

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

**“ESTUDO DOS ALCALOIDES QUINOLÔNICOS DE *Waltheria  
brachypetala* Turcz: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO  
ESTRUTURAL, BIOGÊNESE, ATIVIDADES FUNGITÓXICA E  
ANTICOLINESTERASE”**

**Murilo Marinho de Castro Lima\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA  
ORGÂNICA.

**Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2012**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

L732ea

Lima, Murilo Marinho de Castro.

Estudo dos alcaloides quinolônicos de *Waltheria brachypetala* Turcz : isolamento, determinação estrutural, biogênese, atividades fungitóxica e anticolinesterase / Murilo Marinho de Castro Lima. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
332 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

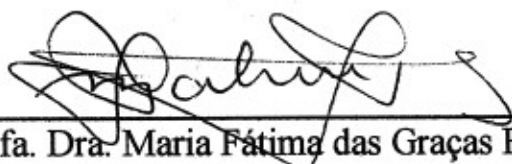
1. Produtos naturais. 2. *Waltheria brachypetala*. 3. Alcalóides. 4. Biogênese. 5. Quimiosistemática. 6. Atividades biológicas. I. Título.

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 Doutorado**

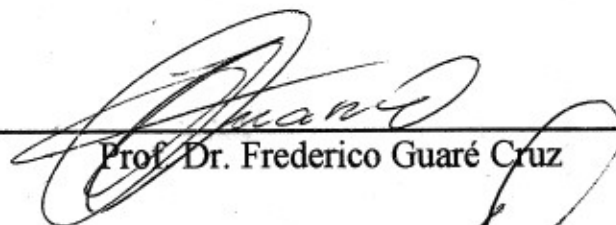
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Murilo Marinho de Castro Lima**, realizada em 26 de junho de 2012:*



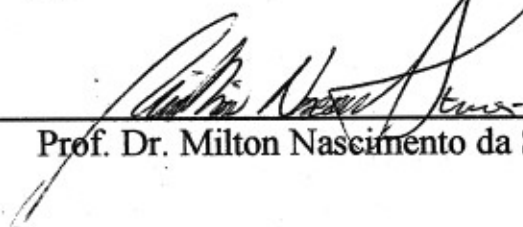
---

Prof. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



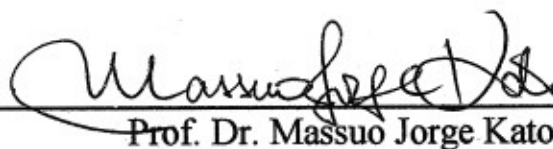
---

Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz



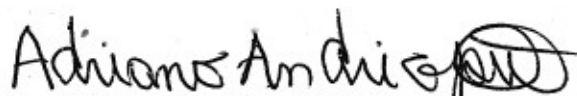
---

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva



---

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato



---

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de doutoramento durou árduos dias e noites durante dois anos e dez meses. Este trabalho foi realizado, sobretudo com amor, dedicação e muita força de vontade. É parte da consolidação dos sonhos de um garoto que aos quatorze anos saiu do seio de sua família para estudar. Por mais que eu quisesse, jamais teria conseguido concluir esse ciclo sozinho. Pois, nos momentos mais difíceis, em que eu achava que tudo estava perdido, sempre apareceram pessoas iluminadas por Deus para enxugar as minhas lágrimas; mas, não foi fácil. Assim, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que sorriram a minha felicidade e choraram a minha dor:

A Deus, pai que todos os dias me acompanha, me guia e me ilumina. Por ser a mão que dá força para lutar e ombro que me conforta nos momentos difíceis. Esse trabalho só foi realizado porque foi da vontade do senhor;

A minha orientadora, Dra Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela acolhida, respeito, orientação e, sobretudo pelo exemplo de profissional que ama o que faz. Obrigado por fazer os meus olhos brilharem com a química de produtos naturais;

Ao Dr. Leonardo Toffano, por todo empenho dispensado á parte biológica deste trabalho, pelos seus ensinamentos, paciência e amizade.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais: doutores João Batista Fernandes, Paulo Cezar Vieira e Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos, pela acolhida e pelo exemplo de profissionais a serem seguidos;

Em especial ao professor Dr Edson Rodrigues Filho por toda atenção dispensada a mim, pelo incentivo, conselhos e exemplo de profissional;

A professora Rose Maria Carlos por ter aberto as portas de seu laboratório (LAFIB) para a realização de experimentos, sempre com muita generosidade;

Ao professor Dr. Norberto Peporine da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Ribeirão Preto) pelas análises de HRMS;

Ao professor Dr Ottaciro Rangel do Instituto de Física da USP (IFSC) pelas análises de DC;

As minhas amigas do LAFIB: Regina, Carol e Márcia, por toda ajuda nos ensaios biológicos, sobretudo pela generosidade sempre dispensada;

A família do Laboratório de Produtos Naturais: pela acolhida, pelo carinho, pelos sorrisos, por toda ajuda. Sem vocês nada seria possível. Pela incrível capacidade de transformar qualquer dia nublado, chuvoso, cheio de nuvens em um belo dia de sol: as meninas: Bárbara Sayuri, Jacke, Kátia Prieto, Keylla Bicalho, Fernanda Villare, Marcela Burgger, Marsele Isidoro, Olívia Sampaio, Roberta Ávila, Sâmya Freitas, Vanessa Domingues, Vanessa Pasqualoto, Vivian Cornélio, Tati Alba, Tati Bondância, Lorena, Suellen Demuner, Lívia Soman, Luciana Amaral, Fabiana Marques, Liliane Nebo, Leila Gimenes, Ana Paula Terezan. Patrícia, Priscila (técnica), Thaynara. Aos meninos: Gabriel, Titi, Enzo, Moacir (High), Cristóvan (desfoque), Israel Cívico, Wesley, Jame's, Bruno, Caio Yu, Rodrigo Japa, José Vinícius (Zé).

Ao pessoal do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, em especial a Luciana Vizzoto, Lorena, Elenilson e Luiz Keng, por toda ajuda, atenção e amizade.

Aos meus pais Gilson Marinho Lima e Maria Milza Castro Lima, pelo incentivo constante, compreensão e, sobretudo pelo amor.

Aos meus irmãos: Vanessa de Castro Lima Campos, Gilson Marinho de Lima Júnior e Igor Marinho de Castro Lima por todo o amor compartilhado durante toda a nossa vida;

Aos meus avós: “vó Neó”, “vô Zito” (*In memorian*), “vó Dezinha” e “vô Traja” (*in memorian*) pelo amor sempre necessário.

Aos meus amigos “baianos” pelo incentivo constante e por toda a amizade. Sarah, Weskley, Carlos, Lila, Tata, Gabriel, Lia e Rosângela.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	deslocamento químico
<i>d</i>	diâmetro
$\lambda$	comprimento de onda
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
APG	angiosperm phylogeny group
BDA	batata-dextrose-ágar
BOD	biological oxygen demand
BSA	albumina de sangue bovino
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	correlation spectroscopy
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
DCM	diclorometano
DEPT	distortionless enhancement polarization transfer
DTNB	ácido-5,5- di-tio-bis-(2-nitrobenzóico)
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>ddd</i>	duplo duplo duplete
DAD	detector de arranjos de diodos
DC	dicroísmo circular
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
EC	efeito cotton
EI	Impacto eletrônico
ESI	ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
Hex	hexano
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IACHÉ	Inibidor(res) da acetilcolinesterase
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>M</i> <sup>+</sup>	pico do íon molecular
[ <i>M</i> + <i>H</i> <sup>+</sup> ]	pico do íon pseudo-molecular (ionização no modo positivo)
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
MPC	mancha preta dos citros
<i>g</i> -NOESY	gradiente nuclear overhauser enhancement spectroscopy
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
MHz	mega-hertz

<i>m</i>	multipleto
m/z	relação massa/carga
Pyr-d <sub>5</sub>	piridina deuterada
RDA	Retro Diels-Alder
SAM	adenosil metionina
<i>s</i>	simpleto
<i>s/</i>	simpleto largo
<i>t</i>	tripleto
TOF	time of flight
UV-Vis	ultravioleta-visível
WCA	Fase acetato de etila do caule de <i>W. brachypetala</i>
WCD	Fase diclorometano do caule de <i>W. brachypetala</i>
WCH	Fase hexânica do caule de <i>W. brachypetala</i>
WRA	Fase acetato de etila da raiz de <i>W. brachypetala</i>
WRD	Fase diclorometano da raiz de <i>W. brachypetala</i>
WRH	Fase hexânica da raiz de <i>W. brachypetala</i>

## LISTA DE FIGURAS

### Parte 1

<b>FIGURA</b>	<b>Pág.</b>
FIGURA 1. Estrutura básica dos alcalóides ciclopeptídicos	04
FIGURA 2. Formação do núcleo 4-quinolona via antranil-CoA e malonil-CoA (adaptado de DEWICK, p.169, 2007)	08
FIGURA 3. Proposta de biogênese da melochinona por Kapadiae colaboradores, adaptado de (KAPADIA <i>et. al.</i> ; 1975)	09
FIGURA 4. Biogênese da antidesmona (adaptado de BRINGMANN <i>et. al.</i> ; 2000)	10
FIGURA 5. Foto de <i>W. brachypetala</i> Turcz	18
FIGURA 6a. Fluxograma de obtenção das fases orgânicas dos extratos etanólicos	21
FIGURA 6b. Cromatograma de íons totais selecionados da fase WCH	50
FIGURA 6c. Cromatograma de íons totais selecionados da fase WCD	52
FIGURA 7. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	64
FIGURA 8. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A1 $\delta$ 1,9 – 4,2	65
FIGURA 9. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A1 $\delta$ 0,3 – 2,4	65
FIGURA 10. Mapa de Correlações do HSQC de A1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	66
FIGURA 11. Mapa de contorno do espectro de COSY de A1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz, $\delta$ 0,5 – 4,5)	67
FIGURA 12. Mapa de correlações do HMBC de A1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	70
FIGURA 13. Estruturas propostas para o alcaloide antidesmona	71
FIGURA 14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (BB) de A1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)	71
FIGURA 15. Espectro de Massas de A1 (ESI; modo positivo)	73
FIGURA 16. Propostas de fragmentações para a antidesmona (A1)	73
FIGURA 17. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A19 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	74
FIGURA 18. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A19 (região de hidrogênios aromáticos)	75
FIGURA 19. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A19 ( $\delta$ 0,8 – 2,8)	75
FIGURA 20. Mapa de correlações do HSQC de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	77
FIGURA 21. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	78
FIGURA 22. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A19 ( $\delta$ 0,6 – 3,3)	78
FIGURA 23. Mapa de correlações do HMBC de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	80
FIGURA 24. Mapa de correlações do HMBC de A19 ( $\delta_c$ 125 – 205)	81
FIGURA 25. Mapa de correlações do HMBC de A19 ( $\delta_c$ 10 – 40)	81
FIGURA 26. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (BB) de A19( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)	82
FIGURA 27. Espectro de DEPT 135° de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)	83



FIGURA 28. Espectro de massas de A19 (ESI, modo positivo)	84
FIGURA 29. Espectro de massas de alta resolução de A19 (ESI, modo positivo)	85
FIGURA 30. Propostas de fragmentação para A19	85
FIGURA 31. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A7 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	87
FIGURA 32. Ampliação de parte do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A7	88
FIGURA 33. Espectro de Massas (EI, 70 e $^-$ V) de A7	88
FIGURA 34. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	90
FIGURA 35. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A3 ( $\delta$ 0 – 4,5)	90
FIGURA 36. Mapa de correlações do HSQC de A3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	92
FIGURA 37. Mapa de correlações do HSQC de A3 ( $\delta_{\text{C}}$ 10 – 80)	92
FIGURA 38. Mapa de correlações doHMBC de A3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	93
FIGURA 39. Espectro de massas de A3 (EI, 70 e $^-$ V)	94
FIGURA 40. Principais fragmentações de A3	94
FIGURA 41. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A2 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	96
FIGURA 42. Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A2	97
FIGURA 43. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A2 ( $\delta$ 0,7 – 3,2)	97
FIGURA 44. Mapa de correlações do HSQC de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	99
FIGURA 45. Mapa de correlações doHSQC de A2 ( $\delta$ 0,8 – 3,2)	100
FIGURA 46. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	100
FIGURA 47. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A2 ( $\delta$ 0 – 4,0)	101
FIGURA 48. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	102
FIGURA 49. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_{\text{H}}$ 6,90 – 7,65)	102
FIGURA 50. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_{\text{C}}$ 10 - 40)	103
FIGURA 51. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_{\text{C}}$ 125 – 175)	103
FIGURA 52. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (BB) de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)	104
FIGURA 53. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de A2 ( $\delta$ 5 – 70)	104
FIGURA 54. Espectro de massas de A2 (ESI, modo positivo)	105
FIGURA 55. Espectro de massas de alta resolução de A2 (ESI, modo positivo)	106
FIGURA 56. Propostas de fragmentação para A2	106
FIGURA 57. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)*	108
FIGURA 58. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A6 ( $\delta$ 6,75 – 7,55)	109
FIGURA 59. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A6 ( $\delta$ 1,20 – 3,30)	109
FIGURA 60. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	111
FIGURA 61. Mapa de correlações de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de A6 ( $\delta$ 0,8 – 3,4)	111
FIGURA 62. Mapa de correlações do HSQC de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	112
FIGURA 63. Mapa de correlações do HSQC de A6 ( $\delta_{\text{H}}$ 0,7 – 3,3; $\delta_{\text{C}}$ 9 – 39)	112
FIGURA 64. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	114
FIGURA 65. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\delta_{\text{H}}$ 6,7 – 7,6; $\delta_{\text{C}}$ 20 –	114

160)	
FIGURA 66. Mapa de correlações doHMBC de A6 ( $\delta_H$ 0,0 - 4,0; $\delta_C$ 5,0 – 65,0)	115
FIGURA 67. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\delta_H$ 1,2 - 4,0; $\delta_C$ 125 – 160)	115
FIGURA 68. Espectro de RMN de $^{13}C$ de A6 (BB) ( $CDCl_3$ ; 100 MHz)	116
FIGURA 69. Espectro de Massas de A6 (ESI, modo positivo)	118
FIGURA 70. Propostas de fragmentação para o alcaloide A6	118
FIGURA 71. Espectro de massas de alta resolução de A6 (ESI, modo positivo).	120
FIGURA 72. Espectro de RMN de $^1H$ de A5 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	121
FIGURA 73. Espectro de RMN de $^1H$ de A5 com integração dos sinais	122
FIGURA 74. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A5 ( $\delta$ 0,8 – 4,0)	122
FIGURA 75. Espectro de RMN de $^{13}C$ (BB) de A5 ( $CDCl_3$ ; 100 MHz)	124
FIGURA 76. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A5 ( $\delta$ 114 – 150)	124
FIGURA 77. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A5 ( $\delta$ 10 – 37)	125
FIGURA 78. Espectro de massas de A5 (ESI, modo positivo)	125
FIGURA 79. Espectro de massas de alta resolução de A5 (ESI, modo positivo)	126
FIGURA 80. Propostas de fragmentação para A5	126
FIGURA 81. Espectro de RMN de $^1H$ de A20 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	128
FIGURA 82. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A20 ( $\delta$ 2,3 – 4,0)	129
FIGURA 83. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A20 ( $\delta$ 0,8 – 2,5)	129
FIGURA 84. Mapa de correlações doHSQC de A20 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	131
FIGURA 85. Espectro de massas de A20 (ESI, modo positivo)	132
FIGURA 86. Propostas de fragmentação para o alcaloide A20	132
FIGURA 87. Espectro de massas de alta resolução de A20 (ESI, modo positivo)	133
FIGURA 88. Espectro de RMN de $^1H$ de A4. ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	135
FIGURA 89. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A4 ( $\delta$ 0,0 – 5,0)	136
FIGURA 90. Espectro de massas de A4 (ESI, modo positivo)	136
FIGURA 91. Propostas de fragmentação para A4	137
FIGURA 92 Espectro de RMN de $^1H$ de A22 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	140
FIGURA 93 Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A22 ( $\delta$ 0,5 – 3,3)	140
FIGURA 94 Espectro de massas de A22 (ESI, modo positivo)	141
FIGURA 95 Proposta de fragmentação de A22.	142
FIGURA 96. Espectro de RMN de $^1H$ de A21 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	144
FIGURA 97. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A21 ( $\delta$ 3,1 – 4,9)	144
FIGURA 98. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A21 ( $\delta$ 0,7 – 3,2)	145
FIGURA 99. Mapa de correlações de $^1H$ x $^1H$ COSY de A21 ( $\delta$ 0,6 – 5,0)	145
FIGURA 100. Mapa de correlações do HSQC de A21 ( $CDCl_3$ ; 400	146

MHz; $\delta_{\text{H}}$ 0,4 – 5,4; $\delta_{\text{C}}$ 0 – 135)	
FIGURA 101. Mapa de correlações do HMBC de A21 (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz; $\delta_{\text{H}}$ 0,2 – 4,8; $\delta_{\text{C}}$ 0 – 180)	148
FIGURA 102. Espectro de massas de A21 (ESI, modo positivo)	149
FIGURA 103. Propostas de fragmentação para A21	149
FIGURA 104. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A16 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	152
FIGURA 105. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A16 ( $\delta$ 6,4 – 7,6)	152
FIGURA 106. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A16 ( $\delta$ 4,50 – 5,40)	153
FIGURA 107. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A16 ( $\delta$ 1,70 – 4,10)	153
FIGURA 108. Mapa de correlações de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY de A16 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	155
FIGURA 109. Mapa de correlações de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY de A16 ( $\delta$ 6,3 – 7,7)	155
FIGURA 110. Mapa de correlações de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY de A16 ( $\delta$ 1,5 – 5,2)	156
FIGURA 111. Mapa de correlações do HSQC de A16 (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz)	156
FIGURA 112. Mapa de correlações do HSQC de A16 (CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{H}}$ 4,5-7,8; $\delta_{\text{C}}$ 75-135)	157
FIGURA 113. Mapa de correlações do HSQC de A16 (CDCl <sub>3</sub> ; $\delta_{\text{H}}$ 1,0-4,0; $\delta_{\text{C}}$ 10-65)	157
FIGURA 114. Mapa de correlações do HMBC de A16 (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz)	159
FIGURA 115. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_{\text{H}}$ 6,3-7,8; $\delta_{\text{C}}$ 20-180)	160
FIGURA 116. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_{\text{H}}$ 6,7-7,6; $\delta_{\text{C}}$ 110-165)	160
FIGURA 117. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_{\text{H}}$ 4,6-5,2; $\delta_{\text{C}}$ 35-135)	161
FIGURA 118. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_{\text{H}}$ 1,5-5,3; $\delta_{\text{C}}$ 20-160)	161
FIGURA 119. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (BB) de A16 (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	162
FIGURA 120. Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup> C de A16 ( $\delta$ 95 – 175)	162
FIGURA 121. Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup> C de A16 ( $\delta$ 14 – 81)	163
FIGURA 122. Espectro de massas de A16 (ESI, modo positivo)	163
FIGURA 123. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A11 (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz)	167
FIGURA 124. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A11 ( $\delta$ 6,2 – 7,6)	167
FIGURA 125. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A11 ( $\delta$ 4,3 – 5,6)	168
FIGURA 126. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A11 ( $\delta$ 3,4 – 4,4)	168
FIGURA 127. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A11 ( $\delta$ 1,7 – 2,8)	169
FIGURA 128. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (BB) de A11 (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz)	169
FIGURA 129. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A14 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	172
FIGURA 130. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A14 ( $\delta$ 6,0 – 7,9)	172
FIGURA 131. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A14 ( $\delta$ 1,6 – 5,5)	173
FIGURA 132. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A17 (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz, 25°C)	175
FIGURA 133. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A17 ( $\delta$ 6,5 -11,5)	176
FIGURA 134. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A17 (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz, 70°C)	177
FIGURA 135. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de A17 a 70°C ( $\delta$ 6,5 –	177

7,4)	
FIGURA 136. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A17 a $70^\circ\text{C}$ ( $\delta$ 3,4 – 5,6)	178
FIGURA 137. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A17 a $70^\circ\text{C}$ ( $\delta$ 0,7 – 2,4)	178
FIGURA 138. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A17 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, $85^\circ\text{C}$ )	179
FIGURA 139. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A17 a $85^\circ\text{C}$ ( $\delta$ 6,6 – 7,4)	179
FIGURA 140. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A17 a $85^\circ\text{C}$ ( $\delta$ 1,1 – 2,2)	180
FIGURA 141. Mapa de correlações de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY de A17 (400 MHz, DMSO- $d_6$ )	181
FIGURA 142. Mapa de correlações de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY de A17 ( $\delta$ 1,2 – 6,6)	182
FIGURA 143. Mapa de correlações do HSQC de A17 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	182
FIGURA 144. Mapa de correlações do HSQC de A17 ( $\delta_{\text{H}}$ 6,2 – 7,7; $\delta_{\text{C}}$ 70 – 130)	183
FIGURA 145. Mapa de correlações do HSQC de A17 ( $\delta_{\text{H}}$ 1,2 – 3,8; $\delta_{\text{C}}$ 10 – 60)	183
FIGURA 146. Espectro de massas de A17 (ESI, modo positivo)	185
FIGURA 147. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (BB) de A17 (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)	185
FIGURA 148. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de A17 ( $\delta_{\text{C}}$ 85 – 175)	186
FIGURA 149. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de A17 ( $\delta_{\text{C}}$ 10 – 78)	186
FIGURA 150. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A15 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)	190
FIGURA 151. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A15 ( $\delta$ 6,5 – 7,4)	190
FIGURA 152. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A15 ( $\delta$ 1,0 – 5,0)	191
FIGURA 153. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (BB) de A15 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)	191
FIGURA 154. Espectro de massas de alta resolução de A15 (ESI, modo negativo)	192
FIGURA 155. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A12 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	194
FIGURA 156. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A12 ( $\delta$ 6,3 – 7,7)	195
FIGURA 157. Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de A12 ( $\delta$ 1,2 – 4,1)	195
FIGURA 158. Mapa de correlações de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY de A12 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	196
FIGURA 159. Mapa de correlações de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY de A12 ( $\delta$ 5,8 – 7,8)	197
FIGURA 160. Mapa de correlações de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY de A12 ( $\delta$ 0,5 – 5,7)	197
FIGURA 161. Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	198
FIGURA 162. Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\delta_{\text{H}}$ 5,0 – 7,8; $\delta_{\text{C}}$ 72 – 140)	199
FIGURA 163. Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\delta_{\text{H}}$ 0,8 – 2,5; $\delta_{\text{C}}$ 10 – 40)	199
FIGURA 164. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)	201

FIGURA 165. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$ 6,3 – 7,7; $\delta_C$ 15 – 175)	201
FIGURA 166. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$ 6,3 – 7,7; $\delta_C$ 10 – 90)	202
FIGURA 167. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$ 1,5 – 5,2; $\delta_C$ 10 – 180)	202
FIGURA 168. Espectro de RMN de $^{13}C$ (BB) de A12 ( $CDCl_3$ , 100 MHz)	203
FIGURA 169. Espectro de massas de alta resolução de A12 (ESI, modo negativo)	203
FIGURA 170. Espectro de RMN de $^1H$ de A13 ( $CDCl_3$ , 400 MHz)	205
FIGURA 171. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A13 ( $\delta$ 6,3 – 8,4)	206
FIGURA 172. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A13 ( $\delta$ 6,95 – 7,65)	206
FIGURA 173. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A13 ( $\delta$ 0,8 – 4,1)	207
FIGURA 174. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A13 ( $\delta$ 0,8 – 2,2)	207
FIGURA 175. Mapa de correlações do HSQC de A13 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	209
FIGURA 176. Mapa de correlações do HSQC de A13 ( $\delta_H$ 6,2 – 7,8; $\delta_C$ 75 – 133)	209
FIGURA 177. Mapa de correlações do HSQC de A13 ( $\delta_H$ 0,8 – 4,1; $\delta_C$ 12 – 62)	210
FIGURA 178. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A13 ( $CDCl_3$ , 400 MHz)	210
FIGURA 179. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A13 ( $\delta$ 6,8 – 7,7)	211
FIGURA 180. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A13 ( $\delta$ 0,5 – 6,7)	211
FIGURA 181. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A13 ( $\delta$ 0,6 – 2,5)	212
FIGURA 182. Mapa de correlações do HMBC de A13 ( $CDCl_3$ ; 400 MHz)	213
FIGURA 183. Mapa de correlações do HMBC de A13 ( $\delta_H$ 6,8 – 7,7; $\delta_C$ 73 – 148)	214
FIGURA 184. Mapa de correlações do HMBC de A13 ( $\delta_H$ 1,9 – 4,0; $\delta_C$ 83 – 152)	214
FIGURA 185. Espectro de RMN de $^{13}C$ (BB) de A13 ( $CDCl_3$ , 100 MHz)	215
FIGURA 186. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A13 ( $\delta$ 110 – 160)	216
FIGURA 187. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A13 ( $\delta$ 10 – 95)	216
FIGURA 188. Espectro de massas de A13 (ESI, modo positivo)	217
FIGURA 189. Espectro de massas de alta resolução de A13 (ESI, modo positivo)	218
FIGURA 190. Espectro de RMN de $^1H$ de A18 ( $DMSO-d_6$ ; 400 MHz)	220
FIGURA 191. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A18 ( $\delta$ 7,20 – 7,85)	221
FIGURA 192. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A18 ( $\delta$ 4,0 – 6,1)	221
FIGURA 193. Ampliação do espectro de RMN de $^1H$ de A18 ( $\delta$ 0,5 – 4,0)	222
FIGURA 194. Mapa de correlações do HSQC de A18 ( $DMSO-d_6$ ; 400 MHz)	223
FIGURA 195. Mapa de correlações do HSQC de A18 ( $\delta_H$ 6,0 - 7,8; $\delta_C$ 77 - 223)	223

133)	
FIGURA 196. Mapa de correlações do HSQC de A18 ( $\delta_H$ 0,5 – 4,3; $\delta_C$ 10 - 70)	224
FIGURA 197. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A18 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)	226
FIGURA 198. Mapa de correlações de $^1H \times ^1H$ COSY de A18 ( $\delta_H$ 0,5 – 5,0)	227
FIGURA 199. Mapa de correlações do HMBC de A18 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)	227
FIGURA 200. Mapa de correlações do HMBC de A18 ( $\delta_H$ 6,0 – 7,8; $\delta_C$ 115 – 155)	228
FIGURA 201. Mapa de correlações do HMBC de A18 ( $\delta_H$ 0,5 – 4,0; $\delta_C$ 15 – 160)	228
FIGURA 202. Espectro de <i>g</i> -NOESY de A18 (MeOD, 600 MHz)	230
FIGURA 203. Espectro de RMN de $^{13}C$ (BB) de A18 (MeOD, 100 MHz)	230
FIGURA 204. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A18 ( $\delta$ 115 - 175)	231
FIGURA 205. Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ de A18 ( $\delta$ 10 - 90)	231
FIGURA 206. Espectro de massas de A18 (ESI, modo positivo)	232
FIGURA 207. Espectro de massas de alta resolução de A18 (ESI, modo positivo)	232
FIGURA 208. Estrutura das waltherionas A e B por difração de raios X retirado de GRESSLER et. al.; 2008	234
FIGURA 209. Espectros de dicroísmo circular das waltherionas	235
FIGURA 210. Espectros de dicroísmo circular da waltheriona C	236
FIGURA 211. waltherionas e suas estereoquímicas	237
FIGURA 212. Espectro de Massas de C-1 (EI, 70 e $^-$ V)	263
FIGURA 213. Alcaloides waltheriona A e waltheriantidesmona	265
FIGURA 214. Proposta para a biogênese da waltheriona A	265
FIGURA 215. Possível intermediário 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochinona	266
FIGURA 216. Possível intermediário 13-hidroxi-melochinona	267
FIGURA 217. Cromatograma de íons totais selecionados de WCD	268
FIGURA 218. Espectro de massas referente ao pico 2 (TR = 34,08 min)	269
FIGURA 219. Espectro de massas referente ao pico 3 (TR = 39,29 min)	270
FIGURA 220. Espectro de massas referente ao pico 1 (TR = 32,53 min)	270
FIGURA 221. Proposta de fragmentação de 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochinona	271
FIGURA 222. Espectro de massas Pico 4 (TR = 41,36 min)	272
FIGURA 223. Espectro de massas Pico 5 (TR = 43,00 min)	272
FIGURA 224. Espectro de massas Pico 6 (TR = 50,54 min)	273
FIGURA 225. Espectro de massas pico 7 (TR = 51,51 min)	273
FIGURA 226. Proposta de fragmentação da 13-hidroxi-melochinona	274
FIGURA 227. Espectro de massas referente ao pico 8 (TR = 63,0 min)	275
FIGURA 228. Proposta de fragmentação da melochinona	275

FIGURA 229. Cromatograma de íons totais selecionados de WCH	276
FIGURA 230. Espectro de massas referente ao pico 5 (TR = 41,36 min)	277
FIGURA 231. Espectro de massas referente ao pico 6 (TR = 43,0 min)	278
FIGURA 232. Espectro de massas referente ao pico 7 (TR = 51,61)	280
FIGURA 233. Propostas de fragmentação para waltheriahyeronimona	280
FIGURA 234. Espectro de massas referente ao pico 9 (TR = 56,23 min)	281
FIGURA 235. Propostas de fragmentação para a vanessina	282
FIGURA 236. Espectro de massas referente ao pico 6 (hyeronimona)	282
FIGURA 237. Espectro de massas referente ao pico 8 (brachytelona B)	283
FIGURA 238. Espectro de massas referente ao pico 10 (antidesmona)	283
FIGURA 239. Espectro de massas referente ao pico 11 (brachytelona C)	284
FIGURA 240. Espectro de massas referente ao pico 12 (desóxi-antidesmona)	284
FIGURA 241. Espectro de massas referente ao pico 13 (chamaedrona)	285
FIGURA 242. Espectro de massas referente ao pico 14 (brachytelona A)	285
FIGURA 243. Espectro de massas referente ao pico 15 (metil-hyeronimona)	286
FIGURA 244. Espectro de massas referente ao pico 16 (waltheriantidesmona)	286
FIGURA 245. Espectro de massas referente ao pico 17 (brachytelona D)	287

## Parte 2

<b>FIGURA</b>	<b>Pág.</b>
FIGURA 1. Hidrólise da acetilcolina promovida pela AChE	292
FIGURA 2. Inibidores da AChE disponíveis no mercado farmacêutico	294
FIGURA 3. Alcaloide huperzina A (6)	295
FIGURA 4. Sintomas da MPC	296
FIGURA 5. <i>G. citricarpa</i> e <i>G. mangiferae</i> em meio aveia	297
FIGURA 6. Princípio químico do ensaio de Ellmann	301
FIGURA 7. Esquema do ensaio de inibição da germinação e da formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	303
FIGURA 8. Foto da inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> por fases orgânicas, controle e alcaloide antidesmona (A1)	316
FIGURA 9. Foto da Inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> por controle, waltheriona A, waltheriona B, N-metil-waltheriona A, brachytelona A, waltheriantidesmona e chamaedrona	317
FIGURA 10. Foto da Inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> por controle, brachytelona B, waltheriona D, 10-hidróxi-waltheriona e N-metil-waltheriona B	317

FIGURA 11. Foto da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* pelos 318 alcaloides: A1 (antidesmona), A2 (waltheriantidesmona), A3 (chamaedrona) e A4 (brachytelona A)

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	Pág.
GRÁFICO 1. Porcentagem de inibição da enzima AChE por fases orgânicas de raiz e caule de <i>W. brachypetala</i> (250 µg/ml)	304
GRÁFICO 2. Porcentagem de inibição da enzima AChE por fases orgânicas de raiz e caule de <i>W. brachypetala</i> (125 µg/ml)	305
GRÁFICO 3. Porcentagem de inibição da AChE pelos alcaloides aril-alquil-quinolônicos e alquil-quinolônicos testados (100 µM)	306
GRÁFICO 4. Porcentagem de inibição da AChE pelas waltherionas testadas (100 µM)	307
GRÁFICO 5. Porcentagem de inibição da AChE por alcaloides ciclopeptídicos e cumarino-lignanais (100 µM)	308
GRÁFICO 6. Inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> por WCH, WCD e WCA	309
GRÁFICO 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> por WCA, WCD, WCH e WCE.	310
GRÁFICO 8. Efeito das fases WCA, WCD e WCH sobre a germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	311
GRÁFICO 9. Efeito de alcaloides alquil-quinolônicos e alquil-aril-quinolônicos sobre o crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> na concentração de 100 µg/ml	312
GRÁFICO 10. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos	312
GRÁFICO 11. Porcentagem de inibição da germinação de esporos de <i>G. citricarpa</i> pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos	313
GRÁFICO 12. Porcentagem de inibição da germinação de esporos de <i>G. citricarpa</i> pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos	313
GRÁFICO 13. Efeito das waltherionas sobre o crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> na concentração de 100 µg/ml	314
GRÁFICO 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> pelas waltherionas	315
GRÁFICO 15. Porcentagem de inibição da germinação de esporos de <i>G. citricarpa</i> pelas waltherionas	316
GRÁFICO 17. Porcentagem de inibição da formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i> pelas waltherionas	320



GRÁFICO 18. Comparação da inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> dos alcaloides com o carbendazin	320
---	-----

## LISTA DE QUADROS

### Parte 1

QUADRO	Pág.
QUADRO 1. Alcaloides ciclopeptídicos 1-6	05
QUADRO 2. Alcaloides ciclopeptídicos 7-13	06
QUADRO 3. Estruturas dos alcaloides ciclopeptídicos 14-16	07
QUADRO 4. Alcalóides quinolônicos de espécies de Rutaceae	07
QUADRO 5. Estrutura dos alcaloides quinolônicos 17-21	09
QUADRO 6. Estruturas dos alcaloides 23-25	12
QUADRO 7. Estruturas dos alcaloides 26 e 27	12
QUADRO 8. Estruturas dos alcaloides 28-32	13
QUADRO 9. Estruturas dos fenólicos de 33 a 44	14
QUADRO 10. Estruturas dos flavonoides de 45 a 52	15
QUADRO 11. Estruturas dos metabólitos secundários de 53 a 64	16
QUADRO 12. Alcaloides identificados por HPLC-MS/MS da fase WCH	51
QUADRO 13. Alcaloides identificados por HPLC-MS/MS da fase WCD	52

### Parte 2

QUADRO 1. Valores de IC <sub>50</sub> para os alcaloides com atividade IChE ≥ 80%	306
QUADRO 2. Valores de IC <sub>50</sub> para as waltherionas com atividade IChE ≥ 80%	307
QUADRO 3. Valores de IC <sub>50</sub> dos alcaloides antidesmona, waltheriantidesmona, chamaedrona e brachytelona A sobre a inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i>	319
QUADRO 4. Valores de IC <sub>50</sub> dos alcaloides antidesmona, waltheriantidesmona, chamaedrona e brachytelona A sobre a inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	319

## LISTA DE TABELAS

TABELA	PAG
TABELA 1. Massas e rendimentos dos extratos de raiz e caule de <i>W. brachypetala</i>	20
TABELA 2. Frações obtidas da CC da fase WRH	23
TABELA 3. Sub-frações obtidas da CC de WRH-55	24
TABELA 4. Sub-frações obtidas da CC de WRH-5511	25
TABELA 5. Sub-frações obtidas da CC de WRH-49	28
TABELA 6. Sub-frações obtidas da CC de WRD	29
TABELA 7. Subfrações obtidas da CC de WRD-11b	30
TABELA 8. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b16	31
TABELA 9. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b17	32
TABELA 10. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b18	33
TABELA 11. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b19	35
TABELA 12. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b20	35
TABELA 13. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b21	36
TABELA 14. Frações obtidas da CC de WCH	39
TABELA 15. Sub-frações obtidas da CC de WCH-42	40
TABELA 16: Sub-frações obtidas da CC de WCH-44	42
TABELA 17. Frações obtidas da CC de WCD	43
TABELA 18. Sub-frações obtidas da CC de WCD-13	44
TABELA 19. Sub-frações obtidas da CC de WCD-15	45
TABELA 20. Sub-frações obtidas da CC de WCD-1534	46
TABELA 21. Sub-frações obtidas da CC de WCD-09	47
TABELA 22. Sistema gradiente de eluição em CLAE-DAD	49
TABELA 23. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do alcaloide A1	72
TABELA 24. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A19	86
TABELA 25. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A3	95
TABELA 26. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A2	107
TABELA 27. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A6	119
TABELA 28. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A5	127
TABELA 29. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A20	134
TABELA 30. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A4	138
TABELA 31. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A22	142
TABELA 32. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A21	150
TABELA 33. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A16	165
TABELA 34. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A11	170
TABELA 35. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A14	174

TABELA 36. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A17	188
TABELA 37. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A15	193
TABELA 38. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A12	204
TABELA 39. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A13	219
TABELA 40. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de A18	233
TABELA 41. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A8	240
TABELA 42. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A9	242
TABELA 43. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de A9	243
TABELA 44. Dados de RMN de $^1\text{H}$ de A10	245
TABELA 45. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de A11	246
TABELA 46. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de F1	248
TABELA 47. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de C1	250
TABELA 48. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de C2	252
TABELA 49. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de Q1	254
TABELA 50. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de CL1	260
TABELA 51. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de CL2	262



## RESUMO

**ESTUDO DOS ALCALOIDES QUINOLÔNICOS DE *Waltheria brachypetala* TURCZ. (MALVACEAE): ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, BIOGÊNESE E ATIVIDADES FUNGITÓXICA A ANTICOLINESTERASE**

*Waltheria brachypetala* Turcz (Malvaceae) é uma planta de ocorrência endêmica do nordeste brasileiro, sendo amplamente utilizada na medicina tradicional como agente anti-fúngico, anti-inflamatório, bem como para o tratamento de bronquite, laringite e distúrbios do sistema nervoso central. Neste trabalho de doutoramento objetivou-se a investigação dos alcaloides quinolônicos produzidos por esta planta. A partir de métodos cromatográficos usuais de purificação, foram isolados das fases hexânica e diclorometano do caule da raiz dezenove alcaloides quinolônicos, sendo dez anteriormente relatados na literatura: antidesmona (1), N-metil-antidesmona (2), desóxi-antidesmona (3), chamaedrona (4), hyeronimona (5), metil-hyeronimona (6), waltherionas A (7), e B (8), N-metil-waltheriona A (9), 4-O-metil-waltheriona A (10) e nove inéditos: waltheriantidesmona (11), brachytelonas A (12), B (13), C (14), D (15), waltherionas C (16) e D (17), N-metil-waltheriona B (18) e 10-hidróxi-waltheriona D (19), além de alcaloides ciclopeptídicos de ocorrência comum na tribo Hermannieae. Foram isoladas ainda duas cumarino-lignananas inéditas no gênero *Waltheria* cleomicina A (20) e acetilcleomicina A (21), além de outros metabólitos de ocorrência comum em plantas. As fases em hexano e diclorometano do caule foram também estudados via HPLC-UV-MS/MS possibilitando a identificação de possíveis intermediários de biogênese das waltherionas: 9,10-epóxi-10-hidróxi-melochinona (22), 13-hidróxi-melochinona (23) emelochinona (23), além da vanessina (28) e waltheriahieronimona (29), este último não reportado ainda na literatura. O isolamento destes alcaloides quinolônicos a partir de *W. brachypetala* confirma a importância destes como marcadores quimiossistemáticos da tribo Hermannieae e reforça a hipótese por quimiossistemática de semelhança evolutiva entre esta tribo e a tribo Antidesmeae (Phyllantaceae), bem como da semelhança da rota de biogênese dos alcaloides derivados da antidesmona com aqueles derivados da melochinona. Os alcaloides 11, 12 e 13 representam uma nova classe de alcaloides aril-alquil-quinolônicos que está sendo reportada pela primeira vez. O potencial biológico de *W. brachypetala* foi avaliado frente à inibição da enzima acetilcolinesterase e com relação a atividade fungitóxica sobre o fitopatógeno de citros *Guignardia citricarpa*. Todos os alcaloides quinolônicos apresentaram resultados relevantes com relação à inibição da AChE, destacando-se os aril-alquil-quinolonas: waltheriantidesmona, brachytelona A e brachytelona B, que inibiram a enzima em 93%, 88,04% e 91,05%, respectivamente, na concentração de 100 µM e com baixos valores de IC<sub>50</sub>. Os alcaloides antidesmona, waltheriantidesmona, chamaedrona, brachytelona A e brachytelona B, apresentaram excelente atividade fungitóxica sobre *G. citricarpa*, tanto com relação à inibição do crescimento micelial, quanto da inibição da germinação de esporos e da formação de apressórios, apresentando baixos valores de IC<sub>50</sub>. Destaca-se os alcaloides brachytelona A e w-antidesmona que apresentaram-se mais potentes que o fungicida comercial carbendazin na concentração de 5 µg/ml, sendo assim potenciais candidatos ao controle da Mancha Preta do Citros.

**Palavras-chave:** *Waltheria*, Hermannieae, alcaloides quinolônicos, acetilcolinesterase, *Guignardia citricarpa*.

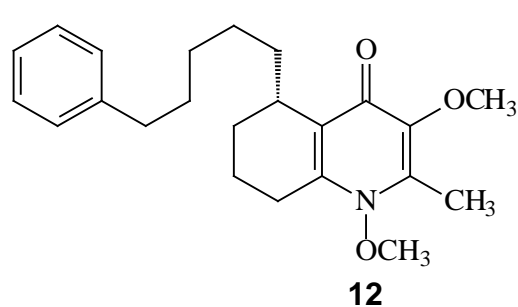
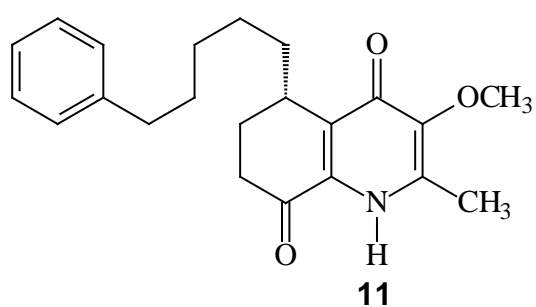
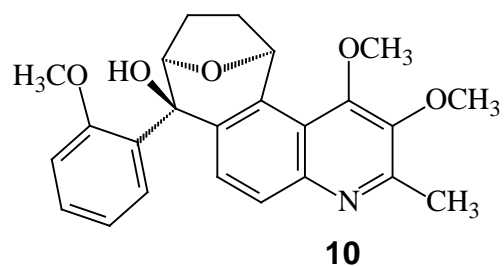
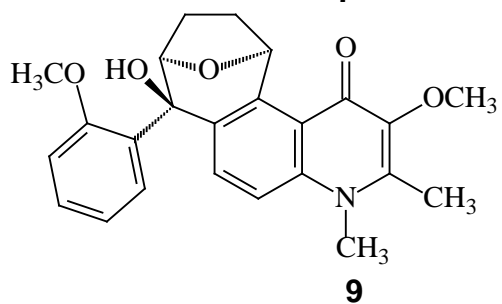
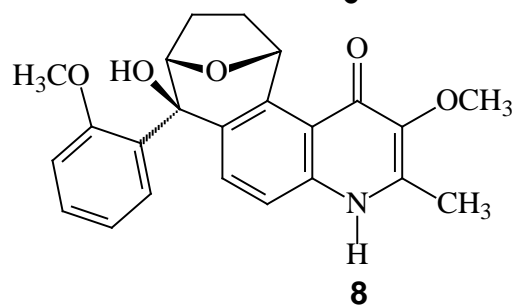
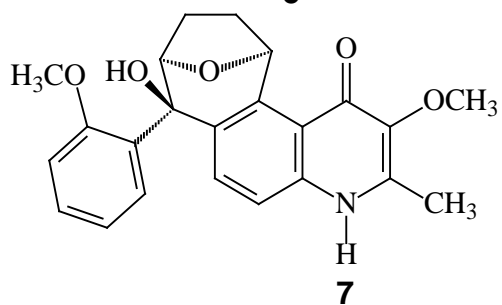
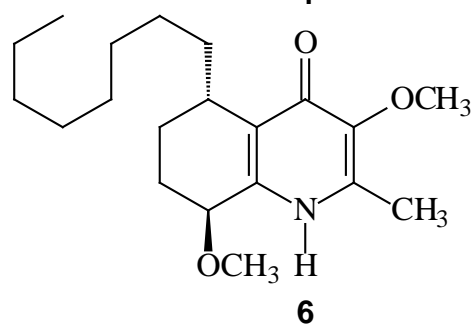
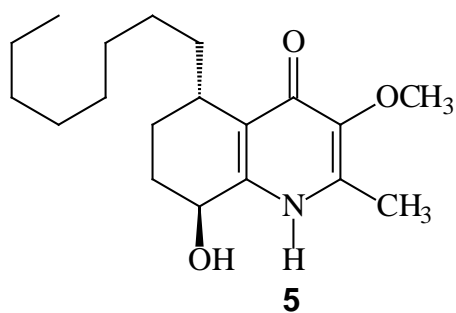
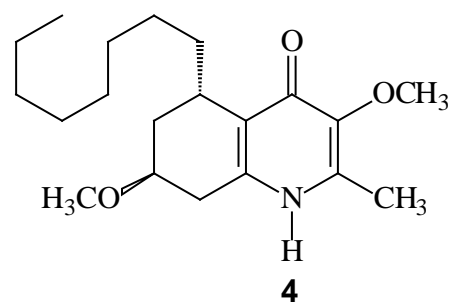
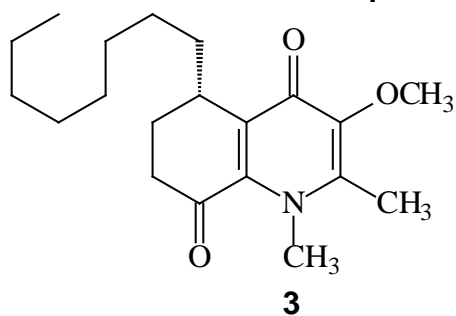
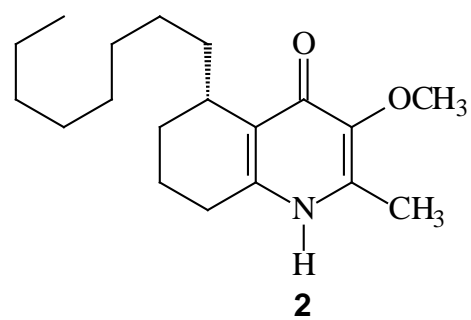
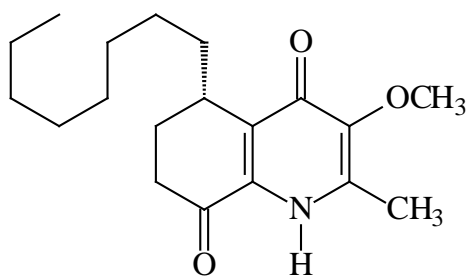


## ABSTRACT

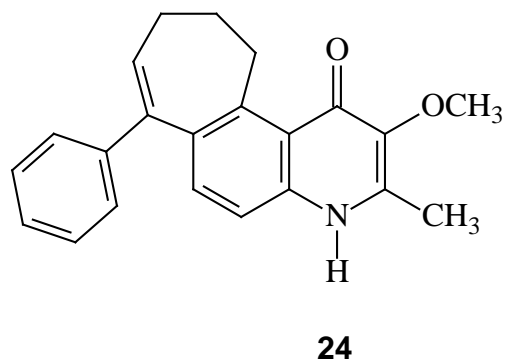
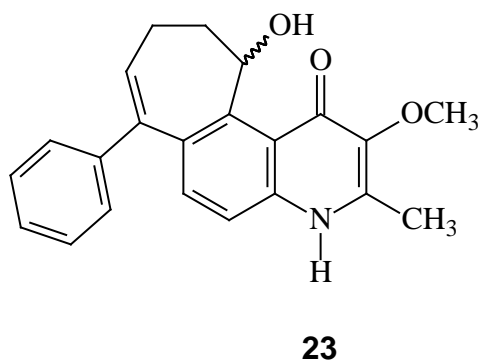
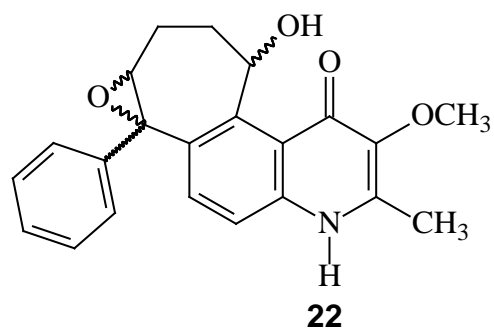
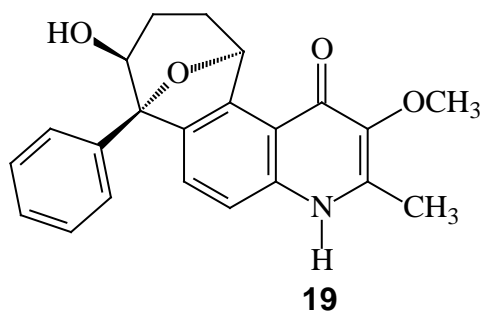
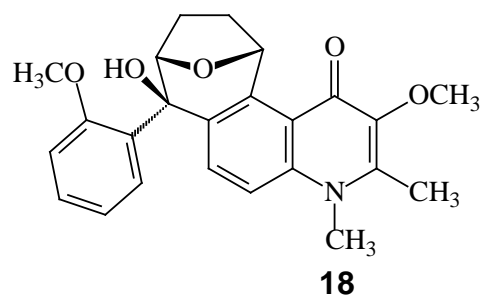
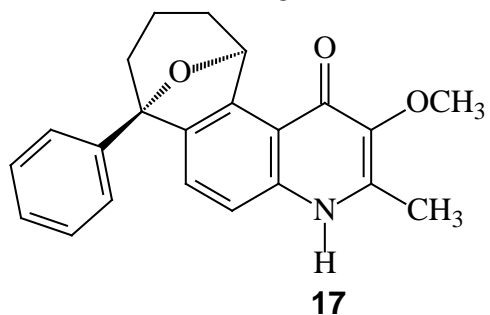
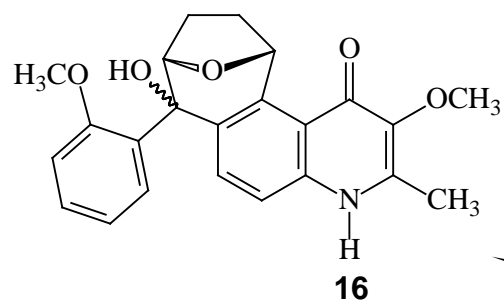
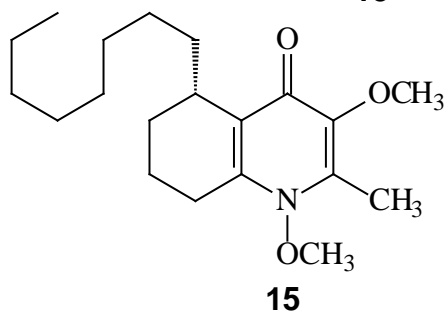
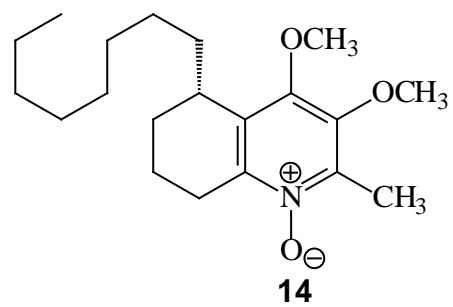
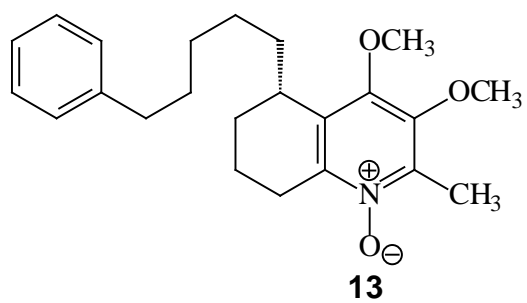
### STUDY OF QUINOLONE ALKALOIDS FROM *Waltheria brachypetala* TURCZ. (MALVACEAE): ISOLATION, STRUCTURAL ELUCIDATION, BIOGENESIS AND FUNGITOXICAL AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES

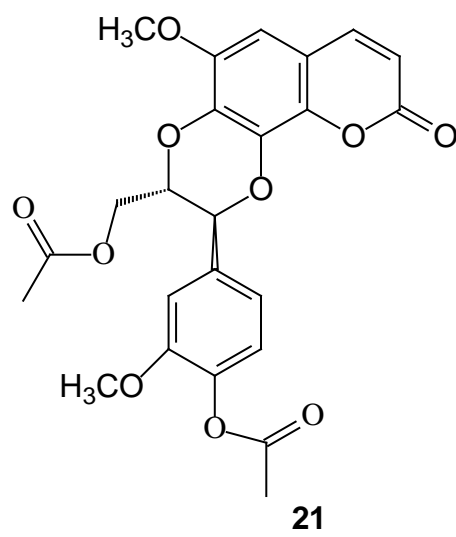
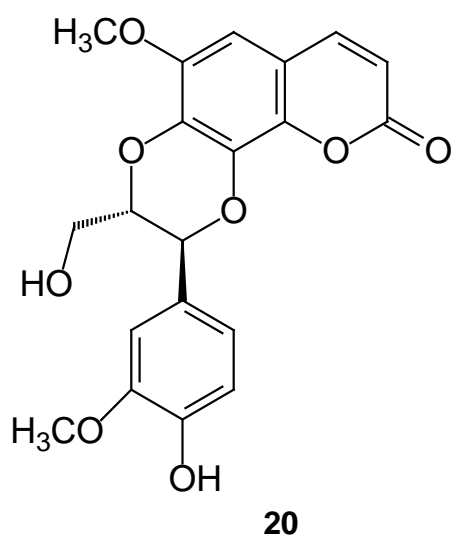
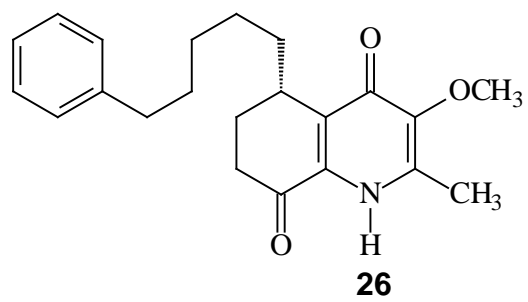
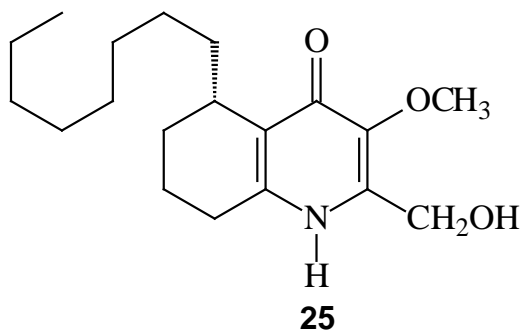
*Waltheria brachypetala* Turcz (Malvaceae) is an endemic medicinal plant from Brazilian northeast. This plant is commonly used on folk medicine as antifungal, antiinflammatory and to treatment of bronchitis and central nervous system disturbs. The aim of this work was the investigation of quinolone alkaloids produced by this plant. Through usual chromatographic methods of purification were isolated from hexane and dichlorometane phases of roots and bark, nineteen quinolone alkaloids, being ten already reported on literature: antidesmone (1), N-methyl-antidesmone (2), desoxi-antidesmone (3), chamaedrone (4), hyeronimone (5), metil-hyeronimone (6), waltheriones A (7) and B (8), N-methyl-waltherione A (9), 4-O-methyl-waltherione A (10) and nine novel alkaloids: waltheriantidesmone (11), brachytelones A (12), B (13), C (14), D (15), waltheriones C (16) and D (17), N-methyl-waltherione B (18) and 10-hydroxi-waltherione D (19), along with common cyclic peptides to Hermannieae. Were also isolated two coumarinolignans cleomicine A (20) and acetylcleomicine A (21) as new to genus *Waltheria*, and other secondary metabolites common in plants. The hexane and dichloromethane phases of the bark were studied by HPLC-UV-MS/MS to make possible the identification of the probable biogenesis intermediates of the waltheriones: 9,10-epoxy-10-hydroxi-melochinone (22), 13-hydroxi-melochinone (23) e melochinone (24), along with vanessine (25) e waltheriahieronimone (26), being 26 did not yet report on literature. The isolation of that alkaloids from *W. brachypetala* confirms it as potential chemosystematic markers to Hermannieae tribe and it strengthens the hypothesis of chemosystematic to suggest possible evolutive similarity between Hermannieae (Malvaceae) and Antidesmeae (Phyllantaceae), as well as similarity of antidesmone biogenesis pathway with melochinone derivatives biogenesis pathway. The alkaloids 11, 12 and 13 represent a new class of aryl-alkyl-quinolone alkaloids that are being reported by first time in this work. The biological potential of *W. brachypetala* was evaluated on the inhibition of AChE enzyme and fungitoxic assays against the citrus phytopathogen *Guignardia citricarpa*. All quinolone alkaloids tested presented significant activity of inhibition of AChE *in vitro* detaching the aryl-alkyl-quinolone alkaloids: waltheriantidesmone, brachytelone A e brachytelone B, that inhibits AChE in 93%, 88,04% e 91,05%, respectively, on concentration of 100 µM and with low value of IC<sub>50</sub>. The alkaloids antidesmone, w-antidesmone, chamaedrone, brachytelone A and brachytelone B, apresentaram excelente fungitoxic activity against *G. citricarpa*, as much with regard to mycelial growth inhibition as to germination of spores and apressorium formation presenting low value of IC<sub>50</sub>. It detaches that the alkaloids brachytelone A and waltheriantidesmone presented more potente than the commercial fungicide carbendazin at concentration of 5 µg/ml, being thus potential candidates to chemical control of the Black Spot of Citrus.

