

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

IVONEIDE SANTANA SOBRAL

ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CAULE DA KIELMEYERA CUSPIDATA

Salvador

2006

IVONEIDE SANTANA SOBRAL

**ESTUDO QUÍMICO DA *Kielmeyera cuspidata*
(CLUSIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz.

Salvador
2006

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Aos meus pais Antonio e Maridete e meus irmãos Sidnei e Eliomara pelo incentivo, proteção e carinho que me proporcionaram não só nesta etapa da minha vida, mas em todos os momentos.

Ao professor Frederico Guaré Cruz pela orientação e pelos recursos fornecido para a realização desta dissertação e dedicado empenho para a finalização.

Ao professor Edilson pela compreensão e ajuste nos horários das aulas de Química geral.

Ao professor Miguel pelas longas conversas e ensinamentos.

A Vânia e Lourdes amigas dedicadas e que sempre estiveram e estão presente em todos os momentos.

A Caline e Isley amigas e acima de tudo companheiras fiéis e integrantes vitalícias do nosso “trio parada dura”.

A Rita, Flor, Luciana e Edson pelos sorrisos e apoio nas horas difíceis.

Gisele pelo carinho e paciência e pelos testes de atividade biológica.

Aos colegas do GESNAT que de forma indireta me ajudaram nesta etapa com apoio e incentivo, bem como aos demais professores e funcionários do Departamento de Química.

A CAPES, CNPQ, FAPESB e FINEP pelo apoio financeiro.

“Quando alguém encontra seu caminho, precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada. Nestes momentos o apoio, o incentivo, o amor e a compreensão nos dão força para continuarmos”. Por estarem sempre caminhado ao meu lado, dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Maridete e meus irmãos Sidnei e Eliomara.

“Na ausência do outro, o homem não se constrói homem...”

Vygotsky

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	
1.2 OBJETIVOS.....	
1.3 ASPECTO GERAL DA FAMÍLIA CLUSIACEAE E DO GÊNERO KIELMEYERA.....	
1.4 CLASSIFICAÇÃO DAS XANTONAS E SUA BIOSÍNTESE.....	
1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE XANTONAS NA FAMÍLIA CLUSIACEAE.....	
2 PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 INSTRUMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS.....	
2.2 COLETA DO MATERIAL.....	
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	
2.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO.....	
2.4.1 Estudo da Fração 19-22 (coluna C-1).....	
2.4.2 Estudo da Fração 27-29/C-1.....	
2.5 FRACIONAMENTO DA FASE DICLOROMETANO DO EXTRATO EM METANOL.....	
2.5.1 Estudo da Fração A7-A8 (Coluna B).....	
2.5.2 Estudo da Fração B12-14 (Coluna C).....	
2.5.3 Estudo da Fração B15 (Coluna D).....	
2.5.4 Estudo da Fração A9 (Coluna E).....	
2.5.5 Estudo da Fração A12-15 (Coluna F).....	

2.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	
2.7.1	Bioautografia.....	
2.7.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	
2.7	REAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS.....	
2.7.1	Reação de Metilação.....	
2.7.2	Reação de Acetilação.....	
3	ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA KIELMEYERA CUSPIDATA.....	
3.1	DADOS FÍSICOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA <i>KIELMEYERA CUSPIDATA</i>	
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	
4.1	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	
4.1.1	Esteróides.....	
4.1.1.1	Identificação Estrutural das Substâncias Kcusp 01 e Kcusp 02	
4.1.2	Triterpenos.....	
4.1.2.1	Identificação Estrutural das Substâncias Kcusp 03 e Kcusp 04	
4.1.3	Xantonas.....	
4.1.3.1	Identificação Estrutural da Substância Kcusp 05	
4.1.3.2	Identificação Estrutural da Substância Kcusp 07	
4.1.3.3	Identificação Estrutural da Substância Kcusp 08	
4.1.3.4	Propostas Estruturais da Substância Kcusp 09	
4.1.3.5	Identificação Estrutural da Substância Kcusp 10	
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de substâncias dos principais grupos de xantonas.....	15
Tabela 2	Atividade antimicrobiana e estruturas de xantonas isoladas das espécies <i>Calophyllum brasiliense</i> e <i>Kielmeyera variabilis</i>	
Tabela 3	Amostra metilada.....	
Tabela 4	Amostra acetilada.....	
Tabela 5	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 3-O-acetil-sitosterol Kcusp 01 e 3-O-acetil-estigmasterol (Kcusp 02) comparado com dados da literatura (SOUSA, 1999) [δ (ppm)].....	
Tabela 6	Dados de RMN ¹³ C das substâncias α -amirina (Kcusp 03) e β -amirina (Kcusp 04) comparado com os dados da literatura (OLEA, 1990) [δ (ppm)].....	
Tabela 7	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona (Kcusp 05) comparada com os dados da literatura (WOLFENDER, <i>et al.</i> , 1991; SOUSA, 2005) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].....	
Tabela 8	Dados de RMN ¹ H da substância 2,3-metilenodioxixantona (Kcusp 07) comparada com os dados da literatura (CRUZ, <i>et al.</i> , 2001), [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].....	
Tabela 9	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona (Kcusp 08) comparada com os dados da literatura (CRUZ, <i>et al.</i> , 2001) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].....	
Tabela 10	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância Kcusp 05 [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].....	
Tabela 11	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (Kusp 10) comparada com dados da literatura (CASTELÃO, <i>et al.</i> , 1977; SOUSA, 2005) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].....	
Tabela 12	Resultado da bioautografia dos extratos em hexano e da fase diclorometano.....	
Tabela 13	Resultado da Concentração Inibitória Mínima da fase diclorometano.....	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação simplificada da biossíntese das xantonas a partir do ácido benzóico.....
- Figura 2 Representação da produção do ácido cinâmico a partir da fenilalanina.....
- Figura 3 Biossíntese de xantonas em células de *C. erythraea* e *H. androsaemum*.....
- Figura 04 Foto da excicata da espécie *Kielmeyera cuspidata*.....
- Figura 5 Procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos do caule da *Kielmeyera cuspidata*.....
- Figura 6 Procedimento experimental para obtenção do extrato orgânicos das folhas da *Kielmeyera cuspidata*.....
- Figura 7 Figura 7: Fracionamento do extrato hexânico da *K.cuspidata*.....
- Figura 8 Fracionamento da fase diclorometano na fração A7-8.....
- Figura 9 Fracionamento da fase diclorometano na fração A9.....
- Figura 10 Fracionamento da fase diclorometano nas frações A4, A10-11 e A12-15.....
- Figura 11 Espectro de RMN ^1H da mistura de 3-O-acetil-sitosterol e 3-O-acetil-estigmasterol [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 12 Espectro de RMN ^{13}C da mistura de 3-O-acetil-sitosterol e 3-O-acetil-estigmasterol [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 13 Espectro de RMN ^1H da mistura de α -amirina e β -amirina [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 14 Espectro de RMN ^{13}C da mistura de α -amirina e β -amirina [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 15 Esqueleto xantônico e deslocamentos químicos de carbono.....
- Figura 16 Alternativas estruturais da substância **Kcusp 05**.....
- Figura 17 Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 05**.....

- Figura 18 Espectro de RMN ^1H da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 19 Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 20 Espectro de RMN ^{13}C da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 21 Espectro de RMN ^1H da substância 2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 22 Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].....
- Figura 23 Deslocamentos químicos de carbono da 2,3-metilenodioxixantona das estruturas propostas para a **Kcusp 08**.....
- Figura 24 Espectro de RMN ^1H da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), DMSO-d_6].....
- Figura 25 Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), DMSO-d_6].....
- Figura 26 Espectro de RMN ^{13}C da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [75 MHz, δ (ppm), DMSO-d_6].....
- Figura 27 Alternativas estruturais da substância **Kcusp 09**.....
- Figura 28 Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 09**.....
- Figura 29 Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 09**.....
- Figura 30 Espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 09** [300 MHz, δ (ppm), Acetona-d_6].....
- Figura 31 Espectro de RMN ^{13}C da substância **Kcusp 09** [75 MHz, δ (ppm), Acetona-d_6].....
- Figura 32 Alternativas estruturais da substância **Kcusp 10**.....
- Figura 33 Alternativas estruturais da substância **Kcusp 10**, com os deslocamentos químicos de carbono.....
- Figura 34 Espectro de RMN ^1H da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].....

- Figura 35 Espectro de RMN ^1H da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].....
- Figura 36 Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [75MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].....

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ac.	Acetilação
Acetona-d ₆	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	centímetro
CoA	Coezima A
<i>d</i>	Dubleto
DMAP	4-dimetilamino-piridina
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO-d ₆	Sulfóxido de dimetila deuterado
<i>dt</i>	duplo tripleto
g	Gramas
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hz)
<i>K.</i>	<i>Kielmeyera</i>
Kcusp	<i>Kielmeyera cuspidata</i>
Kg	Quilograma
<i>m</i>	Multiplete
mg	miligrama
MHz	Megahertz
mL	mililitro
mm	milímetro
NaOAc	Acetato de etila

PM	Peso molecular
p.	página
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente
<i>s</i>	Singlete
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	tripleto largo
TMS	Tetrametil-silano
μg	micrograma
δ	deslocamento químico

RESUMO

O presente trabalho relata a investigação fitoquímica da espécie *Kielmeyera cuspidata*, pertencente à família Clusiaceae. Este é o primeiro estudo fitoquímico desta espécie. A coleta do material – caule e folhas – foi feita na região da Chapada Diamantina no município de Andaraí, estado da Bahia. Do extrato hexânico e da fase diclorometano do extrato metanólico do caule da *K. cuspidata* foram obtidas dez substâncias. Sendo que no extrato hexânico foi identificado uma mistura de esteróides (acetato de sitosterol e acetato de estigmasterol). Já na fase diclorometano foi identificada uma mistura de triterpenos (α -amirina e β -amirina) e seis xantonas. Na determinação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectrométricos usuais; UV, RMN e espectro de massas, juntamente com comparação dos dados descritos na literatura. Foram realizados também testes de atividade antimicrobiana nos extratos trabalhados.

Palavras-chave: *Kielmeyera*, Clusiaceae, xantona, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work describes the phytochemical investigation *Kielmeyera cuspidata* that belongs to the family Clusiaceae. This species was studied chemically for the first time. Many species of Clusiaceae family are known to possess mainly xanthenes that exhibit some important bioactivities. The hexane and methanolic extract were obtained by percolation of the dried e powdered trunk wood and leaf of this species. The hexane and methanolic extracts were subjected to a chromatographic column on silica gel eluted whit mixtures of hexane and ethyl acetate in order of increasing polarity, furnishing the following compounds: six xanthenes, two triterpenes and two steroid. These compounds were identified by comparison with literature data, and their spectroscopic properties.

Keywords: *Kielmeyera*, Clusiaceae, xanthone, antimicrobianas activity.

RESUMO

O presente trabalho relata a investigação fitoquímica da espécie *Kielmeyera cuspidata*, pertencente à família Clusiaceae. Este é o primeiro estudo fitoquímico desta espécie. A coleta do material – caule e folhas – foi feita na região da Chapada Diamantina no município de Andaraí, estado da Bahia. Do extrato hexânico e da fase diclorometano do extrato metanólico do caule da *K. cuspidata* foram obtidas dez substâncias. Sendo que no extrato hexânico foi identificado uma mistura de esteróides (acetato de sitosterol e acetato de estigmasterol). Já na fase diclorometano foi identificada uma mistura de triterpenos (α -amirina e β -amirina) e seis xantonas. Na determinação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectrométricos usuais; UV, RMN e espectro de massas, juntamente com comparação dos dados descritos na literatura. Foram realizados também testes de atividade antimicrobiana nos extratos trabalhados.

Palavras-chave: *Kielmeyera*, Clusiaceae, xantona, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work describes the phytochemical investigation *Kielmeyera cuspidata* that belongs to the family Clusiaceae. This species was studied chemically for the first time. Many species of Clusiaceae family are known to possess mainly xanthenes that exhibit some important bioactivities. The hexane and methanolic extract were obtained by percolation of the dried e powdered trunk wood and leaf of this species. The hexane and methanolic extracts were subjected to a chromatographic column on silica gel eluted whit mixtures of hexane and ethyl acetate in order of increasing polarity, furnishing the following compounds: six xanthenes, two triterpenes and two steroid. These compounds were identified by comparison with literature data, and their spectroscopic properties.

Keywords: *Kielmeyera*, Clusiaceae, xanthone, antimicrobianas activity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho relata o estudo químico da espécie *Kielmeyera cuspidata*, pertencente à família Clusiaceae. Por apresentar-se como o primeiro estudo referente à espécie, vem acrescentar um conhecimento a respeito da composição química desse gênero.

Os estudos referentes ao gênero *Kielmeyera* demonstraram uma frequência de algumas classes de substâncias químicas, dentre elas estão os neoflavonóides e as xantonas. Sendo as xantonas, o metabólito secundário mais largamente encontrado no mesmo. Substâncias isoladas do gênero foram submetidas a ensaios biológicos e algumas destas apresentaram atividade biológica tais como antimicrobiana (CORTEZ *et al.*, 1998), antioxidante (FINNEGAN, *et al.*, 1972; SUNDARAM, *et al.*, 1983; IINUMA, *et al.*, 1996), anti-tumoral (ABOU-SHOER *et al.*, 1988; DALLÁCQUA *et al.*, 2002), dentre outras. Portanto, o estudo dessa espécie torna possível o isolamento de substâncias que poderiam apresentar uma dessas atividades.

A espécie estudada foi coletada na região da Chapada Diamantina – Bahia, em uma área de campo rupestre, sendo que a primeira espécie estudada deste gênero da região da Chapada foi a *Kielmeyera lathrophyton*. Outras espécies do gênero *Kielmeyera* estudadas foram coletadas em *habitat* diferentes como: restinga, cerrado e floresta úmida, os dados obtidos foram comparados com os resultados alcançados no presente trabalho.

1.2 OBJETIVOS

Estudar a composição química, em termos de metabólitos secundários, da espécie vegetal *Kielmeyera cuspidata* que ocorre na Chapada Diamantina, Bahia. Purificar e determinar as estruturas desses metabólitos .

Comparar criticamente a composição química das espécies do gênero *Kielmeyera* presentes na Chapada Diamantina, com as das espécies, já estudadas, de ocorrência na restinga e cerrado.

Estabelecer a atividade antimicrobiana dos extratos.

1.3 ASPECTO GERAL DA FAMÍLIA CLUSIACEAE E DO GÊNERO KIELMEYERA

A família Clusiaceae engloba aproximadamente 1000 espécies em 30 gêneros distribuídas nas zonas tropicais e temperadas (SOUZA, *et al.*, 2005). No Brasil estão presentes aproximadamente 18 gêneros e 150 espécies, com ampla distribuição (SOUZA, *et al.*, 2005). São preferencialmente plantas lenhosas, arbóreas ou arbustivas e inclui algumas herbáceas. Suas flores são em geral vistosas, apresentando-se isoladas ou reunidas em inflorescência (JOLY, 1983). Já o gênero *Kielmeyera* é endêmico da América do Sul. As espécies do gênero são compostas de arbustos localizados em *habitat* de campo cerrado, campo rupestre ou restinga. Em geral, os talos dos arbustos das espécies apresentam-se espessos e com látex branco. Já as suas folhas são grandes e muitas vezes coriáceas (JOLY, 1983).

O grupo de pesquisa GESNAT (Grupo de Estudos de Substâncias Naturais Orgânicas) tem-se dedicado nos últimos dez anos ao estudo de espécies da família Clusiaceae entre outras. Dentre as espécies do gênero *Kielmeyera* estudadas, duas foram descobertas nas dunas de areia do Parque Metropolitano do Abaeté e foram objetos de duas dissertações de mestrado. Do caule destas duas espécies, *K. reticulata* e *K. argentea*, foram isoladas, predominantemente, 4-fenilcumarinas e 4-n-propilcumarinas, contudo, uma única xantona em pequena quantidade foi encontrada em *K. reticulata* (MOREIRA, 1999, SANTOS, 2004). Outras duas *K. lathrophyton* e *K. coriacea* foram coletadas na Chapada Diamantina e também foram objetos de duas dissertações de mestrado e uma tese de doutorado. Da *K. lathrophyton* foram isoladas xantonas, 4-fenil e 4-alquil cumarinas (NETO, 1998) assim como, uma bifenila inédita (SOUSA, 2005). Já na *K. coriacea* foram isoladas xantonas e derivados do fluoroglucinol, cuja ocorrência no gênero *Kielmeyera* nunca foi relatada anteriormente (SOUSA, 2005). De outras espécies deste gênero coletadas no cerrado ao redor de Belo

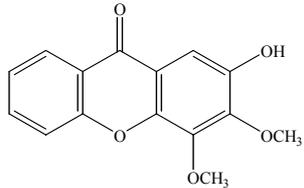
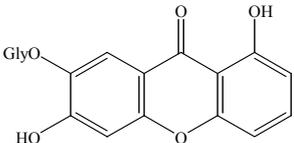
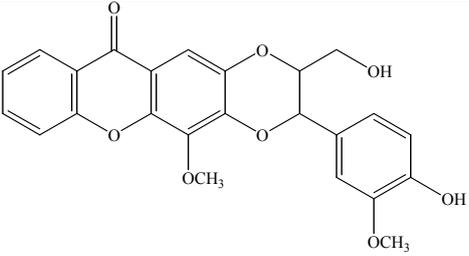
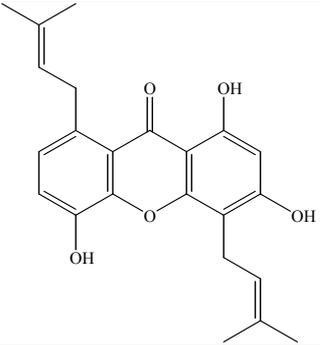
Horizonte, MG, foram isoladas, predominantemente xantonas (FERREIRA *et al.*, 1972, GOTTLIEB *et al.*, 1970 e 1977, NAGEM *et al.*, 1988, LOPES *et al.*, 1977) que são consideradas como marcadoras quimiossistemáticos da família Clusiaceae (BENNETT & LEE, 1989). Com base nestes estudos pode-se perceber a variação no perfil químico das espécies do gênero *Kielmeyera* com a mudança de *habitat*. Dados mostram que as espécies *Kielmeyera* coletadas no cerrado produzem principalmente xantonas, as coletadas em campo rupestre produzem cumarinas e xantonas, já as coletadas na restinga, cumarinas (SOUSA, 2005).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DAS XANTONAS E SUA BIOSÍNTESE

As xantonas são encontradas principalmente em plantas superiores, especialmente naquelas pertencentes às famílias Gentianaceae e Clusiaceae (PERES, *et al.*, 2000). Espécies de outras famílias de plantas superiores também produzem xantonas, como Caryophyllaceae, Gesneriaceae, Iridaceae, Loganiaceae, Lytraceae e Polypodiaceae. Em fungos e líquens também foram relatados a presença de xantonas; como por exemplo, nas espécies *Aspergillus versicolor* e *Diploshistes sp.* (PERES, *et al.*, 2000).

A classificação das xantonas ocorre em quatro grupos principais: oxigenadas simples, glicosiladas, preniladas e xantonolignóides (BENNETT & LEE, 1989). A Tabela 1 (p. 12) apresenta algumas substâncias das classes de xantonas mencionadas anteriormente. As classes das xantonas oxigenadas simples são subdivididas em seis grupos de acordo com o grau de oxigenação, portanto podem ser do tipo; mono, di, tri, tetra, penta ou hexaoxigenadas, sendo que a maioria das xantonas isoladas nas espécies do gênero *Kielmeyera* é pertencente à classe das oxigenadas simples (BENNETT & LEE, 1989).

Tabela 1: Exemplos de substâncias dos principais grupos de xantonas.

	
Xantona simples 2-hidroxi-3,4-dimetoxixantona	Xantona glicosilada 1,6-di-hidroxixantona-7-O-glicosideo
	
Xantonolignóide kielcorina B	Xantona prenilada 4,8-di (3-metilbut-2-enil)-1,3,5-trihidroxixantona

O primeiro relato na literatura de proposta da biossíntese da xantonas em Clusiaceae foi reportado por Bennet e Lee (1989). A dibenzo- γ -pirona ou xantona corresponde ao núcleo base de uma grande família de substâncias. Em geral, o padrão de oxigenação das xantonas de plantas superiores sugere uma biossíntese envolvendo a rota mista do chiquimato-acetato (BENNETT & LEE, 1989). No caminho misto chiquimato-acetato, as benzofenonas hidroxiladas são vistas como precursoras de xantonas.

O ácido benzóico que provém da rota do chiquimato é o precursor do intermediário benzofenônico (EL-MAWLA, *et al.*, 2001) (Figura 1, p. 13), sendo que o ácido benzóico pode ser obtido de duas formas: pela via do ácido cinâmico, intermediário da rota do chiquimato ou ser obtido diretamente do próprio chiquimato sem passar pela fenilalanina (EL-MAWLA, *et al.*, 2001).

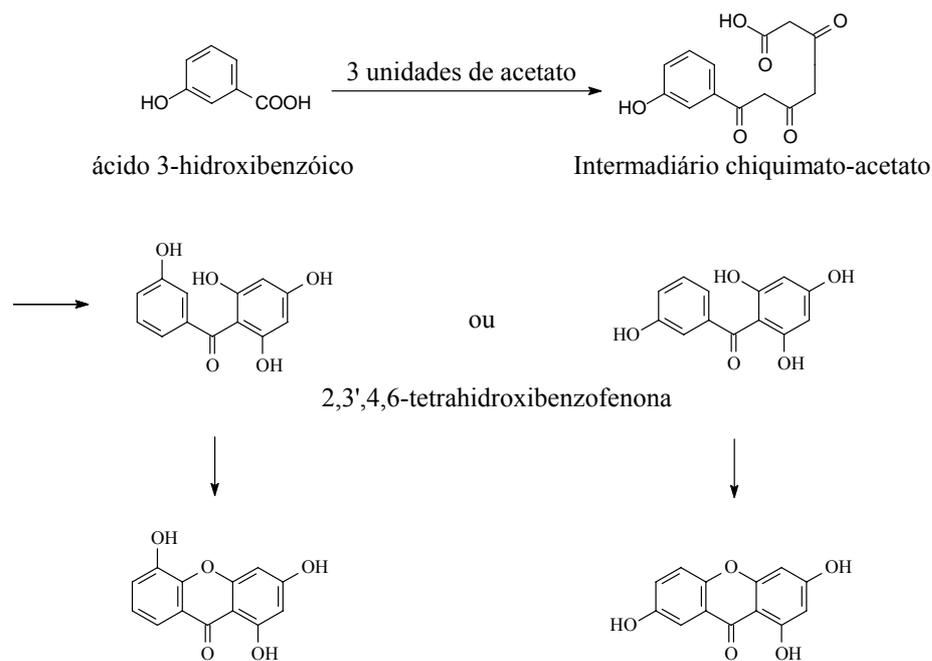


Figura 1: Representação simplificada da biossíntese das xantonas a partir do ácido benzóico.

Os estudos de culturas de células em duas espécies de plantas, *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) e *Hypericum androsaemum* (Hypericaceae) serviu como material de partida para verificar a participação do ácido benzóico na biossíntese das xantonas. Utilizou-se para o estudo ácido benzóico, ácido cinâmico e ácido 3-hidroxibenzoico radioativos na cultura das células das plantas pesquisadas. Na *Hypericum androsaemum* observou-se a incorporação do ácido cinâmico como substância procedente do ácido benzóico, incorporação esta confirmada com o aumento da atividade da enzima fenilalaninase que catalisa a reação de eliminação do íon NH_3^+ na fenilalanina para produzir ácido cinâmico (EL-MAWLA, *et al.*, 2001) (Figura 2, p. 14). Em contraponto, na cultura de células da *Centaurium erythraea* a incorporação exclusiva do ácido 3-hidroxibenzoico na formação da 1-hidroxi-3,5,6,7-tetrametoxixantona, sugeriu que o mesmo é obtido diretamente do chiquimato, portanto, derivou de um caminho independente da fenilalanina (BEERHUES, 1996; SCHIMIDT & BEERHUES, 1997). A partir deste estudo, pode-se notar e comprovar a participação do ácido benzóico como precursor na biossíntese de xantonas.

