



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



ANDERSON RAMOS SANTOS

Metabólitos especiais das folhas e caule de *Conchocarpus mastigophorus*
Kallunki (Rutaceae)

JEQUIÉ - BA

Junho de 2021

ANDERSON RAMOS SANTOS

**Metabólitos especiais das folhas e caule de *Conchocarpus mastigophorus*
Kallunki (Rutaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica
Química de Produtos Naturais

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Vanderlúcia Fonseca de Paula

JEQUIÉ - BA

Junho de 2021

S232m Santos, Anderson Ramos.

Metabólitos especiais das folhas e caule de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae) / Anderson Ramos Santos.- Jequié, 2021.

113f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula)

1.*Conchocarpus mastigophorus* 2.Furanocumarina
3.Piranoquinolin-5-ona 4.Rutaceae I.Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 540

Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

ANDERSON RAMOS SANTOS

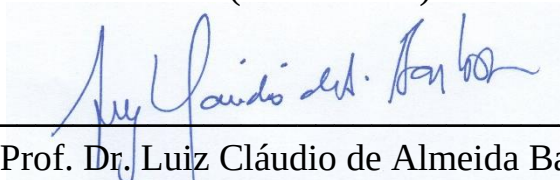
“Metabólitos Especiais das Folhas e Caule de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

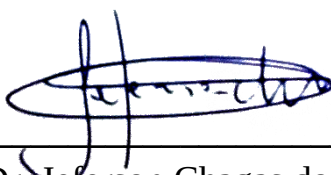
COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula
(UFMG, Belo Horizonte – MG, 1999)
(Orientadora)



Prof. Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(University Of Reading, Grã-Bretanha, 1991)



Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento
(UFBA – Salvador – BA, 2011)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 16/06/2021.

AGRADECIMENTOS

Deixo expresso meus agradecimentos:

À essa “Força superior” que nos move e nos obstina a seguir em frente.

À **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)**, e ao **Programa de Pós-Graduação em Química da UESB** pela formação acadêmica e pelo apoio e incentivo à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao **Herbário da UESB (HUESB)**, no nome da professora Dra. **Guadalupe Edilma Licona de Macedo** por viabilizar a realização das coletas e identificação das plantas estudadas.

Ao **Laboratório de Produtos Naturais da UESB** por disponibilizar toda infraestrutura necessária para realização do estudo fitoquímico deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, especialmente **Hion** pela contribuição nas análises de HPLC.

Aos colaboradores: **Laboratório de RMN da UFSCar** no nome do **Prof.º Antônio Gilberto Ferreira** e ao **Laboratório de RMN da UFV- Cristiane Isaac Cerceau** pela realização das análises de RMN; **Camila Santos** (Doutoranda da USP- São Carlos) que auxiliou em alguma das análises de CG-EM.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Vanderlúcia Fonseca de Paula**, pela inspiração, por ser um exemplo de profissionalismo e de pessoa, pelas lições e riquíssimas orientações no decorrer da minha formação (Graduação e Mestrado) e pelas grandes contribuições a este trabalho.

A minha família, pelo constante apoio e incentivo.

Aos meus amigos pelo companheirismo e apoio.

Ao meu Padrasto (*in memoriam*) que sempre teve orgulho das minhas conquistas.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido. ”

Marie Curie

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero <i>Conchocarpus</i> no Brasil.....	5
Figura 2 - Esqueleto e padrão de numeração dos alcaloides A) quinolínicos e B) acridônicos.	6
Figura 3 – Fórmula estrutural do Ácido antranílico.	7
Figura 4 – Esquema da rota biossintética para formação do esqueleto quinolinico e furoquinolínico a partir do ácido antranílico [adaptado de Dewick (2009)].	7
Figura 5 – Esquema da rota biossintética para formação do esqueleto acridônico a partir do ácido antranílico.	8
Figura 6 - Estrutura básica e numeração das cumarinas.....	11
Figura 7 – Esquema da rota biossintética simplificada para formação de cumarinas [Adaptado de Dewick (2009)].	12
Figura 8 - Exemplos de estruturas básicas de furanocumarinas lineares (1), angulares (2) e piranocumarinas lineares (3) e angulares (4).....	12
Figura 9 - Esqueleto base e numeração dos flavonoides.....	14
Figura 10 - Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides [Adaptado de Dewick (2009)].	15
Figura 11 - Folhas, caules e frutos de espécime de <i>Conchocarpus mastigophorus</i> (Autor: Oliveira, 2015).....	17
Figura 12 - Exsicata de <i>Conchocarpus mastigophorus</i> depositada no HUESB.....	22
Figura 13 - Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i> realizado por Oliveira (2015).....	24
Figura 14 - Esquema de fracionamento dos extratos acetato de etila e metanólico do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	25
Figura 15 - Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	27
Figura 16 - Alcaloides isolados das folhas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	28
Figura 17 - Substâncias isoladas do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	28
Figura 18 - Estrutura da substância huajiaosimulina.....	29
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1.....	31
Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1	32

Figura 21 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1	33
Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1.....	34
Figura 23 - Expansões do mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-1 e principais correlações observadas.	36
Figura 24 - Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1.....	37
Figura 25 - Expansões do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 MHz; 150 MHz em CDCl_3) da substância FCM-1 e as principais correlações na sua estrutura.....	39
Figura 26 – (A) Espectro de massas gerado por IE e (B) principal fragmentação da substância FCM-1.	40
Figura 27 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H das substâncias FCM-1 e FCM-2....	41
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.....	43
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.	44
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.	45
Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-2.....	46
Figura 32 - Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 Hz, em CDCl_3) da substância FCM-2	47
Figura 33 - Expansão do mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-2 e as principais correlações na sua estrutura.	48
Figura 34 - Expansão do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-2 e as principais correlações na sua estrutura.....	49
Figura 35 - Espectro de massas obtido por IE da substância FCM-2.....	49
Figura 36 - Principal fragmentação da substância FCM-2 mostrando a formação do pico base em $m/z= 226$	50
Figura 37 - Fórmula estrutural da substância FCM-2 (mastigoforona).....	50
Figura 38 - Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das substâncias FCM-3 e FCM-1.	52
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.....	54
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.	55
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.	56

Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.....	57
Figura 43 - Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.....	58
Figura 44 - Expansão do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3 e principais correlações na sua estrutura.	59
Figura 45 – (A) Espectro de massas obtido por IE e (B) principal fragmentação da substância FCM-3.	60
Figura 46 – Estrutura da 2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil-2H-pirano[3,2-c]quinolin-5(6H)-ona.	60
Figura 47 - Cromatograma obtido por CG-EM (a) e espectro de massas obtido por IE (B) para a substância majoritária de FCM-4.....	63
Figura 48 - Fórmula estrutural da <i>N</i> -metilisatina.	63
Figura 49 – Esquema simplificado representando o principal mecanismo de fragmentação da substância majoritária de FCM-4 [adaptado de Martinez e Ferreira (2017)]......	64
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância FCM-4.....	65
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da substância FCM-4.....	66
Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-1.	69
Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-1.	70
Figura 54 - Mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C da substância CCM-1.	71
Figura 55 - Possíveis estruturas para a substância CCM-1.	71
Figura 56 - Mapas de contorno HMBC- ^1H , ^{13}C e principais correlações apresentadas para a substância CCM-1.	72
Figura 57 - Espectros NOESY-1D (em CDCl_3) da substância CCM-1 com (A) irradiação de H-5, (B) irradiação de H-3 e (C) irradiação em $\text{CH}_3\text{-O}$	73
Figura 58 - Correlações observadas nos espectros de NOESY-1D para o CCM-1.....	74
Figura 59 - Fórmula estrutural da substância CCM-1.	75
Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância CCM-2.	76
Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da substância CCM-2.	77
Figura 62 - Mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz) com principais correlações da substância CCM-3.	79
Figura 63 - Mapas de contorno HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-3.....	79
Figura 64 - Espectro de massas gerado por IE da substância CCM-3.....	80
Figura 65 - Espectro na região do infravermelho por reflectância total atenuada da substância CCM-3.....	81

Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CD_3OD) da substância CCM-3	82
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CD_3OD) da substância CCM-3.	83
Figura 68 - Fórmula estrutural da substância 5-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona.....	84
Figura 69 - Mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) da substancia CCM-3.....	85
Figura 70 - Mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-3 com as principais correlações apresentadas em sua estrutura.	86
Figura 71 - Estruturas possíveis para a substância CCM-3.....	86
Figura 72 - Mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) com principais correlações para a substância CCM-3.	87
Figura 73 - Espectro NOESY-1D (em $\text{DMSO}-\text{D}_6$) da substância CCM-3 com irradiação em δ_{H} 3,15.	87
Figura 74 - Correlação observada no espectro de NOESY-1D para a substância CCM-3 em sua estrutura tridimensional.	88
Figura 75 - Fórmula estrutural da substância CCM-3: 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies segregadas do gênero <i>Conchocarpus</i>	4
Tabela 2 - Alcaloides isolados de espécies do gênero <i>Conchocarpus</i>	9
Tabela 3 - Cumarinas isoladas de espécies do gênero <i>Conchocarpus</i>	13
Tabela 4 - Flavonoides e outras classes de substâncias isoladas de espécies <i>Conchocarpus</i> ..	15
Tabela 5 - Rendimento dos extratos da folha de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	23
Tabela 6 - Rendimento dos extratos do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	23
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para o composto FCM-1 (CDCl_3 ; 600 e 150 MHz) em comparação com os dados da literatura para huajiaosimulina*.....	35
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D da substância FCM-2.	51
Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância FCM-3 com os descritos na literatura para substância 2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil-2H-pirano[3,2-c]quinolin-5(6H)-ona.	61
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 ; 600 e 150 MHz, respectivamente) 1D e 2D da substância FCM-3.	62
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância FCM-4 comparados com dados de RMN de ^1H da isatina.	67
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3), 1D e 2D, para a substância CCM-1.	74
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância CCM-2 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz) comparados com os dados descritos na literatura para a 2- fenil-1-metilquinol-4-ona.....	78
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância CCM-3.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACLCM – Extrato Acetato de etila do Caule de *Conchocarpus mastigophorus*

AFCM- Extrato Acetato de etila da Folha de *Conchocarpus mastigophorus*

AcOEt – Acetato de etila

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE- Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

COSY- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - Espectroscopia de Correlação $^1\text{H}-^1\text{H}$ (do inglês: “ $^1\text{H}-^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy”)

d – Duplete

dd – Duplo duplete

ddd – Duplo, duplo duplete

dl – Duplete largo

DMSO- Dimetilsulfóxido

EM – Espectrometria de Massas

EV – Elétron-Volt

HCLCM – Extrato Hexanico do caule da *Conchocarpus mastigophorus*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HUESB – Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Hz – Hertz

IE – Impacto eletrônico

J – Constante de acoplamento

m – Multiplete

mg – Miligrama

m/z – Relação massa/carga

MCLCM – Extrato Metanólico do caule da *Conchocarpus mastigophorus*

Me – Metila

MeOH – Metanol

nm – Nanômetro

OMe – Metoxila

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s – Singleto

t – Tripleto

T_f – Temperatura de fusão

UV – Ultravioleta

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

δ – Deslocamento químico

δ_{C} – Deslocamento químico de carbono

δ_{H} – Deslocamento químico de hidrogênio

Metabólitos especiais das folhas e caule de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

Autor: Anderson Ramos Santos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanderlúcia Fonseca de Paula

RESUMO: Este trabalho apresenta o estudo químico de extratos obtidos a partir do caule e das folhas de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae) endêmica do Brasil. Neste estudo foram utilizados métodos cromatográficos clássicos como cromatografia líquida e cromatografia em camada delgada, e também cromatografia líquida de alta eficiência para análise, fracionamento e purificação dos extratos. As substâncias isoladas foram submetidas à análises por espectroscopia na região de infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais para elucidação de suas respectivas estruturas. Do extrato acetato de etila das folhas foram isoladas quatro alcalóides: três do tipo piranoquinolin-5-ona, sendo um conhecido como huajiaosimulina e dois inéditos, (2-[2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona e 2-[(3-acetoxi-4-hidroxi-4-meil)pent-1-il]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona); além da 1-metilisatina, um alcaloide indólico relatado no gênero *Conchocarpus* pela primeira vez. Do extrato acetato de atila do caule foi isolada uma furanocumarina inédita, identificada como 9-hidroxi-4-metoxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona, a 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona, inédita como produto natural, e do alcaloide 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona já isolado de outras espécies do gênero *Conchocarpus*. O conhecimento sobre a fitoquímica de *Conchocarpus mastigophorus*, e especialmente o isolamento de substâncias inéditas, enriquece, assim como ressalta a importância do gênero *Conchocarpus* na obtenção de novas moléculas.

Palavras-chave: *Conchocarpus mastigophorus*, Furanocumarina, Piranoquinolin-5-ona, Rutaceae.

Special metabolites of the leaves and stem from *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)

Author: Anderson Ramos Santos

Advisor: Profa. Dr. ^a Vanderlúcia Fonseca de Paula

ABSTRACT: This work presents the chemical study of extracts from stem and leaves of *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae), endemic to Brazil. In this study, classical chromatographic methods, such as liquid chromatography and thin layer chromatography were used, as well as, high performance liquid chromatography for analysis, fractionation and purification of extracts. The isolated substances were submitted to analysis by infrared spectroscopy, gas chromatography coupled to mass spectrometry, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance, uni and bidimensional, to elucidate their respective structures. From the ethyl acetate extract of the leaves, four substances were isolated: three alkaloids pyranoquinolin-5-one, one known as huajiaosimulina and two new, (2-[2-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)ethyl]-2,6-dimethyl-2,6-dihydro-5H-pyran[3,2-c]quinolin-5-one and 2-[(3-acetoxy-4-hydroxy-4-methyl)pent-1-yl]-2,6-dimethyl-2,6-dihydro-5H-pyran[3,2-c]quino-lin-5-one); beside 1-methylisatin, an indole alkaloid reported in the genus *Conchocarpus* for the first time. From the ethyl acetate extract of the stem, was isolated the new furanocoumarin 9-hydroxy-4-methoxy-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one, in addition to 3-hydroxy-1-methylpiperidin-2-one, isolated from plants for the first unprecedented as a natural product, and the alkaloid 2-phenyl-1-methylquinolin-4-one, already isolated from other species of the genus *Conchocarpus*. The knowledge about the phytochemistry of *Conchocarpus mastigophorus*, and especially the isolation of new substances, enriches, as well as emphasizing the importance of the genus *Conchocarpus* in obtaining new molecules.

Keywords: *Conchocarpus mastigophorus*, Furanocumarina, Pyranoquinolin-5-one, Rutaceae

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1.	Família Rutaceae A. Juss.	3
2.2.	O gênero <i>Conchocarpus</i> J. C. Mikan.....	4
2.2.1.	Classes de metabólitos especiais presentes no gênero <i>Conchocarpus</i>	5
2.2.1.1.	Alcaloides	6
2.2.1.2.	Cumarinas	11
2.2.1.3.	Flavonoides	14
2.3.	<i>Conchocarpus mastigophorus</i> Kallunki.....	16
2.4.	Atividades biológicas das espécies <i>Conchocarpus</i> e de seus metabólitos especiais	17
3.	OBJETIVOS	20
3.1.	Objetivo Geral.....	20
3.2.	Objetivos específicos	20
4.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	21
5.	METODOLOGIA	21
5.1.	Coleta e identificação do material vegetal	21
5.2.	Preparo dos extratos	22
5.2.1.	Extrato das folhas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	22
5.2.2.	Extrato do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	23
5.3.	Isolamento dos constituintes químicos do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	23
5.4.	Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos das folhas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	25
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1.	Substâncias isoladas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	28
6.2.	Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	29
6.2.1.	Substância FCM-1: 2,6-dimetil-2-(4-metil-3-oxopentil)-2,6-diidro-5 <i>H</i> -pirano[3,2- <i>c</i>]quinolin-5-ona (huajiaosimulina)	29
6.2.2.	Substância FCM-2: 2-[2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5 <i>H</i> -pirano[3,2- <i>c</i>]quinolin-5-ona (mastigoforona).....	40

6.2.3. Substância FCM-3: 2-[(3-acetoxi-4-hidroxi-4-metil)pent-1-il]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5 <i>H</i> -pirano[3,2- <i>c</i>]quinolin-5-ona (mastigoforina)	52
6.2.4. Substância FCM-4: <i>N</i> -metilisatina (impura)	63
6.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas do caule de <i>Conchocarpus mastigophorus</i>	67
6.3.1. Substância CCM-1: 9-hidroxi-4-metoxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>]cromen-7-ona	67
6.3.2. Substância CCM-2: 2- fenil-1-metilquinol-4-ona	75
6.3.3. Substância CCM-3: 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona	80
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	90

1. INTRODUÇÃO

As fontes naturais como plantas e microrganismos, apresentam uma infinidade de substâncias com diversidade estrutural e variadas propriedades biológicas e medicinais (FOGLIO *et al.*, 2006; PETSKE, 1996). Sua utilização para fins medicinais no tratamento e prevenção de doenças remonta a milhares de anos; os relatos mais antigos datam de 3000 a.c. na China e 2600 a.c. na Mesopotâmia. São citadas tanto a utilização de folhas e raízes, como também, substâncias derivadas de plantas como *Papaver somniferu* (suco de papoula) no tratamento de infecções parasitárias, resfriados e inflamações (CUNHA, 2007; Da SILVA *et al.*, 2020; JORGE, 2009).

A capacidade das fontes naturais, principalmente plantas, em produzir substâncias com potencial bioativo está associada ao seu mecanismo de defesa contra situações de estresse, sob as quais são submetidas, e a agentes externos danosos. Essas substâncias, classificadas como metabólitos secundários ou especiais, são capazes de interagir com sítios específicos nos microrganismos invasores e agentes patógenos, interferindo em seus processos biológicos. Do mesmo modo, os metabólitos especiais, podem desenvolver um mecanismo de ação semelhante em microrganismos causadores de doenças em outros organismos, como o ser humano, apresentando propriedades farmacológicas de interesse (DEWICK 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A triagem de fontes naturais de substâncias bioativas tem sido bastante evidenciada nos últimos anos, e tem movido várias pesquisas que buscam, dentre estes metabólitos especiais, o isolamento e a obtenção de compostos bioativos que possam auxiliar na formulação de novos fármacos (HATHORE, 2017; SIMÕES *et al.*, 2007). O potencial de obtenção, a partir de plantas, de uma gama de substâncias com variabilidade estrutural – diferentes alcaloides, cumarinas e terpenoides - e com ação biológica, é praticamente ilimitado dada a vasta biodiversidade encontrada na natureza (DEWICK, 2009).

Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade vegetal mundial, distribuídos pelos biomas Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pampa e Pantanal. No entanto, apenas 15 a 17% das espécies vegetais foram submetidas a estudos químicos e, uma parcela ainda menor (6%), submetida a alguma avaliação farmacológica, de modo que existe muitas plantas contendo substâncias potencialmente aplicáveis, com propriedades biológicas e farmacológicas, que ainda não foram estudadas (DE SANTOS *et al.*, 2020; FOGLIO *et al.*, 2006; GOTLLIEB, 2007; LEWINSONHN e PRADO, 2005).

O estudo químico de plantas oriundas da vasta biodiversidade brasileira tem contribuído muito para a produção de novos fármacos formulados com base nos compostos bioativos obtidos do metabolismo secundário das plantas, e que tem auxiliado, com eficácia, no tratamento de várias doenças. A flora do Brasil ainda é bastante inexplorada e apresenta um potencial gigantesco para a descoberta de novas substâncias com valor agregado e com atividades biológicas variadas (SIMÕES *et al.*, 2007).

A família Rutaceae tem se destacado bastante em estudos fitoquímicos, sendo a primeira mais citada nas pesquisas no Brasil. O interesse em plantas desta família é devido à variedade dos metabólitos especiais encontrados, como terpenoides, alcaloides, flavonoides, cumarinas e limonóides (FATTORUSSO e TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008). Dentre estes, destacam-se os alcaloides devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas e por ser encontrado em grande escala e variedade estrutural nas Rutaceae (GROPPO, 2008), sendo os mais representativos os alcaloides derivados do ácido antranílico (acridônicos e quinolônicos) (DA SILVA *et al.* 2020)

O gênero *Conchocarpus* é um dos principais representantes da família Rutaceae. São 47 espécies distribuídas pelo território brasileiro sendo 37 delas endêmicas. Nos estudos relatados para estas espécies constam o isolamento de diferentes tipos de metabólitos especiais dentre os quais estão os alcaloides acridônicos e quinolônicos, bem como, também são relatadas ações biológicas diversas para estes constituintes químicos, como por exemplo, ação antimicrobiana, aticancerígena, antiparasitária e anticolinesterásica (AMBROZIN *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2012; GROPPPO *et al.*, 2021; MACIEL *et al.*, 2020). Mesmo sendo grande o número de espécies de *Conchocarpus*, uma pequena porcentagem foi submetida a estudos fitoquímicos e/ou a alguma avaliação farmacológica de seus constituintes químicos.

A espécie *Conchocarpus mastigophorus*, com ocorrência apenas no estado da Bahia e Espírito Santo, tem sido objeto de estudo do nosso Grupo de Pesquisa desde 2014. Oliveira (2015) demonstrou a partir do estudo fitoquímico do caule desta espécie a ocorrência de alcaloides e cumarinas, bem como a ação antimicrobiana do extrato em acetato de etila. O presente trabalho trata-se de uma continuidade do estudo químico dessa espécie, investigando tanto os extratos do caule quanto os das folhas, em busca de novas substâncias com potencial farmacológico e, também, contribuindo na construção do conhecimento a respeito da biodiversidade brasileira, evidenciando o potencial de produção de substâncias bioativas de plantas presentes no estado da Bahia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família Rutaceae A. Juss.

A família Rutaceae apresenta cerca de 154 gêneros nos quais estão distribuídas, aproximadamente, 2100 espécies. Com ocorrência predominantemente tropical e subtropical, são encontradas em diversas partes do mundo, tendo como centros principais de diversidade a América Tropical, África do Sul e Austrália (GROPPO, 2010; GROPPPO *et al.*, 2012). É uma família com grande importância comercial devido à variabilidade de frutos comestíveis, com destaque ao gênero *Citrus* (com variedades de laranjas, limões, tangerinas, dentre outros) que movimentam o mercado mundial com produção estimada de 100 milhões de toneladas por ano (GROPPO *et al.*, 2012; YARABRASIL, 2020).

No Brasil são relatados, para a família Rutaceae, 50 gêneros, nos quais estão distribuídas cerca de 232 espécies (106 endêmicas), 19 subespécies (10 endêmicas) e 10 variedades (8 endêmicas). A sua distribuição no território brasileiro se dá em todas as cinco macrorregiões e nos diversos biomas como Amazônia, Caatinga, Mata atlântica e Pantanal (PIRANI e GROPPPO, 2015).

Da perspectiva fitoquímica, a importância da família Rutaceae é atribuída tanto à diversidade de metabólitos especiais produzidos por estas plantas quanto pelas atividades biológicas que estas substâncias apresentam. As folhas da jandiroba (*Pollicarpus spp.*) contém a pilocarpina, um alcaloide bastante conhecido no mercado de drogas e importante no tratamento de glaucoma – lesão no nervo ótico que pode levar à cegueira. Já na arruda (*Ruta graveolens* L.) é encontrada a rutina, um flavonoide com propriedade anti-espasmódica, usada popularmente, embora apresente também alguma toxicidade (ALBUQUERQUE 1976; WATERMAN e GRUNDON, 1983).

Dentre as principais classes de metabólitos especiais que são encontrados em plantas desta família, destacam-se os alcaloides, cumarinas, compostos fenólicos, terpenos, dentre outros. Os alcaloides com núcleos quinolínicos e acridônicos, derivados do ácido antranílico, são bastante característicos da família Rutaceae, e são considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (SZEWCZYK, *et al* 2016; WATERMAN e GRUNDON, 1975), embora, também sejam relatados outros tipos de alcaloides (BELLETE, 2009, CORTEZ *et al.*, 2009).

2.2. O gênero *Conchocarpus* J. C. Mikan

Conchocarpus J. C. Mikan é o gênero com maior número de espécies dentro da família Rutaceae. Foram 45 espécies catalogadas na sinopse do gênero realizada por Kallunki e Pirani (1998). Na última década foram adicionadas mais cinco espécies ao gênero, sendo duas delas descritas por Pirani e colaboradores (2011), e três transferidas do gênero *Almeidea* Cham. para o gênero *Conchocarpus* (BRUNIERA *et al.*, 2015). Portanto, até os estudos realizados por Kallunki e Meier (2019), em que descreveram uma nova espécie (*C. jirajaranus*) descoberta na Cordilheira costeira da Venezuela, o gênero *Conchocarpus* era composto por 52 espécies. Porém, em novo estudo realizado por Groppo e colaboradores (2021), com base na análise filogenética de Galipeinae, subtribo na qual está contida o gênero *Conchocarpus*, cinco espécies foram segregadas, dando origem ao novo gênero *Dryade* Groppo, Kallunki e Pirani (**Tabela 1**). A partir de então, restaram 47 espécies para o gênero *Conchocarpus*, com ocorrência desde a Nicarágua até o norte da Bolívia e sul do Brasil (GROPPO *et al.*, 2021).

Tabela 1- Espécies segregadas do gênero *Conchocarpus*.

Espécies no gênero <i>Conchocarpus</i> (antes)	Nova espécie no gênero <i>Dryade</i>
<i>Conchocarpus concinnus</i>	<i>Dryades concinna</i>
<i>Conchocarpus cyrtanthus</i>	<i>Dryades cyrtantha</i>
<i>Conchocarpus gaudichaudianus</i>	<i>Dryades gaudichaudiana</i>
subesp. <i>gaudichaudiana</i>	subesp. <i>gaudichaudiana</i>
subesp. <i>bahiensis</i>	subesp. <i>bahiensis</i>
<i>Conchocarpus hirsutus</i>	<i>Dryades hirsuta</i>
<i>Conchocarpus insignis</i>	<i>Dryades insignis</i>

No Brasil, as 47 espécies do gênero *Conchocarpus* encontram-se distribuídas em todas as macrorregiões (**Figura 1**), sendo 37 endêmicas. Seu domínio fitogeográfico corresponde à Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, apresentando-se na forma de arbustos ou árvores de pequeno e médio porte, atingindo cerca de 7 metros de altura (FLORA DO BRASIL, 2020; PIRANI, 2015).



Figura 1 - distribuição geográfica do gênero *Conchocarpus* no Brasil

Fonte: Flora do Brasil, 2020.

Embora o gênero apresente uma grande quantidade de espécies com ampla distribuição mundial, poucas destas passaram por estudos fitoquímicos. Porém, os estudos já realizados revelam um perfil fitoquímico bastante variado para este gênero, com uma grande variedade de metabólitos especiais. A literatura descreve o isolamento de cumarinas, diterpenos, flavonoides e, principalmente, alcaloides com núcleo acridônico, quinolínic, furoquinolínic e quinolônico de diversas partes das plantas estudadas (caules, folhas, galhos e cascas) (ABROZIN *et al.*, 2008; BELLETE *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA, 2015).

Muitos dos metabólitos especiais isolados de plantas pertencentes ao gênero *Conchocarpus*, apresentam atividades biológicas importantes. Piranoflavonas e alcaloides quinolônicos isolados de *C. heterophyllus* (AMBROZIN *et al.*, 2008) apresentaram forte atividade tripanocida. De *C. fontanesianus* foram isolados alcaloides e cumarinas que apresentaram atividade anticolinesterásica (CABRAL *et al.*, 2012). Em geral, diversos alcaloides acridônicos (comuns às espécies *Conchocarpus*) têm sido estudados quanto às suas atividades biológicas frente à células cancerígenas com resultados significativos (ALWANA *et al.*, 2015).

2.2.1. Classes de metabólitos especiais presentes no gênero *Conchocarpus*

Como mencionado anteriormente, a diversidade de metabólitos no gênero *Conchocarpus* é grande. A seguir serão apresentadas descrições e aspectos relacionados às principais classes e, também, aos metabólitos presentes em espécies desse gênero.

2.2.1.1. Alcaloides

A definição de alcaloides passou por várias modificações ao longo do tempo. A primeira definição descrevia alcaloides como de substâncias alcalinas isoladas de plantas, posteriormente foi adaptado para englobar substâncias de outra origem, mas que compartilhavam propriedades semelhantes. A definição mais usual categoriza os alcaloides como substâncias que apresentam um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura, originados do metabolismo secundário ou especializado de plantas e, também, de alguns animais e microrganismos em menor extensão. Uma subcategorização desta classe de substâncias leva em consideração a rota biossintética que resulta na sua formação, sendo: alcaloides complexos aqueles com nitrogênio heterocíclico originado de um aminoácido; alcaloides simples os que, embora o nitrogênio derive de aminoácidos, este não faz parte de um anel heterocíclico, e pseudo-alcaloides cujo átomo de nitrogênio é adicionado posteriormente por processos enzimáticos (DEWICK, 2009; LICHMAN, 2021; ROBERTS *et al.*, 2018)

Os alcaloides são bastantes diversificados, sendo classificados de acordo com a estrutura nitrogenada que o compõe, a exemplo de alcaloides acridônicos, quinolínicos, furoquinolínicos, piperidínicos e indólicos, dentre outros. Já foram identificadas mais de 27.000 estruturas diferentes para alcaloides sendo, cerca de 80%, derivados de plantas. A variabilidade dessa estrutura depende da rota biossintética e das espécies envolvidas na sua formação a partir do metabolismo primário das plantas. Alguns aminoácidos como a tirosina, triptofano, ornitina, lisina, ácido nicotínico, ácido antranílico e histidina, estão envolvidos na biossíntese dos alcaloides (DA SILVA *et al.*, 2020; DEWICK, 2009; HENRIQUES *et al.*, 2007).

No gênero *Conchocarpus*, por exemplo, há a predominância de alcaloides com esqueleto acridônico e quinolínico (**Figura 2**). Estes são considerados marcadores quimiotaxonômicos para a família Rutaceae e têm como precursor da sua biossíntese o ácido antranílico (**Figura 3**).

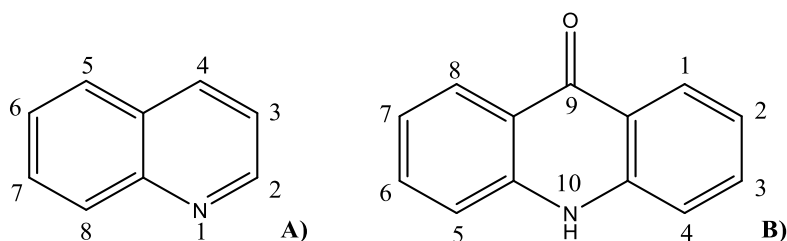


Figura 2 - Esqueleto e padrão de numeração dos alcaloides **A)** quinolínicos e **B)** acridônicos.

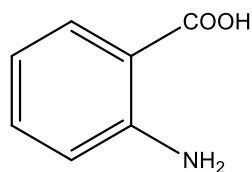


Figura 3 – Fórmula estrutural do Ácido antranílico.

A **Figura 4** mostra um esquema da rota biossintética para a formação de alcaloide quinolínico a partir do antraniloil-CoA, originado da condensação do ácido antranílico com uma unidade acetil-CoA. A continuação da rota metabólica leva, também, à formação de alcaloides quinolônnicos e furoquinolínicos.

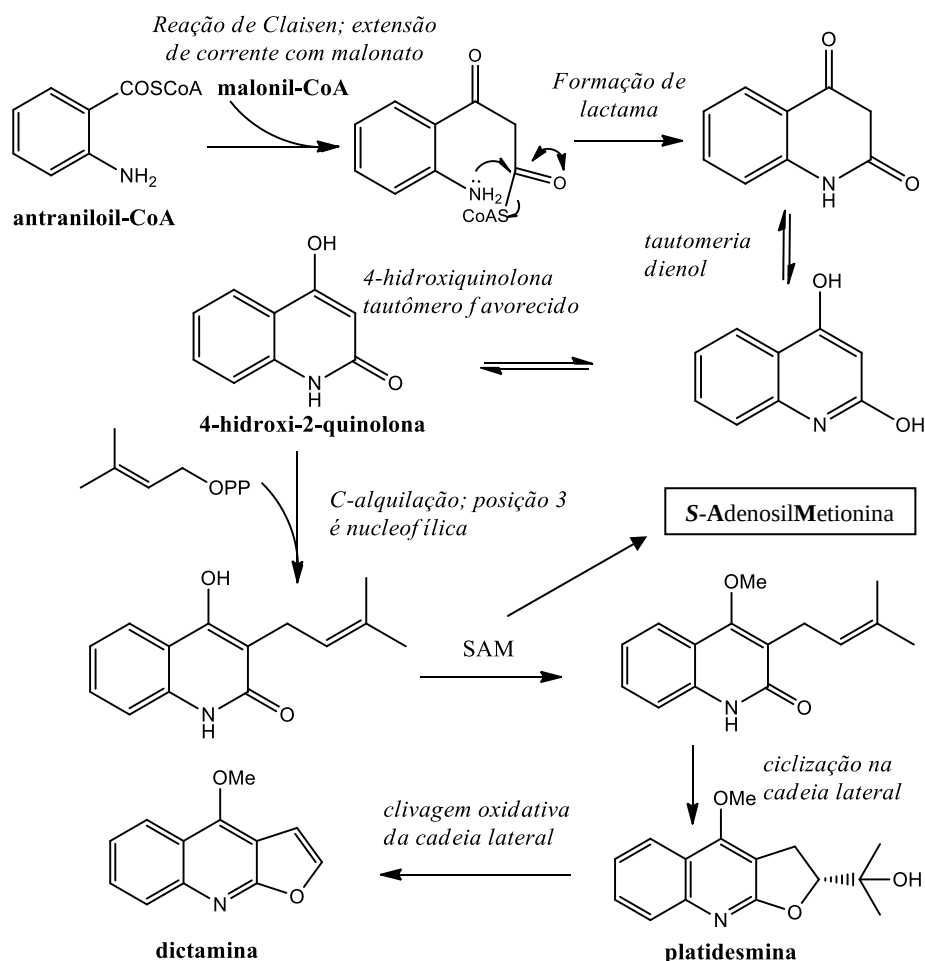


Figura 4 – Esquema da rota biossintética para formação do esqueleto quinolínico e furoquinolínico a partir do ácido antranílico [adaptado de Dewick (2009)].

Concomitantemente à formação do esqueleto quinolínico, o esqueleto acridônico resulta da extensão da cadeia antraniloil-CoA (como o derivado *N*-metil) ao incorporar três unidades acetato/malonato levando a um policetídio. A sequência de reações de Claisen, adição,

desidratação e enolização, leva à formação do alcaloide acridônico 1,3-hidroxi-*N*-metilacridona (Figura 5).

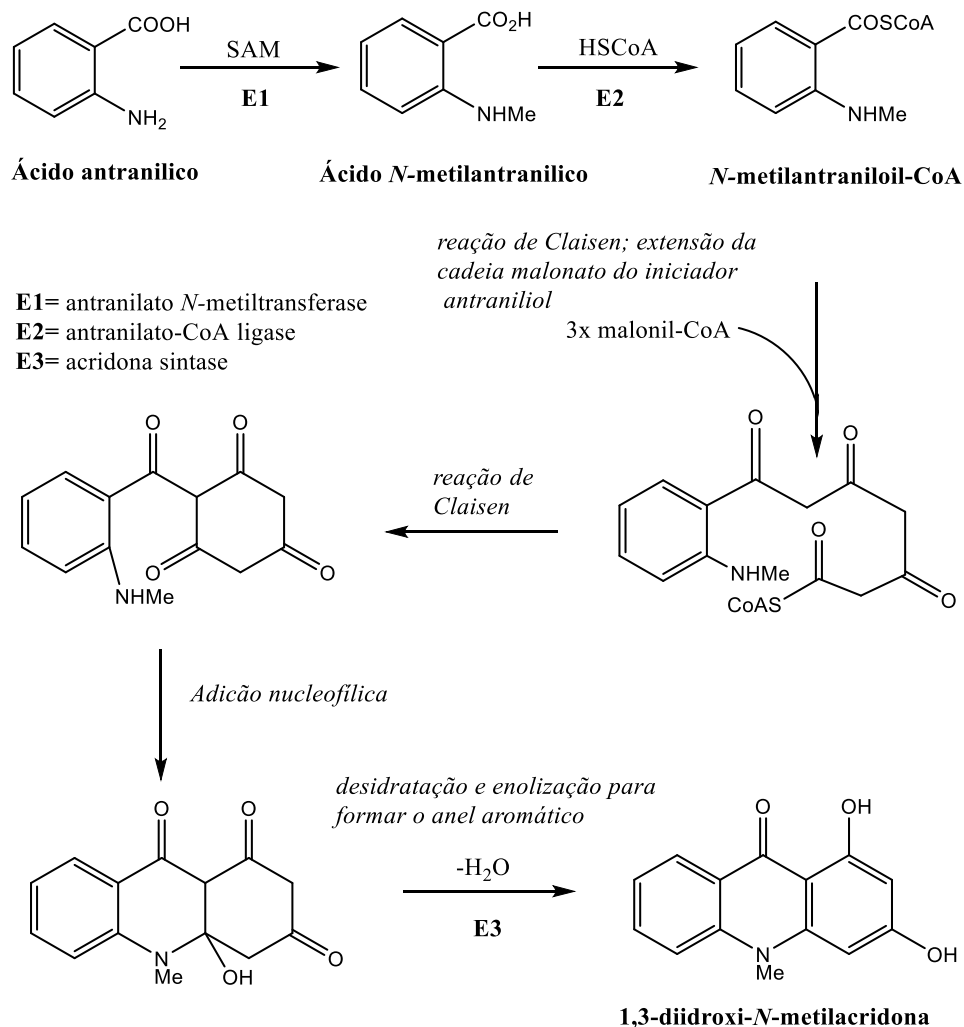


Figura 5 – Esquema da rota biossintética para formação do esqueleto acridônico a partir do ácido antranílico.

