



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LUANA SAN DE OLIVEIRA BRITO**

***Erythroxylum bezerrae* Plowman: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE SEUS METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS**

**FORTALEZA**

**2022**

LUANA SAN DE OLIVEIRA BRITO

*Erythroxylum bezerrae* Plowman: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE SEUS METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química orgânica.

Orientadora: Profa. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B876e Brito, Luana San de Oliveira.  
Erythroxyllum bezerrae Plowman: isolamento, caracterização e avaliação da atividade farmacológica de seus metabólitos secundários / Luana San de Oliveira Brito. – 2022.  
212 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa.
1. Erythroxyllum. 2. Erythroxyllum bezerrae. 3. alcaloides tropânicos. 4. diterpenos. I. Título.  
CDD 572
-

LUANA SAN DE OLIVEIRA BRITO

*Erythroxylum bezerrae* Plowman: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Química da Universidade Federal do Ceará  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor (a) em Química. Área de  
concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 16/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Mariana Helena Chaves  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Aos meus avós, Manoel (*in memoriam*) e Maroli, por todos os ensinamentos, amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida;

À minha família, por todo o suporte, amor e carinho;

À minha orientadora, Profa. Dra. Otília D. L. Pessoa, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e orientação simples e clara. Obrigada pelos ensinamentos, compreensão e por sua amizade;

Ao Prof. Dr. Edilberto R. Silveira, por conceder a realização dos espectros de RMN, pela sua disposição em cooperar com este trabalho e por sua amizade;

Aos professores do curso de pós-graduação em química (UFC), pela contribuição teórica ao meu trabalho;

Aos amigos que estiveram comigo nessa caminhada. Aos colegas do LAFIPLAM, pela amizade, convívio e pelos momentos de descontração no laboratório;

Aos órgãos CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro ao curso de pós-graduação e pelas bolsas de estudo concedidas;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo químico da casca do lenho do caule de *Erythroxylum bezerrae*, uma planta endêmica da Região Nordeste, visando o isolamento e a elucidação estrutural de novos compostos bioativos. A investigação química realizada com *E. bezerrae* resultou no isolamento de 19 substâncias. Do extrato etanólico da casca do caule foram isolados oito compostos pertencentes à classe dos alcaloides tropânicos, sendo seis inéditos, denominados: 3 $\alpha$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-1**), 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-2**), 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-tropano (**EB-3**), 6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-3 $\alpha$ -hidroxi-tropano (**EB-4**), 6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-3 $\alpha$ -hidroxi-tropano (**EB-5**) e 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-6**). Além destes, foram isolados dois alcaloides já conhecidos: 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-7**) e 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-8**). Do extrato hexânico do lenho do caule foram isolados 11 diterpenos, dos quais dez são cauranos e um labdano. Para o isolamento das substâncias foram utilizadas técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna sobre gel de sílica, extração em fase sólida (SPE-C18) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A determinação estrutural dos compostos isolados foi realizada através de técnicas espectroscópicas tais como ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), unidimensionais e bidimensionais, espectrometria de massas (EM), análise de difração de raio-X de monocristal e, ainda, comparação com dados registrados na literatura. Os alcaloides isolados foram submetidos a testes de atividade citotóxica frente às linhagens L929 (Fibroblasto murinho), PC-3 (Próstata), HCT-116 (carcinoma de cólon), SNB-19 (Sistema nervoso) e NCIH-460 (Pulmão), porém somente os compostos **EB-5** e **EB-6** foram considerados ativos, com valores de CI<sub>50</sub> variando entre 10,55-13,89  $\mu$ M e 3,38-15,02  $\mu$ M, respectivamente. Adicionalmente, realizou-se o teste para atividade anti-inflamatória dos compostos diterpênicos e de citotoxicidade sobre células macrófago murino RAW 264.7. A avaliação da viabilidade celular evidenciou valores de CI<sub>50</sub> para EB9-EB19 variando de 70,57 – 346,3, sendo **EB-9**, **EB-10** e **EB-16** as amostras com menor citotoxicidade e com maior capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO), 3,21  $\pm$  0,23, 3,76  $\pm$  0,21 e 3,56  $\pm$  0,32  $\mu$ M, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Erythroxylum*; *Erythroxylum bezerrae*; alcalóides tropânicos; diterpenos.

## ABSTRACT

This work describes the chemical study of the bark of wood of the stem of *Erythroxylum bezerrae*, a plant endemic to the Northeast Region, aiming at the isolation and structural elucidation of new bioactive compounds. The chemical investigation carried out with *E. bezerrae* resulted in the isolation of 19 substances. From the ethanolic extract of the stem bark of eight compounds belonging to the class of tropane alkaloids, six of which were unpublished, called:  $3\alpha$ -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoiloxy)- $6\beta$ -(benzoiloxy)- $7\beta$ -hydroxy-tropane (**EB-1**),  $3\alpha$ -(3,4,5-trimethoxybenzoiloxy)- $6\beta$ -(benzoiloxy)- $7\beta$ -hydroxy-tropane (**EB-2**),  $3\alpha$ -(3,4,5-trimethoxycinnamoiloxy)- $6\beta$ -(3,4,5-trimethoxybenzoiloxy)-tropane (**EB-3**),  $6\beta$ -(benzoiloxy)- $7\beta$ -(3,4,5-trimethoxybenzoiloxy)- $3\alpha$ -hydroxy-tropane (**EB-4**),  $6\beta$ -(benzoiloxy)- $7\beta$ -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoiloxy)- $3\alpha$ -hydroxy-tropane (**EB-5**) and  $3\alpha$ -(3,4,5-trimethoxycinnamoiloxy)- $6\beta$ -(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoiloxy)- $7\beta$ -hydroxy-tropane (**EB-6**). In addition to these, two known alkaloids were isolated:  $3\alpha$ -(3,4,5-trimethoxycinnamoiloxy)- $6\beta$ -(3,4,5-trimethoxybenzoiloxy)- $7\beta$ -hydroxy-tropane (**EB-7**) e  $3\alpha$ -(3,4,5-trimethoxycinnamoiloxy)- $6\beta$ -(benzoiloxy)- $7\beta$ -hydroxy-tropane (**EB-8**). From the hexane extract of the wood of the stem, 11 diterpenes were isolated, of which ten are kauranes and one labdane. Chromatographic techniques were used to isolate the substances, including column chromatography on silica gel, solid phase extraction (SPE-C18) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The structural determination of the isolated compounds was performed using spectroscopic techniques such as hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR), one- and two-dimensional, mass spectrometry (MS), single crystal X-ray diffraction analysis and, still, comparison with data recorded in the literature. The isolated alkaloids were submitted to cytotoxic activity tests against the strains L929 (Murine Fibroblast), PC-3 (Prostate), HCT-116 (colon carcinoma), SNB-19 (Nervous System) and NCIH-460 (Lung), however, only compounds EB-5 and EB-6 were considered active, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 10.55-13.89  $\mu\text{M}$  and 3.38-15.02  $\mu\text{M}$ , respectively. Additionally, a test was performed for anti-inflammatory activity of diterpene compounds and cytotoxicity on RAW 264.7 murine macrophage cells. The evaluation of cell viability showed  $\text{IC}_{50}$  values for EB9-EB19 ranging from 70.57-346.3, with EB-9, EB-10 and EB-16 being the samples with the lowest cytotoxicity and with the greatest ability to inhibit the production of nitric oxide (NO),  $3.21 \pm 0.23$ ,  $3.76 \pm 0.21$  and  $3.56 \pm 0.32$   $\mu\text{M}$ , respectively.

**Keywords:** *Erythroxylum*; *Erythroxylum bezerrae*; tropane alkaloids; diterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do alcaloide tropânico cocaína e do diterpeno caureno.....	23
Figura 2 – Fotos digitais de <i>E. bezerrae</i> em seu habitat natural.....	24
Figura 3 – Representação esquemática da formação do núcleo tropânico..	26
Figura 4 - Estrutura química das moléculas: Atropina, escopolamina e cocaína. ....	26
Figura 5 - Estruturas de alcaloides tropânicos bioativos .....	30
Figura 6 -Estruturas moleculares dos esqueletos básicos dos diterpenos.....	31
Figura 7 - Ciclização de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) .....	32
Figura 8 - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B .....	48
Figura 9 - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B .....	49
Figura 10 - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B.....	50
Figura 11 - Fluxograma ilustrando o fracionamento de <i>E. bezerrae</i> .....	51
Figura 12 - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B.....	57
Figura 13 - Fluxograma mostrando os compostos obtidos de <i>E. bezerrae</i> . ....	58
Figura 14– Esquema mostrando a reação de redução do MTT .....	60
Figura 15 - RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC para EB-1.....	65
Figura 16 – Desenho em ORTEP da estrutura de EB-1. ....	66
Figura 17 - Correlações importantes de NOESY (↔) para EB-1 .....	66
Figura 18 - Estrutura do alcaloide tropânico isolado por Oliveira <i>et al.</i> (2011).....	67
Figura 19 – Estrutura de EB-1.....	67
Figura 20 - Espectro de absorção no infravermelho (KBr) de EB-1 .....	69
Figura 21 - Espectro de massa de alta resolução, [M+H] <sup>+</sup> de EB-1. ....	69
Figura 22 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-1. ....	70
Figura 23 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-1.....	70
Figura 24 - Espectro de RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-COSY (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 x 500 MHz,) de EB-1.....	71
Figura 25 - Espectro de RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 x 125 MHz) de EB-1.....	71
Figura 26 - Espectro de RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HMBC (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 x 125 MHz) de EB-1.....	72
Figura 27 - Espectro de RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-ROESY (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 x 500 MHz) de EB-1.....	72
Figura 28 - RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC (↔) e ROESY (↔) para EB-2. ....	74
Figura 29 - Estrutura de EB-2 e da estrutura do alcaloide Catuabina B.....	74
Figura 30 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-2.....	76
Figura 31 - Espectro de absorção no infravermelho de EB-2.....	76
Figura 32 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-2.....	77

Figura 33 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-2.....	77
Figura 34 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-2.....	78
Figura 35 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-2.....	78
Figura 36 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-2.....	78
Figura 37 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-2.....	79
Figura 38 - RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ – HMBC para EB-3.....	82
Figura 39 – Unidade assimétrica da estrutura cristalina de EB-3,.....	82
Figura 40 - Estrutura de EB-3 e do alcaloide obtido por Chavez <i>et al</i> , 2002.....	83
Figura 41 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-3.....	85
Figura 42 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-3.....	85
Figura 43 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	86
Figura 44 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	86
Figura 45 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	87
Figura 46 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	87
Figura 47 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	88
Figura 48 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-3.....	88
Figura 49 - HMBC e $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -NOESY para EB-4.....	90
Figura 50 - Estrutura de 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dibenzoiloxi-tropano.....	90
Figura 51 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-4.....	92
Figura 52 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-4.....	92
Figura 53 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	93
Figura 54 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	93
Figura 55 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	94
Figura 56 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	94
Figura 57 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	95
Figura 58 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4.....	95
Figura 59 - HMBC e $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -NOESY para EB-5.....	97
Figura 60 - Estrutura de 6,7-dibenzoyloxytropan-3-ol isolado por Cruz <i>et al</i> ., 2016.....	97
Figura 61 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-5.....	99
Figura 62 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-5.....	99
Figura 63 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-5.....	100
Figura 64 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-5.....	100
Figura 65 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-5.....	101
Figura 66 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-5.....	101

Figura 67 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-5 .....	102
Figura 68 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-5.....	102
Figura 69 - HMBC e <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-NOESY para EB-6. ....	104
Figura 70 – Unidade assimétrica da estrutura cristalina de EB-6.....	104
Figura 71 - Estrutura de EB-6 e do alcaloide obtido por Chavez <i>et al</i> , (2002). ....	105
Figura 72 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-6.....	107
Figura 73 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-6.....	107
Figura 74 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6 .....	108
Figura 75 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6. ....	108
Figura 76 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6.....	109
Figura 77 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6 .....	109
Figura 78 - Espectro de RMN NOESY (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6. ....	110
Figura 79 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-6. ....	110
Figura 80 - RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC e <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-NOESY para EB-7.....	112
Figura 81 - Unidade assimétrica da estrutura cristalina de EB-7. ....	112
Figura 82 - Estrutura de EB-7 e do alcaloide obtido por Chavez <i>et al</i> , (2002). ....	113
Figura 83 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-7.....	115
Figura 84 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7.....	115
Figura 85 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7.....	116
Figura 86 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7.....	116
Figura 87 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7.....	117
Figura 88 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7. ....	117
Figura 89 - Espectro de RMN NOESY (300 X 300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-7 .....	118
Figura 90 - RMN 2D <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C – HMBC e <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H-NOESY para EB-8.....	120
Figura 91 - Estrutura de EB-8.....	120
Figura 92 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-8.....	122
Figura 93 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8.....	122
Figura 94 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8.....	123
Figura 95 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8.....	123
Figura 96 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8.....	124
Figura 97 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8. ....	124
Figura 98 - Espectro de RMN NOESY (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) de EB-8.....	125
Figura 99 - Composto 3β,7β-hidroxicaurenolideo e correlações de EB-9. ....	127
Figura 100 - Correlações a longa distância observadas no espectro de EB-9.....	128

Figura 101 - Desenho ORTEP da estrutura cristalina de EB-9. ....	128
Figura 102 - estrutura de EB-9 foi estabelecida como sendo 3 $\alpha$ -hidroxicaurenolídeo. ....	128
Figura 103 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-9.....	130
Figura 104 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9. ....	130
Figura 105 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9. ....	131
Figura 106 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9.....	131
Figura 107 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9.....	132
Figura 108 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9.....	132
Figura 109 - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-9. ....	133
Figura 110 - Correlações a longa distância observadas no espectro de EB-10. ....	135
Figura 111 - Correlações a longa distância observadas no espectro de EB-10. ....	135
Figura 112 – Desenho em ORTEP da estrutura cristalina de EB-10.....	135
Figura 113 - Estrutura de EB-10.....	136
Figura 114 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-10.....	138
Figura 115 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10.....	138
Figura 116 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10 .....	139
Figura 117 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10.....	139
Figura 118 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10.....	140
Figura 119 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10.....	140
Figura 120 - Espectro de RMN ROESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-10.....	141
Figura 121 - Estrutura mostrando as principais correlações de EB-11. ....	143
Figura 122 - Estrutura mostrando as correlações observadas no espectro NOESY.....	143
Figura 123 - Estrutura de EB-11.....	143
Figura 124 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-11.....	145
Figura 125 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11.....	145
Figura 126 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11. ....	146
Figura 127 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11 .....	146
Figura 128 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11.....	147
Figura 129 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11 .....	147
Figura 130 - Espectro de RMN NOESY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-11. ....	148
Figura 131 - Estrutura do cafestol. ....	149
Figura 132 - Algumas correlações importantes de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ de HMBC.....	150
Figura 133 - Estrutura de EB-12.....	150
Figura 134 - Algumas correlações importantes de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de NOESY. ....	151

Figura 135 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-12.....	153
Figura 136 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12.....	153
Figura 137 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12. ....	154
Figura 138 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12.....	154
Figura 139 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12.....	155
Figura 140 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12.....	155
Figura 141 - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-12. ....	156
Figura 142 - Algumas correlações importantes de HMBC. ....	158
Figura 143 - Algumas correlações importantes de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de NOESY. ....	158
Figura 144 - Estrutura de EB-13.....	158
Figura 145 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-13.....	160
Figura 146 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13. ....	160
Figura 147 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13. ....	161
Figura 148 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13.....	161
Figura 149 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13.....	162
Figura 150 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13.....	162
Figura 151 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-13. ....	163
Figura 152 - Algumas correlações importantes de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ de HMBC.....	164
Figura 153 - Algumas correlações importantes de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de NOESY. ....	165
Figura 154 - Estrutura de EB-14 e do <i>ent</i> -caureno. ....	165
Figura 155 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14. ....	167
Figura 156 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14. ....	167
Figura 157 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14.....	168
Figura 158 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14.....	168
Figura 159 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14.....	169
Figura 160 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-14. ....	169
Figura 161 - Algumas correlações de HMBC. ....	171
Figura 162 - Estruturas de EB-15, $3\beta$ -hidroximanol e Manool.....	171
Figura 163 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15. ....	173
Figura 164 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15. ....	173
Figura 165 - Espectro de RMN COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15.....	173
Figura 166 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15.....	174
Figura 167 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15.....	175
Figura 168 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15. ....	175

Figura 169 - Algumas correlações de HMBC de EB-16. ....	177
Figura 170 - Algumas correlações de NOESY de EB-16. ....	177
Figura 171 - Estruturas de EB-16 e ent-caur-16-eno-3 $\beta$ ,15 $\beta$ -diol. ....	178
Figura 172 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	180
Figura 173 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	180
Figura 174 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	181
Figura 175 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	181
Figura 176 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	182
Figura 177 - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16. ....	182
Figura 178 - Estruturas de EB-17 e ent-caur-16-en-3 $\beta$ -ol. ....	184
Figura 179- Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	186
Figura 180 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	186
Figura 181 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	187
Figura 182 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	187
Figura 183 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	188
Figura 184 - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17. ....	188
Figura 185 - Algumas correlações de HMBC de EB-18. ....	191
Figura 186 - Estrutura de EB-18. ....	191
Figura 187 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	191
Figura 188 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	192
Figura 189 - Espectro de RMN COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	192
Figura 190 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	193
Figura 191 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	193
Figura 192 - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-18. ....	194
Figura 193 - Estrutura de EB-19. ....	196
Figura 194 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19. ....	198
Figura 195 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19. ....	198
Figura 196 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19. ....	199
Figura 197 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19. ....	199
Figura 198 - Estrutura de bioatividade moderada de <i>E. bezerrae</i> . ....	200
Figura 199 - Estrutura da desoxorrubicina. ....	201

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas de novos alcalóides tropânicos isolados de <i>Erythroxylum</i> .....	28
Tabela 2 - Diterpenos isolados de <i>Erythroxylum</i> até o ano de 2021. ....	34
Tabela 3 - Partição líquido-líquido do extrato etanólico de <i>Erythroxylum bezerrae</i> . ....	45
Tabela 4 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A.....	46
Tabela 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A3. ....	46
Tabela 6 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-B.....	47
Tabela 7 – Dados do fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-BB.....	48
Tabela 8 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A4. ....	50
Tabela 9 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL. ....	52
Tabela 10 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-A.....	52
Tabela 11 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-B.....	53
Tabela 12 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-C.....	54
Tabela 13 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-C-E. ....	55
Tabela 14 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-D.....	55
Tabela 15 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-E. ....	56
Tabela 16 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-EB.....	57
Tabela 17 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-1.....	68
Tabela 18 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 125 MHz) de EB-2.....	75
Tabela 19 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-3.....	84
Tabela 20 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-4.....	91
Tabela 21 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-5.....	98
Tabela 22 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-7.....	114
Tabela 23 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-8.....	120
Tabela 25 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 x 75 MHz) .....	129
Tabela 26 - Deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 x 75 MHz) de EB-10.....	137
Tabela 27 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de EB-11.....	144
Tabela 28 - Dados espectrais de EB-12, obtidos em $\text{CDCl}_3$ .....	152
Tabela 29 - Dados espectrais de EB-13.....	159
Tabela 30 - Dados espectrais de EB-14.....	166
Tabela 31 – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de EB-15.....	172
Tabela 32 – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de EB-16.....	179
Tabela 33 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de EB-17 e de <i>ent</i> -3 $\beta$ -hidroxi-caur-16-eno. ....	185
Tabela 34 – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de EB-18 e de 16 $\beta$ ,17-didroxicaurano.....	190

Tabela 35 – Dados de EB-18 e do composto 16 $\alpha$ ,17-didroxicaurano. ....	197
Tabela 36 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos EB-1 a EB-8 .....	201
Tabela 37 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos EB-9 a EB-19 .....	202
Tabela 38 - Efeito de EB9-EB19 sobre a viabilidade celular.....	203

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
ax	Axial
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupleto
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
ESI	<i>Eletro Spray Ionization</i>
EMAR	Espectrometria de Massa de Alta Resolução
eq	Equatorial
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantun Coherence</i>
Hz	Hertz
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PPM	Partes Por Milhão
q	Quarteto
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
t	Triplete
T <sub>R</sub>	Tempo de Retenção

## SÚMARIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	21
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	21
3	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	22
3.1	<b>Considerações sobre a família Erythroxylaceae</b> .....	22
3.2	<b>Aspectos gerais do gênero <i>Erythroxylum</i></b> .....	22
3.3	<b>Considerações sobre a espécie <i>Erythroxylum bezerrae</i></b> .....	23
4	<b>ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS</b> .....	24
4.1	<b>Alcaloides tropânicos</b> .....	25
4.3	<b>Diterpenos</b> .....	31
5.	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	41
5.1	<b>Material vegetal</b> .....	41
5.2	<b>Métodos cromatográficos</b> .....	41
5.2.1	<i>Cromatografia de adsorção em gel de sílica</i> .....	41
5.2.2	<i>Extração em fase sólida (SPE)</i> .....	42
5.2.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	42
5.3	<b>Métodos espectrométricos e espectroscópicos</b> .....	42
5.3.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i> .....	42
5.3.2	<i>Espectroscopia de ressonância magnética Nuclear (RMN)</i> .....	43
5.3.3	<i>Espectrometria de massa (EM)</i> .....	44
5.3.4	<i>Espectroscopia de difração de raio-X (Raio-X)</i> .....	44
5.4	<b>Métodos Físicos de Análise</b> .....	44
5.4.1	<i>Determinação da rotação óptica</i> .....	44
5.4.2	<i>Ponto de fusão</i> .....	44
5.5	<b>Processamento do material vegetal de <i>Erythroxylum bezerrae</i> Plowman</b> .....	45
5.5.1	<i>Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule (EEEBC)</i> .....	45
5.5.1.3	<i>Fracionamento de EEEB-A3-BB e isolamento de EB-1, EB-2, EB-3, EB-7 e EB-8</i> .....	47
5.5.2	<i>Fracionamento do extrato hexânico do cerne do caule (EHEBL)</i> .....	52
5.5.2.1	<i>Fracionamento de EHEBL-A e isolamento de EB-13, EB-14, EB-15 e EB-16</i> .....	52
5.5.2.2	<i>Fracionamento de EHEBL-B e isolamento de EB-17</i> .....	53
5.5.2.3	<i>Fracionamento de EHEBL-C e isolamento de EB-18 e EB-9</i> .....	54
5.5.2.4	<i>Fracionamento de EHEBL-D e isolamento de EB-19</i> .....	55
5.5.2.5	<i>Fracionamento de EHEBL-E e isolamento de EB-10, EB-11 e EB-12</i> .....	56
5.5	<b>Atividades biológicas dos compostos isolados</b> .....	59

5.5.1	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro das substâncias isoladas</i> .....	59
5.5.1.2	<i>Linhagens e modelos celulares</i> .....	59
5.5.1.3	<i>Teste de citotoxicidade – Teste do MTT</i> .....	59
5.5.1.3.1	<i>Princípio do teste</i> .....	60
5.5.1.4	<i>Procedimento experimental</i> .....	60
5.5.1.5	<i>Análise dos dados</i> .....	61
<b>5.5.2</b>	<b><i>Atividade anti-inflamatória</i></b> .....	<b>61</b>
5.5.2.1	<i>Cultura celular</i> .....	61
5.5.2.2	<i>Diluição das amostras e número amostral</i> .....	61
5.5.2.3	<i>Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT</i> .....	62
5.5.2.4	<i>Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO) estimulada por LPS</i> .....	62
5.5.2.5	<i>Análise Estatística</i> .....	62
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b>Determinação dos compostos isolados de <i>Erythroxylum bezerrae</i></b> .....	<b>63</b>
6.1.1	<i>Caracterização estrutural de EB-1</i> .....	63
6.1.2	<i>Determinação estrutural de EB-2</i> .....	73
6.1.3	<i>Determinação estrutural de EB-3</i> .....	80
6.1.4	<i>Determinação estrutural de EB-4</i> .....	89
6.1.5	<i>Determinação estrutural de EB-5</i> .....	96
6.1.6	<i>Determinação estrutural de EB-6</i> .....	103
6.1.7	<i>Determinação estrutural de EB-7</i> .....	111
6.1.8	<i>Determinação estrutural de EB-8</i> .....	119
6.1.9	<i>Determinação estrutural de EB-9</i> .....	126
6.1.10	<i>Determinação estrutural de EB-10</i> .....	134
6.1.11	<i>Determinação estrutural de EB-11</i> .....	142
6.1.12	<i>Determinação estrutural de EB-12</i> .....	149
6.1.13	<i>Determinação estrutural de EB-13</i> .....	157
6.1.14	<i>Determinação estrutural de EB-14</i> .....	164
6.1.15	<i>Determinação estrutural de EB-15</i> .....	170
6.1.16	<i>Determinação estrutural de EB-16</i> .....	176
6.1.17	<i>Determinação estrutural de EB-17</i> .....	183
6.1.18	<i>Determinação estrutural de EB-18</i> .....	189
6.1.19	<i>Determinação estrutural de EB-19</i> .....	195
<b>6.2</b>	<b>Testes farmacológicos</b> .....	<b>200</b>
6.2.1	<b>Ensaio da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos alcaloides tropânicos de <i>E. bezerrae</i></b> .....	<b>200</b>

6.2.2	Ensaio da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos diterpenos isolados de <i>E. bezerrae</i> .....	202
6.2.3	Determinação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> dos diterpenos .....	202
7	CONCLUSÕES .....	205
	REFERÊNCIAS .....	206

## 1 INTRODUÇÃO

Pelo menos 25% dos medicamentos são produzidos direta ou indiretamente a partir de alguma planta (MENDES *et al.*, 2018). No entanto, considerando a abundância da biodiversidade brasileira e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de identificação de substâncias biologicamente ativas, poucas plantas foram estudadas quanto ao seu uso medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (BOCHNER *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a relevância da química de produtos naturais (PN) pode ser comprovada através das constantes revisões de Newman e Cragg (2020), as quais mostram que mais da metade dos medicamentos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) são derivados diretamente ou indiretamente de um produto natural. A exemplo da área do câncer, para o período de 1981-2019, observou-se que dos 185 fármacos indicados, 120 são derivados de um produto natural, resultando em 64,9% do total (NEWMAN; CRAGG., 2020).

A composição química de plantas é resultado do “balanço entre biossíntese e transformações que ocorrem durante o crescimento, em decorrência principalmente de fatores genéticos, ambientais e do manejo agrônômico utilizado” (BOTREL *et al.*, 2010). A diversidade estrutural de substâncias provenientes do metabolismo das plantas justifica o crescente interesse químico e farmacológico por estes compostos, os quais pertencem a cinco grandes classes químicas: os carboidratos, os lipídios, os compostos nitrogenados (aminoácidos, peptídios, proteínas, glicosídeos cianogênicos e alcalóides), os terpenóides e os fenilpropanóides (CORDELL, 2002).

O gênero *Erythroxylum*, mais conhecido pela espécie *Erythroxylum coca* (fonte de cocaína), é o maior entre os quatro gêneros pertencentes à família Erythroxylaceae e compreende cerca de 97% de suas espécies, que estão distribuídas por regiões tropicais e subtropicais (RIBEIRO *et al.*, 2013). Este gênero é conhecido pelas espécies que são empregadas na medicina popular, assim como pela ocorrência de marcadores quimiotaxonômicos com propriedades farmacológicas relevantes, tais como alcaloides do tipo tropano, terpenoides e flavonoides (BARBOSA *et al.*, 2014).

Dentre as diversas classes de compostos orgânicos bioativos de origem natural, relatados na literatura, os alcaloides representam uma das maiores classes de metabólitos secundários, utilizados como analgésicos, estimulantes do sistema nervoso central (SNC), antimalárico, antibacteriano, anticancerígeno, entre outros. Essa classe de compostos, biossinteticamente formada a partir de aminoácidos, tem como característica estrutural básica

a presença de um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclico, que lhes conferem características básicas, apresentando uma ampla diversidade estrutural (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007).

Alcalóides do tipo tropano (8-metil-8-azabicyclo [3,2,1] octano), dos quais a cocaína é um exemplo, constituem os princípios ativos das plantas medicinais mais antigas do mundo (GRIFFIN; LIN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Esses compostos apresentam atividades anti-hipertensivas (OLIVEIRA *et al.*, 2011), anticolinérgicas, anestésicas (GRYNKIEWICZ; GADZIKOWSKA, 2008) e citotóxicas (CHAVEZ *et al.*, 2002; GRIFFIN e LIN, 2000; MI *et al.*, 2002; SENA-FILHO *et al.*, 2010).

Além dos alcaloides, os estudos fitoquímicos sobre o gênero *Erythroxylum* têm relatado o isolamento e a caracterização de compostos de natureza terpênica, especialmente os diterpenos, que são compostos formados por vinte átomos de carbonos, provenientes de quatro unidades de isopreno (molécula com cinco átomos de carbonos). Os diterpenos isolados de espécies de *Erythroxylum*, frequentemente, são aqueles de esqueleto do tipo beierano (TENNAKOON *et al.*, 2020), ryanodano (BARREIROS *et al.*, 2007), lábdano (RIBEIRO *et al.*, 2013), abietano (NASCIMENTO *et al.*, 2012) e caurano (ANSELL *et al.*, 1993).

Em levantamento realizado na plataforma de busca *SciFinder*, utilizando “*Erythroxylum*” e, em seguida, refinando a busca com a palavra “diterpene”, foram encontrados 22 trabalhos publicados, dos quais dois realizaram teste de atividade citotóxica. A busca também foi realizada apenas com a palavra “diterpene” e observou-se que além da atividade citotóxica, esses compostos oriundos de espécies de plantas de outros gêneros também apresentaram atividade antioxidante (SAIJO *et al.*, 2015) e anti-inflamatória (NESTEROVA *et al.*, 2014). Esse fato reforça a importância da realização de testes de atividade para os diterpenos oriundos de espécies do gênero *Erythroxylum*.

Nesse sentido, visando contribuir para o conhecimento químico, taxonômico e farmacológico do gênero *Erythroxylum*, o presente trabalho descreve o estudo fitoquímico da espécie *E. bezerrae*, coletada no município de Crateús (CE), na serra da Ibiapaba, com o objetivo de isolar e caracterizar estruturalmente os metabólitos secundários, bem como a realização de teste de atividade citotóxica e anti-inflamatória.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química do extrato etanólico da casca do caule e do extrato hexânico do lenho do caule de *Erythroxylum bezerrae* na busca de alcaloides tropânicos, e avaliação da atividade citotóxica e anti-inflamatória.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Rastrear os alcaloides presentes nos extratos das diversas partes de *Erythroxylum bezerrae*, utilizando o reagente dragendorff;
- Isolar e caracterizar estruturalmente os compostos isolados;
- Avaliar a possível atividade citotóxica dos alcaloides isolados;
- Isolar os metabólitos secundários do extrato hexânico do lenho do caule;
- Realizar os testes de atividade anti-inflamatória dos compostos isolados.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

#### 3.1 Considerações sobre a família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae, de plantas angiospérmicas, compreende quatro gêneros (*Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*), e aproximadamente 240 espécies com distribuição em regiões tropicais da América do Sul, África e na ilha de Madagascar, cujos principais centros de diversidade e endemismo são na Venezuela, Brasil e Madagascar (LOIOLA, 2007). A maioria das espécies, cerca de 230, pertencem ao gênero *Erythroxylum*, o qual é considerado o mais representativo da família e o único com distribuição nas Américas, onde foram registradas 187 espécies (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

#### 3.2 Aspectos gerais do gênero *Erythroxylum*

O interesse pelo gênero *Erythroxylum* intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *E. coca*, que secularmente foram empregadas como anestésico pelos indígenas da região andina da América do Sul. A partir dessa espécie foi possível, posteriormente, o isolamento da cocaína (**1a**), um alcaloide da classe dos tropanos, que tem efeito anestésico local quando utilizado em pequenas cirurgias. No entanto, a cocaína ganhou notoriedade pela sua atividade psicoativa no Sistema Nervoso Central (SNC), tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade (RODRIGUES *et al.*, 2015).

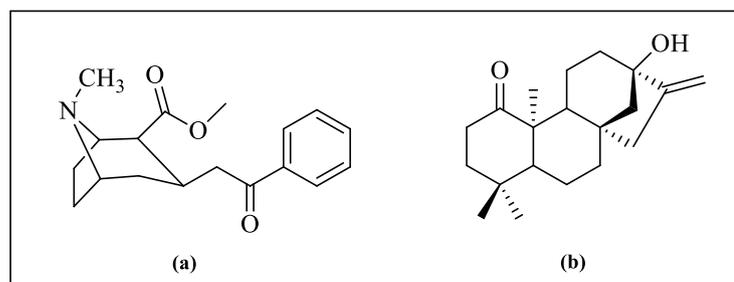
Aproximadamente 128 espécies de *Erythroxylum* são registradas no Brasil, com maior diversidade no domínio da Mata Atlântica e em regiões da caatinga, especialmente na região Nordeste, com cerca de 78 espécies. Esse gênero é representado no território cearense por 24 espécies, correspondendo a 31% e 19% das espécies registradas para a Região Nordeste e Brasil, respectivamente, tornando-se o terceiro estado do nordeste brasileiro em riqueza de espécies do gênero, após os estados da Bahia (56) e Pernambuco (25) (CORDEIRO; LOIOLA, 2018).

A partir do levantamento florístico realizado por Cordeiro e Loiola (2018), identificou-se que as 24 espécies de *Erythroxylum* no Ceará são: *E. barbatum* O. E. Schulz, *E. stipulosum* Plowman, *E. mucronatum* Benth., *E. citrifolium* A. Veg.-Hil., *E. revolutum* Mart., *E. squamatum* Sw., *E. bezerrae* Plowman, *E. laetevirens* O.E.Schulz, *E. tianguanum* Plowman,

*E. rimosum* O. E. Schulz., *E. deciduum* A. Veg.-Hil., *E. campestre* A. Veg.-Hil., *E. pungens* O. E. Schulz., *E. simonis* Plowman, *E. angelicae* Loiola, *E. pulchrum* A. Veg.-Hil., *E. amplifolium* Mart., *E. rosuliferum* O. E. Schulz, *E. vacciniifolium* Mart., *E. subrotundum* A. St.-Hil., *E. caatingae* Plowman, *E. betulaceum* Mart., *E. loefgrenii* Diogo, *E. numulária* Peyr., Mart., encontradas, preferencialmente, em ambientes de climas mais secos como Savana Estépica (Carrasco; 56%) e Floresta Estacional Decidual (mata seca; 41%), diferindo de estudos realizados em outros estados da Região Nordeste, que a exemplo da Paraíba, das treze (13) espécies listadas, onze (11) têm ocorrência exclusiva em tipos de vegetação associados ao domínio da Mata Atlântica.

Além do uso de espécies de *Erythroxylum* pela população como plantas medicinais, na forma de chás, infusões, laxativos e cataplasmas, diversas atividades farmacológicas relevantes como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, anestésica têm sido atribuídas aos compostos isolados de plantas desse gênero, sendo os alcalóides tropânicos, representado pela estrutura da cocaína (**1a**) (Figura 1(a)) e terpenoides, a exemplo do diterpeno caureno erythroxylin A (**1b**), considerados marcadores taxonômicos dessas espécies (Chavez *et al.*, 1996; dos Santos *et al.*, 2005; González-Guevara *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2012).

**Figura 1** – Estrutura do alcaloide tropânico cocaína e do diterpeno caureno erythroxylin A.



### 3.3 Considerações sobre a espécie *Erythroxylum bezerrae*

*Erythroxylum bezerrae* é uma espécie arbustiva, com altura em torno de 3 metros, com ramos entre 2-4 mm de diâmetro (LOIOLA *et al.*, 2013). É uma espécie com distribuição restrita ao domínio da Caatinga na região Nordeste do Brasil, com ocorrência registrada somente nos estados do Ceará e Piauí, com um total de vinte e um (21) números de registros (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). Floresce e frutifica apenas em fevereiro. É uma espécie rara, considerada em Perigo (EN) na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção

(LOIOLA *et al.* 2013). É conhecida popularmente como “pirunga” (CORDEIRO; LOIOLA, 2018). A designação específica “*bezerrae*” se deu em homenagem ao Professor Prisco Bezerra, o primeiro curador do herbário da Universidade Federal do Ceará.

A descrição botânica de *Erythroxylum bezerrae* segundo Cordeiro e Loiola (2018) é dada a seguir:

*Erythroxylum bezerrae* é uma espécie de fácil identificação e se distingue das demais espécies do estado por apresentar folhas coriáceas, orbiculares a suborbiculares com nervuras mais evidentes na face adaxial, estípulas estriado-nervadas, setulosas e flores com pedicelos longos (12-13 mm de comprimento).

A Figura 2 mostra os aspectos gerais e os detalhes das folhas, inflorescências e frutos da espécie *E. bezerrae* Plowman, coletada na serra da Ibiapaba, localizada à Noroeste Cearense e Nordeste do Piauí.

**Figura 2** – Fotos digitais de *E. bezerrae* em seu habitat natural com detalhes para: (A) flores e (B) folhas e frutos.

Foto: Prof. Edilberto R. Silveira



#### 4 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *ERYTHROXYLUM*

Devido o histórico de consumo de *E. coca* e a sua relação com o ser humano, estudos com plantas do gênero *Erythroxylum* têm sido desenvolvidos na tentativa de verificar e compreender suas potencialidades tóxicas e farmacológicas (BARBOSA *et al.*, 2014).

A exemplo do uso medicinal dessas espécies tem-se *E. argentinum*, utilizada no tratamento de gripe, sinusite e estômago (CHAVEZ *et al.*, 1998); *E. zeylanicum*, utilizada como anti-helmíntica (BRIGMANN *et al.*, 2000); *E. catuaba*, com ação protetora contra infecções bacterianas e virais (MANABE *et al.*, 1992), e *E. suberosum* com atividade antimicrobiana, anestésica e anti-reumática (BARROS *et al.*, 2017).

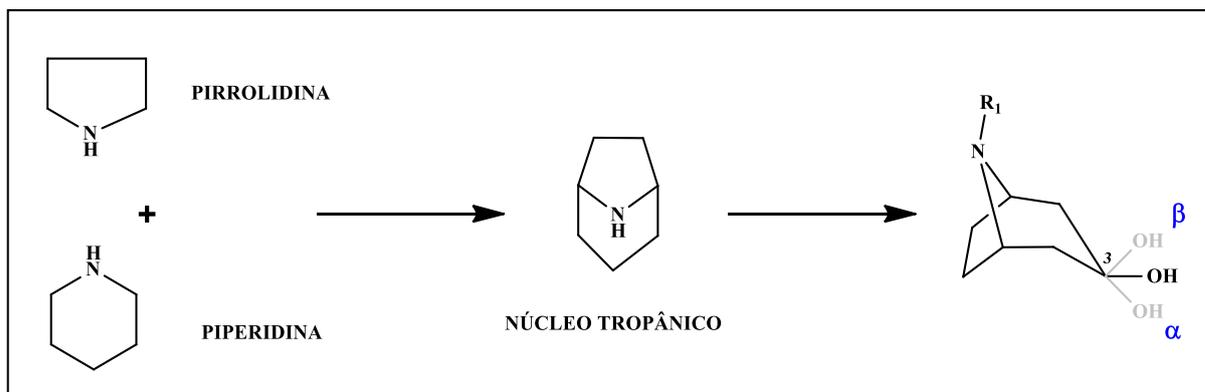
O gênero *Erythroxylum* é conhecido pela ocorrência de marcadores quimiotaxonômicos com propriedades farmacológicas relevantes, tais como alcaloides do tipo tropano (Figura 1(a), pág. 13) e diterpenos do tipo caurano (Figura 1(b), pág. 13) (KOHNNEN-JOHANNSEN; OLIVER KAYSER, 2019).

#### 4.1 Alcaloides tropânicos

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio, e encontrados predominantemente em angiospermas (SIMÕES *et al.*, 2010). Estes produtos naturais são derivados de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano), derivados do ácido chiquímico, e aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina, podendo ser classificados de acordo com o aminoácido precursor (DEWICK, 2002). Os principais aminoácidos envolvidos na biossíntese dos alcaloides são lisina, ornitina, tirosina e triptofano. Os alcaloides tropânicos envolvem a participação de precursores comuns como: a putrescina, diamina derivada da descarboxilação do aminoácido ornitina (SATO *et al.*, 2001).

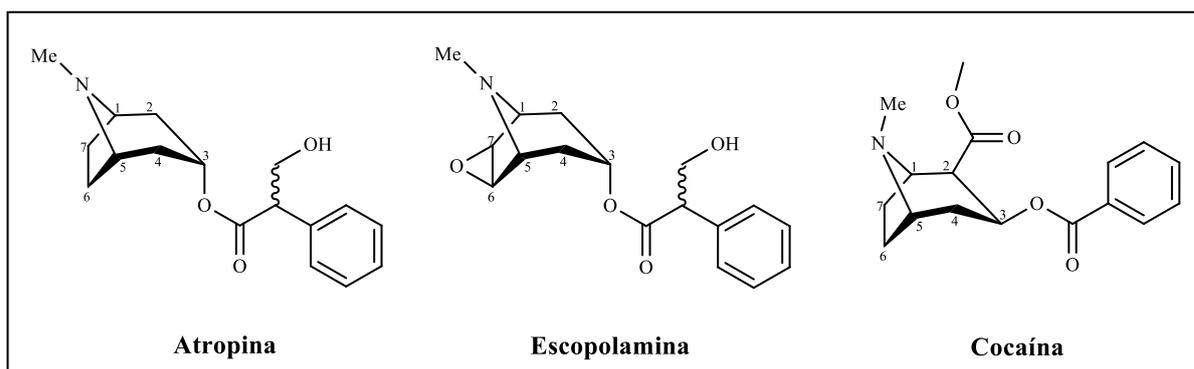
Os alcalóides tropânicos constituem uma classe específica de alcalóides e podem ser definidos como todas as moléculas que apresentam em comum uma estrutura bicíclica, denominada tropano 8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano, a qual é constituída pelos anéis pirrolidina e piperidina, originados a partir da ornitina, aminoácido precursor da rota biossintética de produção desta classe (RESTREPO *et al.*, 2019) (Figura 3). A substituição da hidroxila do núcleo tropânico na posição C3, quando esterificado, produz um dos dois estereoisômeros - tropina ou pseudotropina - que diferem apenas pela orientação do grupo hidroxila ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), denominados  $3\alpha$ -tropanol e  $3\beta$ -tropanol, respectivamente (RESTREPO *et al.*, 2019).

**Figura 3** – Representação esquemática da formação do núcleo tropânico.



A esterificação do grupo hidroxila com ácidos aromáticos origina os alcaloides de maior importância farmacêutica, os quais podem ser divididos em três grupos: o grupo dos alcaloides tropânicos originados pela tropina, pseudotropina e da ecgonina. O grupo da tropina tem como principais alcaloides, a atropina e a escopolamina, encontrados principalmente em espécies da família Solanaceae. O grupo das calisteginas, que são originados pela rota da pseudotropina são alcaloides tropânicos polihidroxilados que ocorrem principalmente em Convolvulaceae, Solanaceae e Erythroxylaceae. E, no grupo do núcleo ecgonina, podemos encontrar o alcaloide mais conhecido desta classe, a cocaína, alcaloide presente em espécies de Erythroxylaceae (Figura 4) (SIMÕES *et al.*, 2003; HERNANDES; KATO; BACCHI, 2017).

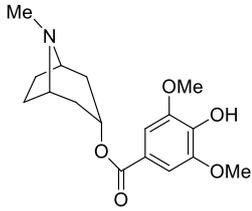
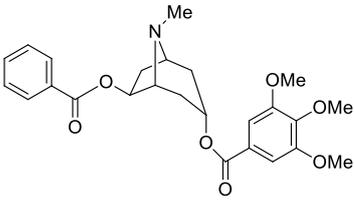
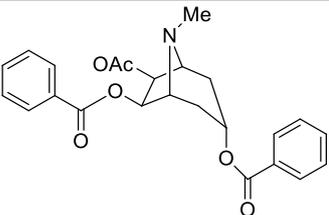
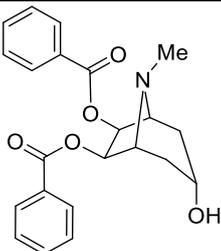
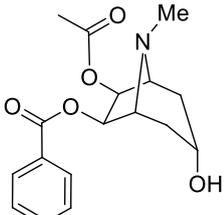
**Figura 4** - Estruturas químicas das moléculas: Atropina, escopolamina e cocaína.



Através de um levantamento bibliográfico utilizando as bases de dados SciFinder e Science Direct, confirmou-se a ocorrência de alcaloides tropânicos naturais em diferentes espécies do gênero *Erythroxylum*. A busca foi realizada utilizando a palavra-chave “*Erythroxylum*”, analisando-se as publicações a partir de 2010, uma vez que a revisão sobre alcaloides tropânicos isolados de *Erythroxylum* foi publicada até este período. Foram encontrados relatos sobre 35 espécies de um total de 230 descrevendo o isolamento de 186

alcaloides tropânicos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Como resultado de nosso levantamento, foram encontradas 544 publicações relacionadas à *Erythroxylum*. Porém, a partir de uma triagem, selecionando-se aqueles que se tratavam de isolamento e caracterização a partir dos artigos de alcaloides tropânicos, observou-se a identificação de apenas cinco novos compostos até o ano de 2021, os quais podem ser observados na Tabela 1.

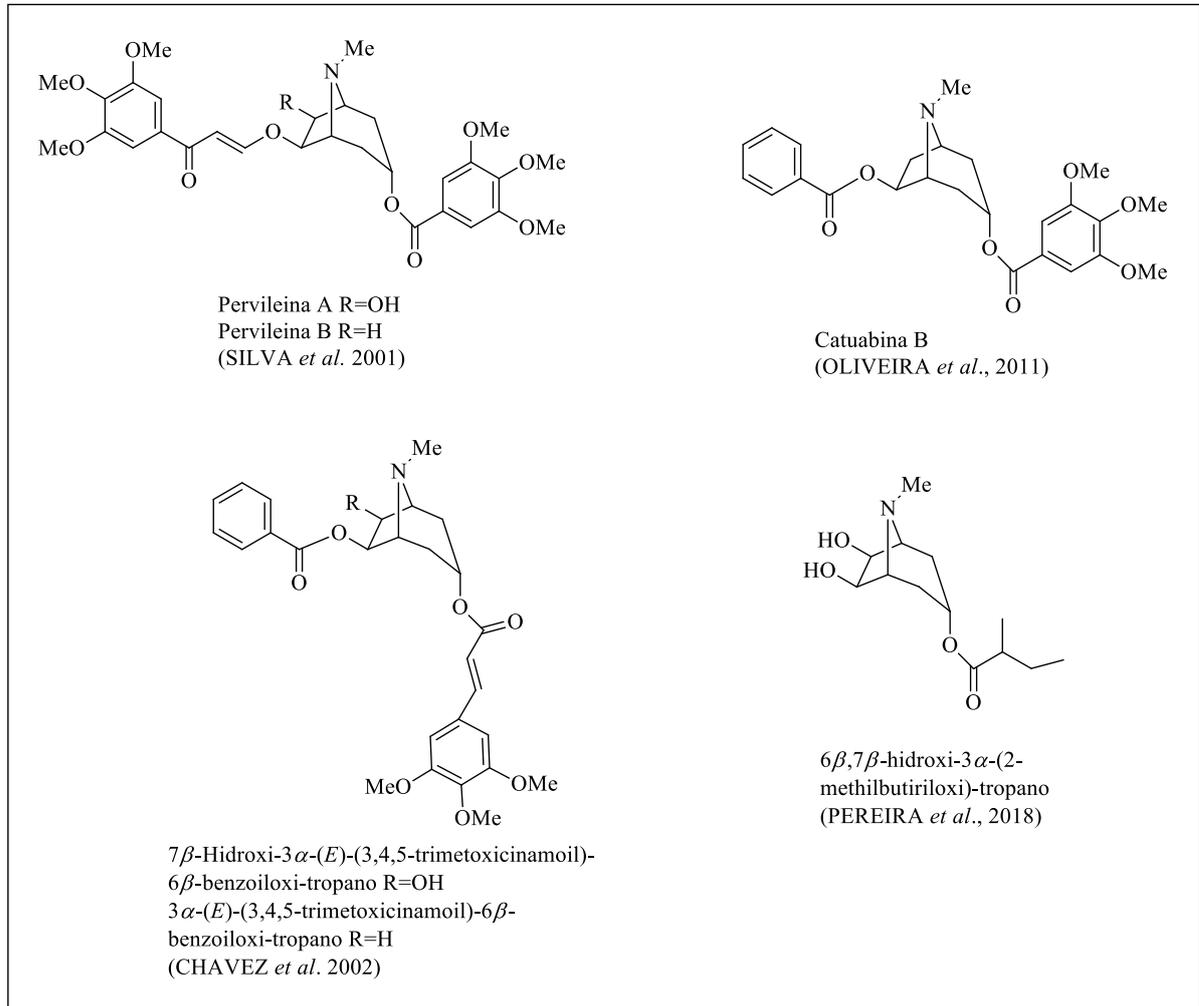
**Tabela 1-** Estruturas de novos alcalóides tropânicos isolados de *Erythroxylum* entre os anos de 2010 a 2021.

<i>E. pungens</i>	Referência
 <p data-bbox="242 600 638 645">(3-<i>endo</i>,8-<i>anti</i>)-8-Metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato</p>	Sena-Filho <i>et al.</i> , 2010
<i>E. caatingae</i>	Referência
 <p data-bbox="242 922 660 967">6β-Benzoiloxi-3α-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi) tropano</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 2011
<i>E. risomum</i>	Referência
 <p data-bbox="242 1265 580 1296">7β-Acetoxi-3β,6β-dibenzoiloxitropano</p>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
<i>E. subsessile</i>	Referência
 <p data-bbox="242 1648 552 1680">6β,7β-Dibenzoiloxitropan-3α-ol</p>	Cruz <i>et al.</i> , 2016
<i>E. macrocalyx</i>	Referência
 <p data-bbox="242 1984 673 2016">7β-Acetoxi-6β-benzoiloxi-3α-hidroxitropano</p>	Silva <i>et al.</i> , 2021

Nos trabalhos sobre alcaloides tropânicos de espécies de *Erythroxylum*, observou-se que têm sido investigados também atividades farmacológicas. De acordo com Dewick (2009), a atividade biológica dos alcaloides está relacionada à presença da função amina, a qual é transformada por protonação, em valores de pH fisiológico. Sendo os exemplos mais conhecidos de alcaloides tropânicos, com aplicações médicas importantes a cocaína, uma droga estimulante do sistema nervoso central (SNC) mais popular do mundo (GRYNKIEWICZ; GADZIKOWSKA, 2008); a atropina, um medicamento anticolinérgico utilizado para problemas oftalmológicos e cardíacos, além de antídoto contra intoxicações por agrotóxicos, além da escopolamina, um agente anticolinérgico, que também tem sido utilizada como antiemético, além de apresentar indicações para espasmos gastrointestinais e depressão (KOHNNEN-JOHANNSEN; KAYSER, 2019; LAKSTYGAL *et al.*, 2019).

Muitos alcaloides tropânicos isolados de *Erythroxylum* apresentaram atividade citotóxica, como as pervileínas A e B (pág. 32), isoladas de *E. pervillei*, que inibiram o crescimento de carcinoma de pele oral em células KB-VI com valores de 0,1-1,9 µg/mL (Silva *et al.*, 2001). Alcaloides extraídos de *E. rotundifolium* também apresentaram atividade contra a linhagem KB-VI com valores entre 0,2 e 1,1 µg/mL (pág. 28) (Chávez *et al.*, 2002). O alcaloide catuabina B, de *E. caatingae* (pág. 28), exibiu citotoxicidade frente a linhagem celular de um carcinoma mucoepidermoide pulmonar (NCI-H292) (Oliveira *et al.*, 2011). De *E. pungens*, foi isolado o alcaloide 3-(2-metilbutiriloxi)-tropan-6,7-diol (pág. 32), o qual mostrou inibição frente a células epiteliais de carcinoma do colo do útero humano (HeLa), na ordem de 0,3-1,0 µg/mL (PEREIRA *et al.*, 2018).

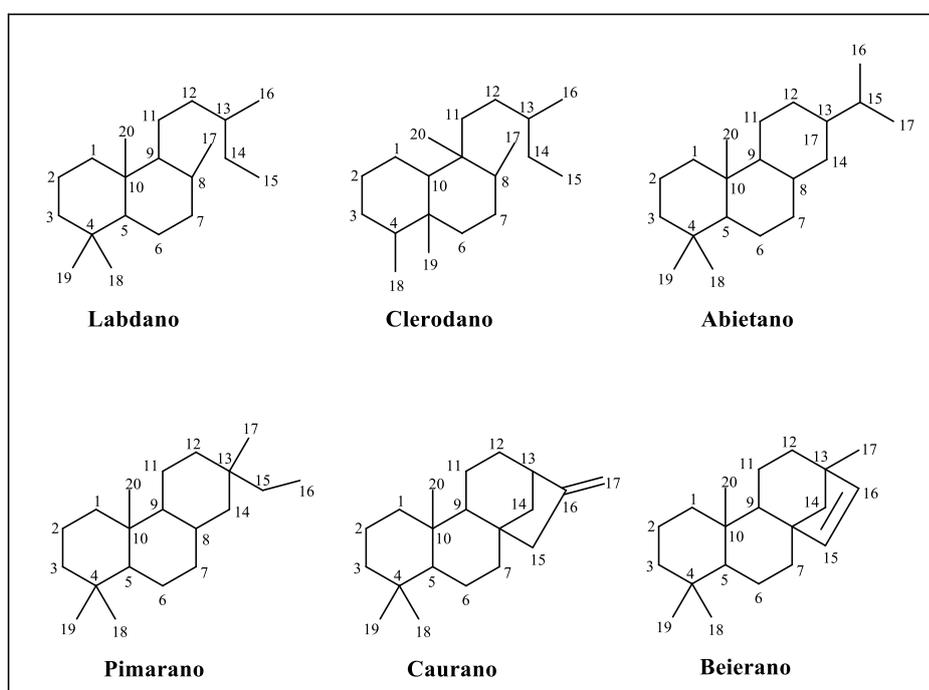
**Figura 5** - Estruturas de alcaloides tropânicos bioativos isolados a partir de espécies do gênero *Erythroxylum*.



### 4.3 Diterpenos

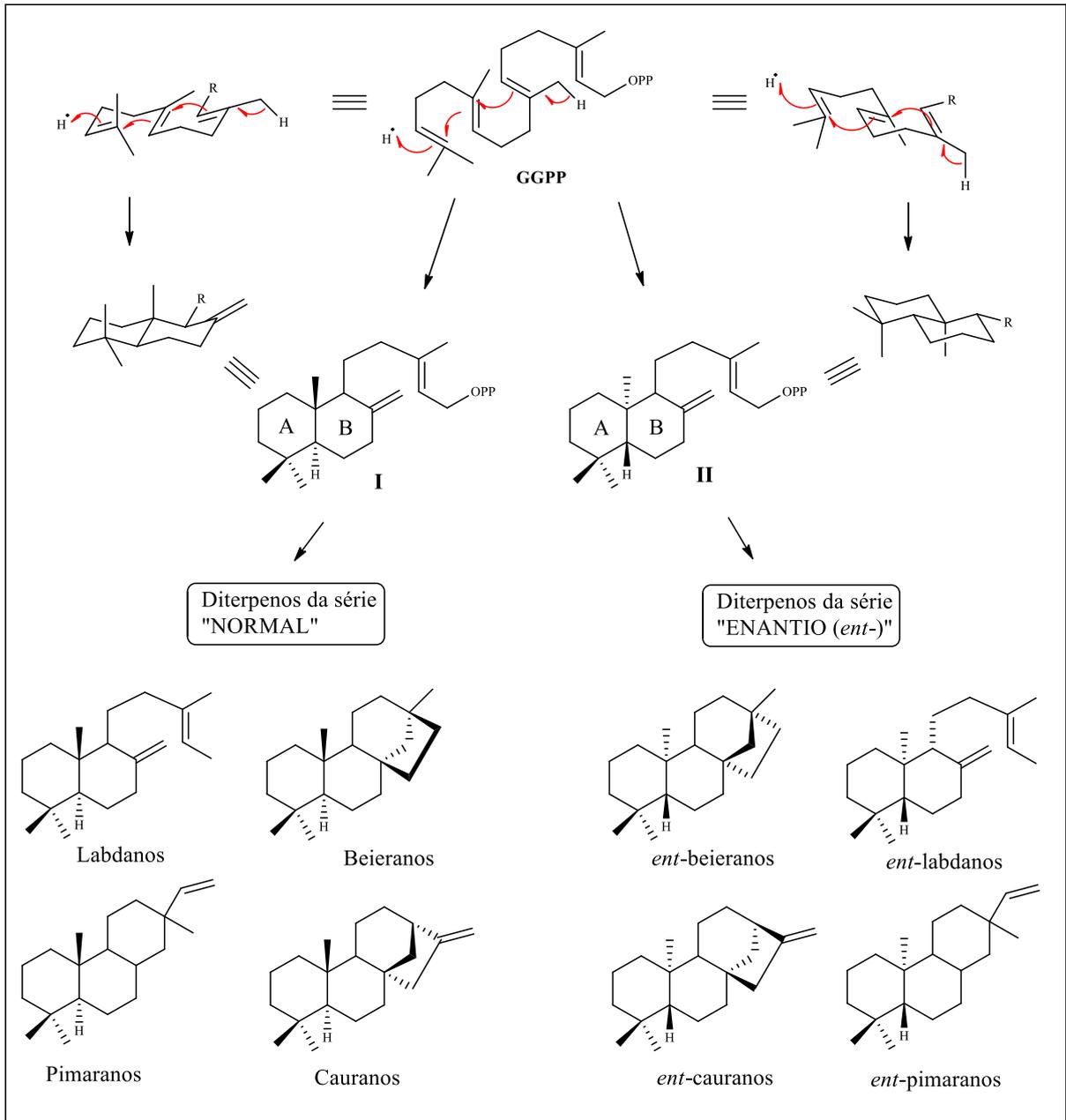
Os diterpenos são metabólitos secundários com vinte átomos de carbonos, encontrados em plantas, fungos, bactérias e animais de ambientes terrestres e marinhos. Eles podem ser classificados de acordo com sua cadeia carbônica em cíclicos e acíclicos, e ainda de acordo com o número de anéis em seu esqueleto base, o qual é formado por reações de ciclização que levam à produção de bicíclicos (lábdanos e clerodanos), tricíclicos (abietanos, pimaranos), tetracíclicos (cauranos e beieranos), dentre outros (Figura 6) (YAMAGUCHI; KAMIYA, 2000).

**Figura 6** -Estruturas moleculares dos esqueletos básicos dos diterpenos.



Os diterpenos cíclicos resultam de dois processos diferentes de ciclização biossintética do GGPP (2E,6E,10E-pirofosfato de geranila), sendo que o principal tipo de ciclização (Figura 7) ocorre sob catálise ácida com a protonação da dupla ligação na unidade inicial de isopropilideno da cadeia GGPP, levando à formação de dois intermediários bicíclicos de perhidronaftaleno (Figura 7, estruturas I e II), os quais resultam nas duas séries enantioméricas que diferem entre si em suas configurações invertidas dos carbonos C-5, C-9 e C-10. Ou seja, as séries “normais” são as estruturas cuja fusão entre os anéis A e B ocorre da mesma forma que nos esteróides, enquanto as estruturas da série “enantiomérica” (denominadas como “*ent-*”) são as imagens especulares correspondentes à série normal (GARCIA, de OLIVEIRA, BATISTA, 2007).

**Figura 7** - Ciclização de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) sob catálise ácida, levando aos diterpenos das séries "NORMAL" e "ENANTIO" (*ent-*).



Fonte: Adaptado pela autora, Garcia; Oliveira; Batista *et al.*, (2007).

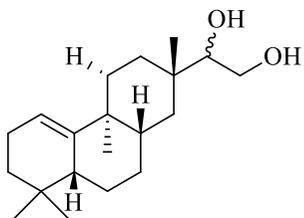
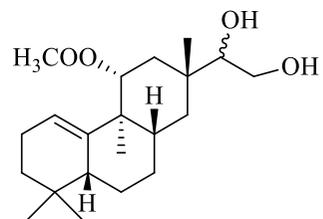
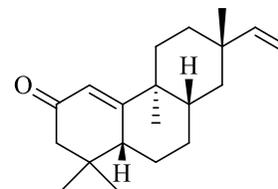
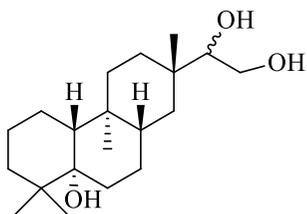
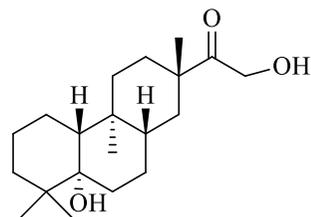
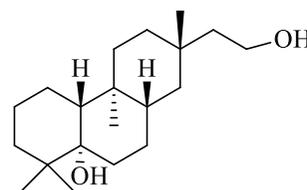
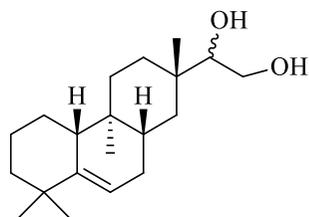
Os cauranos representam um importante grupo de diterpenos tetracíclicos e suas estruturas são constituídas por uma unidade de perhidrofenantreno (anéis A, B e C) fundida com uma unidade de ciclopentano (anel D) formada por uma ponte de dois carbonos entre C-8 e C-13 (Figura 8) (BATISTA *et al.*, 2005). Diferentes critérios são utilizados para a nomenclatura dos diterpenos cauranos, sendo o mais frequente a inversão da descrição convencional da estereoquímica quando o nome é precedido pelo prefixo "ent-" (VELÂNDIA, *et al.*, 1998). Exceto no caso de alguns ent-cauranos que apresentam ligação dupla entre C-9 e C-11, a maioria caracteriza-se por apresentar valores negativos para a rotação óptica específica,  $[\alpha]_D$  (TAMAKI, *et al.* 2008).

Ao refinar a busca com a palavra-chave “diterpenes”, 21 artigos foram encontrados para o gênero *Erythroxylum*. Diterpenos com esqueletos do tipo ent-caurano (MCCRINDLE *et al.*, 1968; KAPADI *et al.*, 1964), ent-beierano (ANSELL *et al.*, 1993a), ent-devadarano (ANSELL *et al.*, 1993a; KAPADI *et al.*, 1964, dos SANTOS *et al.*, 2006), rianodano (BARREIROS *et al.*, 2007), ent-labdano (ANSELL *et al.*, 1993b), abietano (Do Nascimento *et al.*, 2012), pimarano (ANSELL *et al.*, 1993b) e rosano (ANSELL *et al.*, 1993b, 1993c) foram os relatados para o gênero. Estes compostos estão listados na Tabela 2.

Observou-se que o estudo farmacológico dessa classe de compostos ainda é limitado, uma vez que apenas três (3) desses artigos apresentaram testes de atividade. No estudo realizado por Menezes-Filho *et al.*, (2014), foi avaliada a atividade citotóxica de 14-*O*-metil-ryanodanol (**39**, pág. 41) ou 6 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxi-14 $\alpha$ -metoxi-ryanodano-1 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\beta$ ,13 $\beta$ -pentaol, frente à linhagem celular GL-15 (glioblastoma humano), cujo efeito máximo da viabilidade celular se deu a 500  $\mu$ g/mL. Esse diterpeno também mostrou efeito inseticida sob a larva *Aedes aegypti* (BARREIROS *et al.*, 2007). Já no estudo realizado por Nascimento *et al.*, (2012), os diterpenos 7-oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (**40**, pág. 42), 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (**41**, pág. 40), 7 $\alpha$ ,16-dihidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (**42**, pág. 42) e ent-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihidroxi-kaur-16-en-19-oato (**44**, pág. 42) foram avaliados quanto à sua toxicidade contra larvas de *A. salina*, mostrando atividade considerável, com valores de LD<sub>50</sub> entre 34,6 e 53,5 mg/mL.

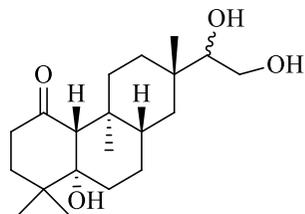
**Tabela 2** - Diterpenos isolados de *Erythroxylum* até o ano de 2021.

<i>E. rotundifolium</i>	Referência	
		Ansell; Pegel; Taylor <i>et al.</i> , 1993b
<i>ent</i> -Labda-8(17),14-dien-13R-ol (1)	<i>ent</i> -13R-Hidroxilabda-8(17)-dien-3-ona (2)	
<i>ent</i> -Labda-8(17),14-dien-3β,13R-diol (3)	<i>ent</i> -Labda-8(17),14-dien-13R,18-diol (4)	
<i>ent</i> -Labda-8(17),13E-dien-15-ol (5)	<i>ent</i> -Labda-8(17),13E-dien-15,16-diol (6)	

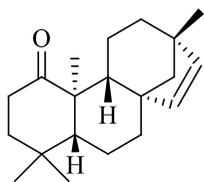
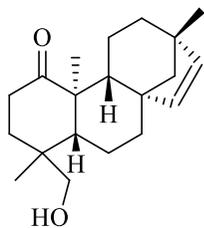
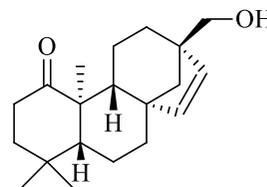
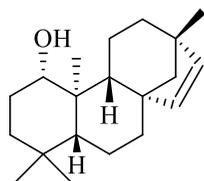
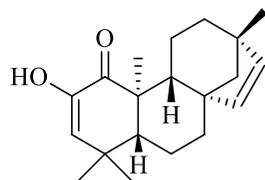
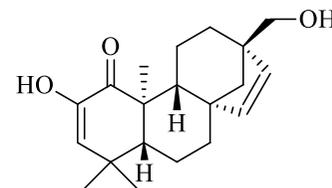
*ent-5β-Ros-1(10)-eno-15,16-diol (7)**ent-11a-Acetoxy-5α-ros-1(10)-eno-15,16-diol (8)**ent-2-Oxo-ros-1(10),15-dieno (9)**ent-Rosane-5α,15,16-triol (10)**ent-5α,16-Di-hidroxirosan-15-ona (11)**ent-Rosano-5α,16-diol (12)**ent-Ros-5-en-15,16-diol (13)*Ansell; Pegel; Taylor *et al.*, 1993b

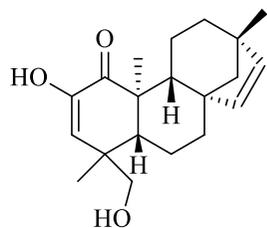
*E. barbatum*

Referência

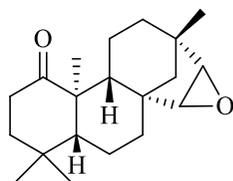
*ent*-Rosan-1-ona-5 $\beta$ ,15,16-triol (14)Santos *et al.*, 2006*E. australe*

Referência

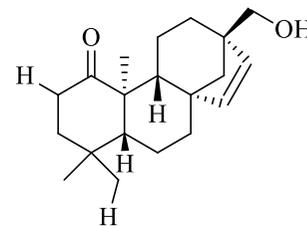
*ent*-Beier-15-en ((+)-hibaieno) (15)*ent*-Beier-15-en-19-ol (erithroxilol A) (16)*ent*-Beier-15-en-17-ol (17)Kapadi; Devi *et al.*, 1964*ent*-Beier-15-en-1a-ol (18)*ent*-2-Hidroxibeier-2,15-dien-1-ona (19)*ent*-2,17-Di-hidroxibeier-2,15-dien-1-ona (20)Ansell; Pegel; Taylor *et al.*, 1993



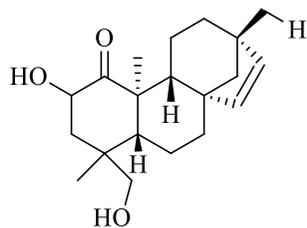
*ent*-2,19-Di-hidroxi-beier-2,15-dien-1-ona (21)



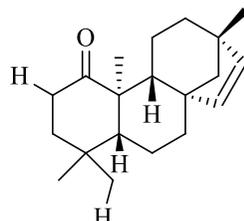
*ent*-15,16-Epoxi-beier-1-ona (22)



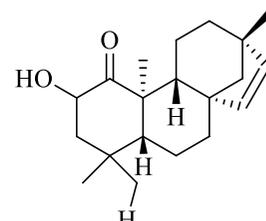
*ent*-17-Hidroxi-beier-15-en-1-ona (23)



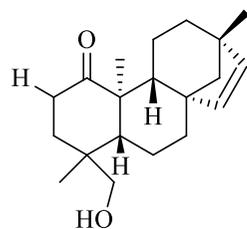
*ent*-2a,19-Di-hidroxi-beier-15-en-1-ona (24)



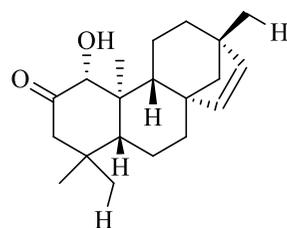
*ent*-Beier-15-en-1-ona (25)



*ent*-2a-Hidroxi-beier-15-en-1-ona (26)

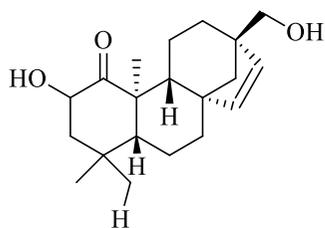
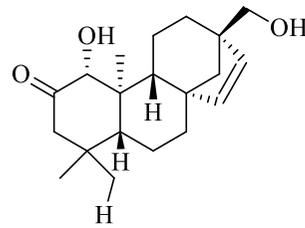
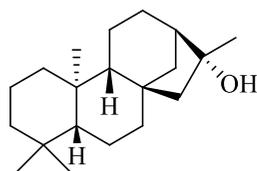
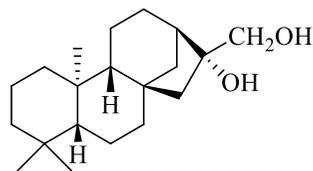


*ent*-19-Hidroxi-beier-15-en-1-ona (27)



*ent*-1a-Hidroxi-beier-15-en-2-ona (28)

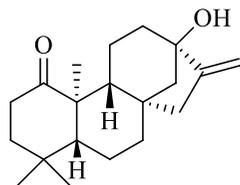
Kapadi; Devi *et al.*, 1964  
Ansell; Pegel; Taylor *et al.*, 1993

*E. pictum**ent*-2a,17-Dihidroxiibeier-15-en-1-ona (29)*ent*-1a-Didroxibeier-15-en-2-ona (30)*ent*-Cauran-16-ol (31)*ent*-Cauran-16,17-diol (32)

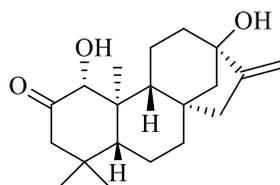
Kapadi; Devi *et al.*, 1964  
Ansell; Pegel; Taylor *et al.*, 1993

*E. barbatum*

## Referência

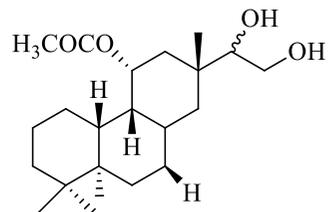


Erythroxylylina A (33)

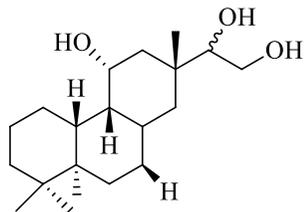


Erythroxylylina B (34)

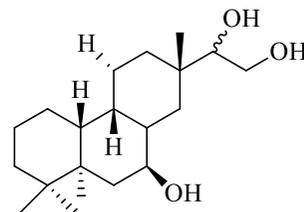
Dos Santos *et al.*, 2006



*ent*-11a-Acetoxy-devadaran-15,16-diol (35)



*ent*-Devadaran-11a,15,16-triol (36)

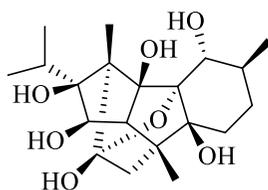


*ent*-Devadaran-7B,15,16-triol (37)

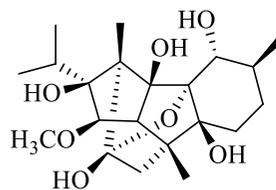
Dos Santos *et al.*, 2006

*E. passerinum*

Referência



Rianodanol (38)

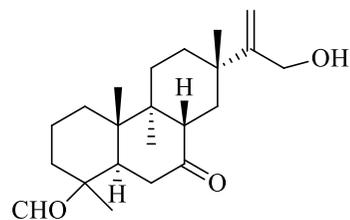


14-O-metil-rianodanol (39)

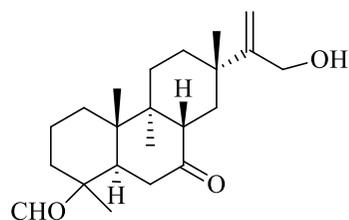
Barreiros *et al.*, 2007

*E. suberosum*

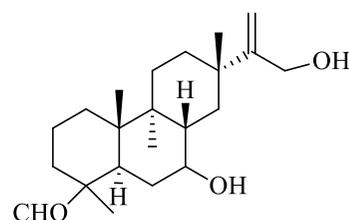
## Referência



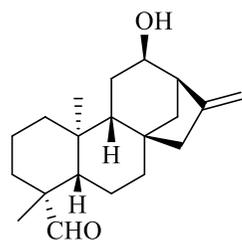
7-Oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (40)



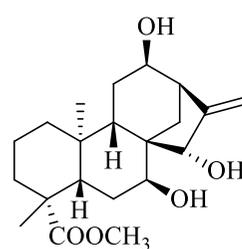
7-Oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (41)



7a,16-Dihidroxi-abiet-15(17)-en-19-al (42)

Do Nascimento *et al.*, 2012

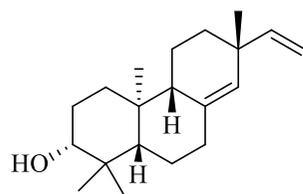
ent-12β-Hidroxi-caur-16-en-19-al (43)



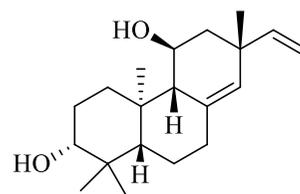
Metilen-7β,15a-dihidroxi-caur-16-en-19-oato (44)

Do Nascimento *et al.*, 2012*E. cuneatum*

## Referência



ent-Pimara-8(14),15-dien-3a-ol (45)



ent-3a,11β-Di-hidroxi-pimara-8(14),15-dieno (46)

Ansell *et al.*, 1993b

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Material vegetal

A coleta de exemplares da espécie *Erythroxylum bezerrae*, no mês de abril, na Reserva Natural Serra das Almas, situada no planalto da Ibiapaba - Ceará, foi realizada, para a prospecção fitoquímica de seus metabólitos secundários.