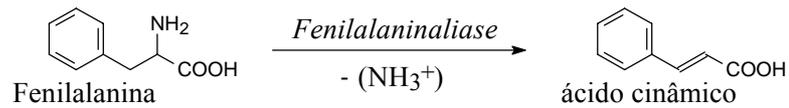


Figura 2: Representação da produção do ácido cinâmico a partir da fenilalanina.

Analisando os dois caminhos (Figura 3, p. 15) percebe-se que a 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona e a enzima responsável por sua conversão isoladas das culturas de células de *C. erythraea* e *H. androsaemum* irá atuar de maneira distinta. Na *C. erythraea* a 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona que juntamente com a enzima xantonasintase, responsável pela ciclização da 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona, é convertida em 1,3,5-trihidroxixantona (Figura 1, p. 12). Já na *H. androsaemum* a benzofenona é convertida na 1,3,7-trihidroxixantona (SCHIMIDT & BEERHUES, 1997) (Figura 3, p. 15). Portanto, a 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona, mostra-se como um importante intermediário na biossíntese das xantonas em plantas superiores (BEERHUES, 1996).

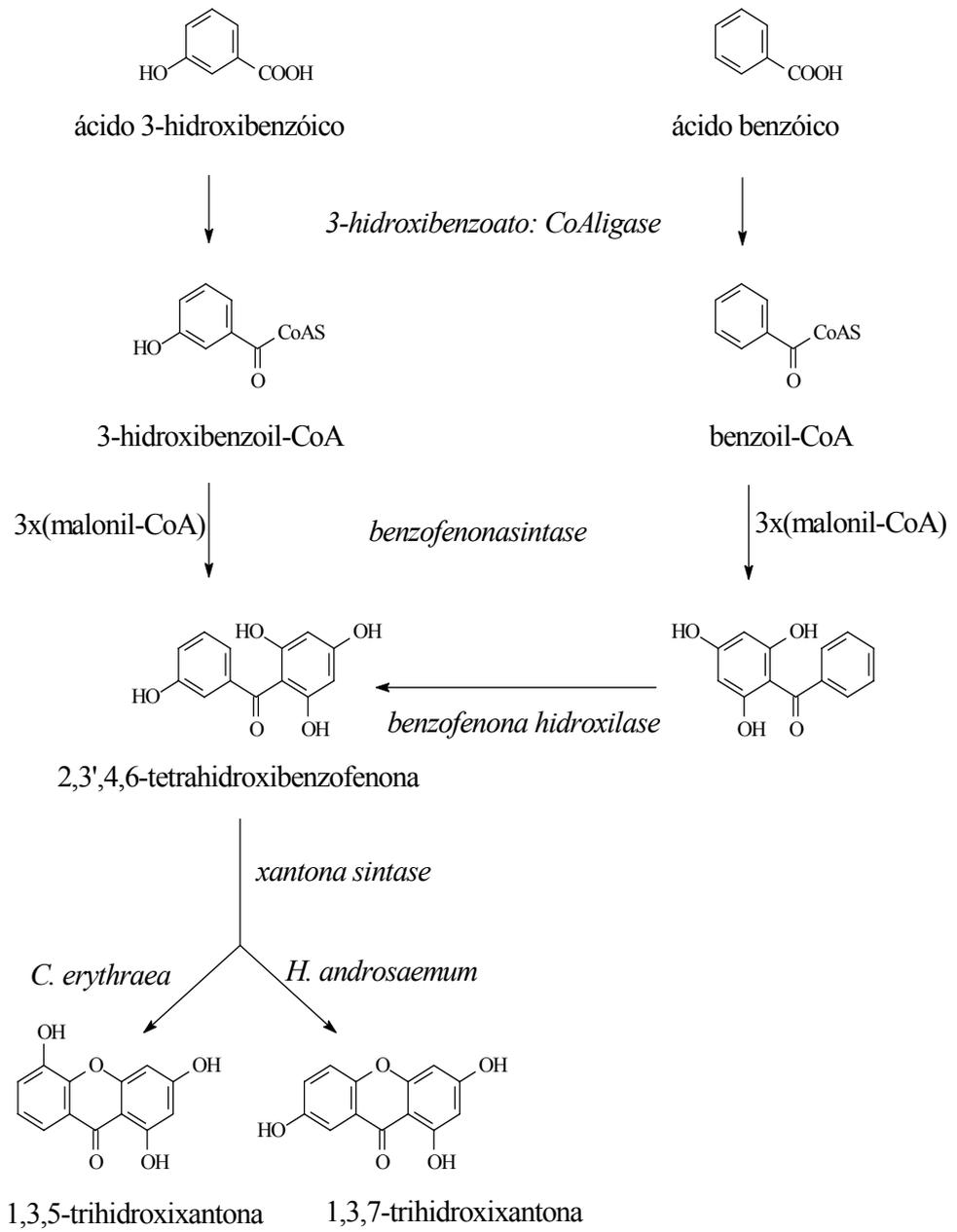


Figura 3: Biossíntese de xantonas em células de *C. erythraea* e *H. androsaemum*.

1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE XANTONAS NA FAMÍLIA CLUSIACEAE

O estudo das plantas mobiliza hoje milhares de engenheiros agrônomos, biólogos, químicos, botânicos, farmacêuticos, bioquímicos e médicos de todos os continentes. Anos e muito dinheiro são gastos em pesquisas para identificar princípios ativos e atividades biológicas. Borris (1996), em um de seus artigos propõe que ocorram no planeta cerca de 250.000 a 500.000 espécies de plantas. Porém, estima-se que apenas 25% a 50% dos fármacos utilizados são derivados de substâncias isoladas de plantas (COWAN, 1999).

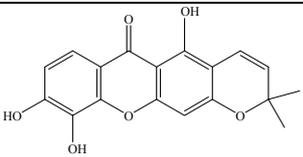
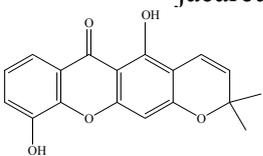
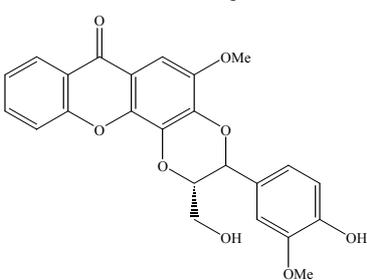
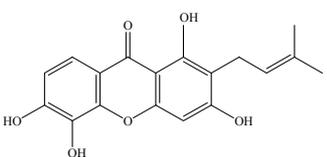
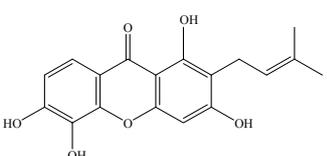
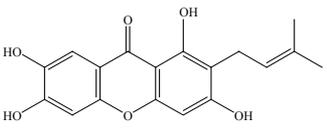
As plantas medicinais são os principais componentes da medicina tradicional. A utilização de plantas para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e que ainda hoje aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Por outro lado, a medicina utiliza antibióticos para reduzir a incidência de muitas doenças infecciosas (ALVES, 2001). Entretanto, muitas enfermidades permanecem não resolvidas, ocasionando o aparecimento de bactérias mutantes resistentes. Um exemplo seria a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (SAMR), uma espécie de bactéria que vem causando infecções hospitalares no mundo inteiro (ICHIYAMA *et al.*, 1991; YASUNAKA & KONO, 1999; TAKEDA *et al.*, 2000, citados por YASUNAKA *et al.*, 2005). Yasunaka e colaboradores, em 2005, relataram que nos últimos anos, o SAMR, vem gerando uma série de problemas, justamente devido a sua resistência a numerosos grupos de antibióticos já testados (KHAN *et al.*, 1980; SAMY *et al.*, 1997; ESSAWI & SROUR, 2000, citado por YASUNAKA *et al.*, 2005).

A literatura relata que as xantonas vêm sendo alvo de estudos como uma importante classe de compostos orgânicos com grande potencial biológico e/ou farmacológico, mostrando-se eficazes como inibidores de alergias e asma (JONES *et al.*, 1977); bem como apresentando atividade antiinflamatória (LIN *et al.*, 1996a), antimalárica (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1998), anti-cancer (LIN *et al.*, 1996b), anti-tumoral e citotóxica (ABOU-SHOER *et al.*, 1988; DALLÁCQUA *et al.*, 2002), mediadoras da proteína C Kinase (SARAIVA *et al.*, 2002), bactericida (CORTEZ, *et al.*, 1998) e fungicida (MOREAU *et al.*, 2002). Também foram encontrados efeitos de xantonas contra o vírus HIV (DHARMARATNE *et al.*, 2002), agentes antihipertensivos e/ou anti-trombóticos (LIN *et al.*, 1996b) e inibidora dos tipos A e B da monoamino-oxidase (BEERHUES & BERGER, 1994).

Do extrato diclorometano de folhas e caule da espécie *Kielmeyera coriacea* foram isoladas xantonas que exibiram atividade antifúngica contra o fitopatogeno *Cladosporium cucumerinum*, e enquanto xantonas preniladas inibiram o crescimento de *Candida albicans* (CORTEZ, *et al.*, 1998). Muitas espécies da família Clusiaceae contêm xantonas preniladas que possuem propriedades antimicrobianas (CORTEZ *et al.*, 1998). Já a *Kielmeyera variabilis* conhecida como “malva-do-campo”, é tradicionalmente usada na medicina popular para tratar de algumas doenças, incluindo schistosomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas (ALVES, 2001). Iinuma e colaboradores em 1996 reportaram que xantonas da família Clusiaceae possuem atividade antimicrobiana contra SAMR. Alguns pesquisadores destacaram a atividade antimicrobiana a partir dos extratos obtidos das plantas sugerindo assim, a capacidade inibitória das futuras substâncias isoladas dos mesmos. O extrato em acetona das folhas da *Calophyllum brasiliensis* e o extrato em metanol das sementes da *Mammea americana* apresentaram-se ativos contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (YASUNAKA, *et al.*, 2005) já o extrato em etanol do caule da *Garcinia mangostana* mostrou-se ativo contra o *Staphylococcus aureus* (VORAVUTHIKUNCHAI & KITPIPIT, 2005).

A Tabela 2 (p. 18) evidência a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de cinco xantonas isoladas das espécies *Calophyllum brasiliensis* (YASUNAKA, *et al.*, 2005) e *Kielmeyera variabilis* (PINHEIRO, *et al.*, 2003) pertencentes à família Clusiaceae. Com base nos valores de concentração inibitória mínima apresentada, pode-se observar que as substâncias jacareubina, isolada da *C. brasiliensis* e a 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona, isoladas da *C. brasiliensis* e *Kielmeyera variabilis* exibiram alta atividade contra (SAMR) e moderada contra *Escherichia coli*. As outras substâncias, kielcorina e 1,3,6,7-tetrahidroxi-2-prenilxantona isoladas da *K. variabilis* apresentaram atividade moderada contra *E. coli* e *S. aureus*, com exceção da 6-desoxijacareubina, isolada da *C. brasiliensis*, que se mostrou inativa contra os dois microorganismos. Com base nestes dados pode-se afirmar que algumas xantonas exibem atividade biológica como previsto na literatura (FINNEGAN, *et al.*, 1972; SUNDARAM, *et al.*, 1983; IINUMA, *et al.*, 1996).

Tabela 2: Atividade antimicrobiana e estruturas de xantonas isoladas das espécies *Calophyllum brasiliense* e *Kielmeyera variabilis*.

Substância	Planta		CIM ^a (µg/mL)	
	Nome científico		<i>E. coli</i>	
 <p style="text-align: center;">jacareubina</p>	<i>C. brasiliense</i>		128	4
 <p style="text-align: center;">6-desoxijacareubina</p>	<i>C. brasiliense</i>		> 512	> 512
 <p style="text-align: center;">kielcorina</p>	<i>K. variabilis</i>		> 100	> 100
 <p style="text-align: center;">1,3,5,6-tetrahydroxi-2-prenilxantona</p>	<i>C. brasiliense</i>		128	2
 <p style="text-align: center;">1,3,5,6-tetrahydroxi-2-prenilxantona</p>	<i>K. variabilis</i>		> 100	6,25
 <p style="text-align: center;">1,3,6,7-tetrahydroxi-2-prenilxantona</p>	<i>K. variabilis</i>		> 100	100

^a Concentração inibitória mínima.

CIM ≤ 64 µg/mL exibe alta atividade, 128 – 512 µg/mL exibe moderada atividade e ≥ 1024 µg/mL não exibe atividade.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 INSTRUMENTOS, MATERIAIS E MÉTODOS

- Os solventes utilizados durante o processo da pesquisa foram: ACS, CRQ, GRUPO QUÍMICA, QUIMEX, MERCK e VETEC.
- As partes utilizadas da planta, caule e folhas, foram moídas depois de secas no moinho THOMAS WILEY LABORATORY MILL-MODEL 4.
- Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro da VARIAN (GEMINI 2000) com operação a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Os solventes utilizados nas amostras foram: acetona, clorofórmio e dimetilsulfóxido, todos deuterados e tendo como referência interna o tetrametil-silano (TMS).
- A evaporação dos solventes presentes nos extratos e frações foi realizada com o auxílio de evaporador rotativo da marca BÜCHI 461 (sob pressão reduzida).
- Nos fracionamentos feitos por meio de cromatografia em coluna foram utilizados sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) e sílica gel 60 H (15 μm) todas da marca MERCK.
- As placas (10x5 cm) utilizadas na cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) foram preparadas utilizando sílica gel GF₂₅₄. As placas foram preparadas manualmente utilizando suspensão em água destilada. As placas utilizadas na cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas utilizando sílica gel PF₂₅₄₊₃₆₆. Para placas (20x20 cm) foi utilizado o espalhador HEIDELBERG, para a obtenção de placas de 1mm de espessura. Todas as placas – CCDC e CCDP – foram ativadas em estufa a 100°C por aproximadamente 1 hora.
- Para as revelações cromatográficas das placas - CCDC e CCDP - foram utilizadas a visualização com ultravioleta de 254 e 356 nm e vapores de iodo, sendo que o último apenas para as placas de CCDC. As substâncias separadas através de CCDP foram extraídas com acetona e clorofórmio, seguido de filtração a vácuo.

2.2 COLETA DO MATERIAL

A *Kielmeyera cuspidata* foi coletada pelo Grupo GESNAT sob a orientação do Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz no dia 10 de maio de 2003 em uma área de campo rupestre na região da Chapada Diamantina no município de Andaraí – Bahia. A Prof^ª. Maria Lenise Silva Guedes do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, curadora do herbário “Alexandre Leal Costa”, identificou e catalogou a espécie sob o registro ALCB – 061902 (Figura 4).

Figura 4: Foto da excicata da espécie *Kielmeyera cuspidata*.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O material coletado – folhas e caule – foi deixado em temperatura ambiente por alguns dias para desidratar. Ao término deste período, as folhas e o caule foram separados e moídos em moinho.

O caule triturado da planta (3,87 Kg) e as folhas (209,32 g) foram submetidos a extrações com solventes orgânicos, primeiramente com hexano e depois com metanol. As extrações foram realizadas pela imersão do material triturado em solvente por três dias com a filtração do mesmo ao fim deste período e sua concentração em evaporador rotativo (o procedimento foi repetido três vezes). Foram obtidos assim, os extratos em hexano da folha (2,18 g) e do caule (46,51 g) e o extrato em metanol (30,14 g) do caule (Figura 5-6, p. 22-23). Sendo que apenas os extratos em hexano e em metanol do caule foram trabalhados.

O extrato em metanol (30,14 g) foi particionado, dissolvendo o extrato em uma solução metanol-água 60%. A solução obtida foi submetida a extrações sucessivas com diclorometano (4x120 mL) e acetato de etila (4x120 mL). As fases obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se a fase diclorometano (8,70 g) e fase acetato de etila (2,14 g) (Figura 5, p.22).

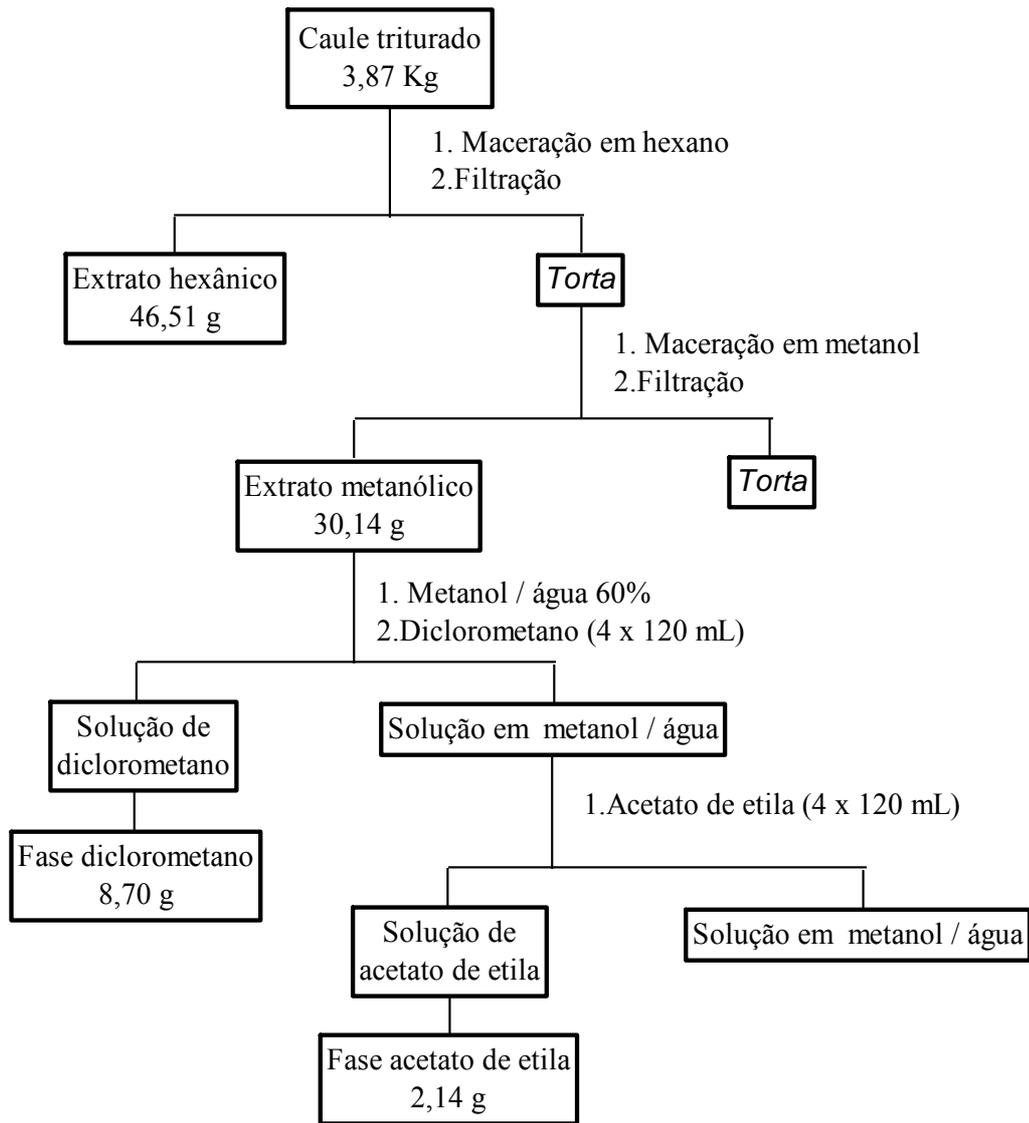


Figura 5: Procedimento experimental para obtenção dos extratos orgânicos do caule da *Kielmeyera cuspidata*.

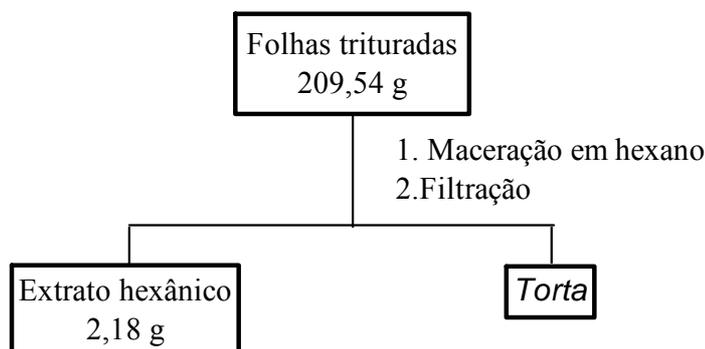


Figura 6: Procedimento experimental para obtenção do extrato orgânicos das folhas da *Kielmeyera cuspidata*.

2.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO

O extrato em hexano (46,71 g) foi fracionado por meio de cromatografia em coluna de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) empacotada a seco. Utilizou-se como fase móvel o sistema hexano e acetona em gradiente crescente de polaridade. Desta coluna foram obtidas 24 frações. As frações foram submetidas à CCDC. Analisando os resultados da CCDC, foram reunidas as frações **19** a **22** (13,02 g) para iniciar os estudos (Figura 7, p. 25).

2.4.1 Estudo da Fração 19-22 (coluna C-1)

A fração **19-22** (13,02 g) obtida na coluna inicial foi analisada por RMN ^1H e a mesma apresentou sinais na região alifáticos e sinais entre 18 e 20 ppm. A fração foi submetida a uma CC em sílica gel 60 (60-200 mm) denominada **C-1**. Utilizou-se como fase móvel hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 26 frações. As frações obtidas foram submetidas à CCDC. Ao analisar as frações nas placas de CCDC observou-se que as mesmas apresentavam-se na forma de uma cauda próxima ao ponto de aplicação da amostra e não foi obtido nenhum sistema de eluente satisfatório para a

separação dos componentes. Após exame de espectros de RMN ^1H todas as frações exibiram sinais de hidrogênio alifáticos e algumas frações exibiram além dos sinais na região de alifáticos sinais entre 18 a 20 ppm, sugerindo assim a presença de grupos hidroxílicos em ligação de hidrogênio. Com base nesses resultados tentou-se diminuir a polaridade exibida pelas referidas frações. Realizou-se uma reação de metilação com a finalidade de diminuir a polaridade dos grupos hidroxílicos, os quais ao reagirem com diazometano formariam grupos metoxílicos. A análise do espectro de RMN ^1H do produto da reação, mostrou que os sinais em torno de 18 ppm não desapareceram, indicando assim que os grupos hidroxílicos presente nas amostras não possuíam a acidez suficiente para a reação. Realizou-se então, a reação de acetilação desses grupos (Figura 7, p. 25) utilizando anidrido acético/piridina como reagentes. A fração selecionada para as reações de metilação e acetilação foi a **27-29C-1** (897,9 mg).

2.4.2 Estudo da Fração 27-29/C-1

A fração **27-29/C-1** (897,9 mg), foi submetida a uma reação de acetilação. Foram utilizados os reagentes anidridos acéticos e piridina. Após a acetilação, a amostra foi submetida à CCDC e RMN ^1H , os quais evidenciaram incorporação de grupos acetatos. Fez-se então a coluna **C-3** (1,17 g) uma CC empacotada com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) e eluída com hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Obtiveram-se 43 frações, reunidas em 18 frações quando submetidas à CCDC. Sendo que desta coluna o agrupamento **10-11/C-1-ac**, representa a mistura das substâncias **Kcusp 01** e **Kcusp 02** (17,5 mg).

