



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



JÉSSICA DE SOUZA DE PAULA

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
Calycophyllum multiflorum – RUBIACEAE

CAMPO GRANDE, MS

2022



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



JÉSSICA DE SOUZA DE PAULA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE
Calycophyllum multiflorum – RUBIACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química)

Profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida

CAMPO GRANDE, MS

2022

*Dedico este trabalho a minha família e amigos,
por todo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta conquista.

Aos meus amados pais, Sebastiana e Valdê, e a meu querido irmão Douglas, por sempre serem uma inspiração para mim, por todo o amor, compreensão e por terem me apoiado tanto desde sempre. À minha namorada Kátia, pelo amor, carinho e pela paciência com os meus surtos diários, muito obrigada por estar do meu lado e sempre me acalmar na reta final dessa caminhada.

À Profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida pela orientação e apoio durante toda a graduação, pela enorme contribuição na minha formação acadêmica, pelas conversas, amizade e por ser esta pessoa maravilhosa.

Aos professores Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez, Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Figueiredo e Dr. Joaquim Corsino, que contribuíram muito para minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Ana Camila Michelletti – Instituto de Química, INQUI-UFMS, por realizar o ensaio de atividade antimicrobiana e avaliação do efeito sinérgico.

Ao Prof. Dr. Arnildo Pott – INBIO-UFMS, pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Às técnicas, Dra. Luciana Marçal Ravaglia e Dra. Jacqueline Marques Petroni, pelas análises de RMN 2D e aos Me. Patrick da Silva Mirowski, Me. Felipe Oliveira Nunes e Me. Carlos dos Santos Totini pela realização dos experimentos de RMN 1D.

Aos amigos Patrick, Rafael, Genilson, Felipe, Jeyciane, Talita, Victor, Maria Eduarda, Maria Victória, Getúlio, Pedro, Lauro e Carlos, por todo o carinho, toda a ajuda, inspiração, e por sempre estarem do meu lado, muito obrigada, vocês são incríveis.

Aos meus amigos da biologia e da vida, Henrique, Anne, Ana Paula, Bruna, Fernanda, Karina, Leonardo, Rebeca e Thaís, por todo o amor, carinho e companheirismo nas viagens de campo.

Aos professores do PPGQ que contribuíram para minha formação.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado contribuir com a minha pesquisa.

Aos órgãos de fomento por ter financiado essa pesquisa.

“I know that we can be strong, in the real way.”

Pearl

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a composição química e avaliar as atividades biológicas dos extratos e fases de *Calycophyllum multiflorum*. O material vegetal (folhas e caule) foi triturado separadamente e submetido à extração por maceração (257,9 g das folhas e 1,5 kg do caule), utilizando-se etanol, durante dez dias, obtendo-se 21g (folhas) e 49g (caule) de extrato etanólico. Os extratos tiveram seus perfis químicos analisados por CLAE-DAD-ESI-EM/EM, além de terem sido avaliados quanto à atividade antimicrobiana e efeito sinérgico, onde o mais ativo no efeito sinérgico, oriundo das folhas, foi submetido à partição líquido-líquido, obtendo-se as fases hexânica (2 g) e acetato de etila (14 g) e resíduo-hidrometanólico (2 g). A fase acetato de etila das folhas, com melhor rendimento, foi submetida ao fracionamento empregando-se técnicas de cromatográficas visando o isolamento dos constituintes químicos. Resultados promissores de atividade antimicrobiana foram observados para o extrato das folhas, que apresentou sinergismo em combinação com o antibiótico ampicilina, levando a um decréscimo significativo na concentração mínima inibitória do fármaco frente a bactérias clínicas multirresistentes gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *Enterococcus faecium*) e gram-negativas (*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*), isoladas no Hospital Universitário-UFMS, e consideradas prioridade máxima para o desenvolvimento de novos tratamentos segundo a OMS. O perfil químico revelou uma diversidade de compostos, e através de técnicas cromatográficas foi possível isolar e identificar, por RMN e espectrometria de massas, 14 substâncias, sendo um iridoide glicosilado: loganina; sete secoiridoide glicosilados: secoxiloganina, α -morronisídeo e β -morronisídeo, swerosídeo, 7-O- α -etil-morronisídeo, 7-O- β -etil-morronisídeo e (E)-aldosecologanina; um fenilpropanoide: ácido clorogênico; quatro flavonoides glicosilados: rutina, quercetina 3-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo, quercitrina e afzelina; e uma proantocianidina: kandelina A-2. Das substâncias isoladas, apenas duas já haviam sido relatadas em *Calycophyllum*, e cinco estão sendo descritas pela primeira vez em Rubiaceae. Esses resultados ampliam os conhecimentos químicos sobre Rubiaceae e reforçam a importância e o potencial dos produtos naturais como alternativas terapêuticas no combate à RAM.

Palavras-chave: *Calycophyllum multiflorum*; resistência antimicrobiana; iridoide; secoiridoide; flavonoides glicosilados.

ABSTRACT

The objective of the present work was to analyze the chemical composition and evaluate the biological activities of the extracts and phases of *Calycophyllum multiflorum*. The plant material (leaves and stem) was crushed separately and subjected to extraction by maceration (257.9 g of leaves and 1.5 kg of stem), using ethanol, for ten days, obtaining 21 g (leaves) and 49g (stem) of ethanol extract. The extracts had their chemical profiles analyzed by HPLC-DAD-ESI-EM/MS and were evaluated for antimicrobial activity and synergistic effect, where the most active in the synergistic effect, from the leaves, was subjected to liquid-liquid extraction, obtaining the hexane (2 g) and ethyl acetate (14 g) phases. The ethyl acetate phase of the leaves, with better yield, had its chemical profile analyzed by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and, later, it was subjected to fractionation using chromatographic techniques aiming at the isolation of chemical constituents. Promising results of antimicrobial activity were observed for the leaf extract, which showed synergism in combination with the antibiotic ampicillin, leading to a significant decrease in the minimum inhibitory concentration of the drug against gram-positive multidrug-resistant clinical bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *Enterococcus faecium*) and gram-negative (*Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*), isolated at the University Hospital-UFMS, and considered a top priority for the development of new treatments according to the WHO. The chemical profile revealed a diversity of compounds, and through chromatographic techniques it was possible to isolate and identify, by NMR and mass spectrometry, 14 compounds, being one iridoid: loganin; seven glycosylated secoiridoids: secoxyloganin, α -morroneiside and β -morroneiside, sweroside, 7-*O*- α -ethyl-morroneiside, 7-*O*- β -ethyl-morroneiside and (*E*)-aldosecologanin; a phenylpropanoid: chlorogenic acid; four glycosylated flavonoids: rutin, quercetin 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranoside, quercitrin and afzelin; and a proanthocyanidin: kandelin A-2. Of the substances isolated, only two had already been reported in *Calycophyllum*, and five are being described for the first time in Rubiaceae. These results expand chemical knowledge about Rubiaceae and reinforce the importance and potential of natural products as therapeutic alternatives in the fight against AMR.

Keywords: *Calycophyllum multiflorum*; Chemical profile; Antimicrobial; Antioxidant; Antiproliferative.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidades isoprênicas presentes nos três principais esqueletos de iridoides.	24
Figura 2. Biossíntese de iridoides (DEWICK, 2009).	25
Figura 3. Alguns esqueletos básicos de flavonoides.	26
Figura 4. Fluxograma da partição líquido-líquido.	35
Figura 5. Cromatograma da fração CMFA1-5.	38
Figura 6. Cromatograma da fração CMFA1-6-22.	40
Figura 7. Precipitado CMFA1-10-14P presente na fração CMFA1-10-14.	41
Figura 8. Cromatograma da fração CMFA1-10-15.	42
Figura 9. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA1.	43
Figura 10. Cromatograma da fração CMFA2-5-6.	45
Figura 11. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA2.	45
Figura 12. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA3.	47
Figura 13. Substâncias isoladas na fase acetato de etila das folhas de <i>C. multiflorum</i>	48
Figura 14. Substância 6, loganina.	51
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância 6.	51
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância 6.	52
Figura 17. Espectro de DEPT-135 da substância 6.	52
Figura 18. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 6.	53
Figura 19. Cromatograma de UV, MS e MS^2 (modo positivo) da substância 6.	53
Figura 20. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.	56
Figura 21. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.	57
Figura 22. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.	57
Figura 23. Correlações observadas no experimento COSY, da substância 1.	58
Figura 24. Correlações observadas no experimento NOESY, da substância 1.	58
Figura 25. Substância 1, a (E)-aldosecologanina.	59
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância 1.	60
Figura 27. Expansões espectro de RMN de ^1H	60
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância 1.	61
Figura 29. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	61
Figura 30. Espectro HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	62
Figura 31. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	62
Figura 32. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	63
Figura 33. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	63
Figura 34. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	64
Figura 35. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	64
Figura 36. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 1.	65
Figura 37. Espectro COSY (^1H , ^1H , 500 MHz, D_2O) da substância 1.	65
Figura 38. Espectro NOESY (^1H , ^1H , 500 MHz, D_2O) da substância 1.	66
Figura 39. Espectro de massas (MS e MS^2 , modo negativo) da substância 1.	66
Figura 40. Cromatograma de UV, MS e MS^2 (modo positivo) da substância 1.	67
Figura 41. Substância 2, a secoxiloganina.	70
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância 2.	71
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância 2.	71
Figura 44. Espectro de DEPT-135 da substância 2.	72
Figura 45. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 2.	72

Figura 46. Espectros de massas (MS e MS ² , modo positivo) da substância 2	73
Figura 47. Substâncias 3 e 4 , α -morronisídeo e β -morronisídeo.	76
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	77
Figura 49. Expansões do espectro de RMN de ¹ H.	77
Figura 50. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	78
Figura 51. Experimento bidimensional HSQC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	78
Figura 52. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	79
Figura 53. Ampliação do experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 (a) e 4 (b).	79
Figura 54. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	80
Figura 55. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	80
Figura 56. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	81
Figura 57. Experimento COSY (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	81
Figura 58. Ampliação do experimento COSY (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	82
Figura 59. Experimento NOESY (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	82
Figura 60. Ampliação do experimento NOESY (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 3 e 4	83
Figura 61. Cromatograma de UV, MS e MS ² (modo positivo) das substâncias 3 e 4	83
Figura 62. Representação estrutural do ácido secologânico e swerosídeo.	86
Figura 63. Substância 5 , Swerosídeo.	86
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O) da substância 5	87
Figura 65. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, D ₂ O) da substância 5	87
Figura 66. Espectro de DEPT-135 (75 MHz, D ₂ O) da substância 5	88
Figura 67. Cromatograma de UV, MS (modo positivo) da substância 5	88
Figura 68. Substâncias 7 e 8 , 7-O- α -etil-morronisídeo e 7-O- β -etil-morronisídeo.	92
Figura 69. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O) da substância 7	93
Figura 70. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O) da substância 8	93
Figura 71. Expansões do espectro de RMN de ¹ H da substância 8	94
Figura 72. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, D ₂ O) da substância 7	94
Figura 73. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, D ₂ O) da substância 8	95
Figura 74. Experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	95
Figura 75. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	96
Figura 76. Experimento bidimensional HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	96
Figura 77. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	97
Figura 78. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	97
Figura 79. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	98
Figura 80. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	98
Figura 81. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	99
Figura 82. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	99
Figura 83. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	100
Figura 84. Experimento bidimensional COSY (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	100
Figura 85. Experimento bidimensional COSY (500 MHz, D ₂ O) das substâncias 8	101
Figura 86. Experimento bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	101
Figura 87. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	102
Figura 88. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 7	102
Figura 89. Experimento bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	103
Figura 90. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	103
Figura 91. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D ₂ O) da substância 8	104

Figura 92. Cromatograma de UV, MS e MS ² (modo positivo) da substância 7 .	104
Figura 93. Cromatograma de UV, MS e MS ² (modo positivo) da substância 8 .	105
Figura 94. Substância 11 , ácido clorogênico.	107
Figura 95. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O com gotas de acetona-d ₆) da substância 11 .	108
Figura 96. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, D ₂ O com gotas de acetona-d ₆) da substância 11 .	108
Figura 97. Acoplamentos encontrados na quercetina.	110
Figura 98. Substância 9 , rutina.	112
Figura 99. Substância 10 , quercetina 3-O-[β-D-xilopiranosil(1→2)]-β-D-galactopiranosídeo.	112
Figura 100. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 9 .	113
Figura 101. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 10 .	113
Figura 102. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 9 .	114
Figura 103. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 9 .	114
Figura 104. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 10 .	115
Figura 105. Espectro HQSC (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 10 .	115
Figura 106. Espectro HMBC (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 10 .	116
Figura 107. Expansões do HMBC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 10 .	116
Figura 108. Substância 13 , quercitrina.	120
Figura 109. Substância 14 , Afzelina.	121
Figura 110. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 13 .	121
Figura 111. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 14 .	122
Figura 112. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 13 .	122
Figura 113. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 13 .	123
Figura 114. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 14 .	123
Figura 115. Espectro de massas (MS e MS ² , modo negativo) da substância 13 .	124
Figura 116. Espectro de massas (MS e MS ² , modo negativo) da substância 14 .	124
Figura 117. Substância 12 , Kandelina A-2.	128
Figura 118. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	129
Figura 119. Expansões do espectro de RMN de ¹ H.	129
Figura 120. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	130
Figura 121. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	130
Figura 122. Espectro HSQC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	131
Figura 123. Espectro HMBC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	131
Figura 124. Expansões do HMBC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	132
Figura 125. Expansões do HMBC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	132
Figura 126. Expansões do HMBC (¹ H, ¹³ C, 500/125 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	133
Figura 127. Principais correlações (em HMBC) para a substância 12 .	133
Figura 128. Cinchonaina IIa, Cinchonaina IIb, Kandelina A-2 e Kandelina A-1.	134
Figura 129. Espectro NOESY (¹ H, ¹ H, 500 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	135
Figura 130. Expansões do NOESY (¹ H, ¹ H, 500 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	135
Figura 131. Expansões do NOESY (¹ H, ¹ H, 500 MHz, CD ₃ OD) da substância 12 .	136
Figura 132. Cromatograma de UV, MS e MS ² (modo positivo) da substância 12 .	136
Figura 133. Cromatogramas de íons totais (BPC) no modo positivo dos extratos etanólicos do caule (vermelho) e folhas (preto) de <i>C. multiflorum</i> .	138

Figura 134. Cromatogramas de íons totais (BPC) no modo negativo dos extratos etanólicos do caule (vermelho) e folhas (preto) de *C. multiflorum*. 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns metabólitos secundários presentes na família Rubiaceae.....	19
Tabela 2. Metabólitos secundários de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	22
Tabela 3. Fracionamento da fase acetato de etila em sílica C-18.....	37
Tabela 4. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1.....	38
Tabela 5. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1-6.	39
Tabela 6. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1-10.	41
Tabela 7. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.....	43
Tabela 8. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.....	44
Tabela 9. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.....	46
Tabela 10. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.....	46
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H da substância 6 (D_2O) e literatura (CALIS et al., 1984), em CD_3OD	54
Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C da substância 6 , em D_2O , e literatura (ITOH et al., 2005; DAMTOFT et al., 1981), em CD_3OD	54
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , 300 MHz/ 75 MHz, da substância 1 (D_2O) e literatura em CD_3OD (MACHIDA et al., 2002).	68
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 2 (D_2O) e literatura em CD_3OD . A calibração foi feita pelo C-6 da glucose com a literatura CALIS, et al., 1984.....	73
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300/75 MHz) das substâncias 3 e 4 (D_2O).	84
Tabela 16. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 3 e 4 e literatura (BOCK et al., 1976), ambos em D_2O	84
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 6 e literatura (VAN BEEK et al., 1982), ambos em D_2O	89
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H das substâncias 7 e 8 (D_2O) e literatura (SUNGHWA et al., 2009), em CD_3OD	105
Tabela 19. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 7 e 8 (D_2O) e literatura (SUNGHWA et al., 2009), em CD_3OD	106
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 11 (D_2O com gotas de acetona- d_6) e literatura (SANTOS et al., 2004, obtido em D_2O).	109
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H das substâncias 9 e 10 , em comparação com a literatura (LI et al., 2008; IWAOKA et al., 2008), ambos em CD_3OD	117
Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 9 e 10 , em comparação com a literatura (LI et al., 2008; IWAOKA et al., 2008), ambos em CD_3OD	118
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H das substâncias 13 e 14 , em comparação com a literatura (YANG et al., 2010), ambos em CD_3OD	125
Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 13 e 14 , em comparação com a literatura (YANG et al., 2010), ambos em CD_3OD	125
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 12 (CD_3OD) e literatura (HSU et al., 1985, obtido em acetona- d_6 com gotas de D_2O).	137
Tabela 26. Principais picos anotados em <i>C. multiflorum</i>	140
Tabela 27. Valores de CMI individuais e em combinação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da ampicilina (AMP), dos extratos etanólicos das folhas e caule, frente a bactérias Gram-positivas.	141
Tabela 28. Valores de CMI individuais e combinados ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do ciprofloxacino (CIP) e extratos etanólicos das folhas e caule, frente a bactérias Gram-negativas.	141

Tabela 29. Valores da concentração inibitória fracionada (CIF) e índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), frente a bactérias Gram-positivas.	142
Tabela 30. Valores da concentração inibitória fracionada (CIF) e do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), frente a bactérias Gram-negativas.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
δ	Deslocamento químico
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
HMBC	Heteronuclear mutiple bond correlation
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICIF	Inibição da Concentração Inibitória Fracionada
J	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
2.1. A FAMÍLIA RUBIACEAE.....	17
2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE RUBIACEAE.....	18
2.3. O GÊNERO <i>Calycophyllum</i>	20
2.4. <i>Calycophyllum multiflorum</i>	22
2. IRIDOIDES E SECOIRIDOIDES	23
2. FLAVONOIDES	25
2.5. ATIVIDADE EFEITO SINÉRGICO.....	27
3. OBJETIVOS	30
4. PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FASES.....	34
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
4.3.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO	36
4.3. OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DA FASE ACETATO DE ETILA ORIUNDA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE <i>C. multiflorum</i>	36
4.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FASE ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS (CMFA).....	37
4.4.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1	37
4.4.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA2: isolamento da substância 11 ..	43
4.4.3. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA3: isolamento das substâncias 13 e 14.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO	141
5.2. ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CAULE DE <i>C. multiflorum</i>	137
5.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FASE ACETATO DAS FOLHAS DE <i>C. multiflorum</i>	48
5.3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS IRIDOIDES: substância 6.....	49
5.3.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS SECOIRIDOIDES: substâncias 1-5 e 7-8.....	55
5.3.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO FENILPROPANOIDE: substância 11.....	106

5.3.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONOIDES: substâncias 9, 10, 13 e 14	109
5.3.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA PROANTOCIANIDINA: substância 12.....	126
CONCLUSÕES.....	146
REFERÊNCIAS	148

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais atuam como importantes fontes terapêuticas na medicina tradicional. Um dos primeiros registros ocorreu na Mesopotâmia, há cerca de 2600 a.C., catalogando aproximadamente 1000 plantas, em que algumas delas ainda são utilizadas para tratar tosse, resfriados e inflamações (DIAS *et al.*, 2012). Outro registro muito conhecido, o “*Ebers Papyrus*”, datado de 1500 a.C., documenta por volta de 700 drogas extraídas majoritariamente de plantas. A medicina tradicional chinesa apresenta uma rica diversidade de registros, sendo o primeiro feito por Wu Shi Er Bing Fang (contendo 52 prescrições), além do livro “*Shennong Herbal*” (em torno de 100 a.C.) que contém 365 drogas documentadas e o *Tang Herbal* (659 d.C.), com 850 drogas (CRAGG & NEWMAN, 2013). Os conhecimentos sobre produtos naturais vêm ajudando o desenvolvimento de novos fármacos para as mais diversas doenças, devido à complexidade estrutural que estas substâncias apresentam, pois são evolutivamente desenvolvidas para as mais diversas interações biológicas (ATANASOV *et al.*, 2021; JONES & FIRN, 1991). Um grande avanço na produção de fármacos foi a descoberta da penicilina, efetuada pelo pesquisador Alexander Fleming em 1928, conferindo a ele um prêmio Nobel e revolucionando a busca por novos medicamentos (BUTLER, 2004).

No que tange a fármacos de origem vegetal, a descoberta da morfina, obtida da espécie *Papaver somniferum*, além dos estudos com *Catharanthus roseus* e o descoberta das substâncias utilizadas como quimioterápicos como a vimblastina e vincristina, bem como a obtenção da digoxina, substância oriunda da flor de *Digitalis lanata*, exemplificam a importância de plantas como fontes de fármacos (LAHLOU, 2013; HEIJDEN, 2004). Sendo assim, pesquisas vêm sendo feitas visando ao estudo químico de plantas e ao descobrimento de novas substâncias biologicamente ativas.

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, apresentando cerca de 50.000 espécies entre algas, plantas e fungos, aproximadamente 20% da flora mundial. As angiospermas (plantas com flor, fruto e semente) representam cerca de 70% da flora brasileira, sendo catalogadas 35.617 espécies, distribuídas em todo o território (JBRJ, 2022; GIULIETTI *et al.*, 2005). Segundo o IBGE, o Brasil é dividido em seis biomas principais, sendo eles a Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica, Caatinga e Pampa. O Cerrado, localizado majoritariamente no Planalto Central, é o segundo maior bioma (segue após a Amazônia) abrangendo aproximadamente 25% do território brasileiro, nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, São

Paulo e Distrito Federal. É reconhecido por ser a savana neotropical com maior biodiversidade do mundo, além de ser um dos *hotspots* mundiais, apresentando 12.454 espécies de angiospermas distribuídas em 185 famílias, em que cerca de 4.400 espécies são endêmicas (KLIN & MACHADO, 2005; CREN, 2019; BUENO *et al.*, 2016).

O Cerrado ocorrente no estado do Mato Grosso do Sul abriga cerca de 540 espécies distribuídas em 84 famílias botânicas, sendo três espécies exclusivas do Cerrado sul-mato-grossense. A flora do MS destaca a ocorrência de 13 famílias ricas em espécies, como as Fabaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Lauraceae, Annonaceae, Vochysiaceae, Malvaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Chrysobalanaceae, Sapindaceae, Arecaceae e Apocynaceae (BUENO *et al.*, 2016). Além da diversidade biológica, as plantas do Cerrado possuem uma variedade significativa de constituintes químicos bioativos, conforme relatam Garcez e colaboradores (2016), em pesquisas envolvendo o estudo químico e avaliação biológica de extratos de plantas, dentre elas espécies da família Rubiaceae, oriundas do Cerrado e Pantanal sul-mato-grossenses.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A FAMÍLIA RUBIACEAE

A família Rubiaceae (ordem Gentianales), é um dos maiores táxons das angiospermas e apresenta 13.465 espécies registradas e distribuídas em mais de 600 gêneros (STEVENS, 2022). No Brasil, estão registradas mais de 2.000 espécies em aproximadamente 120 gêneros (BREMER & PAPKE, 2009; BREMER, 2009), sendo encontradas como árvores, arbustos, lianas ou ervas, nos mais variados ambientes, como regiões tropicais, temperadas e áridas (PELIKAN, 1979). As pontuações areoladas, folhas opostas ou verticiladas, com venação penínérvea com coléteres, flores solitárias terminais ou axilares, com simetria radial, corola em forma de disco uniforme e estípulas, adicionadas à presença de ovário ínfero com disco nectarífero presente e estípulas interpeciolares, são características morfológicas e anatômicas para a identificação de um espécime desta família (JUDD *et al.*, 2009).

A família Rubiaceae possui grande importância econômica, sendo a *Coffea arabica* (café) uma das espécies de maior relevância econômica, além do destaque alimentício da *Genipa americana* (genipapo). Esta família exibe um valor terapêutico extensamente

documentado na literatura, com espécies como a *Uncaria tomentosa*, que apresenta grandes contribuições para a descoberta de fármacos, bem como as espécies dos gêneros *Borreria* e *Spermacoce*, que apresentam atividades antiinflamatórias, antitumorais, antimicrobianas, larvicidas, antioxidantes, gastrointestinais, antiuceras e hepatoprotetivas (BATIHA *et al.*, 2020; CONSERVA & JÚNIOR, 2012; KALA, 2015). As atividades antimicrobianas de Rubiaceae também são amplamente relatadas na literatura, como nos gêneros *Mussaenda*, *Canthium*, *Nauclea*, *Mitragyna*, *Pterocarpusbussei*, *Morinda* e *Psychotria*, além dos gêneros supracitados, demonstrando um potencial uso de espécies desta família no tratamento de infecções microbianas (KALA, 2015; JAYASINGHE *et al.*, 2002; ADEWOLE *et al.*, 2021).

Ademais, esta família possui utilidade ornamental (com exemplos como *Gardenia jasminoides*, *Ixora* spp. e *Mussaenda* spp.) e madeira (*Calycophyllum spruceanum*) amplamente reconhecidas no Brasil. Complementarmente, são encontradas espécies com uso na construção civil, acaricida, no preparo de veneno e tinturas, em rituais religiosos, como forrageira, apícola e artesanal, apresentando ainda outras atividades medicinais como anti-sifilítica, anti-asmática, antiangiogênica (VALLI *et al.*, 2016; GAVILANES *et al.*, 2016).

2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE RUBIACEAE

A composição química da família Rubiaceae é caracterizada pela rica diversidade de metabólitos secundários com potenciais farmacológicos e quimiotaxonômicos, como na subfamília Rubioideae, à qual pertencem os gêneros *Cephaelis*, *Galium* e *Relbunium*, dos quais são isolados iridoides, antraquinonas e/ou alcaloides (MARTINS & NUNES, 2015). Espécies do gênero *Psychotria*, pertencentes a esta subfamília, apresentam o alcaloide emetina cujos efeitos eméticos, anti-helmínticos, antimicrobianos e antitumorais já foram descritos (LAMEIRA, 2002). Ainda, pode-se encontrar iridoides nos gêneros *Anthocephalus* e *Prismatomeris* (KITAGAWA *et al.*, 1996; SALLEH *et al.*, 2019).

A subfamília Cinchonoideae, a qual pertence *Calycophyllum* sp., apresenta o gênero *Cinchona*, onde foram isoladas: a quinina, substância utilizada contra a malária; a cinchonina; a quinidina, substância usada contra a arritmia; os triterpenos ácido cinchólico e ácido quinóvico (JUNG *et al.*, 2012; MARTINS & NUNES, 2015). A unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) é uma das espécies mais utilizadas na medicina popular brasileira, e apresenta diversos metabólitos secundários com atividade biológica descrita na literatura, tais como o alcaloide pteropodina (MARTINS & NUNES, 2015). Adicionalmente, nesta subfamília já

foram caracterizadas saponinas, que apresentaram potencial anti-inflamatório (BORGES *et al.*, 2013).

A subfamília Ixoroideae apresenta uma vasta diversidade de metabólitos secundários descritas na literatura. Nesta subfamília encontra-se o gênero *Coffea*, que contém a cafeína como principal componente químico, além de diterpenos e antraquinonas (MARTINS & NUNES, 2015). A genipina, iridoide isolado no gênero *Genipa*, e ao qual pertence a espécie *Genipa americana* (popularmente conhecida como jenipapo), apresenta atividades antiangiogênica, anti-inflamatória e antioxidante descritas na literatura (KOO *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; MARTINS & NUNES, 2015). Adicionalmente, os monoterpênicos, sesquiterpenos, triterpenos, alcaloides indólicos monoterpênicos, alcaloides β -carbolínicos, secoiridoides, iridoides lactônicos e glicosilados, compostos fenólicos e cumarinas, também são descritos em Ixoroideae (DREWES *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2008; NAHRSTEDT *et al.*, 1995; PAGE *et al.*, 1994; AQUINO *et al.*, 1999; KUNERT *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2013; MOON *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2005; RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; DINDA *et al.*, 2006), como ilustra a tabela 1.

Tabela 1. Alguns metabólitos secundários presentes na família Rubiaceae.

Subfamília	Gênero	Classe	Substância	Ref.
Rubioidae	<i>Cephaelis</i>	Lactona	Ácido Quelidônico	1
	<i>Psychotria</i>	Alcaloide	Psicotrina	1
		Alcaloide	Emetina	2
	<i>Anthocephalus</i>	Seco-iridoide glicosilado	Ácido Logânico	3
	<i>Prismatomeris</i>	Iridoide	Prismatomerina	4
Cinchonoideae	<i>Cinchona</i>	Triterpeno	Ácido Cinchólico	1
	<i>Cinchona</i>	Triterpeno	Ácido Quinóvico	1
	<i>Cinchona</i>	Alcaloide	Quinidina	1
	<i>Cinchona</i>	Alcaloide	Cinchonina	5
	<i>Uncaria</i>	Alcaloide	Pteropodina	1
		Saponinas		6
Ixoroideae	<i>Coffea</i>	Metilxantina	Cafeína	1
	<i>Coffea</i>	Diterpeno	Cafestol	1
	<i>Coffea</i>	Antraquinona	Galiosina	1
	<i>Genipa</i>	Iridoide	Genipina	1
	<i>Canthium</i>	Iridoide	Ácido Geniposídico	7
	<i>Duroia</i>	Iridoide lactona	Duroina	8
	<i>Duroia</i>	Triterpeno	Ácido Ursólico	9
	<i>Gardenia</i>	Triterpeno Cicloartano	Dikamaliartanas A–F	10
	<i>Gardenia</i>	Cumarinas	Umbeliferona	11
	<i>Gardenia</i>	Iridoide	Gardalosídio	12
	<i>Gardenia</i>	Sesquiterpeno	Sotepdienona	13
	<i>Psydrax</i>	Compostos Fenólicos	Psidrosideo	7
	<i>Psydrax</i>	Monoterpeno	Psidrina	7
	<i>Sabicea</i>	Cumarina	Escopoletina	14
	<i>Wendlandia</i>	Iridoide glicosilado	Vendosideo	15

Legenda: Ref.: referência; 1: MARTINS & NUNES, 2015; 2: LAMEIRA, 2002; 3: KITAGAWA *et al.*, 1996; 4: SALLEH *et al.*, 2019; 5: JUNG *et al.*, 2012; 6: BORGES *et al.*, 2013; 7: NAHRSTEDT *et al.*, 1995; 8: AQUINO *et al.*, 1999; 9: MARTINS, 2013; 10: KUNERT *et al.*, 2009; 11: MOON, 2002; 12: CHANG *et al.*, 2005; 13: RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 1998; 14 DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; 15: DINDA *et al.*, 2006.

Desse modo, observa-se que a família Rubiaceae possui grande potencial para os estudos químicos e biológicos, uma vez que suas substâncias apresentam variedades estruturais e de ação farmacológica (VALLI, *et al.*, 2016), podendo servir como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.3. O GÊNERO *Calycophyllum*

Dentre os gêneros pertencentes à família Rubiaceae, o gênero *Calycophyllum*, que compreende árvores de médio a grande porte, endêmicas da América tropical e da flora brasileira, se destaca por apresentar propriedades medicinais e uma variedade de utilidades econômicas a exemplo das espécies *C. spruceanum* e *C. candidissimum*, que são muito empregadas em construções, fabricação de ferramentas, como ornamentais, na produção de cosméticos, molduras, pisos e esquadrias, entre outros, além de potencial farmacológico, conforme descrito a seguir (BALDIN & MARCHIORI, 2016; BALDIN & MARCHIORI, 2015; ABANTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

O gênero é bastante utilizado na medicina tradicional, principalmente em países da América do Sul. No Brasil, a infusão da casca de *C. spruceanum* é usada para tratar diabetes, infecção ocular e distúrbios do ovário, aplicação em manchas, cicatrizes e rugas da idade. Já no estado do Amazonas, a espécie foi citada com uso em distúrbios do aparelho geniturinário, sendo a decocção das cascas relatada para dores na coluna, problemas de próstata e rins, infecção urinária, inflamação, colesterol alto, problemas da tireoide, problemas do aparelho reprodutor feminino e frieza no corpo, além de ser indicado repetidas vezes para o tratamento de rugas ou na manutenção da juventude, devido à sua casca muito lisa estar sempre se renovando. Em Rondônia, foi relatado o uso do chá das cascas de *C. spruceanum* no tratamento de manchas de pele e envelhecimento (DUKE *et al.*, 2008; CASSINO, 2010; CAETANO *et al.*, 2014).

Na Bolívia, os chacobos fazem uso de uma mistura da casca de *C. spruceanum* pulverizada com água e cataplasma em feridas, e no Paraguai, o mulateiro é utilizado para diabetes (DUKE *et al.*, 2008; VEGA & VEGA, 2001).

No Peru, a *C. spruceanum* é amplamente conhecida na medicina tradicional. A casca em pó é utilizada contra infecções fúngicas, a decocção ou infusão da casca para contusões, infecções oculares, picadas de insetos, dermatose, vermes pelagrosos, cicatrizes, pigmentações da pele, inchaço, rugas, feridas e cortes, como cataplasma para fibromas e tumores de pele, diabetes, malária, contraceptivo, tônico e para câncer, hepatoses, feridas, queimaduras, acne, hemorragias, úlceras, lesões internas, tosse, asma, dores abdominais (DUKE *et al.*, 2008; POLESNA *et al.*, 2011). Na Amazônia peruana, foi relatado o uso da decocção da casca de *C. spruceanum* em espinhas e herpes labial, assim como, a mistura de cascas e ervas (*Erythrina amazonica* + *Momordica charantia* + *C. spruceanum* + *Triplaris peruviana*) para lavar infecções epidérmicas (ROUMY *et al.*, 2020).

A espécie *C. acreanum* tem uso relatado no Equador. Os indígenas Huaorani da Amazônia equatoriana utilizam a decocção das cascas no tratamento da malária. A infusão das cascas de *C. obovatum* é usada para eliminar parasitas intestinais por povos indígenas na Colômbia (VEGA & VEGA, 2008).

Além do uso na medicina tradicional, as espécies do gênero *Calycophyllum* apresentam um vasto emprego no setor moveleiro, carpintaria e fabricação de veículos (BACIGALUPO *et al.*, 1968). Por ser bastante flexível, a madeira é utilizada na produção de cabo para ferramentas, molduras, pisos e esquadrias. (SANTOS *et al.*, 2016) CS. Espécies do gênero também estão relacionadas a recuperação de áreas degradadas. (SANTOS, *et al.*, 2016). Além disso, a espécie *C. spruceanum* é utilizada no Peru e Brasil como ingrediente em cosméticos naturais, com uso em cosméticos aprovado pela união europeia. (DUKE *et al.*, 2008). Na cosmetologia, é utilizado em xampu no combate a queda de cabelo, em cremes e hidratantes, sendo considerado rejuvenecedor no combate das rugas, celulite e cicatrizes. É utilizado na forma de chá da casca, em compressas com o pó da casca e o unguento da resina. (ARAUJO *et al.*, 2007).

Dentro do gênero, a espécie mais estudada é a *C. spruceanum*. Zuleta e colaboradores (2003) relataram a presença de secoiridoides isolados da casca, além da atividade antitripanossoma destes compostos. A atividade antifúngica do córtex também foi descrita, sendo os melhores resultados obtidos contra o *Trychophyton mentagrophytes* (WEN *et al.*, 2011). Os extratos metanólicos e hidroalcoólicos apresentaram resultados promissores em análises de atividade antioxidante utilizando-se o método do radical DPPH e cátion radical ABTS, como relata Magrini e colaboradores (2015). Um estudo revelou que o extrato etanólico da casca exibe alta atividade antioxidante (DPPH, ABTS, radicais de ânion superóxido, β -caroteno e fibroblastos murinos) e inibe considerável a peroxidase e mieloperoxidase, enzimas-chave envolvidas na doença vascular inflamatória aguda e crônica (VARGAS *et al.*, 2016).

Posteriormente, foram realizados estudos sobre os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em camundongos sem indução de toxicidade aparente (SILVA *et al.*, 2018).

Ao avaliar a atividade leishmanicida, Arévalo-Lopéz e colaboradores (2018) relatou que o extrato da casca de *C. spruceanum* não apresentou atividade contra os dois organismos testados (*Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*). Já Peixoto e colaboradores (2018), utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*, demonstraram a atividade antioxidante e anti-envelhecimento *in vivo* do extrato aquoso de *C. spruceanum*.

Além dos secoiridoídeos, estudos anteriores descrevem a presença de iridoídeos glicosilados, fitoesteróides, derivados acetilênicos, compostos fenólicos e flavonoides glicosilados na espécie *C. spruceanum* (ZULETA *et al.*, 2003; MAGRINI, 2016 *apud* ZULETA, 2002), como mostrado abaixo.

Tabela 2. Metabólitos secundários de *Calycophyllum spruceanum*.

Nº	Classe	Composto	Ref.
1	Secoiridoide	Secóxiloganina	1
2	Secoiridoide	Diderrosídeo	1
3	Iridoide	Loganina	1
4	Secoiridoide	Kingisídeo	1
5	Iridoide	Loganetina	1
6	Secoiridoide	8- <i>O</i> -Tigloil Diderrosídeo	1
7	Secoiridoide	Éster metílico Diderrosídeo	1
8	Secoiridoide	6'-Acetil-β-D-glicopiranosil Diderrosídeo	1
9	Fitoesteróide	β-sitosterol	2
10	Fitoesteróide	Campesterol	2
11	Fitoesteróide	3-β- <i>O</i> -(D-glicopiranosil) Sitosterol	2
12	Fitoesteróide	3-β- <i>O</i> -(D-glicopiranosil) Estigmasterol	2
13	Ácido acetilênico	Ácido hexadecinoico	2
14	Composto fenólico	1,2- <i>bis</i> -(3,5-di- <i>t</i> -butil-4 hidroxifenil) etano	2
15	Composto fenólico	Éster do ácido <i>p</i> -hidroxifeniletíl-4- <i>O</i> -butanóico	2
16	Composto fenólico	1-β-D- <i>p</i> -cumaroil glicopiranosídeo	2
17	Composto fenólico	Ácido 7-metóxi-3- <i>O-trans</i> -cafeoilquínico	2
18	Composto fenólico	Ácido 7-metóxi-3- <i>O-cis</i> -cafeoilquínico	2
19	Flavonoide glicosilado	Quercetina 3- <i>O</i> -α-arabinopiranosil-(1→6)-β-glicopiranosídeo	3
20	Flavonoide glicosilado	Canferol 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-xilopiranosídeo	3

Legenda: Ref.: referência; 1: ZULETA *et al.*, 2003; 2: ZULETA, 2002; 3: MAGRINI, 2016.

2.4. *Calycophyllum multiflorum*

Calycophyllum multiflorum Griseb. é uma espécie arbórea conhecida popularmente como “palo-branco” ou “ibirá-moroti” (BALDIN & MARCHIORI, 2015), sendo frequentemente encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e, no Brasil, geralmente no estado do Mato Grosso (RECORD & HESS *apud* BALDIN & MARCHIORI *et al.*, 2015). Existem vários estudos sobre a anatomia da madeira de *C. multiflorum*, por sua ampla utilidade na

fabricação de veículos, carpintaria e setor moveleiro (BALDIN & MARCHIORI *et al.*, 2015), no entanto, estudos sobre os potenciais biológicos ainda são escassos.

A infusão das cascas do caule de *C. multiflorum* é utilizada na medicina tradicional do Paraguai no tratamento de doenças de pele, sobretudo de origem fúngica, no qual um estudo demonstra que o extrato diclorometânico das cascas apresentou um amplo espectro de atividade contra sete cepas (principalmente o *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*), de 11 cepas testadas (PORTILLO *et al.*, 2001).

Embora seja uma espécie de interesse comercial e apresentar atividades biológicas relevantes, até o presente momento a composição química de *C. multiflorum* ainda não foi descrita.

2.5. IRIDOIDES E SECOIRIDOIDES

Os iridoides são metabólitos secundários pertencentes à classe dos monoterpenos (C₁₀) cujo esqueleto geralmente apresenta um anel ciclopentano β-*cis*-fundido a um heterociclo de seis membros (anel pirânico), altamente oxigenado. Esta classe de metabólito secundário apresenta o geraniol (formado por duas unidades isoprênicas) como precursor. A partir da rota biosintética é possível inferir a estereoquímica relativa de alguns centros estereogênicos (C-4, C-5 e C-1) (figura 2). A estereoquímica de H-5 e H-9 é definida com o fechamento do anel ciclopentano. A formação do hemiacetal, a partir do iridotrial, origina o anel heterocíclico. Nesta etapa o H-1 se torna *trans* a H-5/H-9, dessa forma, a hidroxila ligada ao C-1 se torna *cis* a H-5/H-9, e no processo de glicosilação, a introdução da unidade glicosídica (sendo a β-D-glucose, mais comum) mantém esta orientação (DEWICK, 2009; PLOUVIER & FAVRE-BONVIN, 1971).

O esqueleto básico é representado pelo 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano ou Iridano, cujo nome é originado de uma espécie de formiga *Iridomyrmex detectus*, secretora de iridoides, como a iridomirmecina e o iridodial. O ciclopentano β-*cis*-fundido ao anel pirânico é chamado de iridoide, e, após o rompimento da ligação dos carbonos 7 e 8 (1 e 5 do anel ciclopentano), são produzidos os secoiridoides, demonstrados na figura 1 (JUNIOR, 1988).

A literatura apresenta diversas revisões relatando o isolamento e elucidação estrutural destas substâncias, como demonstra El-Nagar (1980), Boros e Stermitz (1990 e 1991) em revisões publicadas no periódico *Journal of Natural Products*, além de Júnior em 1988, e Dinda

e colaboradores, que publicaram em 2007 uma revisão completa sobre iridoides dividida em parte I e II, demonstrando ser uma classe bastante estudada.

Uma extensa revisão sobre as atividades biológicas de iridoides foi publicada por Dinda e Debnath (2013) relatando atividades como antialergênicos, antiartrítico, anticâncer, anticoagulantes, antidiabéticos, anti-inflamatórios, anti-osteoporoses, antiprotozoários, antivirais, imunomodulatórios, inseticidas, inibidores da melanogênese, potencializadores do fator de crescimento nervoso, neuroprotetoras, atuantes no auxílio da cicatrização de feridas. Além desta, outras revisões relatam as propriedades quimioprotetivas, antioxidantes, hepatoprotetivas, antilshmania, moluscidas, atividades no sistema vascular, entre outras (TUNDIS *et al.*, 2008). Em relação à atividade antimicrobiana, os iridoides apresentam uma ampla contribuição relatada. Iridoides como a loganina, secologanina e ácido logânico, além do ixorosídeo, ácido 8-epilogânico e aucubina, isolados nas espécies *Pterocephalus perennis* ssp. *perennis* e *Pedicularis kansuensis*, respectivamente, apresentaram atividades contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Pseudomonas aeruginosa*, além da *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (HANH *et al.*, 2015; DINDA, 2013).

Além das substâncias isoladas, extratos ricos em iridoides também vêm apresentando atividade antimicrobiana significativa (SANADHYA & DURVE, 2014), demonstrado que plantas contendo iridoides podem ser tanto fontes de novas substâncias bioativas como também podem atuar como fontes terapêuticas contra agentes microbianos (OLENNIKOV *et al.*, 2015; ANIČIĆ *et al.*, 2021; JOUBOUHI *et al.*, 2017; RATHEE *et al.*, 2016).

Figura 1. Unidades isoprênicas presentes nos três principais esqueletos de iridoides.

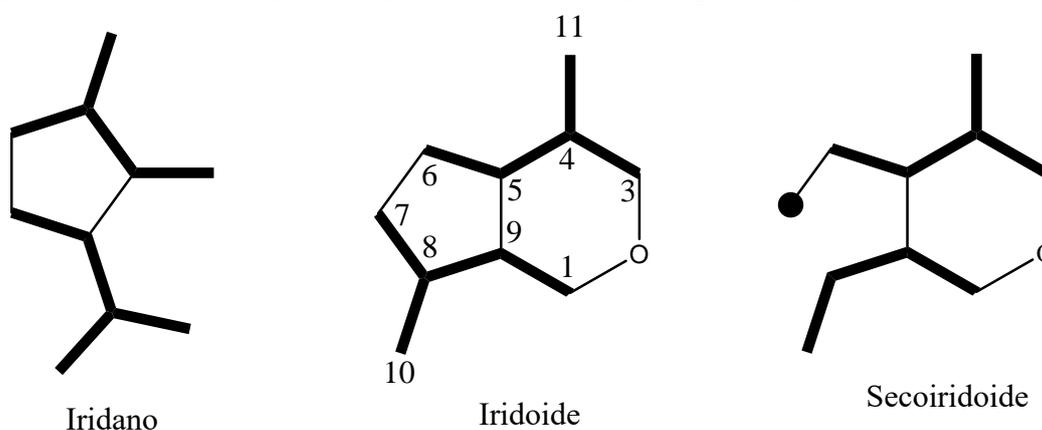
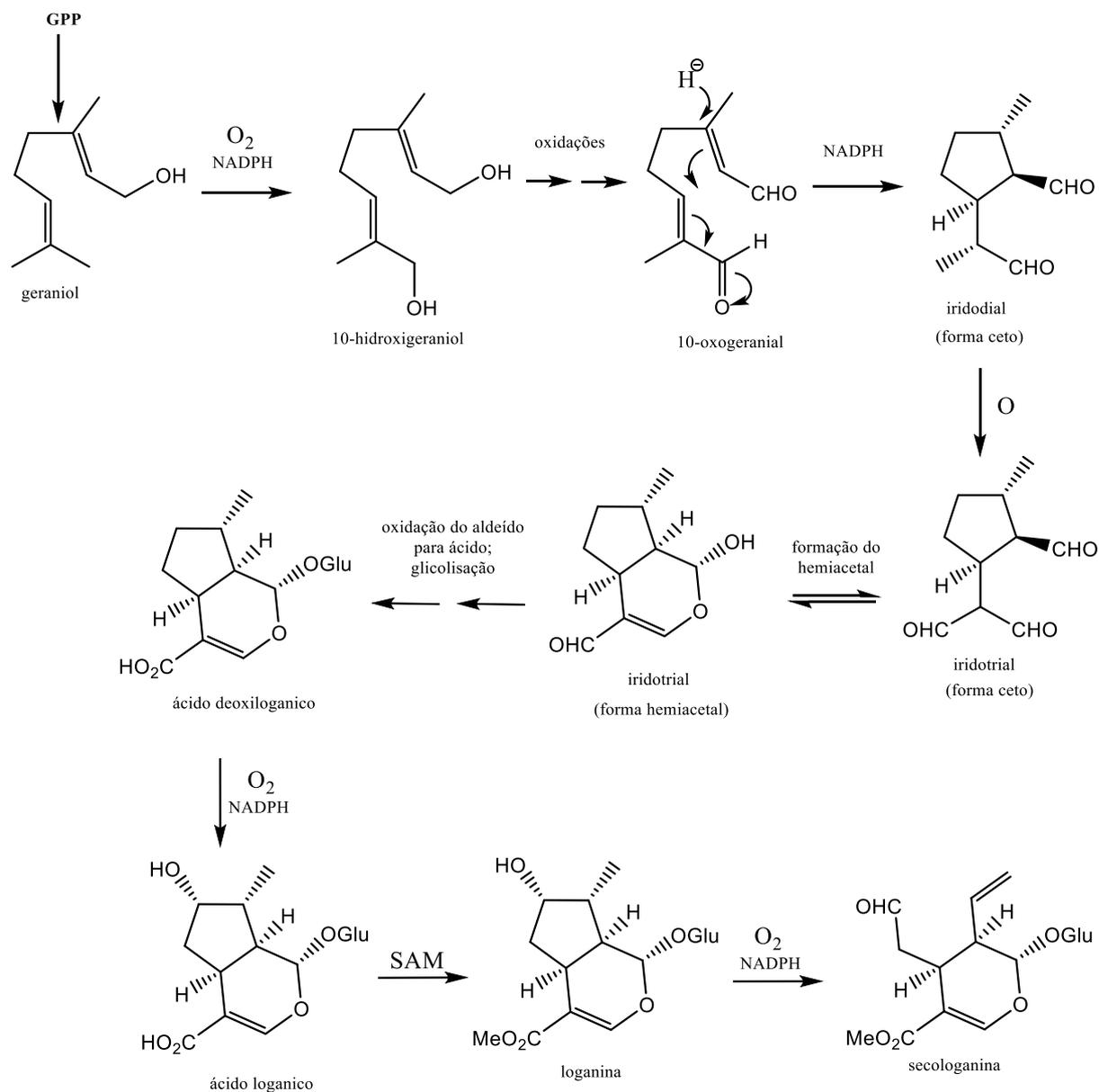


Figura 2. Biossíntese de iridoides (DEWICK, 2009).

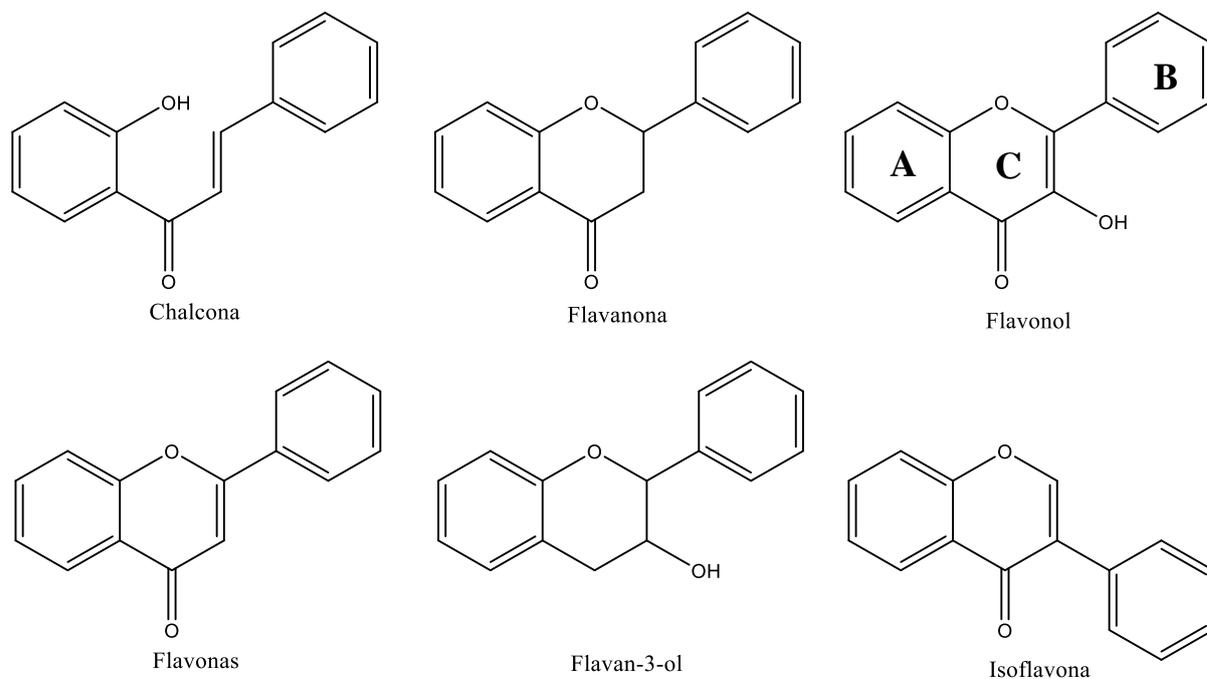


2.6. FLAVONOIDES

Flavonoides são uma classe de metabólitos secundários caracterizada pela presença de um núcleo C6-C3-C6 (15 carbonos), produzido a partir de uma unidade de cinamoil-CoA e três unidades de malonil-CoA. O esqueleto dos flavonoides é constituído por dois anéis aromáticos (A e B, figura 3), conectados por um terceiro anel (C). Na rota biossintética, a primeira subclasse a ser formada são as chalconas (DEWICK, 2009; IWASHINA, 2000). A diversidade estrutural desse grupo é bastante variada, contendo subclasses (figura 3) como as flavanonas, flavonóis, flavonas, flavan-3-ol, dentre outros, originadas a partir modificações como

alquilações, metilações, glicosilações, oligomerizações, entre outras, dando origem a um grupo com mais de 4200 estruturas conhecidas (SIMÕES *et al.*, 2007; TAHARA, 2007).

Figura 3. Alguns esqueletos básicos de flavonoides.



Os flavonóis constituem um grupo importante dentro de flavonoides, tendo o canferol, a quercetina e a miricetina como as substâncias mais estudadas. Este grupo apresenta uma carbonila cetônica conjugada em C-4, além de uma hidroxila em C-3. São importantes agliconas formadoras de flavonoides glicosilados, em que a diferença entre elas consiste no grau de oxidação do anel **B** (PANCHE *et al.*, 2016). Os flavonoides podem apresentar uma ou mais unidades glicosídicas (glucose, galactose, rhamnose, apiose, arabinose, xilose, entre outros), ligadas geralmente em C-3 ou C-7, por ligação O-glicosídica (HARBORNE & MABRY, 1982; AGRAWAL, 1992; MARKHAM *et al.*, 1977).

Sob o ponto de vista farmacológico, os flavonoides despertam grande interesse pois apresentam uma vasta descrição de atividades biológicas relatada na literatura, como efeitos antiaterosclerótico, anti-inflamatório, antitumoral, antitrombogênico, antiosteoporótico, antiviral, antifúngico e antioxidante (AGRAWAL, 2011). Através dos anos, os flavonoides têm sido utilizados para o tratamento de doenças infecciosas, como o uso medicinal de *Tagetes minuta* (contendo quercetagetina-7-arabinosil-galactosídeo), além da *Scutellaria baicalensis*, que possui a flavona baicaleína como agente antioxidante (CUSHNIE & LAMB, 2005).

2.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A resistência a antimicrobianos é uma das maiores ameaças à saúde e desenvolvimento global, constando na lista das dez principais ameaças globais, publicada pela Organização Mundial da Saúde. Esta propriedade é intrínseca às bactérias e ocorre naturalmente, entretanto, ações humanas como a falta de saneamento básico, acesso limitado a água potável, a falta de prevenção e controle inadequado de infecções, aliadas ao uso indevido de medicamentos, vêm acelerando este processo (OMS, 2022; SIMÕES, 2008). De acordo com a OMS, dentre as bactérias com maior preocupação, por provocarem maior número de mortes no mundo, denominadas de agentes patógenos prioritários, encontra-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA), *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* se trata de bactérias multiresistentes.

Os microrganismos vêm desenvolvendo mecanismos bioquímicos rapidamente para inibir a ação dos medicamentos disponíveis. Esses medicamentos, por se tratarem de substâncias isoladas, apresentam apenas um alvo bioquímico contra as células bacterianas, e esta característica favorece o aparecimento da resistência (EFFERTH & KOCH, 2011). Os microrganismos criam mecanismos de resistência não somente para um antibiótico específico, mas sim mecanismos gerais para a diminuição do contato com condições adversas (SIMÕES, 2009). Por outro lado, os produtos naturais, por constituírem-se de matrizes complexas, apresentam diversos alvos bioquímicos contra as bactérias e, conseqüentemente, podem ser utilizados em conjunto com os antimicrobianos para sensibilizar a bactéria ou modular a susceptibilidade a antibióticos, reduzindo a dose destes medicamentos.

Diversas investigações sobre o efeito sinérgico vêm sendo feitas ao longo do tempo, sobretudo o efeito sinérgico de extratos de plantas ao serem combinados com antibióticos. Estudos indicam que os extratos de plantas, quando em combinação com alguns antimicrobianos, são responsáveis por melhorar a eficácia da ação destes, inclusive contra bactérias multiresistentes. O efeito sinérgico consiste na ação biológica desencadeada pela combinação de duas ou mais entidades químicas no tratamento de uma patologia, em que a atividade da combinação de compostos é superior à soma dos efeitos de compostos individuais (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009; TYERS & WRIGHT, 2019; EFFERTH & KOCH, 2011; YANG *et al.*, 2014). Os principais mecanismos pelos quais os efeitos de sinergia são alcançados consistem em ações multialvo, como aumentar a biodisponibilidade e inibir ou suprimir a resistência, diminuindo as concentrações inibitórias mínimas (CIM), contribuindo

também para a redução de possíveis efeitos adversos (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009; YANG *et al.*, 2014). Neste sentido, os produtos de origem natural se tornam um excelente alvo para a busca de novas alternativas terapêuticas, por apresentarem uma grande diversidade estrutural, alvos biológicos diversos e toxicidade em geral moderada.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi analisar a composição química da fase acetato de etila das folhas e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos obtidos da espécie *Calycophyllum multiflorum* (Rubiaceae).

Os objetivos específicos foram:

- 🌿 Analisar o perfil químico dos extratos de *C. multiflorum* através de CLAE-UV-EM/EM;
- 🌿 Avaliar as propriedades antimicrobiana e avaliar do efeito da combinação dos extratos obtidos de *C. multiflorum* com antibióticos contra bactérias clínicas multirresistentes;
- 🌿 Realizar a partição líquido-líquido do extrato bioativo, frente ao efeito sinérgico, para obtenção das fases hexânica, acetato de etila e hidrometanólica;
- 🌿 Empregar métodos cromatográficos visando ao fracionamento e isolamento das substâncias presentes no extrato com melhor perfil de atividade biológica.

PARTE
EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL UTILIZADO

Solventes:

- Para a extração, partição líquido-líquido e processos de cromatografia em coluna, foram utilizados solventes de grau P.A. (Merck[®], Vetec[®], Chemco[®], LabSynth[®]).
- Para a evaporação dos solventes, foi utilizado evaporador rotativo de baixa pressão (Buchi[®]), conectado ao Banho termostático modelo TE-184 (Tecnal).
- Para a CLAE e obtenção dos perfis químicos, foram utilizados metanol grau HPLC (Merck[®] e/ou Sigma-Aldrich[®]) e água Milli-Q oriunda de Sistema Purificador de Água (osmose reversa [OS50 LX (CG-200, Vetec[®]]).
- Para o preparo das amostras analisadas em RMN, foram utilizados solventes deuterados, como metanol (CD₃OD), acetona-d₆ (CD₃COCD₃) e óxido de deutério (D₂O) (Sigma-Aldrich[®], Merck[®], CIL[®]), além de tubos de RMN de 5mm (300-500 MHz) (Wilmad[®]).

Fases estacionárias:

- Para a cromatografia em coluna, utilizou-se sílica de fase reversa C-18 (granulometria de 40-63 µm) (Sigma-Aldrich[®]) e Sephadex[®] LH-20 com partículas de diâmetro entre 25-100 µm (Pharmacia[®]).
- Para a Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizou-se sílica gel 60 G e GF254 (0,063-0,200 mm, Merck[®]) em placa de vidro, ativada a 110 °C por duas horas, além de sílica gel 60 GF254 (5-40 µm, Merck[®]) em cromatoplaca de alumínio.

Reveladores:

- Luz UV (254 nm e 360 nm), monitor de mão, modelo UVGL25, IFP inc. em câmara escura.
- Os reveladores químicos utilizados foram: uma solução 5% de H₂SO₄ (v/v) em metanol e uma solução de 1% de vanilina em etanol, ambos aplicados com o auxílio de nebulizador e seguidos de aquecimento a 36 °C em chapa de aquecimento.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- Colunas analítica Phenomenex® LUNA 5μ (C-18, 250 x 4,6 mm, 100Å) e semi-preparativa Phenomenex® LUNA 5μ (C-18, 250 x 10 mm, 100Å).
- Cromatógrafo Waters® 600, acoplado a detector UV/VIS de dois canais Waters® 2489, utilizado para métodos analítico e semi-preparativo.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni- e bidimensionais:

- Espectrômetro de RMN Bruker DPX 300 (LABRMN/INQUI/UFMS - Campo Grande-MS) operando a 300 MHz para a frequência do ¹H equipado com sonda dual BBO 5mm (com canais dedicados à ¹H e ¹³C).
- Espectrômetro Bruker Avance Neo 500 (LABRMN/INQUI/UFMS - Campo Grande-MS) operando a 500 MHz para a frequência do ¹H equipado com sonda multinuclear Smart Probe 5mm com gradiente no eixo Z.
- Os espectros de massas foram obtidos no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 120-1200.
- Os espectros de RMN foram processados no programa MestReNova 6.0.2, com LB de 0,3 Hz.

Espectrometria de massas (EM):

- Espectrômetro Bruker Daltonics® (modelo micrOTOF-QII) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas quadrupolo e por tempo de voo (Q-TOF). Cromatógrafo Shimadzu com bombas LC- 20AD, controladora CBM-20A, Detector SPD-M20A, injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A, desgaseificador DGU-20A3r e uma coluna Kinetex C-18 (150 x 2,2 mm – 2,6 μm).
- Os espectros de massas foram processados no programa Compass DataAnalysis 4.2 da Bruker®.

Ensaio antimicrobiano e avaliação do efeito sinérgico:

- As bactérias utilizadas (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus intermedius* e

Escherichia coli) foram isoladas de pacientes humanos e animais do Hospital Universitário (HU) e do Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

- 🌿 Os antibióticos usados foram a ampicilina e ciprofloxacino, adquiridos comercialmente, da marca Sigma-Aldrich®.

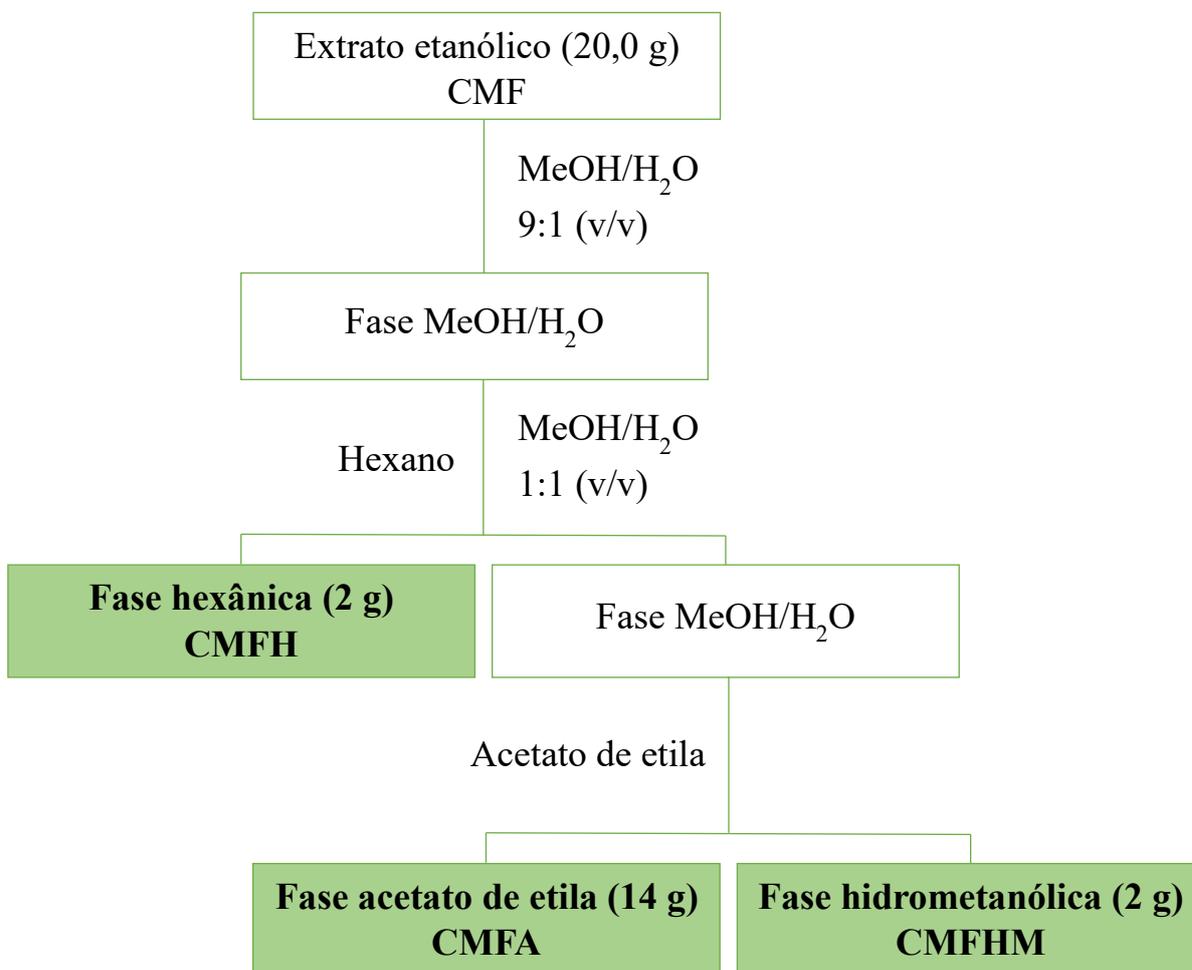
4.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FASES

A espécie *Calycophyllum multiflorum* foi coletada em região de Cerrado, no município de Campo Grande, MS, em agosto de 2016. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Arnildo Pott e uma exsiccata encontra-se depositada no herbário CGMS sob número 37358.

As folhas e caule de *C. multiflorum* (257,9 g e 1599,1 g, respectivamente) foram secos à sombra e temperatura ambiente. Em seguida, o material vegetal foi moído, com o auxílio do moinho de quatro facas, e extraído com etanol, durante 10 dias. No decorrer do processo de extração, o solvente foi rotaevaporado sob pressão reduzida, à temperatura de, no máximo, 37°C. Ao final, obteve-se 22,0 g de extrato etanólico das folhas (codificado como CMF) e 49,7 g de extrato do caule (codificado como CMC), com um rendimento de 8,5% e 3,1%, respectivamente.

O extrato CMF (20,0 g) foi solubilizado em uma mistura de MeOH/H₂O (9:1, v/v) e submetido à partição com hexano. Adicionou-se H₂O na fase hidrometanólica, até a proporção de MeOH/H₂O (1:1, v/v) e posteriormente, a fase foi particionada com acetato de etila. Obteve-se no final do processo 2 g da fase hexânica (10%), 14 g da fase acetato de etila (70%) e 2 g da fase hidrometanólica (10%). As fases foram secas sob pressão reduzida, sendo esta última liofilizada (figura 4).

Figura 4. Fluxograma da partição líquido-líquido.



