

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Euxylophora paraensis* E  
AVALIAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FRENTE À  
ENZIMA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE  
DE *Trypanosoma cruzi*.**

**Marsele Machado Isidoro\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Graças Fernandes da Silva**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

I81ef

Isidoro, Marsele Machado.

Estudo fitoquímico de *Euxylophora paraensis* e avaliação das substâncias isoladas frente à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* / Marsele Machado Isidoro. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
143 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

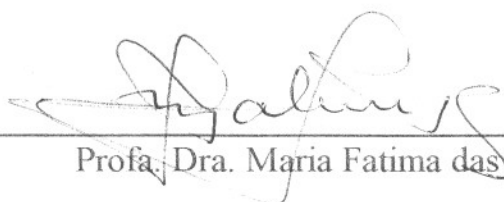
1. *Euxylophora paraensis*. 2. Calorimetria. 3. Chagas, Doença de. 4. GAPDH. I. Título.

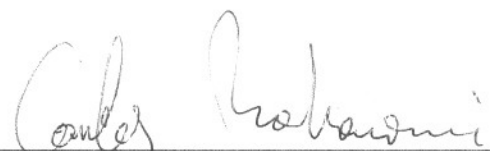
CDD: 547.3 (20<sup>a</sup>)

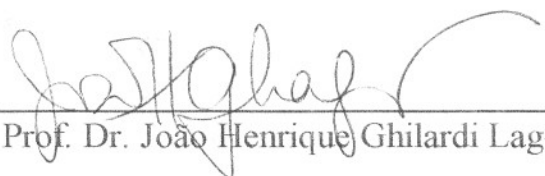
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Marsele Machado Isidoro**, realizada em 22 de agosto de 2008:*

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Fatima das G. F. da Silva

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

*Dedico este trabalho aos meus pais, Jose Maria e Sirley e aos meus irmãos Rodrigo e Leonardo pelo carinho, apoio e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus pelas oportunidades concedidas e por estar sempre iluminando a minha vida.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela confiança, paciência, ensinamentos e amizade.*

*Ao meu co-orientador Dr. Sebastião da Cruz Silva pelos ensinamentos, estímulo à pesquisa e amizade.*

*Ao Rodrigo, pelo carinho, companheirismo, atenção e paciência.*

*Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, João Batista Fernandes, Paulo César Vieira e Edson Rodrigues Filho que participaram da evolução deste trabalho.*

*Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari (IQSC) pela receptividade, ensinamentos e contribuição nos ensaios biológicos.*

*Ao Aluno de doutorado Renato Ferreira de Freitas (IQSC) pela realização dos ensaios, paciência e ensinamentos.*

*À todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar que não citarei nomes por serem muitos, pela amizade, ensinamentos, apoio e por proporcionarem um ambiente de trabalho prazeroso e familiar.*

*À CAPES pela bolsa concedida.*

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Euxylophora paraensis* E AVALIAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FRENTE À ENZIMA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Trypanosoma cruzi* – Este trabalho descreve o estudo fitoquímico do caule e das folhas da espécie *E. paraensis* (Rutaceae). Este estudo visa contribuir com a química da família Rutaceae e verificar a atividade tripanocida das substâncias isoladas desta espécie. O estudo fitoquímico resultou no isolamento de 15 metabólitos secundários, divididos em: dois alcalóides *N*-metil-flindersina e esquimianina; mistura de três esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol; o limonóide limonina; seis cumarinas: marmesina, 8-metoximarmesina, isooxipeucedanina, prangol, isopimpenilina e xantotoxina; e três flavonóides glicosilados, quercetina 3- $\beta$ -O-raminosídeo, miricetina 3- $\beta$ -O-raminosídeo e hesperidina, sendo esta última classe inédita nesta espécie. Os compostos isolados foram avaliados quanto a atividade enzimática inibitória de gGAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) de *T. cruzi*. Contudo, foi utilizada uma estratégia de triagem virtual baseada nas propriedades físico-químicas das substâncias isoladas através do programa computacional Volsurf 3.0. A capacidade inibitória dos compostos pré-classificados foi testada através de uma Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC), que permitiu caracterizar o mecanismo de ação das substâncias ativas sobre a enzima GAPDH. Através do ensaio padronizado foram testados os seguintes compostos frente à GAPDH: Limonina, quercetina-3- $\alpha$ -O-L-raminosídeo e prangol que apresentaram constantes de inibição variando entre 91,8 ( $\pm$ 18,08) e 384,8 ( $\pm$ 145,05)  $\mu$ M; hesperidina e marmesina não apresentaram atividade contra a enzima.

## ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Euxylophora paraensis* AND EVALUATION OF SUBSTANCES ISOLATED FRONT OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE OF *Trypanosoma cruzi*– This work describe the phytochemical study of bark and leaves of the specie *E. paraensis* (Rutaceae). This dissertation aims at contributing with the chemistry of the Rutaceae family and evaluation of the antichagasic activity of substances isolated. The phytochemical study allowed to isolate fifteen secondary metabolites belonging to different classes: two alkaloids: *N*-methylflindersine and skimmianine; the mixture of three steroids:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol e campestanol; the limonoid limonin; six coumarins, which are: marmesin, 8-methoximarmesin, isooxypeucedanin, prangol, isopimpinellin and xanthotoxin; and three glycosides flavonoids: quercetin-3- $\beta$ -O-rhamnopyranoside, myricetin-3- $\beta$ -O-rhamnopyranoside and hesperidin, while there is still no reports on the isolation of flavonoids in this specie. The isolated compounds were evaluated as the enzyme inhibitory activity in Ggapdh (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) of *T. cruzi*. However, a strategy was used for virtual screening based on physical and chemical properties of substances isolated by the computer program Volsurf 3.0. The ability of the inhibitory compounds pre-classified was tested by isothermal titration calorimetry (ITC), which has characterized the mechanism of action of active substances on the enzyme GAPDH. Through the standardized test the following compounds were tested front of GAPDH: Limonin, quercetin-3- $\alpha$ -O-rhamnopyranoside and prangol showed that the inhibition constant ranging between 91.8 ( $\pm$  18.08) and 384.8 ( $145 \pm , 05$ )  $\mu$ M; hesperidin and marmesin that have not submitted activity against the enzyme.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATP	Adenosina tri-fosfato
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP	Cromatografia líquida de média pressão
COSY	Correlação heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	Incremento sem distorção por transferência de polarização
DiCl	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Enzima
EI	Enzima-inibidor
EIS	Enzima-inibidor-substrato
ES	Enzima-substrato
[E] <sub>t</sub>	Concetração total de enzima
ETOH	Etanol
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G <sub>3</sub> P	D,L-Gliceraldeído-3-fosfato
H	Altura da sílica na coluna
Hex	Hexano
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HSQC	Correlação heteronuclear de Quantum-Simples
Hz	Hertz
ITC	Titulação calorimétrica isotérmica
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>k</i> <sub>cat</sub>	Constante de velocidade da etapa lenta



$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$K_I$	Constante de inibição
Lit.	Dados da literatura
$M$	Multiplete
$m/z$	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
P	Produto
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
Rpm	Rotações por minuto
$S$	Singleto
SAM	S-Adenosil metionina
$sl$	Singleto largo
S	Substrato
$T$	Triplete
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA-HCl	Trietanolamina hidrocloreídrico
$V_{\text{max}}$	Velocidade máxima
UV	Ultravioleta
$\phi$	Diâmetro
$\delta$	Deslocamento químico
$\Delta G$	Varição de energia livre de Gibbs
$\Delta S$	Varição de entropia
$\Delta H_{\text{app}}$	Varição de entalpia aparente de reação

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1:</b> Classificação taxonômica de <i>E. paraensis</i> .....	04
<b>TABELA 1.2</b> – Enzimas envolvidas na via glicolítica.....	11
<b>TABELA 3.1</b> – Massas das partições do extrato etanólico das folhas.....	35
<b>TABELA 3.2</b> – Massas e códigos das frações do extrato etanólico do caule.....	37
<b>TABELA 4.1</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da <i>N</i> -metilflindersina (2) .....	58
<b>TABELA 4.2</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ de Esquimianina (3) .....	62
<b>TABELA 4.3</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da limonina (4) .....	71
<b>TABELA 4.4</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da 8-metoximarmesina (5).....	78
<b>TABELA 4.5</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da marmesina (6).....	82
<b>TABELA 4.6</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ isooxipeucedanina (7).....	88
<b>TABELA 4.7</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da Prangol (8).....	94
<b>TABELA 4.8</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ isooxipeucedanina (9).....	99
<b>TABELA 4.9</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ isopimpenilina (10).....	99
<b>TABELA 4.10</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (11) .....	109
<b>TABELA 4.11</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (12) .....	113
<b>TABELA 4.12</b> - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de Hesperidina (13) .....	117
<b>TABELA 5. 1</b> – Valores de $K_M$ e $V_{\max}$ para as substâncias ativas contra a enzima GAPDH através de um mecanismo competitivo.....	125
<b>TABELA 5.2</b> – Valores de $K_I$ para as substâncias testadas contra a enzima GAPDH.....	126

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1:</b> Estrutura da Tubocurarina.....	02
<b>FIGURA 1.2:</b> Alcalóides do tipo 2-quinolona isolados de <i>E. paraensis</i> ..	04
<b>FIGURA 1.3:</b> Alcalóides do tipo indolopiridoquinazonolínicos isolados de <i>E. paraensis</i> .....	05
<b>FIGURA 1.4:</b> Alcalóides do tipo bisquinolona isolados de <i>E. paraensis</i> .	06
<b>FIGURA 1.5:</b> Fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.	08
<b>FIGURA 1.6</b> – Esquema do metabolismo da glicose e glicerol no glicossoma.....	11
<b>FIGURA 1.7</b> – Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH.....	12
<b>FIGURA 1.8</b> – MIF's gerados para a cumarina Chalepina. a) sonda água; b) sonda hidrofóbica.....	14
<b>FIGURA 1.9</b> – Equação de uma reação catalisada por uma enzima.....	15
<b>FIGURA 1.10</b> – Representação gráfica da curva típica de Michaelis-Menten.....	17
<b>FIGURA 1.11</b> – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor competitivo.....	20
<b>FIGURA 1.12</b> – Representação gráfica de uma inibição enzimática competitiva.....	21
<b>FIGURA 1.13</b> – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor não competitivo.....	22
<b>FIGURA 1.14</b> – Representação gráfica de uma inibição enzimática não competitiva.....	22
<b>FIGURA 1.15</b> – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor incompetivo.....	23
<b>FIGURA 1.16</b> – Representação gráfica de uma inibição enzimática por mecanismo incompetivo.....	24
<b>FIGURA 1.17</b> – Esquema representativo da seringa e célula de amostra de um microcalorímetro.....	25
<b>FIGURA 4.1</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura <b>1A</b> + <b>1B</b> + <b>1C</b> . (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	53

<b>FIGURA 4.2</b> – (a) Cromatograma da mistura <b>1A + 1B + 1C</b> ; (b) Espectro de massa (IE = 70 eV) do sitosterol; (c) Espectro de massa do estigmasterol (IE = 70 eV); (d) Espectro de massa (IE = 70 eV) do campesterol.....	54
<b>FIGURA 4.3</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância <b>2</b> . ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	59
<b>FIGURA 4.4</b> – Espectro de COSY H-H da substância <b>2</b> . ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	59
<b>FIGURA 4.5</b> – Mapa de Correlações HSQC da substância <b>2</b> . ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	60
<b>FIGURA 4.6</b> – Mapa de correlações HMBC da substância <b>2</b> . ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	60
<b>FIGURA 4.7</b> – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da esquimianina ( <b>13</b> ).....	62
<b>FIGURA 4.8</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de esquimianina ( <b>3</b> ) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	63
<b>FIGURA 4.9</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da Limonina ( <b>4</b> ) (400 MHz).....	72
<b>FIGURA 4.10</b> – Espectro de HSQC da Limonina ( <b>4</b> ) (400 MHz).....	72
<b>FIGURA 4.11</b> – Espectro de HMBC da Limonina ( <b>4</b> ) (400 MHz).....	73
<b>FIGURA 4.12</b> – Espectro de COSY da Limonina ( <b>4</b> ) (400 MHz).....	73
<b>FIGURA 4.13</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de ( <b>4</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	74
<b>FIGURA 4.14</b> – Espectro de RMN de DEPT $135^\circ$ de ( <b>4</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	74
<b>FIGURA 4.15</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de 8-metoximarmesina ( <b>5</b> ) (400 MHz).....	79
<b>FIGURA 4.16</b> – Espectro de HSQC de 8-metoximarmesina ( <b>5</b> ) (400 MHz).....	79
<b>FIGURA 4.17</b> – Espectro de HMBC de 8-metoximarmesina ( <b>5</b> ) (400 MHz).....	80
<b>FIGURA 4.18</b> – Espectro de massa (IE = 70 e. V.) da marmesina.....	82
<b>FIGURA 4.19</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da marmesina ( <b>6</b> ) (400 MHz).....	83
<b>FIGURA 4.20</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da marmesina ( <b>6</b> ) (100 MHz).....	84
<b>FIGURA 4.21</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da isooxipeucedanina ( <b>7</b> ) (400 MHz).....	89

<b>FIGURA 4.22</b> – Espectro de HSQC da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).....	89
<b>FIGURA 4.23</b> – Espectro de HMBC da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).....	90
<b>FIGURA 4.24</b> – Espectro de COSY da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).....	90
<b>FIGURA 4.25</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Prangol (8) (400 MHz).....	95
<b>FIGURA 4.26</b> – Espectro de COSY de Prangol (8) (400 MHz).....	95
<b>FIGURA 4.27</b> – Espectro de HSQC de Prangol (8) (400 MHz).....	96
<b>FIGURA 4.28</b> – Espectro de HMBC de Prangol (8) (400 MHz).....	96
<b>FIGURA 4.29</b> – Cromatograma da separação das substâncias 9 e 10 por CLMP.....	100
<b>FIGURA 4.30</b> – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da Xantotoxina.....	100
<b>FIGURA 4.31</b> – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da Isopimpenilina.	101
<b>FIGURA 4.32</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 9.....	102
<b>FIGURA 4.33</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância 9 (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	102
<b>FIGURA 4.34</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância 10 (MeOD, 400 MHz).....	103
<b>FIGURA 4.35</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância 10 (MeOD, 100 MHz).....	103
<b>FIGURA 4.36</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da quercetina-3-β-O-raminosídeo (11) (400 MHz, MeOD).....	110
<b>FIGURA 4.37</b> – Espectro de COSY da quercetina-3-β-O-raminosídeo (11) (400 MHz).....	110
<b>FIGURA 4.38</b> – Espectro de HSQC da quercetina-3-β-O-raminosídeo (11) (400 MHz).....	111
<b>FIGURA 4.39</b> – Espectro de HMBC da quercetina-3-β-O-raminosídeo (11) (400 MHz).....	111
<b>FIGURA 4.40</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Miricetina-3-β-O-raminosídeo (12) (400 MHz, MeOD).....	114
<b>FIGURA 4.41</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da Miricetina-3-β-O-raminosídeo (12) (100 MHz, MeOD).....	114

<b>FIGURA 4.42</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da hesperidina ( <b>13</b> ) (400 MHz, DMSO).....	118
<b>FIGURA 4.43</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C da hesperidina ( <b>13</b> ) (100 MHz, DMSO).....	118
<b>FIGURA 5.1</b> – Gráfico de escores (PCA) de predição externa das substâncias isoladas de <i>E. paraensis</i> (em azul) contra o banco de dados de 123 moléculas ativas contra a GAPDH.....	122
<b>FIGURA 5.2</b> – Representação das estruturas químicas dos compostos testados contra a enzima GAPDH por ITC.....	123
<b>FIGURA 5.3</b> – Curvas de Michaelis-Menten dos ensaios de inibição. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas de inibição. A concentração dos inibidores foi mantida em 50 μM.....	124
<b>FIGURA 5.4</b> – Representação das estruturas químicas dos Nucleosídeos <b>N25</b> , <b>N26</b> e <b>N27</b> .....	127

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>FLUXOGRAMA 3.1</b> – Obtenção dos extratos etanólicos do caule e da folha de <i>E. paraensis</i> .....	33
<b>FLUXOGRAMA 3.2</b> – Metodologia utilizada na partição do extrato etanólico das folhas.....	34
<b>FLUXOGRAMA 3.3</b> – Metodologia utilizada na partição do extrato etanólico das folhas.....	36
<b>FLUXOGRAMA 3.4</b> – Fracionamento do extrato EPFH.....	38
<b>FLUXOGRAMA 3.5</b> – Fracionamento do extrato EPFD.....	40
<b>FLUXOGRAMA 3.6</b> – Fracionamento do extrato EPFD.....	41
<b>FLUXOGRAMA 3.7</b> – Fracionamento do extrato EPFHid.....	42
<b>FLUXOGRAMA 3.8</b> – Fracionamento do extrato EPCS3.....	44
<b>FLUXOGRAMA 3.9</b> – Fracionamento do extrato EPCS8.....	45

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 4.1</b> – Proposta de fragmentação do sitosterol.....	55
<b>ESQUEMA 4.2</b> – Propostas de fragmentação para a substância <b>3</b> .....	63
<b>ESQUEMA 4.3</b> – Proposta biogenética para a esquimianina.....	64
<b>ESQUEMA 4.4</b> – Proposta biogenética para a N-metilflindersina.....	65
<b>ESQUEMA 4.4</b> – Proposta de fragmentação da marmesina.....	83
<b>ESQUEMA 4.5</b> – Proposta de fragmentação da substância <b>9</b> .....	101
<b>ESQUEMA 4.6</b> – Proposta de fragmentação da substância <b>10</b> .....	101
<b>ESQUEMA 4.7</b> – Proposta biogenética para as substâncias <b>5, 6, 9 e 10</b> .....	104
<b>ESQUEMA 4.8</b> – Proposta biogenética para as substâncias <b>7 e 8</b> .....	105



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Planta Estudada.....	3
1.1.1. Família Rutaceae.....	3
1.1.2. Perfil químico de <i>Euxylophora paraensis</i> .....	4
1.2. Doença de Chagas.....	7
1.3. A via glicolítica como alvo para o planejamento de fármacos antichagásicos.....	9
1.4. Pré-seleção de substâncias potencialmente bioativas utilizando programas computacionais.....	12
1.4.1. Programa Volsurf 3.0.....	13
1.4.2. Análise por componentes principais (PCA).....	14
1.5. Mecanismo cinético de catálise enzimática.....	15
1.5.1. Inibição Enzimática.....	19
1.5.1.1. Inibição reversível competitiva.....	20
1.5.1.2. Inibição reversível não competitiva.....	21
1.5.1.3. Inibição reversível incompetitiva.....	23
1.6. Determinação da cinética enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC) .....	24
2. Objetivo.....	28
3. Procedimento Experimental.....	30
3.1. Materiais e Métodos.....	31
3.2. Equipamentos.....	32
3.3. Coleta do material botânico.....	33
3.4. Preparação dos extratos vegetais.....	34
3.5. Obtenção das frações.....	35
3.5.1. Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Euxylophora</i>	

<i>paraensis</i> (EPFE) .....	35
3.5.2. Fracionamento do extrato etanólico do caule de <i>Euxylophora</i> <i>paraensis</i> (EPCE) .....	36
3.6. Isolamento dos constituintes de <i>Euxylophora paraensis</i> .....	39
3.6.1. Estudo químico das frações da folha.....	39
3.6.1.1. Estudo químico da fração EPFH.....	39
3.6.1.2. Estudo químico da fração EPFD.....	40
3.6.1.3. Estudo químico da fração EPFA.....	42
3.6.1.4. Estudo químico da fração EPFHid.....	43
3.6.2. Estudo químico das frações obtidas do caule.....	44
3.6.2.1. Estudo químico da fração EPCS3.....	44
3.6.2.2. Estudo químico da fração EPCS8.....	45
3.6.2.3. Estudo químico da fração EPCS12.....	47
4. Resultados.....	48
4.1. Substâncias Isoladas.....	49
4.2. Esteróides.....	53
4.2.1. Identificação estrutural do sitosterol (1A), estigmasterol (1B) e campesterol (1C) .....	53
4.3. Alcalóides.....	57
4.3.1. Determinação estrutural da substância 2.....	57
4.3.2. Identificação estrutural da substância 3.....	62
4.3.3. Biogênese dos Alcalóides.....	65
4.4. Limonóides.....	67
4.4.1. Determinação estrutural da substância 4.....	67
4.5. Cumarinas.....	76
4.5.1. Determinação estrutural da substância 5.....	76
4.5.2. Determinação estrutural do composto 6.....	82
4.5.3. Determinação estrutural da substância 7.....	85
4.5.4. Determinação estrutural da substância 8.....	92

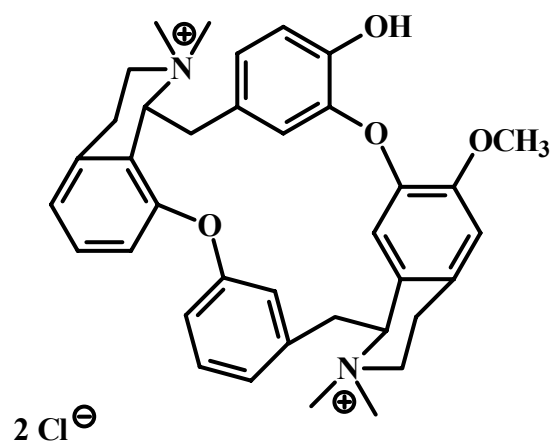
4.5.5. Determinação estrutural das substâncias 9 e 10.....	98
4.6. Biogênese de cumarinas.....	105
4.7. Flavonóides.....	107
4.7.1. Determinação estrutural da substância 11.....	107
4.7.2. Determinação estrutural da substância 12.....	113
4.7.3. Determinação estrutural da substância 13.....	116
5. Ensaio Biológico.....	120
5.1. Procedimento Experimental.....	121
5.1.1. Materiais.....	121
5.1.2. Equipamentos.....	122
5.1.3. Pré-seleção de substâncias potencialmente ativas através de métodos computacionais.....	122
5.1.4. Ensaio de inibição enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC) .....	12
5.2. Resultados e discussão.....	123
5.2.1. Pré-seleção de substâncias potencialmente ativas através de métodos computacionais.....	123
5.2.2. Ensaio de inibição enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC) .....	126
6. Conclusões.....	132
7. Referências Bibliográficas.....	136

# **1 INTRODUÇÃO**

---

---

O uso de plantas como cura para doenças é um conhecimento tradicional, datado de centenas de anos. Ao procurar plantas para o seu sustento e alimentação, o homem, desde a pré-história, acabou descobrindo espécies de plantas com ação tóxica ou medicinal, construindo assim um conhecimento empírico das suas ações medicinais. Como exemplo tem-se o curare, um veneno utilizado nas flechas por certas tribos indígenas da floresta amazônica que deu origem à descoberta de poderosos relaxantes musculares utilizados nos dias atuais, como auxiliares indispensáveis em determinadas intervenções cirúrgicas. As vítimas feridas por essas flechas ficavam paralisadas durante um período de 2 a 3 h. O princípio ativo do curare foi isolado em 1935 de uma trepadeira tropical *Chondodendron tomentosum* da família Menispermaceae e a substância, um alcalóide, foi chamado de tubocurarina<sup>1</sup>. A **FIGURA 1.1** mostra que este alcalóide é, na verdade, um sal de amônio quaternário solúvel em água.



**FIGURA 1.1:** Estrutura da Tubocurarina

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos<sup>2</sup>. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas<sup>3</sup> de um total estimado entre 350.000 e 550.000.

Dentro desse contexto, o grupo de Produtos Naturais da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) vem já há muitos anos, estudando espécies vegetais pertencentes às famílias Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae, preocupando-se não somente com o isolamento e elucidação estrutural de seus constituintes químicos, mas também com ensaios biológicos na tentativa de contribuir com modelos de substâncias potencialmente ativas.

## **1.1 – Planta Estudada**

### **1.1.1 – Família Rutaceae**

A família Rutaceae constitui o maior grupo de plantas da ordem Rurales possuindo cerca de 150 gêneros, com 1500 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália. No Brasil existem cerca de 200 espécies, já descritas<sup>4</sup>.

A família Rutaceae é muito conhecida pela presença de uma ampla diversidade de metabólitos secundários entre eles, podem se destacar os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, as cumarinas, as lignanas, os flavonóides, os terpenóides e os limonóides<sup>5</sup>.

Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica<sup>4</sup>, despertando o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica desta família.

Os gêneros da família Rutaceae já foram classificados de acordo com suas características morfológicas e químicas<sup>6</sup>, sendo que ainda existem controvérsias sobre o posicionamento taxonômico de alguns gêneros, estimulando o estudo de espécies ainda não investigadas.

O presente trabalho estudou a espécie *Euxylophora paraensis*, pertencente a esta família.

### 1.1.2 – Perfil químico de *Euxylophora paraensis*

O gênero *Euxylophora* é monotípico, apresentado somente a espécie *Euxylophora paraensis*<sup>7</sup>. Esta é uma árvore brasileira de grande porte, conhecida popularmente como pau-amarelo devido à cor de seu caule, e fornecedora de madeira de excelente qualidade, encontrando aplicação na confecção de diversos móveis. Infelizmente ela consta na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção desde 1993<sup>8</sup>.

**TABELA 1.1** – Classificação taxonômica de *E. paraensis*.

<b>Taxonomia de <i>E. paraensis</i></b>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Rutaceae
Gênero	<i>Euxylophora</i>

Segundo levantamento bibliográfico, foram isolados diversos alcalóides de *Euxylophora*, sendo eles do tipo 2-quinolona<sup>[9-11]</sup> (**FIGURA 1.2**, p. 40), indolopiridoquinazolínico<sup>[12-16]</sup> (**FIGURA 1.3**, p. 42), bisquinolona<sup>9,10,17,18</sup> (**FIGURA 1.4**, p. 44) e o alcalóide furoquinolínico esquimianina.

Esta espécie já foi estudada anteriormente<sup>19</sup> pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos), onde foram isolados o alcalóide N-metilflindersina, as furanocumarinas marmesina e 8-metoximarmesina e o limonóide limonina, sendo este o primeiro relato desta última classe no gênero.

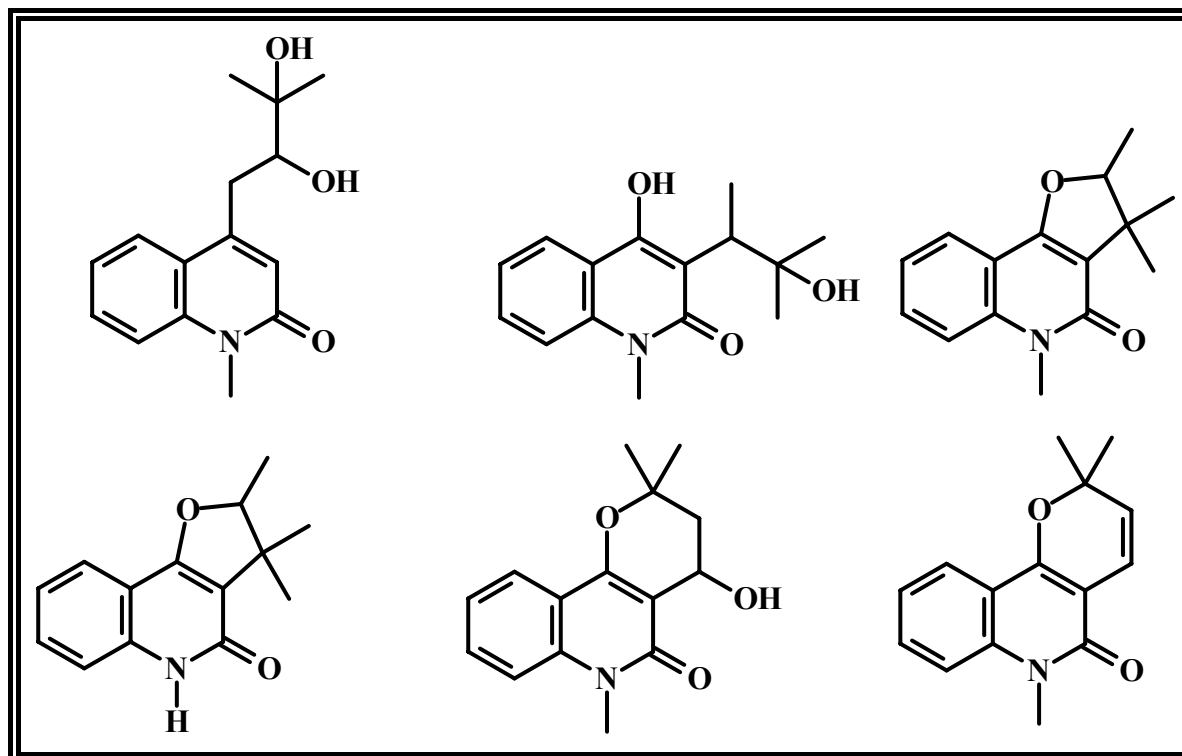


FIGURA 1.2 – Alcalóides do tipo 2-quinolona isolados de *E. paraensis*.

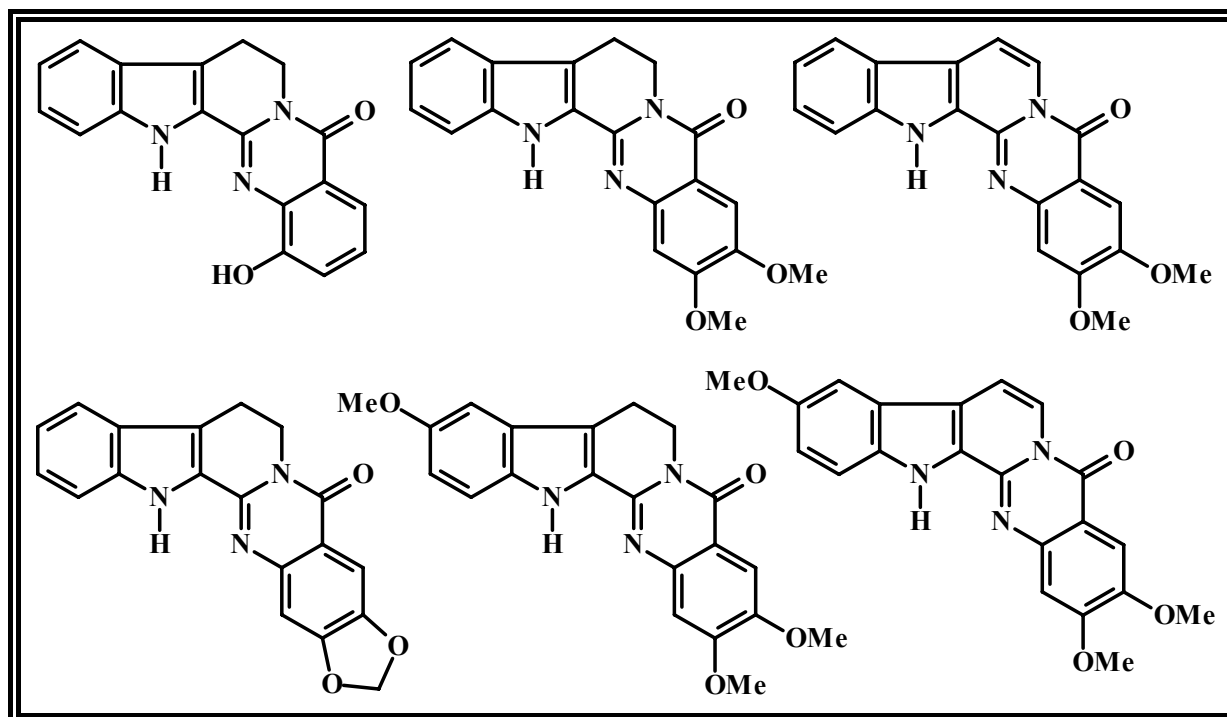
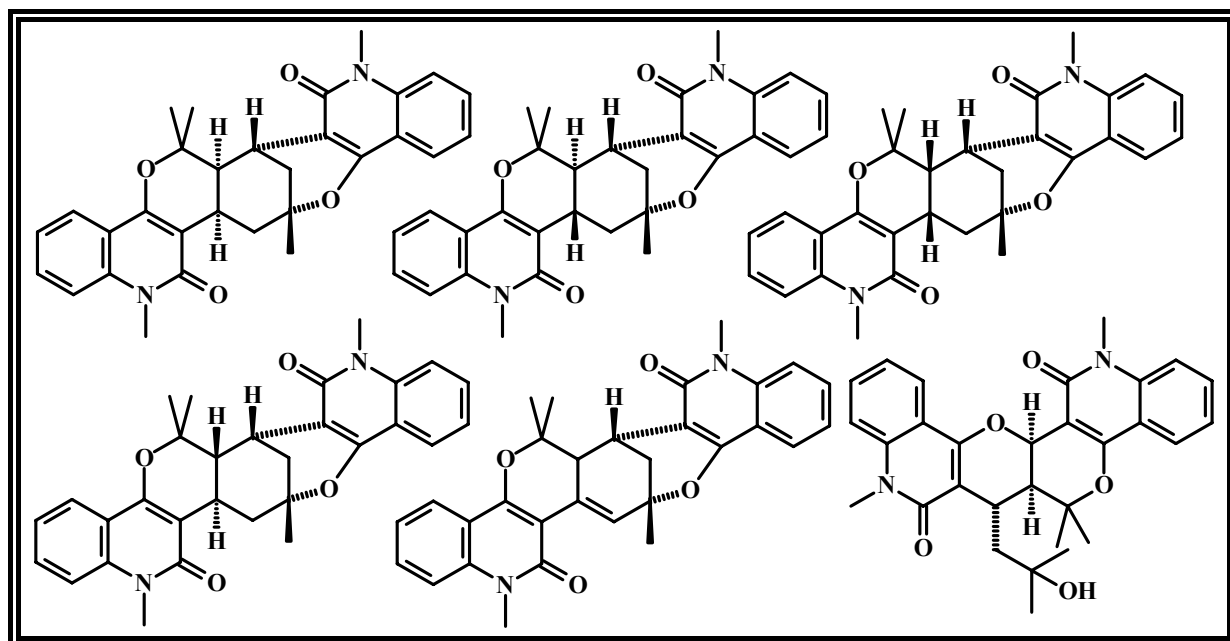


FIGURA 1.3 – Alcalóides do tipo indolopiridoquinazonolínicos isolados de *E. paraensis*.





**FIGURA 1.4** – Alcalóides do tipo bisquinolona isolados de *E. paraensis*.

## **1.2 – Doença de Chagas**

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas, principalmente nas Américas do Sul, Central e também se manifesta em áreas metropolitanas dos Estados Unidos<sup>20</sup>. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 5 milhões de pessoas estão infectadas, a maioria vivendo nas grandes cidades<sup>21</sup>.

O vetor de transmissão é um inseto conhecido popularmente como “barbeiro” (ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae), que ataca o homem à noite para lhe sugar o sangue, infectando-o através das fezes<sup>22</sup>.

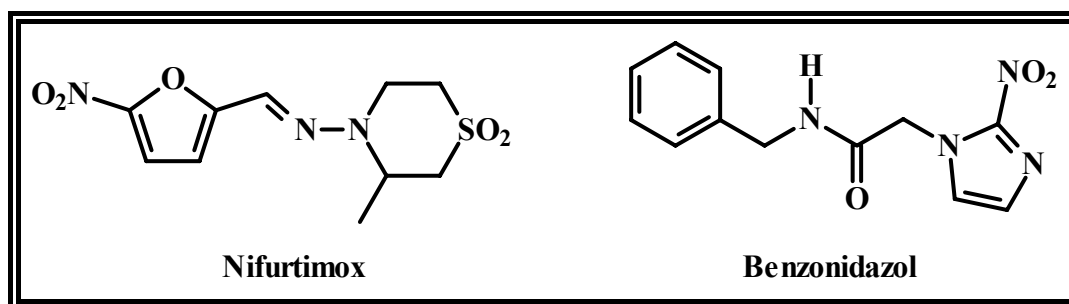
O agente etiológico desta doença é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae). Ao longo de seu ciclo vital, para adaptar-se a diferentes situações bioecológicas, o *T. cruzi* assume diferentes formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota<sup>23</sup>. Os tripomastigotas são as formas infectantes, de movimentação extracelular, encontrados no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e nas porções terminais do tubo digestivo do inseto vetor; Amastigotas são as formas responsáveis pela multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado, onde subsistem exclusivamente no interior de diferentes tipos de células; e Epimastigotas são formas móveis de transição entre tripomastigotas e amastigotas, encontráveis basicamente no tubo digestivo do inseto vetor e em meios artificiais de cultivo<sup>22</sup>.

O parasito penetra através da pele lesionada (pela picada do triatomíneo) ou é injetado na corrente sanguínea pela via transfusional. Disseminado o parasito, haverá multiplicação do mesmo em vários órgãos e tecidos, especialmente em fibras musculares lisas e estriadas, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais<sup>23</sup>. Na fase aguda da doença o número de tripomastigotas circulantes e de células parasitadas aumenta exponencialmente com a sucessão dos ciclos intracelulares do parasito, até o momento em que a

maioria dos hospedeiros consegue estabelecer uma resposta imune suficiente para reprimir o processo e diminuir paulatinamente a parasitemia. Isto caracteriza a entrada na fase crônica da doença, que permanece assintomática durante 10 a 20 anos após o contágio. No entanto, neste período de bem estar o parasita está se reproduzindo continuamente em baixos números causando danos irreversíveis em órgãos como o sistema nervoso e o coração.

A prevenção é a estratégia mais recomendada para o controle desta parasitose, ou seja, com a eliminação do inseto vetor através de melhorias nas condições de habitação e higiene das populações afetadas. Bons resultados têm sido alcançados na redução da incidência da doença por esses mecanismos de controle<sup>24</sup>. Entretanto, existem vários reservatórios silvestres de *T. cruzi*, que inviabilizam a sua completa eliminação<sup>25</sup>.

Atualmente o tratamento é mais sintomático do que etiológico. Do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações clínicas da doença, como a administração de diuréticos no caso de insuficiência cardíaca congestiva. Do ponto de vista etiológico, os fármacos disponíveis há mais de três décadas (**FIGURA 1.5**) nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) e benzonidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Roche), são ativos somente na fase aguda da doença, sendo que o nifurtimox não é mais comercializado no Brasil e em outros países como a Argentina, Chile e Uruguai<sup>26</sup>. Estes fármacos, além de baixa eficácia, apresentam graves efeitos adversos provenientes de sua administração, como anorexia, náuseas, vômitos, alergia cutânea e neuropatia periférica<sup>27</sup>.

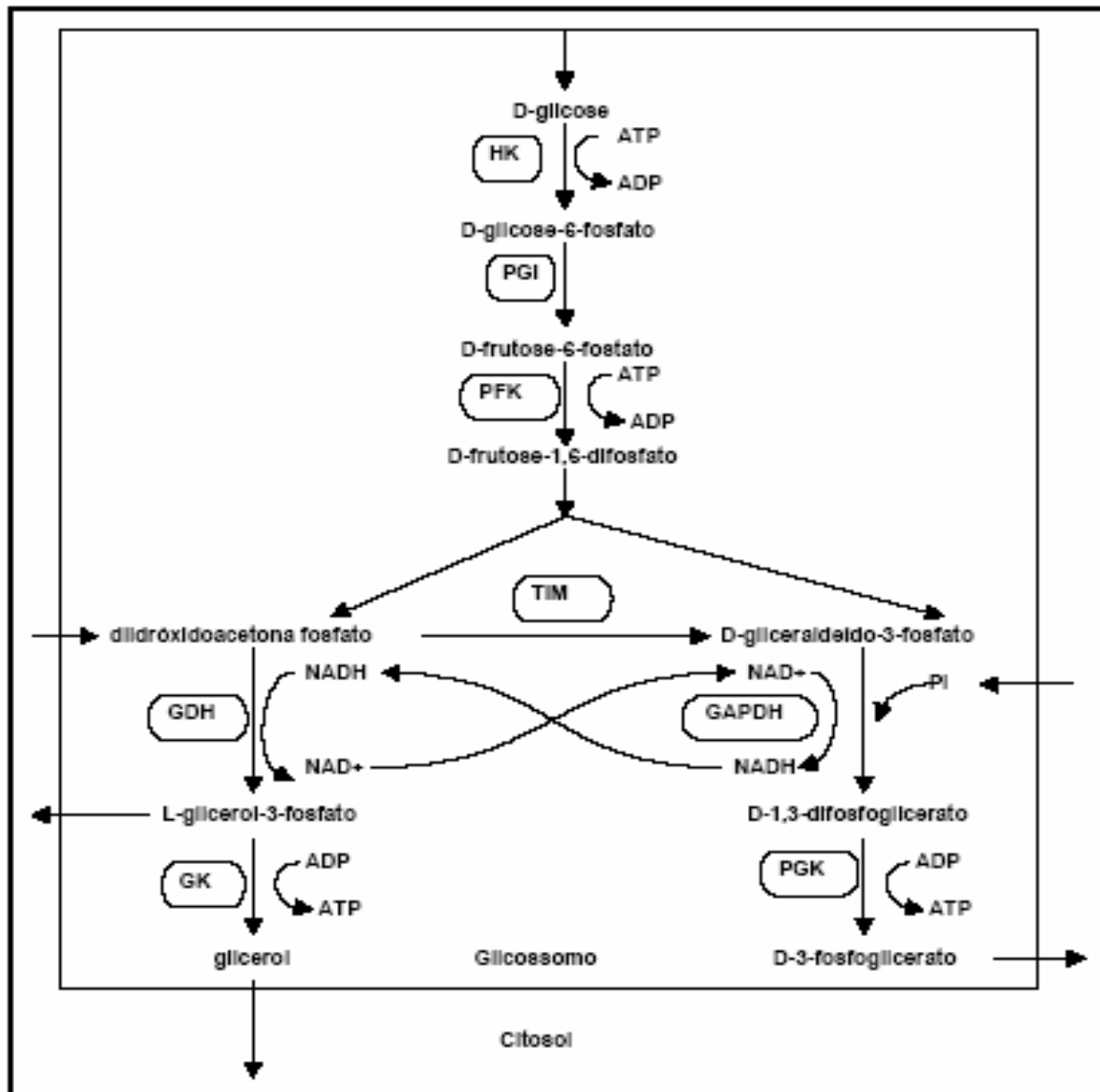


**FIGURA 1.5** – Fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.

### 1.3 – A via glicolítica como alvo para o planejamento de fármacos antichagásicos

O parasita *T. cruzi* apresenta uma organela especializada característica da família *Trypanosomatidae*, chamada glicossoma, que contém nove enzimas envolvidas nas reações da via glicolítica<sup>28,29</sup> (**FIGURA 1.6**). Esta via bioquímica é a principal fonte de energia da forma tripomastigota de *T. brucei* e *T. cruzi*<sup>30</sup>. Isto se deve ao fato de que o parasita possui mitocôndrias inativas durante determinadas fases de seu ciclo celular, o que impede o funcionamento de rotas metabólicas alternativas mais eficientes para a produção de ATP<sup>28,29</sup>. Além disso, estudos realizados com a forma tripomastigota do *T. cruzi* demonstraram que a inibição rota glicolítica é eficaz na morte deste parasita<sup>31</sup>.

As enzimas envolvidas na via glicolítica de tripanosomatídeos se apresentam como alvos importantes para o planejamento de novos fármacos através de inibição seletiva<sup>29</sup>. De fato, uma avaliação do controle do fluxo glicolítico em tripanosomatídeos identificou as enzimas cuja inibição seletiva levaria a uma redução significativa da glicólise no parasita. (**TABELA 1.2**)<sup>32,33</sup>

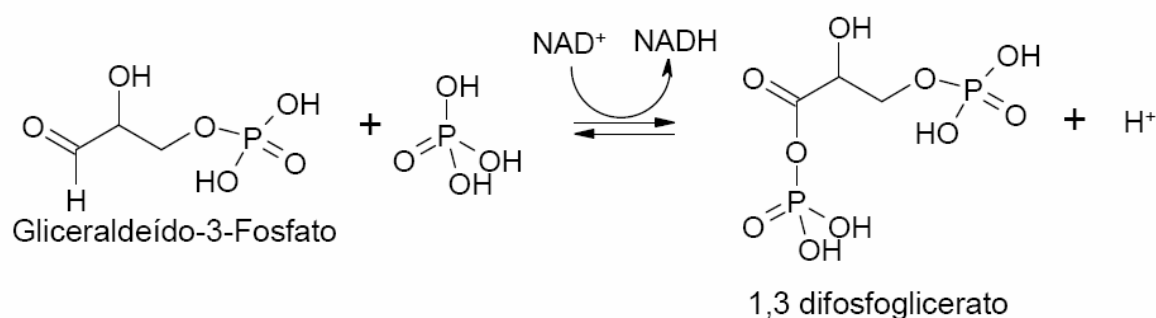


**FIGURA 1.6** – Esquema do metabolismo da glicose e glicerol no glicossoma. As enzimas constituintes do glicossoma são: HK, hexoquinase; PGI, fosfoglicose isomerase; PFK, 6-fosfofruto-quinase; GDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase; GK, glicerol quinase; TIM, triosefosfato isomerase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato quinase;

**TABELA 1.2** – Enzimas envolvidas na via glicolítica. \*HK, hexoquinase; PFK, 6-fosfofruto-quinase; ALDO, frutose-difosfato aldolase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato quinase; GDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase.

Enzima*	Inibição Necessária (%)
HK	93
PFK	93
ALDO	76
GAPDH	84
PGK	85
GDH	83

Tendo-se identificado alguns alvos enzimáticos contra o *T. cruzi*, é possível o planejamento de fármacos contra o parasito. Entre os alvos citados, selecionou-se neste trabalho a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo o mesmo já estabelecido como alvo biológico de notável valor no planejamento de candidatos a fármacos contra as tripanosomíases<sup>34</sup>. Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato (DPG) na presença de  $\text{NAD}^+$  como coenzima e fosfato inorgânico.



**FIGURA 1.7** – Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH.

## **1.4 – Pré-seleção de substâncias potencialmente bioativas utilizando programas computacionais**

Historicamente, a descoberta de fármacos passou por várias etapas, sendo inicialmente ao acaso, (por exemplo a descoberta de benzodiazepínicos, penicilina, etc, em um segundo momento, utilizou-se a busca aleatória (*screening*) de substâncias que apresentassem atividade biológica. Por essa razão, coleções de compostos foram testadas indiscriminadamente a fim de se verificar as suas propriedades anti-tumorais, antiinflamatórias, etc<sup>35</sup>.

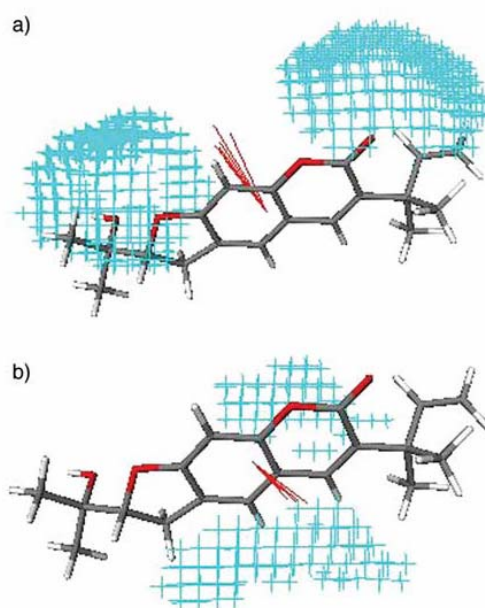
Evidentemente a busca aleatória de moléculas não apresenta uma relação custo / benefício adequado e o avanço da química medicinal possibilitou o acúmulo de conhecimento sobre a fisiopatologia de várias doenças, tornando possível o reconhecimento de moléculas bioativas com base nas suas características físico-químicas e estruturais ideais para a interação com o alvo terapêutico escolhido<sup>36</sup>.

Métodos computacionais são ferramentas amplamente empregadas nos projetos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Estes métodos são utilizados desde a identificação de moléculas com atividade biológica até a otimização de suas propriedades químicas e farmacêuticas.

Pode-se relacionar a resposta biológica de uma substância qualitativamente pelas interações iônicas, de Van Der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes existentes entre eles. Além disso, os diversos fatores estereoquímicos que possam garantir, ou favorecer, a conformação ativa do ligante deve ser levada em consideração<sup>36</sup>. Dentro desse contexto, a descoberta novos fármacos pode ser realizada através de uma metodologia mais racional que envolva os elementos de um planejamento.

### 1.4.1 – Programa Volsurf 3.0

O programa Volsurf é um método computacional que explora as propriedades físico-químicas espaciais das moléculas<sup>37</sup>. O programa GRID constitui parte integrante deste e possui a função de gerar os campos de interação molecular, conhecidos como MIF's (Molecular Interactions Fields). A **FIGURA 1.8** apresenta um exemplo de MIF's calculados entre a molécula Chalepina e as sondas água (a) e hidrofóbica (b). As regiões coloridas da **FIGURA 1.8** representam onde a interação desta cumarina com as referidas sondas são favoráveis, através de ligações de hidrogênio (sonda água) e através de interações hidrofóbicas (sonda hidrofóbica).<sup>38</sup>



**FIGURA 1.8** – MIF's gerados para a cumarina Chalepina. a) sonda água; b) sonda hidrofóbica.

O conceito básico deste programa é converter a informação presente em mapas tridimensionais gerados pelo programa GRID<sup>39</sup> em um número reduzido de descritores de fácil interpretação. Assim, tamanho, forma, ligações de hidrogênio e hidrofobicidade podem ser quantitativamente



diferenciados em uma série de moléculas, não sendo necessário o alinhamento das moléculas em estudo.

Utilizando estas sondas, o programa Volsurf 3.0 gera descritores que apresentam influência significativa sobre a atividade biológica de uma molécula. Esses descritores (ou variáveis) são independentes uns dos outros na determinação da atividade, portanto, devem ser descritos por análise quimiométrica. Entre os métodos mais aplicados para a interpretação de grandes matrizes de dados está a análise por componentes principais (PCA)

### **1.4.2 – Análise por componentes principais (PCA)**

A análise por componentes principais consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante. Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras, pois embora a informação estatística presente nas n-variáveis originais seja a mesma das n-componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais de 90% desta informação<sup>40</sup>.

O gráfico da componente principal 1 (CP1) *versus* a componente principal 2 (CP2) fornece uma janela privilegiada (estatisticamente) para a observação dos pontos no espaço n-dimensional.

A análise por componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as

variáveis originais com maior peso (loadings) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico<sup>41</sup>.

Cada molécula é representada por um ponto no espaço bidimensional (CP1 x CP2) e as variáveis analisadas pelo programa Volsurf relatam propriedades fármaco-cinéticas, assim compostos próximos neste espaço bidimensional irão apresentar tendências similares nas propriedades fármaco-cinéticas, enquanto que compostos distantes tendem a se diferenciarem nestas propriedades.

O gráfico bidimensional de escores gerado através da PCA permite a visualização da dispersão dos pontos (moléculas) em relação a todas as variáveis analisadas simultaneamente, facilitando a interpretação por permitir analisar a similaridade entre duas substâncias como função da distância entre ambas.

## **1.5 – Mecanismo cinético de catálise enzimática**

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas<sup>42</sup>.

Uma reação enzimática simples poderia ser escrita:



**FIGURA 1.9** – Equação de uma reação catalisada por uma enzima.

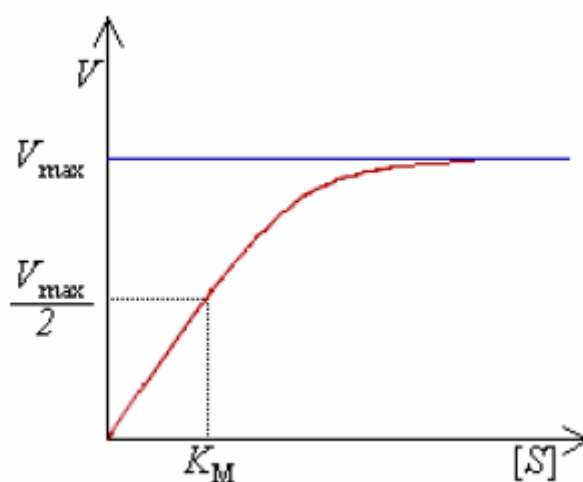
Primeiro a enzima (E) se combina reversivelmente com o substrato (S) para formar o complexo enzima-substrato (ES) em uma etapa reversível e relativamente rápida, o complexo ES depois se quebra em uma segunda etapa mais lenta para produzir a enzima livre e o produto da reação (P).

