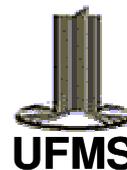




Ministério de Educação e de Desporto  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Departamento de Química  
Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química



**SESQUITERPENOS DAS CASCAS DO CAULE DE *NECTANDRA*  
*CISSIFLORA* NEES (LAURACEAE)**

**Ana Carolina de Melo Miranda**  
Dissertação de Mestrado

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Rodrigues Garcez  
ORIENTADORA

Campo Grande - MS  
Outubro/2008

**A minha Mãe e Irmã pelo apoio, compreensão,  
paciência e carinho.  
A Deus que este trabalho contribua  
para sua obra.**

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fernanda Rodrigues Garcez, pela orientação, competência e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof Dr. Walmir Silva Garcez, pela valiosa colaboração, coleta do material vegetal, obtenção dos espectros e auxílio na elucidação dos mesmos.

Ao Prof Dr. Joaquim Corsino por estar presente em todos os momentos, como um exemplo de ser humano e como uma pessoa com a qual sempre pode-se contar.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lidilhone por sua ajuda e conselhos que contribuíram para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> MSc Zaíra pela realização dos testes biológicos.

Ao MSc. Flávio Alves Macedo (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) pela identificação do material vegetal.

Aos funcionários do departamento de química, Lucinéia, Glaucy, Luciana e Joaquim pela obtenção dos espectros de RMN <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H e Luis Leonardo pela obtenção dos espectros de IV.

Aos meus colegas pela oportunidade de estudarmos juntos Rute, Ricardo e Isabel.

Aos professores que contribuíram para o meu crescimento científico Dennis, Adilson, Neuza, Claudia, Euclésio, Walmir e Lucinéia.

Às minhas colegas Luzinátia, Lilian May, Cristiane, Maria Carolina, Ana Lucia e aos demais colegas de laboratório pela convivência e pela colaboração no dia-a-dia de trabalho.

Aos meus amigos Miguita, Dedy, Carlos e João que participaram do meu trabalho não só como colaboradores, mas como grandes amigos, espero ter vocês por perto por toda a vida.

Às minhas queridas amigas Crislaine e Michelli com as quais sempre pude e poderei contar nos melhores e não tão bons momentos, que bom ter conhecido vocês.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho

## SUMÁRIO

Índice de tabelas	iii
Índice de espectros	iv
Abreviaturas e siglas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1 - Introdução	1
1.1 - A família lauraceae	1
1.2 - Gênero nectandra	1
1.3 - Terpenóides	3
1.3.1 - Sesquiterpenos	6
1.3.2 - Eudesmanos	7
2 – Objetivos	25
3 - Parte experimental	26
3.1 - Materiais e equipamentos utilizados	26
3.2 - Coleta e identificação do material vegetal	27
3.3 - Obtenção do extrato	27
3.4 - Estudo químico do extrato etanólico das cascas do caule	27
3.5 – Fracionamento cromatográfico de NCCII5-8, NCCII9, NCCII15-23, NCCII37.	29
3.5.1 - estudo da fração NCCII5-8.	29
3.5.2 - Estudo da fração NCCII9	29
3.5.3 - Estudo da fração NCCII12	32
3.5.4 - Estudo da fração NCCII15-23	32
3.5.4.1 - Estudo da fração NCCII15R3	32
3.5.5 - Estudo da fração NCCII37.	33
3.6 - Bioensaios	35
3.6.1 - Teste do micronúcleo	35
3.6.1.1 - Soluções e tratamentos	35
4 - Resultados e discussão	37
4.1 - Sesquiterpenos	38

4.1.1 - Identificação do composto 1	38
4.1.2 - Identificação do composto 2	44
4.1.3 - Determinação estrutural do composto 3	51
4.1.4 - Determinação estrutural dos compostos 4 e 5	63
4.1.5 - Identificação do composto 6	70
4.1.6 - Identificação do composto 7	80
4.1.7 - Identificação do composto 8 e 9	91
4.2.1 - Identificação do composto 10	106
4.2 – Flavonóide	106
4.3 - Teste do Micronúcleo (MN)	111
4.3.1 - Avaliação de atividade mutagênica	111
4.3.2- Avaliação da atividade antimutagênica	112
5 - Conclusão	114
6 - Referências bibliográficas	115

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de sesquiterpenos como componentes fixos em espécies da família Lauraceae, agrupadas em seus respectivos gêneros.	9
Tabela 2 - Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.	20
Tabela 3 - Fracionamento do extrato etanólico das cascas do caule de <i>N. cissiflora</i> (colunaII)	28
Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 1.	39
Tabela 5 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 1.	40
Tabela 6 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 2.	45
Tabela 7 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 2.	46
Tabela 8 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 3.	53
Tabela 9 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) e de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) de 4 e 5 e dos demais componentes (1 e 2) presentes na fração NCC1234H6.	65
Tabela 10 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) do composto 6.	71
Tabela 11 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) do composto 6.	72
Tabela 12 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) do composto 7.	81
Tabela 13 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CDCl}_3$ ) e HMBC do composto 7.	82
Tabela 14 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 8 e do éster metílico correspondente 8a obtido de <i>Ursinia eckloniana</i> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	94
Tabela 15 -Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, TMS $\delta=0$ , $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de 9 e do éster metílico correspondente 9a obtido de <i>Dittrichia viscosa</i> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	97
Tabela 16 - Dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, TMS $\delta=0$ .MeOD) de 10	107

Tabela 17 - Dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) do composto 10.	107
Tabela 18 - Resultados do teste de mutagenicidade do caule de <i>N. cissiflora</i>	112
Tabela 19 - Frequência de Micronúcleos nos eritrócitos dos peixes tratados com os extratos EtOH do caule de <i>N. cissiflora</i> associados a Cloridrato de Doxorrubicina (DXR).	113
Tabela 20 - Frequência de Micronúcleos nos eritrócitos dos peixes tratados com os extratos EtOH do caule de <i>N. cissiflora</i> associados à Vincristina (VCR).	113

## ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1 : RMN de $^1\text{H}$ de 1 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	41
Espectro 2: RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 1 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	42
Espectro 3 - DEPT $135^\circ$ de 1 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	43
Espectro 4 : RMN de $^1\text{H}$ da mistura de 1 e 2 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	47
Espectro 5 : RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de 1 e 2 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	48
Espectro 6 - RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura ampliado de 1 e 2 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	49
Espectro 7 : DEPT $135^\circ$ de 1 e 2 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	50
Espectro 8 : RMN de $^1\text{H}$ de 3 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	54
Espectro 9 : RMN de $^{13}\text{C}$ de 3 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	55
Espectro 10 - DEPT $135^\circ$ de 3 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	56
Espectro 11 - HSQC de 3 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	57
Espectro 12 - HSQC ampliado de 3 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	58
Espectro 13 - HMBC de 3 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	59
Espectro 14 – HMBC ampliado de 3 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	60
Espectro 15 - COSY de 3 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	61
Espectro 16 - COSY ampliado de 3 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	62
Espectro 17 – RMN de $^1\text{H}$ da mistura de 4 e 5 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	67
Espectro 18 – RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de 4 e 5 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	68
Espectro 19 - DEPT $135^\circ$ de 4 e 5 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	69
Espectro 20: RMN de $^1\text{H}$ do composto 6 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	73
Espectro 21 - RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 6 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	74
Espectro 22 - DEPT $135^\circ$ de 6 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	75
Espectro 23 - HSQC de 6 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	76
Espectro 24 - HSQC ampliado de 6 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	77
Espectro 25 - HMBC de 6 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	78
Espectro 26 - HMBC ampliado de 6 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	79
Espectro 27 - RMN de $^1\text{H}$ da fração contendo o composto 7 (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	83
Espectro 28 - RMN de $^{13}\text{C}$ da fração contendo o composto 7 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	84

Espectro 29 - RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado da fração contendo o composto 7 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	85
Espectro 30 - DEPT $135^\circ$ da fração contendo o composto 7 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	86
Espectro 31 - HSQC de 7 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	87
Espectro 32 - HSQC ampliado de 7 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	88
Espectro 33 - HMBC de 7 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	89
Espectro 34 - HMBC ampliado de 7 (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	90
Espectro 35 - RMN de $^1\text{H}$ da mistura de 8 e 9 (300MHz, MeOD)	98
Espectro 36 - RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de 8 e 9 (75 MHz, MeOD)	99
Espectro 37 - RMN de $^{13}\text{C}$ ampliado da mistura de 8 e 9 (75 MHz, MeOD)	100
Espectro 38 - DEPT $135^\circ$ da mistura de 8 e 9 (75 MHz, MeOD).	101
Espectro 39 - HSQC da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, MeOD)	102
Espectro 40 - HSQC ampliado da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, MeOD)	103
Espectro 41 - HMBC da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, MeOD)	104
Espectro 42 - HMBC ampliado da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, MeOD)	105
Espectro 43- RMN de $^1\text{H}$ do 10 (300MHz, MeOD)	108
Espectro 44 : RMN de $^{13}\text{C}$ de 10 (75 MHz, MeOD)	109
Espectro 45: DEPT $135^\circ$ de 10 (75 MHz, MeOD)	110

## ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	Homonuclear Correlated Spectroscopy
COSY	
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ax	Axial
CC	Cromatografia em Coluna (À Pressão Atmosférica)
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada
CCSp	Cromatografía em Coluna Aberta usando como fase estacionária Sephadex LH-20.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo Dubleto
DEPT	Distortionless Enhancementy By Polarization Transfer
<i>dl</i>	Dubleto Largo
EM	Espectro de Massas
eq	Equatorial
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho

<i>J</i>	Constante De Acoplamento
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser And Exchange Spectroscopy
p.	Página
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear De Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear De Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto Largo
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	Tripleto Largo
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento Químico
Δ <sup>n</sup>	Ligação Dupla
μm	Micrômetro
v <sub>max</sub>	Frequência Máxima

## RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo químico das cascas do tronco de *Nectandra cissiflora* Ness (Lauraceae). A partir do extrato etanólico das cascas de um espécime coletado em Campo Grande (MS), foram isolados e identificados sete sesquiterpenos com esqueletos eudesmano e eudesmano rearranjado, dois sesquiterpenos com esqueleto eudesmano esterificados com um álcool *nor*-monoterpênico e um flavonóide, respectivamente: ácido cóstico, 12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno, eudesm-13-eno-12,4 $\beta$ -olideo, ácido víscico, ácido 3-oxo- $\gamma$ -cóstico, ácido 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico, ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico, costoato de 10-*nor*-fenchanoíla, eudesma-3,11(13)-dien-12-oato de *nor*-fenchanoíla e (-)-epicatequina. Dentre os sesquiterpenóides obtidos, um (eudesm-13-eno-12,4 $\beta$ -olideo) é inédito como produto natural e quatro (ácido víscico, ácido 3-oxo- $\gamma$ -cóstico, ácido 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico e ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico) estão sendo relatados pela primeira vez na família Lauraceae, tendo sido obtidos anteriormente somente de representantes de Asteraceae. Já 12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno) está sendo descrito pela primeira vez em *Nectandra*, enquanto que ácido cóstico foi isolado das três espécies de *Nectandra* anteriormente estudadas. Os ésteres sesquiterpênicos com a unidade *nor*-monoterpênica foram descritos apenas em *N. cuspidata*. As estruturas das substâncias isoladas foram determinadas com base em técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, incluindo técnicas bidimensionais homo- e heteronucleares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMBC E HMQC) e por comparação dos dados espectrais obtidos com os existentes na literatura. O extrato etanólico bruto das cascas do caule de *N. cissiflora* apresentou atividade antimutagênica, ao ser submetido ao Teste do Micronúcleo *in vivo* em peixes do gênero *Hypostomus*.

## ABSTRACT

The present work describes the chemical study of the trunk bark of *Nectandra cissiflora* Ness (Lauraceae). From the ethanol extract of a specimen collected in Campo Grande (MS), were isolated and identified seven sesquiterpenes with eudesmane and rearranged eudesmane skeletons, two sesquiterpenes esterified with a *nor*-monoterpenic alcohol and one flavonoid, respectively: costic acid, 12-carboxieudesman-3,11(13) - diene, eudesm-13-en-12,4 $\beta$ -olide, viscic acid, 3-oxo- $\gamma$ -costic acid, 5 $\beta$ -hydroxy-4-oxo-11(13) - dehydroiphionan-12-oic acid, 3 $\alpha$ -hydroxyisoiphion-11(13)-en-12-oic acid, 10-*nor*-fenchanoyl-costoate, *nor*-fenchanoyl-eudesma-3,11(13) - dien-12-oate and (-)-epicatechin. Among the isolated sesquiterpenes, one (eudesm-13-en-12,4 $\beta$ -olide) is described for the first time as a naturally occurring compound and four (viscic acid, 3-oxo- $\gamma$ -costic acid, 5 $\beta$ -hydroxy-4-oxo-11(13) - dehydroiphionan-12-oic acid and 3 $\alpha$ -hydroxyisoiphion-11(13)-en-12-oic acid), previously found as constituents of species of the Asteraceae, are being reported for the first time in the Lauraceae. This is also the first reported occurrence of 12-carboxieudesman-3,11(13)- diene in the genus *Nectandra*, while costic acid was isolated from the three species of *Nectandra* previously studied. The sesquiterpene esters containing the *nor*-monoterpenic moiety were only described in *N. cuspidata*. The structures of the isolated compounds have been established on the basis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data, including 2D-NMR techniques ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMBC and HMQC) and by comparison with data reported in the literature. The crude ethanol extract of the trunk bark of this plant showed antimutagenic activity in the Micronucleus Assay *in vivo*, in fishes of the genus *Hypostomus*.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1-A FAMILIA LAURACEAE

Lauraceae é composta por aproximadamente 2500 espécies incluídas em 52 gêneros.<sup>1</sup> Nas Américas, esta família é representada por 29 gêneros e 900 espécies, com grande diversidade na América Central. Comum em regiões tropicais e subtropicais, a família é especialmente diversificada no sudeste da Ásia e norte da América do Sul, ou seja, é pantropical com poucos representantes em regiões temperadas.<sup>2, 3</sup> No Brasil encontram-se 22 gêneros com alta diversidade nas florestas pluviais e também nas restingas e no cerrado.<sup>4</sup> A grande maioria deste grupo de vegetais é constituída por plantas lenhosas e arbóreas.<sup>5</sup>

O potencial econômico das espécies dessa família é conhecido desde os tempos remotos, constatado por meio de documentos da China de 2.800 a.C., como óleo de *Cinnamomum canfora* e outras espécies do gênero na medicina. As folhas de *Laurus nobilis*, (loureiro) eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confecção de coroas e na culinária de todo mundo. O fruto de *Persea americana* (abacateiro) é um produto alimentício muito comercializado na América, do qual se extrai o óleo para fabricação de cosméticos.<sup>6</sup>

No Brasil, destacam-se os gêneros *Nectandra* e *Ocotea*, cujas espécies são conhecidas popularmente como canelas, loureiro ou imbuías, que remontam ao tempo da colonização, quando foram exploradas para a construção naval e movelaria de luxo.<sup>6</sup>

Esta família é muito rica em metabólitos secundários, sendo que ocorrem com maior frequência as seguintes classes de substâncias: neolignananas, lignanas, alcalóides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonóides, sesquiterpenos e pironas.<sup>7</sup>

### 1.2 - GÊNERO NECTANDRA

*Nectandra* Rol. ex Rottb. é o segundo maior gênero da família no Novo Mundo, com 114 espécies e figura como um dos mais importantes dentre as plantas lenhosas, devido à sua representatividade e ampla distribuição. O gênero é restrito à América tropical

e subtropical e quase todas as espécies ocorrem entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio, onde são encontradas desde o norte da Flórida à Argentina.<sup>8</sup> No Brasil ocorrem 43 espécies do gênero, sobretudo na Mata Atlântica e Amazônia.<sup>9</sup> As espécies de *Nectandra* desenvolvem-se em ambientes úmidos, sempre verdes, em planícies de florestas montanhosas e poucas espécies são encontradas em outros habitats.<sup>1</sup> O primeiro centro de diversidade do gênero se encontra nas falhas orientais dos Andes e na região da Amazônia peruana e o Sudeste brasileiro claramente representa o segundo centro de diversidade do grupo.<sup>10</sup> Representantes de *Nectandra* fornecem madeira de boa qualidade e determinadas espécies podem ser destinadas à produção de óleos essenciais. Por isso, têm sido intensamente exploradas ao longo dos anos, colocando em risco a preservação de algumas espécies. Como medida de proteção, algumas delas podem ser indicadas para recomposição florística de áreas em recuperação.<sup>11</sup>

*Nectandra cissiflora* é uma árvore conhecida popularmente por “canela-fedida”, cuja madeira é usada na construção civil. Exemplares desta espécie podem ser encontrados em várias regiões do Brasil, sendo que no estado de São Paulo encontra-se em perigo de extinção.<sup>12</sup>

De acordo com a literatura, várias espécies de *Nectandra* já foram investigadas quanto à sua composição química, tendo sido isolado um grande número de substâncias pertencentes, principalmente, às classes das lignanas/neolignanas e alcalóides, algumas possuindo atividades biológicas significativas. Dentre as espécies destacam-se *Nectandra megapotamica*, possuidora de atividade tripanocida atribuída às lignanas tetraidrofurânicas, *Nectandra salicifolia*, com atividade antiplasmodial atribuída aos alcalóides, *Nectandra membranacea*, com atividade citotóxica relacionada aos seus sesquiterpenos e *Nectandra grandiflora*, com atividade antioxidante atribuída aos seus fenóis.<sup>13, 14, 15, 16</sup>

O estado de Mato Grosso do Sul possui em seu território dois biomas peculiares do Brasil, o Pantanal e o Cerrado. Estes dois biomas apresentam características muito particulares e as espécies vegetais que os habitam desenvolveram mecanismos para adaptação e defesa fazendo uso de seu metabolismo secundário. A investigação química das plantas destes biomas pode conduzir a descobertas de novos protótipos que podem ser empregados ou servir como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos. Nosso

grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos sobre a composição química de espécies pertencentes à família Lauraceae, cujos representantes foram localizados no Pantanal e no Cerrado, tendo sido sendo obtidos e caracterizados metabólitos secundários de interesse, alguns dos quais bioativos.<sup>17, 18, 19, 20</sup>

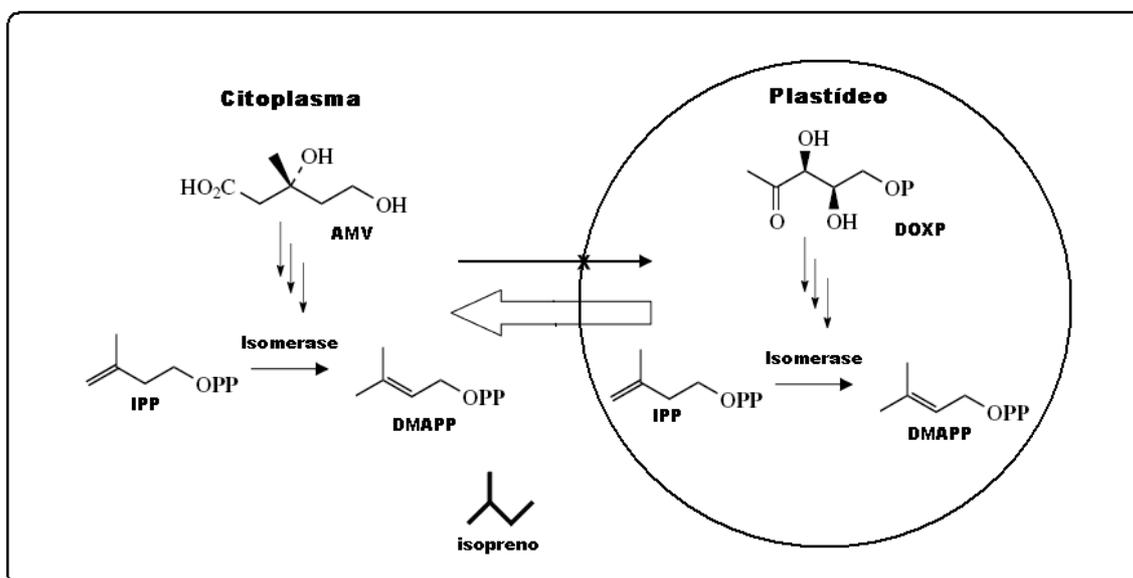
Através de levantamento bibliográfico, verificou-se que não havia nenhum relato sobre a composição química de *Nectandra cissiflora*. Em função dos dados acima apresentados, esta espécie foi selecionada para ser submetida a um estudo químico, de maneira a contribuir para o conhecimento da composição química de plantas da família Lauraceae ocorrentes em Mato Grosso do Sul.

### 1.3- Terpenóides

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, sendo que esse termo é empregado para designar, todas as substâncias cuja origem biossintética é relacionada a unidades de isopreno.<sup>21</sup>

Nas plantas, os terpenóides são essenciais para os seus processos celulares básicos como: transporte de elétrons (ubiquinona, plastoquinona), glicosilação de proteínas (dolicol) e na regulação do desenvolvimento celular (hormônios e proteínas reguladoras modificadas de terpenos). Utilizam ainda uma gama de terpenóides para fins específicos, incluindo toxinas defensivas (fitoalexinas sesqui e diterpênicas), sinais defensivos voláteis (mono e sesquiterpenos), atrativos de polinizadores nos tecidos florais (monoterpenos) e fotoprotetores (isopreno e carotenóides).<sup>22</sup>

As unidades isoprênicas podem derivar-se biossinteticamente de duas vias cujos intermediários são o ácido mevalônico (AMV) ou o 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP), que são convertidos em dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e em isopentenilpirofosfato (IPP). Os animais parecem utilizar exclusivamente a via do ácido mevalônico enquanto, outros organismos, inclusive as plantas, são equipados para utilizar as duas vias. Nas plantas as vias são compartimentalizadas, sendo as enzimas da via do AMV encontradas no citoplasma e as do DOXP encontradas nos cloroplastos (**figura 1**). Os esteróis e os triterpenóides são produzidos somente pela via do AMV, enquanto os demais terpenóides são produzidos por ambas as vias.<sup>23</sup>

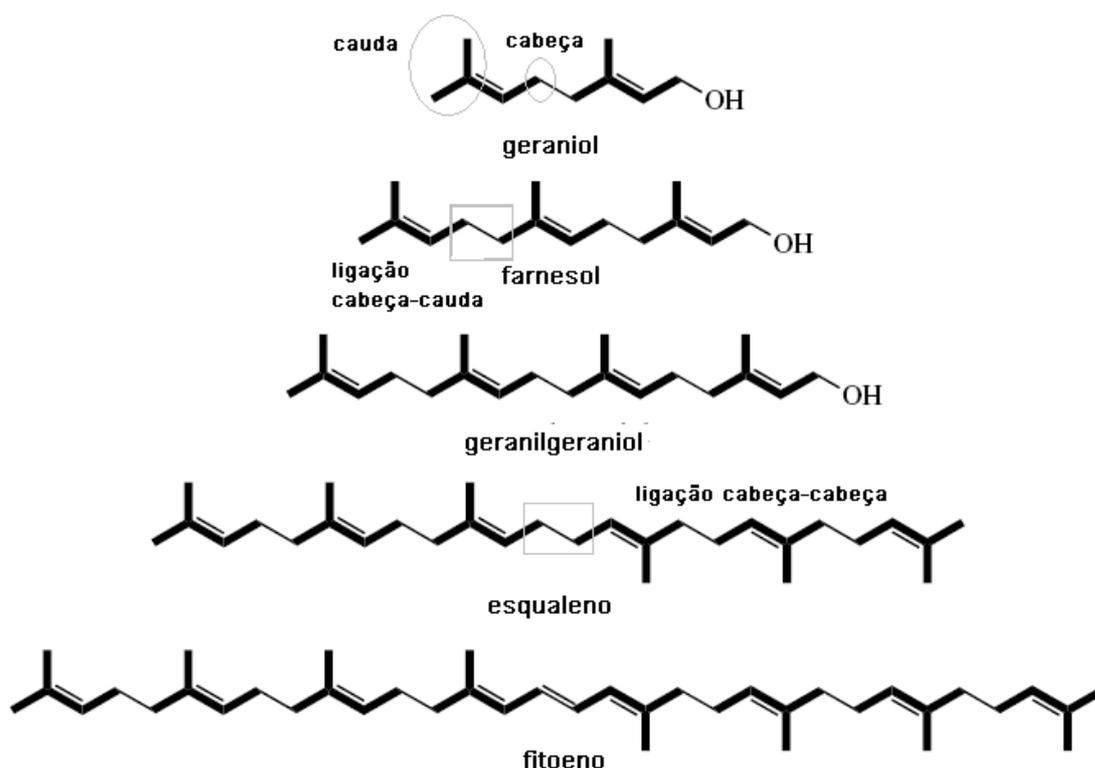


**Figura 1-**Representação dos compartimentos das células vegetais, do ácido mevalônico (AMV), do 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), do dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e do isopentenilpirofosfato (IPP), isopreno C<sub>5</sub>.<sup>23, 24</sup>

Os esqueletos carbonados dos terpenóides, em sua maioria, são formados por arranjos lineares, de um número variável de unidades isoprênicas, pela condensação do tipo "cabeça-cauda", como pode ser observado na formação do geraniol(C<sub>10</sub>), farnesol(C<sub>15</sub>) e do geranilgeraniol(C<sub>20</sub>). Este tipo de condensação não é encontrado no squaleno(C<sub>30</sub>) e no fiteno(C<sub>40</sub>), pois nestes casos ocorrem condensações do tipo "cauda-cauda". Os esqueletos dos terpenos sofrem ciclizações e rearranjos, podendo ser biossinteticamente modificados pela perda ou adição de átomos de carbono (**figura 2**).<sup>23</sup>

As estruturas típicas destes esqueletos carbônicos são representadas por (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, que são classificados como: hemiterpenos (C<sub>5</sub>), unidades C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> que estão presentes em muitos metabólitos cujo esqueleto principal resulta de outras vias biossintéticas, comuns em alquilações de unidades C<sub>5</sub> em átomos de carbono ou oxigênio; monoterenos (C<sub>10</sub>), derivados do pirofosfato de geranila, GPP, (2 x C<sub>5</sub>); sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), derivados do pirofosfato de farnesila, FPP, (3 x C<sub>5</sub>); diterpenos (C<sub>20</sub>), derivados do pirofosfato de geranilgeranila, GGPP, (2 x C<sub>10</sub>); sesterterpenos (C<sub>25</sub>), derivados do GGPP e IPP, (2 x C<sub>10</sub> + C<sub>5</sub>)

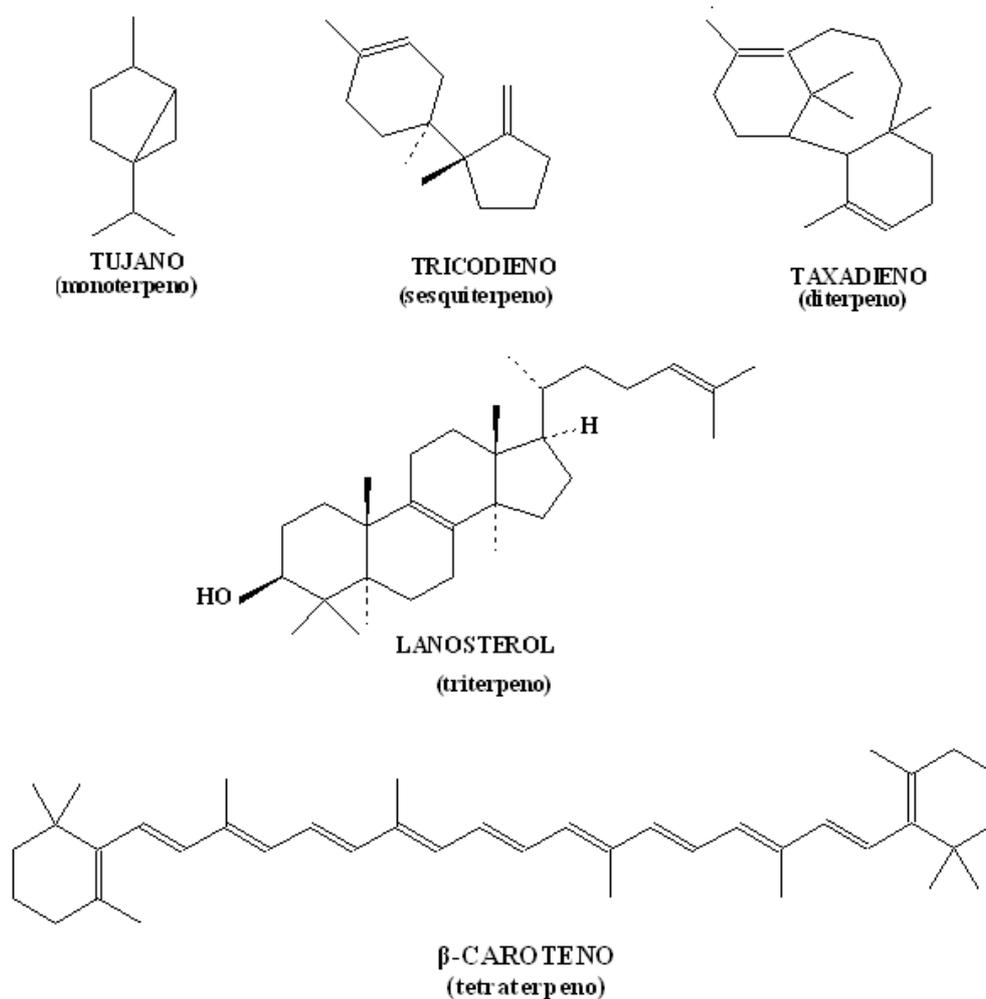
triterpenos ( $C_{30}$ ), derivados de duas unidades de FPP, ( $2 \times C_{15}$ ); tetraterpenos ( $C_{40}$ ), derivados de duas unidades GGPP, ( $2 \times C_{20}$ ) e os politerpenos  $C_{5n}$ : derivam de um número  $n$  de unidades isoprenóides superior a oito até 10.<sup>23, 25, 26, 27</sup>



**Figura 2** - Estruturas do geraniol, farnesol, geranilgeraniol, esqualeno e fitoeno, representação da posição da cabeça e da cauda das unidades isoprenóides e as ligações cabeça-cauda e cabeça-cabeça.<sup>23</sup>

Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimutogênicos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento de raízes. Os compostos terpênicos mais frequentes nos compostos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os

sesquiterpenos. Sendo os diterpenos encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos.<sup>28</sup>



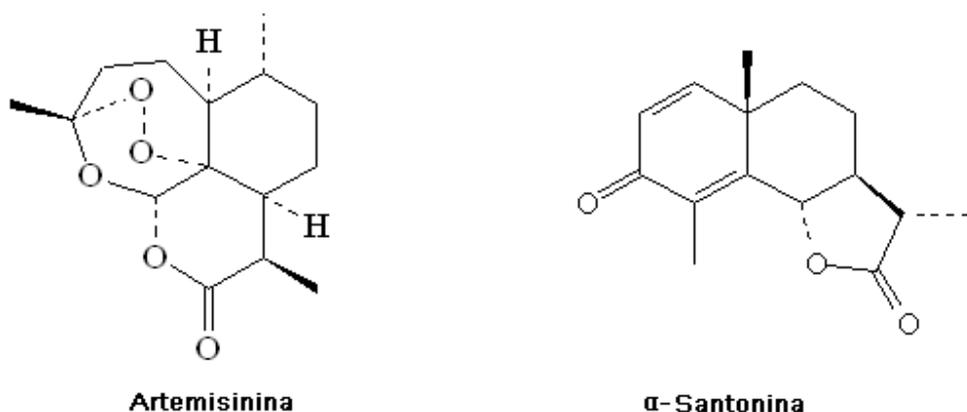
**Figura 3-** Exemplos da variedade dos terpenos .<sup>27</sup>

### 1.3.1 – Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos formam um grande grupo de hidrocarbonatos naturais, de composição  $C_{15}H_{24}$ , sendo o grupo mais extenso de terpenos. Wallach sugeriu a fórmula geral para os sesquiterpenos baseado na idéia de que eles são formados por três moléculas isoprênicas, e que essas moléculas são adequadamente combinadas.<sup>25</sup>

Eles são encontrados em vários sistemas vivos e principalmente em plantas superiores. Há um grande número de esqueletos carbônicos sesquiterpenóides, os quais surgem do mesmo precursor, pirofosfato de farnesila, existindo em diversas formas, incluindo a linear, bicíclica e tricíclica, formadas por rearranjos dos esqueletos.<sup>25, 29</sup>

Os sesquiterpenos oxigenados destacam-se por apresentarem um gama de atividades biológicas e podem ser os principais responsáveis pela ação terapêutica de diversas plantas. Em geral a sua oxigenação é mediada por uma oxidação fotoquímica, que ocorre em condições normalmente presentes nas plantas, o que sugere que a maioria das transformações se dá de maneira não enzimática. Dentre estes sesquiterpenos podem ser ressaltados a Artemisinina (**figura 4**) um importante componente antimalárico e a  $\alpha$ -Santonina (**figura 4**) o principal componente anti-helmíntico, compostos advindos de espécie de *Artemisa* (Compositae/Asteraceae).<sup>23</sup>

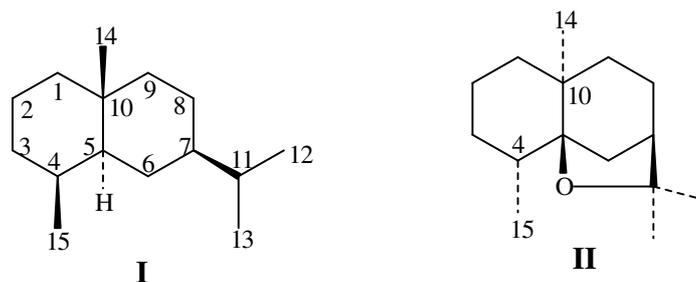


**Figura 4** – Exemplos de sesquiterpenos oxigenados bioativos.<sup>23</sup>

### 1.3.2 – Eudesmanos

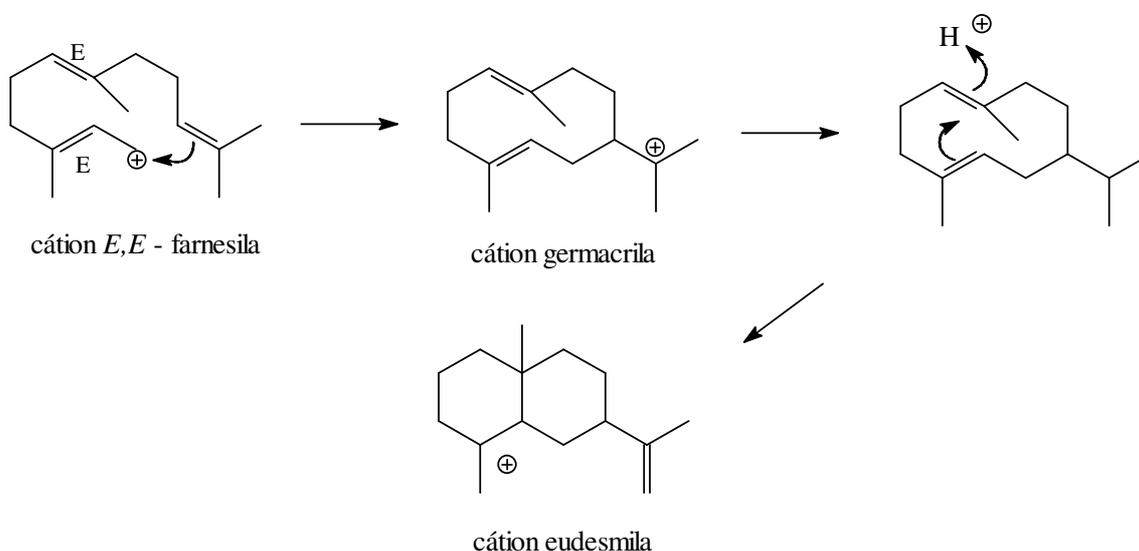
Os sesquiterpenos do tipo eudesmano, também chamados de selinanos, são encontrados em plantas superiores e geralmente possuindo estereoquímica apresentada na **figura 5**. Os *ent*-eudesmanos são encontrados em plantas hepáticas. São divididos em grupos que compreendem eudesmanos de esqueleto simples, além de eudesman-12,6-olideos, eudesman-12,8-olideos, furanoeudesmanos, *seco*-

eudesmanos e *nor*-eudesmanos. Há também um grande grupo de ésteres baseados em esqueletos do tipo diidro- $\beta$ -agarofurano, que são agrupados separadamente (**Figura 5**). Dentro do grupo eudesmano, particularmente os derivados do diidro- $\beta$ -agarofurano, há alguma confusão em relação à numeração dos carbonos 14 e 15, sendo adotada com maior frequência a numeração representada na **figura 5**.<sup>25</sup>



**Figura 5** - Esqueletos do tipo- Eudesmano (I) e Diidro- $\beta$ -agarofurano (II).<sup>25</sup>

A rota biossintética proposta para cátion eudesmila, precursor dos sesquiterpenos apresentados neste trabalho é representada na **figura 6**.<sup>23</sup>



**Figura 6** – Rota biossintética do cátion eudesmila.<sup>23</sup>

Na **Tabela 1** são relacionados os sesquiterpenos cuja ocorrência é relatada em espécies de Lauraceae e suas respectivas estruturas são apresentadas na **Figura 7**.

**Tabela 1-** Ocorrência de sesquiterpenos como componentes fixos em espécies da família Lauraceae, agrupadas em seus respectivos gêneros.

<b>Espécies</b>	<b>Partes estudadas</b>	<b>Sesquiterpenos caracterizados</b>	<b>Referências</b>
<b><i>Caryodaphnopsis</i></b>			
<i>C. tonkinensis</i>	Cascas e folhas	1,2,3,3 $\alpha$ ,4,5,6,7,8,8 $\alpha$ - decaidro-7-(1-hidróxi - 1 - metiletil) - 1,4-dimetilazuleno- 3 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -diol <b>I</b>	30
<b><i>Cinnamomum</i></b>			
<i>C. loureirii</i>	Raízes	$\delta$ -elemano <b>II</b> , $\alpha$ -copaeno <b>III</b> , $\alpha$ -bergamotano <b>IV</b> , $\beta$ -cariofileno <b>V</b> , $\beta$ -bisabolano <b>VI</b> e ar-curcumeno <b>VII</b>	31
<b><i>Laurus</i></b>			
<i>L. nobilis</i>	Folhas, pó seco.	Costunolideo <b>VIII</b> , desidrocostuslactona <b>IX</b> , zaluzanino C <b>X</b> , zaluzanin D <b>XI</b> , santamarino <b>XII</b> , reinosino <b>XIII</b> , 3 $\alpha$ - acetoxieudesma-1,4(15), 11 (13)-trien-12,6 $\alpha$ -olideo <b>XIV</b> , 3-oxoeudesma-1,4, 11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olideo, <b>XV</b> $\beta$ -eudesmol <b>XVI</b> , , $\beta$ -cariofileno <b>V</b> , oxido cariofilano <b>XVII</b> , eremantino <b>XVIII</b> , gazaniolideo <b>XIX</b> , 10-epigazaniolideo <b>XX</b> , Spirafolideo <b>XXI</b> , artemorino <b>XXII</b> , verlotorino <b>XXIII</b> , desacetilaurenobiolideo <b>XXIV</b> , laurenobiolideo <b>XXV</b> , Gallicino <b>XXVI</b> , 5a,9- dimetil-3-metileno-3,3a,4,5,5a,6,7,8-octahidro-1-oxaciclopenta[c]azulen-2-ona <b>XXVII</b> , 3- $\beta$ -clorodesidrocostuslactona <b>XXVIII</b> .	32, 33, 34, 35, 36, 37
<b><i>Licaria</i></b>			
<i>L. macrophylla</i>	Caule	Nerolidol <b>XXIX</b> , elemol <b>XXX</b>	38

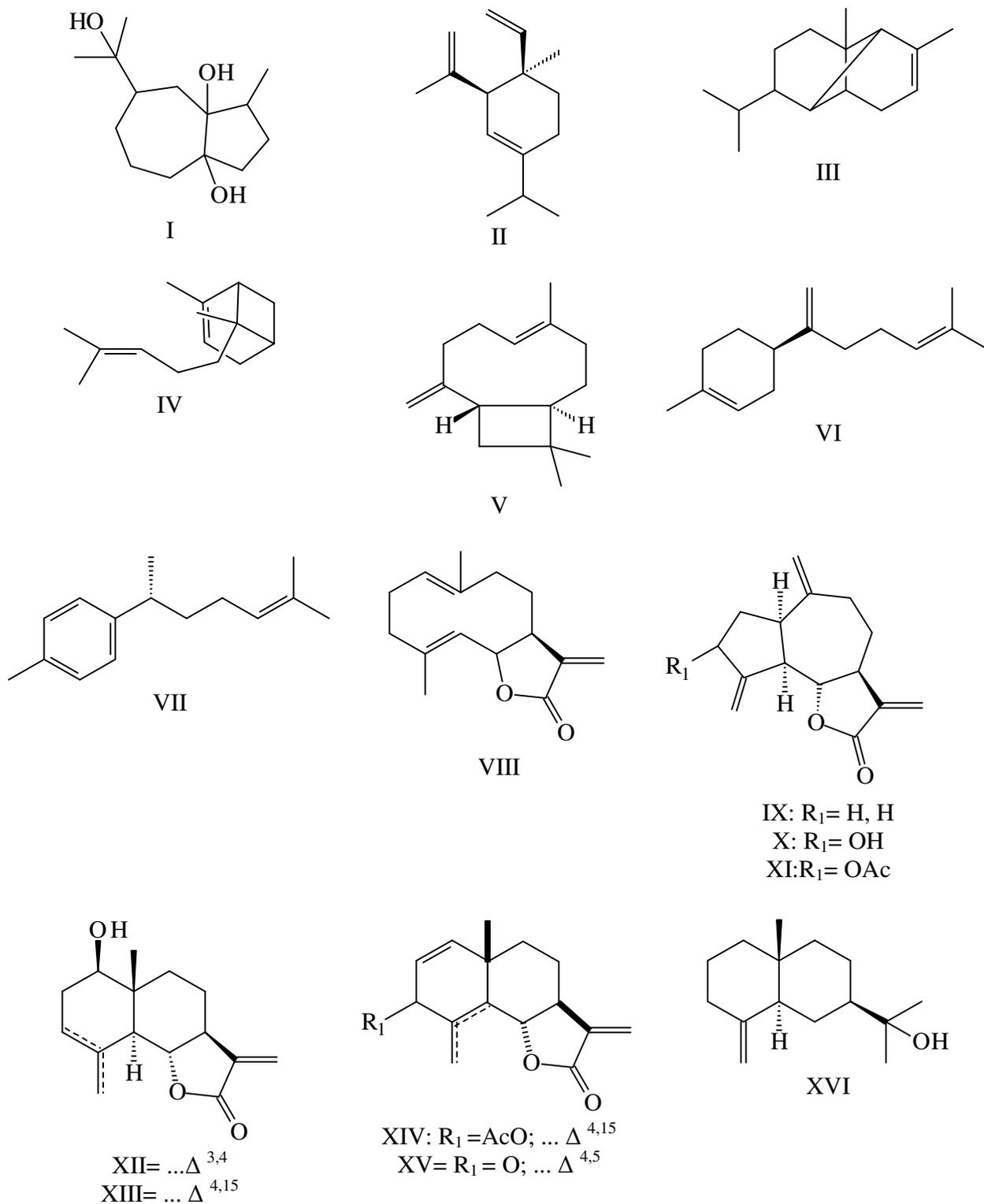
Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos caracterizados	Referências
<i>Lindera</i>			
<i>L. strychnifolia</i>	Raízes	acetato de neosericenila <u>XXXI</u> , pseudonaolinderano <u>XXXII</u> , lindestrene <u>XXXIII</u> , lindenenol <u>XXXIV</u> , acetato lindenenil <u>XXXV</u> , isofuranogermacrano <u>XXXVI</u> , linderóxido <u>XXXVII</u> , lindenenol <u>XXXVIII</u> , linderano <u>XXXIX</u> , linderalactona <u>XL</u> , e isolinderalactona <u>XLI</u> .	39
<i>L. aggregata</i>	Raízes	lindenanolideo A <u>XLII</u> , lindenanolideo B1 <u>XLIII</u> , lindenanolideo B2 <u>XLIV</u> , 6 $\alpha$ -acetil-lindenanolideo B1 <u>XLV</u> , 6 $\alpha$ -acetil-lindenanolideo B2 <u>XLVI</u> , lindenanolideo C <u>XLVII</u> , e lindenanolideo D <u>XLVIII</u> , Linderano <u>XXXIX</u> , linderalactona <u>XL</u> , isolinderalactona <u>XLI</u> , lindenenol <u>XXXVIII</u> , e hidroxilindestrenolideo <u>XLIX</u> .	40
<i>L. glauca</i>	Raízes	Ácido glaucico <u>L</u>	41
<i>Litsea</i>			
<i>L. verticillata</i>	Folhas e galhos finos	Litseaverticillol A-H <u>LI-LVIII</u> , litseagermacrano <u>LIX</u> , 7- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-ano-1 $\alpha,6 \alpha$ -diol <u>LX</u> , 7- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-ano-1 $\beta,6 \beta$ -diol <u>LXI</u> , 5- <i>epi</i> eudesm-4(15)-ano-1- $\beta,6 \beta$ -diol <u>LXII</u> , eudesm-4(15)-eno-1- $\beta,6 \alpha$ diol <u>LXIII</u> , litseahumulano A <u>LXIV</u> e B <u>LXV</u> , octahidro-4-hidroxi-3R-metil-7-metileno-R-(1-metiletil)-1 <i>H</i> -indeno-1-metanol <u>LXVI</u> , 10-hidroxi-15-oxo- $\alpha$ -cadinol <u>LXVII</u> , afanamol <u>LXVIII</u> e litseacromolaevano A <u>LXIX</u> e B <u>LXX</u> , verticilol <u>LXXI</u>	42, 43, 44
<i>L. cassiaefolia</i>	_____	Isocurcumol <u>LXXII</u> e diepoxigermacranolideo <u>LXXIII</u> ,	45

Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos caracterizados	Referências
<i>L. excelsa</i>	_____	valenc-1(10)-eno-8,11-diol <u>LXXIV</u>	45
<b><i>Nectandra</i></b>			
<i>N. membranacea</i>	cascas	Ácido ilícico <u>LXXV</u> , ácido cóstico <u>LXXVI</u> e ácido isocóstico <u>LXXVII</u> .	46
<i>N. grandiflora</i>	Tronco e cascas	Ácido cóstico <u>LXXVI</u>	47
<i>N. cuspidata</i>	Cascas do caule	Ácido cóstico <u>LXXVI</u>	48
<b><i>Neolitsea</i></b>			
<i>N. acciculata</i>	Folhas, raízes e caule	Neoliacino <u>LXXVIII</u> , linderano <u>XXXIX</u> , isolinderalactona <u>XLI</u> , linderalactona <u>XLIX</u> , zeilanino <u>LXXIX</u> , neolinderano <u>LXXX</u> , neoliacinolideo A <u>LXXXI</u> , B <u>LXXXII</u> , e C <u>LXXXIII</u> , litsealactona <u>LXXXIV</u> , litseaculano <u>LXXXV</u> , zeilanano <u>LXXXVI</u> , pseudoneolinderano <u>LXXXVII</u> e linderadino <u>LXXXVIII</u> .	49, 50, 51, 52
<i>N. parvigerama</i>	galhos	parvigemona <u>LXXXIX</u> , neolitrano <u>XC</u> , zeilanidino <u>XCI</u> , zeilanicino <u>XCII</u> , linderalactona <u>XL</u> , pseudonaolinderano <u>XCIII</u> , linderano <u>XLVIII</u> , desacetilzeilanidino <u>XCIV</u> , desacetilzeilanino <u>XCV</u> e parvigemonol <u>XCVI</u>	53, 54, 55

Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos caracterizados	Referências
<i>N. sericea</i>	_____	Sericenino <u>XCVII</u>	56
<b><i>Ocotea</i></b>			
<i>O. corymbosa</i>	Frutas verdes	10-desmetil-1-metil-eudesmano <u>XCVIII</u> , 10-desmetil-10-hidróxi-1-metil-3-oxo-11-eudesmeno <u>XCIX</u> , 10-desmetil-1-metil-1,10-dioxo-1,10-seco-11-eudesmeno <u>C</u> , (1S,4S,1'R,4'S)-bis-[7',8]-7,8'-diidróxi-4,4'-diisopropil-1,1',6,6'-tetrametil-1,3,1',3'-tetraidronaftaleno <u>CI</u> .	57, 58, 59
<i>O. quianensis</i>	Cascas	Ocotealactol <u>CII</u>	60
<b><i>Persea</i></b>			
<i>P. japonica</i>	Xilema	Machikusanol <u>CIII</u> , $\gamma$ -eudesmol <u>CIV</u> , carissona <u>CV</u> , e $\gamma$ -selineno <u>CVI</u> .	61

SESQUITERPENOS DAS CASCAS DO CAULE DE *NECTANDRA CISSIFLORA* NEES  
(LAURACEAE)

9



**Figura 7** - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae

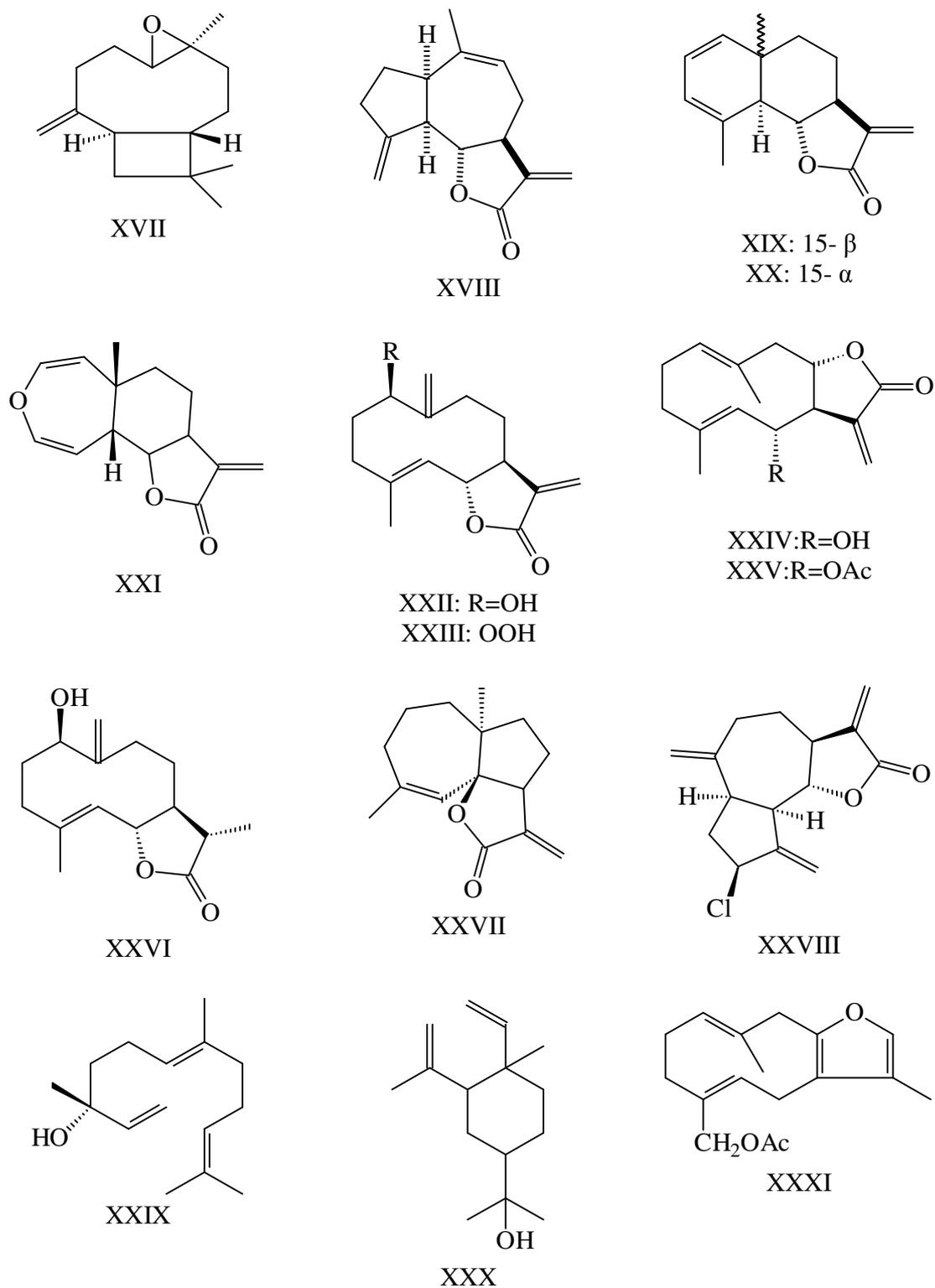


Figura 7 (continuação) - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae

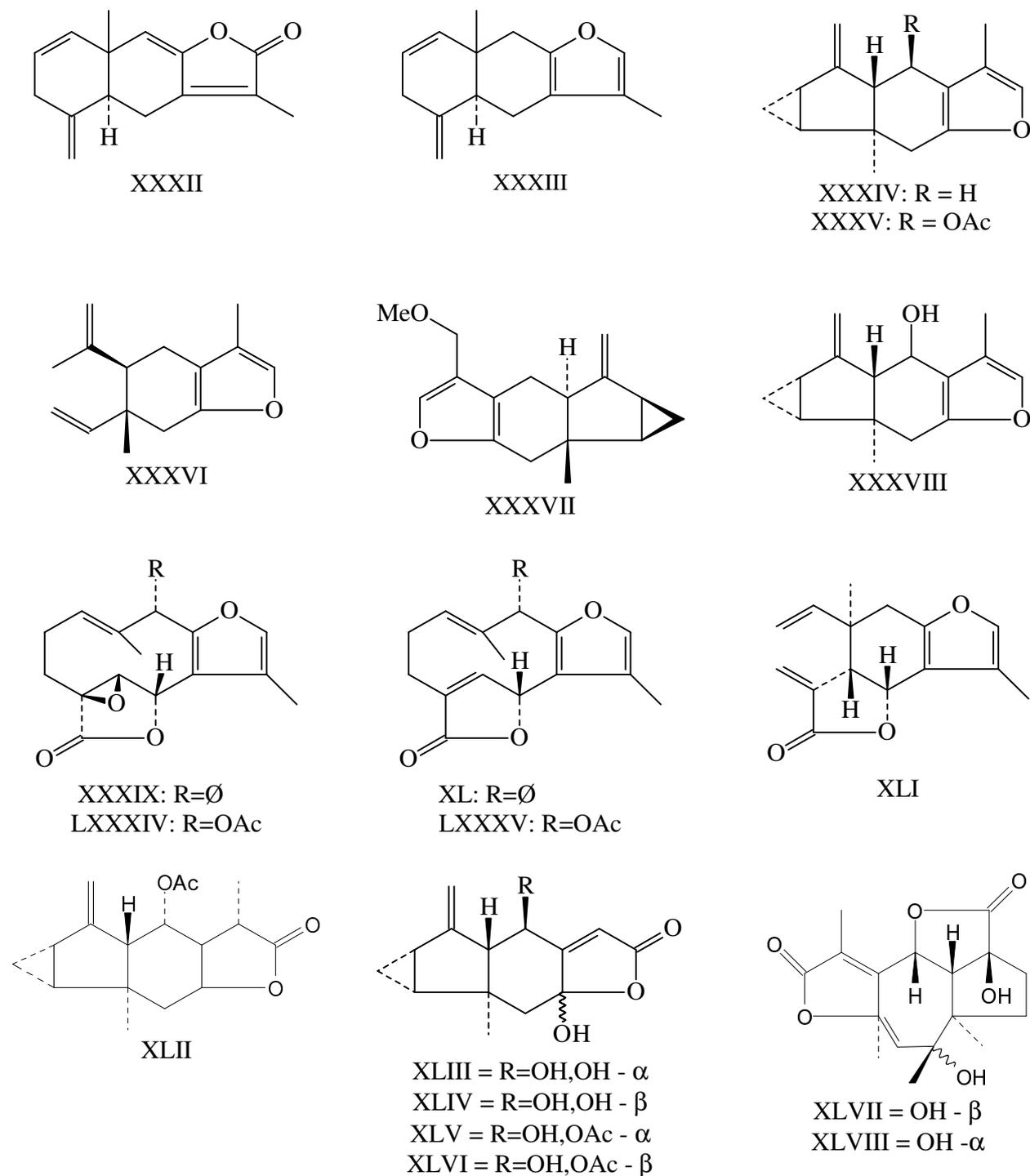


Figura7 (continuação) - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae.

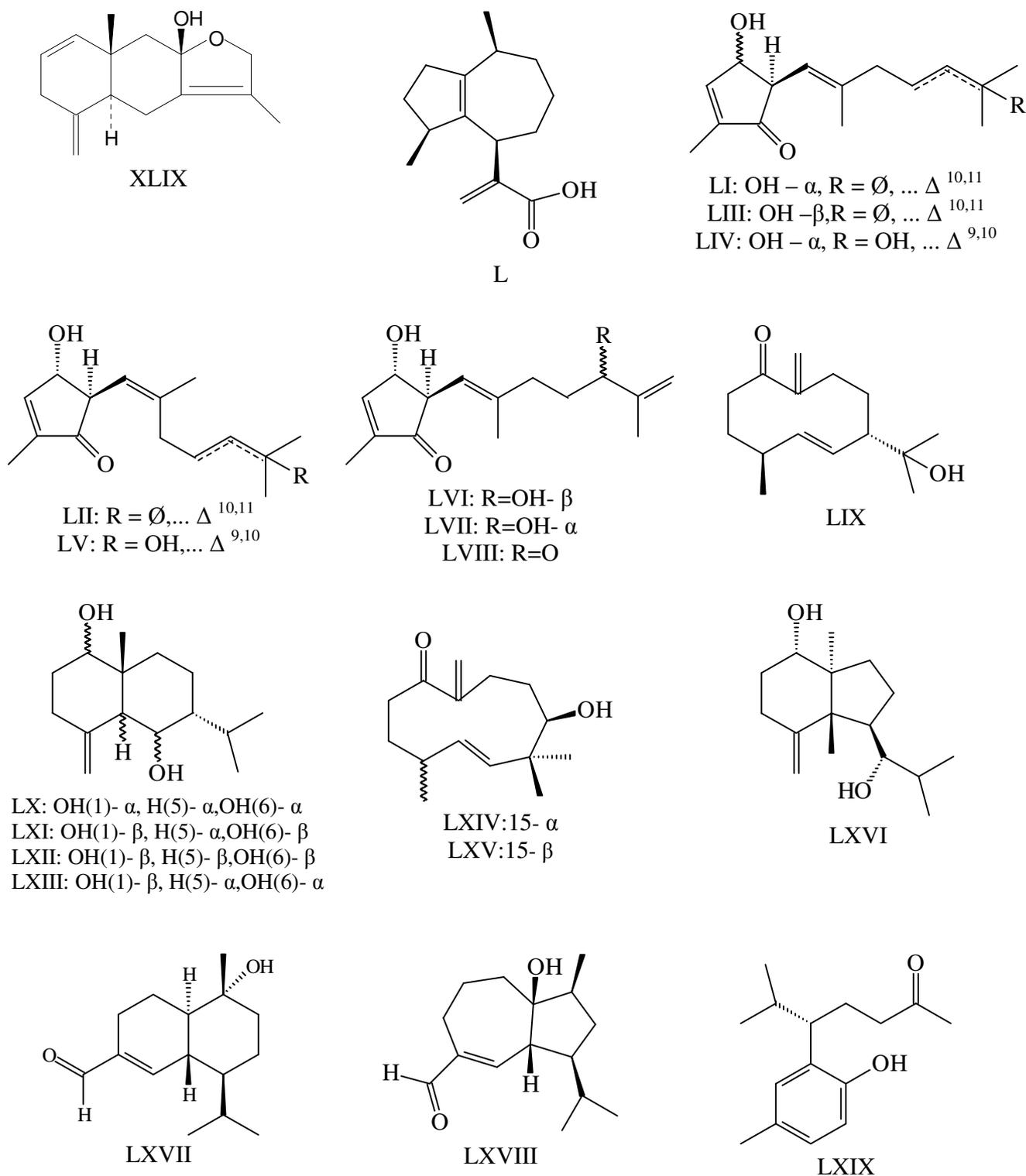


Figura 7(continuação) - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae.

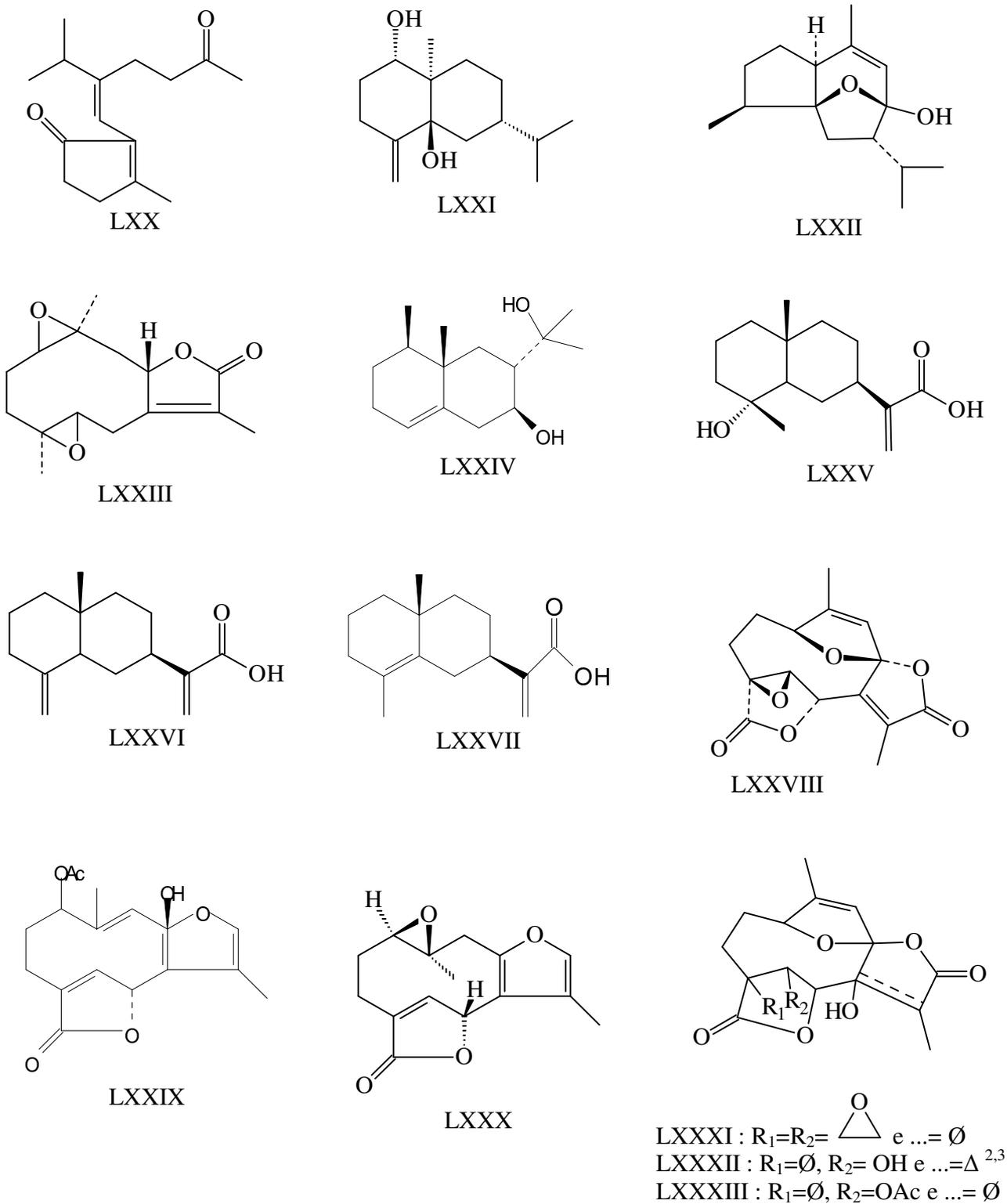


Figura 7 (continuação) - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae.

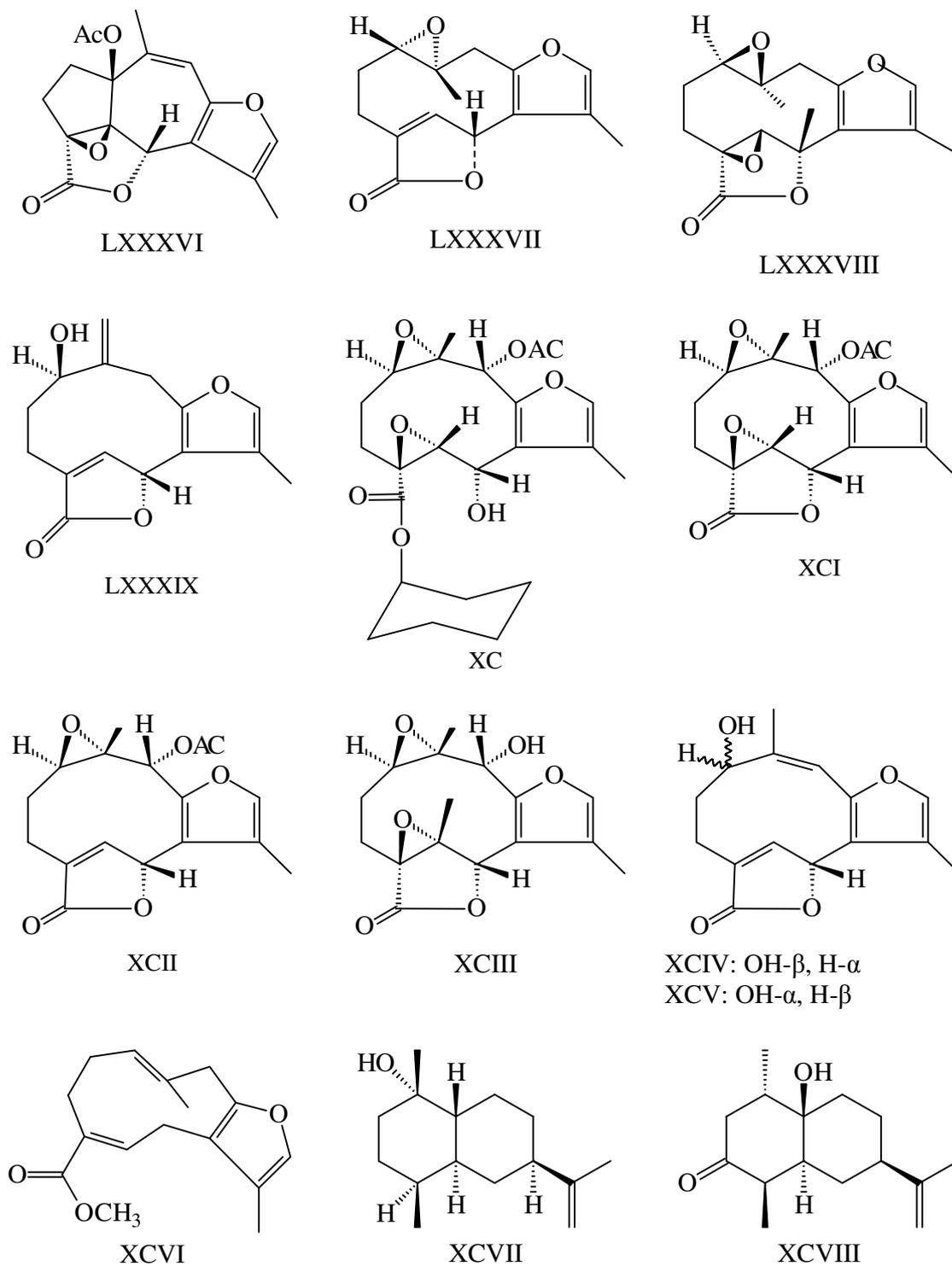
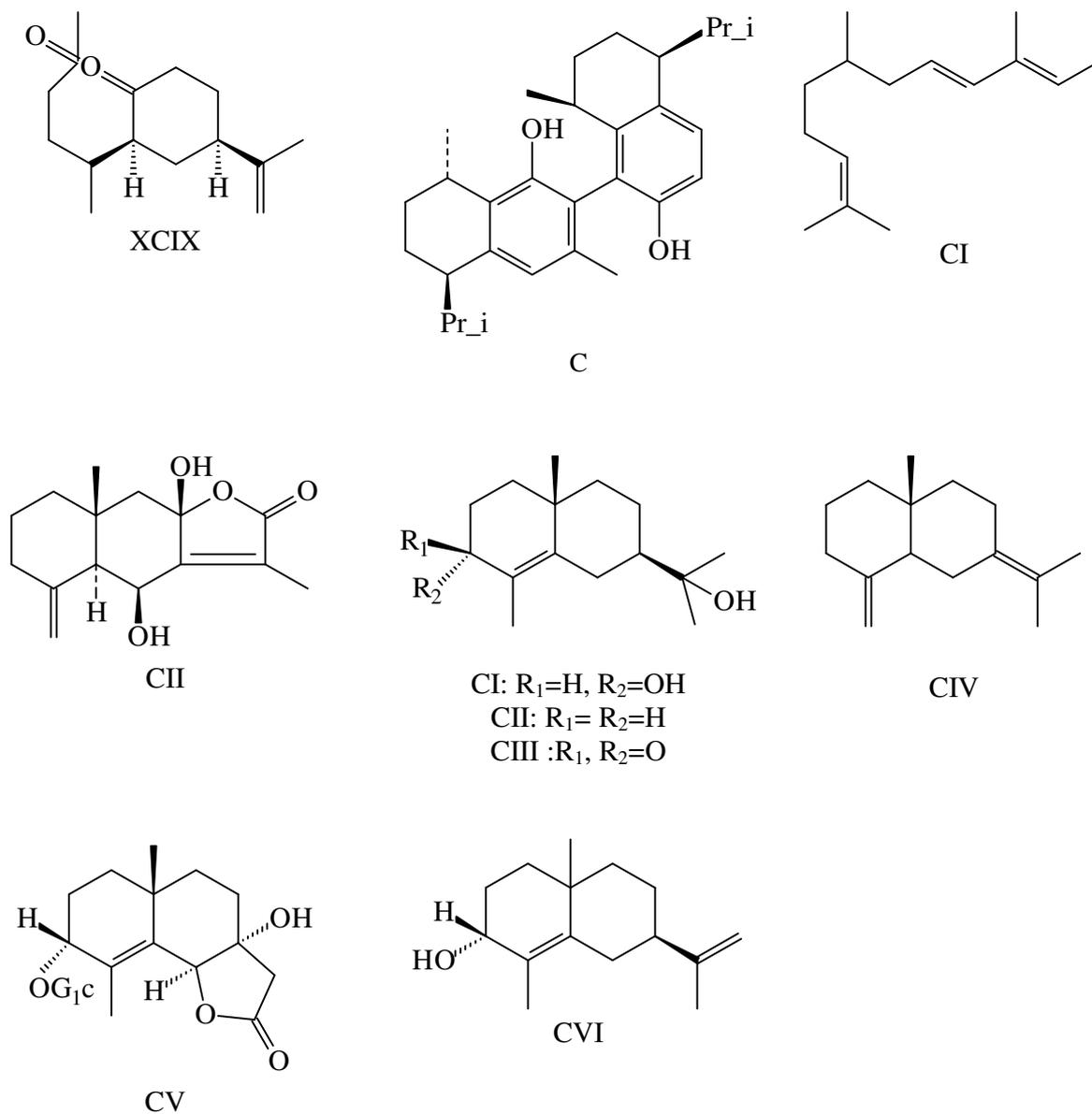


Figura 7(continuação) - Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae.



**Figura 7(continuação)**-Estruturas dos sesquiterpenos isolados de Lauraceae

**Tabela 2-** Sesquiterpenos presentes em óleos essenciais de espécies da família Lauraceae.

<b>Espécies</b>	<b>Partes estudadas</b>	<b>Sesquiterpenos estudados</b>	<b>Referências</b>
<b><i>Aniba</i></b>			
<i>A. canelilla</i>	Caule e cascas	$\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\tilde{\alpha}$ -humulano, $\delta$ e $\alpha$ -cadinano, 1-epi-cubenol, $\alpha$ e $\beta$ -selinano, cadina-1,4 dieno, calamenano, cubenol	62
<i>A. puchury - minor</i>	Folhas	$\beta$ -Cariofilano, germacrano, humulano, $\beta$ -bisabolano, $\beta$ -farnesano, $\alpha$ e $\beta$ -cubebeno, espatulenol, cipereno, $\alpha$ -bergamoteno, $\alpha$ -copaeno.	63
<i>A. rosaeodora</i>		eudesmano	64
<b><i>Beilschmiedia</i></b>			
<i>B. alloiophylla</i>	Folhas	Germacrano, <i>cis</i> e <i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno, $\alpha$ -pineno e biciclogermacrano	65
<i>B. brenesii</i>	Folhas	germacrano, $\beta$ -cariofilano, $\alpha$ -copaeno, $\alpha$ -humuleno, $\delta$ -cadinano, 2-undecanona, <i>trans</i> -2-hexenal, e 2-tridecanona	66
<i>B. costaricensis</i>	Folhas	$\alpha$ -Bisabolol	66
<i>B. tilaranensis</i>	Folhas	germacrano , $\alpha$ -cariofilano, $\beta$ -cadinano	66

Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos estudados	Referências
<i>Cinnamomum</i>			
<i>C. microphyllum</i> , <i>C. altissimum</i> , <i>C. scortechinii</i>	Cascas e das folhas	Guaiol, viridiflorol, bulnesol, $\alpha$ -bisabolol, $\beta$ -bisabolol, $\beta$ -eudesmol, $\gamma$ -eudesmol, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\beta$ -elemeno, <i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoteno, 23 (E)- $\beta$ -cariofilano, <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno, guaia-6,9-dieno, aromadendreno, 4 $\alpha$ H, 10 $\alpha$ H-guaia-1(5),6-dieno, $\alpha$ -humulano, <i>allo</i> -aromadendrano, 7 $\alpha$ H, 10 $\beta$ H-cadina-1(6),4-dieno, 5- <i>epi</i> -aristolochano, $\beta$ -neoclovano, $\gamma$ -humulano, eremofila-1(10),7-dieno, $\alpha$ -muurolo, (E,E)- $\alpha$ -farnesano, $\gamma$ -cadinano, calamenano, $\delta$ -cadinano, zonarano, cadina-1,4-dieno, $\alpha$ -calacorano, espatulenol, globulol, $\alpha$ -guaiol, 1- <i>epi</i> -cubenol, T-muurolol, amorph-4-en-7-ol, $\alpha$ -cadinol, eudesm-4(15)-en-7-ol, 7- <i>epi</i> - $\alpha$ -eudesmol, bulnesol, cadalano, elemol.	66
<i>C. osmophloeum</i>	Folhas	$\alpha$ -cubebeno, humuleno, $\alpha$ -cariofilano, $\beta$ -cariofilano, aromadendrano, T-murrolano, valencano, $\alpha$ -cadinano, murrolano, $\gamma$ -murrolano, $\beta$ -cadinano, $\gamma$ -elemano, óxido de cariofileno, guaiol, $\alpha$ -guaiano, copaeno, T-cadinol, $\alpha$ -cadinol, azulol, $\beta$ -cadinol.	67, 68
<i>C. illicioides</i>	Cascas	$\delta$ -Cadinano, $\alpha$ -copaeno, (E)- $\beta$ -cariofilano, $\alpha$ -cadinol, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\beta$ -elemeno, guaia-6,9-dieno, aromadendrano, 4 $\alpha$ H, 10 $\beta$ H-guaia-1(5),6-dieno, $\alpha$ -humulano, <i>allo</i> -aromadendrano, 7 $\alpha$ H, 10 $\beta$ H-cadina-1(6),4-dieno, 5- <i>epi</i> -aristolochano, $\beta$ -neocloveno, $\gamma$ -humulano, $\alpha$ -muurolo, (E,E)- $\alpha$ -farnesano, $\gamma$ -cadinano, calamenano, $\delta$ -cadinano, zonareno, cadina-1,4-dieno, $\alpha$ -calacoreno, elemol, espatulenol, globulol, $\alpha$ -guaiol, 1- <i>epi</i> -cubenol, T-muurolol, $\alpha$ -cadinol, eudesm-4(15)-en-7-ol, 7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Eudesmol, amorf-4-en-7-ol, bulnesol, cadaleno.	69, 70

Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos estudados	Referências
<i>C. subavenium</i>	Cascas e das folhas	$\beta$ -cariofileno, $\alpha$ -humulano, $\alpha$ -bisabolano, (E)-P-farnesano, (E)-nerolidol, $\beta$ -bisabolano, $\alpha$ -bisabolol, $\alpha$ -cadinol, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\beta$ -cubebeno, $\beta$ -acoradieno, $\beta$ -selinano, cis-calamenano, $\delta$ -cadinano, elemol, spatulenol, ciperona, $\alpha$ -cadinol, $\alpha$ -muurolol, cubenol, epi-globulol, $\alpha$ e $\beta$ -cedrano, aromadendrano, $\gamma$ -muuroleno, viridiflorol, cadalano, álcool patchouli, ar-curcumeno, aristoleno	71
<i>C. tamala</i>	Folhas	germacrano, $\alpha$ -gurjuneno	72, 73
<i>C. zeylanicum</i>	Frutos	$\beta$ -cariofileno, $\delta$ -cadineno, $\alpha$ -muurolol.	74
<i>C. camphora</i>		camferenona, camferenol, $\alpha$ -santaleno, 9-oxonarolidol (I), cis- and trans-3,7,11-trimetildodeca-1,7,10-trien-3-ol-9-ona, 9-oxofarnesol, e seu acetato, elemol, guaiol, $\alpha$ -cadinol, $\beta$ -eudesmol, cânfora juniper, miristicina, kusunol, $\delta$ -quaieno, $\beta$ -elemano, $\beta$ -santalano, $\delta$ -cadinano, calamenano, 1,6-dimetil-4-isopropil-7,8-dihidronaftalene, $\gamma$ -patchouleno, cariofileno, $\alpha$ -humulano, cadina-9,11(12)-dieno, $\beta$ -cariofileno, nerolidol, $\beta$ -selinano, fumureno, $\beta$ -elemeno, $\alpha$ -ylangano, humulano $\beta$ -selinano XIV, nerolidol	75,76,77,78, 79, 80, 81
<b><i>Cryptocaria</i></b>			
<i>C. mandiocana</i> Meisner	Folhas	$\beta$ -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, $\delta$ -cadinano, germacrano D, bicilogermacrano, $\beta$ -cariofileno, germacrano D, $\alpha$ -humulano, aromamadendrane, 9- <i>epi</i> -E-cariofilano, $\gamma$ -muuruleno	82

Espécies	Partes estudadas	Sesquiterpenos estudados	Referências
<b><i>Laurus</i></b>			
<i>L. nobilis</i>		$\beta$ -cariofileno, óxido de espatulenol, $\delta$ -cadinano, germacrano D-4-ol, biciclogermacrano, $\beta$ -cariofileno, germacrano D, $\alpha$ -humulano, $\gamma$ -muuruleno, sabinano, hidrato de <i>cis</i> -sabinano, $\beta$ e $\delta$ elemmano, <i>cis</i> e <i>trans</i> - $\gamma$ -cadinano, $\delta$ -cadinano, $\alpha$ -guaino, cânfora, $\delta$ -elemmano, $\delta$ -quaiano, $\beta$ -santaleno, $\delta$ -cadinano, calamenano, 1,6-dimethyl-4-isopropyl-7,8-dihidronaftaleno, $\gamma$ -patchoulano, cariofileno, $\alpha$ -humulano, cadina-9,11(12)-dieno, $\beta$ -cariofileno, nerolidol, $\beta$ -selinano, fumureno, aromadendrano	83, 84, 85, 86
<b><i>Litsea</i></b>			
<i>L. resinosa</i>	Folhas	Bulnesol, $\beta$ -cariofileno, $\beta$ -elemmano	87
<i>L. gracilipes</i>	Folhas	Ledeno, aromadendrano	88
<i>L. paludosa</i>	Folhas	Elemol, $\gamma$ -cadinano, $\gamma$ -eudesmol, selin-11-en-4 $\alpha$ -ol, $\alpha$ -cadinano, palustrol e selina-3,7(11)-dieno	88
<i>L. kingii</i>	Folhas	Sabinano, hidrato de <i>cis</i> -Sabinano.	88
<b><i>Ocotea</i></b>			
<i>O. veraguensis</i>	Folhas	$\alpha$ -Copaeno	89
<i>O. sinuata</i>	Folhas	$\beta$ -Cariofileno	90
<i>O. tonduzii</i>	Folhas	óxido de cariofileno	90
<b><i>Persea</i></b>			
<i>P. tolimanensis</i>	Folhas	Sabinano, $\beta$ -cariofileno, elemmano, germacrano D, $\alpha$ -humulano, $\alpha$ -cubebeno, $\beta$ -gurjuneno, $\gamma$ -muroleno, $\alpha$ -copaeno	90

<b>Espécies</b>	<b>Partes estudadas</b>	<b>Sesquiterpenos estudados</b>	<b>Referências</b>
<i>P. americana</i>	Mesocarpo do abacate	Sabinano, mirceno, óxido de cariofileno, $\beta$ -cariofileno, $\alpha$ -humulano ( $\alpha$ -cariofileno), car-3-ene, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ -copaeno, $\alpha$ -cadinano, isômero de cadineno, óxido de cariofileno, acetato de farnesila, $\delta$ -elemano, elemano Isomero, $\beta$ -cubebeno, bergamoteno, bisabolano, $\alpha$ -farneseno, isômero de $\alpha$ -farneseno, $\alpha$ -cadinol.	91
<i>P. indica</i>	Folhas	$\beta$ -cariofileno, germacrano-D	92
<b><i>Phoebe</i></b>			
<i>P. porosa</i>	Madeira	$\alpha$ -Copaeno, $\delta$ e $\gamma$ -cadinano, $\beta$ -eudesmol, valerianol, $\alpha$ e $\beta$ -bisabolol, eremoligenol, <i>epi</i> -sesquitujano, oreodaphnenol (6,8-cicloguaian-4-ol), <i>trans</i> - $\alpha$ -bergamot-2-en-10-ona, porosadienona [6 (7 $\rightarrow$ 8)-abeo-eudesmadienona], Porosadienona, oreodafnenol	93, 94, 95, 96
<b><i>Umbellularia</i></b>			
<i>U. californica</i>	Folhas	$\alpha$ -santaleno, umbelulona e sabinano.	97

## **2 – OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico da casca do caule de um espécime de *Nectandra cissiflora* que ocorre em Mato Grosso do Sul, visando ao isolamento e caracterização de seus metabólitos secundários.

### 3- PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

As partes (cascas, caule, folha) de um espécime de *N.cissiflora* foram moídas em moinho de facas tipo Wiley.

Foram utilizados para extração e técnicas cromatográficas, solventes de grau P.A. (Merck, Vetec, Chenco, QM, Synth).

Nas separações em coluna cromatográfica foram utilizadas como adsorventes: sílica gel 60 Vetec (70-230 mesh) e Sephadex LH-20 partículas de 25-100 (Amersham Biosciences).

Os procedimentos cromatográficos em camada fina analítica foram realizados utilizando-se de sílica gel G 60 e sílica gel GF 60(230-400 mesh) Vetec. As placas de vidro 4:10 cm e de espessura variável foram confeccionadas no laboratório .

As revelações das substâncias foram feitas com solução de Vanilina (H<sub>2</sub>O 45%, MeOH 45%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%) e posterior aquecimento em chapa aquecedora. Utilizou-se também irradiação de lâmpada ultravioleta (monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm).

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-300 operando a 300 MHz e 75MHz respectivamente. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN de <sup>1</sup>H e relativos aos carbonos do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN de <sup>13</sup>C. As amostras foram solubilizadas em CDCl<sub>3</sub> das marcas Merck ou Aldrich e CD<sub>3</sub>OD da marca Aldrich.

As separações por CLAE foram efetuadas em cromatógrafo líquido modelo Shimadzu LC 6AD, com detector UV-Visível variável Shimadzu SPD 6 AV, para condições analíticas e semi-preparativas. Foram utilizadas colunas analíticas com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 µm, dimensões de 4,6 Ø x 250 mm (analítica) e 20 Ø x 250 mm (semi-preparativa) RPC-8 ambas da Shimadzu.

### **3.2-COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

*N. cissiflora* foi coletada nos arredores do município de Campo Grande em agosto de 2005, na região do córrego "Ceroula" e identificada por MSc. Flávio Alves Macedo (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul). Uma exsicata foi depositada no Herbário CGMS da UFMS sob o número 11260.

### **3.3 - OBTENÇÃO DO EXTRATO**

As cascas do caule de *N.cissiflora* (1,5 Kg) foram submetidas à secagem ao ar, moídas e posteriormente extraídas com etanol, à temperatura ambiente, exaustivamente.

O extrato obtido foi filtrado e posteriormente concentrado sob pressão reduzida, fornecendo o extrato etanólico bruto.

### **3.4 - ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE**

O extrato etanólico das cascas foi submetido a fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, conforme descrito a seguir.

O extrato etanólico (115,0g) foi submetido à cromatografia em coluna (5,5 cm de diâmetro) de sílica gel 60 (70-230 mesh). A eluição da coluna foi feita em ordem crescente de polaridade: Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH e foram coletadas 39 frações que após análise por CCDA, foram reunidas por semelhança de perfil cromatográfico. Desse processo resultaram 14 frações, das quais foram selecionadas para estudo, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários as frações NCCII5-8, NCCII9, NCCII15-23, NCCII37.

**Tabela 3** – Fracionamento do extrato etanólico das cascas do caule de *N. cissiflora* (coluna II)

ELUENTE	FRAÇÃO	MASSA(g)
Hex	NCCII2-3	0,5
Hex	NCCII4	0,45
Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	NCCII5-8	8,5
Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	NCCII9	3,2
Hex: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1	NCCII10-11	2,7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	NCCII12-14	3,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 9:1, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 8:2 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 1:1	NCCII15-23	7,0
AcOEt	NCCII24-26	4,8
AcOEt	NCCII27-29	3,1
AcOEt: MeOH 9,5:0,5	NCCII30-32	2,1
AcOEt: MeOH 9:1	NCCII33-34	3,2
AcOEt: MeOH 8:2	NCCII35-36	4,4
AcOEt: MeOH 8:2	NCCII37	2,1
AcOEt: MeOH 1:1	NCCII38	7,0

### **3.5 – FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE NCCII5-8, NCCII9, NCCII15-23, NCCII37.**

#### **3.5.1.- ESTUDO DA FRAÇÃO NCCII5-8. (FIG 8).**

A fração NCCII5-8 (8,5g) foi submetida à cromatografia em coluna (L: 34 cm e d: 3,5 cm) de sílica Gel 70-230 mesh, da qual foram obtidas 19 frações. A eluição da coluna foi feita em ordem crescente de polaridade: Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH. As frações foram analisadas em CCDA e as que apresentaram o perfil cromatográfico mais interessante (4, 8, 9, 12, 13, 14) foram submetidas posteriormente às análises espectroscópicas de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT, nas quais foi observada a presença de uma mistura de sesquiterpenos ácidos com o esqueleto eudesmano, o ácido cóstico e o 12-carboxieudesmano-3,11(13)-dieno (**compostos 1 e 2, respectivamente**).

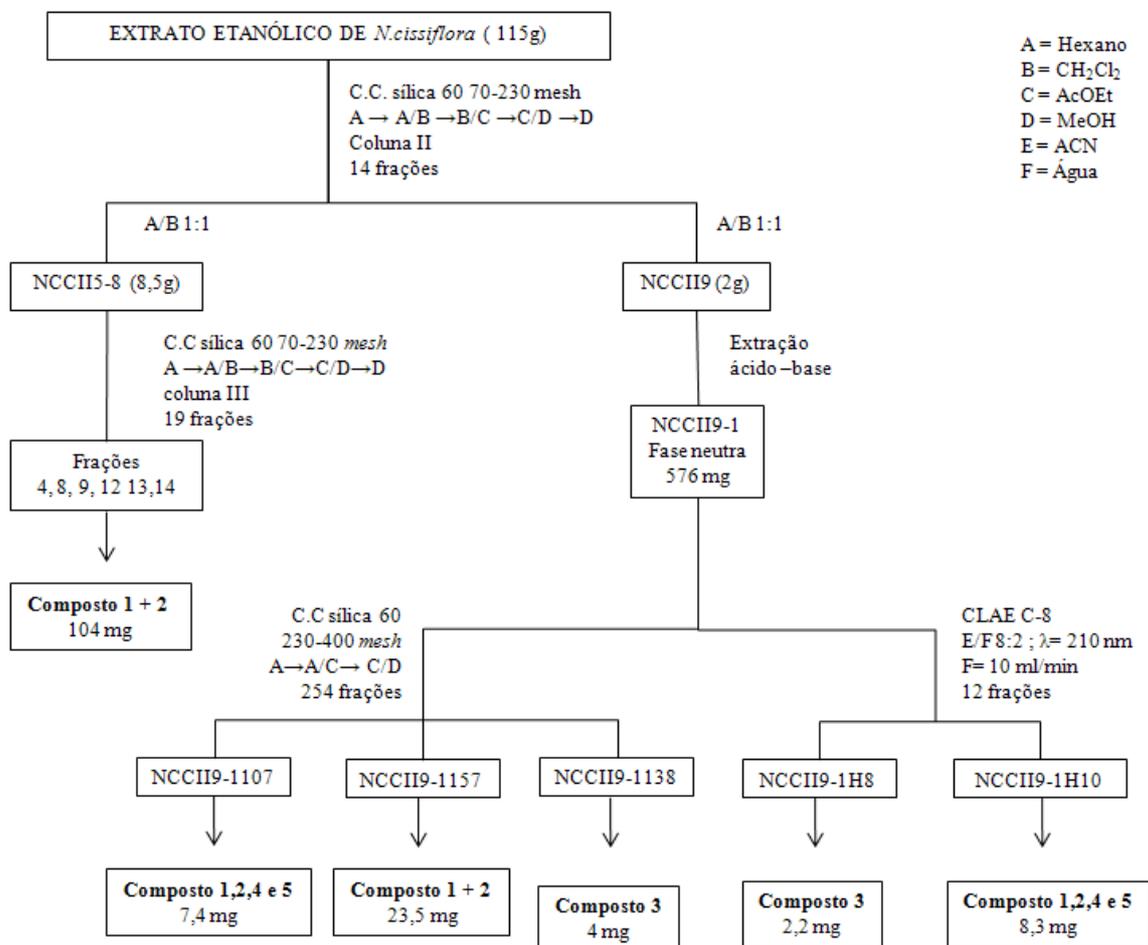
#### **3.5.2 - Estudo da fração NCCII9(fig 8)**

Cerca de 2g da fração NCCII9 foram submetidos à extração ácido-base, conforme descrito a seguir: o material foi submetido à agitação por uma hora em 10 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% e após este período a solução resultante foi extraída em funil de separação, com éter etílico por 3 vezes. A fase orgânica resultante foi lavada com água destilada, por 3 vezes em funil de separação. Em seguida, foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o excesso de solvente foi removido a vácuo, resultando NCCII9-1(576mg). A fase aquosa foi acidificada com ácido clorídrico 10% e extraída por 3 vezes com éter etílico; sendo a fase orgânica final lavada com solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> até a neutralização do pH, em torno de 7. Em seguida, o solvente foi removido a vácuo, sendo obtida a fração NCCII9-2. (1,161g).