4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

No presente estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos, de caule e folhas, realizada pela professora Dra. Ana Camila Micheletti (INQUI-UFMS), sendo o ensaio feito através do método de microdiluição em caldo (MANDA *et al.*, 2018).

As cepas bacterianas foram preparadas em ágar Mueller-Hinton (da Sigma-Aldrich) e incubadas para crescimento. Posteriormente, as bactérias foram suspensas em uma solução salina estéril de (0,45%) e a densidade óptica foi medida com um turbidímetro (da MS-Tecnopon), até 0,5 na escala de McFarland, sendo realizada uma diluição 1:10 em solução salina estéril (0,45%). As suspensões bacterianas foram aplicadas nos poços (5 µL) e as placas foram incubadas a, aproximadamente, 36°C.

Placas de 96 poços foram preparadas colocando-se 100 µL de caldo Mueller- Hinton (marca Kasvi) em cada poço. 100 µL das soluções dos extratos e antibióticos (nas concentrações: extratos, 20 mg.mL⁻¹ e antibióticos, 400 µg.mL⁻¹) foram adicionados à primeira

linha de poços da placa e sucessivas diluições de 1:2, obtendo-se um volume final de 100 µL por poço.

Após 18 horas, a concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pela menor concentração no qual não foi possível observar o crescimento bacteriano visível. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO

Na avaliação das interações sinérgicas dos extratos em combinação com os antibióticos, utilizou-se o ensaio *checkboard* (SOLARTE *et al.*, 2017). Neste ensaio, foram feitas diluições (1:2) verticais dos extratos, em microplaca de 96 poços, partindo-se da concentração de 20 mg.mL⁻¹, preparadas com o caldo Mueller-Hinton (Kasvi), (50 µL de volume final por poço). Na horizontal, foram aplicadas diluições 1:2 de soluções dos antibióticos, preparadas em concentração inicial de 400 µg.mL⁻¹, com caldo Mueller-Hinton (Kasvi), (50 µL por poço). O inóculo bacteriano foi preparado conforme já descrito, e 5 µL foram adicionados em cada poço com as amostras, para posterior incubação, a 36°C, por cerca de 18 horas. As leituras foram feitas determinando a Concentração Mínima Inibitória (CMI), e calculando a Concentração Inibitória Fracionária (CIF) e o Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) (LIM *et al.*, 2018).

4.3. OBTENÇÃO DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS DE *C. multiflorum*

Para a obtenção dos cromatogramas e espectros de massas de alta resolução, de cada extrato, foi injetada 5 µL de uma solução a 1,0 mg/mL (MeOH/H₂O 7:3) em uma coluna Kinetex C-18 (150 x 2,2 mm – 2,6 µm), com forno a 50°C, utilizando um sistema de eluente com H₂O (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição aplicado foi o seguinte: 3% B (0-2 min), 3 a 25% B (2-25 min), fim 25 a 80% B (25-40 min), 80% B (40-43 min) e por fim 80 a 3% B (43-44 min). A análise foi realizada pelo Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM).

Para anotação e identificação dos compostos, foi montada uma biblioteca *in house* com base nas substâncias isoladas em Rubiaceae, adquiridos no banco de dados Scifinder[®], além dos compostos isolados neste estudo.

4.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FASE ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS (CMFA)

A fase acetato de etila (14 g), oriunda do extrato etanólico das folhas de *C. multiflorum*, apresentou o maior rendimento na partição líquido-líquido (70%) e foi selecionada para o fracionamento químico visando ao isolamento dos constituintes químicos. Utilizou-se 11 g para os processos cromatográficos.

Inicialmente, utilizou-se a técnica de cromatografia em coluna (por partição), no qual a fase estacionária escolhida foi sílica gel C-18. Na eluição, utilizou-se 400 mL de eluentes nas proporções em ordem decrescente de polaridade, iniciando-se com MeOH/H₂O (3:7), seguindo com MeOH/H₂O (4:6), MeOH/H₂O (6:4), MeOH/H₂O (8:2), MeOH (100%) e AcOEt (100%) (tabela 3). Com as frações resultantes destacadas em negrito, deu-se a continuidade ao fracionamento.

Tabela 3. Fracionamento da fase acetato de etila em sílica C-18.

Eluente	Proporções	Frações	Massa (mg)
MeOH/H ₂ O	3:7	CMFA1	1980,3
MeOH/H ₂ O	4:6	CMFA2	4900,6
MeOH/H ₂ O	6:4	CMFA3	1690,1
MeOH/H ₂ O	8:2	CMFA4	280,8
MeOH	100%	CMFA5	765,0
AcOEt	100%	CMFA6	1289,8

4.4.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1

A Fração CMFA1 (1,98 g) foi escolhida para ser fracionada utilizando a cromatografia em coluna, com a fase estacionária gel de Sephadex[®] LH-20, sendo utilizado metanol em sistema isocrático como eluente. Ao final, foram obtidas 125 frações e após análises dos perfis cromatográficos usando a CCDA, pôde-se reagrupá-las em 13 frações, conforme a tabela 4. As frações destacadas em negrito foram submetidas a fracionamentos discutidos a seguir.

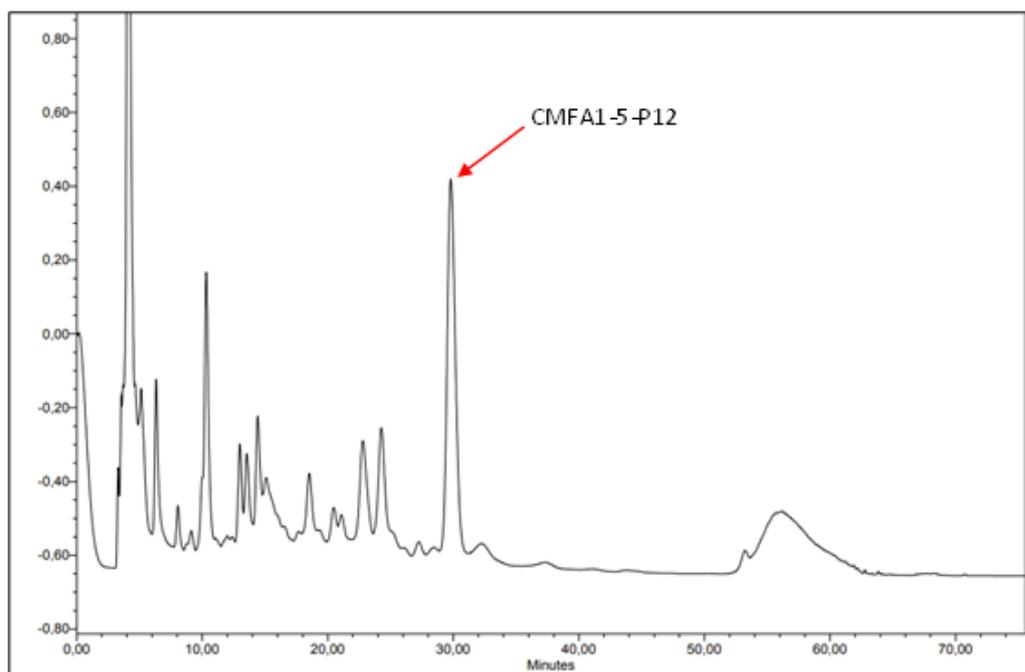
Tabela 4. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
01 a 09	CMFA1-1	29,1
10 a 15	CMFA1-2	25,4
16 a 21	CMFA1-3	35,7
22 a 25	CMFA1-4	10,5
26 a 32	CMFA1-5	127,2
33 a 43	CMFA1-6	253,6
44 a 49	CMFA1-7	50,4
50 a 52	CMFA1-8	23,7
53 a 62	CMFA1-9	296,8
63 a 81	CMFA1-10	209,4
82 a 112	CMFA1-11	244,6
113 a 118	CMFA1-12	59,4
119 a 125	CMFA1-13	233,7

4.4.1.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1-5: obtenção da substância 1

A partir da análise do perfil químico em CCDA, a fração CMFA1-5 (127,2 mg) submetida à CLAE, no eluente isocrático de H₂O: MeOH (6:4), com uma vazão de 0,80 mL/min e detecção por UV em 210 nm. Foram coletadas 13 frações e o pico 12, denominado CMFA1-5-P12 (9 mg) e com tempo de retenção em 30 minutos (figura 5), foi escolhido para ser analisado pelas técnicas de espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni- e bidimensionais, em D₂O, resultando na obtenção da substância **1**.

Figura 5. Cromatograma da fração CMFA1-5.



4.4.1.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1-6: isolamento das substâncias 2-6

A fração CMFA1-6 (253,6 mg) foi fracionada utilizando a cromatografia em coluna, empacotada com 20 g de sílica gel C-18. Empregou-se um sistema de eluição com diferentes proporções de MeOH/H₂O, em ordem decrescente de polaridade (iniciando-se em MeOH/H₂O, 1:9, finalizando em 100% de MeOH). Foram obtidas 85 frações e após análises dos perfis cromatográficos em CCDA, pôde-se reuni-las em 23 frações (Tabela 5).

A partir de análises do perfil químico em CCDA das frações reunidas, as frações CMFA1-6-4 (33,9 mg), CMFA1-6-12 (8,6 mg), CMFA1-6-14 (5,1 mg) e CMFA1-6-16 (15,9 mg) foram selecionadas para serem realizados os experimentos de espectrometria de massas e espectroscopia de RMN uni- e bidimensional, em D₂O, obtendo-se a substância **2**, a mistura das substâncias **3** e **4**, a substância **5** e a substância **6**, respectivamente.

Tabela 5. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1-6.

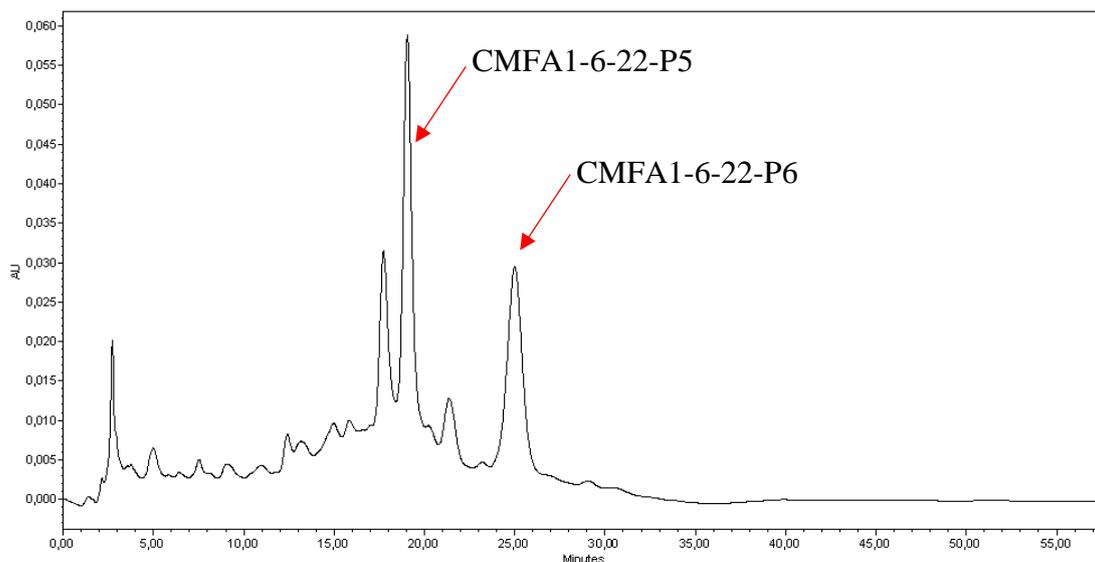
Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
1	CMFA1-6-1	4,2
2	CMFA1-6-2	2,1
3	CMFA1-6-3	5,3
4-7	CMFA1-6-4	33,9
8-9	CMFA1-6-5	2,5
10	CMFA1-6-6	1,3
11-12	CMFA1-6-7	2,0
13-16	CMFA1-6-8	1,0
17-18	CMFA1-6-9	1,8
19-22	CMFA1-6-10	2,6
24-24	CMFA1-6-11	1,4
25-31	CMFA1-6-12	8,6
32-33	CMFA1-6-13	1,3
34-37	CMFA1-6-14	5,1
38	CMFA1-6-15	3,0
39-42	CMFA1-6-16	15,9
43-44	CMFA1-6-17	3,9
45-46	CMFA1-6-18	2,2
47-48	CMFA1-6-19	2,5
49-53	CMFA1-6-20	35,6
54-57	CMFA1-6-21	26,7
58-65	CMFA1-6-22	35,4
66-85	CMFA1-6-23	41,3

4.4.1.2.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1-6-22: isolamento das substâncias 7 e 8

Seguindo o fracionamento da CMFA1-6, a fração CMFA1-6-22 (35,4 g) foi submetida à CLAE. Para a separação, usou-se o eluente em sistema isocrático nas proporções 4:6 (MeOH/H₂O), vazão de 1,0 mL/min e detecção por UV em 210 nm. Após este processo, as

substâncias correspondentes aos picos 5 (3,6 mg) e 6 (5 mg), com tempos de retenção em 19 e 25 minutos (figura 6), respectivamente, foram selecionadas para serem realizados experimentos de RMN uni- e bidimensionais, em D₂O, e espectrometria de massas, ocasionando a elucidação estrutural das substâncias **7** e **8**.

Figura 6. Cromatograma da fração CMFA1-6-22.



4.4.1.3. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1-10: isolamento da substância **9**

A fração CMFA1-10 (209,4 mg) foi submetida ao fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em coluna de sílica gel C-18 (20 mg), iniciando um sistema de eluentes, em ordem crescente de polaridade, de MeOH/H₂O (1:9) até MeOH 100%, obtendo-se 43 frações, no qual, após as análises dos perfis cromatográficos em CCDA, pôde-se reuni-las em 17 frações (Tabela 6).

Tabela 6. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA da CMFA1-10.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
1-2	CMFA1-10-1	3,9
3	CMFA1-10-2	8,7
4	CMFA1-10-3	16,6
5	CMFA1-10-4	17,6
6	CMFA1-10-5	9,8
7	CMFA1-10-6	2,0
8	CMFA1-10-7	1,8
9-10	CMFA1-10-8	3,2
11-13	CMFA1-10-9	2,5
14-17	CMFA1-10-10	3,9
18-19	CMFA1-10-11	4,8
20	CMFA1-10-12	6,5
21	CMFA1-10-13	8,2
22-25	CMFA1-10-14	37,7
26-30	CMFA1-10-15	33,2
31-35	CMFA1-10-16	16,2
36-43	CMFA1-10-17	19,8

A fração CMFA1-10-14 (37,7 mg), apresentou um precipitado amarelado (figura 7) insolúvel em H₂O e solúvel em MeOH. Após sucessivas lavagens com H₂O, o precipitado (codificado como CMFA1-10-14P) foi escolhido para ser analisado através de experimentos utilizando a espectrometria de massas e espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, em CD₃OD, permitindo a elucidação estrutural da substância **9** (10 mg).

Figura 7. Precipitado CMFA1-10-14P presente na fração CMFA1-10-14.



4.4.1.3.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA1-10-15: isolamento da substância 10

A fração CMFA1-10-15 (33,2 mg) foi cromatografada utilizando a CLAE com um eluente em sistema isocrático nas proporções 45:55 (MeOH/H₂O), vazão de 1,00 mL/min e detecção por UV em 254 nm. Deste processo cromatográfico pode-se selecionar o pico 2 (decodificado CMFA1-10-15-P2, 5 mg), com tempo de retenção de 7 minutos (figura 8), e, após análises dos dados de RMN uni- e bidimensionais, em CD₃OD, pôde-se determinar a estrutura da substância 10.

Figura 8. Cromatograma da fração CMFA1-10-15.

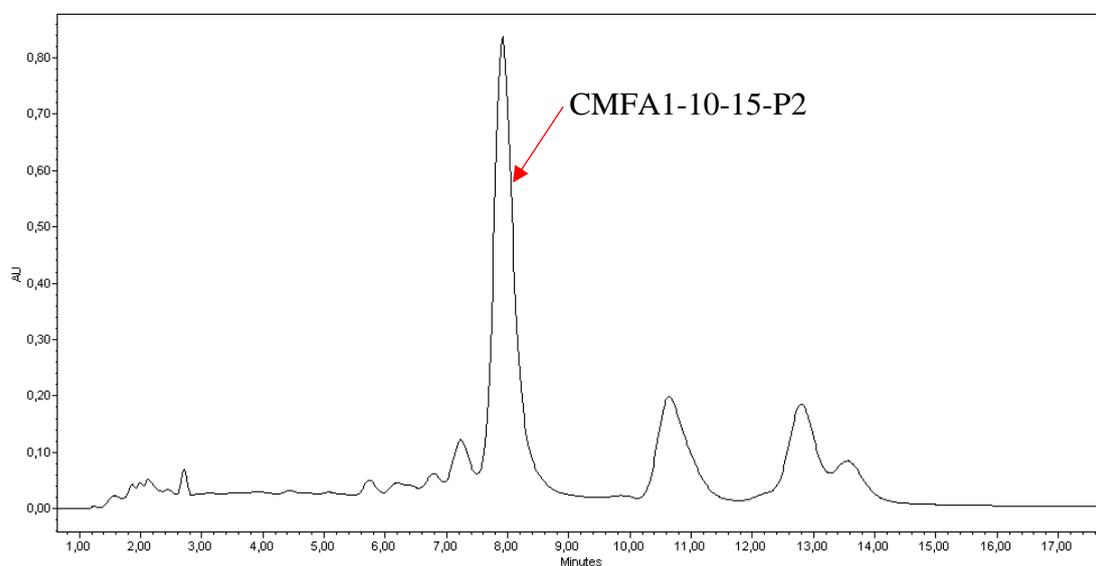
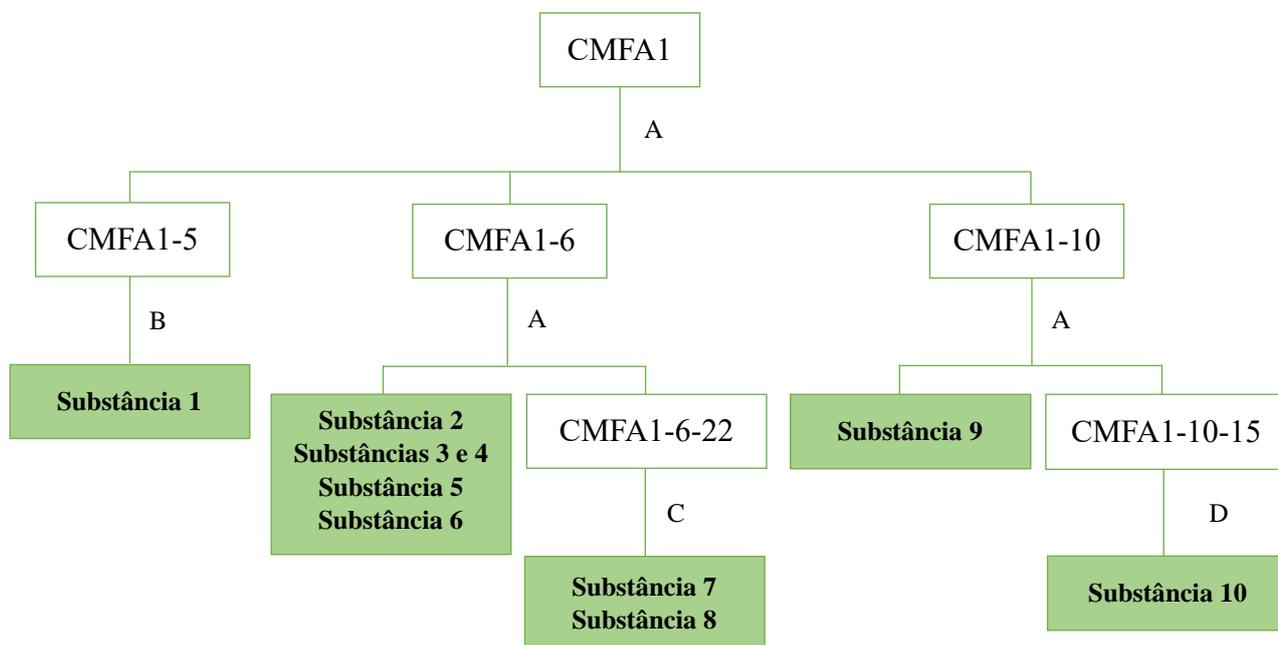


Figura 9. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA1.



A: CC sílica C-18 (H₂O/MeOH, gradiente decrescente de polaridade)

B: CLAE – C-18; H₂O/MeOH (6:4); fl. 1,0 mL/min.; Det. 210 nm

C: CLAE – C-18; H₂O/MeOH (6:4); fl. 1,0 mL/min.; Det. 254 nm

D: CLAE – C-18; H₂O/MeOH (55:45); fl. 1,0 mL/min.; Det. 254 nm

4.4.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA2: isolamento da substância 11

Uma alíquota da fração CMFA2 (2 g) foi fracionada empregando a cromatografia em coluna, utilizando gel de Sephadex[®] LH-20 em eluente isocrático (metanol). Foram obtidas 89 frações, onde após análises dos perfis cromatográficos utilizando CCDA, estas foram reagrupadas em 7 frações, como na tabela 7.

Tabela 7. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
01 a 29	CMFA2-1	153,7
30 a 31	CMFA2-2	24,5
32 a 42	CMFA2-3	564,2
43 a 64	CMFA2-4	886,4
65 a 85	CMFA2-5	280
86 a 87	CMFA2-6	9,4
88 a 89	CMFA2-7	7,5

A fração CMFA2-4 apresentou um sólido branco amorfo, insolúvel em MeOH, no qual após seguidas lavagens com MeOH, foi selecionado para serem realizados os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em D_2O , obtendo-se 60 mg da substância **11**.

4.4.2.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA2-5: isolamento da substância 12

A fração CMFA2-5 (280 mg) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando gel de Sephadex[®] LH-20 e MeOH como eluente em modo isocrático. Ao final, foram obtidas 46 frações, as quais após análises dos perfis cromatográficos utilizando CCDA, foram reagrupadas em 8 frações, como na tabela 8.

Tabela 8. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
1-2	CMFA2-5-1	5,4
3-4	CMFA2-5-2	19,3
5-20	CMFA2-5-3	82,1
21-25	CMFA2-5-4	25,9
26-27	CMFA2-5-5	16,8
28-40	CMFA2-5-6	59,2
42	CMFA2-5-7	1,2
44-46	CMFA2-5-8	32,7

A fração CMFA2-5-6 (59,2 mg) foi selecionada para ser cromatografada utilizando a CLAE, com eluente isocrático de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (7:3), com uma vazão de 1,4 mL/min e detecção por UV em 254 nm. Foram coletadas 5 picos e o pico 3, denominado CMFA2-5-6-P3 (5 mg) e com tempo de retenção em 24 minutos (figura 10), foi selecionado para ser analisado pelas técnicas de RMN uni- e bidimensionais, em CD_3OD , ocasionando na substância **12**.

Figura 10. Cromatograma da fração CMFA2-5-6.

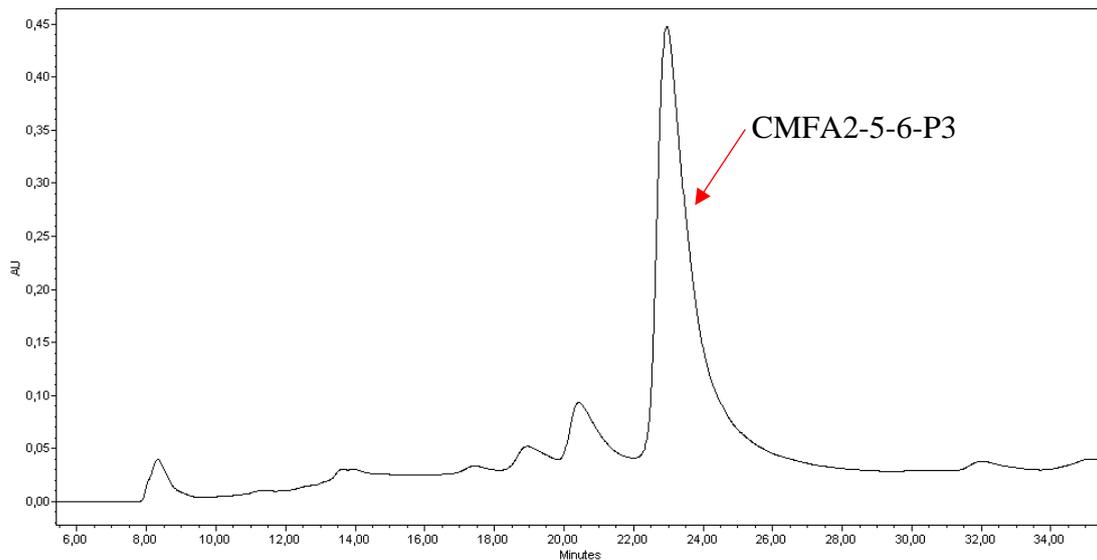
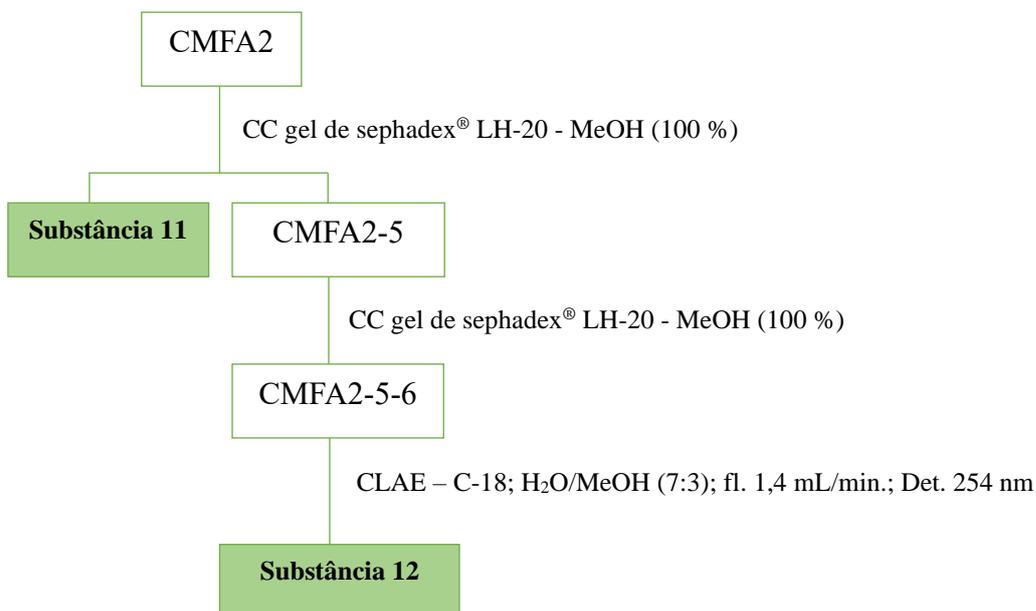


Figura 11. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA2.



4.4.3. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CMFA3: isolamento das substâncias 13 e 14

A Fração CMFA3 (1,7 g) foi escolhida para ser fracionada empregando a cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH-20, com partículas de 25-100 µm, sendo utilizado metanol em sistema isocrático. Obteve-se 61 frações, e após análises dos perfis cromatográficos utilizando CCDA, estas foram reagrupadas em 13 frações (tabela 9).

Tabela 9. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
1-3	CMFA3-1	73,3
4	CMFA3-2	15,6
5-10	CMFA3-3	156
11-16	CMFA3-4	245,2
17-19	CMFA3-5	56,2
20-23	CMFA3-6	198
24-32	CMFA3-7	252,8
33-45	CMFA3-8	178,9
46-48	CMFA3-9	5,0
49-50	CMFA3-10	8,1
51-53	CMFA3-11	10,2
54-60	CMFA3-12	119,8
61	CMFA3-13	2,5

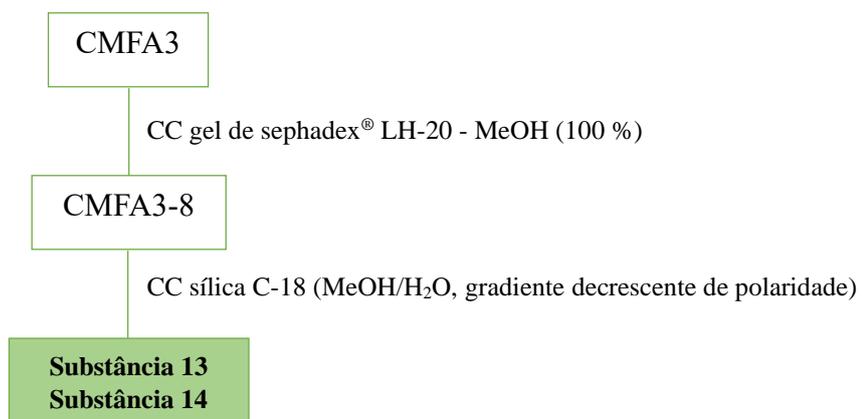
A fração CMFA3-8 (178,9 mg) foi escolhida para ser cromatografada, após análises dos perfis em CCDA, utilizando a técnica de cromatografia em coluna com sílica de fase reversa C-18 (20 mg), iniciando um sistema de eluentes, em ordem decrescente de polaridade, de MeOH/H₂O (3:7) até MeOH 100%, obtendo-se 48 frações, posteriormente reunidas em 14 frações, após análises dos perfis cromatográficos em CCDA (tabela 10).

Tabela 10. Reunião das frações pela análise do perfil químico em CCDA.

Frações	Frações reunidas após CCDA	Massa (mg)
1-10	CMFA3-8-1	44,5
11-12	CMFA3-8-2	14
13-14	CMFA3-8-3	10,3
15-20	CMFA3-8-4	17,8
21-23	CMFA3-8-5	11,4
24-26	CMFA3-8-6	19,6
27-30	CMFA3-8-7	27,2
31-32	CMFA3-8-8	4,1
33-34	CMFA3-8-9	1,7
35-36	CMFA3-8-10	4,6
37-38	CMFA3-8-11	4,1
39-40	CMFA3-8-12	1,3
41-42	CMFA3-8-13	0,9
43-48	CMFA3-8-14	3,8

As frações CMFA3-8-7 (27,2 mg) e CMFA3-8-10 (4,6 mg) foram escolhidas, por análise do perfil cromatográfico, para serem feitos experimentos utilizando a Espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C (CD₃OD) e Espectrometria de Massas, resultando no isolamento das substâncias **13** e **14**.

Figura 12. Esquema de isolamento das substâncias da fração CMFA3.



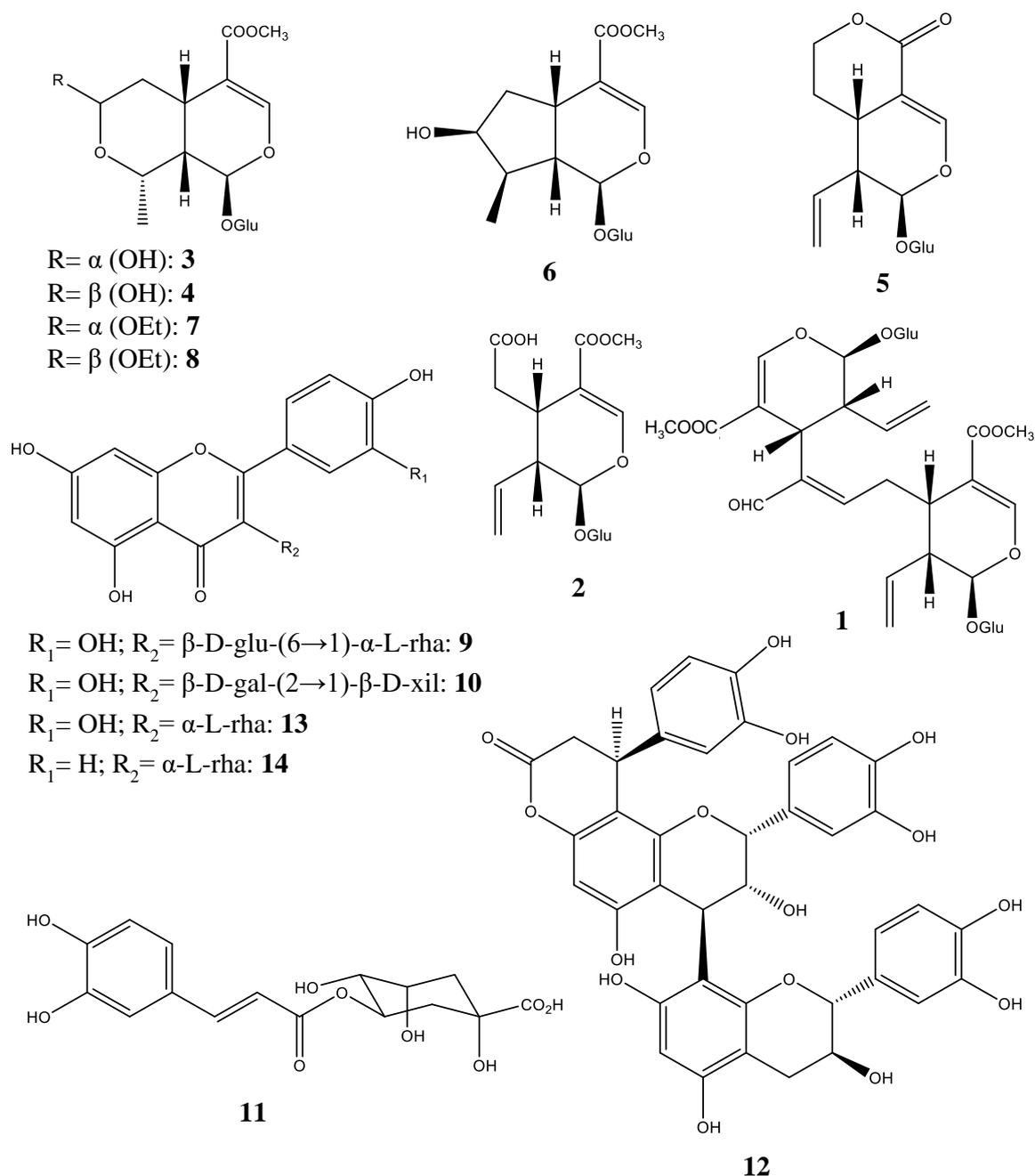
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FASE ACETATO DAS FOLHAS DE *C. multiflorum*

No presente trabalho, foi possível isolar 14 substâncias das classes dos iridoides glicosilados, secoiridoides glicosilados, flavonoides glicosilados, fenilpropanoide e proantocianidina, como mostra a figura a seguir.

Figura 13. Substâncias isoladas na fase acetato de etila das folhas de *C. multiflorum*.



No intuito de facilitar a organização dos resultados, a discussão do processo de identificação das substâncias isoladas foi dividida em classes, iniciando com o iridoide glicosilado, seguindo por secoiridoide glicosilados, fenilpropanoide, flavonoides glicosilados, e por último, a proantocianidina. Esta discussão é independente da ordem de isolamento das substâncias.

5.1.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS IRIDOIDES: substância 6

A fração CMFA1-6-16, cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.4.1.2, apresentou-se como um sólido amorfo amarelado e foi codificada por substância 6.

Na análise do espectro de RMN de ^1H (figura 15; tabela 11) foram visualizados um simpleto em δ 7,40 (1H) atribuído à presença de um hidrogênio olefínico (H-3), e um duplete em δ 5,38 ($J = 3,6$ Hz, 1H), indicativo de um hidrogênio desblindado ligado ao carbono acetal (C-1), característicos do anel pirânico de iridoide (ZULETA, 2003; RIMPLER, 1978; BAKURIDZE, 1987). Foram observados diversos sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados de δ 3,20 a δ 3,89, característico da presença de uma unidade glicosídica, além um duplete em δ 4,77 ($J = 8,2$ Hz, 1H), parcialmente encoberto pelo sinal residual de H_2O , atribuído ao hidrogênio ligado no carbono anomérico da unidade glicosídica. Desse modo, foi possível inferir que a substância 6 pertence à classe dos iridoide glicosilados. Adicionalmente, foi observado um tripleto largo em δ 4,11 ($J = 4,3$ Hz, 1H), referente a um hidrogênio ligado a carbono oxigenado (C-7), e um simpleto com integração para três hidrogênios em δ 3,70, sinal característico de uma metoxila. Observou-se seis sinais como: um duplo-duplete em δ 3,04 ($J = 15,5$ e $7,8$ Hz, 1H), atribuído ao H-5; um duplo-triplete em δ 1,72 ($J = 14,5$ e $5,8$ Hz, 1H) e um duplo-duplo-duplete em δ 2,15 ($J = 14,5$, $8,3$ e $1,3$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios diastereotópicos (H_a e H_b) do C-6; um multiplete em δ 1,88 (1H), pertencente ao H-8; um multiplete em 2,09, referente ao H-9. Além disso, observou-se um duplete em δ 1,04 ($J = 6,9$ Hz) com integração para três hidrogênios, sugerindo a presença de uma metila ligada a um carbono metínico (C-8). As atribuições foram realizadas a partir da análise do experimento de RMN bidimensional HSQC (figura 18).

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 16; tabela 12) apresentou 17 sinais, sendo este analisado em conjunto com o espectro de DEPT-135 (figura 17). Nesses espectros, foram observados sete sinais entre δ 99-61, sugestivos da presença de uma unidade glicosídica. Os sinais em δ 99,4 (CH), 73,4 (CH), 76,4 (CH), 70,3 (CH), 77,1 (CH) e 61,5 (CH_2), aliados ao

deslocamento químico e constante de acoplamento do hidrogênio anomérico, foram compatíveis com os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono da β -D-glucose, comumente encontrada ligada a iridoides. Foi verificada a presença de um sinal em δ 52,6, referente à metoxila (PLOUVIER & FAVRE-BONVIN, 1971; CHAUDHURI *et al.*, 1980).

Desse modo, restaram dez sinais que, após análise combinada com os dados de RMN, reforçam a proposta da estrutura de um monoterpene. Observou-se apenas um sinal em δ 170,9, atribuído à carbonila mais protegida, de um éster conjugado. Foi possível identificar a presença de apenas dois sinais na região de carbonos olefínicos, em δ 151,7 e 113,9, referentes à C-3 e C-4 presentes no anel pirânico, sendo também observado nessa região um sinal de carbono metínico em δ 97,4 ppm, que pôde ser atribuído à C-1, além de um sinal em δ 75,1 referente ao carbono carbinólico C-7. Adicionalmente, o espectro apresentou quatro sinais em δ 45,7 (CH₂), 41,2 (CH), 40,8 (CH) e 30,6 (CH) e um sinal em δ 12,8, referente a uma metila, atribuídos aos carbonos do anel ciclopentano (DINDA e DEBNATH, 2013). No experimento de DEPT-135 apenas dois sinais desaparecem no experimento, indícios da presença de carbonos quaternários na molécula, atribuídos à carboxila e ao carbono olefínico tetrasubstituído (C-4) do anel pirânico (BAKURIDZE *et al.*, 1987). O experimento também confirmou que o C-3 se trata de um carbono metínico sp². O sinal em δ 45,7 foi decisivo para indicar a estereoquímica relativa de C-10, sendo o deslocamento químico de C-9 mais próximo da loganina, que apresenta a metila β orientada (CHAUDHURI *et al.*, 1979; CHAUDHURI *et al.*, 1980; DAMTOFT *et al.*, 1981). Comparações com 8- e 7-epiloganinas foram feitas, a fim de se confirmar a estereoquímica relativa do grupo OH em C-7 (tabela 12), no qual os deslocamentos químicos foram incompatíveis, reforçando a proposta de que 6 se tratava da loganina (ITOH *et al.*, 2005).

Devido à ausência de um sinal para calibração, pois em alguns espectros não foi detectado o sinal do TMS, o C-6' da unidade glicosídica foi definido como padrão interno para a calibração dos espectros de RMN de ¹³C em todas as substâncias analisadas em D₂O, visto que Damtoft e colaboradores (1981) observaram que ao calibrar os espectros a partir deste sinal, não se observou uma diferença nos deslocamentos químicos das metoxilas de iridoides, sendo então, um bom padrão para calibração nestes casos.

Para corroborar a elucidação estrutural, o espectro de massas de alta resolução da substância **6** foi analisado no modo positivo (figura 19), sendo possível observar a presença dos íons a m/z 391,1610 [M+H]⁺, m/z 429,1173 [M+Na]⁺ e m/z 408,1860 [M+NH₄]⁺ (calc. C₁₇H₃₀NO₁₀, erro de 1,0 ppm), compatíveis com a fórmula molecular C₁₇H₂₆O₁₀. O íon [M+NH₄]⁺ gerou os fragmentos a m/z 229, 211, 197, 179, 161 e 151. Já o íon a m/z 229,1071

$[M-162+H]^+$, referente a aglicona protonada, deu origem aos íons de m/z 179, 161 e 151. Estes fragmentos estão de acordo com os relatados por Kucharska e Fecka (2016) para a loganina.

A partir dos dados discutidos acima, aliado aos dados da literatura (CALIS *et al.*, 1984), foi possível identificar que a substância **6** se trata do iridoide glicosilado loganina (figura 14), substância amplamente relatada em Rubiaceae, inclusive no gênero *Calycophyllum* (ZULETA *et al.*, 2003).

Figura 14. Substância **6**, loganina.

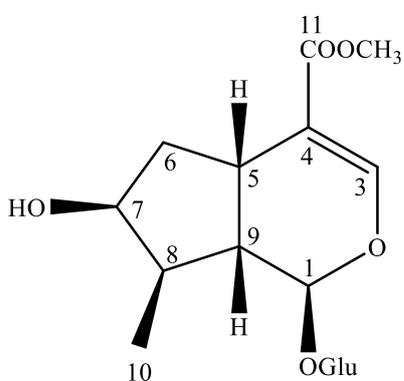


Figura 15. Espectro de RMN de 1H (300 MHz, D_2O) da substância **6**.

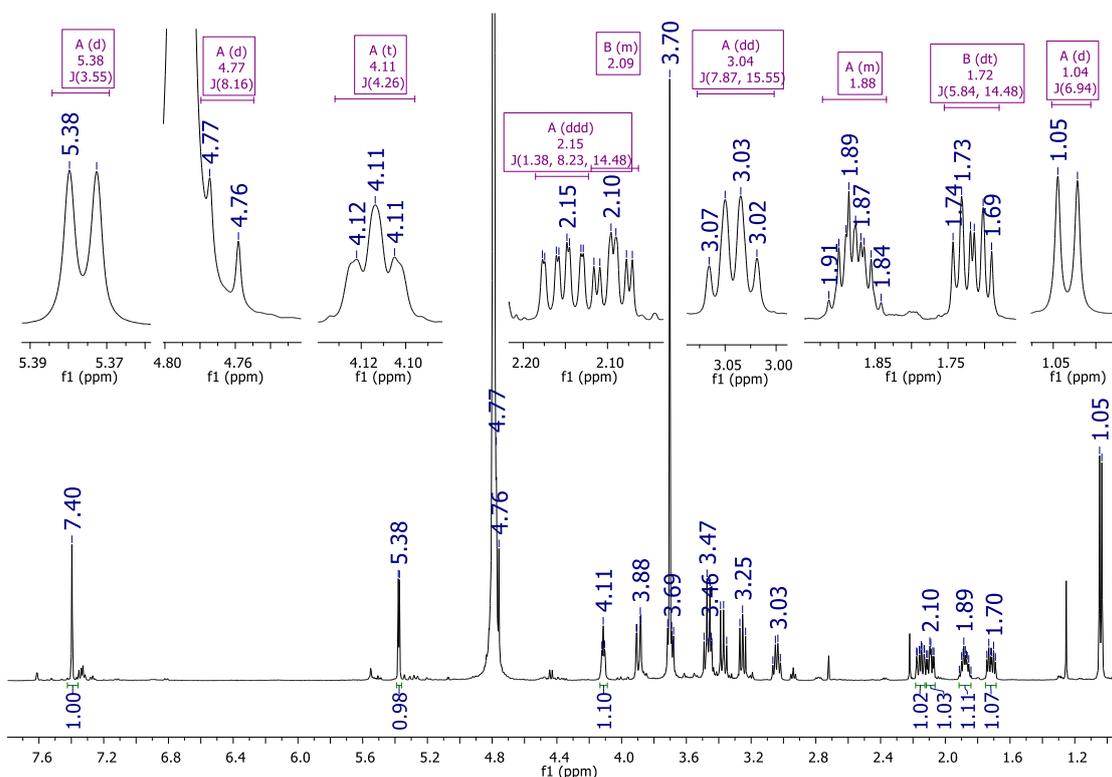


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância **6**.

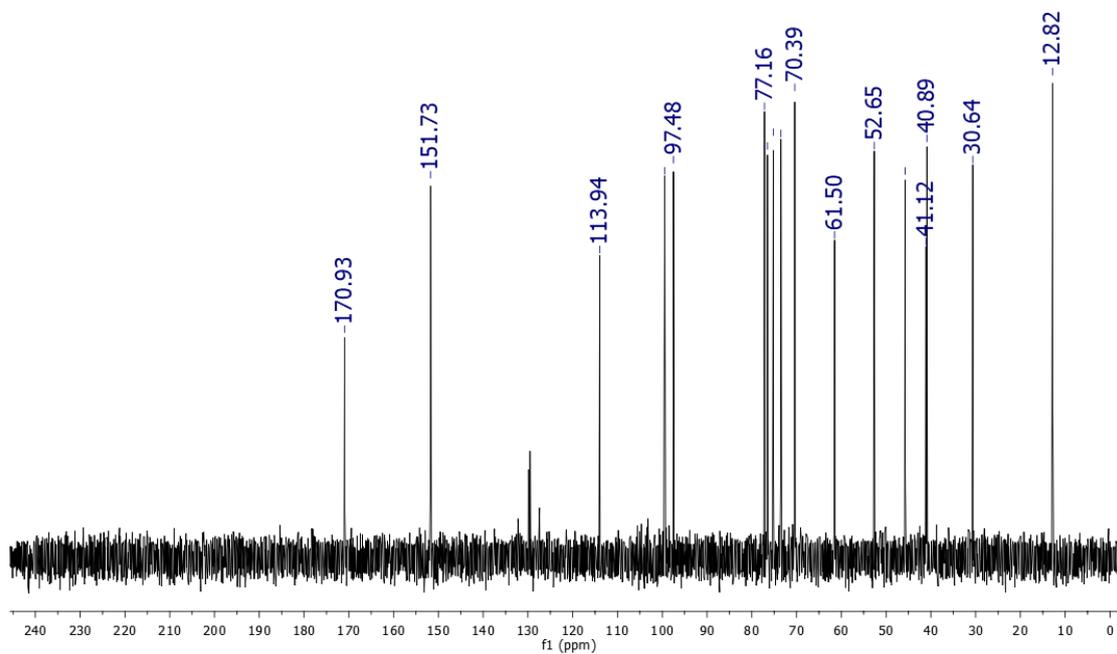


Figura 17. Espectro de DEPT-135 da substância **6**.

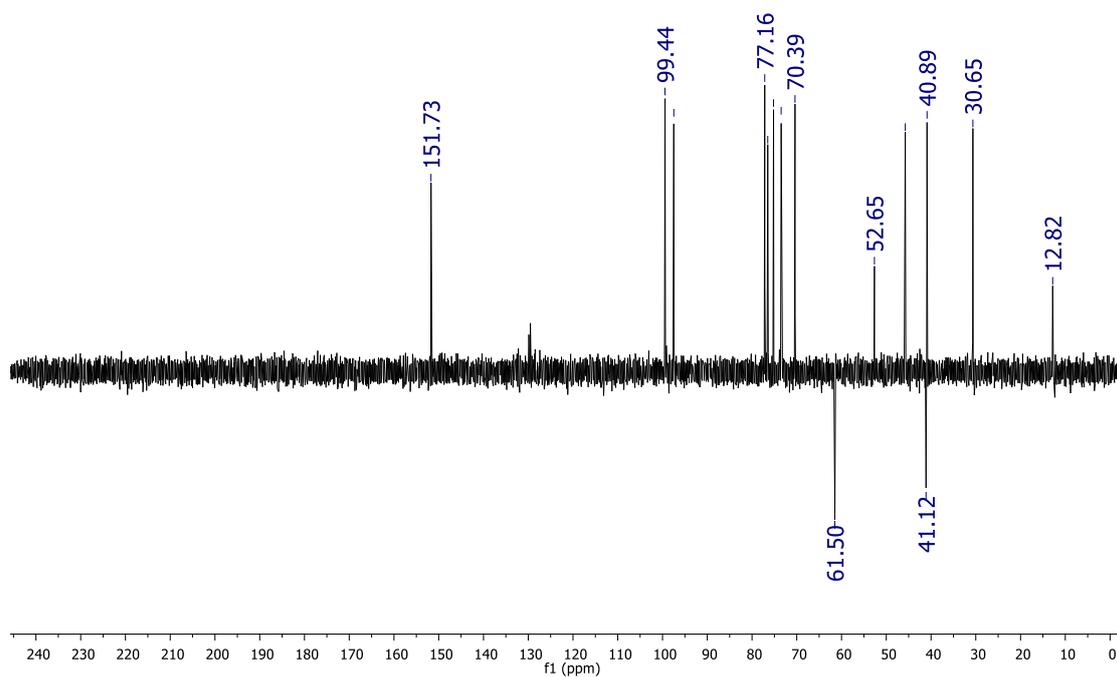


Figura 18. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **6**.

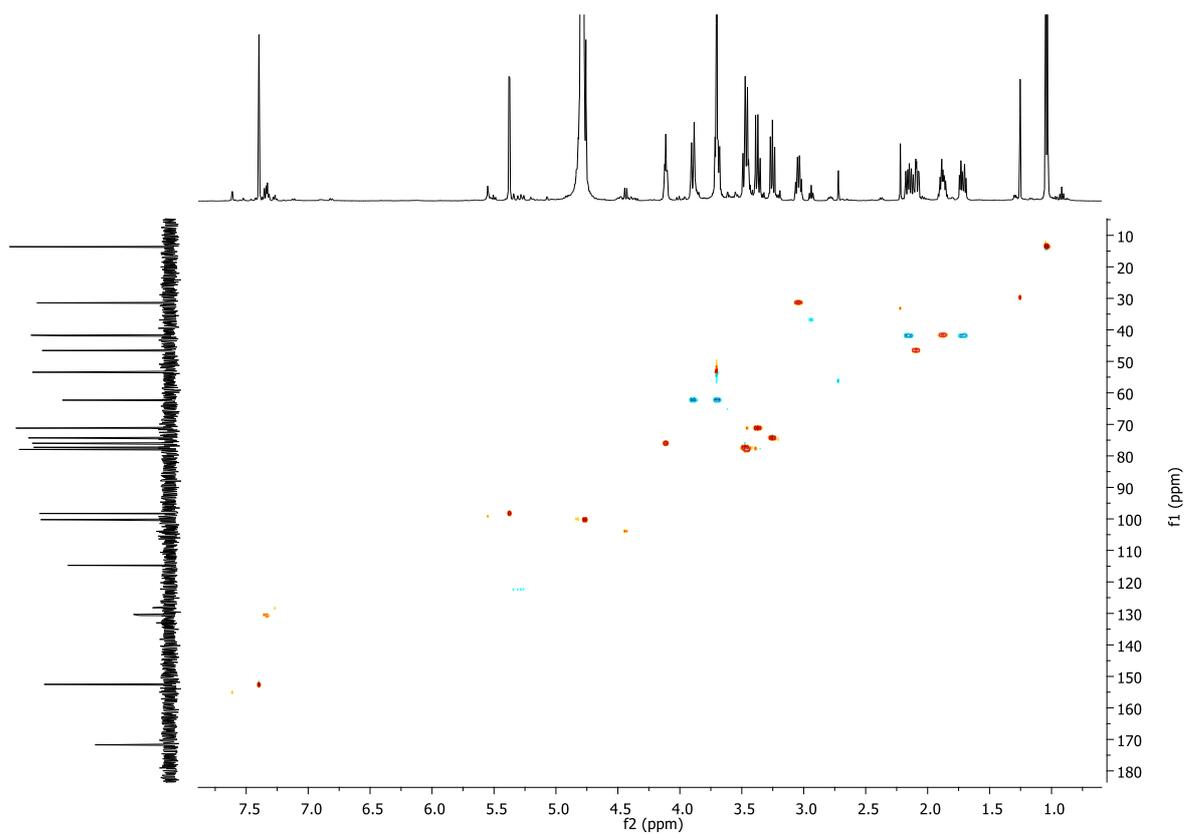


Figura 19. Cromatograma de UV, MS e MS² (modo positivo) da substância **6**.

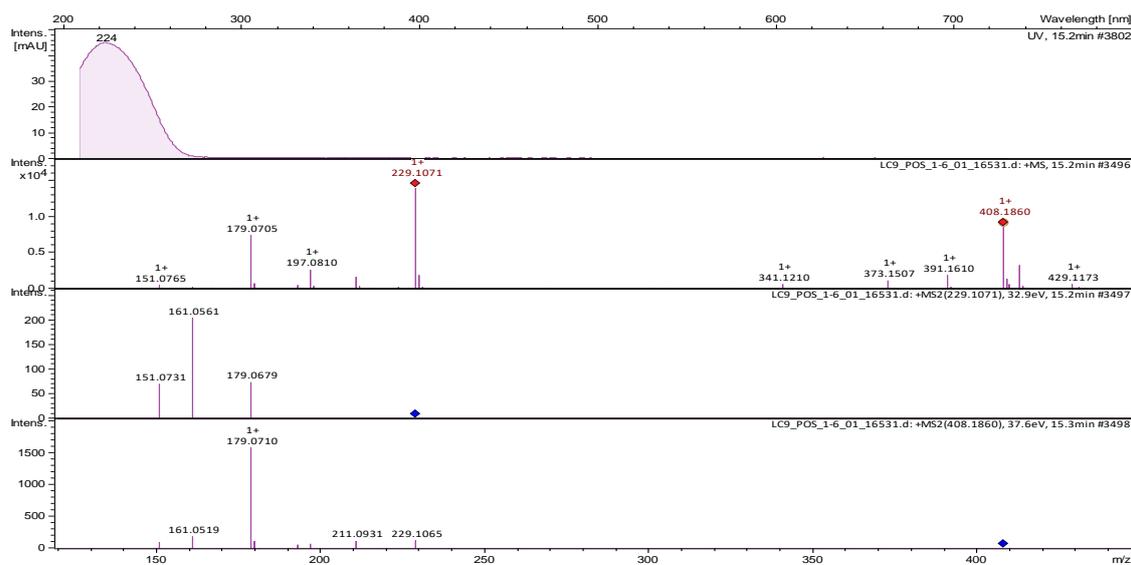


Tabela 11. Dados de RMN de ^1H da substância **6** (D_2O) e literatura (CALIS *et al.*, 1984), em CD_3OD .

C/H	Loganina $^1\text{H}^*$	Substância 6 ^1H
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)
1	5,26 (d, $J = 4,5$, 1H)	5,38 (d, $J = 3,6$, 1H)
3	7,38 (d, $J = 1,2$, 1H)	7,40 (s, 1H)
4	-	-
5	3,12 (m, 1H)	3,04 (dd, $J = 15,5$, 7,8, 1H)
6_a	1,62 (m, 1H)	1,72 (dt, $J = 14,4$, 5,8, 1H)
6_b	2,03 (m, 1H)	2,15 (ddd, 14,4 8,3, 1,3, 1H)
7	4,04 (m, 1H)	4,11 (tl, $J = 4,3$, 1H)
8	1,87 (m, 1H)	1,88 (m, 1H)
9	2,23 (m, 1H)	2,09 (m, 1H)
10	1,09 (d, $J = 6,9$, 1H)	1,04 (d, $J = 6,9$, 1H)
11	-	-
OCH₃	3,69 (s, 1H)	3,70 (s, 1H)
1'	4,64 (d, $J = 7,8$, 1H)	4,77 (d, $J = 8,2$, 1H)
2'	-	3,25 (m, 1H)
3'	3,40-3,19 (m, 1H)	3,49-3,20 (m, 1H)
4'	-	3,37 (m, 1H)
5'	-	3,46 (m, 1H)
6'	3,89 (dd, $J = 12,0$, 1,8, 1H) 3,66 (dd, $J = 12,0$, 5,7, 1H)	3,88 (d, $J = 11,4$, 1H) 3,65 (m, 1H)

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C da substância **6**, em D_2O , e literatura (ITOH *et al.*, 2005; DAMTOFT *et al.*, 1981), em CD_3OD .

C/H	7-Epiloganina ^a	Substância 6	8-Epiloganina ^b	Loganina ^b	Substância 6
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	97,7	98,7	96,4	97,5	97,4
3	152,5	153,0	152,3	151,7	151,7
4	113,3	115,2	113,0	113,8	113,9
5	31,4	31,9	29,4	30,6	30,6
6	42,0	42,1	39,6	41,2	41,2
7	79,7	76,4	78,9	74,8	75,1
8	44,0	42,4	43,6	40,9	40,8
9	47,1	47,0	41,7	45,7	45,7
10	17,7	14,1	13,9	12,8	12,8
11	169,5	172,2	170,4	170,5	170,9
OCH₃	51,7	53,9	52,6	52,5	52,6
1'	100,4	100,7	99,1	99,4	99,4
2'	74,8	74,7	73,4	73,6	73,4
3'	78,4	78,4	76,5	76,5	76,4
4'	71,7	71,6	70,2	70,4	70,3
5'	78,1	77,7	77,1	77,1	77,1
6'	62,8	62,8	61,5	61,5	61,5

Legenda: ^a: ITOH *et al.*, 2005; ^b: DAMTOFT *et al.*, 1981. Para a comparar a substância **6** com a 7-epiloganina, o C-6'' de **6** foi calibrado a δ 62,8 e na comparação com 8-epiloganina, o C-6'' foi calibrado a δ 61,5. As diferenças nos deslocamentos químicos observados entre as duas colunas da substância **6** são referentes a distintas calibrações.

5.1.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS SECOIRIDOIDES: substâncias 1-5 e 7-8

5.1.2.1. Substância 1

A substância **1** foi obtida da fração CMFA1-5-P12, como descrito no item 4.4.1.1 e apresentou-se como um sólido amorfo marrom.

No espectro de RMN de ^1H (figuras 26 e 27; tabela 13), de mesmo modo que para o composto **6**, foram visualizados sinais característicos de iridoides glicosilados. Na região de hidrogênios olefínicos, observou-se dois simpletos largos atribuídos aos H-3 e H-3'', em δ 7,51 (1H) e 7,59 (1H), além dos dupletos em δ 5,48 (m, 1H) e 5,60 ($J = 6,7$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios acetais (H-1, H-1'', respectivamente), dos anéis pirânicos.

Diferentemente da substância anterior, a substância **1** apresentou outros sinais na região de hidrogênios olefínicos, como dois multipletos em δ 5,78 (1H) e 5,50 (1H), referentes aos H-8 e H-8'', quatro dupletos largos em δ 5,32 ($J = 10,8$ Hz, 1H) e 5,38 ($J = 17,1$ Hz, 1H); 5,10 ($J = 9,9$ Hz, 1H) e 5,12 ($J = 16,9$ Hz, 1H), relativos aos H_a e H_b de C-10 e C-10'', respectivamente. Estes sinais são relacionados aos hidrogênios da ligação dupla terminal, originada pelo rompimento da ligação entre os carbonos 7 e 8 no anel pentacíclico, característica presente nos secoiridoides (DEWICK, 2009). Foram observados diversos sinais na região de hidrogênios ligados à carbonos oxigenados entre δ 3,14 e δ 3,91 ppm, indicativos da presença de unidades glicosídicas, além de dois sinais, um parcialmente encoberto pelo sinal residual de H₂O em δ 4,81 (1H) e um duplete em δ 4,84 ($J = 8,1$ Hz, 1H), com constante de acoplamento com 8,1 Hz. Adicionalmente, verificou-se dois simpletos intensos em δ 3,61 e 3,71, com integração para três hidrogênios cada, atribuído a presença de duas metoxilas, além de um simpleto em δ 9,16 (1H) caracterizando a presença de um grupo aldeído.

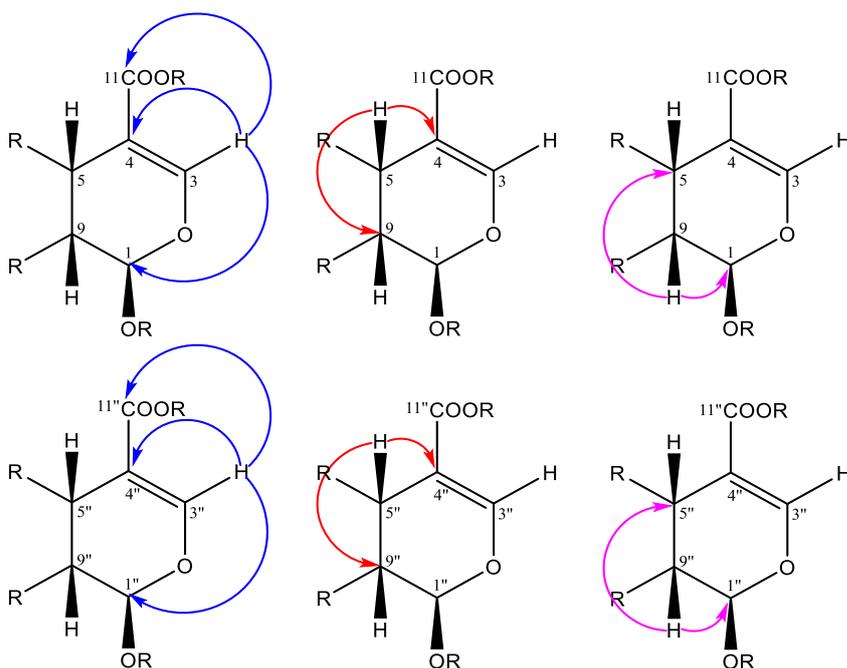
O espectro de RMN ^{13}C apresentou 31 sinais (figura 28; tabela 13). Na região de carbonos oxigenados, foi possível observar sinais entre δ 100-63, sugerindo a presença de unidades glicosídicas, no qual os deslocamentos químicos dos carbonos encontrados nessa região estão de acordo com os relatados para a β -D-glucose (BOROS e STERMITZ, 1991). Os sinais em δ 53,9 e 54,0 foram atribuídos às metoxilas presentes em iridoides, como mencionado anteriormente. Neste caso, ao subtrair os sinais da unidade glicosídica e da metoxila, restaram mais de dez sinais, e deslocamentos químicos de alguns carbonos apresentaram-se duplicados,

sugerindo que esta substância se trata de um dímero de secoiridoides, como relatado anteriormente pela literatura (JUNIOR, 1988).

Seguindo o processo de determinação estrutural, observou-se a presença de oito sinais na região de carbonos olefinicos, em δ 153,5 e 111,4 (C-3 e C-4), 155,6 e 110,0 (C-3'' e C-4'') referente aos carbonos dos anéis pirânicos, além dos sinais em δ 135,5 e 122,4 (C-8 e C-10, respectivamente) e 135,0 e 122,0 (C-8'' e C-10'', respectivamente). Complementarmente, observou-se um sinal em δ 171,6, indicativo da presença de carbonilas de éster conjugadas, e o sinal em δ 200,8, atribuído a presença de uma carbonila de aldeído. As atribuições foram feitas a partir da análise do experimento de HSQC (figura 29) e comparações com a literatura (MACHIDA *et al.*, 2002), como na tabela 13.

No espectro de HMBC (figura 30) pode-se observar as seguintes correlações: em δ 7,59 e 111,4 (H-3 e C-4) e em δ 7,51 e 110,0 (H-3'' e C-4''), em δ 7,59 e 99,4 (H-3 e C-1) e em δ 7,51 e 98,9 (H-3'' e C-1''), além das correlações entre os sinais em δ 7,59 e 171,6 (H-3 e C-11) e em δ 7,51 e 171,6 (H-3'' e C-11'') (figura 31). Foi possível observar correlações entre o H-5 (δ 3,10) e os C-9 (δ 45,7) e C-4 (δ 111,4), além do H-5'' (δ 3,94) e os C-4'' (δ 110,0) e C-9'' (δ 46,1), bem como, uma correlação entre o H-9 (δ 2,80) com os C-1 (δ 99,4) e C-8 (δ 135,5), além do H-9'' (δ 2,68) o C-1'' (δ 98,9) e C-8'' (δ 135,0) (figuras 31 e 32). Tais correlações sustentam a proposta de que os dois anéis são pirânicos (figura 20).

Figura 20. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.



Como mencionado anteriormente, a estereoquímica destes centros quirais foram atribuídas com base na biossíntese dessa classe de compostos, além de comparações dos dados de deslocamento químicos com os descritos na literatura (MACHIDA *et al.*, 2002).

Ainda no espectro de HMBC, observou-se correlações entre: H-5 (δ 3,10) e C-6 (δ 31,6), H-5'' (δ 3,94); C-6'' (δ 142,4) e C-7'' (200,8); H-7 (δ 6,88) com o CH₂ (C-6, δ 31,6); o hidrogênio do grupo aldeído (H-7'', δ 9,16) e os C-5'' (δ 31,6) e C-6'' (δ 142,4) (figuras 32, 33, 34 e 21). Adicionalmente, foi possível identificar uma correlação entre os hidrogênios das metoxilas (OCH₃, δ 3,61 e OCH₃'', δ 3,71) e os C-11 e C-11'' (δ 171,6) (figura 35). Por fim, observou-se uma correlação entre o H-7 e o C-7'' (δ 6,88 e 200,8), conectando as duas porções da substância, como demonstrado na figura 32, além das correlações entre os hidrogênios anoméricos da β -D-glucose (H-1', δ 4,84 e H-1''', δ 4,81) e os C-1 (δ 99,4) e C-1'' (δ 98,9), como apresenta as figuras 36 e 22.

Figura 21. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.