Nas espécies do gênero *Conchocarpus*, para as quais foram reportados estudos fitoquímicos, foram isolados vários alcaloides com núcleos quinolínicos e acridônicos, como demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Alcaloides isolados de espécies do gênero *Conchocarpus*

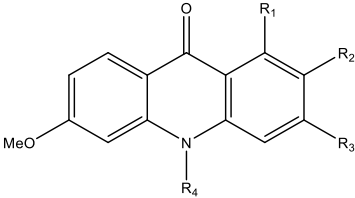
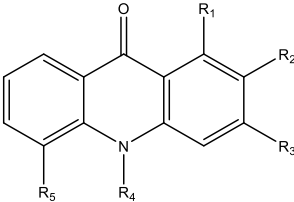
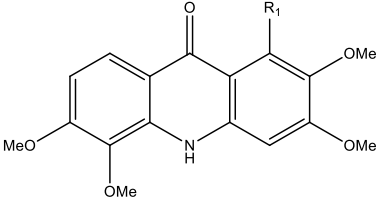
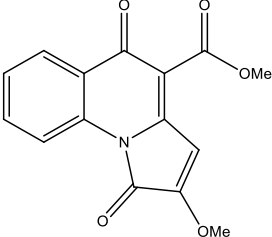
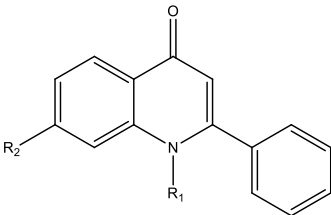
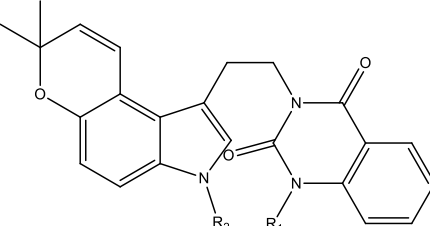
Núcleo	Substituintes	Espécie
	R ₁ , R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = Me 1,2,3,6-tetrametoxi- <i>N</i> -metilacridona	<i>C. marginatus</i> (BELLETE, 2009)
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = Me 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi- <i>N</i> -metilacridona	
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = H 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxiacridona	
	R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = OMe; R ₄ = Me 1-hidroxi-3,6-dimetoxi- <i>N</i> -metilacridona	
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₅ = H, R ₃ = OMe; R ₄ = Me 1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona	<i>C. marginatus</i> (BELLETE, 2009); <i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010)
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = Me; R ₅ = H arborinina	<i>C. marginatus</i> (BELLETE, 2009);
	R ₁ , R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = Me; R ₅ = H metilarborinina	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010); <i>C. macrophyllus</i> (ALBARICI, 2006)
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ , R ₅ = H xanthoxolina	
	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₅ = OMe; R ₄ = Me 1,2,3,5-tetrametoxi- <i>N</i> -metilacridona	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010)
	R ₁ = OH; R ₂ , R ₃ = OMe; R ₄ = CH ₂ OAc; R ₅ = H toddaliopsina C	
	R ₁ = OMe cusculina	<i>C. paniculatus</i> (VIEIRA <i>et al.</i> , 1992)
	R ₁ = OH cuspanina	
	inopinatina	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010)
	R ₁ = Me; R ₂ = H 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona	<i>C. marginatus</i> (BELLETE, 2009); <i>C. fontesianus</i> (CABRAL <i>et al.</i> , 2012); <i>C. heterophyllus</i> (AMBROZIN <i>et al.</i> , 2008)
	R ₁ = Me; R ₂ = OMe 2-fenil-1-metil-7-metoxiquinolin-4-ona	<i>C. marginatus</i> (BELLETE, 2009)

Tabela 2- Continuação

	4-metoxi-1-metil-3-(6,7-dihidroxi-3,7-dimetiloct-2-en-1-il)quinolin-2-ona	<i>C. gaudichaudianus</i> (CORTEZ <i>et al.</i>, 2009)*
	R₁, R₂= OMe; R₃= H haplotusina (1,4-dimetoxiquinolin-2-ona)	<i>C. heterophyllus</i> (AMBROZIN <i>et al.</i>, 2008)
	R₁, R₂, R₃= OMe 6-metoxihaplotusina (1,4,6-trimetoxiquinolin-2-ona)	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005 apud
	R₁, R₃= OMe; R₂= Me 1-metil-4,6-dimetoxiquinolin-2-ona	BELLETE, 2009)
	R₁= Me <i>N</i>-metilhaplamina	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	R₁= OMe <i>N</i>-metoxihaplamina	
	dictamina	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010); <i>C. fontanesianus</i> (CABRAL <i>et al.</i>, 2012); <i>C. cyrtanthus</i> (OLIVEIRA, 2014b)*
	γ-Fagarina	<i>C. fontanesianus</i> (CABRAL <i>et al.</i>, 2012)
	esquimianina	<i>C. fontanesianus</i> (CABRAL <i>et al.</i>, 2012); <i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	Candicina	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)

Tabela 2- Continuação

	R ₁ , R ₂ = H 3-[2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-1-il)etil]quinazolina-2,4-diona	<i>C. gaudichaudianus</i> (CORTEZ <i>et al.</i> , 2009)*
	R ₁ = OH; R ₂ = H 3-[2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-1-il)etil]-1-hidroxiquinazolina-2,4-diona	
	R ₁ = Me; R ₂ = H 3-[2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-1-il)etil]-1-metilquinazolina-2,4-diona	<i>C. gaudichaudianus</i> (CORTEZ <i>et al.</i> , 2009)*; <i>C. macrocarpus</i> (VELOZO, 1995)
	R ₁ = H; R ₂ = OH 3-[2-(3-hidroxi-7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano[3,2-e]indol-1-il)etil]quinazolina-2,4-diona	<i>C. macrocarpus</i> (VELOZO, 1995)

*Espécies retiradas do gênero *Conchocarpus* em 2021.

2.2.1.2.Cumarinas

As cumarinas têm ampla distribuição nos vegetais, ocorrendo, também, em alguns fungos e bactérias. Do ponto de vista estrutural são lactonas do ácido *o*-hidroxicinâmico, sendo seu representante mais simples a cumarina (**Figura 6**). Mais de 1300 cumarinas diferentes já foram isoladas de produtos naturais, na sua grande maioria, de plantas. Esta classe de substâncias desempenha diversas funções nas plantas, como controle de crescimento e defesa contra infecções. Suas atividades biológicas estão associadas aos seus diferentes padrões de substituições (FRANCO *et al.*, 2021).

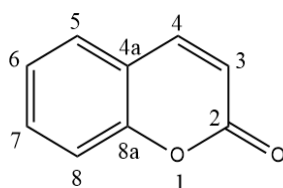


Figura 6 - Estrutura básica e numeração das cumarinas.

Biossinteticamente, as cumarinas são formadas a partir do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus primeiros precursores o ácido cinâmico. Processos enzimáticos diferentes levam a formação de dois precursores principais, o ácido *p*-cumárico e o ácido *o*-cumárico; o primeiro, passa por isomerização fotocatalisada e lactonação espontânea do isômero *Z* resultando na **cumarina**; enquanto o segundo, sofre antes uma hidroxilação enzimática na posição C-2 para posterior isomerização e lactonação favorável produzindo a cumarina **umbeliferona** (**Figura 7**).

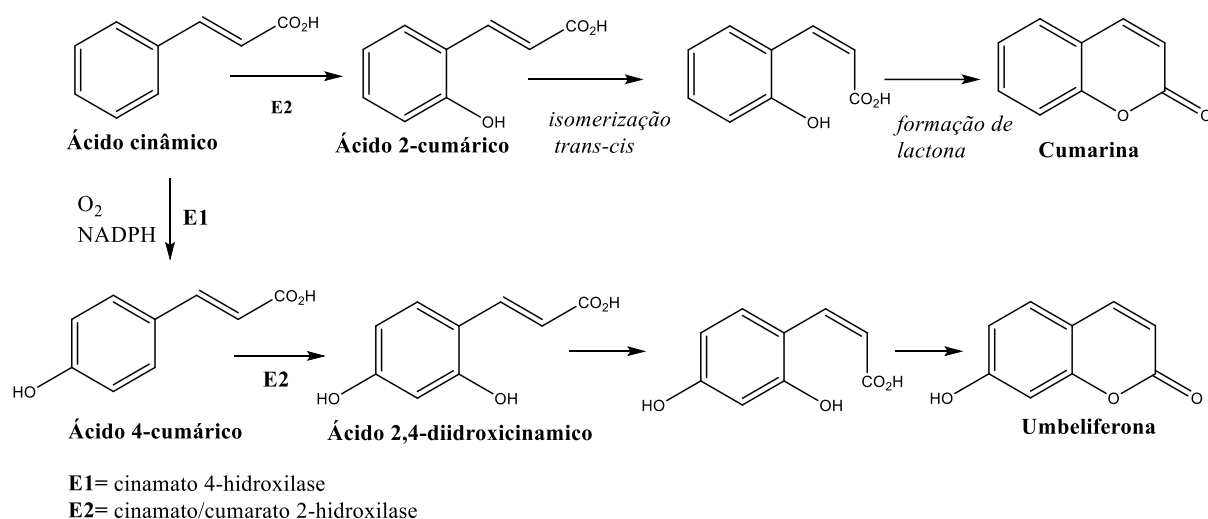


Figura 7 – Esquema da rota biossintética simplificada para formação de cumarinas [Adaptado de Dewick (2009)].

A prenilação nas posições C-6 e C-8 das 7-hidroxicumarinas (umbeliferona) levam a formação de pirano e furanocumarinas, que podem ser lineares ou angulares dependendo das posições de formação dos anéis correspondentes (**Figura 8**). Demais substituições nas diferentes posições do esqueleto principal levam às variabilidades estruturais apresentadas pelas cumarinas isoladas de produtos naturais. Outros esqueletos de piranocumarinas e furanocumarinas angulares podem ser formados.

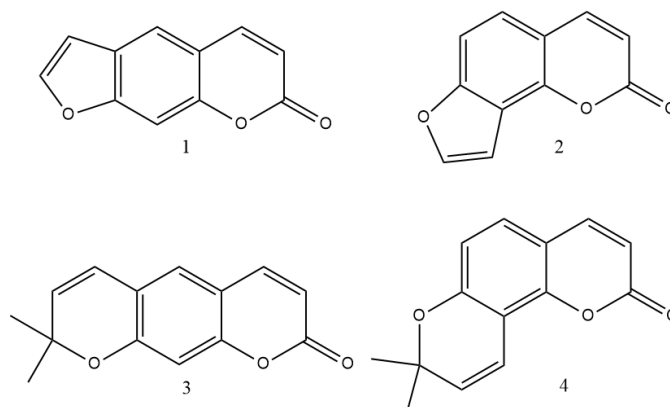
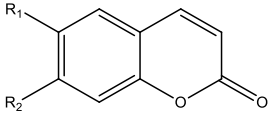
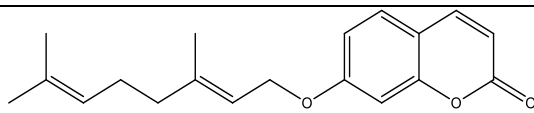
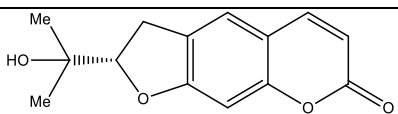
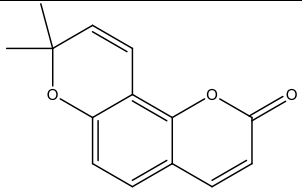
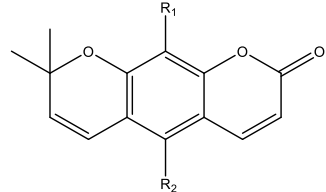
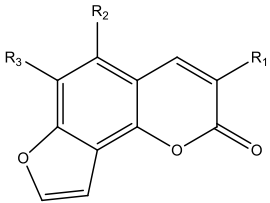
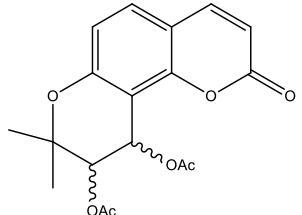


Figura 8 - Exemplos de estruturas básicas de furanocumarinas lineares (1), angulares (2) e piranocumarinas lineares (3) e angulares (4).

A família Rutaceae é bastante citada na literatura quando se trata da produção de diferentes tipos de cumarinas (BOURGAUD *et al.*, 2006; GROVER e JACHAK, 2015). No gênero *Conchocarpus* é encontrado tanto furano como piranocumarinas com grande diversidade estrutural, como mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3 - Cumarinas isoladas de espécies do gênero *Conchocarpus*.

CUMARINAS		
	R ₁ = OMe; R ₂ = OH escopoletina	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010); <i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	R ₁ = H; R ₂ =OH umbeliferona	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	R ₁ , R ₂ = OMe escaparona	
	aurapteno	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	marmesina	<i>C. inopinatus</i> (SÁ, 2010); <i>C. fontanesianus</i> (CABRAL <i>et al.</i> , 2012)
	seselina	<i>C. cyrtanthus</i> * (OLIVEIRA , 2014),
	R ₁ = H; R ₂ = OMe xantoxiletina	<i>C. cyrtanthus</i> * (OLIVEIRA , 2014)
	R ₁ = OMe; R ₂ = H luvangetina	
	R ₁ = OMe; R ₂ , R ₃ = H 3-metoxiangelicina	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)
	R ₁ , R ₂ = H; R ₃ = OMe esfodina	
	R ₁ = H; R ₂ , R ₃ = OMe pimpinelina	
	R ₁ , R ₃ = H; R ₂ = OMe isobergapteno	
	R ₁ , R ₃ = OMe; R ₂ = H 3,6-dimetoxiangelicina	
	quiahucumarina D	<i>C. longifolius</i> (MAFEZOLI <i>et al.</i> 2001; FACCHINI, 2005)

*Espécies retiradas do gênero *Conchocarpus* em 2021.

2.2.1.3. Flavonoides

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis presentes entre os metabólitos especiais dos vegetais. Representam um dos grupos fenólicos mais importante e diversificados entre os produtos de origem natural. Embora haja relatos de sua ocorrência em algumas algas, pteridófitas, briófitas e fungos, essa classe de metabólitos especiais é encontrada em grande abundância e enorme diversidade estrutural nas angiospermas (DEWICK, 2009; SILVA-NETO *et al.*, 2020).

Os flavonoides apresentam diversas formas estruturais, compostos, na sua grande maioria, de 15 átomos de carbono em seu esqueleto principal, sendo duas fenilas ligadas entre si por uma cadeia de três carbonos. Nos compostos tricíclicos cada anel é nomeado de A, B, C e os carbonos são numerados como mostrado na **Figura 9**.

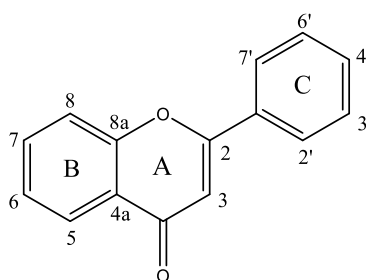


Figura 9 - Esqueleto base e numeração dos flavonoides

A rota biossintética que dá origem aos flavonoides, tem como principal precursor o ácido cinâmico. Durante sua biogênese, a unidade iniciadora de cinamoil-CoA sofre extensão de cadeia com unidades de malonil-CoA resultando após etapas reacionais, catalisadas por enzimas, em chalconas. Uma reação intramolecular do tipo Michael em cetonas α,β -insaturadas, leva à formação de flavonona que, por sua vez, culmina em flavonóis e flavonas (**Figura 10**) (DEWICK, 2009).

No gênero *Conchocarpus* há ocorrências de alguns tipos de flavonoides na sua forma livre, como hidroxiflavonas e piranoflavonas, ou ligadas a unidades glicosídicas, sendo classificados de flavonoides glicosilados. A **Tabela 4** mostra alguns flavonoides e outras classes de metabólitos especiais isolados de diferentes espécies de *Conchocarpus*.

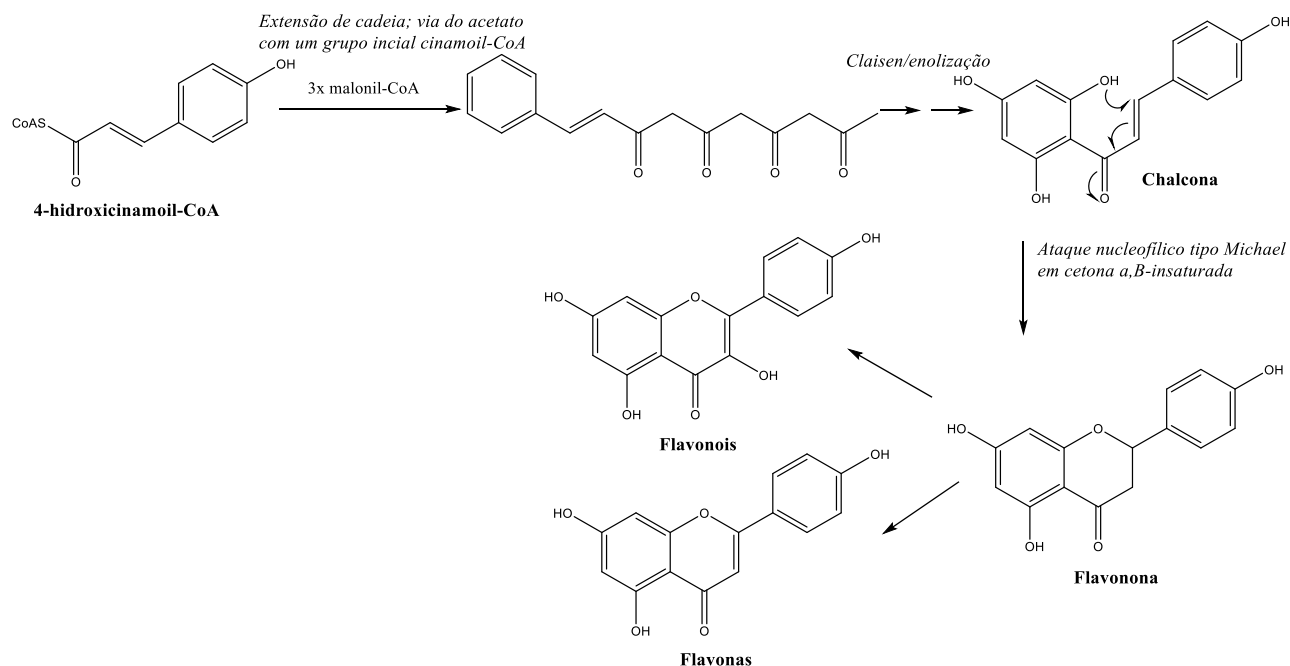


Figura 10 - Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides [Adaptado de Dewick (2009)].

Tabela 4 - Flavonoides e outras classes de substâncias isoladas de espécies *Conchocarpus*.

FLAVONOIDES		
	$R_1 = H$ Flavona	
	$R_1 = OH$ 5-hidroxi flavona	
	$R = [CH_2]_8CH_3$ $R = [CH_2]_{10}CH_3$ $R = [CH_2]_{15}CH_3$ $R = [CH_2]_{14}CH=CHCH_3$ $R = [CH_2]_{16}CH_3$ (mistura de pteroflavonas)	<i>C. heterophyllus</i> (AMBROZIN et al., 2008)
	$R_1 = OH$ 6-glicosil-3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona	
	$R_2 = AcO$ 6-(4-acetil-glicosil)-3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona	<i>C. heterophyllus</i> (AMBROZIN et al., 2008)

Tabela 4- Continuação

	6,8-diglicosil-3,5,7,4'- tetrahydroxiflavona	<i>C. heterophyllus</i> (AMBROZIN <i>et al.</i> , 2008)
OUTROS		
	$R_1 = H$ <i>N-trans-cumaroiltiramina</i> $R_1 = OMe$ <i>N-trans-feruloiltiramina</i>	<i>C. gaudichaudianus*</i> (CORTEZ <i>et al.</i> , 2009)
	$R_1 = OH$ 1-(7-hidroxi-5-metoxi-2,2- dimetil- 3,8a-dihidro-2 <i>H</i> -cromen-8-il)etan- 1-ona $R_1 = OMe$ 1-(5,7-dimetoxi-2,2-dimetil- 3,8a- dihidro-2 <i>H</i> -cromen-8-il)etan-1-ona	<i>C. cuneifolius</i> (VELOZO,1995)
	$R_1 = OH$ 1-(5-hidroxi-7-metoxi-2,2- dimetil- 3,8a-dihidro-2 <i>H</i> -cromen-6-il)etan- 1-ona $R_2 = OMe$ 1-(5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-3,8a- dihidro-2 <i>H</i> -cromen-6-il)etan-1-ona	<i>C. cuneifolius</i> (VELOZO,1995)
	seringaresinol	<i>C. cyrtanthus*</i> (OLIVEIRA , 2014)

*Espécies retiradas do gênero *Conchocarpus* em 2021.

2.3. *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki

A espécie *C. mastigophorus* (**Figura 11**) possui estrutura arbórea que varia entre 1,5 e 4 metros de altura. É nativa e endêmica do Brasil e sua ocorrência foi registrada apenas nas regiões de Mata Atlântica no estado da Bahia e no Norte do Espírito Santo (PIRANI, 2015).

Não há relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e de atividades biológicas para *C. mastigophorus*. Em trabalho prévio (não publicado) realizado pelo Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais – UESB, Oliveira (2015), isolou nove substâncias do extrato do caule dessa espécie: cinco alcaloides acridônicos, um quinolínico e dois quinolônicos, além de uma cumarina. No entanto, o trabalho citado não esgotou o potencial de novos resultados para a espécie, pois o estudo realizado objetivou-se da análise dos extratos do caule e cascas da planta apenas, de modo que ainda é possível obter resultados novos a partir do estudo de outras partes da planta, como folhas, por exemplo.



Figura 11 - Folhas, caules e frutos de espécime de *Conchocarpus mastigophorus* (Autor: Oliveira, 2015).

2.4. Atividades biológicas das espécies *Conchocarpus* e de seus metabólitos especiais

As atividades biológicas apresentadas por metabólitos especiais presentes nas espécies *Conchocarpus* são diversas: ação antimicrobiana, citotóxica (contra células cancerígenas), anticolinesterásica e antiespasmódica. Ensaios biológicos realizados com os extratos brutos das folhas de *C. fontanesianus* mostrou atividade antifúngica significativa contra *Candida albicans*, um microrganismo que coloniza a pele e a mucosa e pode desencadear um amplo espectro de doenças como infecção da mucosa, sapinho e candidíase fatal (CABRAL *et al.*, 2014). Flindersina e 8-metoxiflindersina presentes nas folhas e casca do caule de *C. fontanesianus* exibiram ação antibiótica contra cepas mutantes de *C. albicans* (DSY2661) (CABRAL *et al.*, 2016). Alcaloides acridônicos e quinolínicos das folhas de *C. rubrus* apresentaram atividade

tripanocida moderada em ensaio biológico com as formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo a kocusagina e o acetato de *rel*-(7*R*,8*R*)-8-[(*E*)-3-hidroxi-3-metil-1-butenil]-4,8-dimetoxi-5,6,7,8-tetrahidrofuro[2,3-*b*]quinolin-7-ila responsáveis pela ação mais pronunciada, com concentração inibitória (IC₅₀) igual a 0,5596 e 0,977 (mmol/L), respectivamente (AMBROZIN, 2005). Uma mistura de piranoflavonas e os alcaloides haplotusina e 2-fenil-1-metilquinolin-4(*H*)-ona isoladas das folhas e caule de *C. heterophyllus*, apresentaram ação tripanocida moderada frente à forma tripomastigota do *T. cruzi* com IC₅₀ igual a 136,9 e 144,9 (μM), respectivamente (AMBROZIN et al, 2008). Estudos preliminares com os extratos acetato de etila e metanólico do caule e cascas de *C. mastigophorus* apresentaram ação inibitória do crescimento de cepas das bactérias gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (OLIVEIRA, 2015).

As atividades biológicas apresentadas pelas espécies do gênero *Conchocarpus* está associada à variabilidade de metabólitos especiais. Os alcaloides, principalmente os acridônicos que são característicos do gênero, são bastante evidenciados nos estudos de avaliação de atividades biológicas. A citrusinina I, isolada de *C. mastigophorus* (OLIVEIRA, 2015), apresenta forte ação inibitória da catepsina V (enzima envolvida nos processos de progressão de tumores malignos, doença de Alzheimer, processos inflamatórios, dentre outras patologias) (MARQUES *et al.*, 2016), além de ser um potente anti-herpético agindo na inibição do vírus HSV-1 e HSV-2 (EC_{50%} = 0,59 μg e 0,74 μg, respectivamente). Também apresenta ação citotóxica frente às células adenocarcinoma de cólon humano (COLO-205), hepatoma humano (Hep-3B) e carcinoma hepatocelular de fígado humano (Hep-G2), e ação antimicrobiana contra os microrganismos *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* (MICHAEL, 2017).

A arborinina, isolada de *C. marginatus* (BELLETE, 2009), *C. inopinatus* (SÁ, 2010) e *C. macrophyllus* (ALBARICI, 2006), apresenta ação citotóxica contra várias células cancerígenas (câncer de ovário - A2780, carcinoma epidermóide - A431, adenocarcinoma alveolar basal epitelial - A549, adenocarcinoma colorretal - DLD-1 e carcinoma de cólon - HCT-116), além de ação antiparasita (*Leishmania donovani*; *Plasmodium falciparum*; *Trypanosoma cruzi*) e antimicrobiana frente as cepas de *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *M. luteus* (MICHAEL, 2017). Para a 1-hidroxi-3-metoxi-10-metilacridona, isolada de *C. marginatus* (BELLETE, 2009) e *C. inopinatus* (SÁ, 2010), é relatado ação anticancerígena para células de adenocarcinoma alveolar basal epitelial humano, adenocarcinoma colorretal humano e

glioblastoma humano (U87MG), além de ação antibacteriana frente a *Aspergillus niger*; *Candida albicans*; *E. aerogenes*; *E. coli* (MICHAEL, 2017; SEPÚLVEDA *et al.*, 2013).

São reportados vários outros alcaloides com núcleos acridônicos que apresentam ações biológicas diversas, bem como, também, são utilizados como base para síntese de derivados com atividades biológicas potencializadas como, por exemplo, a 2-(9-oxoacridin-10(9*H*)-il)-*N*-fenilacetamida que apresentou atividade significativa contra adenocarcinoma de mama (MCF-7), cervical (HeLa) e de pulmão (A-549) (IC_{50%} 6,07; 8,80 e 7,34 µM, respectivamente) (ALWANA *et al.*, 2015).

Além dos acridônicos, também são relatados na literatura outros tipos de alcaloides que são encontrados nas espécies *Conchocarpus* e que apresentam atividades biológicas, como é o caso da γ -fagarina, com resultados promissores em estudos de atividade anti-HIV, e a dictamina, com atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *Leucoagaricus gongylophorus*, e biocida para a inseto praga *Leucoagaricus gongylophorus* (MICHAEL, 2008).

Cumarinas também estão entre os metabólitos especiais bioativos encontrados no gênero *Conchocarpus*. Cabral e colaboradores (2012) relata a ação da marmesina, isolada de *C. fontanesianus*, na inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por distúrbios de neurotransmissores podendo desencadear neuropatologias como o Mal de Alzheimer (ARAÚJO *et al.*, 2016). A umbeliferona, isolada de *C. longifolius* (MAFEZOLI *et al.*, 2001; FACCHINI, 2005), apresentou atividade anti-inflamatória (VASCONCELOS *et al.*, 2009), e o aurapteno, ação antimicrobiana (*B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida lipolytica*) e citotóxica frente às células de leucemia linfoblástica humana (CCRF-CEM) (ALMAHY e ALAGIMI, 2012; GROVER e JACHAK, 2015).

A quantidade de metabólitos especiais diferentes já isolados de espécies *Conchocarpus*, com uma gama de atividades biológicas comprovadas, atrelada ao grande número de espécies ainda não submetidas a estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos configura este gênero como potencial fonte de novas substâncias com diversas bioatividades e aplicações farmacológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo químico das folhas e caule de *Conchocarpus mastigophorus*

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o estudo fitoquímico dos extratos brutos de folhas e caule das espécies *C. mastigophorus*, utilizando métodos cromatográficos clássicos e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência);
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- Contribuir para o conhecimento quimiotaxonômico de espécies de plantas do gênero *Conchocarpus* presentes na flora brasileira

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Nos processos de separação por cromatografia em coluna (CC) foram utilizados como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,200 nm) da Macherey-Nagel e Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich. Para as análises por cromatografia em camada de delgada (CCD) foram utilizadas placas de vidro contendo uma fina camada (0,50 mm) de sílica gel 60 GF₂₅₄ da Macherey-Nagel, ativadas em estufa a 100 °C. Como fase móvel e na preparação dos extratos foram utilizados solventes PA das marcas Química Moderna, Synth, Vetec e Quimex.

Como reveladores de CCD foram utilizados irradiação de luz UV (254 e 365 nm), iodo sublimado e spray com reagente de Dragendorff [solução ácida de Subnitrato de Bismuto com iodeto de potássio (ALICE *et al.*, 1995)].

Para eliminação dos solventes presentes nos extratos e nas frações derivadas destes, foi utilizado evaporador rotativo, da marca Fisaton, operando sob baixa pressão. Na determinação da temperatura de fusão (T_f) foi utilizado um aparelho modelo MQAPF-302 da Microquímica. As plantas foram secas em estufa com circulação de ar, da Tecnal, modelo TE-394/2.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de ¹³C a 600 Hz e 150 Hz foram obtidos na Universidade Federal de São Carlos a 600 MHz em aparelho Bruker Avance III 600. As análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos em um cromatógrafo da marca Shimadzu modelo QP2010 SE. Nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizado um aparelho da marca Shimadzu SPD-20A com detector UV operando com dois comprimentos de onda (254 e 365 nm). Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em aparelho da Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR, pelo método da reflectância atenuada.

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal (folhas, caule e casca) da espécie *C. mastigophorus* foi coletado no dia 18/02/2014 na Fazenda Alto da Caixa D'Água (S13°71'804" W039°62'815") localizada no município de Itamarí, Bahia, Brasil. A identificação da espécie foi feita professora Dra. Guadalupe Edilma de Licona Macedo, com confirmação posterior de um especialista da família

Rutaceae, o professor Dr. José Rubens Pirani – USP. Uma exsicata (**Figura 12**) foi depositada no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, com o registro HUESB 9559.

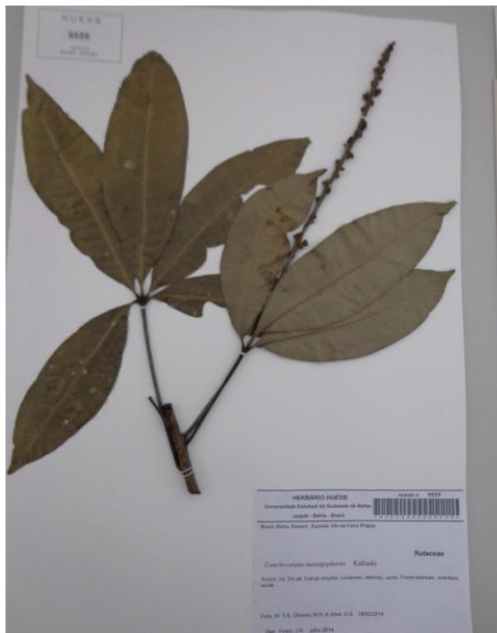


Figura 12 - Exsicata de *Conchocarpus mastigophorus* depositada no HUESB.

Fonte: Oliveira (2015)

5.2. Preparo dos extratos

5.2.1. Extrato das folhas de *Conchocarpus mastigophorus*

As folhas de *C. mastigophorus* foram submetidas a secagem em estufa com circulação de ar, à temperatura de 40 °C, por 48 h. Em seguida, a biomassa seca (372,45 g) foi triturada e submetida a extração por maceração com hexano por três períodos de 96 h. A cada período foi realizado uma filtração, e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. O resíduo sólido retido no papel filtro, na etapa de filtração, foi submetido à nova extração. O concentrado resultante de cada processo foi agrupado e mantido em capela de exaustão até completa evaporação do solvente residual.

O material residual sólido, obtido na etapa de filtração da extração com hexano, foi submetido à nova extração com acetato de etila e, em seguida, com metanol, conforme descrito no procedimento com hexano. Ao final do processo foram obtidos três extratos de polaridades diferentes: hexânico (HFCM); acetato de etila (AFCM) e metanólico (MFCM). Seus rendimentos estão expressos na **Tabela 5**.

Tabela 5- Rendimento dos extratos da folha de *Conchocarpus mastigophorus*

Extrato	Código	Massa
Extrato hexânico da folha	HFCM	7,96 g
Extrato AcOEt da folha	AFCM	7,69 g
Extrato metanólico da folha	MFCM	17,00 g

5.2.2. Extrato do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

Os extratos do caule de *C. mastigophorus* foram preparados previamente por Oliveira (2015) onde o mesmo, após secagem e trituração do caule da planta, procedeu a extração utilizando o mesmo método descrito no item 5.2.1. obtendo três extratos diferentes como está descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Rendimento dos extratos do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

Extrato	Código	Massa (a partir de 2195 g caule)
Extrato hexânico do caule	HCLCM	6,199 g
Extrato AcOEt do caule	ACLCLM	6,700 g
Extrato metanólico do caule	MCLCM	6,300 g

5.3. Isolamento dos constituintes químicos do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

O isolamento dos constituintes químicos do caule de *C. mastigophorus* foram realizados a partir de frações obtidas previamente por Oliveira (2015) (**Figura 13**), onde o extrato ACLCLM (6,7 g) foi fracionado por CC, usando como fase estacionária sílica gel e como eluente misturas de hexano/AcOEt iniciando com a proporção de 100:0, aumentando, gradualmente no decorrer da eluição, a proporção de AcOEt até atingir 0:100. Em seguida, foram utilizadas misturas de AcOEt/MeOH, variando na proporção de 100:0 até 0:100. Este processo resultou, após análise por CCD e combinação das frações, de acordo com suas similaridades, em um total de 41 grupos (ACLCLM-1 a ACLCLM-41). A fração ACLCLM-16 foi, subsequentemente, dividida em quatro subfrações, por solubilização parcial com hexano, DCM e acetona.

Neste trabalho foi dada a continuidade ao fracionamento das subfrações da ACLCLM-16. Após análises por CCD e comparação com os constituintes já isolados por Oliveira (2015), foi selecionada a subfração ACLCLM-16.4 (80,0 mg) para estudo, dada a diversidade de constituintes químicos ainda não tinham sido isolados. O fracionamento da subfração ACLCLM-16.4 foi realizado por CC com sílica gel, usando como sistema de eluição a mistura de

Hex/DCM/MeOH (46:50:4), resultando em 6 frações (ACLCM-16.4.1 – ACLCM-16.4.6). Destas, a subfração ACLCM-16.4.2 (20,0 mg) foi fracionada por CC, usando Sephadex LH-20 como fase estacionária, e mistura de Hexano/DCM (1:3) como eluente. Este procedimento resultou em 3 subfrações, das quais a subfração ACLCM-16.4.2.1 (13,5 mg) foi submetida a subsequente fracionamento por CC (sílica gel), com eluição por uma mistura de Hex:DCM:AcOEt (50:40:10), resultando na substância **CCM-1** (1,5 mg)

A fração ACLCM-36 (188,7 mg) também foi submetida à purificação por CC utilizando sílica gel como fase estacionária e DCM/AcOEt/acetona (60:20:20) como sistema eluente, obtendo-se 10 subfrações, resultando no isolamento da substância **CCM-2** (18,0 mg), da ACLCM-36.6.

O extrato metanólico do caule de *C. mastigophorus* (MCLCM - 1,2 g) foi submetido a fracionamento por CC com sílica gel e eluída com CHCl₃/MeOH (2:8) obtendo-se 6 frações nomeadas de MCLCM-1 a 6. Após análise por CCD, a fração MCLCM-6 (71,0 mg) foi submetida a purificação por CC, usando Sephadex LH-20 (fase estacionária) e metanol (fase móvel). Desse fracionamento, obteve-se 4 subfrações (MCLCM-6.1 a 6.4), sendo a MCLCM-6.2 constituída da substância **CCM-3** (35,0 mg). Os procedimentos empregados no isolamento dos constituintes da fração ACLCM-16 e do extrato metanólico do caule de *C. mastigophorus* estão resumidos na **Figura 14**.

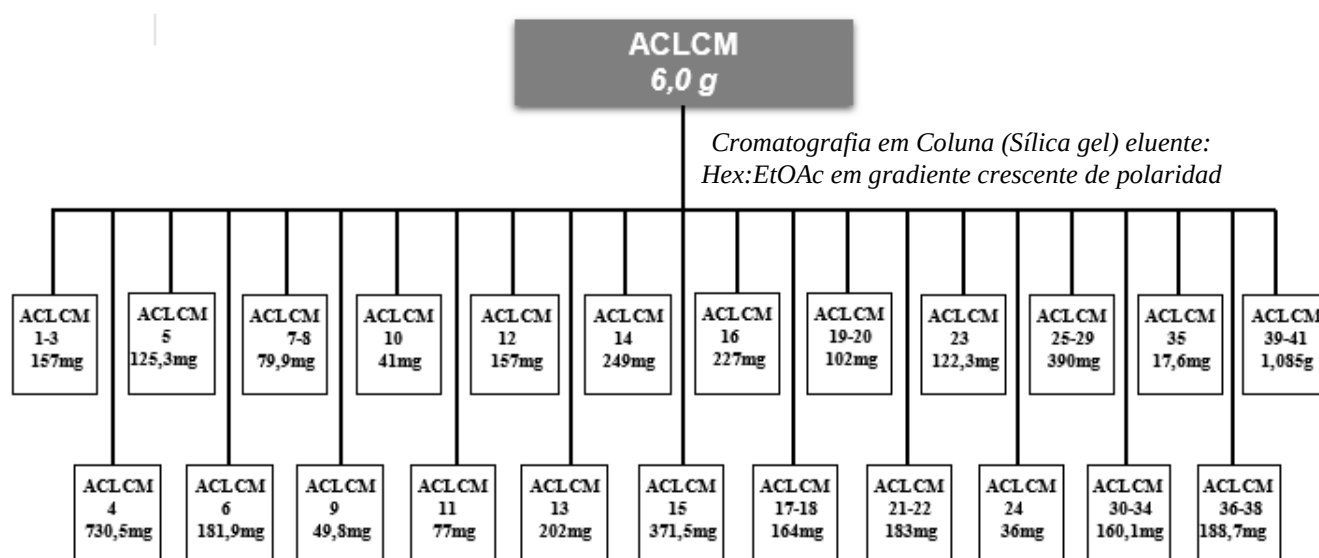


Figura 13 - Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila do caule de *Conchocarpus mastigophorus* realizado por Oliveira (2015).

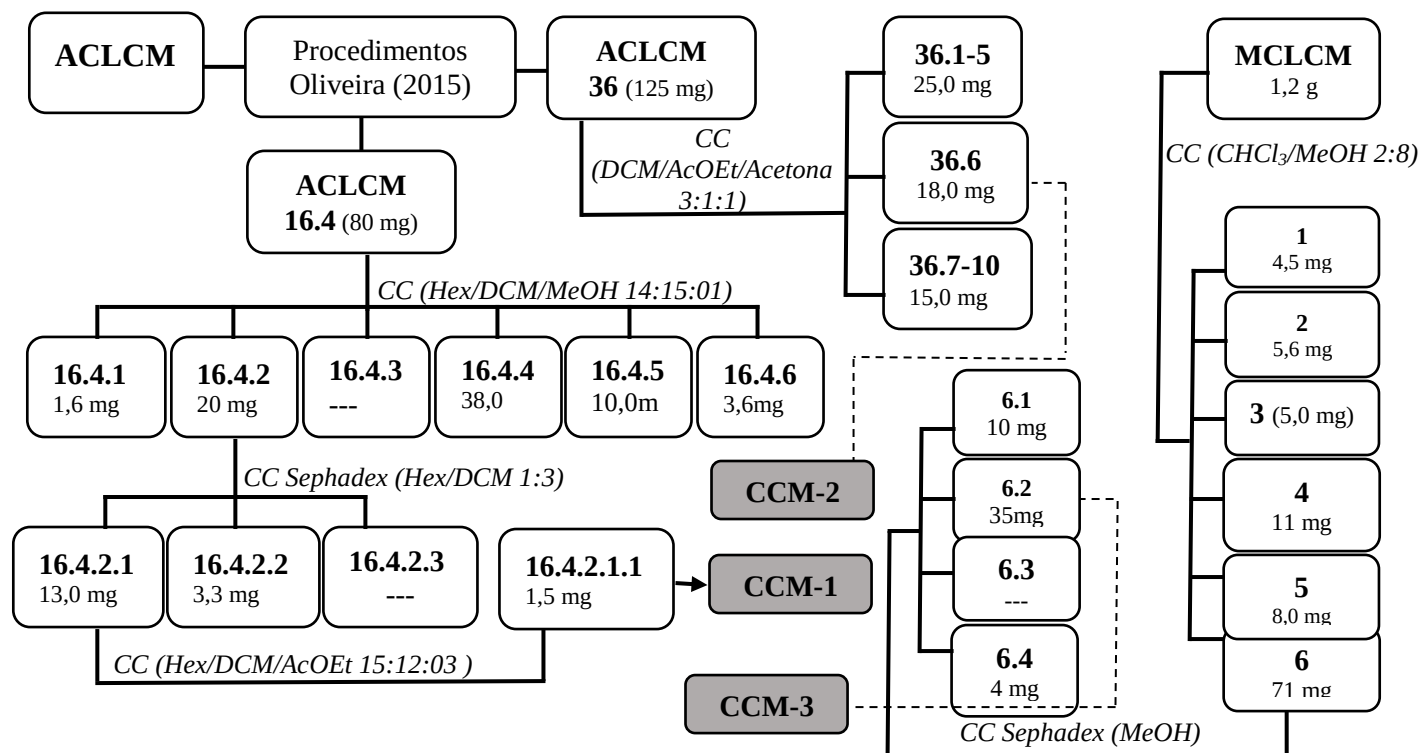


Figura 14 - Esquema de fracionamento dos extratos acetato de atila e metanólico do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

5.4. Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos das folhas de *Conchocarpus mastigophorus*

Os extratos HFCM, AFCM e MFCM foram submetidos a uma triagem em CCD usando como revelador o reagente de Dragendorff. O extrato AFCM foi escolhido para estudo por apresentar uma maior concentração de alcaloides, quando comparado, qualitativamente, com os demais extratos. Este foi, então, submetido a fracionamento em coluna cromatográfica tendo como fase estacionária sílica gel, e como eluente, uma mistura de Hexano:AcOEt com gradiente crescente de polaridade (iniciando em 90:1 até 0:100). Neste procedimento, após análise por CCD, foram obtidas sete frações (AFCM-1 a AFCM-7).