**Key-words:** *Waltheria*, Hermannieae, quinolone alkaloids, acetylcholinesterase, *Guignardia citricarpa*.









## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE GRÁFICOS	IX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI

**Parte 1: Estudo dos alcaloides quinolônicos de *Waltheria brachypetala* Turcz.: Isolamento, determinação estrutural e biogênese**

<b>1. Revisão da Literatura</b>	02
1.1. A família Malvaceae	02
1.2. A tribo Hermannieae	03
1.3. A Química da Tribo Hermannieae: Metabólitos secundários de <i>Waltheria</i> e <i>Melochia</i>	04
1.3.1. Alcaloides Ciclopeptídicos	04
1.3.2. Alcalóides Quinolônicos (4-quinolonas)	07
1.3.3. Alcalóides isatínicos	13
1.3.4. Flavonóides	13
1.3.5. Outras classes de metabólitos secundários	15
1.3.6. Conclusões parciais e hipóteses acerca do perfil químico dos gêneros <i>Waltheria</i> e <i>Melochia</i>	16
1.4. <i>Waltheria brachypetala</i> Turczaninov (Turcz.)	18
<b>2. Objetivos</b>	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
<b>3. Procedimentos Experimentais</b>	20
3.1. Coleta e identificação do material vegetal	20
3.2. Preparo dos Extratos	20
<b>3.3. Estudo químico da raiz de <i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.</b>	22
<b>3.3.1. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WRH</b>	22
3.3.1.1. Purificação da fração WRH-55	24
3.3.1.2. Purificação da sub-fração WRH-5511	25
3.3.1.3. Purificação da sub-fração WRH551128	26
3.3.1.4. Purificação da sub-fração WRH551130	26
3.3.1.5. Purificação da sub-fração WRH551131	26
3.3.1.6. Purificação da sub-fração WRH551142	26
3.3.1.7. Identificação dos alcaloides da sub-fração WRH551145	26

3.3.1.8. Purificação da sub-fração WRH551148	27
3.3.1.9. Análise e purificação da sub-fração WRH55114812 por CLAE	27
3.3.1.10. Purificação da fração WRH-49	27
3.3.2. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WRD	28
3.3.2.1. Identificação dos alcaloides em mistura nas frações WRD-10 e WRD-11a	30
3.3.2.2. Purificação da fração WRD-11b	30
3.3.2.3. Purificação da sub-fração WRD-11b16	31
3.3.2.4. Análise e purificação da sub-fração WRD-11b-1610 por CLAE	32
3.3.2.5. Purificação da fração WRD-11b17	32
3.3.2.6. Purificação das sub-frações WRD-11b1701a e WRD-11b1701b	33
3.3.2.7. Purificação da sub-fração WRD-11b18	33
3.3.2.8. Purificação da sub-fração WRD-11b1818	34
3.3.2.9. Purificação da sub-fração WRD-11b1824	34
3.3.2.10. Purificação da sub-fração WRD-11b19	34
3.3.2.11. Purificação da sub-fração WRD-11b20	35
3.3.12. Purificação da sub-fração WRD-11b21	36
3.3.2.13. Purificação da sub-fração WRD-11b2112	37
3.3.2.14. Purificação da sub-fração WRD-13	37
3.3.2.14. Purificação da fração WRD-5	37
3.3.2.15. Purificação da fração WRD-8	37
<b>3.4. Estudo químico do caule de <i>Waltheria brachypetala</i> Turcz.</b>	38
<b>3.4.1. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WCH</b>	38
3.4.1.1. Purificação da fração WCH-42	39
3.4.1.2. Purificação da sub-fração WCH-4223	40
3.4.1.2. Purificação da sub-fração WCH-422307	40
3.4.1.3. Purificação da sub-fração WCH-42230725	41
3.4.1.3. Purificação da sub-fração WCH-42230727	41
3.4.1.4. Purificação da fração WCH-44	41
3.4.1.5. Purificação da sub-fração WCH-4412	42
3.4.1.6. Análise e purificação da sub-fração WCH-441214 por CLAE	42
3.5. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WCD	43
3.5.1. Purificação da fração WCD-18	44
3.5.2. Purificação da fração WCD-13	44
3.5.3. Purificação da fração WCD-15	45
3.5.4. Purificação da sub-fração WCD-1528	45
3.5.5. Purificação das sub-frações WCD-152807 e WCD-152808	46
3.5.6. Purificação da sub-fração WCD-1534	46
3.5.7. Purificação da sub-fração WCD-153417	47
3.5.8. Purificação da sub-fração WCD-15341715	47

3.5.9. Purificação da fração WCD-09	47
3.5.10. Purificação da fração WCD-22	48
<b>3.6. Estudo químico do caule de <i>W. brachypetala</i> por HPLC-UV-MS-MS</b>	48
3.6.1. Condições experimentais de análise por HPLC-DAD das fase WCH e WCD.	48
3.6.2. Condições para as análises de MS	49
3.6.3. Análises de HPLC-MS/MS da fase WCH	50
3.6.4 Análises de HPLC-MS/MS da fase WCD	52
<b>3.7. Materiais e métodos</b>	53
3.7.1. Obtenção dos extratos brutos	53
3.7.2. Separações cromatográficas	53
3.7.3. Análises por Cromatografia em Camada Delgada	53
3.7.4. Métodos de determinação estrutural	54
3.7.5. Processamento de espectros	55
<b>3.8. Metabólitos secundários isolados</b>	56
3.8.1. Alcaloides quinolínicos e quinolin-4-onas	56
3.8.2. Ciclopeptídeos	60
3.8.3. Flavonoides e derivado do ácido quínico	61
3.8.4. Triterpenos	61
3.8.5. Cumarino-lignanas e cumarina	62
<b>4. Determinação estrutural das substâncias isoladas</b>	64
<b>4.1. Alcaloides quinolônicos</b>	64
4.1.1. Identificação do alcaloide A1	64
4.1.2. Elucidação estrutural do alcaloide A19	75
4.1.3. Identificação do alcaloide A7	87
4.1.4. Identificação do alcaloide A3	89
4.1.5. Elucidação estrutural do alcaloide A2	96
4.1.6. Elucidação estrutural do alcaloide A6	108
4.1.7. Elucidação estrutural do alcaloide A5	121
4.1.8. Elucidação estrutural do alcaloide A20	128
4.1.9. Identificação do alcaloide A4	135
4.1.10. Identificação do alcaloide A22	139
4.1.11. Identificação do alcaloide A21	143
4.1.12. Identificação do alcaloide A16	151
4.1.13. Identificação do alcaloide A11	166
4.1.14. Identificação do alcaloide A14	171
4.1.15. Identificação do alcaloide A17	175
4.1.16. Elucidação estrutural do alcaloide A15	189
4.1.17. Elucidação estrutural do alcaloide A12	194
4.1.18. Elucidação estrutural do alcaloide A13	205

4.1.19. Elucidação estrutural do alcaloide A18	220
4.1.20. Determinação da configuração absoluta das waltherionas	234
<b>4.2. Alcaloides ciclopeptídicos</b>	238
4.2.1. Identificação do alcaloide ciclopeptídico A8	238
4.2.2. Identificação do alcaloide ciclopeptídico A9	241
4.2.3. Identificação do alcaloide ciclopeptídico A10	243
<b>4.3. Constituintes fenólicos</b>	246
4.3.1. Identificação do flavonóide F1	246
4.3.2. Identificação do Flavan-3-ol C1	249
4.3.3. Identificação do Flavan-3-ol C2	251
4.3.4. Identificação do derivado de ácido quínico Q1	253
<b>4.4. Triterpenos e Esteróides</b>	255
4.4.1. identificação da mistura de triterpenos T1, T2 e T3 e da mistura dos triterpenos T4 e T5;	255
4.4.2. Identificação da mistura de esteroides E1 e E2 e do esteroide E3	256
<b>4.5. Cumarino-lignanas</b>	257
4.5.1. Identificação da cumarino-lignana CL1	257
4.5.2. Identificação da cumarino-lignana CL2	261
<b>4.6. Cumarina</b>	263
4.6.1. Identificação da cumarina C1	263
<b>5. Busca de intermediários de biogênese por HPLC-UV-MS/MS</b>	264
<b>5.1. Identificação dos alcaloides da fase diclorometano por HPLC-MS/MS (ESI, modo positivo)</b>	268
5.1.1. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 1, 2 e 3	268
5.1.2. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 4 - 7	271
5.1.3. Identificação do alcaloide referente ao pico 8	274
<b>5.2. Identificação dos alcaloides da fase hexânica do caule (WCD) por HPLC-MS/MS (ESI, modo positivo)</b>	276
5.2.1. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 1 – 5	277
5.2.2. Identificação dos alcaloides de 6 a 17	279
<b>6. Significância quimiossistemática</b>	288

## Parte 2: Atividades Anticolinesterase e Antifúngica

<b>Parte 2: Atividades Anticolinesterase e Antifúngica</b>	292
<b>1. Revisão da Literatura</b>	292
1.1. A enzima Acetilcolinesterase	292
1.2. O fungo <i>Guignardia citricarpa</i> e a Mancha Preta do Citros (MPC)	295
1.3. Plantas como fonte de agentes antifúngicos	298
<b>2. Objetivos</b>	299
2.1. Objetivo geral	299

2.2. Objetivos específicos	299
<b>3. Procedimentos Experimentais</b>	300
3.1. Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase	300
3.2. Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>Guignardia citricarpa</i>	301
3.3. Ensaio de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios	302
<b>3.4. Materiais e Métodos</b>	303
3.4.1. Materiais e reagentes	303
3.4.2. Equipamentos	303
<b>4. Resultados e Discussões</b>	304
<b>4.1. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)</b>	304
4.1.1. Atividade de inibição da enzima AChE dos extratos de <i>W. brachypetala</i>	304
4.1.2. Atividade de inibição da AChE dos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos	305
4.1.3. Atividade de inibição da AChE das waltherionas	306
4.1.4. Atividade de inibição da AChE de alcaloides ciclopeptídicos e cumarino-lignanais	308
<b>4.2. Atividade fungitóxica dos alcaloides quinolônicos sobre o fungo <i>Guignardia citricarpa</i></b>	309
4.2.1. Efeito das fases obtidas do extrato etanólico do caule de <i>W. brachypetala</i> sobre o crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i>	309
4.2.2. Efeito das fases WCH, WCD e WCA sobre a germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	310
4.1.3. Efeito dos alcaloides alquila-quinolonas e aril-alquila-quinolonas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	311
4.1.4. Efeito das waltherionas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i>	314
4.1.5. Efeito dos alcaloides alquila-quinolonas e aril-alquila-quinolonas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de <i>G. citricarpa</i> em diferentes concentrações: cálculos de IC <sub>50</sub>	318
<b>Considerações Finais</b>	322
<b>Referências</b>	324

## PARTE I

### **Estudo dos alcaloides quinolônicos de *Waltheria brachypetala* Turcz.: Isolamento, determinação estrutural e biogênese**

Este capítulo está dividido em:

- ✓ Revisão da literatura;
- ✓ Procedimentos Experimentais;
- ✓ Objetivos;
- ✓ Resultados e discussões: Identificação e elucidação estrutural, biogênese e Quimiossistemática.



## 1. Revisão da Literatura

### 1.1. A família Malvaceae

*Waltheria brachypetala* Turcz., planta objeto deste trabalho, pertence à família Malvaceae de acordo com a última classificação da APG baseada em dados de análises morfológicas e filogenéticas (KUBITZKI & BAYER *et. al.*, 2003). De acordo com (TAIA, 2009), a classificação desta família tem sido confusa desde a década de 1980, sendo que de acordo com a nova classificação, a grande família Malvaceae *s. l.* corresponde à união de quatro grandes famílias: Malvaceae *s.s.*, Sterculiaceae, Bombacaceae e Tiliaceae, sendo que o gênero *Waltheria* pertencia a ex. família Sterculiaceae.

A família Malvaceae encontra-se dividida em nove sub-famílias, sendo estas: Bombacoideae, Brownlowioideae, Byttnerioideae, Grewioideae, Helicteroideae, Malvoideae, Sterculioideae, Tilioideae e Dombeyoideae, expandindo assim de 119 para 250 gêneros na última classificação (TAIA, 2009). Plantas desta família são caracterizadas por serem ervas, arbustos ou árvores de pequeno porte ocorrendo principalmente nas zonas mais quentes do globo e caracterizando-se pela ocorrência endêmica de determinadas regiões.

Uma vez que as classificações da família Malvaceae têm se baseado apenas em análises morfológicas e filogenéticas, neste trabalho são analisadas as evidências quimiotaxonômicas com base no metabolismo secundário para a classificação do gênero *Waltheria* dentro desta família. Este gênero pertence à tribo Hermannieae da sub-família Byttnerioideae. Esta ainda é subdividida em outras duas tribos: Byttnerieae e Lasiopetalae (PERVEEN *et. al.*, 2004).

A tribo Byttnerieae é pantropical, plantas desta tribo podem ser encontradas principalmente na América do Norte, com exceção de *Abroma augusta* que é encontrada exclusivamente na Austrália. Esta tribo comporta apenas três gêneros: *Byttneria*, *Ayenia* e *Abroma* (gênero monóico) (PERVEEN *et. al.*, 2004).

A tribo Lasiopetaleae é de ocorrência quase exclusiva da Austrália, comportando poucas espécies relatadas em Madagascar, Papua Nova Guiné, ilhas Fiji e Nova Caledônia. Esta tribo comporta quatro gêneros: *Kerandrenia*, *Maxwellia*, *Commersonia* e *Seringea* (PERVEEN *et. al.*, 2004).

Neste trabalho é dada maior ênfase a tribo Hermannieae, que comporta além do gênero *Waltheria*, os gêneros *Melochia*, *Hermannia* e *Dicarpidium*. Enquanto os gêneros *Waltheria* e *Melochia* são quase exclusivos das Américas, sudeste da Ásia e Austrália; o gênero *Hermannia* é quase exclusivo do sul da África, com três espécies encontradas na América do Norte, uma na Austrália e Arábia e poucas em Madagascar, já o gênero *Dicarpidium* é exclusivo da Austrália.

## 1.2. A tribo Hermannieae

Na tribo Hermannieae, plantas dos gêneros *Waltheria* e *Melochia*, possuem características morfológicas bastante semelhantes, sendo muitas vezes difícil a diferenciação entre plantas destes dois gêneros. Segundo (SABA & SANTOS, 2003) durante muitos anos *Waltheria bracteosa* foi confundida com *Melochia spicata*. Entre estes dois gêneros, *Waltheria* têm uma ocorrência mais endêmica e restrita, enquanto que *Melochia* encontra-se mais distribuída pelo globo.

Apesar de o gênero *Waltheria* ser pan-tropical, uma maior diversidade de espécies é verificada nas Américas. A espécie mais difundida no globo é *Waltheria indica* (Ex. *Waltheria americana*) sendo esta encontrada nas Américas, sudeste da Ásia e Austrália. Plantas do gênero *Waltheria* encontram-se desde a costa sul dos Estados Unidos até a Argentina, ocorrendo principalmente no México e no Brasil, onde este gênero é mais diverso, com 22 espécies: *W. indica*, *W. ackermanniana*, *W. albicans*, *W. aspera*, *W. brachypetala*, *W. bracteosa*, *W. carpinifolia*, *W. cinerescens*, *W. communis*, *W. douradinha*, *W. erioclada*, *W. excelsa*, *W. ferruginea*, *W. glazioviana*, *W. macropoda*, *W. maritima*, *W. operculata*, *W. petiolata*, *W. polyantha*, *W. rotundifolia*, *W. selloana* e *W. viscosíssima* (KUBITZKI & BAYER *et al.*, 2003).

Segundo Macedo & Martins (1998), espécies do gênero *Waltheria* são ervas ou arbustos, consideradas como plantas invasoras ou daninhas, devido ao seu pequeno porte e por ocorrerem em margens de estradas, beiradas de cercas, voçorocas e em ambientes não aproveitáveis diretamente, em propriedades rurais e áreas cultiváveis. Nas áreas urbanas frequentemente ocorrem em terrenos baldios e logradouros.

O gênero *Melochia* também é pan-tropical, localizando-se principalmente pelas Américas, mas com grande distribuição no sudeste asiático. Este gênero foi extensivamente revisado por Goldberg (1967) possuindo 54 espécies, sendo também caracterizadas por serem ervas ou arbustos de pequeno porte.

Consultando a base de dados do software *Science finder scholar* (10-03-2012) nenhum estudo químico de espécies dos gêneros *Hermannia* e *Dicarpidium* foi encontrado. Assim, neste trabalho, é dado maior ênfase à revisão de literatura sobre os gêneros *Waltheria* e *Melochia*, principalmente em relação aos metabólitos secundários isolados até o momento, para que futuras considerações a cerca da quimiosistemática da tribo Hermannieae possam ser levantadas e discutidas.

### 1.3. A Química da Tribo *Hermannieae*: Metabólitos secundários de *Waltheria* e *Melochia*

Apesar do grande número de espécies de *Waltheria* e *Melochia*, poucas foram estudadas sobre o ponto de vista químico até o momento. As principais classes de metabólitos secundários relatados para estes dois gêneros são: alcaloides ciclopeptídicos, alcaloides quinolônicos e flavonoides. A ocorrência destes metabólitos em *Waltheria* e *Melochia* neste item foi descrita separadamente e de modo cronológico.

#### 1.3.1. Alcaloides Ciclopeptídicos

Os alcaloides ciclopeptídicos são macrocíclos de 12, 13 ou 14 membros formados a partir da ciclização de unidades de aminoácido via ligação peptídica ou da ciclização de unidades de aminoácido com uma unidade central de estirilamina. Estes alcaloides são encontrados principalmente na família Rhamnaceae, mas também podem ser encontrados em Asteraceae, Celastraceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Pandaceae, Rubiaceae, Malvaceae e Urticaceae (EL-SEEDI *et. al.*, 2007).

Na figura 1, pode-se observar a estrutura básica de um alcaloide ciclopeptídico.

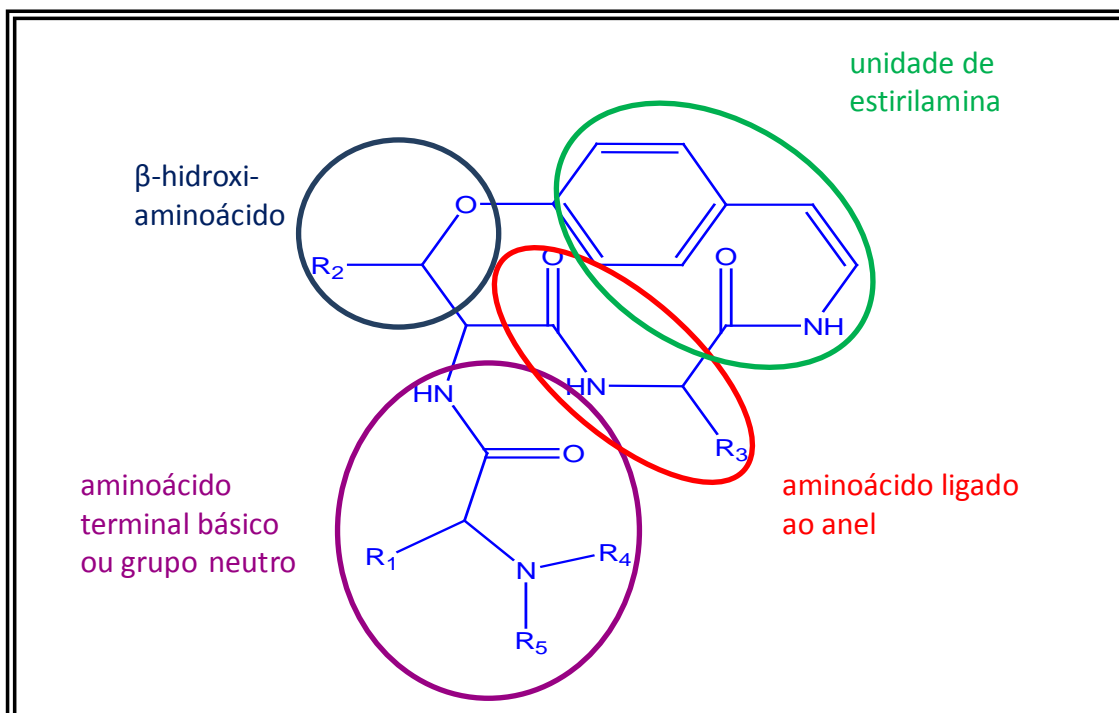
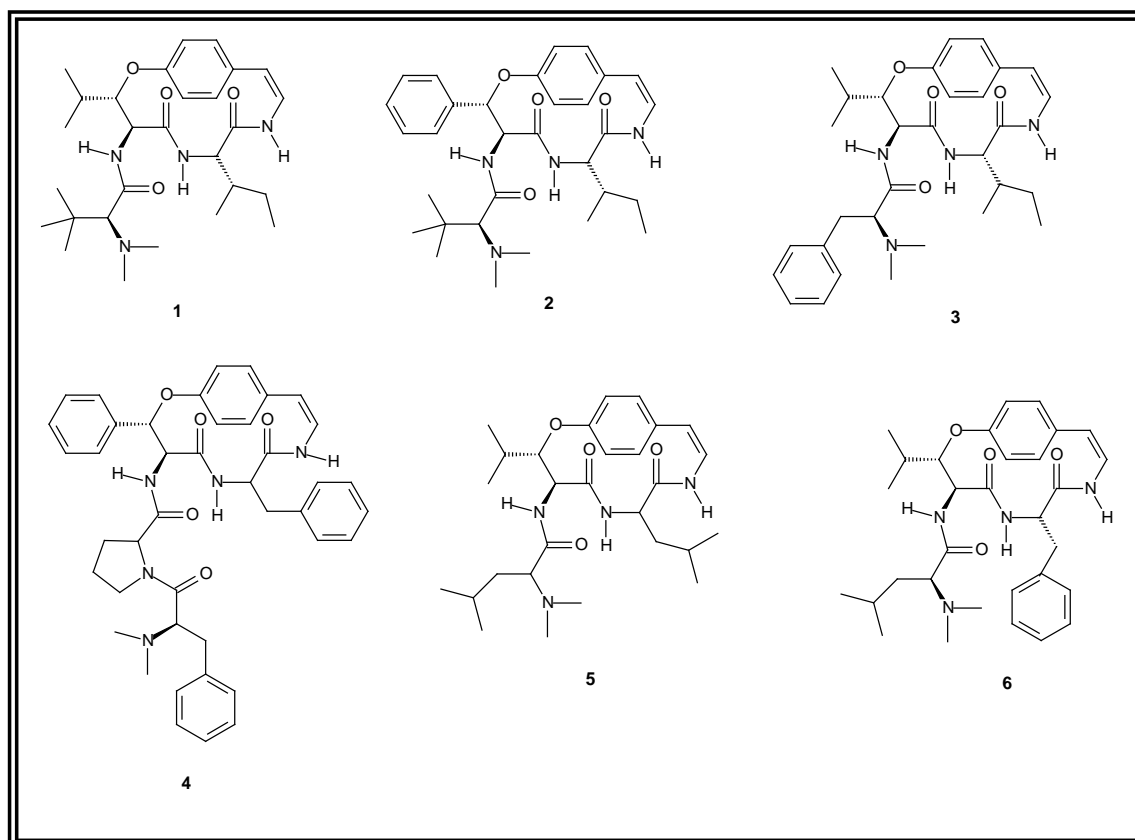


FIGURA 1. Estrutura básica dos alcaloides ciclopeptídicos

Os primeiros alcalóides ciclopeptídicos de espécies da tribo Hermannieae foram identificados na década de 1960. Pais e colaboradores isolaram de *W. americana* os ciclopeptídeos adoutinas X (1), Y (2), Y' (3) e Z (4) (PAIS *et. al.*, 1963 e 1968), enquanto que Tschsche e colaboradores isolaram além da adoutina Y' (3), a franganina (5) e a frangufolina (6) (TSCHSCHE *et. al.*, 1968). As estruturas destes alcalóides encontram-se no quadro 1.

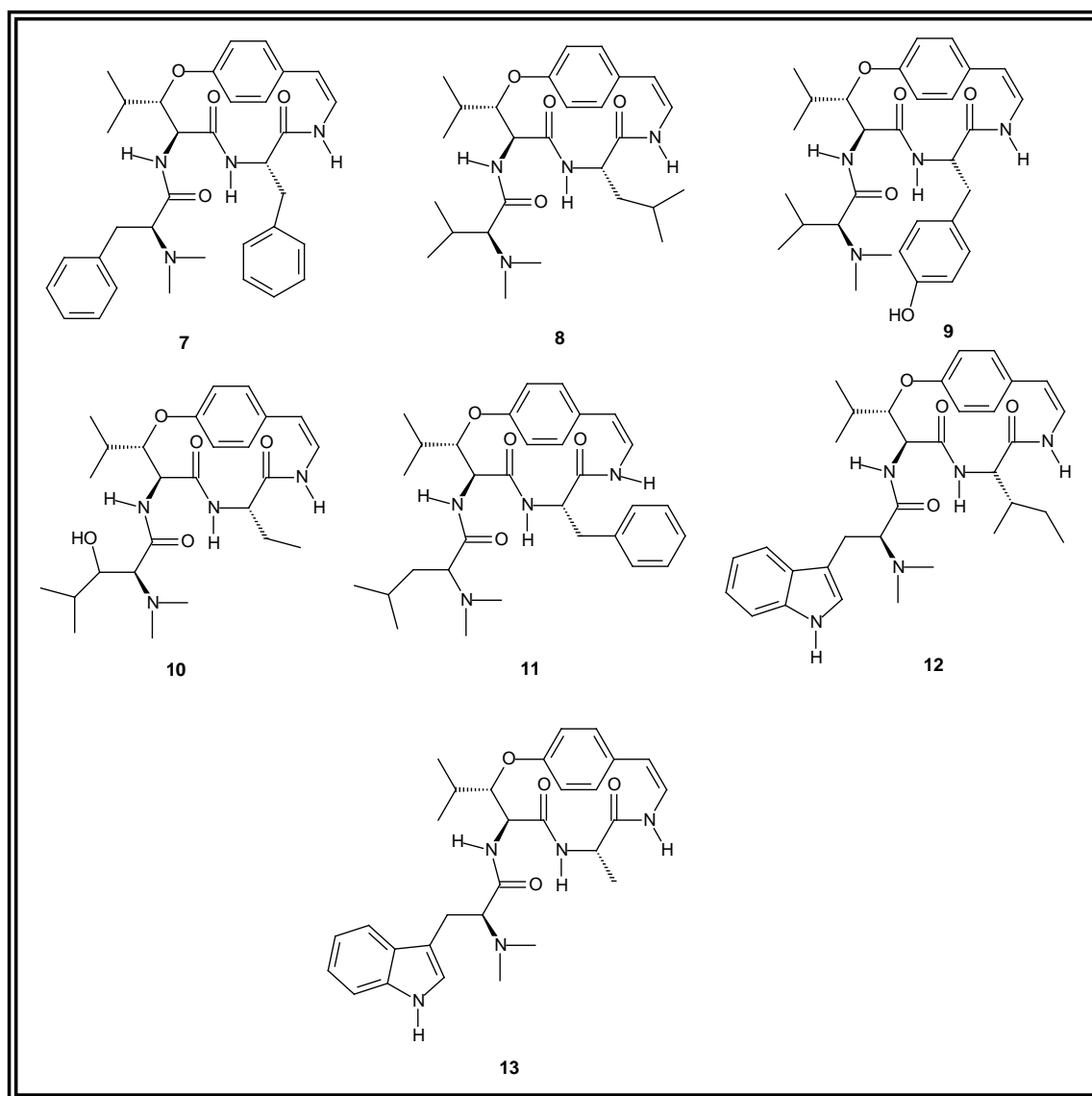


QUADRO 1. Alcalóides ciclopeptídicos 1- 6

Entre as décadas de 1970 e 1980, nenhum isolamento de alcaloide ciclopeptídico foi reportado para o gênero *Waltheria*, enquanto que para *Melochia* destacam-se os estudos de Kapadia e colaboradores que identificaram a scutianina B (7) e as melonovinas A (8) e B (9) de *M. tomentosa*, sendo essas duas últimas reportadas pela primeira vez (KAPADIA *et. al.* 1980), enquanto que de *M. corchorifolia* foram identificados a adoutina Y' (3) e a melofolina (10), essa última pela primeira vez (BHAKUNI *et. al.*, 1986).

Na década de 1990 nenhum isolamento de alcaloide ciclopeptídico foi reportado para o gênero *Melochia*, já para o gênero *Waltheria* destacaram-se os estudos realizados por Morel e colaboradores com a espécie *W. douradinha*, onde foram reportados o isolamento da adoutina Y' (3), scutianina B (7), além de três

novos ciclopeptídeos, as waltherinas A (**11**), B (**12**) e C (**13**) (MOREL *et. al.*, 1999a, 1999b). As estruturas dos alcalóides de **7-13** encontram-se no quadro 2.

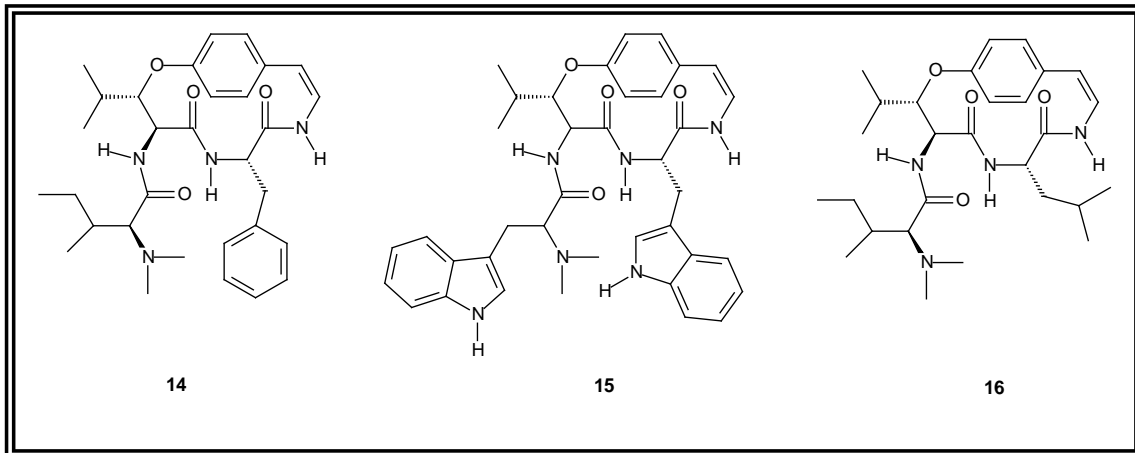


QUADRO 2. Alcalóides ciclopeptídicos 7-13

Na década de 2000, *W. douradinha* foi novamente re-estudada por Morel e colaboradores, entretanto nenhum alcaloide ciclopeptídico novo foi identificado nestes estudos (HOELZEL *et. al.*, 2005) (GRESSLER *et. al.*, 2008). Esse mesmo grupo de pesquisa realizou o estudo de *M. chamaedrys*, o que levou ao isolamento das scutianinas B (**7**) e C (**14**), adoutina X (**1**), frangufolina (**6**) e de um novo ciclopeptídeo, a chamaedrina (**15**) (DIAS *et. al.*, 2007a), enquanto que de *M. odorata* foi isolada a frangulanina (**16**) por Emile e colaboradores (EMILE *et. al.*, 2007). As estruturas dos alcalóides de 14 a 16 encontram-se no quadro 3.

Até o momento, para a família Malvaceae, os alcalóides ciclopeptídicos têm tido ocorrência restrita à tribo Hermannieae, sendo possível observar correlações claras entre os gêneros *Waltheria* e *Melochia*, com a ocorrência comum de

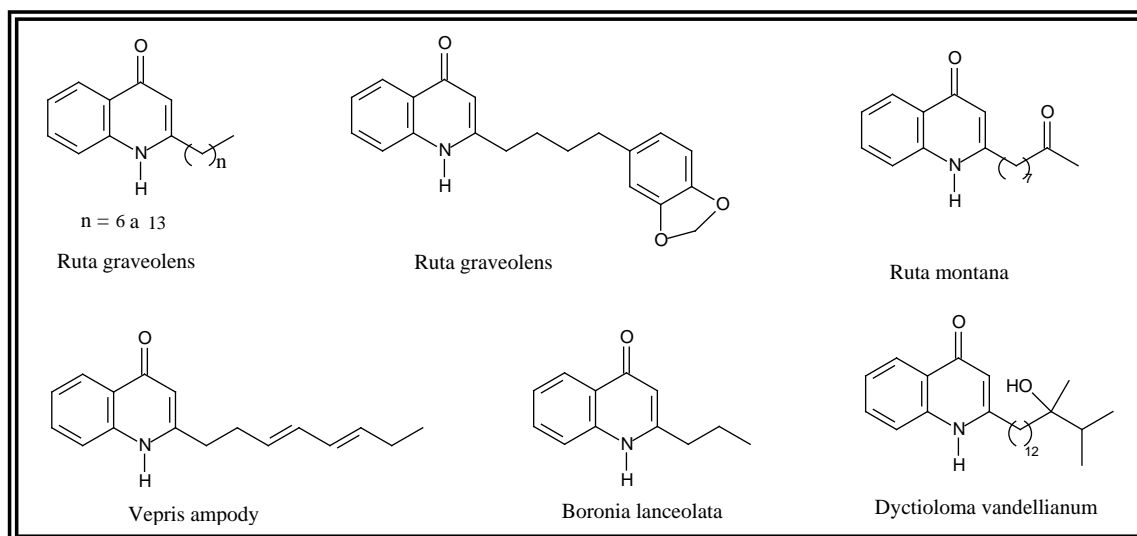
ciclopeptídeos como as adoutinas X (1) e Y' (3) e scutianina-B (7). Entretanto, não é possível afirmar com maior clareza que estes compostos são marcadores quimiotaxonômicos exclusivos desta tribo, uma vez que a ocorrência destes alcalóides não é restrita a *Hermannieae*. As estruturas dos alcalóides de 14-16 encontram-se no quadro 3.



QUADRO 3. Estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos 14-16

### 1.3.2. Alcalóides Quinolônicos (quinolin-4-onas)

Os alcalóides quinolônicos são amplamente distribuídos entre microorganismos. Entre plantas, estes alcalóides possuem maior ocorrência em *Rutaceae*, principalmente nos gêneros *Ruta* (REISCH *et. al.*; 1975) (KOSTOVA *et. al.*; 1979) (TOUATI *et. al.*; 2000) (OLIVA *et. al.*; 2003), *Boronia* (ASHAN *et. al.*; 1993), *Vespris* (KAN-FAN *et. al.*; 1970) e *Dyctioloma* (SARTOR *et. al.*; 2003). Destaca-se que a maioria destes alcalóides são alquil-quinolin-4-onas, sendo muitos idênticos aqueles isolados de bactérias do gênero *pseudomonas* (da SILVA *et. al.*, 2008).



QUADRO 4. Alcalóides quinolônicos de espécies de *Rutaceae*

A formação dos alcalóides 4-quinolônicos dá-se a partir do ácido antranílico, onde temos inicialmente uma condensação de Claisen entre antranil-CoA e malonil-CoA, essa condensação ocorre com o ataque do grupo amino de antranil-CoA ao grupo tio-éster da unidade de malonil-CoA. Na figura 2 é proposta a biossíntese de 4-quinolonas de acordo com (DEWICK, 2007). 2.

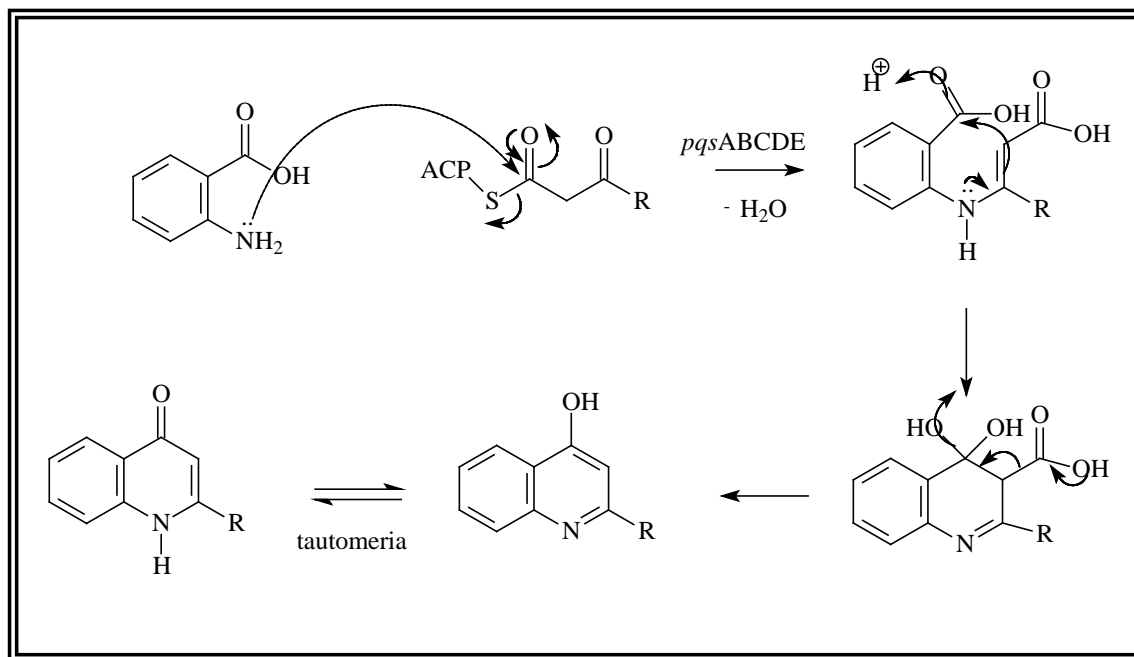


Figura 2. Formação do núcleo 4-quinolona via antranil-CoA e malonil-CoA (adaptado de DEWICK, p. 169, 2007)

O primeiro relato de isolamento de alcalóide do tipo quinolin-4-ona na tribo *Hermannieae* foi em 1975, em trabalho realizado por Kapadia e colaboradores a partir das raízes de *Melochia tomentosa* (KAPADIA *et. al.*; 1975) de onde foi isolado o alcaloide melochinona (**17**). A estrutura da melochinona foi deduzida a partir da análise de espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C unidimensional, espectrometria de massas, ultra-violeta e difração de raios-X. Para a época da elucidação estrutural da melochinona (**17**) já se conheciam vários alcalóides quinolin-4-ona de plantas da família *Rutaceae* e de microorganismos, de modo que a estrutura desse alcaloide foi considerada não usual, por possuir um anel de sete membros geminado a um anel aromático, além disso, verificou-se na estrutura deste alcaloide a primeira descrição da presença de metila na posição 2 e metoxila na posição 3. Os autores consideraram a presença do anel de sete membros como um problema em termos biossintéticos, chegando a propor que a formação deste seria através da condensação de um derivado da paracoteína com antranilato. Já a presença de metoxila na posição 3 e metila na posição 2 foi sugerida a partir da condensação da

unidade de antranilato com metil-piruvato, como pode-se verificar na figura 3 (KAPADIA *et. al.*; 1975).

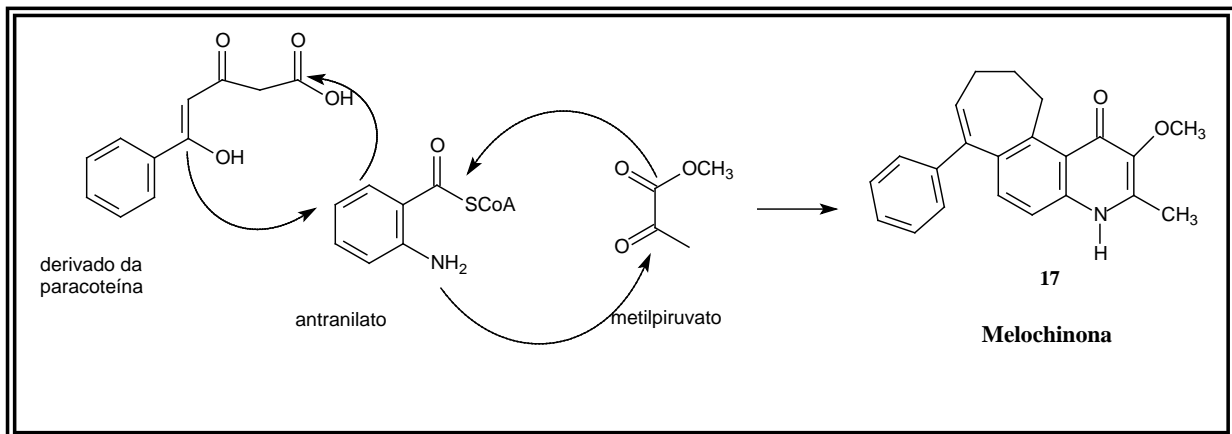
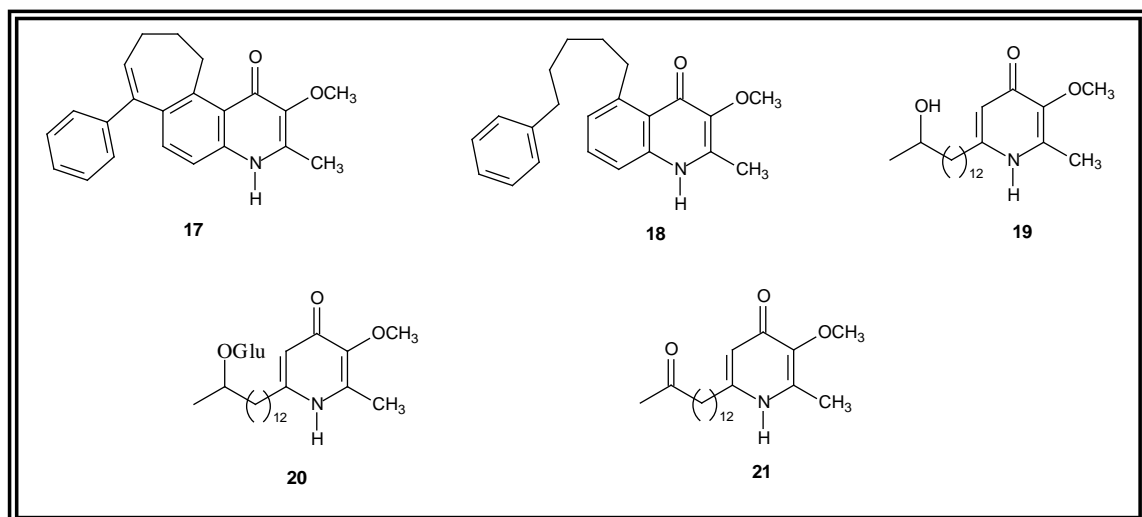


Figura 3. Proposta de biogênese da melochinona por Kapadia e colaboradores, adaptado de (KAPADIA *et. al.*; 1975).

Em 1978 o mesmo grupo de pesquisa relatou o isolamento da melovinona (18), um análogo de cadeia aberta da melochinona (17) (KAPADIA *et. al.*; 1978). Um ano depois, em 1979, Medina e colaboradores relataram o isolamento dos alcaloides melochinina (19) e  $\beta$ -D-glucosil-melochinina (20) de *M. pyramidata* (MEDINA & SPITELLER, 1979), enquanto que Arriaga e colaboradores isolaram a melochininona (21) da mesma espécie (ARRIAGA *et. al.*; 1981).



Quadro 5. Estrutura dos alcalóides quinolônicos 17-21

É interessante ressaltar neste momento que todos os alcaloides quinolin-4-onas isolados do gênero *Melochia* possuem metila na posição 2 e metoxila na posição 3, sugerindo origem biogênica entre estes. Contudo, uma melhor análise dos alcaloides 19 a 21 sugerem uma origem policetídica e não a partir de antranil-CoA, devido à ausência do anel aromático.



Em 2000, Buske e colaboradores publicaram a estrutura do alcaloide quinolin-4-ona antidesmona (**22**), este com metila na posição 2 e metoxila na posição 3, a partir de *Antidesma membranaceum* (Phyllantaceae) (BUSKE *et. al.*; 2000). A estrutura deste alcaloide foi inicialmente publicada em 1999 (BUSKE *et. al.*; 1999) mas corrigida na publicação do ano 2000. Os autores consideraram a biogênese da antidesmona como sendo não usual e realizaram então um estudo de biossíntese via marcação isotópica utilizando culturas de células de *A. membranaceum* (BRINGMANN *et. al.*; 2000). Através da incorporação de precursores marcados com  $^{13}\text{C}$  (glucose e acetato) e  $^{15}\text{N}$  (glicina e aspartato), e lançando mão de modernas técnicas de RMN, Bringmann e colaboradores concluíram que a antidesmona era biossintetizada a partir de uma cadeia policetídica C-16 e glicina, onde foi sugerida também a rota biossintética, que neste trabalho foi adaptado na figura 4.

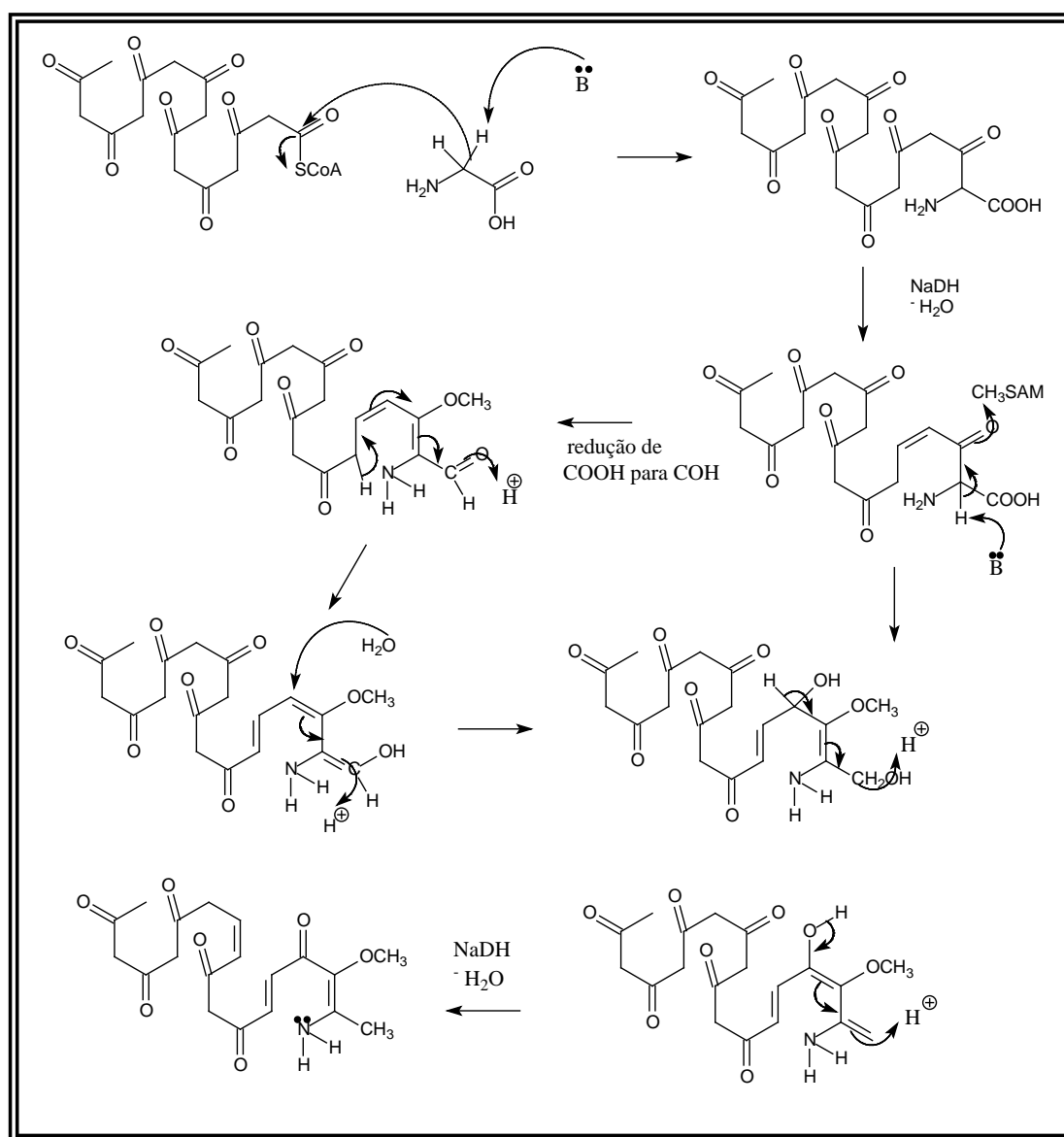


FIGURA 4. Biogênese da antidesmona (adaptado de BRINGMANN *et. al.*; 2000).

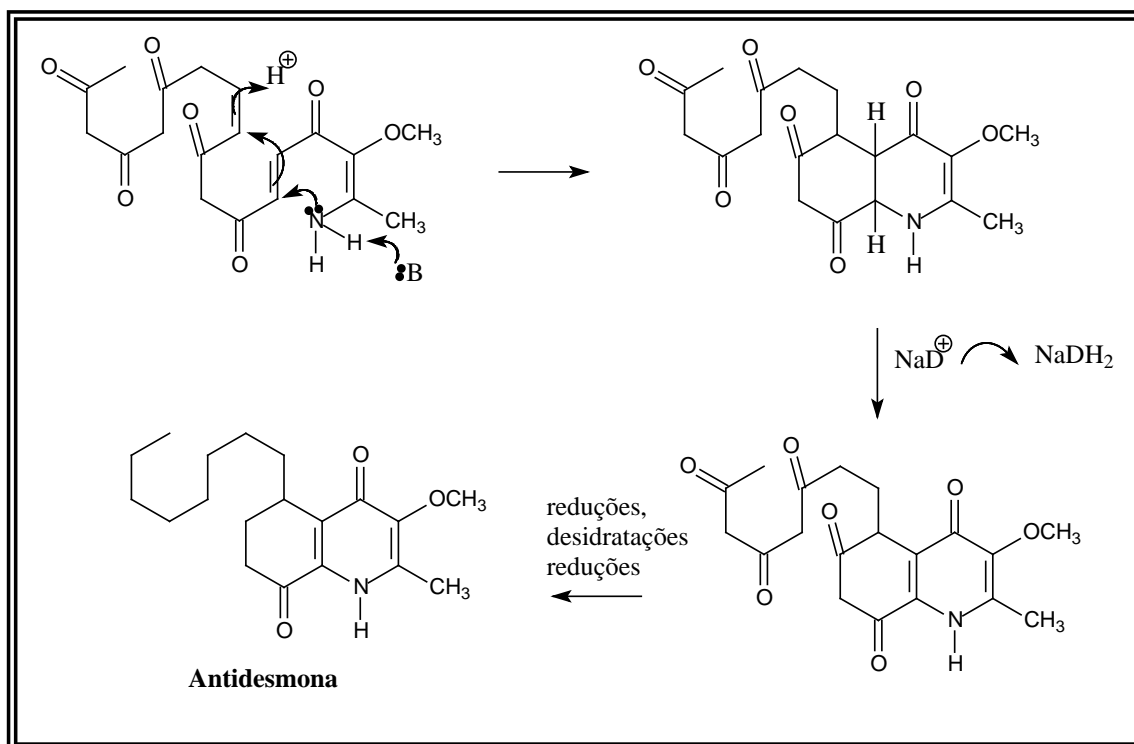


FIGURA 4. Biogênese da antidesmona (adaptado de BRINGMANN *et. al.*; 2000)  
(Continuação)

Para a antidesmona, a metila ligada ao carbono 2 do sistema 4-quinolona vem do aminoácido glicina, enquanto que para a metoxila ligada ao carbono 3 temos que o oxigênio vem da rota do acetato e a metila provém da SAM. Brigmann e colaboradores consideraram a possibilidade da antidesmona (**22**) e melochinona (**17**) terem como precursor comum, a melochininona (**21**).

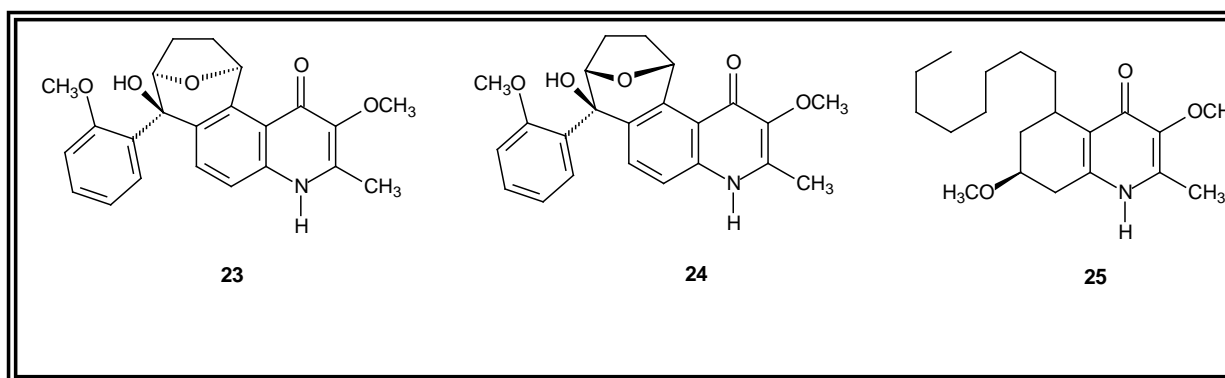
Buske e colaboradores realizaram um estudo quimiosistemático de várias espécies dos gêneros *Antidesma* e *Hyeronima*, utilizando, a técnica de HPLC-MS/MS, onde foi possível identificar vários derivados da antidesmona e concluir que este alcaloide é um marcador quimiotaxonômico da tribo Antidesmeae (Phyllantaceae, Ex. Euphorbiaceae) (BUSKE *et. al.*; 2003).

Em 2005, Hoelzel e colaboradores relataram o isolamento de outro alcaloide quinolin-4-ona, a waltheriona A (**23**) (HOELZEL *et. al.*; 2005), a partir de *Waltheria douradinha*. Este alcaloide também possui metila na posição 2 e metoxila na posição 3, além de um anel de sete membros, o que sugeriu então tratar-se de um derivado da melochinona (**17**).

A waltheriona A (**23**), posteriormente foi isolada de outras duas espécies de *Melochia*, *M. chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007a), *M. odorata* (EMILE *et. al.*; 2007) e de *W. brachypetala* (LIMA *et al.*; 2009).

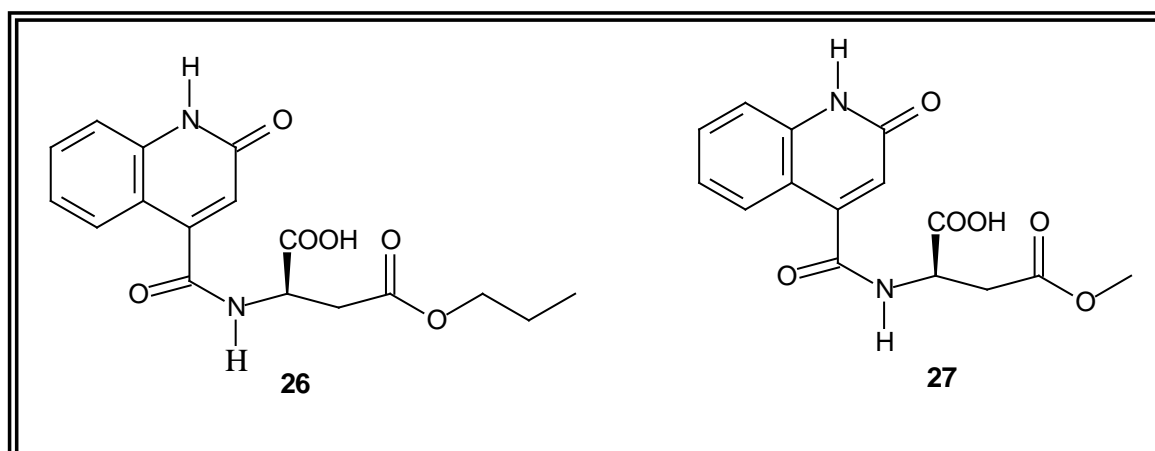
Em 2008, Gressler e colaboradores relataram o isolamento de um diastereoisômero da waltheriona A, sendo este denominado de waltheriona-B (**24**), também a partir de *W. douradinha* (GRESSLER *et al.*; 2008).

A biogênese das waltherionas A e B não foi discutida pelos autores Hoelzel e colaboradores e Gressler e colaboradores. Entretanto em 2007, Da Silva e colaboradores, no capítulo 4 do periódico *The alkaloids*, sugeriram uma possível correlação entre a biogênese das waltherionas A e B com melochinona, melochinina e melochininona, além de sugerir também que a antidesmona poderia ser um precursor comum destes alcalóides (Da Silva *et. al.*; 2007). Esta hipótese de Da Silva e colaboradores teve um maior sentido quando foi relatada a ocorrência do alcaloide antidesmona (**22**) em *M. chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007b) e *W. douradinha* (GRESSLER *et. al.*; 2008). Dias e colaboradores ainda relataram um derivado inédito da antidesmona (**22**), denominado de chamaedrona (**25**) (DIAS *et. al.*; 2007b).



QUADRO 6. Estruturas dos alcalóides 23-25

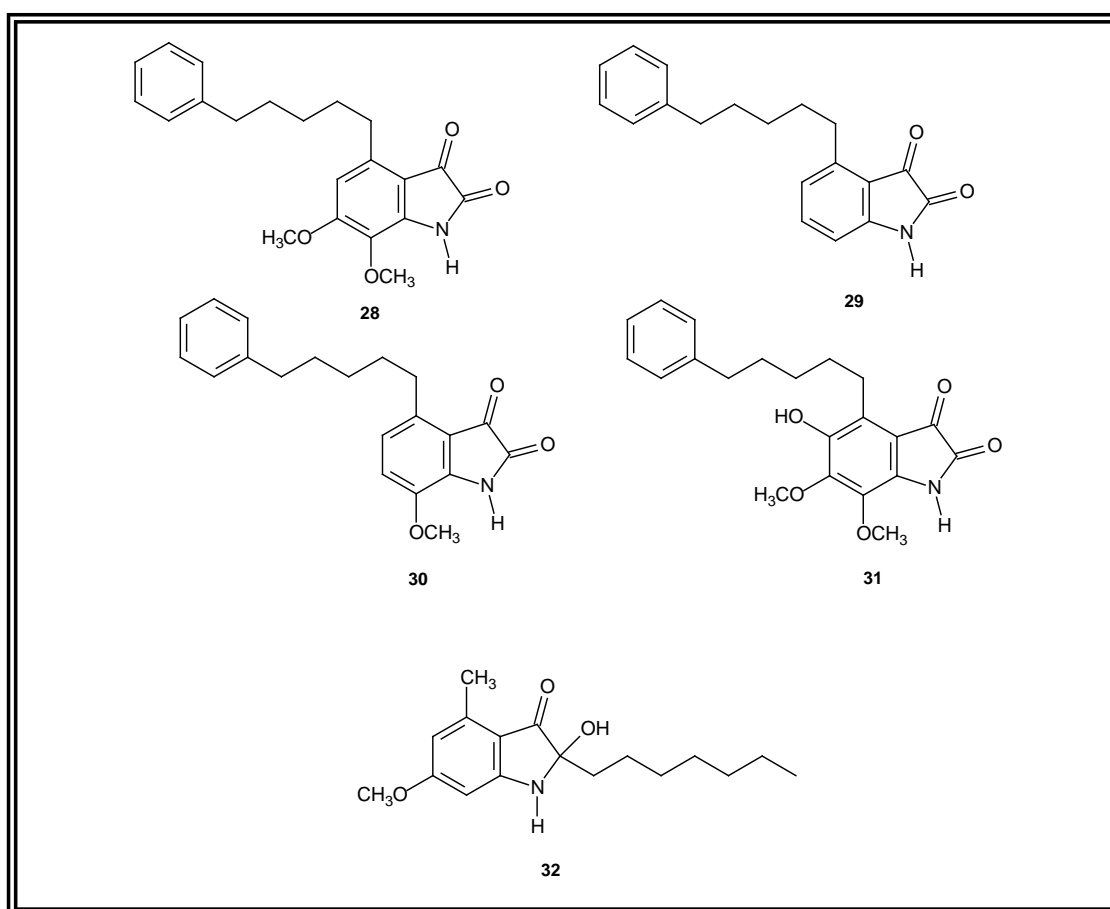
Na família Malvaceae, até fevereiro de 2012, não se encontra nenhum outro relato de ocorrência de alcalóides do tipo quinolin-4-ona. Entretanto Ru-Feng Wang e colaboradores relataram a ocorrência das sterculininas I (**26**) e II (**27**), que são alcalóides quinolin-2-onas de *Sterculia lychnophora*. Assim, pode-se inferir que até o momento, na família Malvaceae, a ocorrência de alcalóides quinolin-4-onas é exclusiva da tribo Hermannieae.