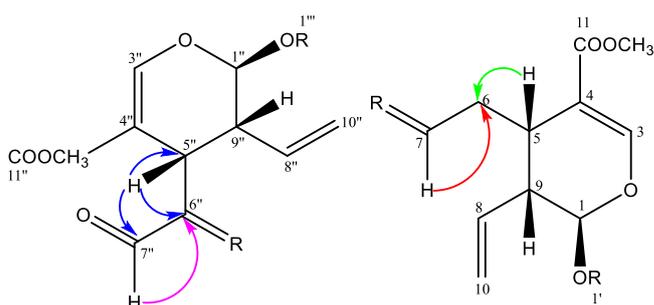
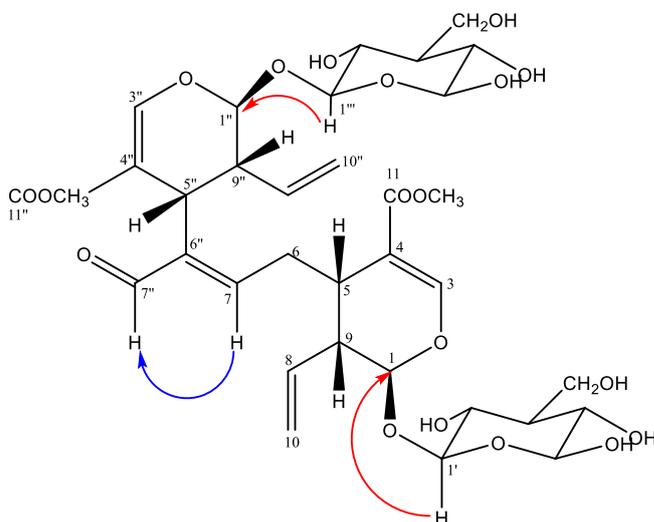
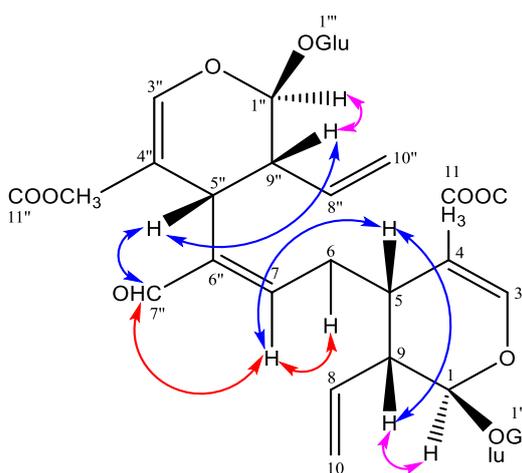


Figura 22. Correlações observadas no espectro HMBC, da substância 1.



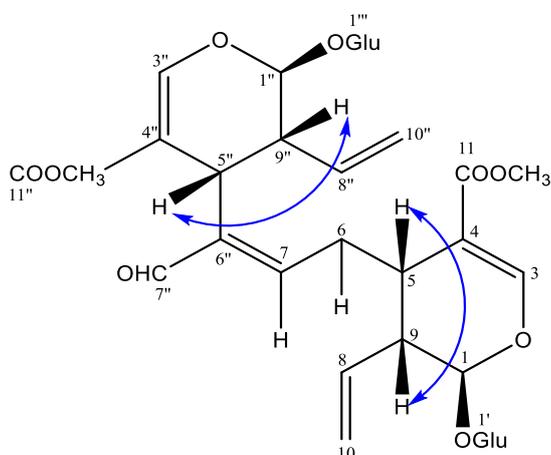
No experimento bidimensional COSY (figura 37), a comprovação da presença dos ciclos pirânicos advém dos acoplamentos observados entre os vizinhos H-5/H-5'' (δ 3,10 e 3,95) e H-9/H-9'' (δ 2,80 e 2,68), os H-1/H-1'' (δ 5,48 e 5,60) e H-9/H-9'' (δ 2,80 e 2,68) conforme mostra a figura 23.

Figura 23. Correlações observadas no experimento COSY, da substância 1.



Complementarmente, foi possível observar acoplamentos entre os H-5 e H-6, H-7 e H-6, H-8 com H-10 e H-9. No experimento de RMN bidimensional NOESY (figura 39), foi possível visualizar um efeito NOE entre o H-5 (δ 3,10) e H-9 (δ 2,80) e entre o H-5'' (δ 3,95) e o H-9'' (δ 2,68), confirmando que ambos estão para o mesmo lado (figura 40), e, justificando a conectividade entre as duas porções da molécula, verificou-se um NOE entre os H-7 (δ 6,88) e H-7'' (δ 9,16).

Figura 24. Correlações observadas no experimento NOESY, da substância 1.



Para contribuir com a proposta estrutural, os espectros de massas, obtidos nos modos positivo (figura 40) e negativo (figura 39), foram analisados. O modo positivo indicou um íon

a m/z 776,2965 referente a molécula hidratada e a m/z 759,2722 $[M+H]^+$ ($C_{34}H_{47}O_{19}$, erro de -2,1 ppm), condizente com a fórmula molecular $C_{34}H_{46}O_{19}$. No modo negativo, observou-se picos a m/z 803,2565 $[M+HCOO]^-$ e 757,2385 $[M-H]^-$. A fragmentação do íon $[M+HCOO]^-$ originou os íons a m/z 595, 525 e 493 (figura 39), estando de acordo com as fragmentações descritas na literatura para a aldosecologanina (REN *et al.*, 2008; TANG *et al.*, 2016).

A partir dos sinais observados nos experimentos de RMN unidimensionais (RMN de 1H e ^{13}C), bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) e espectros de massas, aliados aos dados da literatura, foi possível identificar que a substância **1** como o secoiridoide glicosilado (*E*)-aldosecologanina, conforme apresenta a figura 25. Trata-se do primeiro relato desta substância no gênero *Calycophyllum*, sendo anteriormente relatada apenas na espécie *Palicourea luxurians* (KORNPOINTNER *et al.*, 2020).

Figura 25. Substância **1**, a (*E*)-aldosecologanina.

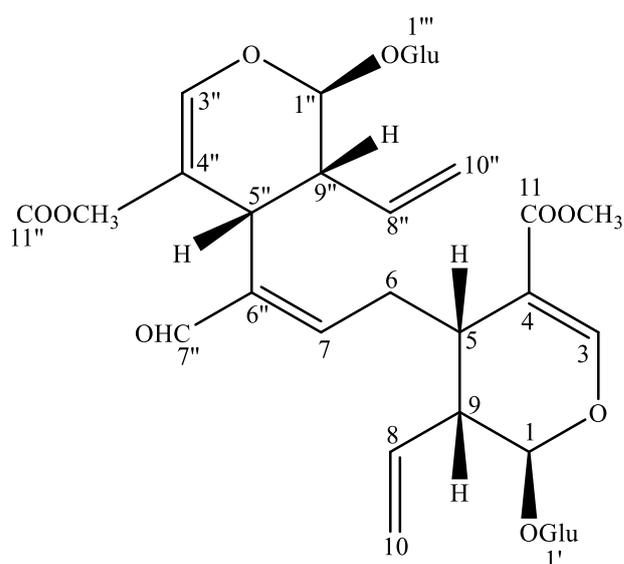


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância **1**.

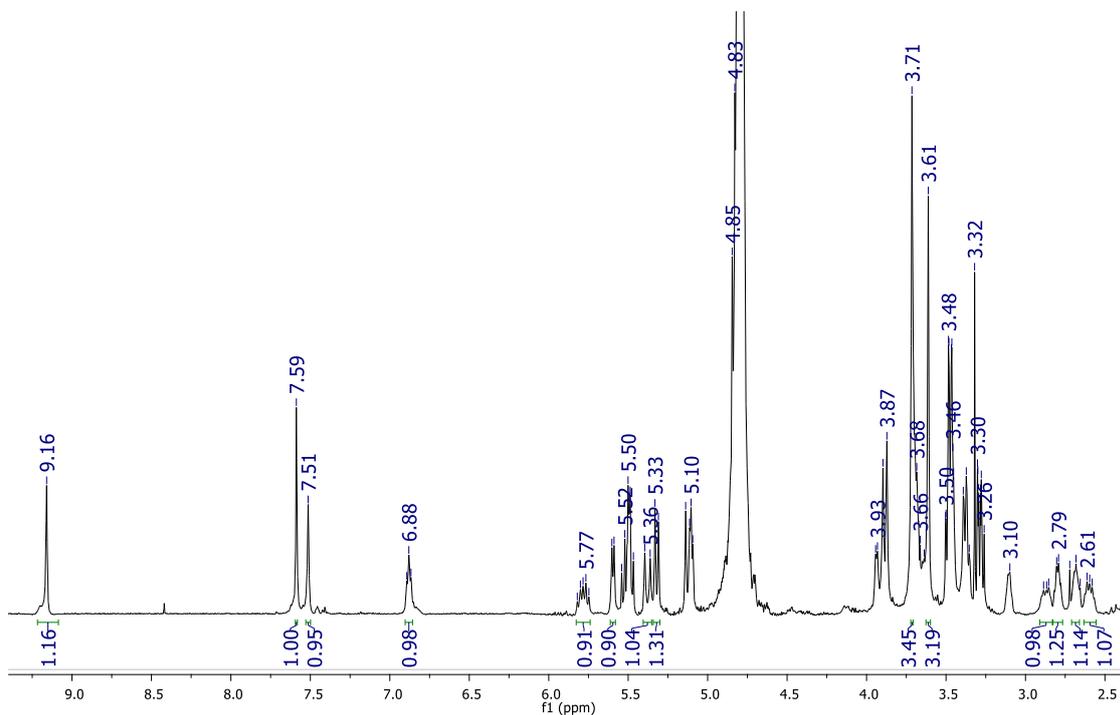


Figura 27. Expansões espectro de RMN de ^1H .

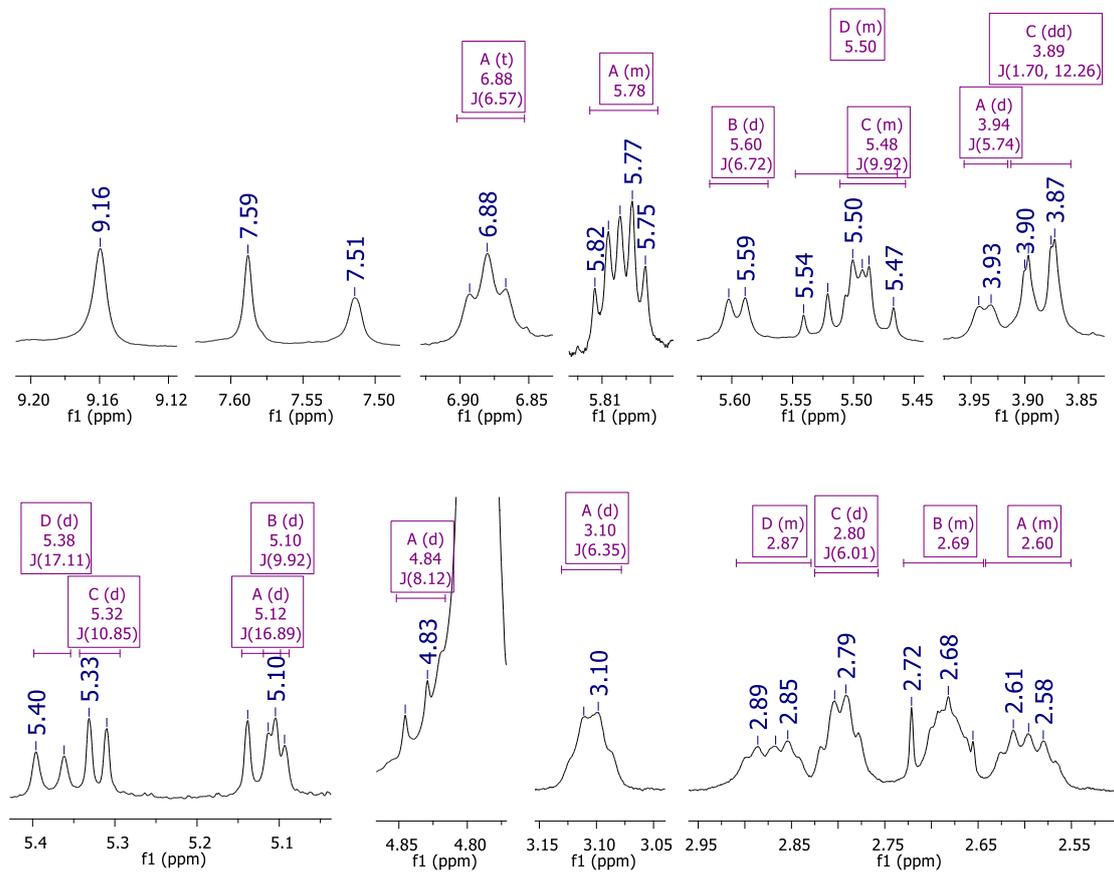


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância **1**.

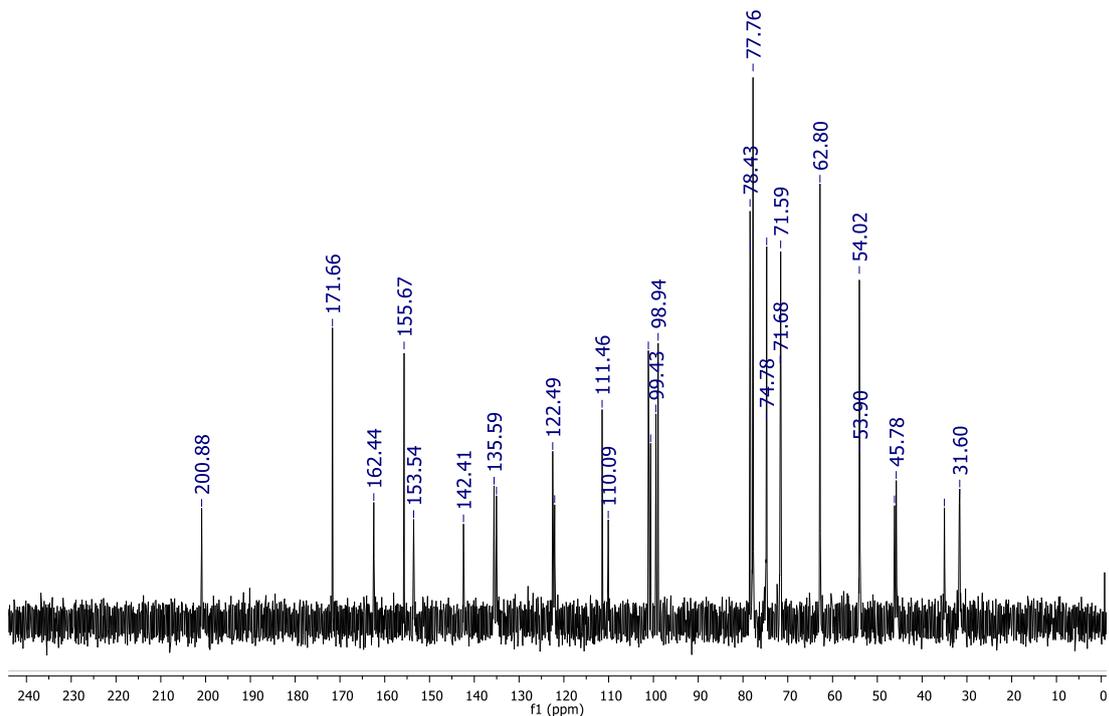


Figura 29. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

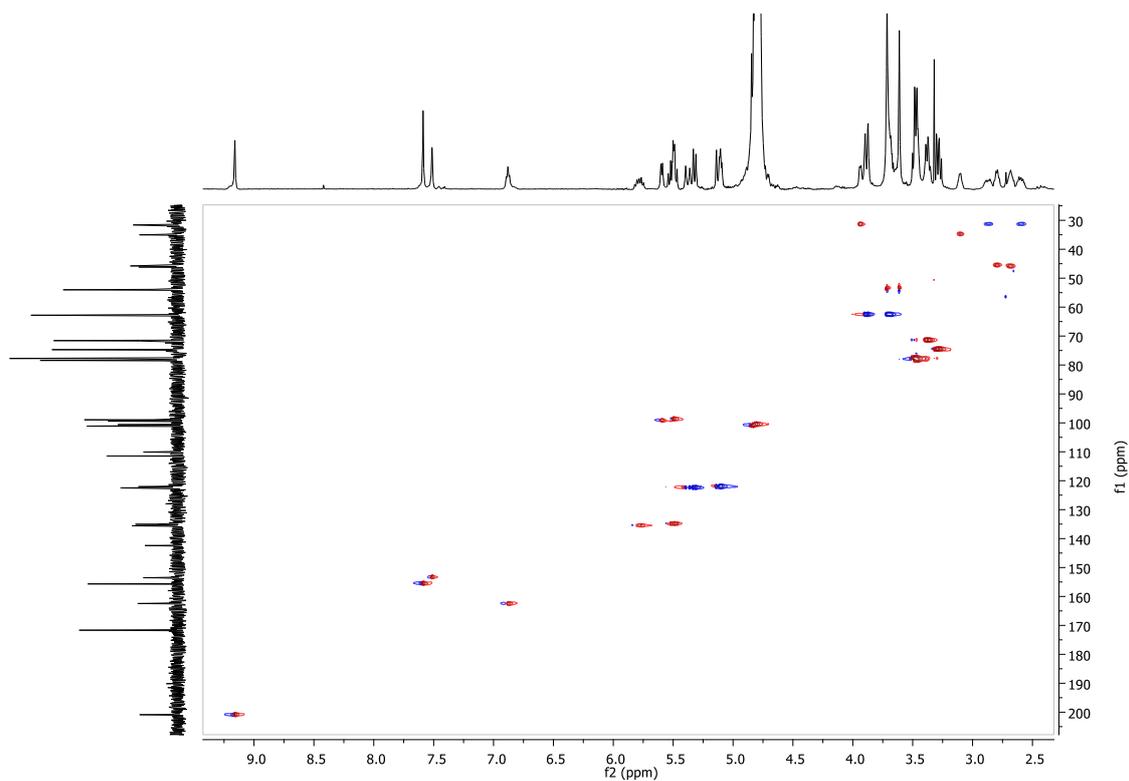


Figura 30. Espectro HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

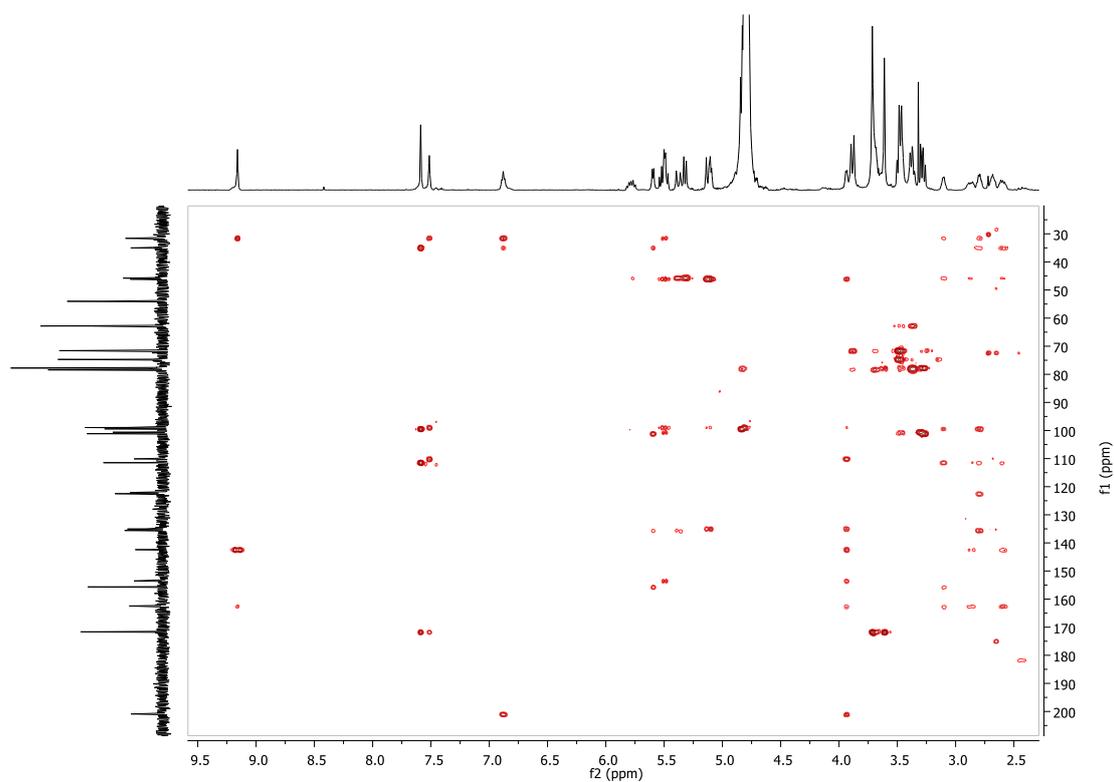


Figura 31. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

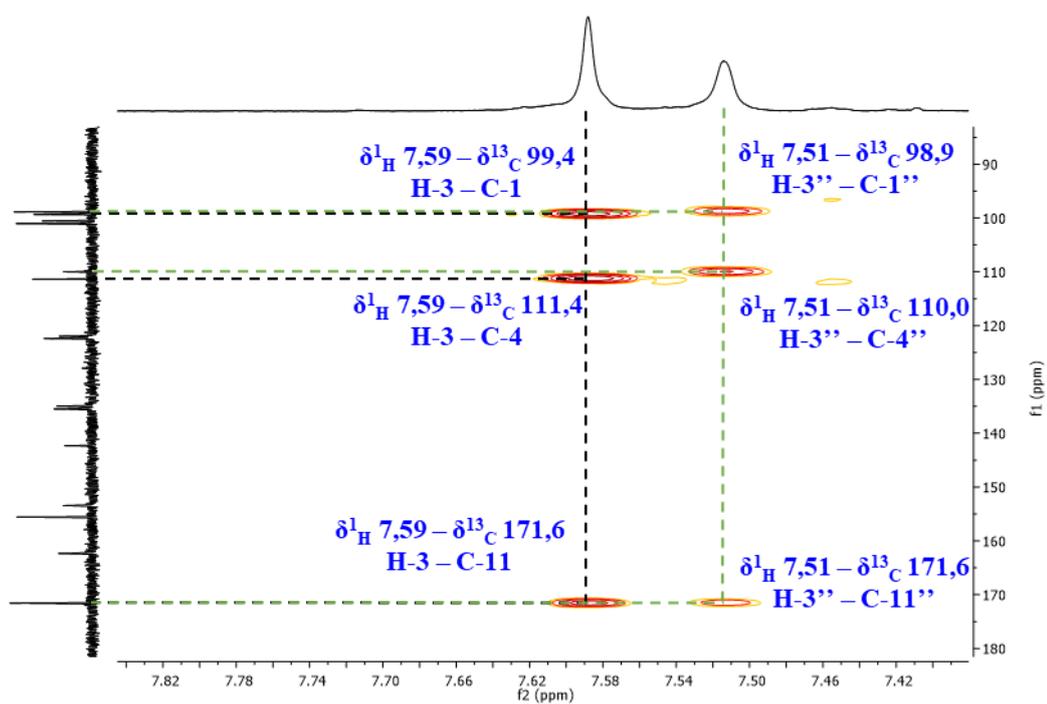


Figura 32. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

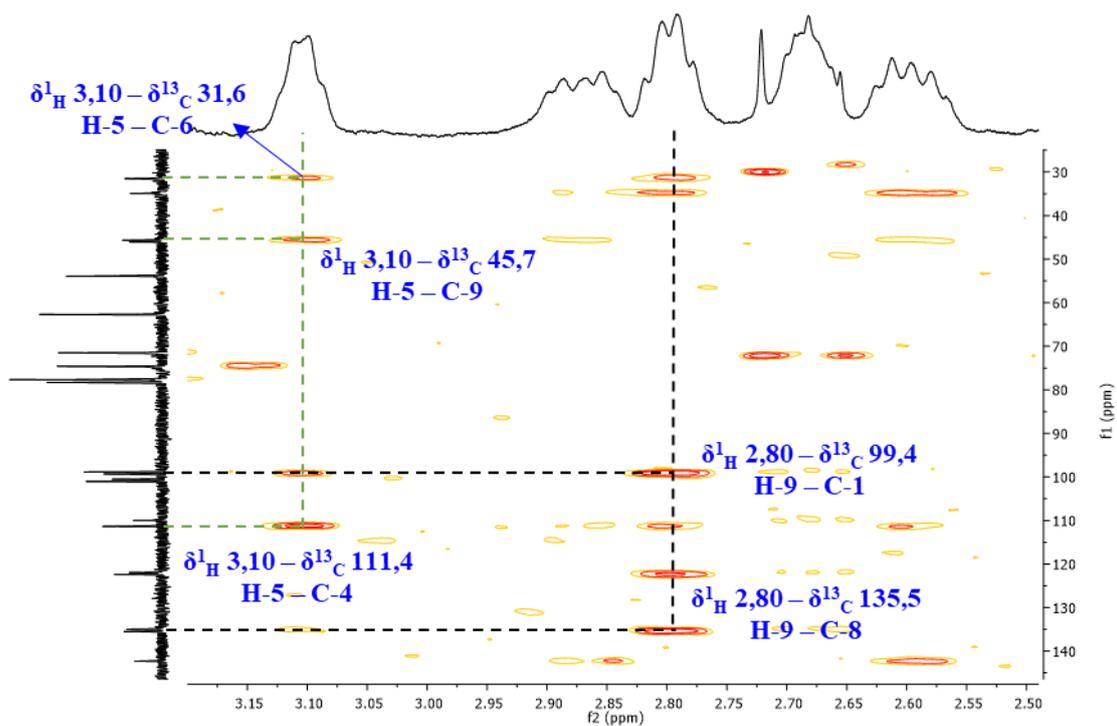


Figura 33. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

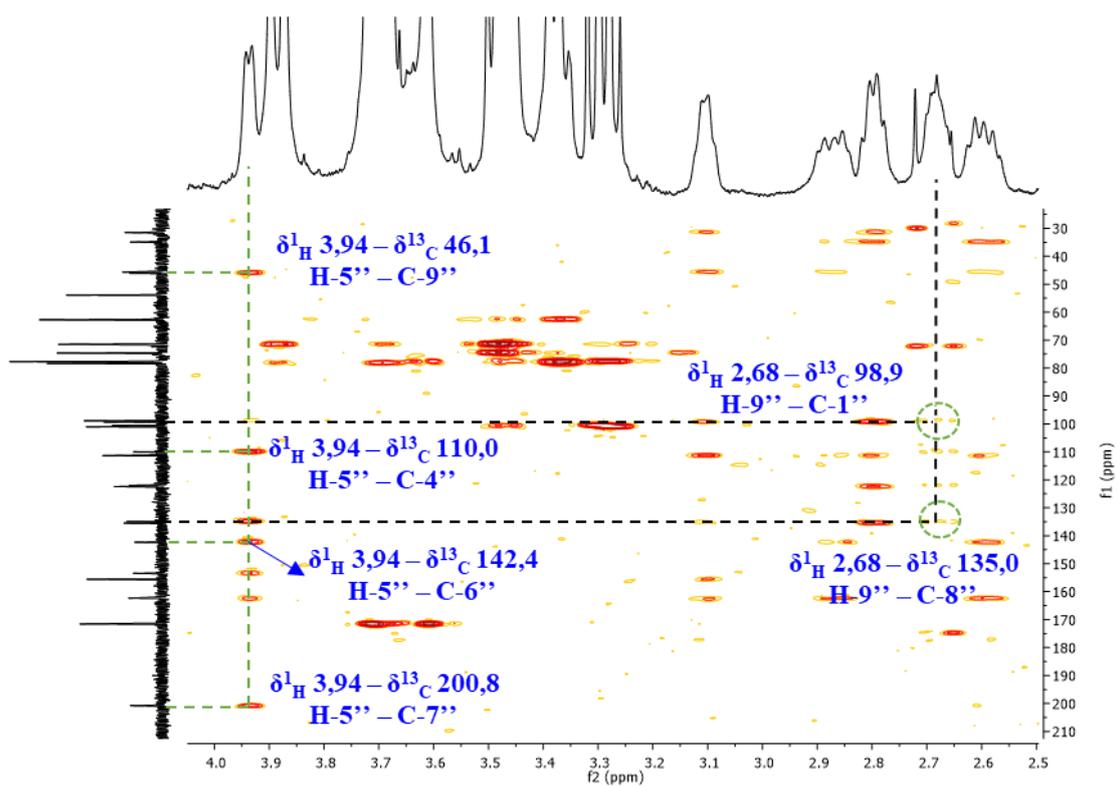


Figura 34. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

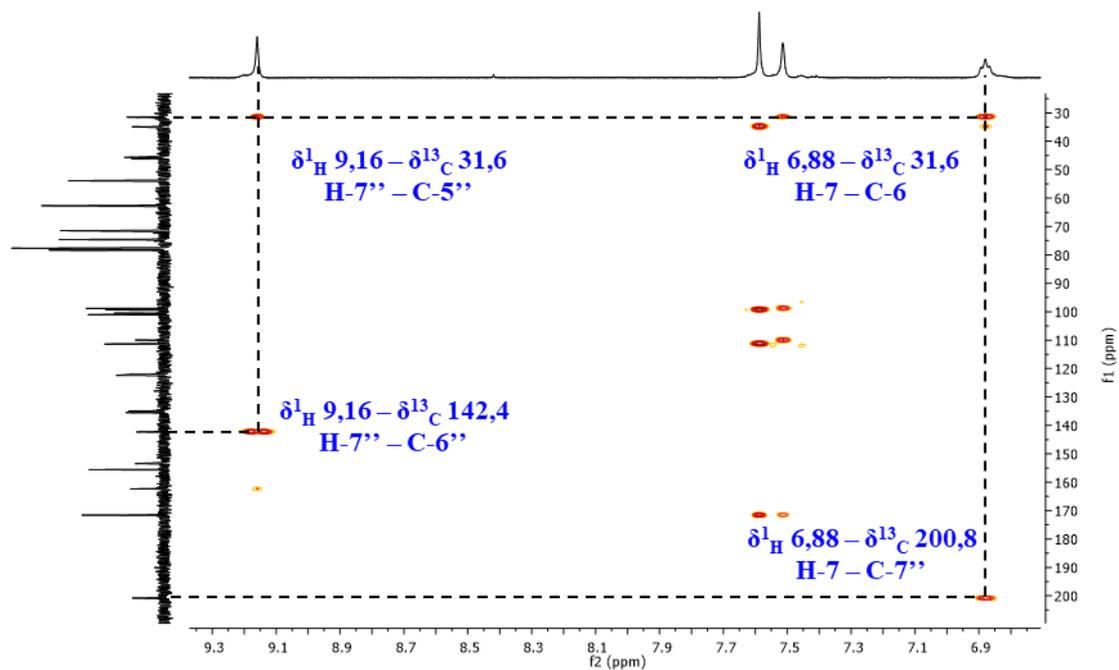


Figura 35. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

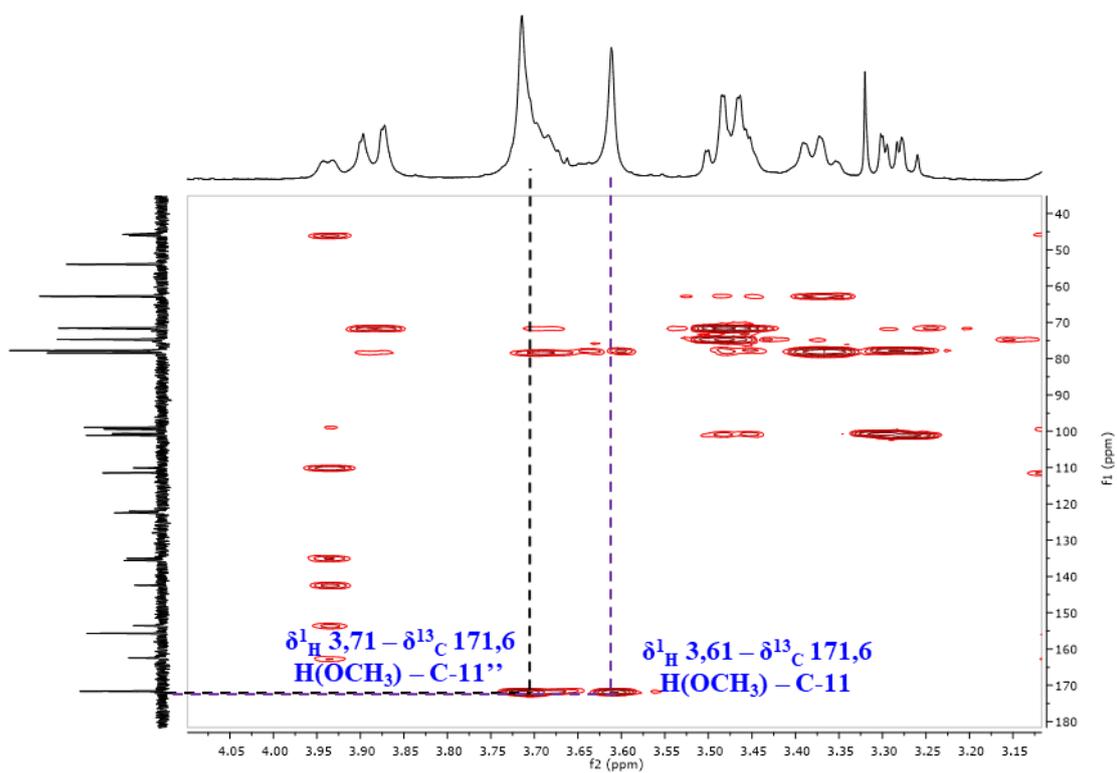


Figura 36. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância **1**.

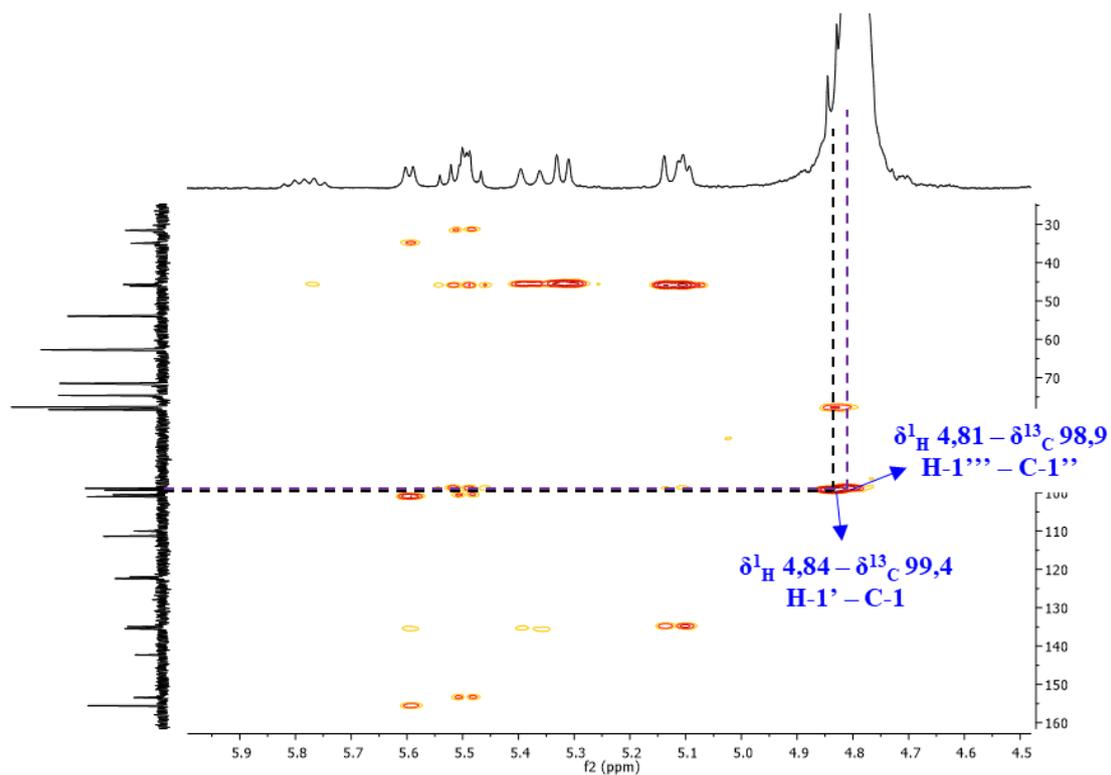


Figura 37. Espectro COSY (^1H , ^1H , 500 MHz, D_2O) da substância **1**.

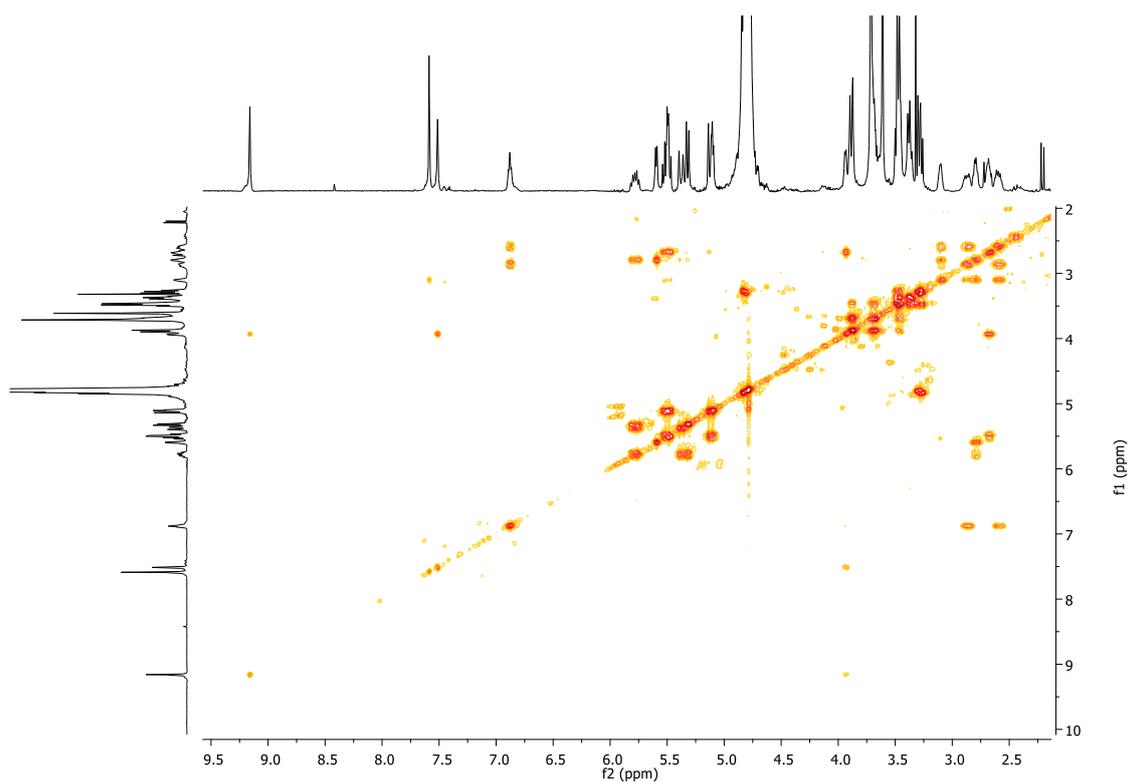


Figura 38. Espectro NOESY (^1H , ^1H , 500 MHz, D_2O) da substância **1**.

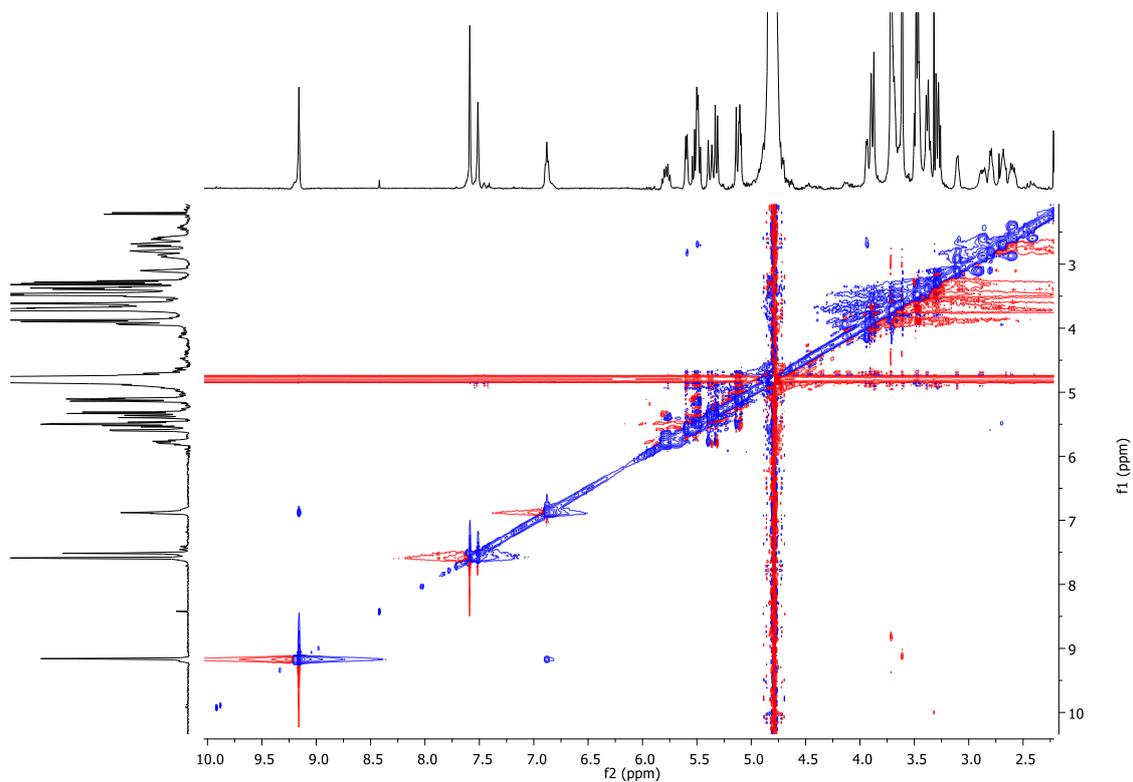


Figura 39. Espectro de massas (MS e MS^2 , modo negativo) da substância **1**.

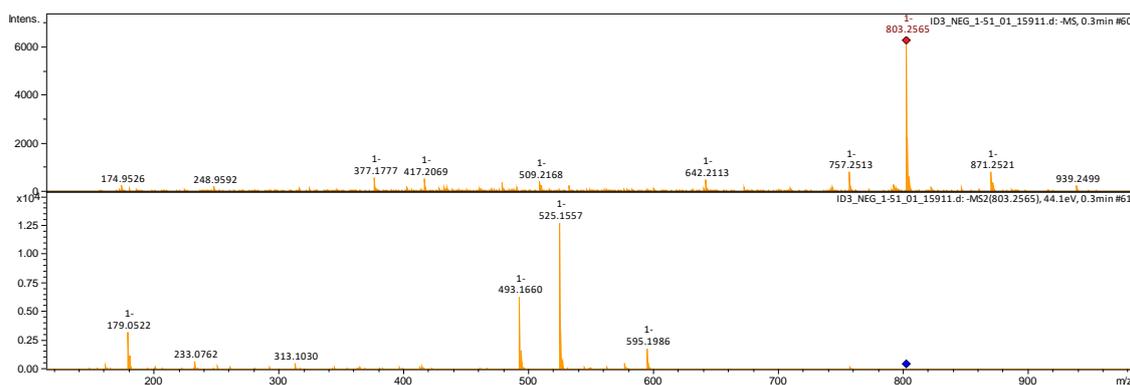


Figura 40. Cromatograma de UV, MS e MS² (modo positivo) da substância 1.

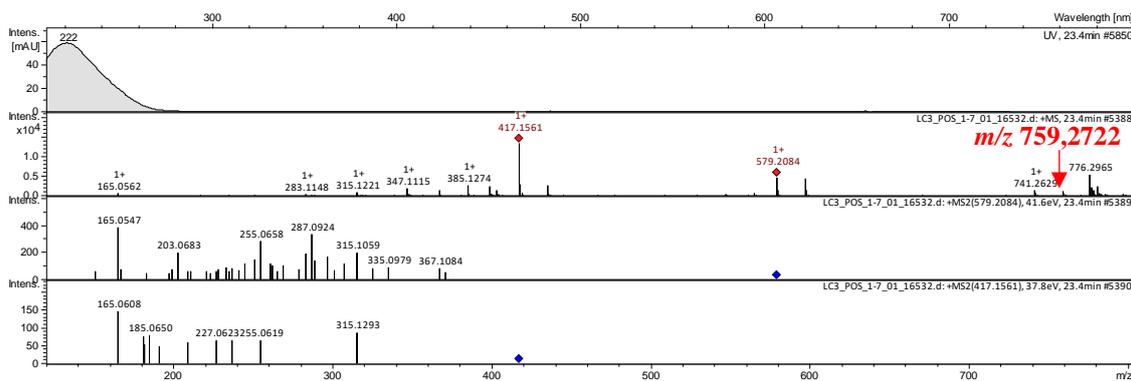


Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , 300 MHz/ 75 MHz, da substância **1** (D_2O) e literatura em CD_3OD (MACHIDA *et al.*, 2002).

	<i>(E)</i> -aldosecologanina		<i>(Z)</i> -aldosecologanina		Substância 1	
C/H	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	5,58 (d, $J = 5,1$, 1H)	97,8	5,50 (d, $J = 5,1$, 1H)	97,7	5,48 (m, 1H)	99,4
3	7,54 (s, 1H)	154,3	7,48 (d, $J = 1,1$, 1H)	153,9	7,59 (s, 1H)	153,5
4	-	110,6	-	110,3	-	111,4
5	3,10 (m, 1H)	33,7	2,95 (m, 1H)	34,0	3,10 (d, $J = 6,3$, 1H)	35,0
6a	2,44 (m, 1H)	29,8	2,57 (m, 1H)	27,2	2,60 (m, 1H)	31,6
6b	3,08 (m, 1H)		3,26 (m, 1H)		2,87 (m, 1H)	
7	6,71 (dd, $J = 7,3$, 6,6, 1H)	157,0	6,31 (dd, $J = 8,4$, 8,1, 1H)	150,7	6,88 (t, $J = 6,6$, 1H)	162,44
8	5,79 (m, 1H)	135,6	5,73 (ddd, $J = 17,2$, 10,3, 9,2, 1H)	135,6	5,78 (m, 1H)	135,5
9	2,78 (ddl, $J = 8,8$, 5,1, 1H)	45,5	2,61 (ddd, $J = 9,2$, 5,1, 4,4, 1H)	45,2	2,80 (dl, $J = 6,0$, 1H)	45,7
10a	5,29 (dl, $J = 9,9$, 1H)	120,4	5,26 (dd, $J = 10,3$, 1,8, 1H)	120,5	5,32 (dl, $J = 10,8$, 1H)	122,4
10b	5,36 (dl, $J = 17,2$, 1H)		5,29 (dl, $J = 17,2$, 1H)		5,38 (dl, $J = 17,1$, 1H)	
11	-	169,2	-	168,9	-	171,6
OCH₃	3,78 (s, 1H)	52,0	3,70 (s, 1H)	52,1	3,61 (s, 3H)	53,9
1'	4,69 (d, $J = 8,1$, 1H)	100,3	4,66 (d, $J = 8,1$, 1H)	100,3	4,84 (d, $J = 8,1$, 1H)	101,1
2'	3,18 (dd, $J = 9,2$, 8,1, 1H)	74,8	3,17 (dd, $J = 9,2$, 8,1, 1H)	74,7	3,58 (m, 1H)	74,7
3'		78,1	3,25-3,36 (m, 1H)	78,1	3,44 (m, 1H)	77,7
4'	3,28-3,37 (m, 1H)	71,63	3,25-3,36 (m, 1H)	71,6	3,37 (m, 1H)	71,6
5'		78,42	3,25-3,36 (m, 1H)	78,43	3,44 (m, 1H)	78,3
6'	3,66 (m, 1H) 3,88 (m, 1H)	62,8	3,67 (dl, $J = 12,9$, 1H) 3,88 (dl, $J = 12,9$, 1H)	62,8	3,69 (m, 1H) 3,89 (dd, $J = 12,3$, 1,7, 1H)	62,8
1''	5,49 (d, $J = 3,3$, 1H)	97,4	5,42 (d, $J = 5,9$, 1H)	97,5	5,60 (d, $J = 6,7$, 1H)	98,9
3''	7,47 (s, 1H)	152,2	7,61 (d, $J = 1,5$, 1H)	154,5	7,51 (s, 1H)	155,67
4''	-	109,4	-	110,0	-	110,0
5''	4,06 (m, 1H)	31,1	4,08 (dl, $J = 5,5$, 1H)	34,0	3,94 (d, $J = 5,7$, 1H)	31,6
6''	-	143,3	-	141,0	-	142,4
7''	9,22 (s, 1H)	197,1	10,03 (s, 1H)	192,0	9,16 (s, 1H)	200,8
8''	5,60 (m, 1H)	135,5	5,42 (m, 1H)	135,2	5,50 (m, 1H)	135,0
9''	2,59 (m, 1H)	46,5	2,67 (ddd, $J = 9,2$, 5,9, 5,5, 1H)	45,8	2,68 (m, 1H)	46,1
10a''	5,02 (dl, $J = 10,3$, 1H)	119,4	5,07 (dd, $J = 10,6$, 1,5, 1H)	119,6	5,10 (dl, $J = 9,9$, 1H)	122,0
10b''	5,07 (dl, $J = 17,2$, 1H)		5,10 (dl, $J = 17,2$, 1H)		5,12 (dl, $J = 16,9$, 1H)	
11''	-	169,1	-	168,7	-	171,6
OCH₃''	3,59 (s, 1H)	51,7	3,66 (s, 1H)	51,9	3,71 (s, 3H)	54,0
1'''	4,68 d ($J = 7,7$, 1H)	99,9	4,69 (d, $J = 8,1$, 1H)	100,0	4,81 (parcialmente encoberto pelo sinal residual da H_2O)	100,6
2'''	3,25 (m, 1H)	74,7	3,20 (dd, $J = 9,2$, 8,1, 1H)	74,7	3,58 (m, 1H)	74,7
3'''	-	78,0	-	78,1	3,44 (m, 1H)	77,7
4'''	3,28-3,37 (m, 1H)	71,55	3,25-3,36 (m, 1H)	71,5	3,37 (m, 1H)	71,5
5'''	-	78,37	-	78,4	3,44 (m, 1H)	78,4
6'''	3,66 (m, 1H) 3,88 (m, 1H)	62,7	3,65 (dl, $J = 12,9$, 1H) 3,87 br d ($J = 12,9$, 1H)	62,7	3,69 (m, 1H) 3,89 (dd, $J = 12,3$, 1,7, 1H)	62,8

5.1.2.2. Substância 2

A substância **2** foi obtida da fração CMFA1-6, como descrito no item 4.4.1.2 e apresentou-se como um sólido amorfo marrom.

No espectro de RMN de ^1H (figura 42; tabela 14), foram visualizados sinais característicos de iridoides glicosilados, como um duplete em δ 7,45 ($J = 1,2$ Hz, 1H) atribuído ao H-3 e um duplete em δ 5,49 ($J = 5,4$ Hz, 1H), referente ao H-1, característicos do anel pirânico, como já mencionado. Observou-se demais sinais na região de hidrogênios olefínicos, como um múltiplo em δ 5,66 (1H), referente ao H-8, um duplo-duplete em δ 5,24 ($J = 10,4$ e $1,5$ Hz, 1H) e um duplete largo em δ 5,28 ($J = 16,5$ Hz, 1H), referentes aos H_a e H_b de C-10, atribuídos aos H de uma ligação dupla terminal, sugestivo de que este iridoide se trata de um secoiridoide (BOROS e STERMITZ, 1991). Constatou-se diversos sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados entre δ 3,20 a δ 3,91, indicativos da presença de uma unidade glicosídica, e um sinal parcialmente encoberto pelo sinal residual da água em δ 4,80, semelhante ao discutido anteriormente, referente ao hidrogênio anomérico da β -D-glucose. Além disso, observou-se um simpleto intenso em δ 3,69, com integração para 3 hidrogênios, atribuído a presença de uma metoxila, como listado na tabela 14.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta 17 sinais (figura 43). Na região de carbonos oxigenados, observou-se seis sinais entre δ 100-63 sugerindo a presença de uma unidade glicosídica na molécula, e um sinal em 53,87 referente à metoxila. A presença de dez sinais, nas regiões de carbonos oxigenados e olefínicos, sugere que a substância se trata de um monoterpeno, mais especificamente um secoiridoide (EL-NAGGAR e BEAL, 1980). Notou-se quatro sinais na região de carbonos olefínicos, em δ 112,28 e 154,30, atribuídos aos C-4 e C-3 do anel pirânico e os sinais em δ 134,94 e 122,31, atribuídos a uma ligação dupla terminal (C-8 e C-10, respectivamente), característica dos secoiridoides. Observou-se também um sinal em δ 171,85, referente a uma carbonila de éster, comumente encontrado em iridoides, e uma carboxila em δ 182,99. No experimento de DEPT-135 (figura 44), três dos 17 sinais desaparecem (δ 122,31, 171,85 e 182,99), confirmando a presença dos três carbonos quaternários (C-4, C-7 e C-11). Ainda, três sinais de carbonos metilênicos foram verificados. A calibração do espectro foi realizada com o valor do C-6 (δ 62,79) da unidade glicosídica descrito para a secoxiloganina (CALIS, *et al.*, 1984). As atribuições foram realizadas a partir da análise dos experimentos HSQC (figura 45) e comparações com a literatura.

Reforçando a proposta da substância **2**, no espectro de massas de alta resolução (figura 46), obtido em modo negativo, observou-se a presença do íon a m/z 403,1251 $[M-H]^-$, cuja fórmula molecular proposta é $C_{17}H_{23}O_{11}$ (erro de -1,7 ppm), compatível a fórmula molecular esperada $C_{17}H_{24}O_{11}$. Os fragmentos a m/z 371, 223, 209, 191, 181 e 165, obtidos do íon a m/z 403, estão de acordo com o proposto por Kucharska e colaboradores (2016) para a secoxiloganina.

A partir dos sinais observados nos experimentos de RMN unidimensionais e espectrometria de massas, em conjunto aos dados da literatura, foi possível identificar que a substância **2** se trata do secoiridoide glicosilado secoxiloganina, conforme apresenta a figura 41, já relatado no gênero, conforme descreve Zuleta e colaboradores (2003).

Figura 41. Substância **2**, a secoxiloganina.

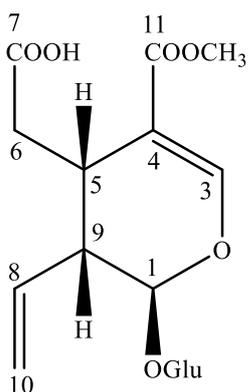


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância 2.

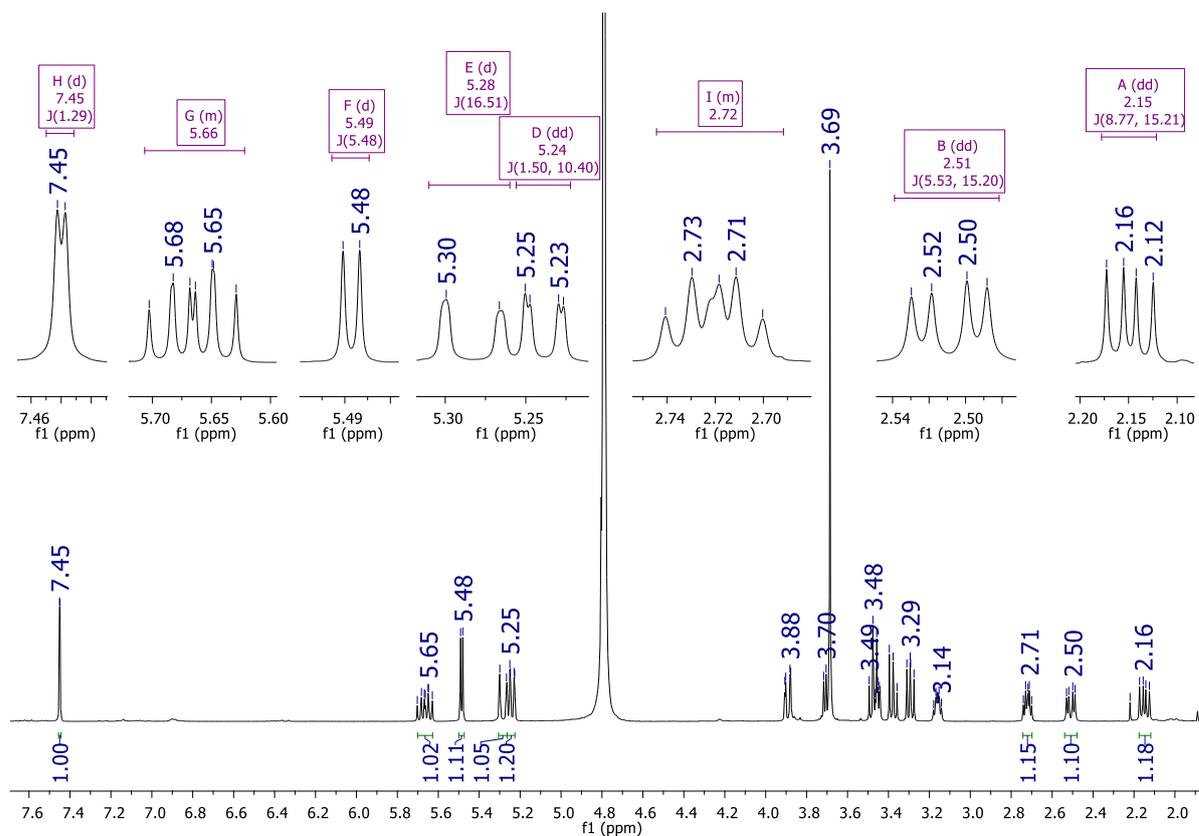


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância 2.

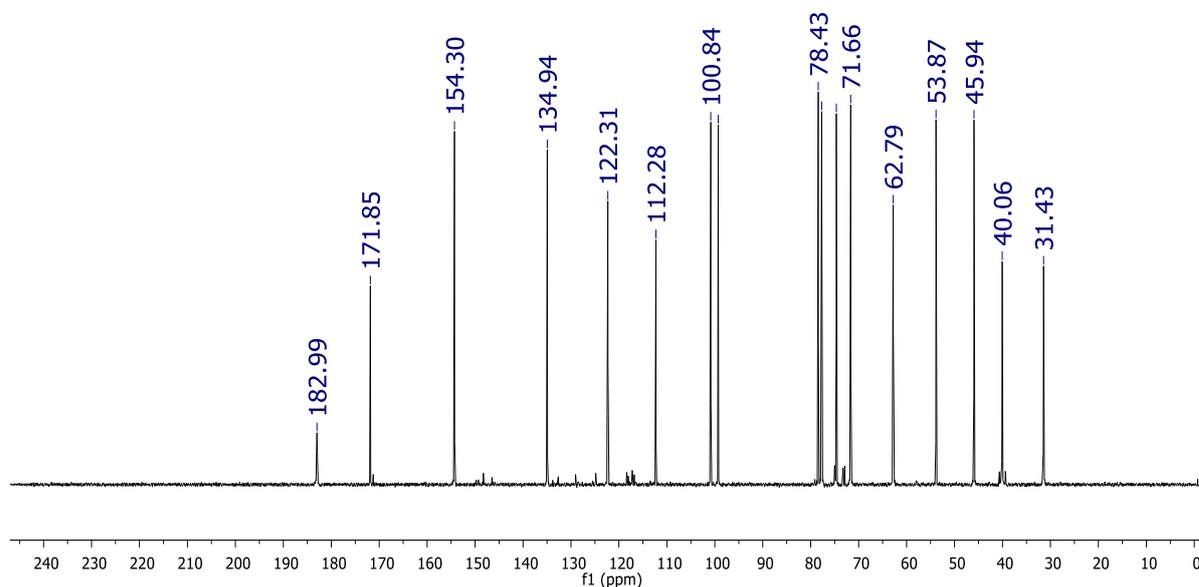


Figura 44. Espectro de DEPT-135 da substância 2.

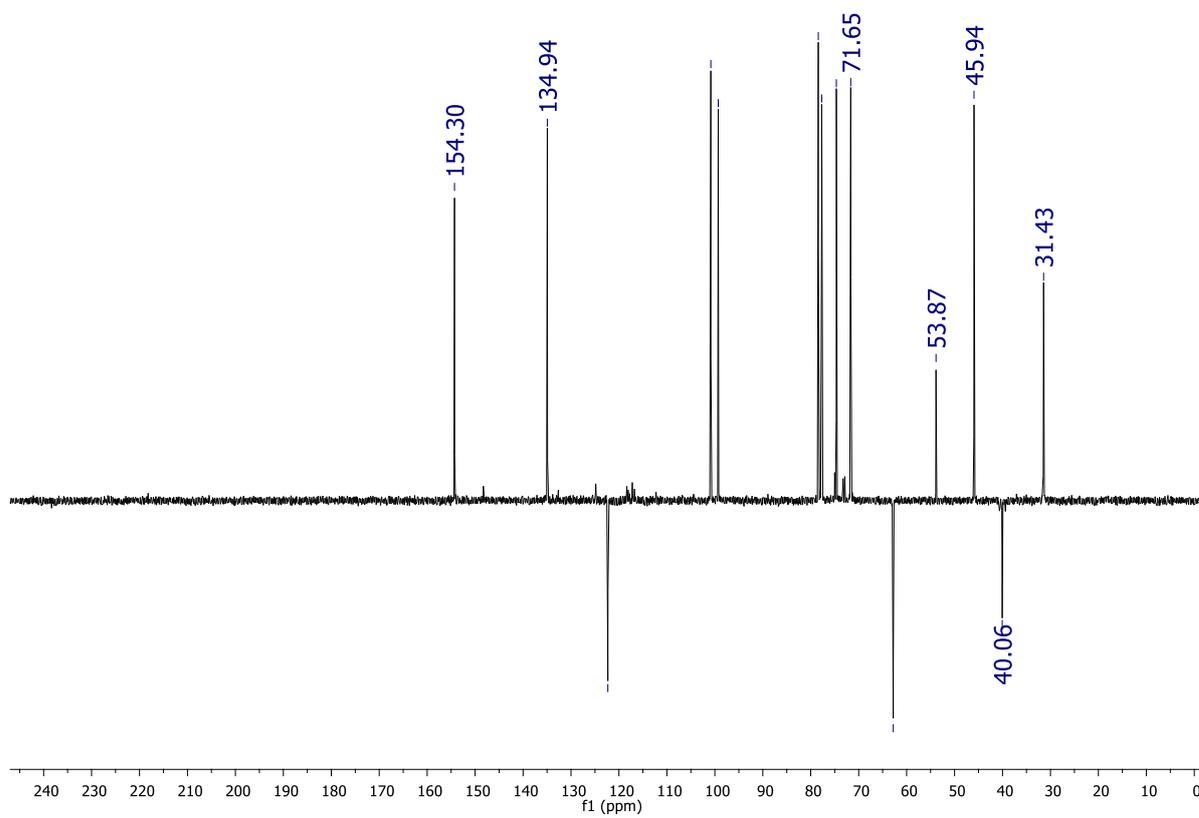


Figura 45. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, D_2O) da substância 2.

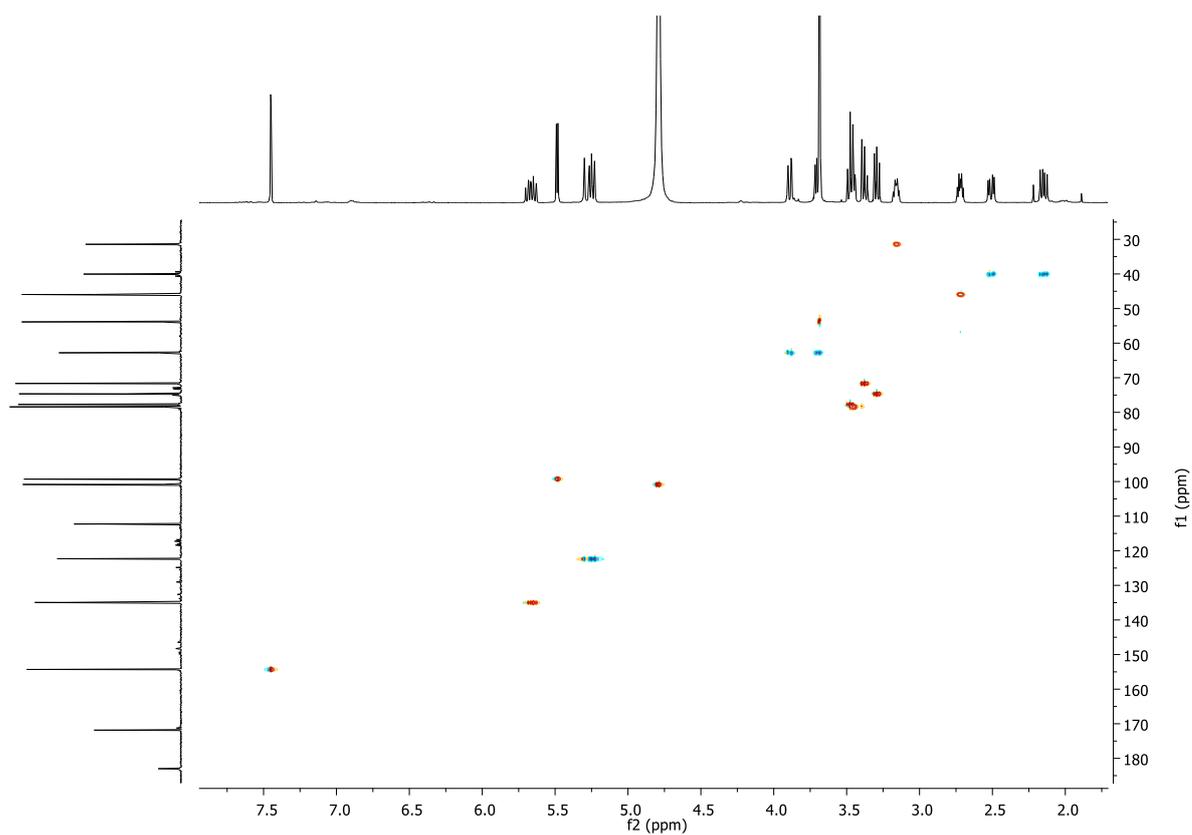


Figura 46. Espectros de massas (MS e MS², modo positivo) da substância **2**.

