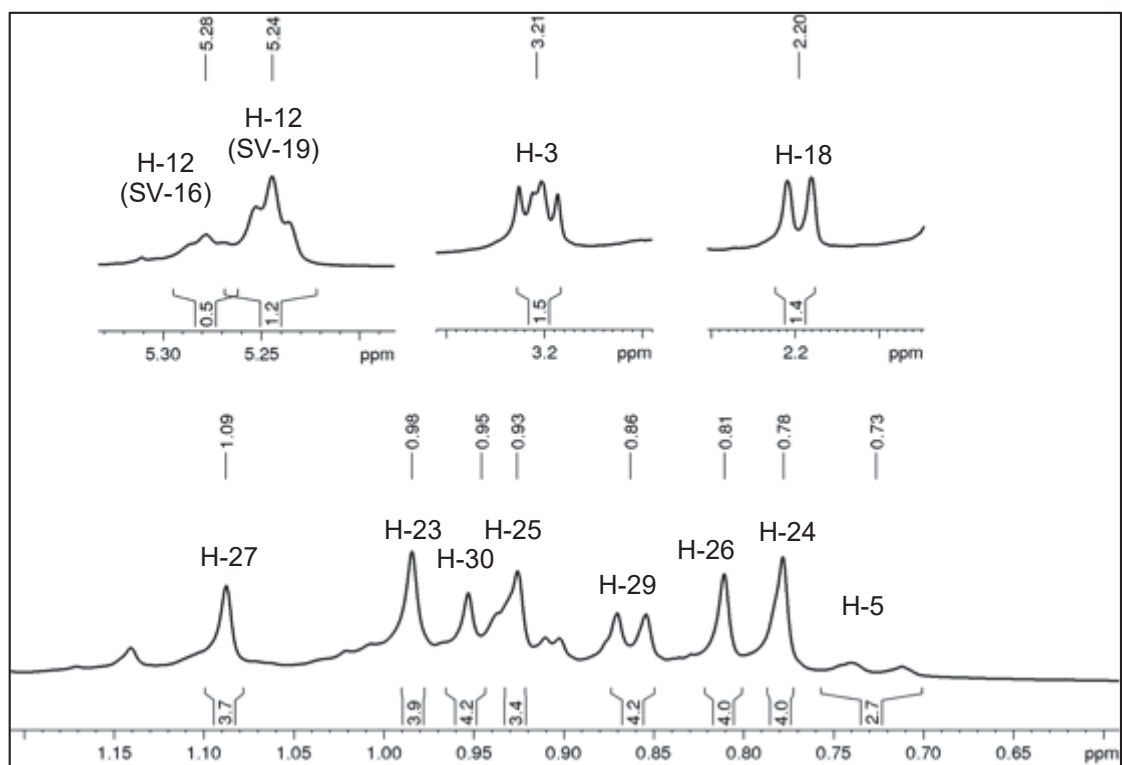


FIGURA 145 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAS DE **SV18**



No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 146) foi possível observar um perfil muito característico dos triterpenos, com vários sinais na região de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Foi observado o par de carbonos olefínicos de C-12 e C-13 em δ_{H} 125,7 e 138,3, respectivamente. O deslocamento químico destes sinais indica o esqueleto ursan-12-eno (OLEA; ROQUE, 1990). A presença de uma carboxila em δ_{C} 180,9, atribuída ao carbono C-28, indicou um ácido triterpênico. Devido à sobreposição de sinais apresentada pelo espectro de RMN de ^1H vários sinais foram deduzidos principalmente pelas correlações à ligação direta ^1H - ^{13}C (HSQC, FIGURA 147).

FIGURA 146 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE **SV18** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 100 MHz)

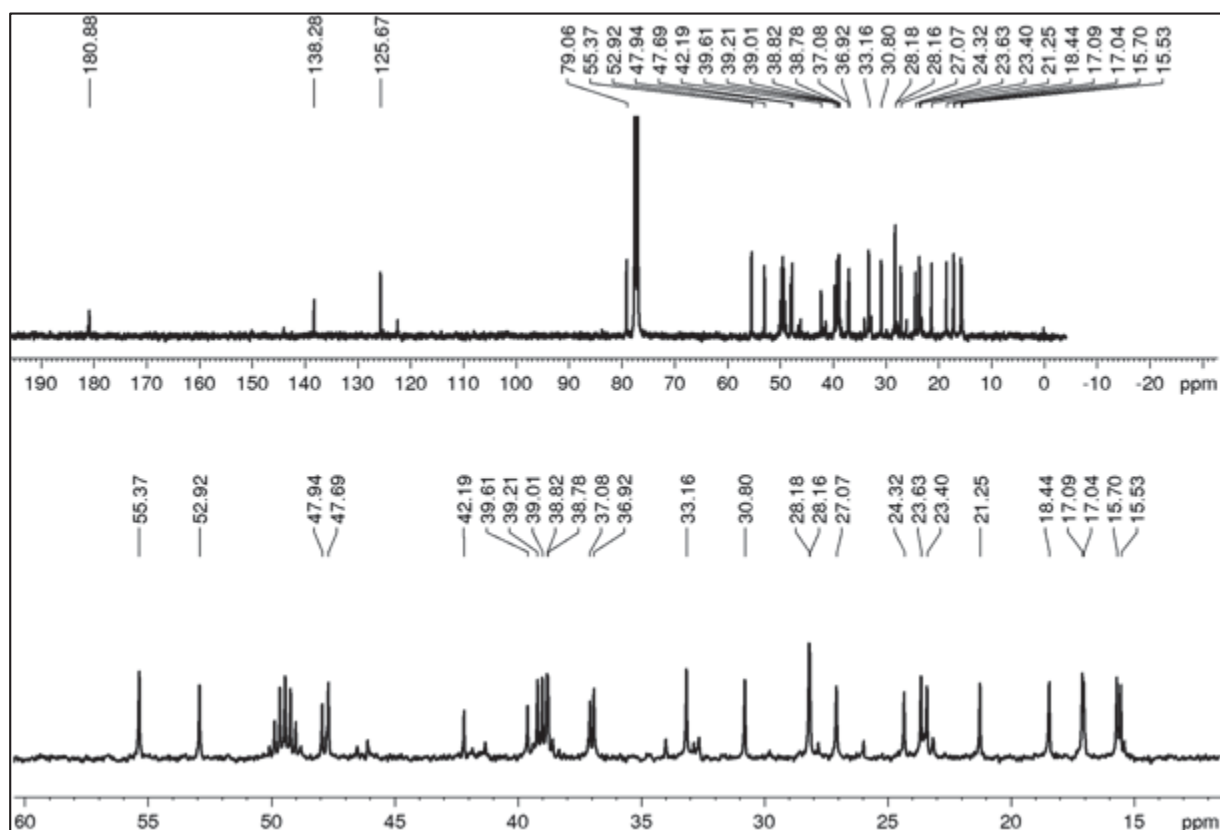


FIGURA 147 - MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV18**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

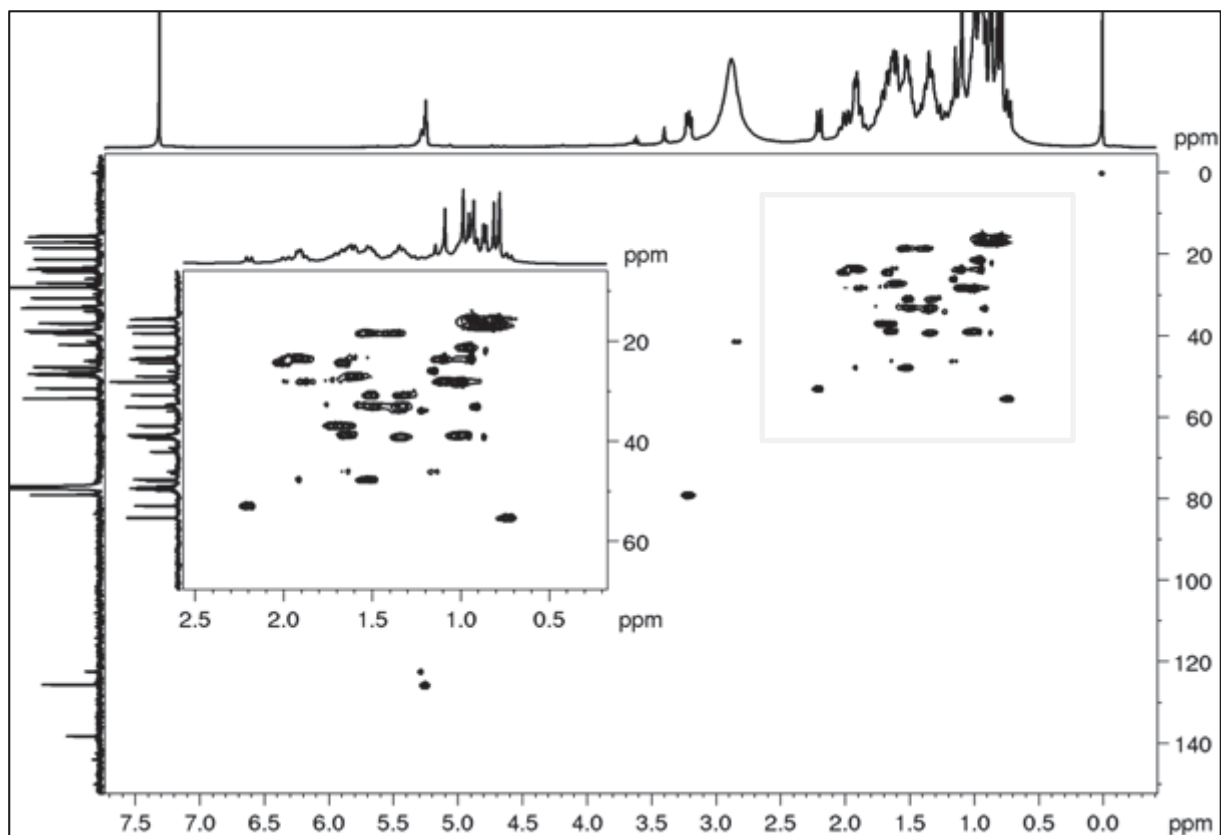


FIGURA 148 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV18**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

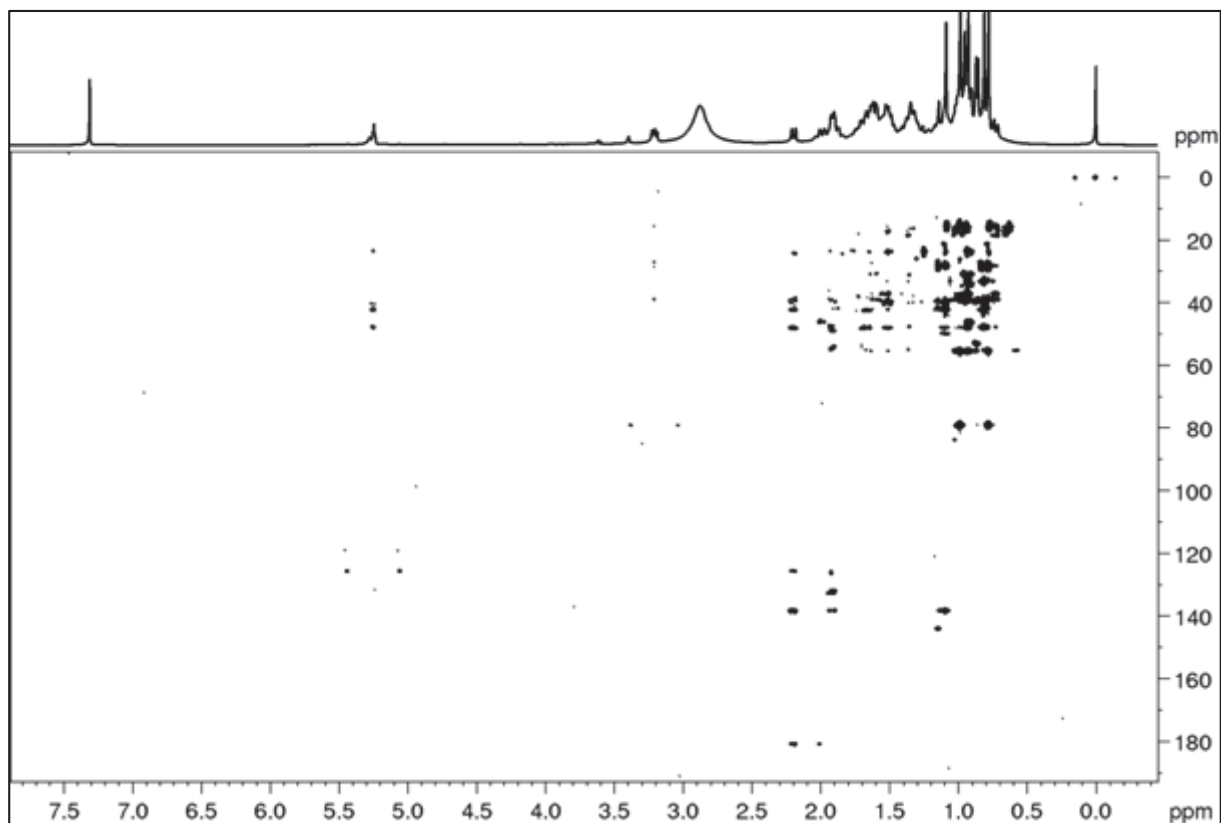
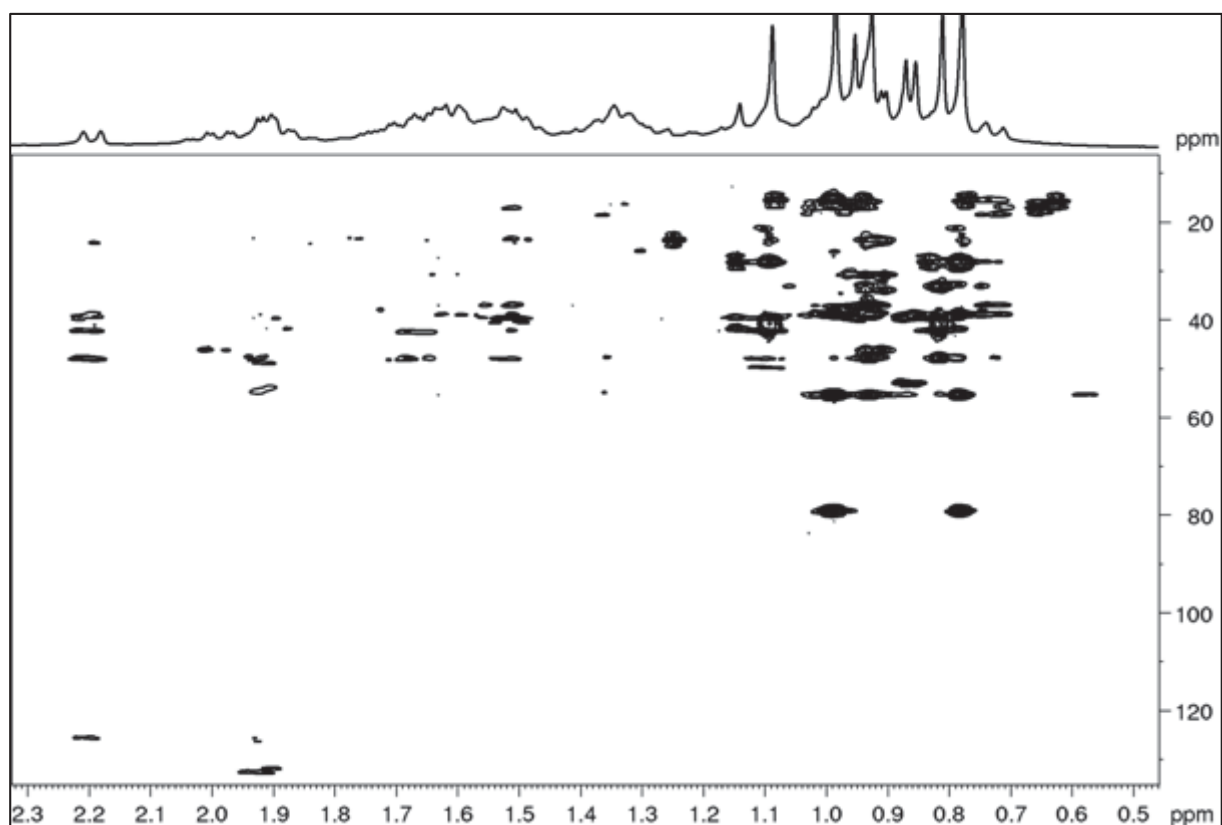


FIGURA 149 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DE **SV18**

Por meio dos dados citados e dos demais observados nos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURAS 147-149; TABELA 31) foi possível propor a estrutura química de **SV18** como sendo o triterpeno ácido ursólico (DAIS et al., 2017). Esta substância é muito comum em espécie do gênero *Salvia*, tendo já sido isolada anteriormente das folhas de *S. lachnostchys* (OLIVEIRA, 2017).

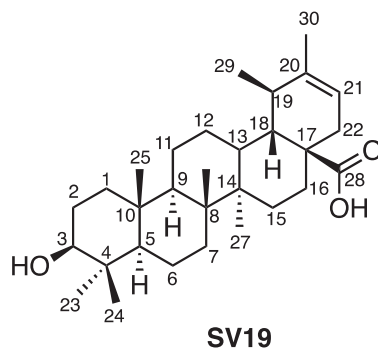
TABELA 31 – DADOS DE RMN DE **SV18** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO URSÓLICO (CLOROFÓRMIO-*d*, 850 MHz, DAIS et al., 2017)

Pos.	SV18			Ácido ursólico	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	38,78	1,00 <i>m</i> *	n.o	38,6	1,00 <i>dd</i> (12,9; 3,5) e 1,64 <i>m</i>
2	27,0	1,63 <i>m</i> *	n.o	27,2	1,57 <i>m</i> e 1,62 <i>m</i>
3	79,0	3,21 <i>dd</i> (11,5, 5,0)	2, 23, 24	79,1	3,21 <i>dd</i> (11,6; 4,6)
4	38,82	-	-	38,7	-
5	55,4	0,72 <i>d</i> (11,3)	4	55,2	0,72 <i>d</i> (12,1)
6	18,4	1,53 <i>m</i> *	n.o	18,3	1,35 <i>m</i> e 1,53 <i>m</i>
7	33,2	1,33 <i>m</i> *	6, 8, 26	32,9	1,33 <i>m</i> e 1,48 <i>m</i>
8	39,6	-	-	39,5	-
9	47,7	1,51 <i>m</i> *	7, 10, 11, 14	47,5	1,50 <i>t</i> (8,7)
10	36,9	-	-	36,9	-
11	23,4	1,87 <i>m</i> *	8, 12, 13	23,3	1,92 <i>dd</i> (8,9; 3,7)
12	125,7	5,24 <i>t</i> (3,6)	8	125,8	5,25 <i>t</i> (3,6)
13	138,3	-	-	138,1	-
14	42,2	-	-	42,0	-
15	28,2	1,10 <i>m</i> *	14, 16	28,0	1,10 <i>m</i> e 1,86 <i>ddd</i> (13,8; 13,8; 4,7)
16	24,3	1,66 <i>m</i> *	17	24,2	1,66 <i>m</i> e 2,02 <i>dd</i> (13,8; 4,5)
17	47,9	-	-	48,1	-
18	52,9	2,20 <i>d</i> (11,5)	12, 14, 16, 17	52,7	2,19 <i>d</i> (11,4)
19	39,0	1,33 <i>m</i> *	18, 21, 30	39,0	1,33 <i>m</i>
20	39,2	0,95 <i>m</i> *	-	38,8	0,95 <i>m</i>
21	30,8	1,31 <i>m</i> *	19, 22	30,6	1,31 <i>m</i> e 1,51 <i>m</i>
22	37,1	1,63 <i>m</i> *	18, 20, 21, 30	36,7	1,67 <i>dt</i> (13,2; 3,3) e 1,74 <i>dt</i> (13,2; 3,3)
23	28,2	0,98 <i>s</i>	4, 5, 24	28,1	0,99 <i>s</i>
24	15,7	0,78 <i>s</i>	4, 5, 23	15,6	0,77 <i>s</i>
25	15,5	0,93 <i>s</i>	1, 5, 9	15,5	0,93 <i>s</i>
26	17,0	0,81 <i>s</i>	8	17,1	0,79 <i>s</i>
27	23,6	1,09 <i>s</i>	8, 13, 14, 15	23,6	1,08 <i>s</i>
28	180,9	-	-	181,0	-
29	17,1	0,86 <i>d</i> (6,4)	19, 20, 21	16,9	0,86 <i>d</i> (6,4)
30	21,2	0,95 <i>d</i> (6,2)	20	21,2	0,95 <i>d</i> (6,5)

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC. n.o = não observado.

1.6.5.5 Identificação de **SV19**

FIGURA 150 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA



A substância **SV19** (FIGURA 150) foi isolada como o constituinte minoritário em mistura com **SV4** (demetilsofruticulina A). Entretanto, foi possível realizar sua identificação. A região alifática do espectro de RMN de ^1H da mistura (FIGURAS 151 e 152) foi bem similar àquela dos demais triterpenos já descritos nesse trabalho. O sinal de um hidrogênio olefínico foi observado como um duplete em δ_{H} 5,26 ($J = 6,8$ Hz, H-21). Já o sinal típico de H-3 foi observado como um duplo-duplete em δ_{H} 3,21 ($J = 8,9$ e $4,9$ Hz). O hidrogênio alílico foi observado como um duplete em δ_{H} 2,27 ($J = 6,8$ Hz, H-19). Também foram observados os sinais de sete metilas, sendo seis mais blindadas em δ_{H} 0,97 (H-23), 0,77 (H-24), 0,85 (H-25), 0,95 (H-26), 0,97 (H-27) e 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, H-29), e uma mais desblindada em δ_{H} 1,63 (H-30).

FIGURA 151 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV19** (CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

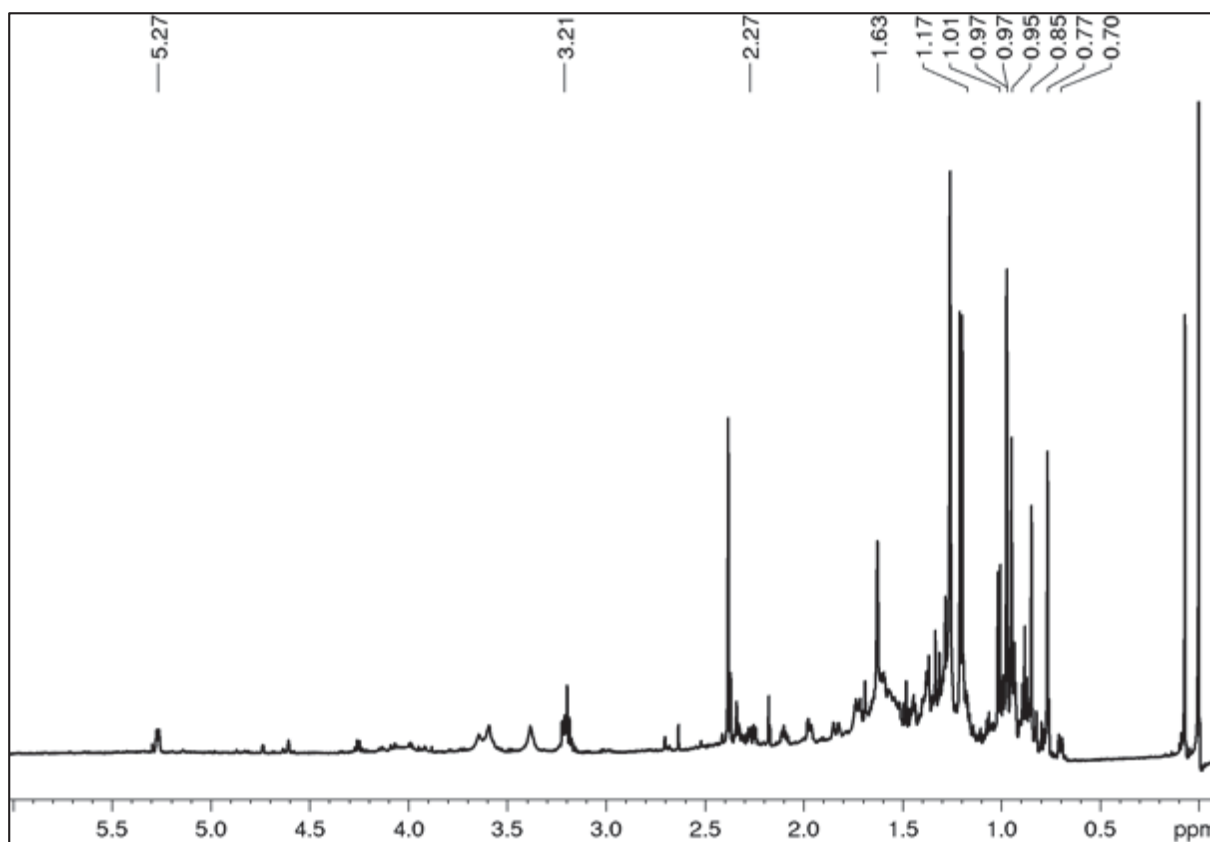
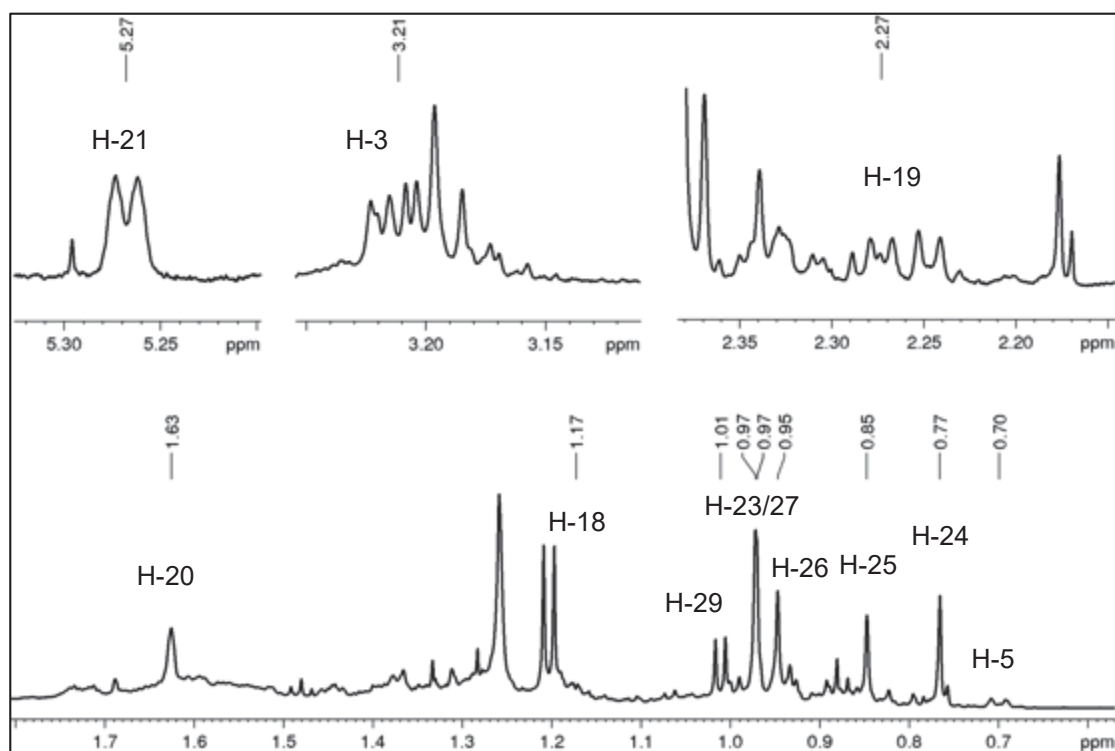


FIGURA 152 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE **SV19**



No HSQC (FIGURA 153), o sinal do hidrogênio olefínico em δ_H 5,26 (H-21) revelou estar ligado ao carbono em δ_C 116,8, e no HMBC (FIGURA 154 e 155) correlacionou com um carbono metílico em δ_C 21,9 (C-30), e com outros carbonos em δ_C 37,2 (C-19), 49,0 (C-17) e 42,7 (C-22). A metila em δ_H 1,63 (H-30) apontou correlações com C-19, e com o par de carbonos olefínicos em δ_C 116,8 (C-21) e 143,4 (C-20). Além disso, o hidrogênio alílico em δ_H 2,27 (H-19) apresentou correlações com o carbono metínico em δ_C 48,7 (C-18), além do par olefínico C-21 e C-22 (FIGURA 156). Diante dessas correlações é possível atribuir a posição da ligação dupla em C-20/C-21, ao invés de C-12/C-13 como nos demais triterpenos descritos anteriormente. Considerando ainda o HMBC, foi observada uma correlação entre o hidrogênio em δ_H 1,17 e uma carboxila em δ_C 179,0, a qual foi atribuída para C-28.

FIGURA 153 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV19**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

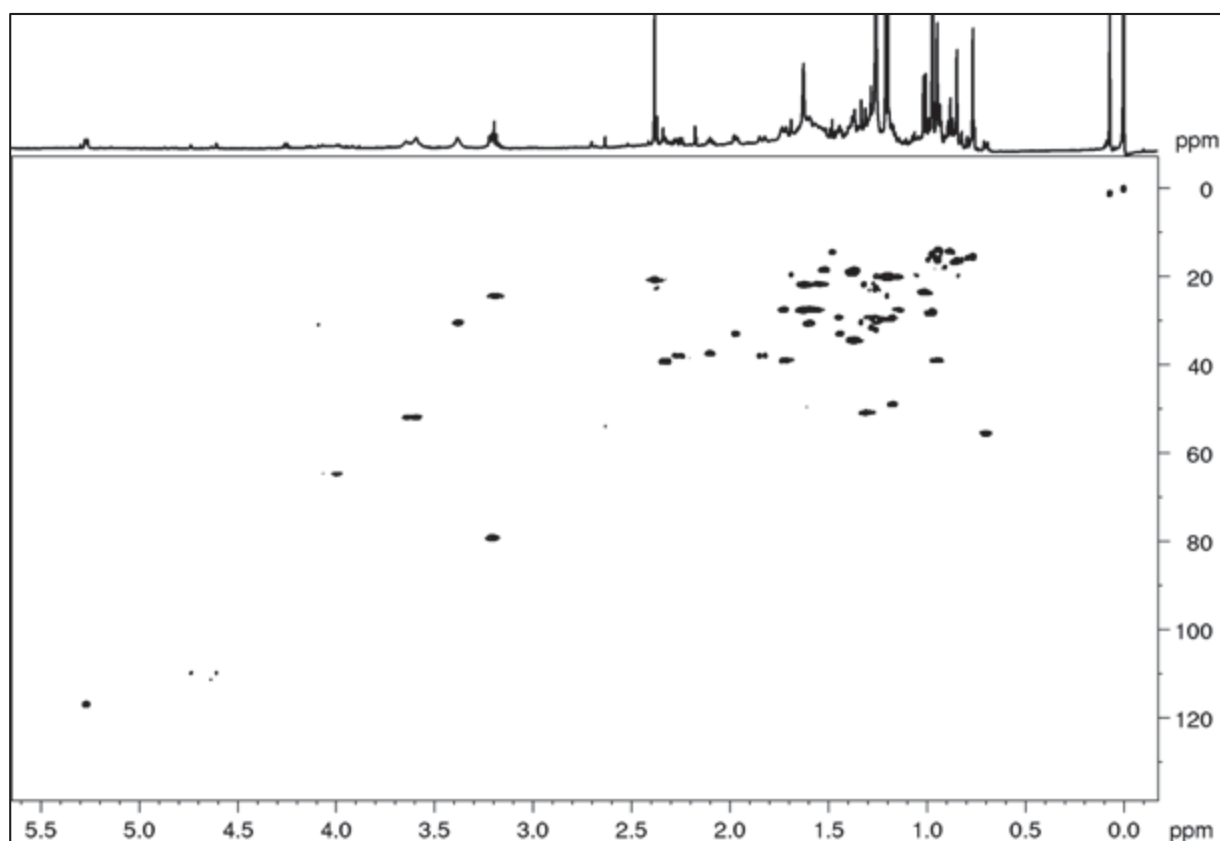


FIGURA 154 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV19**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 400 MHz)

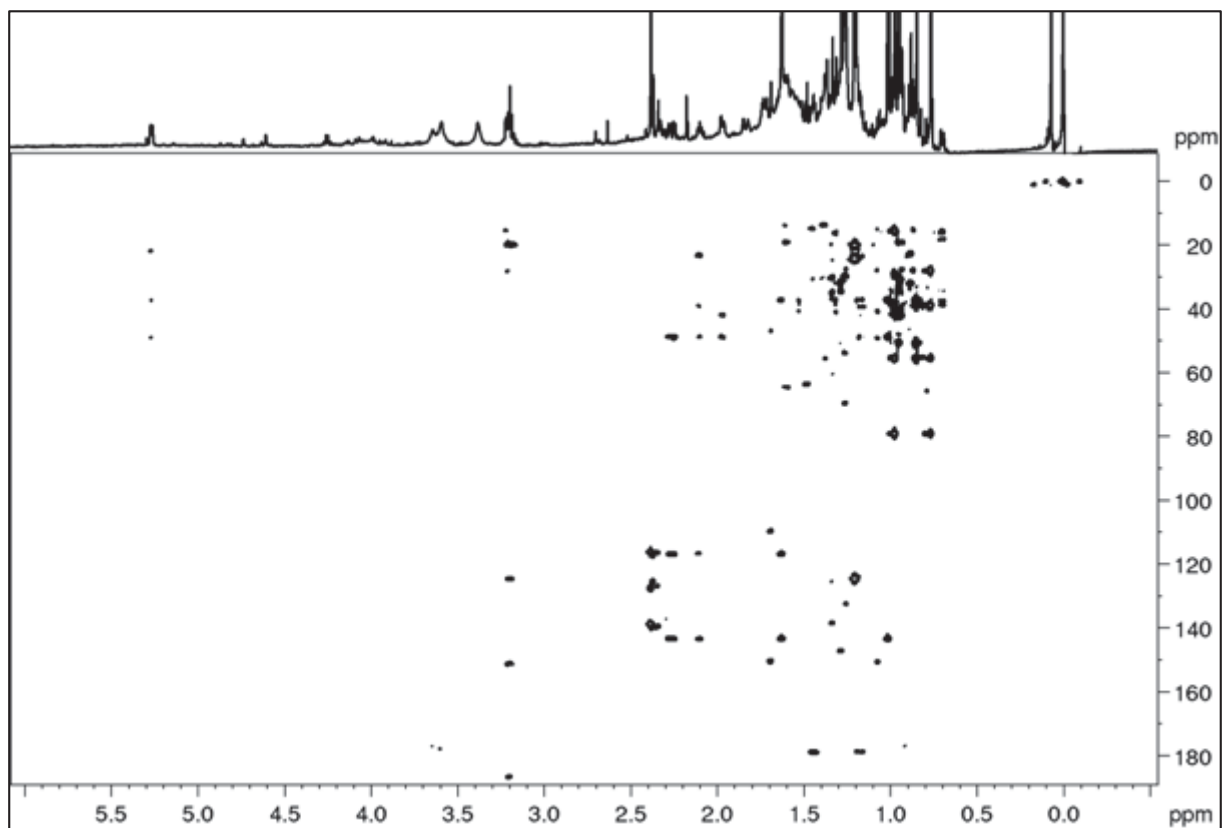


FIGURA 155 – AMPLIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES DO HMBC DE **SV19**

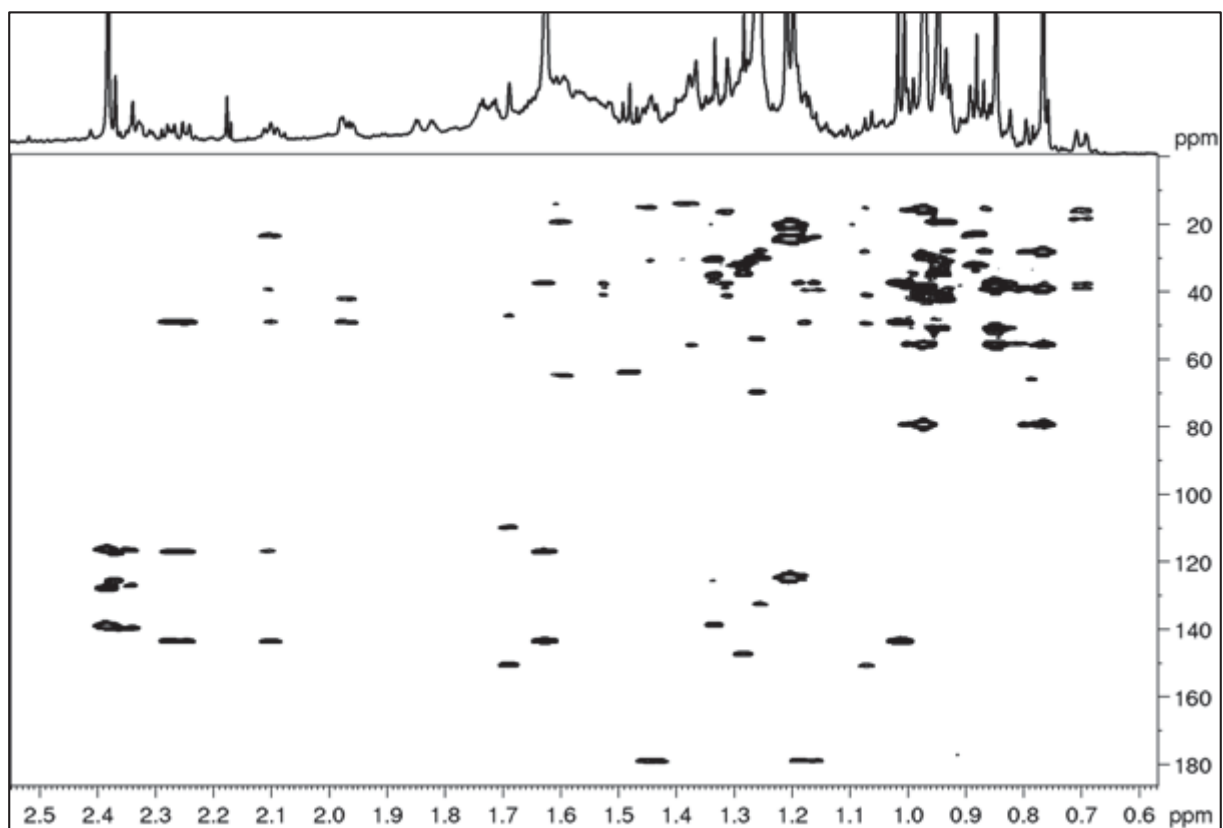
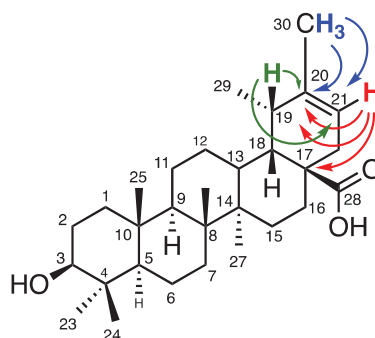


FIGURA 156 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV19**

Através das atribuições citadas, e das demais observadas nos mapas de correlação HSQC e HMBC (TABELA 32) foi possível identificar **SV19** como um isômero do ácido ursólico (**SV18**), diferenciando-se na posição da ligação dupla, e na estereoquímica de C-19, conhecido como ácido heterobetulínico (LOBO-ECHEVERRI et al., 2005). Segundo a literatura, este é o primeiro relato de **SV19** no gênero *Salvia*.

TABELA 32 – DADOS DE RMN DE **SV19** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO HETEROBETULÍNICO (PIRIDINA-*d*₆, 360 MHz, LOBO-ECHEVERRI et al., 2005)

Pos.	SV19			Ácido heterobetulínico	
	δ _C	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ _C	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)
1	38,5	1,71 <i>m</i> * e 0,95 <i>m</i> *	n.o	39,1	1,71 <i>m</i>
2	28,5	1,89 <i>m</i> *	n.o	27,1	1,91 <i>m</i>
3	79,1	3,21 <i>dd</i> , (8,9, 4,9)	4,24	78,1	3,49 <i>t</i> (7,8)
4	33,8	-	-	39,3	-
5	55,5	0,70 <i>d</i> (11,5)	4,6,10,24	55,9	n.o
6	18,0	1,52 <i>m</i> * e 1,37 <i>m</i> *	n.o	18,7	1,58 <i>m</i>
7	34,3	1,37 <i>m</i> *	n.o	34,7	1,40 <i>m</i>
8	41,1	-	-	41,1	-
9	50,7	1,31 <i>m</i>	8,10	51,1	1,34 <i>m</i>
10	37,7	-	-	37,5	-
11	21,4	1,20 <i>m</i> *	n.o	21,9	1,36 <i>m</i>
12	34,5	2,32 <i>m</i> *	n.o	33,7	2,36 <i>d</i> (10,0) e 1,55 <i>d</i> (10,0)
13	n.o	n.o	n.o	39,2	2,87 <i>m</i>
14	46,3	-	-	42,3	-
15	29,0	1,44 <i>m</i> * e 1,17 <i>m</i> *	n.o	27,9	1,88 <i>m</i>
16	n.o	n.o	n.o	29,6	1,81 <i>m</i>
17	49,0	-	-	49,1	-
18	48,7	1,17 <i>m</i> *	17,28	49,3	1,31 <i>m</i>
19	37,2	2,27 <i>d</i> (6,5)	18,20,21	37,8	2,47 <i>m</i>
20	143,4	-	-	143,1	-
21	116,8	5,26 <i>d</i> (6,8)	17,19,22,30	117,9	5,49 <i>d</i> (6,8)
22	38,5	2,33 <i>m</i> *	20,21	38,5	2,64 <i>dd</i> (15,3 e 7,0) e 2,04 <i>m</i>
23	28,1	0,97 <i>s</i>	3,5,24	28,3	1,04 <i>s</i>
24	15,5	0,77 <i>s</i>	3,4,5,23	16,5	1,25 <i>s</i>
25	16,4	0,85 <i>s</i>	4,5,9,10	16,7	0,88 <i>s</i>
26	16,0	0,95 <i>s</i>	7,9,14	16,4	1,08 <i>s</i>
27	15,0	0,97 <i>s</i>	8,15	15,1	1,06 <i>s</i>
28	179,0	-	-	178,2	-
29	23,5	1,01 <i>d</i> (6,5)	18,19,20	23,7	1,13 <i>d</i> (6,5)
30	21,9	1,63 <i>s</i>	19,20,21	22,3	1,74 <i>s</i>

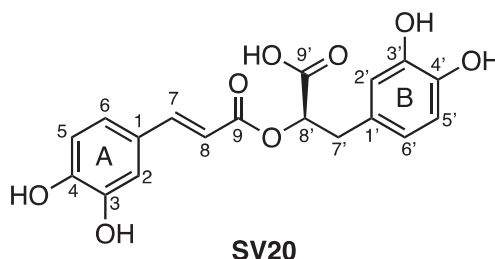
*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC. n.o = não observado.

1.6.6 Identificação da substância fenólica

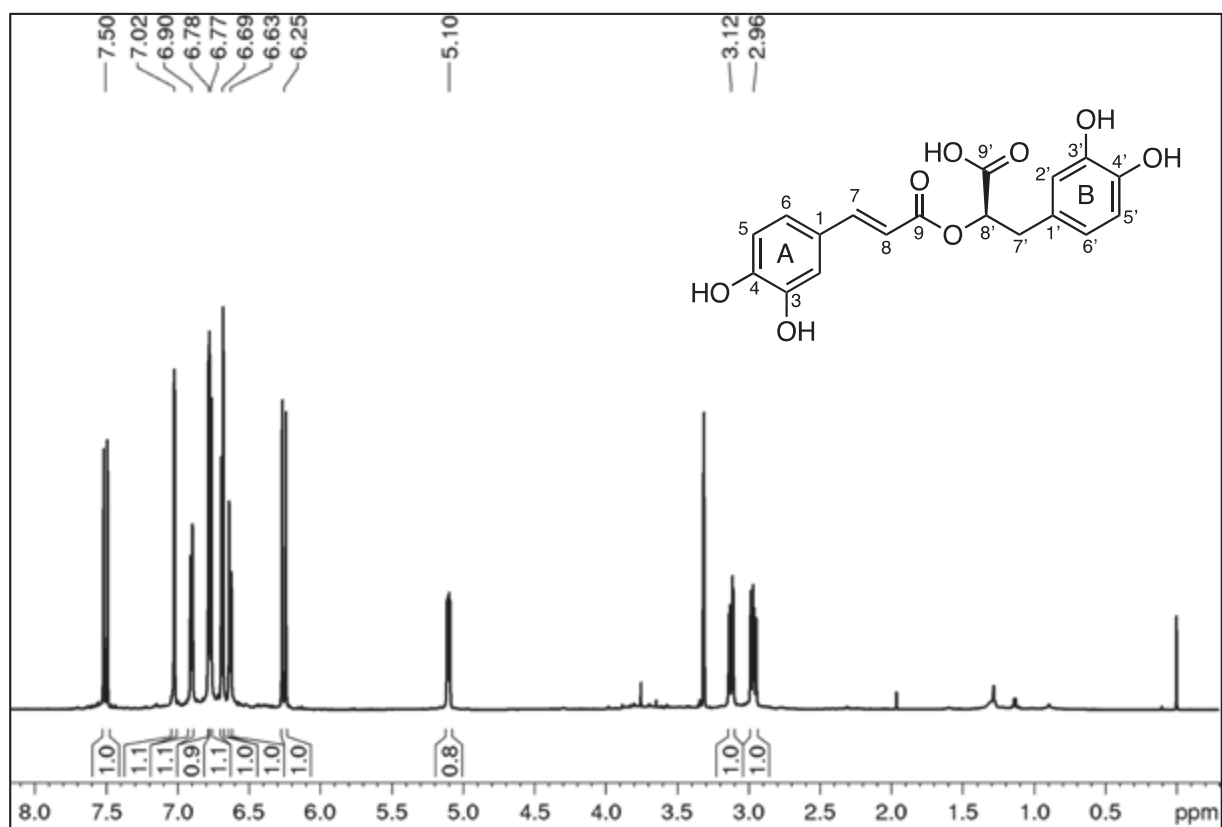
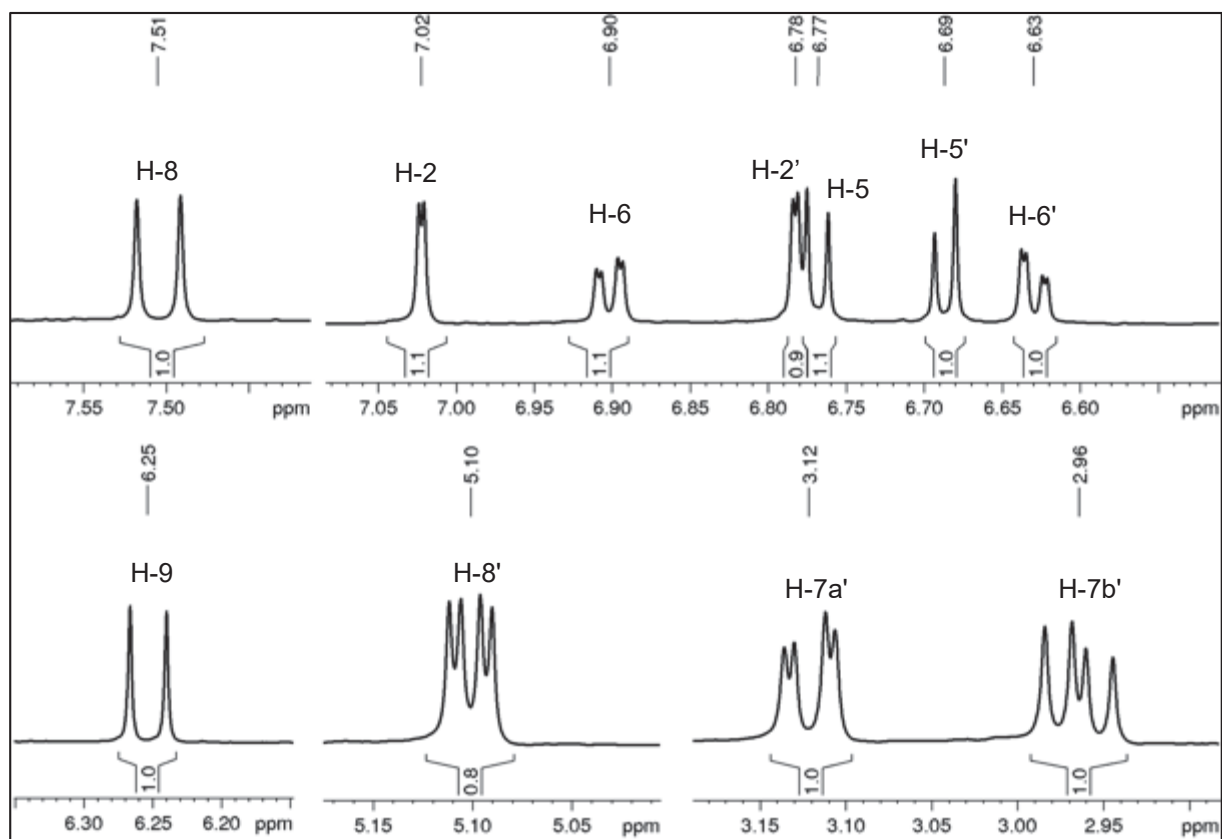
As substâncias fenólicas são encontradas com muita frequência em espécies de *Salvia*. No presente estudo com as espécies *Salvia lachnostachys* e *Salvia melissiflora* foi isolada uma substância fenólica derivada do ácido cafeico (**SV20**), sendo o constituinte majoritário nas frações de maior polaridade (**LFD**, **LFE** e **MSB**) do extrato etanólico das duas espécies. A seguir será discutida a identificação da substância **SV20**.

1.6.6.1 Identificação de **SV20**

FIGURA 157 – ESTRUTURA QUÍMICA DE **SV20**



A substância **SV20** (FIGURA 157) foi isolada como um sólido branco. Observando o seu RMN de ^1H (FIGURA 158 e 159) foi possível identificar sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos, os quais estavam distribuídos em dois sistemas de spins, o que indica a presença de dois anéis aromáticos (A e B). Para o anel A foram atribuídos três sinais, um duplete em δ_{H} 6,77 (1H, $J = 8,3$ Hz, H-5), um duplo-duplete em δ_{H} 6,90 (1H, $J = 8,3$ e $2,0$ Hz, H-6) e um duplete em δ_{H} 7,02 (1H, $J = 2,0$ Hz, H-2). Essa multiplicidade é típica de padrões de acoplamento *orto*, *orto/meta* e *meta*, respectivamente. Para o segundo sistema de spins (anel B) foram observados os mesmos padrões de acoplamento nos sinais em δ_{H} 6,69 (1H, d , $J = 8,2$ Hz, H-5'), δ_{H} 6,63 (1H, dd , $J = 8,2$ e $2,1$ Hz, H-6') e δ_{H} 6,78 (1H, d , $J = 2,1$, H-2'). Portanto, os dados indicam que **SV20** tem dois anéis aromáticos 1,2,4-trissubstituídos.

FIGURA 158 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **SV20** (METANOL- d_4 , 600 MHz)FIGURA 159 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAS DE **SV20**

O espectro de RMN de ^1H ainda revelou, na mesma região de hidrogênios olefínicos e/ou aromáticos, dois dupletos com a mesma constante de acoplamento, integrando para um hidrogênio cada, em δ_{H} 7,50 e 6,25 ($J = 15,9$ Hz, H-8 e H-7), característico de hidrogênios de uma ligação dupla em configuração *E*. Também foram observados na região de hidrogênios metilênicos dois duplo-dupletos em δ_{H} 3,12 (1H, $J = 14,4$ e 3,5 Hz, H-7a') e em δ_{H} 2,96 (1H, $J = 14,4$ e 9,5 Hz, H-7b'). As constantes de acoplamento e as multiplicidades indicam que ambos os sinais se referem a hidrogênios metilênicos não equivalentes, que estão vizinhos a um centro estereogênico, representado por um hidrogênio oximetínico, o qual foi observado como um duplo-duplete em δ_{H} 5,10 (1H, $J = 9,5$ e 3,5 Hz, H-8').

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 160) apresentou o total de 18 sinais. Destes, 14 foram atribuídos a carbonos sp^2 : quatro oxigenados em δ_{C} 149,6 (C-3), 146,9 (C-4), 141,1 (C-3') e 145,0 (C-4'); dois quaternários em δ_{C} 131,1 (C-1') e 128,0 (C-1); os oito restantes eram carbonos hidrogenados, visto a presença de correlação direta (HSQC, FIGURA 161). Também foram observados sinais de dois grupos carbonila em δ_{C} 169,4 (C-9) e 178,8 (C-9'), sugerindo a presença de grupos éster e carboxila, respectivamente. Além destes, foram observados os sinais de um carbono metilênico em δ_{C} 38,6 (C-7') e de um carbono oximetínico em δ_{C} 77,5 (C-8').

FIGURA 160 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE **SV20** (METANOL- d_4 , 150 MHz)

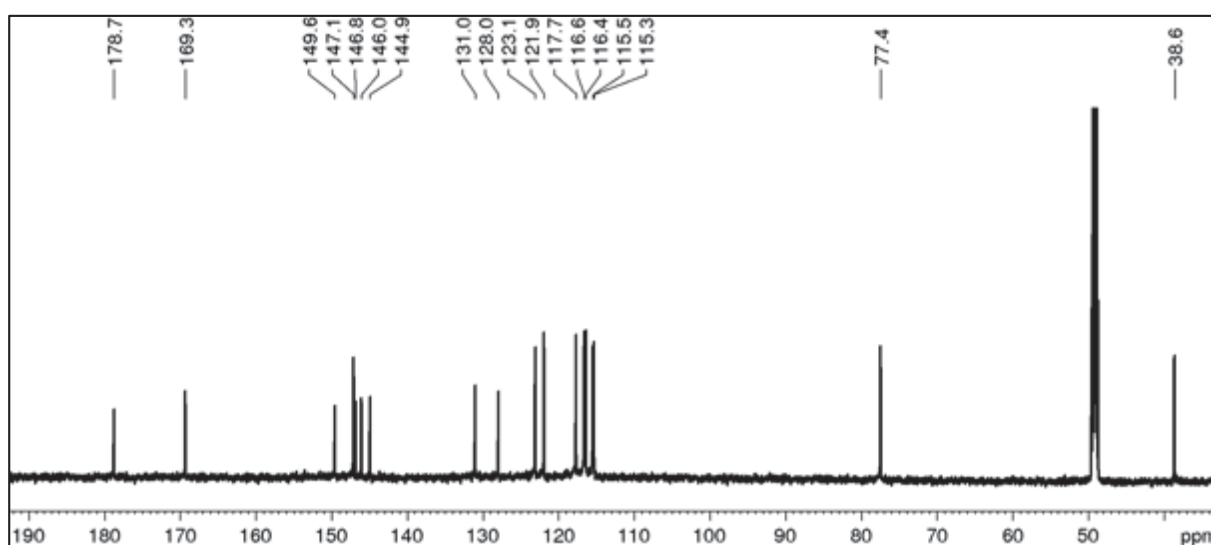
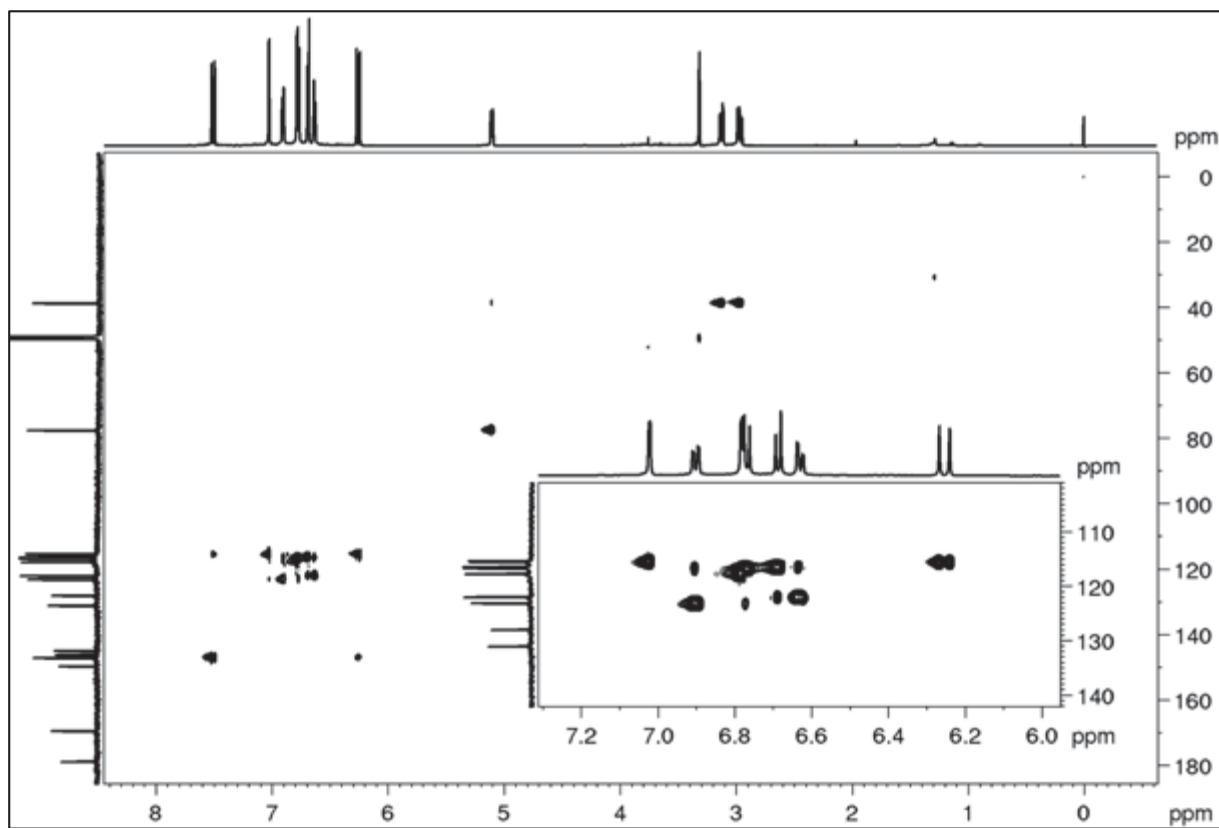
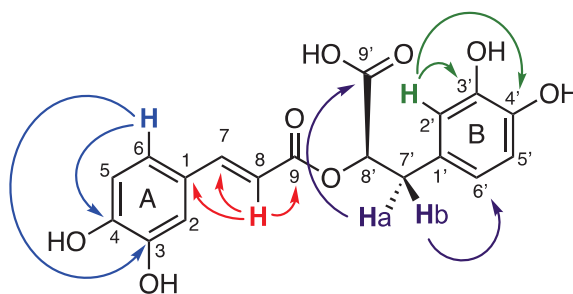
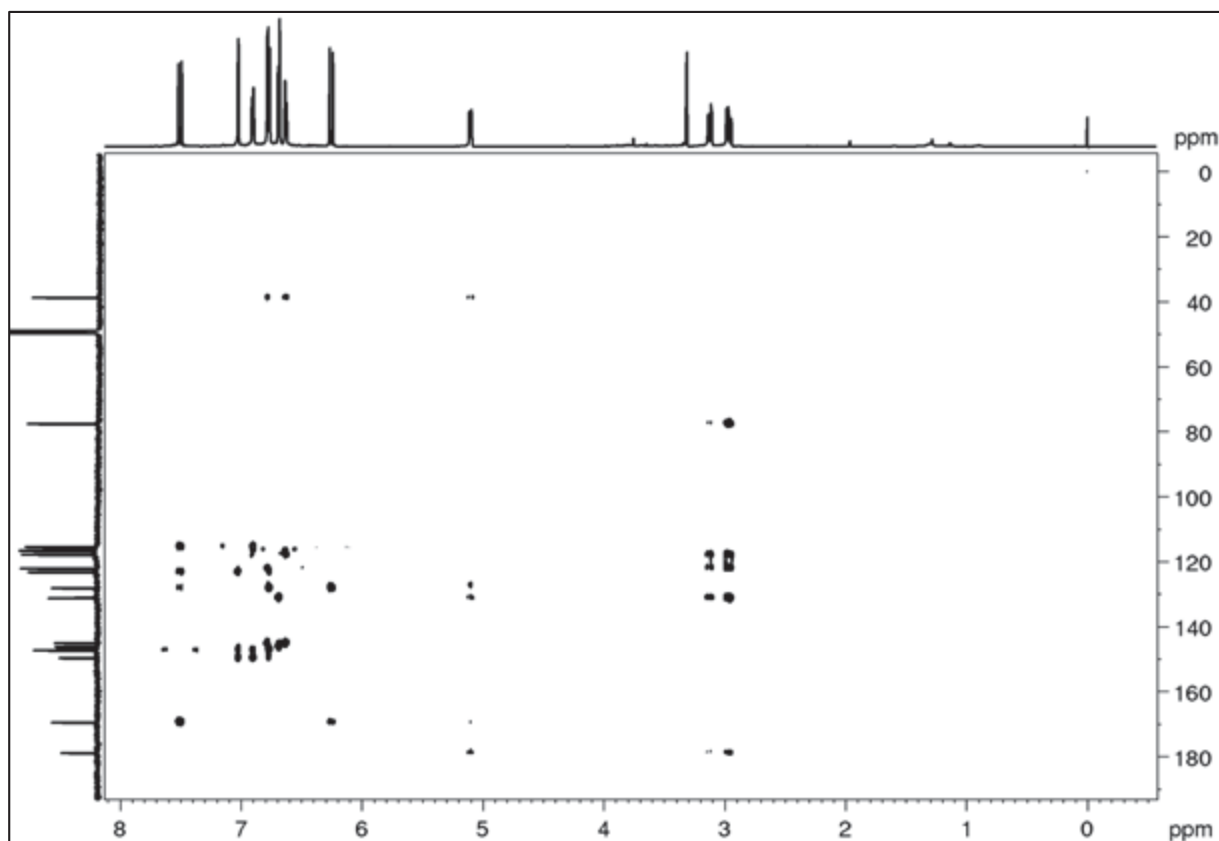


FIGURA 161 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **SV20** (METANOL- d_4 , 600 MHz)



Nas correlações a longa distância (HMBC, FIGURA 163), observou-se a correlação do sinal em δ_{H} 7,50 (H-8) com os carbonos do anel aromático em δ_{C} 128,0 (C-1), da ligação dupla em δ_{C} 146,1 (C-7), e com a carbonila do grupo éster em δ_{C} 169,4 (C-9). Diante disso, pode-se afirmar que a ligação dupla está entre um anel aromático e o grupo éster. O hidrogênio do anel aromático em δ_{H} 6,90 (H-6) correlacionou com dois carbonos oxigenados em C-3 e C-4, o que sugere a presença de grupos hidroxila nestas posições (anel A). Correlações similares foram observadas para o anel B. Por outro lado, os hidrogênios geminais não equivalentes em δ_{H} 3,12 (H-7' α) e 2,96 (H-7' β) apresentaram correlações com δ_{C} 131,1 (C-1'), 117,7 (C-2'), 122,0 (C-6') e 178,8 (C-9), confirmando a posição do grupo metilênico, vizinho ao anel B e ao grupo carboxila (C-9). O hidrogênio oximetínico em δ_{H} 5,10 (H-8') correlacionou com C-1' e δ_{C} 38,6 (C-7'), C-9 e C-9', confirmando sua posição entre os grupos éster e carboxílico (FIGURA 162).