QUADRO 7. Estruturas dos alcalóides 26 e 27

### 1.3.3. Alcalóides isatínicos

Esta nova classe de alcalóides foi relatada para a espécie *M. tomentosa* em estudos realizados por Kapadia e colaboradores. Trata-se de alcalóides com esqueleto 4-alkil-aril-dioxo-indol, relatados apenas para esta espécie, sendo estes denominados de melosatina A (**28**), melosatina (B) (**29**), melosatina C (**30**) (KAPADIA *et. al.*; 1980), melosatina D (**31**) (KAPADIA *et. al.*; 1980). Em 1991, Bhakuni e colaboradores relataram um alcalóide de *M. corchorifolia*, a melochicorina (**32**) que também possui um núcleo oxo-indólico (BAKHUNI *et. al.*; 1991). A ocorrência dos alcalóides isatínicos pode ser característica de outras espécies de *Melochia*, mas não é possível afirmar aqui, haja visto que apenas *M. chamaedrys* e *M. odorata* foram estudadas posterior a década de 1990.

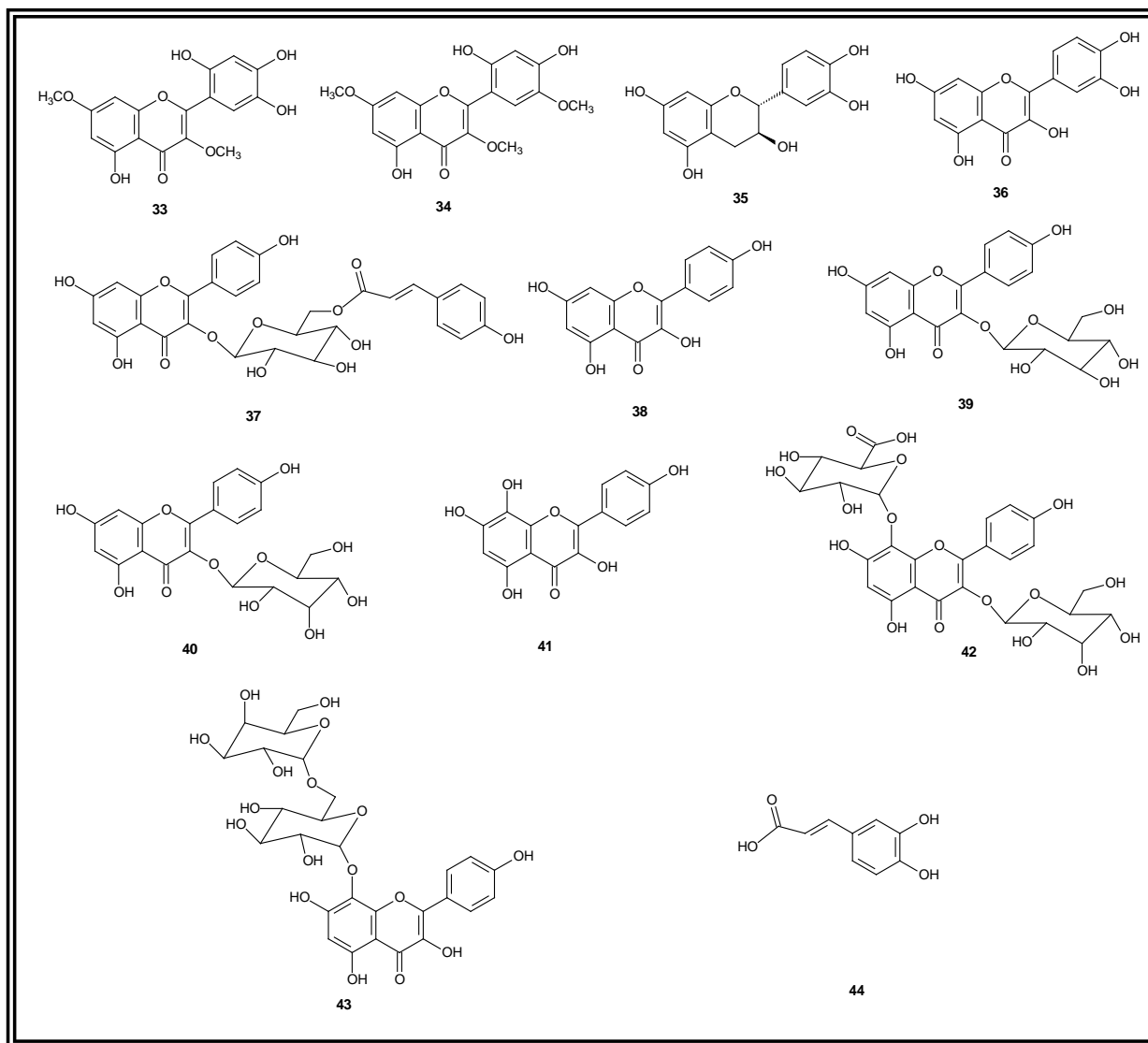


QUADRO 8. Estruturas dos alcalóides 28-32

### 1.3.4. Flavonóides

Até o momento desta revisão, foi reportado o isolamento de flavonoides no gênero *Waltheria* apenas para *W. americana* e *W. indica*, enquanto no gênero *Melochia* encontra-se relatos para *M. corchorifolia*, *M. umbellata* e *M. chamaedrys*. Os flavonoides metoxilados **33** e **34** foram relatados para a espécie *W. americana* em estudos realizados por Ragasa e colaboradores (RAGASA *et. al.*; 1997), enquanto que para *W. indica* encontra-se relatos de ocorrência dos flavonoides

epicatequina (**35**), quercetina (**36**), tilirosídeo (**37**) (RAO *et. al.*; 2005) (MAHESWARA *et. al.*; 2006), Kaempferol (**38**), 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-kaempferol (**39**), 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-kaempferol (**40**) gossipetina (**41**), 8-O-glucuronosil-gossipetina (**42**), 8- $\beta$ -O-galactosil-6'''- glucosil-gossipetina (**43**) e do composto fenólico, ácido cafeico (**44**) (PETRUS *et. al.*; 1990). Dentre os flavonoides destaca-se que segundo (RAO *et. al.*; 2005), o flavonóide tilirosídeo (**37**) pode ser encontrado em grande quantidade a partir das inflorescências de *W. americana*. As estruturas dos flavonoides de 33 a 43 e do ácido cafeico (**44**) encontram-se no quadro 9.

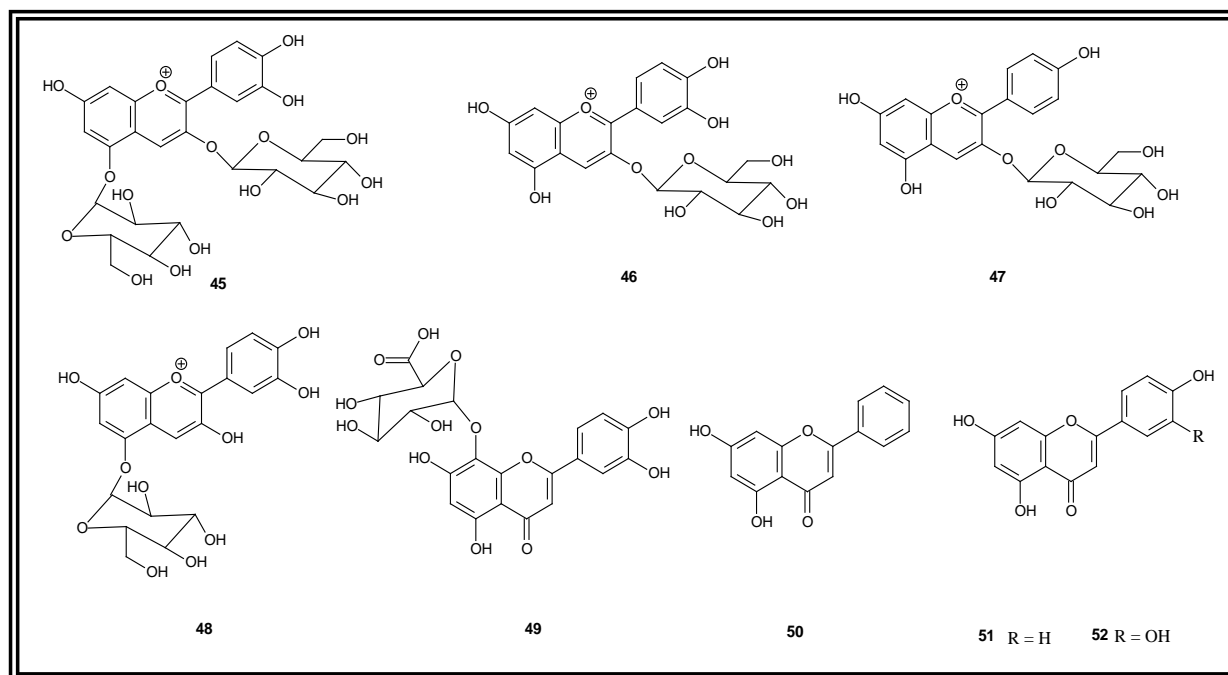


QUADRO 9. Estruturas dos fenólicos de 33 a 44

Também são relatadas para a espécie *W. indica* a presença das antocianinas cianina (**45**), crisantemina (**46**), calistefina (**47**) e flavilum (**48**) (OGBEDE *et. al.*; 1986).

A partir de estudos químicos da espécie *M. corchorifolia* foram relatados os falvonóides melocorina (**49**) (NAIR *et. al.*; 1977), enquanto que em estudo mais recente Tripathi e colaboradores relataram a ocorrência das flavonas **50** e **51**,

quercetina (**36**) e Kaempferol (**38**), também para esta espécie (TRIPTATHI *et. al.*; 2010). Já para *M. umbellata*, é relatada a ocorrência de 3-O- $\beta$ -D-galactocopiranosil-kaempferol (**40**) (GUNASEGARAN *et. al.*; 1980), enquanto que para *M. chamaedrys* é relatado apenas a epicatequina (**35**) (DIAS *et. al.*; 2007a). As estruturas dos flavonoides de 45 a 52 encontram-se no quadro 10. R = OH

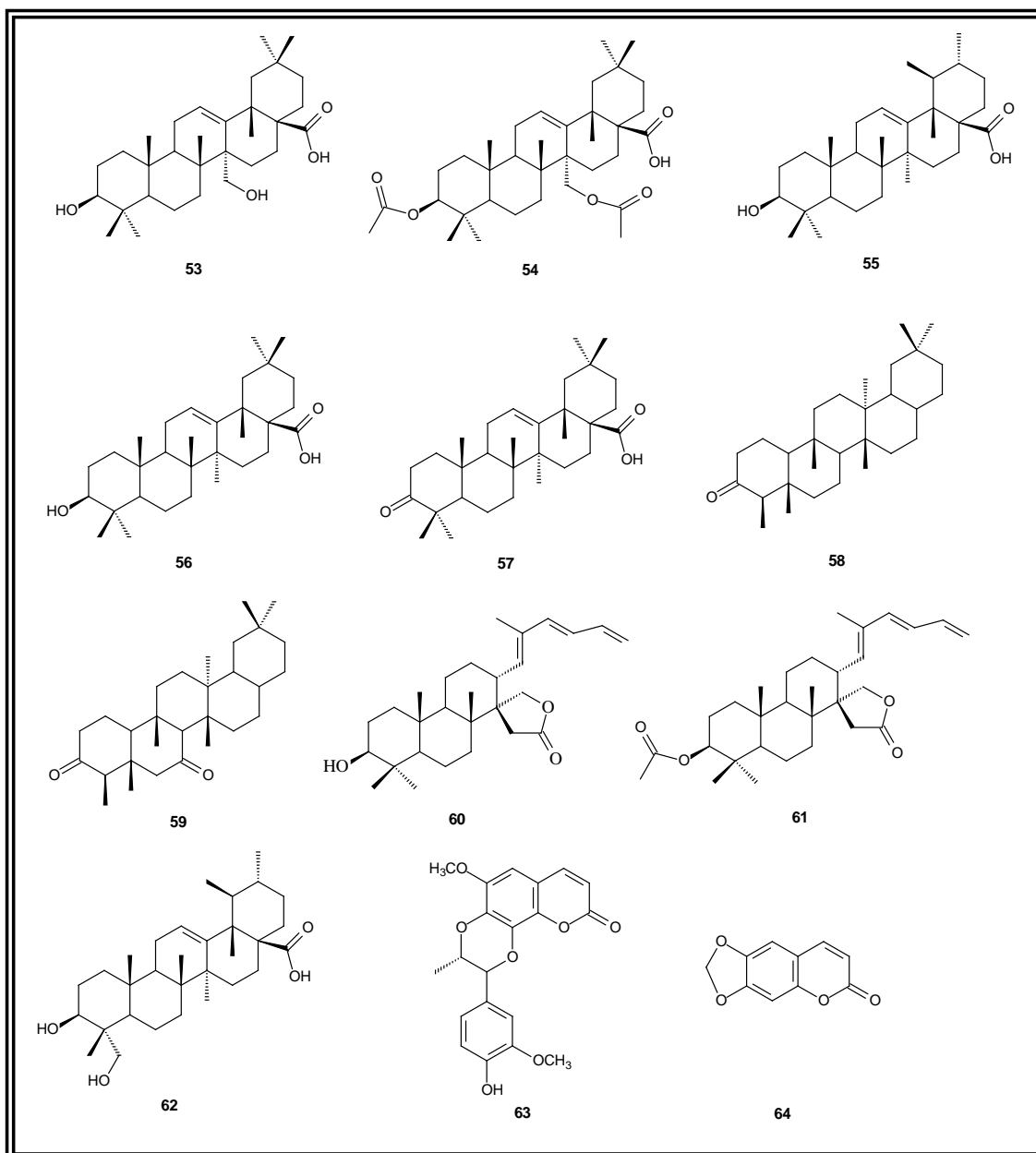


QUADRO 10. Estruturas dos flavonoides de 45 a 52

### 1.3.5. Outras classes de metabólitos secundários

Dentre outras classes de metabólitos secundários reportados para espécies dos gêneros *Waltheria* e *Melochia* destacam-se os triterpenos: ác. 3,27-diidroxi-12-olean-28-óico (**53**), ác. 3,27-bis-acetoxi-12-olean-28-óico (**54**), ác. 3 $\beta$ -hidroxi-12-olean-28-óico (**55**), ác. 3 $\beta$ -hidroxi-12-urs-28-óico (**56**) isolados de *M. pyramidata* (BORGES-DEL-CASTILHO *et. al.*, 1983) e ác. 3-Oxo-olean-18-en-28-óico (**57**), friedelina (**58**), 7-oxo-friedelina (**59**), ebelina lactona (**60**), 3-O-acetil-ebelina lactona (**61**) e ác. 3, 24-diidroxi-urs-12-en-28-óico (**62**) isolados de *W. viscosíssima* (SOARES *et. al.*, 1998).

Também é reportado na literatura a ocorrência de uma cumarinolignana, a propacina (**63**) de *M. chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007a) e uma cumarina simples, a metileno-dioxi-cumarina (**64**) de *M. tomentosa* (SHKULA *et. al.*, 1978). As estruturas dos metabólitos secundários de 53 a 64 encontram-se no quadro 11.



QUADRO 11. Estruturas dos metabólitos secundários de 53 a 64

### 1.3.6. Resumo sobre o perfil químico dos gêneros *Waltheria* e *Melochia*

O levantamento da literatura acerca do perfil químico dos gêneros *Waltheria* e *Melochia* permite inferir que os alcalóides quinolônicos (4-quinolonas) e ciclopetídicos caracterizam bem esses gêneros, podendo ser possíveis marcadores quimiotaxonômicos para a tribo Hermannieae. Dentre os alcalóides ciclopetídicos, a adoutina Y' (**3**) e a scutianina-B (**7**) são os alcalóides de maior ocorrência entre os dois gêneros citados, enquanto que entre os alcalóides 4-quinolônicos a waltheriona A (**23**) e a antidesmona (**22**) (fig. 5) são os únicos que ocorrem nos dois gêneros até o momento desta revisão.

Até o momento, os alcaloides da classe dos isatínicos são exclusivos de *M. tomentosa*, de modo que não se pode afirmar que esta nova classe de alcalóides é característica do gênero *Melochia*.

Outras classes de metabólitos secundários como flavonoides e terpenóides também são relatados para a tribo Hermannieae, entretanto para poucas espécies. Os flavonoides relatados são de ocorrência comum em plantas de várias famílias. Entre os triterpenos é interessante a ocorrência de triterpenos com anel lactônico de *W. viscosíssima*, entretanto esta classe de metabólitos é relatada apenas para esta espécie dentro da tribo Hermannieae.

A partir da revisão da literatura é possível levantar algumas hipóteses sobre o perfil químico da tribo Hermannieae no que se refere à ocorrência dos alcalóides quinolin-4-onas.

- ✓ Uma vez que a antidesmona é um marcador quimiotaxonômico da tribo Antidesmeae (Phyllantaceae), será que outros derivados da antidesmona também poderiam ocorrer em Hermannieae assim como ocorrem em Antidesmeae e possíveis de serem isolados?
- ✓ Considerando o alcaloide melochinona como precursor das waltherionas, como proposto por (DA SILVA *et. al.*; 2007), quais seriam os possíveis intermediários mais próximos das waltherionas? Haveriam ainda outros derivados ainda não reportados na literatura, e possíveis de serem isolados?

Em busca de respostas para estas hipóteses levantadas e de se obter maiores informações sobre o perfil quimiosistemático da tribo Hermannieae, decidiu-se, para este trabalho de doutoramento, pelo estudo químico de uma planta do gênero *Waltheria*. A planta escolhida foi *Waltheria brachypetala* Turcz, popularmente conhecida como “*guaxuma*”.



#### 1.4. *Waltheria brachypetala* Turczaninov (Turcz.)

*Waltheria brachypetala* Turcz. É uma arbusto de pequeno porte, considerado como planta daninha de diversas culturas. Sua ocorrência é endêmica do semi-árido nordestino, desde a Bahia até a Paraíba. Esta planta ocorre frequentemente em beira de estradas e em terrenos baldios, sendo conhecida popularmente como “*guaxuma*” e muitas vezes confundida como “*malva*” ou “*malva-branca*” (SABA & SANTOS, 2003). As propriedades medicinais e o uso tradicional desta planta serão discutidos no capítulo 2 desta tese. No que se refere ao estudo químico desta espécie, encontra-se apenas o estudo das folhas, sendo relatada a identificação dos alcaloides waltherina A (**11**), waltheriona A (**23**) e seu derivado N-metilado (LIMA *et. al.*; 2009).

Foto autoria: Murilo  
Marinho C. Lima  
(Município de Piripá,  
Bahia)  
07 de agosto de 2011



FIGURA 5. Foto de *W. brachypetala* Turcz.

## 2. Objetivos

A partir da discussão levantada na revisão da literatura, constituiu-se como objetivos da parte 1 deste trabalho:

### 2.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo dos alcaloides quinolônicos da raiz e do caule de *Waltheria brachypetala* Turcz.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Isolar os alcalóides, da raiz e do caule de *W. brachypetala* Turcz. através de técnicas cromatográficas usuais de purificação como: Cromatografia em Coluna de Sílica gel, Cromatografia em Coluna de Sephadex LH-20 e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- ✓ Determinar as estruturas dos alcaloides isolados através de técnicas espectrométricas e espectroscópicas de elucidção estrutural como: RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), EM, UV, IV dentre outras que forem necessárias;
- ✓ Estudar via HPLC-UV-MS-MS os extratos alcaloídicos de *W. brachypetala* visando a busca de possíveis intermediários de biossíntese e identificação de alcalóides minoritários;
- ✓ A partir dos resultados obtidos, estabelecer relações quimiosistemáticas dentro da tribo Hermannieae e entre Hermannieae e Antidesmeae (Phyllanthaceae).

### 3. Procedimentos Experimentais

#### 3.1. Coleta e identificação do material vegetal

Raízes, caules e folhas de *Waltheria brachypetala* Turcz. foram coletados no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) em novembro do ano de 2009, sendo identificados pelo botânico MSc. Cosme Correia dos Santos, sob supervisão do prof. Dr Luciano Paganucci de Queiroz. A excicata da espécie encontra-se depositada no Herbário da UEFS sob código HUEFS 148549.

#### 3.2. Preparo dos Extratos

Após serem coletados, raízes e caules foram lavados com água para a retirada de material de solo residual e submetidos à secagem em estufa a 40°C, sob ventilação, por um período de sete dias. Após a secagem raízes e caules foram moídos separadamente em moinho sendo obtidos 500 g de raízes e 1500g de caules moídos. Estes foram submetidos separadamente à maceração com etanol por quatro vezes em intervalo de 72 horas. A cada intervalo de 72 horas o líquido extraído foi filtrado e posteriormente concentrado sob pressão reduzida, em rota evaporador rotatório (40°C) para a obtenção dos respectivos extratos etanólicos da raiz (WRE) e caule (WCE), com massas de 80,97 g e 160,50 g respectivamente.

Os extratos brutos WRE e WCE foram posteriormente submetidos a partição líquido-líquido após serem solubilizados, separadamente, em uma mistura de água:metanol (3:1) com posterior partição em funil de separação com os solventes: hexano, diclorometano e acetato de etila, para a obtenção das respectivas fases hexânica (WRH e WCH), diclorometano (WRD e WCD) e acetato de etila (WRA e WCA), cujas massas encontram-se na tabela 1.

Observou-se que tanto para a raiz, como para o caule, as fases acetato de etila tiveram maior rendimento, enquanto que as fases diclorometano apresentaram menor rendimento.

TABELA 1. Massas e rendimentos dos extratos de raiz e caule de *W. brachypetala*

Raíz			Caule		
Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)	Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
WRE	81,0	16,19	WCE	160,5	10,70
WRH	4,46	0,89	WCH	11,00	0,73
WRD	1,22	0,24	WCD	6,050	0,40
WRA	18,0	3,60	WCA	25,56	1,68

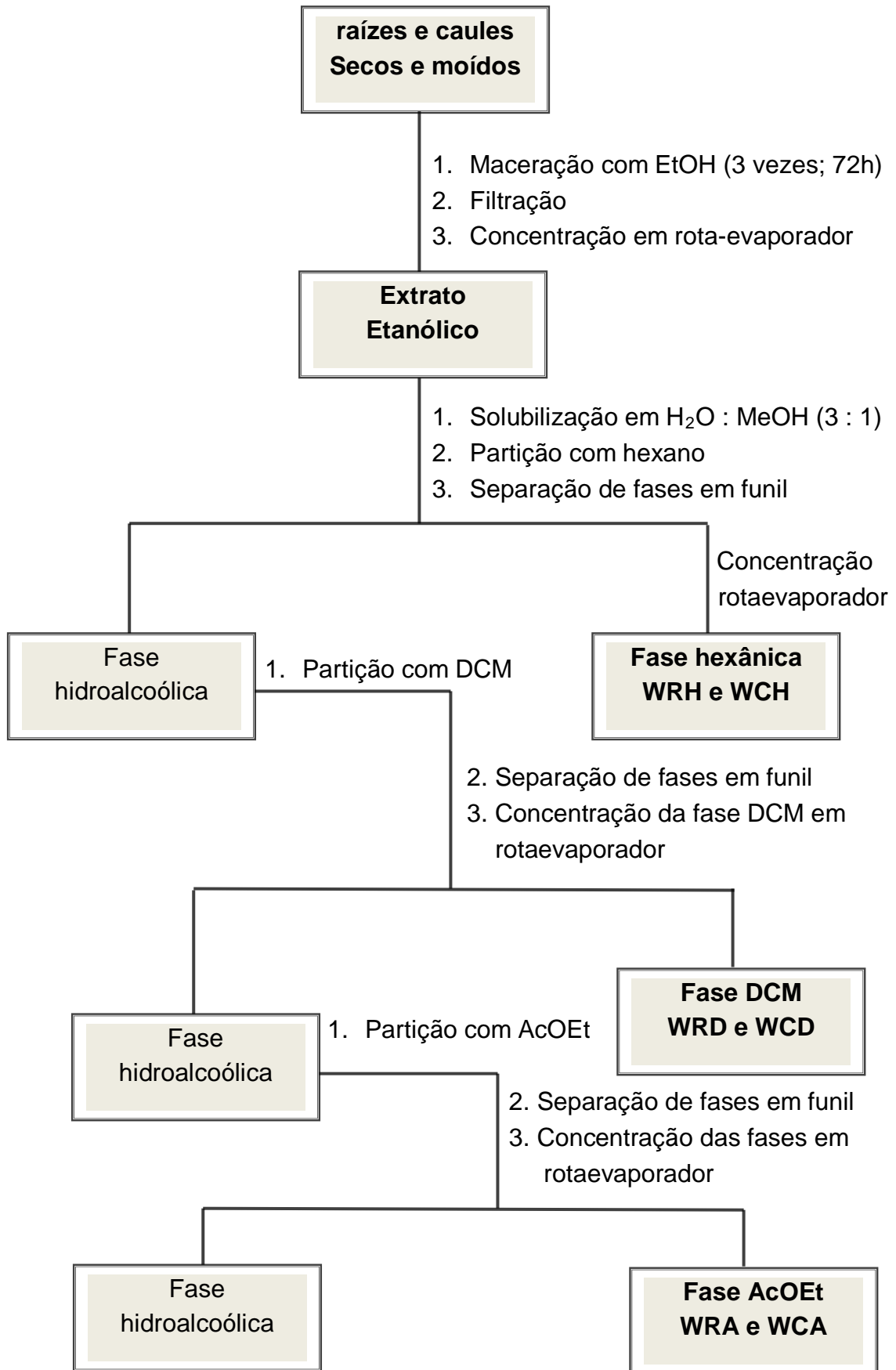


FIGURA 6a. Fluxograma de obtenção das fases orgânicas dos extratos etanólicos

### 3.3. Estudo químico da raiz de *Waltheria brachypetala* Turcz.

As fases WRH (fase hexânica da raiz), WRD (fase diclorometano da raiz) e WRA (fase acetato de etila da raiz) obtidas do extrato etanólico das raízes de *W. brachypetala* foram submetidas a análises por CCDA no intuito de identificar, qualitativamente, a presença de alcaloides. Para as fases WRH e WRD o melhor sistema eluente para a separação dos *spots* observados na placa de CCD foi DCM : MeOH 97:3, enquanto que para a fase WRA o melhor sistema eluente foi DCM : MeOH 80:20, com adição de gotas de ácido acético glacial. As placas de CCDA foram analisadas em luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, reveladas com vanilina-ácido sulfúrico com aquecimento da placa e o reagente de Dragendorff.

Na luz UV, o comprimento de onda de 254 nm foi o melhor para a visualização dos *spots*. Com o reagente de vanilina-ácido sulfúrico observou-se a presença de *spots* com coloração de róseo a roxo para a fase WRH sugerindo a presença de esteroides ou triterpenos; para as fases WRD e WRA foram observados *spots* com coloração amarelada. Ao revelar em CCD as fases WRH e WRD com o reagente de Dragendorff foram observados vários *spots* de coloração laranja-tijolo sugerindo a presença de alcaloides ou outras substâncias nitrogenadas, já para a fase WRA não foram observados *spots* com esse tipo de coloração.

Dado que as fases WRH e WRD apresentaram resultado positivo em CCDA com reagente de Dragendorff, essas foram selecionadas para purificação por métodos cromatográficos, considerando o objetivo central do estudo químico de *W. brachypetala*.

#### 3.3.1. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WRH

A fase hexânica das raízes de *W. brachypetala* (WRH) foi submetida a Cromatografia em Coluna de sílica ( $d = 3,5$  cm;  $h = 47$  cm), utilizando-se como fase móvel uma combinação entre os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. As frações foram separadas de acordo com as diferentes cores observadas a olho nú, sendo obtidas 80 frações.

As 80 frações obtidas foram monitoradas por CCD, sendo posteriormente reunidas com base na semelhança de R<sub>f</sub>s entre os *spots* e com a revelação para os reagentes de vanilina e Dragendorff, bem como pela monitoração das placas por luz UV (365 e 245 nm), sendo obtidas assim 12 sub-frações, como pode-se observar na tabela 2.

Através da monitoração por CCDA despertou-se a atenção prioritariamente pela sub-fração 55, uma vez que esta apresentou *spots* revelados positivamente com o reagente de Dragendorff.

Outras duas sub-frações também despertaram interesse. A sub-fração 49, proveniente da reunião das sub-frações de 40 a 49, revelou positivamente para triterpenos ou esteróides, utilizando-se o reagente de vanilina com posterior aquecimento. Mesmo tipo de revelação foi obtida para a sub-fração 69, proveniente da reunião das sub-frações de 66 a 69.

TABELA 2. Frações obtidas da CC da fase WRH

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Volume de solvente (mL)</b>	<b>Sistema eluente</b>
WRH-12	1-12	225,0	500,0	Hex : AcOEt 97:3
WRH-18	13-18	50,75	300,0	Hex : AcOEt 95:5
WRH-24	19-24	112,0	300,0	Hex : AcOEt 90:10
WRH-30	25-30	125,0	300,0	Hex : AcOEt 86:14
WRH-34	31-34	45,00	200,0	Hex : AcOEt 80:20
WRH-42	35-42	72,50	250,0	Hex : AcOEt 77:23
WRH-49	43-49	100,0	300,0	DCM
WRH-55	50-55	1640	400,0	DCM : MeOH 90:10
WRH-61	56-61	210,0	200,0	DCM : MeOH 80:20
WRH-65	62-65	45,00	150,0	MeOH

As sub-frações WRH-24 e WRH-52 ao serem monitoradas por CCDA utilizando como revelador luz UV (245nm e 265nm) e o reagente de vanilina com aquecimento da placa, verificou-se a presença de apenas uma mancha homogênea com os sistemas eluentes Hex:AcOEt (9:1 e 8:2), reveladas em tom de roxo a róseo, sugerindo tratar-se de esteróide ou triterpeno. Posteriormente, WRH-24 foi identificada como sendo uma mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol (E1 e E2), enquanto que a sub-fração WRH-52 foi identificada como sendo o 3-O-glicopiranosil-sitosterol (E3).

As sub-frações WRH-49 e WRH-55 foram selecionadas para purificação, sendo dada prioridade à sub-fração WRH-55, uma vez que esta apresentou vários spots revelados positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD.

### 3.3.1.1. Purificação da fração WRH-55

A fração WRH-55 apresentou-se com uma forte coloração verde, sugerindo a presença de pigmentos derivados da clorofila. Esta fração ao ser dissolvida em diclorometano apresentou a formação de um precipitado branco, que logo se dissolvia à medida que aumentava-se a quantidade de diclorometano. Esta fração foi então submetida à precipitação por adição de gotas de etanol e em seguida submetida a filtração. Foi então realizada CCD deste precipitado, utilizando-se como revelador o reagente de Dragendorff, cujo resultado da avaliação foi negativo para alcaloides. Este sólido mostrou-se puro quando observado em luz UV (245 e 365 nm), sendo posteriormente identificado como o esteroide E3.

A fração WRH-55 sobrenadante foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão, utilizando-se coluna de vidro (d = 2,5cm; h = 21cm), foi escolhido um sistema eluente composto de mistura de solventes em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 51 sub-frações. As frações foram reunidas e analisadas por CCD utilizando como revelador luz UV e reagente de Dragendorff.

Todos os alcaloides ficaram localizados entre as frações 5 a 11, que foram então reunidas. Apesar do procedimento não ter tido êxito na separação dos alcaloides, este serviu para separar a mancha verde, provável derivados de clorofila, e outras demais substâncias cujos spots em CCD não revelaram positivamente com Dragendorff.

TABELA 3. Sub-frações obtidas da CC de WRH-55

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRH-5504	1-4	6,000	200,0	Hex : AcOEt 97:3
WRH-5511	5-11	355,2	300,0	Hex : AcOEt 95:5
WRH-5512	12	6,700	50,00	Hex : AcOEt 90:10
WRH-5522	13-22	36,00	400,0	Hex : AcOEt 86:14
WRH-5528	23-28	56,70	200,0	Hex : AcOEt 80:20
WRH-5534	29-34	6,000	250,0	Hex : AcOEt 77:23
WRH-5540	35-40	340,0	250,0	DCM
WRH-5547	41-47	206,0	300,0	DCM : MeOH 90:10

### 3.3.1.2. Purificação da sub-fração WRH-5511

Esta sub-fração WRH-5511 foi submetida a CC de sílica ( $d = 2,5$  cm;  $h = 21$  cm) com sistema eluente composto de solventes em ordem crescente de polaridade. Este procedimento levou a obtenção de 93 sub-frações que em seguida foram analisadas por CCDA utilizando-se como reveladores reagente de Dragendorff e luz UV. Os alcaloides ficaram concentrados entre as frações de 23 a 48, entretanto neste procedimento não foi obtido nenhum alcaloide puro. As frações que revelaram positivo para o reagente de Dragendorff em CCDA foram selecionadas para nova purificação.

TABELA 4. Sub-frações obtidas da CC de WRH-5511

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRH-551105	1-5	-	100,0	DCM
WRH-551108	6-8	-	100,0	DCM
WRH-551116	9-16	-	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551122	17-22	-	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551128	23-28	42,50	50,00	DCM : MeOH 95:5
WRH-551130	29-30	29,40	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551131	31	9,400	50,00	DCM : MeOH 95:5
WRH-551138	32-38	6,200	150,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551139	39	3,200	50,00	DCM : MeOH 90:10
WRH-551142	40-42	35,00	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551145	43-45	4,500	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551148	46-48	32,90	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRH-551161	49-61	-	100,0	MeOH



### 3.3.1.3. Purificação da sub-fração WRH551128

Esta sub-fração foi submetida a purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5$  cm;  $h = 17$  cm), com sistema eluente composto de solventes em ordem crescente de polaridade. A partir deste procedimento resultaram-se 13 novas sub-frações que em seguida foram monitoradas por CCDA. Observou-se que os alcaloides ficaram concentrados na fração 5, eluída em DCM:MeOH 98:2. Esta sub-fração WRH55112805 foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5$  cm;  $h = 17$  cm), utilizando-se hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade até a proporção de 1:1, em seguida houve uma troca para DCM, adicionando-se a cada 50 mL 1% de metanol. Assim, na fração 9, eluída em DCM : MeOH (99:1) foi isolado o alcaloide antidesmona (**A1**) (10,0 mg). A fração 12, eluída em DCM:MeOH (97:3) apresentou também outro alcaloide puro, a brachytelona A (**A2**) (1,00 mg).

### 3.3.1.4. Purificação da sub-fração WRH551130

A sub-fração WRH551130 apresentou-se quase pura em CCDA. Esta foi submetida a CC de sílica gel granulação ( $d = 1,5$  cm;  $h = 17$  cm), com sistema eluente isocrático, composto de DCM : MeOH (97:3). As frações de 1 a 4 eluídas em DCM:MeOH 98:2, quando monitoradas por CCD mostraram um único *spot* revelado positivamente com reagente de Dragendorff, estas frações foram reunidas (20 mg), sendo posteriormente caracterizadas como sendo um novo alcaloide denominado como brachytelona A (**A2**).

### 3.3.1.5. Purificação da sub-fração WRH551131

A fração WRH551131 foi submetida a idêntico processo de purificação descrito anteriormente para WRH551130, sendo que de forma idêntica a anterior foi isolado o alcaloide brachytelona A (**A2**) (4mg).

### 3.3.1.6. Purificação da sub-fração WRH551142

A sub-fração WRH-55-11-42 foi selecionada para purificação em procedimento idêntico ao descrito no item 3.11.1.4. Através deste procedimento e após análises de CCDA, a fração 8 eluída em DCM:MeOH (95:5) apresentou-se pura, sendo posteriormente identificada como sendo o alcaloide chamadrona (**A3**) (10,5 mg).

### 3.3.1.7. Identificação dos alcaloides da sub-fração WRH551145

Uma vez que essa sub-fração possuía pouca massa, a mesma foi submetida a análise por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo possível identificar uma mistura dos alcaloides chamaedrona (**A3**) e hyeronimona (**A4**).

### 3.3.1.8. Purificação da sub-fração WRH551148

Uma vez que esta fração apresentou spots revelados positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, a mesma foi submetida a CC de sílica gel granulação ( $d = 1,5$  cm;  $h = 17$  cm), utilizando-se o mesmo esquema descrito no item 3.11.1.4. Este procedimento levou a obtenção de 20 sub-frações, que em seguida foram monitoradas por CCD e RMN de  $^1\text{H}$ . A sub-fração 9, eluída em DCM : MeOH apresentou a mistura dos alcalóides A3 e A4, já a sub-fração 12, também eluída neste sistema, apresentou outro alcalóide diferente dos descritos anteriormente, entretanto com vários sinais de substâncias minoritárias verificados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Uma vez que os procedimentos de Cromatografia em Coluna não foram eficientes para purificar este alcalóide, esta fração (17mg) foi selecionada para purificação por CLAE.

### 3.3.1.9. Análise e purificação da sub-fração WRH55114812 por CLAE

A fração WRH55114812 foi submetida à análise por CLAE no modo analítico, utilizando-se como fase estacionária coluna propildiol ( $d = 0,46$  cm;  $c = 25$  cm), no comprimento de onda de 254 nm e nos sistemas de solvente HEX : EtOH (7:3; 8:2; 9:1) com fluxo de 0,5 mL/min. O melhor sistema de separação das bandas cromatográficas foi HEX:EtOH 9:1, sendo obtidas quatro bandas bem definidas e nos tempos de retenção 11, 15, 17 e 26 min. Para purificação no modo semi-preparativo, foi utilizada coluna propildiol ( $d = 0,78$  cm;  $c = 30$  cm) e fluxo de 1,4 mL/min. No procedimento semi-preparativo as quatro bandas foram reproduzidas nos tempos de retenção 10, 13, 15 e 24 minutos. Após análises de RMN, verificou-se que a substância correspondente ao  $\text{Tr} = 24$  min tratava-se do alcalóide chamaedrona (**A3**) (3,5 mg), a banda proveniente do  $\text{TR} = 10$  min, trata-se de um novo alcalóide denominado de brachytelona C (**A5**) (1,5 mg), já a substância proveniente do  $\text{TR} = 13$  min tratava-se do alcalóide majoritário, posteriormente elucidado como sendo um novo alcalóide denominado brachytelona B (**A6**) (8 mg). Por fim, a substância referente a banda em  $\text{TR} = 17$  min, devido a pouca massa (0,5 mg) não teve sua estrutura elucidada.

### 3.3.1.10. Purificação da fração WRH-49

A fração WRH-49, quando monitorada por CCD utilizando-se como revelador reagente de vanilina e luz UV apresentou spots bem intensos, sendo que com o revelador de vanilina apresentou spots de coloração roxo, vermelho e azulada, indicando a possibilidade da presença de compostos de natureza terpênica e também de aromáticos. Assim, essa fração foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 17$  cm) utilizando como sistema eluente os solvente hexano, DCM e MeOH em ordem crescente de polaridade levando a obtenção de 47 sub-frações, como pode-se observar na próxima tabela 5. A fração 9

apresentou-se pura em CCD revelando-se em luz UV e com reagente de vanilina com uma coloração avermelhada, sendo posteriormente identificada como sendo uma catequina metoxilada (**C1**) (1,7 mg). As frações de 12 a 18 apresentaram spots revelados em tom de roxo a róseo com reagente de vanilina em CCD, indicando tratar-se de uma mistura de triterpenos ou esteroides, sendo esta posteriormente identificada como sendo uma mistura dos triterpenos lupeol (**T1**),  $\alpha$ -amirina (**T2**) e  $\beta$ -amirina (**T3**). As frações de 19 a 25 apresentaram 2 spots com Rfs muito próximos e revelados em tons de roxo a róseo com reagente de vanilina em CCD, posteriormente estes foram identificados como sendo uma mistura dos ácidos triterpênicos: ác. oleanólico (**T4**) e ác. ursólico (**T5**).

TABELA 5. Sub-frações obtidas da CC de WRH-49

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRH-4008	1-8	2,400	300,0	Hex : DCM 10:90
WRH-4909	9	1,700	50,00	DCM
WRH-4911	10-11	5,600	100,0	DCM : MeOH 99:01
WRH-4918	12-18	25,00	300,0	DCM : MeOH 99:01
WRH-4925	19-25	23,00	350,0	DCM : MeOH 97:03
WRH-4929	26-29	1,200	150,0	DCM : MeOH 96:04
WRH-4937	30-37	8,000	300,0	DCM : MeOH 90:10
WRH-5547	38-47	30,00	200,0	MeOH

### 3.3.2. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WRD

A fase Diclorometano (WRD) ao ser monitorada por CCDA utilizando o reagente revelador Dragendorff, sugeriu-se a possível presença de alcaloides devido a vários spots revelados em tom de laranja-tijolo. A purificação de 1,2 g desta fase deu-se então por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 4$  cm;  $h = 29,5$  cm), utilizando como fase móvel sistemas de solventes em ordem crescente de polaridade. As 25 frações obtidas foram reunidas mediante a semelhança de seus Rfs observados por CCDA, bem como da revelação dos mesmos com reagente de Dragendorff, como pode se observar na tabela 6. A análise por RMN de  $^1\text{H}$  e a observação das placas de CCDA reveladas positivamente com Dragendorff foram

fundamentais para o prosseguimento das purificações. Observou-se spots revelados com Dragendorff nas frações de 8 a 13. As frações 1 e 2, ao serem monitoradas por RMN de  $^1\text{H}$  mostraram ser constituídas basicamente por ácidos graxos e triglicerídeos. Nas frações de 3 a 5 foi observado a presença de um spot que em luz UV (254 e 365 nm) revelou como azul intenso e azul celeste, sugerindo a presença de uma cumarina. A fração 26, eluída em metanol, apresentou-se como um sólido vermelho, puro em CCDA variando-se o sistema eluente, sendo posteriormente identificado como sendo a galocatequina (**C2**) (30,0 mg).

TABELA 6. Sub-frações obtidas da CC de WRD

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Volume de solvente (mL)</b>	<b>Sistema eluente</b>
WRD-1	1	122,3	300,0	Hex:AcOEt 9:1
WRD-2	2	9,000	200,0	Hex:AcOEt 8:2
WRD-3	3	6,300	100,0	Hex:AcOEt 7:3
WRD-5	4-5	17,60	200,0	Hex:AcOEt 6:4
WRD-8	6-8	83,60	200,0	Hex:AcOEt 1:1
WRD-9	9	2,500	200,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-10	10	3,000	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-11a	11a	2,900	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-11b	11b	562,6	300,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-12	12	148,6	200,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-13	13	10,50	100,0	DCM : MeOH 90:10
WRD-15	14-15	176,7	100,0	DCM : MeOH 80:20
WRD-18	16-18	133,3	100,0	DCM : MeOH 70:30
WRD-22	19-22	33,00	100,0	DCM : MeOH 60:40
WRD-25	23-25	20,90	100,0	DCM : MeOH 50:50
WRD-26	26	40,00	100,0	MeOH

### 3.3.2.1. Identificação dos alcaloides em mistura nas frações WRD-10 e WRD-11a

Uma vez que estas frações apresentaram pouca massa, as mesmas foram submetidas a análises por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo possível identificar a mistura dos alcalóides antidesmona (**A1**) e chamaedrona (**A3**) na fração WRD-10 e hyeronimona (**A4**) e chamaedrona (**A3**) na fração WRD-11a.

### 3.3.2.2. Purificação da fração WRD-11b

A fração WRD-11b foi submetida a purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 23,5$  cm) utilizando como sistema eluente, mistura de solventes em ordem crescente de polaridade para obter 25 sub-frações, que em seguida foram analisadas por CCDA, utilizando como revelador o reagente de Dragendorff. Foram observados *spots* positivos para Dragendorff entre as frações de 11 a 21, estas em seguida foram reunidas após análise de seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

TABELA 7. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b09	1-9	22,00	300,0	Hex : AcOEt 6:1
WRD-11b10	10	13,50	100,0	Hex : AcOEt 1:1
WRD-11b12	11-12	1,500	50,00	DCM
WRD-11b15	13-15	6,300	150,0	
WRD-11b16	16	70,00	100,0	DCM : MeOH 97:3
WRD-11b17	17	60,00	100,0	DCM : MeOH 95:5
WRD-11b18	18	40,00	100,0	
WRD-11b19	19	115,0	200,0	
WRD-11b20	20	34,00	100	
WRD-11b21	20-21	45,00	100,0	DCM : MeOH 90:10
WRD-11b25	23-25	200,0	100,0	MeOH

A fração WRD-11b12 apresentou-se quase pura em CCDA, a mesma revelou positivamente para o reagente de Dragendorff, sendo posteriormente identificada como sendo N-metil-antidesmona (**A-7**).

A fração WRD-11b15, devido a pouca massa, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e apresentou-se como uma mistura dos alcalóides antidesmona, chamaedrona, brachytelona A e brachytelona B. Uma vez que estes alcalóides já haviam sido isolados anteriormente da fase WRH esta fração não foi submetida a novas purificações.

As sub-frações WRD-11b de 16 a 21 foram submetidas à purificação separadamente devido a diferenças de sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Já a fração WRD-11b-25 apresentou apenas sinais de açúcares no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e não foi trabalhada.

### 3.3.2.3. Purificação da sub-fração WRD-11b16

Esta fração foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5 \text{ cm}$ ;  $c = 24 \text{ cm}$ ) com sistema eluente composto de mistura de solventes em ordem crescente de polaridade, sendo obtidas 13 sub-frações de acordo com a tabela 8.

TABELA 8. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b16

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD11b1601	1	3,400	50,00	Hex : AcOEt 4:6
WRD11b1603	2-3	5,300	50,00	Hex : AcOEt 3:7
WRD11b1605	4-5	10,50	50,00	Hex : AcOEt 2:8
WRD11b1610	6-10	30,00	50,00	Hex : AcOEt 18:82
WRD11b1611	11	4,750	50,00	Hex : AcOEt 16:84
WRD11b1615	12-15	1,230	50,00	AcOEt

Na sub-fração WRD-11b1611, eluída em DCM:MeOH 98:2 foi obtida uma mistura de alcalóides já anteriormente isolados: brachytelona B (**A-6**), brachytelona C (**A-5**) e chamaedrona (**A3**). A sub-fração WRD-11b1610 apresentou *spots* revelados positivamente com o reagente de Dragendorf em CCD e foi posteriormente submetida à análise por CLAE-UV.

### 3.3.2.4. Análise e purificação da sub-fração WRD-11b-1610 por CLAE

A fração WRD-11b1610 foi submetida à análise em CLAE no modo analítico, utilizando-se como fase estacionária coluna propildiol ( $d = 0,46$  cm;  $c = 25$  cm), no comprimento de onda de 254 nm e nos sistemas de solvente DCM : isopropanol (9:1; 95:5 e 98:2) com fluxo de 0,5 mL/min. O melhor sistema de separação das bandas cromatográficas foi DCM : isopropanol (98:2), onde foram observadas três bandas nos tempos de retenção 6,5 min, 8 min e 11 min.

Para purificação no modo semi-preparativo foi utilizada coluna propildiol ( $d = 0,78$  cm;  $c = 30$  cm) e fluxo de 1,4 mL/min, as três bandas foram reproduzidas nos tempos de retenção 8 min, 11 min e 15 min. As três bandas foram separadas e analisadas por RMN, sendo posteriormente identificadas como os alcalóides ciclopeptídicos franganina (**A-8**), frangulanina (**A-9**) e adoutina Y' (**A-10**), respectivamente.

### 3.3.2.5. Purificação da fração WRD-11b17

Esta fração foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm,  $h = 20,5$  cm) com sistema eluente composto de n-hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 11 novas sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus Rfs em CCD e da análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

TABELA 9. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b17

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b171a	1a	5,000	100,0	Hex:AcOEt 3:7
WRD-11b171b	1b	6,000	100,0	
WRD-11b1705	2-5	1,500	100,0	Hex : AcOEt 20:80
WRD-11b1706	6	12,00	100,0	Hex : AcOEt 18:82
WRD-11b1708	7-8	2,000	100,0	Hex : AcOEt 18:82
WRD-11b1709	9	10,00	100,0	
WRD-11b1710	10	12,00	100,0	Hex : AcOEt 1:1
WRD-11b1711	11	8,000	100,0	MeOH

As frações WRD-11b1706 e WRD-11b1709 apresentaram-se puras em CCD e revelaram positivamente com o reagente de Dragendorff, sendo posteriormente identificadas como sendo os alcaloides quinolônicos N-metil-waltheriona-A (**A11**) e waltheriona-C (**A12**) respectivamente. A fração WRD-11b1708 apresentou a mistura destes dois alcaloides. As frações WRD11b1701a e WRD11b1701b apresentaram-se quase puras e muito parecidas em CCD revelando-se com luz UV (254 nm), entretanto foram submetidas a purificação separadamente.

### 3.3.2.6. Purificação das sub-frações WRD-11b1701a e WRD-11b1701b

Estas frações foram submetidas separadamente ao mesmo processo de purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5$  cm;  $h = 21$  cm) com sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (1:3), as frações foram coletadas em oito frascos de 25 mL cada, utilizando, portanto 200 ml de sistema. Assim, em ambas as colunas foi obtido na fração 6 o mesmo alcaloide, entretanto o resultante da CC de WRD11b171b apresentou-se mais puro na análise por RMN de  $^1\text{H}$ , de modo que não houve a reunião entre as frações contendo este alcaloide, que, posteriormente teve sua estrutura elucidada, sendo nomeado de waltheriona D (**A13**). Na fração 7 das duas CCs foi obtido um metabólito secundário que posteriormente foi identificado como sendo a cumarina-lignóide cleomicina A (**CL1**).

### 3.3.2.7. Purificação da sub-fração WRD-11b18

Esta fração foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,0$  cm;  $h = 23$  cm) sendo obtidas 29 novas sub-frações que foram posteriormente reunidas após análises por CCDA.

TABELA 10. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b18

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b1809	1-9	1,500	300,0	Hex : AcOEt 3:7
WRD-11b1813	10-13	2,000	150,0	Hex : AcOEt 25:75
WRD-11b1815	14-15	3,400	100,0	
WRD-11b1818	16-18	10,00	200,0	Hex : AcOEt 18:82
WRD-11b1823	19-23	0,900	50,00	
WRD-11b1824	24	12,00	100,0	
WRD-11b1728	25-28	6,000	200,0	Hex : AcOEt 10:90
WRD-11b1729	29	3,000	100	MeOH



As sub-fração WRD-11b1818 e WRD-11b1824 apresentaram-se quase puras em CCDA revelando-se em luz UV (254 nm), sendo então selecionadas para novas purificações, sendo que a sub-fração WRD-11b1818 apresentou um spot revelado positivamente com o reagente de Dragendorff.

### 3.3.2.8. Purificação da sub-fração WRD-11b1818

Esta sub-fração foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 0,5$ ;  $h = 17$  cm) utilizando sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (20:80) para a obtenção de 12 novas subfrações. As subfrações de 2 a 6 apresentaram o mesmo spot revelado fortemente com luz UV (254 nm) em CCD, destas a sub-fração 4 apresentou-se mais pura, sendo posteriormente identificada como sendo a cumarina-lignóide cleomicina-A.

### 3.3.2.9. Purificação da sub-fração WRD-11b1824

Esta sub-fração foi submetida a CC de sílica flash sob pressão ( $d = 0,5$ ;  $h = 17$  cm) utilizando sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (20:80) para a obtenção de 15 novas subfrações. As sub-frações de 7 a 14 apresentaram o mesmo spot revelado positivamente com reagente de Dragendorff, sendo que as sub-frações 13 e 14 se apresentaram mais puras e foram reunidas, posteriormente esta substância foi identificada como sendo o alcalóide quinolônico waltheriona D (**A13**).

### 3.3.2.10. Purificação da sub-fração WRD-11b19

Esta fração foi submetida a purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 20,5$  cm) com sistema eluente composto de n-hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 32 sub-frações que posteriormente foram monitoradas por CCDA. A partir do sistema Hex : AcOEt 25:75, as frações foram coletadas em frascos de 20 ml, levando ao isolamento de 4 alcaloides quinolônicos. Nas sub-frações 11 e 12 foi isolado o alcaloide 4'-O-metil-waltheriona A (**A14**), nas sub-frações 13 e 14 o alcaloide waltheriona C (**A12**), enquanto que na sub-fração 15 foi isolado o alcaloide waltheriona A (**A-6**) e nas sub-frações de 17 a 19, foi isolado o alcaloide N-metil-waltheriona-B (**A15**).

As demais frações não revelaram positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, portanto não despertou-se o interesse pelo estudo dessas frações.

TABELA 11. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b19

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b1910	1-10	7,500	500,0	Hex : AcOEt 3:7
WRD-11b1912	11-12	6,000	100,0	Hex : AcOEt 25:75
WRD-11b1814	13-14	5,000	100,0	
WRD-11b1815	15	25,70	100,0	
WRD-11b1816	16	1,200	50,00	Hex : AcOEt 18:82
WRD-11b1819	17-19	35,00	100,0	
WRD-11b1725	20-25	10,00	100,0	Hex : AcOEt 1:1
WRD-11b1730	26-30	12,00	100,0	MeOH
WRD-11b1733	31-33	6,000	100,0	MeOH

### 3.3.2.11. Purificação da sub-fração WRD-11b20

A sub-fração WRD-11b20 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , e uma vez que esta apresentou sinais característicos das waltherionas, foi selecionada para purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 20,5$  cm) com sistema eluente composto de n-hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 40 sub-frações que posteriormente foram reunidas de acordo com a semelhança de seus R<sub>f</sub>s em CCDA, utilizando-se como revelador luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff, como pode ser observado na tabela 12.

TABELA 12. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b20

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b2009	1-9	4,000	500,0	Hex : AcOEt 3:7
WRD-11b1913	10-13	3,500	100,0	Hex : AcOEt 25:75
WRD-11b1816	14-16	2,500	100,0	
WRD-11b1817	17	3,000	100,0	
WRD-11b1823	18-23	2,000	50,00	Hex : AcOEt 18:82
WRD-11b1824	24	8,100	100,0	
WRD-11b1727	25-27	5,000	100,0	Hex : AcOEt 1:1
WRD-11b1735	28-35	2,000	100,0	MeOH
WRD-11b1740	36-40	2,500	100,0	MeOH

As subfrações WRD-11b2013 e WRD-11b2024 apresentaram-se puras em CCD, sendo posteriormente identificadas como sendo os alcalóides waltheriona A (**A16**) e waltheriona C (**A12**), respectivamente.

### 3.3.12. Purificação da sub-fração WRD-11b21

A sub-fração WRD-11b21 apresentou dois *spots* revelados positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, sendo então submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5$  cm;  $h = 21$  cm), utilizando como sistema eluente os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 12 novas sub-frações que em seguida foram reunidas de acordo com a semelhança de seus Rfs em CCDA.

TABELA 13. Sub-frações obtidas da CC de WRD-11b21

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WRD-11b2105	1-5	5,000	50,00	Hex : AcOEt 7:3
WRD-11b1906	6	2,300	50,00	Hex : AcOEt 6:4
WRD-11b1807	7	4,000	50,00	Hex : AcOEt 1:1
WRD-11b1809	8-9	3,000	50,00	Hex : AcOEt 3:7
WRD-11b2110	10	5,000	50,00	Hex : AcOEt 2:8
WRD-11b2111	11	6,000	50,00	Hex : AcOEt 1:9
WRD-11b2112	12	15,70	50,00	MeOH

A sub-fração WRD-11b2110 apresentou-se pura em CCD e posteriormente foi identificada como sendo o alcaloide waltheriona A (**A16**). Já a fração WRD-11b2111 continha além da waltheriona A, o mesmo alcaloide da fração WRD-11b2112, sendo que esta última fração foi submetida a novo procedimento de purificação.

### 3.3.2.13. Purificação da sub-fração WRD-11b2112

Uma vez que esta fração estava quase pura e com base na análise de seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se que a substância minoritária possuía sinais típicos dos alcaloides ciclopeptídicos, resolveu-se purificar a mesma em CC de Sephadex LH-20 ( $d = 1,5 \text{ cm}$ ;  $h = 30 \text{ cm}$ ), utilizando como eluente metanol. Foram obtidas 6 frações de 30 ml cada, sendo que na fração 2 obteve-se o alcaloide ciclopetídico (0,85 mg), este não identificado, e na fração 4 foi identificado posteriormente o alcaloide quinolônico waltheriona B (**A17**)

### 3.3.2.14. Purificação da sub-fração WRD-13

A fração WRD-13 foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5 \text{ cm}$ ;  $h = 21 \text{ cm}$ ) com fase móvel composta de sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (1:1) (150 mL), sendo obtidas 15 sub-frações coletadas em volume de 10 ml cada. As sub-frações de 9 a 12 revelaram positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA. Todas apresentaram um spot majoritário, que mostrou-se mais puro nas frações 11 e 12, que foram reunidas e posteriormente o alcaloide correspondente teve sua estrutura elucidada, sendo nomeado de 10-hidroxi-waltheriona D (**A18**) (5,1 mg).

### 3.3.2.14. Purificação da fração WRD-5

A fração WRD-5 quando monitorada por CCDA em luz UV (365nm e 254 nm) apresentou um spot de coloração azul celeste em 365nm e azul intenso em 254nm sugerindo tratar-se de uma cumarina. Esta fração foi então submetida a CC de sílica gel ( $d = 0,5 \text{ cm}$ ;  $h = 21 \text{ cm}$ ), com sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (7:3), foram obtidas 10 sub-frações de 10 mL. A sub-fração 5 apresentou-se pura em CCDA e posteriormente foi identificada como sendo a cumarina escopoletina (**CM1**).

### 3.3.2.15. Purificação da fração WRD-8

A fração WRD-8 foi selecionada para purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão, utilizando sistema eluente isocrático Hex : AcOEt (6:4) até a sub-fração 12 e DCM : MeOH 98:2 da sub-fração 13 até a 18.

A subfração WRD-809 apresentou-se pura em CCDA e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff, sendo posteriormente identificada como sendo a antidesmona (1,5 mg). Já a fração WRD-1814 tratava-se da catequina tetrametoxilada (**C-1**) impura.

### 3.4. Estudo químico do caule de *Waltheria brachypetala* Turcz.

As fases WCH (fase hexânica do caule), WCD (fase diclorometano do caule) e WCA (fase acetato de etila do caule) obtidas do extrato etanólico do caule de *W. brachypetala* foram submetidas aos mesmos procedimentos de análise por CCDA realizados com as fases WRH, WRD e WRA no intuito de identificar, qualitativamente, a presença de alcaloides. Na análise de CCDA com o reagente de Dragendorff, observou-se spots revelados positivamente para as fases WCH e WCD sendo estas selecionadas para posteriores purificações. Durante o procedimento de partição líquido-líquido da fase hidroalcoólica com acetato de etila, formou-se um precipitado que foi filtrado, centrifugado e posteriormente analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo identificado como sendo o flavonoide tirilósideo (**F-1**).