A autenticação do material vegetal foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Maria Iracema Bezerra Loiola, do Departamento de Biologia da UFC. A exsiccata de nº EAC 58211 encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

### 5.2 Métodos cromatográficos

#### 5.2.1 Cromatografia de adsorção em gel de sílica

A fase estacionária utilizada para cromatografia de adsorção foi gel de sílica 70-30 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da marca Merck para cromatografia de média pressão (cromatografia *flash*). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as massas das amostras e as massas de gel de sílica utilizadas. Para cromatografia de camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas Merck de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> sobre alumínio (espessura de 0,2 mm).

Os solventes utilizados como fase móvel foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, e em ordem crescente de polaridade. Os solventes P.A. utilizados na eluição foram das marcas Vetec<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup>.

As revelações das substâncias nas cromatoplasas analíticas (Merck) foram realizadas através de exposição à lâmpada ultravioleta da marca Spectroline<sup>®</sup> modelo CM-10 em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e pulverização com solução de dragendorff, além da pulverização com solução de vanilina (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), seguido de aquecimento por exposição ao ar quente pelo uso de soprador térmico DWT (Modelo HLP15-500).

- **Solução alcoólica ácida de vanilina**

Para 200 mL de solução, solubiliza-se 5 g de vanilina ( $C_8H_8O_3$ ) em 100 mL de álcool etílico. Em seguida, acrescenta-se à solução de vanilina, 100 mL de solução 0,75 M de ácido perclórico ( $HClO_4$ ).

- **Solução de dragendorff**

Para 200 mL de solução, solubiliza-se 5,2 g de nitrato de bismuto em água 80 mL (solução A) e 4 g de iodeto de potássio em água 80 mL (solução B). Mistura-se as soluções A e B e, em seguida, adiciona-se 40 mL de ácido acético à solução.

### **5.2.2 Extração em fase sólida (SPE)**

Foram utilizados cartuchos de fase reversa (Strata C18-E, 20g/60 mL, 55  $\mu$ m, 70 Å) de 1 g da marca Phenomenex. O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente (fase estacionária) com metanol, seguida de acondicionamento com água deionizada (Milli-Q), utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho.

### **5.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As análises por CLAE foram realizadas empregando um aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. As separações foram realizadas em coluna semi-preparativa C18 (10 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m), da marca Phenomenex® e mantida em um forno termostático a 35°C.

Os solventes empregados foram grau CLAE (acetonitrila) e  $H_2O$  deionizada (Milli-Q), acrescida de 0,05% da base trietilamina (TEA). Os solventes foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45  $\mu$ m (Milipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de politetrafluoretileno com poros de 0,45  $\mu$ m (Whatman).

## **5.3 Métodos espectrométricos e espectroscópicos**

### **5.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetros Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 1000 da central analítica do Departamento de Química

Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) para análise das amostras.

### 5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (uni e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetros Bruker<sup>®</sup> modelo DRX-500 e DPX-300 equipados com sonda de 5mm no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) pertencente à Universidade Federal do Ceará. O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras de alcaloides tropânicos e obtenção de seus espectros foi piridina- $d_5$ , enquanto que para a dissolução das amostras de diterpenos e obtenção de seus espectros utilizou-se o solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), o qual, assim como a piridina- $d_5$ , também foi produzido por Cambridge Isotope Laboratories.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de prótio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio ( $\delta_{\text{H}}$  7,27) e piridina ( $\delta_{\text{H}}$  8,74; 7,58 e 7,22). Para os espectros RMN  $^{13}\text{C}$ , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes utilizados: clorofórmio ( $\delta_{\text{C}}$  77,23) e piridina ( $\delta_{\text{C}}$  150,35; 135,91 e 123,87).

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), t (triplete), dd (duplo duplete), td (triplete de dublete), dt (duplo triplete), ddd (triplo duplete) e m (multiplete).

Os experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram efetuados em sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (500 MHz) ou em sonda dual de 5 mm com detecção direta (300 MHz). Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram:  $^1\text{H}$  (zg),  $^{13}\text{C}$ -CPD (zggp30), APT (jmod), COSY (cosygpqf), NOESY (noesygpqh), HSQC (hsqcgpqh) e HMBC (hmbcgpqh).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização das técnicas  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° e HSQC, e expressado segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

### **5.3.3 Espectrometria de massa (EM)**

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, em um espectrômetro Acquity UPLC acoplado a um sistema quadrupolo, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (IES), adquirido no modo positivo.

### **5.3.4 Espectroscopia de difração de raio-X (Raio-X)**

As análises de difração de raio-X foram realizadas em um difratômetro de monocristal da marca Bruker® modelo D8 Venture equipado com gerador de radiação de molibdênio e cobre pertencente ao Laboratório de Cristalografia Estrutural da Universidade Federal do Ceará. Os cristais das amostras foram crescidos através da lenta evaporação do solvente (CHCl<sub>3</sub> e MeOH), na proporção de 6:4, a baixa temperatura por um período entre 1 a 2 semanas.

## **5.4 Métodos físicos de análise**

### **5.4.1 Determinação da rotação óptica**

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Jasco Brasil P2000, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará à temperatura de 22°C. Os solventes utilizados foram CHCl<sub>3</sub> e MeOH, na proporção de 1:1, em cubeta de 2,5 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento. As medidas foram feitas em triplicata, com tempo de duração de cada análise de 15 segundos. Antes de cada análise foi obtido o branco de cada solvente para a correção dos valores. Foram considerados aceitáveis valores de desvio padrão menores que um.

### **5.4.2 Ponto de fusão**

Os pontos de fusão foram determinados utilizando equipamento digital de ponto de fusão da Microquímico Equipamentos Ltda, modelo MQADF-302, acoplada a um microscópio óptico monocular. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2,0°C/min. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) da Universidade Federal do Ceará.

## 5.5 Processamento do material vegetal de *Erythroxylum bezerrae* Plowman

A casca (1,8 kg) e o cerne do caule (3,0 kg) de *E. bezerrae*, secos a temperatura ambiente e trituradas, foram submetidas individualmente à maceração em 8 L de *n*-hexano e EtOH 96%, respectivamente, por 72 horas. A extração foi repetida 2 vezes e as soluções hexânicas e etanólicas foram evaporadas sob pressão reduzida para a obtenção dos extratos *n*-hexânico (EHEBC, 9,2 g, 0,5% de rendimento) e etanólico (EEEBC, 154,9 g, rendimento de 8,6%), referentes à casca do caule. 11,6 g de extrato *n*-hexânico (EHEBL, rendimento de 0,38%) e 51,0 g do extrato etanólico (EEEEL, rendimento de 1,67%), referentes ao cerne do caule.

### 5.5.1 Fracionamento do extrato etanólico da casca do caule (EEEBC)

46,5 g do extrato EEEBC foi solubilizado em 120 mL de metanol e 80 mL de água. Após este procedimento, foi submetido à extração líquido-líquido com 300 mL de clorofórmio (3 x 100 mL), seguido por 300 mL de AcOEt (3 x 100 mL) e, finalmente, por 50 mL de *n*-butanol, fornecendo, após serem secas com sulfato de sódio anidro e rotaevaporadas sob pressão reduzida, as frações conforme a Tabela 3. Após análise por CCDA, a fração clorofórmica EEEBC-A apresentou teste positivo frente ao reagente de Dragendorff, indicativo da possível presença de alcaloides.

**Tabela 3** - Partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do caule de *Erythroxylum bezerrae*.

Solvente	Fração	Massa (g)
CHCl <sub>3</sub>	<b>EEEBC-A</b>	<b>18,28</b>
AcOEt	EEEBC-B	2,62
<i>n</i> -BuOH	EEEBC-C	2,41
<b>Total</b>		23,31
<b>Rendimento</b>		50,0 %

#### 5.5.1.1 Fracionamento da fração EEEBC-A

Uma alíquota (10,0 g) da fração EEEBC-A foi adsorvida em 8 g de sílica gel e submetida à cromatografia sob 50 g de sílica gel numa coluna de 8,0 cm de diâmetro interno. Na eluição foram utilizados os solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 95:5, 90:10, 80:20, 50:50 e MeOH). As frações foram concentradas sob pressão reduzida e suas respectivas massas organizadas conforme a Tabela 4.

**Tabela 4** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração *EEEBC-A*.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300	EEEBC-A1	564 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	300	EEEBC-A2	372 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%	300	<b>EEEBC-A3</b>	<b>4,31 g</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	300	<b>EEEBC-A4</b>	<b>2,41 g</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	300	EEEBC-A5	1,93 g
MeOH	300	EEEBC-A6	218 mg
Total			9,80
Rendimento			97,98 %

A análise comparativa por CCDA, revelada sob lâmpada de UV (365 nm), seguida por borrifação com vanilina e aquecimento ou por detecção com reagente de dragendorff das frações obtidas do fracionamento de *EEEBC-A*, revelou que as frações **EEEBC-A3** e **EEEBC-A4** apresentaram teste positivo frente ao reagente Dragendorff e foram, inicialmente, selecionadas para prospecção fitoquímica.

A fração **EEEBC-A3** (4,3 g), obtida por eluição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90:10), foi adsorvida em 8 g de gel de sílica e disposta sobre 50,0 g de gel de sílica. A eluição foi realizada com os solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH, de acordo com a tabela 5 abaixo.

**Tabela 5** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração *EEEBC-A3*.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	150	1-5	9 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	150	6-10	69 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%	150	11-15	3,4 g
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%	150	16-20	275 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	150	21-25	51 mg
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	150	26-30	87 mg
MeOH	50	31-35	15 mg
Total			3,90 g
Rendimento			97,98 %

Foram coletadas 35 frações de aproximadamente 30 mL, as quais foram posteriormente analisadas por CCDA e reunidas conforme suas semelhanças da seguinte forma: F 1-10 (EEEBC-A3-A), F 11-17 (EEEBC-A3-B), F 18-27 (EEEBC-A3-C) e F 19-35 (EEEBC-A3-D). A possível presença de alcaloides foi observada na fração EEEBC-A3-B.

#### 5.5.1.2 Fracionamento de EEEBC-A3-B

A fração EEEBC-A3-B (3,5 g) foi misturada a 7,0 g de gel de sílica e disposta sobre 50,0 g de gel de sílica, utilizando como eluente os solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH puros ou em misturas binárias, em escala crescente de polaridade, nas proporções mostradas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-B.

Eluente (%)	Fração	Massa (g)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %	1-9	0,2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	10-18	0,7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%	19-29	1,4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	30-38	0,7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	39-45	0,3
MeOH 100%	46-53	0,04
<b>Total</b>		3,34
<b>Rendimento</b>		95,4 %

Foram coletadas 53 frações de aproximadamente 10 mL cada, as quais, após análise em CCDA, foram agrupadas em três frações: F 1-18 (A), F 19-32 (B) e F 33-53 (C). Após exposição ao reagente dragendorff, a fração B foi considerada alcaloídica. Esta foi submetida a uma coluna cromatográfica de média pressão, utilizando sílica *flash* como adsorvente.

#### 5.5.1.3 Fracionamento de EEEBC-A3-BB e isolamento de EB-1, EB-2, EB-3, EB-4, EB-7 e EB-8.

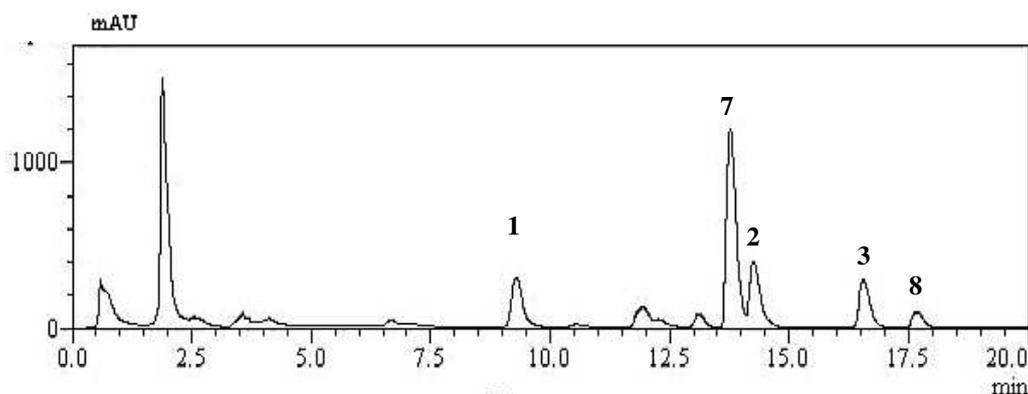
A fração **EEEBC-A3-BB** (1,5 g) foi solubilizada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e adsorvida em 3,0 g de sílica flash. Este material foi adicionado em uma coluna de 3,0 cm de diâmetro, empacotada com 80,0 g de sílica flash. A eluição ocorreu no modo isocrático, utilizando o eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/i-PrOH na proporção de (90:10). As frações obtidas (62 com aproximadamente 10 mL cada) foram agrupadas com base na semelhança de seus perfis, após análise por CCDA, conforme disposto na Tabela 7.

**Tabela 7** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-BB.

Eluente (%)	Frações reunidas	Frações	Massa (mg)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / i-PrOH 10%	1-10	EEEBC-A3-BB-A	265,7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / i-PrOH 10%	11-29	EEEBC-A3-BB-B	612,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / i-PrOH 10%	30-31	EEEBC-A3-BB-C	198,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / i-PrOH 10%	32-62	EEEBC-A3-BB-D	314,0
<b>Total</b>			1,39
<b>Rendimento</b>			92,6%

As frações EEEBC-A3-BB-B (612,0 mg) e EEEBC-A3-BB-D (314,0 mg) indicaram, através do reagente de dragendorff, a presença de alcaloides.

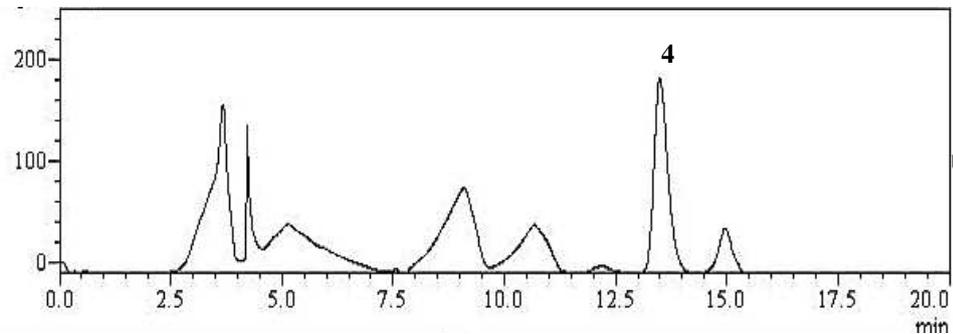
200,0 mg da fração EEEBC-A3-BB-B, foram dissolvidos em 10 mL de MeCN e submetidos a CLAE, utilizando um detector de fotiodo (PDA). A análise foi realizada utilizando coluna semipreparativa de fase reversa (C-18) (10,0 x 250 mm, 5µm), H<sub>2</sub>O (0,05% TEA)/MeCN 50-100% como fase móvel, fluxo de 3,0 mL/min, 150 µL de volume injetado em cada análise e temperatura de forno da coluna de 40°C. Nestas condições e utilizando uma faixa de comprimento de onda de 210-400 nm, obteve-se o cromatograma a seguir:

**Figura 8**– Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B para isolamento de EB-1, EB-2, EB-3, EB-7 e EB-8.

Este procedimento levou ao isolamento de EB-1 (13,0 mg, tR = 9,4 min), EB-2 (7,0 mg, tR = 9,4 min), EB-3 (8,3 mg, tR = 13,4 min), EB-7 (7,8 mg, tR = 10,6 min) e EB-8 (6,7 mg, tR = 11,2 min).

Uma alíquota (100,0 mg) da fração EEEBC-A3-BB-D foi dissolvida em 5 mL de MeCN e submetidos a CLAE, utilizando um detector de fotodiodo (PDA). Assim como para a fração anterior, a análise dessa fração foi realizada utilizando coluna semipreparativa de fase reversa (C-18) (10,0 x 250 mm, 5 $\mu$ m), H<sub>2</sub>O (0,05% TEA)/MeCN 50-100% como fase móvel, fluxo de 3,0 mL/min, 150  $\mu$ L de volume injetado em cada análise e temperatura de forno da coluna de 40°C. Nestas condições e utilizando uma faixa de comprimento de onda de 210-400 nm, obteve-se o cromatograma da figura 9. Deste procedimento obteve-se 5 mg de um sólido branco amorfo denominado EB-4 (t<sub>R</sub> = 13,5 min).

**Figura 9** - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B para isolamento de EB-4.



#### 5.5.1.4 Fracionamento cromatográfico de EEEBC-A4 e isolamento de EB-5, EB-1 e EB-6.

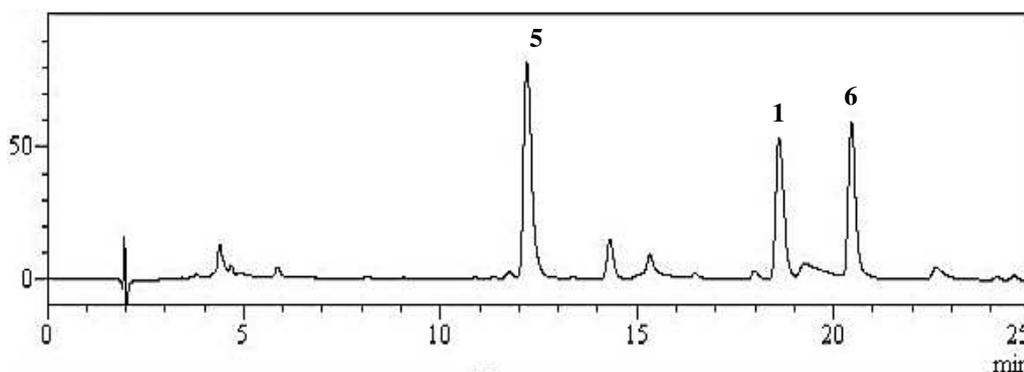
Com uma alíquota (1,0 g) da fração EEEBC-A4, realizou-se uma extração em fase sólida, SPE C-18, utilizando como eluentes H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1), H<sub>2</sub>O/MeOH (2:3), H<sub>2</sub>O/MeOH (3:7), H<sub>2</sub>O/MeOH (2:8), H<sub>2</sub>O/MeOH (1:9) e MeOH, resultando em 6 frações de 100 mL cada (Tabela 8, abaixo).

**Tabela 8** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EEEBC-A4.

Eluentes (%)	Volume (mL)	Fração	Massa (mg)
H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1)	100	EEEBC-A4-A	758,3
H <sub>2</sub> O/MeOH (2:3)	100	EEEBC-A4-B	59,4
H <sub>2</sub> O/MeOH (3:7)	100	EEEBC-A4-C	42,7
H <sub>2</sub> O/MeOH (2:8)	100	EEEBC-A4-D	23,8
H <sub>2</sub> O/MeOH (1:9)	100	EEEBC-A4-E	15,8
MeOH 100%	100	EEEBC-A4-F	48,6
<b>Total</b>			948,6
<b>Rendimento</b>			94,8

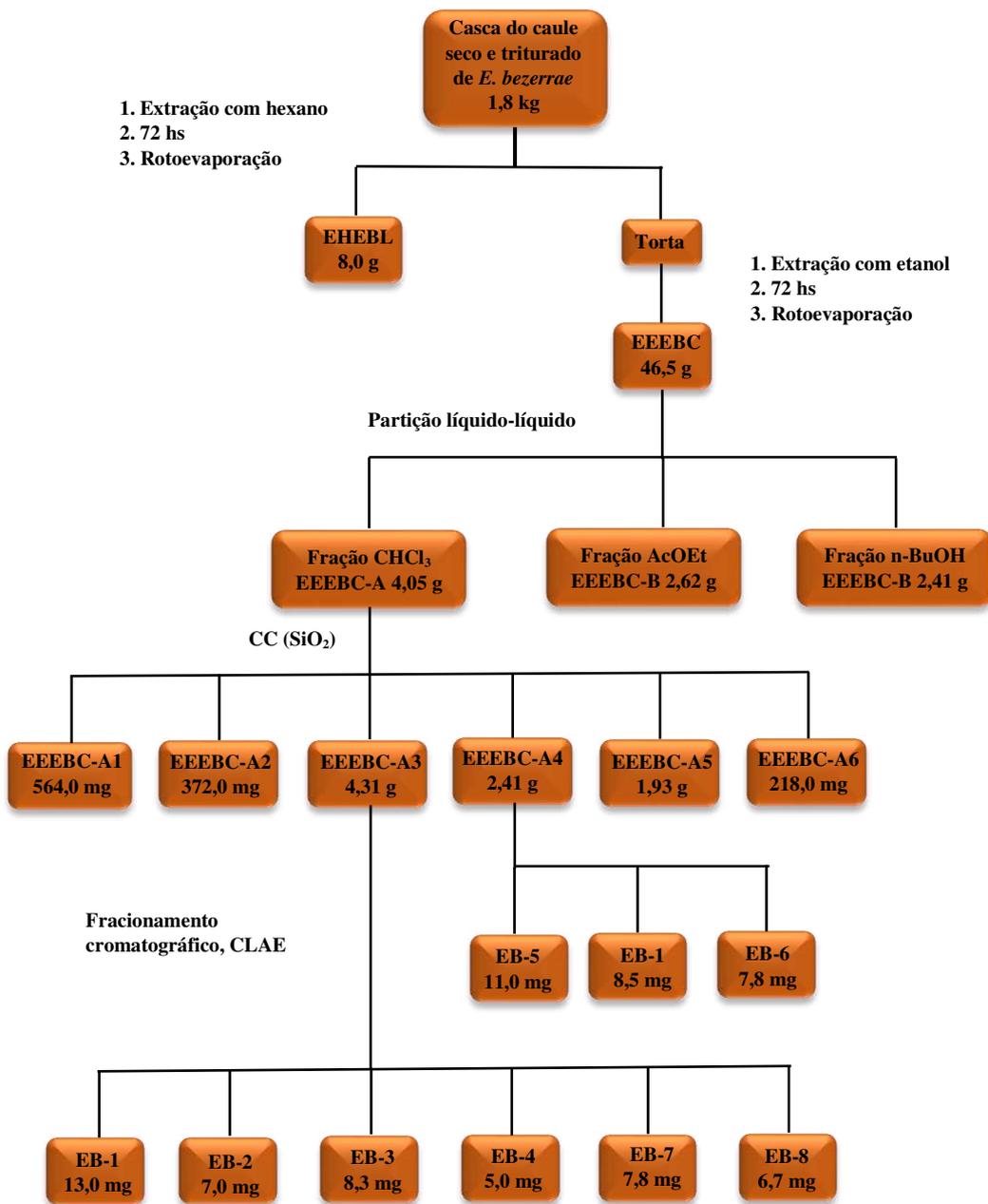
A análise por CCD, cujo reagente utilizado foi o dragendorff, revelou a presença de alcaloides na fração EEEBC-A4-A. Uma alíquota de 100 mg foi submetida a CLAE semi-preparativa, C<sub>18</sub>. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O (0,05% TEA)/ACN 20-100%, fluxo de 3,0 mL/min e canal de monitoramento 210-400 nm (cromatograma da figura 10).

**Figura 10** - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B para isolamento de EB-5, EB-1 e EB-6.



Este procedimento levou ao isolamento de **EB-5** (11,4 mg,  $t_R = 10,0$  min), o composto já isolado anteriormente **EB-1** (8,5 mg,  $t_R = 18,7$  min) e **EB-6** (7,8 mg,  $t_R = 20,5$  min).

**Figura 11** - Fluxograma ilustrando o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da casca do caule de *E. bezerrae*.



### 5.5.2 Fracionamento do extrato hexânico do cerne do caule (EHEBL)

Uma alíquota (8,0 g) do extrato hexânico do cerne do caule de *E. bezerrae* foi adsorvida em 17,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 72,0 g de gel de sílica em uma coluna de 5 cm de diâmetro. O fracionamento cromatográfico foi realizado por eluições com hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias. Foram obtidas 23 frações de 100 mL cada, que após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), resultaram em 5 frações (Tabela 9).

**Tabela 9** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano/AcOEt 20%	400	EHEBL-A	4,05	50,6
Hexano/AcOEt 40%	300	EHEBL-B	0,42	5,2
Hexano/AcOEt 60%	300	EHEBL-C	1,23	15,3
Hexano/AcOEt 80%	200	EHEBL-D	0,47	5,8
AcOEt	200	EHEBL-E	0,53	6,6
<b>Total</b>				<b>83,5</b>

#### 5.5.2.1 Fracionamento de EHEBL-A e isolamento de EB-13, EB-14, EB-15 e EB-16.

A fração EHEBL-A (4,05 g) foi solubilizada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e acondicionada em 54,0 g de gel de sílica em coluna de 4,0 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada utilizando-se de misturas binárias hexano/acetato de etila, fornecendo 27 frações de aproximadamente 25 mL (Tabela 10).

**Tabela 10** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-A.

Eluente	Volume (mL)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano/AcOEt 5%	350	1-8	0,618	15,2
Hexano/AcOEt 10%	450	9-27	2,70	66,6
<b>Total</b>				<b>81,8</b>

Após análise por CCDA, obteve-se: F 1-10 (A), F 11-17 (B) e F 18-27 (C).

A fração EHEBL-A-B (752,0 mg) foi submetida à cromatografia líquida em coluna sobre 40 g de gel de sílica (coluna de 4 cm de diâmetro interno) e eluída com hexano e acetona puros ou em proporções binárias: Hexano/acetona 5%, hexano/acetona 50% e acetona. Foram coletadas 59 frações de aproximadamente 8 mL, as quais, após análise em CCDA, foram reunidas. O grupo de frações F 12-15 (14 mg) apresentou-se como uma resina amarela com satisfatório grau de pureza e foi denominada **EB-13**.

A fração F 25 (57,8 mg), obtida por eluição com hexano/acetona 5% apresentou um precipitado branco, que após filtração resultou em 14,2 mg de um composto puro denominado de **EB-14**. Enquanto a fração F 28 (35,0 mg) apresentou satisfatório grau de pureza, e foi denominada **EB-15**.

A fração EHEBL-A-C (1,95 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna (4 cm de diâmetro interno) com 60 g de gel de sílica e eluída com: DCM/isopropanol 2%. Foram coletadas 30 frações de aproximadamente 8 mL, as quais após análise em CCDA, foram reunidas de acordo com suas semelhanças. O grupo de frações F 18-27 (860,0 mg) apresentou-se como um sólido branco amorfo com satisfatório grau de pureza e foi denominada **EB-16**.

#### 5.5.2.2 *Fracionamento de EHEBL-B e isolamento de EB-17.*

A fração EHEBL-B (420,0 mg) foi solubilizada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e cromatografada sobre 18 g de sílica gel em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi constituída pelos solventes hexano e acetato de etila puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, de acordo com a tabela 11, abaixo.

**Tabela 11** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-B.

Eluente	Volume (mL)	Fração
Hexano/AcOEt 20%	150	1-25 (A)
Hexano/AcOEt 30%	50	26-33 (B)
Hexano/AcOEt 50%	50	34-40 (C)
Hexano/AcOEt 70%	50	41-46 (D)
AcOEt	50	47-49 (E)

Foram coletadas 49 frações de aproximadamente 10 mL, as quais foram posteriormente analisadas por CCD e reunidas conforme suas semelhanças da seguinte forma: F 1-25 (A), F 26-33 (B), F 34-40 (C), F 15-21 (D) e F 22 (E).

A fração C (113,7 mg) foi submetida a procedimento cromatográfico em gel de sílica, utilizando-se os solventes: DCM, DCM/acetona 95:5, 8:2, 5:5 e acetona. Foram coletadas 80 subfrações, as quais foram analisadas por CCD e reunidas conforme suas semelhanças da seguinte forma: F 1-29 (A), F 30-35 (B), F 36-43 (C), F 44-66 (D), F 67-80 (E). A subfração B (27,7 mg) foi recromatografada, utilizando-se os solventes DCM e DCM/acetona 5%, foram obtidas 16 subfrações, as quais foram monitoradas por CCDA. A subfração C (8,0 mg) apresentou-se como uma resina incolor com satisfatório grau de pureza e foi denominada **EB-17**.

#### 5.5.2.3 Fracionamento de EHEBL-C e isolamento de EB-18 e EB-9.

1,23 g da fração hexano/AcOEt (EHEBL-C) foram misturados a 3,0 g de gel de sílica, pulverizados em gral de porcelana e dispostos sobre 32 g de gel de sílica em coluna de 8 cm de diâmetro. O fracionamento foi conduzido utilizando os solventes hexano/AcOEt (7:3). Foram obtidas 55 frações de aproximadamente 10 mL cada, que após análise por CCDA, foram reunidas em 6 frações (Tabela 12).

**Tabela 12** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-C.

Frações resultantes	Eluente	Peso (mg)	Fração
<b>1</b>	Hexano/AcOEt 30%	84,1	EHEBL-C-A
<b>2</b>	Hexano/AcOEt 30%	60,5	EHEBL-C-B
<b>3</b>	Hexano/AcOEt 30%	235,6	EHEBL-C-C
<b>4</b>	Hexano/AcOEt 30%	270,0	EHEBL-C-D
<b>5</b>	Hexano/AcOEt 30%	213,0	EHEBL-C-E
<b>6</b>	Hexano/AcOEt 30%	217,9	EHEBL-C-F
<b>Total</b>		1,08 g	
<b>Rendimento</b>		87,8%	

As frações EHEBL-C-C (235,6 mg) e EHEBL-C-D (270,0 mg) apresentaram precipitados, os quais foram filtrados de seus respectivos líquidosz mãe, resultando em 127,0 mg de um composto químico codificado como **EB-18**.

A fração EHEBL-C-E (213,0 mg) foi adsorvida em 500 mg de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 15 g de gel de sílica em coluna de 4 cm de diâmetro interno. O fracionamento cromatográfico foi realizado por eluições com: DCM/AcOEt (8:2) e AcOEt, resultando em 4 subfrações como sumarizado na Tabela 13.

**Tabela 13** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-C-E.

Frações resultantes	Eluente	Peso (mg)	Fração
<b>1</b>	DCM/AcOEt 20%	30,8	EHEBL-C-EA
<b>2</b>	DCM/AcOEt 20%	38,1	EHEBL-C-EB
<b>3</b>	DCM/AcOEt 20%	110,5	EHEBL-C-EC
<b>4</b>	AcOEt	12,8	EHEBL-C-ED
<b>Total</b>		192,2 g	
<b>Rendimento</b>		90,0%	

A subfração EHEBL-C-EB (38,1 mg) foi purificada utilizando coluna de gel de sílica e o sistema de solvente: hexano/AcOEt 30%, obtendo-se 17 frações, as quais foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos em 4 subfrações, da seguinte forma: F 1-8 (A), F 9-13 (B) e F 14-17 (C). A fração C apresentou considerável grau de pureza, resultando em um sólido branco cristalino, denominado **EB-9**.

#### 5.5.2.4 Fracionamento de EHEBL-D e isolamento de EB-19.

A fração EHEBL-D (0,47 g) foi solubilizada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e cromatografada sobre 21 g de sílica gel numa coluna de 6,0 cm de diâmetro interno. A fase móvel utilizada foi constituída pelos solventes hexano e acetato de etila puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, de acordo com a tabela 14 abaixo.

**Tabela 14** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-D.

Eluente	Volume (mL)	Fração
Hexano/AcOEt 25%	150	1-14
Hexano/AcOEt 30%	100	15-35
Hexano/AcOEt 40 %	100	36-50
Hexano/AcOEt 50%	100	51-61
AcOEt 100%	50	62-72

Foram coletadas 72 frações de aproximadamente 10 mL, as quais foram posteriormente analisadas por CCD e reunidas conforme suas semelhanças da seguinte forma: F 1-3 (A), F 4-13 (B), F 14-43 (C), F 44-53 (D), F 54-62 (E), F 63-66 (F) e F 67-72 (G).

A fração E (26,4 mg) apresentou-se como um sólido cristalino incolor, com um grau de pureza considerável, o qual foi denominado **EB-19**.

#### 5.5.2.5 Fracionamento de EHEBL-E e isolamento de EB-10, EB-11 e EB-12.

534,3 mg da fração EHEBL-E foram misturados a 1,1 g de gel de sílica, pulverizadas em gral de porcelana e dispostas sobre 15,0 g de gel de sílica em coluna de 2,5 cm de diâmetro. O fracionamento foi conduzido utilizando como eluente hexano/AcOEt 30%, rendendo 33 frações de 10 mL cada, que após análise em CCDA, foram reunidas em 4 frações (Tabela 15).

**Tabela 15** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-E.

Frações resultantes	Eluente	Peso (mg)	Fração
<b>1</b>	Hexano/Acetona 20%	86,0	EHEBL-EA
<b>2</b>	Hexano/Acetona 20%	237,7	EHEBL-EB
<b>3</b>	Hexano/Acetona 20%	101,7	EHEBL-EC
<b>4</b>	Acetona	12,8	EHEBL-ED
<b>Total</b>		438,2	
<b>Rendimento</b>		82,0%	

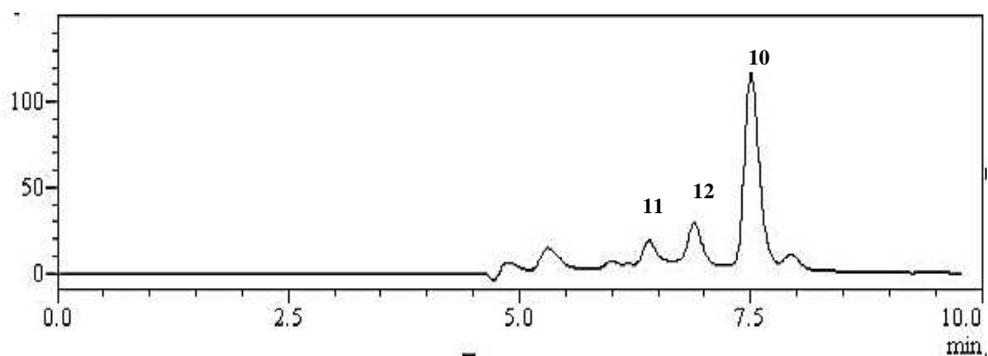
A fração EHEBL-EA (86,0 mg) rendeu pequenos cristais brancos, os quais foram filtrados para remoção do líquido sobrenadante, rendendo 8,5 mg de um composto denominado **EB-10**.

237,7 mg da fração EHEBL-EB, submetida a cromatografia a média pressão, foi misturada a 500,0 mg de gel de sílica e adsorvidas em 8,0 g de gel de sílica em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro. O fracionamento foi conduzido utilizando: hexano/acetona 20%, resultando em 21 frações com cerca de 10 mL, cada. Após análise por CCDA, reuniu-se as frações em 4 frações (Tabela 16)

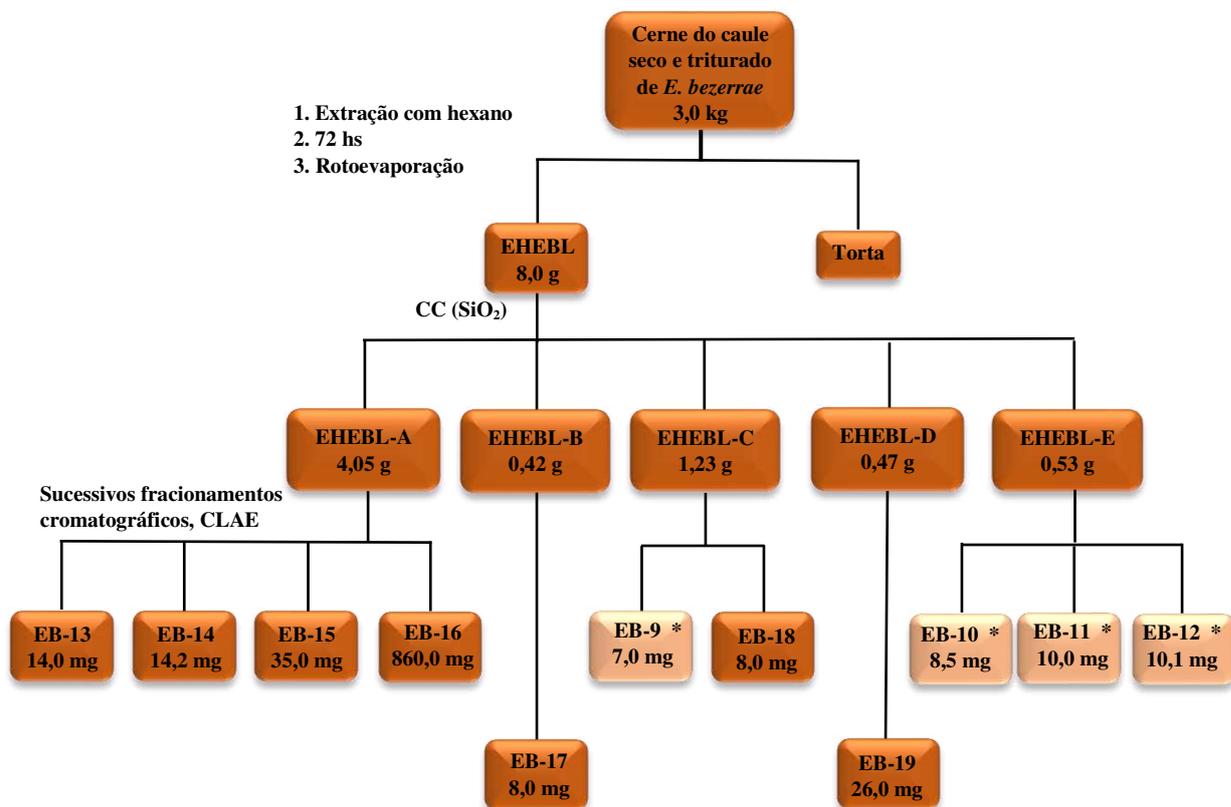
**Tabela 16** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da fração EHEBL-EB.

Frações resultantes	Eluente	Peso (mg)	Fração
<b>1</b>	Hexano/acetona 20%	30,5	EHEBL-EB-1
<b>2</b>	Hexano/acetona 20%	24,6	EHEBL-EB-2
<b>3</b>	Hexano/acetona 20%	32,8	EHEBL-EB-3
<b>4</b>	Hexano/acetona 20%	84,9	EHEBL-ED-4
<b>Total</b>		172,8	
<b>Rendimento</b>		72,6 %	

A fração EHEBL-ED-4 (84,9 mg) foi submetida à CLAE, utilizando coluna semipreparativa de fenil-hexil (10,0 x 250 nm, 5  $\mu$ m); H<sub>2</sub>O (0,1% TFA)/MeOH 90-100% como fase móvel; fluxo de 3,0 mL/min; volume injetado de 150  $\mu$ L, e temperatura de forno de 40°C. Nestas condições, e utilizando uma faixa de comprimento de onda de 210-400 nm, foram obtidos três picos, referentes aos compostos EB-11 (7,0 mg, Tr = 6,4 min), EB-12 (10,1 mg, Tr = 6,8 min) e o composto previamente isolado EB-10 (18,0 mg, Tr = 7,5 min), (Figura 12).

**Figura 12** - Cromatograma obtido da fração EEEBC-A3-BB-B para isolamento de EB-11, EB-12 e EB-10.

**Figura 13** - Fluxograma mostrando os compostos obtidos do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico do cerne do caule de *E. bezerrae*. 58



\*Os compostos EB-9 a EB-12 são novos diterpenos derivados de cauranos e EB-13 um composto inédito de produto natural.

## 5.5 Atividades biológicas dos compostos isolados

### 5.5.1 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* das substâncias isoladas

Os compostos EB-1 a EB-19 puros foram investigados quanto à atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais através do ensaio colorimétrico do MTT. Os testes de citotoxicidade foram realizados no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo como responsável o Dr. Danilo Damasceno Rocha, cujo procedimento encontra-se descrito abaixo.

#### 5.5.1.2 Linhagens e modelos celulares

Para o ensaio da atividade citotóxica foram utilizadas as linhagens tumorais: PC3 (Carcinoma de próstata), HCT-116 (Câncer de colorretal), SNB 19 (sistema nervoso), NCIH-460 (pulmão), além de uma linhagem normal L929 (Fibroblasto murino) para teste de toxicidade, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, enquanto L929 foi cultivada em DMEM. Todos os materiais foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram diluídas em DMSO e testadas na concentração de 20 µg/ml.

#### 5.5.1.3 Teste de citotoxicidade – Teste do MTT

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo rotineiramente utilizada em vários programas de *screening*, inclusive pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula.

### 5.5.1.3.1 Princípio do teste

É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em um precipitado de coloração azul (formazan), a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

### 5.5.1.4 Procedimento experimental

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para a linhagem PC3,  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para HCT-116, e para L929 a concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél/mL. As placas de PC3 e L929 foram incubadas por 72 horas e as placas de HCT-116 foram incubadas por 24, 48 e 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foi adicionado 100 µL da solução de sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT), o qual é convertido em formazan (Figura 14), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias de células viáveis (MOSMAN, 1983). As placas foram incubadas por 3h nessa solução, as quais, em seguida, tiveram suas absorbâncias lidas após dissolução do precipitado em 100 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

**Figura 14**– Esquema mostrando a reação de redução do MTT a formazan por enzimas mitocondriais.



#### 5.5.1.5 Análise dos dados

Para a determinação da  $CI_{50}$  (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) as absorbâncias das amostras foram analisadas utilizando o logaritmo das concentrações testadas por regressão não-linear. Foram realizadas duas repetições individuais para cada um dos compostos em todas as linhagens previamente indicadas. Todos os experimentos foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.0.

#### 5.5.2 Atividade anti-inflamatória

Os compostos EB-9 a EB-19 foram investigados quanto a sua atividade anti-inflamatória dos compostos em células RAW 264.7 estimuladas por LPS. Os testes foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo como responsável a Dra Flávia Almeida Santos, cujo procedimento encontra-se descrito abaixo.

##### 5.5.2.1 Cultura celular

Para o cultivo celular, foi utilizada a linhagem de macrófagos murino (RAW 264.7), obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico, contendo 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 5.5.2.2 Diluição das amostras e número amostral

Todas as amostras foram previamente solubilizadas em DMEM contendo 1% de DMSO (Veículo), seguindo as diluições necessárias para a obtenção das concentrações preconizadas em cada um dos testes realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n = 6).

### 5.5.2.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT

A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (MOSMANN, 1983). As células RAW 264.7 foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h. As células foram tratadas com os compostos de teste EB9-EB19 (0.78 – 400  $\mu$ M) por 24 h. O MTT (1 mg/mL) foi adicionado em cada poço de células e incubado por 4 h a 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e adicionado DMSO (100  $\mu$ L) a cada poço. Após 30 min de incubação, a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplaca (Asys UVM 340, Biochrom, EUA).

### 5.5.2.4 Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico (NO) estimulada por LPS

A concentração de nitrito no meio foi medida como um indicador da produção de NO de acordo com a reação de Griess (GASPARRINI, 2018). As células RAW 264,7 foram semeadas a uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço, em placa de 96 poços, e tratadas com os compostos EB9-EB19, em diferentes concentrações, por 1 h e, em seguida, estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/mL) a 37 °C, por 24 h. Dexametasona (1.25 – 10  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Para análise, o sobrenadante da cultura foi coletado e misturado com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de N-[1-naftil]-etilenodiamina, 5% de ácido fosfórico) e a absorbância medida a 540 nm. A quantidade de nitrito nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (ZHAI *et al.*, 2016).

### 5.5.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Todos os dados foram avaliados sob a sua distribuição normal, analisada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados a partir das curvas de concentração-resposta e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Para comparações múltiplas dos parâmetros foi utilizada a ANOVA, sendo o nível de significância entre os grupos determinado pelo pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism® 5.03 (San Diego, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Determinação estrutural dos compostos isolados de *Erythroxylum bezerrae*

O estudo químico dos extratos da casca do caule e do lenho do caule de *E. bezerrae* resultou no isolamento de vinte e um compostos, codificados como EB-1 a EB-21. A partir das análises dos seus dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff, observou-se que oito destes compostos pertencem à classe dos alcaloides tropânicos (**EB-1** a **EB-8**), enquanto os demais são diterpenos cauranos (**EB-9** a **EB-14**) e (**EB-16** a **EB-19**), exceto por um diterpeno do tipo labdano (**EB-15**). A seguir, serão apresentadas as determinações estruturais das substâncias isoladas, iniciando pelos alcaloides.

#### 6.1.1 Determinação estrutural de **EB-1**

O tratamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-BB-B do extrato etanólico de *E. bezerrae* (item 5.5.1.3, Pág. 51), permitiu o isolamento de 14,7 mg de um sólido branco cristalino,  $[\alpha]_D^{22} -8.8^\circ$  (*c* 0,06,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1), com P.F. 226-228 °C, denominado de **EB-1**.

O composto **EB-1** teve sua fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_8$  (12 graus de insaturação), definida com base no espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI), o qual exibiu íon correspondente a molécula protonada  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  458,1815 (calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NO}_8$ , 458,1809).

O espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de fourier (IV-FT) (Figura 20, p. 71) exibiu duas bandas de absorção em 3563 e 3410  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes à deformação axial de OH livre e de OH quelado, respectivamente, incluindo duas bandas de deformação axial da ligação C-O em 1128 e 1221  $\text{cm}^{-1}$ , compatíveis com a presença de álcoois e fenóis. Foram observadas bandas esqueléticas em 1503, 1460 e 1416  $\text{cm}^{-1}$  e bandas de deformação angular fora do plano de  $\text{Csp}^2\text{-H}$  em 843 e 758  $\text{cm}^{-1}$ , características de anéis benzênicos mono e tetra substituído. Observou-se também duas bandas de absorção em 1710 e 1631  $\text{cm}^{-1}$ , características de deformação axial da ligação C=O de carbonila conjugada, além da banda de deformação axial da ligação C-N em 1054  $\text{cm}^{-1}$ , inferindo a presença de amina terciária alifática, corroborando com a possível presença de alcaloides de núcleo tropânico (CHÁVEZ *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

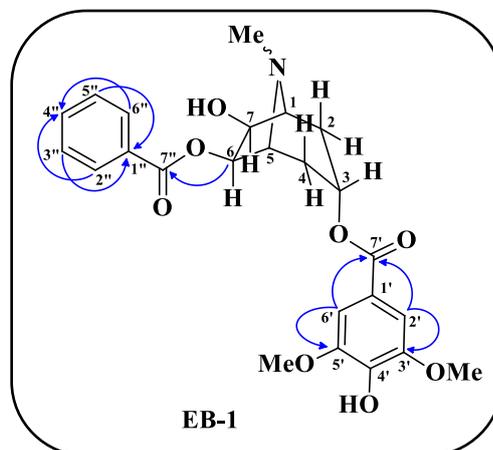
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) mostrou quatro sinais na região de hidrogênios ligados a anel benzênico em  $\delta_{\text{H}}$  8,27 (2H, d,  $J = 7,2$  Hz, H-2''/H-6''), 7,88 (2H, s, H-2'/H-6'), 7,49 (1H, t,  $J = 7,4$  Hz, H-4'') e 7,37 (2H, t,  $J = 7,6$  Hz, H-3''/H-5''), três sinais de hidrogênios oximetínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6), 5,53 (1H, t,  $J = 4,7$  Hz, H-3) e 5,32 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-7), um sinal característico de metoxilas em  $\delta_{\text{H}}$  4,05 (6H, s), bem como sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,55 (1H, s, H-5) e 3,41 (1H, s, H-1), correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados. Adicionalmente, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em associação com espectro COSY, revelou sinais para dois pares de hidrogênios metilênicos diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,32/1,87 (2H-2) e 2,31/1,91 (2H-4), Tabela 15.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CPD, 75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) apresentou vinte sinais, que após comparação com o espectro DEPT 135°, revelou a existência de três carbonos metílicos, dois metilênicos, nove metínicos e, conseqüentemente, seis carbonos não-hidrogenados. De acordo com o espectro HSQC (Figura 25, pág. 73), o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  56,9 equivale a duas metoxilas, assim como, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  108,3, 129,0, 130,4, e 149,3 correspondem, cada um, a dois carbonos magneticamente equivalentes, totalizando 24 átomos de carbono (Tabela 17) em acordo com a fórmula molecular  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_8$ . Os sinais de carbonos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  80,7 (C-6), 76,4 (C-7) e 68,3 (C-3) e nitrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  68,5 e 64,8, mostraram correlações com os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6), 5,53 (1H, t,  $J = 4,7$  Hz, H-3), 5,32 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-7), 3,55 (s, H-5) e 3,41 (s, H-1), respectivamente, evidenciando um núcleo tropânico tri-substituído, típico de alcaloides previamente isolados de espécies de *Erythroxylum* (PAYO-HILL *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Uma análise detalhada dos dados de RMN  $^1\text{H}$  combinado ao HMBC mostrou, além do núcleo tropânico, duas unidades benzoílas, sendo uma não substituída e a outra tri-substituída, por duas metoxilas equivalentes e uma hidroxila, substituintes estes comuns em alcaloides de *Erythroxylum* (BRINGMANN *et al.*, 2000). A posição inequívoca destes substituintes foi determinada com base em informações do espectro HMBC (Figura 26, pág. 74) e literatura (CHAVEZ *et al.*, 2002). O sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,21 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6), correlacionado no espectro HSQC com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  80,7 (C-6), mostrou correlação a longa distância com o carbono de éster em  $\delta_{\text{C}}$  166,9, permitindo determinar a posição do grupo benzoíla não substituído em C-6. Conseqüentemente, a unidade benzoíla metoxilada foi posicionada em C-3 em acordo com as estruturas de alcaloides previamente descritas (OLIVEIRA *et al.*, 2011), enquanto, o grupo hidroxila foi posicionado em C-7 devido

à correlação do hidrogênio oximetínico em 5,32 (H-7) com o sinal de carbono em  $\delta_c$  80,7 (C-6), Figura 15.

**Figura 15** - Estrutura mostrando suas correlações à longa distância ( $^3J$ ) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC para EB-1.

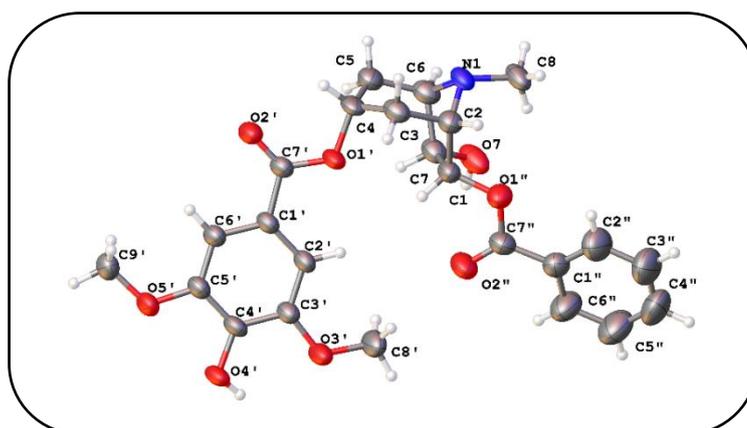


A configuração relativa de **EB-1** foi inferida com base na interpretação do espectro NOESY, multiplicidades/valores de constante de acoplamento ( $J$ ) e por comparação com dados de RMN de estruturas análogas previamente relatadas (Chavez *et al.*, 2001). No espectro NOESY, as correlações do sinal em  $\delta_H$  2,78 (3H, s, *N*-metil) com os hidrogênios em  $\delta_H$  2,31 (1H, m, H-4 $_{ax}$ /H-2 $_{ax}$ ) sugeriram a posição *axial* para o grupo *N*-metila. De forma semelhante, as correlações de H-7 e H-6 com os hidrogênios equatoriais H-2 e H-4, respectivamente, sugeriram que os grupos HO-7 e BzO-6 se encontram  $\beta$ -posicionados, como justificado pelo valor de  $J$  (6,0 Hz), o qual indica acoplamento *cis*. Por outro lado, o grupo BzO-3 substituído foi  $\alpha$ -posicionado em função da multiplicidade tripleto (t) observada para H-3 e valor de  $J = 4,7$  Hz, compatível com acoplamento *eq/ax* entre H-3 $_{eq}$  com H-2 $_{ax}$  e H-4 $_{ax}$ . Isto foi ainda confirmado através das correlações dos hidrogênios H-6 $_{ax}$  e H-7 $_{ax}$  com os hidrogênios ligados a carbonos aromáticos H-2'/H-6', conforme apresentado na Figura 15.

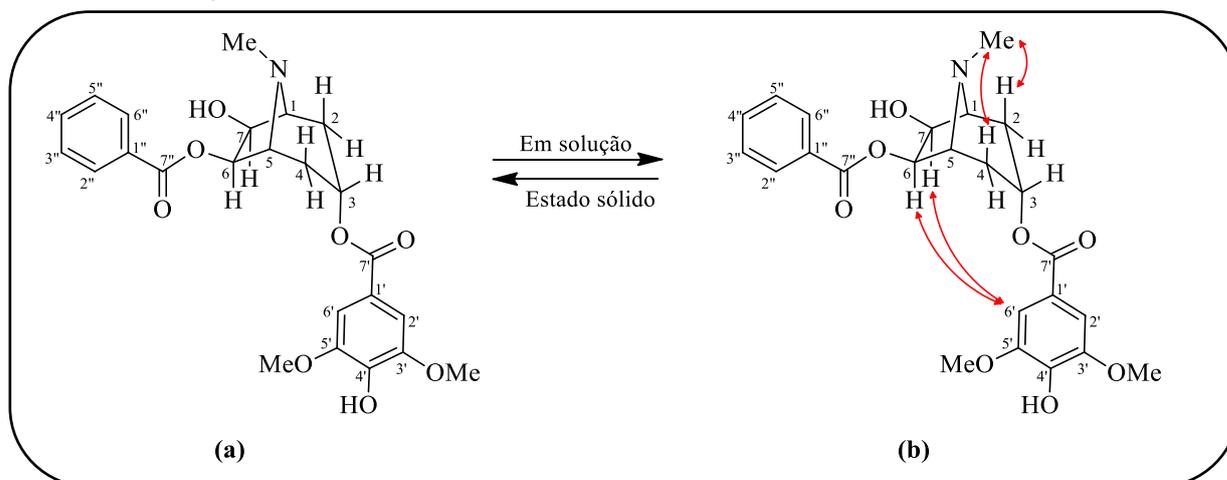
Curiosamente, a difração de raios-X de **EB-1** mostrou o *N*-metila na posição pseudo-equatorial [Figura 17(a)], enquanto seu espectro NOESY exibiu correlações dos prótons *N*-metila com H-2 e H-4 em posição  $\beta$ , indicando uma posição pseudo-axial para aquele grupo [Figura 17(b)]. Com base nesses resultados, sugerimos ambas as conformações para o grupo *N*-metil, um fenômeno bem documentado (COCINERO *et al.*, 2010; CLOSS, 1959), sendo a conformação pseudo-*equatorial* a preferida no estado sólido, enquanto a conformação pseudo-*axial* é preferida em solução.

A estrutura obtida por difração de raios-X mostrou a configuração relativa de EB-1, conforme observado na Figura 16. Porém, em acordo com o padrão da rota biosintética comum aos alcalóides tropânicos (DEWICK, 2009), o grupamento benzoíla foi posicionado em C-6 no anel tropano e a estrutura de EB-1 foi estabelecida como um enantiômero [Figura 17(a)].

**Figura 16** – Desenho em ORTEP da estrutura de EB-1.



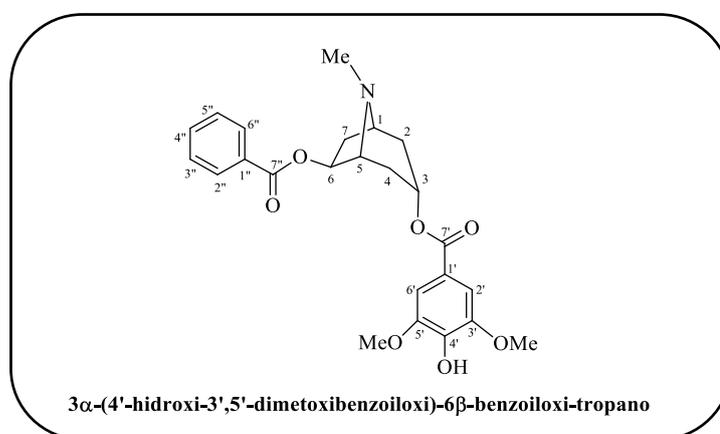
**Figura 17** - Correlações importantes de NOESY (↔) para EB-1 e orientações do grupo *N*-metil no estado sólido (a) e em solução (b).



Vale ressaltar que a estereoquímica relativa dos grupos *N*-alquila nos alcalóides tropânicos tem estimulado diversos estudos. Por exemplo, estudos conformacionais por espectroscopia de RMN em  $\text{CDCl}_3$ , sugeriram preferências pseudo-axiais para os grupos *N*-alquila na tropinona, mas preferências pseudo-equatoriais em alguns tropanos substituídos em C-3, em uma solução de  $\text{CFCl}_3$  (SIDOROWICZ *et al.*, 2015). Na forma de cristal, a conformação *N*-metil foi determinada como pseudo-equatorial na cocaína (HRYNCHUK *et al.*, 1983), mas, pseudo-axial na escopolamina (GLASER; SHIFTAN, 1999). Portanto, parece não haver uma posição definida para o grupo alquila localizado no átomo de nitrogênio em alcalóides tropânicos.

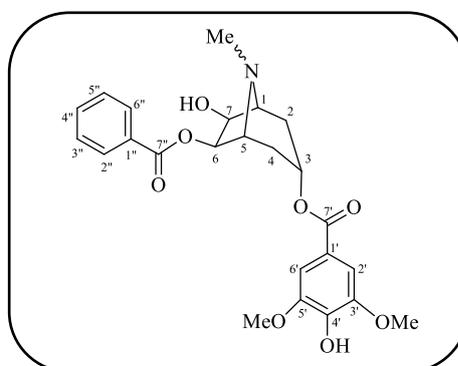
A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **EB-1** com os apresentados por Oliveira *et al.* (2011) (Tabela 17, p. 71) revelou dados compatíveis, incluindo a posição do grupo *N*-metil em pseudo-axial na forma de cristal, com o alcaloide tropânico  $3\alpha$ -(4'-hidroxi-3',5'-dimetoxibenzoila)- $6\beta$ -benzoiloxi-tropano (Figura 18), isolado do caule de *E. Caatingae* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Diferenças foram observadas nos sinais de C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  60,0) e C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  36,7) no composto da literatura, os quais mostraram-se mais blindados que os sinais da estrutura proposta C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  68,5) e C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  76,4), compatíveis com a ausência de um grupo hidroxila em C-7.

**Figura 18** - Estrutura do alcaloide tropânico isolado por Oliveira *et al.* (2011)



Deste modo, conforme os dados acima mencionados, a estrutura de **EB-1** se trata de um novo alcaloide tropânico, denominado de  $7\beta$ -hidroxi- $3\alpha$ -(4'-hidroxi-3',5'-dimetoxibenzoiloxi)- $6\beta$ -benzoiloxi-tropano (Figura 19, abaixo).

**Figura 19** – Estrutura de EB-1



**Tabela 17** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-1 e do alcaloide isolado por Oliveira *et al.*, (2011).

No.	EB-1 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz)		<b>3<math>\alpha</math>-(4'-Hidroxi-3',5'- dimetoxibenzoila)-6<math>\beta</math>- benzoiloxi-tropano</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	68,5	3,41 sl	60,1	3,45 m
2	30,8	2,31 (m) 1,87 d (14,0)	34,6	2,29 m 1,82 dl (15,0)
3	68,3	5,53 (t, 4,7)	67,3	5,34 tl (5,0)
4	30,7	2,31 (m) 1,91 (d, 14,0)	33,3	2,37 m 2,03 dl (15,0)
5	64,8	3,55 (sl)	65,7	3,43 m
6	80,7	6,21 (d, 6,0)	79,7	5,93 dd (7,0; 3,0)
7	76,4	5,32 (d, 6,0)	36,7	2,82 dd (15,0;7,0) 2,33 m
1'	120,9	-	121,1	-
2'/6'	108,3	7,88s	106,5	7,32 s
3'/5'	149,3	-	147,0	-
4'	143,3	-	139,6	-
7'	166,3	-	165,4	-
8'	-	-	-	-
9'	-	-	-	-
1''	131,8	-	130,3	-
2''/6''	130,4	8,27 (d, 7,2)	129,5	8,01 dd (7,5; 1,0)
3''/5''	129,0	7,37 (t, 7,6)	128,3	7,43 t (7,5)
4''	133,3	7,49 (t, 7,4)	132,9	7,55 t (7,5)
7''	166,9	-	166,0	-
4'-MeO			-	-
3'/5'-MeO	56,9	4,05 s	56,5	4,00 s
Me-N	38,3	2,78 s	40,0	2,46 s

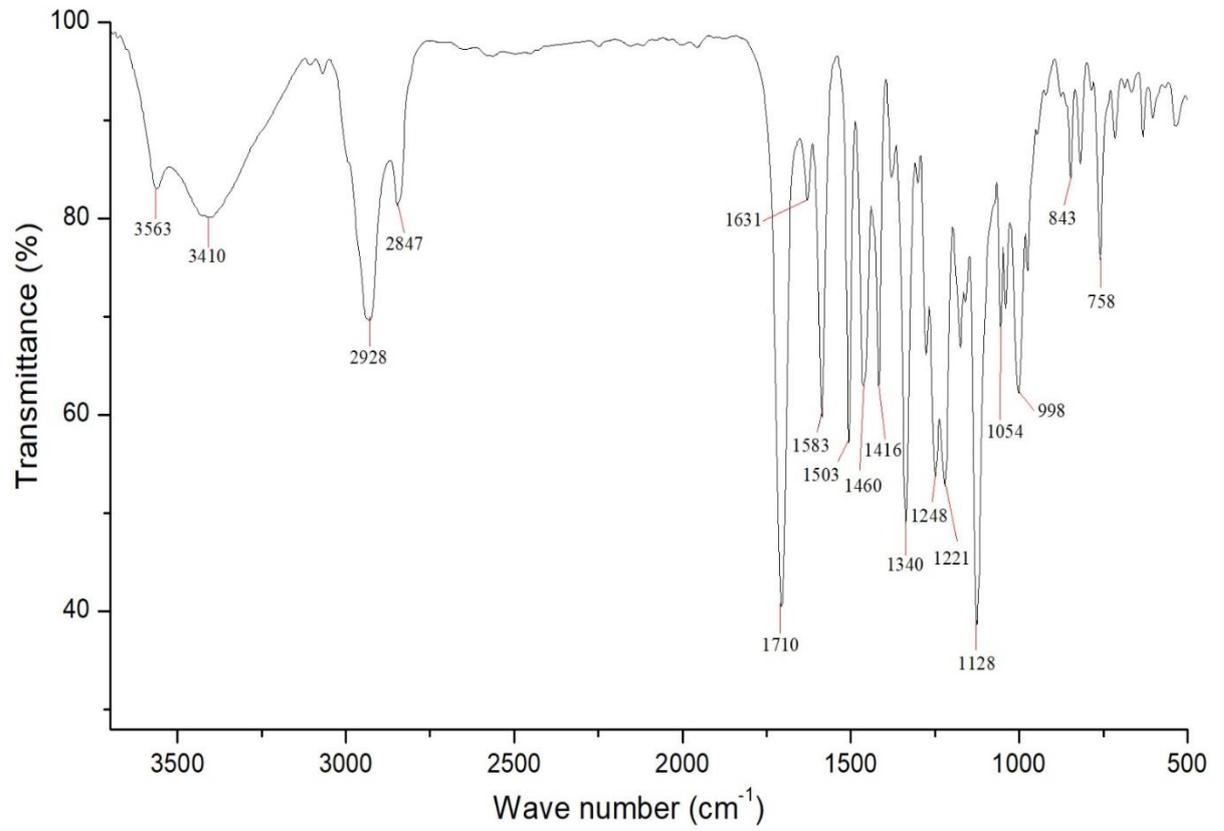
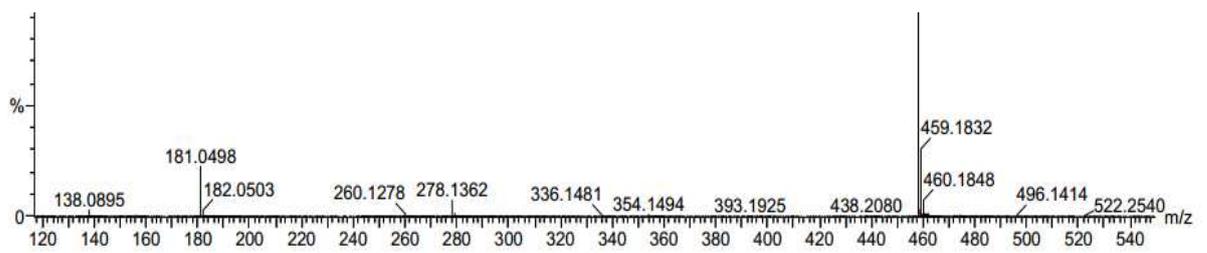
**Figura 20** - Espectro de absorção no infravermelho (KBr) de **EB-1****Figura 21** - Espectro de massa de alta resolução,  $[M+H]^+$  de **EB-1**.

Figura 22 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-1.

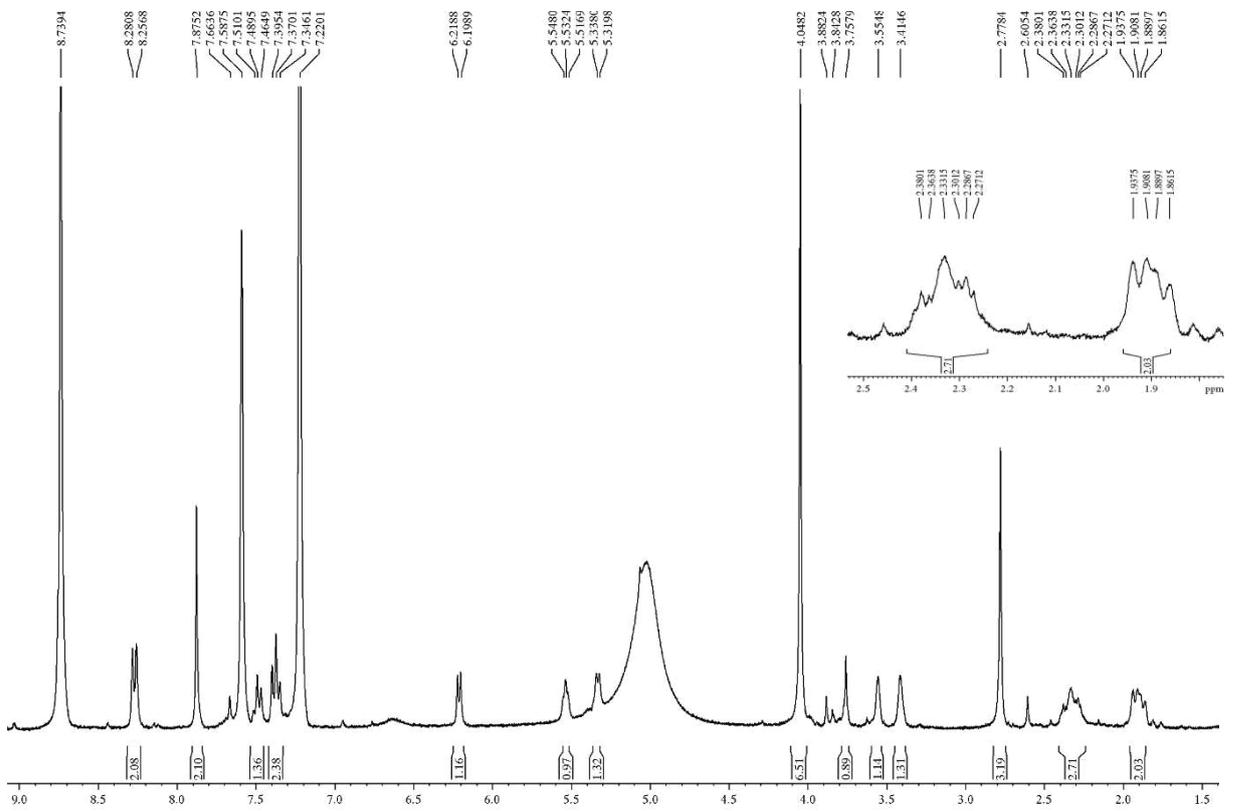


Figura 23 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-1.