FIGURA 162 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **SV20**FIGURA 163 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **SV20**
(METANOL- d_4 , 600 MHz)

Estes dados e as demais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 33) permitiram identificar **SV20** como o ácido rosmarínico (FIGURA 157, p. 2015), uma substância comum em *Salvia* (PETERSEN, 2013). Os dados obtidos estão de acordo com a literatura (KUHN, et al., 1994), incluindo o valor de rotação específica, que foi determinado como + 22,7, muito próximo ao valor tabelado para o enantiômero puro (+ 22,9) (SUWANCHAIKASEM et al., 2014).

TABELA 33 – DADOS DE RMN DE **SV20** (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO PARA O ÁCIDO ROSMARINÍCO (METANOL- d_4 , 600 MHz, KUHNT et al., 1994)

Posição	SV20			Ácido rosmariníco	
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
1	128,0	-	-	127,9	-
2	115,5	7,02 <i>d</i> (2,0)	2,3,4,5	115,6	7,03 <i>d</i> (2,3)
3	149,6	-	-	149,4	-
4	146,8	-	-	146,7	-
5	116,6	6,77 <i>d</i> (8,3)	1,4,6	116,5	6,79 <i>d</i> (8,3)
6	123,1	6,90 <i>dd</i> (8,3, 2,0)	3,4,6	122,9	6,92 <i>dd</i> (8,3, 2,3)
7	147,1	6,25 <i>d</i> (15,9)	1,8,9	146,7	6,25 <i>d</i> (15,8)
8	115,3	7,50 <i>d</i> (15,9)	1,7,9	115,6	7,50 <i>d</i> (15,8)
9	169,3	-	-	169,1	-
1'	131,0	-	-	131,1	-
2'	117,7	6,78 <i>d</i> (2,1)	3',4',6',7'	117,5	6,77 <i>d</i> (2,3)
3'	146,0	-	-	145,9	-
4'	144,9	-	-	144,8	-
5'	116,4	6,69 <i>d</i> (8,2)	1',4'	116,2	6,67 <i>d</i> (8,3)
6'	121,9	6,63 <i>dd</i> (8,2, 2,1)	2',4',7'	121,8	6,62 <i>dd</i> (8,2, 2,3)
7'	38,6	3,12 <i>dd</i> (14,4, 3,5)	1',2',6',8',9	38,8	3,10 <i>dd</i> (14,3, 3,0)
		2,96 <i>dd</i> (14,4, 9,5)	1',2',6',8',9		2,93 <i>dd</i> (14,3, 9,8)
8'	77,4	5,10 <i>dd</i> (9,5, 3,5)	1',7',9'	77,6	5,09 <i>dd</i> (9,8, 3,0)
9'	178,7	-	-	177,9	-

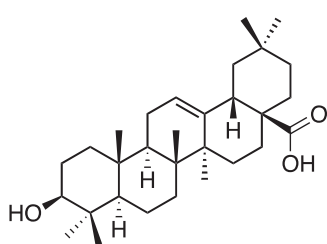
1.6.7 Ensaios de atividade antioxidante

Os ensaios *in vitro* avaliaram a capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* (**LF**) bem como das frações **LFA-LFE** obtidas por CLV e de algumas substâncias puras. Foram avaliados também os extratos **MSD** e **MSE** das partes aéreas de *Salvia melissiflora*. No ensaio ORAC-FL é considerado que valores acima de 800 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ indicam atividade antioxidante.

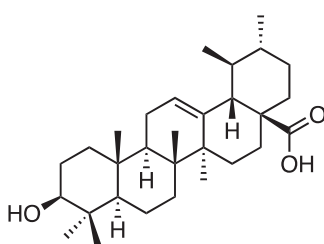
O extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* (**LF**) mostrou elevada atividade antioxidante (2.991,7 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), visto que apresentou valor muito superior a 800 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$. A atividade das frações foi variável. A fração mais ativa foi a **LFD** (2.861,0 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), seguida de **LFB** (2.821,5 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$), e **LFE** (2.422,0 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Pode-se supor que os constituintes dessas frações são os principais responsáveis pela atividade detectada no extrato bruto (TABELA 34).

Nas frações **LFD** e **LFE** o estudo fitoquímico revelou que o constituinte majoritário era o ácido rosmarínico (**SV20**), uma substância bem conhecida pela sua alta atividade antioxidante (SUWANCHAIKASEM et al., 2014). A fração **LFB** já havia sido investigada no estudo anterior (OLIVEIRA, 2017). O estudo fitoquímico com essa fração revelou conter principalmente os ácidos oleanólico (**SV15**) e ursólico (**SV18**), que também têm comprovada ação antioxidante (FIGURA 164) (YIN; CHAN, 2007).

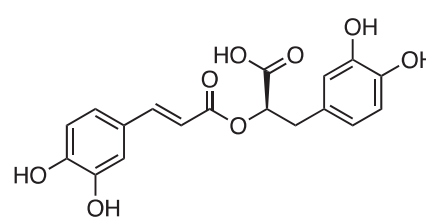
FIGURA 164 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **SV15**, **SV18** E **SV20**



SV15 (ácido oleanólico)



SV18 (ácido ursólico)



SV20 (ácido rosmarínico)

A fração **LFC** mostrou uma atividade antioxidante bem inferior às frações anteriores (1150,9 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) e a fração **LFA** foi considerada inativa (289,9 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$). Em **LFA** foram encontrados apenas diterpenos, enquanto **LFC** contém diterpenos e os ácidos oleanólico e ácido ursólico. A presença desses ácidos triterpênicos e de

diterpenos com hidroxilas fenólicas pode explicar a maior atividade da fração **LFC** em comparação com **LFA** (TABELA 34).

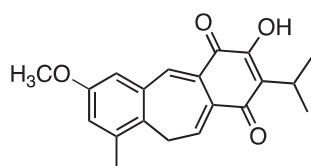
TABELA 34 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) *in vitro* DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *S. lachnostachys*

Amostras	ORAC-FL ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \pm$ desvio padrão)
LF	2.911 $\pm$ 30
LFA	289,9 $\pm$ 9,3
LFB	2.821 $\pm$ 165
LFC	1.150,9 $\pm$ 17,6
LFD	2.861 $\pm$ 26
LFE	2.422 $\pm$ 39

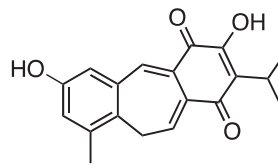
Dados apresentados com média do ensaio ORAC-FL em triplicata. Os resultados são expressos em micromols de Trolox equivalente por grama de amostra seca ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$). **LF** = extrato etanólico. Frações do extrato etanólico: **LFA** = hexano; **LFB** = hexano:CH₂Cl₂; **LFC** = CH₂Cl₂; **LFD** = Me₂CO; **LFE** = MeOH.

Para avaliar a contribuição para a atividade antioxidante dos diterpenos presentes nestas frações, dois diterpenos isolados de **LFA**, fruticulina A (**SV1**), e fruticulina B (**SV8**) e dois da fração **LFC**, demetilfruticulina A (**SV2**) e demetilfruticulina B (**SV9**) foram também avaliados (FIGURA 165).

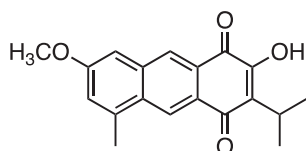
FIGURA 165 – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS AVALIADAS NOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL)



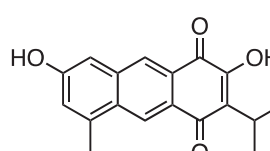
SV1 (fruticulina A)



SV2 (demetilfruticulina A)



SV8 (fruticulina B)



SV9 (demetilfruticulina B)

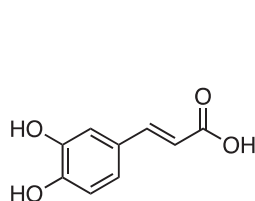
Todas as substâncias puras apresentaram atividade antioxidante, uma vez que os valores de ORAC-FL foram superiores a 1,0 Trolox equivalente relativo (TE relativo) (TABELA 35).

TABELA 35 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) *in vitro* DE DITERPENOS ISOLADOS DE *S. lachnostachys*

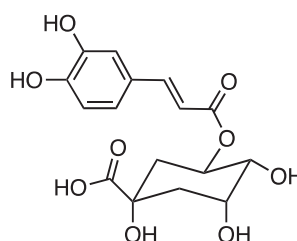
Amostras	ORAC-FL (TE relativo $\pm$ desvio-padrão)
SV1 (fruticulina A)	1,20 $\pm$ 0,04
SV2 (demetilfruticulina A)	1,57 $\pm$ 0,04
SV8 (fruticulina B)	1,80 $\pm$ 0,04
SV9 (demetilfruticulina B)	2,42 $\pm$ 0,02
Quercetina*	5,60 $\pm$ 0,08
Isoquercitrina*	5,15 $\pm$ 0,09
Ácido caféico*	2,85 $\pm$ 0,03
Ácido clorogênico*	2,65 $\pm$ 0,03

Dados apresentados com média do ensaio ORAC-FL em triplicata, acompanhada do desvio-padrão. Os resultados são expressos em trolox equivalente relativo por se tratar de substâncias puras. * controles positivos.

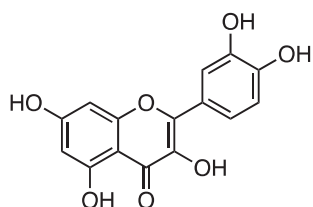
FIGURA 166 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS CONTROLES POSITIVOS UTILIZADOS NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL)



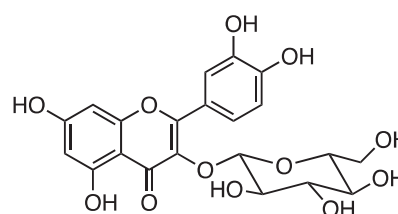
ácido caféico



ácido clorogênico



quercetina



isoquercitrina

Em geral, a atividade antioxidante está relacionada com o número e a posição dos grupos hidroxila. Outros fatores, como tipo de grupo substituinte, presença de ligação intramolecular de hidrogênio, condições estéricas e extensão do número de conjugações também afetam a atividade antioxidante (GULCIN, 2020). Os diterpenos abietanos com esqueleto icetexano, como é o caso das substâncias **SV1** e **SV2** revelaram atividade antioxidante crescente com o número de grupos hidroxila presentes. A fruticulina A (**SV1**) com um grupo hidroxila foi a que mostrou a menor atividade antioxidante (1,20 TE relativo) (TABELA 35). A atividade aumentou na demetilfruticulina A (**SV2**) que contém dois grupos hidroxila (1,57 TE relativo). Além

do número de hidroxilas fenólicas, o tipo de esqueleto carbônico também influencia. Isso pode ser visto nas substâncias fruticulina B (**SV8**) e demetilfruticulina B (**SV9**), com esqueletos do tipo antraceno. Entre as duas, a menor atividade foi de **SV8** (1,80 TE relativo), que mesmo possuindo apenas um grupo hidroxila foi mais ativa do que **SV2** que apresenta dois grupos hidroxila em sua estrutura. A atividade de **SV9** (2,42 TE relativo) foi, como esperado, ainda maior, aproximando-se daquela do padrão ácido clorogênico (TABELA 35).

A ausência de atividade na fração **LFA**, que continha **SV1** e **SV8**, pode ser explicada pelo fato de que esses diterpenos estavam acompanhados de grande quantidade de substâncias alifáticas de cadeia longa (graxa), que não apresentam atividade antioxidante.

Para a espécie *Salvia melissiflora* foram testados os extratos em CH₂Cl₂ (**MSD**) e EtOH (**MSE**). O extrato em hexano não foi avaliado porque o seu espectro de RMN de ¹H mostrou sinais somente de substâncias alifáticas de cadeia longa. Dentre os dois extratos testados, apenas **MSE** foi ativo (2.845,2 µmol TE g⁻¹), e sua atividade foi similar àquela do extrato etanólico de *Salvia lachnostachys* (TABELA 36). Este resultado está coerente com a presença do ácido rosmarínico (**SV20**) como constituinte majoritário nas duas espécies. A ausência de atividade do extrato em diclorometano é justificada pela predominância neste extrato de substâncias alifáticas de cadeia longa e diterpenos sem hidroxilas fenólicas.

TABELA 36 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (ORAC-FL) *in vitro* DOS EXTRATOS DE *S. melissiflora*

Amostras	ORAC-FL (µmol TE g ⁻¹ ± desvio padrão)
MSD	202,6 (38,10) ^a
MSE	2.845,2 (2,70) ^a

Dados apresentados com média do ensaio ORAC-FL em triplicata. Extratos de *S. melissiflora*: **MSD** = CH₂Cl₂; **MSE** = EtOH.

1.6.8 Ensaios de atividade citotóxica

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos de *S. melissiflora* foi avaliada utilizando as linhagens de células tumorais PC-3 (próstata) e MCF-7 (mama), além de linhagem de células não tumorais 3T3 (fibroblastos), utilizadas como controle. A atividade foi expressa em termos de concentração necessária para inibir 50% o crescimento celular (CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foram utilizados para os ensaios os extratos diclorometânico (**MSD**) e etanólico (**MSE**). Nesse ensaio, é considerado ativo o extrato que apresenta $CI_{50} \leq 50$ $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dois extratos testados mostraram $CI_{50} > 250$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, portanto, foram considerados inativos (TABELA 37).

TABELA 37 – ATIVIDADE CITOTÓXICA *in vitro* DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS DE *S. MELISSIFLORA* CONTRA LINHAGENS DE CELULAS TUMORAIS HUMANAS (CI_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	PC3	MCF-7	3T3
MSD	< 250	< 250	< 250
MSE	< 250	< 250	< 250
Doxorrubicina	$0,20 \pm 0,01$	$4,03 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,14$

3T3 - linhagem controle de fibroblastos, célula não tumoral; **PC-3** - linhagem de células de câncer de próstata humano metastático andrógeno-independente; **SKMEL 103** - linhagem de células de melanoma humano metastático; **Doxorrubicina** - controle positivo.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA ESPÉCIE *Myrcia selloi*

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae, pertencente às angiospermas, compreendendo 142 gêneros e cerca de 6.000 espécies, ocupando a terceira posição como a família arbórea com maior riqueza de espécies. As espécies desta família ocorrem predominantemente no hemisfério Sul (SANTOS et al., 2020; PROENÇA et al., 2021). No Brasil, a família está representada por 29 gêneros e 1193 espécies, das quais 784 espécies são endêmicas do Brasil. Podem variar de arbustos, subarbustos ou árvores. Suas espécies podem ser encontradas em todas as regiões, com predominância na região Sudeste do país (PROENÇA et al., 2021).

Grande parte das representantes desta família apresenta frutos carnosos, sendo que por isso muitas de suas espécies são utilizadas para o consumo. Destaca-se a jabuticaba (*Plinia cauliflora*), encontrada com frequência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Outra espécie também muito apreciada é a goiaba (*Psidium guajava*), cultivada e consumida em todo o território brasileiro que, consequentemente agrega um potencial econômico (PROENÇA et al., 2021). Além disso, a família é reconhecida por suas árvores aromáticas, devido a presença de óleos essenciais. Assim, muitas espécies possuem importância econômica, como por exemplo, as espécies do gênero *Eucalyptus*, utilizadas para inúmeros fins, incluindo as indústrias de perfumes, pesticidas naturais e antissépticos. O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é também muito conhecido e cultivado em todo o mundo por suas propriedades antissépticas (SOUZA; LORENZI, 2012; PROENÇA et al., 2021).

As mirtáceas são importantes fontes de óleos essenciais. Geralmente os sesquiterpenos são encontrados com frequência em seus óleos voláteis. Já as substâncias não voláteis, geralmente são substâncias fenólicas, principalmente flavonoides (glicosilados ou não), taninos, ácidos orgânicos, e acetofenonas. Triterpenoides também são encontrados com frequência em alguns gêneros (CASCAES et al., 2015).

Frequentemente espécies da família Myrtaceae são utilizadas na medicina popular para diversos tipos de enfermidades, como diarreia, inflamações, tratamento

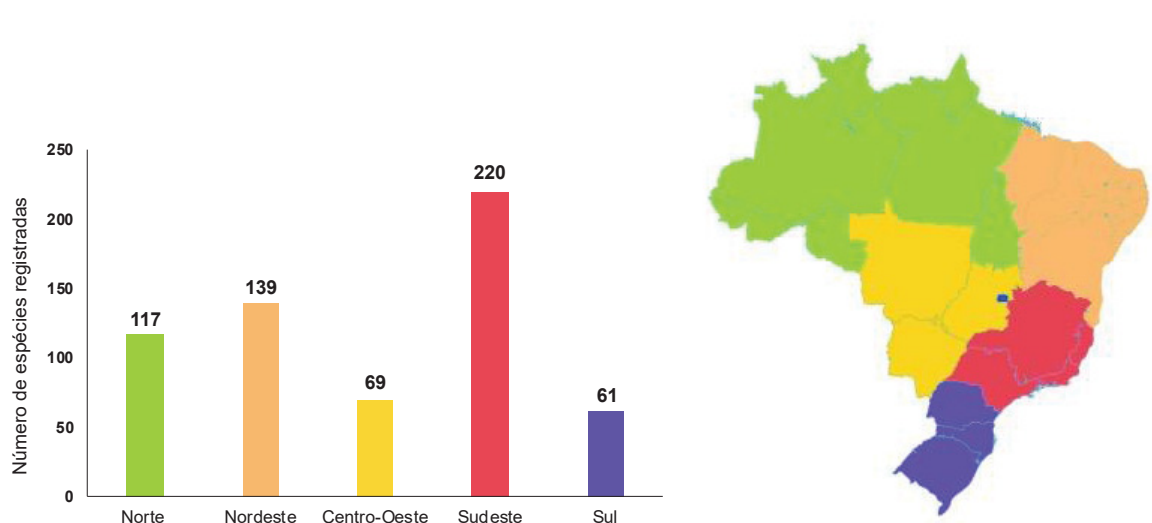
de úlceras crônicas, hemorragia, cistite e febre (CRUZ; KAPLAN, 2004; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Devido a isto, óleos voláteis de várias espécies foram avaliados em diversas atividades biológicas, tendo apresentado principalmente atividades antifúngica e antibacteriana. Devido a presença marcante de substâncias fenólicas, espécies da família são reconhecidas por apresentarem elevada atividade antioxidante, além de atividade anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, citotóxica, anti-tumoral, antilarval, antinociceptiva, antifúngica, laxativa, gastroprotetiva e antidepressiva (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011; DEXHEIMER; POZZOBON, 2017).

2.1.2 O gênero *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, ocupando o quarto lugar em número de espécies. Compreende cerca de 800 espécies, as quais são encontradas em regiões neotropicais (WCSP, 2021). Suas espécies possuem maior diversidade na região do Cerrado, Mata Atlântica brasileira, Amazônia e Caribe (LUCAS et al., 2018). No Brasil já foram confirmadas 397 espécies, sendo que destas, 309 espécies são endêmicas. O maior centro de diversidade do gênero no Brasil está na região Sudeste com 220 espécies registradas (FIGURA 167). No estado do Paraná o gênero está representado por 59 espécies (SANTOS et al., 2021).

FIGURA 167 – REGIÕES DO BRASIL COM OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Myrcia*



FONTE: adaptado de SANTOS et al., 2021.

Morfologicamente, as espécies do gênero *Myrcia* variam de árvores, arbustos e subarbustos, com folhas inteiras, com disposição alternada ou oposta, raramente opostas cruzadas. Seus ramos são opostos e decussados (em forma de cruz). Suas flores, geralmente brancas, se dispõem em grupos de três em três, com simetria radial. Os frutos são geralmente globulosos apresentando apenas uma semente (SANTOS, 2021; LANNOY et al., 2021).

Na medicina popular as espécies do gênero são utilizadas principalmente como hipoglicemiantes, destacando-se as espécies conhecidas popularmente como “pedra-ume-caá”, ou também insulina, terminologia que conglomerava as espécies *Myrcia amazonica*, *M. citrifolia*, *M. guianensis*, *M. multiflora*, *M. salicifolia*, *M. speciosa* e *M. sylvatica* (LOPES, 2015).

A espécie *Myrcia multiflora* (FIGURA 168) merece um destaque especial devido a sua ampla distribuição no território brasileiro. Essa planta ocorre desde o norte do Rio Grande do Sul até a região norte do país. Além da utilização na medicina popular como hipoglicemiante (“pedra-ume-caá”), também é utilizada para o estancamento de hemorragias, auxilia no tratamento de diarreia, aftas e enterite. Comumente as folhas e cascas são utilizadas, por meio de infusão, para esses fins (MATSUDA et al., 2002). Os principais estudos farmacológicos dessa espécie estão direcionados aos efeitos no tratamento de diabetes, uma vez que seu extrato metanólico apresentou efeito anti-hiperglicêmico em ratos diabéticos (OLIVEIRA et al., 2021).

FIGURA 168 – IMAGENS DA ESPÉCIE *Myrcia multiflora* COM DETALHES DOS FRUTOS (A), FLORES (B) E FOLHAS



FONTE: OLIVEIRA et al., 2021.

Apesar do grande número de espécies já registradas, poucas têm estudos do ponto de vista químico e farmacológico. Entretanto, as poucas espécies do gênero que foram avaliadas apresentaram atividades biológicas como: atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, hipoglicêmica e anti-hemorrágica. Em relação à composição química, muitas espécies são reconhecidas por serem ricas em óleos voláteis, uma característica marcante do gênero. Devido a isto, os principais estudos químicos estão relacionados à investigação da composição química desses óleos voláteis, bem como das atividades biológicas. Já os extratos oferecem majoritariamente substâncias fenólicas, as quais podem estar acompanhadas de uma pequena porção de triterpenos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011; FRANCO et al., 2021).

2.1.3 Metabolismo especializado do gênero *Myrcia*

Embora o gênero *Myrcia* esteja representado por um grande número de espécies, são poucos os estudos relacionados aos constituintes químicos fixos presentes em seus extratos. A maioria dos estudos encontrados na literatura está relacionada com os constituintes voláteis presentes nas folhas e frutos, os quais são constituídos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Os constituintes fixos do gênero são corriqueiramente triterpenos e substâncias fenólicas das mais variadas classes, como em outros gêneros da família. Entretanto, em *Myrcia* predominam os flavonoides, os quais podem apresentar uma ou mais unidade de açúcar (glicosídeos), juntamente com ácidos orgânicos e taninos (CASCAES et al., 2015). A seguir serão descritas as principais substâncias encontradas no gênero, bem como algumas de suas principais atividades biológicas.

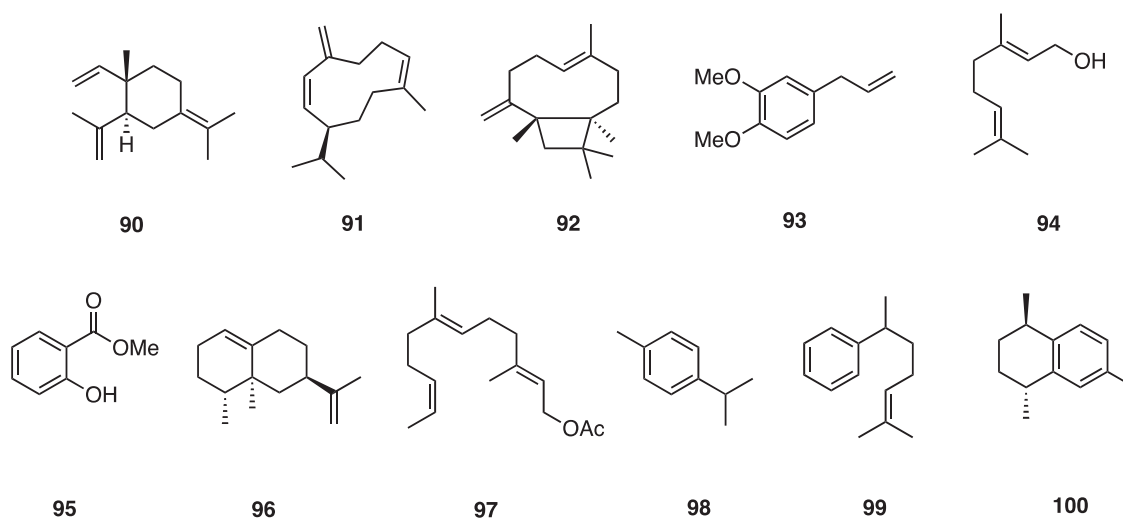
2.1.3.1 Monoterpenos e sesquiterpenos

Espécies do gênero são amplamente reconhecidas por seus óleos voláteis que são uma mistura de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (FILHO et al., 2020). De acordo com estudos já realizados foi comprovado que a maioria das espécies do gênero apresenta em sua composição sesquiterpenos como constituintes majoritários (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A espécie *Myrcia tomentosa*, conhecida popularmente como goiaba-brava, é amplamente conhecida e nativa do Brasil. Um estudo recente com o óleo essencial de suas partes aéreas revelou uma grande concentração de sesquiterpenos, sendo os majoritários: γ -elemeno (**90**, 12,52 %), germacreno D (**91**, 11,45 %) e *E*-cariofileno (**92**, 10,22 %) (FIGURA 169). O estudo ainda revelou atividade antioxidante, pelo método do DPPH, apresentando porcentagem de inibição relativamente elevada (213,1 %) (FRANCO et al., 2021). Além disso, outros estudos relataram que *M. tomentosa* apresenta atividade fitotóxica, antibacteriana e antifúngica (INAMOTINI et al., 2013; SA et al., 2017).

Outra espécie encontrada no Brasil que pode ser destacada é a *Myrcia guianensis* (sin. *Myrcia obtecta*) conhecida popularmente como pedra-ume-caá, no norte do país, e como guamirim-branco ou cambuí na região Sul. Um estudo com plantas do Cerrado, região de Goiás, revelou em sua composição dos óleos essenciais das flores e frutos um total de 38 e 19 substâncias voláteis, respectivamente. Os voláteis majoritários foram o metil-eugenol (**93**, 20,27 %), geraniol (**94**, 7,00 %) e salicilato de metila (**95**, 5,19 %), para as flores. Já para os frutos os majoritários foram valenceno (**96**, 10,63 %), acetato de farnesila (**97**, 10,29 %) e cubenol (**98**, 9,96 %) (FIGURA 169). No mesmo estudo foi verificado que ambos os óleos essenciais apresentam atividade antifúngica (FILHO et al., 2020). Dois outros estudos sobre os voláteis de *M. guianensis* foram realizados. O primeiro, com um exemplar do Rio Grande do Sul, reportou 28 substâncias no óleo essencial das folhas, que era constituído principalmente de sesquiterpenos. O componente majoritário era o ar-curcumeno (**99**) (LIMBERGER et al., 2004). O outro estudo, realizado com uma planta crescendo em Curitiba, descreveu a composição e variação sazonal do óleo essencial das folhas e a composição do óleo essencial das flores. Foram identificados 55 componentes no óleo essencial das folhas, sendo o *trans*-calameneno (**100**) (FIGURA 169) o constituinte principal durante o todo o ano (17,0-29,3%). Por outro lado, o óleo das flores continha um alto teor de salicilato de metila (**95**, 88,2%) (STEFANELLO et al., 2011).

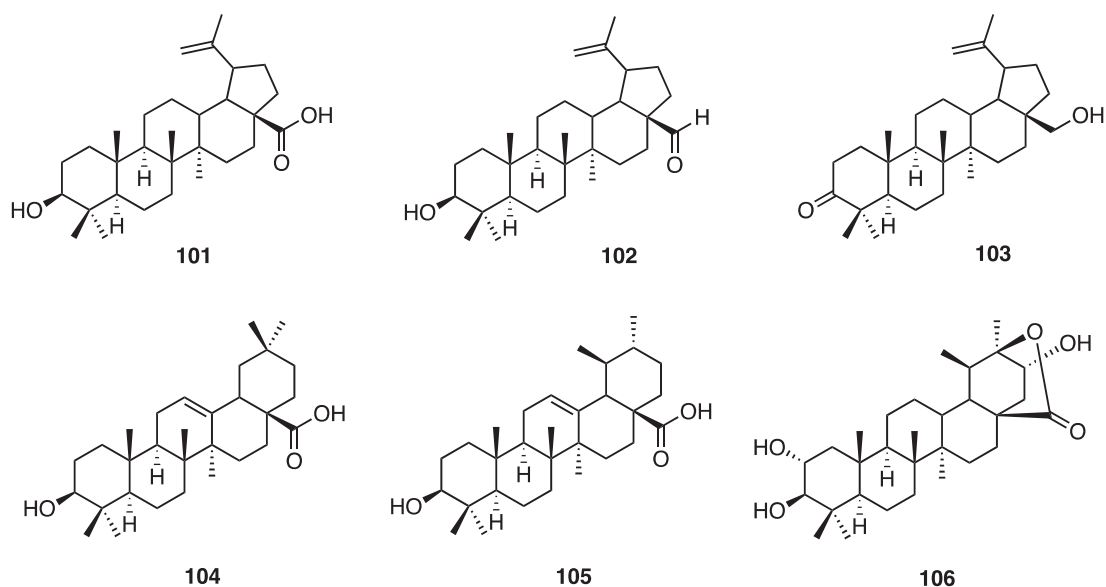
FIGURA 169 – ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE MYRCIA



2.1.3.2 Triterpenos

Os triterpenos são substâncias com 30 átomos de carbono, geralmente apresentando uma estrutura básica pentacíclica. A espécie *M. myrtifolia*, endêmica do cerrado brasileiro, foi submetida a um fracionamento cromatográfico, o qual resultou no isolamento de cinco triterpenos: ácido betulínico (**101**), betulinaldeído (**102**), ácido betulônico (**103**), ácido oleanólico (**104**), ácido ursólico (**105**) e $2\alpha,3\beta,21\alpha$ -tri-hidroxitaxastan-28,20- β -olídeo (**106**) (FIGURA 170) (SILVA, 2012).

FIGURA 170 – TRITERPENOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *M. myrtifolia*



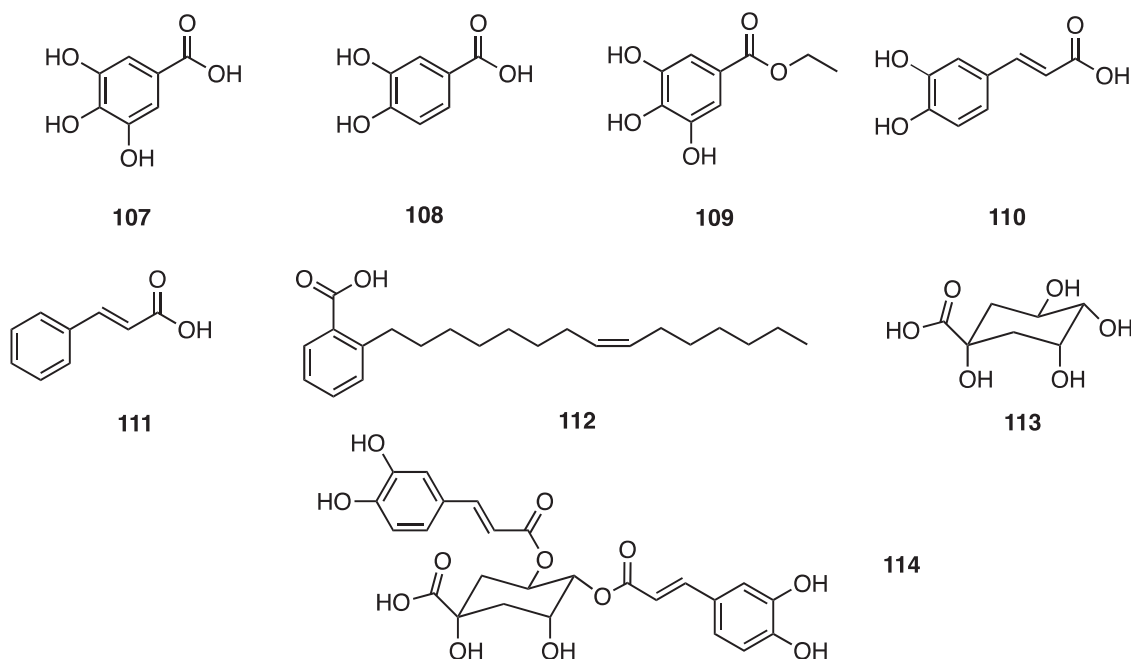
2.1.3.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são aquelas substâncias que possuem um grupo carboxila e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila presentes na estrutura básica. Destacando-se os ácidos fenólicos, estes podem ser classificados em dois grupos. O primeiro compreende as substâncias derivadas do ácido hidroxibenzóico (C6-C1) (FIGURA 171), que são considerados os ácidos mais simples encontrados em espécies vegetais. Já o segundo grupo corresponde aos derivados do ácido cinâmico (C9-C3), sendo o mais comum o ácido cafeico, que pode ser encontrado em diversas plantas na forma livre ou esterificada (DEWICK et al., 2009).

FIGURA 171 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS REPRESENTANTES DOS ÁCIDOS FENÓLICOS



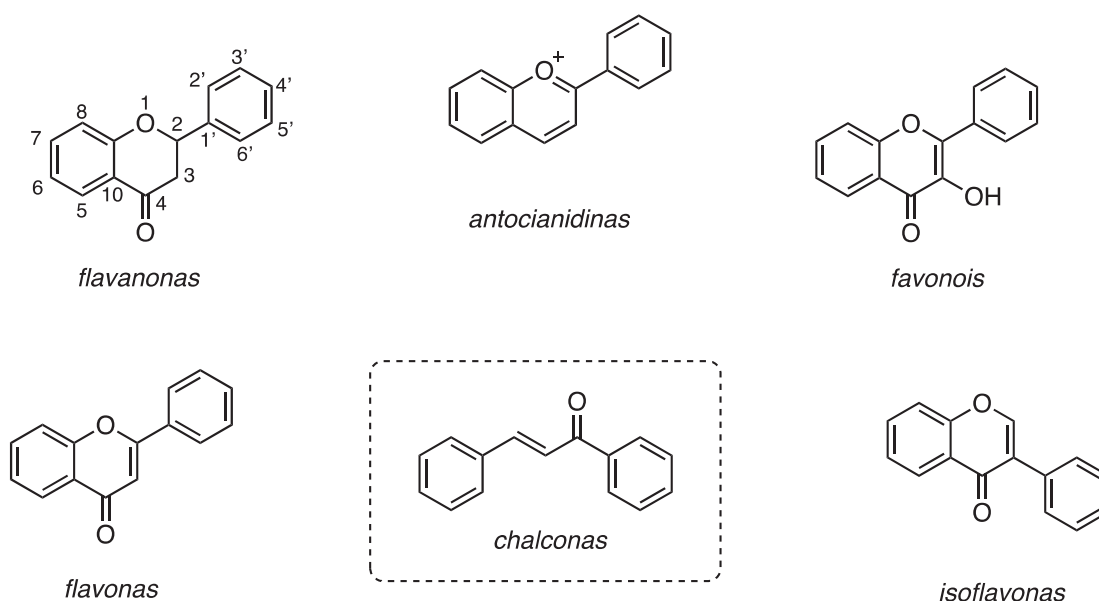
Algumas espécies de *Myrcia* revelaram a presença de ácidos orgânicos. O ácido gálico (**107**) se mostrou presente nas folhas de *M. bela* e *M. guianensis*. Essa última espécie e *M. palustris* também contém o ácido protocatecuico (**108**). Em *M. bella* também foram reportados o galato de etila (**109**), o ácido caféico (**110**) e o ácido quínico (**113**). O ácido cinâmico (**111**) foi isolado das folhas de *M. hiemalis*, enquanto que o ácido ginkgolico (**112**) estava presente em *M. multiflora* (CASCAES et al., 2015). Além destes, foi também identificado nas folhas de *M. rubella* o ácido 4,5-dicafeoilquínico (**114**) (FIGURA 172), o qual mostrou atividade enzimática inibindo a α -glucosidase (LIMA et al., 2018).

FIGURA 172 – PRINCIPAIS ÁCIDOS ORGÂNICOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Myrcia*

2.1.3.4 Flavonoides

A classe dos flavonoides compreende uma vasta quantidade de substâncias polifenólicas de origem vegetal, cuja biossíntese não ocorre na espécie humana (LOPES et al., 2010). A estrutura química básica desta classe de produtos naturais consiste de 15 carbonos no esqueleto principal, distribuídos em dois sistemas de anéis aromáticos (anéis A e B), os quais são conectados por três carbonos formando um esqueleto carbônico básico do tipo C₆-C₃-C₆. Na maioria dos flavonoides os três carbonos intermediários ciclizam, formando um terceiro anel (anel C). São conhecidos milhares de flavonoides, os quais variam entre si quanto ao grau de oxidação e quanto aos substituintes presentes nos anéis. Devido a essa diversidade, os flavonoides são classificados em subgrupos: flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianidinas e chalconas (FIGURA 173) (PIETTA, 2000; PANCHE et al., 2016).

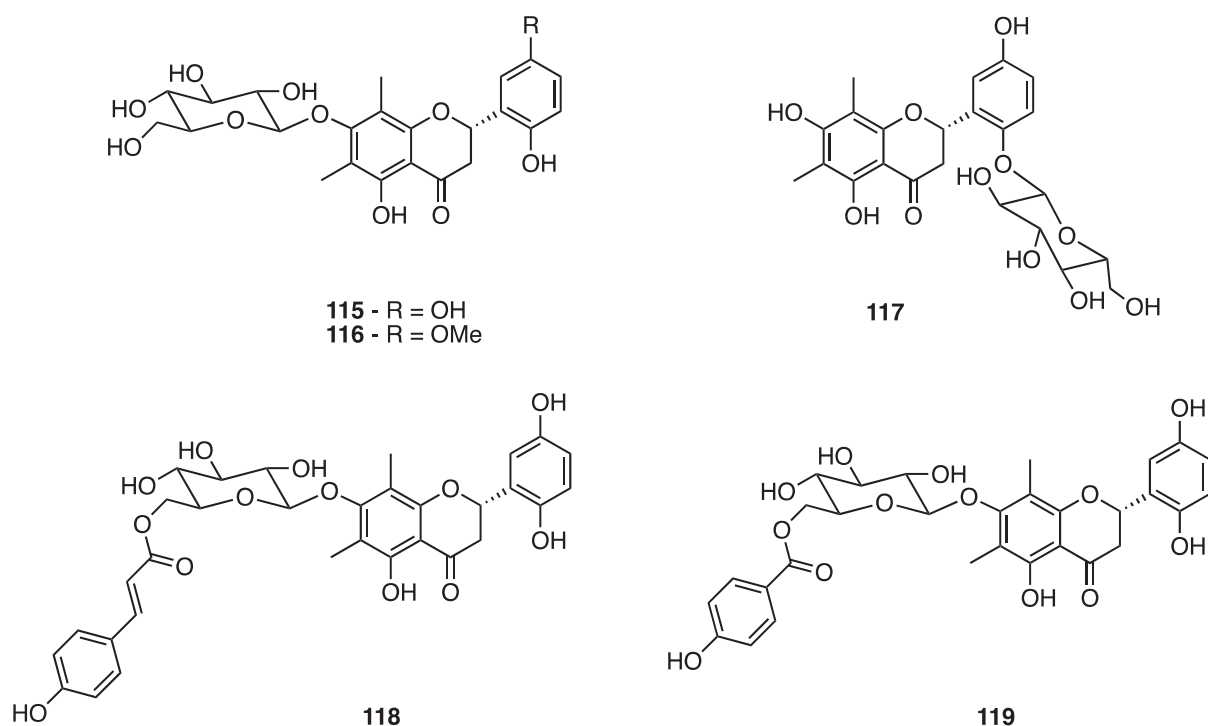
FIGURA 173 – ESTRUTURA DO ESQUELETO BÁSICO DOS FLAVONOIDES E SUAS CLASSES



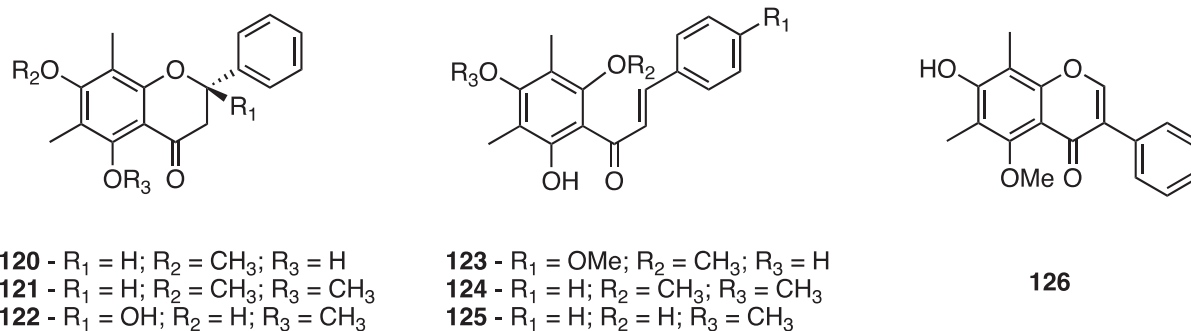
Os flavonóides possuem inúmeras atividades farmacológicas, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antitumoral (PANCHE et al., 2016).

Os flavonoides isolados no gênero *Myrcia* são principalmente da classe das flavanonas e flavonóis, frequentemente glicosilados. As unidades de açúcar são geralmente galactose, glucose, arabinose e ramnose (CASCAES et al., 2015).

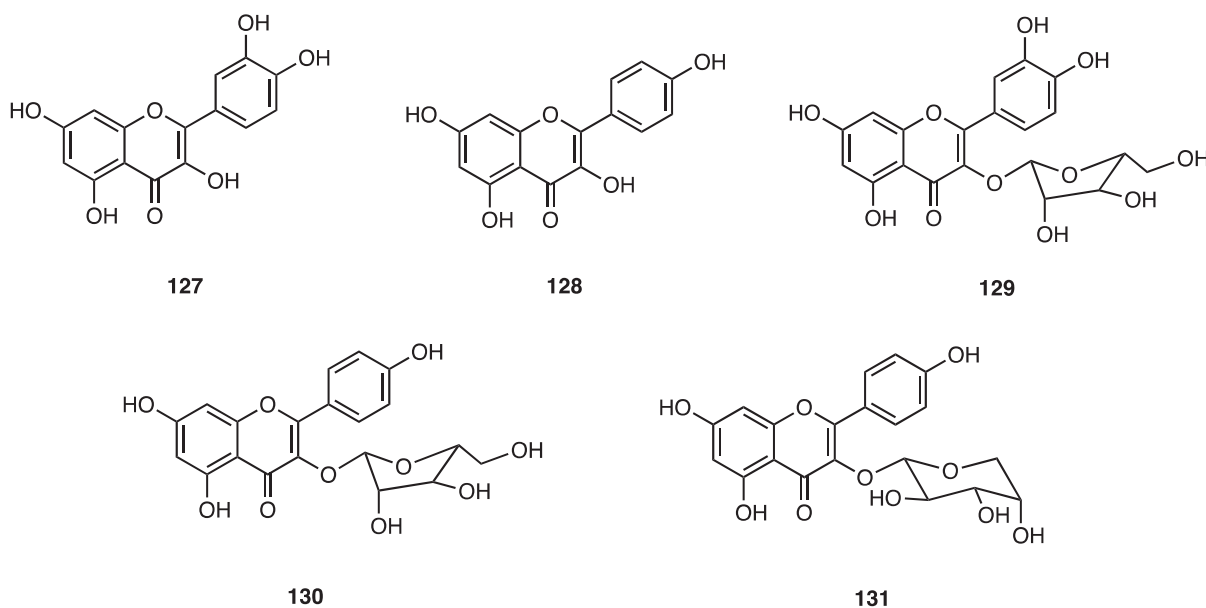
Em um estudo fitoquímico com as folhas de *Myrcia multiflora* foram isolados cinco flavanonas glicosiladas, com uma unidade de β -glucose, que foram denominadas: myrciacitrinas I (**115**), II (**116**), III (**117**), IV (**118**) e V (**119**) (MATSUDA et al., 2002) (FIGURA 174). Os estudos ainda apontaram que todos esses flavonoides apresentaram atividade anti-hipoglicêmica, por meio da atividade inibitória da aldose redutase em roedores. A atividade foi mais elevada com os flavonoides **118** e **119** (JUNG et al., 2006).

FIGURA 174 – FLAVONOIDES GLICOSILADOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *M. multiflora*

Um estudo com *M. guianensis* (sin. *M. hiemalis* e *M. obtecta*) revelou sete flavonoides em seu extrato de maior polaridade. Destes três eram flavanonas, 5-hidroxi-6,8-dimetil-7-metoxiflavanona (**120**), 6,8-dimetil-5,7-dimetoxiflavanona (**121**) e 2,7-diidroxi-6,8-dimetil-5-metoxiflavanona (**122**); três chalconas: 2',4'-diidroxi-3',5'-dimetil-4',6'-dimetoxichalcona (**123**) 2'-hidroxi-3',5'-dimetil-4',6'-dimetoxichalcona (**124**) e 2',6'-dihidroxi-3',5'-dimetil-4'-metoxichalcona (**125**); e uma isoflavona, 7-hidroxi-6,8-dimetil-5-metoxi-isoflavona (**126**) (FIGURA 175). Segundo CASCAES et al. (2015) este foi o primeiro relato de chalconas, metilflavonas e isoflavonas no gênero *Myrcia*. Posteriormente, diversos flavonóis glicosilados foram encontrados nessa espécie que demonstrou atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (SANTOS et al., 2018).

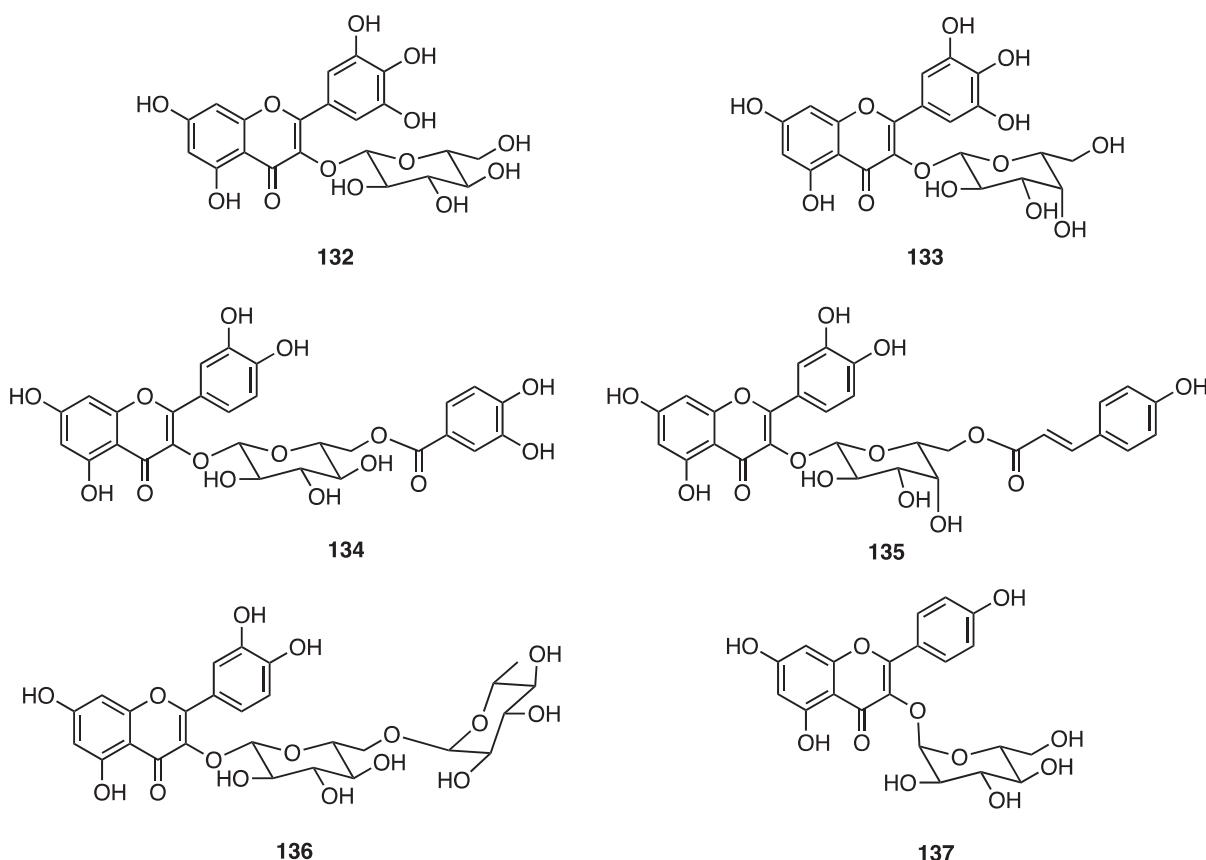
FIGURA 175 – FLAVONOIDES ISOLADOS DA ESPÉCIE *M. guianensis*

O estudo fitoquímico de *Myrcia tomentosa*, resultou no isolamento dos flavonoides quercetina (**127**) e canferol (**128**), além de três flavonoides glicosilados, avicularina (**129**), juglanina (**130**) e guaijaverina (**131**) (FIGURA 176). O mesmo estudo indicou que o extrato etanólico promoveu significativamente a atividade antibacteriana e antifúngica, inibindo o crescimento antimicrobiano. Os flavonoides também foram avaliados; dentre eles o flavonoide avicularina foi o mais ativo (SA et al., 2017). Além disso, os flavonoides que foram isolados nesse trabalho são conhecidos por suas atividades biológicas. Destaca-se, a quercetina (**127**) que é encontrada em abundância em muitas frutas e vegetais, e apresenta efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético, anticarcinogênico, neuroprotetor e antiproliferativo *in vitro* e *in vivo* (ZHANG et al., 2021).

FIGURA 176 – FLAVONOIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DE *M. tomentosa*

Em outro estudo químico mais recente, foi avaliada a composição química do extrato em acetato de etila das folhas de *Myrcia rubella*, por meio de CLAE acoplada a espectrômetros de massas e de ressonância magnética nuclear. O estudo permitiu a identificação de 25 flavonoides, que se diferenciavam principalmente pela posição dos grupos hidroxila e pela unidade de açúcar. Sendo assim, foram selecionados alguns desses flavonoides, a fim de representar as principais diferenças entre os mesmos: miricetina-3-O- β -glucose (**132**), miricetina-3-O- β -galactose (**133**), miricetina-3-O-(6"-[3,4-diidroxibenzoil])- β -glucose (**134**), quercetina-3-O-(6"-((*E*)-p-cumaroil))- β -gactose (**135**), quercetina-3-O-(α -ramnose-(1"-6"))- β -glucose (**136**) e canferol-3-O- α -ramnose (**137**) (FIGURA 177) (LIMA et al., 2018).

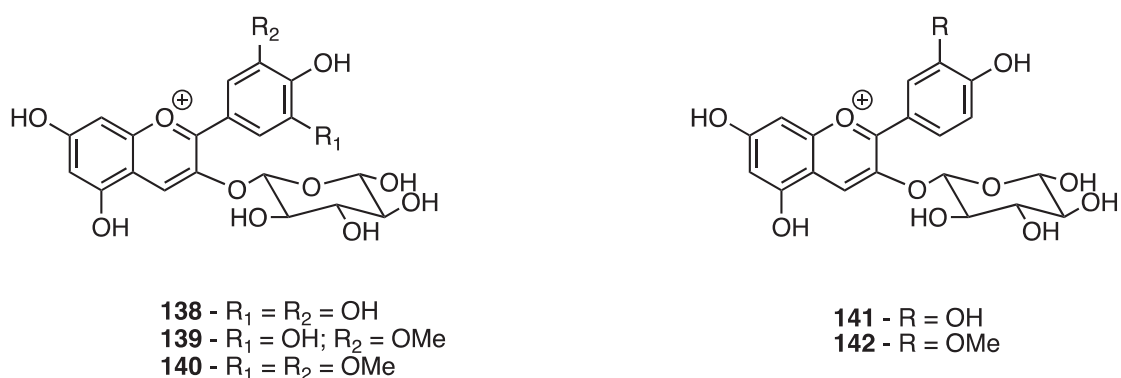
FIGURA 177 – ALGUNS FLAVONOIDES IDENTIFICADOS EM *M. rubella*



Recentemente, foi realizado um estudo fitoquímico com os frutos de *M. eriopus* (espécie nativa e endêmica do Brasil), o qual proporcionou o isolamento e identificação de cinco antocianinas, sendo que todas apresentaram uma unidade de

glucose em suas estruturas. Foram identificadas a delfinidina-3-O-glucosídeo (**138**), cianidina-3-O-glucosídeo (**139**), petunidina-3-O-glucosídeo (**140**), peonidina-3-O-glucosídeo (**141**) e malvidina-3-O-glucosídeo (**142**) (FIGURA 178). Além disso, foi verificado que o pó liofilizado dos frutos dessa espécie tem potencial antioxidante, por meio dos ensaios DPPH ($EC_{50} = 2419 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ABTS ($339 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) (MARTINS et al., 2021).

FIGURA 178 – ANTOCIANINAS ISOLADAS DOS FRUTOS DE *M. eriopus*



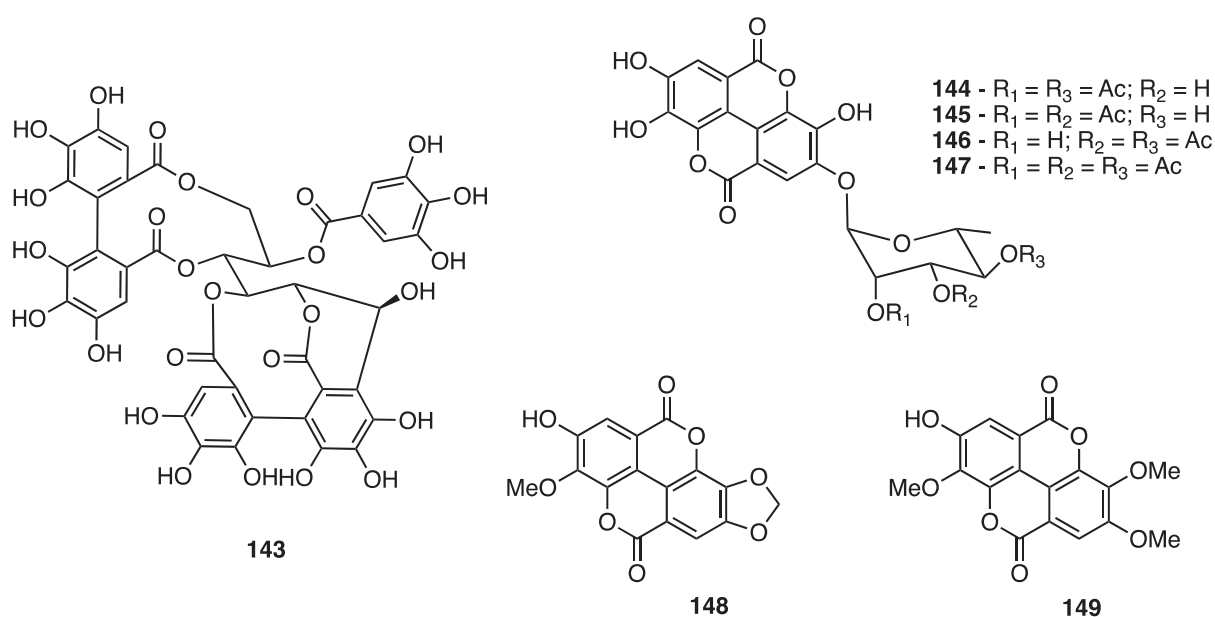
2.1.3.5 Taninos

Os taninos são substâncias polifenólicas de polaridade elevada, geralmente solúveis em água. Possuem massa molecular na faixa de 500 a 3000 Daltons. Essas substâncias fenólicas estão presentes na maioria das espécies vegetais. São isolados como sólidos amorfos ou cristalinos de coloração amarela ou branca. Quimicamente, os taninos podem ser classificados em dois grandes grupos, os poliflavonoides condensados e os taninos hidrolisáveis. Esse último grupo pode ainda ser dividido em galotaninos e elagitaninos (PIZZI et al., 2019).

M. palustris, popularmente conhecida como pitangueira-do-mato, é uma espécie nativa do Brasil encontrada na região Sul (WUBSHET et al., 2015). O extrato em acetato de etila de suas folhas foi submetido a um estudo fitoquímico, resultando no isolamento de seis elagitaninos (WUBSHET et al., 2015). Um deles, a casuarinina (**143**) (FIGURA 179) possui uma cadeia aberta de uma unidade da β -glucose central com dois grupos hexaidroxidifenoila (HHDF) além de uma unidade galoíla. Esse tanino é frequentemente estudado devido às suas atividades biológicas relevantes, como anti-herpes (HSV-2), antioxidante, e a capacidade de acelerar a morte celular

por apoptose em células cancerosas dos tipos mama humana (MCF-7) e pulmão (A549) (WAKAMORI et al., 2020). Além da casuarinina, foram isolados quatro derivados do ácido elágico com uma unidade de ramnose cada: ácido 4-O-(2'',4''-O-diacetil- α -raminose) elágico (**144**), 4-O-(2'',3''-O-diacetil- α -raminose) elágico (**145**), 4-O-(3'',4''-O-diacetil- α -raminose) elágico (**146**) e 4-O-(2'',3'',4''-O-triacetil- α -raminose) elágico (**147**). A espécie *M. rubella* também apresentou taninos em sua composição química. De suas folhas foram isolados os derivados do ácido elágico, ácido 3,4-metilenodioxi-3'-O-metilelágico (**148**) e ácido 3,4,3'-tri-O-metilelágico (**149**) (LIMA et al., 2018), o qual apresentou elevada inibição da α -glucosidase, indicando efeito hipoglicêmico (FIGURA 179).