A fração AFCM-4 (130,1 mg) foi submetida à CC usando Sephadex LH-20 (fase estacionária) e Hexano/Acetona (3:2) (eluente) resultando em 4 novas frações (AFCM-4.1 a AFCM-4.4). Destas, a fração AFCM-4.2 (68,7 mg) foi submetida a CC (sílica gel) eluída com a mistura Hex/DCM/MeOH (20/75/05) levando a 4 subfrações (AFCM-4.2.1- AFCM-4.2.4). A AFCM-4.2.2 foi submetida a CC (sílica gel), eluída com a mistura Hex/DCM/MeOH (53/40/7), levando ao isolamento da substância **FCM-1** (7,2 mg). Da AFCM-4.3 (109,9), submetida a CC (sílica gel), eluída com Hex/DCM/MeOH (66/32/2), foi isolada a substância **FCM-2** (7,3 mg).

A fração AFCM-6 (0,5153 g) foi fracionada por CC, usando sílica gel e a mistura de Hex/AcOEt (20:80), como eluente, resultando em 5 frações (AFCM-6.1 – AFCM-6.5). Subsequentemente, a fração AFCM-6.4 foi submetida a CC de sílica gel, eluída com CHCl₃/MeOH (95:05), obtendo-se 10 subfrações. A purificação da fração AFCM-6.4.1 (60 mg), foi procedida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no modo semi-preparativo, utilizando uma coluna em fase reversa C-18 (Shim-pack, 250 x 20 mmI.D), e sistema de eluição isocrático, acetonitrila:H₂O (35:65), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,01%, com fluxo de 10,0 mL/min. A fração AFCM-6.4.1 foi dissolvida em 500 µL do sistema de eluição utilizado e injetada no aparelho de CLAE. O processo cromatográfico foi monitorado com detector UV, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sendo coletado os picos com tempo de retenção de 10,29 min e 50,63 min, correspondentes às substâncias **FCM-4** (1,8 mg) e **FCM-3** (4,0 mg), respectivamente. A **Figura 15** resume os processos de isolamentos adotados para o extrato acetato de etila das folhas de *C. mastigophorus*. Todas as frações purificadas foram submetidas à análise por RMN de ¹H e ¹³C (1D e 2D) e CG-EM para elucidação de suas respectivas estruturas.

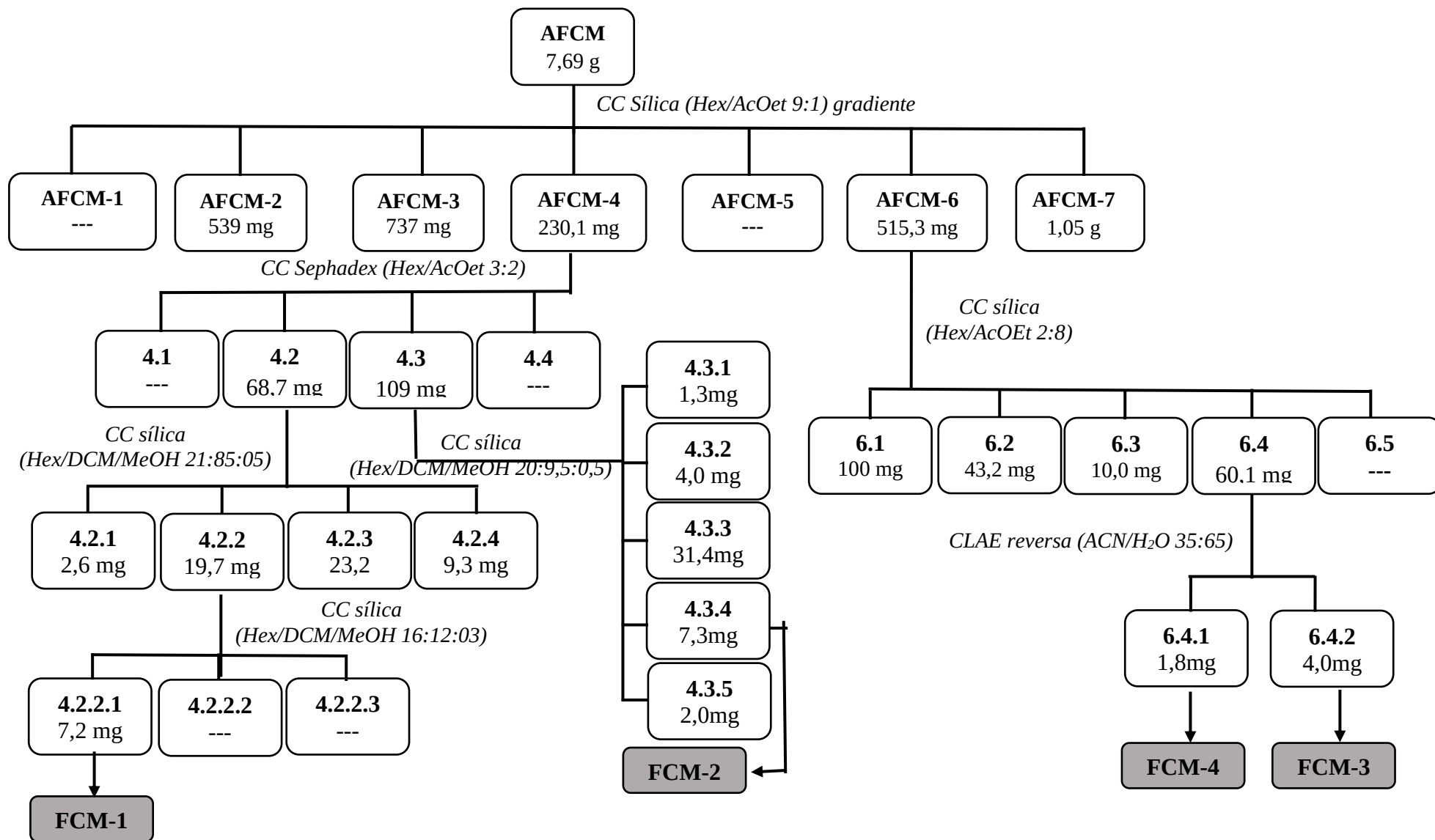


Figura 15 - Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de *Conchocarpus mastigophorus*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Substâncias isoladas de *Conchocarpus mastigophorus*

O estudo fitoquímico do extrato acetato de etila das folhas de *C. mastigophorus* (AFCM) levou ao isolamento e identificação de quatro alcaloides (**Figura 16**), sendo três do tipo piranoquinolin-5-ona, um já relatado na literatura (**FCM-1**) e dois inéditos (**FCM-2** e **FCM-3**), e um derivado da isatina (**FCM-4**), também descrito na literatura. Do extrato acetato de etila do caule de *C. mastigophorus* (ACLCM) foi isolado e identificado uma nova furanocumarina **CCM-1** e o alcaloide do tipo quinolin-4-ona **CCM-2** (**Figura 17**) já isolado de outras plantas do mesmo gênero. Do extrato metanólico do caule foi isolada a substância **CCM-3** (**Figura 17**), sendo este o primeiro relato de seu isolamento como produto natural.

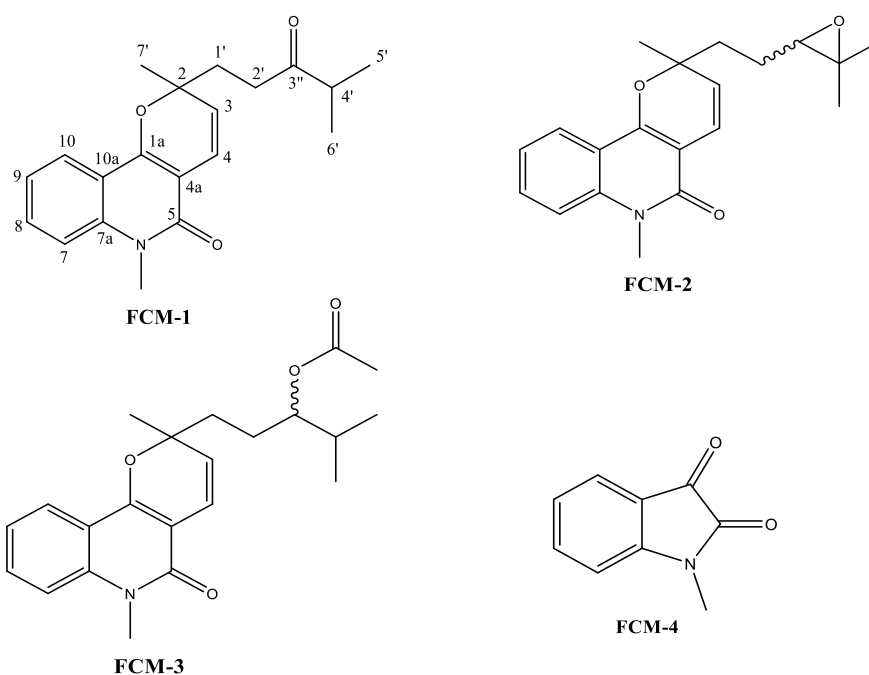


Figura 16 - Alcaloides isolados das folhas de *Conchocarpus mastigophorus*.

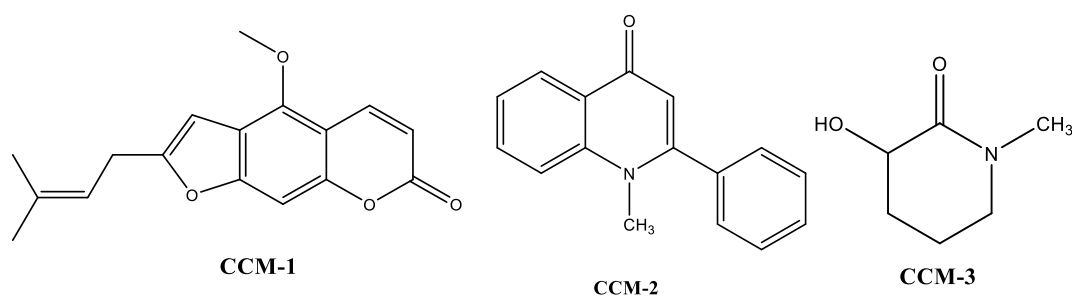


Figura 17 - Substâncias isoladas do caule de *Conchocarpus mastigophorus*.

6.2. Elucidação estrutural das substâncias isoladas das folhas de *Conchocarpus mastigophorus*

6.2.1. Substância FCM-1: 2,6-dimetil-2-(4-metil-3-oxopentil)-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona (huajiaosimulina)

A substância FCM-1 (**Figura 18**), resultante da purificação por cromatografia em coluna da fração AFCM-4.2.2 (**Figura 15**, p. 28), apresentou aspecto oleoso castanho e resultado positivo para alcaloides na análise em CCD revelado com reagente de Dragendorff. Seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figura 19**; **Figura 22**), obtidos em CDCl_3 , apresentaram deslocamentos químicos característicos de alcaloides do tipo piranoquinolin-5-ona que, comparado com dados da literatura (WU e CHEN, 1993), permitiu identificá-la como sendo a 2,6-dimetil-2-(4-metil-3-oxopentil)-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona, também conhecida como huajiaosimulina.

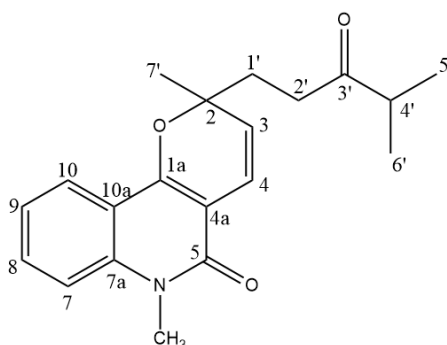


Figura 18 - Estrutura da substância huajiaosimulina.

O esqueleto base da piranoquinolin-2-ona foi confirmado com base na análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 19**; **Figura 20**; **Figura 21**), que apresentou sinais de hidrogênios aromáticos correspondentes ao H-7 (δ_{H} 7,32; *dl*, $J = 7,8$ Hz), H-8 (δ_{H} 7,55; *tl*, $J = 7,8$ Hz), H-9 (δ_{H} 7,23; *t*, $J = 7,8$ Hz) e H-10 (δ_{H} 7,91; *dl*, $J = 7,8$ Hz) característicos de anel aromático 1,2-dissubstituído, e um sinal em forma de singleto, integrando para 3 hidrogênios, com deslocamento químico típico de grupo metila ligada a heteroátomo (δ_{H} 3,69; $\text{CH}_3\text{-N}$). Os sinais relativos ao H-3 (δ_{H} 6,82; *d*, $J = 10,0$ Hz) e H-4 (δ_{H} 5,42; *d*, $J = 10,0$ Hz), acoplando entre si, com constante de acoplamento e deslocamento químico característicos de hidrogênios vicinais ligados a carbono sp^2 , em configuração *cis*, confirma a existência do anel pirano na estrutura policíclica e com substituintes na posição C-2, dada a quantidade e multiplicidade dos

sinais dos hidrogênios correspondentes. Os demais sinais correspondem, portanto, aos grupos substituintes, sendo os dupletos em δ_H 1,01 ($J=6,9$ Hz; 3H) e δ_H 1,04 ($J=6,9$ Hz; 3H), atribuídos às metilas C-5' e C-6', respectivamente, acoplada à H-4' (δ_H 2,55; *sept*, $J=6,9$ Hz); os sinais em δ_H 2,18 (*dt*, $J=15,0$ e $9,0$ Hz) e δ_H 2,00 (*dt*, $J=15,0$ e $9,0$ Hz) referentes aos hidrogênios diastereotópicos (Ha-1' e Hb-1') vizinhos ao centro estereogênico C-2; e o multipletto em δ_H 2,62 (2H) atribuído ao H-2' que aparece mais desblindado por de estar próximo a uma carbonila. Por fim, o singletto em δ_H 1,47 (3H) relativo aos hidrogênios H-7' da metila ligada ao carbono-2 do anel pirano.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 22**) foram identificados 20 sinais referentes aos 20 carbonos na estrutura proposta: 12 sinais (entre δ_C 81,3 e δ_C 161,1) atribuídos aos carbonos do esqueleto piranoquinolin-5-ona, com destaque para os sinais em δ_C 161,08 atribuído à carbonila da porção quinolinona (C-5) e em δ_C 29,46 correspondente à metila ligada ao nitrogênio; 6 sinais atribuídos ao substituinte (4-metil-3-oxo)pent-1-il (δ_C =18,3; 18,5; 35,3; 35,4; 41,2; 214,1) onde o valor de δ_C 214,1 corrobora com a atribuição da carbonila cetônica em C-3' e, por fim, um sinal em δ_C 27,6 atribuído ao C-7' da metila. A comparação dos sinais apresentados nos espectros da FCM-1 com os descritos na literatura para este alcaloide (**Tabela 7**) demonstra similaridade entre os valores de deslocamento químicos para ambas as substâncias, confirmando a estrutura proposta.

Os espectros bidimensionais foram utilizados para confirmar as atribuições feitas para a substância FCM-1. A análise do mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (**Figura 23**) mostra o acoplamento, como era esperado para o padrão de substituição no anel pirano, apenas entre os hidrogênios H-3 e H-4, excluindo a possibilidade de hidrogênios adjacentes no mesmo anel. Assim como confirma, também, o padrão relativo de substituição no anel aromático (1,2-dissubstituído) pelos acoplamentos de: H-10 em posição *orto* a H-9 e *meta* a H-8; H-8 em *orto* a H-7/H-9, e *meta* a H-10, e H-7 em *orto* a H-8 e *meta* a H-9.

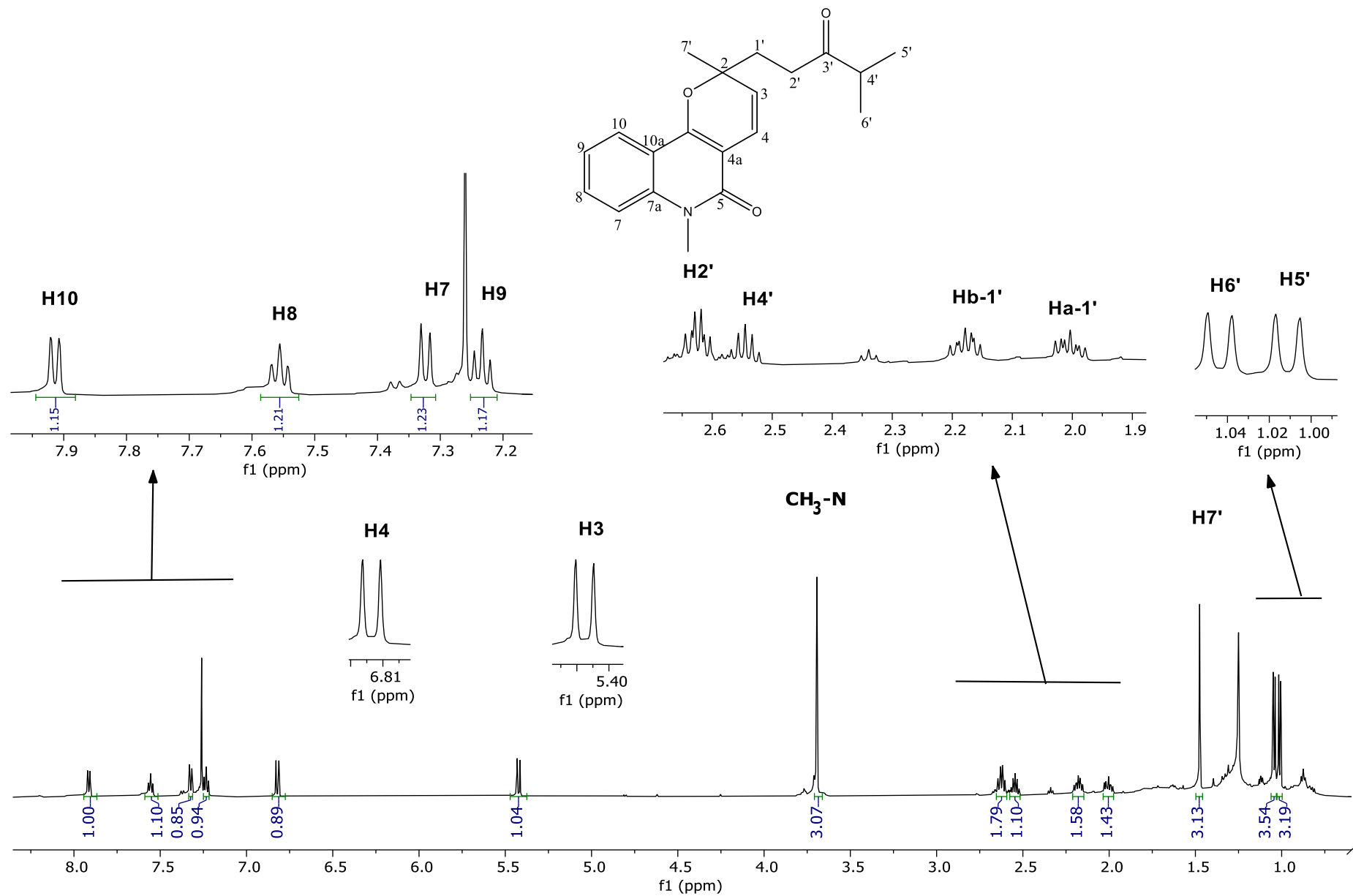


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1

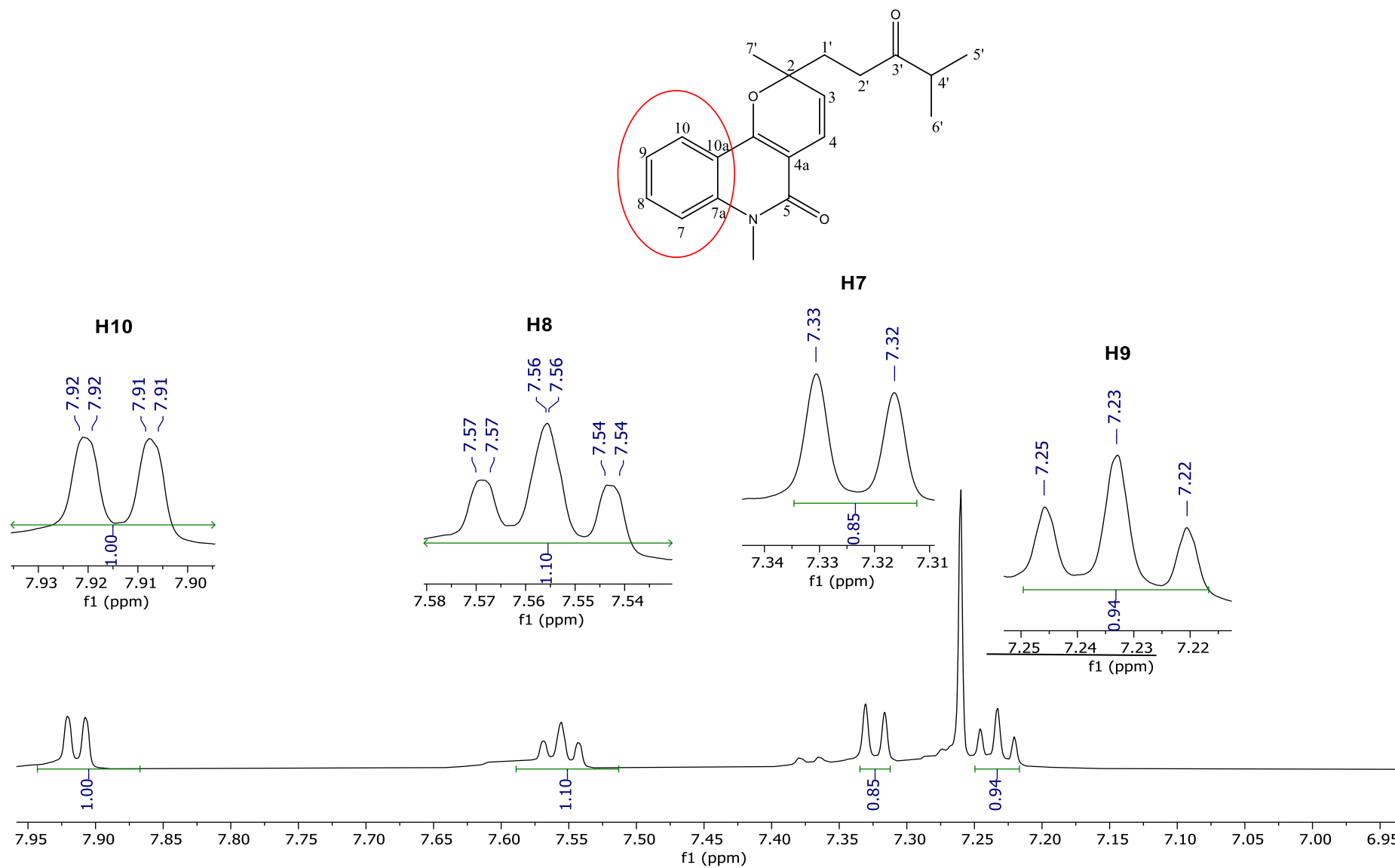


Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1

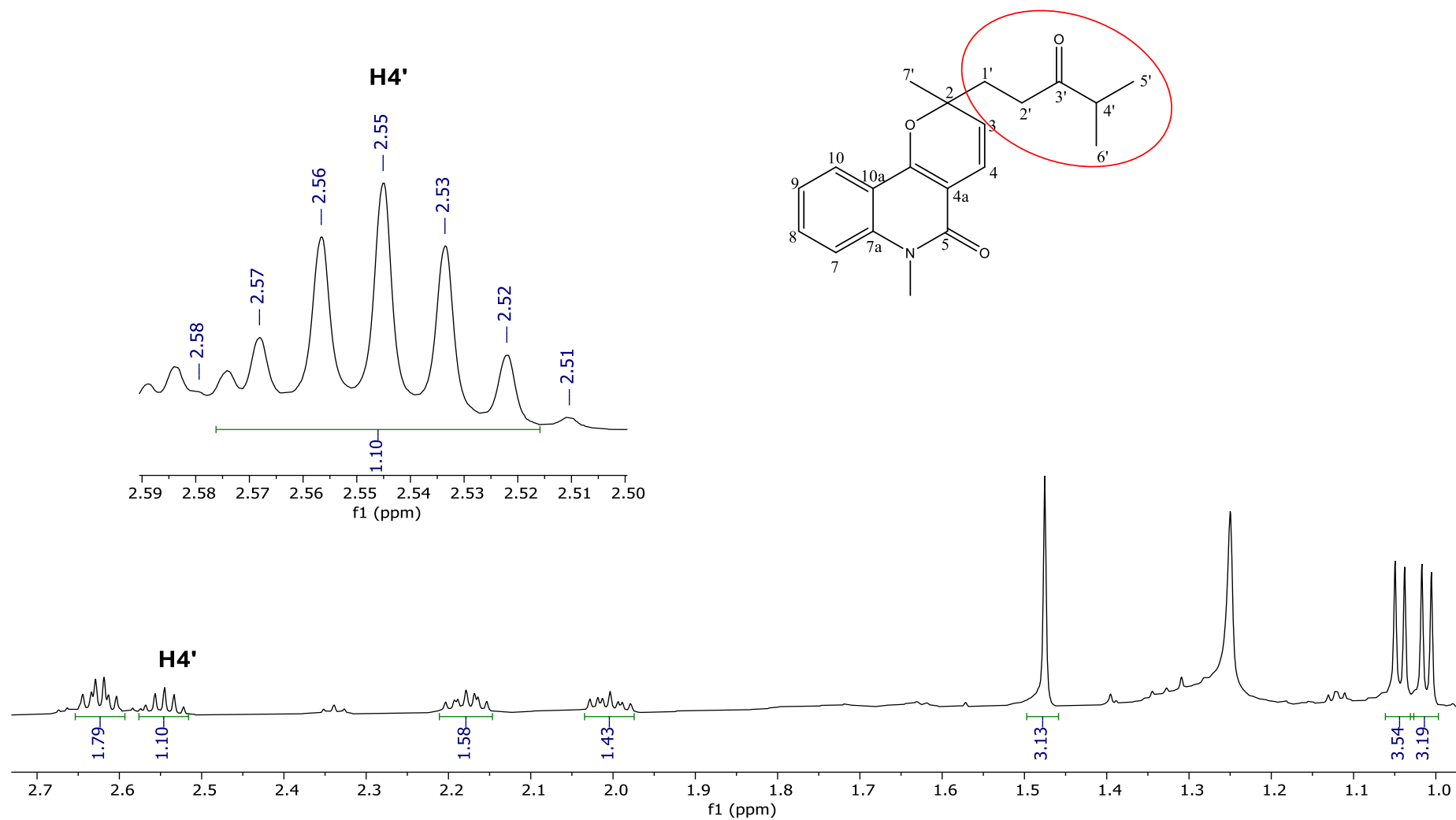


Figura 21 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1

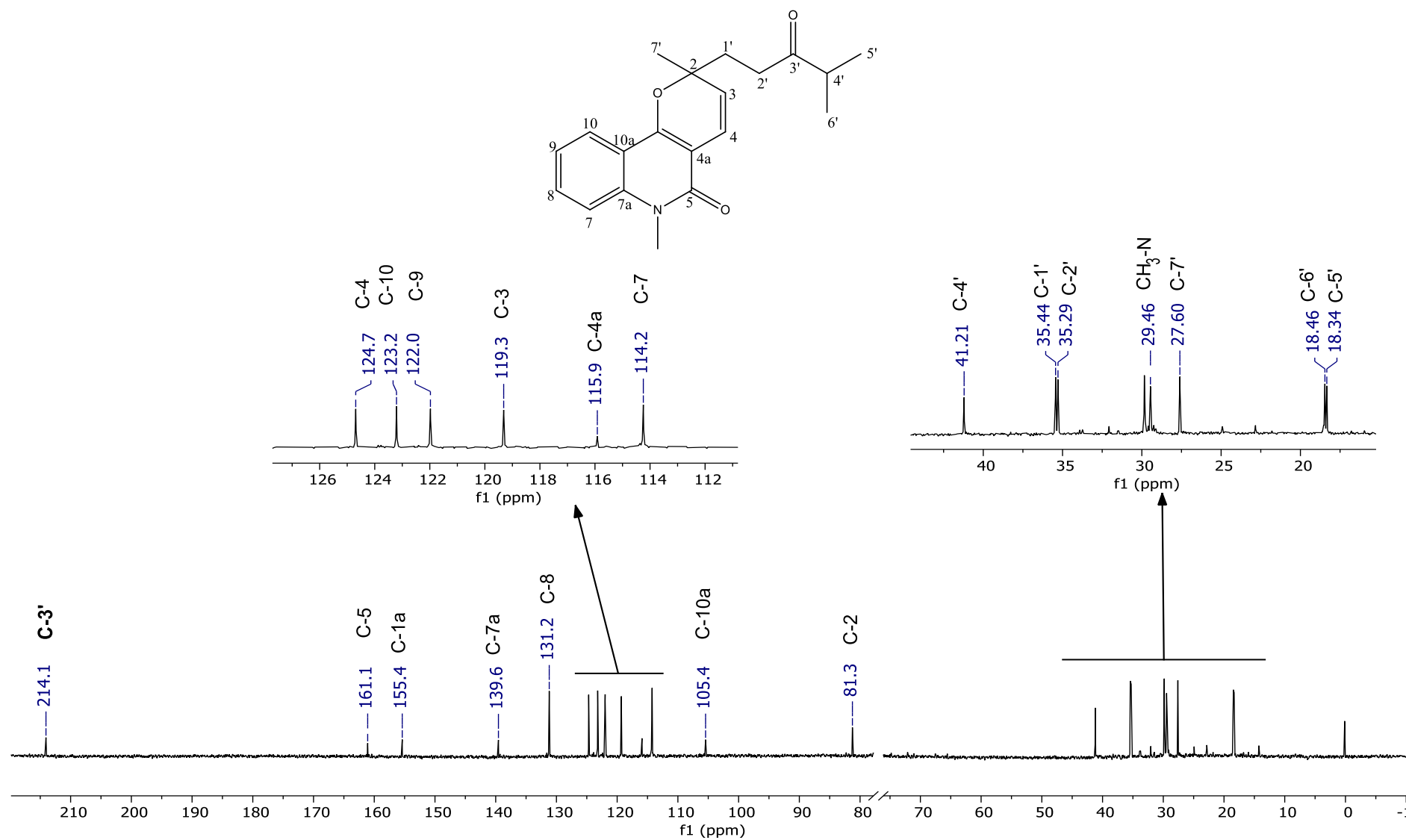


Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1

Tabela 7- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para o composto FCM-1 (CDCl_3 ; 600 e 150 MHz) em comparação com os dados da literatura para huajiaosimulina*.

Posição/Grupo	FCM-1		huajiaosimulina
	δ_{H} mult. (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J/Hz)
1a	-	155,4	
2	-	81,3	
3	5,42 <i>d</i> (10,2)	119,3	5,43 <i>d</i> (10,2)
4	6,82 <i>d</i> (10,2)	124,7	6,82 <i>d</i> (10,2)
4a	-	115,9	
5	-	161,1	
7	7,32 <i>dl</i> (7,8)	114,3	7,32 <i>d</i> (7,8)
7a	-	139,6	
8	7,56 <i>tl</i> (7,8)	131,3	7,56 <i>t</i> (7,8)
9	7,23 <i>t</i> (7,8)	122,0	7,23 <i>t</i> (7,8)
10	7,91 <i>dl</i> (7,8)	123,2	7,91 <i>d</i> (7,8)
10a	-	105,4	
1'	a -2,00 <i>dt</i> (15,0; 9,0)	35,4	2,01 <i>dt</i> (14,4; 7,4)
	b- 2,18 <i>dt</i> (15,0; 9,0)		2,18 <i>dt</i> (14,4; 7,4)
2'	2,65 – 2,60 <i>m</i>	35,3	2,63 <i>t</i> (7,4)
3'	-	214,1	
4'	2,55 <i>sept</i> (6,9)	41,2	2,55 <i>sept</i> (6,9)
5'	1,01 <i>d</i> (6,9)	18,3	1,02 <i>d</i> (6,9)
6'	1,04 <i>d</i> (6,9)	18,5	1,05 <i>d</i> (6,9)
7'	1,48 <i>s</i>	27,6	1,48 <i>s</i>
CH₃-N	3,69 <i>s</i>	29,5	3,69 <i>s</i>

*Dados obtidos a 300 MHz, em CDCl_3

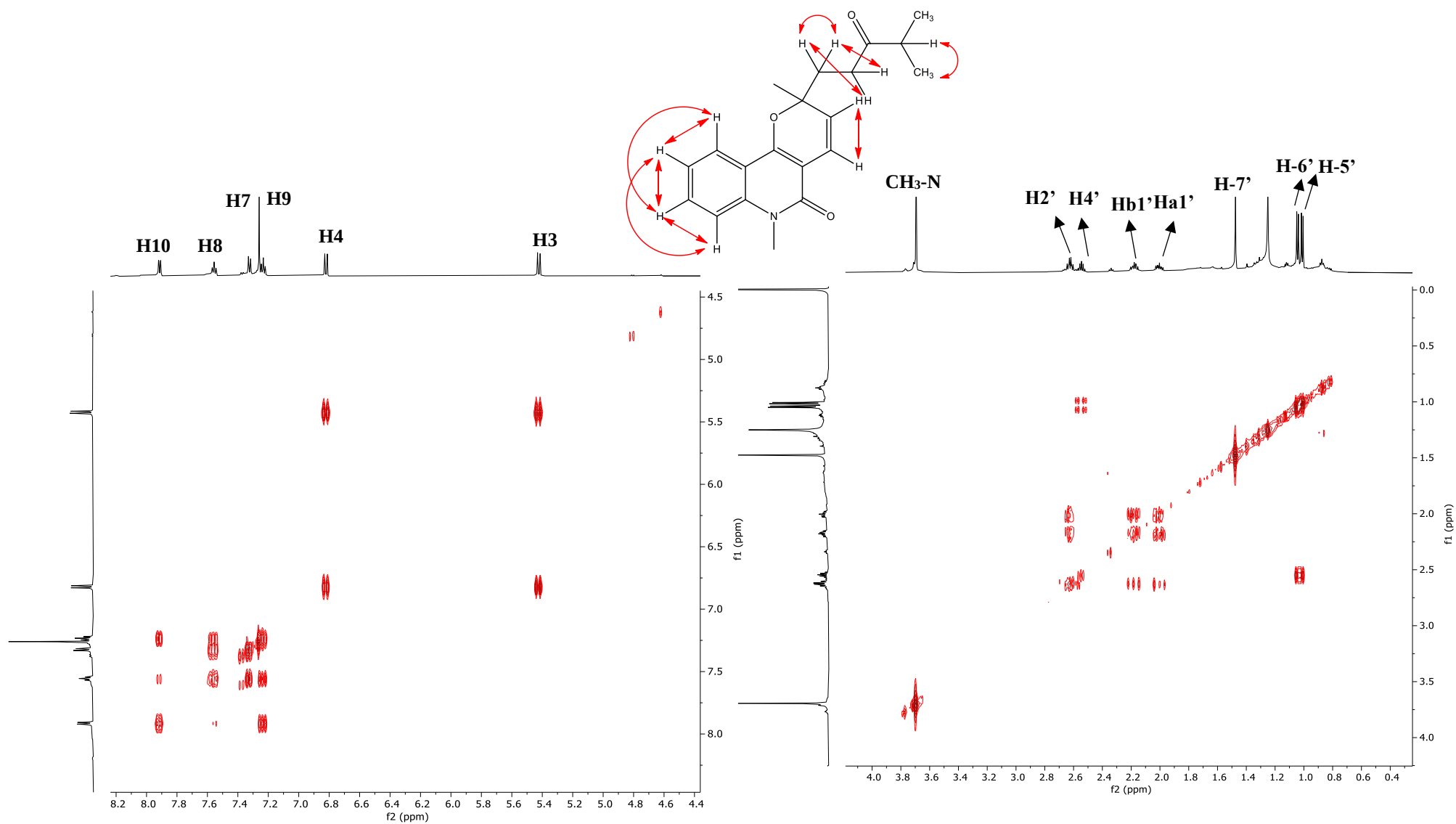


Figura 23 - Expansões do mapa de contornos COSY-¹H, ¹H (600 MHz em CDCl₃) da substância FCM-1 e principais correlações observadas.

O mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (**Figura 24**) mostra que os hidrogênios em δ_{H} 2,18 e δ_{H} 2,00 estão ligados no mesmo carbono, portanto, são diasterotópicos e vizinhos a um centro de quiralidade que, no caso, corresponde ao C-2. As principais correlações no COSY- ^1H , ^1H que confirmam a estrutura do substituinte (4-metil-3-oxo)pent-1-il são as do grupo isopropil ligado à carbonila, pelo acoplamento entre as duas metilas ($\text{H}_3\text{C}-5'/\text{H}_3\text{C}-6'$) e H-4', resultando em duplete, para cada sinal das metilas, e desdobrando o sinal de H-4' em um septeto, como esperado. Há, também, a indicação de acoplamento entre o H-2' com os hidrogênios diasterotópicos (H-1'a e H-1'b).

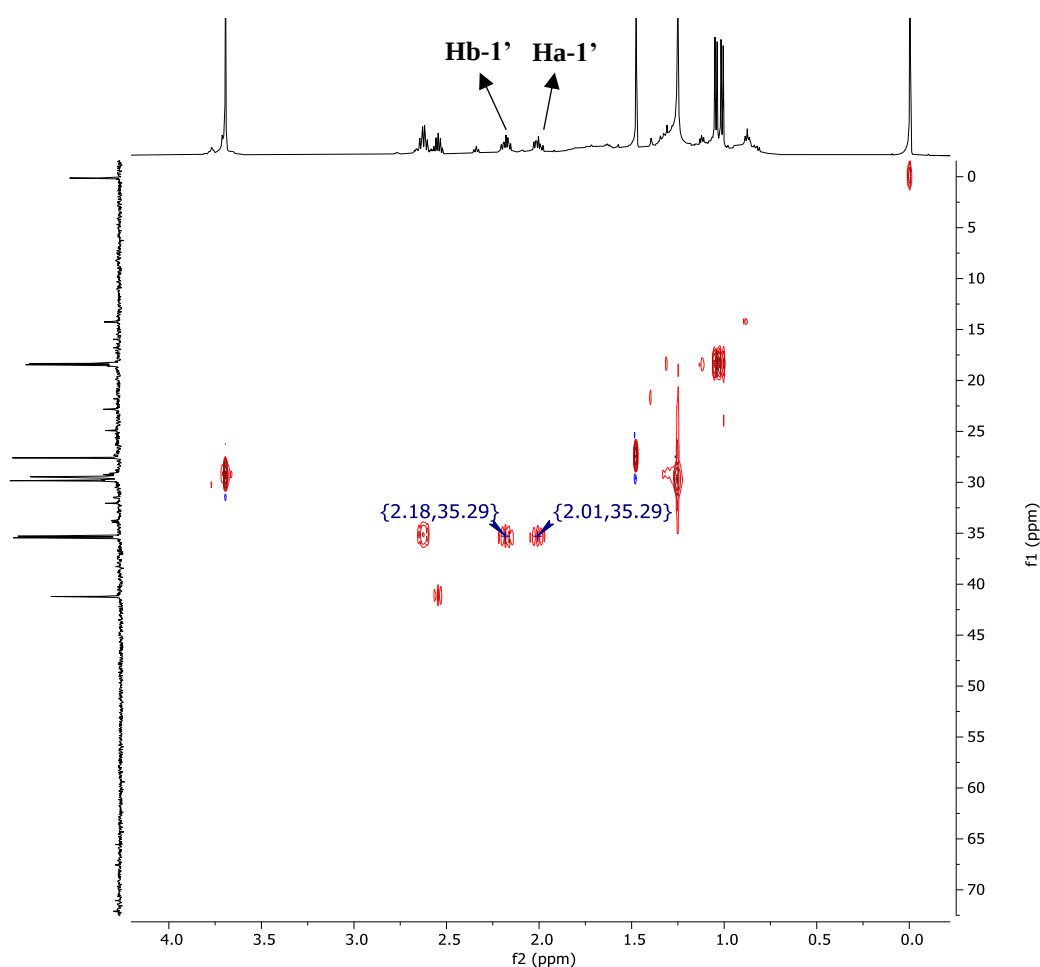


Figura 24 - Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-1.