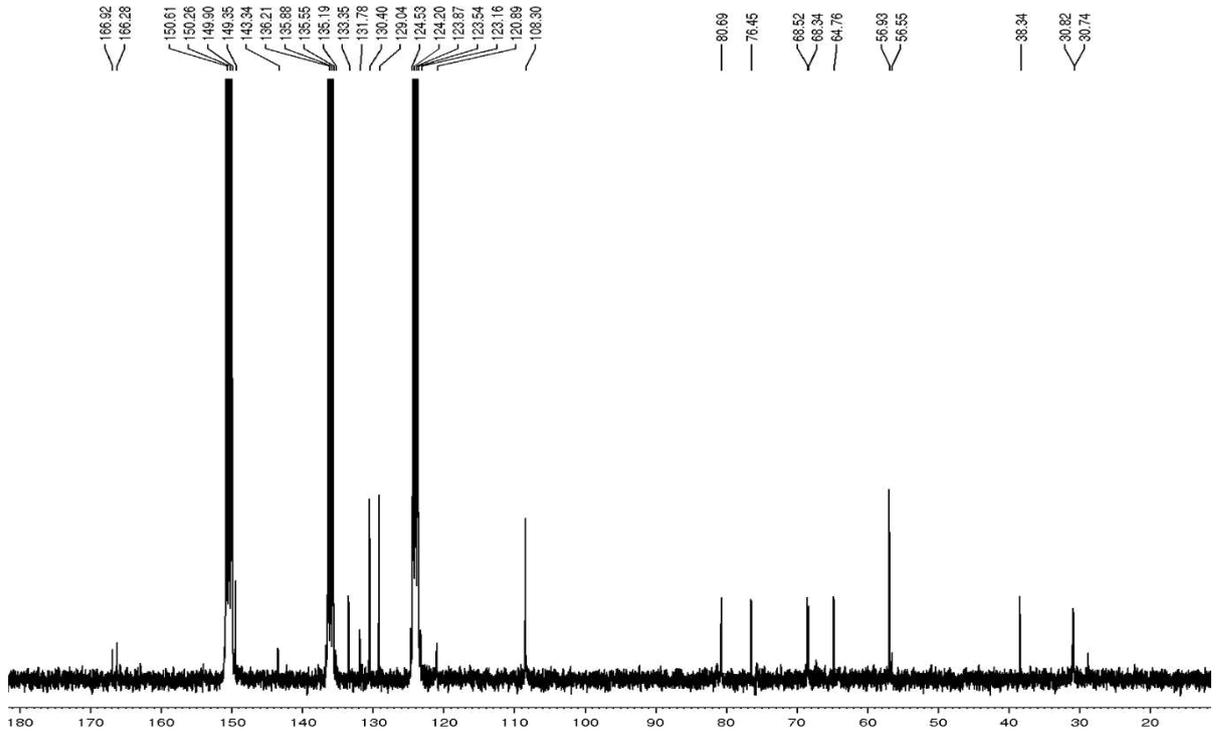


Figura 24 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 500 MHz,) de **EB-1**.

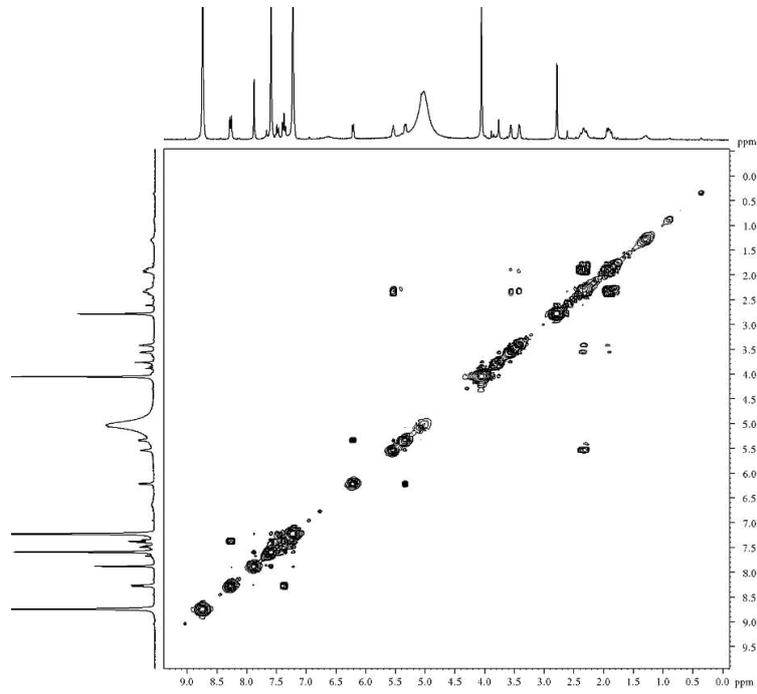
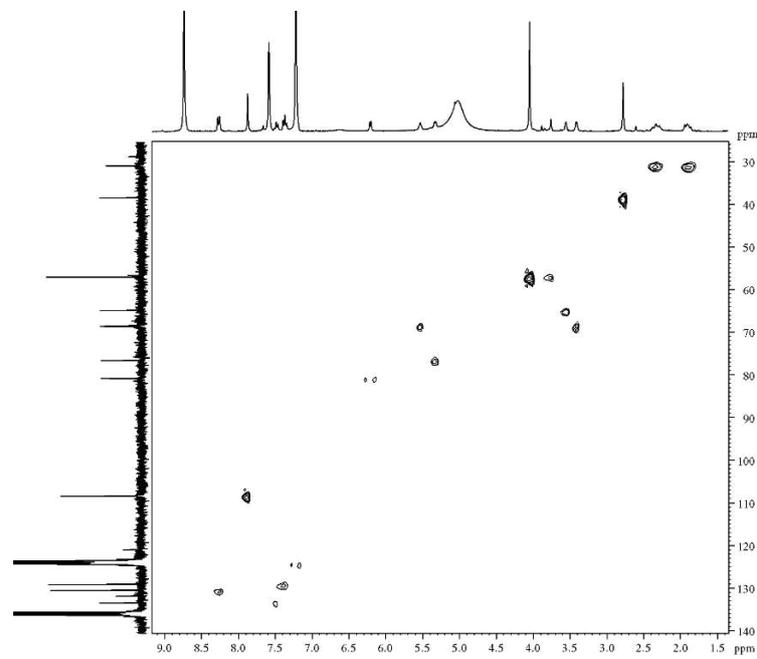
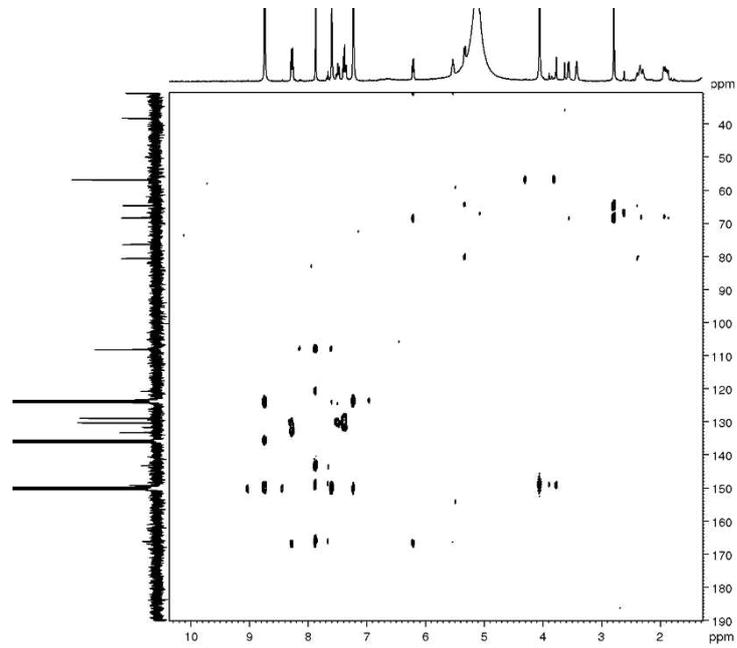


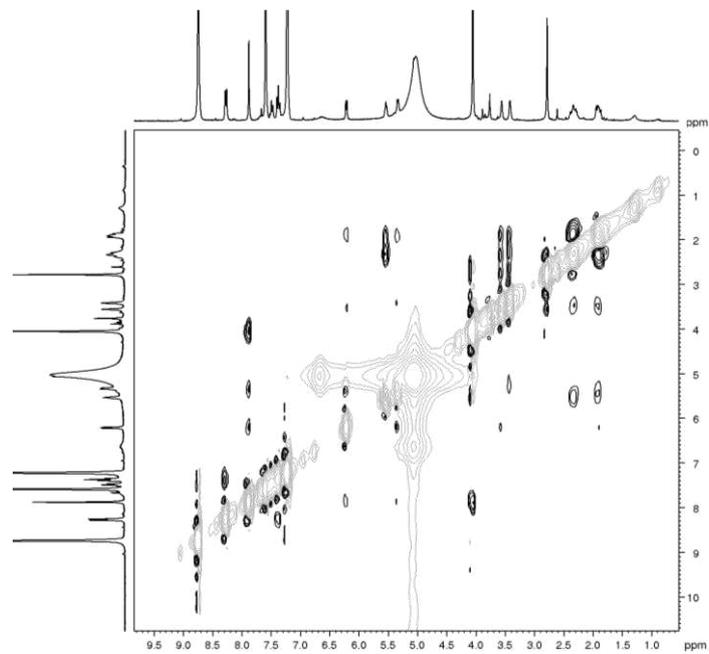
Figura 25 - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 125 MHz) de **EB-1**.



**Figura 26** - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 125 MHz) de **EB-1**.



**Figura 27** - Espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -ROESY ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 500 MHz) de **EB-1**.



### 6.1.2 Determinação estrutural de EB-2

O tratamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-BB-B, incluindo CLAE, (ver experimental, item 5.5.1.3, Pág. 51), resultou na obtenção de 8,5 mg de uma resina amarela, denominada de **EB-2**.

A fórmula molecular  $C_{25}H_{29}NO_8$  foi determinada por EMAR-ESI (Fig.28, p. 79), baseado no pico da molécula protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  472.1963  $[M+H]^+$  (calc 472.1966), portanto com 14 unidades de massa ( $CH_2$ ) superior a **EB-1**.

O espectro de absorção IV-TF de EB-2 (Figura 29) exibiu bandas de absorção para hidroxila livre em  $3487\text{ cm}^{-1}$  e para carbonila de cetona conjugada em  $1675\text{ cm}^{-1}$  (PAVIA, 2016).

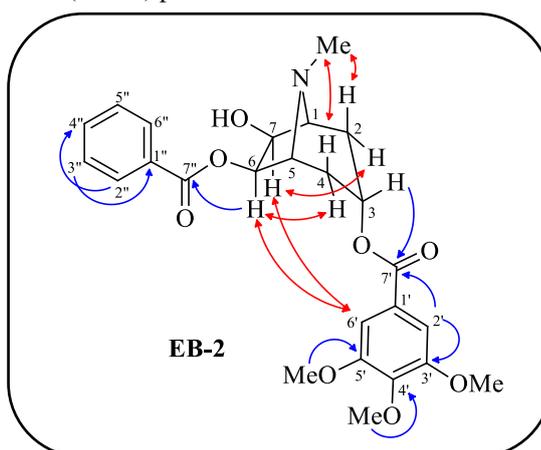
O espectro de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $C_5D_5N$  - Fig. 30) demonstrou sinais para dois pares de hidrogênios equivalentes na região de aromáticos em  $\delta_H$  8,26 (d,  $J=7,3$ , H-2''/6'') e 7,37 (t,  $J=7,3$ , H-3''/5''), bem como um sinal em  $\delta_H$  7,49 (t,  $J=7,3$ , H-4'') correspondente a um anel benzênico não substituído. Ainda na região de aromáticos, foi observado um sinal com integração para dois hidrogênios em 7,74 (s, H-2'/6'), o qual foi atribuído a um benzeno substituído por três grupos metoxilas, uma vez que o espectro HMBC mostrou correlações de destes grupos metoxilas com os carbonos em  $\delta_C$  154,3 (C-3'/5') e 144,0 (C-4'). Além desses, evidenciou a presença de cinco sinais de hidrogênios metínicos, dos quais três são ligados a carbonos oxigenados em  $\delta_H$  6,15 (d,  $J=6,0$ , H-6), 5,53 (t,  $J=4,4$ , H-3) e 5,29 (d,  $J=6,0$ , H-7), sendo os demais ligados a carbonos nitrogenados em  $\delta_H$  3,57 (s, H-1) e 3,43 (s, H-5). Foram observados ainda sinais para hidrogênios metilênicos na faixa de  $\delta_H$  2,38-1,88 e de uma metila em  $\delta_H$  2,78 (s, Me-N), compatíveis com um alcaloide tropânico semelhante a EB-1, cuja diferença se deve ao aparecimento de um sinal extra para metoxila em  $\delta_H$  3,98 (3H).

Os dados de RMN de  $^{13}C$  do composto EB-2 se mostraram semelhantes ao do composto EB-1, com pequenas diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático substituído relacionados com a presença de uma metoxila em  $\delta_C$  61,0 (4'-MeO), mais desprotegida devido a compressão estérica dos dois grupos metoxilas adjacentes [ $\delta_C$  56,7 (3'/5'-MeO)], em substituição a um grupo hidroxila, como confirmada pela correlação do sinal em  $\delta_H$  3,98 (4'-MeO) com o carbono em  $\delta_C$  144,0 (C-4') no espectro de RMN 2D-HMBC. Além disso, observou-se correlações dos hidrogênios H-2''/6'' ( $\delta_H$  8,26) e H-6 ( $\delta_H$  6,15) com o sinal da

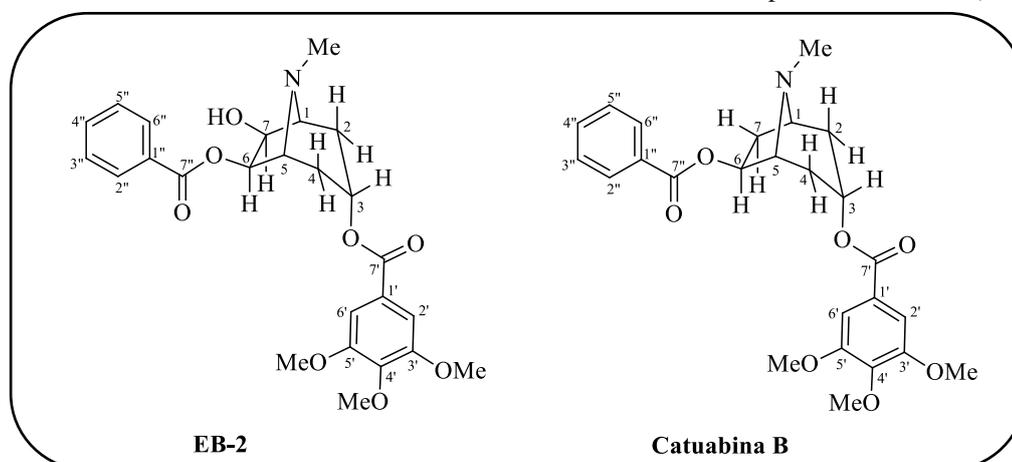
carbonila em  $\delta_C$  166,9, bem como do simpleto H-2'/6' ( $\delta_H$  7,88) com a carbonila em 165,9, conforme mostra a Figura 28, a seguir.

A configuração relativa de EB-2 foi estabelecida pelo espectro de RMN 2D ROESY, o qual exibiu correlações dipolares dos hidrogênios  $\beta$ -metilênicos H-2 e H-4 em  $\delta_H$  2.36 (2H, m) com os hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  2,78 (*N*-Me), sugerindo a posição do grupo *N*-Me em *pseudo*-axial (CHAVEZ *et al*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2013). Os grupos HO-7 e BzO-6 foram  $\beta$ -posicionados devido às correlações dipolares dos hidrogênios  $\alpha$ -posicionados em H-6 e H-7 com H-4 $\alpha$  e H-2 $\alpha$ , respectivamente, corroborando com a estrutura de um novo alcaloide tropânico denominado 3 $\alpha$ -(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (Figura 27), cujos dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  estão apresentados na Tabela 18 (Pag. 77).

**Figura 28** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância ( $^3J$ ) apresentados pelo espectro de RMN 2D  $^1H$ ,  $^{13}C$  – HMBC (↷) e ROESY (↶) para EB-2.



**Figura 29** - Estrutura de EB-2 e da estrutura do alcaloide Catuabina B, isolado por Oliveira *et al.*, (2011).



A análise comparativa dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-2 possibilitou encontrar semelhanças com os dados apresentados por Oliveira *et al.*, (2011) para o alcaloide tropânico  $3\alpha$ -(3',4',5'-trimetoxibenzoiloxi)- $6\beta$ -benzoiloxi-tropano, conhecido como catuabina B, previamente isolado de *E. vacciniifolium*, por Graf e Lude, (1978) (Tabela 18, p.77), mas com diferenças significativas nos sinais de H-7/C-7 devido à presença de um grupo hidroxila em EB-2.

**Tabela 18** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 x 125 MHz) de EB-2 e catuabina B.

No.	EB-2 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)		Catuabina B ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	68,4	3,43 sl	60,0	3,43 m
2	30,7	2,36 m 1,90 d (14,0) <i>eq</i>	34,6	2,26 m 1,83 dl (15,0)
3	68,8	5,53 t (4,4)	67,6	5,34 tl (5,0)
4	30,6	2,36 m 1,92 d (14,0) <i>eq</i>	33,3	2,33 m 2,03 dl (15,0)
5	64,7	3,57 sl	65,7	3,42 m
6	80,6	6,15 d (6,0)	79,8	5,92 dd (7,0; 3,0)
7	76,3	5,29 d (6,0)	36,7	2,80 dd (15,0;7,0) 2,30 m
1'	126,5	-	125,4	-
2'/6'	107,7	7,74 s	106,6	7,39 s
3'/5'	154,3	-	153,1	-
4'	144,0	-	153,1	-
7'	165,9	-	165,4	-
8'	-	-	-	-
9'	-	-	-	-
1''	131,7	-	130,0	-
2''/6''	130,4	8,26 d (7,2)	129,5	8,02 dd (7,5; 1,0)
3''/5''	129,0	7,37 t (7,2)	128,3	7,42 t (7,5)
4''	133,4	7,49 t (7,2)	132,9	7,55 t (7,5)
7''	166,9	-	166,0	-
<i>p</i> -MeO	61,0	3,98 s	60,9	3,92 s
<i>m</i> -MeO	56,7	4,00 s	56,3	3,98 s
Me-N	38,3	2,78 s	40,1	2,60 s

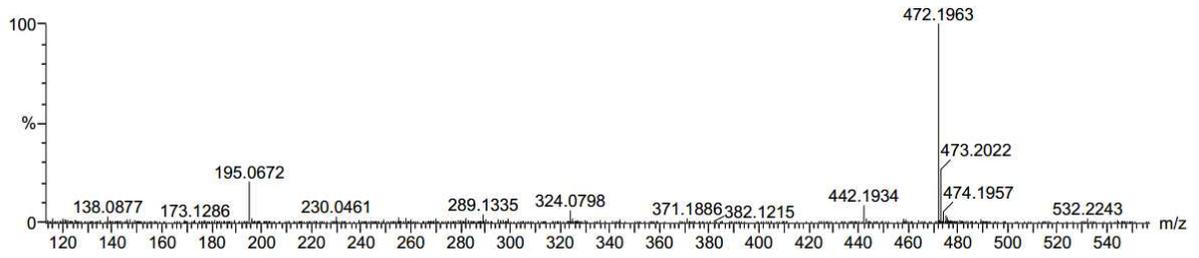
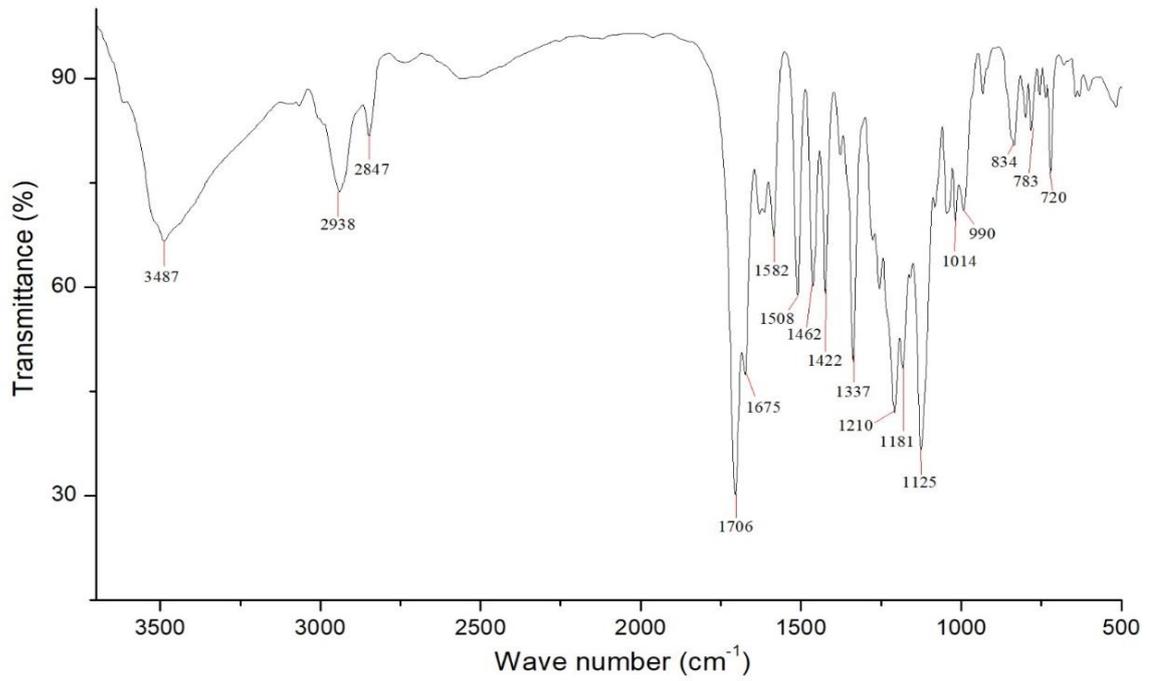
**Figura 30** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-2**.**Figura 31** - Espectro de absorção no infravermelho de **EB-2**.

Figura 32 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-2**.

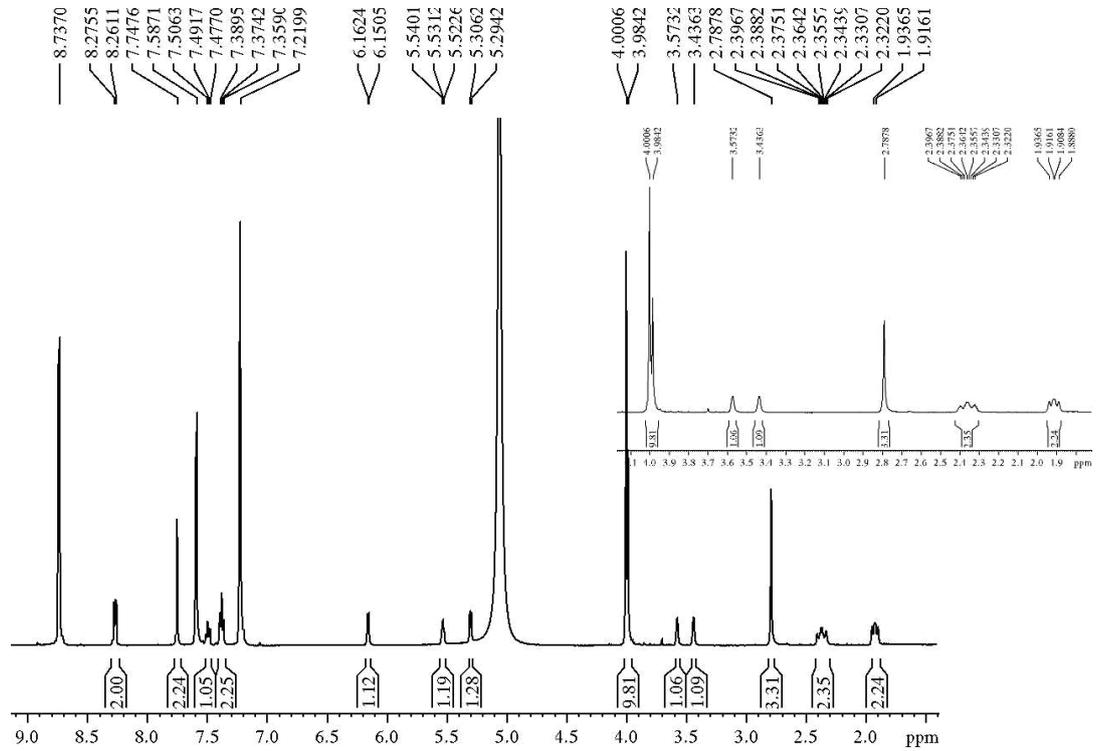
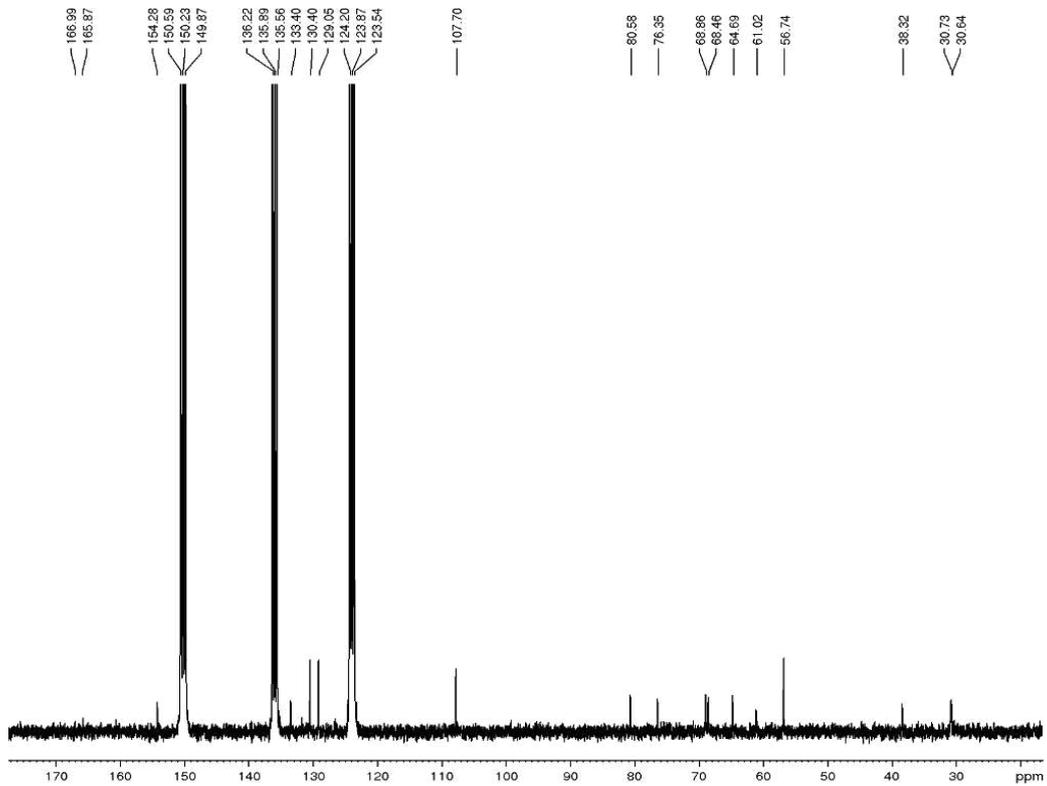
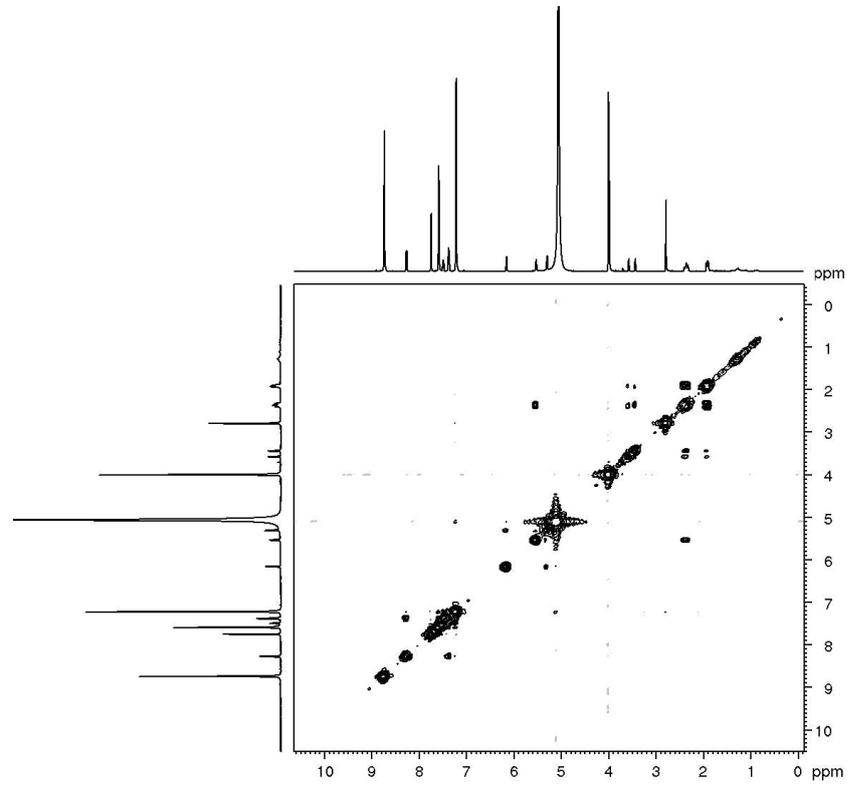


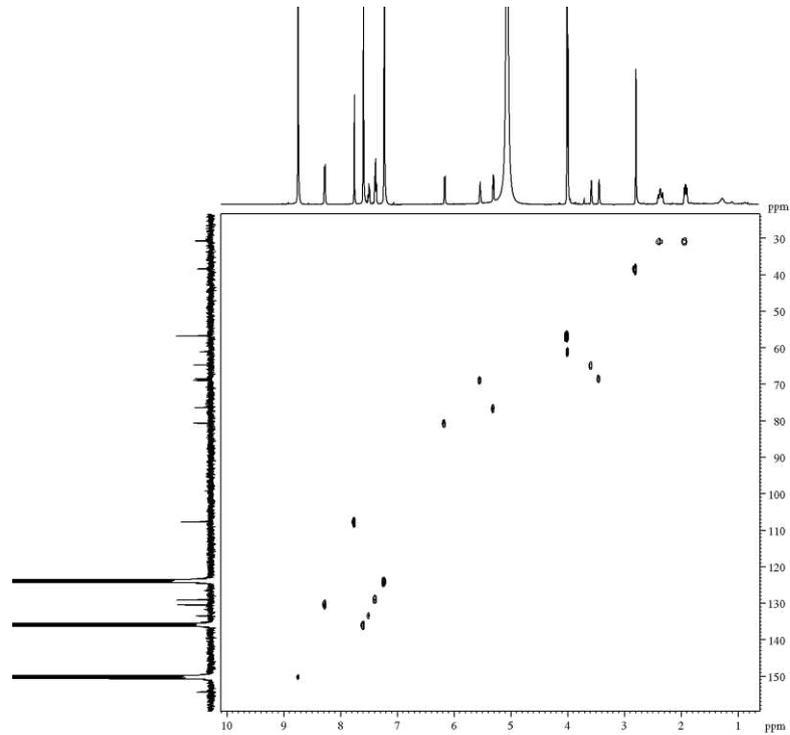
Figura 33 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-2**.



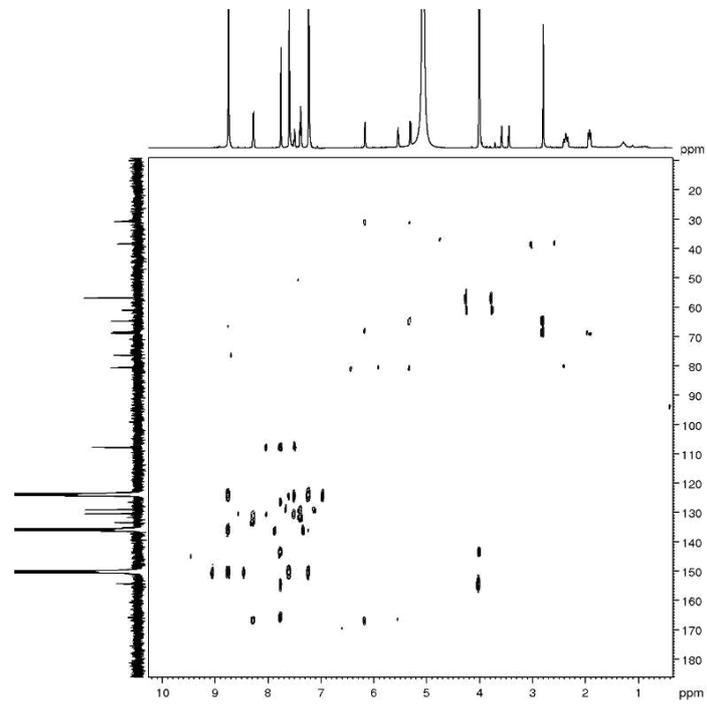
**Figura 34** - Espectro de RMN COSY (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-2**.



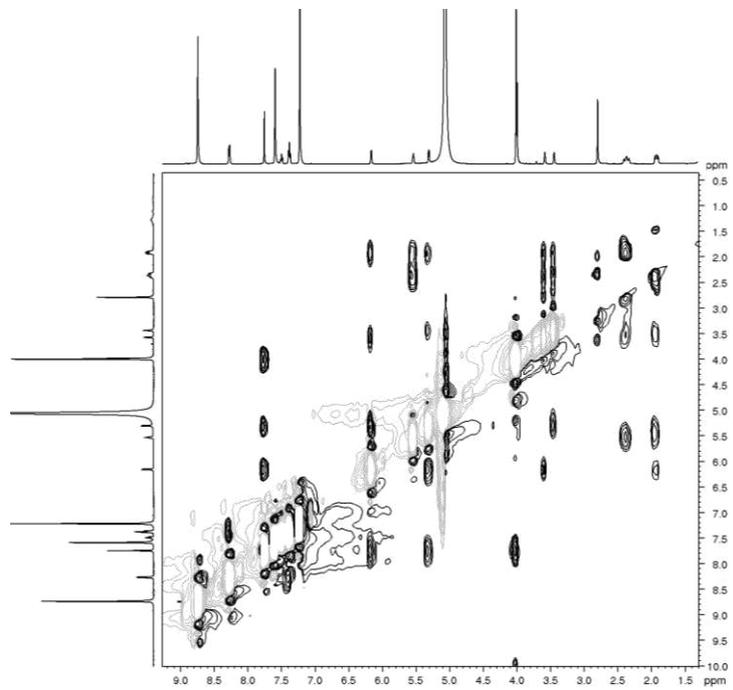
**Figura 35** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-2**.



**Figura 36** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-2**.



**Figura 37** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-2**.



### 6.1.3 Determinação estrutural de EB-3

A fração EEEBC-A3-BB, após sucessivas cromatografias, incluindo purificação por CLAE (C-18) (ver experimental, item 5.5.1.3, Pág. 51), resultou na obtenção de um sólido branco cristalino (12,6 mg), de rotação específica  $[\alpha]_D^{22} +23,6^\circ$  (c 0,11, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:1), com P.F. 140-142 °C, o qual foi denominado **EB-3**.

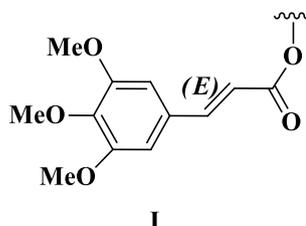
O composto **EB-3** teve sua fórmula molecular estabelecida pelo EMAR-ESI, o qual exibiu o íon correspondente a molécula protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  572,2491, indicando a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>10</sub>, (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>10</sub>, 572.2490), indicando um IDH igual a 13, portanto, uma unidade maior que a dos composto **EB-1** (pág. 69) e **EB-2** (pág. 76), correspondendo a uma ligação dupla.

Uma análise detalhada do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **EB-3** mostrou perfil similar ao de **EB-1** e **EB-2**. No entanto, diferentemente desses compostos, seu espectro exibiu sinais característicos de hidrogênios diastereotópicos extras em  $\delta_H$  2,34 (H-7 $\beta$ ) e 2,85 (H-7 $\alpha$ ), bem como sinais para hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  8,15 (1H, d, H-7') e 6,97 (1H, d, H-8'), ambos com constante de acoplamento de 16,0 Hz, indicando uma ligação dupla com configuração *trans*. Aliado a isto, os dois sinpletos em  $\delta_H$  7,23 e 7,54, atribuídos a hidrogênios *ortho* posicionados, respectivamente, e os três sinpletos (6H, cada) em  $\delta_H$  3,89, 3,82 e 3,74, correspondentes a três metoxilas foram compatíveis com a presença de uma unidade cinamoila e outra benzoíla 3'',4'',5''-trisubstituída (PAYO-HILL *et al.*, 2000, CHAVEZ *et al.*, 2002).

O espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H – COSY (Fig. 45, p. 89) mostrou acoplamentos escalares entre os hidrogênios do núcleo tropânico H-6a e H-7a, H-3b e H-2b/4b, e destes com os hidrogênios H-1 e H-5, além do acoplamento entre os hidrogênios olefínicos H-7' e H-8'. Os principais acoplamentos observados encontram-se representados na figura 36 (p. 80).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C CPD (75 MHz, MeOD – Fig. 44, p. 88) exibiu 22 linhas espectrais, que, juntamente com a análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C – HSQC (Fig. 90, p. 133), demonstrou a presença de três sinais de carbonos metílicos [ $\delta_C$  61,0 (4'/4''-OMe), 56,5 (3'/5'-OMe, 3''/5''-OMe) e 39,6 (*N*-Me)], três sinais metilênicos [ $\delta_C$  37,5 (H-7), 34,1 (H-2) e 32,9 (H-4)], oito carbonos metínicos, dos quais quatro destes em  $\delta_C$  145,9 (H-7'), 118,8 (H-8'), 106,9 (C-2'/6') e 107,8 (C-2''/6''). A combinação dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C evidenciaram unidades benzoíla e cinamoíla (CHAVEZ *et al.*, 2002), e oito carbonos não hidrogenados, incluindo duas carbonilas de éster em  $\delta_C$  166,6 (C-7'') e 166,3 (C-9').

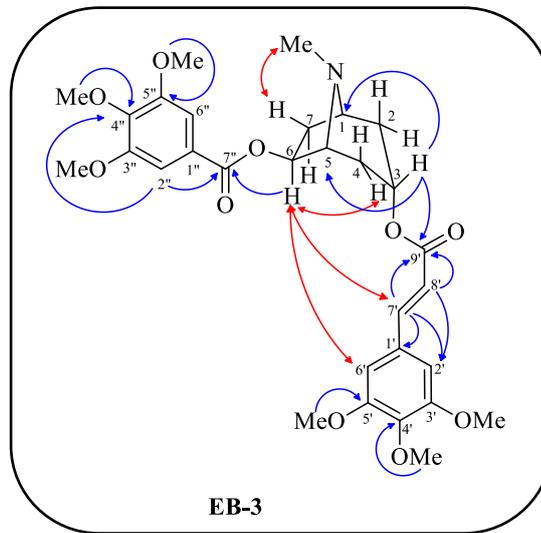
No espectro de RMN 2D-HMBC, os hidrogênios olefínicos (H-7' e H-8') exibiram correlações com a carbonila de éster em  $\delta_C$  166,3 (C-9'), bem como com os carbonos benzênicos em  $\delta_C$  106,9 (C-2'/6') e 131,0 (C-1'), sugerindo uma unidade cinamoíla tri-substituída conforme evidenciada na (sub-estrutura I).



A posição da unidade benzoíla tri-substituída em C-6, foi determinada pela correlação do sinal em  $\delta_H$  6,06 (H-6) com a carbonila em  $\delta_C$  166,6 (C-7''), enquanto o grupo cinamoíla foi posicionado em C-3 devido às correlações dos sinais em  $\delta_H$  5,37 (t,  $J=5,0$  Hz, H-3), 6,97 (d,  $J = 16,0$  Hz, H-8') e 8,15 (d,  $J = 16,0$  Hz, H-7') com a carbonila em  $\delta_C$  166,3 (C-9'), conforme mostrado na Figura 38.

A estereoquímica relativa de EB-3 foi definida por cristalografia de raio-X (Figura 39) e pelo espectro NOESY (Figura 38, p 90), o qual mostrou acoplamento dipolar entre os hidrogênios *N*-Me com H-7b, corroborando com a posição da metila em *pseudo*-equatorial. Desse modo, a estrutura do composto EB-3 foi determinada como 3 $\alpha$ -(3',4',5'-trimetoxicinamoilxi)-6 $\beta$ -(3'',4'',5''-dimetoxibenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (Figura 38, abaixo).

**Figura 38** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância ( $^3J$ ) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC para **EB-3**.



**Figura 39** – Unidade assimétrica da estrutura cristalina de **EB-3**, obtida por difração de raio-X.

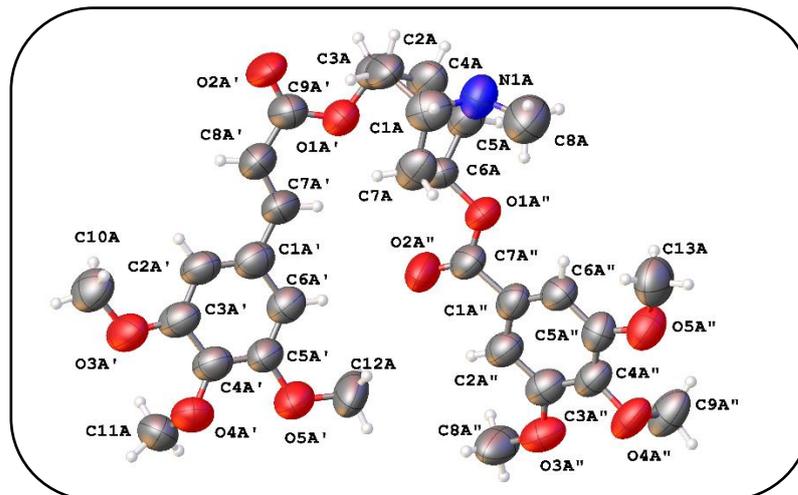
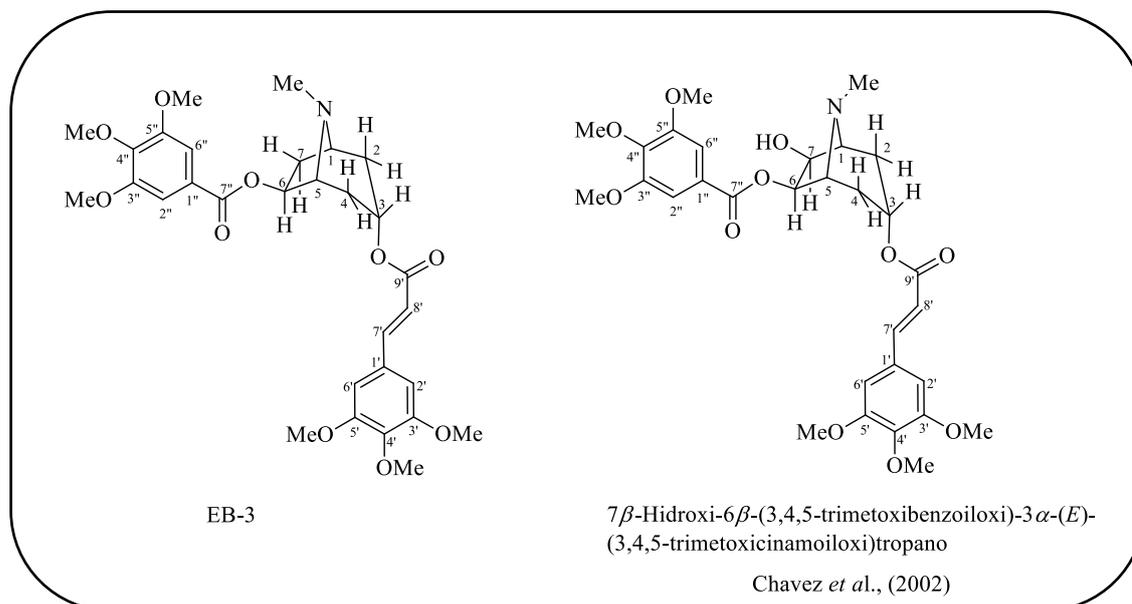


Figura 40 - Estrutura de EB-3 e do alcaloide obtido por Chavez *et al.*, 2002.

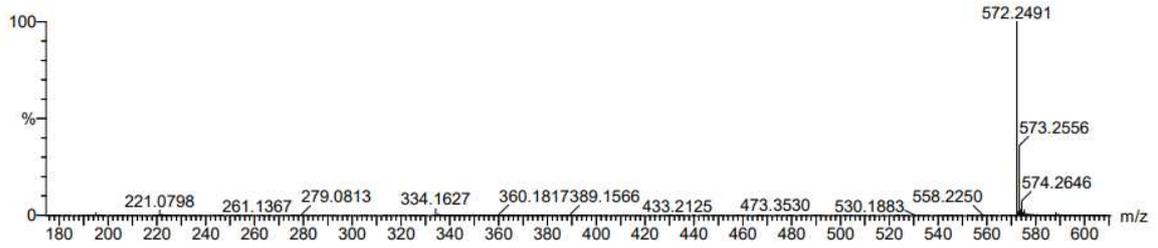


A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-3 com aqueles apresentados por Chavez *et al.*, (2001), confirmou a semelhança dos compostos para alcaloide tropanico denominado 7 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-3 $\alpha$ -(3'',4'',5''-trimetoxicinamoiloxi)-tropano (Tabela 19, p. 86), com pequenas diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático referentes a um grupamento benzoila não substituído.

**Tabela 19** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de **EB-3**.

No.	<b>EB-3</b> ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 500 MHz)		Chavez <i>et al.</i> , (2002) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	60,4	3,33 sl	66,1	3,20 sl
2	34,1	2,26 m 1,75 d (15,0)	27,0	2,29 dd (13,5;4,4) 1,69 d (13,5)
3	67,8	5,37 t (4,3)	66,9	5,26 tl (4,5)
4	32,9	2,33 m 2,02 d (15,5)	27,2	2,34 dd (11,7;4,2) 1,73 d (11,7)
5	66,0	3,50 sl	62,7	3,43 sl
6	80,9	6,06 dd (7,8; 2,7)	79,1	5,80 d (6,0)
7	37,5	2,85 dd (14,2; 7,8) 2,34 m	75,4	4,80 tl (6,0)
1'	131,0	-	129,8	-
2'/6'	106,9	7,23 s	105,6	7,32 s
3'/5'	154,6	-	153,4	-
4'	141,4	-	140,2	-
7'	145,9	8,15 d (16,0)	145,6	7,78 d (16,0)
8'	118,8	6,97 d (16,0)	117,1	6,36 d (16,0)
9'	166,3	-	165,7	-
1''	126,5	-	124,9	-
2''/6''	107,8	7,54 s	107,0	6,96 s
3''/5''	154,1	-	153,0	-
4''	143,5	-	142,5	-
7''	166,6	-	166,4	-
4'-MeO	61,0	3,95 s	61,0	3,91
3'/5'-MeO	56,5	3,89 s	56,2	3,90
4''-MeO	61,0	3,95 s	61,0	3,90
3''/5''-MeO	56,5	3,80 s	56,2	3,96
Me-N	39,6	2,61 s	35,2	2,63 s

**Figura 41** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-3**.



**Figura 42** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-3**.

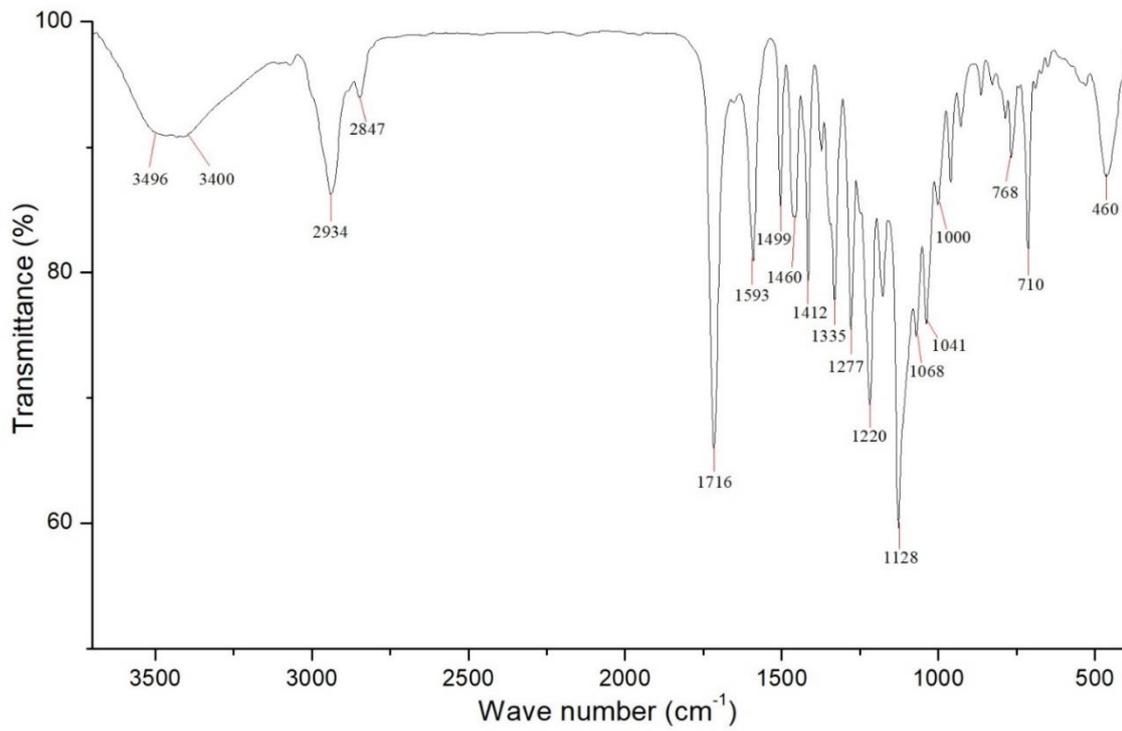


Figura 43 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-3**.

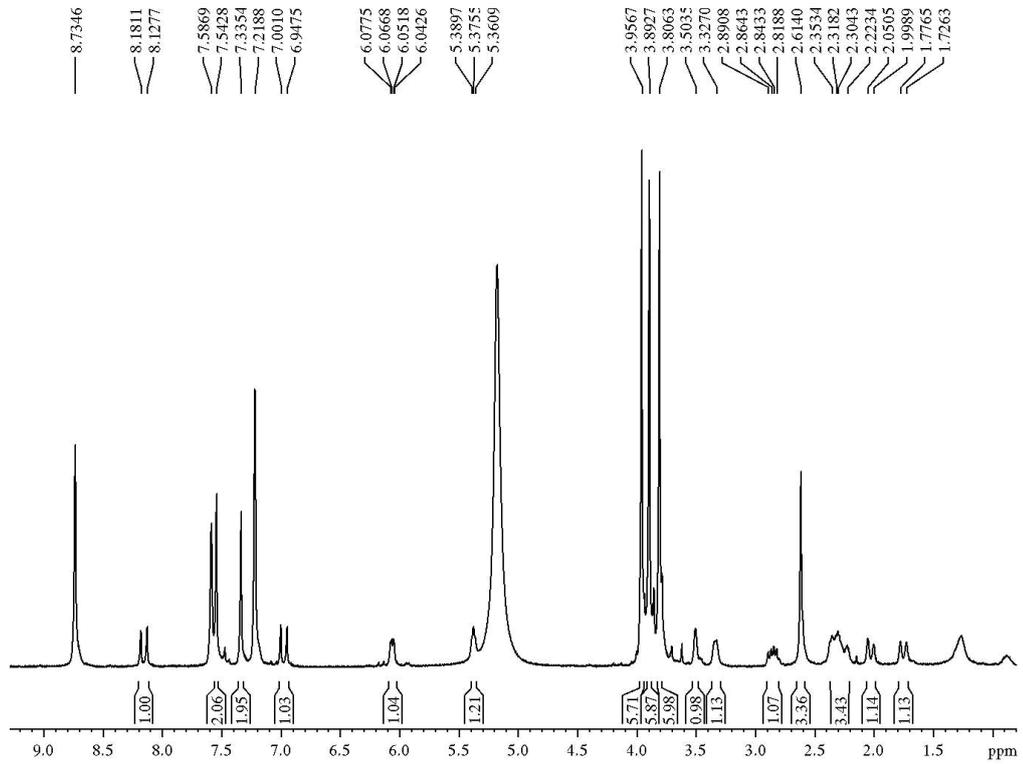
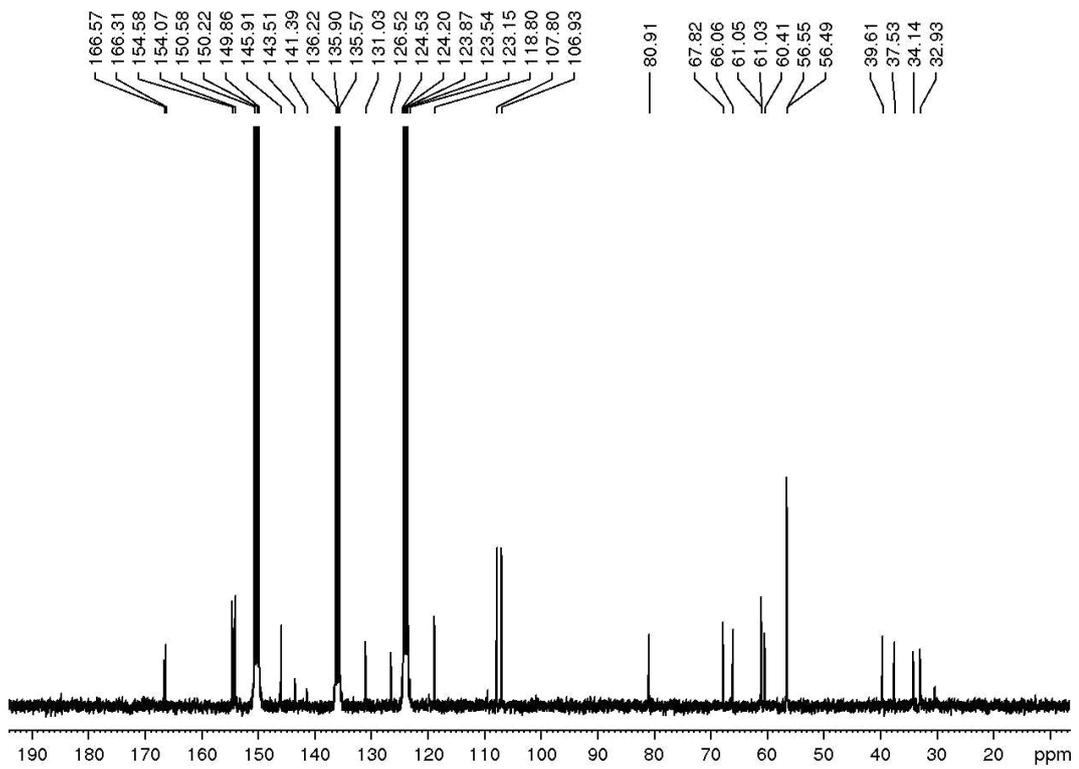
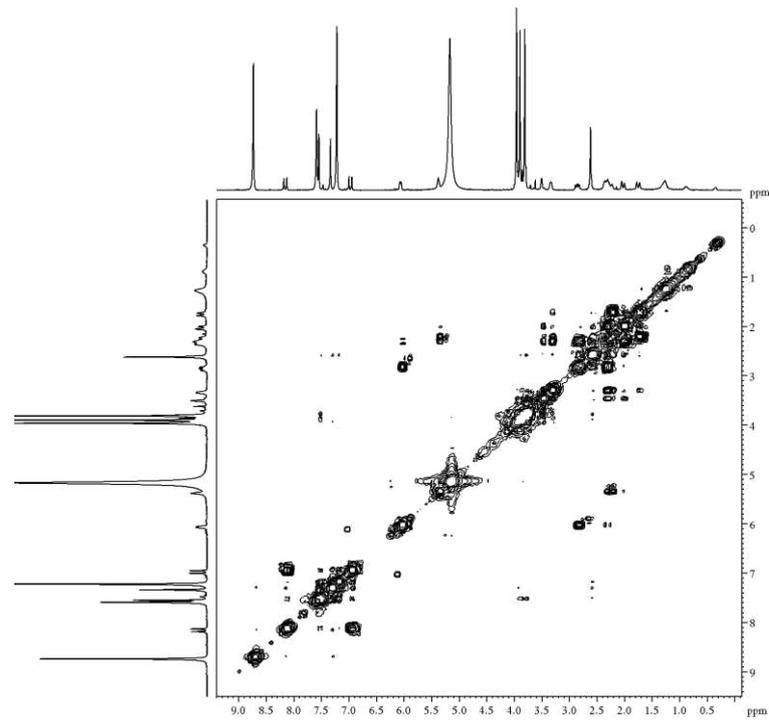


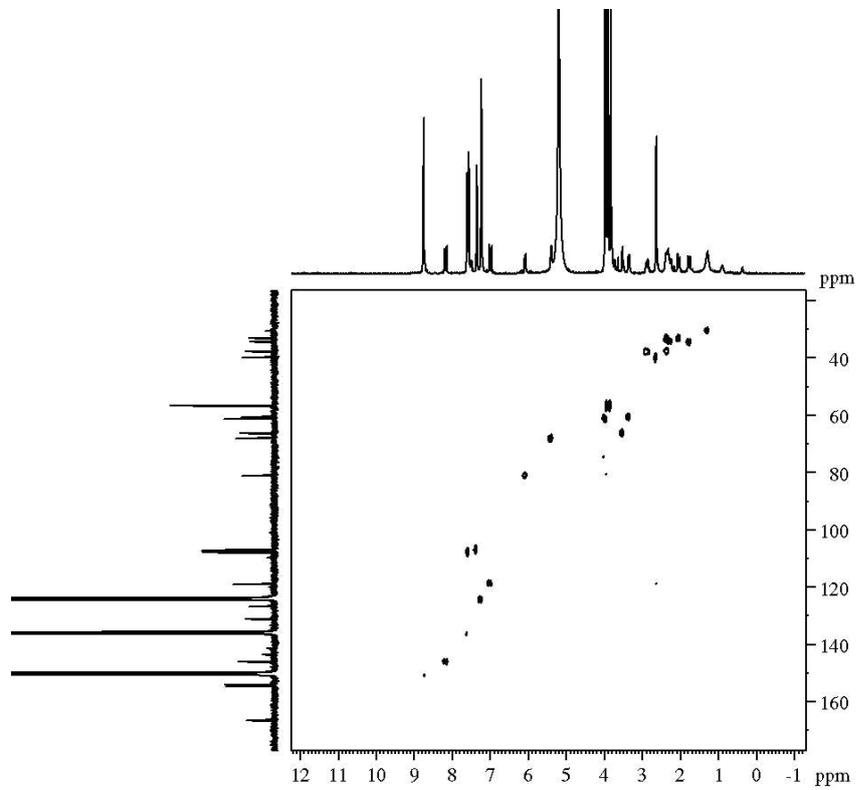
Figura 44 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-3**.



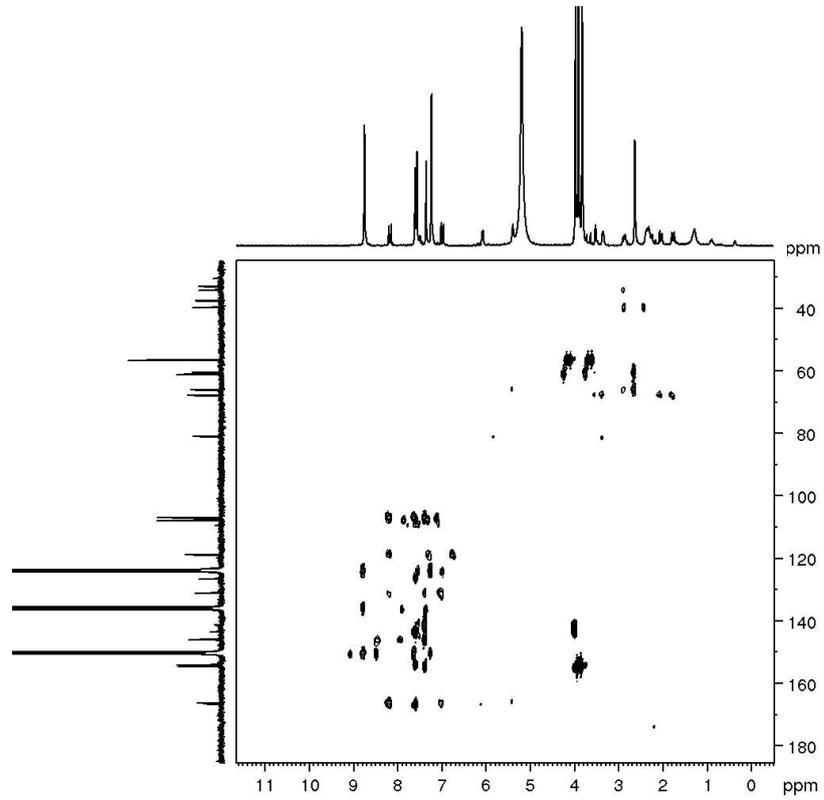
**Figura 45** - Espectro de RMN COSY (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-3**.



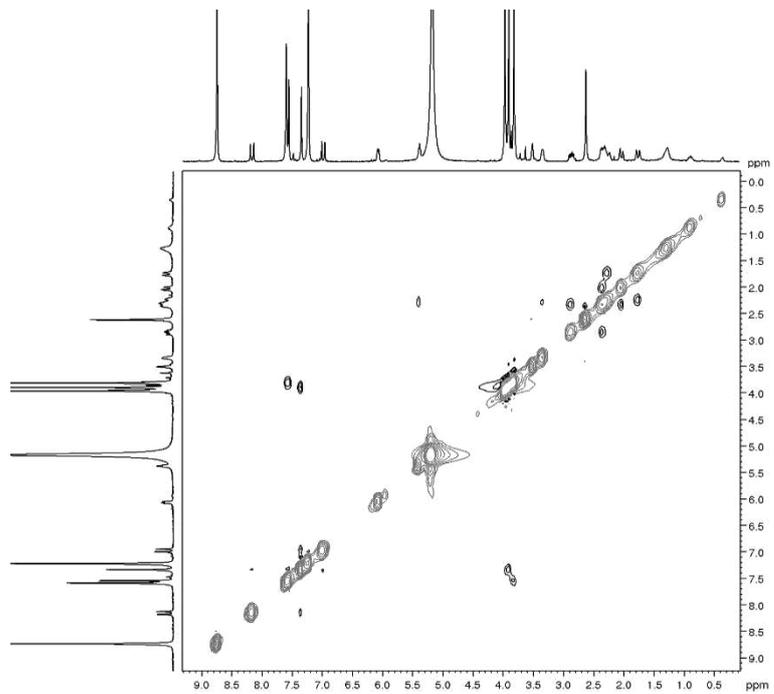
**Figura 46** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-3**.



**Figura 47** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-3**.



**Figura 48** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-3**.



#### 6.1.4 Determinação estrutural de EB-4

O tratamento cromatográfico da fração EEEBC-A4, incluindo CLAE, (ver experimental, item 5.5.1.4, Pág. 53), levou à obtenção de 5,0 mg de **EB-4**, uma resina amarela, com  $[\alpha]_D^{20} -9.7^\circ$  (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1).

O espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de EB-4 forneceu o pico da molécula protonada  $[M+H]^+$  em *m/z* 472,1961 (calculado para C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>8</sub>, 472,1966), permitindo propor a fórmula molecular C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>8</sub> e tornando possível a atribuição de um IDH igual a 12, semelhante a EB-2 (Pág 72).

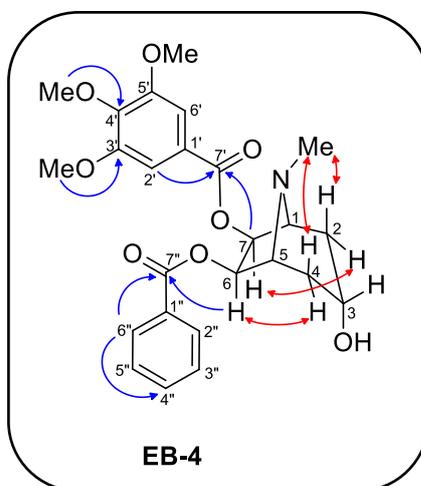
Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de RMN de EB-4 foram semelhantes aos de EB-2. No entanto, uma análise detalhada dos dados de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR desses dois compostos mostrou diferenças consideráveis nos deslocamentos químicos ( $\Delta\delta_C$  3,4 - 5,0 ppm) referentes aos carbonos metínicos C-3 e C-7, bem como para os carbonos metilênicos C-2 e C-4 (Tabela 20), indicando a troca de posicionamento dos substituintes hidroxí e trimetoxi-benzoíla [EB-2:  $\delta_C/\delta_H$  68,8/ 5,53, t, *J* = 4,4 Hz (C-3) e  $\delta_C/\delta_H$  76,3/5,29, d, *J* = 6,0 Hz (C-7)]; EB-4:  $\delta_C/\delta_H$  63,8/4,31, t, *J* = 4,3 Hz (C-3) e  $\delta_C/\delta_H$  79,7/6,69, d, *J* = 6,3 Hz (C-7)].

A partir do espectro HMBC (Figura 57) observou-se as correlações à longa distância dos sinais em  $\delta_H$  6,69 (d, *J* = 6,3, H-7) e 7,58 (s, H-2'/6') com o sinal de uma carbonila em  $\delta_C$  166,2 (C-7'), corroborando com o posicionamento do grupo trimetoxi-benzoíla em C-7. Um grupamento benzoíla não substituído foi posicionado ao carbono C-6, como para os compostos EB-1 à EB-3, devido às correlações dos sinais em  $\delta_H$  8,26 (2H, d, *J* = 7,3 Hz, H-2''/H-6'') e 6,71 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, H-6) com a carboxila em  $\delta_C$  166,4 (C-7'').

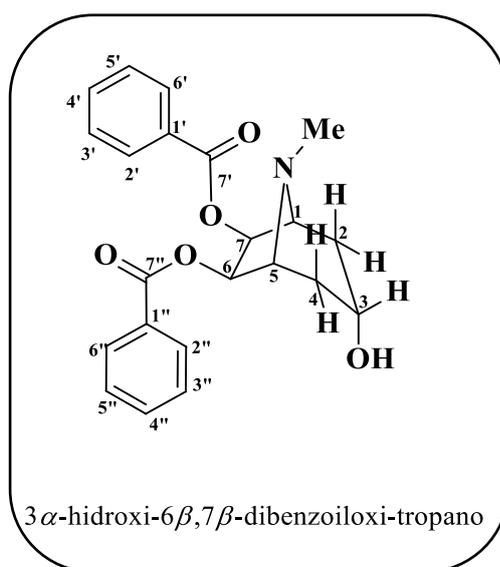
Assim, diferentemente do composto EB-2, ambos os grupos benzoílas foram posicionados nos carbonos oximetínicos vicinais C-6 e C-7, em uma relação sin-periplanar, conforme corroborado pela multiplicidade (duplete) e o valor da constante de acoplamento (6,3 Hz) exibido para os hidrogênios oximetínicos H-6 e H-7 (PEREIRA *et al.*, 2018).

A estereoquímica relativa de EB-4 foi sugerida com base no espectro NOESY o qual exibiu correlação dipolar de H-7 com H-2 $\alpha$  e H-6 com H-4 $\alpha$ , bem como do sinal da metila em  $\delta_H$  2,78 (Me-N) com ambos  $\beta$  posicionados em H-2 e H-4, indicando a posição pseudo-axial para o *N*-metil. Com isto, a estrutura de EB-4 foi estabelecida como o 6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-3 $\alpha$ -hidroxí-tropano.

**Figura 49** - Estruturas mostrando as correlações à longa distância ( $^3J$ ) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC e  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY para **EB-4**.



**Figura 50** - Estrutura de 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dibenzoiloxi-tropano isolado por Cruz *et al.*, 2016.



A análise dos dados discutidos, bem como a comparação com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  registrados para EB-2, e aqueles obtidos por Cruz *et al.*, (2016) para o alcaloide tropanico 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dibenzoiloxi-tropano (Tabela 20, p.93), reforçou a elucidação estrutural de **EB-4** como 3 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -(benzoiloxi)-6 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-tropano (Figura 50).

**Tabela 20** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-4 e do alcaloide isolado por Cruz *et al.*, (2016).

No.	HSQC		Cruz <i>et al.</i> , 2016 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	66,6	3,63 s	69,0	4,39 sl
2	35,0	2,27 dd (14,5; 2,8) 2,08 (14,5)	35,7	2,49 dl (15,5) 2,39 d (15,5)
3	63,9	4,31 t (4,0)	60,6	4,17 sl
4	35,0	2,27 dd (13,9; 2,7) 2,08 d (13,9)	35,7	2,49 dl (15,5) 2,39 d (15,5)
5	67,2	3,60 s	69,0	4,39 sl
6	79,9*	5,95 d (6,0)*	74,2	6,44 s
7	79,2*	6,71 d (6,0)*	74,2	6,44 s
1'	122,0	-	128,5	-
2'/6'	108,4	7,58 s	129,2	7,85 d (7,7)
3'/5'	149,0	-	128,3	7,34 t (7,7)
4'	143,3	-	133,5	7,57 t (7,4)
7'	166,7	-	164,8	-
8'	-	-	-	-
9'	-	-	-	-
1''	131,5	-	128,5	-
2''/6''	130,4	8,26 d (7,3)	129,2	7,85 d (7,7)
3''/5''	129,2	7,31 t (7,1)	128,3	7,34 t (7,7)
4''	133,6	7,43 t (6,5)	133,5	7,57 t (7,4)
7''	166,4	-	164,8	-
<i>p</i> -MeO	-	-	-	-
<i>m</i> -MeO	56,3	3,49 s	-	-
Me-N	39,3	2,79 s	40,8	3,34 s

\*Estes valores podem estar trocados.