FIGURA 179 - ELAGITANINOS IDENTIFICADOS EM *M. palustris* E *M. rubella*

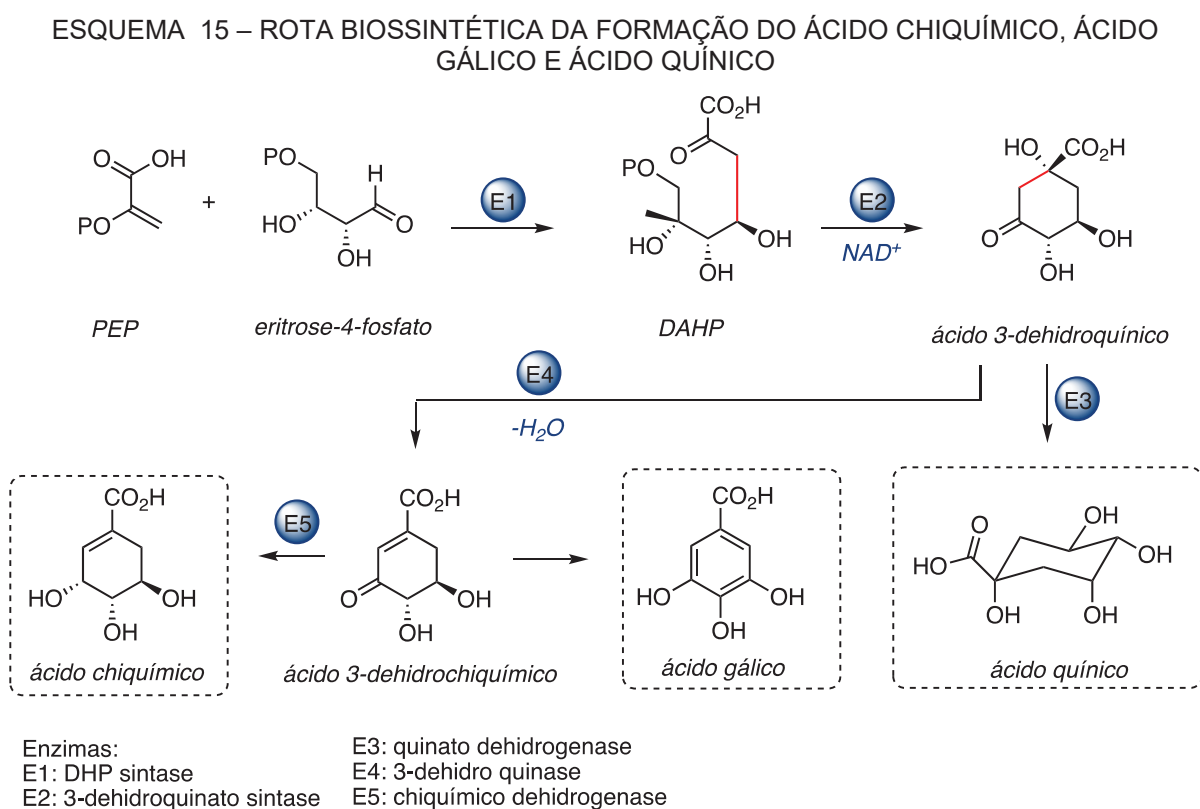


2.1.4 Biossíntese das substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas são formadas no organismo vegetal por meio de duas rotas biossintéticas distintas: a via do ácido chiquímico e a via do mevalonato (MEV), sendo que a rota do ácido chiquímico é responsável pela formação da maioria das substâncias fenólicas de origem vegetal (DEWICK, 2009).

A via do ácido chiquímico se inicia por meio da condensação aldólica entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e uma unidade de eritrose-4-fosfato, resultando no 3-deoxi-

arabino-hept-2-ulosonato-7-fosfato (DAHP), que por sua vez pode realizar uma reação aldólica intramolecular e formar o ácido 3-deidroquínico. Este, após uma redução gera o ácido quínico, um ácido amplamente encontrado na forma livre ou esterificado. O ácido 3-deidroquínico pode sofrer uma desidratação e formar o ácido 3-deidrochiquímico. A partir desse último pode se formar o ácido chiquímico depois de uma redução. O ácido 3-deidrochiquímico gera o ácido gálico após uma desidrogenação, que é seguida por uma enolização. Cada transformação é realizada por meio de enzimas específicas indicadas por E1-E5 (ESQUEMA 16) (DEWICK, 2009).



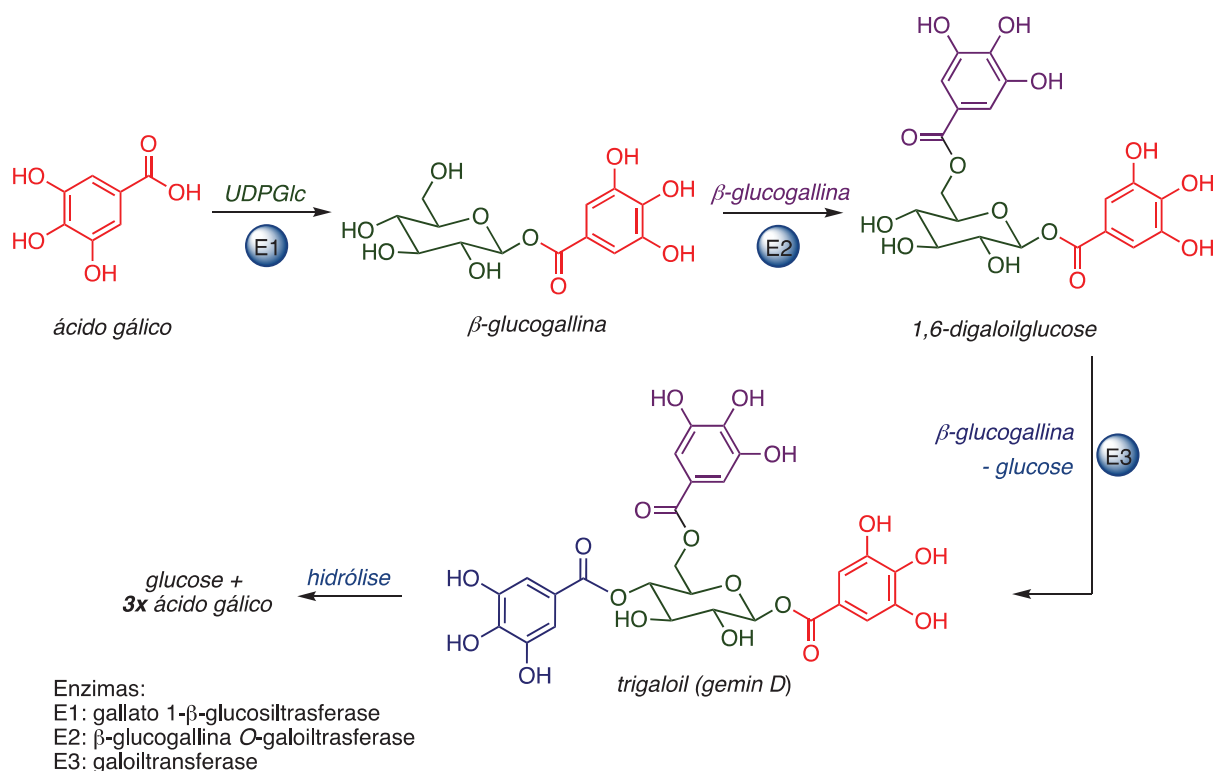
FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

Os taninos são formados após o ácido gálico ser gerado, uma vez que esse ácido é um componente dos taninos hidrolisáveis, que são comuns no gênero *Myrcia* (WUBSHET et al., 2015).

Os taninos hidrolisáveis possuem o ácido gálico geralmente esterificado com uma unidade poliol central, tipicamente a glucose ou derivados, embora uma grande variedade de tipos de poliois possa ser encontrada (DEWICK 2009).

A biossíntese dos taninos inicia-se com o ácido gálico que se combina com uma enzima chamada de difosfato de uridina glicose (UDPGlc) responsável pela transferência de uma unidade de glucose central (poliol), a qual gera a β -glucogallina, a qual é uma substância crucial na formação dos taninos hidrolisáveis, pois atua como substrato para a esterificação posterior, além de ser doadora de outras unidades do grupo galoíla. Com isso, o próximo produto formado é o 1,6-digaloilglucose. Uma nova transferência de galoíla ocorre por meio da β -glucogallina, produzindo um trigaloilglucose (gemin D). Esse processo pode se repetir até a completa esterificação da glucose (pentagaloilglucose). Após uma hidrólise o ácido gálico e a glucose são novamente gerados. São esses produtos formados após hidrólise que originou o nome galotaninos a essas substâncias (ESQUEMA 17) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 16 – BIOSÍNTESE DOS GALOTANINOS A PARTIR DO ÁCIDO GÁLICO E UDPGLC

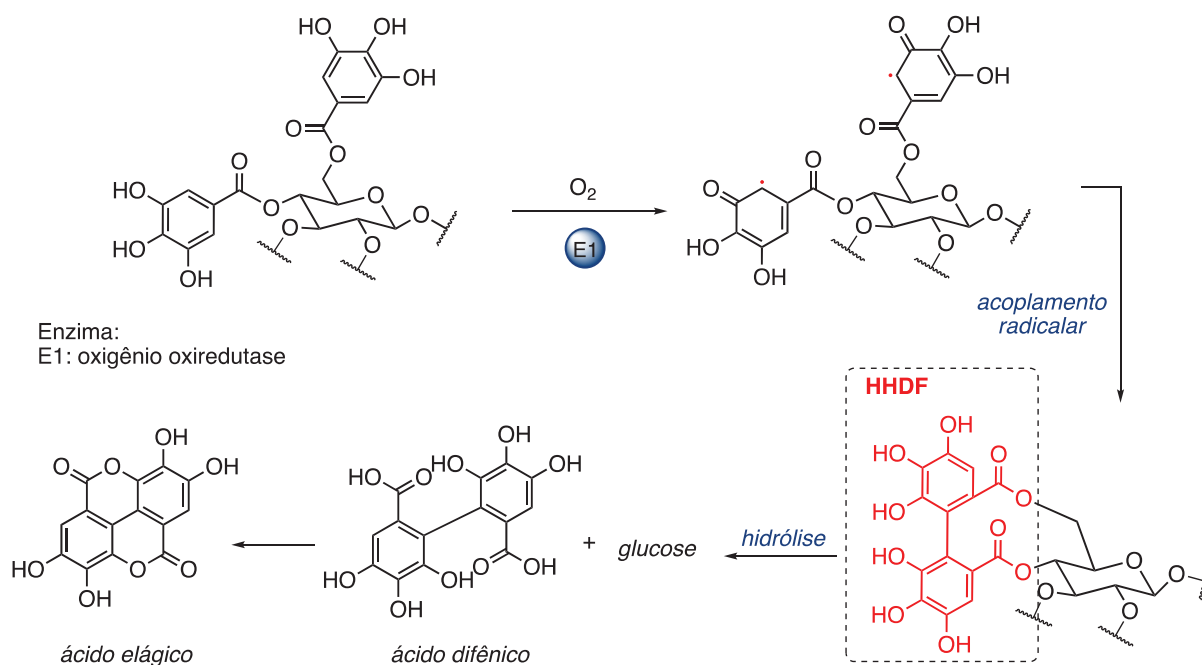


FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

Por sua vez, os elagitaninos, seguem o mesmo caminho da biossíntese dos galotaninos. Entretanto, esses taninos apresentam um ou mais grupos hexahidroxifenoíla (HHDF) em sua estrutura, os quais são formados entre duas unidades galoíla vicinais. Após a formação dos ésteres, como demonstrado no

ESQUEMA 17, dois grupos galoila podem sofrer oxidação, gerando duas espécies radiculares, as quais são estabilizadas por deslocalização eletrônica envolvendo os grupos fenólicos. Posteriormente, ocorre um acoplamento oxidativo, formando uma nova ligação C-C entre dois grupos galoila, resultando no grupo HHDF. O nome elagitaninos é referente ao produto gerado após a hidrólise, uma vez que o grupo HHDF gera o ácido difênico, que por sua vez pode se rearranjar espacialmente, favorecendo uma lactonização que resulta no ácido elágico, o qual deu origem ao nome dos elagitaninos (ESQUEMA 18) (DEWICK 2009).

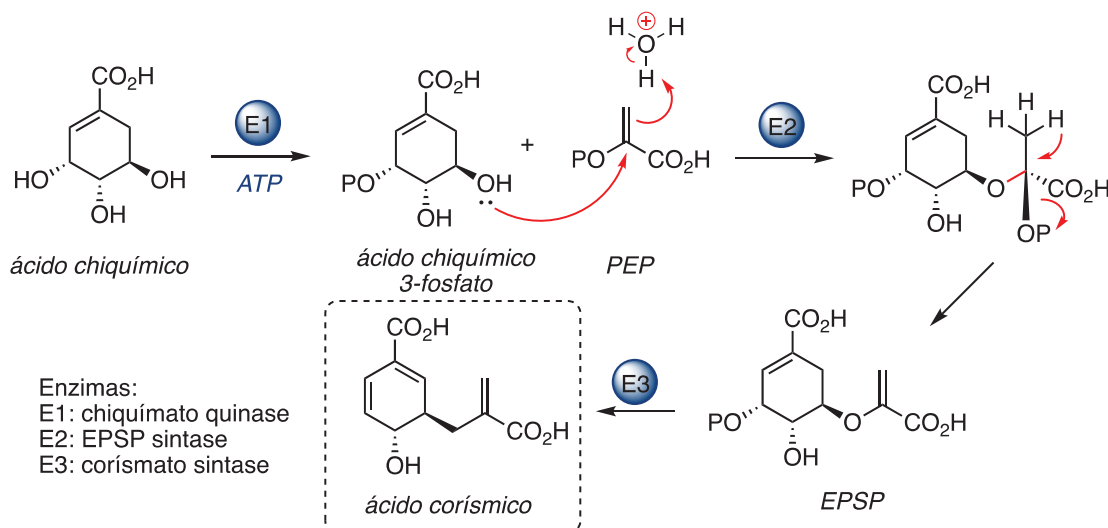
ESQUEMA 17 – FORMAÇÃO DO GRUPO HEXAHIDRODIFENOÍLA (HHDF) A PARTIR DE DUAS UNIDADES GALOÍLA



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

O ácido chiquímico, combinado com o ácido fosfórico (ácido chiquímico 3-fosfato), reage com uma unidade de PEP, por meio de um ataque nucleofílico do grupo hidroxila à ligação dupla do PEP. Após uma eliminação-1,2 do ácido fosfórico, é formado o 5-enolpiruvilchiquímico 3-fosfato (EPSP). A formação do ácido corísmico envolve uma eliminação-1,4 do ácido fosfórico. O ácido corísmico é de extrema importância no metabolismo especializado das substâncias fenólicas, uma vez que pode ser precursor de diversas classes de metabólitos, incluindo os aminoácidos, alcaloides, ácidos orgânicos e flavonoides (ESQUEMA 19) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 18 – ROTA BIOSSINTÉTICA DA FORMAÇÃO DO ÁCIDO CORÍSMICO A PARTIR DO ÁCIDO CHIQÚIMICO



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

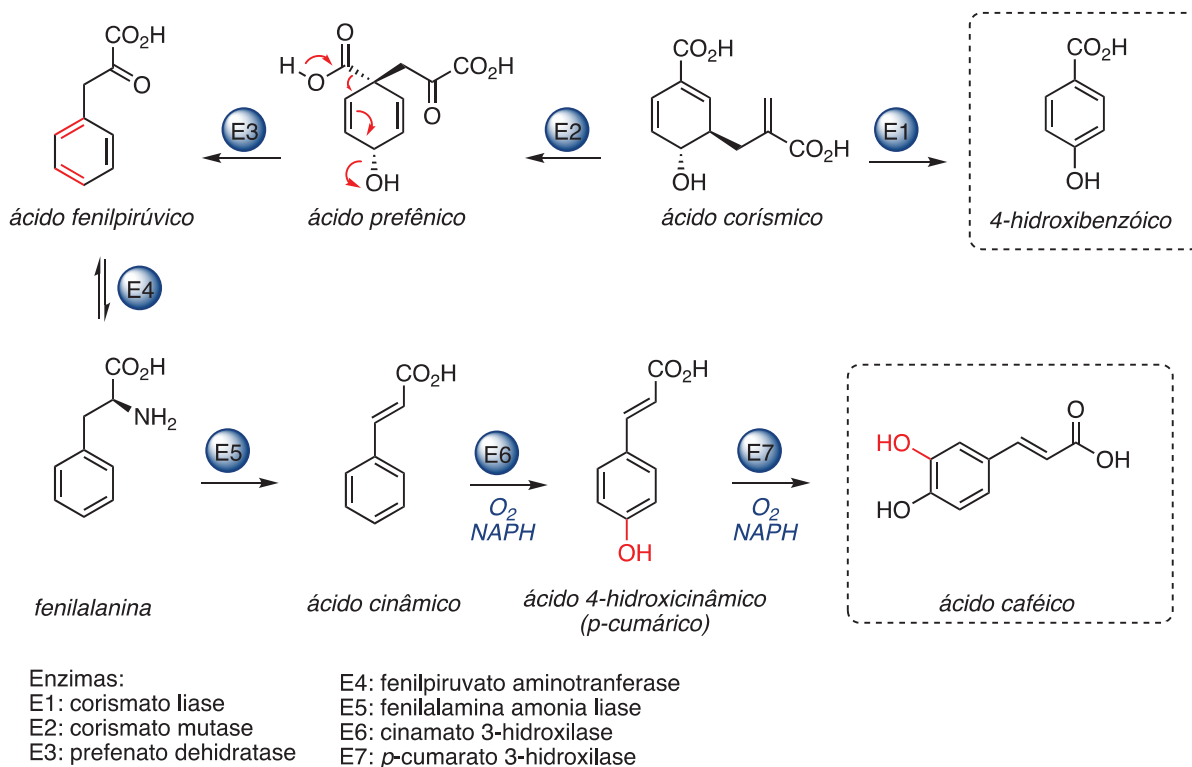
Posteriormente, o ácido corísmico sofre uma eliminação do ácido enolpirúvico (introduzido anteriormente na cadeia lateral), que é seguida de aromatização no anel formando o ácido 4-hidroxibenzóico (C6-C1), o qual é o ácido fenólico mais simples encontrado nos vegetais. Os demais ácidos apresentando esse mesmo padrão são biossintetizados a partir do precursor ácido corísmico (DEWICK, 2009).

O ácido corísmico ainda pode sofrer um rearranjo de Claisen para formar o ácido prefênico, que posteriormente sofre uma descarboxilação, seguida de aromatização do anel para gerar o ácido fenilpirúvico. Em seguida, ocorre uma transaminação, gerando o aminoácido chamado de fenilalanina, que por sua vez sofre uma reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) para a eliminação, do tipo E2, da amônia e formação do ácido cinâmico (DEWICK, 2009).

O ácido cinâmico apresenta o esqueleto básico do segundo grupo dos ácidos fenólicos (C6-C3), que ainda pode ser hidroxilado e formar o ácido *p*-cumárico. Uma segunda hidroxilação gera o ácido cafeico (ESQUEMA 20). Outros ácidos derivados do ácido cinâmico podem estar presentes nos organismos vegetais, os quais são gerados por reações, como hidroxilação e metilação. Esses ácidos fenólicos formados pela via do ácido chiquímico apresentam um padrão de substituição em que as hidroxilas (ou metoxilas) estão dispostas em orientação *orto* entre si, o que é característico dessa via. Por outro lado, os fenólicos provenientes da via do mevalonato apresentam um padrão de substituição em orientação *meta*. Essa

diferença é mais perceptível na biossíntese dos flavonoides, pois envolve as duas vias (DEWICK, 2009).

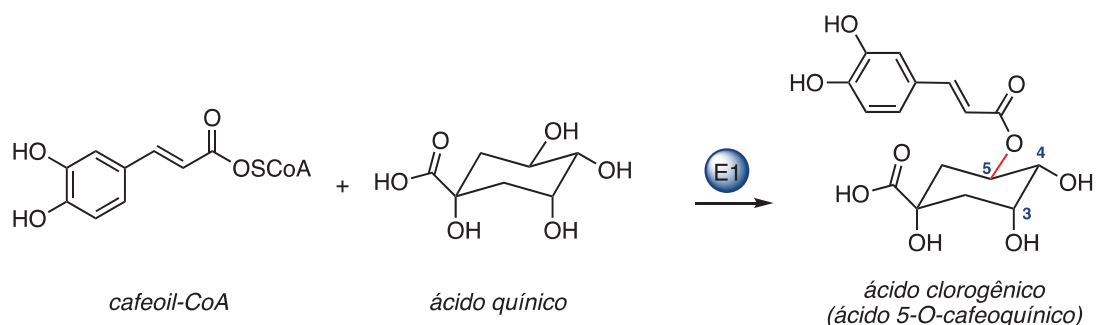
ESQUEMA 19 – BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS FENÓLICOS (4-HIDROXIBENZÓICO E ÁCIDO CAFÉICO) A PARTIR DO ÁCIDO CORÍSMICO



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

Em geral, os ácidos fenólicos podem ser encontrados nas plantas na forma livre ou esterificados com diferentes substratos. Um exemplo é a formação do ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) que consiste da combinação do ácido quínico com o ácido cafeico. Inicialmente, o ácido cafeico é combinado com uma enzima (cafeoil-coenzima A), e posteriormente o ácido clorogênico é gerado. Além da esterificação na posição C-5, os ésteres também são formados nas posições C-4 e C-3 (ESQUEMA 21) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 20 – FORMAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DA REAÇÃO DO CAFEOIL-COA E ÁCIDO QUÍNICO



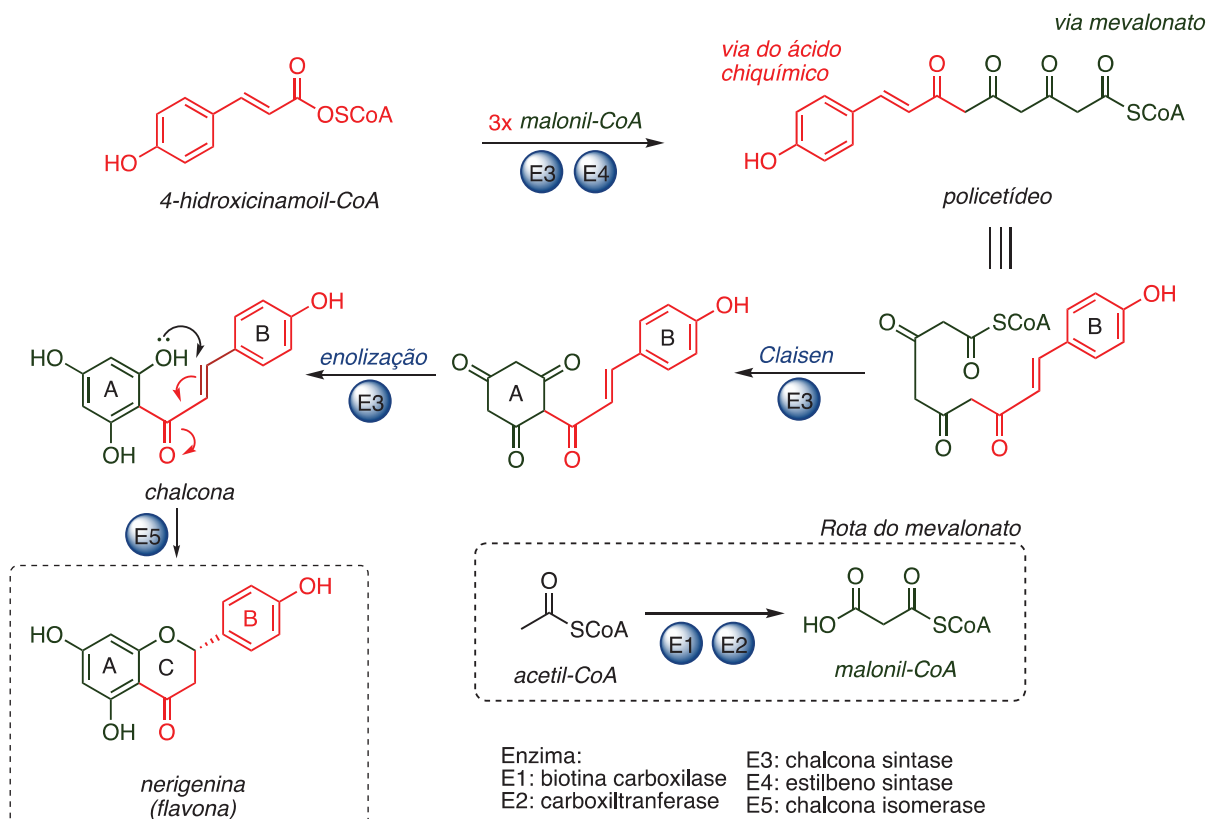
Enzima:
E1: quinato O-hidroxicinamoiltransferase

FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

A via do ácido chiquímico é a mais importante rota para a produção das substâncias fenólicas. Entretanto, como já mencionado, os flavonoides são originados por via mista. A via do ácido chiquímico é responsável pela formação do anel B, além das três unidades de carbono entre os anéis A e B. Já o anel A é originado da via do mevalonato (DEWICK, 2009).

A biossíntese se inicia pelo ácido 4-hidroxicinâmico, que por sua vez é transformado a uma espécie ativa, o 4-hidroxicinamoil-CoA. Em seguida três moléculas de malonil-CoA, que são geradas por meio da descarboxilação da acetil-CoA (via do mevalonato (MEV), descrita no **Capítulo 1**, ESQUEMA 1, p. 57), formam um poliketídeo. Esse poliketídeo pode se arranjar espacialmente para facilitar uma condensação de Claisen, seguida por uma enolização, resultando em uma chalcona (naringenina-chalcona). As chalconas são as precursoras dos demais flavonoides. A maioria dos flavonoides apresentam um anel heterocíclico de seis membros (anel C), formado por uma reação do tipo Michael via ataque nucleofílico da hidroxila (anel A) à posição β da cetona α,β -insaturada, resultando em uma flavanona (naringenina) (ESQUEMA 22). A partir dessas etapas, outras transformações podem ocorrer, como oxigenações nos anéis aromáticos, metilações, glicosilações, entre outras modificações, resultado em um grande número de flavonoides conhecidos (DEWICK 2009).

ESQUEMA 21 – BIOSSÍNTESE DAS FLAVONAS A PARTIR DO 4-HIDROXICINAMOIL-COA E MALONIL-COA



FONTE: adaptado de DEWICK, 2009.

2.1.5 A espécie *Myrcia selloi*

A espécie *Myrcia selloi* (FIGURA 180), conhecida popularmente como cambuí, é uma planta nativa do Brasil. Recentemente, esta espécie foi re-circunscrita para abranger as espécies *Myrcia laruotteana* e *M. lajeana* (LANNOY et al., 2019). Há ocorrência desta espécie na Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil. No Brasil, a espécie já foi registrada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. No Paraná essa espécie pode ocorrer em todos os tipos de vegetação (LANNOY et al., 2021).

Morfologicamente, suas folhas são oblongas, com 6,0 cm de comprimento e 2,0 cm de largura. Possui flores com coloração branca, as quais florescem de abril a fevereiro. Os frutos verdes possuem coloração verde-claro, e ao amadurecerem formam frutos roxos comestíveis de 5,0 a 10 mm, surgindo o ano todo (LANNOY et al., 2021).

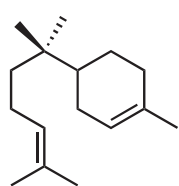
FIGURA 180 – IMAGENS DA ESPÉCIE *M. selloi* NO LOCAL DE COLETA COM DETALHES DAS FLORES E FOLHAS



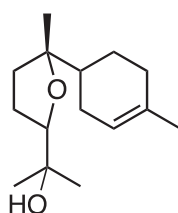
FONTE: Stefanello, M. E. A. (2010)

Devido à presença marcante de óleos voláteis, estes foram previamente analisados. Os principais constituintes das folhas, frutos e flores foram sesquiterpenos oxigenados, sendo o constituinte principal o sesquiterpeno α -bisabolol (**150**, folhas: 20,7 %, frutos: 23,6 % e flores: 28,1 %). Outros constituintes importantes foram o óxido de α -bisabolol B (**151**, 11,5 %) nos frutos, e o 14-hidroxi- α -muuroleno (**152**) nas folhas (19,9 %) e nos frutos (13,7 %) (FIGURA 181) (STEFANELLO et al., 2007; 2011).

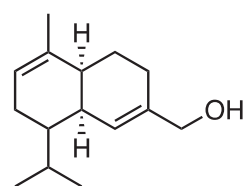
FIGURA 181 – PRINCIPAIS SESQUITERPENOS OXIGENADOS IDENTIFICADOS NAS FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE *M. selloi*



150



151

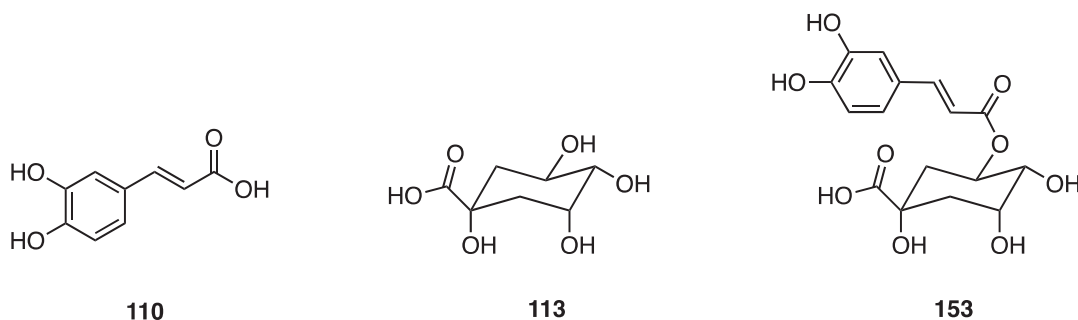


152

O mesmo estudo realizado com os frutos verdes de *M. selloi* ainda revelou o potencial citotóxico do óleo essencial total e de uma fração rica em α -bisabolol (**150**) contra dez linhagens de células tumorais humanas *in vitro*: glioma (U251), melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário resistente a múltiplos fármacos (NC1-ADR/RES), rim (786,0), pulmão (NCI-H450), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29), e leucemia (K562). O óleo essencial total foi ativo contra todas as linhagens de células testadas, uma vez que os valores de concentração necessária para inibição total do crescimento (TGI) foram inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção da linhagem de pulmão ($\text{TGI} > 125 \mu\text{g mL}^{-1}$). A maior atividade foi registrada contra células de glioma ($\text{TGI} = 20,46 \mu\text{g mL}^{-1}$) e rim ($\text{TGI} = 20,74 \mu\text{g mL}^{-1}$). A fração rica em α -bisabolol apresentou atividade similar àquela do óleo total, mas tendo maior atividade, especialmente contra as células de rim ($\text{TGI} = 8,74 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ovário ($\text{TGI} = 8,58 \mu\text{g mL}^{-1}$) (STEFANELLO et al., 2011).

Em outro estudo, foi avaliada a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas. Este apresentou forte atividade antioxidante tanto no ensaio pelo método DPPH ($\text{CI}_{50} = 3,38 \mu\text{g mL}^{-1}$), como no ensaio ORAC-FL ($3.785,70 \mu\text{mol TE g}^{-1}$). Esses resultados foram associados ao alto teor de conteúdo fenólico (401,4 mg de ácido gálico equivalente por grama de extrato). Em uma tentativa de identificar os fenólicos responsáveis por essa atividade, o extrato etanólico foi analisado por CLAE-UV e por espectrometria de massas. A análise permitiu comprovar a presença dos ácidos caféico (**110**), quínico (**113**) e clorogênico (**153**) (FIGURA 182), justificando a atividade antioxidante encontrada (SALVADOR et al., 2011).

FIGURA 182 – ÁCIDOS ORGÂNICOS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. selloi*



2.2 JUSTIFICATIVA

Considerando que o estudo anterior com o extrato etanoico identificou somente três substâncias fenólicas, ficando várias sem identificação, torna-se relevante um estudo fitoquímico com esse extrato ativo de *M. selloi*, a fim de ampliar o conhecimento sobre os metabólitos especializados dessa espécie.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar atividade citotóxica com a espécie *Myrcia selloi*, a fim de contribuir para o conhecimento químico mais amplo das myrtáceas, bem como para a descoberta de seus principais metabólitos especializados.

2.3.2 Objetivos específicos

- Realizar partição sequencial a partir do extrato bruto das folhas de *M. selloi*.
- Isolar os principais metabólitos especializados das folhas de *M. selloi*.
- Identificar os principais metabólitos especializados isolados de *M. selloi*, utilizando principalmente a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), e outras técnicas que foram necessárias, e outras técnicas que forem necessárias, como espectrometria de massas de alta resolução (EM-AR), espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e medidas de rotação específica.
- Realizar ensaios de atividade citotóxica utilizando o método da sulforrodamina B com o extrato bruto das folhas de *M. selloi*.

2.4 MATERIAS E MÉTODOS

2.4.1 Procedimentos gerais

Para o isolamento dos constituintes químicos das folhas de *M. selloi* deste **Capítulo 2** foram utilizados os mesmos métodos cromatográficos descritos no **Capítulo 1**. Foram utilizadas as técnicas: Cromatografia Líquida em Coluna (CC), Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), Cromatografia em Camada Delgada Analítica Preparativa (CCDP) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Entretanto, foi utilizado outro método para CLAE, diferente dos descritos no capítulo anterior. O método foi otimizado utilizando coluna semi-preparativa com octadesilsilano (C18) como fase estacionária (XTerra, Waters), com diâmetro de partícula de 10 μm e com dimensões de 300 x 7,8 mm. Utilizou-se vazão da fase móvel de 2,0 mL min⁻¹. As análises foram conduzidas utilizando-se o método isocrático com a proporção de 60 % (H₂O-MiliQ®) e 40 % (MeOH, grau HPLC) (método 6), a detecção das substâncias foi acompanhada em 245 nm. Em adição, foi também utilizado cromatografia líquida por exclusão utilizando-se como fase estacionária gel de sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

Os metabólitos secundários isolados foram identificados por meio das técnicas de identificação já descritas no capítulo anterior, como Ressonância Magnética Nuclear, incluindo técnicas unidimensional (¹H e ¹³C) e bidimensional (HSQC e HMBC), Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta/Visível (UV-Vis), Rotação Específica e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM-AR).

2.4.2 Material vegetal

As **folhas** da espécie *Myrcia selloi* foram coletadas no Centro Politécnico (UFPR), em Curitiba, PR (25° 27' 16" S, 49° 14' 9" O), em fevereiro de 2010. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Armando Carlos Cervi (Departamento de Botânica, UFPR), e uma exsicata foi depositada no herbário da UFPR (UPCB 53303).

2.4.3 Preparação do extrato e frações

O material vegetal foi secado em estufa (40°C) e pulverizado. A extração foi conduzida utilizando a técnica de maceração à temperatura ambiente, com renovação de solvente a cada 24 horas. O volume utilizado foi de 500 mL para cada 100 g de material vegetal, e repetido por três vezes para cada solvente. Em seguida, os extratos foram filtrados e os solventes evaporados.

As **folhas** de *Myrcia selloi* (254,8 g) foram extraídas com um único solvente (EtOH). Após a evaporação do solvente foi obtida o respectivo extrato total em EtOH (**ML**, 51,64 g). Uma parte do extrato foi reservada para ensaios biológicos (1,6 g). O restante foi conservado em refrigerador até o fracionamento. Em 2020 uma parte desse extrato reservado (31,1 g) foi solubilizada em EtOH:H₂O 1:1 e submetida à partição sequencial com éter de petróleo (EP), CH₂Cl₂, AcOEt e 1-BuOH, com aproximadamente 200 mL de cada solvente, por quatro vezes. Após a eliminação dos solventes foram obtidas as seguintes frações: EP (**MLE**, 1,49 g), CH₂Cl₂ (**MLD**, 4,38 g), AcOEt (**MLA**, 5,06 g) e BuOH (**MLB**, 5,29 g) (TABELA 38).

TABELA 38 – RELAÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO SEQUENCIAL DO EXTRATO BRUTO (**ML**) DAS FOLHAS DE *Myrcia selloi*

Frações	Solvente v/v	Massa (g)	Rendimento (%)
MLE	EP	1,49	4,79
MLD	CH ₂ Cl ₂	4,38	14,08
MLA	AcOEt	5,06	16,27
MLB	1-BuOH	5,29	17,01

2.4.4 Isolamento das substâncias das folhas de *M. selloi*

2.4.4.1 Isolamento dos constituintes químicos da fração **MLD**

A fração **MLD** (4,38 g) foi inicialmente submetida ao fracionamento por CC (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH 95:5, 9:1, 8:2 e MeOH). O processo de fracionamento resultou em 49 subfrações (20 mL cada), as quais foram reunidas em 7 subfrações após análise por CCDA (TABELA 39; FLUXOGRAMA 5).

TABELA 39 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO **MLD** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLD1	1-18	CH ₂ Cl ₂	697,9	-
MLD19	19-20	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5	167,5	-
MLD21	21-30	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	323,0	MS2, MS3
MLD31	31-34	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	80,8	-
MLD35	35-39	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	328,1	MS7, MS8
MLD40	40-41	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 8:2	191,6	-
MLD42	42-49	MeOH	981,9	-

A subfração **MLD21** (323,0 mg) foi submetida à CC (CH₂Cl₂:MeOH 9:1 e MeOH); o fracionamento forneceu 29 subfrações (20 mL), que após CCDA foram reunidas em 7 subfrações (TABELA 40; FLUXOGRAMA 5).

TABELA 40 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MLD21** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLD21-1	1-2	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	11,4	-
MLD21-3	3-4	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	40,2	MS2, MS3
MLD21-5	5-6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	56,9	MS3
MLD21-7	7	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	17,6	MS3
MLD21-8	8-9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	50,9	MS2, MS2 + MS3
MLD21-10	10	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9:1	18,0	-
MLD21-11	17-29	MeOH	98,6	-

A subfração **MLD213** (40,2 mg) foi purificada pro CLAE (método 6, p. 241). A amostra foi solubilizada em 3,0 mL de MeOH:H₂O-Mili-Q 9:1, utilizando-se o volume de injeção de 100 µL, com repetições de 28 vezes. O procedimento resultou no isolamento de **MS2** (2,0 mg, t_R = 12,31 min) e **MS3** (3,1 mg, t_R = 17,68 min) (FLUXOGRAMA 5).

A subfração **MLD215** (56,9 mg) foi submetida à CCDP (AcOEt:MeOH 99:1). O fracionamento resultou em uma mistura (8,3 mg) que foi novamente purificada por CCDP (AcOEt:MeOH 95:5), fornecendo **MS3** (2,7 mg) (FLUXOGRAMA 5).

A subfração **MLD217** (17,6 mg) foi purificada por CLAE (método 6, p. 241). A subfração foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH:H₂O-Mili-Q 9:1. Foi utilizado o volume de injeção de 100 µL (17 vezes). O fracionamento cromatográfico resultou no isolamento de **MS3** (4,0 mg, t_R = 10,90 min) (FLUXOGRAMA 5).

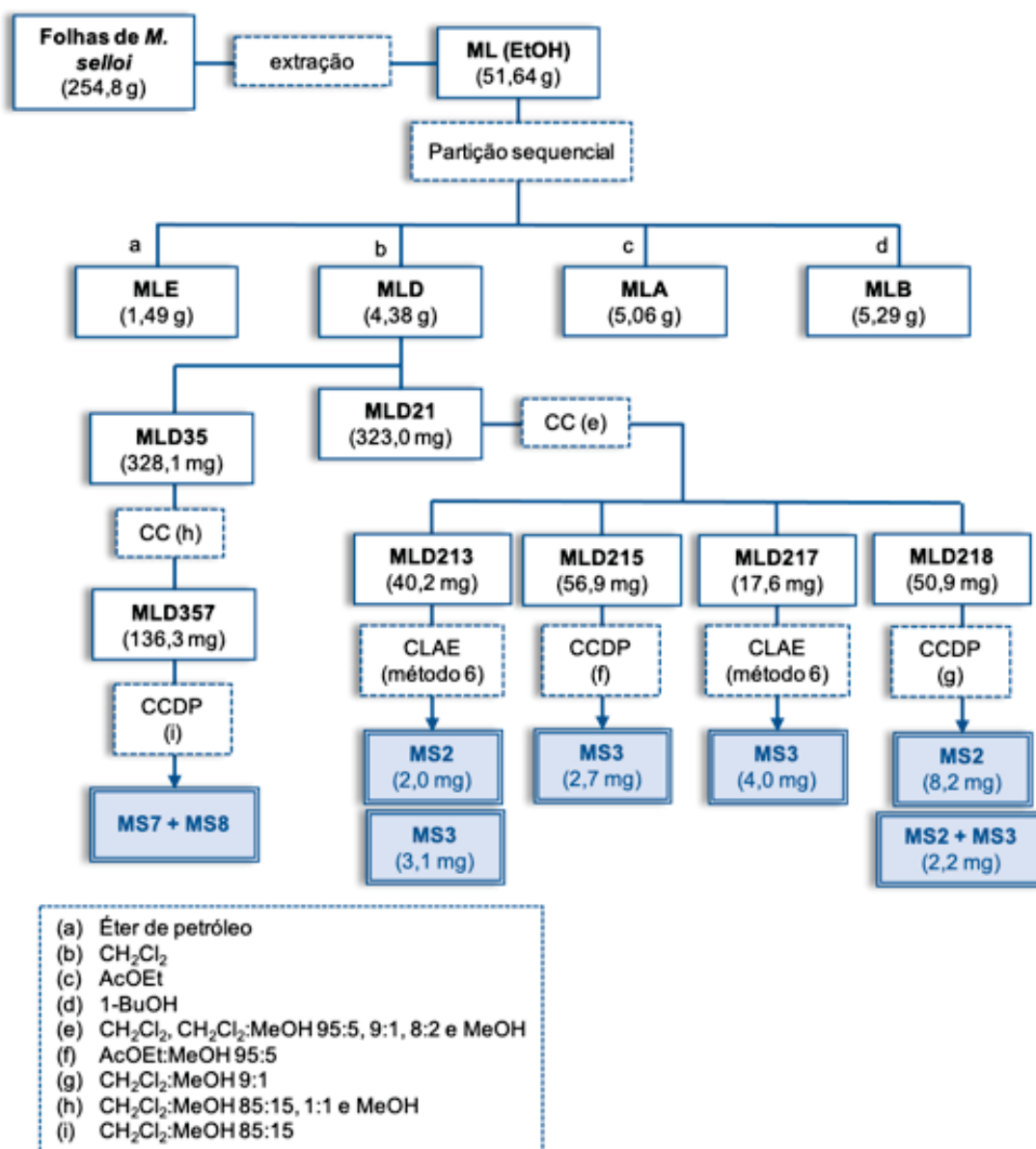
A subfração **MLD218** (50,9 mg) foi purificada por CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 9:1) resultando em **MS2** (8,2 mg) e uma mistura (16,4 mg), a qual foi purificada por CLAE (método 6, p. 241). A subfração foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH:H₂O-Mili-Q 9:1, utilizando-se o volume de injeção de 200 µL (10 vezes). Esse processo resultou no isolamento de **MS2 + MS3** (2,2 mg) (FLUXOGRAMA 5).

A subfração **MLD35** (328 ,1 mg) foi submetida a CC (CH₂Cl₂:MeOH 85:15, 1:1 e MeOH), o fracionamento forneceu em 23 subfrações (10 mL), quais foram reunidas em 5 subtrações após análise comparativa por CCDA (TABELA 41; FLUXOGRAMA 5).

TABELA 41 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MLD35** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLD351	1-3	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	22,4	-
MLD354	4-6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	45,8	-
MLD357	7-17	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 85:15	136,3	MS7 + MS8
MLD3518	18-21	CH ₂ Cl ₂ :MeOH 1:1	13,5	-
MLD3522	22-23	MeOH	11,4	-

A subfração **MLD357** (136,3 mg) foi submetida à CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 85:15). O processo de purificação resultou em duas novas subfrações **MLD357B** (26,1 mg) e **MLD357C** (27,3 mg). As duas subfrações revelaram ser uma mistura contendo majoritariamente **MS7 + MS8** (FLUXOGRAMA 5).

FLUXOGRAMA 5 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO **ML** DE *Myrcia selloi*

2.4.4.2 Isolamento dos constituintes químicos da fração **MLA**

A fração **MLA** (5,06 g) foi fracionada por CC, utilizando gel de sephadex LH-20 como fase estacionária e eluída somente com MeOH. O fracionamento resultou em 31 subfrações (50 mL), as quais foram reunidas em 7 subfrações após análise por CCDA (TABELA 42; FLUXOGRAMA 6).

TABELA 42 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA FRAÇÃO **MLA** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLA1	1-4	MeOH	80,4	-
MLA5	5-6	MeOH	540,4	MS2, MS3, MS4 + MS5
MLA7	7	MeOH	397,4	-
MLA8	8-9	MeOH	791,5	MS1, MS2, MS3, MS4, MS7, MS8, MS10, MS11 e MS12
MLA10	10-12	MeOH	191,5	MS7, MS8
MLA13	13-15	MeOH	279,1	MS6, MS9
MLA16	16-20	MeOH	501,6	-
MLA 21	21	MeOH	49,2	MS13

A subfração **MLA5** (540,4 mg) foi submetida à CC (AcOEt:MeOH 95:5, 8:2, 1:1 e MeOH). O processo resultou em 26 subfrações (10 mL), reunidas em 4 subfrações após análise por CCDA (TABELA 43; FLUXOGRAMA 6).

TABELA 43 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MLA5** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLA51	1-2	AcOEt:MeOH 95:5	63,9	-
MLA53	3	AcOEt:MeOH 95:5	72,2	MS2, MS3 e MS4 + MS5
MLA54	4-6	AcOEt:MeOH 8:2	75,5	MS2 + MS3 + MS4 + MS5
MLA57	7-9	AcOEt:MeOH 1:1	13,6	-
MLA510	10-15	AcOEt:MeOH 1:1	41,2	MS2 + MS3 + MS4 + MS5
MLA516	16-26	MeOH	71,8	-

A subfração **MLA53** (72,2 mg) foi submetida à CCDP (AcOEt:MeOH 95:5); o fracionamento forneceu três novas subfrações. Destas, a subfração **MLA53B** (35,7 mg) foi novamente submetida à CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 9:1). O fracionamento resultou no isolamento de **MS2** (3,3 mg), **MS3** (10,9 mg) e **MS4 + MS5** (6,9 mg) (FLUXOGRAMA 6).

Já as frações **MLA54** (75,5 mg) e **MLA510** (41,2 mg) foram submetidas a análise qualitativa por CCDA (AcOEt:MeOH 95:5) revelando conter **MS2 + MS3 + MS4 + MS5** (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA8** (791,5 mg) foi submetida à CC (AcOEt:MeOH 95:5, 9:1 e 1:1 e MeOH). O fracionamento forneceu no total de 21 subfrações (10 mL), as quais foram reunidas em 8 subfrações (TABELA 44; FLUXOGRAMA 6).

TABELA 44 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MLA8** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLA81	1	AcOEt:MeOH 95:5	47,2	-
MLA82	2	AcOEt:MeOH 95:5	50,0	MS2, MS3 + MS4
MLA83	3	AcOEt:MeOH 9:1	97,4	MS10 e MS12
MLA84	4-5	AcOEt:MeOH 9:1	67,2	MS7, MS7 + MS8 e MS11
MLA86	6-9	AcOEt:MeOH 1:1	43,7	-
MLA810	10	AcOEt:MeOH 1:1	10,2	MS2 + MS3
MLA811	11-18	MeOH	82,0	-
MLA819	19-21	MeOH	28,0	MS1

Parte da subfração **MLA82** (50,0 mg) foi fracionada por CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 8:2 + 1% H₂O), levando ao isolamento de **MS2** (5,3 mg), **MS3 + MS4** (4,4 mg) (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA83** (97,4 mg) foi purificada por CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 8 + 1% H₂O). O processo de purificação resultou no isolamento de **MS10** (4,5 mg) e **MS12** (2,3 mg) (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA84** (67,2 mg) foi recristalizada em Me₂CO (5 mL). O precipitado resultante revelou conter **MS7** (18,0 mg), enquanto que o sobrenadante continha **MS7 + MS8** (7,9 mg) e **MS11** (5,1 mg) (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA810** (10,2 mg) revelou por CCDA (AcOEt:MeOH 9:1) conter **MS2 + MS3** majoritariamente (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA819** (28,0 mg) revelou conter somente **MS1** (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA13** (279,1 mg) foi fracionada por CC (AcOEt:MeOH 95:5, 8:2 e MeOH), o procedimento forneceu 25 subfrações, quais foram reunidas em 4 subfrações (TABELA 45; FLUXOGRAMA 6)

A subfração **MLA131** (13,0 mg) foi submetida à CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 85:15). O processo de purificação resultou no isolamento de **MS6** (2,8 mg) (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA134** (26,8 mg) foi purificada por CCDP (CH₂Cl₂:MeOH 85:15) resultando em **MS9** (5,0 mg) (FLUXOGRAMA 6).

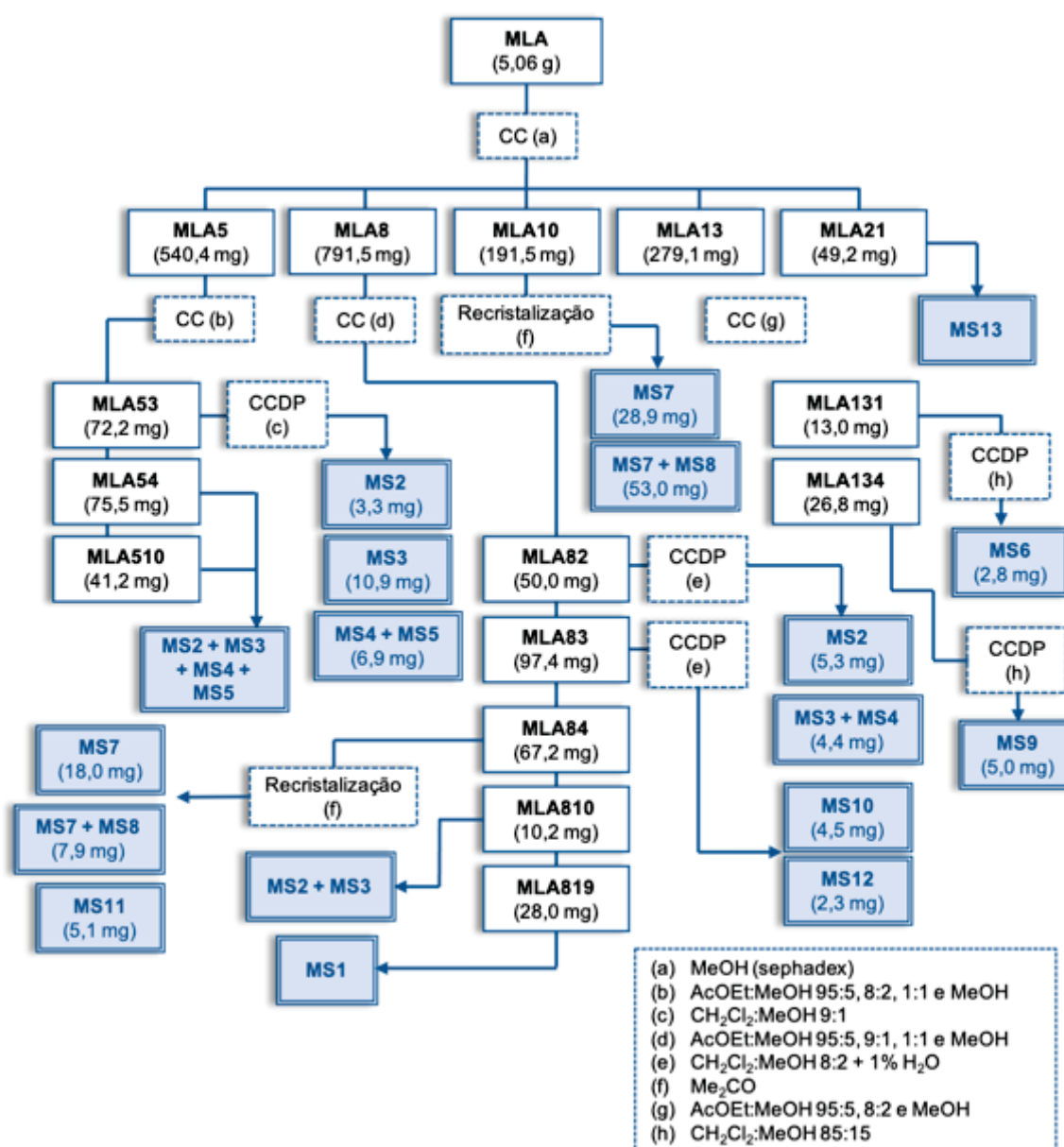
A subfração **MLA 10** (91,5 mg) foi recristalizada em Me₂CO (5 mL). O precipitado revelou conter **MS7** (28,9 mg), já o sobranete a mistura de **MS7 + MS8** (53,0 mg) (FLUXOGRAMA 6).

A subfração **MLA21** (49,2 mg) revelou conter **MS13** como constituinte majoritário (FLUXOGRAMA 6).

TABELA 45 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO POR CC DA SUBFRAÇÃO **MLA13** DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Código	Subfrações	Solvente v/v	Massa (mg)	Substâncias isoladas
MLA131	1-3	AcOEt:MeOH 95:5	13,0	MS6
MLA134	4	AcOEt:MeOH 95:5	26,8	MS9
MLA135	5-9	AcOEt:MeOH 8:2	57,8	-
MLA13-10	10-25	MeOH	92,1	-

FLUXOGRAMA 6 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO **MLA** DE *Myrcia selloi*



2.4.5 Ensaios de atividade biológica

2.4.5.1 Ensaios de atividade citotóxica

Os ensaios de atividade citotóxica realizados nesse **Capítulo 2** diferem na metodologia empregada daqueles descritos para o **Capítulo 1**.

Os ensaios foram realizados somente com o extrato etanólico das folhas de *M. selloi* (**ML**). Foram utilizadas nove linhagens de células tumorais humanas: UACC-62 (melanona), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia). Os experimentos foram realizados utilizando o método da sulforrodamina B, como descrito por SKEHAN et al. (1990). Resumidamente, as células tumorais humanas foram distribuídas em 96 poços (100 mL de célula por poço), e tratadas em quatro concentrações do extrato (**ML**, 0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, foi adicionado DMSO (0,1% solução aquosa), e as células foram incubadas a 37 °C, com 5 % de CO₂, por 48 h. A concentração final de DMSO (1 %) não afetou a viabilidade celular. Como controle positivo utilizou-se doxorrubicina (0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e como controle negativo o solvente (DMSO, 0,1 %). A proliferação celular foi determinada por meio da quantificação espectrofotométrica em 540 nm do teor de proteína utilizando sulforrodamina B. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os dados foram tratados utilizando ANOVA e teste-*F* para determinar qualquer diferença entre os grupos avaliados. Os resultados foram expressos em TGI (*Total Growth Inhibition*) que é a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. Esses ensaios foram realizados no Departamento de Biologia Vegetal, localizado no instituto de Biologia da UNICAMP e supervisionado pelo Prof. Dr, José Marcos Salvador.

2.5 DADOS FÍSICOS E ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

- **MS1**

Ácido clorogênico: sólido amarelo; fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ (massa exata: 354,0951); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 189-FIGURA 192 (p. 267-269); TABELA 47 (p. 270) (PAULI et al., 1998; LEE et al., 2010).

- **MS2**

Clorogenato de metila: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{17}H_{20}O_9$ (massa exata: 368,1107); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 195-FIGURA 199 (p. 272-275); TABELA 48 (p. 276) (LEE et al., 2010).

- **MS3**

Clorogenato de etila: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{18}H_{22}O_9$ (massa exata: 382,1264); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 201-FIGURA 205 (p. 277-280); TABELA 49 (p. 281) (YOUN et al., 2015).

- **MS4**

Neo-clorogenato de etila: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{18}H_{22}O_9$ (massa exata: 382,1264); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 206-FIGURA 211 (p. 282-285); TABELA 50 (p. 286) (YOUN et al., 2015).

- **MS5**

Criptoclorogenato de etila: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{18}H_{22}O_9$ (massa exata: 382,1264); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 213-FIGURA 217 (p. 287-289); TABELA 51 (p. 290) (GE et al., 2018).

- **MS6**

Quercetina: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_7$ (massa exata: 302,0427); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 221-FIGURA 224 (p. 293-295); TABELA 52 (p. 296) (ESPOSITO et al., 2013).

- **MS7**

Hiperosídeo: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{12}$ (massa exata: 464,0955); UV-vis (MeOH) λ_{max}/nm (log ϵ): 207 (3,93), 257 (2,94), 361 (2,08), FIGURA 235 (p. 302); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$ HSQC, HMBC, FIGURA 227-FIGURA 234 (p. 297-301); TABELA 53 (p. 303) (RENDA et al., 2018).

- **MS8**

Isoquercitrina: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{12}$ (massa exata: 464,0955); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 236-FIGURA 241 (p. 304-307); TABELA 54 (p. 308) (FERNANDEZ et al., 2005).

- **MS9**

3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{28}H_{24}O_{16}$ (massa exata: 616,1064); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 243-FIGURA 247 (p. 310-312); TABELA 55 (p. 313) (KADOTA et al., 1990).

- **MS10**

Canferol: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_6$ (massa exata: 286,0477); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 249-FIGURA 252 (p. 315-317); TABELA 56 (p. 318) (BAEK et al., 2015).

- **MS11**

Astragalina: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{11}$ (massa exata: 448,1006); RMN de 1H , HSQC, HMBC: FIGURA 254-FIGURA 258 (p. 319-321); TABELA 57 (p. 315) (TUYEN et al., 2020).

- **MS12**

3-O- β -glicosilramnocitrina: sólido amarelo; fórmula molecular: $C_{22}H_{22}O_{11}$ (massa exata: 462,1162); RMN de 1H , HSQC, HMBC, FIGURA 261-FIGURA 264 (p. 324-326); TABELA 58 (p. 327) (NISHINA et al., 2017).

- **MS13**

Eugeniina: sólido branco; EM-AR: m/z 938,0977 $[M]^+$, FIGURA 275 (p. 335); fórmula molecular: $C_{41}H_{30}O_{26}$ (massa exata: 938,6650); $[\alpha]_D^{20}$: +57,1 (Me_2CO), valor da literatura: $[\alpha]_D^{25}$: +56,9 (c: 0,15 mg mL^{-1} , Me_2CO); UV-vis ($MeOH$) λ_{max}/nm (log ϵ): 209 (4,87), 297 (2,37), FIGURA 276 (p. 335); RMN de 1H , $^{13}C\{^1H\}$, HSQC, HMBC: FIGURA 267-FIGURA 273 (p. 329-333); TABELA 59 (p. 336) (NONAKA et al., 1980; LIU et al., 2019).

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas de *M. selloi* forneceu o isolamento de 13 substâncias fenólicas (TABELA 46). Entre elas, cinco são ésteres do ácido quínico com o ácido caféico (**MS1-MS5**), seis são flavonoides (dois como aglicona: **MS6** e **MS10** e quatro glicosilados: **MS7**, **MS8**, **MS9**, **MS11** e **MS12**), e um tanino: **MS13**.

TABELA 46 – RELAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NA ESPÉCIE *M. selloi*

Classe	Código	Substância identificada
Derivados do ácido quínico	MS1	Ácido clorogênico
	MS2	Clorogenato de metila
	MS3	Clorogenato de etila
	MS4	Neoclorogenato de etila
	MS5	Criptoclorogenato de etila
Flavonoides	MS6	Quercetina
	MS7	Hiperosídeo
	MS8	Isoquercitrina
	MS9	3-O-β-(6''-galoil)-galactosilquercetina
	MS10	Canferol
	MS11	Astragalina
	MS12	3-O-β-glucosilramnocitrina
Tanino	MS13	Eugeniina

2.6.1 Identificação dos ésteres do ácido quínico

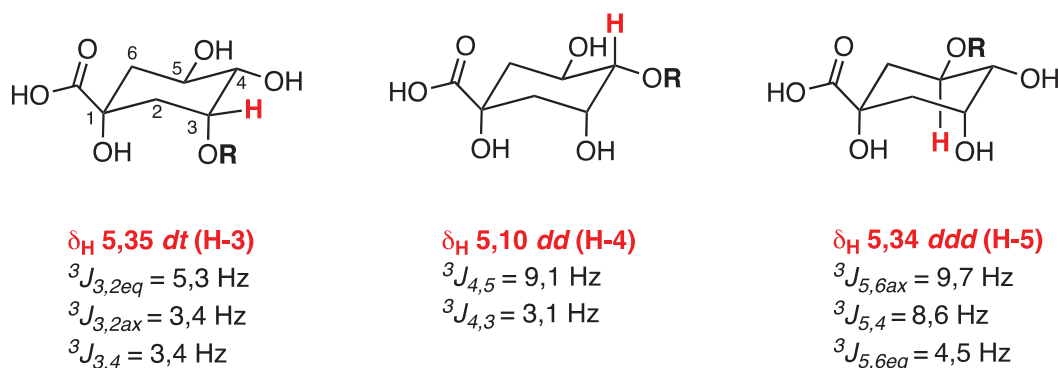
Como já mencionado anteriormente, os ácidos orgânicos são substâncias frequentes em espécies do gênero *Myrcia*. Dentre os ácidos fenólicos, destaca-se o ácido caféico que é encontrado em muitas espécies vegetais, incluindo aquelas do gênero *Myrcia*. Geralmente é isolado e/ou identificado na forma livre ou esterificado com o ácido quínico, o qual por sua vez também é muito comum no metabolismo especializado das plantas. Esses dois ácidos compartilham a mesma rota biossintética (via do ácido chiquímico). O ácido quínico possui quatro hidroxilas (em C-1, C-3, C-4 e C-5) que podem sofrer esterificação, sendo esta mais comum nas posições C-3, C-4 e C-5, gerando os chamados ácidos cafeoilquínicos (FIGURA 183).