A fração NCCII9-1 (83mg) sofreu cromatografia em coluna (coluna L: 23 cm e d: 2 cm) de sílica "flash"(200-400mesh), da qual foram obtidas 254 frações. A eluição da coluna foi feita em ordem crescente de polaridade: Hexano, AcOEt e MeOH e após análise por CCDA, foram reunidas por semelhança de seus perfis cromatográficos, em 6 frações

(NCCII9-192, NCCII9-1107, NCCII9-1138, NCCII9-1157, NCCII9-1201 e NCCII9-125 ). Na fração NCCII9-1107 puderam ser identificados os **compostos 1, 2, 4 e 5**, na fração NCCII9-1138 o **composto 3** e na fração NCCII9-1157 os **compostos 1 e 2**, que não deveriam aparecer nas frações obtidas nesta coluna por esta ser fruto da fase que continha os compostos de natureza neutra (não acídicos). Estes compostos podem ser artefatos oriundos dos compostos 4 e 5, pois sendo o grupo éster suscetível à hidrólise, esta pode ter ocorrido durante a extração ácido-base ou durante a própria cromatografia ou mesmo pelo contato com o solvente (CDCl<sub>3</sub>) utilizado no experimento de RMN.

Parte da fração NCCII9-1 (493mg) foi submetida à "CLAE", em coluna de fase reversa C-8, no eluente ACN: Água 8:2, e foram obtidas 12 frações, sendo: a lactona sesquiterpênica (**composto 3**), e a mistura dos ésteres sesquiterpênicos com unidades de monoterpêno(**compostos 4 e 5**) e seus ácidos de origem (**compostos 1 e 2**) identificados nas frações NCCII9-1H8 e 10, respectivamente.



**Figura 8-** Fluxograma do estudo das frações NCCII5-8, NCCII9 originadas do extrato etanólico das cascas do caule de *N.cissiflora*.

### 3.5.3 - Estudo da fração NCCII12 (fig. 9)

Cerca de 1 g da fração **NCCII12** foi submetida à cromatografia em coluna de sílica "flash" (coluna L: 18 cm e d: 3cm )-230-400 mesh, sendo a eluição da coluna feita em ordem crescente de polaridade, utilizando-se Hexano, AcOEt e MeOH. Foram obtidas 304 frações, que após análise por CCDA, foram reunidas por semelhança de seus perfis cromatográfico, resultando 13 frações, nomeadas NCCII12-1 a 13.

A fração NCCII12-3 (312 mg) foi submetida à cromatografia de exclusão (coluna L: 32 cm e d: 2cm ) - Sephadex LH-20 em ACOEt, sendo obtidas 32 frações, que após análise por CCDA, foram reunidas por semelhança de seus perfis cromatográficos, em 6 frações (NCCII12-31 a 6).

A fração NCCII12-34 foi submetida à "CLAE", em coluna de fase reversa C-8 empregando-se como eluente ACN: Água 18%, 210 nm em 30 mim, da qual foram obtidas 11 frações (NCCII1234H1-11). A observação do cromatograma gerado durante o experimento permitiu a seleção dos picos melhor definidos e de maior concentração, Deste processo resultaram as frações NCC1234H6 e NCCII1234H7 que consistiam da mistura dos **compostos 1,2, 4 e 5**

### 3.5.4 - Estudo da fração NCCII15-23 (fig. 9)

A fração NCCII15-23(7,0g) foi cromatografada, em uma coluna de sílica de fase reversa C-18 (coluna L: 4,5 cm e d: 6cm ), eluída em MeOH: H<sub>2</sub>O nas seguintes proporções: 2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 9:1, 9,5: 0,5 e 100% de MeOH. Deste processo foram obtidas 7 frações (NCCII15R1 a NCCII15R7).

#### 3.5.4.1 - Estudo da fração NCCII15R3

A fração NCCII15R3(1,4g) foi submetida à coluna de Sephadex LH-20 (coluna L: 33,5 cm e d: 3,5 cm), eluída em AcOEt: MeOH 8,5: 1,5, da qual foram coletadas 77 frações que foram posteriormente reunidas em 6 frações (NCCII15R3S1 a 6), após a análises por CCDA.

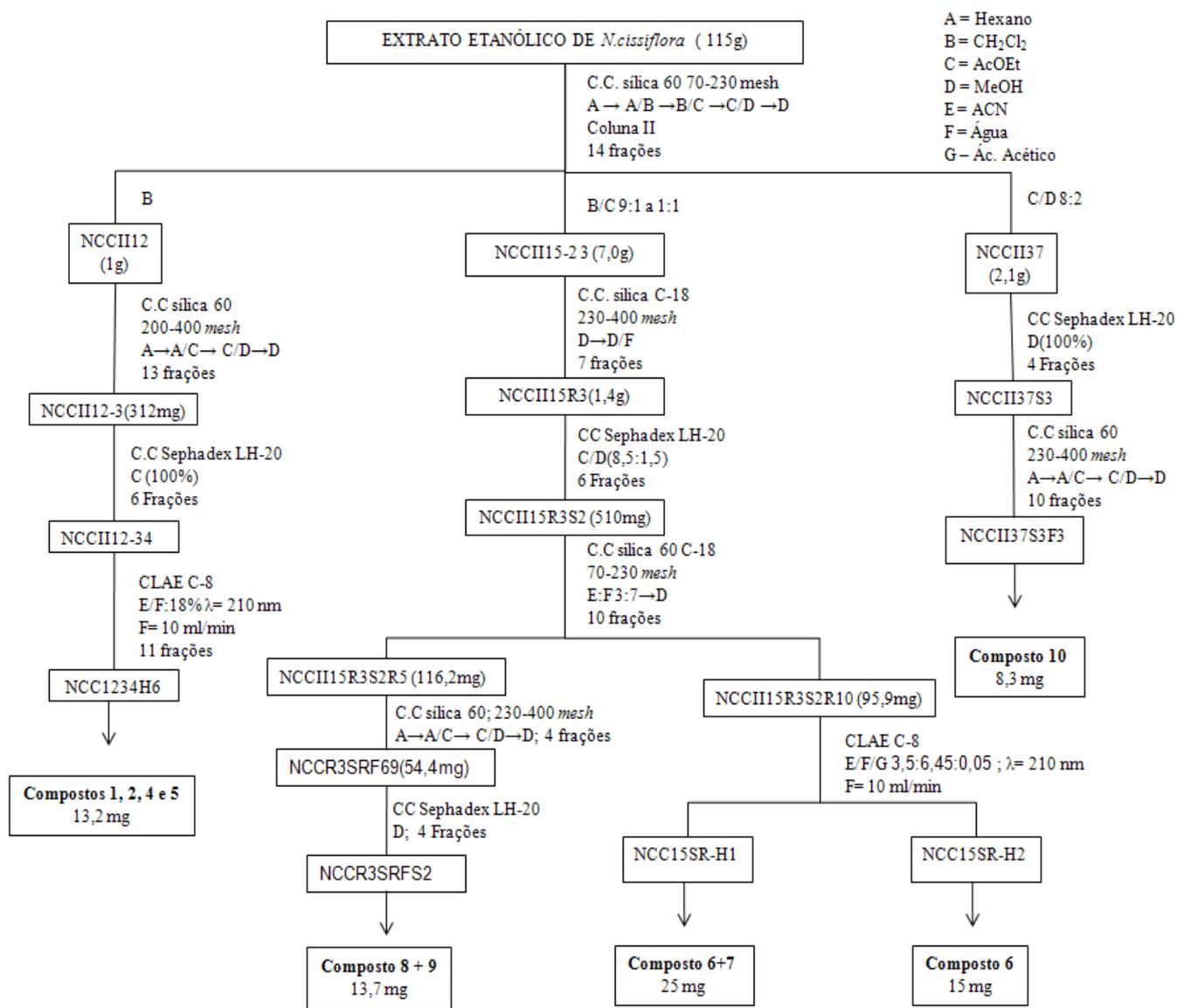
Uma coluna de sílica fase reversa C-18 (coluna L: 11cm e d: 3 cm), eluída em ACN:H<sub>2</sub>O, foi feita a partir da fração NCCII15R3S2(510mg) e dela foram obtidas 86 frações. Estas foram agrupadas em 10 frações nomeadas NCCII15R3S2R1 a 10, após a observação das semelhanças em CCDA.

A fração NCCII15R3S2R5 (116,2 mg) sofreu cromatografia em coluna (coluna L: 11cm e d: 3 cm) de sílica "flash"(200-400mesh), da qual foram obtidas 70 frações. Destas, a fração 69 (NCCR3SRF69), pesando 54,4mg, foi submetida a uma coluna de Sephadex LH-20 (coluna L: 33,5 cm e d: 3,5 cm), eluída em MeOH, sendo coletadas 52 frações, que foram reunidas após observação do perfil cromatográfico em CCDA, obtendo-se ao final 4 frações (NCCR3SRFS1 a 4). Os compostos **8** e **9** puderam ser identificados em mistura na fração NCCR3SRFS2 (13,7 mg).

A fração NCCII15R3S2R10(95,9 mg) foi submetida à "CLAE", em coluna de sílica de fase reversa C-8, no eluente ACN: Água: Ácido Acético 3,5:6,45:0,05, da qual foram obtidas 5 frações (NCC15SR-H1 a 5). Nas frações NCC15SR-H1 e NCC15SR-H2 foram identificados os compostos **6** e **7**, respectivamente (**Figura 9**).

### 3.5.5-Estudo da fração NCCII37(fig 9).

A fração NCCII37(2,1316g) foi submetida à cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex LH-20 (h=33 e Ø=3,3cm) com eluição isocrática em MeOH, sendo coletadas 99 frações. Estas, após a observação dos respectivos perfis cromatográficos em CCDA, resultaram em 4 frações (NCCII37S1 a 4). A fração NCCII37S3 (1,772g) foi cromatografada em coluna de sílica "flash"(230-400 mesh) de L: 15 cm e d: 3,3 cm, em gradiente de polaridade crescente Hex→AcOEt→MeOH, sendo obtidas após reunião 10 frações (NCCII37S3F1 a 10). Destas, as frações NCCII37S3F1 e NCCII37S3F3 foram submetidas a análises espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e DEPT135° identificado o **Composto 10**: (-)-epicatequina.



**Figura 9** - Fluxograma do estudo da fração NCCII12, NCCII15 e NCCII15- 23 originadas do extrato etanólico das cascas do caule de *N. cissiflora*.

### 3.6 - BIOENSAIOS

#### 3.6.1-TESTE DO MICRONÚCLEO

No presente trabalho, foram utilizados peixes do gênero *Hypostomus* para avaliar os efeitos mutagênicos ou antimutagênicos causados pelo extrato etanólico obtido das cascas da *N. cissiflora*, associados ao agente mutagênico cloridrato de doxorubicina.

Os peixes foram coletados ao acaso, no córrego Criminoso, localizado no município de Coxim MS. Após a coleta, os espécimes foram levados para o Laboratório da UEMS – Coxim, colocados em aquários com 40 litros de água destilada, onde passaram por uma aclimatação durante sete dias, mantidos à temperatura média de 25°C.

##### 3.6.1.1 SOLUÇÕES E TRATAMENTOS

O cloridrato de doxorubicina (DXR) foi diluído em água destilada, obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL e desta solução foram aplicados 20µL, resultando uma concentração final de 20 µg. Os extratos do caule de *N. cissiflora* foram diluídos em 0,4 mL de Tween-80; 0,6mL de etanol e 11mL de água destilada. Foram realizados experimentos pilotos com três concentrações destes extratos e verificou-se que a maior concentração foi mais efetiva na redução de micronúcleo (MN), portanto os experimentos foram realizados somente com a concentração final de 6µg.

Foram realizadas três baterias de testes de micronúcleo. Em todas as baterias de testes, os animais foram divididos em seis grupos (A, B, C, D, E e F), cada um com 03 animais e tratados via injeção intraperitoneal.

O grupo A foi tratado com 20µL de água destilada, servindo como controle negativo. O grupo B foi tratado com Cloridrato de Doxorubicina (DXR), utilizado como controle positivo; O grupo C foi tratado com Vincristina (VCR), utilizado como o segundo controle positivo; o grupo D tratado com o extrato da planta a ser testada; o grupo E tratado com o extrato da planta associado à DXR e o grupo F tratado com o extrato da planta associado a VCR (o ensaio feito com as amostras do grupo D foi efetuado para avaliação

de atividade mutagênica, enquanto que os ensaios realizados com as amostras dos grupos E e F foi efetuado para avaliação de atividade antimutagênica).

Após 24, 48 e 72 horas, o sangue periférico foi coletado do arco branquial, com seringas contendo Citrato de Sódio 5% (anticoagulante). As lâminas foram preparadas por esfregaço, secas por 24 horas, posteriormente fixadas em etanol 70%, durante 15 minutos e coradas com técnica convencional (giemsa 5%), por 5 minutos. Foram analisados 4000 eritrócitos por indivíduo, anotando-se a frequência de micronúcleos (MN) formados, totalizando 3 lâminas e 12000 eritrócitos analisados por animal.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

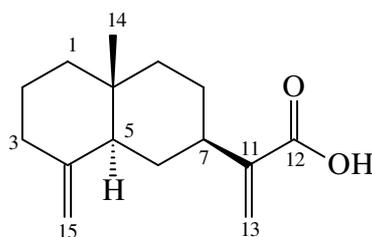
As substâncias apresentadas neste trabalho foram obtidas do extrato etanólico das cascas de *N. cissiflora*, por meio de técnicas cromatográficas descritas na parte experimental, item 3.

A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base em dados espectrocópicos de IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, incluindo técnicas bidimensionais homo- e heteromoleculares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMBC E HMQC); no caso das substâncias conhecidas, a identificação também foi realizada por comparação dos dados espectrais obtidos com os existentes na literatura.

Para efeito de discussão, as substâncias obtidas no presente trabalho foram agrupadas de acordo com a classe a que pertencem e tipo de esqueleto apresentado.

## 4.1-SESQUITERPENOS

### 4.1.1 - Identificação do composto 1



Ácido Cóstico (1)

A fração denominada NCCII5813 (464mg), proveniente do extrato etanólico das cascas de *N.cissiflora* (**Parte Experimental 3.4 e 3.5.1**), foi obtida como um óleo amarelado, de aroma agradável e apresentou como componente majoritário um sesquiterpeno de esqueleto eudesmano, identificado como ácido cóstico (**Composto 1**). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 1, Tabela 4**) apresentou um grupo de sinais situados entre  $\delta$  1,0-2,6, destacando-se um singlete a  $\delta$  0,76 atribuído a uma metila. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 2, Tabela 5**) foram observados quinze sinais, os quais, com o auxílio dos dados provenientes do espectro DEPT-135°, foram atribuídos a um carbono metílico a  $\delta$  16,3; oito carbonos metilênicos a  $\delta$  41,8; 23,4; 27,2; 36,8; 29,9; 41,0, sendo dois olefínicos a 124,9 e 105,5; dois carbonos metínicos a  $\delta$  49,8 e 39,3 e quatro carbonos quaternários a  $\delta$  35,8; 145,1 e 150,5 (olefínicos) e 172,9 (carbonílicos). Estes dados sugeriram a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ , compatível com a de um sesquiterpeno bicíclico

Os singletos largos observados a  $\delta$  4,39 e 4,69 e, no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos de C-15, ao qual foi atribuído o sinal a  $\delta$  105,5 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Tais deslocamentos químicos são típicos de uma ligação dupla exocíclica, formada entre C-4 a  $\delta$  150,5 e C-15, do anel A do sesquiterpeno bicíclico de esqueleto eudesmano.<sup>98</sup>

Os singletos largos a  $\delta$  5,67 e 6,31 foram atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono olefínico C-13 ( $\delta$  124,9), que forma ligação dupla com C-11 ( $\delta$ 145,1). Os valores

de deslocamento químico atribuídos a C-11 e C-13, assim como os hidrogênios olefínicos em C-13 foram sugestivos da presença em C-12 de um grupo carboxila ( $\delta_C$  172,9).

O singlete a  $\delta$  0,76 no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi atribuído aos hidrogênios da metila C-14, ligada a C-10 cujos valores de RMN  $^{13}\text{C}$  foram observados a  $\delta$  16,3 e 35,8 respectivamente.

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , em comparação com os dados disponíveis na literatura para os sesquiterpenos com esqueleto eudesmano, permitiram assim a identificação desta substância como sendo o ácido cóstico [ácido 4(15), 11(13)-eudesmano-dienóico].<sup>99</sup>

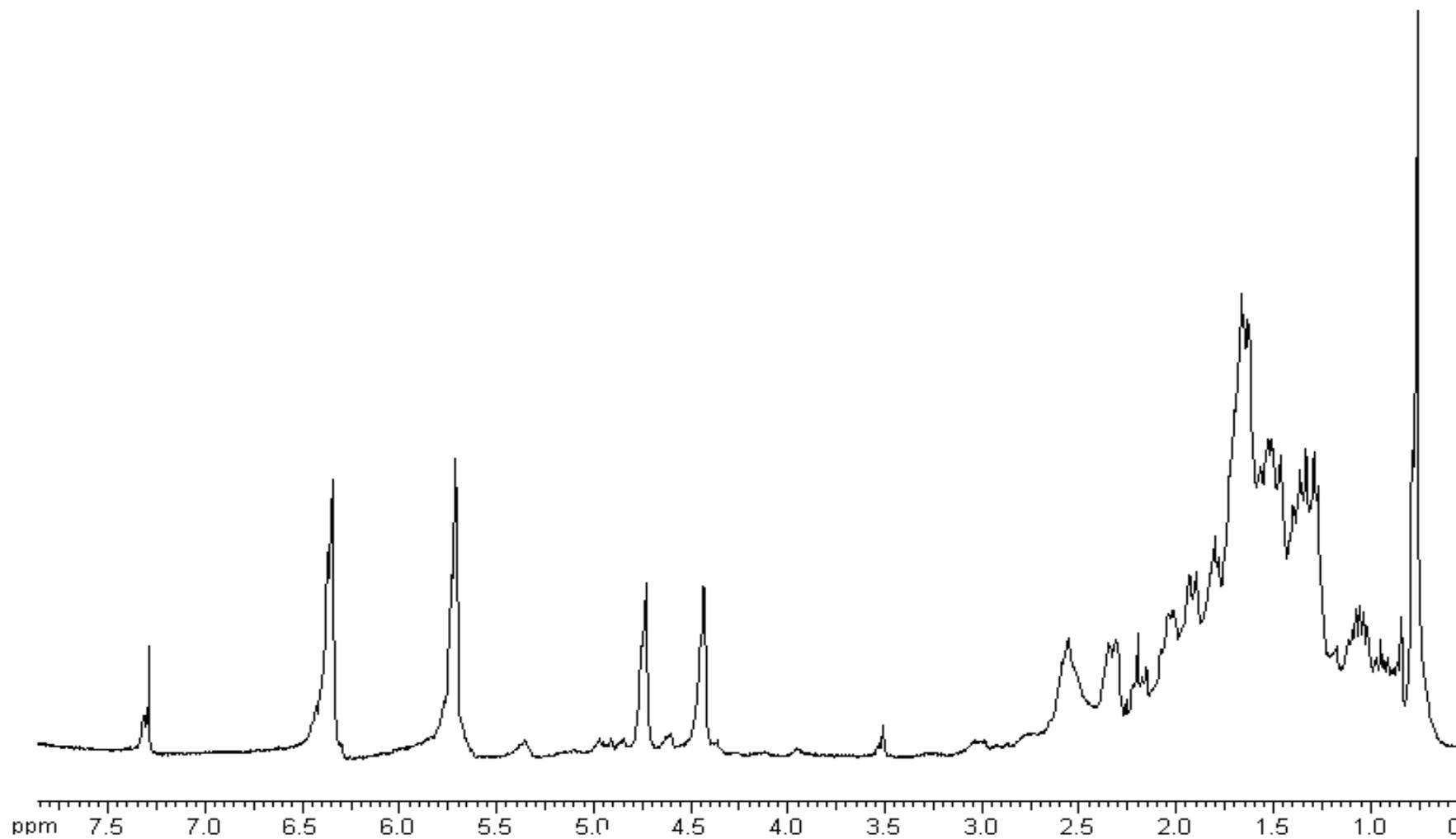
O ácido cóstico já foi isolado anteriormente de outras espécies de Lauraceae, incluindo três do gênero *Nectandra*: *N. membranacea*, *N. grandiflora*, *N. cuspidata*, assim como de outras famílias vegetais. Possui atividade aleloquímica, “antifeedant” e fungistática contra fungos dermatofíticos.<sup>47, 100,101</sup>

**Tabela 4** - Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) de **1**

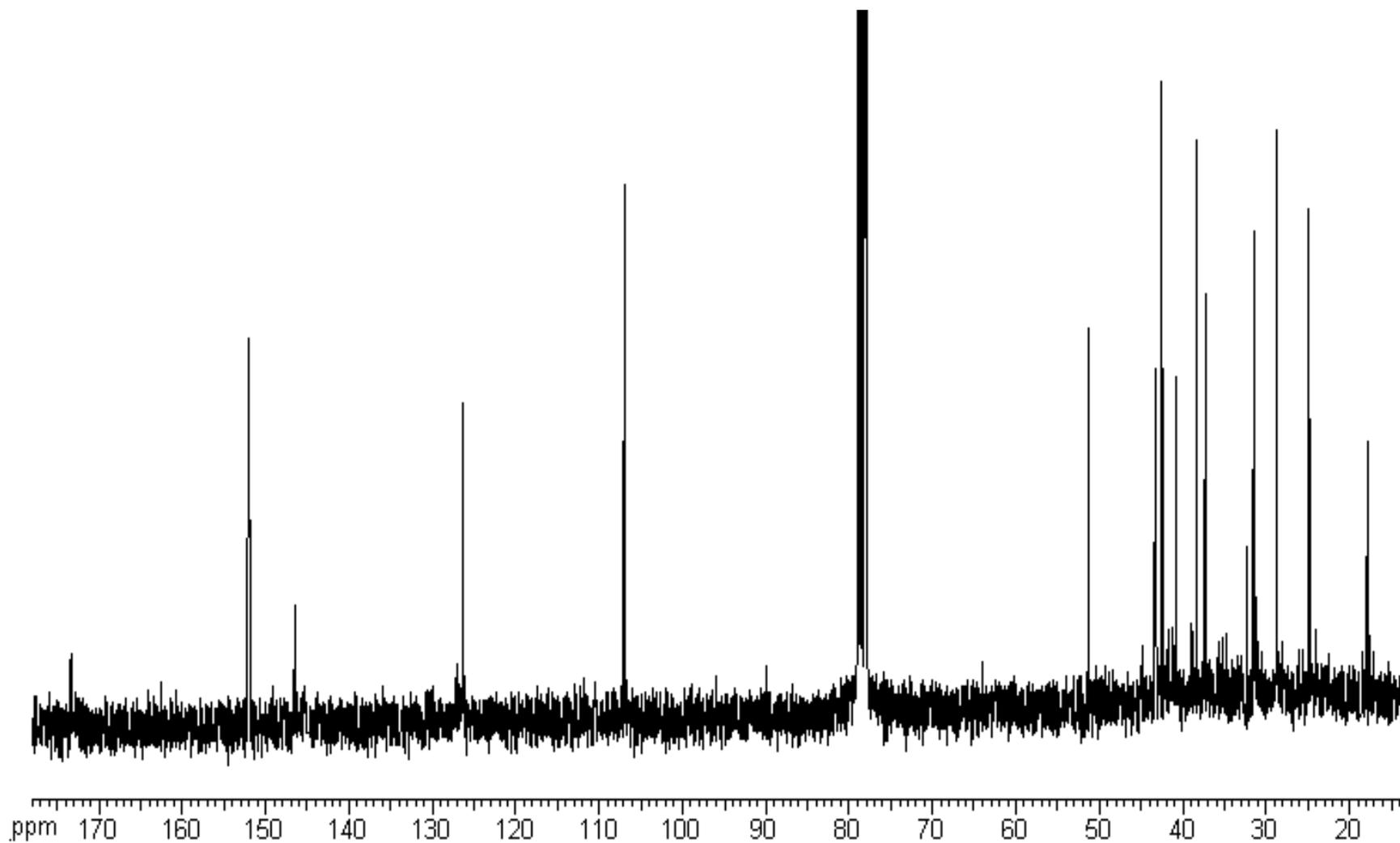
H	$\delta_{\text{H}}$ [m, J(Hz)]	$\delta_{\text{H lit}}$ [m, J(Hz)] <sup>100</sup>
13	6,31 (s) e 5,67 (s)	6,32 (s) e 5,74 (s)
14	0,76 (s)	0,75 (s)
15	4,39 (s) e 4,69 (s)	4,42 (s) e 4,72 (s)

**Tabela 5-**Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) de 1.

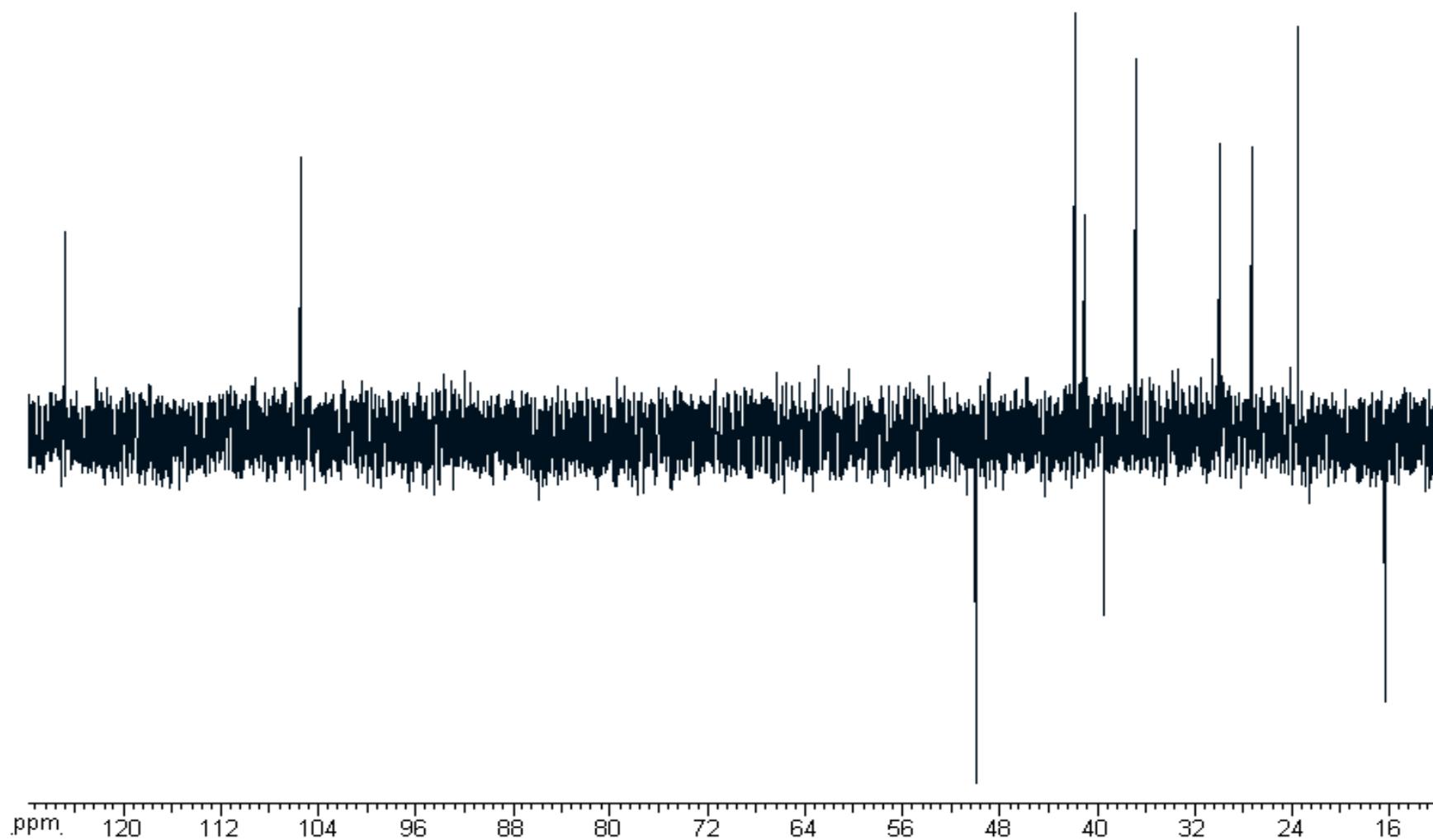
Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C lit}}^{98}$
1	41,8 (CH <sub>2</sub> )	41,8 (CH <sub>2</sub> )
2	23,4 (CH <sub>2</sub> )	23,4 (CH <sub>2</sub> )
3	36,8 (CH <sub>2</sub> )	36,8 (CH <sub>2</sub> )
4	150,5 (C)	150,6 (C)
5	49,9 (CH)	49,8 (CH)
6	29,9 (CH <sub>2</sub> )	29,9 (CH <sub>2</sub> )
7	39,3 (CH)	39,2 (CH)
8	27,2 (CH <sub>2</sub> )	27,2 (CH <sub>2</sub> )
9	41,0 (CH <sub>2</sub> )	41,0 (CH <sub>2</sub> )
10	35,8 (C)	35,9 (C)
11	145,1 (C)	145,2 (C)
12	172,9 (C)	172,9 (C)
13	124,9 (CH <sub>2</sub> )	124,9 (CH <sub>2</sub> )
14	16,3 (CH <sub>3</sub> )	16,4 (CH <sub>3</sub> )
15	105,5 (CH <sub>2</sub> )	105,5 (CH <sub>2</sub> )



**Espectro 1** : RMN de  $^1\text{H}$  de **1** (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

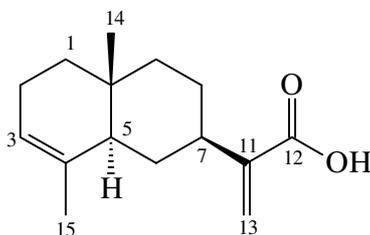


**Espectro 2:** RMN de <sup>13</sup>C do composto **1** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 3 - DEPT 135° de **1** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.2 - Identificação do composto 2



12-carboxiesudesman-3,11(13)-dieno (**2**)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 4 e 5, Tabelas 6 e 7**), correspondentes à fração NCCII5-814 (108mg) (**parte experimental 3.4 e 3.4.1.1**), mostraram-se bastante semelhantes aos da fração NCCII5813 (**Parte Experimental item 3.4 e 3.5.1**) indicando a presença do ácido cóstico (**1**) como componente majoritário também em NCCII5-814: foram observados os sinais dos hidrogênios olefínicos H-13 ( $\delta$  5,67 e 6,32) e H-15 ( $\delta$  4,40 e 4,70) e da metila 14 ( $\delta$  0,81), dos carbonos olefínicos C-4, C-15, C-11 e C-13 ( $\delta$  134,7; 21,1; 145,3 e 125,0, respectivamente), do carbono carboxílico ( $\delta$  172,9) e da metila C-14 ( $\delta$  15,6), além dos sinais correspondentes aos demais carbonos deste sesquiterpeno. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram também observados um singlete a  $\delta$  1,59 atribuído a um grupo metila ligado a um carbono tetrassubstituído, além de um singlete largo a  $\delta$  5,3 referente a um hidrogênio olefínico. A intensidade dos sinais atribuídos aos dois hidrogênios em C-13 do ácido cóstico mostrou-se bem maior que a dos sinais de **2** H-15 neste espectro. Este fato sugeriu que o segundo componente da mistura também apresentava o mesmo tipo de grupo funcional presente no composto **1** (ligação dupla em C-11 e C-13).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , por sua vez, pôde ser dividido em picos mais intensos atribuídos aos carbonos do composto **1** (majoritário) e em picos correspondentes aos carbonos do segundo composto mais abundante na mistura (composto **2**). Com o auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT-135°, os sinais referentes ao composto **2** foram atribuídos a dois carbonos metílicos a  $\delta$  15,6 e  $\delta$  21,1; seis carbonos metilênicos

(sendo um deles o carbono olefínico C-13) a  $\delta$  22,9; 27,4; 29,4; 37,8; 40,1 e 125,0; três carbonos metínicos (um deles olefínico) a  $\delta$  40,1; 46,9; e 121,0 e quatro carbonos quaternários, sendo um ligado a carbono  $sp^3$  ( $\delta$  32,3), dois olefínicos ( $\delta$  134,7 e 145,3), sendo um deles atribuído a C-11 ( $\delta$  145,3) e o carbono carboxílico atribuído a C-12 ( $\delta$  172,9).

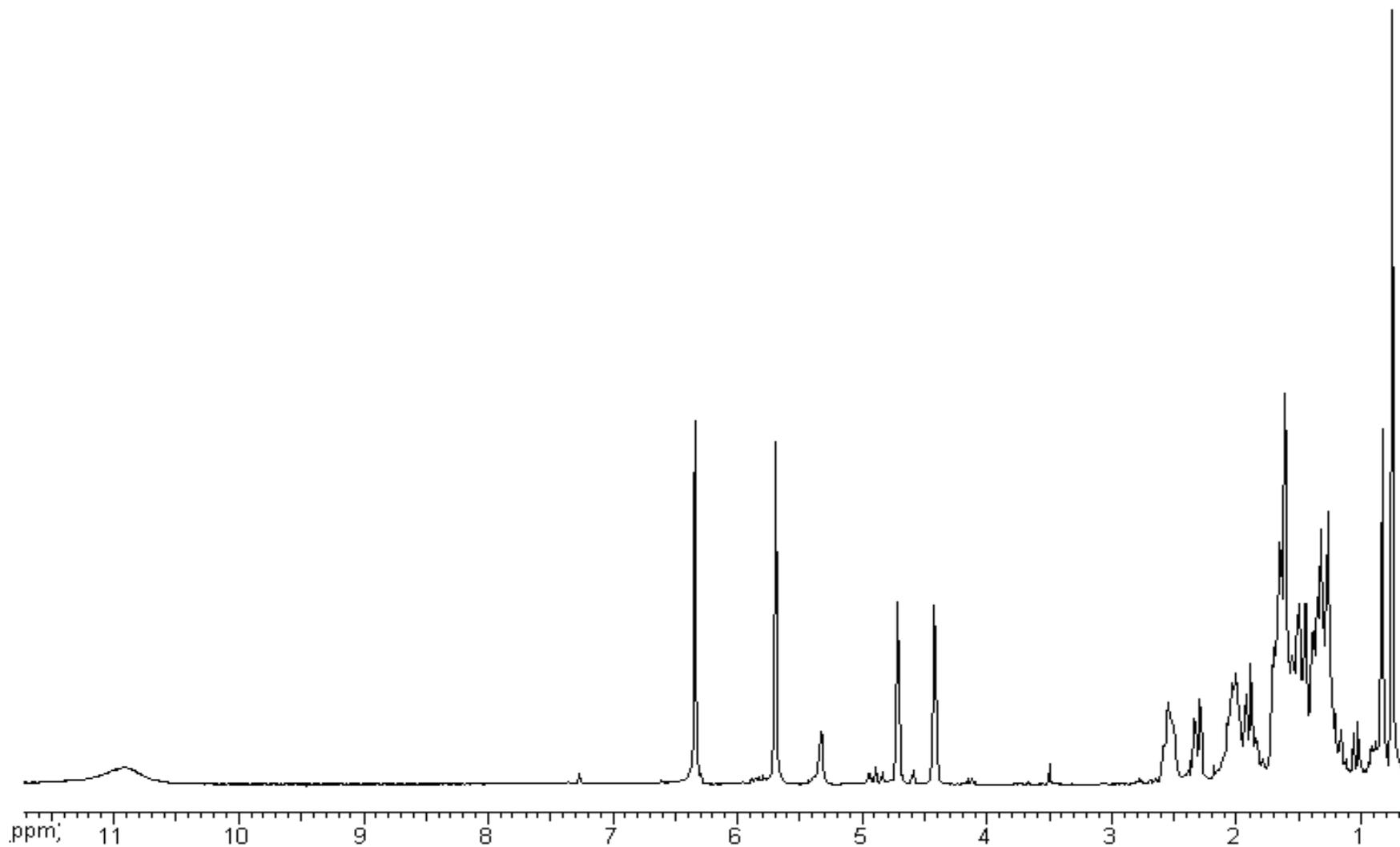
Estes dados indicaram que o composto **2**, apresentava também um esqueleto do tipo eudesmano, cuja única diferença com relação ao composto **1** residia na localização da ligação dupla no anel A, que no caso de **2** encontra-se entre os carbonos 3 e 4 ( $\delta_H$  5,3,  $\delta_C$  121,0 e 134,7). Assim, a estrutura do composto **2** foi determinada como sendo a do 12-carboxieudesman-3,11(13)-diene. Os dados espectrais de **2** apresentaram uma boa correlação com os do mesmo sesquiterpeno relatado na literatura. O isolamento desta substância já foi relatado anteriormente em outras espécies vegetais por exemplo: *Dittrichia graveolens* e *Inula viscosa* (Asteraceae), assim como as suas atividades ictiotóxica, antifúngica e antibacteriana.<sup>102,103</sup> Os dados espectrais de **2** apresentaram uma boa correlação com os do mesmo sesquiterpeno relatado na literatura<sup>102</sup>. Portanto, este é o primeiro relato da ocorrência de 12-carboxieudesman-3,11(13)-diene em uma espécie de *Nectandra*.

**Tabela 6** - Dados espectrais de RMN de  $^1H$  (300 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $CDCl_3$ ) de **2**.

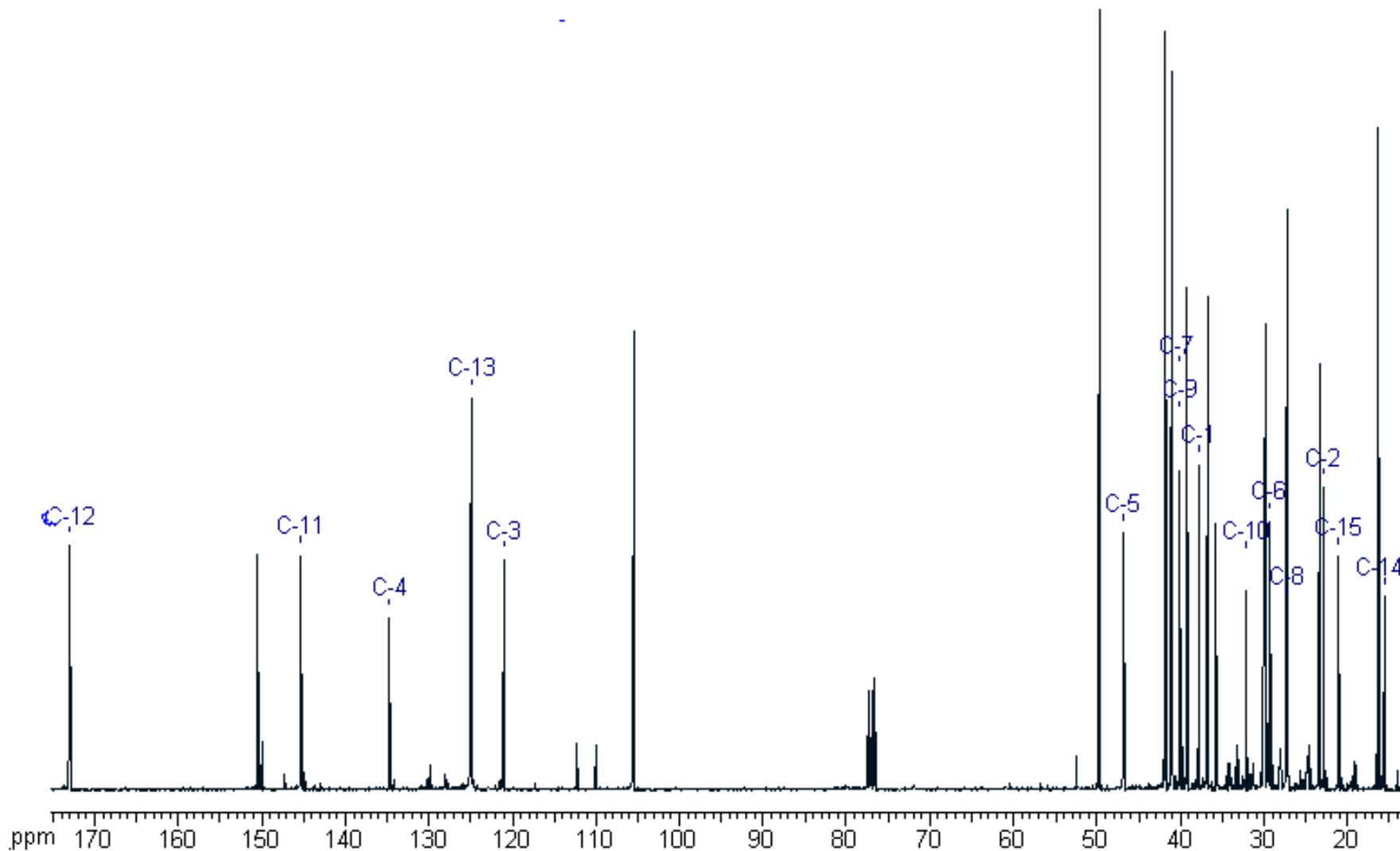
H	$\delta^1H$	$\delta^1H$ lit <sup>102</sup>
3	5,31(s)	5,34(s)
13	5,67(s) e 6,32(s)	5,70(s) e 6,34(s)
14	0,81(s)	0,84(s)
15	1,59(s)	1,61(s)

**Tabela 7-** Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) de **2**.

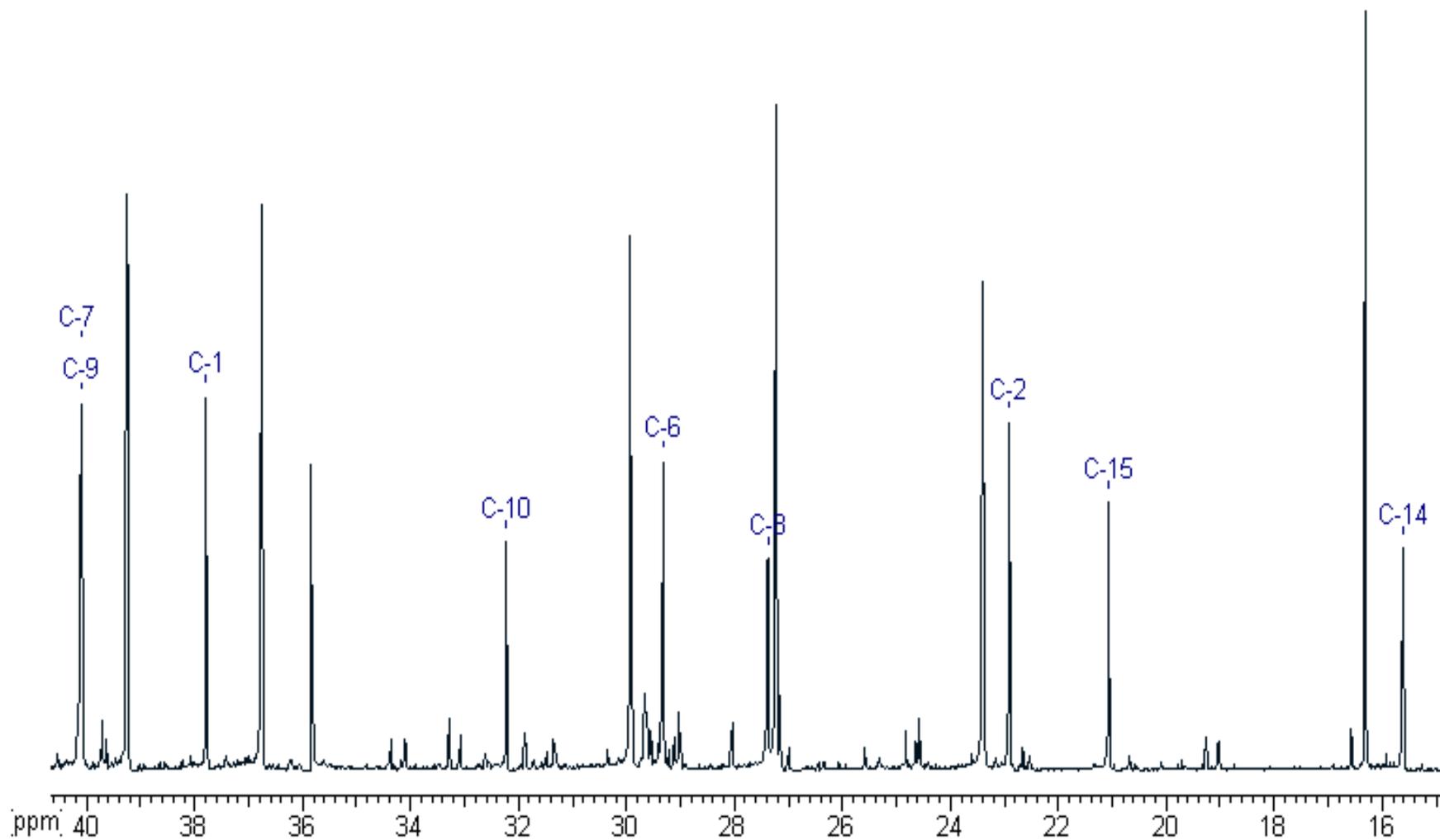
Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ lit <sup>102</sup>
1	37,8(CH <sub>2</sub> )	37,8(CH <sub>2</sub> )
2	22,9(CH <sub>2</sub> )	23,0(CH <sub>2</sub> )
3	121,0(CH)	121,1(CH)
4	134,7(C)	134,8(C)
5	46,9(CH)	46,9(CH)
6	29,4(CH <sub>2</sub> )	29,4(CH <sub>2</sub> )
7	40,1(CH)	40,1(CH)
8	27,4(CH <sub>2</sub> )	27,4(CH <sub>2</sub> )
9	40,1(CH <sub>2</sub> )	40,1(CH <sub>2</sub> )
10	32,3(C)	32,3(C)
11	145,3(C)	145,3(C)
12	172,9(C)	172,4(C)
13	125,0(CH <sub>2</sub> )	125,0(CH <sub>2</sub> )
14	15,6(CH <sub>3</sub> )	15,7(CH <sub>2</sub> )
15	21,1(CH <sub>3</sub> )	21,1(CH <sub>2</sub> )



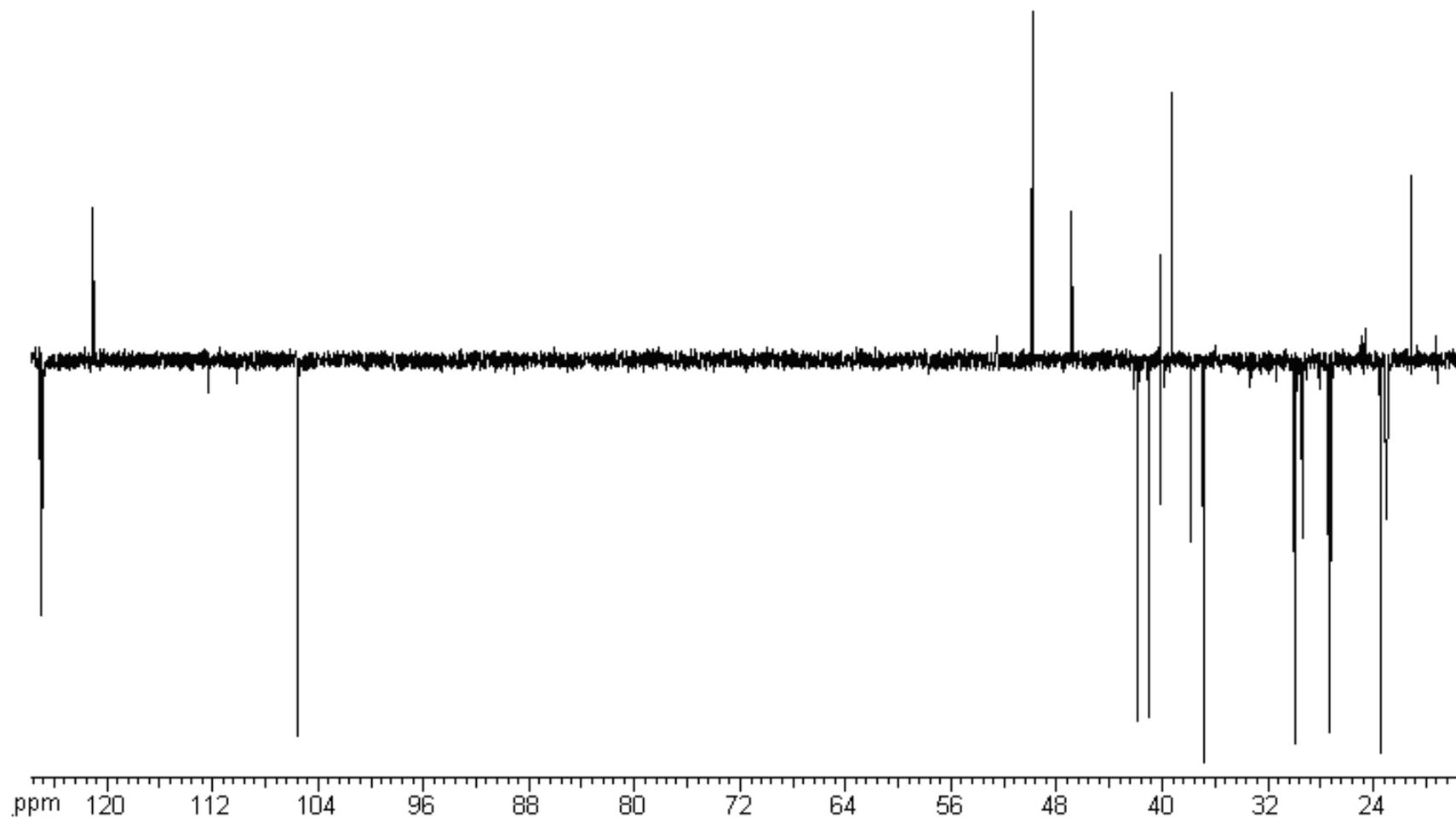
**Espectro 4** : RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **1** e **2** (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Espectro 5** : RMN de <sup>13</sup>C da mistura de **1** e **2** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

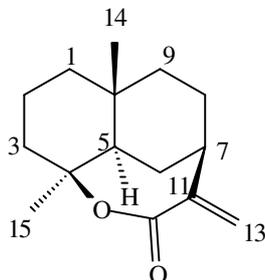


**Espectro 6** - RMN de <sup>13</sup>C ampliado da mistura de 1 e 2 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 7 : DEPT 135° de **1** e **2** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.3-Determinação estrutural do composto 3



Eudesm-11(13)-eno-12,4 $\beta$ -olídeo (**3**)

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 8 e 9, Tabela 8**) do composto **3**, presente na fração NCCII9-1H8, 2,2 mg, (**Parte Experimental 3.4 e 3.5.2**) mostraram-se semelhantes aos dos compostos 1 e 2. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram observados dois singletos largos a  $\delta$  5,44 e 6,25 atribuíveis aos hidrogênios metilênicos da ligação dupla  $\alpha,\beta$  - insaturada C-11/C-13. Este espectro também mostrou dois singletos a  $\delta$  0,96 e 1,51 relativos às metilas ligadas a carbonos tetrassubstituídos.