Os termos  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  são as constantes, para a associação da enzima com o substrato, sua dissociação e a formação do produto respectivamente.

Pelo fato da segunda reação (mais lenta) limitar a velocidade da reação global, a velocidade deve ser proporcional à concentração das espécies que reagem na segunda etapa, ou seja, ES.

$$v = k_2 \cdot [ES] \quad \text{Equação 1}$$

As reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento de substrato<sup>43</sup>. Se a velocidade da reação for medida sobre uma escala de concentrações de substrato (denotada como [S]), a velocidade de reação (v) aumenta com o acréscimo de [S]. Todavia, à medida que [S] aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atinge um valor máximo, denominado velocidade máxima ( $v_{\max}$ ).



**FIGURA 1.10** – Representação gráfica da curva típica de Michaelis-Menten.

O sistema alcança o estado estacionário quando a concentração do substrato (representada por [S]) presente no meio é suficientemente alta para que toda enzima livre no meio seja convertida à forma complexada (ES). No estado estacionário a concentração do complexo [ES] é constante, ou seja, a velocidade da formação de ES é igual a velocidade da dissociação do complexo [ES], que pode ocorrer de duas maneiras, seja pela formação do produto ou pela não reatividade do substrato pela enzima. Assim o estado estacionário pode ser escrito:

$$\begin{aligned} \text{Velocidade de formação de [ES]} &= \text{Velocidade de dissociação [ES]} \\ k_1([E] \cdot [S]) &= k_{-1}[ES] + k_2[ES] \end{aligned} \quad \text{Equação 2}$$

A concentração total da enzima  $[E_t]$  é dada pela equação abaixo:

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$[E_t]$  = Concentração total da enzima;

$[E]$  = Concentração da enzima no meio;

$[ES]$  = Concentração do complexo;

Substituindo  $[E]$  dada pela equação 3 na equação 2 temos:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) \cdot [S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad \text{Equação 4}$$

Adicionando o termo  $k_1[ES] \cdot [S]$  em ambos os lados da equação 4, tem-se o valor da  $[ES]$  dado por:

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{[S] + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1}} \quad \text{Equação 5}$$

O termo  $\frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1}$  é definido como a constante de Michaelis ( $K_M$ ), sua substituição na equação 5:

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equação 6}$$

Pode-se expressar a velocidade da reação ( $v$ ) em função da  $[ES]$ , através da equação 1 e substituir o seu valor na equação 6:

$$v = \frac{k_2[E_t] \cdot [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equação 7}$$

A equação 7 pode ser ainda mais simplificada, visto que a velocidade máxima ocorre quando a enzima encontra-se saturada (quando  $[ES] = [E_t]$ ),  $V_{\max}$  pode ser definida como  $k_2 \cdot [E_t]$ , substituindo este termo na equação 7, obtém-se a Equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equação 8}$$

Esta equação expressa algebricamente a forma geral da curva hiperbólica de uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato (partindo da hipótese de que nestas reações o passo limitante da velocidade é a quebra do complexo ES para formar o produto e a enzima livre).

A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) é uma constante dinâmica característica para cada enzima, é numericamente igual à concentração do

substrato na qual a velocidade da reação é igual a metade da velocidade máxima. Esta constante tem outro significado, que está relacionado com as constantes de velocidade da equação apresentada na **FIGURA 1.9**, que reflete a afinidade da enzima por um dado substrato. Quanto menor o valor de  $K_M$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato<sup>53</sup>.

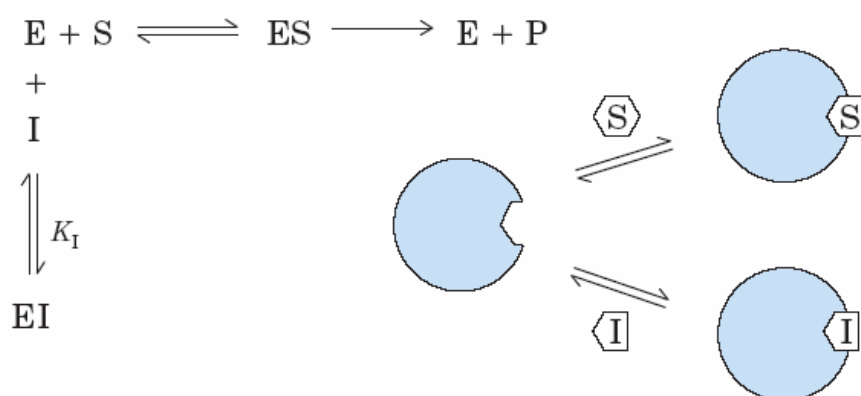
### **1.5.1 – Inibição Enzimática**

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, devido principalmente ao seu papel essencial em inúmeras vias bioquímicas associadas a desordens e doenças em humanos. A aspirina (acetilsalicilato), por exemplo, inibe a enzima que catalisa a primeira etapa na síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em muitos processos, incluindo alguns que produzem dor<sup>42</sup>. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos. Há duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis<sup>42</sup>.

Os inibidores irreversíveis tornam a enzima inativa, pois se ligam covalentemente a ela, destruindo um grupo funcional essencial para a sua atividade. Os inibidores enzimáticos do tipo reversível se ligam à enzima de forma rápida, não covalente e não produzem mudança significativa na estrutura da enzima. Estes últimos podem ser classificados em: competitivos, não competitivos e incompetitivo.

### 1.5.1.1 – Inibição reversível competitiva

Na inibição reversível competitiva a molécula de inibidor pode apresentar estrutura semelhante ao substrato da enzima<sup>46</sup>. Neste caso, o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, embora o inibidor ocupe o sítio ativo da enzima, o processo catalítico não é estabelecido. Em estado o sítio ativo ocupado pelo inibidor, o substrato deixa de ocupar o mesmo sítio e então o processo catalítico de conversão em produto não se realiza.

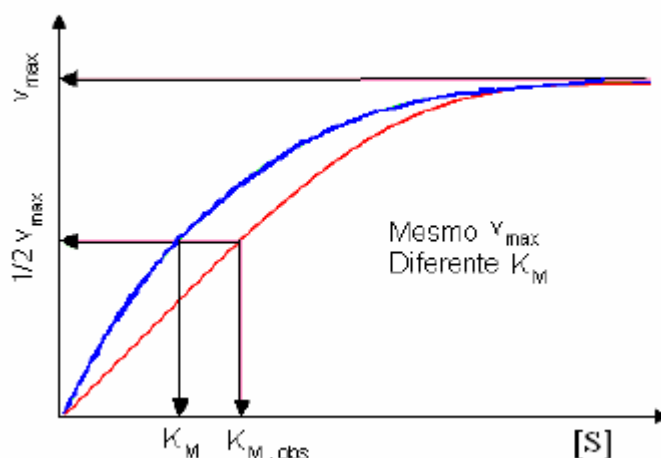


**FIGURA 1.11** – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor competitivo.

Assim a equação de Michaelis-Menten, na presença de um inibidor competitivo torna-se:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad \text{Equação 9}$$

Na **FIGURA 1.12** é traçado o gráfico da velocidade da reação na presença (em vermelho) e na ausência (curva em azul) de um inibidor competitivo.



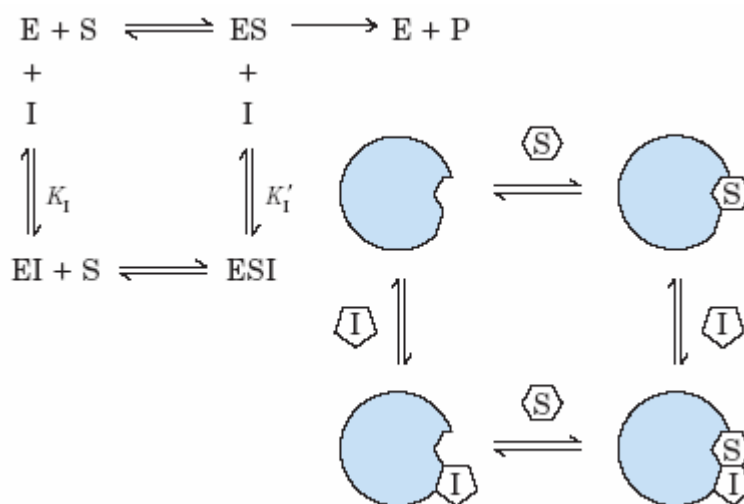
**FIGURA 1.12** – Representação gráfica de uma inibição enzimática competitiva.

O efeito do inibidor competitivo modifica o valor da constante de Michaelis ( $K_M$ ), mas não altera o valor da velocidade máxima da reação ( $v_{\max}$ )<sup>54</sup>.

### 1.5.1.2 – Inibição reversível não competitiva

Os inibidores do tipo não competitivo não se ligam no mesmo sítio de reação do substrato, e sim a outra região da enzima, denominada sítio alostérico. Os inibidores não competitivos podem se ligar à enzima livre para formar o complexo enzima-substrato (ES), ou então ao complexo enzima-substrato para formar o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI). Nos dois casos a ligação ao sítio alostérico induz mudanças conformacionais na estrutura da enzima tornando o processo catalítico ineficiente<sup>42</sup>.



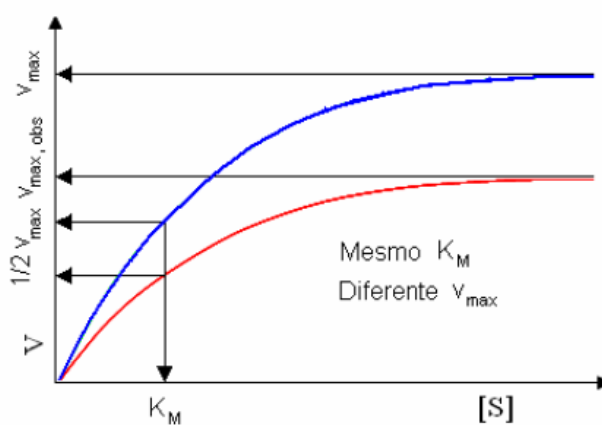


**FIGURA 1.13** – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor não competitivo.

Assim a equação de Michaelis-Menten, na presença de um inibidor não competitivo torna-se:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \qquad \text{Equação 10}$$

O gráfico de Michaelis-Menten na presença (-) e ausência (-) de um inibidor não competitivo é representado na **FIGURA 1.14**.

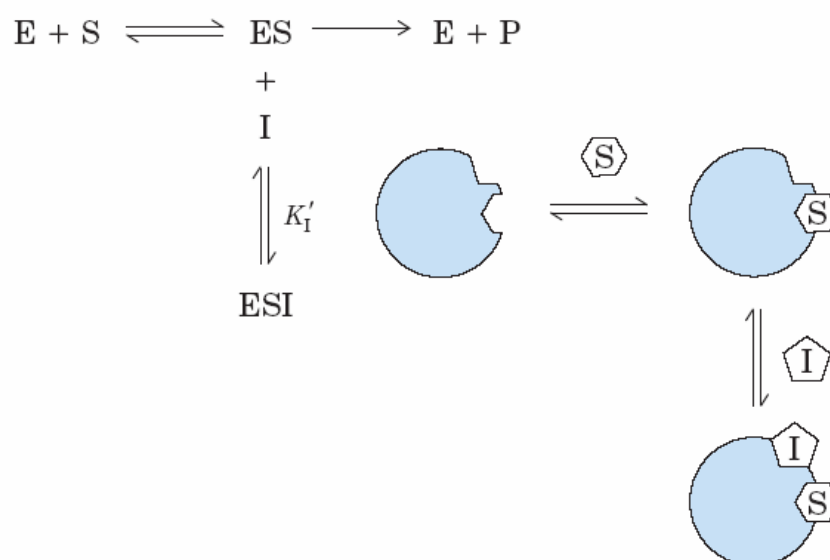


**FIGURA 1.14** – Representação gráfica de uma inibição enzimática não competitiva.

O efeito desse inibidor é a diminuição da velocidade máxima da reação, enquanto  $K_M$  permanece constante.

### 1.5.1.3 – Inibidores Incompetitivos

Inibidores desta categoria se ligam exclusivamente ao complexo enzima-substrato (ES), formando o complexo (ESI) inativo, e não interage com a enzima livre. Como pode ser observado na **FIGURA 1.15**.

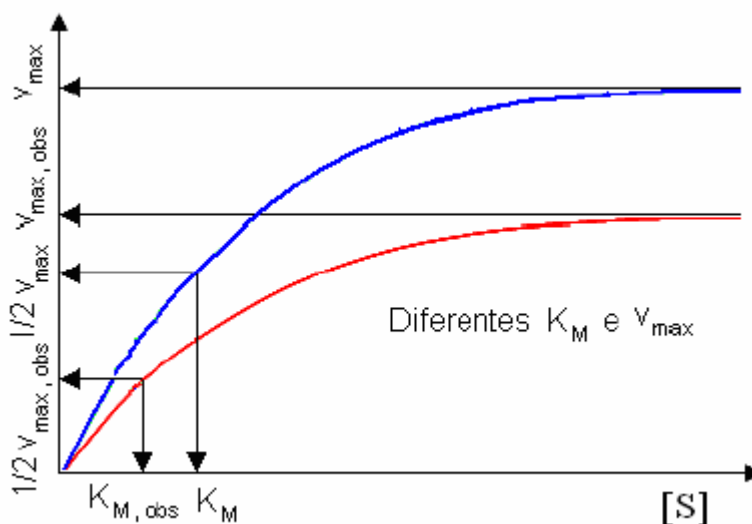


**FIGURA 1.15** – Equação de velocidade e representação esquemática de uma catálise enzimática na presença de um inibidor incompetitivo.

Assim, a equação de Michaelis-Menten, na presença deste tipo de inibidor torna-se:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]\right)} \quad \text{Equação 11}$$

O gráfico de Michaelis-Menten na presença (-) e ausência (-) de um inibidor incompetivo é representado na **FIGURA 1.16**.



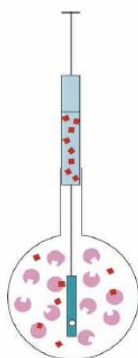
**FIGURA 1.16** – Representação gráfica de uma inibição enzimática por mecanismo incompetivo.

## 1.6 – Determinação da cinética enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC)

É comprovado que modernos calorímetros são sensíveis o bastante para medir o calor envolvido nas reações enzimáticas com suficiente

precisão<sup>47,48</sup>. Consequentemente, titulação calorimétrica isotérmica (ITC) fornece dados precisos que podem ser avaliados em termos cinéticos de Michaelis-Menten<sup>49</sup>.

Este método consiste na adição do titulante, através de uma micropipeta automática, sobre o titulado que se encontra na célula de amostra (**FIGURA 1.17**). Em um experimento típico de interação entre uma enzima e seu ligante, a macromolécula (proteína) é colocada na célula de amostra e titulada com o ligante; a interação entre as duas espécies implica em uma liberação ou absorção de calor, que é detectada e registrada na forma de uma isoterma<sup>50</sup>.



**FIGURA 1.17** – Esquema representativo da seringa e célula de amostra de um microcalorímetro.

Para cada injeção no experimento calorimétrico, o calor gerado pela conversão do substrato a produto é dado como<sup>47</sup>:

$$q = n \cdot \Delta H_{\text{app}} = [P]_{\text{tot}} \cdot V \cdot \Delta H_{\text{app}}, \quad \text{Equação 12}$$

Onde  $n$  é o número de mols do produto,  $[P]_{\text{tot}}$  é a concentração total do produto,  $V$  é um volume conhecido de solução na célula reacional e  $\Delta H_{\text{app}}$  é a entalpia molar aparente<sup>48</sup>.

$\Delta H_{\text{app}}$  é determinado em um experimento adicional. O valor de  $\Delta H$  dever ser corrigido, já que o experimento pode ser acompanhado de outras

fontes de calor além da interação entre o receptor e o ligante<sup>49</sup>. Por exemplo, quando há ionização de um tampão devido à interação, ou reação, entre ligante e receptor.  $\Delta H_{app}$  é calculado pela seguinte equação:

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]_{tot} \cdot V} \int_0^{\infty} \frac{dq(t)}{dt} \cdot dt. \quad \text{Equação 13}$$

Para a determinação da cinética enzimática, um experimento com múltiplas injeções do substrato deve ser conduzido<sup>50</sup>. A correlação entre a velocidade da reação e a taxa de variação do calor em função do tempo, que pode ser medida diretamente no calorímetro<sup>51</sup>, é determinada pela equação abaixo.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dq}{dt} \quad \text{Equação 14}$$

A concentração do substrato pode ser calculada a qualquer momento através da integração do calor em função do tempo:

$$[S]_t = [S]_{t=0} - \frac{\int_{t=0}^t \frac{dQ}{dt} dt}{V_0 \Delta H_{app}} \quad \text{Equação 15}$$

A análise cinética da interação enzima-substrato pode ser feita através da curva de Michaelis-Menten (**FIGURA 1.10**), onde a concentração da enzima [E] tem um valor conhecido, a concentração do substrato  $[S]_t$  pode ser calculada em qualquer tempo, e a velocidade é determinada diretamente durante o experimento. Esta curva hiperbólica é obtida através da regressão não linear destes valores, onde os valores de  $K_M$  e  $k_{cat}$  podem ser determinados<sup>55</sup>.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_{\text{tot}} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad \text{Equação 16}$$

Além disto, a constante de inibição  $K_I$  pode ser obtida através desses experimentos. Um experimento controle é realizado e as constantes de Michaelis-Menten são determinadas, em seguida é feito o experimento na presença do inibidor e os dados obtidos para a velocidade são ajustados graficamente na equação correspondente ao tipo de inibição. Desta forma o valor de  $K_I$  pode ser determinado<sup>55</sup>.

## **2 OBJETIVOS**

---

---

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Estudo fitoquímico do caule e das folhas da espécie *Euxylophora paraensis*;
- Utilizar programas computacionais para a seleção de metabólitos secundários, isolados da espécie em estudo, potencialmente ativos na inibição da enzima gGAPDH de *T.cruzi*;
- Avaliar a atividade inibidora das substâncias pré-selecionadas, que foram isoladas de *E. paraensis*, sobre a enzima gGAPDH, através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).



## **3 PARTE EXPERIMENTAL**

---

---

### **3 – Procedimento Experimental**

Os procedimentos químicos foram realizados no laboratório de pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

#### **3.1 – Materiais e Métodos**

##### **Suportes para cromatografia em coluna (CC):**

- Sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-400 mesh) da Merck
- Florisil da Merck
- Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB

##### **Solventes para cromatografia:**

Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.

##### **Cromatografia em coluna:**

Foram utilizadas colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem cromatografadas. Os suportes e os eluentes usados foram os mencionados anteriormente.

##### **Cromatografia em camada delgada comparativa:**

Utilizada para a monitoração dos fracionamentos efetuados. Para tanto, usaram-se folhas de alumínio (com sílica gel 60 F<sub>254</sub>,  $\phi = 0,2$  mm) da Merck. Os reveladores empregados foram: radiação UV (254 e 360 nm), reagente de Dragendorff e vanilina em ácido sulfúrico.

### **Cromatografia em camada delgada preparativa:**

Foram utilizadas placas preparativas de sílica gel 60 (20 x 20 cm) com indicador UV<sub>254</sub>.

### **Solventes para obtenção de espectros de RMN:**

- Deuterados da Merck e Aldrich

## **3.2 – Equipamentos**

### **Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear:**

- Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN <sup>13</sup>C) – DQ/UFSCar;
- Bruker ARX 4,9 T (200 MHz para RMN <sup>1</sup>H e 50 MHz para RMN <sup>13</sup>C) – DQ/UFSCar;

### **Espectrômetro de Massa**

- CG-EM: Shimadzu QP 5000 – DQ/UFSCar. Ionização por impacto eletrônico;
- MICROMASS Quatro LC – DQ/UFSCar. Ionização por Eletrospray.

### **Polarímetro**

- PERKIN ELMER modelo 241 – UFSCar.

### **Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta**

- Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10 com luz tipo SPECTROLINE modelo ENF-260C.

### **Balança analítica**

- SARTORIUS modelo BP210S.

### **Evaporadores rotativos**

- BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

### **Equipamentos de CLAE**

- Shimadzu LC-8A com válvula de reciclo;
- Shimadzu SCL-10Avp com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, bomba Shimadzu LC-6AD.

### **Equipamentos de CLMP**

- GE AKTA – Armerstam Biosciences.

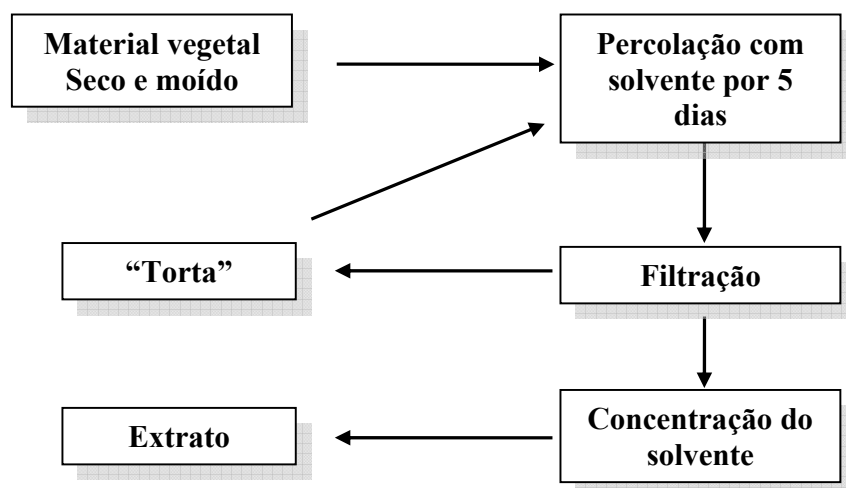
## **3.3 – Coleta do material botânico**

Um espécime de *Euxylophora paraensis* foi coletado em 05 de abril de 2005 na Fazenda Paulo Maria no Município de Marituba (PA). Um

exemplar do material coletado encontra-se registrado no Herbário da EMBRAPA Amazônia Oriental sob o número 181030.

### 3.4 – Preparação dos extratos vegetais

O caule e as folhas de *Euxylophora paraensis* foram escolhidos para estudo e os mesmos foram obtidos secos e moídos. Tanto o caule quanto as folhas foram submetidos à secagem em estufa de ar circulante a 40° C, pulverizado em moinho e a extração foi feita à frio e com etanol, durante cinco dias, por três vezes obtendo-se os extratos conforme representado no **FLUXOGRAMA 3.1**. As soluções resultantes foram concentradas sob vácuo em evaporador rotativo e a completa secagem do material vegetal foi obtida através do seu armazenamento em vidros parcialmente tampados, para permitir a evaporação do solvente, à temperatura ambiente sob capela de exaustão de gases.

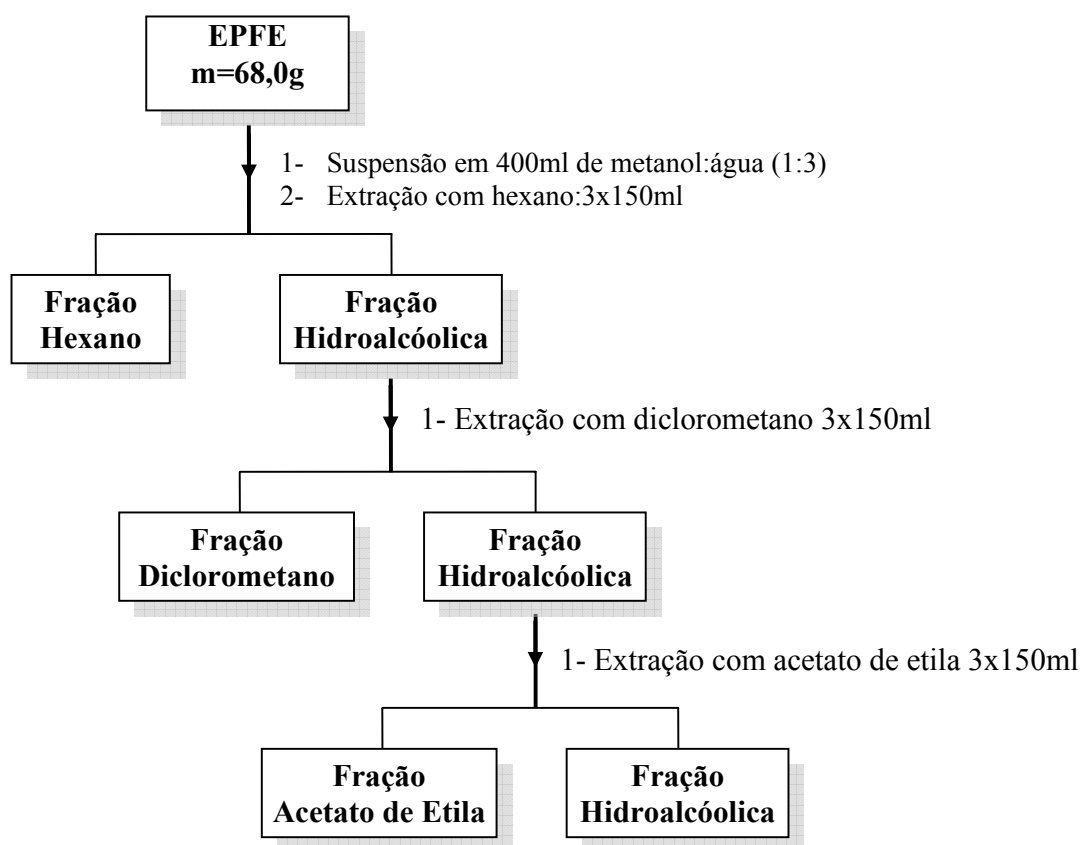


**FLUXOGRAMA 3.1** – Obtenção dos extratos etanólicos do caule e da folha de *E. paraensis*.

### 3.5 – Obtenção das frações

#### 3.5.1 – Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Euxylophora paraensis* (EPFE)

O extrato etanólico das folhas foi fracionado através de uma partição líquido-líquido (FLUXOGRAMA 3.2), originando 4 partições. As frações obtidas e suas respectivas massas estão representadas na TABELA 3.1.



**FLUXOGRAMA 3.2** – Metodologia utilizada na partição do extrato etanólico das folhas.

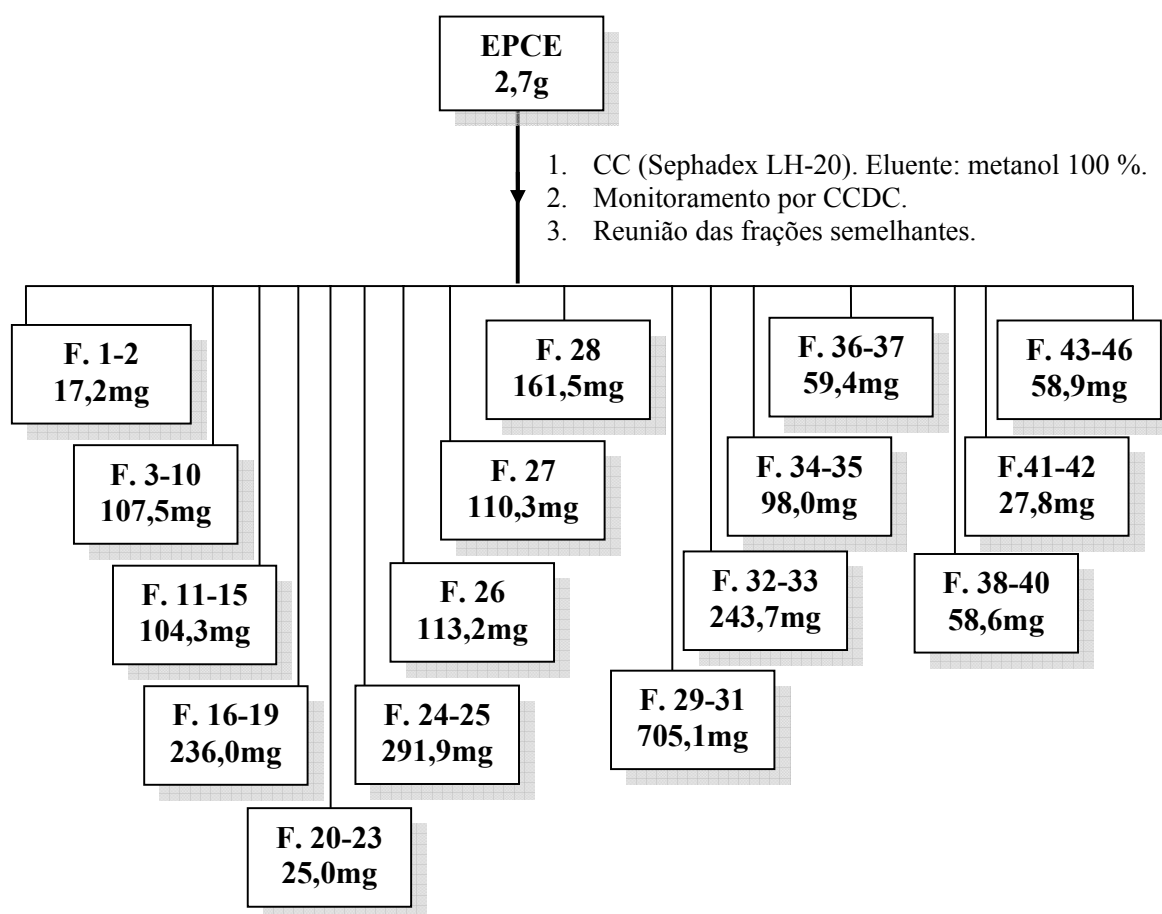
**TABELA 3.1** – Massas das partições do extrato etanólico das folhas.

<b>Massa do extrato</b>	<b>Partições</b>	<b>Massas das partições</b>	<b>Código</b>
68,0 g	Hexânico	3,7 g	EPFH
	Diclorometano	25,4 g	EPFD
	Acetato de etila	10,3 g	EPFA
	Hidroalcóolico	13,2	EPFHid

EP = *Euxylophora paraensis*; F = folhas; H = hexano; D = diclorometano; A = acetato de etila; Hid = hidroalcóolico.

### **3.5.2 – Fracionamento do extrato etanólico do caule de *Euxylophora paraensis* (EPCE)**

O extrato EPCE foi submetido à cromatografia por exclusão em coluna sephadex LH-20 eluída com metanol 100 %, 16 grupos de frações foram obtidos após reunião das frações semelhantes. O **FLUXOGRAMA 3.3** resume o fracionamento cromatográfico do extrato EPCE.



**FLUXOGRAMA 3.3** – Metodologia utilizada no fracionamento do extrato etanólico das folhas.



**TABELA 3.2** – Massas e códigos das frações do extrato etanólico do caule.

<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Código</b>
1-2	17,2	EPCS1
3-10	107,5	EPCS2
11-15	104,3	EPCS3
16-19	236,0	EPCS4
20-23	291,6	EPCS5
24-25	291,9	EPCS6
26	113,2	EPCS7
27	110,3	EPCS8
28	161,5	EPCS9
29-31	705,1	EPCS10
32-33	243,7	EPCS11
34-35	98,0	EPCS12
36-37	59,4	EPCS13
38-40	58,6	EPCS14
41-42	27,8	EPCS15
43-46	58,9	EPCS16

EP = *Euxylophora paraensis*; C = caule; S = sephadex.

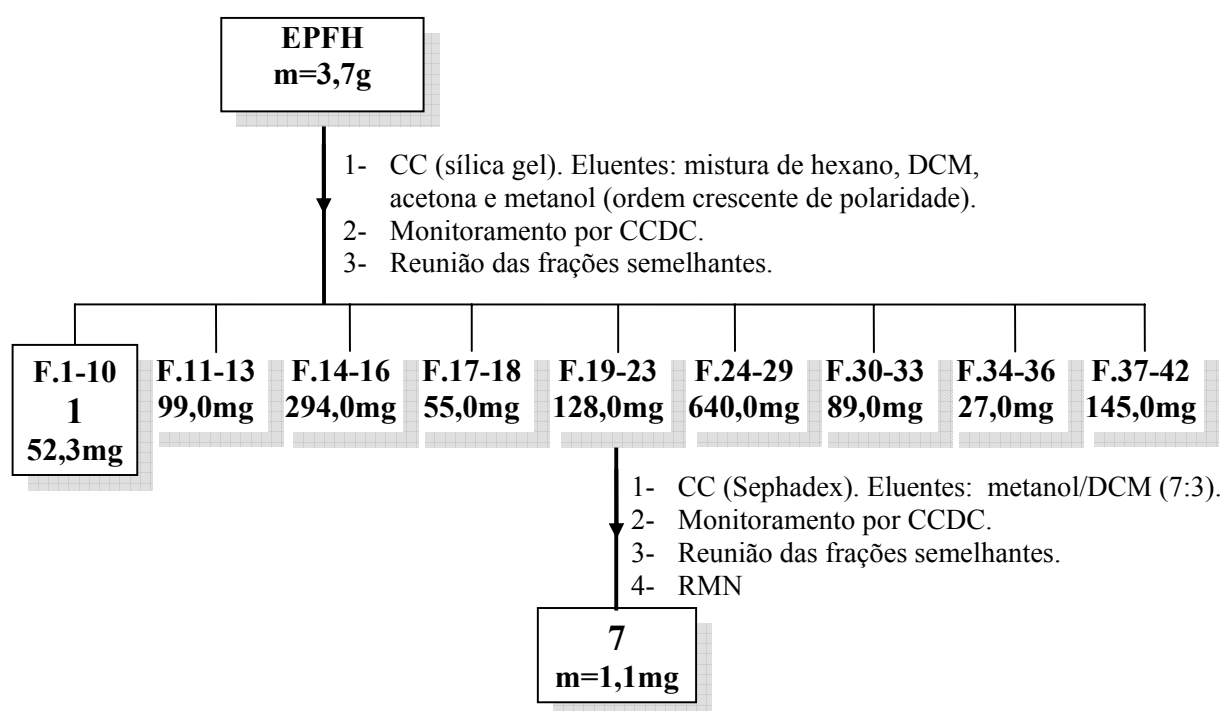
### 3.6 – Isolamento dos constituintes de *Euxylophora paraensis*

#### 3.6.1 – Estudo químico das frações da folha

O estudo das frações obtidas por partição líquido-líquido das folhas de *E. paraensis* utilizando-se várias técnicas cromatográficas, permitiu o isolamento de 10 substâncias que, posteriormente foram identificadas através de experimentos de RMN de 1D e 2D e através de espectrometria de massas.

##### 3.6.1.1 – Estudo químico da fração EPFH

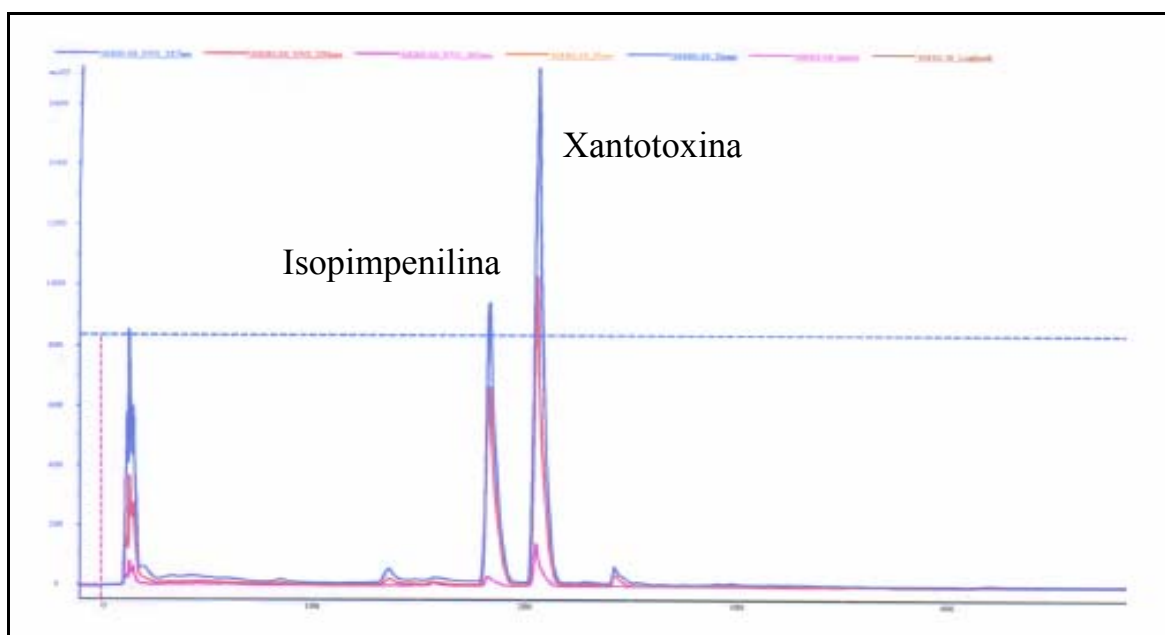
O estudo da fração hexânica das folhas de *E. paraensis* permitiu a identificação das substâncias **1** e **7**, utilizando-se basicamente cromatografia em coluna, tendo-se como fase estacionária sílica gel 230-400 mesh em coluna de vidro, e sephadex LH-20. A substância **1**, presente em grande quantidade nesta fração, não permitiu o isolamento de maior quantidade da substância **7**.



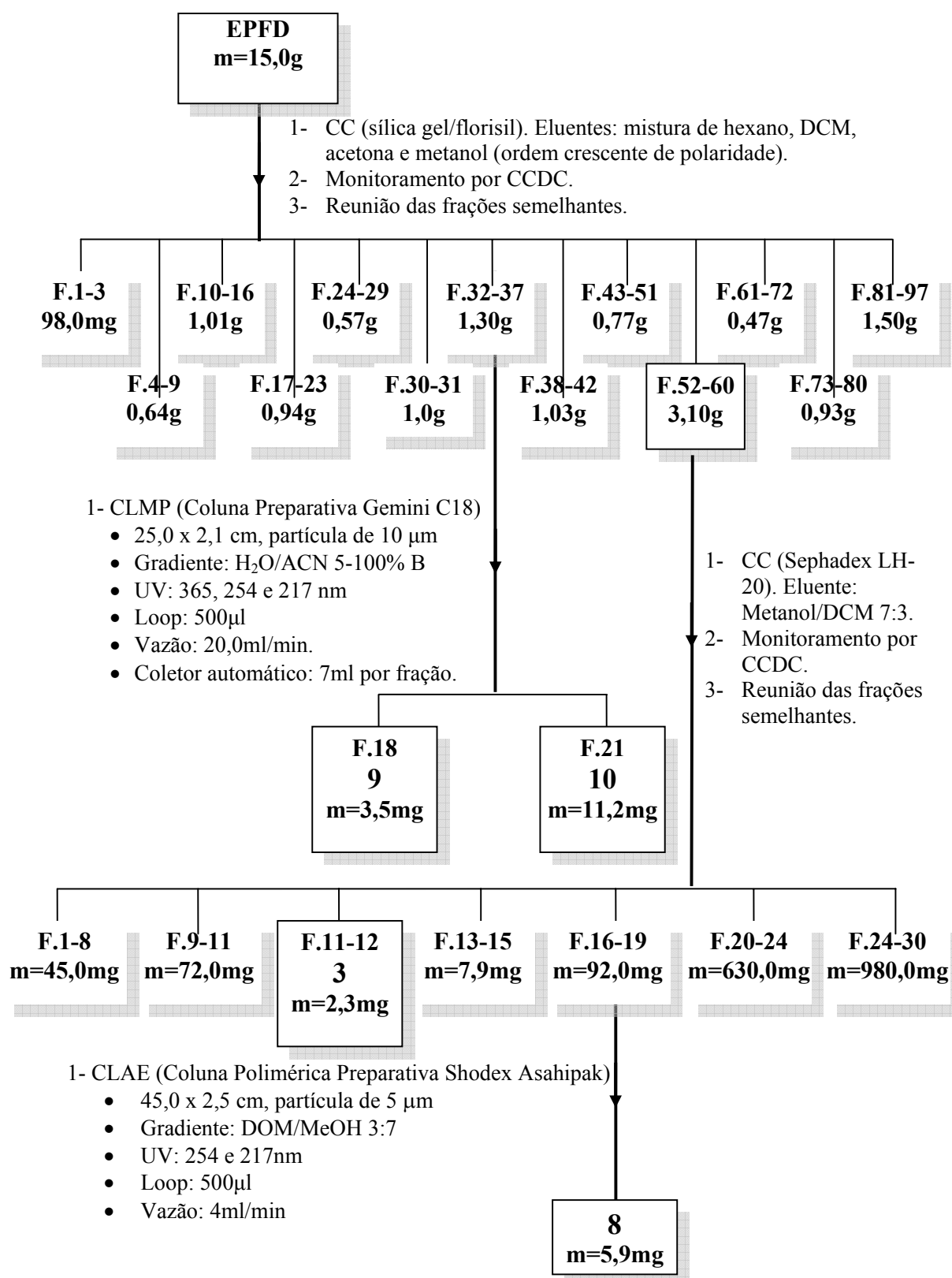
FLUXOGRAMA 3.4 – Fracionamento do extrato EPFH.

### 3.6.1.2 – Estudo químico da fração EPFD

O estudo da fração diclorometano das folhas de *E. paraensis* permitiu o isolamento das substâncias **3**, **8**, **9**, e **10**. Primeiramente o extrato EPFD foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 Mesh) e uma pequena camada de florisil, utilizando coluna de vidro ( $\phi \times h = 5,0 \times 60,0$  cm), com gradiente hexano/diclorometano/acetona/metanol, 13 grupos de frações foram obtidos após reunião das frações semelhantes. 48,0 mg da fração (F. 32-37) foi recromatografada e as condições cromatográficas utilizadas encontram-se no **FLUXOGRAMA 3.5**. As substâncias **9** e **10**, estavam presentes em quantidade majoritária na fração (F. 32-37) e a obtenção de maior quantidade destas substâncias poderia ter sido alcançada com a repetição do fracionamento por CLMP de acordo com a **FIGURA 3.1**.



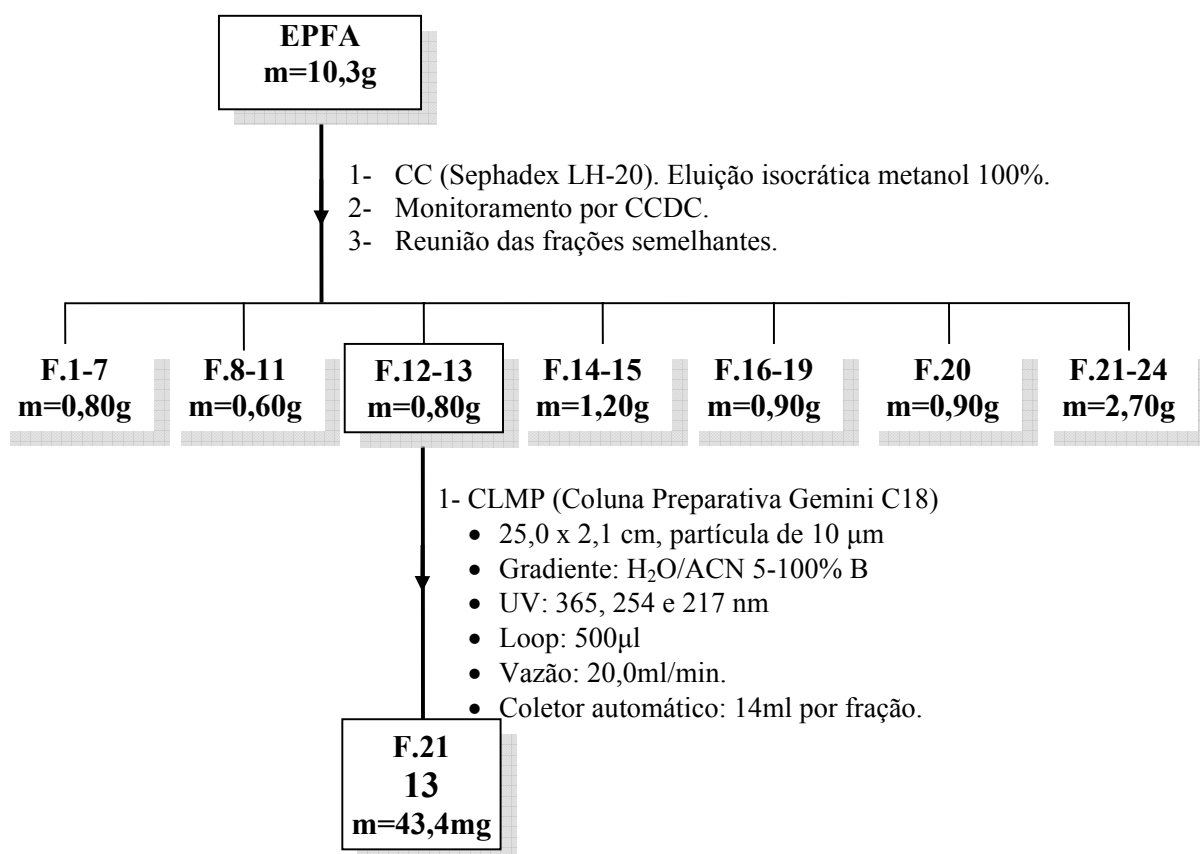
**FIGURA 3.1** – Cromatograma da separação das substâncias **9** e **10** por CLMP. Condições cromatográficas: coluna preparativa Gemini C-18 (25,0 x 2,1 cm, partícula de 10  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária; gradiente: H<sub>2</sub>O/ACN (5-100 % de ACN); detector UV: 365, 254 e 217 nm; loop: 2,5 mL e vazão: 20,0 mL/min.



FLUXOGRAMA 3.5 – Fracionamento do extrato EPFD.

### 3.6.1.3 – Estudo químico da fração EPFA

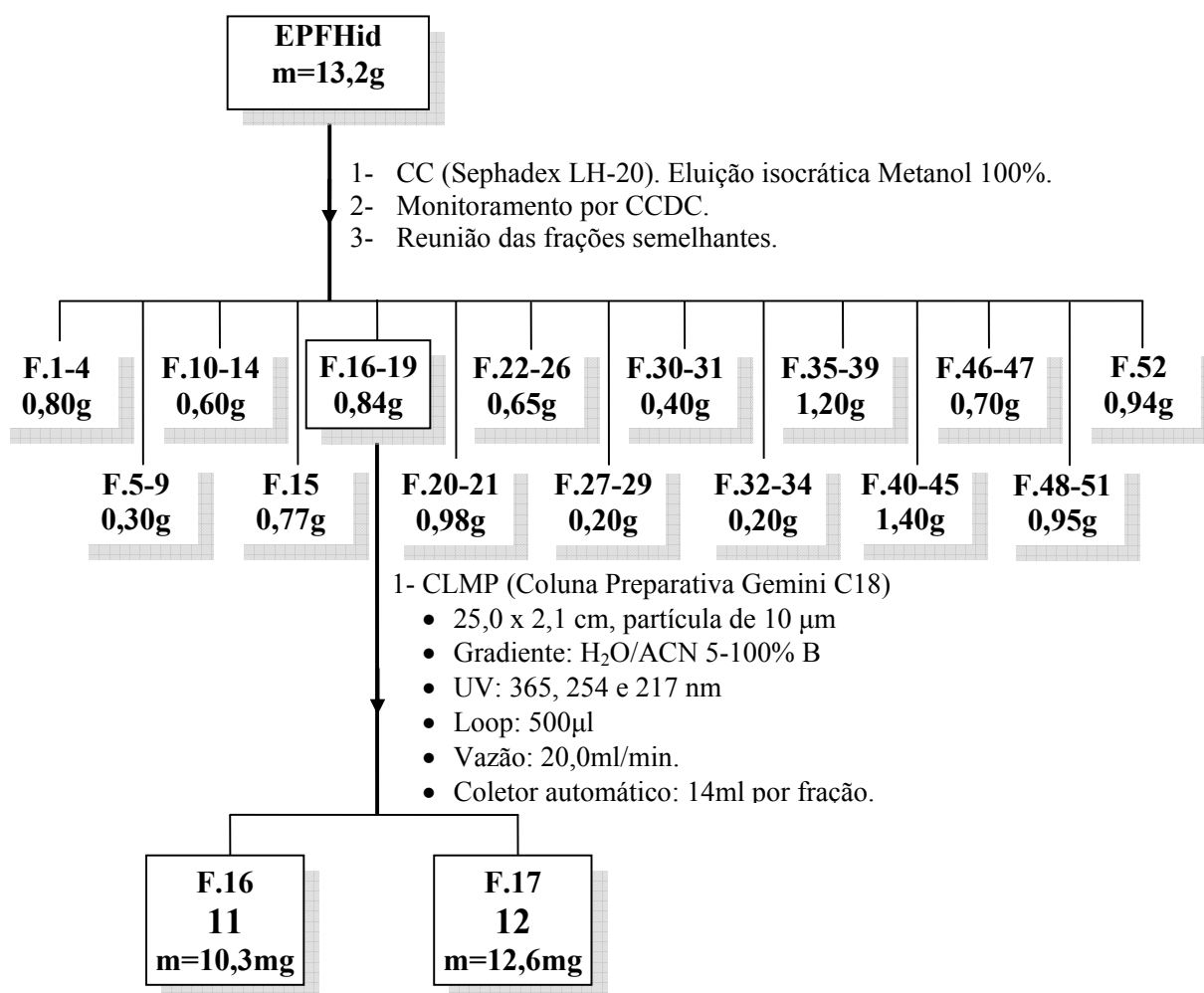
O estudo da fração acetato de etila das folhas de *E. paraensis* permitiu o isolamento da substância **13**. O extrato EPFD inicialmente foi submetido a cromatografia por exclusão em coluna de vidro ( $\phi \times h = 3,0 \times 30,0$  cm), tendo como fase estacionária sephadex LH-20. Com a reunião das frações semelhantes, foram obtidas 7 novas frações e o refractionamento da fração (F. 12-13) permitiu o isolamento da substância **13**, de acordo com o **FLUXOGRAMA 3.6**.



**FLUXOGRAMA 3.6** – Fracionamento do extrato EPFD.

### 3.6.1.4 – Estudo químico da fração EPFHid

O estudo da fração hidroalcolica das folhas de *E. paraensis* permitiu o isolamento das substâncias **11** e **12**. O extrato EPFHid foi submetido a cromatografia por exclusão em coluna de vidro ( $\phi \times h = 4,5 \times 50,0$  cm), tendo como fase estacionária sephadex LH-20. Com a reunião das frações semelhantes, foram obtidas 16 frações e o refractionamento da fração (F.16-19) permitiu o isolamento das substâncias, através de CLMP, com as condições cromatográficas relatadas no **FLUXOGRAMA 3.7**.