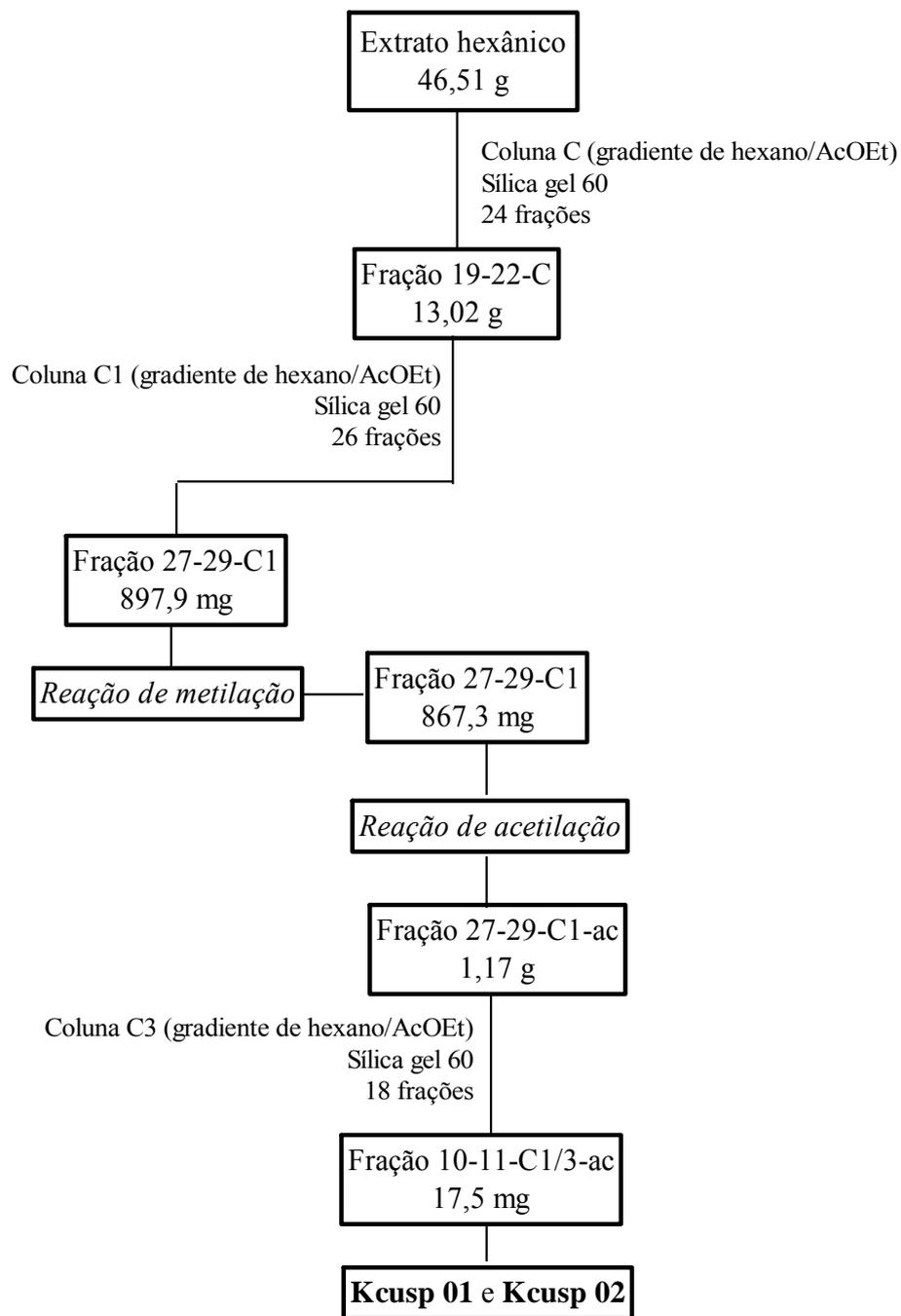


Figura 7: Fracionamento do extrato hexânico da *K.cuspidata*.

2.5 FRACIONAMENTO DA FASE DICLOROMETANO DO EXTRATO EM METANOL

A fase diclorometano (8,70 g) foi fracionada por meio de uma coluna de sílica gel 60 e empacotada a seco, utilizando o sistema hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade.

Foram obtidas 22 frações, que após análise por CCDC foram agrupadas nas seguintes frações: **A7** e **A8** (808,9 mg) e **A12** a **A15** (739,0 mg). Ambas foram submetidas a uma CC preparativa em sílica gel 60, sendo respectivamente as colunas **B** e **F**.

As frações **A4** e o agrupamento **A10-11**, quando recristalizadas em acetona forneceram, respectivamente as substâncias **Kcusp 03** e **Kcusp 04** em mistura (33,9 mg) e a substância **Kcusp 08** (14,5 mg) (Figura 10, p. 30).

A fração **A9** (494,7 mg) foi analisada por CCDC e RMN ^1H e fracionada em uma CC em sílica gel 60, denominada **E** (Figura 9, p. 29).

As demais frações não foram trabalhadas por apresentarem-se em mistura e em quantidade insuficiente para posteriores fracionamentos.

2.5.1 Estudo da Fração A7-A8 (Coluna B)

A fração **A7-A8** (808,9 mg) obtida a partir de **A**, foi submetida a uma CC em sílica gel 60, utilizando o sistema hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 19 frações, as quais foram examinadas com CCDC (Figura 8, p. 27).

A fração **B10** (28,1 mg) foi aplicada em placas para CCDP, eluídas dez vezes com hexano/diclorometano (8:2). Uma das subfrações foi identificada como **Kcusp 07** (3,0 mg).

Com base no comportamento das frações **B12** (69,1 mg), **B13** (59,4 mg) e **B14** (87,2 mg) em CCDC e RMN ^1H , reuniu-se as mesmas, que posteriormente foi submetida a uma CC, denominada **C**. O mesmo procedimento foi feito com a fração **B15** (158,1 mg), após análise de CCDC e RMN ^1H , foi fracionada em CC, denominada **D**.

As frações restantes da **coluna B** não foram trabalhadas por apresentarem-se em mistura e em quantidade insuficiente para posteriores fracionamentos.

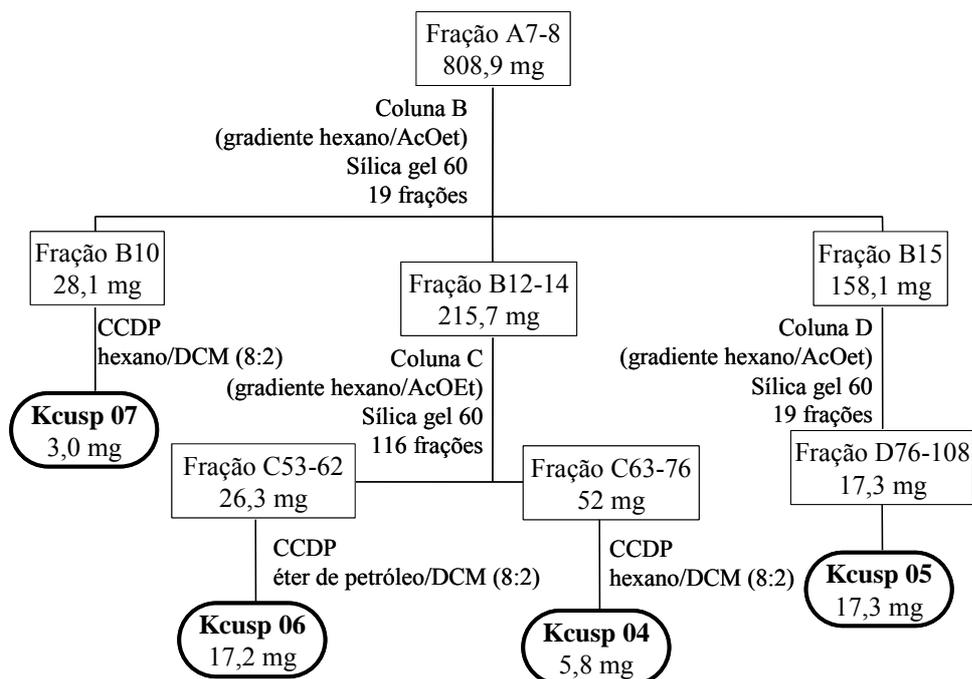


Figura 8: Fracionamento da fase diclorometano na fração A7-8.

2.5.2 Estudo da Fração B12-14 (Coluna C)

A fração **B12-14** (215 mg), obtida da **coluna B**, foi submetida a uma CC de sílica gel 60, utilizando o sistema hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade o que resultou em 116 frações. Agrupadas em 9 frações após monitoramento por CCDC (Figura 8, p.27).

Por apresentarem comportamento semelhante ao serem analisadas em CCDC, as frações **C53-62** (26,3 mg) e **C63-76** (52,0 mg) foram agrupadas.

A fração **C53-62** (26,3 mg) foi submetida a CCDP, eluída doze vezes em um sistema éter de petróleo/diclorometano (8:2). Uma das subfrações foi identificada como **Kcusp 06** (1,8 mg).

A fração **C63-76** (52,0 mg) também foi submetida à CCDP, eluída três vezes em sistema hexano/acetona (8:2). Uma das subfrações foi identificada como **Kcusp 04** (5,8 mg). Sendo que a substância **Kcusp 04**, já havia sido isolada em frações trabalhadas anteriormente.

As frações restantes foram analisadas em CCDC, contudo por apresentarem-se em mistura e em quantidade insuficiente para posteriores fracionamentos não foram trabalhadas.

2.5.3 Estudo da Fração B15 (Coluna D)

Procedeu-se o fracionamento da **B15** (158,1 mg) em CC de sílica gel 60, em gradiente crescente de polaridade de hexano e acetato de etila. Foram obtidas 154 frações que após análise em CCDC foram agrupadas em 12 frações (Figura 8, p.27).

A fração **D76-108** foi analisada por CCDC e apresentou-se como uma mancha única. A análise da mesma por RMN ¹H permitiu identificar a substância **Kcusp 05** (17,3 mg).

As demais frações resultantes de **E** não foram trabalhadas por apresentarem-se em mistura e em quantidade insuficiente para posteriores fracionamentos não foram trabalhadas.

2.5.4 Estudo da Fração A9 (Coluna E)

A fração **A9** (494,7 mg), proveniente da **coluna A**, foi fracionada em CC em sílica gel 60 em gradiente crescente de polaridade de hexano e acetato de etila resultando em 28 frações que quando submetidas à CCDC foram agrupadas em 15 frações (Figura 9, p.29).

A fração **E15** foi analisada por CCDC e apresentou-se como uma mancha única. A análise da mesma por RMN ¹H permitiu identificar a substância **Kcusp 05** (20,2 mg) já isolada anteriormente.

A fração **E18** (28,2 mg) foi submetida a CCDP, eluída cinco vezes em sistema éter de petróleo/diclorometano (8:2), sendo que de uma das subfrações foi identificada a substância **Kcusp 09** (4,0 mg).

As frações restantes da coluna foram analisadas em CCDC, contudo por apresentarem-se em mistura e em quantidade insuficiente para posteriores fracionamentos não foram trabalhadas.

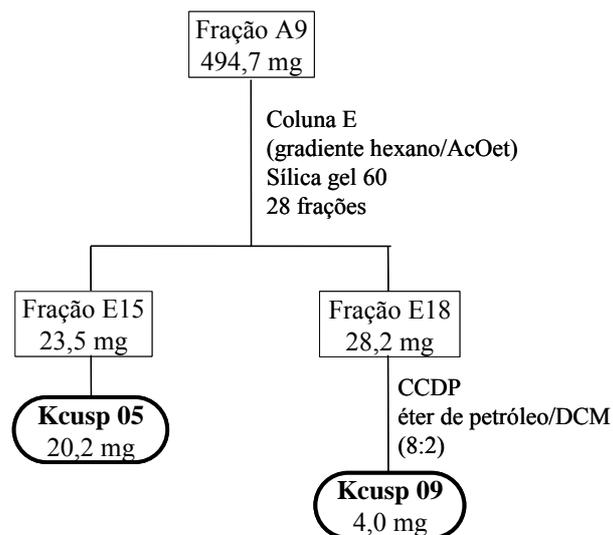


Figura 9: Fracionamento da fase diclorometano na fração A9.

2.5.5 Estudo da Fração A12-15 (Coluna F)

A coluna **F**, proveniente da fração **A12-15** (739,0 mg), foi fracionada numa CC sob pressão de N_2 , empacotada com sílica 60 H eluída com hexano e diclorometano em gradiente crescente de polaridade, foram recolhidas 144 frações. Após análise em CCDC foram agrupadas em 30 frações (Figura 10, p. 30).

A fração **F70-94** (12,2 mg) foi analisada por CCDC e apresentou-se como uma mancha única. A análise da mesma por RMN 1H permitiu identificar a substância **kcusp 10** (12,2 mg).

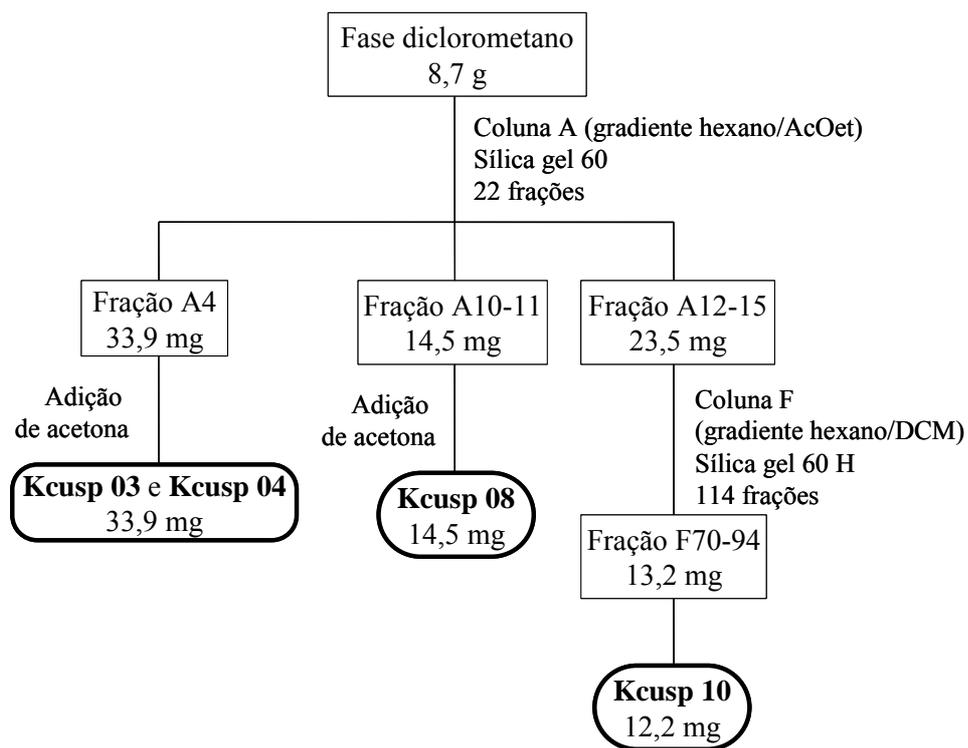


Figura 10: Fracionamento da fase diclorometano nas frações A4, A10-11 e A12-15.

2.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios com o extrato em hexano e a fase diclorometano do extrato em metanol no teste de Bioautografia. Já no teste de Concentração inibitória mínima (CIM) apenas a fase diclorometano foi testada.

2.7.1 Bioautografia

O teste de Bioautografia foi realizado segundo SAXENA e colaboradores (1995) com algumas modificações. Em placas de CCD em sílica gel G60 F₂₅₄ alumina (6x6 cm) aplicou-se 50 µg das amostras de extrato em hexano e da fase diclorometano. Em seguida, as placas foram eluídas em um sistema acetato de etila e hexano (8:2). Após a eluição, as placas de CCD foram expostas no fluxo laminar sob radiação UV por 30 minutos.

As placas de CCD foram acondicionadas dentro de placas de Petri e verteu-se o meio de cultura apropriado (caldo agar nutriente). Após solidificação do meio de cultura, adicionou-se 200µl de suspensão do microrganismo (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 5175, *Escherichia coli* ATCC 94863, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Aspergillus niger* ATCC 16404).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 hs (bactérias) e a 26 °C por 72 hs (fungos).

2.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de microdiluição, CIM, foi realizado segundo Bicalho e colaboradores (2003). Foram adicionados 100 µL do meio de cultura apropriado em cada poço da placa de Elisa. Em seguida, verteu-se 100 µL da solução estoque da amostra, fase diclorometano, que

se encontrava a uma concentração de $2000 \mu\text{.mL}^{-1}$. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se $100 \mu\text{L}$ de um poço para outro. Depois foram acrescentados $100 \mu\text{L}$ de suspensão de microrganismo (10^8 células. mL^{-1} ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus lutus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 5175, *Escherichia coli* ATCC 94863, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa*). As placas foram incubadas a 37°C por 24 hs.

O controle positivo utilizado foi cloranfenicol e o negativo foi uma solução aquosa de DMSO (20 %). As amostras foram testadas nas concentrações de 500 a $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A leitura do CIM foi realizado visualmente.

2.7 REAÇÕES QUÍMICAS REALIZADAS

2.7.1 Reação de Metilação

Foram dissolvidos 2,15 g de p-toluisulfonilmetil-nitrozamida em 30 mL de éter etílico. Adicionou-se 10 mL de uma solução 4% de hidróxido de sódio em etanol. A mistura reacional foi então vertida num reator de vidro, acoplado a um condensador. O reator contendo a mistura reacional foi aquecido e a solução etérea do diazometano formada após a condensação foi coletada diretamente no frasco contendo a amostra. Na tabela 3 esta a fração que foi submetida à reação de metilação.

Tabela 3: Amostra metilada.

<i>Amostra</i>	<i>Massa</i>	<i>Massa após metilação</i>
27-29-C1	897,9 mg	867,3 mg

2.7.2 Reação de Acetilação

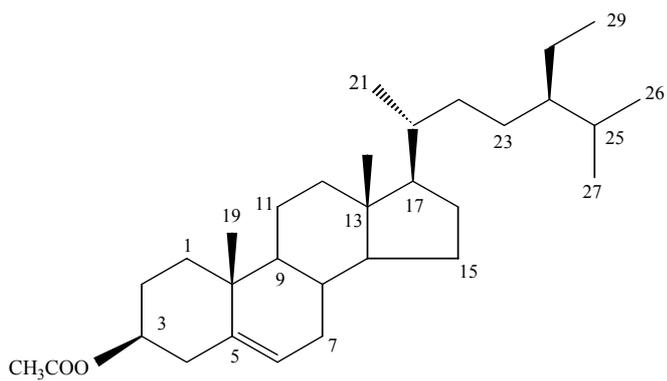
Foram utilizados dois procedimentos para a reação de acetilação. No primeiro procedimento a amostra foi dissolvida em piridina e em seguida adicionou-se do anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente por um período de 36 horas. O produto da reação foi vertido em gelo triturado e homogeneizado até completa hidrólise do anidrido acético. A extração do produto foi efetuada com clorofórmio (3x25 mL) em funil de separação. A fase clorofórmio foi lavada sucessivamente com solução de ácido clorídrico 5% (3x25 mL) e em seguida com uma solução de bicarbonato de sódio 5% (3x25 mL). A amostra foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente orgânico foi evaporado à pressão reduzida.

No segundo procedimento adicionou-se DMAP a solução que havia a amostra dissolvida em piridina e anidrido acético. A mistura reacional foi deixada em repouso a temperatura ambiente por um período de 24 horas. As demais etapas da reação foram procedidas como no primeiro procedimento. Na tabela 4 esta a fração que foi submetida à reação de acetilação.

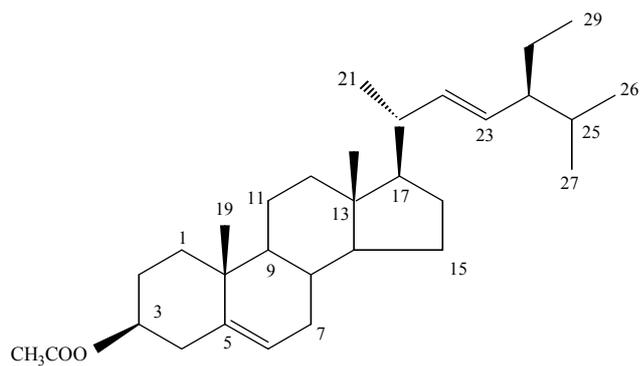
Tabela 4: Amostra acetilada.

<i>Amostra</i>	<i>Massa</i>	<i>Massa após metilação</i>
27-29-C1	867,3 mg	1,17 g

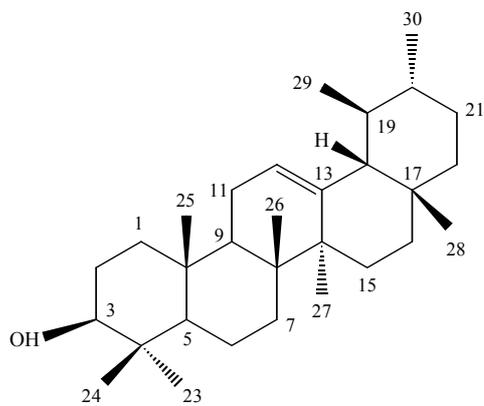
3 ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA KIELMEYERA CUSPIDATA



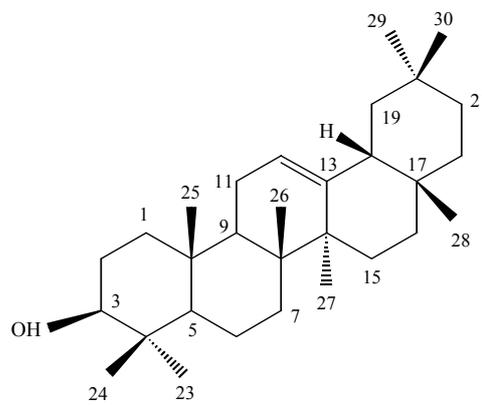
Kcusp 01



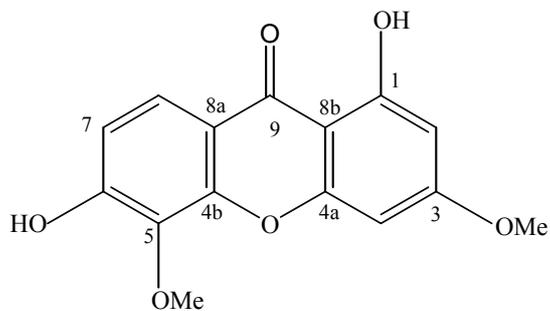
Kcusp 02



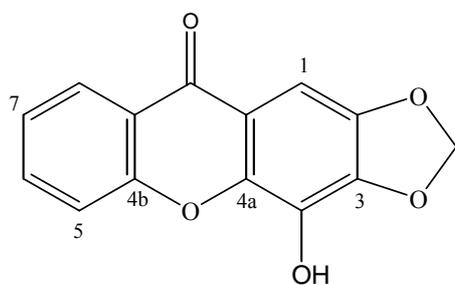
Kcusp 03



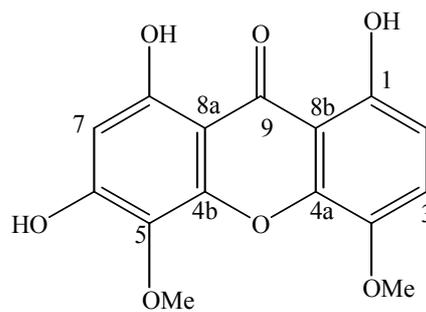
Kcusp 04



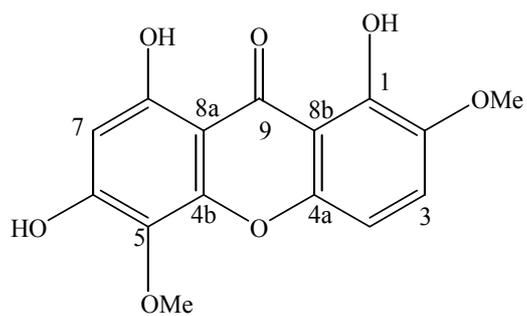
Kcusp 05



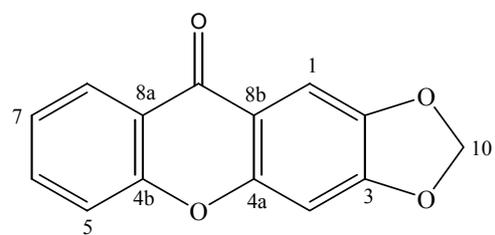
Kcusp 07



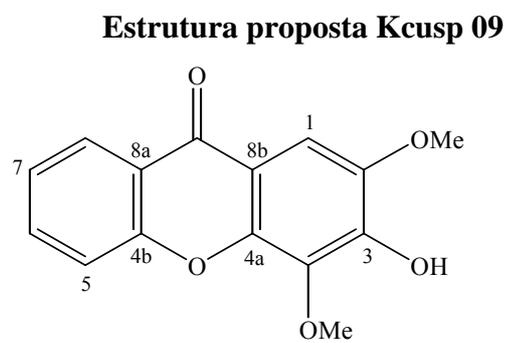
Kcusp 08



Estrutura proposta Kcusp 09



Kcusp 10



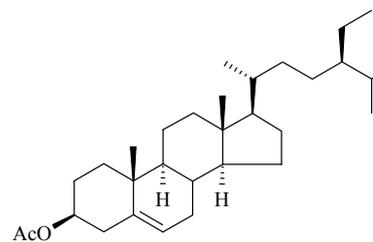
3.1 DADOS FÍSICOS ESPECTROSCÓPICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA *KIELMEYERA CUSPIDATA*

Kcusp 01

3-O-acetil-sitosterol (C₃₁H₅₂O₂)

PM = 456,76

- Sólido marron
- RMN ¹H. (Fig.
- RMN ¹³C. (Fig.