FIGURA 183 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁCIDOS QUÍNICO E CAFÉICO



Considerando o ácido quínico livre, os hidrogênios oximetínicos localizados em C-3, C-4 e C-5 apresentam deslocamentos químicos entre δ_H 3,3-4,1. A esterificação em qualquer uma destas hidroxilas gera uma desproteção do hidrogênio geminal ao grupo cafeoila, deslocando o sinal para a região de δ_H 5,0 a 6,0 ppm. Sendo assim, para determinar a localização do grupo cafeoila deve-se notar qual sinal foi deslocado, bem como a sua multiplicidade, visto que mesmo ocorrendo uma esterificação as constantes de acoplamento permanecem sem e/ou com pouca variação. Quando é observado no espectro de RMN de 1H um duplo-triplete com duas constantes de acoplamento pequenas ($J = 5,3$ e $3,4$ Hz) a esterificação ocorreu na posição C-3 do ácido quínico, originando o ácido 3-O-cafeoilquínico. Já quando é observado um duplo-duplete com uma constante de acoplamento grande e uma pequena ($J = 9,1$ e $3,1$ Hz) a esterificação é em C-4 (ácido 4-O-cafeoilquínico). Por outro lado, quando se observa um duplo-duplo-duplete com duas constantes de acoplamento grandes e uma pequena ($J = 9,7$, $8,6$ e $4,5$ Hz) tem-se o ácido 5-O-cafeoilquínico (PAULI et al., 1998). Na FIGURA 184 estão apresentados esses dados (metanol- d_4 , 600 MHz), os quais são aproximados, visto que os mesmos podem sofrer alterações quando o espectro de RMN de 1H é realizado em solventes diferentes ou em mistura. Vale enfatizar que durante muito tempo houve confusão na numeração do ácido quínico, principalmente na inversão das posições C-3 e C-5. Devido a isto, há muita incoerência nos dados reportados da literatura. Sendo assim, a numeração utilizada nesse trabalho está de acordo com a recomendação da IUPAC (1973) que considera que a posição C-1 é aquela que apresenta um grupo hidroxila em *axial* e um grupo carboxila em *equatorial*, e que a posição C-3 é aquela que possui um grupo hidroxila em *axial* (PAULI et al., 1998).

FIGURA 184 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E CONSTANTES DE ACOPLAMENTO (J) DOS ÁCIDOS CAFEILOQUÍNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz)



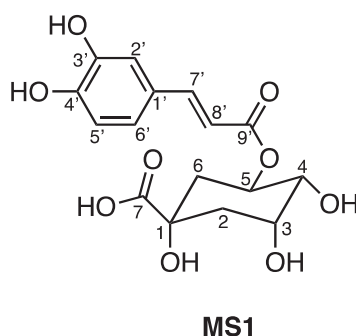
Fonte: Adaptado de PAULI et al., 1998.

O presente estudo fitoquímico das folhas de *Myrcia selloi* permitiu o isolamento de seis ácidos cafeoilquínicos, os quais foram codificados como **MS1-MS6**, e serão descritos a seguir.

2.6.1.1 Identificação de **MS1**

A substância **MS1** (FIGURA 185) foi isolada, com aspecto de um sólido de cor amarela, em mistura com outras substâncias minoritárias.

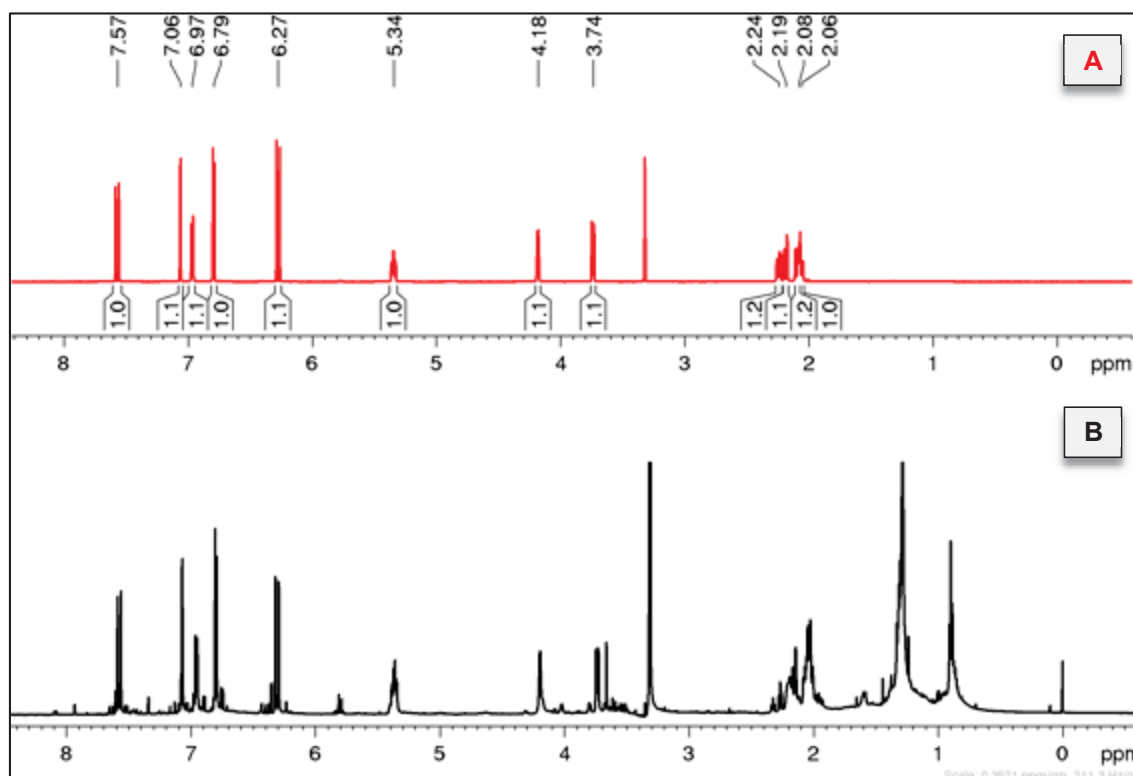
FIGURA 185 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA SUBSTÂNCIA **MS1**



O espectro de RMN de ^1H de **MS1** (FIGURA 186) evidenciou a presença de um grupo cafeoila e do ácido quínico, indicando um ácido cafeoilquínico. Considerando a abordagem descrita no subitem anterior, o ponto chave para propor a localização do grupo cafeoila no ácido quínico é por meio da análise da multiplicidade e das constantes de acoplamento do hidrogênio que se deslocou. Portanto, o sinal atribuído

ao hidrogênio geminal ao grupo hidroxila esterificado corresponde a um duplo-duplo-duplete em δ_H 5,37, com três constantes de acoplamento, sendo duas grandes e uma pequena em $J = 10,7, 9,5$ e $4,7$ Hz. De acordo com as comparações citadas, esse sinal pode ser atribuído para H-5 (PAULI et al., 1998). Através desses dados foi possível deduzir que **MS1** se tratava do ácido clorogênico, o mais comum da série dos ácidos cafeoilquínicos. A fim de confirmar essa identificação, foi realizado o espectro de RMN de 1H do padrão do ácido clorogênico (adquirido comercialmente, Acros Organics), separadamente. Analisando a sobreposição dos dois espectros (FIGURA 187-189) é possível verificar que os espectros são sobreponíveis, confirmando tratar-se da mesma substância. Devido a isto, as demais atribuições foram realizadas por meio dos dados obtidos da amostra-padrão, uma vez que no seu espectro de RMN de 1H não há sinais de impurezas e a resolução está melhor, facilitando a atribuição dos sinais. Além disso, servirá como referência para os demais ácidos cafeoilquínicos que serão descritos no decorrer desse subitem.

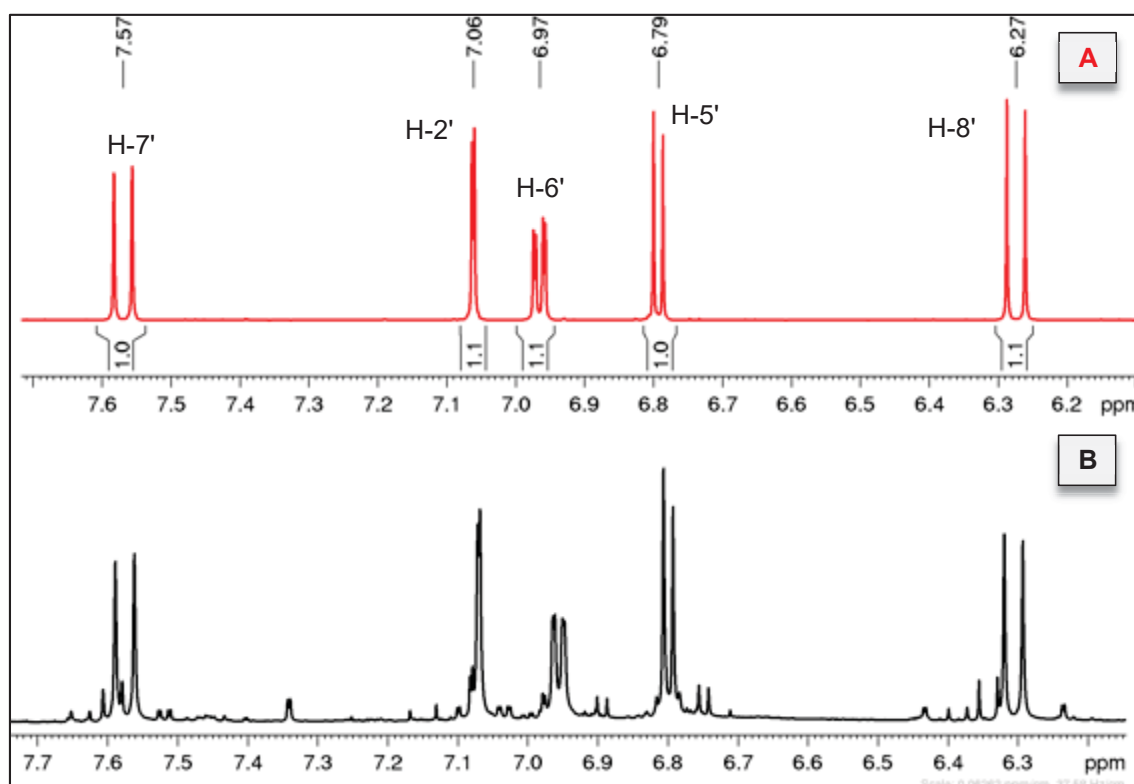
FIGURA 186 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE 1H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) COM **MS1** (B) (METANOL- d_4 , 600 MHz)



Ampliando a região de hidrogênios olefínicos, foram observados cinco sinais. Destes, três foram atribuídos a hidrogênios de um anel aromático, em um único

sistema de spins, indicado por um duplo-duplete em δ_H 7,06 (1H, $J = 1,9$ Hz, H-2'), um duplo-duplete em δ_H 6,97 (1H, $J = 8,2$ e $1,9$ Hz, H-6') e um duplete em δ_H 6,79 (1H, $J = 8,2$ Hz, H-5'). Estes dados são característicos de acoplamentos *meta*, *orto/meta* e *orto*, respectivamente, evidenciando um anel aromático do tipo 1,3,4-trissubstituído. Ainda na mesma região, foram observados dois dupletos em δ_H 7,57 (1H, $J = 15,8$ Hz, H-7') e 6,27 (1H, $J = 15,8$ Hz, H-8'), os quais são típicos de hidrogênios olefínicos em configuração *E*. Esse conjunto de sinais indicam a presença do grupo cafeoila em **MS1** (LEE et al., 2010) (FIGURA 187).

FIGURA 187 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE 1H DOS SINAIS DO GRUPO CAFEOILA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) E DE **MS1** (B)



Foram observados na região de δ_H 5,4 a 2,0 ppm os sinais do ácido quínico (FIGURA 189). O sinal atribuído ao hidrogênio oximetínico geminal à hidroxila esterificada foi um duplo-duplo-duplete em δ_H 5,35 (1H, $J = 9,5$, $8,5$ e $4,5$ Hz, H-5); os demais sinais de hidrogênios oximetínicos foram observados como um duplo-triplete em δ_H 4,18 (1H, $J = 5,3$ e $3,1$ Hz, H-3), e um duplo-duplete em δ_H 3,74 (1H, $J = 8,5$ e $3,1$ Hz, H-4). Já os hidrogênios metilênicos foram observados como um duplo-duplo-duplete em δ_H 2,24 (1H, $J = 13,4$, $4,5$ e $2,2$ Hz, H-H-6_{eq}), um duplo-duplete em δ_H 2,19

(1H, $J = 14,1$ e $3,5$ Hz, H-2_{ax}), um duplo-duplete em δ_H 2,08 (1H, $J = 13,4$ e $9,6$ Hz, H-6_{ax}), e um duplo-duplo-duplete em δ_H 2,05 (1H, $J = 14,1$, $5,3$ e $2,2$ Hz, H-2_{eq}) (FIGURA 188).

FIGURA 188 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO (J EM HZ) DO ÁCIDO QUÍNICO EM **MS1**

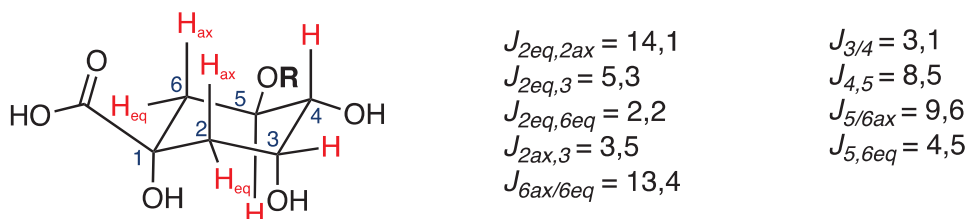
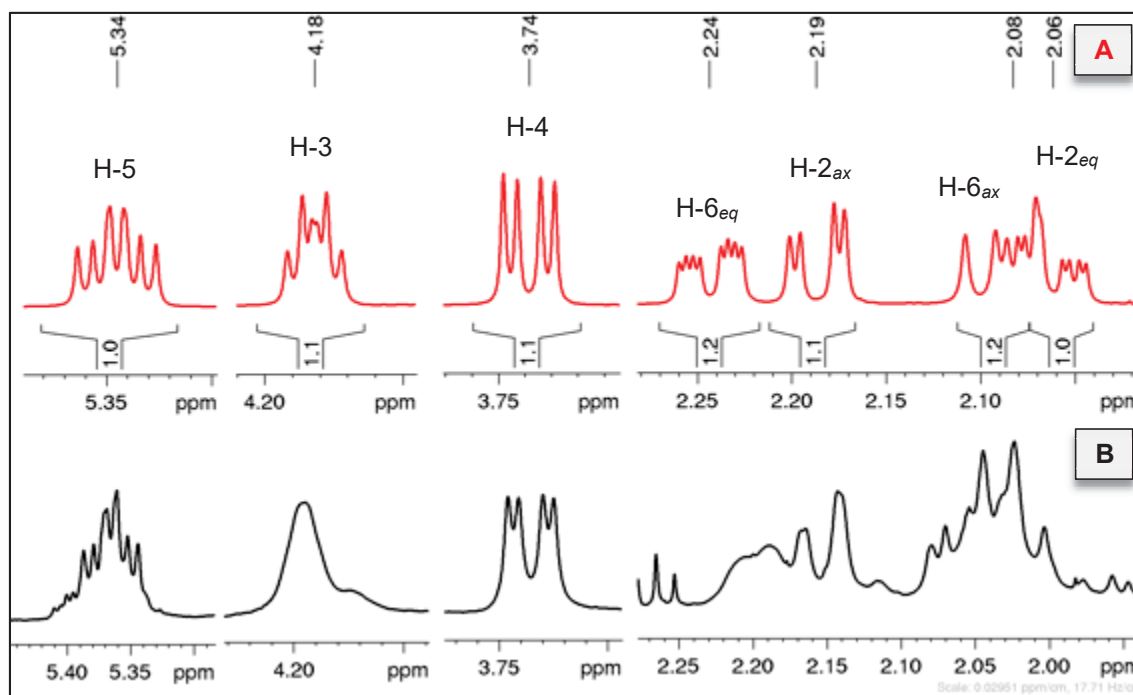


FIGURA 189 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE 1H DOS SINAIS DO ÁCIDO QUÍNICO NO ÁCIDO CLOROGÊNICO (A) E **MS1** (B)



Observando os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURAS 191 e 192) foi possível confirmar o grupo cafeóila. O sinal em δ_H 7,06 (H-2') revelou no HSQC estar ligado ao carbono em δ_C 113,6, e no HMBC revelou correlações com um carbono olefínico em δ_C 121,4 (C-6'), e dois carbonos olefínicos oxigenados em δ_C 145,8 (C-3') e 148,5 (C-4'), os quais indicam dois grupos hidroxila vizinhos. E ainda, o sinal em δ_H 6,25 (H-8') mostrou correlações com dois carbonos, sendo um olefínico em δ_C 126,1 (C-1') e uma carbonila de éster em δ_C 167,4 (C-9'), indicando um sistema α,β -

insaturado. Já o sinal em δ_H 6,97 (H-6') correlacionou com os carbonos em δ_C 114,8 (C-5') e com os carbonos olefínicos oxigenados em C-3'e C-4' (FIGURA 190).

FIGURA 190 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DO GRUPO CAFEÓILA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

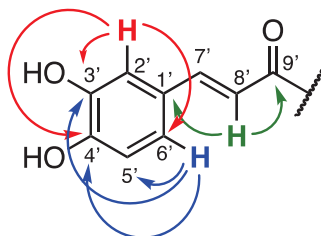


FIGURA 191 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C (HSQC) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz)

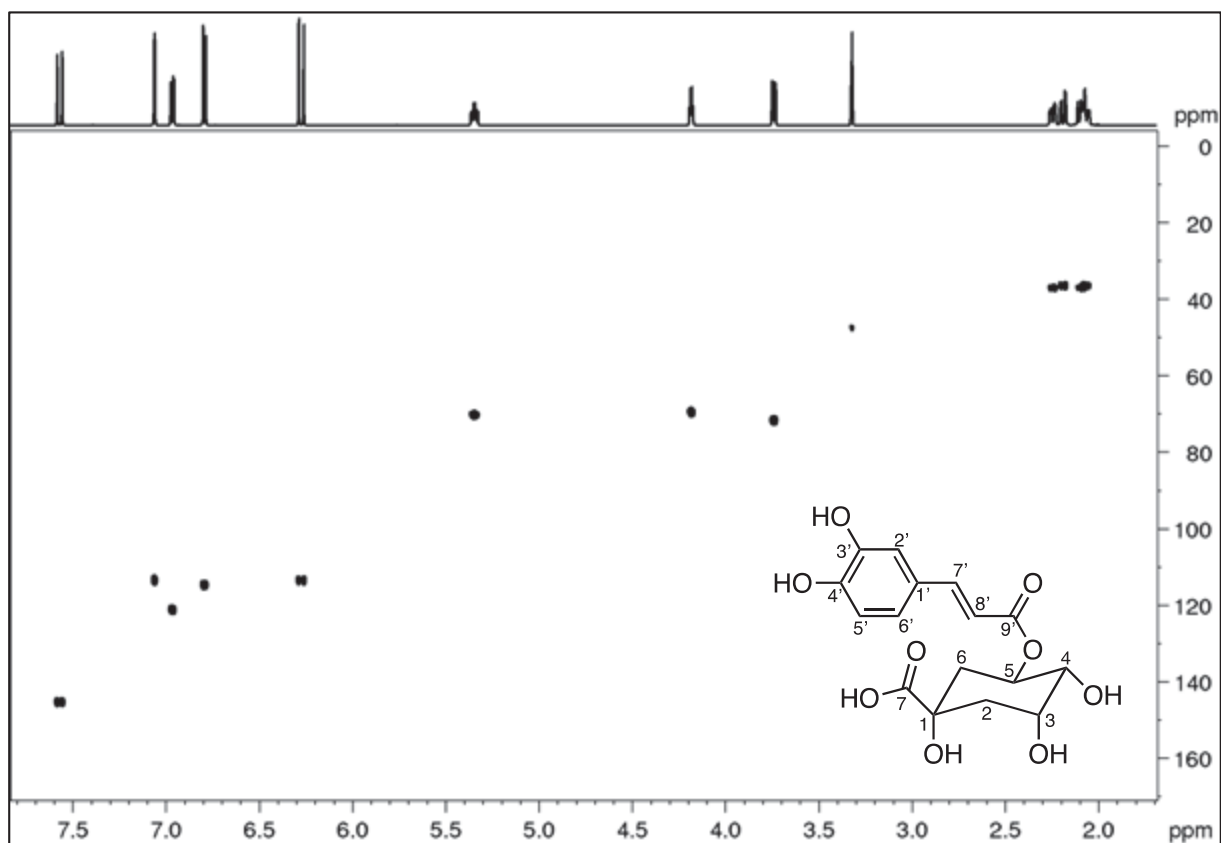
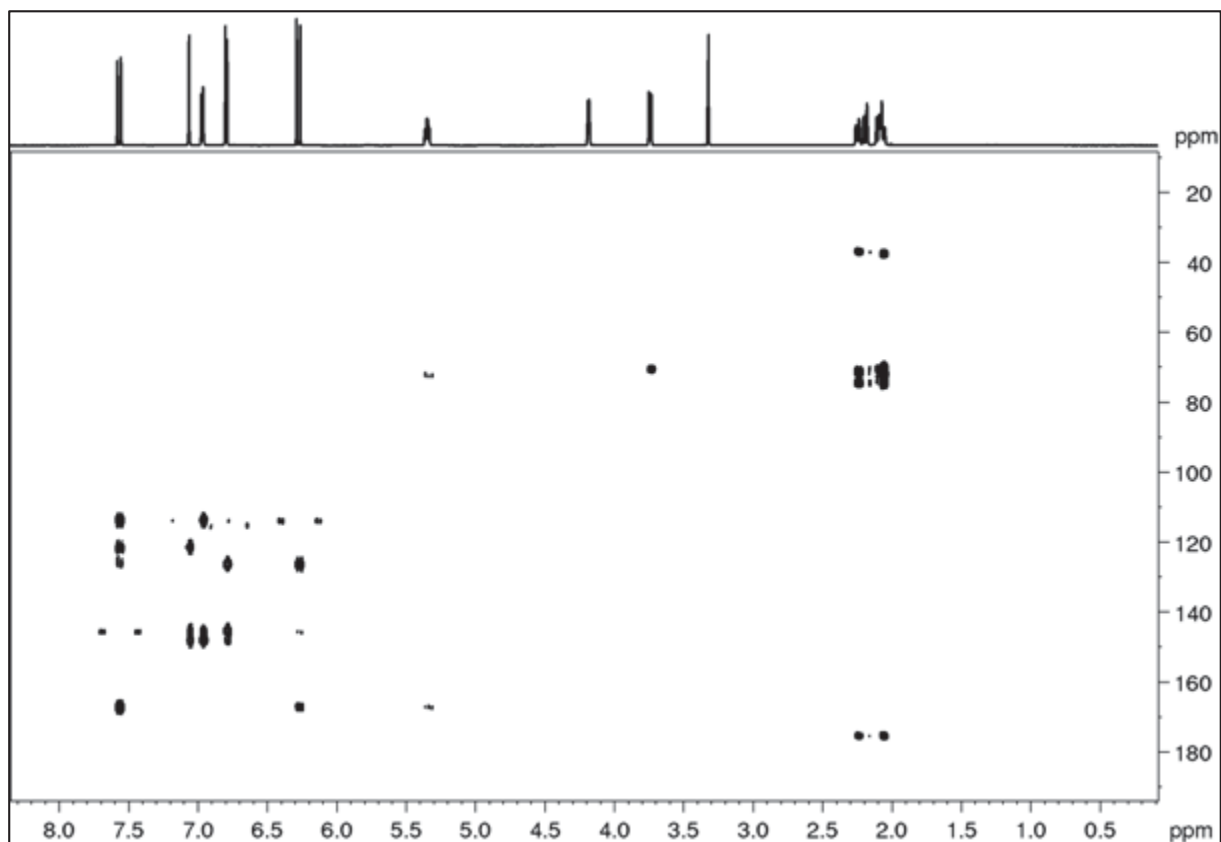
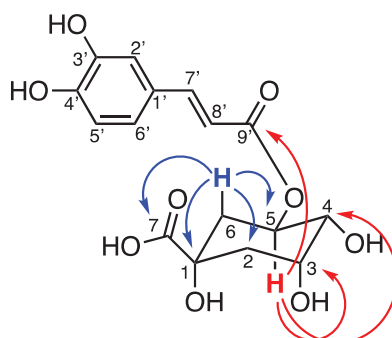


FIGURA 192 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz)



O HMBC ainda mostrou que o sinal em δ_{H} 2,08 (H-6_{ax}) correlacionava com um carbono metilênico em δ_{C} 36,9 (C-2) e dois carbonos oxigenados em δ_{C} 70,2 (C-5) e 74,5, sendo esse último atribuído a C-1, além de uma carboxila em δ_{C} 175,5, confirmando tratar-se de um ácido orgânico. Já o sinal em δ_{H} 5,35 (H-5) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 69,6 (C-3) e 71,7 (C-4) e com a carbonila de éster do grupo cafeoíla em δ_{C} 167,4 (C-9'), indicando mais uma vez a esterificação na posição 5-OH do ácido quínico (FIGURA 193).

FIGURA 193 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DO ÁCIDO QUÍNICO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO



Todos os dados de RMN obtidos e a comparação com a literatura (TABELA 47) confirmaram **MS1** como o ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico, PAULI et al., 1998; LEE et al., 2010), um ácido orgânico muito comum em espécies do gênero *Myrcia* e, que já havia sido identificado em mistura no extrato de *M. selloi* (SALVADOR et al., 2011).

TABELA 47 – DADOS DE RMN DE **MS1** (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO (METANOL- d_4 , 600 MHz, PAULI et al., 1998; METANOL- d_4 300 MHz, LEE et al., 2010)

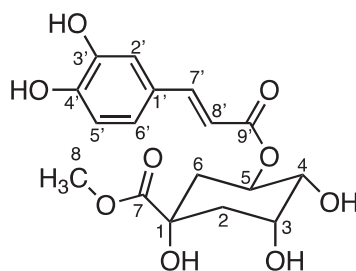
Posição	MS1			Ácido clorogênico	
	δ_c	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c^*	δ_H mult (J em Hz)**
1	74,5	-	-	76,1	-
2	36,4	2,19 dd (14,1, 3,5) ^a 2,06 dd (14,1, 5,3 e 2,2) ^b	1,5,6,7	38,2	2,16 dd (14,2 e 3,3) ^a 2,04 ddd (14,2, 5,1 e 2,3) ^b
3	69,5	4,18 dt (5,3 e 3,1)	1,2,5	71,3	4,16 dt (5,1 e 3,3)
4	71,7	3,74 dd (8,5 e 3,1)	5,6	73,5	3,72 dd (8,6 e 3,2)
5	70,2	5,34 ddd (9,5, 8,5 e 4,5)	3,4,9'	72,0	5,34 dd (9,7, 8,6 e 4,5)
6	36,9	2,08 d (13,4 e 9,5) ^a 2,24 ddd (13,4, 4,5 e 2,2) ^b	1,2,5,7 1,2,5,7	38,8	2,06 dd (13,3 e 9,7) ^a 2,23 ddd (13,3 e 4,5 e 2,3) ^b
7	175,5	-	-	177,0	-
1'	126,1	-	-	127,8	-
2'	113,6	7,06 d (1,9)	3',4',6'	115,2	7,04 d (2,1)
3'	145,8	-	-	146,8	-
4'	148,5	-	-	149,6	-
5'	114,8	6,79 d (8,1)	1',3',4'	116,5	6,77 d (8,2)
6'	121,4	6,97 dd (8,2 e 1,9)	3',4',5'	123,0	6,94 dd (8,2 e 2,1)
7'	145,3	7,57 d (15,8)	6',8',9'	147,1	7,55 d (15,9)
8'	113,4	6,27 d (15,8)	1',9'	115,3	6,25 d (15,9)
9'	167,4	-	-	168,7	-

*CH₃OH- d_4 , 300 MHz, 100 MHz; **CH₃OH- d_4 , 600 MHz. ^a H_{axial}, ^b H_{equatorial}.

2.6.1.2 Identificação de **MS2**

A substância **MS2** (FIGURA 194) foi isolada como um sólido amorfo, amarelo. Os dados de RMN obtidos para **MS2** revelaram um perfil muito similar ao obtido para **MS1** (ácido clorogênico), indicando conter o mesmo esqueleto carbônico básico.

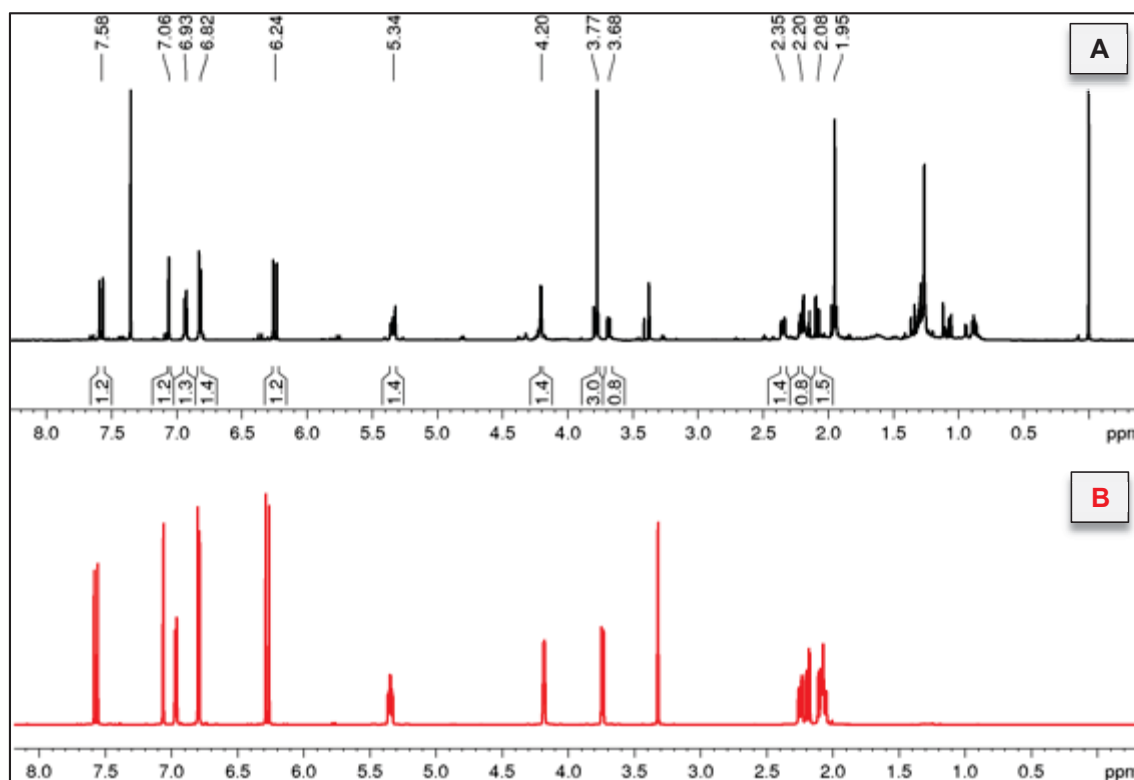
FIGURA 194 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS2**



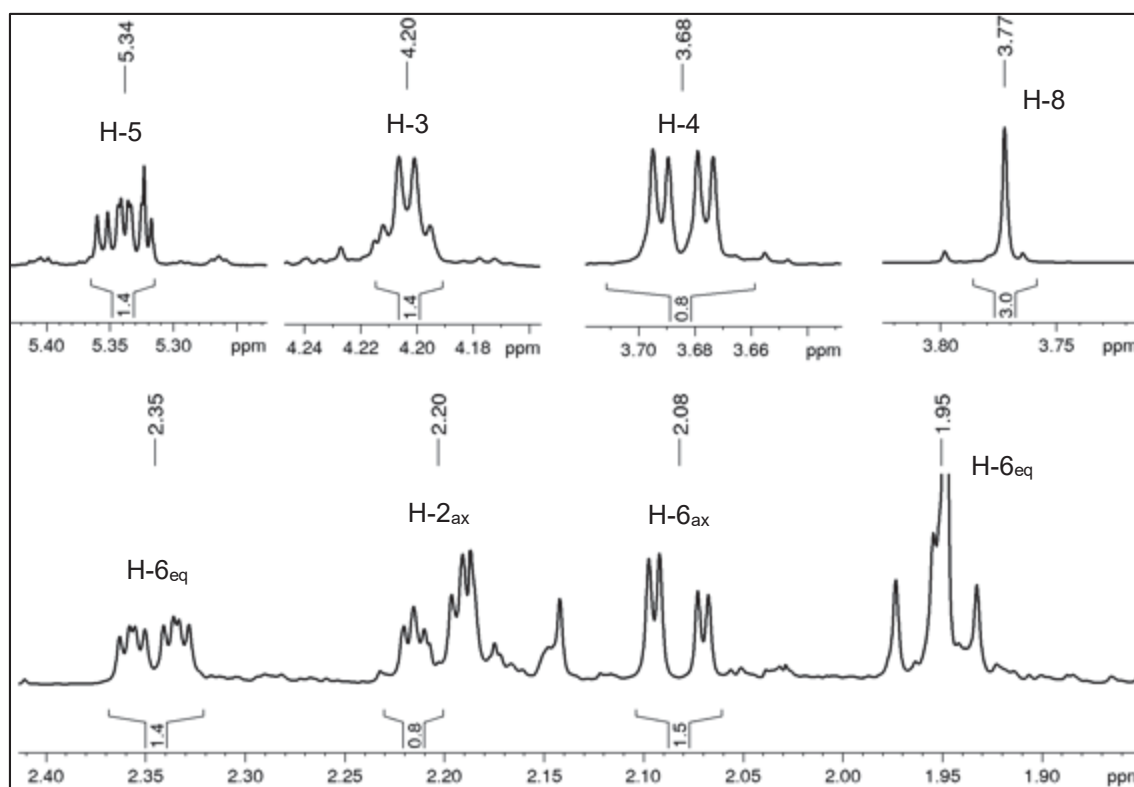
MS2

Observando a sobreposição dos espectros de RMN de ^1H de **MS2** com o ácido clorogênico (utilizado para as atribuições de **MS1**) (FIGURAS 195 e 196) foi possível observar semelhanças entre os espectros. Alguns sinais revelaram pequenas diferenças, o que pode ser justificado pelo solvente utilizado para solubilizar **MS2** (clorofórmio- d + gotas de metanol- d_4), diferentemente do ácido clorogênico que foi solubilizado em metanol- d_4 puro.

FIGURA 195 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DE **MS2** (A, CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz) COM O ÁCIDO CLOROGÊNICO (B, METANOL- d_4 , 600 MHz)



Os sinais típicos do grupo cafeóila foram observados em δ_{H} 7,58 (1H, *dd*, $J = 15,8$ Hz, H-7'), 7,06 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz, H-2'), 6,93 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,9$ Hz, H-6'), 6,82 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz, H-5') e 6,24 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz, H-8'). Foram também observados os sinais do ácido quínico. O sinal de diagnóstico para confirmar a posição da esterificação foi um duplo-duplo-duplete em δ_{H} 5,34 com duas constantes de acoplamento grandes e uma pequena ($J = 10,8$, $9,8$ e $3,2$ Hz), indicando a esterificação em C-5, como no ácido clorogênico (PAULI et al., 1998). Os outros dois sinais referentes aos hidrogênios oximetínicos foram observados em δ_{H} 4,20 (1H, *dd*, $J = 6,7$ e $3,2$ Hz, H-3) e 3,68 (1H, *dd*, $J = 9,8$ e $3,2$ Hz, H-4), sendo esses deslocamentos químicos e multiplicidades compatíveis com a ausência de esterificação em C-3 e C-4. Os dois grupos metilênicos apresentaram sinais em δ_{H} 2,34 (1H, *ddd*, $J = 13,2$, $4,5$ e $3,0$ Hz, H-6_{eq}), 2,20 (1H, *dd*, $J = 14,5$ e $3,0$ Hz, H-2_{ax}), 2,08 (1H, *dd*, $J = 14,5$ e $3,0$ Hz, H-2_{eq}) e 1,95 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz, H-6_{ax}, parcialmente sobreposto a um simpleto de uma impureza) (FIGURA 196). Em adição, o espectro ainda revelou um simpleto em δ_{H} 3,77 (H-8), com integração para três hidrogênios, que estava ausente no espectro de RMN de ^1H de **MS1**, correspondente a um grupo metoxila presente em **MS2**.

FIGURA 196 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE **MS2**

O sinal em δ_{H} 5,34 (H-5) revelou pelo HSQC (FIGURA 198) estar ligado ao carbono em δ_{C} 70,6. E por meio do HMBC (FIGURA 199) foi possível atribuir as correlações desse hidrogênio com os carbonos em δ_{C} 38,7 (C-6), 73,5 (C-4) e com a carbonila de éster do grupo cafeoíla em δ_{C} 168,9 (C-9'). O sinal do grupo metoxila em δ_{H} 3,77 (H-8) indicou no HSQC estar ligado ao carbono em δ_{C} 52,3, e correlacionou com uma carbonila de éster em δ_{C} 175,1 (C-7) (FIGURA 197) Por meio desses dados foi possível concluir que havia uma segunda esterificação na carboxila do ácido quínico. Essas correlações, em conjunto com as demais observadas nos mapas HSQC e HMBC de **MS2** (TABELA 48) permitiu identificar **MS2** como o clorogenato de metila, um éster metílico do ácido clorogênico (LEE et al., 2010). Apesar de conhecido e amplamente encontrado em várias espécies vegetais, o clorogenato de metila está sendo reportado pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

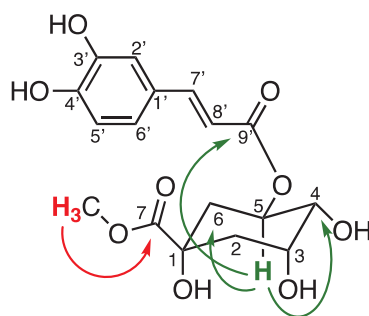
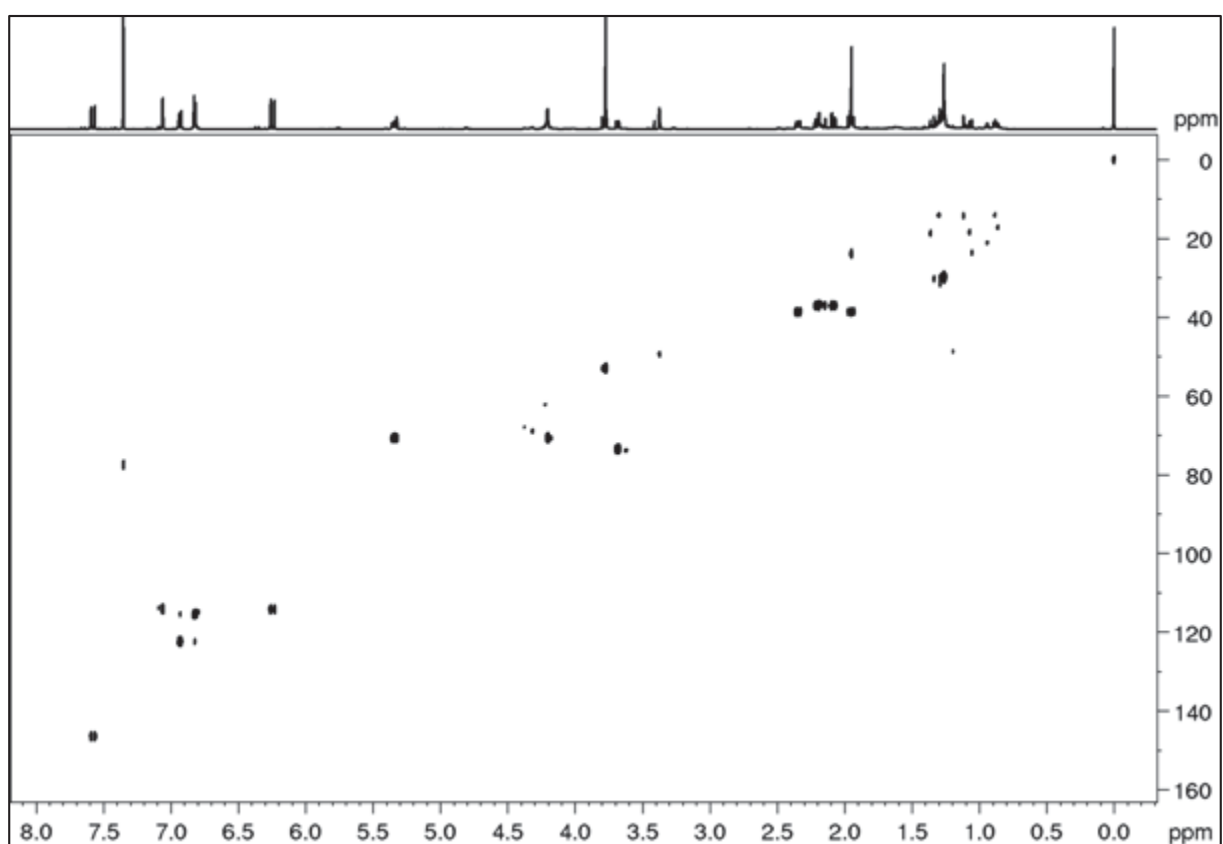
FIGURA 197 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS2**FIGURA 198 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS2**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

FIGURA 199 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS2**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

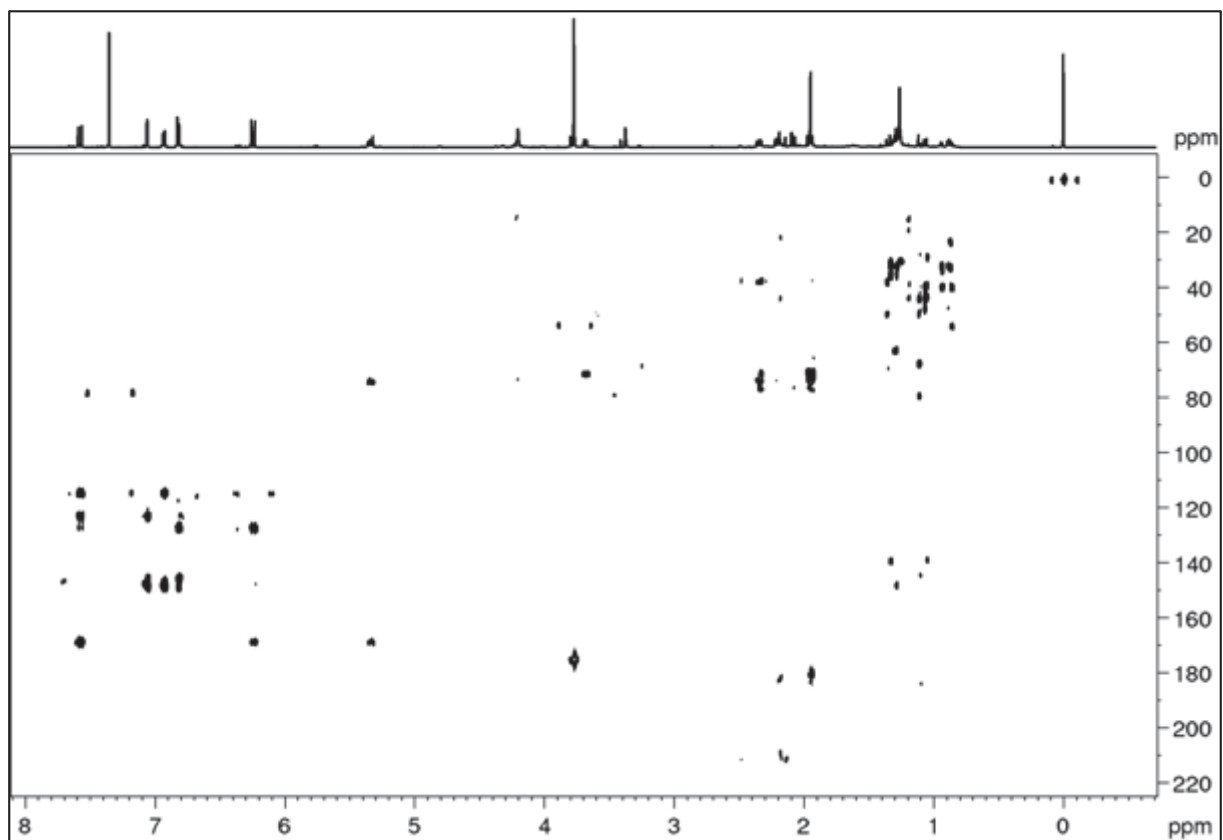


TABELA 48 – DADOS DE RMN DE **MS2** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O CLOGENATO DE METILA (METANOL-*d*₄, 300 MHz, LEE, et al 2010)

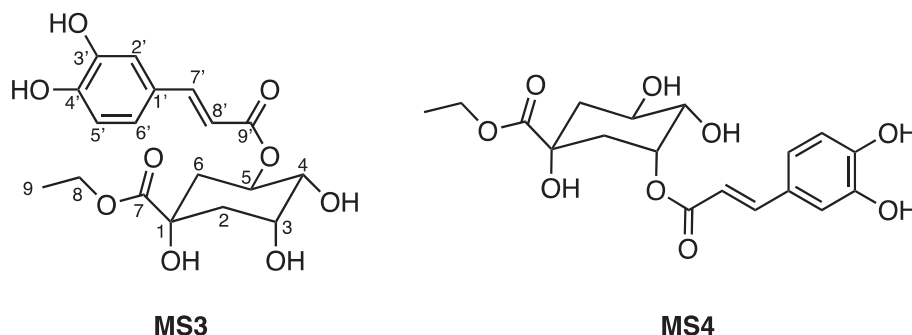
Posição	MS2			Clorogenato de metila	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	75,9	-	-	75,8	-
2	37,0	2,20 <i>dd</i> (14,5, 3,0) ^a 2,08 <i>dd</i> (14,5 3,0) ^b	n.o n.o	38,0	1,98 – 2,24 <i>m</i> 1,98 – 2,24 <i>m</i>
3	70,7	4,20 <i>dd</i> (6,7 e 3,2)	4	70,3	4,12 <i>quint</i> (3,3)
4	73,5	3,68 <i>dd</i> (9,8 e 3,2)	3,5	72,5	3,72 <i>dd</i> (7,5 e 3,0)
5	70,6	5,34 <i>ddd</i> (10,8, 9,8 e 4,5)	4,6,9'	72,1	5,26 <i>ddd</i> (7,5, 7,2 e 4,8)
6	38,7	1,95 <i>d</i> (10,8) ^a 2,34 <i>ddd</i> (13,2, 4,5 e 3,0) ^b	5 1,4,5	37,7	1,98 – 2,24 <i>m</i> 1,98 – 2,24 <i>m</i>
7	175,1	-	-	175,4	-
8	52,3	3,77 <i>s</i>	7	53,0	3,68 <i>s</i>
1'	127,3	-	-	127,6	-
2'	114,2	7,06 <i>d</i> (1,9)	4',6'	115,1	7,03 <i>d</i> (2,1)
3'	145,9	-	-	146,9	-
4'	148,7	-	-	149,7	-
5'	115,6	6,82 <i>d</i> (8,1)	1',3'	116,5	6,77 <i>d</i> (8,1)
6'	122,6	6,93 <i>dd</i> (8,2 e 1,9)	4',5'	123,0	6,94 <i>dd</i> (8,1 e 2,1)
7'	146,6	7,58 <i>d</i> (15,8)	6',8',9'	147,2	7,51 <i>d</i> (15,9)
8'	114,27	6,24 <i>d</i> (15,8)	1',9'	115,0	6,20 <i>d</i> (15,9)
9'	168,9	-	-	168,2	-
8	52,3	3,77 <i>s</i>	7	53,0	3,68 <i>s</i>

n.o = não observado. ^aH_{axial}, ^bH_{equatorial}.

2.6.1.3 Identificação de **MS3** e **MS4**

As substâncias **MS3** e **MS4** (FIGURA 200) foram isoladas, separadamente, como sólidos amarelos.

FIGURA 200 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **MS3** E **MS4**



Observando a sobreposição do espectro de RMN de ¹H de **MS3** com o ácido clorogênico (FIGURAS 201 e 202) foi possível identificar semelhanças. Os sinais

indicativos do grupo cafeoila foram observados em: δ_H 7,58 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-7'), 7,06 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz, H-2'), 6,92 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,8$ Hz, H-6'), 6,82 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-5') e 6,24 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-8'). Os sinais típicos do ácido quínico também estavam presentes no espectro. Foi observado um duplo-duplo-duplete em δ_H 5,34 (1H, $J = 11,0$, $9,6$ e $4,7$ Hz), o qual está de acordo com a esterificação em C-5 (PAULI et al., 1998). Os demais sinais do ácido quínico foram observados em: δ_H 4,20 (*m*, H-3, sinal parcialmente sobreposto com um quarteto em δ_H 4,22 (2H, $J = 7,1$ Hz, H-8), 3,69 (1H, *dd*, $J = 9,6$ e $3,3$ Hz, H-4), 2,34 (1H, *ddd*, $J = 13,1$, $4,5$ e $3,0$, H-6_{eq}), 2,20 (1H, *dd*, $J = 14,6$ e $3,0$ Hz, H-2_{ax}), 2,08 (1H, *dd*, $J = 14,6$ e $3,0$ Hz, H-2_{eq}) e 1,94 (1H, *dd*, $J = 13,1$ e $11,0$ Hz, H-6_{ax}) (FIGURA 202).

FIGURA 201 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE 1H DE **MS3** (A, CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz) COM O ÁCIDO CLOROGÊNICO (B, METANOL-*d*₄, 600 MHz)

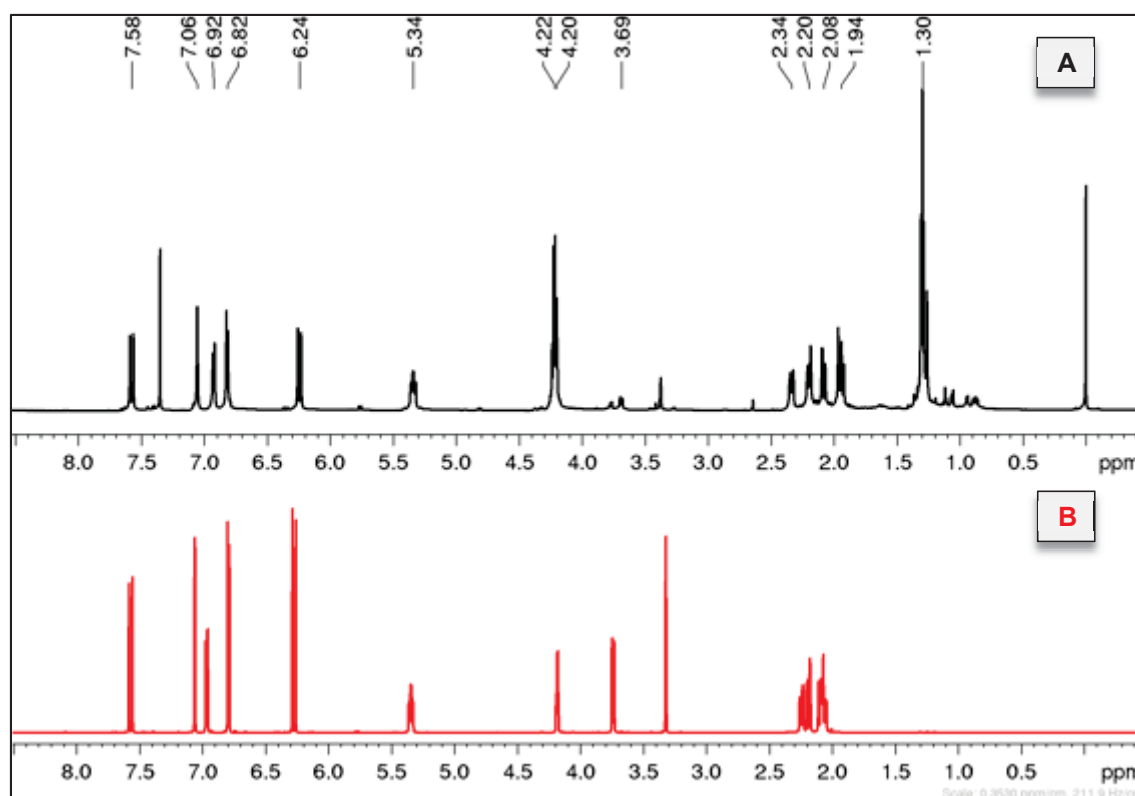
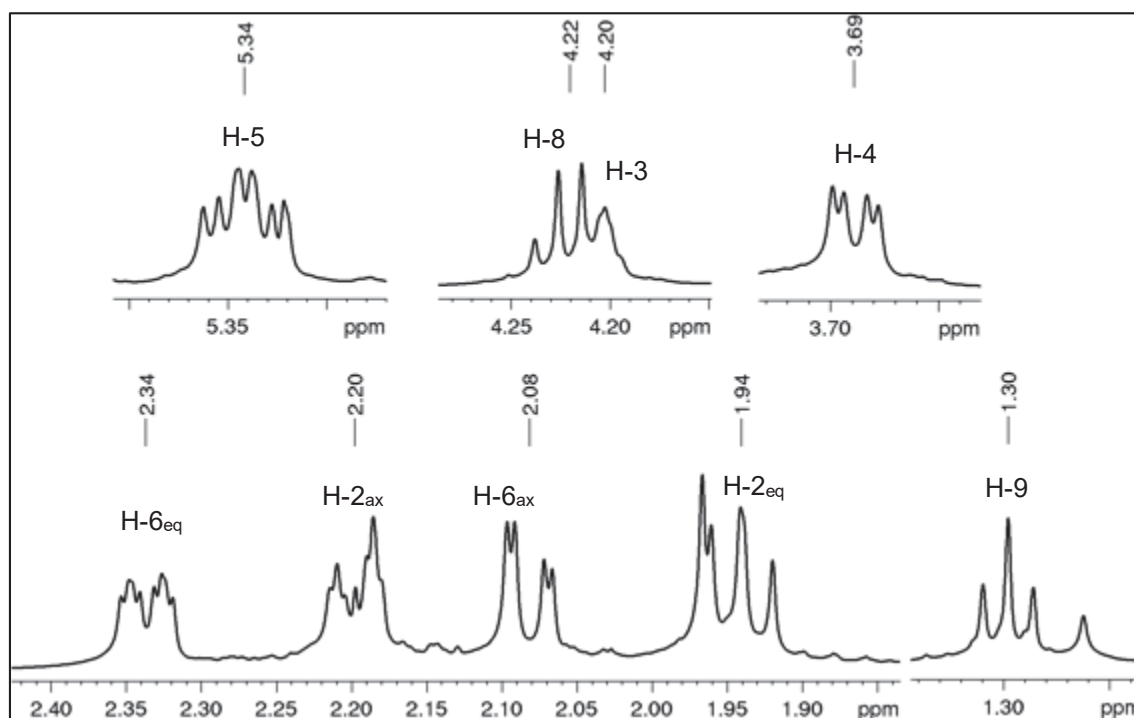


FIGURA 202 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA REGIÃO DO ÁCIDO QUÍNICO E DO GRUPO ETILA DE **MS3**



Adicionalmente, foram observados dois sinais, os quais permitiram distinguir **MS3** do ácido clorogênico. Esses sinais foram: um quarteto com integração para dois hidrogênios em δ_{H} 4,22 ($J = 7,1$ Hz, H-8), o qual é característico de um grupo metileno ligado a um átomo de oxigênio. A mesma constante de acoplamento foi observada para um tripleto, com integração para três hidrogênios, em δ_{H} 1,30 ($J = 7,1$ Hz, H-9), típico de uma metila terminal. Esses dados são condizentes com um grupo etoxila. A confirmação, bem como posição do grupo etoxila foi determinada por meio do HSQC e HMBC (FIGURAS 204 e 205). O sinal em δ_{H} 4,22 (H-8) revelou pelo HSQC estar ligado ao carbono em δ_{C} 62,3, e correlacionou no HMBC com o carbono metílico em δ_{C} 14,3 (C-9) e com uma carbonila de éster em δ_{H} 174,5, típica de C-7. Por outro lado, o sinal em δ_{H} 1,30 (H-9) está ligado ao carbono em δ_{C} 14,3, e apresentou correlação no HMBC com C-8. Em adição, o H-5 (5,34) correlacionou com um carbono oxigenado em δ_{C} 73,8, típico de H-4, e com a carbonila de éster do grupo cafeoila em 168,1 (C-9') (FIGURA 203).

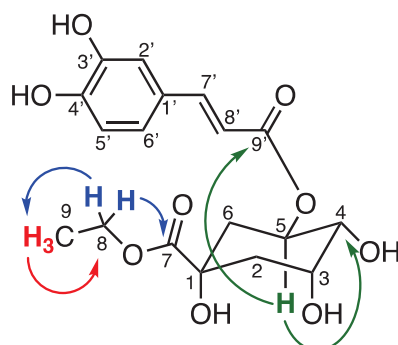
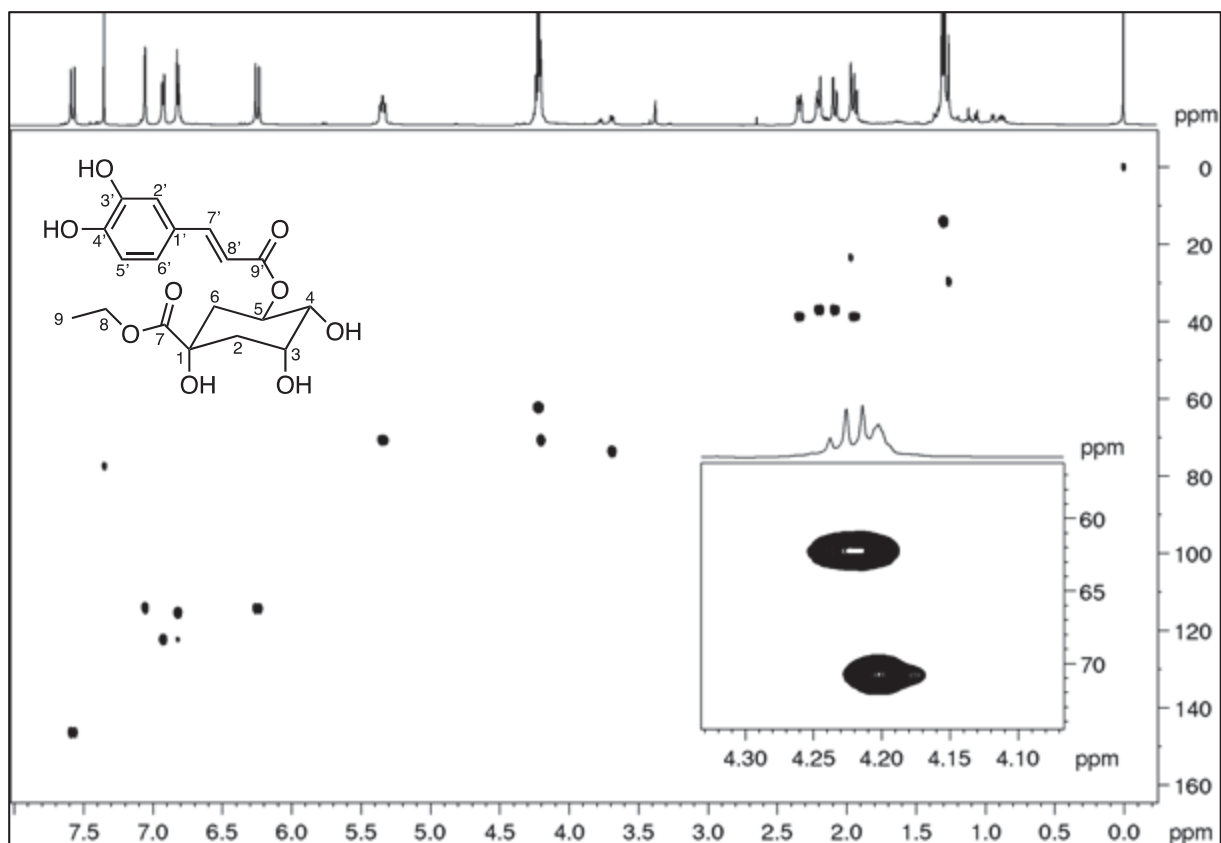
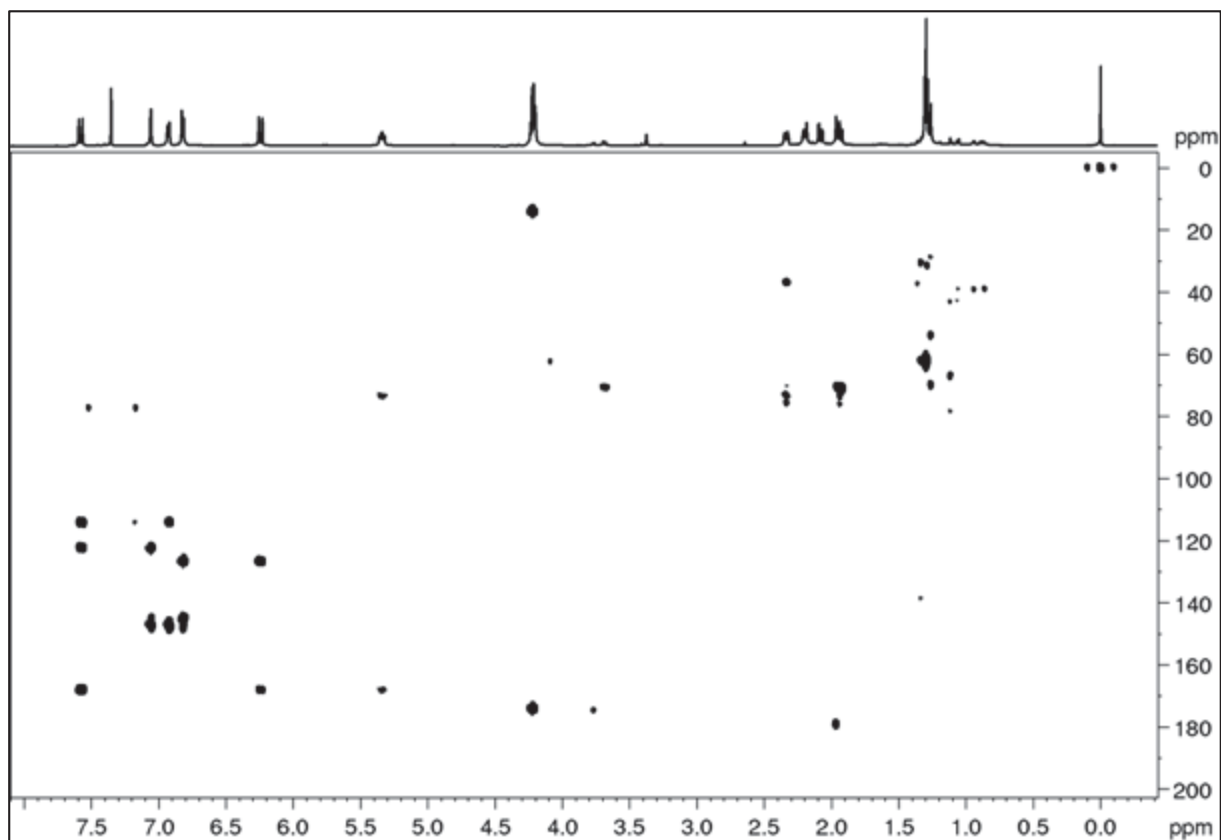
FIGURA 203 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE **MS3**FIGURA 204 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS3**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

FIGURA 205 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS3**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)



Diante dos sinais descritos e das demais correlações observadas no HSQC e HMBC (TABELA 49) foi possível identificar **MS3**, como clorogenato de etila, um éster etílico do ácido clorogênico (YOUN et al., 2015). De acordo com a revisão bibliográfica esse é seu primeiro relato no gênero *Myrcia*.