**FLUXOGRAMA 3.7** – Fracionamento do extrato EPFHid.

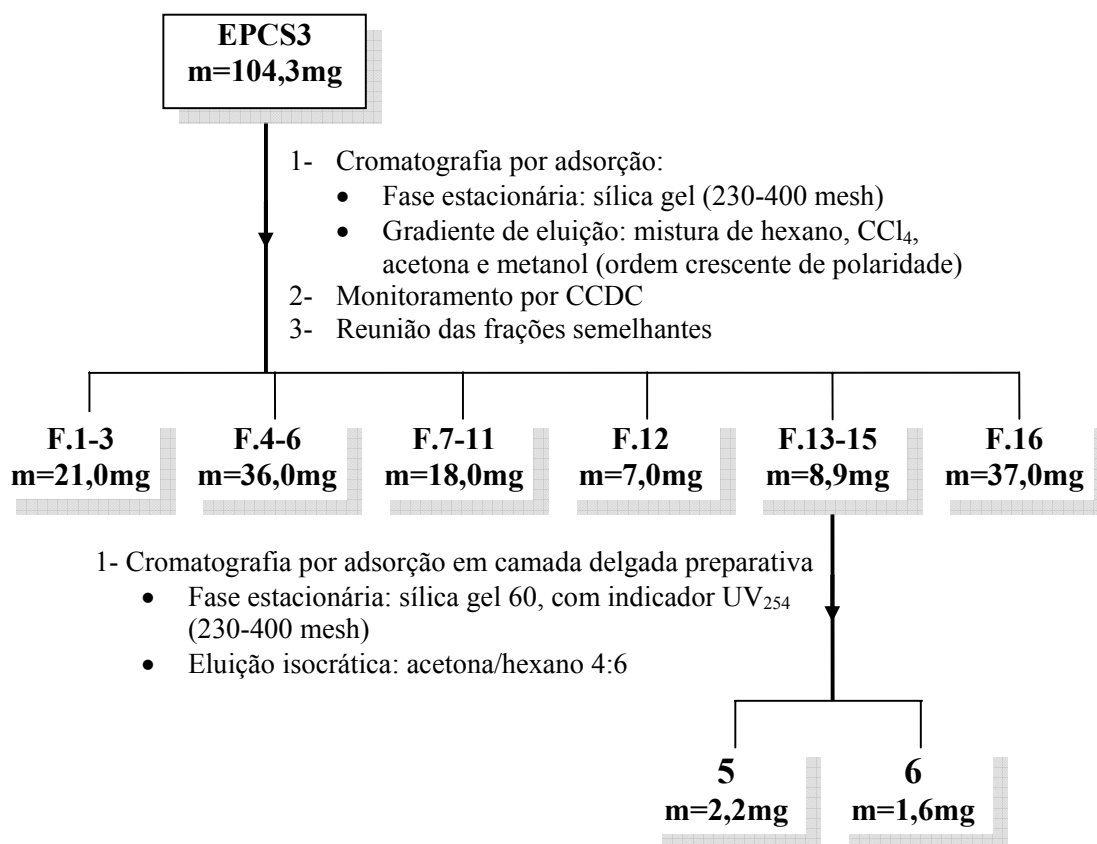
### **3.6.2 – Estudo químico das frações obtidas do caule**

Devido a pequena quantidade de material vegetal de partida (2,7 g), o extrato etanólico do caule foi inicialmente fracionado através de cromatografia por exclusão em coluna de vidro ( $\phi \times h = 4,5 \times 50,0$  cm), tendo como fase estacionária sephadex LH-20 com eluição isocrática (MeOH 100%).

As frações obtidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada e reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico e, então denominadas: EPCS1–EPCS16 (**TABELA 3.2**). Todas as frações foram estudadas, no entanto, o isolamento de substâncias do caule foi obtido somente com o estudo químico das frações EPCS3, EPCS8 e EPCS11, que serão relatados abaixo.

#### **3.6.2.1 – Estudo químico da fração EPCS3**

A fração EPCS3 foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ( $\phi \times h = 3,5 \times 25,0$  cm), tendo como fase estacionária sílica gel (230-400 mesh) com gradiente de eluição hexano/diclorometano/acetona/metanol. Com a análise da fração 13-15, através de cromatografia em camada delgada, observaram-se duas manchas bem separadas na placa analítica que absorvem intensamente a luz ultravioleta com comprimento de onda 254 nm então, optou-se pela sua separação através de cromatografia por adsorção em camada delgada preparativa em placa de vidro ( $h \times h = 25,0 \times 25,0$  cm) com eluição isocrática em acetona/hexano 4:6. O **FLUXOGRAMA 3.8** mostra resumidamente como este estudo foi realizado.



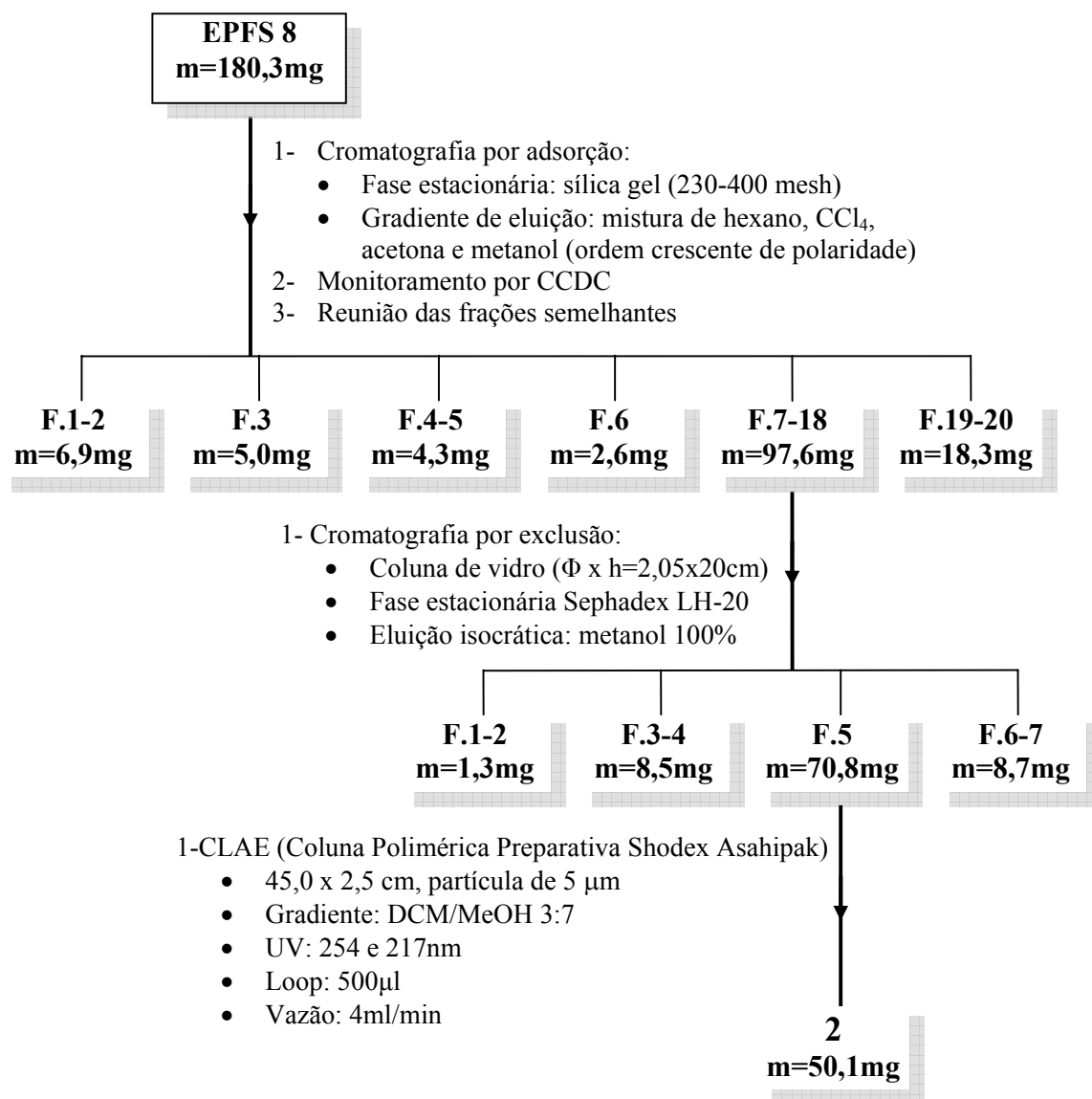
**FLUXOGRAMA 3.8** – Fracionamento do extrato EPCS3.

### 3.6.2.2 – Estudo químico da fração EPCS8

A fração EPCS8 foi submetida à cromatografia por adsorção em coluna de vidro ( $\phi \times h = 3,5 \times 25,0$  cm), tendo como fase estacionária sílica gel (230-400 mesh) com gradiente de eluição hexano/diclorometano/acetona/metanol, fornecendo a sub-fração (F. 13-15) que foi posteriormente refractionada através de cromatografia em coluna, utilizando como fase móvel sephadex LH-20 em coluna de vidro ( $\phi \times h = 3,5 \times 25,0$  cm), fornecendo a sub-fração 5 que foi recromatografada por CLAE,



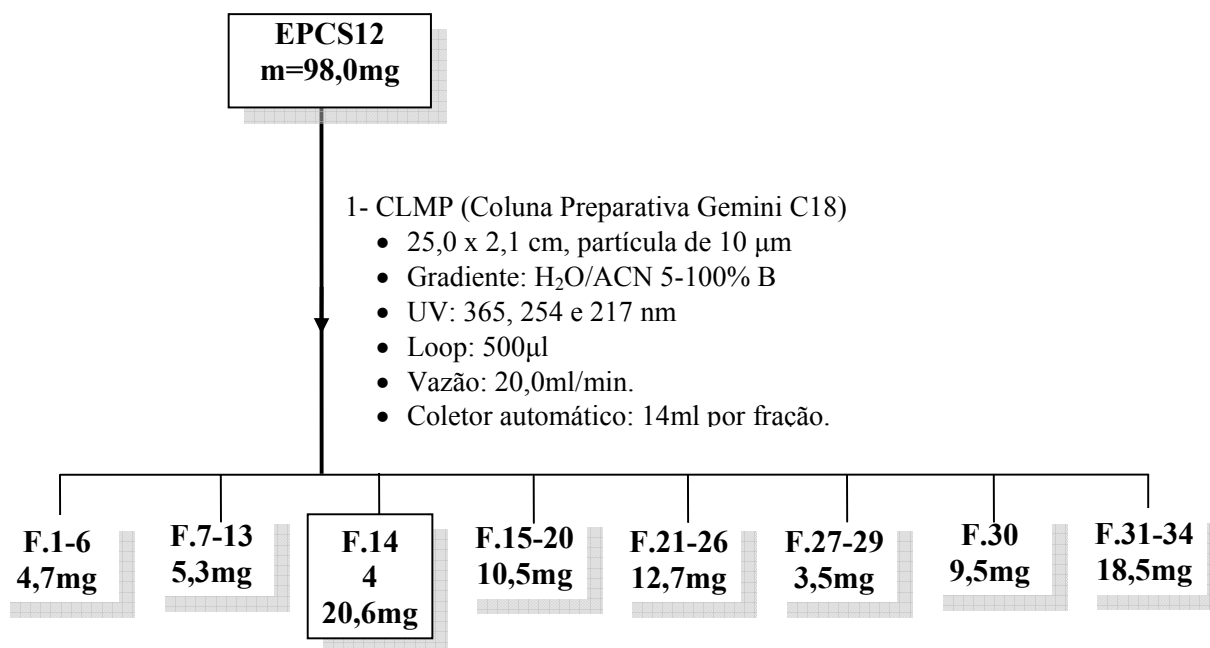
com as condições cromatográficas apresentadas no **FLUXOGRAMA 3.9**, possibilitando o isolamento da substância **2**.



**FLUXOGRAMA 3.9** – Fracionamento do extrato EPFS8.

### 3.6.2.3 – Estudo químico da fração EPCS12

A fração EPFS12 foi submetida a cromatografia líquida de média pressão (CLMP), utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: coluna preparativa Gemini C-18 (25,0 x 2,1 cm, partícula de 10  $\mu$ m); gradiente: H<sub>2</sub>O/ACN (5-100 % de ACN); detector UV: 365, 254 e 217 nm; loop: 2,5 mL e vazão: 20,0 mL/min. Após a eluição foram obtidos 34 frações de 14 mL, que foram reunidas mediante análise por cromatografia em camada delgada. A fração contida no frasco de número 14 continha 20,6 mg da substância **4** pura.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

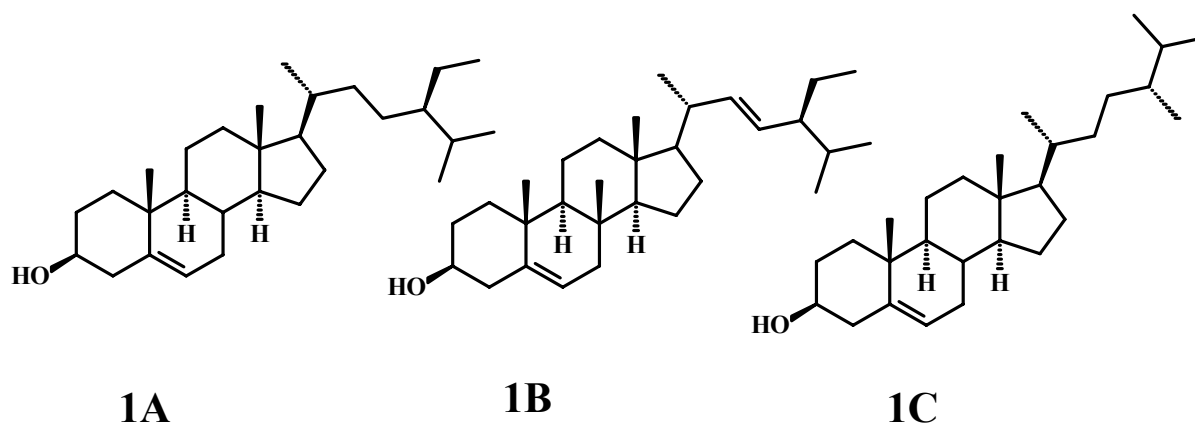
---

---

## 4.1 – Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico de *Euxylophora paraensis* permitiu o isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes: esteróides, alcalóides, limonóides, cumarinas e flavonóides. Para facilitar a Identificação estrutural dos metabólicos isolados, estes serão discutidos por classes.

### Esteróides



#### Sitosterol (1A), Estigmasterol (1B) e Campesterol (1C) (em mistura)

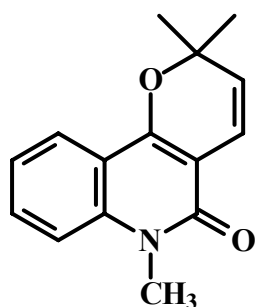
m = 52,3 mg

procedência: folhas de *E. paraensis*

isolamento: p. 39

identificação: p.53-56

### Alcalóides



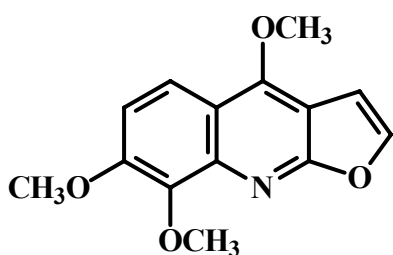
#### N-metilflindersina (2)

m = 50,1 mg

procedência: caule de *E. paraensis*

isolamento: p. 46

identificação: p.57-61



**Esquimianina (3)**

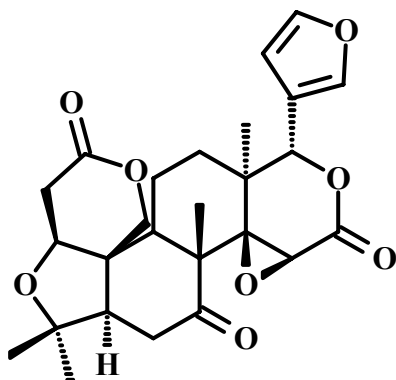
m = 2,3 mg

procedência: folha de *E. paraensis*

isolamento: p. 40-41

identificação: p.62-64

Limonóide



**Limonina (4)**

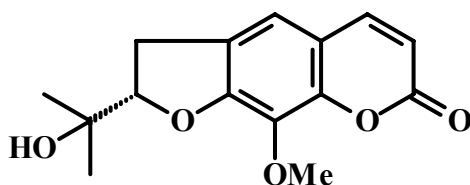
m = 20,6 mg

procedência: caule de *E. paraensis*

isolamento: p. 47

identificação: p. 67-75

Cumarinas



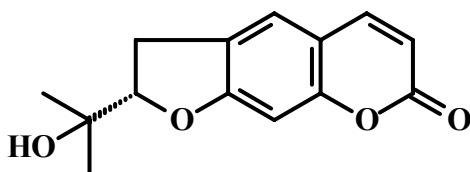
**8-metoxi-marmesina (5)**

m = 2,2 mg

procedência: caule de *E. paraensis*

isolamento: p. 45

identificação: p.76-81



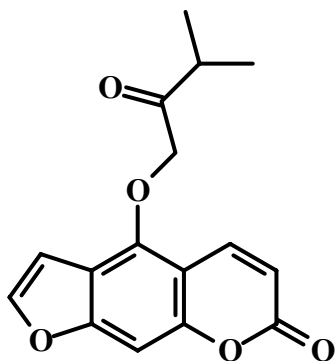
**Marmesina (6)**

m = 1,6 mg

procedência: caule de *E. paraensis*

isolamento: p. 45

identificação: p.82-84



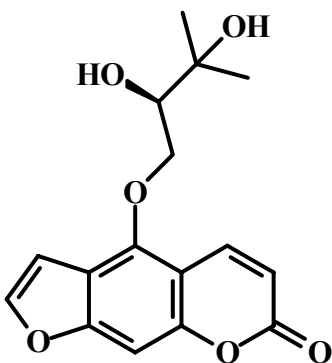
**Isooxipeucedanina (7)**

m = 1,1 mg

procedência: folhas de *E. paraensis*

isolamento: p. 39

identificação: p. 85-91



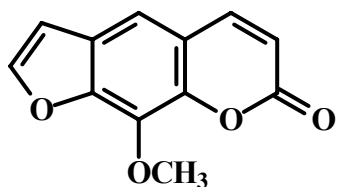
**Prangol (8)**

m = 5,9 mg

procedência: folhas de *E. paraensis*

isolamento: p. 40-41

identificação: p. 92-97



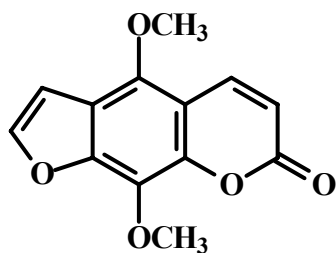
**Xantotoxina (9)**

m = 21,0 mg

procedência: foha de *E. paraensis*

isolamento: p. 40-41

identificação: p. 98-104



**Isopimpenilina (10)**

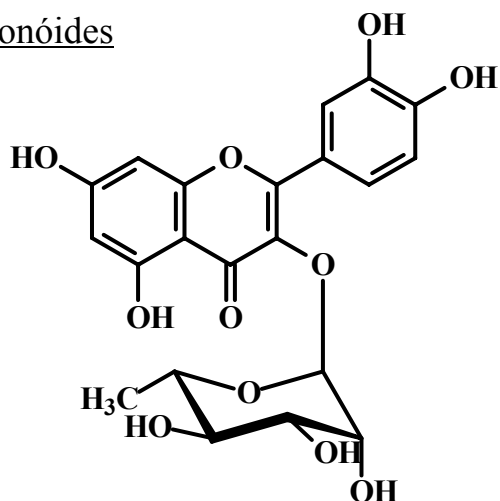
m = 11,2 mg

procedência: folha de *E. paraensis*

isolamento: p. 40-41

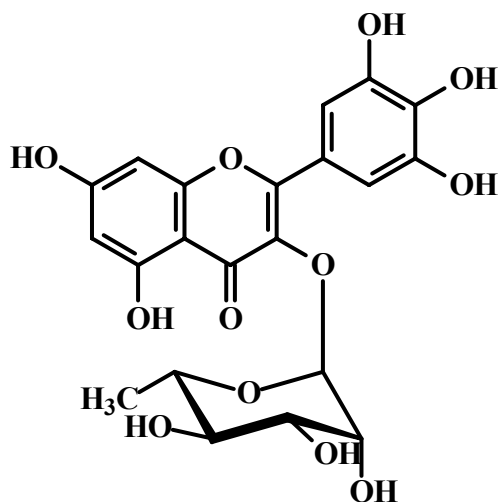
identificação: p. 98-104

Flavonóides



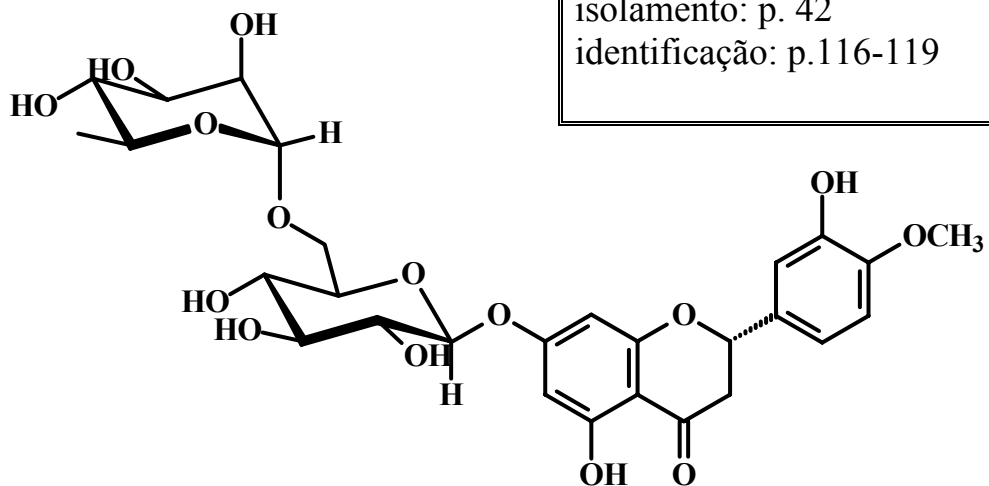
**Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (11)**

m = 10,3 mg  
 procedência: folhas de *E. paraensis*  
 isolamento: p. 43  
 identificação: p. 107-112



**Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (12)**

m = 12,6 mg  
 procedência: folhas de *E. paraensis*  
 isolamento: p. 43  
 identificação: p. 113-115



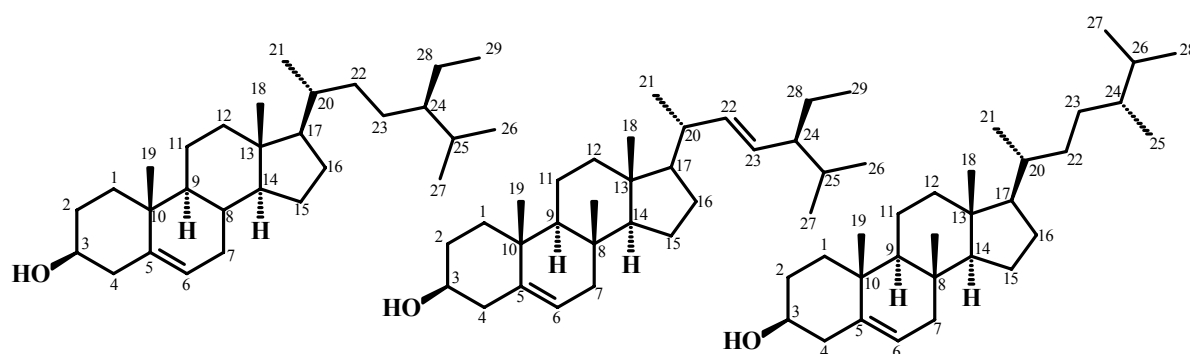
**Hesperidina (13)**

m = 43,4 mg  
 procedência: folhas de *E. paraensis*  
 isolamento: p. 42  
 identificação: p. 116-119

## 4.2 – Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol, o estigmasterol e o campesterol são os esteróides mais frequentemente encontrados no reino vegetal<sup>57</sup>. Quase sempre estes esteróides encontram-se em mistura devido às suas semelhanças estruturais ocasionando dificuldades em suas separações, então, na maioria das vezes, suas identificações são realizadas em mistura através de CG/EM.

### 4.2.1 – Identificação estrutural do sitosterol (1A), estigmasterol (1B) e campesterol (1C)

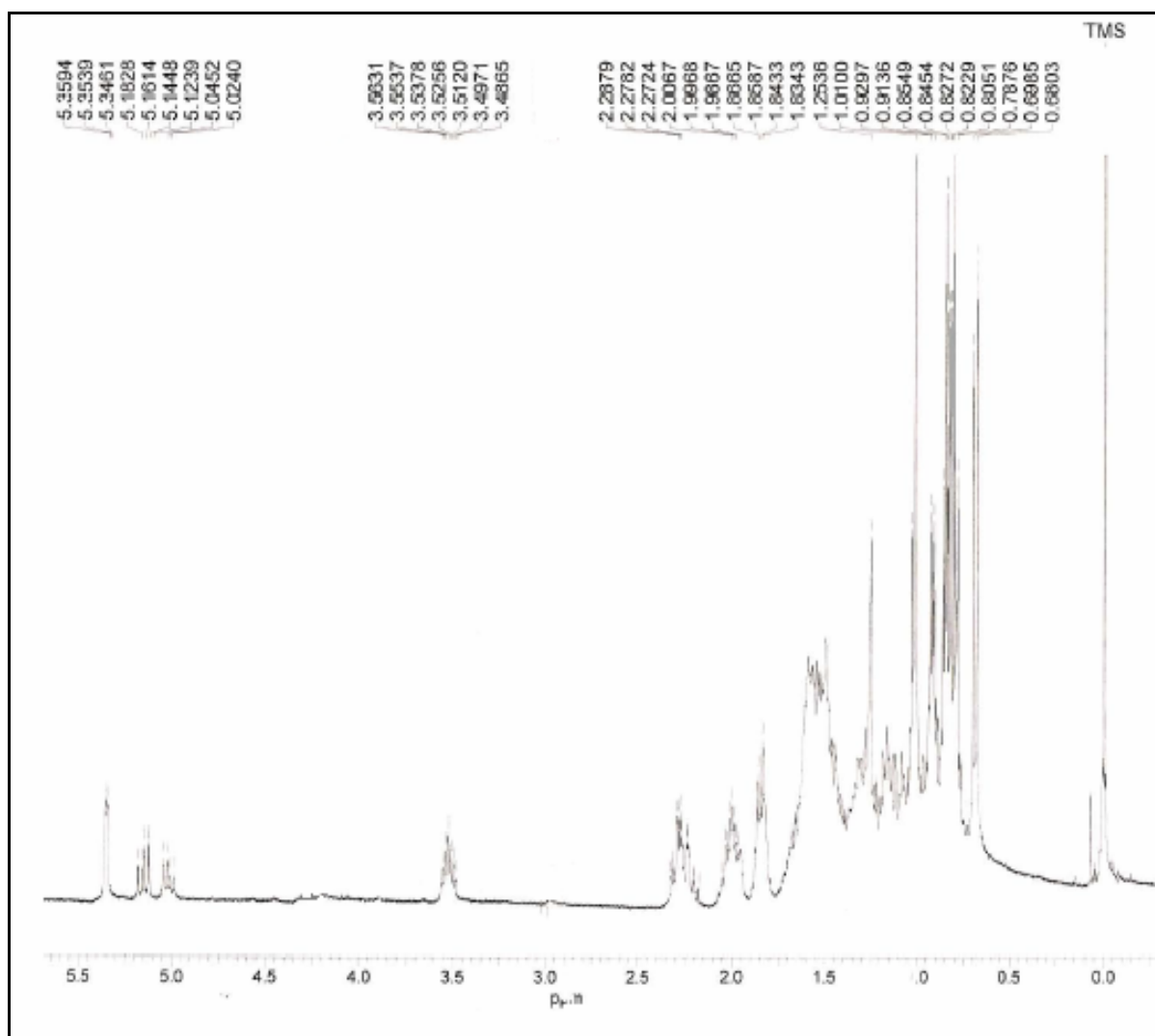


Estes esteróides foram obtidos da partição hexânica do extrato etanólico do caule. Através do espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.1), pode-se observar a presença de um dubleto largo em  $\delta_H$  5,33 ( $J = 5,0$  Hz) e um multipeto em  $\delta_H$  3,52 característicos dos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente dos esqueletos esteroidais do sitosterol, estigmasterol e campesterol; foi observado também sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta_H$  5,07  $dd$  ( $J = 8,0$  e  $15,4$  Hz) e  $\delta_H$  5,12  $dd$  ( $J = 8,1$  e  $15,1$  Hz) atribuídos aos da cadeia lateral do estigmasterol, e ainda, um grande número de sinais congestionados na região de  $\delta_H$  0,68 – 2,31 referentes a vários grupos de hidrogênios metílicos,

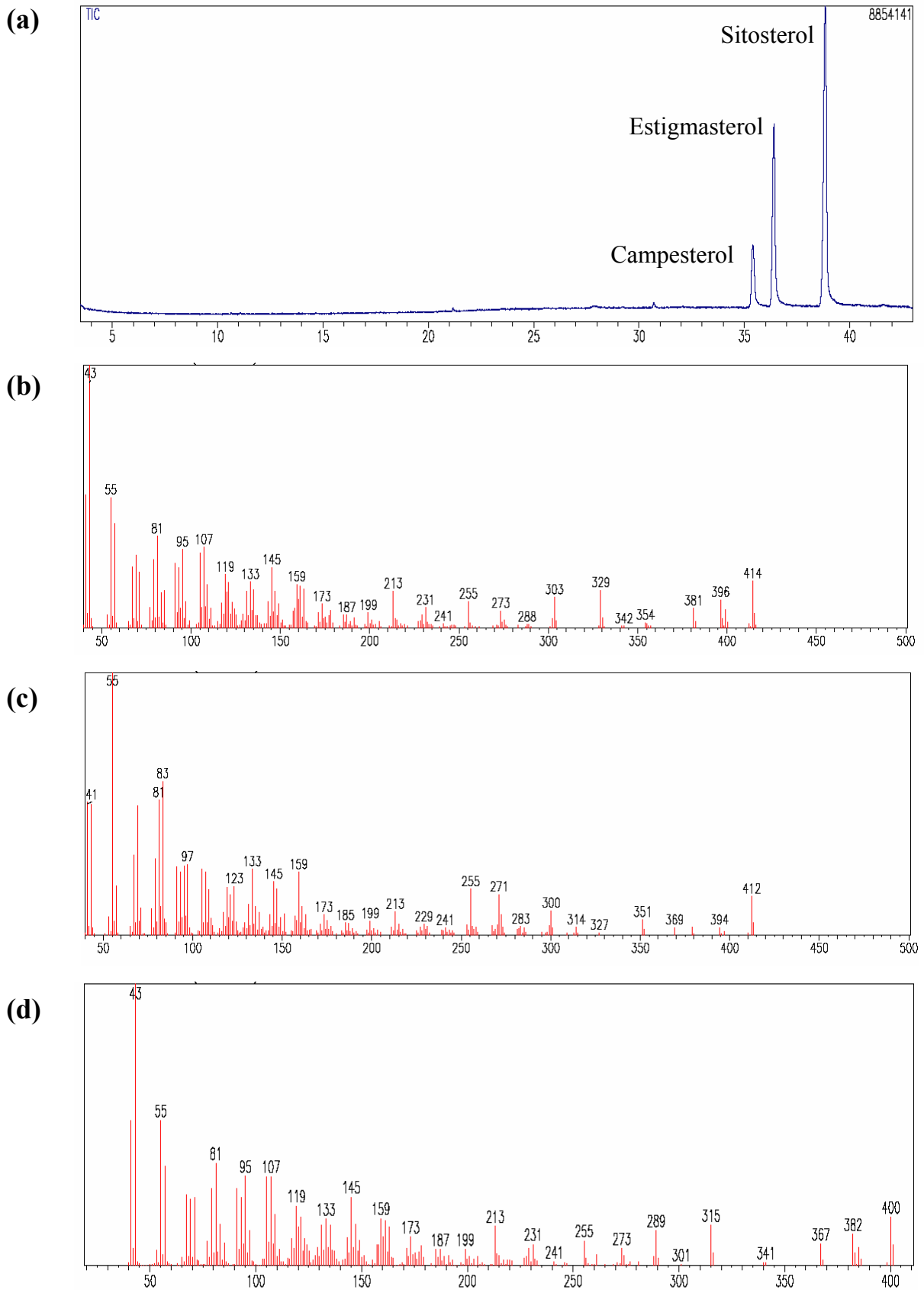


metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. O sitosterol e o campesterol possuem cadeias laterais praticamente idênticas, portanto, não há como diferencia-los com um simples espectro de hidrogênio.

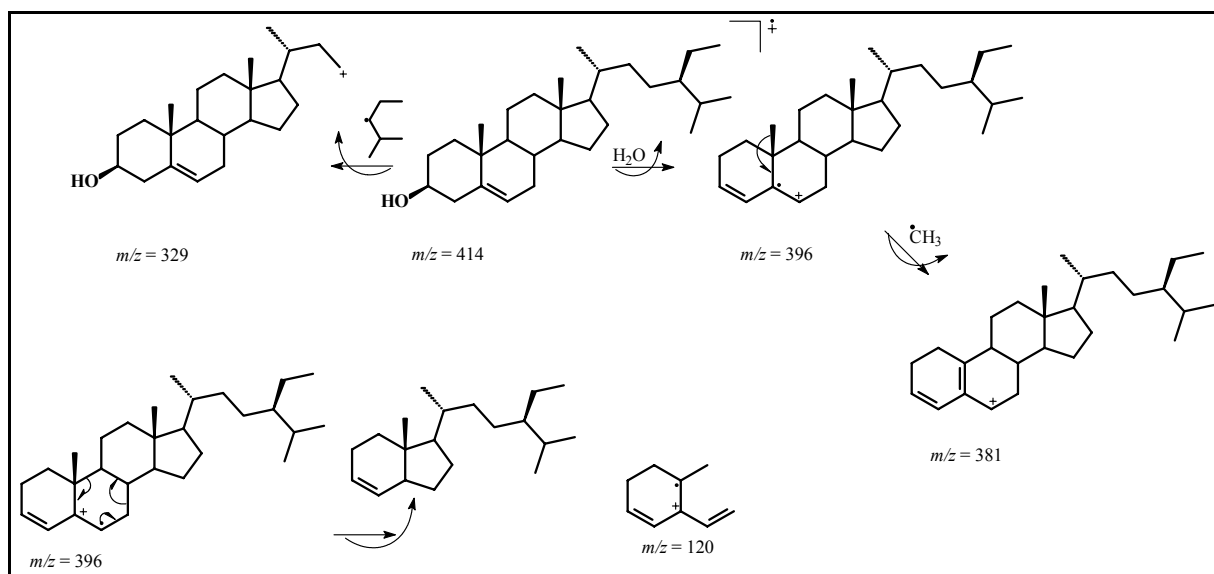
Na análise por CG/EM, foram observados três picos no cromatograma (**FIGURA 4.1 a**) que indicaram a presença de três substâncias. A presença da mistura sitosterol (**1 A**), estigmasterol (**1 B**) e campesterol (**1 C**) foi confirmada através dos picos referentes ao íon molecular em  $m/z$  414, 412 e 400 (**FIGURA 4.1 a**) que conferiram com as fórmulas moleculares das três substâncias  $C_{29}H_{50}O$ ,  $C_{29}H_{48}O$  e  $C_{28}H_{48}O$ , respectivamente. O **ESQUEMA 4.1** apresenta propostas de fragmentação do sitosterol.



**FIGURA 4.1** – Espectro de RMN  $^1H$  da mistura **1A** +**1B** + **1C**. ( $CDCl_3$ , 200 MHz).



**FIGURA 4.2** – (a) Cromatograma da mistura **1A + 1B + 1C**; (b) Espectro de massa (IE = 70 eV) do sitosterol; (c) Espectro de massa do estigmasterol (IE = 70 eV); (d) Espectro de massa (IE = 70 eV) do campesterol.



ESQUEMA 4.1 – Proposta de fragmentação do sitosterol.

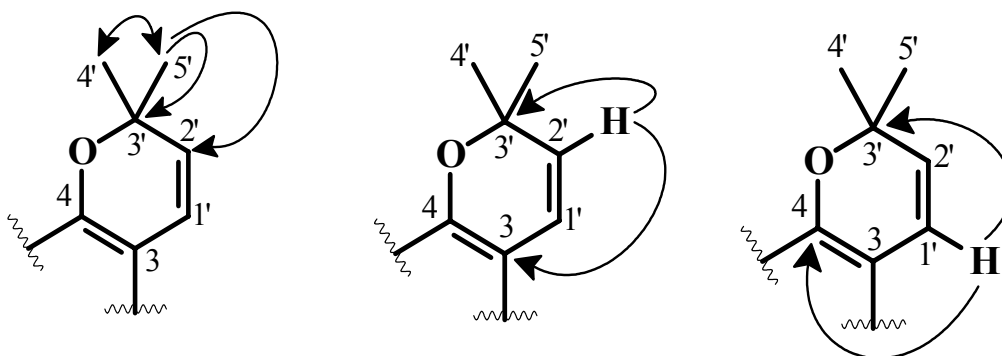
## 4.3 – Alcalóides

### 4.3.1 – Identificação estrutural da substância 2:

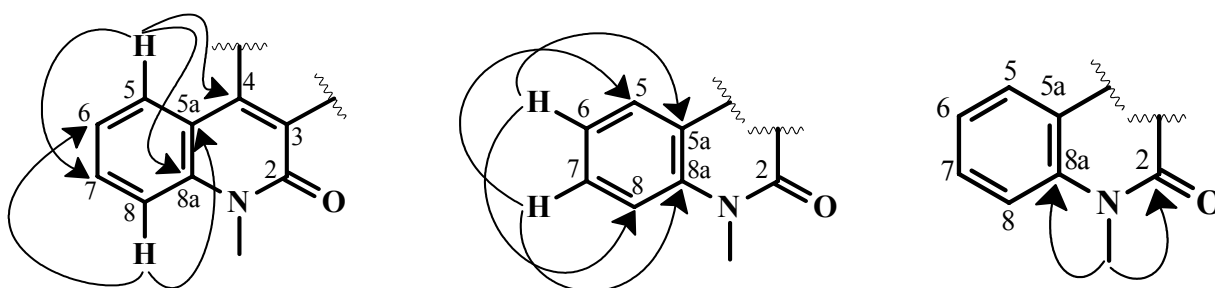
O alcalóide do tipo piranoquinolona foi isolado do caule de *Euxylophora paraensis* e apresentou-se como um sólido cristalino de coloração branca. Foi identificado através da análise dos experimentos RMN 1D e 2D e também por comparação com dados da literatura<sup>58</sup>.

O Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **2** apresenta dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 e  $\delta_{\text{H}}$  5,54 (1H,  $J = 9,9$  Hz) e um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,52 (6H) que sugerem a presença de um anel 2,2 dimetilcromeno. A região aromática do espectro mostrou um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,97 (1H,  $J = 8,4$  e 2,0 Hz), um duplo duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,55 (1H,  $J = 8,4$ ; 6,8 e 1,6 Hz), um dubleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  7,32 (1H,  $J = 8,6$ ) e outro duplo duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,23 (1H,  $J = 8,6$ ; 6,8 e 2,0 Hz) que sugerem a presença de um anel aromático dissubstituído. A presença de um singleto em  $\delta$  3,70 (3H) sugere a presença de uma metila ligada a um heteroátomo (N ou O).

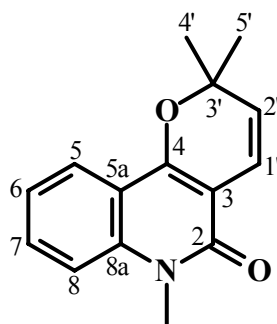
Através da análise do mapa de contorno de HMBC (**FIGURA 4.6**) foi possível observar a correlação do sinal das metilas Me-4',5' em  $\delta_{\text{H}}$  1,52 com o sinal de um carbono em 78,8 que foi atribuído ao C-3', também foi observado a correlação destes prótons com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  125,5 (C-2'). O sinal relativo ao H-2' em  $\delta_{\text{H}}$  5,54 (1H, d,  $J = 9,9$  Hz) mostrou correlação com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  78,8 (C-3') e com um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  106,2 que foi atribuído ao C-3. O sinal correspondente ao H-1' em  $\delta_{\text{H}}$  6,76 mostrou correlações com o sinal de C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  78,8) e com um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  155,0 que foi atribuído ao C-4.



O sinal do hidrogênio aromático em  $\delta_H$  7,97 mostrou correlação com o sinal atribuído ao C-4 ( $\delta_C$  155,0), permitindo então atribuí-lo ao H-5 que também mostrou correlação com sinais de carbonos em  $\delta_C$  139,5 e  $\delta_C$  131,0, atribuídos aos carbonos C-8a e C-7, respectivamente. O sinal em  $\delta_H$  7,55 atribuído ao H-7 mostrou correlações com os sinais de carbonos de C-8a ( $\delta_C$  139,5) e de C-5 ( $\delta_C$  123,0). O sinal em  $\delta_H$  7,32 (H-7) mostrou correlações com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  122,0 e  $\delta_C$  116,2, atribuídos aos carbonos C-6 e C-5a, respectivamente. O hidrogênio aromático em  $\delta_H$  7,23 (H-6) mostrou correlações com os sinais de carbonos de C-4a ( $\delta_C$  116,2) e C-8 ( $\delta_C$  114,0). E finalmente, o sinal em  $\delta_H$  3,70 (3H) correlacionou-se com o sinal em  $\delta_C$  139,5 (C-8a) e com um sinal característico de carboxila de lactama em  $\delta_C$  161,0 (C-2).



A análise dos experimentos de RMN 1D e 2D e a comparação com os dados descritos na literatura<sup>58</sup> (TABELA 4.1) permitiram identificar a substância **2** como sendo o alcalóide *N*-metilflindersina.



N-Metilflindersina

**TABELA 4.1** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da N-metilflindersina (**2**) juntamente com os dados encontrados na literatura<sup>58</sup> para **2**.

C	<b>2</b>		<b>2 (Lit.)</b> <sup>58</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ <sup>a</sup> <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}$ <sup>b</sup>	$\delta_{\text{H}}$ <sup>c</sup> <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}$ <sup>d</sup>
2	-	161,0	-	161,0
3	-	106,2	-	105,9
4	-	155,0	-	155,2
5a	-	116,2	-	116,1
5	7,97 <i>dd</i> (8,4 e 2,0)	123,0	7,97 <i>dd</i> (8,2 e 1,5)	123,1
6	7,23 <i>ddd</i> (8,4; 6,8 e 2,0)	122,0	7,23 <i>ddd</i> (8,2; 7,1 e 1,0)	121,7
7	7,55 <i>ddd</i> (8,6; 6,8 e 1,6)	131,0	7,55 <i>ddd</i> (8,6; 7,1 e 1,5)	130,8
8	7,32 <i>dl</i> (8,6)	114,0	7,32 <i>d</i> (8,6)	114,0
8a	-	139,5	-	139,4
1'	6,76 <i>d</i> (9,9)	117,9	6,76 <i>d</i> (9,8)	118,0
2'	5,54 <i>d</i> (9,9)	125,5	5,54 <i>d</i> (9,8)	126,3
3'	-	78,8	-	78,7
4'	1,52 <i>s</i>	29,2	1,52 <i>s</i>	29,2
5'	1,52 <i>s</i>	29,2	1,52 <i>s</i>	29,2
N-Me	3,70 <i>s</i>	28,2	3,70 <i>s</i>	28,2

<sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz

<sup>b</sup>  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz

<sup>c</sup>  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz

<sup>d</sup>  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz

Valores de  $J$ , entre parênteses, em Hz.

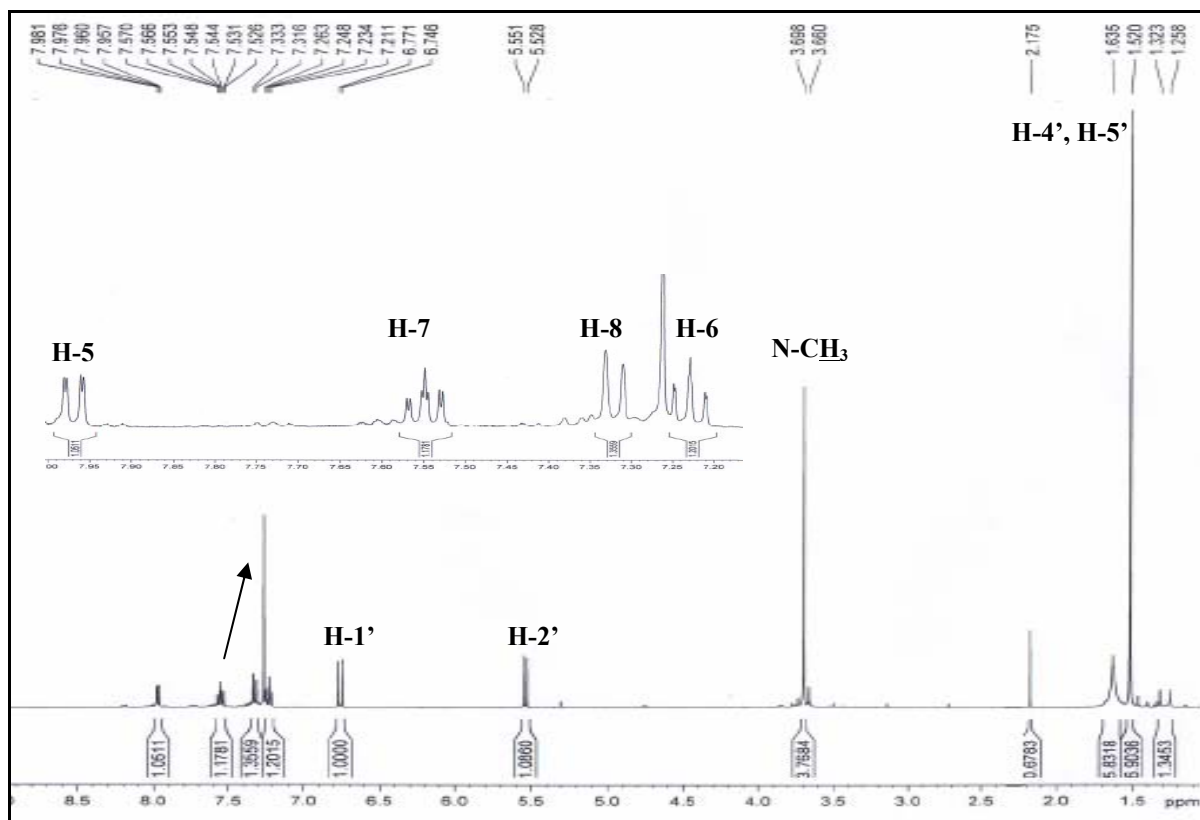


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância 2. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

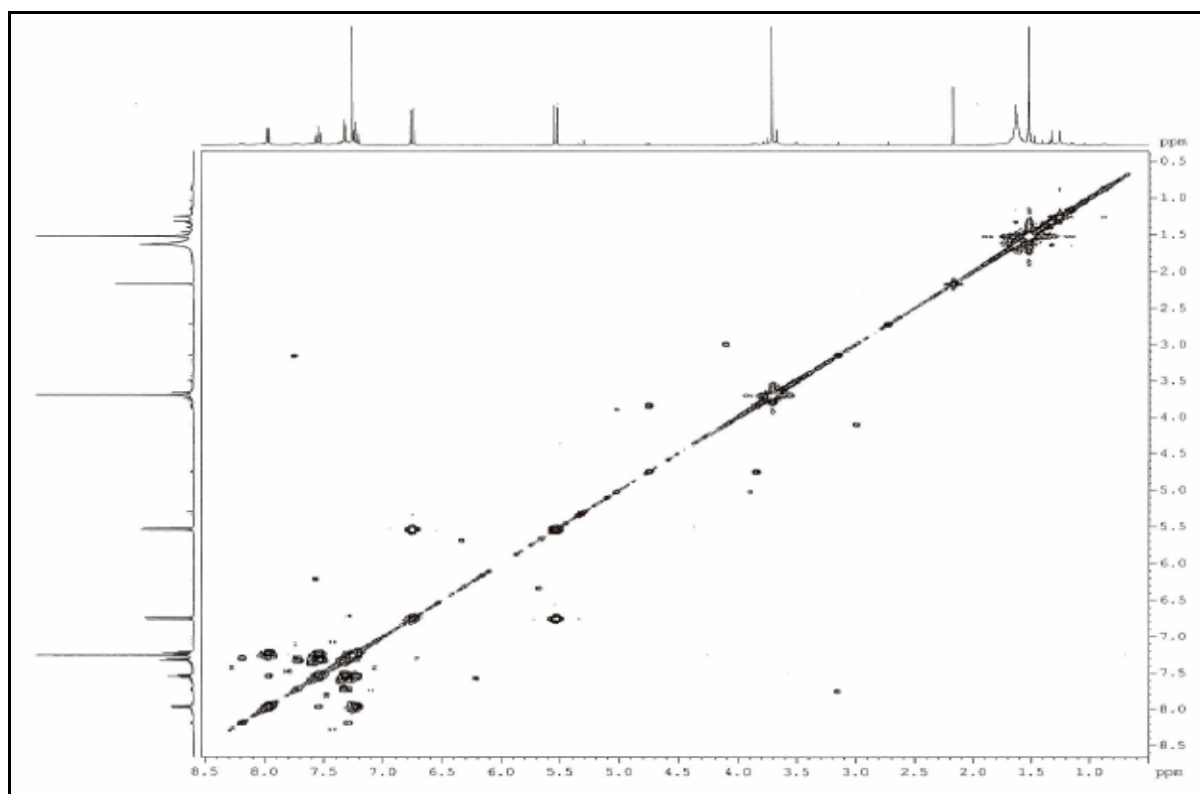
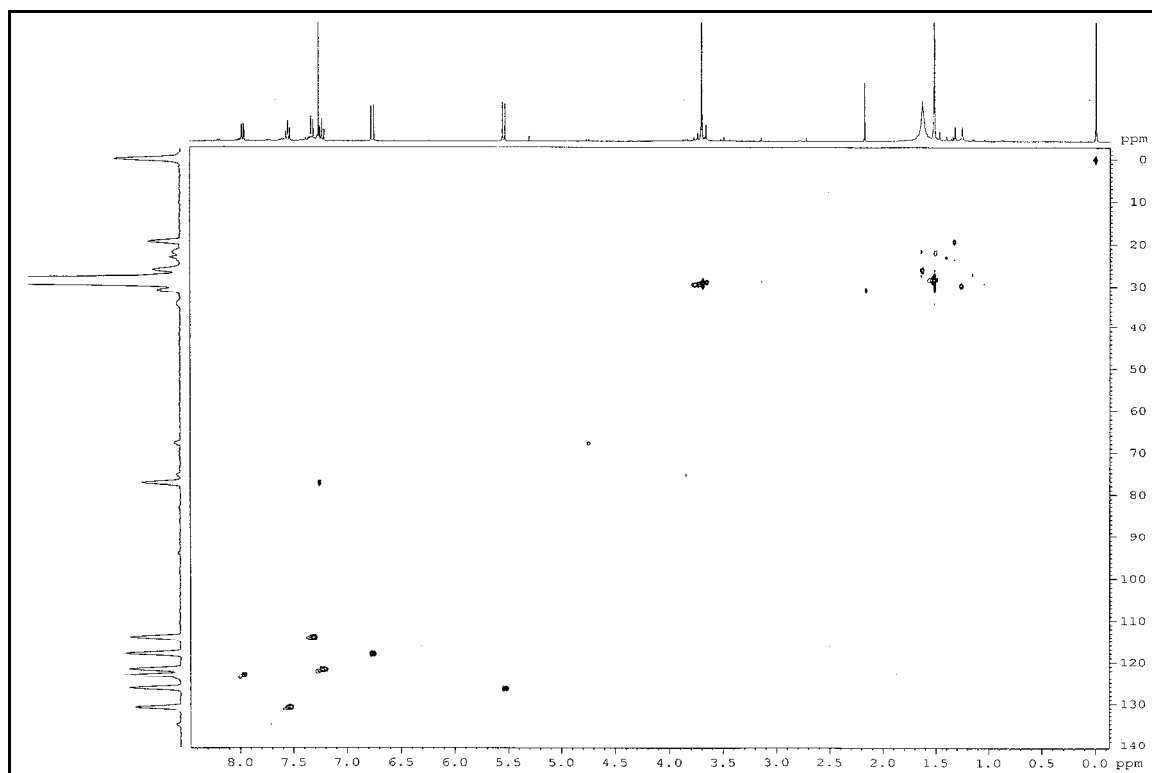
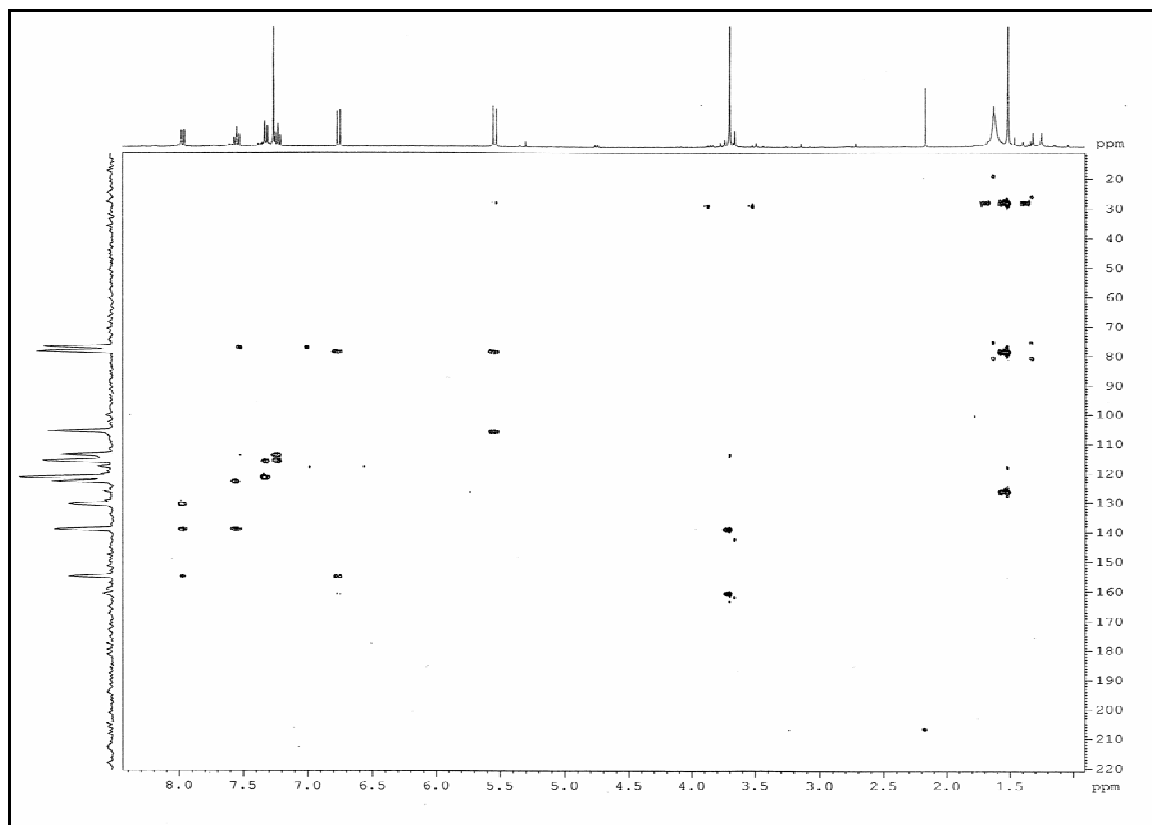


FIGURA 4.4 – Espectro de COSY H-H da substância 2. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



**FIGURA 4.5** – Mapa de Correlações HSQC da substância **2**. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



**FIGURA 4.6** – Mapa de correlações HMBC da substância **2**. (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

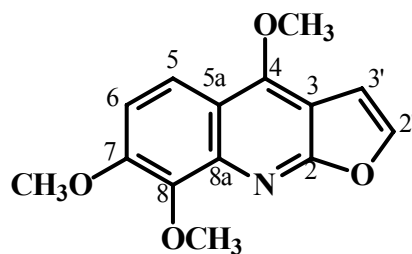


### 4.3.2 – Identificação estrutural da substância 3:

A substância **3** foi isolada da fração diclorometano do extrato etanólico da caule de *Euxylophora paraensis*.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  desta substância apresentou um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4,44 (3H), relativo a uma metoxila no C-4, e dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,59 e  $\delta_{\text{H}}$  7,05 ( $J = 2,8$  Hz) de hidrogênios furânicos, que são sinais bastante característicos dos alcalóides furoquinolínicos. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra também um par de dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  8,03 e  $\delta_{\text{H}}$  7,24 ( $J = 9,4$  Hz) que indicam a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*, os quais foram atribuídos a H-5 e H-6. Estes dados indicaram que C-7 e C-8 deveriam estar substituídos e por ainda existirem no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  4,12 e 4,04 integrando para três hidrogênios cada, relativos a grupos metoxilas, definiu-se a estrutura **3** como sendo o alcalóide esquimianina, que foi identificado anteriormente em *Almeidea rubra*<sup>59</sup>.