Nos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 $^\circ$  foram observados os sinais relativos a dois carbonos metílicos a  $\delta$  18,5 e 19,1; sete carbonos metilênicos a  $\delta$  19,4; 24,8; 30,5; 38,3; 40,5; 44,7; dois carbonos metínicos a  $\delta$  53,6 e 40,1 e quatro carbonos quaternários a  $\delta$  34,8; 86,2; 147,0; 166,7. Os sinais a  $\delta$  123,1(CH<sub>2</sub>) e a  $\delta$  147,0 (C) reforçam a proposta da presença de uma ligação dupla  $\alpha,\beta$ - insaturada C-11/C-13. No entanto, o valor do deslocamento químico do carbono carbonílico a  $\delta$  166,7, a presença de um sinal a  $\delta$  86,1, indicativa de um carbono oxigenado tetrassubstituído e ainda as multiplicidades apresentadas pelos demais sinais no espectro DEPT-135 $^\circ$ , sugeriram a presença de um anel lactônico na estrutura de **3** e a fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>. Dessa forma, este sesquiterpeno seria tricíclico e com base no valor de deslocamento químico e a multiplicidade do sinal da metila a  $\delta$  1,51 e também por comparação com os dados espectrais do composto **1**, chegou-se à conclusão que o anel lactônico teria sido formado entre C-12 ( $\delta$  166,7) e C-4 ( $\delta$  86,1). Os dois singletos largos observados a  $\delta$  5,44 e 6,25

foram atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos de C-13 ( $\delta$  123,1), que forma dupla ligação com C-11 observado na posição  $\alpha$  à carbonila do éster cíclico (lactona), C-12.

As correlações presentes nos espectros HSQC C e HMB (**Espectros 11 e 13, Tabela 8**) corroboraram esta proposta. No espectro HMBC, foram observados picos cruzados entre os hidrogênios em C-13 ( $\delta$  5,44 e 6,25) e C-7 ( $\delta$  40,1) e C-12 ( $\delta$  166,7), entre os hidrogênios da metila-14 ( $\delta$  0,96) e C-1 ( $\delta$  44,7), C-5 ( $\delta$  53,6), C-9 ( $\delta$  40,5) e C-10 ( $\delta$  34,8), e entre os hidrogênios da metila-15 ( $\delta$  1,51) e C-4 ( $\delta$  86,1) e C-5 ( $\delta$  53,6) [Tabela 8].

Assim, a estrutura de **3** foi proposta como sendo a lactona correspondente do ácido 4-*epi*-ilícico, que possui um grupo hidroxila em C-4 com orientação  $\beta$ .<sup>104</sup>

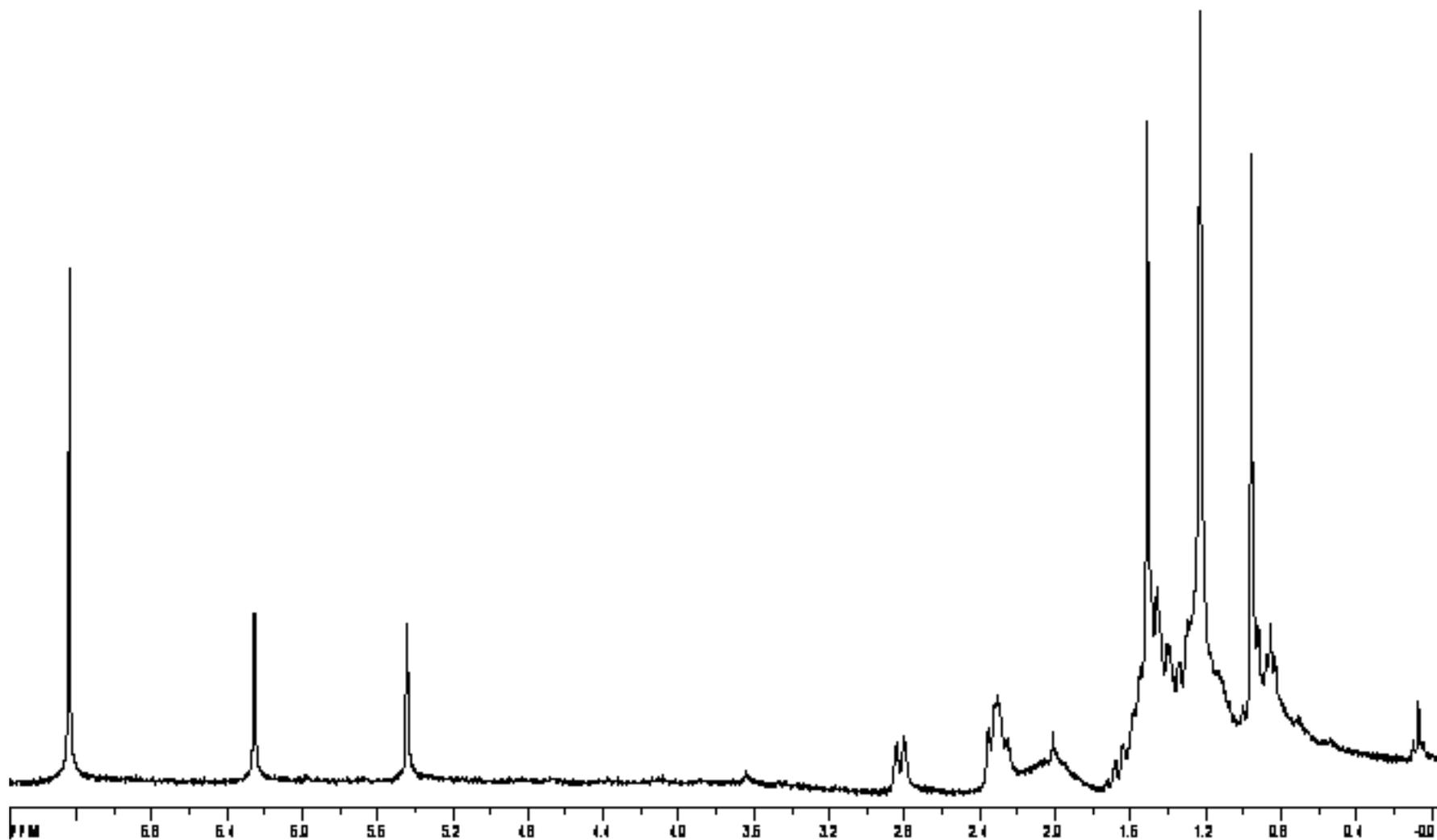
Na literatura há apenas um relato sobre a obtenção desta lactona (sem a definição da estereoquímica) como produto de transformação do ácido ilícico (também denominado ácido vachânico) isolado de *Artemisia vachanica* (Asteraceae), porém fornecendo apenas dados de RMN de  $^1\text{H}$ .<sup>105</sup> Desta forma, o composto **3** é inédito como produto natural e seus dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  estão sendo descritos também pela primeira vez.

Muitos destes sesquiterpenos lactônicos têm se mostrado possuidores de efeitos farmacológicos, como antimicrobianos, imunomoduladores e atividade citotóxica, antitumoral, antiinflamatória, e antiúlcera.<sup>106, 107, 108, 109, 110, 111, 112</sup>

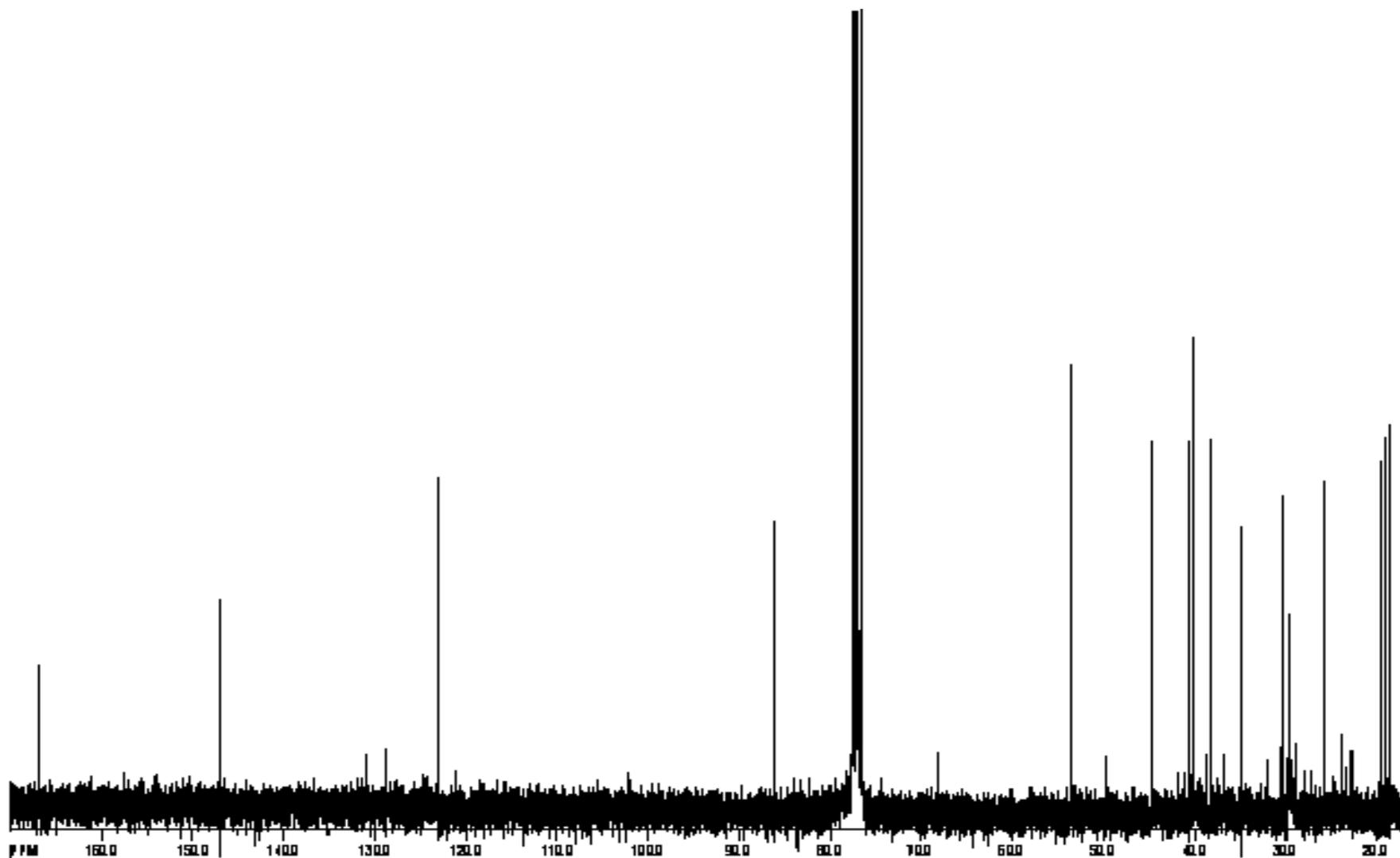
**Tabela 8** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) de **3**.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]	HMBC
1	44,7(CH <sub>2</sub> )	1,48 (m) <sup>a</sup> e 1,32 (m)	
2	19,4(CH <sub>2</sub> )	1,56 (m)	
3	38,3(CH <sub>2</sub> )	1,37 (m) e 2,83 (dl, $J = 12,5$ )	
4	86,2(C)	-	
5	53,6(CH)	1,51 <sup>a</sup>	C-3
6	30,5(CH <sub>2</sub> )	0,95 (m) e 2,35 (m) <sup>b</sup>	C-5
7	40,1(CH)	2,32 (m) <sup>b</sup>	
8	25,8(CH <sub>2</sub> )	1,46 (m) <sup>a</sup> e 1,66 (m)	
9	40,5(CH <sub>2</sub> )		
10	34,8(C)		
11	147,0(C)		
12	166,7(C)		
13	123,1(CH <sub>2</sub> )	5,44(s) e 6,25(s)	C-7, C-12; C-11
14	19,1(CH <sub>3</sub> )	0,96(s)	C-1, C-5, C-9, C-10
15	18,5(CH <sub>3</sub> )	1,51(s)	C-4, C-5

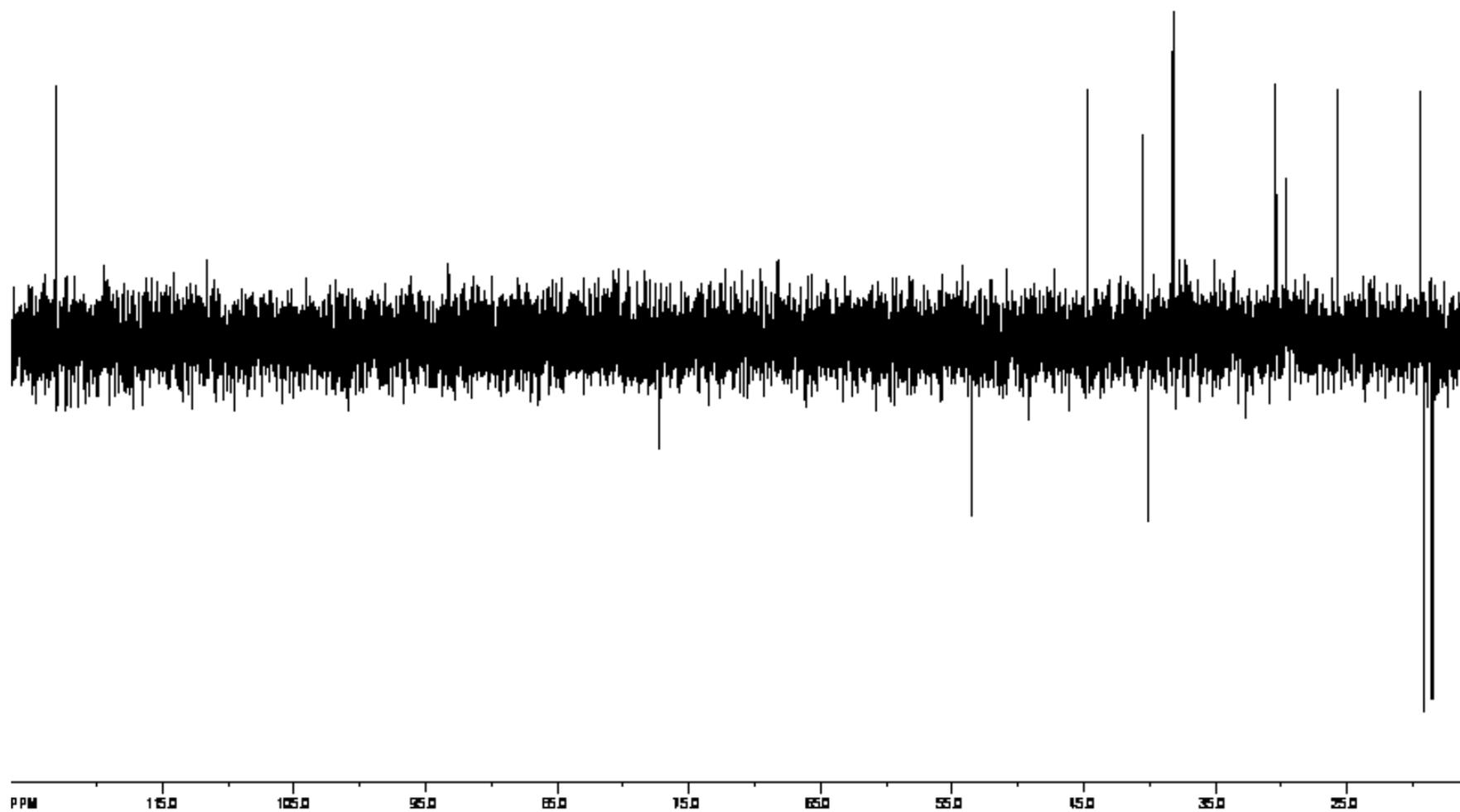
<sup>a</sup>, <sup>b</sup> - sinais sobrepostos



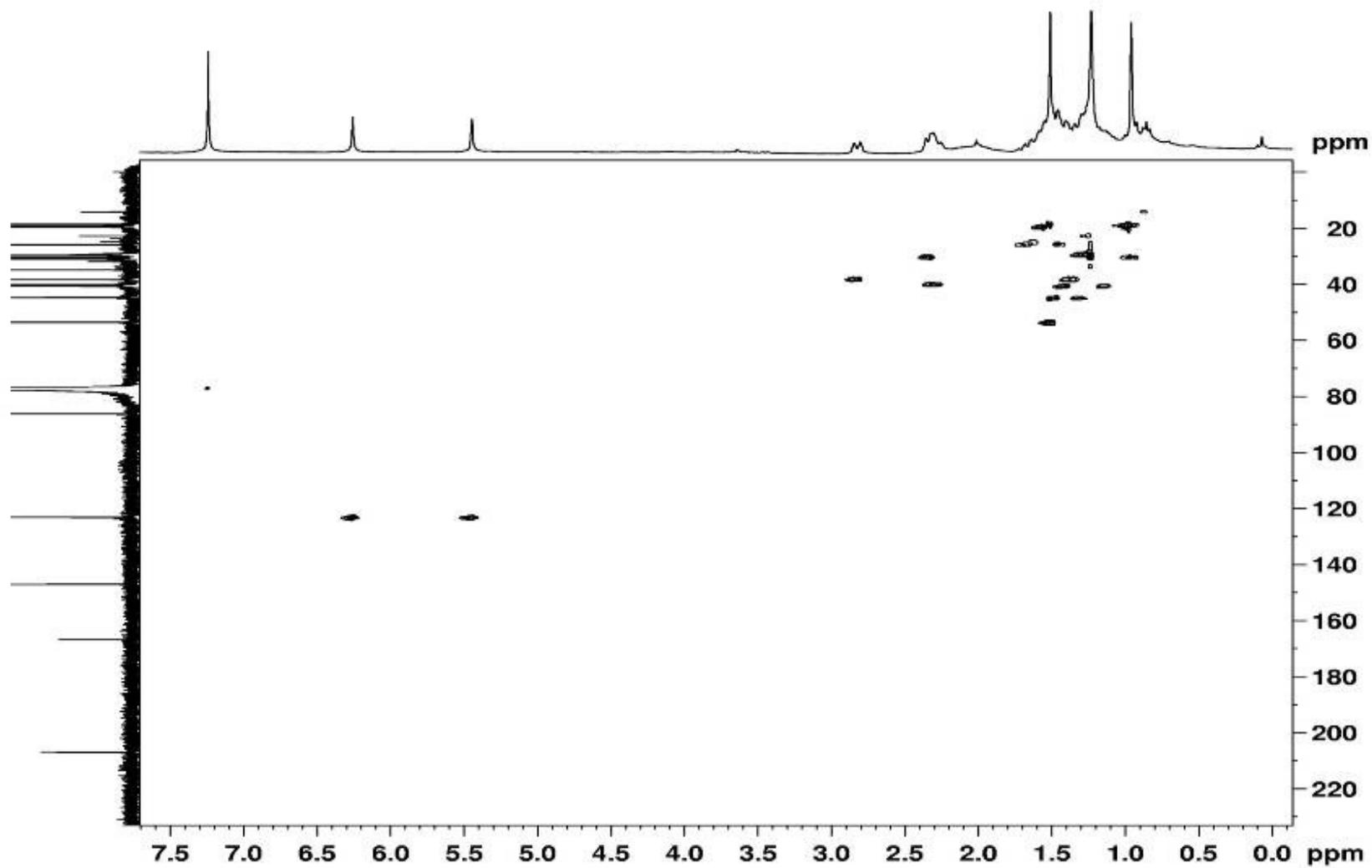
Espectro 8 : RMN de <sup>1</sup>H de 3 (300MHz, CDCl<sub>3</sub>).



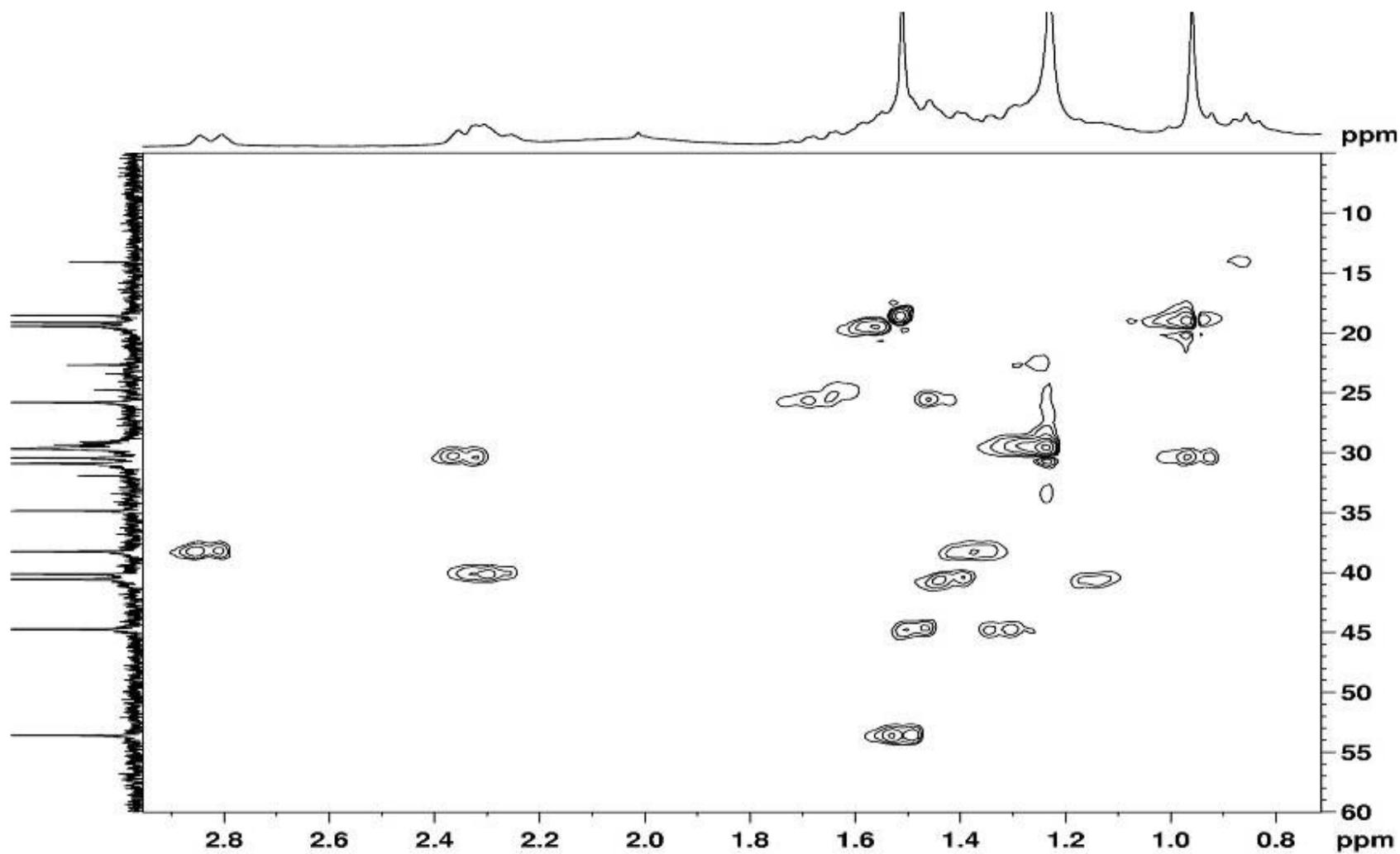
Espectro 9 : RMN de <sup>13</sup>C de **3** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



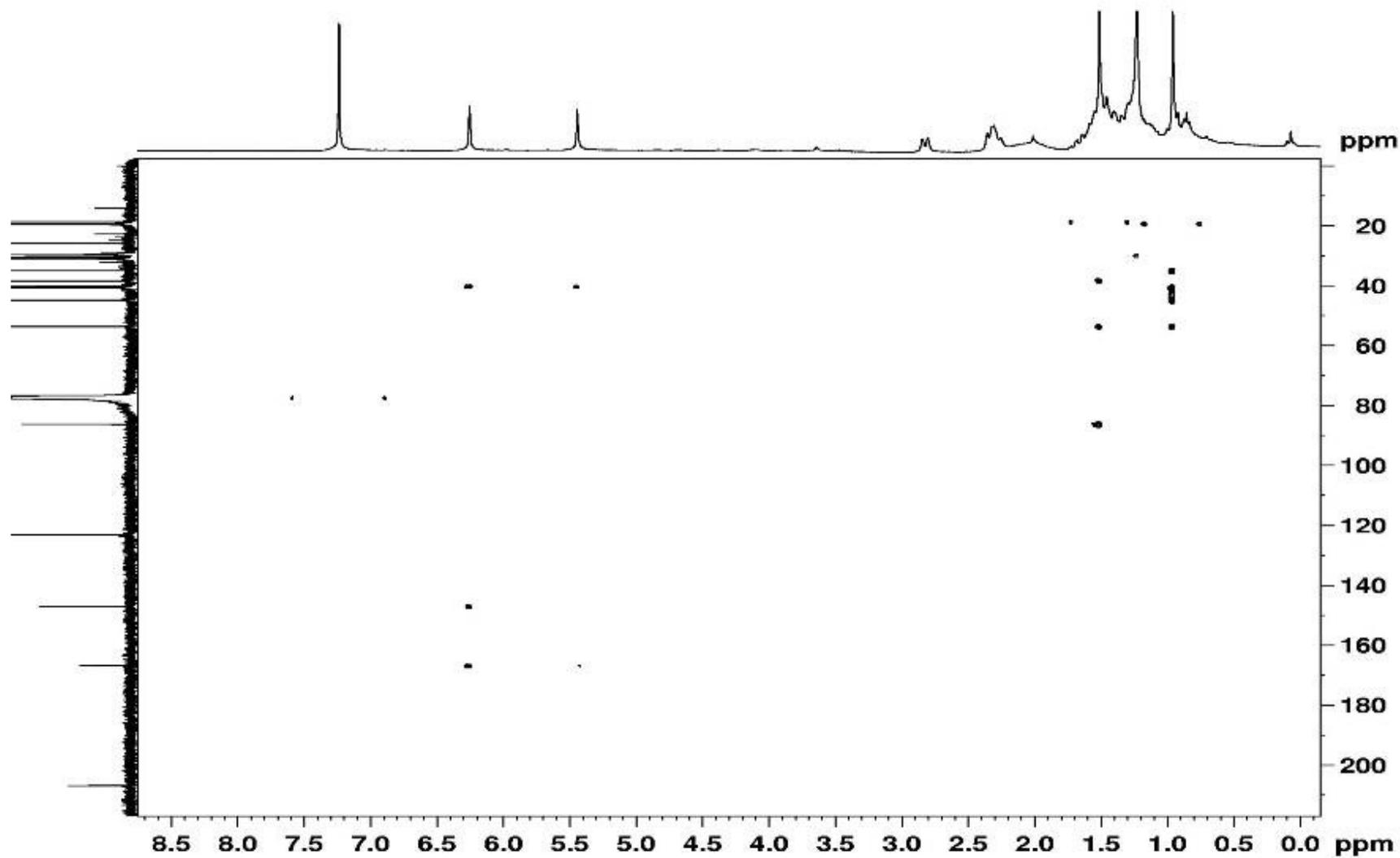
Espectro 10 - DEPT 135° de 3 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



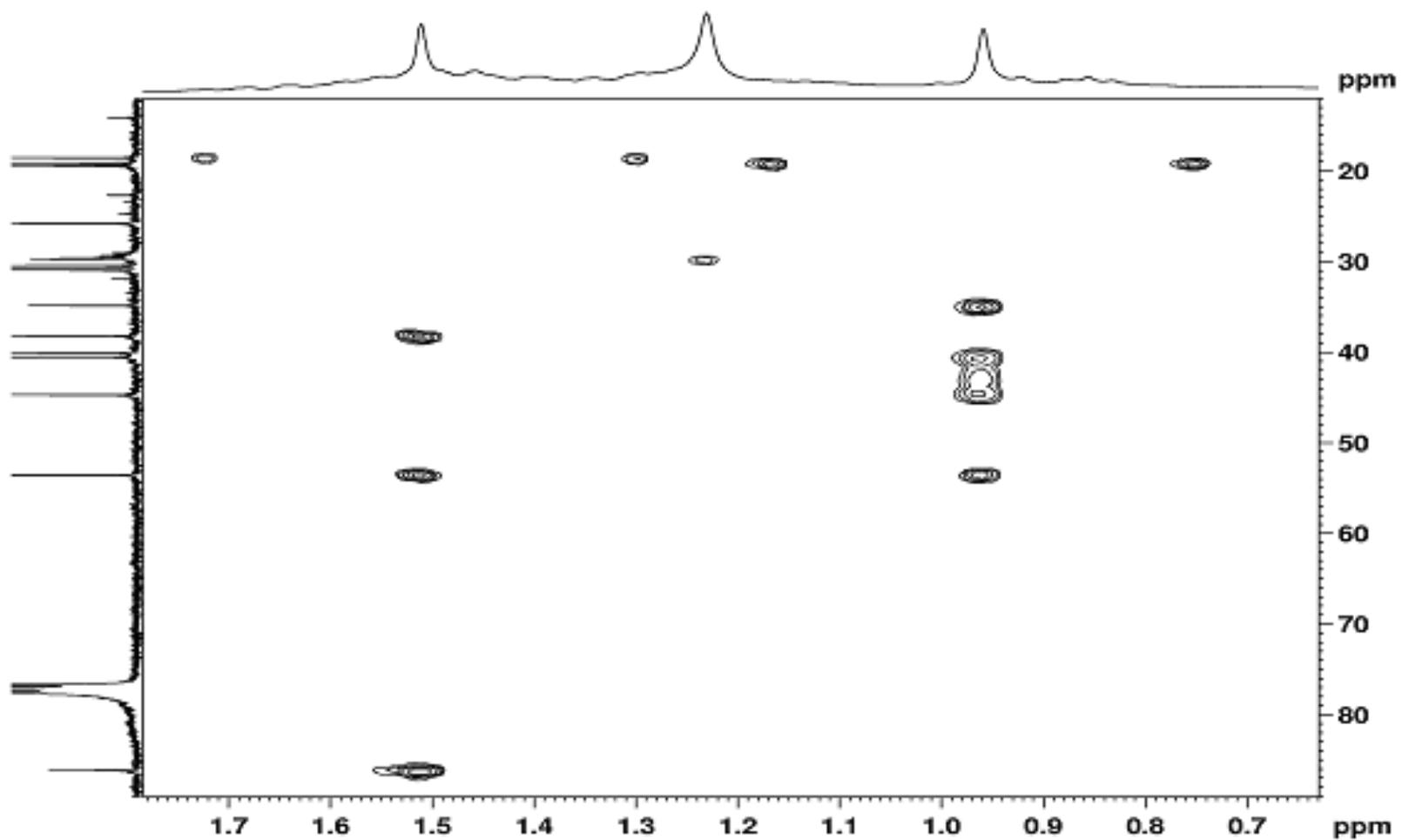
Espectro 11 - HSQC de **3** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



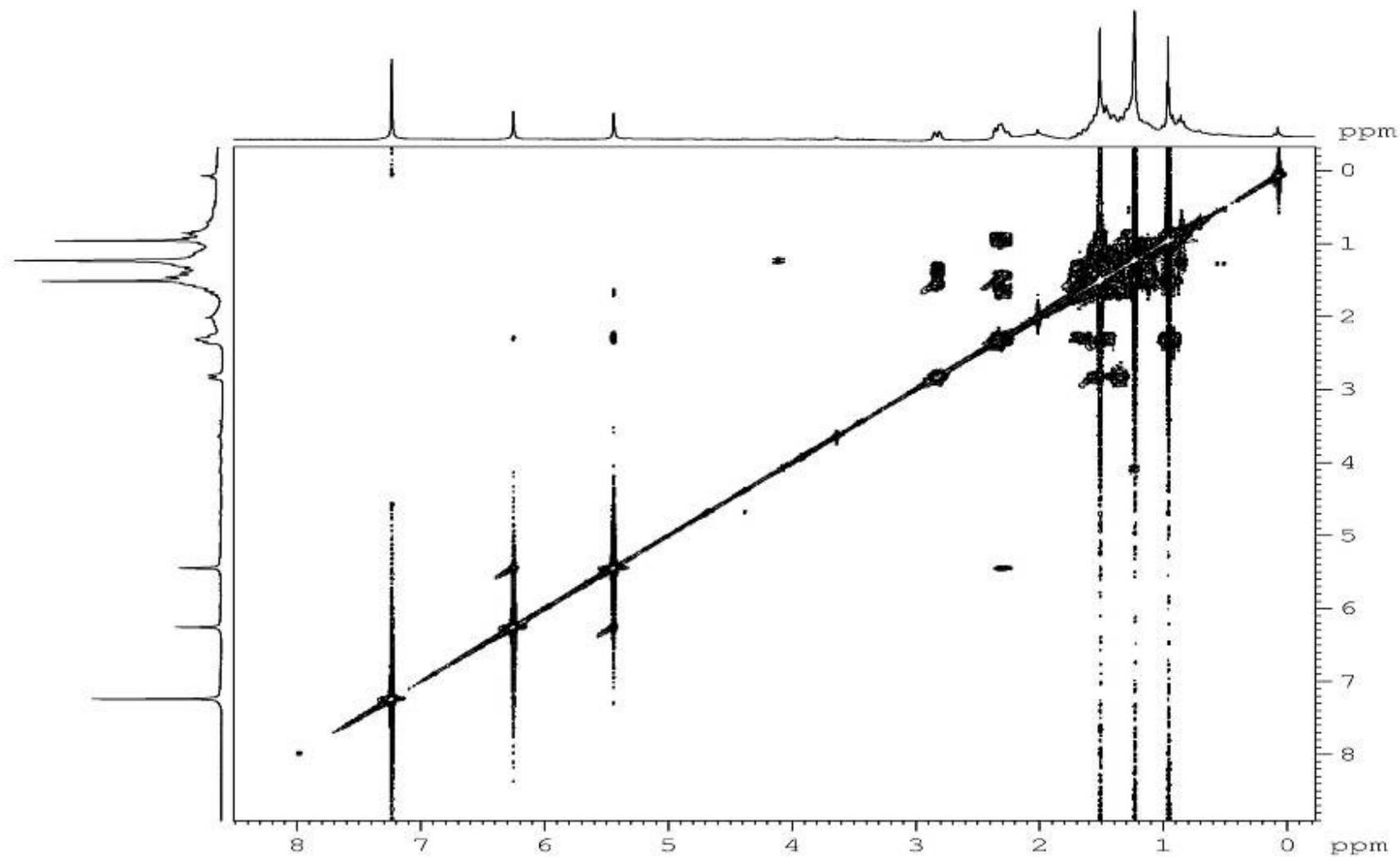
Espectro 12 - HSQC ampliado de 3 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



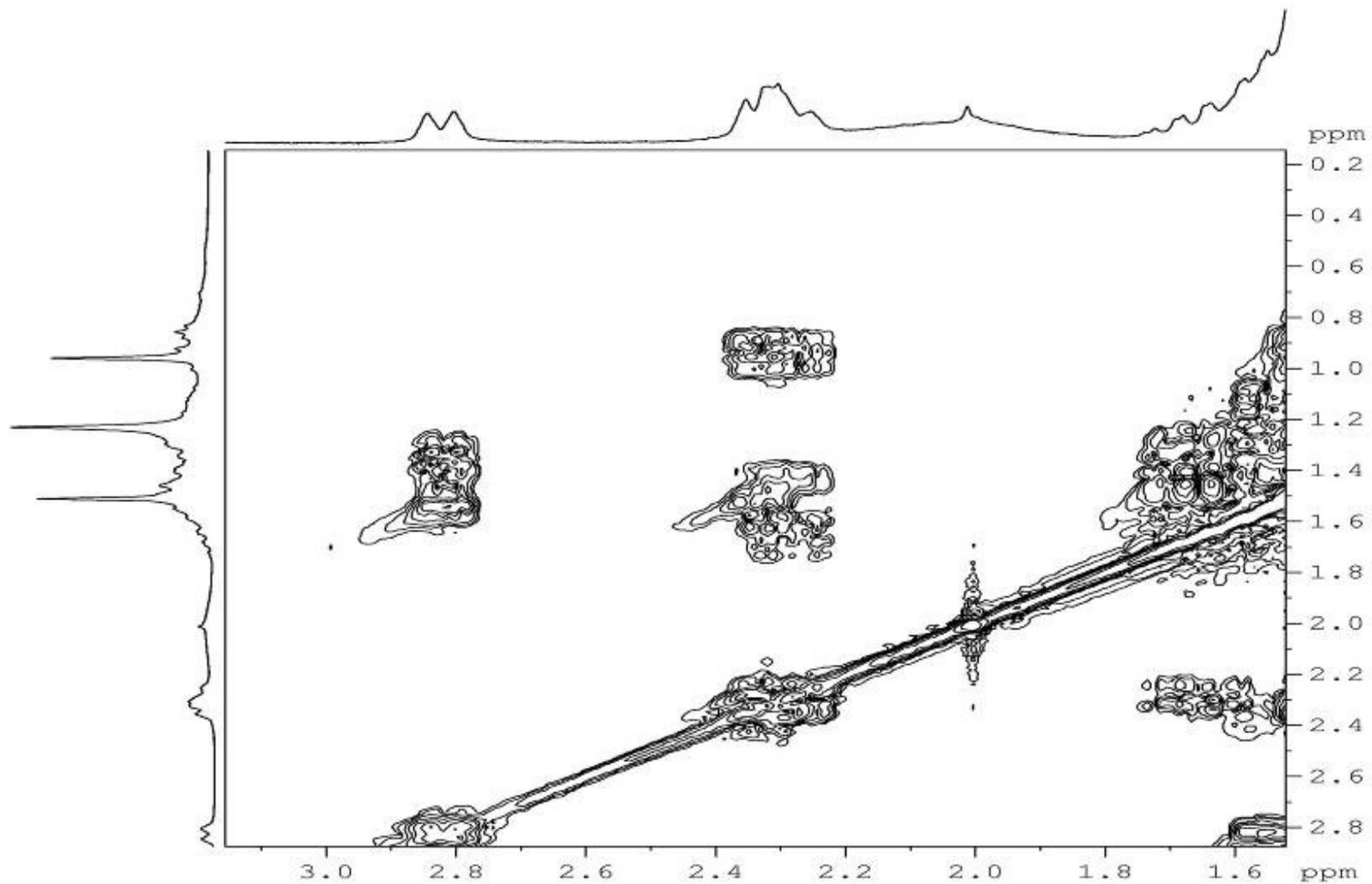
Espectro 13 - HMBC de 3 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 14 – HMBC ampliado de **3** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

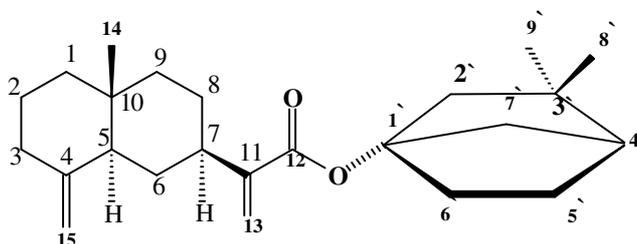


Espectro 15 - COSY de **3** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

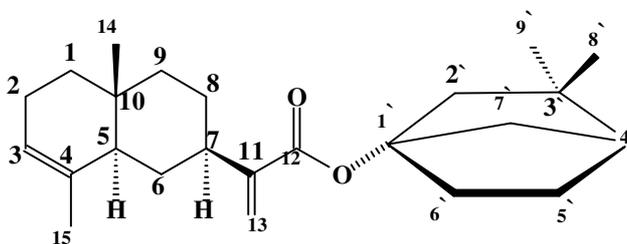


Espectro 16 - COSY ampliado de **3** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.4 Determinação estrutural dos compostos 4 e 5



Costoato de 10-nor-fenchanoíla (4)



Eudesman-3,11(13)-dien-12-oato de nor-fenchanoíla (5)

Em observação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 17, Tabela 9**) da fração NCC1234H6, proveniente do extrato etanólico das cascas de *N. cissiflora* (**parte experimental 3.4 e 3.5.3**), foi verificada a presença de uma mistura complexa de substâncias. Os sinais típicos do ácido cóstico (composto **1**) ainda persistiam, o que pôde ser caracterizado pela presença dos singletos largos observados  $\delta$  4,65 e 4,35, atribuídos aos hidrogênios em C-15 e também pelos singletos largos a  $\delta$  6,29 e 5,64, atribuídos aos hidrogênios em C-13. Os sinais correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-13 do composto **2** [12-carboxieudesman-3,11(13)-diene] também foram identificados neste espectro ( $\delta$  5,28; 6,29 e 5,64). Os hidrogênios da metila-14 presente no esqueleto dos compostos **1** e **2** foram caracterizados pelos singletos a  $\delta$  0,69 e 0,77, respectivamente, assim como os hidrogênios da metila-15 do esqueleto de **2** ( $\delta$  1,55). A intensidade relativa dos sinais dos hidrogênios em C-15 (composto **1**) e em C-13 (compostos **1** e **2**) é praticamente de 1:2, o que é mais um indício da presença do esqueleto do sesquiterpeno **2**.