TABELA 49 – DADOS DE RMN DE **MS3** (CLOROFÓRMIO-*d* + GOTAS DE METANOL-*d*₄, 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O CLOROGENATO DE ETILA (DMSO-*d*₆, 600 MHz, YOUN et al., 2015)

Posição	MS3			Clorogenato de etila	
	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ_C	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
1	75,7	-	-	77,6	-
2	37,1	2,20 <i>dd</i> (14,6, 3,0) ^a 2,08 <i>dd</i> (14,6 3,0) ^b	n.o 1	39,7	1,96 <i>d</i> (13,2) 1,96 <i>d</i> (13,2)
3	70,8	4,20 <i>m</i>	1	72,1	3,39 <i>dd</i> (4,2 e 3,0)
4	73,7	3,69 <i>dd</i> (9,6 e 3,3)	3,5	74,3	3,60 <i>dd</i>
5	70,7	5,33 <i>ddd</i> (10,8, 9,8 e 4,5)	4,9'	74,0	5,01 <i>dt</i> (9,6)
6	38,8	1,94 <i>dd</i> (13,1 e 11,0) ^a 2,34 <i>ddd</i> (13,2, 4,5 e 3,0) ^b	1,4,5 1,2,4	39,5	n.o 2,15 <i>ddd</i> (12,6, 5,4 e 3,6)
7	174,9	-	-	177,0	-
8	62,1	4,22 <i>q</i> (7,1)	7,9	64,6	3,60 <i>m</i>
9	14,1	1,30 <i>t</i> (7,1)	8	16,1	1,67 <i>t</i>
1'	127,1	-	-	129,4	-
2'	114,2	7,06 <i>d</i> (1,8)	3',6'	118,5	7,01 <i>d</i> (2,4)
3'	147,7	-	-	117,0	-
4'	147,9	-	-	151,4	-
5'	115,3	6,82 <i>d</i> (8,2)	1',3',4'	149,2	6,70 <i>d</i> (7,8)
6'	122,7	6,92 <i>dd</i> (8,2 e 1,8)	2',3',4'	116,8	6,94 <i>dd</i> (8,4 e 2,4)
7'	146,5	7,58 <i>d</i> (15,9)	4',6',8',9'	148,5	7,41 <i>d</i> (15,6)
8'	114,3	6,24 <i>d</i> (15,9)	1',9'	125,0	6,07 <i>d</i> (15,6)
9'	168,4	-	-	170,4	-

^aH_{axial}, ^bH_{equatorial}; n.o = não observado.

A substância **MS4** foi isolada em mistura com **MS2** (clorogenato de metila). Devido a isto, alguns sinais no espectro de RMN de ¹H (FIGURAS 206 e 207) apresentaram sobreposição. Entretanto, foi possível identificar os principais sinais e realizar a identificação de **MS4**. Foram identificados os sinais característicos do grupo cafeoíla na região de hidrogênios olefínicos, além dos sinais do ácido quínico. Foi também observado um duplo-triplete em δ_H 5,37, com duas constantes de acoplamento pequenas (*J* = 6,9 e 3,7 Hz), estando coerente com a esterificação em C-3 (diferenciando-se dos demais ésteres descritos até aqui, com esterificação em C-5) (PAULI et al., 1998). Os outros dois sinais oximetínicos do ácido quínico foram observados como um multiplete em δ_H 4,12 (H-5) e um duplo-duplete em δ_H 3,68 (*J* = 8,0 e 3,3 Hz), o qual é típico de H-4. Também estavam presentes os sinais do grupo etoxila em δ_H 4,18 (*q*, *J* = 7,1 Hz, H-8) e 1,29 (*t*, *J* = 7,1 Hz, H-9). Os sinais característicos dos grupos metilênicos do ácido quínico (H-2 e H-6) foram observados

na faixa de δ_H 1,95 a 2,23, os quais estavam sobrepostos com os sinais de **MS2** (FIGURA 207).

FIGURA 206 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **MS4** (METANOL- d_4 , 600 MHz)

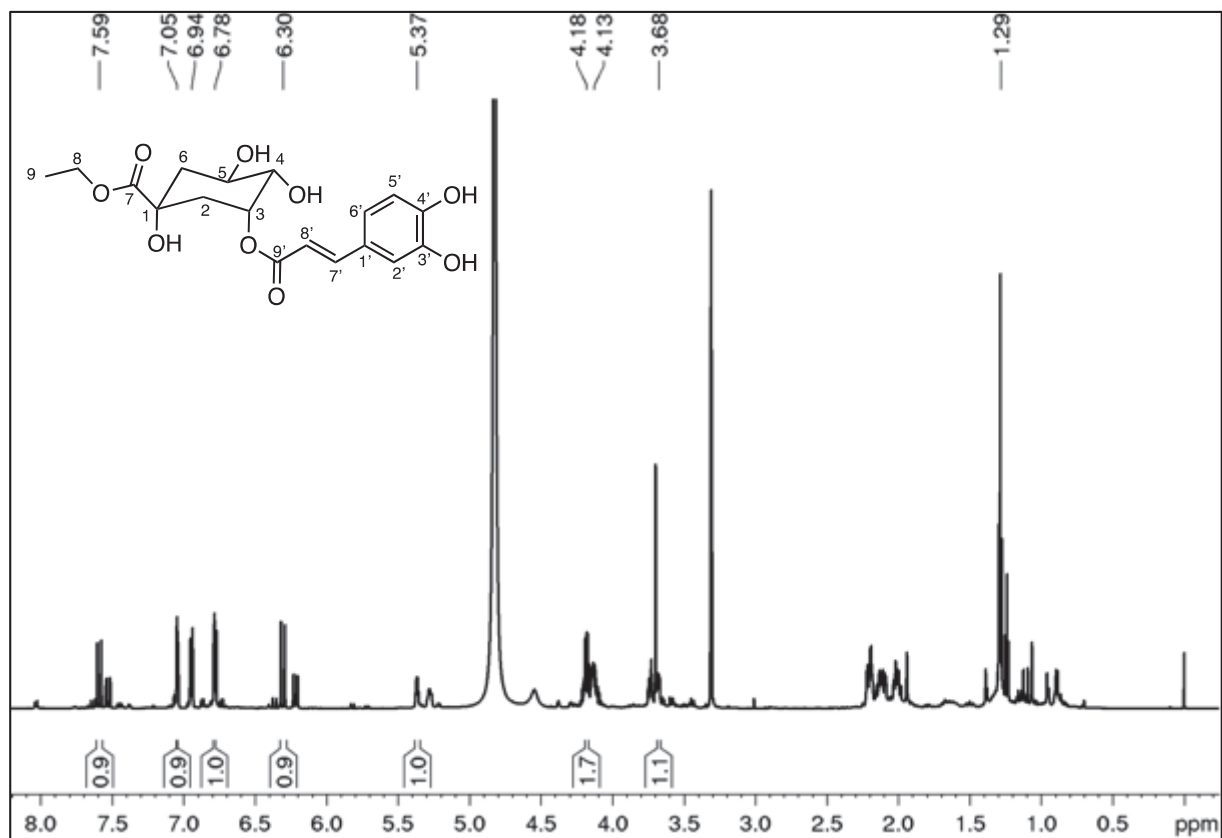
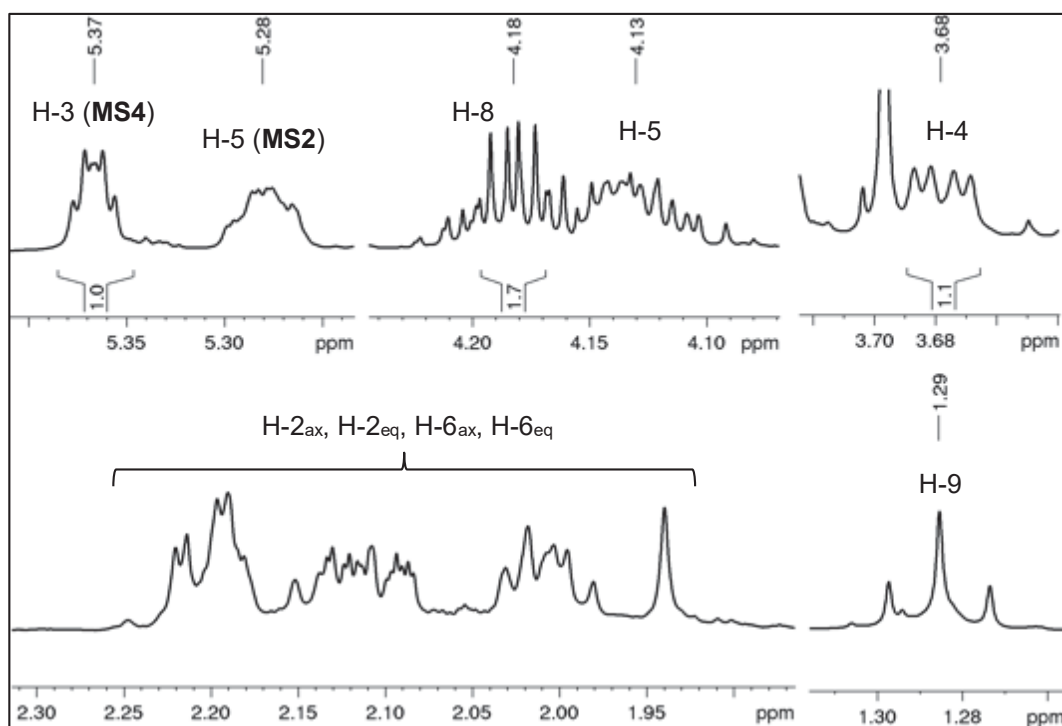


FIGURA 207 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS PRINCIPAIS SINAIS DE **MS4**

O sinal em δ_{H} 5,37 correlacionou no HSQC (FIGURA 209) com o carbono em δ_{C} 72,8. A longa distância (HMBC, FIGURAS 210 e 211) esse sinal apresentou correlações com os carbonos oxigenados em δ_{C} 68,7 (C-5) e 75,2 (C-1) e com a carbonila de éster do grupo cafeoila em δ_{C} 169,1 (C-9'), confirmando a sua posição em C-3. Já o sinal em δ_{H} 4,18 (H-8) correlacionou no HMBC com a metila vizinha a ele em δ_{C} 14,5 (C-9) e com a carbonila em δ_{C} 176,0 (C-7), confirmando, como em **MS3**, um grupo etoxila (FIGURA 208).

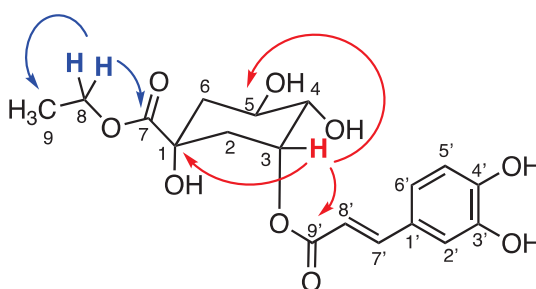
FIGURA 208 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADOS NO HMBC DE **MS4**

FIGURA 209 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS4**
(METANOL- d_4 , 600 MHz)

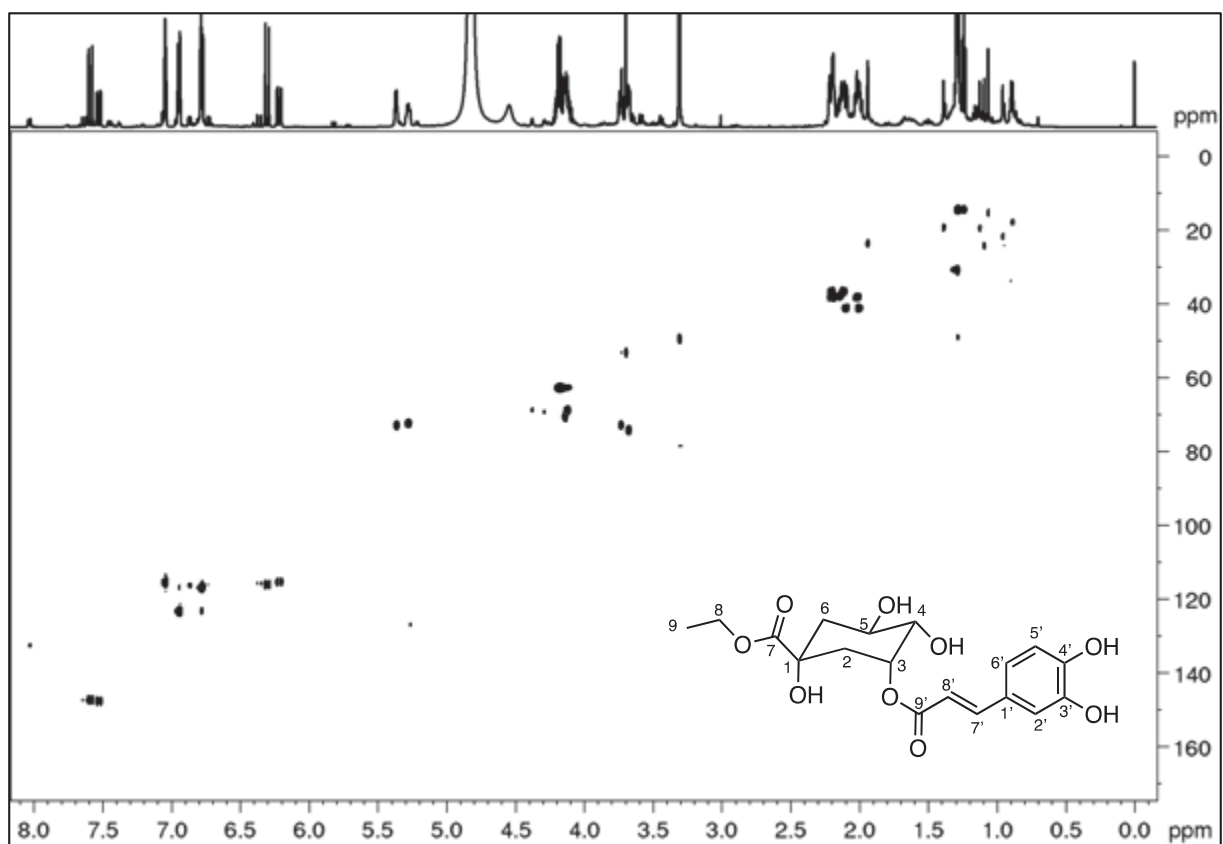


FIGURA 210 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS4**
(METANOL- d_4 , 600 MHz)

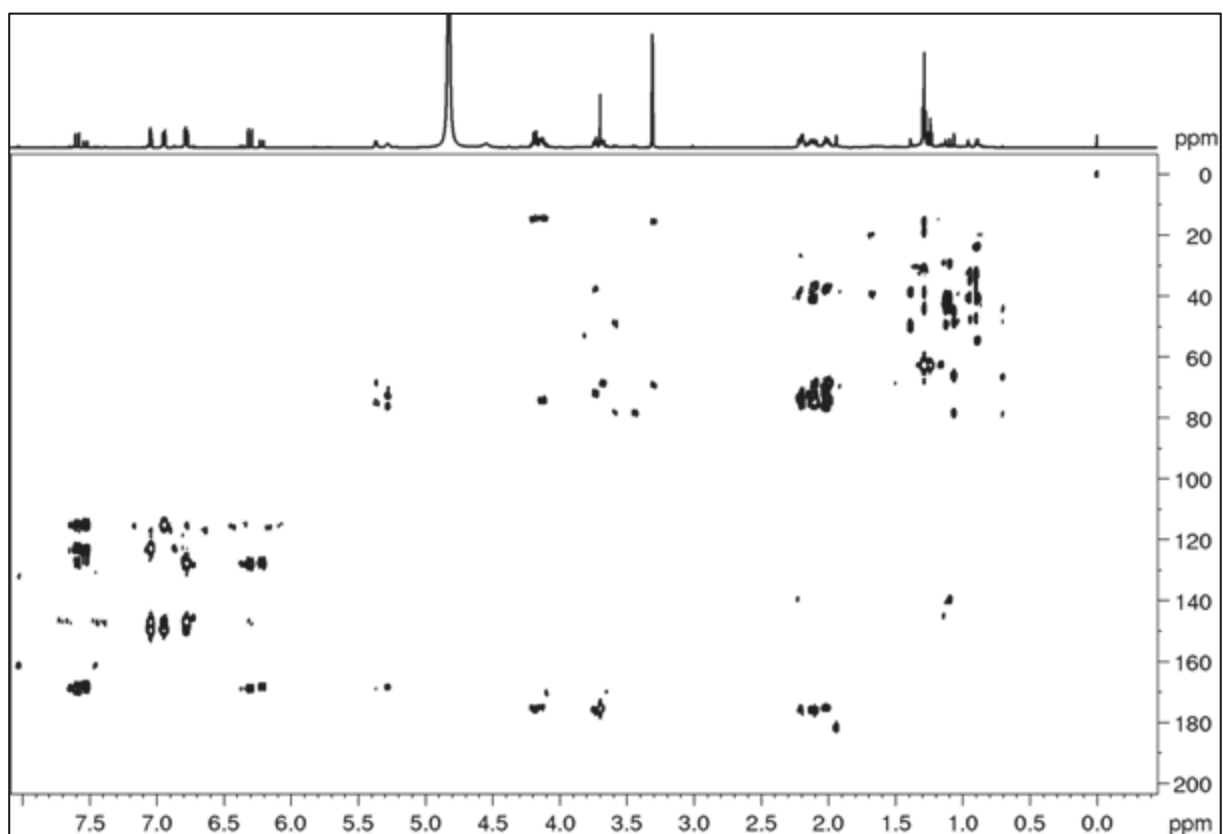
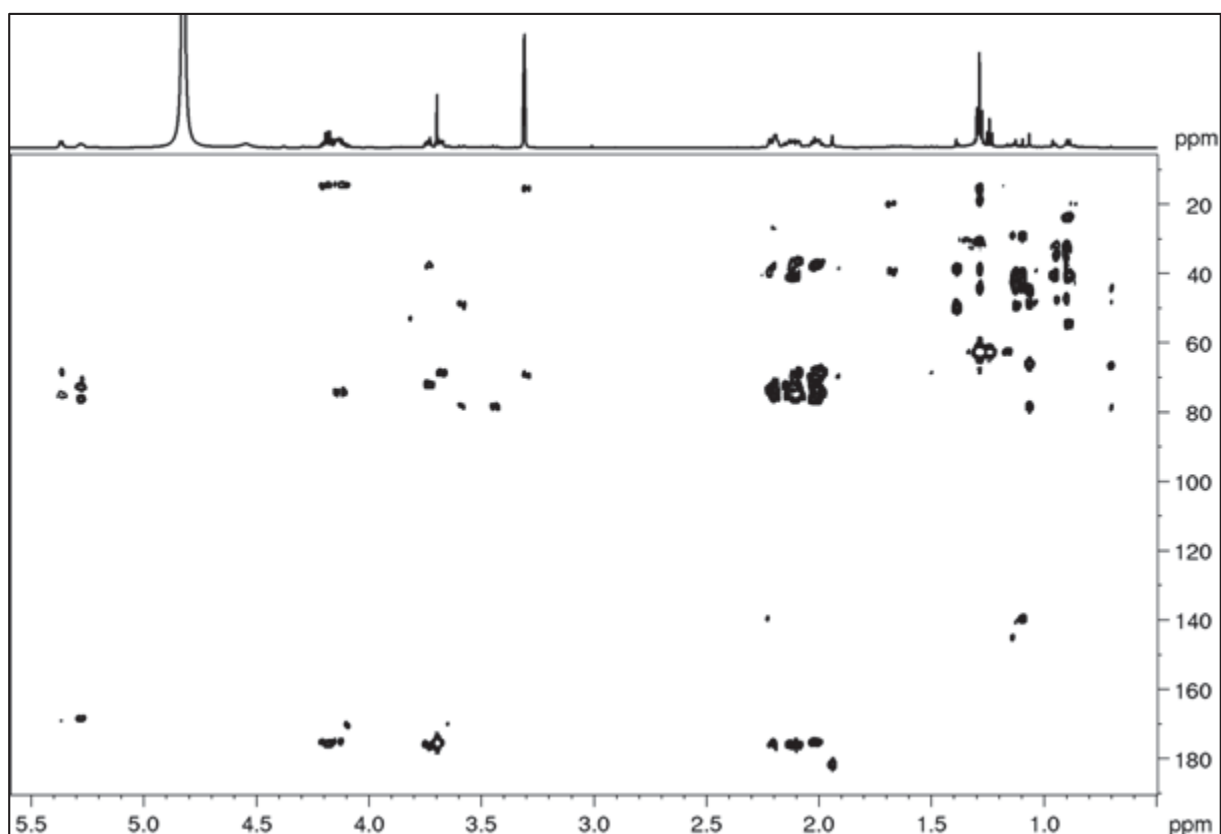


FIGURA 211 – AMPLIAÇÃO DO HMBC DA REGIÃO DO ÁCIDO QUÍNICO DE **MS4**

Por meio dos dados apresentados e os demais observados no HSQC e HMBC (TABELA 50) **MS4** foi identificada como 3-O-cafeoilquinato de etila (neo-clorogenato de etila), um isômero de **MS3** (clorogenato de etila), que se diferencia pela posição da esterificação (**MS3**: C-5; **MS4**: C-3) (YOUN et al., 2015). Apesar de conhecido, são poucos os relatos de isolamento desse éster que está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

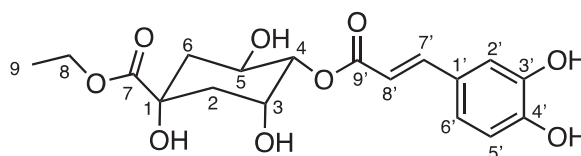
TABELA 50 – DADOS DE RMN DE **MS4** (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM O NEO-CLOROGENATO DE ETILA (DMSO- d_6 , 600 MHz, YOUN et al., 2015)

Posição	MS4			Neo-clorogenato de etila	
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C^*	δ_H mult (J em Hz)
1	75,2	-	-	77,4	-
2	38,1	1,95-2,23 <i>m</i>	n.o	39,5	1,96 <i>m</i>
3	72,8	5,37 <i>dt</i> (6,9 e 3,7)	1,5,9'	74,0	5,26 <i>m</i>
4	74,3	3,68 <i>dd</i> (8,0 e 3,3)	5	73,9	3,76-3,61 <i>m</i>
5	68,7	4,13 <i>m</i>	4	71,8	3,76-3,61 <i>m</i>
6	41,0	1,95-2,23 <i>m</i>	n.o	39,2	2,21 <i>m</i>
7	176,0	-	-	176,9	-
8	62,7	4,18 <i>q</i> (7,1)	7,9	64,5	4,18-4,10 <i>m</i>
9	14,5	1,29 <i>t</i> (7,1)	8	16,0	-
1'	127,8	-	-	129,2	-
2'	115,4	7,05 <i>d</i> (2,1)	3',4',6'	118,4	7,07 <i>d</i> (2,4)
3'	147,0	-	-	116,9	-
4'	149,9	-	-	151,2	-
5'	116,4	6,78 <i>d</i> (8,2)	1',3',4'	149,0	6,69 <i>d</i> (8,4)
6'	123,2	6,94 <i>dd</i> (8,2 e 2,1)	3',4',5'	116,6	6,81 <i>dd</i> (8,4 e 2,4)
7'	147,1	7,59 <i>d</i> (15,9)	2',6',9'	148,3	7,53 <i>d</i> (15,6)
8'	115,9	6,30 <i>d</i> (15,9)	1',9'	124,8	6,23 <i>d</i> (15,6)
9'	169,1	-	-	170,3	-

n.o = não observado.

2.6.1.4 Identificação de **MS5**

A substância **MS5** (FIGURA 212) foi isolada em mistura com **MS4** (neo-clorogenato de etila), sendo que alguns sinais revelaram estarem sobrepostos. Contudo, foi possível extrair os principais sinais e identificar a estrutura química de **MS5**.

FIGURA 212 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS5****MS5**

O espectro de RMN de 1H (FIGURAS 213 e 214) revelou similaridade com os demais ésteres descritos anteriormente. Foram observados os sinais típicos do grupo cafeoíla e do ácido quínico. Entretanto, foi possível distinguir **MS5** das demais pela

presença de um duplo-duplete em δ_H 4,81, com duas constantes de acoplamento, sendo uma grande e outra pequena ($J = 9,8$ e $2,9$ Hz). Por meio desse dado foi atribuir determinar que a esterificação ocorreu em C-4 (PAULI et al., 1998). O sinal de H-3 foi atribuído a um duplo-duplete em δ_H 4,32 ($J = 6,7$ e $3,2$ Hz), enquanto o sinal de H-5 foi observado como um multipletto em δ_H 4,19. Além disso, foram observados os sinais do grupo etoxila em δ_H 4,24 (*m*, H-8) e 1,30 (*t*, $J = 7,1$ Hz, H-9). Os sinais de H-2 e H-6 foram detectados na faixa δ_H 1,86 a 2,3 (FIGURA 214).

FIGURA 213 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **MS5** (CLOROFÓRMIO- d_4 + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

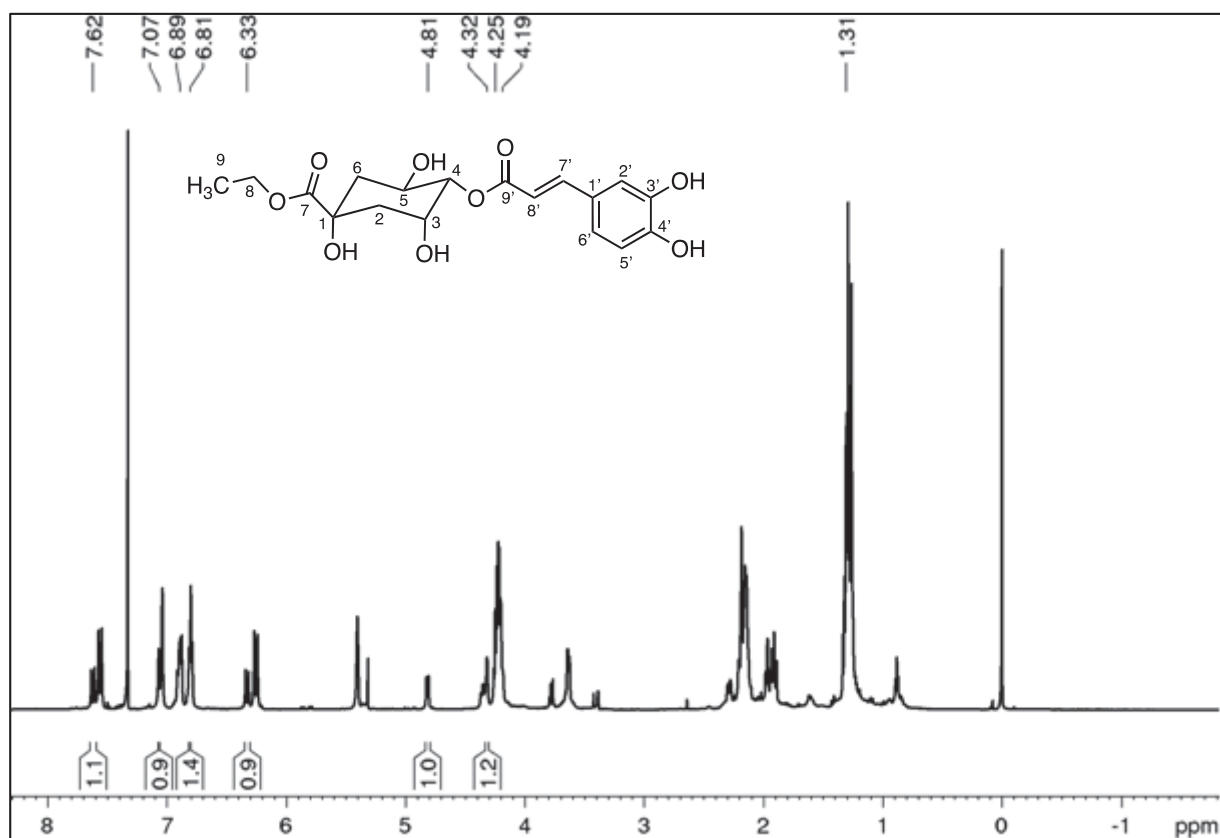
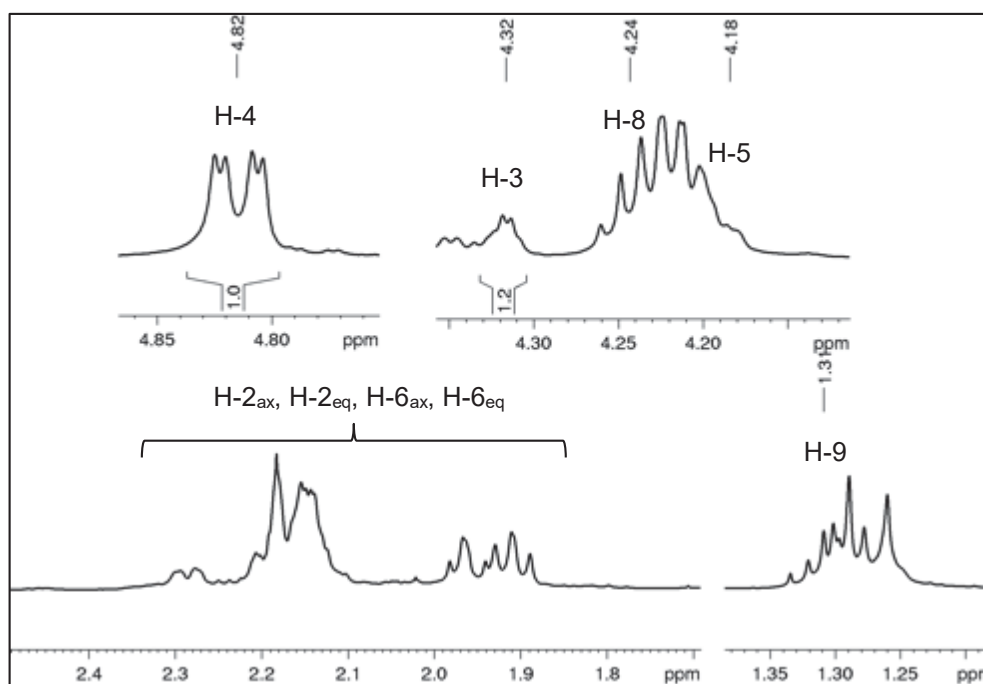


FIGURA 214 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS PRINCIPAIS SINAIS DE **MS5**

O HSQC (FIGURA 216) revelou que o hidrogênio em δ_{H} 4,81 (H-4) estava ligado ao carbono em δ_{C} 79,3 (C-4), e mostrava correlações no HMBC com os carbonos em δ_{C} 67,8 (C-5) e com a carbonila de éster do grupo cafeoila em δ_{C} 169,0 (C-9'), confirmando a localização da esterificação em C-4 (FIGURA 215).

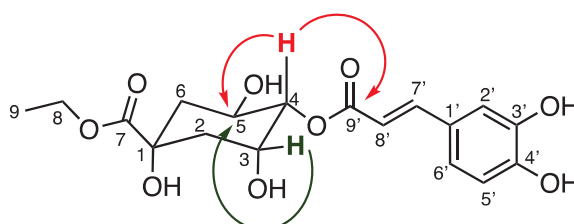
FIGURA 215 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS5**

FIGURA 216 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS5**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)

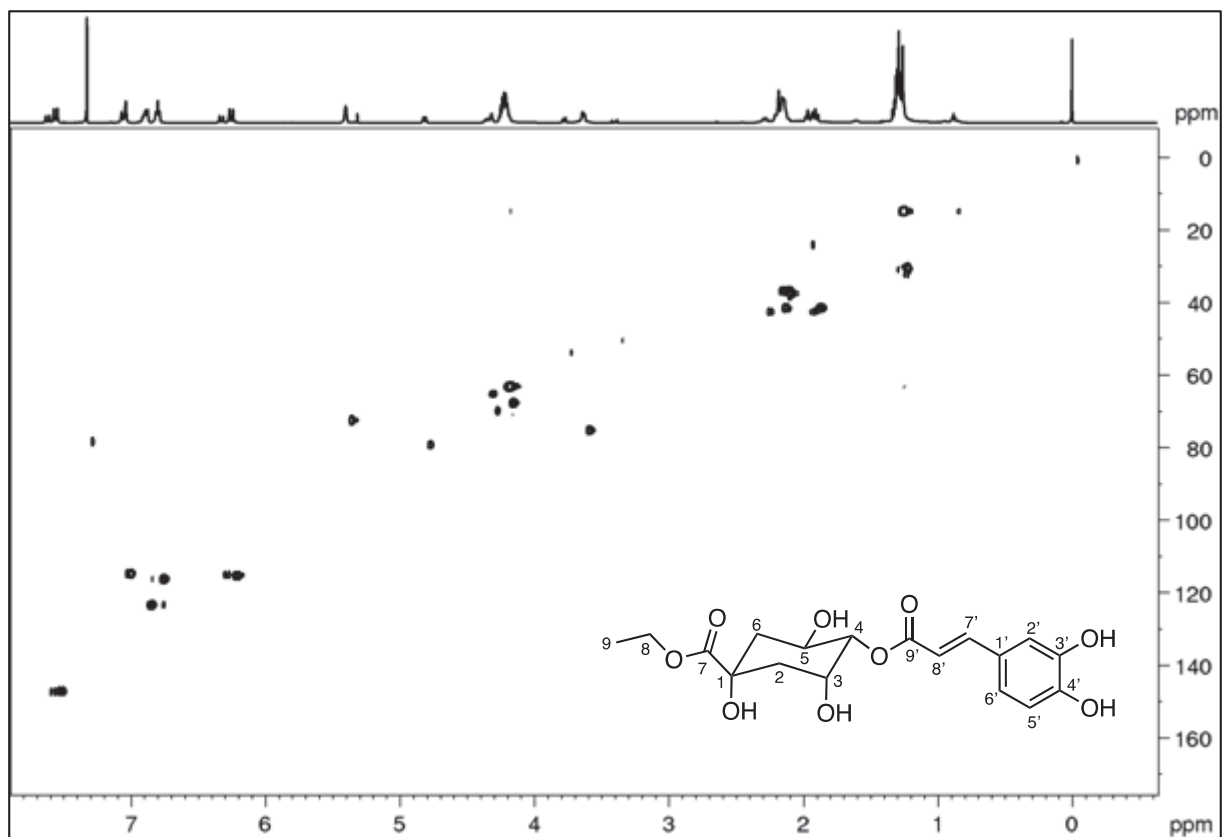
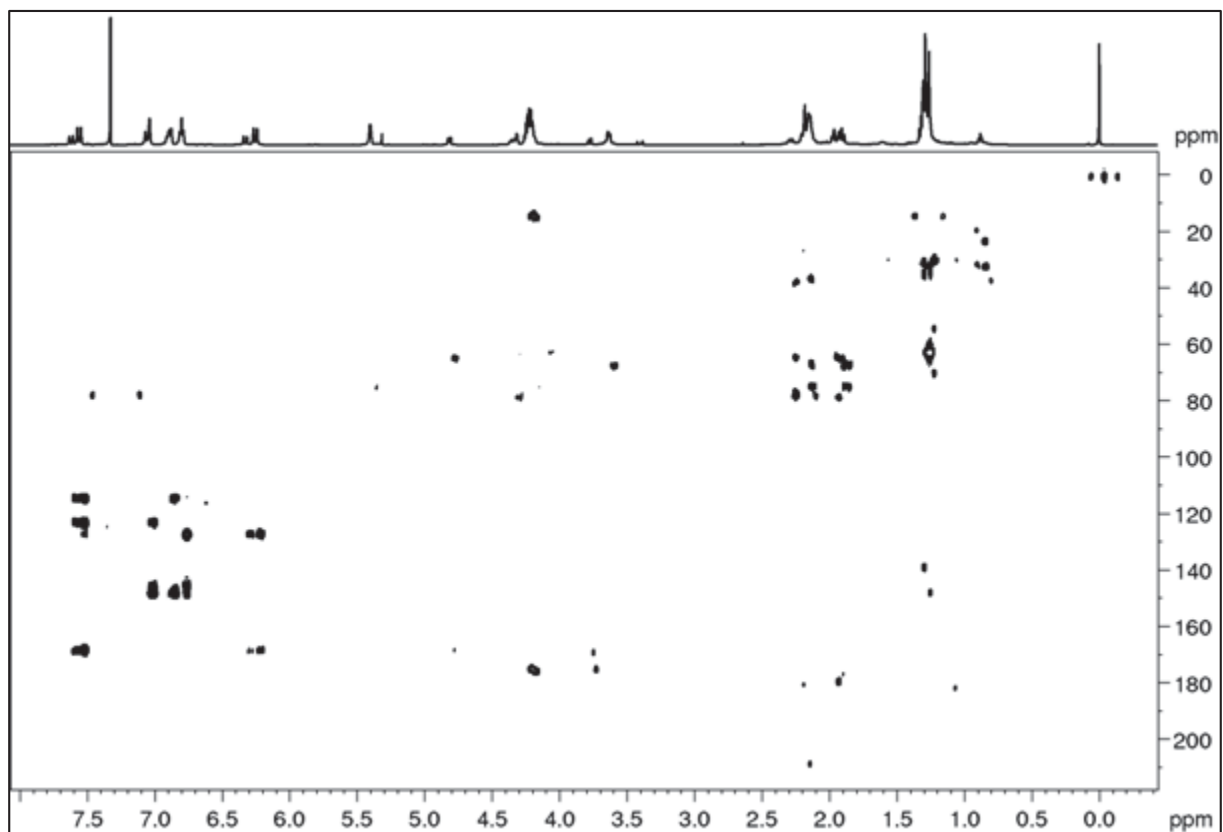


FIGURA 217 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS5**
(CLOROFÓRMIO- d + GOTAS DE METANOL- d_4 , 600 MHz)



Os dados apresentados permitiram propor a estrutura de **MS5** como um isômero de **MS3** e **MS4**, diferenciando-se destes pela posição da esterificação, sendo agora em C-4 (TABELA 51). Este éster, chamado de 4-O-cafeoilquinato de etila (criptoclorogenato de etila) é conhecido, porem de ocorrência rara na natureza (GE et al., 2018). Seu isolamento está sendo reportada pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

TABELA 51 – DADOS DE RMN DE **MS5** (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O CRIPTOCLOROGENATO DE ETILA (DMSO- d_6 , 400 MHz, GE et al., 2018)

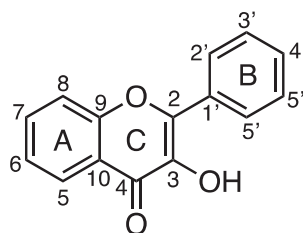
Posição	MS5			Criptoclorogenato de etila	
	δ_c	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c	δ_H mult (J em Hz)
1	76,2	-	-	73,0	-
2	37,1	1,86-2,31 m	n.o	35,2	2,11-1,77 m
3	69,9	4,32 dd (6,7 e 3,2)	4	67,0	3,58 m
4	79,3	4,81 dd (9,8 e 2,9)	5,9'	71,0	5,02 d (3,7)
5	76,2	4,19 m	1	69,5	3,89 m
6	41,1	1,86-2,31 m	n.o	37,1	2,11-1,77 m
7	175,2	-	-	173,0	-
8	62,8	4,24 q (7,1)	7,9	60,3	4,00 m
9	14,8	1,30 t (7,1)	8	13,8	1,12 t (7,1)
1'	127,8	-	-	125,4	-
2'	114,6	7,06 sl	3',4',6'	115,8	7,02 sl
3'	148,3	-	-	148,5	-
4'	145,8	-	-	145,6	-
5'	116,3	6,80 d (8,4)	1',3',4'	114,5	6,77 d (8,0)
6'	123,2	6,89 dl (8,4)	3',4',5'	121,3	6,96 d (8,0)
7'	147,2	7,62 d (15,8)	2',6',9'	145,0	7,39 d (15,9)
8'	115,0	6,33 d (15,8)	1',9'	113,8	6,11d (15,9)
9'	169,0	-	-	165,4	-

n.o = não observado.

2.6.2 Identificação dos flavonoides

Os flavonoides, como já mencionado, são muito comuns no metabolismo secundário do organismo vegetal. Esses produtos naturais são subdivididos em subclasses de acordo com o grau de oxidação do anel pirano (anel C). Nesse trabalho todos os flavonoides isolados foram da subclasse dos flavonóis, a qual apresenta uma oxigenação em C-3 (FIGURA 218).

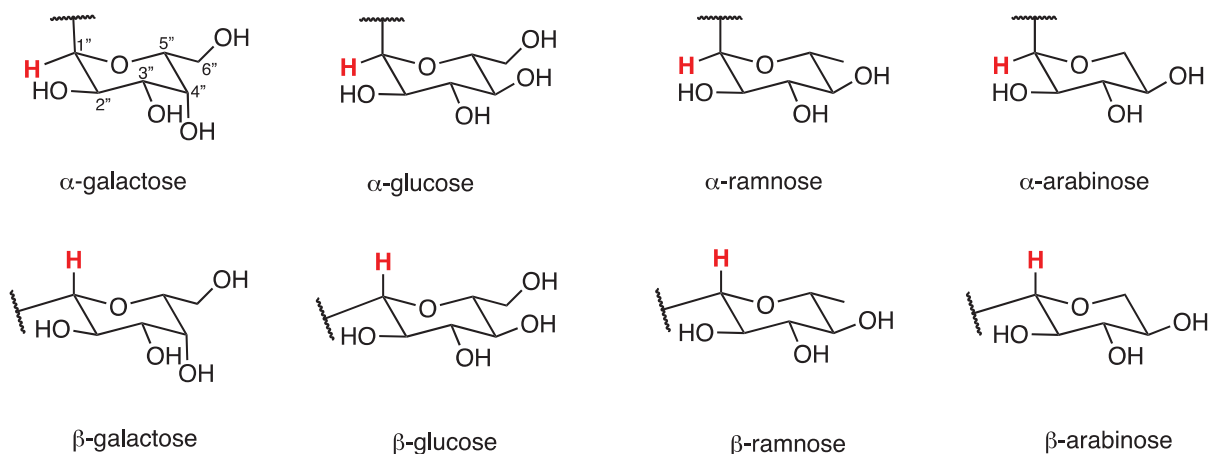
FIGURA 218 – ESQUELETO BÁSICO DOS FLAVONÓIS

*flavonol*

De modo geral, os flavonoides podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou como glicosídeos (uma ou mais unidades de açúcar ligado à aglicona). A grande maioria dos flavonoides presentes em plantas ocorre como substâncias glicosiladas, as quais podem ser consideradas como O-glicosídeos (quando o açúcar está ligado à aglicona através do oxigênio) ou C-glicosídeos (quando o açúcar está ligado a aglicona através de uma ligação carbono-carbono). Os principais flavonoides reportados para o gênero *Myrcia* são glicosilados. As principais unidades de açúcar encontradas nesses flavonoides são: galactose, glucose, ramnose e arabinose (CASCAES et al., 2015) (FIGURA 219).

Alguns sinais no espectro de RMN de ^1H são cruciais para diferenciação e determinação das unidades glicosídicas. Um sinal na região de δ_{H} 5,0 indica a presença de um hidrogênio anomérico; já os demais sinais dessa unidade são observados na faixa de δ_{H} 3,0-4,0. O sinal típico do hidrogênio anomérico aparece no espectro como um duplete, sendo que a sua constante de acoplamento permite distinguir os α -glicosídeos dos β -glicosídeos. Ou seja, um duplete com uma constante de acoplamento grande ($J = 7-10 \text{ Hz}$), implica um acoplamento do tipo $J_{\text{axial-axial}}$ (ângulo diedro: 180°), caracterizando um β -glicosídeo. Por outro lado, uma constante de acoplamento pequena ($J = 2-5 \text{ Hz}$), é compatível com um acoplamento do tipo $J_{\text{equatorial-axial}}$ (ângulo diedro: 60°), indicando os α -glicosídeos (FIGURA 219) (JACOBSEN, 2007).

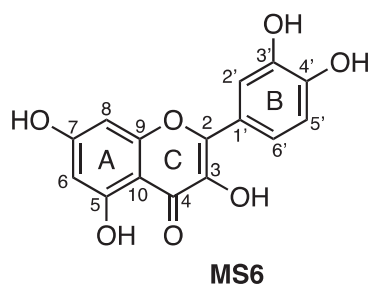
FIGURA 219 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS UNIDADES GLICOSÍDICAS DO GÊNERO *Myrcia*



O presente estudo fitoquímico permitiu a identificação de sete flavonoides. Destes, dois (**MS6** e **MS10**) foram identificados na forma livre, ou seja, como agliconas, enquanto que os sete restantes (**MS7**, **MS8**, **MS9**, **MS11**, **MS12**) foram identificados como glicosídeos. A sua identificação será discutida a seguir.

2.6.2.1 Identificação de **MS6**

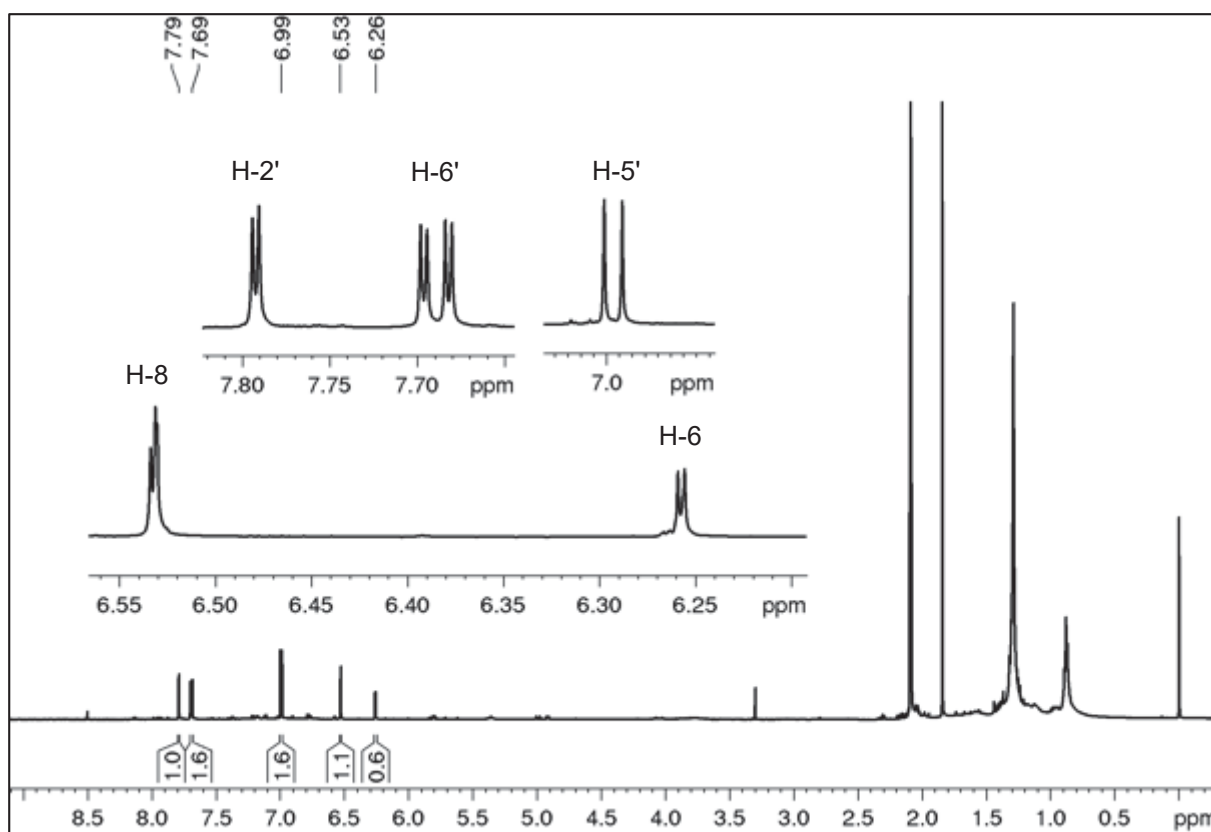
FIGURA 220 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS6**



A substância **MS6** (FIGURA 220) foi isolada como um sólido amarelo. O seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 221) revelou ser relativamente simples, apresentando apenas cinco sinais, quais foram atribuídos a hidrogênios de anéis aromáticos, distribuídos em dois sistemas de spins. O primeiro sistema de spins é formado por três sinais, observados como um duplete em δ_{H} 7,79 ($J = 2,1$ Hz, H-2'), um duplo-duplete em δ_{H} 7,69 ($J = 8,5$ e $2,1$ Hz, H-6') e um duplete em δ_{H} 6,99 ($J = 8,5$ Hz, H-5'). Esses dados são condizentes com hidrogênios em acoplamentos do tipo

meta, *orto/meta* e *meta*, característicos de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído (anel B). Por outro lado, o segundo sistema de spins consiste de dois dupletos com a mesma constante de acoplamento em δ_H 6,53 ($J = 2,0$ Hz, H-8) e 6,26 ($J = 2,0$ Hz, H-6), os quais são sinais típicos de acoplamento *meta*, indicando um segundo anel aromático 1,2,3,5-tetrassubstituído (anel A).

FIGURA 221 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **MS6** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)



Os sinais em δ_H 7,79 (H-2'), 7,69 (H-6') e 6,99 (H-5'), revelaram no HSQC (FIGURA 223) estarem ligados aos carbonos em δ_C 115,6 (C-2'), 116,5 (C-6') e 121,4 (C-5'), respectivamente. Já no HMBC (FIGURA 224) o H-2' correlacionou com C-6' e com um carbono olefínico oxigenado em δ_C 148,0 (C-2), enquanto o H-6' correlacionou com C-2' e com um segundo carbono oxigenado em δ_C 148,1, atribuído ao C-4'. Já H-5' indicou correlações com os carbonos em δ_C 123,5 (C-1') e com um terceiro carbono olefínico oxigenado em δ_C 145,9 (C-3'). Esses dados são condizentes com o anel B da quercetina, o qual está ligado ao carbono C-2 do anel pirano (anel C), e possui duas hidroxilas fenólicas. Por sua vez, o HSQC mostrou que os hidrogênios presentes no anel A em δ_H 6,53 (H-8) e 6,26 (H-6) estavam ligados aos carbonos em δ_C 94,8 e

99,6, respectivamente; no HMBC H-8 apresentou correlações com C-6, com o carbono em 103,5 (C-10) e com os carbonos oxigenados em 157,6 (C-9) e 165,9 (C-7) (FIGURA 222).

FIGURA 222 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS6**

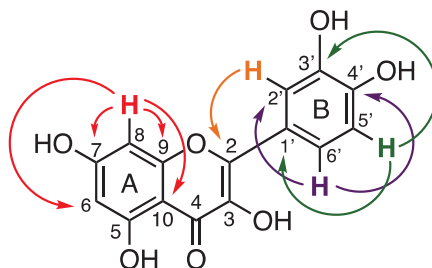


FIGURA 223 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS6** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)

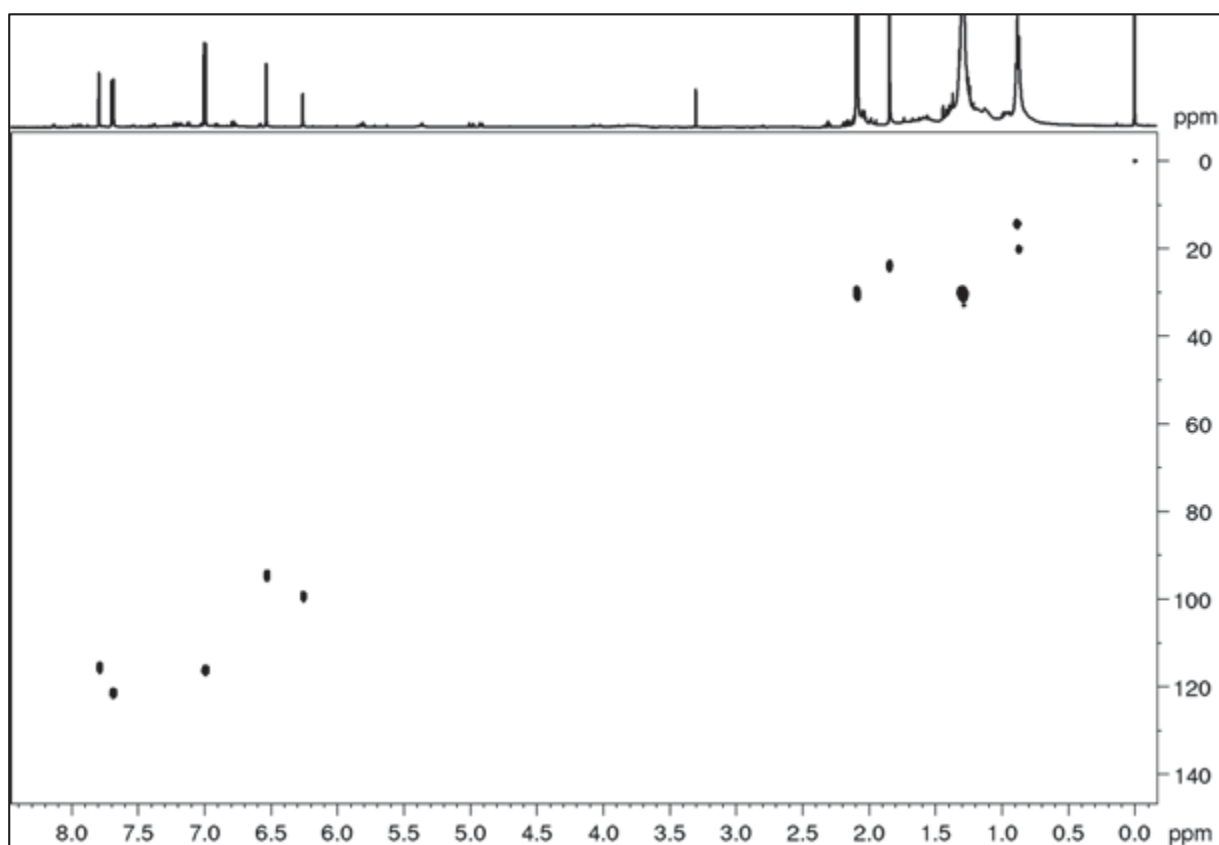
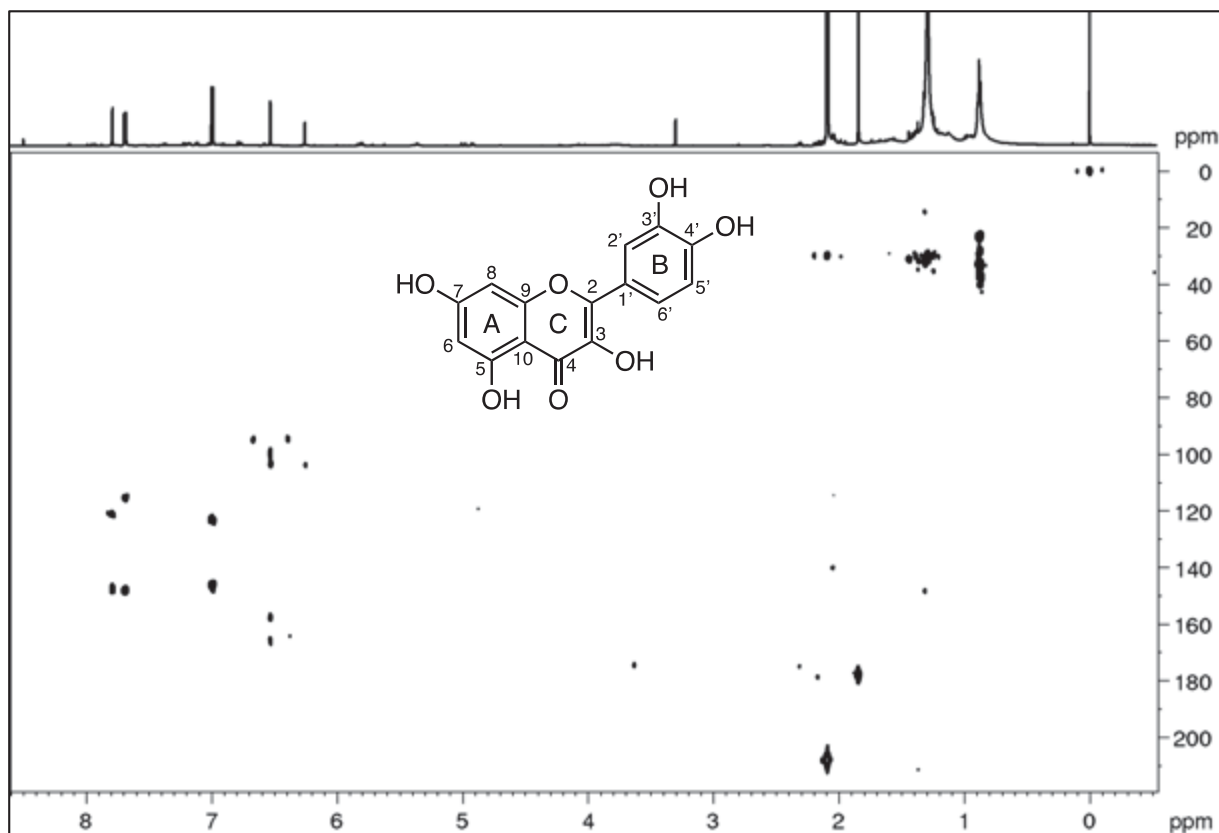
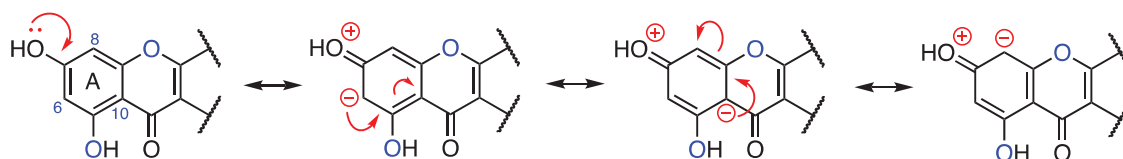


FIGURA 224 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS6**
(ACETONA- d_6 , 600 MHz)



Os deslocamentos químicos observados para C-6 (δ_{C} 99,6), C-8 (δ_{C} 94,8) e C-10 (δ_{C} 103,5) estão mais protegidos que o comum para carbonos aromáticos. Isso se deve a presença de grupos oxigenados em uma relação *orto/para* a essas posições. Uma vez que os elétrons do átomo de oxigênio (não ligantes) podem migrar por deslocalização eletrônica para a ligação C-O, resultando em cargas parciais negativas nas posições *orto/para* do anel aromático, os núcleos ficam mais protegidos, e em consequência, os deslocamentos químicos apresentam valores menores que o esperado. Esse efeito é ainda mais intenso quando três grupos oxigenados estão em posição tal que reforçam o efeito de proteção. A FIGURA 225 apresenta esse efeito com uma das hidroxilas, o mesmo podendo ocorrer com os demais grupos oxigenados.

FIGURA 225 – REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DE RESSONÂNCIA RESPONSÁVEL PELOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE C-6, C-8 E C-10 DO ANEL A DE **MS6**

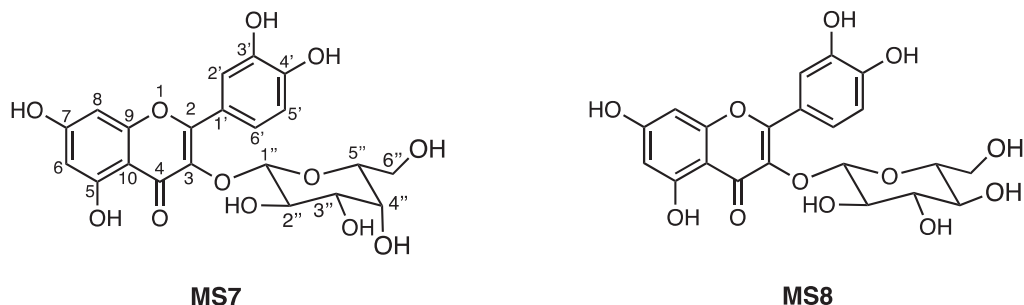


Os dados descritos, bem como a comparação com aqueles encontrados na literatura (TABELA 52) confirmam a estrutura química de **MS6** como sendo o flavonol quercetina (ESPOSITO et al 2013). Este é um flavonoide muito recorrente em espécies vegetais, tendo já sido isolado e descrito anteriormente em *Myrcia tomentosa* (SA et al., 2017) e em outras espécies de *Myrcia* (SANTOS et al., 2018; CASCAES et al., 2015).