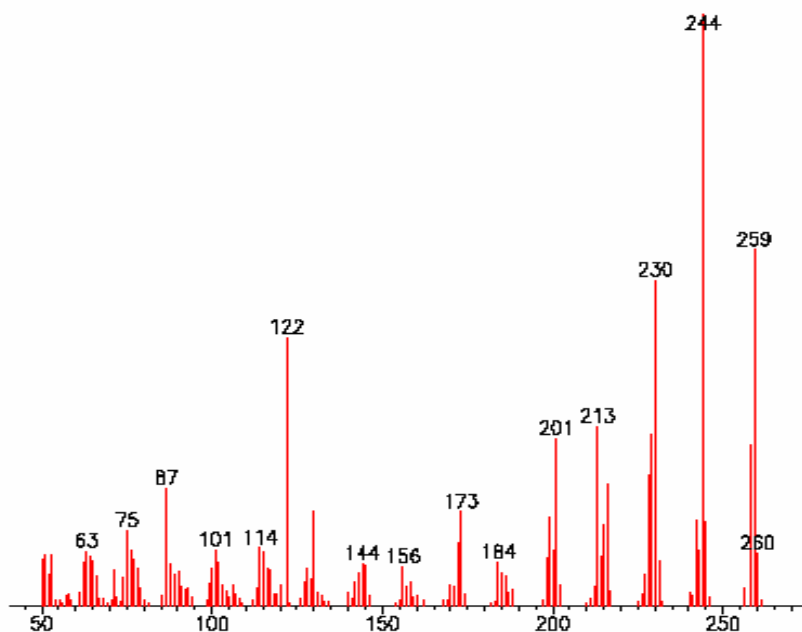
No espectro de massas (**FIGURA 4.7**) de **3** confirmou-se a estrutura proposta através do pico do íon molecular em  $m/z$  259 daltons, compatível com a fórmula molecular da esquimianina ( $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ). O **ESQUEMA 4.2** apresenta propostas dos principais fragmentos observados no espectro de massas para esta substância.



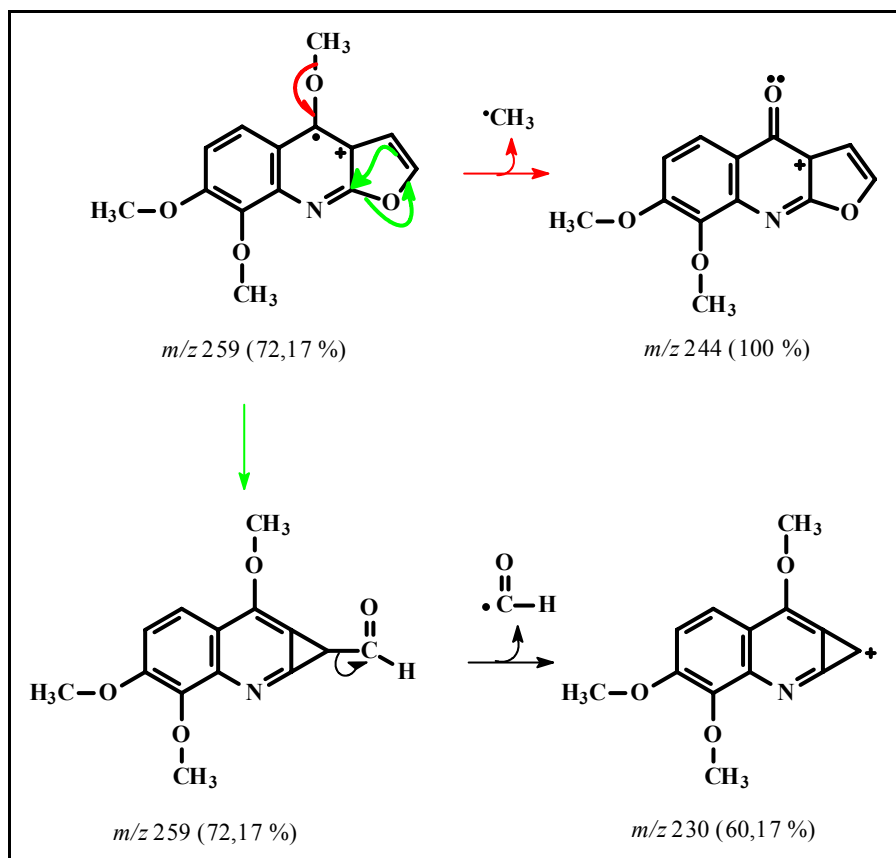
Esquimianina

**TABELA 4.2** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  de Esquimianina (**3**) juntamente com os dados descritos na literatura<sup>59</sup> para **5**.

H	<b>3</b> $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	<b>3 (Lit.)</b> <sup>59</sup> $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>
5	8,03 <i>d</i> , (9,4)	8,03 <i>d</i> , (9,0)
6	7,24 <i>d</i> , (9,4)	7,23 <i>d</i> , (9,0)
2'	7,59 <i>d</i> , (2,8)	7,58 <i>d</i> , (2,5)
3'	7,05 <i>d</i> , (2,8)	7,05 <i>d</i> , (2,5)
4-OCH <sub>3</sub>	4,44 <i>s</i>	4,46 <i>s</i>
7-OCH <sub>3</sub>	4,04 <i>s</i>	4,07 <i>s</i>
8-OCH <sub>3</sub>	4,12 <i>s</i>	4,16 <i>s</i>



**FIGURA 4.7** – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da esquimianina (**13**).



ESQUEMA 4.2 – Propostas de fragmentação para a substância 3.

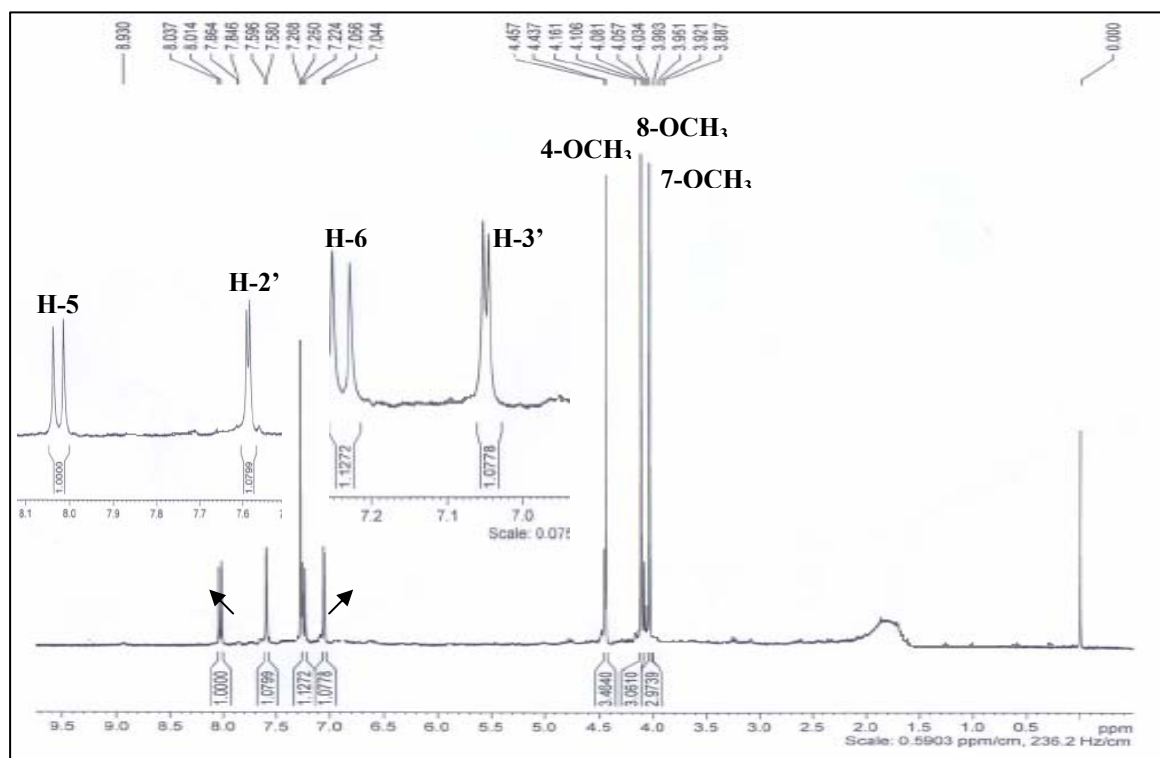
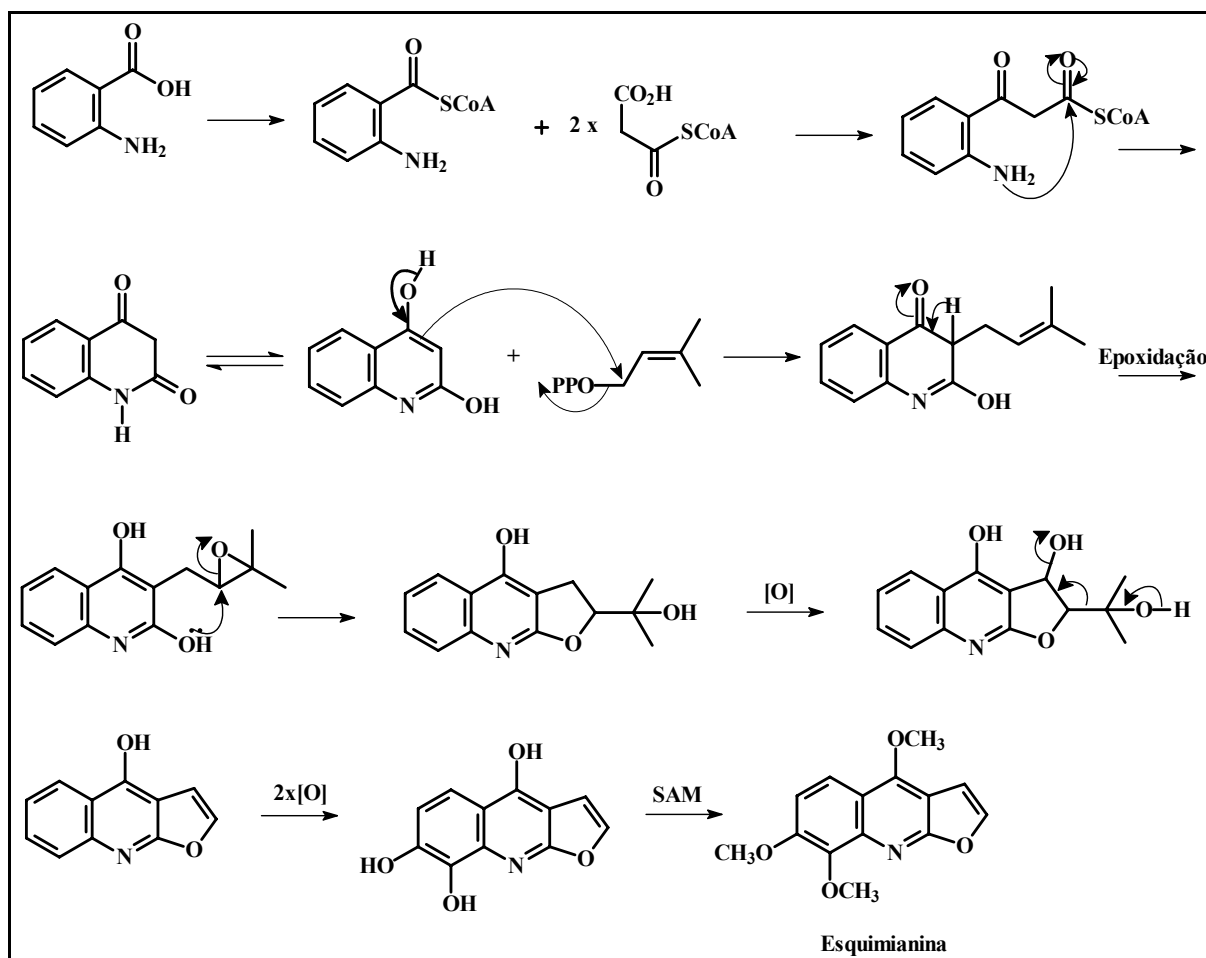


FIGURA 4.8 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de esquimianina (3) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

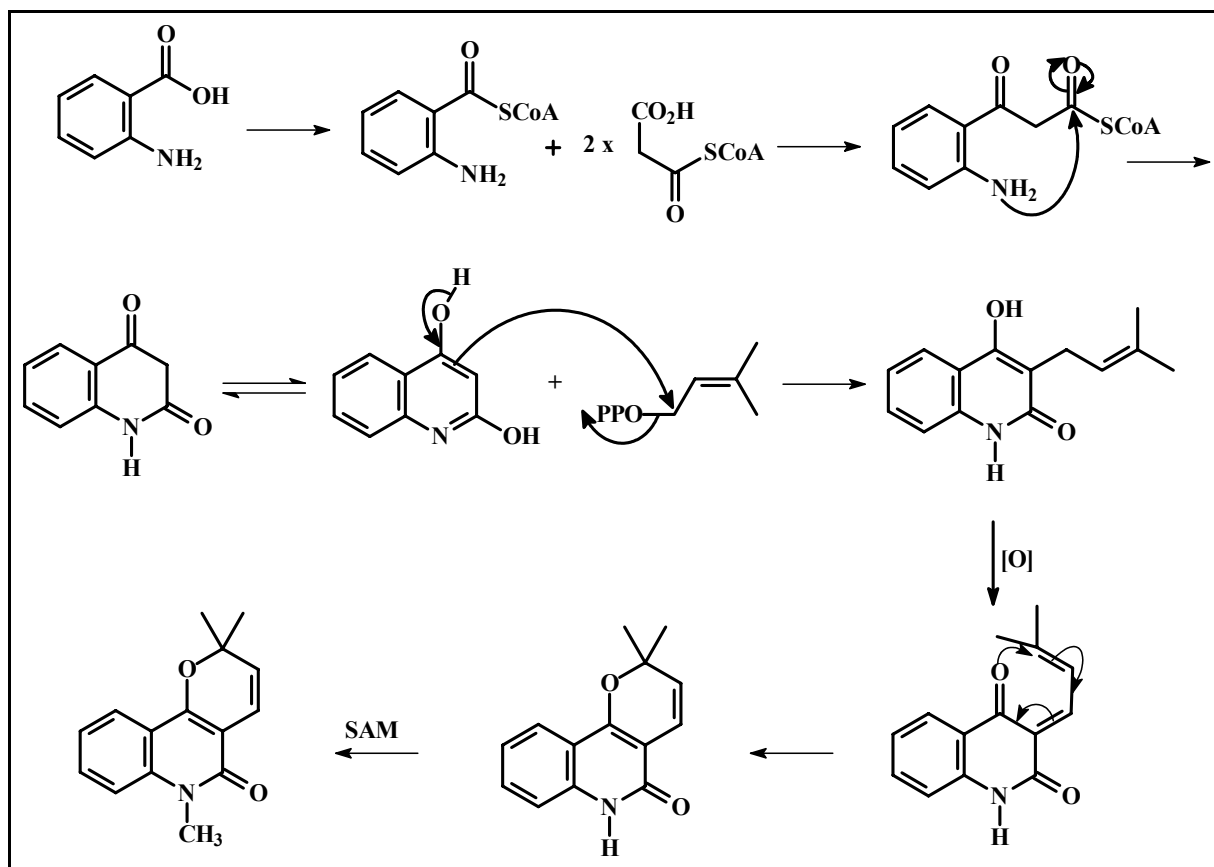
### 4.3.3 – Biogênese dos Alcalóides

Os alcalóides isolados têm sua origem biossintética no ácido antranílico. Inicialmente ocorre a condensação deste ácido com unidades do malonil-CoA. A incorporação de duas unidades de malonil-CoA leva à formação do esqueleto quinolínico normalmente em forma de 2-quinolona, que pode incorporar unidades de prenila através de adição nucleofílica na posição 3. A molécula formada pode sofrer ciclização com o oxigênio na posição 2, levando à formação dos alcalóides diidrofuroquinolínicos e através da perda da cadeia isopropil leva à formação dos alcalóides furoquinolínicos<sup>60</sup>.

A ciclização da prenila incorporada na posição 3 com o oxigênio na posição 4 leva à formação dos alcalóides furoquinolínicos<sup>60</sup>.



ESQUEMA 4.3 – Proposta biogenética para a esquimianina.



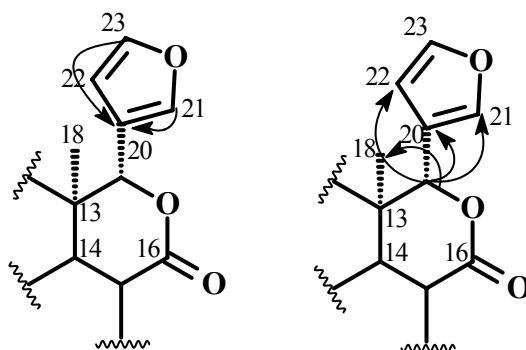
ESQUEMA 4.4 – Proposta biogénica para a N-metilflindersina.

## 4.4 – Limonóides

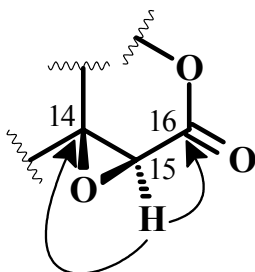
### 4.4.1 – Identificação estrutural da substância 4

O limonóide **4** apresentou-se como um sólido branco e através de análise por CCD apresentou uma única mancha roxa, após revelação com vanilina. A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.9**) revelou a presença de sinais característicos do anel furano  $\beta$ -substituído, onde os sinais de H-21 e H-23 apareceram como tripletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  7,42 ( $J = 0,7$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  7,40 ( $J = 1,7$  Hz), respectivamente e o sinal do hidrogênio H-22 apareceu como um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,34 ( $J = 1,7$  e  $0,7$  Hz).

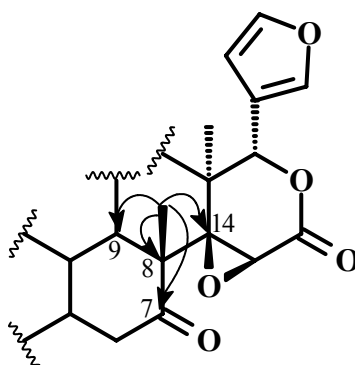
O espectro de HSQC (**FIGURA 4.10**), mostra a correlação dos hidrogênios H-21, H-23 e H-22 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  141,2,  $\delta_{\text{C}}$  143,3 e  $\delta_{\text{C}}$  109,7, respectivamente e o espectro de HMBC (**FIGURA 4.11**) mostra a correlação dos sinais de H-21 e H-23 com um carbono em  $\delta_{\text{C}}$  120,0, relativo ao C-20. O sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (*s*) foi atribuído ao H-17 do anel  $\delta$ -epoxilactona, pois através do mapa de correlações HMBC observa-se a correlação deste sinal com os carbonos C-20, C-21 e C22, e este hidrogênio também se correlaciona com um carbono em  $\delta_{\text{C}}$  20,8, sugerindo este sinal para a metila 18.



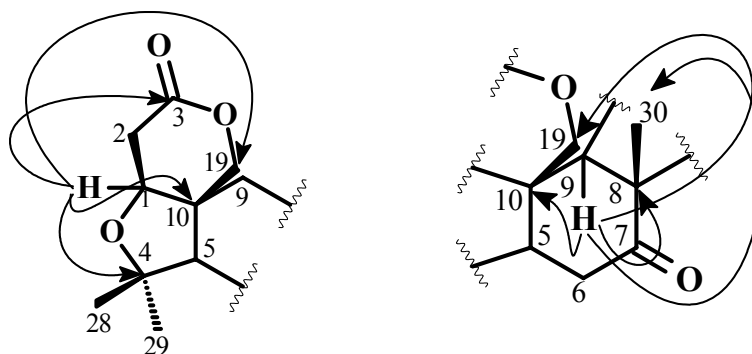
O HMBC mostra um singlete em  $\delta_H$  4,04 se correlacionando com carbonos em  $\delta_C$  65,7 e  $\delta_C$  166,6, o que sugere um epóxido entre C-14 e C-15, assim tem-se a seguinte subunidade:



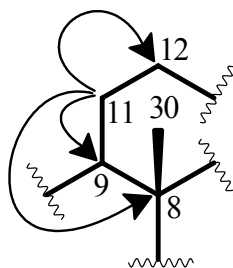
O HMBC mostra um sinal de metila em  $\delta_H$  1,07 correlacionando-se com o sinal de C-14, indicando este sinal para a metila 30. O sinal desta metila ainda se correlaciona com os carbonos em  $\delta_C$  206,7,  $\delta_C$  48,2 e  $\delta_C$  51,4.



A presença de sinais em  $\delta_H$  4,77 (*dd*,  $J = 13,0$  e  $0,6$  Hz) e  $\delta_H$  4,47 (*d*,  $J = 13,0$  Hz), atribuídos aos hidrogênios geminais do C-19, sugerem tratar-se de um limonóide com o anel A-seco. O Sinal de carbono em  $\delta_C$  169,1, observado no espectro de RMN  $^{13}C$  (FIGURA 4.13), foi uma boa indicação da presença de um grupo carboxil em C-19. O mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.11) mostrou acoplamentos a longa distância ( $J^3$ ) entre os sinais de H-1 ( $\delta_H$  4,04), H-9 ( $\delta_H$  2,55) e C-19 ( $\delta_C$  65,4) como indicado abaixo, confirmando que C-19 de 4 foi oxidado.

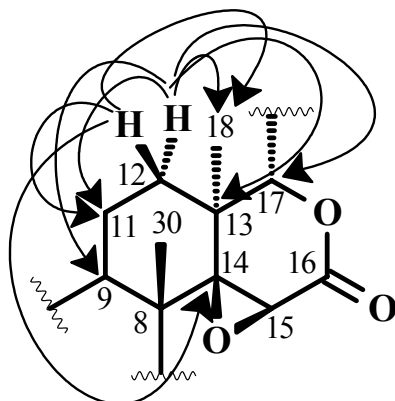


O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**FIGURA 4.13**), com o auxílio do mapa de correlações HSQC, apresentou cinco sinais relatados para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  19,0 (C-11),  $\delta_{\text{C}}$  30,9 (C-12),  $\delta_{\text{C}}$  35,7 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  36,5 (C-6) e o C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  65,4) anteriormente citado. O experimento de HMBC mostrou as correlações observadas para os sinais dos 2H-11 com os sinais de carbonos de C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  51,4,  $J^{\beta}$ ), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  48,2,  $J^{\beta}$ ) e C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  30,9,  $J^{\beta}$ ). Os hidrogênios metilênicos H-11 ressonam em  $\delta_{\text{H}}$  1,78 e  $\delta_{\text{H}}$  1,90 e o espectro de COSY (**FIGURA 4.12**) mostrou acoplamentos do sinal  $\delta_{\text{H}}$  1,90 com o sinal de H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,55) e do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,78 com o sinal de H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  1,51).

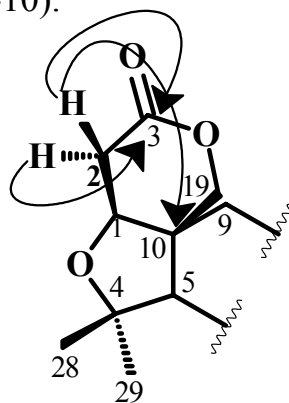


Os hidrogênios metilênicos H-12 foram observados em  $\delta_{\text{H}}$  1,51 e  $\delta_{\text{H}}$  1,84. O mapa de correlações HMBC mostrou correlações destes sinais de hidrogênios com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  19,0 (C-11),  $\delta_{\text{C}}$  20,8 (Me-18),  $\delta_{\text{C}}$  38,0 (C-13),  $\delta_{\text{C}}$  48,2 (C-9),  $\delta_{\text{C}}$  65,7 (C-14) e  $\delta_{\text{C}}$  77,9 (C-17).

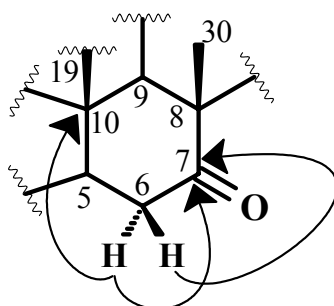




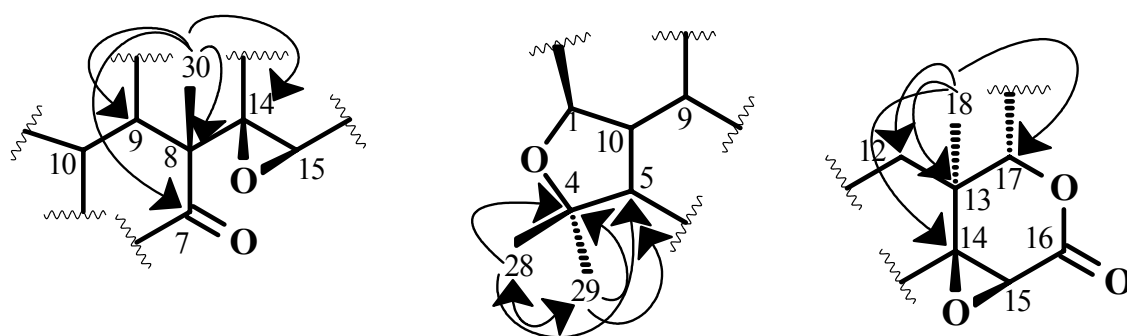
Os sinais duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,68 ( $J = 16,8$  e  $1,9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,98 ( $J = 16,8$  e  $3,8$  Hz) correlacionaram-se com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  35,7 (C-2) via HSQC e através da análise do mapa de correlações HMBC pode-se observar as correlações desses sinais duplos dubletos com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  169,1 (C-3) e  $\delta_{\text{C}}$  46,0 (C-10).



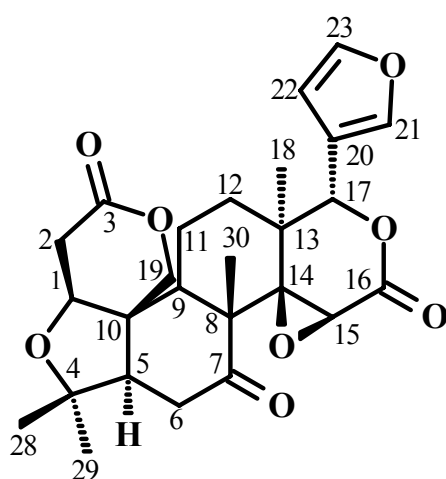
O último par de hidrogênios diastereotópicos foi observado como dois duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,47 ( $J = 14,5$  e  $3,2$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,86 ( $J = 15,8$  e  $14,5$  Hz) e foram atribuídos aos 2H-6. O experimento de HMBC mostrou as correlações observadas para os sinais de 2H-6 com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  46,0 (C-10) e  $\delta_{\text{C}}$  206,1 (C-7). O espectro de COSY apresentou acoplamento entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,86 com o sinal de H-5 em  $\delta_{\text{H}}$  2,23 ( $dd$ ,  $J = 15,8$  e  $3,2$  Hz).



Dois outros singletos (3H) relativo a grupos metila foram observados em  $\delta_H$  1,19 (Me-29) e  $\delta_H$  1,30 (Me-28). A correta atribuição da posição de cada grupo metila foi efetuada com auxílio dos mapas de correlações HSQC e HMBC. As correlações a longa distância do sinal em  $\delta_H$  1,19 (Me-29) com os sinais de carbonos C-4 ( $\delta_C$  80,4), C-5 ( $\delta_C$  60,7) e C-28 ( $\delta_C$  30,2) e por fim o sinal em  $\delta_H$  1,30 com os sinais de carbonos C-4 ( $\delta_C$  80,4), C-5 ( $\delta_C$  60,7) e C-29 ( $\delta_C$  21,5), puderam facilmente ser observados no mapa de correlações HMBC.



A estrutura da substância **4** foi definida como sendo o limonóide limonina, característico do gênero *Citrus* (Rutaceae)<sup>61</sup>. Os dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  de **4** estão listados na TABELA 4.3 juntamente com os dados descritos na literatura para a limonina<sup>62</sup>.



**Limonina**

TABELA 4.3 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da limonina (4) juntamente com os dados encontrados na literatura<sup>62</sup>.

C	4		4 (Lit) <sup>62</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$
1	4,04 <i>sl</i>	79,2	4,03 <i>sl</i>	79,1
2	2,68 <i>dd</i> (16,8 e 1,9)	35,7	2,66 <i>dd</i> (16,8 e 1,8)	35,6
2	2,98 <i>dd</i> (16,8 e 3,8)		2,98 <i>dd</i> (16,8 e 3,8)	
3	-	169,1	-	169,1
4	-	80,4	-	80,2
5	2,23 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	60,7	2,23 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	60,4
6 ax	2,86 <i>dd</i> (15,8 e 14,5)	36,5	2,85 <i>d</i> (15,8)	36,3
6 eq	2,47 <i>dd</i> (14,5 e 3,2)		2,46 <i>dd</i> (15,8 e 3,2)	
7	-	206,1	-	206,1
8	-	51,4	-	51,3
9	2,55 <i>dd</i> (12,2 e 2,8)	48,2	2,56 <i>m</i>	48,1
10	-	46,0	-	45,9
11	1,78 <i>m</i>	19,0	1,81 <i>m</i>	18,8
11	1,90 <i>m</i>		-	
12 ax	1,84 <i>m</i>	30,9	-	30,1
12 eq	1,51 <i>m</i>		1,50 <i>m</i>	
13	-	38,0	-	37,9
14	-	65,7	-	65,6
15	4,04 <i>s</i>	53,9	4,03 <i>s</i>	53,8
16	-	166,6	-	167,0
17	5,47 <i>s</i>	77,9	5,47 <i>s</i>	77,7
18	1,18 <i>s</i>	20,8*	1,17* <i>s</i>	21,3
19	4,47 <i>d</i> (13,0)	65,4	4,46 <i>d</i> (13,0)	65,3
19	4,77 <i>dd</i> (13,0 e 0,6)		4,47 <i>d</i> (13,0)	
20	-	120,0	-	119,9
21	7,42 <i>tl</i> (0,7)	141,2	7,40 <i>m</i>	141,1
22	6,34 <i>dd</i> (1,7 e 0,7)	109,7	6,35 <i>m</i>	109,8
23	7,40 <i>tl</i> (1,7)	143,3	7,40 <i>m</i>	143,2
28	1,30 <i>s</i>	30,2	1,63 <i>s</i>	30,8*
29	1,19 <i>s</i>	21,5*	1,17 <i>s</i>	20,7*
30	1,07 <i>s</i>	17,7	1,07* <i>s</i>	17,6

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz<sup>c</sup> CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz<sup>d</sup> CDCl<sub>3</sub>, 50 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz.

\*Intercambiáveis.

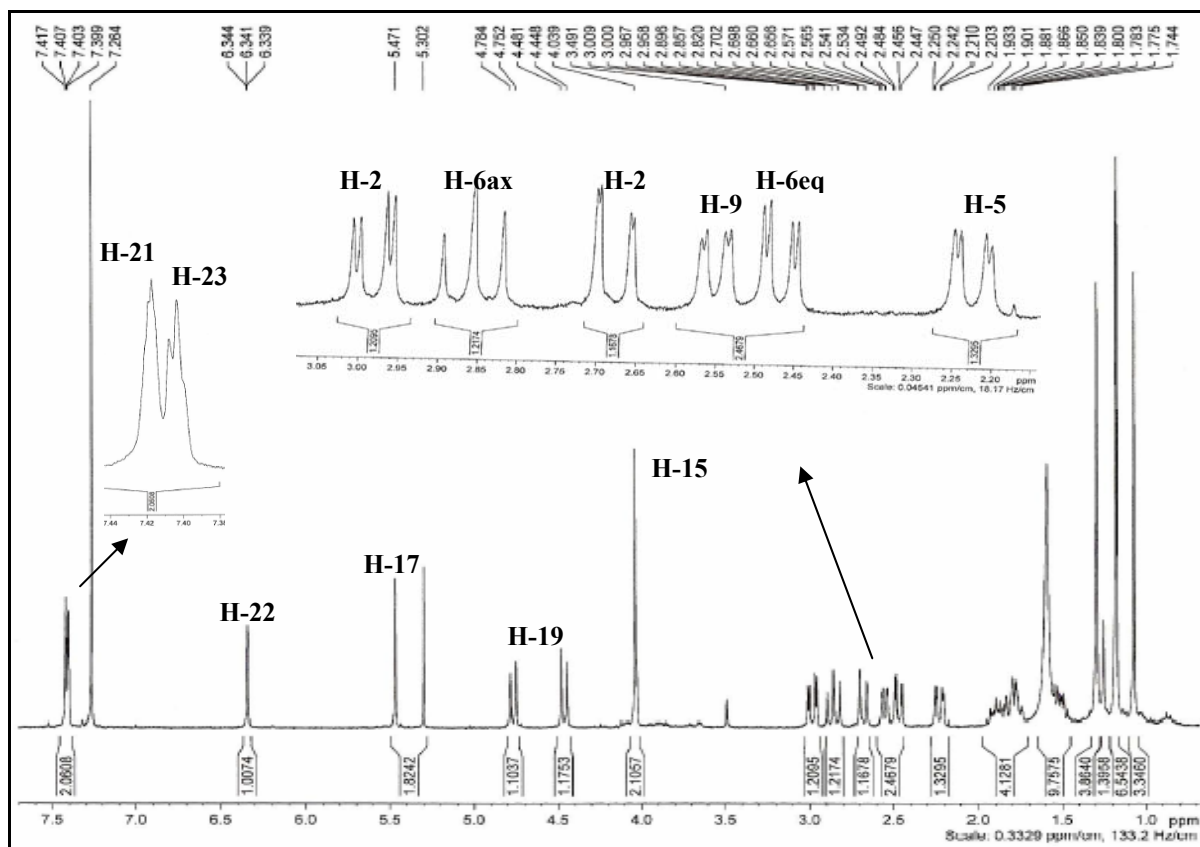


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Limonina (4) (400 MHz).

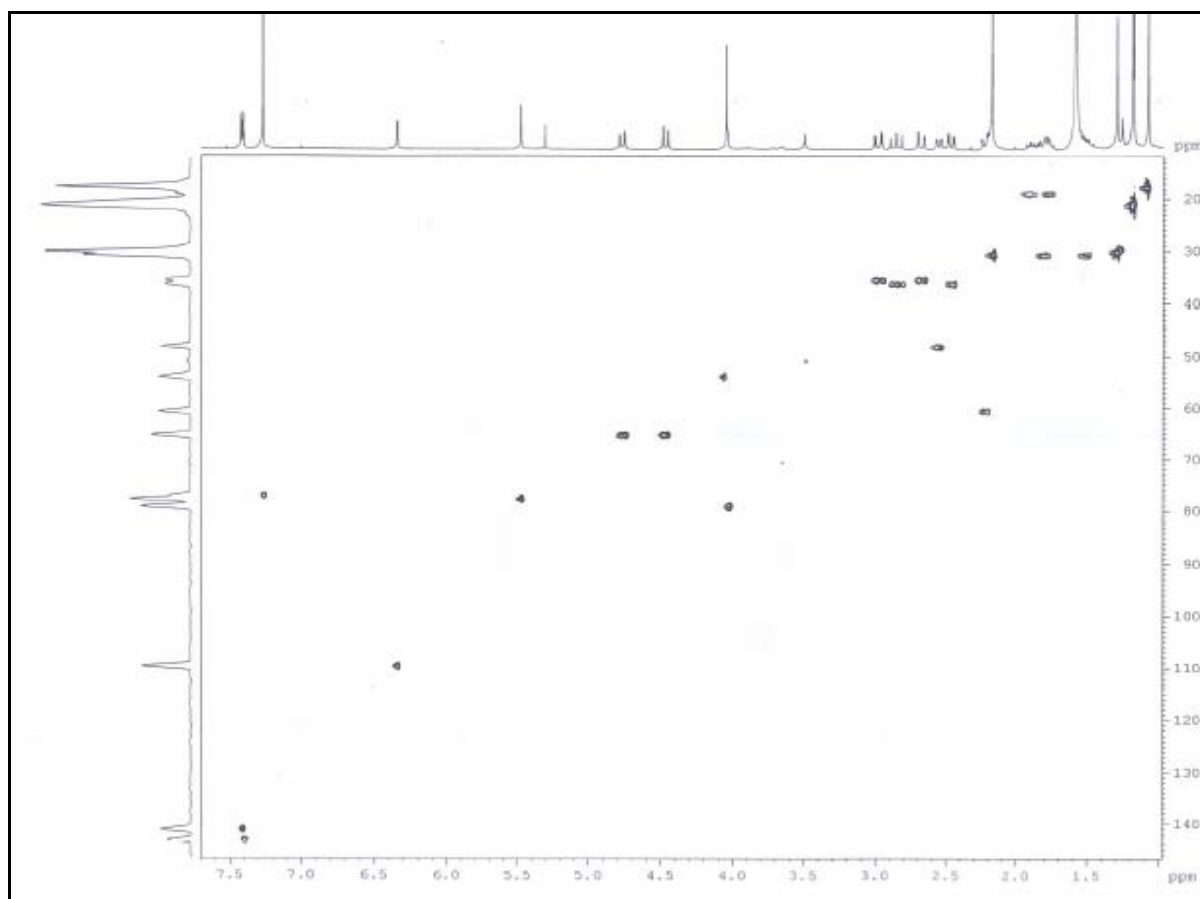


FIGURA 4.10 – Espectro de HSQC da Limonina (4) (400 MHz).

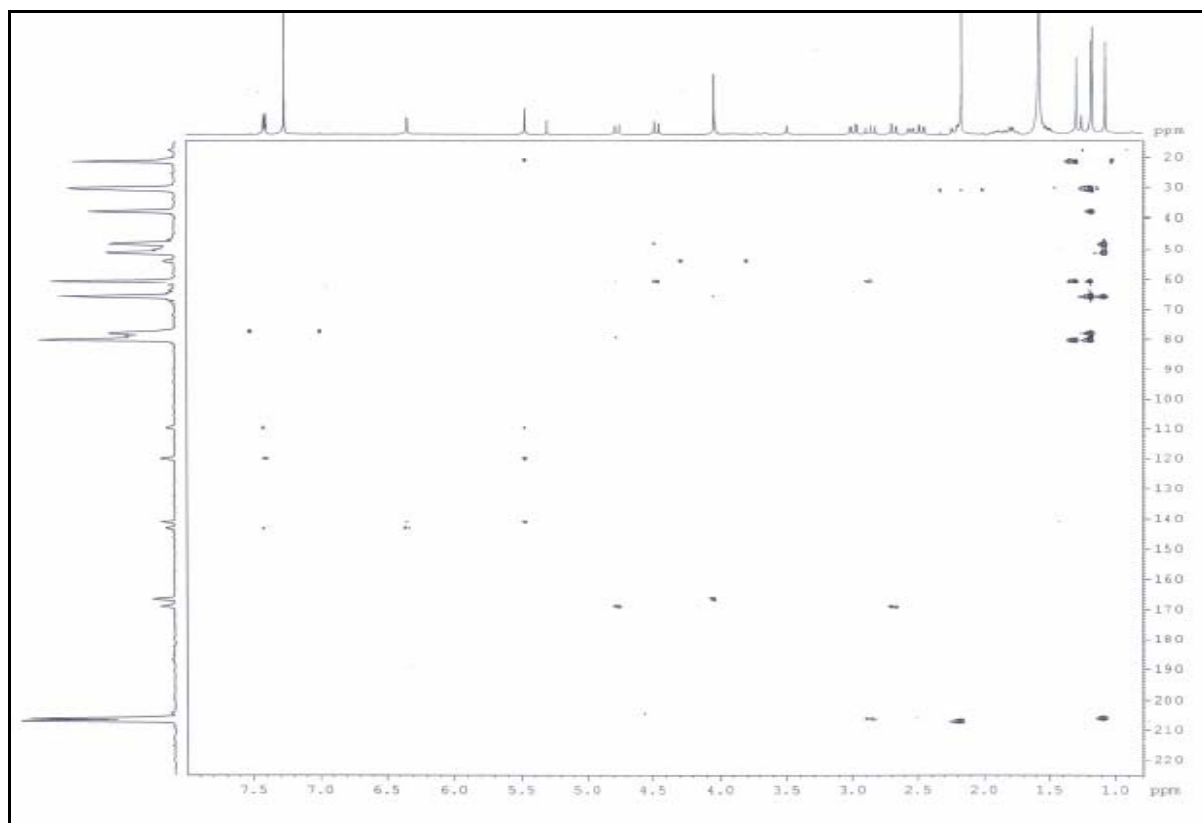


FIGURA 4.11 – Espectro de HMBC da Limonina (4) (400 MHz).

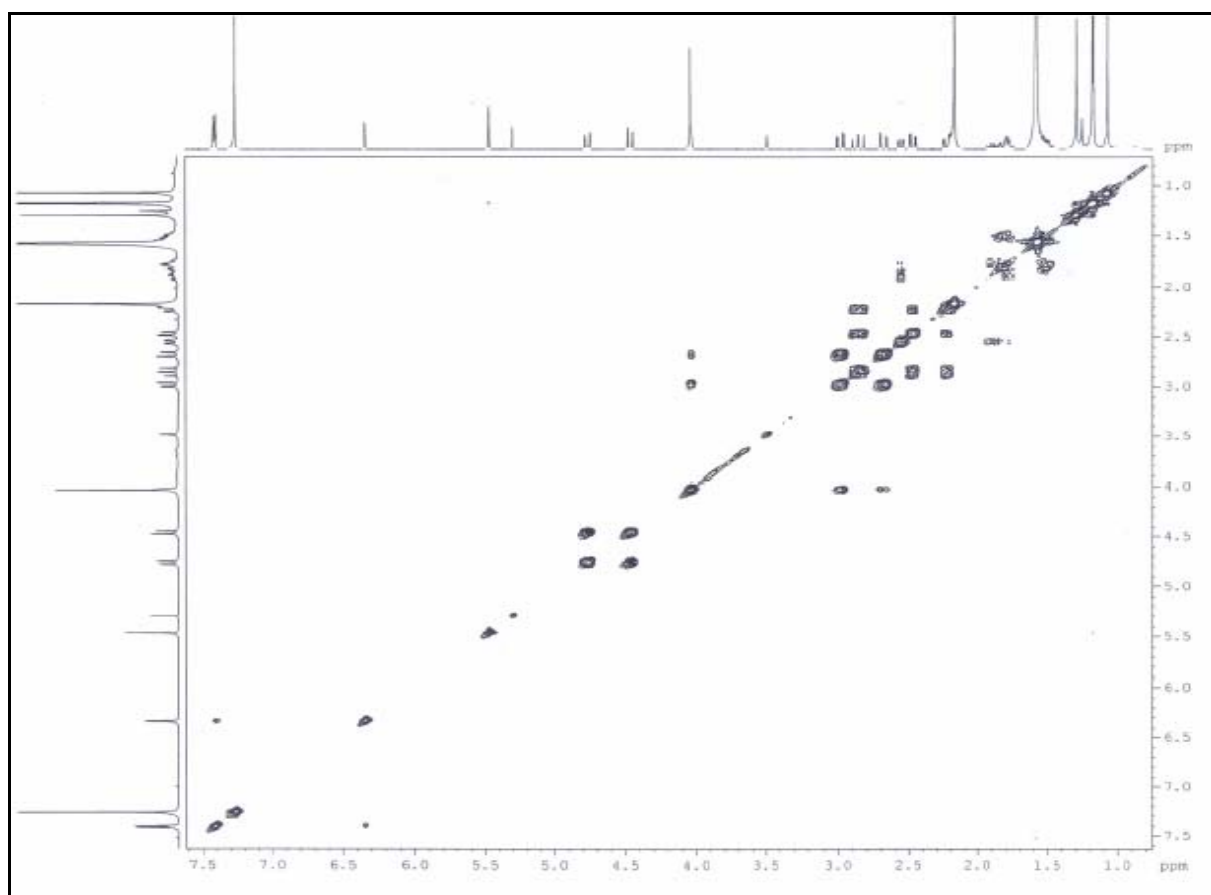


FIGURA 4.12 – Espectro de COSY da Limonina (4) (400 MHz).