Na análise do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (**Figura 25**) foram observadas algumas correlações que permitiram confirmar tanto a estrutura do esqueleto piranoquinolin-5-ona quanto a estrutura e posição dos substituintes, tais como a correlação de H-4 com o carbono da carbonila do sistema quinolinona e, também, com o carbono sp^2 (δ 155,4) diretamente ligado ao oxigênio no anel pirano. H-3, por sua vez, correlaciona com C-2 ($^2J_{\text{CH}}$) e, a três ligações,

com C-1' do 4-metil-3-oxopent-1-il, confirmando a posição deste substituinte. A estrutura desse substituinte é confirmada pelas correlações entre os hidrogênios das metilas 5' e 6' e o carbono carbonílico (C-3'), assim como as correlações entre C-3' e H-2' ($^2J_{CH}$) e H-1'a/H-1'b ($^3J_{CH}$). As correlações de H-1'a/H-1'b com C-2 ($^2J_{CH}$) e C-3 ($^3J_{CH}$), bem como a que se estabelece entre H-7' e C-2 ($^2J_{CH}$), reforçam a localização dos grupos substituintes em C-2.

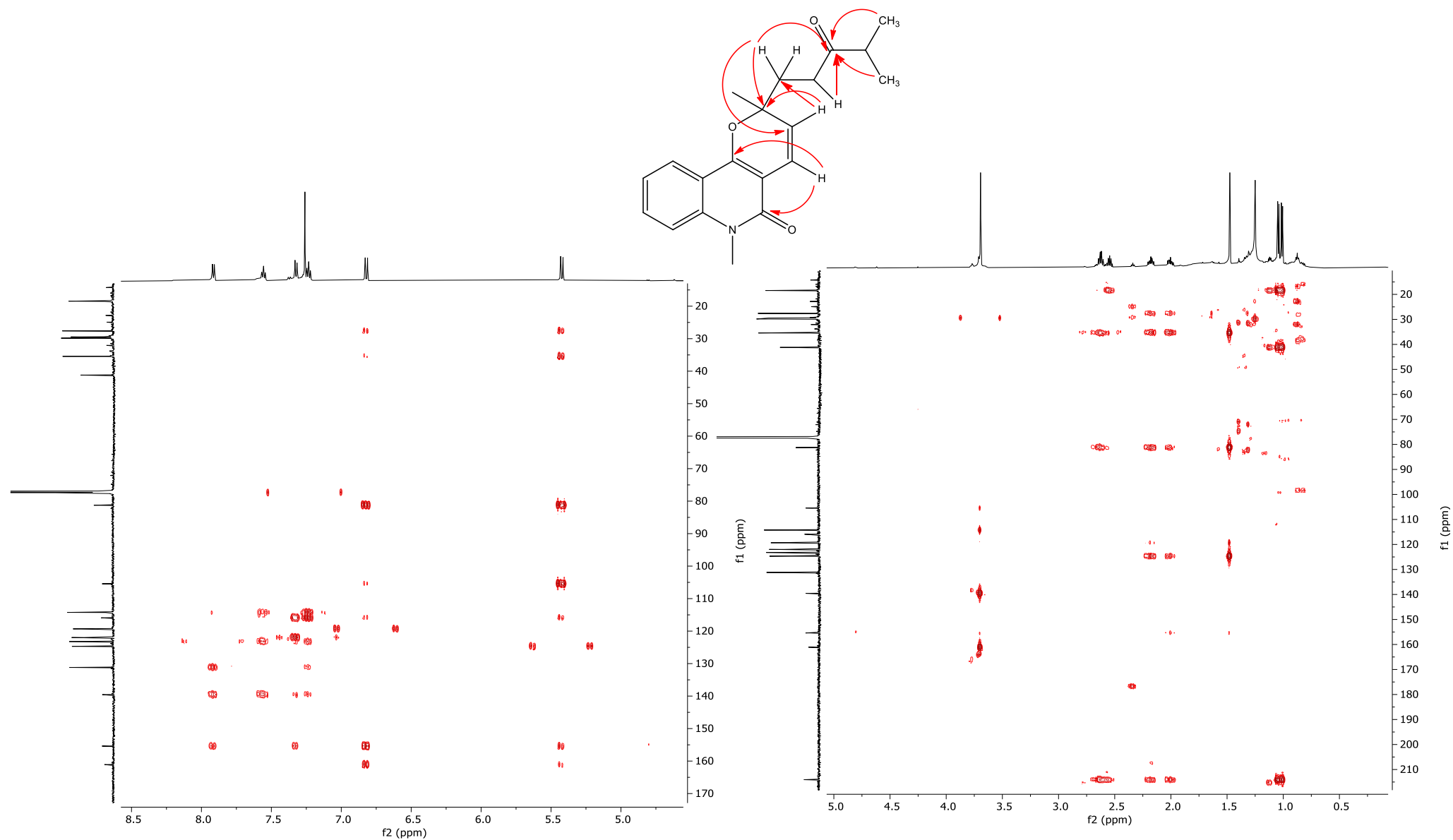


Figura 25 - Expansões do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 MHz; 150 MHz em CDCl_3) da substância FCM-1 e as principais correlações na sua estrutura

A análise do espectro de massas gerado por ionização por elétrons (IE) (**Figura 26**) também confirma as atribuições feitas para a FCM-1. O pico do íon molecular com $m/z = 325$ é coerente com a fórmula molecular $C_{20}H_{23}NO_3$ e o principal fragmento ($m/z = 226$) está de acordo com o padrão de fragmentação da estrutura apresentada para a substância FCM-1 (MCLAUGHLIN e HSUNG, 2001). A huajiasimulina foi isolada pela primeira vez da espécie *Zanthoxylum simulans* (Rutaceae) (WU e CHEN, 1993) e não há relatos na literatura para seu isolamento e/ou identificação dentro do gênero *Conchocarpus*. Ensaios biológicos realizados por Chen e colaboradores (1994) mostraram que esta substância apresenta um perfil de citotoxicidade seletivo e considerável contra células de câncer de mama receptor-positivo de estrogênio ZR-75-1.

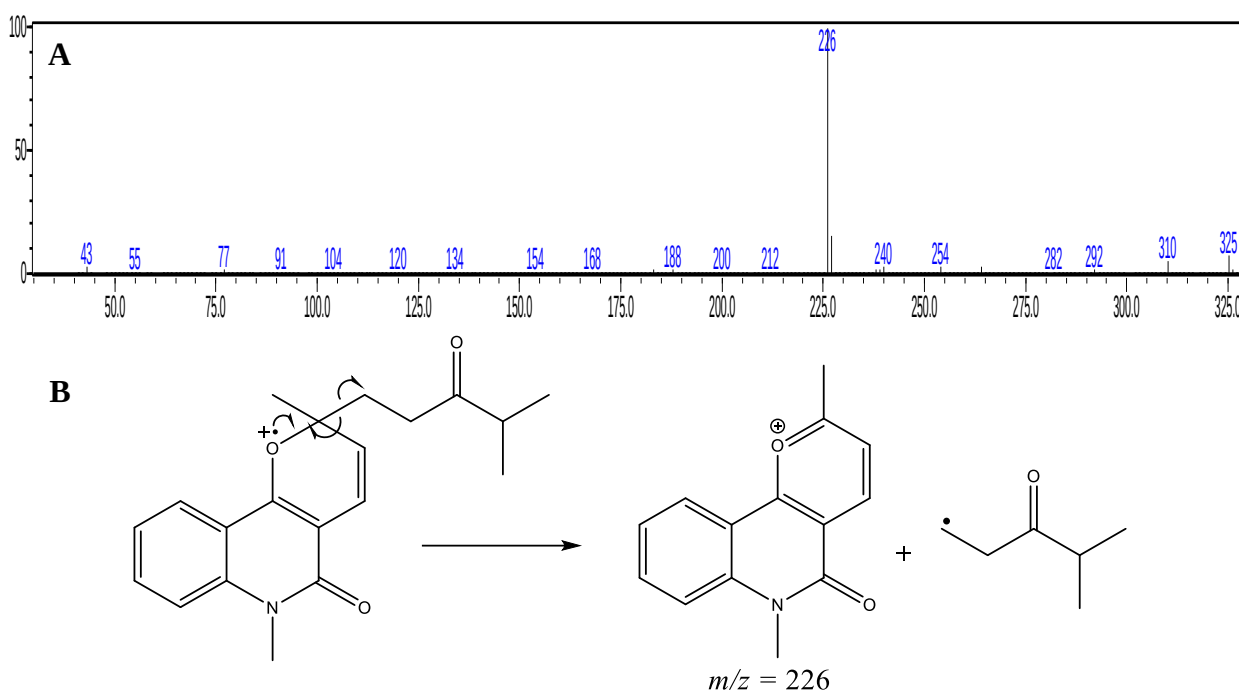


Figura 26 – (A) Espectro de massas gerado por IE e (B) principal fragmentação da substância FCM-1.

6.2.2. Substância FCM-2: 2-[2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona (mastigoforona)

A substância FCM-2 foi isolada na forma de um sólido amorfo castanho cuja análise em CCD, revelando em reagente de Dragendorff, indicou tratar-se de um alcaloide. Seus dados de espectro de RMN 1H e ^{13}C apresentaram grande semelhança com os correspondentes espectros da substância FCM-1. A sobreposição dos dois espectros de RMN de 1H (**Figura 27**) mostraram que houve uma relativa semelhança de todos os sinais de na região de δ_H 8,20 a δ_H 5,30 de

ambas substâncias, e dos sinais em δ_H 3,69 e δ_H 1,48 referentes às metilas nas posições 6 e 2, respectivamente, indicando que a substância FCM-2 também apresenta um esqueleto piranoquinolin-5-ona, com o mesmo padrão de substituição da substância FCM-1. Contudo, foi observado duplicidade de alguns sinais relativos ao esqueleto piranoquinolin-5-ona em FCM-2, indicando uma possível mistura de diastereoisômeros. Analisando os demais dados do espectro de RMN de 1H (**Figura 28**; **Figura 29**; **Figura 30**), significativa diferença foi observada nos sinais correspondentes aos hidrogênios alifáticos, δ_H 4,00 a δ_H 1,20, indicando a presença de um substituinte isoprênico em C-2 diferente daquele presente em FCM-1. Foram observados dois singletos em δ_H 1,26 (3H) e δ_H 1,28 (3H) típicos de metila, e sinal em δ_H 3,84 ($dd - J=14,6; 2,0$ Hz, 1H), δ_H 1,78-1,82 (m , 2H) e δ_H 2,08-2,13 (m , 2H) como componentes do segundo substituinte.

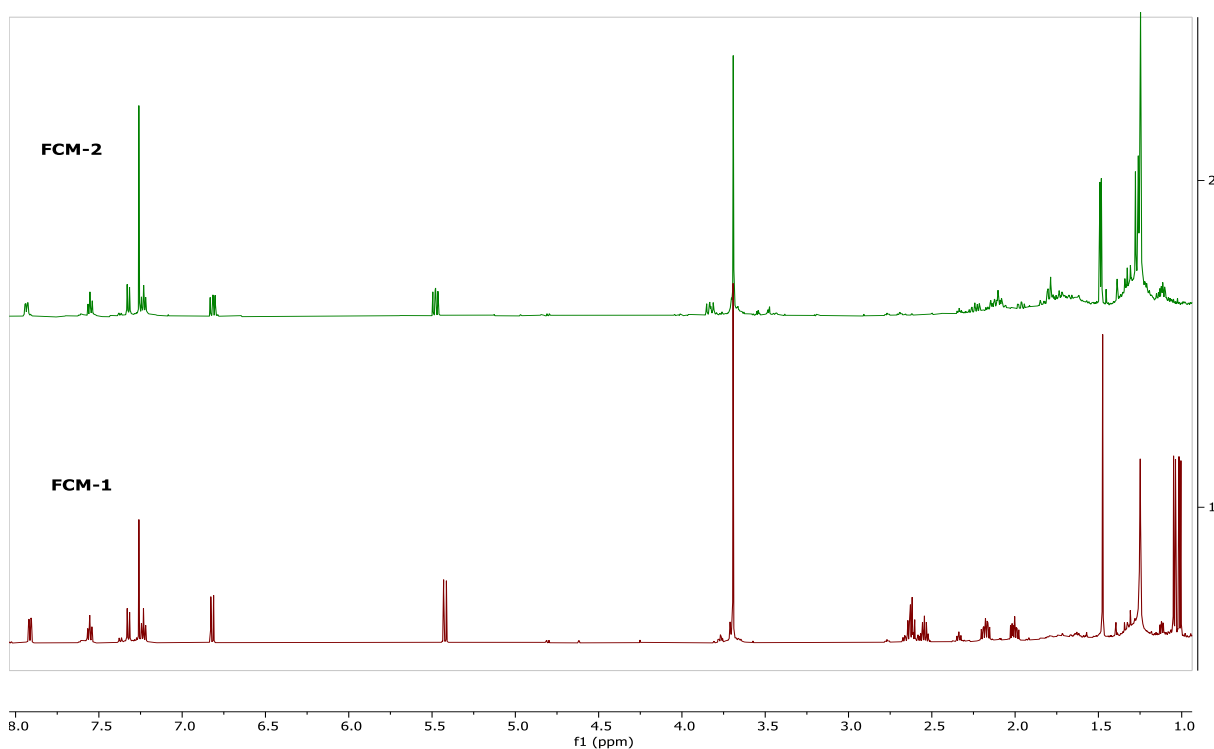


Figura 27 - Sobreposição dos espectros de RMN de 1H das substâncias FCM-1 e FCM-2.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 31**) apresentou 12 sinais com deslocamentos químicos semelhantes aos da substância FCM-1 referentes aos carbonos do esqueleto piranoquinolin-5-ona, comuns às duas substâncias, neste também foi observado a duplicidade de alguns sinais, reforçando a proposição de uma mistura de diastereoisômeros para a fração FCM-2. Os demais sinais ($\delta_C = 25,5; 26,5; 28,3; 39,6; 73,0; 74,3$) foram atribuídos ao

substituinte ligado em C-2. Comparando estes sinais com os do grupo isoprênico em FCM-1, foi observado a ausência do sinal da carbonila cetônica (δ_C 214) e o surgimento de dois sinais em δ_C 74,3 e δ_C 73,0, característicos de carbonos ligados a oxigênio. Também foi observada a mudança na multiplicidade dos sinais das metilas (de dupletos para singletos) e a ausência do sinal de H-4' (δ_H 2,55 *sept*, $J = 6,9$ Hz, 1H), em contrapartida, é observado um novo sinal em δ_H 3,84 (*dd*, $J = 14,6; 2,1$ Hz). Estas observações levaram à proposição da formação de epóxido entre C-3' e C-4', caracterizando o grupo substituinte como 2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil.

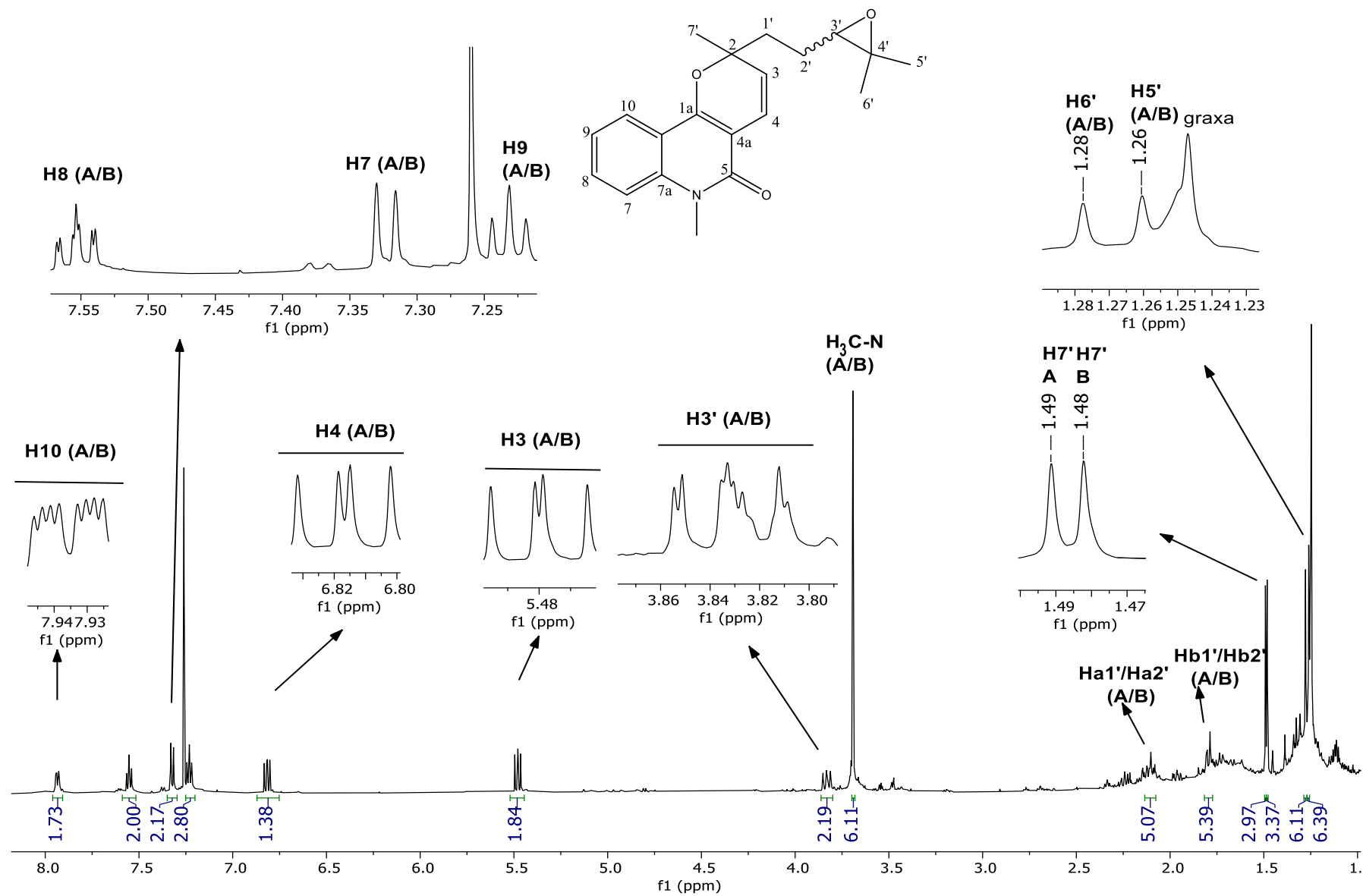


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.

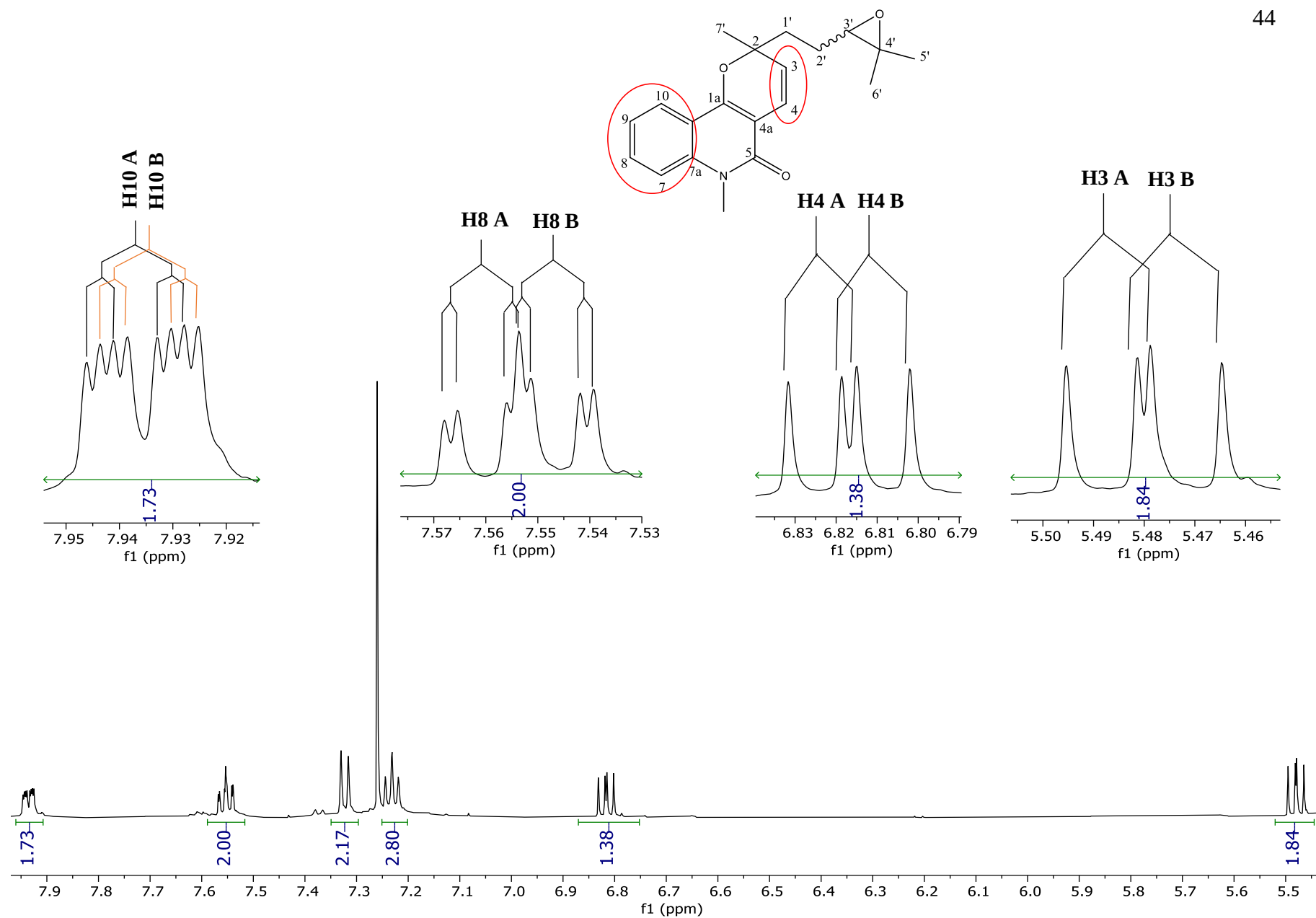


Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.

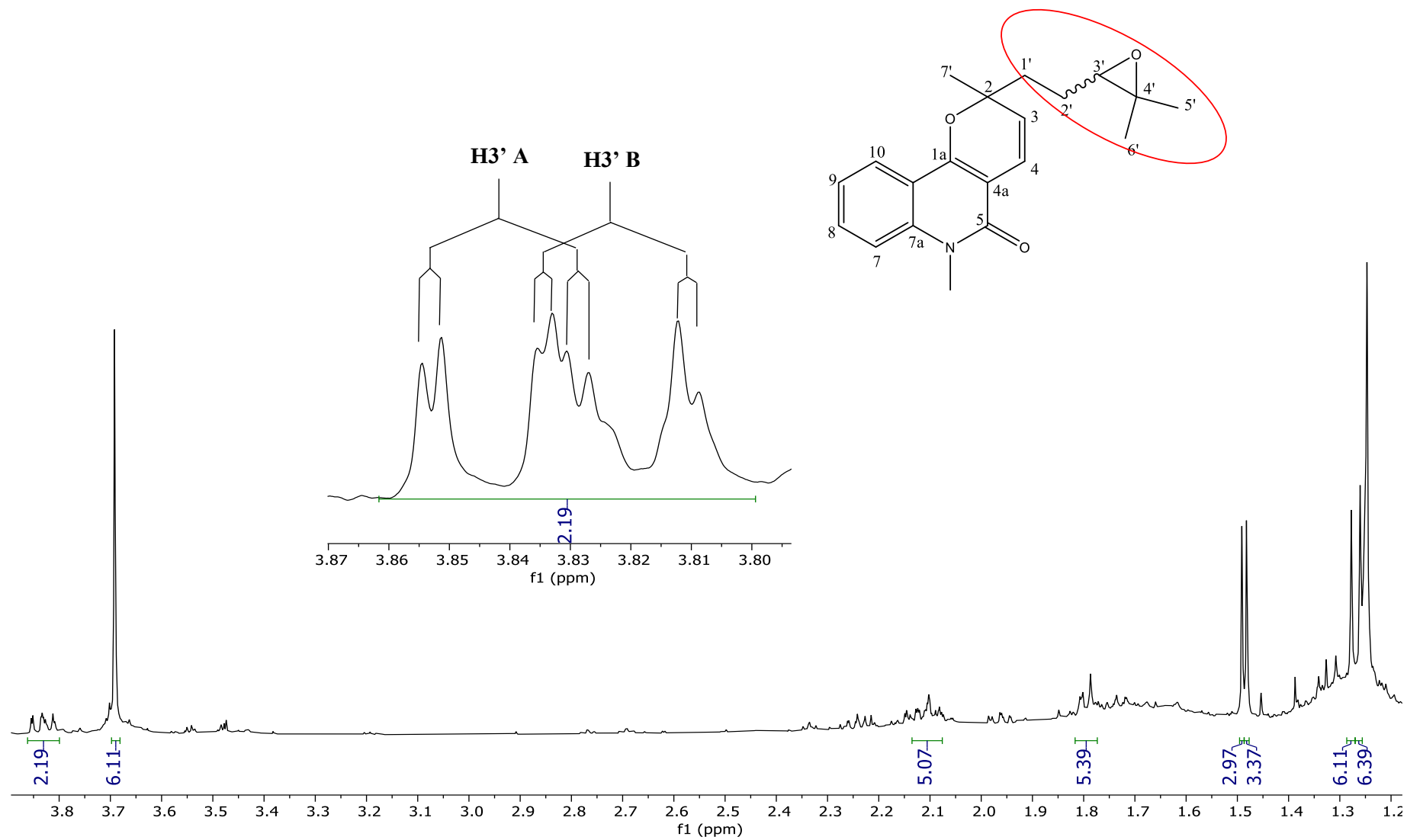


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz em CDCl_3) da substância FCM-2.

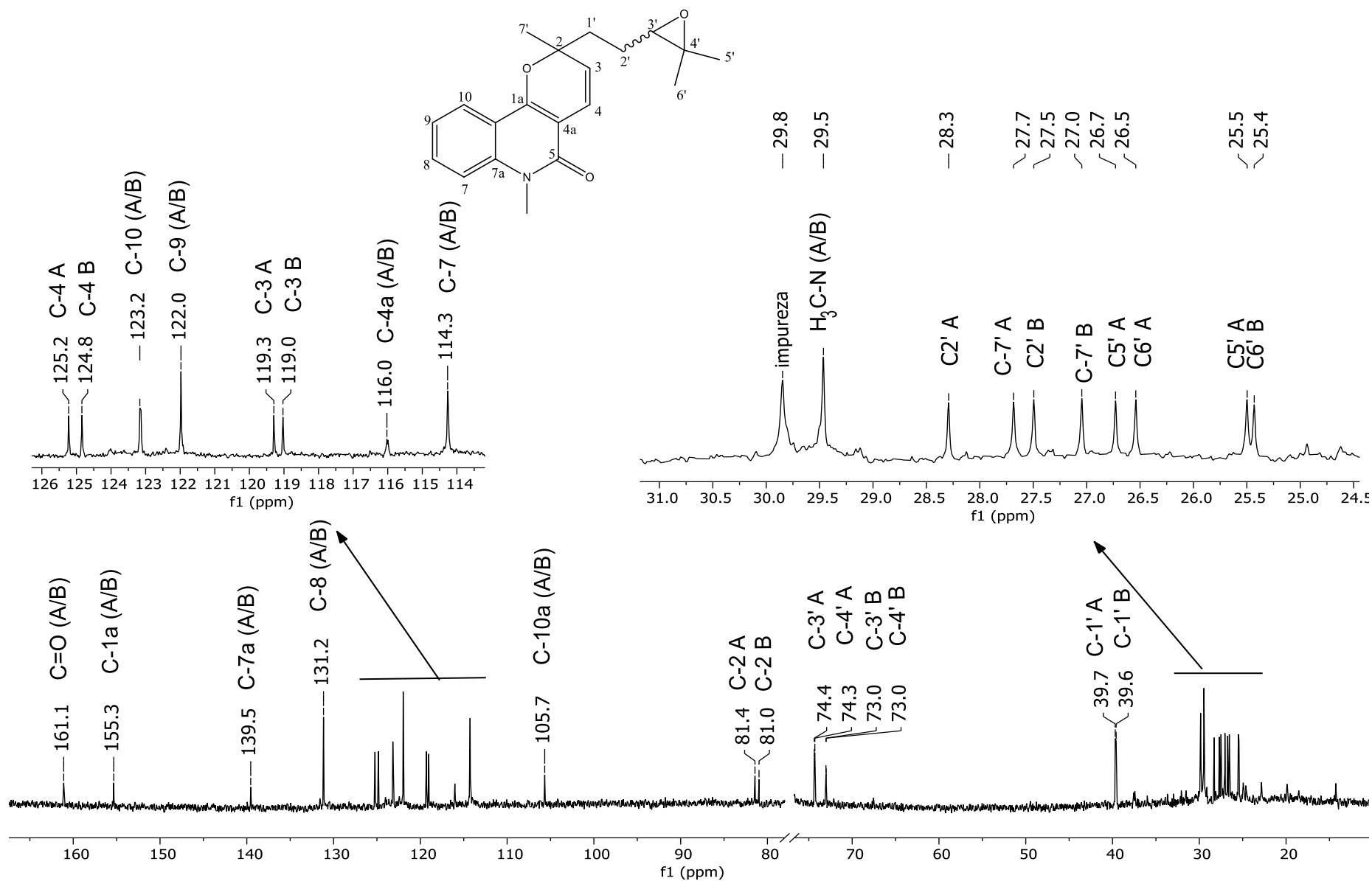


Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³C (150 MHz, em CDCl₃) da substância FCM-2.

O mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (**Figura 32**) auxiliou nas atribuições dos respectivos sinais no grupo 2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil. Este mostra correlação do sinal δ_{H} 3,84 com δ_{C} 74,4 condizente com o H-C-3'; não foi observado correlações com o sinal em δ_{C} 73,0 de modo que este foi atribuído a C-4'; os sinais δ_{H} 1,26 e δ_{H} 1,28 foram atribuídos às metilas C-5' e C-6', respectivamente. Os sinais δ_{H} 1,78-1,82 (*m*, 2H) e δ_{H} 2,08-2,13 (*m*, 2H) apresentaram correlação simultânea com δ_{C} 28,3 (C-2') e δ_{C} 39,7 (C-1') indicando dois pares de hidrogênios diastereotópicos, em conformidade com o que era esperado para os hidrogênios em C-1' e C-2', ambos vizinhos a centros quirais (C-2 e C-3'), respectivamente. As demais correlações foram as mesmas observadas para a substância FCM-1 referentes ao esqueleto da piranoquinolin-5-ona.

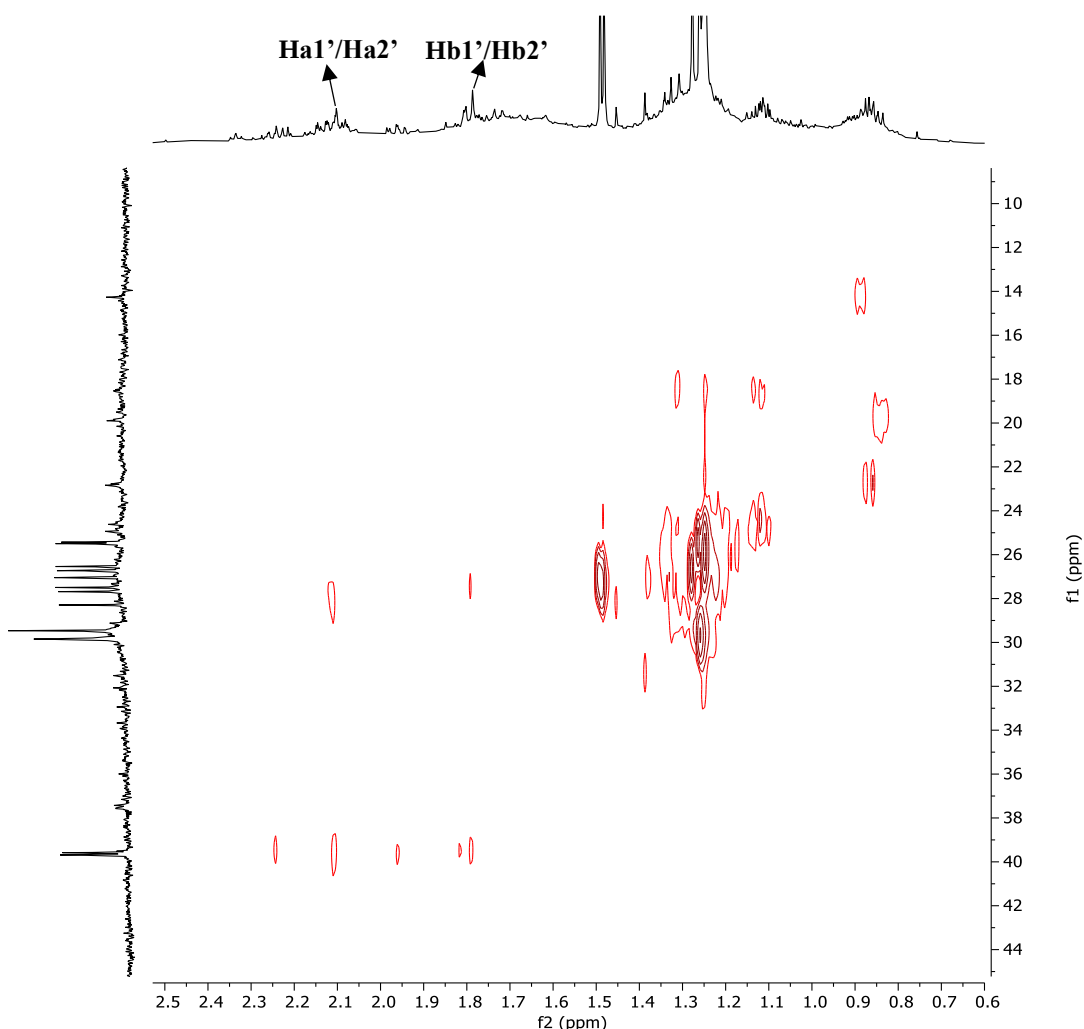


Figura 32- Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 Hz, em CDCl_3) da substância FCM-2

Ambos mapas de contornos COSY- ^1H , ^1H e HMBC- ^1H , ^{13}C (**Figura 33**; **Figura 34**) mostram correlações consistentes com as atribuições propostas para a estrutura da substância

FCM-2, tais como as que indicam o acoplamento de H-3' (δ_H 3,84 dd, $J = 14,6; 2,1$ Hz) apenas com os hidrogênios diastereotópicos em C-2', e o acoplamento entre os dois pares de hidrogênios em C-1' e C-2'. Por sua vez, o mapa HMBC mostrou correlações, a duas e três ligações, de H-3' com C-4' C-5' e C-6', e, também, de H-6' e H-5' com C-3' e C-4', condizentes com a estrutura atribuída ao grupo substituinte 2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil. As correlações de H-1' com C-2 e, também, com a metila H₃C-7' confirmam a posição do substituinte em C-2.

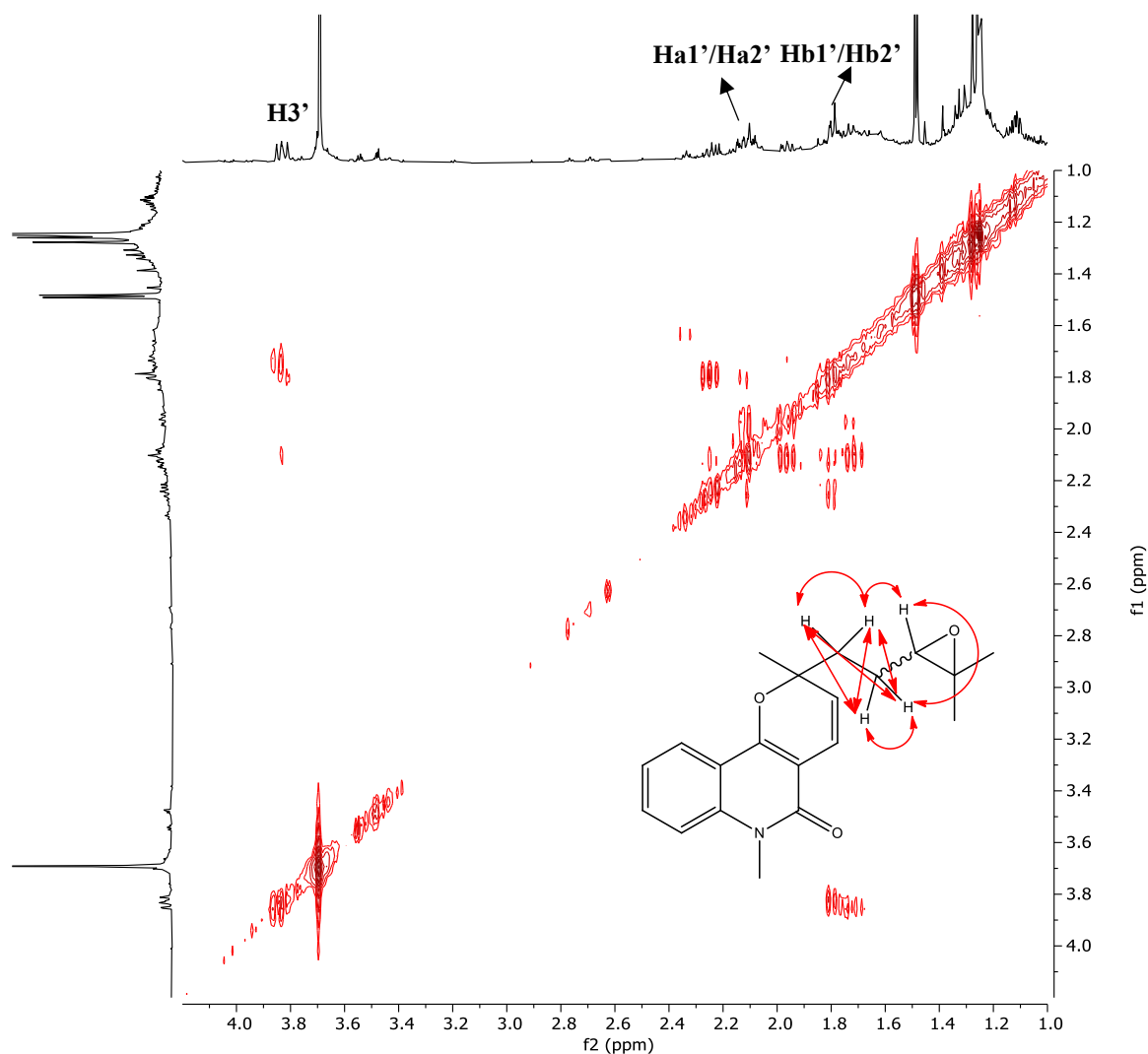


Figura 33 - Expansão do mapa de contornos COSY-¹H,¹H (600 MHz, em CDCl₃) da substância FCM-2 e as principais correlações na sua estrutura.