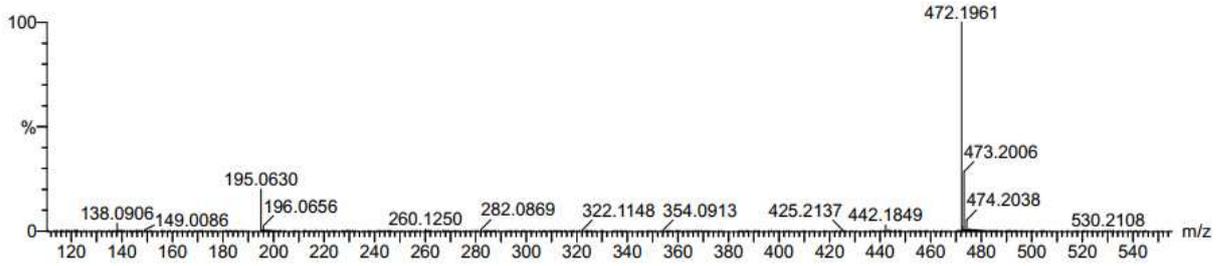
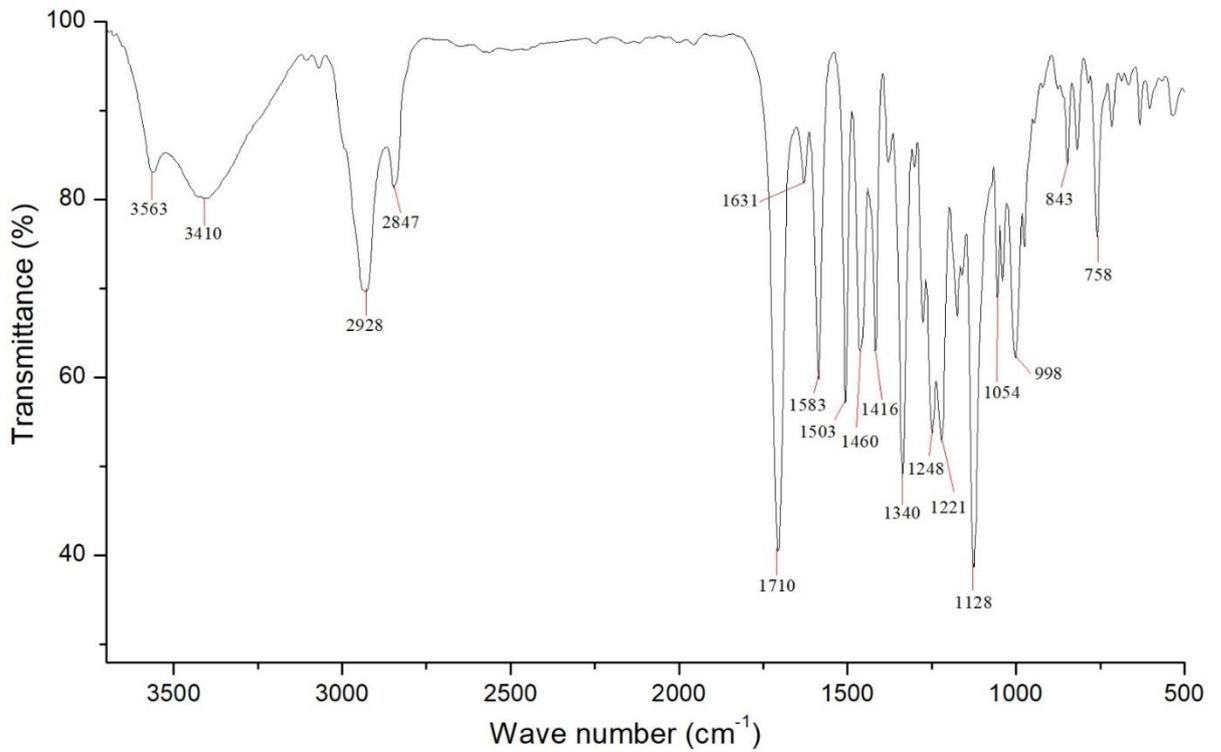
**Figura 51** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-4**Figura 52** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-4

Figura 53 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4

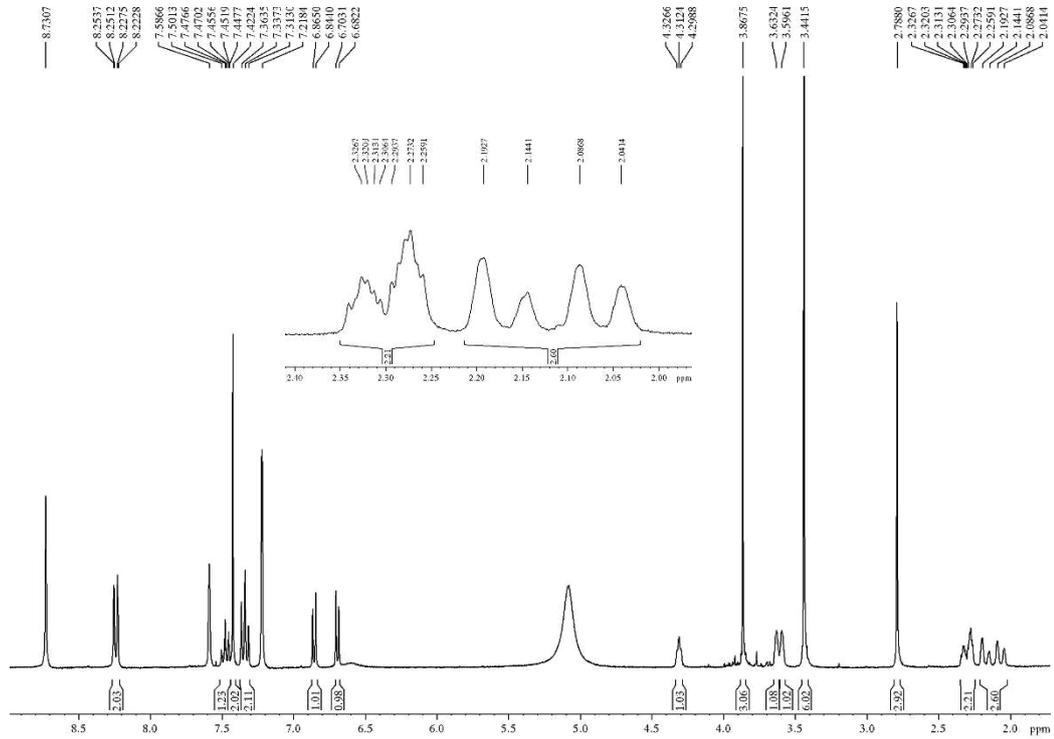
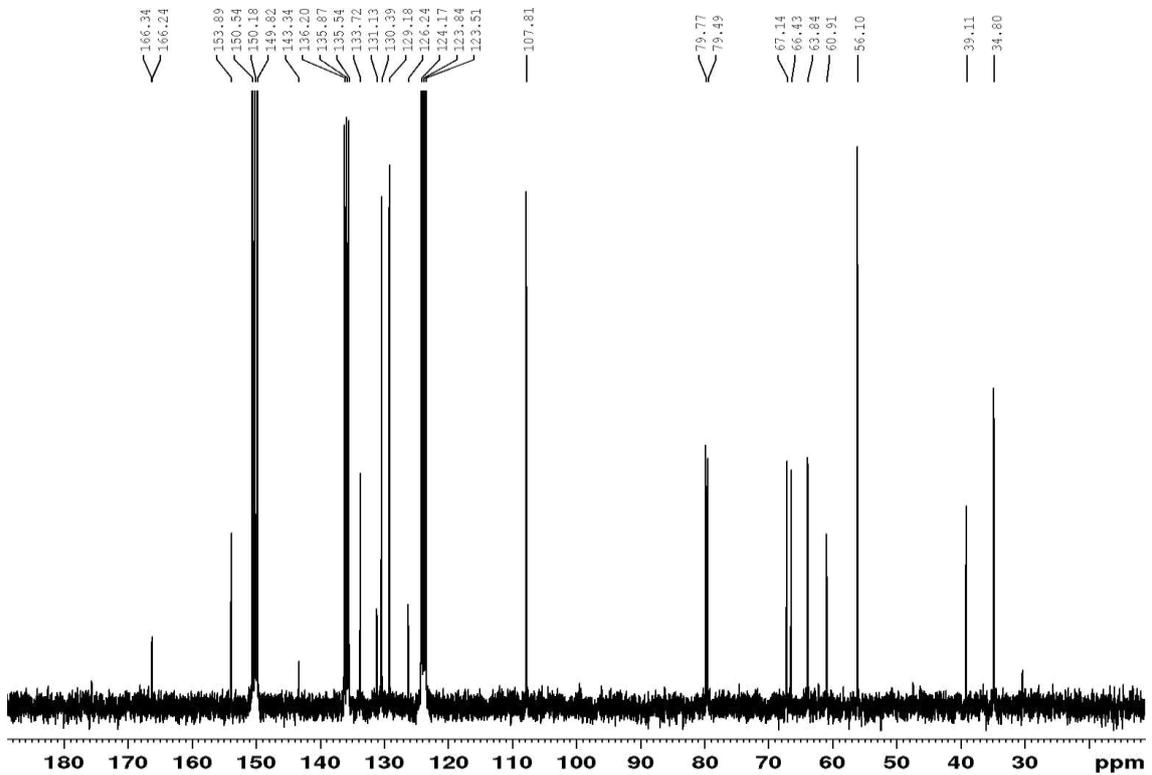
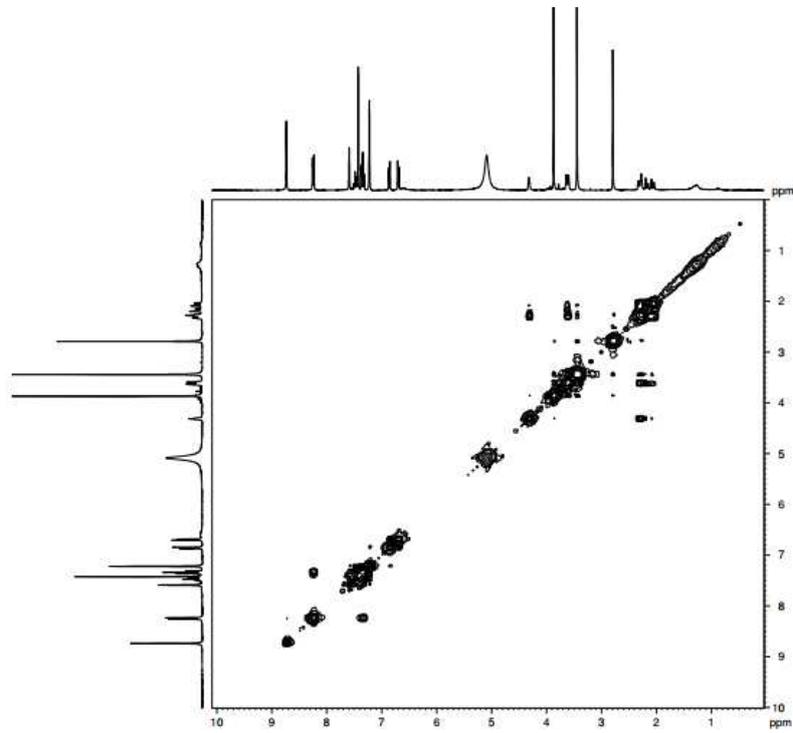


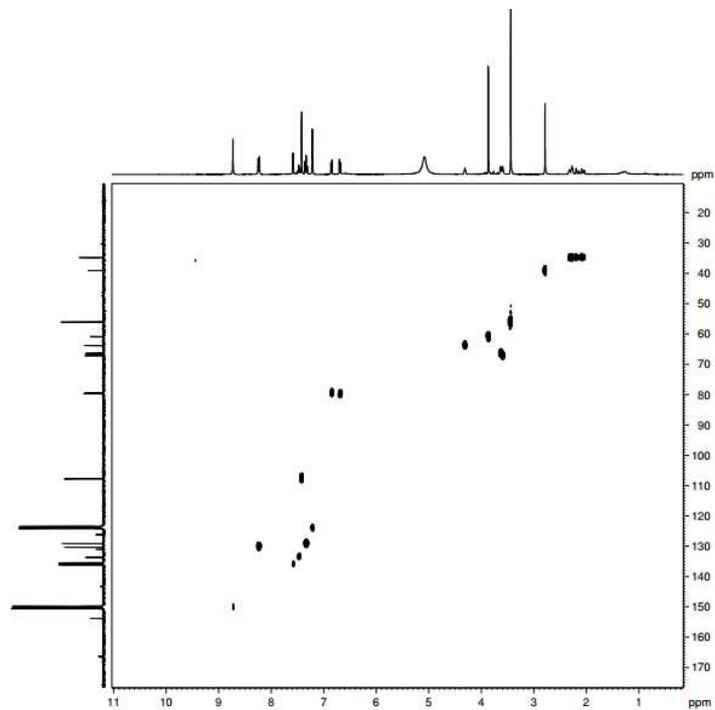
Figura 54 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-4



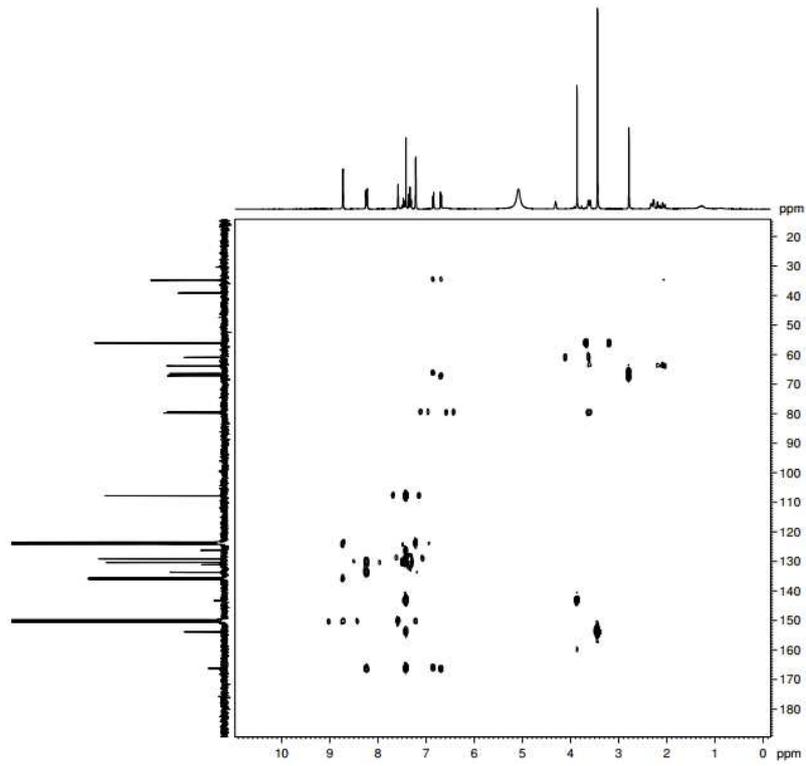
**Figura 55** - Espectro de RMN COSY (500 MHz, C5D5N) de EB-4



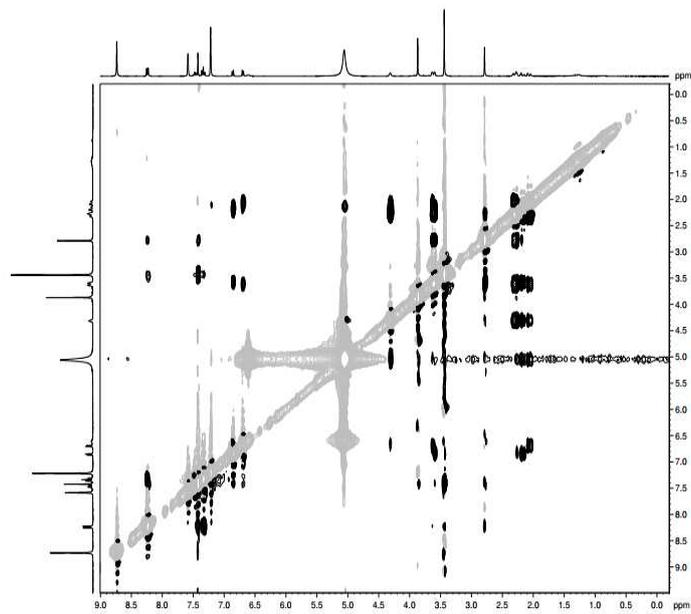
**Figura 56** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, C5D5N) de EB-4



**Figura 57** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C5D5N) de EB-4



**Figura 58** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C5D5N) de EB-4



### 6.1.5 Determinação estrutural de EB-5

O tratamento cromatográfico da fração EEEBC-A4, incluindo CLAE, (ver experimental, item 5.5.1.4, Pág. 53), levou à obtenção de 11,0 mg de **EB-5**, uma resina amarela, a qual apresentou  $[\alpha]_D^{20} - 7.0^\circ$  (*c* 0,1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1).

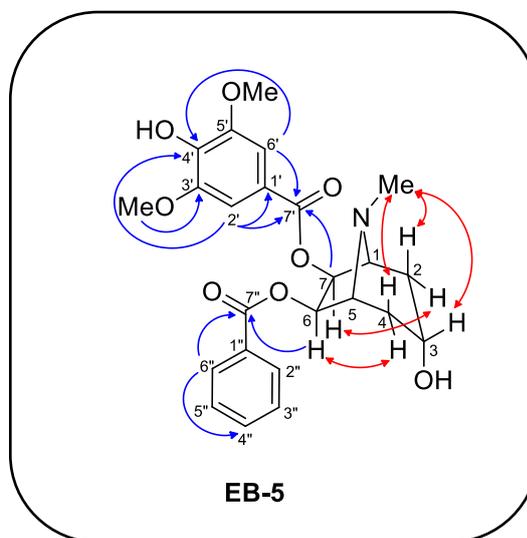
O HRESIMS do composto EB-5 apresentou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  (modo positivo) em *m/z* 458,1808 (calculado para C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>8</sub>, 458,1809), indicando a fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub>, com IDH igual a 12, semelhante a EB-4.

A análise comparativa dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos compostos EB-4 e EB-5 se mostraram bastante semelhantes, sendo que a única diferença entre esses compostos à substituição de um grupo metoxila em C-4' (EB-4) por uma hidroxila, corroborando com o EM.

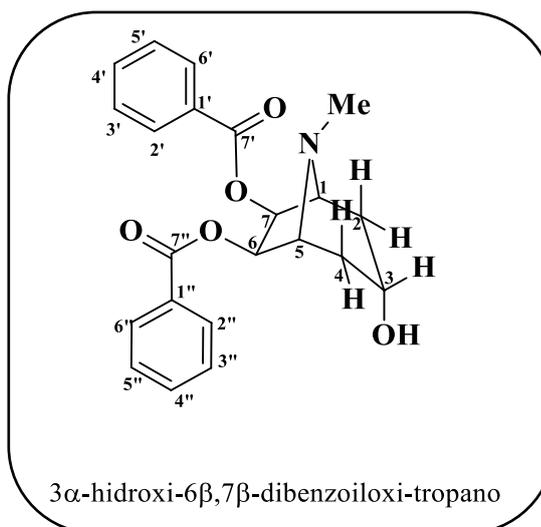
A unidade 4'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-benzoila foi sugerida com base no simpleto em  $\delta_H$  3,49, com integração para seis hidrogênios, indicou duas metoxilas equivalentes, bem como pelo simpleto. A posição vicinal para os dois grupos benzoílas foi confirmada pelo espectro HMBC (Figura 8) o qual revelou correlação dos sinais em  $\delta_H$  8,26 (2H, d, *J* = 7,3 Hz, H-2''/H-6'') e 6,86 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, H-7) com a carboxila em  $\delta_C$  166,5 (C-7''), de H-7 com o C-5 ( $\delta_C$  67,2), bem como dos sinais em  $\delta_H$  7,58 (1H, s, H-2'/H-6') e 6,71 (1H, d, *J* = 6,1 Hz, H-6) com  $\delta_C$  166,8 (C-7') e de H-6 com C-1 ( $\delta_C$  66,6).

A estereoquímica relativa de EB-5 (Figura 59), contendo os dois grupos benzoílas *cis* e *trans* em relação ao grupo hidroxila em C-3, foi definida através dos valores de *J* (4 a 6 Hz) exibidos para H-3, H-6 e H-7, e pelo espectro NOESY, o qual mostrou acoplamento dipolar entre os hidrogênios H-7 e H-2*eq*; H-6 e H-4*eq*, bem como da *N*-metila em  $\delta_H$  2,79 (3H, s, Me-N) com o sinal em  $\delta_H$  4,31 (1H, t, *J* = 4,0, H-3), confirmando a metila na posição *axial*.

**Figura 59** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância (3J) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC e  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY para **EB-5**.



**Figura 60** - Estrutura de 6,7-dibenzoiloxitropân-3-ol isolado por Cruz *et al.*, 2016.



A comparação com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-5 com aqueles relatados para o alcaloide tropânico 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\beta$ ,7 $\beta$ -dibenzoiloxi-tropano (CRUZ *et al.*, 2016) (Tabela 21, p.100), cuja diferença observada é a presença do grupo benzoil tri-substituído em EB-5 reforçaram o estudo proposto, a qual foi nomeada como 3 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -(benzoiloxi)-6 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-tropano, um composto inédito na literatura (Figura 60).

**Tabela 21** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-5 e do alcaloide isolado por Cruz *et al.*, (2016).

No.	HSQC		Cruz <i>et al.</i> , 2016 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	66,6	3,63 s	69,0	4,39 sl
2	35,0	2,27 dd (14,5; 2,8) <i>ax</i> 2,08 (14,5) <i>eq</i>	35,7	2,49 dl (15,5) 2,39 d (15,5)
3	63,9	4,31 t (4,0)	60,6	4,17 sl
4	35,0	2,27 dd (13,9; 2,7) <i>ax</i> 2,08 d (13,9) <i>eq</i>	35,7	2,49 dl (15,5) 2,39 d (15,5)
5	67,2	3,60 s	69,0	4,39 sl
6	79,9*	5,95 d (6,0)*	74,2	6,44 s
7	79,2*	6,71 d (6,0)*	74,2	6,44 s
1'	122,0	-	128,5	-
2'/6'	108,4	7,58 s	129,2	7,85 d (7,7)
3'/5'	149,0	-	128,3	7,34 t (7,7)
4'	143,3	-	133,5	7,57 t (7,4)
7'	166,7	-	164,8	-
8'	-	-	-	-
9'	-	-	-	-
1''	131,5	-	128,5	-
2''/6''	130,4	8,26 d (7,3)	129,2	7,85 d (7,7)
3''/5''	129,2	7,31 t (7,1)	128,3	7,34 t (7,7)
4''	133,6	7,43 t (6,5)	133,5	7,57 t (7,4)
7''	166,4	-	164,8	-
<i>p</i> -MeO	-	-	-	-
<i>m</i> -MeO	56,3	3,49 s	-	-
Me-N	39,3	2,79 s	40,8	3,34 s

\*Estes valores podem estar trocados.

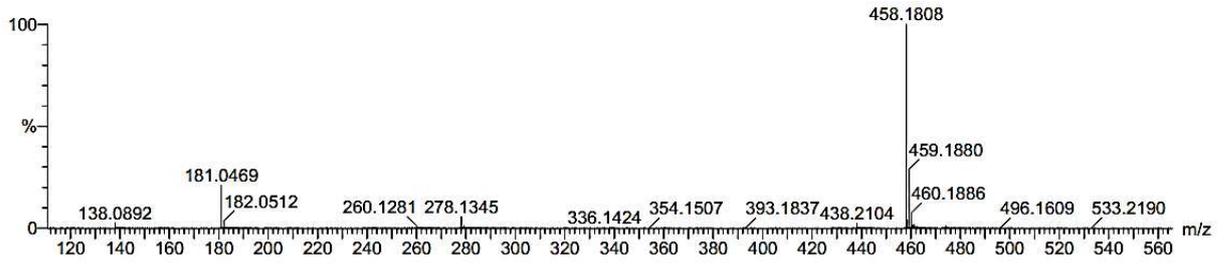
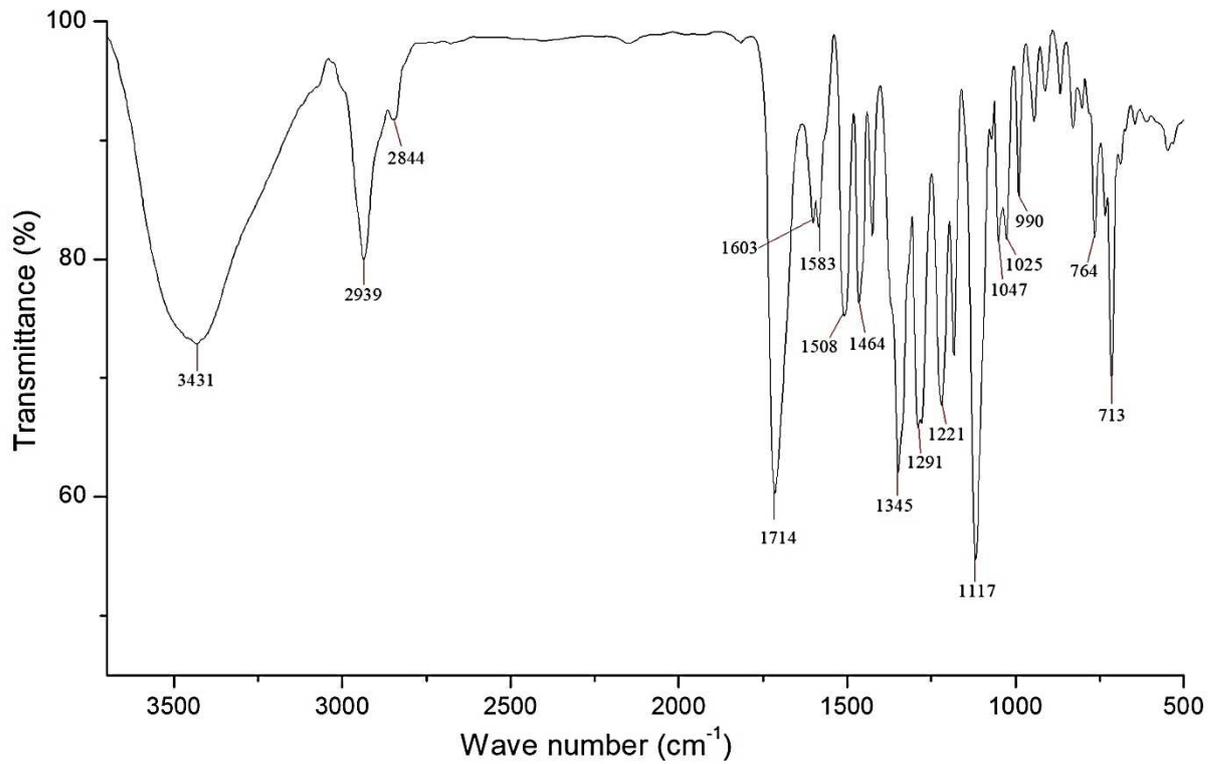
**Figura 61** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-5****Figura 62** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-5**

Figura 63 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-5

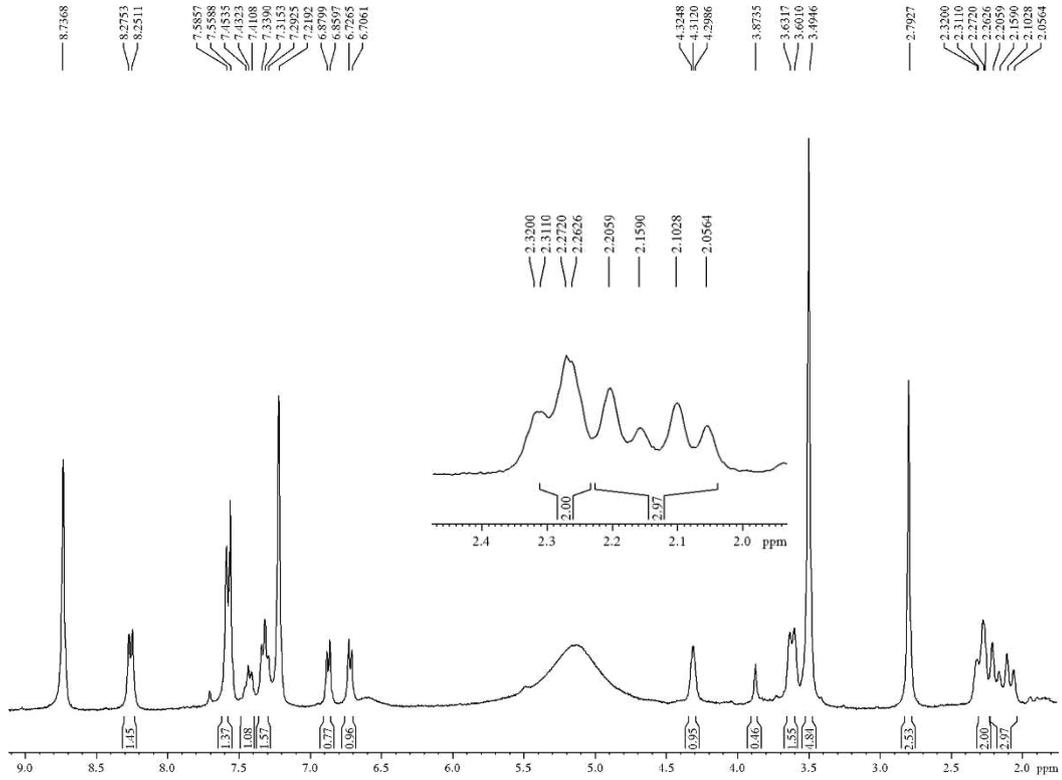
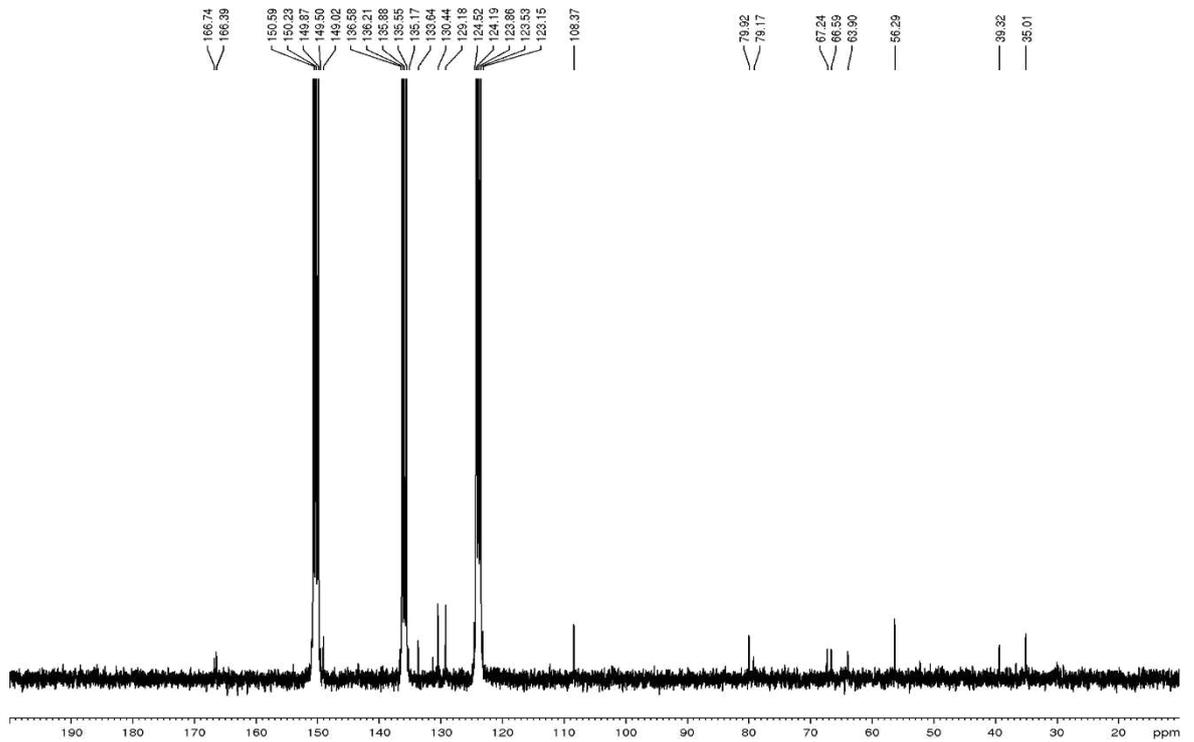
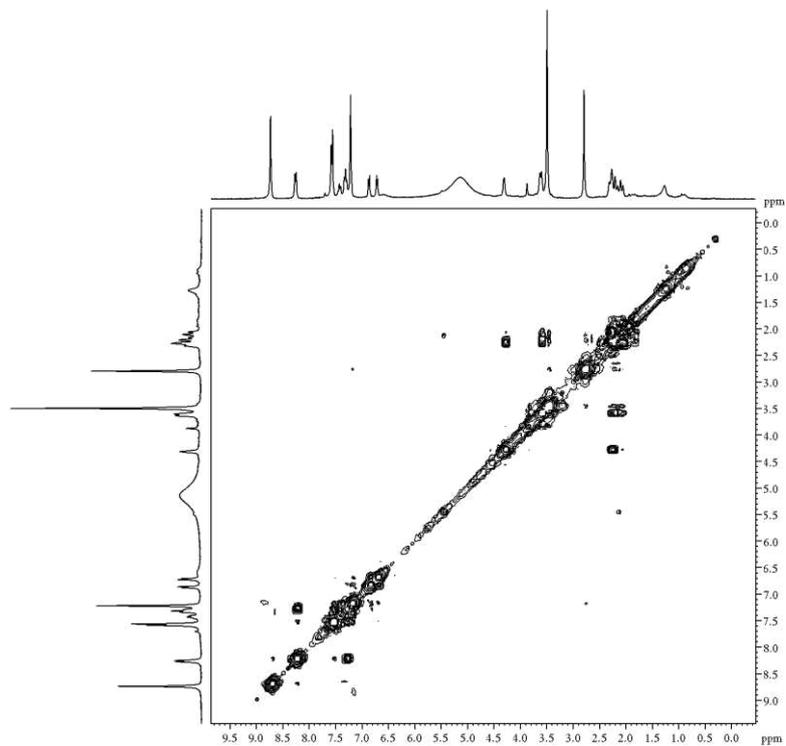
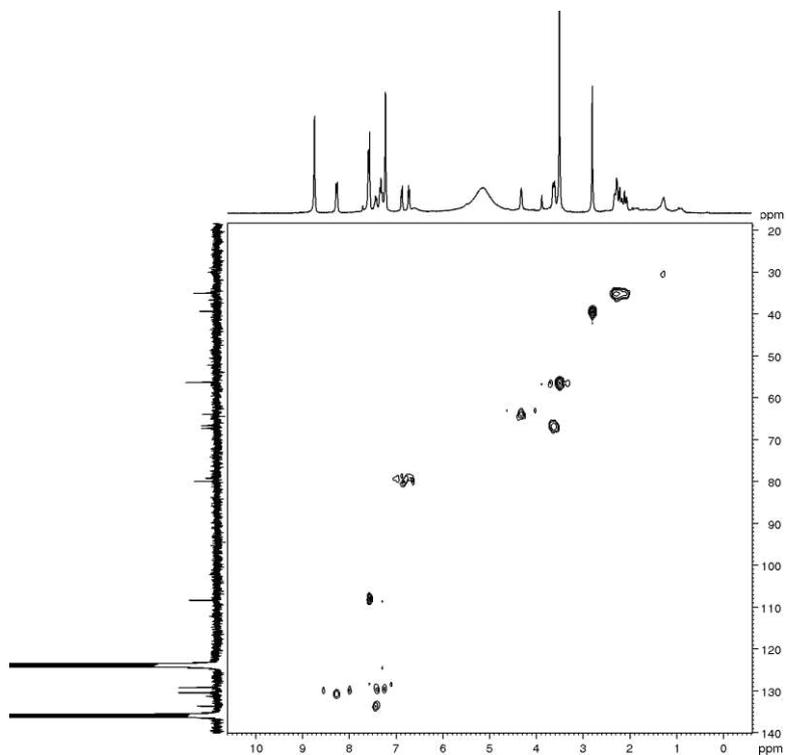
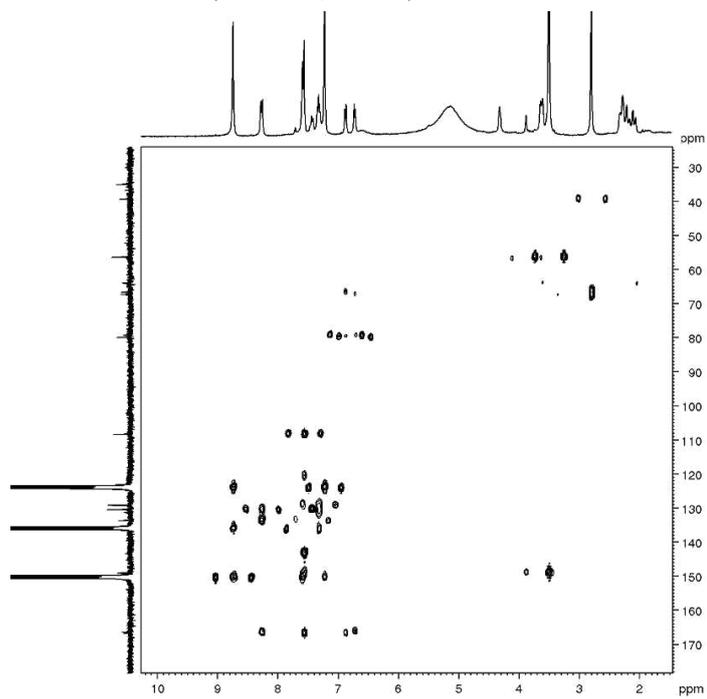
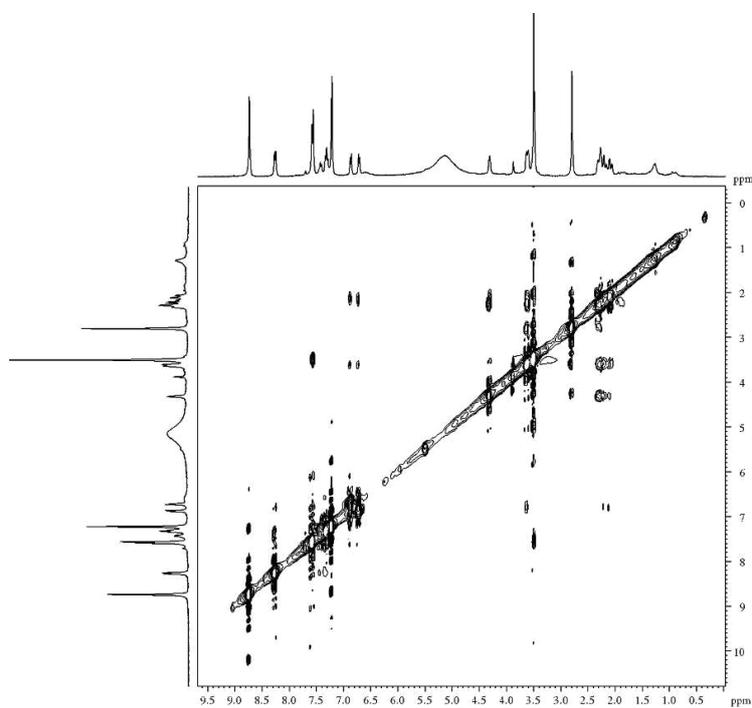


Figura 64 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-5



**Figura 65** - Espectro de RMN COSY (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-5**Figura 66** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-5

**Figura 67** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-5****Figura 68** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-5**

### 6.1.6 Determinação estrutural de EB-6

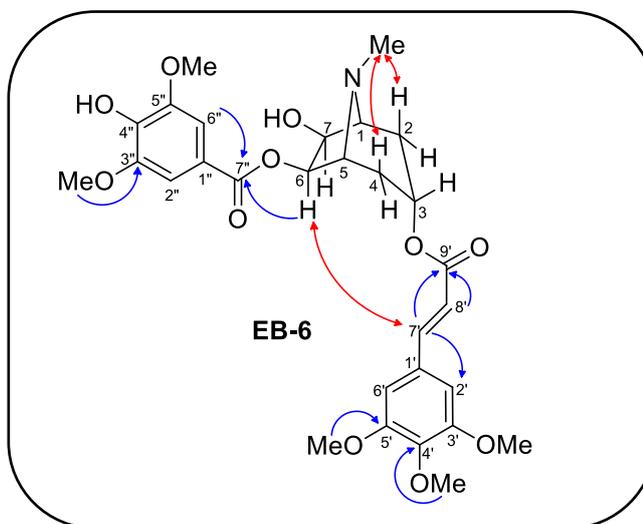
A fração EEEBC-A4, após sucessivas cromatografias, incluindo purificação por CLAE (C-18), (ver experimental, item 5.5.1.4, Pág. 53) resultou na obtenção de um sólido branco (7,8 mg), de rotação específica  $[\alpha]_D^{25} - 4,3^\circ$  ( $c$  0,11,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  1:1), com P.F. 199-201 °C, o qual foi denominado **EB-6**.

O composto EB-6 também foi obtido como um sólido branco cristalino e a exemplo de EB-3, sua estrutura também foi estabelecida com base em cristalografia de raio-X e análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e EMAR-ESI, cujo íon correspondente a molécula protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  574,2262 indicou a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}$ , (calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{NO}_{11}$ , 574,2283), IDH é igual a 13.

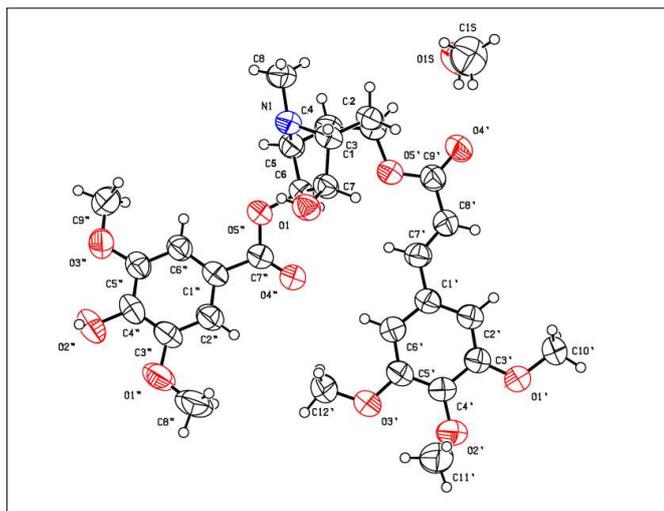
Assim como para o composto EB-3 (Pág. 85), também foram observados sinais em  $\delta_H$  8,29 (1H, d, H-7') e 6,87 (1H, d, H-8'), sendo o sinal mais desprotegido atribuído ao hidrogênio  $\beta$ -conjugado a uma carboxila. A constante de acoplamento de 15,0 Hz, indicou uma ligação dupla com configuração *trans*. No espectro HMBC estes sinais apresentaram correlações tanto com o sinal da carbonila em  $\delta_C$  166,0 (C-9') como com o sinal benzênico 108,6 (C-2'/6'), corroborando com a presença de uma unidade cinamoíla, assim como, anteriormente observado para EB-3.

A unidade benzoíla tri-substituída (4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi-bezoila) foi posicionada em C-6 a partir da correlação, no espectro HMBC, entre o hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  6,27 (d,  $J = 6,0$ , H-6) com o sinal da carbonila em  $\delta_C$  167,4 (C-7'') (Figura 69), enquanto, a posição da unidade cinamoíla em C-3 foi determinada por cristalografia de raio-X (Figura 70). Quanto à estereoquímica relativa, o espectro NOESY mostrou apenas as correlações entre H-6 e H-9', e do grupo *N*-metila com os hidrogênios axiais H-2 e H-4. Dessa forma, a estrutura desse composto foi determinada como 7 $\beta$ -hidroxi-3 $\alpha$ -(*E*)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-tropano (Figura 69, abaixo).

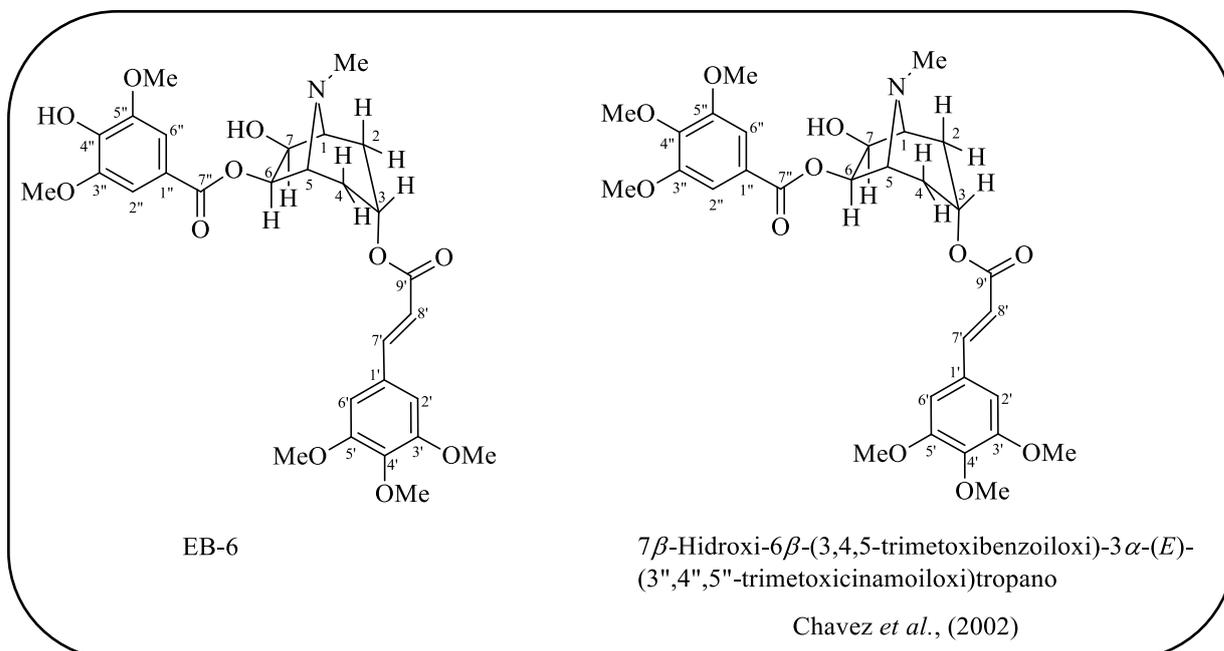
**Figura 69** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância ( $^3J$ ) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HMBC e  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY para **EB-6**.



**Figura 70** – Unidade assimétrica da estrutura cristalina de **EB-6**.



**Figura 71** - Estrutura de EB-6 e do alcaloide obtido por Chavez *et al.*, (2002).



A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-6 com os apresentados por Chavez *et al.*, (2002), mostrou que os dados foram compatíveis com os do alcaloide tropanico denominado 7β-hidroxi-3α-(E)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6β-(3,4,5-dimetoxibenzoiloxi)-tropano (Tabela 23, p. 108). As pequenas diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático substituído justificam a presença de uma hidroxila em substituição a um dos grupos metoxila no anel benzoíla, confirmando EB-6 como um composto inédito na literatura.

**Tabela 23** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-6 e do alcaloide isolado por Chavez *et al.*, (2002).

No.	HSQC		Chavez <i>et al.</i> , (2002) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	68,2	3,36 sl	66,1	3,20 sl
2	29,3	2,27 dd (14,5; 4,2) <i>ax</i> 1,78 d (14,5) <i>eq</i>	27,0	2,29 dd (13,5;4,4) 1,69 d (13,5)
3	68,5	5,42 t (4,0)	66,9	5,26 tl (4,5)
4	29,5	2,31 dd (14,0; 4,2) <i>ax</i> 1,84 d (14,0) <i>eq</i>	27,2	2,34 dd (11,7;4,2) 1,73 d (11,7)
5	64,4	3,59 sl	62,7	3,43 sl
6	80,3	6,27 d (6,0)	79,1	5,80 d (6,0)
7	76,4	5,26 d (6,0)	75,4	4,80 tl (6,0)
1'	131,1	-	129,8	-
2'/6'	107,1	7,46 s	105,6	7,32 s
3'/5'	154,6	-	153,4	-
4'	141,4	-	140,2	-
7'	146,0	8,29 d (15,0)	145,6	7,78 d (16,0)
8'	118,8	6,87 d (15,0)	117,1	6,36 d (16,0)
9'	166,0	-	165,7	-
1''	121,2	-	124,9	-
2''/6''	108,6	7,71 s	107,0	6,96 s
3''/5''	149,1	-	153,0	-
4''	143,1	-	142,5	-
7''	167,4	-	166,4	-
4'-MeO	61,1	3,99 s	61,0	3,91
3'/5'-MeO	56,6	3,97 s	56,2	3,90
4''-MeO	-	-	61,0	3,90
3''/5''-MeO	56,5	3,74 s	56,2	3,96
Me-N	37,6	2,71 s	35,2	2,63 s

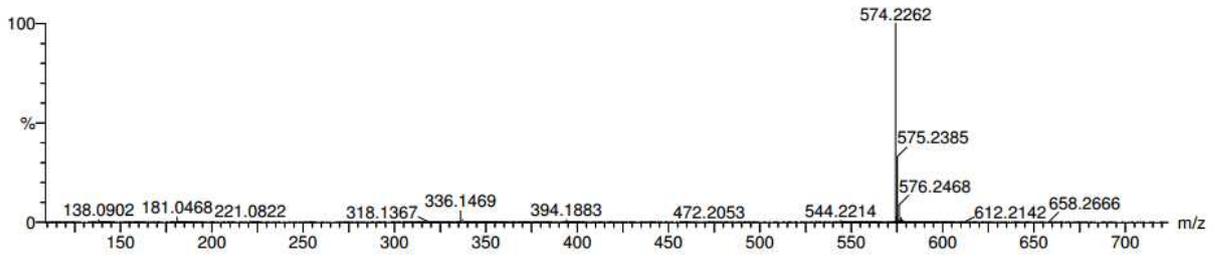
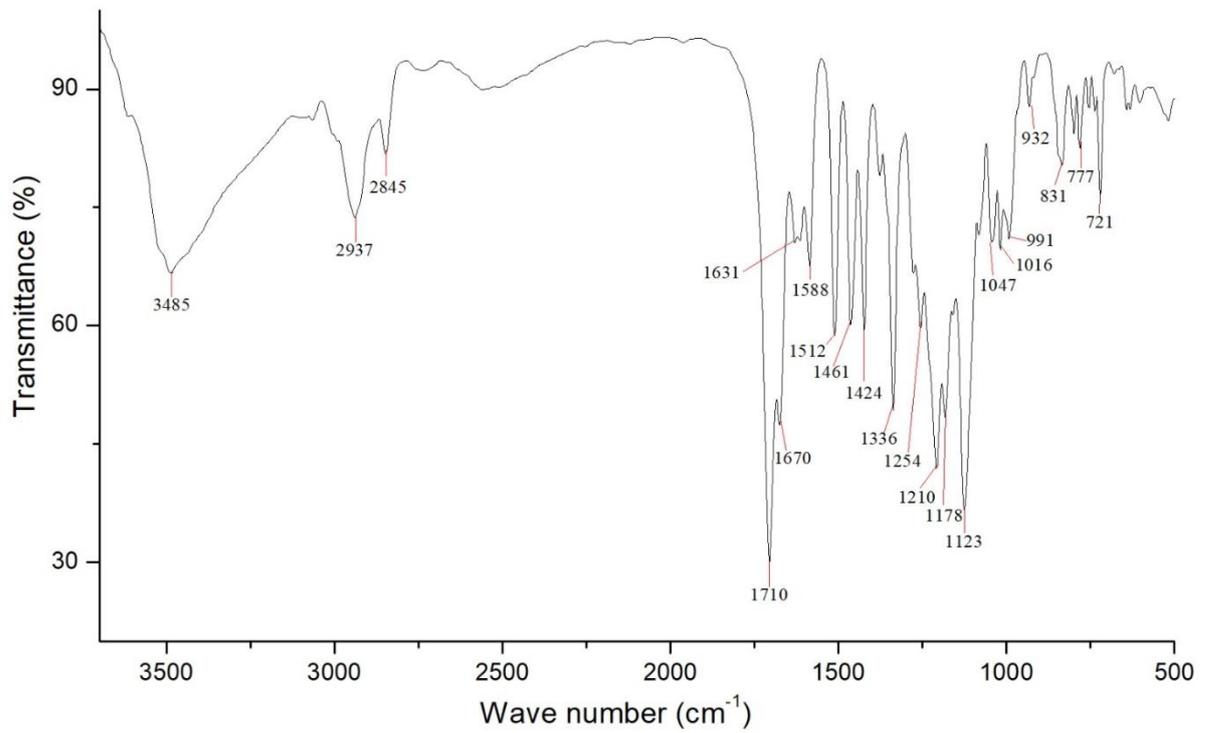
**Figura 72** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-6****Figura 73** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-6**

Figura 74 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-6

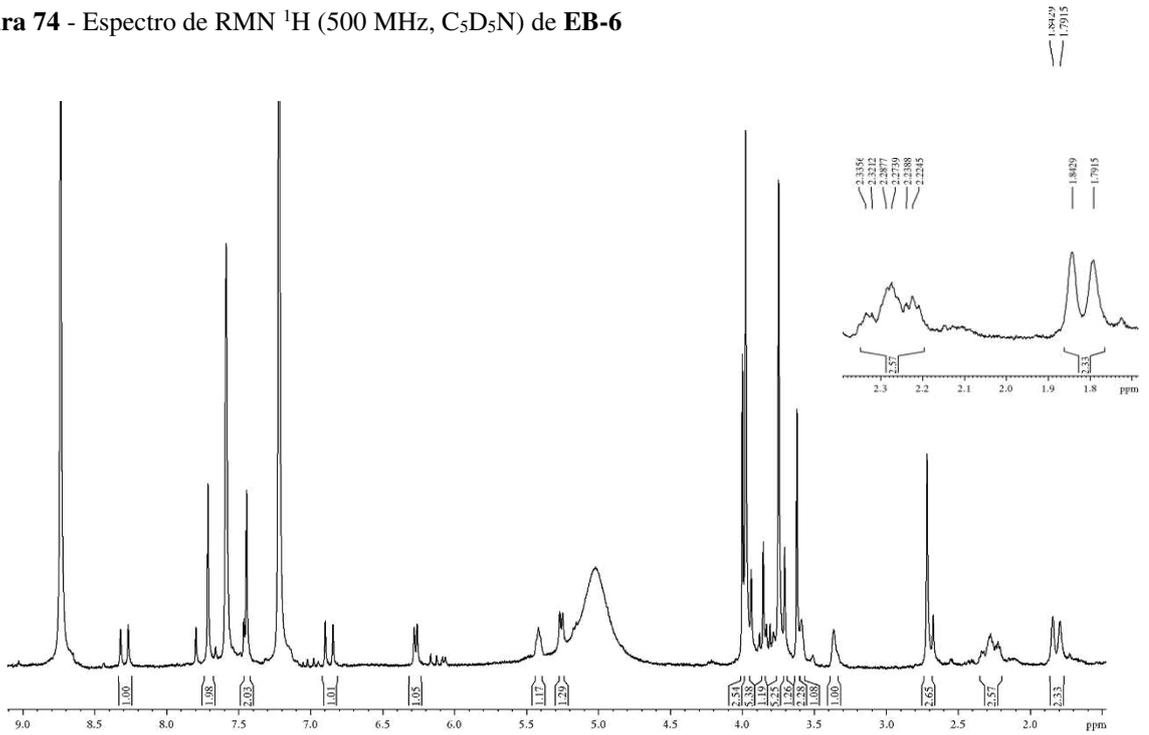
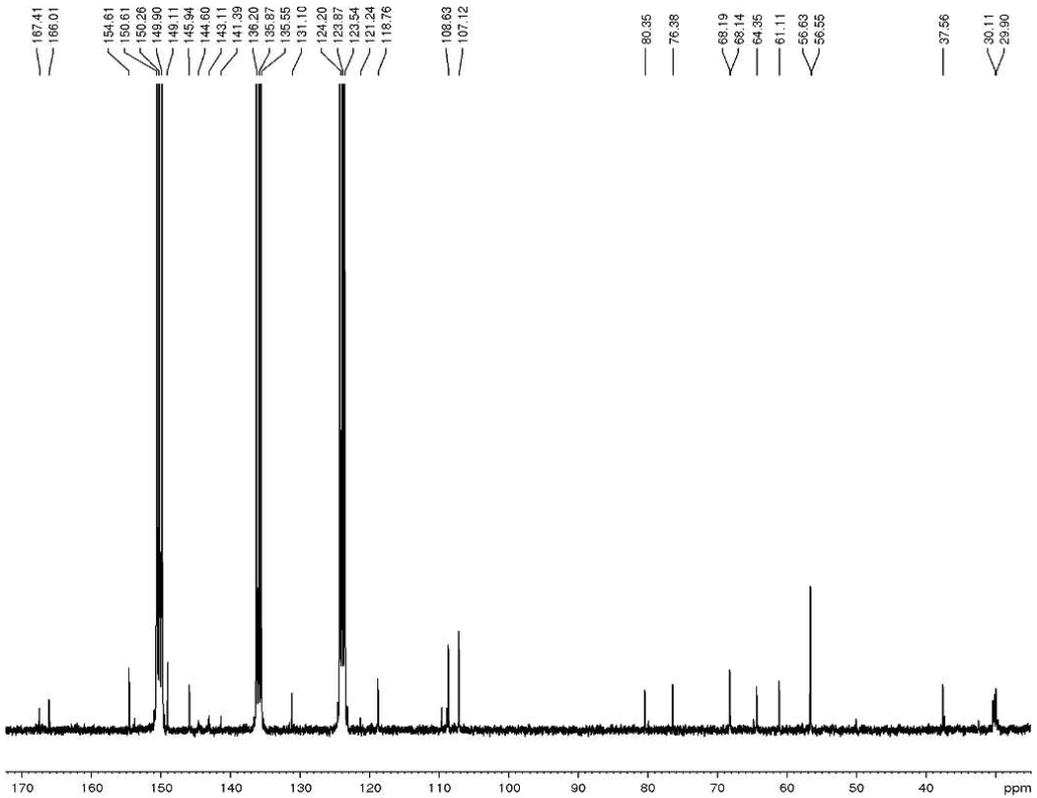
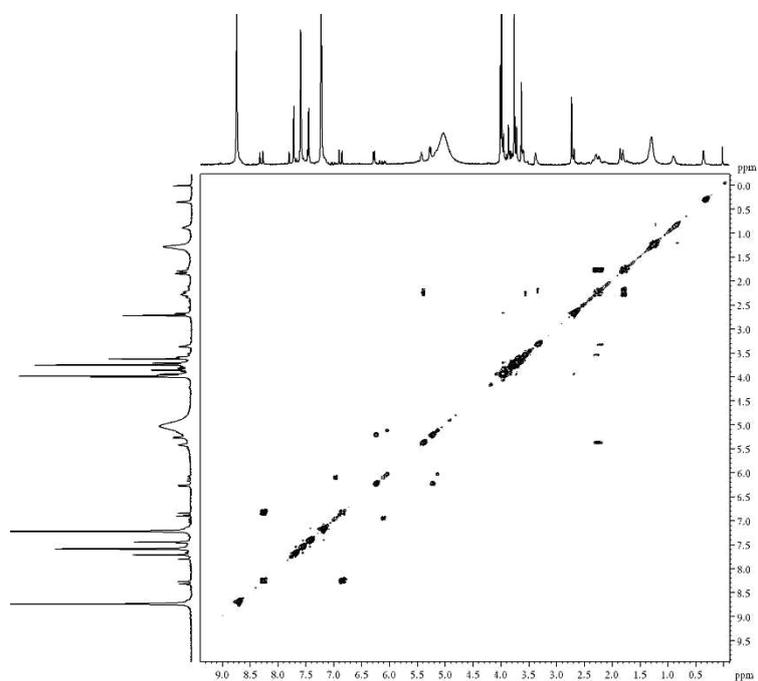


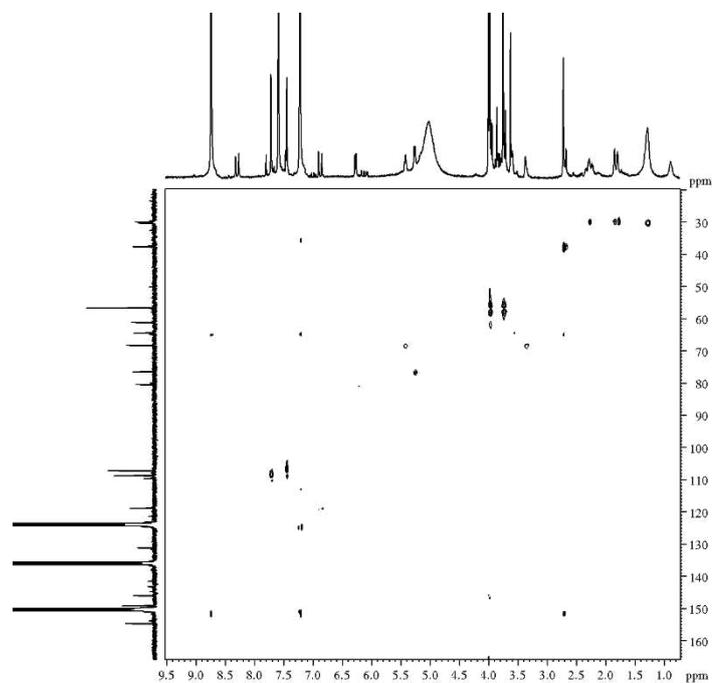
Figura 75 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-6.



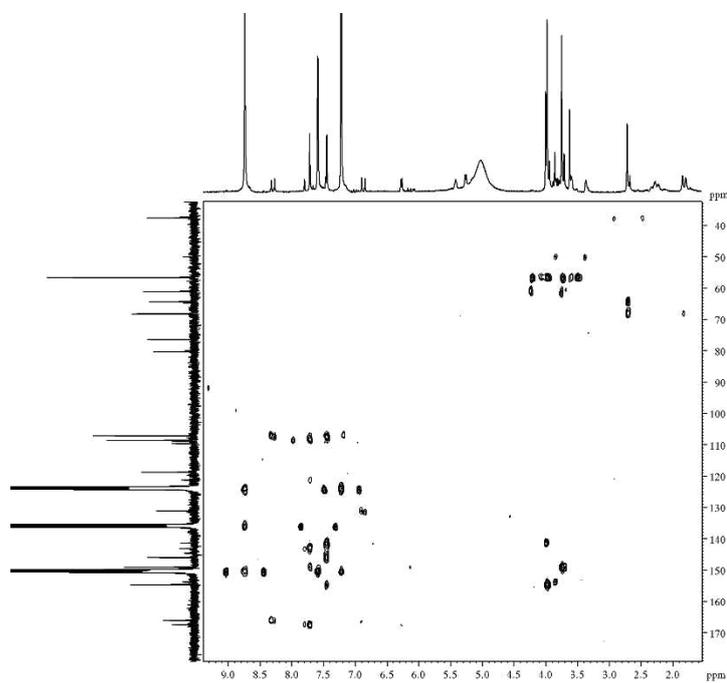
**Figura 76** - Espectro de RMN COSY (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-6**.



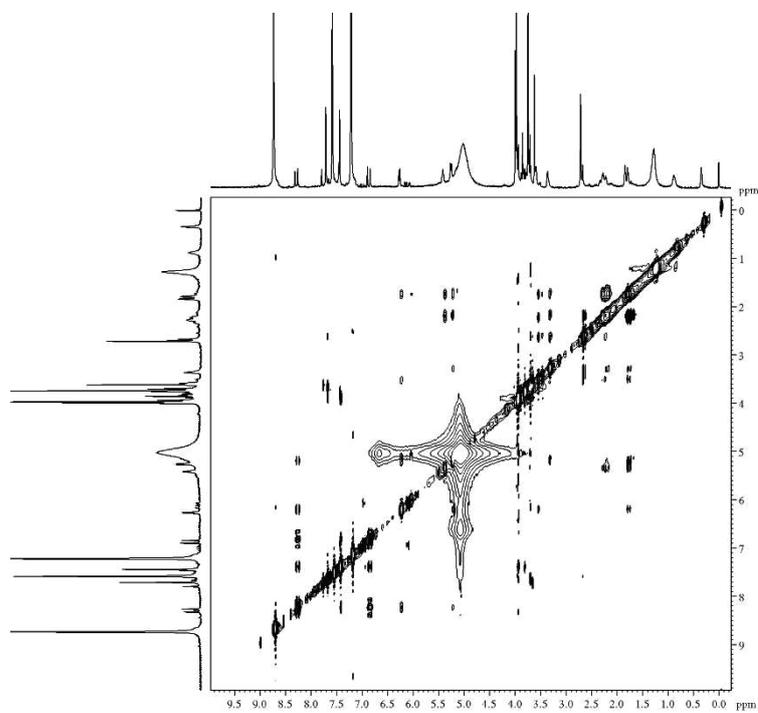
**Figura 77** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-6**.



**Figura 79** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-6**.



**Figura 78** - Espectro de RMN NOESY (300 X 300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-6**.



### 6.1.7 Determinação estrutural de EB-7

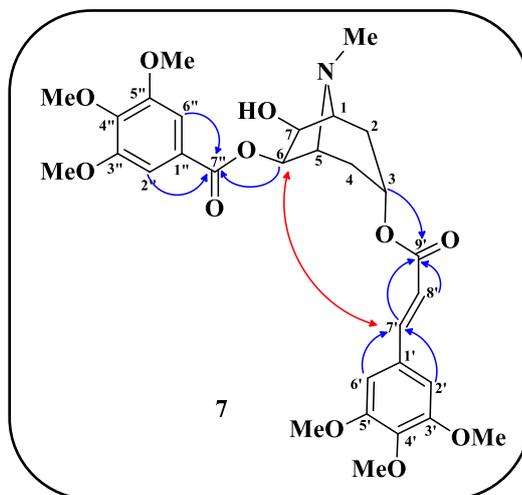
O fracionamento cromatográfico de EEEBC-A3-BB, incluindo CLAE (ver experimental 5.5.1.3, pg. 52), levou ao isolamento de EB-7, um sólido branco cristalino, ponto de fusão 178-180 °C e  $[\alpha]_D^{22} + 29,54^\circ$  (c 0,08, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1).

O espectro, EMAR-ESI, de EB-7 forneceu o pico da molécula protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  588,1734 (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>11</sub>, 588,2445), indicando a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>11</sub>, exibindo um IDH igual a 13, similar a EB-3 e EB-6.

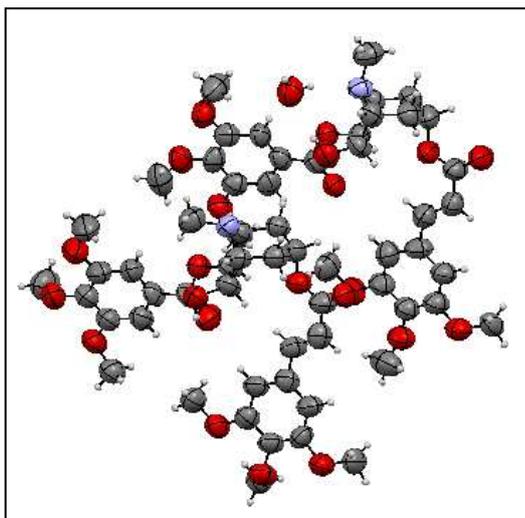
A análise comparativa dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) e <sup>13</sup>C (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), indicou um sistema  $\alpha$ - $\beta$  conjugado à carbonila, o qual foi confirmado pela presença dos sinais em  $\delta_H$  8,27 (d,  $J = 16,1$  Hz, 1H) e 6,88 (d,  $J = 16,1$  Hz, 1H); dois simpletos em  $\delta_H$  7,61 (s, 2H, H-2''/6'') e 7,44 (s, 2H, H-2'/6'), cada um equivalente a dois hidrogênios de anel benzênico, sendo o primeiro, mais desprotegido, por fazer parte da conjugação com a carbonila. Foram também observados sinais para seis grupos metoxilas ligados a anel benzênico: representados pelos sinais em  $\delta_H$  4,00, 3,93, 3,98 e 3,70, sendo os dois últimos correspondentes, cada um, a duas metoxilas. Além destes sinais, foram observados hidrogênios metilênicos e metínicos do anel tropânico. Assim como em EB-6 (Pág. 105), a posição do grupo benzoíla tri-substituído no carbono C-6 foi confirmada pelo espectro HMBC (Figura 88), o qual revelou correlação do sinal em  $\delta_H$  6,25 (1H, d,  $J = 6,0$ , H-6) com a carbonila em  $\delta_C$  166,6 (C-7''), enquanto o grupo cinamoíla foi posicionado em C-3 devido as correlações dos sinais em  $\delta_H$  5,42 (sl, H-3), 6,87 (d,  $J = 16,1$  Hz, H-8') e 8,27 (d,  $J = 16,1$  Hz, H-7') com a carbonila em  $\delta_C$  166,3 (C-9').

A diferença observada para EB-7 em relação EB-6, foi devido o sinal em  $\delta_H$  5,26 (d,  $J = 5,22$ , 1H), o qual, pelo espectro HSQC mostrou correlação com o sinal em  $\delta_C$  76,2 (C-7), contendo um grupo hidroxila. A estereoquímica relativa de EB-6 foi definida por cristalografia de raio-X (Figura 81). A relação trans entre o grupo cinamoíla e os substituintes em C-6 e C-7 foi corroborado pelo espectro NOESY, o qual mostrou acoplamento dipolar entre os hidrogênios H-6 com H-7'.

**Figura 80** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância ( $^3J$ ) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HMBC e  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY para **EB-7**.

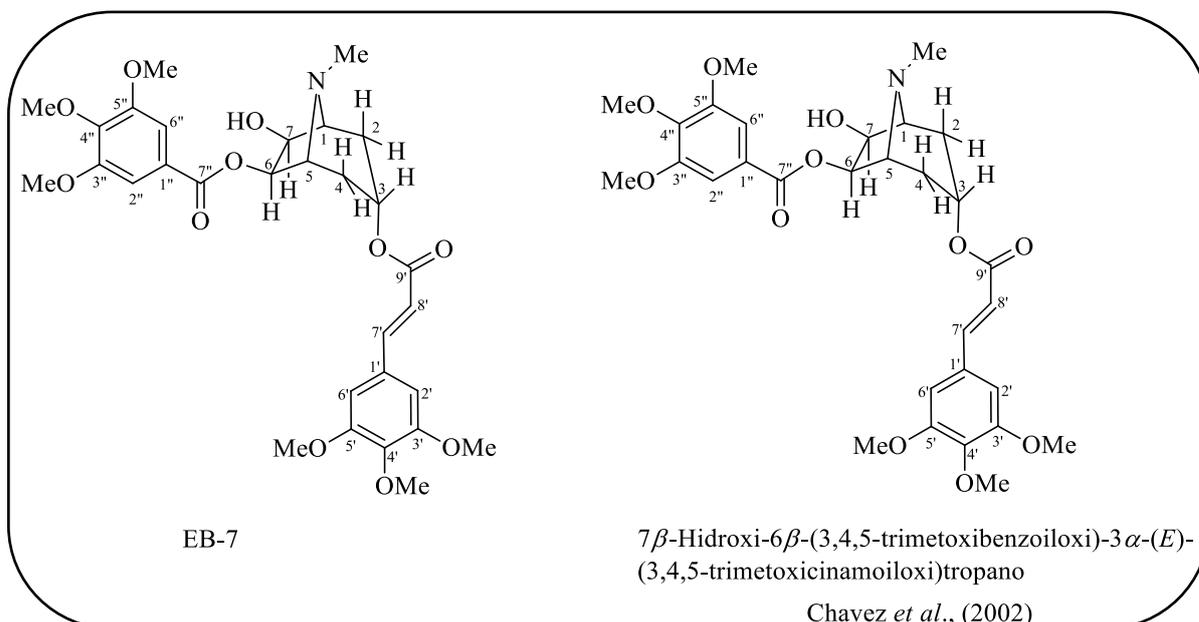


**Figura 81** - Unidade assimétrica da estrutura cristalina de **EB-7**.



Com base nas informações apresentadas e comparação com dados previamente relatados para o composto  $7\beta$ -hidroxi- $3\alpha$ -(*E*)-(3,4,5-trimethoxycinnamoiloxi)- $6\beta$ -(3,4,5-trimethoxybenzoiloxi)-tropano (Figura 82, abaixo). Anteriormente isolado de *Erythroxylum rotundifolium* (CHAVEZ *et al.*, 2002), confirmou-se a estrutura proposta.

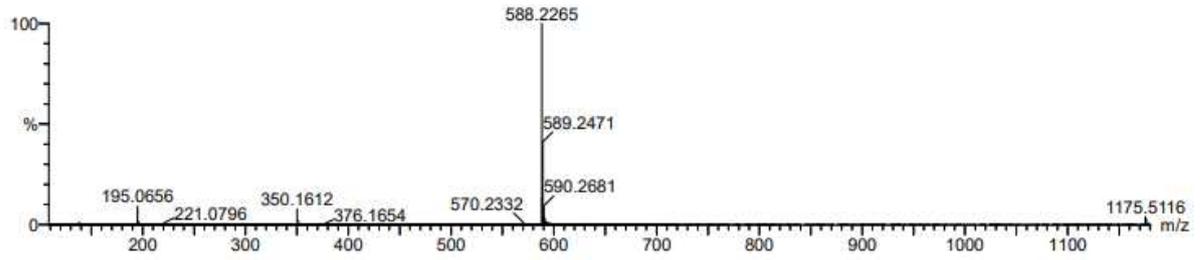
Figura 82 - Estrutura de EB-7 e do alcaloide obtido por Chavez *et al.*, (2002).