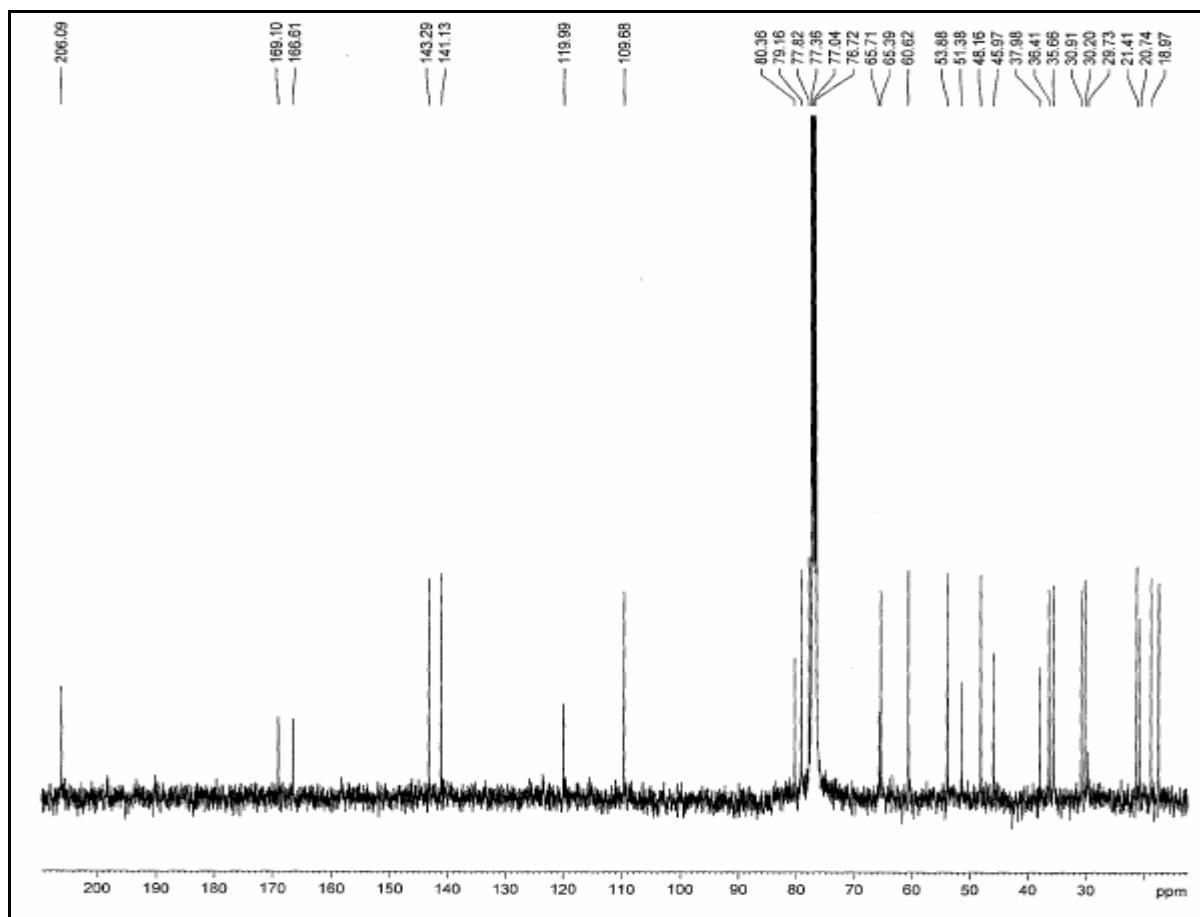


FIGURA 4.13 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de (4) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

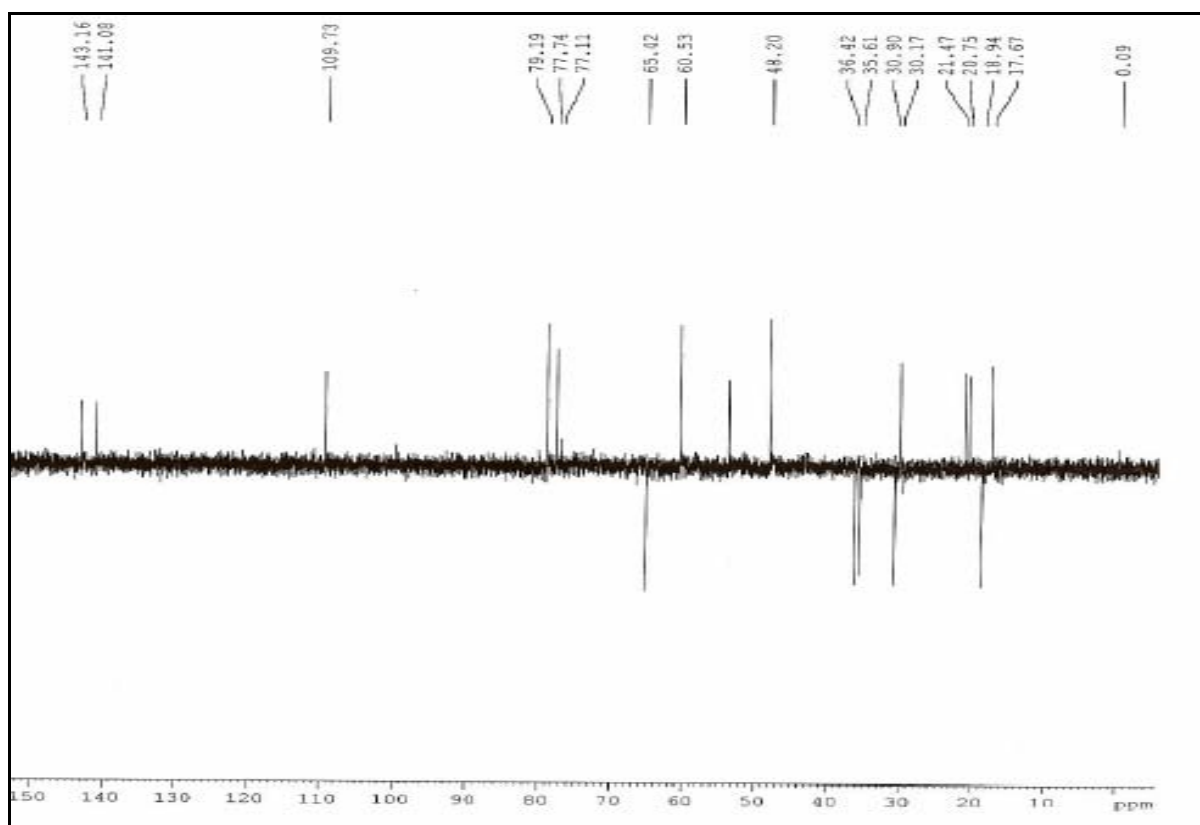


FIGURA 4.14 – Espectro de RMN de DEPT  $135^\circ$  de (4) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

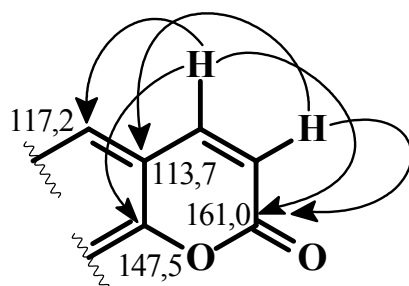
## 4.5 – Cumarinas

### 4.5.1 – Identificação estrutural da substância 5

A observação de um par de dubletos, ( $J \cong 9,5$  Hz), localizado em  $\delta_H \sim 6,1-6,4$  e  $7,5-8,3$  no espectro de RMN<sup>1</sup>H (solvente: CDCl<sub>3</sub>) de um produto natural, sugerem a presença de um esqueleto cumarínico não substituído no anel pirano<sup>63</sup>, estes sinais são característicos dos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.15) desta substância permitiu observar os sinais referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico em  $\delta_H$  7,58 (*d*,  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta_H$  6,22 (*d*,  $J = 8,4$  Hz), respectivamente.

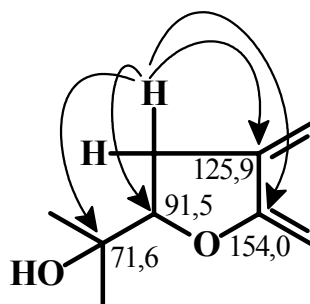
O sinal singlete observado para um hidrogênio aromático em  $\delta_H$  6,96 (*s*) foi atribuído ao hidrogênio H-5 com base nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 4.16) e HMBC (FIGURA 4.17).

O mapa de correlações HMBC mostrou a correlação do sinal de H-3 ( $\delta_H$  6,22) com um sinal em  $\delta_H$  161,0 referente à carboxila de lactona (C-2) e com o sinal em  $\delta_H$  113,7 que pode ser atribuído somente ao C-4a. O sinal do hidrogênio H-4 ( $\delta_H$  7,58) mostrou correlações com o sinal de C-2 ( $\delta_C$  161,0) e com o sinal em  $\delta_C$  147,5, atribuído ao carbono C-8a. Pode-se ainda observar a correlação mostrada para o H-4 ( $\delta_H$  7,58) com um sinal de carbono em  $\delta_C$  117,2 que, pelas possíveis correlações para H-4, este sinal foi atribuído ao carbono C-5, o que permitiu atribuir corretamente H-5 ( $\delta_H$  6,96), uma vez que se observa a correlação entre H-5 e o carbono em  $\delta_C$  117,2 via HSQC.



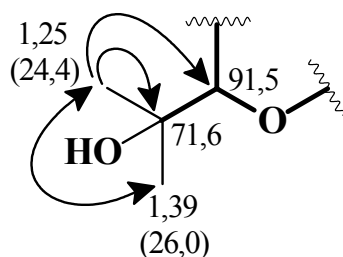
A presença do anel diidrofurano é evidenciada pelo sinal duplo dubleto em  $\delta_H$  4,78 ( $J = 9,3$  e  $8,5$  Hz) atribuído ao hidrogênio H-2' e pelos sinais em  $\delta_H$  3,25 ( $ddd$ ,  $J = 14,8$ ;  $8,5$  e  $1,3$  Hz) e  $\delta_H$  3,20 ( $ddd$ ,  $J = 14,8$ ;  $9,3$  e  $0,9$  Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3'a e H-3'b. Ainda no espectro de RMN  $^1H$  foi possível observar sinais que caracterizam um grupo hidroxiiisopropila. Estes sinais apresentaram-se como singletos em  $\delta_H$  1,39 (3H, *s*) e  $\delta_H$  1,25 (3H, *s*).

Analisando o mapa de correlações HMBC (**FIGURA 4.17**) observou-se as correlações dos sinais em  $\delta_H$  3,25 (H-3'a) e  $\delta_H$  3,20 (H-3'b) com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  71,6,  $\delta_C$  91,5,  $\delta_C$  125,0 e  $\delta_C$  154,0 atribuídos aos carbonos C-1'', C-2', C-6 e C-7, respectivamente. As atribuições aos carbonos C-2' e C-3' foram confirmadas através do experimento de HSQC.



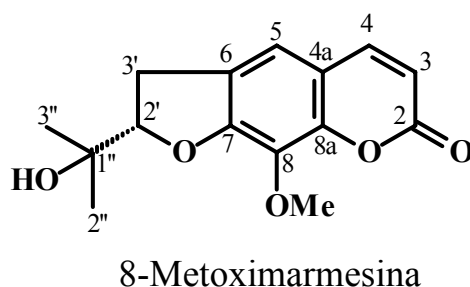
Os sinais singletos  $\delta_H$  1,39 e  $\delta_H$  1,25 correlacionaram com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  26,0 e  $\delta_C$  24,4 via HSQC. E através do mapa de correlações HMBC apresentaram correlações com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  24,4 (C-3''),  $\delta_C$  26,0 (C-2''),  $\delta_C$  71,6 (C-1'') e  $\delta_C$  91,5 (C-2').





O espectro de RMN<sup>1</sup>H mostrou a presença de um sinal em  $\delta_H$  4,06 (3H, s) relativo a um grupo metoxila. O sinal em  $\delta_H$  4,06 mostrou correlação com o sinal de carbono em  $\delta_C$  61,0 via HSQC e através do mapa de correlações HMBC apresentou correlação com o sinal de carbono em  $\delta_C$  132,0, que foi atribuído ao C-8.

Portanto, através da análise dos experimentos de RMN em 1D e 2D a cumarina **5** foi identificada como a marmesina e a sua configuração absoluta foi obtida por comparação com os dados encontrados na literatura<sup>64</sup> para esta substância, que estão apresentados na **TABELA 4.4**.



**TABELA 4.4** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da 8-metoximarmesina (**5**).

C	<b>5</b>		<b>5 (Lit.)<sup>64</sup></b>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	161,0	-	161,0
3	6,22 <i>d</i> (9,5)	112,5	6,23 <i>d</i> (9,3)	112,5
4	7,58 <i>d</i> (9,5)	143,5	7,58 <i>d</i> (9,3)	143,9
4a	-	113,7	-	113,7
5	6,96 <i>sl</i>	117,2	6,96 <i>s</i>	117,2
6	-	125,9	-	125,9
7	-	154,4	-	154,0
8	-	132,0	-	132,0
8a	-	147,5	-	147,5
2'	4,78 <i>dd</i> (9,2 e 8,5)	91,5	4,78 <i>dd</i> (9,2 e 8,5)	91,5
3'a	3,25 <i>ddd</i> (14,8; 8,5 e 0,9)	29,9	3,25 <i>ddd</i> (15,8; 8,5 e 1,3)	29,9
3'b	3,20 <i>ddd</i> (14,8; 9,2 e 0,9)		3,20 <i>ddd</i> (15,8; 9,2 e 0,9)	
1''	-	71,6	-	71,6
2''	1,39*	26,0*	1,39*	26,0*
3''	1,25*	24,4*	1,25*	24,4*
OMe	4,06	61,0	4,06 <i>s</i>	-

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz

<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

\*Valores Intercambiáveis

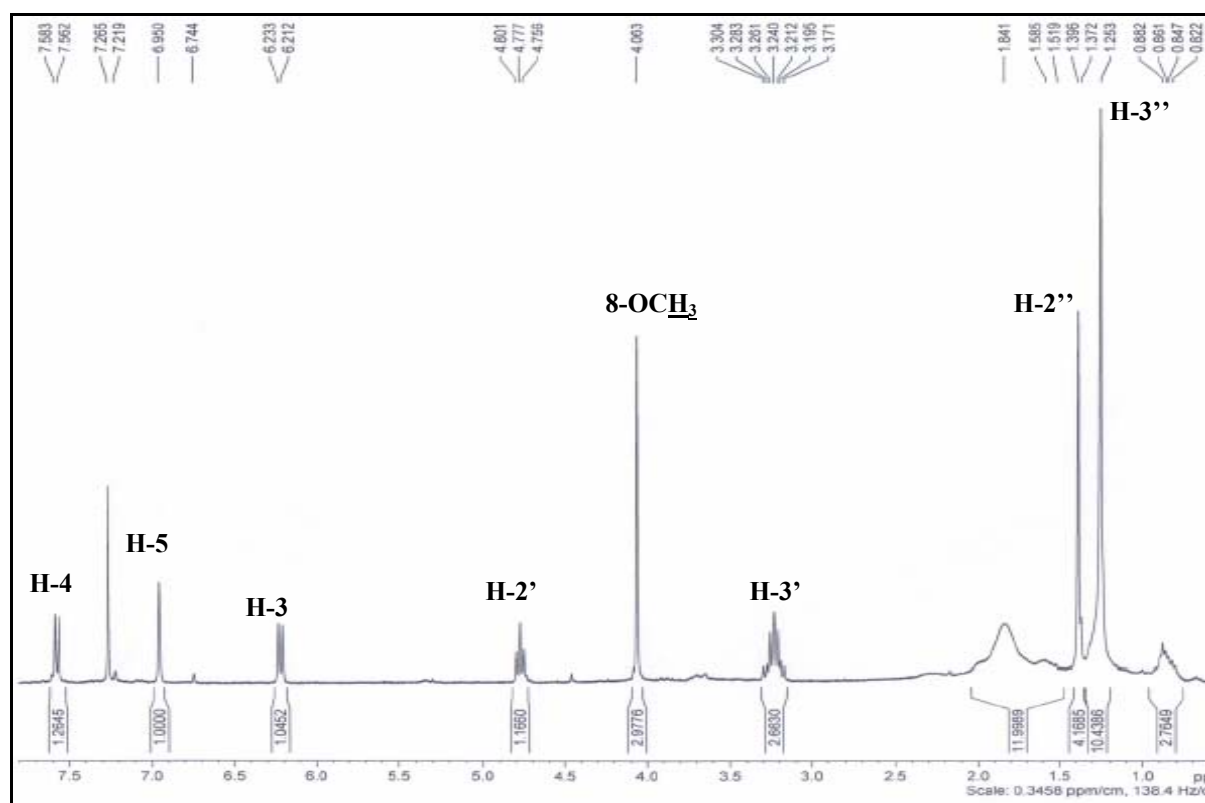


FIGURA 4.15 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 8-metoximarmesina (**5**) (400 MHz).

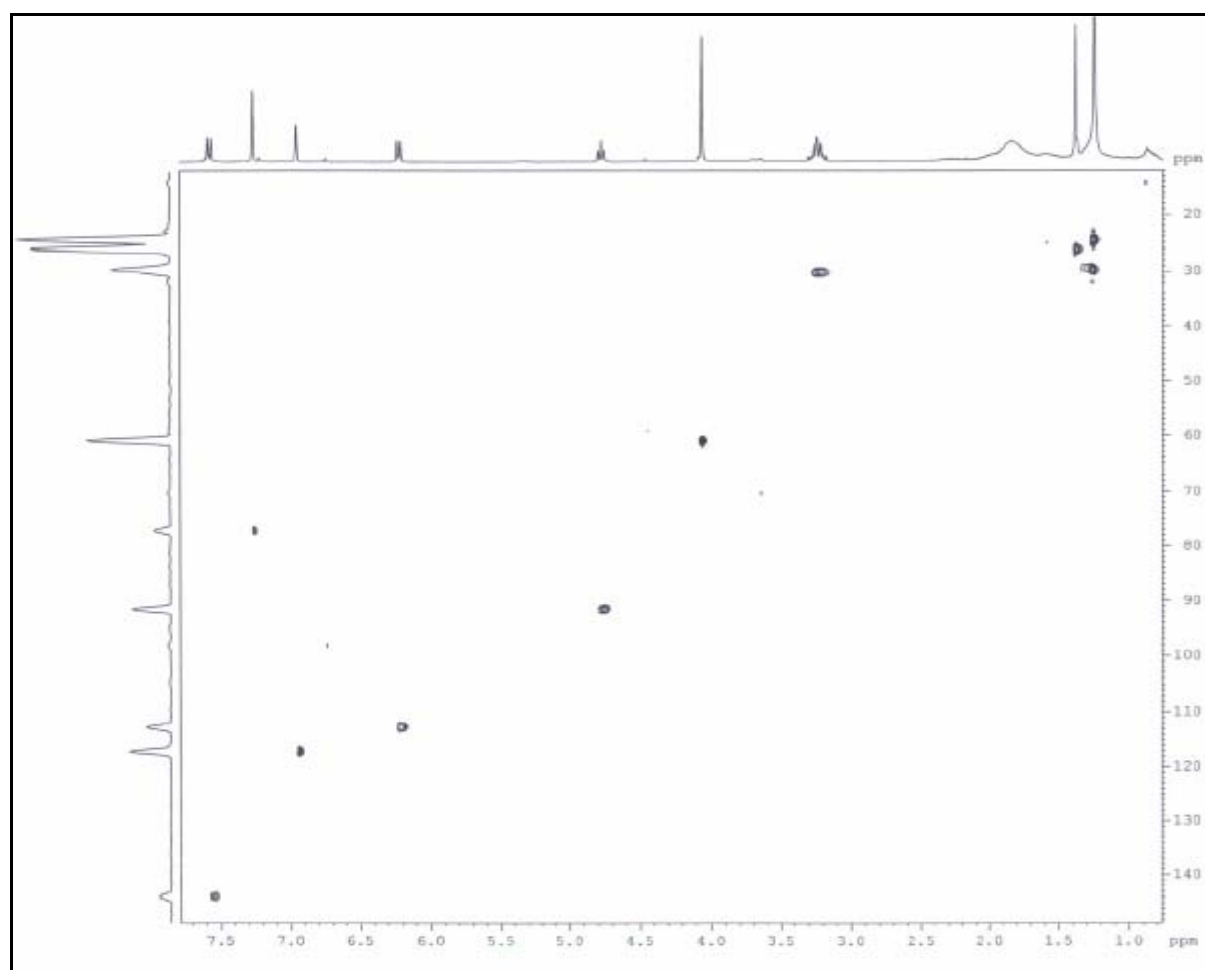
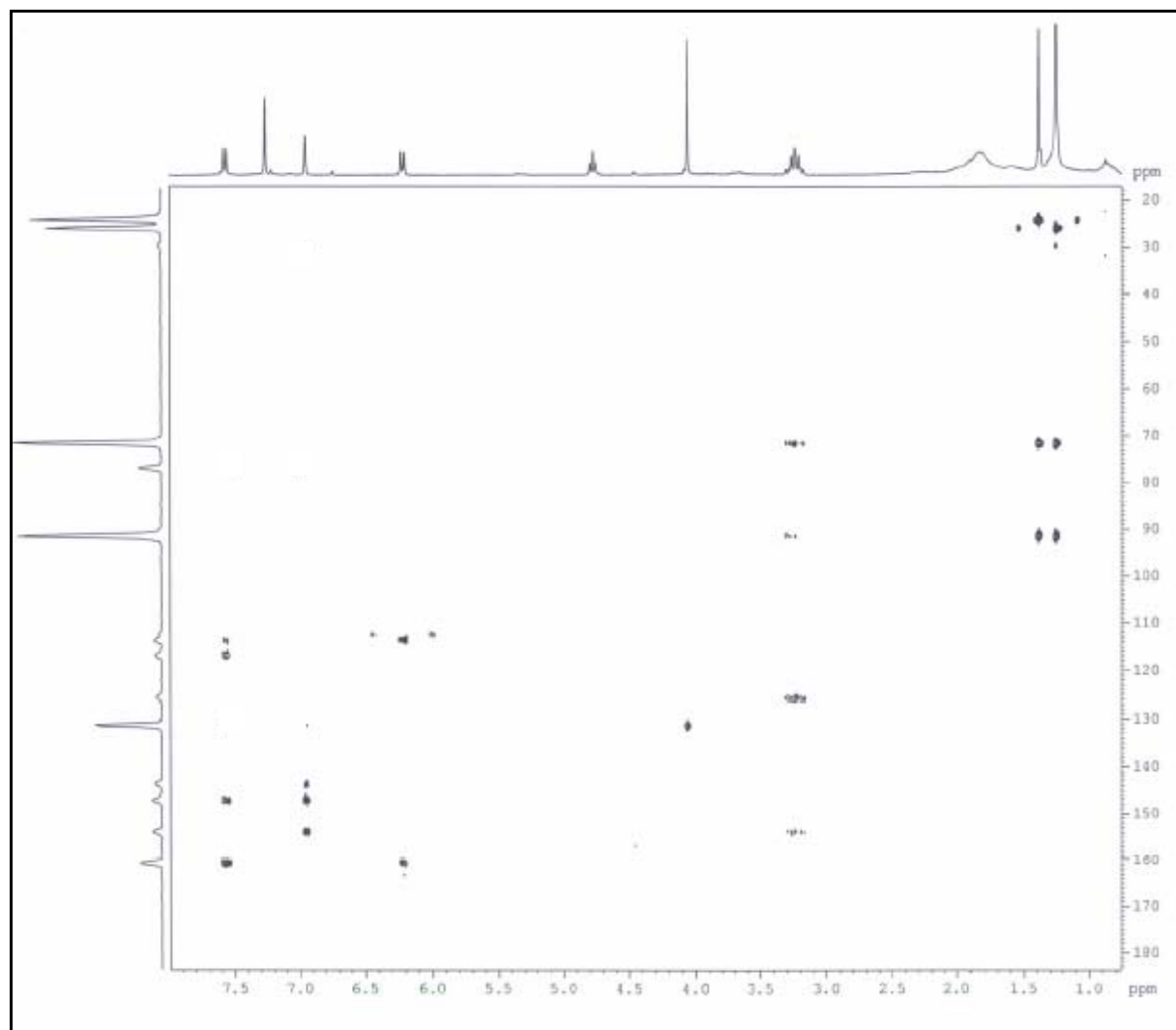


FIGURA 4.16 – Espectro de HSQC de 8-metoximarmesina (**5**) (400 MHz)



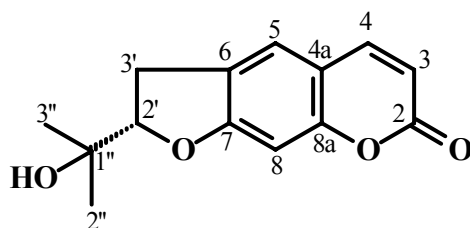
**FIGURA 4.17** – Espectro de HMBC de 8-metoximarmesina (**5**) (400 MHz).

#### 4.5.2 – Identificação estrutural da substância 6

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.19) desta substância mostra várias semelhanças com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da cumarina 8-metoximarmesina devido a presença de um par de dubletos, ( $J = 9,4$  Hz), relativos a H-4 e H-3 em  $\delta_{\text{H}}$  7,60 e 6,22, respectivamente. Também é observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,22 que foi atribuído ao hidrogênio H-5; um duplodoubleto ( $J = 8,4$  Hz) em  $\delta_{\text{H}}$  4,74 relativo a um hidrogênio carbinólico; dois sinais (*ddd*) de hidrogênios benzílicos diastereotópicos que coalescem em  $\delta_{\text{H}}$  3,22 e dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,38 e  $\delta_{\text{H}}$  1,24 de metilas terciárias ligadas a carbono carbinólico.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância 6 diferem dos dados da marmesina devido a ausência de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,06 (3H, *s*) relativo a um grupo metoxila, sendo que para a substância 6 é observado um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,75, que foi atribuído ao H-8. Os sinais singletos observados para os hidrogênios dos anéis aromáticos indicam que também se trata de uma cumarina linear, pois caso contrário teríamos hidrogênios vizinhos acoplado com constantes *orto* próximo de 8 Hz.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.20) mostra sinais referentes a 10 carbonos, porém não foram observados os sinais referentes a carbonos quaternários já que a substância foi isolada em pequena quantidade e o tempo de aquisição do espectro não foi suficiente para que os sinais referentes aos carbonos quaternários fossem adquiridos. O espectro de massas (IE) (FIGURA 4.18), desta substância apresentou o pico do íon molecular  $m/z$  246, condizente com sua fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{O}_4\text{H}_{14}$ , confirmando ser este a cumarina marmesina. No ESQUEMA 4.4 estão as propostas dos principais fragmentos observados para esta substância.



Marmesina

TABELA 4.5 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da marmesina (6).

C	6		6 (Lit.) <sup>64</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	161,1	-	161,1
3	6,22 <i>d</i> (9,4)	112,3	6,23 <i>d</i> (9,5)	112,3
4	7,60 <i>d</i> (9,4)	143,6	7,58 <i>d</i> (9,5)	143,7
4a	-	-	-	113,7
5	7,22 <i>sl</i>	123,4	7,21 <i>sl</i>	123,4
6	-	-	-	125,0
7	-	-	-	163,3
8	6,75 <i>s</i>	97,9	6,75 <i>s</i>	97,9
8a	-	-	-	155,7
2'	4,74 <i>dd</i> (9,2 e 8,5)	91,1	4,78 <i>dd</i> (9,2 e 8,5)	91,1
3'a	3,22 <i>ddd</i> (14,8; 8,5 e 1,0)	29,5	3,25 <i>ddd</i> (14,8; 8,5 e 1,3)	29,5
3'b	3,20 <i>ddd</i> (14,8; 9,2 e 1,0)		3,20 <i>ddd</i> (14,8; 9,2 e 0,9)	
1''	-	71,6	-	71,6
2''	1,38*	26,2	1,39*	26,1
3''	1,24*	24,2	1,25*	24,2

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz.

\*Intercambiáveis.

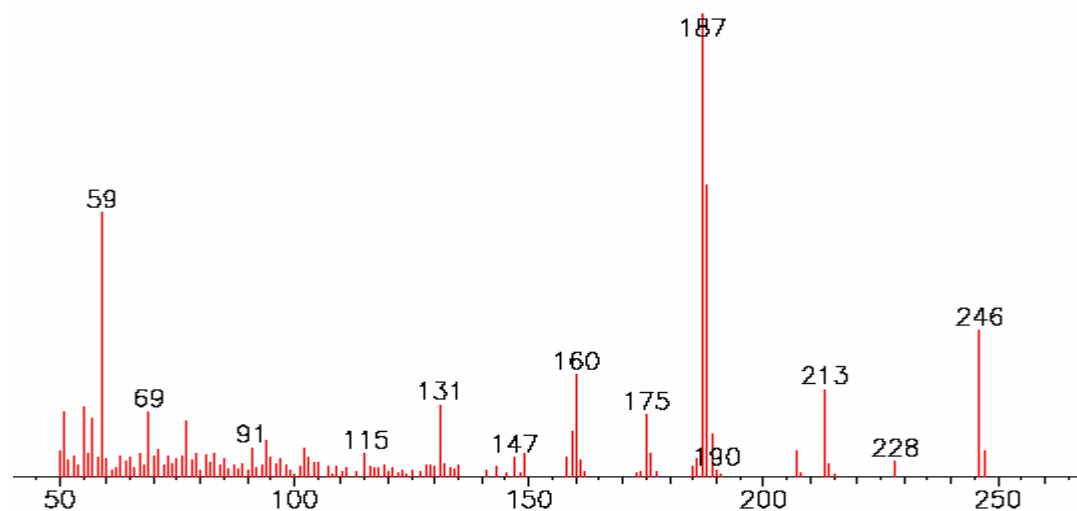
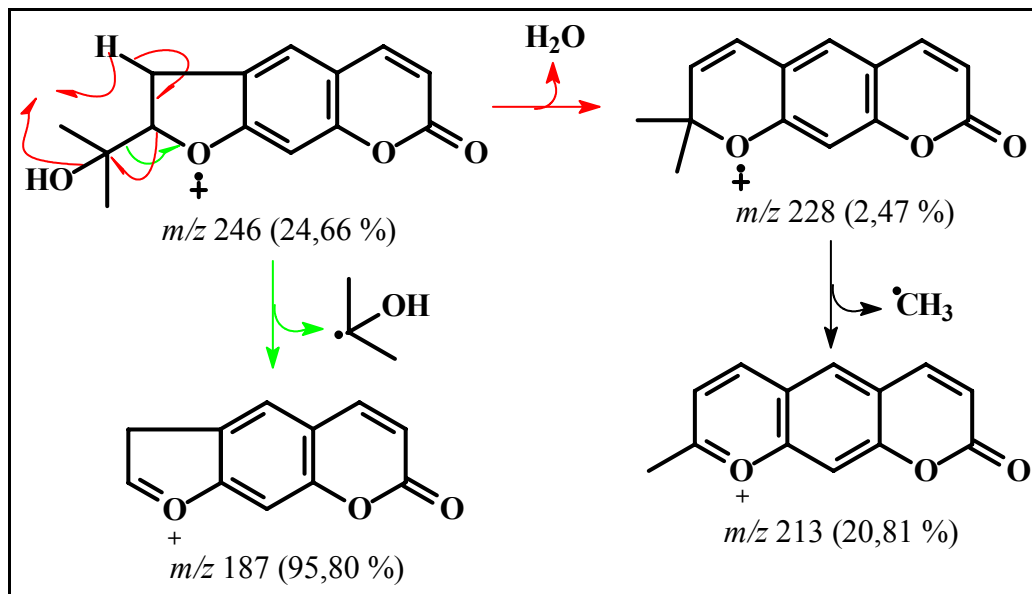


FIGURA 4.18 – Espectro de massa (IE = 70 e. V.) da marmesina.



ESQUEMA 4.4 – Proposta de fragmentação da marmesina.

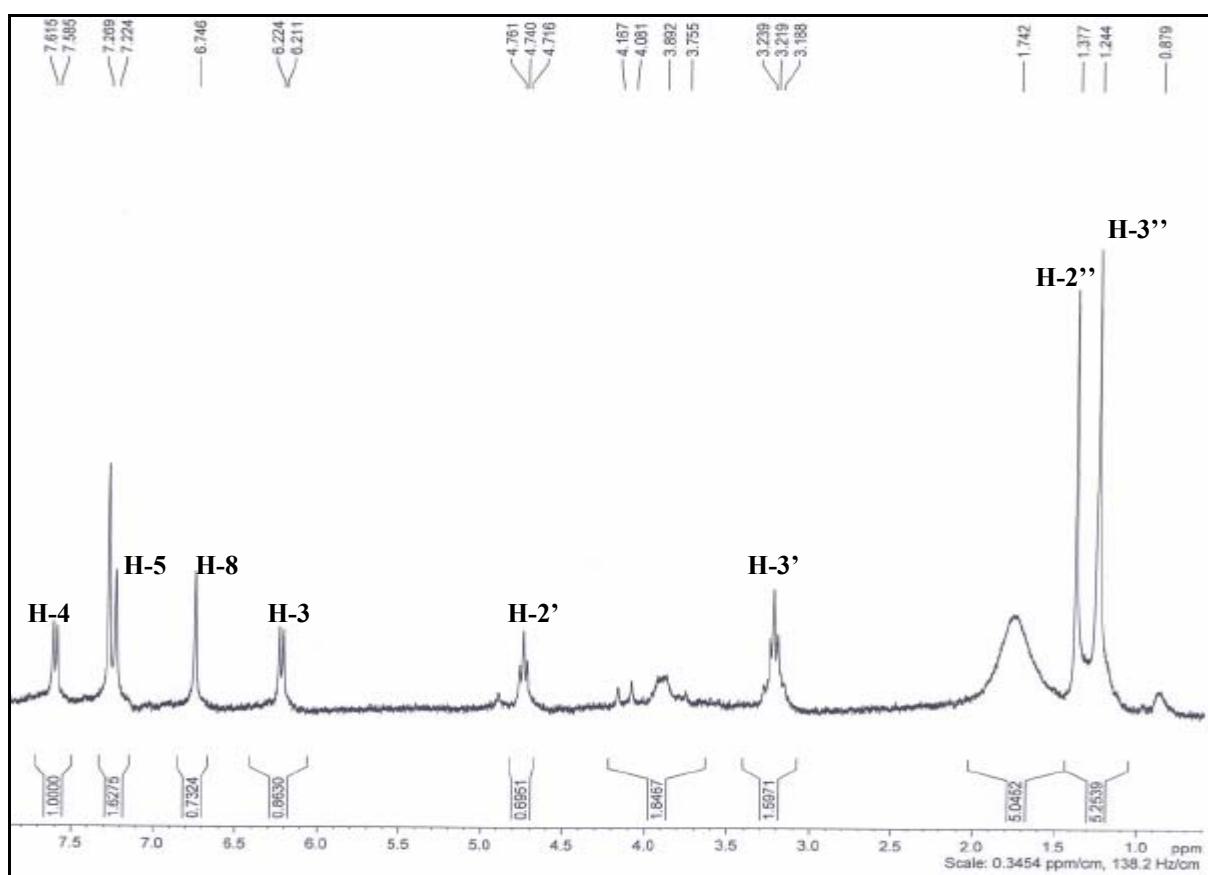
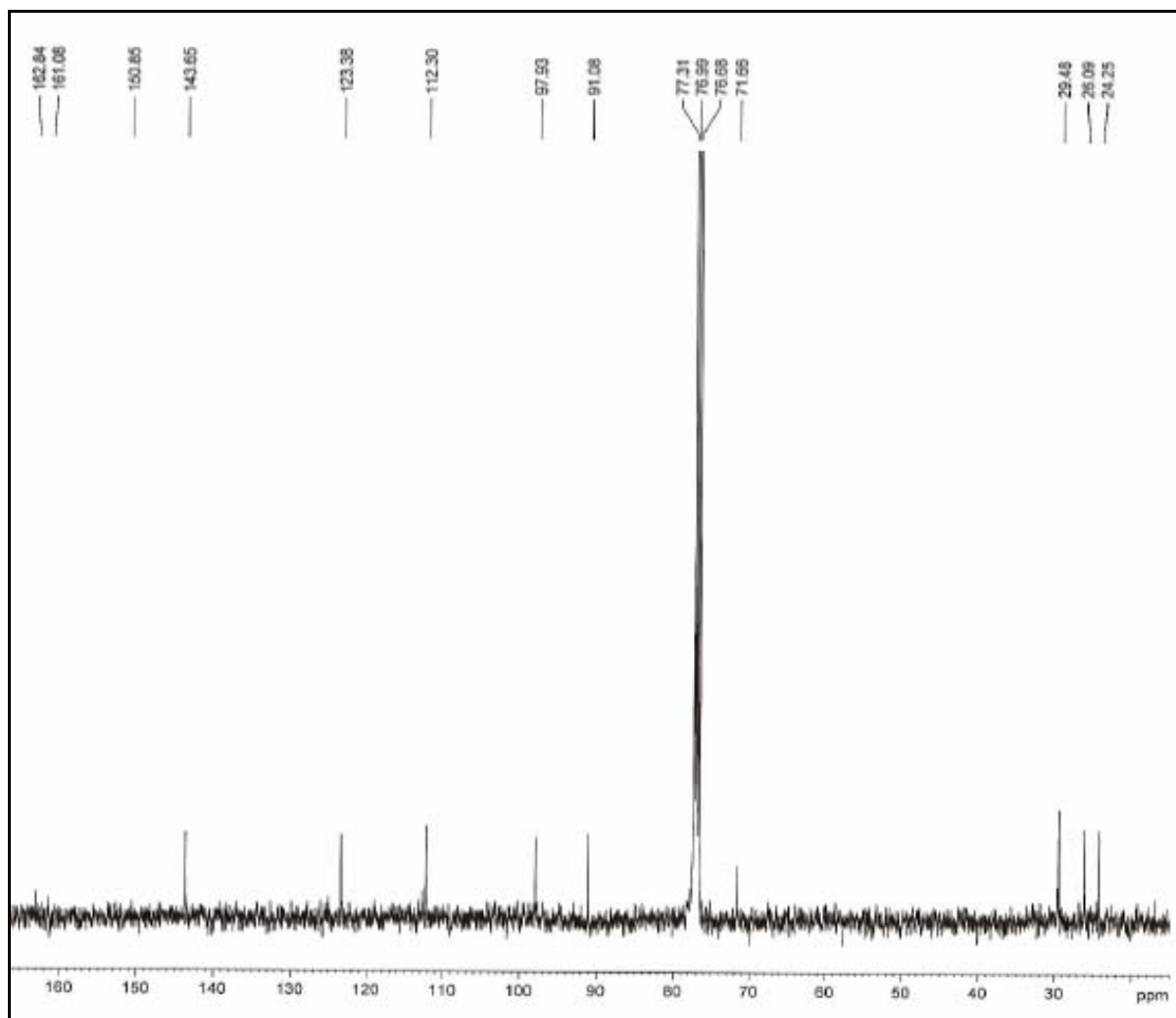


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN  $^1H$  da marmesina (6) (400 MHz).



**FIGURA 4.20** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da marmesina (**6**) (100 MHz).



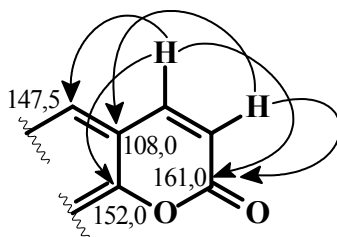
### 4.5.3 – Identificação estrutural da substância 7

A cumarina 7 apresentou-se como um sólido cristalino branco e através de análise por CCD apresentou uma única mancha azul, após revelação com vanilina.

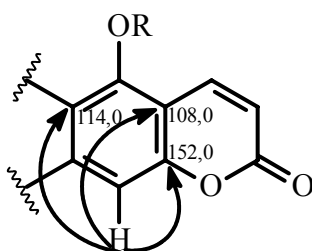
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.21) permitiu observar os sinais referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico em  $\delta_{\text{H}}$  8,33 (*dd*,  $J = 9,6$  e  $0,6\text{Hz}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6,35 (*d*,  $J = 9,6$  Hz), respectivamente. Sendo que o sinal referente a H-4 encontra-se consideravelmente desblindado, isto pode ser atribuído a presença de um grupo alcóxido em C-5, que altera o seu deslocamento químico em aproximadamente 0,5 ppm devido ao efeito periférico. Este hidrogênio apresenta também um fraco acoplamento à longa distância ( $^5J = 0,6$  Hz) com um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,21 (*dd*,  $J = 0,8$  e  $0,6$  Hz) atribuído a H-8.

Este hidrogênio atribuído em  $\delta_{\text{H}}$  7,21 (*dd*,  $J = 0,8$  e  $0,6$  Hz) e a presença de uma função oxigenada em C-5 foram confirmados com base nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 4.22) e HMBC (FIGURA 4.23).

O mapa de correlações HMBC mostrou a correlação do sinal de H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  6,35) com um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  161,0 referente à carboxila de lactona (C-2) e com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  108,0 que pode ser atribuído somente ao C-4a. O sinal do hidrogênio H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  8,33) mostrou correlações com o sinal de C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  161,0), com o sinal de C-8a ( $\delta_{\text{C}}$  152,0) e também foi observada a correlação para o H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  8,33) com um sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  147,5 e este sinal foi atribuído ao carbono C-5 que, pelo seu deslocamento trata-se de um carbono  $\text{sp}^2$  oxigenado, o que permitiu atribuir corretamente um grupo alcóxido ao C-5. Os hidrogênios H-3 e H-4 se correlacionaram com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  113,0,  $\delta_{\text{C}}$  139,1, respectivamente via HSQC.

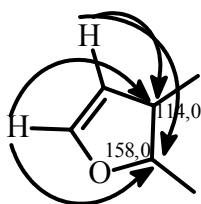


O mapa de correlações HMBC mostrou também a correlação do sinal atribuído a H-8 ( $\delta_H$  7,21) com um sinal em  $\delta_H$  152,0 (C-8a) e com o sinal em  $\delta_H$  108,0 (C-4a), indicando a correta atribuição deste sinal ao H-8, uma vez que se tem um substituinte em C-5. Também é observado via HMBC a correlação de H-8 com um sinal de carbono em  $\delta_C$  114,0, atribuído ao C-6. A atribuição ao carbono C-8 em  $\delta_C$  95,1 foi obtida através do experimento de HSQC.

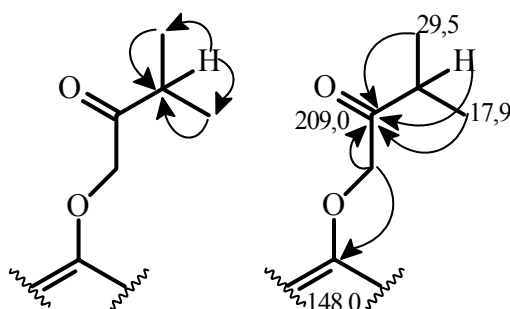


A presença de um anel furano não substituído é facilmente reconhecida através de um par de dubletos, ( $J = 2,5$  Hz), sendo que o sinal em  $\delta_H$  7,61 é relativo a H-2' e o sinal em  $\delta_H$  6,84 é característico do próton H-3', e o sinal deste hidrogênio é observado como um duplo dubleto ( $J = 2,4$  e 0,8) devido a um acoplamento a longa distância ( $^5J$ ), que se dá entre H3' e H-8.

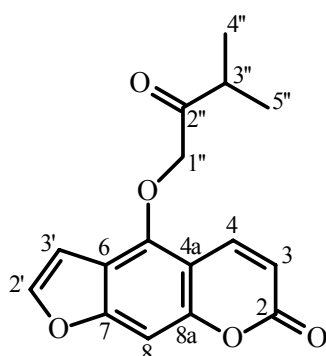
Analisando o mapa de correlações HMBC observaram-se as correlações dos sinais em  $\delta_H$  7,61 (H-2') e  $\delta_H$  6,84 (H-3') com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  114,0 (C-6) e  $\delta_C$  158,0 atribuído ao carbono C-7. As atribuições aos carbonos C-2' e C-3' foram realizadas através do experimento de HSQC.



No espectro de RMN<sup>1</sup>H observa-se um singlete relativo a dois hidrogênios em  $\delta_H$  5,08, um septupletto relativo a um hidrogênio em  $\delta_H$  2,87 e um dubleto em  $\delta_H$  1,19 integrando para seis hidrogênios. Através do espectro em 2D de correlação homonuclear de gCOSY <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H (**FIGURA 4.24**) é observado o acoplamento entre estas duas últimas espécies, sugerindo tratar-se de um sistema onde se tem metilas ligadas a um carbono metínico. Através do mapa de correlações HMBC, os sinais em  $\delta_H$  1,19,  $\delta_H$  2,87 e  $\delta_H$  5,08 apresentaram correlação com um sinal de carbono em  $\delta_C$  209,0, indicando a presença de uma carbonila na estrutura desta substância e a correlação do sinal em  $\delta_H$  5,08 com um carbono em  $\delta_C$  147,5 (C-5), indica que os hidrogênios em  $\delta_H$  1,19,  $\delta_H$  2,87 e  $\delta_H$  5,08 fazem parte do substituinte presente no C-5. A correta atribuição da posição de cada substituinte foi efetuada a partir das correlações observadas através dos mapas de correlações HMBC, representadas abaixo.



Portanto, através da análise dos experimentos de RMN em ID e 2D a cumarina **3** foi identificada como a isooxipeucedanina e os dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão ilustrados na **TABELA 4.6**, juntamente com os dados encontrados na literatura<sup>65</sup> para esta substância.



Isooxipeucedanina

TABELA 4.6 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  isooxipeucedanina (7).

C	7		7 (Lit.) <sup>65</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	161,0	-	159,8
3	6,35 ( <i>d</i> , $J = 9,6$ )	113,3	6,32 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	113,3
4	8,33 ( <i>dd</i> , $J = 9,6$ e $0,6$ )	139,1	8,32 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	139,1
5a	-	108,0	-	107,5
5	-	147,5	-	148,0
6	-	114,0	-	113,6
7	-	158,0	-	158,1
8	7,21 ( <i>dd</i> , $J = 0,8$ e $0,6$ )	95,1	7,17 ( <i>s</i> )	95,2
8a	-	152,0	-	152,7
2'	7,61 ( <i>d</i> , $J = 2,4$ )	145,5	7,59 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ )	145,5
3'	6,84 ( <i>dd</i> , $J = 2,4$ e $0,8$ )	104,1	6,83 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ )	104,1
1''	5,08 ( <i>s</i> )	75,0	5,10 ( <i>s</i> )	75,0
2''	-	209,0	-	208,6
3''	2,87 ( <i>m</i> )	37,4	2,81 ( <i>m</i> )	37,6
4''	1,19 ( <i>d</i> , $J = 6,8$ )	17,9*	1,17 ( <i>s</i> )	17,9
5''	1,19 ( <i>d</i> , $J = 6,8$ )	29,5*	1,20 ( <i>s</i> )	24,9

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHzValores de  $J$ , entre parênteses, em Hz.

\*Valores Intercambiáveis.

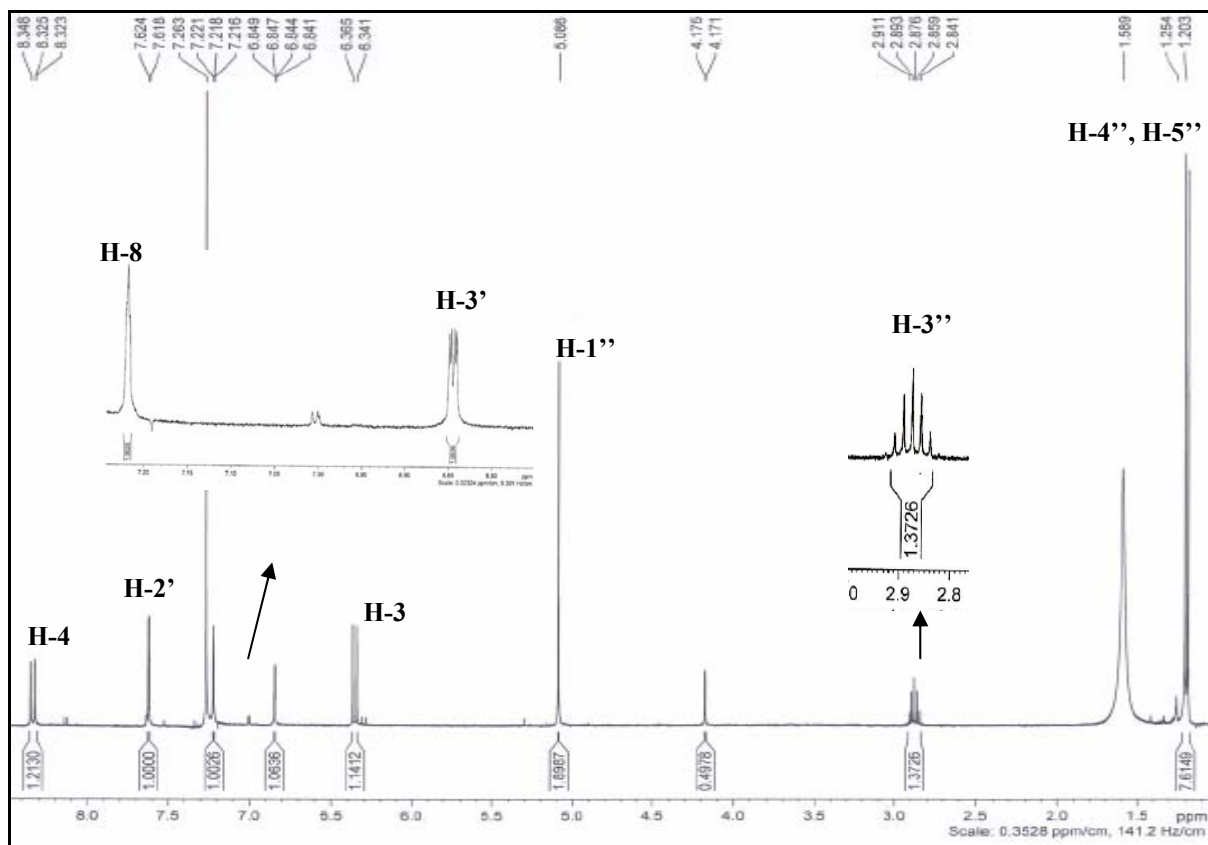


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).

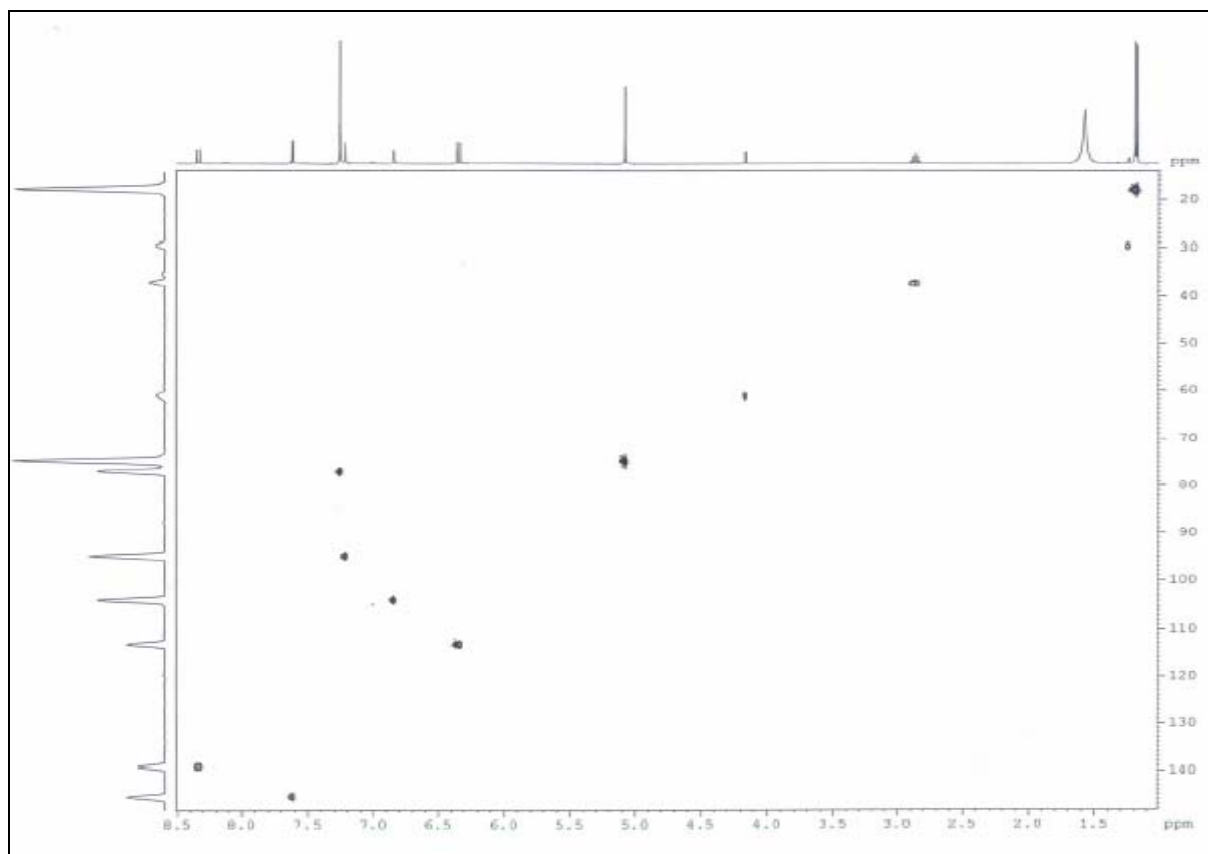
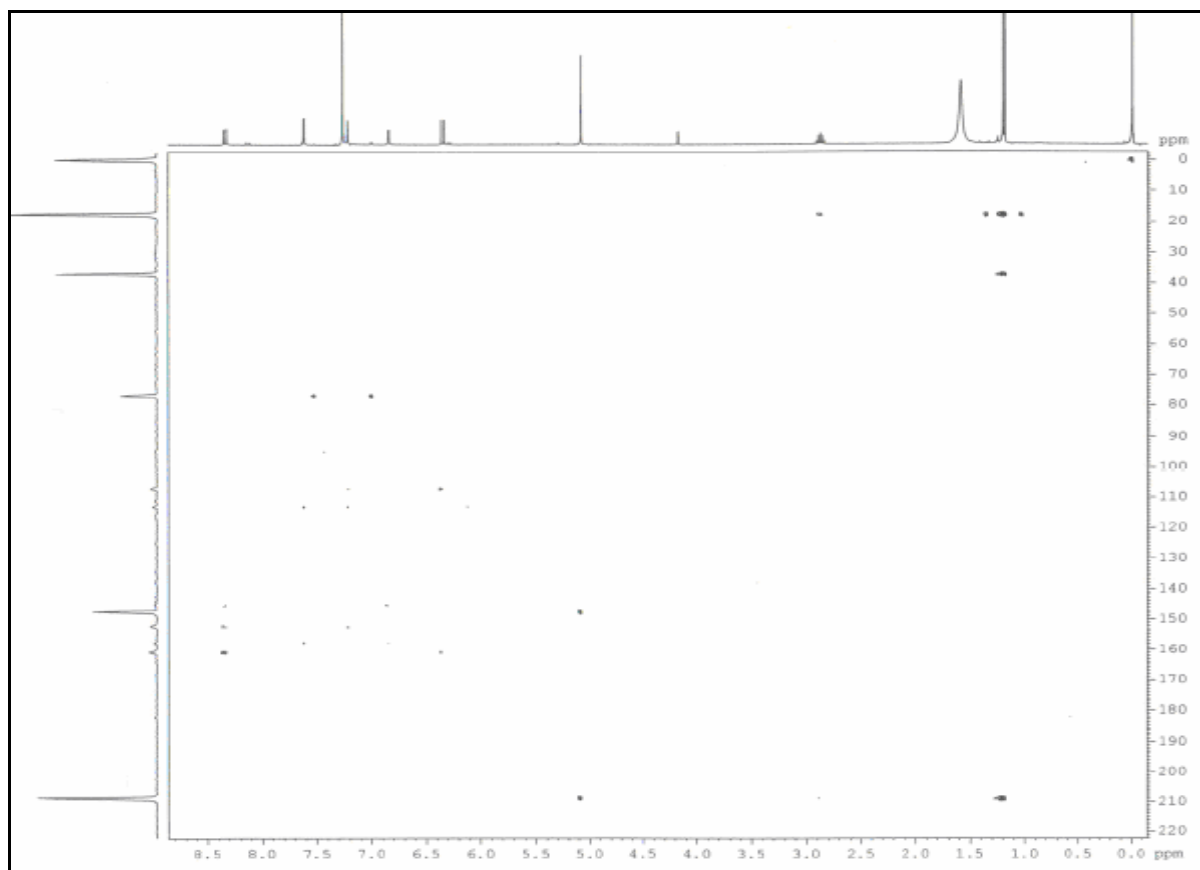
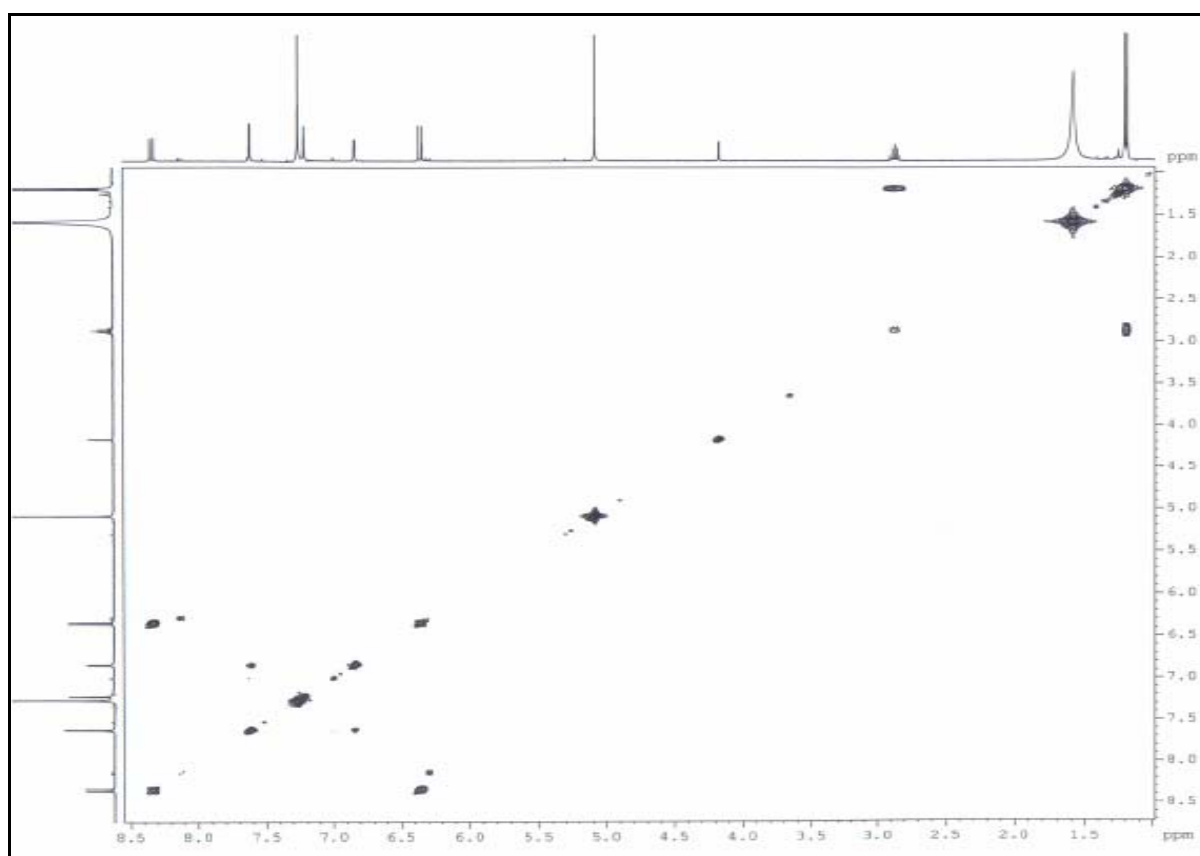


FIGURA 4.22 – Espectro de HSQC da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).