Este espectro mostrou ainda dois singletos largos a  $\delta$  6,01 e 5,41, os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos em C-13 presentes nos compostos **4** e **5**. A diferença

observada entre os valores de deslocamento químico destes hidrogênios, quando comparados com os valores observados para os mesmos hidrogênios nos compostos **1** e **2**, sugeriram a ocorrência de uma esterificação em C-12. Esta proposta pôde ser confirmada pela observação no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 18, Tabela 9**) de um sinal a  $\delta$  166,4 atribuível à carbonila conjugada de éster. A presença no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de sinais adicionais relativos a dois grupos metila a  $\delta$  0,94 e 1,44, aliada aos sinais presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  correspondentes a nove carbonos foram sugestivos de uma outra unidade terpênica esterificada no carbono-12 destes sesquiterpenos.

A caracterização desta unidade terpênica presente nos esqueletos de **4** e **5** pôde ser efetuada pela análise dos sinais observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135° (**Espectro 18 e 19, Tabela 9**), os quais também permitiram definir as estruturas dos quatro principais componentes da mistura.

Assim, os sinais foram divididos em grupos, de acordo com seus respectivos valores de deslocamento químico, multiplicidades e intensidades relativas. Os sinais correspondentes aos carbonos do ácido cóstico (**1**) e 12-carboxieudesma-3,11(13)-dieno (**2**) foram então identificados e pela análise dos sinais restantes, confirmou-se que os compostos **4** e **5** seriam equivalentes, respectivamente, a **1** e **2** esterificados com o mesmo resíduo de um álcool *nor*-monoterpênico. Foram observados sinais para dois carbonos metílicos a  $\delta$  18,7 e 19,1, três carbonos metilênicos na região de 38 a 45 ppm e um mais protegido a  $\delta$  19,6, um carbono metínico a  $\delta$  52,7 e dois carbonos tetrassubstituídos (sendo um deles oxigenado) a  $\delta$  34,8 e 85,7. O valor de deslocamento químico deste último indicou, portanto, o local da esterificação. Estas informações foram compatíveis com a presença de um resíduo derivado de um álcool *nor*-monoterpênico com fórmula  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$ , possuindo um esqueleto bicíclico do tipo fenchano com ausência da metila em C-1, identificado como sendo o 1-*nor*-1-fenchanol. Os valores de deslocamento químico relatados na literatura para álcoois derivados do fenchano corroboraram esta proposta.<sup>113</sup>

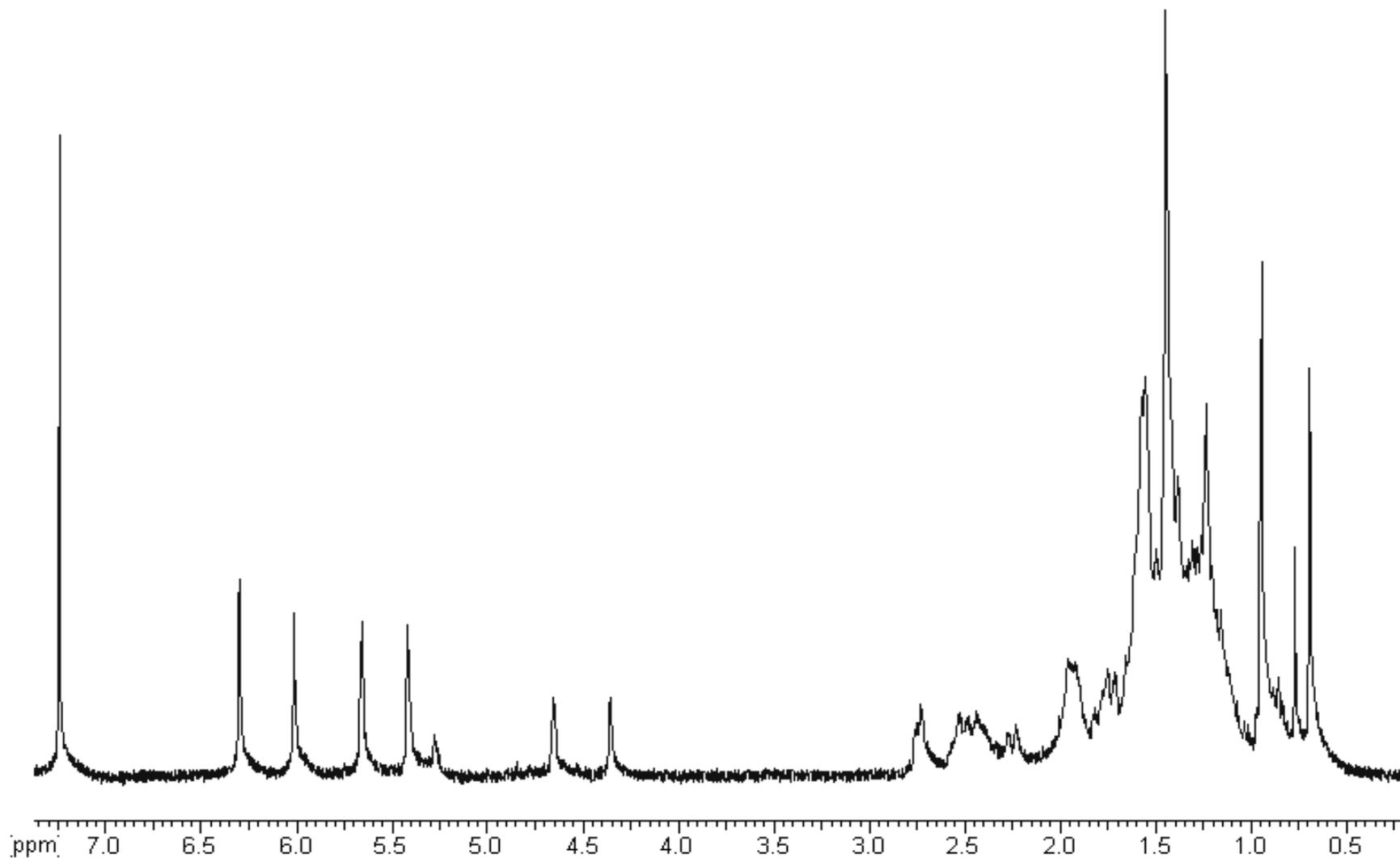
Desta forma, os compostos **4** e **5**, obtidos em mistura com **1** e **2** da fração NCC1234H6, foram caracterizados, respectivamente, como ésteres do ácido cóstico e de 12-carboxieudesma-3,11(13)-dieno com o 1-*nor*-1-fenchanol. A ocorrência de **4** já havia

sendo descrita em uma outra espécie de *Nectandra* estudada em nosso laboratório (*N. cuspidata*).<sup>48</sup>

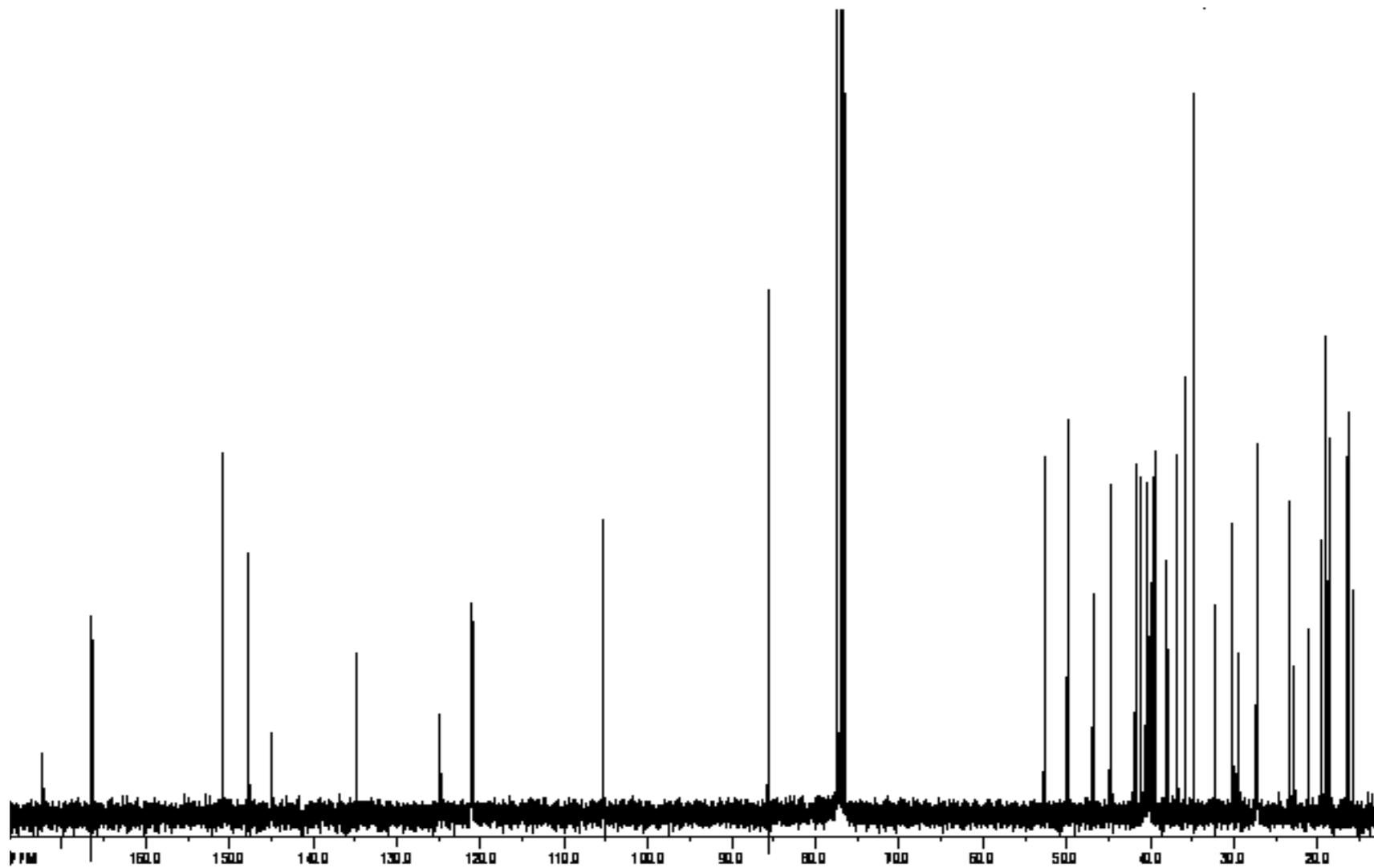
**Tabela 9** - Dados espectrais de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz) e de <sup>1</sup>H (300 MHz, TMS δ=0, CDCl<sub>3</sub>) de **4** e **5** e dos demais componentes (**1** e **2**) presentes na fração NCC1234H6.

C	Ac. Cístico (1)		Costoato de 10-nor-fenchoila (4)		12- carboxieudesma- 3,11(13)-dieno (2)		Eudesma-3,11(13)- dien- 12-oato de nor- fenchanoíla (5)	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
<b>1</b>	41,8 (CH <sub>2</sub> )		41,8 (CH <sub>2</sub> )		37,8 (CH <sub>2</sub> )		37,8 (CH <sub>2</sub> )	
<b>2</b>	23,4 (CH <sub>2</sub> )		23,4 (CH <sub>2</sub> )		22,7 (CH <sub>2</sub> )		22,7 (CH <sub>2</sub> )	
<b>3</b>	36,7 (CH <sub>2</sub> )		36,7 (CH <sub>2</sub> )		120,9 (CH)	5,28(s)	120,9 (CH)	
<b>4</b>	150,7 (C)		150,7 (C)		134,9 (C)		134,8 (C)	
<b>5</b>	49,9 (CH)		49,9(CH)		46,9 (CH)		46,9 (CH)	
<b>6</b>	30,2 (CH <sub>2</sub> )		30,2 (CH <sub>2</sub> )		29,5 (CH <sub>2</sub> )		29,5 (CH <sub>2</sub> )	
<b>7</b>	39,5 (CH)		40,0 (CH)		40,1 (CH)		40,3 (CH)	
<b>8</b>	27,3 (CH <sub>2</sub> )		27,2 (CH <sub>2</sub> )		27,4 (CH <sub>2</sub> )		27,2 (CH <sub>2</sub> )	
<b>9</b>	41,1 (CH <sub>2</sub> )		41,1 (CH <sub>2</sub> )		40,2 (CH <sub>2</sub> )		40,2 (CH <sub>2</sub> )	
<b>10</b>	35,9 (C)		35,9 (C)		32,3 (C)		32,3 (C)	
<b>11</b>	145,0 (C)		147,7 (C)		145,0 (C)		147,7(C)	
<b>12</b>	172,3 (C)		166,4 (C)		172,3 (C)		166,4 (C)	
<b>13</b>	124,8(CH <sub>2</sub> )	6,29(s) e 5,64(s)	121,1(CH <sub>2</sub> )	6,01(s) e 5,41(s)	124,8 (C)	6,29(s) e 5,64(s)	121,2 (CH <sub>2</sub> )	6,01(s) e 5,41(s)
<b>14</b>	16,4 (CH <sub>3</sub> )	0,69(s)	16,4 (CH <sub>3</sub> )		15,7 CH <sub>3</sub> )	0,77(s)	15,7 (CH <sub>3</sub> )	
<b>15</b>	105,4(CH <sub>2</sub> )	4,65(s) e 4,35(s)	105,4(CH <sub>2</sub> )		21,1(CH <sub>3</sub> )	1,55(s)	21,1 (CH <sub>3</sub> )	
<b>1'</b>			85,7 (C)				85,7 (C)	

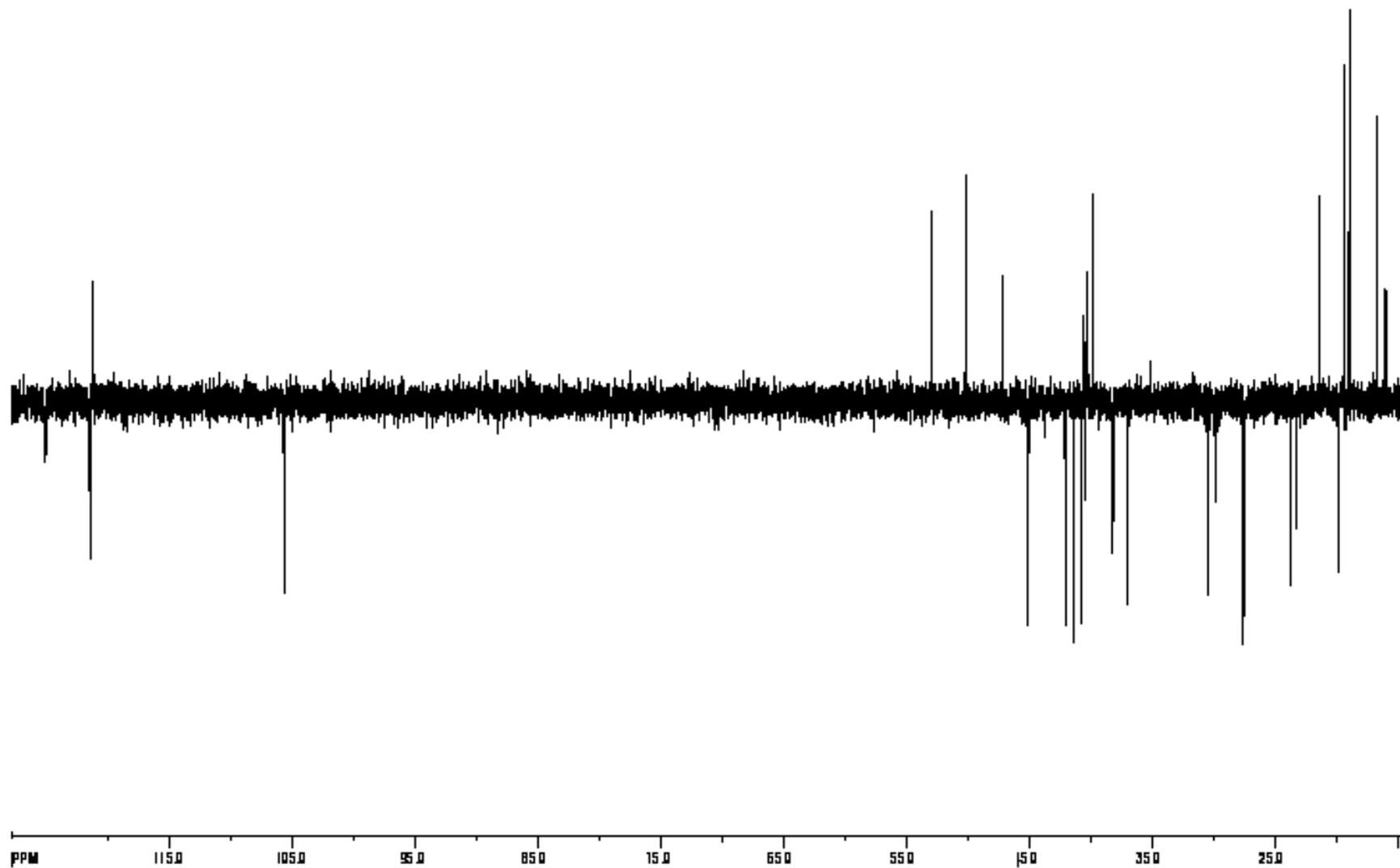
2			44,8 (CH <sub>2</sub> )				44,8 (CH <sub>2</sub> )	
3			34,8 (C)				34,8 (C)	
4			52,7 (CH)				52,7 (CH)	
5			19,6 (CH <sub>2</sub> )				19,6 (CH <sub>2</sub> )	
6			38,0 (CH <sub>2</sub> )				38,0 (CH <sub>2</sub> )	
7			40,5 CH <sub>2</sub> )				40,5 CH <sub>2</sub> )	
8			19,1 (CH <sub>3</sub> )	0,94(s)			19,1 (CH <sub>3</sub> )	0,94(s)
9			18,7 (CH <sub>3</sub> )	1,44(s)			18,7 (CH <sub>3</sub> )	1,44(s)



**Espectro 17** – RMN de <sup>1</sup>H da mistura de **4 e 5** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>).

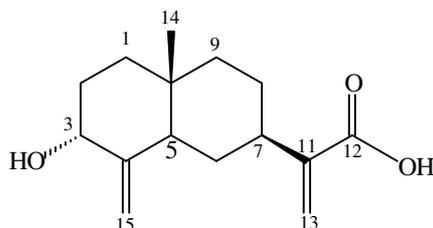


Espectro 18 – RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de 4 e 5 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Espectro 19 - DEPT 135° de 4 e 5 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.5 Identificação do composto 6



Ácido víscico (6)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração NCC15RSR-H2 (**parte experimental 3.4 e 3.5.4**) apresentou os sinais característicos dos sesquiterpenos de esqueleto eudesmano, observados nos espectros das amostras anteriormente discutidas e assemelharam-se principalmente aos sinais atribuídos ao ácido cóstico (composto **1**). No entanto, a região mais desprotegida do espectro mostrou algumas peculiaridades, o que sugeria a inserção de algum grupamento funcional que viria a ser responsável por estas alterações, como por exemplo, a presença de um singlete largo a 4,29  $\delta$  não observado até então nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 20, Tabela 10**) dos sesquiterpenos anteriores.

A natureza deste grupo funcional pôde ser definida pela observação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de DEPT  $135^\circ$  (**Espectros 21 e 22, Tabela 11**), onde um sinal com deslocamento químico de a 73,5  $\delta$  caracterizava um carbono hidroximetínico.

Os valores de deslocamento químico e multiplicidades dos demais sinais presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  eram muito próximos aos atribuídos aos carbonos do ácido cóstico (composto **1**), principalmente os do anel B e os da cadeia lateral em C-7.

As diferenças mais significativas foram observadas com relação ao anel A onde se inseria a hidroxila, que viria a influenciar os deslocamentos químicos dos carbonos de toda a sua vizinhança. Os experimentos bidimensionais permitiram a localização exata da hidroxila no carbono C-3. Assim, por meio das correlações observadas no espectro HSQC (**Espectro 23**), foi possível verificar que o singlete largo a 4,29  $\delta$  era referente a um hidrogênio ligado a um carbono a 73,5  $\delta$ , sinal este atribuído ao carbono carbinólico citado

anteriormente. Com base nas correlações presentes no espectro HMBC, pôde-se verificar que este hidrogênio se relacionava com os carbonos a 35,6  $\delta$  (C-2), 43,7  $\delta$  (C-5), 109,1  $\delta$  (C-15) e 151,4  $\delta$  (C-4), o que justificou a localização do grupo hidroxila em C-3. Também neste espectro foram observadas correlações entre os hidrogênios da metila-14 e os carbonos C-1 (35,6  $\delta$ ), C-5 (43,7  $\delta$ ) e C-9 (40,6  $\delta$ ).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a multiplicidade do sinal a 4,29  $\delta$  relativo a H-3 (singleto largo) possibilitou a definição da orientação deste hidrogênio como sendo equatorial e consequentemente, estabelecer a configuração  $\alpha$  para o grupo hidroxila. Este fato foi confirmado pelo efeito  $\gamma$  de proteção exercido pela hidroxila sobre C-1 (35,6  $\delta$ ) e C-5 (43,66  $\delta$ ), em relação aos sinais observados para C-1 (41,8  $\delta$ ) e C-5 (49,9  $\delta$ ) do ácido cóstico.

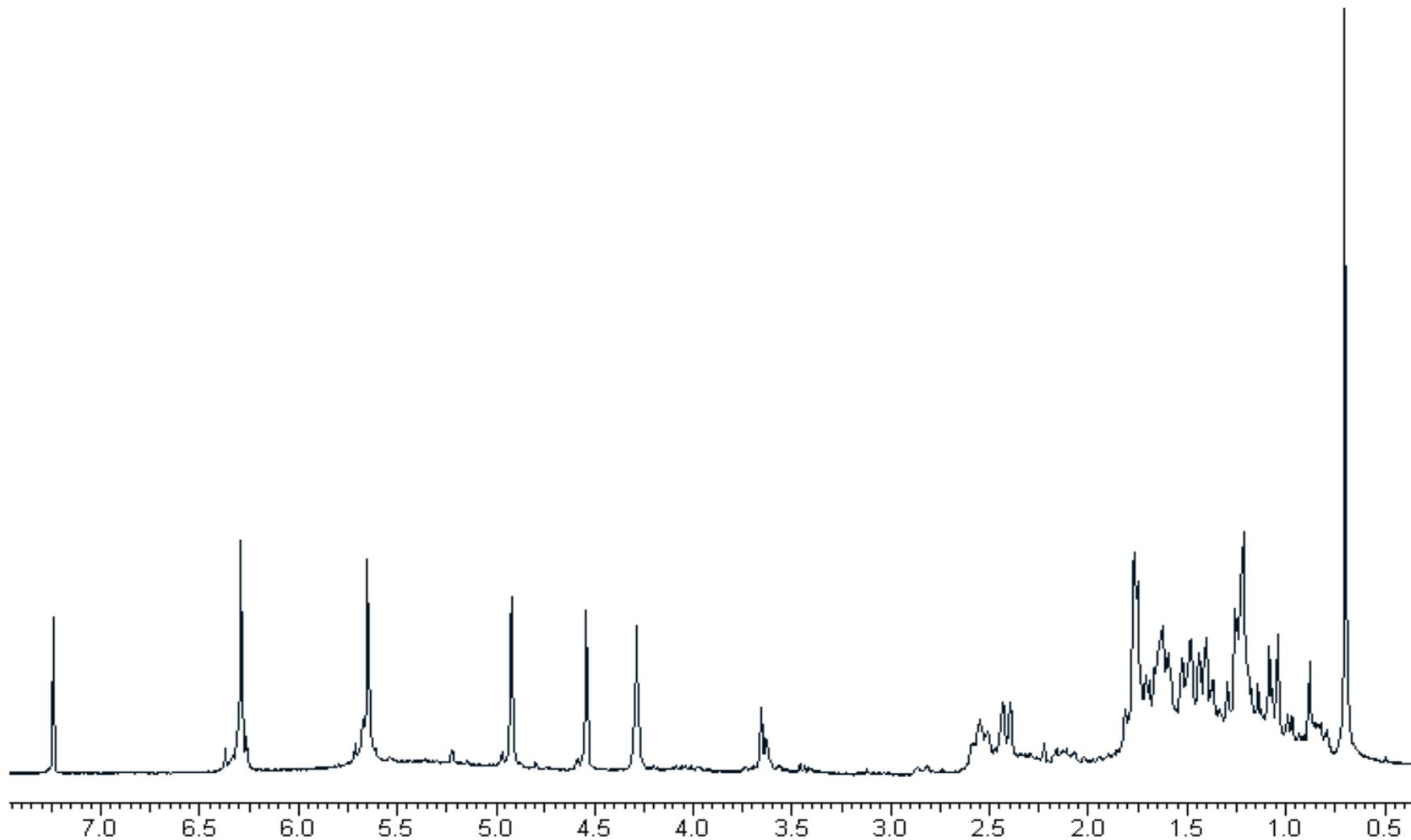
Assim, a estrutura do composto **6** foi caracterizada como sendo correspondente à do ácido 3 $\alpha$ -hidroxicóstico (ácido 3 $\alpha$ -hidroxieudesma-4(15),11(13)-dien-12-óico), também conhecido como ácido víscico. O ácido víscico foi isolado anteriormente de *Inula viscosa* (sinonímia *Dittrichia viscosa*)<sup>114</sup> e *Inula graveolens* (sinonímia *Dittrichia graveolens*)<sup>103</sup>, espécies pertencentes à família Asteraceae. Este, portanto, é o primeiro relato da ocorrência deste sesquiterpeno na família Lauraceae. Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6** também estão sendo descritos pela primeira vez.

**Tabela 10** - Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **6**.

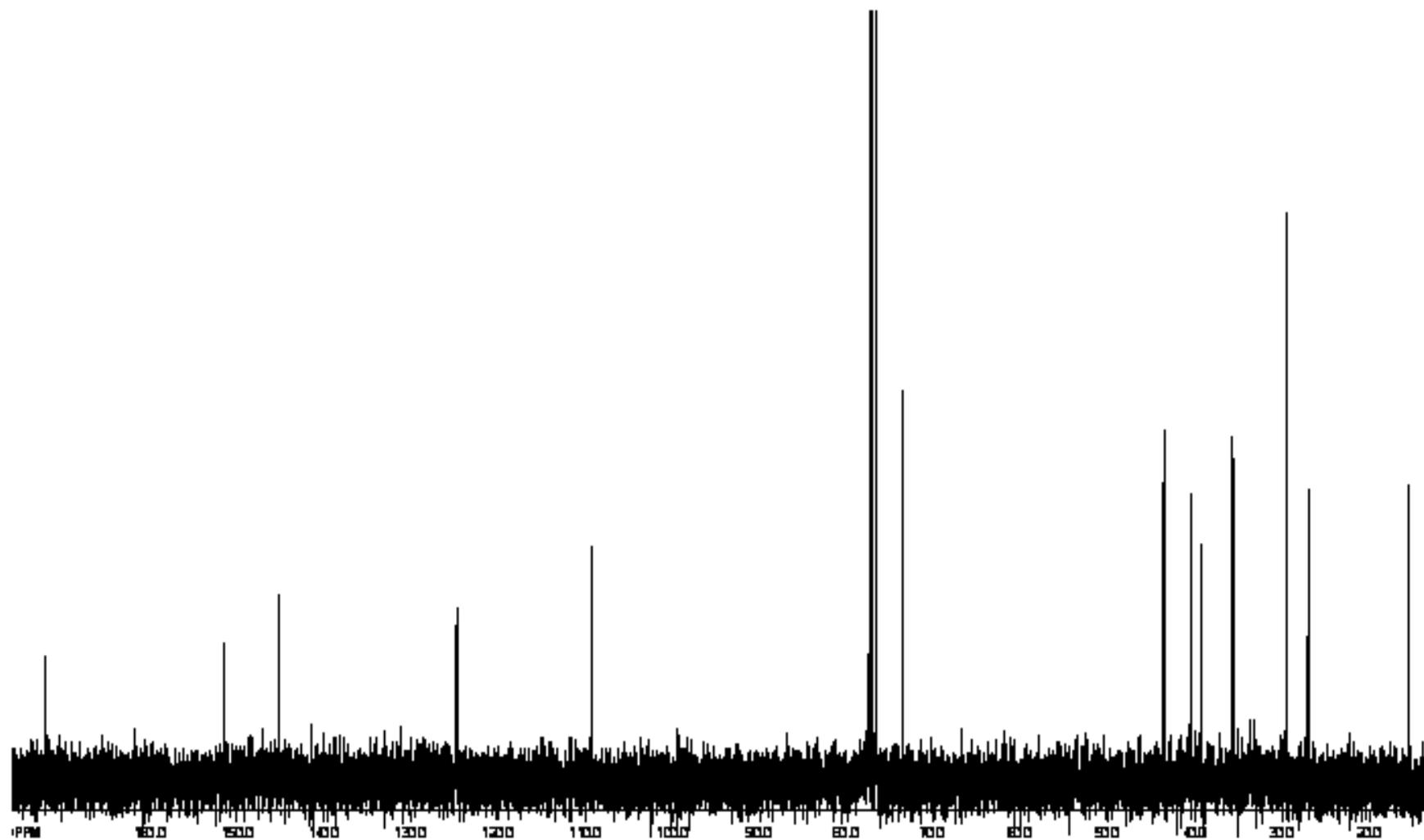
H	$\delta_{\text{H}}$ [m, J(Hz)]	$\delta_{\text{H}}$ lit <sup>115</sup>
<b>3</b>	4,29 (sl)	4,37 (t, 2,5)
<b>13</b>	6,29 e 5,65 (s)	6,31 (sl) e 5,68 (sl)
<b>14</b>	0,70 (sl)	0,73 (s)
<b>15</b>	4,54 e 4,92 (sl)	4,56 (sl) e 4,94 (sl)

**Tabela 11** - Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **6**.

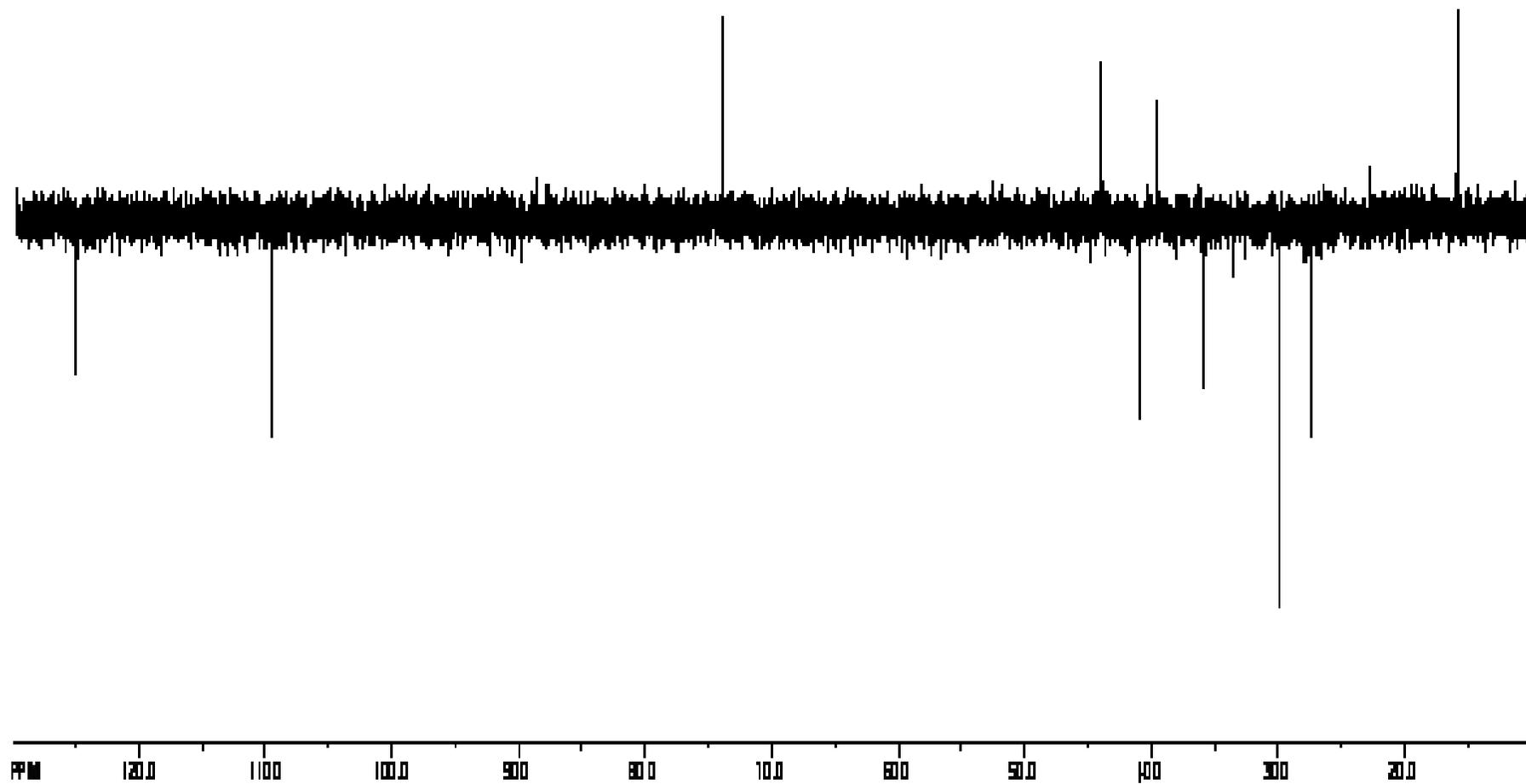
Posição	$\delta^{13}\text{C}$
1	29,6(CH <sub>2</sub> )
2	35,6(CH <sub>2</sub> )
3	73,5(CH)
4	151,5(C)
5	43,7(CH)
6	29,6(CH <sub>2</sub> )
7	39,3(CH)
8	27,1(CH <sub>2</sub> )
9	40,6(CH <sub>2</sub> )
10	35,8(C)
11	145,1(C)
12	172,0(C)
13	124,75(CH <sub>2</sub> )
14	15,5(CH <sub>3</sub> )
15	109,2(CH <sub>2</sub> )



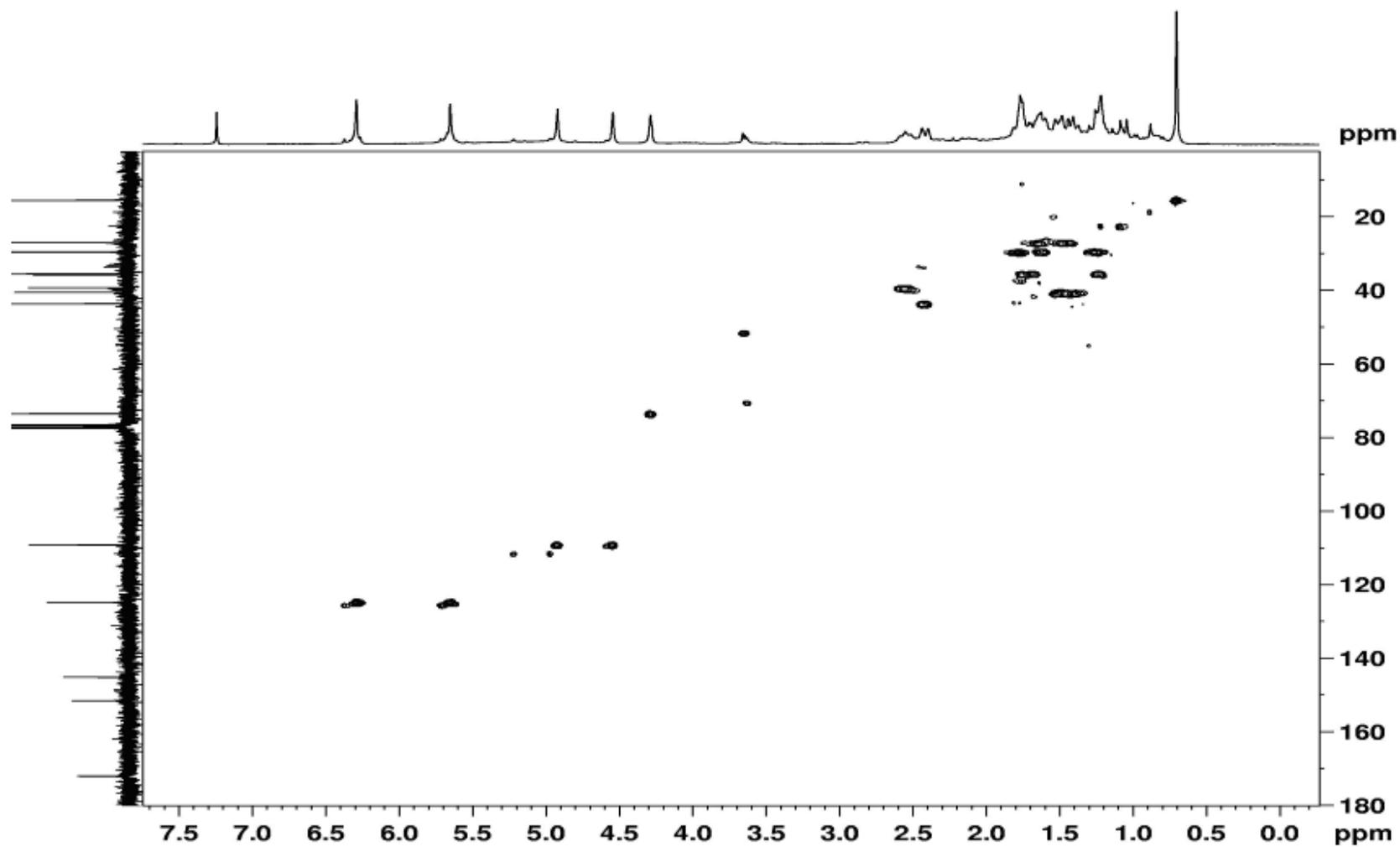
**Espectro 20:** RMN de <sup>1</sup>H do composto **6** (300MHz, CDCl<sub>3</sub>).



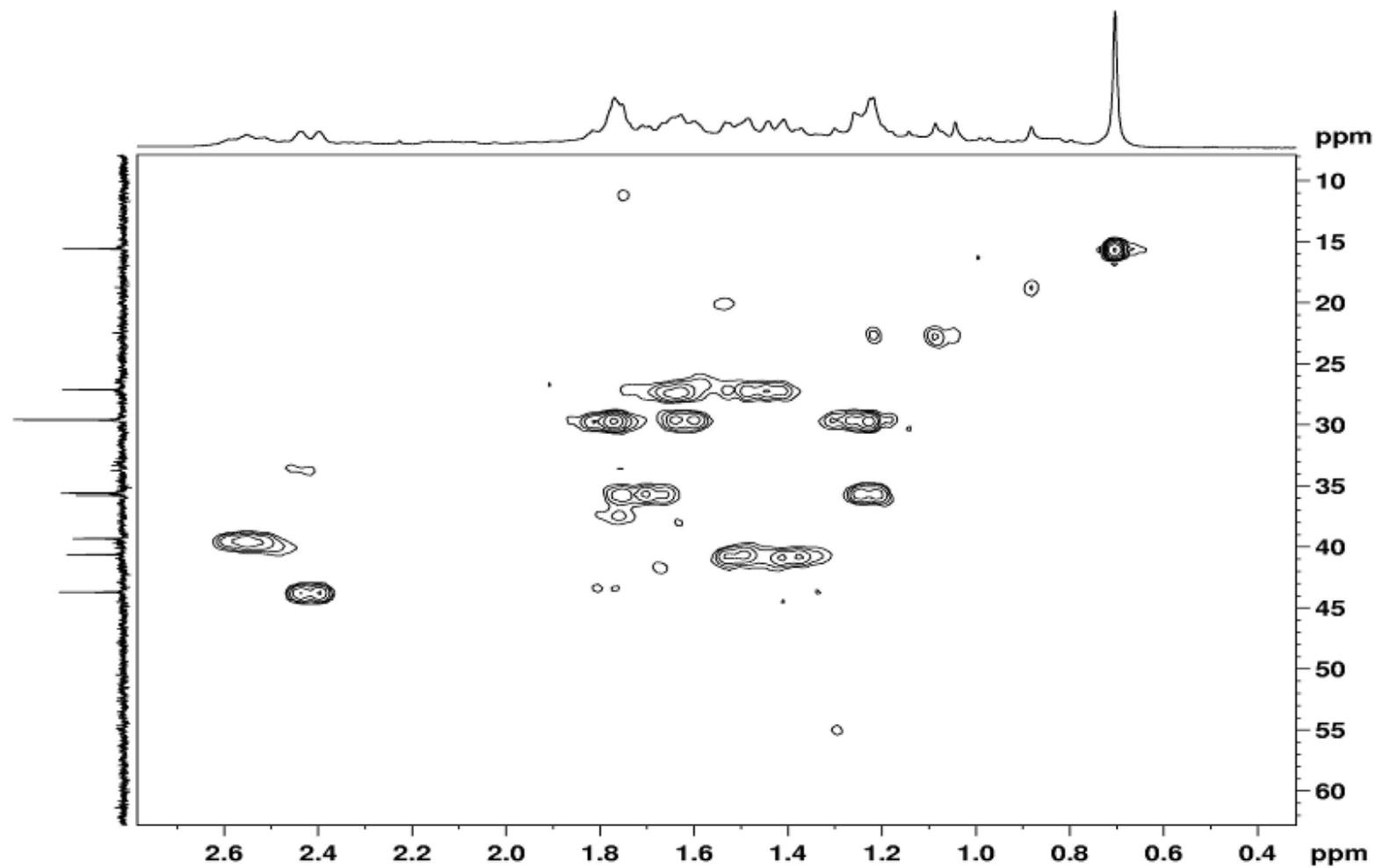
Espectro 21 - RMN de <sup>13</sup>C do composto 6 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



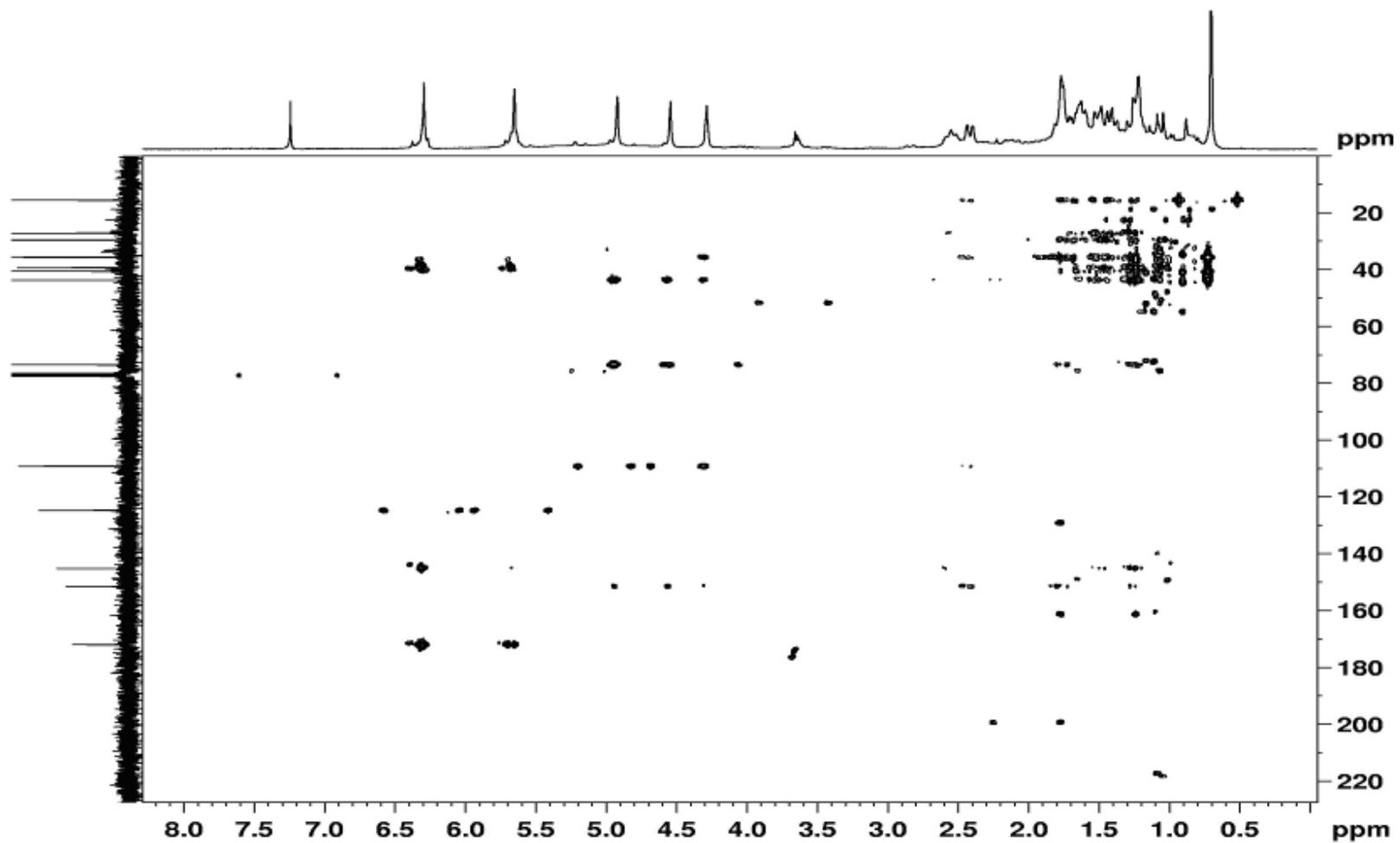
Espectro 22 - DEPT 135° de 6 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



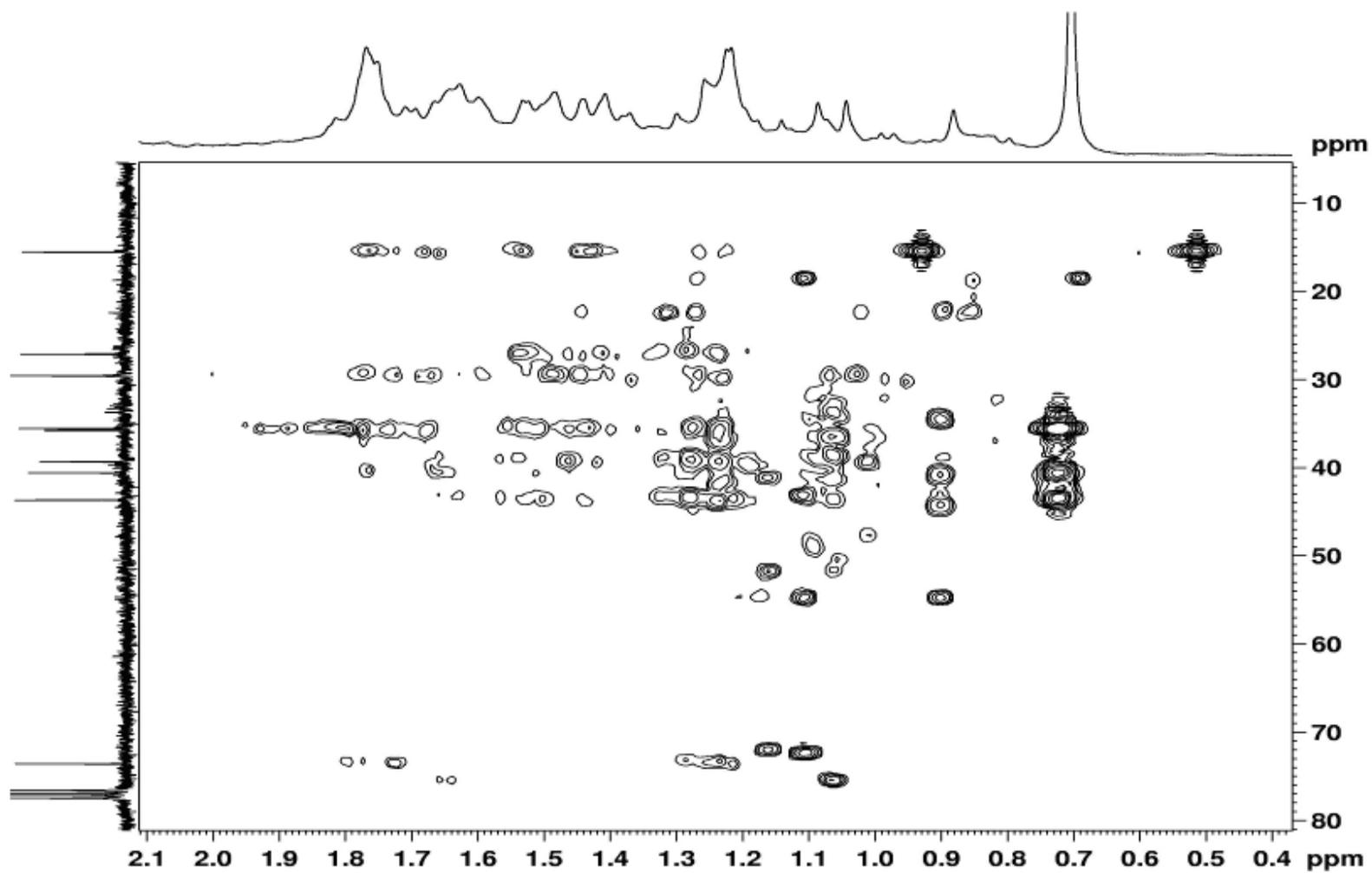
Espectro 23 - HSQC de **6** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 24 - HSQC ampliado de **6** (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

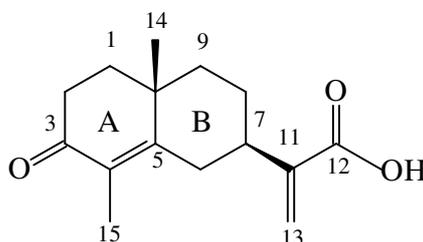


Espectro 25 - HMBC de 6 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 26 - HMBC ampliado de 6 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.6- Identificação do composto 7



Ácido 3-Oxo- $\gamma$ -cóstico (7)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 27 e 28, Tabelas 12 e 13**) da fração NCC15RSR-H1 (**Parte Experimental 3.4 e 3.5.4**) revelaram que o material tratava-se de uma mistura. Foram identificados nestes espectros os sinais relativos aos hidrogênios e carbonos do ácido víscico (composto **6**) e após a exclusão destes, os sinais remanescentes foram atribuíveis aos de um outro sesquiterpeno também possuindo esqueleto eudesmano.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram observados dois singletos relativos a grupos metila, a  $\delta$  1,21 e 1,74 (metila vinílica), de maneira semelhante aos sinais observados para o composto **2**. No espectro HSQC estes sinais apresentaram correlações com os sinais a  $\delta$  22,4 e 10,9, os quais foram atribuídos a C-14 e C-15, respectivamente. Também neste espectro, as correlações observadas entre os sinais a  $\delta$  5,71 e 6,36 com o sinal a  $\delta$  125,4 confirmaram a atribuição dos hidrogênios em C-13.<sup>115</sup>

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de DEPT 135° (**Espectro 30**) destacaram-se os sinais a  $\delta$  199,4 (C), atribuível ao carbono de uma carbonila cetônica e os sinais a  $\delta$  161,4 (C) e 129,1 (C), indicativos da presença de uma ligação dupla tetrassubstituída, sendo o primeiro sinal sugestivo de um carbono olefínico  $\beta$  à carbonila. Tratando-se destes os sinais diferenciais em comparação com os dos demais sesquiterpenos discutidos até o presente momento, a partir do esqueleto sesquiterpênico eudesmano e com o auxílio do espectro de HMBC, foram propostas as possíveis localizações destes grupos funcionais no anel A, uma vez que os sinais atribuíveis aos carbonos do anel B e da cadeia lateral em C-7 permaneceram praticamente inalterados em relação aos dos compostos discutidos anteriormente.