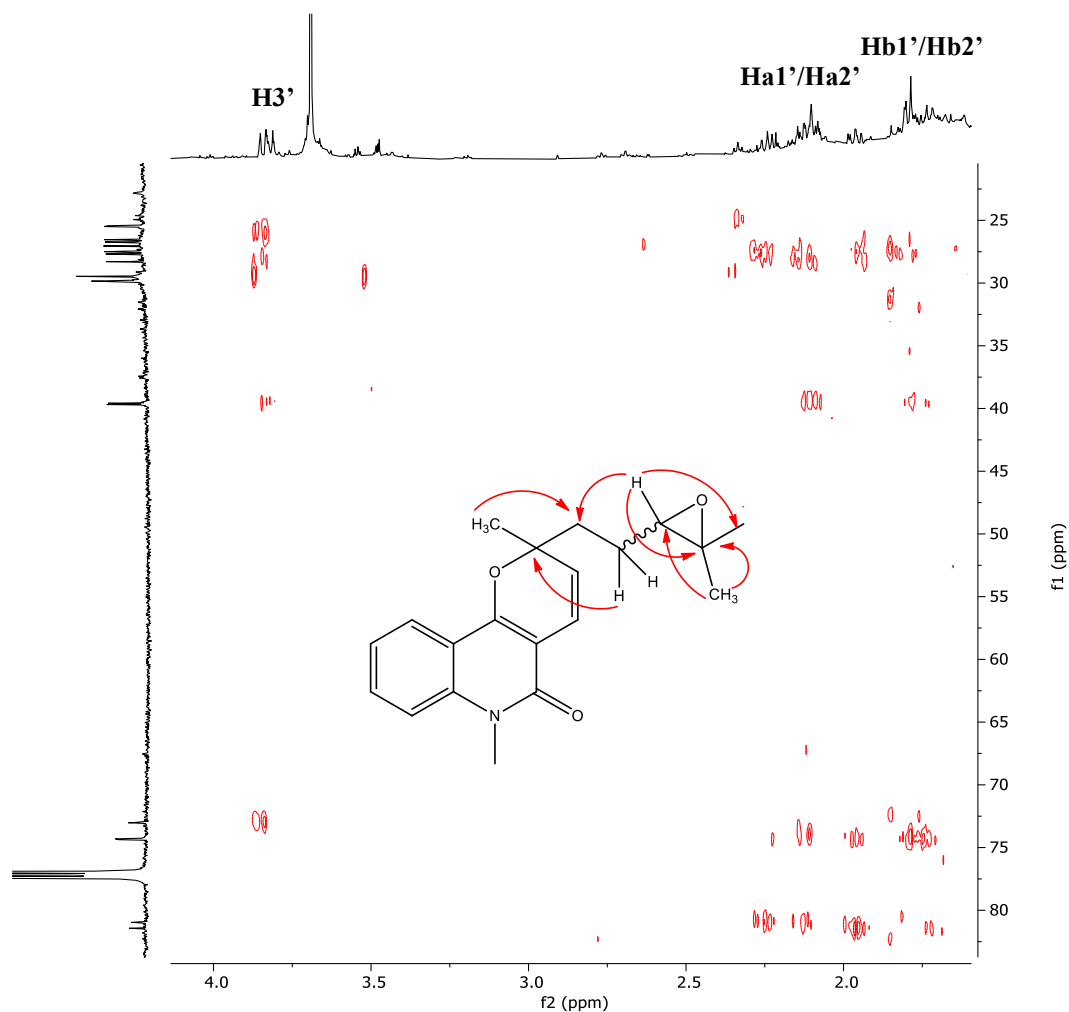


Figura 34 - Expansão do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-2 e as principais correlações na sua estrutura.

O espectro de massas obtido por ionização por elétrons (IE) da substância FCM-2 (**Figura 35**) apresentou o pico do íon molecular em $m/z = 325$, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ estabelecida para a substância FCM-2. O principal fragmento apresentado no espectro de massas ($m/z = 226$) condiz com o padrão de fragmentação (**Figura 36**) apresentado por piranoquinolin-5-onas substituídas em C-2 (MCLAUGHLIN e HSUNG, 2001), assim como as substâncias FCM-1 e FCM-2.

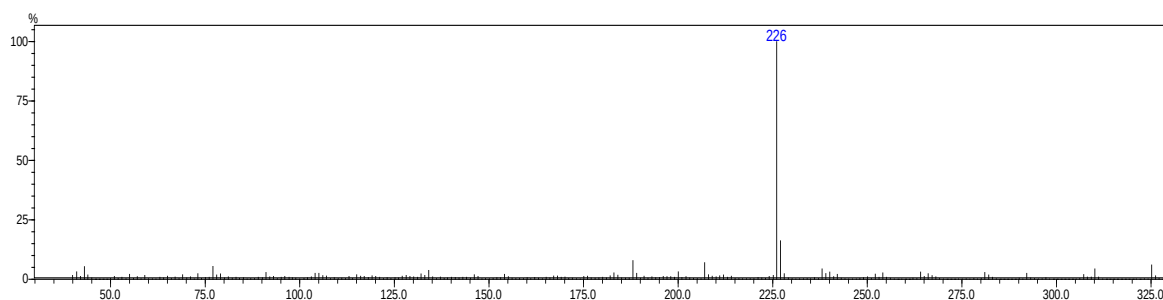


Figura 35 - Espectro de massas obtido por IE da substância FCM-2

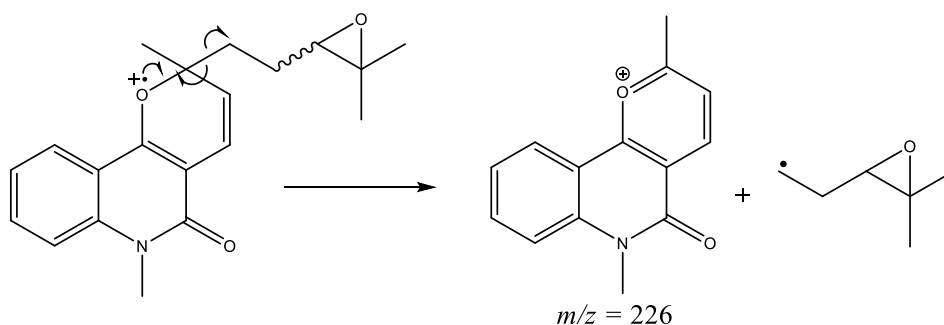


Figura 36 - Principal fragmentação da substância FCM-2 mostrando a formação do pico base em $m/z = 226$.

A análise dos dados espectroscópicos da fração FCM-2, resumidos na **Tabela 8**, permitiu identificá-la como uma mistura dos diastereoisômeros da substância inédita 2-[2-(3,3-dimetiloxiran-2-il)etil]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5*H*-pirano[3,2-*c*]quinolin-5-ona (**Figura 37**), um alcaloide do tipo piranoquinolin-5-ona, a qual denominamos de mastigoforona. Embora estes sejam os primeiros dados descritos para esta substância, alcaloides da mesma classe (*N*-metilhaplamina e *N*-metoxihaplamina) já foram isolados de *Conchocarpus longifolius* (MAFEZOLI *et al.* 2001; FACCHINI, 2005). Esta classe de alcaloides apresenta grande potencial bioativo. Ação antimicrobiana e citotóxica tanto de piranoquinolin-5-onas isoladas de plantas (zantroxissimulina, huajiaosimulina) como, também, de vários derivados sintéticos já foram reportados (DI LIBERTO *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 1994).

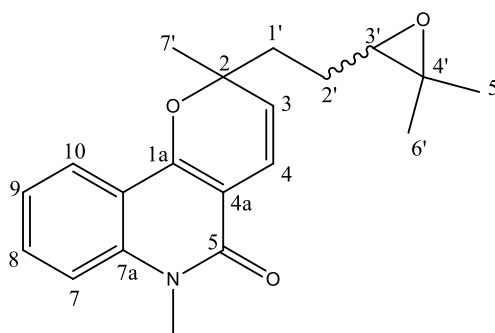


Figura 37 - Fórmula estrutural da substância FCM-2 (mastigoforona).

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D da substância FCM-2.

Posição/ Grupo	Diastereoisômero A		Diastereoisômero B		COSY- ^1H , ^1H	HMBC- ^1H , ^{13}C
	δ_{H} multi. (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} multi. (J/Hz)	δ_{C}		
1a	-	155,3		155,3	---	
2	-	81,4		81,0	---	
3	5,49 <i>d</i> (10,0)	125,2	5,47 <i>d</i> (10,0)	124,8	H-4	C-2; C-7'; C-1'; C-4a; C-5
4	6,82 <i>d</i> (10,0)	119,3	6,81 <i>d</i> (10,0)	119,0	H-3	C-2; C-1a; C-5 C-7'
4a	-	105,7		105,7	---	
5	-	161,1		161,1	---	
7	7,32 <i>d</i> (8,0)	114,3	7,32 <i>d</i> (8,0)	114,3	H-8	C-10a; C-9; C-7a
7a	-	139,6		139,6	---	
8	7,56 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	131,2	7,55 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	131,2	H-7; H-9; H-10	C-7; C-10; C-7a
9	7,23 <i>t</i> (8,0)	122,0	7,23 <i>t</i> (8,0)	122,0	H-8; H-10	C-7; C-10a; C-10
10	7,94 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	123,2	7,93 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	123,2	H-9; H-8	C-8, C-7a; C-1a
10a	-	116,0		116,0	---	
1'	1,78-1,82/ 2,08-2,13 <i>m</i>	39,7	1,78-1,82/ 2,08-2,13 <i>m</i>	39,6	Ha-2' Hb-2'; H-1'	C-2'; C-7'
2'	1,78-1,82/ 2,08-2,13 <i>m</i>	28,3	1,78-1,82/ 2,08-2,13 <i>m</i>	27,5	Ha-1'; Hb-1'; H-2'; H-3'	C-2'; C-7'
3'	3,84 <i>dd</i> (14,6; 2,0)	74,4	3,82 <i>dd</i> (14,6; 2,2)	74,3	Ha-2'; Hb-2'	C-1'; C-4'; C-6'
4'	-	73,0		73,0	---	
5'	1,26 <i>s</i>	26,5	1,26 <i>s</i>	25,4	---	C-3'; C-4'
6'	1,28 <i>s</i>	26,3	1,28 <i>s</i>	25,5	---	C-3'; C-4'
7'	1,49 <i>s</i>	27,7	1,48 <i>s</i>	27,1	---	C-1'; C-2; C-3
CH₃-N	3,69 <i>s</i>	29,5	3,69 <i>s</i>	29,5	---	C-7'; C-7a; C-5

6.2.3. Substância FCM-3: 2-[(3-acetoxi-4-hidroxi-4-metil)pent-1-il]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona (mastigoforina)

A substância FCM-3, foi obtida a partir da purificação por CLAE da fração AFCM-6.4.1 (**Figura 15**, p. 28). Apresentou aspecto de um sólido amorfo castanho e resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff, na análise por CCD, indicando também se tratar de um alcaloide. Seus dados de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C também apresentaram semelhanças com os das substâncias FCM-1 e FCM-2. A comparação da FCM-3 com FCM-1, pela sobreposição de seus respectivos espectros de RMN de ^1H (**Figura 38**), mostrou relativa equivalência entre os deslocamentos químicos atribuídos ao esqueleto piranoquinolin-5-ona, e também dos sinais de metila em δ_{H} 3,69 e δ_{H} 1,46, de modo a constatar que FCM-3 pertence à mesma classe de alcaloides das substâncias FCM-1 e FCM-2, inclusive com o mesmo padrão de substituição.

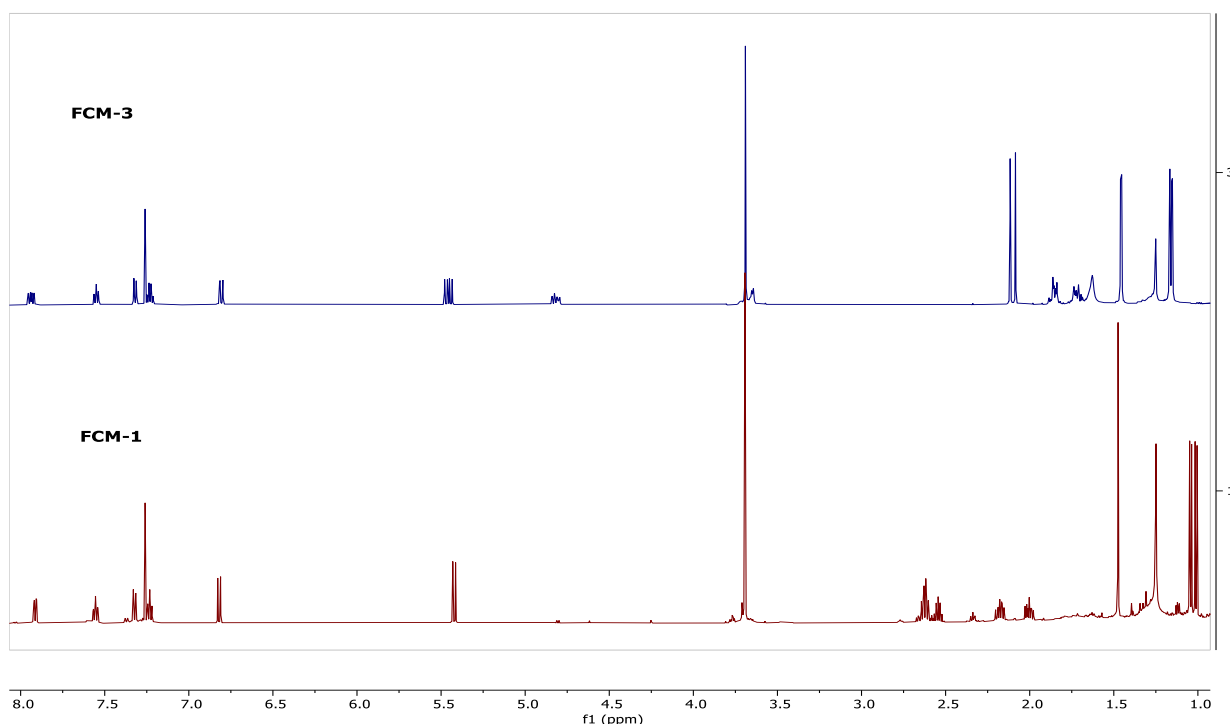


Figura 38 - Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das substâncias FCM-3 e FCM-1.

Assim como a substância FCM-2, foi observado a duplicidade de alguns dos sinais de hidrogênio, indicando uma possível mistura de diastereoisômeros para fração FCM-3 também. Os demais sinais observados no espectro de RMN de ^1H (**Figura 39**; **Figura 40**; **Figura 41**), na região de hidrogênios alifáticos, foram atribuídos ao segundo substituinte em C-2. Foram

observados sinais em δ_H 1,87 – 1,83 (*m*, 2H) e δ_H 1,76 – 1,69 (*m*, 2H), δ_H 4,85 – 4,79 (*m*, 1H), e sinais típicos de metilas em δ_H 2,12 (3 H), δ_H 2,08 (3 H), δ_H 1,18 (3 H), δ_H 1,17 (3 H), δ_H 1,16 (3 H) e 1,15 (3 H).

A determinação da estrutura deste substituinte foi feita com base na associação dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 42**) com os respectivos sinais de hidrogênio a partir das correlações apresentadas no mapa de contornos HSQC- 1H , ^{13}C (**Figura 43**). Foram observadas correlações do sinal em δ_C 38,1 com os sinais em δ_H 1,87-1,83 (*m*, 2H) e δ_H 1,76-1,69 (2H), e de δ_C 24,3 com estes mesmos sinais, indicando que são carbonos com hidrogênios diastereotópicos, e correlação apenas do sinal em δ_H 4,85 – 4,79 (1H) com δ_C 79,9 indicando um grupo oximetínico. Estes dados, juntamente com os sinais de metilas entre δ_H 1,18 e δ_H 1,15 e de carbono ligado a oxigênio (δ 72,6), apontaram relativa semelhança com a estrutura do substituinte isoprênico da FCM-2 (**Figura 37**- p. 51) um grupo isohexanil com substituintes oxigenados em C-3' e C-4'.

Os sinais em δ_H 1,87-1,83, δ_H 1,76-1,69 foram, então, atribuídos a (Ha/Hb)-C1' e (Ha/Hb)-C2', δ_H 4,85 – 4,79 atribuído a H-C3', e os sinais entre δ_H 1,18 e δ_H 1,15 atribuídos às metilas H₃-C5' e H₃-C6', respectivamente. Os sinais destas metilas aparecem duplicados em função da mistura de estereoisômeros que levam a uma pequena diferença nos seus valores de deslocamentos químicos. Os sinais de carbonila (δ_C 171,3) e de metila em δ_H 2,12, sugeriram a presença de grupo acetoxi (ALBERNAZ *et al.*, 2012) na estrutura do substituinte, e a ausência de correlação de sinal de hidrogênio em C-4', atrelado ao seu valor de deslocamento químico, indicaram uma possível hidroxila nesta posição, embora não apareça o sinal característico no espectro, em decorrência da troca com solvente delterado (CDCl₃). Estas observações culminaram na atribuição do grupo (3-acetoxi-4-hidroxi-4-metil)pent-1-il para o substituinte na posição C-2 da substância FCM-3.

-.

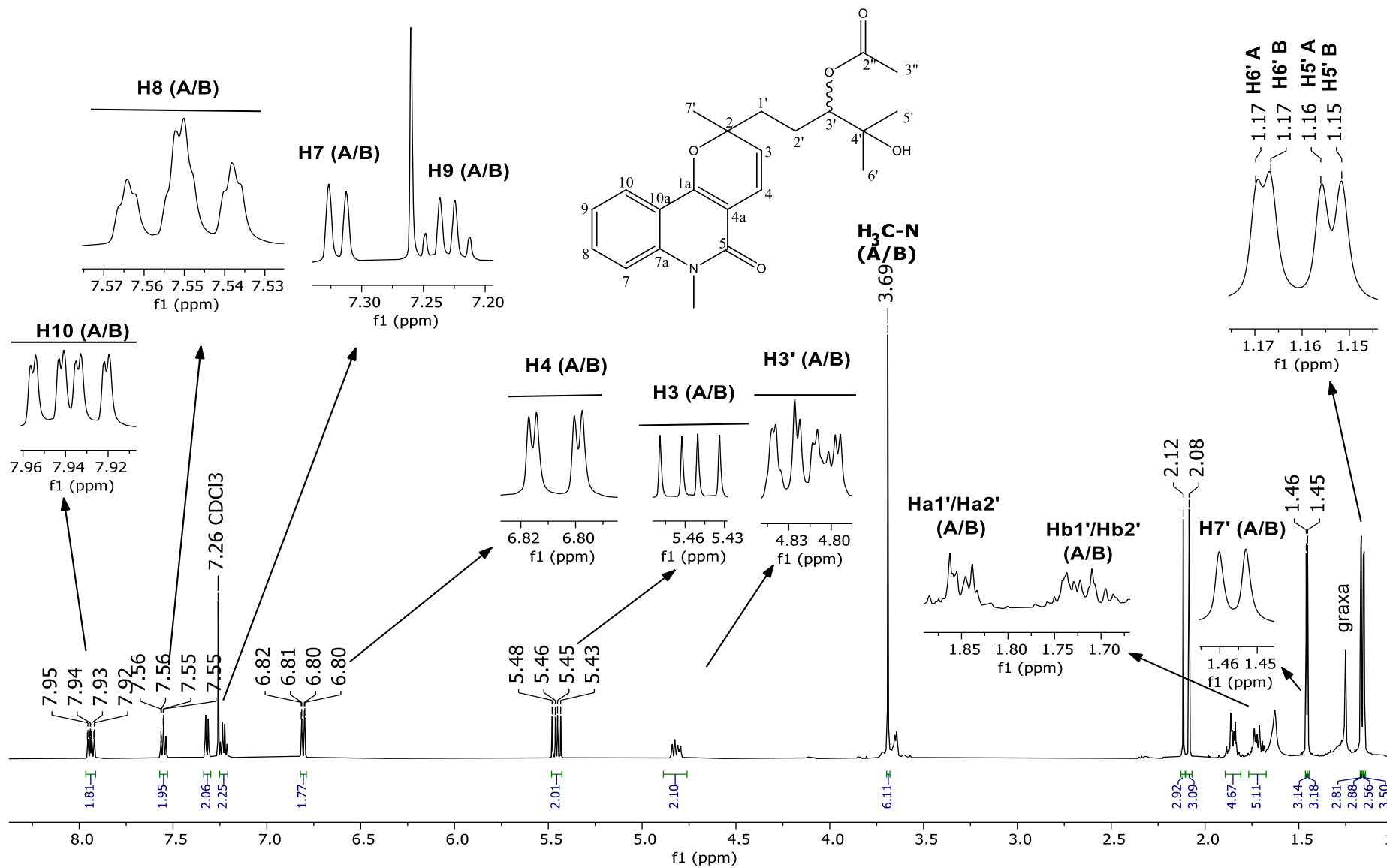


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.

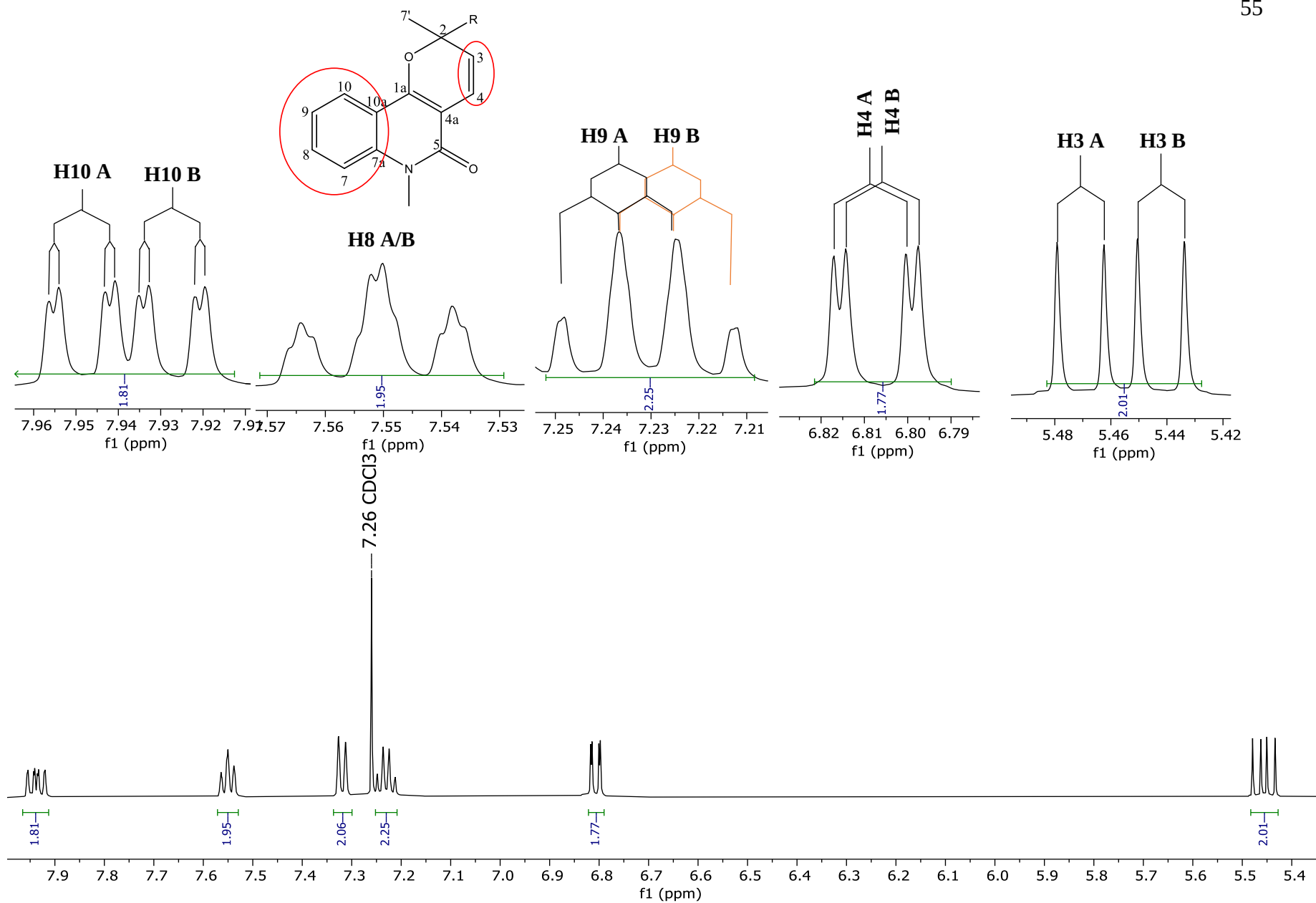


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.

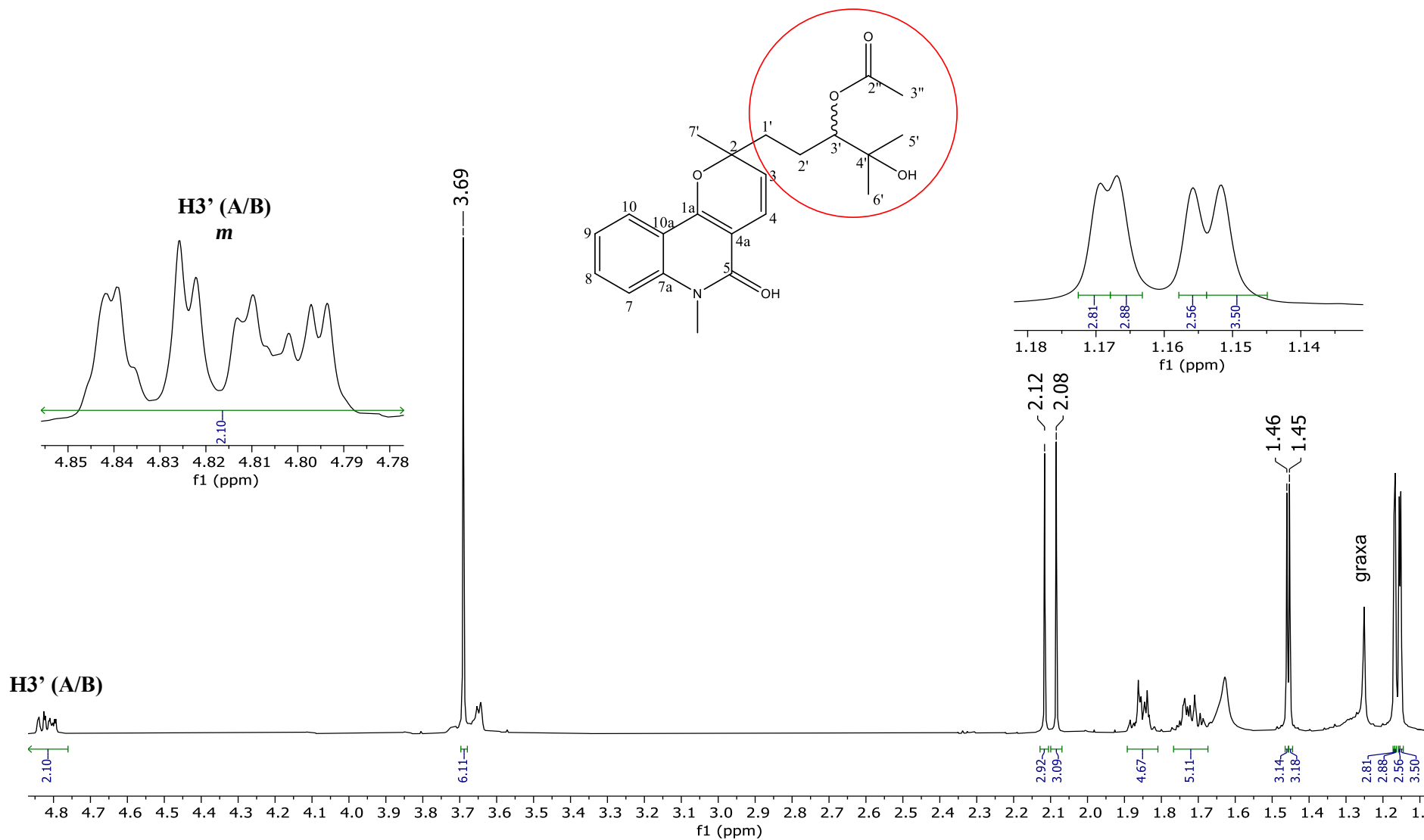


Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.

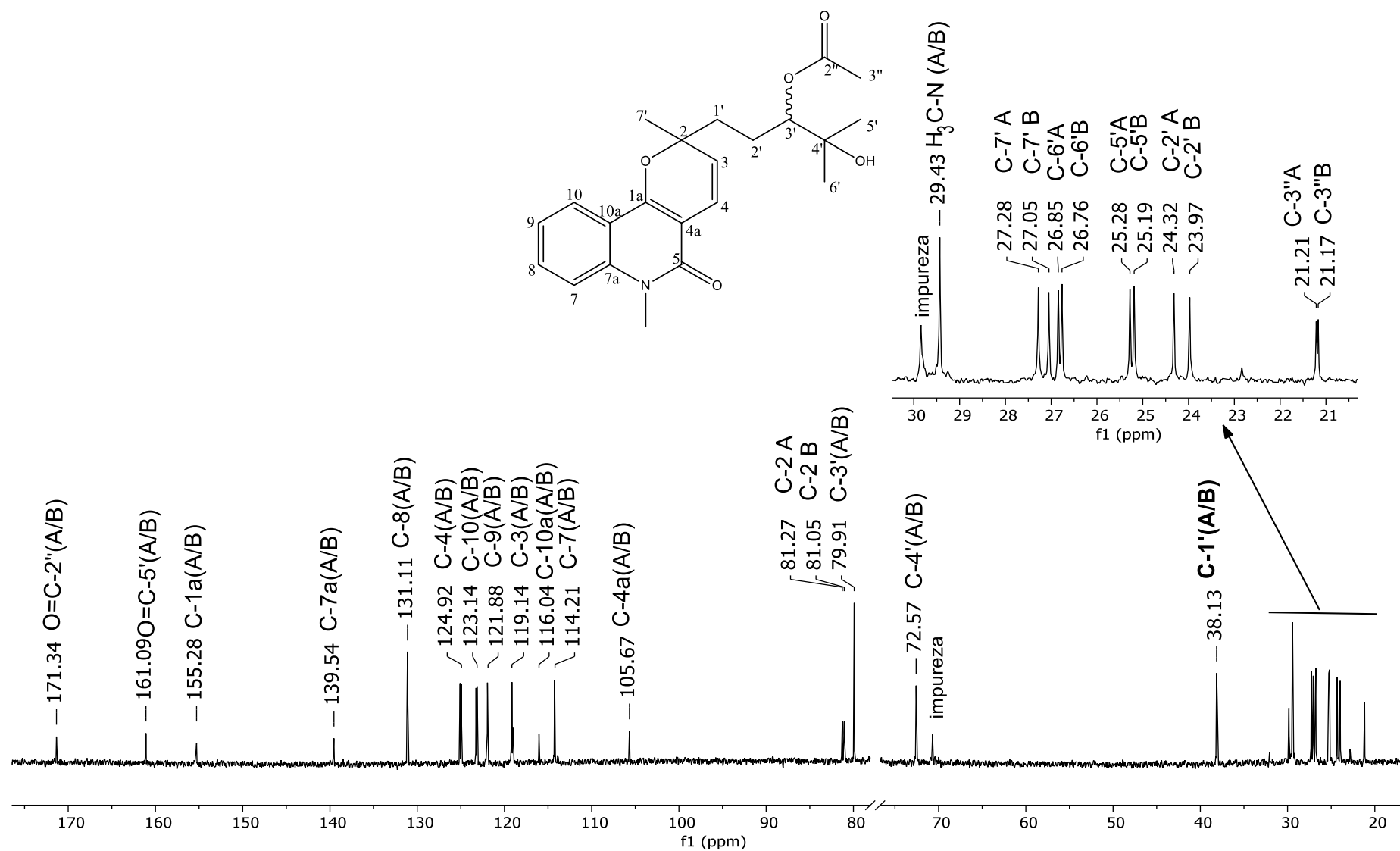


Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.

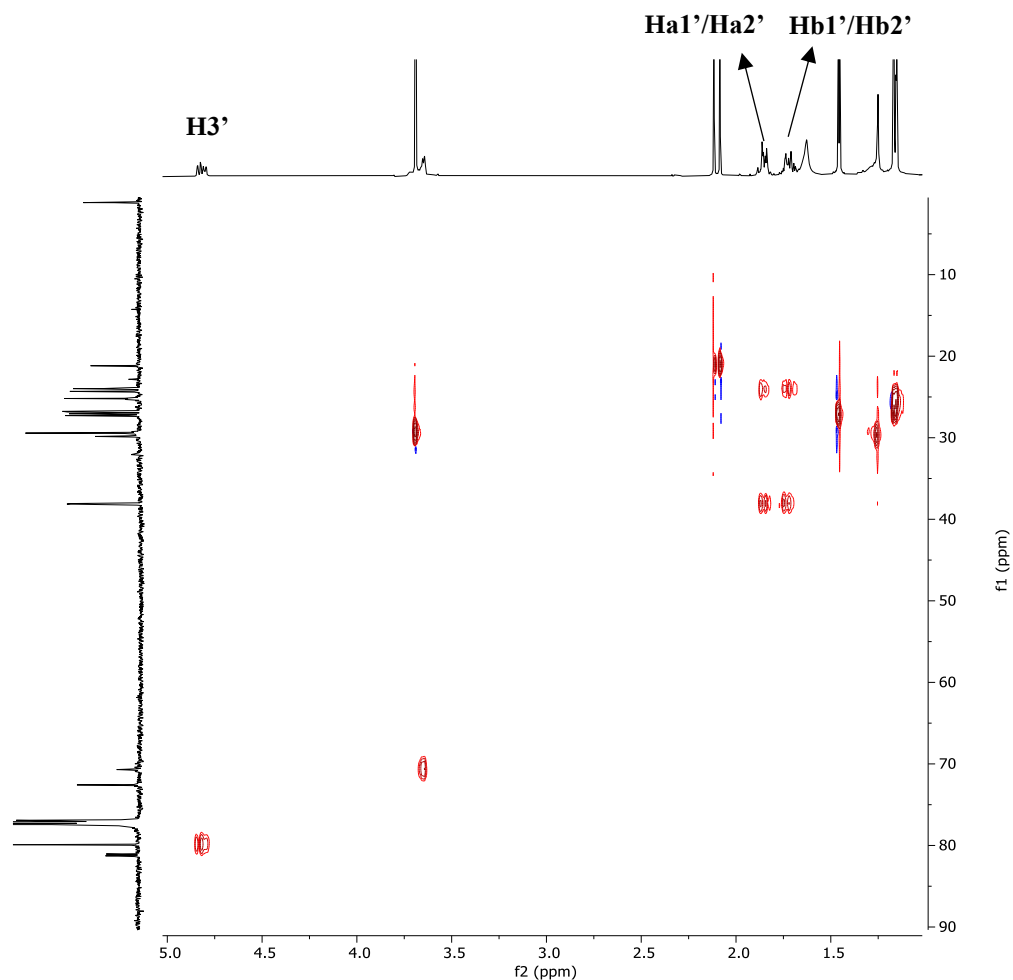


Figura 43- Expansão do mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3.

O mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (**Figura 44**) apresentou correlações condizentes com estrutura proposta, sendo as mais importantes, as que se estabeleceram entre o H-3'' a duas ligações com C-2'' e a quatro com C-3', coerentes com a unidade acetoxi ligada em C-3'. É observado, também, H-3' correlacionando tanto com C-2'', confirmando a posição do grupo acetoxi, quanto com C-4', C-5' e C-6'. Outra correlação importante observada foi entre Ha-1' /Hb-1' e C-3 juntamente com Ha-2'/Hb-2' correlacionando com C-2, que confirma a posição do substituinte (3-acetoxi-4-hidroxi-4-metil)pent-1-il em C-2.

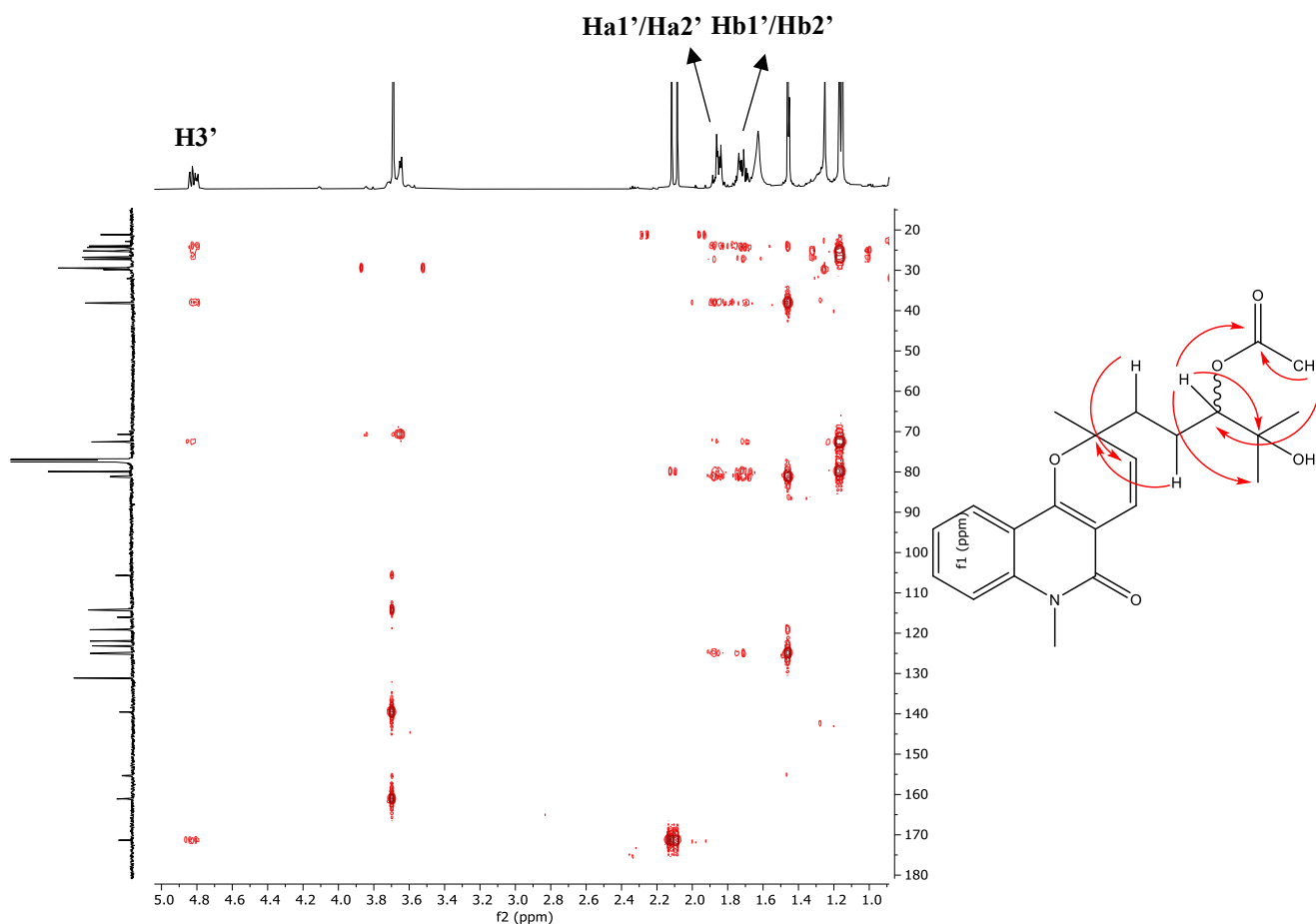


Figura 44 - Expansão do mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância FCM-3 e principais correlações na sua estrutura.

No espectro de massas (**Figura 45**) foi observado o pico do íon molecular com $m/z = 385$, equivalente à fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5$, e o fragmento com valor de $m/z = 226$, condizentes com a estrutura atribuída para a substância FCM-3. Além disso, a principal fragmentação, que leva ao fragmento $m/z = 226$, é decorrente da perda da cadeia lateral com $m/z = 159$, ratificando a fórmula molecular do grupo substituinte em C-2.