#### 3.4.1. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WCH

Uma vez que a fase WCH apresentou spots revelados positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, 5 g desta fase foi selecionada para purificação por CC de sílica ( $d = 4,5$  cm;  $h = 27$  cm) utilizando como sistema eluente os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 50 frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus Rfs, de acordo com as análises por CCD. Somente as frações de 39 a 44 revelaram positivamente com o reagente de Dragendorff, sendo estas selecionadas para as futuras purificações.

As frações de 1 a 4 apresentaram grande quantidade de triglicerídeos, já as frações 5 e 6 apresentaram apenas a mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol.

As frações de 7 a 13, quando analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , mostraram possuir uma mistura de triterpenos, sendo possível identificar a mistura de lupeol,  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina. Entre as frações reunidas de 29 a 33, observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais da cumarina escopoletina (**C-1**). Entretanto, despertou-se o interesse apenas no estudo das frações alcaloídicas.

TABELA 14. Frações obtidas da CC de WCH

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WCH-4	1-4	400,0	1000	Hex
WCH-6	5-6	350,0	500,0	Hex : AcOEt 9:1
WCH-10	7-10	350,0	300,0	Hex : AcOEt 8:2
WCH-13	11-13	450,0	400,0	
WCH-16	14-16	460,0	200,0	Hex : AcOEt 7:3
WCH-25	17-25	570,0	500,0	Hex : AcOEt 6:4
WCH-28	26-28	334,00	300,0	DCM
WCH-33	29-33	77,00	400,0	DCM : MeOH 99:1
WCH-38	34-38	280,0	200,0	DCM : MeOH 98:2
WCH-42	39-42	384,0	300,0	DCM : MeOH 97:3
WCH-44	43-44	300,0	300,0	DCM : MeOH 95:5
WCH-49	45-49	350,0	200,0	DCM : MeOH 9:1
WCH-50	50	330,0	200,0	MeOH

### 3.4.1.1. Purificação da fração WCH-42

Uma vez que a fração WCH-42 apresentou spots revelados positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, a mesma foi submetida a CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5\text{cm}$ ;  $h = 27\text{ cm}$ ), utilizando como sistema eluente, os solventes: hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 29 novas sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus Rfs em CCDA. As frações de 11 a 15 apresentaram-se puras em CCD, foram reunidas e posteriormente identificadas como sendo a cumarina escopoletina (**C1**). As sub-frações de 16 a 23 revelaram positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, sendo que as sub-frações de 16 a 18 apresentaram-se puras em CCDA, sendo reunidas, e posteriormente identificadas como sendo o alcaloide antidesmona (**A-1**). A fração 19, apresentou pouca massa, mas através da análise de RMN de  $^1\text{H}$  e GC-MS foi possível identificar

a mistura de antidesmona (**A1**) e hyeronimona (**A4**). As frações de 20 a 23 foram reunidas para posterior purificação.

TABELA 15. Sub-frações obtidas da CC de WCH-42

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WCH-4203	1-3	45,00	200,0	Hex : AcOEt 7:3
WCH-4207	4-7	63,00	100,0	Hex : AcOEt 6:4
WCH-4210	8-10	43,00	100,0	
WCH-4215	11-15	45,00	100,0	
WCH-4218	16-18	35,00	200,0	DCM : MeOH 99:1
WCH-4219	19	1,500	100,0	DCM : MeOH 99:1
WCH-4223	20-23	55,00	300,0	DCM : MeOH 95:5
WCH-4226	24-26	55,00	200,0	DCM : MeOH 9:1
WCH-4229	27-29	50,00	100,0	MeOH

#### 3.4.1.2. Purificação da sub-fração WCH-4223

A sub-fração WCH-4223 apresentou uma coloração verde intensa sugerindo a presença de derivados da clorofila. Esta fração foi submetida a CC de sílica flash ( $d = 2,5$ ;  $h = 21$  cm) utilizando sistema eluente isocrático DCM : MeOH 96:4, sendo obtidas 21 novas frações coletadas em frascos de 30 ml. Verificou-se que os alcalóides ficaram concentrados entre as frações de 1 a 7 (35 mg), sendo estas então reunidas, as demais frações não revelaram positivamente para Dragendorff em CCD. Este procedimento não foi eficaz na separação do pigmento verde da fração alcaloídica.

#### 3.4.1.2. Purificação da sub-fração WCH-422307

A sub-fração WCH-422307 contendo os alcalóides da sub-fração “mãe” WCH-4223 foi submetida à nova CC de sílica gel granulação ( $d = 2,5$ ;  $h = 21$  cm) com sistema eluente isocrático Hex : AcOEt 25:75, sendo obtidas 25 novas sub-frações reunidas com base na semelhança de seus R<sub>f</sub>s em CCD. As sub-frações 12 e 13 foram reunidas e devido a pouca massa (2,5 mg) foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H e GC-MS sendo identificada uma mistura da barchytelona A (**A2**) e a cumarina-

lignóide cleomicina-A (**CL1**). As sub-frações de 15 a 19 foram reunidas e também analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  devido a pouca massa, sendo identificada uma mistura dos alcalóides brachytelona A (**A2**) e chamaedrona (**A3**). Já a sub-fração 14 apresentou um alcaloide puro em CCD, que posteriormente teve sua estrutura elucidada e denominada de waltheriantidesmona (**A19**) (8,1 mg). O pigmento de coloração verde ficou concentrado nas frações 25 e 27, entretanto, estas ainda possuíam spots revelados positivamente com Dragendorff, sendo então submetidas a nova purificação.

#### 3.4.1.3. Purificação da sub-fração WCH-42230725

Esta sub-fração (25 mg) foi submetida a purificação por Sephadex LH-20 ( $d = 2,5$  cm;  $d = 30$  cm) utilizando metanol como sistema eluente. Foram obtidas 5 novas sub-frações, sendo que o pigmento verde ficou concentrado nas sub-frações de 1 a 3. A sub-fração 4 apresentou-se pura em CCD e foi identificada como sendo o alcaloide brachytelona A (**A2**) (10 mg), já a sub-fração 5, também se apresentou pura e posteriormente foi elucidada como sendo um novo alcaloide, posteriormente nomeado de brachytelona D (2,5 mg) (**A20**).

#### 3.4.1.3. Purificação da sub-fração WCH-42230727

A sub-fração WCH-42230727 foi submetida à purificação em procedimento análogo a WCH-42230725, sendo que os alcaloides ficaram concentrados nas sub-frações 5 e 6. Uma vez que estas possuíam pouca massa, foram submetidos a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e GC-MS sendo possível a identificação dos alcalóides brachytelona A (**A2**) e C (**A5**) na sub-fração 5 e a chamaedrona (**A3**) (1,5 mg) na fração 6.

#### 3.4.1.4. Purificação da fração WCH-44

A fração WCH-44 foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação ( $d = 3$  cm;  $h = 20$  cm) utilizando como sistema eluente os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Esse procedimento originou 15 novas sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus R<sub>f</sub>s verificado em CCDA. Analisando com o revelador Dragendorff, observou-se que os alcaloide ficaram concentrados nas sub-frações 11 e 12. Estas sub-frações reunidas apresentaram um sólido branco que posteriormente foi filtrado e identificado como sendo o esteroide sitosterol glicosilado (**E-3**) (100 mg).



TABELA 16: Sub-frações obtidas da CC de WCH-44

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WCH-4401	1	5,00	200,0	Hex : AcOEt 1:1
WCH-4402	2	4,00	300,0	
WCH-4405	3-5	14,00	100,0	
WCH-4408	6-8	4,500	200,0	DCM
WCH-4410	9-10	2,300	100,0	DCM : MeOH 97:3
WCH-4412	11-12	200,0	200,0	DCM : MeOH 95:5
WCH-4413	13	25,00	100,0	DCM : MeOH 9:1
WCH-4414	14	20,00	100,0	DCM : MeOH 8:2
WCH-4415	15	10,00	100,0	MeOH

#### 3.4.1.5. Purificação da sub-fração WCH-4412

Esta sub-fração foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação ( $d = 1,7$  cm;  $h = 25$  cm), utilizando sistema isocrático DCM : MeOH (97:3) como sistema eluente, sendo obtidas 15 novas sub-frações, posteriormente reunidas com base na semelhança de seus R<sub>f</sub>s e submetidas a análises por RMN de <sup>1</sup>H.

Na sub-fração 1 obteve-se a chamaedrona (**A3**) como alcaloide puro, já nas sub-frações reunidas 2 e 3 obteve-se uma mistura da chamaedrona (**A3**) e waltheriona D (**A13**). Nas frações reunidas 4 e 5 obteve-se o alcaloide waltheriona A (**A16**) puro. Enquanto-que nas sub-frações reunidas 6 e 7 obteve-se o sosterol glicosilado (**E-1**) juntamente com a mistura de waltheriona A (**A16**) e waltheriona D (**A13**). Na fração 8 obteve-se o sitosterol glicosilado puro e nas frações de 9 a 14 uma mistura de alcaloides que posteriormente foi submetida a purificação por CLAE.

#### 3.4.1.6. Análise e purificação da sub-fração WCH-441214 por CLAE

A sub-fração WCH-441214 foi submetida à análise por CLAE no modo analítico, utilizando-se como fase estacionária coluna propildiol ( $d = 0,46$  cm;  $c = 25$  cm), no comprimento de onda de 254 nm e nos sistemas de solvente HEX : EtOH (8:2; 9:1 e 95:5) com fluxo de 0,5 mL/min. O melhor sistema de separação das bandas cromatográficas foi HEX : EtOH (95:5), onde foram observadas 5 bandas cromatográficas nos tempos de retenção 18, 20, 22, 30 e 40 minutos. Para purificação no modo semi-preparativo foi utilizada coluna propildiol ( $d = 0,78$  cm;  $c =$

30 cm) e fluxo de 1,4 mL/min. Neste procedimento, as cinco bandas foram reproduzidas nos tempos de retenção 19, 21, 23, 31 e 41 minutos. Estas foram separadas e analisadas por RMN, sendo possível o isolamento da brachytelona-C (**A5**) em Tr = 19 min, brachytelona-B (**A6**) em Tr = 21 min, o alcaloide 8-O-metilhyeronimona (**A21**) em Tr = 23 min, o alcaloide desóxi-antidesomona (**A22**) em Tr = 31 min e chamaedrona (**A3**) em Tr = 41 min.

### 3.5. Isolamento dos alcaloides e outros metabólitos da fase WCD

A fase WCD (4,0 g) foi submetida à purificação por CC de sílica gel ( $d = 4,5$  cm;  $h = 38$  cm) utilizando os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Este procedimento levou à obtenção de 22 sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus Rfs em CCDA.

TABELA 17. Frações obtidas da CC de WCD

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WCD-2	1-2	100,0	300,0	Hex : AcOEt 9:1
WCD-3	3	150,0	200,0	Hex : AcOEt 8:2
WCD-5	4-5	300,0	200,0	Hex : AcOEt 4:6
WCD-7	6-7	200,0	200,0	Hex : AcOEt 3:7
WCD-9	8-9	150,0	200,0	Hex : AcOEt 1:1
WCD-10	10	250,0	100,0	DCM : MeOH 98:2
WCD-12	11-12	350,0	300,0	DCM : MeOH 95:5
WCD-13	13	150,0	200,0	
WCD-15	14-15	750,0	200,0	
WCD-18	16-18	250,0	200,0	DCM : MeOH 9:1
WCD-19	19	600,0	200,0	DCM : MeOH 8:2
WCD-22	20-22	550,0	200,0	MeOH

As frações de 13 a 19 revelaram positivamente para Dragendorff sendo selecionadas para posteriores purificações. As frações 9 e 22 foram monitoradas por RMN de  $^1\text{H}$  e apresentaram sinais de compostos fenólicos, sendo também selecionadas para purificação.

### 3.5.1. Purificação da fração WCD-18

A fração WCD-18 foi submetida à purificação por CC de Sephadex LH-20, utilizando metanol como sistema eluente. Este procedimento levou à obtenção de 10 novas sub-frações. As subfrações de 3 a 7 apresentaram um único spot revelado positivamente com o reagente de Dragendorff, posteriormente este alcaloide foi identificado como sendo a waltheriona B (**A17**) (78,8 mg).

### 3.5.2. Purificação da fração WCD-13

A fração WCD-13 foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 25$  cm) utilizando como eluente os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 19 novas sub-frações, posteriormente reunidas com base na semelhança de seus Rfs.

TABELA 18. Sub-frações obtidas da CC de WCD-13

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (mL)	Sistema eluente
WCD-1305	1-4	40,00	200,0	Hex : AcOEt 25-75
WCD-1308	5-8	34,00	200,0	Hex : AcOEt 18:82
WCD-1309	9	17,00	100,0	
WCD-1313	10-13	30,00	150,0	
WCD-1317	14-17	25,00	100,0	AcOEt
WCD-1319	18-19	2,000	100,0	MeOH

As sub-frações de 10 a 13 foram reunidas e posteriormente foi identificado a cumarina-lignóide cleomicina A (**CL1**), já as sub-frações de 14 a 17 também foram reunidas e posteriormente identificadas como sendo uma mistura de cleomicina A (**CL1**) e waltheriona-D (**A13**).

### 3.5.3. Purificação da fração WCD-15

Esta fração foi submetida a procedimento idêntico de purificação àquele realizado com a fração WCD-13. Foram obtidas 40 novas sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus R<sub>f</sub>s em CCD e de acordo com análises de RMN de <sup>1</sup>H.

TABELA 19. Sub-frações obtidas da CC de WCD-15

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (ml)	Sistema eluente
WCD-1506	1-6	5,000	100,0	Hex : AcOEt 25:75
WCD-1508	7-8	7,000	100,0	
WCD-1513	9-13	4,000	100,0	
WCD-1515	14-15	2,500	100,0	
WCD-1520	16-20	7,000	100,0	Hex : AcOEt 2:8
WCD-1523	21-23	8,000	100,0	
WCD-1528	24-28	200,0	100,0	Hex : AcOEt 1:9
WCD-1534	29-34	400,0	100,0	
WCD-1535	35	25,00	100,0	DCM:MeOH 95:5
WCD-1536	35-36	15,00	100,0	
WCD-1537	37	15,00	100,0	MeOH
WCD-1538	38	5,000	100,0	
WCD-1539	39	5,000	100,0	
WCD-1540	40	47,00	100,0	

Em CCD revelando-se com o reagente de Dragendorff, observou-se que os alcaloides ficaram concentrados entre as frações de 16-40. As frações 38 e 39 apresentaram-se puras e iguais em CCD, sendo posteriormente identificadas como sendo o alcaloide waltheriona A (**A16**). Já a fração 40 também apresentou-se pura em CCD, sendo posteriormente identificado como sendo a waltheriona B (**A18**). Foi dado prosseguimento na purificação das sub-frações 28 e 34. As frações de 35 a 37 apresentaram a waltheriona-A (**A16**) impura.

### 3.5.4. Purificação da sub-fração WCD-1528

Esta sub-fração foi submetida a purificação por CC de sílica gel granulação sob-pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 25$  cm) utilizando como eluente, um sistema isocrático DCM : MeOH 97:3. Foram obtidas 17 sub-frações que posteriormente foram reunidas por CCD e monitoradas por RMN de <sup>1</sup>H. Essas análises mostraram que a fração WCD-1528 era composta majoritariamente por cumarinas-lignóides

concentradas entre as sub-frações de 1 a 8. Foram reunidas as frações de 1 a 7 e a fração 8 foi mantida separada.

### 3.5.5. Purificação das sub-frações WCD-152807 e WCD-152808

Estas duas sub-frações foram submetidas a idêntico processo de purificação por CC de sílica gel ( $d = 2,5$  cm;  $h = 12$  cm). Da sub-fração WCD-152807 foram obtidas 15 novas sub-frações coletadas em frascos de 20 mL. Neste procedimento foram obtidas duas cumarinas lignóides puras, na sub-fração 4 foi obtida a di-acetil-cleomicina A (**CL2**) e na sub-fração 5 foi obtida a cleomicina A (**CL1**). Já para a sub-fração WCD-152808 foi obtida apenas uma mistura das duas cumarinas-lignóides **CL1** e **CL2** na fração 5.

### 3.5.6. Purificação da sub-fração WCD-1534

Esta sub-fração foi submetida à purificação por CC de sílica flash sob pressão ( $d = 2,5$  cm;  $h = 27$  cm) utilizando se como sistema eluente os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Este procedimento levou a obtenção de 41 novas sub-frações posteriormente reunidas com base na semelhança de seus R<sub>f</sub>s em CCD e por análises de RMN de <sup>1</sup>H.

TABELA 20. Sub-frações obtidas da CC de WCD-1534

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (ml)	Sistema eluente
WCH-153408	1-8	5,000	400,0	Hex : AcOEt 1:1
WCH-153409	9	3,500	50,00	Hex : AcOEt 1:1
WCH-153412	10-12	5,000	100,0	Hex : AcOEt 25:75
WCH-153414	13-14	23,00	200,0	
WCH-153415	15	30,00	50,00	
WCH-153417	16-17	100,0	100,0	
WCH-153423	18-23	100,0	300,0	Hex : AcOEt 18:82
WCH-153427	24-27	200,0		
WCH-153430	28-30	6,500	200,0	DCM : MeOH 95:5
WCH-153435	31-35	3,500	200,0	DCM : MeOH 9:1
WCH-153440	36-40	2,300	200,0	MeOH

As Sub-frações de 15 a 30 apresentaram alcaloides quando monitoradas por CCDA com reagente de Dragendorff, as sub-frações 23 e 27 apresentaram como componente majoritário a waltheriona-D (**A13**).

### 3.5.7. Purificação da sub-fração WCD-153417

Uma vez que esta fração apresentou dois spots revelados positivamente com Dragendorff em CCD, a mesma foi submetida à purificação por CC de sílica gel granulação sob pressão ( $d = 1,5$  cm;  $h = 22$  cm), utilizando como eluente o sistema isocrático Hex : AcOEt 18:82. Foram obtidas 15 sub-frações coletadas em erlenmeyrs de 50 ml cada, sendo que os alcaloides ficaram concentrados na sub-fração 15.

### 3.5.8. Purificação da sub-fração WCD-15341715

Esta sub-fração foi submetida à purificação por CC de Sephadex LH-20, utilizando como sistema eluente metanol. Foram obtidas 9 sub-frações. Nas frações 4 e 5 ficaram concentrados um alcaloide, que posteriormente foi identificado como sendo o alcaloide *N*-metil-waltheriona A (**A11**).

### 3.5.9. Purificação da fração WCD-09

Esta fração foi submetida a CC de sílica gel ( $d = 2,5$  cm;  $h = 27$  cm) com sistema eluente composto dos solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, foram obtidas 15 novas sub-frações que posteriormente foram reunidas com base na semelhança de seus Rfs.

TABELA 21. Sub-frações obtidas da CC de WCD-09

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Volume de solvente (ml)	Sistema eluente
WCD-0905	1-5	40,00	200,0	Hex : AcOet 7:3
WCD-0907	6-7	35,00	200,0	Hex : AcOet 6:4
WCD-0910	8-10	25,00	100,0	Hex : AcOet 3:7
WCD-0912	11-12	15,00	100,0	
WCD-0914	13-14	08,00	100,0	Hex : AcOEt 1:1
WCD-0915	15	14,00	100,0	MeOH

A sub-fração 7 apresentou-se pura em CCDA, sendo posteriormente identificada como sendo a cumarina escopoletina (**C1**).

### 3.5.10. Purificação da fração WCD-22

A fração WCD-22 foi submetida a purificação por CC de Sephadex LH-20 ( $d = 2,5$  cm;  $h = 50$  cm), utilizando metanol como sistema eluente. Foram obtidas 30 novas sub-frações, reunidas com base na semelhança de seus Rfs em CCDA ou a partir de análise comparativa de seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Na sub-fração 7 obteve-se uma substância pura, posteriormente identificada como sendo o ácido clorogênico (**Q-1**). Não foi dada continuidade a purificação das demais sub-frações de WCD-22.

## 3.6. Estudo químico do caule de *W. brachypetala* por HPLC-UV-MS-MS

Com o objetivo de se obter mais informações a cerca dos alcaloides quinolônicos de *Waltheria brachypetala* Turcz. foi realizado um estudo das fases WCH e WCD via HPLC-UV-MS e HPLC-UV-MS-MS. Foi realizado um levantamento na literatura dos alcaloides derivados da antidesmona e um estudo teórico sobre uma possível rota dos intermediários das waltherionas. Então, para todas essas estruturas levantadas foi feito o cálculo de suas massas, somado o valor de uma unidade, já considerando o modo de ionização positivo. Assim foi realizado uma busca dos íons selecionados e em seguida realizado os experimentos de MS-2.

### 3.6.1. Condições experimentais de análise por HPLC-DAD das fase WCH e WCD.

Para análise das fases WCH e WCD via CLAE-DAD foi utilizada coluna C-18 (5 micra) em sistema gradiente de eluição, utilizando-se os solvente metanol, acetonitrila e água, de acordo com a tabela 22. Foi escolhida uma faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm. Posteriormente estas mesmas condições foram reproduzidas no aparelho de HPLC-MS, onde para cada banda cromatográfica foi possível saber a massa *pseudo*-molecular  $[M + H^+]$  da substância correspondente.

TABELA 22. Sistema gradiente de eluição em CLAE-DAD

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	água (%)	acetonitrila (%)	metanol (%)
0,00	0,80	5,00	5,00	90,0
50,0	0,80	40,0	40,0	30,0
70,0	0,80	30,0	60,0	10,0
80,0	0,80	30,0	60,0	10,0
80,1	0,80	5,00	5,00	90,0
90,0	0,80	5,00	5,00	90,0

### 3.6.2. Condições para as análises de MS

✓ Condições gerais:

Modo de ionização: Eletro-spray (ESI), modo positivo.

Volume de injeção: 20 microlitros

Concentração de fase (extrato particionado): 50 micromolar

✓ Condições específicas de MS para a fase WCH:

CUR = 30,0

IS = 5000

Temperatura: 450°C

Gás 1 = 40,0

Gás 2 = 45,0

Ihe = on

CAD = 6,00

DP = 20,0

FP = 400,0

EP = 12,00

CEP = 28,82

CE = 60, mas variando de acordo com cada substância.

CXP = 4,00



✓ Condições específicas de MS para a fase WCD

CUR = 40,0

IS = 5500

Temperatura: 450°C

Gás 1 = 30,0

Gás 2 = 20,0

Ihe = on

CAD = \*

DP = 60,0

FP = 350

EP = 9,00

CEP = 28,82

CE = 60, mas variando de acordo com cada substância

### 3.6.3. Análises de HPLC-MS/MS da fase WCH

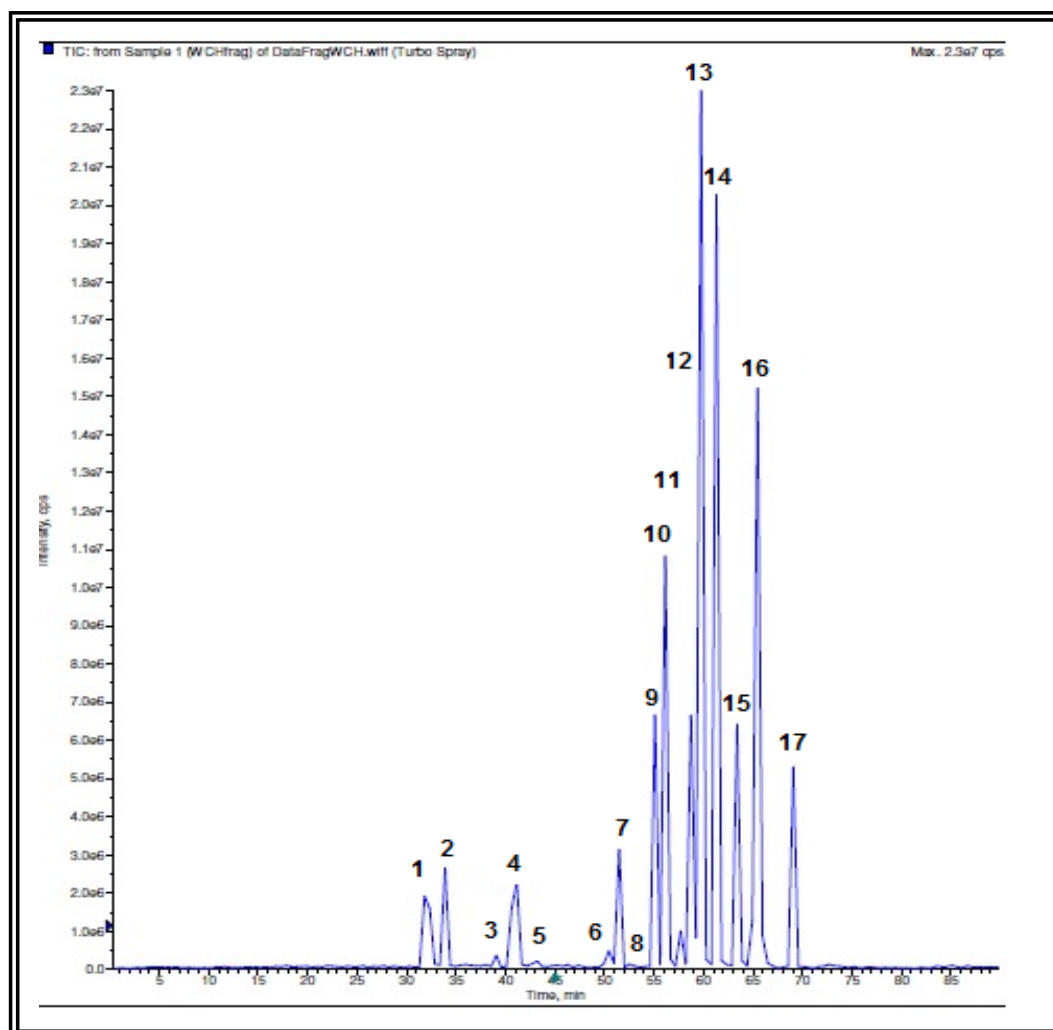


FIGURA 6b. Cromatograma de íons totais selecionados da fase WCH

A partir da análise de HPLC-MS/MS da fase WCH utilizando o modo íon selecionado, foram obtidos 17 picos com seus respectivos valores de  $m/z$  no modo positivo. Estes posteriormente foram submetidos à análise por HPLC-MS/MS. A identificação dos compostos referentes a estes picos está discutida no item “Resultados e Discussões”. O quadro 12 apresenta os respectivos tempos de retenção referente a cada pico e o valor de  $m/z$  do íon *pseudo*-molecular.

Pico cromatográfico	Tempo de Retenção (min)	$m/z$ [M + H <sup>+</sup> ]	Substância identificada
1	32,53	394	waltheriona A
2	34,08	394	waltheriona B
3	39,29	348	13-hidroxi-melochinona
4	41,36	348	waltheriona D
5	43,00	348	diastereoisômero da waltheriona D
6	50,54	322	hyeronimona
7	51,61	356	waltheriahyeronimona
8	52,30	370	brachytelona B
9	56,23	322	vanessina
10	56,13	320	antidesmona
11	57,72	336	brachytelona C
12	58,88	306	desoxi-antidesmona
13	59,79	336	chamaedrona
14	63,44	370	brachytelona A
15	65,48	336	metil-hyeronimona
16	65,58	354	waltheriantidesmona
17	69,10	336	brachytelona D

QUADRO 12. Alcaloides identificados por HPLC-MS/MS da fase WCH

## 3.6.4 - Análises de HPLC-MS/MS da fase WCD

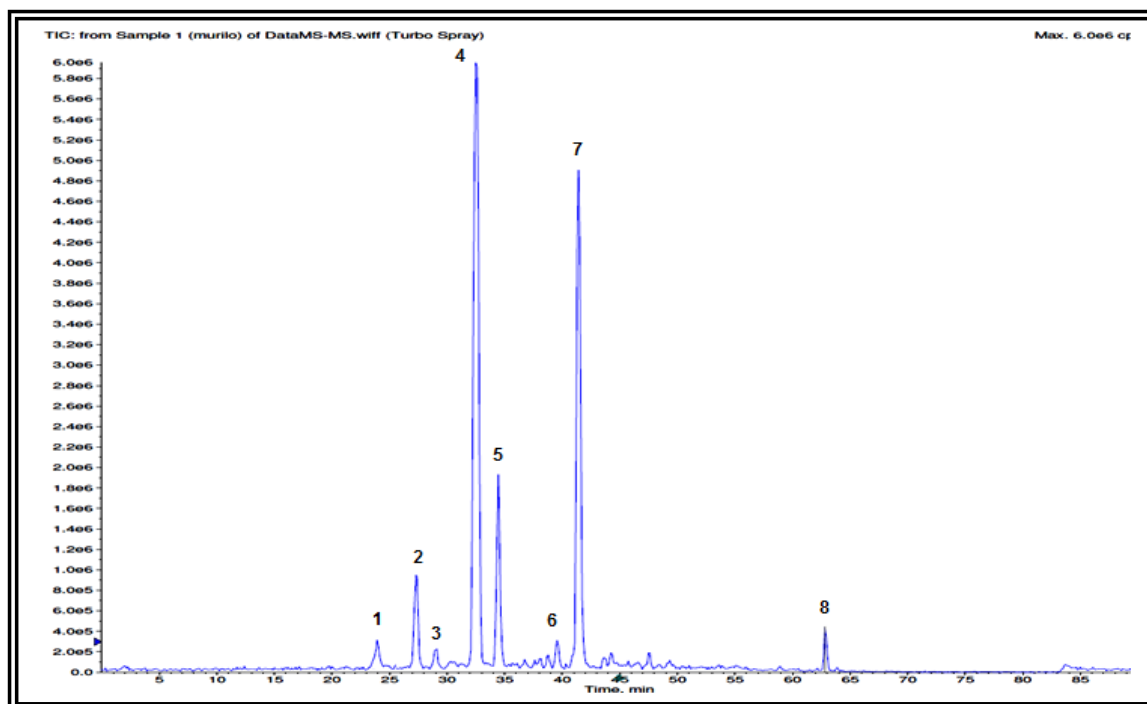


FIGURA 6c. Cromatograma de íons totais selecionados da fase WCD

A partir da análise de HPLC-MS da fase WCD utilizando o modo íon selecionado, foram obtidos 8 picos com seus respectivos valores de  $m/z$  no modo positivo. Estes posteriormente foram submetidos à análise por HPLC-MS/MS. A identificação dos compostos referentes a estes picos está discutida no ítem “Resultados e Discussões”. O quadro 13 apresenta os respectivos tempos de retenção referente a cada pico e o valor de  $m/z$  do íon *pseudo*-molecular.

Pico cromatográfico	Tempo de Retenção (min)	$m/z$ [M + H <sup>+</sup> ]	Substância identificada
1	32,53	364	13-hidroxi-9,10-epóxi-melochinona
2	34,08	364	10-hidroxi-waltheriona D
3	39,29	364	<i>epi</i> -10-OH-waltherionaD
4	41,36	394	waltheriona A
5	43,00	394	Waltheriona B
6	50,54	348	13-OH-melochinona
7	51,61	348	Waltheriona D
8	63,00	332	melochinona

QUADRO 13. Alcaloides identificados por HPLC-MS/MS da fase WCD

### 3.7. Materiais e métodos

#### 3.7.1. Obtenção dos extratos brutos

Raízes e caule secos foram moídos em moinho da marca Willey TECNAL modelo TE-650. Para a maceração do material vegetal moído foi utilizado etanol destilado do grupo de Produtos Naturais da UFSCAR e aparelho de Ultra-turrax operando com 14,7 rpm. Para a concentração de frações líquidas foram utilizados rota evaporadores rotatórios sob pressão reduzida: BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C e BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

#### 3.7.2. Separações cromatográficas

Para a purificação das substâncias foram utilizadas:

- i. Cromatografia por adsorção em coluna de vidro (CC) utilizando-se como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh da ACROS ORGANICS.
- ii. Cromatografia por exclusão em coluna de vidro utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, da Amersham Pharmacia Biotech AB.
- iii. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando-se o equipamento SHIMADZU LC-6AV, condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo e "loop" de 200 µL. Como fase estacionária foi utilizada colona propil-diol (25 x 0,46 cm) para o modo analítico e (30 x 0,78 cm) no modo semipreparativo e diâmetro de partícula 10µm. Como fase móvel foram utilizados os solventes hexano, etanol, diclorometano e metanol grau HPLC das marcas da MERCK, TEDIA e da J. T. BECKER.

#### 3.7.3. Análises por Cromatografia em Camada Delgada

Para as análises em CCD foram utilizadas folhas de alumínio com sílica gel 60 F254, com 0,2 mm de espessura da Merck. Como reveladores foram utilizados luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, utilizando-se Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C. Foram utilizando ainda os reagentes de Dragendorff e Liebermann-Burchard.

O reagente de Liebermann-Burchard foi preparado em capela adicionando-se cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado para cada 20ml de anidrido acético e 20 mL álcool etílico misturados em banho de gelo.

O reagente de Dragendorff foi preparado a partir de duas soluções A e B. A solução A foi preparada dissolvendo em 80 ml de água 1,7g de nitrato básico de bismuto, já para a solução B foi dissolvido 16g de iodeto de potássio em 40 mL de

água. A solução estoque foi preparada a partir da mistura 1:1 (V:V) da solução A e B e mantida em refrigerador. O reagente Spray foi preparado adicionando-se para cada 5 ml de solução estoque 10 g de ácido tartárico em 50 mL de água.

### 3.7.4. Métodos de determinação estrutural

Foram utilizados os seguintes métodos para determinação estrutural das substâncias isoladas:

#### i. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (1D e 2D)

Para as análises de RMN substâncias puras ou em mistura foram solubilizadas em solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, com % de deutério de 99,8% para  $\text{CDCl}_3$  e MeOD e 99,9% para DMSO- $d_6$ .

Foram utilizados espectrômetros de RMN do DQ/UFSCAR: Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e 100 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e AVANCE III 400NANO Varian 9,4 T (400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e 100 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

#### ii. Espectrometria de Massas

Para as análises de MS no modo ESI as amostras puras foram solubilizadas em metanol grau HPLC para uma concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$  e para a análise de extratos, estes foram solubilizados também em metanol grau HPLC na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Foram utilizados os equipamentos MICROMASS QUATTRO LC – Modo de ionização Eletrospray (ESI) (modo positivo) do LABIOMIM/UFSCAR (Laboratório de Bioquímica Micromelecular de Microorganismos) e APPLIED BIO SYSTEM MS (triplo quadrupolo) equipado com fonte ESI/APCI modelo Agilent 1200 do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCAR, para as análises de HPLC/MS foi utilizado este equipamento, sendo que para o cromatógrafo foi utilizada coluna C-18 (15 x 0,5 cm) e partícula de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Para as análises de GC/MS as amostras foram dissolvidas em acetato de etila grau HPLC, sendo injetados 1  $\mu\text{l}$  de composto na concentração de 1mg/ml, com *split ratio* 10. Para os alcaloides foi utilizada rampa padrão descrita na literatura por (BUSKE *et. al.*; 1999), para a cumarina escopoletina e o derivado de nor-ionona calendina foi utilizada rampa com temperatura do injetor 250°C e temperatura da interface 280°C, a temperatura inicial de 70°C mantida por 5 min e elevando 10°C/min até 250°C, mantendo-se esta temperatura por 10 minutos. Foi utilizado o equipamento Shimadzu QP 5000- Ionização por Impacto Eletrônico (70 eV) do DQ/UFSCAR e coluna DB-5.

As substâncias inéditas foram submetidas a análises por espectrometria de massas de alta resolução, utilizando-se o equipamento BRUKER DALTONICS, BILLERICA, modelo UltrOTOFG-ESI-TOF (modo positivo e negativo) pertencente ao laboratório de Espectrometria de Massas do grupo de pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

### iii. Rotação óptica

Os compostos com carbono quiral tiveram sua rotação óptica determinada em equipamento PERKIN-ELMER modelo 241 do laboratório de Sínteses Orgânicas do prof. Timothy John Brockson. Utilizou-se como solventes: diclorometano e metanol grau HPLC e as concentrações foram determinadas a partir de modelos da literatura.

### iv. Curvas de Dicroísmo Circular

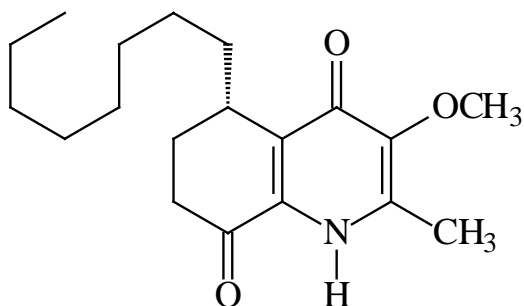
Curvas de DC foram obtidas em aparelho JASCO-720 do grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física da USP (São Carlos). Foi utilizada como faixa de comprimento de onda 200 a 500 nm.

## 3.7.5. Processamento de espectros

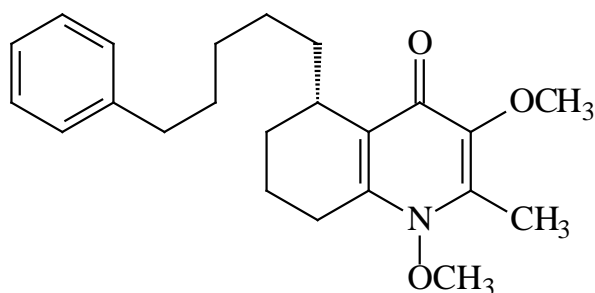
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram processados utilizando-se os *softwares* TOPSPIN 6.0, ACD LABS e Spin Works. Os espectros de massas e dicroísmo circular foram processados pelos respectivos *softwares* dos aparelhos.

## 3.8. Metabólitos secundários isolados

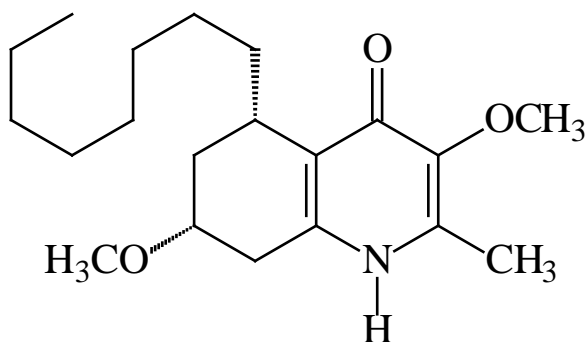
## 3.8.1. Alcaloides quinolínicos e quinolin-4-onas



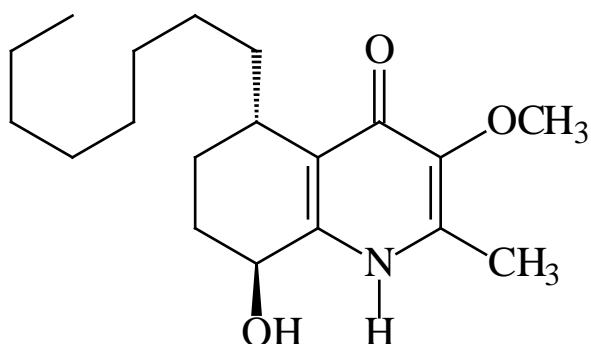
Nome: antidesmona  
 Código: A1  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 63  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



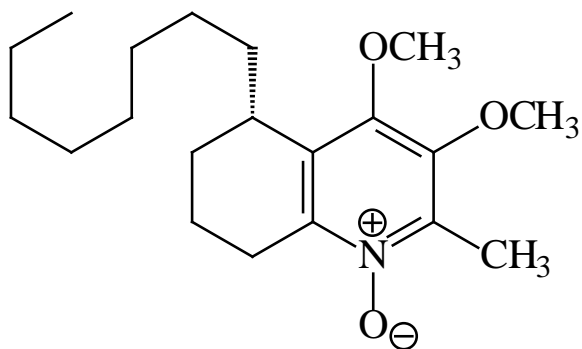
Nome: brachytelona A  
 Código: A2  
 Aspecto físico: óleo marrom  
 Origem: raiz e caule  
 elucidação estrutural: p. 95  
 atividades biológicas: a partir de 323  
**SUBSTÂNCIA INÉDITA**



Nome: chamaedrona  
 Código: A3  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 88  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: hyeronimona  
 Código: A-4  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 134  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: brachytelona C

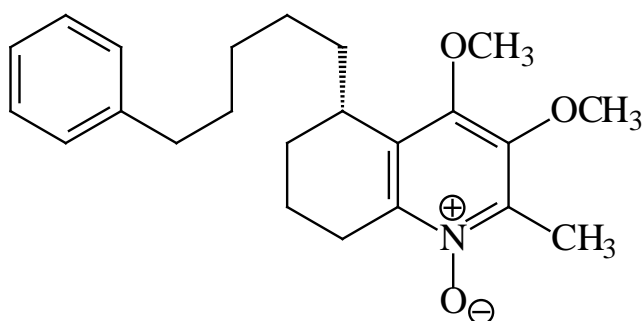
Código: A5

Aspecto físico: óleo incolor

Origem: raiz e caule

elucidação estrutural: p. 120

atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: brachytelona B

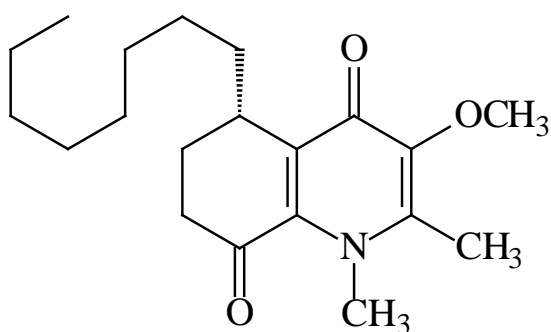
Código: A6

Aspecto físico: óleo incolor

Origem: raiz e caule

elucidação estrutural: p. 107

atividades biológicas: p. a partir de 323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**



Nome: *N*-metil-antidesmona

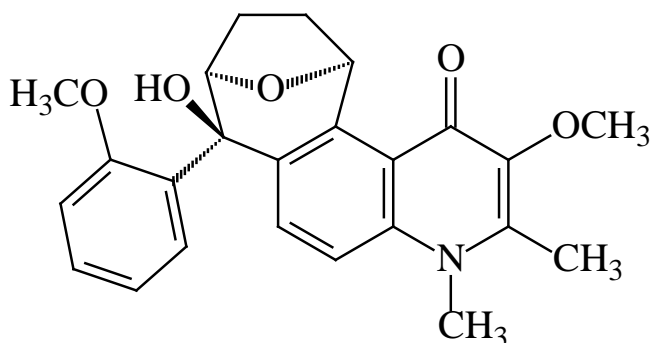
Código: A7

Aspecto físico: óleo marrom

Origem: raiz e caule

Identificação estrutural: p. 86

Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: *N*-metil-waltheriona A

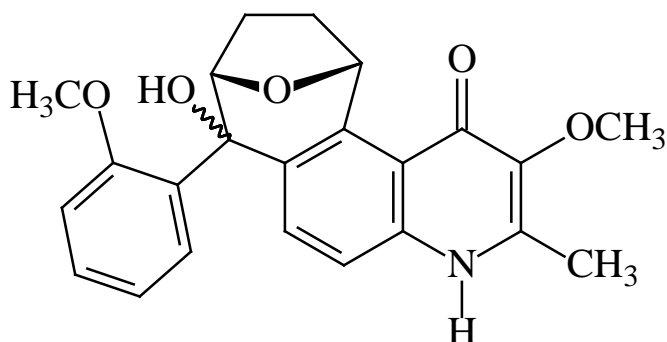
Código: A11

Aspecto físico: sólido branco amorfo

Origem: raiz e caule

Identificação estrutural: p. 165

Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: waltheriona C

Código: A12

Aspecto físico: sólido branco amorfo

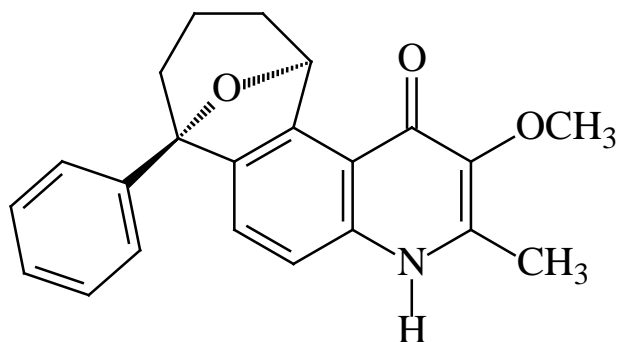
Origem: raiz e caule

Identificação estrutural: p. 193

Atividades biológicas: p. a partir de 323

**SUBSTÂNCIA INÉDITA**





Nome: walthersona D

Código: A13

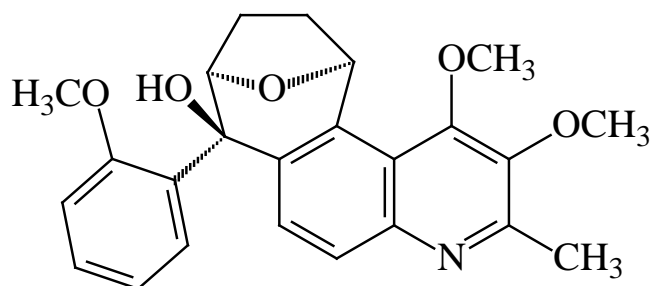
Aspecto físico: sólido branco amorfo

Origem: raiz e caule

elucidação estrutural: p. 204

atividades biológicas: p. a partir de

323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**



Nome: 4-O-metil-walthersona A

Código: A14

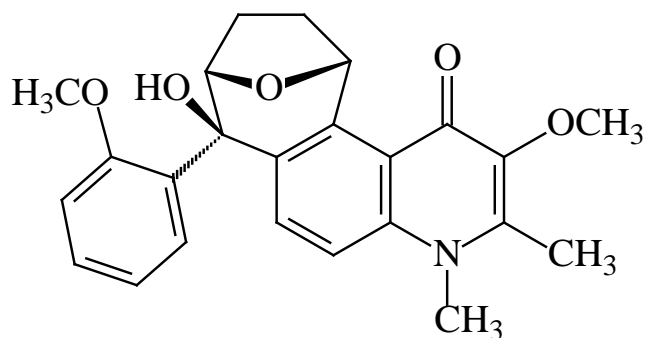
Aspecto físico: sólido branco amorfo

Origem: raiz e caule

elucidação estrutural: p. 170

atividades biológicas: p. a partir de

323



Nome: N-metil-walthersona B

Código: A15

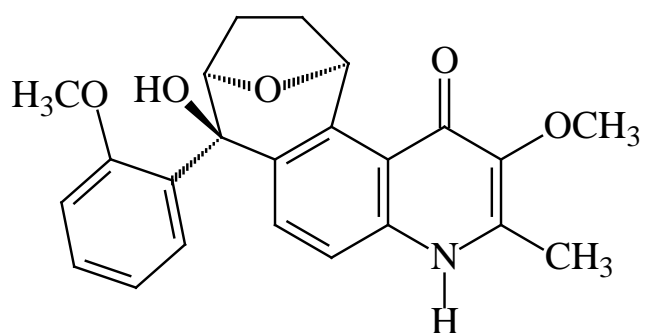
Aspecto físico: sólido branco amorfo

Origem: raiz e caule

elucidação estrutural: p. 188

atividades biológicas: p. a partir de

323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**



Nome: walthersona A

Código: A16

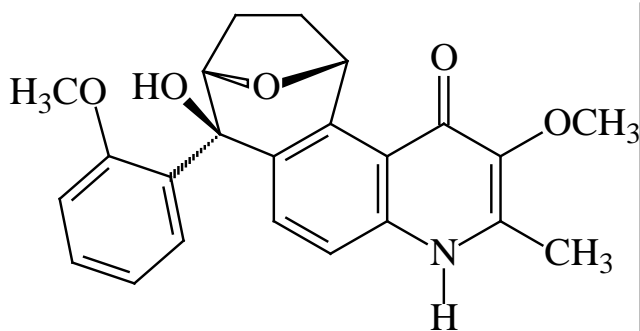
Aspecto físico: sólido branco amorfo

Origem: raiz e caule

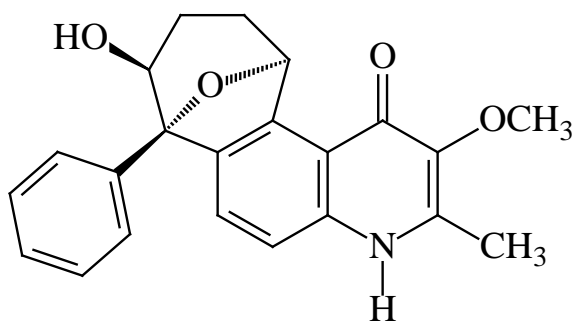
Identificação estrutural: p. 150

Atividades biológicas: p. a partir de

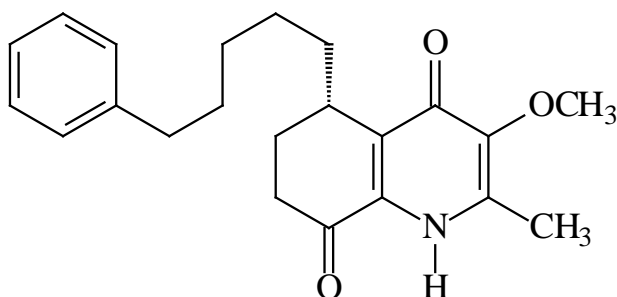
323



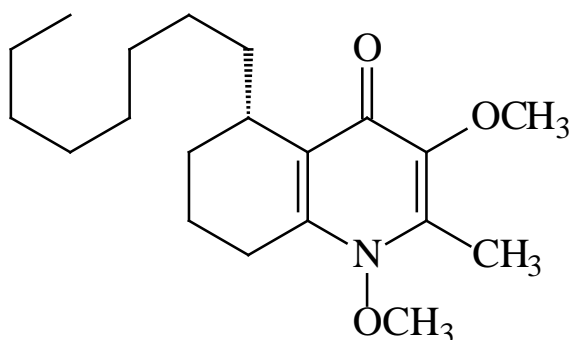
Nome: waltheriona B  
 Código: A-17  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 174  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



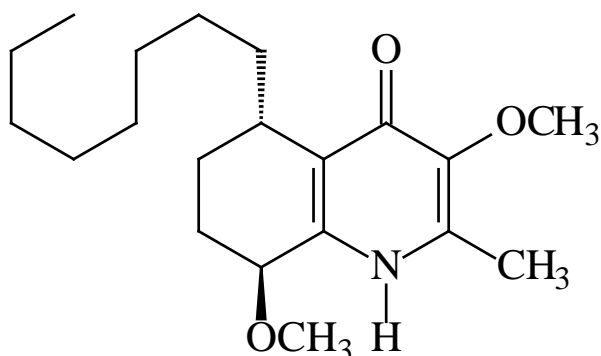
Nome: 10-hidroxi-waltheriona D  
 Código: A-18  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: raiz e caule  
 elucidação estrutural: p. 219  
 atividades biológicas: p. a partir de 323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**



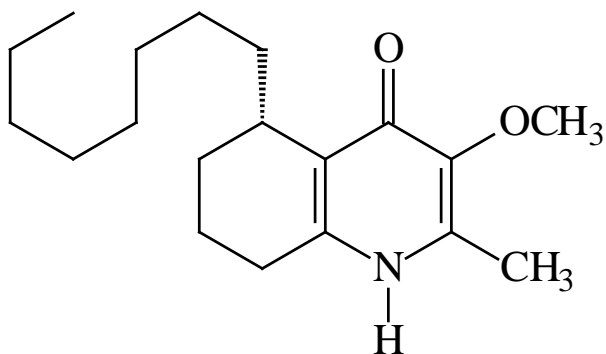
Nome: waltheriantidesmona  
 Código: A-19  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: caule  
 elucidação estrutural: p. 73  
 atividades biológicas: p. a partir de 323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**



Nome: brachytelona D  
 Código: A-20  
 Aspecto físico: óleo incolor  
 Origem: caule  
 elucidação estrutural: p. 127  
 atividades biológicas: p. a partir de 323 **SUBSTÂNCIA INÉDITA**

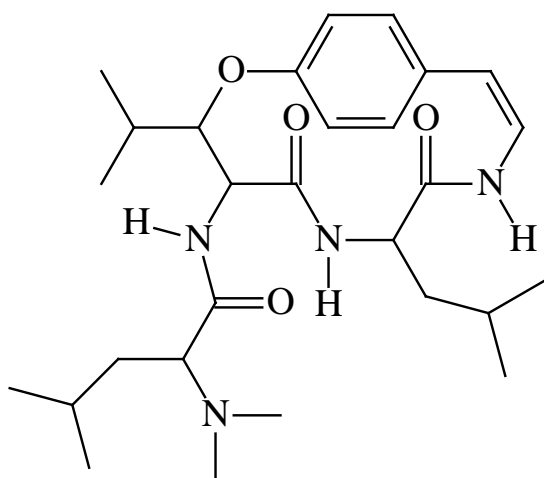


Nome: 8-O-metil-hyeronimona  
 Código: A-21  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: caule  
 Identificação estrutural: p. 142  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

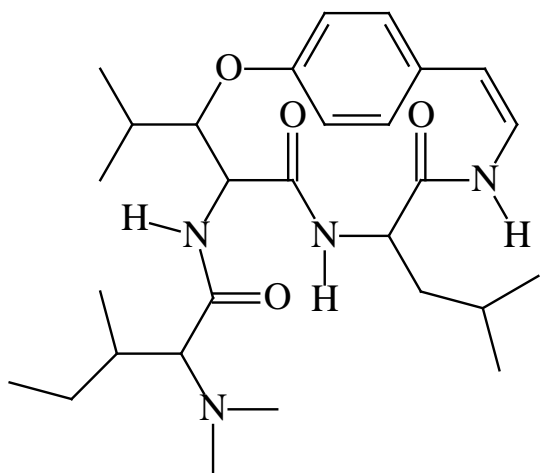


Nome: desóxi-antidesmona  
 Código: A-22  
 Aspecto físico: óleo amarelo  
 Origem: caule  
 Identificação estrutural: p. 138  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

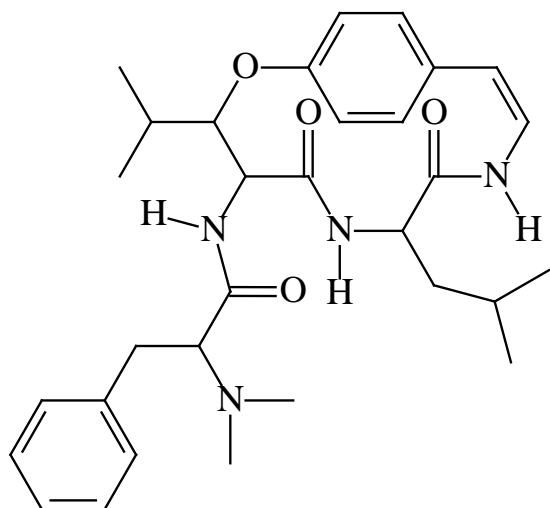
### 3.8.2. Ciclopeptídeos



Nome: franganina  
 Código: A-8  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 237  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

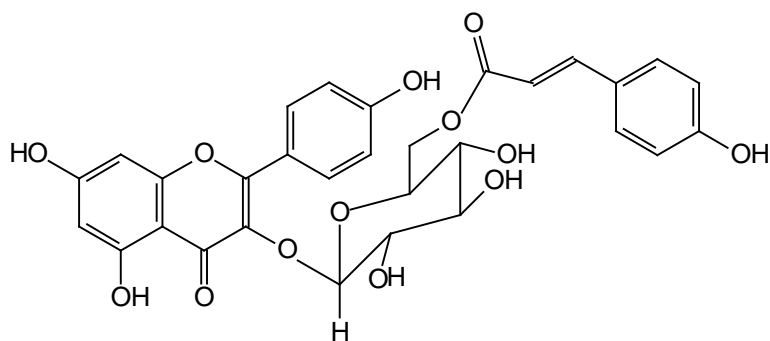


Nome: frangulanina  
 Código: A-9  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 242  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

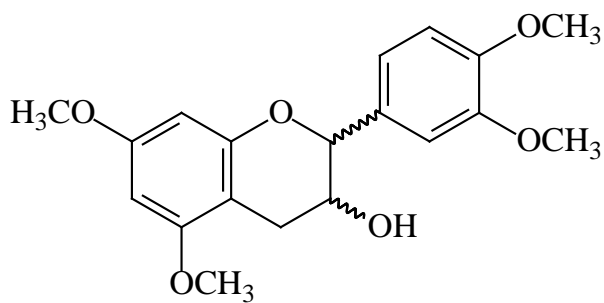


Nome: adoutina Y'  
 Código: A-10  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 245  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

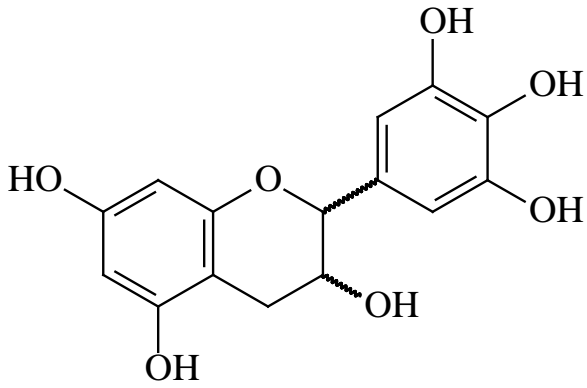
### 3.8.3. Flavonoides e derivado do ácido quínico



Nome: tilirosídeo  
 Código: F-1  
 Aspecto físico: sólido amorfo amarelo  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 249  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

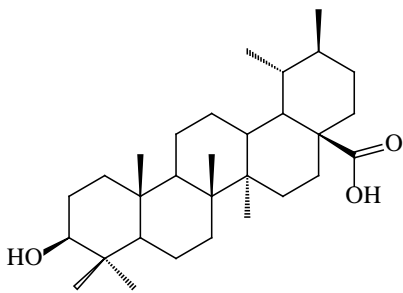


Nome: 5,7,3',4'-tetra-metóxi-catequina  
 Código: C-1  
 Aspecto físico: sólido branco  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 254  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

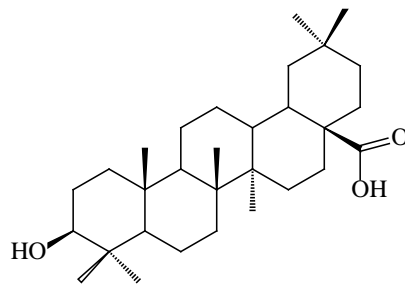


Nome: galocatequina  
 Código: C-2  
 Aspecto físico: sólido vermelho  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 258  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323

### 3.8.4. Triterpenos

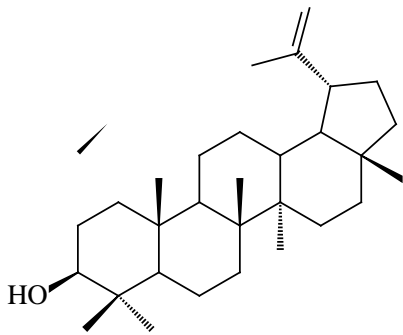


ác. ursólico

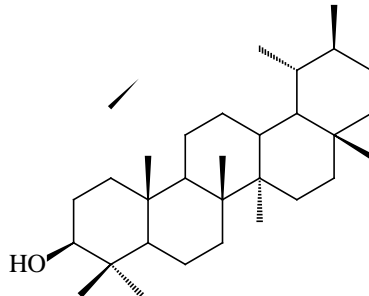


ác. oleanólico

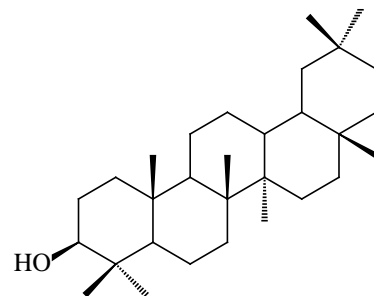
Nomes: ác. ursólico e ác. oleanólico  
 Códigos: T-3 e T-4  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz  
 Identificação: 264



lupeol



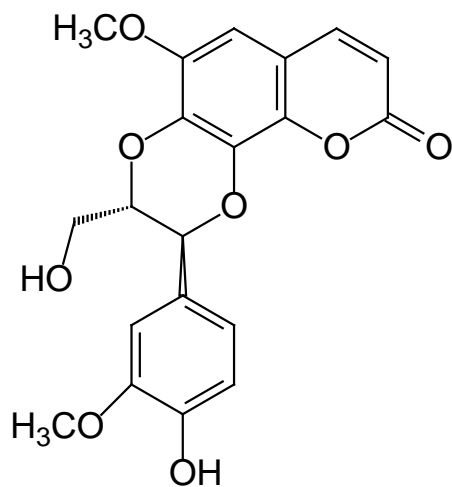
alfa-amirina



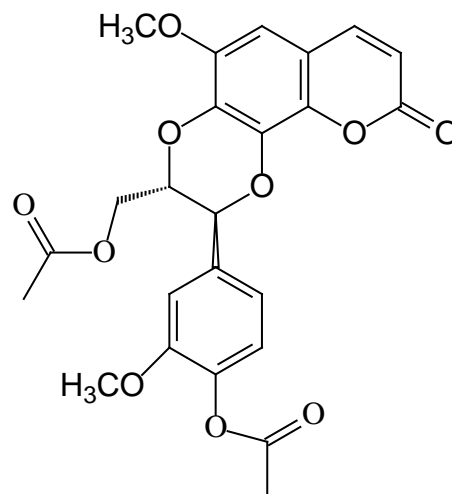
beta-amirina

Nomes: lupeol, beta-amirina e alfa-amirina  
 Códigos: T-1, T-2, T-3 e T-4  
 Aspecto físico: sólido branco amorfo  
 Origem: raiz (isolados em mistura)  
 Identificação: 267

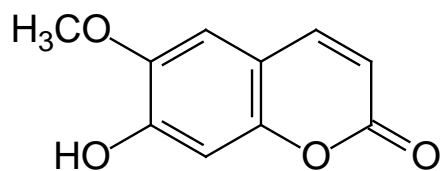
## 3.8.5. Cumarino-lignanas e cumarina



Nome: cleomicina A  
 Código: CL-1  
 Aspecto físico: sólido branco  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 269  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: di-acetil-cleomicina A  
 Código: CL-2  
 Aspecto físico: sólido branco  
 Origem: raiz  
 Identificação estrutural: p. 276  
 Atividades biológicas: p. a partir de 323



Nome: escopoletina  
 Código: CM-1  
 Aspecto físico: sólido branco  
 Origem: raiz e caule  
 Identificação estrutural: p. 282

## 4. Determinação estrutural das substâncias isoladas

### 4.1. Alcaloides quinolônicos

#### 4.1.1. Identificação do alcaloide A1

A substância A1 foi isolada das fases hexânica da raiz e do caule de *W. brachypetala*. Esta substância apresentou-se como um óleo amarelo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo-se assim, a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A1 apresentou sinais que caracterizam a presença de uma cadeia alquílica lateral na molécula, como um tripleto em  $\delta$  0,87 ( $J = 7,0$  Hz), característico de metila terminal; um sinal intenso em  $\delta$  1,25 e multipletos entre  $\delta$  1,3 – 1,8 característicos de hidrogênios metilênicos. Este espectro apresentou ainda quatro sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,08 ( $dddd$ ); 2,20 ( $dddd$ ); 2,58 ( $ddd$ ) e 2,75 ( $ddd$ ), sugerindo a presença de um sistema cíclico com um grupo carbonílico ou centro estereogênico vizinho a estes hidrogênios.