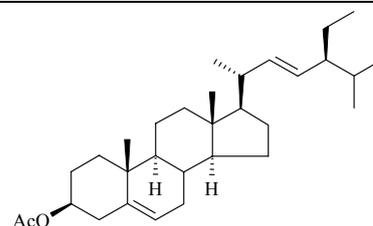


Kcusp 02

3-O-acetil-estigmasterol (C₃₁H₅₀O₂)

PM = 454,74

- Sólido marron
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

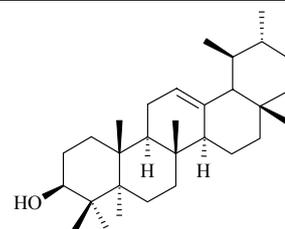


Kcusp 03

α-amirina (C₃₀H₅₀O)

PM = 426,73

- Sólido branco
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

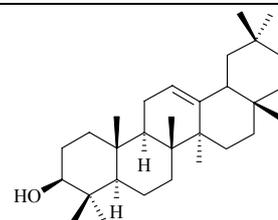


Kcusp 04

β-amirina (C₃₀H₅₀O)

PM = 426,73

- Sólido branco
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

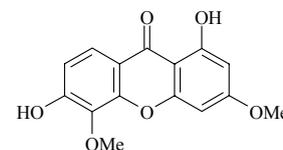


Kcusp 05

1,6-diidroxi-3,5-dimetoxixantona (C₁₅H₁₂O₆)

PM = 288,26

- Sólido amarelo ouro
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

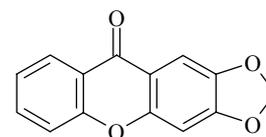


Kcusp 07

2,3-metilenodioxixantona (C₁₄H₈O₄)

PM = 240,22

- Sólido amarelo
- RMN ¹H:

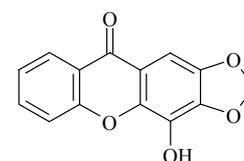


Kcusp 08

4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona (C₁₄H₈O₅)

PM = 256,22

- Sólido amarelo palha
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

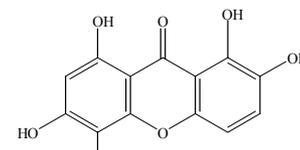
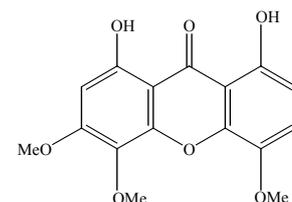


Kcusp 09

Estruturas propostas (C₁₅H₁₂O₇)

PM = 305,26

- Sólido amarelo
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

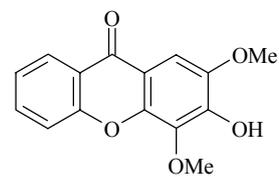


Kcusp 10

3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (C₁₅H₁₂O₅)

PM = 272,26

- Sólido amarelo
- RMN ¹H:
- RMN ¹³C:

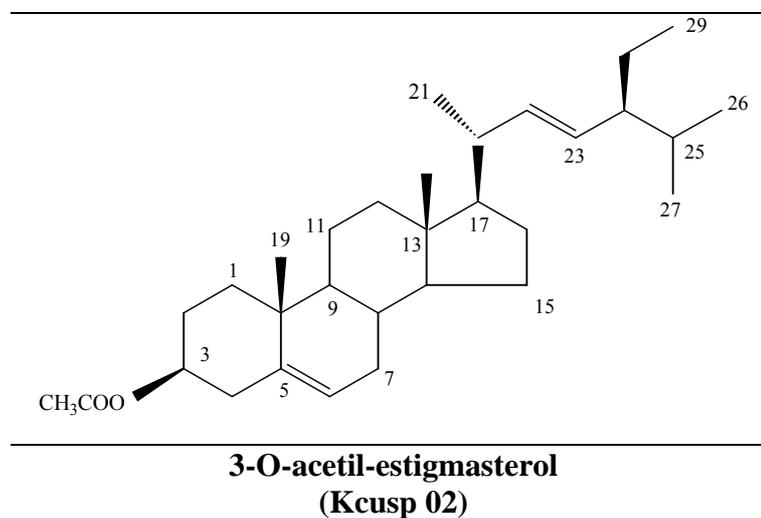
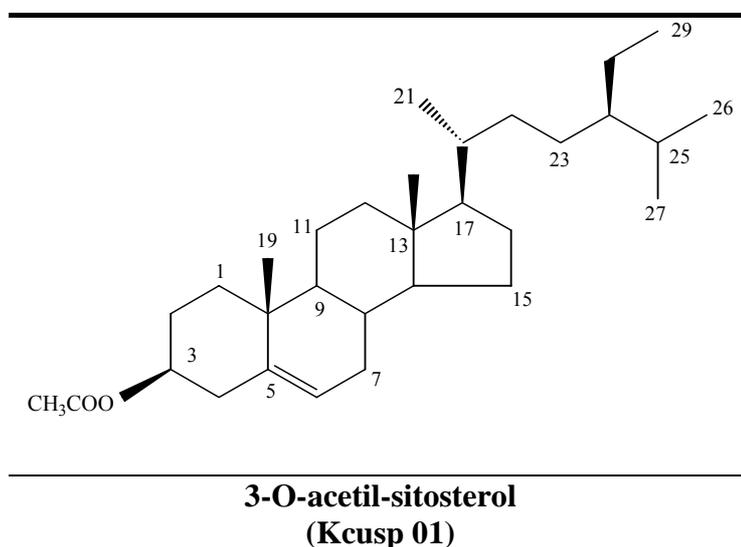


4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.1.1 Esteróides

4.1.1.1 Identificação Estrutural das Substâncias **Kcusp 01** e **Kcusp 02**



As substâncias **Kcusp 01** e **Kcusp 02** que se apresentaram em mistura, foram obtidas do extrato em hexano do caule da *K. cuspidata* após acetilação. A identificação destas substâncias foi estabelecida através da análise dos dados espectroscópicos adquiridos em RMN ^1H e RMN ^{13}C e comparados com os dados obtidos na literatura (RICCA & NICOTRA, 1978; GRECA, *et al.*, 1990; CARVALHO, 1996; SOUSA, 1999).

O espectro de RMN ^1H (Figura 11, p. 41) exibiu um dubleto largo em δ 5,37 e um multipeto entre δ 5,01-5,19 atribuídos a hidrogênios olefinicos. Apresentou outro multipeto entre δ 4,55-4,68 típico de hidrogênio ligado a carbono adjacente a um grupo éster, um singlete em δ 2,03 relativo a hidrogênio metoxílico, além de um acúmulo de sinais superpostos entre δ 0,69-1,02 que correspondem a grupos metílicos (CARVALHO *et al.*, 1998). A partir da análise dos sinais foi possível sugerir a presença de derivados acetilados dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Contudo é importante ressaltar que as substâncias mostram-se na forma de éster de esteróide devido à acetilação a qual a fração foi submetida.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 12, p. 41) observou-se os sinais de carbonos olefinicos em δ 122,6 (CH), δ 139,6 (C), δ 138,6 (CH) e δ 129,3 (C) confirmando a identificação dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Já o sinal δ 170,5 (C) foi atribuído ao carbono da carbonila (ABREU, *et al.*, 2001), além da presença dos sinais em δ 74,0 (CH) e δ 21,4 que confirmaram a presença dos derivados acetilados destes esteróides. Os demais sinais correspondem a carbonos coincidentes para os dois esteróides, uma vez que estruturalmente são muito parecidos, sendo observado diferença apenas nos deslocamentos dos carbonos C-20, C-22, C23 e C-24 (Tabela 5, p. 40).

Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C das substâncias 3-O-acetil-sitosterol (**Kcusp 01**) e 3-O-acetil-estigmasterol (**Kcusp 02**) comparado com dados da literatura (SOUSA, 1999) [δ (ppm)].

Posições	<i>3-O-acetil-sitosterol</i>		<i>3-O-acetil-estigmasterol</i>	
	Kcusp 01 ^a	(SOUSA, 1999) ^a	Kcusp 02 ^a	(SOUSA, 1999) ^a
1	37,0	37,0	37,0	37,0
2	29,7	27,8	29,7	27,8
3	74,0	74,0	74,0	74,0
4	38,1	38,1	38,1	38,1
5	139,6	139,6	139,6	139,6
6	122,6	122,6	122,6	122,6
7	31,9	31,8	31,9	31,8
8	31,9	31,8	31,9	31,8
9	50,0	50,0	50,0	50,0
10	36,6	37,0	36,6	37,0
11	21,0	21,2	21,0	21,2
12	39,7	39,7	39,7	39,7
13	42,2	42,3	42,2	42,3
14	56,7	56,7	56,7	56,7
15	24,3	24,4	24,3	24,4
16	28,2	28,2	28,2	28,4
17	56,0	56,0	56,0	56,0
18	12,0	12,0	12,0	12,0
19	19,3	19,3	19,3	19,3
20	36,1	36,2	40,5	40,5
21	18,8	18,8	21,2	21,2
22	33,9	33,9	138,6	138,3
23	26,1	26,1	129,3	129,3
24	45,9	45,8	51,2	51,2
25	29,2	29,1	29,2	29,1
26	19,8	19,8	19,8	19,8
27	19,0	19,0	19,0	19,0
28	23,1	23,1	25,3	25,4
29	11,2	11,8	12,2	12,2
C=O	170,5	170,5	170,5	170,5
H₃C	21,4	21,4	21,4	21,4

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3

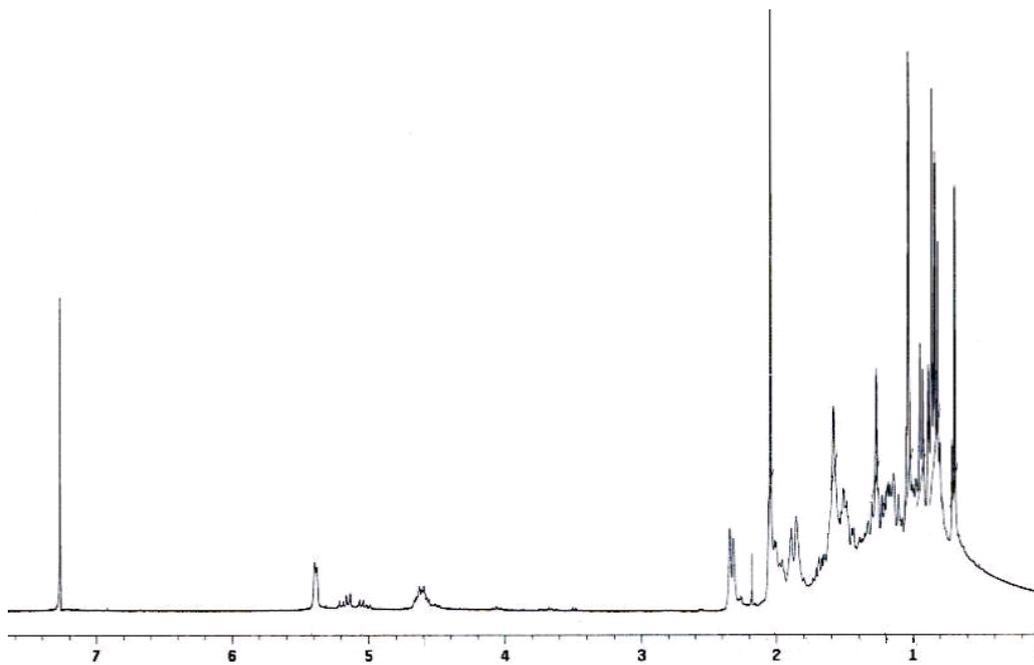


Figura 11: Espectro de RMN ¹H da mistura de 3-O-acetil-sitosterol e 3-O-acetil-estigmasterol [300 MHz, δ (ppm), CDCl₃].

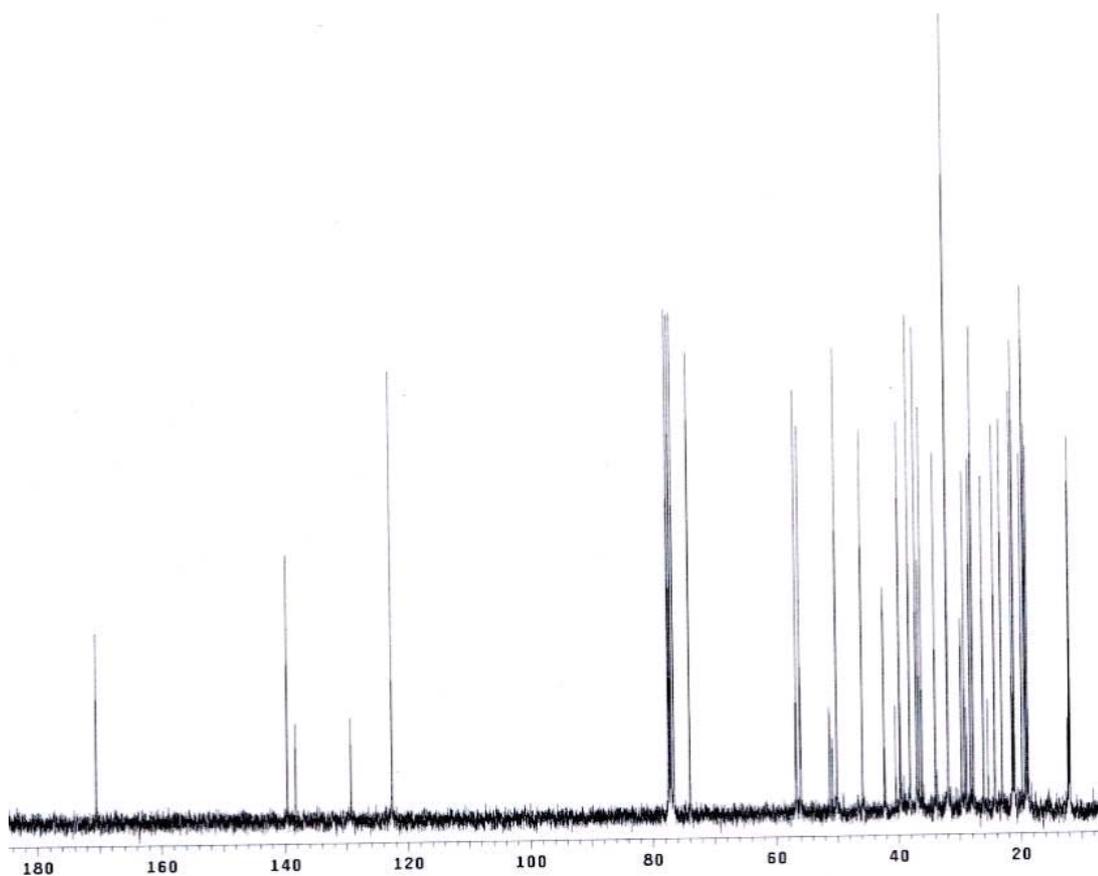
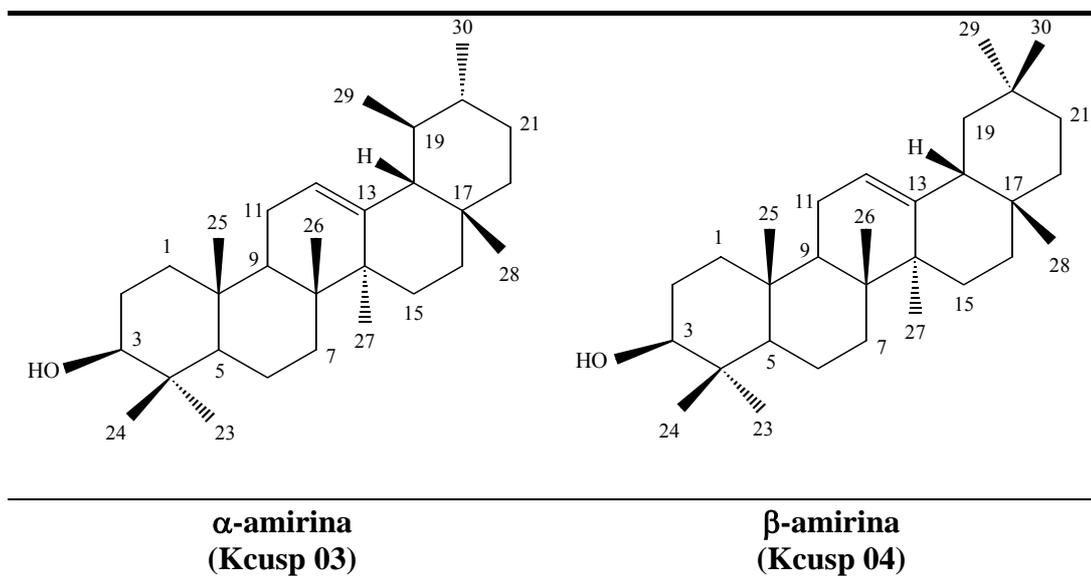


Figura 12: Espectro de RMN ¹³C da mistura de 3-O-acetil-sitosterol e 3-O-acetil-estigmasterol [75 MHz, δ (ppm), CDCl₃].

4.1.2 Triterpenos

4.1.2.1 Identificação Estrutural das Substâncias **Kcusp 03** e **Kcusp 04**



As substâncias **Kcusp 03** e **Kcusp 04**, que se apresentaram em mistura, foram obtidas do extrato em hexano do caule da *K. cuspidata*. A identificação destas substâncias foi estabelecida através da análise dos dados espectroscópicos adquiridos em RMN ^1H e RMN ^{13}C e comparados com os valores obtidos na literatura (OLEA, 1990; MOREIRA, 1999).

O espectro de RMN ^1H (Figura 13, p. 45) demonstrou a presença de dois tripletos em δ 5,19 e δ 5,13 correspondentes a hidrogênios olefínicos, um multipletto entre δ 3,58-3,67 relativo a hidrogênio carbinólico. Além dos sinais entre δ 0,76-1,26 que são atribuídos a hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 14, p. 45) exibiu sinais principalmente na região entre δ 23-60 que poderiam indicar a presença de uma mistura de triterpenos. Com os deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos foi possível à identificação dos triterpenos presentes na mistura (OLEA, 1990). Os sinais em δ 124,7 (CH/C-12) e δ 139,8 (C/C-13) são característicos do esqueleto ursânico. Já os sinais em δ 122,0 (CH/C-12) e δ 145,4 (C/C-12) são característicos do esqueleto oleanânico. Além destes deslocamentos químicos, o sinal δ 79,3 foi atribuído a carbono carbinólico (C-3) com configuração β hidroxilada (JUNGES, *et al.*, 2000).

Com base nos dados discutidos anteriormente e da análise completa das informações espectrais e posterior comparação com os dados registrados na literatura (OLEA, 1990, MOREIRA, 1999), conferiu-se as estruturas das substâncias **Kcusp 03** e **Kcusp 04** como sendo respectivamente, α -amirina e β -amirina (Tabela 6, p. 44).

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C das substâncias α -amirina (**Kcusp 03**) e β -amirina (**Kcusp 04**) comparado com os dados da literatura (OLEA, 1990) [δ (ppm)].

Posições	<i>α-amirina</i>		<i>β-amirina</i>	
	Kcusp 03 ^a	(OLEA, 1990) ^a	Kcusp 04 ^a	(OLEA, 1990) ^a
1	39,0	38,7	38,9	38,5
2	27,5	27,2	27,2	27,0
3	79,3	78,8	79,3	78,9
4	39,1	38,7	38,1	38,7
5	55,5	55,2	55,5	55,1
6	18,6	18,3	18,6	19,6
7	33,2	32,9	32,9	32,3
8	40,3	40,0	40,0	38,6
9	48,0	47,7	47,9	46,8
10	37,2	36,9	37,4	36,6
11	23,6	23,3	22,9	23,6
12	124,7	124,3	122,0	121,6
13	139,8	139,3	145,4	145,2
14	42,3	42,0	42,3	41,9
15	29,0	28,7	28,6	27,1
16	26,9	26,6	26,4	26,1
17	33,6	33,7	33,6	32,6
18	59,3	58,9	47,9	47,3
19	39,8	39,6	47,5	46,8
20	39,9	39,6	31,3	31,0
21	31,5	31,2	34,9	34,7
22	41,8	41,5	37,4	37,0
23	28,4	28,1	28,6	26,6
24	15,8 *	15,6	15,7	21,2
25	15,9 *	15,6	15,7	15,1
26	17,1	16,8	17,1	16,8
27	23,5	23,3	26,4	25,7
28	28,3	28,1	28,3	28,8
29	17,7	17,4	32,9	33,2
30	21,6	21,3	23,8	23,6

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3 .

* indica que na mesma coluna os valores podem ser trocados.

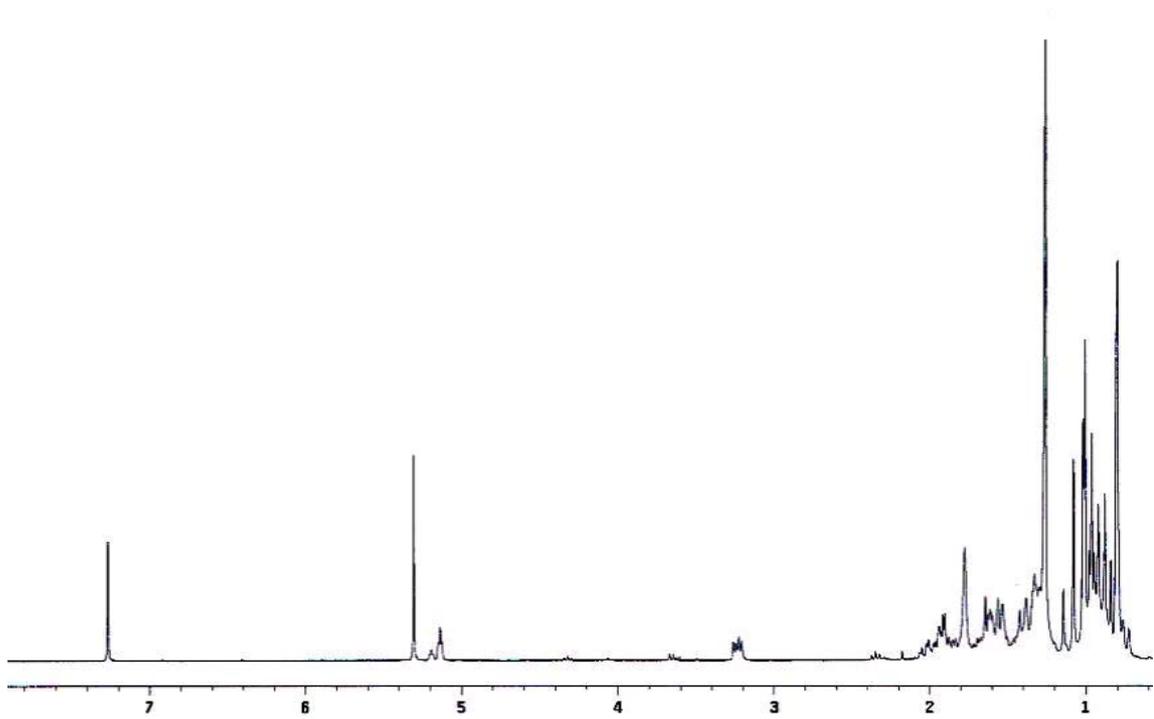


Figura 13: Espectro de RMN ¹H da mistura de α -amirina e β -amirina [300 MHz, δ (ppm), CDCl₃].