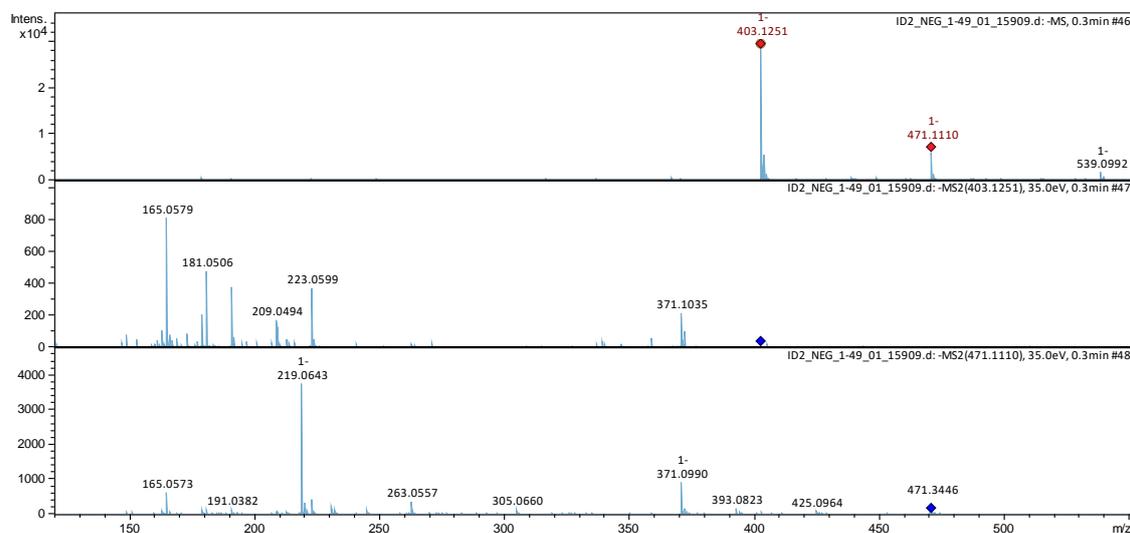


Tabela 14. Dados de RMN de ¹H e ¹³C da substância **2** (D₂O) e literatura em CD₃OD. A calibração foi feita pelo C-6 da glucose com a literatura CALIS, *et al.*, 1984.

	Secoxiloganina ¹ H	¹³ C	Substância 2	¹³ C
C/H	δ _H (m J Hz)	δ _c	δ _H (m J Hz)	δ _c
1	5,55 (d, J = 4,4, 1H)	97,67	5,49 (d, J = 5,4, 1H)	99,29
3	7,54 (s, 1H)	153,56	7,45 (d J = 1,2, 1H)	154,30
4	-	110,83	-	112,28
5	3,24 (m, 1H)	29,26	3,14 (m, 1H)	31,43
6a	2,36 (dd, J = 16,0, 7,5, 1H)	36,90	2,15 (dd, J = 15,2, 8,8, 1H)	40,06
6b	2,60 (dd, J = 16,0, 4,0, 1H)		2,51 (dd, J = 15,2, 5,5, 1H)	
7	-	176,60	-	182,99
8	5,71 (ddd, J = 9,5, 16,6, 9,5, 1H)	134,69	5,66 (m, 1H)	134,94
9	2,79 (m, 1H)	45,41	2,72 (m, 1H)	45,94
10_a	5,31 (d, J = 9,5, 1H)	120,46	5,24 (dd, J = 10,4, 1,5, 1H)	122,31
10_b	5,36 (d, J = 16,6, 1H)		5,28 (dl, J = 16,5, 1H)	
11	-	169,15	-	171,85
OCH₃	3,75 (s, 3H)	51,79	3,69 (s, 3H)	53,87
1'	4,85 (d, J = 7,7, 1H)	99,92	4,80 (sinal encoberto pela H ₂ O)	100,84
2'	3,22-3,56 (m, H)	74,65	3,29 (dd, J = 9,3, 8,1, 1H)	74,66
3'	3,21-3,75 (m, 1H)	77,89	3,46 (m, 1H)	77,71
4'	3,21-3,75 (m, 1H)	71,59	3,38 (m, 1H)	71,66
5'	3,21-3,75 (m, 1H)	78,41	3,46 (m, 1H)	78,43
6'	3,75 (m, 1H)	62,79	3,71 (m, 1H)	62,79
	3,95 (d, J = 12,4, 1H)		3,89 (dd, J = 12,4, 2,1, 1H)	

5.1.2.3. Substâncias **3** e **4**

As substâncias **3** e **4**, obtidas em mistura, são oriundas da fração CMFA1-6-12, cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.4.1.2, sendo adquirido como um sólido amorfo marrom.

O espectro de RMN de ^1H (figuras 48 e 49; tabela 15), indicou a presença de uma mistura de substâncias similares, sendo possível visualizar sinais característicos de iridoides glicosilados, como discutido anteriormente. A presença de dois simpletos na região de δ 7,55, com integração equivalente a 1 e 0,5, indica uma mistura de duas substâncias, sendo uma majoritária (**3**) e outra minoritária (**4**), estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios ligados nos carbonos olefínicos C-3 e os dupletos em δ 5,82 ($J = 9,4$ Hz, 1H) e 5,86 ($J = 9,1$ Hz, 1H), correspondentes aos hidrogênios do carbono acetálico C-1, de **3** e **4**, respectivamente. Adicionalmente, observou-se outros sinais na faixa de δ 3,31 a δ 3,52, referentes a presença de uma unidade glicosídica. A priori, não foi possível identificar o sinal esperado do hidrogênio ligado ao carbono anomérico, por estar encoberto por outros sinais. Entretanto, através do experimento HSQC (figura 51), o hidrogênio anomérico das unidades glicosídicas, de cada substância, pode ser atribuído ao multiplete em δ 4,88.

Foram observados outros sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, como um multiplete majoritário em δ 4,88 ($J = 5,4$ Hz) e um duplete minoritário em δ 5,27 ($J = 3,6$ Hz), que com o auxílio dos dados de HSQC, puderam ser atribuídos aos hidrogênios do C-7 de cada substância. Da mesma maneira, dois quartetos de dupletos em δ 4,01 ($J = 6,8, 2,0$ Hz) e δ 4,50 ($J = 7,2, 2,3$ Hz) puderam ser atribuídos aos hidrogênios H-8 de **3** e **4**, respectivamente. Além disso, observou-se um simpleto intenso em δ 3,70 (3H), referente a presença de uma metoxila.

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 50; tabela 16), observou-se sinais entre δ 61,7 e 99,7 relativos à presença das unidades glicosídicas nas moléculas. A partir de comparações com a literatura utilizando os deslocamentos químicos dos carbonos em δ 99,6 (**3**), 99,7 (**4**), 73,7, 76,7, 70,5, 77,1 e 61,6 (CH_2) aliado aos deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos dos hidrogênios anoméricos, pode-se atribuir esses sinais aos C-1'-C-6', de unidades de β -D-glucose ligadas a cada substância (BOCK *et al.*, 1976; BOCK e THØGERSEN, 1983).

Assim como discutido anteriormente, foi observado um sinal referente a uma metoxila em δ 52,7 para **3** e **4**. O sinal referente às carboxilas de éster conjugadas está presente em δ 170,3 (**3** e **4**). Como predito, a metoxila geralmente encontra-se ligado na carbonila de éster (C-11). Verificou-se também, um sinal referente ao carbono olefínico em δ 154,9, atribuídos ao C-3, de cada substância. As atribuições foram possíveis pela análise do experimento bidimensional HSQC (figura 51) e comparações com a literatura (BOCK *et al.*, 1976) e encontram-se listadas nas tabelas 15 e 16.

Os experimentos bidimensionais de HMBC e COSY permitiram confirmar as propostas das estruturas em mistura. No experimento HMBC (figura 52), foram observadas correlações entre o H-3 (δ 7,55, para **3** e **4**) com os sinais em δ 110,4 (C-4, **3**) e 111,1 (C-4, **4**); δ 96,2 (C-1, **3**) e 96,0 (C-1, **4**); δ 170,3 (C-11, **3** e **4**). Além disso, notou-se correlações entre o H-5 em δ 2,86 e 3,05 (**3** e **4**) com os C-4 (δ 110,4 e 111,1, **3** e **4**) e C-9 (δ 38,8 e 39,4, **3** e **4**), respectivamente. E encontrou-se também correlações entre os H-9 em δ 1,82 e 1,89 com os C-1 (δ 96,2 e 96,0, **3** e **4**) e C-5 (δ 31,1 e 26,7, **3** e **4**). Com estas correlações (figuras 53-55), foi possível confirmar a presença do anel pirânico, discutido anteriormente.

A análise conjunta dos experimentos de RMN uni- e bidimensionais possibilitaram a proposta de um segundo anel heterocíclico nas substâncias. Ao comparar os deslocamentos químicos dos H-7 (δ 4,89 e 5,27, **3** e **4**) e H-8 (δ 4,01 e 4,50, **3** e **4**) e C-7 (δ 96,2 e 91,8, **3** e **4**) C-8 (δ 73,8 e 66,1, **3** e **4**) com os dados obtidos da loganina (δ 4,10 e 1,86, H-7 e H-8; δ 75,1 e 40,8, C-7 e C-8), nota-se que estes estão mais desprotegidos, principalmente os H-8/C-8, sugerindo uma modificação estrutural nesta parte da molécula, além disso, os deslocamentos químicos de H-7/C-7 indicam a presença de dois oxigênios ligados em C-7. Ao analisar o HMBC, não foram notadas correlações entre os C-6 e C-8, e, principalmente, entre os vizinhos C-7 e C-8, indicando ausência de um anel de cinco membros. Além disso, as fracas correlações no HMBC entre o H-8 (δ 4,01 e 4,50, para **3** e **4**) e o C-7 (δ 96,2 e 91,8, para **3** e **4**) aliado ao alto valor de deslocamento químico dos C-7 e C-8, apontam a presença de um segundo anel de 6 membros, com um átomo de oxigênio entre os C-7 e C-8, comum em iridoídeos do tipo morronisídeo (JUNIOR, 1988; INOUE *et al.*, 1974; YE *et al.*, 2020). Adicionalmente, verificou-se correlações dos H-1 (em δ 4,88 para ambas as substâncias) e C-1' (δ 99,6 e 99,7, para **3** e **4**, respectivamente) da unidade glicosídica, indicando que a unidade de glicose está ligada no iridoídeo pelo C-1 (figura 56).

Já no experimento bidimensional COSY (figura 57), a comprovação da presença do anel pirânico decorre dos acoplamentos entre os H vizinhos: H-5 (δ 2,86 e 3,05, **3** e **4**) e H-9 (δ 1,82 e 1,89, **3** e **4**); H-1 (δ 5,82 e 5,86, **3** e **4**) e H-9 (δ 1,82 e 1,89, **3** e **4**), como mostra a figura 58. Complementarmente, foi possível observar acoplamentos entre os H-5 e H-6, H-7 e H-6, H-8 com H-10 e H-9, para cada uma das substâncias propostas. Neste experimento, notou-se a ausência do acoplamento entre os H-7 e H-8, o que indica que não há uma ligação direta entre os C-7 e C-8, corroborando com a proposta da presença de um heteroátomo entre estes dois carbonos.

No experimento de RMN bidimensional NOESY (figura 59), observou-se uma correlação entre os H-5 (δ 2,86 e 3,05, **3** e **4**) e H-9 (δ 1,82 e 1,89, **3** e **4**), indicando uma proximidade espacial entre eles, confirmando a junção *cis* dos anéis, previamente indicado pela biossíntese. Além do efeito NOE entre os H-1 (δ 5,82 e 5,86, **3** e **4**) e H-10 (δ 1,35 e 1,30, **3** e **4**) e os vizinhos H-8 (δ 4,01 e 4,50, **3** e **4**) e H-9 (δ 1,82 e 1,89, **3** e **4**) (figura 60), demonstrando uma proximidade dos hidrogênios metílicos (H-10) com o H-1, confirmando a orientação α da metila (C-10), comumente encontrado em iridoídeos do tipo morronisídeo (YE *et al.*, 2020).

O espectro de massas (modo positivo, figura 61) revelou o íon de m/z 427,1382 $[M+Na]^+$, cuja proposta da fórmula molecular foi $C_{17}H_{26}NaO_{11}$ (erro de -3,4 ppm), compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{26}O_{11}$, corroborando com a presença de um átomo de oxigênio como heteroátomo do segundo ciclo, como discutido acima. Foi possível observar um íon a m/z 389,1453 $[M-H_2O+H]^+$ cuja fragmentação gerou os íons a m/z 195 e 227, condizentes com os relatados na literatura (LV *et al.*, 2018) para o iridoídeo morronisídeo, reforçando a proposta das estruturas discutidas anteriormente.

A partir dos dados dos experimentos de RMN uni- e bidimensionais, além do espectro de massas, aliados aos dados de deslocamentos químicos disponíveis na literatura (tabelas 15 e 16) foi possível identificar as substâncias **3** e **4** como os iridoídeos glicosilados α -morronisídeo e β -morronisídeo, respectivamente, conforme apresenta a figura 47, substâncias relatadas pela primeira vez no gênero *Calycophyllum*.

Figura 47. Substâncias **3** e **4**, α -morronisídeo e β -morronisídeo.

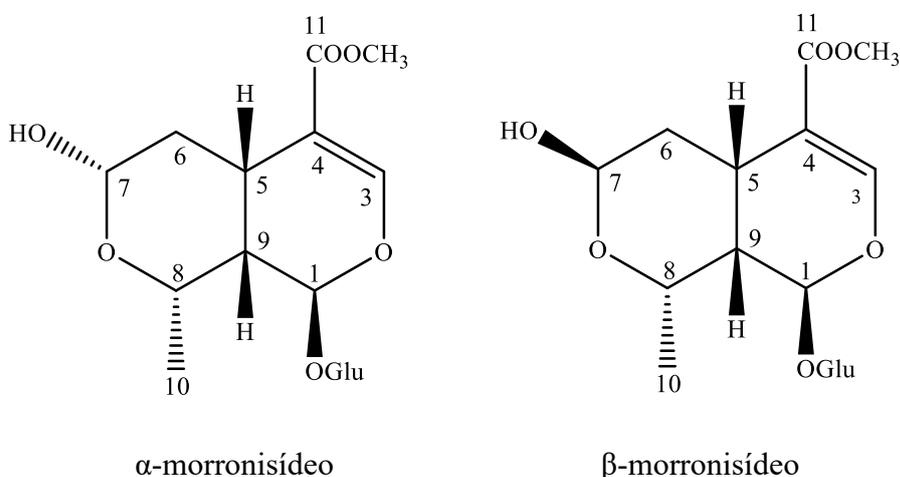


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) das substâncias **3** e **4**.

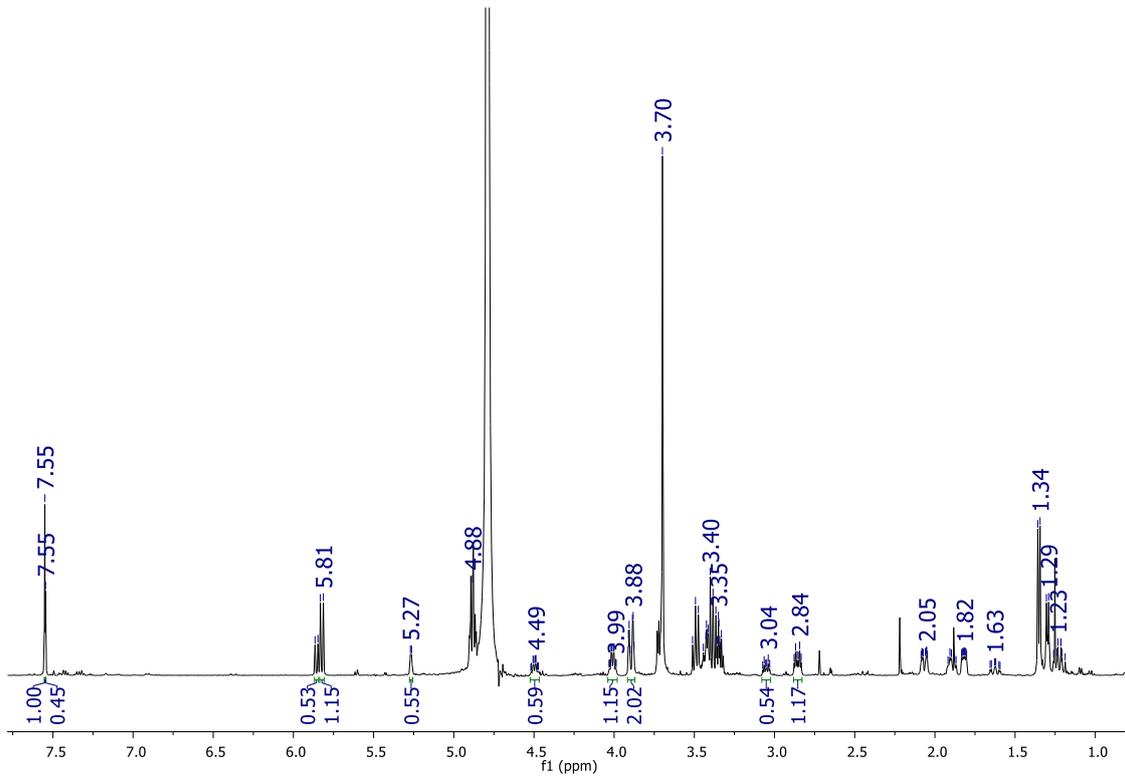


Figura 49. Expansões do espectro de RMN de ^1H .

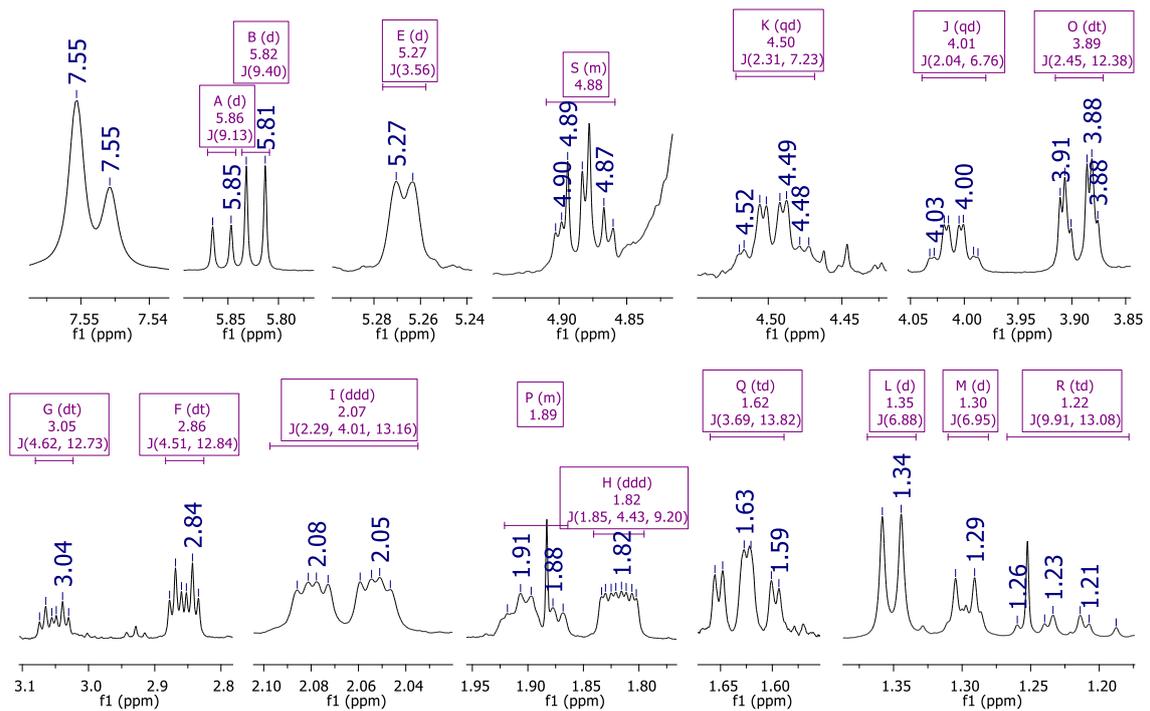


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) das substâncias **3** e **4**.

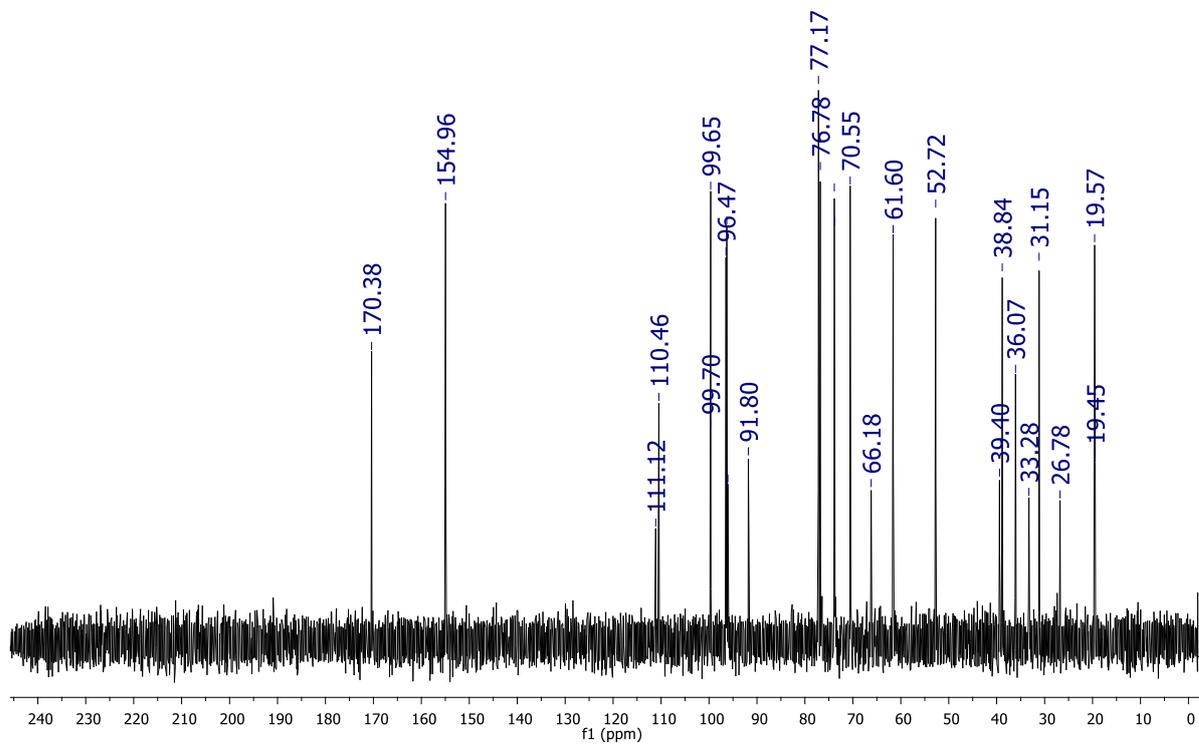


Figura 51. Experimento bidimensional HSQC (500 MHz, D_2O) das substâncias **3** e **4**.

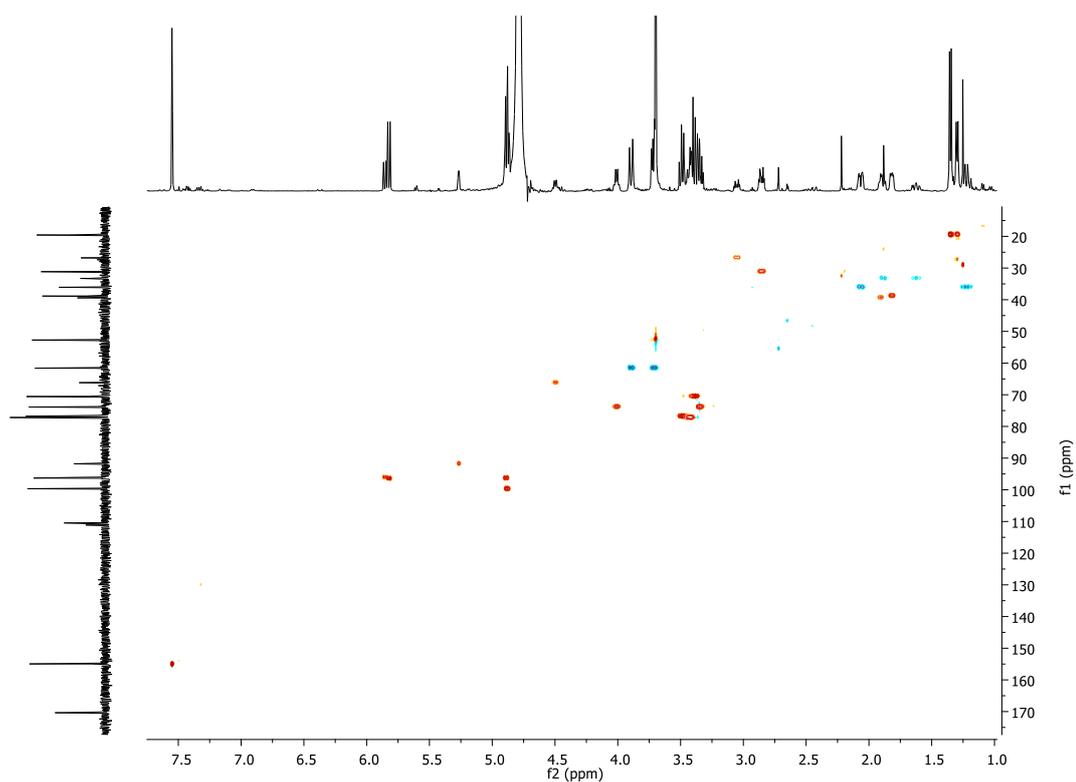


Figura 52. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

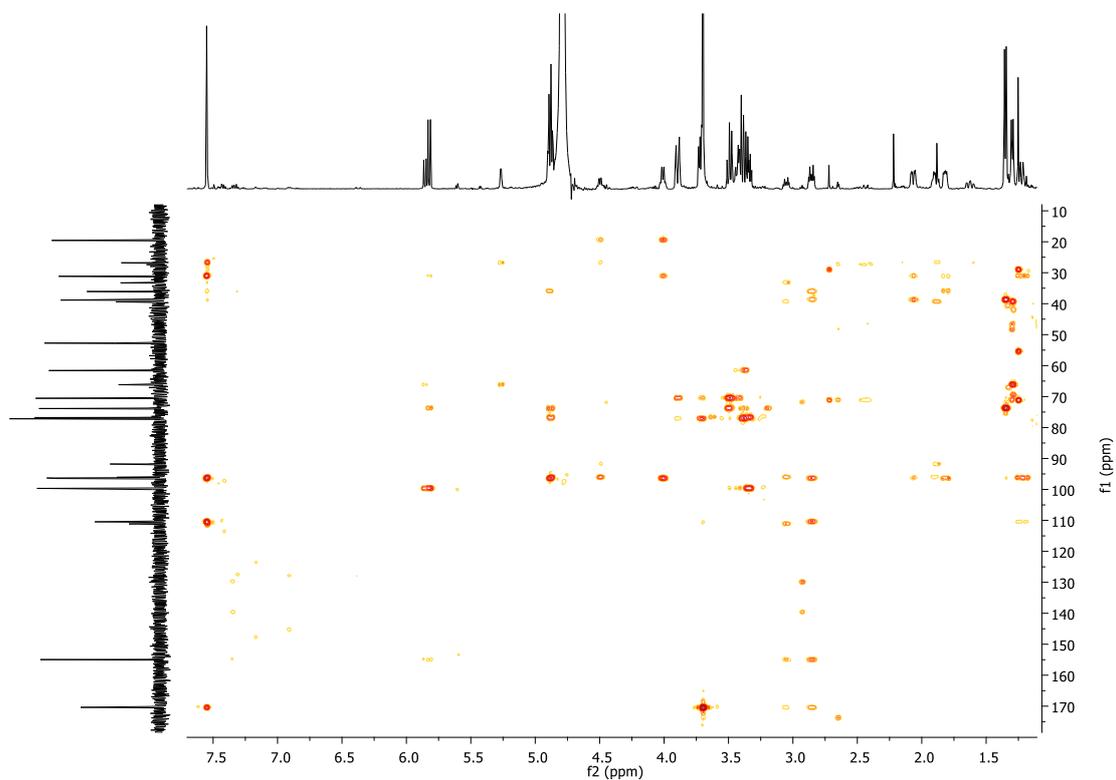


Figura 53. Ampliação do experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** ^(a) e **4** ^(b).

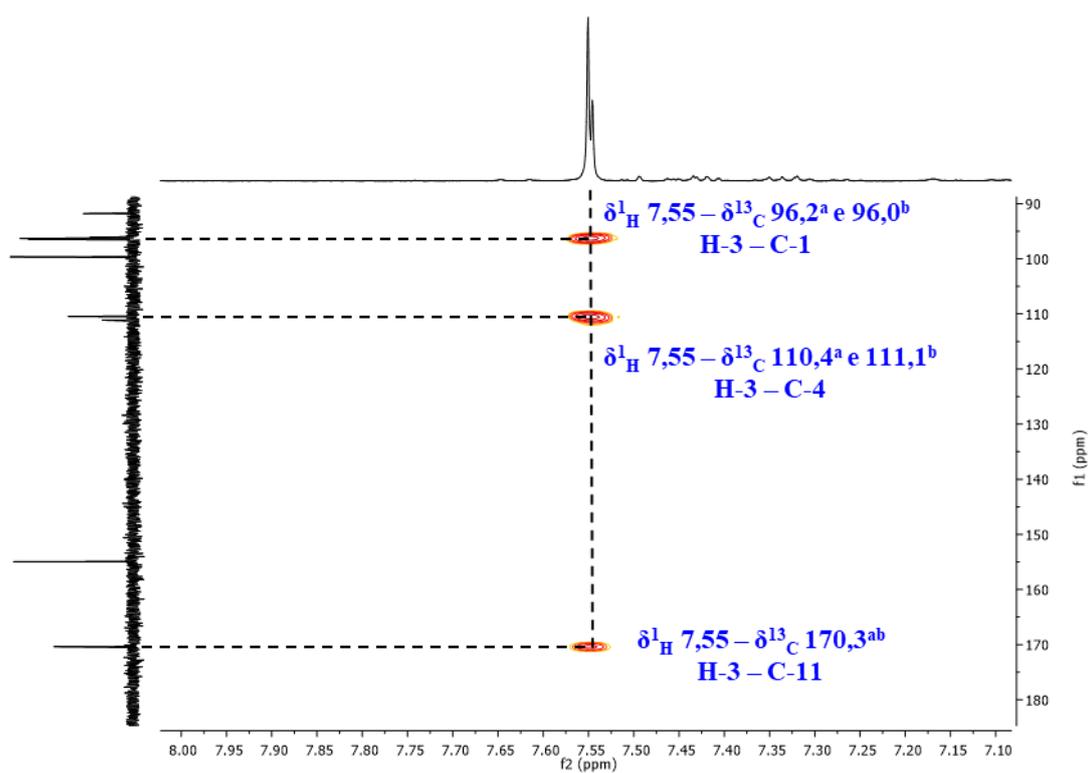


Figura 54. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

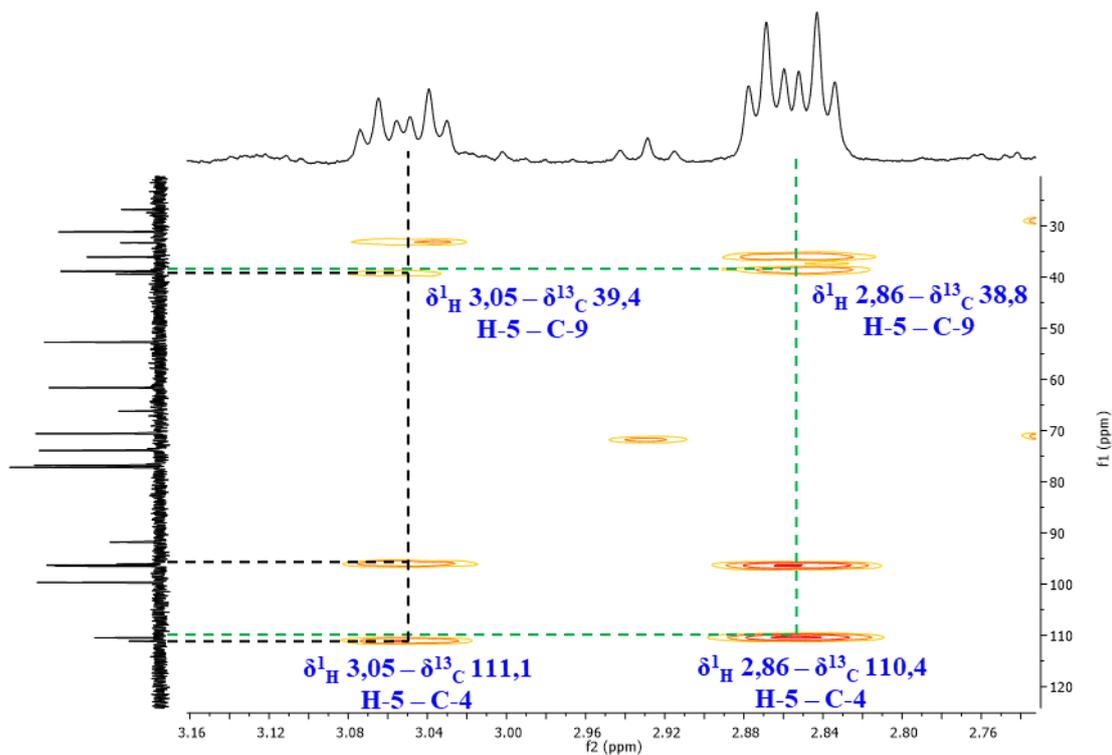


Figura 55. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

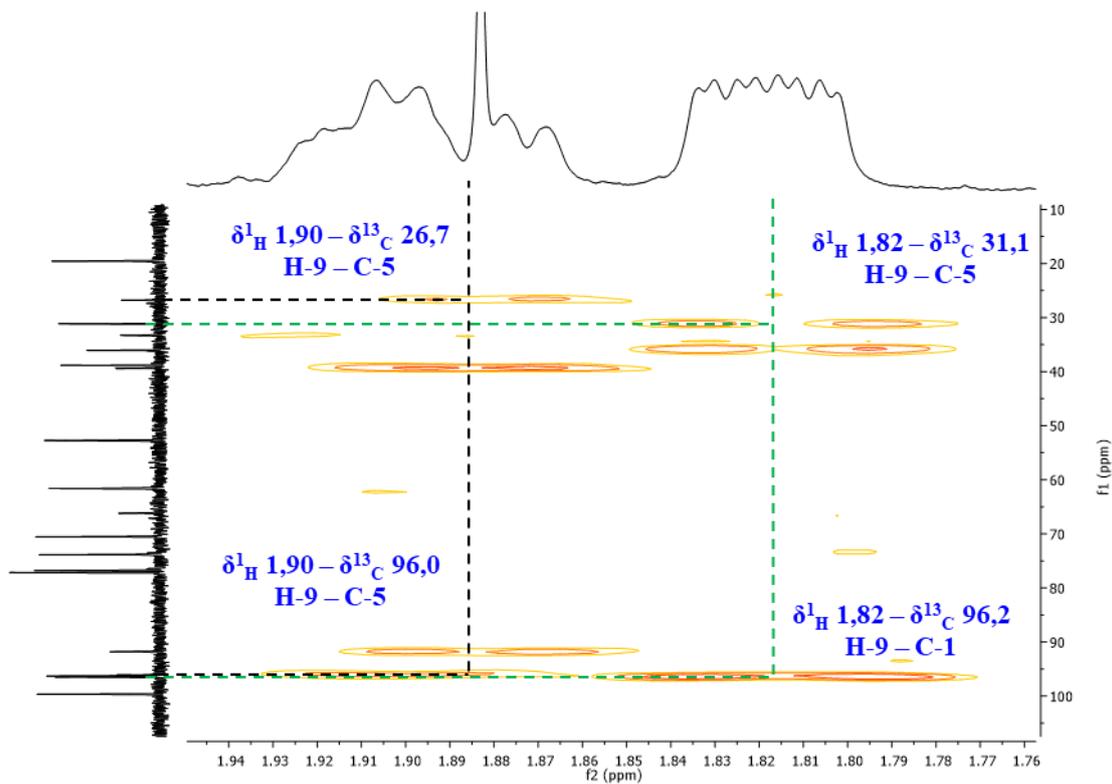


Figura 56. Ampliação do experimento HMBC (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

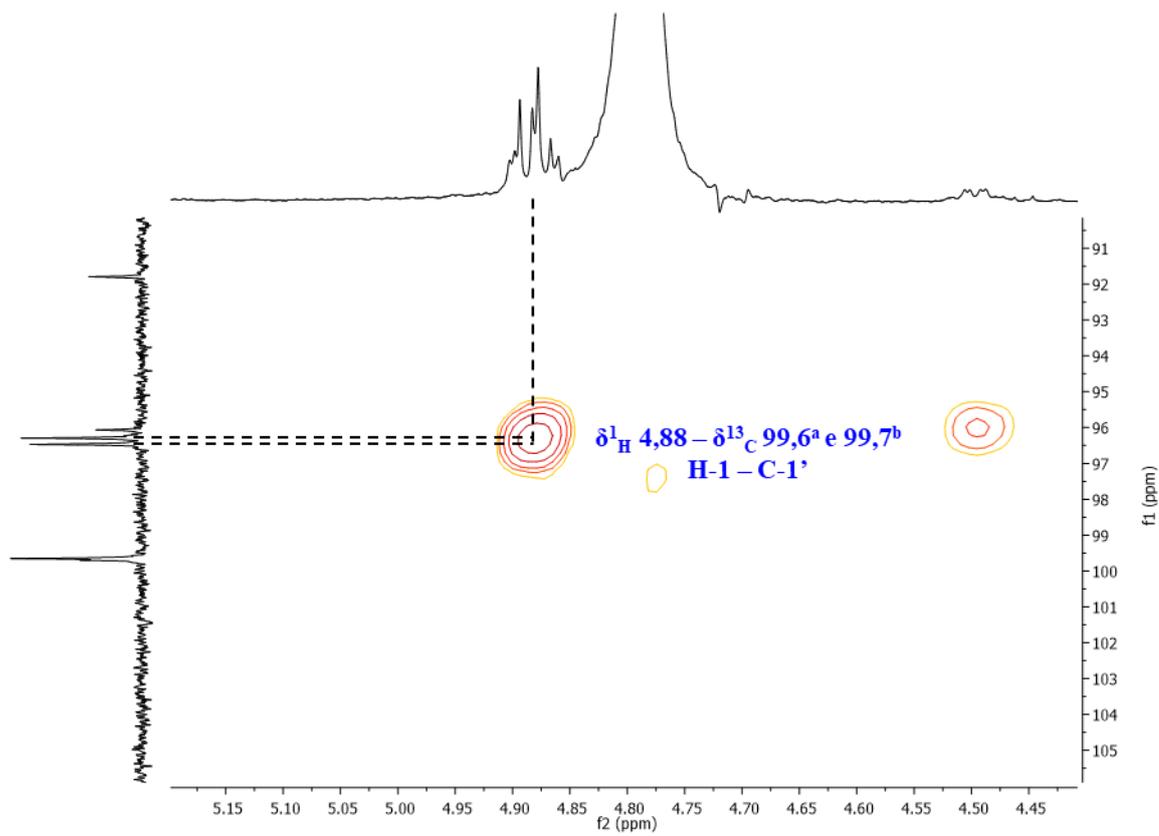


Figura 57. Experimento COSY (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

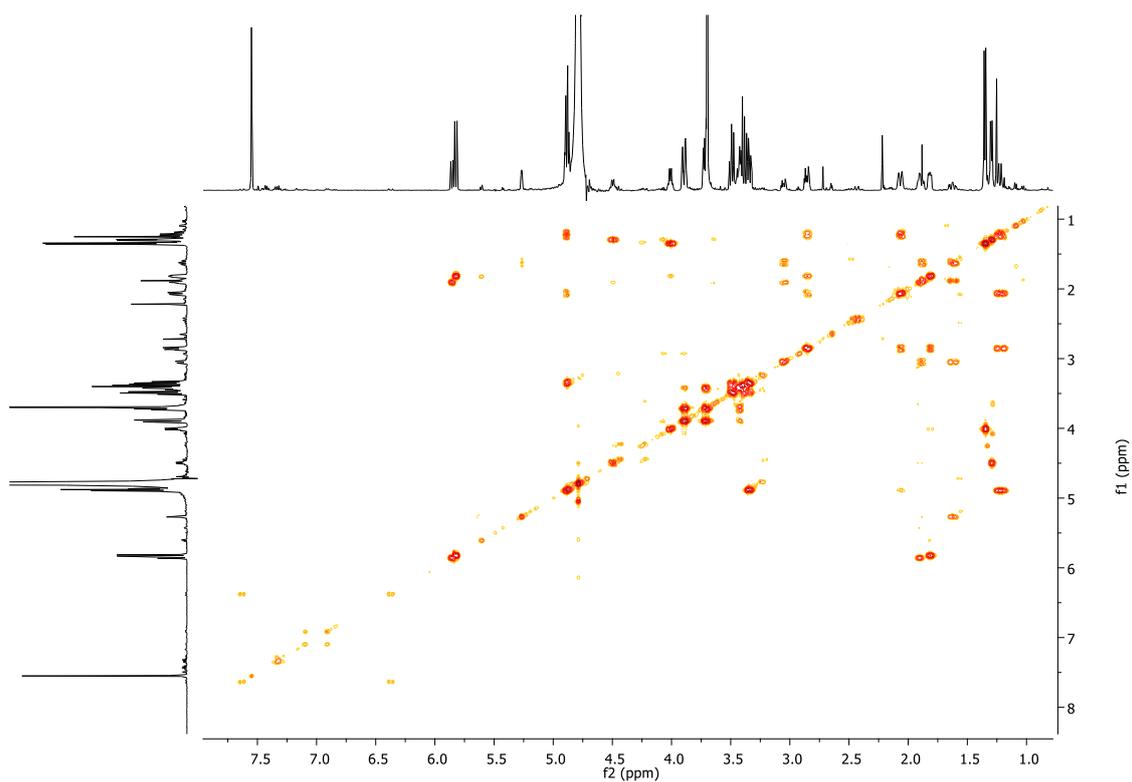


Figura 58. Ampliação do experimento COSY (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**

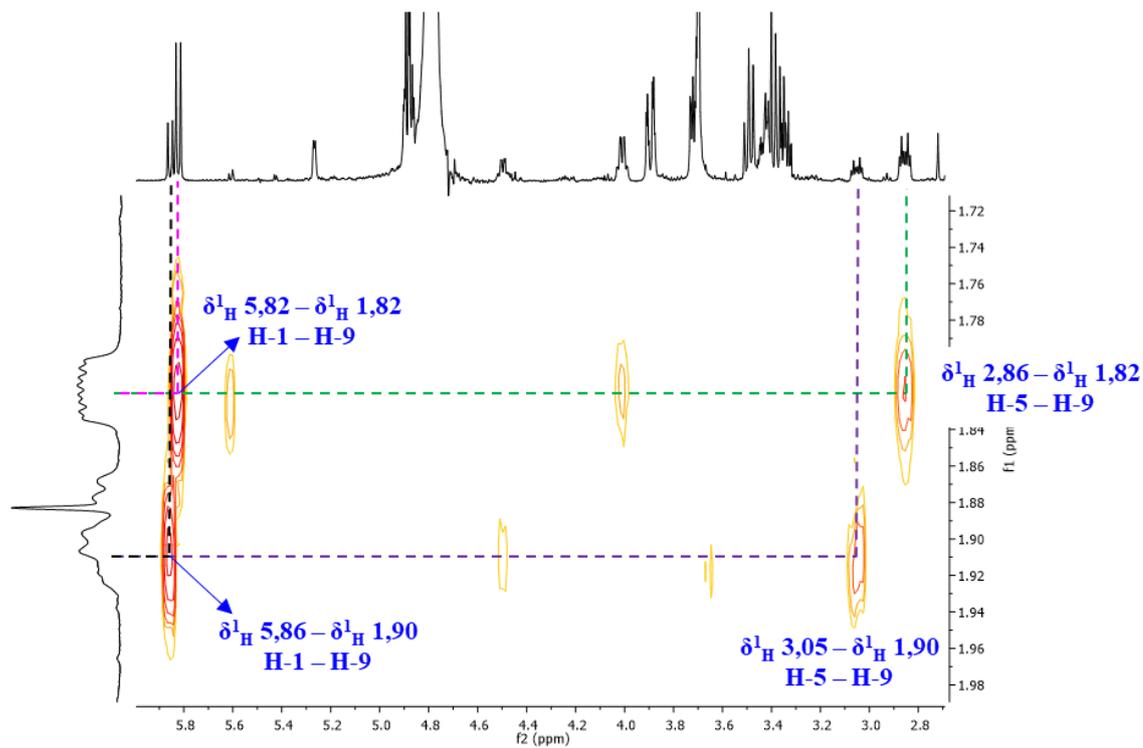


Figura 59. Experimento NOESY (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

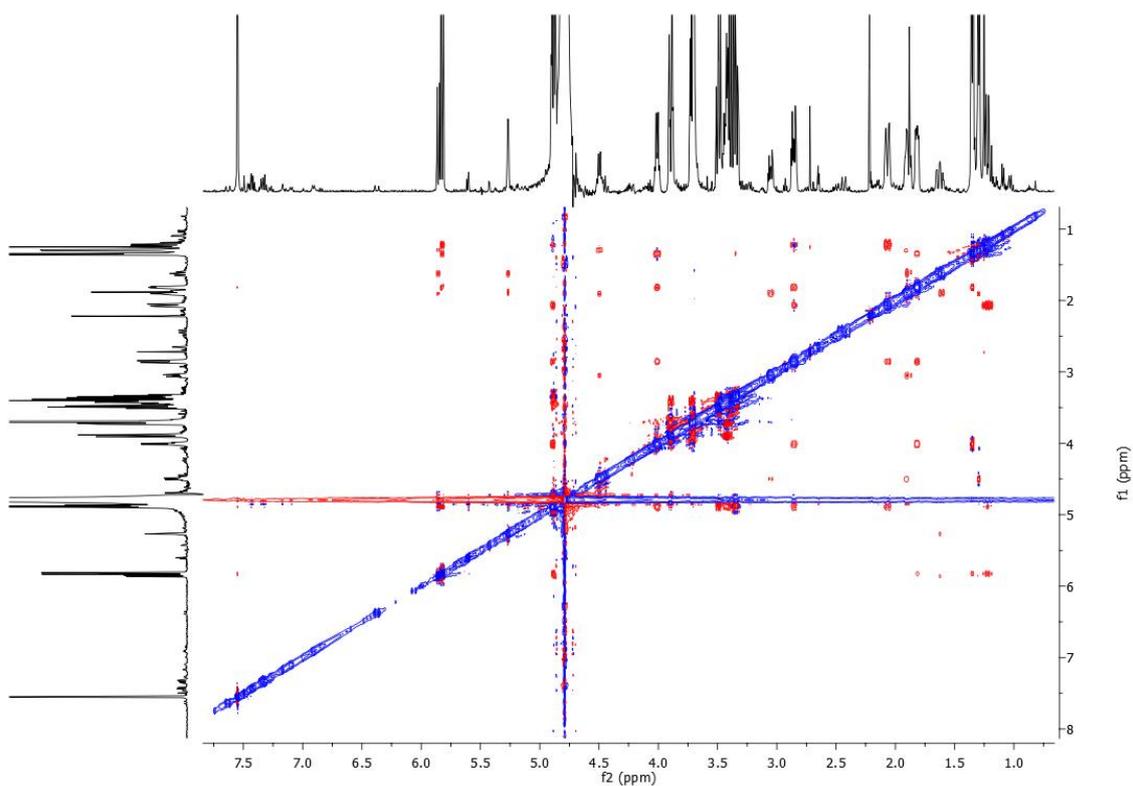


Figura 60. Ampliação do experimento NOESY (500 MHz, D₂O) das substâncias **3** e **4**.

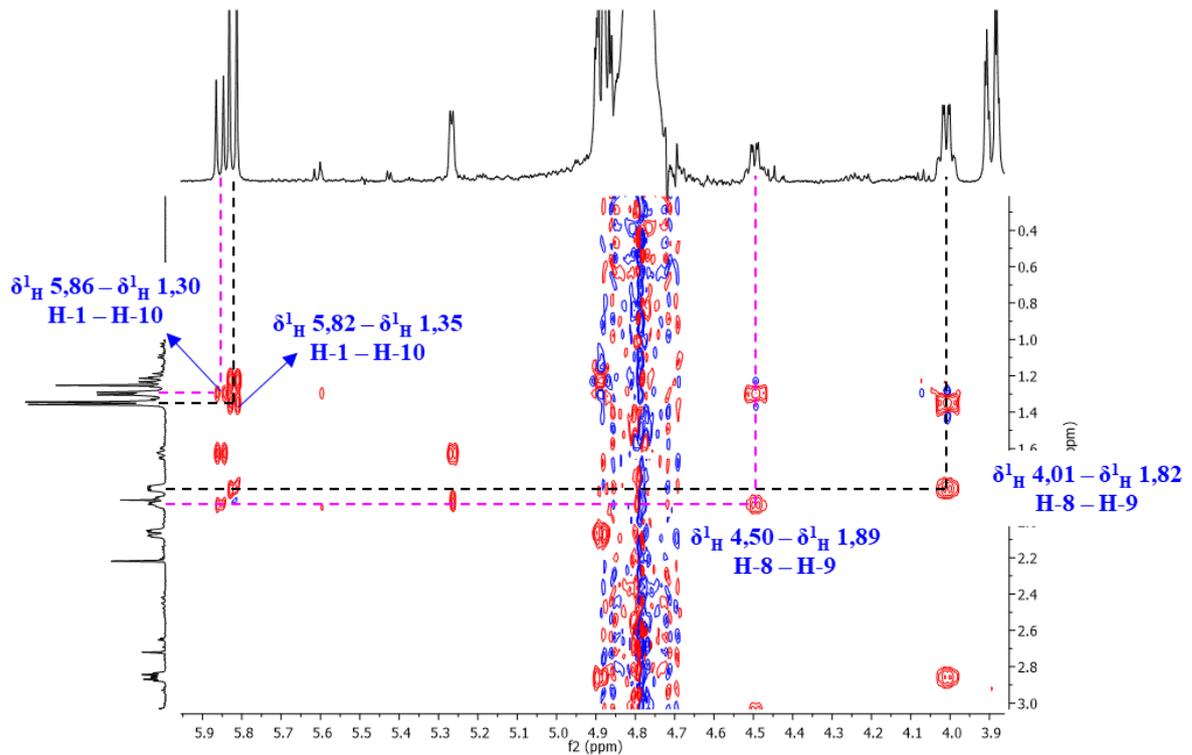


Figura 61. Cromatograma de UV, MS e MS² (modo positivo) das substâncias **3** e **4**.

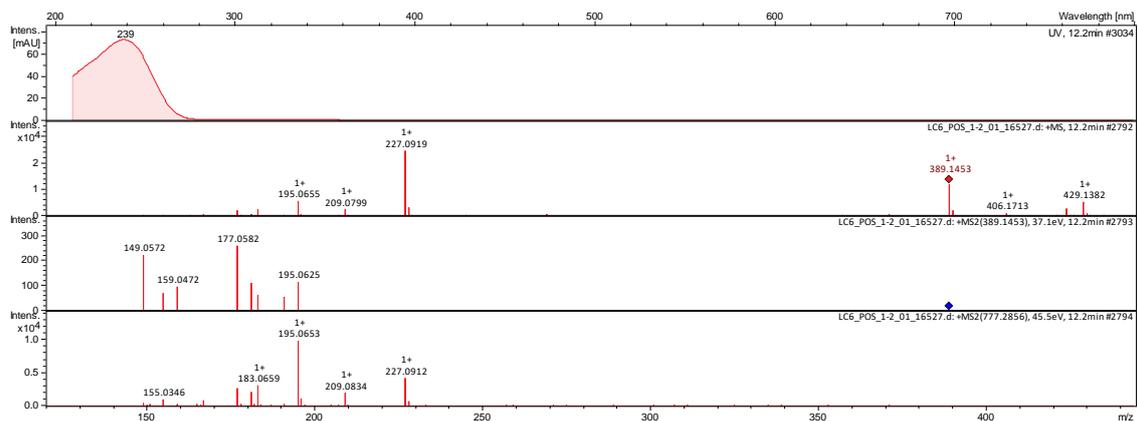


Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300/75 MHz) das substâncias **3** e **4** (D_2O).

C/H	Substância 3 ^a		Substância 4 ^b	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	5,82 (d, $J = 9,4$, 1H)	96,2	5,86 (d, $J = 9,1$, 1H)	96,0
3	7,55 (sl, 1H)	154,9	7,55 (sl, 1H)	154,9
4	-	110,4	-	111,1
5	2,86 (dt, $J = 12,8$, 4,5, 1H)	31,1	3,05 (dt, $J = 12,7$, 4,6, 1H)	26,7
6 H_a	1,22 (td, $J = 13,1$, 9,9, 1H)	36,0	1,62 (td, $J = 13,8$, 3,7, 1H)	33,2
6 H_b	2,07 (ddd, $J = 13,2$, 4,0, 2,3, 1H)		1,89 (m, 1H)	
7	4,89 (m, 1H)	96,4	5,27 (d, $J = 3,6$, 1H)	91,8
8	4,01 (qd, $J = 6,8$, 2,0, 1H)	73,8	4,50 (qd, $J = 7,2$, 2,3, 1H)	66,1
9	1,82 (ddd, $J = 9,2$, 4,4, 1,9, 1H)	38,8	1,89 (m, 1H)	39,4
10	1,35 (d, $J = 6,9$, 1H)	19,5	1,30 (d, $J = 7,0$, 1H)	19,4
C=O	-	170,3	-	170,3
OCH₃	3,70 (s, 1H)	52,7	3,70 (s, 1H)	52,7
1'	4,88 (m, 1H)	99,6	4,88 (m, 1H)	99,7
2'	3,35 (m, 1H)	73,7	3,35 (m, 1H)	73,7
3'	3,49 (m, 1H)	76,7	3,49 (m, 1H)	76,7
4'	3,39 (m, 1H)	70,5	3,39 (m, 1H)	70,5
5'	3,42 (m, 1H)	77,1	3,42 (m, 1H)	77,1
6'	3,89 (dt, $J = 12,4$, 2,5, 1H)	61,6	3,89 (dt, $J = 12,4$, 2,5, 1H)	61,6
	3,71 (m, 1H)		3,71 (m, 1H)	

Legenda: ^a: substância majoritária (**3**); ^b: substância minoritária (**4**).

Tabela 16. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **3** e **4** e literatura (BOCK *et al.*, 1976), ambos em D_2O .

C/H	α -Morrónisídeo	Substância 3 ^a	β -Morrónisídeo	Substância 4 ^b
1	96,2	96,2	96,2	96,0
3	154,9	154,9	154,9	154,9
4	110,2	110,4	110,9	111,1
5	31,1	31,1	26,8	26,7
6	36,1	36,0	33,4	33,2
7	96,9	96,4	91,6	91,8
8	73,8	73,8	65,9	66,1
9	38,7	38,8	39,3	39,4
10	19,6	19,5	19,6	19,4
C=O	169,8	170,3	169,8	170,3
OMe	52,6	52,7	52,6	52,7
1'	99,5	99,6	99,5	99,7
2'	73,6	73,7	73,6	73,7
3'	76,8	76,7	76,8	76,7
4'	70,5	70,5	70,5	70,5
5'	77,1	77,1	77,1	77,1
6'	61,6	61,6	61,6	61,6

Legenda: ^a: substância majoritária (**3**); ^b: substância minoritária (**4**).

5.1.2.4. Substância 5

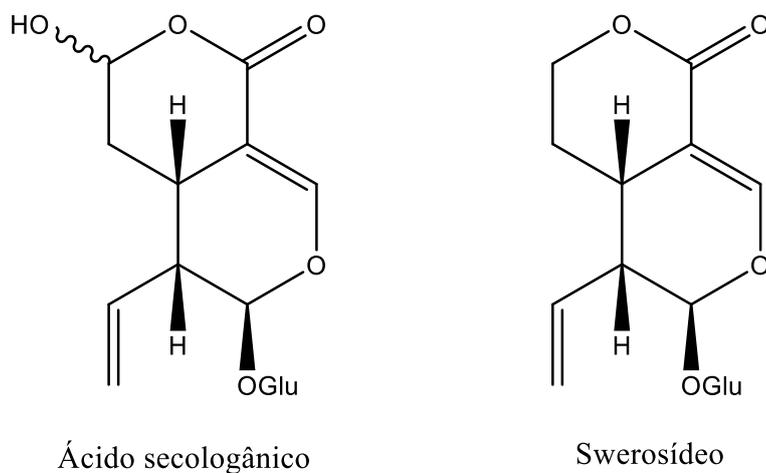
A substância **5**, obtida da fração CMFA1-6-16 como descrito no item 4.4.1.2, apresentou-se como um sólido amorfo marrom.

No espectro de RMN de ^1H (figura 64; tabela 17), foi possível identificar a presença de um duplete em δ 7,62 ($J = 1,9$ Hz), com integração para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio olefínico (H-3), além em um simpleto largo em δ 5,56 (1H) referente ao hidrogênio oximetínico H-1, do anel pirânico. Seguidamente, visualizou-se um multiplete, com integração para um hidrogênio, em δ 5,51 (H-8) e dois dupletos largos em δ 5,28 ($J = 10,6$ Hz, 1H) e 5,33 ($J = 17,6$ Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios olefínicos (H_a e H_b) de uma ligação dupla terminal, caracterizando um secoiridoide, como já mencionado. Foram visualizados 2 sinais de hidrogênios carbinólicos em δ 4,40 (td, $J = 11,5$ e $2,2$ Hz, 1H) e 4,49 (m, 1H), atribuídos aos H_a e H_b de C-7, com o auxílio da literatura. Observou-se sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados entre δ 3,23 - 3,90, referentes a presença de uma unidade glicosídica. Nesta substância, notou-se a ausência do sinal da metoxila, atribuído nas demais estruturas.

Diferentemente das demais substâncias, o espectro de RMN ^{13}C (figura 65; tabela 17) apresentou apenas 15 sinais. Assim como nos iridoideis supracitados, a substância **5** contém uma unidade glicosídica, indicada pela presença de seis sinais entre δ 76,2 - 60,5, na região de carbonos oxigenados. Os nove sinais restantes, similares aos encontrados nas substâncias discutidas até então, aliada aos sinais de carbonos vinílicos C-8 e C-10 (δ 131,30 e 120,49), indicou a presença de um secoiridoide, onde o sinal do C-7 (δ 69,47) apresenta o mesmo deslocamento químico do C-4 da unidade glicosídica (VAN BEEK *et al.*, 1982), explicando a ausência de um sinal do esqueleto do iridoide. Ainda na região de carbonos olefínicos, o espectro apresentou dois sinais, em δ 153,29 e 104,63, referentes aos C-3 e C-4, respectivamente. Observou-se apenas um sinal em δ 169,63, referente a uma carbonila de éster (C-11). No experimento de DEPT-135 (figura 66) apenas dois sinais desaparecem, indícios da presença de carbonos quaternários na molécula (C-4 e C-11), assim como foram verificados sinais de carbonos metilênico (C-6, C-10, C-6').

A análise dos dados de RMN permitiu a proposta de duas possíveis substâncias, o ácido secologânico e o Swerosídeo (figura 62). Contudo, a ausência do sinal referente a um carbono oximetínico (C-7) e presença de um carbono oximetilênico, com os H_a -7 e H_b -7 presentes no espectro de RMN de ^1H , indica que esta substância se trata do swerosídeo. O espectro de massas (modo positivo, figura 67) revelou os íons a m/z 359,1333 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 381,1149 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, cuja proposta da fórmula molecular foi $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_9$ (erro de 1,0 ppm), incompatível com o ácido secologânico ($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$). Estes dados condizem com os dados relatados na literatura para o iridoide swerosídeo (KUCHARSKA & FECKA, 2016), bem como reforçam a proposta discutidas anteriormente.

Figura 62. Representação estrutural do ácido secologânico e swerosídeo.



A partir dos sinais observados nos experimentos de massas, RMN de ¹H, RMN de ¹³C e DEPT-135, aliados aos dados da literatura (tabela 17), foi possível identificar que a substância **6** trata-se do secoiridoide glicosilado swerosídeo (figura 63). Este é o primeiro relato desta substância em *Calycophyllum* sp.

Figura 63. Substância **5**, Swerosídeo.

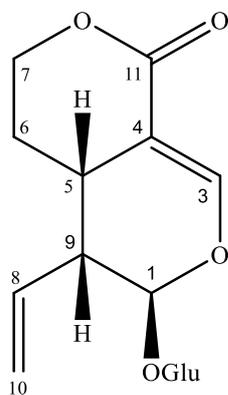


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância **5**.

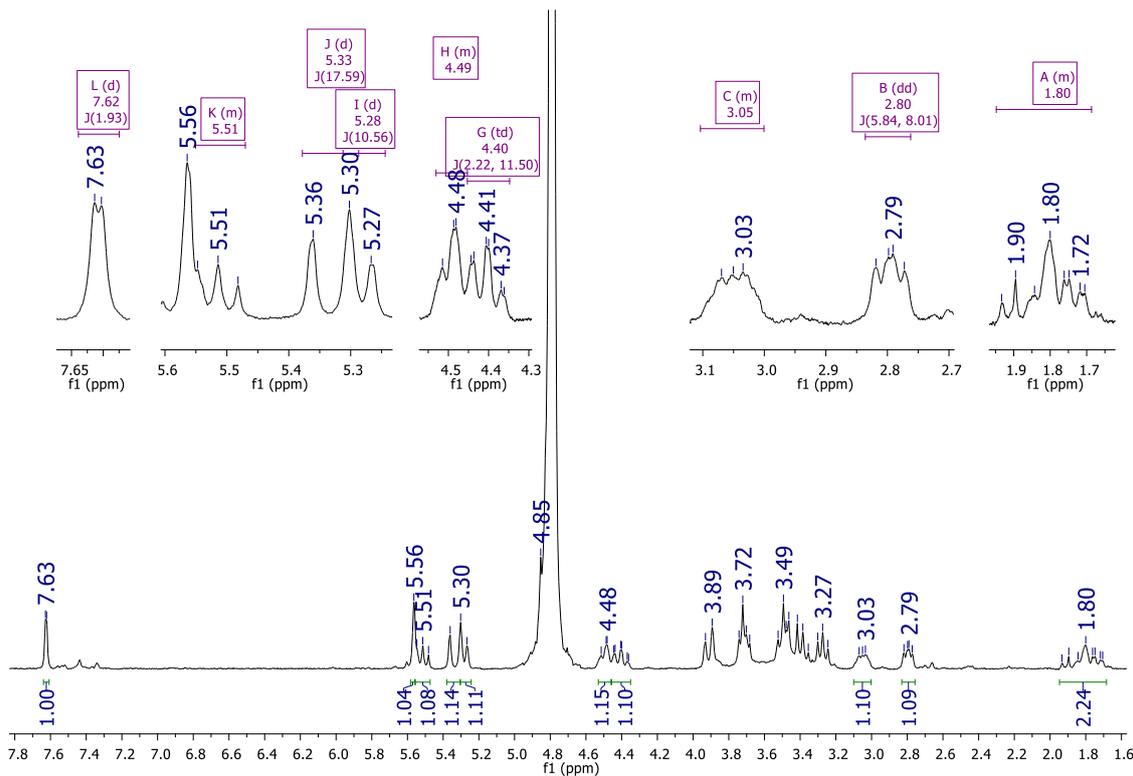


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância **5**.

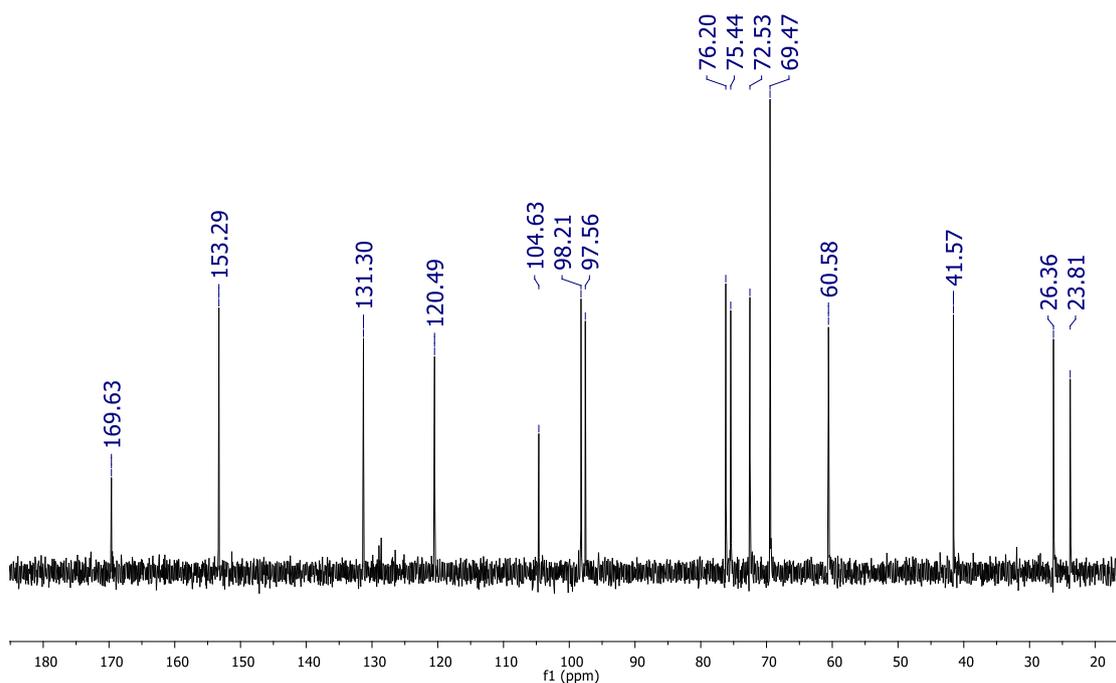


Figura 66. Espectro de DEPT-135 (75 MHz, D₂O) da substância **5**.