Observou-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A1 um multipletto em  $\delta$  3,27 integrando para um hidrogênio e dois simpletos integrando para três hidrogênios cada, em  $\delta$  3,94 e 2,36 característicos de metila ligada a um heteroátomo e metila ligada a carbono  $\text{sp}^2$  de sistema aromático, respectivamente.

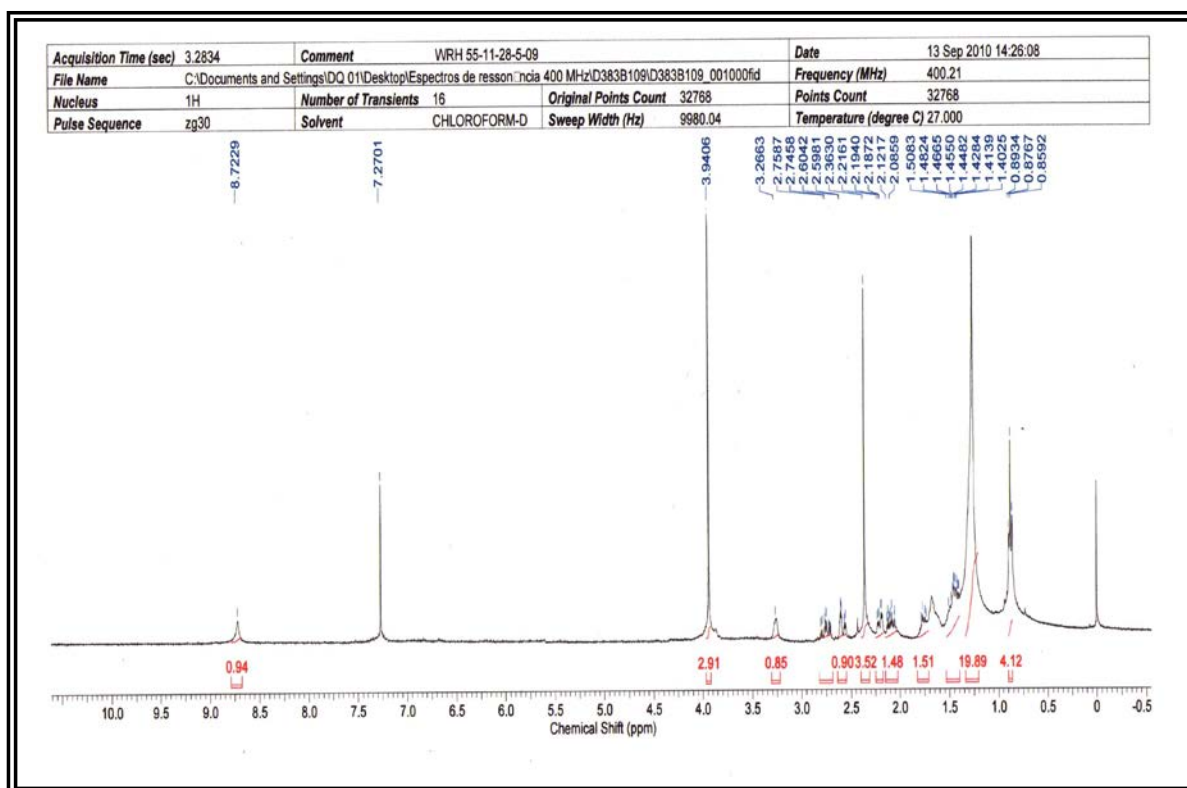
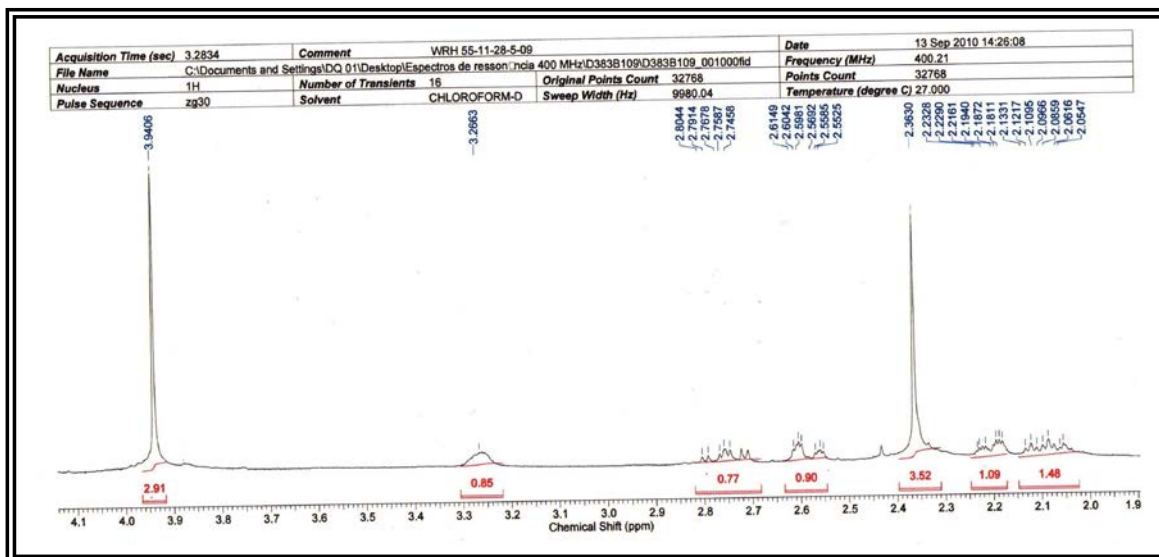
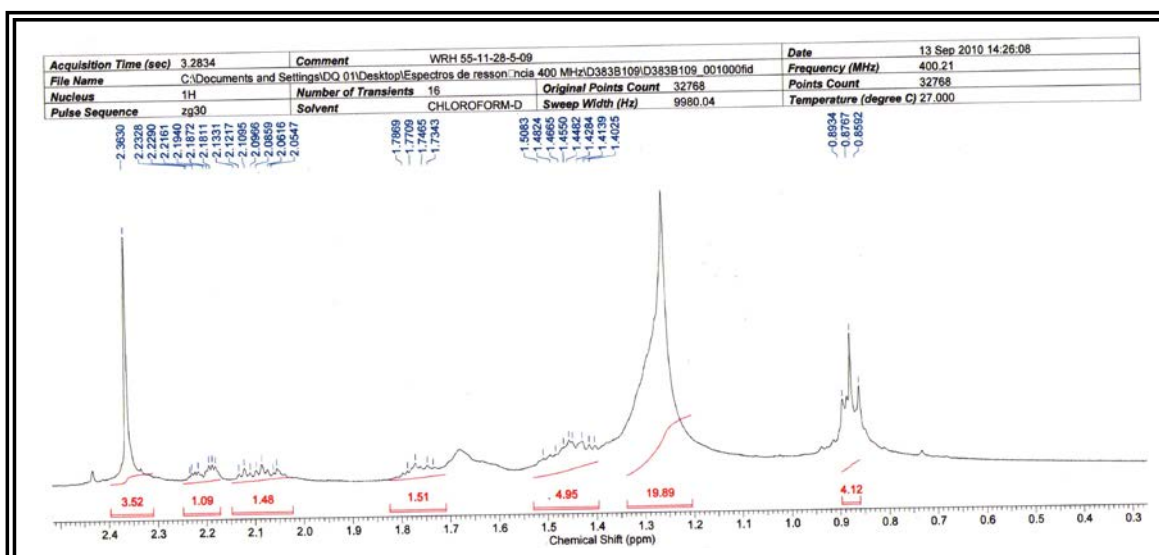


FIGURA 7. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

FIGURA 8. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A1 ( $\delta$  1,9 – 4,2)FIGURA 9. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A1 ( $\delta$  0,3 – 2,4)

Através da análise do mapa de correlações do HSQC de A1 foi possível verificar que os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,08 e 2,20 correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta$  22,45; justificando a alta constante de acoplamento de 14 Hz verificada no espectro de RMN de <sup>1</sup>H; enquanto que os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,58 e 2,75 correlacionam-se com sinal de carbono em  $\delta$  32,24; o que também justifica a alta constante de 18 Hz verificada no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, de modo que se tem dois pares de hidrogênios possivelmente diastereotópicos ou  $\alpha,\beta$  carbonílicos.

Verificou-se ainda no mapa de correlações do HSQC, a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,27 (*m*) com o sinal de carbono em  $\delta$  30,31; enquanto que para o sinal de carbono em  $\delta$  30,58 são observadas correlações com dois sinais de



hidrogênio em  $\delta$  1,45 (sobreposto) e 1,75 (sobreposto), sugerindo que estes hidrogênios sejam vizinhos a um centro estereogênico.

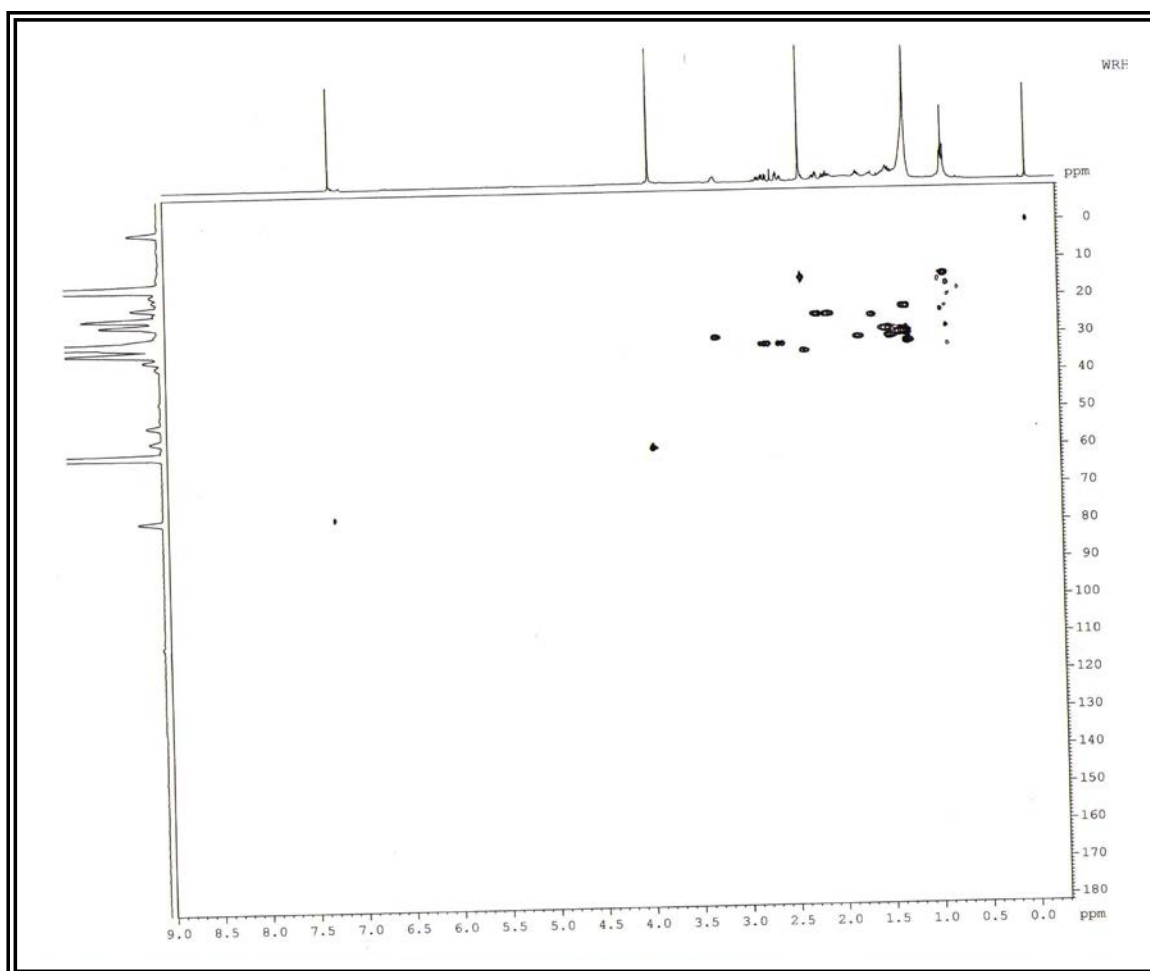


FIGURA 10. Mapa de correlações HSQC de A1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

O mapa de correlações do espectro de COSY de A1 foi fundamental para identificar as conectividades entre os hidrogênios na estrutura deste composto. A análise deste espectro confirmou os acoplamentos entre os hidrogênios geminais em  $\delta$  2,08 e 2,20 e em  $\delta$  2,58 e 2,75. Observou-se ainda que ambos os hidrogênios em  $\delta$  2,58 e  $\delta$  2,75 correlacionam-se com os hidrogênios geminais em  $\delta$  2,08 e 2,20; sendo assim possível, juntamente com o cálculo das constantes de acoplamento, caracterizar a multiplicidade desses hidrogênios com sendo *ddd*. Já os hidrogênios em  $\delta$  2,08 e 2,20 além de correlacionarem com ambos os hidrogênios em  $\delta$  2,58 e 2,75; também correlacionam-se com o hidrogênio em  $\delta$  3,27; sendo possível caracterizar a multiplicidade destes hidrogênios como *dddd*, confirmando a análise da multiplicidade pelos cálculos das constantes de acoplamento.

Através do mapa de correlações do espectro de COSY foi possível observar ainda a correlação entre o hidrogênio em  $\delta$  3,27 com os hidrogênios metilênicos diastereotópicos em  $\delta$  1,45 e 1,75 sugerindo a possibilidade do hidrogênio em  $\delta$  3,27 estar ligado a um carbono quiral. A última correlação importante observada foi entre a metila em  $\delta$  0,87 com o sinal largo em  $\delta$  1,25 de grupo metilênico.

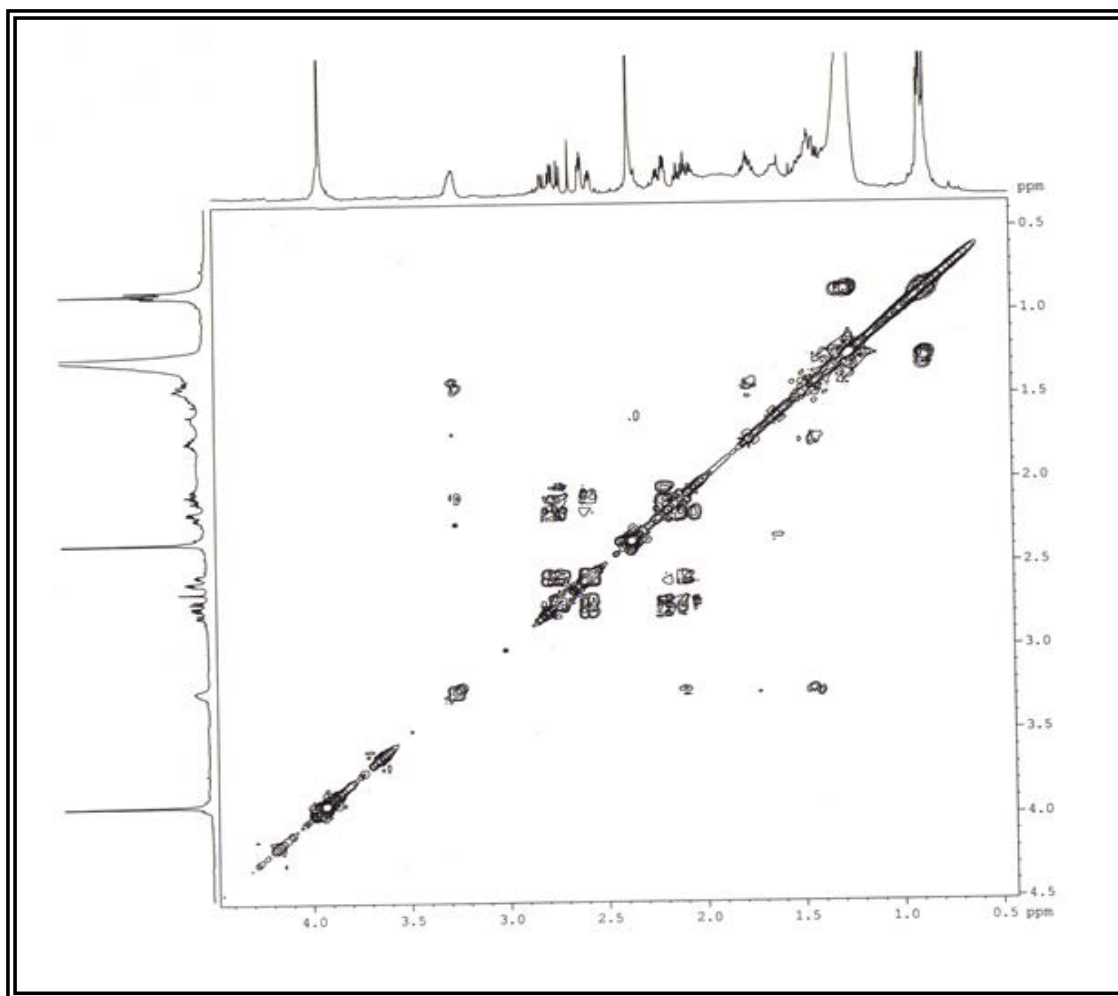
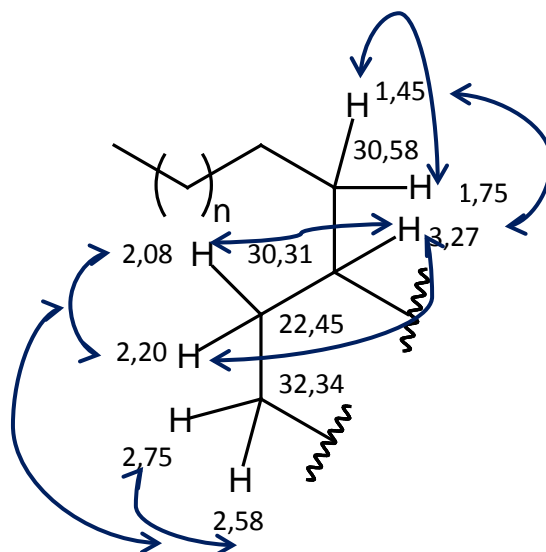


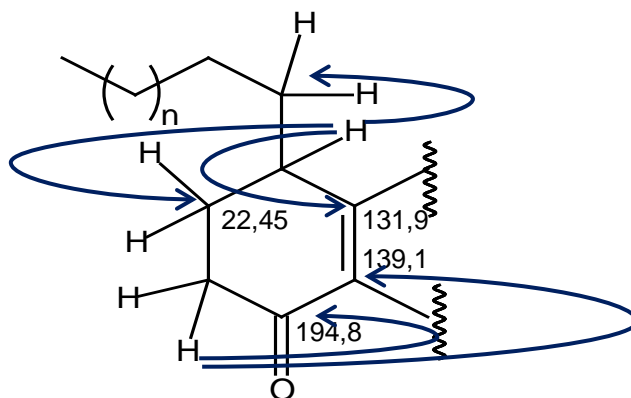
FIGURA 11. Mapa de contorno do espectro de COSY de A1  
(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz,  $\delta$  0,5 – 4,5)

A partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , COSY e HSQC foi possível sugerir uma parte da estrutura molecular de A-1 como sendo:

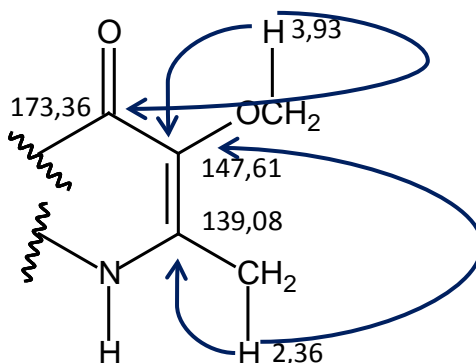


Através da análise do mapa de correlações do HMBC de A1, verificou-se que os sinais de hidrogênios geminais em  $\delta$  2,58 e 2,75 correlacionaram com um sinal característico de carbonila conjugada em  $\delta$  194,8. Essa correlação confirmou que os hidrogênios metilênicos com deslocamentos químicos diferentes são  $\alpha$  ( $\delta$  2,58 e 2,75) e  $\beta$  ( $\delta$  2,08 e 2,20) carbonílicos. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,75 apresentou ainda uma correção com sinal de carbono olefínico em  $\delta$  139,1; sugerindo a presença de uma ligação dupla próxima.

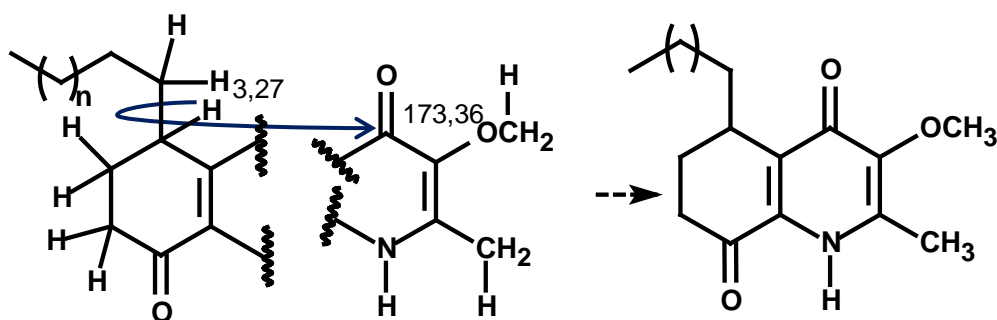
O sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,27 apresentou correlação com os carbonos metilênicos em  $\delta$  22,45 e 30,58 confirmando a conectividade de parte da estrutura proposta anteriormente. Este hidrogênio apresentou ainda correlação com um sinal de carbono olefínico em 131,98 confirmando assim a sugestão anterior da presença de uma ligação dupla no anel, possivelmente conjugando com a carbonila em  $\delta$  194,8.



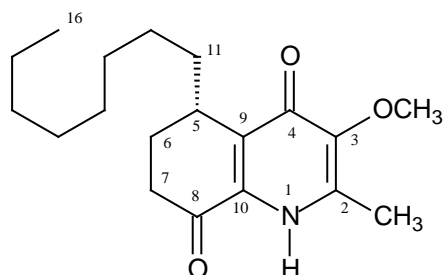
O sinal de metoxila em  $\delta$  3,93 correlacionou-se com o sinal de carbono olefínico em  $\delta$  147,61 e com um sinal de carbono carbonílico conjugado em  $\delta$  173,36. Já o sinal de metila em  $\delta$  2,36 apresentou correlação com dois sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  139,08 e 147,61; sugerindo-se assim a vizinhança entre estes dois carbonos, sendo possível propor uma segunda parte para a estrutura molecular de A1.



Uma vez que o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,27 correlacionou com o sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  173,36 foi possível fazer a união das duas partes propostas para a estrutura molecular de A1.



O espectro de massas de A-1 obtido no modo de ionização *Eletro-Spray* (ESI) apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z = 320$  Da; sendo assim possível atribuir o número de  $\text{CH}_2$  da cadeia lateral como sendo sete. Concluiu-se a proposta para a estrutura do alcaloide A-1, como sendo um alcaloide quinolin-4-ona.



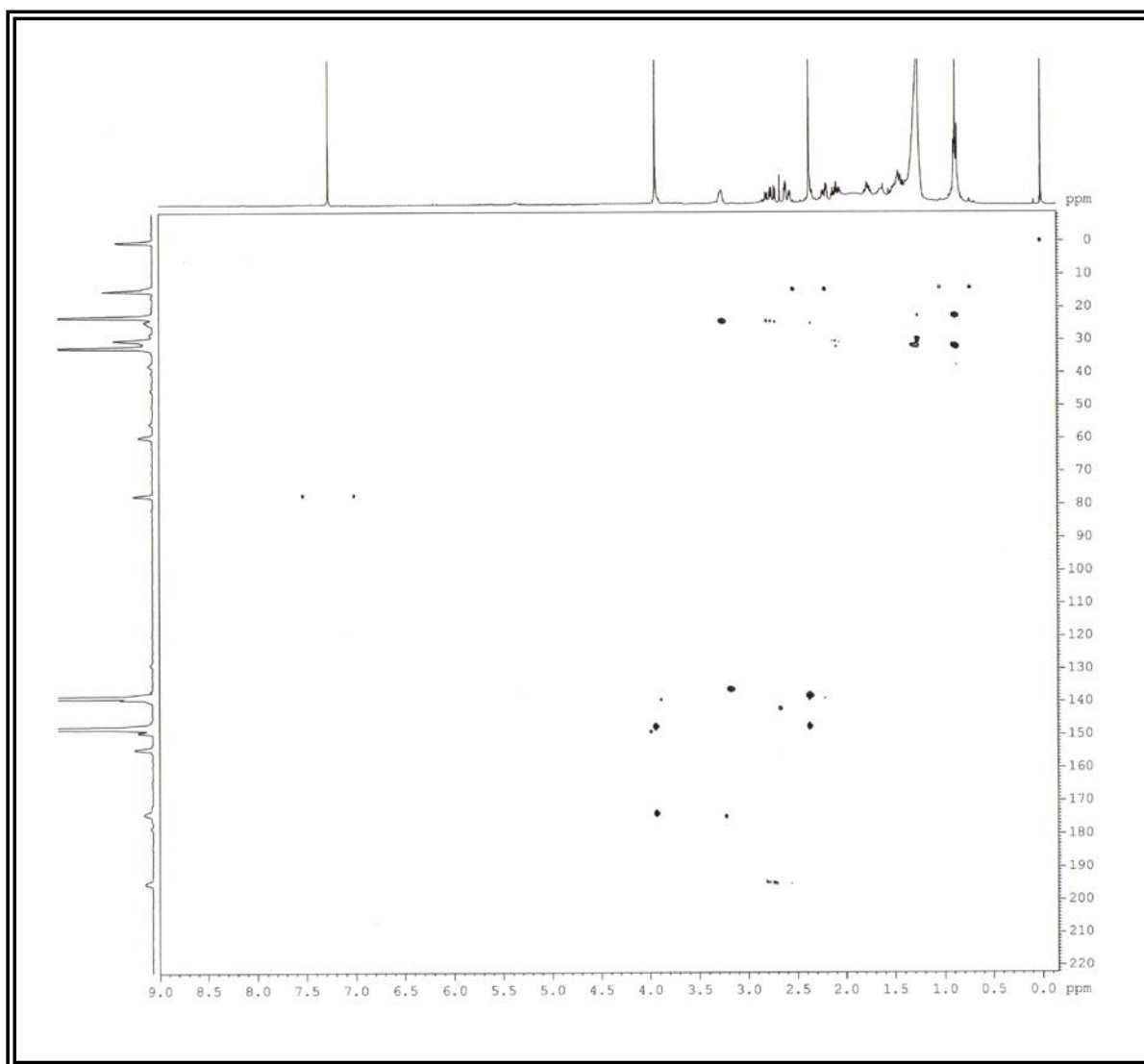


FIGURA 12. Mapa de correlações do HMBC de A1 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

A estrutura de A1 não é inédita. O primeiro relato para esta estrutura foi em 1999 por Buske e colaboradores (BUSKE *et. al.*; 1999), que publicaram a estrutura deste alcaloide primeiramente como sendo um alcaloide isoquinolínico, isolado de uma planta endêmica da África tropical, *Antidesma membranaceum*. Este alcaloide foi nomeado então como antidesmona. Entretanto, este mesmo grupo de pesquisa ao realizar estudos de biossíntese por marcação isotópica em culturas de células de *A. membranaceum* (BRINGMANN *et. al.*; 2000), fez a correção da estrutura da antidesmona como sendo um alcaloide quinolin-4-ona (BRINGMANN *et. al.*; 2000b).

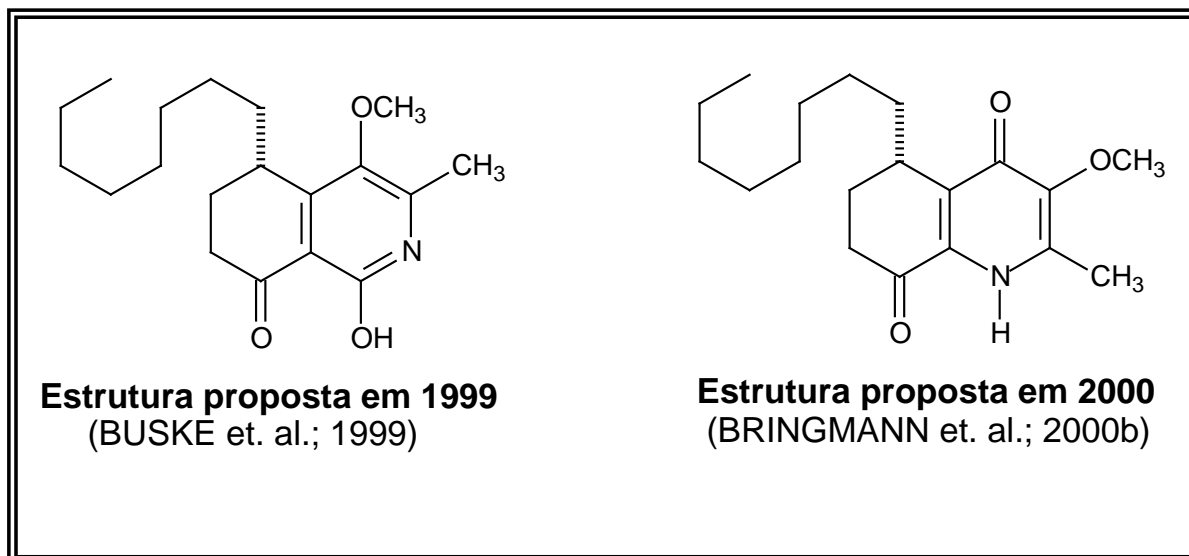
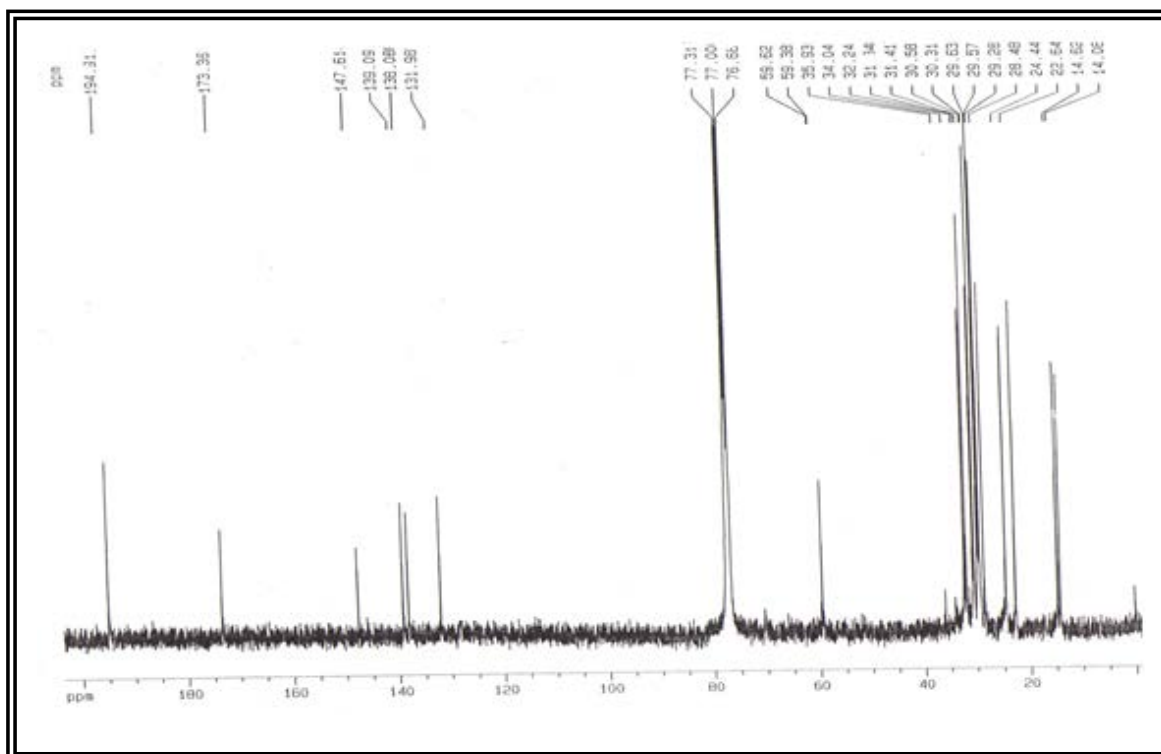


FIGURA 13. Estruturas propostas para o alcaloide antidesmona

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (figura 15) de A1 foram comparados com aqueles reportados por Bringmann e colaboradores (BRINGMANN *et. al.*; 2000b) (tabela 23), de modo que o alcaloide A1 foi identificado, inequivocamente, como sendo a antidesmona. Este é o primeiro relato de isolamento da antidesmona de *W. brachypetala*. Entre espécies da tribo Hermannieae, este alcaloide foi anteriormente isolado de *Waltheria douradinha* (GRESSLER *et. al.*; 2008) e *Melochia chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007b).

FIGURA 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

A estereoquímica do carbono 5 da antidesmona foi previamente definida como sendo *S* através de estudos teóricos e experimentais de dicroísmo circular (BUSKE *et. al.*; 1999). A fim de confirmar a estereoquímica de A1 foi realizado experimento de  $\alpha_D$  nas mesmas condições encontradas na literatura (BUSKE *et. al.*; 1999) e (DIAS *et. al.*; 2007b), e o valor encontrado  $[\alpha]_D^{25^\circ} = + 26^\circ$  (*c* 1,5; CHCl<sub>3</sub>), confirma também a estereoquímica (*S*) para o carbono 5 de A1, idêntico a (*S*)-antidesmona.

TABELA 23. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do alcaloide A1

Posição	A-1 (CDCl <sub>3</sub> )		Antidesmona (Lit* <sup>1</sup> ) (CDCl <sub>3</sub> )	
	<sup>1</sup> H 400 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	<sup>13</sup> C 100 MHz $\delta$ (ppm)	<sup>1</sup> H 500 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	<sup>13</sup> C 125 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	139,08	-	138,90
3	-	147,61	-	147,50
4	-	173,36	-	172,18
5	3,26 ( <i>m</i> )	30,31	3,27 ( <i>m</i> )	30,30
6ax	2,08 ( <i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,5; 4,3)	24,45	2,08 ( <i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,7; 4,4)	24,30
6eq	2,20 ( <i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,3)		2,20 ( <i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,4)	
7ax	2,75 ( <i>ddd</i> , 14,7 ;18,1; 5,3)	32,24	2,75 ( <i>ddd</i> , 14,7 ;18,2; 5,3)	32,20
7eq	2,58 ( <i>ddd</i> , 18,1 ;4,4 ; 2,4)		2,58 ( <i>ddd</i> , 18,2 ;4,4 ; 2,4)	
8	-	194,80	-	194,60
9	-	131,98	-	
10	-	139,10	-	139,00
11a	1,75* <sup>2</sup> (sobreposto)	30,58	1,75* <sup>2</sup> (sobreposto)	30,50
11b	1,45* <sup>2</sup> (sobreposto)		1,45* <sup>2</sup> (sobreposto)	
12-16	1,25 – 1,80	29,20 - 29,60	1,25 – 1,80	29,20 – 29,60
17	1,25	22,64	1,25	22,60
18	0,87 ( <i>t</i> , 7,0)	14,08	0,87 ( <i>t</i> , 7,0)	14,00
2-C-CH <sub>3</sub>	2,36 ( <i>S</i> )	14,62	2,36 ( <i>S</i> )	14,50
3-O-CH <sub>3</sub>	3,93 ( <i>S</i> )	59,50	3,93 ( <i>S</i> )	59,40
N-H	8,73 ( <i>S</i> )	-	8,73 ( <i>S</i> )	-

\*<sup>1</sup> (BRINGMANN *et. al.*; 2000b); \*<sup>2</sup> Estes valores podem estar trocados.

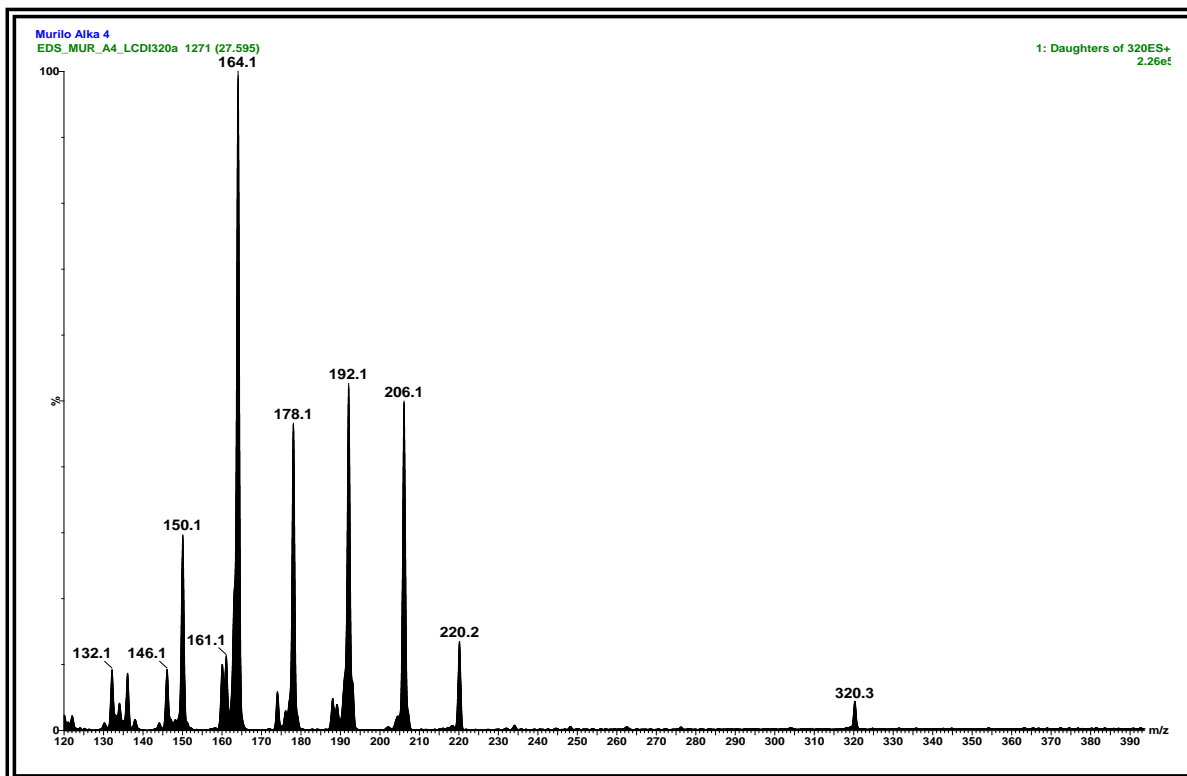


FIGURA 15. Espectro de Massas de A1 (ESI; modo positivo)

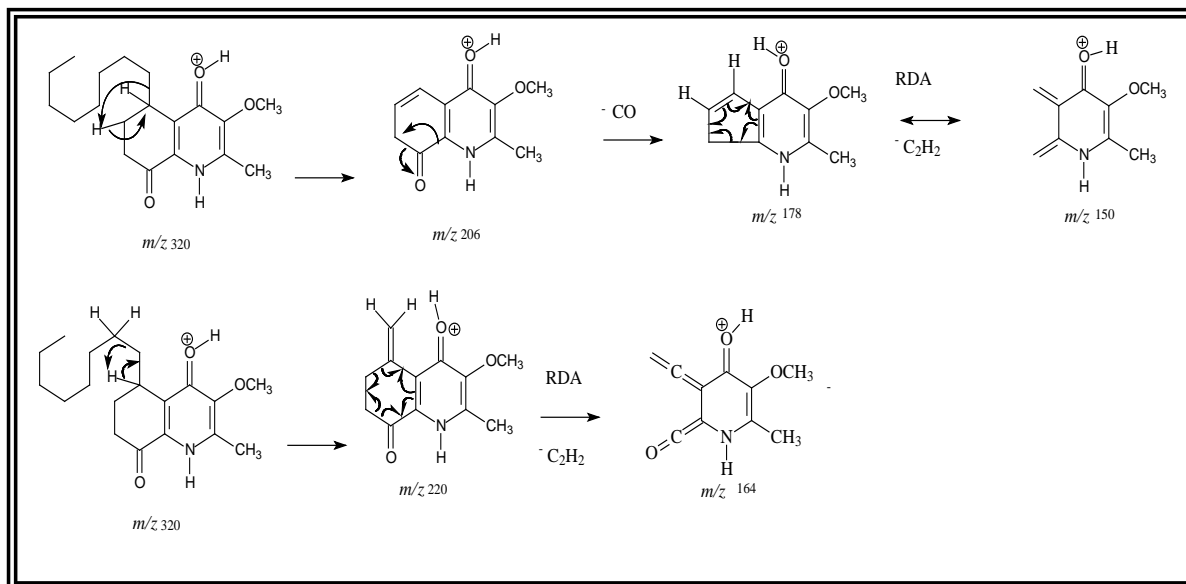


FIGURA 16. Propostas de fragmentações para a antidesmona (A1)



#### 4.1.2. Elucidação estrutural do alcaloide A19

A substância A19 foi isolada da fase hexânica do caule de *W. brachypetala* Turcz. Esta substância apresentou-se como um óleo amarelo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-19 apresentou sinais bem semelhantes ao da antidesmona (A-1), destacando-se a presença de dois simples em  $\delta$  3,93 e 2,35 característicos do grupo metoxílico em C-3 e da metila ligado a carbono  $\text{sp}^2$  aromático, respectivamente. Verificou-se ainda sinais análogos como o multipletto em  $\delta$  3,25 referente ao hidrogênio H-5, e os sinais de hidrogênios  $\alpha,\beta$  carbonílicos em  $\delta$  2,08; 2,20; 2,58 e 2,75. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,58, que no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da antidesmona aparece como um *ddd*, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-19 encontra-se sobreposto a um tripleto, de modo que estes dois sinais integram juntos para três hidrogênios.

Além deste sinal de tripleto em  $\delta$  2,62 observam-se outras diferenças entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da antidesmona e de A-19, como a ausência do tripleto referente à metila terminal em  $\delta$  0,87 e a presença de um multipletto entre  $\delta$  7,15 – 7,28 bem característico de grupo fenila em livre rotação.

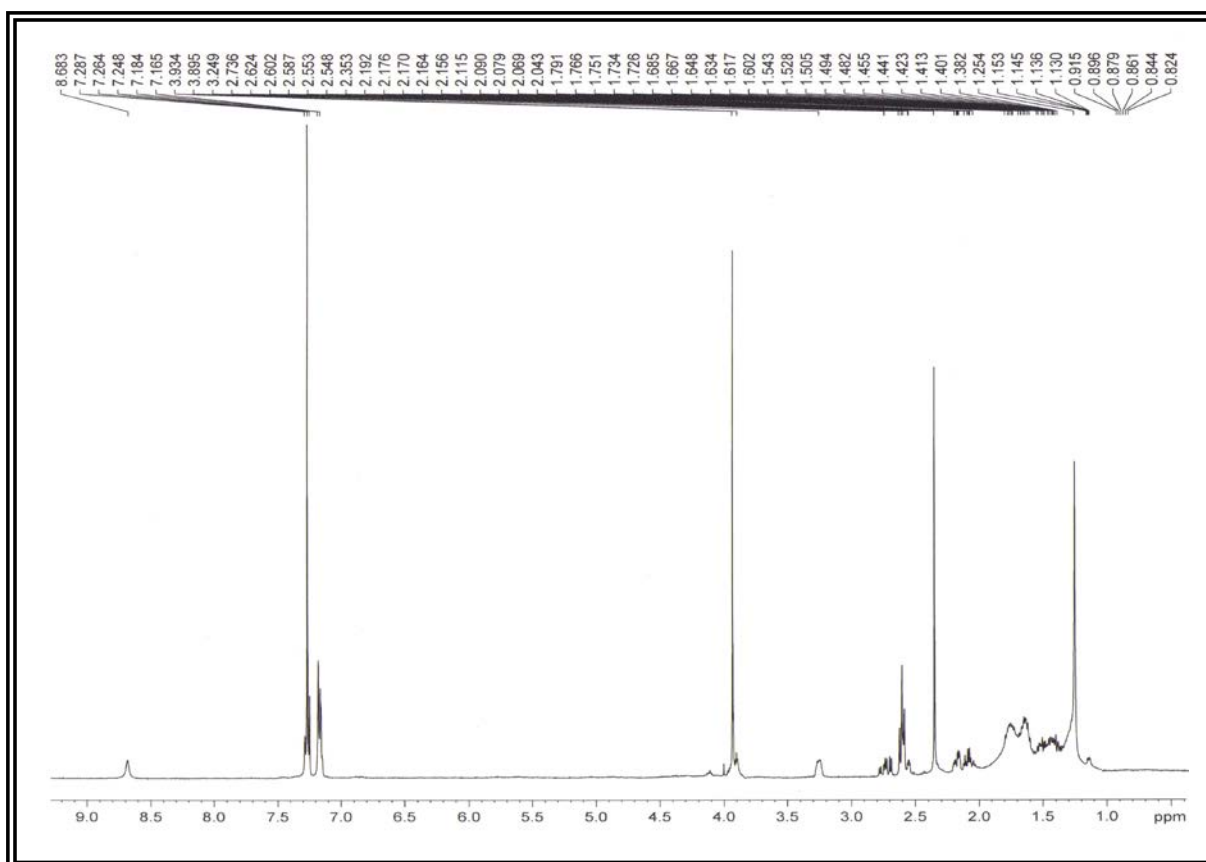


FIGURA 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A19 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

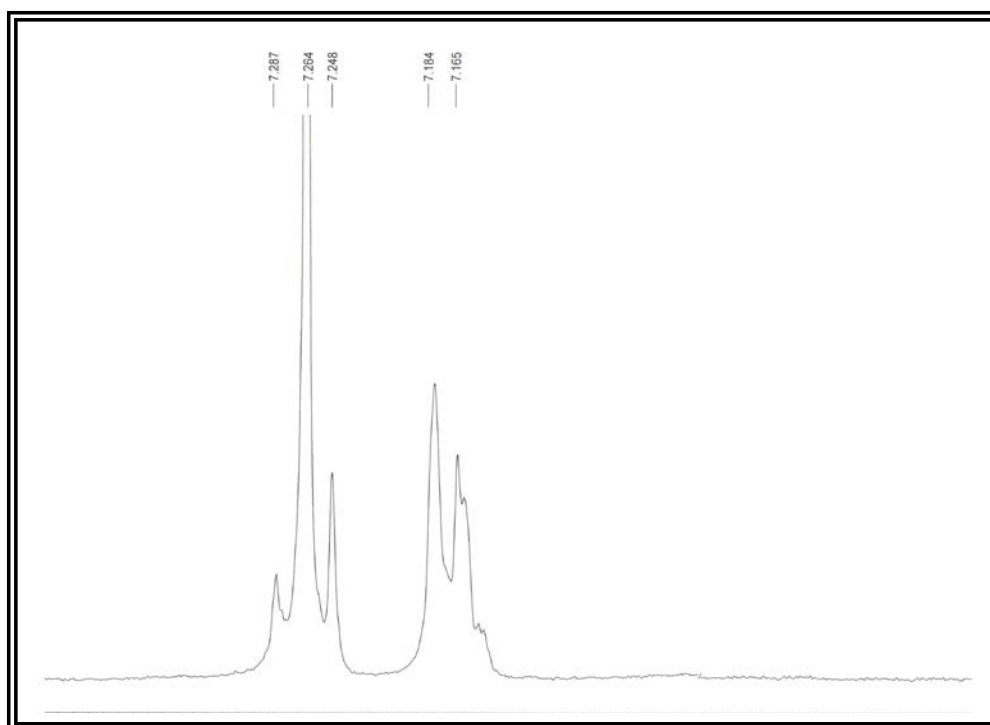


FIGURA 18. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A19 (região de hidrogênios aromáticos)

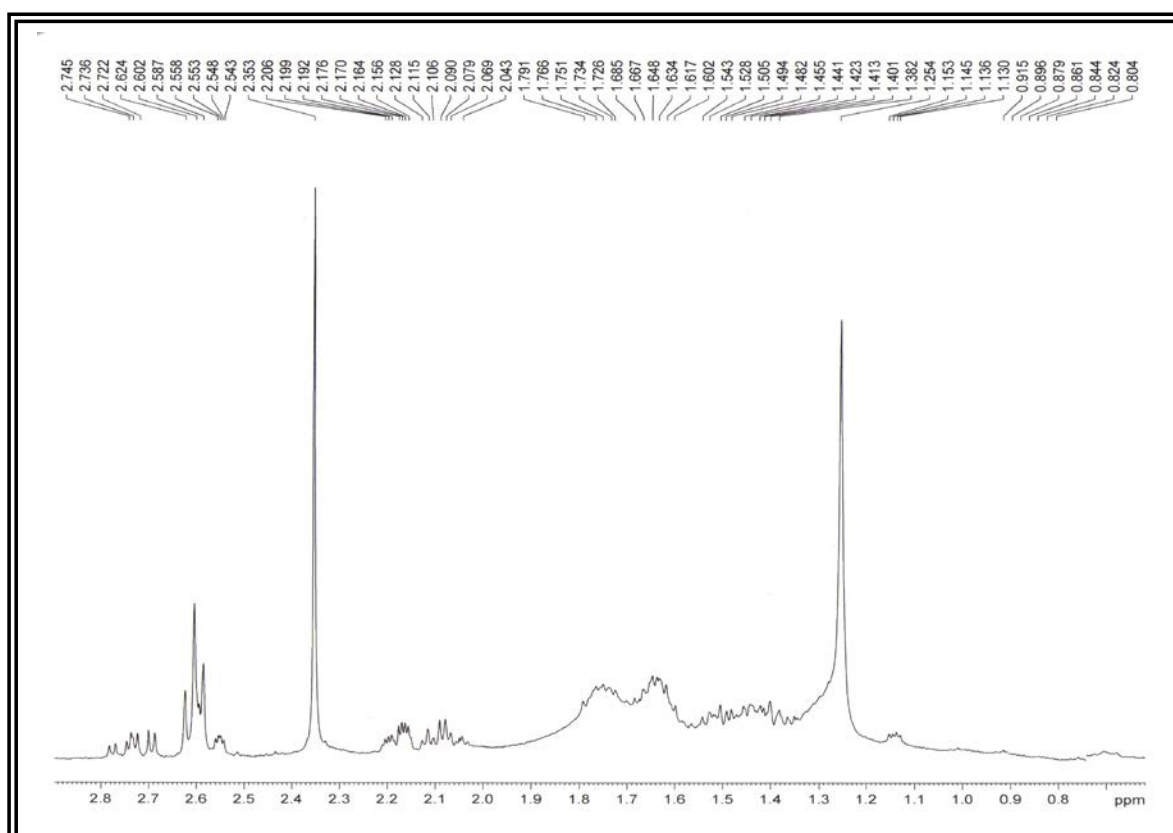
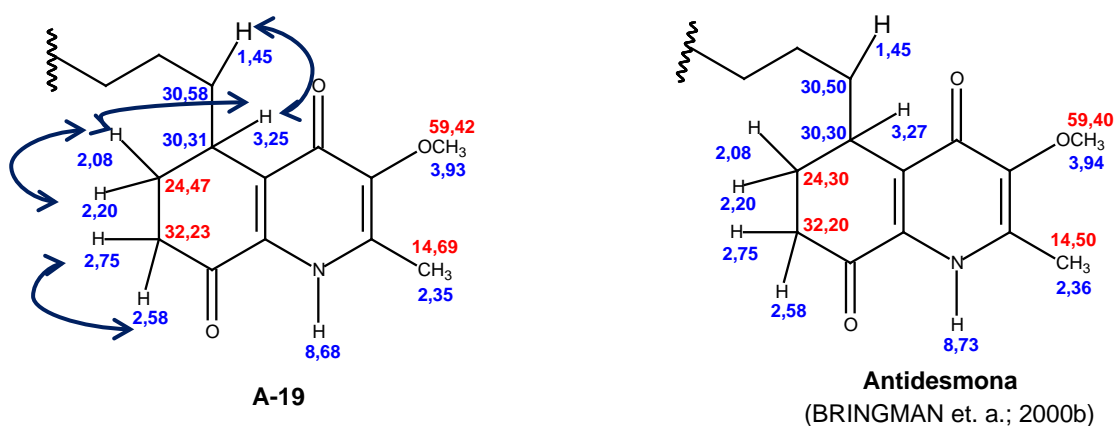


FIGURA 19. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A19 ( $\delta$  0,8 – 2,8)

Analisando do mapa de correlações do espectro de COSY, pôde-se confirmar o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos  $\alpha$  e  $\beta$  carbonílicos, bem como o acoplamento dos hidrogênios  $\beta$  carbonílicos com o hidrogênio H-5, assim como ocorre na estrutura de A1, entretanto neste espectro não são observadas as correlações entre o hidrogênio H-5 ( $\delta$  3,27) com os hidrogênios em  $\delta$  2,20 e 1,75 uma vez que as constantes de acoplamento são pequenas. Mas comparando os dados espectrais até agora discutidos para A19 com aqueles da antidesmona, é possível afirmar que parte da molécula de A19 é idêntica a uma parte da molécula da antidesmona.



No espectro de COSY observa-se ainda correlações entre os hidrogênios do anel aromático, além da correlação entre o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,62 ( $t$ ) com um sinal sobreposto em  $\delta$  1,60 de hidrogênios metilênicos.

Dada a dificuldade de integração dos sinais dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-19 devido à sobreposição de sinais com o sinal do clorofórmio deuterado, foi realizada uma análise conjunta dos espectros de HSQC e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Observou-se no espectro de HSQC que o sinal de hidrogênio entre  $\delta$  7,14-7,19 correlaciona-se com um sinal de carbono referente a dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em  $\delta$  128,25 e com um sinal de carbono em  $\delta$  125,47, caracterizando assim três hidrogênios aromáticos. Já o sinal de hidrogênio entre  $\delta$  7,24-7,29 correlacionou-se com o sinal referente a dois carbonos  $\delta$  128,06 caracterizando dois hidrogênios para este sinal.

Para a integração do sinal de hidrogênio referente ao tripleto sobreposto em  $\delta$  2,62 foi feita uma análise do mapa de correlações espectro de HSQC com projeção do espectro obtido de DEPT135°. Observou-se que esse sinal de hidrogênio correlacionou-se com o sinal de carbono metilênico em  $\delta$  35,95 confirmando que se tratava de hidrogênios metilênicos.