TABELA 52 – DADOS DE RMN DE **MS6** (ACETONA- d_6 , 600 MHz) COM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA QUERCETINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, ESPOSITO et al., 2013)

Posição	MS6			Quercetina	
	δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
2	148,0	-	-	146,1	-
3	n.o	-	-	133,5	-
4	n.o	-	-	178,9	-
5	n.o	-	-	159,9	-
6	99,6	6,26 d (2,0)	10	100,0	6,20 d (1,8)
7	165,9	-	-	166,3	-
8	94,8	6,53 d (2,0)	6,7,9,10	94,9	6,41 d (1,8)
9	157,6	-	-	158,5	-
10	103,5	-	-	100,5	-
1'	123,5	-	-	122,8	-
2'	115,6	7,79 d (2,2)	2,6'	116,3	7,67 d (2,0)
3'	145,9	-	-	146,2	-
4'	148,1	-	-	150,3	-
5'	116,4	6,99 d (8,5)	1',3'	117,2	6,87 d (7,2)
6'	121,4	7,69 dd (8,5 e 2,2)	2',4'	123,5	7,66 dd (7,2 e 2,0)

n.o = não observado.

2.6.2.2 Identificação de **MS7** e **MS8**FIGURA 226 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS **MS7** E **MS8**

Observando o espectro de RMN de ^1H de **MS7** (FIGURAS 227 e 228) foram identificados cinco sinais de hidrogênios aromáticos, característicos da quercetina em δ_{H} 8,06 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz, H-2'), 7,62 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $2,2$ Hz, H-6'), 6,96 (1H, *dd*, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,55 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-8) e 6,30 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-6) (FIGURA 228).

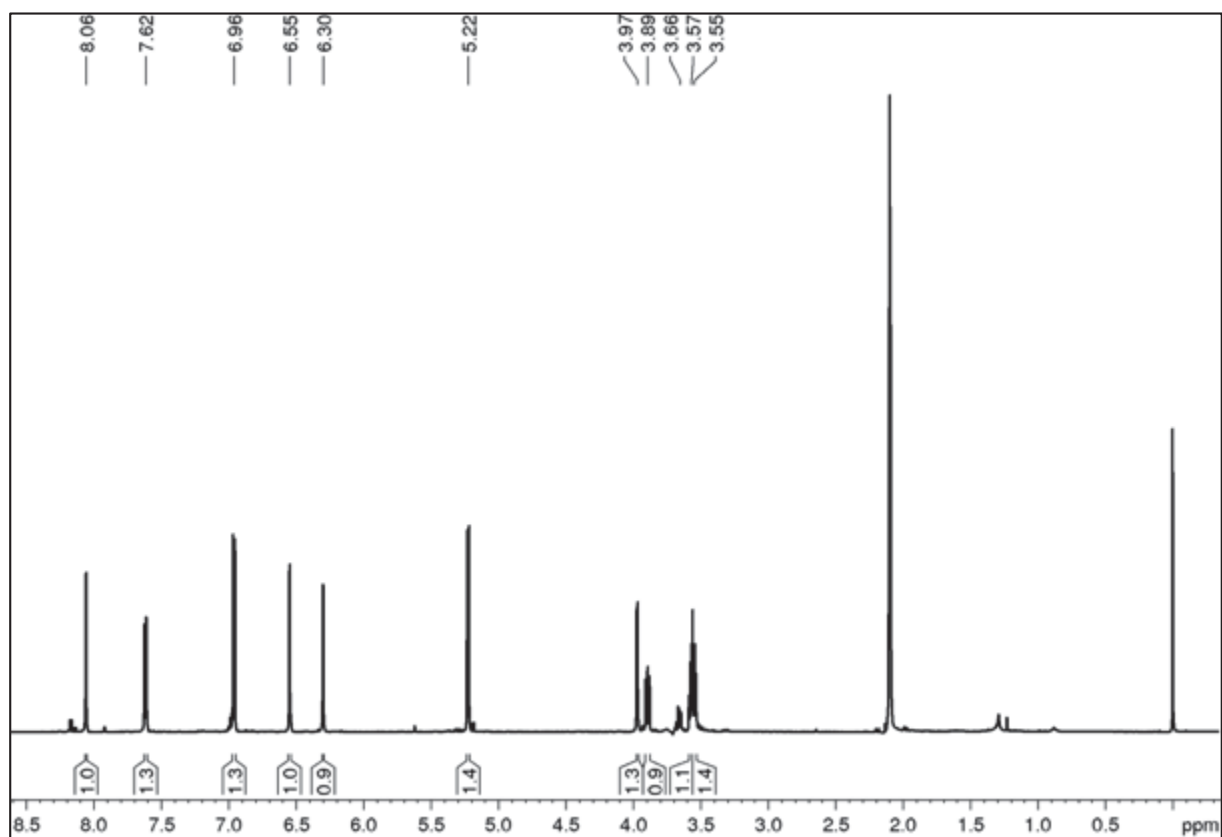
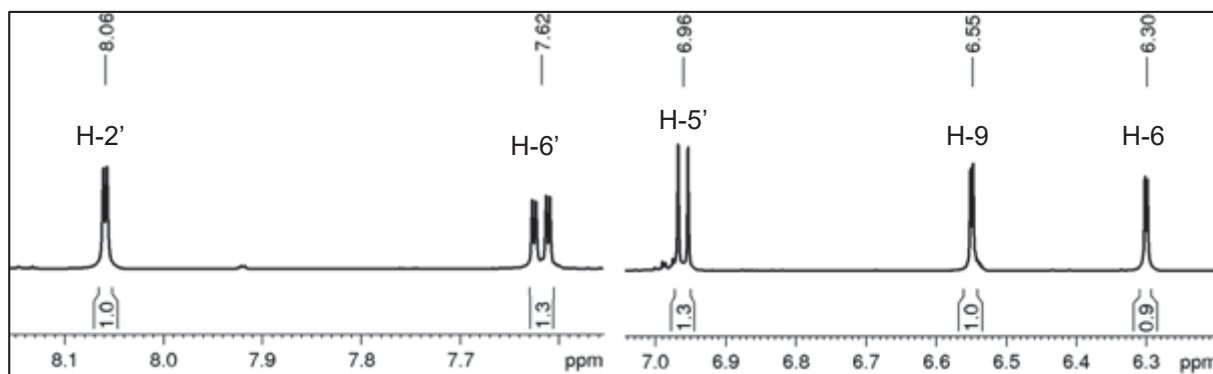
FIGURA 227 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS7** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)

FIGURA 228 – AMPLIAÇÃO DO DOS SINAIS DA AGLICONA QUERCETINA DE MS7



Ampliando-se a região alifática do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 230) foi possível observar sinais característicos de unidade glicosídica. O hidrogênio anomérico foi observado como um duplete em δ_{H} 5,22 (1H, $J = 7,8$ Hz, H-1''); a constante de acoplamento indica que H-1'' está na posição *axial*, cujo acoplamento remete a um β -glicosídeo, compatível com um acoplamento $J_{\text{axial-axial}}$. A mesma constante de acoplamento ($J = 7,8$ Hz) também foi observada para um duplo-duplete em δ_{H} 3,89 (1H, $J = 9,5$ e $7,8$ Hz, H-2''); a segunda constante de acoplamento ($J = 9,5$ Hz) informou que o hidrogênio H-3'' também está em *axial*. Por sua vez, o sinal de H-3'' foi observado como um duplo-duplete em δ_{H} 3,66 (1H, $J = 9,5$ e $3,4$ Hz'). Neste caso, a constante de acoplamento de $3,4$ Hz indica um acoplamento do tipo $J_{\text{axial-equatorial}}$ entre H-3'' e H-4'', cujo sinal pode ser atribuído a um duplete-largo em δ_{H} 3,97 (1H, $J = 3,4$ Hz, H-4''). Foi observado ainda um duplo-duplo-duplete em δ_{H} 3,57 (1H, $J = 6,4$, $5,6$ e $1,1$ Hz, H-5''), sendo que a constante de $J = 5,6$ Hz foi encontrada também em um duplo-duplete em δ_{H} 3,55 (1H, $J = 10,2$ e $6,4$ Hz, H-6b''). Neste sinal, a maior constante sugere um acoplamento vicinal entre os hidrogênios de um grupo metileno, o qual é comum em algumas unidades glicosídica. O hidrogênio H-6a'' não foi observado no espectro de RMN de ^1H . Por meio desse conjunto de sinais foi possível sugerir que a unidade glicosídica é a β -galactose, a qual apresenta um grupo hidroxila em *axial* em C-4'' (FIGURA 229).

FIGURA 229 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIOS DA β -GALACTOSE DE MS7

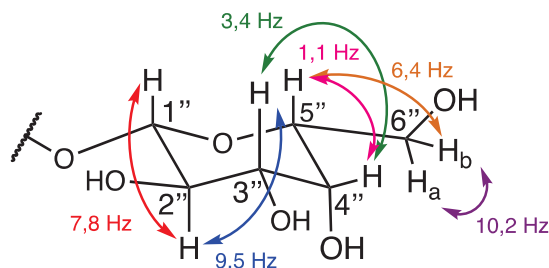
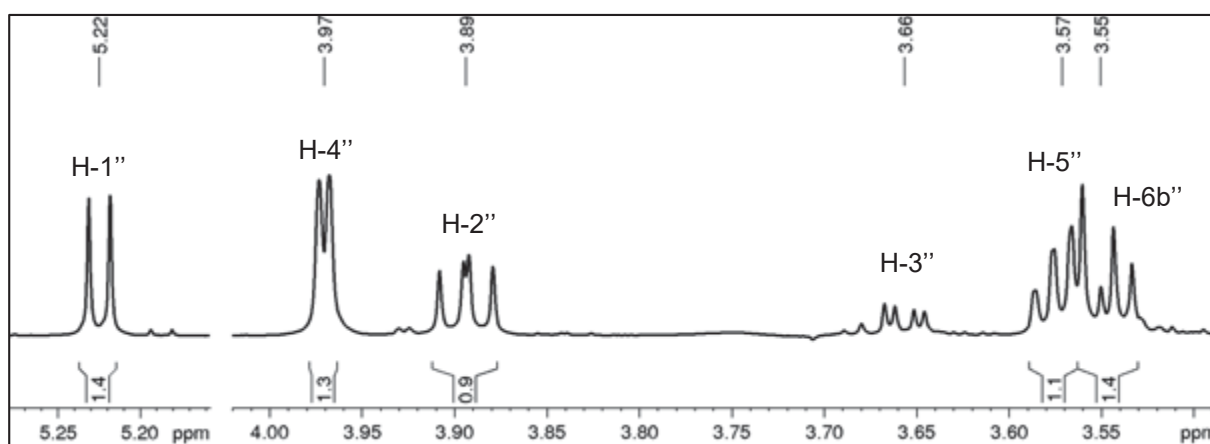
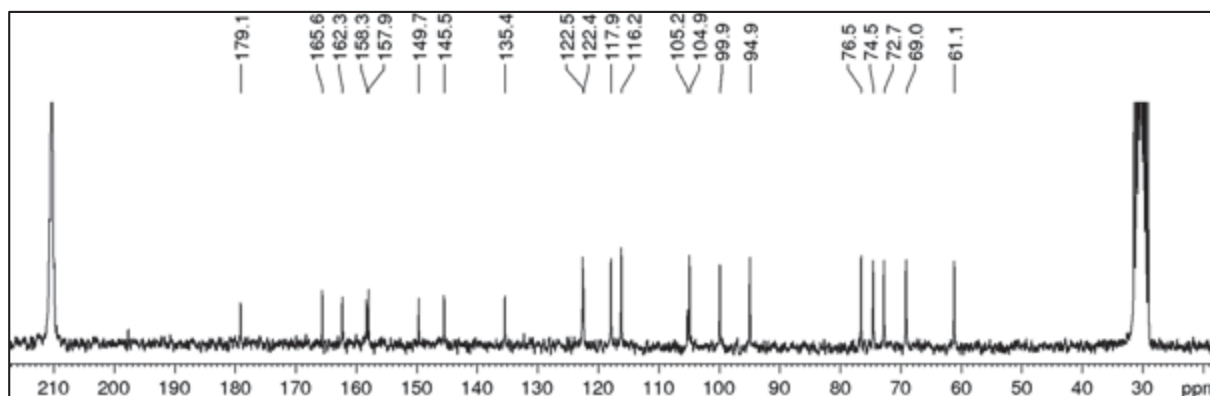


FIGURA 230 – AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DA β -GALACTOSE DE MS7



O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 231) revelou 21 sinais. Destes 15 sinais foram atribuídos a carbonos sp^2 da aglicona quercetina, sendo sete oxigenados e os demais sinais de carbonos hidrogenados ou quaternários dos anéis aromáticos. A carbonila α,β -insaturada típica de C-4 foi localizada em δ_c 179,1 e o carbono olefínico oxigenado em C-3 foi observado em δ_c 135,4. Outros cinco sinais foram atribuídos aos carbonos oximetínicos da β -galactose, os quais foram observados em δ_c 76,5 (C-5''), 74,5 (C-3''), 72,7 (C-2''), 69,0 (C-4'') e 61,0 (C-6'').

FIGURA 231 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DE **MS7** (ACETONA- d_6 , 50 MHz)

O hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,22 (H-1'') apresentou no HSQC (FIGURA 233) correlação com o carbono em δ_{C} 105,2, e no HMBC (FIGURA 234) correlacionou com os carbonos em δ_{C} 74,5 (C-3'') e com o carbono em δ_{C} 135,4, o qual corresponde ao carbono C-3 da aglicona quercetina. Esta correlação permitiu localizar a unidade de galactose em C-3. Já o sinal em δ_{H} 3,89 (H-2'') correlacionou no HMBC com C-1'' e com o carbono em δ_{C} 74,5 (C-3''). Por outro lado, o sinal em δ_{H} 3,57 (H-5'') exibiu correlações no HMBC com os carbonos em δ_{C} 61,1 (C-6''), 69,0 (C-4'') e com o anomérico C-1''. O hidrogênio H-6b'' (δ_{H} 3,55), inicialmente atribuído ao grupo metileno da β -galactose, revelou no HSQC estar ligado ao carbono em 61,1 (C-6''), que por sua vez, foi correlacionado com outro sinal em 3,69, que seria H-6a'' (FIGURA 232). Esse sinal estava ausente no espectro de RMN de ^1H , pois o mesmo foi encoberto pelo sinal da água (HDO, δ_{H} 3,74) presente na amostra. Este sinal estava muito intenso, tornando necessária à sua pré-saturação, o que causou o desaparecimento do sinal de H-6a'' e a atenuação de H-3'' no espectro de RMN de ^1H .

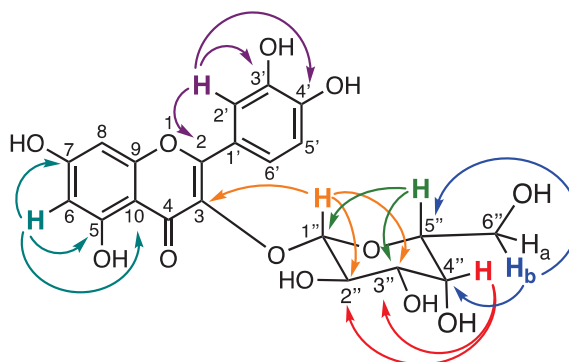
FIGURA 232 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS7**

FIGURA 233 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS7**
(ACETONA- d_6 , 600 MHz)

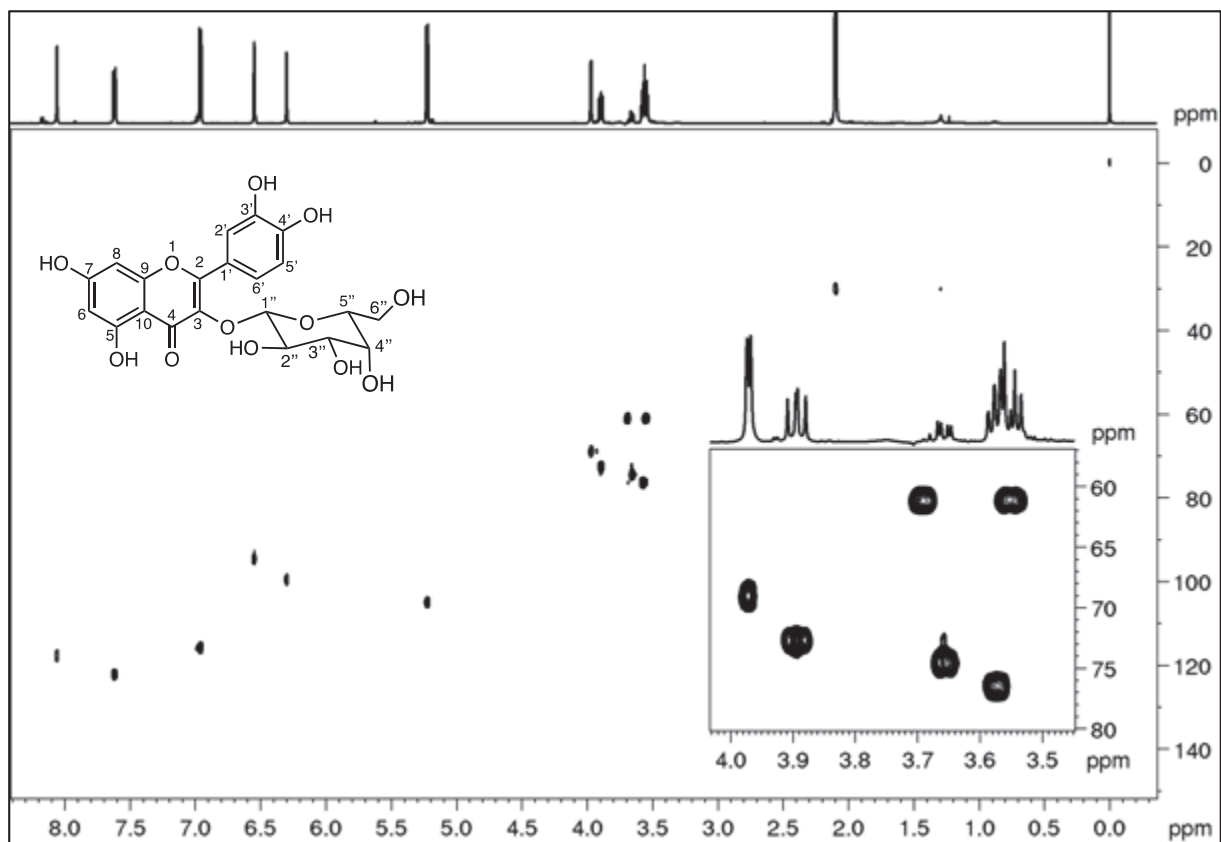
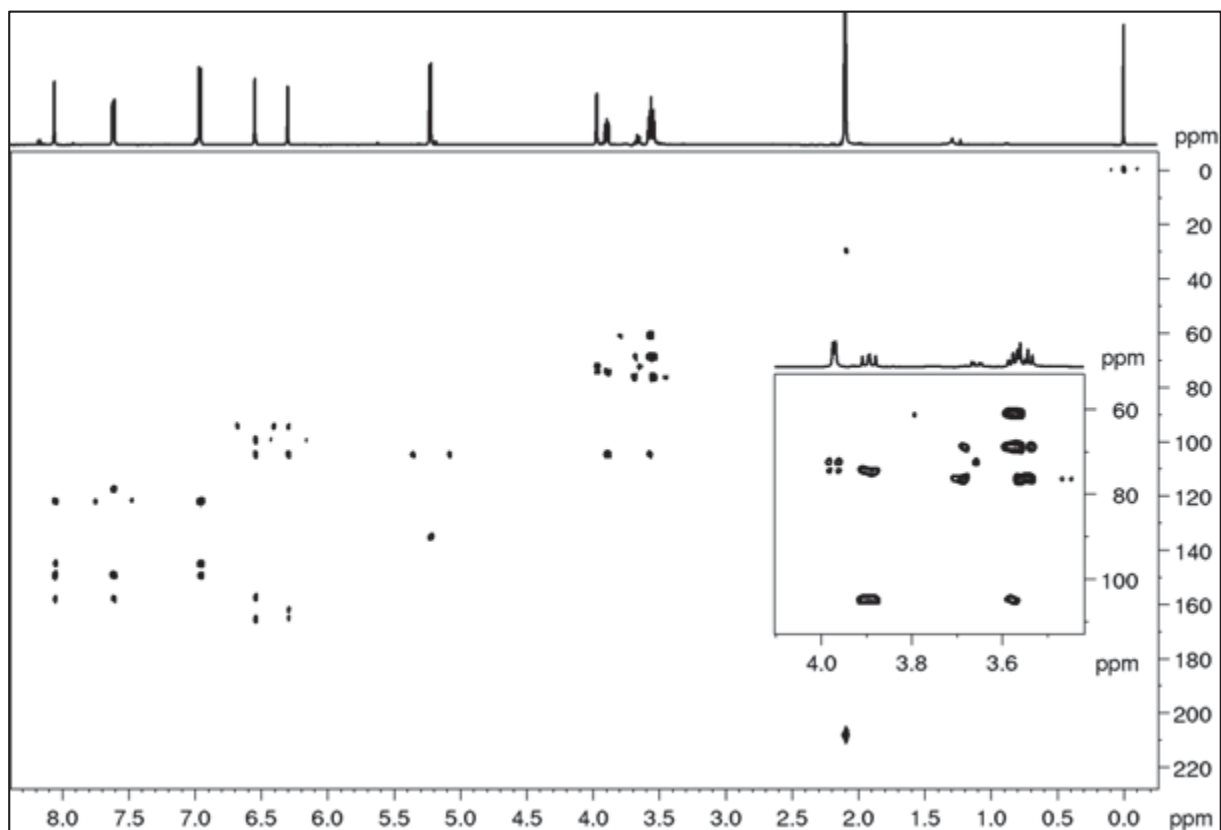


FIGURA 234 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS7**
(ACETONA- d_6 , 600 MHz)



Após a análise dos dados descritos e dos demais observados no HSQC e HMBC (TABELA 53) foi possível identificar a substância **MS7** como um flavonol glicosilado, conhecido como 3-O- β -galactosilquercetina (RENDA et al., 2018), também denominado hiperosídeo. Apesar de conhecido, esse flavonoide está sendo reportado pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

A aglicona quercetina presente em **MS7** também pode ser identificada pelo espectro de absorção no UV-Vis (FIGURA 235), que é muito característico desses flavonóis. No espectro de **MS7** foram observadas três bandas com máximos de absorção em λ_{max} 207, 257 e 361 nm, indicando transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, típicas dos anéis aromáticos em **MS7**. As duas primeiras bandas (207 e 257 nm) estão associadas à conjugação do sistema benzoila, entre o anel A e a carbonila α,β -insaturada (anel C), enquanto que a absorção máxima em λ_{max} 361 nm está relacionada com a conjugação entre o anel B e a carbonila α,β -insaturada do anel C (MARKHAN, 1982).

FIGURA 235 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS de **MS7** (MEOH)

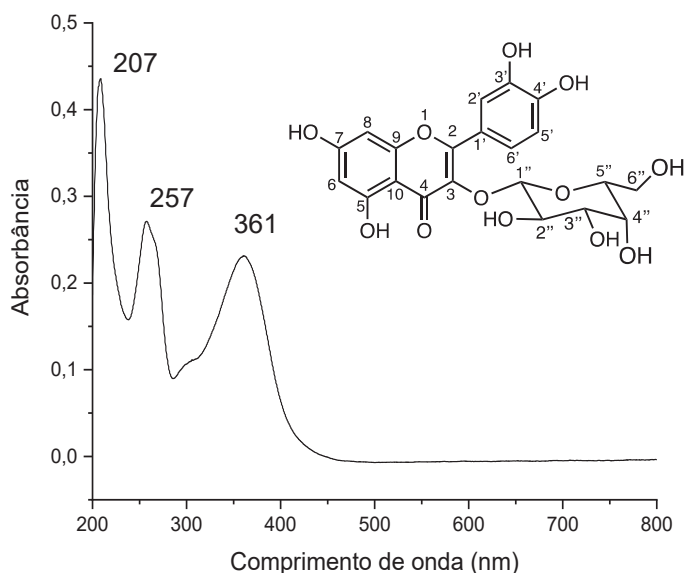


TABELA 53 – DADOS DE RMN DE **MS7** (ACETONA- d_6 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O HIPEROSÍDEO (METANOL- d_4 , 600 MHz, RENDA et al., 2018)

Grupo	Pos.	MS7				Hiperosídeo	
		δ_C	δ_H mult (J em Hz)	δ_H mult (J em Hz)*	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
Aglicona quercetina	2	158,3	-	-	-	158,9	-
	3	135,6	-	-	-	135,6	-
	4	179,1	-	-	-	179,4	-
	5	162,3	-	-	-	163,0	-
	6	99,9	6,30 <i>d</i> (2,1)	6,19 <i>d</i> (2,0)	5,7,8,10	99,9	6,19 <i>d</i> (2,1)
	7	165,6	-	-	-	166,2	-
	8	94,9	6,55 <i>d</i> (2,1)	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,7,9,10	94,7	6,37 <i>d</i> (2,1)
	9	157,9	-	-	-	158,0	-
	10	104,9	-	-	-	105,0	-
	1'	122,5	-	-	-	122,8	-
	2'	117,9	8,06 <i>d</i> (2,2)	7,83 <i>d</i> (2,1)	2,3',4',6'	117,7	7,84 <i>d</i> (2,2)
	3'	145,5	-	-	-	145,8	-
	4'	149,7	-	-	-	150,0	-
	5'	116,2	6,96 <i>d</i> (8,4)	6,88 <i>d</i> (8,5)	1',3',4'	116,1	6,86 <i>d</i> (8,4)
	6'	122,4	7,62 <i>dd</i> (8,2 e 2,2)	7,58 <i>dd</i> (8,5 e 2,1)	-	122,9	7,58 <i>dd</i> (8,5 e 2,2)
β -Galactose	1''	105,2	5,22 <i>d</i> (7,8)	5,16 <i>d</i> (7,8)	3,2'	105,5	5,15 <i>d</i> (7,8)
	2''	72,7	3,89 <i>dd</i> (9,5 e 7,8)	3,81 <i>dd</i> (9,5 e 7,8)	1'',3''	73,2	3,82 <i>dd</i> (9,7 e 7,8)
	3''	74,5	3,66 <i>dd</i> (9,5 e 3,4)	3,55 <i>dd</i> (9,5 e 3,4)	2''	75,1	3,56 <i>dd</i> (9,7 e 3,4)
	4''	69,0	3,97 <i>dl</i> (3,4)	3,84 <i>dl</i> (3,2)	2'',3''	70,0	3,85 <i>dd</i> (3,4 e 1,2)
	5''	76,5	3,57 <i>ddd</i> (6,4, 5,6, 1,1)	3,57 <i>ddd</i> (6,4, 6,1 e 1,3)	1'',3''	77,2	3,47 <i>ddd</i> (6,5, 6,0 e 1,2)
	6''	61,1	3,69 <i>m</i> ** ^a 3,55 <i>dd</i> (10,2 e 6,4) ^b	3,64 <i>dd</i> (11,2 e 6,1) 3,55 <i>dd</i> (11,2 e 6,4)	5'' 4'',5''	61,9	3,64 <i>dd</i> (11,2 e 6,0) ^a 3,55 <i>dd</i> (11,2 e 6,5) ^b

*sinais observados para a mistura de **MS7** + **MS8** (METANOL- d_4 , 600 MHz); ** posição central dada pelo HSQC. ^aHa; ^bHb.

A substância **MS8** revelou em seu espectro de RMN de 1H (FIGURA 226, p. 296) sinais na região de hidrogênios aromáticos e alifáticos muito próximos aos obtidos para o flavonoide anterior (**MS7**). Pela duplicação dos sinais encontrada em algumas regiões do espectro, principalmente na região glicosídica, deduziu-se a existência de uma mistura de dois flavonoides glicosilados. E de fato, isto foi comprovado pela presença de dois dupletos em δ_H 5,25 ($J = 7,8$ Hz) e 5,16 ($J = 7,8$ Hz) com integração de 1:3, respectivamente, os quais indicaram a presença de dois hidrogênios anoméricos, apontando para uma mistura de dois flavonoides

glicosilados. De acordo com a literatura, o sinal em δ_H 5,16 está muito próximo para H-1" de **MS7** (TABELA 53; metanol- d_4 , RENDA et al., 2018). Por sua vez, o segundo sinal em δ_H 5,25 foi atribuído ao H-1" de **MS8**. Adicionalmente, foram observados os sinais de uma aglicona quercetina em δ_H 7,71 (1H, *d*, $J = 2,1$, H-2'), 7,59 (*dd*, $J = 8,7$ e 2,1, H-6', sinal em sobreposição com H-6'de **MS7**), 6,86 (*m*, H-5', sinal em sobreposição com H-5'de **MS7**), 6,39 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-8) e 6,20 (*m*, H-6, sinal em sobreposição com H-6 de **MS7**) (FIGURA 237). As sobreposições puderam ser confirmadas pelo HSQC (FIGURA 240).

FIGURA 236 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **MS7** + **MS8** (METANOL- d_4 , 600 MHz)

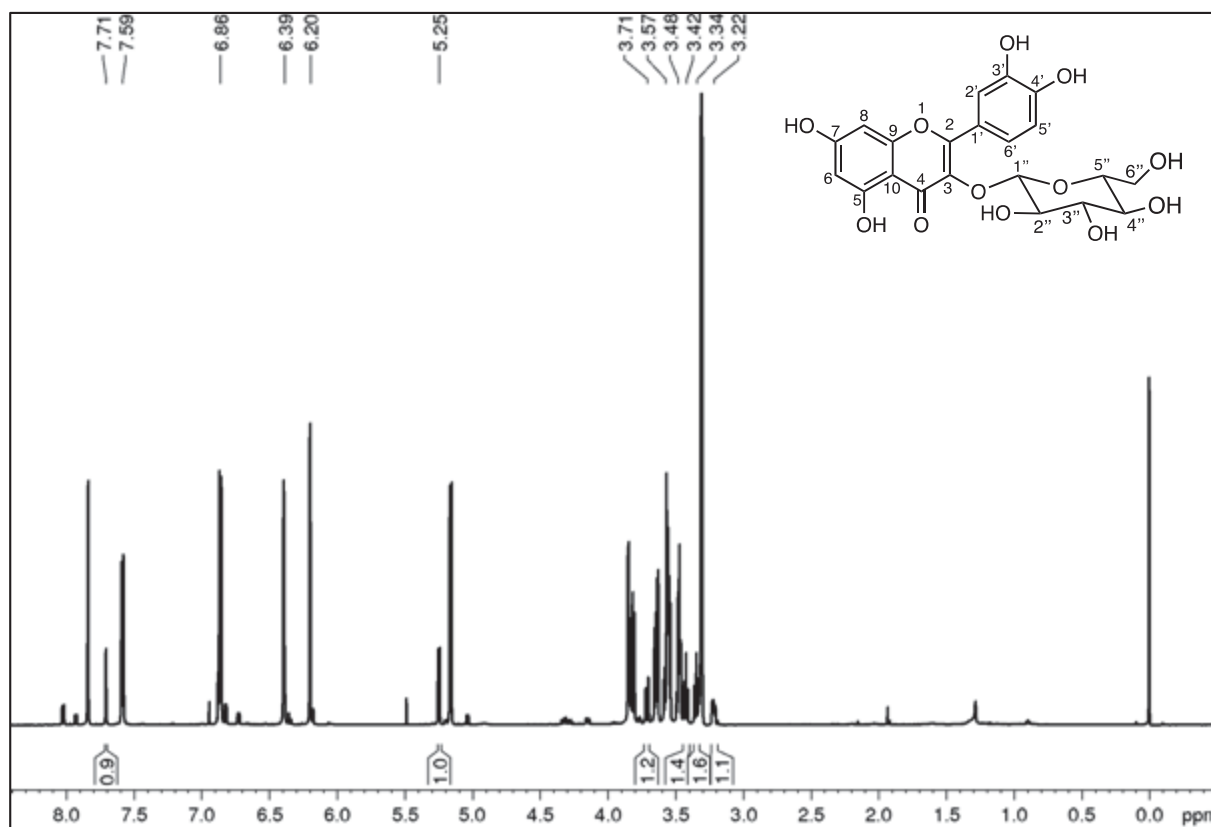
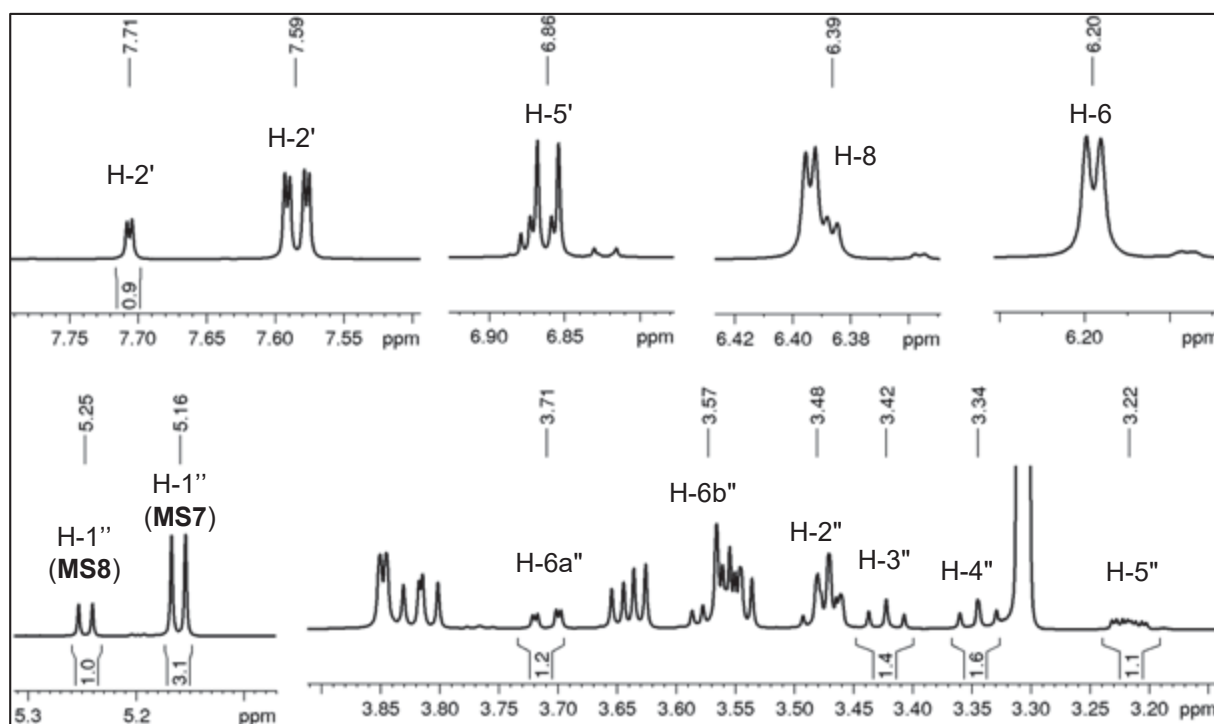
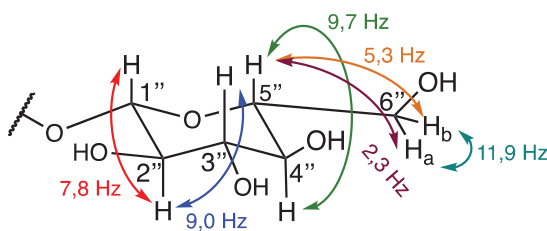
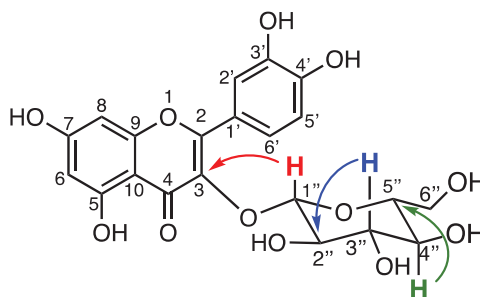


FIGURA 237 – AMPLIAÇÃO DOS SINAS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS7** + **MS8**

Com já mencionado, a substância **MS8** apresenta uma unidade β -glicosídica, confirmada pelo hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,25 ($J = 7,8$ Hz, H-1''). Em adição, os demais sinais dessa unidade foram observados como um duplo-duplete δ_{H} 3,71 ($J = 11,9$ e $2,3$ Hz), sendo que a maior constante observada sugere acoplamento geminal, típico dos hidrogênios metilênicos (H-6a'' e H-6b''). Por outro lado, a menor constante ($J = 2,3$ Hz) também foi observada em um duplo-duplo-duplete em δ_{H} 3,22 ($J = 9,7$, $5,3$ e $2,3$ Hz, H-5''). A constante de $9,7$ Hz também foi observada em um tripleto em δ_{H} 3,34 ($J = 9,7$ Hz, H-4''). Além destes, outro tripleto foi observado em δ_{H} 3,42 ($J = 9,0$ Hz, H-3'') e um multipeto em δ_{H} 3,48 (H-2''). Uma vez que todos os sinais observados apresentaram constantes de acoplamento em torno de $J_{\text{axial-axial}} = 9,0$ Hz, pode-se afirmar que a unidade glicosídica apresenta todos os hidrogênios do anel pirano em posição *axial*, o que caracteriza uma unidade de β -glucose (FIGURA 238).

FIGURA 238 – CONSTANTES DE ACOPLAMENTO DOS HIDROGÊNIOS DA β -GLUCOSE DE **MS8**

Observando o HSQC (FIGURA 240) foi possível determinar que o hidrogênio anomérico em δ_H 5,25 (H-1'') está ligado ao carbono em δ_C 104,1, e revelou correlações no HMBC com o carbono olefínico em δ_C 135,4, típico de C-3 da aglicona quercetina, confirmando que a unidade β -glucose está ligada nessa posição. Por outro lado, H-3'' (δ_H 3,42) revelou correlação com o carbono em δ_C 75,3 (C-2'') e H-4'' (δ_H 3,34) com o carbono em δ_C 78,5 (C-5'') (FIGURA 239).

FIGURA 239 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS8**

Com base nos dados citados, bem como nos demais observados nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 54) foi possível atribuir a estrutura de **MS8** como o flavonoide 3-O- β -glucosilquercetina (isoquercitrina) (FERNANDEZ et al., 2003), amplamente distribuído em espécies vegetais. Apesar de sua ocorrência ser comum, esse flavonoide está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Myrcia*.

FIGURA 240 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS7** + **MS8** (METANOL- d_4 , 600 MHz)

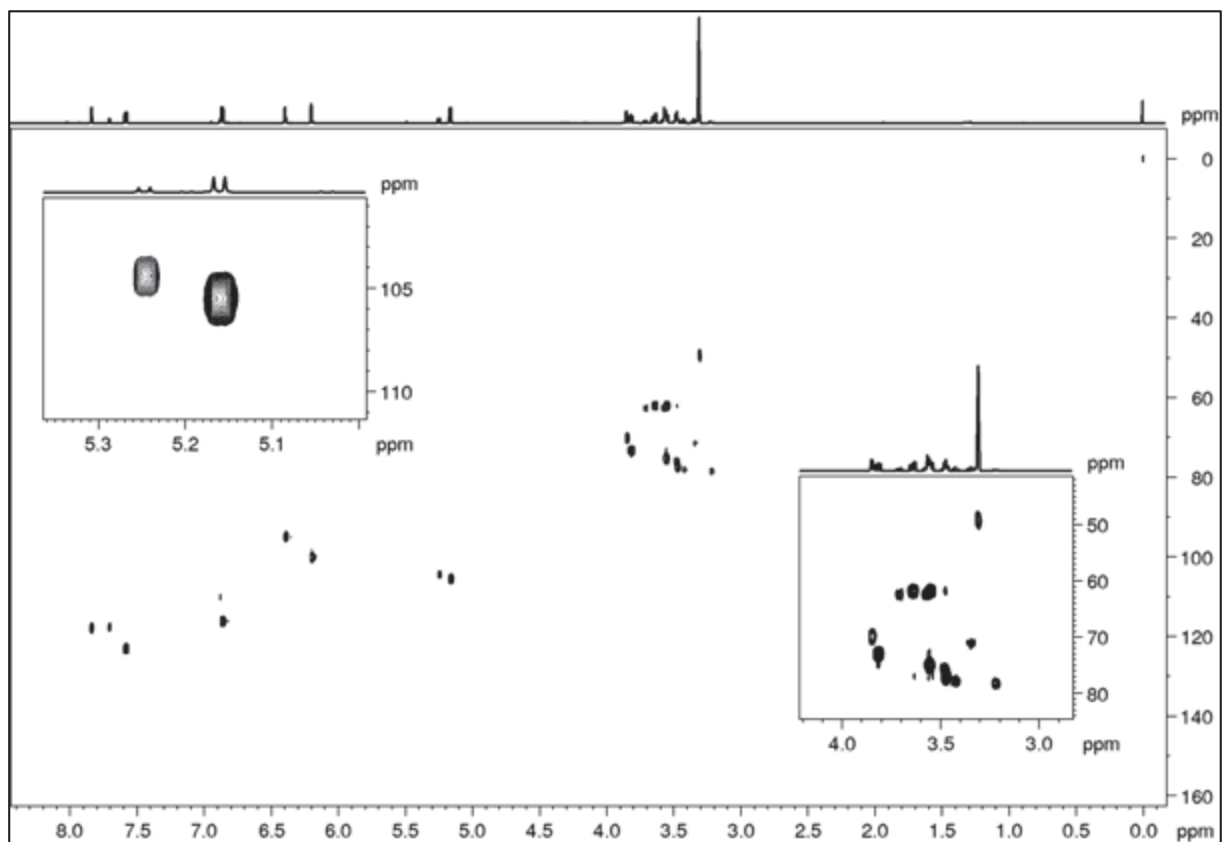


FIGURA 241 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS7** + **MS8** (METANOL- d_4 , 600 MHz)

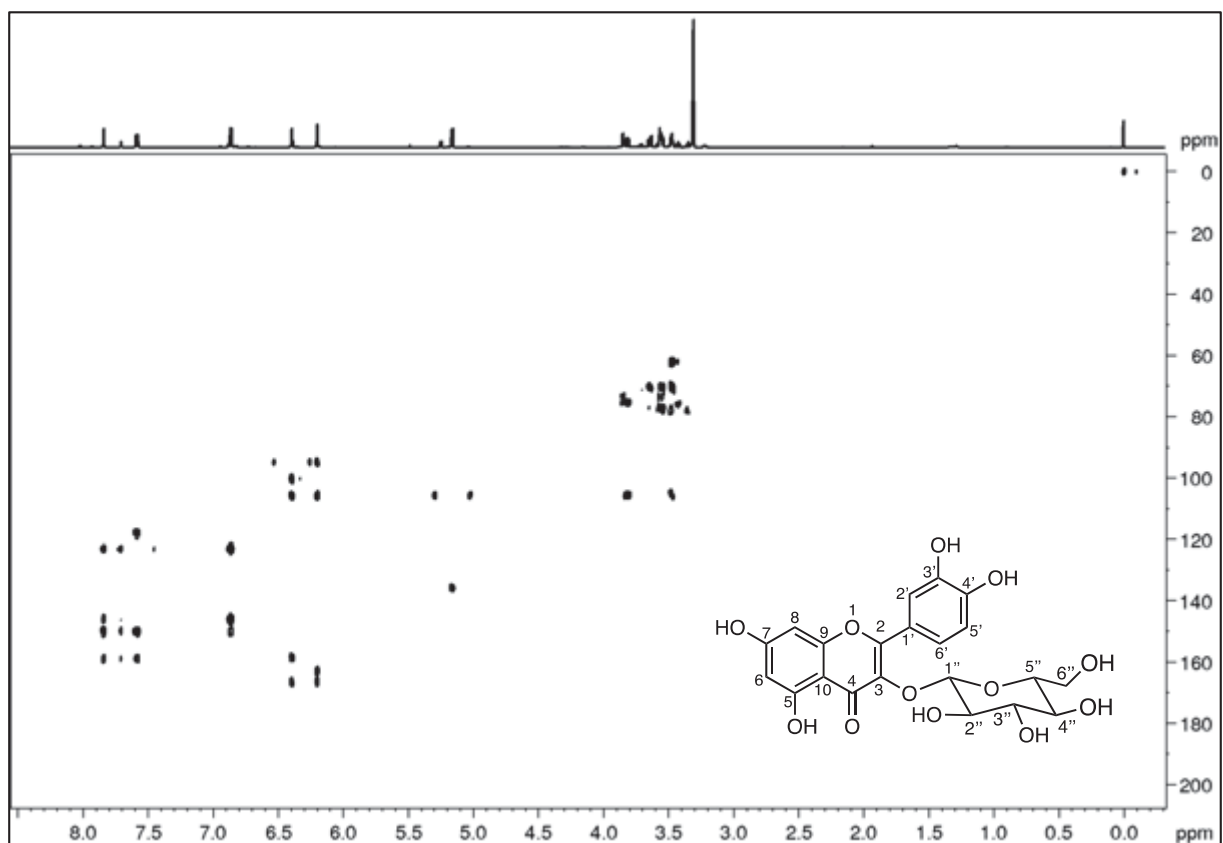


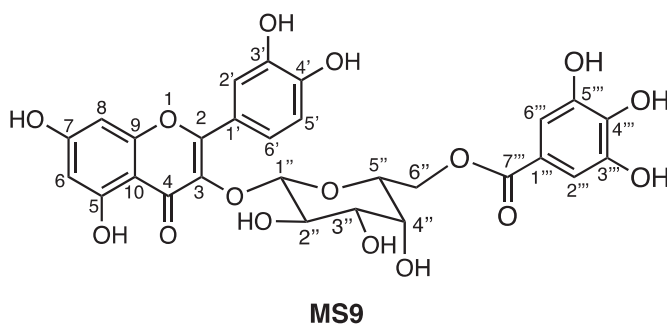
TABELA 54 - DADOS DE RMN DE **MS8** (METANOL- d_4 , 600 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A ISOQUERCETRINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, FERNANDEZ et al., 2005)

Grupo	Pos.	MS8			Isoquercitrina	
		δ_c	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_c	δ_H mult (J em Hz)
Aglicona quercetina	2	159,2	-	-	159,1	-
	3	135,7	-	-	135,7	-
	4	n.o	-	-	179,6	-
	5	n.o	-	-	163,2	-
	6	100,0	6,20 m^*	5,7,8,10	100,0	6,20 d (1,4)
	7	165,6	-	-	166,1	-
	8	94,8	6,39 d (2,2)	7,8,9,10	94,8	6,39 d (1,4)
	9	158,4	-	-	158,6	-
	10	104,9	-	-	105,8	-
	1'	123,5	-	-	123,2	-
	2'	117,6	7,71 d (2,1)	1',4'	117,1	7,71 d (2,1)
	3'	146,5	-	-	146,0	-
	4'	149,3	-	-	150,0	-
	5'	116,3	6,86 m^*	1',3',4'	116,1	6,87 d (8,5)
	6'	123,1	7,59 m^*	2,2',4'	123,3	7,58 dd (8,5 e 2,1)
β -Glucose	1''	104,1	5,25 d (7,8)	3	104,4	5,23 d (8,2)
	2''	75,3	3,48 m^*	3''	75,8	3,48 t (9,5 e 8,2)
	3''	78,0	3,42 t (9,0)	2'',6''	78,2	3,43 t (9,5)
	4''	71,2	3,34 t (9,7)	5''	71,3	3,35 t (9,8)
	5''	78,5	3,22 ddd (9,7, 5,3 e 2,3)	n.o	78,5	3,22 ddd (9,8, 5,5 e 2,3)
	6''	62,5	3,71 dd (11,9 e 2,3) ^a 3,57 $m^{*,b}$	4'' n.o	62,7	3,71 dd (11,9 e 2,3) ^a 3,57 dd (11,9 e 5,4) ^b

*Sinais em sobreposição. O valor de deslocamento químico corresponde a posição central do sinal, dada por HSQC; ^aHa, ^bHb; n.o = não observado.

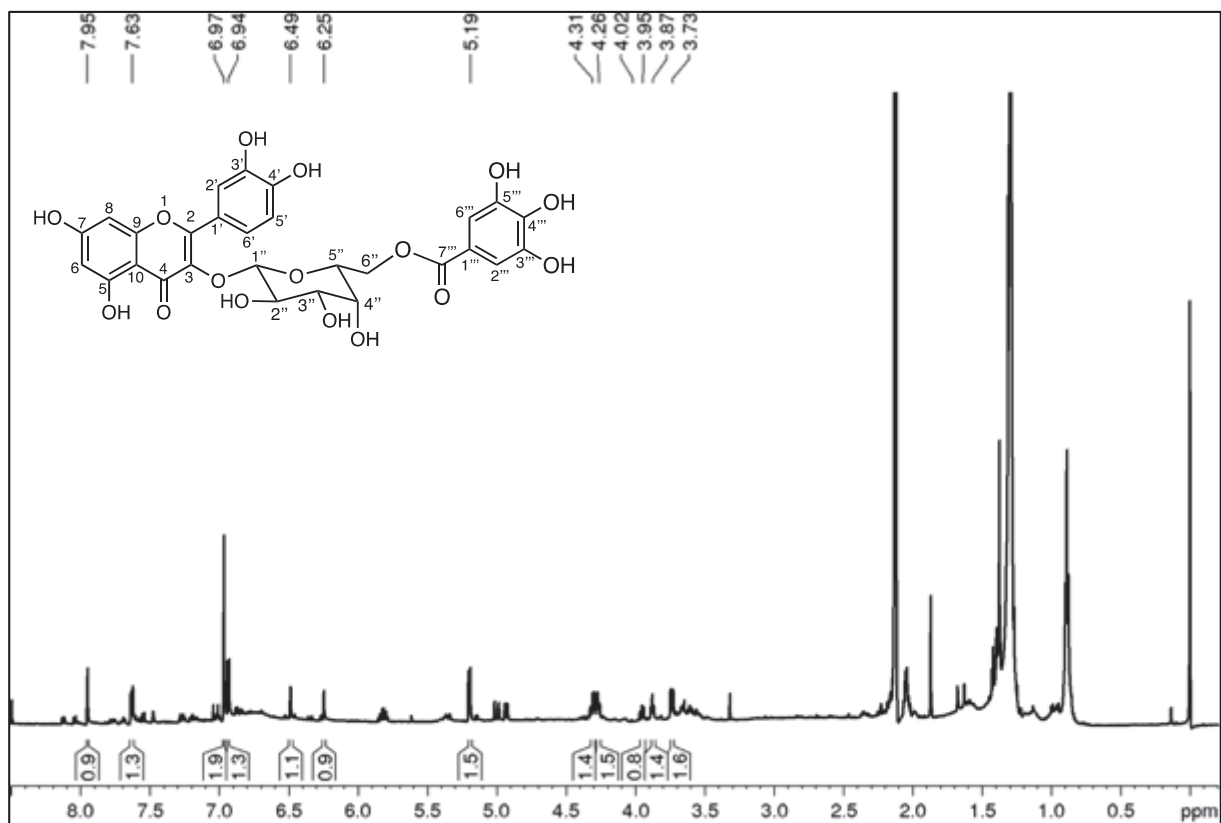
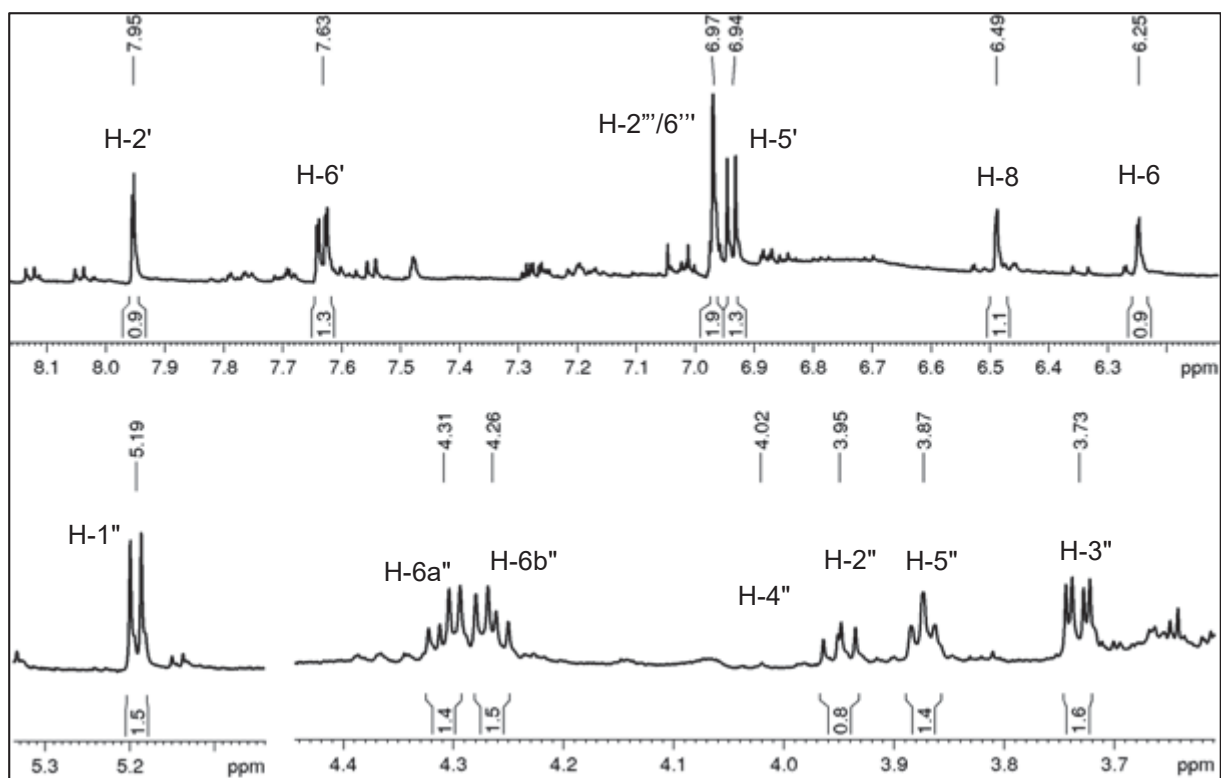
2.6.2.3 Identificação de **MS9**

FIGURA 242 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS9**



A substância **MS9** (FIGURA 242) foi isolada como o constituinte majoritário em uma mistura com outros constituintes não identificados. Analisando o seu espectro

de RMN de ^1H (FIGURAS 243 e 244) foi possível identificar os sinais característicos da aglicona quercetina na região de hidrogênios de anéis aromáticos em δ_{H} 7,95 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz, H-2'), 7,63 (1H, *dd*, $J = 8,5$ e $2,2$ Hz, H-6'), 6,97 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,49 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-8) e 6,25 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz, H-6). Ainda na mesma região foi observado um simpleto com integração para dois hidrogênios em δ_{H} 6,97 (H-2''/6''), indicando dois hidrogênios equivalentes, típicos de um grupo galoíla. Também foram observados sinais típicos de um β -glicosídeo. O sinal referente ao hidrogênio anomérico apresentou-se no espectro como um duplete em δ_{H} 5,19 (1H, $J = 7,8$ Hz, H-1''). A mesma constante de acoplamento foi observada para um duplo-duplete em δ_{H} 3,95 (1H, $J = 9,7$ e $7,8$ Hz, H-2''). Por outro lado, a constante em $J = 9,7$ Hz (característico de acoplamento $J_{\text{axial-axial}}$) também foi observada para um duplo-duplete em δ_{H} 3,73 (1H, $J = 9,7$ e $3,4$ Hz, H-3''). Já a menor constante observada para H-3'' implica em um acoplamento $J_{\text{axial-equatorial}}$, indicando que H-4'' está em posição *equatorial*, compatível com uma unidade de β -galactose. Os sinais característicos do grupo metileno em C-6 foram observados como dois duplos-dupletos em δ_{H} 4,30 (1H, $J = 11,1$ e $5,9$ Hz, H-6a'') e 4,26 (1H, $J = 11,1$ e $6,5$ Hz, H-6b''). Os sinais dos hidrogênios do grupo metileno (C-6'') da β -galactose são observados no espectro de RMN de ^1H em torno de δ_{H} 3,5-3,7, mas no caso do espectro de RMN de ^1H de **MS9** esses sinais estão mais desprotegidos, sugerindo uma esterificação na posição C-6''.

FIGURA 243 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS9** (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)FIGURA 244 – AMPLIAÇÃO DO SINAS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS9**

No espectro de RMN de ^1H de **MS9** o sinal de H-4" não foi encontrado. Entretanto, ao analisar o HSQC (FIGURA 246) foi possível localizar esse sinal, pois estava encoberto pelo sinal da água (HDO, δ_{H} 4,05), que foi pré-saturado, resultando no desaparecimento do sinal de H-4". Diante disso, o sinal de H-4" foi observado através do HSQC em δ_{H} 4,02, pela sua correlação com um carbono em δ_{C} 69,2, e pelas correlações a longa distancia (HMBC, FIGURA 247) com o carbono em δ_{C} 72,6 (C-2"). O hidrogênio anomérico em 5,19 (H-1") correlacionou no HMBC com o carbono em δ_{C} 135,2 (C-3), confirmando a posição da β -galactose em C-3 da aglicona quercetina. Já o sinal em δ_{H} 3,95 (H-2") correlacionou com os carbonos em δ_{C} 74,2 (C-3") e C-1". Os hidrogênios em δ_{H} 4,30 (H-6a") e 4,26 (H-6b") revelaram estarem ligados ao mesmo carbono em 63,4 (C-6"), confirmando um grupo metileno. O valor de deslocamento químico apresentado por C-6" indica mais uma vez a esterificação nessa posição, já que está mais desprotegido do que o esperado (δ_{C} 61). Já o H-5" (δ_{H} 3,87) correlacionou com os carbonos em C-4" e C-6". E por fim, os hidrogênios do grupo galoíla em δ_{H} 6,98 (H-2"/6") revelaram através do HSQC estarem ligados ao carbono em δ_{C} 109,4, e correlacionaram no HMBC com um carbono olefínico oxigenado em δ_{C} 140,2 (C-4''') e com uma carbonila de éster em 167,3 (C-7''') (FIGURA 245).