**Tabela 22** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-7 e do alcaloide isolado por Chàvez *et al.*, (2002).

No.	HSQC		Literatura ( $\text{CDCl}_3$ ) Chàvez <i>et al.</i> , 2002	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	68,1	3,36 sl	66,1	3,20 br s
2	30,1	2,28 dd (14,7; 4,4) 1,79 d (14,7)	27,0	2,29 dd (13,5;4,4) 1,69 d (13,5)
3	68,1	5,42 t (4,5)	66,9	5,26 tl (4,5)
4	29,9	2,33 dd (14,7;4,4) 1,83 d (14,7)	27,2	2,34 dd (11,7, 4,2) 1,73 d (11,7)
5	64,2	3,59 sl	62,7	3,43 sl
6	80,8	6,24 d (6,0)	79,1	5,80 d (6,0)
7	76,2	5,25 d (6,0)	75,4	3,43 tl (6,0)
1'	131,1	-	129,8	-
2'/6'	107,1	7,44 s	105,6	6,96 s
3'/5'	154,6	-	153,4	-
4'	141,4	-	140,2	-
7'	145,9	8,24 d (16,1)	145,6	7,78 d (16,0)
8'	118,7	6,85 d (16,1)	117,1	6,36 d (16,0)
9'	165,9	-	165,7	-
1''	126,9	-	124,9	-
2''/6''	107,9	7,61 s	107,0	7,32 s
3''/5''	153,9	-	153,0	-
4''	143,3	-	142,5	-
7''	167,0	-	166,4	-
<i>m</i> '-MeO	56,6	3,98 s	56,2	3,90 s
<i>p</i> '-MeO	61,1	4,00 s	61,0	3,91 s
<i>m</i> ''-MeO	56,3	3,69 s	-	-
Me-N	37,5	2,71 s	35,2	2,63 s

**Figura 83** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-7**.



**Figura 84** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-7**.

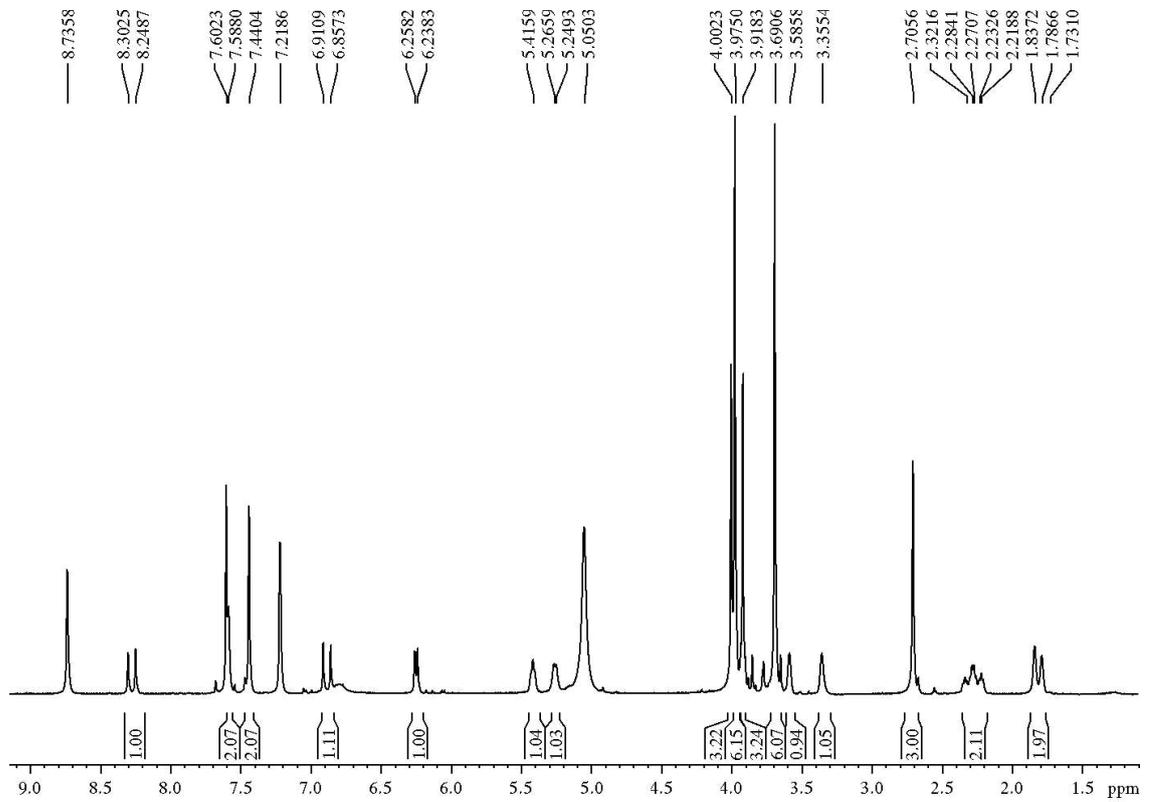


Figura 85 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-7.

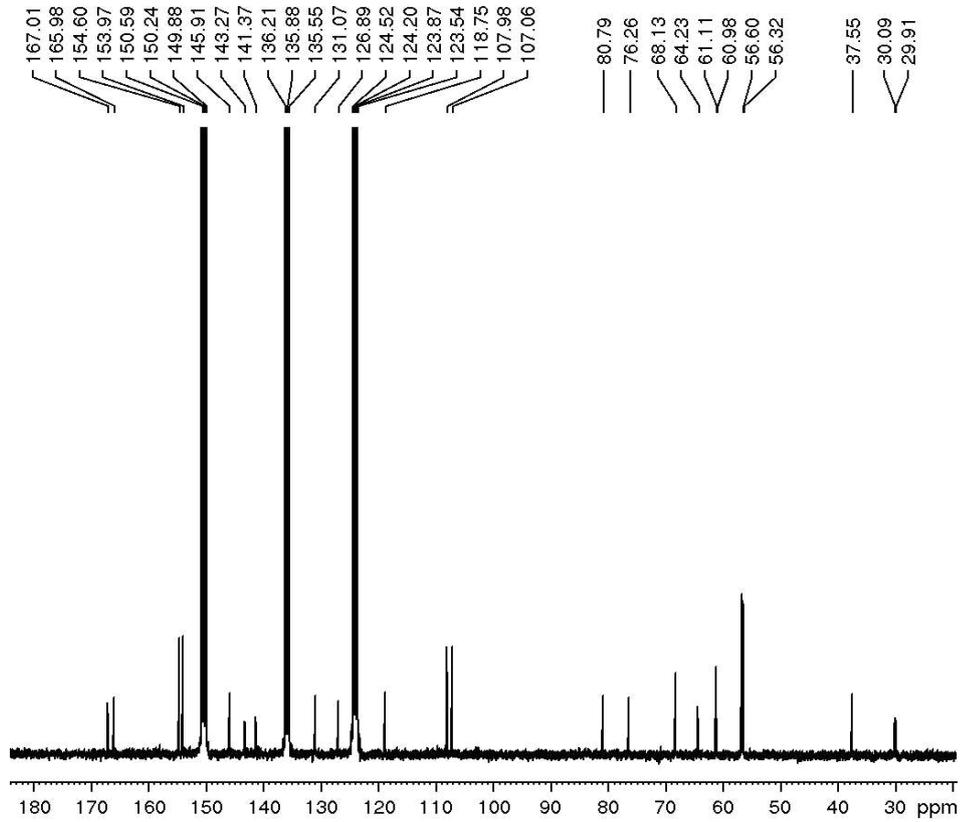
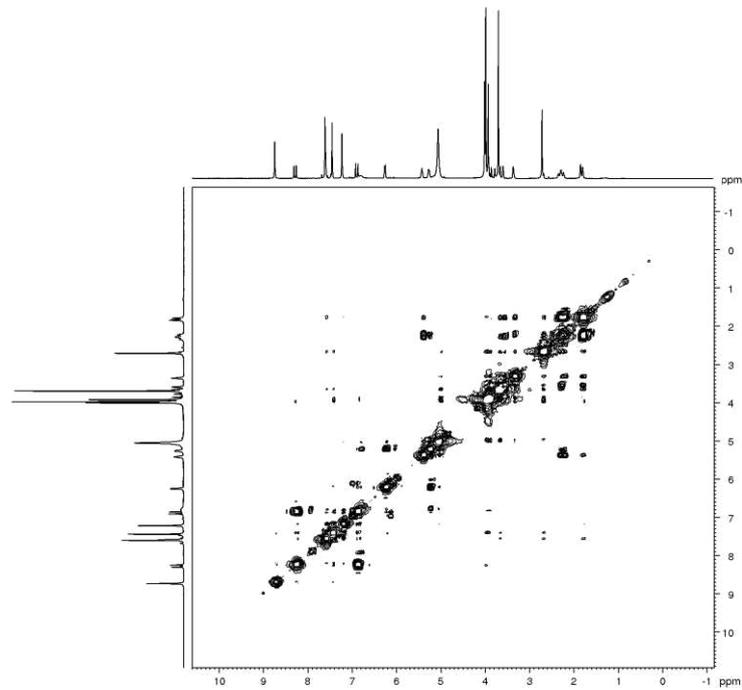
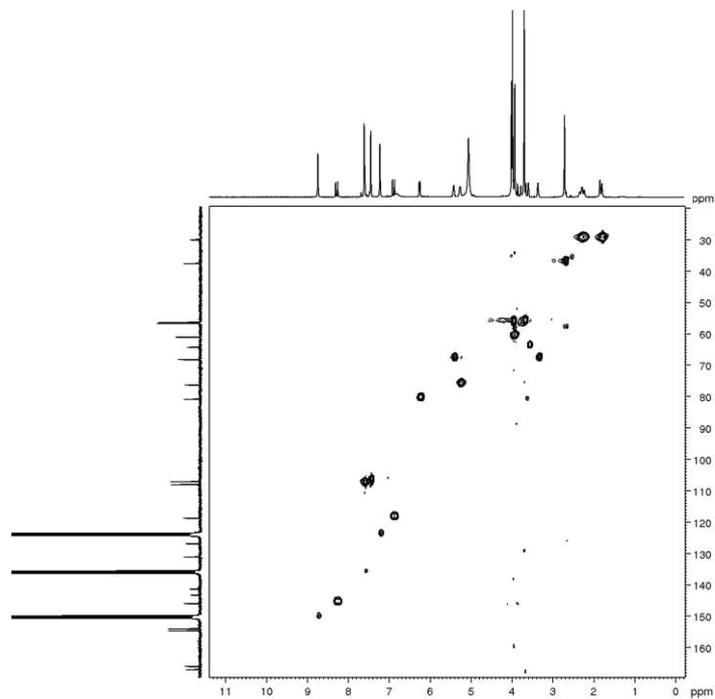


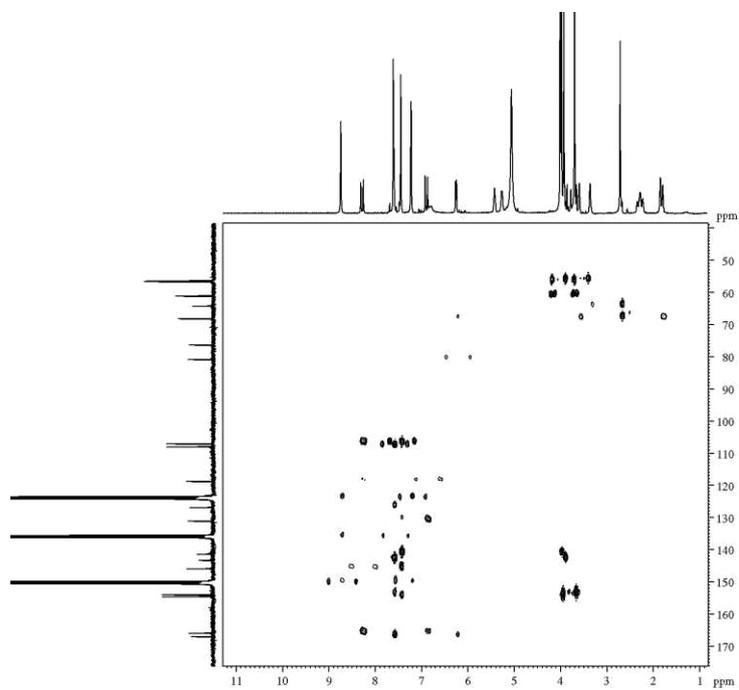
Figura 86 - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de EB-7.



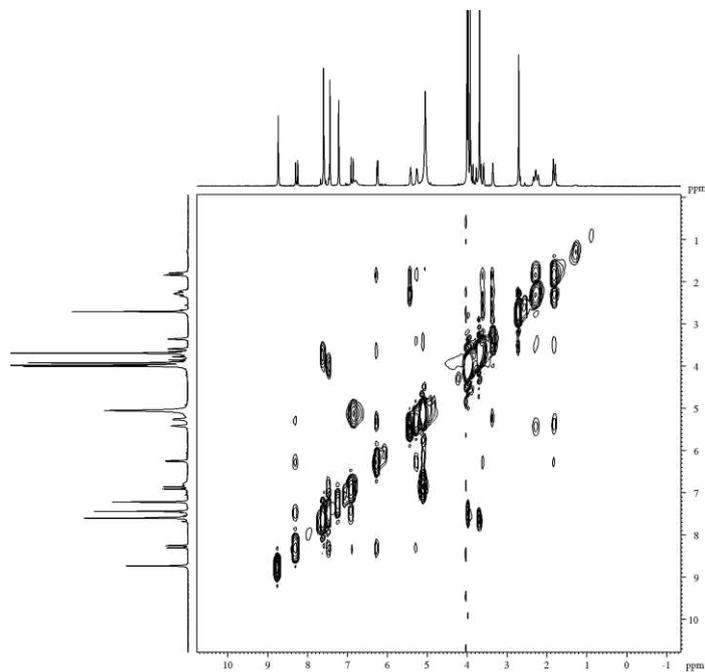
**Figura 87** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-7**.



**Figura 88** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-7**.



**Figura 89** - Espectro de RMN NOESY (300 X 300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-7**



### 6.1.8 Determinação estrutural de EB-8

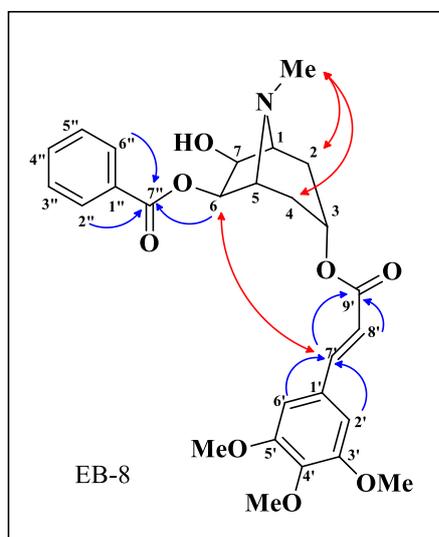
O tratamento cromatográfico da fração EEEBC-A3-BB do extrato etanólico de *E. bezerrae* (item 5.5.1.3, Pág. 52), incluindo purificação por CLAE (C-18), resultou no isolamento de 10,4 mg de um sólido branco amorfo com ponto de fusão 185-186 °C e  $[\alpha]_D^{21} +39,88^\circ$  (*c* 0,14, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1), denominado EB-8.

O composto **EB-8** teve sua estrutura estabelecida pela interpretação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e EMAR-ESI, o qual exibiu o íon correspondente a molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 498,2131, indicando a fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub> (calculado para C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub>, 498,2128), com IDH igual a 13.

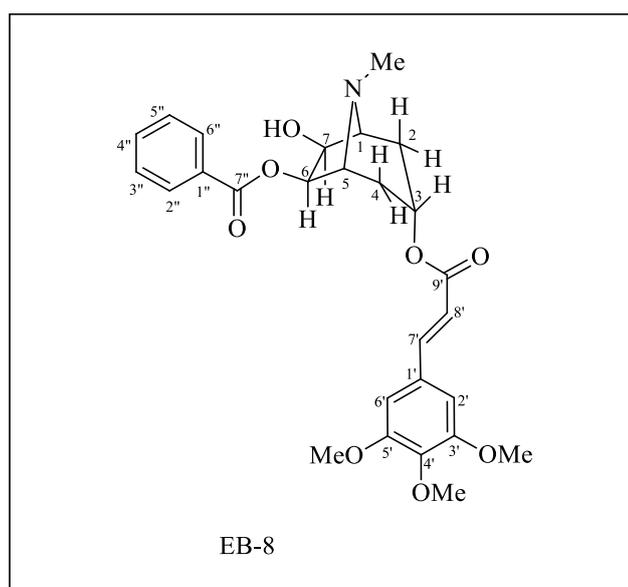
Análise comparativa dos dados de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H dos compostos **EB-8** e **EB-7** se mostraram semelhantes, diferindo apenas pela presença de um grupo benzoila não substituído em EB-8 ao invés de um grupo benzoíla tri-substituído em EB-7. Isto foi confirmado pela presença dos sinais em  $\delta_H$  8,23 (d, *J* = 7,5, 2H, H-2''/6''), 7,52 (t, *J* = 4,4, 1H, H-4'') e 7,40 (t, *J* = 7,6, 2H, H-3''/5''), os quais, no espectro HSQC, foram correlacionados aos sinais em  $\delta_C$  130,3 (C-2''/6''), 133,5 (C-4'') e 129,1 (C-3''/5''), respectivamente. A partir do espectro HMBC (Figura 97), observou-se correlação do sinal em  $\delta_H$  8,25 (d, *J* = 7,5, 2H, H-2''/6'') com a carbonila mais desprotegida em C-7'', a qual exibe correlação com H-6 ( $\delta_H$  6,20, d, *J*=6,0), indicando a posição da unidade benzoíla não substituída em  $\delta_C$  80,4 (C-6).

A configuração relativa de EB-8 se deu através do espectro de RMN NOESY, o qual apresentou acoplamento dipolar para o sinal em  $\delta_H$  6,20 (H-6) com o sinal do hidrogênio do carbono *beta* pseudoaxial em acordo com a posição de H-6, também *alfa* posicionado à carbonila em  $\delta_H$  8,20 (H-7'), indicando o posicionamento da unidade cinamoíla em orientação *alfa* (Figura 90). O acoplamento dipolar do grupo *N*-metila ( $\delta_H$  2,82) com os hidrogênios axiais H-2 ( $\delta_H$  2,36) e H-4 ( $\delta_H$  2,41), indicou a orientação do grupamento *N*-metil em posição *axial*.

**Figura 90** - Estruturas mostrando suas correlações à longa distância (3J) observadas no espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC e  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY para **EB-8**.



**Figura 91** - Estrutura de **EB-8**.



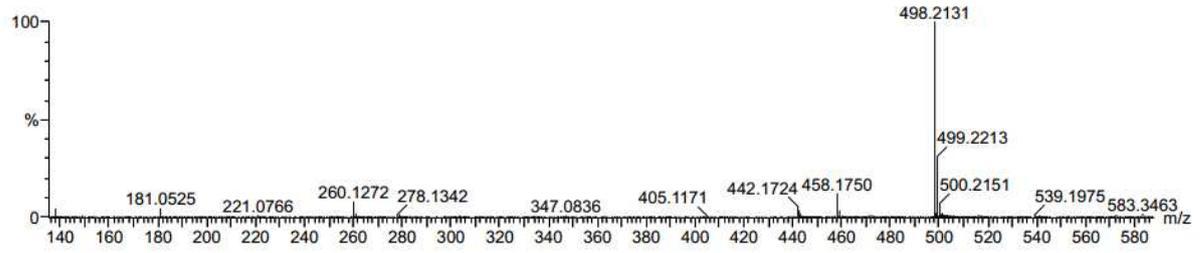
A comparação dos dados espectroscópicos de EB-8 com os previamente relatados na literatura (Tabela 23, p. 123), foram consistentes com a estrutura 7 $\beta$ -hidroxi-3 $\alpha$ -(*E*)-(3,4,5-trimethoxicinnamoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-tropano (ver Figura 91), previamente isolado por El-Iman *et al.*, (1987), a partir da espécie *Erythroxylum zambesiacum*.

**Tabela 23** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ , 300 x 75 MHz) de EB-8.

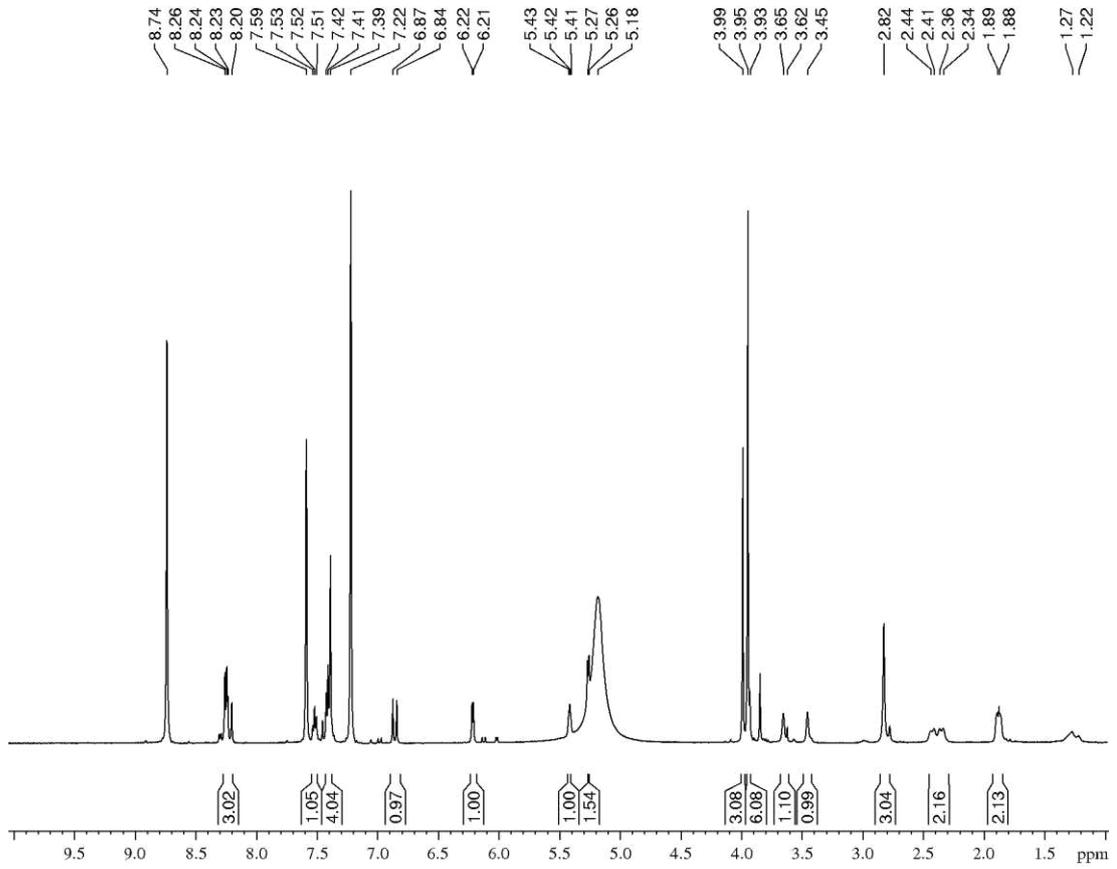
No.	HSQC	Literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz)
-----	------	---

<b>El-Iman et al., 1987</b>				
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	68,7	3,45 sl	-	3,2 br s
2	30,8	2,36 d (13,6) 1,87 d (13,6)	-	2,22 m
3	67,9	5,41 t (4,6)	-	5,25 t
4	30,6	2,41 d (14,0) 1,88 d (14,0)	-	2,22 m
5	64,8	3,45 sl	-	3,4 sl
6	80,4	6,20 d (6,0)	-	5,87 sl
7	76,1	5,25 d (6,0)	-	4,87 sl
1'	131,7	-	-	-
2'/6'	107,1	7,38 s	-	-
3'/5'	154,6	-	-	6,9 s
4'	139,4	-	-	-
7'	145,9	8,20 d (16,1)	-	7,77 d (16,0)
8'	118,7	6,84 d (16,1)	-	6,35 d (16,0)
9'	165,9	-	-	-
1''	131,0	-	-	-
2''/6''	130,3	8,23 d (7,5)	-	8,06 m
3''/5''	129,1	7,40 t (7,5)	-	7,50 m
4''	133,5	7,52 t (7,5)	-	-
7''	167,1	-	-	-
<i>p</i> -MeO	56,6	3,94 s	-	3,90 s
<i>m</i> -MeO	61,1	3,98 s	-	3,95 s
Me-N	38,4	2,82 s	-	2,75 s

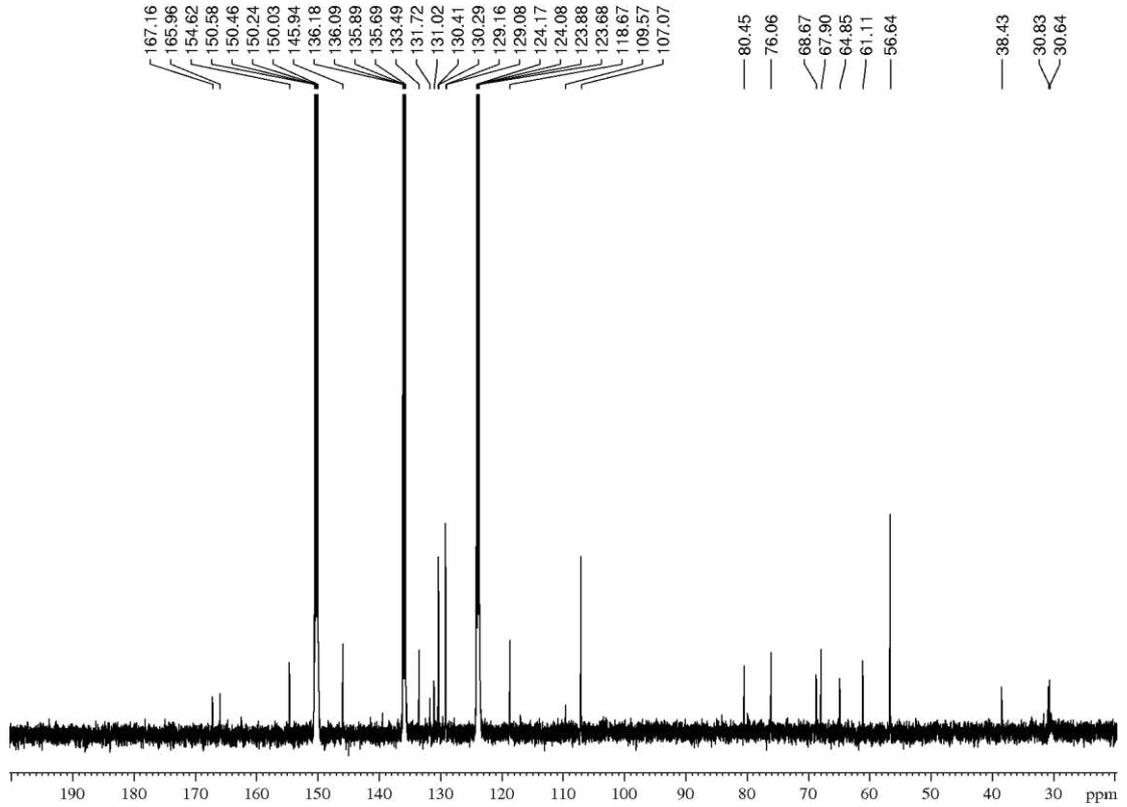
**Figura 92** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-8**.



**Figura 93** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-8**.



**Figura 94** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-8**.



**Figura 95** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de **EB-8**.

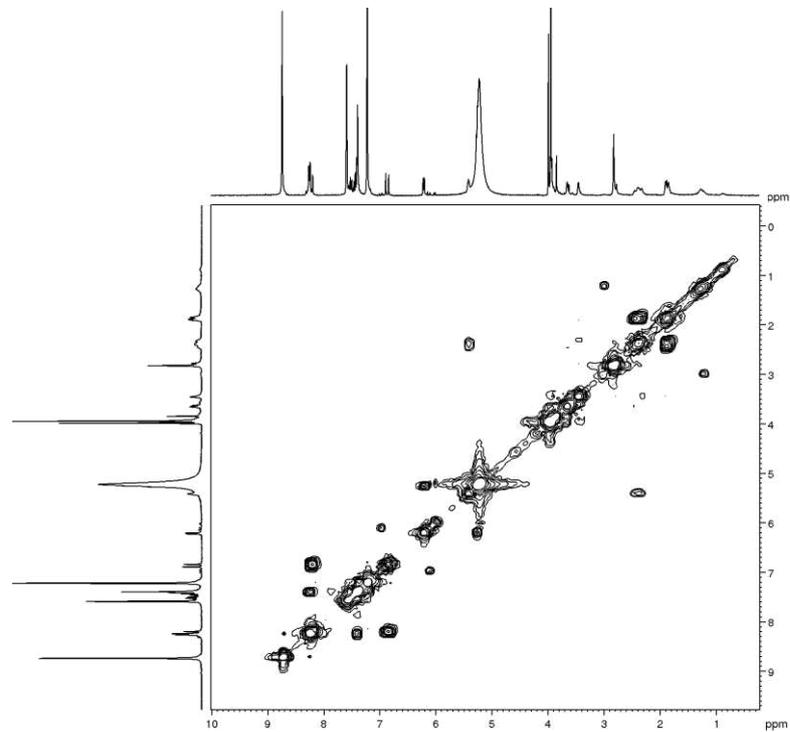


Figura 96 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-8.

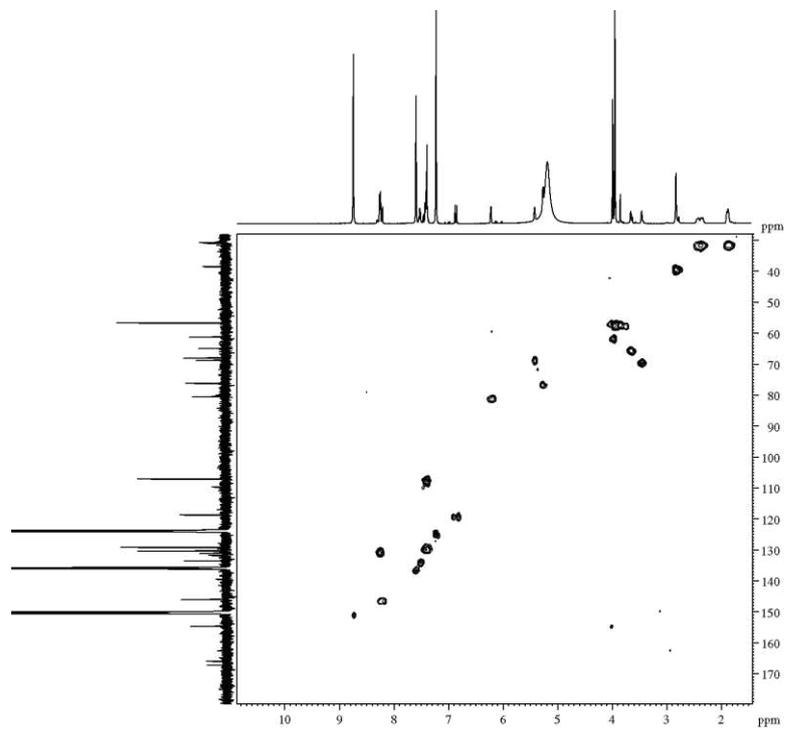
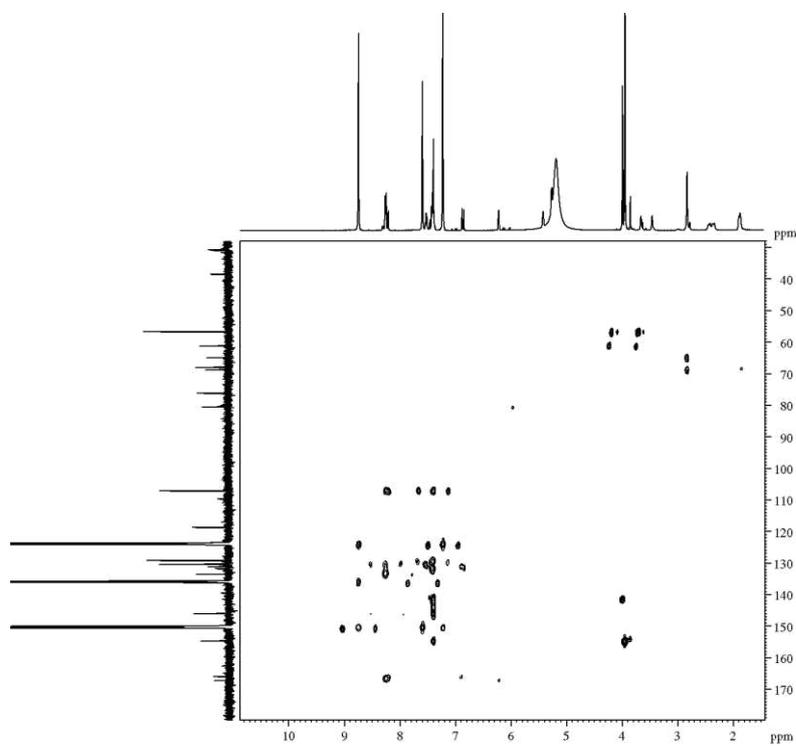
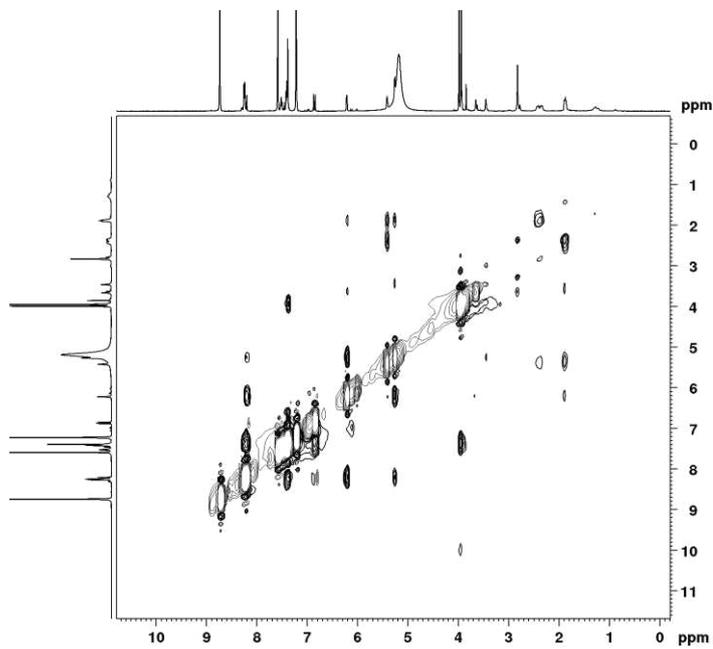


Figura 97 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de EB-8.



**Figura 98** - Espectro de RMN NOESY (300 X 300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de **EB-8**.



### 6.1.9 Determinação estrutural de EB-9

A fração HLCCC-3 (Item 5.5.2.3, p. 58), originada do extrato *n*-hexano do lenho do caule de *E. Bezerrae*, após sucessivos fracionamentos cromatográficos, resultou na obtenção de um sólido branco cristalino (8,0 mg), com rotação  $[\alpha]_D^{24} -19.6^\circ$  (*c* 0,5, CHCl<sub>3</sub>), o qual foi denominado **EB-9**.

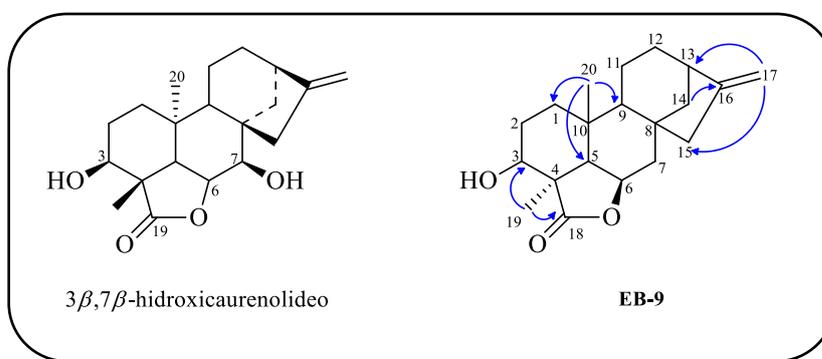
O espectro de massas de alta resolução (Figura 103, p. 128) exibiu o íon correspondente à molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 317,2114 (calculado *m/z* 317,2117; erro = - 0,9 ppm), indicando a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, com IDH igual a 7.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Figura 104, p. 132), mostrou dois singletos largos em  $\delta_H$  4,81 (1H, H-17 $\alpha$ ) e 4,87 (1H, H-17 $\beta$ ), atribuídos a hidrogênios metilênicos vinílicos, bem como dois sinais em  $\delta_H$  4,46 (1H, td, *J*=11,0; 4,6, H-6) e 3,85 (1H, dd, *J*=10,8; 6,3, H-3), inferidos a hidrogênios oximetínicos, os quais no espectro HSQC (Figura 107) apresentaram correlação com os carbonos em  $\delta_C$  75,0 (C-6) e 73,3 (C-3), respectivamente. Adicionalmente, exibiu dois singletos atribuídos à hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,27 (3H, s, H-19) e 1,12 (3H, s, H-20), além de um conjunto de deslocamentos químicos na faixa de  $\delta_H$  1,47-1,77, característicos de hidrogênios metilênicos e metínicos, compatíveis com uma substância de natureza terpênica (YAMASAKI *et al.*, 1976).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Figura 105, p.133) apresentou sinais correspondentes a vinte átomos de carbonos, indicando um diterpeno. A comparação deste espectro com o espectro de RMN de <sup>13</sup>C-DEPT 135° revelou a existência de dois carbonos metílicos, oito metilênicos, sendo um olefínico em  $\delta_C$  104,1 (C-17), cinco metínicos, incluindo dois oxigenados em  $\delta_C$  75,0 e 73,3. A subtração deste espectro mostrou cinco carbonos não hidrogenados, incluindo um grupo carboxila de lactona em  $\delta_C$  181,3 e um carbono olefínico em  $\delta_C$  153,4. De acordo com o espectro HSQC, as correlações dos dois hidrogênios olefínicos com o sinal de carbono em  $\delta_C$  104,1 (C-17) indicam uma ligação dupla exocíclica. Além destas, observou-se correlações dos sinais de carbonos oxigenados em  $\delta_C$  75,0 (C-6) e 73,3 (C-3) com os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  4,45 (1H, td, *J*=11,1; 4,7, H-6), 3,85 (1H, dd, *J*=9,0; 2,4, H-3), bem como as correções dos sinais de carbonos metílicos em  $\delta_C$  11,1 (C-19) e 17,6 (C-20) com os sinais em  $\delta_H$  1,27 (3H, sl, C-19) e 1,12 (3H, sl, C-20), respectivamente. No espectro HMBC (Fig 108) as correlações do sinal de hidrogênio metílico em  $\delta_H$  1,27 (Me-19) com o carbono oximetínico  $\delta_C$  73,3 (C-3) e carboxila em  $\delta_C$  181,3 (C-18); do sinal em  $\delta_H$  1,12 (Me-20) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  57,9 (C-5), 54,9 (C-9) e 41,2 (C-1), bem como dos hidrogênios

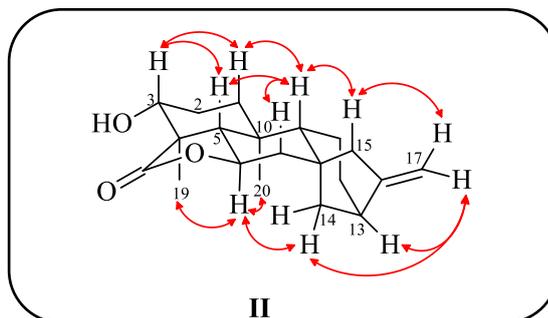
metínicos H-5 e H-6 com a carboxila evidencia a presença de uma lactona de cinco membros posicionada em C-4 ( $\delta_C$  45,5) e C-6 ( $\delta_C$  75,0). Além destas, as correlações dos sinais de hidrogênio vinílico  $\delta_H$  4,82 (1H, H-17 $\alpha$ ) e 4,87 (1H, H-17 $\beta$ ) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  48,5 (C-15), 43,8 (C-13) e dos hidrogênios metilênicos  $\delta_H$  2,07 (1H, H-14 $\alpha$ ) e 1,65 (1H, H-14 $\beta$ ) com o carbono olefínico  $\delta_C$  153,4 (C-16), indicaram que EB-9 se trata de um diterpeno caureno, com estrutura semelhante ao composto 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -hidroxicaurenolideo (Figura 99) (HANSON *et al.*, 1973).

**Figura 99** - Composto 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -hidroxicaurenolideo e correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC de EB-9.

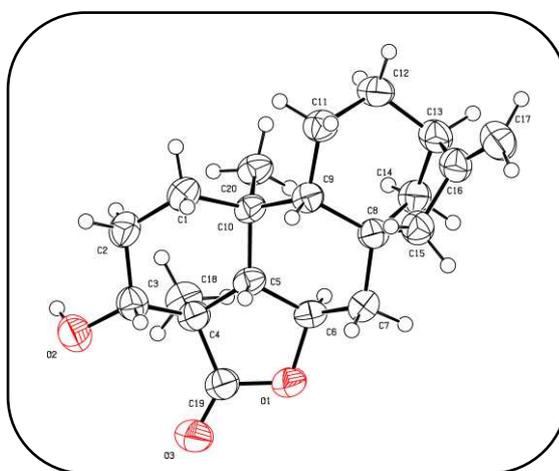


A configuração relativa (Figura 100) inferida para os centros estereogênicos foi realizada através do espectro NOESY (Figura 109), o qual revelou interações espaciais do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  3,85 (H-3) com os hidrogênios em  $\delta_H$  1,02 (H-1 $\beta$ ) e 1,30 (H-5 $\beta$ ), indicando uma  $\beta$ -orientação (equatorial) do grupo hidroxila em C-3, enquanto a posição  $\beta$  para a lactona foi confirmada pelas interações espaciais do sinal em  $\delta_H$  4,46 (H-6 $\alpha$ ) com os sinais de hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,27 (Me-19 $\alpha$ ) e 1,12 (Me-20 $\alpha$ ). As configurações dos demais estereocentros foram determinadas com base nas correlações do sinal em  $\delta_H$  1,18 (H-9 $\beta$ ) com os sinais em  $\delta_H$  1,02 (H-1), 1,30 (H-5), 1,90 (H-7), 2,24 (H-15) e 4,87 (H-17) como mostra a figura 98, corroborada pela cristalografia de raio-X (Figura 101).

**Figura 100** - Correlações a longa distância observadas no espectro de NOESY de **EB-9**.

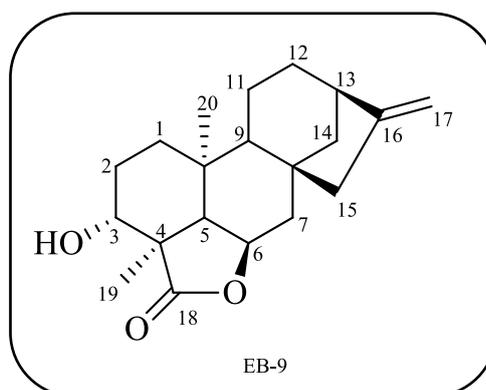


**Figura 101** - Desenho ORTEP da estrutura cristalina de **EB-9**.



Deste modo, a estrutura de EB-9 foi estabelecida como sendo  $3\alpha$ -hidroxicaurenolídeo (Figura 100), um diterpeno do tipo caurenol ainda não registrado na literatura. Para fins de comprovação adicional da estrutura, na Tabela 25 são mostrados os dados espectrais de EB-9, obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , comparando-os com aqueles relatados para a  $3\beta,7\beta$ -hidroxicaurenolideo (HANSON *et al.*, 1974).

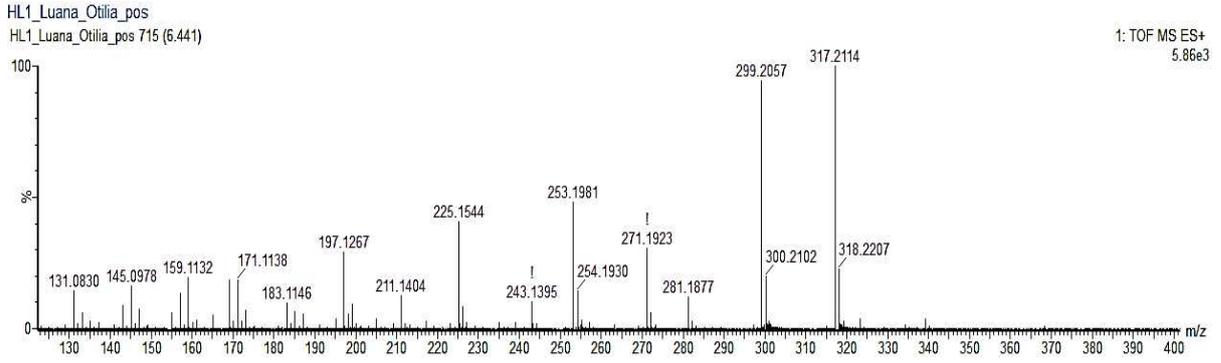
**Figura 102** - estrutura de EB-9 foi estabelecida como sendo  $3\alpha$ -hidroxicaurenolídeo.



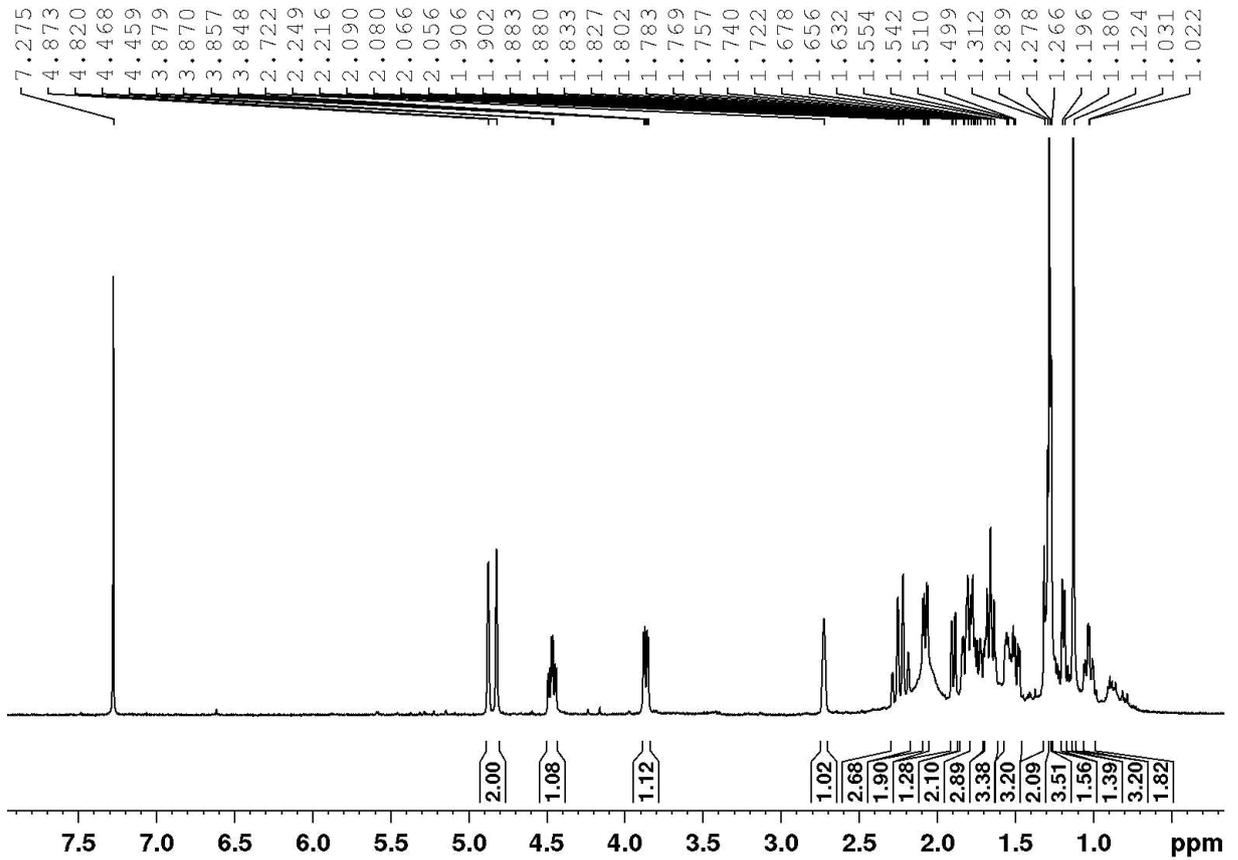
**Tabela 24** - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 x 75 MHz) de EB-9 e dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $3\beta,7\beta$ -hidroxicaurenolideo (Hanson *et al.*, 1974).

C	EB-9 ( $\text{CDCl}_3$ )		$3\beta,7\beta$ - hidroxicaurenolideo ( $\text{CDCl}_3$ )
	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_C$
1	41,2	1,81 (m) 1,02 (td, $J=13,0, 4,4$ )	36,6
2	26,7	1,33 (m) 1,57 (m)	27,5
3	73,3	3,85 (dd, $J=10,8, 6,3$ )	65,6
4	45,8	-	47,2
5	57,9	1,30 (m)	57,2
6	75,0	4,46 (td, $J=11,0, 4,6$ )	84,5
7	39,8	1,88 (dd, $J=11,0, 1,9$ ) 1,90 (m)	70,9
8	45,9	-	46,1
9	54,9	1,18 (d, $J=7,9$ )	56,4
10	37,4	-	34,3
11	18,3	1,50 (m) 1,47 (m)	17,4
12	32,3	1,65 (m) 1,55 (m)	32,9
13	43,8	2,72 (s)	38,2
14	44,6	2,07 (dd, $J=11,0, 7,3$ ) 1,65 (m)	34,2
15	48,5	2,26 (d, $J=17,0$ ) 2,19 (dt, $J=17,0, 26$ )	42,7
16	153,4	-	160,5
17	104,1	a. 4,81 (sl) b. 4,87 (sl)	106,9
18	181,3	-	18,4
19	11,1	1,27 (s)	182,6
20	17,6	1,12 (s)	22,4

**Figura 103 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-9**



**Figura 104 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de EB-9.**



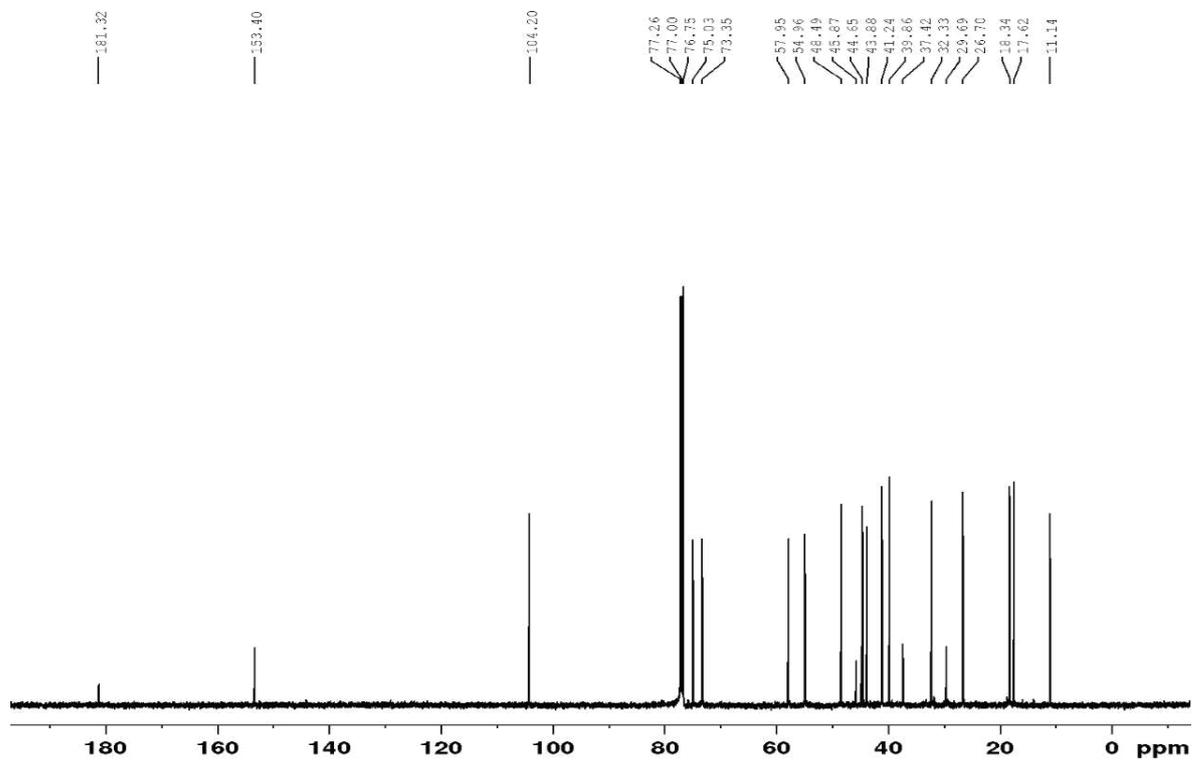
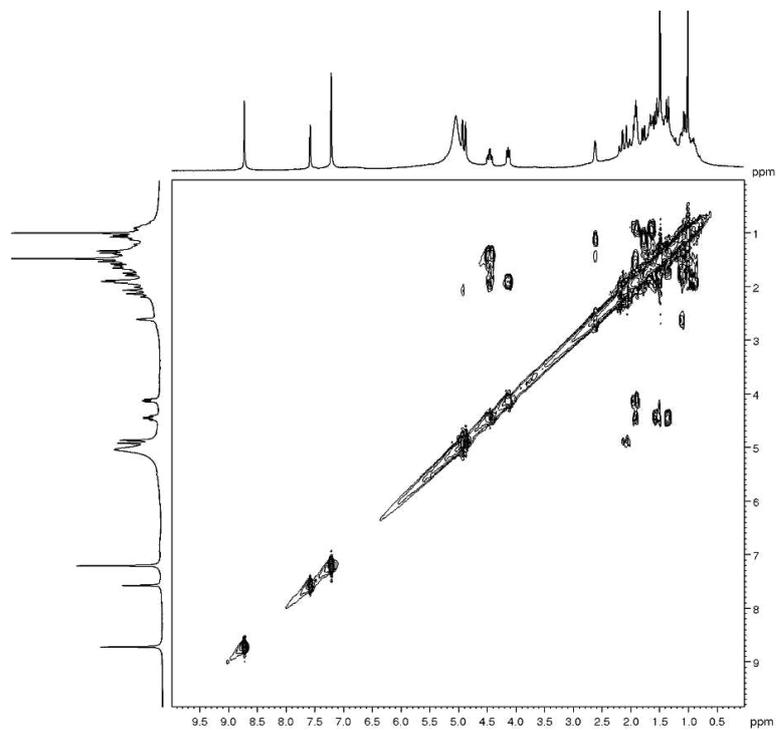
**Figura 105** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-9**.**Figura 106** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-9**.

Figura 107 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-9**.

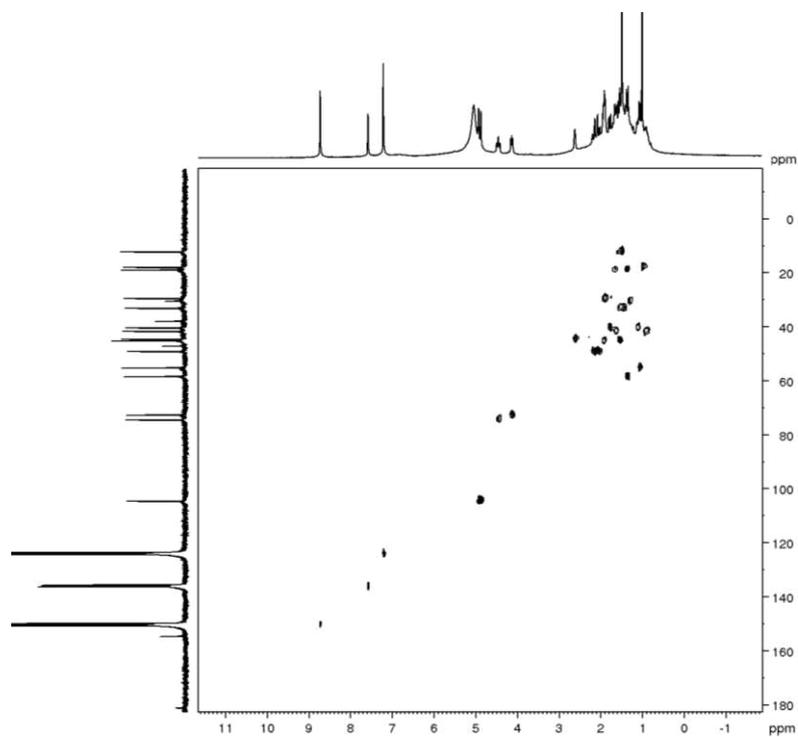
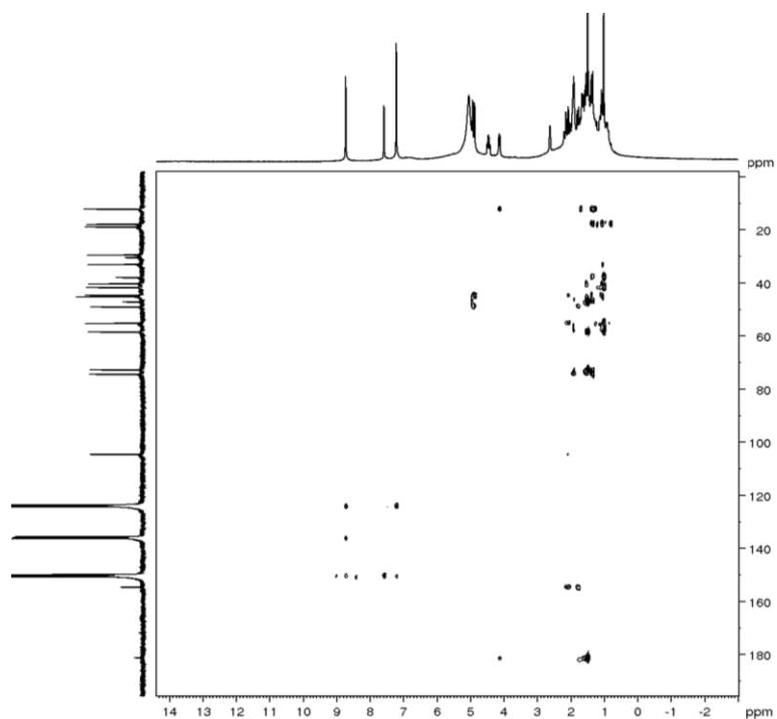
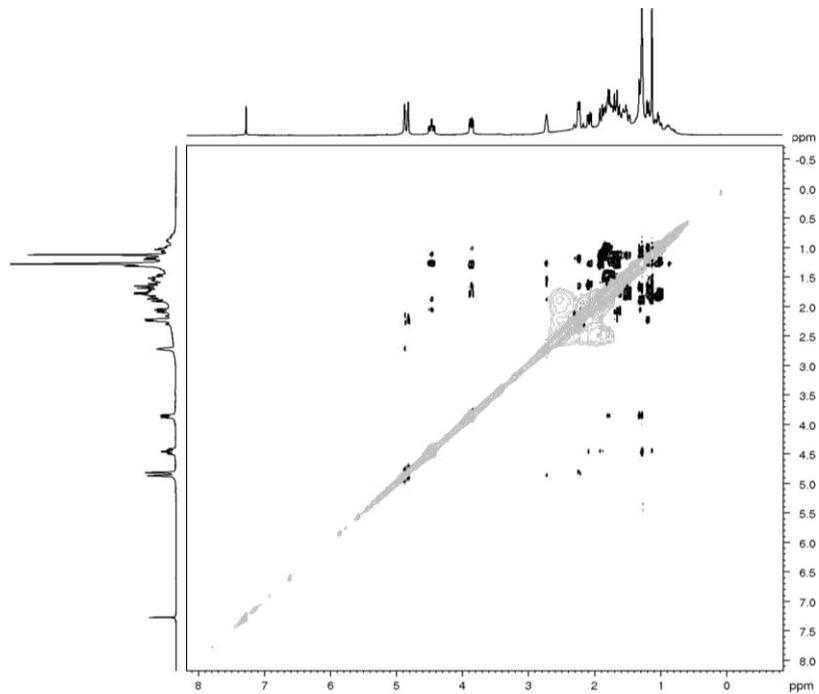


Figura 108 - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-9**.



**Figura 109** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-9**.



### 6.1.10 Determinação estrutural de EB-10

O extrato *n*-hexano do lenho do caule de *E. bezerrae*, após sucessivos fracionamentos cromatográficos (Item 5.5.2.5, p. 60), resultou na obtenção de um sólido branco cristalino (70,0 mg), com rotação  $[\alpha]_D^{23} -44.2^\circ$  (*c* 0,5, CHCl<sub>3</sub>), o qual foi denominado **EB-10**.

A fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> foi estabelecida baseado no pico da molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> com *m/z* 303,2326 (calc. para C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub> *m/z* 303,2324), em acordo com o espectro de massas de alta resolução (Figura 112, p. 136) de **EB-10**.

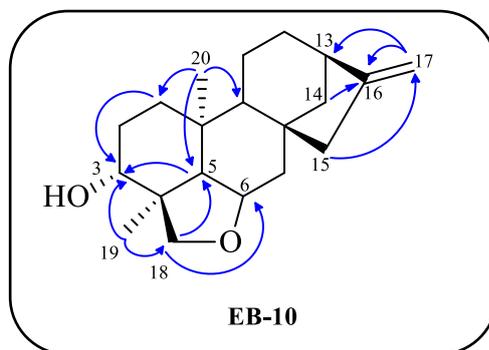
A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Fig. 115, p. 140) mostrou que este composto apresenta um perfil estrutural semelhante ao de EB-9 (p. 130), ou seja, um diterpeno caureno. Entretanto, apresentou dois sinais de dubletos referentes a hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  3,78 (*J*=7,5 Hz) e 3,55 (*J*=7,5 Hz).

Como esperado, o espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostrou deslocamentos químicos para vinte átomos de carbonos, sendo a principal diferença, em relação a EB-9, o aparecimento de um sinal correspondente a um carbono oximetilênico  $\delta_C$  83,2, em vez da carboxila. Em acordo com as informações apresentadas e na análise comparativa dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C ficou evidente que EB-10 se trata de um diterpeno contendo um heterociclo de cinco membros localizado em C-4/C-5.

No espectro HSQC (Figura 118, p. 142), as correlações dos sinais em  $\delta_H$  3,78 (d, *J*=7,6 Hz, H-18 $\beta$ ) e 3,55 (d, *J*=7,6 Hz, H-18 $\alpha$ ) com o carbono oximetínico em  $\delta_C$  83,2 (C-18) confirmou a proposta. Além disso, a presença do anel heterociclo foi corroborada pelo espectro HMBC (Fig. 119, p. 142), o qual mostrou correlação do sinal em  $\delta_H$  3,78 (*J*=7,6 Hz, H-18 $\beta$ ) com os sinais em  $\delta_C$  78,0 (C-3), 59,5 (C-5) e 14,4 (C-19), e do sinal em  $\delta_H$  3,55 (*J*=7,6 Hz, H-18 $\alpha$ ) com o sinal de carbono em  $\delta_C$  72,6 (C-6), reforçando a proposta.

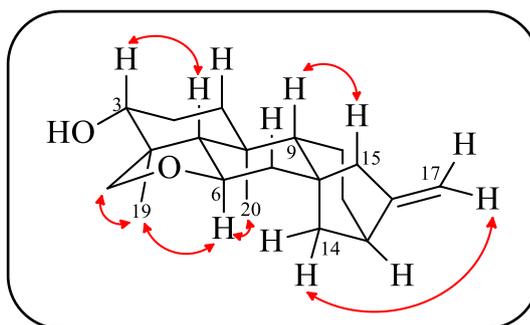
Além destas correlações, foi possível posicionar uma hidroxila em C-3 pelas correlações dos hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,12 (s, H-19) e metínico em  $\delta_H$  0,87 (m, H-5) com o sinal de carbono oxigenado em  $\delta_C$  78,0 (C-3), semelhante a **EB-9**.

**Figura 110** - Correlações a longa distância observadas no espectro de HMBC de **EB-10**.

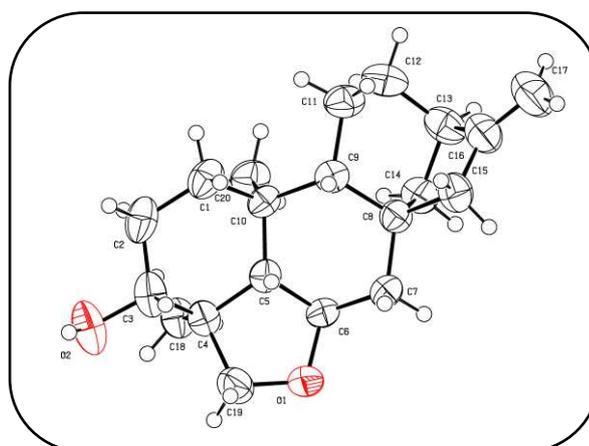


No espectro NOESY a interação espacial do hidrogênio H-3 com H-5 $\beta$  e H-1 $\beta$  indicou que o grupo hidroxila se encontrava *alfa*-orientada, enquanto as correlações de Me-20 e Me-19 com H-6 $\alpha$  indicaram a orientação *beta* para o anel heterocíclico. A estereoquímica relativa de **EB-10** foi confirmada por cristalografia de raio-X (Figura 112, p. 137).

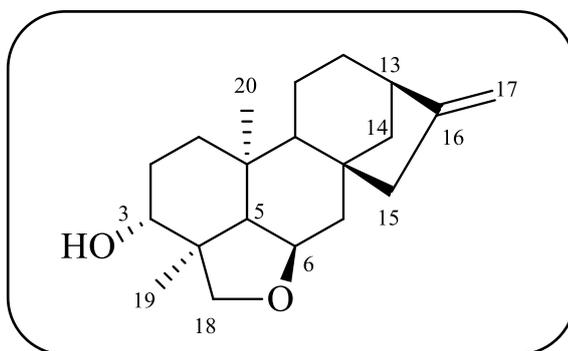
**Figura 111** - Correlações a longa distância observadas no espectro de NOESY de **EB-10**.



**Figura 112** – Desenho em ORTEP da estrutura cristalina de **EB-10**.



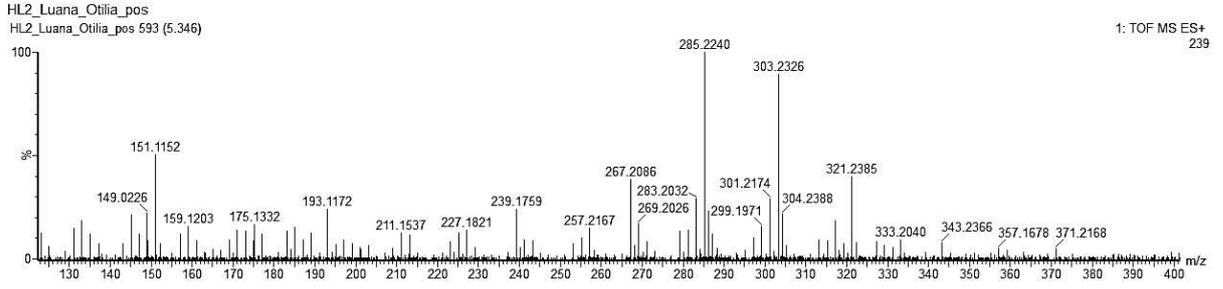
De acordo com a análise descrita, a estrutura para **EB-10** foi estabelecida como 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\alpha$ ,19 $\beta$ -epoxi-caur-16-eno (Figura 113, p. 138), um diterpeno do tipo caureno, ainda não registrado na literatura.

**Figura 113** - Estrutura de **EB-10**.

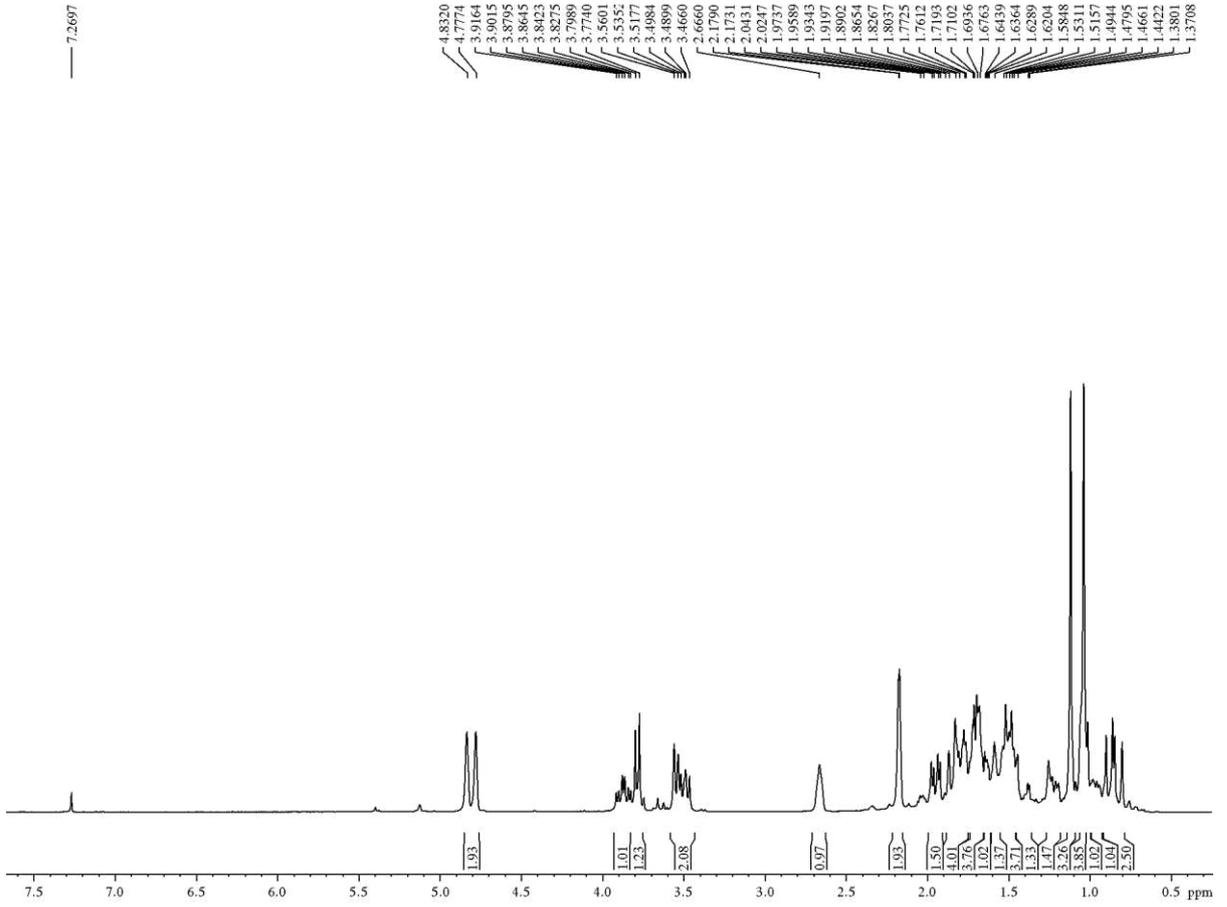
**Tabela 25** - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 x 75 MHz) de EB-10 e dados de RMN de EB-9.