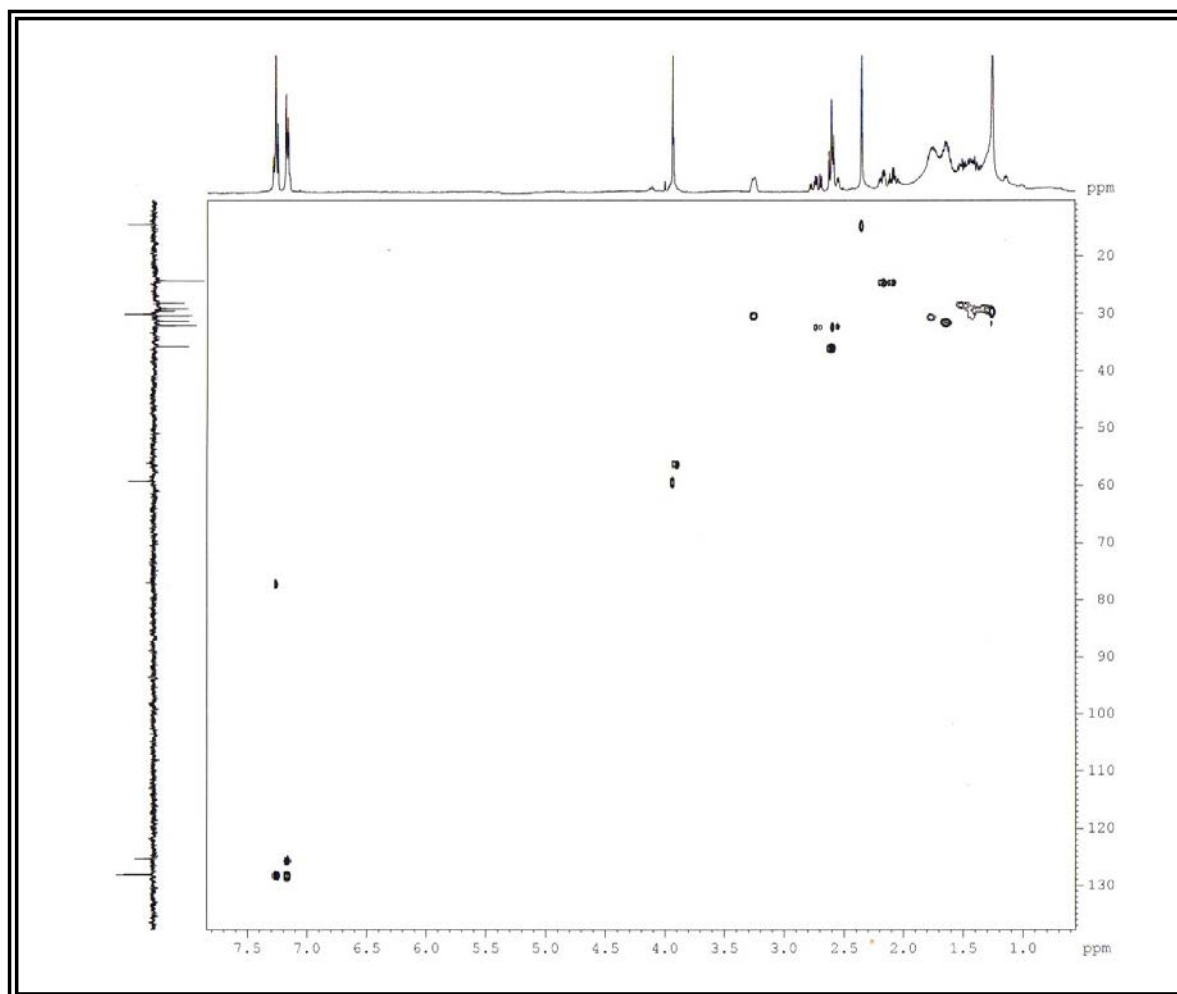


FIGURA 20. Mapa de correlações do HSQC de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

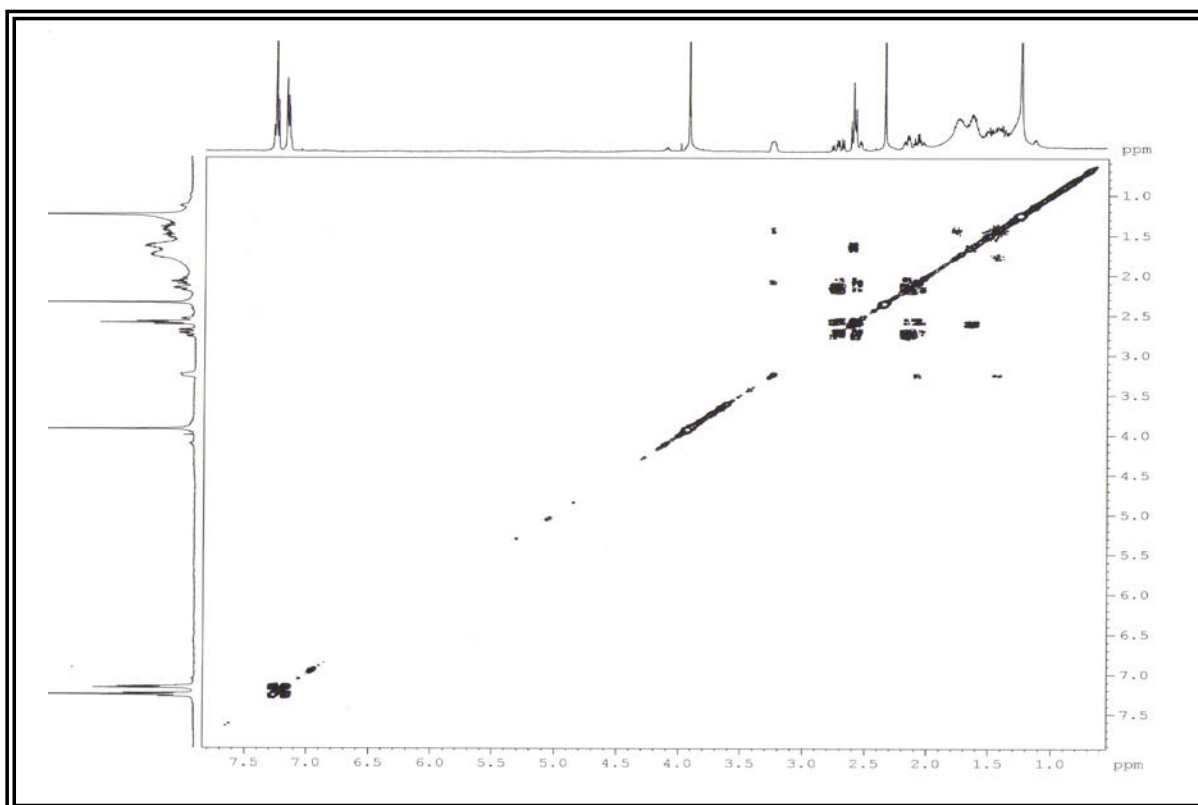


FIGURA 21. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A19 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

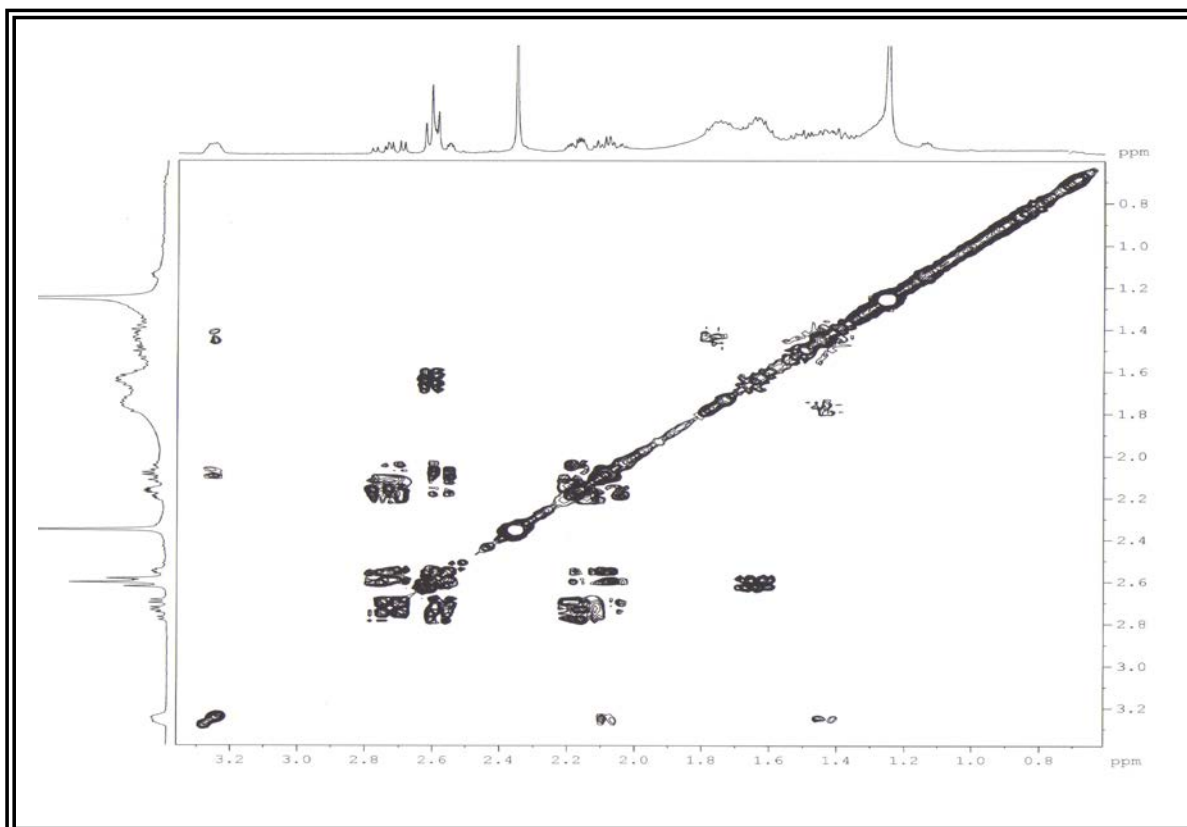
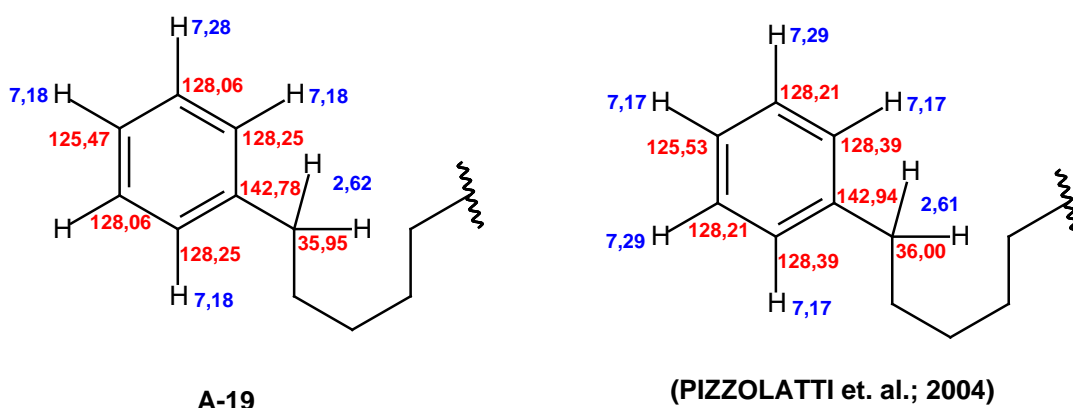


FIGURA 22. Mapa de correlações do  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A19 ( $\delta$  0,6 – 3,3)

Uma vez que foi evidenciada a presença de uma cadeia lateral na estrutura de A19, devido aos sinais característicos de hidrogênios metilênicos observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e, dada a ausência do sinal referente à metila terminal, sugeriu-se que a cadeia lateral da estrutura de A19 possui um grupo fenílico terminal, haja vista a presença de cinco hidrogênios aromáticos na forma de multipletto. Foi sugerido ainda que o sinal de triplete em  $\delta$  2,62 refere-se a hidrogênios metilênicos benzílicos.

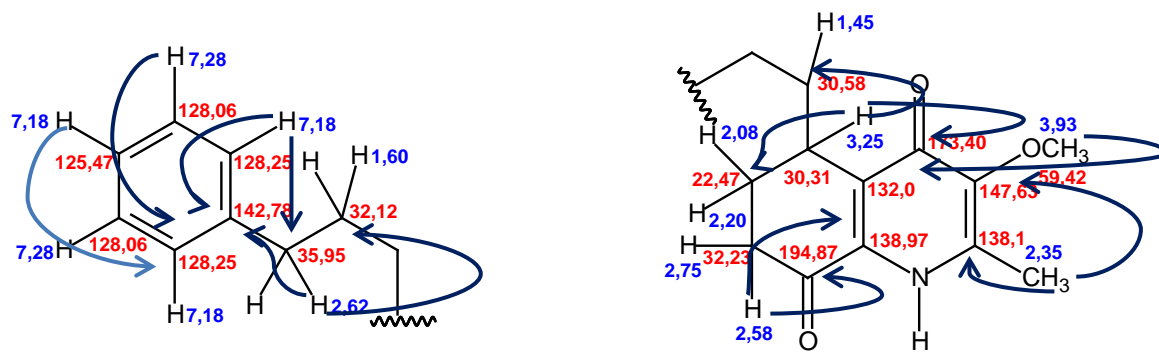
Para tanto, foi feita uma comparação entre os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  referentes a esta parte da molécula de A19, com um modelo de ácido fenil-alcanóico previamente descrito na literatura (PIZZOLATTI *et. al.*; 2004), onde foi evidenciado grande similaridade.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A19 apresentou um sinal de carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  142,78 que não apareceu no espectro de DEPT135°, tratando-se portanto de um carbono totalmente substituído, este atribuído ao carbono 1 do grupo fenílico, cujo valor apresentou grande semelhança ao descrito na literatura citada anteriormente.

Através da análise do espectro de HMBC de A19 observou-se a correlação entre o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,62 com o carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  142,78 confirmando assim que esse sinal tratava-se de hidrogênios metilênicos benzílicos. O sinal multipletto referente a dois hidrogênios em  $\delta$  7,18 correlacionou-se também com o carbono metilênico benzílico em  $\delta$  35,95 confirmando-se que este hidrogênio refere-se as posições 2 e 6 do anel aromático.

Os sinais de hidrogênio da parte da molécula de A19 proposta como idêntica a antidesmona (A1), apresentaram as mesmas correlações a múltiplas ligações no espectro de HMBC, destacando-se as correlações do hidrogênio em  $\delta$  2,58 com o carbono carbonílico em  $\delta$  194,87 e com o carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  138,97; além das correlações do hidrogênio em  $\delta$  3,25 com o carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  132,0 e com a carbonila em  $\delta$  173,40.



Correlações observadas no HMBC de A-19

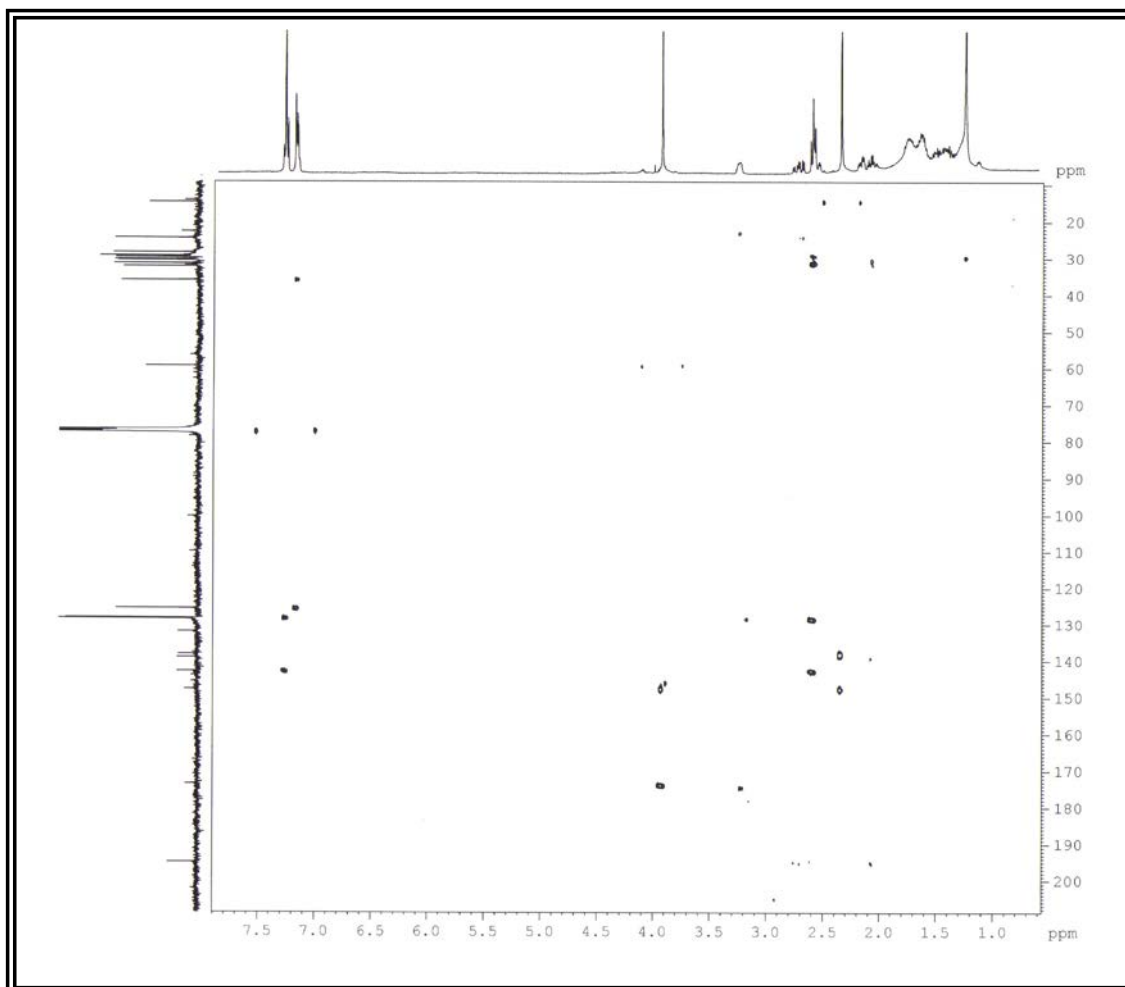


FIGURA 23. Mapa de correlações do HMBC de A19 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

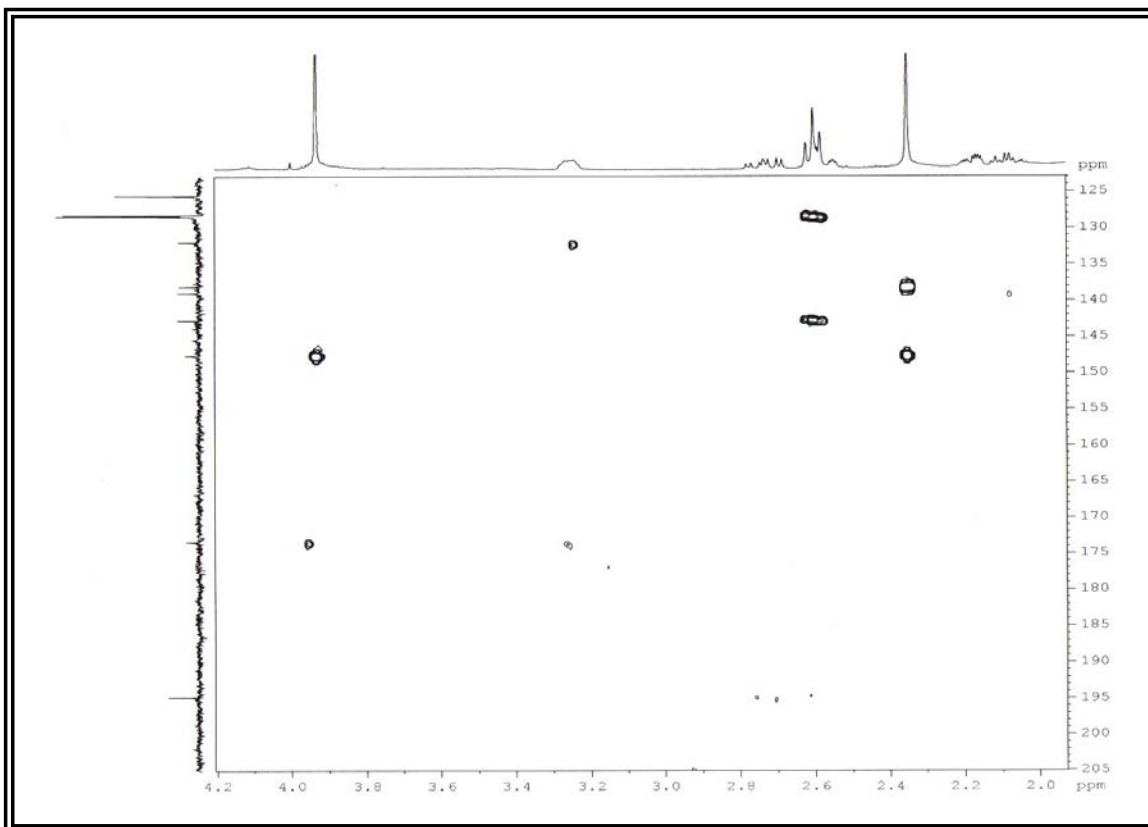


FIGURA 24. Mapa de correlações do HMBC de A19 ( $\delta_C$  125 – 205)

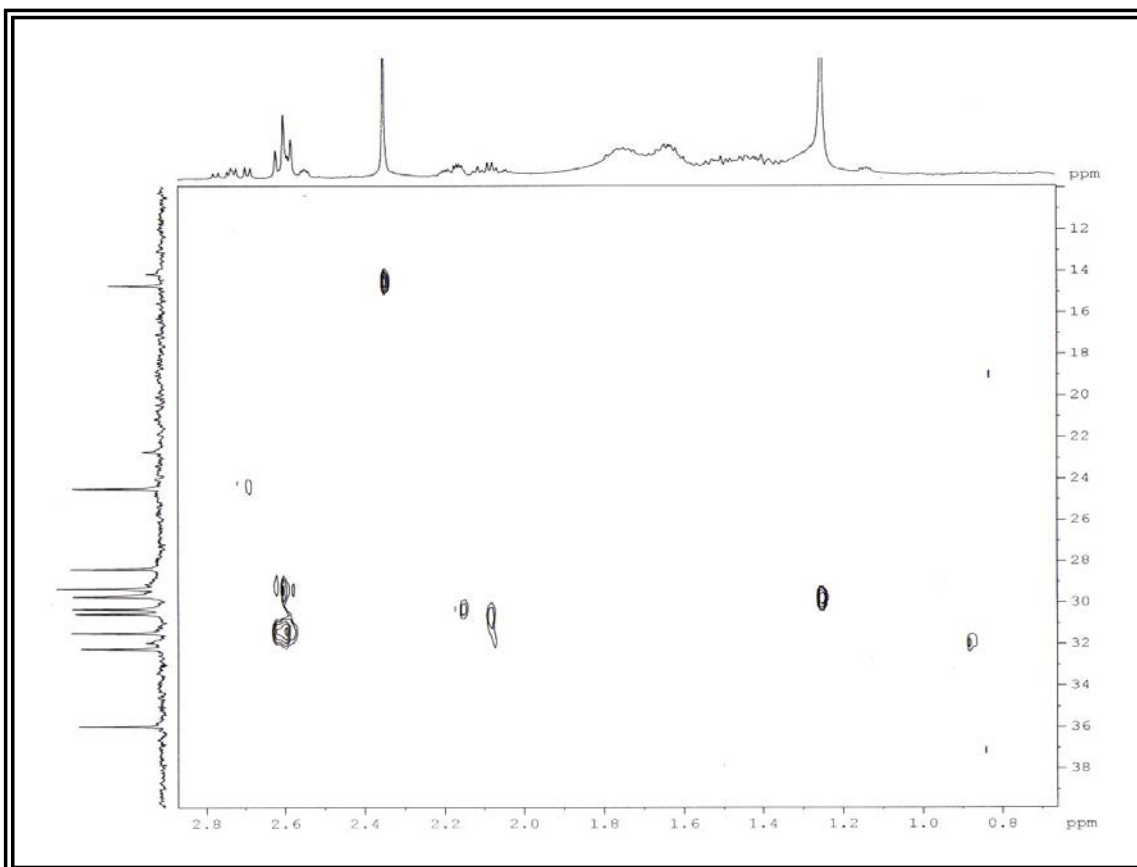
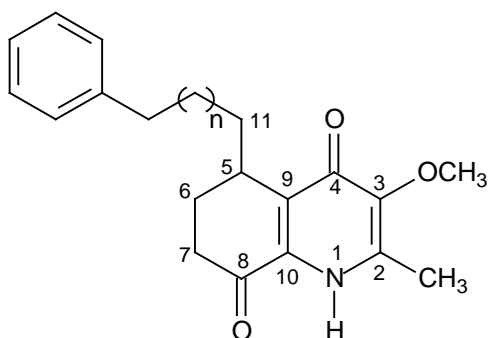


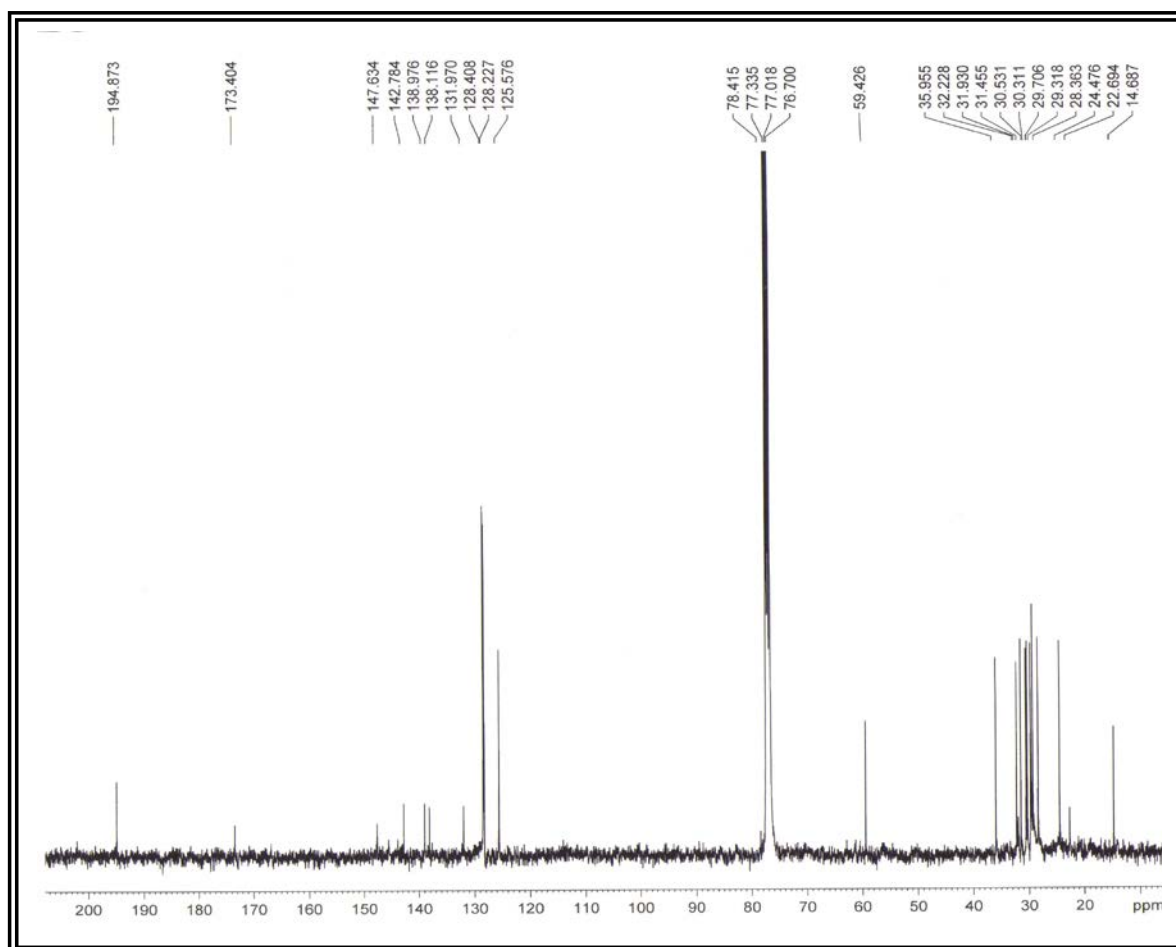
FIGURA 25. Mapa de correlações do HMBC de A19 ( $\delta_C$  10 – 40)



A partir da união das duas partes propostas para a estrutura de A19, e com a confirmação das atribuições de deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como das respectivas multiplicidades dos carbonos através do espectro de DEPT135°, foi proposta a estrutura de A19 como sendo:



**Estrutura proposta para o alcaloide A-19**



**FIGURA 26.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A19 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

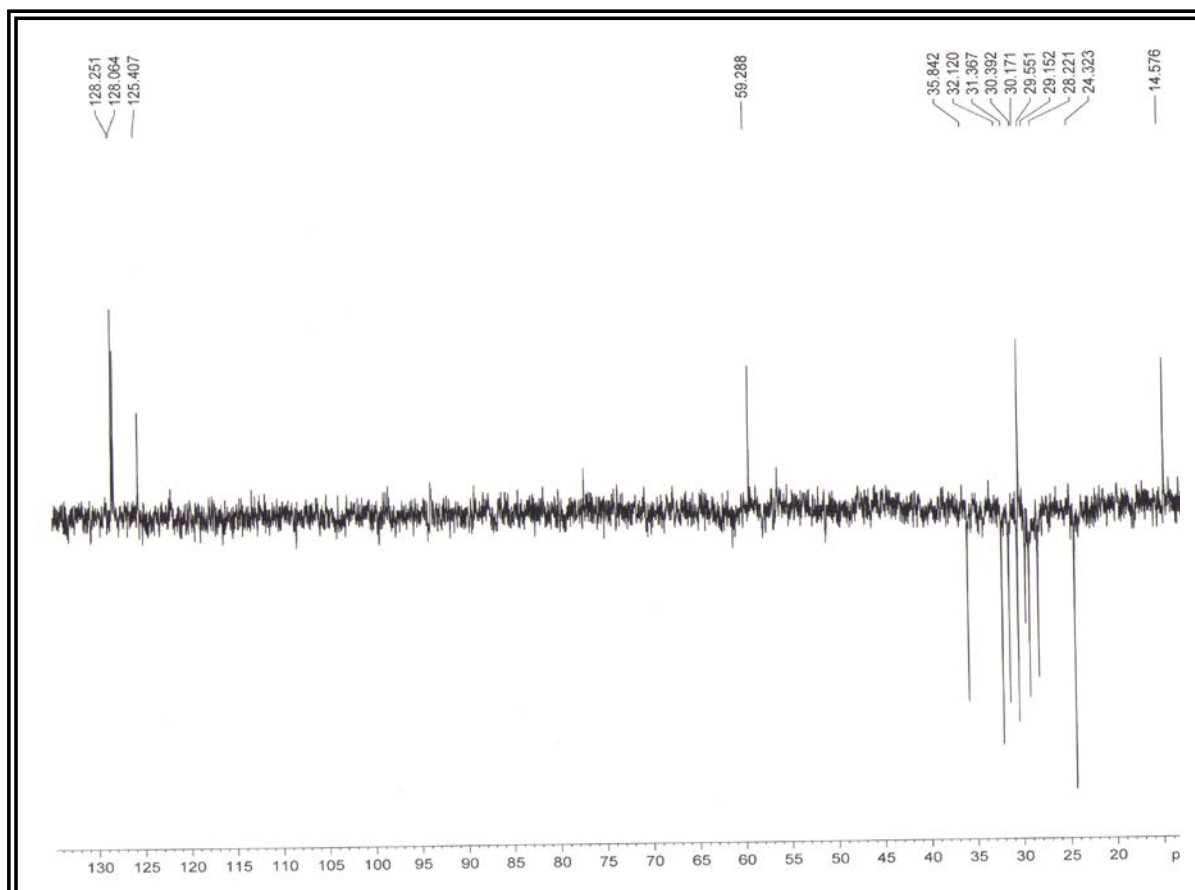
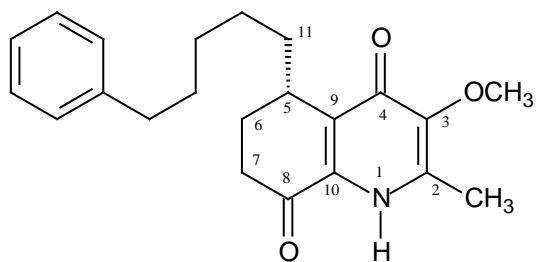


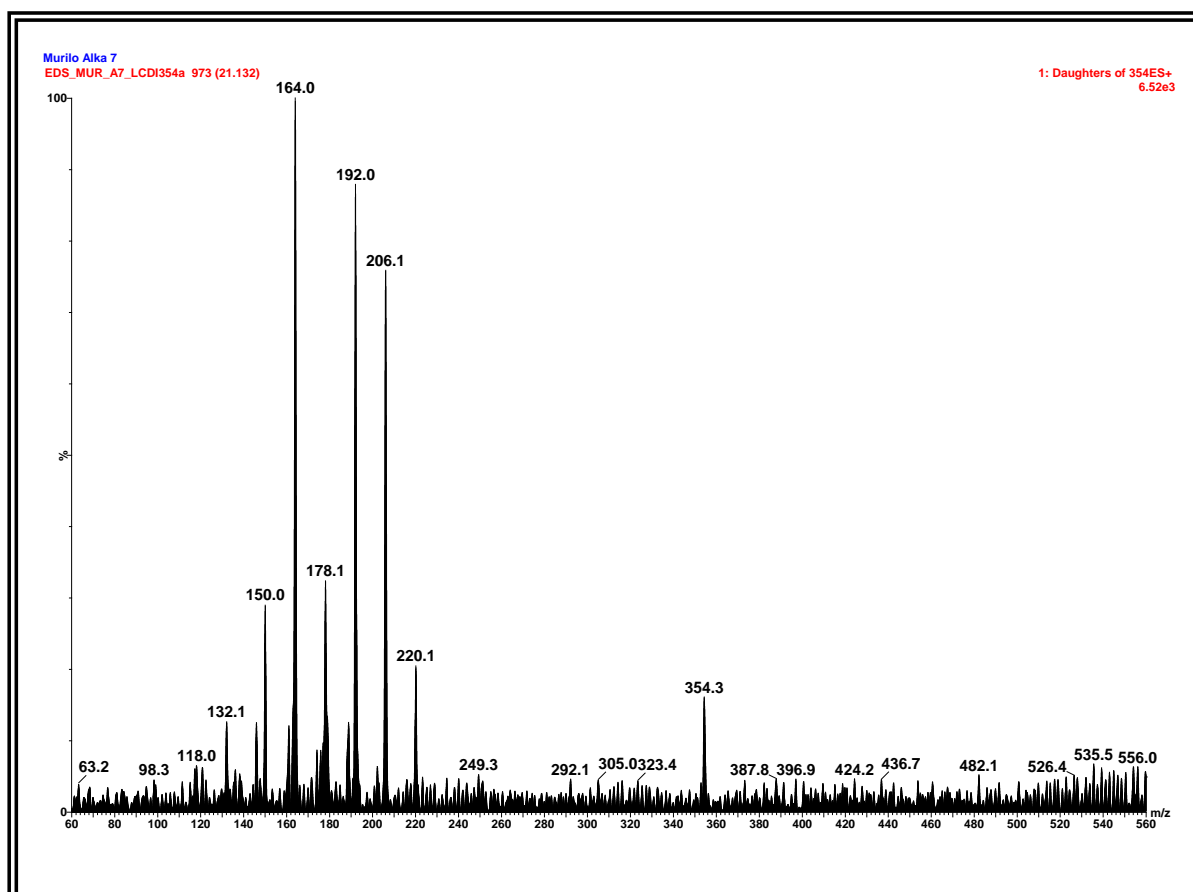
FIGURA 27. Espectro de DEPT 135° de A19 (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)

O tamanho da cadeia lateral de A19 foi determinado a partir da análise do espectro de massas obtido com fonte de ionização ESI no modo positivo, onde verificou-se o íon *pseudo*-molecular [M + H]<sup>+</sup> em  $m/z$  354 Da, sugerindo assim cinco grupos metilênicos na cadeia lateral de A19. O espectro de massas de A19 os mesmos picos de íons produtos verificados para a antidesmona (A1), sugerindo mecanismos similares de fragmentação, como a quebra da cadeia lateral nas posições 11 e 12 e perdas de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e CO.

A estrutura proposta para A19 é inédita e confirmada também por espectrometria de massas de alta resolução, onde verifica-se o íon *pseudo*-molecular [M + H]<sup>+</sup> em  $m/z$  354,2064 compatível com a fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>N. A estereoquímica do carbono 5 foi designada como sendo idêntica a (S)-antidesmona, haja visto o valor encontrado de  $[\alpha]_D^{25} = + 26^\circ$  (c 1,5 M; CHCl<sub>3</sub>), quando comparado com a literatura (BUSKE *et.al.*; 1999). O alcaloide A19 foi nomeado como *w*-antidesmona.



**Estrutura do alcaloide A19**



**FIGURA 28.** Espectro de massas de A19 (ESI, modo positivo)

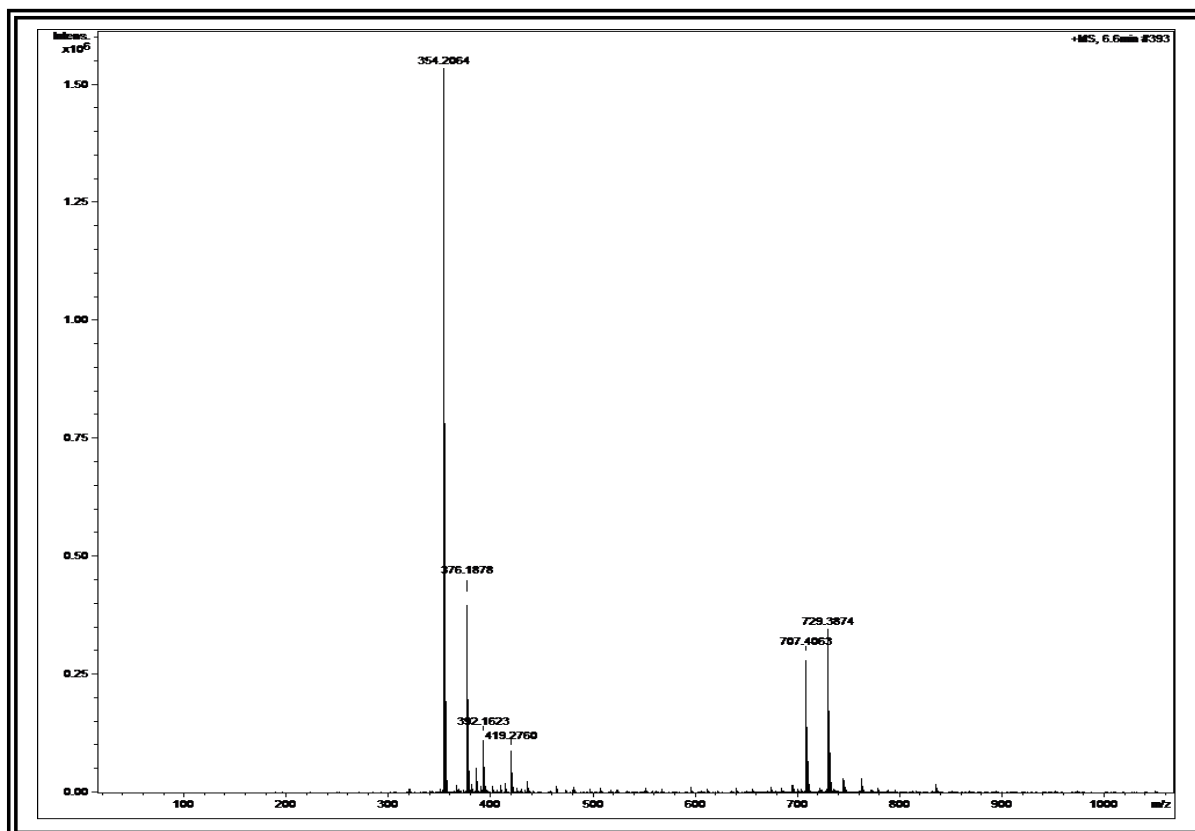


FIGURA 29. Espectro de massas de alta resolução de A19 (ESI, modo positivo)

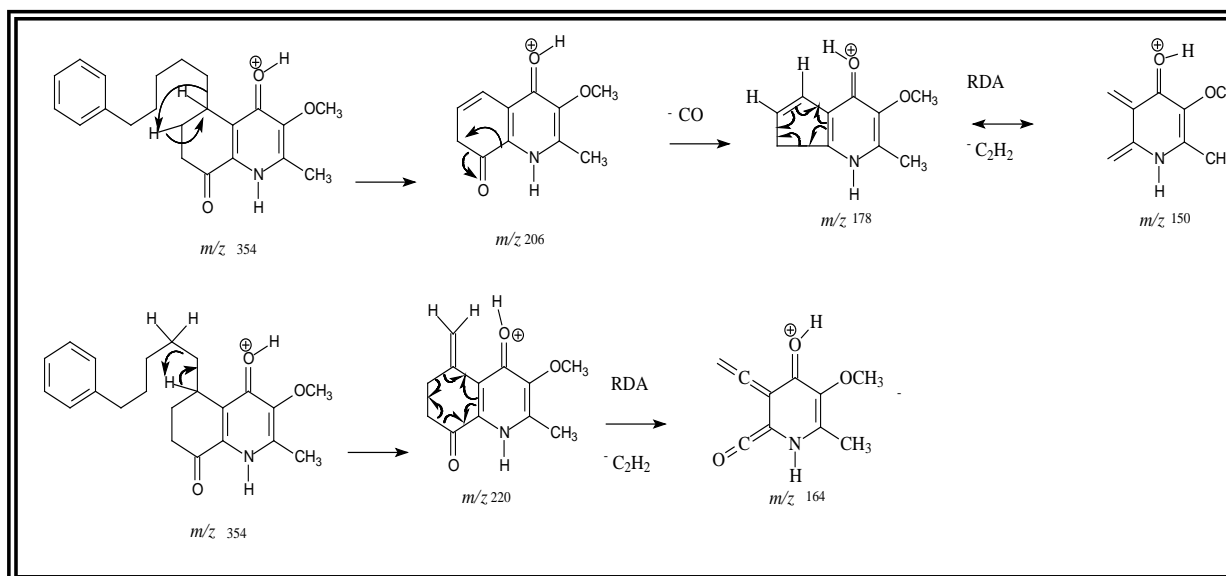


FIGURA 30. Propostas de fragmentação para A19

TABELA 24. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do alcaloide A19

Posição	A19 ( $\text{CDCl}_3$ )		Antidesmona (Lit* <sup>1</sup> ) ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 500 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	$^{13}\text{C}$ 125 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	138,12	-	138,90
3	-	147,63	-	147,50
4	-	173,40	-	172,18
5	3,25 ( <i>m</i> )	30,31	3,27 ( <i>m</i> )	30,30
6ax	2,08 ( <i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,5; 4,3)	24,47	2,08 ( <i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,7; 4,4)	24,30
6eq	2,20 ( <i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,3)		2,20 ( <i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,4)	
7ax	2,75 ( <i>ddd</i> , 14,7 ;18,1; 5,3)	32,23	2,75 ( <i>ddd</i> , 14,7 ;18,2; 5,3)	32,20
7eq	2,58 sobreposto		2,58 ( <i>ddd</i> , 18,2 ;4,4 ; 2,4)	
8	-	194,87	-	194,60
9	-	131,97	-	
10	-	138,97	-	139,00
11a	1,50 – 1,80 (sobreposto)	30,53	1,75 (sobreposto)	30,50
11b	1,45 (sobreposto)		1,45 (sobreposto)	
12-13	1,25 – 1,80	29,20 - 29,60	1,25 – 1,80	29,20 – 29,60
14	1,60 (sobreposto)	32,12	1,25	22,60
15	2,62 ( <i>t</i> , 7,0)	36,00	0,87 ( <i>t</i> , 7,0)	14,00
1'	-	142,78	-	-
2'	7,18 ( <i>m</i> )	128,25	-	-
3'	7,28 ( <i>m</i> )	128,06	-	-
4'	7,18 ( <i>m</i> )	125,47	-	-
5'	7,28 ( <i>m</i> )	128,06	-	-
6'	7,18 ( <i>m</i> )	128,25	-	-
2-C- $\text{CH}_3$	2,35 ( <i>s</i> )	14,68	2,36 ( <i>s</i> )	14,50
3-O- $\text{CH}_3$	3,93 ( <i>s</i> )	59,42	3,93 ( <i>s</i> )	59,40
N-H	8,68 ( <i>s</i> )	-	8,73 ( <i>s</i> )	-

\*<sup>1</sup> (BRINGMANN *et. al.*; 2000b)

### 4.1.3. Identificação do alcaloide A7

A substância A-7 foi isolada em pequena quantidade (1,1mg) da fase diclorometano da raiz (WCD). Esta substância apresentou-se como um óleo amarelo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-7 apresentou grande semelhança com o espectro da antidesmona, destacando-se os sinais de hidrogênios metílicos em  $\delta$  3,93 e  $\delta$  2,35 referente a metoxila ligada em C-3 e a metila ligada ao C-2  $\text{sp}^2$ , respectivamente, além do sinal de metila terminal como tripleto em  $\delta$  0,87; sinais de hidrogênios metilênicos  $\alpha,\beta$  carbonílicos em  $\delta$  2,58 e  $\delta$  2,75 ( $\alpha$ ),  $\delta$  2,08 e  $\delta$  2,20 ( $\beta$ ); o sinal de hidrogênio na posição 5 em  $\delta$  3,26 além dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-7 apresentou um sinal adicional integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,70; que, dada a ausência do sinal de N-H na faixa de  $\delta$  8,70 foi sugestivo da presença de um grupo *N*-metil na estrutura de A-7.

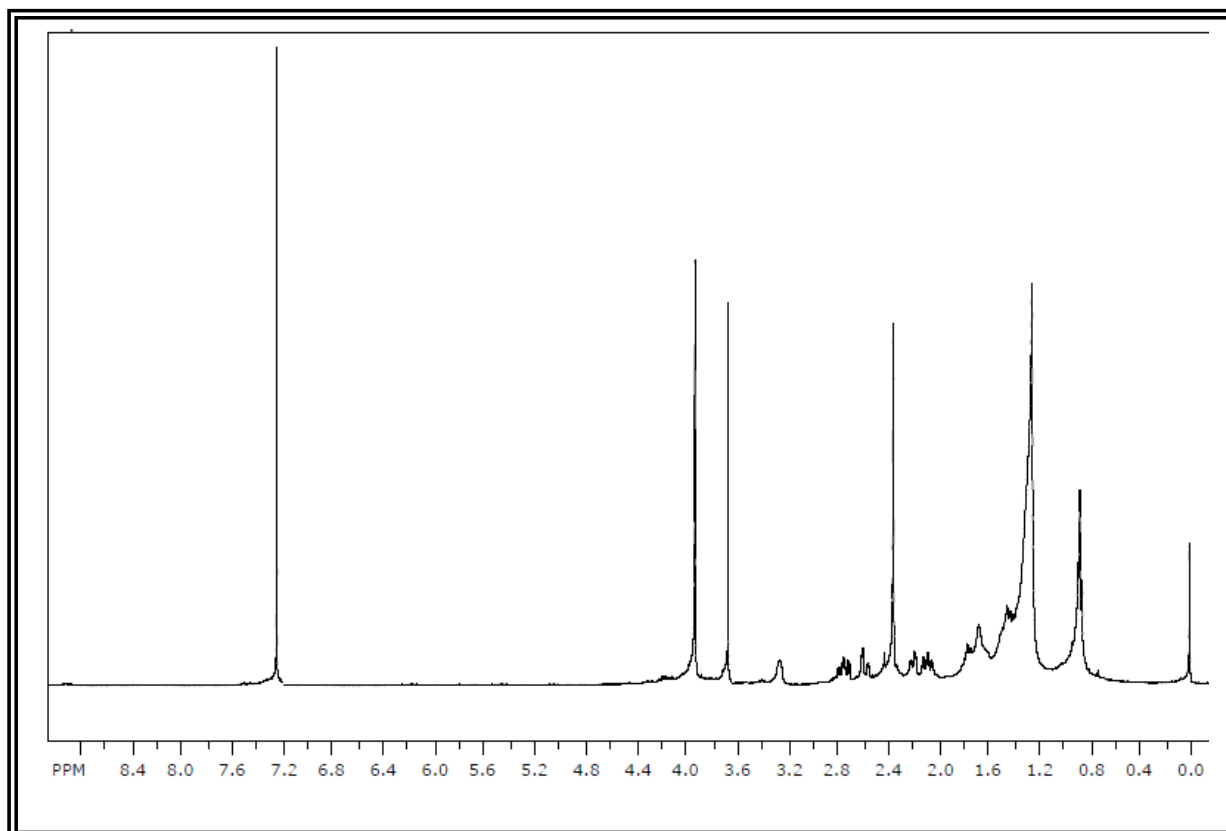


FIGURA 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A7 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

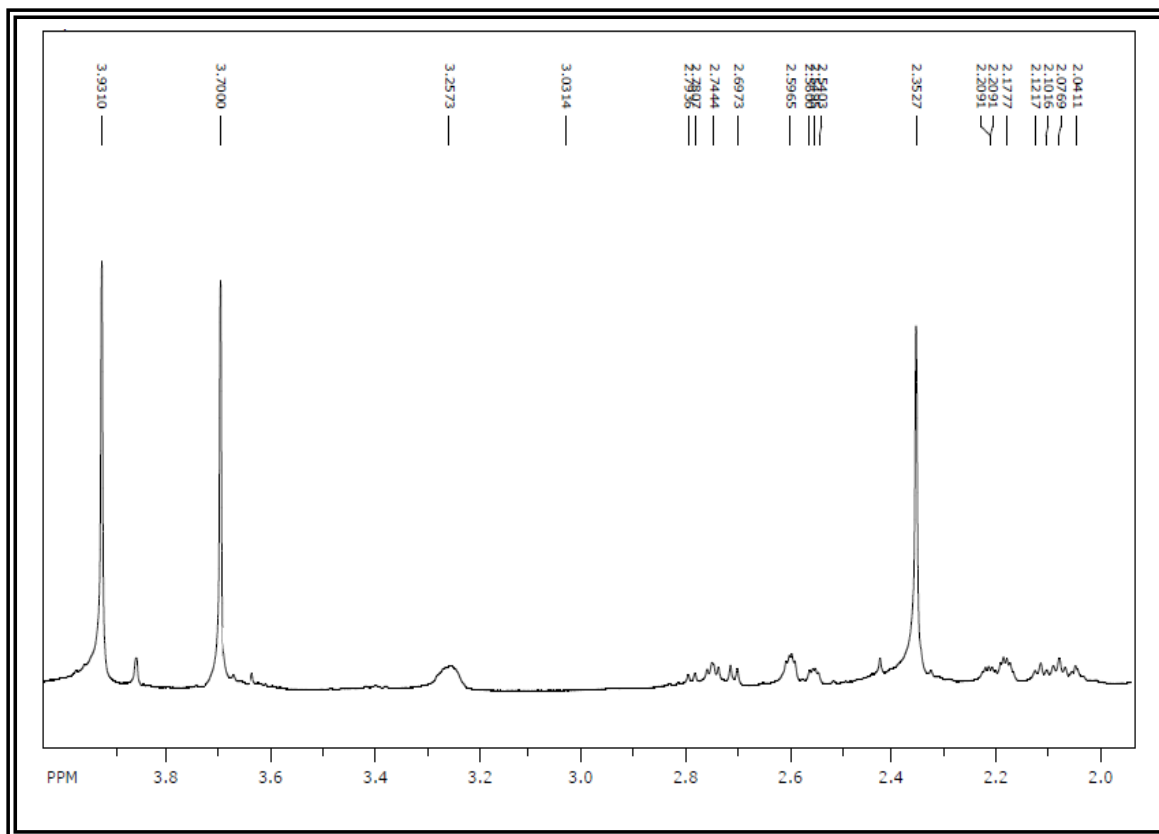


FIGURA 32. Ampliação de parte do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A7

O espectro de massas de A7, obtido no modo de ionização por impacto de elétrons, apresentou o sinal de  $m/z$  333 compatível com fórmula molecular da antidesmona N-metilada  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$ , além de fragmentação característica de cadeia saturada com perda sucessiva de unidades de  $\text{CH}_2$ , até o pico base em  $m/z$  207, com posterior perda de  $\text{CO}$  para o fragmento em  $m/z$  187. Comparando com o modelo da antidesmona, a fragmentação no modo EI difere-se do modo ESI, enquanto que neste a quebra da cadeia lateral ocorre entre os carbonos 11 e 12, no impacto eletrônico a cadeia vai quebra a partir da perda de cada unidade  $\text{CH}_2$ .

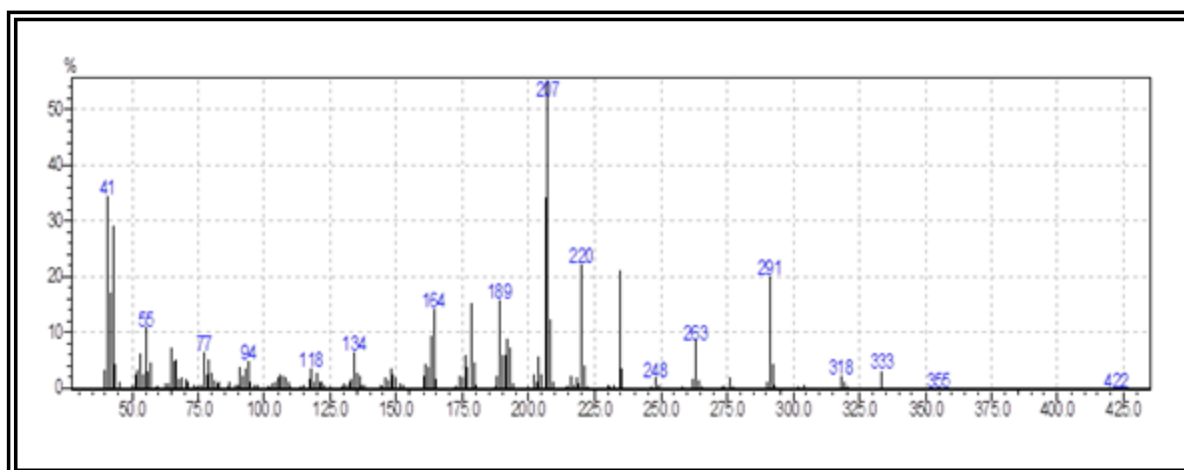
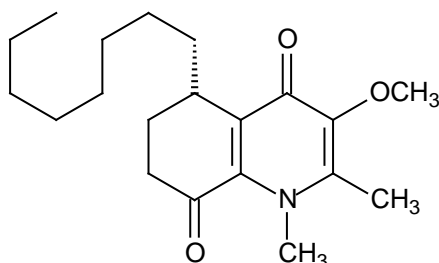


FIGURA 33. Espectro de Massas (EI, 70 eV) de A7

Através da análise dos dados espectrais obtidos para A7 e a comparação dos mesmos com a literatura, essa substância foi identificada com sendo a N-metil-antidesmona. O valor de  $[\alpha]_D^{25} = + 26^\circ$  ( $c$  1,5;  $\text{CHCl}_3$ ) obtido para A7 é compatível com a estereoquímica da (*S*)-antidesmona para o carbono 5.



**N-metil-antidesmona**

#### 4.1.4. Identificação do alcaloide A3

A substância A3 foi isolada das fases hexânica da raiz e do caule de *W. brachypetala*. Esta substância apresentou-se como um sólido branco amorfo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff, sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A3 apresentou sinais característicos das quinolonas discutidas anteriormente, destacando-se os sinais em  $\delta$  3,89 e 2,30 integrando para três hidrogênios cada, característicos de metoxila e metila ligada a carbono  $\text{sp}^2$  aromático, respectivamente. Estes sinais, juntamente com o simpleto largo em  $\delta$  8,16 sugeriram a presença do núcleo quinolônico idêntico a antidesmona.

Observou-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A3 sinais característicos de hidrogênios de cadeia alquílica lateral, como o simpleto intenso em  $\delta$  1,25 de hidrogênios metilênicos e o tripleto em  $\delta$  0,87 ( $J=7,0$  Hz) referente à metila terminal. Comparando com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da antidesmona é possível sugerir que o hidrogênio na posição 5 da estrutura de A3 é o multiplete que absorve em  $\delta$  2,90.

É possível observar neste espectro dois sinais adicionais, sendo um simpleto integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,50 e um duplo-duplete em  $\delta$  4,23 ( $J = 5,6$  e  $10,0$  Hz), característicos de metila ligada a heteroátomo e hidrogênio oxi-metínico respectivamente.