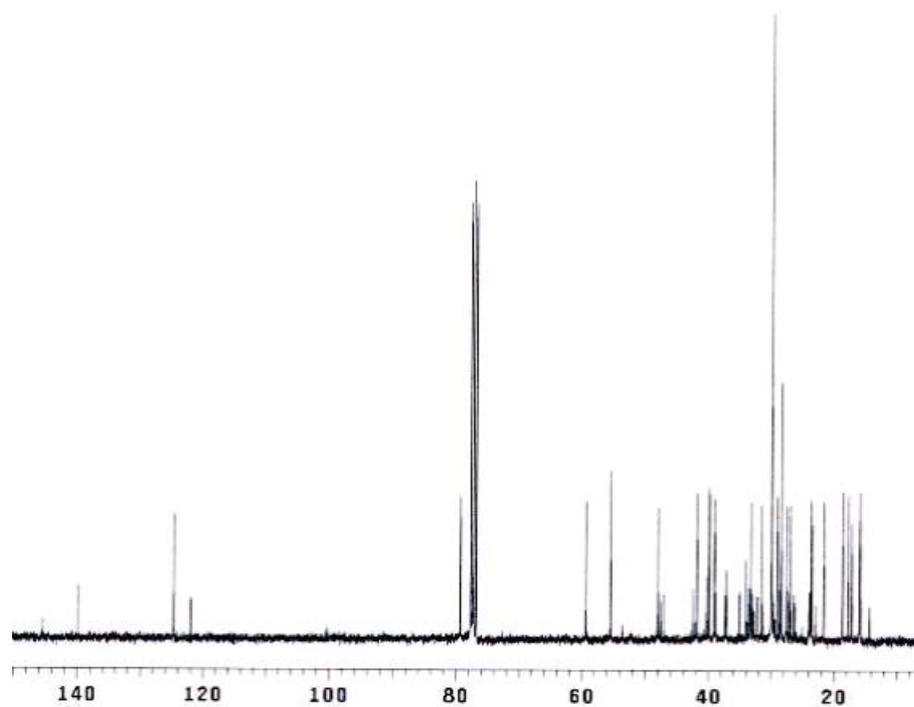


Figura 14: Espectro de RMN ¹³C da mistura de α -amirina e β -amirina [75 MHz, δ (ppm), CDCl₃].

4.1.3 Xantonas

As substâncias **Kcusp 05** (p. 47), **Kcusp 07** (p. 53), **Kcusp 08** (p. 58), **Kcusp 09** (p.63) e **Kcusp 10** (p. 66) pertencem a classe de substância conhecida como xantonas. As xantonas são metabólitos secundários que possuem um esqueleto básico formado por treze átomos de carbono em um arranjo C₆-C₁-C₆ (SULTANBAWA, 1980). Ao esqueleto xantônico podem ser encontrados substituintes oxigenados na forma de grupos hidroxílicos, metoxílicos e ou metilenodioxílico, além de unidades de isoprenos (SULTANBAWA, 1980) A presença destes substituintes interferem nos deslocamentos químicos gerando proteção ou desproteção. Portanto, as atribuições dos deslocamentos de carbono do núcleo xantônico sem substituição (CASTELÃO, *et al.*, 1977) (Figura 15, p. 46) servem como base para a interpretação e identificação estrutural das xantonas descritas neste trabalho.

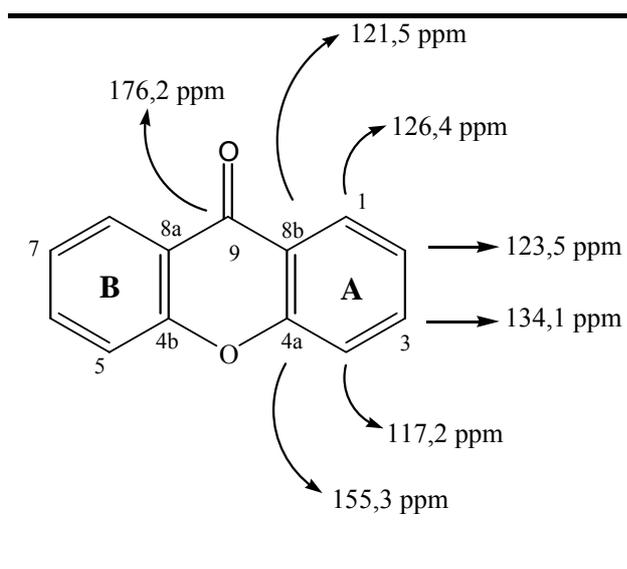
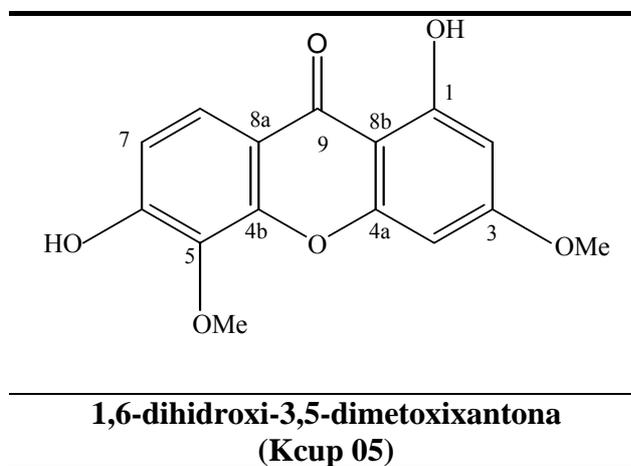


Figura 15: Esqueleto xantônico e deslocamentos químicos de carbono.

4.1.3.1 Identificação Estrutural da Substância **Kcusp 05**



O espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 05** (Figura 18, p. 51) apresentou um singleto largo em δ 12,95 um singleto largo com integração relativa para um hidrogênio, sugerindo a presença de um grupo hidroxílico em ligação de hidrogênio com um grupo carbonílico. Os sinais em δ 4,10 e δ 3,89 também se apresentaram na forma de singleto ambos com integração para três hidrogênios, indicando a presença de dois grupos metoxílicos. Neste espectro foram observados ainda sinais característicos de hidrogênio aromático em δ 6,98 (*d*, 1H) e δ 7,92 (*d*, 1H), acoplados em *orto* com $J = 8,6$ Hz e δ 6,47 (*d*, 1H) e δ 6,35 (*d*, 1H), acoplados em *meta* com $J = 2,1$ Hz. Os referidos desdobramentos e deslocamentos estão na expansão da Figura 19 (p. 51).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 20, p. 52) confirmou a presença de um grupo carbonílico de esqueleto xantônico exibindo deslocamento δ 180,1. A desproteção foi atribuída ao grupo hidroxílico, no C-1 em ligação de hidrogênio com a carbonila do anel (ABDEL-LATEFF, *et al.*, 2003). Os sinais em δ 166,4, δ 163,6, δ 157,2, δ 154,5, δ 149,7 e δ 133,7 foram atribuídos a carbonos oxigenados do anel aromático (Tabela 7, p. 50). Já os sinais δ 60,7 e δ 56,0 confirmaram a existência de dois grupos metoxílicos na estrutura da substância. Os deslocamentos observados para os grupos metoxílicos indicaram que um dos grupos se encontrava em ambiente de impedimento estérico (GOTTLIEB & NAGEM, 1977). Os sinais δ 97,2 e δ 93,0 foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-4, respectivamente, uma vez que os mesmos exibiram uma proteção devido à presença de grupos oxigenados ligados a carbonos do anel em posição *orto/para*.

Com base nos dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C , pode-se propor duas estruturas, (A) e (B) (Figura 16).

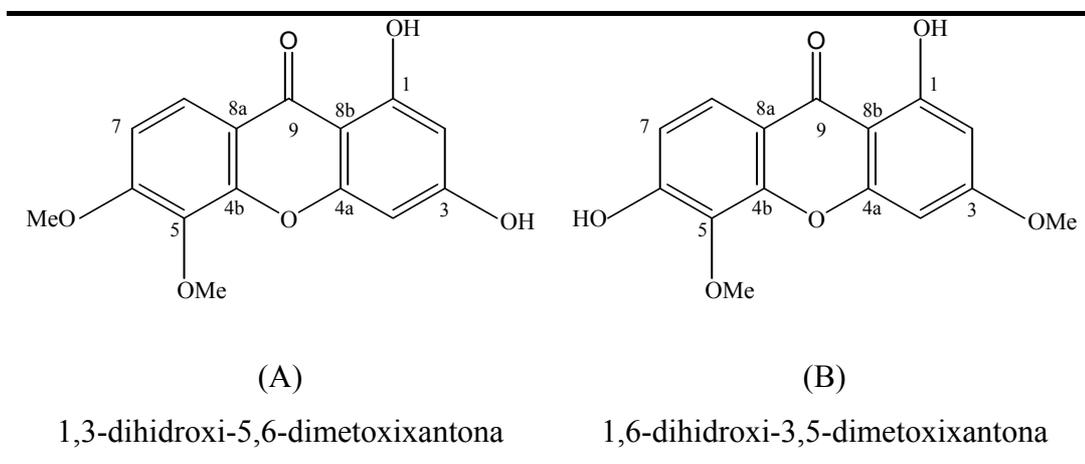


Figura 16: Alternativas estruturais da substância **Kcusp 05**.

Analisando as duas estruturas propostas, (A) e (B), e comparando-as com dados relatados na literatura (GIL, *et al.*, 1988; WOLFENDER, *et al.*, 1991; SOUSA, 2005). Percebeu-se que os valores de deslocamentos químicos dos carbonos das estruturas propostas, (A') (GIL, *et al.*, 1988) e (B') (WOLFENDER, *et al.*, 1991), são concordantes com exceção do C-8a (Figura 17).

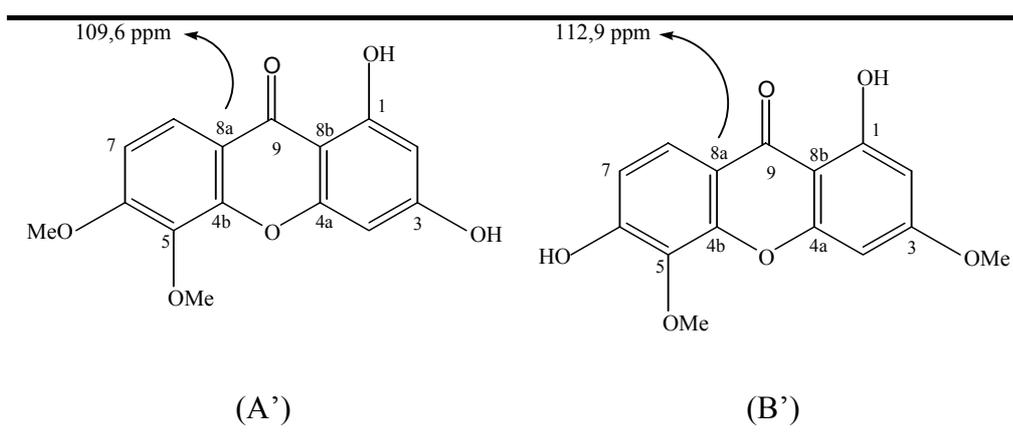


Figura 17: Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 05**.

Examinando simultaneamente estes dados e os confrontando com os obtidos na substância **Kcusp 05** (Tabela 7, p. 50), pode-se confirmar que a estrutura (B) corresponde à feição estrutural da substância isolada, já que a proposta (A) exibiu C-8a em δ 109,6 (GIL, *et al.*, 1988). Os deslocamentos químicos restantes foram atribuídos a partir dos valores encontrados na literatura (WOLFENDER, *et al.*, 1991) e estão expostos na Tabela 7 (p. 50).

A substância **Kcusp 05** corresponde a uma xantona com um padrão de oxigenação 1,3,5,6, difícil de ser encontrada na natureza, assim como o 1,3,7 (WOLFENDER, *et al.*, 1991). A 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona já foi isolada anteriormente na *Kielmeyera elata* (OLIVEIRA, *et al.*, 1999) e *K. lathropyton* (SOUSA, 2005).

Tabela 7: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona (**Kcusp 05**) comparada com a literatura (WOLFENDER, *et al.*, 1991; SOUSA, 2005) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].

Posições	<i>1.6-dihidroxi-3.5-dimetoxixantona</i>			
	^{13}C	Kcusp 05 ^a ^1H	(WOLFENDER, <i>et al.</i> , 1991; SOUSA, 2005) ^b ^{13}C	^1H
1	163,6	---	162,5	---
2	97,2	6,47 <i>d</i> 2,1 1H	97,8	6,37 <i>d</i> 2,4 1H
3	166,4	---	166,0	---
4	93,0	6,35 <i>d</i> 2,1 1H	92,7	6,48 <i>d</i> 2,4 1H
4a	157,2	---	157,1	---
4b	149,7	---	145,2	---
5	133,7	---	134,5	---
6	154,5	---	156,9	---
7	115,0	6,98 <i>d</i> 8,6 1H	114,2	7,00 <i>d</i> 9,0 1H
8	121,9	7,92 <i>d</i> 8,6 1H	120,7	7,94 <i>d</i> 9,0 1H
8a	112,5	---	112,9	---
8b	103,3	---	102,3	---
9	180,1	---	179,4	---
<u>OH</u>-1	---	12,95 <i>s</i> 1H	---	12,95 <i>s</i> 1H
<u>H₃CO</u>-3	55,8	4,10 <i>s</i> 3H	56,0	3,91 <i>s</i> 3H
<u>H₃CO</u>-5	61,9	3,89 <i>s</i> 3H	60,7	4,13 <i>s</i> 3H

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3 .

^b Solvente utilizado na análise DMSO-d_6 .

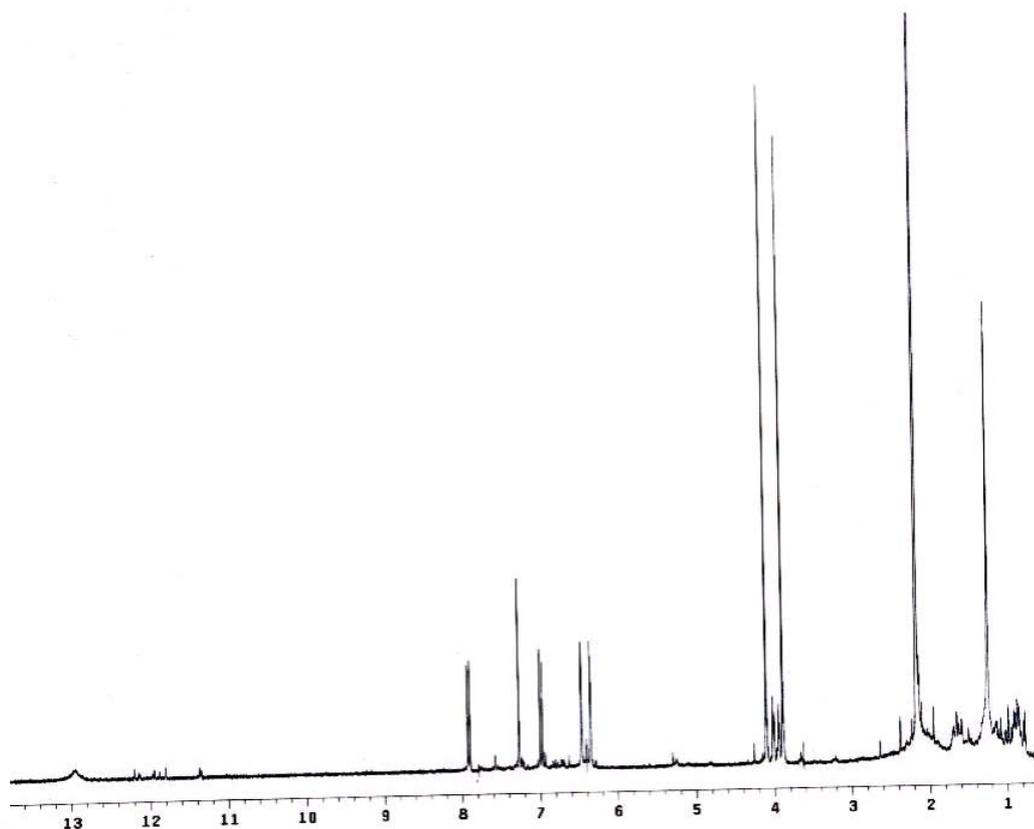


Figura 18: Espectro de RMN ^1H da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].

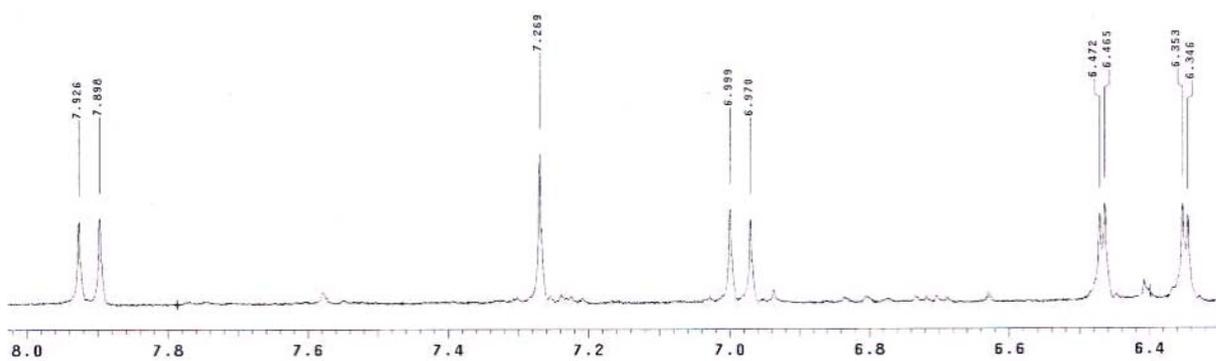


Figura 19: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].

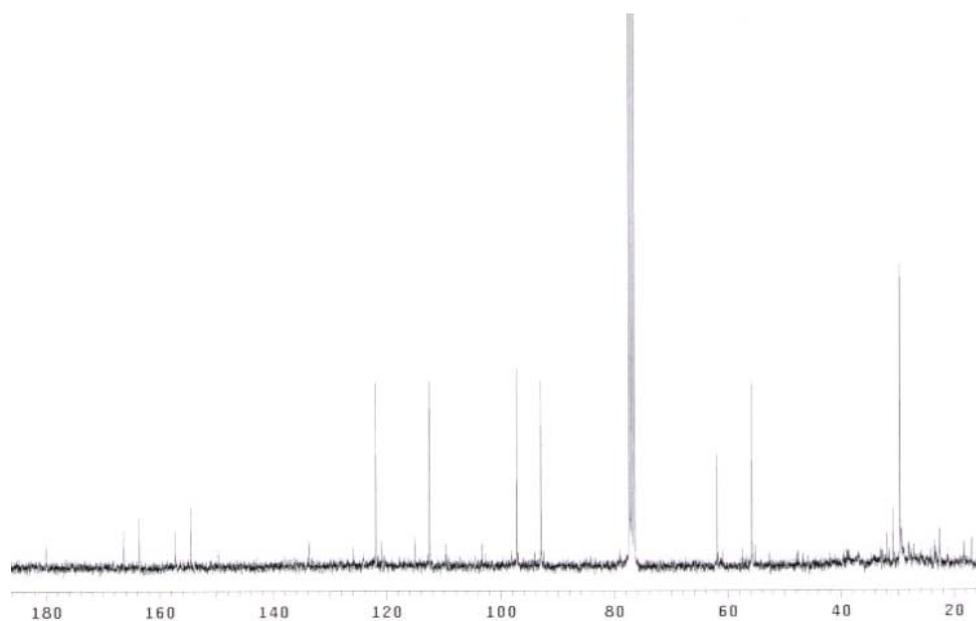
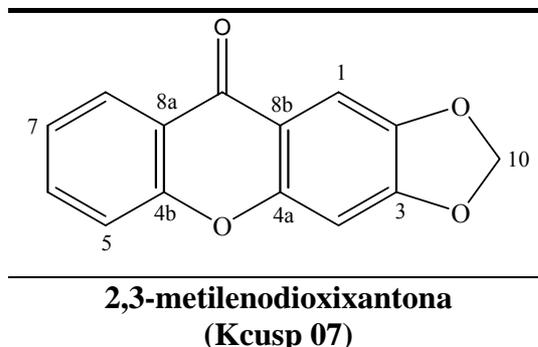


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C da substância 1,6-dihidroxi-3,5-dimetoxixantona [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3].

4.1.3.2 Identificação Estrutural da Substância **Kcusp 07**



O espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 07** (Tabela 8, p.55, Figura 21-22, p.56-57) mostrou um singlete em δ 6,12 com integração para dois hidrogênios, confirmando a existência do grupo metilenodioxílico. O exame da região de hidrogênio aromático no espectro revelou sinais em δ 7,47 (*dl*, 8,4 Hz, 1H), δ 7,71 (*m*, 1H), δ 7,38 (*tl*, 9,8 Hz, 1H) e δ 8,33 (*dd*, 8,1Hz e 1,8 Hz, 1H) indicaram a existência de um anel aromático com quatro hidrogênios em carbonos adjacentes. Ainda na região de hidrogênios aromáticos, a presença de dois singletos em δ 7,67 e δ 6,92, com integração para um hidrogênio cada, indicaram a presença de outro anel aromático com diss substituição. É importante ressaltar que a substância **Kcusp 07** foi obtida com impurezas

Como **Kcusp 07** se tratava de uma substância já descrita na literatura (CRUZ, *et al.*, 2001) e de simples identificação utilizou-se apenas os dados espectroscópicos do RMN ^1H para confirmar a feição estrutural da substância isolada. A Tabela 08 (p. 55) mostra os deslocamentos químicos obtidos, assim como, os valores encontrados na literatura (CRUZ, *et al.*, 2001).

Fazendo as distribuições dos hidrogênios no anel xantônico, têm-se: δ 7,67 (*s*, 1H) e δ 8,33 (*dd*, 8,1Hz e 1,8 Hz, 1H), que foram atribuídos aos hidrogênios nas posições 1 e 8 respectivamente, os deslocamentos químicos apresentaram uma desproteção porque os mesmos se encontram em posição *orto* à carbonila. Já o sinal em δ 6,92 (*s*, 1H) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao C-4. A proteção experimentada por este hidrogênio nesta posição indicou a existência de funções oxigenadas em posição *orto* a ele. Os deslocamentos químicos restantes foram atribuídos a partir dos valores encontrados na literatura (CRUZ, *et al.*, 2001).

A substância **Kcusp 07** tratava-se de uma xantona já descrita na literatura, inclusive em algumas espécies de *Kielmeyera*, como a *K. lathrophyton* (CRUZ, *et al.*, 2001) e *K. reticulata* (CRUZ, *et al.*, 1998), ambas estudadas pelo grupo GESNAT.

Tabela 8: Dados de RMN ^1H da substância 2,3-metilenodioxixantona (**Kcusp 07**) comparada com a literatura (CRUZ, *et al.*, 2001), [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].

Posições	<i>2.3-metilenodioxixantona</i>	
	Kcusp 07 ^a ^1H	(CRUZ, <i>et al.</i> , 2001) ^a ^1H
1	7,67 <i>s</i> 1H	7,64 <i>s</i> 1H
2	---	---
3	---	---
4	6,92 <i>s</i> 1H	6,89 <i>s</i> 1H
4a	---	---
4b	---	---
5	7,47 <i>dl</i> 8,4 1H	7,44 <i>dd</i> 8,0 1H
6	7,71 <i>m</i> 1H	7,68 <i>td</i> 8,0/1,5 1H
7	7,38 <i>tl</i> 9,8 1H	7,36 <i>td</i> 8,0/0,9 1H
8	8,33 <i>dd</i> 8,1/1,8 1H	8,31 <i>dd</i> 8,0/1,5 1H
8a	---	---
8b	---	---
9	---	---
10	6,12 <i>s</i> 2H	6,12 <i>s</i> 2H

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3 .