**FIGURA 4.23** – Espectro de HMBC da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).

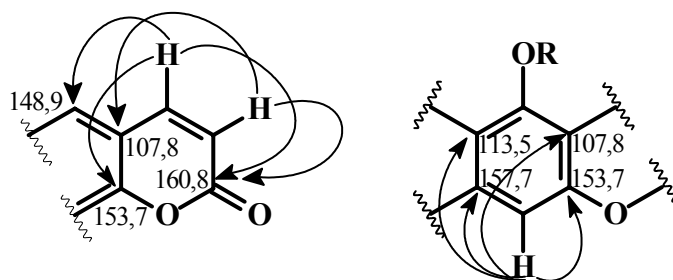


**FIGURA 4.24** – Espectro de COSY da isooxipeucedanina (7) (400 MHz).

#### 4.5.4 – Identificação estrutural da substância 8

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.25) desta substância mostra várias semelhanças com o espectro da cumarina isooxipeucedanina, pois foram observados: o duplo dubleto ( $J = 9,5$  e  $0,8$  Hz) relativo ao acoplamento de H-4 ( $\delta_{\text{H}} 8,18$ ) com H-8 ( $\delta_{\text{H}} 7,19$ , *dd*,  $J = 0,8$  e  $0,6$  Hz) e com H-3 ( $\delta_{\text{H}} 6,31$ , *d*,  $J = 9,5$  Hz), a presença de uma função oxigenada em C-5 desblindando H-4 e a presença de um anel furano não substituído é reconhecido através de um par de dubletos ( $J = 2,5$  Hz) sendo que o sinal em  $\delta_{\text{H}} 7,61$  é relativo a H-2' e o sinal em  $\delta_{\text{H}} 6,99$  é característico do próton H-3'. Todos estes dados foram confirmados com base nos mapas de correlações HSQC (FIGURA 4.27) e HMBC (FIGURA 4.28).

Analisando o mapa de correlações HMBC observaram-se as correlações do sinal em  $\delta_{\text{H}} 6,31$  (H-3) com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 160,8$  e  $\delta_{\text{C}} 107,8$  atribuídos aos carbonos C-2 e C-4a, respectivamente. O sinal do hidrogênio H-4 ( $\delta_{\text{H}} 8,33$ ) mostrou correlações com o sinal de C-2 ( $\delta_{\text{C}} 160,8$ ), com o sinal de C-8a ( $\delta_{\text{C}} 153,7$ ) e também foi observada a correlação de H-4 com um sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 148,9$ , característico de carbono  $\text{sp}^2$  oxigenado, atribuído ao carbono C-5. O sinal atribuído a H-8 ( $\delta_{\text{H}} 7,19$ ) mostrou correlação com o sinal do C-8a ( $\delta_{\text{C}} 153,7$ ), com o sinal do C-4a ( $\delta_{\text{C}} 107,8$ ), com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}} 113,5$  e  $\delta_{\text{C}} 157,7$  atribuídos aos carbonos C-6 e C-7, respectivamente.



Através do mapa de correlações HMBC e HSQC confirmou-se que a substância **8** tratava-se de uma furocumarina linear através das correlações dos sinais relativos a H-2' ( $\delta_H$  7,61) e H-3' ( $\delta_H$  6,99) com os carbonos em  $\delta_C$  113,5 (C-6) e  $\delta_C$  157,7 (C-7).

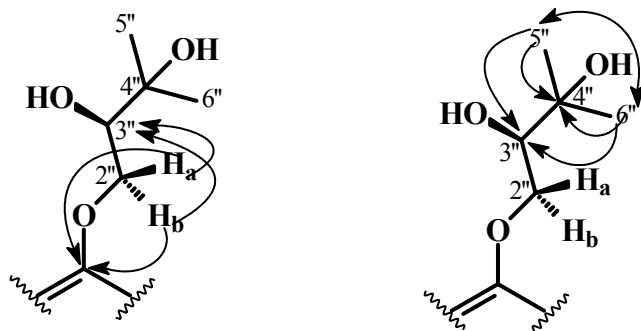
Os dados de RMN  $^1H$  da substância **8** diferem dos dados da cumarina oxipeucedanina nos sinais relativos ao grupo substituinte em C-5, sendo que para a substância **8** é observado dois sinais (*dd*) de hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  4,45 ( $J = 10,0$  e  $3,0$  Hz) e  $\delta_H$  4,54 ( $J = 10,0$  e  $3,0$  Hz), um multipletto em  $\delta_H$  3,91, um singletto largo em  $\delta_H$  2,81 e dois singlettos em  $\delta_H$  1,31 e  $\delta_H$  1,36 de metilas terciárias ligadas a carbono carbinólico. Através do espectro em 2D de correlação homonuclear de gCOSY  $^1H \times ^1H$  (FIGURA 4.26) pode-se ver o acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta_H$  4,45 e  $\delta_H$  4,54 e deles com o hidrogênio em  $\delta_H$  3,91, sendo que também é observado o acoplamento deste último com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,81.

Através do mapa de correlações HSQC foi observado a correlação dos hidrogênios deste substituinte com os carbonos ligados diretamente a eles: os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  4,45 e  $\delta_H$  4,54 se correlacionam com um carbono em  $\delta_C$  74,8; o sinal em  $\delta_H$  3,91 com o carbono em  $\delta_C$  72,1; a metila em  $\delta_H$  1,36 com o carbono em  $\delta_C$  26,4; a metila em  $\delta_H$  1,31 com o carbono em  $\delta_C$  24,6; sendo que o sinal em  $\delta_H$  2,81 não apresentou correlação com nenhum átomo de carbono, podendo-se sugerir que o mesmo seria um hidrogênio de uma hidroxila.

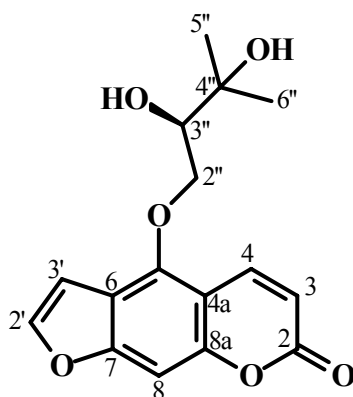
Através do mapa de correlações HMBC observa-se a correlação dos hidrogênios em  $\delta_H$  4,45 e  $\delta_H$  4,54 com o C-5 ( $\delta_C$  148,9) e com um carbono em  $\delta_C$  72,1, que foi atribuído ao C-3''; é observado também a correlação dos sinais das metilas com os carbonos C-3'' ( $\delta_C$  72,1) e C-4'' ( $\delta_C$  76,9) e a correlação



entre si das metilas. De acordo com estas correlações, pode-se determinar a estrutura do substituinte presente no C-5.



A Identificação estrutural por RMN em 1D e 2D, não permitiram a Identificação da configuração do centro quiral de C-3''. A configuração absoluta desta substância foi determinada como sendo a cumarina (+) prangol por comparação do seu valor de  $\alpha_D +21$  com o valor descrito na literatura<sup>66</sup>.



Prangol

TABELA 4.7 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da cumarina Prangol (**8**).

C	<b>8</b>		<b>8 (Lit.)<sup>67</sup></b>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	160,8	-	161,0
3	6,31 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	113,3	6,34 ( <i>d</i> , $J = 10,0$ )	113,5
4	8,18 ( <i>dd</i> , $J = 9,6$ e $0,8$ )	139,1	8,11 ( <i>d</i> , $J = 10,0$ )	139,1
4a	-	107,8	-	107,6
5	-	148,9	-	148,5
6	-	113,5	-	113,5
7	-	157,7	-	157,7
8	7,19 ( <i>dd</i> , $0,8$ e $0,6$ )	95,1	7,20 ( <i>s</i> )	95,0
8a	-	153,7	-	153,7
2''	7,61 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	145,5	7,63 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	145,5
3''	6,99 ( <i>dd</i> , $J = 2,5$ e $0,6$ )	104,1	7,03 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	104,0
1''	-	-	-	-
2''a	4,45 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $3,0$ )	74,8	4,46 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $3,0$ )	74,8
2''b	4,45 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $3,0$ )		4,51 ( <i>dd</i> , $J = 10,0$ e $3,0$ )	
3''	3,91 ( <i>m</i> )	72,1	3,91 ( <i>m</i> )	70,0
OH-3''	2,81 ( <i>sl</i> )	-	2,81 ( <i>sl</i> )	-
4''	-	76,9	-	76,9
5''	1,31 ( <i>s</i> )*	24,6	1,31 ( <i>s</i> )	24,6*
6''	1,36 ( <i>s</i> )*	26,4	1,36 ( <i>s</i> )	26,2*

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHzValores de  $J$ , entre parênteses, em Hz

\*Valores Intercambiáveis

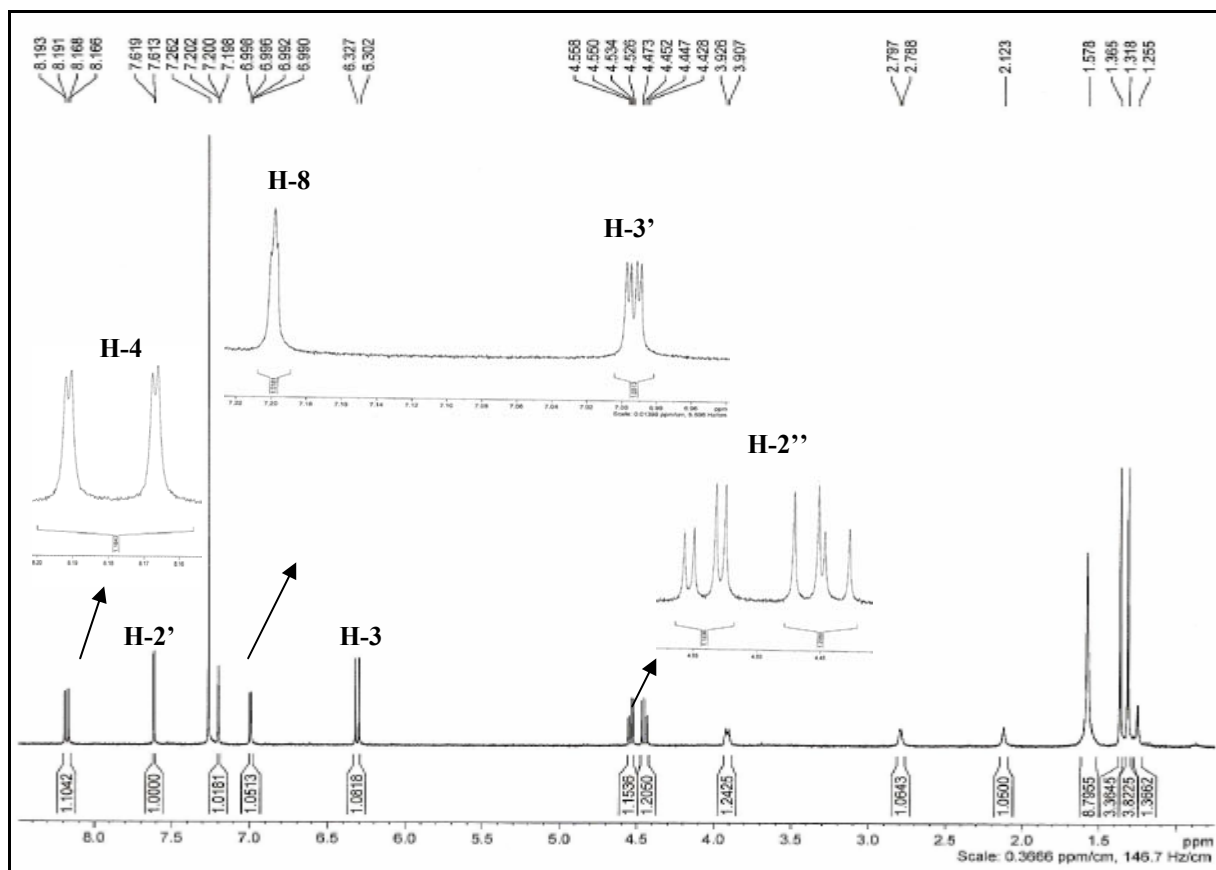


FIGURA 4.25 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Prangol (**8**) (400 MHz).

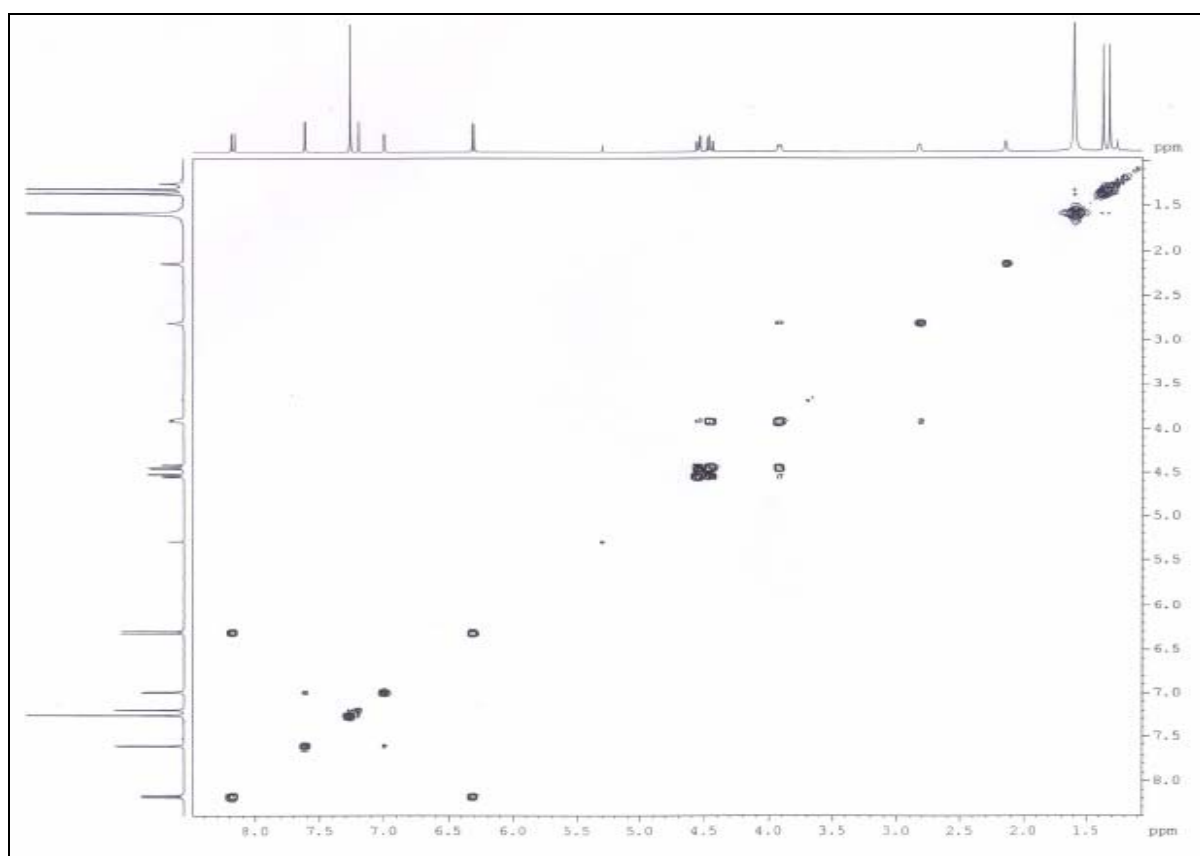


FIGURA 4.26 – Espectro de COSY de Prangol (**8**) (400 MHz).

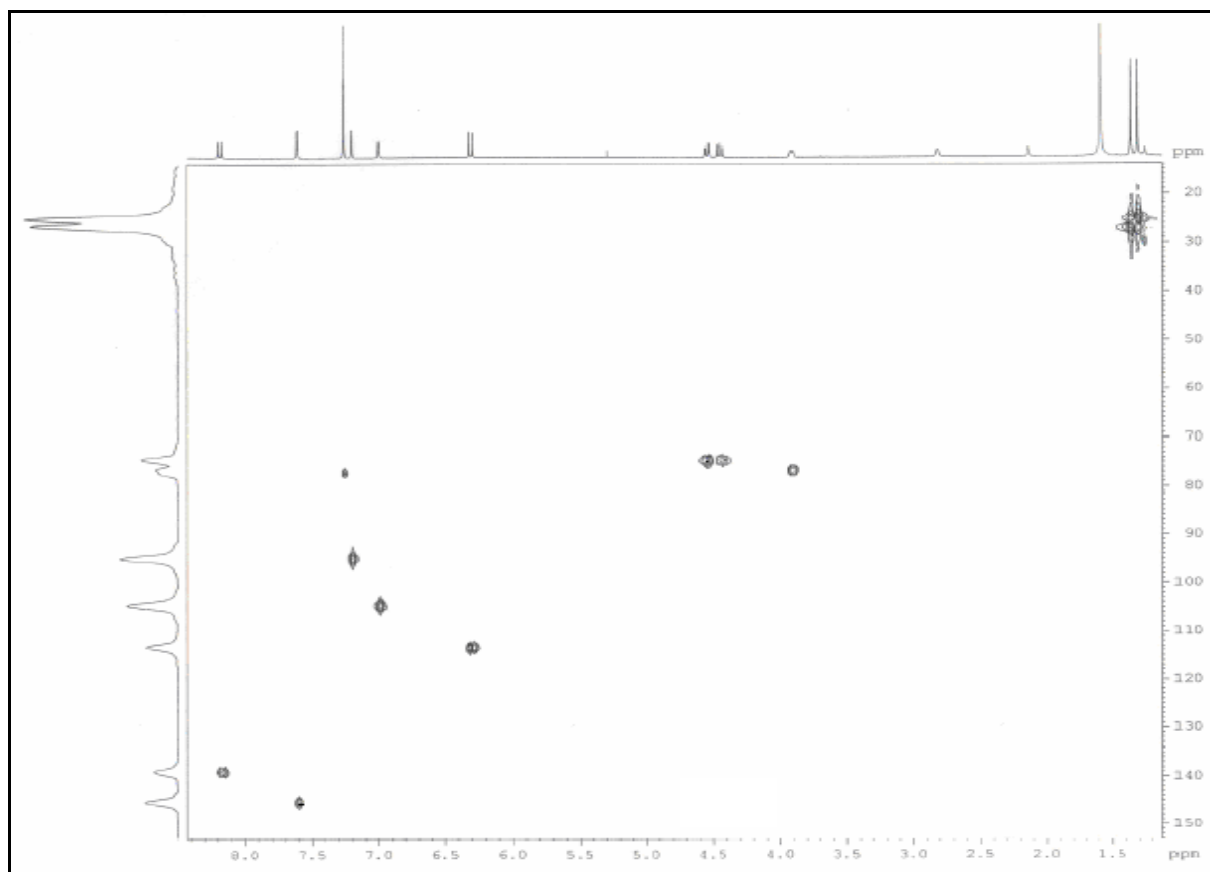


FIGURA 4.27 – Espectro de HSQC de Prangol (**8**) (400 MHz).

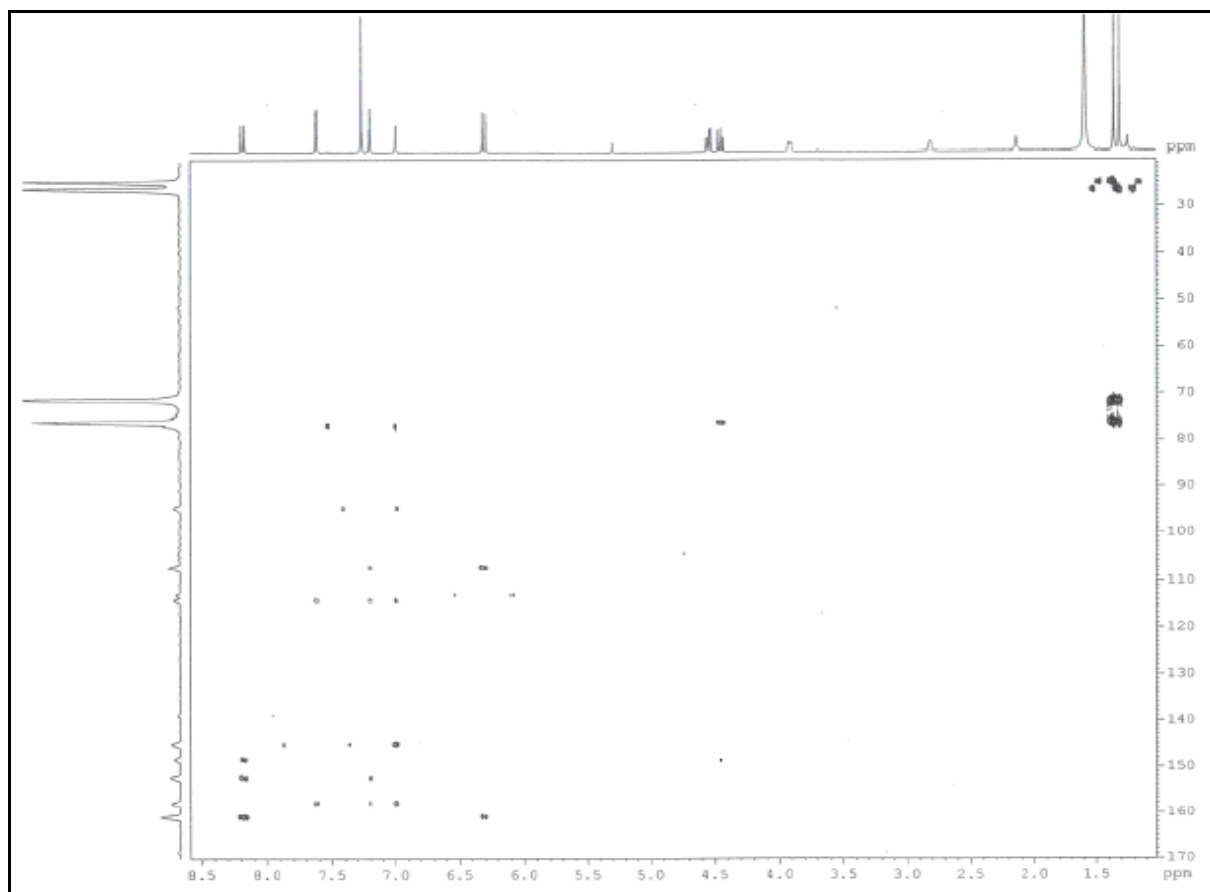
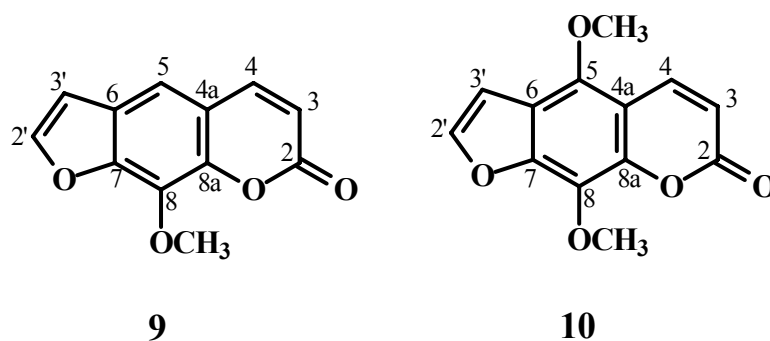


FIGURA 4.28 – Espectro de HMBC de Prangol (**8**) (400 MHz).

#### 4.5.5 – Identificação estrutural das substâncias 9 e 10

As furanocumarinas **9** e **10** foram isoladas conforme relatado na **Parte Experimental** da pág. 39 e apresentaram-se como sólidos cristalinos de coloração branca.



A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  destas substâncias (**FIGURA 4.31**) e (**FIGURA 4.33**) permitiram observar os sinais referentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel lactônico em  $\delta_{\text{H}}$  7,75 (*d*,  $J = 9,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,35 (*d*,  $J = 9,5$  Hz) para **9** e  $\delta_{\text{H}}$  8,11 (*d*,  $J = 9,3$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,28 (*d*,  $J = 9,3$  Hz) para **10** e também os sinais característicos dos hidrogênios furânicos H-2' e H-3', através de um par de dubletos ( $J = 2,5$  Hz), em  $\delta_{\text{H}}$  7,68 e  $\delta_{\text{H}}$  6,80 para **9** e  $\delta_{\text{H}}$  7,61 e  $\delta_{\text{H}}$  6,99 para **10**.

A substância **9** também apresentou em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.31**) um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 e outro em  $\delta_{\text{H}}$  4,28, integrando para três hidrogênios, característico do grupo metoxila. O singlete relativo ao hidrogênio aromático foi atribuído a H-5, pois caso a metoxila estivesse em C-5, esta tornaria o sinal de H-4 mais desblindado (conforme discutido anteriormente para a substância **7**), já para o grupo metoxila existem duas possíveis orientações: encontrar-se em C-8, em uma furanocumarina linear e encontrar-se em C-6 em uma furanocumarina angular.

O deslocamento químico do grupo 8-metoxil no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , provém um rápido e conveniente meio para distinguir entre uma furanocumarina angular ou linear<sup>68</sup>, onde no primeiro caso o sinal relativo ao

grupo 6-metoxil é observado em aproximadamente  $\delta_H$  4,0 e quando se tem uma orientação linear do anel furano o deslocamento observado para o grupo 8-metoxil é de aproximadamente  $\delta_H$  4,26. O grupo metoxila da substância **9** encontra-se em  $\delta_H$  4,28, o que inferiu na presença de uma furanocumarina linear.

Então, a cumarina **9** foi identificada como a xantotoxina, através de comparação dos dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  desta substância, que estão ilustrados na **TABELA 9**, juntamente com os dados encontrados na literatura<sup>69</sup> e também a partir da análise por CG/EM, onde o pico referente ao íon molecular em  $m/z$  416 (**FIGURA 4.29**) conferiu com a sua fórmula molecular. O **ESQUEMA 4.5** apresenta propostas de fragmentação desta substância.

A substância **10** apresentou em seu espectro de RMN  $^1H$  (**4.33**) além dos sinais relatados acima, um singlete em  $\delta_H$  4,16, integrando para seis hidrogênios, atribuído a duas metoxilas. A presença de uma metoxila em C-5 é facilmente observada através do deslocamento do sinal de H-4 em  $\delta_H$  8,11. A outra metoxila poderia ser encontrada em C-6 (anel furano angular) ou em C-8 (anel furano linear). O efeito da orientação do anel furano no sinal do grupo metoxila também foi utilizado para se determinar a posição exata deste grupo na estrutura da molécula<sup>68</sup>. Em uma furanocumarina linear, com C-5 e C-8 substituídos por metoxilas, o sinal relativo as duas metoxilas coalescem em um singlete em  $\delta_H$  4,10 e, em uma cumarina angular, com C-5 e C-6 substituídos por metoxilas, o sinal da metoxila em C-6 encontra-se  $\delta_H$  3,91 e o sinal da metoxila em C-8 encontra-se em  $\delta_H$  3,96. A posição da metoxila em C-8 também pode ser deduzida através de comparação dos deslocamentos químicos de carbono. Metoxilas *orto*-dissubstituídas por oxigênio (furanocumarina linear) apresentam deslocamento em torno de  $\delta_C$  60,0, enquanto que em furanocumarinas angulares o deslocamento químico deste carbono é observado em torno de  $\delta_C$  55,0; através destas comparações, pode-se sugerir a presença de uma furanocumarina linear na substância analisada. A estrutura da substância **10** foi definida como sendo a cumarina isopimpenilina, confirmado através da

análise da fragmentação por CG/EM (ESQUEMA 4.6) e por comparação com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **10**, que estão listados na TABELA 4.9, com os dados descritos na literatura<sup>70</sup>.

TABELA 4.8 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  isooxipeucedanina (**9**).

C	<b>9</b>		<b>9 (Lit.)</b> <sup>69</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	160,3	-	160,4
3	6,35 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	114,8	6,35 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	114,7
4	7,75 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	144,2	7,80 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	144,3
4a	-	116,5	-	116,4
5	7,34 ( <i>s</i> )	112,9	7,36 ( <i>s</i> )	112,9
6	-	126,1	-	126,1
7	-	147,8	-	147,6
8	-	132,9	-	133,7
8a	-	143,1	-	142,9
2'	7,68 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	146,6	7,69 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ )	146,6
3'	6,80 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	106,7	6,83 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ )	106,7
8-OCH <sub>3</sub>	4,28 ( <i>s</i> )	61,3	4,28 ( <i>s</i> )	61,3

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz

<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz

Valores de  $J$ , entre parênteses, em Hz

TABELA 4.9 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  isopimpenilina (**10**).

C	<b>10</b>		<b>10 (Lit.)</b> <sup>70</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	160,5	-	160,8
3	6,28 ( <i>d</i> , $J = 9,3$ )	112,9	6,29 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	112,7
4	8,11 ( <i>d</i> , $J = 9,3$ )	139,4	8,10 ( <i>d</i> , $J = 9,5$ )	139,9
4a	-	107,7	-	107,9
5	-	144,3	-	144,5
6	-	114,8	-	114,6
7	-	150,0	-	149,6
8	-	128,3	-	127,4
8a	-	143,7	-	143,3
2'	7,61 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	145,2	7,59 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	145,5
3'	6,99 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	105,1	7,00 ( <i>d</i> , $J = 2,5$ )	105,3
5-OCH <sub>3</sub>	4,16 ( <i>s</i> )	61,7	4,16 ( <i>s</i> )	61,5
8-OCH <sub>3</sub>	4,16 ( <i>s</i> )	60,8	4,16 ( <i>s</i> )	61,0

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz

<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz

Valores de  $J$ , entre parênteses, em Hz

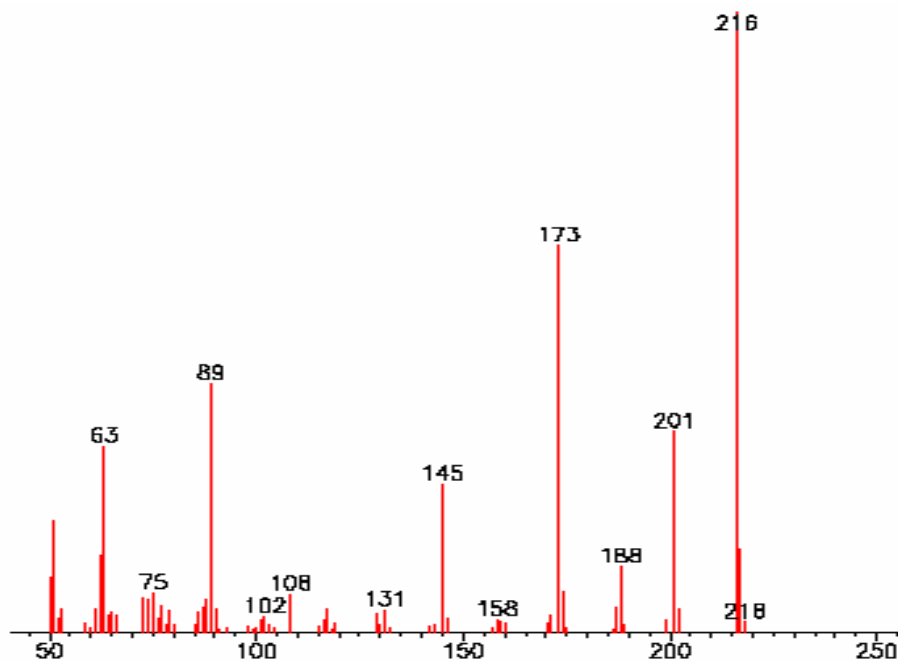
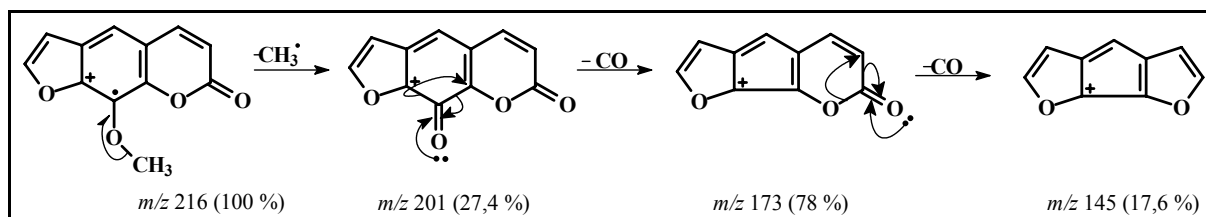


FIGURA 4.29 – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da Xantotoxina.



ESQUEMA 4.5 – Proposta de fragmentação da substância 9.

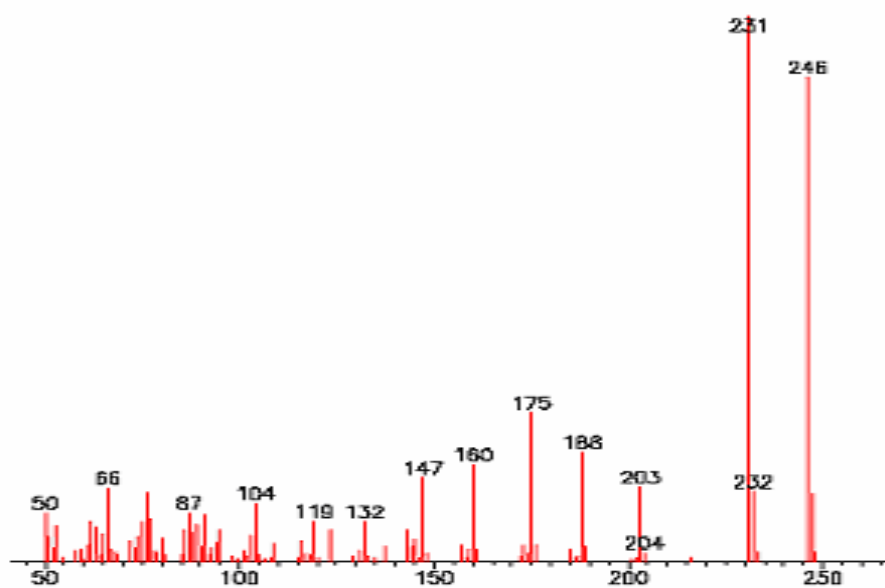
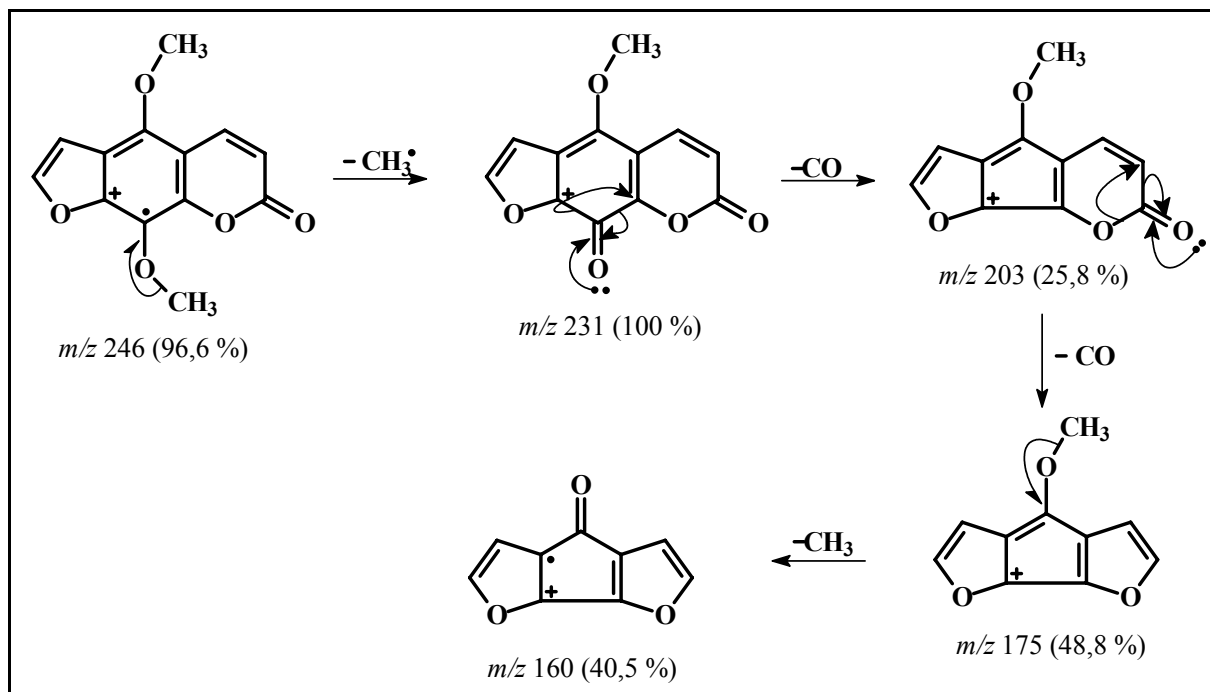


FIGURA 4.30 – Espectro de massas (IE = 70 e. V.) da Isopimpenilina.





ESQUEMA 4.6 – Proposta de fragmentação da substância 10.

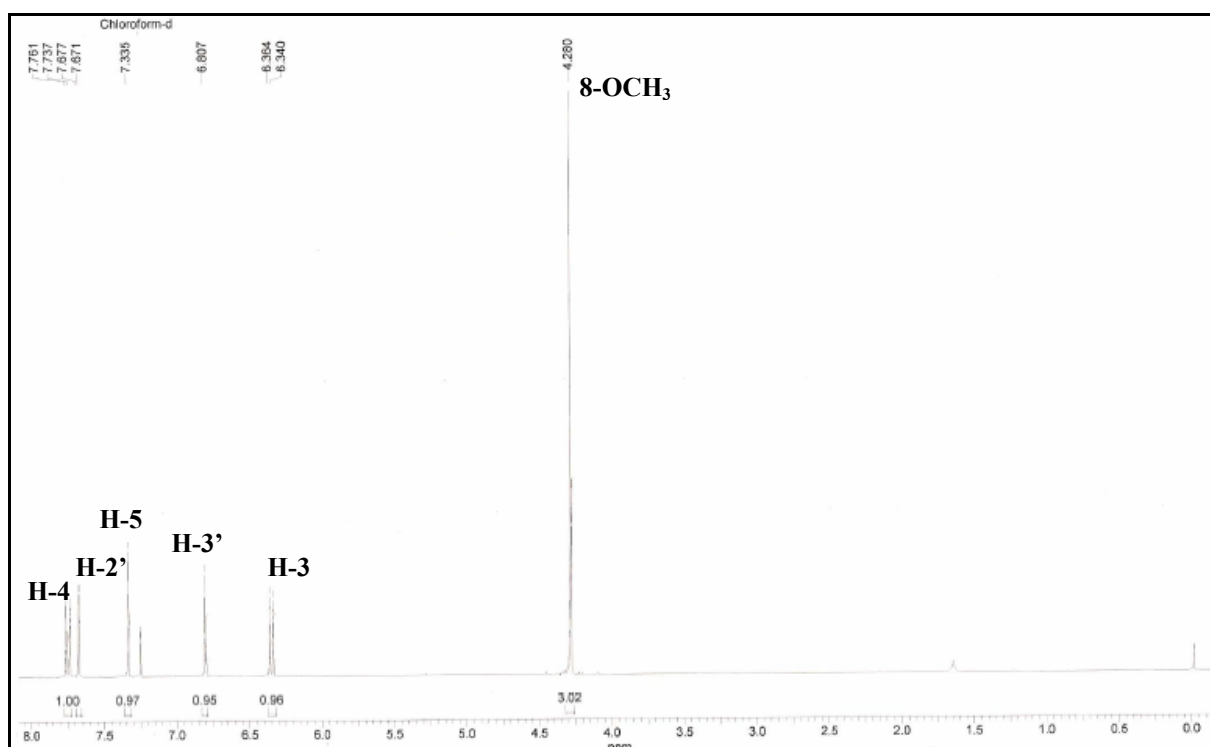


FIGURA 4.31 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 9.

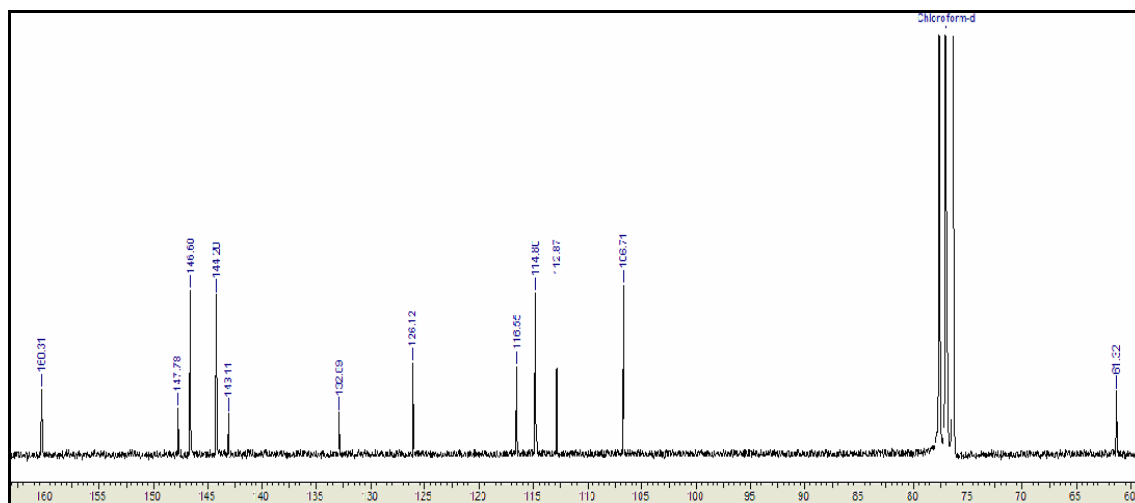


FIGURA 4.32 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

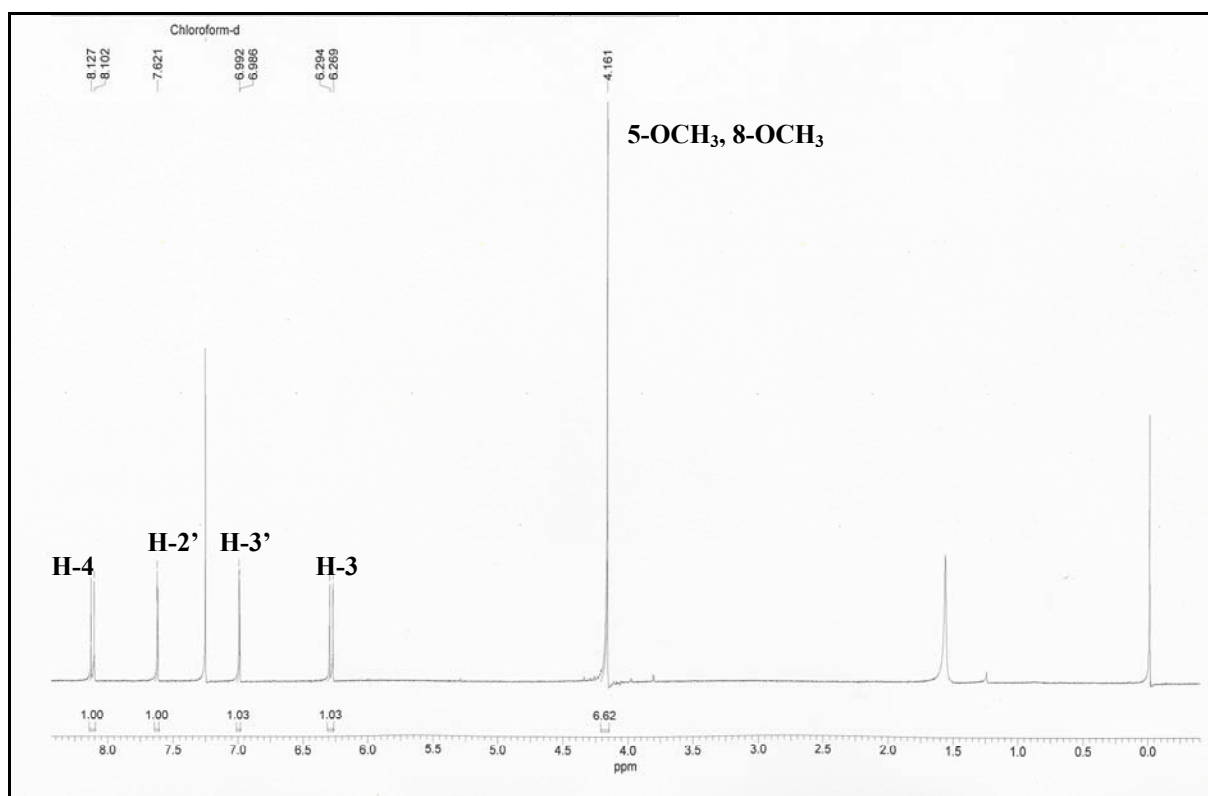


FIGURA 4.33 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **10** ( $\text{MeOD}$ , 400 MHz).