FIGURA 245 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS9**

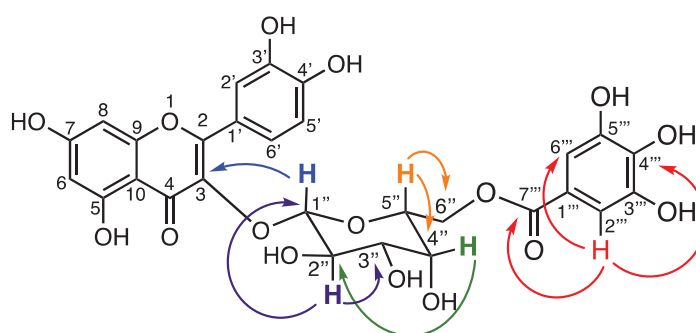


FIGURA 246 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS9** (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)

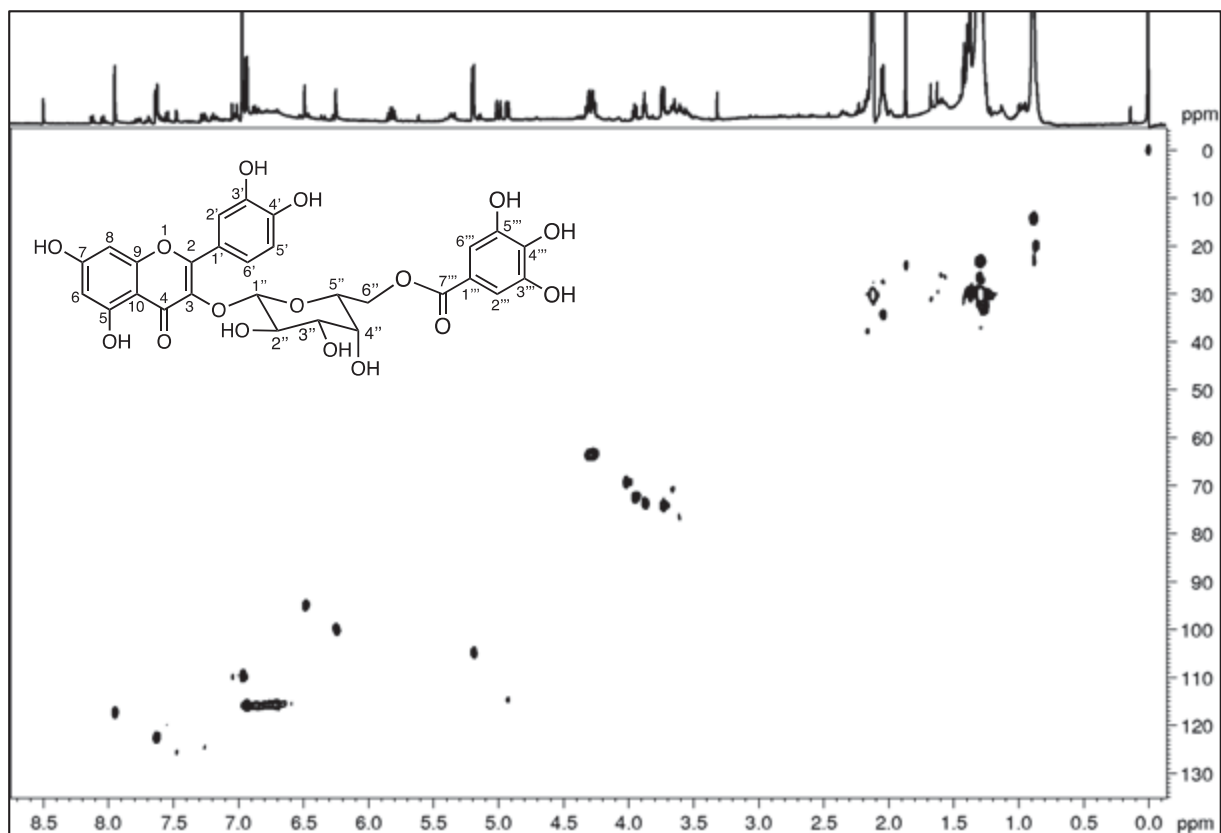
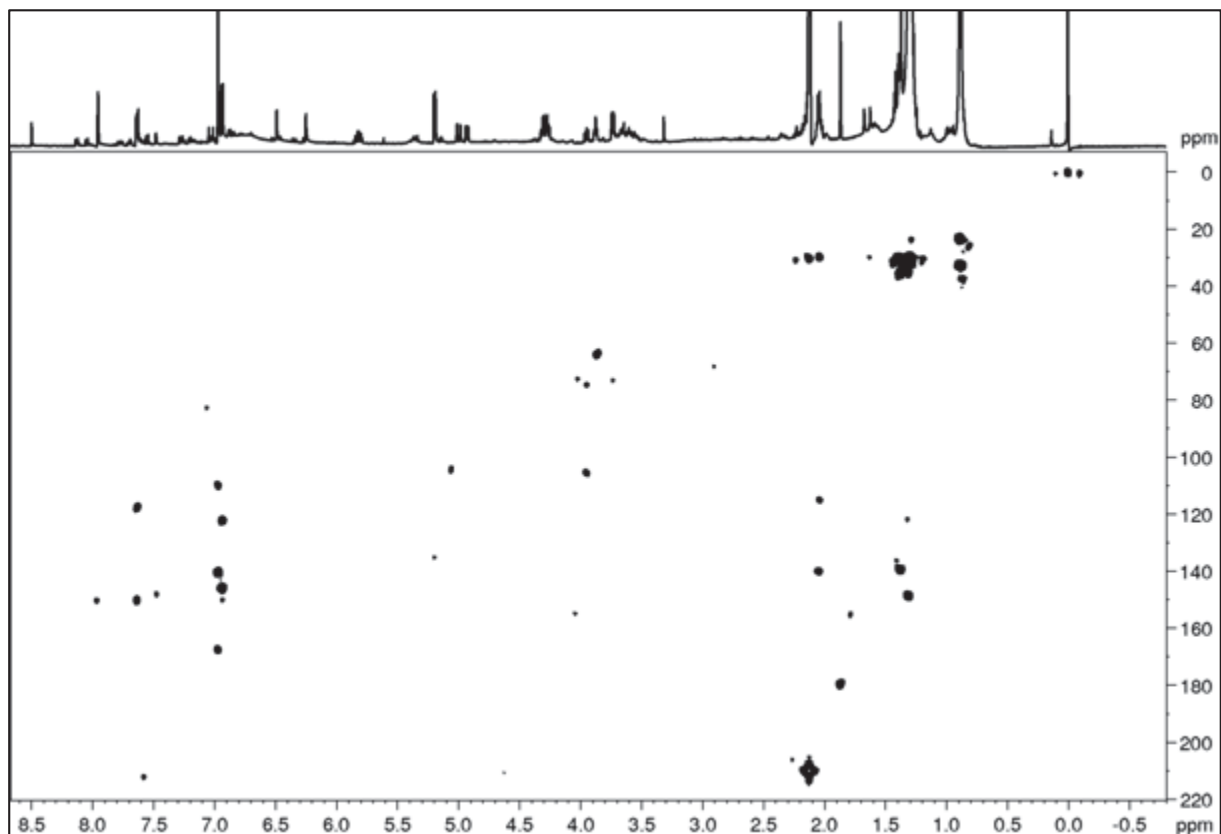


FIGURA 247 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS9** (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O)

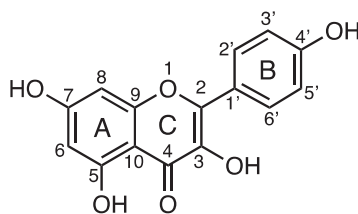


Por meio da comparação destes e dos demais dados com a literatura (TABELA 55), **MS9** foi identificado como o flavonoide 3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina (KADOTA et al., 1990), isolado anteriormente da espécie *Myrcia bella* (SALDANHA et al., 2013).

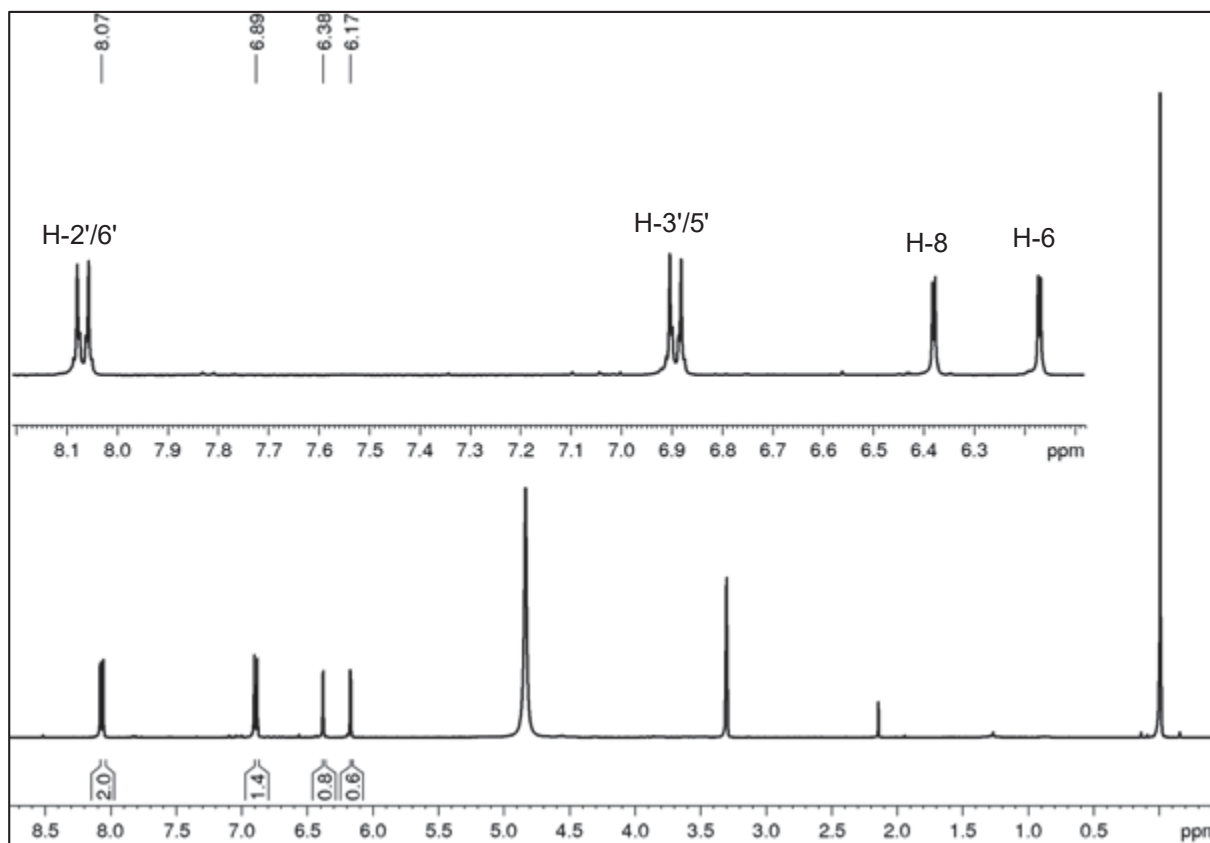
TABELA 55 – DADOS DE RMN DE **MS9** (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A 3-O- β -(6''-GALOIL)-GALACTOSILQUERCETINA (METANOL- d_4 , 300 MHz, KADOTA et al., 1990)

Grupo	Pos.	MS9			3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina	
		δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
Aglicona quercetina	2	n.o	-	-	159,7	-
	3	135,0	-	-	136,4	-
	4	n.o	-	-	180,3	-
	5	n.o	-	-	163,6	-
	6	100,0	6,25 d (2,1)	n.o	100,8	6,18 d (2,0)
	7	n.o	-	-	166,8	-
	8	94,9	6,49 d (2,1)	n.o	95,6	6,37 d (2,0)
	9	n.o	-	-	159,2	-
	10	n.o	-	-	106,3	-
	1'	n.o	-	-	123,6	-
	2'	117,2	7,95 d (2,2)	4'	118,5	7,78 d (2,0)
	3'	145,9	-	-	146,5	-
	4'	150,4	-	-	150,7	-
	5'	116,0	6,94 d (8,5)	3',6'	116,8	6,81 d (8,5)
	6'	122,6	7,63 dd (8,5 e 2,2)	2',4'	123,8	7,56 m
β -Galactose	1''	104,9	5,19 d (7,8)	3	106,3	5,10 d (8,0)
	2''	72,6	3,96 dd (9,7 e 7,8)	1'',3''	73,8	3,84 dd (9,5 e 8,0)
	3''	74,2	3,73 dd (9,7 e 3,4)	n.o	75,7	3,59 dd (9,5 e 3,5)
	4''	69,6	4,02 m*	2''	70,8	3,88 d (3,5)
	5''	73,9	3,87 dd (6,5 e 5,9)	4'',6''	75,3	3,79 t (6,5)
	6''	63,4	4,30 dd (11,1 e 5,9) ^a 4,26 dd (11,1 e 6,5) ^b	n.o n.o	64,6	4,31 dd (11,0 e 7,0) ^a 4,21 dd (11,0 e 6,0) ^b
Galoila	1'''	n.o	-	-	121,9	-
	2'''/6'''	109,4	6,98 s	4''',7'''	110,9	6,89 s
	3'''/5'''	n.o	-	-	147,1	-
	4'''	140,2	-	-	140,2	-
	7'''	167,2	-	-	168,7	-

* posição central dada por HSQC; ^aHa, ^bHb; n.o = não observado.

2.6.2.4 Identificação de **MS10**FIGURA 248 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS10****MS10**

O espectro de RMN de ^1H de **MS10** (FIGURA 249) apresentou certa similaridade com a substância **MS9** (quercetina). Entretanto, agora foram observados apenas quatro sinais, típicos de hidrogênios aromáticos, ao invés de cinco como em **MS6**. Foram observados dois dupletos em δ_{H} 6,37 (1H, $J = 2,1$ Hz, H-8) e 6,16 (1H, $J = 2,1$ Hz, H-6), cuja constante de acoplamento indica uma relação *meta* entre elas, confirmando a presença de um anel 1,2,3-5-tetrassubstituído (anel A), como foi observado para **MS6**. A principal diferença no espectro residiu nos sinais do anel B de **MS10**. Para esse anel foram encontrados dois sinais, como dois dupletos, com integração para dois hidrogênios cada, em δ_{H} 8,06 (2H, $J = 8,6$ Hz, H-2'/6') e 6,88 (2H, $J = 8,6$ Hz, H-3'/5'). Os dados apontaram para um anel 1,4-dissubstituído, com hidrogênios em acoplamento *orto*, quimicamente equivalentes. Esses dados sugeriram um flavonoide apresentando em seu anel B apenas um grupo hidroxila (C-4').

FIGURA 249 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS10** (METANOL- d_4 , 400 MHz)

Analisando o HSQC (FIGURA 251), os sinais em δ_{H} 8,06 (H-2'/6'), 6,88 (H-3'/5'), 6,37 (H-8) e 6,16 (H-6) apresentaram correlação com os carbonos em δ_{H} 130,3, 115,9, 94,1 e 98,9, respectivamente. De acordo com o HMBC (FIGURA 252), o sinal em δ_{H} 8,06 (H-2'/6') correlacionou com três carbonos sp^2 , sendo um hidrogenado em δ_{C} 115,9 (C-2'/6'), e dois oxigenados em δ_{C} 148,1 (C-2) e 160,7 (C-4'). Por outro lado, os hidrogênios H-3'/5' (δ_{H} 6,88) correlacionaram a longa distancia com os carbonos em δ_{C} 121,2 (C-1') e C-4'. Já o sinal em δ_{H} 6,37 (H-8) apresentou correlações com os carbonos C-6, em δ_{C} 105,1 (C-10), além de dois carbonos oxigenados em δ_{C} 158,4 (C-9) e 165,8 (C-7). E por fim, o hidrogênio H-6 (δ_{H} 6,16) apresentou correlações com os carbonos C-8, C-10, em δ_{C} 162,7 (C-5) e C-7 (FIGURA 250).

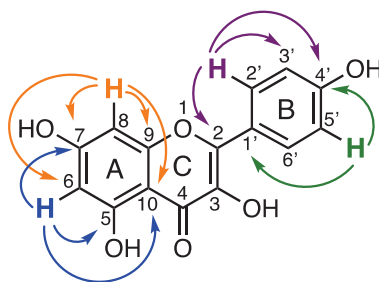
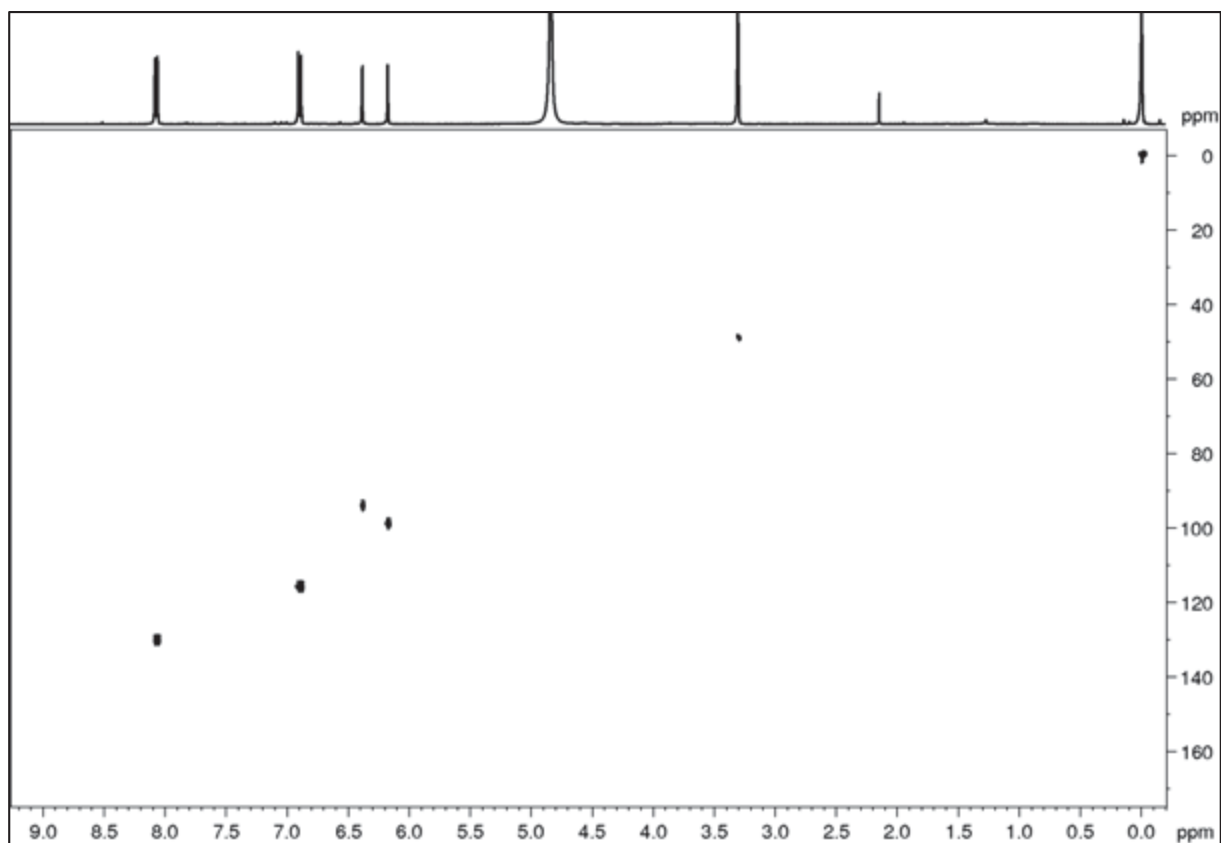
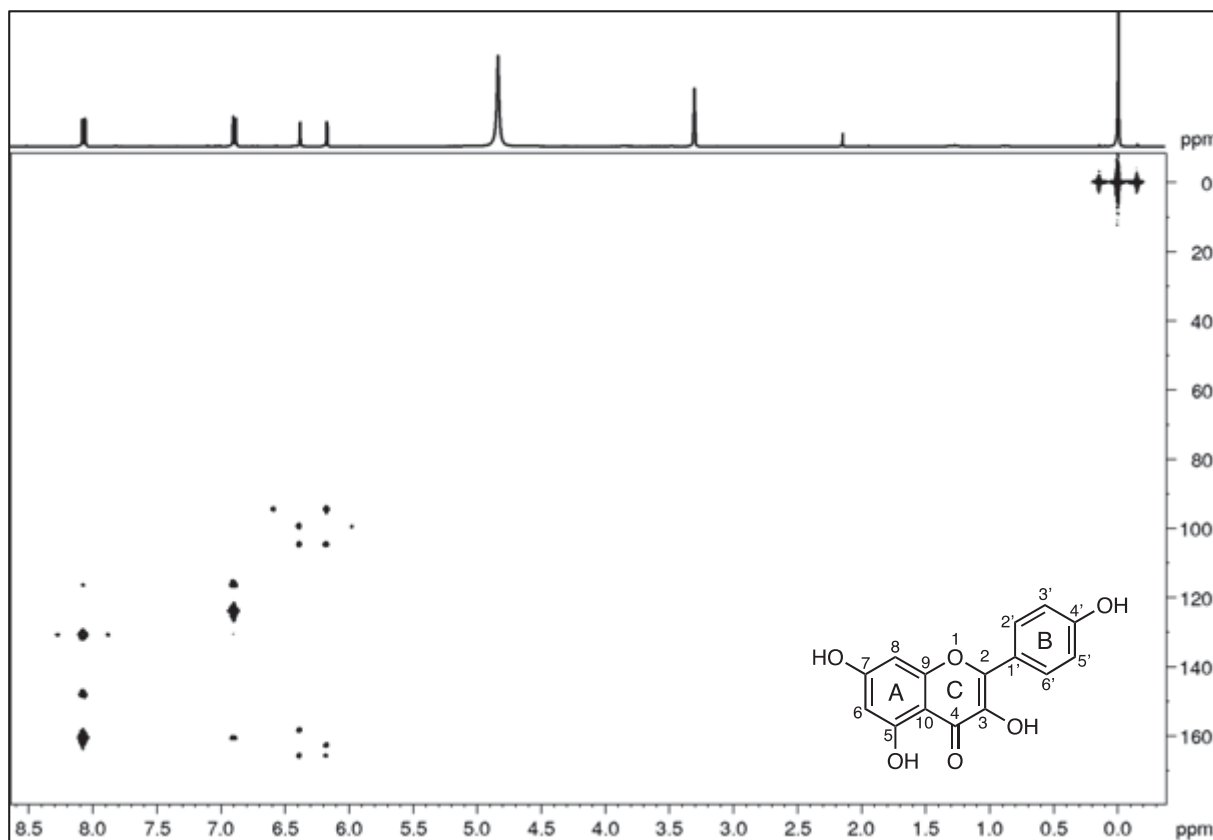
FIGURA 250 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS10**FIGURA 251 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS10**
(METANOL- d_4 , 400 MHz)

FIGURA 252 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS10**
(METANOL- d_4 , 400 MHz)

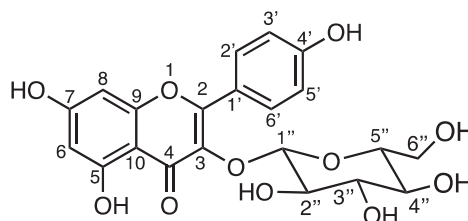


Diante dos dados citados a substancia **MS10** foi identificada como canferol (TABELA 56; BAEK et al., 2015), um flavonoide muito comum em espécies vegetais, incluindo o gênero *Myrcia*, tendo já sido anteriormente isolada de *Myrcia tomentosa* (SA et al., 2017).

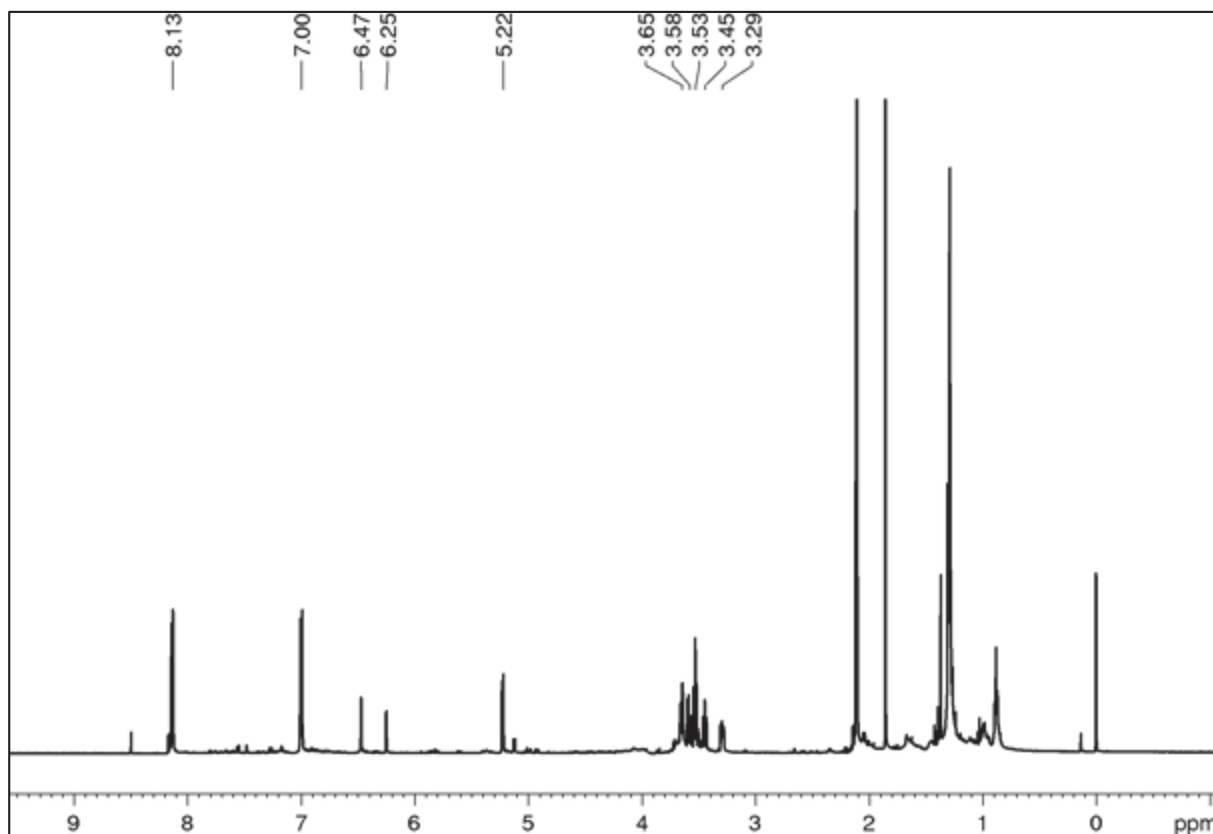
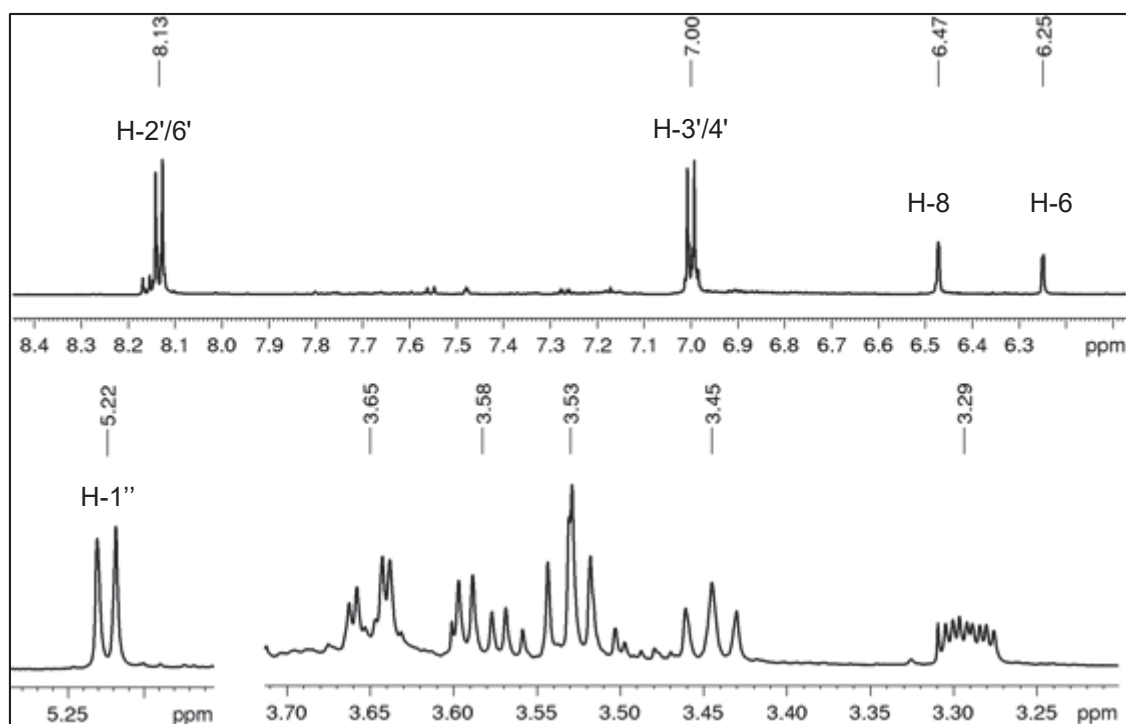
TABELA 56 – DADOS DE RMN DE **M10** (METANOL-*d*₄, 400 MHz) E COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA O CANFEROL (METANOL-*d*₄, 600 MHz, BAEK et al., 2015)

Posição	MS10			Canferol	
	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ_c	δ_H mult (<i>J</i> em Hz)
2	148,1	-	-	147,1	-
3	n.o	-	-	136,7	-
4	n.o	-	-	177,3	-
5	162,7	-	-	160,0	-
6	98,9	6,16 d (2,1)	10	99,2	6,16 d (2,0)
7	165,8	-	-	166,4	-
8	94,1	6,37 d (2,1)	6,7,9,10	94,4	6,36 d (2,0)
9	158,4	-	-	157,8	-
10	105,1	-	-	104,5	-
1'	124,2	-	-	123,3	-
2'	130,3	8,06 d (8,6)	2,6'	130,5	8,06 d (8,8)
3'	115,9	6,88 d (8,6)	-	116,3	6,90 d (8,8)
4'	160,7	-	-	160,1	-
5'	115,9	6,88 d (8,6)	1',3'	116,3	6,90 d (8,8)
6'	130,3	8,06 d (8,6)	2',4'	130,5	8,06 d (8,8)

n.o = não observado.

2.6.2.5 Identificação de **MS11**FIGURA 253 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS11****MS11**

A substância **MS11** (FIGURA 253) foi isolada em mistura com outros constituintes minoritários não identificados. Ampliando o seu espectro de RMN de ¹H (FIGURAS 254 e 255) foram identificados os sinais típicos da aglicona canferol na região hidrogênios aromáticos, distribuídos em quatro sinais em δ_H 8,13 (*d*, *J* = 8,9 Hz, H-2' e H-6'), 7,00 (*d*, *J* = 8,9 Hz, H-3' e H-5'), 6,47 (*d*, *J* = 2,1 Hz, H-8) e 6,25 (*d*, *J* = 2,1 Hz, H-6).

FIGURA 254 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS11** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)FIGURA 255 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DOS SINAIS DE **MS11**

Além dos sinais da aglicona canferol, o espectro de RMN de ^1H também apresentou sinais de uma unidade β -glicosídica, devido à presença de um duplete em δ_{H} 5,22 ($J = 7,6$ Hz, H-1''), típico de um hidrogênio anomérico. Os demais sinais da unidade β -glicosídica foram observados através dos sinais em δ_{H} 3,65 (dd , $J = 11,9$ e 2,5 Hz, H-6a''), 3,58 (dd , $J = 11,9$ e 5,2 Hz, H-6b''), 3,53 (dd , $J = 8,8$ e 7,6 Hz, H-2''), 3,45 (t , $J = 9,6$ Hz, H-4'') e 3,29 (ddd , $J = 9,6$, 5,2 e 2,5 Hz, H-5''). O sinal de H-4'' revelou uma constante de acoplamento típica de $J_{\text{axial-axial}}$, indicando uma unidade de β -glucose.

O hidrogênio anomérico (δ_{H} 5,22, H-1'') revelou estar ligado ao carbono em 105,5 (HSQC, FIGURA 257) e apresentou correlação no HMBC (FIGURA 258) com um carbono olefínico em δ_{C} 134,9, típico de C-3 da aglicona canferol, confirmando a sua localização (FIGURA 256).

Com base nos dados expostos, bem como os demais observados nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 57) foi possível atribuir a estrutura de **MS11** como o flavonoide 3-O- β -glucosilcanferol (astragalina) (TUYEN et al., 2020). Esse flavonoide possui ocorrência frequente em diversas espécies vegetais, incluindo em *Myrcia rubella* (LIMA et al., 2018).

FIGURA 256 – CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO HMBC DE **MS11**

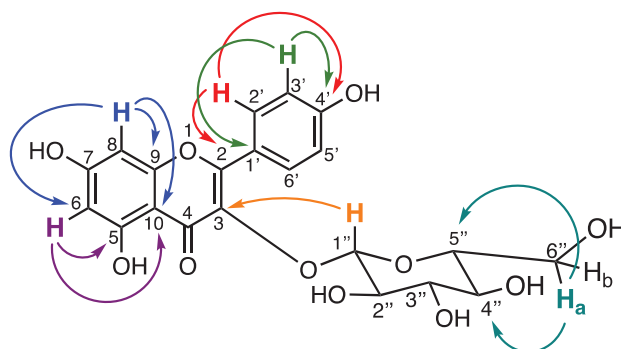


FIGURA 257 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS11**
(ACETONA- d_6 , 600 MHz)

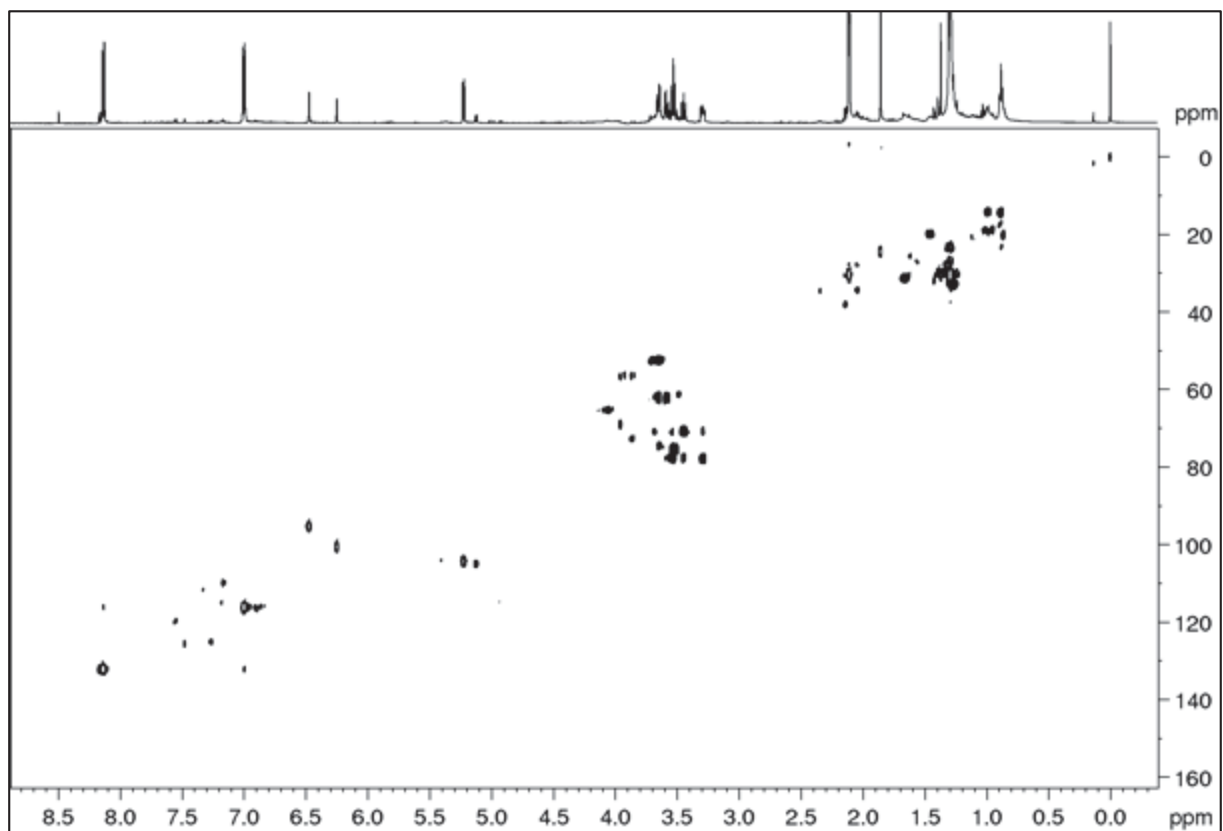


FIGURA 258 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS11**
(ACETONA- d_6 , 600 MHz)

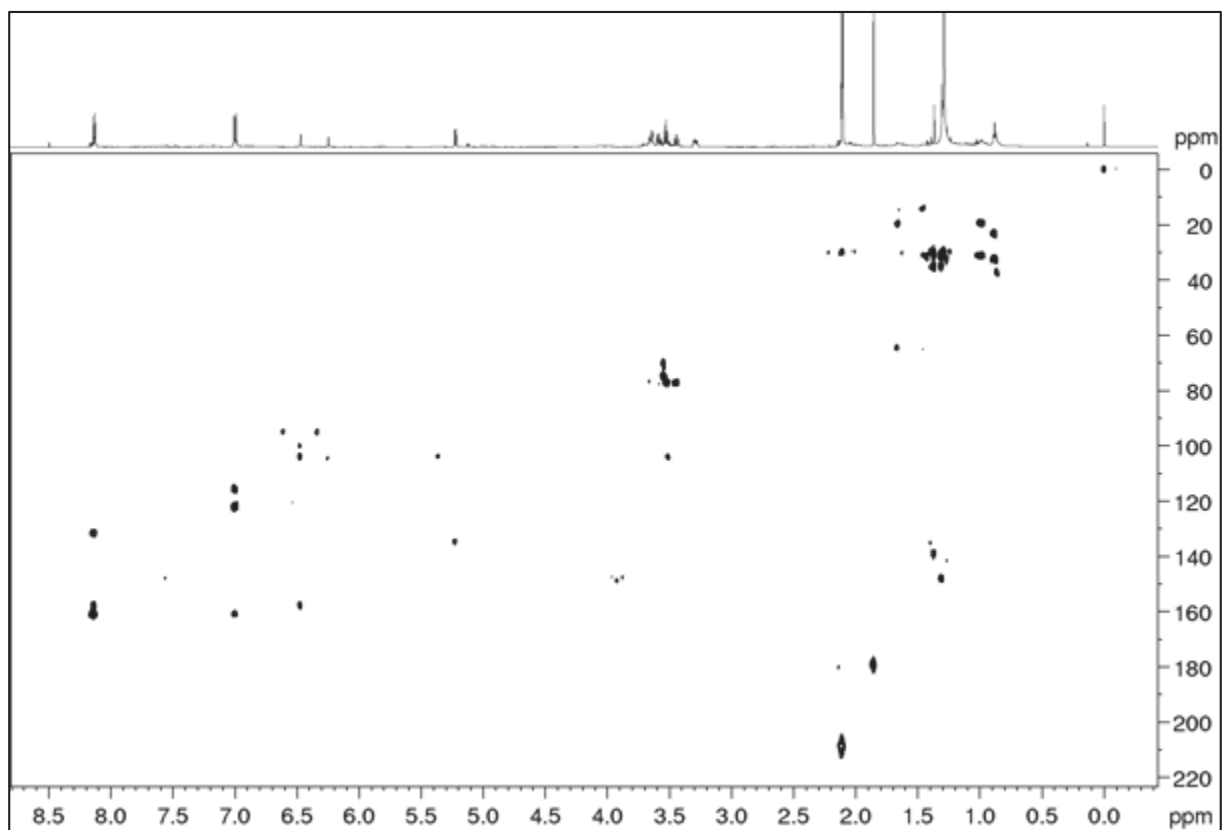
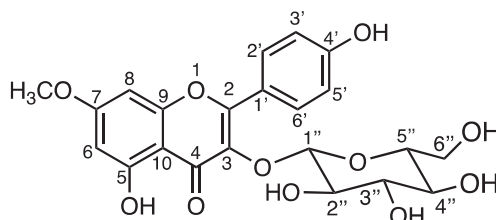


TABELA 57 – DADOS DE RMN DE **MS11** (ACETONA- d_6 , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA A ASTRAGALINA (ACETONA- d_6 , 500 MHz, TUYEN et al., 2020)

Grupo	Pos.	MS11			Astragalina	
		δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
Aglicona canferol	2	158,5	-	-	157,9	-
	3	134,9	-	-	135,4	-
	4	n.o	-	-	179,1	-
	5	162,5	-	-	162,9	-
	6	100,6	6,24 d (2,1)	5,8,10	99,7	6,28 d (2,0)
	7	n.o	-	-	165,2	-
	8	95,3	6,47 d (2,1)	6,9,10	94,6	6,52 d (2,0)
	9	158,1	-	-	158,6	-
	10	104,6	-	-	105,5	-
	1'	124,4	-	-	122,6	-
	2'	132,2	8,13 d (8,9)	2,4'	132,1	8,14 d (8,0)
	3'	116,4	6,99 d (8,9)	1'4'	115,8	6,97 d (8,0)
	4'	161,0	-	-	161,0	-
	5'	116,4	6,99 d (8,9)	1'4'	115,8	6,97 d (8,0)
	6'	132,2	8,13 d (8,9)	2,4'	132,1	8,14 d (8,0)
β -Glucose	1''	104,3	5,22 d (7,5)	3	104,8	5,23 d (7,5)
	2''	75,3	3,53 dd (8,8 e 7,5)	1'',3''	75,4	3,31-3,22 m
	3''	77,6	3,52 m^*	n.o	77,8	3,31-3,22 m
	4''	70,3	3,44 t (9,6)	5''	71,2	3,31-3,22 m
	5''	77,9	3,29 ddd (9,6, 5,2 e 2,5)	n.o	78,0	3,31-3,22 m
	6''	62,1	3,64 dd (11,9 e 2,5) ^a	4'',5''	62,7	3,31-3,22 m
			3,58 dd (11,9 e 5,2) ^b	5''		3,31-3,22 m

*sinal em sobreposição, posição central dada por HSQC; ^aHa, ^bHb; n.o = não observado.

2.6.2.6 Identificação de **MS12**

FIGURA 259 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS12****MS12**

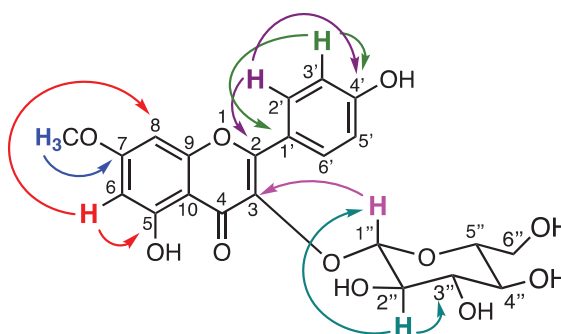
O espectro de RMN de 1H de **MS12** (FIGURAS 261 e 262) revelou sinais similares para uma aglicona canferol, devido à presença de quatro sinais na região de hidrogênios de anéis aromáticos em δ_H 8,03 (d , J = 8,9 Hz, H-2' e H-6'), 6,91 (d , J =

8,9 Hz, H-3'e H-5'), 6,26 (*d*, $J = 1,9$ Hz, H-8) e 6,10 (*d*, $J = 1,9$ Hz, H-6). Entretanto, foi observado um simpleto em δ_H 3,87 (7-OCH₃), o qual foi atribuído a um grupo metoxila em C-7, o que é comum em diversos flavonoides. De acordo com a literatura os flavonoides com a aglicona canferol metoxilados na posição C-7 são denominados de ramnocitrinas (HARBONE, 1975). O sinal em δ_H 3,87 revelou no HSQC (FIGURA 261) estar ligado ao carbono em δ_C 56,8, confirmando se tratar de uma metoxila. Já no HMBC (FIGURA 262) esse sinal correlacionou com o carbono em δ_C 150,5, que deve ser C-7.

Também foi observada a presença de uma unidade β -glicosídica. Os sinais para essa unidade foram: δ_H 5,06 (*d*, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 3,67 (*dd*, $J = 11,9$ e 2,4 Hz, H-6a''), 3,55 (*dd*, $J = 11,9$ e 5,2 Hz, H-6b''), 3,55 (*dd*, $J = 9,6$ e 8,6 Hz, H-4''), 3,48 (*dd*, $J = 9,1$ e 7,5 Hz, H-2''), 3,43 (*t*, $J = 9,1$ Hz, H-3''), 3,35 (*dd*, $J = 9,6$ e 8,6 Hz) e 3,20 (*ddd*, $J = 9,6$, 5,2 e 2,4 Hz, H-5''). Esses sinais são condizentes para uma unidade β -glucose, uma vez que as todas as constantes de acoplamento são compatíveis com a relação axial-axial entre os hidrogênios vizinhos.

O sinal do hidrogênio anomérico foi observado em δ_H 5,06 (H-1''), o qual apresentou correlação a longa distância (HMBC) com o carbono olefínico em δ_C 135,2, típico de C-3 da aglicona ramnocitrina, confirmando a sua localização nessa posição (FIGURA 260).

FIGURA 260 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES OBSERVADAS DO HMBC DE **MS12**



Diante dos dados apresentados e das demais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC (TABELA 58) foi possível atribuir a estrutura

química de **MS12** como sendo o flavonoide 3-O- β -glucosilramnocitrina (NISHINA et al., 2017), um flavonoide conhecido, mas inédito no gênero *Myrcia*.

FIGURA 261 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS12** (ACETONA- d_6 +GOTAS DE D_2O , 600 MHz)

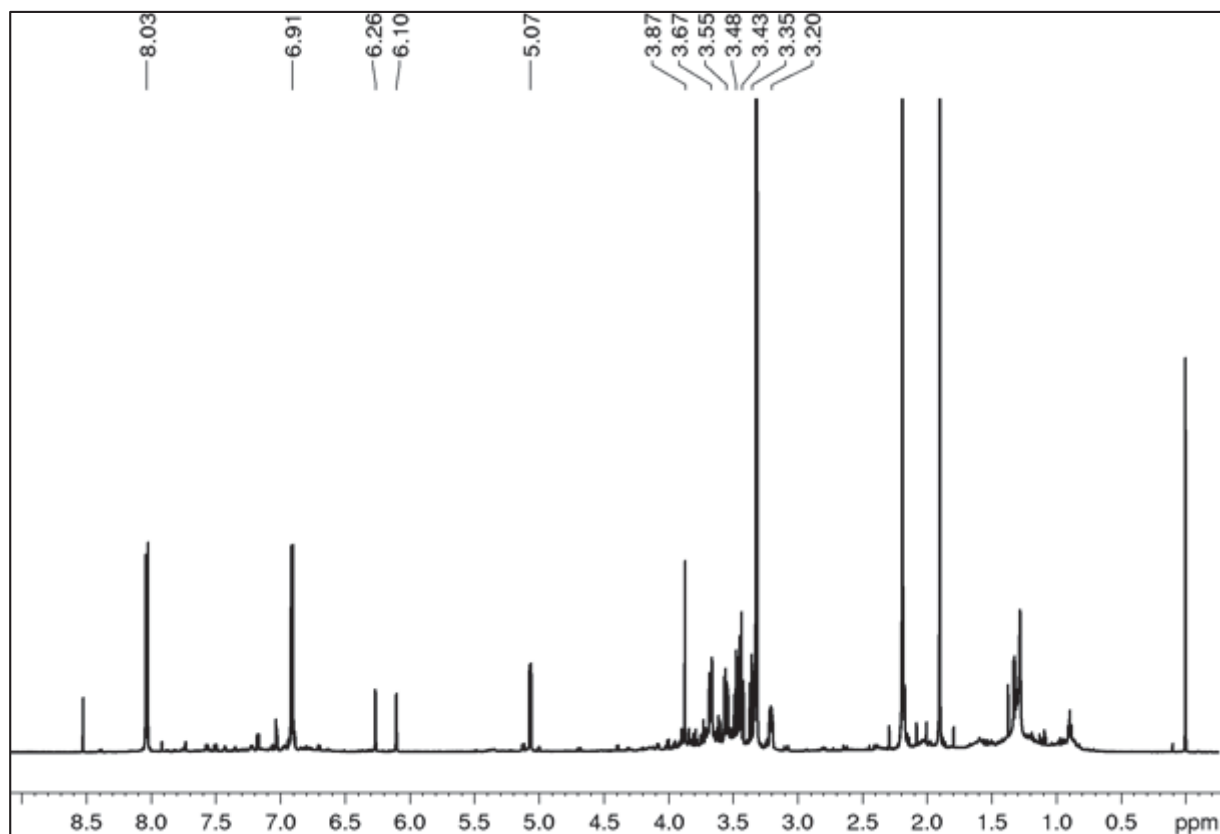


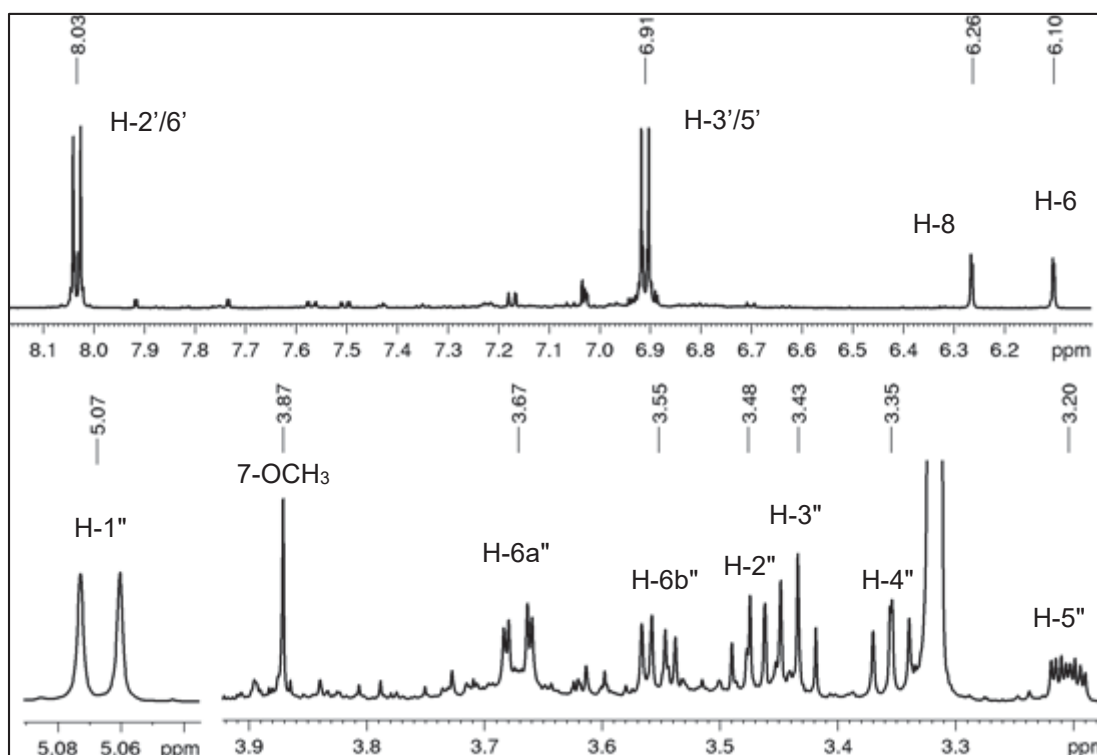
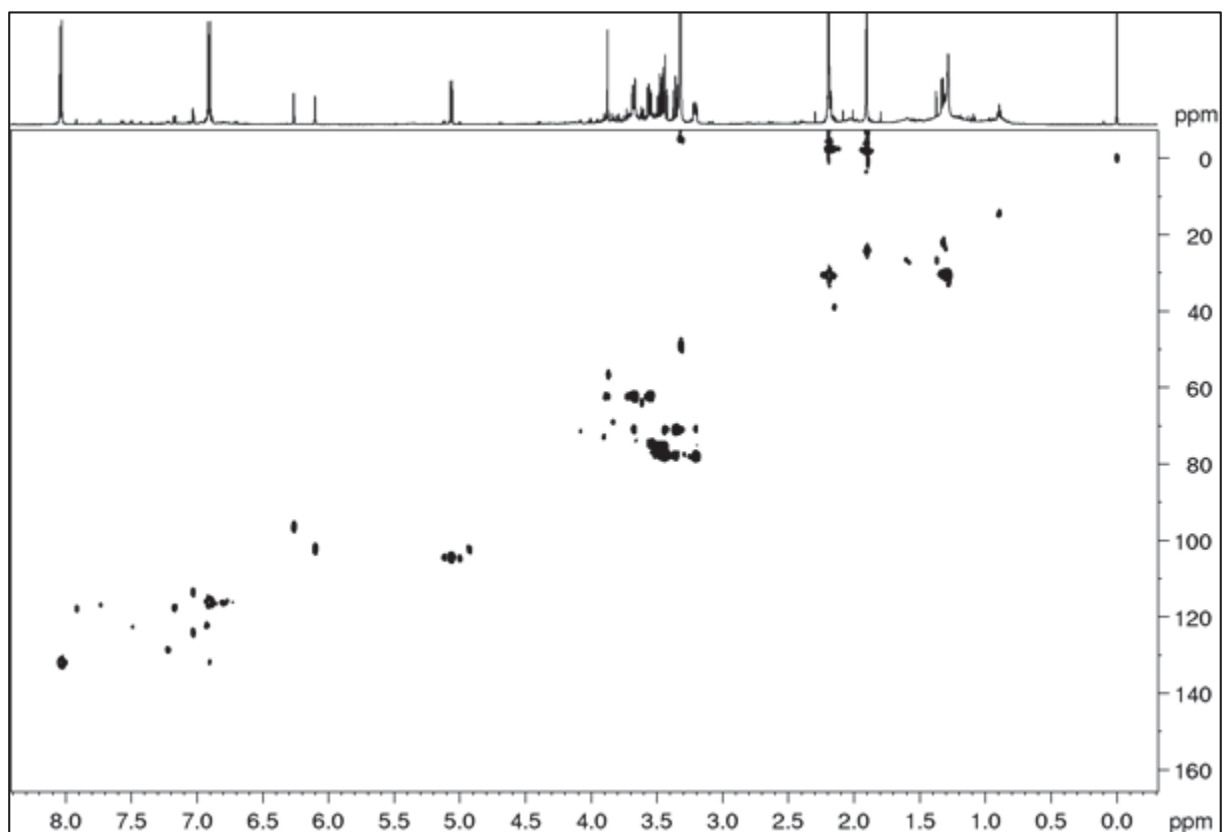
FIGURA 262 - AMPLIAÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE **MS12**FIGURA 263 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LIGAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS12**
(ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz)

FIGURA 264 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS12**
(ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz)

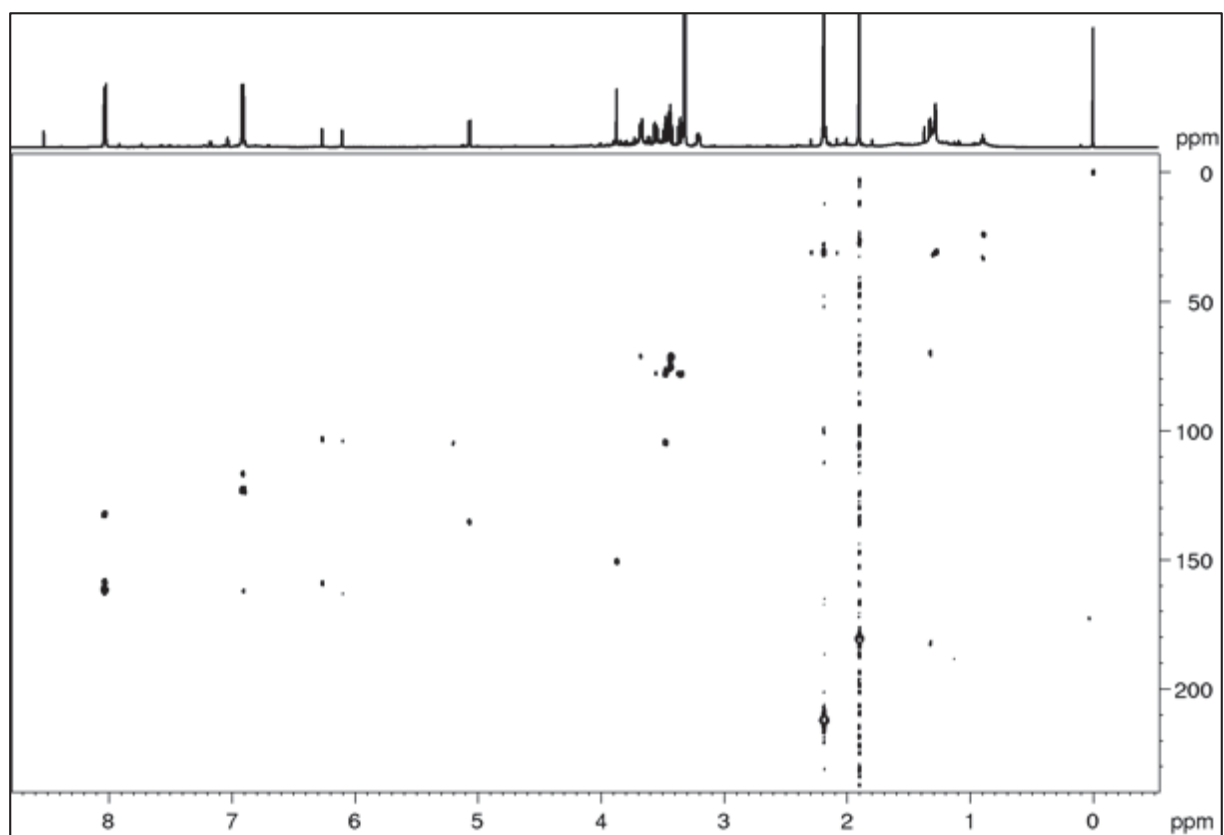


TABELA 58 – DADOS DE RMN DE **MS12** (ACETONA- d_6 + GOTAS DE D_2O , 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA 3-O- β -GLICOSILRAMNOCITRINA (METANOL- d_4 , 400 MHz, NISHINA et al., 2017)

Grupo	Posição	MS12			3-O- β -glicosilramnocitrina	
		δ_C	δ_H mult (J em Hz)	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)	δ_C	δ_H mult (J em Hz)
Ramnocitrina	2	158,7	-	-	158,0	-
	3	135,2	-	-	134,3	-
	4	n.o	-	-	178,3	-
	5	163,1	-	-	166,0	-
	6	102,3	6,10 <i>d</i> (1,9)	5,8,9	97,7	6,32 <i>d</i> (2,3)
	7	150,5	-	-	157,1	-
	8	96,5	6,26 <i>d</i> (1,9)	6,10	91,8	6,59 <i>d</i> (2,3)
	9	104,1	-	-	105,3	-
	10	159,0	-	-	160,3	-
	1'	123,1	-	-	121,4	-
	2'	132,2	8,03 <i>d</i> (8,9)	2,4'	131,0	8,08 <i>d</i> (8,7)
	3'	116,1	6,91 <i>d</i> (8,9)	1',4'	114,8	6,88 <i>d</i> (8,7)
	4'	161,6	-	-	161,5	-
	5'	116,1	6,91 <i>d</i> (8,9)	1'4'	114,8	6,88 <i>d</i> (8,7)
	6'	132,2	8,03 <i>d</i> (8,9)	2,4'	131,0	8,08 <i>d</i> (8,7)
	7-OCH₃	56,8	3,87 <i>s</i>	7	55,2	3,88 <i>s</i>
β -Glucose	1''	104,3	5,06 <i>d</i> (7,5)	3	102,6	5,26 <i>d</i> (7,2)
	2''	75,3	3,47 <i>dd</i> (9,1 e 7,5)	1'',3''	74,4	3,49-3,40 <i>m</i>
	3''	77,6	3,43 <i>t</i> (9,1)	2'',4''	77,1	3,49-3,40 <i>m</i>
	4''	70,3	3,35 <i>dd</i> (9,6 e 8,6)	3''	70,0	3,35-3,19 <i>m</i>
	5''	77,9	3,20 <i>ddd</i> (9,6, 5,2 e 2,4)	n.o	76,7	3,35-3,19 <i>m</i>
	6''	62,1	3,67 <i>dd</i> (11,9 e 2,4) ^a 3,55 <i>dd</i> (11,9 e 5,2) ^b	4'' 5''	61,3	3,69 <i>dd</i> (11,9 e 2,3) ^a 3,21 <i>dd</i> (11,9 e 5,5) ^b

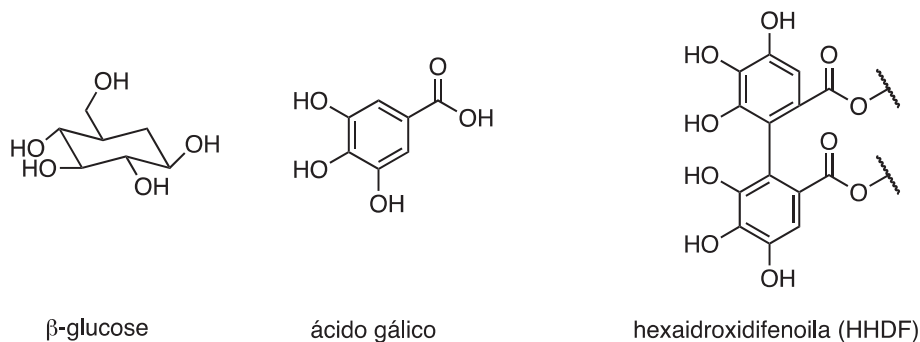
^aHa, ^bHb; n.o = não observado.

2.6.3 Identificação do tanino

Os taninos são substâncias polifenólicas, comumente encontradas em extratos vegetais de maior polaridade. Os taninos podem ser divididos em dois subgrupos: condensados que são polímeros de flavonóides, e hidrolisáveis, os quais possuem uma unidade de açúcar central (comumente a β -glucose), cujas hidroxilas estão esterificadas com uma ou mais unidades do ácido gálico. Esse subgrupo pode ainda ser classificado em galotaninos e elagitaninos (DEWICK, 2009). Os elagitaninos são substâncias que possuem unidades do ácido gálico ligadas a β -glucose, além de uma ou mais unidade do grupo hexaidroxidifenoila (HHDF) (FIGURA 265). O presente

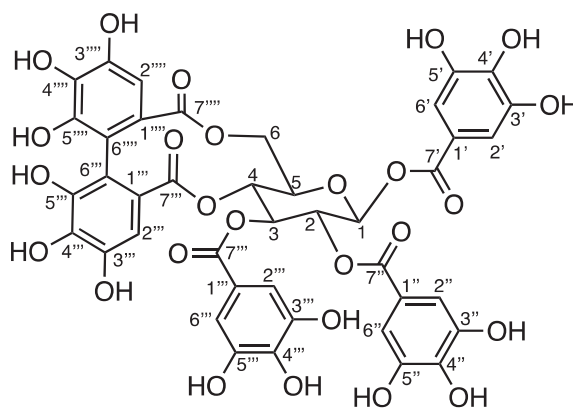
estudo fitoquímico permitiu o isolamento de um elagitanino (**MS13**), cuja identificação será apresentada a seguir.

FIGURA 265 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS UNIDADES PRESENTES NOS TANINOS HIDROLISÁVEIS (ELAGITANINOS)



2.6.3.1 Identificação de **MS13**

FIGURA 266 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA **MS13**



MS13

A substância **MS13** (FIGURA 266) foi isolada como um sólido amorfo, branco. O seu espectro de RMN de ^1H (FIGURA 267) revelou sinais de hidrogênios aromáticos e oximetínicos. Na região de hidrogênios aromáticos (FIGURA 268) foram observados cinco sinais. Destes, três simpletos, com integração para dois hidrogênios cada, em δ_{H} 7,13 (H-2'/6'), 7,02 (H-2''/3'') e 6,99 (H-2'''/6'''). Estes sinais apontaram para três grupos galoíla. Ainda na mesma região foram observados dois simpletos integrando

para um hidrogênio cada em δ_H 6,68 (H-2''''') e 6,49 (H-2'''), sugerindo a presença de um grupo hexaidroxidifenoila (HHDF).