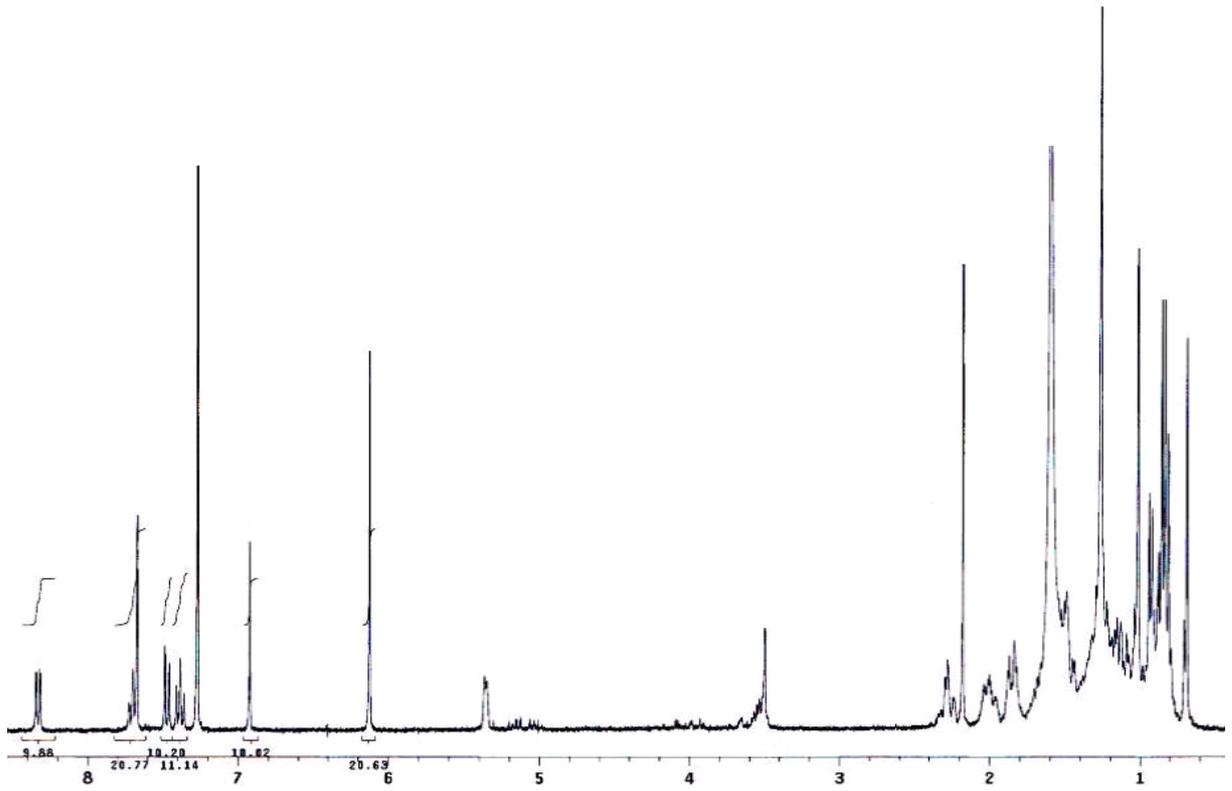


Figura 21: Espectro de RMN ^1H da substância 2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3].

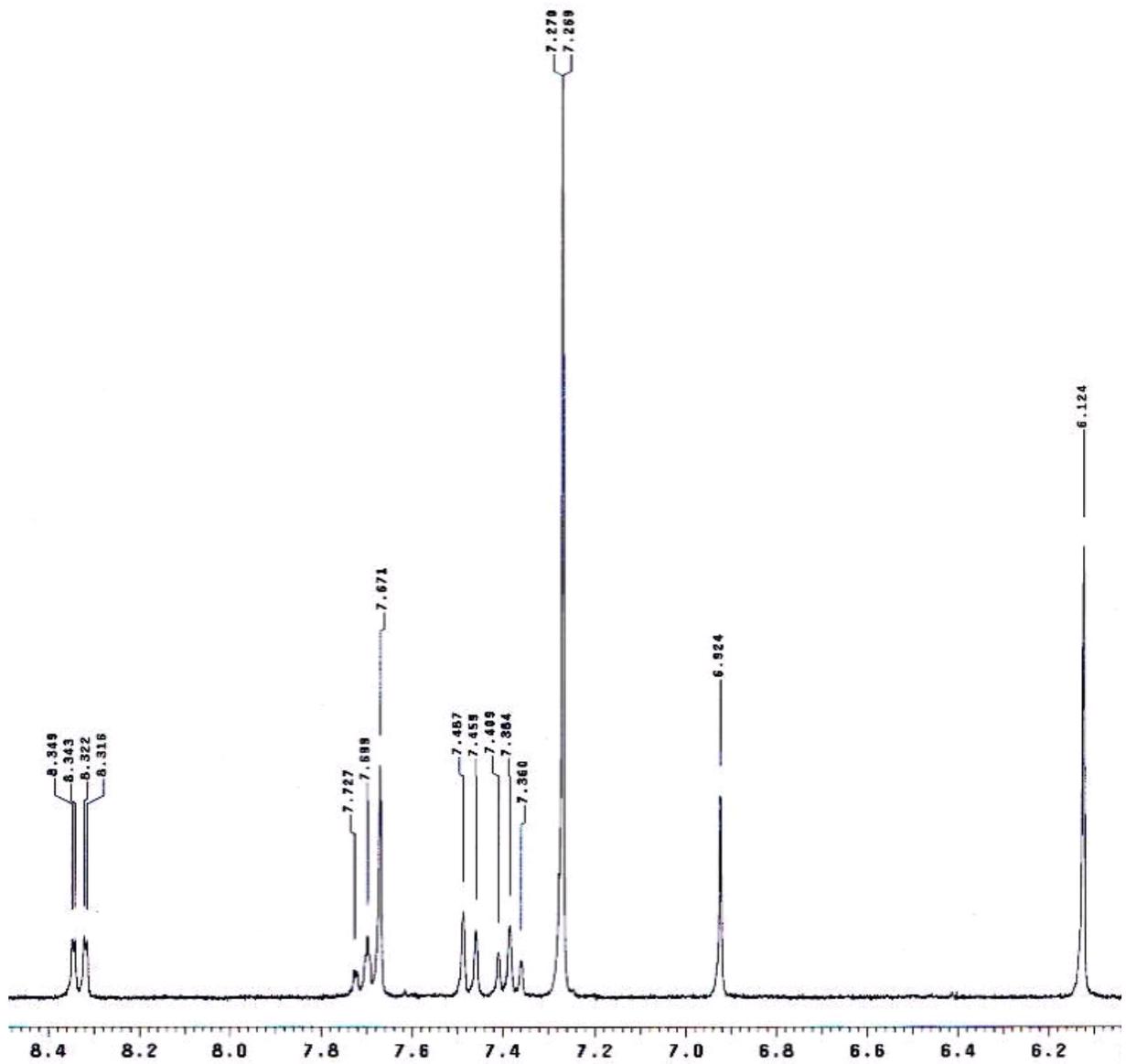
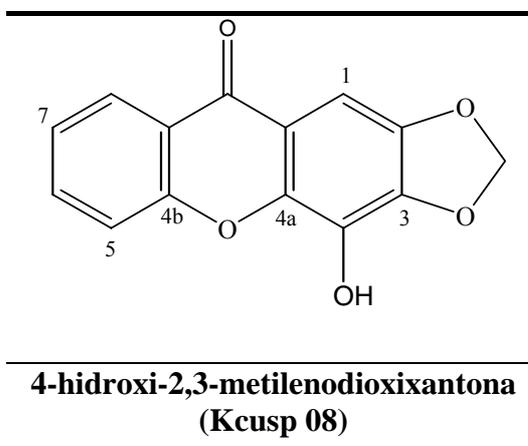


Figura 22: Expansão do espectro de RMN ¹H da substância 2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl₃].

4.1.3.3 Identificação Estrutural da Substância **Kcusp 08**



O espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 08** (Figura 24-25, p. 61-62) apresentou sinais correspondentes ao da substância **Kcusp 07** (p. 53) com exceção para o singlete largo em δ 10,5 com integração relativa para um hidrogênio, que desapareceu após a adição de água deuterada. Confirmando assim, a presença de um hidrogênio hidroxílico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 26, p. 62) apresentou quatorze sinais. O sinal em δ 174,9 evidenciou a presença do grupo carbonílico de xantona com as posições 1 e 8 sem substituintes (OLIVEIRA, 1996). O sinal δ 93,8 indicou a presença de carbono aromático com substituintes oxigenados nos carbonos em posições *orto/para*. Já os carbonos aromáticos em δ 130,4, δ 141,0, δ 145,0, δ 146,1 e δ 155,8 foram atribuídos a carbonos oxigenados do anel. Com base nos dados espectroscópicos de hidrogênio e carbono, pode-se propor para a substância apenas uma estrutura, sendo que a mesma foi comparada com a 2,3-metilenodioxixantona (CRUZ, *et al.*, 2001) (Figura 23, p. 59).

Analisando a estrutura proposta e comparando-a com dados relatados na literatura (CRUZ, *et al.*, 2001) pode-se inferir que o grupo hidroxílico observado no espectro de RMN ^1H (Figura 22, p. 60) apenas poderia assumir a posição 4, já que os deslocamentos químicos não sugeriram a formação de ligação de hidrogênio (ABDEL-LATEFF, *et al.*, 2003). Além disso, o carbono que sustenta o grupo hidroxílico, apresentou-se desprotegido, confirmando sua ligação com um grupo oxigenado (Figura 23). Percebeu-se também, que os valores de deslocamentos químicos dos carbonos das estruturas são concordantes, com exceção dos carbonos no anel (A) do esqueleto xantônico (Figura 23). Esta diferença nos deslocamentos químicos ocorre devido à presença do grupo hidroxílico, que gera um efeito fortemente

ativante nas posições *orto/para*. Examinando simultaneamente estes dados e os confrontando com os obtidos na substância **Kcusp 08** (Tabela 09, p. 60), pode-se confirmar que a estrutura (A) corresponde à feição estrutural da substância isolada. Os deslocamentos químicos restantes foram atribuídos a partir dos valores encontrados na literatura (CRUZ, *et al.*, 2001) e estão expostos na Tabela 09 (p. 60).

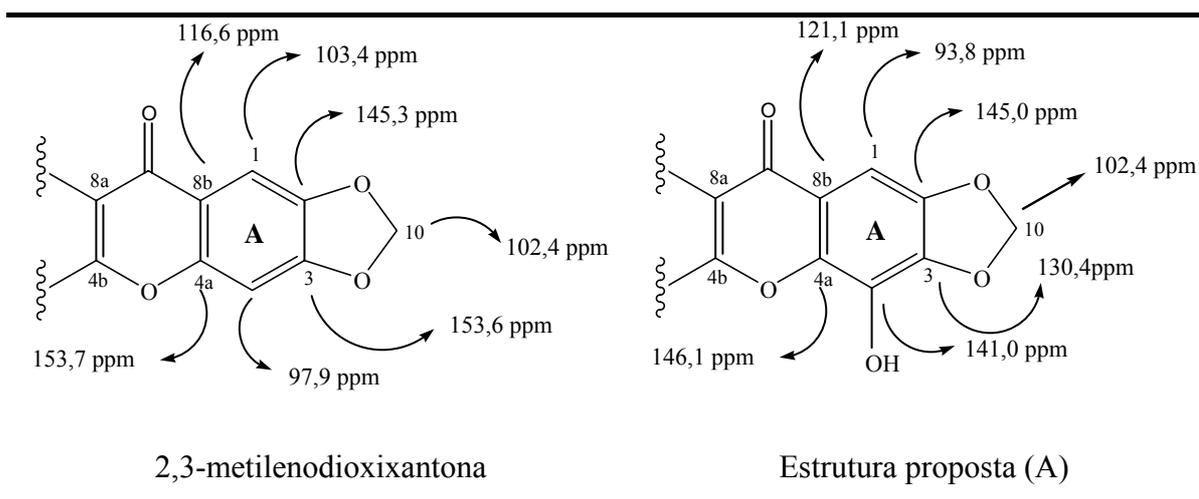


Figura 23: Deslocamentos químicos de carbono da 2,3-metilenodioxixantona das estruturas propostas para a **Kcusp 08**.

A substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona, **Kcusp 08**, já havia sido relatada anteriormente na espécie *Kielmeyera*, na *K. speciosa* (OLIVEIRA, *et al.*, 1966), *K. corymbosa* (GOTTLIEB, *et al.*, 1966), *K. coriaceae* (GOTTLIEB, *et al.*, 1966) e *K. rubriflora* (GOTTLIEB, *et al.*, 1971).

Tabela 9: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**Kcusp 08**) comparada com a literatura (CRUZ, *et al.*, 2001) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].

Posições	<i>4-hidroxi-2.3-metilenodioxixantona</i>			
	^{13}C	Kcusp 08 ^b ^1H	^{13}C	(CRUZ, <i>et al.</i> , 2001) ^a ^1H
1	93,8	7,01 s 1H	103,4	7,64 s 1H
2	145,0	---	145,3	---
3	130,4	---	153,6	---
4	141,0	---	97,9	6,89 s 1H
4a	146,1	---	153,7	---
4b	155,2	---	156,0	---
5	118,7	7,62 <i>dl</i> 8,7 1H	117,6	7,44 <i>d</i> 8,0 1H
6	135,4	7,42 <i>tl</i> 10,0 1H	134,0	7,68 <i>td</i> 8,0/1,5 1H
7	124,9	7,79 <i>t</i> 10,0/2,1 1H	124,0	7,36 <i>t</i> 8,0 1H
8	126,5	8,10 <i>dl</i> 7,8 1H	126,8	8,31 <i>dd</i> 8,0/1,5 1H
8a	121,1	---	121,5	---
8b	116,6	---	116,6	---
9	174,9	---	175,7	---
10	103,2	6,10 <i>s</i> 2H	102,4	6,12 <i>s</i> 2H

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3 .

^b Solvente utilizado na análise DMSO-d_6 .

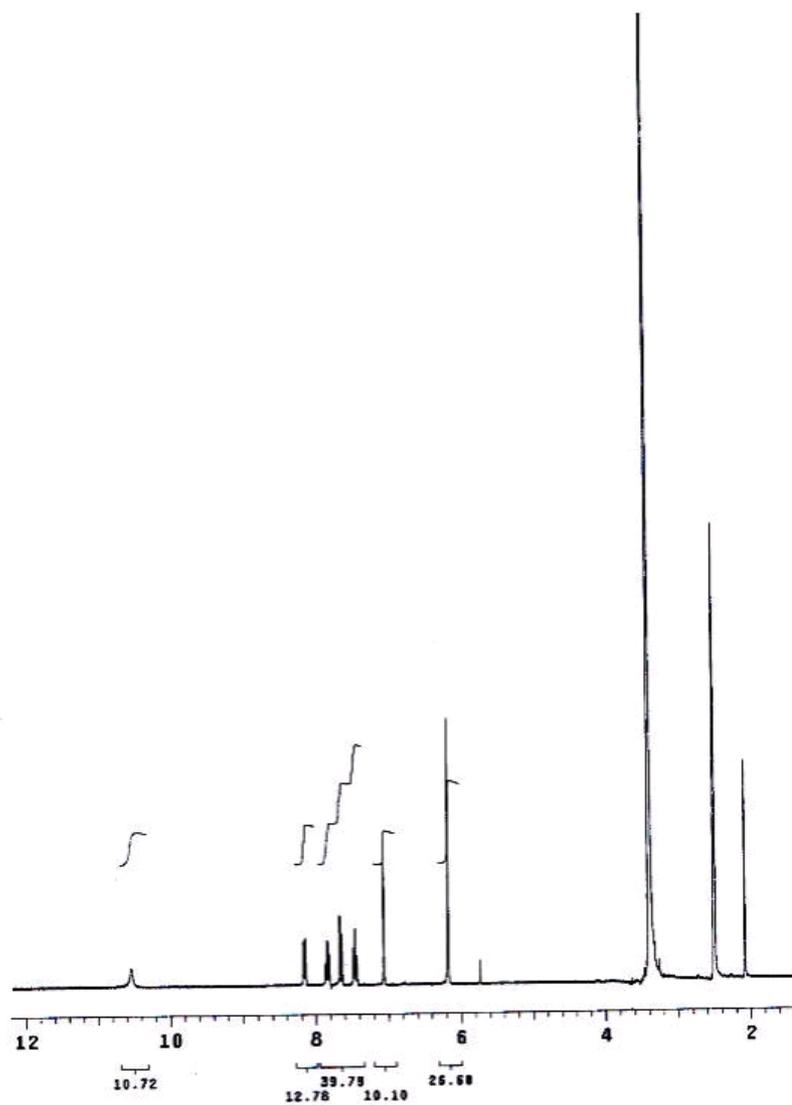


Figura 24: Espectro de RMN ^1H da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), DMSO-d_6].

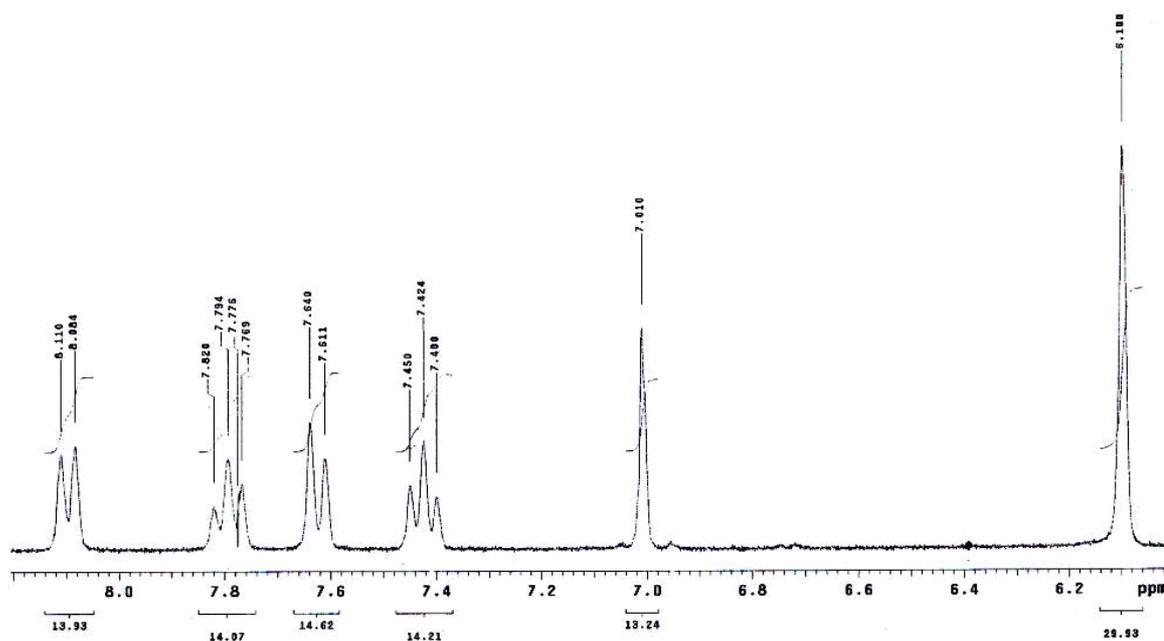


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [300 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6].

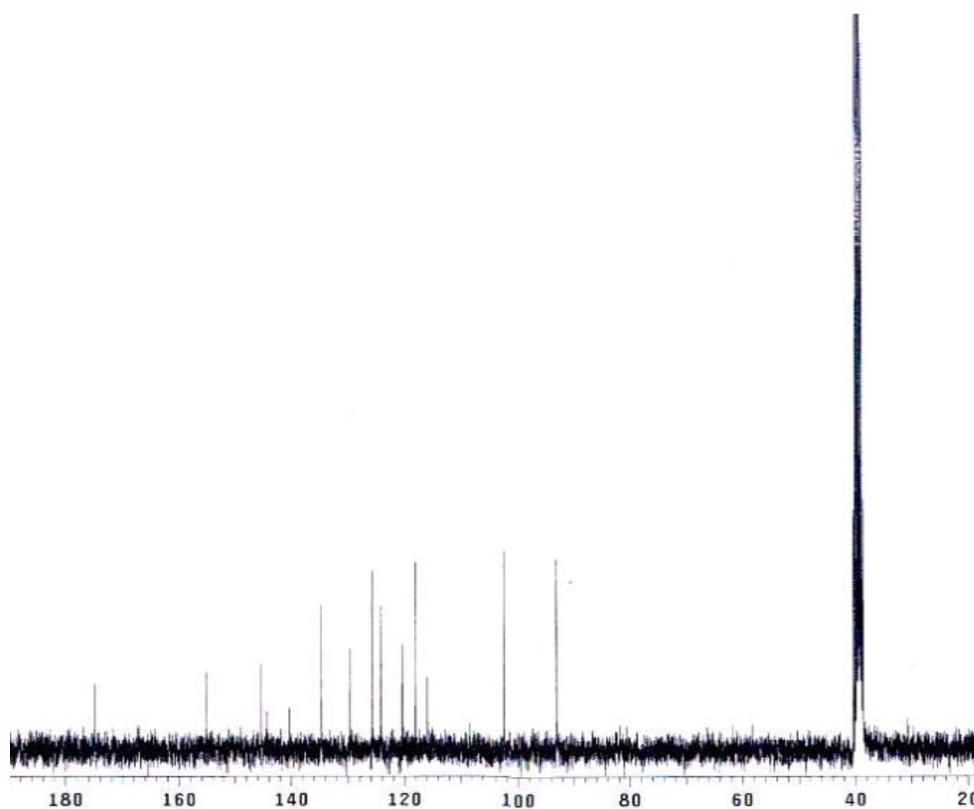
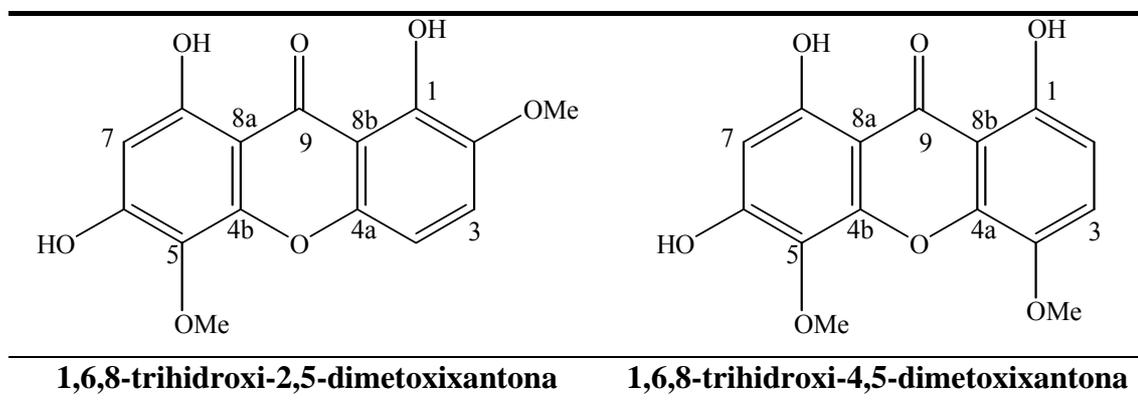


Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C da substância 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [75 MHz, δ (ppm), DMSO- d_6].

4.1.3.4 Propostas Estruturais da Substância **Kcusp 09**



O espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 09** (Figura 30, p.) apresentou dois singletos em δ 11,81 e δ 12,12, ambos com integração relativa para um hidrogênio, sugerindo a presença de dois grupos hidroxílicos em ligação de hidrogênio com um grupo carbonílico. Os sinais em δ 3,90 e δ 3,91 também se apresentaram na forma de singletos ambos com integração para três hidrogênios, indicando a presença de dois grupos metoxílicos. Neste espectro foram observados ainda sinais característicos de hidrogênio aromático em δ 6,32 (*s*, 1H), δ 7,04 (*d*, 1H) e δ 7,51 (*d*, 1H). Sendo que os sinais em δ 7,04 e δ 7,51 exibiam acoplamentos em *orto* com 9,0 Hz. Os referidos desdobramentos e deslocamentos estão na expansão da Figura 30 (p.). A amostra da substância **Kcusp 09** apresentou impurezas.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 31, p.) exibiu apenas cinco sinais, sendo que os sinais de carbonos não hidrogenados não foram observados, devido à pequena quantidade de amostra (4,0 mg). Foram observados sinais em δ 98,9, δ 106,6, δ 122,6, δ 57,4, δ 61,7 (Tabela 10, p. 66). Já os sinais δ 57,4 e δ 61,7 confirmaram a existência de dois grupos metoxílicos na estrutura da substância. Os deslocamentos observados para os grupos metoxílicos indicaram que um dos grupos se encontrava em ambiente de impedimento estérico (GOTTLIEB & NAGEM, 1977). Pode-se observar nos espectros de carbono

Com base nos dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C , pode-se propor quatro estruturas, (A), (B), (C), e (D) (Figura 27, p. 64).