Com base informações apresentadas, a única possibilidade da localização no anel A de uma ligação dupla tetrassubstituída  $\beta$  à carbonila seria entre os carbonos C-4 e C-5, com o grupo carbonila situado em C-3. As correlações presentes no espectro HMBC (espectro 30) entre os hidrogênios da metila 15 ( $\delta$  1,74) e com o carbono carbonílico a 199,3 e entre os hidrogênios das metilas 15 e 14 ( $\delta$  1,21) com o carbono olefínico atribuído a C-4 ( $\delta$  161,4) confirmaram a localização da ligação dupla tetrassubstituída entre C-4 e C-5. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , a proteção observada para o carbono da metila 15 ( $\delta$  10,9) em relação ao valor do deslocamento químico de C-15 no composto **2** ( $\delta$  21,1) pode ser justificada pelo efeito  $\gamma$  exercido pela carbonila localizada em C-3 no composto **7**. A atribuição inequívoca dos demais valores de deslocamento químico dos carbonos de **7** foi efetuada com base nas correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC (Espectros **31** e **33**, Tabelas **13**).

A estrutura do sesquiterpeno **7** foi então determinada como a do ácido 3-oxo- $\gamma$ -cóstico, também denominado ácido 3-oxoisocóstico. Esta substância, apesar de ter sido obtida de várias espécies de Asteraceae, está sendo relatada pela primeira vez em uma espécie de Lauraceae.

**Tabela 12-** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto **7**.

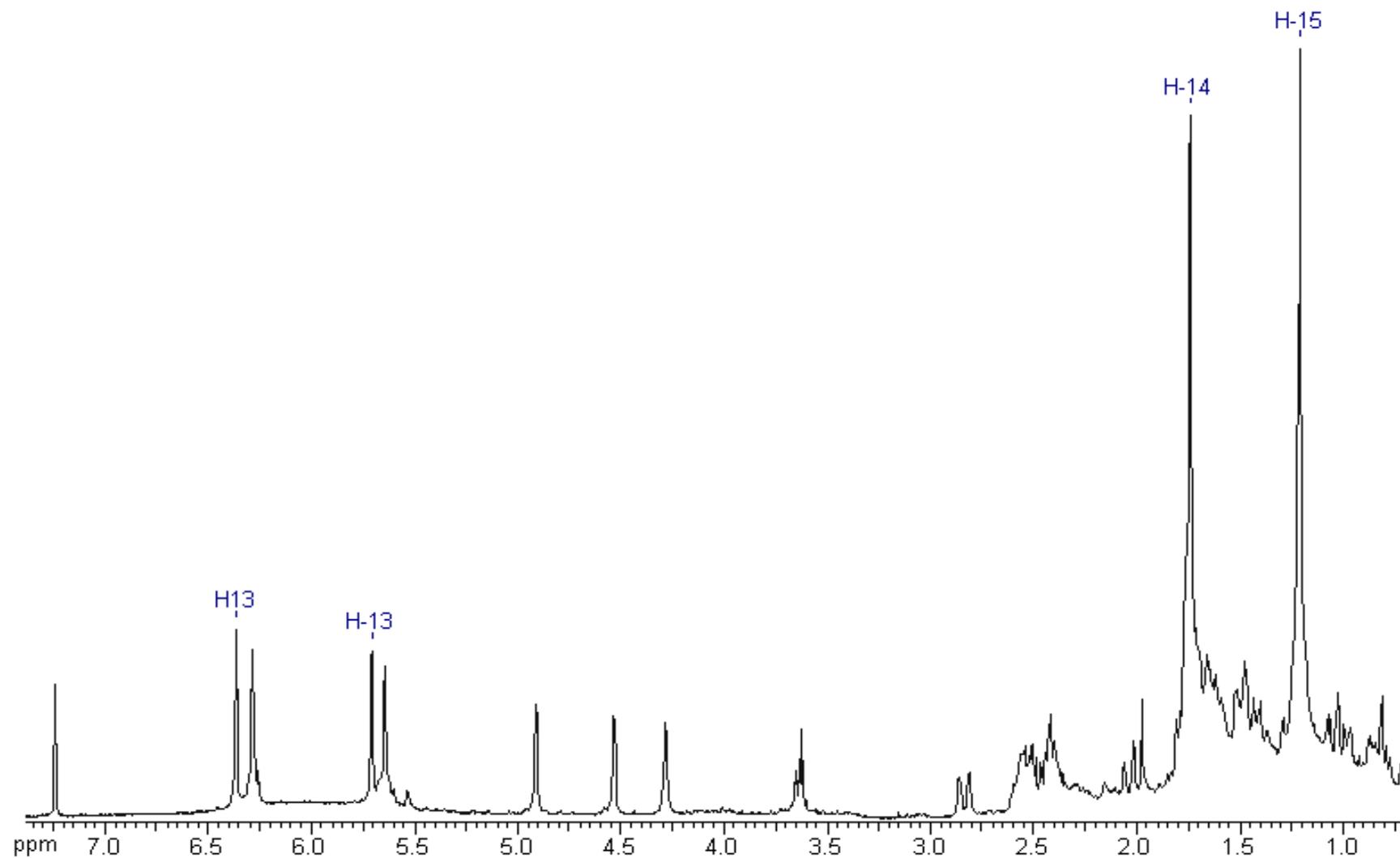
Posição	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H lit}}^{116}$
<b>1</b>	1,70 (m)	1,75-1,80 (m)
<b>2</b>	2,35-2,60 (m)	2,39-2,58 (m)
<b>6</b>	2,02 (tl, $J = 13,5$ ) e 2,83 (dl, $J = 13,5$ )	2,06 (tl, $J = 14$ ) e 2,86 (dl, $J = 14$ )
<b>7</b>	2,55 (m)	2,60 (m)
<b>8</b>	1,45 (m) e 1,68 (m)	1,51 (td, $J = 12,7; 4,4$ ) e 1,70 (m)
<b>9</b>	1,66 (m) e 1,73 (m)	1,75-1,80 (m)
<b>13</b>	5,71 (s) e 6,36 (s)	5,76 (s) e 6,42 (s)
<b>14</b>	1,21 (s)	1,78 (s) *
<b>15</b>	1,74 (s)	1,25 (s) *

\* sinais trocados

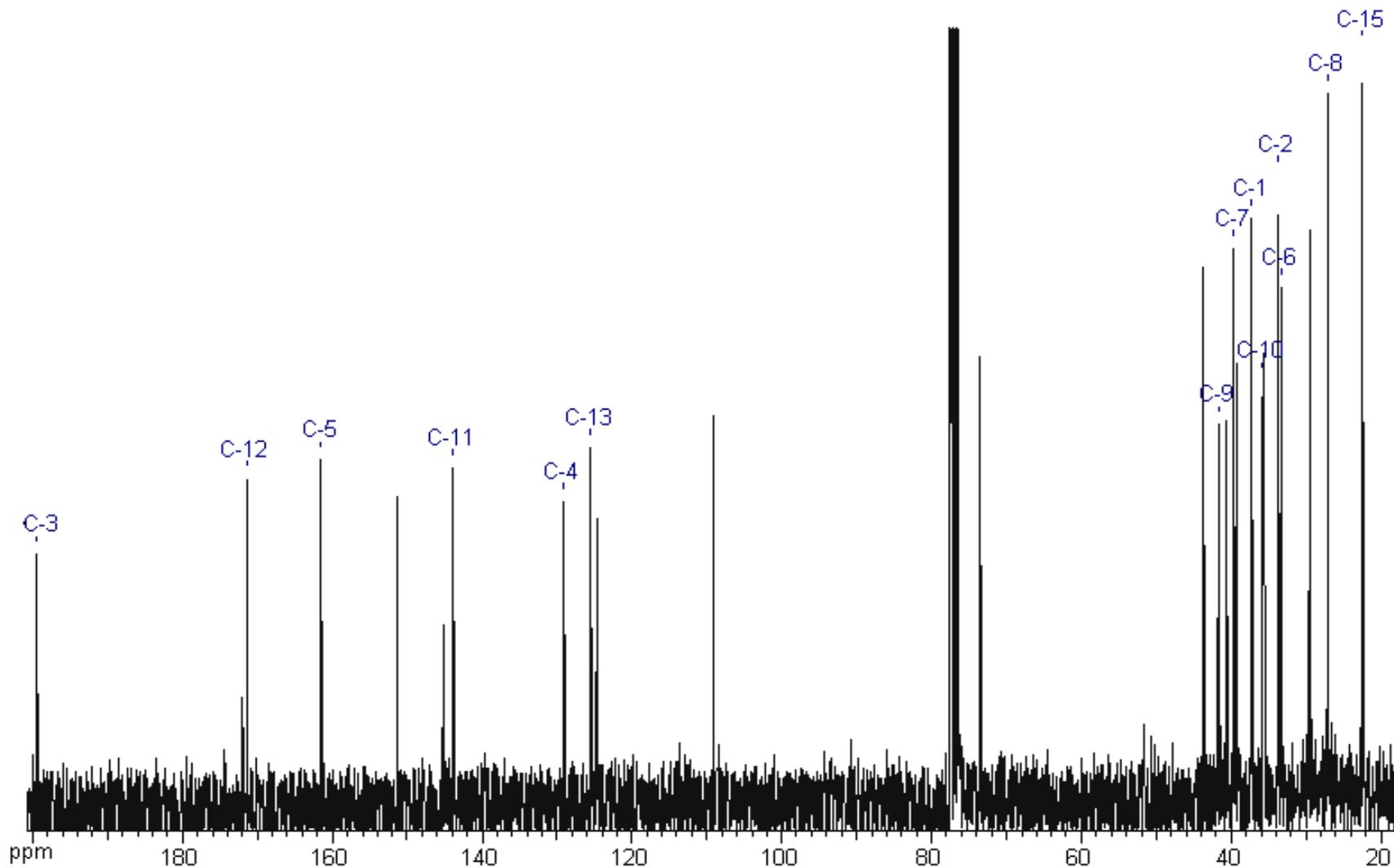
**Tabela 13** - Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) e HMBC do composto 7.

Posição	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ lit <sup>116*</sup>	HMBC
1	37,3(CH <sub>2</sub> )	27.3	C-3
2	33,7(CH <sub>2</sub> )	33.9	C-3, C-4
3	199,4 (C)	198.9	
4	129,1 (C)	129.1	
5	161,4 (C)	160.9	
6	33,3 (CH <sub>2</sub> )	33.4	C-4, C-5, C-7, C-11, C-9, C-13
7	39,7 (CH)	39.8	
8	27,1 (CH <sub>2</sub> )	41.8	
9	41,7 (CH <sub>2</sub> )	37.4	C-7, C-9
10	35,8 (C)	35.9	
11	143,9 (C)	143.6	
12	171,4(C)	171.3	
13	125,4 (CH <sub>2</sub> )	125.6	
14	22,4 (CH <sub>3</sub> )	11.1	C-5
15	10,9 (CH <sub>3</sub> )	22.6	C-3, C-4, C-5

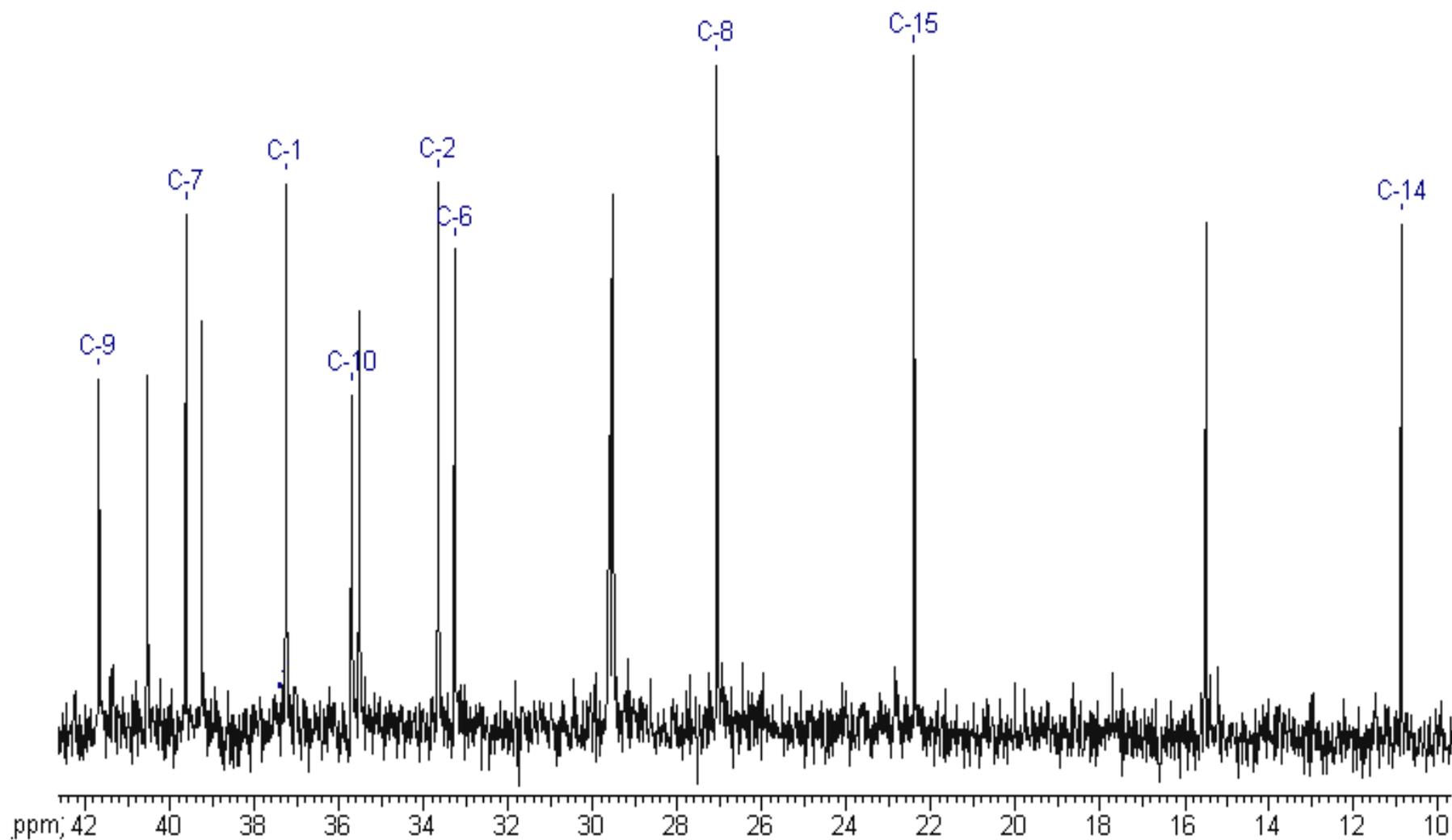
\* Os valores de C-1, C-8, C-9, C-14 e C-15 estão trocados na literatura citada.



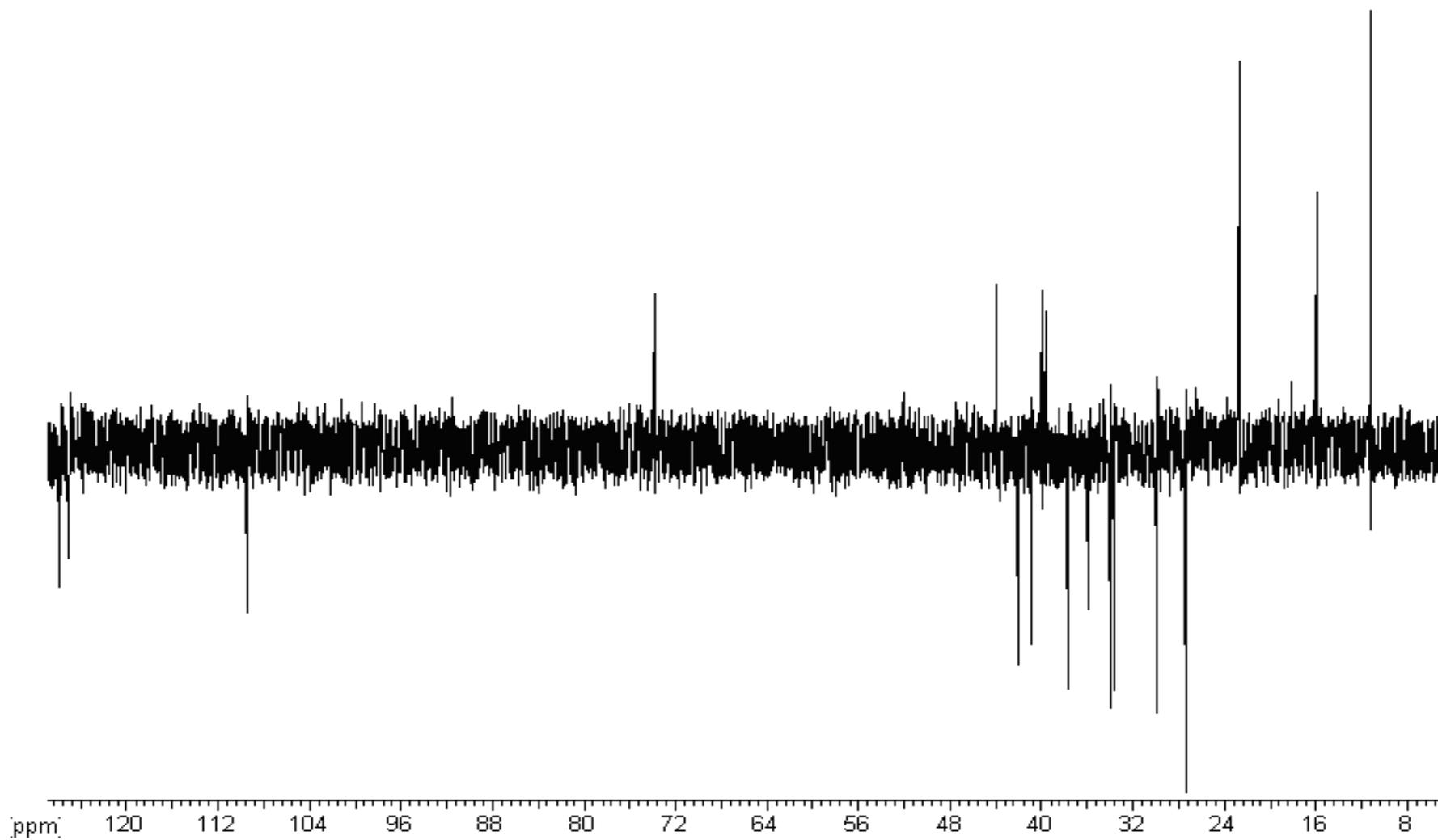
**Espectro 27** - RMN de  $^1\text{H}$  da fração contendo o composto **7** (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



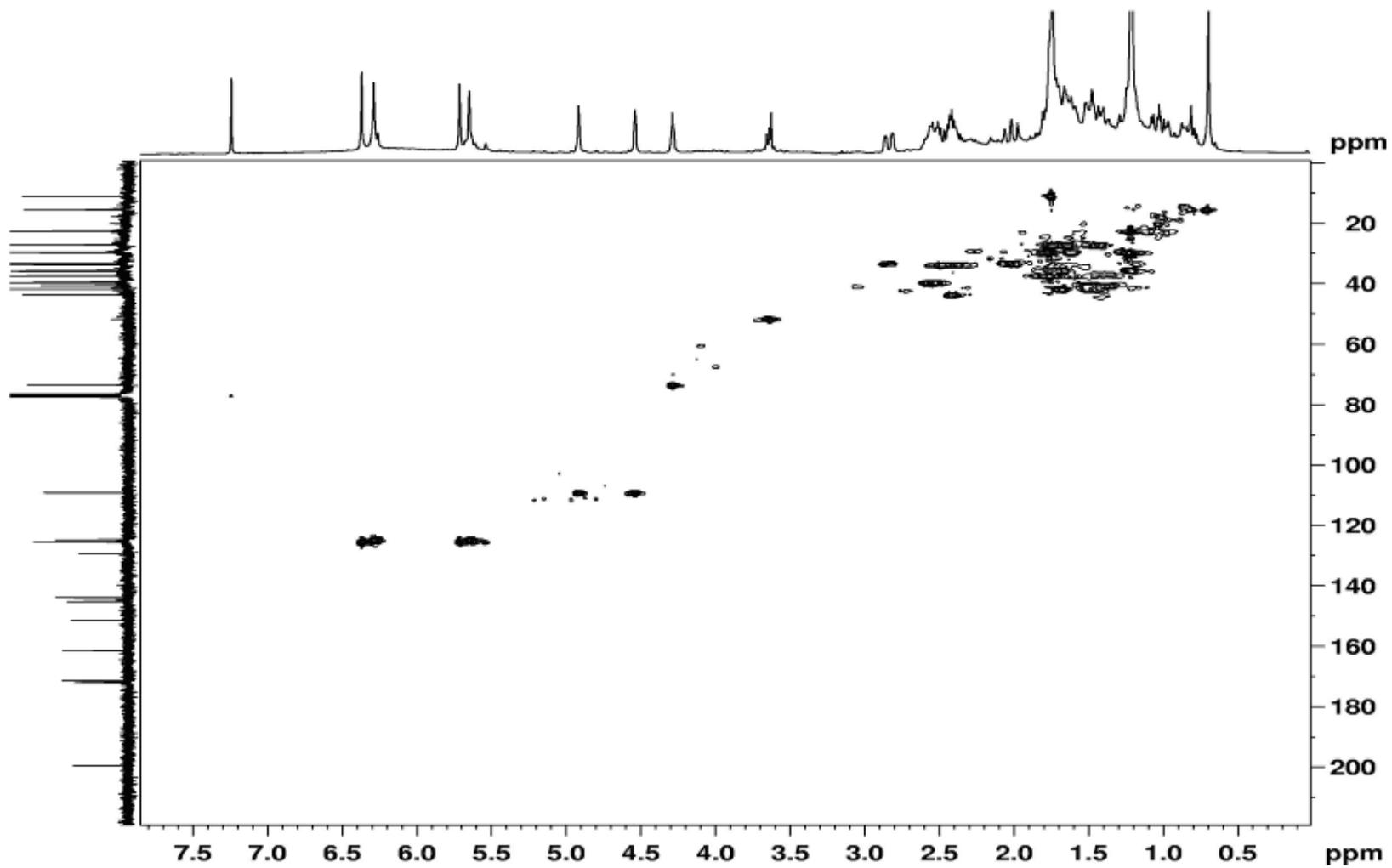
**Espectro 28** - RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração contendo o composto **7** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



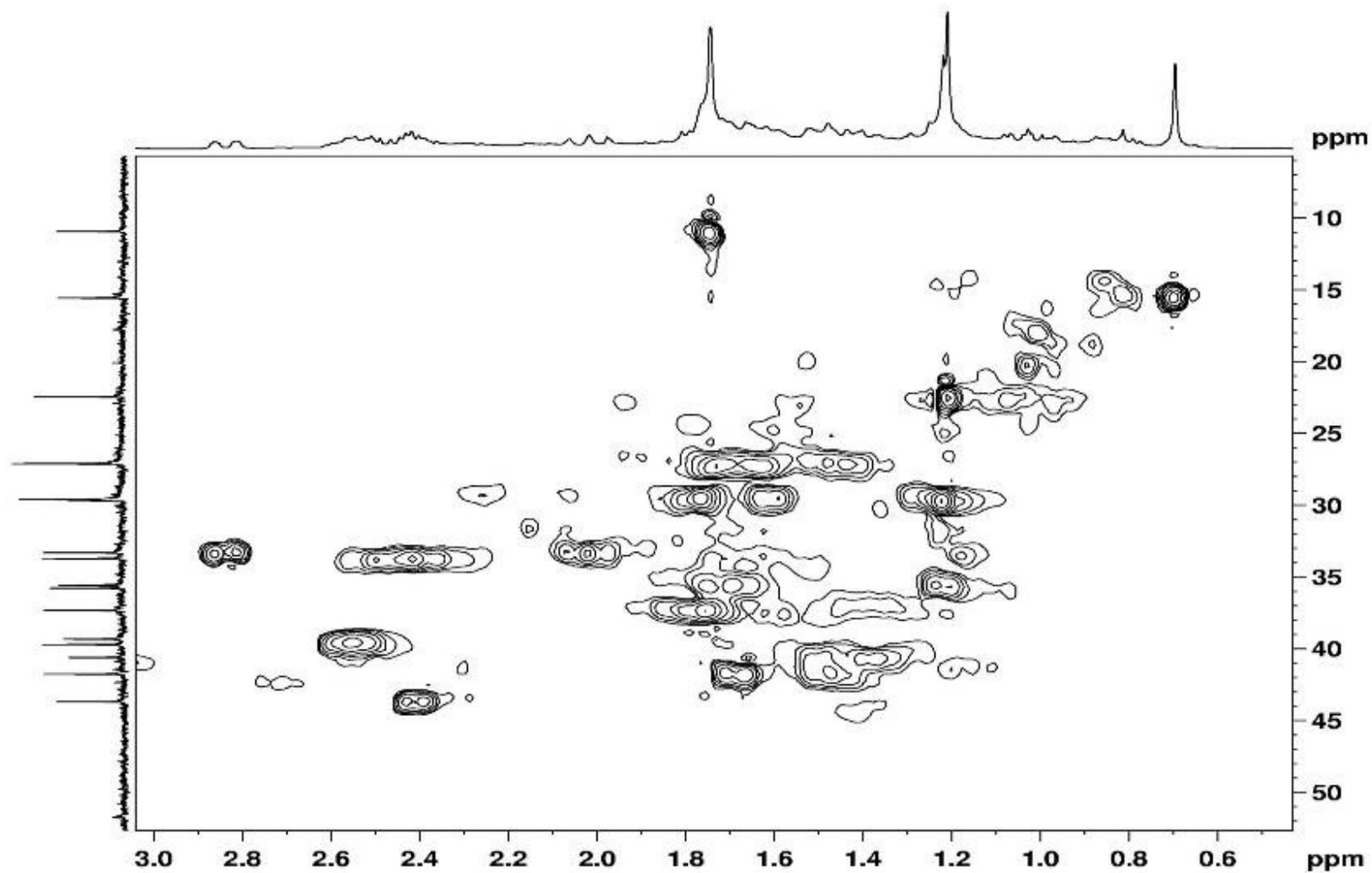
**Espectro 29** - - RMN de <sup>13</sup>C ampliado da fração contendo o composto 7 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



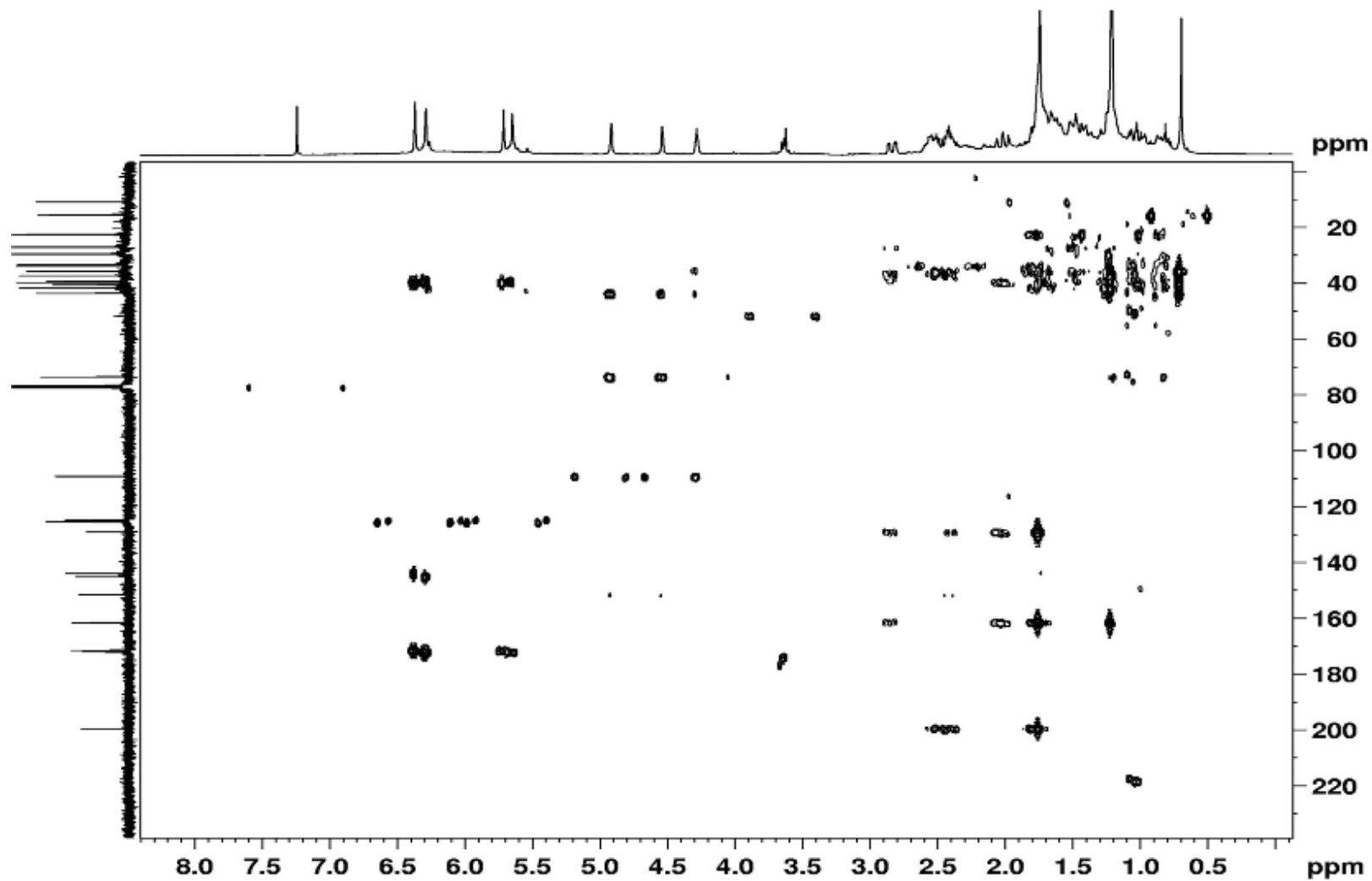
**Espectro 30** - DEPT 135° da fração contendo o composto **7** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



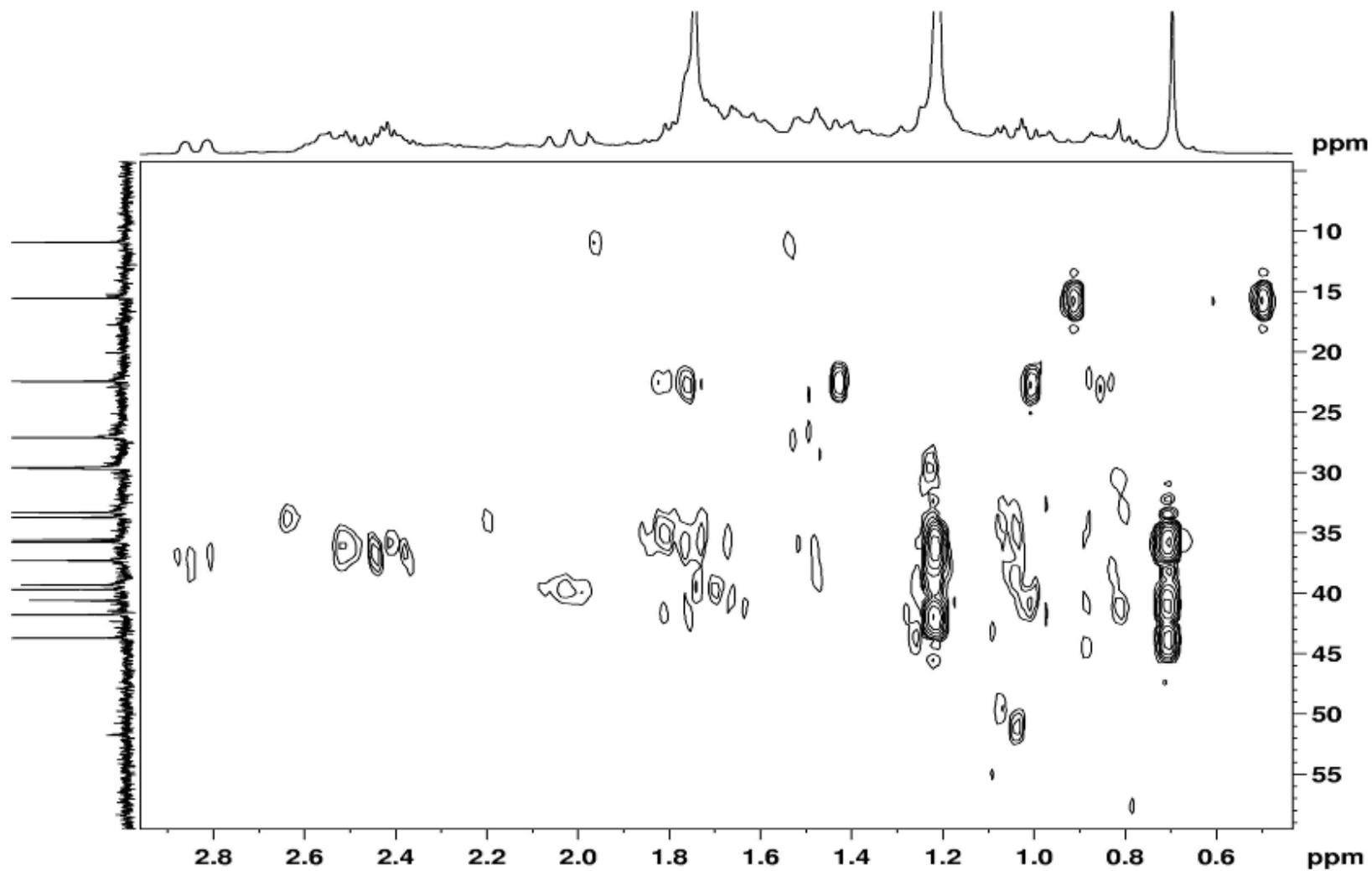
Espectro 31 - HSQC de 7 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 32 - HSQC ampliado de 7 (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

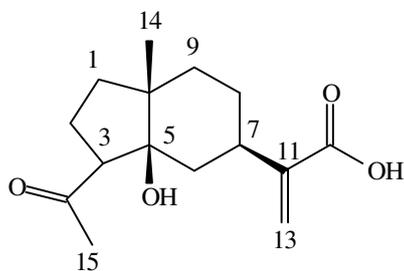


Espectro 33 - HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

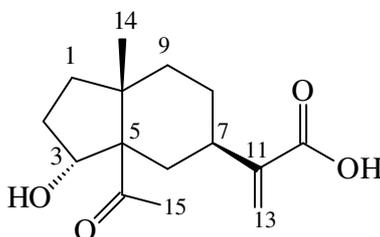


Espectro 34 - HMBC ampliado de 7 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.7- Identificação dos compostos 8 e 9



Ácido 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico **8**



Ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico **9**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 35 e 36, Tabela 14 e 15**) da fração NCCR3SRFS2 (**Parte Experimental 3.4 e 3.5.4**) revelaram que o material tratava-se de uma mistura, da qual foram destacados e elencados os sinais de maior intensidade, formando um grupo de 15 carbonos, tratando-se mais uma vez de um sesquiterpeno.

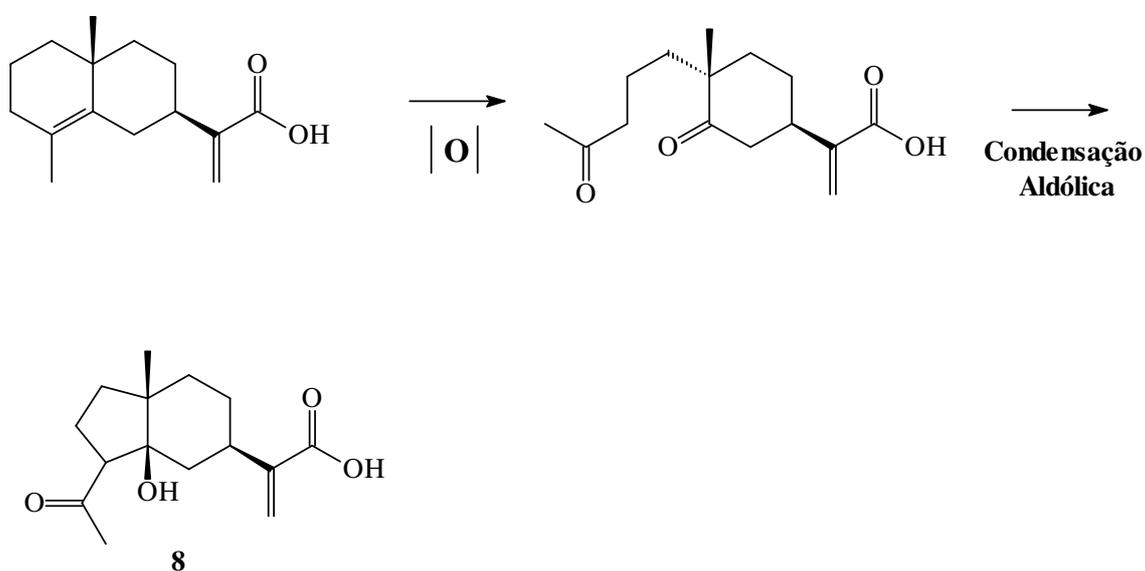
Estes espectros guardavam algumas semelhanças com os já apresentados, principalmente no que se refere aos sinais atribuídos aos carbonos e hidrogênios do anel B e da cadeia lateral em C-7, destacando-se assim no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  os sinais a 5,28  $\delta$  e 5,85  $\delta$ , atribuíveis aos hidrogênios em C-13 e no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  os sinais dos carbonos olefínicos C-11 e C-13 a 151,8  $\delta$  e 117,6  $\delta$ , respectivamente e o correspondente à carboxila a 175,1  $\delta$ . Outros sinais que se destacaram nestes espectros foram dois singletos relativos a hidrogênios metílicos a 0,98  $\delta$  e 2,23  $\delta$  e sinais referentes a um carbono carbonílico a 213,5  $\delta$ , um carbono quaternário oxigenado a 84,8  $\delta$ , além de dois carbonos metílicos a 19,1  $\delta$  e 31,6  $\delta$ .

Tentou-se a princípio montar a estrutura baseando-se no esqueleto eudesmano presente nos demais compostos, porém esta proposta não se mostrou compatível com os sinais presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e com as informações fornecidas pelo espectro DEPT-135 $^{\circ}$  (**Espectro 38**), 5 carbonos quaternários, sendo dois carbonílicos, um oxigenado e um olefínico, 2 carbonos metínicos, 6 metilênicos, sendo um deles olefínico e 2 carbonos metílicos. Tais informações foram indicativas da fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$ , sugerindo portanto um esqueleto bicíclico para este sesquiterpeno.

A presença do singlete referente a uma metila a 2,23  $\delta$  (o qual no espectro HSQC mostrou uma correlação com o sinal a 31,6  $\delta$ ), juntamente com o sinal do carbono carbonílico a 213,5  $\delta$  (o qual apresentou no espectro HMBC correlação com o sinal dos hidrogênios daquela metila) indicaram a presença de um grupo acetila no esqueleto de **8**. Sendo assim, o anel A deste composto seria constituído de cinco membros, estando o grupo acetila ligado a C-3. Esta proposta pôde ser confirmada a partir das correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC (**Espectros 39 e 41, Tabela 14**). Assim, o duplo dubleto a 3,58  $\delta$  ( $J = 9,8$  e  $7,7$  Hz), relativos ao hidrogênio ligado ao carbono a 57,3  $\delta$  e atribuído a H-3, mostrou no espectro HMBC correlações com os sinais do carbono carbonílico a 213,5  $\delta$ , do carbono quaternário oxigenado a 84,8  $\delta$  e do carbono metilênico a 23,3  $\delta$ , compatíveis com a localização do grupo acetila em C-3 e de um grupo hidroxila em C-5. Da mesma forma, a correlação entre os hidrogênios metílicos do grupo acetila e o carbono metilênico C-2 (23,3  $\delta$ ) corroborou esta proposta, assim como a correlação entre os hidrogênios da metila 14 (0,98  $\delta$ ) e o carbono C-5 (84,8  $\delta$ ).