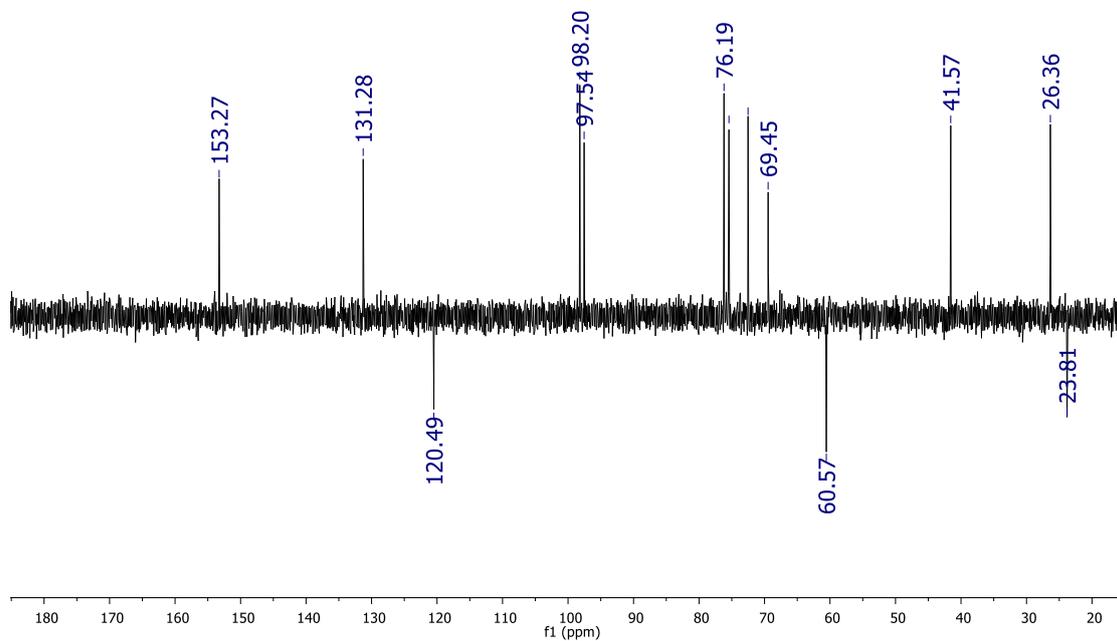


Figura 67. Cromatograma de UV, MS (modo positivo) da substância **5**.

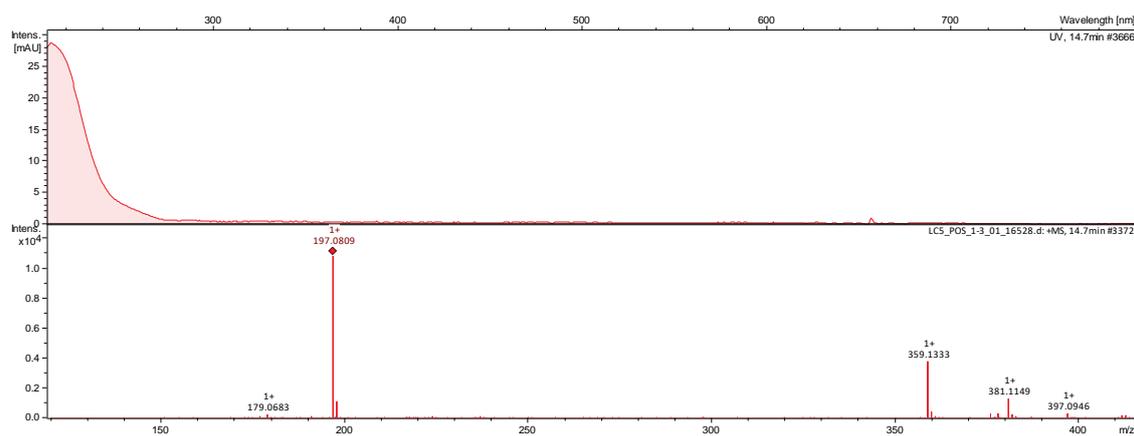


Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **6** e literatura (VAN BEEK *et al.*, 1982), ambos em D_2O .

		Swerosídeo*		Substância 5	
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)	
1	97.50	5,60 (d, $J = 1,8$, 1H)	97,56	5,56 (sl, 1H)	
3	153.22	7,66 (d, $J = 2,5$, 1H)	153,29	7,62 (d, $J = 1,9$, 1H)	
4	104.60	-	104,63	-	
5	26.39	3,09 (m, 1H)	26,36	3,05 (m, 1H)	
6	23.84	1,77 (m, 1H) 1,87 (m, 1H)	23,81	1,80 (m, 2H)	
7	69.44	4,54(ddd, $J = 11,4$, 4,3, 1,9, 1H) 4,44 (ddd, $J = 12,6$, 11,4, 2,4, 1H)	69,47	4,49 (m, 1H) 4,40 (td, $J = 11,5$, 2,2, 1H)	
8	131.26	5,58 (ddd, $J = 17,2$, 10,2, 9,5, 1H)	131,30	5,51 (m, 1H)	
9	41.56	2,83 (ddd, $J = 9,5$, 5,5, 1,8, 1H)	41,57	2,80 (ddl, $J = 8,0$, 5,8, 1H)	
10	120.49	5,32 (dd, $J = 10,2$, 1,9, 1H) 5,38 (dd, $J = 17,2$, 1,9, 1H)	120,49	5,28 (dl, $J = 10,6$, 1H) 5,33 (dl, $J = 17,6$, 1H)	
C=O	169.45	-	169,63	-	
1'	98.19	4,87 (d, $J = 7,9$, 1H)	98,21	4,85, parcialmente encoberto pelo D_2O	
2'	75.41	3,31 (dd, $J = 9,5$, 7,9, 1H)	75,44	3,23 – 3,54 (m, 1H)	
3'	76.17	3,53 (dd, $J = 9,5$, 8,8, 1H)	76,20	3,23 – 3,54 (m, 1H)	
4'	69.44	3,42 (d, $J = 10,1$, 8,8, 1H)	69,47	3,23 – 3,54 (m, 1H)	
5'	72.50	3,54 (ddd, $J = 10,1$, 6,1, 2,1, 1H)	72,53	3,23 – 3,54 (m, 1H)	
6'	60,58	3,75 (dd, $J = 12,4$, 2,1, 1H) 3,95 (dd, $J = 12,4$, 6,1, 1H)	60,58	3,71 (dd, $J = 11,9$, 6,0, 1H) 3,91 (dl, $J = 11,9$, 1H)	

*: DAMTOFT *et al.*, 1994.

5.1.2.5. Substâncias 7 e 8

As substâncias **7** e **8** (codificadas anteriormente como CMFA1-6-22-P5 e CMFA1-6-22-P6, respectivamente) foram obtidas como um sólido amorfo marrom, descrito no item 4.4.1.2.1. A determinação estrutural das duas substâncias será discutida no mesmo tópico, devido as similaridades estruturais que ambas compartilham.

A análise de cada espectro de RMN de ^1H (figura 69, para **7**; figura 70 e 71, para **8**, tabela 18 para **7** e **8**) apresentou sinais característicos de iridoides glicosilados, como discutido anteriormente. Para a substância **7**, observou-se um simpleto largo em δ 7,59 (1H), atribuído ao H-3 e o duplete em δ 5,83 ($J = 9,4$ Hz, 1H) correspondente ao H-1. Já para a substância **8**, foi possível identificar os sinais para os H-3 e H-1 com deslocamento químico de δ 7,58 (sl, 1H) e 5,91 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), respectivamente. Novamente, foi possível atribuir a presença do anel pirânico, assim como nas demais substâncias discutidas até então.

Para as duas substâncias, foram visualizados sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, característico da presença de uma unidade glicosídica. Na substância **7**, o sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico está parcialmente encoberto pelo sinal

residual da H₂O, porém foi possível atribuí-lo ao duplete em δ 4,92 ($J = 8,0$ Hz, 1H). Já em **8**, o duplete foi constatado em δ 4,91 ($J = 8,0$ Hz, 1H). Como nas substâncias **3** e **4**, apresentadas no item anterior, pôde-se visualizar os demais sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados.

No espectro de RMN de ¹H de **8**, foi possível observar um duplo-duplete largo em δ 4,39 (ddl, $J = 6,9, 2,1$ Hz, 1H), atribuído ao H-8, além de um duplete em δ 4,96 ($J = 3,4$ Hz, 1H) correspondente ao H-7. Porém, para **7**, não foi possível notar o sinal do H-7, quando analisado somente o espectro de RMN de ¹H. Entretanto, ao analisar o experimento de HSQC, pode-se observar uma correlação entre o um carbono em δ 103,7 com um hidrogênio em aproximadamente δ 4,74 (figura 75), e o sinal referente ao H-8 se encontra em δ 4,04 (m, 1H).

Os H-7 e H-8 destas substâncias apresentaram-se mais desprotegidos, assim como nas substâncias **3** e **4**, sugerindo que estas possuem o segundo anel parecido com as substâncias discutidas no item 5.3.1.2. Ademais, observou-se um simpleto intenso em δ 3,74 (3H) e 3,73 (3H), atribuído a presença de metoxilas em **7** e **8**, respectivamente. As atribuições foram possíveis pela análise dos experimentos bidimensionais HSQC (figuras 74 e 76).

O espectro de RMN ¹³C apresentou 26 sinais (figuras 72 e 73). Observou-se sinais entre δ 62 e 100,0 indicativo da presença de compostos ligados a unidades glicosídicas (C-1' a C-6'), porém com deslocamento químico do C-1' diferente em cada composto. Assim como mencionado pela literatura e discutido anteriormente, a unidade glicosídica presente é a β -D-glucose (PLOUVIER & FAVRE-BONVIN, 1971; RATAN *et al.*, 1980; RIMPLER, 1978). Foram observados sinais em δ 53,9 (**7**) e 54,0 (**8**) referentes às metoxilas em cada substância, os sinais em δ 171,6 (**7**) e 171,7 (**8**) foram atribuídos a carbonilas de ésteres conjugados, além dos sinais dos carbonos metínicos sp² em δ 156,2 (C-3 de **7** e **8**) e carbonos olefínicos δ 111,5 e 112,4 (C-4), para **7** e **8**, respectivamente.

As substâncias **7** e **8** até então se apresentaram muito similares à **3** e **4**, entretanto, foi possível observar sinais a mais nos espectros de RMN de ¹H como dois multipletos, com integração para um hidrogênio cada, em δ 3,69 e 3,94 (**7**) e δ 3,56 e 3,75 (**8**), referentes a hidrogênios diastereotópicos de um carbono oximetilênico, e um tripleto com integração para três hidrogênios em δ 1,21 ($J = 7,1$ Hz, 1H) para **7**, e em δ 1,24 ($J = 7,1$ Hz) para **8**. No RMN de ¹³C, notou-se sinais referentes a um carbono oximetilênico e uma metila em δ 67,3 16,4 (**7**) e δ 65,3 e 16,33 (**8**). Este conjunto de sinais sugeriu a presença de um grupo etóxi (CH₃CH₂O–

). A análise dos experimentos bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) proporcionou a confirmação da disposição dos átomos de ambas as estruturas, como discutido a seguir.

No experimento de HMBC (figuras 77 e 81) das substâncias **7** e **8**, foram observadas as mesmas correlações discutidas para o α -morronisídeo e β -morronisídeo, entre os: H-3 com o C-4, C-1 e C-11; H-5 com o C-4 e C-9; H-9 com os C-1 e C-5, confirmando a presença do anel heterociclo de seis membros.

Corroborando com a hipótese do segundo anel ser heterocíclico de seis membros com um oxigênio entre os C-7 e C-8, como citado acima e apresentado nas substâncias supracitadas (**3** e **4**), não foram encontradas correlações entre os H-8 e C-7, assim como já havia sido discutido para as substâncias **3** e **4**. Além disso, não foi observada correlação entre os C-6 e C-8, C-9 e C-7, indicando que o segundo anel não é de cinco membros. Adicionalmente, notou-se correlações dos carbonos anoméricos (em δ 100,8 para **7** e δ 101,1, para **8**) e H-1 (δ 5,83 e 5,91, da substância **7** e **8**, respectivamente) da β -D-glucose, mostrando que a glucose está ligada no iridoide pelo C-1 (figuras 78 e 82).

Na porção etóxi de **7** e **8**, observou-se uma correlação entre os hidrogênios metílicos, em δ 1,21 (**7**) e δ 1,24 (**8**) e os carbonos oximetilênicos em δ 67,3 (**7**) e δ 65,3 (**8**), além da correlação entre os H-7 (δ 4,74 e 4,97, **7** e **8**) e os carbonos oximetilênicos, do grupo etóxi em δ 67,3 e 65,3, de **7** e **8**, respectivamente (figuras 79 e 83; figuras 80 e 82).

Como descrito para **3** e **4**, observou-se os mesmos acoplamentos principais para **7** e **8** no experimento bidimensional COSY (figuras 84 e 85), incluindo a ausência do acoplamento entre os H-7 e H-8, indicando a presença do anel heterocíclico de seis membros, como discutido acima. Adicionalmente, no NOESY (figura 86 e 89), visualizou-se um efeito NOE entre os H-5 (δ 2,90 e 3,05, **7** e **8**) e H-9 (δ 1,87 e 1,94, **7** e **8**), demonstrando uma proximidade espacial entre esses átomos de hidrogênio, comprovando a fusão *cis* dos anéis. Na substância **8**, foi possível visualizar o efeito NOE dos H-7 (δ 4,97) com os H(OCH₂) (δ 3,56 e 3,73), já na substância **7** estes sinais foram encobertos pelo sinal residual da H₂O. Ademais, observou-se um efeito NOE entre os H-1 (δ 5,83 e 5,91, **7** e **8**) e H-10 (δ 1,40 e 1,36, **7** e **8**), demonstrando uma proximidade dos hidrogênios metílicos (H-10) com o H-1, confirmando a orientação α da metila (C-10), comumente encontrado em iridoídeos do tipo morronisídeo (YE *et al.*, 2020). As ampliações dos experimentos de NOESY se encontram nas figuras 87, 88, 90 e 91.

Para as duas substâncias (**7**, figura 92 e **8**, figura 93), observou-se a presença dos íons a: m/z 452,2124 [M+H₂O]⁺ e 457,1688 [M+Na]⁺ para **7**; m/z 427,2127 [M+H₂O]⁺ e 457,1691

[M+Na]⁺ para **8**, na qual a proposta da fórmula molecular foi C₁₉H₃₀NaO₁₁ (erro de -1,8 ppm para **7** e -2,4 ppm para **8**) condizentes com a fórmula molecular esperada C₁₉H₃₀O₁₁ dos iridoides 7-*O*- α -etil-morronisídeo e 7-*O*- β -etil-morronisídeo (SUNGHWA *et al.*, 2009).

A partir dos dados dos experimentos de RMN unidimensionais (RMN de ¹H e ¹³C) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) discutidos acima, aliados aos dados de deslocamentos químicos relatados por Sunghwa e colaboradores (2009) (tabelas 18 e 19), foi possível identificar que as substâncias **7** e **8** como os iridoides glicosilados 7-*O*- α -etil-morronisídeo e 7-*O*- β -etil-morronisídeo, respectivamente, conforme apresenta a figura 68. Trata-se do primeiro relato das respectivas substâncias na família Rubiaceae, entretanto, ao observar um isolamento de pouca quantidade das substâncias aliado à obtenção do extrato em EtOH é importante ressaltar a possibilidade da obtenção das substâncias como artefatos de isolamento.

Figura 68. Substâncias **7** e **8**, 7-*O*- α -etil-morronisídeo e 7-*O*- β -etil-morronisídeo.

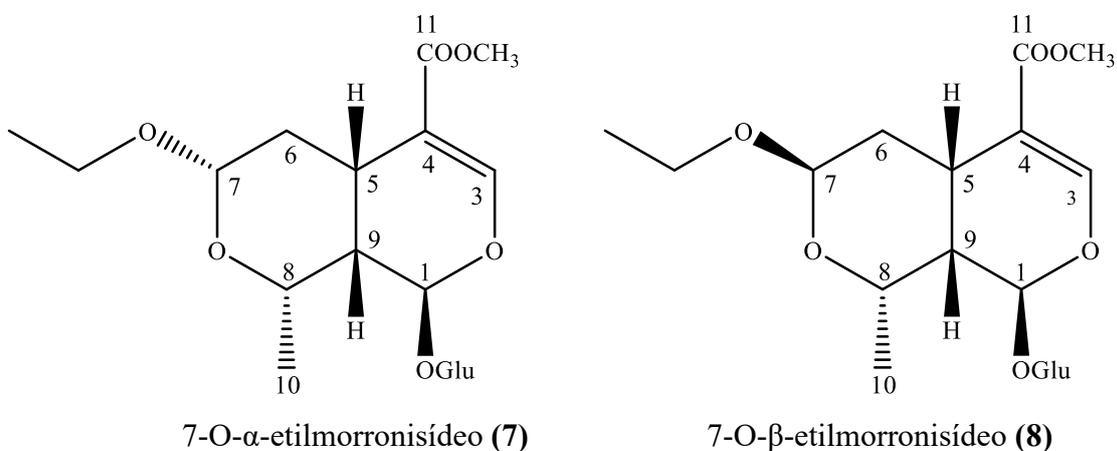


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância **7**.

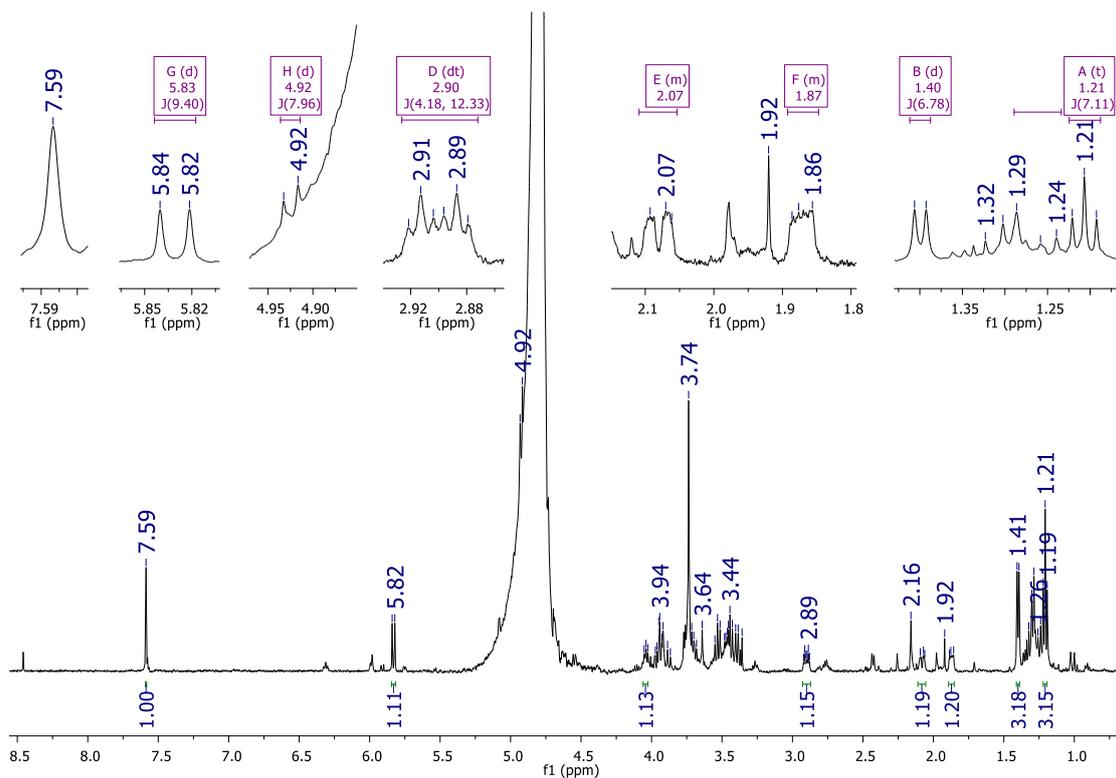


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) da substância **8**.

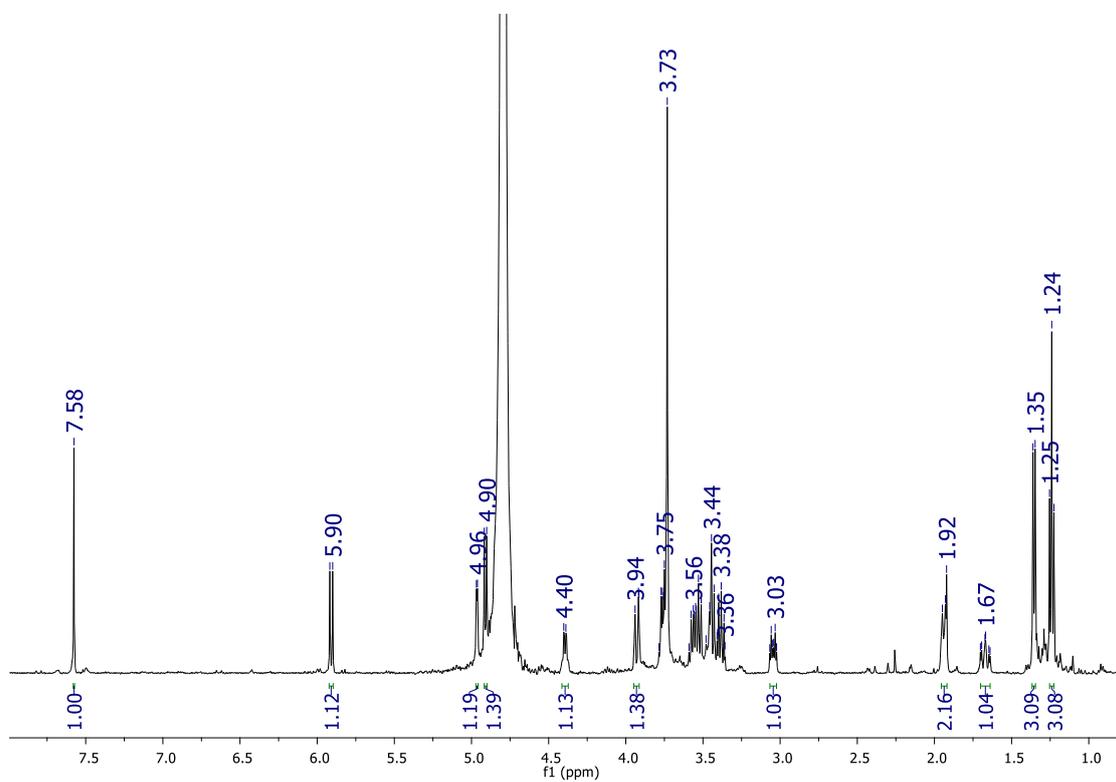


Figura 71. Expansões do espectro de RMN de ^1H da substância **8**.

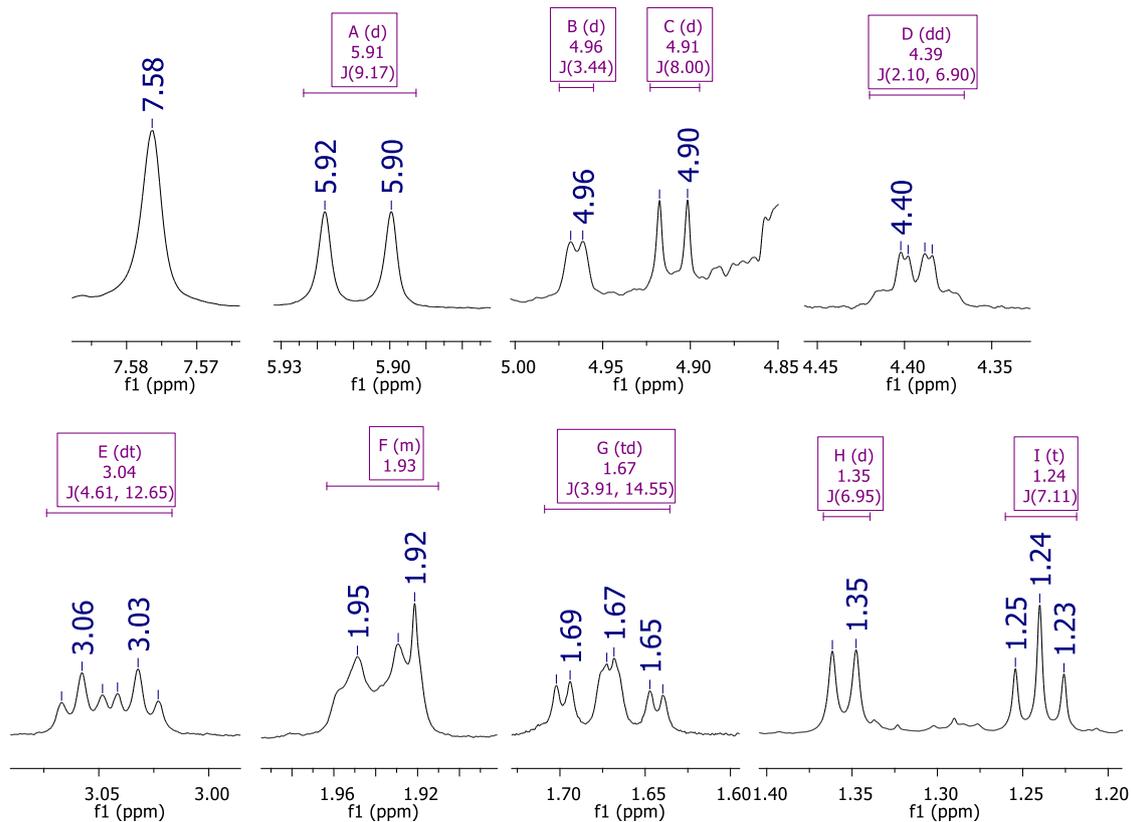


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância **7**.

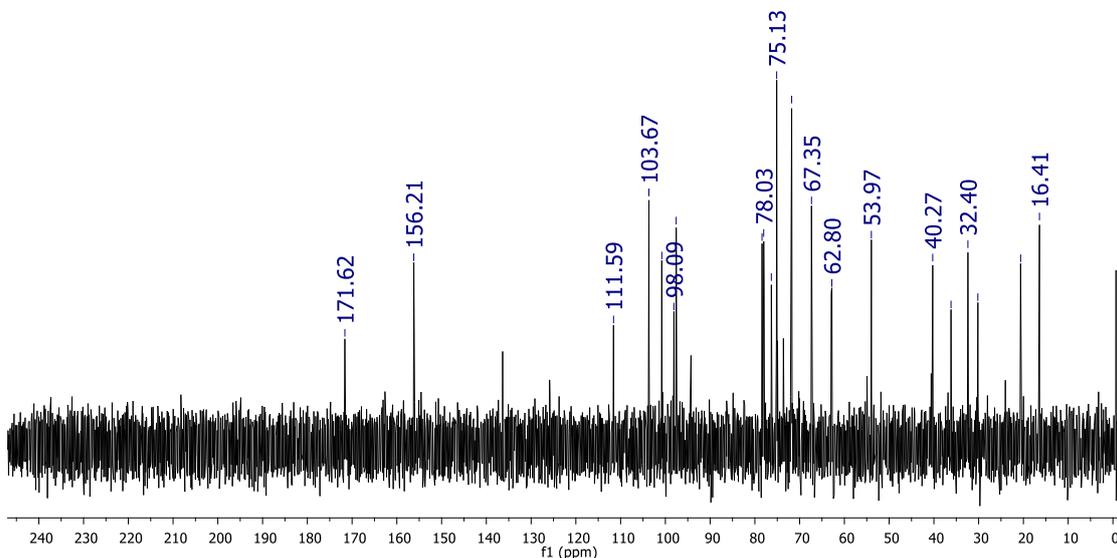


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) da substância **8**.

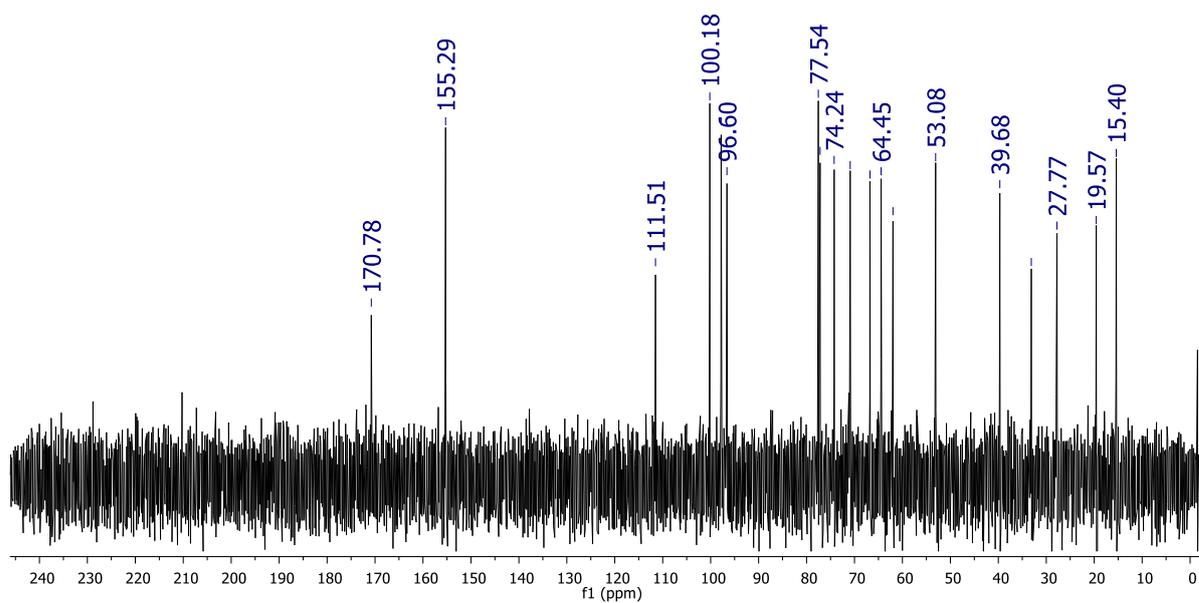


Figura 74. Experimento HSQC (500 MHz, D_2O) da substância **7**.

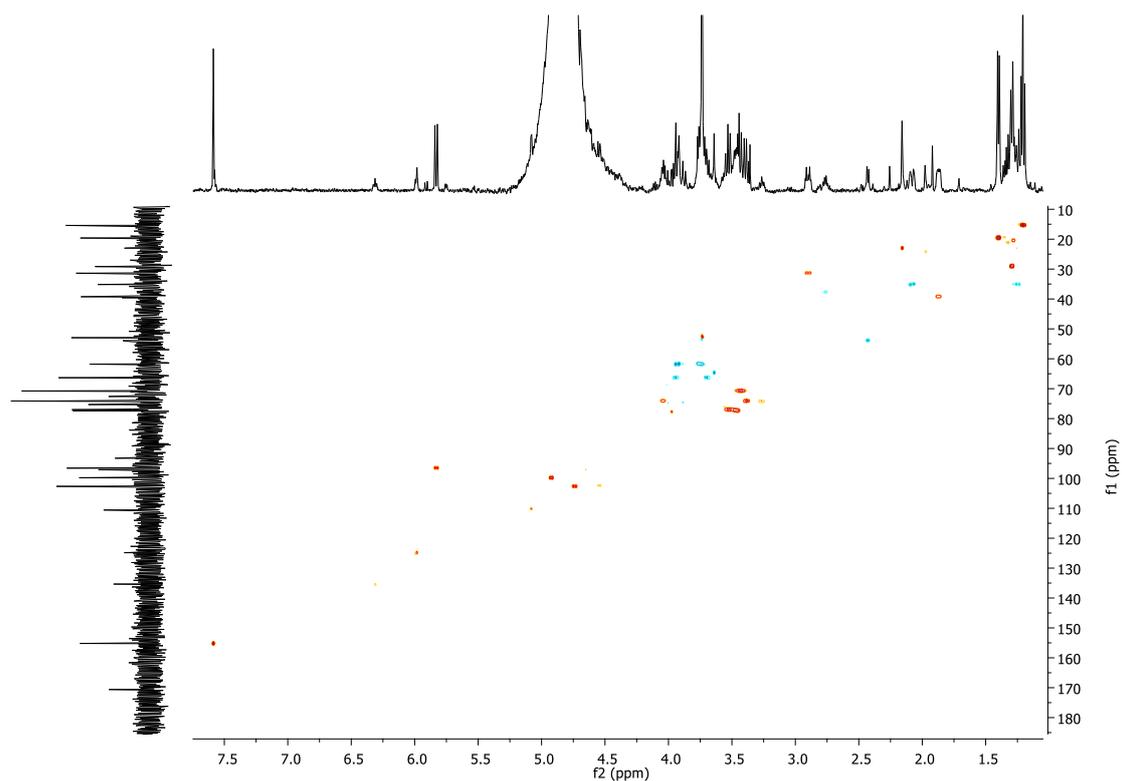


Figura 75. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D₂O) da substância **7**.

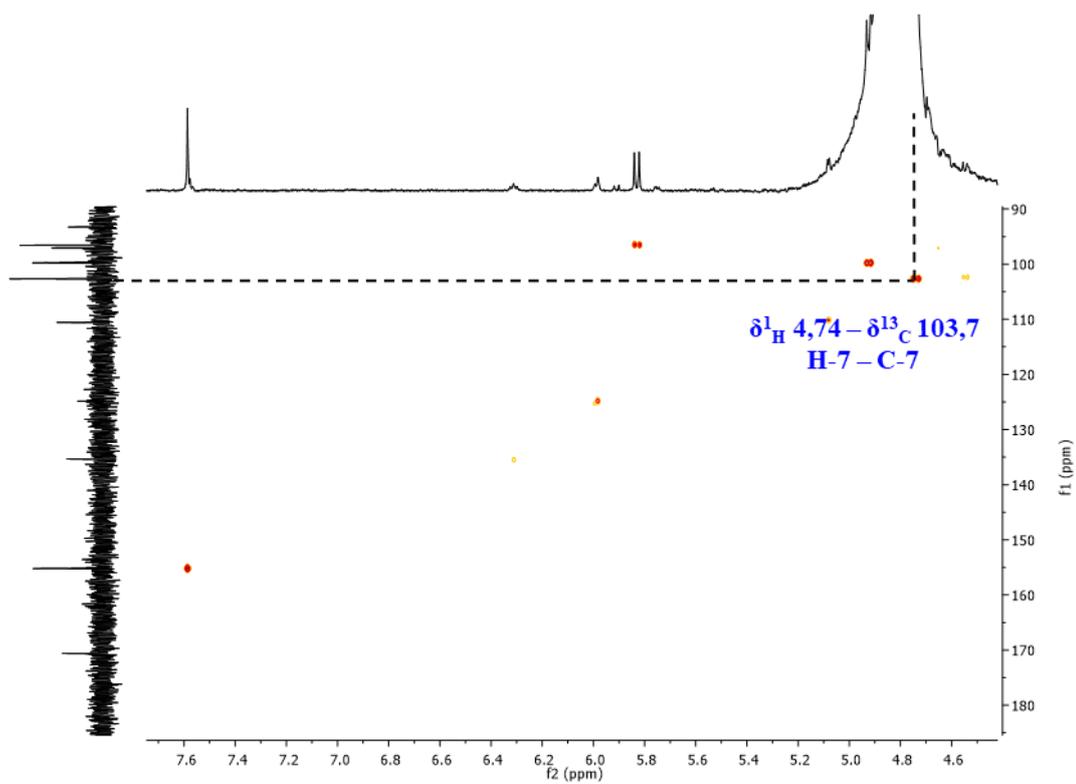


Figura 76. Experimento bidimensional HSQC (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

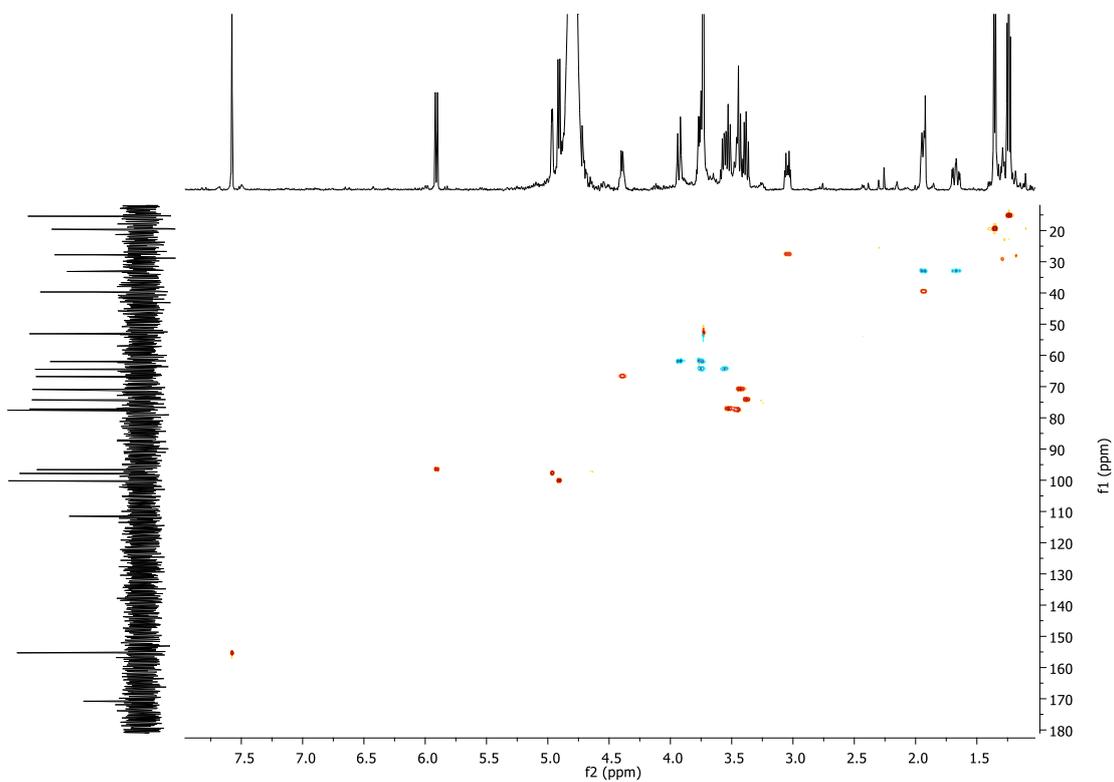


Figura 77. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D₂O) da substância 7.

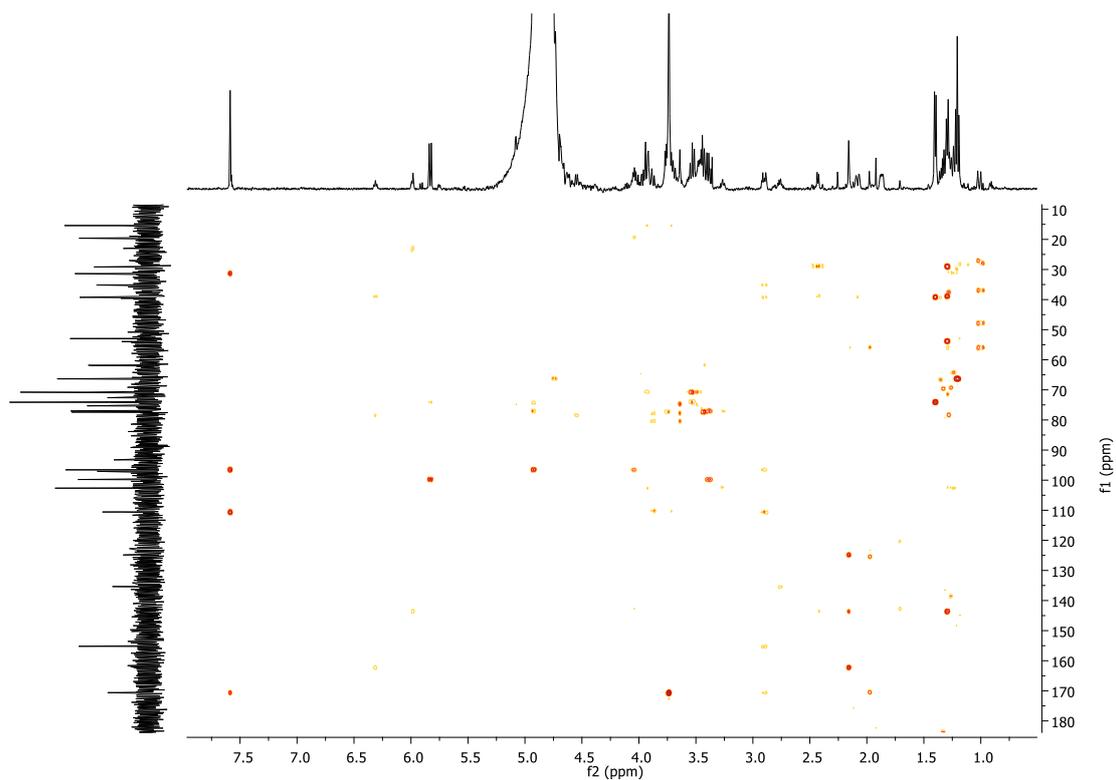


Figura 78. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D₂O) da substância 7.

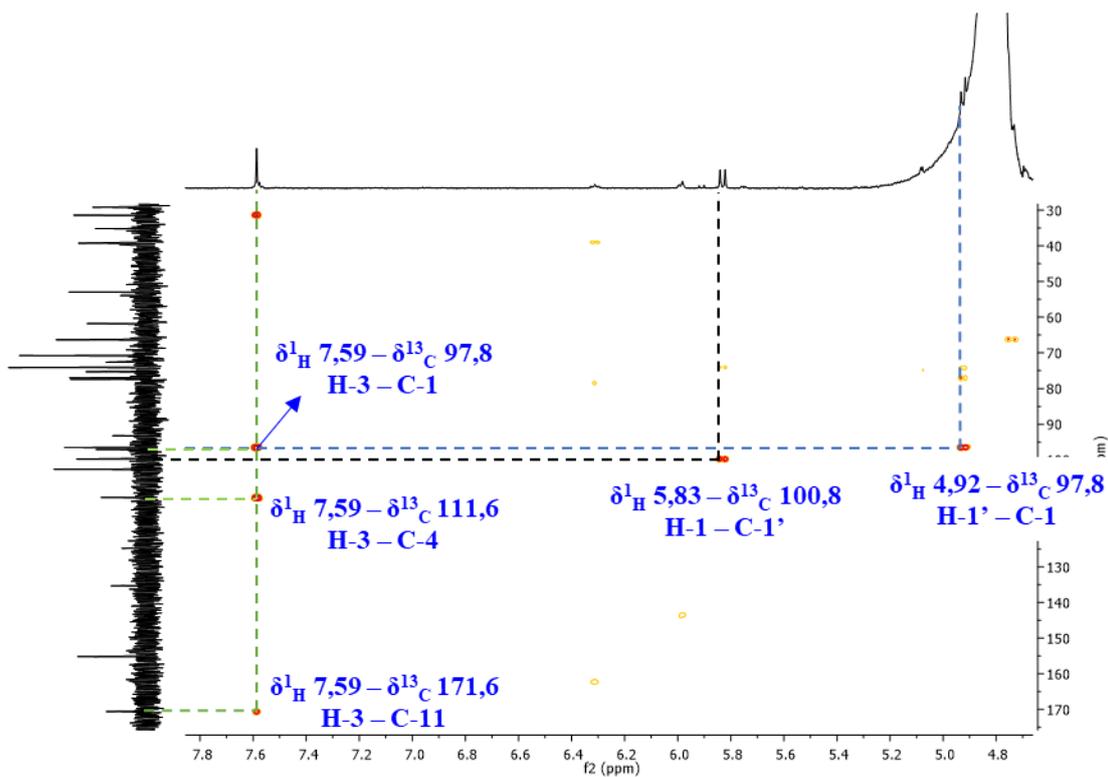


Figura 79. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D₂O) da substância 7.

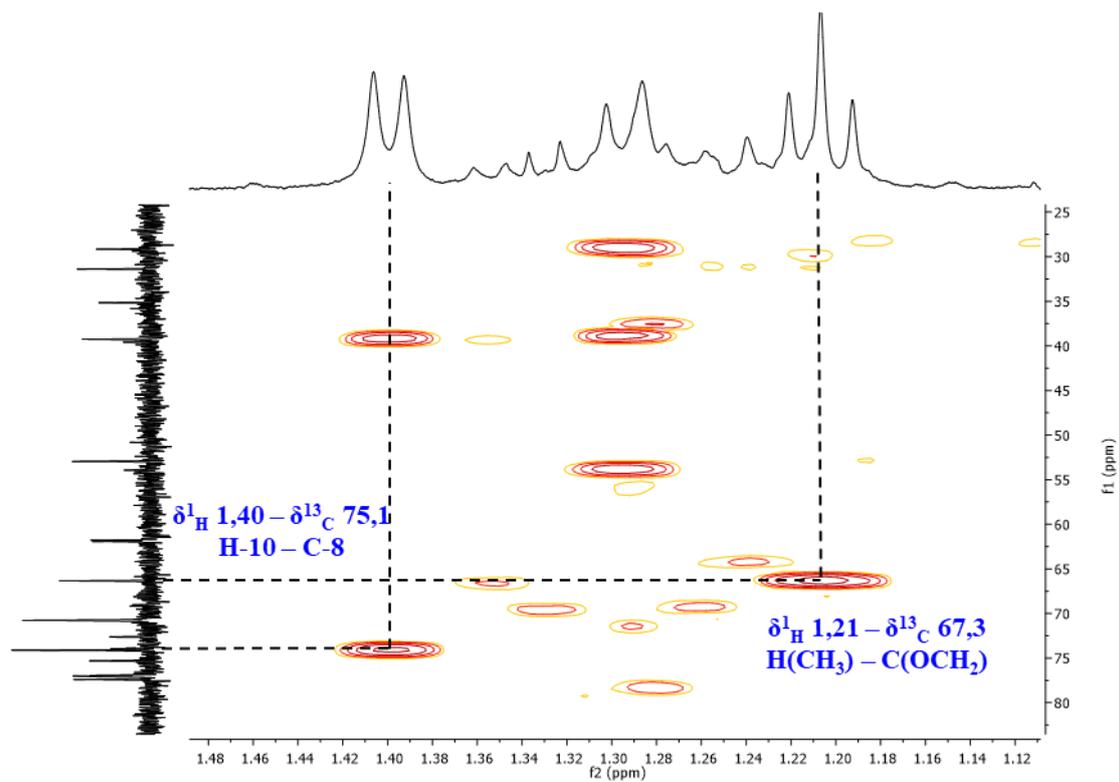


Figura 80. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D₂O) da substância 7.

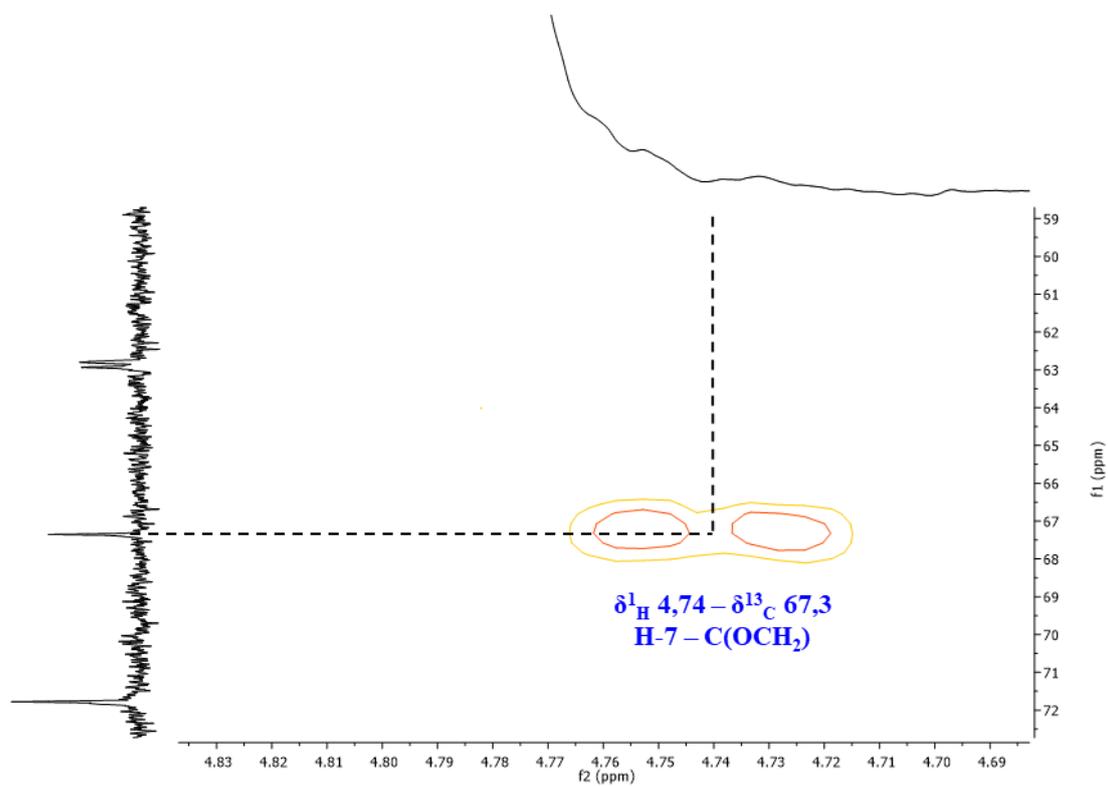


Figura 81. Experimento bidimensional HMBC (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

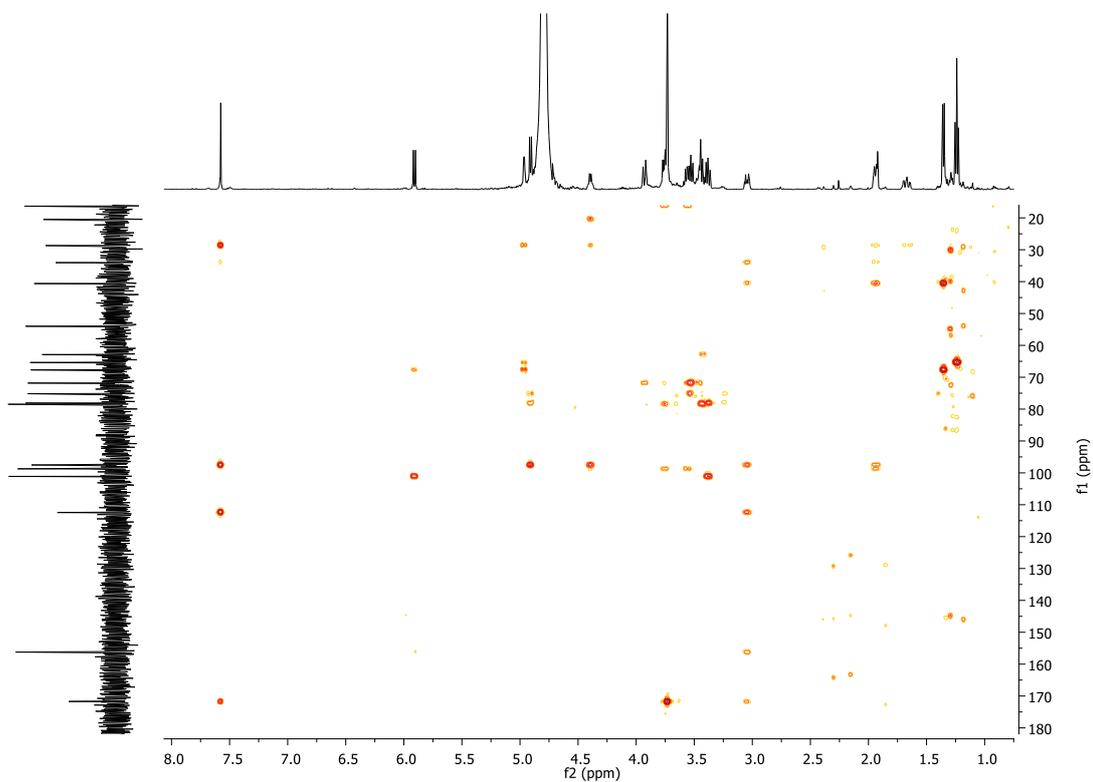


Figura 82. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

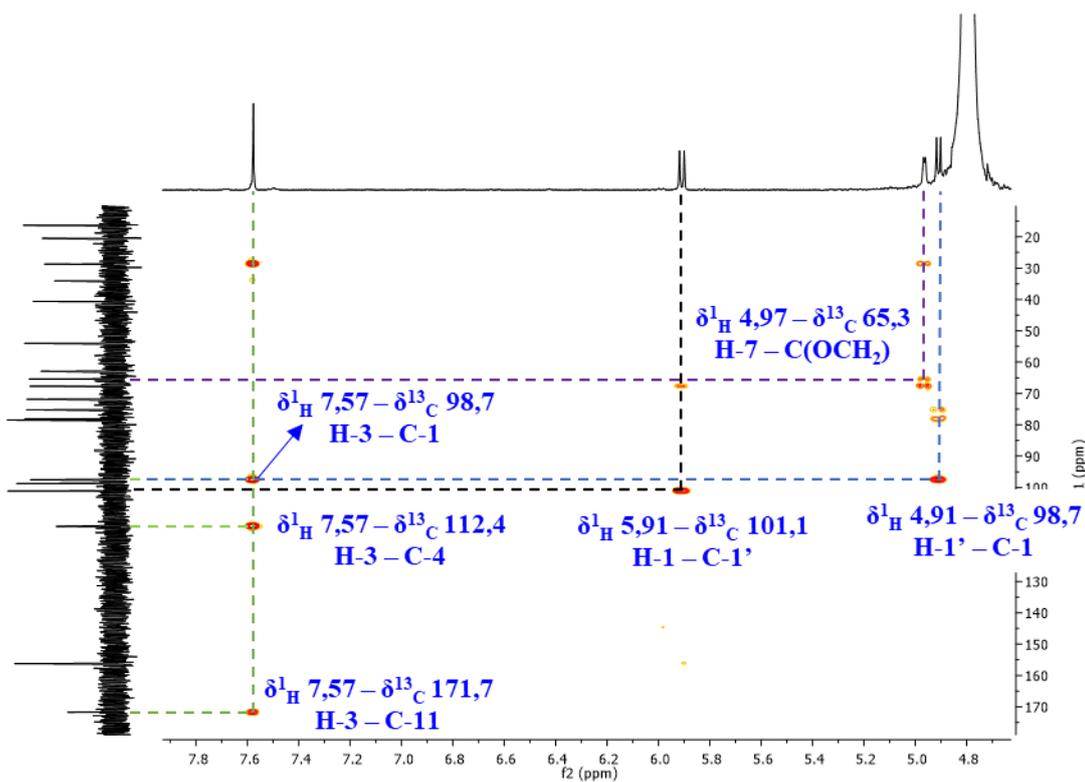


Figura 83. Ampliação experimento HSQC (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

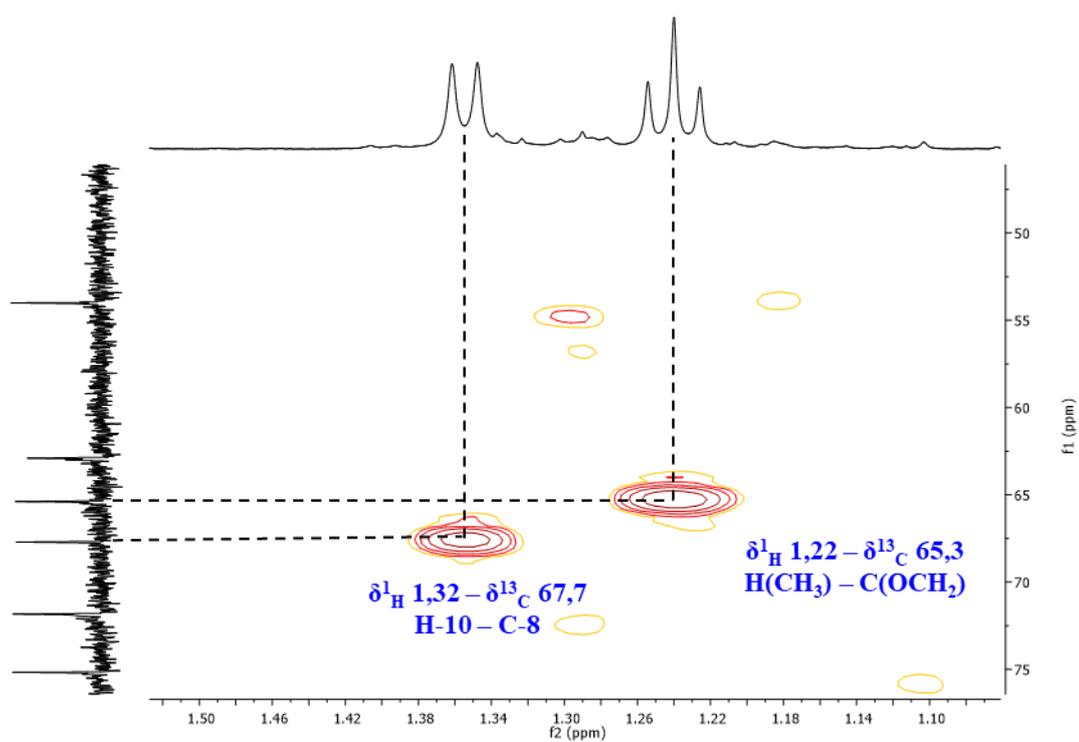


Figura 84. Experimento bidimensional COSY (500 MHz, D₂O) da substância **7**.

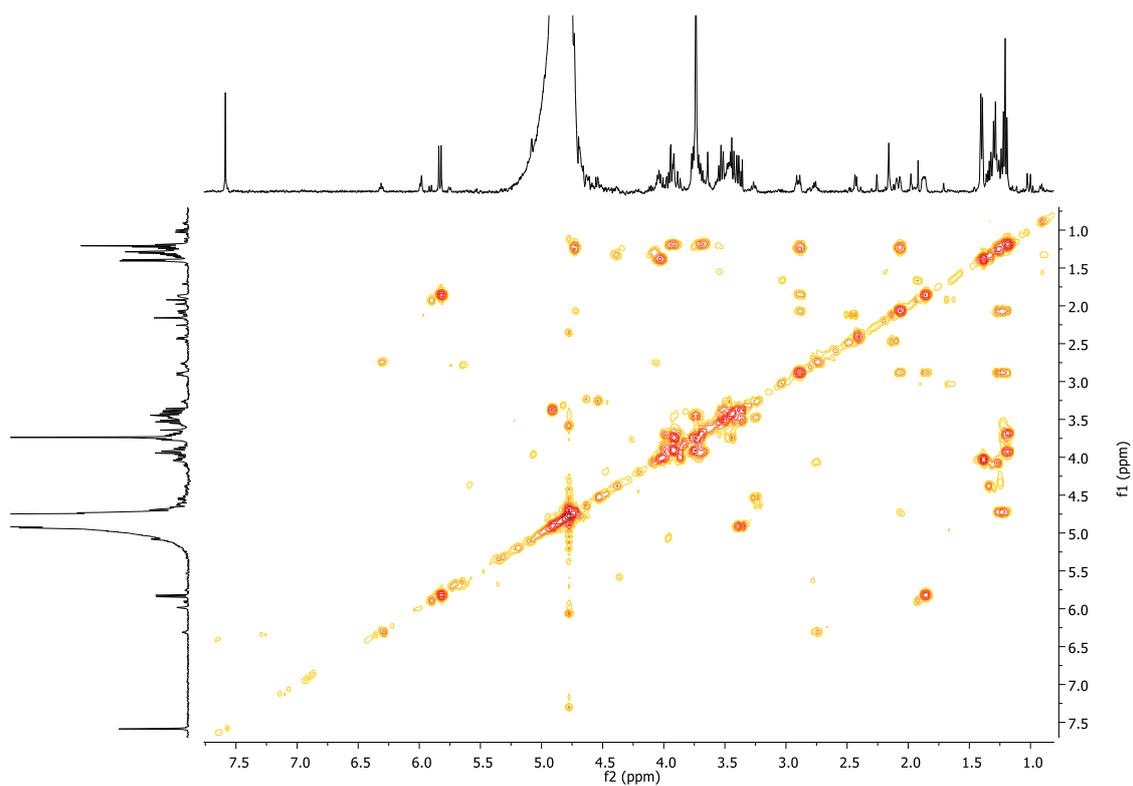


Figura 85. Experimento bidimensional COSY (500 MHz, D₂O) das substâncias **8**.

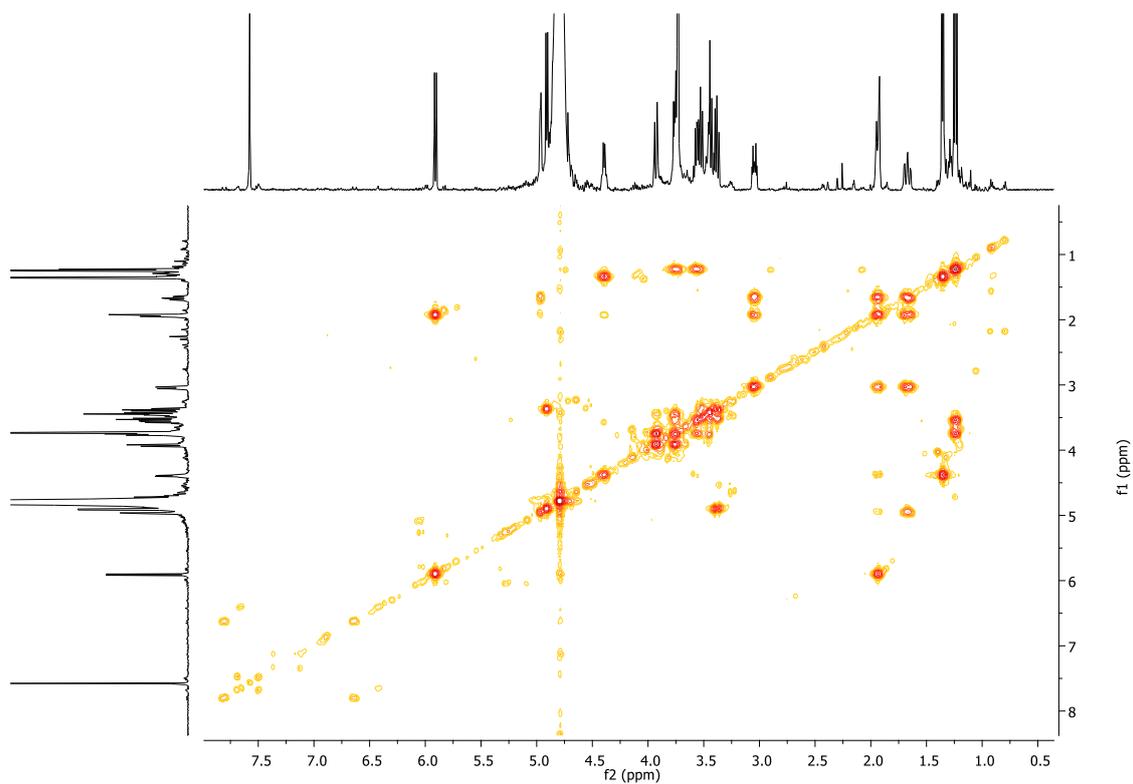


Figura 86. Experimento bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância **7**.

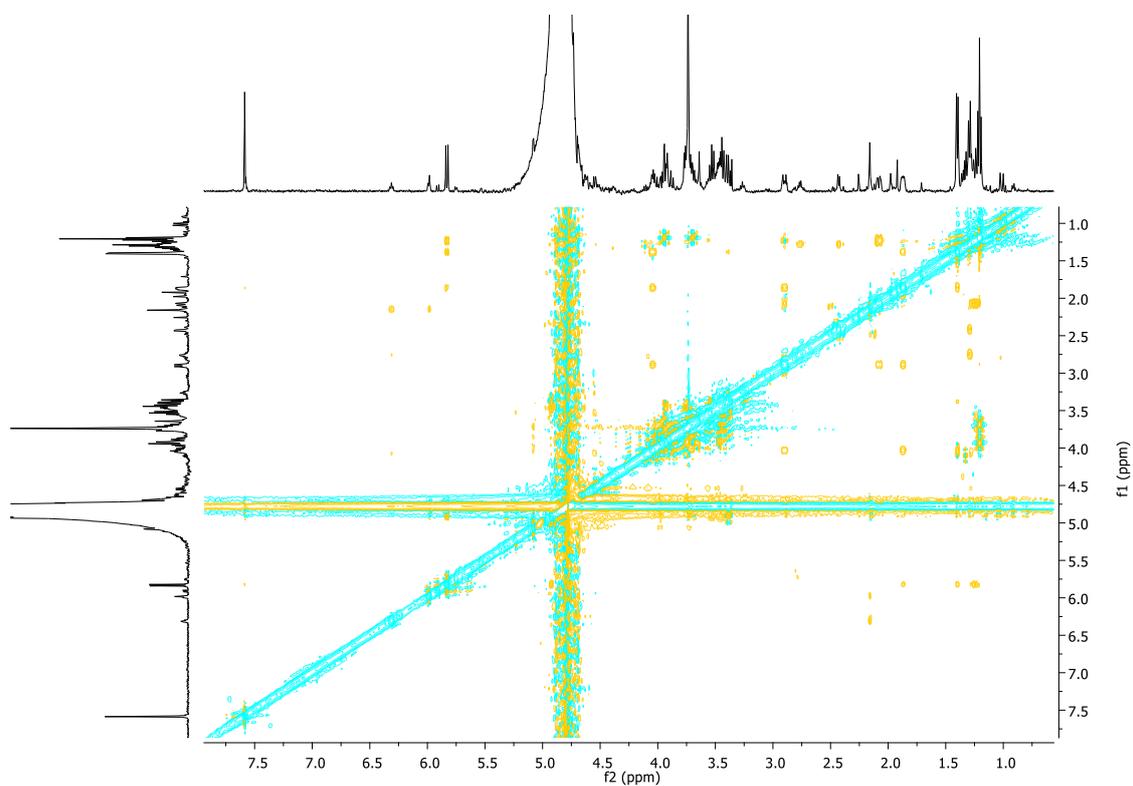


Figura 87. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância 7.