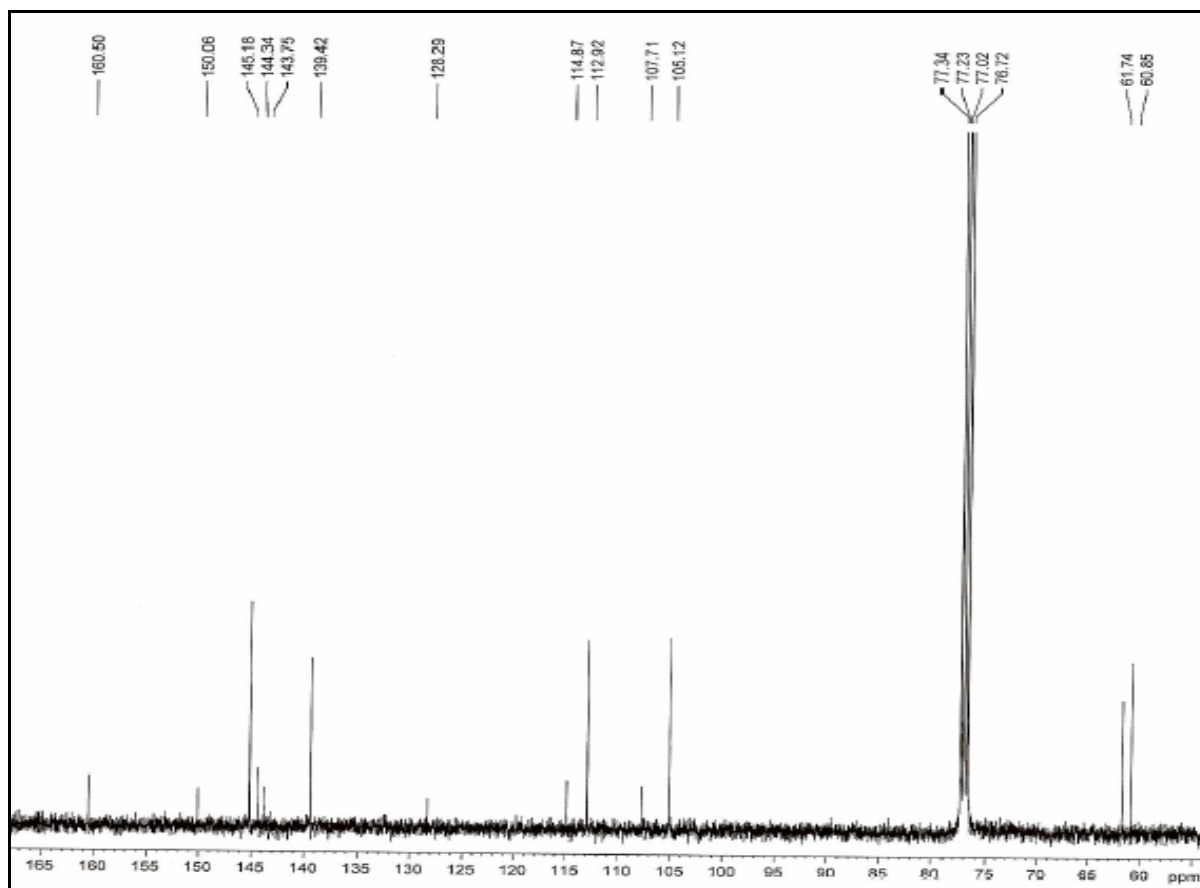
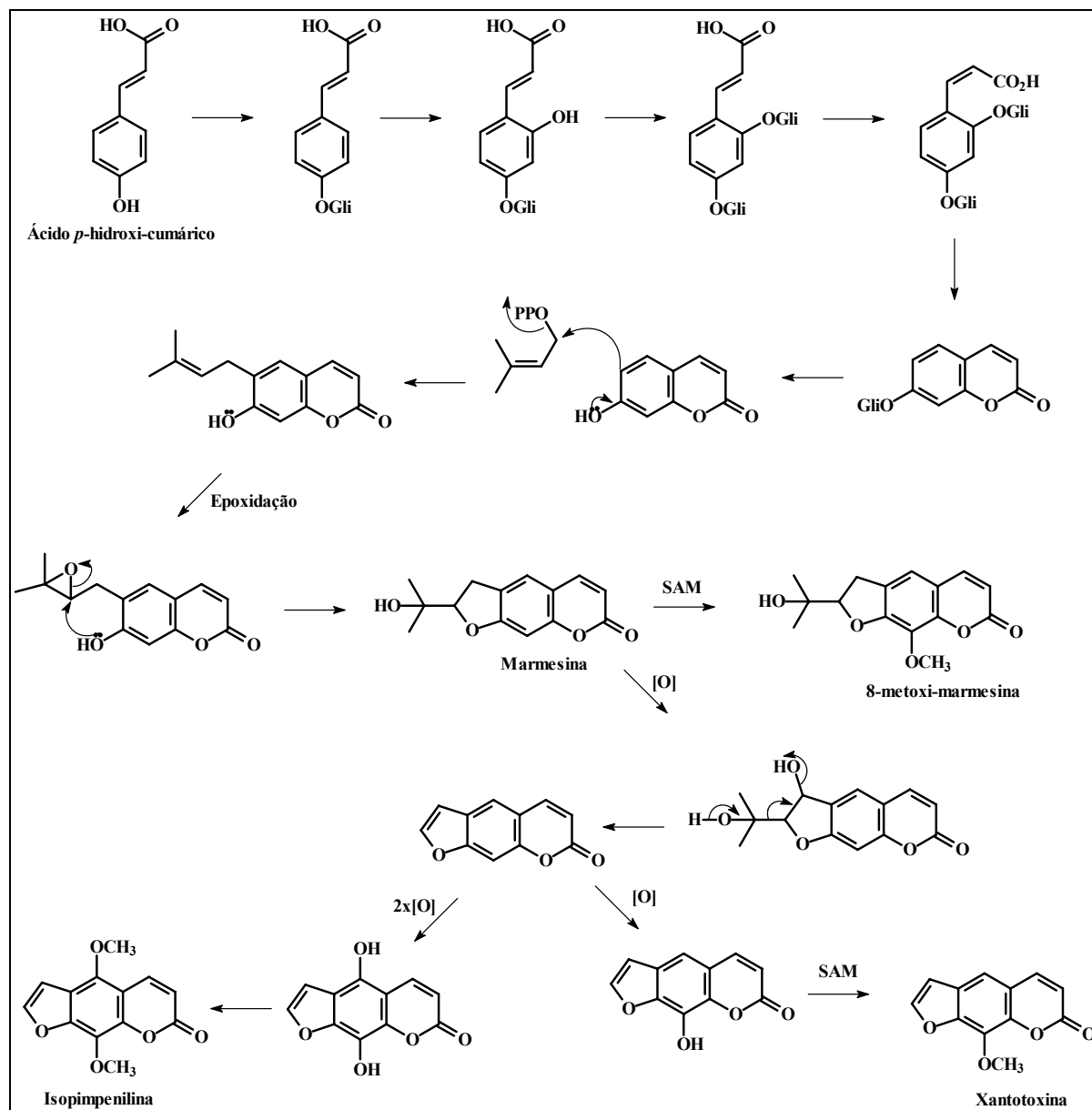


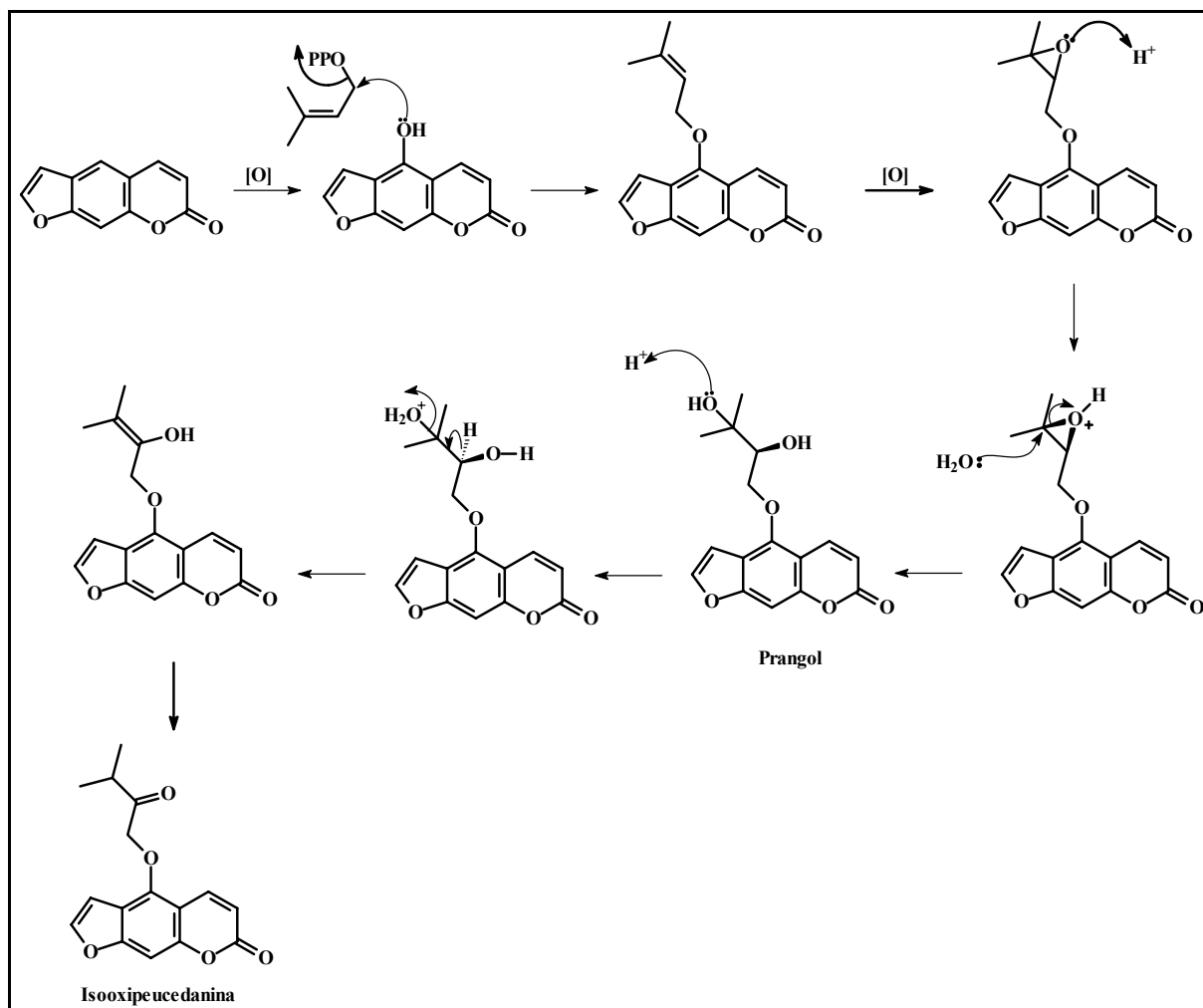
FIGURA 4.34 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **10** (MeOD, 100 MHz).

#### 4.6 – Biogênese de cumarinas

As cumarinas têm origem biossintética no ácido *p*-hidróxi-cinâmico (*p*-cumárico). Sua grande diversidade estrutural é devido principalmente a incorporação de unidades prenila. As prenilações nas posições 6 e 8 são comuns devido a presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador *orto*. Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações secundárias, geralmente iniciadas com a epoxidação da ligação dupla da unidade prenila<sup>70</sup>.



ESQUEMA 4.7 – Proposta biogenética para as substâncias 5, 6, 9 e 10.



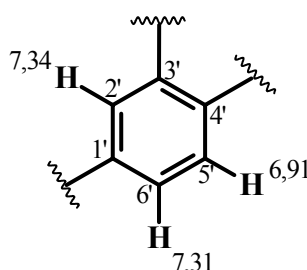
ESQUEMA 4.8 – Proposta biogenética para as substâncias 7 e 8.

## 4.6 – Flavonóides

### 4.6.1 – Identificação estrutural da substância 11:

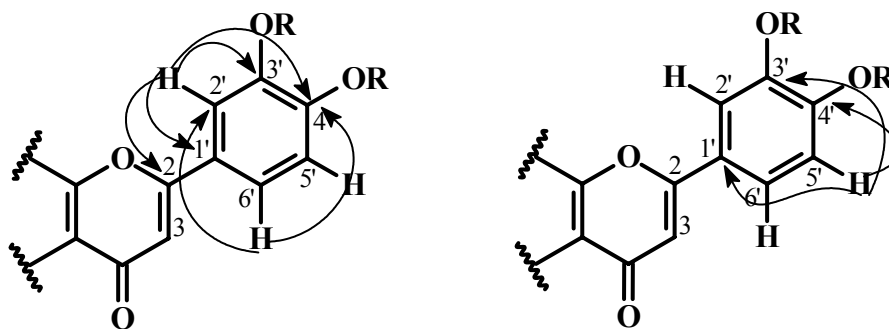
Três flavonóides foram isolados de *Euxylophora paraensis*, sendo este o primeiro relato do isolamento desta classe nesta espécie. Suas estruturas foram determinadas através de RMN em uma e duas dimensões e por comparação com os dados descritos na literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 11 (FIGURA 4.35) apresentou um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 ( $J= 2,0$  Hz) acoplado com um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 ( $J= 8,0$  e  $2,0$  Hz) e que por sua vez acopla com outro dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,91 ( $J= 8,0$  Hz) o que evidencia um acoplamento *meta* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 e  $\delta_{\text{H}}$  7,31, além deste último apresentar um acoplamento *orto* com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,91, que foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5', do anel B de um flavonóide.

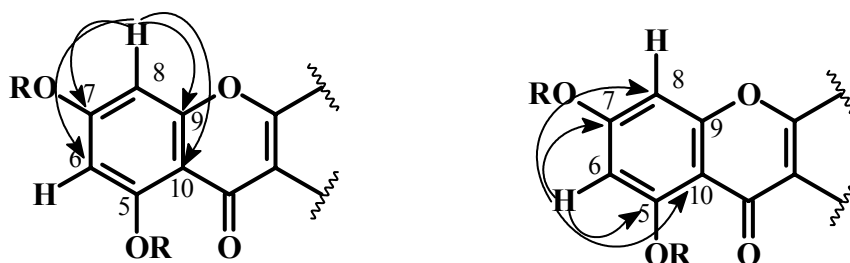


O espectro de HSQC (FIGURA 4.37) mostra a correlação dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,34,  $\delta_{\text{H}}$  7,31 e  $\delta_{\text{H}}$  6,91 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  116,5 (C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  123,0 (C-6') e  $\delta_{\text{C}}$  116,4 (C-5'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (FIGURA 4.38) mostra a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  122,1, atribuído ao C-1';  $\delta_{\text{C}}$  146,2, atribuído ao C-3';  $\delta_{\text{C}}$  149,8, atribuído ao C-4' e do duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,31 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  116,5 (C-2') e  $\delta_{\text{C}}$  149,8 (C-4'); e finalmente o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,91 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  122,1 (C-1');  $\delta_{\text{C}}$  146,2 (C-2');  $\delta_{\text{C}}$  149,8 (C-3'). A presença destas correlações

e a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  7,34 com um carbono em  $\delta_C$  158,9, deslocamento este característico do carbono- $\beta$  de um sistema carbonila  $\alpha$ - $\beta$  insaturada, podendo-se afirmar então que estes são os hidrogênios 2', 5' e 6' do anel B de uma flavona.



Ainda no espectro de RMN  $^1H$  (FIGURA 4.38) tem-se um par de dubletos com  $J = 2,0$  Hz em  $\delta_H$  6,37 e  $\delta_H$  6,20. O espectro de HSQC (FIGURA 4.37) mostrou a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,37 com o carbono em  $\delta_C$  94,7 e também mostrou a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,20 com o carbono em  $\delta_C$  99,8. Através do espectro de HMBC (FIGURA 4.38) podem-se verificar a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,37 com os carbonos em  $\delta_C$  165,8, atribuído ao C-7;  $\delta_C$  99,8 (C-6);  $\delta_C$  105,9, atribuído ao C-10 e  $\delta_C$  159,0 atribuído ao C-9 e a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,20 com os carbonos em  $\delta_C$  165,8 (C-7); 163,2 (C-5);  $\delta_C$  94,7 (C-8) e  $\delta_C$  105,9 (C-10). A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 6 e 8 do anel A de uma flavona.

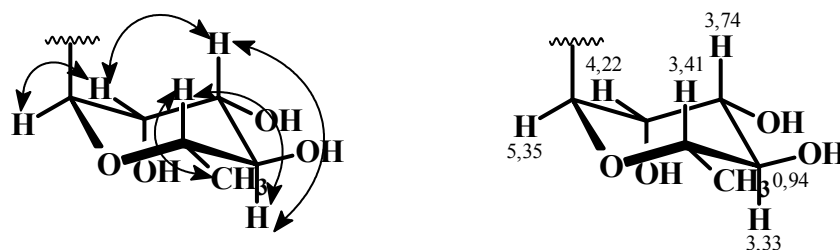


Voltando ao espectro de RMN  $^1H$  (FIGURA 4.35), a observação de sinais entre  $\delta_H$  3,0-4,4 sugerem a presença de uma unidade de açúcar, onde o

dubleto em  $\delta_H$  0,94 (3H, H-6'',  $J= 5,6$  Hz) é característico da metila de uma unidade de ramnose.

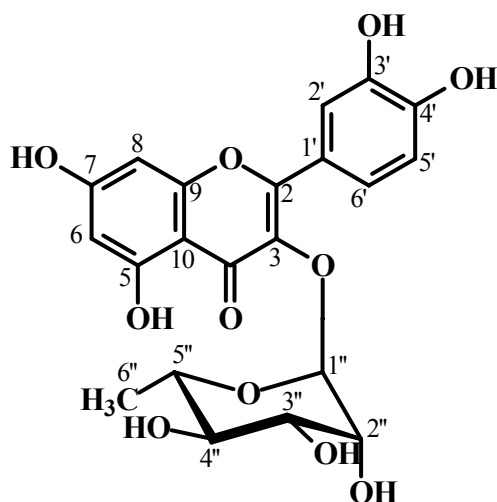
A estereoquímica do carbono anomérico da ramnose foi determinada basicamente por dados comparativos<sup>60</sup>, sabendo-se que quando o flavonol liga-se ao açúcar pela face  $\alpha$ , o anel B é impedido de assumir a coplanaridade com o anel C, devido ao efeito estérico, o que faz com que haja uma diminuição da conjugação com o C-1', assumindo então um deslocamento químico em torno de  $\delta_C$  130. No entanto, quando o flavanol liga-se pela face  $\beta$  do açúcar é possível haver conjugação entre os anéis C e B e o C-1' passa a ter deslocamento químico em torno de  $\delta_C$  120 quando o espectro é obtido metanol deuterado<sup>60</sup>.

O espectro em 2D de correlação homonuclear de gCOSY  $^1H \times ^1H$  (FIGURA 4.36) foi usado para confirmação das interações spin-spin dos átomos de hidrogênios presentes no anel da ramnose. As interações entre os sinais destes hidrogênios encontram-se indicadas abaixo.



Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado na aglicona, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC (FIGURA 4.38) do hidrogênio anomérico com um carbono em  $\delta_C$  136,0 que foi atribuído ao C-3 do anel C da flavona, pois era o único que faltava ser atribuído. Os substituintes nos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4' da flavona são hidroxilas, devido a ausência de sinais característicos de metoxilas na região entre 3,5-4,5 ppm no espectro de RMN  $^1H$  (FIGURA 4.35) e a substância é conhecida como Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo.



Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo

**TABELA 4.10** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**11**) juntamente com os dados descritos na literatura<sup>71</sup> para **11**.

C	<b>11</b>		<b>11 (Lit.)<sup>71</sup></b>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	158,9	-	159,0
3	-	136,0	-	136,5
4	-	-	-	179,8
4a	-	105,9	-	106,0
5	-	163,2	-	163,4
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	99,8	6,20 <i>d</i> (2,2)	100,0
7	-	165,8	-	166,0
8	6,37 <i>d</i> (2,0)	94,7	6,37 <i>d</i> (2,2)	94,9
8a	-	159,0	-	158,7
1'	-	122,1	-	122,2
2'	7,34 <i>d</i> (2,0)	116,5	7,30 <i>d</i> (2,2)	116,5
3'	-	146,2	-	147,0
4'	-	149,8	-	149,8
5'	6,91 <i>d</i> (8,0)	116,4	6,91 <i>d</i> (8,4)	116,6
6'	7,31 <i>dd</i> (8,0 e 2,0)	123,0	7,31 <i>dd</i> (8,4 e 2,0)	123,0
1''	5,34 <i>d</i> (1,8)	103,5	5,35 <i>d</i> (1,7)	103,8
2''	4,22 <i>dd</i> (3,2 e 1,8)	71,2	4,21 <i>dd</i> (3,3 e 1,7)	71,6
3''	3,74 <i>dd</i> (9,4 e 3,2)	72,2	3,74 <i>dd</i> (9,3 e 3,3)	72,2
4''	3,33 <i>dl</i> (9,4)	73,0	3,30 <i>dd</i> (9,5 e 6,1)	72,3
5''	3,41 <i>m</i>	71,8	3,40 <i>dd</i> (9,5 e 9,3)	72,0
6''	0,94 <i>d</i> (5,6)	17,9	0,94 <i>d</i> (6,1)	17,8

<sup>a</sup> MeOD, 400MHz

<sup>b</sup> MeOD, 200MHz

Valores de *J*, entre parênteses, em Hz.

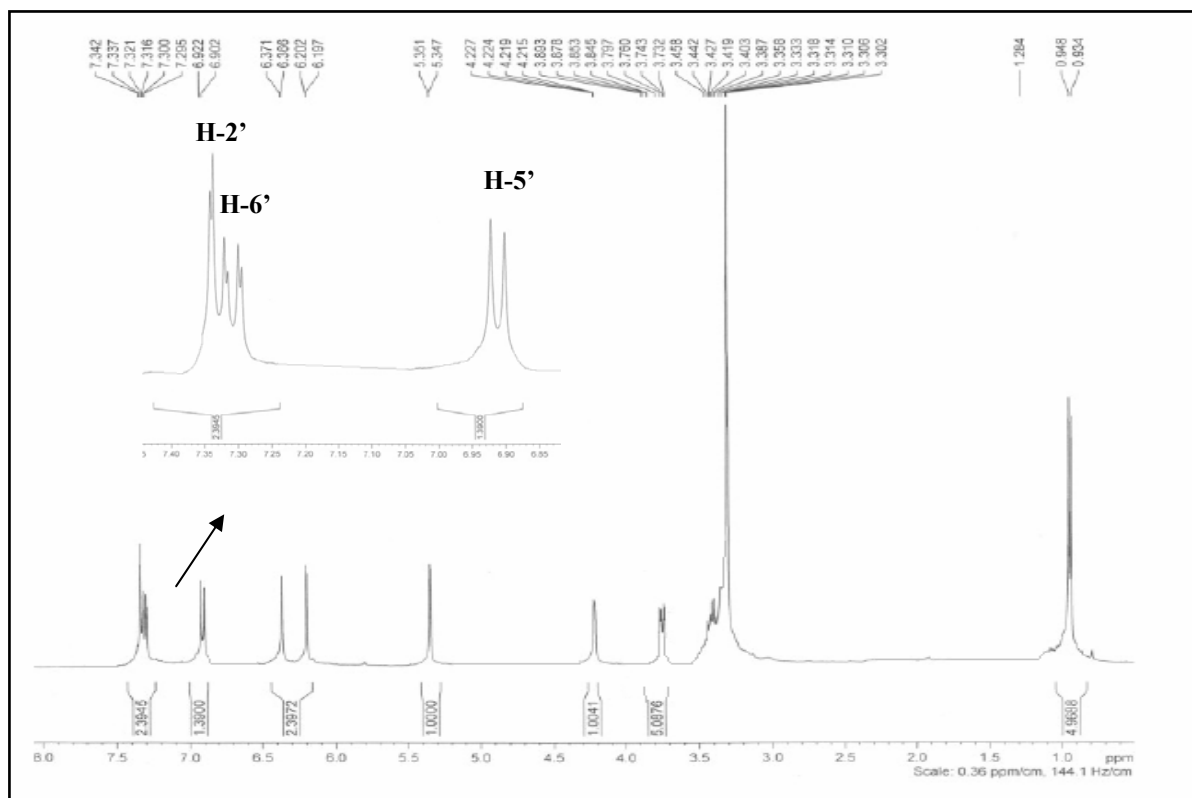


FIGURA 4.35 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (11) (400 MHz, MeOD).

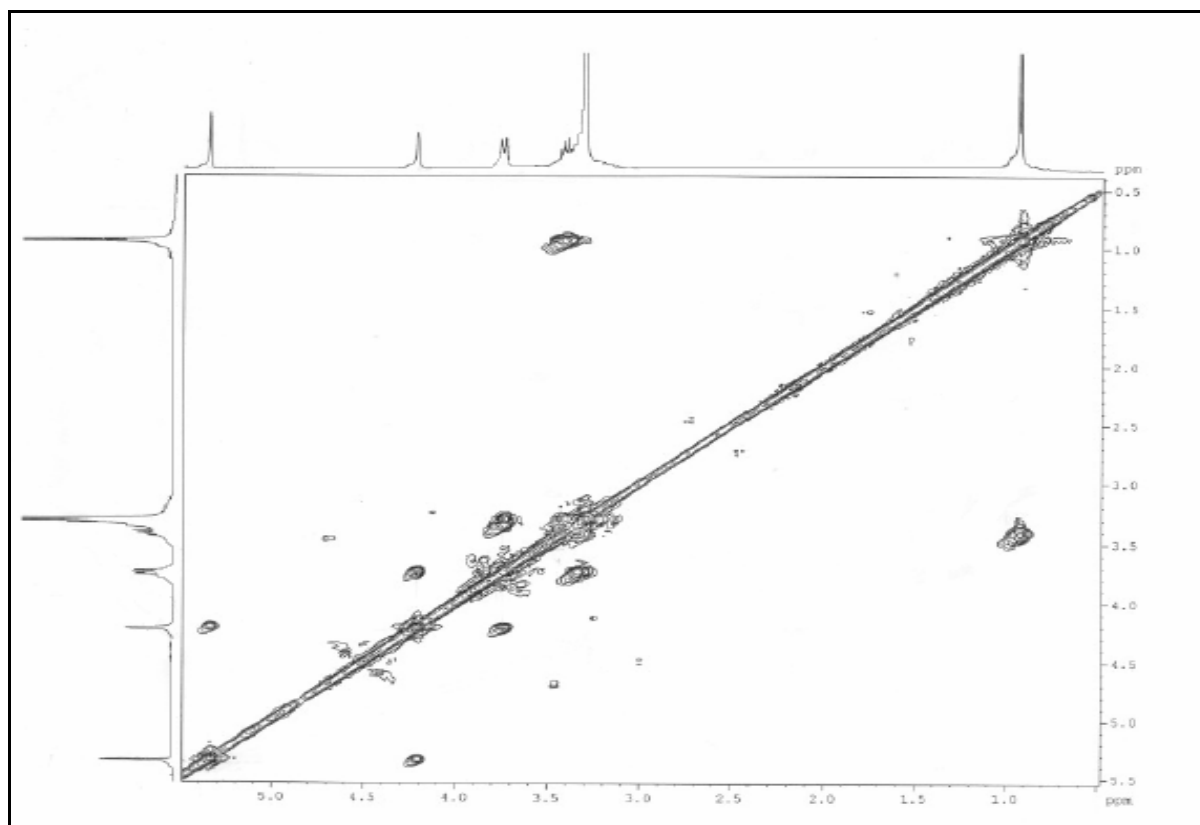
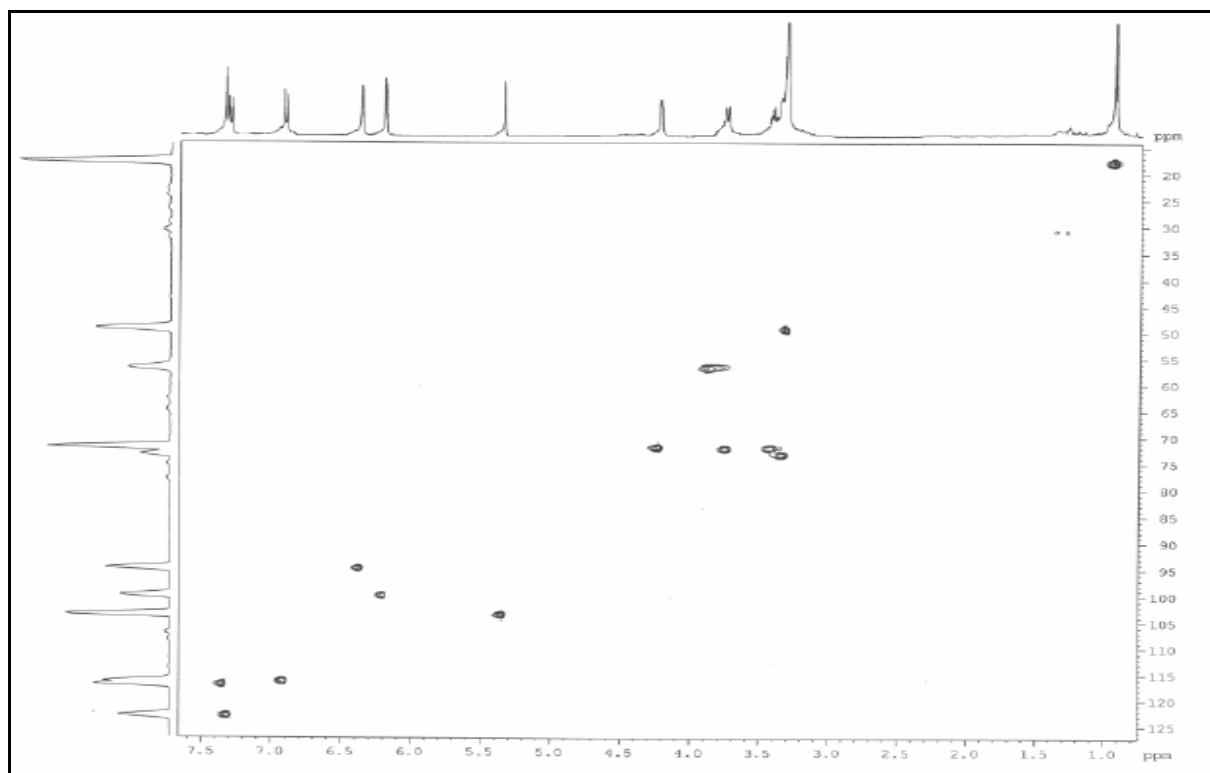
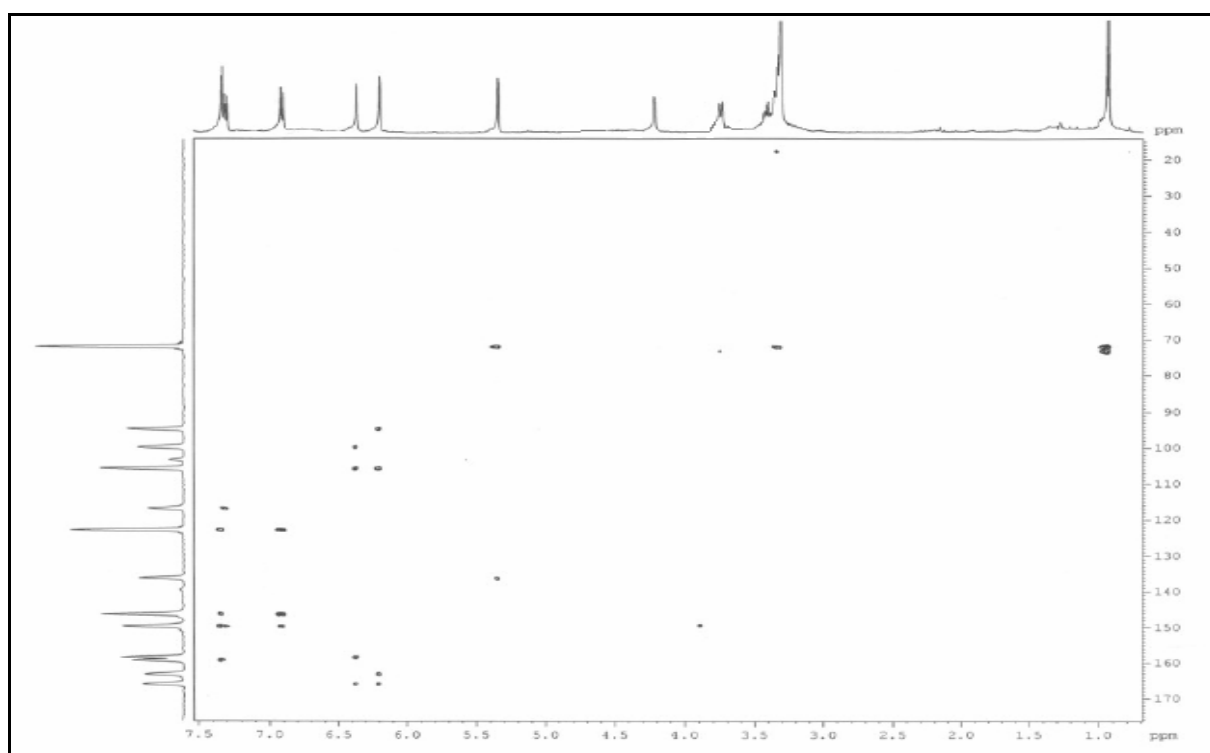


FIGURA 4.36 – Espectro de COSY da quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (11) (400 MHz).



**FIGURA 4.37** – Espectro de HSQC da quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**11**) (400 MHz).



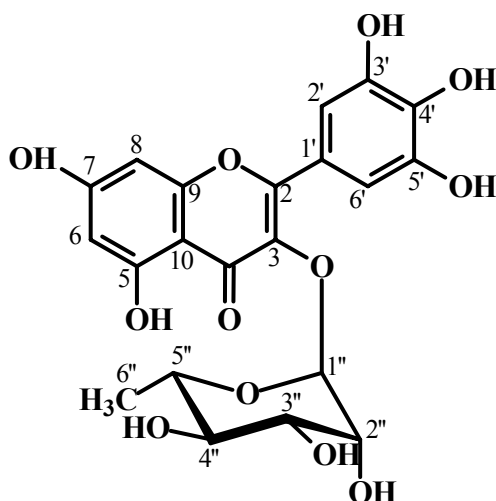
**FIGURA 4.38** – Espectro de HMBC da quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**11**) (400 MHz).

#### 4.6.2 – Identificação estrutural da substância 12:

A substância **12** apresentou-se como um sólido amorfo de coloração alaranjada, sendo isolada das folhas de *E. paraensis*.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.39**) mostra um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,95 integrando para dois hidrogênios, que é característico dos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B de uma flavona e a equivalência dos mesmos é ocasionada pela livre rotação do anel. A presença de um par de dubletos com  $J= 2,0$  Hz em  $\delta_{\text{H}}$  6,42 e  $\delta_{\text{H}}$  6,20 correspondem aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, mantendo o mesmo padrão de substituição para o anel A descrito anteriormente. A observação de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  3,0-4,4 sugerem a presença de uma unidade de açúcar, onde o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,96 (3H, H-6'',  $J= 6,0$  Hz) é característico da metila de uma unidade de ramnose e o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 (H-1'',  $J= 2,8$  Hz) corresponde ao hidrogênio anomérico.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**FIGURA 4.40**) foram observados 21 sinais, que somados aos dados anteriores e em comparação com a literatura<sup>72</sup> levaram a flavona miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo como sendo a substância **12**.

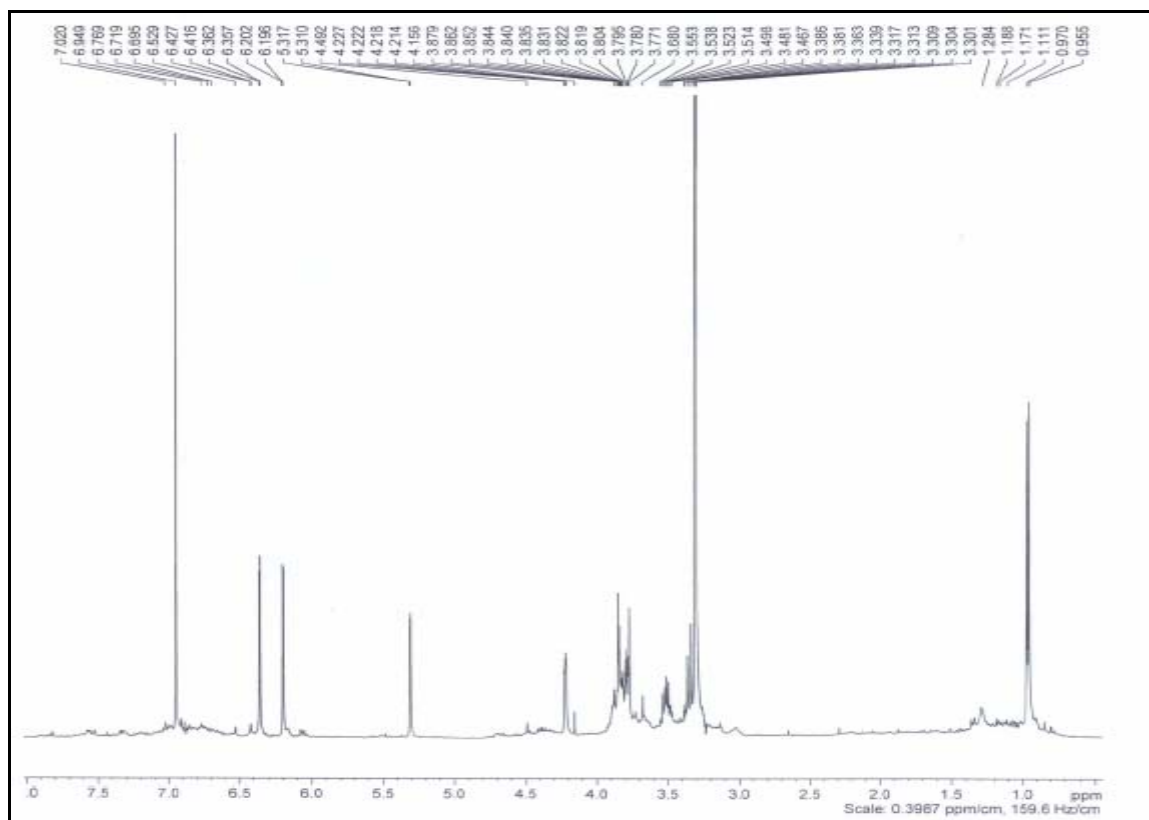


Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo

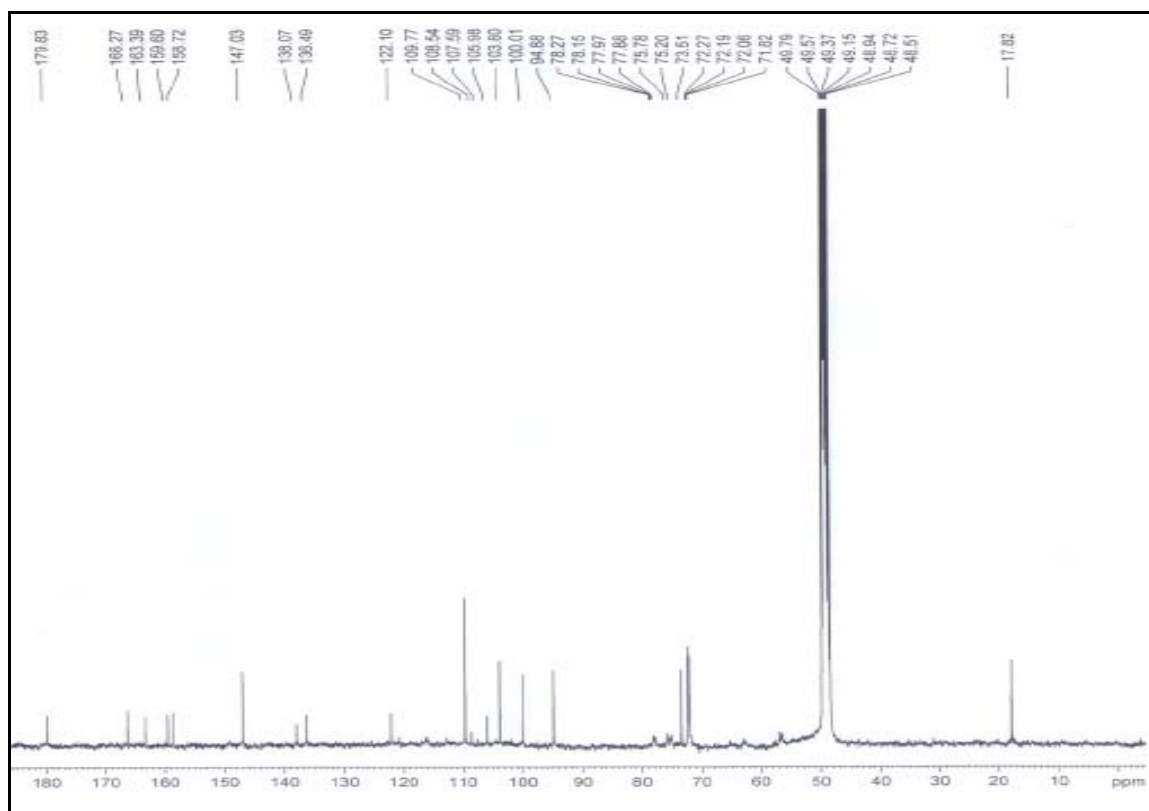
TABELA 4.11 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**12**) juntamente com os dados descritos na literatura<sup>72</sup> para **12**.

C	<b>12</b>		<b>12 (Lit.)<sup>72</sup></b>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2	-	159,6	-	159,2
3	-	136,5	-	136,1
4	-	179,8	-	179,5
4a	-	106,0	-	105,6
5	-	163,4	-	163,1
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	100,0	6,19 <i>d</i> (2,3)	99,7
7	-	166,3	-	164,0
8	6,42 <i>d</i> (2,0)	94,9	6,35 <i>d</i> (2,3)	94,6
8a	-	158,7	-	158,4
1'	-	122,1	-	121,7
2'	6,95 <i>s</i>	109,7	6,94 <i>s</i>	109,4
3'	-	147,0	-	146,7
4'	-	138,1	-	137,7
5'	-	147,0	-	146,7
6'	6,95 <i>s</i>	108,5	6,94 <i>s</i>	109,4
1''	5,31 <i>d</i> (2,0)	103,8	5,30 <i>d</i> (1,8)	103,5
2''	4,21 <i>dd</i> (3,2 e 1,8)	71,8	4,21 <i>dd</i> (3,2 e 1,8)	71,7
3''	3,78 <i>dd</i> (9,2 e 3,2)	72,2	3,78 <i>dd</i> (9,2 e 3,2)	72,0
4''	3,33 <i>t</i> (9,2)	72,3	3,33 <i>t</i> (9,2)	73,2
5''	3,51 <i>m</i>	72,0	3,51 <i>dq</i> (9,2 e 6,4)	71,9
6''	0,94 <i>d</i> (5,6)	17,8	0,95 <i>d</i> (6,4)	17,5

<sup>a</sup> MeOD, 400 MHz<sup>b</sup> MeOD, 100 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz



**FIGURA 4.39** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**12**) (400 MHz, MeOD).



**FIGURA 4.40** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da Miricetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (**12**) (100 MHz, MeOD).

### 4.6.3 – Identificação estrutural da substância 13:

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiu caracterizar a substância **13** como a flavanona Hesperidina. A confirmação desta estrutura foi obtida através de comparação dos deslocamentos químicos com valores descritos na literatura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIGURA 4.41**) apresenta os seguintes sinais na região de hidrogênios alifáticos:  $\delta_{\text{H}}$  3,14 (*dd*,  $J = 14,0$  e  $12,6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,72 (*dd*,  $J=14,0$  e  $3,0$  Hz) e um *dd* em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 ( $J = 12,6$  e  $3,0$  Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios H-3ax, H-3eq e H-2, respectivamente, do anel C de uma flavanona. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**FIGURA 4.42**) corrobora com o exposto anteriormente, uma vez que apresenta sinais de uma carbonila referente ao C-4 em  $\delta_{\text{C}}$  197,4 e o  $\text{CH}_2$  em  $\delta_{\text{C}}$  42,3 referente ao C-3 da flavanona.

A presença de anel A 5,7-dioxigenado foi reconhecida pelos dois singletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  6,05 (H-6) e 6,91 (H-8) revelados pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$ . O sinal do grupo metoxila foi observado em  $\delta_{\text{H}}$  3,86. A presença de dois resíduos de açúcar na estrutura desta substância foi confirmada devido a presença dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,50 (s) e  $\delta_{\text{H}}$  4,98 (d,  $J = 8,0$  Hz) que são característicos de hidrogênios anoméricos atribuídos a H-1'' e H-1'', respectivamente. Os demais hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica estão entre  $\delta_{\text{H}}$  3,20-3,90 e o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,96 (3H, H-6'',  $J= 6,0$  Hz) é correlacionado a metila de uma unidade de ramnose. O sinal múltiplo em  $\delta_{\text{H}}$  6,95 foi correlacionado com os hidrogênios aromáticos H-2', H-5' e H-6', sugerindo a presença no anel B de 3'-hidroxi-4'-metoxi- ou 4'-hidroxi-3'-metoxi-. Outros sinais observados no espectro foram atribuídos aos hidrogênios HO-3' ( $\delta_{\text{H}}$  9,14), HO-5 ( $\delta_{\text{H}}$  12,00, hidroxila quelatogênica). A principal dificuldade enfrentada para caracterizar a estrutura deste flavonóide glucosilado, utilizando principalmente os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (**FIGURA 4.42**), envolveu a confirmação dos grupos hidroxílicos e metoxílicos nos átomos de carbono C-3' e C-4', podendo a aglicona correspondente ser caracterizada hesperidina (3',5,7-

triidroxi-4'-metoxiflavanona) ou seu isômero homoeriodictiol (4',5,7-triidroxi-3'-metoxiflavanona). A comparação dos  $\delta_C$  (em DMSO) dos átomos de carbono quaternários C-1' ( $\delta_C$  131,0), C-3' ( $\delta_C$  146,1), C-4' ( $\delta_C$  148,0) e metínicos CH-2' ( $\delta_C$  114,2), CH-5' ( $\delta_C$  112,0), CH-6' ( $\delta_C$  118,0) da flavanona glucosídica isolada com dados descritos na literatura para a hesperidina revelou dados praticamente idênticos, mostrando ser a mesma substância<sup>73</sup>.

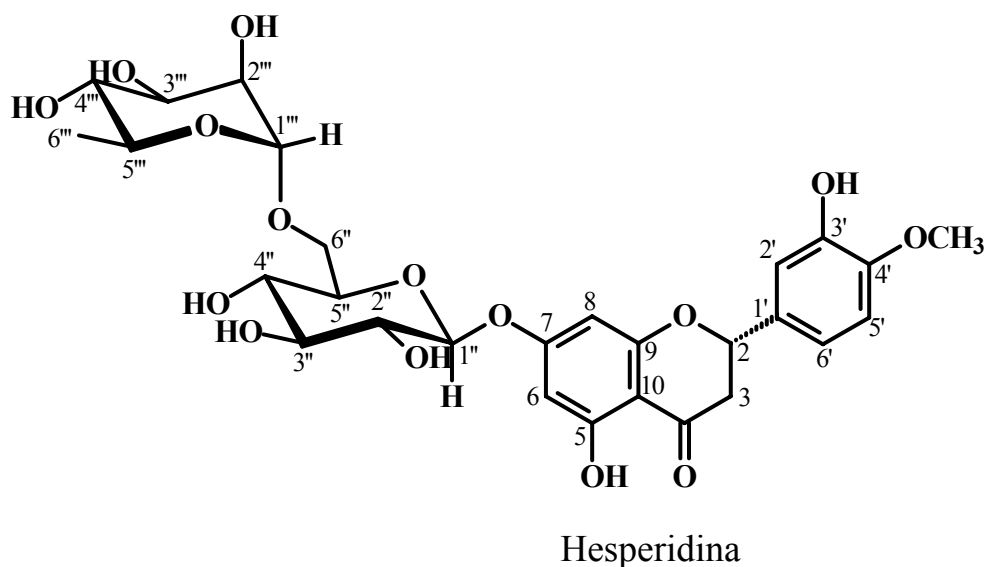




TABELA 4.12 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Hesperidina (**13**) juntamente com os dados descritos na literatura<sup>73</sup> para **13**.

C	13		13 (Lit.) <sup>73</sup>	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ <i>mult</i>	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
4	-	197,4	-	197,1
5	-	165,4	-	165,3
7	-	163,3	-	163,2
9	-	162,8	-	162,6
10	-	103,6	-	103,5
1'	-	131,0	-	131,0
3'	-	146,1	-	146,2
4'	-	148,0	-	148,1
<b>CH</b>				
2	5,38 <i>dd</i> (12,6 e 3,0)	78,8	5,50 <i>dl</i> (9,0)	78,6
6	6,05 <i>sl</i>	96,8	6,50 <i>sl</i>	96,8
8	6,91 <i>sl</i>	95,9	6,91 <i>sl</i>	95,7
2'	6,95 <i>m</i>	114,2	6,75-6,95 <i>m</i>	114,3
5'	6,95 <i>m</i>	112,0	6,75-6,95 <i>m</i>	112,0
6'	6,95 <i>m</i>	118,0	6,75-6,95 <i>m</i>	118,1
1''	4,98 <i>d</i> (1,8)	100,9	4,98 <i>d</i> (8,0)	100,7
2''	3,20-4,90 <i>m</i>	73,3	3,20-3,90 <i>m</i>	73,1
3''	3,20-4,90 <i>m</i>	76,6	3,20-3,90 <i>m</i>	76,4
4''	3,20-4,90 <i>m</i>	69,9	3,20-3,90 <i>m</i>	69,9
5''	3,20-4,90 <i>m</i>	75,7	3,20-3,90 <i>m</i>	75,6
1'''	4,50 <i>s</i>	99,8	4,50 <i>s</i>	99,8
2'''	3,20-4,90 <i>m</i>	70,6	4,50 <i>s</i>	70,6
3'''	3,20-4,90 <i>m</i>	71,1	3,20-3,90 <i>m</i>	70,9
4'''	3,20-4,90 <i>m</i>	72,5	3,20-3,90 <i>m</i>	72,3
5'''	3,20-4,90 <i>m</i>	68,7	3,20-3,90 <i>m</i>	68,4
<b>CH<sub>2</sub></b>				
3 ax	3,14 <i>dd</i> (14,0 e 12,6)	42,3	2,50-2,90 <i>m</i>	42,1
3 eq	2,72 <i>dd</i> (14,0 e 3,0)		2,50-2,90 <i>m</i>	
6''	3,20-4,90 <i>m</i>	66,4	3,20-3,90 <i>m</i>	66,5
<b>CH<sub>3</sub></b>				
6'''	0,96 <i>d</i> (6,0)	18,2	1,10 <i>d</i> (6,8)	17,9
MeO-4'	3,86 <i>s</i>	56,0	3,85 <i>s</i>	55,9
HO-5	12,00 <i>s</i>	-	12,00 <i>s</i>	-
HO-3'	9,14 <i>s</i>	-	9,10 <i>s</i>	-

<sup>a</sup> DMSO, 400 MHz<sup>b</sup> DMSO, 200 MHzValores de *J*, entre parênteses, em Hz

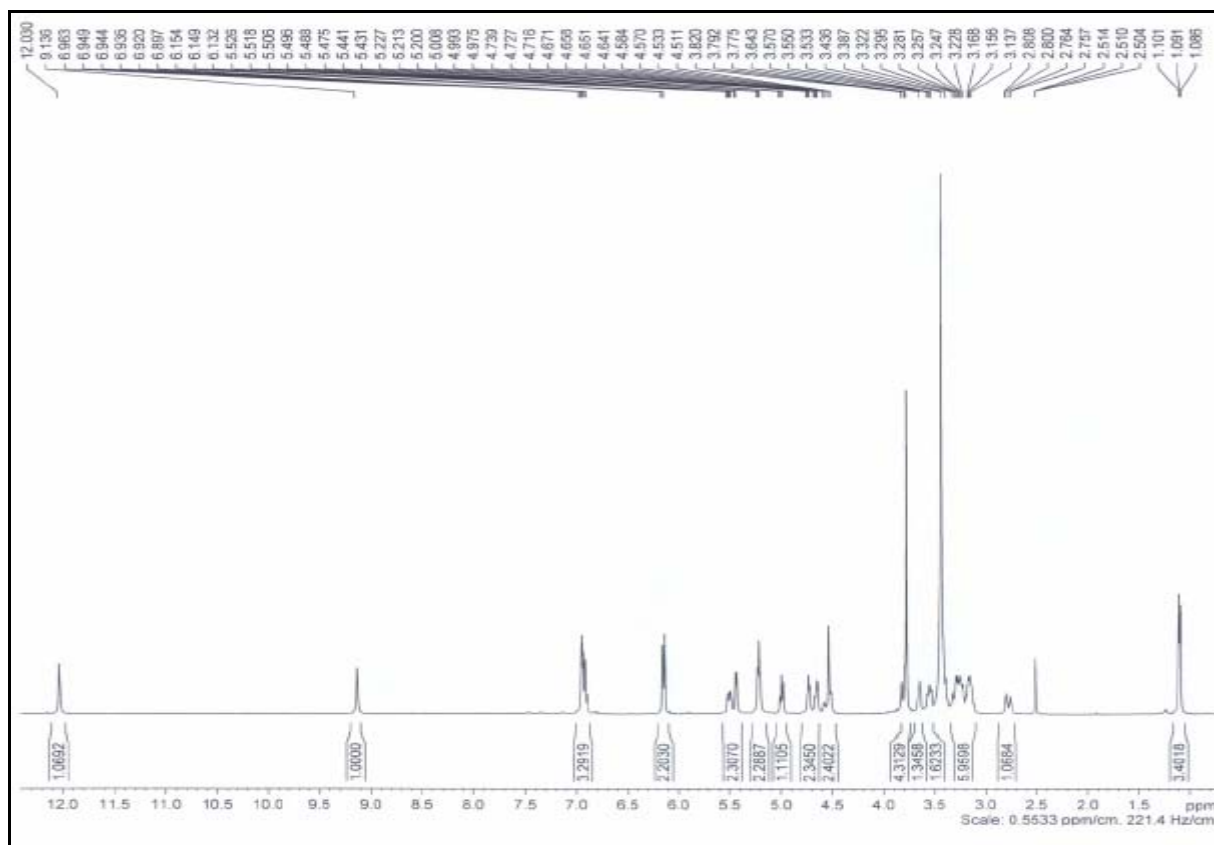


FIGURA 4.41 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da hesperidina (**13**) (400 MHz, DMSO).