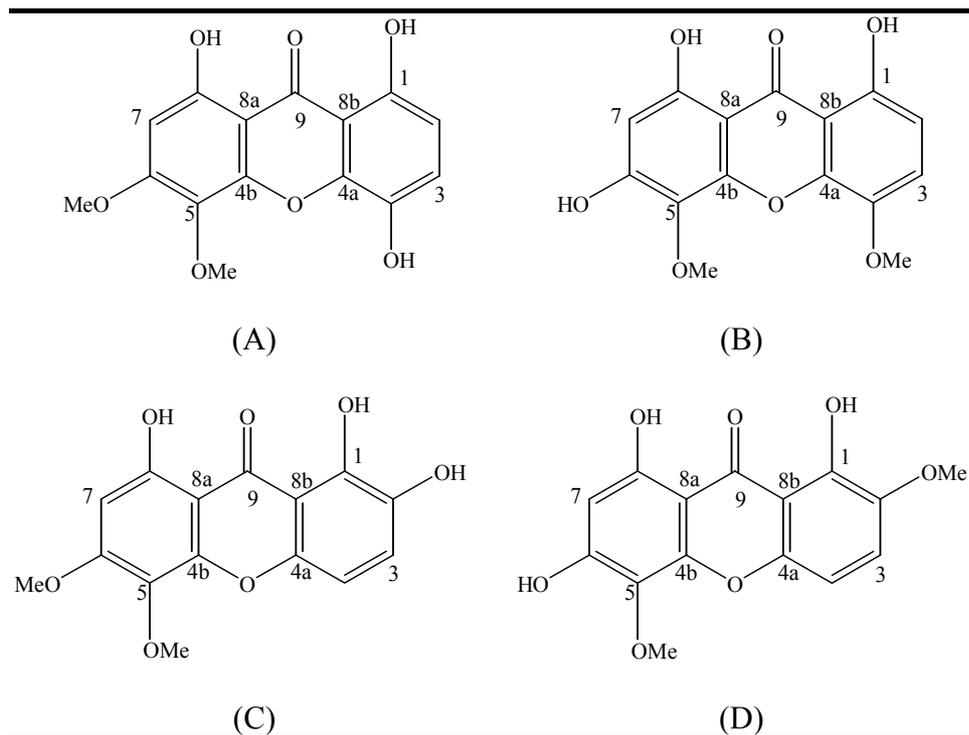


Figura 27: Alternativas estruturais da substância **Kcusp 09**.

Com base nas propostas dos regioisômeros e comparando-as com dados relatados na literatura (GIL, *et al.*, 1991) (Figura 28), percebeu-se que o anel xantônico com o sinal do C-2 em δ 98,9 corresponde ao valor obtido no espectro de ^{13}C da substância **Kcusp 09**. A partir desta conclusão, as estruturas propostas (A) e (C) podem ser eliminadas ficando apenas os regioisômeros (B) e (D).

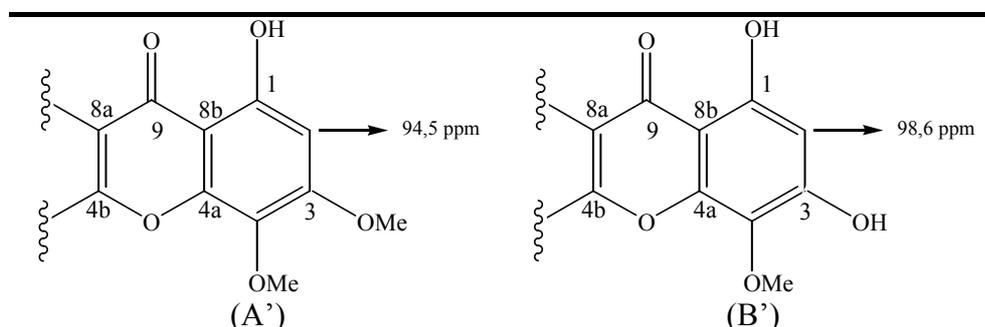


Figura 28: Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 09**.

Analisando, portanto, as estruturas propostas, (B) e (D), e as comparando-as com a literatura (ASTHANA, *et al.*, 1991) (Figura 29), notou-se que os valores dos deslocamentos de carbono das duas estruturas, (C') e (D'), são parecidos e, por conseguinte, não se pode afirmar com certeza qual das duas estruturas corresponderia à substância **Kcusp 09**.

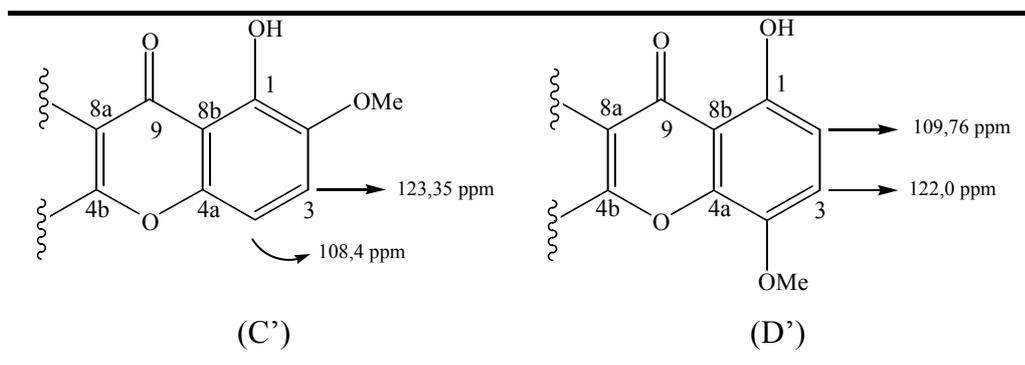


Figura 29: Deslocamento químico de carbono das estruturas propostas para **Kcusp 09**.

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância **Kcusp 05** [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].

Posições	<i>Kcusp 09</i> ^a			
	1,6,8-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona		1,6,8-trihidroxi-4,5-dimetoxixantona	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	*	---	*	---
2	*	---	106,6	7,50 <i>d</i> 9,0 1H
3	122,6	7,03 <i>d</i> 9,0 1H	122,6	7,03 <i>d</i> 9,0
4	106,6	7,50 <i>d</i> 9,0 1H	*	---
4a	*	---	*	---
4b	*	---	*	---
5	*	---	*	---
6	*	---	*	---
7	98,5	6,32 <i>s</i> 1H	*	6,32 <i>s</i> 1H
8	*	---	*	---
8a	*	---	*	---
8b	*	---	*	---
9	*	---	*	---
<u>OH</u>-1	*	12,12 <i>s</i> 1H	*	12,12 <i>s</i> 1H
<u>OH</u>-8	*	11,81 <i>s</i> 1H	*	11,81 <i>s</i> 1H
<u>H₃</u>CO	61,7	3,91 <i>s</i> 3H	61,7	3,91 <i>s</i> 3H
<u>H₃</u>CO	57,4	3,90 <i>s</i> 3H	57,4	3,90 <i>s</i> 3H

^a Solvente utilizado na análise Acetona- d_6 .

* Sinal não observado

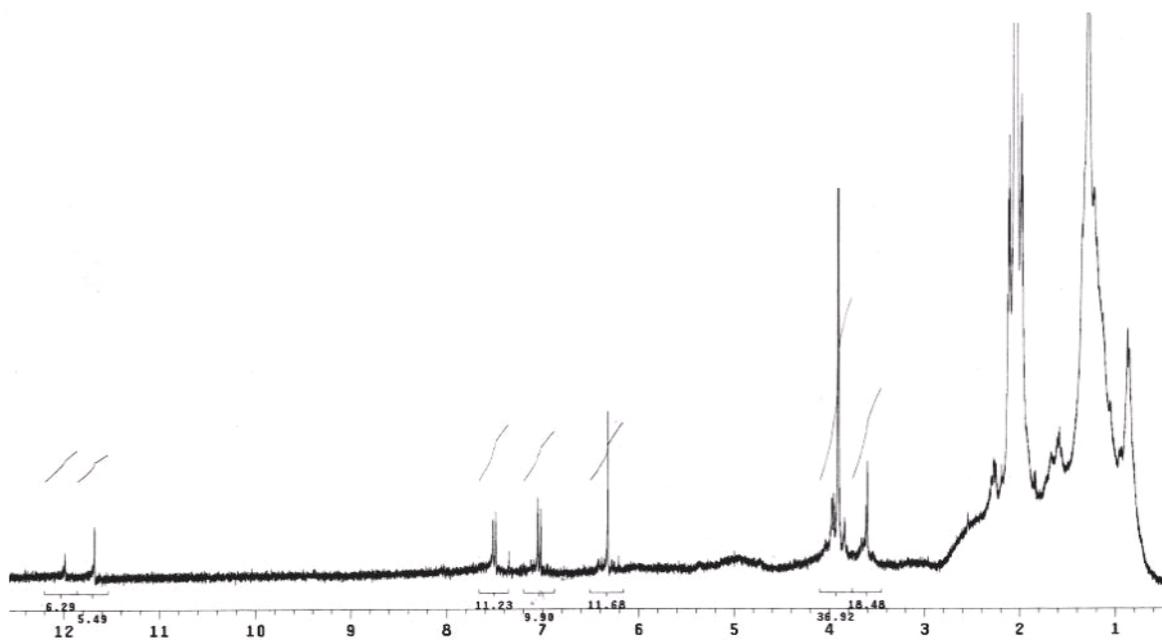


Figura 30: Espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 09** [300 MHz, δ (ppm), Acetona- d_6].

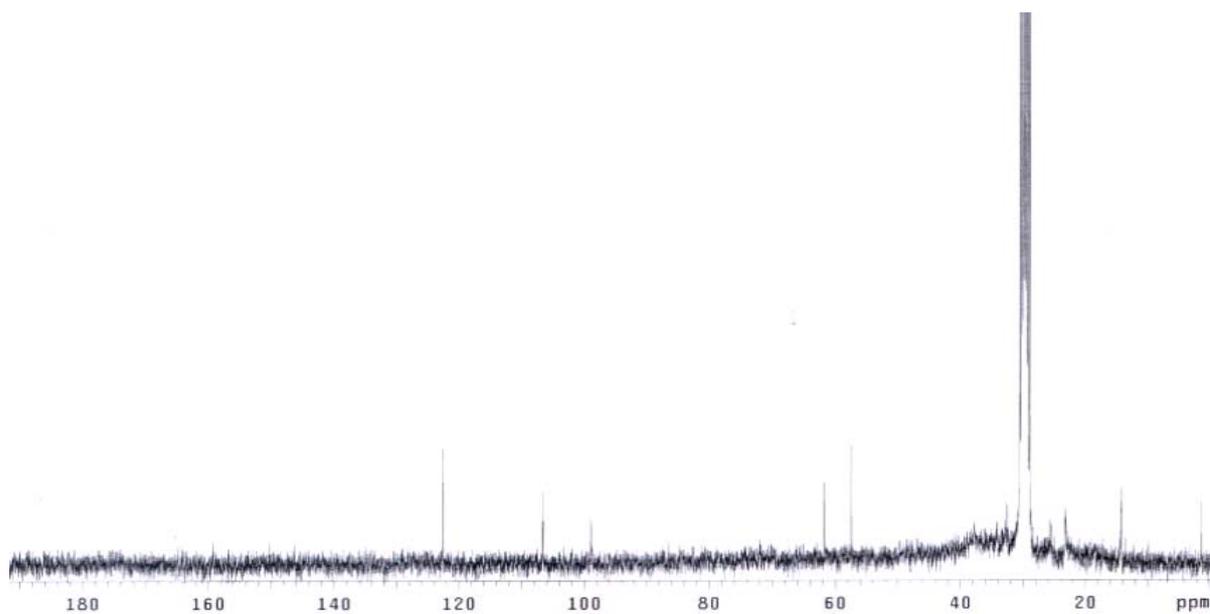


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C da substância **Kcusp 09** [75 MHz, δ (ppm), Acetona- d_6].

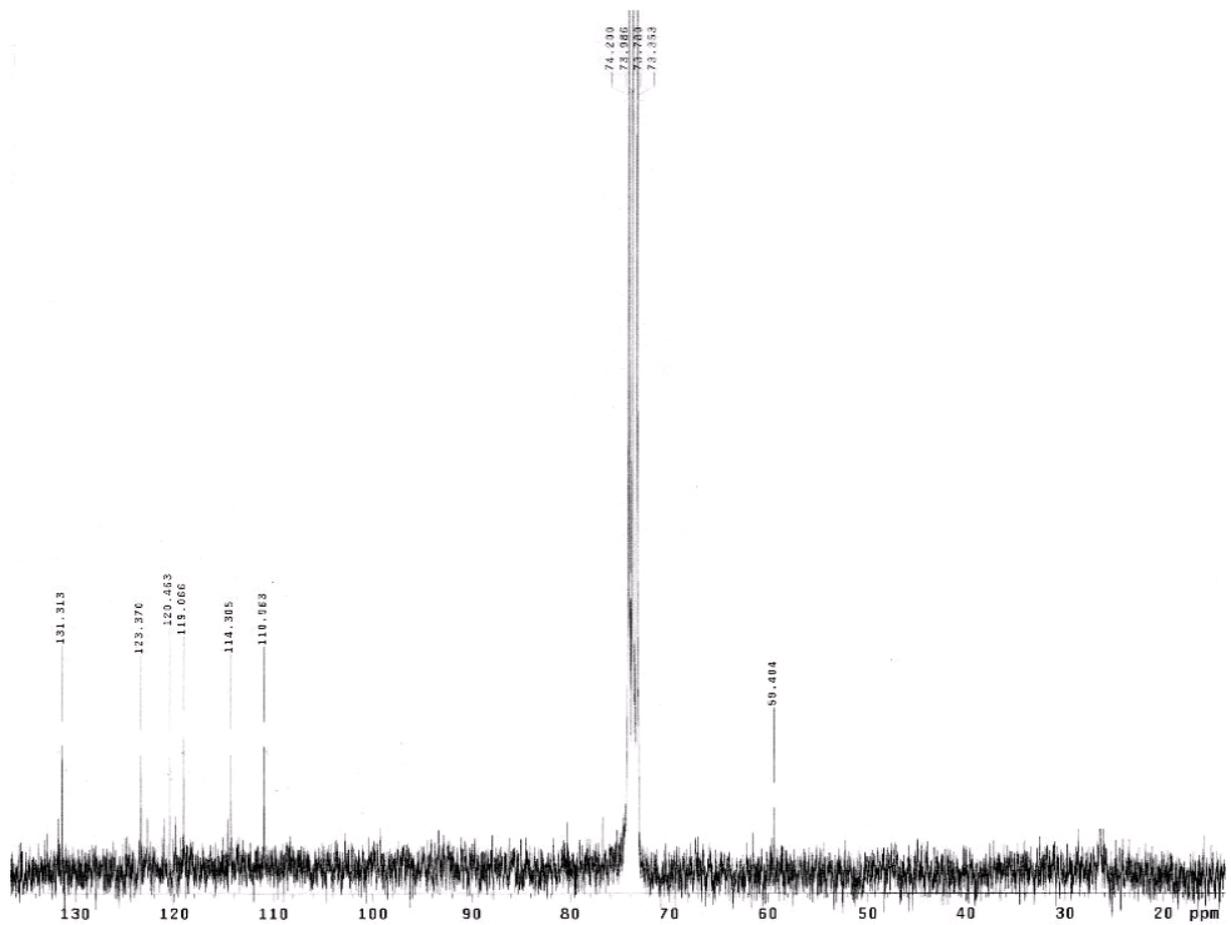
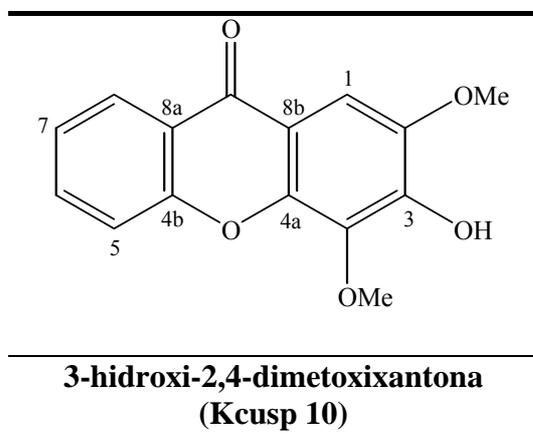


Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C da substância **Kcusp 06** [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3].

4.1.3.5 Identificação Estrutural da Substância **Kcusp 10**



O espectro de RMN ^1H da substância **Kcusp 10** (Figura 27, p. 66) apresentou dois singletos em δ 3,97 e δ 4,05, ambos com integração para três hidrogênios, indicando a presença de dois grupos metoxílicos. Um singlete em δ 6,03, cuja integração correspondeu a um hidrogênio, o qual desapareceu após a adição de água deuterada. Este sinal foi então atribuído a um hidrogênio hidroxílico. O exame da região de hidrogênios aromáticos no espectro, revelou sinais em δ 7,53 (*dd*, 8,7 Hz e 1,7 Hz, 1H), δ 7,67 (*dt*, 8,7 Hz, 6,5 Hz e 1,4 Hz, 1H), δ 7,34 (*tl*, 10 Hz, 1H) e δ 8,29 (*dl*, 8,0 Hz e 1,7 Hz, 1H) evidenciaram a existência de um anel aromático com quatro átomos de hidrogênio vicinais. Já o singlete em δ 7,47 assinalou a presença de outro anel aromático trissubstituído (Figura 28, p. 66).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 29, p. 67) evidenciou a presença de um grupo carbonílico de xantona devido ao sinal em δ 175,7 (CASTELÃO, *et al.*, 1977). Já os sinais δ 100,4, δ 117,7, δ 133,7, δ 123,5 e δ 126,1 confirmaram a existência de um anel aromático sem substituintes. No entanto, os sinais dos carbonos aromáticos em δ 145,5, δ 134,8, δ 146,2 e δ 155,6 apresentaram-se desprotegidos, assinalando a existência de carbonos oxigenados.

Os dois grupos metoxílicos que foram observados no espectro de RMN ^1H (Figura 27, p. 66) exibiram deslocamentos químicos em δ 56,1 e δ 61,2. Sendo que o grupo metoxílico em δ 61,2 encontrava-se em ambiente de impedimento estérico (GOTTLIEB & NAGEM, 1977; CASTELÃO, *et al.*, 1977).

Com base nos dados espectroscópicos de hidrogênio e carbono, pode-se propor para a substância **Kcusp 10**, duas estruturas, (A) e (B) (Figura 25).

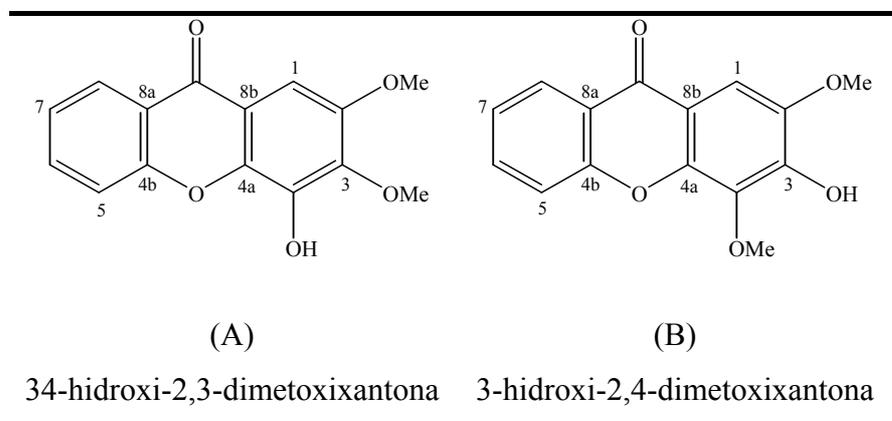


Figura 32: Alternativas estruturais da substância **Kcusp 10**.

Analisando as duas estruturas propostas, (A) e (B), e comparando-as com dados relatados na literatura (CASTELÃO, *et al.*, 1977; MINAMI, *et al.*, 1993; KIJJOA, *et al.*, 2000; KATO, *et al.*, 2004; SOUSA, 2005), percebeu-se que os valores de deslocamentos químicos dos carbonos das estruturas propostas, (A') e (B'), são concordantes, com exceção dos carbonos do anel A do esqueleto xantônico (Figura 26) (CASTELÃO, *et al.*, 1977).

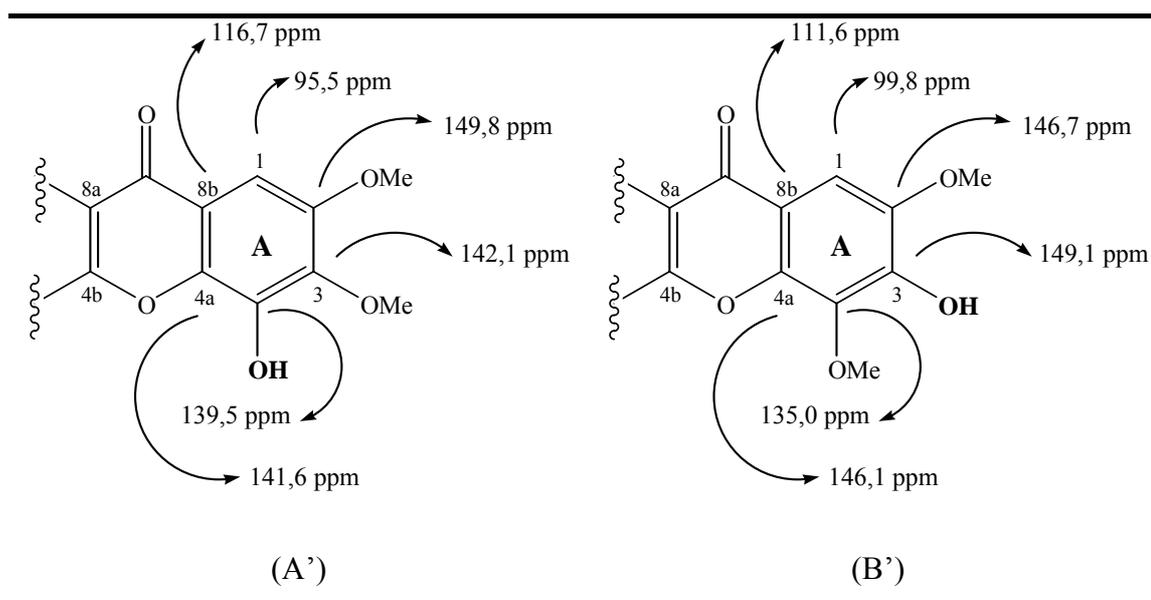


Figura 33: Alternativas estruturais da substância **Kcusp 10**, com os deslocamentos químicos de carbono.

Esta diferença nos valores de deslocamentos químicos das estruturas dos regioisômeros (A') em ;C-4a, C-3 e C-1 e em (B') em; C-2, C-4 e C-8b, ocorrem devido ao efeito fortemente ativante do grupo hidroxílico nas posições *orto/para* (GOTTLIEB & NAGEM, 1977; CASTELÃO, *et al.*, 1977). Examinando simultaneamente estes dados e os confrontando com os obtidos na substância **Kcusp 10** (Tabela 10, p. 65), pode-se confirmar que a estrutura (B) corresponde à feição estrutural da substância isolada, uma vez que a mesma exibiu para o C-1 sinal δ 100,4 e o C-8b em δ 113,6. Os dados espectroscópicos completo encontram-se na Tabela 10 (p.65).

A substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona trata-se de uma xantona já descrita na literatura, inclusive em algumas espécies de *Kielmeyera*, como a *K. lathrophyton* (SOUSA, 2005) estudada pelo grupo GESNAT, *K. rubriflora* (GOTTLIEB *et al.*, 1971), *K. speciosa* (OLIVEIRA *et al.*, 1968) e *K. coriacea* (PIMENTA *et al.*, 1964).