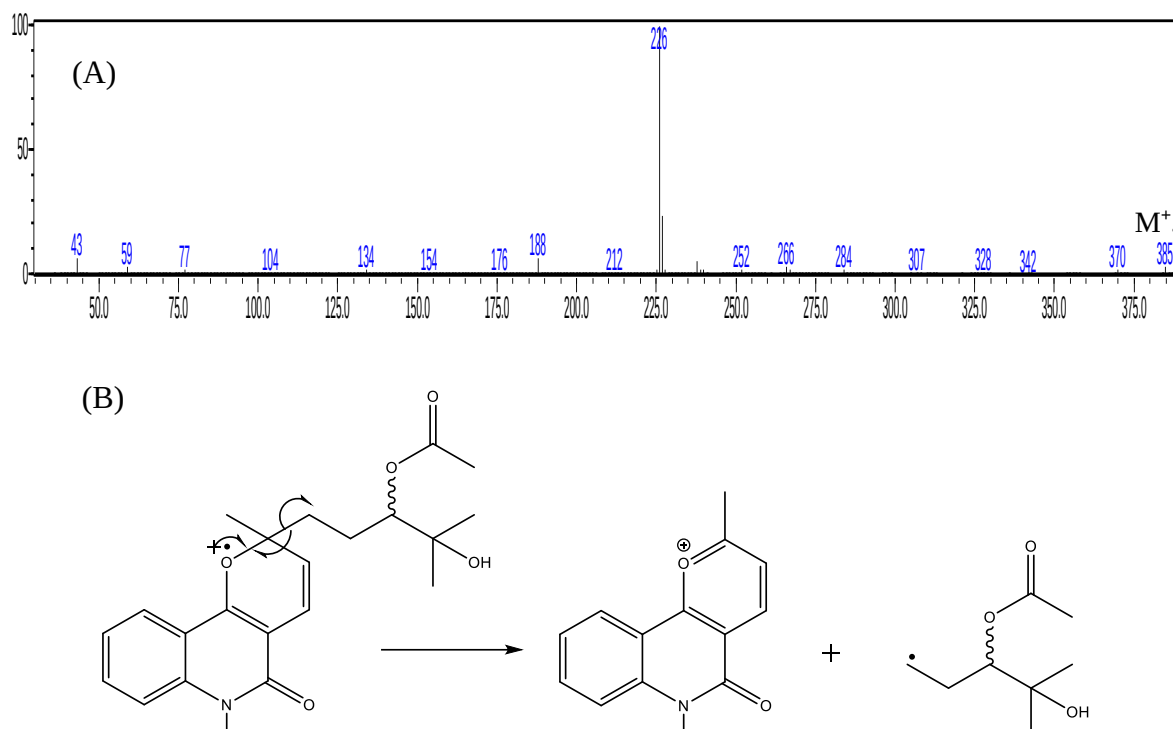


Figura 45 – (A) Espectro de massas obtido por IE e (B) principal fragmentação da substância FCM-3.

A comparação dos dados da substância FCM-3 com os dados descritos na literatura para a substância 2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil-2*H*-pirano[3,2-*c*]quinolin-5(6*H*)-ona (**Figura 46**) confirmaram, também, algumas atribuições feitas para a estrutura de FCM-3 (**Tabela 9**).

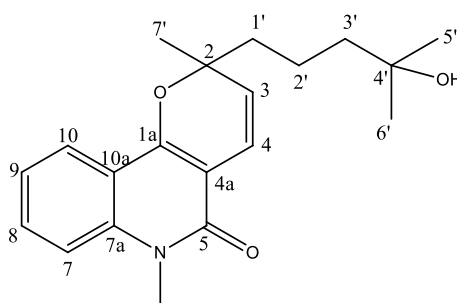


Figura 46 – Estrutura da 2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil-2*H*-pirano[3,2-*c*]quinolin-5(6*H*)-ona.

Este alcaloide é estruturalmente similar à FCM-3, exceto pela ausência do grupo acetoxi no substituinte isoprênico. Os valores de deslocamento químicos de ^1H e ^{13}C correspondentes ao sistema piranoquinolin-5-ona apresentam relativa equivalência para ambas as substâncias, assim como as multiplicidades dos sinais de ^1H e suas respectivas constantes de acoplamento. As diferenças mais pronunciadas observadas são referentes ao grupo isoprênico, dada a presença do substituinte acetoxi em C-3' na substância FCM-3, configurando um centro

estereogênico nesta posição e, conseqüentemente, alterando os deslocamentos químicos e multiplicidade dos sinais referentes aos núcleos próximos, como é o caso de H-C3', H-C2', H₃-C5', H₃-C6' que diferem entre as duas substâncias (DI LIBERTO *et al.*, 2020).

Tabela 9 - Comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância FCM-3 com os descritos na literatura para substância 2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil-2H-pirano[3,2-c]quinolin-5(6H)-ona.

Posição/ Grupo	FCM-3	2-(4-hidroxi-4-metilpentil)-2,6-dimetil- 2H-pirano[3,2-c]quinolin-5(6H)-ona*		
	δ _H mult. (J/Hz)	δ _C	δ _H mult. (J/Hz)	δ _C
1a	-	155,3	-	155,1
2	-	81,3	-	81,2
3	5,47 <i>d</i> (10,0)	124,9	5,49 <i>d</i> (10,0)	125,2
4	6,81 <i>d</i> (10,0)	119,1	6,79 <i>d</i> (10,0)	118,3
4a	-	105,7	-	105,4
5	-	161,1	-	160,8
7	7,32 <i>d</i> (8,6)	114,2	7,31 <i>dl</i> = (8,6)	113,9
7a	-	139,5	-	139,2
8	7,57 – 7,53 <i>m</i>	131,1	7,57 – 7,53 <i>m</i>	130,7
9	7,24 <i>t</i> (8,0)	121,9	7,22 <i>ddd</i> (8,0; 7,2; 0,9)	121,6
10	7,94 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	123,3	7,95 <i>dd</i> (8,0; 1,3)	122,9
10a	-	116,0	-	115,8
1'	1,76-1,69/ 1,87-1,83 <i>m</i>	38,1	1,92-1,64 <i>m</i>	41,7
2'	1,76-1,69/ 1,87-1,83 <i>m</i>	24,3	1,62-1,42 <i>m</i> **	18,5**
3'	4,85 - 4,79 <i>m</i>	79,9	1,62-1,42 <i>m</i> **	43,8**
4'	-	72,6	-	70,7
5'	1,16 <i>s</i>	25,3	1,19 <i>s</i> **	29,1**
6'	1,17 <i>s</i>	26,9	1,19 <i>s</i> **	29,1**
7'	1,46 <i>s</i>	27,3	1,47 (<i>s</i>)	26,7
2''	-	171,3	-	-
3''	2,12 <i>s</i>	21,2	2,08 <i>s</i>	-
CH₃-N	3,69 <i>s</i>	29,4	3,69 <i>s</i>	29,2

*Di Liberto *et al.*, 2020. Dados obtidos em CHCl₃. ** Valores diferentes em comparação com FCM-3

Com base na análise dos espectros de massas, RMN de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais, cujo os principais dados estão descritos na **Tabela 10**, foi possível identificar a fração FCM-3 como uma mistura de diastereoisômeros da substância 2-[(3-acetoxi-4-hidroxi-4-meil)pent-1-il]-2,6-dimetil-2,6-diidro-5H-pirano[3,2-c]quinolin-5-ona, um novo alcaloide do tipo piranoquinolin-5-ona, aqui denominado de mastigoforina.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 ; 600 e 150 MHz, respectivamente) 1D e 2D da substância FCM-3.

Posição/ Grupo	Diastereoisômero A		Diastereoisômero B		COSY- ^1H , ^1H	HMBC- ^1H , ^{13}C
	δ_{H} mult. (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J/Hz)	δ_{C}		
1a	-	155,3	-	155,3	-	-
2	-	81,3	-	81,0	-	-
3	5,47 <i>d</i> (10,0)	124,9	5,44 <i>d</i> (10,0)	124,9	H-4	C7'; C1'; C2; C4a; C1a
4	6,81 <i>d</i> (10,0)	119,1	6,81 <i>d</i> (10,0)	119,1	H-3	C7'; C1'; C2; C1a; C5
4a	-	105,7	-	105,7	-	-
5	-	161,1	-	161,1	-	-
7	7,32 <i>d</i> (8,6)	114,2	7,32 <i>d</i> (8,6)	114,2	H-8	C10a; C9; C7a; C1a
7a	-	139,5	-	139,5	-	-
8	7,57 – 7,53 <i>m</i>	131,1	7,57 – 7,53 <i>m</i>	131,1	H-9; H-7; H-10	C7; C10; C7a
9	7,24 <i>t</i> (8,0)	121,9	7,23 <i>t</i> (8,0)	121,9	H-10; H-8	C7; C10a; C:10
10	7,94 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	123,3	7,93 <i>dd</i> (8,0; 1,6)	123,1	H-8; H-9	C8; C7a; C1a
10a	-	116,0	-	116,0	-	-
1'	Hb 1,72 e Ha 1,85 <i>m</i>	38,1	Hb 1,72 e Ha 1,85 <i>m</i>	38,1	Ha-2' Hb-2'; H-1'	C2; C3
2'	Hb 1,72 e Ha 1,85 <i>m</i>	24,3	Hb 1,72 e Ha 1,85 <i>m</i>	24,0	Há-1'; Hb-1'; H-2'; H-3'	C2; C3
3'	4,85 - 4,79 <i>m</i>	79,9	4,85 - 4,79 <i>m</i>	79,9	Ha-2'; Hb-2'	C2'; C6'; C1'; C4'; C2''
4'	-	72,6	-	72,6	-	-
5'	1,16 <i>s</i>	25,3	1,15 <i>s</i>	25,2	-	C4'; C3'
6'	1,17 <i>s</i>	26,9	1,17 <i>s</i>	26,8	-	C4'; C3'
7'	1,46 <i>s</i>	27,3	1,45 <i>s</i>	27,1	-	C1'; C2; C3
2''	-	171,3	-	171,3	-	-
3''	2,12 <i>s</i>	21,2	2,08 <i>s</i>	21,1	-	C2''; C3'
CH₃-N	3,69 <i>s</i>	29,4	3,69 <i>s</i>	29,4	-	C7; C4a; C7a; C5

6.2.4. Substância FCM-4: *N*-metilisatina (impura)

A substância FCM-4 foi identificada como constituinte majoritário da fração AFCM-6.4.1 (**Figura 15**, p. 28). O cromatograma (**Figura 47-A**) obtido na análise por CG-EM apresentou, além de outros constituintes, um pico majoritário com tempo de retenção (T_R) igual a 22,30 min. A base de dados da biblioteca NIST14 apontou uma similaridade de 93% do espectro de massas do componente majoritário (**Figura 47-B**) com o da substância *N*-metilisatina (**Figura 48**). Neste, aparece o pico do íon molecular com $m/z = 161$ referente a fórmula molecular $C_9H_7NO_2$. Os demais picos apresentam coerência com o mecanismo de fragmentação proposto para essa substância (**Figura 49**).

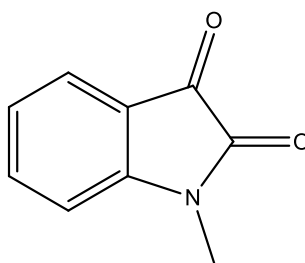


Figura 48 - Fórmula estrutural da *N*-metilisatina.

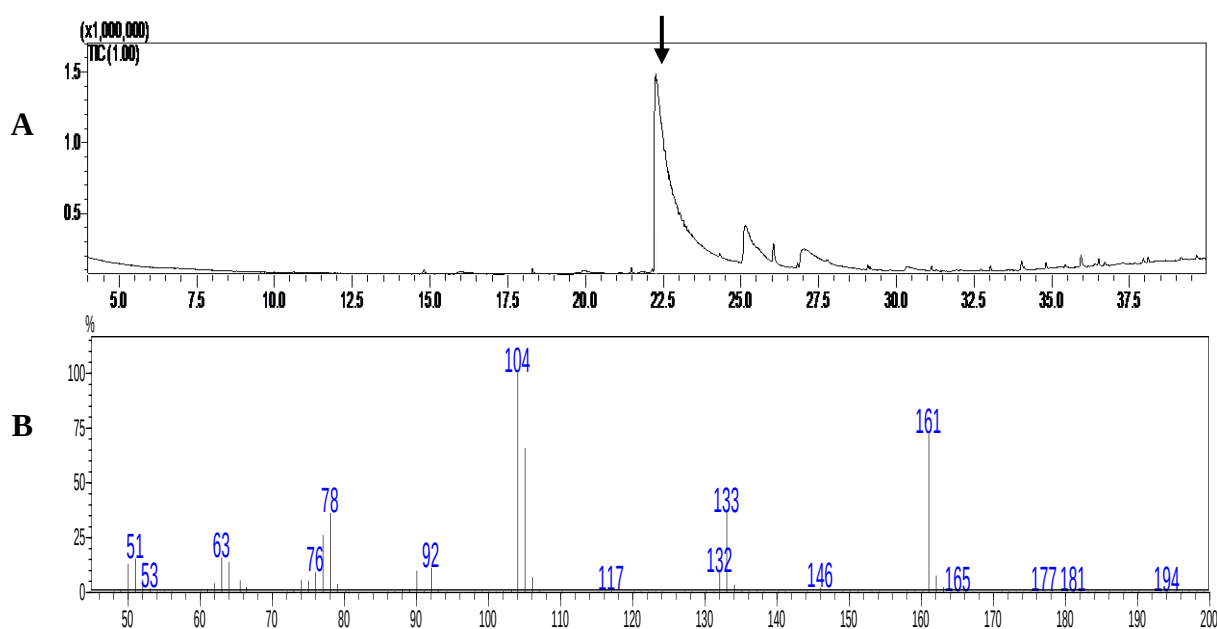


Figura 47 - Cromatograma obtido por CG-EM (a) e espectro de massas obtido por IE (B) para a substância majoritária de FCM-4

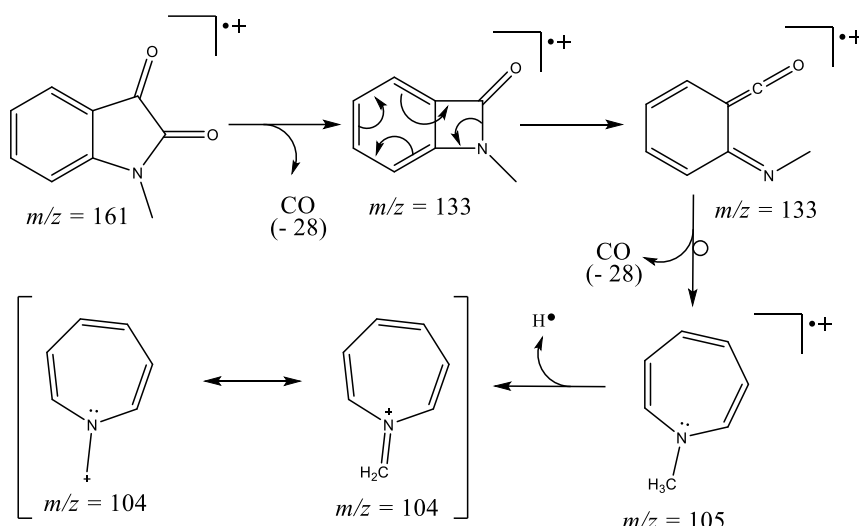


Figura 49 – Esquema simplificado representando o principal mecanismo de fragmentação da substância majoritária de FCM-4 [adaptado de Martinez e Ferreira (2017)].

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H de FCM-4 (**Figura 50**) foram comparados com os dados descritos na literatura para a isatina (SILVA *et al.*, 2010), e quatro sinais foram similares aos que compunham o anel aromático presente na estrutura dela. Esses sinais foram atribuídos a H-7 (δ_{H} 6,84; *dl*, $J = 7,8$ Hz) acoplado em *orto* com H-6 (δ_{H} 7,33; *td*, $J = 7,8$; 1,3 Hz) que, por sua vez, acopla em *orto* com H-5 (δ_{H} 7,07; *td*, $J = 7,8$; 1,3 Hz) e em *meta* com H-4 (δ_{H} 7,37; *dd*). Para FCM-4 além dos sinais do sistema aromático, foi ainda observado um singlete, integrando pra 3H (δ_{H} 3,20), o qual foi atribuído a um grupo metila ligado ao átomo de N.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 51**) também apresentou sinais com deslocamentos químicos compatíveis com os carbonos do anel aromático (δ_{C} 108,8 – δ_{C} 143,7) e com o grupo metila ligada ao nitrogênio (δ_{C} 26,4; N-CH₃). No entanto, não foram observados os sinais esperados para as carbonilas da lactama (C-2) e da cetona (C-3) que deveriam aparecer com valores de deslocamentos químicos próximos de δ_{C} 159,5 e δ_{C} 184,5, respectivamente (PANASENKO *et al.*, 1994). A ausência destes sinais pode ser atribuída à pequena massa da amostra submetida à análise de RMN (1,8 mg) resultando em sinais de C=O de baixa intensidade e incapaz de serem distinguidos dos ruídos de fundo do aparelho ou, ainda, pode ser atribuído ao maior tempo de relaxação do núcleo de carbono na carbonila quando submetido ao campo eletromagnético do aparelho de RMN, reduzindo a intensidade do seu sinal ou impedindo a sua detecção (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

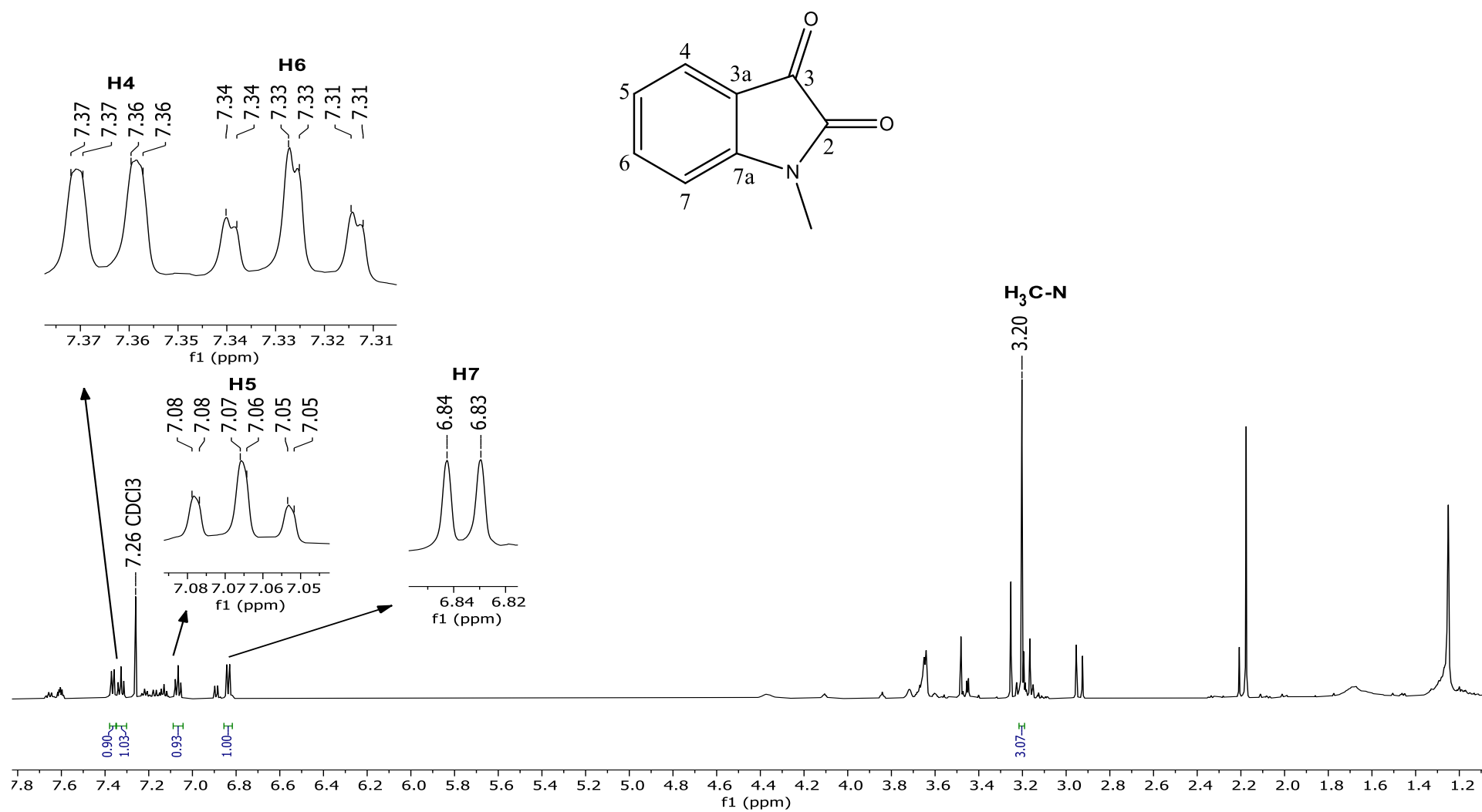


Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da substância FCM-4.

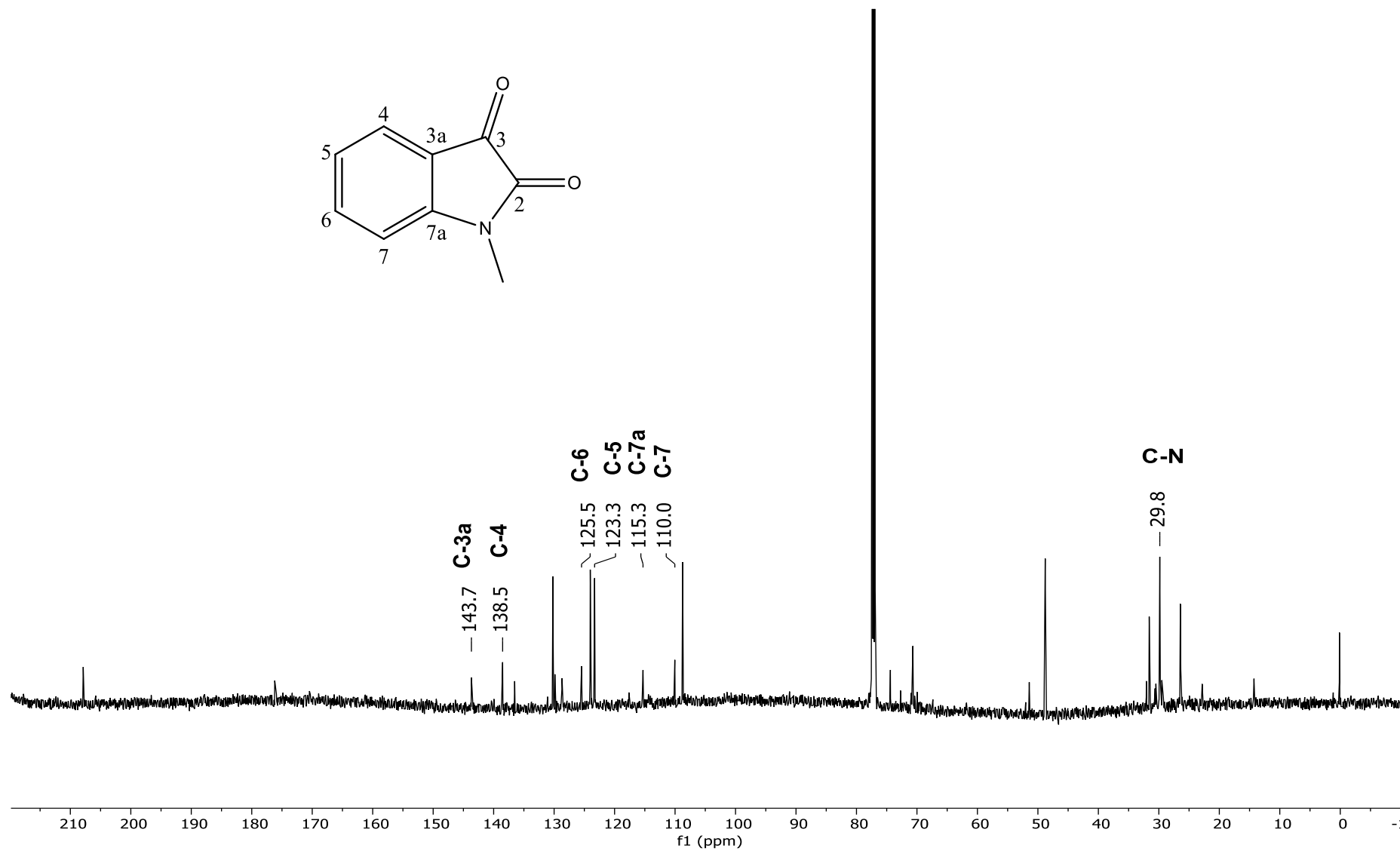


Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da substância FCM-4

Embora os sinais correspondentes às carbonilas (C-2 e C-3) não tenham sido detectados, os dados de CG-EM, juntamente com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em comparação com os dados da literatura (**Tabela 11**) foram suficientes para identificar e confirmar a *N*-metilisatina como constituinte majoritário de FCM-4. A *N*-metilisatina é uma substância muito versátil utilizada como precursor na síntese de vários derivados com diversas atividades biológicas e farmacológicas. É encontrada em plantas do gênero *Isatis*, nas espécies *Calanthe discolor* Lindl. e *Coroupita guianenses*, e no ser humano, como derivado metabólico da adrenalina (SILVA *et al.*, 2010; SARDELLA, 2014; MARTINEZ e FERREIRA, 2017). Não há relatos na literatura para o isolamento ou identificação da *N*-metilisatina no gênero *Conchocarpus*, sendo estes os primeiros dados de sua identificação em espécies *Conchocarpus*.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância FCM-4 comparados com dados de RMN de ^1H da isatina.

Posição/grupo	<i>N</i> -metilisatina (FCM-4)		Isatina	
	δ_{H} multi. (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult.*	δ_{C} **
2	---	ND	---	159,5
3	---	ND	---	184,5
3a	---	143,7	---	150,9
4	7,37 <i>dd</i> (7,8; 1,3)	138,5	7,52 <i>d</i>	138,5
5	7,07 <i>td</i> (7,8; 1,3)	123,3	7,05 <i>td</i>	122,9
6	7,33 <i>td</i> (7,8; 1,3)	125,5	7,57 <i>td</i>	124,7
7	6,84 <i>dl</i> (7,8)	110,0	6,86 <i>d</i>	117,4
7a	---	115,3	---	117,9
H ₃ C-N	3,20 <i>s</i>	29,8	---	---

* Silva *et al.*, 2010 (Dados obtidos em DMSO-D₆). ** Panasenco *et al.*, 1994 (Dados obtidos em DMSO-D₆). ND= não detectado.

6.3.Elucidação estrutural das substâncias isoladas do caule de *Conchocarpus mastigophorus*

6.3.1. Substância CCM-1: 9-hidroxi-4-metoxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona

A substância CCM-1 foi isolada na forma de um sólido cristalino amarelado. A proposta para a sua estrutura foi feita com base na análise simultânea dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

No espectro de ^1H (**Figura 52**) foram identificados, na região de hidrogênios alifáticos, sinais típicos de metila em δ_{H} 1,68 (*s*, 3H) e δ_{H} 1,85 (*s*, 3H), metila ligada a heteroátomo em δ 3,94 (*s*, 3H) e um sinal em δ_{H} 3,56 (*d*, $J = 7,4$ Hz, 2H). Na região de hidrogênios ligados a

carbonos sp^2 foram identificados sinais em δ_H 5,26-5,30 (*m*, 1H), dois singletos em δ_H 6,20 (1H) e δ_H 6,72 (1H), e os sinais em δ_H 6,26 (*d*, $J = 9,4$ Hz) e δ_H 7,58 (*d*, $J = 9,4$ Hz), característicos de hidrogênios olefínicos *cis* (SARDARI *et al.*, 1999).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 53**) foram identificados três sinais na região de alifáticos ($\delta_C = 18,1$; 22,3; 25,9), um sinal em $\delta_C = 56,5$, nove sinais na região de carbonos sp^2 ($\delta_C = 105,2$; 111,4; 113,2; 116,4; 120, 8; 133,3; 143,9; 147,5; 148,5) e um sinal em $\delta_C = 161,7$. A quantidade de sinais de carbonos observados na região de aromáticos e seus valores de deslocamentos químicos bem como o sinal em δ 161,7, típico de carbonila lactônica, apontaram relativa coerência com um esqueleto de uma furanocumarina angular ou linear (CHAVARÍA *et al.*, 2008; SARDARI *et al.*, 1999).

O mapa de contorno HSQC- 1H , ^{13}C (**Figura 54**) auxiliou na atribuição dos sinais de hidrogênio aos respectivos carbonos. Neste, estão evidenciadas as correlações de δ_H 6,26 e δ_H 7,58 com δ_C 113,3 e δ_C 143,9, respectivamente, coerentes com H-5 (δ_H 7,58 *d*, $J = 9,4$ Hz) e H-6 (δ_H 6,26 *d*, $J=9,4$ Hz) na estrutura de uma furanocumarina (CHAVARÍA *et al.*, 2008), e correlação de δ_H 6,72 com δ_C 105,2 sendo atribuído ao hidrogênio na posição C-3. Não foram observadas correlações dos demais sinais de hidrogênio com os carbonos no esqueleto furanocumarina, indicando então, que estes hidrogênios pertenciam a grupos substituintes presentes na estrutura. A ausência de correlação do sinal em δ_H 6,20 (*s*, 1H) com algum carbono na estrutura indicou a possibilidade de uma hidroxila como um dos substituintes. Um segundo substituinte foi proposto com base na correlação observada entre o sinal δ_H 3,94 (*s*, 3H) e δ_C 56,5 sendo, então, atribuídos a uma metoxila. A presença de outro grupo substituinte, de natureza isoprênica, foi indicada pelos sinais em δ_H 1,68 (*d*, $J= 1,3$ Hz 3H), δ_H 1,85 (*d*, $J= 1,3$ Hz 3H), δ_H 3,57 (*d*, $J= 7,5$; 2H), δ_H 5,29 (*m*, 1H) que mostraram correlações com δ_C 25,9, δ_C 18,1, δ_C 22,3 e δ_C 120,8, respectivamente. Este conjunto de sinais, juntamente com o sinal em δ_C 133,3, são característicos do grupo isopentenil (3-metilbut-2-en-1-il) (NUNES, *et al.*, 2005) um derivado de prenilação, etapa muito comum durante a rota biossintética de alguns metabólitos especiais nas plantas (DEWICK, 2009). Para este substituinte, foram feitas as atribuições dos sinais δ_H 1,68 e δ_H 1,85 às metilas H_3C-4' e H_3C-5' geminais em C-3' (133,3), do sinal δ_H 5,29 ao H-2' olefínico e, por fim, de δ_H 3,57 a H-1'.

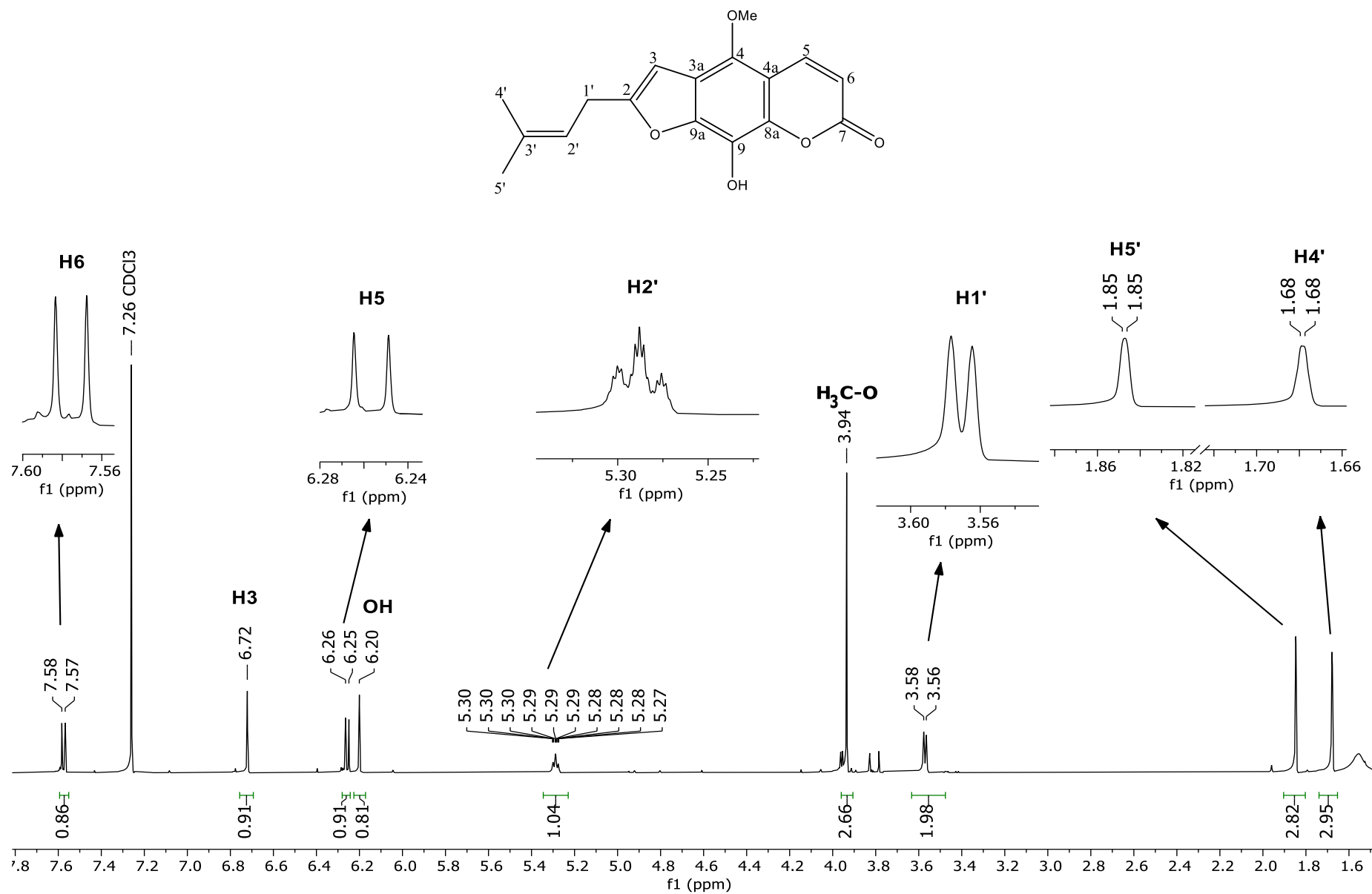


Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-1.

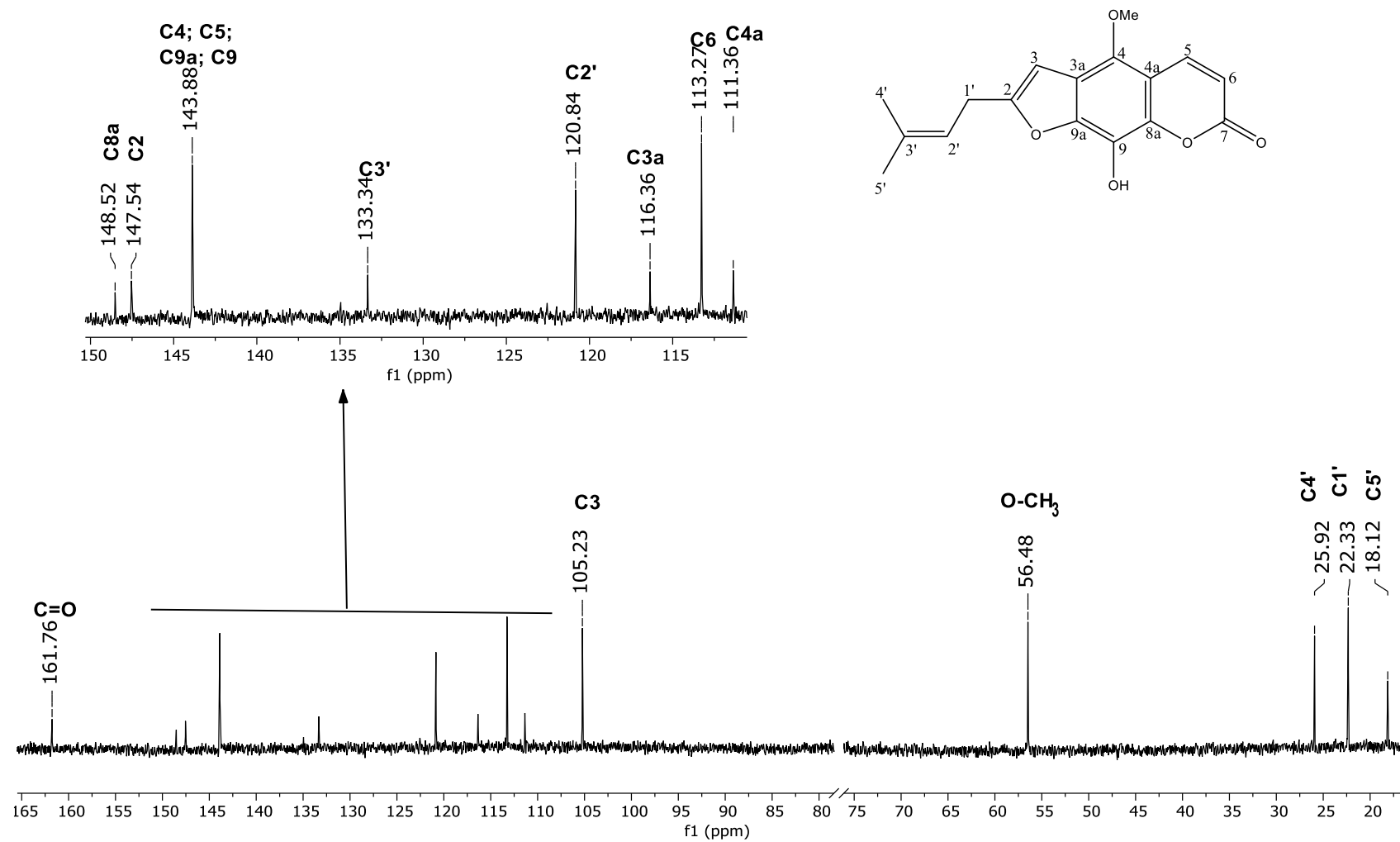


Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-1.

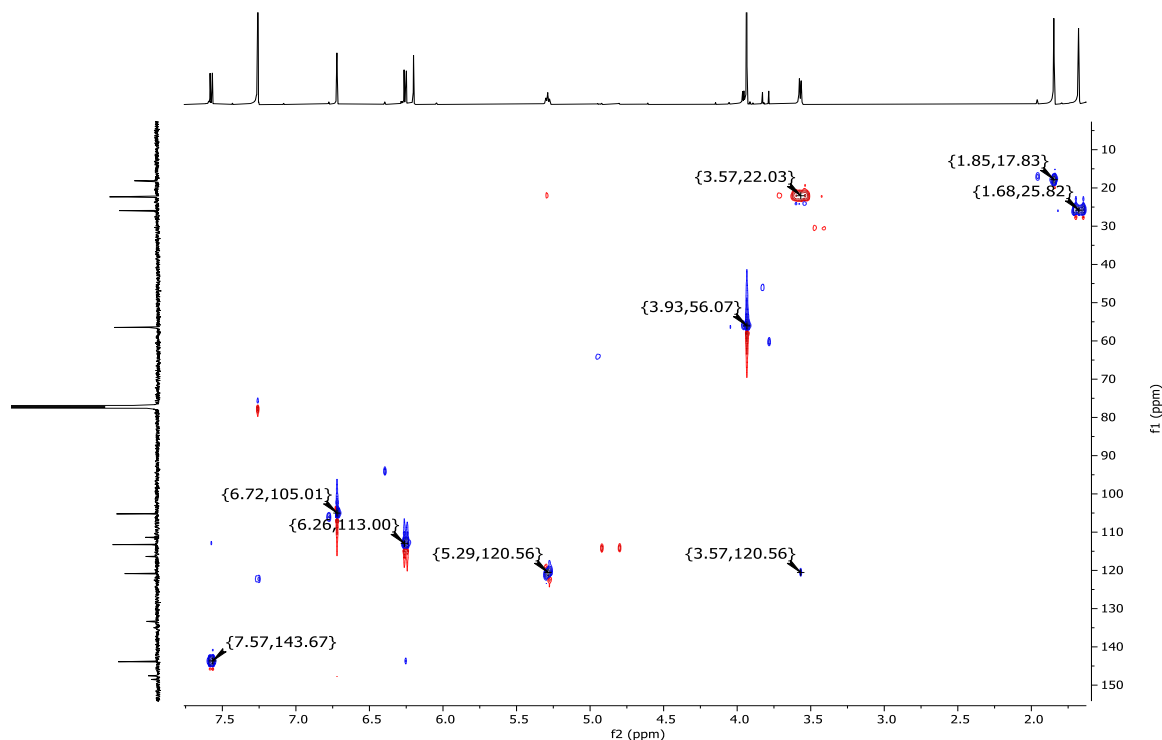
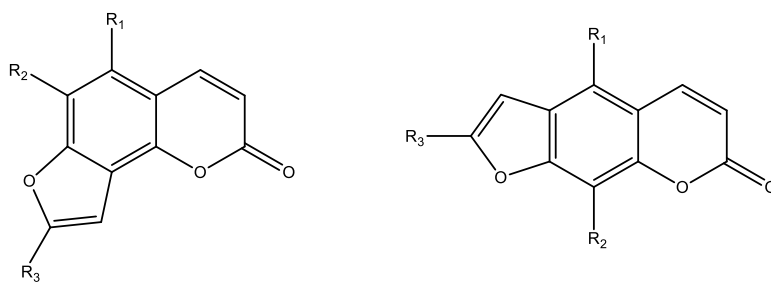


Figura 54 - Mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C da substância CCM-1.