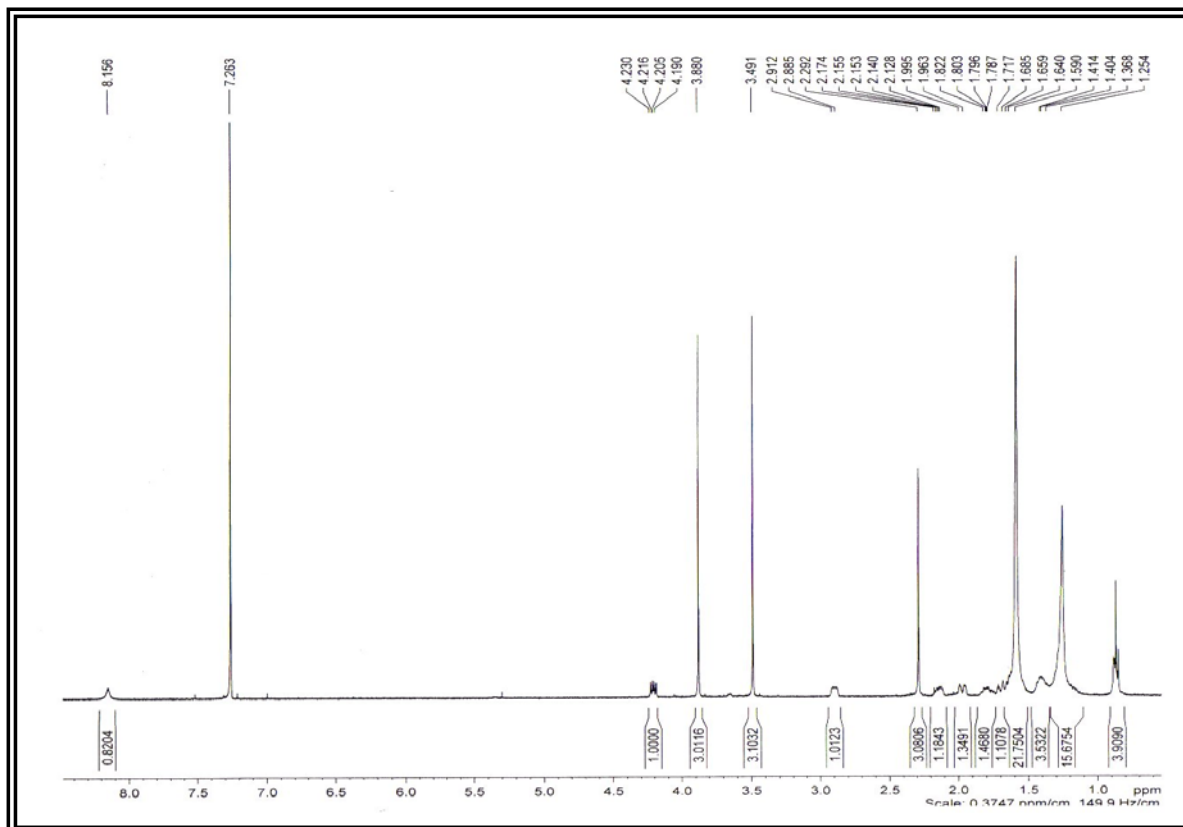


Figura 34. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A3 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)\*

\*Para este espectro, os valores de  $\delta$  foram reajustados para a referência  $\text{CDCl}_3$  (7,270 ppm)

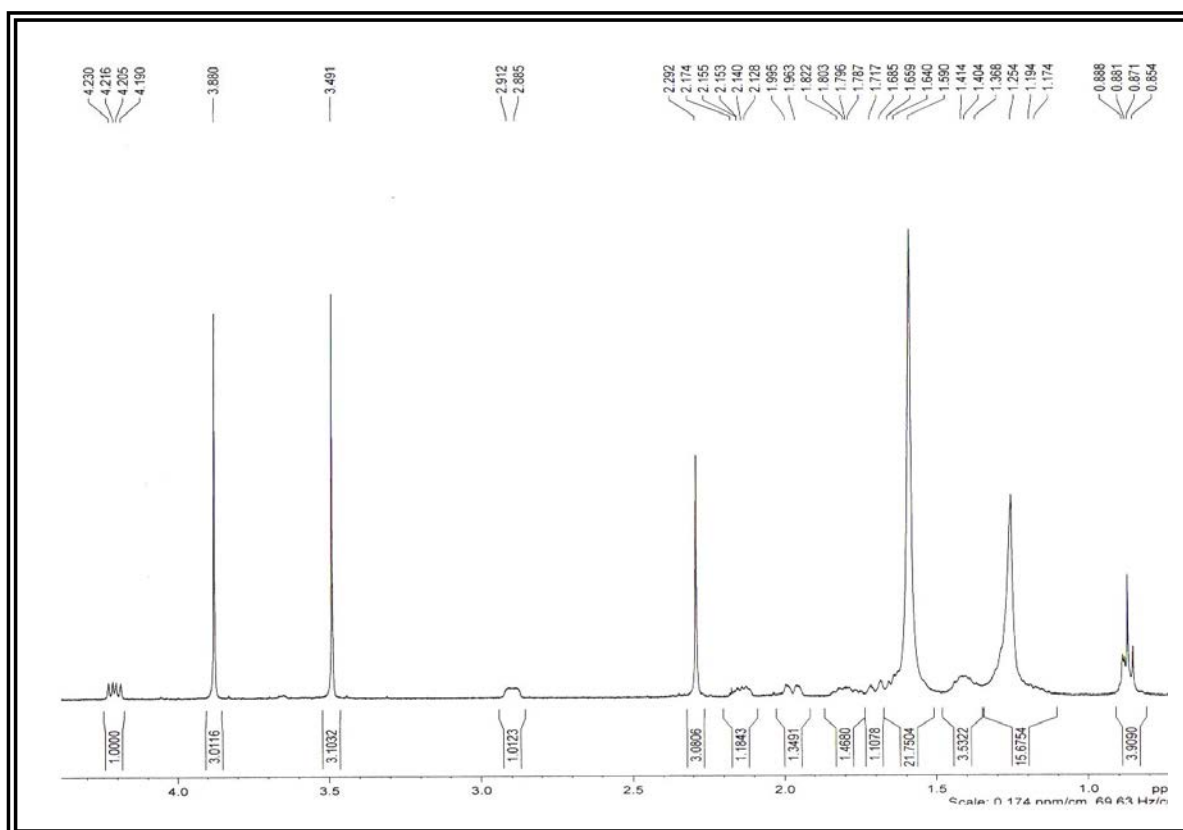


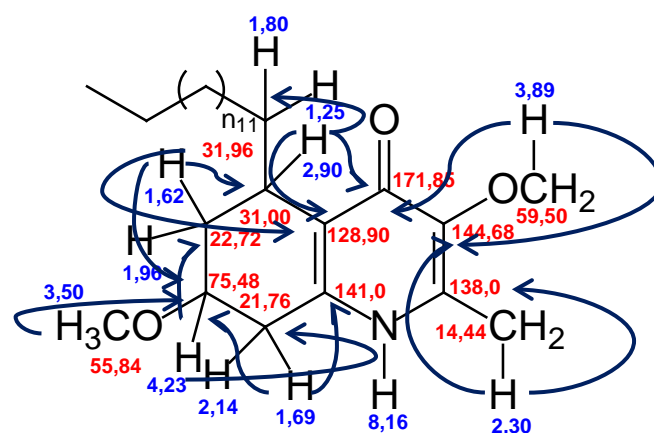
FIGURA 35. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A3 ( $\delta$  0 – 4,5)

O mapa de correlações do espectro de HSQC de A3 apresentou informações importantes sobre a estrutura deste composto. Observou-se a presença de três grupos metilênicos diasterotópicos referente aos carbonos em  $\delta$  31,96; 22,72 e 21,76 que correlacionaram com dois hidrogênios cada. Comparando com os valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  da antidesmona, foi possível sugerir que o sinal de carbono em  $\delta$  31,96 refere-se à posição 11. Neste espectro observou-se que o sinal referente à metila em  $\delta$  3,50 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  55,84 confirmando que se trata de uma metoxila, o deslocamento deste sinal para um campo de maior blindagem é típico de metoxila ligada a um sistema cíclico saturado (BARREIROS *et. al.*; 2007).

Observa-se ainda no mapa de correlações do espectro de HSQC de A3 a correlação entre o hidrogênio em  $\delta$  4,23 com o sinal de carbono em  $\delta$  75,48; sugerindo que o grupo metoxílico esteja ligado a este carbono, sendo este um possível centro estereogênico. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,90 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  31,00, sendo este atribuído a C-5.

No mapa de correlações do espectro de HMBC de A3, observou-se a correlação entre os hidrogênios metilênicos diasterotópicos em  $\delta$  1,62 e 1,96 com os sinais de carbono em  $\delta$  31,0;  $\delta$  75,48 e 128,87 sugerindo vizinhança aos carbonos C-5, carbono oximetínico e carbono  $\text{sp}^2$ , respectivamente. Os hidrogênios metilênicos diasterotópicos em  $\delta$  2,14 e 1,69 correlacionaram com os sinais de carbono em  $\delta$  141,00 e 75,48 sugerindo a vizinhança destes hidrogênios com os carbonos  $\text{sp}^2$  e oxi-metínico, respectivamente a uma ou mais ligações.

Observa-se ainda neste espectro a correlação entre o sinal de metoxila em  $\delta$  3,50 com o carbono oxi-metínico em  $\delta$  75,48 e do hidrogênio em  $\delta$  2,90 com os sinais de carbono em  $\delta$  22,72; 128,87 e 171,85 sendo possível sugerir parte da estrutura de A3 como sendo:



**Correlações de HMBC para A3**

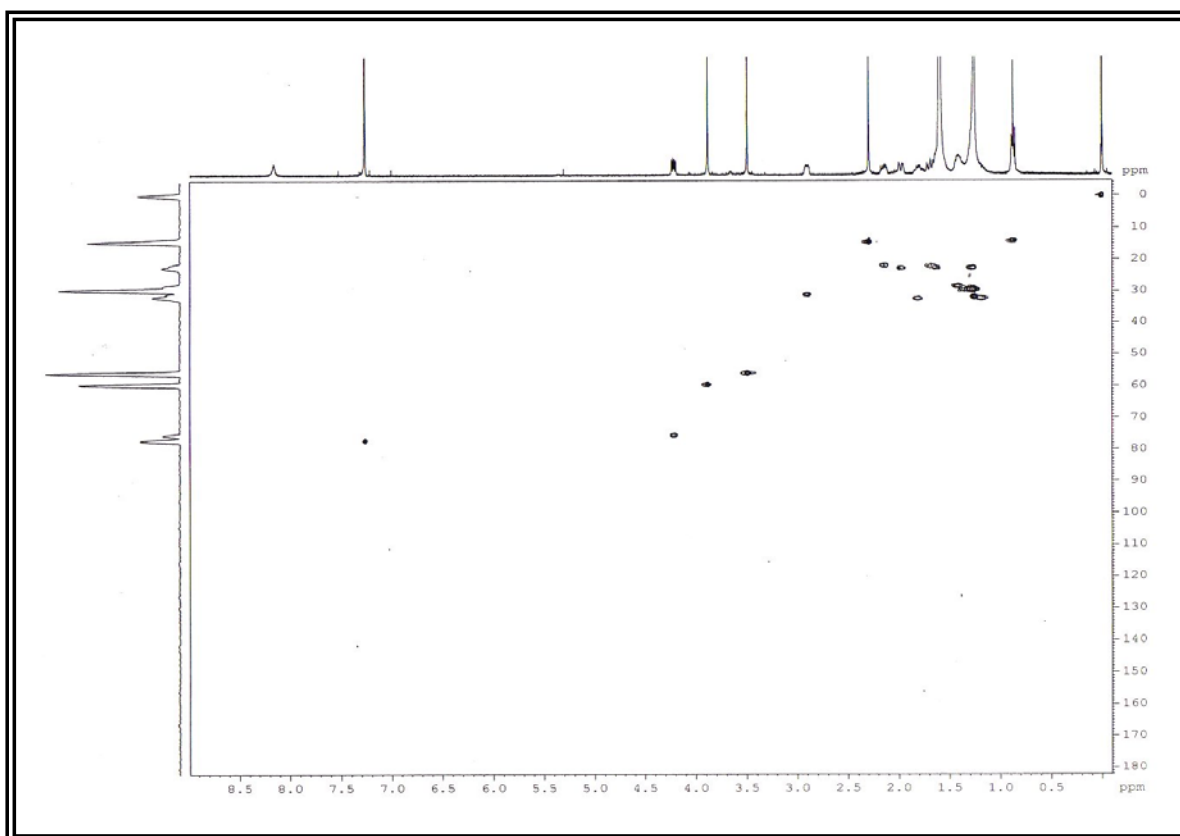


FIGURA 36. Mapa de correlações do HSQC de A3 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

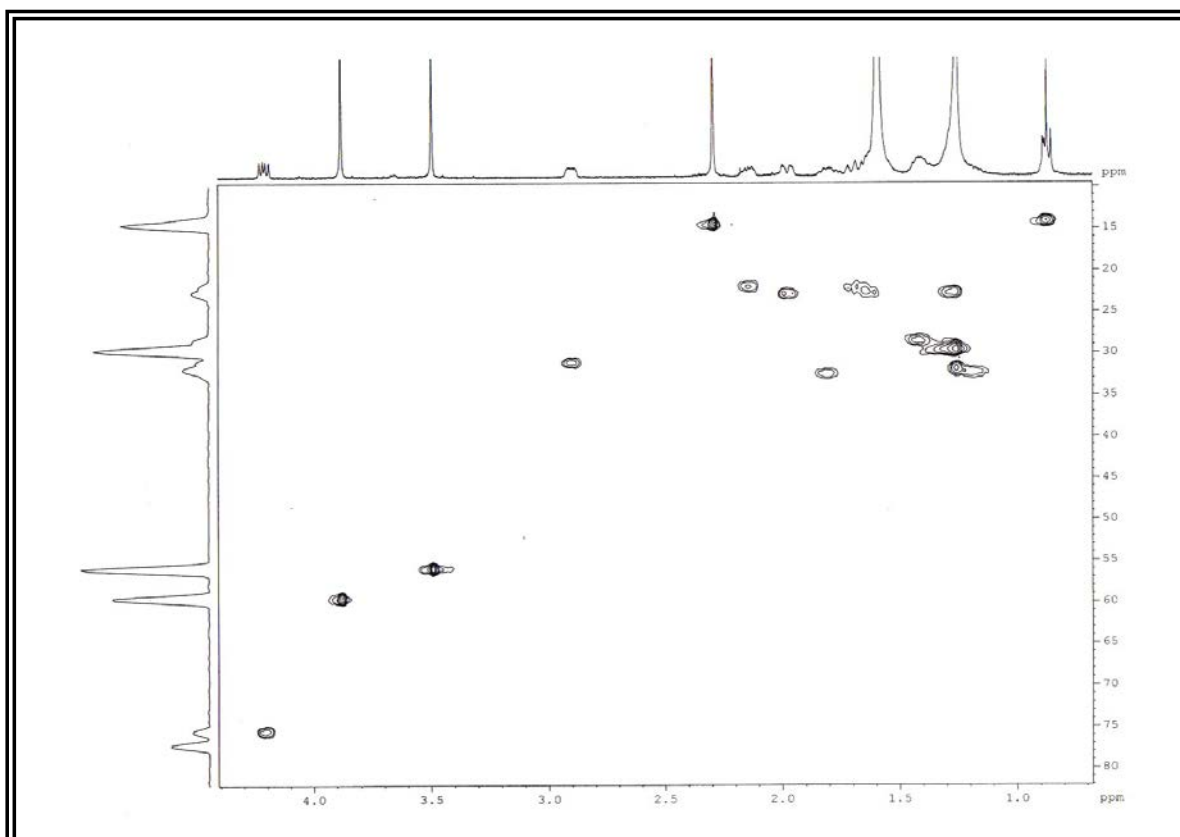


FIGURA 37. Mapa de correlações do HSQC de A3 ( $\delta_C$  10 – 80)

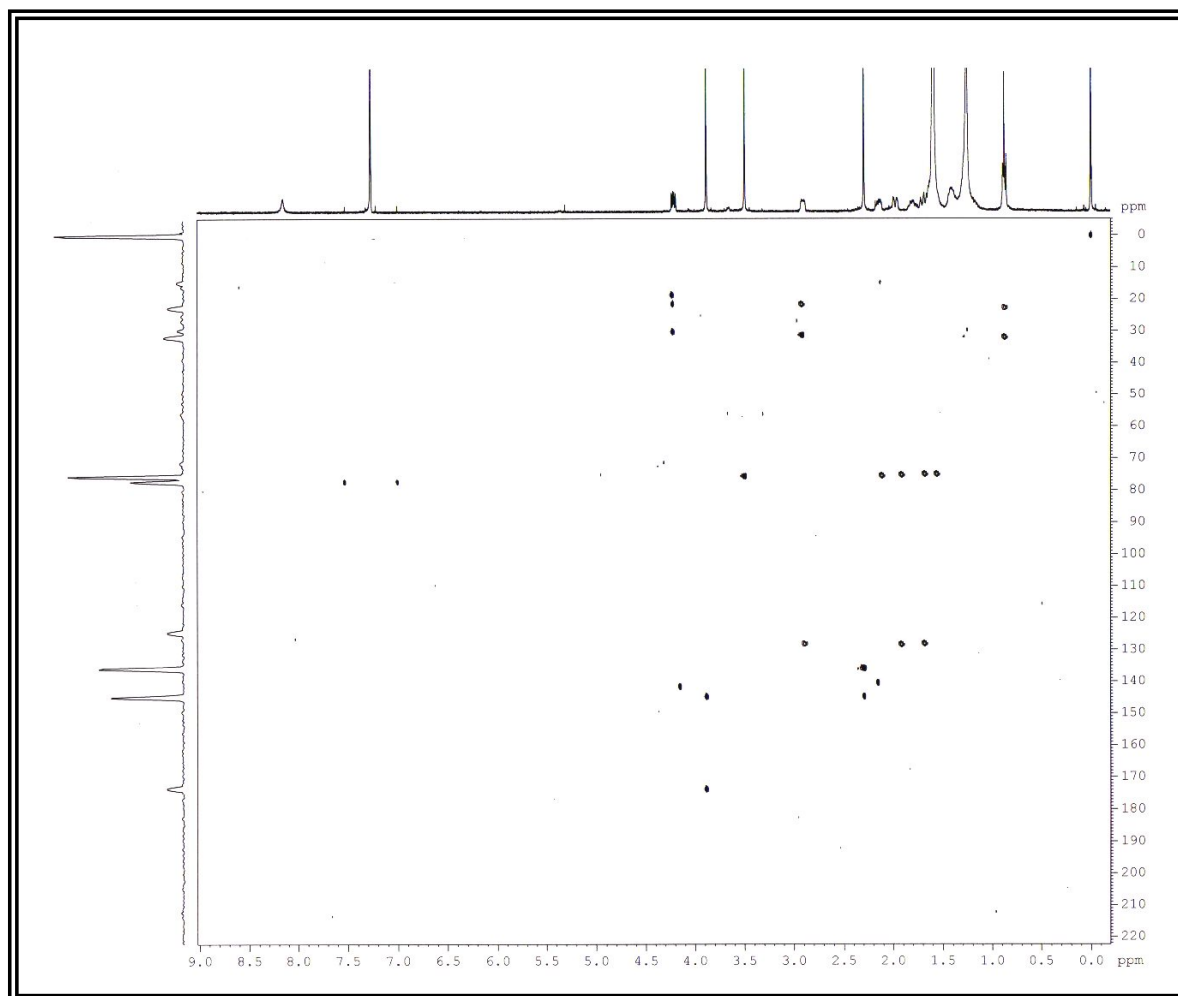
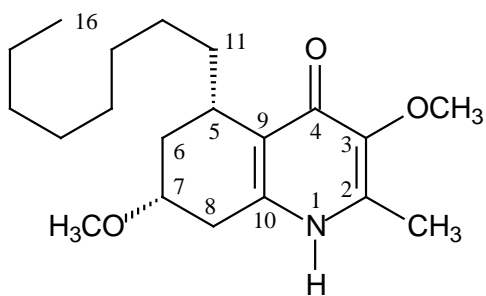


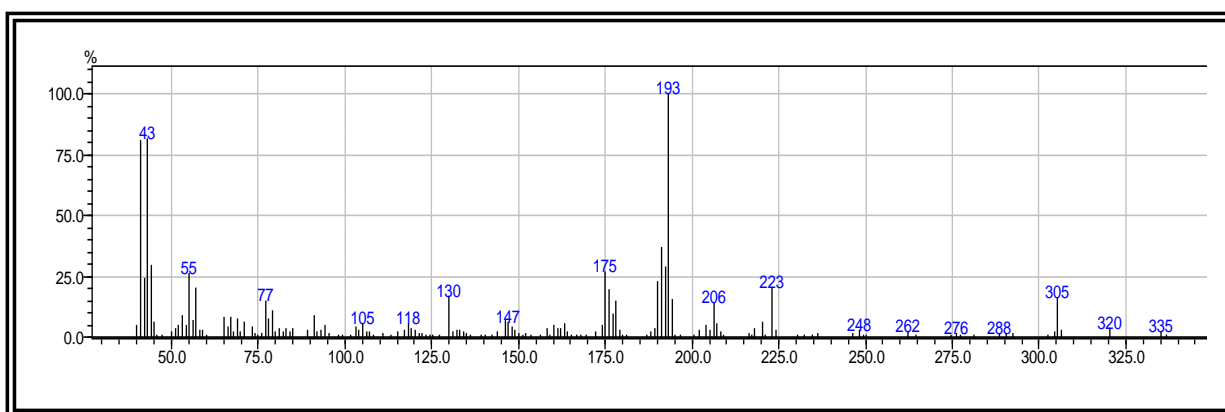
FIGURA 38. Mapa de correlações do HMBC de A3 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

O espectro de massas (EI) de A3 apresentou o íon molecular em  $m/z$  335 Da, sendo possível afirmar que a cadeia lateral de A-3 possui sete grupos metilênicos. Com base na análise dos dados espectrais apresentados e a comparação com dados da literatura (DIAS *et. al.*; 2007b), a substância A3 foi identificada, inequivocamente, como sendo o alcaloide quinolin-4-ona chamaedrona. Este alcaloide foi isolado anteriormente de *Melochia chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007b), sendo este o segundo relato de ocorrência deste alcaloide na literatura.

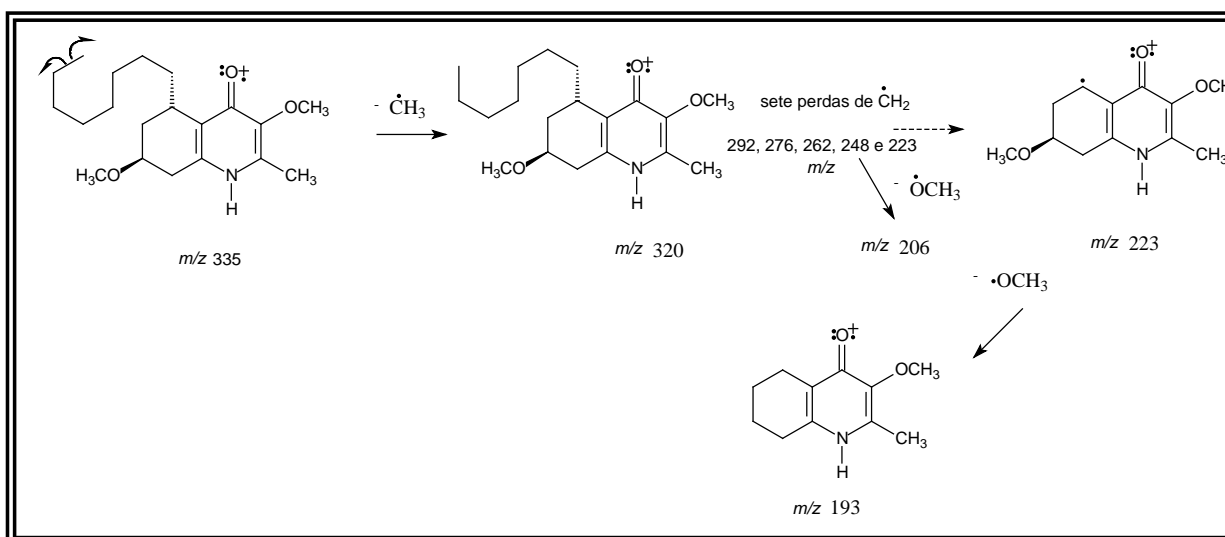
A estereoquímica da chamaedrona foi determinada por difração de raios-X por Dias e colaboradores (DIAS *et. al.*; 2007b). Neste estudo, verificou-se que a estereoquímica do carbono C-5 da chamaedrona é a mesma da (S)-antidesmona. Já para o carbono 7, verificou-se por raio-X que a estrutura mais estável tem a metoxila em face beta e o valor medido de  $[\alpha]_D^{25} = -3,8^\circ$  (c 1,2; CHCl<sub>3</sub>). Assim, dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = -3,9^\circ$  (c 1,2; CHCl<sub>3</sub>) para A-3, sugere-se que A-3 tenha a mesma estereoquímica que a chamaedrona relatada na literatura.



**Estrutura da chamaedrona**



**FIGURA 39. Espectro de massas de A3 (EI, 70 eV)**



**FIGURA 40. Principais fragmentações de A3**

TABELA 25. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A3

Posição	A-3 ( $\text{CDCl}_3$ )		chamaedrona (Lit <sup>*1</sup> ) ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	138,0	-	137,95
3	-	144,68	-	144,57
4	-	171,85	-	171,75
5	2,90 ( <i>m</i> )	31,00	2,90 ( <i>m</i> )	30,58
6a	1,62 ( <i>m</i> )	22,72	1,62 ( <i>m</i> )	22,65
6b	1,96 ( <i>m</i> )		1,96 ( <i>m</i> )	
7	4,23 ( <i>dd</i> ; 5,0; 10)	75,48	4,27 ( <i>dd</i> ; 5,0; 10)	75,03
8a	1,69 ( <i>m</i> )	21,76	1,69 ( <i>m</i> )	22,15
8b	2,14 ( <i>m</i> )		2,14 ( <i>m</i> )	
9	-	128,90	-	128,87
10	-	141,00	-	140,98
11a	1,50 – 1,80 (sobreposto)	31,96	1,75 ( <i>m</i> )	31,87
11b	1,45 (sobreposto)		1,25 (sobreposto)	
12-17	1,25 – 1,80	22,20 – 32,0	1,25 – 1,80	22,20 – 32,51
18	0,87 ( <i>t</i> , 7,0)	14,40	0,86 ( <i>t</i> , 7,0)	14,09
7-OCH <sub>3</sub>	3,50 ( <i>s</i> )	55,84	3,49 ( <i>s</i> )	55,74
2-C-CH <sub>3</sub>	2,30 ( <i>s</i> )	14,40	2,34 ( <i>s</i> )	14,40
3-O-CH <sub>3</sub>	3,89 ( <i>s</i> )	59,50	3,93 ( <i>s</i> )	59,78
N-H	8,20 ( <i>s</i> )	-	NO <sup>*3</sup>	-

\*1 (BRINGMANN *et. al.*; 2000a)

\*2 Esses valores são atribuídos por HSQC e HMBC.

\*3 sinal não observado ou não publicado.

#### 4.1.5. Elucidação estrutural do alcaloide A2

A substância A-2 foi isolada de fase hexânica da raiz e do caule de *W. brachypetala*. Esta substância apresentou-se como um óleo de coloração amarronzada e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo assim a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A2 apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente, como os sinais em  $\delta$  3,88 e 2,44 característicos de metoxila em C-3 e metila ligado a carbono C-2  $\text{sp}^2$ , respectivamente, o sinal de multiplete em  $\delta$  3,03 característico no hidrogênio H-5. São observados ainda sinais de multiplete entre  $\delta$  1,25 – 1,80 característicos de hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica saturada.

A exemplo do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *w*-antidesmona (A19), não se observou o tripleto em  $\delta$  0,87 referente à metila terminal da cadeia lateral, mas sim um tripleto adicional integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  2,60 ( $J = 8,0\text{Hz}$ ) e dois multipletos típico de sistema AB, integrando para cinco hidrogênios, sugerindo assim uma fenila terminal para a cadeia lateral da estrutura de A2. Outro sinal de metila ligada a heteroátomo foi observado em  $\delta$  3,95, sugerindo a presença de metoxila ou N-metila como substituinte na estrutura de A2.

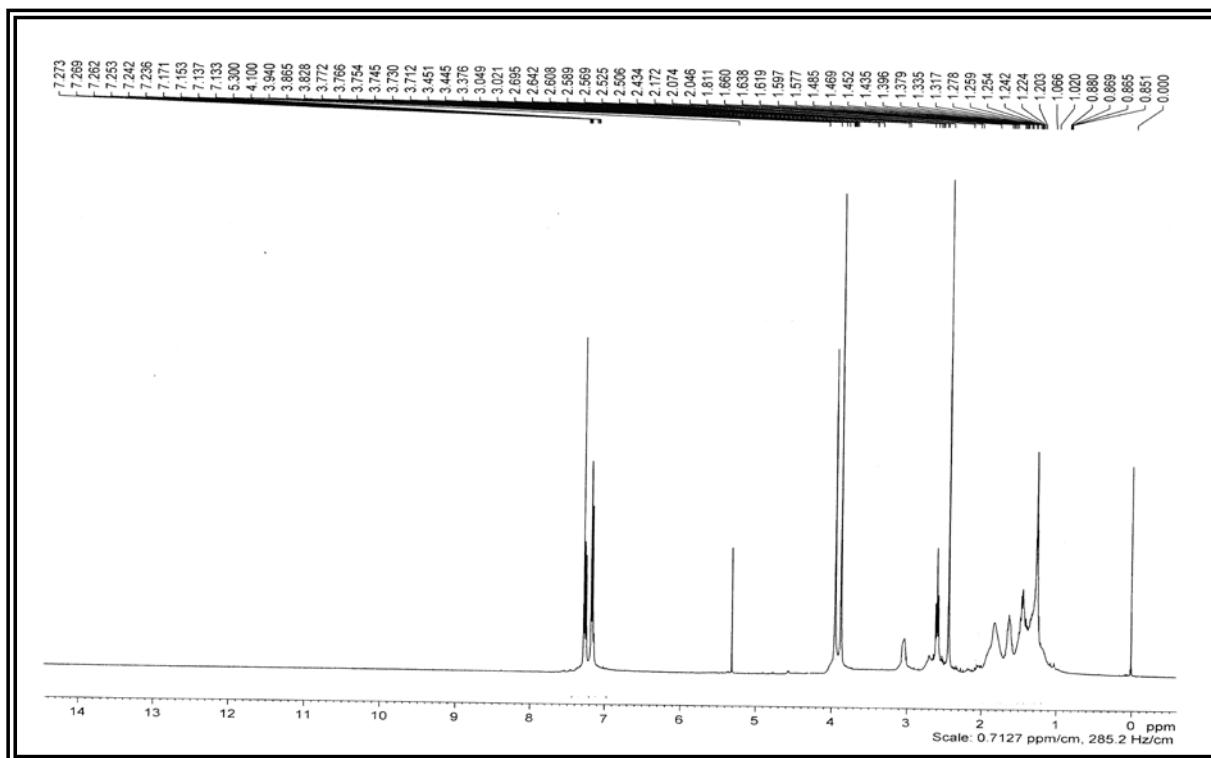


FIGURA 41. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)\*

\*Para este espectro os valores de deslocamento químico  $\delta_{\text{H}}$  foram calibrados para a referência  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  7,270 com o acréscimo de 0,032 ppm.

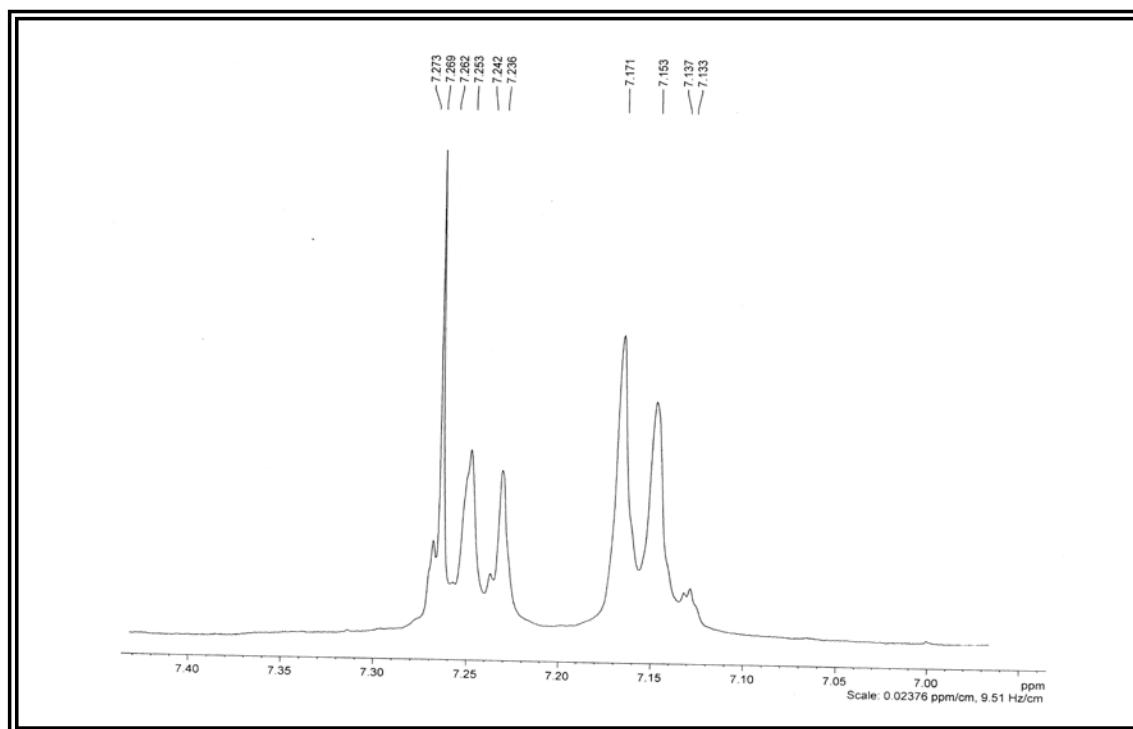


FIGURA 42. Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A2

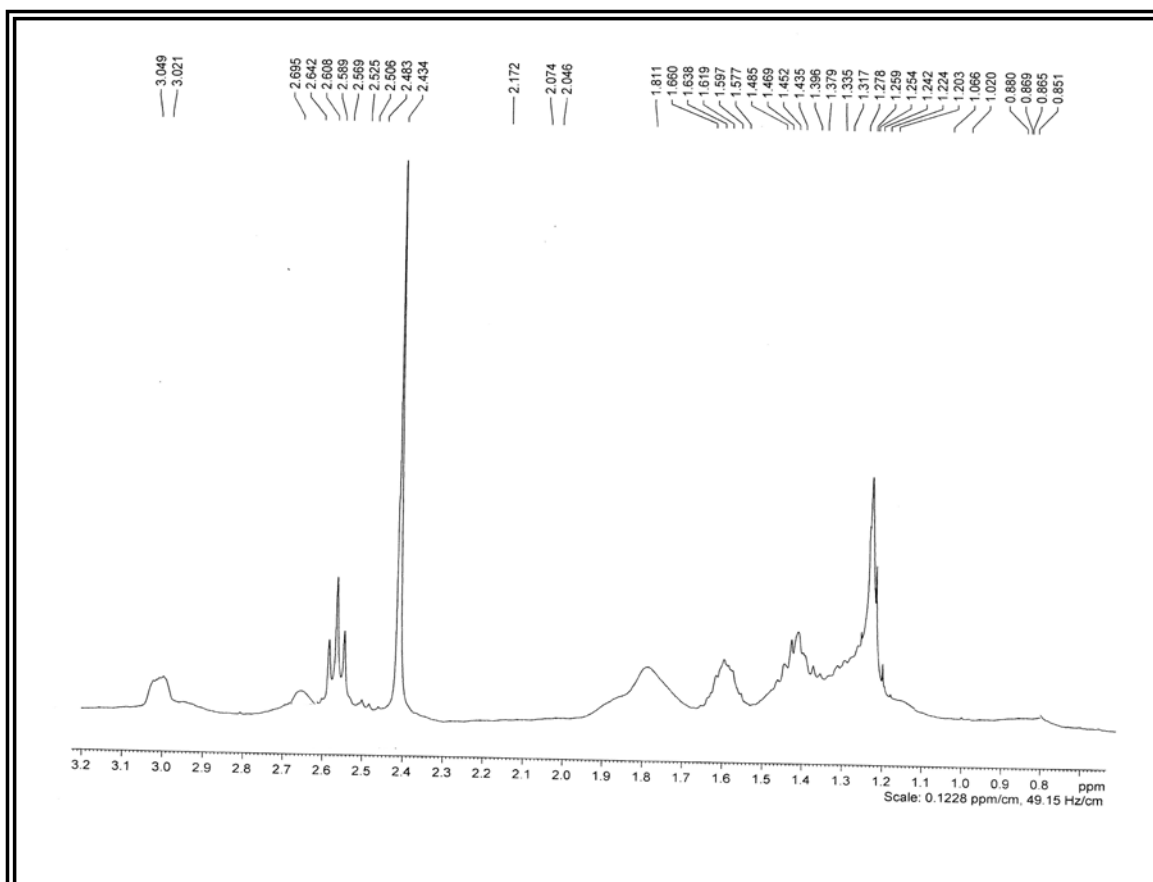


FIGURA 43. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A2 ( $\delta$  0,7 – 3,2)



O mapa de correlações do espectro de HSQC de A2 apresentou informações importantes sobre a estrutura deste composto. O sinal referente à metila em  $\delta$  3,95 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  65,37 o que caracterizou a presença de uma *N*-metoxila na estrutura de A2 dada a desblindagem do carbono metílico acima de  $\delta$  63,5 de acordo com (RAZAKOVA *et. al*; 1984). Esse tipo raro de substituição justifica a ausência do sinal de N-H no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A2.

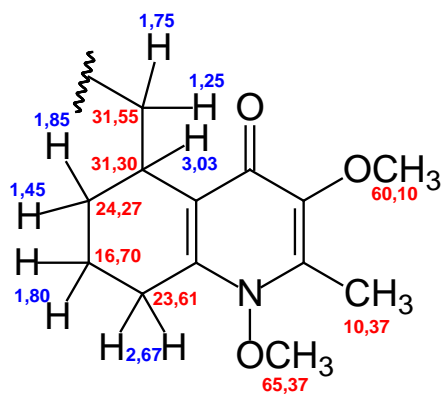
Observou-se ainda neste espectro dois grupos de hidrogênios metilênicos diasterotópicos. Os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,75 e 1,25 correlacionaram-se com o sinal de carbono em  $\delta$  31,55, sendo este característico do carbono C-11 vizinho ao centro esterogênico em C-5, quando comparado com os valores de C-11 dos alcaloides A1, A19 e A3 discutidos anteriormente. O multipletto em  $\delta$  3,03 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  31,30, sendo estes sinais característicos da posição 5 do anel B das quinolonas discutidas anteriormente.

Os hidrogênios metilênicos diasterotópicos em  $\delta$  1,45 e 1,85 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  24,27; e dada a presença de apenas dois grupos de hidrogênios metilênicos diasterotópicos verificado no espectro de HSQC de A2, sugeriu-se a presença de apenas um centro estereogênico na molécula, sendo este referente à posição 5. Assim, foi possível atribuir o sinal de carbono em  $\delta$  24,27 à posição 6.

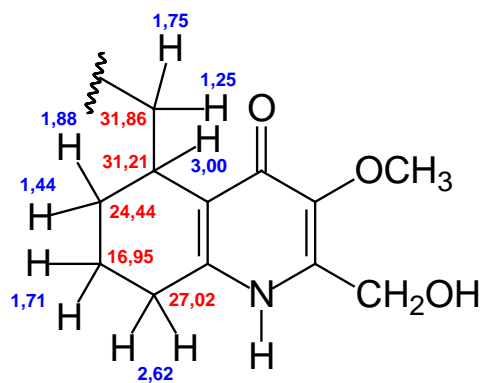
Observou-se ainda outras correlações importantes, como a do tripleto em  $\delta$  2,60 com o sinal de carbono em  $\delta$  36,0 característico de carbonos metilênicos benzílicos. O sinal de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,67 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  23,61 sugerindo ser vizinho a um carbono  $\text{sp}^2$ , devido à desblindagem desses hidrogênios.

O mapa de correlações do espectro de COSY confirmou o acoplamento entre o hidrogênio H-5 em  $\delta$  3,03 com os hidrogênios metilênicos diasterotópicos ligados aos carbonos em  $\delta$  31,55 (C-11) e 24,27 (C-16), enquanto que os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,67 correlacionaram com hidrogênios em  $\delta$  1,80 sobrepostos, sugerindo acoplamento entre estes. Através deste espectro observou-se também o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos.

Devido à ausência de sinais de outros substituintes (OH e  $\text{OCH}_3$ , por exemplo) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi proposta duas partes para a estrutura de A-2 e buscou-se modelos da literatura para comparar os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono. A primeira parte da molécula seria o núcleo quinolônico comum aos alcalóides quinolônicos A1, A19, A7 e A3, porém com uma substituição *N*-metóxi no anel A e nenhuma substituição no anel B. A segunda parte da molécula seria composto do grupo fenílico ligado a uma cadeia lateral em livre rotação com a união entre as duas partes através do carbono C-11.

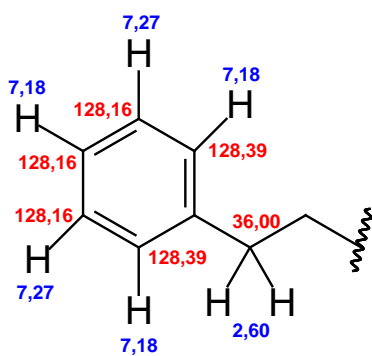


A-2

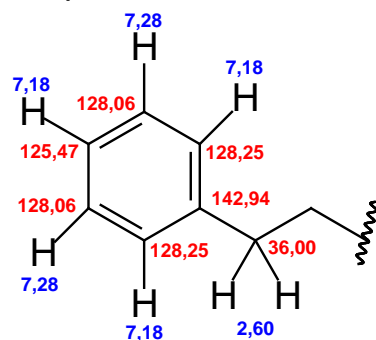


vanessina

(GRESSLER et. al.; 2008)



A-2



(PIZZOLATTI et. al.; 2004)

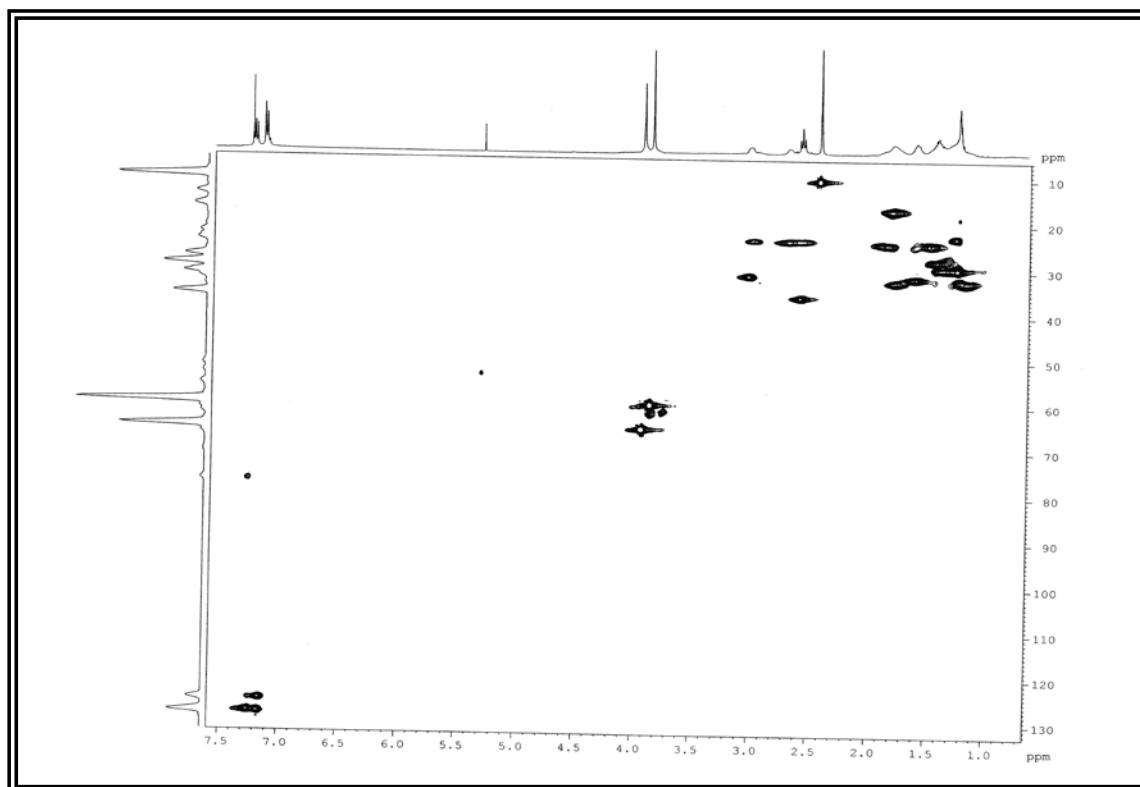


FIGURA 44. Mapa de correlações do HSQC de A2 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

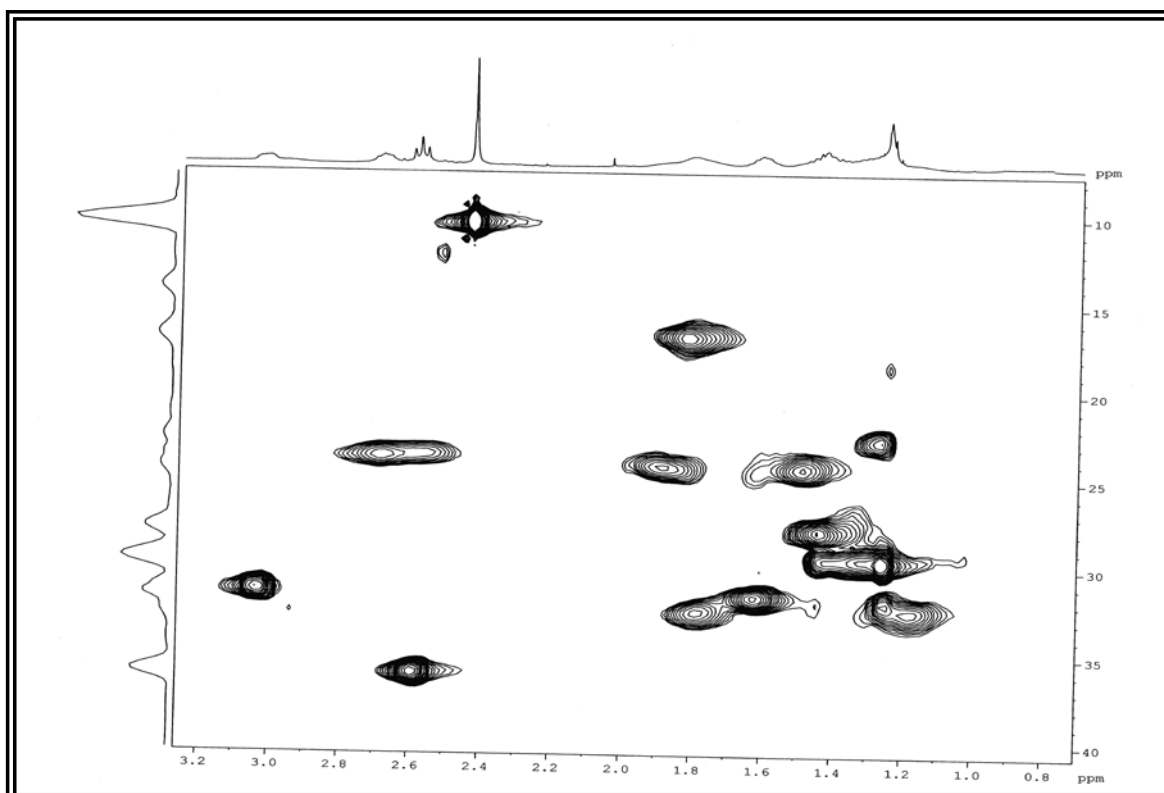


FIGURA 45. Mapa de correlações do HSQC de A2 ( $\delta$  0,8 – 3,2)

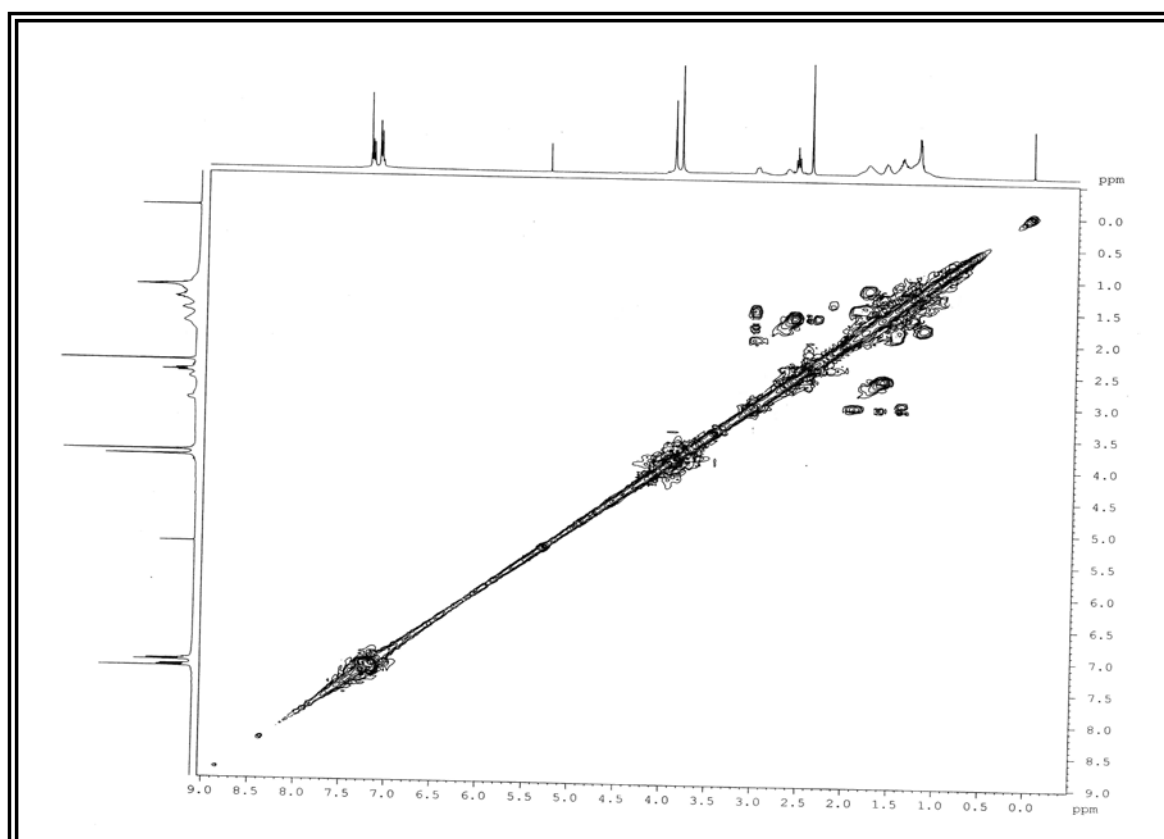


FIGURA 46. Mapa de correlações do  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  COSY de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

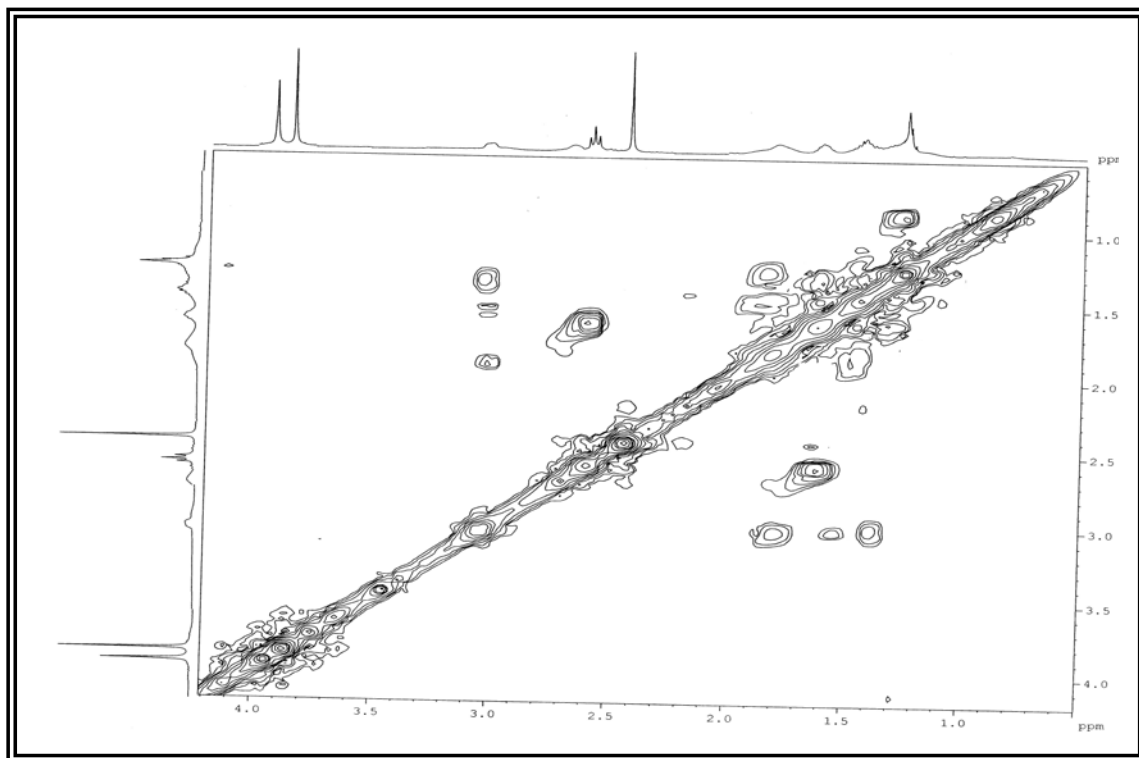
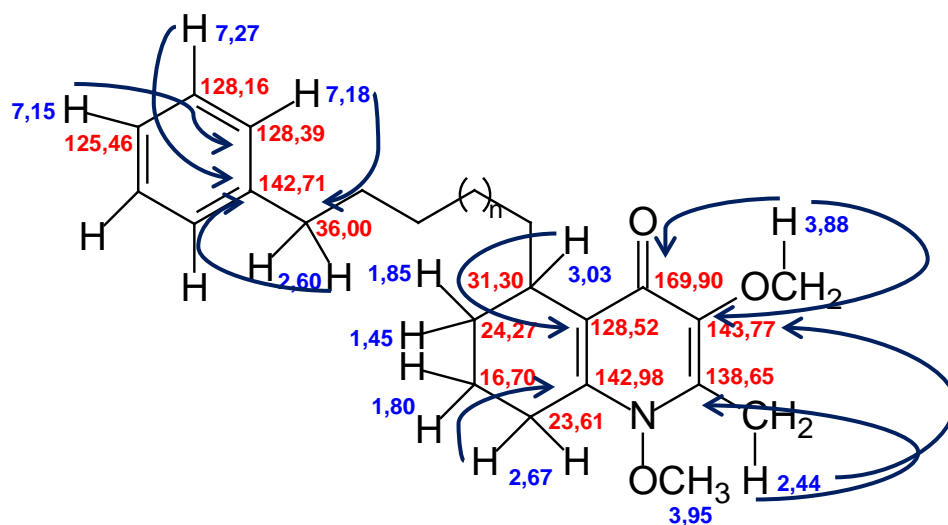


FIGURA 47. Mapa de correlações do  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY COSY de A2 ( $\delta$  0 – 4,0)

As correlações observadas no espectro de HMBC de A-2 confirmaram as atribuições de  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$  propostas com base nos experimentos de HSQC e COSY quando comparados com o alcaloide vanessina, previamente relatado na literatura (GRESSLER *et. al.*; 2008); destacando-se a correlação entre o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,67 com o sinal referente ao carbono C-10 em  $\delta$  142,98; a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,85 com o sinal do carbono C-5 em  $\delta$  31,30 e a correlação do sinal de tripleto, referente aos hidrogênios benzílicos em  $\delta$  2,60 com o sinal de carbono  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  142,71 referente ao carbono aromático C-1', pertencente ao grupo fenil terminal da cadeia lateral.