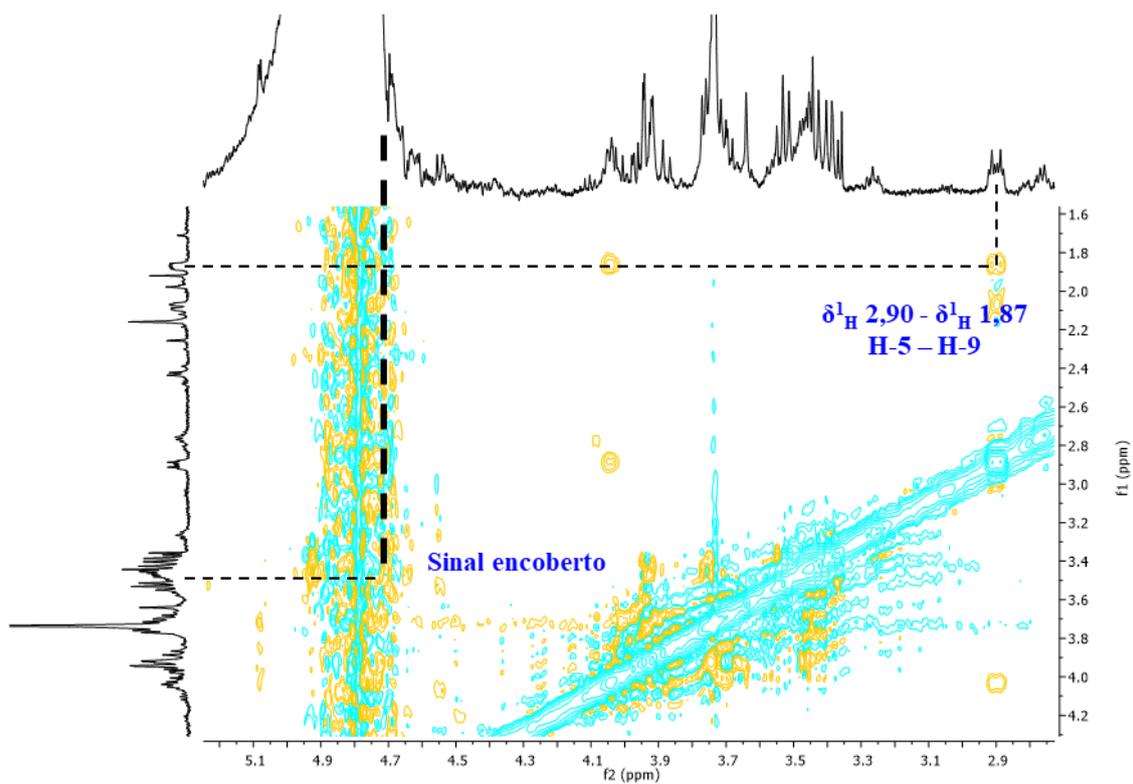


Figura 88. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância 7.

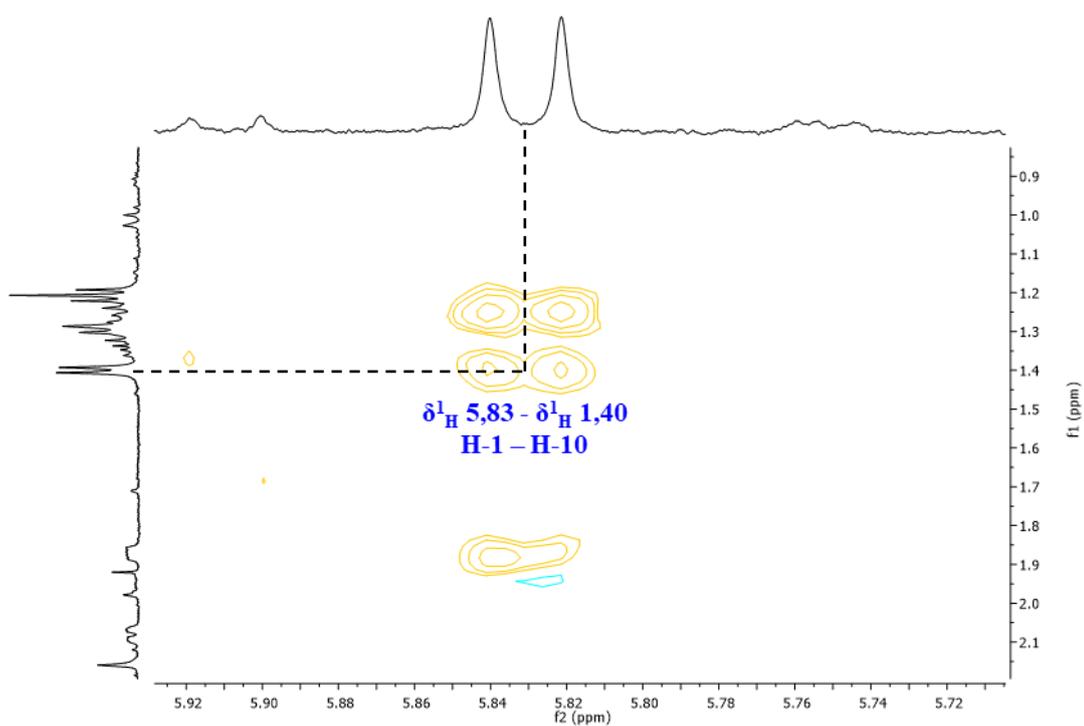


Figura 89. Experimento bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

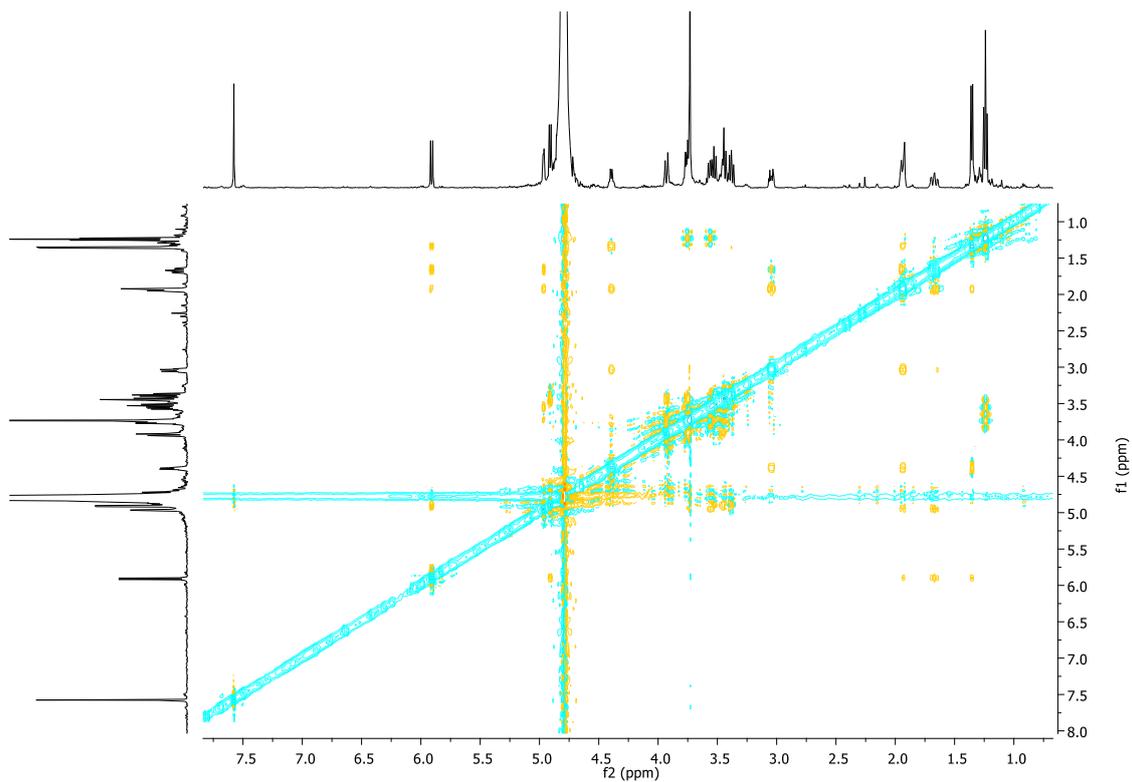


Figura 90. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

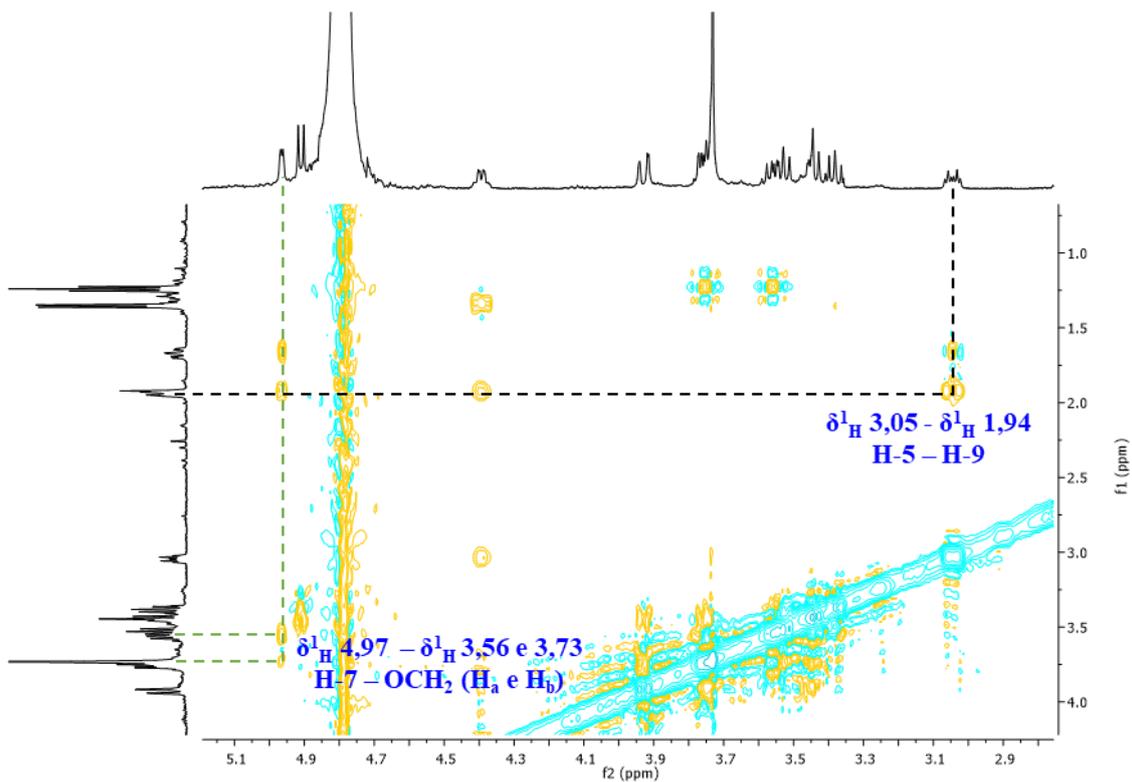


Figura 91. Ampliação bidimensional NOESY (500 MHz, D₂O) da substância **8**.

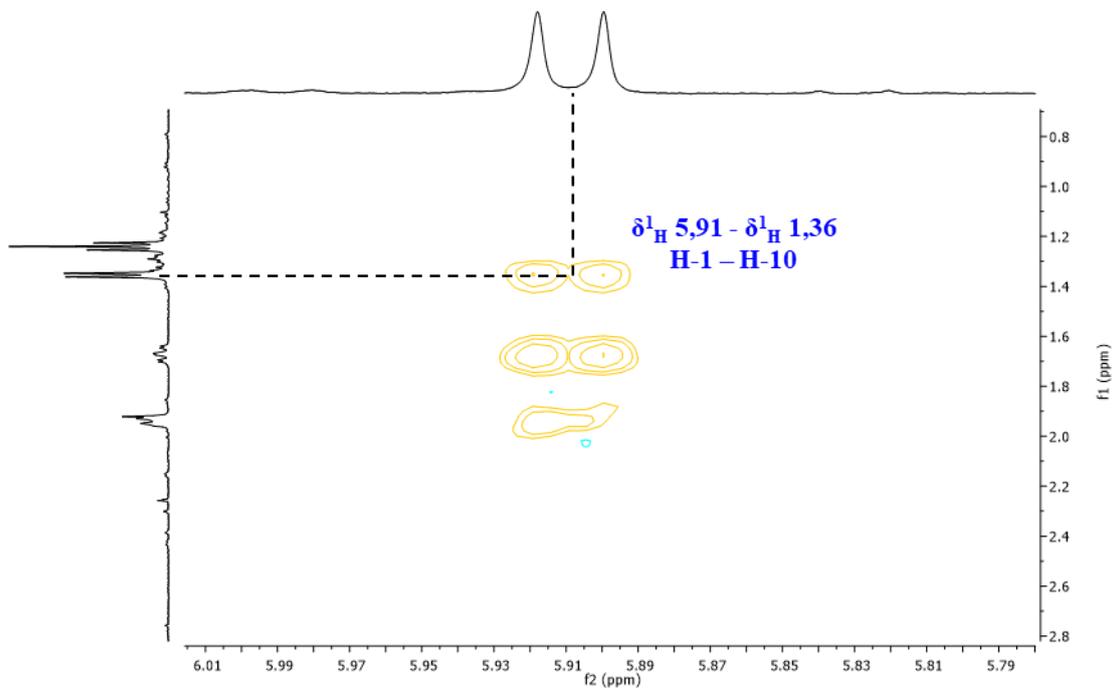


Figura 92. Cromatograma de UV, MS e MS² (modo positivo) da substância **7**.

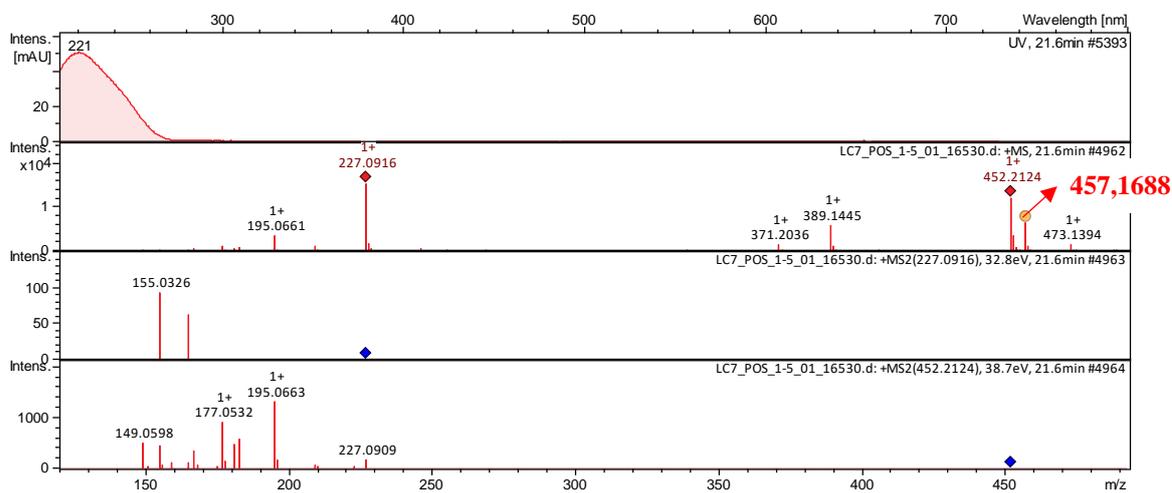


Figura 93. Cromatograma de UV, MS e MS² (modo positivo) da substância **8**.

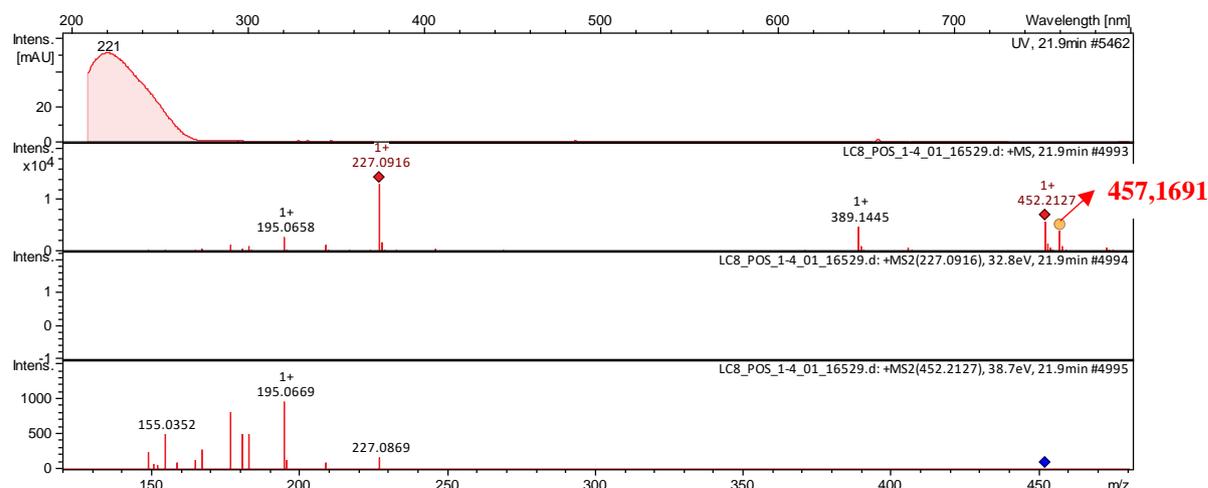


Tabela 18. Dados de RMN de ¹H das substâncias **7** e **8** (D₂O) e literatura (SUNGHWA *et al.*, 2009), em CD₃OD.

	7-O-α-etil morronisídeo	Substância 7	7-O-β-etil morronisídeo	Substância 8
C/H	δ ¹H (m, J Hz)	δ ¹H (m, J Hz)	δ ¹H (m, J Hz)	δ ¹H (m, J Hz)
1	5,80 (d, J = 9,0, 1H)	5,83 (d, J = 9,4, 1H)	5,88 (d, J = 9,0, 1H)	5,91 (d, J = 9,2, 1H)
3	7,51 (s, 1H)	7,59 (1H, s)	7,51 (s, 1H)	7,58 (1H, s)
4	-	-	-	-
5	2,78 (dt, J = 13,0, 4,0, 1H)	2,90 (dt, J = 12,3, 4,2, 1H)	3,00 (dt, J = 13,0, 4,0, 1H)	3,05 (dt, J = 4,7, 12,9, 1H)
6	2,00 (m, 2H)	1,26 (m, 1H) 2,07 (m, 1H)	1,91 (m, 2H)	1,67 (td, J = 14,6, 4,0, 1H) 1,94 (m, 1H)
7	4,78 (d, J = 4,0, 1H)	4,74, encoberto pelo sinal residual da água	4,78 (d, J = 4,0 Hz, 1H)	4,96 (d, J = 3,5, 1H)
8	3,89 (m, 1H)	4,04 (m, 1H)	-	4,39 (dd, J = 6,9, 2,1, 1H)
9	1,81 (m, 1H)	1,87 (m, 1H)	1,51 (ddd, J = 9,0, 4,0, 2,0, H)	1,94 (m, 1H)
10	1,38 (d, J = 7,0, 1H)	1,40 (d, J = 6,8, 1H)	1,32 (d, J = 7,0, 3H)	1,36 (d, J = 7,0, 1H)
11	-	-	-	-
OCH₃	3,69 (s, 3H)	3,74 (s, 3H)	3,69 (s, 3H)	3,73 (s, 3H)
OCH₂	3,69 (m, 1H) 3,94 (m, 1H)	3,56 (m, 1H) 3,75 (m, 1H)	-	3,69 (m, 1H) 3,94 (m, 1H)
CH₃	1,22 (t, J = 7,0, 3H)	1,21 (t, J = 7,1, 3H)	1,22 (t, J = 7,0, 3H)	1,24 (t, J = 7,1, 3H)
1'	4,86 (d, J = 8,0, 1H)	4,92 (d, J = 8,0, 1H)	4,86 (d, J = 8,0, 1H)	4,91 (d, J = 8,0, 1H)
2'	3,20—3,47	3,43 (m, 1H)	3,20—3,47	3,42 (m, 1H)
3'	3,20—3,47	3,46 (m, 1H)	3,20—3,47	3,46 (m, 1H)
4'	3,20—3,47	3,38 (m, 1H)	3,20—3,47	3,38 (m, 1H)
5'	3,20—3,47	3,53 (m, 1H)	3,20—3,47	3,53 (m, 1H)
6'	4,34 (dd, J = 12,0, 2,0, 2H)	3,75 (m, 1H) 3,93 (m, 1H)	4,58 (dd, J = 12,0, 2,0, 2H)	3,75 (m, 1H) 3,93 (dd, J = 1,8, 12,5, 1H)

Tabela 19. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **7** e **8** (D_2O) e literatura (SUNGHWA *et al.*, 2009), em CD_3OD .

C/H	7-O- α -etil morronisídeo	Substância 7	7-O- β -etil morronisídeo	Substância 8
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	98,1	97,8	98,1	98,7
3	154,4	156,2	154,4	156,2
4	111,6	111,5	111,6	112,4
5	31,8	32,4	28,0	28,6
6	35,8	36,2	33,9	34,0
7	95,6	103,7	95,6	97,5
8	74,9	75,1	66,3	67,7
9	40,1	40,2	40,4	40,6
10	19,6	20,6	19,6	20,5
11	168,7	171,6	168,7	171,7
OCH₃	51,7	53,9	51,7	54,0
OCH₂	62,8	67,3	62,8	65,3
CH₃	15,4	16,4	15,4	16,3
1'	100,0	100,8	100,0	101,1
2'	71,6	71,7	71,6	71,8
3'	78,4	78,4	78,4	78,5
4'	74,1	75,1	74,1	75,1
5'	77,5	78,0	77,5	78,0
6'	62,9	62,9	62,9	62,9

5.1.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO FENILPROPANOIDE: substância 11

A fração CMFA2-4 apresentou-se como um sólido branco amorfo, insolúvel em H_2O . O processo de purificação foi descrito no item 4.4.2, onde no final, esta fração foi decodificada como substância **11**.

No espectro de RMN de ^1H (figura 95; tabela 20), foram visualizados sinais na região de hidrogênios pertencentes à sistemas aromáticos, como um simpleto largo em δ 7,08 (1H), um duplete largo em δ 7,01 ($J = 8,2$ Hz, 1H) e um duplete em δ 6,87 ($J = 8,2$ Hz, 1H), correspondentes aos C-2, C-5 e C-6, respectivamente, caracterizando acoplamentos do tipo *meta*, *orto* e *orto-meta*, respectivamente, referentes a um anel 1,3,4-trissubstituído. Observou-se dois dupletos com uma constante de acoplamento de 16 Hz, indicativo de ligação dupla de configuração *trans*, em δ 6,26 (1H) e 7,52 (1H), atribuídos aos hidrogênios olefínicos ligados nos C-7 e C-8, respectivamente. Além destes sinais, foram observados um multipletos em δ 4,24 ($J = 3,1$ Hz, 1H), um duplo-duplete em δ 3,85 ($J = 9,6, 2,9$ Hz, 1H) e um triplo-duplete em δ 5,29 ($J = 9,6, 4,2$ Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios carbinólicos dos C-2', C-6' e C-5', respectivamente. Foram identificados dois multipletos em δ 2,20 e em δ 2,07, atribuídos aos C-2 e C-6 respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 96; tabela 20), foram identificados 16 sinais, sendo três sinais de carbonos oxigenados (δ 79,3; 73,5; 75,7 e 74,5), referentes aos C-1, C-3, C-4 e C-5, respectivamente. Observou-se dois sinais de carbonos alifáticos, em δ 40,46 e 41,10 atribuídos ao restante dos carbonos da porção derivada do ácido quínico, sendo C-2 e C-6. Notou-se nove sinais restantes no espectro. Com o auxílio da literatura, os seis sinais na região de carbonos presentes em um sistema aromático (δ 130,4; 118,6; 147,9; 150,7; 119,7 e 126,3) foram atribuídos aos C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6' do anel aromático. Os dois sinais de carbonos olefínicos (δ 149,7 e 117,9) foram atribuídos ao C-7 e C-8 e o sinal em δ 172,3 é referente a uma carbonila de éster conjugado, indicando a presença de um composto C_6C_3 .

Com a análise dos dados experimentais (RMN de ^1H e ^{13}C) e comparações com a literatura, foi possível identificar que a substância **11** (figura 94) se trata do fenilpropanoide ácido clorogênico (SANTOS *et al.*, 2004). Apesar desta ser uma substância amplamente relatada no reino vegetal, este é o primeiro relato da ocorrência do ácido clorogênico em *Calycophyllum*, sendo anteriormente relatados seus derivados metilados em C-7 (ZULETA *et al.*, 2003).

Figura 94. Substância **11**, ácido clorogênico.

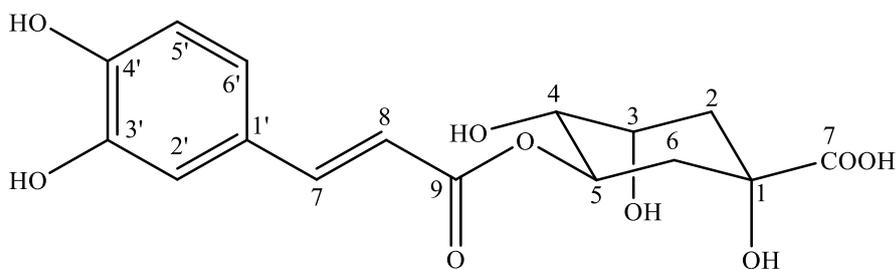


Figura 95. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, D_2O com gotas de acetona- d_6) da substância **11**.

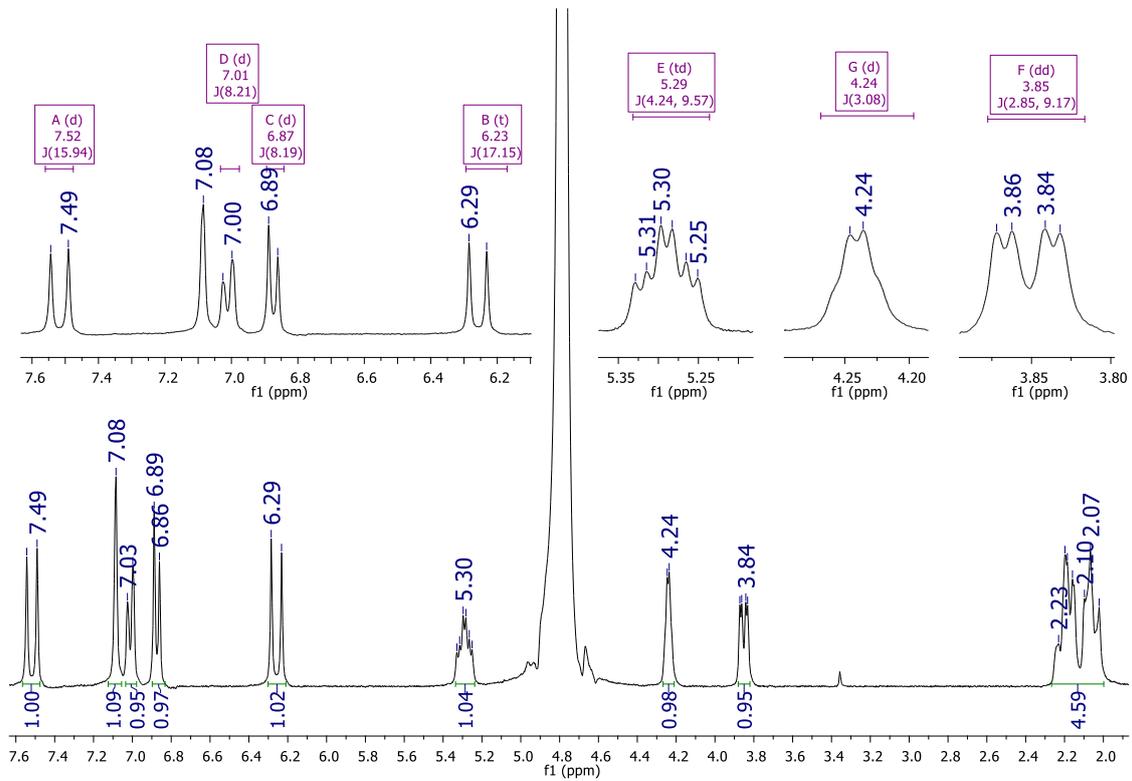


Figura 96. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O com gotas de acetona- d_6) da substância **11**.

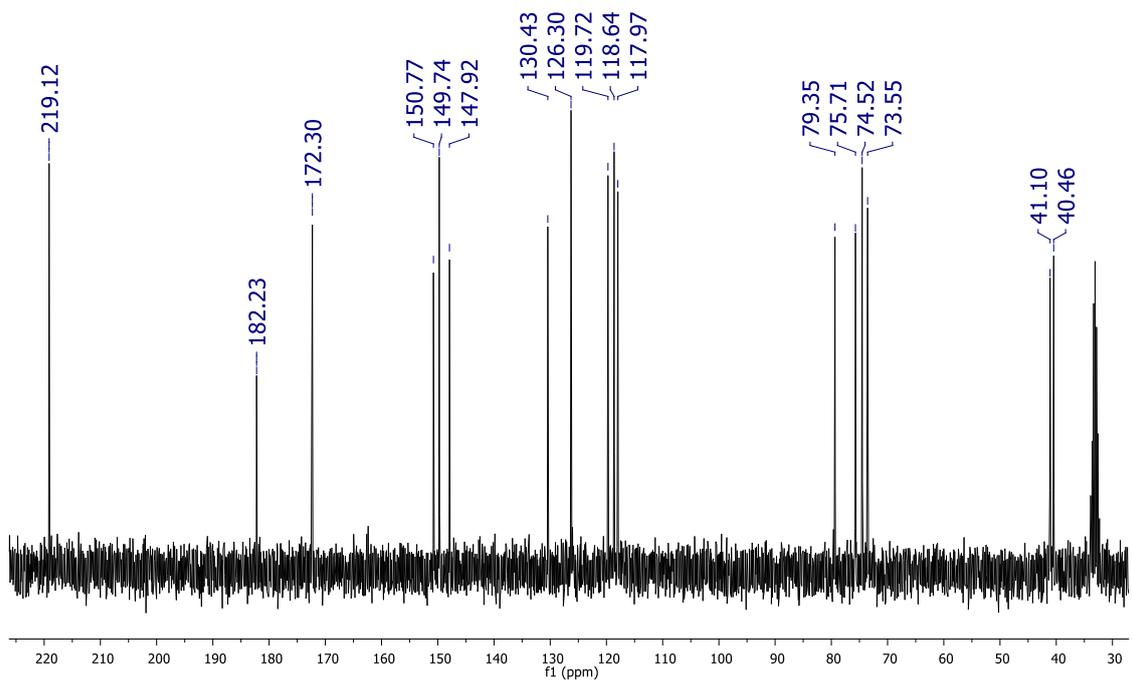


Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **11** (D_2O com gotas de acetona- d_6) e literatura (SANTOS *et al.*, 2004, obtido em D_2O).

C/H	Ácido clorogênico		Substância 11	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	-	79,9	-	79,3
2_a	2,05 (d, $J = 12,0$, 1H)	40,2	2,20 (m, 1H)	40,4
2_b	1,96 (d, $J = 12,0$, 1H)			
3	4,26 (d, $J = 3,0$, 1H)	73,8	4,24 (m, $J = 3,1$, 1H)	73,5
4	3,87 (dd, $J = 10,5$, 3,0, 1H)	75,9	3,85 (dd, $J = 9,6$, 2,9, 1H)	75,7
5	5,33 (td, $J = 10,5$, 4,6, 1H)	74,2	5,29 (td, $J = 9,6$, 4,2, 1H)	74,5
6	2,15 (m, 1H)	41,4	2,07 (m, 1H)	41,1
7	-	184,0	-	182,2
1'	-	130,1	-	130,4
2'	7,15 (d, $J = 1,8$, 1H)	118,2	7,08 (sl, 1H)	118,6
3'	-	147,4	-	147,9
4'	-	150,2	-	150,7
5'	6,91 (d, $J = 8,4$, 1H)	119,3	6,87 (d, $J = 8,2$, 1H)	119,7
6'	7,06 (dd, $J = 8,2$, 1,8, 1H)	125,7	7,01 (dl, $J = 8,2$, 1H)	126,3
7'	7,60 (d, $J = 15,9$, 1H)	149,2	7,52 (d, $J = 16,0$, 1H)	149,7
8'	6,34 (d, $J = 15,9$, 1H)	117,8	6,26 (d, $J = 16,0$, 1H)	117,9
9'	-	172,3	-	172,3

5.1.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS FLAVONOIDES: substâncias **9**, **10**, **13** e **14**

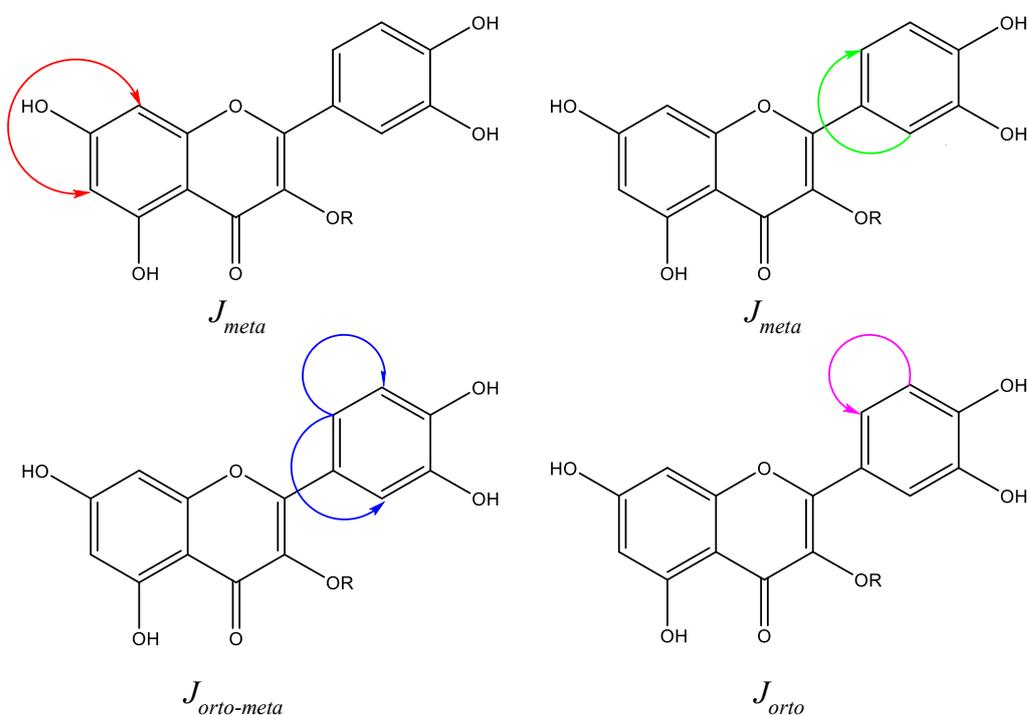
5.1.4.1. Substância **9** e **10**

As substâncias **9** e **10** serão discutidas no mesmo tópico em função das similaridades estruturais. A fração CMFA1-10-14P, posteriormente decodificada como substância **9**, apresentou-se como um sólido amorfo amarelado, insolúvel em H_2O , cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.4.1.3. Já a fração CMFA1-10-15-P2, demonstrou-se como um sólido amorfo alaranjado, onde o processo de obtenção foi descrito no item 4.4.1.3.1 e, após análises dos experimentos de RMN uni- e bidimensional, bem como o espectro de massas, foi possível identificar o componente majoritário dessa fração, posteriormente decodificada como substância **10**.

Em cada espectro de RMN de ^1H (figura 100 e 101; tabela 21), observou-se sinais de hidrogênios pertencentes a sistemas aromáticos, tais como dois dupletos indicando um acoplamento *meta* em δ 6,21 ($J = 2,1$ Hz, 1H) e 6,40 ($J = 2,1$ Hz, 1H), para a substância **9**, e em δ 6,19 ($J = 2,0$ Hz, 1H) e 6,39 ($J = 2,0$ Hz, 1H), para a substância **10**.

Os sinais característicos de acoplamentos *orto-meta*, em δ 7,63 (dd, $J = 8,4$ e $2,0$ Hz) e δ 7,65 (dd, $J = 8,5$ e $2,3$ Hz) foram visualizados para as substâncias **9** e **10**, respectivamente, além dos sinais com acoplamento *orto*, como um duplete em δ 6,88 ($J = 8,4$ Hz, 1H), assim como um duplete com integração para um hidrogênio, com J_{meta} ($2,0$ Hz) em δ 7,67, para a substância **9**. A substância **10** também apresentou os mesmos sinais em δ 6,87 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H) e δ 7,71 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H). Estes sinais são característicos de sistemas trissubstituídos, atribuídos ao anel B do flavonoide (figura 97).

Figura 97. Acoplamentos encontrados na quercetina.



A região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados apresentou-se muito congestionada, com sinais de δ 4,0 - 3,20, para ambas as substâncias. Todavia, foi possível identificar os sinais atribuíveis aos hidrogênios de carbonos anoméricos de duas unidades glicosídicas, em δ 5,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H) e 4,52 (d, $J = 0,6$ Hz) e em δ 5,40 (d, $J = 7,6$ Hz) e 4,76 (d, $J = 6,7$ Hz), de **9** e **10**, respectivamente. Para a determinação estrutural da substância **9**, somente os experimentos de RMN de ^{13}C e DEPT-135 já foram suficientes para obter uma proposta estrutural. Já para a substância **10**, foram necessários experimentos de RMN uni- e bidimensionais para a confirmação da estrutura.

Para a substância **9**, o espectro de RMN de ^{13}C (figura 102; tabela 22) exibiu 27 sinais, sendo que apenas 17 sinais foram visualizados no DEPT-135 (figura 104), como sendo 1 carbono metílico, 1 carbono metilênico, 15 carbonos metínicos e 10 carbonos quaternários. No espectro de RMN de ^{13}C (figura 104; tabela 22) da substância **10** foi possível observar 26 sinais majoritários, similares aos citados acima. Nestes experimentos observou-se sinais sugestivos de flavonoides glicosilados, no qual a presença da carbonila em δ 179,0 e 178,5 (substâncias **9** e **10**, respectivamente), aliado aos dados obtidos no RMN de ^1H , foi sugestivo de que a aglicona apresenta um padrão de substituição do tipo quercetina.

Na região de carbonos oxigenados, destacaram-se os sinais em δ 104,3 e 99,7 (**9**) e em δ 105,3 e 101,4 (**10**), atribuídos aos carbonos anoméricos de duas unidades glicosídicas, presentes em cada estrutura. Na substância **9**, os sinais em δ 102,4 (CH), 75,7 (CH), 78,1 (CH), 71,3 (CH), 77,2 (CH) e 68,5 (CH₂) foram compatíveis com os deslocamentos químicos para átomos de carbonos de uma unidade de glucose substituída em C-6'', uma vez que a literatura aponta que se o valor de deslocamento químico do C-6'' fosse δ 63,0, este não apresentaria ligado a outra unidade de açúcar, estando livre (AGRAWAL *et al.*, 1992). O deslocamento químico observado no RMN de ^1H de δ 1,12 (d, $J = 6,2$ Hz) e o sinal em δ 17,8 (espectro de RMN de ^{13}C), neste caso, indica a presença de uma unidade de açúcar com uma metila em C-6'', característico da rhamnose.

Diferentemente de **9**, a substância **10** não apresentou um sinal referente a uma metila, demonstrando que o açúcar não se trata da rhamnose. Além disso, foi possível observar um sinal em δ 61,9 indicando que o C-6'' de uma unidade glicosídica está livre. Então, os sinais de deslocamentos químicos, valores dos hidrogênios anoméricos (δ 5,40, d, $J = 7,6$ Hz; 4,76, d, $J = 6,7$ Hz) e correlações encontradas nos experimentos HSQC (figura 106) e HMBC, aliado aos dados da literatura (BOCK e THØGERSEN, 1983; BRUYN *et al.*, 1975; IWAOKA *et al.*, 2009; MARKHAN *et al.*, 1977), permitiram a proposição da presença de unidades de galactose e xilose.

Para comprovar a posição das unidades glicosídicas na substância **10** foi realizado o experimento de RMN bidimensional HBMC (Figura 106). A correlação entre o C-3 (δ 135,1) da aglicona e o hidrogênio anomérico da galactose (δ 5,40) (figura 107) sugere que a unidade glicosídica está ligada no C-3 do flavonoide, já o deslocamento químico do carbono anomérico da galactose (δ 101,5) sugere que esta ligação é *O*-glicosídica (AGRAWAL & BANSAL, 1989). A correlação entre o hidrogênio anomérico da xilose (δ 4,76) e o C-2'' em δ 80,1 (da

galactose), comprovam a ligação do carbono-1 da xilose com o carbono-2 da galactose (figura 107), incomum em flavonoides glicosilados.

Sendo assim, a partir da análise dos dados de RMN uni- e bidimensional e dos dados obtidos no espectro de massas, aliado às informações disponíveis na literatura (LI *et al.*, 2008; IWAOKA *et al.*, 2009), foi possível identificar que as substâncias **9** e **10** (apresentadas nas figuras 98 e 99) como os flavonoides glicosilados quercetina 3-*O*-[α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (rutina) e quercetina 3-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo, respectivamente. Trata-se do primeiro relato da substância **10** em Rubiaceae, bem como o primeiro relato do flavonoide rutina no gênero *Calycophyllum*.

Figura 98. Substância **9**, rutina.

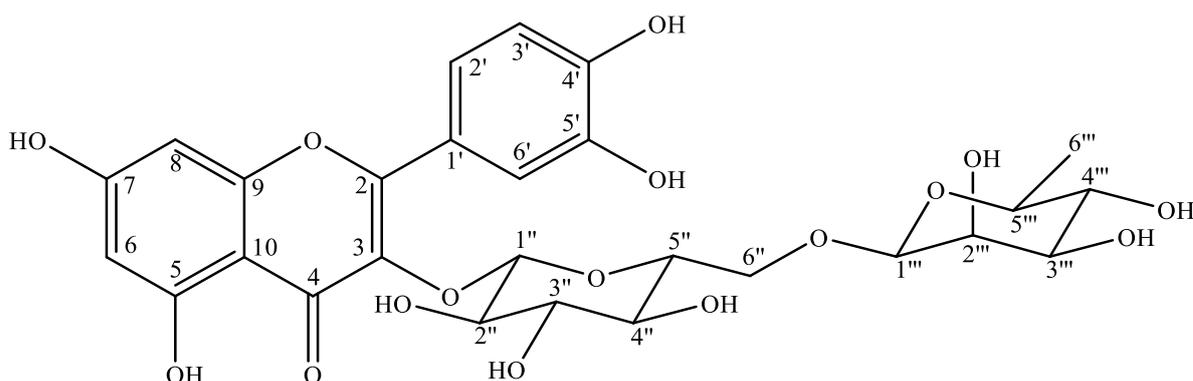


Figura 99. Substância **10**, quercetina 3-*O*-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo.

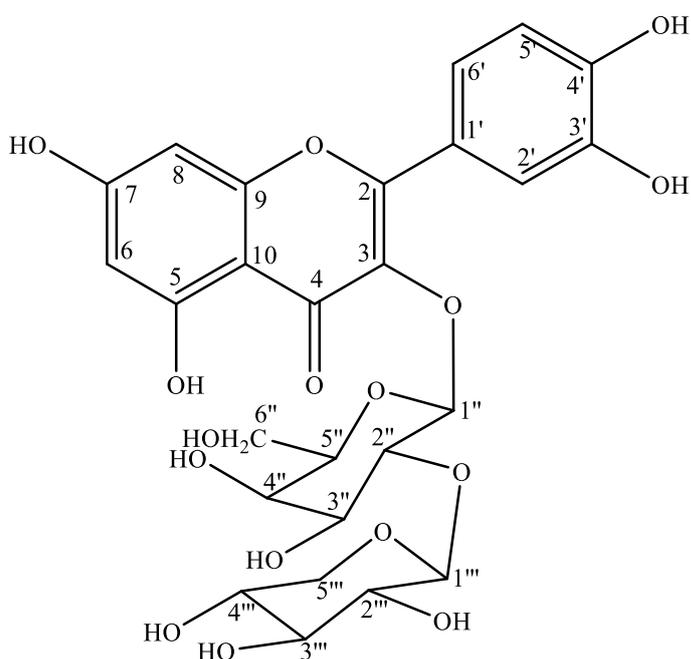


Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância 9.

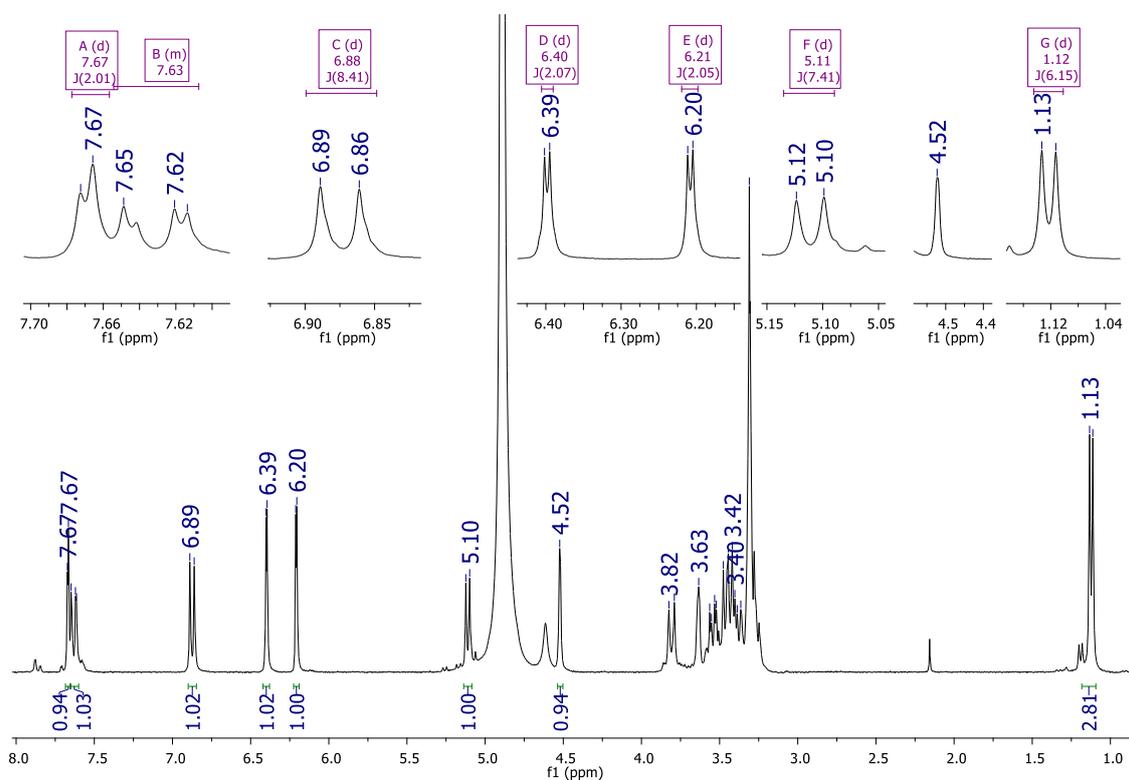


Figura 101. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância 10.

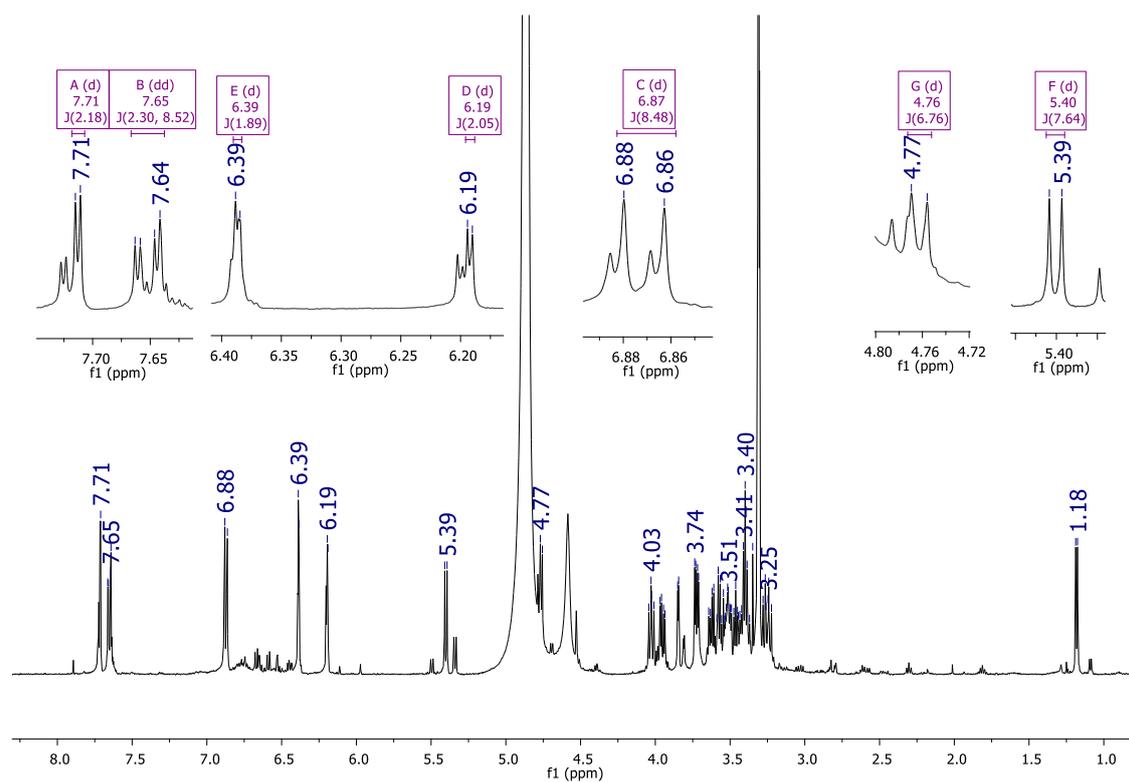


Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **9**.

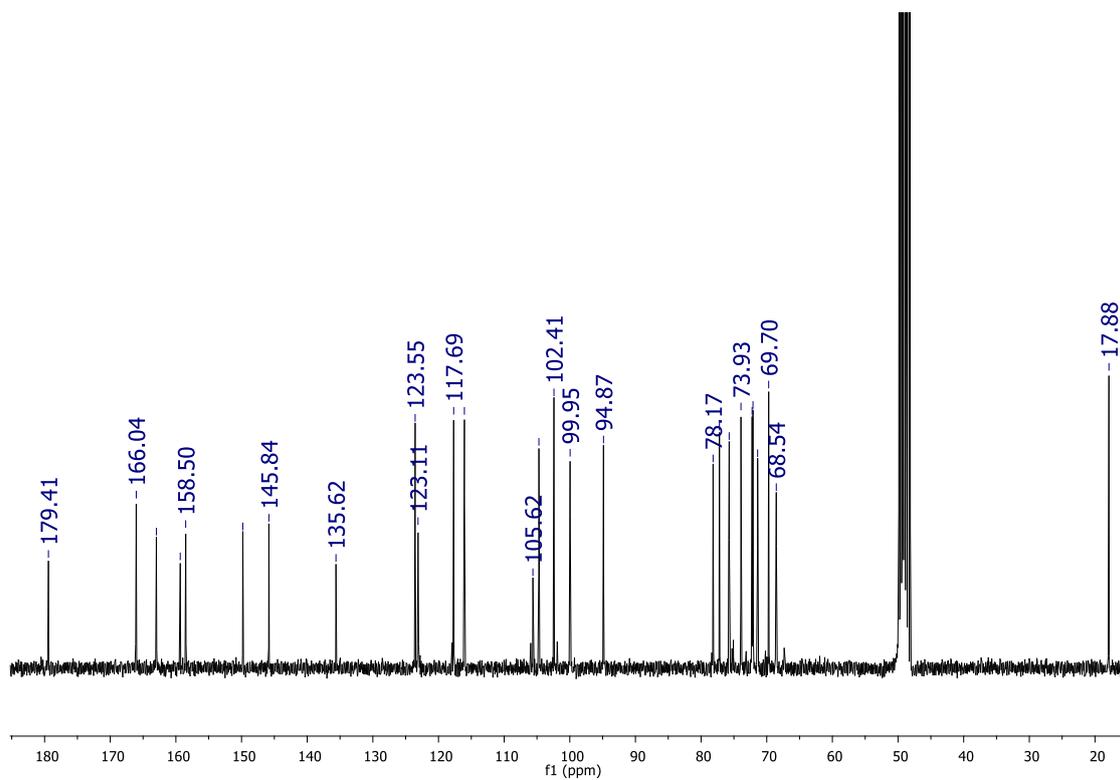


Figura 103. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD_3OD) da substância **9**.

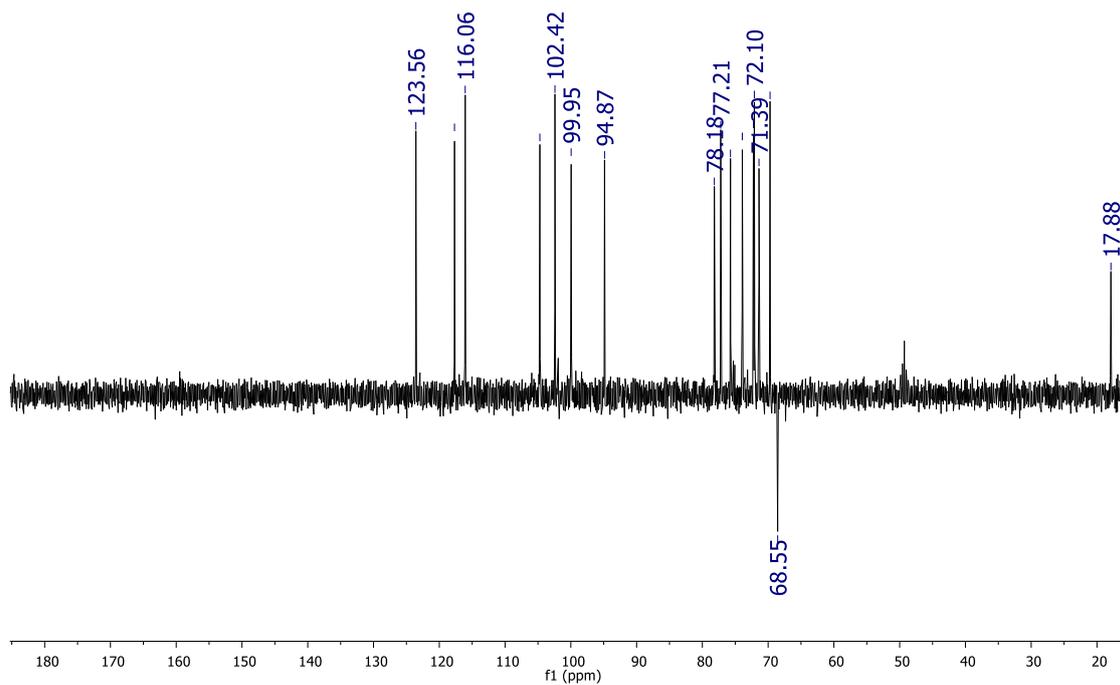


Figura 104. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **10**.

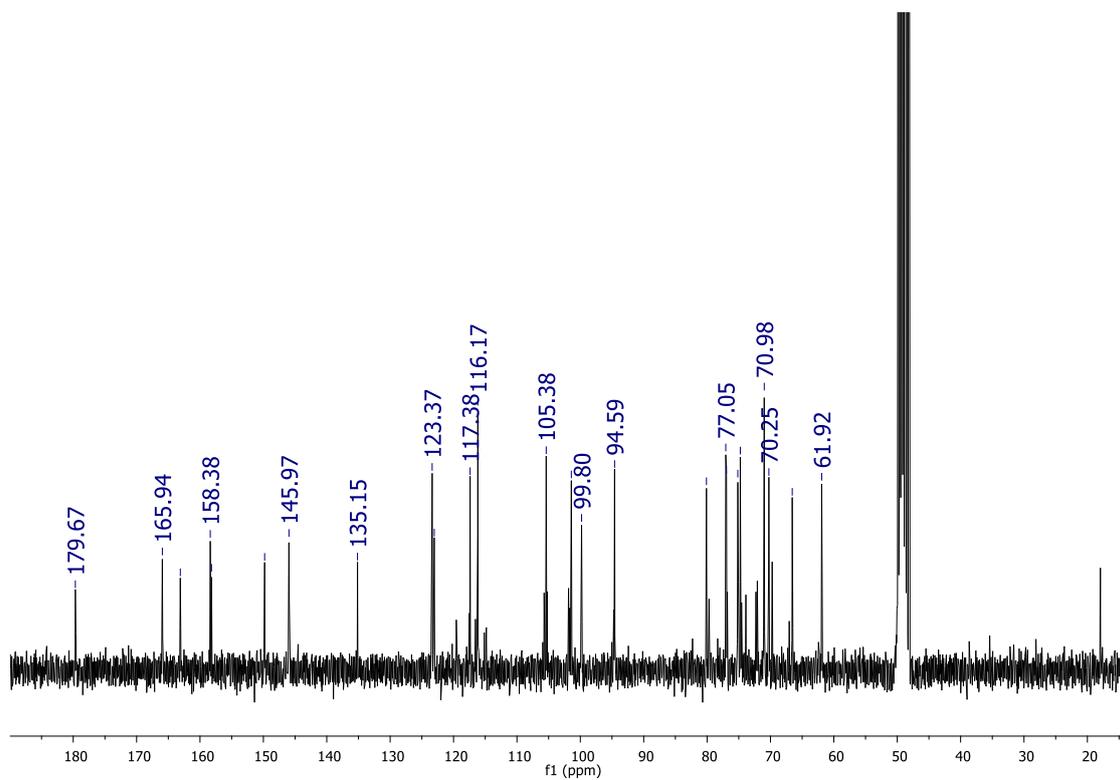


Figura 105. Espectro HQSC (75 MHz, CD_3OD) da substância **10**.

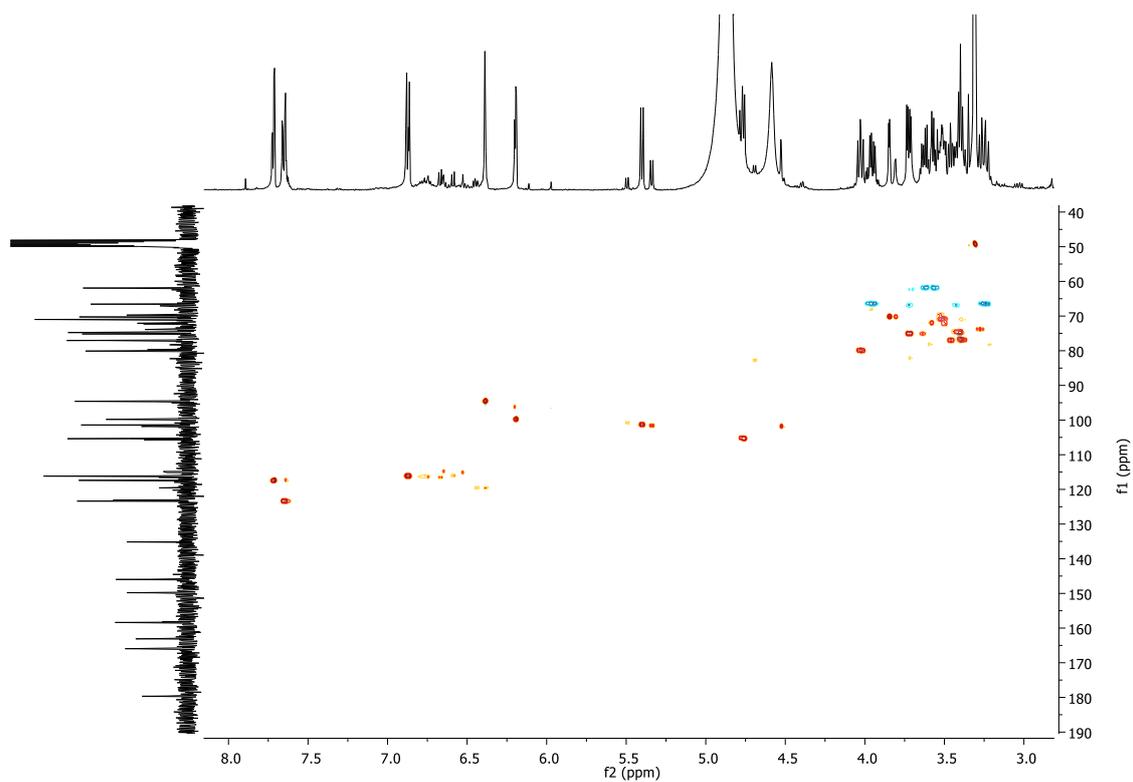


Figura 106. Espectro HMBC (75 MHz, CD₃OD) da substância 10.

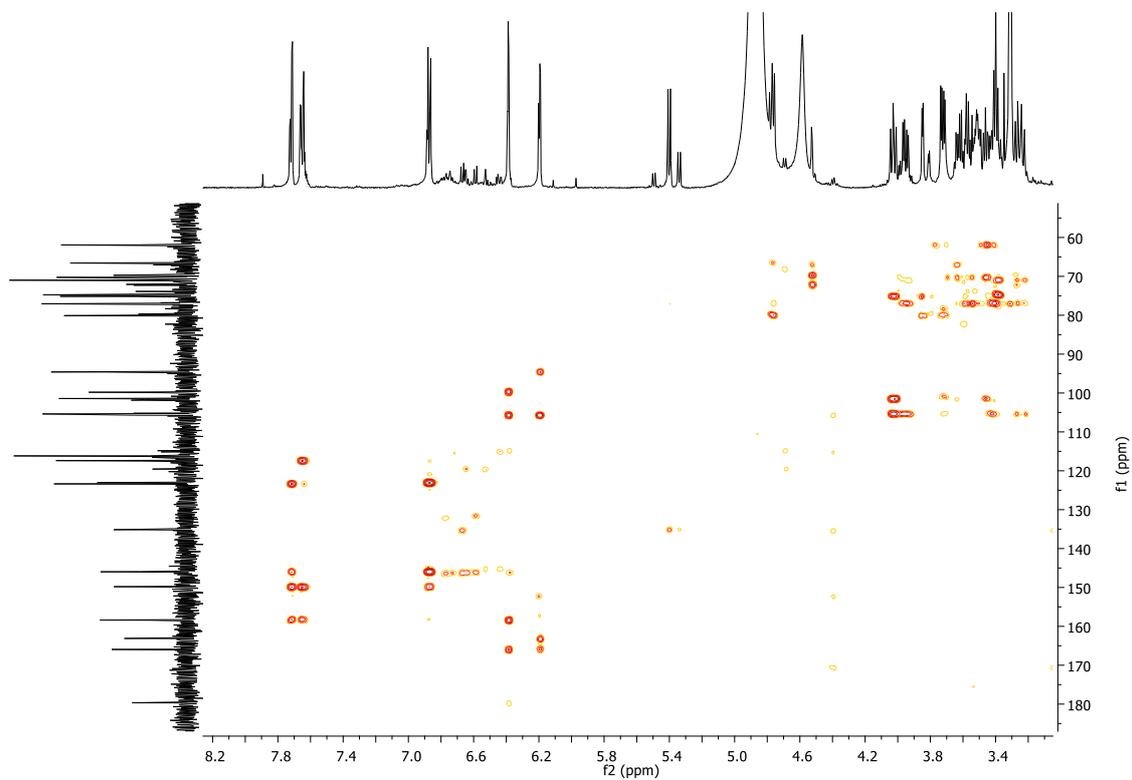


Figura 107. Expansões do HMBC (¹H, ¹³C, 500/125 MHz, CD₃OD) da substância 10.

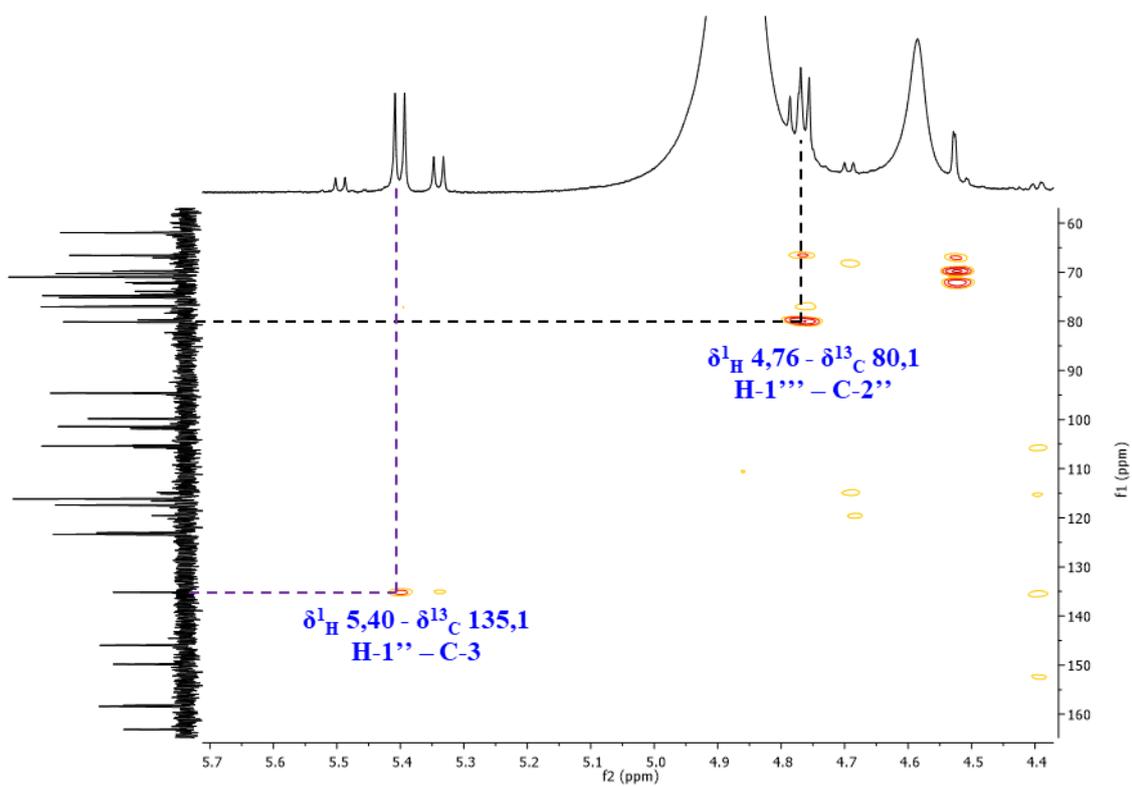


Tabela 21. Dados de RMN de ^1H das substâncias **9** e **10**, em comparação com a literatura (LI *et al.*, 2008; IWAOKA *et al.*, 2008), ambos em CD_3OD .