As posições substituídas na estrutura da furanocumarina foram indicadas pelo sinal de H-3 como um singleto, apontando a substituição em C-2, pois para furanocumarinas não substituídas nesta posição é esperado um duplete para o sinal de H-3 (REED e MOORE, 1988), e, também, pela ausência de correlações no mapa de contornos HSQC em C-8 e C-9 para um esqueleto angular, ou em C-4 e C-9 para um esqueleto linear. Estas observações configuraram 12 estruturas possíveis para a substância CCM-1 (**Figura 55**).



- | | |
|---|--|
| 1) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OMe}$ $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ | 7) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{OMe}$ $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ |
| 2) $\text{R}_1 = \text{OMe}$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ | 8) $\text{R}_1 = \text{OMe}$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ |
| 3) $\text{R}_1 = \text{OMe}$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_3 = \text{OH}$ | 9) $\text{R}_1 = \text{OMe}$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_3 = \text{OH}$ |
| 4) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_3 = \text{OMe}$ | 10) $\text{R}_1 = \text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_3 = \text{OMe}$ |
| 5) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{OMe}$ | 11) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{OH}$ $\text{R}_3 = \text{OMe}$ |
| 6) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{OMe}$ $\text{R}_3 = \text{OH}$ | 12) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{OMe}$ $\text{R}_3 = \text{OH}$ |

Figura 55 - Possíveis estruturas para a substância CCM-1.

No mapa de contornos HMBC- ^1H , ^{13}C (**Figura 56**) foram observadas correlações que corroboram com a proposta do esqueleto furanocumarina para a substância CCM-1, sendo as mais importantes as que se estabeleceram entre o H-6 ($\delta_{\text{H}} = 6,26$) com o carbono da carbonila lactônica ($\delta_{\text{C}} = 161,8$) e C-4a ($\delta_{\text{C}} = 111,4$); H-5 ($\delta_{\text{H}} = 7,58$) correlacionando com o carbono carbonílico ($\delta_{\text{C}} = 161,8$) e com C-8a ($\delta_{\text{C}} = 148,5$), e H-3 correlacionando com C-2 ($\delta_{\text{C}} = 147,5$), C-3a ($\delta_{\text{C}} = 116,4$) e C-9a ($\delta_{\text{C}} = 143,9$). Foram observados, também, correlações de H-1' ($\delta_{\text{C}} = 3,57$) com C-2' ($\delta_{\text{C}} = 120,8$) e C-3' ($\delta_{\text{C}} = 133,3$), consistente com a atribuição para grupo isopentenil, e com C-2 ($\delta_{\text{C}} = 147,5$), apontando ser esta a posição deste grupo substituinte na estrutura da furanocumarina. Com isso, as possibilidades estruturais para a substância CCM-1 foram reduzidas às estruturas 1, 2, 7, e 8 (**Figura 55**, p. 72).

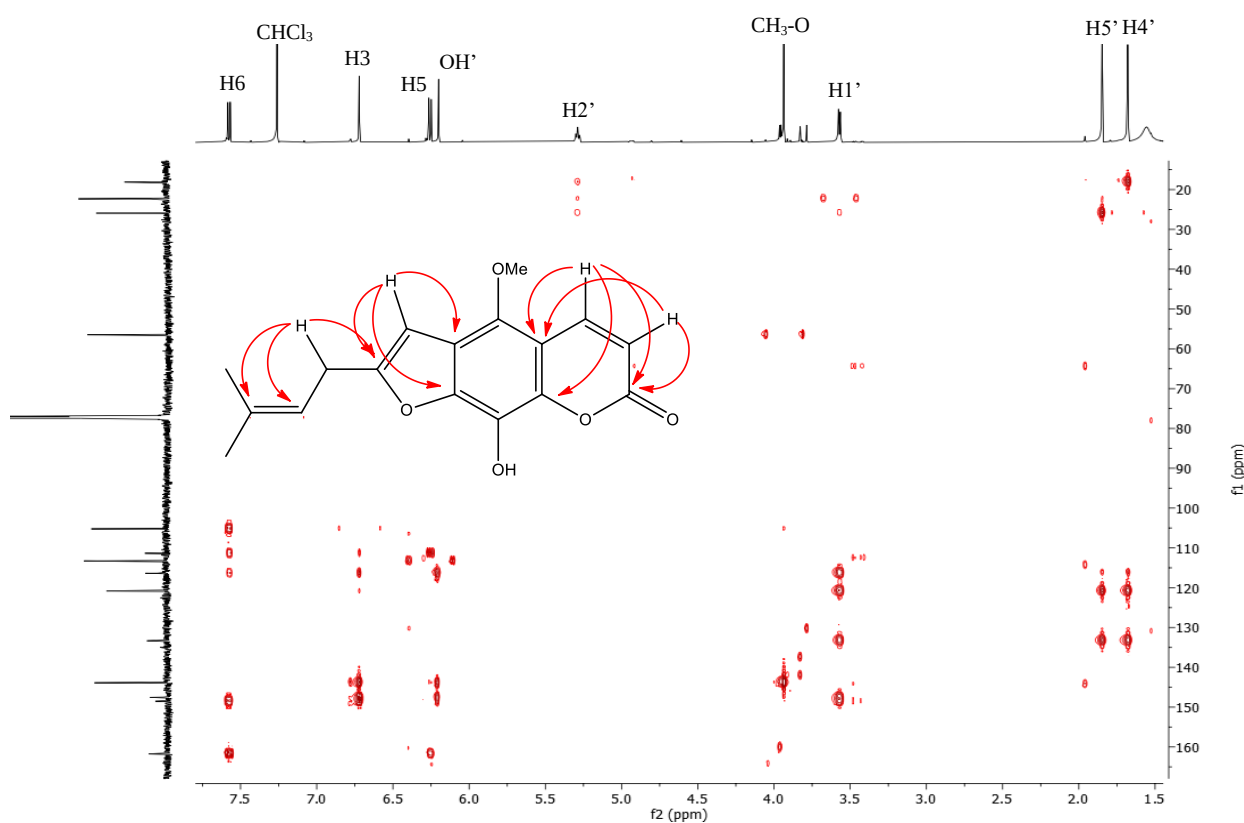


Figura 56 - Mapas de contorno HMBC- ^1H , ^{13}C e principais correlações apresentadas para a substância CCM-1.

A partir dos espectros NOESY 1D (**Figura 57**) percebeu-se que houve uma relativa degradação da substância CCM-1, provavelmente devido à isomerização da ligação dupla, sendo observado um número bem maior de sinais quando comparado ao espectro de RMN de ^1H obtido previamente. Ainda assim, foi possível verificar a ocorrência de nOe em H-5 e em H-3, pela irradiação da metoxila. A irradiação do H-3, resultou em nOe apenas nos hidrogênios

da metoxila. Essa observação culminou na atribuição do esqueleto linear para a furanocumarina, e da posição da metoxila em C-4, sendo o único arranjo onde pode ser esperado o nOe observado. Por fim, com a irradiação de H-5, foi observado um nOe em H-6 e também no grupo metoxila, confirmando a posição do substituinte metoxila em C-4, próximo a H-5 (**Figura 58**). Desse modo, a hidroxila estaria na posição C-9, culminando na estrutura 8 (**Figura 55**, p. 72) para a substância CCM-1.

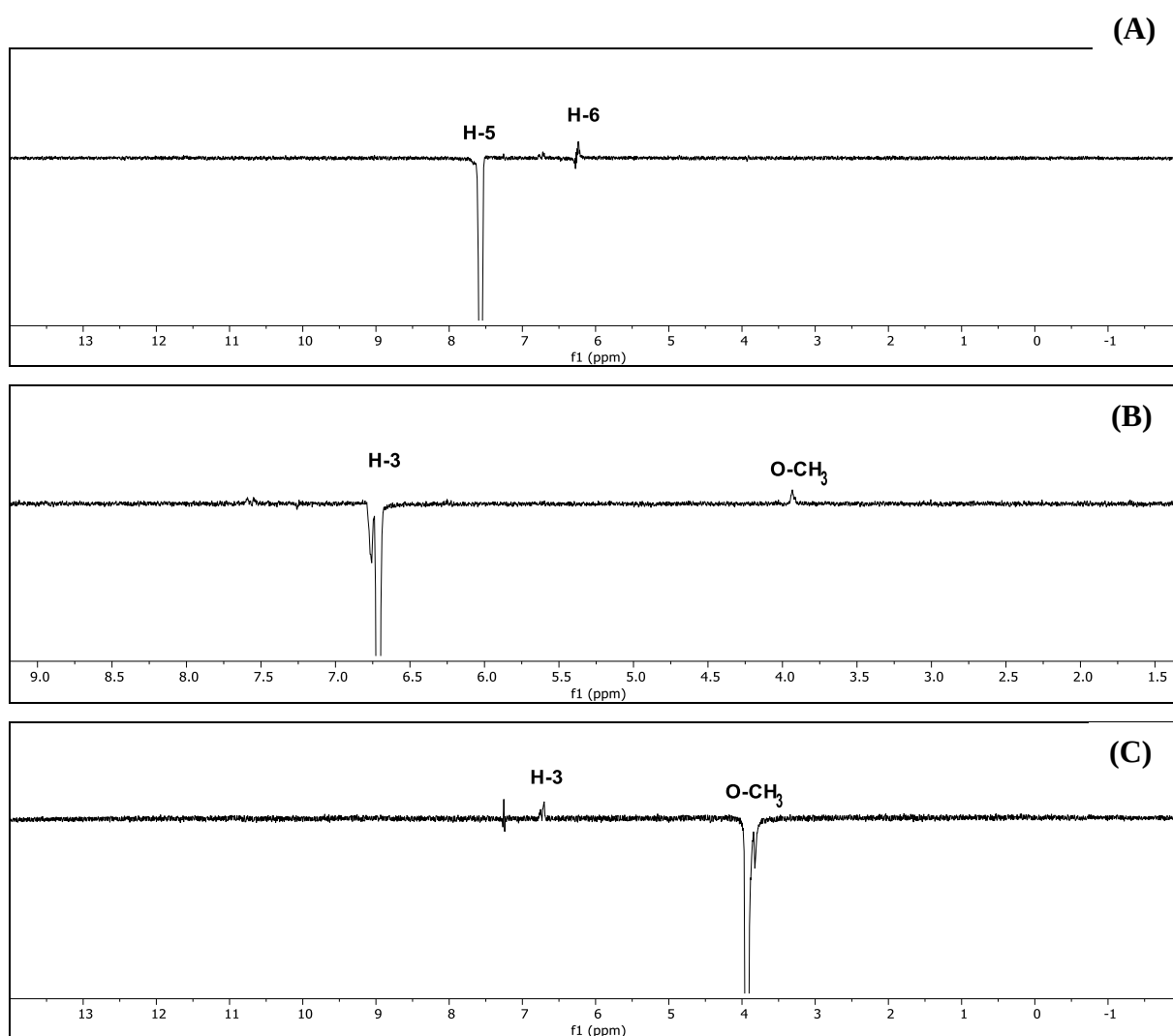


Figura 57 - Espectros NOESY-1D (em CDCl_3) da substância CCM-1 com (A) irradiação de H-5, (B) irradiação de H-3 e (C) irradiação em $\text{CH}_3\text{-O}$.

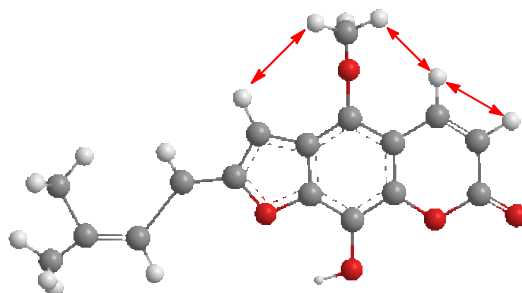


Figura 58 - Correlações observadas nos espectros de NOESY-1D para o CCM-1.

A análise dos dados espectroscópicos, resumidos na **Tabela 12**, resultou na identificação da substância CCM-1 como sendo a 9-hidroxi-4-metoxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona (**Figura 59**), uma furanocumarina ainda não relatada na literatura. Esta classe de cumarina já foi isolada da espécie *C. longifolius*, porém, todas angulares (3-metoxiangelicina, 3,6-dimetoxiangelicina, pimpinelina, esfodina e isobergapteno) (MAFEZOLI *et al.* 2001; FACCHINI, 2005).

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, CDCl_3), 1D e 2D, para a substância CCM-1.

Posição/ Grupo	δ ^1H mult. (J/Hz)	δ ^{13}C	HMBC- ^1H , ^{13}C	NOESY-1D
2	--	147,5		
3	6,72 (s, 1H)	105,2	C-9a; C-9	H ₃ C-O
3a	--	116,4		
4	--	143,9		
4a	--	111,4		
5	7,58 (d, 9,4 – 1H)	143,9	C-7; C-8a; C-4a	H ₃ C-O; H-6
6	6,26 (d, 9,4 – 1H)	113,3	C-4a; C-7	
7	--	161,8		
8a	--	148,5		
9	--	143,9		
9a	--	143,9		
1'	3,57 (d, 7,5 2H)	22,3	C-2'; C-3; C-2	
2'	5,30-5,27 (m, H)	120,8	C-4'; C-5'; C-1'	
3'	--	133,3		
4'	1,68 (d, 1,3, 3H)	25,9	C-5'; C-2'; C-3'	
5'	1,85 (d, 1,3, 3H)	18,1	C-4'; C-2'; C-3'	
O-CH ₃	3,94 (s, 3H)	56,5	C-4	H-5; H-3
-OH	6,20 (s, 1H)	--		

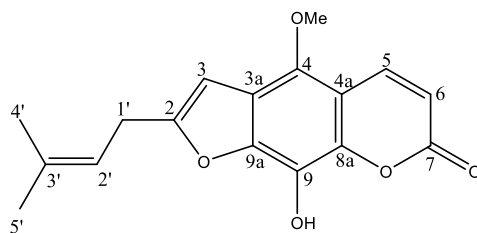


Figura 59 - Fórmula estrutural da substância CCM-1.

Furanocumarinas são bastante citadas na literatura relatando um largo espectro de atividades biológicas e aplicações farmacêuticas como anticancerígena, antiinflamatória, antiviral e antimicrobiana (MAHENDRA *et al.*, 2020). Substâncias similares a CCM-1, como a isopimpinellina e fellopterina, apresentaram inibição promissora contra cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (ZUO *et al.*, 2016). Esta nova furanocumarina tem, portanto, grande potencial para apresentar alguma bioatividade.

6.3.2. Substância CCM-2: 2- fenil-1-metilquinol-4-ona

A substância CCM-2 foi obtida na forma de um sólido cristalino amarelado a partir do fracionamento cromatográfico da fração ACLCM-36.6 (**Figura 14**, p. 26) e apresentou resultado positivo para alcaloide ao ser analisado por CCD, usando com revelador o reagente de Dragendorff.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 60**) da substância CCM-2 foram identificados seis sinais de hidrogênios ligados a anel aromático, sendo quatro destes característicos de anel aromático 1,2-disubstituído, δ_{H} 8,48 (*dd*, $J = 8,1; 1,7$ Hz, 1H), δ_{H} 7,60 (*d*, $J = 8,8$ Hz, 1H), δ_{H} 7,74 (*ddt*, $J = 8,8; 8,1; 1,7$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,45 (*t*, $J = 1,7$ Hz, 1H), e dois sinais em δ_{H} 7,42-7,39 (*m*, 2H) e δ_{H} 7,51-7,47 (*m*, 3H) típicos de anel aromático monossubstituindo. Foi observado, também, um sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,47 (*s*, 1H) e um singlete em δ_{H} 3,66 (3H), característico de grupo metila ligada a heteroátomo.

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 61**) foram identificados 13 sinais, sendo 11 deles na região de carbonos sp^2 (δ_{C} 112,3 – δ_{C} 155,5), uma carbonila (δ_{C} 176,8) e apenas um na região de alifáticos (δ_{C} 37,7). Este conjunto de dados, juntamente com os de RMN de ^1H , apontaram similaridade com os descritos por Biavatte *et al.* (2002) para a substância 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona (**Tabela 13**).

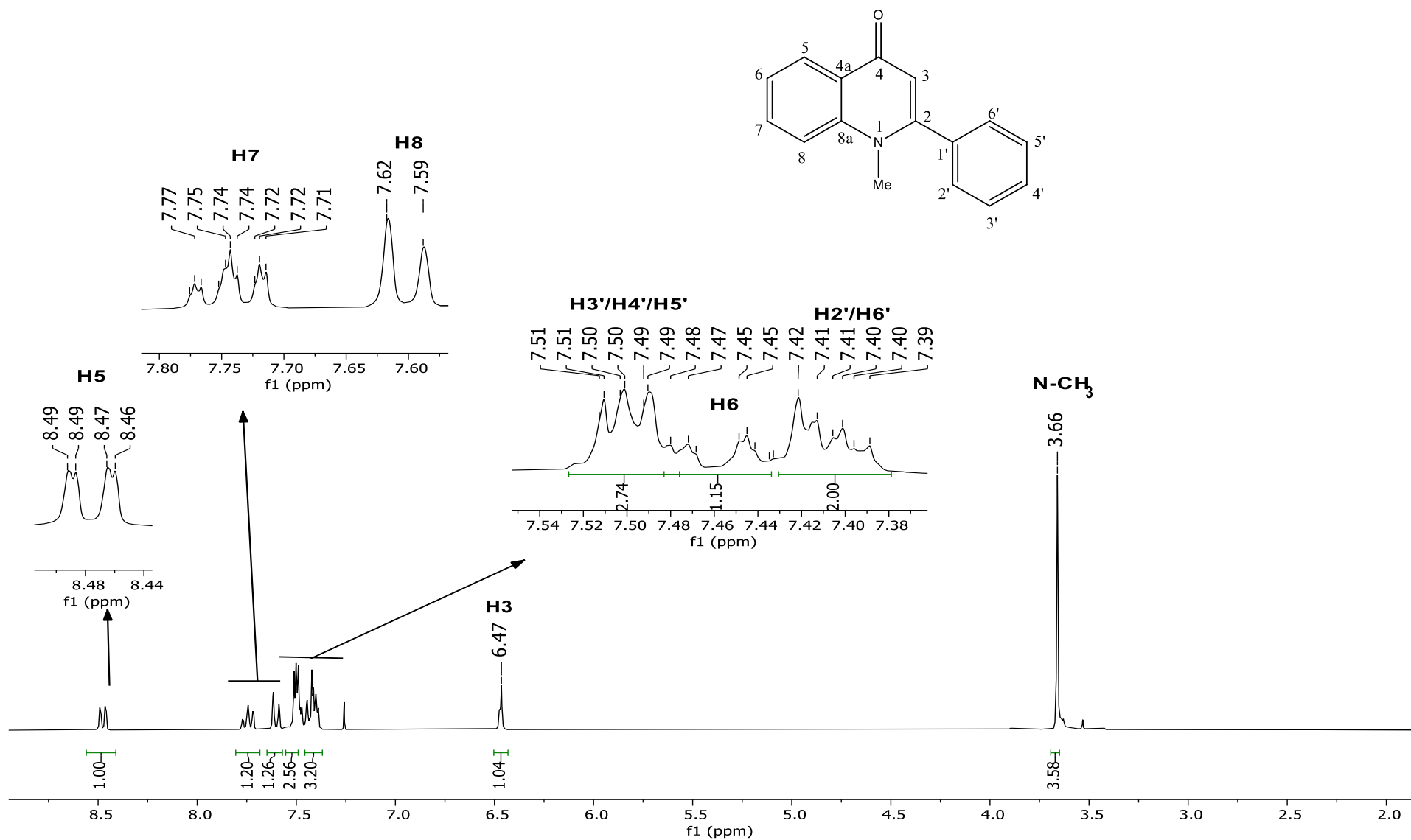


Figura 60 - Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da substância CCM-2.

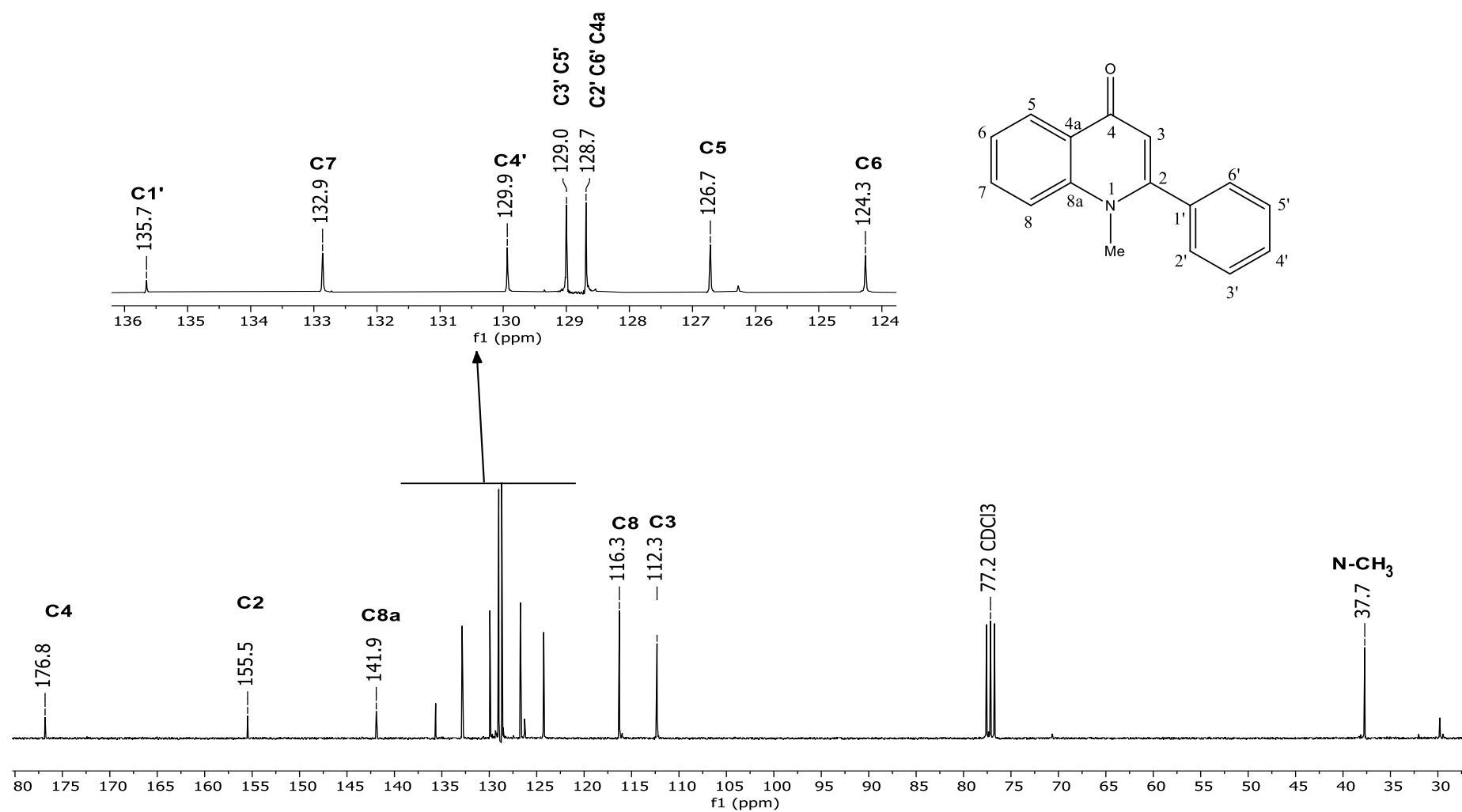


Figura 61 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da substância CCM-2.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância CCM-2 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz) comparados com os dados descritos na literatura para a 2- fenil-1-metilquinol-4-ona.

Posição/ Grupo	Substância CCM-3		2- fenil-1-metilquinol-4-ona*	
	δ_{H} mult. (J/Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J/Hz)	δ_{C}
2	---	155,5	---	154,8
3	6,46 (s)	112,3	6,31 s	112,7
4	---	176,8	---	177,6
4a	---	128,7	---	126,8
5	8,48 <i>dd</i> (8,1; 1,7)	126,2	8,51 <i>dd</i> (8,0; 1,4)	126,8
6	7,45 <i>t</i> (1,7)	124,2	7,45 <i>br t</i> (1,0)	123,8
7	7,74 <i>ddt</i> , (8,8; 8,1;1,7)	132,8	7,73 <i>dt</i> (7,8; 1,6)	132,3
8	7,60 <i>d</i> (8,8)	116,2	7,57 <i>d</i> (8,5)	115,9
8a	---	141,9	---	141,9
1'	---	135,6	---	135,9
2'	7,42-7,39 <i>m</i>	128,7	7,42 <i>m</i>	128,5
3'	7,51-7,47 <i>m</i>	128,9	7,52 <i>m</i>	128,8
4'	7,51-7,47 <i>m</i>	129,9	7,52 <i>m</i>	129,6
5'	7,51-7,47 <i>m</i>	128,9	7,52 <i>m</i>	128,8
6'	7,42-7,39 <i>m</i>	128,7	7,42 <i>m</i>	128,5
N-Me	3,66 s	37,7	3,62 s	37,3

*Biavatti *et al.* (2002). Dados obtidos em CDCl_3 a 400 e 100 MHz

Analizando o mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (**Figura 62**) da substância CCM-2, foram observadas correlações que indicam o acoplamento de δ_{H} 8,48 (H-5) com δ_{H} 7,45 (H-6, $J = 1,7$ Hz, indicando um acoplamento *meta*) e com δ_{H} 7,74 (H-7, $J = 8,1$ Hz, indicando um acoplamento *orto*); acoplamento de δ_{H} 7,45 com δ_{H} 7,74 ($J = 1,7$ Hz, indicando acoplamento *meta*) e acoplamento de δ_{H} 7,74 com δ_{H} 7,60 (H-8, $J = 8,8$ Hz, indicando acoplamento *orto*) coerentes com o padrão de substituição relativo 1,2-dissubstituído do anel aromático no sistema quinolinona. Há, também, indicação do acoplamento entre os grupos de hidrogênios H-3'/H-4'/H-5' e H-2'/H-6', no substituinte fenil.

O mapa de contorno HSQC- ^1H , ^{13}C (**Figura 63**) apresentou correlações que auxiliaram na correta atribuição dos sinais na estrutura proposta para CCM-2, tais como a correlação do hidrogênio olefínico δ_{H} 6,37 (H-3) com δ_{C} 112,31; as dos sinais δ_{H} 7,42-7,39 (H-2'/H-6') e δ_{H} 7,51-7,47 (H-3'/H-4'/H-5') com δ_{C} 128,8 e δ_{C} 129,6 respectivamente, para o grupo fenila, e a correlação entre o δ_{H} 3,66 e δ_{C} 37,71 caracterizando a metila ligada ao nitrogênio.

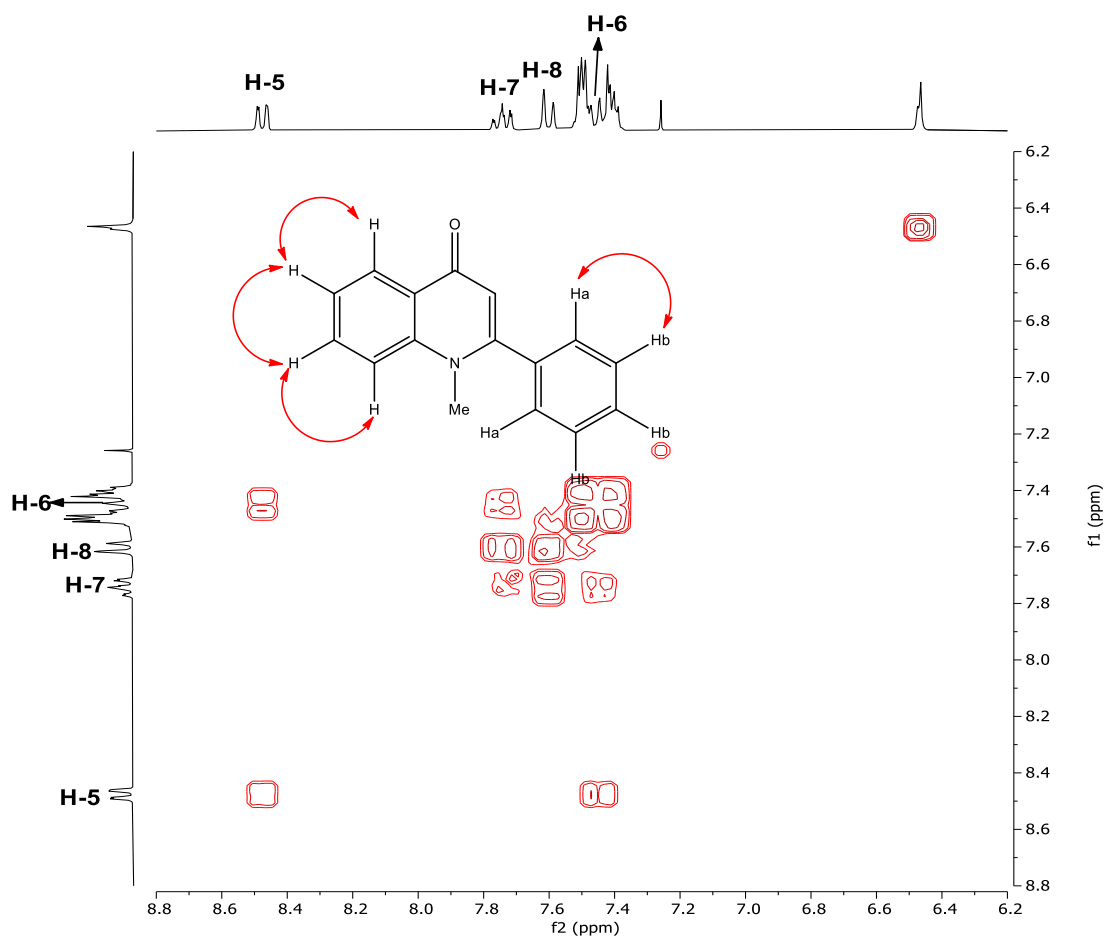


Figura 62 - Mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz) com principais correlações da substância CCM-3.

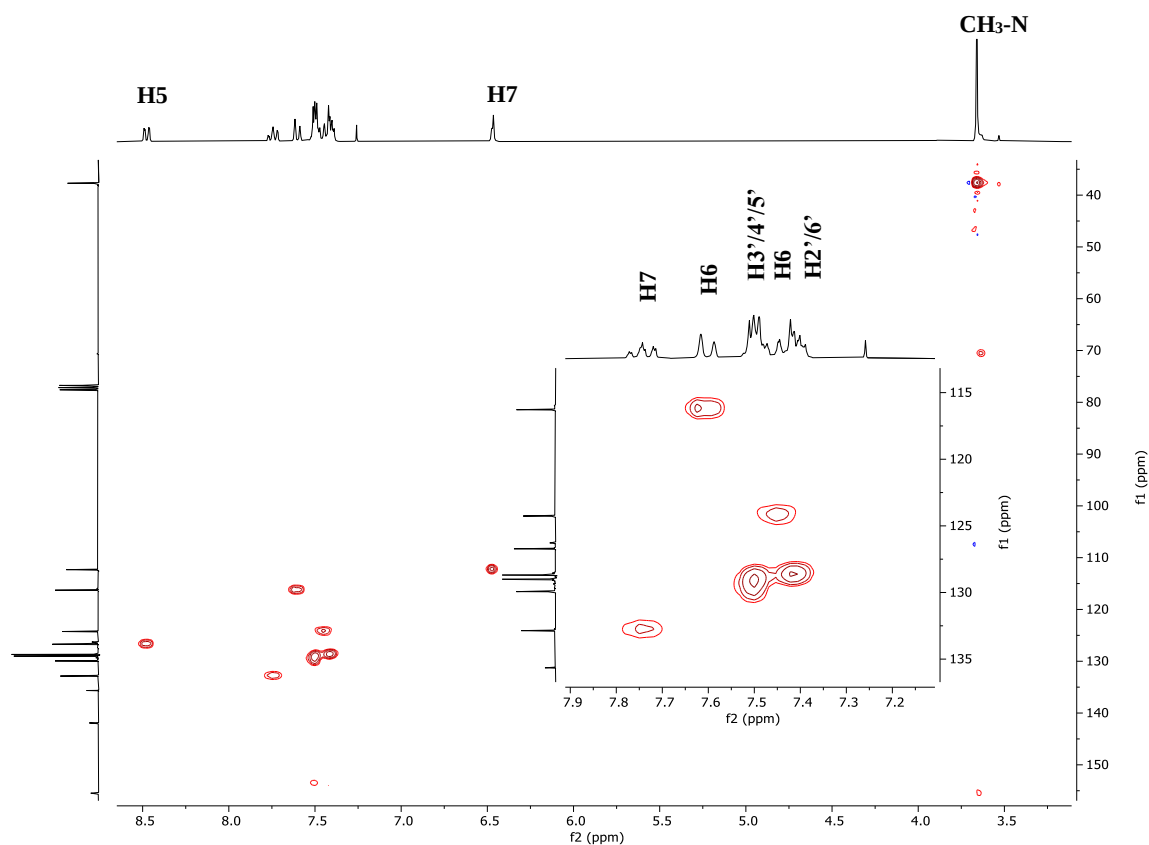


Figura 63 - Mapas de contorno HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-3.

A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais da substância CCM-2, comparados com a literatura, foram suficientes para confirmar a sua identidade como 2-fenil-1-metilquinolin-4-ona. Este alcaloide foi também isolado por Belleste (2009) no estudo fitoquímico de *C. marginatus*, pertencente ao mesmo gênero da espécie abordada neste trabalho, e por Biavatti *et al.* (2002) da espécie *Raulinoa echinata*, ambas da família Rutaceae. Ensaio de atividade biológica para esta substância revelaram ação tripanocida moderada contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (AMBROZIN *et al.*, 2008).

6.3.3. Substância CCM-3: 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona

A substância CCM-3 foi isolada a partir do fracionamento cromatográfico da fração MCLCM-6 (**Figura 14**, p. 26) na forma de um sólido cristalino incolor, solúvel em metanol e apresentou uma faixa estreita de temperatura de fusão variando entre 138 e 139 °C, indicando alto teor de pureza.

O espectro de massas obtido por ionização por elétrons (**Figura 64**) apresentou o pico do íon molecular com $m/z = 129$ correspondente à fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$. No espectro de infravermelho (IV) (**Figura 65**) foi observada banda de absorção larga na região de 3500-3300 cm^{-1} que, dada a fórmula molecular com base no espectro de massas, pode ser característico de estiramento da ligação O-H; banda de absorção intensa na região de 1670-1600 cm^{-1} característico de estiramento axial de carbonila lactâmica e bandas na região 1300-1100 cm^{-1} apontando a presença de grupos C-N e C-O (SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

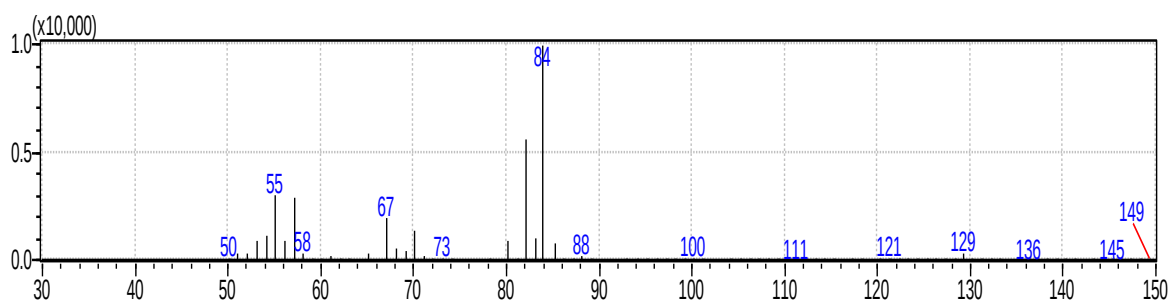


Figura 64 - Espectro de massas gerado por IE da substância CCM-3.

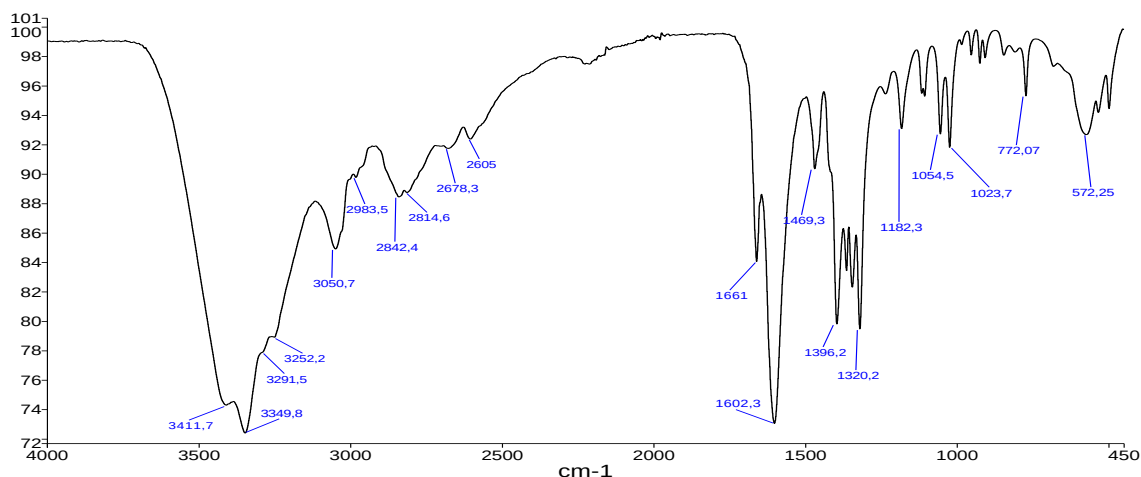


Figura 65 - Espectro na região do infravermelho por reflectância total atenuada da substância CCM-3

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 66**) apresentou sete sinais distribuídos na região de alifáticos, sendo um sinal em δ_{H} 2,96 (s, 3H) característico de metila ligada a heteroátomo, seguido dos sinais δ_{H} 2,05-1,97 (m, 1H), δ_{H} 2,18-2,09 (m, 2H), δ_{H} 2,54-2,47 (m, 1H), δ_{H} 3,15 (ddd, $J = 11,3; 9,0; 7,4$ Hz), δ_{H} 3,79-3,74 (m, 1H), δ_{H} 3,83 (dd, $J = 9,4; 7,0$ Hz). Por sua vez, o espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 67**) apresentou cinco sinais de carbonos alifáticos ($\delta_{\text{C}} = 24,0; 30,1; 41,4; 57,22; 72,0$) e um sinal em δ_{C} 172,2 indicando uma carbonila, em conformidade com a banda de absorção observada no espectro de IV. Não foram observados sinais com deslocamentos químicos típicos de carbonos aromáticos ou olefínicos. Estes dados apresentaram relativa semelhança com os dados espectrais descritos na literatura para a substância 5-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona (**Figura 68**) (ALAGAR-YADAV *et al.*, 2015).