Tabela 11: Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (**Kusp 10**) comparada com dados da literatura (CASTELÃO, *et al*, 1977; SOUSA, 2005) [δ (ppm); multiplicidade (m); J (Hz); integração].

Posições	<i>3-hidroxi-2.4-dimetoxixantona</i>			
	^{13}C	Kusp 10 ^c ^1H	(CASTELÃO, <i>et al</i> , 1977; SOUSA, 2005) ^a ^{13}C	^1H
1	100,4	7,47 <i>s</i> 1H	99,8	7,54 <i>s</i> 1H
2	145,5	---	146,7	---
3	145,9	---	149,1	---
4	134,8	---	135,0	---
4a	146,2	---	146,1	---
4b	155,6	---	155,1	---
5	117,7	7,53 <i>dl</i> 8,4 1H	117,8	7,58 <i>d</i> 8,4 1H
6	133,7	7,67 <i>dt</i> 8,9/6,5/1,4 1H	134,0	7,72 <i>dt</i> 8,4/6,9/1,8 1H
7	123,5	7,34 <i>tl</i> 10,0 1H	123,7	7,41 <i>dt</i> 8,4/6,9/1,2 1H
8	126,1	8,29 <i>dd</i> 8,0/1,7 1H	125,6	8,35 <i>dd</i> 7,8/1,2 1H
8a	121,0	---	120,7	---
8b	113,6	---	111,6	---
9	175,7	---	174,1	---
<u>OH</u>-3	---	6,03 <i>s</i> 1H	---	---
<u>H₃CO</u>-2	56,1	3,97 <i>s</i> 3H	55,8	4,03 <i>s</i> 3H
<u>H₃CO</u>-4	61,2	4,05 <i>s</i> 3H	60,8	4,13 <i>s</i> 3H

^a Solvente utilizado na análise CDCl_3 .

^b Solvente utilizado na análise DMSO-d_6 .

^c Solvente utilizado na análise CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6 .

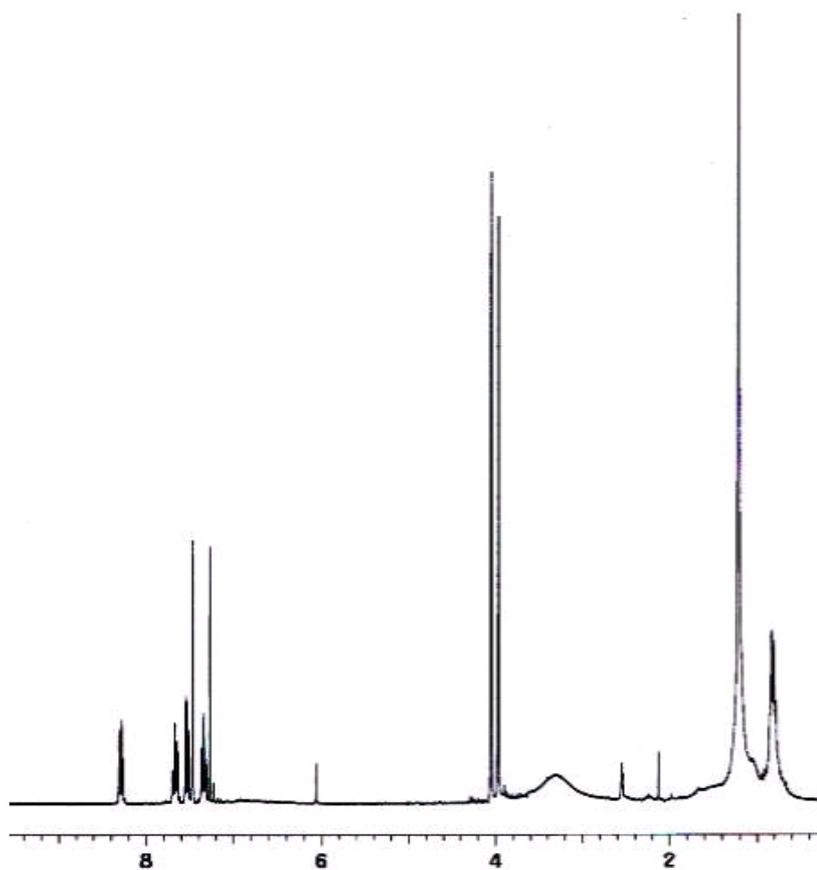


Figura 34: Espectro de RMN ^1H da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].

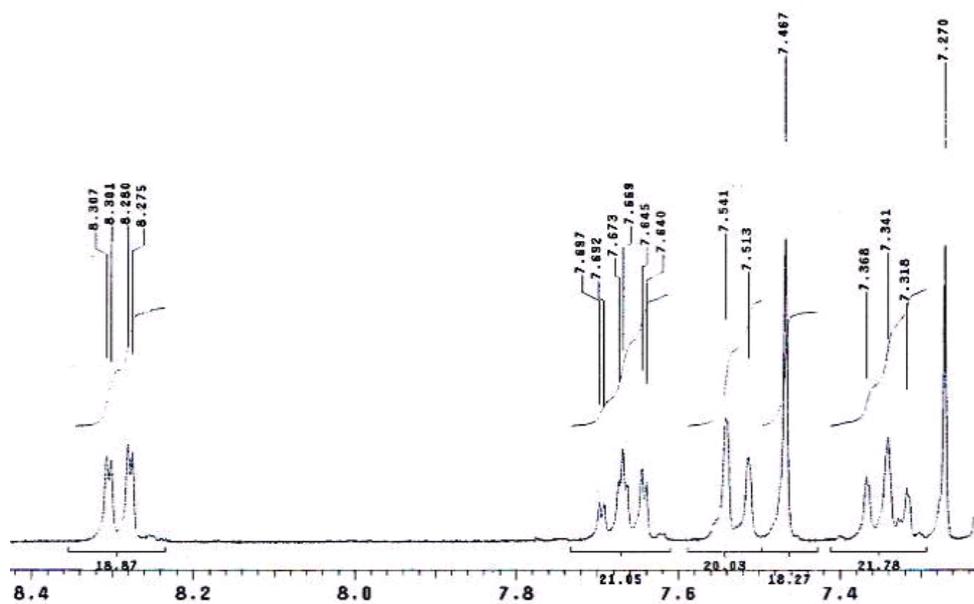


Figura 35: Espectro de RMN ^1H da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].

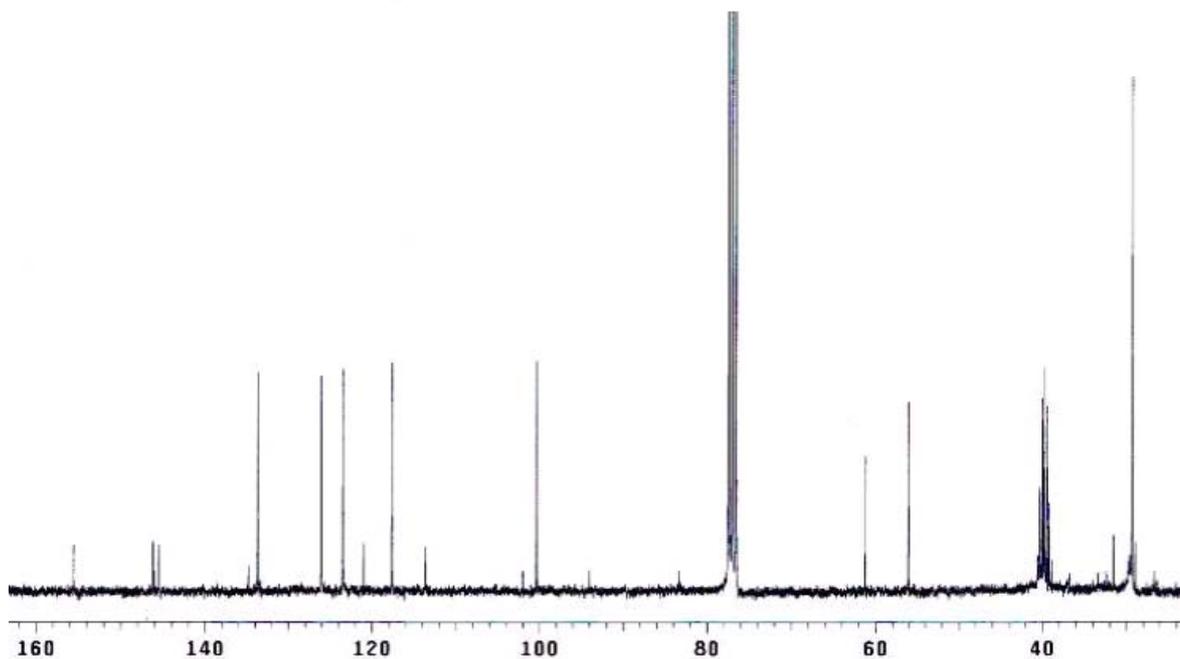


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [75MHz, δ (ppm), CDCl_3 + gotas de DMSO-d_6].

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.

Os bioensaios foram realizados com o extrato em hexano e a fase DCM do caule da *K. cuspidata*. A CIM foi realizada apenas com a fase DCM.

Inicialmente foi realizada a bioautografia como avaliação qualitativa do potencial das amostras frente à inibição dos microrganismos. Oito microrganismos foram testados, sendo quatro bactérias gram (+) (*B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* e *S. mutans*), duas gram (-) (*E. coli* e *S. choleraesuis*) e um fungo (*A. niger*).

Analisando a Tabela 11, pode-se perceber que o extrato em hexano apresentou atividade contra as bactérias gram (+), *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. mutans*. Já a fase diclorometano, apresentou atividade apenas contra *S. aureus*. A atividade antimicrobiana no extrato em hexano pode estar associada ao sinal de hidrogênio δ 18-20. Esse sinal pode estar relacionado a derivado de fluoroglucinol, isolado pela primeira vez na *K. coriaceae* (SOUSA, 2005)

Tabela 12: Resultado da bioautografia dos extratos em hexano e da fase diclorometano.

<i>Microrganismo</i>	<i>Extrato em hexano</i>	<i>Fase diclorometano</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 5175	+	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 94863	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	-	-

No teste de sensibilidade a antibióticos CIM, a fase diclorometano foi submetida a atividade antimicrobiana para os microrganismos, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. mutans*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*.

A fase diclorometano foi seletiva para as bactérias gram (+), apresentando baixos valores de concentração da amostra. Verifica-se na Tabela 2, que a amostra analisada mostrou um potencial efeito inibitório contra *M. luteus* exibindo uma concentração de $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do cloranfenicol, antibiótico utilizado como controle positivo.

Tabela 13: Resultado da Concentração Inibitória Mínima da fase diclorometano.

<i>Microrganismo</i>	<i>Fase diclorometano</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Cloranfenicol</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,6	3,9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	31,2	7,8
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 5175	31,2	3,9
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	7,8	3,9
<i>Escherichia coli</i> ATCC 94863	> 500	3,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 500	62,2
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	> 500	3,9

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentado descreve o primeiro estudo fitoquímico do caule da espécie *Kielmeyera cuspidata* (Clusiaceae). Espécie esta, que foi coletada na Chapada Diamantina, em uma região de campo rupestre. O recente trabalho resultou na identificação de dez substâncias, sendo uma mistura de esteróides (3-o-acetil-sistosterol e 3-o-acetil-estigmasterol) e de triterpenos (α e β -amirina), assim como o isolamento de seis xantonas (1,6-diidroxi-3,5-dimetoxixantona, 2,3-metilenodioxixantona, 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona, 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona). Sendo que as substâncias identificadas são comumente encontradas no gênero *Kielmeyera*.

Houve também a realização de ensaios biológicos com os extratos – hexânico, metanólico, fase diclorometano e fase acetato de etila (ambas provenientes da partição do extrato metanólico) – os quais

Apenas algumas frações da fase diclorometano foram estudadas, ficando ainda as demais frações além do extrato da fase acetato de etila. O extrato hexânico também pode ser melhor analisado uma vez que o mesmo apresenta sinais em 18 ppm e 19 ppm, provavelmente de grupos hidroxílicos (presente em enonas ou fenóis) em ligação de hidrogênio. Os mesmos sinais foram observados na *Kielmeyera lathrophyton* e *Kielmeyera coriacea* (ambas coletadas na Chapada Diamantina). Em recente defesa de tese, a investigação química do extrato hexânico do caule da *Kielmeyera coriacea* resultou na obtenção de duas substâncias, as quais, após análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais sugeriram tratar-se de derivadas do floroglucinol, contudo os dados não foram suficientes para a total elucidação das estruturas (SOUSA, 2005). A presença desta classe de substância pode ser observada devida presença dos sinais em 18 ppm e 19 ppm.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATEFF, A.; KLEMKE, C.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A.D. Two new xanthenes derivatives from the *Algicolous* marine fungus *Wardomyces anomalus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 706-708, 2003.

ABREU, A.S.; BARBOSA, P.S.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Cróton pullei* Var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, n. 2, p.1-9, 2001.

ABOU-SHOER, M.; BOETTNER, F.E.; CHANG, C.J.; CASSADY, J.M. Antitumour and Cytotoxic Xanthenes of *Psorospermum febrifugum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2795-2800, 1988.

ALVES, H.H. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola**, n.3, p.10-15, 2001.

BEERHUES, L.; BERGER, U. Xanthenes in cell suspension cultures of two *Centaurium* species. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1227-1231, 1994.

BEERHUES, L. Benzophenone synthase from cultured of *Centaurium erythraea*. **FEBS Letters**, v. 383, 264-266, 1996.

BENNETT, G.J.; LEE, H.H. Xanthenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, v.28, n.4, p.967-998, 1989.

BICALHO, B.; GONÇALVES, R.A.C.; ZIBORDI, A.P.; MANFIO, G.P.; MARSAIOLI, A. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* ssp. (Clusiaceae) Pollinating Bees. **Verlag der Zeitschrift für Naturforsch**, 58c, p. 746-751, 2003

BORRIS, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal Ethnopharmacol**, v.51, p.29-38, 1996.

CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; DE OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F.B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, p. 740-743, 1998.

CARVALHO, R.L.P. **Isolamento e caracterização de constituintes da *Melloa quadrivalvis* (Jacq.) A. Gentrys (Bignoniaceae)**. Maceió: UFAL, 1996. Dissertação de mestrado.

CASTELÃO JR., J.F.; GOTTLIEB, O.R.; LIMA, R.A.; MESQUITA, A.L. Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species – ^{13}C NMR spectroscopy of xanthones. **Phytochemistry**, v. 16, p. 735-740, 1977.

CORTEZ, D.A.G.; YOUNG, M.C.M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K. Xanthones, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p.1367-1374, 1998.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobiana agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CRUZ, F.G.; NETO, J.T.S.; GUEDES, M.L.S. Xanthones and Cumarinas de *Kielmeyera lathrophyton*. **Journal. Brazilian. Chemistry. Society**, v.12, n. 1, p. 117-122, 2001.

CRUZ, F. G., MOREIRA, L.M., JESUS, J.A., DAVID, J.M., CHÁVES, J.P. **Cumarinas de *Kielmeyera reticulata* (Guttiferae)**. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1363-1366, 1998.

DALL'ÁQUA, S.; INNOCENTI, G.; VIOLA, G.; PIOVAN, A.; CANIATO, R.; CAPPELLETTI, E.M. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 11, p.1499-1501, 2002.

DHARMARATNE, H.R.W.; TAN, G.T.; MARASINGLE,G.P.; PEZZUTO, J.M. Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase and HIV-1 Replication by *Calophyllum* coumarins and xanthones. **Planta Medica**, v.68, n. 1, p.86-87, 2002.

EL-MAWLA, A.M.A.; SCHMIDT, W.; BEERHUES, L. Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN. **Planta**, v.212, p.2888-298, 2001.

FERREIRA, G.A.L.; GOTTLIEB, O.R.; MESQUITA, A.A.L. Xanthones from *Kielmeyera species*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 4, p.1512-1513, 1972.

FINNEGAN, R.A.; MERKEL, K.E. Constituents of *Mammae Americana* L. IX. Oxidation of mammein and mammeisin. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 61, n. 10, p. 1603-1608, 1972.

GIL, S.; PARRA, M.; SANZ, V.; TORTAJADA, A. Synthesis of 1,3-dihidroxy-5,6-dimethoxyxanthone, a confirmation of struture. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 339-342, 1988.

GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; CAMEY, M.; MESQUITA, A.A.L.; CORREA, D.B. 1,3,5-trioxygenated xanthones from *Kielmeyera species*. **Tetrahedron**, v. 22, p. 1777-1784, 1966.

GOTTLIEB, O.R.; MESQUITA, A.A.L.; NAGEM, T.J. Xanthones from *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemistry**, v.10, p.2253, 1971.

GOTTLIEB, O.R.; MESQUITA, A.A.L.; OLIVEIRA, G.G.; MELO, M.T. Xanthones from *Kielmeyera speciosa*. **Phytochemistry**, v.9, n. 12, p.2537-2544, 1970.

GOTTLIEB, O.R.; NAGEM, T.J. 2-Hydroxy-3,4-Dimethoxyxanthone from *Kielmeyera species*. **Revista Latinoamericana. Química**, v.8, p.137-138, 1977.

GRECA, M.D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Thypha latifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1430-1435, 1990.

IINUMA, M.; TOSA, H.; TANAKA, T.; KANAMARU, S.; ASAI, F.; KOBAYASHI, Y.; MIYAUCHI, K.; SHIMANO, R. Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 2, p. 311-314, 1996.

JOLY, A.B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. **Editora Nacional**, São Paulo, p.319-337, 1983.

JONES, W.D.; ALBRECHT, W.L.; MUNRO, N.L.; STEWART, K.T. Antiallergic agents. Xanthone-2,7-dicarboxylic acid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.20, n.4, p.594-595, 1977.

JUNGES, M.J.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, M.F.G.S.; FILHO, E.R.; FRÜHAUF, M.; BARAÑANO, A.G. Triterpenos ursânicos e oleanânicos isolados do caule de *Eugenia florida* DC. **Revista de Pesquisa E Pós-Graduação**, v. 1, p. 13-30, 2000.

KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E. Xanthones from *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae). **Biochemical Systematics Ecology**, v. 33, p. 331-334, 2005.

KIJJOA, A.; GONZALEZ, M.J.; PINTO, M.M.M.; SILVA, A.M.S.; ANANTACHOKE, C.; HERZ, W. Xanthones from *Calophyllum teysmanni* Var. *inonphylloid*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 833-836, 2000.

LIKHITWITAYAWUID, K.; PHADUNGCHAROEN, T.; KRUNGKRAI, J. Antimalarial Xanthones from *Gracinia cowa*. **Planta Medica**, v.64, p.70-72, 1998.

LIN, C.N.; CHUNG, M.I.; LIOU, S.J.; LEE, T.H.; WANG, J.P. Synthesis and Anti-inflammatory Effects of Xanthone Derivatives. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v.48, n.9, p.532-538, 1996a.

LIN, C.N.; LIOU, S.J.; LEE, T.H.; CHUANG, Y.C.; WONG, S.J. Xanthone Derivatives as Potential Anti-cancer Drugs. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v.48, n.5, p.539-544, 1996b.

LOPES, J.L.C., LOPES, J.N.C., GILBERT, B., BONINI, S.E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v.16, n. 7, p.1101, 1977.

MINAMI, H.; KINOSHITA, M.; FUKUYAMA, Y.; KODAMA, M.; YOSHIZAWA, T.; SUGIURA, M.; NAKAGOWA, K.; TAGO, H. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 501-506, 1994.

MOREAU, S.; VARACHE-LEMBEGE,; LARROUTURE, S.; FALL, D.; NEVEU, A.; DEFFIERUX, G.; VERCAUTEREN, J.; NUHRICH, A. (2-Arylhidrazonomethyl)-substituted Xanthenes as Antimycotics: Synthesis and Fungistatic Activity against *Candida* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 237-253, 2002.

MOREIRA, L.M. **Estudo químico da *Kielmeyera reticulata* (Guttiferae)**. Salvador: UFBA, 1999. 178p. Dissertação de mestrado.

NAGEM, T.J.; SILVA, M.A. Xanthenes and Phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila*. **Phytochemistry**, v.27, n. 9, p.2961-2962, 1988.

NETO, J.T. **Estudo fitoquímico de *Kielmeyera lathrophyton***. Salvador: UFBA, 1998. 102p. Dissertação de mestrado.

OLEA, R.S.G. **Metodologia para identificação dos componentes de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C** . Salvador: USP, 1990. Dissertação de mestrado.

OLIVEIRA, G.G., MESQUITA, A.A.L.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.T. Constituintes xantônicos da *Kielmeyera speciosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 421, 1966.

OLIVEIRA, G.G., MESQUITA, A.A.L.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.T. Novas xantonas de *Kielmeyera speciosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 40, p. 29-31, 1968.

OLIVEIRA, M.F.: **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFCE, 1996. 273p. Dissertação de mestrado.

OLIVEIRA, F.F.; NAGEM, T.J.; CASSINI, S.T.A.; MELO, T.M.S.; QUEIROZ, Y.S.; OLIVEIRA, R.A.; OLIVEIRA, T.T. Xantonas isoladas das raízes de *Kielmeyera elata* Saddi (Guttiferae). In: **22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Livro de Resumos. 2: Poços de Caldas, 1999. PN-198.

PERES, V.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, F.F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v.55, n. 7, p. 683-710, 2000.

PIMENTA, A., MESQUITA, A. A. L., CAMEY, M., GOTTLIEB, O R., MAGALHÃES, M. T. A química das gutíferas brasileiras I. Constituintes xantônicos da *Kielmeyera coriacea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.36, p.39-41, 1964.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D. A. G.; VIDOTTI, G. I.; YOUNG, M.C.M.; FERREIRA, A.G. Antibacterial xanthenes from *Kielmeyera variabilis* MART. **Química Nova**, v.26, n.2, p.2157-160, 2003.

RICA, G.S.; NICOTRA, F. Carbono-13 Nuclear Magnetic Resonance spectro of some phytosterols. **Gazzetta Italiana**, v. 108, p. 713-715, 1978.

SCHIMIDT, W.; BEERHUES, L. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. **FEBS Letters**, v. 420, p. 143-146, 1997.

SARAIVA, L.; FRESCO, P.; PINTO, E.; SOUSA, E.; PINTO, M.; GONÇALVES, J. Synthesis and In Vivo Modulatory Activity of Protein Kinase C of Xanthone Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, n. 10, p.3219-3227, 2002.

SAXENA, G., FARMER, S., TOWER, G.H.N., HANCOCK, E.W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical Analysis**, v.6, p.125-129, 1995.

SUNDARAM, B.M.; GOPALAKRISHNAN, C.; SUBRAMANIAN, S.; SHANKARANARAYANAN, D.; KAMESWARAN, L. Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. **Planta Medica**, v. 48, n. 1, p. 59-60, 1983.

SANTOS, N.A.S. **Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados da espécie *Kielmyera argêntea*: 4-fenil e 4-álquilcumarinas**. Salvador: UFBA, 2004. 222p. Dissertação de mestrado.

SULTANBAWA, M.S.U. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, p. 1465-1506, 1980.

SOUSA, V.R. **Estudo fitoquímico de *Kielmeyera coriacea* e *Kielmeyera sp.*** Salvador: UFBA, 1999. 144p. Dissertação de mestrado.

SOUSA, V.R. **Triterpenos, xantonas, cumarinas, bifenilas e derivados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e de *Kielmeyera coriacea***. Salvador: UFBA, 2005. 192p. Tese de doutorado.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira. **Instituto Plantarum**, São Paulo, p. 348, 2005.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; KITPIPIT, L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.6, p. 510-512, 2005.

YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, A.; OKABE, H.; LOZADA-P'EREZ, L.; LÓPEZ-VILAFRANCO, E.; MUNIZ, E.E.; AGUILAR, A.; REYES-CHILPA, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p. 293-299, 2005.

WOLFENDER, J.L.; HAMBURGER, M.; MSONTH, J.D.; HOSTETTMANN, K. Xanthenes from *Chironia krebssii*. **Phytochemistry**, v.30, n.11, p. 3625-3629, 1991.