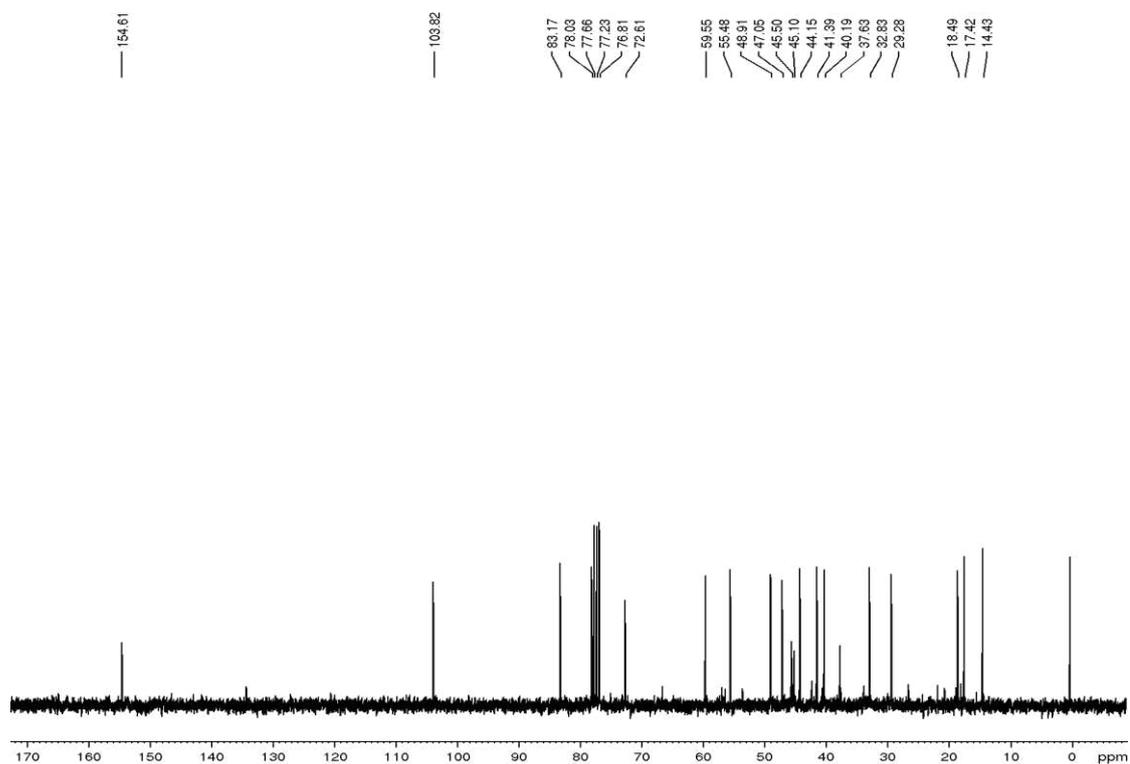
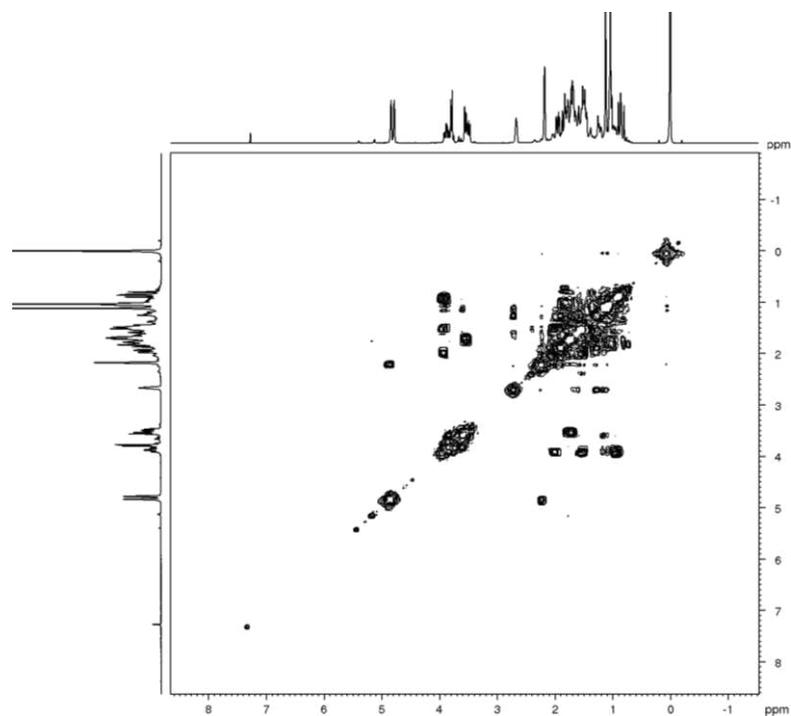
C	EB-10 ( $\text{CDCl}_3$ )		EB-9 ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	41,4	1,77 (m) 0,95 (td, $J=13,0, 4,4$ )	41,2	1,81 (m) 1,02 (td, $J=13,0, 4,4$ )
2	29,3	1,26 (m) 1,68 (m)	26,7	1,33 (m) 1,57 (m)
3	78,0	3,48 (dd, $J=10,8, 6,3$ )	73,3	3,85 (dd, $J=10,8, 6,3$ )
4	45,5	-	45,8	-
5	55,5	1,01 (m)	57,9	1,30 (m)
6	72,6	3,86 (td, $J=11,1, 4,4$ )	75,0	4,46 (td, $J=11,1, 4,4$ )
7	47,0	1,46 m 1,94 dd (11.1, 4.4)	39,8	1,88 (dd, $J=11,4, 1,9$ ) 1,90 (m)
8	45,1	-	45,9	-
9	59,9	0,87 (m)	54,9	1,18 (d, $J=7,9$ )
10	37,6	-	37,4	-
11	18,5	1,63 (m) 1,44 (m)	18,3	1,50 (m) 1,47 (m)
12	32,8	1,67 (m) 1,50 (m)	32,3	1,65 (m) 1,55 (m)
13	44,1	2,67 (s)	43,8	2,72 (s)
14	40,2	1,84 (d, $J=11, 7$ ) 1,23 (m)	44,6	2,07 (dd, $J=11,0, 7,3$ ) 1,65 (m)
15	48,9	2,18 (s) 2,17 (s)	48,5	2,24 (s) 2,24 (s)
16	154,6	-	153,4	-
17	103,8	a. 4,77 (sl) b. 4,83 (sl)	104,1	a. 4,81 (sl) b. 4,87 (sl)
18	83,2	3,55 (d, $J=7,5$ ) 3,78 (d, $J=7,5$ )	11,1	1,27 (s)
19	14,4	1,12 (s)	181,3	-
20	17,4	1,03 (s)	17,6	1,12 (s)

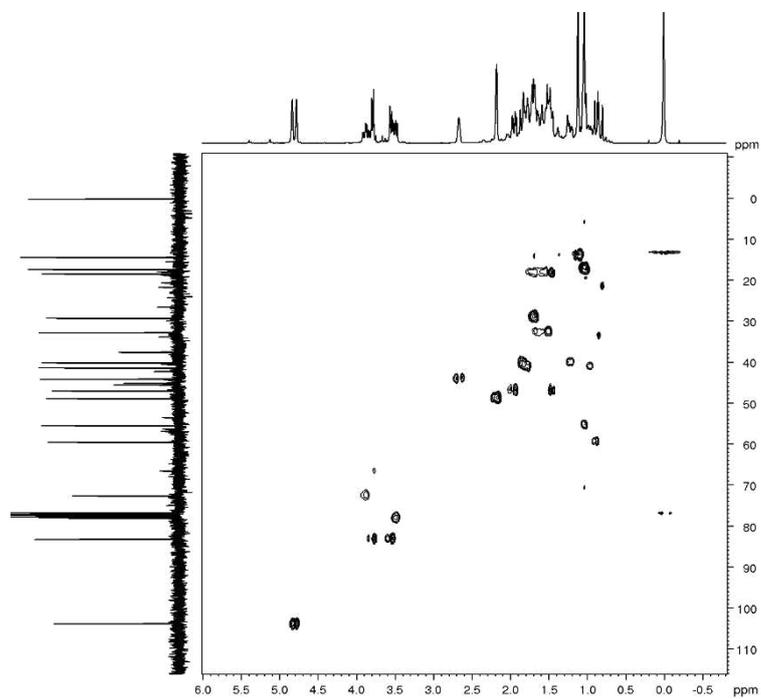
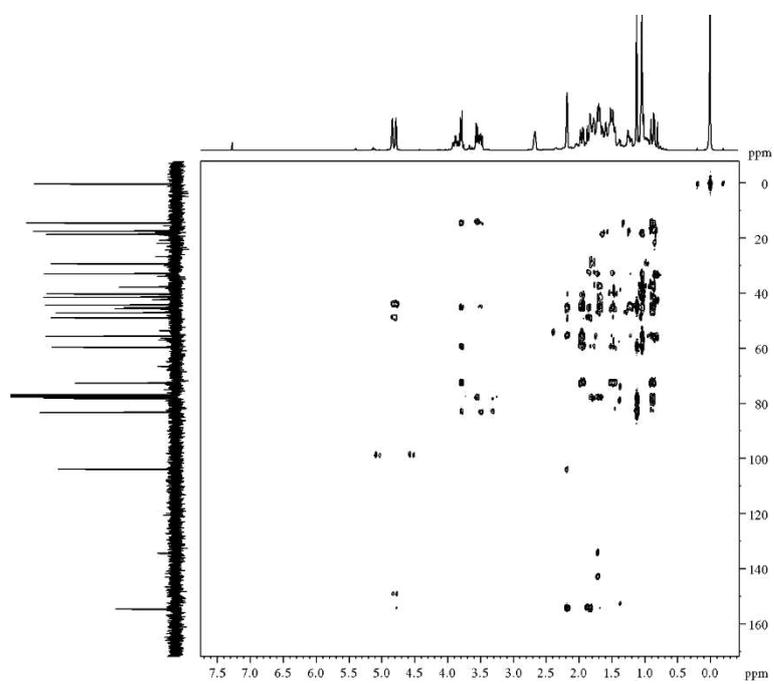
**Figura 114 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-10**



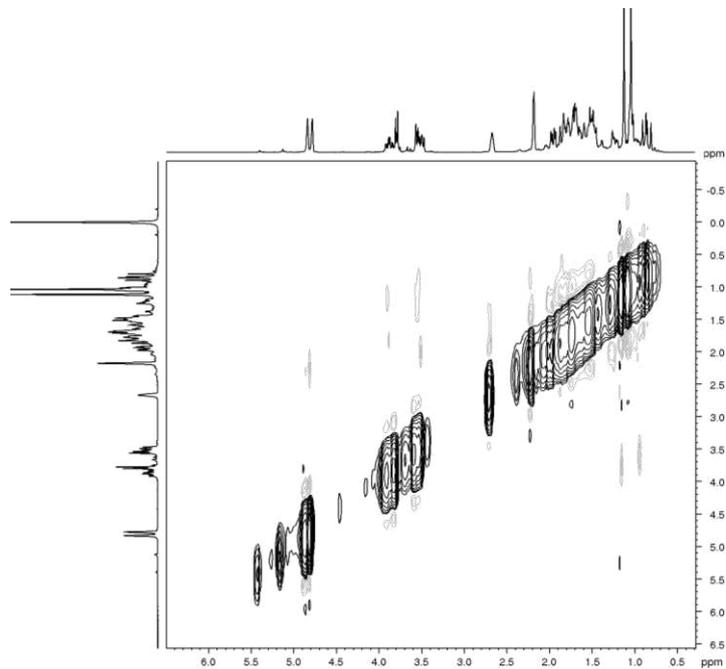
**Figura 115 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de EB-10.**



**Figura 116** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-10****Figura 117** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-10**.

**Figura 118** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-10**.**Figura 119** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-10**.

**Figura 120** - Espectro de RMN ROESY (300 x 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-10**.



### 6.1.11 Determinação estrutural de EB-11

O tratamento cromatográfico de EHEBL-E, incluindo purificação por CLAE, resultou em uma resina incolor (11,0 mg) (Item 5.5.2.5, p. 60), com rotação  $[\alpha]_D^{24} +70.3^\circ$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ), o qual foi denominado **EB-11**.

O espectro de massas de alta resolução forneceu o pico da molécula protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  303,2311 (calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$   $m/z$  303,2319), permitindo propor a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ , com um IDH igual a seis.

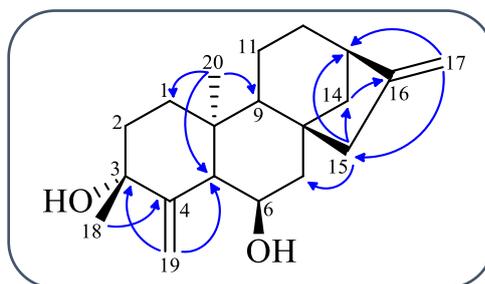
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 123, p. 143) mostrou dois sinais simpleto referentes a grupos metilas em  $\delta_H$  1,38 (s, H-18) e 0,87 (s, H-20), sinais para dois pares de hidrogênios vinílicos exo-metilênicos em  $\delta_H$  5,12 (s, H-19 $\beta$ ), 4,84 (s, H-19 $\alpha$ /H-17 $\beta$ ) e 4,80 (s, H-17 $\alpha$ ), bem como um sinal de hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  3,94 (td,  $J=10,5$ , 4,2 Hz, H-6), além de outros sinais de hidrogênios de carbonos metilênicos e metínicos característicos de um composto de natureza diterpênica.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 126, p. 148) mostrou sinais correspondentes a 20 átomos de carbono, que foram definidos pelo espectro DEPT 135° em dois carbonos metílicos, nove metilênicos e quatro carbonos metínicos e, por subtração, cinco carbonos não hidrogenados. Diferentemente de EB-10, observou-se para este composto, sinais para uma segunda ligação dupla exocíclica em  $\delta_C$  104,6 (C-19) e 152,7 (C-4).

No espectro COSY (Figura 127, p 148), foi evidenciado o acoplamento alílico do sinal  $\delta_H$  1,90 (H-5) com os hidrogênios vinílicos em  $\delta_H$  5,12 (H-19 $\beta$ ), 4,84 (H-19 $\alpha$ ) e com o sinal em  $\delta_H$  3,94 (H-6), indicando a presença de uma dupla ligação próxima a um carbono contendo uma hidroxila em C-4 ( $\delta_C$  152,7). Adicionalmente, foi observado o acoplamento alílico entre os hidrogênios em  $\delta_H$  2,18 (H-15) com os hidrogênios em  $\delta_H$  4,84 (H-17 $\beta$ ) e 4,80 (H-17 $\alpha$ ), confirmando a presença de uma dupla ligação exocíclica em C-16 ( $\delta_C$  154,0), como observado em EB-9 e EB-10.

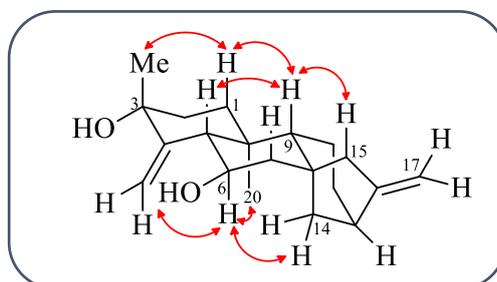
A análise do espectro HMBC (Figura 129, p 149) confirmou que uma dupla ligação exocíclica encontrava-se em C-4 através das correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  5,12 (s, H-19 $\beta$ ), 4,84 (s, H-19 $\alpha$ ) com os sinais em  $\delta_C$  74,0 (C-3) e 1,90 (C-5). Além dessa, observou-se também a correlação dos prótons da metila em  $\delta_H$  1,38 (H-18) com o carbono em  $\delta_C$  152,7 (C-4), indicando a posição da metila em C-3 ( $\delta_C$  74,0), e dos prótons metílicos em C-20 ( $\delta_H$  0,87) com os sinais em  $\delta_C$  38,7 (C-1), 52,8 (C-9) e 57,2 (C-5).

**Figura 121** - Estrutura mostrando as principais correlações observadas no espectro HMBC de **EB-11**.



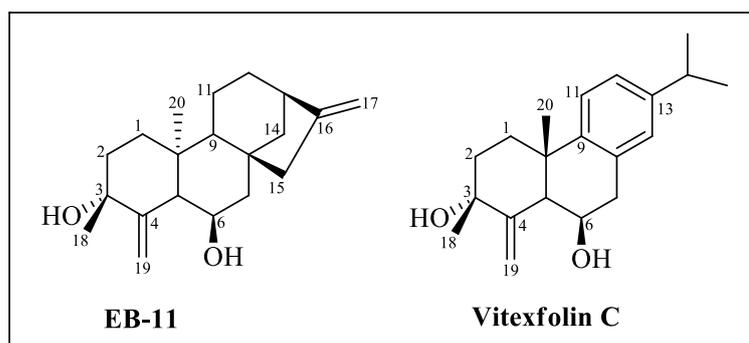
A estereoquímica relativa de EB-11 foi deduzida através da análise do espectro NOESY (Figura 130, p 150), onde foram observados os acoplamentos dipolares do hidrogênio em  $\delta_H$  1,80 (H-1 $\beta$ ) com os hidrogênios *beta*-orientados em  $\delta_H$  1,38 (H-18) e 1,70 (H-11), indicando a *alfa* orientação de HO-3. De forma semelhante, a hidroxila ligada ao C-6 foi *beta* orientada devido às correlações dos hidrogênios metílicos *alfa* orientados em  $\delta_H$  0,77 (H-20) com os hidrogênios em  $\delta_H$  3,94 (H-6 $\alpha$ ) e 1,95 (H-14 $\alpha$ ). Além destas, observou-se também correlações a longa distância entre o sinal  $\delta_H$  2,18 (H-15) com os sinais *beta* orientados em  $\delta_H$  1,90 (H-5), 1,70 (H-7) e 1,26 (H-9).

**Figura 122** - Estrutura mostrando as correlações observadas no espectro NOESY.



Adicionalmente, realizou-se a comparação dos dados de ressonância (Tabela 11) do composto EB-11 com o composto vitexfolin C (ONO *et al.*, 2002), um diterpeno do tipo abietano com estrutura semelhante à EB-11 nos anéis A e B. O composto EB-11 foi definido como cau-4,16-dien-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di-hidroxo, relatado pela primeira vez na literatura.

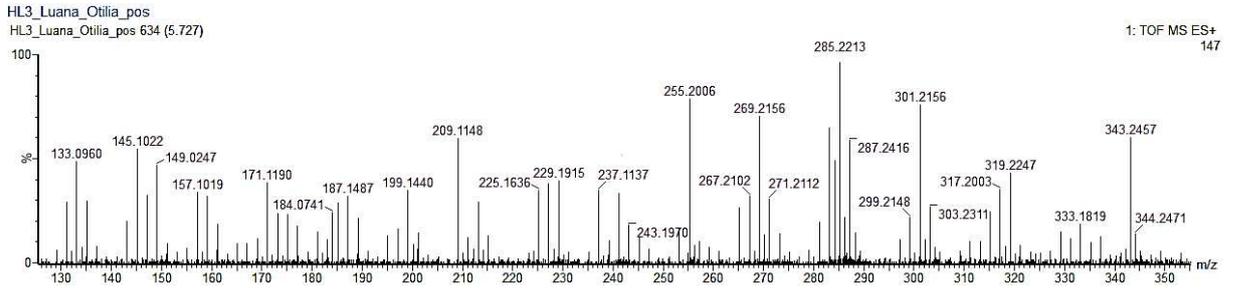
**Figura 123** - Estrutura de EB-11 e de vitexfolin C.



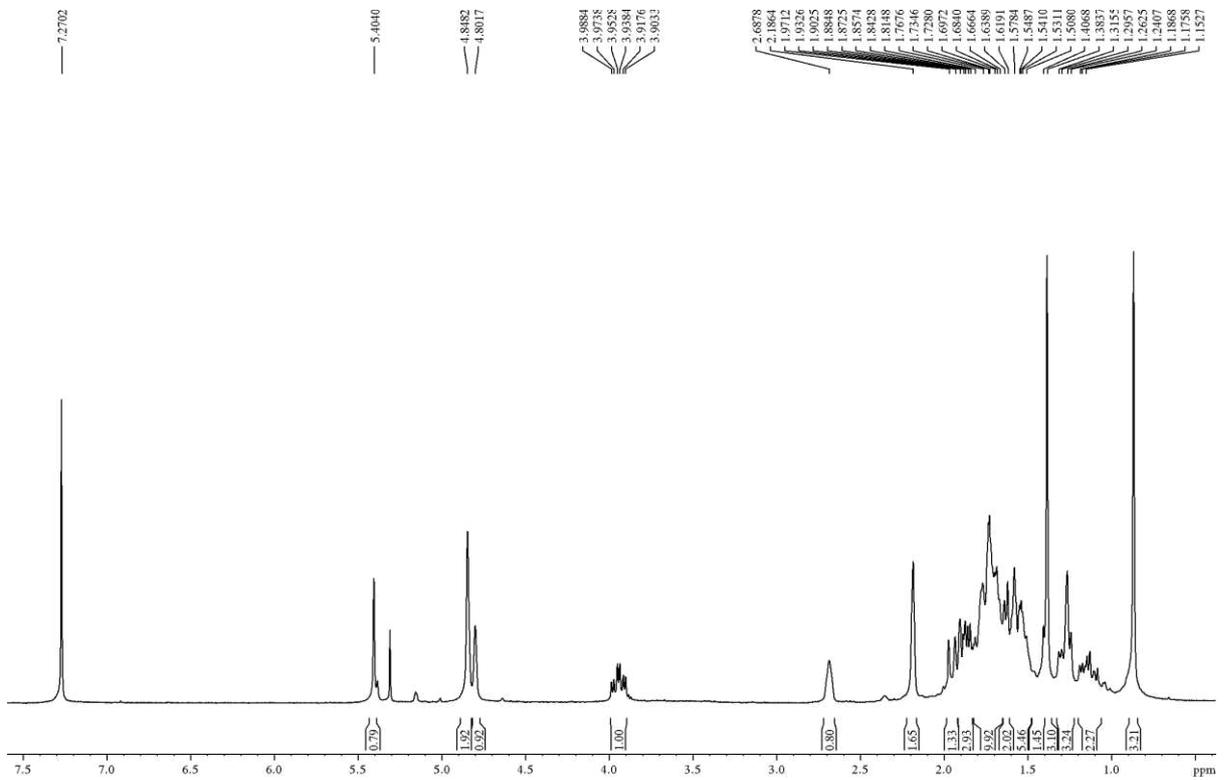
**Tabela 26** - Dados espectrais de EB-11, obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , comparando-os com aqueles encontrados para o Vitexfolin C (ONO et al., 2002).

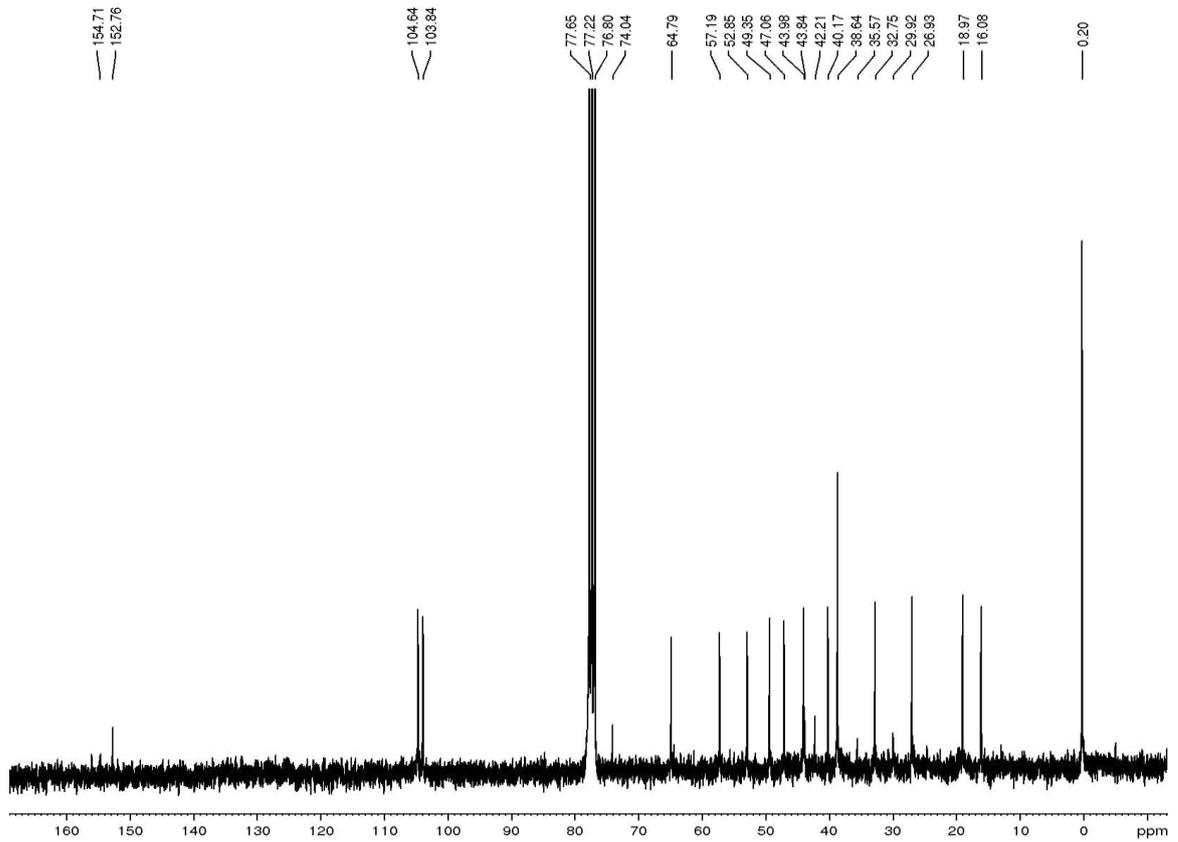
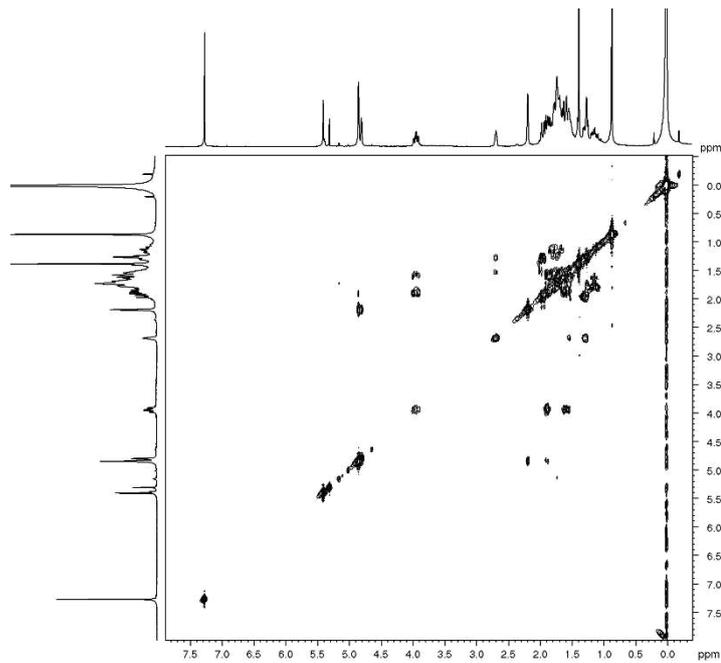
C	EB-11 ( $\text{CDCl}_3$ )		Vitexfolin C	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	38,7	1,80 (m)	34,0	2,06 (ddd, 14,0,4,5, 2,5)
		1,14 (td, 14,8, 4,9)		1,95 (ddd, 14,0, 14,0, 4,5)
2	29,9	1,26 (m)	37,0	1,84 (ddd, 14,0, 4,5, 2,5)
				1,75 (ddd, 14,0, 14,0 4,5)
3	74,0	-	71,3	-
4	152,7	-	154,0	-
5	57,2	1,90 (m)	42,7	2,84 (m)
6	64,7	3,94 (td, 10,5, 4,2)	21,8	1,77 (m)
7	47,2	1,84 (m)	30,2	2,92 (dd, 10,0, 2,5)
		1,60 (m)		2,84 (m)
8	43,8	-	134,7	-
9	52,8	1,26 (m)	144,3	-
10	42,2	-	38,9	-
11	19,0	1,77 (m)	125,4	7,22 (d, 8,0)
		1,54 (m)		
12	32,7	1,55 (m)	123,9	7,01 (dd, 8,0, 2,0)
13	43,9	2,68 (s)	145,8	-
14	40,2	1,95 (d, 11,6)	127,0	6,93 (d, 2,0)
		1,30 (m)		
15	49,5	2,18 (s)	33,5	2,84 (m)
16	154,0	-	24,0	1,23 (d, 7,0)
17	103,8	a. 4,80(sl)	24,0	1,23 (d, 7,0)
		b. 4,84 (sl)		
18	26,9	1,38 (s)	27,9	1,45 (s)
19	104,6	a. 4,84 (sl)	106,9	4,76 (s)
		b. 5,12 (sl)		5,12 (s)
20	16,1	0,87 (s)	21,6	0,95 (s)

**Figura 124** - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo **EB-11**.

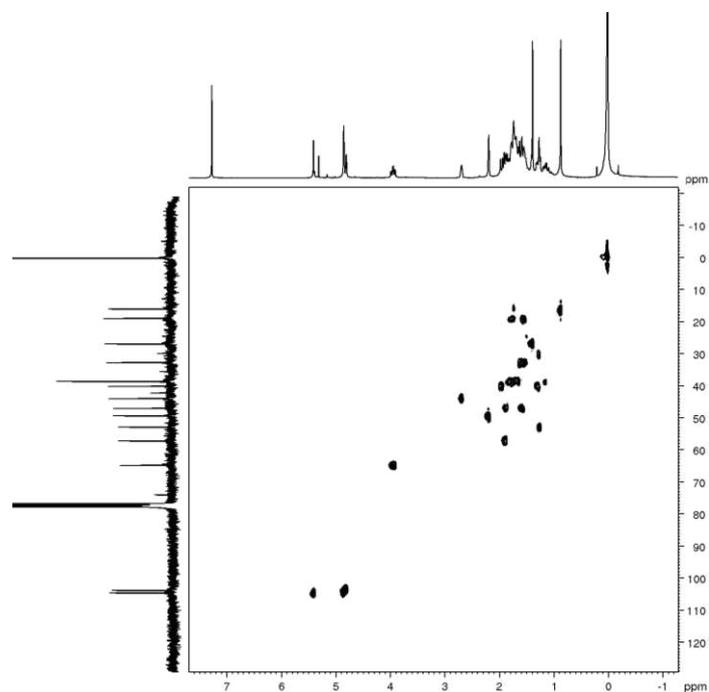


**Figura 125** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-11**.

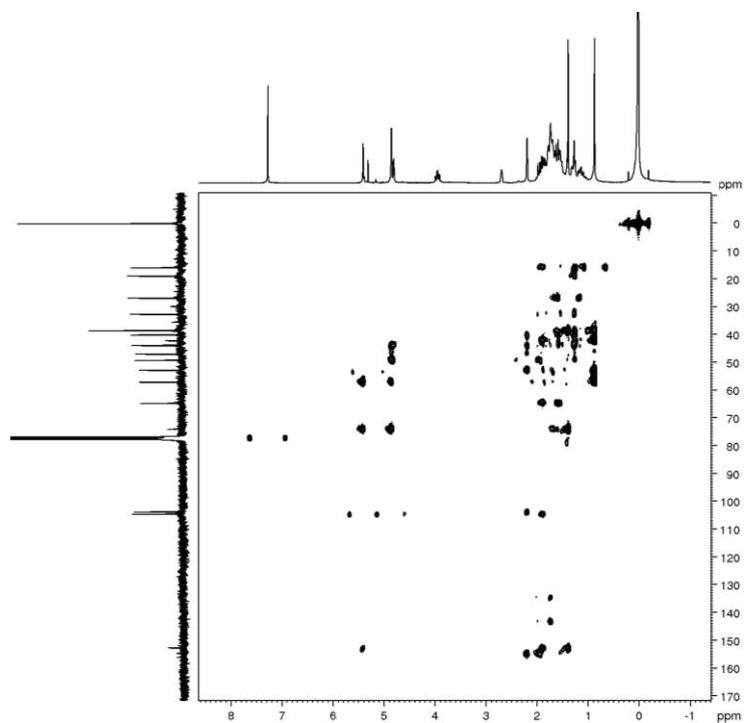


**Figura 126** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-11**.**Figura 127** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-11**

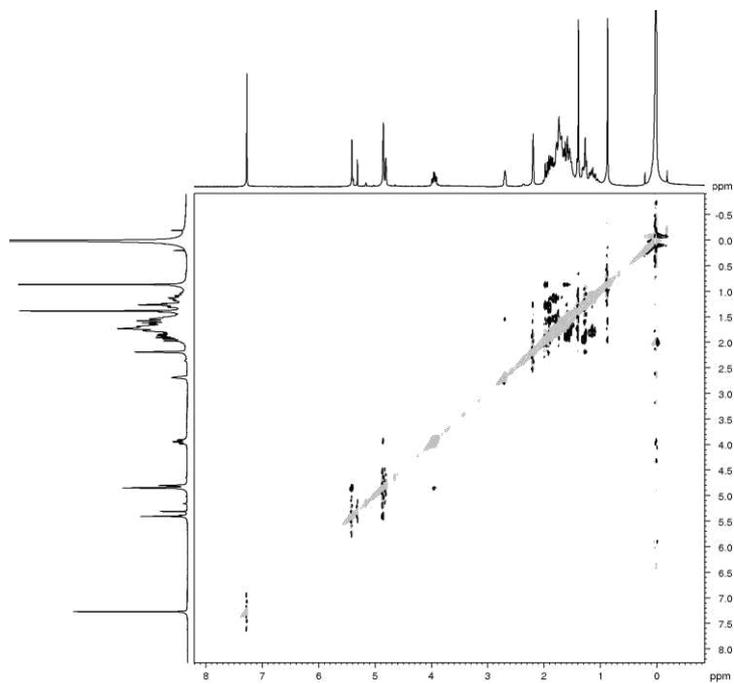
**Figura 128** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-11**.



**Figura 129** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-11**.



**Figura 130** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-11**.



### 6.1.12 Determinação estrutural de EB-12

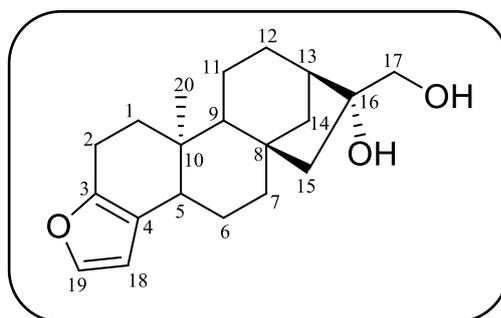
Após tratamento cromatográfico de EHEBL-E, incluindo purificação por CLAE, obteve-se um sólido branco amorfo (8,0 mg) (Item 5.5.2.5, p. 60), com rotação  $[\alpha]_D^{23} + 52.8^\circ$  (c 0,5,  $\text{CHCl}_3$ ), e P.F.  $164^\circ$ , o qual foi denominado EB-12.

O HRESIMS forneceu o pico da molécula protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  303,2311 (calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$   $m/z$  303,2319), permitindo propor a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ , indicando um IDH igual a sete.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 136), mostrou sinais dubleto em  $\delta_H$  7,13 (d,  $J=1,10$  Hz, H-18) e 7,09 (d,  $J=1,10$ , H-19), característicos de anel furânico (SILVERSTEIN, 2006); dois dubletos em  $\delta_H$  3,84 (d,  $J=10,9$  Hz, H-17 $\beta$ ) e 3,72 (d,  $J=10,9$  Hz, H-17 $\alpha$ ), sugerindo a presença de hidrogênios metilênicos hidroxilados, além da presença dos sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2,60 (m, H-2), 1,82 (dd,  $J=12,7, 2,7$ , H-6), 1,67 (m, H-7) e metínicos em  $\delta_H$  2,23 (d,  $J=12,0$  Hz, H-5), 1,18 (d,  $J=7,2$ , H-9) e 2,07 (m, H-13), similares aos do composto cafestol (Figura 131), um diterpeno de esqueleto *ent*-caurano biogeneticamente modificado pela migração da metila do carbono 18 (ou 19) formando um anel furano, previamente isolado por Novaes *et al.*, 2020 (Tabela 28).

De acordo com o estudo realizado por Novaes *et al.*, 2020, o cafestol possui atividade hipercolesterolêmica, hepatoprotetora e antioxidante, e esse fato sugere a possibilidade de testagem do composto EB-12 para outras atividades além da atividade citotóxica já evidenciada neste trabalho.

**Figura 131** - Estrutura do cafestol.

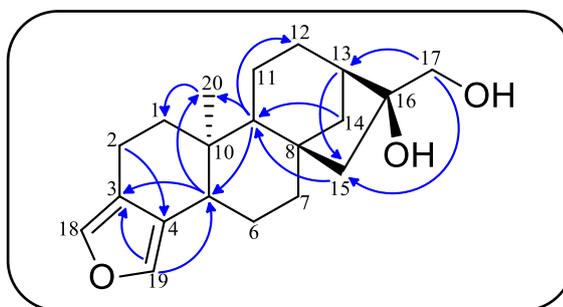


O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 137), mostrou vinte sinais de carbono, com deslocamentos químicos próximos ao do cafestol, sendo as principais diferenças para os sinais de carbono em  $\delta_c$  16,4, 138,0, 136,4 e 126,7, referentes à porção furânica. A partir desses sinais, foi possível indicar que, diferentemente do anel furânico no cafestol, onde o carbono oxigenado do furano se encontra diretamente ligado ao núcleo caurano,

a localização esteja em C-3 e C-4 em EB-12, da porção furano que se encontra ligado através dos carbonos oxigenados.

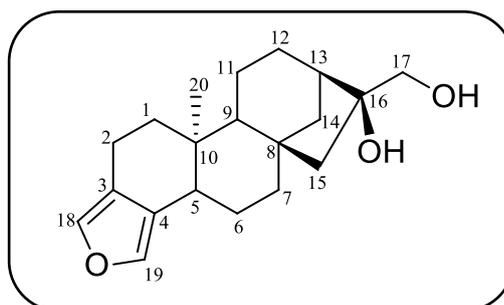
O aparecimento dos carbonos oxigenados em  $\delta_c$  82,2 (C-16) e 66,5 (C-17) em substituição aos sinais correspondentes a ligação dupla vinílica, indicaram a hidroxilação daqueles carbonos. A confirmação da posição do anel furano em C-3 e C-4 se deu a partir das correlações no espectro HMBC (Fig. 140, p. 157), bem como do sinal de hidrogênio metilênico em  $\delta_H$  2,60 (m, H-2) com os carbonos vinila em  $\delta_c$  119,9 (C-4) e 138,0 (C-18), além das correlações do hidrogênio metínico em  $\delta_H$  2,23 (d,  $J=12,0$ , H-5) com os sinais em  $\delta_c$  126,7 (C-3), 38,4 (C-10), 136,4 (C-19) e 13,8 (C-20) (Figura 132).

**Figura 132** - Algumas correlações importantes de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de HMBC.



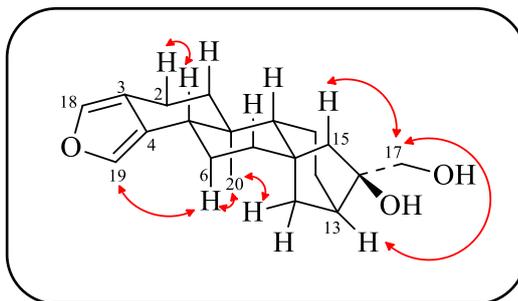
Então, EB-12 foi determinado como sendo um diterpeno denominado (3,4,18,19, c)-furan-16,17-dihidroxi-cauranol (Figura 133), inédito na literatura.

**Figura 133** - Estrutura de EB-12.



A configuração relativa de EB-12 foi determinada a partir do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY, cuja correlação a longa distância entre o sinal alfa posicionado em  $\delta_H$  1,82 (dd,  $J=12,7$ , 2,7 Hz, H-6) com os sinais em  $\delta_H$  0,86 (s, H-20 $\alpha$ ) e 7,09 (d,  $J=1,1$  Hz, H-19). As correlações NOESY de (3,4,18,19, c)-furan-16,17-di-hidroxi-cauranol.

**Figura 134** - Algumas correlações importantes de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de NOESY.



**Tabela 27** - Dados espectrais de EB-12, obtidos em CDCl<sub>3</sub>, comparando-os com aqueles encontrados para o cafestol (Novaes *et al.*, 2020).

C	EB-12 (CDCl <sub>3</sub> )		Cafestol (CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )
1	36,4	1,99 (m) 1,14 (m)	35,8	2,05 (m) 1,25 (m)
2	16,4	2,58 (m) 2,67 (m)	20,8	2,63 (dd, $J=5,8, 2,7$ )
3	126,7	-	148,8	-
4	119,9	-	120,2	-
5	52,2	2,23 (d, $J=12,0$ )	44,3	2,28 (dq, $J=12,6, 2,7$ )
6	23,1	1,82 (dd, $J=12,7, 2,7$ )	23,2	1,82 (ddd, $J=12,9, 6,2, 3,2$ ) 1,65 (m)
7	40,5	1,66 (m) 1,69 (m)	41,0	1,65 (m) 1,74 (m)
8	44,8	-	44,8	-
9	45,5	1,18 (d, $J=7,2$ )	52,2	1,19 (d, $J=7,7$ )
10	38,4	-	38,7	-
11	19,3	1,74 (m) 1,59(m)	19,1	1,74 (m) 1,50 (m)
12	26,1	1,69 (m) 1,50 (m)	26,2	1,74(m) 1,50 (m)
13	44,8	2,07 (s)	45,5	2,06 (m)
14	45,5	2,07 (m) 1,67 (m)	38,3	2,06 (m) 1,70 (m)
15	53,5	1,67 (m) 1,52 (d, $J=14,6$ )	53,4	1,74 (m) 1,50 (m)
16	82,2	5,1 (s)	82,1	-
17	66,5	3,84 (d, $J=10,9$ ) 3,72 (d, $J=10,9$ )	66,4	3,83 (d, $J=11,1$ ) 3,71 (d, $J=11,1$ )
18	136,4	7,13 (d, $J=1,2$ )	108,4	6,22 (d, $J=1,8$ )
19	138,0	7,09 (d, $J=1,2$ )	140,7	7,26 (d, $J=1,8$ )
20	13,8	0,86 (s)	13,5	0,83 (s)

Figura 135 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-12.

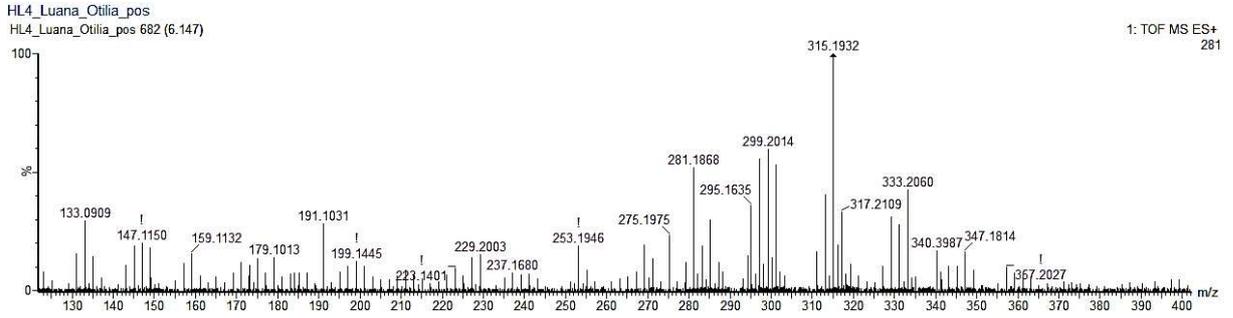
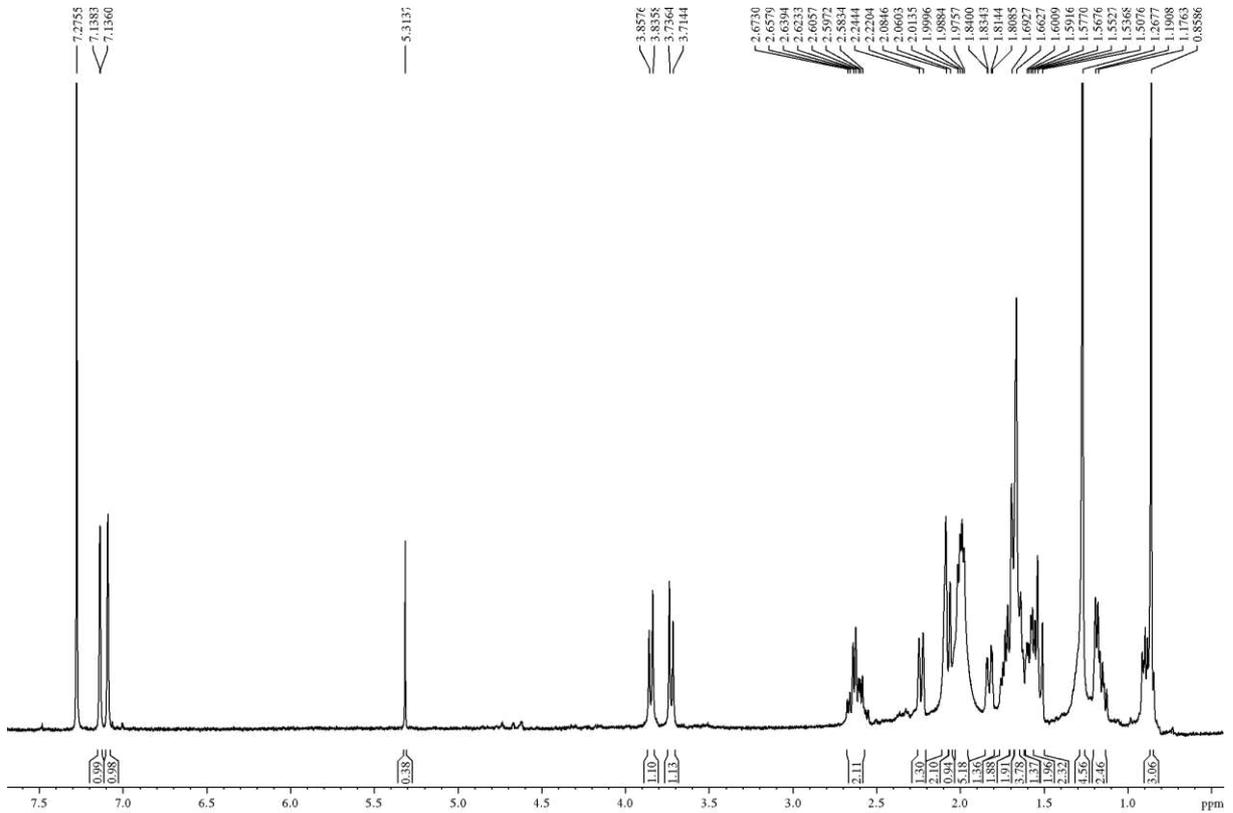
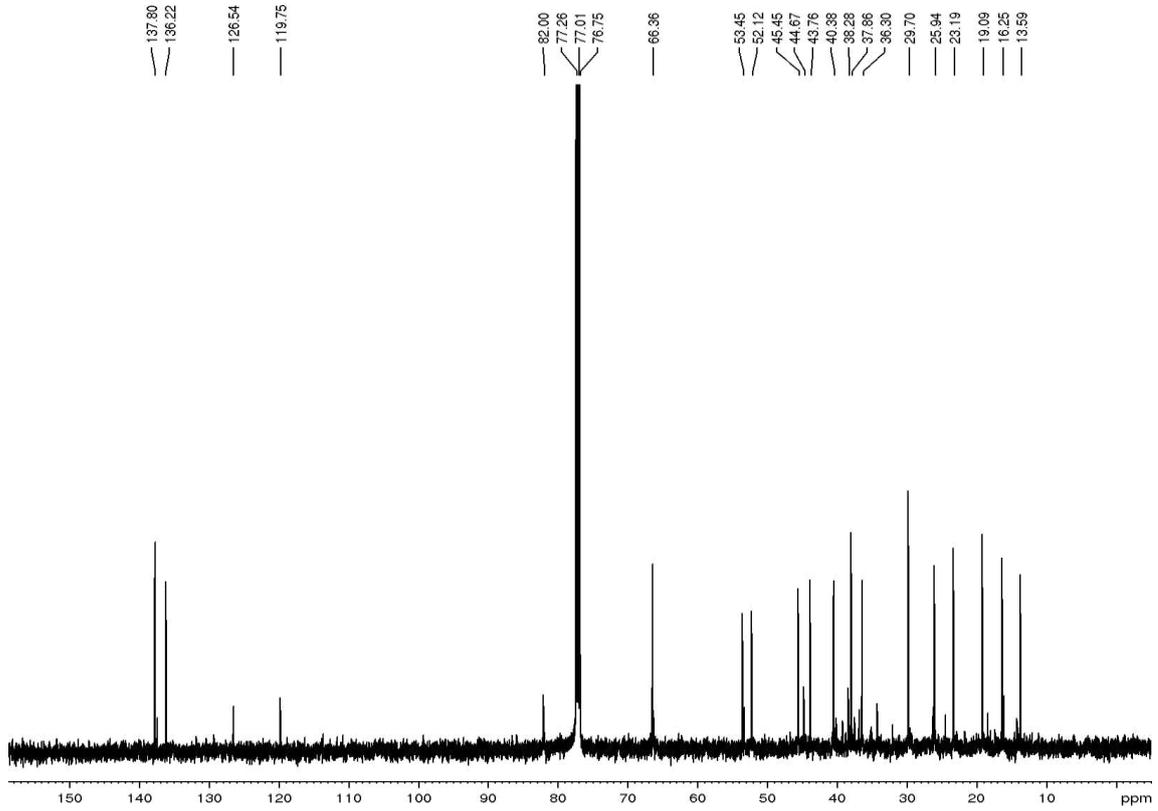


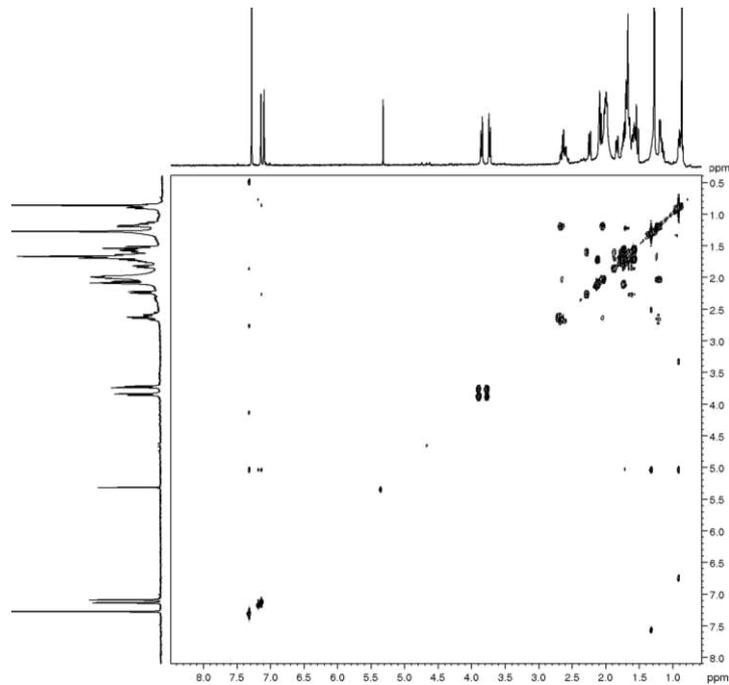
Figura 136 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de EB-12.

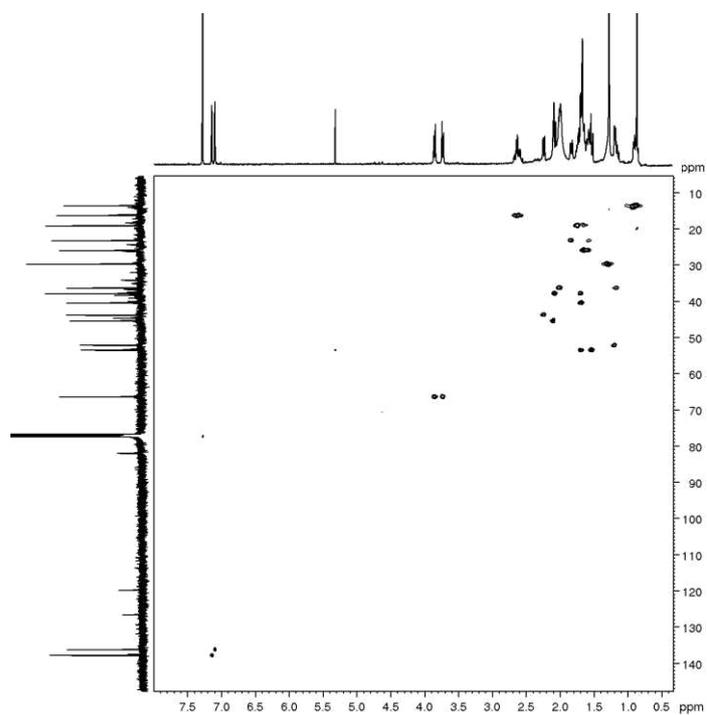
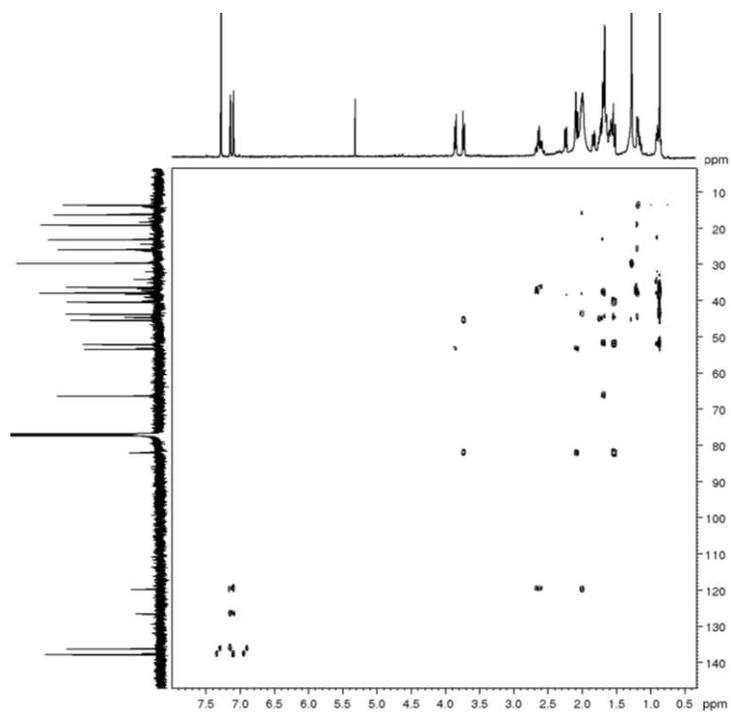


**Figura 137** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-12**.

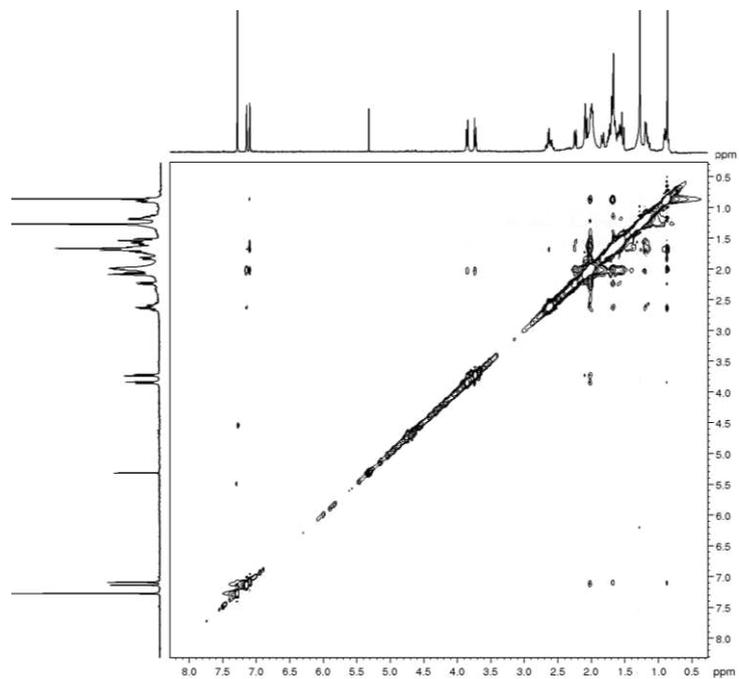


**Figura 138** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-12**.



**Figura 139** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-12**.**Figura 140** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-12**.

**Figura 141** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-12**.



### 6.1.13 Determinação estrutural de EB-13

Da fração EHEBL-A (Item 5.5.2.1, p. 56), obteve-se um sólido branco (14,0 mg), com rotação  $[\alpha]_D^{23} - 85,8^\circ$  ( $c$  0,5,  $\text{CHCl}_3$ ), o qual foi denominado **EB-13**.

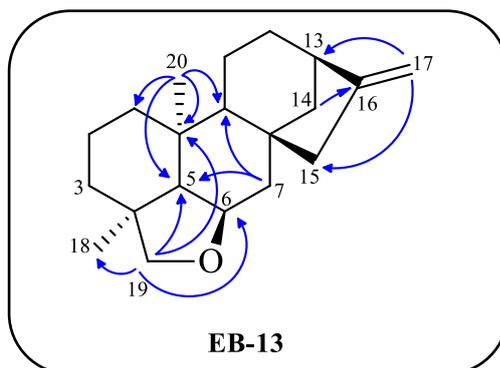
A fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$  para EB-13 foi proposta através do HRESIMS (Figura 145, p. 162), o qual forneceu o pico referente a molécula protonada em  $m/z$  287,2381  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_1$   $m/z$  287,2375), com cálculo de IDH igual a 6.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 146, p. 162) revelou a presença de dois sinais de hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,10 (s, Me-19) e 1,02 (s, Me-20), um par de dubletos, correspondentes a hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  3,61 ( $J=7,1$  Hz, H-18 $\beta$ ) e 3,38 ( $J=7,1$  Hz, H-18 $\alpha$ ) e dois singletos largos em  $\delta_H$  4,82 (H-17 $\beta$ ) e 4,77 (H-17 $\alpha$ ), correspondentes a dupla ligação exometilênica. Além disso, sinais na faixa de 0,76 a 1,74, caracterizam EB-13 como um diterpeno do tipo caureno, similar ao composto EB-10 (Figura 113, p. 138), diferenciando-os apenas pela ausência do grupo hidroxila em C-3 no composto EB-13.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] mostrou vinte sinais (Figura 147, p. 163) e a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  foi possível observar todos os graus de hidrogenação dos átomos de carbonos. Com base no espectro HSQC (Figura 147, p. 164) foi possível correlacionar todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos. A comparação dos três espectros mencionados acima, evidenciou, por consequência, a presença de quatro carbonos não hidrogenados, dos quais um corresponde a um carbono vinílico em  $\delta_C$  154,9 (C-16), de dupla ligação, comum em diterpenos do tipo caureno. A interpretação destes dados corroborou com a proposta de que EB-13 se trate de um diterpeno carregando em sua estrutura um heterociclo.

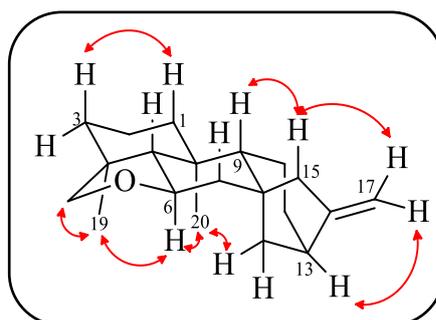
No espectro HMBC [500 x 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 148, p. 164), foram observadas as correlações à longa distância entre os hidrogênios em  $\delta_H$  3,38 (d,  $J=7,1$  Hz, H-19 $\beta$ ) e 3,61 (d,  $J=7,1$  Hz, H-19 $\alpha$ ) com os carbonos em  $\delta_C$  72,7 (C-6), 61,1 (C-5), 39,9 (C-10) e 19,6 (C-18), sugerindo a posição do tetrahydrofurano em C-4 e C-6, conforme Figura 142. As correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  4,82 (s, H-17 $\beta$ ) e 4,77 (s, H-17 $\alpha$ ) com os carbonos em  $\delta_C$  49,1 (C-15) e 44,2 (C-13), confirmaram a possível presença da dupla exocíclica entre C-13 e C-15. Outras correlações que confirmam a estrutura proposta se encontra na (Figura 142, p. 162).

**Figura 142** - Algumas correlações importantes de HMBC.



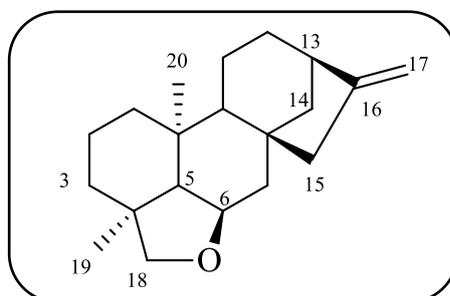
A estereoquímica relativa de EB-13 foi estabelecida através da análise do espectro NOESY (Figura 151, p. 165), onde foram observados os acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em  $\delta_H$  3,80 (H-6) com os em  $\delta_H$  1,10 (H-18) e 1,02 (H-20), indicando a posição em  $\beta$  para o anel heterociclo.

**Figura 143** - Algumas correlações importantes de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de NOESY.



Com base na análise dos espectros de RMN, o composto EB-13 foi caracterizado como 6 $\beta$ ,18 $\beta$ -epoxi-caur-16-eno (Figura 142), inédito na literatura.

**Figura 144** - Estrutura de EB-13.



**Tabela 28** - Dados espectrais de EB-13, obtidos em CDCl<sub>3</sub>, comparando-os com aqueles encontrados para EB-10.

C	EB-13 (CDCl <sub>3</sub> )		EB-10 (CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )
1	41,3	1,74 (m) 0,76 (m)	41,4	1,77 (m) 0,95 (td, $J=13,0, 4,4$ )
2	19,5	1,59 (m) 1,70 (m)	29,3	1,26 (m) 1,68 (m)
3	36,2	1,68 (m) 1,13 (m)	78,0	3,48 (dd, $J=10,8, 6,3$ )
4	38,2	-	45,5	-
5	61,1	0,95 (d, $J=11,6$ )	59,9	0,87 (m)
6	72,7	3,80 (td, $J=11,1, 4,3$ )	72,6	3,86 (td, $J=11,1, 4,4$ )
7	47,2	1,93 (dd, $J=12,0, 4,0$ ) 1,50 (m)	40,2	1,84 (d, $J=11,7$ ) 1,23 (m)
8	45,4	-	45,1	-
9	55,8	1,07 (d, $J=8,0$ )	55,5	1,01 (m)
10	39,9	-	37,6	-
11	18,2	1,68 (m) 1,47 (m)	18,5	1,63 (m) 1,44 (m)
12	32,9	1,66 (m) 1,50 (m)	32,8	1,67 (m) 1,50 (m)
13	44,2	2,65 (s)	44,1	2,67 (s)
14	40,2	1,86 (d, $J=11,4$ ) 1,20 (dd, $J=11,0, 4,3$ )	47,0	1,94 (dd, $J=11,0, 7,1$ ) 1,46 (m)
15	49,1	2,16 (d, $J=13,0$ ) 2,16 (d, $J=13,0$ )	48,9	2,17 (s) 2,17 (s)
16	154,9	-	154,6	-
17	103,6	a. 4,77 (sl) b. 4,82 (sl)	103,8	a. 4,77 (sl) b. 4,83 (sl)
18	83,8	3,38 (d, $J=7,1$ ) 3,61 (d, $J=7,1$ )	14,4	1,12 (s)
19	19,6	1,02 (s)	83,2	3,55 (d, $J=7,5$ ) 3,78(d, $J=7,5$ )
20	17,2	1,10 (s)	17,4	1,12 (s)

Figura 145 - Espectro de massa de alta resolução no modo positivo EB-13.

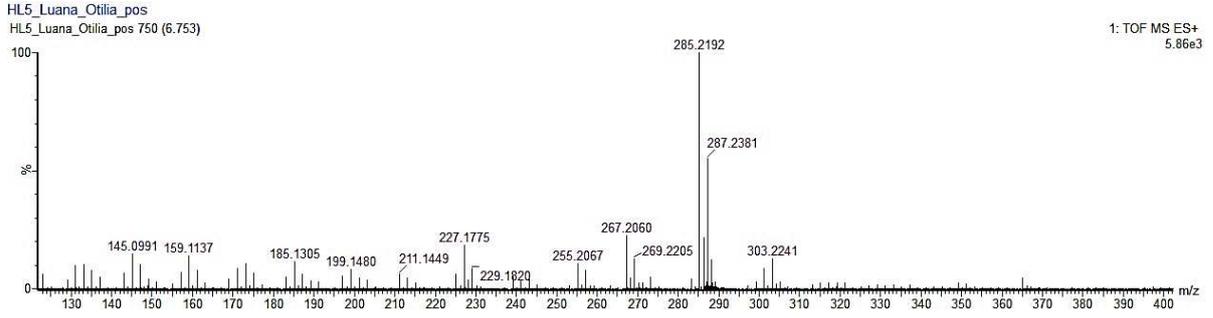
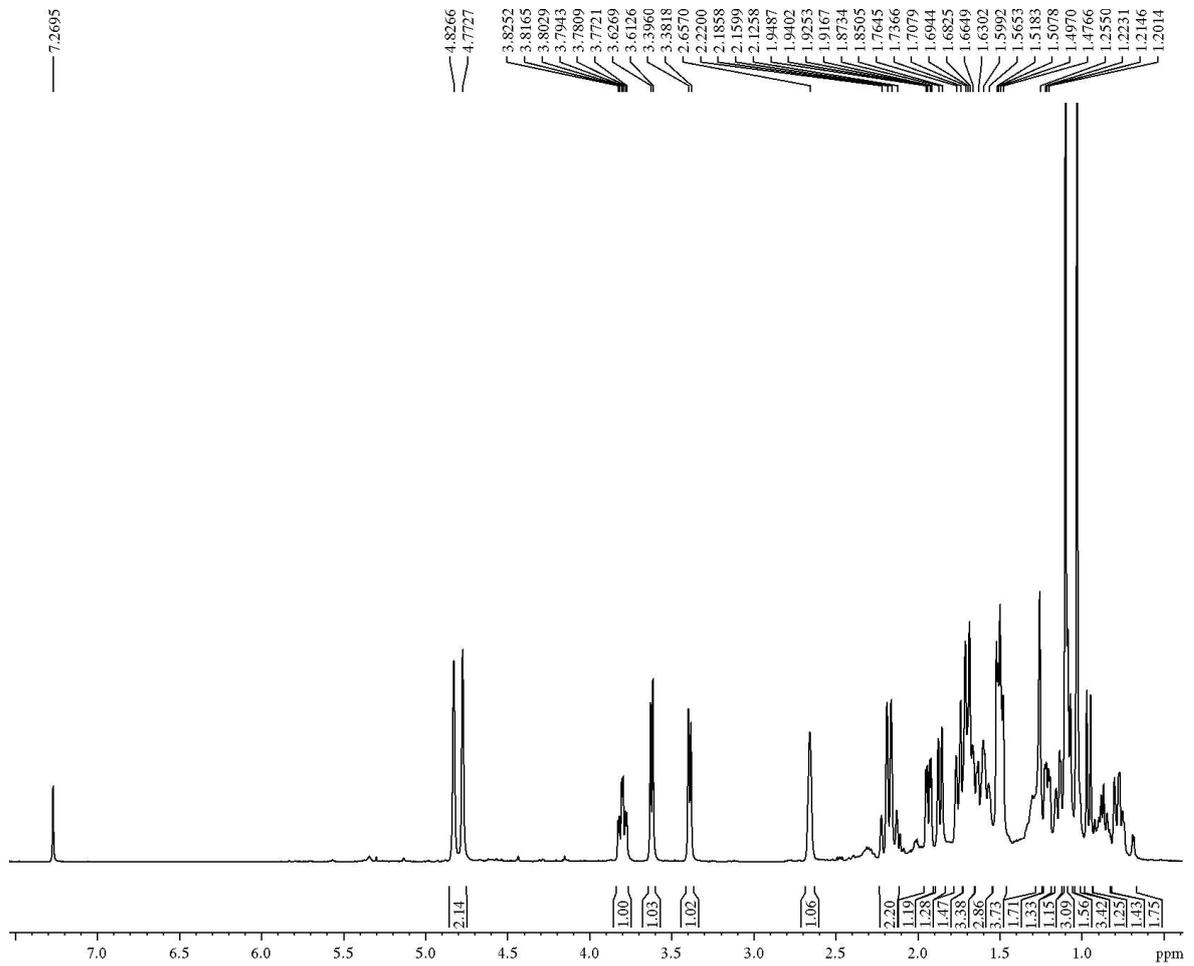
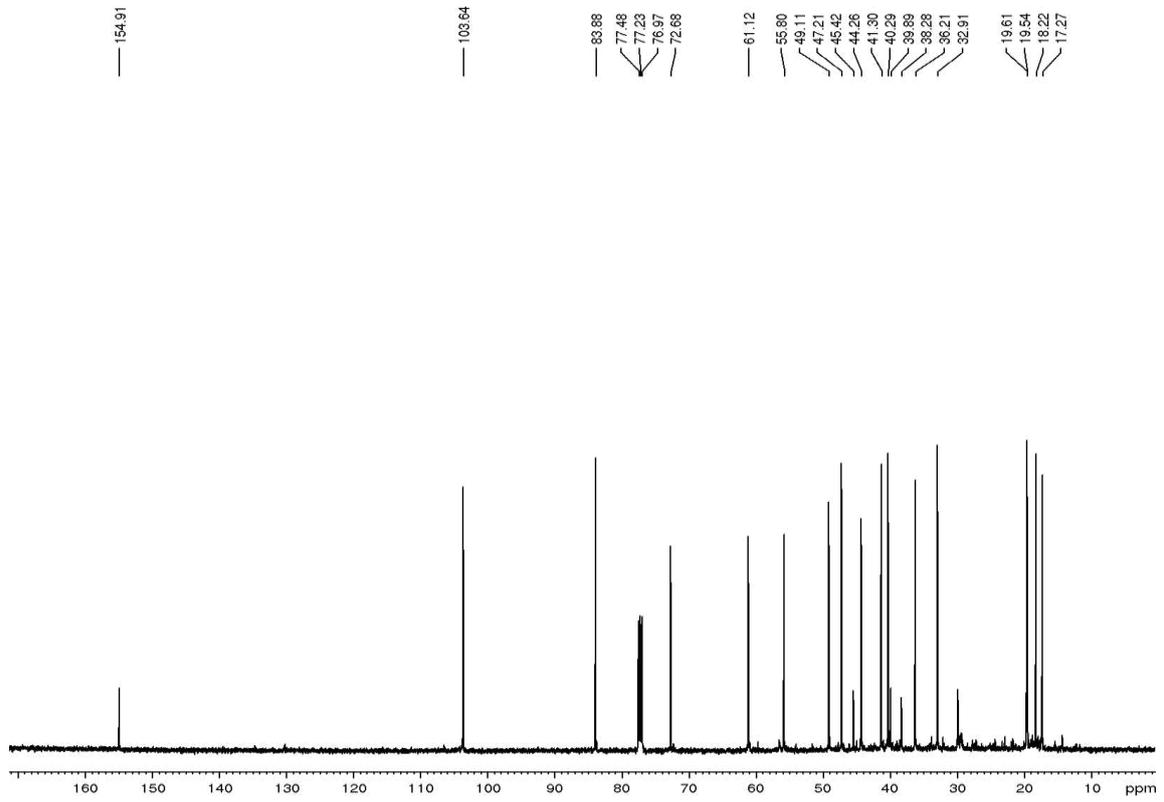


Figura 146 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de EB-13.



**Figura 147** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-13**.



**Figura 148** - Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-13**.

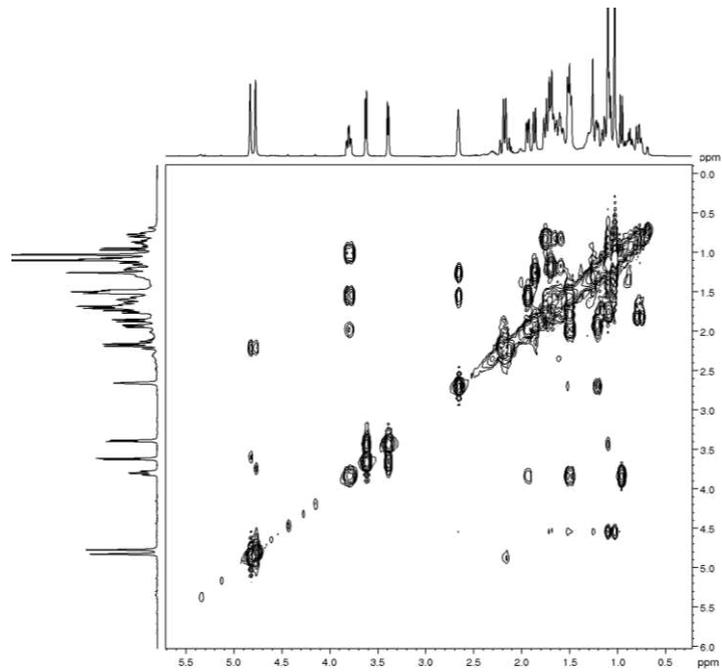


Figura 149 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-13**.