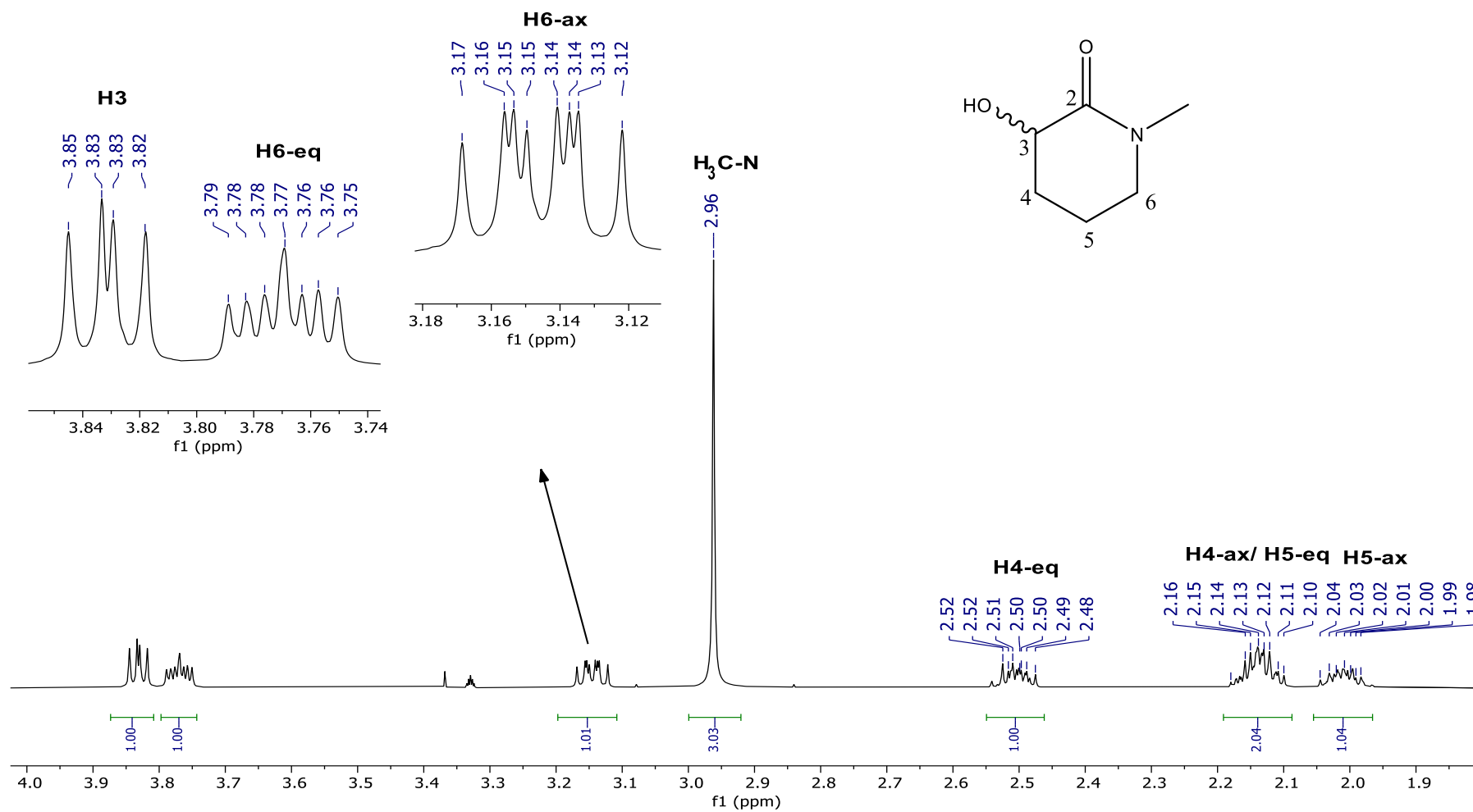


Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, em CD_3OD) da substância CCM-3

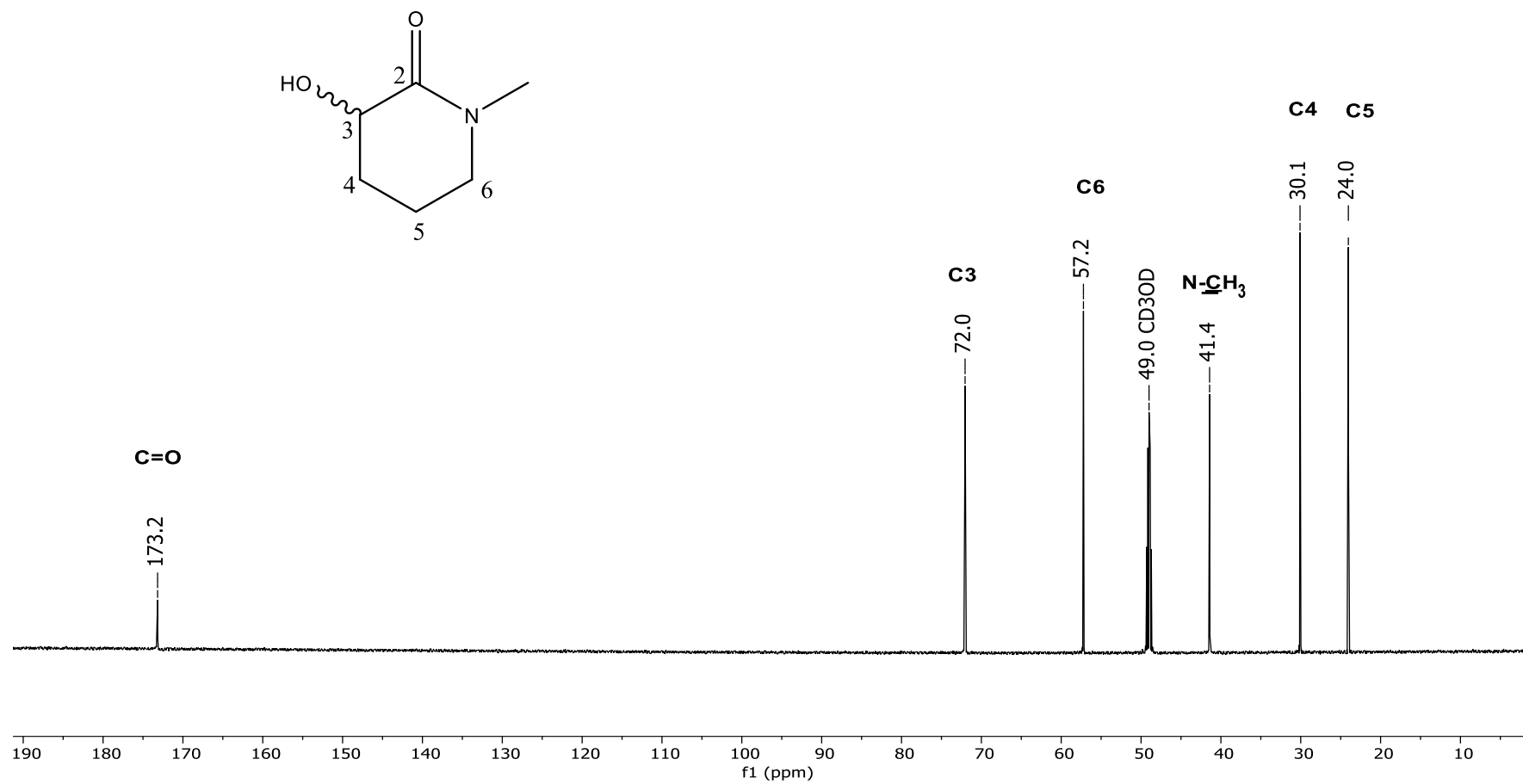


Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, em CD_3OD) da substância CCM-3.

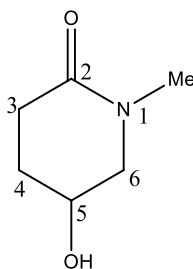


Figura 68 - Fórmula estrutural da substância 5-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona.

O mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (**Figura 69**) da substância CCM-3 apontou correlações consistentes com a estrutura de uma piperidinona: os sinais δ_{H} 2,04-1,97 (*m*, 1H) e δ_{H} 2,17-2,09 (*m*, 2H) correlacionando com δ_{C} 24,0; os sinais δ_{H} 2,53-2,47 (*m*, 1H) e, também, δ_{H} 2,17-2,09 (*m*, 2H) correlacionando com δ_{C} 30,1, e os sinais δ_{H} 3,79-3,74 (*m*, 1H) e δ_{H} 3,17-3,11 (*m*, 1H) correlacionando com δ_{C} 57,2, configurando três grupos CH_2 para os quais os hidrogênios não são quimicamente equivalentes, efeito da ocorrência de centros de quiralidade e/ou estrutura rígida onde os hidrogênios, no mesmo carbono, assumem orientações axiais e equatoriais resultando em diferentes valores de deslocamento químico. A integração do sinal em δ_{H} 2,17-2,09 indicou dois núcleos, porém, este aparece acoplando com dois carbonos diferentes, se tratando, então, da sobreposição dos sinais de hidrogênios ligados a carbonos distintos, mas que apresentam deslocamento químico semelhante. Também foi observado correlação do sinal δ_{H} 3,83 (*dd*, $J = 9,5; 7,1$ Hz - 1H) com δ_{C} 72,0 indicando um grupo CH no qual, também, está substituída a hidroxila, dado o valor do deslocamento químico. O sinal da metila (δ_{H} 2,96, *s*, 3H) aparece correlacionado com δ_{C} 41,4 caracterizando um grupo metila ligada ao nitrogênio.

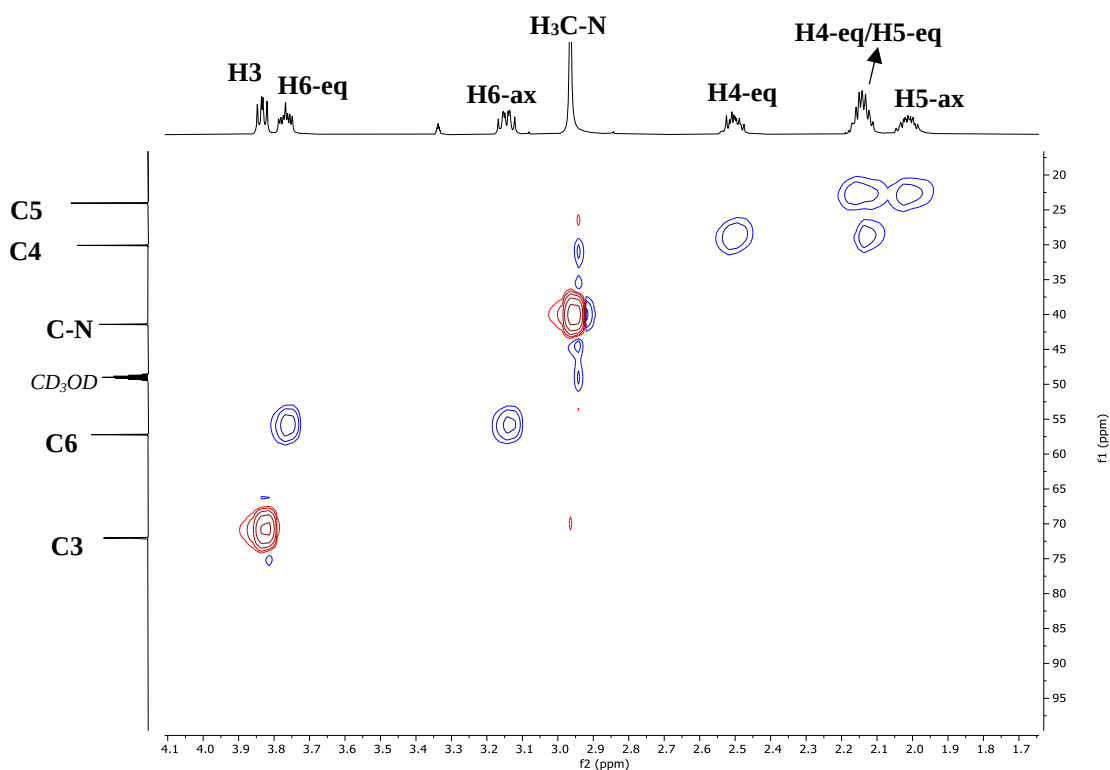


Figura 69 - Mapa de contornos HSQC- ^1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) da substância CCM-3.

As correlações apresentadas no mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (**Figura 70**) apontaram o acoplamento de H-ax (δ_{H} 3,17-3,11) e H-eq (δ_{H} 3,70-3,74) em δ_{C} 57,2 apenas com o H-ax (δ_{H} 2,17-2,09) e H-eq (δ_{H} 2,53-2,47) em δ_{C} 30,1; estes, por sua vez, aparecem acoplando, também, com H-ax (δ_{H} 2,04-1,97) e H-eq (δ_{H} 2,17-1,09) em δ_{C} 24,0, indicando que os três grupos CH_2 estão ligados em sequência. Desse modo, a hidroxila não poderia estar substituída em C-5 como na estrutura da 5-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona, e sim na posição C-3 ou C-6, resultando em duas estruturas possíveis para a substância CCM-3 (**Figura 71**). Esta observação também é confirmada pela indicação do acoplamento de δ_{H} 3,83 (1H) em δ_{C} 72,0 apenas com os H-ax e H-eq em δ_{C} 30,1 indicando a ocorrência de hidrogênios vicinais apenas em um dos carbonos ligado a δ_{C} 72,0.

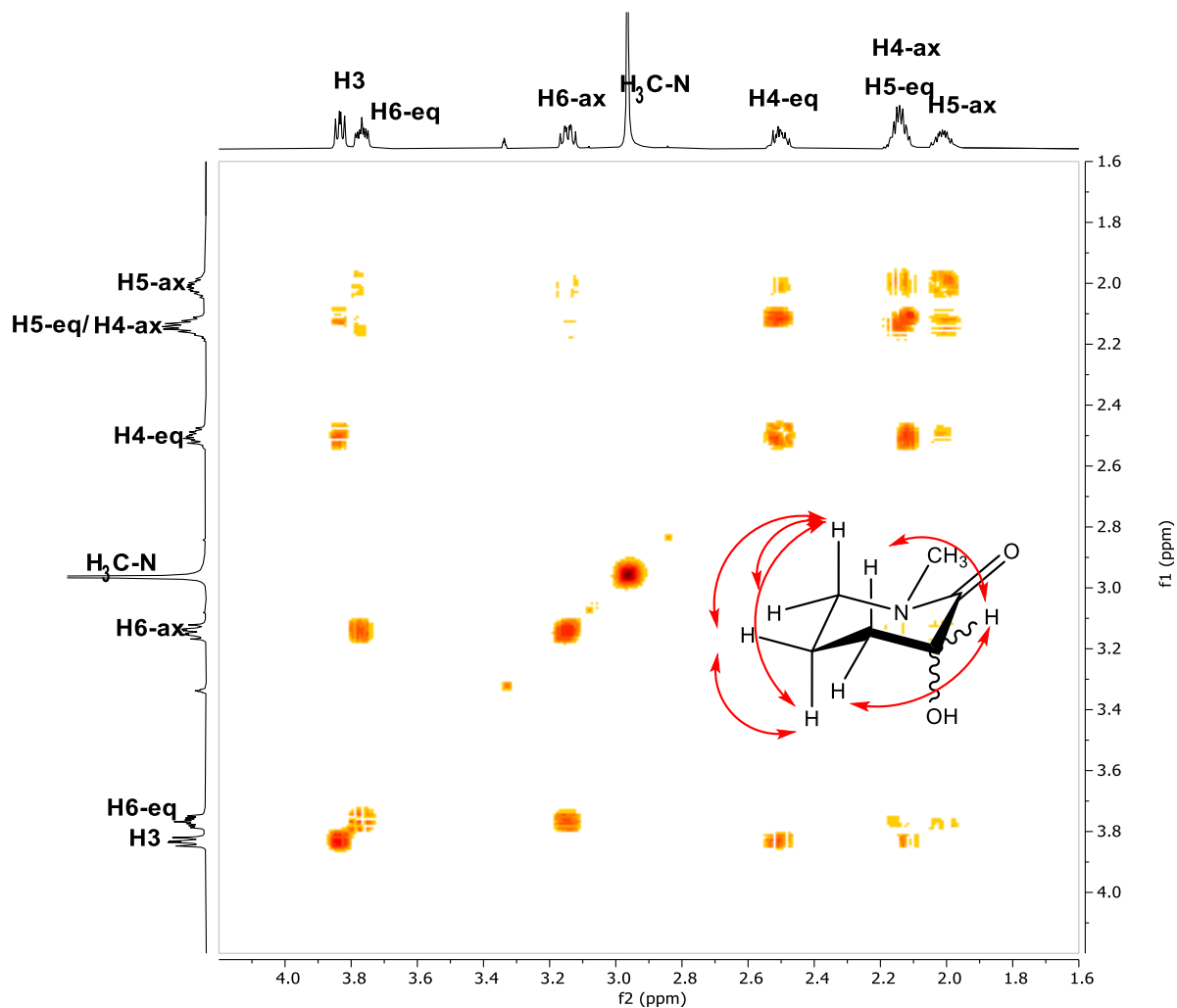


Figura 70 - Mapa de contornos COSY- ^1H , ^1H (600 MHz, em CDCl_3) da substância CCM-3 com as principais correlações apresentadas em sua estrutura.

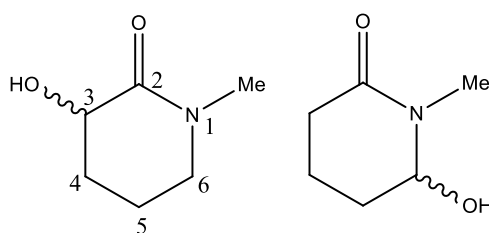


Figura 71 - Estruturas possíveis para a substância CCM-3

O mapa de contorno HMBC- ^1H , ^{13}C (**Figura 72**) apresentou correlações que permitiram determinar a posição da hidroxila na estrutura, sendo a principal delas a correlação do sinal δ_{H} 3,17-3,11 a três ligações com o carbono da metila, assegurando a sua posição em C-6 e, conseqüentemente, da hidroxila em C-3. Em concordância, é observado a correlação de H-4 com o carbono carbonílico a três ligações, o que não seria observado se a hidroxila estivesse

em C-6 e o sinal δ_H 2,53-2,47 fosse atribuído, então, ao H-5. As correlações apresentadas no mapa de contornos NOESY-1D (**Figura 73**) corroboraram com a atribuição da hidroxila em C-3 onde, a irradiação do sinal δ_H 3,15 (H-6) apresentou nOe com os hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio e também com H-6 geminal (δ_H 3,77) (**Figura 74**), confirmando o grupo CH_2 (δ_C 57,2) vizinho ao nitrogênio.

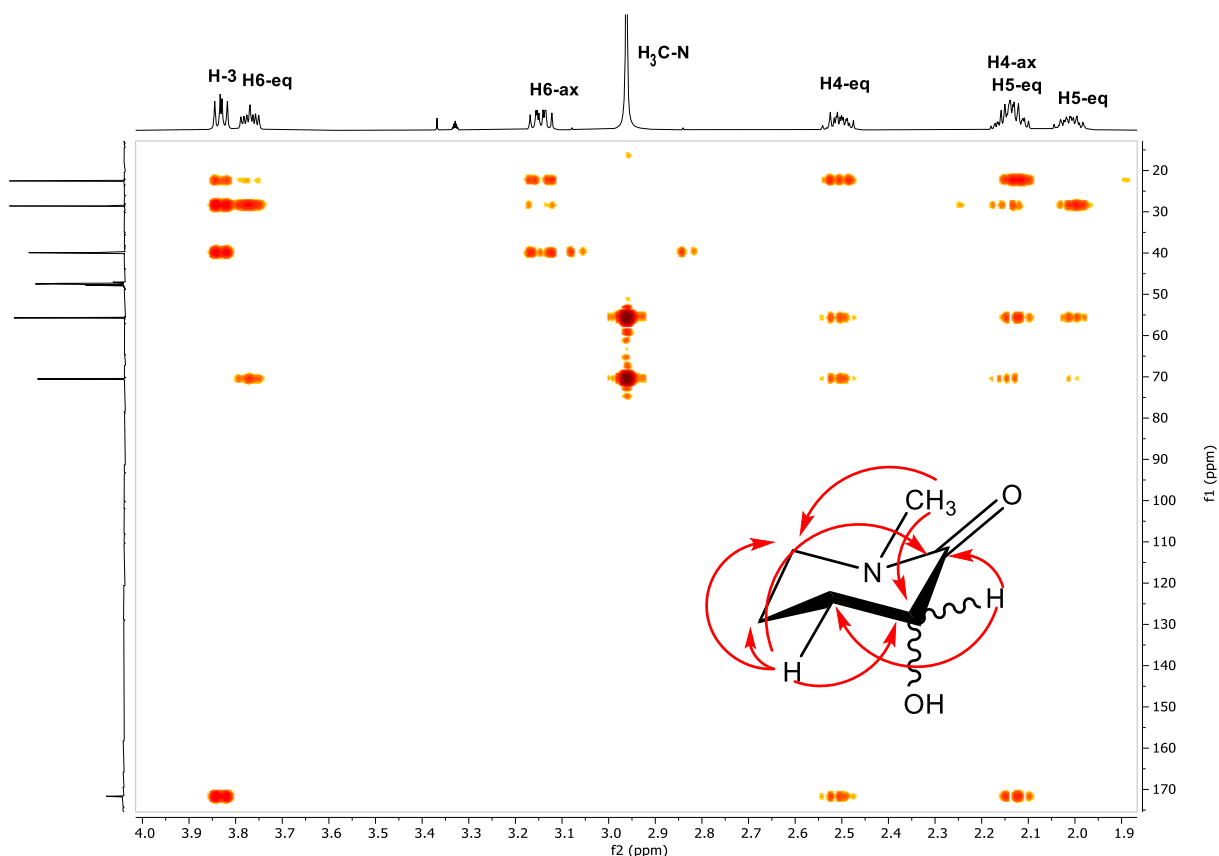


Figura 72 - Mapa de contornos HMBC- 1H , ^{13}C (600 e 150 MHz, em CD_3OD) com principais correlações para a substância CCM-3.

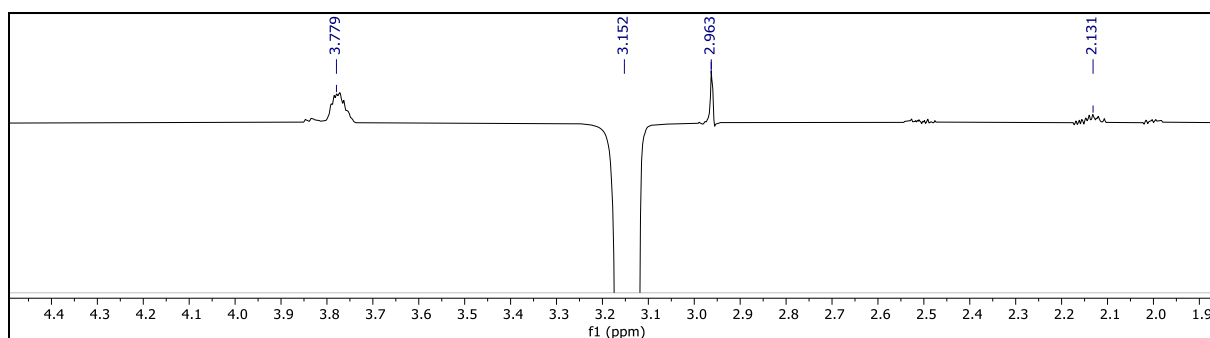


Figura 73 - Espectro NOESY-1D (em $DMSO-D_6$) da substância CCM-3 com irradiação em δ_H 3,15.

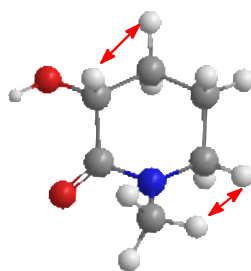


Figura 74 - Correlação observada no espectro de NOESY-1D para a substância CCM-3 em sua estrutura tridimensional.

A análise dos dados espectrais da substância CCM-3, resumidos na **Tabela 14**, levou a sua identificação como 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona (**Figura 75**). No entanto, apenas com estes dados não foi possível determinar a configuração absoluta em C-3. Experimentos de dicroísmo circular vibracional deverão ser realizados para determinação inequívoca da configuração absoluta.

Os relatos descritos na literatura para essa substância são apenas da sua obtenção através de síntese em laboratório como precursor para síntese de estricnocarpinas, uma classe bem conhecida de compostos ativos farmacodinâmicos (HERDEIS e DIMMERLING, 1984). A 5-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona, substância bastante similar a CCM-2, exceto pela posição da hidroxila, foi isolada das folhas de *Tragia involucrata* L. e revelou ser um potente relaxante muscular e anti-histamínico (ALAGAR-YADAV *et al.*, 2015), de modo que é interessante investigar se este mesmo potencial pode ser observado para a 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona. Os dados aqui descritos são, então, o primeiro relato da obtenção da 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona a partir de produtos naturais (plantas).

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância CCM-3.

Posição	$\delta_{\text{H mult. (J/Hz)}}$	δ_{C}	HMBC- ^1H , ^{13}C
2	-	173,3	
3	3,83 <i>dd</i> (9,5; 7,1)	72,0	C2, C4
4	ax- 2,17 – 2,09 eq- 2,53-2,47 <i>m</i>	30,1	C2, C3, C5, C6
5	ax 2,04 - 1,97 eq- 2,17 – 2,09 <i>m</i>	24,0	C3, C4, C6
6	ax- 3,17 – 3,11 eq- 3,79 – 3,74 <i>m</i>	57,2	C4, C5, $-\text{CH}_3$
N- CH_3	2,96 <i>s</i>	41,4	C6, C3

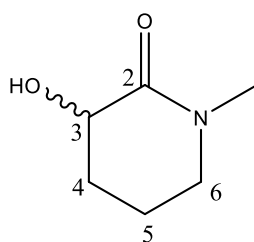


Figura 75 - Fórmula estrutural da substância CCM-3: 3-hidroxi-1-metilpiperidin-2-ona.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico dos extratos dos galhos e folhas de *Conchocarpus mastigophorus* levou ao isolamento e identificação de sete substâncias. Das folhas foram isoladas quatro substâncias, sendo três alcaloides do tipo piranoquinolin-4-ona, dois deles estão sendo descritas pela primeira vez, e um alcaloide indólico, 1-metilisatina, cuja identificação está sendo descrita pela primeira vez dentro do gênero *Conchocarpus*. Do caule foram isoladas três substâncias, dentre elas uma furanocumaraina inédita, uma piperidinona, cujo isolamento está sendo descrito pela primeira vez a partir de plantas, e um alcaloide quinolínic já relatado na literatura. As substâncias isoladas, principalmente os alcaloides quinolínicos e a cumarina, estão de acordo com o perfil fitoquímico descrito para o gênero *Conchocarpus*. A obtenção das substâncias inéditas reforça o potencial desse gênero para produção de moléculas com diversidade estrutural e ressalta a importância da continuidade de estudos das demais espécies para descobertas de novas substâncias.

Tem-se como perspectiva para este trabalho, realizar ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica das substâncias inéditas. O levantamento de dados da literatura revelou que várias substâncias pertencentes à mesma classe e estruturalmente similares às isoladas neste trabalho, apresentaram atividades biológicas diversas, dentre elas, antimicrobiana e citotóxica. Portanto, estas novas substâncias podem apresentar resultados promissores de bioatividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALAGAR-YADAV, S., RAMALINGAM, S., JABAMALAI-RAJ, A., SUBBAN, R. Antihistamine from *Tragia involucrata* L. leaves. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12(3), p. 217- 226, 2015.
- ALBARICI, T. R. **Estudo fitoquímico de *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas**. 2006, 182p. Tese (Doutorado em Ciência). Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos-SP. 2006.
- ALBERNAZ, L. *et al.* Spiranthenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. **Planta Medica**, v. 78(05), p. 459–464, 2012.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. Revisão taxonômica das Rutaceae do estado do Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 6(3), p. 1-67, 1976.
- ALICE, B.C.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. Metodologia de análise de Plantas. In: **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**. Canoas: Editora ULBRA, 1995, p. 11-19.
- ALMAHY, H. A.; ALAGIMI, A. A. Coumarins from the roots of *Cleome viscosa* (L.) antimicrobial and cytotoxic studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5(2), p. 241–244, 2012.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Química de produtos naturais: plantas que testemunham histórias. **Revista Virtual de Química**, v. 9(3), p. 1117–1153, 2017.
- ALWANA S. W.; *et al.* Acridone-based Antitumor Agents: A Mini-review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1012-1025, 2015.
- AMBROZIN, A. R. P. *et al.* Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n.4, p. 740-743, 2008.
- AMBROZIN, A. R. P. *et al.* New Pyrone and Quinoline Alkaloid from *Almeidea rubra* and their Trypanocidal Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 3A, p. 434-439, 2005.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, p. 1818-1834, 2016.
- BELLETE, B. S. **Estudo fitoquímico de *Conchocarpus marginatus* (Rutaceae), e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados**. 2009, 175p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos – SP, 2009.
- BELLETE, B. S.; *et al.* Phytochemical and chemosystematics studies of *Conchocarpus marginatus* and *C. inopinatus* (Rutaceae). **Química Nova**, v.35, n.11, p. 2132-2138, 2012.

- BETONI, J. E. C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Men Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p.387-390, 2006.
- BIAVATTI, M. W *et al.* Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine. **J.Braz. Chem. Soc.** v. 13, n.1, p.66-70, 2002.
- BOURGAUD, F. *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Review**, v. 15, p. 293-308, 2006.
- BRUNIERA, C. P., KALLUNKI, J. A. C., M. GROPPA. *Almeida A. St.-Hil.* belongs to *Conchocarpus* J. C. Mikan (Galipeinae, Rutaceae): evidence from morphological and molecular data, with a first analysis of subtribe Galipeinae. **PLoS ONE**. v. 10, n.5, 2015.
- CABRAL, R. *et al.* Targeted Isolation of Indolopyridoquinazoline Alkaloids from *Conchocarpus fontanesianus* Based on Molecular Networks. **Journal of Natural Products**., 79, 2270–2278, 2016.
- CABRAL, R. S. *et al.* Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.2, p. 374-380, 2012.
- CHAVARRÍA, M., *et al.* Cuatro compuestos nuevos del extracto no polar de la planta *Amyris brenesii* (Rutaceae) de Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** v. 56 (3), p. 1043-1051, 2008.
- CHEN, I.S. *et al.* Chemical and Bioactive Constituents from *Zanthoxylum Simulans*. **Journal of Natural Products**. v. 57, p. 1206-1211, 1994.
- CORTEZ, L. E. R. *et al.* New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. **Heterocycles**, v.78, n.8, p.2053-2059, 2009.
- CUNHA, A. P. O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente. In: **Caracterização e utilização das plantas aromáticas em Portugal**. Fundação Calouste Gulbenkian. 1ª ed, 328p, 2007.
- da SILVA B. N. M.; BASTOS, R. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida. **Quim. Nova**, v. 33, Nº. 10, p. 2279-2282, 2010.
- DA SILVA M. F. G. F. *et al.* The Widening Panorama of Natural Products Chemistry in Brazil. In: **Brazilian Medicinal Plants**. Florida: CRC Press, 2020. p. 33-65.
- DAIANA P. *et al.* A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Quim. Nova**. v. 44(2), p. 180-197. 2021.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3a ed, London, John Wiley e Sons, 2009, 515p.

DI LIBERTO, M. G. *et al.* Zanthosimuline and related pyranoquinolines as antifungal agents for postharvest fruit disease control. **ACS Omega**. v. 5, p. 7481–7487, 2020.

FACCHINI, P. H. **Estudo Fitoquímico biomonitorado visando o controle de formigas e microrganismos**. 2005, Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em química – UFSCar, São Carlos-SP, 2005.

FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology**. Wiley, p. 3-4, 2008.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: dezembro de 2020

FOGLIO, M.A. QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Construindo a História dos Produtos Naturais. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm. Acesso em dezembro de 2020.

GOTLLIEB, R. O.; BORIN, M. R. M. B. **Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas**. 2001 in: **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007., p. 107-122.

GROPPO M. *et al.*; A tree nymph of the Brazilian Atlantic Forest: *Dryades* (Galipeinae, Rutaceae), a new neotropical genus segregated from *Conchocarpus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 154:106971, 2021. doi: 10.1016/j.ympev.2020.106971.

GROPPO, M. Neotropical Rutaceae (2010). In: Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Rutaceae.htm>. Acesso em Janeiro de 2021.

GROPPO, M.; KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R.; ANTONELLI, A. Chilean pitavia more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the Family. **PhytoKeys**, v.19. p. 9-29, 2012.

GROVER, J., JACHAK, S. M. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. **RSC Advances**, v. 5(49), p. 38892-38905, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

HATHORE, H. S.; **Green pesticides for organic farming**: occurrence and proprieties of essential oil for use in pest control. In: **Green pesticides handbook**: essential oils for pest control. CRC Press, ed. 2017, p. 4-22.

HENRIQUES, A. T.; *et al.* Alcalóides: generalidades e aspectos básicos in: **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. p. 765-791.

HERDEIS, C.; DIMMERLING, A. Synthesis with hidroxilactamas III: a facile entry to the 1-oxo-8-carboline skeleton, synthesis of strechnocarpine. **Heterocycles**, v. 22, n. 10, p. 2277-2283, 1984.

HOEHNE, F. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. **Departamento de Botânica**, São Paulo-SP: p. 355, 1939.

JEN, S. J.; CHEN, I. S. Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, Vol. 34, Nº 6, p. 1659-1661, 1993.

JORGE, S.S.A. **Plantas medicinais: coletânea de saberes**. 2009. Disponível em: <https://docplayer.com.br/2788147-Plantas-medicinais-coletanea-de-saberes-schirlei-da-silva-alves-jorge.html>. Acessado em janeiro de 2021.

KALLUNKI, J. A., MEIER, W. *Conchocarpus jirajaranus* (Rutaceae), a new endemic species of the Coastal Cordillera of Venezuela. **Brittonia**, v. 71(2), p. 196-200, 2019.

KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R. Synopses of *Angostura* Roem. e Schult. and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae). **Kew Bulletin**, v. 53(2), p. 257-334, 1998.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, p. 537-556.

LEVY, S. B., e MARSHALL, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10 (12), p.122–129, 2004.

LEWINSOHN, T.M. e PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade** v.1, n.1, p. 36-42, 2005.

LICHMAN, B. R. The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. **Nat. Prod. Rep.**, V. 38, p. 103–129, 2021

MACIEL D. G., *et al.* Trypanocidal Activity of Flavanone Derivatives. **Molecules**, v. 25(2), p.397, 2020.

MAFEZOLI, J. **Atividade tripanocina e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae**. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado, 240 p. 2001.

MARQUES E. F.; VIEIRA P. C.; SEVERINO R. P. Acridone alkaloids as inhibitors of cathepsin I and V. **Quím. Nova**. v.39, n.1, 2016.

MAHENDRA, C. K., *et al.* Angelicin—A Furocoumarin Compound With Vast Biological Potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

MARTINEZ, S. T., FERREIRA, V. F. As isatinas do professor Angelo. **Rev. Virtual Quím.** v. 9 (3), p. 1154-1183, 2017.

MCLAUGHLIN, M. J., HSUNG, R. P. Total Syntheses of Pyranoquinoline Alkaloids: Simulenoline, Huajiaosimuline, and ($\pm$)-7-Demethoxyzanthodioline. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 1049–1053, 2001.

MICHAEL J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 166–187, 2008.

MICHAEL, J. P. The alkaloids. **Elsevier Inc.** v. 78, 2017. 108 p.

NUNES, F. M. *et al.* Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of the alkaloid 3,3-diisopentenyl-*N*-methyl-2,4-quinoldione and novel reaction derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43(2), p. 180–183, 2005.

OLIVEIRA, F. O. **Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki (Rutaceae)**. 2015, 116 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química – UESB, Jequié-BA, 2015.

OLIVEIRA, L. S. S. **Constituinte químico de *Conchocarpus cyrtanthus* (Rutaceae)**. 2014, 220 p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014.

PANASENKO, A. A., CAPROSH, A. F., RADUL, O. M., REKHTER, M. A. ^{13}C NMR spectra of some indole derivatives. **Russian Chemical Bulletin**, v. 43, n. 1, p. 66-69, 1994.

PETSKO, G. A. For medicinal purposes. **Nature**, v. 234, n.6604, p. 7-9, 1996.

PIRANI, J. R., GROPPPO, M., KALLUNKI, J. A. Two new species and a new combination in *Conchocarpus* (Rutaceae, Galipeeae) from eastern Brazil. **Kew Bulletin** v. 66, p. 521-527, 2011.

PIRANI, J.R. e GROPPPO M. Rutaceae in **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1591-1593, 2010.

PIRANI, J.R., GROPPPO, M. 2015. Rutaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em janeiro de 2021.

ROBERTS M. F.; STRACK D.; WINK, M. Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. **Annual Plant Reviews**. v. 40, p. 20-41, 2018.

REED, M. W., MOORE, H. W. Efficient synthesis of furochromone and furocoumarin natural products (khellin, pimpinellin, isophellopterin) by thermal rearrangement of 4-furyl-4-hydroxycyclobutenones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53(18), p. 4166–4171. 1988.

RUTACEAE in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB438>>. Acesso em: 02 dez. 2020

SÁ, I. C. G. **Estudo fitoquímico de *Rabdodendron amazonicum*, *Conchocarpus inopinatus* e avaliação dos compostos isolados na inibição da fotossíntese**. 2010, 111 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP 2010.

SARDARI, S., *et al.* Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.7(9), p. 1933–1940, 1999.

SARDELLA, T. B. **Isatina, N-metil-isatina, N-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol: Perfil Antinociceptivo e Mecanismo de Ação**. 2014, 116 p. (Dissertação) Programa de pós-graduação em farmacologia e química medicinal - UFRJ, Rio de Janeiro, 2014.

SEPÚLVEDA C. S.; FASCIO M. L.; GARCÍA1 C. C.; D'ACCORSO N. B.; DAMONTE E. B. Acridones As Antiviral Agents: Synthesis, Chemical and Biological Properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2402-2414, 2013.

SILVA-NETO, Total Synthesis of Some Important Natural Products from Brazilian Flora In: **Brazilian Medicinal Plants**. Florida: CRC Press, 2020. p. 305-323.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 506p.

SIMÕES, C. M. O *et al.* in: **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

SZEWCZYK, A. A.; GLOWNIAK, K.; BAJ, T. Furochinoline alkaloids in plants from Rutaceae Family – a review. **Curr. Issues Pharm. Med. Sci.**, v. 29, n. 1, p. 33-38, 2016.

VASCONCELOS, J. F. *et al.* Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 609(1–3), p. 126–131, 2009.

VELOZO, E.S. **Fitoquímica comparada dos gêneros *Conchocarpus*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae)**, 1995. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

VIEIRA P.C, *et al.* Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis. **Journal of Natural Products**, v.55, p. 1112-1117, 1992.

WATERMAN P. G. GRUNDON M. F. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution as systematic significance. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 3 (7/8). p. 149-180, 1975.

WATERMAN, P. G., GRUNDON, M.F. Chemistry and chemical taxonomy on the Rutales. London, **Academic Press**. p. 308-309, 1983.

WU, S-J., CHEN, I-H. Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1659-1661, 1993.

YARA BRASIL. **Produção mundial de citros**. Disponível em: <https://www.yarabrasil.com.br/nutricao-de-plantas/citros/producao-mundial-de-citros/> Acesso em 10 de novembro de 2020.

ZUO, G.-Y., WANG, C.-J., HAN, J., LI, Y.-Q., WANG, G.-C. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23(14), p. 1814–1820, 2016.