A estrutura de **8** foi então definida como a de um sesquiterpeno bicíclico apresentando um anel B idêntico ao dos demais sesquiterpenóides ácidos descritos nos itens anteriores e um anel A de 5 membros possuindo em C-3 um grupo acetila e em C-5 um grupo hidroxila, além de uma metila em C-10. O esqueleto deste sesquiterpeno seria então correspondente ao de um eudesmano rearranjado pouco comum na natureza e ainda não descrito em Lauraceae, oriundo de uma quebra oxidativa da ligação C-4/C-5 de um precursor sesquiterpênico com esqueleto eudesmano [ácido eudesma-4,11(13)-dien-12-óico], levando a um derivado 4,6-diceto, com posterior condensação aldólica entre C-3 e C-5 (**Figura 15**). A estrutura proposta para **8** mostrou ser idêntica à do sesquiterpeno obtido

anteriormente apenas de uma única espécie de Asteraceae (*Jasonia candicans*) e denominado ácido 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico, cujos dados espectrais não foram, no entanto, publicados.<sup>117</sup> Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **8** foram então comparados com os do éster metílico correspondente **8a** (5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionanoato de metila), obtido de uma outra espécie de Asteraceae, *Ursinia eckloniana*, apresentando uma boa correlação <sup>118</sup>. Assim, o composto **8** está sendo relatado em uma espécie de Lauraceae pela primeira vez, assim como seus dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 10** – Proposta biogênica para a formação do esqueleto do composto **8**

**Tabela 14** - Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **8** e do éster metílico correspondente **8a** obtido de *Ursinia eckloniana* (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>8</b> $\delta_{\text{C}}$	<b>8</b> $\delta_{\text{H}}$ [m, J(Hz)]	<b>8</b> HMBC	<b>8a</b> $\delta_{\text{H}}$ lit <sup>119</sup>
<b>1</b>	38,6* ( $\text{CH}_2$ )			1,48(m) e 1,90(m)
<b>2</b>	23,3 ( $\text{CH}_2$ )	1,90 (m) e 2,20 (m)		1,92(m) e 2,08 (m)
<b>3</b>	57,3 (CH)	3,58 (dd; 9,8 e 7,7)	C-2, C-4, C-5, C-10	3,49 (m)
<b>4</b>	213,5 (C)	-		-
<b>5</b>	84,8 (C)	-		-
<b>6</b>	37,4 ( $\text{CH}_2$ )	1,45 (m) e 1,85 (m)	C-5	1,46(dd) e 1,93(dd)
<b>7</b>	38,0 (CH)	2,81 (tl; 12,0)		2,62(dd)
<b>8</b>	28,6 ( $\text{CH}_2$ )	1,40 (m) e 1,65 (m)		1,32(dd) e 1,62(dd)
<b>9</b>	38,4* ( $\text{CH}_2$ )			1,45(m)
<b>10</b>	47,6 (C)	-		-
<b>11</b>	151,8 (C)	-		-
<b>12</b>	175,1 (C)	-		-
<b>13</b>	117,6 ( $\text{CH}_2$ )	5,28 (s) e 5,85 (s)	C-7, C-11, C-12	5,58(s) e 6,17(s)
<b>14</b>	19,1 ( $\text{CH}_3$ )	0,98 (s)	C-5, C-10	1,03(s)
<b>15</b>	31,6 ( $\text{CH}_3$ )	2,23 (s)	C-3, C-4	2,24(s)
<b>OMe</b>				3,75(s)

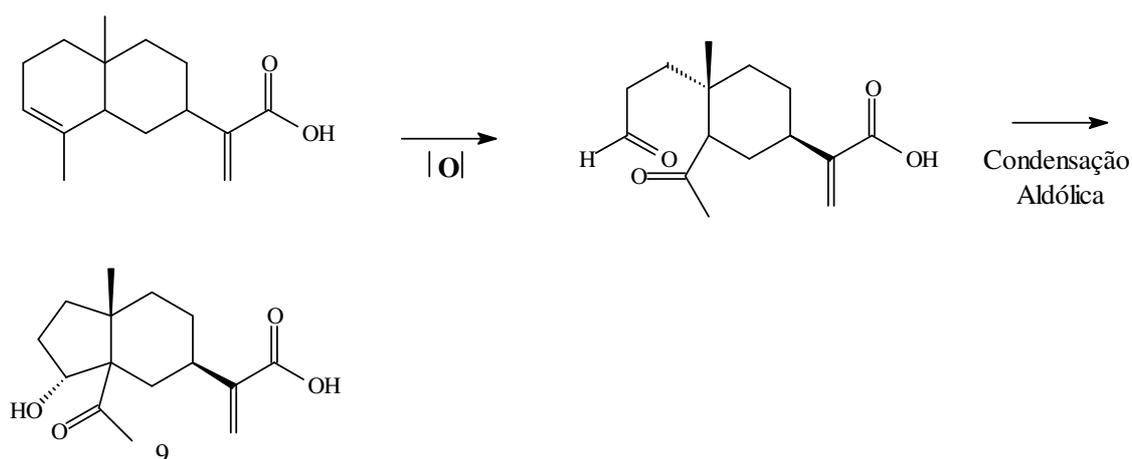
\* valores que podem estar trocados

Os sinais remanescentes nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 35 e 36, Tabela 15**), referentes ao componente presente em menor proporção na mistura (composto **9**) apresentaram pequenas variações em relação aos sinais de **8**, sugerindo que **9** deveria possuir uma estrutura semelhante à de **8**, com o mesmo esqueleto eudesmano rearranjado. Assim, com base nas informações adicionais fornecidas pelos espectros DEPT-135°, HSQC e HMBC, também foram observados nestes espectros sinais atribuíveis à metila-14 ( $\delta_{\text{H}}$  0,98,  $\delta_{\text{C}}$  23,0), à cadeia lateral em C-7 (singletos largos em  $\delta$  5,31 e 5,82 dos hidrogênios H-13a e H-13b e sinais a  $\delta_{\text{C}}$  153,1; 175,1 e 117,6 relativos a C-11, C-12 e C-13, respectivamente) e ao grupo acetila (singlete a  $\delta_{\text{H}}$  2,15 e sinais a  $\delta_{\text{C}}$  217,0 e 30,2). Além destes, foi verificada a presença de um duplo dublete a  $\delta$  4,36 ( $J = 8,4$  e  $4,3$  Hz), o qual mostrou correlação com o sinal de um carbono metínico a  $\delta$  80,1 no espectro HSQC, sugerindo a presença de um grupo hidroxila ligado a um carbono secundário. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , o sinal referente a um carbono quaternário a  $\delta$  65,9 foi atribuído a C-5, com base na correlação existente no espectro HMBC entre este carbono e os hidrogênios correspondentes à metila-14 ( $\delta$  0,98). Os valores de deslocamento químico e multiplicidades presentes nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  seriam então compatíveis com a localização do grupo hidroxila em C-3 e do grupo acetila em C-5. Assim, o esqueleto de **9** poderia ter sido originado, da mesma maneira que o de **8**, a partir de uma clivagem oxidativa do precursor correspondente, 12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno (composto **2**), seguida de uma condensação aldólica (**Figura 16**).

De acordo com um levantamento feito na literatura, verificou-se que os dados espectrais de **9** apresentaram uma boa correspondência com os do ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisofion-11(13)-en-12-óico (**9a**), isolado anteriormente sob a forma de éster metílico de *Dittrichia viscosa*.<sup>119</sup> O epímero em C-3 correspondente [ácido 3 $\beta$ -hidroxiisofion-11(13)-en-12-óico] foi obtido de uma outra Asteraceae, *Jasonia montana*, e apresentou um valor de deslocamento químico para H-3 igual a  $\delta$  3,45 (dd,  $J = 10,0$  e  $9,0$  Hz), mais protegido, portanto, que no isômero 3 $\alpha$ -hidróxi correspondente.<sup>120</sup> Neste, H-3 foi observado como um duplo dublete a 4,56 ( $J = 10,0$  e  $6,5$  Hz), desprotegido pela proximidade com o grupo ceto

em C-4.<sup>119</sup> Este fato também foi observado em outros sesquiterpenos obtidos de Asteraceae com o mesmo esqueleto e possuindo um grupo hidroxila em C-3, cuja orientação pôde também ser confirmada por experimentos de NOE.<sup>121, 122</sup> A orientação *cis* dos grupos acetila em C-5 e metila em C-10 foi definida pelo valor do deslocamento químico desta no espectro de RMN <sup>13</sup>C ( $\delta$  23,0).<sup>122</sup>

Assim, a estrutura de **9** foi proposta como sendo correspondente à do ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico. A literatura relata o isolamento do epímero em C-3 de **9** também de *Dittrichia viscosa* (chamado ácido ciperânico), porém o valor descrito para H-3 neste composto ( $\delta$  4,56; dd;  $J = 9,0$  e  $6,0$  Hz) sugere uma orientação  $\alpha$  para a hidroxila em C-3 e não  $\beta$ , como proposto pelos autores.<sup>123</sup>

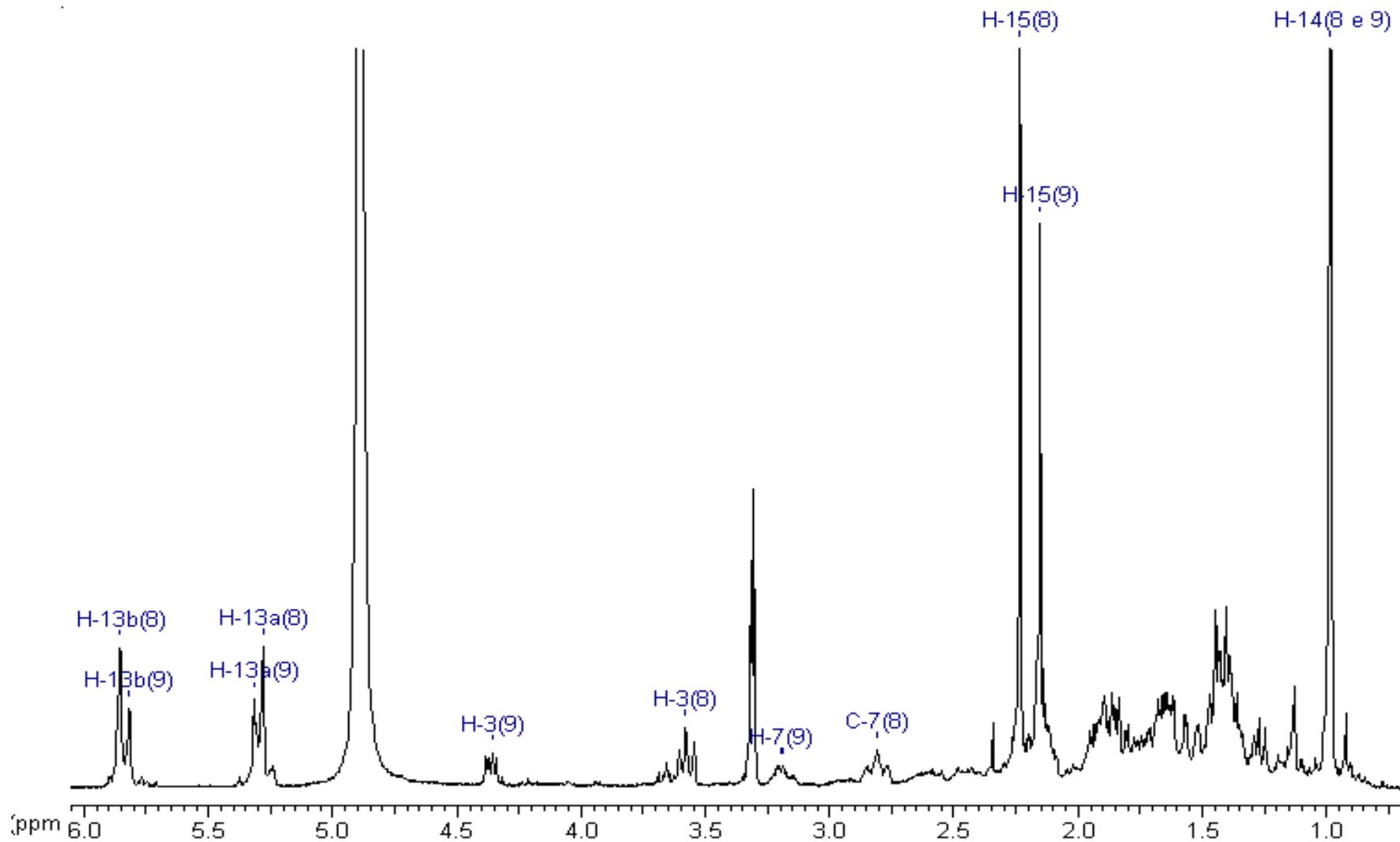


**Figura 11** – Proposta biogenética para a formação do esqueleto do composto **9**.

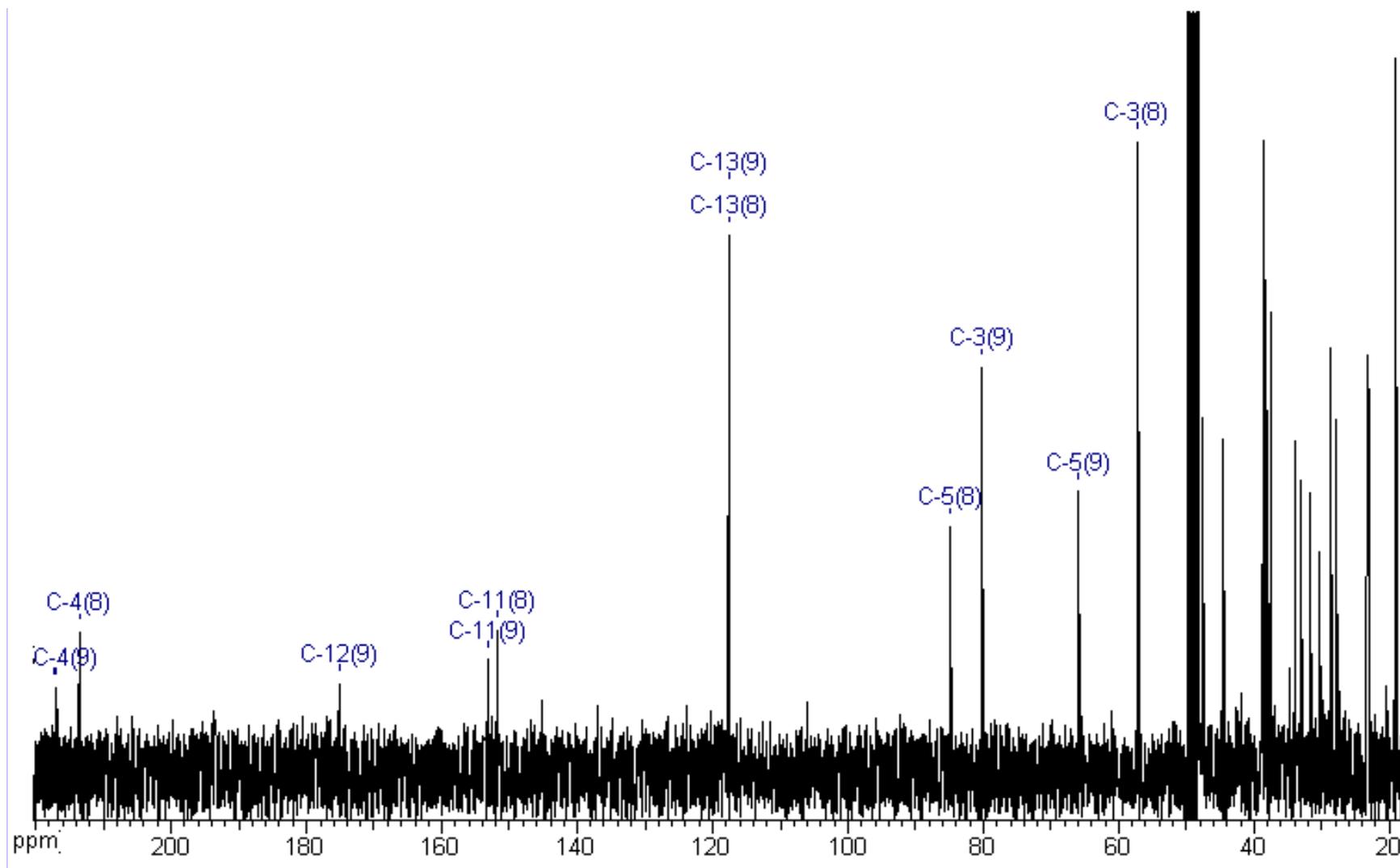
**Tabela 15** -Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, TMS  $\delta=0$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **9** e do éster metílico correspondente **9a** obtido de *Dittrichia viscosa* (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	<b>9</b> $\delta_{\text{C}}$	<b>9</b> $\delta_{\text{H}}$ [m, J(Hz)]	<b>9</b> HMBC	<b>9a</b> $\delta_{\text{H}}$ lit <sup>120</sup>
<b>1</b>	38,3* ( $\text{CH}_2$ )			1,87 (ddd; 12,0, 12,0, 7,0) e 1,34 (ddl; 12,0, 10)
<b>2</b>	33,0 ( $\text{CH}_2$ )	2,15 (m) e 1,90 (m)		2,34 (dddd; 12,0, 7,0, 10,0, 10,0) e 1,78 (dddd; 12,0, 12,0, 6,5)
<b>3</b>	80,1 (CH)	4,36 (dd; 8,4 e 4,3)		4,56 (dd; 10,0, 6,5)
<b>4</b>	217,0 (C)	-		-
<b>5</b>	65,9 (C)	-		-
<b>6</b>	33,9 ( $\text{CH}_2$ )	2,25 (m) e 1,75 (m)	C-5	2,11(ddd,; 13,0, 12,0, 3,0) e 1,84 (dd; 13,0, 12,0)
<b>7</b>	37,3 (CH)	3,20 (m)		2,75(ddd; 12,0, 12,0, 3,0)
<b>8</b>	27,7 ( $\text{CH}_2$ )	1,60 (m) e 1,50 (m)		1,65 (dl, 12,0) e 1,40 (m)
<b>9</b>	38,7* ( $\text{CH}_2$ )			1,54(ddd; 14,0, 14,0, 3,0) e 1,40 (m)
<b>10</b>	44,6 (C)	-		-
<b>11</b>	153,1 (C)	-		-
<b>12</b>	175,1 (C)	-		-
<b>13</b>	117,6 ( $\text{CH}_2$ )	5,31 (s) e 5,82 (s)	C-7, C-11, C-12	5,62 (sl) e 6,22 (sl)
<b>14</b>	23,0 ( $\text{CH}_3$ )	0,98 (s)	C-5, C-10	0,99 (s)
<b>15</b>	30,2 ( $\text{CH}_3$ )	2,15 (s)	C-4, C-5	2,16 (s)

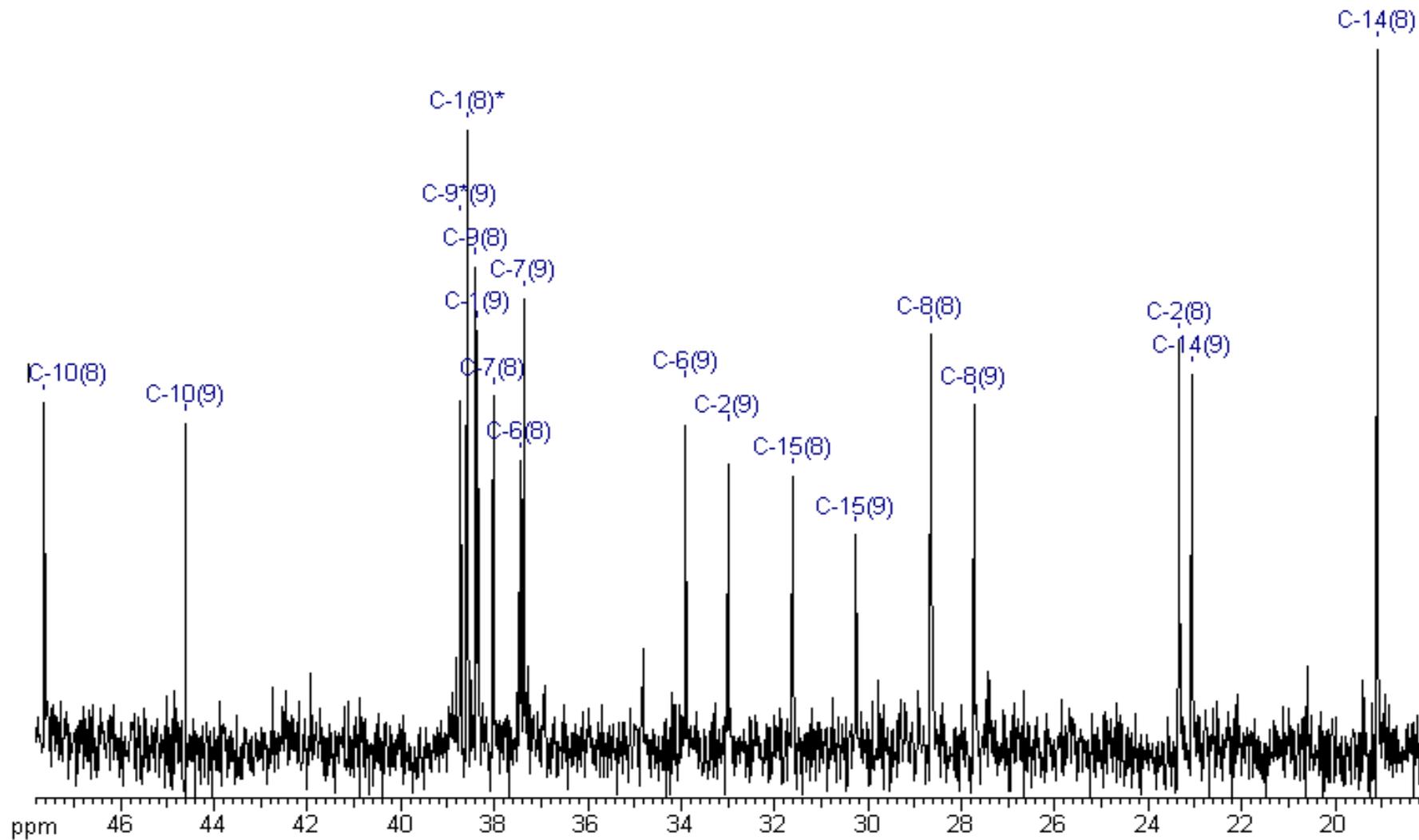
\* valores que podem estar trocados



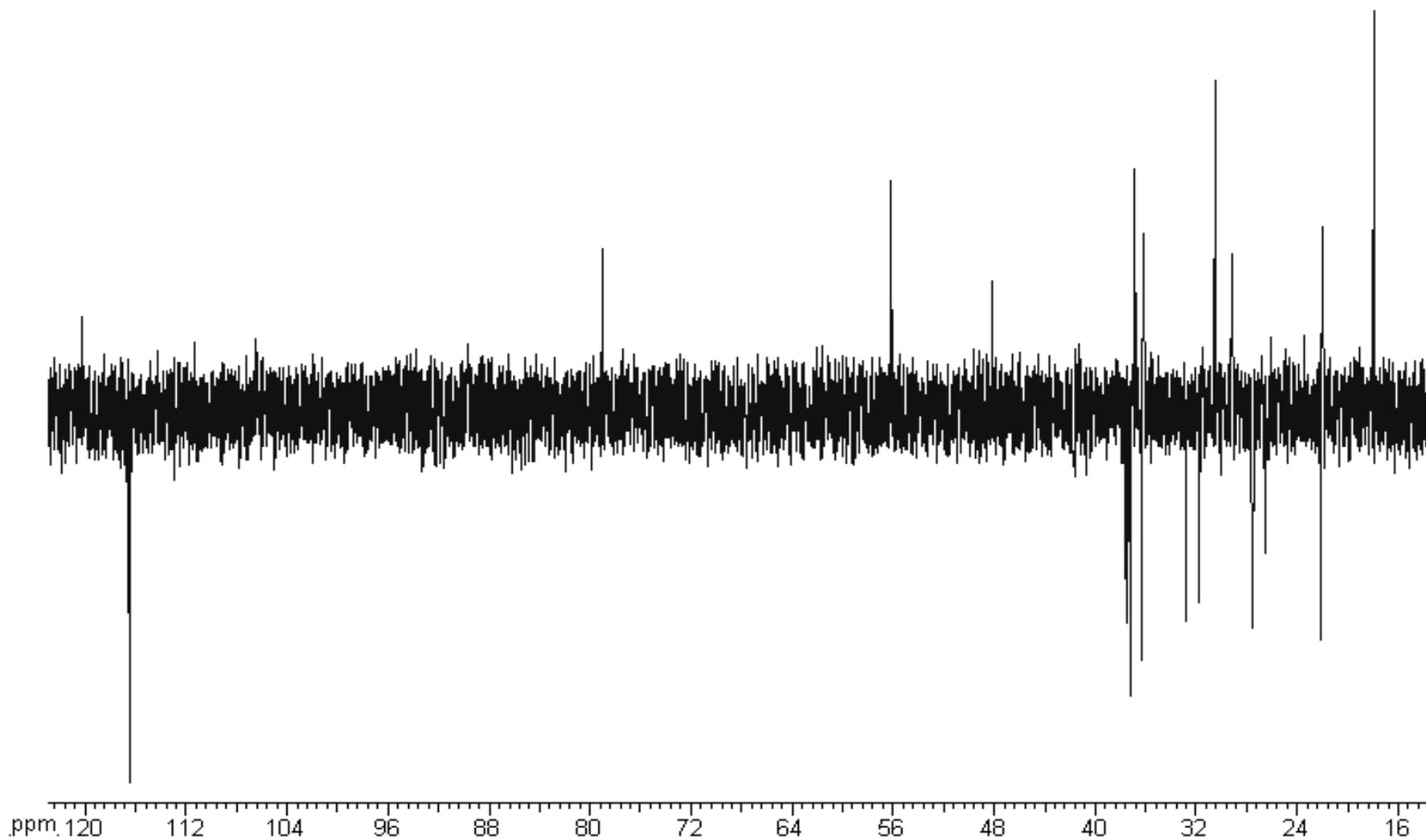
**Espectro 35** - RMN de <sup>1</sup>H da mistura de **8** e **9** (300MHz, CD<sub>3</sub>OD)



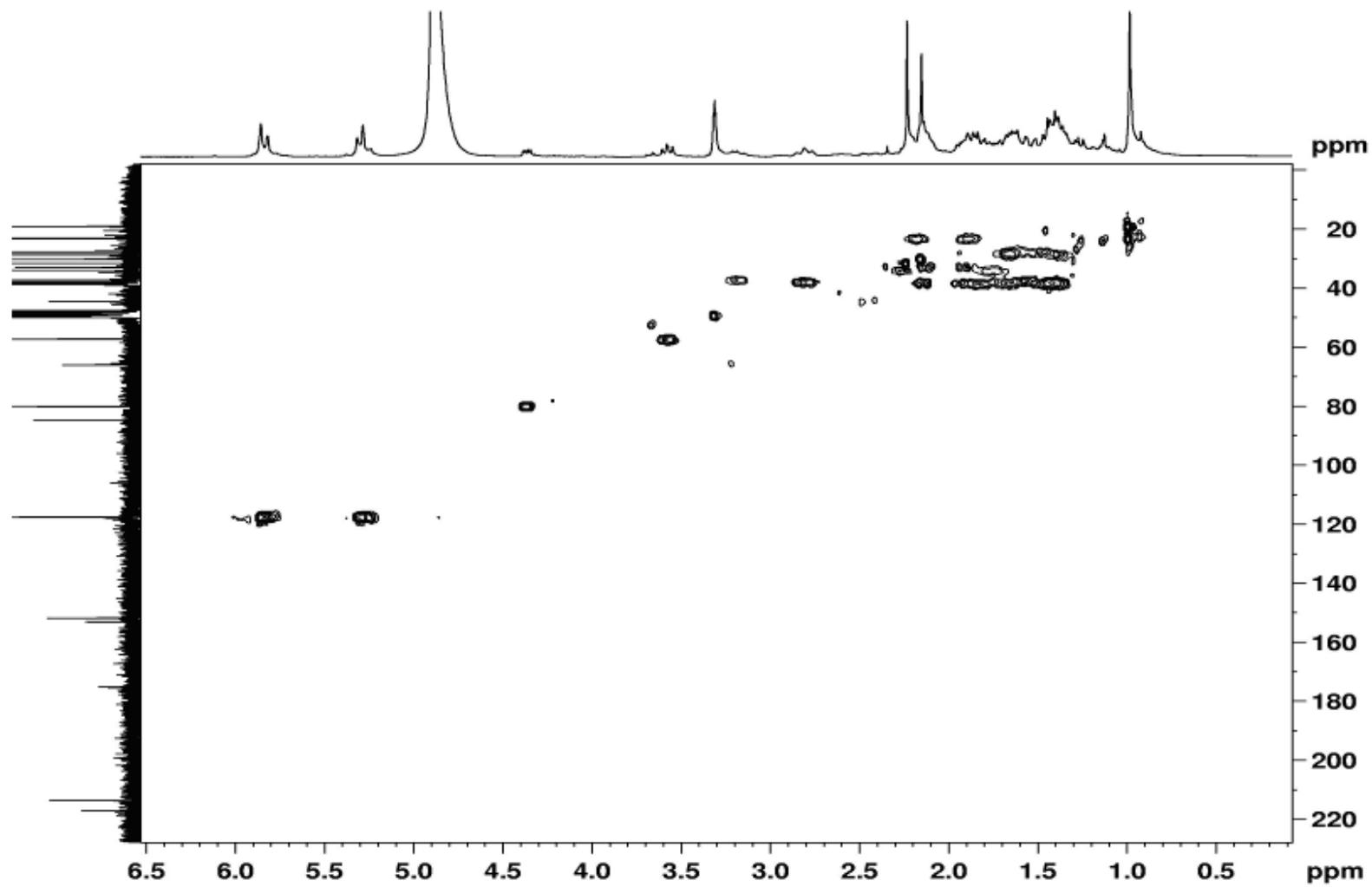
Espectro 36 - RMN de <sup>13</sup>C da mistura de 8 e 9 (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



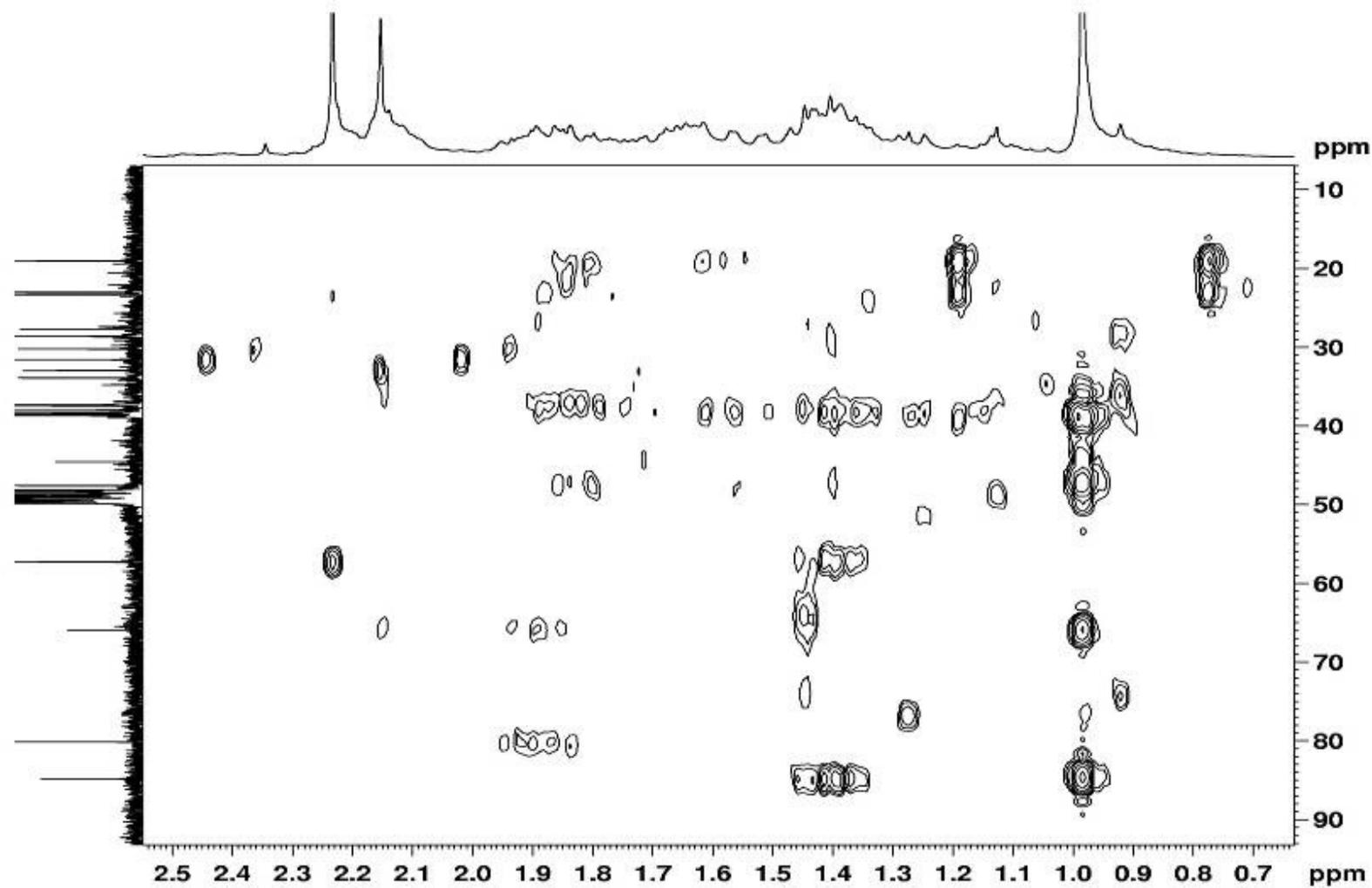
Espectro 37 - RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado da mistura de **8** e **9** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



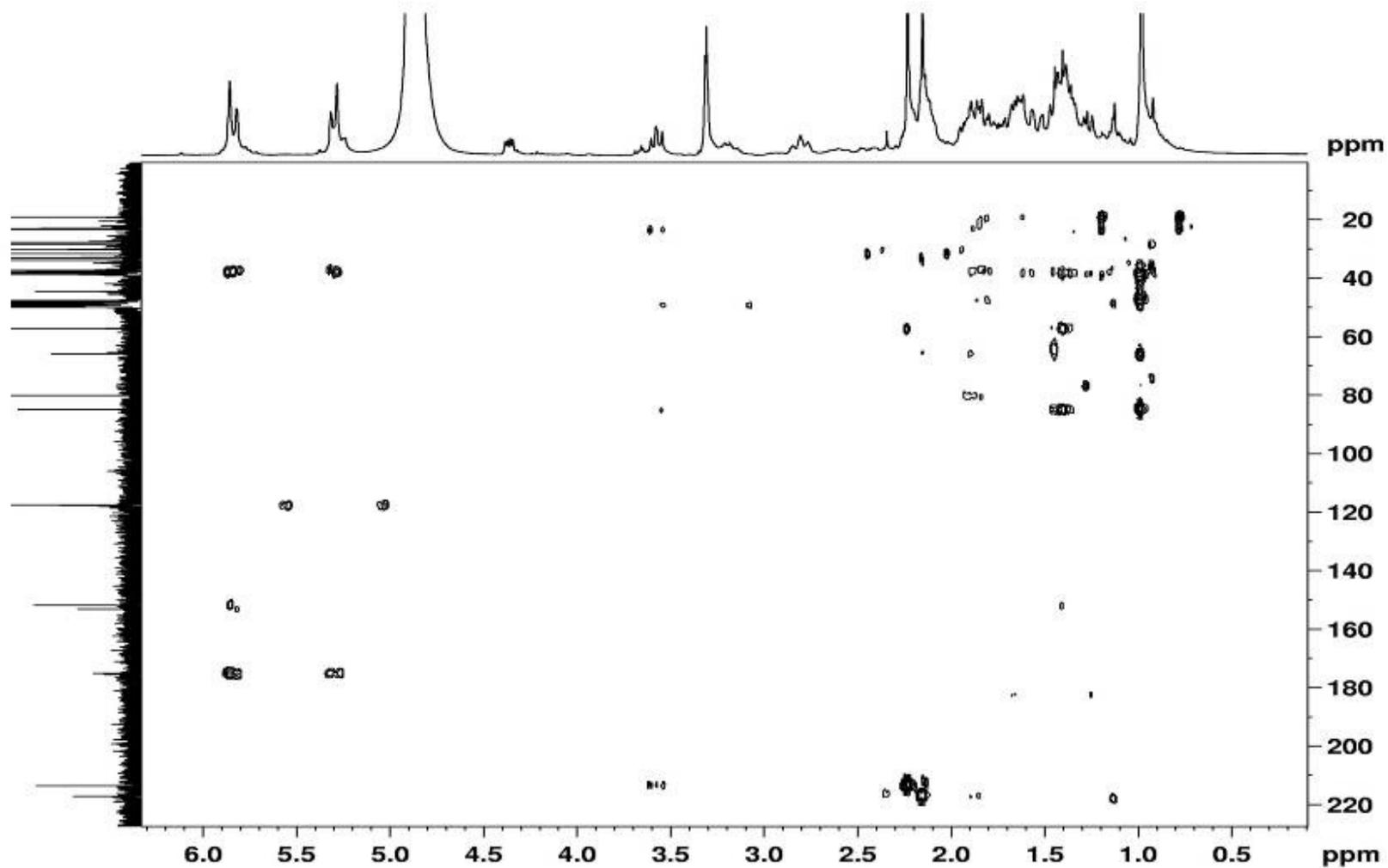
**Espectro 38** - DEPT 135° da mistura de **8** e **9** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



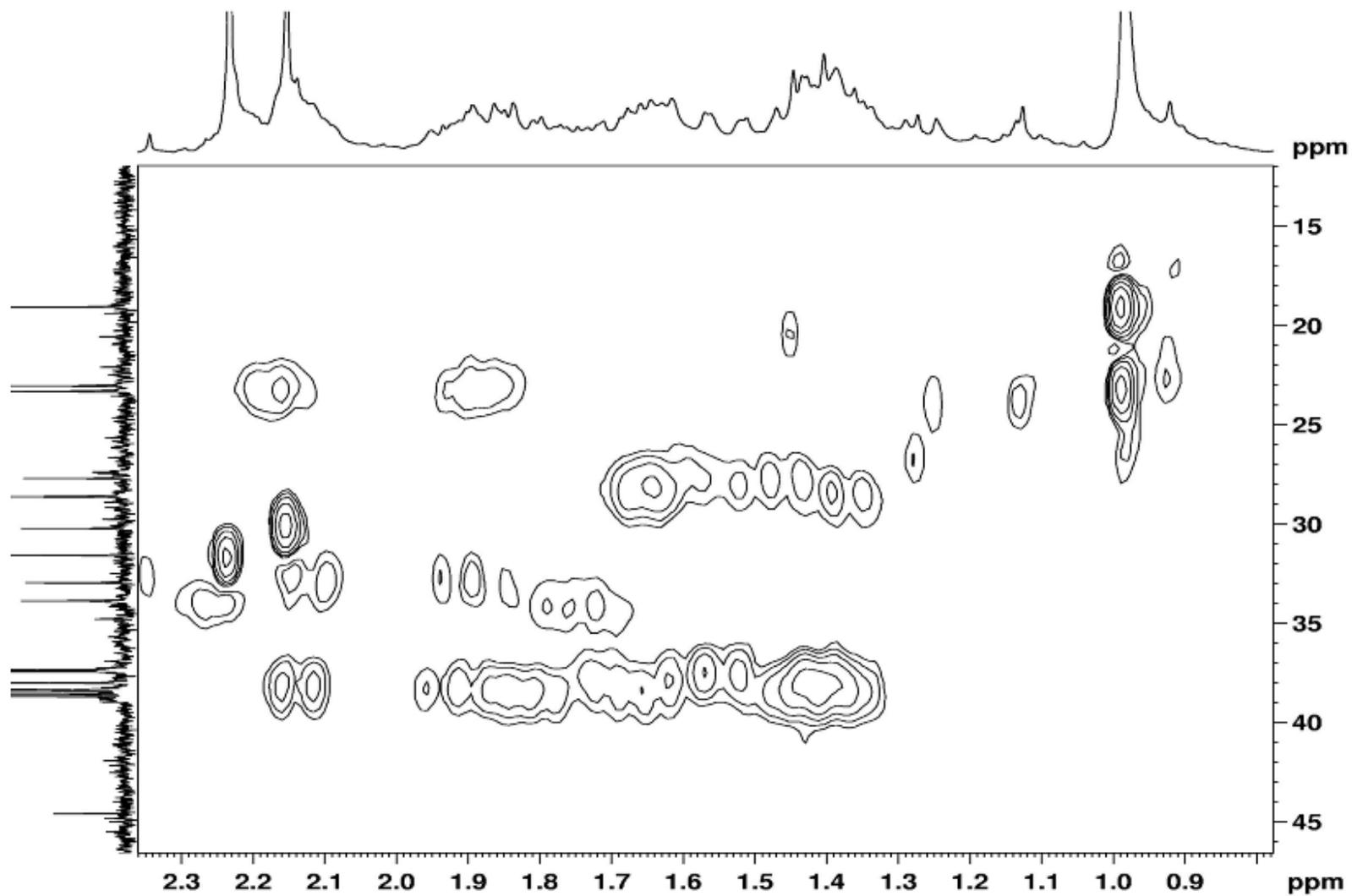
Espectro 39 - HSQC da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



Espectro 40 - HSQC ampliado da mistura de **8** e **9** (300/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



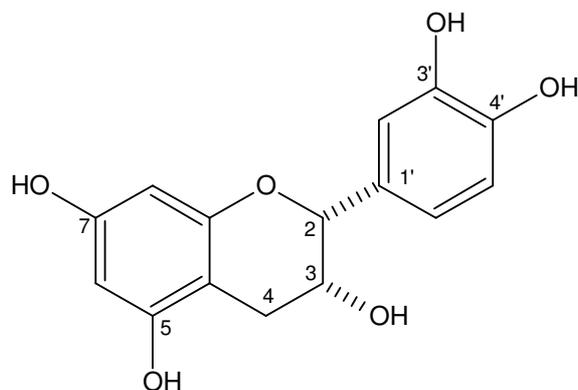
Espectro 41 - HMBC da mistura de 8 e 9 (300/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



Espectro 42 - HMBC ampliado da mistura de **8** e **9** (300/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

## 4.2 – FLAVONÓIDE

### 4.2.1 Identificação do composto 10



(-)-epicatequina (**10**)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração NCCII37S3F3 (**Parte Experimental 3.4 e 3.5.5**), **composto 10**, revelou a presença de sinais atribuíveis a hidrogênios de anel aromático na região de 5,89 e 6,93  $\delta$ , além de sinais na região de 2,69 a 2,89 ppm e dois sinais a 4,78  $\delta$  e 4,14  $\delta$  (espectro 20).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 43**) além dos sinais dos carbonos de anel aromático na região de 95,9 a 158,0  $\delta$ , foram observados dois sinais atribuíveis a carbonos oximetínicos a 79,9  $\delta$  e 67,5  $\delta$  e um sinal de carbono metilênico a 29,3  $\delta$ . Estes dados sugeriram um esqueleto do tipo flavan-3-ol para o composto **10**. Os demais sinais presentes nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 $^\circ$  de **10** foram indicativos de um esqueleto 5 (158,0B  $\delta$ ), 7(157,7  $\delta$ ), 3'(145,8  $\delta$ ), 4'(146,0  $\delta$ ) tetraoxigenado.