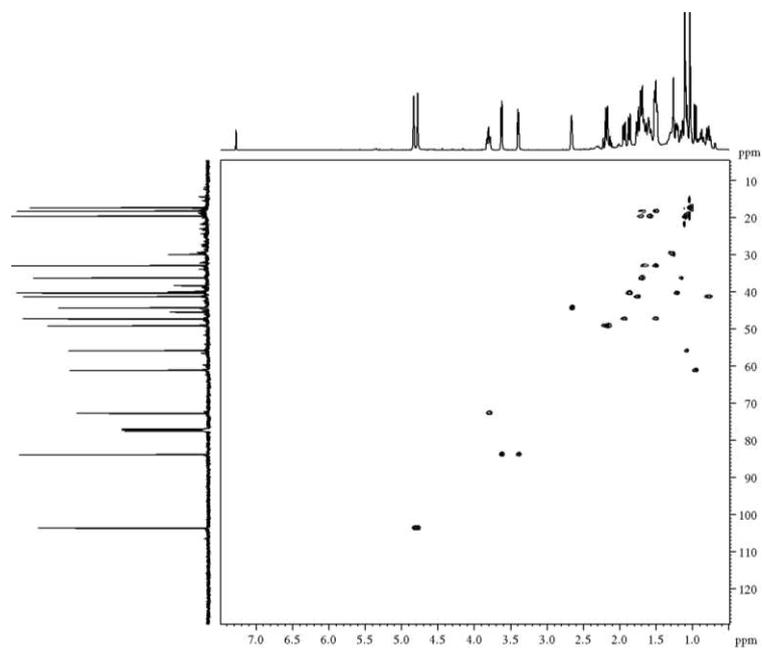
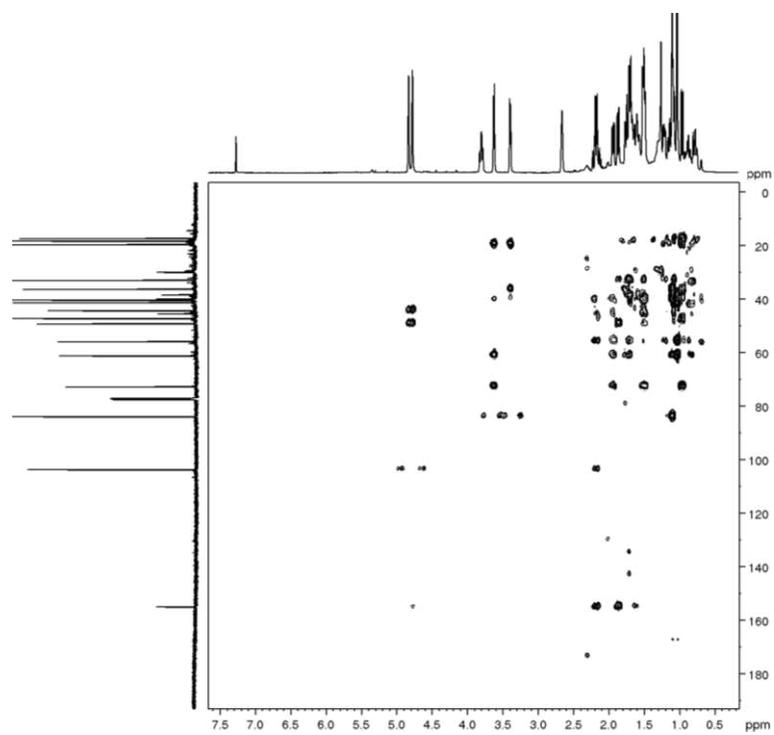
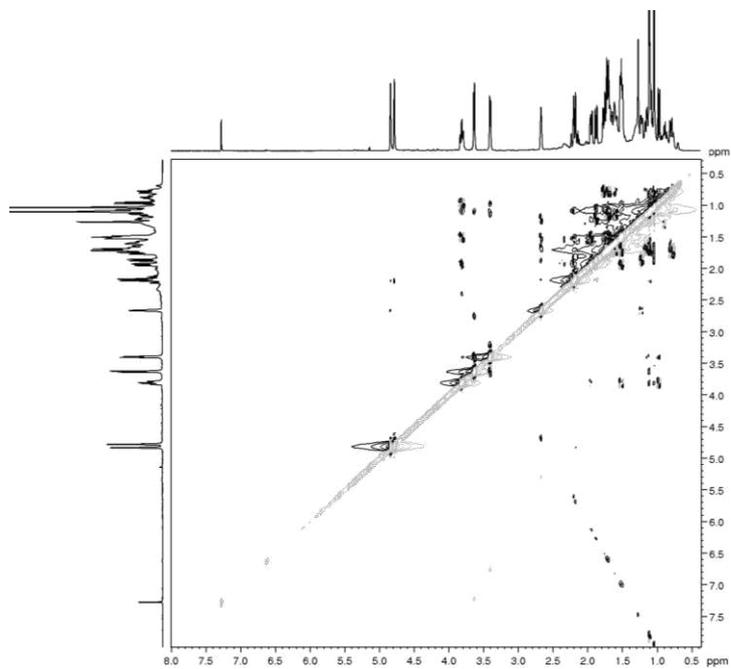


Figura 150 - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-13**.



**Figura 151** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-13**.



### 6.1.14 Determinação estrutural de EB-14

A fração EHEBL-A foi submetida à cromatografia gravitacional (ver experimental, item 5.5.2.1, p. 56), a qual resultou em um material sólido que, após recristalização em diclorometano: AcOEt (1:1), resultou em um sólido cristalino branco denominado EB-14, com rotação  $[\alpha]_D^{24} -34.6^\circ$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ) e P.F.  $119^\circ$ .

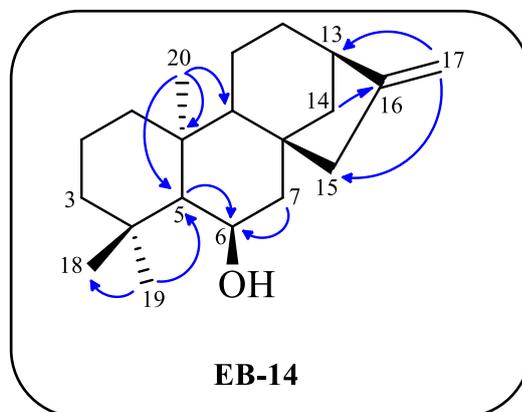
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 155, p. 169) de EB-14 revelou a presença de três singletos correspondentes a grupos metílicos ligados a carbonos quaternários em  $\delta_H$  1,04 (Me-19), 1,06 (Me-20) e 1,16 (Me 18), bem como sinais para hidrogênios vinílicos em  $\delta_H$  4,76 (H-17a) e 4,82 (H-17b), e oximetínico em  $\delta_H$  3,95 (H-6).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CPD [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] (Figura 156, p. 170), exibiu vinte linhas espectrais, que após análise do espectro HSQC (Figura 157, p. 170) possibilitou determinar a presença de três carbonos metílicos, nove metilênicos, sendo um sinal referente a carbono vinila em  $\delta_C$  155,3 (C-17), quatro metínicos, com um carbono oximetínico em  $\delta_C$  69,4 (C-6) e, por consequência, quatro sinais de carbono não hidrogenados.

A principal diferença de EB-14 para EB-13 (Figura 144, p. 159) se deu devido à presença de hidrogênios metílicos ao invés dos hidrogênios geminais oximetínicos do anel heterociclo em EB-13. Além disso, observou-se a presença de um grupo hidroxila em C-6, justificando a proteção de C-6 ( $\delta_C$  69,4) em comparação a C-6 ( $\delta_C$  72,7) para EB-13.

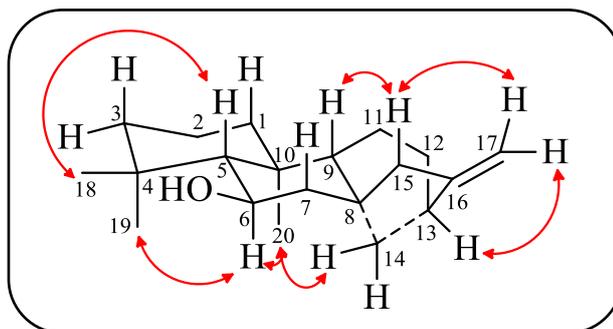
No espectro HMBC (Figura 159, p. 171), as correlações dos hidrogênios metílico em  $\delta_H$  1,06 (Me-20) e 1,04 (Me-19) com o carbono em  $\delta_C$  69,4 (C-5) e dos hidrogênios em  $\delta_H$  0,90 (H-5), 1,79 (H-7b) e 1,57 (H-7a) com o carbono oximetínico em  $\delta_C$  69,4 (C-6), reforçaram a posição do grupo hidroxila em C-6 (Figura 152).

**Figura 152** - Algumas correlações importantes de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de HMBC.



A configuração relativa do centro estereogênico C-6 foi atribuída levando em consideração os acoplamentos dipolares das metilas alfa posicionadas em  $\delta_H$  1,06 (Me-20) e 1,04 (Me-19) com o sinal do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  3,95 (H-6), indicando a posição da hidroxila em  $\beta$ .

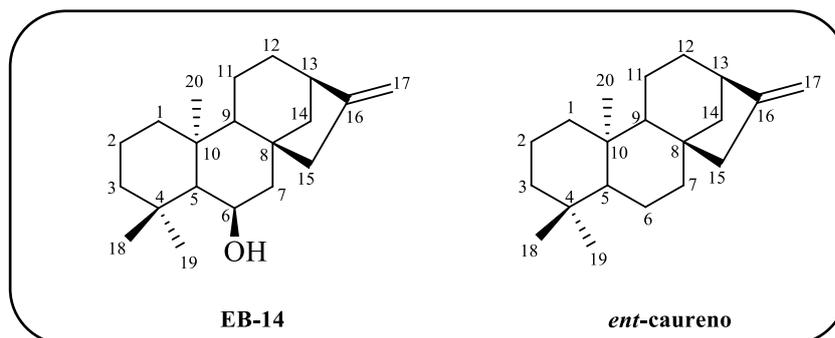
**Figura 153** - Algumas correlações importantes de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de NOESY.



Além da comparação dos dados de RMN de EB-14 com os dados de EB-13, comparou-se também com os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  relatados na literatura para o composto *ent*-caureno (Figura 154), isolado da espécie *Agathis australis* Salisb. por Enzell e Thomas (1964). As diferenças observadas foram nos valores de deslocamentos químicos dos carbonos C-5, C-6 e C-7, devido à presença do grupo hidroxila em C-6 para EB-14.

Então, o composto EB-14 foi caracterizado como cauren-6 $\beta$ -ol (Figura x), um diterpeno anteriormente sintetizado por Satoru (1964), mas que está sendo relatado pela primeira vez como um diterpeno natural.

**Figura 154** - Estrutura de EB-14 e do *ent*-caureno.



**Tabela 29** - Dados espectrais de EB-14, obtidos em CDCl<sub>3</sub>, comparando-os com os dados de EB-13 e do composto *ent*-caureno.

C	EB-14 (CDCl <sub>3</sub> )		EB-13 (CDCl <sub>3</sub> )		<i>ent</i> -caureno (CDCl <sub>3</sub> )
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (multip, J <sub>H,H</sub> )	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (multip, J <sub>H,H</sub> )	
1	40,4	1,79 (dd, J=12,4, 3,8) 0,79 (td, J=12,6, 3,9)	41,3	1,74 (m) 0,76 (m)	41,3
2	18,5	1,57 (m) 1,37 (m)	19,5	1,59 (m) 1,70 (m)	18,7
3	43,7	1,34 (m) 1,19 (m)	36,2	1,68 (m) 1,13 (m)	42,0
4	33,6	-	38,2	-	33,3
5	61,0	0,90 (d, J=10,5)	61,1	0,95 (d, J=11,6)	56,1
6	69,4	3,95 (td, J=10,4, 3,5)	72,7	3,80 (td, J=11,1, 4,3)	20,3
7	51,6	1,79 (dd, J=12,4, 3,8) 1,57 (m)	47,2	1,93 (dd, J=12,0, 4,0) 1,50 (m)	40,4
8	44,3	-	45,4	-	44,2
9	55,4	1,06 (m)	55,8	1,07 (d, J=8,0)	56,1
10	41,0	-	39,9	-	39,3
11	18,1	1,57 (m) 1,37 (m)	18,2	1,68 (m) 1,47 (m)	18,1
12	33,2	1,60 (m) 1,47 (m)	32,9	1,66 (m) 1,50 (m)	33,3
13	43,7	2,65 (s)	44,2	2,65 (s)	44,2
14	40,5	1,95 (d, J=10,9) 1,24 (m)	40,2	1,86 (d, J=11,4) 1,20 (dd, J=11,0, 4,3)	39,9
15	49,3	2,12 (s) 2,12 (s)	49,1	2,16 (d, J=13,0) 2,16 (d, J=13,0)	49,2
16	155,3	-	154,9	-	156,0
17	103,4	a. 4,76 (sl) b. 4,82 (sl)	103,6	a. 4,77 (sl) b. 4,82 (sl)	102,8
18	36,8	1,16 (s)	19,6	1,10 (s)	33,7
19	22,3	1,04 (s) 18,9 1,06 (s)	83,8	3,38 (d, J=7,1) 3,61 (d, J=7,1)	21,7
20	40,4	1,79 (dd, J=12,4, 3,8)	17,2	1,02 (s)	17,6

Figura 155 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.

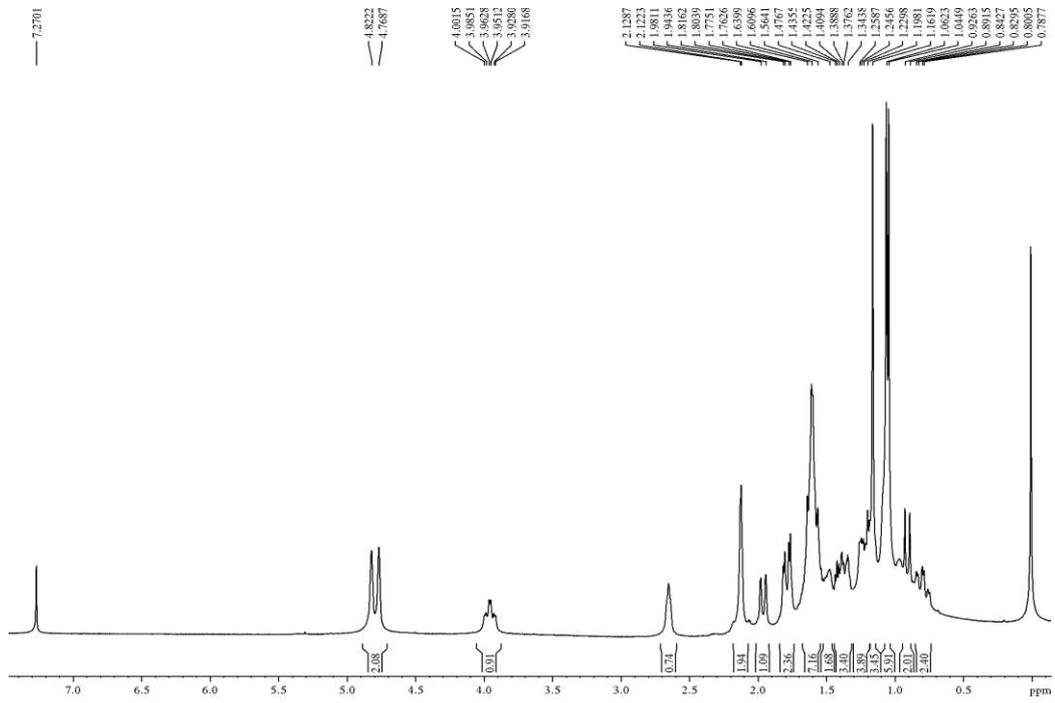
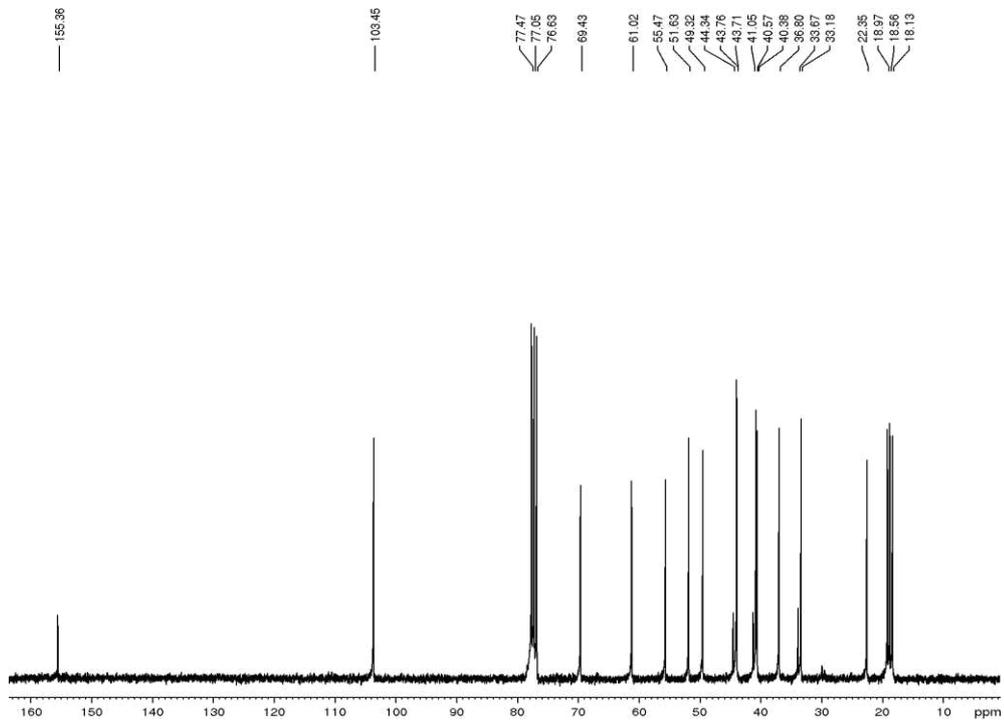
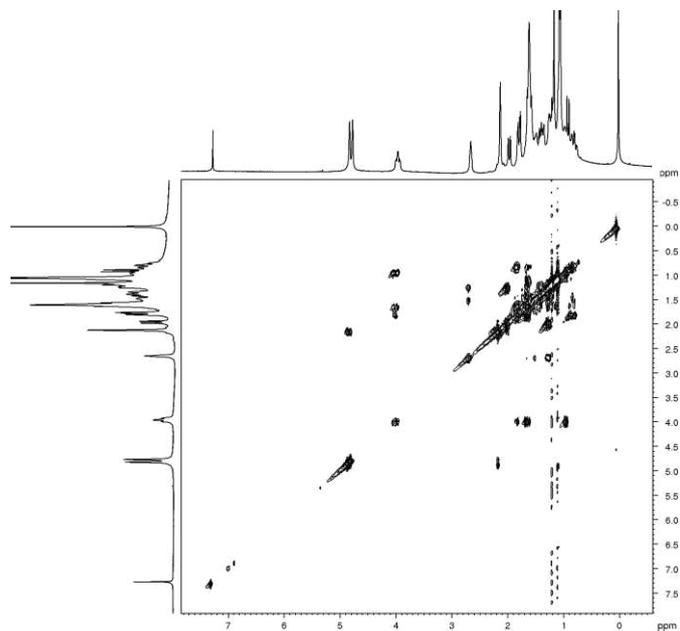


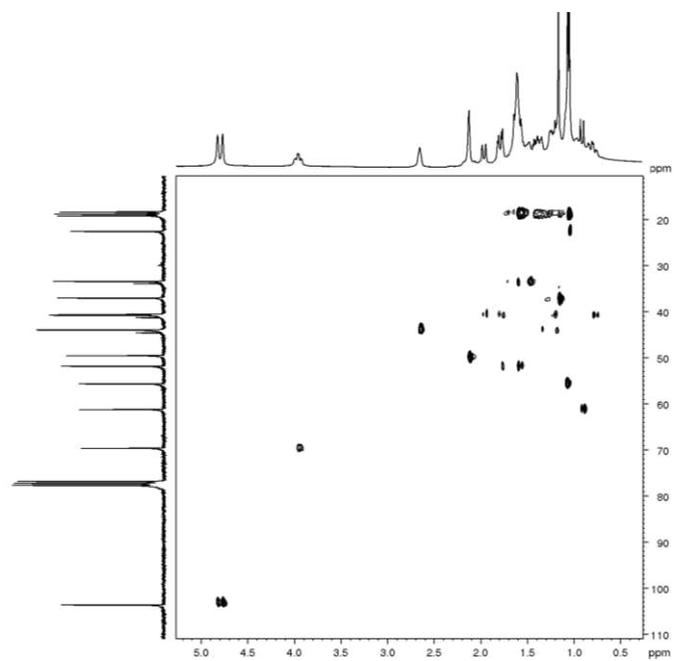
Figura 156 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.



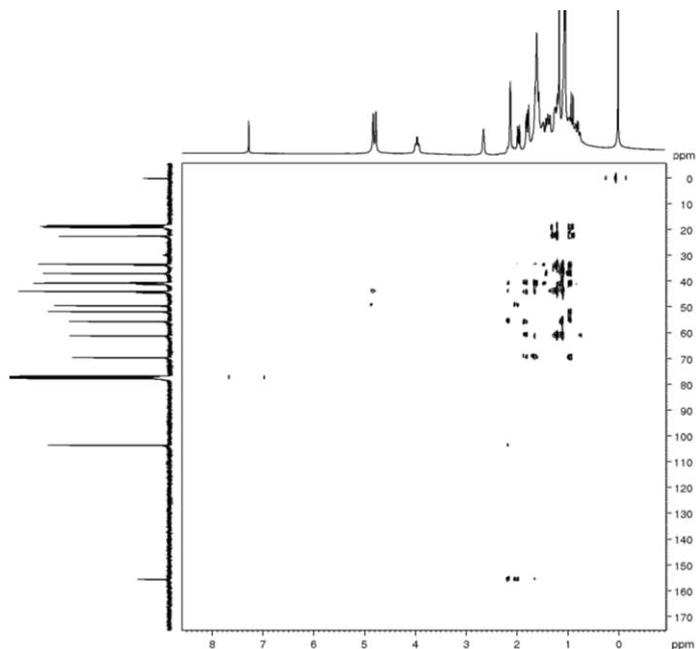
**Figura 157** - Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.



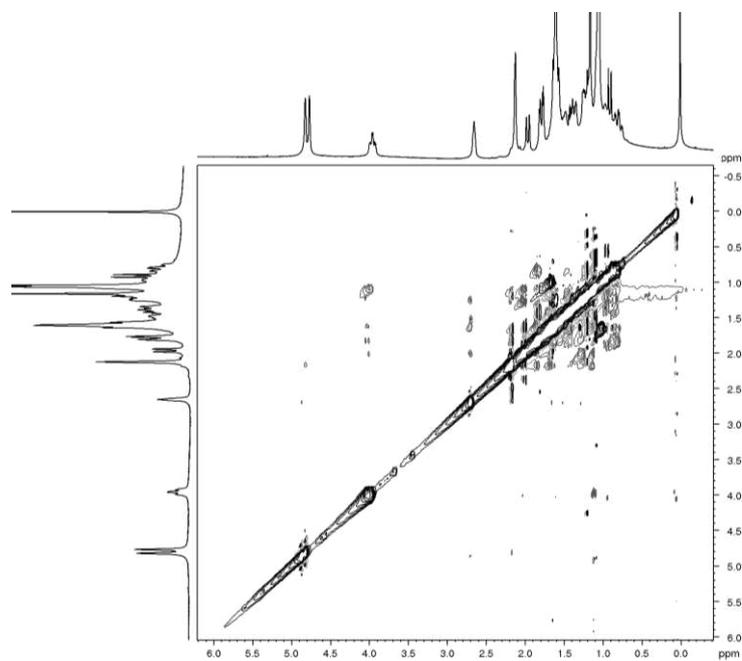
**Figura 158** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.



**Figura 159** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.



**Figura 160** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-14**.



### 6.1.15 Determinação estrutural de EB-15

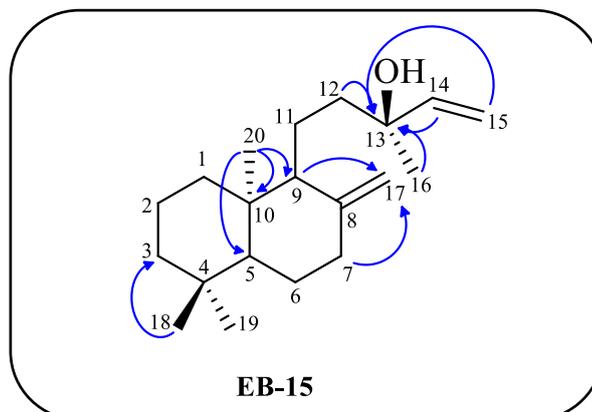
Após fracionamento cromatográfico de EHEBL-A (ver experimental, item 5.5.2.1, p. 56), obteve-se uma resina amarelada, com rotação  $[\alpha]_D^{24} -54.8^\circ$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>), denominada de EB-15.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Figura 163, p. 175), mostrou um duplo dubleto em  $\delta_H$  5,90 (dd, *J*=10,8; 17,4, H-14), dois dubletos em  $\delta_H$  5,20 (*J*=17,4, H-15b) e 5,05 (*J*=10,8, H-15a) e dois singletos em  $\delta_H$  4,80 (H-17b) e 4,47 (H-17a), referentes a hidrogênios vinílicos. Foram observados também sinais de singletos em  $\delta_H$  1,27 (Me-16), 0,86 (Me-18), 0,79 (Me-19) e 0,67 (Me-20), de hidrogênios de carbonos metílicos, além de outros sinais de hidrogênios metilênicos e metínicos característicos de diterpenos.

Como esperado, o espectro de RMN de <sup>13</sup>C CPD [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] (Figura 164, p. 171), revelou sinais correspondentes a vinte átomos de carbono. A partir da comparação dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C, DEPT 135° e HSQC (Figura 166, p. 176), foi possível determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, como: quatro carbonos metílicos, nove metilênicos, três metínicos e, por consequência, quatro carbonos não hidrogenados. Dois grupamentos vinílicos foram determinados com base na presença dos carbonos olefínicos em  $\delta_C$  111,8 (C-15) e 106,5 (C-17).

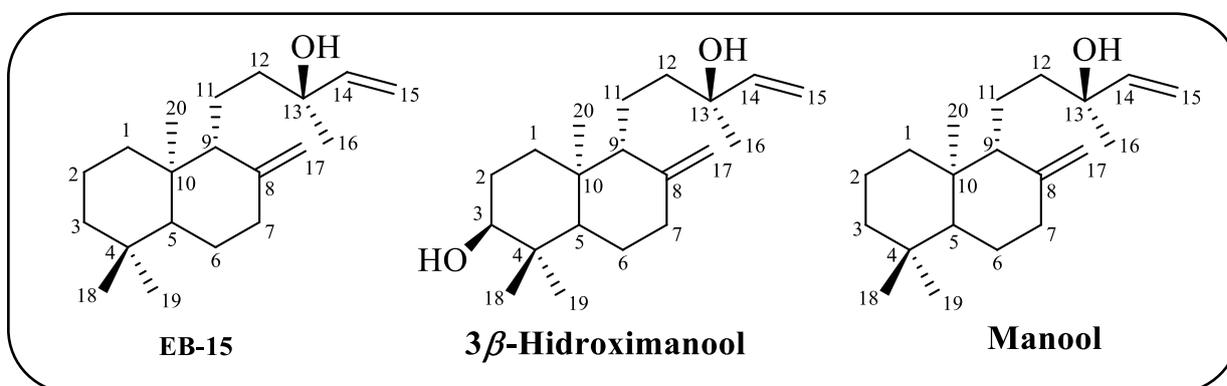
A análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY de EB-15 (Figura 165, p. 172), mostrou acoplamentos dos hidrogênios em  $\delta_H$  5,20 (H-15b) e 5,05 (H-15a) com o hidrogênio em  $\delta_H$  5,90 (H-14), permitindo diferenciar os hidrogênios vinílicos exometilênicos do grupo vinila (-CH=CH<sub>2</sub>) terminal.

A posição do grupo hidroxila em C-13 foi confirmada pelo espectro HMBC (Figura 167, p. 173), a partir das correlações dos sinais em  $\delta_H$  5,90 (<sup>2</sup>*J*, H-14), 5,20 (<sup>3</sup>*J*, H-15b), 5,05 (<sup>3</sup>*J*, H-15a), 1,70 (<sup>2</sup>*J*, H-12) e 1,27 (<sup>2</sup>*J*, Me-16) com o sinal de carbono oximetínico em  $\delta_C$  73,8 (C-13). A posição da metila (Me-16) também foi posicionada no carbono oximetínico (C-13) devido à correlação do sinal em  $\delta_H$  1,27 (Me-16) e do hidrogênio olefínico em  $\delta_H$  5,90 (H-14) com o sinal em  $\delta_C$  41,6 (C-12). Além disso, a dupla insaturação exocíclica (C=CH<sub>2</sub>) em C-8 foi definida através das correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  2,37 (H-7a), 1,96 (H-7b) e 1,55 (H-9) com o sinal de carbono em  $\delta_C$  106,5 (C-17).

**Figura 161** - Algumas correlações de HMBC.

Ao centro estereogênico C-13 foi atribuído a mesma estereoquímica relativa observada para os compostos manool e  $3\beta$ -hidroximanool (Figura 162), isolados de *Erythroxyllum pictum* e *Erythroxyllum betulaceum*, respectivamente, com a metila na posição  $\alpha$  e a hidroxila na posição  $\beta$ , levando em consideração a similaridade dos valores de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamentos dos hidrogênios H-14, H-15 $\alpha$ , H-15 $\beta$  e Me-16 (ANSELL *et al.*, 1993c; RIBEIRO *et al.*, 2013), bem como dos valores de deslocamento químico do carbono 13 (Tabela 31).

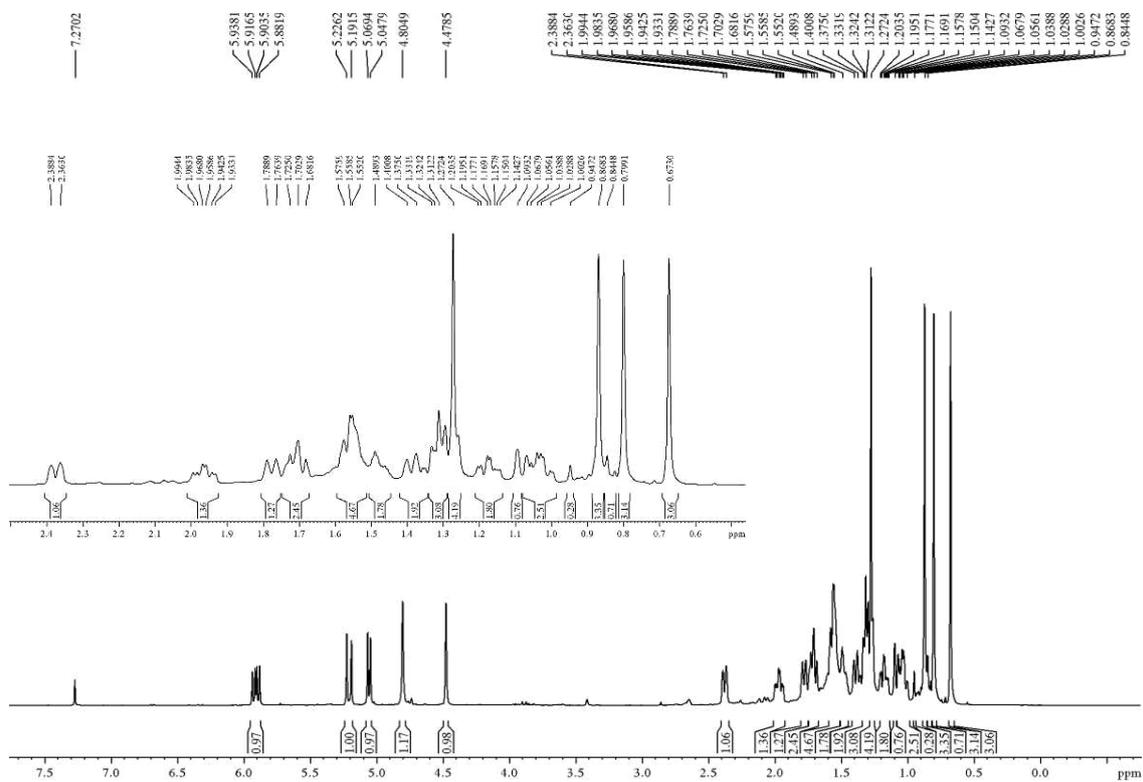
A análise dos dados discutidos, bem como a comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-15, com aqueles obtidos por Ansell *et al.*, (1993c) para o composto manool (Tabela 31, p. 170), permitiu identificar EB-15 como sendo o diterpeno labdano 8(17),14-labdadien-13-ol, isolado de *Erythroxyllum pictum*, conhecido como manool. De acordo com a literatura, o manool apresenta propriedade anti-hipertensiva (AWANG *et al.*, 2012).

**Figura 162** - Estruturas de EB-15,  $3\beta$ -hidroximanool e Manool.

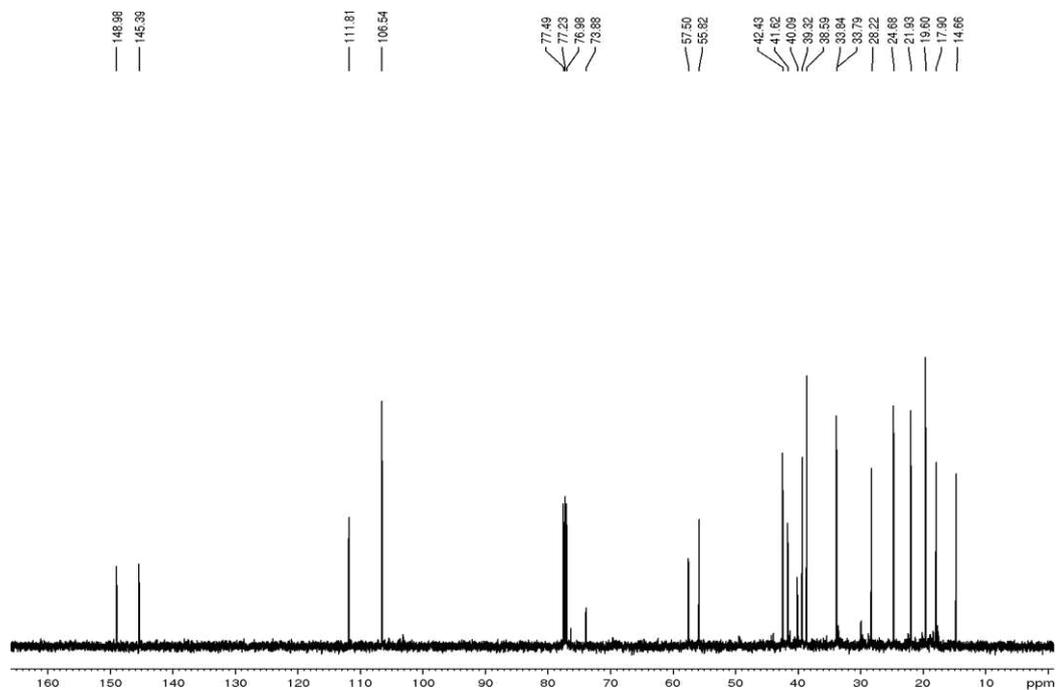
**Tabela 30** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-15 comparando com os dados de  $3\beta$ -hidroximanol e manool.

C	EB-15 ( $\text{CDCl}_3$ )		$3\beta$ -hidroximanol ( $\text{CDCl}_3$ )		Manool ( $\text{CDCl}_3$ )
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$
1	39,3	1,77 (d, $J=12,7$ ) 1,02 (m)	37,0	-	39,0
2	19,6	1,57 (m) 1,48 (m)	27,8	-	19,3
3	42,4	1,38 (d, $J=13,0$ ) 1,16 (td, $J=13,0, 4,2$ )	78,8	3,17 (dd, $J=12,0, 4,5$ )	42,1
4	33,8	-	39,1	-	33,5
5	55,8	1,09 (m)	54,6	-	55,5
6	24,6	1,68 (m) 1,31 (m)	23,9	-	24,4
7	38,6	2,37 (d, $J=12,7$ ) 1,95 (td, $J=13,2, 5,4$ )	38,1	-	38,3
8	148,9	-	148,1	-	148,4
9	57,5	1,55 (m)	56,9	-	57,2
10	40,1	-	39,5	-	39,8
11	17,9	1,55 (m) 1,33 (m)	17,8	-	17,6
12	41,6	1,57 (m) 1,29 (m)	41,2	-	41,3
13	73,8	-	73,6	-	73,4
14	145,4	5,90 (dd, $J=17,3, 10,7$ )	145,0	5,82 (dd, $J=17,5, 10,5$ )	144,9
15	111,8	5,20 (d, $J=17,3$ ) 5,05 (d, $J=10,6$ )	111,6	5,13 (dd, $J=12,0, 4,5$ ) 4,98 (dd, $J=10,5, 4,5$ )	111,4
16	28,2	1,27 (s)	28,0	1,19	27,9
17	106,5	a. 4,47 (s) b. 4,80 (s)	106,7	4,74 (d, $J=1,5$ ) 4,42 (d, $J=1,5$ )	106,2
18	33,8	0,86 (s)	28,2	0,91 (s)	33,5
19	21,9	0,79 (s)	15,3	0,69 (s)	21,7
20	14,6	0,67 (s)	14,4	0,60 (s)	14,4

**Figura 163** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-15**.



**Figura 164** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-15**.



**Figura 165** - Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-15**.

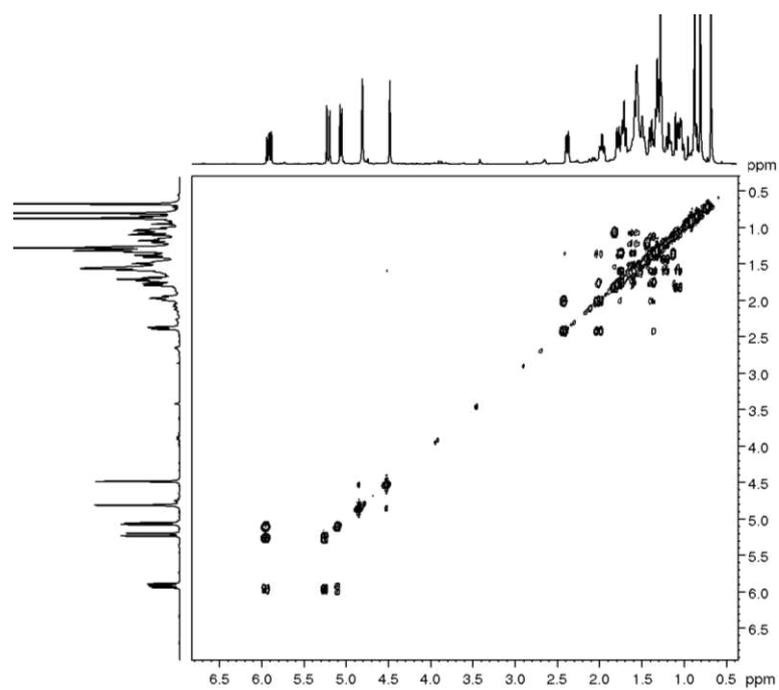
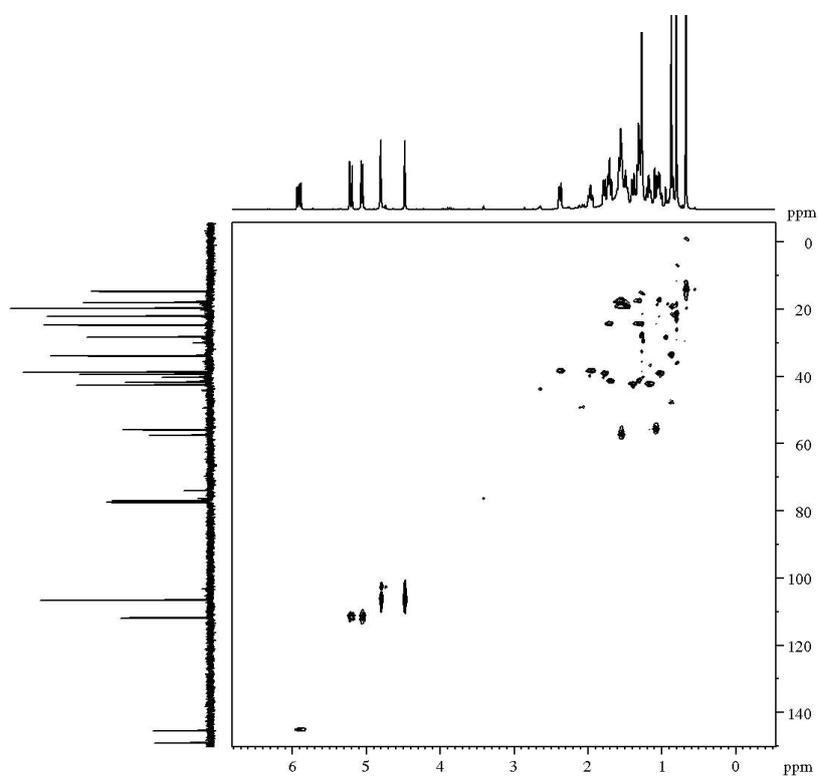
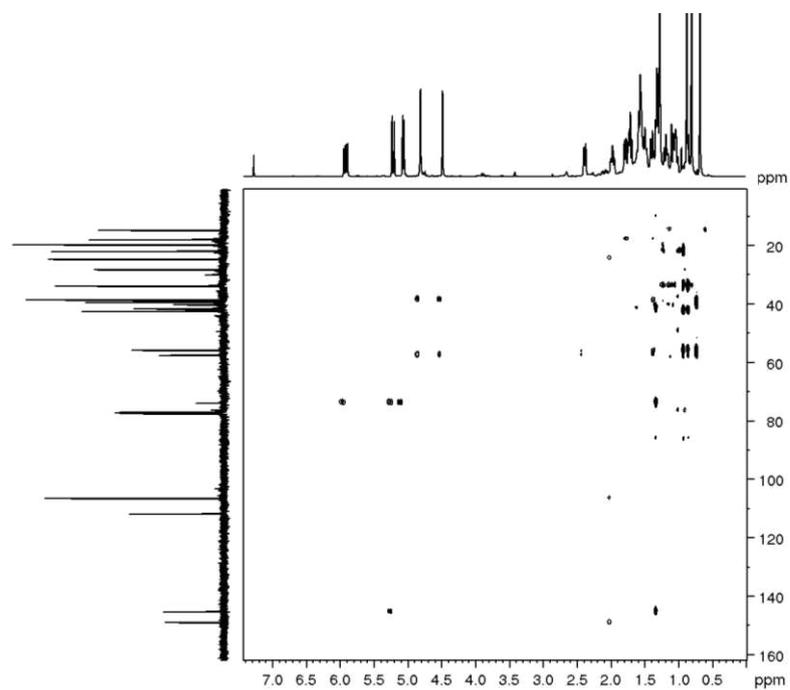


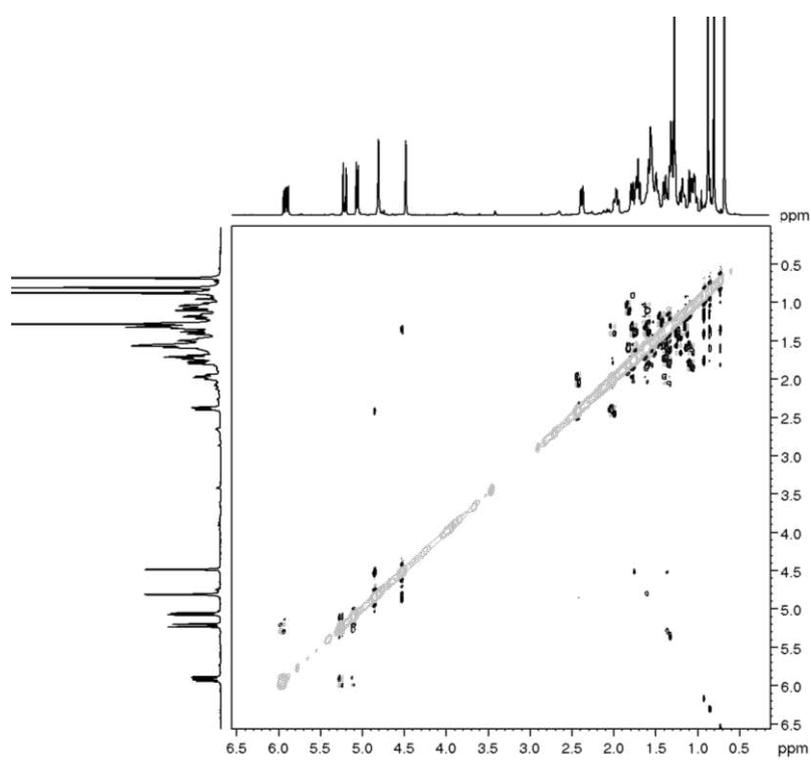
Figura 166 - Espectro de RMN HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-15.



**Figura 167** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-15**.



**Figura 168** - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-15**.



### 6.1.16 Determinação estrutural de EB-16

O composto **EB-16** foi obtido a partir de fracionamentos cromatográficos da fração diclorometano do extrato etanólico do cerne de *E. bezerrae* (item 3.5.4, p. 63) e apresentou-se como um sólido branco amorfo, com  $[\alpha]_D^{24}$   $-18.3^\circ$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); lit.  $[\alpha]^{25}$   $-14^\circ$ ,  $c$  0,04,  $\text{CHCl}_3$  (GARCEZ *et al.*, 2004).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  – Fig. 172, p. 182) revelou sinais para hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (s, H-17b) e 5,08 (s, H-17a) referente a dupla vinílica, dois sinais de hidrogênios oximetínicos, sendo um singlete  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (H-15) e um duplo dubleto  $\delta_{\text{H}}$  3,21 ( $J=10,8, 5,8$ , H-3), além de três sinais para metilas em  $\delta_{\text{H}}$  1,03 (s, Me-20), 1,00 (s, Me-19) e 0,79 (s, Me-18). Soma-se a isto a presença de vários sinais na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  1,24 - 2,52, ressaltando a natureza terpênic de **EB-16**.

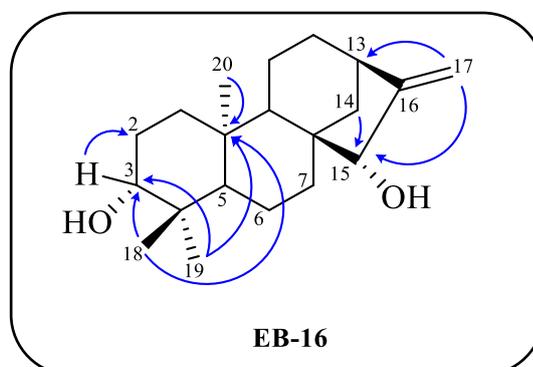
No espectro COSY (Fig. 174, p. 183) o hidrogênio hidroximetínico em  $\delta_{\text{H}}$  3,80 mostrou acoplamento alílico com os hidrogênios metilênicos exocíclicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (H-17b) e 5,08 (H-17a) e com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (H-14b) e 5,08 (H-14a), indicando a posição de um grupo hidroxila em C-15. De forma semelhante, também foi observado um sistema isolado de spins para o sinal do hidrogênio oximetínico  $\delta_{\text{H}}$  3,21 (H-3) com o hidrogênio metilênico mais desprotegido em  $\delta_{\text{H}}$  1,64 (H-2b), confirmando uma hidroxila em C-3.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  CPD (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$  – Fig 173, p. 182) de **EB-16** apresentou 20 linhas espectrais, indicando um diterpeno caureno, semelhante a **EB-15**. Através do espectro HSQC (Fig. 175, p. 183) foi possível atribuir três carbonos metílicos [ $\delta_{\text{C}}$  28,5 (C-18), 17,9 (C-20) e 15,7 (C-19)], oito carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos, dentre eles, dois oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  83,1 (C-15) e 79,2 (C-3), bem como quatro carbonos não-hidrogenados, sendo um olefínico [ $\delta_{\text{C}}$  160,7 (C-16)] (Tabela 32, p. 177).

A posição  $\beta$  das hidroxilas e da insaturação na estrutura proposta foi confirmada através das correlações apresentadas pelo espectro HMBC (Fig. 176, p. 184), assim como as correlações dos hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 (H-17b) e 5,08 (H-17a) e do hidrogênio metilênico em  $\delta_{\text{H}}$  1,89 (H-14b) com o carbono oximetínico em  $\delta_{\text{C}}$  83,1 (C-15), o que mostra a proximidade do grupo hidroxila com a dupla ligação. Os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,00 (Me-19) e 0,79 (Me-18) mostraram correlação com o sinal de carbono oximetínico em  $\delta_{\text{C}}$  79,2, assegurando um grupo hidroxila em C-3. Além destas, também foram observadas correlações dos hidrogênios metílicos (Me-18, Me-19 e Me-20) com o carbono não

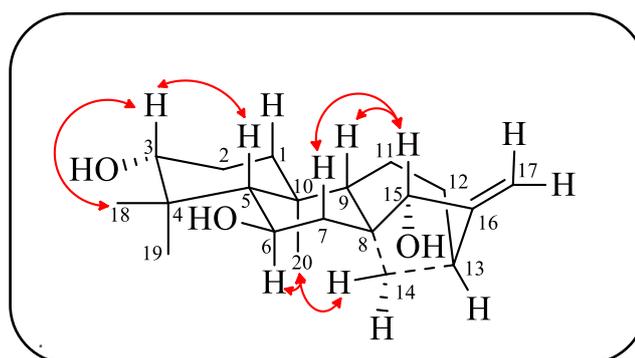
hidrogenado em (C-10) e com C-3, corroborando com a estrutura de um diterpeno do tipo caureno, cujas correlações estão apresentadas na Figura 169 abaixo.

**Figura 169** - Algumas correlações de HMBC de EB-16.



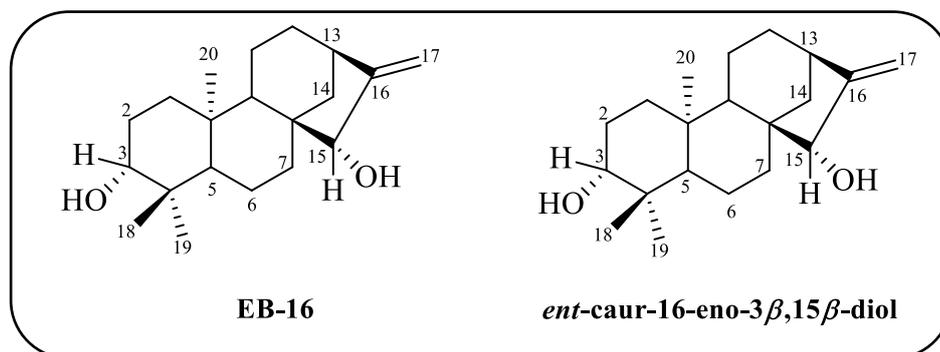
De acordo com Jia, Shi, Yang (1994), para estruturas *ent*-caurenoides, o hidrogênio hidroximetínico  $15\alpha$  aparece como um tripleto com um valor de  $J$  na faixa de 2 a 3 Hertz, enquanto o hidrogênio hidroximetínico  $15\beta$  aparece como um singlete. Nesse sentido, observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um sinal correspondente a um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (H-15), indicando a configuração *beta* do hidrogênio e, portanto, *alfa* para o grupo hidroxila. Esse fato foi corroborado pelo espectro NOESY (Fig. 177, p. 185), o qual mostrou interação entre H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  3,80) e H-9 $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  0,98), bem como a orientação *alfa* da hidroxila em C-3, devido o acoplamento dipolar de H-3 com H-5 $\beta$  e H-18.

**Figura 170** - Algumas correlações de NOESY de EB-16.



Os dados apresentados nesta discussão, e a comparação com a literatura para o diterpeno denominado  $13\alpha$ -*ent*-caur-16-en-3 $\beta$ ,15 $\beta$ -diol (Euphoranginol B) (Fig. 171, p. 180), isolado de *Euphorbia wangii* (Jia, Gong Shi, Yang, 1994), confirmam o estudo proposto.

Figura 171 - Estruturas de EB-16 e *ent*-caur-16-eno-3 $\beta$ ,15 $\beta$ -diol.



**Tabela 31** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-16 comparando com os dados do composto *ent-caur-16-eno-3 $\beta$ ,15 $\beta$ -diol*.

C	EB-16 ( $\text{CDCl}_3$ )		<i>ent-caur-16-eno-3<math>\beta</math>,15<math>\beta</math>-diol</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	37,8	1,89 (m)	38,7	1,85 (m) 0,91 (m)
2	27,5	1,64 (m) 1,46 (m)	27,3	1,64 (m) -
3	79,2	3,21 (dd, $J=10,8, 5,8$ )	78,9	3,20 (dd, $J=11,2, 5,2$ )
4	39,4	-	39,2	-
5	55,3	0,77 (m)	55,0	0,76 (d, $J=12,7$ )
6	18,3	1,55 (m) 1,40 (m)	19,1	1,52 (m) 1,35 (m)
7	35,4	1,70 (m) 1,41 (m)	35,2	1,73 (m) -
8	49,2	-	47,5	-
9	55,3	0,98 (m)	54,2	0,88 (m)
10	38,8	-	38,8	-
11	19,3	1,55 (m) 1,40 (m)	18,1	1,56 (m) -
12	32,9	1,62 (m) 1,46 (m)	32,7	1,60 (m) 1,60 (m)
13	42,4	2,75 (s)	42,3	2,74 (s)
14	36,4	1,89 (m) 1,24 (m)	36,2	1,87 (m) 1,31 (m)
15	83,1	3,80 (s)	82,9	3,79 (s)
16	160,7	-	160,3	-
17	108,5	5,21 (sl) 5,08 (sl)	108,2	5,20 (sl) 5,07 (sl)
18	28,5	0,79 (s)	28,4	0,78 (s)
19	15,7	1,00 (s)	15,5	0,98 (s)
20	17,9	1,03 (s)	17,7	1,02 (s)

Figura 172 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16.

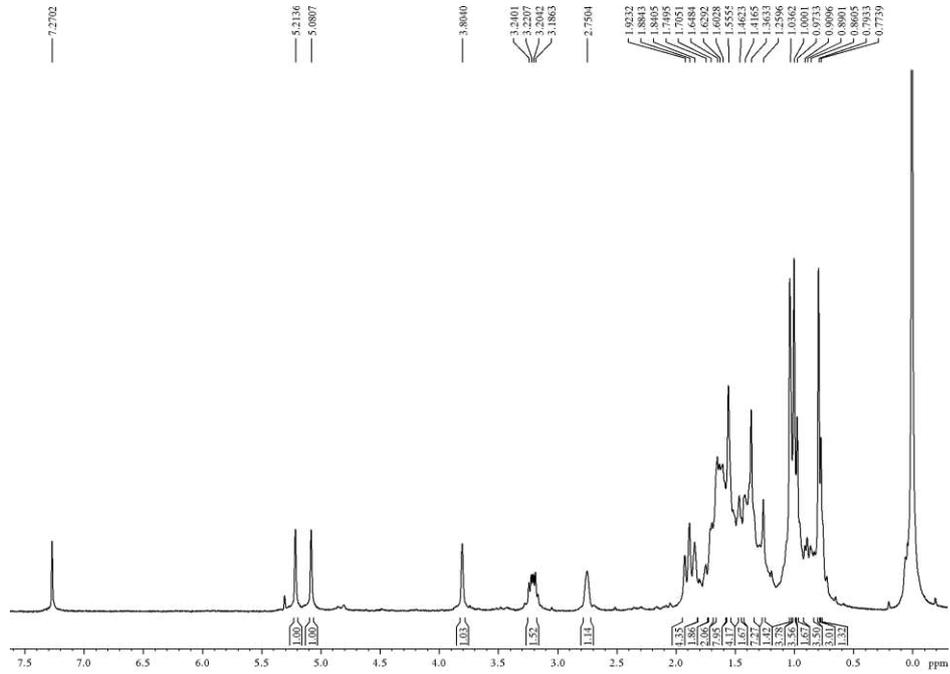


Figura 173 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-16.

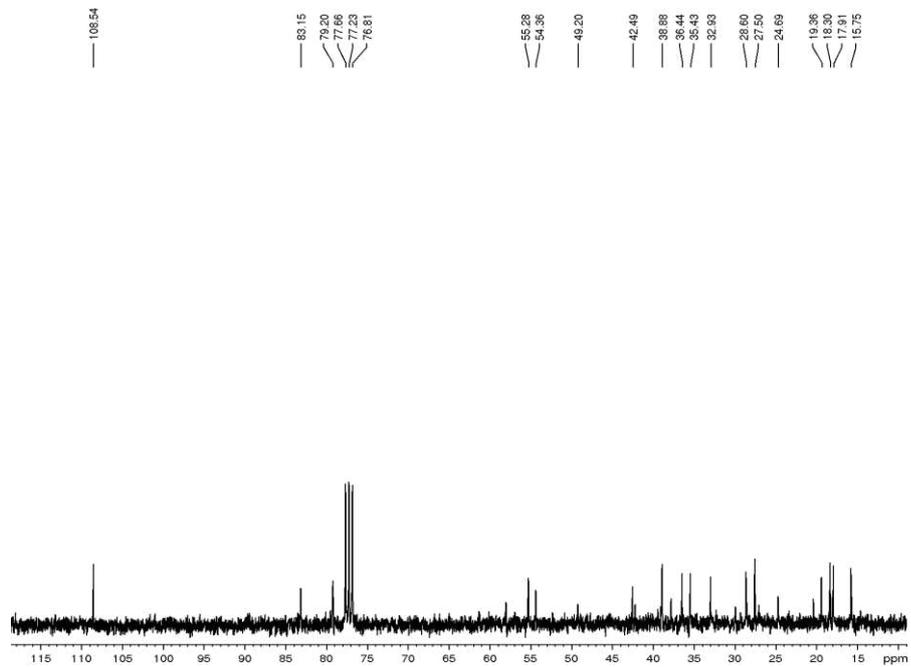


Figura 174 - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-16**.

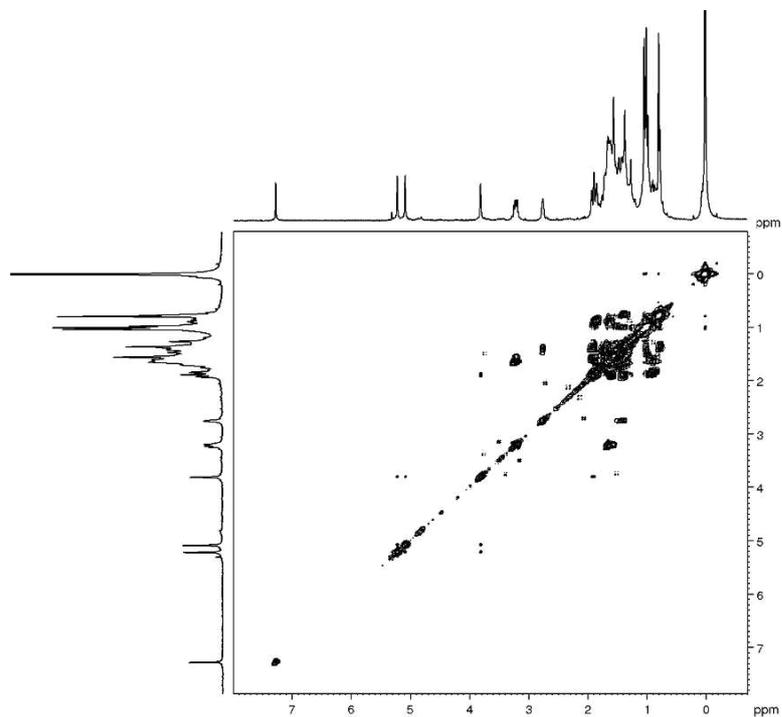
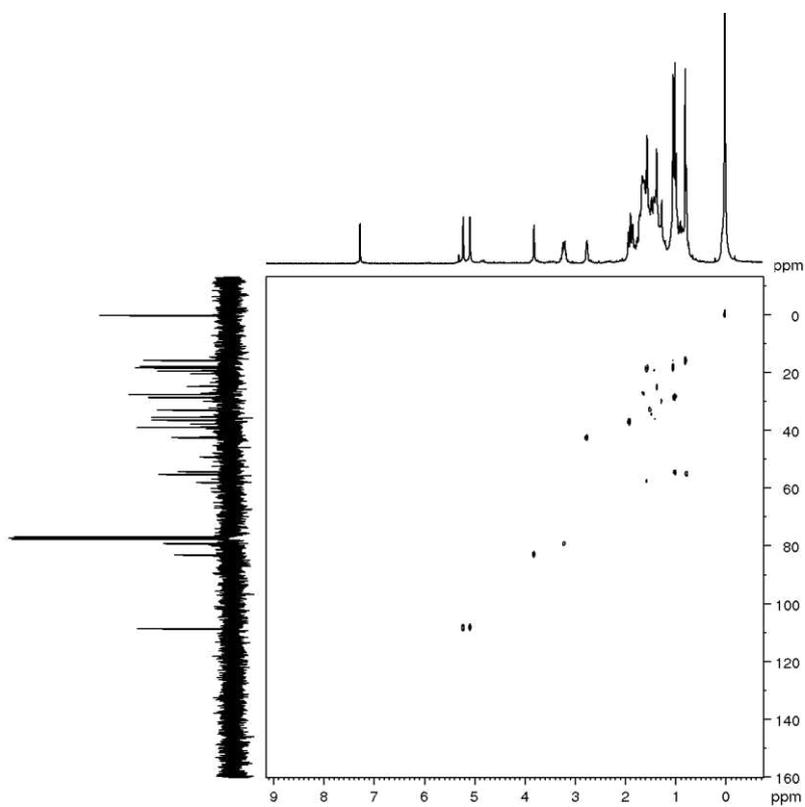
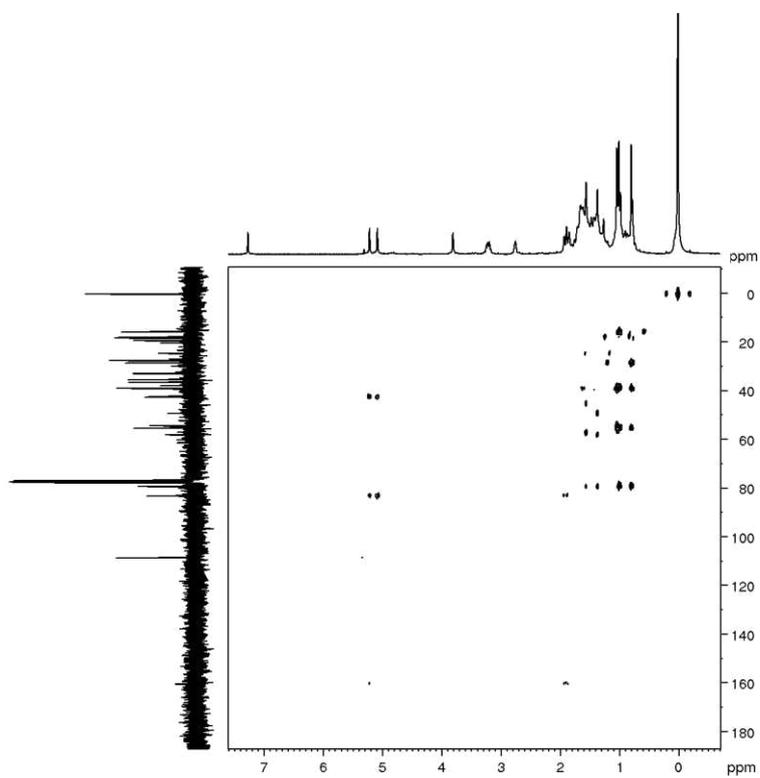


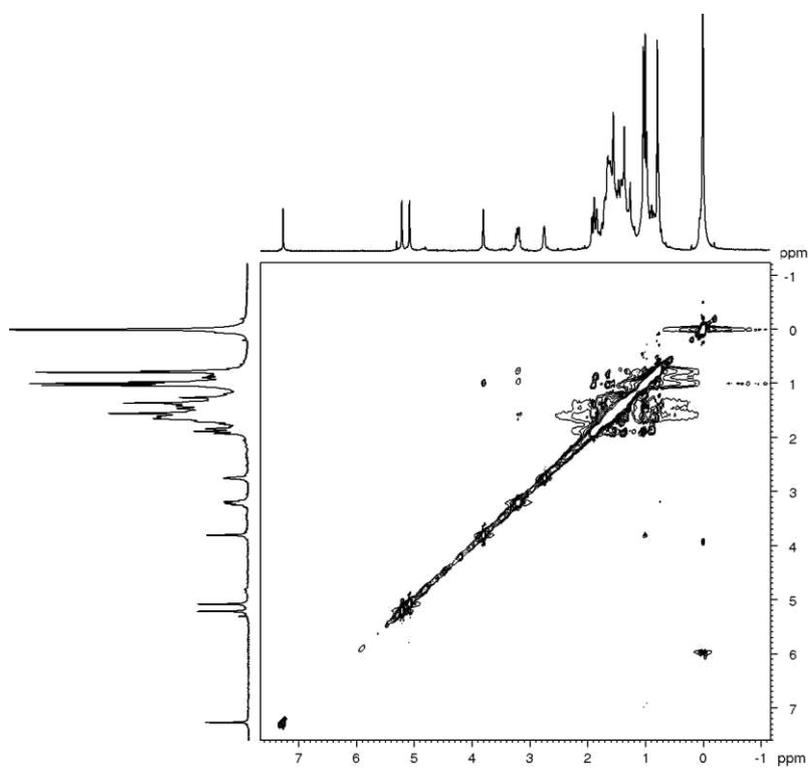
Figura 175 - Espectro de RMN HSQC (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-16**.



**Figura 176** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-16**.



**Figura 177** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-16**.



### 6.1.17 Determinação estrutural de EB-17

O composto denominado **EB-17** foi isolado da fração EHEBL-B (item 5.5.2.2, p. 57) como um sólido branco amorfo, com  $[\alpha]_D^{24} -53,7^\circ$  ( $c$  0,5,  $\text{CHCl}_3$ ).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  – Fig. 177, p. 184) mostrou a presença de três de singletos referentes a grupos metílicos ligados a carbonos não hidrogenados em  $\delta_{\text{H}}$  1,02, 0,98 e 0,78, característicos de diterpenos semelhante aos isolados anteriormente, com as metilas em C-20 e C-19 em posição *axial* e em C-18 em posição equatorial (DUTRA *et al.*, 2014). Adicionalmente, observou-se dois sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,80 e 4,75, típicos de hidrogênios de uma ligação dupla exocíclica, bem como um sinal de hidrogênio oximetínico em  $\delta_{\text{H}}$  3,30, típicos de diterpenos anteriormente isolados.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CPD (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$  – Fig. 180, p. 188) apresentou 20 linhas espectrais, semelhante a **EB-16**, compatíveis com a estrutura de um diterpeno caurano. A análise do espectro HSQC (Fig. 182, p. 189) demonstrou a existência de três carbonos metílicos [ $\delta_{\text{C}}$  28,4 (C-18), 17,6 (C-20) e 15,5 (C-19)], nove carbonos metilênicos, sendo um olefínico [ $\delta_{\text{C}}$  103,0 (C-17)], quatro carbonos metínicos, entre eles um oxigenado [ $\delta_{\text{C}}$  79,1 (C-3)] e quatro carbonos não-hidrogenados [ $\delta_{\text{C}}$  155,8 (C-16), 44,0 (C-8), 39,1 (C-10) e 38,7 (C-4)] (Tabela 33, p. 187).

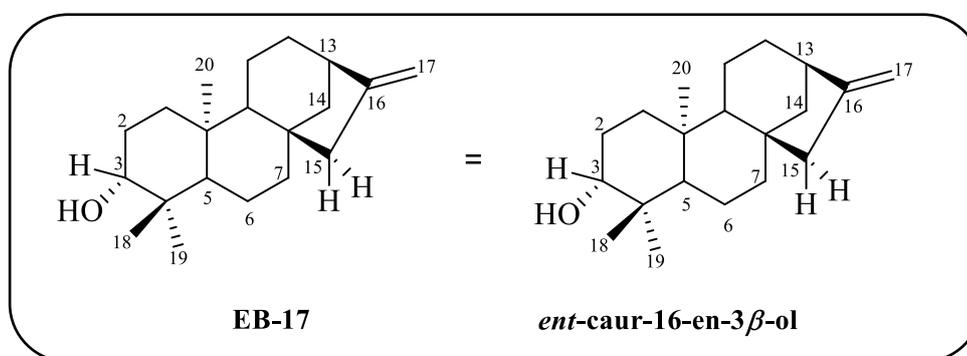
A análise comparativa dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo informações obtidas do espectro HSQC de **EB-16** com **EB-17** aponta que os dois compostos diferem entre si quanto aos deslocamentos químicos dos carbonos C-8, C-15 e C-16 que passaram de [( $\delta_{\text{C}}$  47,5, 82,9 e 160,3)], respectivamente, em EB-16 para valores de deslocamentos mais protegidos [( $\delta_{\text{C}}$  44,0, 49,1 e 155,8)] em EB-17. Essas informações sugerem que o composto em questão apresenta o mesmo tipo de esqueleto (diterpeno caurenico), sem o grupo hidroxila em C-15.

Através das correlações a longa distância exibidos no espectro HMBC (Fig 183, p. 190) foi possível atribuir corretamente os deslocamentos químicos e confirmar a estrutura de **EB-17**. As principais correlações observadas foram entre os hidrogênios olefínicos H-17a ( $\delta_{\text{H}}$  4,75) e H-17b ( $\delta_{\text{H}}$  4,80) com os carbonos C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  44,0) e C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  49,1), confirmando a dupla ligação exocíclica em C-16, bem como a correlação hidrogênio oximetínico H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  3,20) com os carbonos C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  38,7), C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  28,4) e C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  15,5), corroborando com a posição do grupo hidroxila em C-3.

A configuração relativa de EB-17 foi sugerida através do espectro NOESY (Fig 184, p. 191), o qual revelou a orientação *alfa* da hidroxila em C-3, devido à correlação à longa distância de H-3 com H-5 e H-18 (ambos *beta*-posicionados), bem como de H-20 com H-14 e H-19 compatíveis com hidrogênios *alfa*-posicionados.

A análise dos dados apresentados, junto com a comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os relatados na literatura, possibilitou identificar **EB-17** como sendo o diterpeno *ent*-3 $\beta$ -hidroxi-caur-16-eno (Fig. 178, p. 186), previamente isolado da casca do caule de *Annona vepretorum*, por DUTRA *et al.*, 2014.