FIGURA 267 – ESPECTRO DE RMN DE 1H DE **MS13** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)

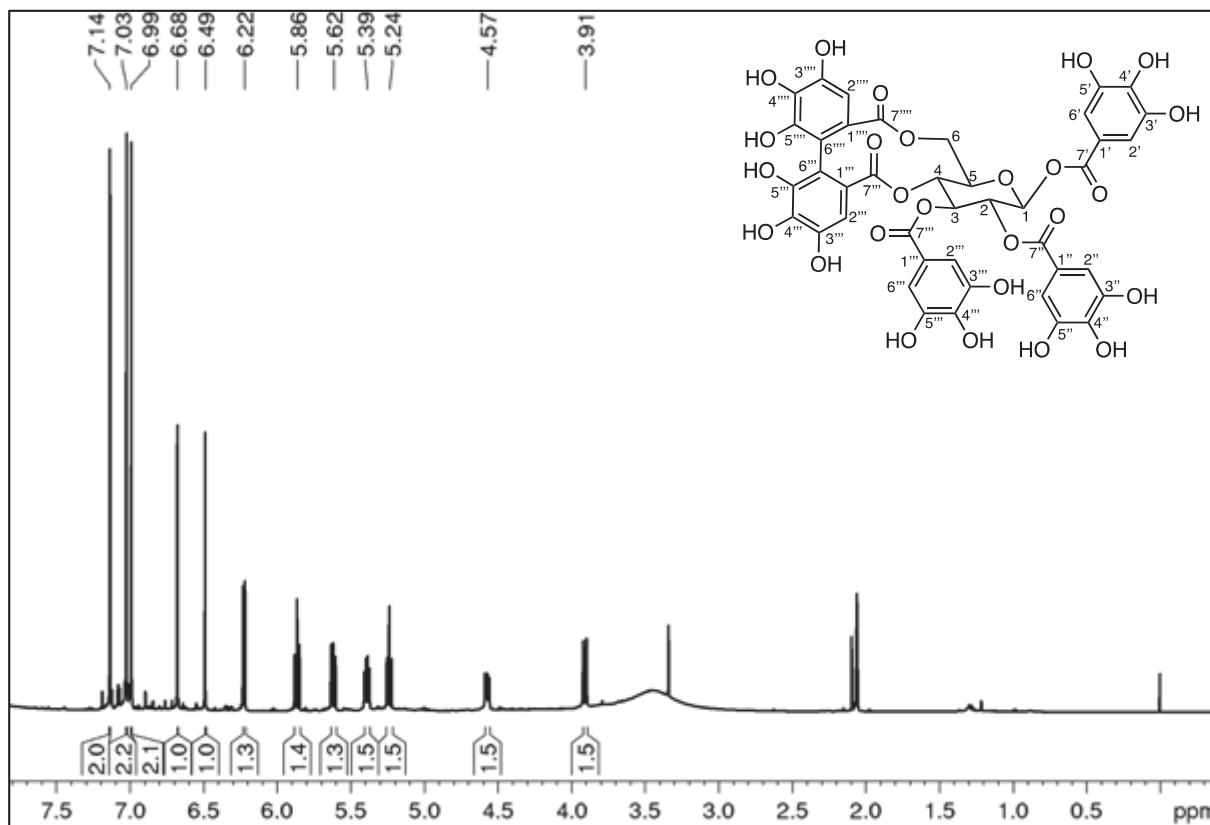
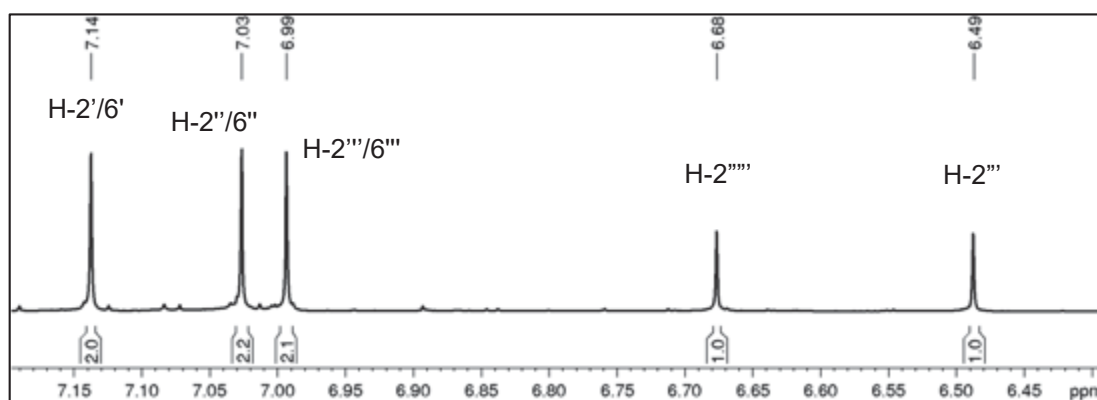


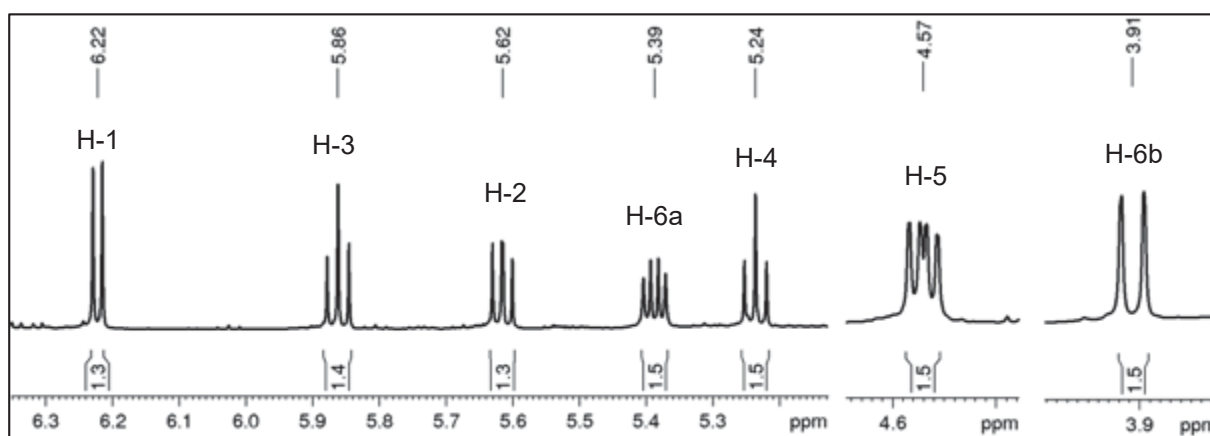
FIGURA 268 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE 1H NA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DE **MS13**



Na região de hidrogênios oximetínicos (FIGURA 269) foram observados sete sinais que indicaram uma unidade glicosídica. O hidrogênio anomérico foi visto no

espectro como um duplete em δ_H 6,22 (1H, $J = 8,3$ Hz, H-1). A constante de acoplamento indica uma relação *trans*-diaxial com o hidrogênio vizinho, compatível com um β -glicosídeo. Os demais sinais foram observados como um tripleto em δ_H 5,86 (1H, $J = 9,8$ Hz, H-3), um duplo-duplete em δ_H 5,62 (1H, $J = 9,8$ e $J = 8,3$ Hz, H-2), um tripleto em δ_H 5,24 (1H, $J = 10,3$ Hz, H-4) e um duplo-duplete em δ_H 4,57 (1H, $J = 10,3$ e $J = 6,6$ Hz, H-5). O grupo metileno foi observado como um duplo-duplete em δ_H 5,39 (1H, $J = 13,5$ e $6,6$ Hz, H-6a) e um duplete em δ_H 3,91 (1H, $J = 13,5$ Hz, H-6b). Por meio desses sinais foi possível deduzir que a unidade glicosídica era a β -glucose, uma vez que todas as constantes de acoplamento foram compatíveis com acoplamentos *trans*-diaxiais entre os hidrogênios vizinhos. Os valores observados para os hidrogênios oximetínicos da β -glucose estão mais desprotegidos do que aqueles observados nos flavonoides (descritos anteriormente), indicando que houve esterificação em todos os grupos hidroxila.

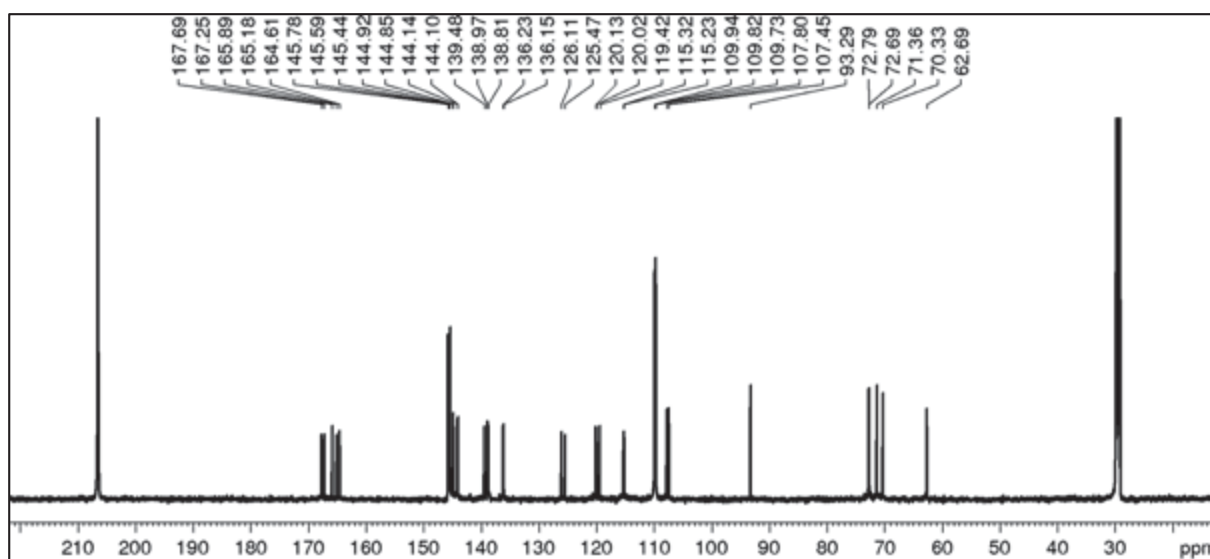
FIGURA 269 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DOS HIDROGÊNIOS DA β -GLUCOSE DE **MS13**



No espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ de **MS13** (FIGURA 270) foram observados 35 sinais. Destes, cinco sinais foram atribuídos aos grupos carbonila de ésteres, em δ_C 167,7 (C-7'''''), 167,3 (C-7'''''), 165,9 (C-7''') e 165,2 (C-7'') e 164,6 (C-7'), e 24 sinais foram considerados carbonos do tipo sp^2 , sendo 12 oxigenados, que podem ser atribuídos aos carbonos ligados a grupos hidroxila das diferentes unidades galoila. Dentre estes, seis sinais destacam-se no espectro, apresentando uma intensidade maior do que os demais oxigenados. E de fato é de se esperar, devido a simetria do grupo galoila, que estes sinais representem dois carbonos equivalentes. Esses sinais foram observados em δ_C 145,8 (C-3'/5'), 145,6 (C-3''/5''), 145,4 (C-3'''/5'''), 109,9 (C-

2'/6'), 109,8 (C-2'''/6''') e 109,7 (C-2''/6''). E ainda, os 12 carbonos sp^2 restantes foram atribuídos os carbonos aromáticos do grupo galoíla. Os demais (seis sinais) sinais foram atribuídos à unidade da β -glucose em δ_C 93,3 (carbono anomérico, C-1), 72,8 (C-3), 72,7 (C-5), 71,4 (C-2), 70,3 (C-4) e 62,7 (C-6). Por meio dessa análise foi possível atribuir o total de 41 átomos de carbono para **MS15**.

FIGURA 270 – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}C\{^1H\}$ DE **MS13** (ACETONA- d_6 , 150 MHz)



Considerando a presença de três grupos galoíla, uma análise por HSQC e HMBC (FIGURAS 272 e 273) torna-se imprescindível para determinar a localização de cada grupo galoíla esterificando a β -glucose. O hidrogênio anomérico em δ_H 6,22 (H-1) indicou, através do HSQC, estar ligado ao carbono em δ_C 93,3 que é característico do carbono anomérico. No HMBC este hidrogênio correlacionou com uma carbonila de éster em δ_C 164,3 (C-7'), enquanto que o sinal em δ_H 5,62 (H-2) correlacionou com δ_C 165,2 (C-7''), e o sinal em δ_H 5,86 (H-3) tinha correlação com a carbonila em δ_C 165,9 (C-7'''). Diante disso, a localização de cada grupo galoíla foi determinada pelas correlações dos hidrogênios aromáticos presentes em cada grupo galoíla. O sinal em δ_H 7,14 (H-2'/6') correlacionou com o carbono em δ_C 109,9 (C-2'/6'), correspondente aos dois carbonos hidrogenados equivalentes, e também com o carbono em δ_C 119,4 (C-1'), e com dois carbonos sp^2 oxigenados (confirmando os grupos hidroxila) em δ_C 139,5 (C-4') e 145,8 (C-3'/5'). Além disso, esse sinal e o hidrogênio anomérico (δ_H 6,22) apresentaram correlação com o mesmo grupo carbonila, em δ_C 164,3, indicando que esse grupo galoíla estava ligado ao carbono

anomérico. De modo semelhante, foi determinado que os grupos galoila representados pelos sinais em δ_H 7,02 (H-2''/6'') e 6,99 (H-2'''/6''') estavam, respectivamente, em C-2 e C-3 da unidade de glucose (FIGURA 271).

FIGURA 271 – PRINCIPAIS CORRELAÇÕES NO HMBC DA β -GLUCOSE COM OS GRUPOS GALOÍLA DE **MS13**

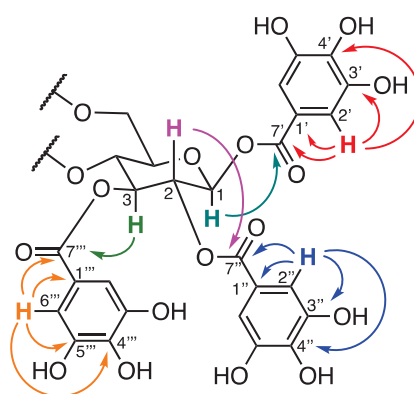


FIGURA 272 – MAPA DE CORRELAÇÃO À LIGAÇÃO DIRETA 1H - ^{13}C (HSQC) DE **MS13** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)

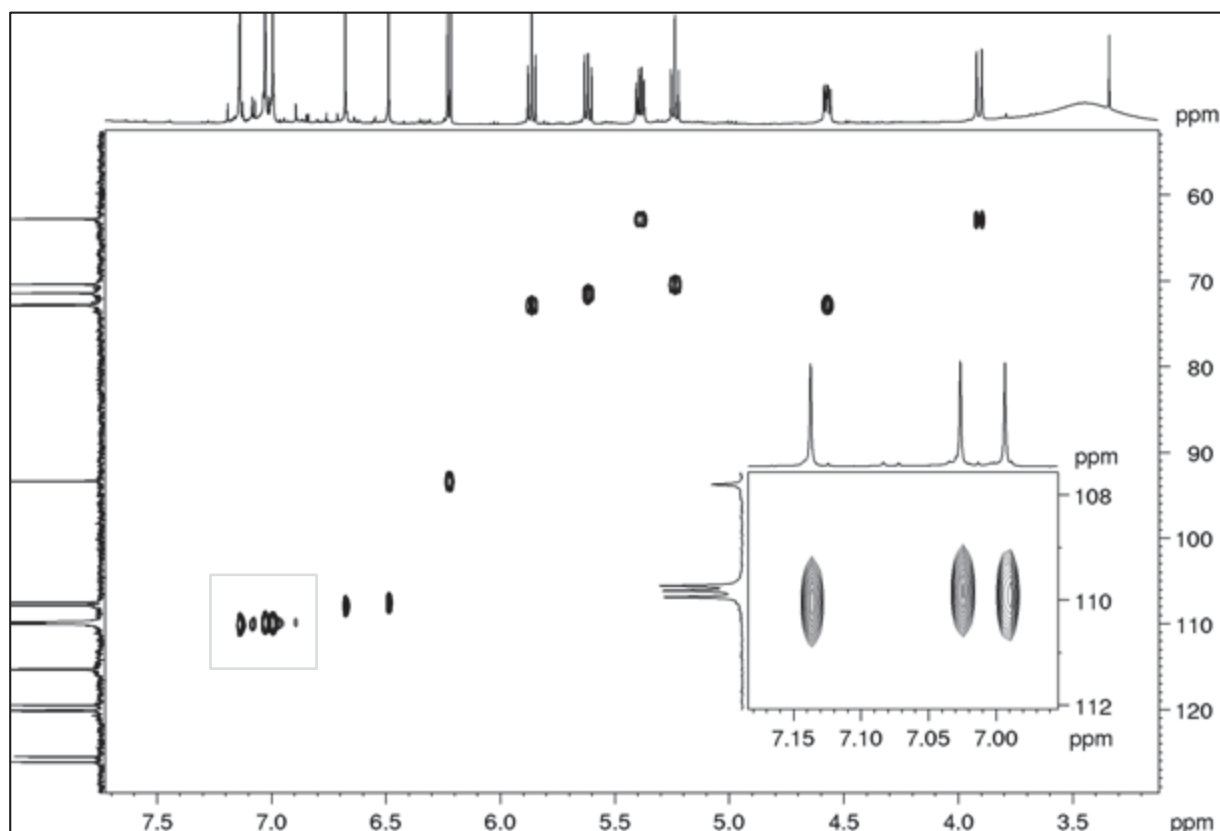
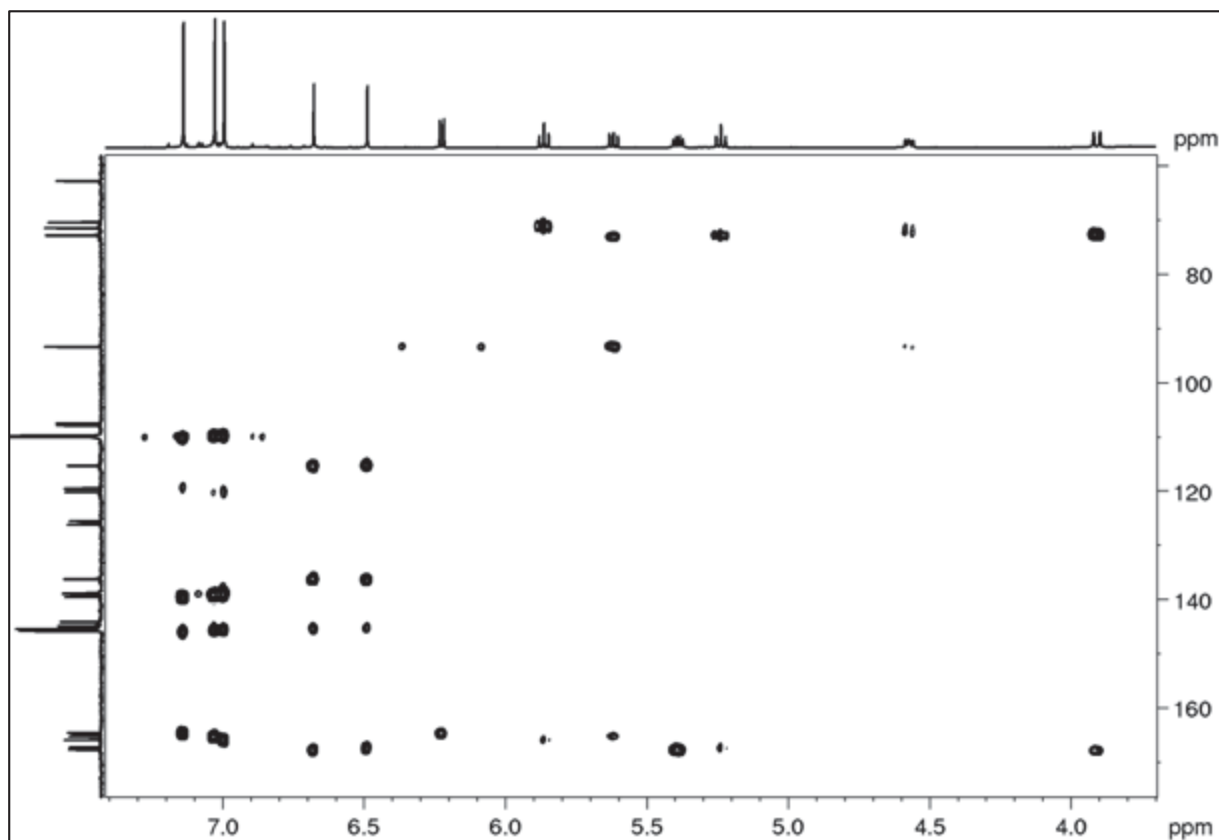
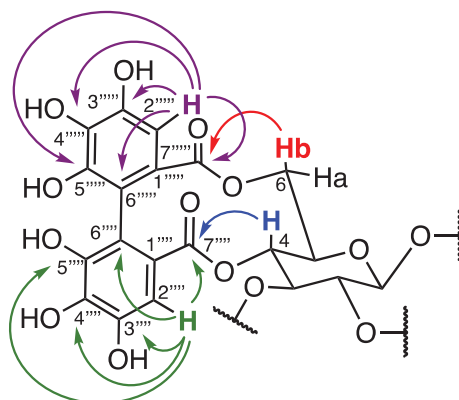


FIGURA 273 – MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C (HMBC) DE **MS13** (ACETONA- d_6 , 600 MHz)



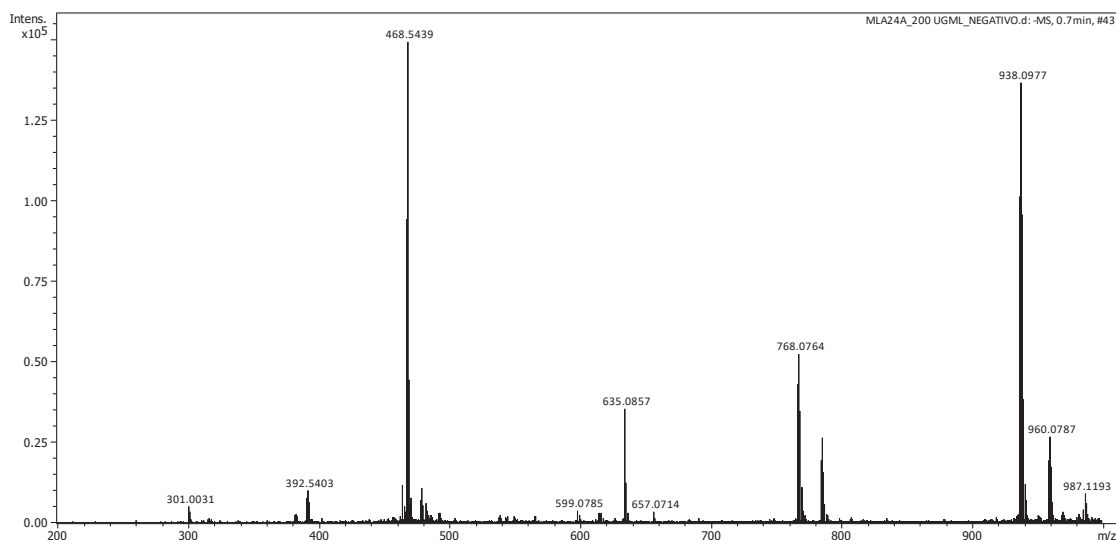
Os dois hidrogênios em δ_{H} 6,49 (H-2''') e 6,68 (H-2'''), com integração para um hidrogênio cada, os quais foram inicialmente atribuídos ao grupo HHDF, revelaram no HSQC estarem ligados aos carbonos em δ_{C} 107,4 e 107,8, respectivamente. O sinal em δ_{H} 6,49 (H-2''') correlacionou no HMBC com os carbonos em δ_{C} 115,2 (C-6'''), 144,91 (C-3'''), 144,85 (C-5''') e com uma carbonila de éster em 167,7 (C-7'''). O outro sinal em δ_{H} 6,68 (H-2''') revelou correlações com os carbonos em 115,3 (C-6'''), 136,2 (C-4'''), 144,10 (C-3'''), 144,09 (C-5''') e 167,3 (C-7'''). Entretanto, o HMBC não revelou o deslocamento químico de C-1''' e C-1''', pois os hidrogênios estão adjacentes a esta posição; porém no espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram observados dois sinais em 125,5 e 126,1, os quais foram atribuídos a C-1''' e C-1'', respectivamente. Em adição, as correlações no HMBC dos hidrogênios H-4 e H-6b confirmaram a posição do grupo HHDF em C-4 e C-6, pois H-4 correlacionou com a carbonila de éster em δ_{C} 167,3 (C-7'''), enquanto que H-6b mostrou correlação com o carbono em δ_{C} 167,7 (C-7''') (FIGURA 274).

FIGURA 274 – CORRELAÇÕES DO HMBC DO GRUPO HHDF DE **MS13**

Por meio das correlações descritas e das demais observadas no HMBC (TABELA 59) foi possível determinar a estrutura de **MS13** como sendo um tanino elágico, conhecido e presente em diversas espécies vegetais, chamado de eugeniina. Esse tanino já foi descrito na família Myrtaceae, sendo que seu primeiro isolamento foi em *Eugenia caryophyllata* (NONAKA et al., 1980; LIU et al., 2019). Apesar de conhecido esse é o primeiro relato no gênero *Myrcia*.

Foi determinada a rotação específica desse tanino. O valor experimental obtido foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 56,9$ ($c = 0,15$, acetona), o qual está de acordo com o valor encontrado na literatura de $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 57,1$ (acetona) (NONAKA et al., 1980).

Também foi obtido o espectro de massas de alta resolução (FIGURA 275) que apresentou um pico de m/z de 938,0977 $[M]^+$, compatível para a fórmula molecular de $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{26}$ (massa exata: 938,6650), a qual está de acordo com a estrutura proposta por RMN para **MS13**.

FIGURA 275 – ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DE **MS13**

E por fim, o espectro de absorção na região do UV-Vis de **MS13** (FIGURA 276) revelou duas bandas de absorção, sendo uma mais intensa com absorção máxima em λ_{max} 209 nm e outra menos intensa em λ_{max} 297 nm. O perfil observado é condizente para transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, típicas dos anéis aromáticos, confirmando a presença dos grupos galoíla e hexaidroxidifenoila (HHDF).

FIGURA 276 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS (ACETONA)

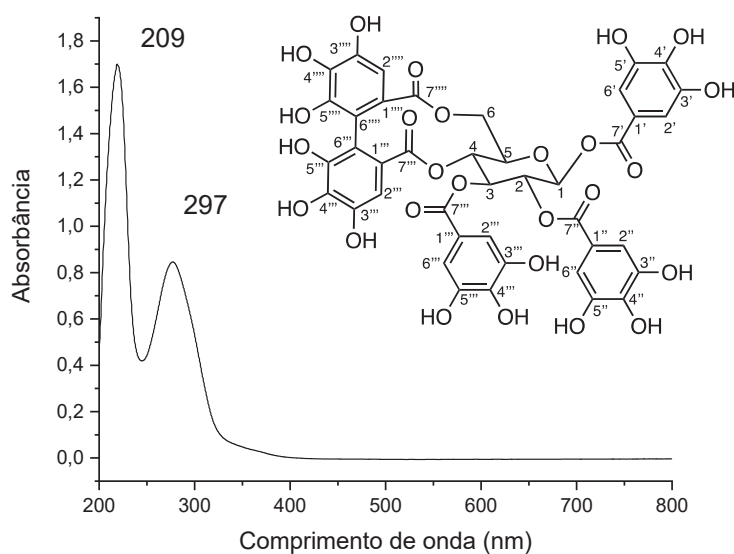


TABELA 59 – DADOS DE RMN DE **MS15** (ACETONA-*d*₆, 600 MHz) EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA PARA EUGENIINA (ACETONA-*d*₆, 100 MHz, NONAKA et al., 1980; DMSO-*d*₆, 600 MHz, LIU et al., 2019)

Grupo	Pos.	MS15			Eugeniina	
		δ _C	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)	HMBC (¹ H→ ¹³ C)	δ _C *	δ _H mult (<i>J</i> em Hz)**
β-Glucose	1	93,3	6,22 <i>d</i> (8,3)	7'	98,8	6,21 <i>d</i> (8,0)
	2	71,4	5,62 <i>dd</i> (9,8 e 8,3)	1,3,7''	72,1	5,59 <i>t</i> (8,0)
	3	72,7	5,86 <i>d</i> (9,8)	2,7'''	73,5	5,85 <i>t</i> (9,0)
	4	70,3	5,24 <i>t</i> (10,3)	7''''	70,6	5,42 <i>t</i> (10,0)
	5	72,8	4,57 <i>dd</i> (10,3 e 6,6)	1,4,6	72,7	4,53 <i>dd</i> (10,0 e 6,0)
	6	62,7	5,38 <i>dd</i> (13,5 e 6,6) ^a 3,91 <i>d</i> (13,5) ^b	7''''' 5,7'''''	63,0	5,38 <i>dd</i> (14,0 e 6,0) ^a 3,88 <i>d</i> (14,0) ^b
Galoila	1'	119,4	-	-	119,2	-
	2'/6'	109,9	7,14 <i>s</i>	1',2',3',4', 5', 6' 7'	109,3	7,12 <i>s</i>
	3',5'	145,8	-	-	146,1	-
	4'	139,5	-	-	139,4	-
	7'	164,6	-	-	167,4	-
	1''	120,1	-	-	118,9	-
	2''/6''	109,7	7,03 <i>s</i>	1'',2'',3'',4'', 5'',6'',7''	109,3	7,00 <i>s</i>
	3'',5''	145,6	-	-	146,0	-
	4''	138,8	-	-	139,2	-
	7''	165,2	-	-	165,9	-
	1'''	120,0	-	-	118,8	-
	2'''/6'''	109,8	6,99 <i>s</i>	1''',2''',3''',4''', 5''',6''',7'''	109,3	6,96 <i>s</i>
	3''',5'''	145,4	-	-	145,9	-
	4'''	138,8	-	-	139,2	-
	7'''	165,9	-	-	165,7	-
HHDF	1''''	126,1	-	-	124,8	-
	2''''	107,5	6,49 <i>s</i>	3''',4''',5''', 6''',7''''	115,8	6,48 <i>s</i>
	3''''	144,13	-	-	145,7	-
	4''''	136,2	-	-	135,9	-
	5''''	144,02	-	-	145,7	-
	6''''	115,2	-	-	106,1	-
	7''''	167,3	-	-	168,1	-
	1'''''	126,1	-	-	124,2	-
	2'''''	107,8	6,68 <i>s</i>	3'''',4'''',5'''', 6'''',7'''''	115,7	6,65 <i>s</i>
	3'''''	149,91	-	-	145,7	-
	4'''''	136,1	-	-	135,7	-
	5'''''	149,85	-	-	145,7	-
	6'''''	115,3	-	-	105,8	-
	7'''''	167,7	-	-	168,1	-

*DMSO-*d*₆, 600 MHz, **acetona-*d*₆, 100 MHz. ^aHa, ^bHb

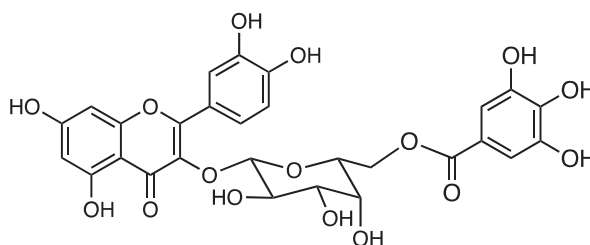
2.6.4 Ensaios de atividade biológica

2.6.4.1 Ensaios de atividade citotóxica

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados para o extrato etanólico, e a atividade foi medida em valores de TGI (*Total Growth Inhibition*), a qual corresponde a concentração necessária para inibir completamente o crescimento celular. Para ser considerada ativa, a amostra deve exibir valores de TGI inferiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerada fracamente ativa quando TGI varia entre $15\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderadamente ativa para valores entre $6,25\text{-}15 \mu\text{g mL}^{-1}$, e fortemente ativa para valores abaixo de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FOUCHE et al., 2008; SANTOS et al., 2018).

O extrato etanólico das folhas de *M. selloi* (**ML**) apresentou valores de TGI superiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as linhagens de células tumorais avaliadas, exceto para a linhagem de leucemia (K562), cujo valor de TGI foi de $11,76 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto o extrato etanólico de *M. selloi* apresenta uma atividade citotóxica moderada apenas contra a linhagem celular K562. Dentre as substâncias isoladas de *M. selloi* neste trabalho, **MS9** (3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina) (FIGURA 277) foi anteriormente reportada como tendo atividade citotóxica contra células de leucemia (linhagens CCRF-CEM e Kasumi-1) (VITEK et al., 2016), e deve ser, ao menos em parte, responsável pela atividade observada.

FIGURA 277 – ESTRUTURA QUÍMICA DE **MS9** ISOLADA DAS FOLHAS DE *M. selloi*



3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina) (**MS9**)

TABELA 60 – ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *M. selloi*

Linhagens de células	TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	ML	Doxorrubicina
UACC-62	126,86	0,56
MCF-7	216,65	2,58
NCI-ADR/RES	217,55	10,11
786-0	222,52	2,71
NCI-H460	>250,0	0,57
PC-3	211,34	0,78
OVCAR-3	>250,0	>25,0
HT-29	>250,0	>25,0
K562	11,76	0,009

ML – extratato etanólico das folhas de *M. selloi*; **Doxorrubicina** – controle positivo; **UACC-62** – melanoma; **MCF-7** – mama; **NCI-ADR/RES** – ovário resistente a múltiplos fármacos; **786-0** – rim; **NCI-H460** – pulmão, tipo não pequenas células; **PC-3** – próstata; **OVCAR-3** - ovário; **HT-29** – cólon; **K562** – leucemia.

CONCLUSÃO GERAL

Alguns estudos químicos já haviam sido realizados anteriormente com as espécies descritas nesse trabalho: *Salvia lachnostachys*, *S. melissiflora* e *Myrcia selloi*. Para *S. lachnostachys* o estudo anterior ficou restrito as frações menos polares de suas folhas. Por outro lado, em *S. melissiflora* foram avaliados somente os constituintes voláteis presentes em suas partes aéreas. Já para *M. selloi* foi relatada a composição química dos voláteis de suas folhas, frutos e flores e também foi verificada a presença de algumas substâncias fenólicas.

O presente estudo fitoquímico investigou pela primeira vez as frações mais polares de *S. lachnostachys*, além de relatar os principais constituintes químicos fixos das partes aéreas de *S. melissiflora*. Foi também descrito o fracionamento cromatográfico das folhas de *M. selloi*. Como resultado, foram identificados 33 metabólitos especializados, incluindo terpenoides (19) e substâncias fenólicas (14). Destas, nove estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

A continuidade do estudo das folhas de *S. lachnostachys* forneceu o isolamento de 20 substâncias, das quais seis foram re-isoladas na espécie, tendo já sido descritas em um estudo anterior, sete são inéditas na literatura e sete são substâncias conhecidas, mas relatadas pela primeira vez na espécie. Os caules não forneceram nenhuma substância diferente das folhas mostrando que não havia necessidade de separar folhas e caules para o estudo fitoquímico.

Foi verificado que o extrato etanólico das folhas de *S. lachnostachys* apresenta elevada atividade antioxidante, a qual está relacionada principalmente a presença do ácido rosmarínico. Os diterpenos também contribuem para a atividade antioxidante do extrato, pois exibiram atividade antioxidante quando testados puros.

Já o estudo fitoquímico com as partes aéreas de *S. melissiflora* forneceu até o momento a identificação de sete substâncias, sendo duas inéditas e cinco conhecidas. Destas, três também estavam presentes nas folhas e caules de *S. lachnostachys*: os triterpenos ácido oleanólico, ácido ursólico e ácido rosmarínico. Essas substâncias são muito comuns, sendo encontradas em diversas espécies do gênero. Por outro lado, os quatro diterpenos encontrados em *S. melissiflora* apresentam um esqueleto diferente daquele de *S. lachnostachys*, que por sua vez produz diterpenos derivados do esqueleto abietano, enquanto *S. melissiflora* produz diterpenos com esqueleto clerodano.

O extrato etanólico de *S. melissiflora* também apresentou elevada atividade antioxidante, similar à de *S. lachnostachys*, mas a atividade citotóxica não foi encontrada em seus extratos.

E por fim, o estudo fitoquímico das folhas de *Myrcia selloi* levou a identificação de 13 substâncias fenólicas, sendo todas conhecidas, as quais estão sendo descritas pela primeira vez na espécie. E ainda, o estudo indicou uma semelhança química muito grande com as demais espécies do gênero, uma vez que algumas de suas substâncias fenólicas identificadas nesse trabalho também foram isoladas de outras espécies do gênero.

O extrato etanólico das folhas de *M. selloi* revelou atividade citotóxica moderada somente contra a linhagem de células tumorais de leucemia (K562), o que pode estar relacionado a presença de flavonoides, incluindo o 3-O- β -(6''-galoil)-galactosilquercetina que apresentou em estudos anteriores atividade citotóxica contra algumas linhagens de células de leucemia.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; BURTOLOSO, A. C. B. Total synthesis of (±)-brussonol and (±)-komaroviquinone via a regioselective cross-electrophile coupling of aryl bromides and an epoxide. **Organic Letters**, v. 21, p. 6079-6083, 2019.
- AL-QUDAH, M. A.; AL-JABER, I. H.; ZARGA, A. H. M.; ORABI, A. T. S. Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. Growing wild in Jordan and their antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 99, p. 115–120, 2014.
- ALMANZA, G.; BALDERRAMA, L.; LABBÉ, C.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; NUZILLARD, J.; CANNOLY, J. D.; FARUGIA, L. J.; RYCROFT, D. S. Clerodane diterpenoids and an ursane triterpenoid from *Salvia haenkei*. Computer-assisted structural elucidation. **Tetrahedron**, v. 53, n. 43, p. 14719–14728, 1997.
- BAEK, Y.; SONG, N.; NAM, T.; KIM, D.; KANG, H.; KWON, O.; BAEK, N. Flavonoids from *Frangaria ananassa* calyx and their antioxidant capacities. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 787-793, 2015.
- BECHKRI, S.; MAGID, A. A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKI, L.; BERREHAL, D.; KABOUCHE, A.; LEHBILI, M.; LAKHAL, H.; ABEDINI, A.; GANGLOFF, C. S.; MORJANI, H.; KABOUCHE, Z. Triterpenes from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* and their antibacterial and cytotoxic activities. **Fitoterapia**, v. 139, p. 104296, 2019.
- BERNARDINI, S. TIEZZI, A.; MASCI, L.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, n. 16, v. 32, p. 1926-1950, 2018.
- BISIO, A.; PEDRELLI, F.; D'AMBOLA, M.; LABANCA, F.; SCHITO, M. A.; GOVAERTS, R.; TOMMASI, N.; MILELLA, L. Quinone diterpenes from *Salvia* species: chemistry, botany and biological activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, p. 665-842, 2019.
- BISIO, A.; ROMUSSI, G.; RUSSO, E.; CAFAGGI, S.; SCHITO, A. M.; REPETTO, B.; TOMMASI, N. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 10468-10472, 2008.
- CASCAES, M. M.; GUIHON, P. S. M. G.; ANDRADE, A. H. E.; ZOGHBI, B. G. M.; SANTOS, S. L.; Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): a review of an aromatic and medicinal group plants. **Molecules**, v. 16, p. 23881-23904, 2015.

CIOFFI, G.; BADER, A.; MALAFRONT, A.; PIAZ, F. D.; TOMMASI, N. Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palestina* Benth. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1005-1012, 2008.

CORSO, C. R.; STIPP, M. C.; ADAMI, E. R.; SILVA, L. M.; MARIOTT, M.; ANDRADE, S. F.; RAMOS, E. A. S.; KLASSEN, G.; BELTRAME, O. C.; QUEIROZ-TELLES, J. E.; **OLIVEIRA, C. S.**; STEFANELLO, M. E. A.; ACCO, A. *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. **Molecular Biology reports**, v. 46, p. 4827-4841, 2019.

CORSO, C. R.; STIPP, M. C.; MARIOTT, M.; RAMOS, E. A. S.; KASSEN, G.; QUEIROZ-TELLES, J. E.; **OLIVEIRA, C. S.**; STEFANELLO, M. E. A.; VERHOEVEN, A.; ELFERICK, R.; ACCO, A.; SILVA, L. Fruticuline A, a chemically defined diterpene, exerts antineoplastic effects *in vitro* and *in vivo* by multiple mechanisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 16477, p. 1-14, 2020.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DAIS, P.; PLESSEL, R.; WILLIAMSON, K.; HATZAKIS, E. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignment and ^{31}P NMR determination of pentacyclic triterpenic acids. **Analytical Methods**, v. 9, p.949-957, 2017.

DELAMARE, L. A. P.; MOSCHEN-PISTORELLO, T. I.; ARTICO, L. ATTI-SERAFANI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

DESHEIMER, G. M.; POZZOBON, A. Atividade biológica de plantas da família Myrtaceae: revisão sistemática de artigos entre 1989 e 2015. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 2, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**, 3rd Edition, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2009.

DIZKIRICI, A. A molecular phylogeny of *Salvia euphratica* sensu lato (*Salvia* L.: Lamiaceae) and its closely related species with a focus on the section Hymenosphace. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 2313–2323, 2015.

EL-HADRI, A.; DEL RIO, G. M. A.; SANZ, J. S. Cytotoxic activity of α -humulene and *trans*-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 76, p. 343-356, 2010.

ERBANO, M.; EHRENFRIED, C. A.; STEFANELLO, M. E. A.; SANTOS, E. P., Morphoanatomical and phytochemical studies of *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1737-1744, 2012.

ESPOSITO, F.; SANNA, C.; VECCHIO, C. D.; CANNAS, V.; VENDITTI, A.; CORONA, A.; BIANCO, A.; SERRILI, A. M.; GUARCINI, L.; PAROLIN, C.; BALLERO, M.; TRAMONTANO, E. *Hypericum hircinum* L components as new single-molecule inhibitors of both HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities. **Pathogens and Disease**, v. 68, p. 116-124, 2013.

ESQUIVEL, B.; BUSTOS-BRITO, C.; SÁNCHEZ-CASTELLANOS, M.; NIETO-CAMACHO, A.; RAMIREZ-APAN, T.; NATHAN-JOSEPH, P.; QUIJANO, L. Structure, absolute configuration, and antiproliferative activity of abietane and icetaxane diterpenoids from *Salvia ballotiflora*. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.

FERNANDEZ, J.; REYES, R.; PONCE, H.; OROPEZA, M.; VAN-CALSTEREN, M.; JANKOWSKI, C.; CAMPOS, M. G. Isoquercetrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D₄-induced contraction in guinea-pig airways. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, p. 108-115, 2005.

FILHO, A. C. P. M.; SOUSA, W. C.; CASTRO, C. F. S. Composição química, físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da flor e do fruto de *Myrcia guianensis* (Aubl) DC. **Revista Principia**, n. 52, p. 92-104, 2020.

FONTANA, G.; SAVONA, G.; RODRIGUEZ, B. Clerodane diterpenoids from *Salvia splendens*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1734-1738, 2006.

FRANCO, C. J. P.; FERREIRA, O. O.; MORAES, A. A. B.; VARELA, E. L. E.; NASCIMENTO, L. D.; PERCÁRIO, S.; OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, E. H. A. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Eugenia patrisii* Vahl, *E. puniceifolia* (Kunth) DC., and *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. leaf of family Myrtaceae. **Molecules**, v. 26, p. 2392, 2021.

GE, L.; WAN, H.; TANG, S.; CHEN, H.; LI, J.; ZHANG, K.; ZHOU, B.; FEI, JIA.; WU, S.; ZENG, X. Novel caffeoylquinic acid derivatives from *Lonicera japonica* Thumb. Flower buds exert pronounced anti-HBV activities. **RSC Advances**, v. 8, 2018.

GHORBANI, A.; ESMAEILIZADEH, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 433–440, 2017.

GIACOMELLI, E.; BERTRAND, S.; NIEVERGELT, A.; SIMOES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; RIVARA-MINTEN, E.; CUENDET, M.; BISIO, A.; WOLFENDER, J. L. Cancer chemopreventive diterpenes from *Salvia corrugata*. **Phytochemistry**, v. 96, p. 257-264, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, n. 2, v. 30, 2007.

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, 2020.

HARDING, W. W.; TIDGEWELL, K.; SCHMIDT, M. Salvicins A and B, new neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*. **Organic Letters**, v.7, p. 3017-3020, 2005.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E. P.; SANTOS, J. S.; PASTORE, J. F. *Lamiaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>. Acesso em: 16 mai. 2021.

HU, D.; KAZUYOSHI, K.; TAKAISHI, Y. Diterpenoids from *Salvia splendens*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 781-784, 1997.

IUPAC Recommendations: 1973. Nomenclature of cyclitols. **Biochemical Journal**, v. 153, n. 1, p. 23-31, 1976.

JACOBSEN, N. E. **NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.

JASSBI, A. R.; ZARE, S.; FIRUZI, O.; XIAO, J. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 823-867, 2016.

JIMENA, E. S.; FRANÇA, F.; SOBRAL, M. *Lamiaceae*. In: STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, S.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. (Eds.). **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 297-303, 2009.

JUNG, J.; PARK, M.; LEE, H. C.; KANG, Y.; KANG, E. S.; KIM, S. K. Antidiabetic agents from medical plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1203-1218, 2006.

KADOTA, S.; TAKAMORI, Y.; NYEIN, N. K.; KIKUCHI, T.; TANAKA, K.; EKIMOTO, H. Constituents of the leaves of the leaves of *Woodfordia fruticosa* Kurtz. I. Isolation, structure, and proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance signal assignments of woodfruticosin (woodfordin C) an inhibitor of deoxyribonucleic acid topoisomerase II. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 2687-2697, 1990.

KASSUYA, C. A. L.; WISNIEWSKI-JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A. Composição dos óleos essenciais de *Salvia lachnostachys* e *S. melissiflora* (Lamiaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 919-921, 2009.

KUHNT, M.; RIPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis Verticillata*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 485-489,

1994.

LANNOY, L. C.; OLIVEIRA, A. I.; GOLDENBERG, R., LIMA, D. *Myrcia* (Myrtaceae) in the state of Paraná, Brazil. **Phytotaxa**, v. 486, n. 1, p. 1-105, 2021.

LEAL, L.; BIONDI, D. Potencial ornamental de espécies nativas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 4, p. 1-16, 2006.

LEE, E. J.; KIM, J. S.; KIM, H. P.; LEE, J.; KANG, S. S. Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 120, p. 134-139, 2010.

LI, R.; SUSAN, M. N.; KUO-HSIUNG, L. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 1166–1226, 2016.

LIMA, R. C. L.; KATO, L.; KONGSTAD, K. T.; STAERK, D. Brazilian insulin pant as a bifunctional food: dual high-resolution PTP1B an α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 444-451, 2018.

LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BASSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LIU, S.; ZHU, T.; QIU, Y.; QI, W.; WU, H.; CAI, B.; LIN, J. Chromones and tannins from the fruit of *Euscaphis japonica* Var. *wupingensis*. **BioResources**, v. 14, n. 3, p. 5355-5364, 2019.

LOBO-ECHEVERRI, T.; RIVERO-CRUZ, J. F.; SU, N.; CHAI, H.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; SWANSON, S. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN. Constituintes of the leaves and twigs of *Calyptranthes pallens* collected from an experimental plot in southern Florida. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 577–580, 2005.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, p. 3293-3299, 2007.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 14, p. 18-22, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LU, Y.; FOO, Y. L.; Polyphenolics of *Salvia* – a review. **Phytochemistry**, v. 59, p. 117–140, 2002.

MACIEL, M. A.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e aspectos

relevantes de diterpenos clerodanes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 54–73, 2006.

MARTINI, K.; BIONDI, D.; BATISTA, A. C.; NATAL, C. M. Fenologia de espécies com potencial paisagístico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 75–84, 2010.

MARTINS, V. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SOUZA, M. C.; CARVALHO, M. G.; GODOY. *Myrcia eriopus* DC. (Myrtaceae) fruits, a new endemic Brazilian source of bioactive anthocyanins. **Natural Product Research**, v. 5, p. 1-5, 2021.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* Dc. (2): Structure of Myrciatrins III, IV, and V. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 3, p. 429-431, 2002.

MIRZAEI, H. H.; FIRUZI, O.; SCHNEIDER, B.; BALDWIN, I. T.; JASSBI, R. A. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Salvia lachnoscalyx*, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 1–5, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, M.; DREW, B. T.; PASTORE, J. F. B. *Salvia rupestres* (Lamiaceae), a new species endemic to Aapuá Mountain in Pernambuco State, Brazil. **Brittonia**, v. 72, p. 303-307, 2020.

NEGRELLE, R. R. B.; FORNAZZARI, K. R. C. Estudo etnobotânico em duas comunidades rurais (Limeira e Ribeirão Grande) de Guaratuba (Paraná, Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 2, p. 36-54, 2007.

NISHINA, A.; ITAGATI, SUZUKI, Y.; KOKETSU, M.; NINOMIYA, M.; SATO, D.; SUSUKI, T.; HAYAKAWA, S.; KURUDA, M.; KIMURA, H. Effects of flavonoids and triterpene analogues from leaves of *Eleutherococcus sieboldianus* (Makino) Koidz. ‘Himeukogi’ in 3T3-L1 preadipocytes. **Molecules**, v. 22, p. 671, 2017.

NONAKA, G.; HARADA, M.; NISHIOKA, I. Eugenilin, a new ellagitannin from Cloves. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 685-687, 1980.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n.4, p.278-281, 1990.

OLIVEIRA, A. B.; MOTA, M. C. A.; PASTORE, J. F. B.; ANTAR, G. M. *Salvia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8296>. Acesso em: 16 mai. 2021.

OLIVEIRA, C. S. Constituintes químicos e atividade citotóxica de *Salvia lachnostachys* (Lamiaceae). Dissertação de mestrado, UFPR, 2017.

OLIVEIRA, C. S.; SALVADOR, M. J.; CARVALHO, J. E.; SANTOS, E. P.; BARISSON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Cytotoxic abietane-derivative diterpenoids of *Salvia lachnostachys*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 140-143, 2016.

OLIVEIRA, E. S. C.; PONTES, F. D. F.; ACHO, L. D.R.; ROSÁRIO, S. A.; SILVA, B. J. P.; BEZERRA, J. CAMPOS, F. R.; LIMA, E. S.; MACHADO, M. B. qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 201, p. 114109, 2021.

ORTEGA, A.; CARDENAS, J.; TOSCANO, A.; MALDONADO, E.; AUMELAS, A.; CALSTEREN, M. R. V.; JANKOWSKI, C. Salviandulines A and B. Two secoclerodanes diterpenoids from *Salvia lavanduloides*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3357–3360, 1991.

ORTEGA, A.; ORTIZ-PASTRANA, N.; BEDOLLA-GARCÍA, B. Y.; TOSCANO, R. A.; BAUTISTA, E. NMR analysis and crystal structure of hydroxyclerodanes from Mexican *Salvia* species. **Journal of Molecular Structure**, v. 1141, p. 157–162, 2017.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, R. S. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1-15, 2016.

PAULI, G. F.; POETSC. H, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 177-185, 1998.

PICCINELLI, A. C.; AQUINO, D. F. S.; MORATO, P. N.; KURAOKA-OLIVEIRA, A. M.; STRAPASSON, R. L. B.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L. Anti-inflammatory and antihyperalgesic activities of ethanolic extract and fruticulins A from *Salvia lachnostachys* leaves in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, artigo ID 835914, 8p, 2014.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, P. S.; Terpenóides em espécies do gênero *Salvia*. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2012.

PIORNEDO, R. R.; SOUZA, P.; AVILA, T. V.; SILVA, L. M.; BARETTA, I. P.; VERDAN, M. H.; SANTOS, E. P.; ZAMPRONIO, A. R.; STEFANELLO, M. E. A.; KASSUYA, C. A. L. Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de *Salvia melissiflora* (Lamiaceae) sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. In: **7º. Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, Maringá, PR, 2009.

PIVETTA, K. F. L.; ROSA, C. S.; PITELLI, R. A.; COAN, R. M. Selectivity of *Salvia splendens* to oxyfluorfen applied to rice straw. **Planta Daninha**, n. 26, v. 3, p. 645-655, 2007.

PIZZI, A. Tannins: perspectives and actual industrial applications. **Biomolecules**, v. 9, p. 344, 2019.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCHWOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PROENÇA, C. E. B.; AMORIM, B. S.; ANTONICELLI, M. C. ; BÜNGER, M.; BURTON, G. P.; CALDAS, D. K. D.; COSTA, I. R.; FARIA, J. E. Q.; FERNANDES, T.; GAEM, P.H.; GIARETTA, A.; LIMA, D. F.; LOURENÇO, A. R. L.; LUCAS, E. J.; MAZINE, F. F.; MEIRELES, L. D.; OLIVEIRA, M. I. U.; PIZZARDO, R. C.; ROSA, P. O.; SANTANA, K. C.; SANTOS, L. L. D.; SANTOS, M. F.; SOUZA, M. C.; SOUZA, M. A. D.; STADNIK, A.; STAGGEMEIER, V. G.; TULER, A. C; VALDEMARIN, K. S.; VASCONCELOS, T. N. C.; VIEIRA, F. C. S.; WALTER, B. M. T.; SOBRAL, M. 2020. *Myrtaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 13 jul. 2021.

RENDA, G.; ÖZEL, A.; BARUT, B.; KORKMAZ, B.; SORAL, M.; KANDEMIR, Ü.; LIPTAJ, T. Bioassay guided isolation of active compound from *Achemilla barbatiflora* Juz. **Records of Natural Products**, v. 12, n. 1, p. 76-85, 2018.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, K, J. Brazilian medical plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, n. 1, v. 56, 2008.

RIBEIRO, V.; DIAS, N.; PAIVA, T.; HAGSTRÖM-BEX, L.; NITZ, N.; PRATESI, R.; HECHT, M. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7-17, 2020.

RUSSO, A.; FORMISANO, C.; RIGANO, D.; VENERA, C.; APOSTOLIDES, A. N.; SENATORE, F. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three Lebanese *Salvia* species. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 492-499, 2016.

SA, F. A. S.; PAULA.; SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G. A. R.; LIAO, J. R. P.; SILVA, M. R. R. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. Leaves. **Molecules**, v. 22, p. 1100, 2017.

SALVADOR, J. M.; LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C. R.; STEFANELLO, M. E. A. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae

plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 19-25, 2006.

SANCHEZ, A. M.; JIMENEZ-ORTIZ, V.; SARTOR, T.; TONN, C. E. GARCÍA, M, N.; BURGOS, M. H.; SOSA, M. A. A novel icetaxane diterpene, 5-*epi*-icetaxona from *Salvia giliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 98, p. 118-124, 2006.

SANTOS, C.; GALAVERNA, R. S.; ANGOLINI, C. F. F.; NUMES, V. V. A.; ALMEIDA, L. F. R.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; DUARTE, R. M. T.; DUARTE, M. C.T.; EBERLIN, M. N. Antioxidante, antiproliferative and antimicrobial activities of phenolic compounds from three *Myrcia* species. **Molecules**, v. 23, p. 986-1008, 2018.

SANTOS, J. A; PICCINELLI, A. C; FORMAGIO, M. D; OLIVEIRA, C. S; SANTOS, E. P. STEFANELLO, M. E. A; JUNIOR, U. L; OLIVEIRA, R. J; SUGIZAKI, M. M; KASSUYA, C. A. L. Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fruticuline A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents. **Plos One**, v. 12, n. 2, e0172151, 2017.

SANTOS, M. F.; AMORIM, B. S.; BURTON, G. P.; FERNANDES, T.; GAEM, P. H.; LIMA, D. F.; LOURENÇO, A. R. L.; ROSA, P. O.; SANTOS, L. L. D.; STAGGEMEIER, V. G.; VASCONCELOS, T. N. C.; LUCAS, E. J. 2020. *Myrcia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10660>. Acesso em: 13 jul. 2021.

SAVONA, G.; BRUNO, M.; PATERNOSTRO, M.; MARCO, J. L.; RODRIGUEZ, B. Salviacoccin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia coccinea*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2563–2566, 1982.

SHARIFI-RAD, M.; OZCELIK, B.; ALTIN, G.; DAŞKAYA-DIKMEN, C.; MARTORELL, M.; RAMÍREZ-ALARCÓN, K.; ALARCÓN-ZAPATA, P.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N. P.; ALVES BORGES LEAL, A. L.; COUTINHO, H.; GYAWALI, R.; TAHERGORABI, R.; IBRAHIM, S. A.; SAHRIFI-RAD, R.; SHAROPOV, F.; SALEHI, B.; CONTRERAS, M.; CARRETERO, A.; SEN, S.; ACHARYA, K.; SHARIFI-RAD, J. *Salvia* spp. Plant-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 242-263, 2018.

SHIROTA, O.; NAGAMATSU, K.; SEKITA, S. Neo-clerodane diterpenes from the Hallucinogenic Sage *Salvia divinorum*. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 1782–1786, 2006.

SILVA, P.D. Compostos fenólicos e terpenos de *Myrcia hiemalis* e *Myrcia myrtifolia* (Myrtaceae). Tese de doutorado, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, Brasil, 2012.

SIMMONS, E. M.; SARPONG, R.; Structure, biosynthetic relationships and chemical synthesis of the icetexane diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1195-1217, 2009.

SITAREK, P.; MERECZ-SODOWSKA, A.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R.; KOWALCZYK. *In vitro* evolution of the molecular mechanism of action of medical plants from the Lamiaceae family as effective sources of active compounds against human cancer cell lines. **Cancer**, n. 12, v. 2957, p. 1-47, 2020.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SLAMENOVA, D.; MASTEROVA, I.; LABAJ, J. Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 94, p. 282-290, 2004.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L. Essential oil composition of *Myrcia laruotteana* Camb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 466-467, 2007.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73-92, 2011.

STEFANELLO, M. E. A.; RIVA, D.; SIMIONATTO, E.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T.; SALVADOR, M. J. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil from *Myrcia laruotteana* fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 7-10, 2011.

SUWANCHAIKASEM, P.; CHAICHANTIPYUTH, C.; SUKRONG, S. Antioxidant-guides isolation of rosmarinic acid, a major constituent from *Thunbergia laurifolia*, and its use as a bioactive marker for standardization. **Chiang Mai Journal Science**, v. 41, p. 117-127, 2014.

TOPÇU, G., Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 482-487, 2006.

TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The pharmaceutical industry in 2019. An analysis of FDS drug approvals from the perspective of molecules. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 745-158, 2019.

TUYEN, P. N. K.; LINH, T. T. T.; SON, D. V.; THANG, N. V.; SON, D. V.; TRANG, N, T, Q.; CHI, H, B, L.; KY, N. D. X.; PLAT, N, T. Phenolic compounds from the leaves of *Ricinus communis* Linn. **Science & Technology Development Journal**, v. 23, n. 3, p. 694-698, 2020.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VITEK, R., NOVAES, L. M. R.; TORQUATO, H. F. V.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARVALHO, M. G.; SOUSA-JR, P. T.; JACINTO, M. J.; SILVA, V. C. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p. 1930-1934, 2017.

WAKAMORI, S.; MATSUMOTO, S.; KASUKI, R.; IKEUCHI, K.; YAMADA, H. Total synthesis of casuarinin. **Organic Letters**, v. 22, n. 9, p. 3392-3396, 2020.

WU, Y.-B.; NI, Z.-Y.; SHI, Q.-W.; DONG, M.; KIYOTA, H.; GU, Y.-C.; CONG, B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. **Chemistry Review**, v. 112, p. 5967-6026, 2012.

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. C.; STAERK, D. Hight-resolution bioactivity profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR: a-glucosidase inhibitors and acetylated ellegic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae), **Phytochemistry**, v. 116, p. 246-252, 2015.

XU, G.; PENG, L. Y.; ZHAO, Y.; LI, X. L.; TU, L.; Q, S.; SUN, H. S. Two new icetexane diterpenoids from *Salvia przewalskii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, n. 53, v. 12, p. 1575-1576, 2005.

YIN, M.-C.; CHAN, K.-C. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 7177-7181, 2007.

YOUN, J.; KIM, J.; WHANG, W. Comparative antioxidant activity of Korean and Canadian High Bush Blueberry Fructus. **Yakhak Hoeji**, v. 59, n. 3, 2015.

ZHANG, C.; JIANG, D.; WANG, J.; QI, Q. The effects of TPT and dietary quercetin on growth, hepatic oxidative damage and apoptosis in zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 224, p. 112697, 2021.

ZHANG, LI.; SON, JUNKE.; KONG, LINGLEI, KONG.; YUAN, TIANYI, Y.; LI, WAN.; ZHANG, WE.; HOU, BIYU.; LU, YANG.; DU, GUANHUA, DU. The strategies and techniques of drugs discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, p. 1-13, 2020.