	Rutina ^a	Substância 9	Quercetina 3-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo ^b	Substância 10
C/H	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,21 (d, $J = 2,2$, 1H)	6,21 (d, $J = 2,1$, 1H)	6,19 d ($J = 1,9$, 1H)	6,19 d ($J = 2,0$, 1H)
7	-	-	-	-
8	6,40 (d, $J = 2,2$, 1H)	6,40 (d, $J = 2,1$, 1H)	6,38 d ($J = 1,9$, 1H)	6,39 d ($J = 2,0$, 1H)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,67 (d, $J = 2,5$, 1H)	7,67 (d, $J = 2,0$, 1H)	7,71 d ($J = 2,3$, 1H)	7,71 d ($J = 2,3$, 1H)
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	6,87 (d, $J = 8,3$, 1H)	6,88 (d, $J = 8,4$, 1H)	6,87 d ($J = 8,7$, 1H)	6,87 (d, $J = 8,5$, 1H)
6'	7,63 (dd, $J = 8,6$, 2,2, 1H)	7,63 (dd, $J = 8,4$, 2,1, 1H)	7,64 dd ($J = 8,7$, 2,3, 1H)	7,65 dd ($J = 8,5$, 2,3, 1H)
1''	5,11(d, $J = 7,7$, 1H)	5,11 (d, $J = 7,4$, 1H)	5,41 (d, $J = 7,4$, 1H)	5,40 (d, $J = 7,6$, 1H)
2''	-	-	4,03 (dd, $J = 7,4$, 9,6, 1H)	4,03 (dd, $J = 9,5$, 7,7, 1H)
3''	-	-	3,72 (dd, $J = 9,6$, 3,4, 1H)	3,72 (dd, $J = 9,5$, 3,5, 1H)
4''	-	-	3,85 (dd, $J = 3,4$, 1,5, 1H)	3,85 (d, $J = 3,2$, 1H)
5''	-	-	3,47 (m, 1H)	3,46 (m, 1H)
6''	-	-	3,63 (dd, $J = 11,4$, 6,0, 1H)	3,56 (m, 1H)
			3,57 (dd, $J = 11,4$, 6,4, 1H)	3,61 (m, 1H)
1'''	4,52 (d, $J = 1,5$, 1H)	4,52 (d, $J = 0,6$, 1H)	4,77 (Unresolved*)	4,76 (d, $J = 6,7$, 1H)
2'''	-	-	3,41 (m, 1H)	3,40 (m, 1H)
3'''	-	-	3,41 (m, 1H)	3,39 (m, 1H)
4'''	-	-	3,51 (m, 1H)	3,51 (m, 1H)
5'''	-	-	3,24 dd ($J = 11,7$, 9,1, 1H)	3,25 (m, 1H)
			3,95 dd ($J = 11,7$, 4,8, 1H)	3,95 (dd, $J = 11,7$, 4,9, 1H)
6'''	1,12 (d, $J = 6,1$, 3H)	1,12 (d, $J = 6,2$, 3H)	-	-

Legenda: ^a: LI *et al.*, 2008; ^b: IWAOKA *et al.*, 2008.

Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **9** e **10**, em comparação com a literatura (LI *et al.*, 2008; IWAOKA *et al.*, 2008), ambos em CD_3OD .

Rotina ^a		Substância 9	quercetina 3-O-[β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo ^b	Substância 10
C/H	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	159,4	158,5	158,2	158,1
3	135,7	135,6	135,2	135,1
4	179,5	179,4	179,6	179,6
5	163,0	162,9	163,1	163,1
6	99,9	99,9	99,8	99,8
7	166,1	166,0	165,8	165,9
8	94,9	94,8	94,6	94,5
9	158,6	159,3	158,3	158,3
10	105,7	105,6	105,8	105,7
1'	123,2	123,1	123,1	123,0
2'	116,1	116,0	117,4	117,3
3'	145,9	145,8	145,9	145,9
4'	149,9	149,8	149,8	149,8
5'	117,7	117,6	116,2	116,1
6'	123,6	123,5	123,3	123,3
1''	104,8	104,7	101,5	101,4
2''	75,8	75,7	80,1	80,1
3''	78,2	78,1	75,2	75,1
4''	71,4	71,3	70,3	70,2
5''	77,3	77,2	77,0	77,0
6''	68,6	68,5	62,0	61,9
1'''	102,5	102,4	105,3	105,3
2'''	72,3	72,2	74,7	74,7
3'''	72,1	72,1	76,9	76,9
4'''	74,0	73,9	71,0	70,9
5'''	69,8	69,7	66,5	66,5
6'''	17,9	17,8	-	-

^a: LI *et al.*, 2008; ^b: IWAOKA *et al.*, 2008.

5.1.4.2. Substância 13 e 14

As substâncias **13** e **14** apresentam características estruturais similares, então serão discutidas em conjunto neste tópico. A fração CMFA3-8-7, posteriormente decodificada como substância **13**, demonstrou-se como um sólido amorfo amarelado, insolúvel em H_2O , cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.4.3. Já a fração CMFA3-8-10, apresentou-se como um sólido amorfo alaranjado, no qual o processo de obtenção foi descrito no item 4.4.3 e, após análises dos experimentos de RMN uni- e bidimensional, bem como o espectro de massas, foi possível identificar o componente majoritário dessa fração, posteriormente decodificada como substância **14**.

Nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135, observou-se sinais característicos de flavonoides glicosilados, como os discutidos anteriormente, sendo que a substância **13** também apresentou a quercetina como aglicona.

Os espectros de RMN de ^1H (figuras 110 e 111; tabela 23), apresentaram sinais de hidrogênios ligados em anéis aromáticos, como os dupletos com J_{meta} (2,1 e 2,0 Hz) e integração para um hidrogênio em δ 6,21 e 6,40 (**13**) e em δ 6,21 e 6,39 (**14**). Para a substância **13**, observou-se um duplo-duplete com $J_{orto-meta}$ (2,0 e 8,4 Hz) em δ 7,63, um duplete com acoplamento *meta* em δ 6,88 (1H), além de um duplete com J_{orto} e integração para um hidrogênio em δ 7,67, característicos de sistemas trissubstituídos, atribuído ao anel B 3,4-dihidroilado. Entretanto, para a substância **14**, dentre os sinais na região de hidrogênios ligados a anel aromático, foi possível visualizar dois dupletos J_{orto} (8,8 Hz) em δ 7,77 e 6,94, com integração para dois hidrogênios, sendo possível inferir que o anel B é *para*-hidroilado e apresenta simetria. Após a análise dos dados, pode-se identificar o flavonol quercetina como a parte aglicona da substância **13** e o flavonol canferol como aglicona da substância **14**.

Nas duas substâncias, a região de δ 3,20 a 3,80, característica de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, apresentou-se congestionada, sugerindo a presença de uma unidade glicosídica. Em δ 4,52 (d, $J = 0,6$ Hz) e em δ 5,38 (d, $J = 1,4$ Hz), foi possível identificar os sinais referentes aos hidrogênios anoméricos, e a presença de um duplete, com integração para três hidrogênios, em δ 1,12 (d, $J = 6,2$) (**13**) e 0,92 (d, $J = 5,6$) (**14**), referente a metila (C-6'') da rhamnose, aliado as constantes de acoplamentos do hidrogênios anoméricos, indica que a unidade glicosídica se trata de um α -L-ramnosídeo.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (figuras 112 e 114, **13** e **14**; tabela 24) e DEPT-135 (figura 113), foram observados 21 sinais majoritários (no espectro de RMN ^{13}C) e 11 sinais no DEPT-135 (1 carbono metílico, 10 carbonos metínicos e 10 carbonos quaternários) para substância **13**. No DEPT-135 da substância **14** não foi possível identificar todos os sinais, em virtude da baixa concentração na amostra analisada, ainda assim, o espectro de RMN de ^{13}C possui 20 sinais atribuíveis a esta substância (o sinal em 131,9 foi atribuído aos C-2' e C-6'), como consta na tabela 24. Os sinais em δ 131,9 (C-2'), 116,5 (C-3'), 163,2 (C-4'), 116,5 (C-5') e 131,9 (C-6') corroboraram com os valores de deslocamentos químicos para a aglicona com padrão de oxigenação do caferol.

Assim como no espectro de RMN de ^1H , no espectro de ^{13}C foi possível observar diversos sinais na região de carbonos oxigenados características da presença de uma unidade

glicosídica. Os sinais em δ 103,4 (CH), 71,9 (CH), 72,0 (CH), 73,2 (CH), 71,8 (CH) e 17,6 (CH₃), para **13**, e em δ 103,5, 72,1, 72,0, 73,1, 71,9 e 17,6, para **14**, foram comparados com a literatura, sendo compatíveis com os valores de deslocamento químico para átomos de carbono de uma unidade de rhamnose. Esta proposta foi corroborada pela presença um sinal de carbono metílico em δ 17,6 (13) e 17,6 (14) pertencente ao C-6 da rhamnose. Ademais, os hidrogênios metílicos em δ 1,12 (13) e 0,92 (14), além dos dupletos em δ 4,52 e 5,38 com uma constante de acoplamento de 0,6 e 1,4 Hz, para **13** e **14**, respectivamente, são compatíveis com a α -L-ramnose (BOCK e THØGERSEN, 1983; BRUYN *et al.*, 1975; MARKHAN *et al.*, 1977).

O espectro de massas de alta resolução de **13** (figura 115) e **14** (figura 116), ambos no modo negativo, demonstrou íons de $[M-H]^-$ a m/z 447,0983 para **13** e m/z 431,0990 para **14**, indicando que as estruturas apresentam fórmulas moleculares C₂₁H₂₀O₁₁ e C₂₁H₂₀O₁₀. O fragmento em m/z 301 indicam a presença de flavonoide glicosilado com uma aglicona do tipo quercetina para **13**, e o fragmento a m/z 284, indica não só que o flavonoide possui uma aglicona do tipo canferol, mas também, que ramnose está ligada por C-3 no flavonoide, para a substância **14** (HVATTUM *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2005).

A análise dos dados da literatura e dados obtidos nos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C e DEPT-135, juntamente com o espectro de massas, resultou na identificação dos flavonoides glicosilados: quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina), para a substância **13** (figura 108) e Canferol 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (Afzelina), para **14** (figura 109), relatando-os pela primeira vez no gênero *Calycophyllum*.

Figura 108. Substância **13**, quercitrina.

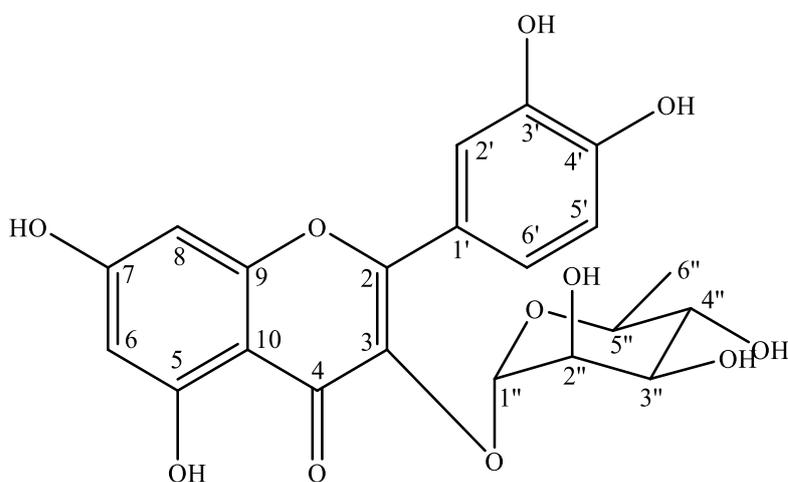


Figura 109. Substância 14, Afzelina.

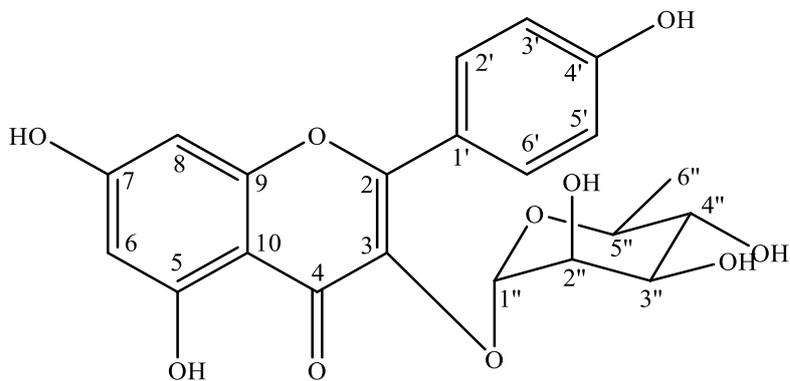


Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância 13.

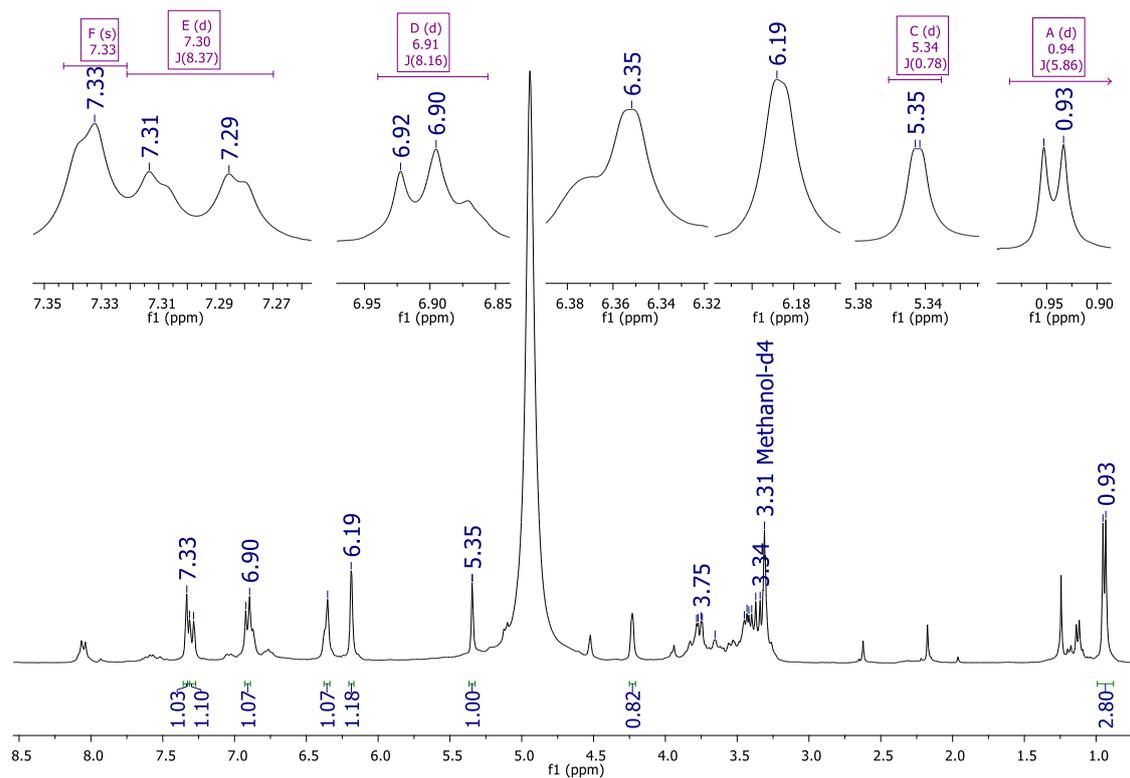


Figura 111. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **14**.

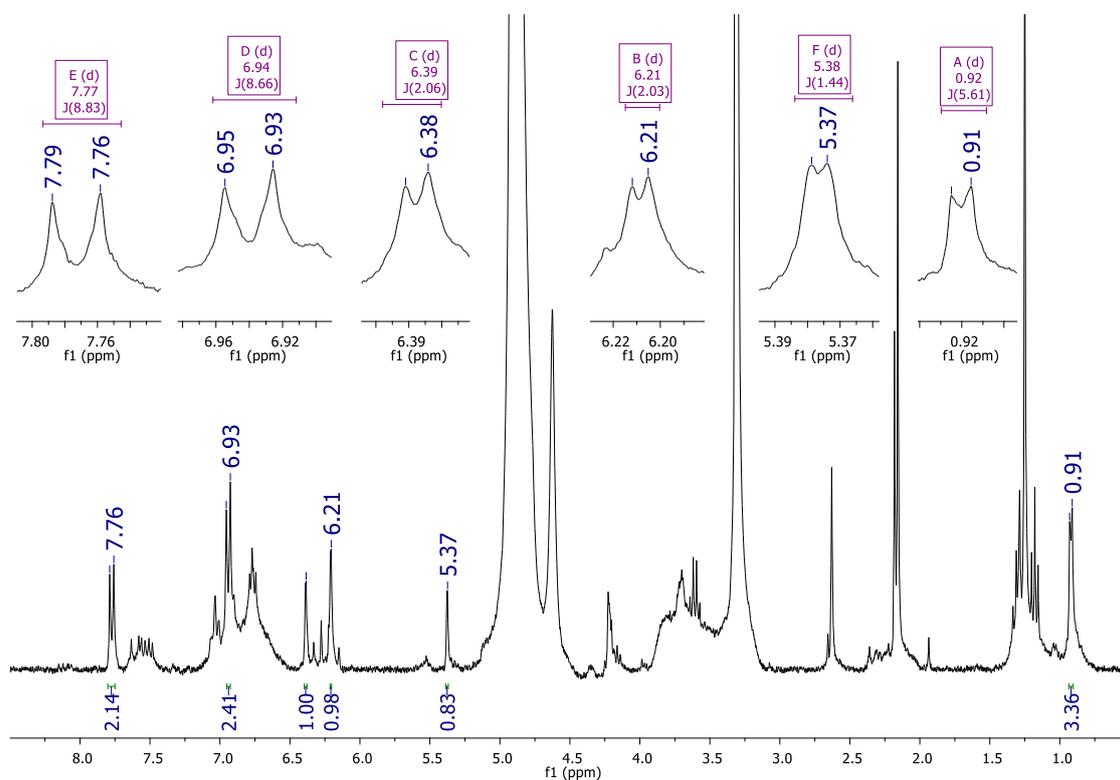


Figura 112. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **13**.

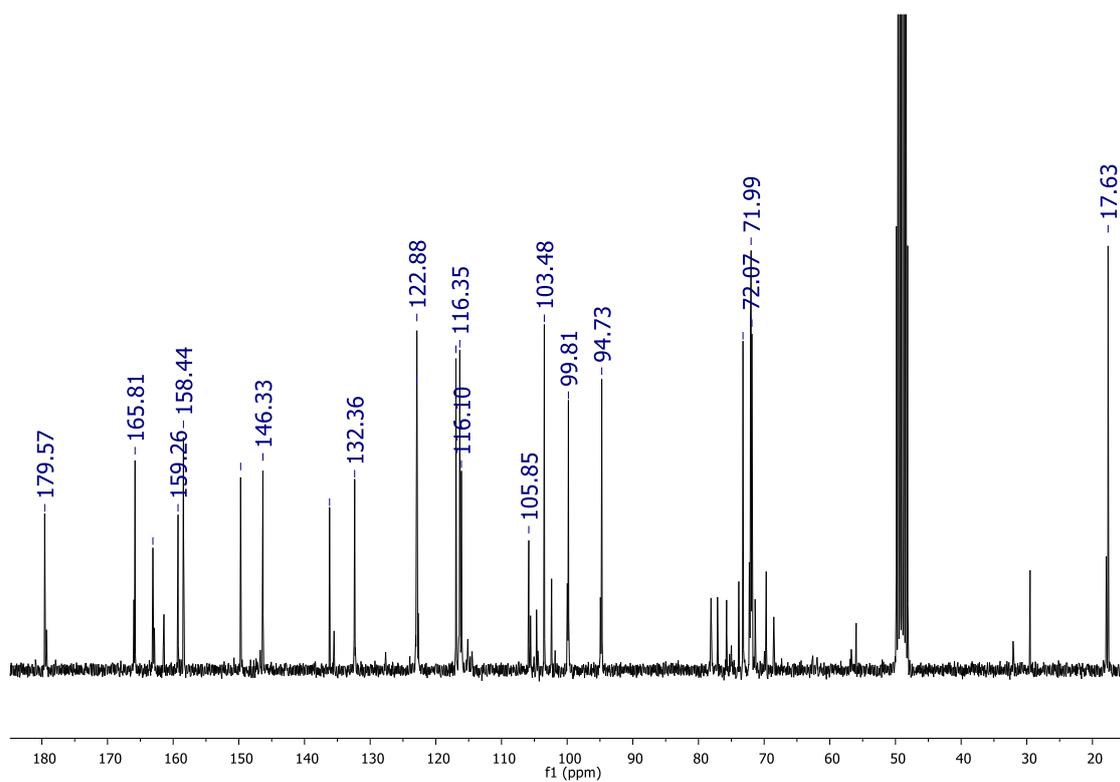


Figura 113. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD₃OD) da substância **13**.

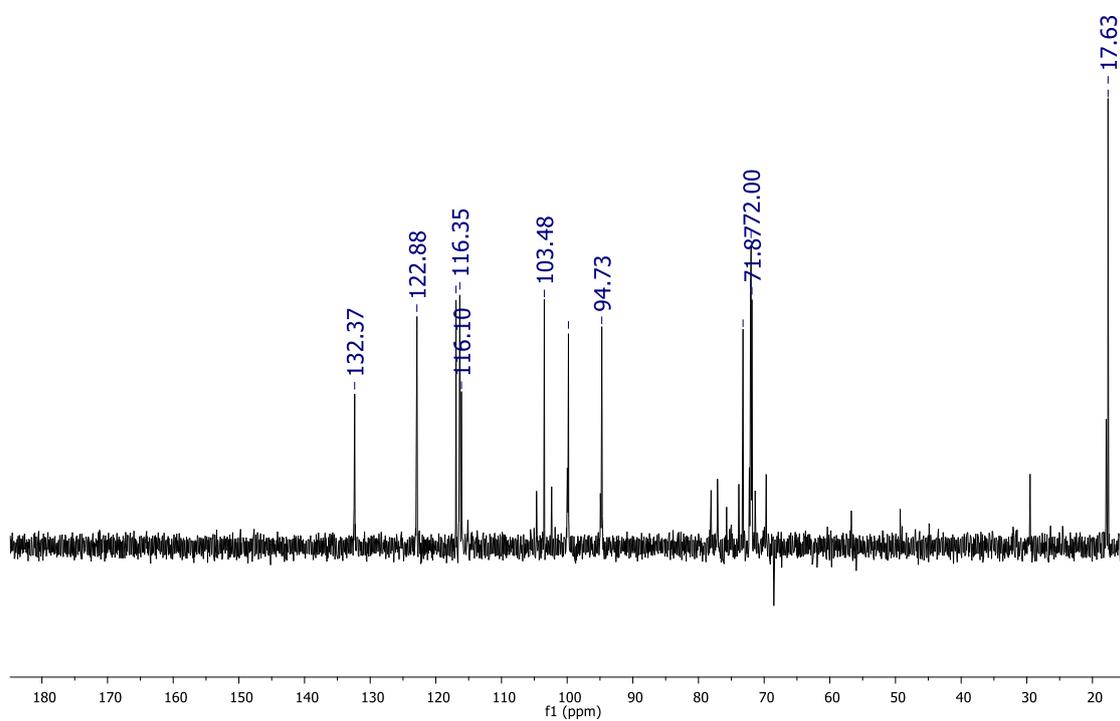


Figura 114. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) da substância **14**.

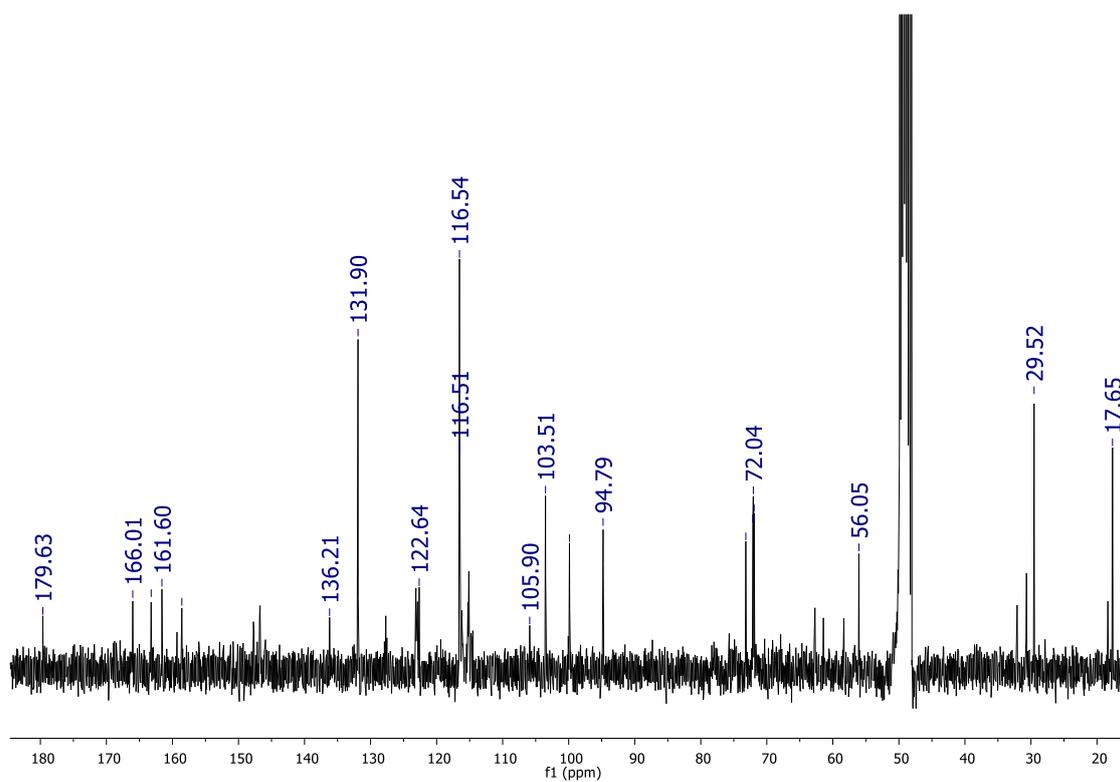


Figura 115. Espectro de massas (MS e MS², modo negativo) da substância **13**.

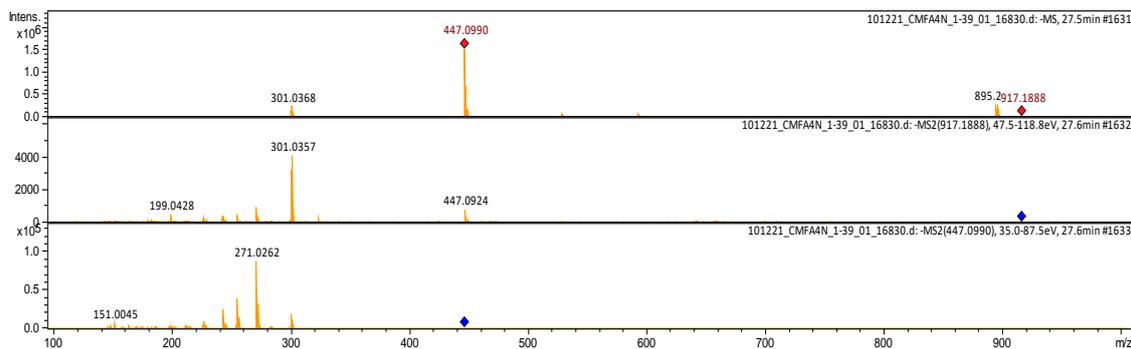


Figura 116. Espectro de massas (MS e MS², modo negativo) da substância **14**.

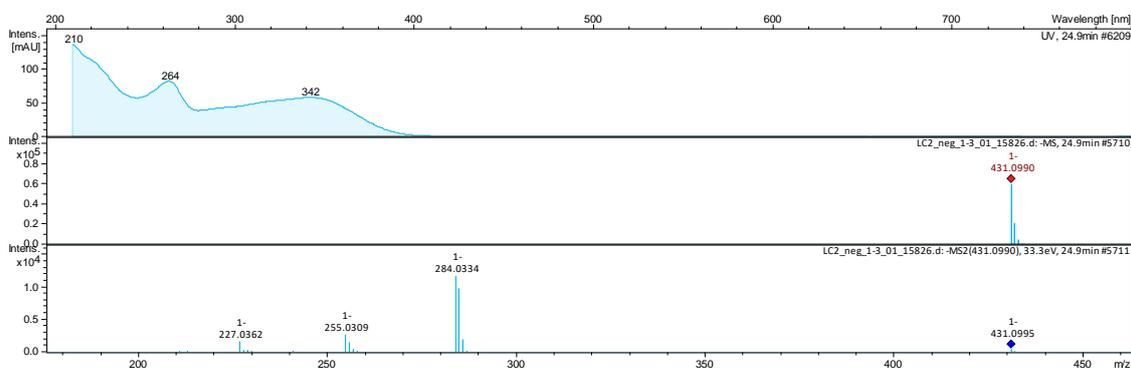


Tabela 23. Dados de RMN de ^1H das substâncias **13** e **14**, em comparação com a literatura (YANG *et al.*, 2010), ambos em CD_3OD .

	Quercitrina	Substância 13	Afzelina	Substância 14
C/H	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{H} (m, J Hz)
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,21 (d, $J = 2,2$, 1H)	6,21 (d, $J = 2,1$, 1H)	6,15 (d, $J = 2,0$, 1H)	6,21 (d, $J = 2,0$, 1H)
7	-	-	-	-
8	6,40 (d, $J = 2,2$, 1H)	6,40 (d, $J = 2,1$, 1H)	6,31 (d, $J = 2,0$, 1H)	6,39 (d, $J = 2,0$, 1H)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,67 (d, $J = 2,5$, 1H)	7,67 (d, $J = 2,0$, 1H)	7,73 (dd, $J = 8,8$, 2,8, 1H)	7,77 (dl, $J = 8,8$, 1H)
3'	-	-	6,89 (dd, $J = 8,4$, 2,8, 1H)	6,94 (d, $J = 8,8$, 1H)
4'	-	-	-	-
5'	6,87 (d, $J = 8,3$, 1H)	6,88 (d, $J = 8,4$, 1H)	6,89 (dd, $J = 8,4$, 2,8, 1H)	6,94 (d, $J = 8,8$, 1H)
6'	7,63 (dd, $J = 8,6$, 2,2, 1H)	7,63 (dd, $J = 8,4$, 2,1, 1H)	7,73 (dd, $J = 8,8$, 2,8, 1H)	7,77 (d, $J = 8,8$, 1H)
1''	4,52 (d, $J = 1,5$, 1H)	4,52 (d, $J = 0,6$, 1H)	5,35 (s, 1H)	5,38 (d, $J = 1,4$, 1H)
2''	3,96 (sl, 1H)	4,23 (sl, 1H)	4,21 (sl, 1H)	4,23 (sl, 1H)
3''	3,33 (m, 1H)	3,97 – 3,32 (m, 1H)	3,71 (m, 1H)	-
4''	3,09 (m, 1H)	3,97 – 3,32 (m, 1H)	3,33 (m, 1H)	-
5''	3,09 (m, 1H)	3,97 – 3,32 (m, 1H)	3,33 (m, 1H)	-
6''	1,12 (d, $J = 6,1$, 3H)	1,12 (d, $J = 6,2$, 3H)	0,91 (d, $J = 6,0$, 3H)	0,92 (d, $J = 5,6$, 3H)

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **13** e **14**, em comparação com a literatura (YANG *et al.*, 2010), ambos em CD_3OD .

	Quercitrina	Substância 13	Afzelina	Substância 14
C/H	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	159,2	159,2	158,5	158,5
3	136,1	136,1	136,2	135,6
4	179,4	179,5	179,5	179,6
5	162,9	163,0	161,4	161,6
6	99,7	99,8	99,8	99,9
7	165,7	165,8	165,7	166,0
8	94,7	94,7	94,7	94,8
9	158,4	158,4	159,2	159,3
10	105,8	105,8	105,9	105,9
1'	122,9	122,9	122,6	122,6
2'	116,9	116,9	131,9	131,9
3'	146,3	146,3	116,5	116,5
4'	149,6	149,7	163,1	163,2
5'	116,3	116,3	116,5	116,5
6'	122,7	122,8	131,9	131,9
1''	103,4	103,4	103,5	103,5
2''	71,9	71,9	72,1	72,1
3''	72,0	72,0	72,0	72,0
4''	73,2	73,2	73,2	73,1
5''	71,8	71,8	71,8	71,9
6''	17,7	17,6	17,6	17,6

5.1.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA PROANTOCIANIDINA: substância 12

A substância **12** foi obtida a partir da fração CMFA2-5-6-P3 como um sólido amorfo alaranjado, cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.4.2.1.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentaram sinais característicos para um biflavonoide. No espectro de RMN de ^1H (figuras 118 e 119; tabela 25), foram visualizados um duplo-triplete em δ 3,68 ($J = 16,0, 8,0$ Hz, 1H), dois simpletos largos em δ 3,91 (1H) e 5,36 (1H) e um duplete em 3,87 ($J = 9,2$ Hz, 1H), atribuídos aos hidrogênios ligados à carbonos oximetínicos (C-3'', C-3, C-2 e C-2'', respectivamente), e um simpleto largo em δ 4,59, com integração para um hidrogênio, referente ao hidrogênio metínico (H-4), posição em que é ligada a outra unidade de flavan-3-ol (4 \rightarrow 8 ou 4 \rightarrow 6). Este conjunto de sinais são típicos do anel C de flavanas diméricas. Além disso, foram observados dois duplo-dupletos em δ 2,41 ($J = 16,1$ e 10,1 Hz, 1H) e 3,05 ($J = 16,1$ e 6,3 Hz, 1H), atribuído aos hidrogênios diasterotópicos do carbono metilênico (C-4'), presente em catequinas e epicatequinas.

A região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos exibiu um sistema complexo de sinais, sendo possível distinguir dois simpletos em δ 5,97 (1H) e 6,13 (1H), atribuídos aos anéis pentasubstituídos (A e A'). Verificou-se dois dupletos com constante de acoplamento *meta* em δ 6,70 ($J = 1,6$ Hz, 1H) e 6,62 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H) referentes aos H-2' e H-2''', respectivamente, além de um duplo-duplete em δ 6,55 (dd, $J = 9,0$ e 1,6 Hz, 1H) com $J_{orto-meta}$ referente aos H-6' e um multiplete em δ 6,53, com integração para um hidrogênio (H-6'''). Ainda assim, foi possível observar dois dupletos com acoplamento *orto* em δ 6,69 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), atribuído ao H-5' e em 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), com integração para 2H, sugerindo a presença de dois sinais com o mesmo deslocamento químico, sendo um referente ao H-5''', característico de anéis trissubstituídos, relativos aos dois anéis B do dímero. Ademais, foi possível visualizar demais sinais em δ 2,32 (dd, $J = 15,1$ e 7,1 Hz, 1H) e 2,59 (dl, $J = 15,1$ Hz, 1H) atribuídos aos hidrogênios diasterotópicos de um CH₂, um hidrogênio metínico em δ 3,94 (dl, $J = 7,1$ Hz, 1H), além de outros sinais na região de hidrogênios ligados a sistemas aromáticos, como: um duplete com J_{meta} em δ 6,53 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), um duplete com J_{meta} em δ 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H) encoberto por outros sinais e um duplo-duplete com $J_{orto-meta}$ em δ 6,46 (dd, $J = 9,0, 2,0$ Hz, 1H), pertencentes aos H-2''', H-5'''' e H-6'''' de outro anel aromático 1,3,4-trissubstituído.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (figura 120; tabela 25), foram visualizados 38 sinais, sendo que apenas 18 sinais apareceram no DEPT-135 (sendo 2 carbonos metilênico, 16 carbonos metínicos e 20 carbonos desprovidos de hidrogênio), como demonstra a figura 121.

Foram observados quatro sinais de carbonos oximetínicos em δ 77,0, 73,1, 83,5 e 69,9, atribuídos aos C-2, C-3, C-2'' e C-3'', respectivamente, bem como, dois sinais na região de carbonos alifáticos: em δ 37,1 e 30,8, respectivos ao carbono metínico (C-4) e metilênico (C-4''). O espectro exibiu 30 sinais de carbonos referentes a um dímero de flavan-3-ol, entretanto, observou-se outros 9 sinais, sendo 6 sinais pertencentes a um anel aromático (δ 136,2, 119,4, 116,0, 144,9, 146,1 e 115,4), sinais de carbonos metínicos (δ 35,2) e metilênicos (δ 37,8) e um sinal de uma carbonila de éster em δ 171,5. Com bases nesses dados, aliado ao espectro de RMN de ^1H , foi possível propor a presença de uma unidade fenilpropanoídica, ligada no biflavonoide.

As atribuições dos hidrogênios aos respectivos carbonos foram feitas através da análise do espectro de HSQC (figura 122), e as posições relativas na estrutura de **12** foram confirmadas pelo espectro de HMBC (figura 123), onde as principais correlações se encontram nas figuras 124-127. O sinal em δ 171,5 é sugestivo da presença de uma carbonila de éster e não uma carboxila, e o fato do C-8 ser desprovido de hidrogênio, aliada a correlação encontrada entre o H-7'''' (δ 3,94) e C-8 (δ 105,1) (figura 125), propõem a formação de um anel lactônico, cuja união com a unidade de flavan-3-ol (A, B e C), se dá pela carbonila e a hidroxila em C-7, além de outra ligação por C-7'''' \rightarrow C-8. A ligação entre as unidade duas unidades (C-4 \rightarrow C-8'') foi confirmada pela presença de uma correlação entre os sinais em δ 4,59 e 108,7, como na figura 127. No experimento NOESY (figura 129), observou-se um efeito NOE entre os H-2 (δ 5,36) e H-3 (δ 3,91), demonstrando que o flavan-3-ol (A, B, C) se trata de uma unidade de *epi*-catequina (figura 130).

A comparação com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **12** com dados da literatura (HSU, *et al.*, 1985; NONAKA, *et al.*, 1982) indicou a possibilidade um dímero de flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) de quatro substâncias diastereoisomérica: a cinchonaína IIa, cinchonaína IIb, kandelina A-2 e a kandelina A-1 (figura 128). Entretanto, a constante de acoplamento observada para H-2'' ($J = 9,2$ Hz), aliada ao deslocamento químico do C-2'' (δ 83,5) e dados disponíveis na literatura (FLETCHER, *et al.*, 1977; HSU, *et al.*, 1985), sugere a presença de uma unidade de catequina (C-2 e C-3: *trans*), permitindo a exclusão das propostas cinchonina IIa e cinchonina IIb.

HSU e colaboradores (1985) descrevem que a diferença entre as kandelinas A-1 e A-2 é a presença do H-2 como um simpleto estreito (kandelina A-1) ou largo (kandelina A-2), no espectro de RMN de ^1H de **12**, foi observado a presença de um simpleto largo em δ 5,36, entretanto, a orientação do anel foi proposta com base no espectro de NOESY, onde foi possível

visualizar um NOE entre os H-7'''' (δ 3,94) e H-2' (δ 6,70) (figura 131), sugerindo que H-7'''' tem a mesma orientação que o anel aromático da unidade de epicatequina e portanto, a mesma presente na estrutura da kandelina A-2 (CHEN, *et al.*, 1993).

A análise do espectro de massas, obtido no modo positivo (figura 133), indicou a presença de um íon a m/z 741,1804 $[M+H]^+$ correspondente a fórmula molecular $C_{39}H_{33}O_{15}$, para uma razão m/z calculada de 741,1804 (erro de 1,3 ppm), compatível com a fórmula molecular e m/z encontrado nas kandelinas e cinchonainas (LONGHINI *et al.*, 2013), corroborando a proposta discutida até o momento.

Sendo assim, a análise dos dados supracitados e comparações com a literatura (HSU, *et al.*, 1985) possibilitou a determinação estrutural da substância **12** (apresentada na figura 117), tratando-se da proantocianidina kandelina A-2, substância relatada pela primeira vez em Rubiaceae, além deste ser o primeiro estudo a descrever completamente os dados de RMN uni- e bidimensional da kandelina A-2.

Figura 117. Substância 12, Kandelina A-2.

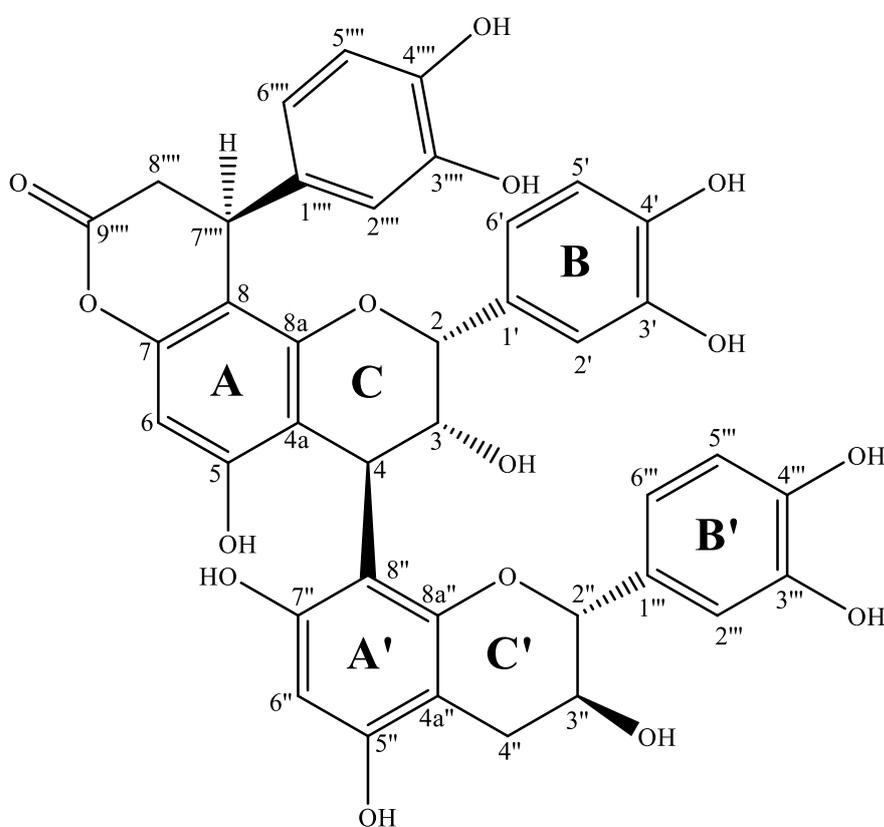


Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

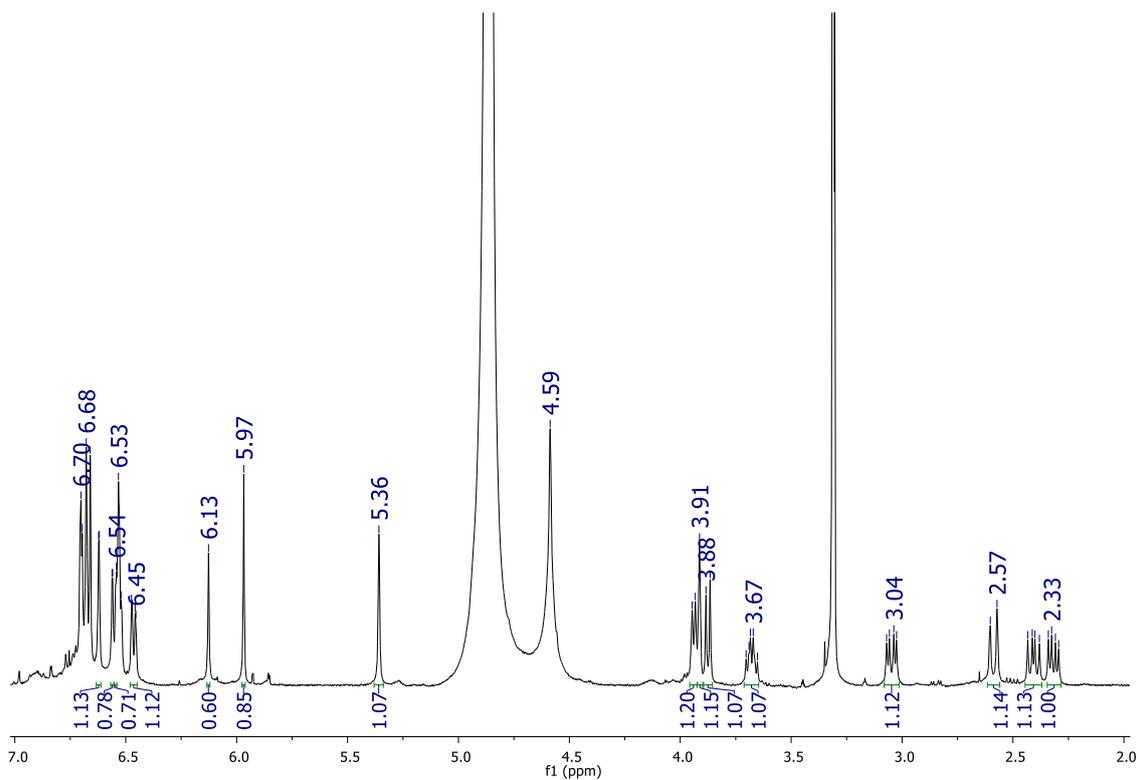


Figura 119. Expansões do espectro de RMN de ^1H .

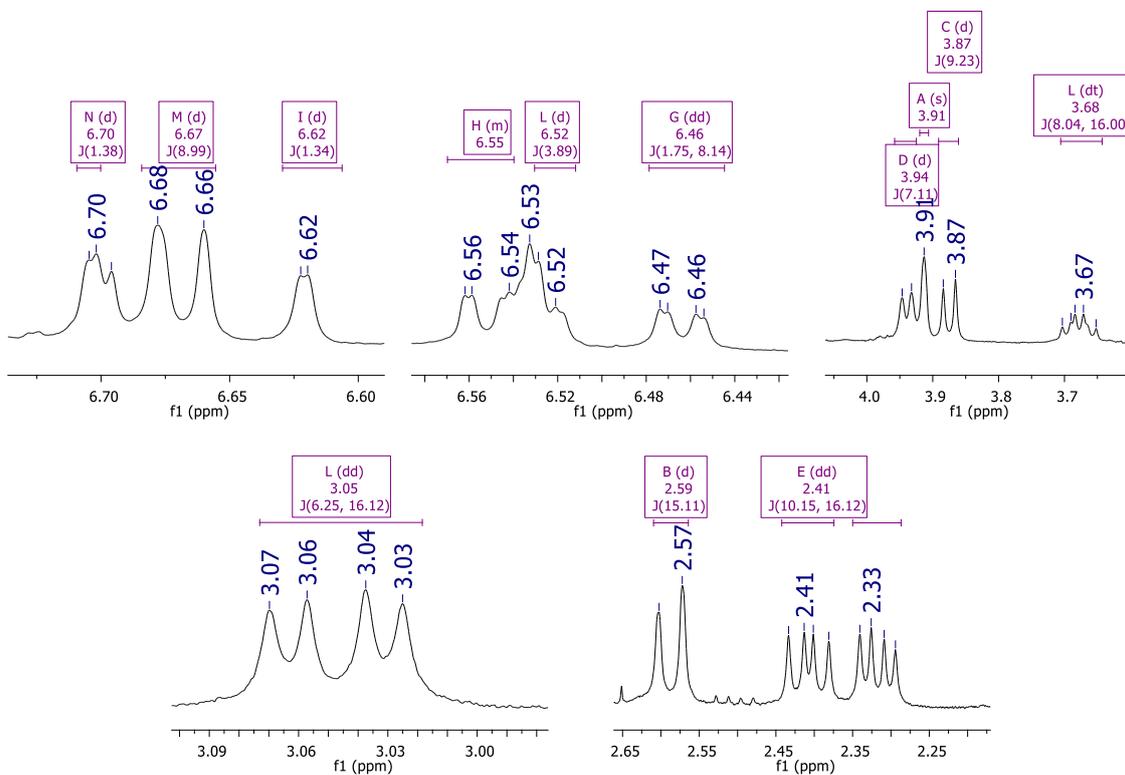


Figura 120. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

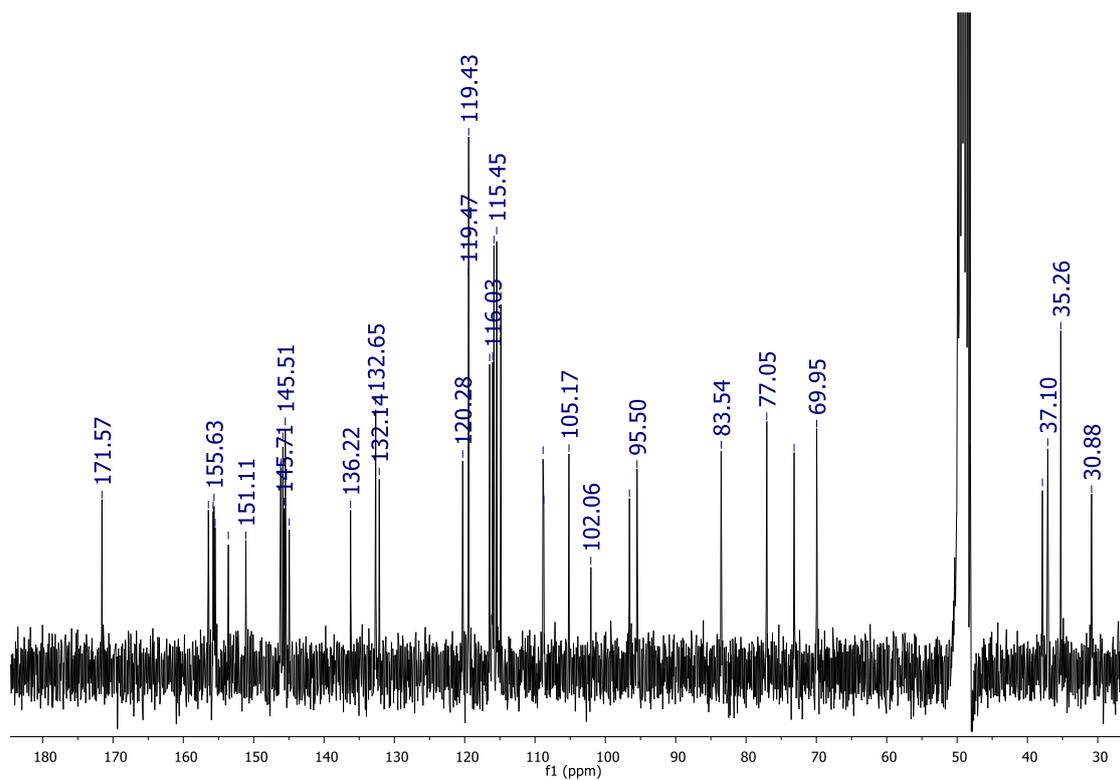


Figura 121. Experimento DEPT-135 (75 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

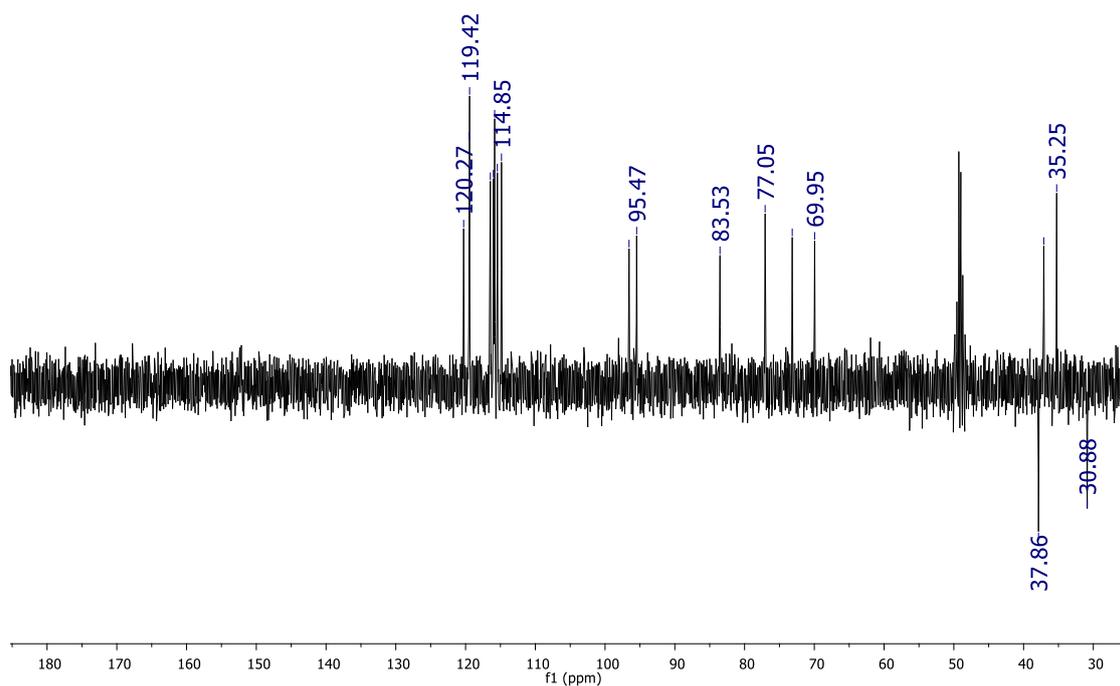


Figura 122. Espectro HSQC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

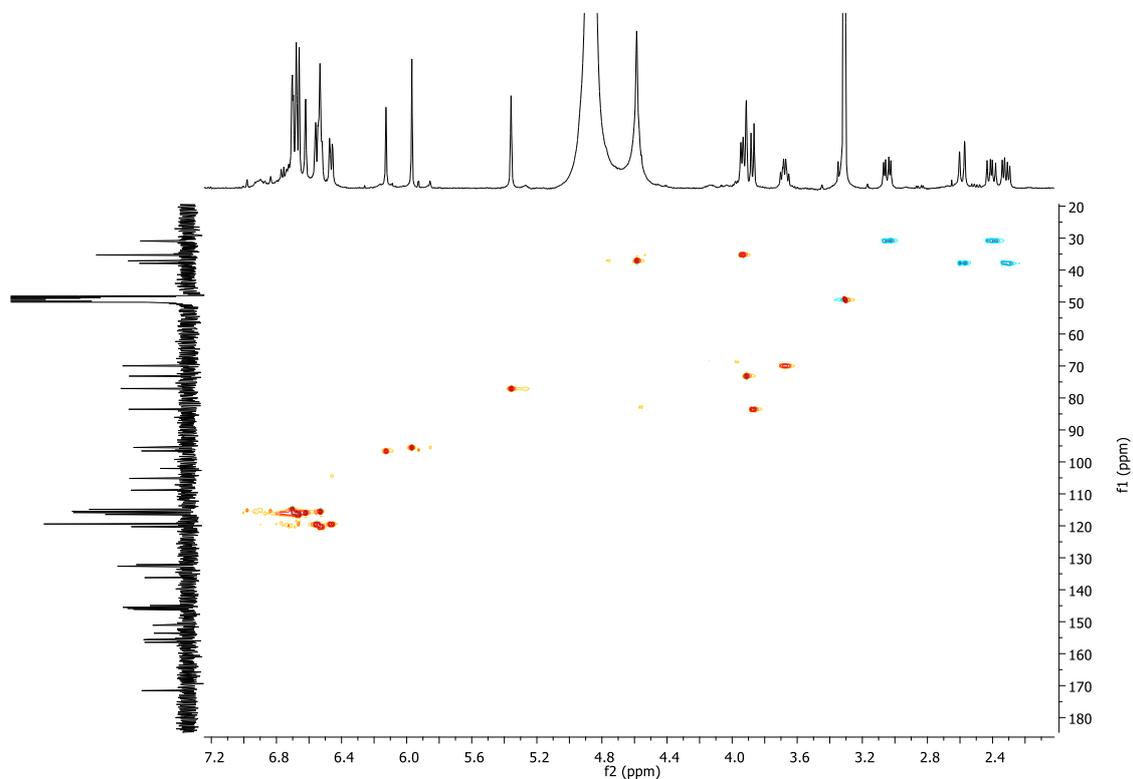


Figura 123. Espectro HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

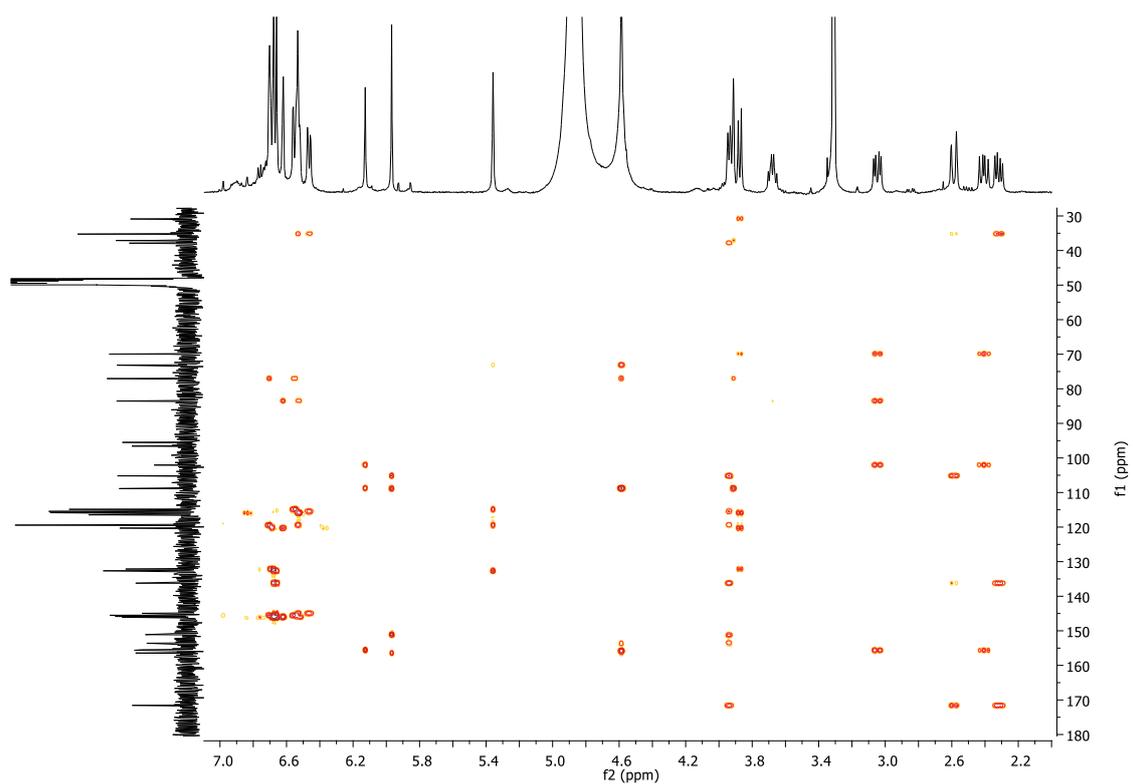


Figura 124. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

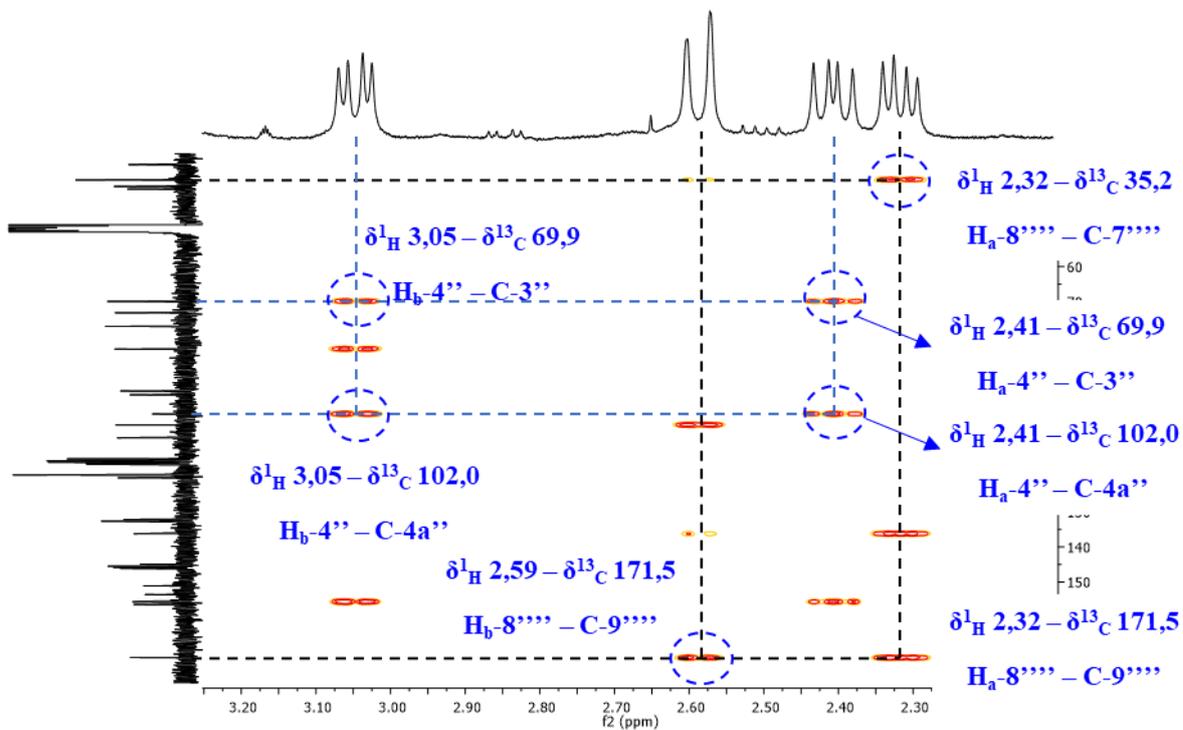


Figura 125. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

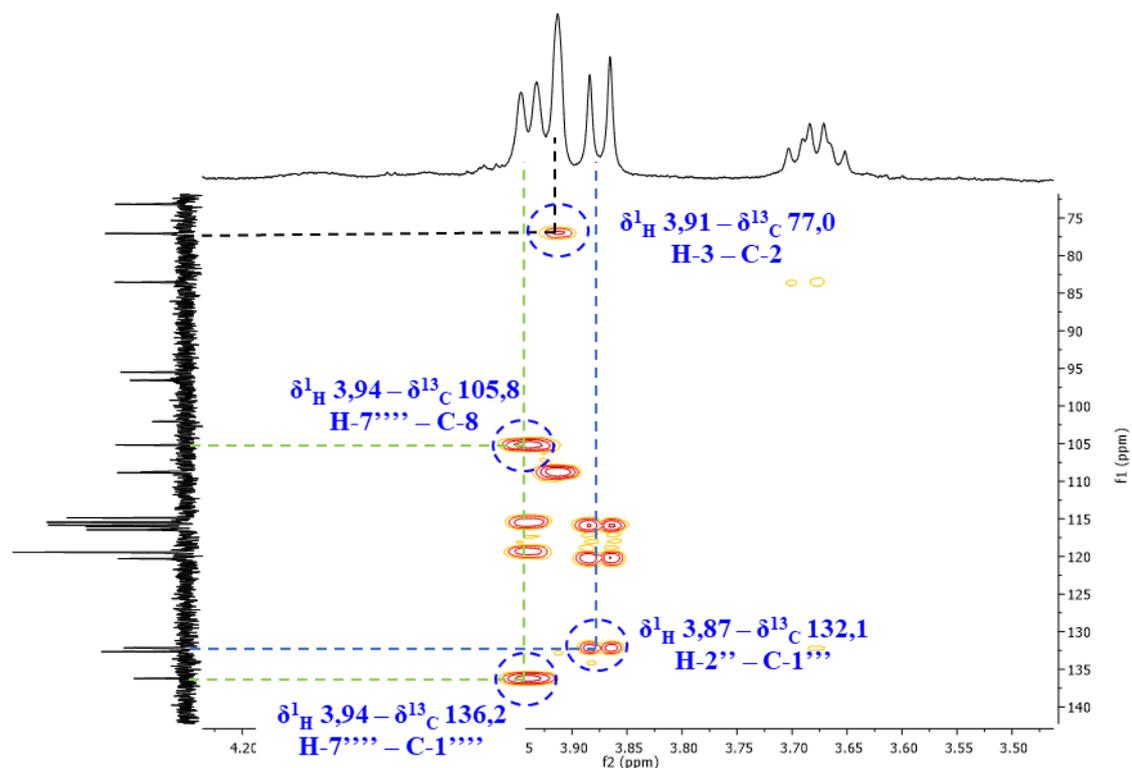


Figura 126. Expansões do HMBC (^1H , ^{13}C , 500/125 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

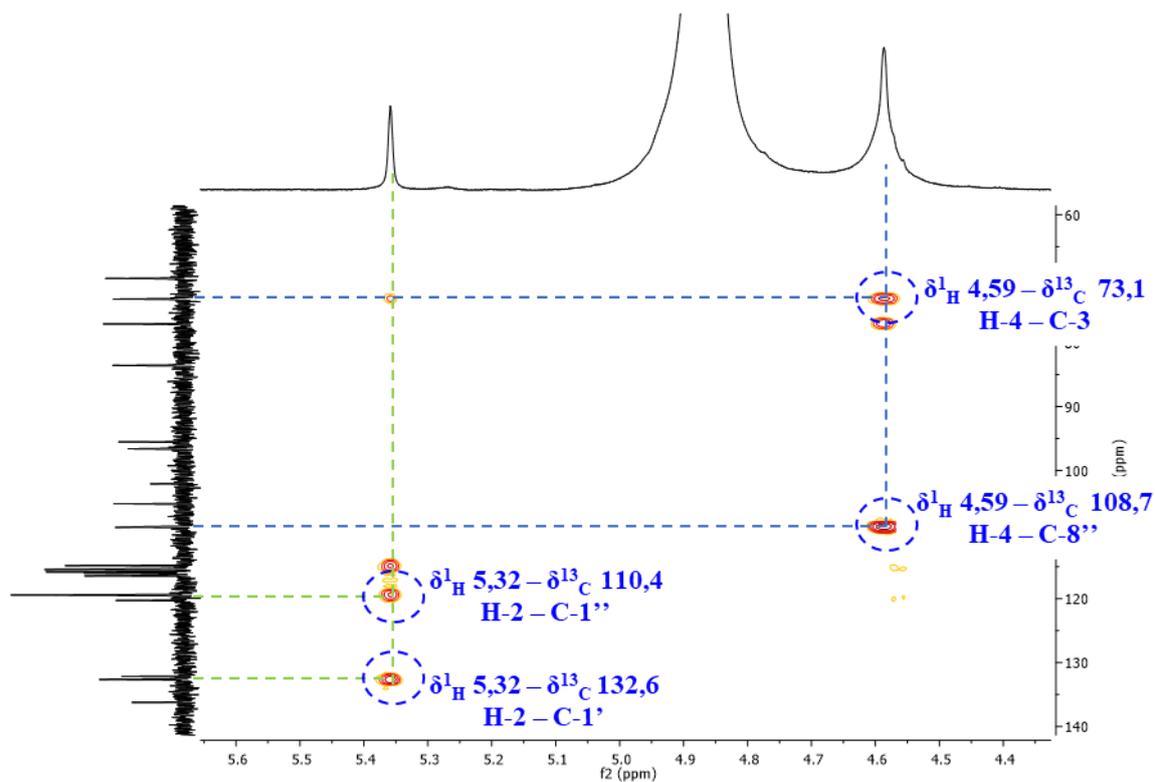


Figura 127. Principais correlações (em HMBC) para a substância **12**.