**Figura 178** - Estruturas de EB-17 e *ent*-caur-16-en-3 $\beta$ -ol.



**Tabela 32** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-17 e de *ent*-3 $\beta$ -hidroxi-caur-16-eno.

C	EB-17 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)		<i>ent</i> -3 $\beta$ -hidroxi-caur-16-eno (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	38,8	1,85 (dt, $J=13,2;3,8$ ) 0,90 (td, $J=13,1;4,4$ )	38,7	1,85 (ddd, $J=13,4;3,7; 3,4$ ) 0,90 (ddd, $J=13,2;12,4;5,2$ )
2	27,4	1,64 (m)	27,4	1,63 (m) 1,60 (m)
3	79,1	3,20 (dd, $J=11,1;5,0$ )	79,1	3,19 (dd, $J=10,9;5,6$ )
4	38,7	-	38,9	-
5	55,3	0,76 (m)	55,2	0,76 (dd, $J=11,8;1,9$ )
6	20,0	1,58 (m) 1,40 (m)	20,0	1,55 (m) 1,40 (m)
7	41,2	1,51 (m)	41,2	1,52 (m) 1,48 (m)
8	44,0	-	44,0	-
9	55,3	1,05 (m)	55,9	1,03 (m)
10	39,1	-	39,1	-
11	18,3	1,65 (m) 1,56 (m)	18,3	1,62 (m) 1,53 (m)
12	27,4	1,64 (m)	39,8	1,98 (m) 1,11 (dddd, $J=11,4;5,1;1,8;1,6$ )
13	44,0	2,65 (s)	43,9	2,64 (s)
14	33,2	1,65 (m) 1,50 (m)	33,2	1,62 (m) 1,48 (m)
15	49,1	2,07 (s)	49,0	2,06 (m) 2,05 (m)
16	155,8	-	155,8	-
17	103,0	4,80 (sl) 4,75 (sl)	103,0	4,80 (sl) 4,74 (sl)
18	28,4	0,99 (s)	28,4	0,98 (s)
19	15,5	0,79 (s)	15,5	0,78 (s)
20	17,6	1,03 (s)	17,6	1,02 (s)

Figura 179- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17

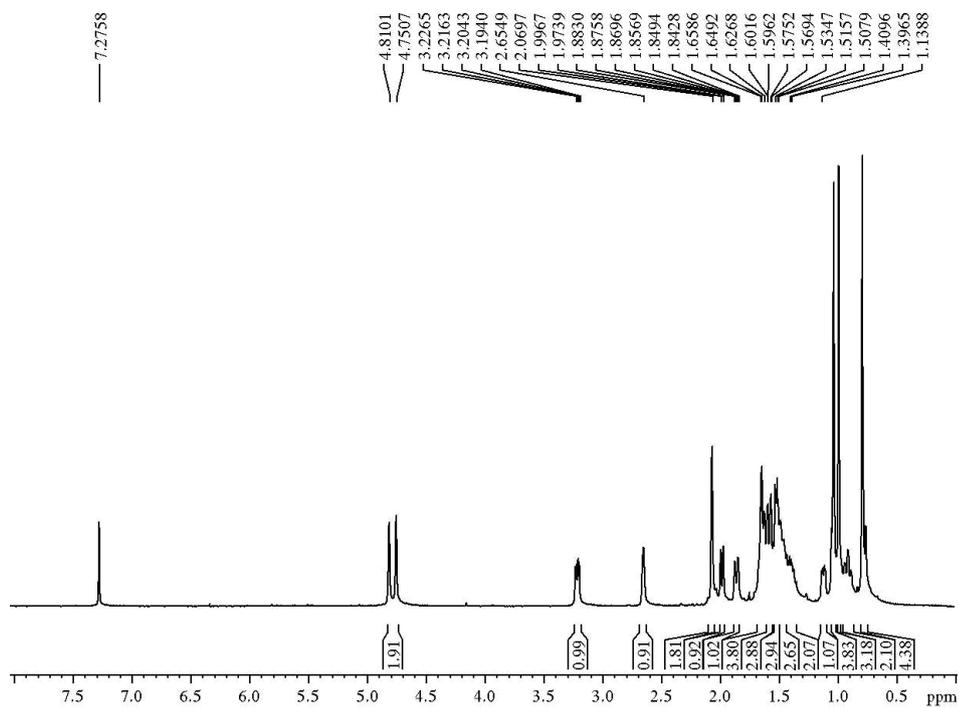
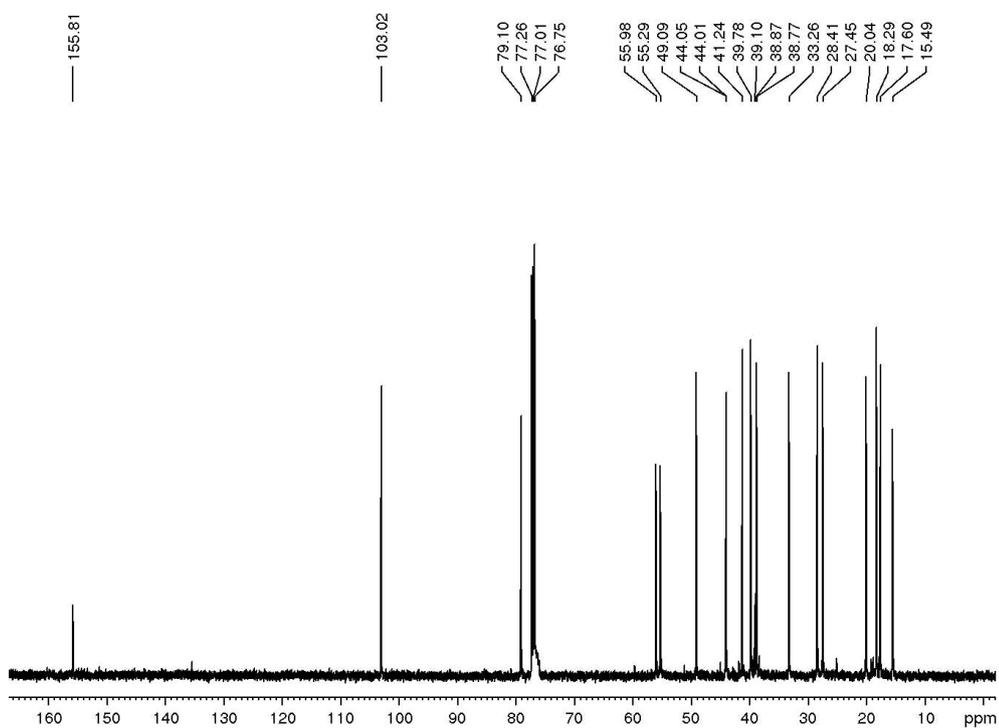
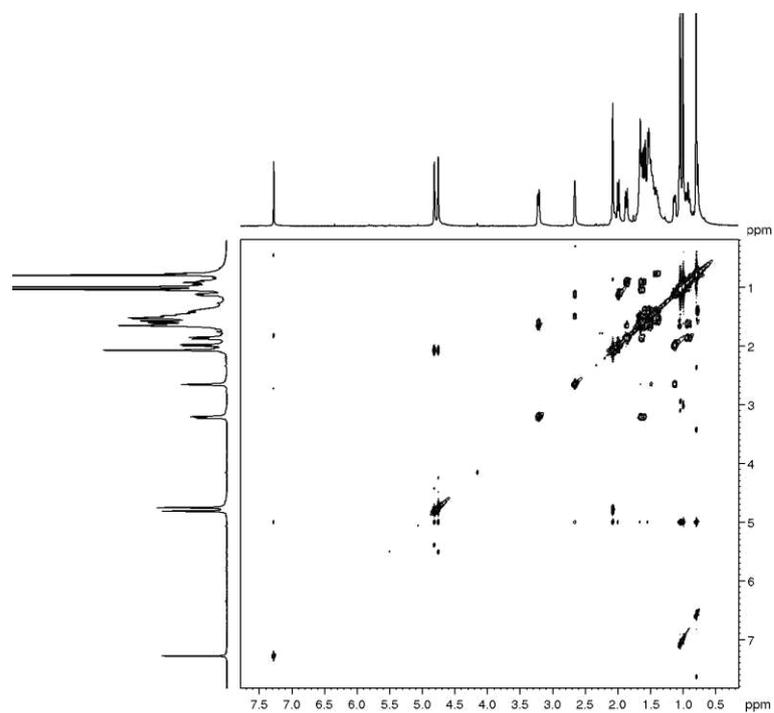


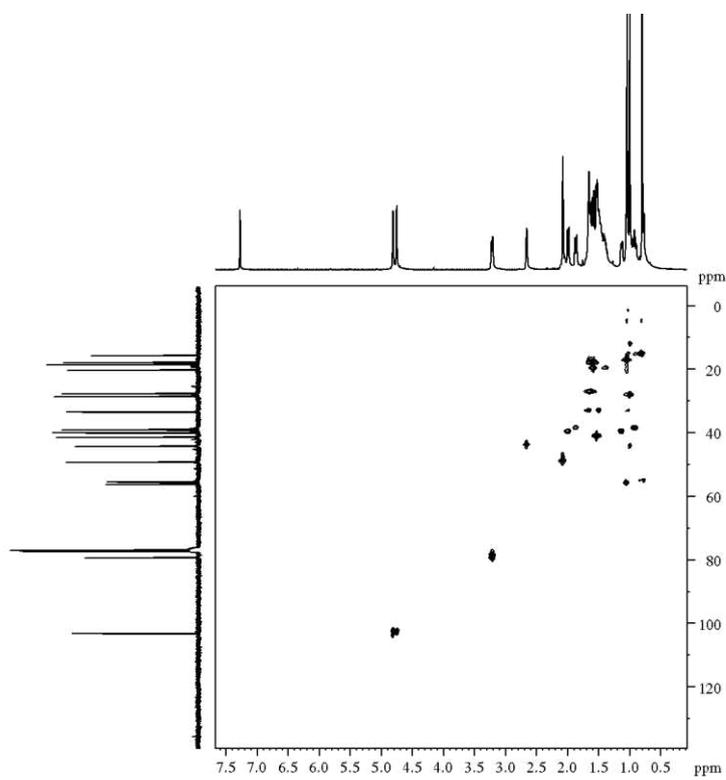
Figura 180 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-17.



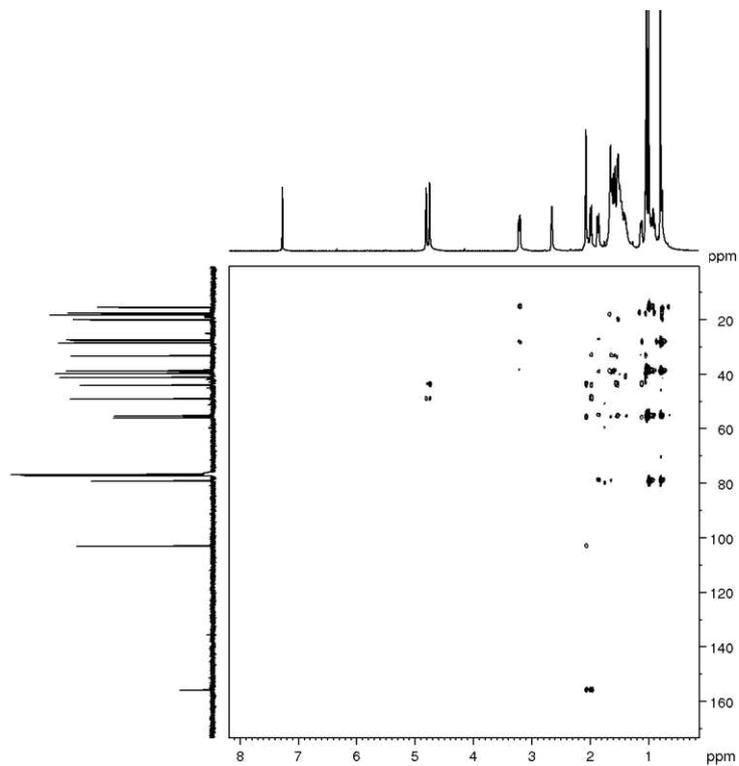
**Figura 181** - Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-17**.



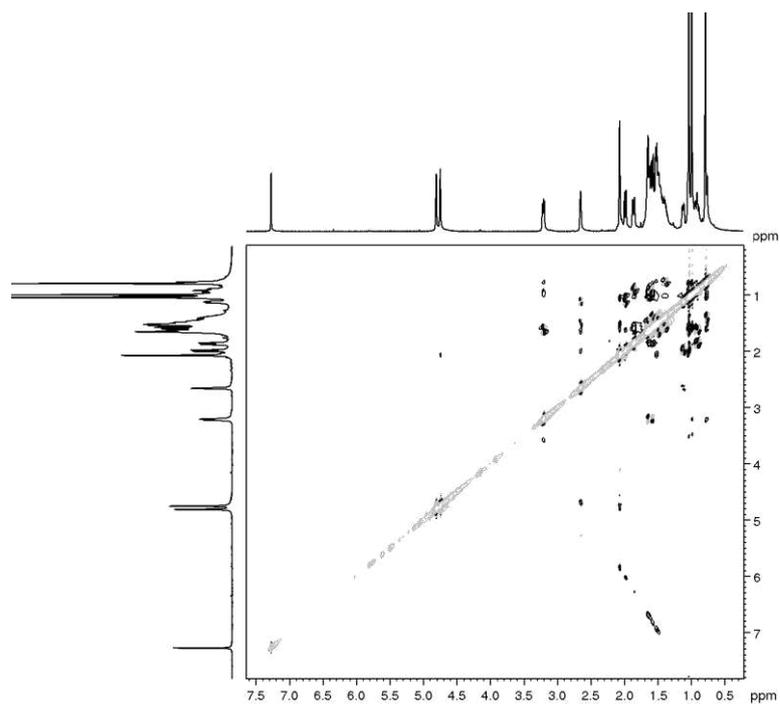
**Figura 182** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-17**.



**Figura 183** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-17**.



**Figura 184** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-17**.



### 6.1.18 Determinação estrutural de EB-18

Após tratamento cromatográfico de EHEBL-C, incluindo purificação por CLAE, obteve-se um sólido branco amorfo (8,0 mg) (Item 5.5.2.3, p. 58), com  $[\alpha]_D^{23} -25,3^\circ$  (*c* 0,5, CHCl<sub>3</sub>), o qual foi denominado **EB-18**.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> –Fig. 186, p. 194) para EB-18, se mostrou semelhante ao de EB-17, mas apresentou um quarteto do tipo AB (2H) com dupletos centrados em  $\delta_H$  3,39 e 3,47 (*J*=10,8 Hz), sugerindo a presença de um grupo hidroximetila ao invés de uma insaturação dupla exocíclica.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C CPD (75 MHz, CDCl<sub>3</sub> – Fig. 187, p. 194) mostrou sinais para 20 carbonos, os quais foram caracterizados a partir do espectro HSQC (Fig. 189, p. 195) em três carbonos metílicos [ $\delta_C$  33,8 (C-18), 21,8 (C-19) e 17,8 (C-20)], dez carbonos metilênicos, incluindo um hidroxilado em  $\delta_C$  70,0 (C-17), três carbonos metínicos e, por fim, quatro carbonos não hidrogenados, dos quais um é oxigenado em  $\delta_C$  80,0 (C-16).

A caracterização da estrutura de **EB-18** foi concluída através das correlações observadas no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C - HMBC (Fig. 190, p. 196), no qual foi possível confirmar a posição da hidroxila em C-17 devido à correlação dos hidrogênios em  $\delta_H$  3,39 (H-17a) e 3,47 (H-17b) com os sinais de carbono em  $\delta_C$  41,0 (C-13), 53,0 (C-15) e 80,0 (C-16). Adicionalmente, a partir das correlações dos sinais em  $\delta_H$  2,03 (d, *J*=12,1, H-14b) e 1,01 (m, H-14a) com o sinal característico de carbono oximetínico em  $\delta_C$  80,0 (C-16) indicou a presença de uma hidroxila em C-16. Essas e outras correlações presentes no espectro HMBC encontram-se representadas na figura 185 (p. 193).

A estereoquímica relativa de **EB-18** foi determinada a partir do espectro NOESY (Fig. 191, p. 197), devido às correlações espaciais dos sinais em  $\delta_H$  3,39 e 3,47 (H-17) com os sinais em  $\delta_H$  2,03 (d, *J*=12,1, H-14b), 1,01 (m, H-14a) e 1,42 (H-7), corroborando com a orientação dos grupos hidroximetilênico e hidroxila *alfa* e *beta* posicionados, respectivamente, em C-16. A posição relativa desses grupos em C-16 também foi estabelecida baseando-se nos valores de deslocamento químico de H-17a/H-17b, os quais, de acordo com Etse, Gray e Waterman (1987), quando um quarteto AB com dubletos está centrado em  $\delta_H$  3,66 e 3,78 (*J*=11,0 Hz), a orientação do grupo hidroximetilênico é *beta* posicionado, enquanto para o quarteto centrado em  $\delta_H$  3,37 e 3,47 (*J*=11,0 Hz), a orientação do grupo hidroximetilênico é *alfa* posicionado. Dessa forma, de acordo com os dados discutidos e por comparação com os

dados relatados na literatura, identificou-se EB-18 como um diterpeno caurano, previamente isolado por Etse, Gray e Waterman (1987), denominado 16 $\beta$ ,17-dihidroxicaurano (Figura 186).

**Tabela 33** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de EB-18 e de 16 $\beta$ ,17-dihidroxicaurano.

C	EB-18 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)		16 $\beta$ ,17-di-hidroxicaurano (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multip, $J_{\text{H,H}}$ )
1	40,6	1,80 (m)	41,4	
2	19,0	0,77 (m)	18,7	
		1,65 (m)		
		1,43 (m)		
3	42,2	1,14 (m)	42,0	
4	33,4	-	33,2	-
5	56,4	0,77 (m)	56,1	
6	20,2	1,90 (m)	20,0	
		1,54 (m)		
7	42,1	1,42 (m)	38,2	
8	43,7	-	43,5	-
9	57,2	1,13 (m)	56,9	
10	39,6	-	39,3	-
11	18,8	1,65 (m)	18,6	
		1,43 (m)		
12	26,9	1,76 (m)	26,7	
		1,61 (m)		
13	41,0	2,09 (s)	52,6	
14	38,5	2,03 (d, $J=12,1$ )	40,4	
		1,01 (m)		
15	53,0	1,42 (m)	56,1	
16	80,0	-	79,7	-
17	70,0	3,47 (d, $J=10,8$ )	69,7	3,47 (d, $J=11,0$ )
		3,39 (d, $J=10,8$ )		3,37 (d, $J=11,0$ )
18	33,8	0,85 (s)	33,6	
19	21,8	0,80 (s)	21,5	
20	17,8	1,03 (s)	17,6	

Figura 185 - Algumas correlações de HMBC de **EB-18**.

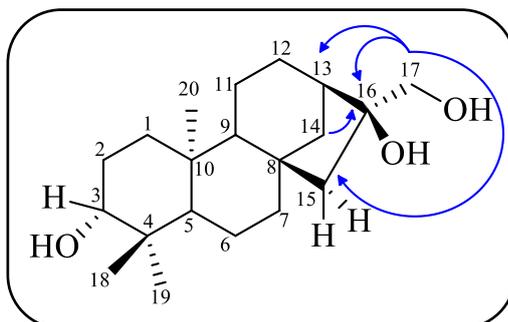


Figura 186 - Estrutura de **EB-18**.

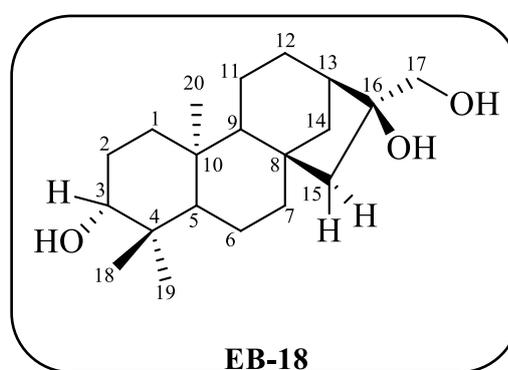
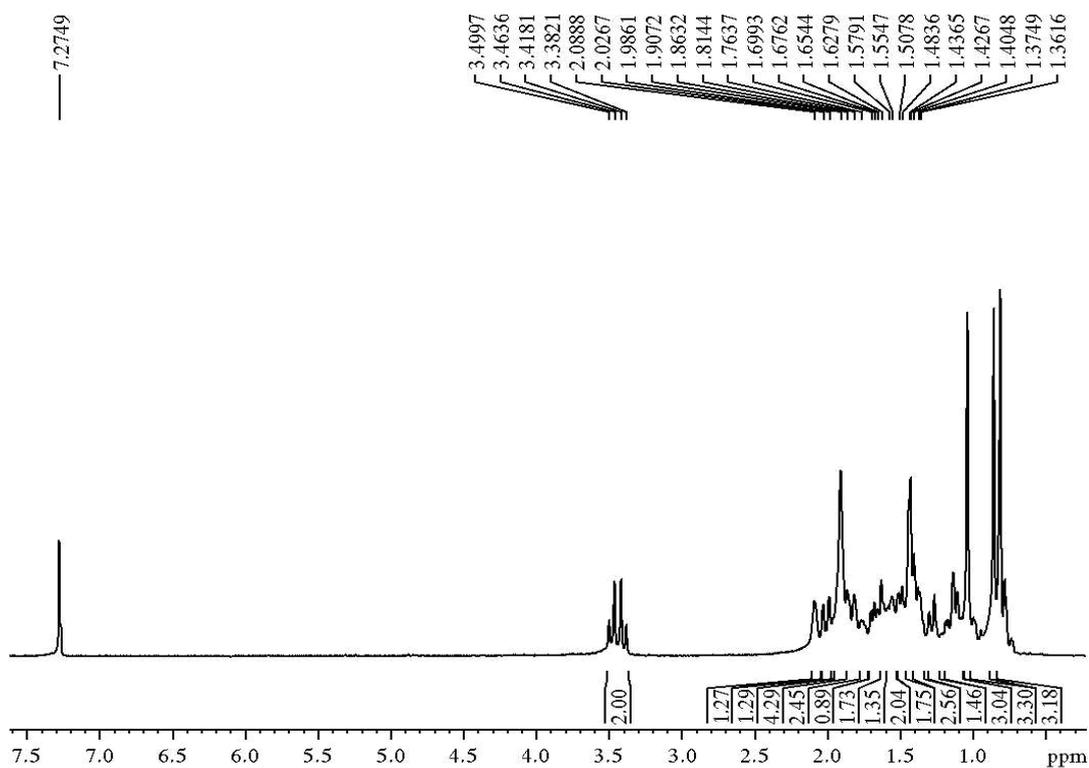
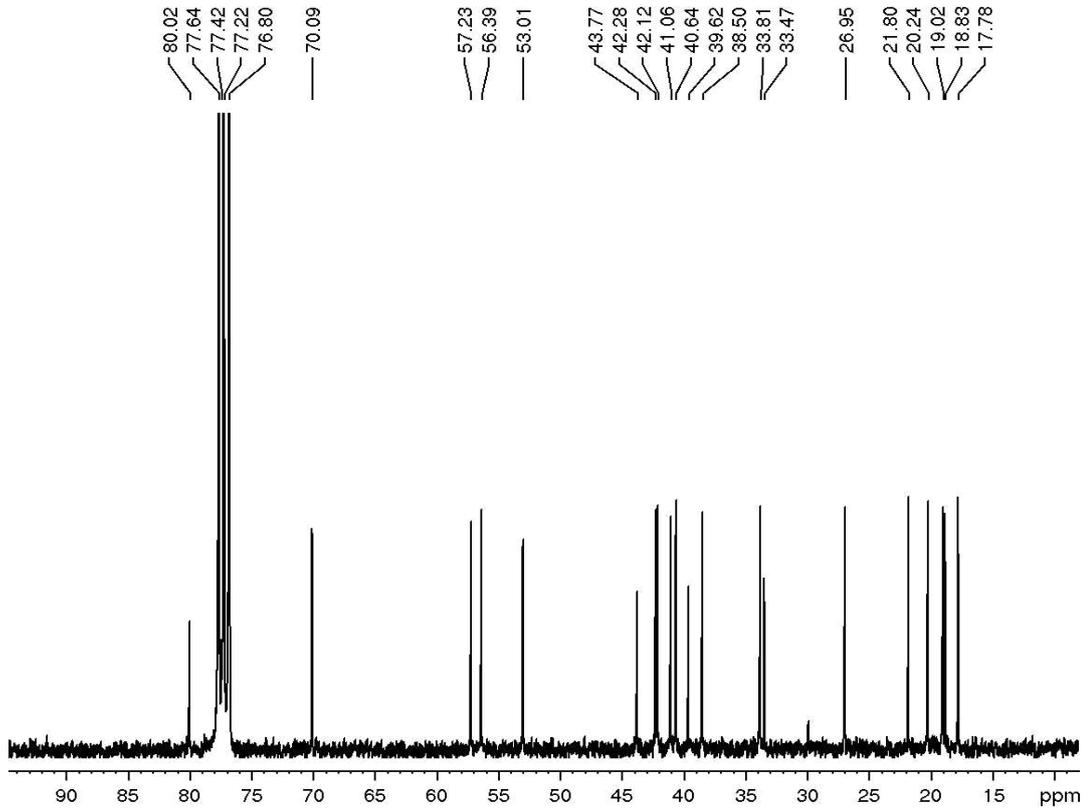


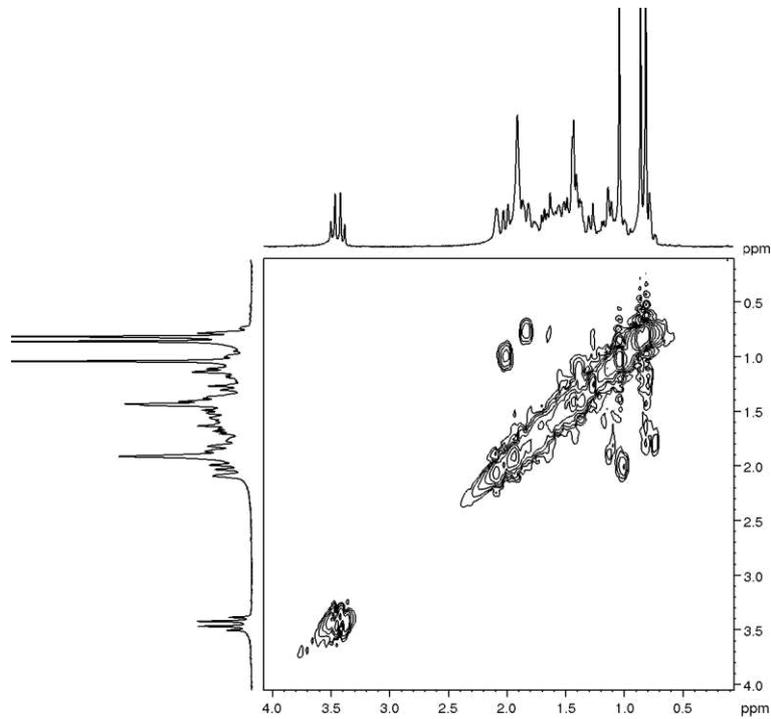
Figura 187 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-18**

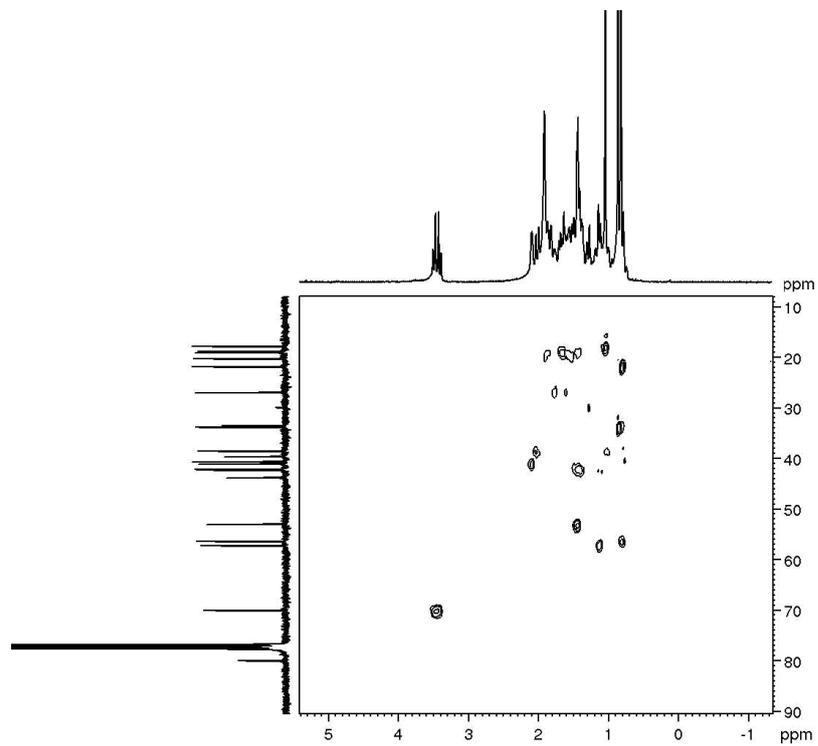
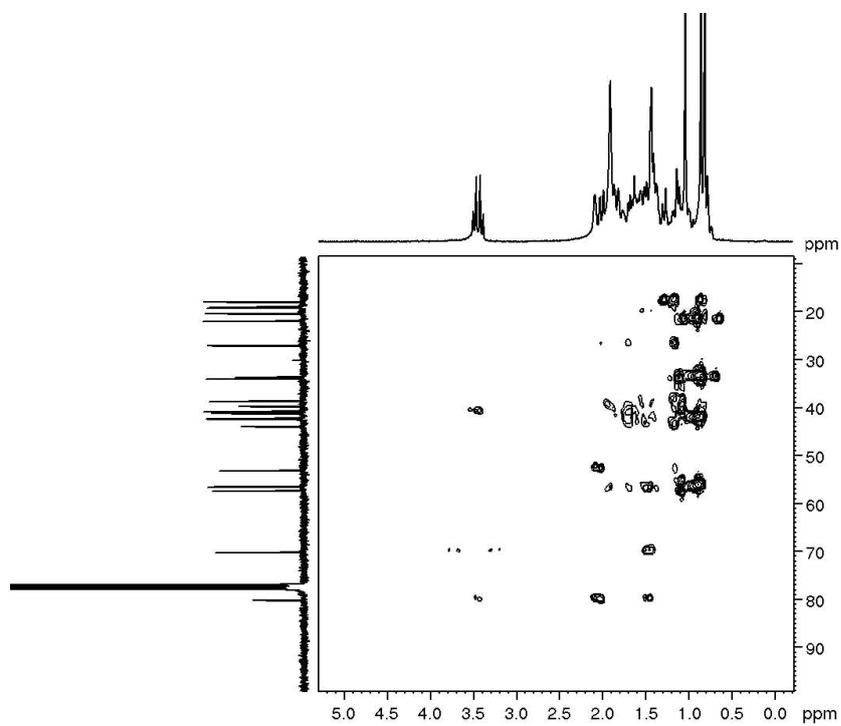


**Figura 188** - Espectro de RMN 13C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-18**.

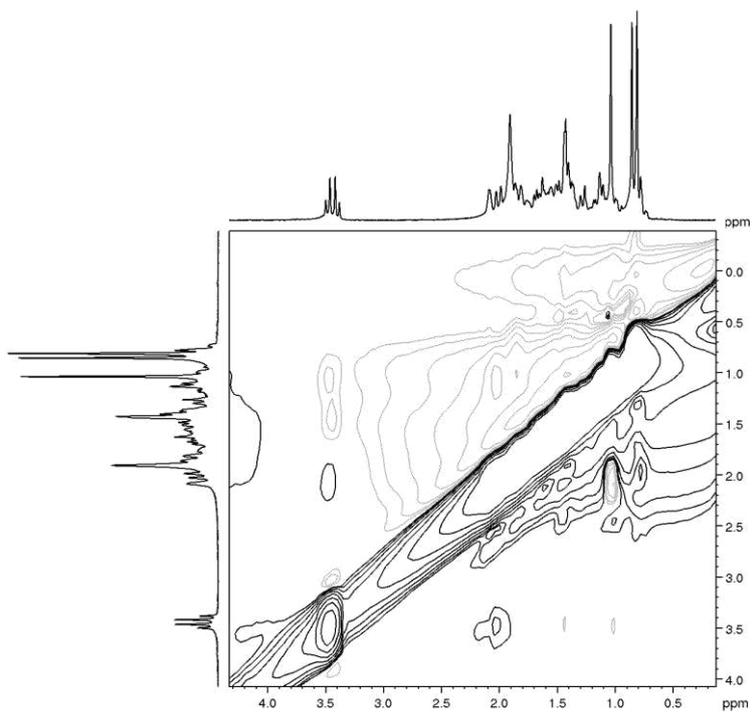


**Figura 189** - Espectro de RMN COSY (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-18**.



**Figura 190** - Espectro de RMN HSQC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-18****Figura 191** - Espectro de RMN HMBC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-18**.

**Figura 192** - Espectro de RMN NOESY (300 x 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **EB-18**.



### 6.1.19 Determinação estrutural de EB-19

O composto **EB-19**, um sólido branco amorfo, foi isolado a partir da fração diclorometano do extrato hexânico do lenho do caule de *E. bezerrae* (item 5.5.2.4, p. 59),  $[\alpha]_D^{24}$  -31.2° (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> –Fig. 194, p. 200) de EB-19 se mostrou semelhante ao de EB-18, mas apresentou um sistema de spin AB (2H) com dupletos, mais desprotegidos centrados em  $\delta_H$  3,78 e 3,66 (*J*=10,8 Hz), ao invés de  $\delta_H$  3,39 e 3,47 (*J*=10,8 Hz).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C CPD (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> – Fig. 195, p. 200) apresentou 20 linhas espectrais, com sinais de deslocamentos químicos semelhante a **EB-18**. A análise do espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C–HSQC (Fig. 196, p. 201) demonstrou a existência de três carbonos metílicos [ $\delta_C$  18,0 (C-20), 21,7 (C-19) e 33,7 (C-18)], dez carbonos metilênicos, sendo um oxigenado [ $\delta_C$  66,6 (C-17)], três carbonos metínicos e, por fim, quatro carbonos não hidrogenados, dos quais um é oxigenado em [ $\delta_C$  82,1 (C-16)] (Tabela 48, p. 199).

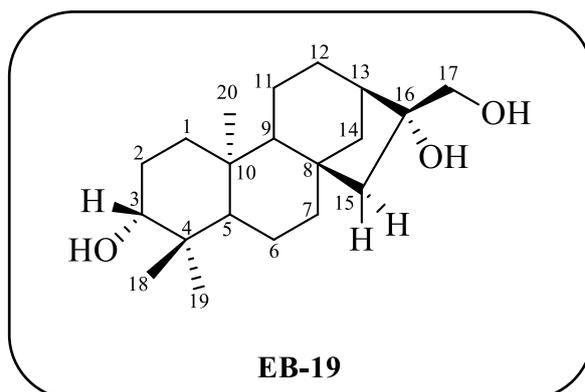
A análise comparativa dos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, incluindo informações obtidas do espectro HSQC de **EB-19** com **EB-18** aponta que os dois compostos diferem entre si quanto aos deslocamentos químicos dos sinais em  $\delta_C$  42,2 (C-14), 45,7 (C-13), 66,6 (C-17) e 82,1 (C-16) para EB-19, os quais em EB-18 aparecem em  $\delta_C$  40,6 (C-14), 41,0 (C-13), 70,0 (C-16) e 80,0 (C-17) para EB-18.

Essas informações sugerem que o composto em questão se trata de um epímero de **EB-18**, ou seja, com a orientação espacial do grupo hidroximetil em C-16, que passou de *alfa* para *beta* em EB-19.

Através das correlações a longa distância observadas no espectro de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C–HMBC (Fig 197, p. 202) foi possível confirmar a estrutura de **EB-19**. As principais correlações observadas à longa distância (<sup>2</sup>*J* e <sup>3</sup>*J*) foram entre os hidrogênios hidroximetilênicos H-17a ( $\delta_H$  3,66) e H-17b ( $\delta_H$  3,78) com os carbonos C-13 ( $\delta_C$  45,7) e C-15 ( $\delta_C$  53,6), dos hidrogênios metílicos H-19 ( $\delta_H$  0,85) e H-20 ( $\delta_H$  0,85) com os carbonos C-3 ( $\delta_C$  42,3) e C-10 ( $\delta_C$  39,6), respectivamente, e dos hidrogênios metínicos H-5 ( $\delta_H$  0,80) com C-18 ( $\delta_C$  33,7) e H-9 ( $\delta_H$  1,01) com C-5 ( $\delta_C$  56,4).

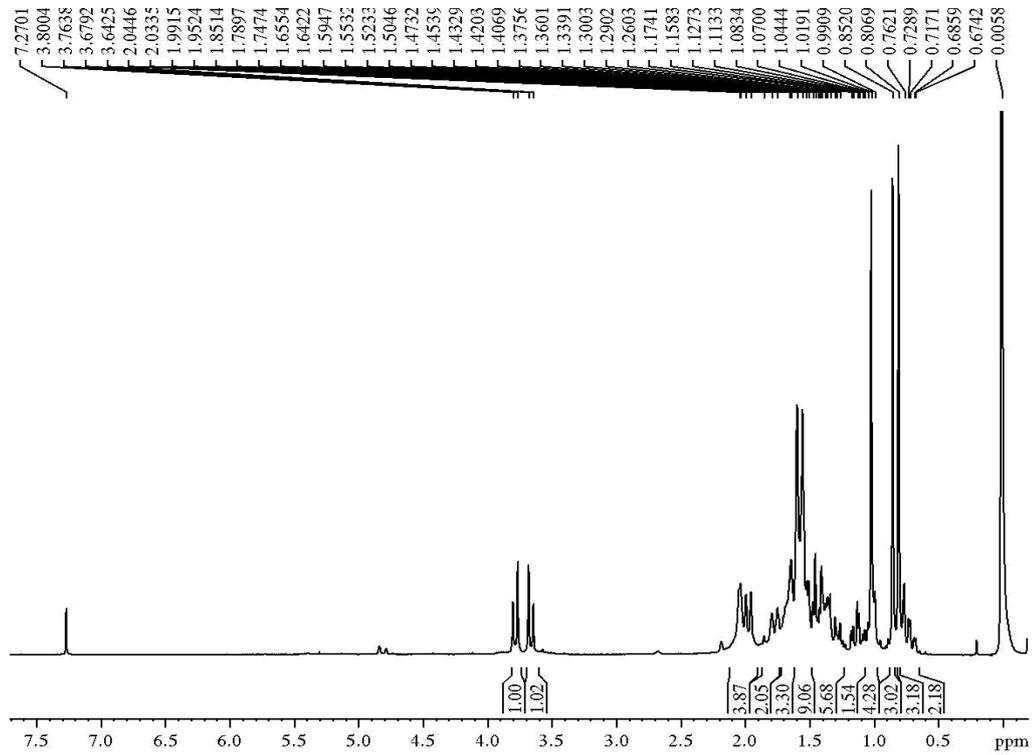
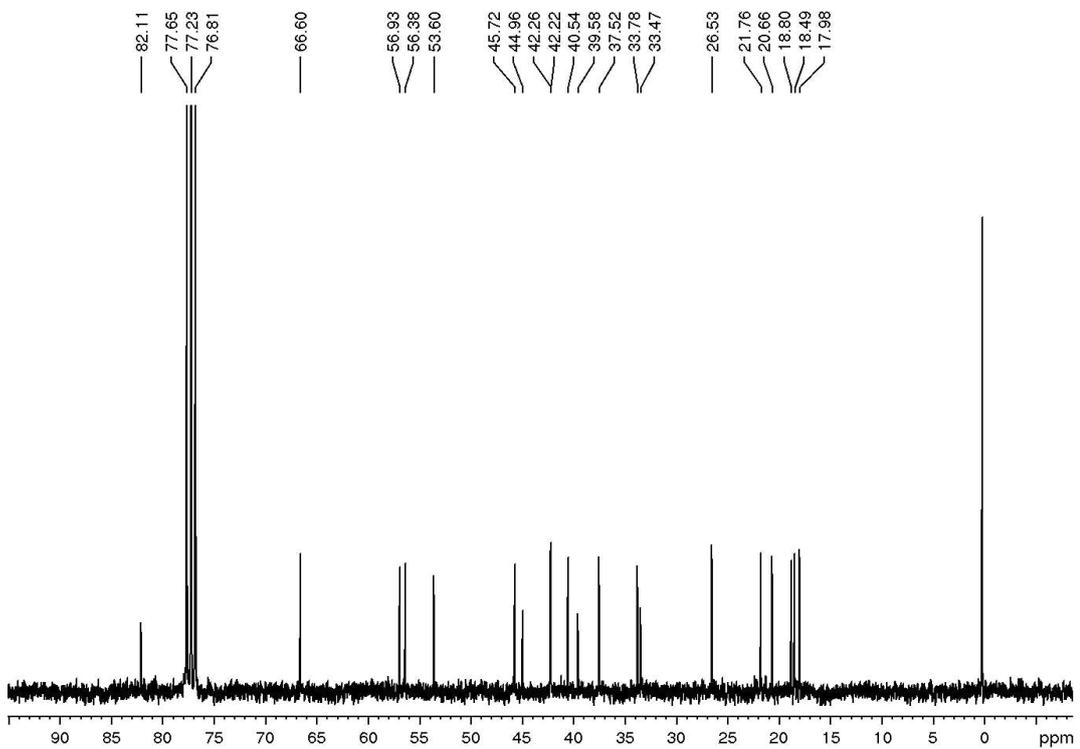
A análise dos dados apresentados, junto com a comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os relatados na literatura, possibilitou identificar **EB-19** como sendo um diterpeno caurano 16 $\alpha$ ,17-dihidroxicaurano (Fig. 193, p. 198), relatado pela primeira vez no gênero *Erythroxylum*, mas que foi isolado de *Annona reticulata* (ETSE; GRAY; WATERMAN, 1987).

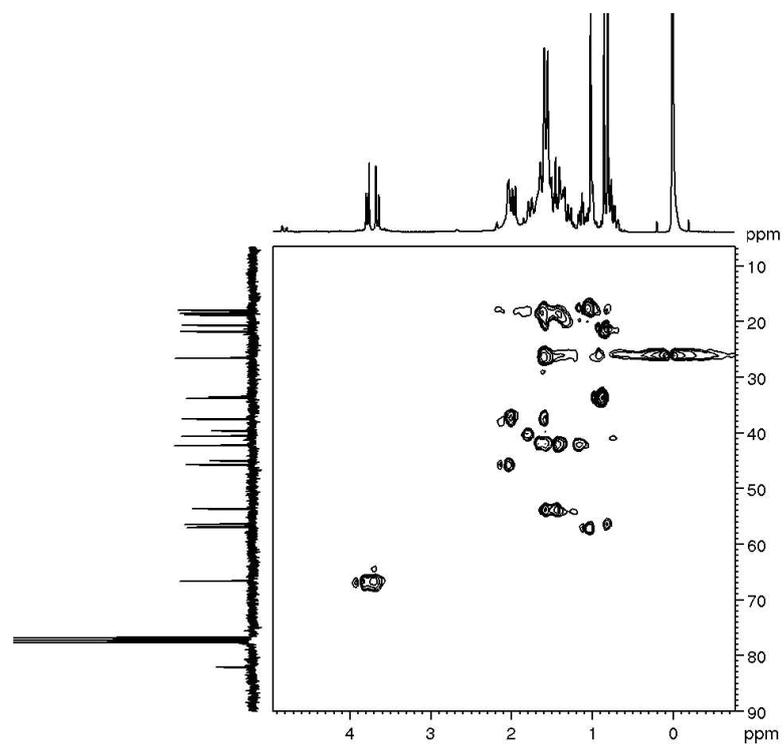
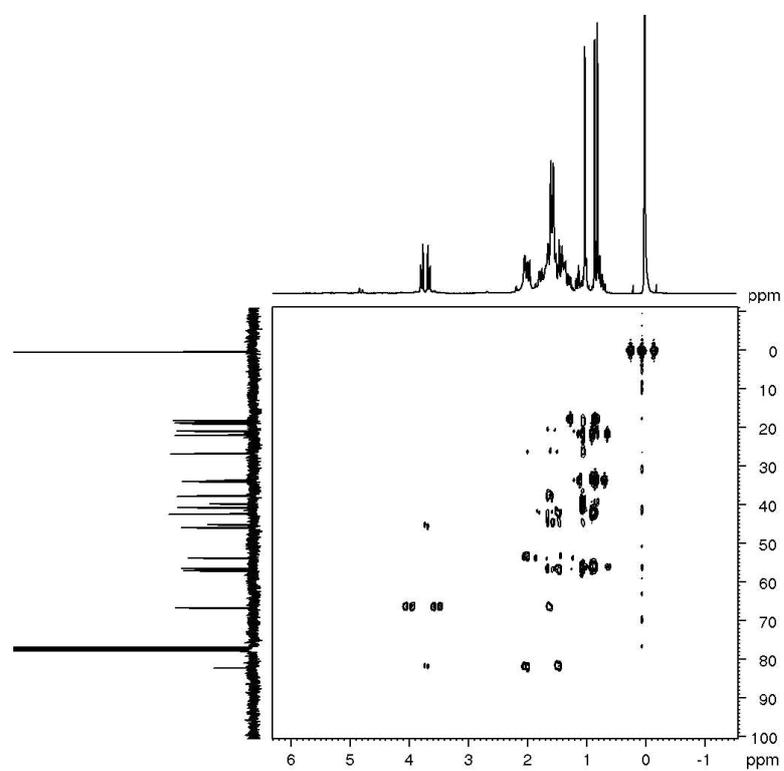
**Figura 193** - Estrutura de **EB-19**.



**Tabela 34** – Dados de RMN de H e C de EB-19, EB-18 e do composto 16 $\alpha$ ,17-dihidroxicaurano.

C	EB-19 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)		EB-18 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz)		16 $\alpha$ ,17-di-hidroxicaurano (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )	$\delta_C$	$\delta_H$ (multip, $J_{H,H}$ )
1	40,8	1,78 (m) 0,71 (td, 12,8, 3,5)	40,6	1,80 (m) 0,77 (m)	41,4	
2	18,5	1,62 (m) 1,40 (m)	19,0	1,65 (m) 1,43 (m)	18,7	
3	42,3	1,11 (m)	42,2	1,14 (m)	42,0	
4	33,4	-	33,4	-	33,2	
5	56,4	0,80 (m)	56,4	0,77 (m)	56,1	
6	20,6	- 1,58 (m)	20,2	1,90 (m) 1,54 (m)	20,0	
7	37,5	1,97 (d, $J=12,0$ ) 1,57 (m)	38,5	2,03 (d, $J=12,1$ ) 1,01 (m)	38,2	
8	45,0	-	43,7	-	43,5	
9	57,0	1,01 (m)	57,2	1,13 (m)	56,9	
10	39,6	-	39,6	-	39,3	
11	18,8	- 1,39 (m)	18,8	1,65 (m) 1,43 (m)	18,6	
12	26,5	- 1,58 (m)	26,9	1,76 (m) 1,61 (m)	26,7	
13	45,7	2,04 (s)	41,0	2,09 (s)	52,6	
14	42,2	1,40 (m) 1,11 (m)	42,1	1,42 (m) 1,14 (m)	40,4	
15	53,6	1,61 (m) 1,43 (m)	53,0	1,42 (m)	56,1	
16	82,1	-	80,0	-	79,7	
17	66,6	3,78 (d, $J=11,0$ ) 3,66 (d, $J=11,0$ )	70,0	3,47 (d, $J=10,8$ ) 3,39 (d, $J=10,8$ )	69,7	3,80 (d, $J=11,0$ ) 3,65 (d, $J=11,0$ )
18	33,7	1,02 (s)	33,8	0,85 (s)	33,6	
19	21,7	0,85 (s)	21,8	0,80 (s)	21,5	
20	18,0	0,80 (s)	17,8	1,03 (s)	17,6	

Figura 194 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19.Figura 195 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de EB-19.

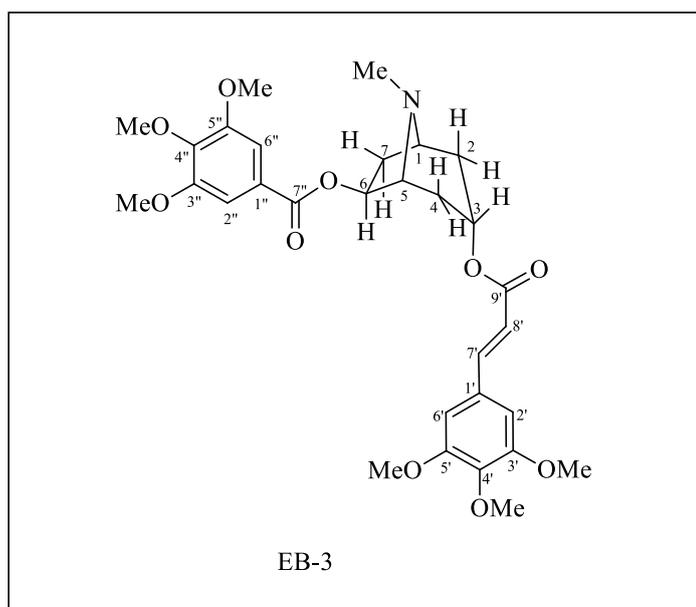
**Figura 196** - Espectro de RMN HSQC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-19****Figura 197** - Espectro de RMN HMBC (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **EB-19**.

## 6.2 Testes farmacológicos

### 6.2.1 Ensaio da citotoxicidade *in vitro* dos alcaloides tropânicos isolados de *E. bezerrae*

As propriedades antiproliferativas dos alcalóides isolados foram avaliadas contra quatro linhagens celulares de câncer humano [câncer de próstata metastático (PC-3), adenocarcinoma de cólon (HCT-116), glioblastoma (SNB-19) e câncer de pulmão (NCI-H460)] e uma linhagem celular de fibroblastos murino (L929). Como pode ser visto na Tabela 36, apenas o composto EB-3 (Fig. 198) apresentou citotoxicidade: HCT-116 ( $CI_{50}$  3,38  $\mu$ M) e NCI-H460 ( $CI_{50}$  5,43  $\mu$ M). As demais amostras mostraram valores de  $CI_{50}$  maiores que 10  $\mu$ M, não tendo sido consideradas citotóxicas.

**Figura 198** - Estrutura de bioatividade moderada de *E. bezerrae*.



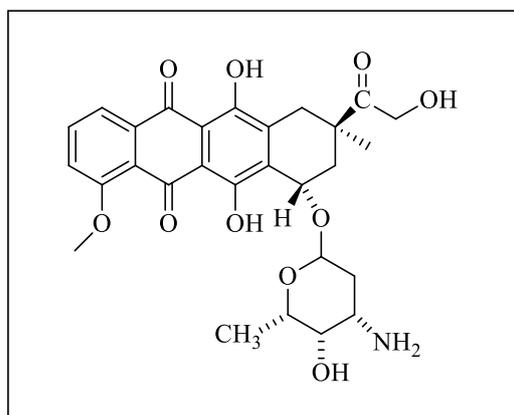
Correlacionando estrutura com a atividade observou-se que o composto EB-3 não possui hidroxila ligada ao biciclo tropânico, o que o torna mais apolar, o que, provavelmente, pode ter influenciado na citotoxicidade.

Tabela 35 - Atividade citotóxica *in vitro* dos compostos EB-1 a EB-8 frente a linhagem de célula tumoral.

Compostos	MTT CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)				
	L929	PC-3	HCT-116	SNB-19	NCI-H460
EB-1	>40	17,14 (15,11 – 19,46)	28,95 (26,21 – 31,97)	36,67 (21,81 – 61,66)	15,45 (12,60 – 18,93)
EB-2	>40	>40	28,07 (25,58 – 30,81)	21,23 (17,60 – 25,63)	21,95 (18,80 – 25,63)
EB-3	20,71 (18,42 – 23,31)	15,02 (13,36 – 16,89)	3,38 (3,05 – 4,20)	10,47 (9,64 – 11,37)	5,43 (4,88 – 6,04)
EB-4	>40	>40	>40	>40	>40
EB-5	>40	>40	38,88 (36,50 – 41,42)	>40	>40
EB-6	>40	>40	17,75 (15,52 – 20,31)	28,41 (25,38 – 31,80)	29,81 (26,30 – 33,79)
EB-7	19,40 (14,69 – 25,89)	10,56 (9,75 – 11,45)	16,45 (14,15 – 17,87)	13,89 (12,65 – 15,26)	10,55 (9,43 – 11,80)
EB-8	30,58 (25,29 – 30,80)	>40	19,26 (17,75 – 20,91)	31,37 (25,92 – 31,99)	17,33 (15,74 – 19,08)
Dox	1,72 (1,58 – 1,87)	0,76 (0,59 – 0,93)	0,21 (0,16 – 0,29)	0,15 (0,13 – 0,18)	2,06 (1,73 – 2,45)

Dox = Doxorubicina.

Figura 199 - Estrutura da desoxorrubicina.



### 6.2.2 Ensaio da citotoxicidade *in vitro* dos diterpenos isolados de *E. bezerrae*

Para o teste de atividade dos diterpenos foram utilizadas células tumorais de HCT-116 (adenocarcinoma de cólon), SNB 19 (sistema nervoso), PC-3 (carcinoma de próstata), HL-60 (leucemia), A549 (pulmão), NCIH460 (pulmão) e MRC5 (fibroblasto de pulmão não tumoral). O ensaio foi feito numa concentração única de 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Os compostos **EB-9 a EB-13, EB-15 a EB-16 e EB-19** apresentaram porcentagem de inibição acima de 75%. Após este “screening”, os compostos ativos foram submetidos a um segundo ensaio pelo método MTT, para a determinação da medida da concentração que inibe 50% das células tumorais (CI<sub>50</sub>) sobre a linhagem HL-60. Foram encontrados valores de CI<sub>50</sub> de 10,34 a 19,55 µM, os quais representam uma baixa seletividade dos compostos testados (Tabela 37).

**Tabela 36** - Atividade citotóxica *in vitro* dos compostos EB-9 a EB-19 frente a linhagem de célula tumoral HL-60.

MTT CI <sub>50</sub> µM	
Compostos	HL-60
<b>EB-9</b>	12,30 (10,39 – 16,97)
<b>EB-10</b>	12,42 (9,71 – 15,87)
<b>EB-11</b>	10,34 (8,72 – 12,25)
<b>EB-12</b>	12,90 (10,03 – 16,59)
<b>EB-13</b>	15,58 (12,56 – 19,3)
<b>EB-15</b>	19,55 (3,32-11,5)
<b>EB-16</b>	16,33 (13,11 – 20,00)
<b>EB-19</b>	15,35 (11,96 – 19,71)
<b>Dox</b>	0,21 (0,16 – 0,29)

### 6.2.3 Determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro* dos diterpenos

O ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foi realizado para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos diterpênicos em células de macrófagos murinos RAW 264.7 (Mosmann, 1983). Conforme mostrado na Tabela x, os compostos demonstraram uma redução da viabilidade com valores  $CI_{50}$  na faixa de 70,57 a 346,3  $\mu$ M. Para avaliar os efeitos dos compostos na produção de óxido nítrico (NO) induzido por polissacarídeos sulfatados (LPS) em células RAW 264.7, as concentrações de nitrito no meio foram medidas como um indicador da produção de NO de acordo com a reação de Griess (GASPARRINI, 2018).

A avaliação da viabilidade celular evidenciou valores de  $CI_{50}$  para EB9 a EB19 variando de 70,57 – 346,3. Considerando os valores de viabilidade celular e inibição do NO, observou-se que os diterpenos EB-9, EB-10 e EB-16 exibiram semelhante atividade inibitória do NO, porém EB-10 teve menor citotoxicidade em comparação com os compostos EB-9 e EB-16 (Tabela 38). O diterpeno EB-14 apresentou citotoxicidade potente, com o menor valor de  $CI_{50}$  na viabilidade celular, mas mostrou um potencial significativo para inibir a produção de NO. A partir dos dados de produção de NO, selecionou-se os diterpenos EB-9, EB-10 e EB-16 para avaliar os efeitos na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 induzidas por LPS em RAW 264.7 e observou-se que o LPS elevou significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 em células tratadas com veículo. Os diterpenos selecionados foram capazes de reduzir significativamente os níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzidos por LPS em células RAW264.7, enquanto o diterpeno EB-10 reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma semelhante à dexametasona.

**Tabela 37** - Efeito de EB9-EB19 sobre a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264,7 estimuladas por LPS.

Composto	Viabilidade celular $CI_{50}$ (média $\pm$ DP, $\mu$ M)	Inibição NO $CI_{50}$ (média $\pm$ DP, $\mu$ M)
EB-9	113,3 $\pm$ 9,60	3,21 $\pm$ 0,23
EB-10	219,1 $\pm$ 23,07	3,76 $\pm$ 0,21
EB-11	117,9 $\pm$ 11,44	12,21 $\pm$ 0,52
EB-12	245,7 $\pm$ 41,95	10,24 $\pm$ 0,32
EB-13	133,6 $\pm$ 9,92	48,57 $\pm$ 1,21
EB-14	70,57 $\pm$ 12,75	1,23 $\pm$ 0,02
EB-15	99,17 $\pm$ 27,20	14,54 $\pm$ 0,42
EB-16	120,7 $\pm$ 14,91	3,56 $\pm$ 0,32

EB-17	200,3 ± 16,46	13,84 ± 0,55
EB-18	110,4 ± 24,90	10,46 ± 0,98
EB-19	346,3 ± 40,90	59,28 ± 1,25
Dexametasona	-	0,75 ± 0,03

Os valores representam as médias dos resultados de três experimentos independentes com padrões semelhantes (n = 6). A dexametasona foi usada como controle positivo para a inibição da produção de NO.

O presente estudo examinou os efeitos anti-inflamatórios dos diterpenóides de *Erythroxylum bezerrae* usando o modelo RAW 264.7 induzido por LPS. Macrófagos estimulados por LPS desencadeiam uma resposta inflamatória, produzindo e secretando níveis mais altos de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6, e NO (AQUILA et al., 2009). Nesse contexto, sabe-se que vários diterpenóides *ent*-cauranos possuem atividade anti-inflamatória por inibir a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7, efeito relacionado à inibição da resposta de neutrófilos devido à inibição da liberação de cálcio citosólico, bem como à inibição da produção de prostaglandina E2 (PGE2) através da supressão da ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (WENG et al., 2007; HWANG et al., 2001). Hwang et al. (2001) descreveram alvos relevantes dos quais diterpenos do tipo caurano, isolados de *Isodon japonicus* (Labiatae) mostraram ser fortes inibidores da produção de NO e PGE2 induzida por LPS em células RAW264.7, bem como inibição da ativação de NF- $\kappa$ B.

## 7 CONCLUSÕES

A prospecção química da casca e do cerne do caule de *Erythroxylum bezerrae* resultou no isolamento de dezenove substâncias, das quais dez estão sendo descritas pela primeira vez: (3 $\alpha$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-1**), 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-2**), 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-tropano (**EB-3**), 6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-3 $\alpha$ -hidroxi-tropano (**EB-4**), 6 $\beta$ -(benzoiloxi)-7 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-3 $\alpha$ -hidroxi-tropano (**EB-5**), 3 $\alpha$ -(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)-6 $\beta$ -(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoiloxi)-7 $\beta$ -hidroxi-tropano (**EB-6**), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -hidroxicaurenolideo (**EB-9**), 3 $\alpha$ -hidroxi-6 $\alpha$ ,19 $\beta$ -epoxi-caur-16-eno (**EB-10**), cau-4,16-dien-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -di-hidroxo (**EB-11**), (3,4,18,19, c)-furan-16,17-di-hidroxi-cauranol (**EB-12**). Foram isolados e caracterizados oito alcaloides tropânicos, dos quais seis são inéditos, onze diterpenos cauranos, sendo cinco inéditos e um diterpeno abietano já descrito na literatura.

Através dos resultados descritos neste trabalho é possível observar a predominância de alcaloides tropânicos e diterpenos do tipo caurano para a espécie *E. bezerrae*. Estes são metabólitos secundários considerados marcadores taxonômicos do gênero *Erythroxylum*. Este fato ratifica a importância de estudos com outras espécies, uma vez que alcaloides tropânicos e diterpenos normalmente são substâncias bioativas.

A atividade citotóxica *in vitro* apresentada pelo composto EB-3 evidencia a necessidade de estudos posteriores com esta substância a fim de prosseguir com a investigação em busca de novas drogas citotóxicas. Além disso, a baixa toxicidade dos alcalóides tropânicos EB-1 a EB-8 em relação à área do câncer, incluindo uma linhagem celular de fibroblasto murino, pode ser útil para mostrar sua importância para outros fins terapêuticos, tais como: anestésico, anticolinérgico e anti-hipertensivo.

O teste de atividade anti-inflamatória dos diterpenos mostrou que os compostos EB-9, EB-10 e EB-16 são capazes de reduzir significativamente os níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzidos por LPS em células RAW264.7, sendo que EB-10 reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma semelhante à dexametasona.

Este trabalho contribui com o conhecimento químico e farmacológico não somente da espécie, mas também para o gênero.

## REFERÊNCIAS

- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v.32, p. 953–9, 1993b.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the timber of *Erythroxylum australe*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 937–43, 1993c.
- AQUILA, S.; WENG, Z. Y.; ZENG, Y. Q.; SUN, H. D.; RÍOS, J. L. Inhibition of NF-kappaB activation and iNOS induction by *ent*-kaurane diterpenoids in LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1269-72, 2009.
- AWANG, K.; ABDULLAH, N. H.; HADI, A. H.; FONG, Y. S. Cardiovascular activity of labdane diterpenes from *Andrographis paniculata* in isolated rat hearts. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 7. p. 8764-58. 2012.
- BARBOSA, C. C.; SILVA F. D.; SANTOS, A. M.; VAZ, M. R. F.; NÓBREGA, F. F. F. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *erythroxylum*. **Revista saúde e ciência On line**, v.3, p. 207-216, 2014.
- BARREIRO, J. B.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p.679-688, 2009.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; DE SÁ, M. S.; COSTA, J. F. O. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1735–1739, 2007.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p. 537-547, 2012.
- BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B.; DE ARAÚJO, A.C.C.; BERTOLUCCI, S. K. V. Variation in the content and volatile composition of *Hyptis marrubioides* EPL: cultivated in field and greenhouse. **Química Nova**, v. 33, p. 33-37, 2010.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente, **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.
- BRINGMANN, G.; GUNTHER, C.; MUHLBACHER, J.; GUNATHILAKE, M.D.L.P.; WICKRAMASINGHE, A. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O. E. Schulz (Erythroxylaceae). **Phytochemistry**, v. 53, p. 409-416, 2000.
- CHAVES, C. G.; SCHAPOVAL, E. E.; ZUANAZZI, J. A.; DIEHL, E.; DE SIQUEIRA, N. C.; HENRIQUES, A. T. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 117-20. 1988.
- CHAVEZ, J.P.; DOS SANTOS, I. D.; CRUZ, F.G; DAVID, J.M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 941-943, 1996.

CHAVEZ, D. CUI, B.; CHAI, H. B.; GARCIA, R.; MEIJA, M.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Reversal of multidrug resistance by tropane alkaloids from the stems of *Erythroxylum rotundifolium*. **International Journal of molecular sciences**, v.65, p. 606–610. 2002.

CHIN, Y.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; MCCLOUD, T. G.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. Tropane aromatic ester alkaloids obtained from a large-scale recollection of *Erythroxylum pervillei* stem bark collected in Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 414–417, 2009.

CLOSS, G.L. The Configurational Equilibrium of the N-Methyl Group in Some Tropane Deuteriohalides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 20, p. 5456–5461, 1959.

COCINERO, E. J.; LESARRI, A.; ÉCIJA, P.; GRABOW, J. U.; FERNÁNDEZ, J. A.; CASTAÑO, F. N-Methyl stereochemistry in tropinone: the conformational flexibility of the tropane motif. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 6076–6083, 2010.

CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Erythroxylaceae. **Rodriguésia**, v. 69, p. 881–903, 2018.

CORDELL, G. A. Biodiversity and Drug Discovery: a Symbiotic Relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

CRUZ, R. A.; ALMEIDA, H.; FERNANDES, C. P.; JOSEPH-NATHAN, P.; ROCHA, L.; LEITAO, G. G. A new tropane alkaloid from the leaves of *Erythroxylum subsessile* isolated by pH-zone-refining counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 1273–7, 2016.

DUTRA, L. M.; BOMFIM, L. SUELLEN, L. A. ROCHA, A. N. *Ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter**, v. 24, p. 3315-3320, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 2. Ed., London: John Wiley e Sons, 2002. 517 p.

EL-IMAN, Y. M. A.; EVANS, W.; RAMSEY, K. Alkaloids of *Erythroxylum zambesiicum* root-bark. **Phytochemistry**, v. 8, p. 2385–2389, 1987.

EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 277–305, 2007.

ENZELL, C.R.; THOMAS, B.R. The wood resin of *Affathis australis* salis. - Structure and stereochemistry of the blain constituents. **Tetrahedron Letters**, v. 8, p. 391-397, 1964.

ETSE, J. T.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Chemistry in the Annonaceae, XXIV. Kaurane and Kaur-16-ene Diterpenes from the Stem Bark of *Annona reticulata*. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 979–983, 1987.

FARNSWORTH, N. R., CORDELL, G. A., PEZZUTO, JOHN M., KINGHORN, A. D. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.1514-1520, 2001.

GARCEZ, F. R.; GARCEZA, W. S.; SILVA, A. F. G.; BAZZO, R. C. Terpenoid Constituents from Leaves of *Guarea kunthiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 767-772, 2004.

GARCÍA, P. A.; OLIVEIRA, A. B.; BATISTA, R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. **Molecules**, v. 12, p. 455-483, 2007.

GENG, H.; LIU, Y. C.; LI, D. S.; XIAO, C. J.; LIU, Y.; LI, X. N.; LI, S. H. Unusual glycosidic labdane diterpenoids with cytotoxicity from the root of *Phlomis betonicoides*. **Phytochemistry**, v. 173, p. 112325. 2020

GLASER, R.; SHIFTAN, D.; DROUIN, M. Conformational pseudopolymorphism and solid-state CPMAS NMR studies for determination of solvent-dependent solution-state conformational preferences for (-)-scopolamine hydrobromide/hydrochloride salts. **Organic Chemistry Portal**, v. 64, p. 9217-9224. 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381. 2007.

GRAF, E.; LUDE, W. Alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* Martius, I: Isolation of catuabine A, B, and C. **Archiv der Pharmazie**, v. 310, p. 05-10, 1977.

GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GRYNKIEWICZ, G.; GADZIKOWSKA, M. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. **Pharmacological Reports**, v. 60, p. 439-463, 2008.

GONZÁLEZ-GUEVARA J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H., GONZÁLEZ-GARCÍA, K. A. L.; PAYO-HILL, J. A.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J.; MOLINA-TORRES, S.; PRIETO-GONZÁLEZ. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 34, p. 539-542, 2006.

HANSON, J.R. SAVONA, G. SIVERNS, M. <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectra and Microbiological Hydroxylation of 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -Hydroxykaurenolide. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 2001-2005, 1974.

HERNANDES, L. S.; KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M. Alcaloides Tropânicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 330-364.

HRYNCHUK, R. J.; BARTON, R. J.; ROBERTSON, B. E. The crystal structure of free base cocaine, C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 61, p. 481-487, 1983.

HWANG, B. Y. LEE, J.H. KOO, T. H. KIM, H.S. HONG, Y. S. RO, J.S. LEE, K.S. LEE, J.J. Kaurane Diterpenes from *Isodon japonicus* Inhibit Nitric Oxide and Prostaglandin E<sub>2</sub> Production and NF- $\kappa$ B Activation in LPS-Stimulated Macrophage RAW264.7 Cells. **Planta Médica**, v. 67, p. 406-410, 2001.

JIA, Z. J.; SHI, J. G.; YANG, L. Ent-Kaurane Diterpenoids from *Euphorbia wangii*. **Journal of Natural Products**, v. 6, p. 811-816, 1994.

KAPADI, A. H.; DEV, S. The diterpenoids of *Erythroxylon monogynum* – I. Monogynol. **Tetrahedron Letters**, v. 5, p. 1171–80, 1964.

KOHNEN-JOHANNSEN, K. L.; KAYSER, O. Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. **Molecules**, v. 24, p. 796, 2019.

LAKSTYGAL, A. M.; KOLESNIKOVA, T. O.; KHATSKO, S. L.; ZABEGALOV, K. N.; VOLGIN, A. D.; DEMIN, K. A.; SHEVYRIN, V. A.; WAPPLER-GUZZETTA, E. A.; KALUEFF, A. V. Dark classics in chemical neuroscience: atropine, scopolamine, and other anticholinergic deliriant hallucinogens. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, p. 2144–2159, 2019.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta botânica brasileira**, v. 21, p. 473–487, 2007.

LOIOLA, M. I. B. A new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from the Brazilian semiarid region. **Phytotaxa**, v. 150, p. 61–64, 2013.

MANABE, H.; SAKAGAMI, H.; ISHIZONE, H.; KUSANO, H.; FUJIMAKI, M.; WADA, C.; KOMATSU, N.; NAKASHIMA, H.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, N. Effects Of Catuaba Extracts On Microbial and HIV Infection. **Vivo Athens Greece**, v. 6, 161–165, 1992.

MI, Q., CUI, B., SILVA, G.L., LANTVIT, D., LIM, E., CHAI, H., HOLLINGSHEAD, M.G., MAYO, J.G., KINGHORN, A.D., PEZZUTO, J.M. Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Letters**, v. 184, p. 13–20, 2002

MENDES, J. R.; LOPES, M. C.; VANCINI-CAMPANHARO, C. R.; OKUNO, M. F.; BATISTA, R. E. Tipos e frequência de erros no preparo e na administração de medicamentos endovenosos. **Einstein** (São Paulo). V. 16, 2018.

MENEZES-FILHO, N. J.; SOUZA, C. S.; COSTA, T. C. S.; SILVA, V. D. A.; RIBEIRO, C. S. O.; BARREIROS, M. L.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L.; COSTA, S. L. Cytotoxicity of the diterpene 14-O-methyl-ryanodanol from *Erythroxylum passerinum* in an astrocytic cells model. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1245–8, 2014.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. Review. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770–803. 2020.

NESTEROVA, Y. V.; POVETIEVA, T. N.; SUSLOV, N. I.; ZYUZ'KOV, G. N.; AKSINENKO, S. G.; PUSHKARSKII, S. V.; KRAPIVIN, A. V. Anti-inflammatory activity of diterpene alkaloids from *Aconitum baikalense*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.156, p. 665–8. 2014.

do NASCIMENTO, C. J.; POVOAVIOLANTE, I. M.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and *ent*-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 401–6, 2012.

NOVAES, F. J. M.; LIMA, F. A.; CALADO, V.; MARRIOTT, F. J.; DE AQUINO NETO, F. R.; REZENDE, C. M. Isolating valuable coffee diterpenes by using an inexpensive procedure. **Industrial Crops & Products**, v. 152, p. 112494, 2020.

OLIVEIRA, S. L., DA SILVA, M. S., TAVARES, J. T., SENA-FILHO, J. G., LUCENA, H. F. S., ROMERO, M. A. V. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of <sup>13</sup>C-NMR Spectral Data. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, p. 302-326, 2010.

OLIVEIRA, S. L., TAVARES, J. F., BRANCO, M. V. S. C., LUCENA, H. F. S., BARBOSA-FILHO, J. M., AGRA, M. F., NASCIMENTO, S. C., SILVA, M. S. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 155-165, 2011.

ONO, M.; YANAKA, T.; YAMAMOTO, M.; ITO, Y.; NOHARA, T. New Diterpenes and Norditerpenes from the Fruits of *Vitex rotundifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 537-541, 2002.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 5. Ed Philadelphia: Cengage Learning. 2016. 716p.

PAYO-HILL, A. L.; DOMINGUEZ, R. S.; SUAREZ, M. O.; BATISTA-BAEZ, M.; VELEZ CASTRO, H. T.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylon alaternifolium* and *Erythroxylon rotundifolium*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 927-932, 2000.

PEREIRA, G. M.; MOREIRA, L. G. L.; NEGREIROS, T. S.; DE ALMEIDA, W. A. M.; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O. Isolation, spectral characterization, molecular docking, and cytotoxic activity of alkaloids from *Erythroxylum pungens* O. E. Schulz, **Phytochemistry**, v.155, p. 12-18, 2018.

PLOWMAN, T.C.; HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, p. 1-53, 2004.

PLOWMAN, T. Four new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from Northeastern Brazil. **Brittonia**, v. 38, p. 189-200, 1986.

RESTREPO, D. A.; SAENZ, E.; JARA-MUÑOZ, O. A.; CALIXTO-BOTÍA, I. F.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, S.; ZULETA, P.; CHAVEZ, B. G.; SANCHEZ, J. A.; D'AURIA, J. C. *Erythroxylum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. **Molecules**, v. 24, p. 3788, 2019.

RIBEIRO, E. M. O. **Estudo fitoquímico de *Erythroxylum rimosum* o. e. schulz e *Erythroxylum betulaceum* Mart. (erythroxylaceae)**. 240 f. Tese (doutorado em química), Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2011.

RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; LOPES, L. M. X.; do VALE, A. E. A new tropane alkaloids and other constituents of *Erythroxylum risomun* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 232-235, 2013.

RODRIGUES, G.A.; SOUZA, W.C.; GODINHO, M.G.C.; FERREIRA, H.D.; VILA VERDE, G.M. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1159-1168, 2015.

DOS SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1304-1308, 2006.

SATO, F.; HASHIMOTO, T.; HACHIYA, A.; TAMURA, K.; CHOI, K. B.; MORISHIGE, T.; FUJIMOTO, H.; YAMADA, Y. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 367-372. 2001.

Satoru, M. Total Syntheses of Diterpenes and Diterpene Alkaloids. III. Kaurene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 2, p. 289-290. 1964.

SAIJO, H.; KOFUJITA, H.; TAKAHASHI, K.; ASHITANI, T. Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol. **Natural Product Research**, v. 29, p. 1739-43, 2015.

SENA-FILHO, J. G.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; ROMERO, M. A. V.; XAVIER, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R.. Cytotoxic evaluation of pungencine: A new tropane alkaloid from the roots of *Erythroxylum pungens* O. E. Schulz. **Helv. Analytica Chimica Acta**, v. 93, p. 1742-1744, 2010.

SIDOROWICZ, K.; RATKIEWICZ, A.; NODZEWSKA, A.; LAZNY, R.. Determination of the *N*-invertomer stereochemistry in *N*-substituted nortropanones and norgranatanones using computational and NMR methods. **Comptus Rendus Chimie**, v. 18, p. 693-704, 2015.

SILVA, G. L.; CUI, B.; CHÁVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H. B.; RASOANAIVO, P.; LYNN, M. S. X.; O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A.; BESTERMAN, J. M.; MONKS, A. Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-collection of *Erythroxylum pervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 414-7, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.1102p.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T. BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

TAMAKI, N.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T.; ARAMOTO, M.; TAKEDA, Y. Rearranged *ent*-kauranes from the stems of *Tricalysia dubia* and their biological activities. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 314-320, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4 Edtiion, **Artmed**, Porto Alegre, 848 p. 2009.

TENNAKOON, D. S.; THAMBUGALA, K. M.; WANASINGHE, D. N.; GENTEKAKI, E. Additions to Phaeosphaeriaceae (Pleosporales), *Elongaticollum* gen. nov., *Ophiosphaerella taiwanensis* sp. nov., *Phaeosphaeriopsis beaucarneae* sp. nov. and a new host record of *Neosetophomapoaceicola* from Musaceae. **Mycokeys**, v. 70, p. 59-88, 2020.

VELANDIA, J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Ácido *ent*-16 $\alpha$ ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de ouratea semiserrata e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. **Química Nova**, v. 21, 1998.

WENG, Z. Y.; HUANG, S. X.; LI, M. L.; ZENG, Y. Q.; HAN, Q. B.; RIOS, J. L. SUN, H.D. Isolation of Two Bioactive ent-Kauranoids from the Leaves of *Isodon xerophilus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6039-43, 2007.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellin Biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 251–257, 2000.

YAMAZAKI, K.; BOYSE, E. A.; MIKÉ, V.; THALER, H. T.; MATHIESON, B. J.; ABBOTT, J. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. **Journal of Experimental Medicine**, v. 144, p. 1324-1335, 1976.