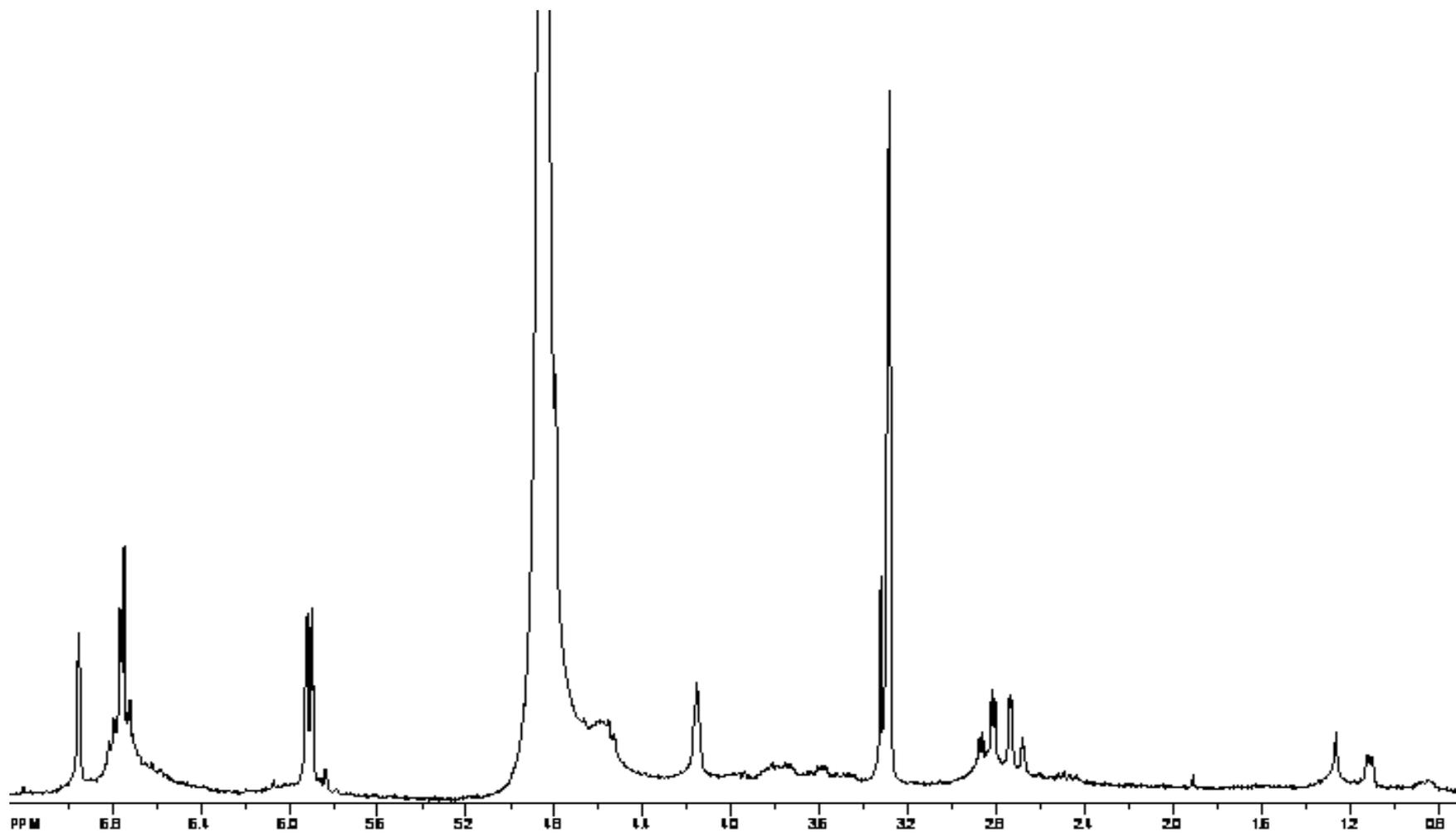
Os dados espectrais de **10** (**Tabelas 16 e 17**) mostraram-se bastante semelhantes com os descritos na literatura para o flavonóide de ocorrência comum em plantas (-)-epicatequina, confirmando assim sua identidade. 124

**Tabela 16-** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, TMS  $\delta=0$ .MeOD) de **10**

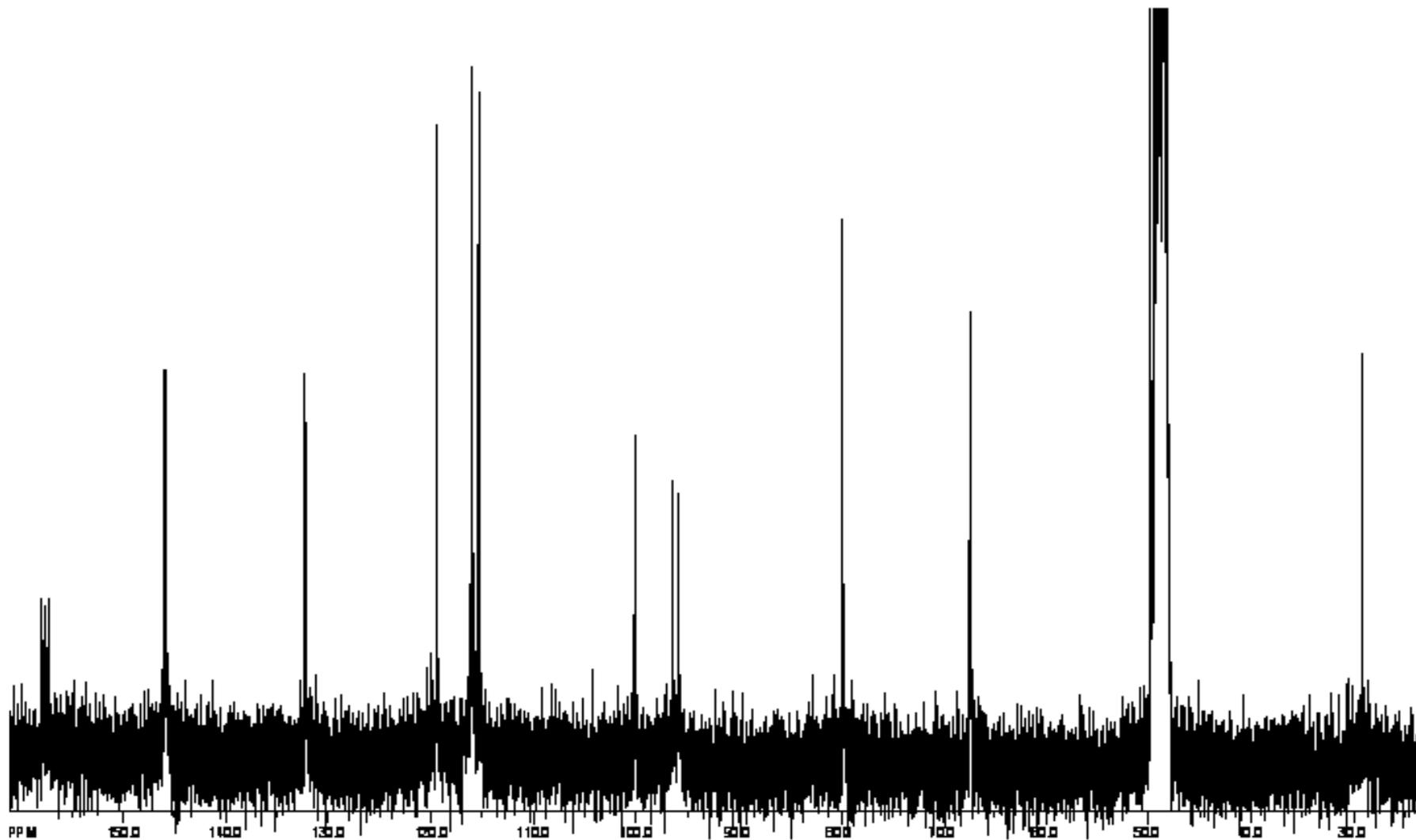
H	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^1\text{H}_{\text{lit}}$ [m, J(Hz)] <sup>125</sup>
2	4,78(m)	4,81
3	4,14(m)	4,17
4	—	2,72 (H-4a) e 2,86(H-4b)
8	5,90(m)	5,91
2'	6,93(m)	6,97
5'	6,73(m)	6,75
6'	6,76(m)	6,79

**Tabela 17 -** Dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do composto **10**.

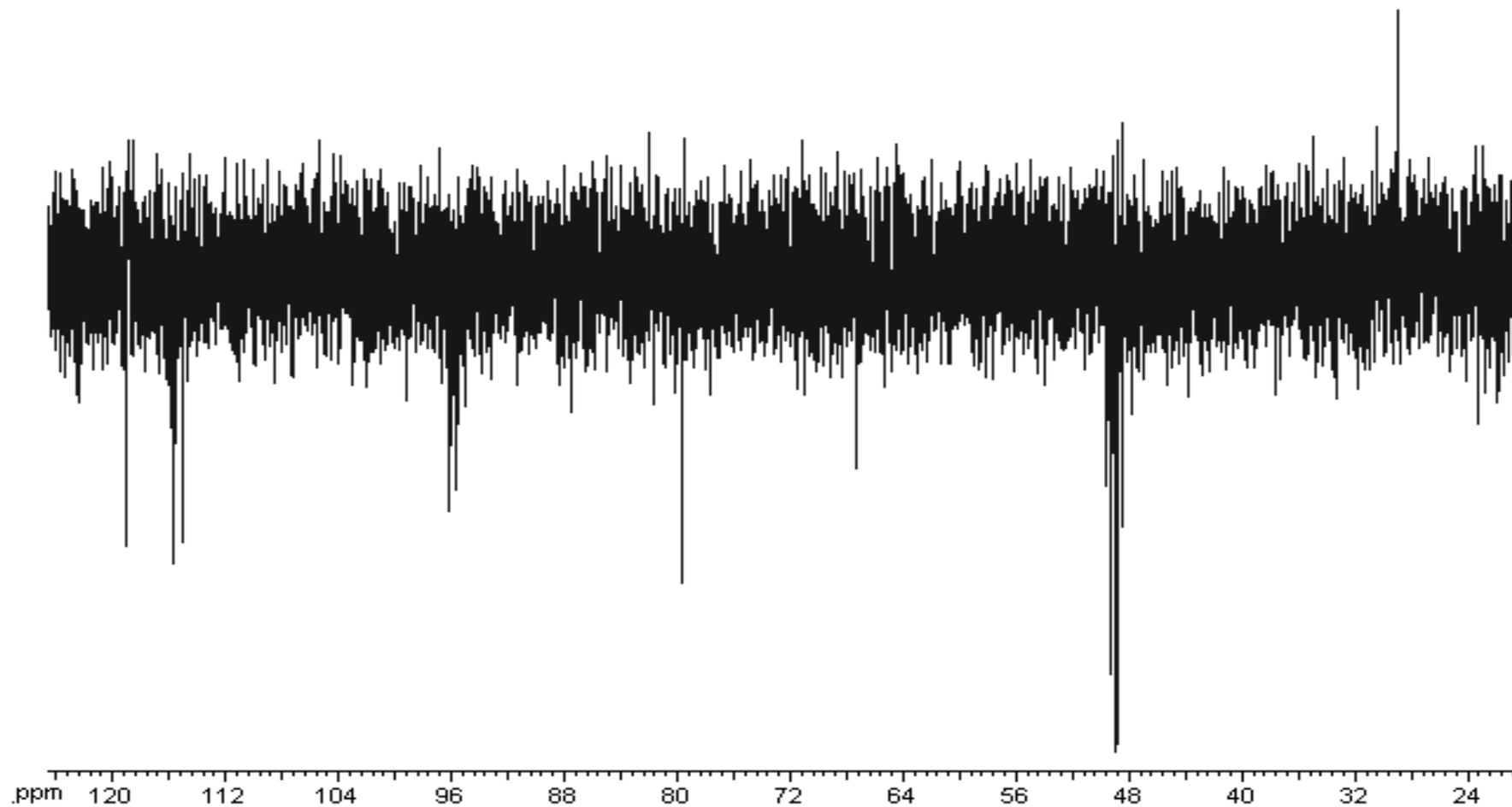
Posição	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}_{\text{lit}}$ <sup>125</sup>
2	79,9 (CH)	79,9
3	67,5 (CH)	67,5
4	29,3 (CH <sub>2</sub> )	29,2
5	158,0 (C)	157,9
6	96,4 (CH)	96,5
7	157,7 (C)	158,2
8	95,9 (CH)	96,0
9	157,4 (C)	157,6
10	100,0 (C)	100,2
1'	132,3 (C)	132,4
2'	115,4 (CH)	115,4
3'	145,8 (C)	146,0
4'	146,0 (C)	146,1
5'	115,9 (CH)	116,0
6'	119,4 (CH)	119,5



Espectro 43- RMN de  $^1\text{H}$  do **10** (300MHz, MeOD)



Espectro 44 : RMN de <sup>13</sup>C de 10 (75 MHz, MeOD)



**Espectro 45:** DEPT 135° de **10** (75 MHz, MeOD)

### 4.3 - TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

Uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no LP-1 do Departamento de Química da UFMS consiste em avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico de extratos brutos e metabólitos secundários obtidos de plantas de Mato Grosso do Sul.

A avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica é realizada através do teste do Micronúcleo *in vivo*<sup>125,126,127</sup>, que é efetuado na UEMS sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> MSc Zaira da Rosa Guterres.

O Teste de Micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal).<sup>128</sup> O micronúcleo é um núcleo extra, visível ao microscópio, localizado fora do núcleo, porém compartilhando o citoplasma celular, composto por um fragmento cromossômico ou um cromossomo inteiro. É formado por eventos clastogênicos ou aneugênicos, aparecendo nas células filhas em decorrência de danos genéticos induzidos nas células parentais.<sup>129</sup> O teste de micronúcleo em peixes permite a detecção de substâncias com potencial mutagênico ou antimutagênico, uma vez que os peixes respondem às substâncias tóxicas de maneira similar aos demais vertebrados neste ensaio.<sup>130</sup>

Assim, o extrato etanólico obtido do caule de *N. cissiflora* foi um dos selecionados para avaliação de atividade mutagênica/antimutagênica através do ensaio do micronúcleo *in vivo* e apresentou atividade antimutagênica.

Foi utilizado o Teste do Micronúcleo (MN) em peixes do gênero *Hypostomus* (Cascudo), o qual foi realizado através da análise dos micronúcleos presentes nos eritrócitos dos peixes.<sup>126</sup>

#### 4.3.1 - AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MUTAGÊNICA

A Tabela 18 apresenta os resultados do teste de mutagenicidade realizado com o extrato etanólico bruto do caule de *N. cissiflora*. Os dados obtidos mostraram que o extrato

não apresentou atividade mutagênica, pois não houve diferença significativa ao serem comparados o número de micronúcleos obtidos no tratamento com o do controle negativo.

**Tabela 18** - Resultados do teste de mutagenicidade do caule de *N. cissiflora*

Extrato avaliado	Parte da planta	Quantidade	Dose aplicada	Resultados
( <i>N. cissiflora</i> -Lauraceae)	caule	4,7 mg/mL	20 µL	(-)

#### 4.3.2- Avaliação da atividade antimutagênica

As Tabelas 19 e 20 apresentam os resultados do teste de antimutagenicidade realizado com o extrato etanólico bruto da parte da planta coletada. Foram testadas as atividades antimutagênicas deste extrato frente a dois agentes mutagênicos: doxorubicina (agente mutagênico clastogênico) e vincristina (agente mutagênico aneugênico), aplicados em diferentes concentrações.

Nestes experimentos de co-tratamento (extrato etanólico da planta associado ao agente mutagênico), os dados apresentados nas tabelas mostram que houve uma redução significativa do número de micronúcleos ao se associar o extrato etanólico do caule de *N. cissiflora* ao agente mutagênico, quando comparados com os resultados obtidos com o controle positivo. Estes resultados demonstram o efeito protetor do extrato etanólico de *N. cissiflora* contra a mutagenicidade da doxorubicina e da vincristina, constatando-se também que a atividade antigemutagênica não é tempo-dependente. Em função de terem sido obtidos sesquiterpenóides como componentes majoritários das cascas do caule de *N. cissiflora*, pode-se sugerir que esta classe de compostos seja a responsável pela atividade antimutagênica apresentada pelo extrato bruto.

**Tabela 19** - Frequência de Micronúcleos nos eritrócitos dos peixes tratados com os extratos EtOH do caule de *N. cissiflora* associados a Cloridrato de Doxorubicina (DXR).

Período de exposição	Número de micronúcleos				
	Controle negativo	DXR 3 µg	Extrato etanólico (4,7 mg/mL) + DXR 3 µg	DXR 20 µg	Extrato etanólico (4,7 mg/mL) + DXR 20 µg
24 h	0	5	1	9	2
48 h	0	7	1	11	3
72 h	0	5	2	14	4

Agente mutagênico: Doxorubicina (DXR)

**Tabela 20** - Frequência de Micronúcleos nos eritrócitos dos peixes tratados com os extratos EtOH do caule de *N. cissiflora* associados à Vincristina (VCR).

Período de exposição	Número de micronúcleos				
	Controle negativo	VCR 3 µg	Extrato etanólico (4,7 mg/mL) + VCR 3 µg	VCR 12 µg	Extrato etanólico (4,7 mg/mL) + VCR 12 µg
24 h	0	7	1	12	3
48 h	0	8	2	14	4
72 h	0	10	2	14	6

Agente mutagênico: Vincristina (VCR)

Testes realizados em triplicata, analisando-se 4000 eritrócitos por vez. Em seguida, cada teste foi repetido após 48 e 72 horas.

## 5 – CONCLUSÃO

O estudo químico das cascas do caule de *Nectandra cissiflora*, o qual contribuiu para o conhecimento dos constituintes presentes em espécies de Lauraceae que ocorrem em Mato Grosso do Sul, resultou no isolamento e caracterização de sete sesquiterpenos com esqueletos eudesmano e eudesmano rearranjado, dois sesquiterpenos com esqueleto eudesmano esterificados com um álcool *nor*-monoterpênico e um flavonóide. Embora sesquiterpenos tenham sido relatados em várias espécies da família Lauraceae, principalmente como componentes de óleos essenciais de folhas, apenas três representantes desta classe de metabólitos secundários haviam sido descritos até o momento como constituintes fixos em três espécies de *Nectandra*. Dos nove sesquiterpenóides obtidos de *N. cissiflora*, um (eudsm-13-eno-12,4 $\beta$ -olideo) é inédito como produto natural, quatro [ácido víscico, ácido 3-oxo- $\gamma$ -cóstico, ácido 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico e ácido 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico] estão sendo relatados pela primeira vez na família Lauraceae, tendo sido obtidos anteriormente somente de representantes de Asteraceae e um (12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno) está sendo descrito pela primeira vez em *Nectandra*. Deve-se destacar também que a ocorrência de sesquiterpenos com o esqueleto eudesmano rearranjado apresentado pelos ácidos 5 $\beta$ -hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico e 3 $\alpha$ -hidroxiisoifion-11(13)-en-12-óico é pouco comum na natureza. Apenas um dos sesquiterpenos obtidos (ácido cóstico) foi isolado das três espécies de *Nectandra* já estudadas, enquanto que os sesquiterpenos esterificados com um álcool *nor*-monoterpênico (costoato de 10-*nor*-fenchanoíla, eudesma-3,11(13)-dien-12-oato de *nor*-fenchanoíla) foram descritos apenas em *N. cuspidata*.

Alcalóides, lignanas e neolignanas, classes de metabólitos secundários de maior ocorrência no gênero, não foram detectados, no entanto, no espécime de *Nectandra cissiflora* estudado no presente trabalho.

A presença de sesquiterpenos como componentes majoritários no espécime de *N. cissiflora* estudado pode ser responsável pela atividade antimutagênica apresentada pelo extrato bruto ao ser submetido ao Teste do Micronúcleo *in vivo*, em peixes do gênero *Hypostomus*.

## 6-Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup>- **ROHWER, J. G.** *Lauraceae. The Families and Genera of Vascular Plants.* vol. 2. Magnoliid, Hamameliid ad Caryophyllid families. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 336-391. 1993.
- <sup>2</sup>- **SOLZA, M. A. et al.** *Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.* INPA, Manaus. Pp. 150-179.
- <sup>3</sup> - **JUDD, W. S. et al.** *Plant systematics: a phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, 792p. 1999.
- <sup>4</sup> - **BARROSO, G. M. et al.** *Sistemática de Angiospermas do Brasil.* v.1, 2a ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- <sup>5</sup> - **JOLY, A.B.** *Introdução à Taxonomia Vegetal.* Editora da USP, São Paulo, 777 p. 1991.
- <sup>6</sup> - **SILVA L. M.G.E.** *Estudo químico dos frutos, cascas do caule, e cerne de um espécime de *Ocotea minarum* (Meissen) Mez (Lauraceae)* Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, 2005.
- <sup>7</sup> - **GARCEZ, W.S., YOSHIDA M., GOTTLIEB O. R.** Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry.*, **39**, 815-816, 1995.
- <sup>8</sup> - **WERFF, H. VAN DER. et al.** A Key to the Genera of Lauraceae in the New World. *Ann. Miss. Bot. Garden.* **78**, 377-387, 1991.
- <sup>9</sup> - **BAITELLO, J. B. et al.** *Lauraceae.* Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. vol. 3. FAPESP/Rima, São Paulo. Pp. 149-223. 2003
- <sup>10</sup> - **ROHWER, J. G.** *Lauraceae: Nectandra.* Flora Neotropica Monograph 60: 1-332. 1993.
- <sup>11</sup> - **QUINET, A. & ANDREATA, R. H. P.** *Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, RJ, Brasil.* Rodriguésia 53(82): 59-121. 2002
- <sup>12</sup> - **KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.** *Bot. Acta*, **106**, 88-99, 1993. **Missouri Botanical Garden-W TROPICOS.** <http://www.mobot.org/>. Acessado em 8/12/2005.
- <sup>13</sup> **GOTTLIEB, O. R.** Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, **11**, 1537-1570, 1972.

- 
- <sup>14</sup> - **LORENZI, H.** *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. 2<sup>a</sup> ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. **BIOTA** - lista das espécies ameaçadas de extinção no estado de São Paulo. <http://www.biota.org.br/info/wap/lista1mn.html>. Acessado em 8/12/2005.
- <sup>15</sup> **GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., MARTINS, M., CRUZ, A. C.** A Bioactive Lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Med.*, **65**, 775, 1999.
- <sup>16</sup> - **RIBEIRO A. B. et al.** *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**, 526-530, 2005. **CHERIGO, L. et al.** *Nat. Prod. Res.*, **19**, 373-377, 2005. **DA SILVA FILHO, A. A. et al.** *J. Nat. Prod.*, **67**, 42-45, 2004. **BOHLKE, M. et al.** *J. Nat. Prod.*, **59**, 576-580, 1996. **WU, X. et al.** *Nat. Prod. Comm.* . **1**, 465-468, 2006
- <sup>17</sup> **GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T.** Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*.: *Planta Med.*, **71**, 923-7, 2005.
- <sup>18</sup> **GARCEZ, W. S. ; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SHIMABUKURO, A. A.** Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *J. Braz. Chem. Soc.* **16B**, 1382-1386, 2005.
- <sup>19</sup> **GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., MARTINS, M., CRUZ, A. C.** A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Med.* **65**, 775, 1999.
- <sup>20</sup> **GARCEZ, W. S., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R.** Benzylisoguinoline alkaloids and flavonol from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, **39**, 815-816, 1995.
- <sup>21</sup> - **RUZICKA L.** The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **9**, 357-67, 1953.
- <sup>22</sup> **MCCASKILL D., CROTEAU R.** Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends Biotechnol.*, **16**, 349-55, 1998.
- <sup>23</sup> -**DEWICK, P.M.** *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2<sup>o</sup> ed. John Wiley & Sons, LTD. Londres, 2002.
- <sup>24</sup> - **HAMPEL D., MOSANDL A., WÜST M.** Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry*, **66**, 305-11, 2005.

- 
- <sup>25</sup> - **BUCKINGHAM, J.** *Dictionary of Natural Products: v. 10, Supplement 3* Chapman & Hall/CRC, England, 1996.
- <sup>26</sup> - **SIMÕES, C.M. O, GUERRA, M.P et al.** *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5° ed. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004.
- <sup>27</sup> - **MANN, J.** *Chemical Aspects of Biosynthesis.* Oxford University Press. Nova Iorque, 1994
- <sup>28</sup> - **HARBONE, J.B. & BAXTER, H.** *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants.* Taylor & Francis, London, 1995. **STEINEGGER, E.; HANSEL, R.** *Pharmakognosie.* 5 ed. Berlin:Springer, 1992.
- <sup>29</sup> - **KAUFMAN, P. B., CSEKE, L.J., DUKE, J. A.** *Natural Products from Plants.* CRC Press, New York, 1999.
- <sup>30</sup> - **ANH N. H., RIPPERGER H., SUNG T. V., ADAM G.** Neolignans and a Sesquiterpene from *Caryodaphnosis Tonkinensis*. *Phytochemistry*, **42**, 1167-1169, 1996.
- <sup>31</sup> - **ASAKAWA Y., KOMATSU T., HAYASHI, S., MATSUURA T.** Chemical components of the benzene extract of *Cinnamomum loureirii* (Lauraceae). *Flavour Ind.*, **2**, 114-19, 1971
- <sup>32</sup> - **YOSHIKAWA M., SHIMODA H., UEMURA T., MORIKAWA T., KAWAHARAB Y., MATSUDA H.** Alcohol Absorption Inhibitors from Bay Leaf (*Laurus nobilis*): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2071-7, 2000.
- <sup>33</sup> - **TANAKA R., SAKANO Y., SHIMIZU K., SHIBUYA M., EBIZUKA Y., GODA Y.** Constituents of *Laurus nobilis* L. inhibit recombinant human lanosterol synthase. *J Nat Med* **60**, 78–81, 2006.
- <sup>34</sup> - **FANG F., SANG S., CHEN K. Y., GOSSLAU A., HO C., ROSEN R. T.** Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bayleaf (*Laurus nobilis*). *Food Chem.* **93**, 497–501, 2005.
- <sup>35</sup> - **HERRERA1 J. L., COSTA M. C., GONZALEZ H. G., RODRIGUES A. I., CASTILHO P. C.** Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *J. Antimicrobial Chemother.* **59**, 548–552, 2007.
- <sup>36</sup> - **BENIGNI F.E. D.** Sesquiterpene Lactones of *Laurus nobilis* Leaves. *J. Nat.Prod.* **43**, 528-530, 1979.

- <sup>37</sup> - **DALL'ACQUA S., VIOLA G., GIORGETTI M., LOI M. C., INNOCENTI G.** Two New Sesquiterpene Lactones from the Leaves of *Laurus nobilis*. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1187-9, 2006.
- <sup>38</sup> - **FRANCA N. C.; GOTTLIEB, O. R., SOARES J. G. M.** Chemistry of Brazilian Lauraceae. 27. Macrophyllin, a neolignan from *Licaria macrophylla*. *Phytochemistry*, **13**, 2839-42, 1974.
- <sup>39</sup> - **TADA H., MINATO H., TAKEDA.K.** Components of the Root of *Lindera strychnifolia* Vill. Part XVIII.1 Neosericenyl Acetate and Dehydrolindestrenolide. *J. Chem. Soc.* 1971.
- <sup>40</sup> - **CHOU, G., NAKAMURA N., MA C., WANG Z., HATTORI M., XU L., XU G.** Seven new sesquiterpene lactones from *Lindera aggregata*. Seven new sesquiterpene lactones from *Lindera aggregata*. *Yaoke Daxue Xuebao* **31**, 339, 2000.
- <sup>41</sup> - **NII, HIROMICHI; FURUKAWA, KIYOSHI; IWAKIRI, MITSUO; KUBOTA, TAKASHI.** A new sesquiterpene carboxylic acid from *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) blume. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **57**, 725-32, 1983.
- <sup>42</sup> - **ZHANG H., TAN G. T., ANG V. D. H., HUNG N. V., CUONG N. M., SOEJARTO D. D., PEZZUTO J. M., FONG H. H. S.** Natural anti-HIV agents. Part 3: Litseaverticillols A–H, novel sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *Tetrahedron* **59** 141–148, 2003.
- <sup>43</sup> - **ZHANG H., TAN G. T., SANTARSIERO B. D., MESECAR A. D., HUNG N. V., CUONG N. M., SOEJARTO D. D., PEZZUTO J. M., FONG H. H. S.** New Sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *J. Nat. Prod.*, **66**, 609-15, 2003
- <sup>44</sup> - **HOANGA V. D., TANA G. T., ZHANGA H., TAMEZA P. A., HUNGB N. V., CUONGC N. M., SOEJARTOA D. D., FONGA H. H.S., PEZZUTO J. M.** Natural anti-HIV agents-part I: (+)-demethoxyepiexcelsin and verticillatol from *Litsea verticillata*. *Phytochemistry*, **59** 325–9. 2002
- <sup>45</sup> - **HAKIM, E. H.; ACHMAD, S. A.; EFFENDY; GHISALBERTI, E. L.; HOCKLESS, D. C. R.; WHITE, A. H.** Structural studies of three sesquiterpenes from *Litsea* spp. (Lauraceae). *Aust. J. Chem.*, **46**, 1355-62, 1993.
- <sup>46</sup> - **WU, X.; VOGLER, B.; HABER, W. A.; SETZER, W. N.** A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monteverde, Costa Rica. *Nat.Prod.Com.*, **1**, 465-8, 2006.

- 
- <sup>47</sup> - MORENO, P.R.H., VON POSER, G.L., RATES, S.M.K.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R., SOUZA, I.A., HENRIQUES, A.T. Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. *Int. J. Pharmacogn.*, **31**,189-192, 1993.
- <sup>48</sup> - BATISTA A. L. Estudo fitoquímico das folhas e casca de *Nectandra cuspidata*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, **2001**;
- <sup>49</sup> - NOZAKI H., HIROI M., TAKAOKA D., NAKAYARNA M. Neoliacine, a Novel Germacranolide Sesquiterpene Dilactone from *Neolitsea acciculata* Koidz. : X-Ray Crystal Structure. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **19**, 1107-8, 1983.
- <sup>50</sup> - TAKEDA K., HORIBE M., MINATO T. H. Sesquiterpenes of Lauraceae Plants. Part 1. Components of *Neolitsea aciculata* Koidz. *J. Chem. SOC.* 973- 80, 1970.
- <sup>51</sup> - TAKAOKA, D.; TANI, H.; NOZAKI, HIROSHI; N., MITSURU. Structures of three germacranolide sesquiterpene dilactones from *Neolitsea aciculata* Koid. *Nat. Prod. Let.* 3, 203-8, 1993.
- <sup>52</sup> - TAKEDA, K.; HORIBE, I.; TERAOKA, M.; MINATO, H. Components of *Neolitsea aciculata*. Structures and absolute configuration of litsealactone, litseaculane, zeylanine, and zeylanane. *Chem. Comm.*, **16**, 940-2, 1968.
- <sup>53</sup> - CHEN, K. S.; CHANG, F. R.; JONG, T. T.; WU, Y. C.; Two Novel Sesquiterpenes from *Neolitsea parvigemma*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 704-6, 1996.
- <sup>54</sup> - CHEN, K. S.; CHANG, F. R.; CHIA, Y. C.; WU, T. S.; WU, Y. C. Chemical constituents of *Neolitsea parvigemma* and *Neolitsea konishii*. *J. Chin. Chem. Soc.*, **45**, 103-110, 1998.
- <sup>55</sup> - CHEN K. T., WU Y. Sesquiterpenoids from *Neolitsea parvigemma*: Isolation, Oxidation Products and Antiplatelet Actions. *Tetrahedron*, **55**,1353-66, 1999.
- <sup>56</sup> - TAKEDA K., TORI K., HORIBE H. M., HAYASHI, S. H., MATSUURA T. Structure of Sericenine. *J. Chem. Soc.*, **7**, 985, 1970
- <sup>57</sup> - CHAVEZ J. P., GOTTLIEB O. R., YOSHIDA M. 10-Desmethyl- 1-Methyl-Eudesmanes from *Ocotea Corymbosa*. *Phytochemistry*, **39**, 849-52, 1995.
- <sup>58</sup> - DAVID J. P.; YOSHIDA, M. Bicalamenenes from *Ocotea corymbosa*. *Rev.Latinoamer. Quim.*, **26**, 91-94, 1998.
- <sup>59</sup> - PEREIRA CHAVEZ, JUCENI; GOTTLIEB, OTTO R.; YOSHIDA, MASSAYOSHI. The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part 104. 10-Desmethyl-1-methyl-eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*, **39**, 849-52, 1995.

- 
- <sup>60</sup> - **ROQUE N. F.; FERREIRA Z. S., GOTTLIEB O. R., STEPHENS R. L., WENKERT E.** The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part L. The structure of ocotealactol, a new eudesmanolide. *Rev. Latinoamer. Quim.*, **9**, 25-7, 1978.
- <sup>61</sup> - **WANG C., KUOH C., WU T.** Constituents of *Persea japonica*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 409-11, 1996.
- <sup>62</sup> - **TAVEIRA F.S.N., LIMA W.N., ANDRADE E.H.A., MAIA J.G.S.** Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 69-75, 2003.
- <sup>63</sup> - **SILVA M. F., ET ALL .** The Natural Occurrence of Magnosalicin Diastereomers. *Phytochemistry*, **45**, 1527-8, 1997.
- <sup>64</sup> - **NAVES R. Y., PIERRE A.** Volatile plant substances. CXXXIX. Sesquiterpenes of Brazilian rosewood oil (*Aniba rosaeodora* var. *amazonica*). *Bull. Soc. Chim. France*, 292-7, 1956.
- <sup>65</sup> - **SETZER, WILLIAM N.; HABER, WILLIAM A.** Leaf essential oil composition of five species of *Beilschmiedia* from Monteverde, Costa Rica. *Nat. Prod. Comm.*, **2**, 79-83, 2007.
- <sup>66</sup> - **JANTAN I., LING Y. E., ROMLI S.** A Comparative Study of the Constituents of the Essential Oils of Three *Cinnamomum* Species from Malaysia. *J. Essent. Oil Res.*, **15**, 387-391, 2003.
- <sup>67</sup> - **CHENG S., LIU J., TSAI K., CHEN W., CHANG S.** Chemical Composition and Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from Leaves of Different *Cinnamomum osmophloeum* Provenances. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4395-4400, 2004.
- <sup>68</sup> - **CHAO L. K., HUA K., HSU H., CHENG S., LIU J., CHANG S.** Study on the Antiinflammatory Activity of Essential Oil from Leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7274-78, 2005.
- <sup>69</sup> - **GIANG P. M., KÖNIG W. A., TONG P. S.** Chemical constituents of the essential oil from the bark of *Cinnamomum illicioides* A. Chev. from Vietnam. *J Nat Med*, **60**, 248-50, 2006
- <sup>70</sup> - **CHENG S., LIU J., HSUI Y., CHANG S.** Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Biores. Technol.* **97**, 306-312, 2006.
- <sup>71</sup> - **JANTAN I. B., MUHAMMAD K., NEE C. C.** Constituents of the Leaf and Bark Oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 281-83, 2005.

- <sup>72</sup> - RANA, V. S., BLAZQUEZ, M. A. GC-MS analysis of the essential oil of *Cinnamomum tamala* L. leaves. *Indian Perfumer*, **49**, 475-78, 2005.
- <sup>73</sup> - MIR S. R., ALI M., KAPOOR R. Chemical composition of essential oil of *Cinnamomum tamala* Nees et Eberm. leaves. *Flavour Frag. J.*, **19**, 112-14, 2004.
- <sup>74</sup> - MALLAVARAPU G. R., RAMESH S. Essential oil of the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 628-630, 2000.
- <sup>75</sup> - HIKINO H., SUZUKI N., TAKEMOTO T. Structure of campherenone and campherenol. *Tetrah. Lett.*, **50**, 5069-70, 1967.
- <sup>76</sup> - IBRAHIM, J. B.; GOH, S. H. Essential oils of *Cinnamomum* species from Peninsular Malaysia. *J. Essent. Oil Res.*, **4**, 161-71, 1992.
- <sup>77</sup> SATTAR, A.; GILANI, A. MUSTAFA; S., AKBAR, M. Gas chromatographic examination of the essential oil of *Cinnamomum camphora*. *J. Scient. Ind. Res.*, **34**, 135-6, 1991.
- <sup>78</sup> - HIKINO, H., SUZUKI, N., TAKEMOTO, T. Sesquiterpenoids. XXXVIII. Structure and absolute configuration of campherenone and campherenol, sesquiterpenoids of *Cinnamomum camphora*. . *Chem.Pharm. Bull.***19**, 87-92, 1971
- <sup>79</sup> - SHUICHI Y., KATSUMI H., NANAOM. T. Sesquiterpene alcohols and a phenol ether from the essential oil of the kusunoki (*Cinnamomum camphora*). *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **41**, 1465-6, 1968.
- <sup>80</sup> - HIKINO, H., SUZUKI, N., TAKEMOTO, T. Sesquiterpenoids. XXI. Structure and absolute configuration of kusunol. . *Chem.Pharm. Bull.*, **16**, 832-8, 1968.
- <sup>81</sup> - HIROI M. Sesquiterpenoids in the leaf oil of the camphor tree. I. Sesquiterpenoids of *Cinnamomum camphora* (Japanese camphor tree). *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **40**, 1003 - 4, 1967.
- <sup>82</sup> - TELASCREA M., ARAUJO C. C., MARQUES M. O. M., FACANALI R., MORAES P. L.R., CAVALHEIRO A. J. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. *Biochem. Syst. Ecol*, **35**, 222-32, 2007.
- <sup>83</sup> - FLAMINI G., CIONI P. L., MORELLI I. Differences in the Fragrances of Pollen and Different Floral Parts of Male and Female Flowers of *Laurus nobilis*. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4647-52, 2002.
- <sup>84</sup> - S. SANTOYO · R. LLORIA · L. JAIME · E. IBAÑEZ · F. J. SEÑORÁNS · G. REGLERO. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds

---

from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 565–71, 2006.

<sup>85</sup> - **KILIC A., HAFIZOGLU H., KOLLMANNBERGER H., NITZ S.** Volatile Constituents and Key Odorants in Leaves, Buds, Flowers, and Fruits of *Laurus nobilis* L. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1601-06, 2004.

<sup>86</sup> - **KILIC A., ALTUNTAS E.** Wood and bark volatile compounds of *Laurus nobilis* L. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **64**, 317–20, 2006.

<sup>87</sup> - **AHMAD F. B., JANTAN I. B., BAKAR B. A., AHMAD A. S. B.** A Comparative Study of the Composition of the Leaf Oils of Three *Litsea* species from Borneo. *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 323-26, 2005.

<sup>88</sup> - **KANJILAL, P. B.; KOTOKY, RUMI; SINGH, R. S.** Composition of essential oil from leaf of *Litsea kingii* H.K. *Indian Perfumer*, **45**, 253-56, 2001.

<sup>89</sup> - **SETZER W. N., TAKAKU S., STOKES S. L., PENTON A. F.** Inhibition of Cruzain by Ocotea Leaf Essential Oils. from Monteverde, Costa Rica. *Pharmacol.*, **3** 785-93, 2006.

<sup>90</sup> - **SCORA R. W., AHMED M.** Terpenes of *Persea tolimanensis* (Lauraceae), an Ancestor of the Guatemalan Avocados. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1971-73, 1993.

<sup>91</sup> - **SINYINDA S., GRAMSHAW J. W.** Volatiles of avocado fruit. *Food Chem.*, **62**, 483-87, 1998.

<sup>92</sup> - **WEYERSTAHL, P., MARSCHALL H., SCORA R. W.** Constituents of the leaf essential oil of *Persea indica* (L.) K. Spreng. *Flavour Frag. J.*, **8**, 201-7, 1993.

<sup>93</sup> - **REYNOLDS T., KITE G.** Volatile constituents of *Phoebe porosa* Mez. *J. Essent. Oil Res.*, **7**, 415-18, 1995.

<sup>94</sup> - **WEYERSTAHL P., WAHLBURG H. C., SPLITTGERBER U., MARSCHALL H.** Volatile constituents of Brazilian phoebe oil. *Flavour Frag. J.*, **9**, 179-86, 1994.

<sup>95</sup> - **WEYERSTAHL P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H.; WAHLBURG H. C.** Terpenes and terpene derivatives. XXV. Oreodaphnenol-a sesquiterpene alcohol with a new carbon skeleton. *Liebigs Ann. Chem.*, **3**, 307-8, 1989.

<sup>96</sup> - **WEYERSTAHL P.; MARSCHALL H.; SPLITTGERBER U.** Porosadienone, a Phoebe oil sesquiterpene with a new carbon skeleton. *Liebigs Ann. Chem.*, **5**, 523-5, 1994.

- <sup>97</sup> - **KELSEY R. G., MCCUISTION O., KARCHESY J.** Bark and leaf essential oil of *Umbellularia californica*, California Bay laurel, from Oregon, *Nat. Prod. Comm.*, **2**, 779-80, 2007.
- <sup>98</sup> - **NUNEZ, C. V., ROQUE, N. F.** Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *J. Essent. Oil Res.*, **11**,(4), 439-440, 1999.
- <sup>99</sup> - **WATANABE Y.** Termite repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood. *J Wood Sci* **51**,:514–519, 2005.
- <sup>100</sup> -**GOREN N., JAKUPOVIC J., TOPAL S.** Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*. *Phytochemistry*, **29**, 1467-1469,1990.
- <sup>101</sup> -**MORENO, P.R.H.** Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. *Int. J. Pharmacog.*, **31**, 89-192, 1993.
- <sup>102</sup> - **LANZETTA R., LAMA G., MAURIELLO G., PARRILLI M., RACIOPPI R., SODANO G.** Ichthyotoxic sesquiterpenes and xanthanolides from *Dittrichia graveolens*. *Phytochemistry*, **30**, 1121-4, 1991.
- <sup>103</sup> - **GONZALEZ C. A., GUADANO A, TONN C.E., SOSA M.E.** Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semi-arid lands. *J. Biosc.*, **60** , 855-861,2005
- <sup>104</sup> - **GARDNER, H. W.; DESJARDINS A. E., MCCORMICK, S. P., WEISLEDER D.** Detoxification of the potato phytoalexin rishitin by *Gibberella pulicaris*. *Phytochemistry*, **37**, 1001-5, 1994.
- <sup>105</sup>- **KECHATOVA, N. A.; BANKOVSKII, A. I.; SHEICHENKO, V. I.; RYBALKO, K. S.** Constitution of a sesquiterpene hydroxy acid of *Artemisia vachanica*. *Khim. Prirodn. Soedin.*, **5**, 306-11, 1965.
- <sup>106</sup> - **FRAGA B. M.** Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 392- 413,2003.
- <sup>107</sup> **SUN C., SYU W. J., DON M. J., LU J. J., LEE G. H.** Sesquiterpene Lactones from the Root of *Saussurea lappa*. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1175-1180, 2003.
- <sup>108</sup> - **RODRIGUEZ, E., TOWERS, G. H. N., MITCHELL, J. C.** Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, **15**, 1573-1580. 1976.
- <sup>109</sup> - **PICMAN, A. K.** Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, **14**, 255-282, 1986.

- 
- <sup>110</sup> - LEE, M. G., LEE, K. T., CHI, S. G., PARK, J. H. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 303-6, 2001.
- <sup>111</sup> - LYSS, G., KNORRE, A., SCHMIDT, T. J.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- $\kappa$ B by directly targeting p65. *J. Biol.Chem.*, **273**, 33508-16,1998.
- <sup>112</sup> - YOSHIKAWA, M., HATAKEYAMA S., INOUE Y., YAMAHARA J. Saussureamines A, B, C, D, and E, new anti-ulcer principles from Chinese *Saussureae Radix*. *Chem.Pharm. Bull.*, **41**, 214-216, 1993.
- <sup>113</sup> - F. W WEHRLI, T NISHIDA. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, **36**, 1. New York, Springer-Verlag, 1979.
- 114 - JUNEJA, R. K.; SHARMA, S. C.; TANDON, J. S. Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium*. *Phytochemistry*, **26**, 1123-5. 1987.
- <sup>115</sup> - SANZ M. B. K., DONADEL O. J. Biotransformation of eudesmanes by *Tessaria absinthioides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.***73**, 123–29, 2003.
- <sup>116</sup> -AL-DABBASA M. M., HASHINAGAA F., ABDELGALEILA S. A.M., SUGANUMAA T., AKIYAMAB K., HAYASHIB H. Antibacterial activity of an eudesmane sesquiterpene isolated from common *Varthemia*, *Varthemia iphionoides*. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 237–40, 2005.
- <sup>117</sup> - AHMED A. A., MAHMOUD A. A. Jasonol, a rare tricyclic eudesmane sesquiterpene and six other new sesquiterpenoids from *Jasonia candicans*. *Tetrahedron*, **54**, 8141-52, 1998.
- <sup>118</sup> - JAKUPOVIC J., GANZER U., PRITSCHOW P., LEHMANN L., BOHLMANN F., KING R. M. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Ursinia* species. *Phytochemistry*, **31**, 863-80,1992.
- <sup>119</sup> - RUSTAIYAN A., JAKUPOVIC J., CHAU-THI T. V., BOHLMANN F., SADJADI A. Further sesquiterpene lactones from the genus *Dittrichia*. *Phytochemistry*, **26**, 2603-6, 1987.
- <sup>120</sup> - AHMED, A. A., JAKUPOVIC, J. Sesqui- and monoterpenes from *Jasonia Montana*. *Phytochemistry*, **29**, 3658-61, 1990.

- 
- <sup>121</sup> - **EL-GHAZOULY M. G., EL-SEBAKHY N. A., SEIF EL-DIN A. A., ZDERO C., BOHLMANN F.** Sesquiterpene xylosides from *Iphiaona scabra*. *Phytochemistry*, **26**, 439 - 43, 1987.
- <sup>122</sup> - **TODOROVA M. N., TSANKOVA E. T.** New sesquiterpenoids from *Achillea clypeolata*. *Phytochemistry*, **52**, 1515-18, 1999.
- <sup>123</sup> - **ECCHERELLI P., URINI A S., ARCOTULLIO M. C.** Structure of Cyperanic Acid, A New Sesquiterpene From *Dittrichia Viscosa*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 1006 - 09, 1988.
- <sup>124</sup> **TANAKA J. C. A., SILVA C. C., FILHO B. P. D., NAKAMURA C. V., CARVALHO J. E., FOGGIO M. A.** Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE). *Quim. Nova*, **28**, 834-37, 2005.
- <sup>125</sup> - **HAYASSHI M.; TICE, R.R.; MACGREGOR, J.T.; ANDERSON, D. BLAKEY, D. H., KIRSH-VOLDERS, M., OLESON, F. B. JR., PACCHIEROTTI F., ROMAGNA F. , SHIMADA H., SUTOU SIZUYO , VANNIER, B.** In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut. Res.* **312**, 293-304,1994.
- <sup>126</sup> - **CHOY, W.N.** Regulatory Genetic Toxicology Tests. *In: Genetic Toxicology And Cancer Risk Assessment*. Informa Healthcare, USA .2001
- <sup>127</sup> - **CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L; MYRES, M.S.** Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **47**, 2123-36, 1990.
- <sup>128</sup>-**MACGREGOR, J.T.; HEDDLE J. A., HITE M., BARRY H. MARGOLIN, CLACS RAMEL, SALAMONE M. F., TICE R. R. , WILD D.** Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mut Res.***189**, 103-112, 1987.
- <sup>129</sup> - **FENECH, M.** The in vitro micronucleus technique. *Mut. Res.* **455**, 81-95, 2000.
- <sup>130</sup> - **HOOFTMAN, R. N., RAAT, W.** Induction of nuclear anomalies micronuclei in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mut. Res.*, **104**, 147-52, 1982.