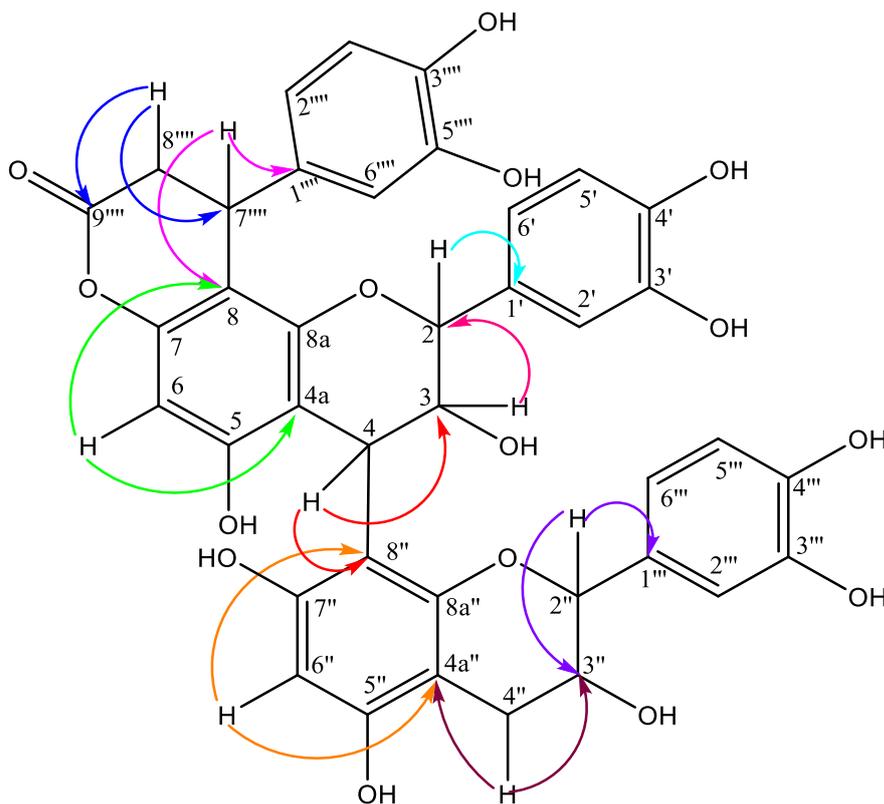


Figura 128. Cinchonaina IIa, Cinchonaina IIb, Kandelina A-2 e Kandelina A-1.

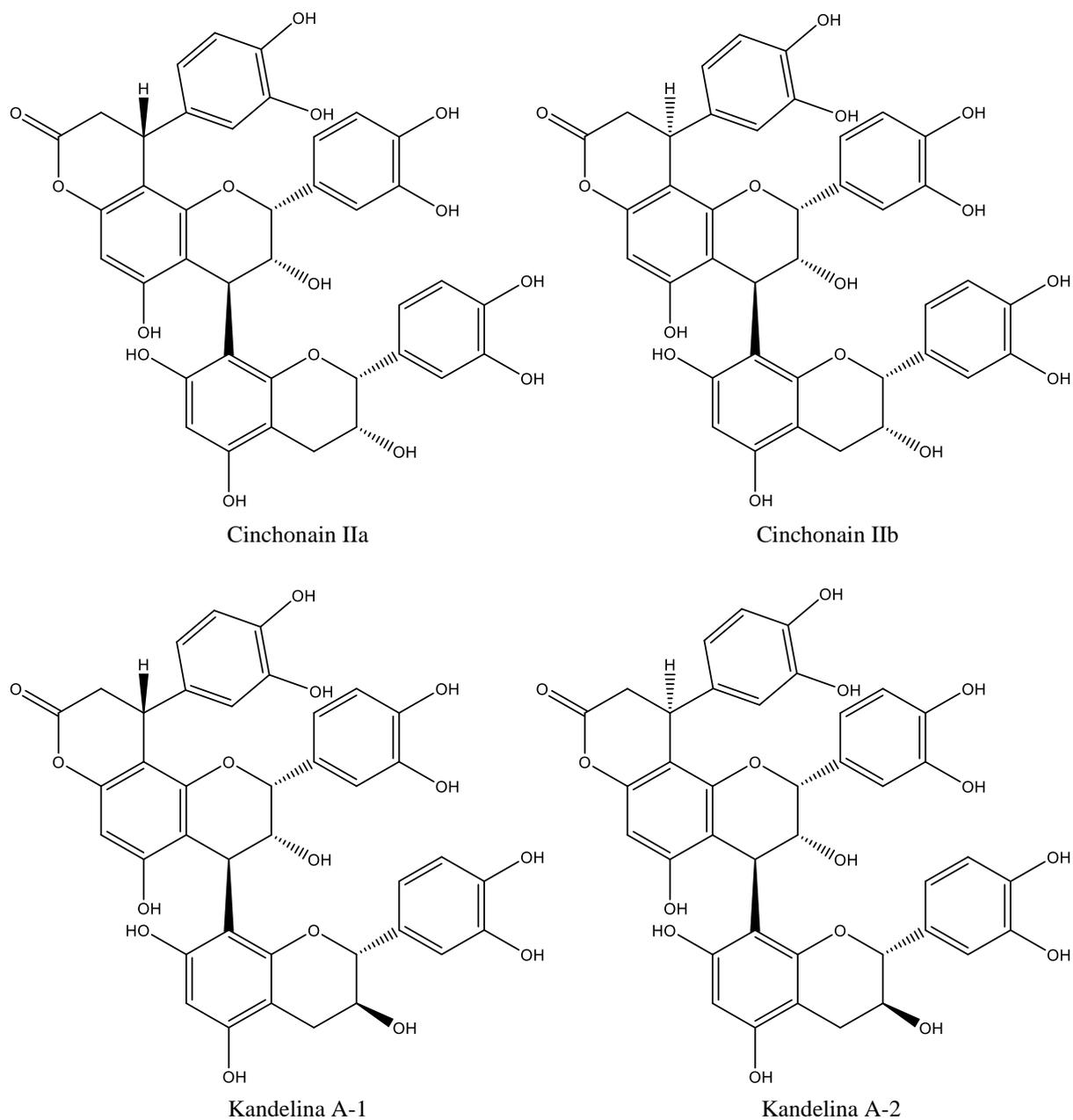


Figura 129. Espectro NOESY (^1H , ^1H , 500 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

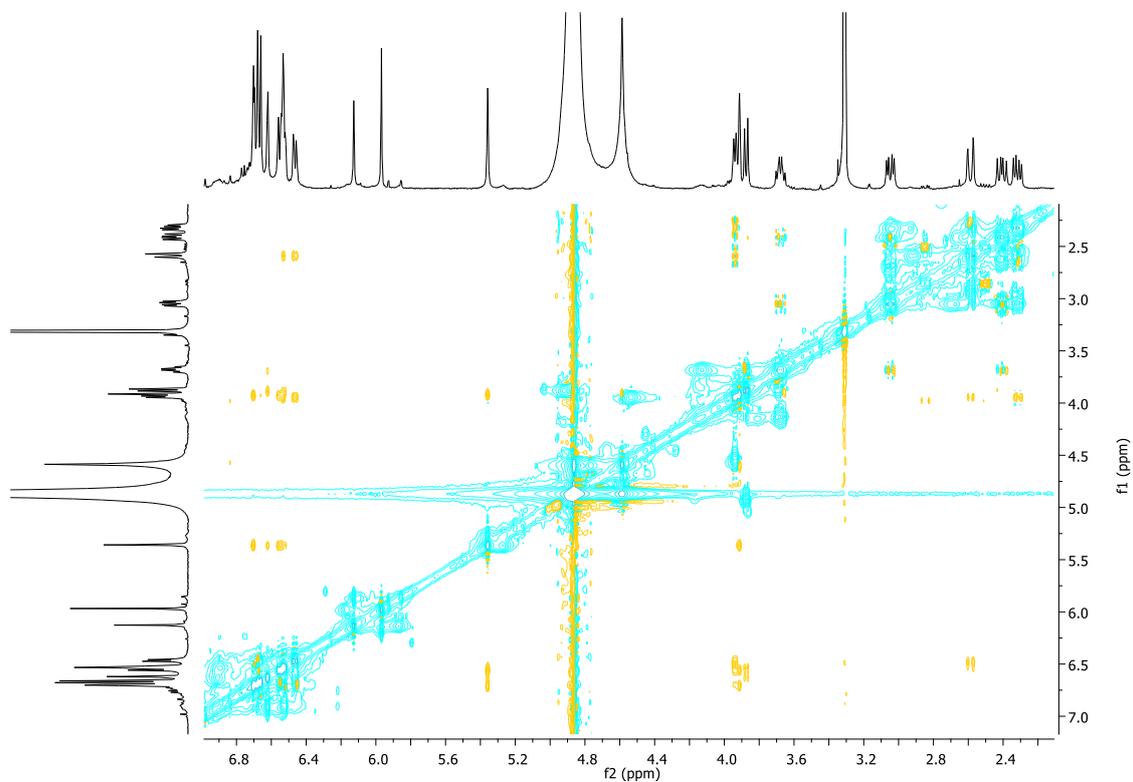


Figura 130. Expansões do NOESY (^1H , ^1H , 500 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

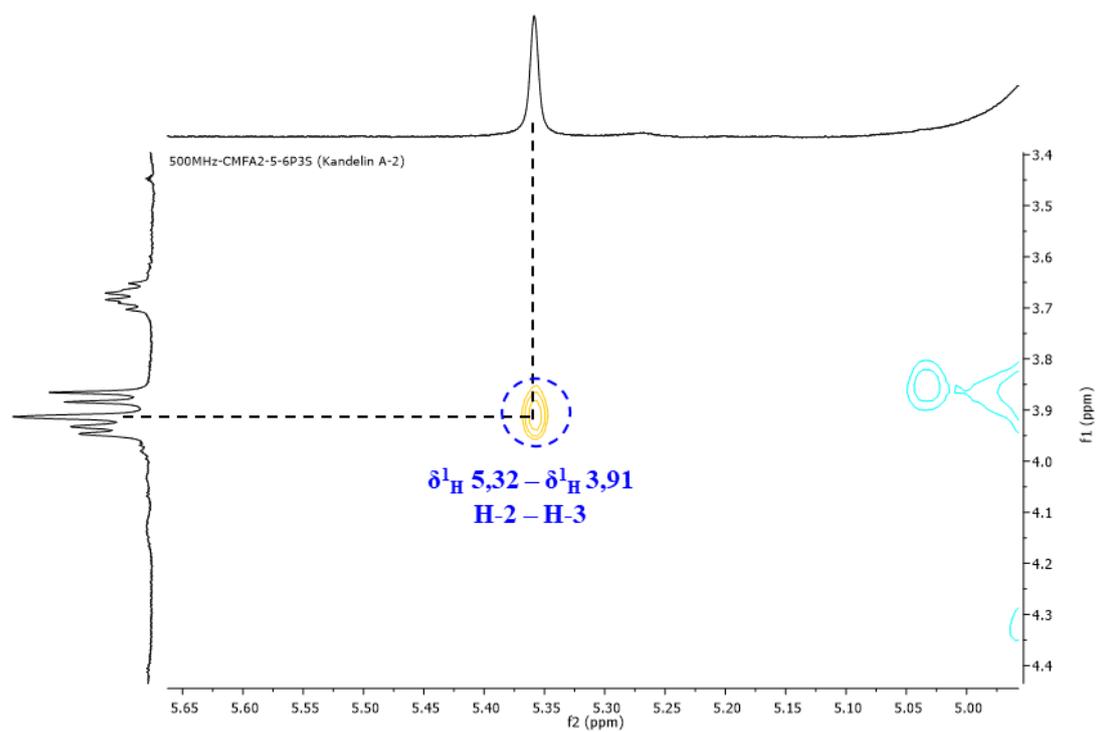


Figura 131. Expansões do NOESY (^1H , ^1H , 500 MHz, CD_3OD) da substância **12**.

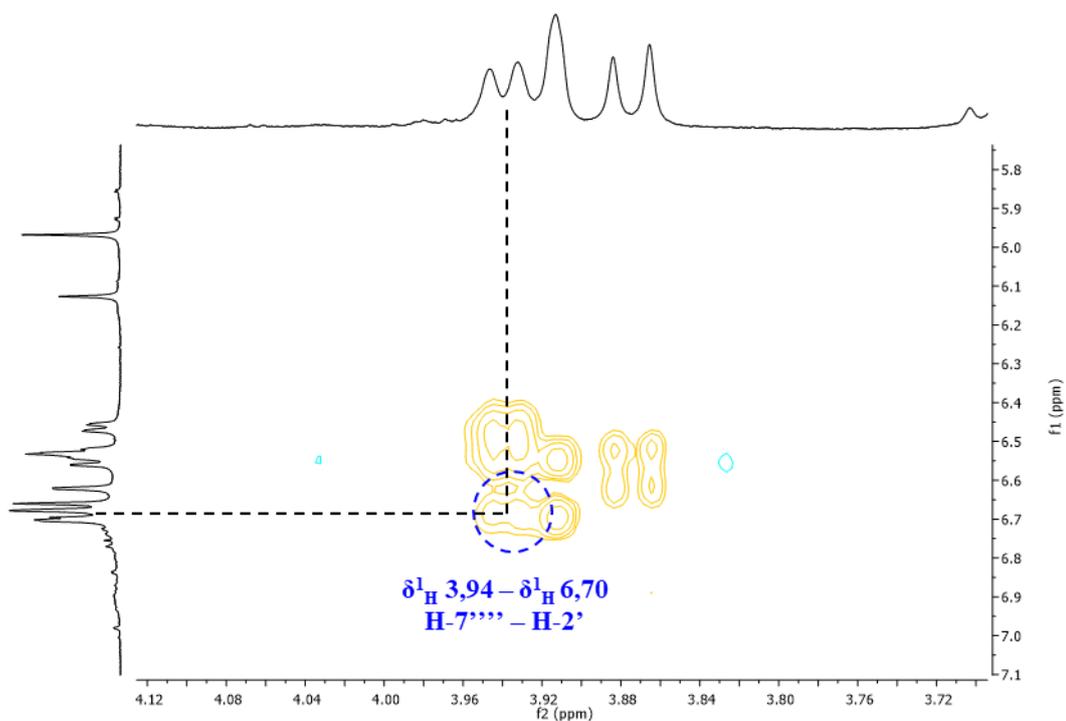


Figura 132. Cromatograma de UV, MS e MS^2 (modo positivo) da substância **12**.

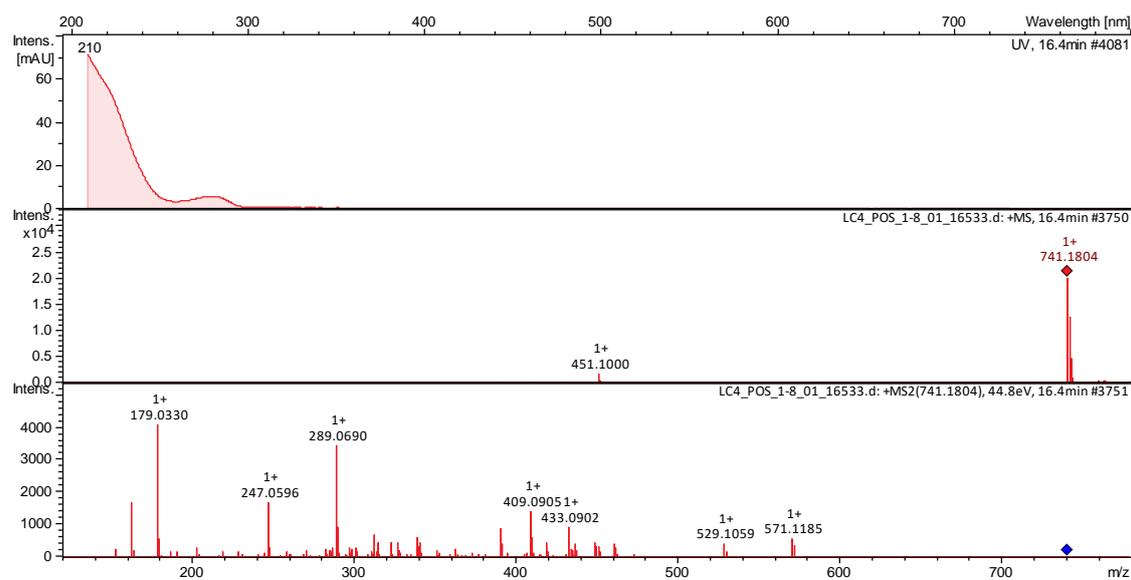


Tabela 25. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **12** (CD_3OD) e literatura (HSU *et al.*, 1985, obtido em acetona- d_6 com gotas de D_2O).

C/H	Kandelin A-2		Substância 12	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
2	5,44 (sl, 1H)	76,5	5,36 (sl, 1H)	77,05
3	3,99 (sl, 1H)	72,3	3,91 (sl, 1H)	73,17
4	4,70 (sl, 1H)	36,6	4,59 (sl, 1H)	37,10
5	-	-	-	156,43
6	6,21 (s, 1H)	95,1	5,96 (s, 1H)	95,50
7	-	-	-	151,11
8	-	108,7	-	105,17
8a	-	-	-	153,60
4a	-	104,8	-	108,86
1'	-	-	-	132,65
2'	-	-	6,70 (d, $J = 1,6$, 1H)	114,85
3'	-	-	-	145,71
4'	-	-	-	145,51
5'	-	-	6,69 (d, $J = 9,0$, 1H)	115,83
6'	-	-	6,55 (dd, $J = 9,0$, 1,6, 1H)	119,43
2''	4,70 (m, 1H)	82,9	3,87 (d, $J = 9,2$, 1H)	83,54
3''	3,90 (m, 1H)	69,2	3,68 (dt, $J = 16,0$, 8,0, 1H)	69,95
4''	2,2-3,2 (m, 1H)	30,00	3,05 (dd, $J = 16,1$, 6,3, 1H) 2,41 (dd, $J = 16,1$, 10,1, 1H)	30,88
5''	-	-	-	155,48
6''	6,02 (s, 1H)	96,5	6,13 (s, 1H)	96,58
7''	-	-	-	155,76
8''	-	108,7	-	108,76
8a''	-	-	-	155,63
4a''	-	101,1	-	102,06
1'''	-	-	-	132,14
2'''	-	-	6,62 (d, $J = 1,3$, 1H)	115,83
3'''	-	-	-	146,08
4'''	-	-	-	145,84
5'''	-	-	6,67 (d, $J = 9,0$, 1H)	116,45
6'''	-	-	6,53 (m, 1H)	120,28
1''''	-	-	-	136,22
2''''	-	-	6,53 (d, $J = 2,0$, 1H)	115,46
3''''	-	145,3	-	146,18
4''''	-	144,6	-	144,93
5''''	-	-	6,67 (d, $J = 9,0$, 1H)	116,0
6''''	-	-	6,46 (dd, $J = 9,0$, 2,0, 1H)	119,47
7''''	-	34,3	3,94 (dl, $J = 7,1$, 1H)	35,26
8''''	-	37,0	2,59 (dl, $J = 15,1$, 1H) 2,32 (dd, $J = 15,1$, 7,1, 1H)	37,86
9''''	-	169,9	-	171,57

5.2. ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS FOLHAS E CAULE DE *C. multiflorum*

Os extratos foram analisados por CLAE-EM/EM, e os cromatogramas resultantes revelaram uma semelhança entre os dois extratos, uma diversidade de compostos, de diferentes polaridades, concentrando-se na região dentre 10 – 27 min. A região destacada de verde foi

comparada com o branco, no qual verificou-se que estes picos não pertencem às amostras, como mostram as figuras 133 e 134.

Figura 133. Cromatogramas de íons totais (BPC) no modo positivo dos extratos etanólicos do caule (vermelho) e folhas (preto) de *C. multiflorum*.

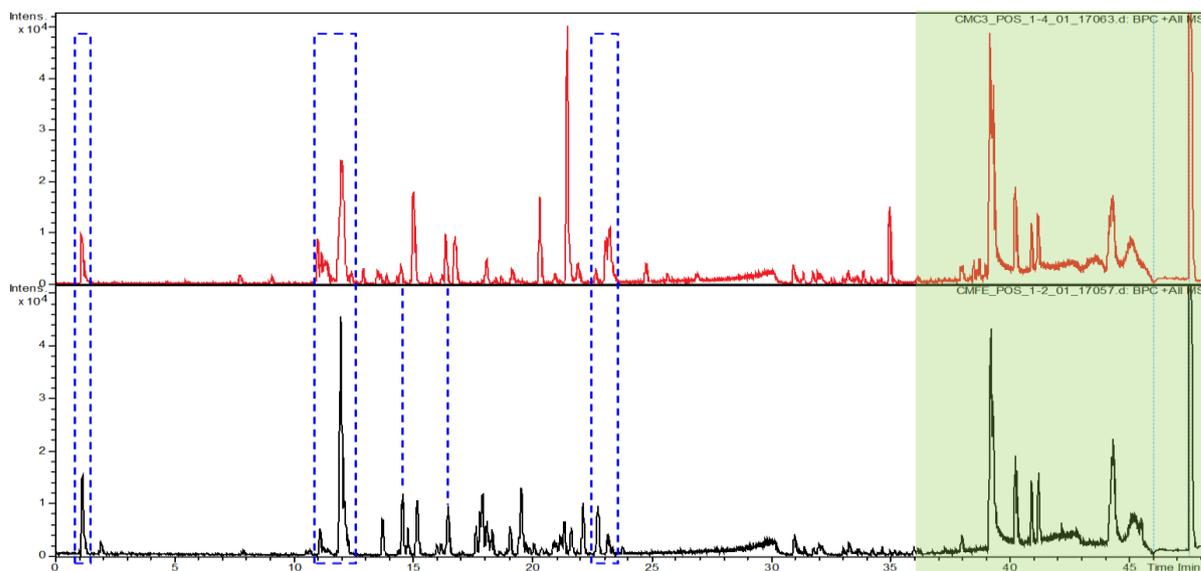
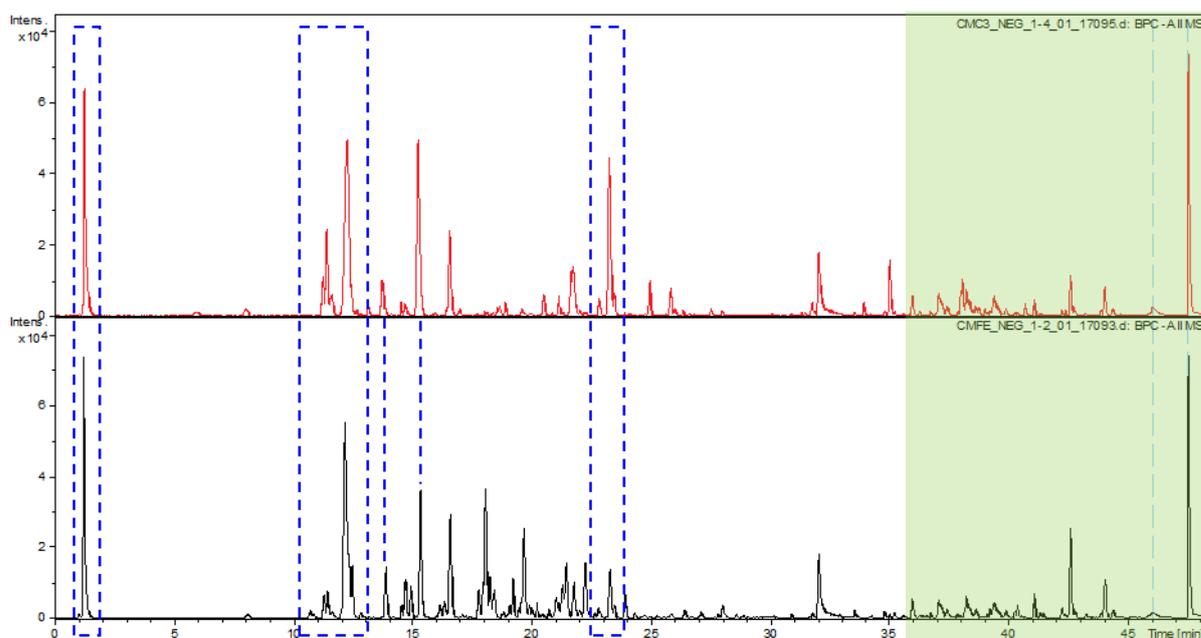


Figura 134. Cromatogramas de íons totais (BPC) no modo negativo dos extratos etanólicos do caule (vermelho) e folhas (preto) de *C. multiflorum*.



A análise dos perfis químicos (em ambos os modos) dos extratos resultou na anotação 16 picos (tabela 26), com destaque para o pico **2** (12 min), que apresentou m/z 355,1029 $[M+H]^+$ e 353,0874 $[M-H]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ (erro de -1,5 ppm). O fragmento a m/z 163 (modo positivo) relativo à presença de uma unidade de ácido quínico, em conjugação ao fragmento a m/z 191 (modo negativo), correspondente à parte do ácido cafeico, foram condizentes com a proposta para o ácido clorogênico (QI, *et al.*, 2009). Adicionalmente, dados da literatura relatam a presença deste composto nas espécies pertencentes à Rubiaceae e a identificação dessa substância, descrito no item 5.1.3, reforçam a anotação desta substância como sendo o ácido clorogênico.

Em linhas gerais, os extratos mostraram-se ricos em substâncias da classe dos iridoides, com picos (**1, 3-7**) entre 11-17 min (tabela 26), apresentando íons condizente com fórmulas moleculares $C_{17}H_{24}O_{11}$, $C_{16}H_{22}O_9$, $C_{17}H_{24}O_{11}$, $C_{19}H_{28}O_{13}$, $C_{17}H_{26}O_{10}$ e $C_{17}H_{24}O_{11}$ e fragmentações compatíveis com iridoides e secoiridoides glicosilados. Dados da literatura descrevem a presença de iridoides em *Calycophyllum* e o isolamentos dessas substâncias, discutidas nos itens 5.1.1. e 5.1.2., reforçam a proposta da presença dessa classe de compostos nos extratos de *C. multiflorum*.

O extrato etanólico das folhas apresentou uma maior riqueza em flavonoides, onde os picos **8-10** e **14** (18-22 min, tabela 26) apresentaram em comum o perfil de absorção no UV, com duas bandas observadas entre 266 e 355 nm. Esses dados, aliados às fórmulas moleculares como $C_{26}H_{28}O_{16}$, $C_{27}H_{30}O_{16}$, $C_{27}H_{30}O_{16}$ e $C_{21}H_{20}O_{11}$, bem como o fragmento a m/z 300 (indicativo de substâncias contendo unidades de quercetina) permitiu propor a anotação desses compostos como sendo flavonoides glicosilados derivados da quercetina (HVATTUM *et al.*, 2002). O isolamento destes constituintes químicos contidos no item 5.1.4., reforça estas propostas.

Tabela 26. Principais picos anotados em *C. multiflorum*.

Pico	TR (min)	m/z	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	UV max. (nm)	Folhas (F)	Caule (C)	Referência
1	11,1	405,1384 [M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	-0,6	-	F	C	KUCHARSKA, <i>et al.</i> , 2016.
2	12,0	355,1029 [M+H] ⁺ 353,0874 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-1,5	240 324	F	C	QI, <i>et al.</i> , 2009.
3	14,6	359,1346 [M+H] ⁺ 403,1241 [M-H+46] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	-2,5	-	F	-	KUCHARSKA, <i>et al.</i> , 2016.
4	14,8	405,1386 [M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	-0,6	-	F	-	QI, <i>et al.</i> , 2009.
5	15,0	465,1601 463,1459	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₃	0,5	-	-	C	LENDL <i>et al.</i> , 2005.
6	15,2	408,1856 [M+NH ₄] ⁺ 435,1517 [M-H+46] ⁻	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	-2,8	-	F	-	KUCHARSKA, <i>et al.</i> , 2016.
7	16,5	405,1384 [M+H] ⁺ 403,1249 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	-1,4	-	F	C	KUCHARSKA, <i>et al.</i> , 2016.
8	18,1	597,1444 [M+H] ⁺ 595,1301 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	-1,0	266 355	F	-	IWAOKA <i>et al.</i> , 2009.
9	19,1	611,1615 [M+H] ⁺ 609,1446 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0,4	266 355	F	-	AVULA, <i>et al.</i> , 2020.
10	19,5	611,1609 [M+H] ⁺ 609,1465 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0,5	266 355	F	-	AVULA, <i>et al.</i> , 2020.
11	20,3	575,2252 573,2094	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	-2,8	-	-	C	SILVA, <i>et al.</i> , 1971.
12	21,3	453,1183 [M+H] ⁺ 451,1023 [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	-0,6	285	F	-	LI, <i>et al.</i> , 2020.
13	21,5	571,1938 [M+H] ⁺ 569,1792 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₁₁	-2,7	-	-	C	BRONW & WARAMBWA, 1978.
14	22,1	449,1083 [M+H] ⁺ 447,0930 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-1,9	266 355	F	-	HVATTUM <i>et al.</i> , 2002.
15	19,7	531,2361 [M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₉	-4,5	-	F	C	SANTOS, <i>et al.</i> , 2020.
16	23,2	517,1338 [M+H] ⁺ 515,1200 [M+H] ⁻	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	0,4	324	F	C	QI, <i>et al.</i> , 2009.

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO

Os extratos etanólicos das folhas e caule, oriundos de *C. multiflorum*, foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição frente às bactérias multirresistentes de origem clínica, cedidas pelo Hospital Universitário e Hospital Veterinário da UFMS. Neste ensaio, os extratos apresentaram-se inativos, com CMI acima de 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os extratos foram avaliados em combinação com os antibióticos ampicilina e ciprofloxacino – para os quais as bactérias apresentavam resistência –, de acordo com o ensaio de *checkerboard* descrito no item 4.2.1. Neste experimento, pode-se observar uma diminuição expressiva nos valores de CMI, como relatado nas tabelas 27 e 28, sobretudo quando comparados aos resultados da avaliação da ação antimicrobiana dos antibióticos isoladamente.

Tabela 27. Valores de CMI individuais e em combinação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da ampicilina (AMP), dos extratos etanólicos das folhas e caule, frente a bactérias Gram-positivas.

Combinação	<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>		<i>E. faecium</i>	
	CMI		CMI		CMI	
	Individual	Combinado	Individual	Combinado	Individual	Combinado
Folhas	≥ 5000	312,5	≥ 2500	156,25	≥ 5000	156,25
AMP	3,125	0,78	50	0,09	100	6,25
Caule	≥ 5000	2500	≥ 2500	625	≥ 5000	1250
AMP	3,125	0,009	50	0,39	100	12,5

Tabela 28. Valores de CMI individuais e combinados ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do ciprofloxacino (CIP) e extratos etanólicos das folhas e caule, frente a bactérias Gram-negativas.

Combinação	<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CMI		CMI	
	Individual	Combinado	Individual	Combinado
Folhas	≥ 2500	39,1	≥ 2500	625
CIP	50	12,5	50	12,5
Caule	≥ 2500	2500	≥ 2500	39,1
CIP	50	12,5	50	25

Em combinação com o extrato etanólico das folhas, destaca-se a atividade da ampicilina que apresentou valor de CMI *c.* 500 vezes menor contra *S. intermedius* e 16 vezes contra *E. faecium*. Em relação ao CMI obtidos dos extratos, destacaram-se os resultados observados para o extrato etanólico das folhas contra *S. intermedius* e *E. faecium*, com valores de CMI de 156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando um decréscimo da CMI de cerca de 16 vezes contra *S. intermedius* e *E.*

faecium. Essas bactérias são importantes pois *E. faecium* possui um amplo espectro de resistência a antibióticos, sendo um dos principais patógenos de origem hospitalar, contido na lista de patógenos prioritários da OMS (KLARE *et al.*, 2003; OMS, 2022). *S. intermedius*, é um patógeno encontrado em animais domésticos, entretanto, está sendo cada vez mais reconhecido como causador de infecções humanas (YARBROUGH *et al.*, 2018).

Na avaliação dos efeitos da combinação dos extratos de *C. multiflorum* com o antibiótico ciprofloxacino, foi observado um CMI de 39,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *A. baumannii*, indicando uma redução de cerca de 64 vezes no CMI do extrato das folhas com o CIP. Já o antibiótico, apresentou uma redução de 4 vezes com um CMI de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Após a obtenção dos valores de CMI combinados, foi realizado o cálculo da CIF, utilizando a razão entre os valores de CMI individuais e combinados para cada extrato e antibiótico analisado. Com os valores de CIF foi realizado o cálculo do ICIF através da soma das CIF dos extratos e antibióticos (tabelas 29 e 30).

De acordo com Lim e colaboradores (2018) e Simões e colaboradores (2008) considera-se: efeito sinérgico valores de ICIF $\leq 0,5$ (a combinação excede os efeitos aditivos); efeito aditivo para valores de ICIF entre 0,5 e 1 (a combinação é igual à soma dos efeitos individuais); indiferente quando o ICIF está entre 1 e 4 (a combinação promove efeitos iguais aos do produto mais ativo) e antagônico com um ICIF > 4 (a combinação promove uma redução de efeito do produto individual mais eficaz).

Tabela 29. Valores da concentração inibitória fracionada (CIF) e índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), frente a bactérias Gram-positivas.

Combinação	<i>S. aureus</i>			<i>S. intermedius</i>			<i>E. faecium</i>		
	CIF	ICIF	Efeito	CIF	ICIF	Efeito	CIF	ICIF	Efeito
Folhas	0,0625	-	-	0,0625	-	-	0,031	-	-
AMP	0,25	-	-	0,002	-	-	0,0625	-	-
F + AMP	-	0,31	Sinérgico	-	0,064	Sinérgico	-	0,09	Sinérgico
Caule	0,5	-	-	0,25	-	-	0,25	-	-
AMP	0,03	-	-	0,008	-	-	0,125	-	-
C + AMP	-	0,53	Aditivo	-	0,26	Sinérgico	-	0,38	Sinérgico

Legenda: AMP: ampicilina; F + AMP: extrato etanólico das folhas em combinação com a ampicilina; C + AMP: extrato etanólico do caule em combinação com a ampicilina.

Tabela 30. Valores da concentração inibitória fracionada (CIF) e do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), frente a bactérias Gram-negativas.

Combinação	<i>A. baumannii</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	CIF	ICIF	Efeito	CIF	ICIF	Efeito
Folhas	0,02	-	-	0,25	-	-
CIP	0,25	-	-	0,25	-	-
F + CIP	-	0,27	Sinérgico	-	0,5	Sinérgico
Caule	0,25	-	-	0,02	-	-
CIP	0,25	-	-	0,5	-	-
C + CIP	-	0,5	Sinérgico	-	0,52	Aditivo

Legenda: CIP: ciprofloxacino; F + CIP: extrato etanólico das folhas em combinação com o ciprofloxacino; C + CIP: extrato etanólico do caule em combinação com o ciprofloxacino.

Em reflexo a diminuição da CMI observada anteriormente, os valores de ICIF observados foram extremamente baixos. Foi observado que todas as combinações dos extratos de *C. multiflorum* e antibióticos avaliadas apresentaram efeito sinérgico, com exceção da combinação do extrato etanólico do caule com a ampicilina (ICIF de 0,53) frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e da combinação do extrato etanólico do caule com o ciprofloxacino (ICIF de 0,52) frente a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, que apresentaram um efeito aditivo. É interessante ressaltar que o extrato das folhas apresentou efeito sinérgico com todos os antibióticos e bactérias testados.

Os resultados demonstram-se promissores pois estas bactérias são responsáveis infecções hospitalares graves e recorrentes (MORAES *et al.*, 2013), sendo o resultado obtido frente a bactéria *E. faecium* é especialmente importante, pois esta espécie apresenta cepas muito resistentes, sobretudo à vancomicina, que é o antibiótico utilizado como último recurso contra bactérias Gram-positivas (VILELA, 2009). É interessante destacar os valores de ICIF (0,064 e 0,09) obtidos para a combinação da ampicilina com os extratos das folhas frente às bactérias Gram-positivas *S. intermedius* e *E. faecium*, respectivamente. Pois estes são valores extremamente baixos, expondo uma alta sensibilidade dessas bactérias a um antibiótico que antes demonstravam-se resistentes.

Bactérias Gram-negativas representam um desafio no desenvolvimento de tratamentos, pois contém uma membrana externa que atua como barreira permeável, dificultando a entrada dos medicamentos, aliado aos sistemas de efluxo, que restringem a difusão de antimicrobianos (SIMÕES *et al.*, 2008). Nesse sentido, a combinação do extrato das folhas com o antibiótico ciprofloxacino apresentou resultados promissores contra *A. baumannii* (ICIF de 0,27) uma bactéria Gram-negativa, que apresenta cepas resistentes de difícil tratamento e responsável por

infecções hospitalares, considerada prioridade máxima para o desenvolvimento de novas terapias pela OMS (ATAIDE *et al.*, 2015).

Na avaliação dos perfis químicos do extrato e folhas, discutidos no item 5.2., observou-se que o extrato das folhas apresenta uma maior predominância de flavonoides. A literatura relata a contribuição acentuada de fenilpropanoides e flavonoides para o efeito sinérgico, como relata Aires e colaboradores (2016), ao combinar extratos hidroalcoólicos de *Pterospartum tridentatum* e *Mentha pulegium* contra isolados *Staphylococcus aureus* MSSA resistente à meticilina. Já Basri e colaboradores (2008), ao testar a combinação de 23 substâncias com a oxacilina contra *S. aureus* resistente à vancomicina, notou que a quercetina diminuiu significativamente o valor de MIC, sugerindo que combinações à base de flavonoides podem ser excelentes candidatos no tratamento de infecções. Céspedes e colaboradores (2014), novamente atribuem o efeito sinérgico aos flavonoides presentes na espécie *Calceolaria integrifolia*.

Deste modo, a avaliação do efeito sinérgico dos extratos etanólicos das folhas e caule de *C. multiflorum* revelaram resultados promissores, apontando um potencial emprego desta espécie em combinação com antibióticos contra bactérias resistentes.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O fracionamento do extrato etanólico oriundo das folhas de *Calycophyllum multiflorum* resultou no isolamento e identificação de 14 substâncias, sendo um iridoide glicosilado, a loganina (**6**); sete secoiridoides glicosilados, a secoxiloganina (**2**), α -morronisídeo (**3**), β -morronisídeo (**4**), swerosídeo (**5**), 7-O- α -etil-morronisídeo (**7**), 7-O- β -etil-morronisídeo (**8**) e (*E*)-aldosecologanina (**1**), sendo o último uma secologanina dimérica. Além destes, foi isolado um fenilpropanoide, o ácido clorogênico (**11**), quatro flavonoides glicosilados, a rutina (**9**), a quercetina 3-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo (**10**), quercitrina (**13**) e a afzelina (**14**); além de uma proantocianidina, a kandelina A-2 (**12**). Das substâncias obtidas, trata-se do primeiro relato das substâncias 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 no gênero *Calycophyllum* e o primeiro relato das substâncias 7, 8, 10 e 12 na família Rubiaceae.

A análise do perfil químico dos extratos etanólicos através de CLAE-DAD-EM/EM indicou a presença do ácido clorogênico, além de iridoides e secoiridoides glicosilados, flavonoides glicosilados, e fenilpropanoides, condizente com o isolamento químico e revelando a diversidade de metabólitos secundários produzidos por *C. multiflorum*.

Quanto avaliação do efeito sinérgico, ambos os extratos se mostraram altamente ativos frente às cepas testadas (na avaliação do efeito sinérgico), apresentando um ICIF menor que 0,5 para todas as cepas, exceto na análise da combinação do extrato etanólico do caule contra o *S. aureus* e *P. aeruginosa*. É importante ressaltar que a combinação do extrato etanólico das folhas com a ampicilina, frente a *S. intermedius* e *E. faecium*, gerou um ICIF de 0,06 e 0,09, indicando um potente efeito sinérgico.

Os resultados contribuem com a descrição dos constituintes químicos dessa espécie, sendo este o primeiro estudo químico de *Calycophyllum multiflorum*, além de relatar resultados promissores na avaliação do efeito sinérgico, indicando um potencial emprego desta espécie em combinação com antibióticos contra bactérias resistentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABANTO-RODRIGUEZ, C.; GARCÍA-SORIA, D.; GUERRA-ÁREVALO, W.; MURGA-ORRILLO, H.; SALDANÑA-RÍOS, G.; VÁZQUEZ-REÁTEGUI, D.; TADASHI-SAKAZAKI, R. Sustratos orgánicos en la producción de plantas de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.). **Scientia Agropecuaria**, v. 7, n. 3, p. 341-347, 2016.
- ADEWOLE, K. E.; ATTAH, A. F.; ADEBAYO, J. O. *Morinda lucida* Benth (Rubiaceae): A review of its ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 276, p. 1–24, 2021.
- AGATI, G. et al. Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1–17, 2020.
- AGRAWAL, A. D. Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1394–1398, 2011.
- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307–3330, 1992.
- AIRES, I.; MARRINHAS, E.; CARVALHO, R.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M. J. Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* Isolates. **Bioactive Natural Products**, v. 2016, p. 1-11, 2016.
- ANIČIĆ, N.; GAŠIĆ, U.; LU, F.; ĆIRIĆ, A.; IVANOV, M.; JEVTIĆ, B.; DIMITRIJEVIĆ, M.; ANDELKOVIĆ, B.; SKORIĆ, M.; ŽIVKOVIĆ, J. N.; MAO, Y.; LIU, J.; TANG, C.; SOKOVIĆ, M.; YE, Y.; MIŠIĆ, D. Antimicrobial and immunomodulating activities of two endemic *Nepeta* species and their major iridoids isolated from natural sources. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, 2021.
- AQUINO, R.; TOMMASI, N. D.; TAPIA, M.; LAURO, M. R.; RASTRELLI, L. New 3-methoxyflavones, an iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 4, p. 560-562, 1999.
- ARAÚJO, V. F.; PASTORE JR, F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; LEITE, F. H. F. Plantas da Amazônia para produção Cosmética: uma abordagem

química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia. Brasília, 2005. 244 p.

ARÉVALO-LOPÉZ, D. NINA, N.; TICONA, J. C.; LIMACHI, I.; SALAMANCA, E.; UDAETA, E.; PAREDES, C.; ESPINOZA, B.; SERATO, A.; GARNICA, D.; LIMACHI, A.; COAQUIRA, D.; SALAZAR, S.; FLORES, N.; STERNER, O.; GIMÉNEZ, A. Leishmanicidal and cytotoxic activity from plants used in *Tacana* traditional medicine (Bolivia). **Journal of ethnopharmacology**, v. 216, p. 120-133, 2018.

ATAIDE, L. A., ABADE, S. M. M. Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos: Estudo em Hospital Universitário. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 4, 2015.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

BACIGALUPO, N. M. Sinopsis preliminar del género «*Calycophyllum*» (Rubiaceae). **Darwiniana**, v. 2, n. 10, p. 145-156, 1953.

BAKURIDZE, A. D.; DARGAeva, T. D.; Nikolaeva, G. G.; Patudin, A. V.; Brutko, L. I. Iridoids of plants of the genus *Gentiana* from the family Gentianaceae. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 1987.

BALDIN, T.; MARCHIORI, J. N. C. Descrição anatômica de *Calycophyllum multiflorum* Griseb. (Rubiaceae). **Balduinia**, n. 49, p. 16-23, 2015.

BALDIN, T.; SIEGLOCH, A. M.; MARCHIORI, J. N. C. Compared anatomy of species of *Calycophyllum* DC. (Rubiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 40, n. 4, p. 759-768, 2016.

BATIHA, G. E. S.; BESHBI SHY, A. M.; WASEF, L.; ELEWA, Y. H. A.; EL-HACK, M. E. A.; TAHA, A. E.; AL-SAGHEER, A. A.; DEVKOTA, H. P.; TUFARELLI, V. *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC.: A review on chemical constituents and biological activities. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 8, 2020.

BARSI, D. F.; ZIN, N. M.; BAKAR, N. S. Synergistic Effects of Phytochemicals and Oxacillin on Laboratory Passage-Derived Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Strain. **Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 131-136, 2008.

- BOCK, K.; JENSEN, S. R.; NIELSEN, B. J.; JOHNSON, I.; TATICCHI, A.; ANTHONSEN, T. Secogalioside, an Iridoid Glucoside from *Galium album* Mill. and ^{13}C NMR Spectra of Some Seco-iridoid Glucosides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 30b, p. 743–748, 1976.
- BOCK, K.; THBGERSEN, H. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Study of Mono- and Oligosaccharides. In: **Annual reports on NMR spectroscopy**, v. 1, p. 1–57, 1983.
- BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids . An updated review, part I. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 5, p. 1055–1147, 1990.
- BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids . An updated review, part II. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 1173–1246, 1991.
- BORGES, R. M.; VALENÇA, S. S.; LOPES, A. A.; BARBI, N. S.; SILVA, A. J. R. Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 96-100, 2013.
- BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, n. 1, p. 4-26, 2009.
- BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, n. 6, p. 766-793, 2009.
- BUENO, M. L.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PONTARA, V.; POTT, A.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A. Tree flora of the Cerrado of Mato Grosso do Sul state. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, p. 53–64, 2018.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- CALIS, I.; LAHLOUB, M. F.; STICHER, O. 8. Loganin, Loganin Acid and Periclymenoside, a New Biosidic Ester Iridoid Glucoside from *Lonicera peviclymenum* L. (Caprifoliaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 67, n. 1, p. 160–165, 1984.
- CAETANO, R. S.; DE SOUZA, A. C. R.; FEITOZA, L. F. O Uso de Plantas Mediciniais Utilizadas por Frequentadores dos Ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho-RO. **Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014.

- CALIS, I.; STICHER, O. Secoiridoid glucosides from *Lonicera periclymenum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2539–2540, 1984.
- CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. D. S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2008.
- CASSINO, M. F. Estudo etnobotânico de plantas medicinais em comunidades de várzea do rio Solimões, Amazonas e aspectos farmacognósticos de *Justicia pectoralis* Jacq. forma *mutuquinha* (Acanthaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.
- CÉSPEDES, C. L.; SALAZAR, J. R.; ARIZA-CASTOLO, A.; YAMAGUCHI, L.; ÁVILA, J. G.; AQUEVEQUE, P.; KUBO, I.; ALARCÓN, J. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. **Environmental Research**, v.132, n. 1, p. 391-406, 2014.
- CHANG, W. L.; WANG, H. Y.; SHI, L. S.; LAI, J. H.; LIN, H. C. Immunosuppressive iridoids from the fruits of *Gardenia jasminoides*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1683-1685, 2005.
- CHAUDHURI, R. K.; AFIFI-YAZAR, F.; STICHER, O. ¹³C NMR spectroscopy of naturally occurring iridoid glucosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 36, n. 1, p. 2317–2326, 1980.
- CHAUDHURI, R. K.; AFIFI-YAZAR, F. U.; STICHER, O. The Configuration of Naturally Occurring Iridoid Glucosides at C(6) and C(8): A Complementary Assignment Aid by ¹³C-NMR. Spectroscopy. **Helvetica Chimica Acta**, v. 62, n. 5, 1979.
- CHEN, H. F.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K. Phenylpropanoid-substituted catechins from *Castanopsis hystrix* and structure revision of cinchonains. **Phytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 183, 1993.
- CONSERVA, L. M.; FERREIRA, J. C. *Borreria* and *Spermacoce* species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 46–55, 2012.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, 2009.

- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.
- DAMTOFT, S.; JENSEN, R.; NIELSEN, J. ¹³C and ¹H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2717–2732, 1981.
- DE BRUYN, A.; ANTEUNIS, M.; VERHEGGE, G. ¹H-NMR Study of the Di-Glucopyranoses in D₂O. **Bulletin des Societes Chimiques Belges**, v. 84, n. 7, p. 721–734, 1975.
- DE OLIVEIRA, A. M.; LIMA, R. A. S.; FERRO, J. N. S.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Chemical Constituents from the Stems and Preliminary Antinociceptive Activity of *Sabicea grisea* var. *grisea*. **Chemistry Natural Compounds**, v. 49, n. 6, p. 1119-1120, 2014.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Reino Unido: Wiley, 2009, 546 p.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; ARIMA, S.; SATO, N.; of HARIGAYA, Y. Iridoid glucosides from *Wendlandia tinctoria* roots. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n. 7, p. 1030-1033, 2006.
- DINDA, B.; DEBNATH, S. Monoterpenes: Iridoids. In: **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. 1 ed. Berlin: Springer Heidelberg, 2013. p. 3009–3067.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 159–222, 2007.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A Review, Part 2. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 689–728, 2007.

- DREWES, S. E.; HORN, M. M.; CONNOLLY, J. D.; BREDENKAMP, B. Enolic iridolactone and other iridoids from *Alberta magna*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 991-996, 1998.
- DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; OTTESEN, A. R. Duke's handbook of medicinal plants of Latin America. 1. ed. CRC press, 2008.
- EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 122-132, 2011.
- EL-NAGGAR, L. J.; BEAL, J. L. Iridoids. A review. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 6, p. 649-707, 1980.
- FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant Proanthocyanidins. Part 3. Conformational and Configurational Studies of Natural Procyanidins. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 124, n. 7, p. 1628-1637, 1977.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, N. C.; FIGUEIREDO, P. O. The chemical diversity from the vegetation of Mato Grosso do Sul and its relevance as a source of bioactive molecules. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016.
- GAVILANES, M. L. CASTRO, E. M.; PIRES, M. F.; PEREIRA, F. J.; PEREIRA, M. P. Micromorfometria foliar de *palicourea rigida* kunth. (rubiaceae) em ambiente de cerrado e campo rupestre. **Cerne**, v. 22, n. 2, p. 163-170, 1 abr. 2016.
- GIULIETTI, A. M. HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, P.; DAS GRAÇAS, M.; WANDERLEY, L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, mar. 2013.
- HAN, J. et al. Determination of diterpenoids and flavonoids in *Isodon rubescens* by LC-ESI-MS-MS. **Chromatographia**, v. 62, n. 3-4, p. 203-207, ago. 2005.
- HANH, N. P.; Ye, M.; Chen, H.; Dai, S.; Guo, D. Two new simple iridoids from the ant-plant *Myrmecodia tuberosa* and their antimicrobial effects. **Natural Product Research**, v. 30, n. 18, p. 2071-2076, 2016.

- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. 1. ed. Nova Iorque: Chapman and Hall Ltd, v. 1, 1982.
- HENGEL, P.; NIKKEN, J. J.; JONG, G. M.; HESP, W. L. E. M.; BOMMEL, E. F. H. Mannitol-induced acute renal failure. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 50, n. 1, p. 21-24, 1997.
- HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 7, p. 655–662, 2002.
- HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 43–49, 2003.
- IBGE-CREN. *Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000*. Rio de Janeiro: IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 2019, 164 p.
- INOUE, H.; UEDA, S.; INOUE, K.; TAKEDA, Y. Studies on Monoterpene Glucosides and Related Natural Products. XXIII. Biosynthesis of the Secoiridoid Glucosides, Gentiopicroside, Morroniside, Oleuropein, and Jasminin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 3, p. 676–686, 1974.
- ITOH, A.; KUMASHIRO, T.; YAMAGUCHI, M.; NAGAKURA, N.; MIZUSHINA, Y.; NISHI, T.; TANAHASHI, T. Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 848–852, 2005.
- IWAOKA, E.; OKU, H.; TAKAHASHI, Y.; ISHIGURO, K. Allergy-Preventive Effects of *Hibiscus mutabilis* ‘Versicolor’ and a Novel Allergy-Preventive Flavonoid Glycoside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 3, p. 509–512, 2009.
- IWASHINA, T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. **Journal of Plant Research**, v. 113, p. 287–299, 2000.
- JAYASINGHE, U. L. B. JAYASOORIYA, C. P.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, S. P.; MERLINI, L.; ASSANTE, G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 424–427, 2002.

- JBRJ. *Calycophyllum* in Flora e Funga do Brasil. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13848>. Acesso em: 27 de maio de 2022.
- JONES, C. G.; FIRN, R. D. On the evolution of plant secondary chemical diversity. **Philosophical Transactions - Royal Society of London, B**, v. 333, n. 1267, p. 273–280, 1991.
- JOUBOUHI, C.; TAMOKOU, J. D.; NGNOKAM, D.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; KUIATE, J. R. Iridoids from *Canthium subcordatum* iso-butanol fraction with potent biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 2017.
- JUNIOR, P. Recent Developments in the Isolation and Structure Elucidation of Naturally Occurring Iridoid Compounds. **Planta Medica**, v. 56, 1990.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed. Artmed Editora, 2009.
- JUNG, S. A.; CHOI, M.; KIM, S.; YU, R.; PARK, T. Cinchonine prevents high-fat-diet-induced obesity through downregulation of adipogenesis and adipose inflammation. **PPAR Research**, v. 2012, 11p. 2012.
- KIM, B. C.; KIM, H. G.; LEE, S. A.; LIM, S.; PARK, E. H.; KIM, S. J.; LIM, C. J. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 9, p. 1398-1407, 2005.
- KITAGAWA, I.; WEI, H.; NAGAO, S.; MAHMUD, T.; HORI, K.; KOBAYASHI, M.; UJI, T.; SHIBUYA, H. Indonesian Medicinal Plants. XIV. Characterization of 3'-O-caffeoylsweroside, a new secoiridoid glucoside, and kelampayosides A and B, two new phenolic apioglucosides, from the Bark of *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 1162-1167, 1996.
- KOO, H. J.; SONG, Y. S.; KIM, H. J.; LEE, Y. H.; HONG, S. M.; KIM, B. C.; JIN, C.; LIM, C. J.; PARF, E. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of *Gardenia*. **European journal of pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 201-208, 2004.
- KORNPOINTNER, C. BERGER, A.; TRAXLER, F.; HADŽIABDIĆ, A.; MASSAR, M.; MATEK, J.; BRECKER, L.; SCHINNERL, J. Alkaloid and iridoid glucosides from

Palicourea luxurians (Rubiaceae: Palicoureeae) indicate tryptamine- and tryptophan-iridoid alkaloid formation apart the strictosidine pathway. **Phytochemistry**, v. 173, 1 maio 2020.

KUCHARSKA, A. Z.; FECKA, I. Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS. **Molecules**, v. 21, n. 9, 2016.

KUNERT, O.; SREEKANTH, G.; BABU, G. S.; RAO, B. V. R. A.; RADHAKISHAN, M.; KUMAR, B. R.; RAO, A. V. N. A.; SCHÜHLY, W. Cycloartane triterpenes from Dikamali, the gum resin of *Gardenia gummifera* and *Gardenia lucida*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1185-1192, 2009.

LAMEIRA, O. A. Cultivo da ipecacuanha *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Embrapa Amazônia Oriental**, p. 1-4, 2002.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 04, n. 03, p. 17–31, 2013.

LIM, A.; SUBHAN, N.; JAZAYERI, J.; JOHN, G.; VANNIASINKAM, T.; OBIED, H. K. Plant phenols as antibiotic boosters: In vitro interaction of olive leaf phenols with ampicillin. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 3, p. 503-509, 2018.

LONGHINI, R.; KLEIN, T.; BRUSCHI, M. L.; DA SILVA, W. V.; RODRIGUES, J.; LOPES, N. P.; DE MELLO, J. C. P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 7, p. 1247–1254, 2013.

LV, X.; SUN, J. Z.; XU, S. Z.; CAI, Q.; LIU, Y. Q. Rapid characterization and identification of chemical constituents in *Gentiana radix* before and after wine-processed by UHPLC-LTQ-orbitrap MSn. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

MACHIDA, K.; SASAKI, H.; IJIMA, T.; KIKUCHI, M. Studies on the Constituents of *Lonicera* Species. XVII. 1) New Iridoid Glycosides of the Stems and Leaves of *Lonicera japonica* THUNB. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 1041–1044, 2002.

- MAGRINI, V. Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial de cosmético funcional. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- MAGRINI, Viviane, et al. Avaliação biológica, química e cromatográfica de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae). In: IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 2015, Paraná. *Anais...* Paraná: UniCesumar, 2015. p. 4-8.
- MARKHAN, K. R.; TERNAI, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids. III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1389–1397, 1977.
- MARTINS, D.; CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; SALOMÉ, K. S.; DA SILVA, P. E. A.; BARISON, A.; NUNEZ, C. V. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research International**, 2013.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.
- MOON, H. I.; OH, J. S.; KIM, J. S.; CHEN, P. C.; ZEE, O. P. Phytochemical Compounds from the Underground Parts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2002.
- MORAES, G. M., COHRS, F. M., BATISTA, R. E. A., GRINBAUM, R. S. Infecção ou colonização por micro-organismos resistentes: identificação de preditores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 2, p. 185-191, São Paulo, 2013.
- NAHRSTEDT, A.; ROCKENBACH, J.; WRAY, V. Phenylpropanoid glycosides, a furanone glucoside and geniposidic acid from members of the Rubiaceae. **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 375-378, 1995.
- NONAKA, G.; KAWAHARA, O.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. VIII. A new type of proanthocyanidin, cinchonains IIa and IIb from *Cinchona succirubra*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 4277–4282, 1982.
- OLENNIKOV, D. N.; KASHCHENKO, N. I.; CHIRIKOVA, N. K.; KORYAKINA, L. P.; VLADIMIROV, L. N. Bitter gentian teas: Nutritional and phytochemical profiles,

- polysaccharide characterisation and bioactivity. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20014–20030, 5 nov. 2015.
- OMS. Antimicrobial resistance. World Health Organization, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 22 de junho de 2022.
- PAGE, J. E.; MADRINAN, S.; TOWERS, G. H. N. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the ‘Devil's Garden’. **Experientia**, v. 50, n. 9, p. 840-842, 1994.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.
- PEIXOTO, H.; ROXO, M.; SILVA, F.; SILVA, E.; BRAUN, M. S.; WANG, X.; WINK, M. Calycophyllum spruceanum (Benth.), the Amazonian “Tree of Youth” prolongs longevity and enhances stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 534, 2018.
- PELIKAN, W. The Rubiaceae. **British Homoeopathic Journal**, v. 68, n. 4, p. 188-197, 1979.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.
- PLOUVIER, V.; FAVRE-BONVIN, J. Les iridoïdes et séco-iridoïdes: Répartition, structure, propriétés, biosynthèse. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1697–1722, 1971.
- POLESNA, L.; POLESNY, Z.; CLAVO, M. Z.; HANSSON, A.; KOKOSKA, L. Ethnopharmacological inventory of plants used in Coronel Portillo Province of Ucayali Department, Peru. **Pharmaceutical biology**, v.49, n. 2, p. 125-136, 2011.
- PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAR, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 93–98, 2001.
- POWO. *Calycophyllum* in Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:34281-1>. Acesso em: 27 de maio de 2022.

- QI, L. W.; CHEN, C. Y.; LI, P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 19, p. 3227–3242, 2009.
- RATHEE, D.; RATHEE, P.; RATHEE, S.; RATHEE, D. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Picrorrhiza kurroa*, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S1307–S1313, 1 nov. 2016.
- ROUMY, V.; MACEDO, J. C. R.; BONNEAU, N.; SAMAILLIE, J.; AZAROUAL, N.; ENCINAS, L. A.; RIVIÈRE, C.; HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; ANTHERIEU, S.; PINÇON, C.; NEUT, C.; SIAH, A.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.; RUIZ, L. Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 2020.
- RUKACHAISIRIKUL, V.; NAOVANIT, S. A.; TAYLOR, W. C.; BUBB, W. A.; DAMPAWAN, P. A. Sesquiterpene from *Gardenia sootepensis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 197-200, 1998.
- REN, M. T.; CHEN, J.; SONG, Y.; SHENG, L. S.; LI, P.; QI, L. W. Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 5, p. 1351–1360, 2008.
- RIMPLER, H. Strukturaufklärung von Iridoidglykosiden. **Planta Medica**, v. 33, n. 4, p. 313–335, 1978.
- SALLEH, W. M. N. H. W.; JIBRIL, S.; ABED, S. A.; HASHIM, N. A. Genus *Prismatomeris* (Rubiaceae): Phytochemistry and their biological activities. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 13, n. 2, p. 92-97, 2019.
- SANADHYA, A.; DURVE, A. Isolation and characterisation of antimicrobial compound from fruits of *Anthocephalus indicus* A. Rich. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 975–1491, 2014.
- SANTOS, A. R.; BARROS, M. P.; SANTIN, M. O.; SARRAGIOTTO, S. M. H.; SOUZA, M. C.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 525–527, 2004.

- SANTOS, A. B.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; CARVALHO, C. M. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 383-389, 2016.
- SILVA, Ana Paula Azevedo Barros, et al. *Calycophyllum spruceanum* BENTH ameliorates acute inflammation in mice. **Journal of ethnopharmacology**, 2018, 219: 103-109.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis, Porto Alegre: Ed. da UFSC: Ed. da UFRGS, 2007.
- SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746–757, 2009.
- SOLARTE, A. L.; ASTORGA, R. J.; AGUIAR, F.; GALÁN-RELAÑO, Á.; MALDONADO, A.; HUERTA, B. Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of *Salmonella enterica* multiresistant strains related to foodborne disease. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 10, p. 588-563, 2017.
- SUNGHWA, F.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; KOKETSU, M. Iodine-Catalyzed Etherification of Morroniside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 1, p. 112–115, 2009.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website, Version 14. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>. Acesso em: 27 de maio 2022.
- TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 71, 6, 1387-1404, 2007
- TANG, Y.; YIN, L.; ZHANG, Y.; HUANG, X.; ZHAO, F.; CUI, X.; SHI, L.; XU, L. Study on anti-inflammatory efficacy and correlative ingredients with pharmacodynamics detected in acute inflammation rat model serum from *Caulis Loniceræ japonicæ*. **Phytomedicine**, v. 23, n. 6, p. 597–610, 2016.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. **Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 399–420, 2008.

- TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 141-155, 2019.
- VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. A beleza invisível da biodiversidade: O táxon Rubiaceae. **Revista Virtual Química**, v. 8, n. 1, p. 296-310, 2016.
- VAN BEEK, T. A.; LANKHORST, P. P.; VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A. B. Isolation of the Secoiridoid-Glucoside Sweroside from *Tabernaemontana psorocarpa*. **Planta Medica**, v. 44, p. 30–31, 1982.
- VARGAS, F. G.; ALMEIDA, P. D. O.; BOLETI, A. P. A.; PEREIRA, M. M.; DE SOUZA, T. P.; VASCONCELLOS, M. C.; NUNEZ, C. V.; POHLIT, A. M.; LIMA, E. S. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 83, 2016.
- VEGA, M.; VEGA, V. O. Etnobotánica de la Amazonia peruana. 1 ed. Editorial Abya Yala, 2001.
- VILELA, M. A. Caracterização molecular de isolados bacterianos apresentando mecanismos de resistência a antimicrobianos que atuam na parede celular. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas – Departamento de Genética: Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2009.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 97–110, 2009.
- WEN, Louise, et al. Antifungal activity of four plants used in Peruvian traditional medicine: isolation of the active principle of *Psidium acutangulum*. **Revista de la Sociedad Química del Peru**, 2011, 77.3: 199-204.
- XU, F.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and Related Compounds. XXXI. Isolation and Characterization of Proanthocyanidins in *Kandelia candel* (L.) DRUCE. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 3142–3152, 1985.
- YANG, N. Y.; TAO, W. W.; DUAN, J. A. Antithrombotic flavonoids from the faeces of *Trogopterus xanthipes*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 19, p. 1843–1849, 2010.
- YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-147, 2014.

- YARBROUGH, M. L.; LAINHART, W.; BURNHAM, C. D. Epidemiology, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, p. 1-10, 2018.
- YE, X. S.; HE, J.; XU, J. K.; HE, X. L.; XIA, C. Y.; YAN, Y.; LIAN, W. W.; ZHANG, W. K. Undescribed morroniside-like secoiridoid diglycosides with α -glucosidase inhibitory activity from *Corni Fructus*. **Phytochemistry**, v. 171, 2020.
- ZULETA, L. M. C. Estudo químico e bioativo das cascas de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae). 2002. 231 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- ZULETA, L. M.; CAVALHEIRO, A.; SILVA, D.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; ALBURQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 549-553, 2003.