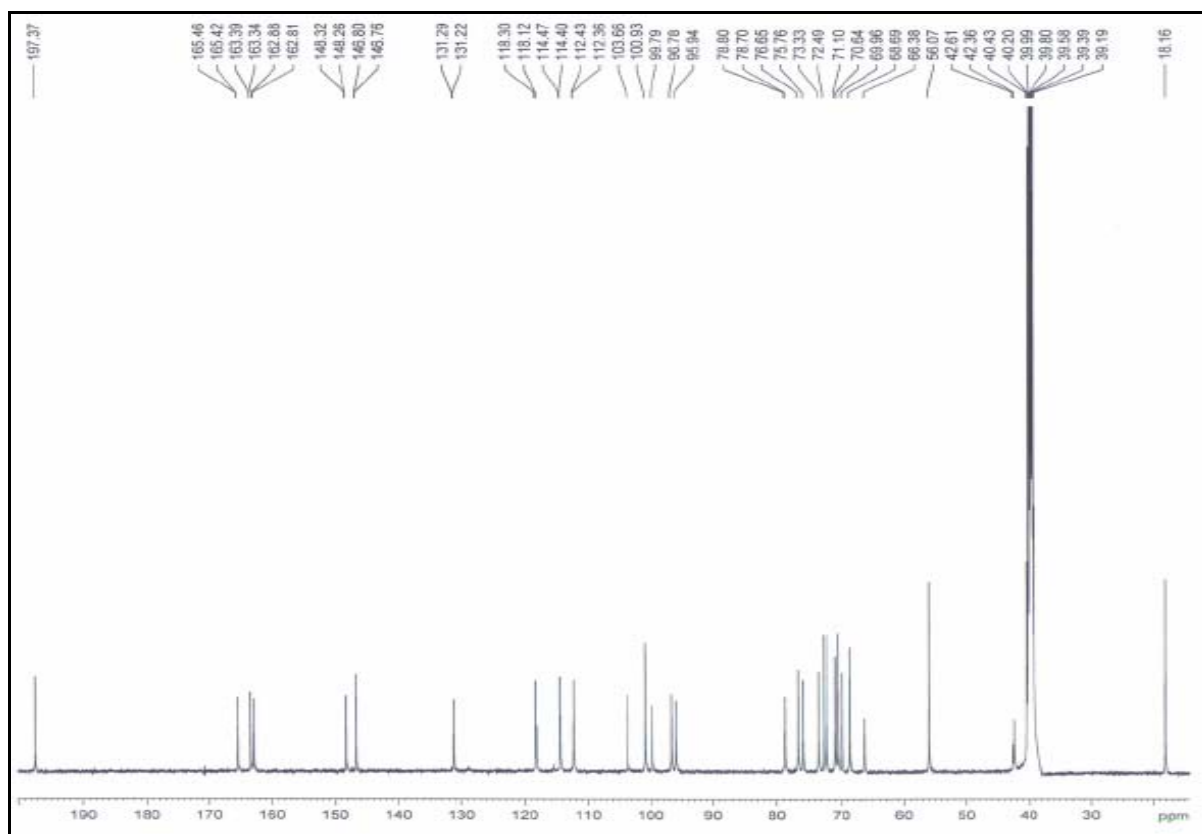


FIGURA 4.42 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da hesperidina (**13**) (100 MHz, DMSO).

## **5 ENSAIO BIOLÓGICO**

---

---

## **5.1 – Procedimento Experimental**

Os ensaios biológicos foram realizados no Núcleo de Estudos em Química Medicinal – NEQUIMED-PN, do Instituto de Química de São Carlos – USP.

### **5.1.1 – Materiais**

- D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) da Sigma Aldrich (USA);
- Trietanolamina hidrocloreto (TEA-HCl) da Sigma Aldrich (USA);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Sigma Aldrich (USA);
- $\beta$ -mercaptoetanol (G3P) da Sigma Aldrich (USA);
- Arseniato de sódio hepta-hidratado ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) da Sigma Aldrich (USA);
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) da Sigma Aldrich (USA);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (99%) da Sigma Aldrich (USA);

A preparação e a purificação da enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram realizadas pelo grupo de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME do Instituto de Física de São Carlos – USP conforme descrito na literatura<sup>77</sup>.

### **5.1.2 – Equipamentos**

- Programa computacional GRID-Volsurf NEQUIMED-PN, IQSC-USP ;
- Termostatizador-Desgaseificador (ThermoVac, MicroCal) – NEQUIMED-PN, IQSC-USP;
- Calorímetro VP-ITC (MicroCal, Northampton, USA) – NEQUIMED-PN, IQSC-USP.

### **5.1.3 – Pré-seleção de substâncias potencialmente ativas através de métodos computacionais.**

A triagem virtual das substâncias isoladas de *Euxylophora paraensis* foi realizada utilizando o método computacional Volsurf. Através do cálculo da superfície de descritores foi analisada a afinidade ligante entre a enzima (GAPDH) e as substâncias investigadas. Para explorar a relação existente entre a estrutura das mesmas e a atividade biológica foram utilizadas as sondas: água, hidrofóbica e carbonila. A análise quimiométrica destes resultados gerou a resposta por componentes principais.

### **5.1.4 – Ensaio de inibição enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC)**

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados em um calorímetro (VP-ITC), através de uma titulação isotérmica. A cela de amostra foi preenchida com o tampão TEA-HCl 100 mM pH 7,5,  $\beta$ -mercaptoetanol 1,0 mM, NaHSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 30 mM, GAPDH 10 nM, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM e DMSO 5% (v/v). A seringa foi preenchida com a solução de G3P no mesmo tampão da cela

de amostra. Titulou-se a solução de G3P na solução contendo a enzima através de 20 injeções consecutivas de 4  $\mu\text{L}$ , com um intervalo entre as injeções de 60 segundos.

Um experimento controle foi realizado anteriormente a cada ensaio de inibição, logo em seguida, sob as mesmas condições experimentais o ensaio de inibição foi realizado adicionando-se conjuntamente na cela de amostra o composto a ser testado contra a enzima em uma concentração de 50  $\mu\text{L}$ . O DMSO foi utilizado como co-solvente para solubilizar as substâncias testadas como inibidores enzimáticos e também foi adicionado nos experimentos controle (sem adição de inibidor). Tanto o ensaio controle quanto o ensaio de inibição foram realizados em triplicata.

## **5.2 – Resultados e discussão**

### **5.2.1 – Pré-seleção de substâncias potencialmente ativas através de métodos computacionais.**

Um conjunto de 94 descritores foram gerados automaticamente a partir da estrutura tridimensional das substâncias isoladas de *E. paraensis*, utilizando o programa Volsurf 3.0<sup>37</sup>. A sonda água foi usada para simular o processo de solvatação-desolvatação, enquanto que a sonda hidrofóbica e a carbonila foram usadas para simular interações fármaco-membrana.

As propriedades farmacocinéticas de um fármaco frequentemente dependem de uma variedade de parâmetros físico-químicos e, nesse sentido, requer uma descrição estatística multivariada. Análise por componentes principais (PCA) é a ferramenta quimiométrica mais comum para extrair e racionalizar as informações obtidas através de descrição multivariada de sistemas biológicos<sup>74</sup>.

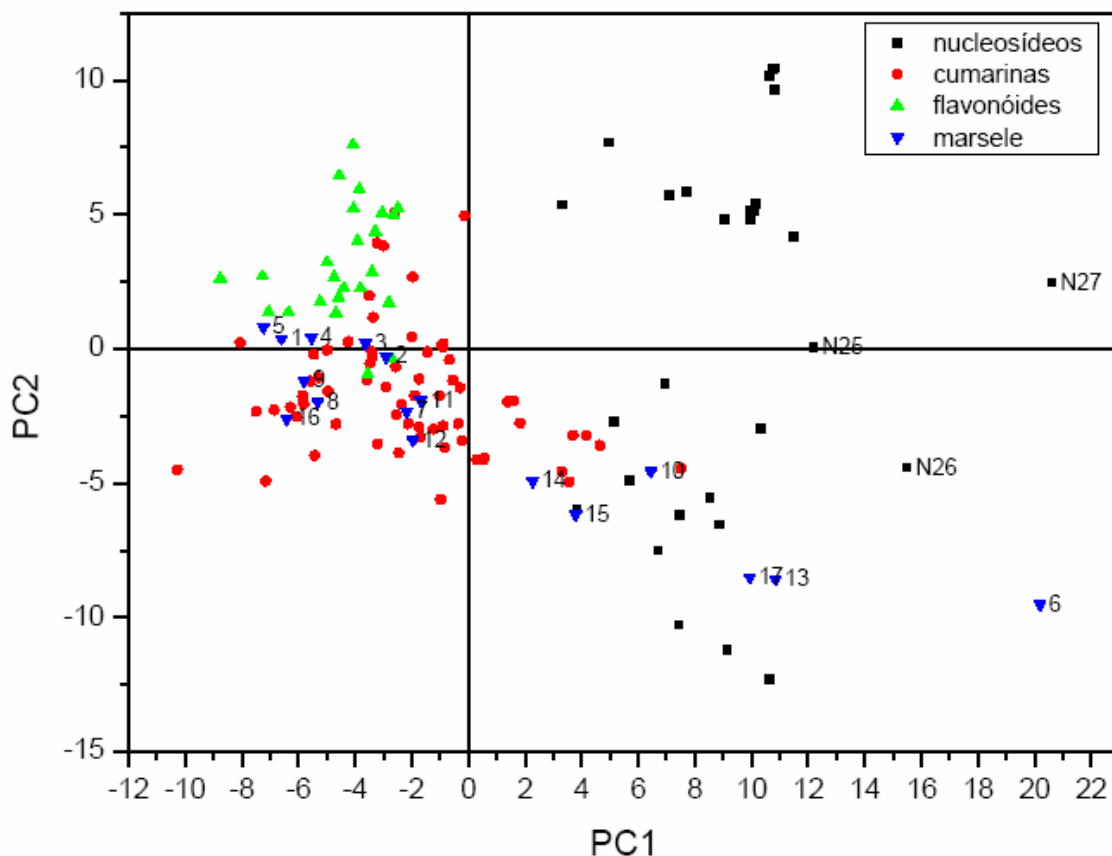
Com a aplicação da técnica estatística PCA foi possível considerar todos os descritores originais no tratamento estatístico e visualizar a resposta em um gráfico em duas dimensões, reduzindo a complexidade da matriz de dados.

Cada molécula é representada por um ponto no espaço bidimensional (PC1 x PC2) e as variáveis analisadas pelo programa Volsurf relatam propriedades fármaco-cinéticas. Assim, compostos próximos neste espaço bidimensional irão apresentar tendências similares nas propriedades fármaco-cinéticas, enquanto que compostos distantes tendem a se diferenciarem nestas propriedades.

Neste trabalho, primeiramente teve-se a análise do comportamento inibitório de um conjunto de substâncias, tratadas por PCA (**FIGURA 5.1**), frente a enzima GAPDH, com mais de 123 compostos, publicados anteriormente<sup>75</sup>, de diversas classes: nucleosídeos (representados por pontos pretos), cumarinas (pontos vermelhos) e flavonóides (pontos verdes). Em estudos anteriores<sup>75</sup>, foi observado que os nucleosídeos, aqui denominados N25, N26 e N27 foram os compostos experimentalmente avaliados mais potentes frente a enzima GAPDH e os menos potentes estão situados na região de baixos valores de PC1. Esta classificação é de grande interesse, visto que PCA não considera explicitamente a atividade destes compostos, mas foi hábil em agrupar as moléculas de tal maneira que a atividade biológica frente a enzima foi reconhecida, sendo que os compostos agrupados na região de altos valores de PC1 são os potencialmente mais ativos<sup>75</sup>.

Baseado nestes resultados, fez-se a projeção externa das moléculas isoladas de *E. paraensis* neste modelo. O critério de seleção utilizado na seleção das substâncias potencialmente mais ativas foi a localização destas substâncias no gráfico PC1 X PC 2 (**FIGURA 5.1**). As substâncias representadas por pontos azuis neste gráfico foram as isoladas da planta em estudo e entre elas, as agrupadas em altos valores de PC1 foram as selecionadas. Também foi testada biologicamente uma substância localizada na região de compostos menos

potentes com a finalidade de se validar o método de pré-seleção escolhido. De acordo com esta pré-seleção, foram testadas biologicamente as seguintes substâncias: Hesperidina (6); Quercetina-3- $\beta$ -O-raminosídeo (17); Limonina (10); Prangol (14) e Marmesina (12) para validação do método.

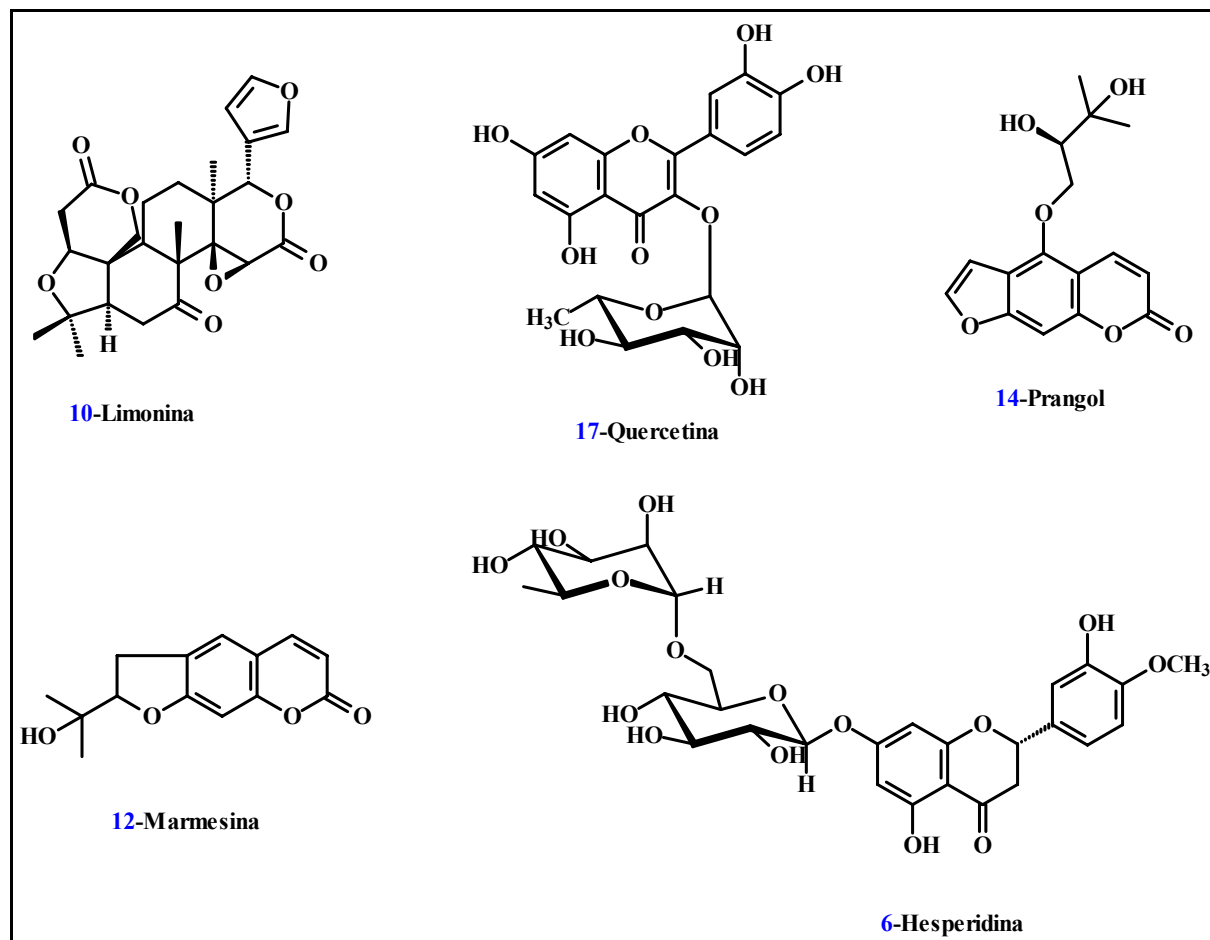


**FIGURA 5.1** – Gráfico de escores (PCA) de predição externa das substâncias isoladas de *E. paraensis* (em azul) contra o banco de dados de 123 moléculas ativas contra a GAPDH.



## 5.2.2 – Ensaio de inibição enzimática por titulação calorimétrica isotérmica (ITC)

Os compostos escolhidos são pertencentes a diversas classes químicas e as suas estruturas, bem como as numerações atribuídas no gráfico de escores (PCA) da **FIGURA 5.1** estão representadas na **FIGURA 5.2**.



**FIGURA 5.2** – Representação das estruturas químicas dos compostos testados contra a enzima GAPDH por ITC.

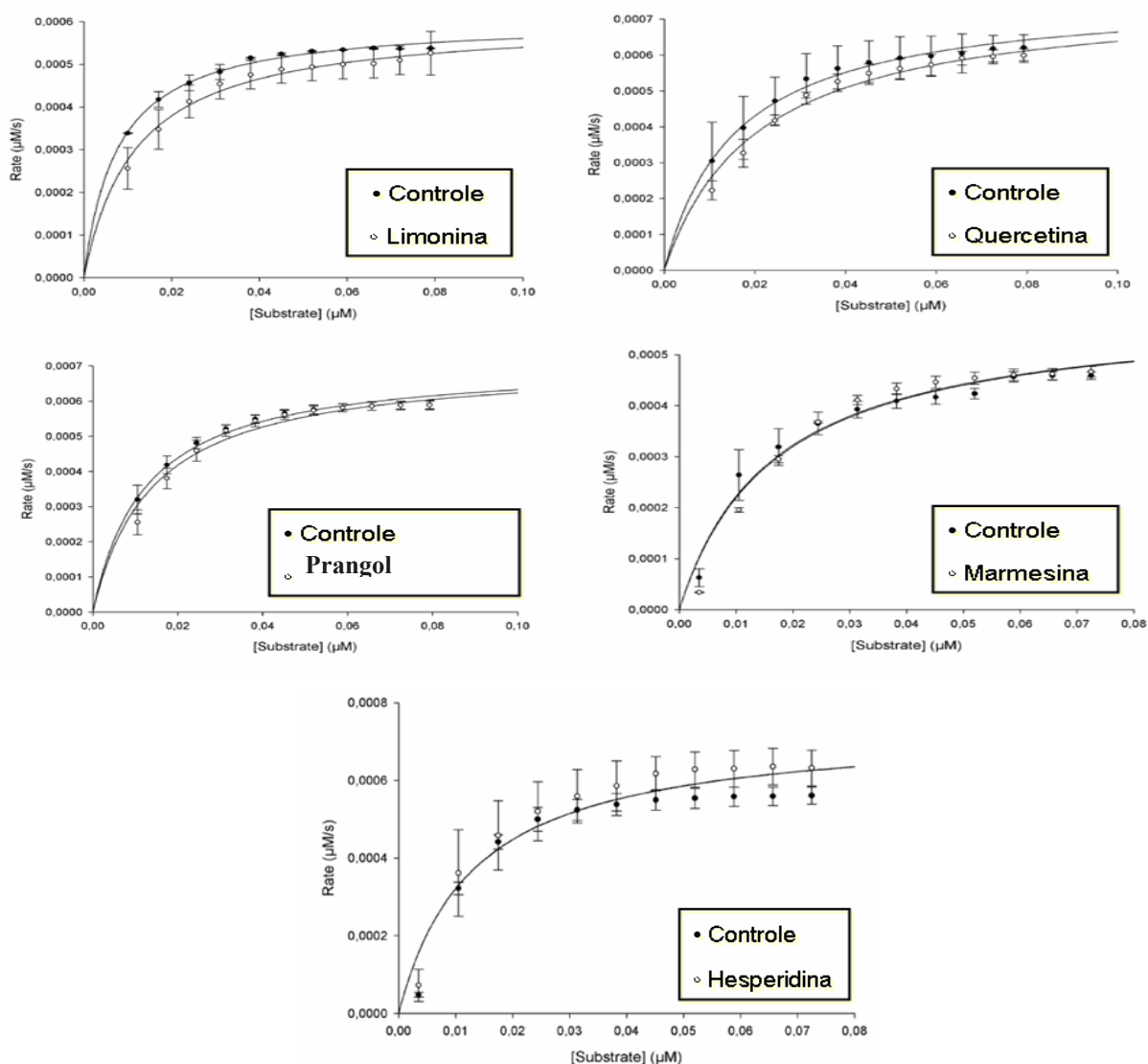
Através de estudos anteriores<sup>50</sup>, foi observado que a presença de DMSO, utilizado como co-solvente, aumenta a capacidade catalítica da enzima, devido a isto o co-solvente também foi adicionado nos experimentos controle (sem adição de inibidor). Também foi observado, perda na atividade catalítica da enzima GAPDH em função do tempo de estocagem. Isso representa um problema na avaliação da inibição enzimática, pois substâncias testadas em

diferentes dias ou usando diferentes preparações enzimáticas, podem gerar dados não comparáveis, devido à incerteza da velocidade catalítica, se esta foi ou não alterada em função da perda da atividade da enzima ou pela presença do inibidor.

O método utilizado para resolver este problema foi realizar um experimento controle na ausência do inibidor previamente ao teste de inibição, assim a constante de inibição ( $K_I$ ) é calculada em relação a esse experimento.

Estabelecido as condições necessárias para os experimentos, realizaram-se os estudos de inibição com os compostos selecionados. A

**FIGURA 5.3** mostra as curvas de Michaelis-Menten para cada substância.



**FIGURA 5.3** – Curvas de Michaelis-Menten. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas na presença das substâncias selecionadas. A concentração dos inibidores foi mantida em 50  $\mu\text{M}$ .

Através da análise gráfica das curvas de Michaelis-Menten apresentadas na **FIGURA 5.3**, pode-se observar a alteração na curva hiperbólica gerada na presença das seguintes substâncias: Limonina, Quercetina-3-β-O-raminosídeo e Prangol, quando comparada com a curva do experimento controle. As curvas obtidas na presença da marmesina e hesperidina mantiveram-se inalteradas, indicando que estas substâncias não inibem a atividade da enzima GAPDH.

Para as substâncias que alteraram a cinética enzimática foram obtidos os valores dos parâmetros de atividade enzimática ( $K_M$  e  $V_{max}$ ) por ajuste não linear das curvas de Michaelis-Menten (**TABELA 5.1**). Considerando a faixa de erro experimental, verificou-se para as três substâncias que inibiram a atividade enzimática um aumento no valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) enquanto a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) permaneceu constante, o que é característico de um mecanismo competitivo de inibição enzimática.

**TABELA 5. 1** – Valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  para as substâncias ativas contra a enzima GAPDH através de um mecanismo competitivo.

	$K_M$ ( $\mu M$ )	$V_{MAX}$ ( $\cdot 10^{-4} mM \cdot s^{-1}$ )	Mecanismo
Controle 1	$6,67 \pm 0,51$	$5,97 \pm 0,76$	<b>Competitivo</b>
<b>Limonina</b>	$10,14 \pm 0,71$	$6,03 \pm 0,94$	
Controle 2	$8,59 \pm 0,70$	$7,46 \pm 1,18$	<b>Competitivo</b>
<b>Quercetina</b>	$29,79 \pm 5,42$	$8,67 \pm 2,23$	
Controle 3	$9,18 \pm 0,38$	$6,84 \pm 0,87$	<b>Competitivo</b>
<b>Prangol</b>	$19,12 \pm 2,78$	$7,52 \pm 0,35$	

Conhecendo-se o mecanismo de atuação (competitivo) das substâncias: limonina, quercetina-3-β-O-raminosídeo e prangol frente à enzima,

pode-se calcular os valores das constantes de inibição ( $K_I$ ), apresentados na **TABELA 5.2**.

**TABELA 5.2** – Valores de  $K_I$  para as substâncias testadas contra a enzima GAPDH.

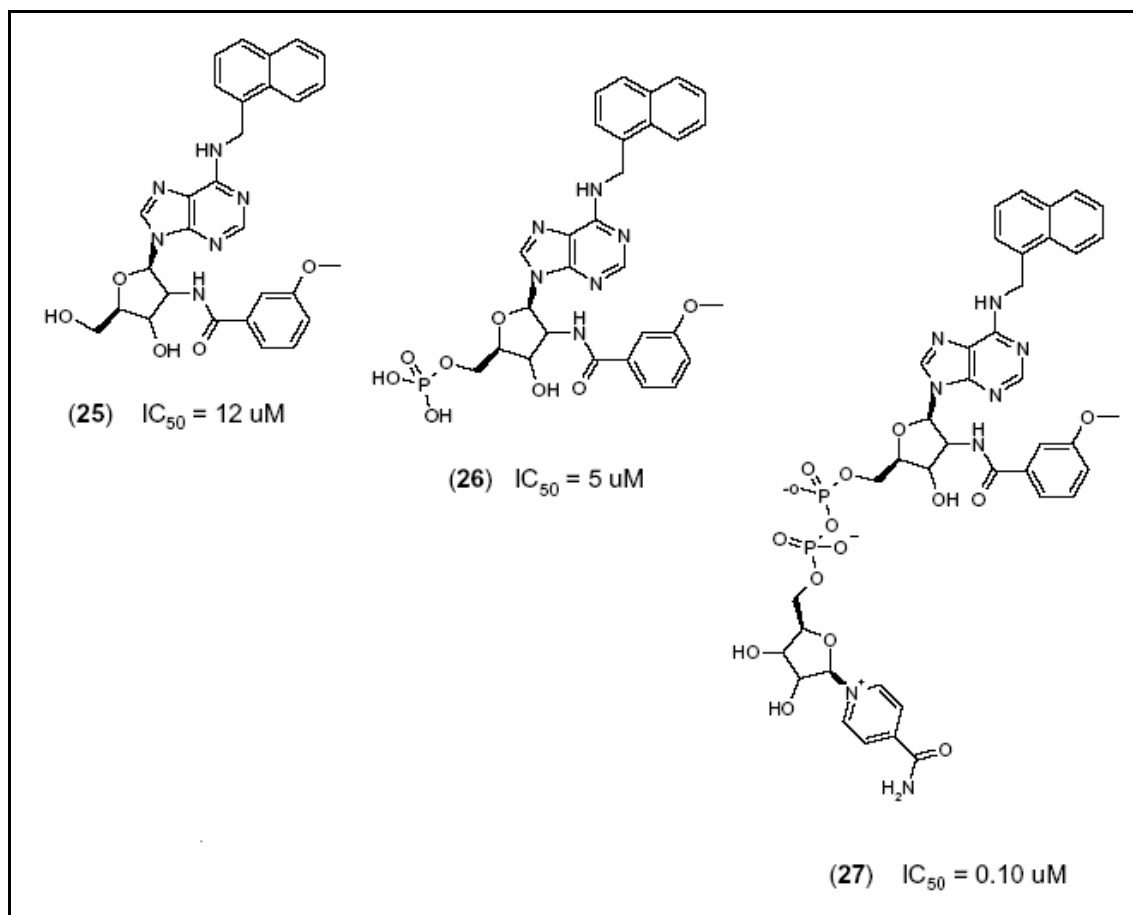
Substância	$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>Limonina</b>	91,8 $\pm$ 18,08
<b>Quercetina</b>	167,6 $\pm$ 75,06
<b>Prangol</b>	384,8 $\pm$ 145,05
<b>Marmesina</b>	Não inibiu
<b>Hesperidina</b>	Não inibiu

Os valores de  $K_I$ , constante de dissociação do complexo Enzima-Inibidor (EI), das substâncias testadas mostraram que a limonina apresentou o maior potencial de inibição, porém ainda pequeno quando comparado com outros produtos naturais testados, como por exemplo, a substância mangiferina que apresentou valor de  $K_I$  da ordem de 20,1  $\mu\text{M}$ , considerado um bom inibidor<sup>50</sup>.

As posições das substâncias testadas no gráfico de escores de PCA (**FIGURA 5.1**) estão diretamente relacionadas ao seu potencial de inibição, pois quanto mais próximas de substâncias fortemente inibidoras<sup>78</sup> (nucleosídeos N25, N26 e N27) maior sua atividade frente à enzima e menor o seu  $K_I$ , exceto a hesperidina que não apresentou atividade.

Estes nucleosídeos são relatados<sup>78</sup> como fortes inibidores por apresentarem baixos valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima) e suas estruturas químicas e valores  $\text{IC}_{50}$  estão apresentados na **FIGURA 5.4**.

Não há relatos na literatura em testes de inibição para a limonina, a substância mais ativa, no entanto a quercetina foi testada, *in vivo*, diretamente contra o parasito na forma tripomastigota, onde o valor de  $IC_{50}$  determinado foi de  $187 \mu M$ <sup>76</sup>. Esse estudo não traz informações a respeito do mecanismo de ação da substância. Deste modo, através do teste de inibição da GAPDH, pode-se inferir que há a possibilidade da quercetina agir na via glicolítica do parasito.



**FIGURA 5.4** – Representação das estruturas químicas dos Nucleosídeos **N25**, **N26** e **N27**<sup>75</sup>.

Apesar da pequena atividade das substâncias testadas frente à enzima GAPDH, vários flavonóides glicosilados têm apresentado atividade contra esta enzima de *T. cruzi*<sup>75</sup>. O grupamento glicosídico destas moléculas confere uma maior solubilidade do composto em água, sendo uma boa alternativa na otimização de propriedades farmacocinéticas dos compostos. Além disto, nucleosídeos como N27 (**FIGURA 5.4**) apresentam propriedades farmacocinéticas inadequadas para a sua utilização como fármaco de acordo

com a regra dos cinco<sup>79</sup>, que estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. A regra foi formulada por Christopher A. Lipinski, em 1997, baseado na observação de que a maior parte dos medicamentos são moléculas lipofílicas e relativamente pequenas.

Desta forma, torna-se viável a otimização das substâncias mais ativas isoladas da planta em estudo (com utilização previa de métodos de modelagem molecular que faz a relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade biológica – QSAR, por exemplo), pois estes compostos abrem caminho e direcionam os estudos futuros para a obtenção de promissores fármacos antichagásicos.

## **6 CONCLUSÃO**

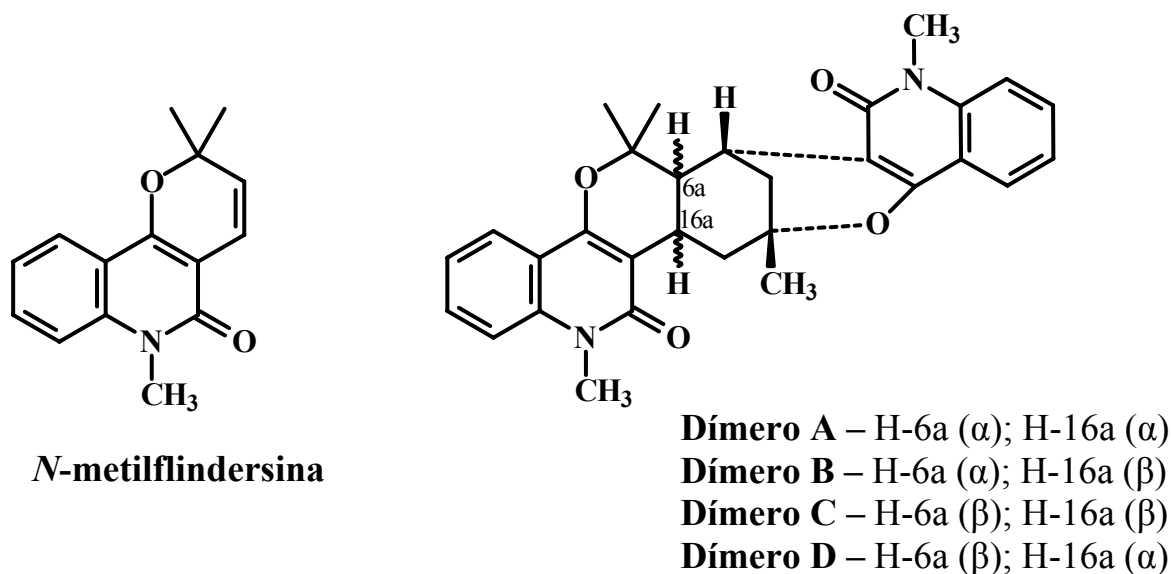
---

---

O estudo químico de *Euxylophora paraensis* proporcionou o isolamento de 15 substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários como esteróides, cumarinas, alcalóides, limonóides e flavonóides, o que contribui com o conhecimento do perfil químico do gênero, confirmando a classificação desta espécie junto à família Rutaceae. O isolamento de flavonóides é pela primeira vez descrita para o gênero *Euxylophora*.

De acordo com levantamento bibliográfico<sup>9-18</sup>, foram isolados desta espécie vários alcalóides, sendo eles do tipo: 2-quinolona, indolopiridoquinazonolínico, bisquinolona e furoquinolínico, **pág. 4-6**, dos quais apenas os alcalóides *N*-metilflindersina e esquimianina foram re-isolados através deste estudo. O isolamento de alcalóides do tipo bisquinolona, onde a única diferença é a configuração dos hidrogênios de junção de anel, leva à questão: os dímeros **A-D (FIGURA 6.1)** são produtos naturais ou artefatos?

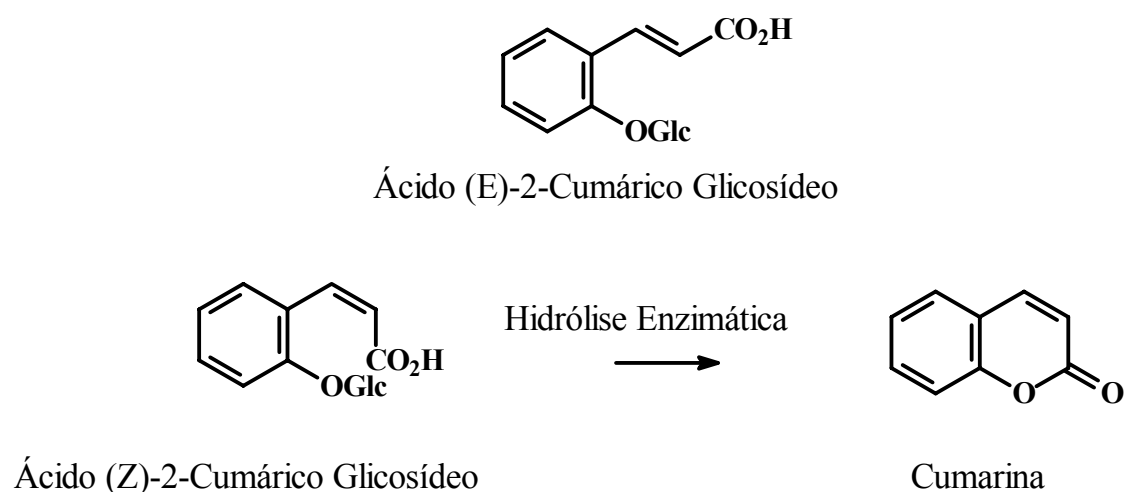
A formação destes dímeros, oriundos do composto *N*-metilflindersina que é encontrado em grande quantidade nesta planta, pode ocorrer durante a extração ou nos procedimentos de isolamento, devido à ausência de controle enzimático, justificando o fato de não ter sido encontrado dímeros neste estudo.



**FIGURA 6.1** – Estrutura dos dímeros isolados de *E. paraensis*.



O isolamento de cumarinas nesta espécie foi anteriormente relatado apenas com a identificação das substâncias: marmesina e 8-metoximarmesina em mistura<sup>19</sup>. No entanto, com este estudo observaram-se uma grande quantidade e diversidade de cumarinas, sendo a classe de metabólitos secundários mais presentes nesta espécie. Para justificar este fato, existem evidências de que as plantas das famílias Rutaceae e Umbeliferaceae contêm em grande quantidade os glicosídeos (E) e (Z)-2-ácido cumárico (**Figura 6.2**) e as cumarinas somente são formadas através de uma hidrólise enzimática e lactonização quando se tem danos nos tecidos das plantas, que pode ocorrer durante a colheita ou sob condições de ataques de herbívoros<sup>57</sup>. Devido ao isolamento de uma variedade de substâncias desta classe, pode-se sugerir que as mesmas foram produzidas como resposta da planta ao ambiente e mascararam outros possíveis metabólitos que estavam presentes em menor quantidade.



**Figura 6.2** – Estrutura das substâncias envolvidas na produção de cumarinas<sup>re</sup>.

O isolamento dos esteróides sitosterol, estigmasterol e campesterol também é inédito no gênero, sendo que os mesmos foram isolados das folhas desta espécie, parte da planta que ainda não havia sido estudada.

Este presente trabalho teve como finalidade dar uma contribuição para o processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco contra a

doença de Chagas, através da inibição de uma das enzimas-chave da via glicolítica do *T. cruzi*, o agente causador da doença.

Os compostos testados biologicamente foram selecionados a partir de uma abordagem computacional, utilizando o programa Volsurf 3.0 onde foi obtido um considerável índice de predição, mostrando ser uma ferramenta útil para a seleção de moléculas bioativas.

O método escolhido para os bioensaios foi a Titulação Calorimétrica Isotérmica ultra-sensível, uma técnica reprodutível e acurada que forneceu informações termodinâmicas e cinéticas sobre as interações enzima alvo-inibidor. Neste ensaio cinético, foi possível determinar as constantes de Michaelis-Menten ( $k_I$  e  $K_M$ ) e desta forma monitorar a atividade enzimática, através de um único experimento.

Após a pré-seleção das moléculas isoladas de *E. paraensis*, cinco compostos foram testados para a determinação de  $K_I$ . A hesperidina e a marmesina não apresentaram atividade frente à enzima e as substâncias limonina, quercetina-3- $\beta$ -O-L-raminosídeo e prangol apresentaram constantes de inibição variando entre 91,8 ( $\pm 18,08$ ) e 384,8 ( $\pm 145,05$ )  $\mu\text{M}$ .

Uma das perspectivas deste trabalho estabelece-se pela possibilidade de que futuramente o método calorimétrico proposto seja amplamente empregado no planejamento de novos inibidores, pois o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos requer a utilização de modelos experimentais adequados bem como a padronização de protocolos de ensaio *in vitro*. Caso contrário, continuar-se-á a despender muito esforço em estudos experimentais sem se chegar a um fármaco que possa ser posteriormente submetido a ensaios clínicos.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

1. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos: EdUFSCar, 2003.
2. NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. *Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos*. In: \_\_\_\_\_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000, 817 p.
3. DIAS, B. F. S. *A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: Desafios e oportunidades*. Campinas: André Tosello, 1996, 10 p. *apud*
4. WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. London: Academic Press, 1983, 465 p.
5. WATERMAN, P. G. “The chemical systematic of alkaloid: a review emphanzing the contribution of Robert Hegnauer”. *Biochem. Syst. Encol.*, 27: 395-406, 1999.
6. SILVA, M. F. DAS G. F DA; GOTTLIEB O.R.; EHRENDORFER, F. “Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family”. *Plant. Syst. Evol.*, **161**: 97-134, 1988.
7. BUCHANAN, B.; GRUISSEM, R.; JONES, R. *Biochemistry and molecular biology of plantas*. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000.
8. [www.ibama.gov.br/ipf/madeira/caracteristicas.php](http://www.ibama.gov.br/ipf/madeira/caracteristicas.php). Acesso em 21 de maio de 2008.
9. JURD, L. & WONG, R. Y. “New quinolinone alkaloids from the heartwood of *Euxylophora paraensis*”. *Australian Journal of Chemistry* **34** (8), 1625-1632, 1981.
10. JURD, L.; WONG, R. Y.; BENSON, M. “The structures of paraensidimerin A and C, two bisquinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*”. *Australian Journal of Chemistry* **35** (12), 2505-2517, 1982.
11. DANIELI, B.; MANITTO, P.; RONCHETTI, F.; RUSSO, G.; FERRARI, G. “Paraensine, a new indolopyridoquinazoline alkaloid from *Euxylophora paraensis*”. *Experientia* **28** (3), 249-250, 1972b.

12. DANIELI, B.; PALMISANO, G.; RAINOLDI, G.; RUSSO, G. "1-Hydroxyrutaecarpine from *Euxylophora paraensis*". *Phytochemistry* **13** (8), 1603-1606, 1974.
13. DANIELI, B.; FARACHI, G.; PALMISANO, G. "A new indolopyridoquinazoline in the bark of *Euxylophora paraensis*". *Phytochemistry* **15** (6), 1095-1096, 1976.
14. CANONICA, L.; DANIELI, B.; MANITTO, P.; RUSSO, G. "New quinazolinocarboline alkaloids from *Euxylophora paraensis*". *Tetrahedron Letters* **47**, 4865-4866, 1968.
15. DANIELI, B.; PALMISANO, G.; RUSSO, G.; FERRARI, G. "Minor indolopyridoquinazoline alkaloids from *Euxylophora paraensis*". *Phytochemistry* **12** (10), 2521-2525, 1973.
16. DANIELI, B.; MANITTO, P.; RONCHETTI, F.; RUSSO, G.; FERRARI, G. "New indolopyridoquinazoline alkaloids from *Euxylophora paraensis*". *Phytochemistry* **11** (5), 1833-1836, 1972a.
17. JURD, L.; BENSON, M.; WONG, R. Y. "New quinolinone and bisquinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*". *Australian Journal of Chemistry* **36** (4), 759-768, 1983b.
18. JURD, L. & BENSON, M. "Structures of paraensidimerins B, E, F, and G, four new dimeric quinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*". *Journal of the Chemistry Society, Chemical Communications* **2**, 92-93, 1983a.
19. MARINHO, P. S. B., "Estudo químico das espécies *Khaya ivorensis* (Meliaceae) e *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de Doutorado p. 153-169.
20. GELB, M. H.; HOL, W. G. J. "Drugs to combat tropical protozoan parasites". *Science*, **297**: 343-344, 2002.
21. FERREIRA, S. F.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; DIAS, J. C. P.; OSTERMAYER, A. L. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de infectologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, 1997. p. 1175-1213.
22. COURA, J. R. "Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias". *Editora guanabara*, V.1, 557-677, 2005.
23. Brener, Z. "*Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Dias J. C. P.; Coura, J. R., *Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para a Clínica geral*, Fio Cruz, Rio de Janeiro, p. 25-31, 1997.

24. MONCAYO, A.; ORTIZ, Y. M. I.; “An update on Chagas Disease (Human American Trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.100, p. 663-677, 2006.
25. MOREL, C. M. “Chagas disease, from discovery to control and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 p.3-16, 1999.
26. FAIRLAMB, A. H. “Future prospects for the chemotherapy of Chaga’s disease”. *Medicina-Buenos Aires*, v. 59, p. 179, 1999.
27. VERONESI, R. “Doenças infecciosas e parasitárias” Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
28. MICHELS P. A. M. “Compartmentation of Glycoysis in Trypanosomes: a potential target for new Trypanocidal drugs”. *Biol. Cell.*, v. 64, p. 157-164, 1988.
29. VERLINDE, C. L. M. et. al. “Glycolysis as a target for the design of new anti typranosome drugs”. *Drug. Resist. Updat.*, v.4, p. 50-65, 2001.
30. CLARKSON, A. B. J.; BROHN, F. H. “Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism”. *Science*, v. 8, p. 204-206, 1976.
31. ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B; CAZZULO, J. J. “Aerobic glucose fermentation by *Tripanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes.” *Molecular and biochemical parasitology*, v. 26, n. 1-2, p. 1-10, 1987.
32. BAKKER, B. M. et. al. “What controls Glycolysis in bloodstream from *Trypanosoma brucei*”. *J. Biol. Chem.* V. 274, p. 14551-14559, 1999.
33. BAKKER, B. M. et. al. “Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs”. *Mol Biochem. Parasitol.*, v. 106, p. 1-10, 2000.
34. OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. “Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drugs target”. *Int. J. Parasitology*, v. 31, p. 482-490, 2001.

35. SILVERMAN, R. B. "The Organic Chemistry of drug action" *Academic Press*. v. 1, p. 232-240, 1992.
36. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. "Química Medicinal- As bases moleculares das ações dos fármacos"
37. CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. "Volsurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds". *Eur. J. Pharm. Sci.*, Paris, v. 11, (2), p. 529-539, 2000.
38. MENEZES, I. R. A.; LOPES, J. C. D.; MONTANARI, C. A.; OLIVA, G.; PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; VIEIRA, P. C.; PUPO, M. T. J. "3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*" *M. T. J. Comput Aided Mol. Des.*, 17, 277-290, 2003.
39. BOOBBYER, D.N.A.; GOODFORD, P.J.; MCWHINNIE, P.M. "New hydrogen-bond potential for use in determining energetically favourable binding sites of molecules of known structure". *J. Med. Chem.*, Columbus, v. 32, n. 5, p. 1083-1094, 1989.
40. NETO, J. M. M.; MOITA, G.C. "Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados". *Química Nova* 21, (4), 1998.
41. DODDAREDDY, M. R.; CHA, J. H. CHO, Y. S.; KOH, H. Y.; YOO, K. Y.; KIM, D. J.; PAE, A. N. "Volsurf analysis of carbapenem antibiotics" *Bio. & Med. Chem.*, 13, 3339-3349, 2005.
42. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. "Princípios de Bioquímica". São Paulo: Sarvier, p. 543-678, 2006.
43. MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. "Kinetics of invertase action. *Biochemische Zeitschrift*", v. 49, p. 333-369, 1913.
44. SEGEL, I. H. *Enzyme kinetics: "behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems"*. New York: Wiley, 2006. 957p.
45. YAO, C., LEVY, R. H. "Inhibition-Based metabolic drug-drug interactions: predictions from in vitro data". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 9, p. 1923-1935, 2002.
46. MAUIZIO, M.; MASSIMO, P. "Irreversible inhibitors: the kinetics of the progress curve". *Medicinal Chemistry Research*, v. 3, n. 3, p. 139-153, 1993.

47. TODD, M. J.; GOMEZ, J. “Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity”, *Anal Biochem.* 296, p. 179–187, 2001.
48. LADBURY, J. E.; DOYLE, M.L. (Eds.), *Biocalorimetry 2*, Wiley–VCH, Weinheim, Germany, 2004.
49. BIANCONI, M.L. “Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes”, *J. Biol. Chem.* 278 p.18709–18713, 2003.
50. WIGGERS, H. J. “Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* por biocalorimetria”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química IQSC-USP. Dissertação de mestrado, 2007.
51. JEOH, T.; BAKER, J.O.; ALI, M.K.; HIMMEL, M.E. ADNEY, W.S. “(-d-Glucosidase reaction kinetics from isothermal titration microcalorimetry, *Anal. Biochem.*” 347 p. 244–253, 2005.
52. COPELAND, R.A. “Enzymes, Wiley–VCH”, Weinheim, Germany, 2000.
53. VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. São Paulo: Artmed, 2006. 1596p.
54. SCHNELL, S.; MENDOZA, C. “Time-dependent closed form solutions for fully competitive enzyme reactions”. *Bulletin of Mathematical Biology*, v. 62, p. 321-336, 2000.
55. HENZLER, K.; HAUPT, B.; BALLUFF, M. “Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry”. *Analytical biochemistry*, 378, p. 184-189, 2008.
56. MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V. “The evolution of kinetoplastid glycosomes”. *J. Bioenerg. Biomembr.* v. 26, p. 213-219, 1994.
57. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2 ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2001.
58. KAMPERDICK, C.; VAN, N. H.; SUNG, T. V.; ADAM, G. “Bisquinoline alkaloids from *Melicope ptelefolia*”. *Phytochemistry* **50**: 177-181, 1999.
59. JEONG, S. H.; HUAN, X. H.; HONG, S. S.; HWANG, J. S.; HWANG, J. H.;



- LEE, M. K.; RO, J. S.; HWANG, B. Y. "Monoamine Oxidase Inhibitory Coumarins from the Aerial Parts of *Dictamnus albus*". *Arch Pharm Res* Vol 29, No 12, 1119-1124, 2006.
60. MARKHAM, K. R. & TENAI, B. "<sup>13</sup>C NMR of flavonoids – II, flavonoids other than flavone and flavonol aglycones". *Tetrahedron* **32**, 2607, 1976.
61. ROY, A.; SARAF, S. "Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom". *Biol. Pharm. Bull.* **29** (2), 191-201, 2006.
62. RIBEIRO, T. A. N.; NDIAYE, E. A. da S.; VELOZO, E. da S.; VIEIRA, P. C.; ELLENA, J.; JÚNIOR SOUSA, P. T. de. "Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil". *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16** (6B), 1347-1352, 2005.
63. DISTASI, L. C. *Plantas medicinais: Arte e Ciência*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
64. KIM, J. S.; KIM, J. C.; SHIM, S. H.; LEE, E. J.; JIN, W. J.; SON, K. H.; KIM, H. P.; KANG, S. S.; CHANG, H. W. "Chemical Constituents of the Root of *Dystaenia takeshimana* and Their Anti-Inflammatory Activity". *Arch Pharm Res* Vol 29, No 8, 617-623, 2006.
65. HARKAR, S.; RAZDAN, T. K.; WAIGHT, E. S. "Steroids, chromone and coumarins from *angelica officinalis*". *Phytochemistry*, Vol. 23, No. 2, pp. 419-426, 1984.
66. BOYD, D. R.; SHARMA, N. D.; LOKE, P. L. MALONE, J. F.; HAMILTON, T. G. "Absolute configuration assignment and enantiopurity determination of chiral alkaloids and coumarins derived from O- and C-prenyl epoxides". *The Royal Society of Chemistry*, 3070-3071, 2002.
67. TESSO, H.; KONIG, W. A.; KUBECZKA, M. B.; GLOWNIAK, K. "Secondary metabolites of *Peucedanum tauricum* fruits". *Phytochemistry* **66** (2005) 707–713.
68. MURRAY, R. D. H.; JORGE, Z. D. "A simple method for differentiating between angular linear 5-methoxyfuranocoumarins". *Phytochemistry*, Vol. 23, No. 3, pp. 697-699, 1984.
69. STEVENSON, P. C.; SIMMONDS, M. S. J.; YULE, M. A.; VEITCH, N. C. "Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*". *Phytochemistry* **63** (2003) 41–46

70. MIKOLAJCZAK, K. L.; WEISLEDER, D.; PARKANYL, L.; CLARDY, J. *Journal of Natural Products* **51** (3), 606, 1988.
71. BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C. “Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves”. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6689-6695
72. CHUNG, S.; KIM, Y.; TAKAYA, Y.; TERASHIMA, K. “Novel Flavonol Glycoside, 7-O-Methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and Its Antioxidant Effect”. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4664-4668
73. PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. “Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *bauhinia forficata* (Leguminosae)”. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 466-469, 2003.
74. WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. *Chemom. Intell Lab. Syst.*, 2, 37–52, 1987.
75. LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; DE MARCHI, A. A.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M. F. G. F., FERREIRA, V. F.; DE SOUZA M. C. B. V. SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C.A. “Structure–activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 9, p. 2199-2204, 2004
76. MANNERS, G. D.; JACOB, R. A.; BREKSA III, A. P.; SCHOCH, T. K.; HASEGAWA, S. “Bioavailability of Citrus Limonoid in humans”. *J. Agricult. and food Chem.* 51, 4156-4161, 2003.
77. HANNAERT, V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. “Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *trypanosoma brucei* and *trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes”. *Protein Expression and Purification*, v. 6, p. 244-250, 1995.
78. KEVIN, J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. “A Disubstituted NAD<sup>+</sup> Analogue is a Nanomolar Inhibitor of Trypanosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, p. 95-98, 2001.
79. LIMA, L. M. “Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira”. *Química Nova*, v. 30, n.6, 1456-1468, 2007.