Principais correlações de HMBC observadas para A-2

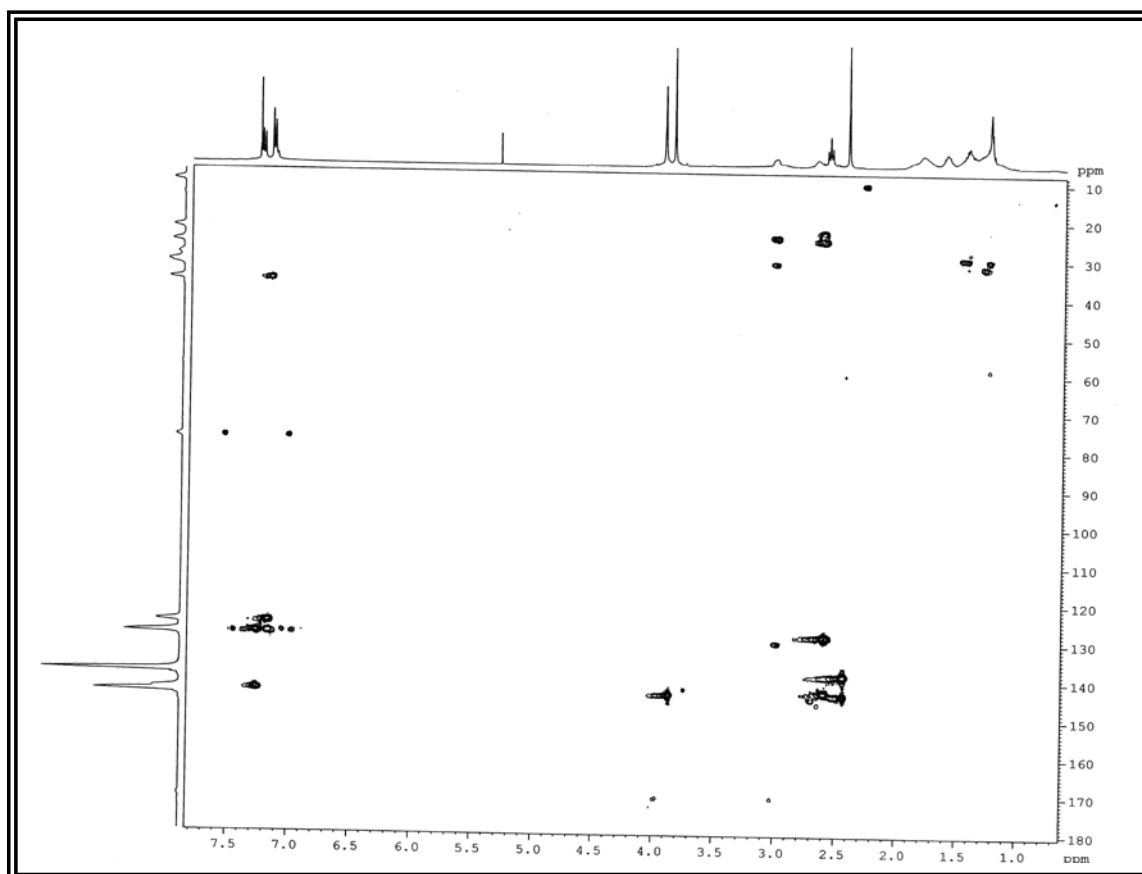


FIGURA 48. Mapa de correlações do HMBC de A2 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

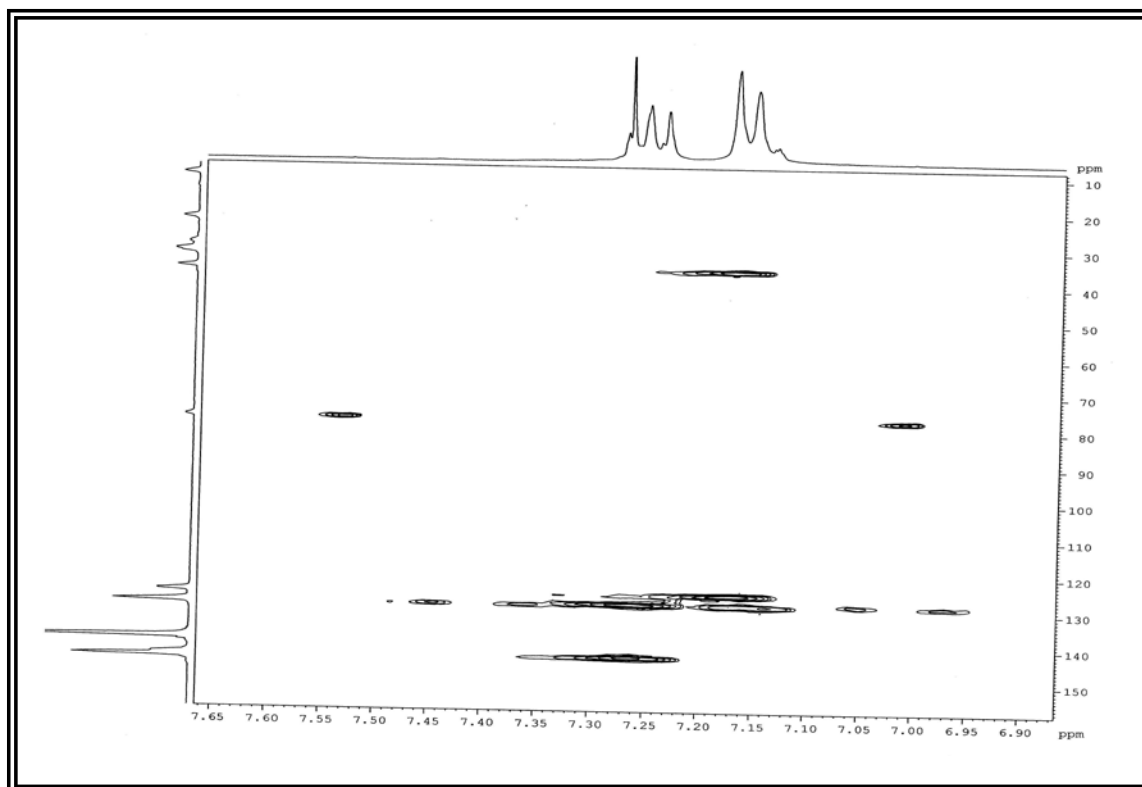


FIGURA 49. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_H$  6,90 – 7,65)

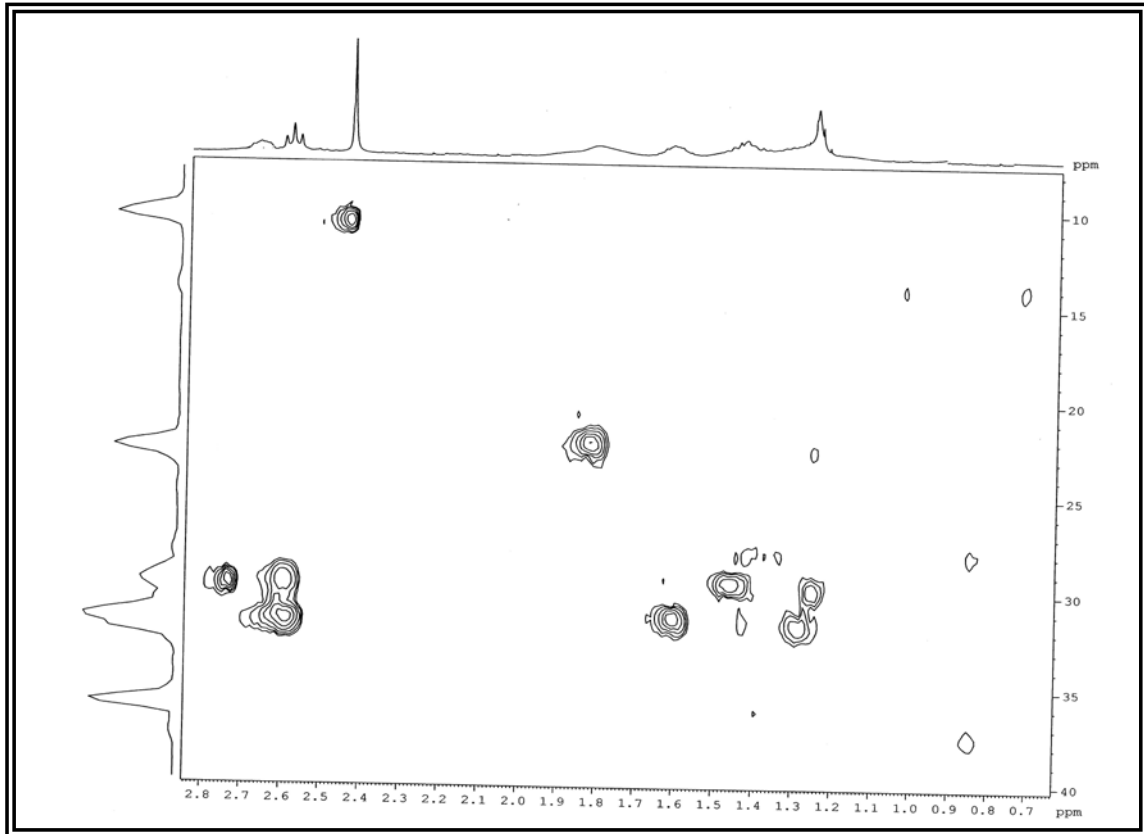


FIGURA 50. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_C$  10 - 40)

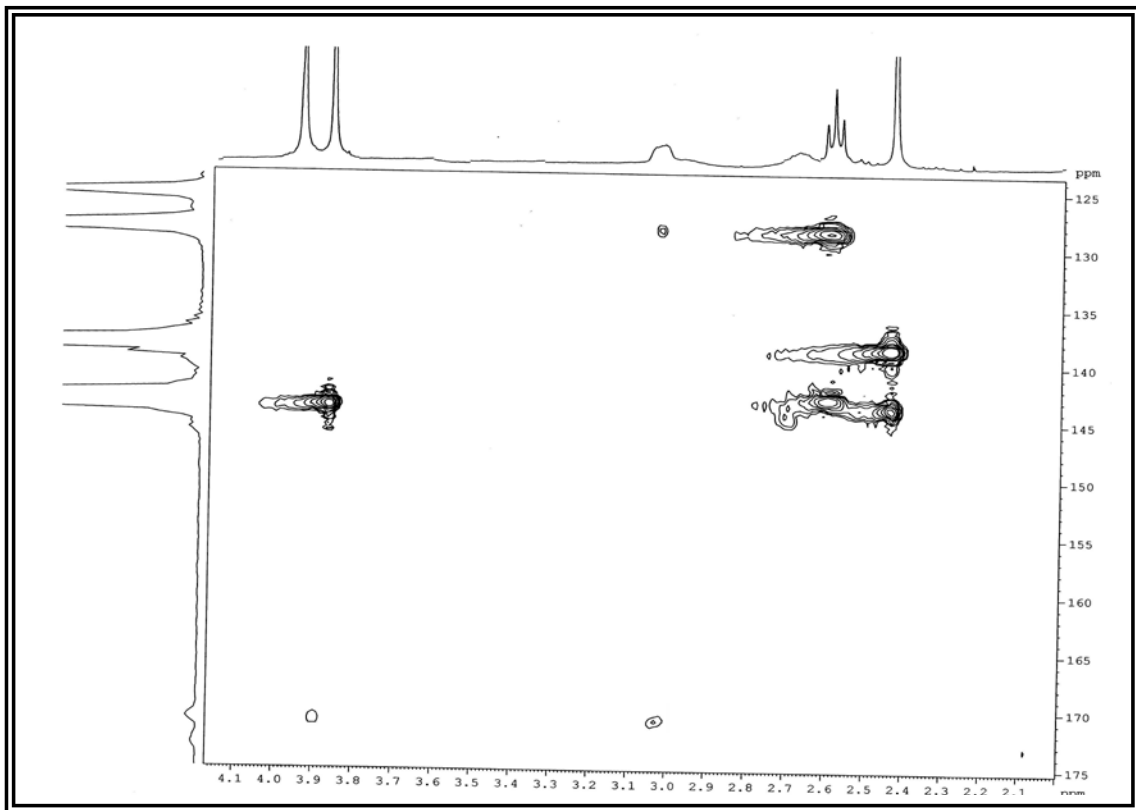


FIGURA 51. Mapa de correlações do HMBC de A2 ( $\delta_C$  125 - 175)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou todos os sinais de carbono da estrutura de A-2, inclusive os carbonos totalmente substituídos e o sinal da carbonila conjugada do núcleo quinolônico em  $\delta$  169,90.

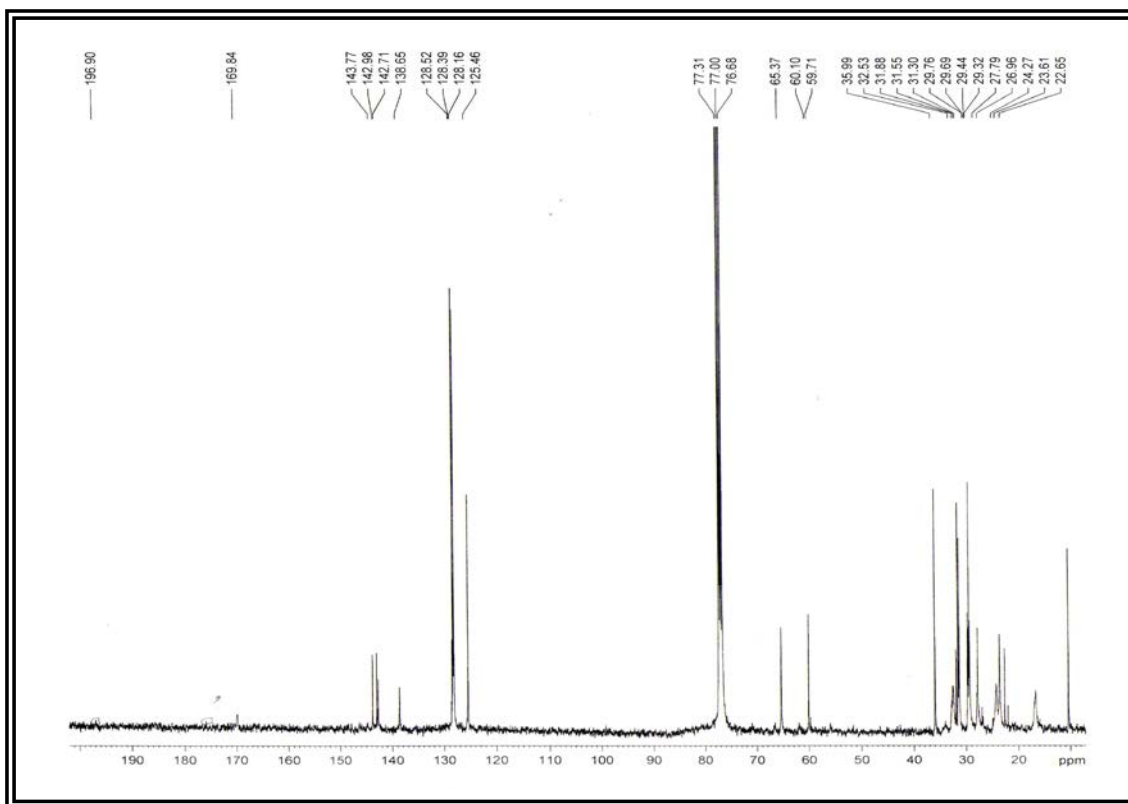


FIGURA 52. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A2 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

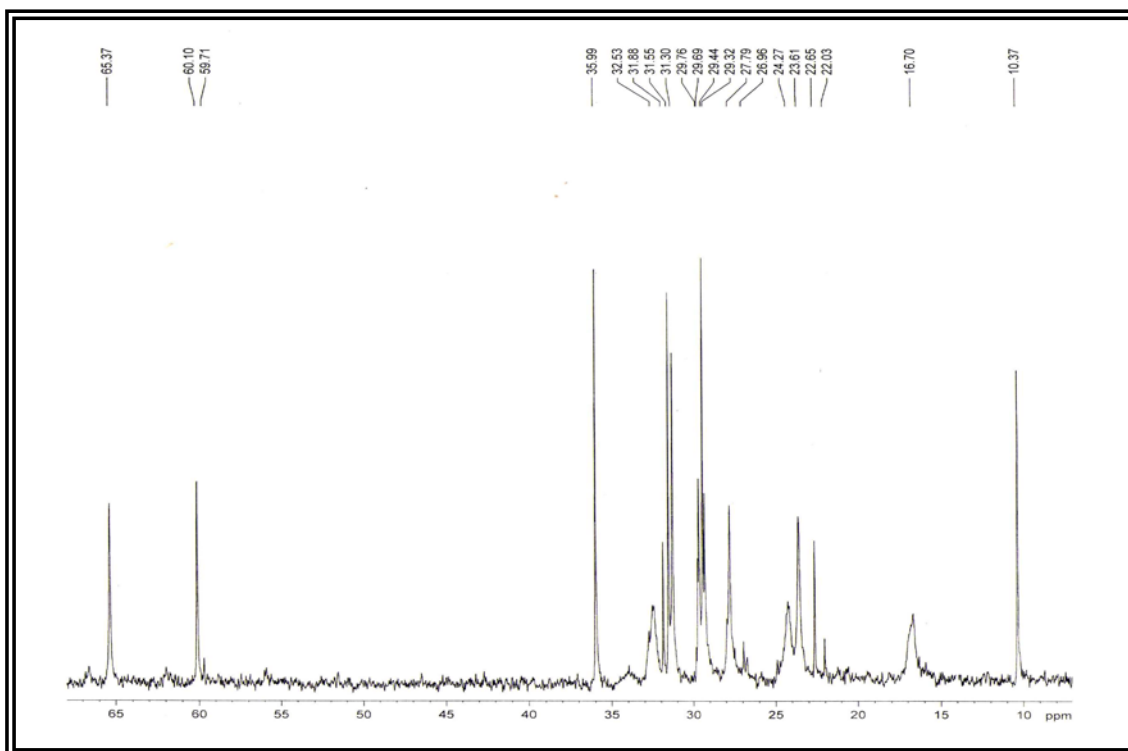
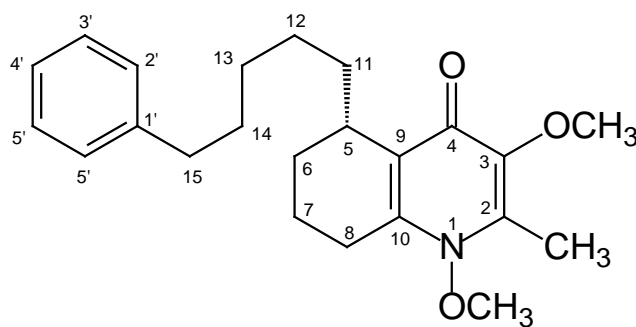


FIGURA 53. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A2 ( $\delta$  5 – 70)

O espectro de massas de A-2 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular em  $m/z$  370, confirmando a estrutura de A-2 com a cadeia lateral contendo cinco grupos metilênicos. Assim, através da análise de todos os dados espectrais apresentados e a comparação com modelos da literatura foi possível elucidar a estrutura de A-2 como sendo um alcaloide aril-alquil-quinolin-4-ona, cuja estrutura é inédita, sendo este alcaloide nomeado como brachytelona A. A configuração do carbono C-5 da brachytelona A foi atribuída como sendo (S), dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = + 27,5^\circ$  ( $c$  1,5;  $\text{CHCl}_3$ ), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (Buske *et.al.*; 1999).

Uma vez que a estrutura da brachytelona A é inédita, foi realizada a análise por espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS), onde se observou no modo positivo o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  370,244 compatível com a fórmula molecular da brachytelona A ( $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$ ).



Estrutura da brachytelona A (A-2)

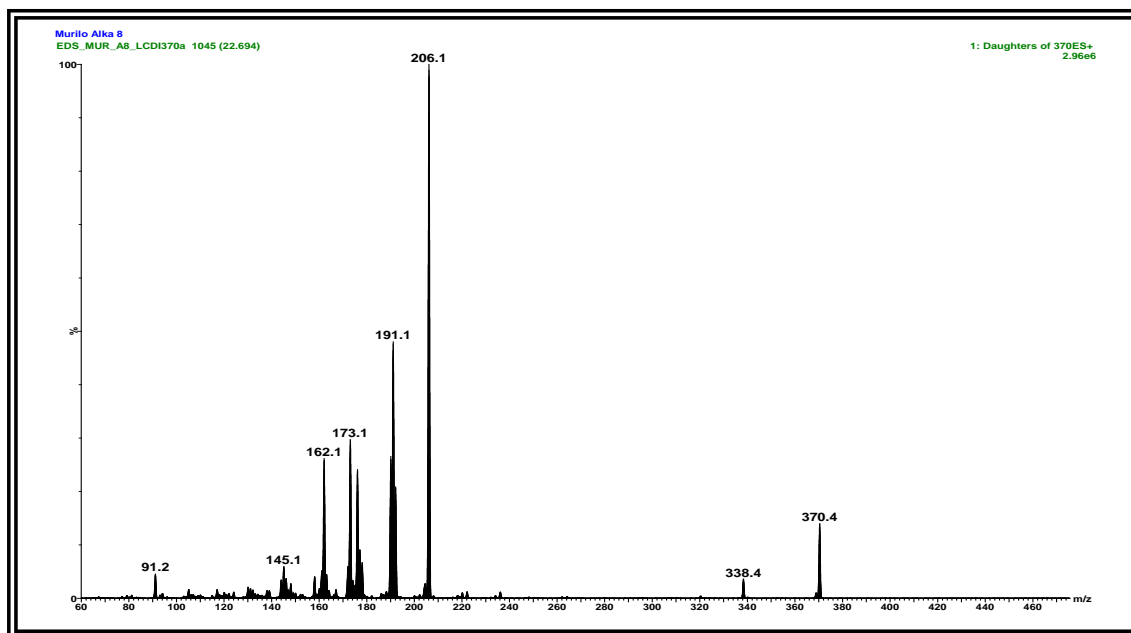


FIGURA 54. Espectro de massas de A2 (ESI, modo positivo)



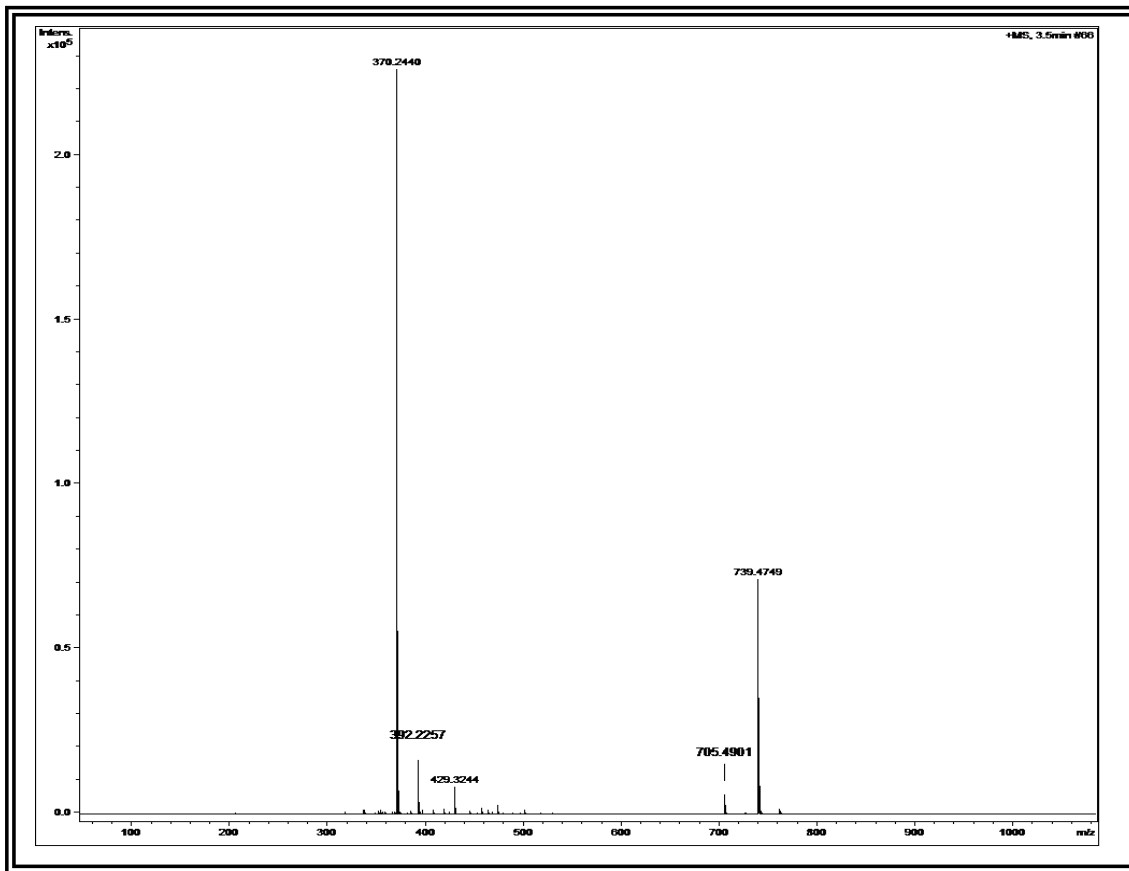


FIGURA 55. Espectro de massas de alta resolução de A2 (ESI, modo positivo)

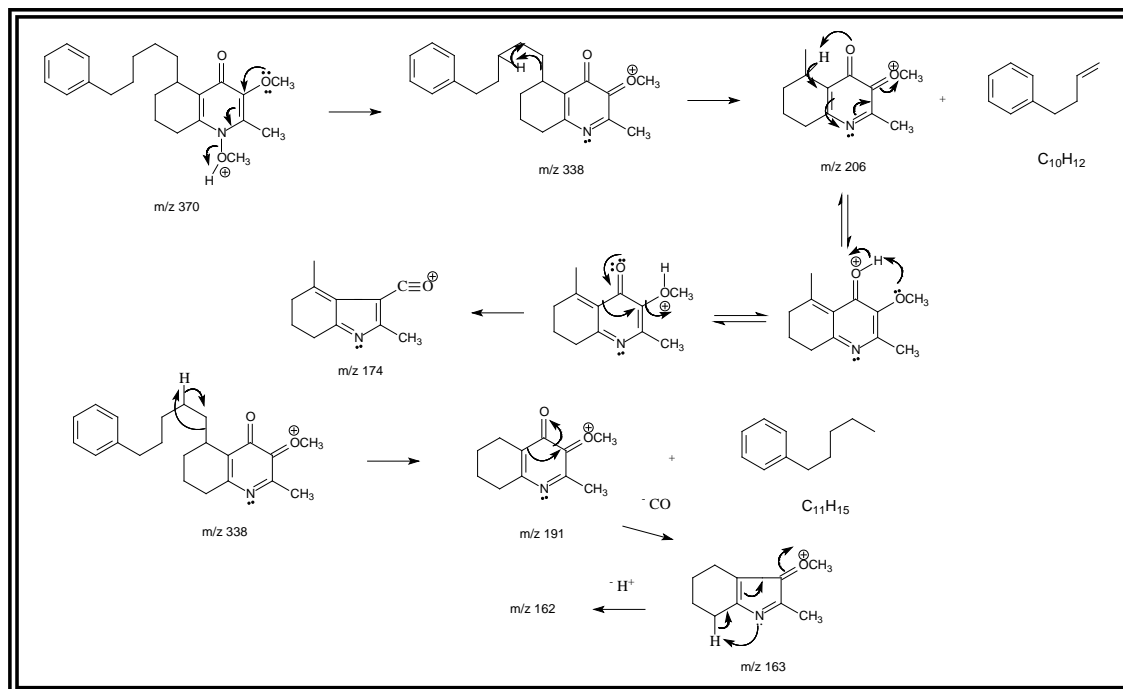


FIGURA 56. Propostas de fragmentação para A2

TABELA 26. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-2

Posição	A-2 ( $\text{CDCl}_3$ )		Literatura* ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	138,65	-	141,80
3	-	143,77	-	143,50
4	-	169,90	-	172,30
5	3,03 ( <i>m</i> )	31,30	3,27 ( <i>m</i> )	31,86
6a	1,85 sobreposto	24,27	2,08 ( <i>dddd</i> , 14; 14,7; 4,7; 4,4)	24,60
6b	1,45 (sobreposto)		2,20 ( <i>dddd</i> , 14; 5,3; 2,4; 4,4)	
7	1,80 (sobreposto)	16,70	2,75 ( <i>ddd</i> , 14,7 ;18,2; 5,3)	16,90
8	2,67	23,61	-	27,90
9	-	128,52	-	128,90
10	-	142,98	-	141,80
11a	1,75 (sobreposto)	31,55	1,75 (sobreposto)	30,50
11b	1,25 (sobreposto)		1,45 (sobreposto)	
12-13	1,25 – 1,85	27,90 – 29,60	1,25 – 1,80	29,20 – 29,60
14	1,60 (sobreposto)	32,53	1,60 (sobreposto)	32,12
15	2,60 ( <i>t</i> , 7,0)	36,00	2,62 ( <i>t</i> , 7,0)	36,00
1'	-	142,71	-	142,78
2'	7,18 ( <i>m</i> )	128,39	7,18 ( <i>m</i> )	128,25
3'	7,27 ( <i>m</i> )	128,16	7,28 ( <i>m</i> )	128,06
4'	7,18 ( <i>m</i> )	125,46	7,18 ( <i>m</i> )	125,47
5'	7,27 ( <i>m</i> )	128,16	7,28 ( <i>m</i> )	128,06
6'	7,18 ( <i>m</i> )	128,39	7,18 ( <i>m</i> )	128,25
2-C- $\text{CH}_3$	2,44 ( <i>s</i> )	10,37	2,35 ( <i>s</i> )	14,68
3-O- $\text{CH}_3$	3,88 ( <i>s</i> )	60,10	3,93 ( <i>s</i> )	59,42
N-O $\text{CH}_3$	3,95 ( <i>s</i> )	65,37	-	-

\*Foram utilizados dois modelos da literatura para comparação. Das posições 2 a 11 foi utilizado como modelo o alcaloide vanessina (GRESSLER *et. al.*; 2008), para as demais posições e substituintes foi utilizado como modelo o alcaloide A-19 (waltheriantidesmona).

#### 4.1.6. Elucidação estrutural do alcaloide A6

A substância A6 foi isolada das fases hexânica da raiz e do caule de *W. brachypetala*. Esta apresentou-se como um óleo incolor e revelou positivamente com reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6 apresentou grande semelhança com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da brachytelona A (A2), destacando-se os sinais característicos da cadeia alquílica lateral com um grupo fenílico terminal, sendo os multipletos entre  $\delta$  7,14 – 7,28 característicos de anel aromático monossustituído em livre rotação, o tripleto em  $\delta$  2,60 ( $J = 8,0$  Hz) de hidrogênios metilênicos benzílicos e demais sinais entre  $\delta$  1,25 – 1,90, característicos dos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral.

Observou-se ainda neste espectro sinais característicos do núcleo quinolônico dos alcaloides discutidos anteriormente, como os sinais de metila em  $\delta$  3,81 e 2,58 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligada a carbono  $\text{sp}^2$  na posição 2, bem como um multiplete em  $\delta$  2,95 referente ao H-5. Assim como para a brachytelona A, foi observado um sinal adicional de metila ligada a heteroátomo em  $\delta$  4,01 e a ausência do sinal referente ao hidrogênio ligado a nitrogênio. Foram observados dois sinais adicionais, com relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da brachytelona A, sendo um *ddd* em  $\delta$  2,78 ( $J = 19,6; 10,8$  e  $7,2$  Hz), e, um *dd* em  $\delta$  3,20 ( $J = 19,6; 6,0$  Hz). A constante de acoplamento de 19,6 Hz em ambos, foi sugestivo de que estes hidrogênios sejam geminais.

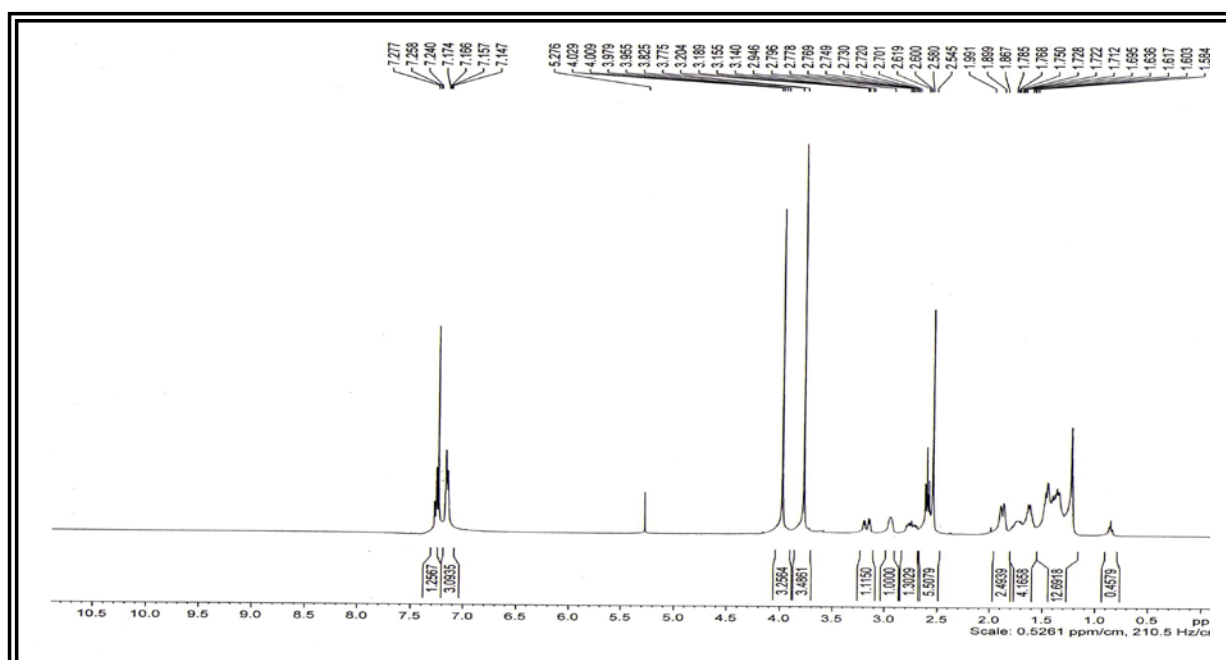


FIGURA 57. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)\*

\*Os valores de  $\delta_{\text{H}}$  foram padronizados para a referência  $\delta$  7,27 referente ao  $\text{CDCl}_3$  com a adição de 0,03 ppm a cada sinal de  $\delta_{\text{H}}$ .

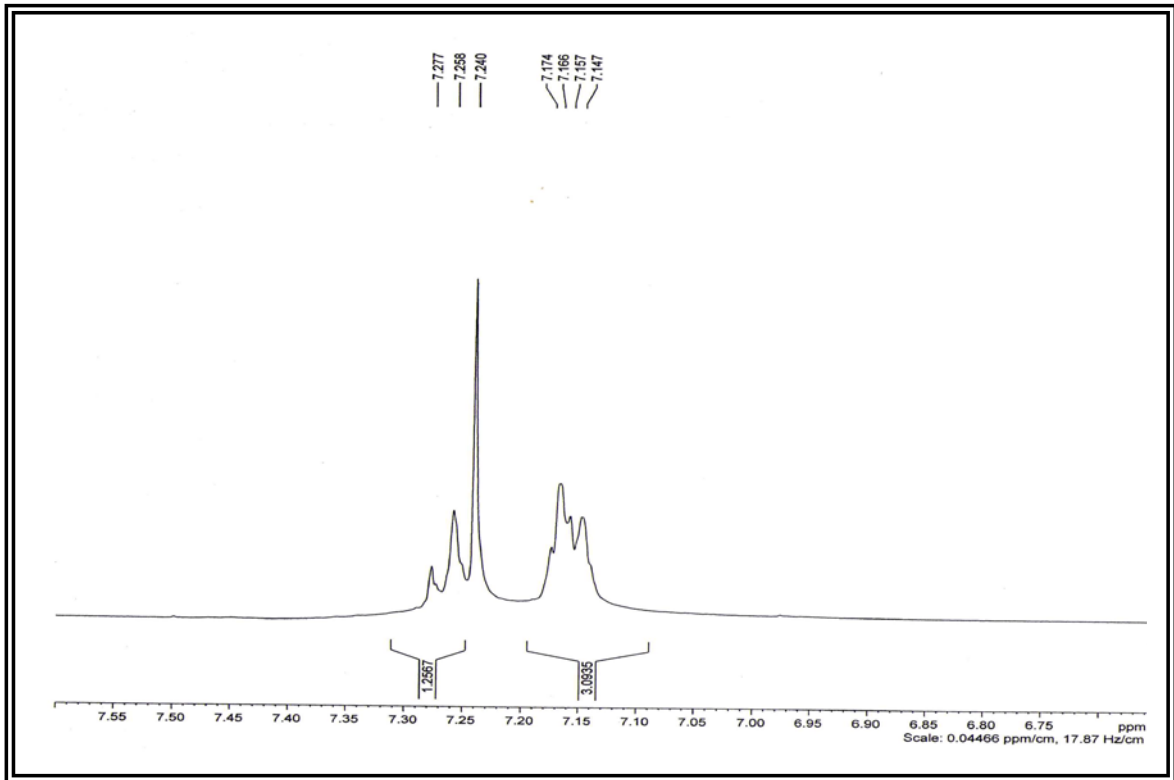


FIGURA 58. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6 ( $\delta$  6,75 – 7,55)

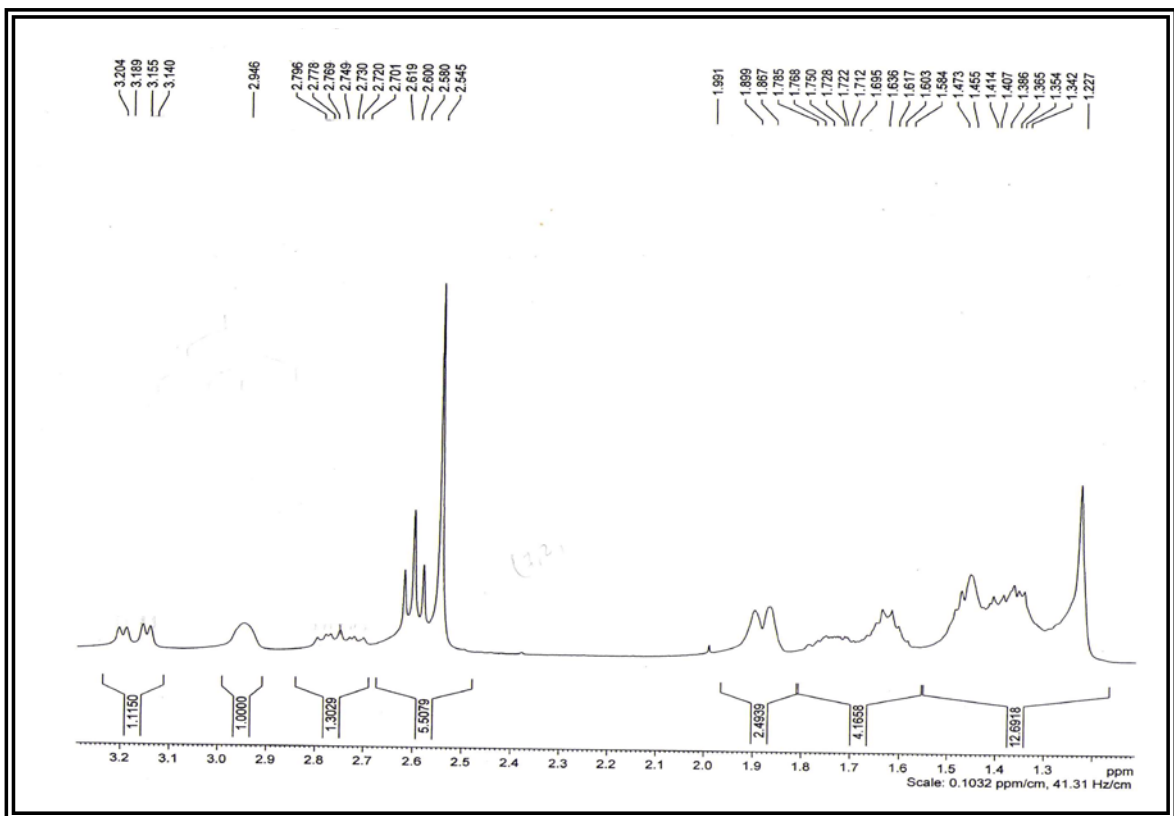
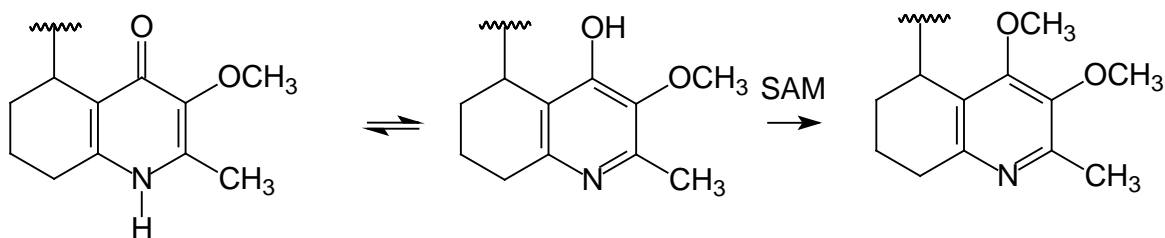


FIGURA 59. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6 ( $\delta$  1,20 – 3,30)

A partir da análise do mapa de correlações do espectro de COSY de A6, observou-se o acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta$  2,78 e 3,20 confirmando que estes são geminais. O hidrogênio em  $\delta$  2,78 acopla com hidrogênios sobrepostos entre  $\delta$  1,45 e 1,75; enquanto que o hidrogênio em  $\delta$  3,20 acopla com um hidrogênio sobreposto em  $\delta$  1,70, já o hidrogênio em 2,95 (H-5) acopla com hidrogênios sobrepostos entre  $\delta$  1,25 e 1,55. Observou-se ainda neste espectro o acoplamento entre hidrogênios metilênicos e o acoplamento entre os hidrogênios do anel aromático.

No espectro de HSQC de A6 observou-se quatro grupos de hidrogênios metilênicos diasterotópicos. Os hidrogênios em  $\delta$  1,25 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  31,60; sendo este característico da posição 11. Os hidrogênios geminais em  $\delta$  2,78 e  $\delta$  3,20 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  25,61, enquanto que os hidrogênios em  $\delta$  1,90 e 1,45 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  23,83, enquanto que os hidrogênios em  $\delta$  1,40 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  16,17. Todos esses valores de deslocamento são característicos do anel B do núcleo quinolônico, quando comparado com o modelo da brachytelona A (A2) e do alcaloide vanessina, previamente reportado na literatura (GRESSLER *et. al.*; 2008).

O segundo sinal de metoxila observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6 em  $\delta$  4,01 correlacionou-se com o sinal de carbono em 60,76; descartando assim a possibilidade de tratar-se de uma *N*-O-metoxila, sugerindo-se então que esta poderia estar ligada na posição 4. Isso pode ocorrer devido ao equilíbrio entre as formas ceto e enólica das quinolin-4-onas, como relatado anteriormente por (WERNER, 1969).



#### Tautomeria ceto-enólica em quinolin-4-onas descrita por (WERNER, 1969)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6, o deslocamento químico da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  apresentou uma desblindagem de 0,14 ppm, quando comparado com o deslocamento químico desta metila para o alcaloide brachytelona A. Utilizou-se então um modelo já descrito na literatura (HOELZEL *et. al.*; 2005), onde o anel A é idêntico ao dos alcaloides quinolônicos já discutidos. Neste modelo o alcaloide quinolônico *O*-metilado na posição 4, apresentou a metila na posição 2 em  $\delta$  2,59; confirmando a hipótese de a metoxila em  $\delta$  4,01 estar ligada na posição 4 do anel A quinolínico.

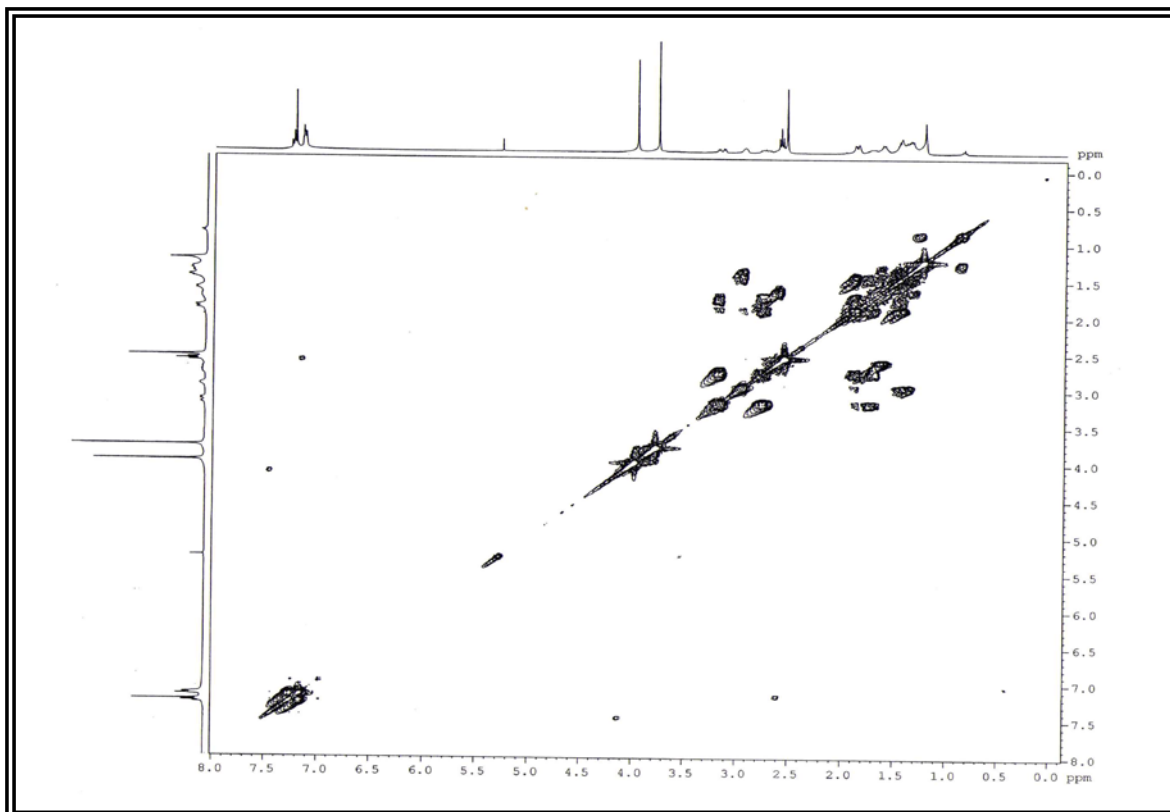


FIGURA 60. Mapa de correlações do <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY de A6 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

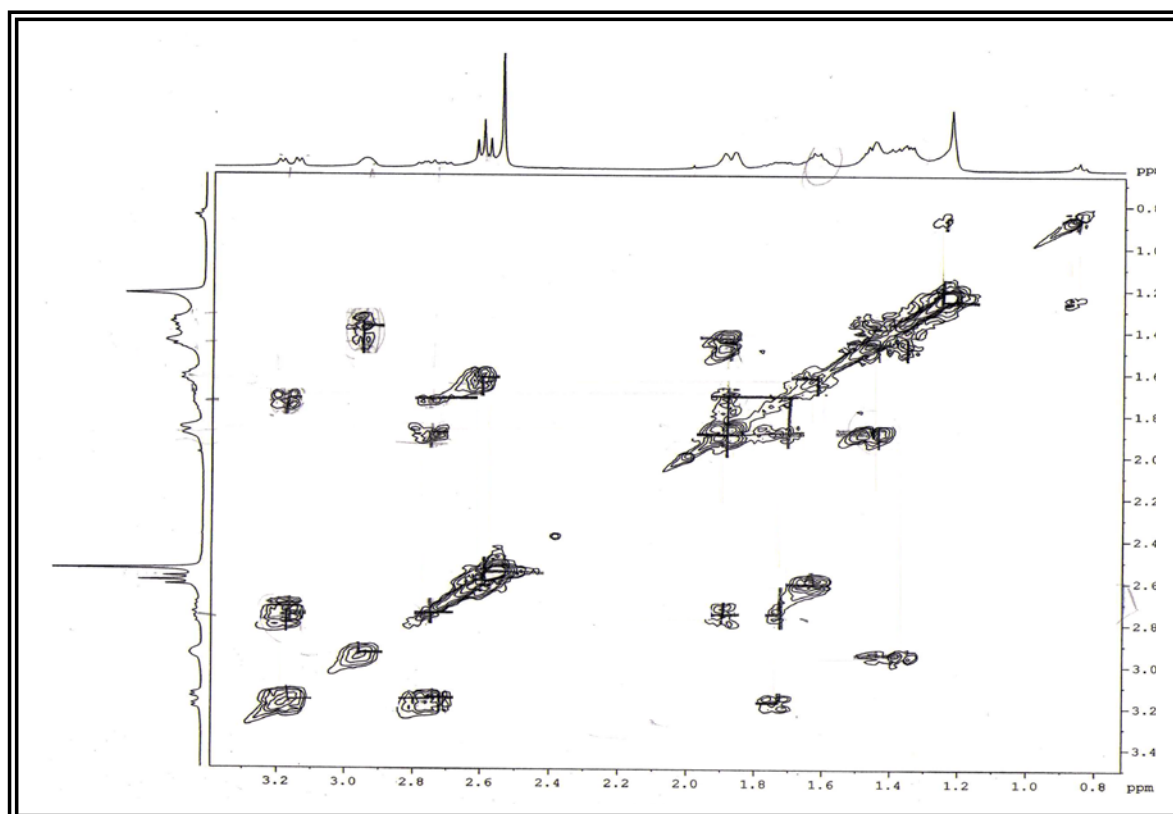


FIGURA 61. Mapa de correlações do <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY de A6 ( $\delta$  0,8 – 3,4)

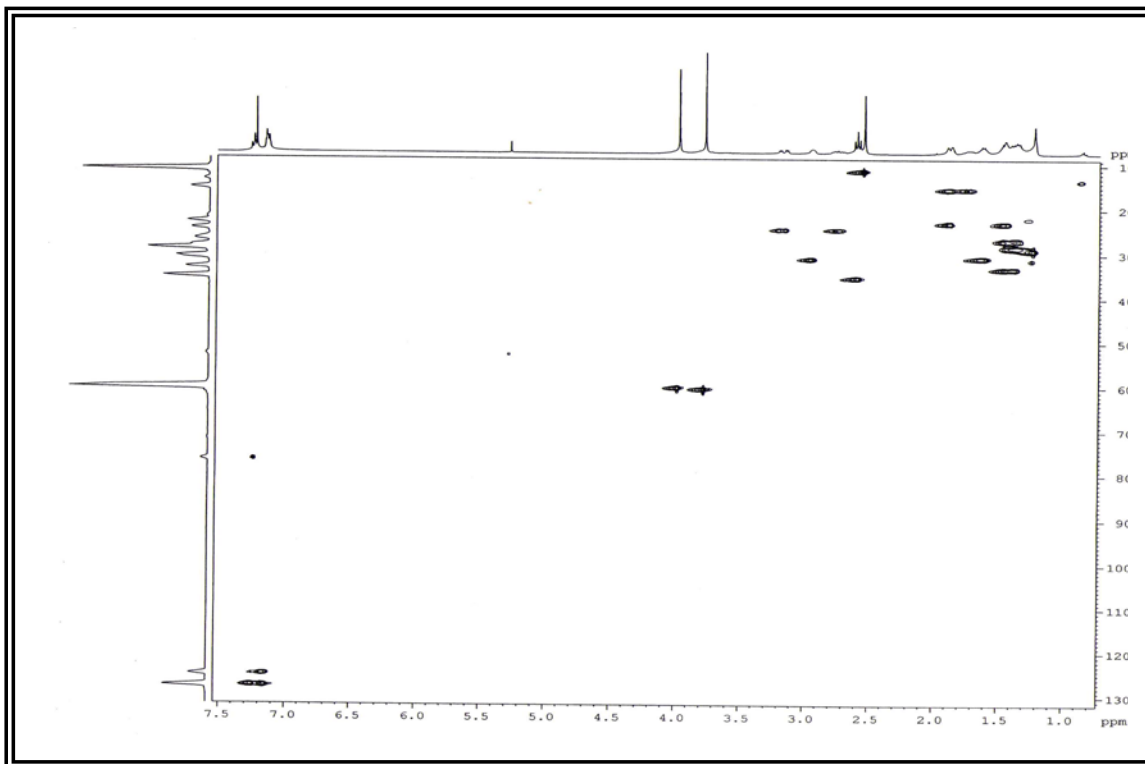


FIGURA 62. Mapa de correlações do HSQC de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

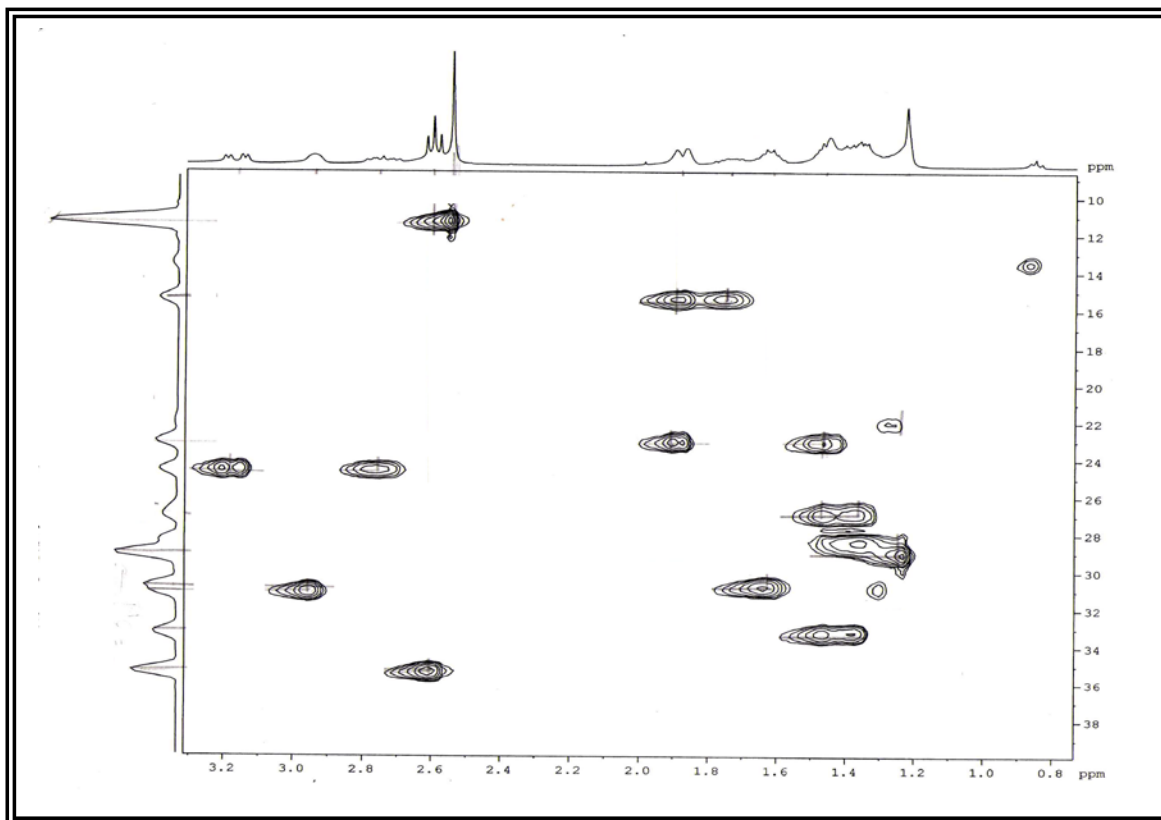


FIGURA 63. Mapa de correlações do HSQC de A6 ( $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 3,3;  $\delta_{\text{C}}$  9 – 39)

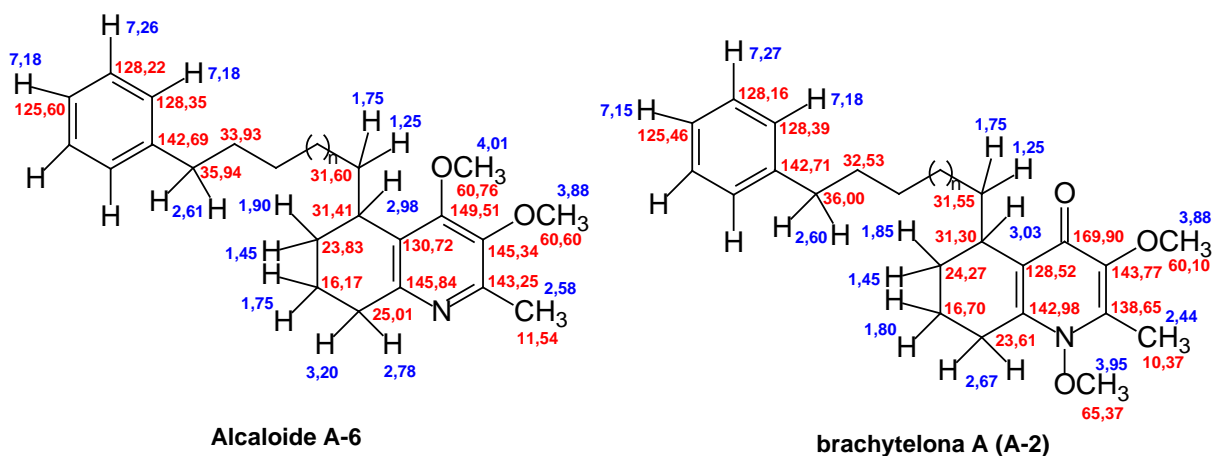
O mapa de correlações do espectro de HMBC de A6 apresentou correlações importantes que sugeriram para A6 uma estrutura semelhante à de A2 (brachytelona A), com mudança apenas na posição da metoxila em  $\delta$  4,01. O sinal de tripleto em  $\delta$  2,60, referente aos hidrogênios metilênicos benzílicos, apresentou correlação com o sinal de carbono em  $\delta$  142,69 e 128,35 referentes aos carbonos C1' e C-2' da fenila terminal, bem como com o carbono em  $\delta$  33,93 da cadeia hidrocarbônica lateral. O sinal do hidrogênio H-5 em  $\delta$  2,98 correlacionou com os sinais de carbono em  $\delta$  31,60 e 23,83; atribuído aos carbonos C-11 e C-6, respectivamente, quando comparado com respectivos valores de deslocamento destes carbonos para a brachytelona A (A2). O sinal referente ao hidrogênio H-5 apresentou ainda correlação com o sinal de carbono  $sp^2$  em  $\delta$  130,72; atribuído ao carbono C-9.

Observou-se ainda no mapa de correlações do espectro de HMBC de A-6 as correlações dos hidrogênios geminais em  $\delta$  2,78 e 3,20 com os sinais de carbono em  $\delta$  23,83, 16,17 e 145,82 atribuídos aos carbonos C-6, C-7 e C-10, respectivamente, quando comparado com os respectivos valores de deslocamento destes carbonos com aqueles referente à brachytelona A. Estas correlações em *J-1* e *J-2* foram fundamentais para sugerir que o anel B do alcaloide A-6 é idêntico ao da brachytelona A com a atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênios citados na posição 8.

Os sinais de simpletos referentes às metoxilas em  $\delta$  4,01 e  $\delta$  3,81 correlacionaram-se com os sinais de carbono em  $\delta$  149,51 e  $\delta$  145,34; respectivamente, sendo estes valores de  $\delta_C$  atribuídos aos carbonos nas posições 4 e 3 do anel A, respectivamente. Já o sinal de metila em  $\delta$  2,58 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  143,25 atribuído ao carbono C-2.

A partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}C$  de A6 foi possível confirmar os valores exatos de  $\delta_C$  atribuídos aos carbonos a partir da projeção de  $\delta_C$  no espectro de HMBC.

A estrutura do alcaloide A6 foi proposta com base na interpretação dos dados espectrais obtidos e comparação com dados espectrais da brachytelona A.





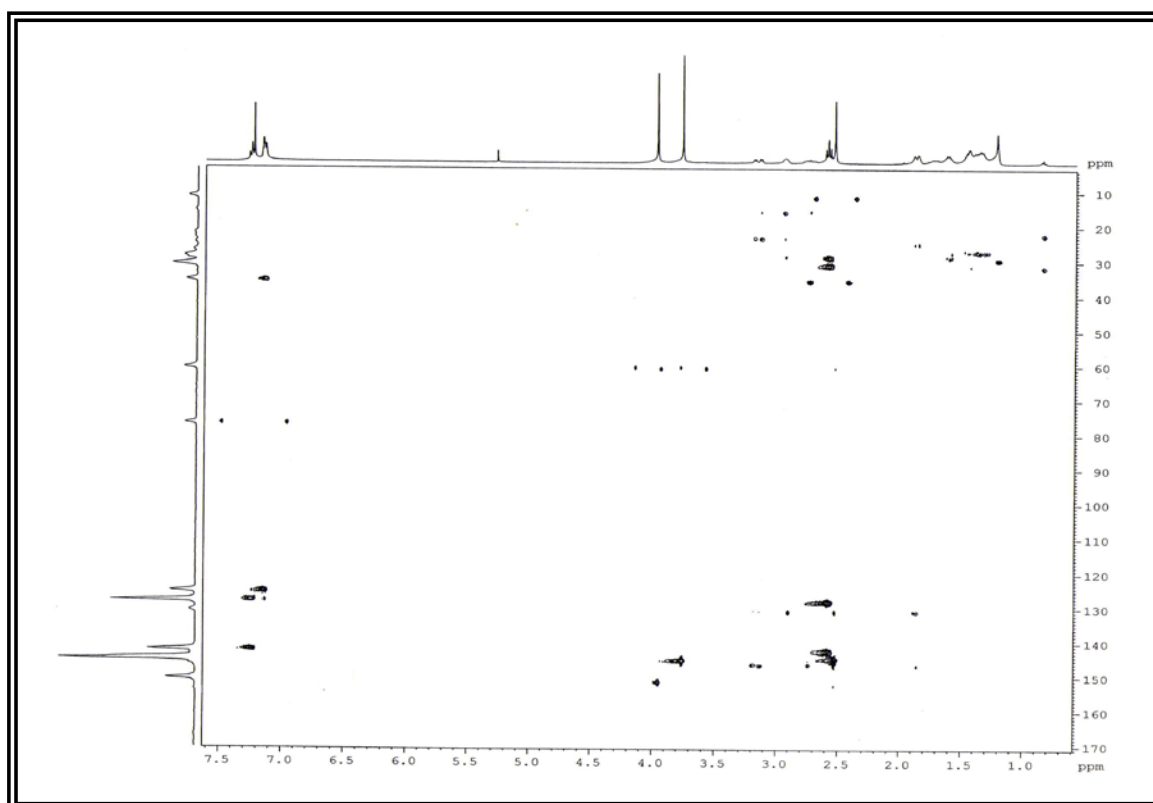


FIGURA 64. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz)

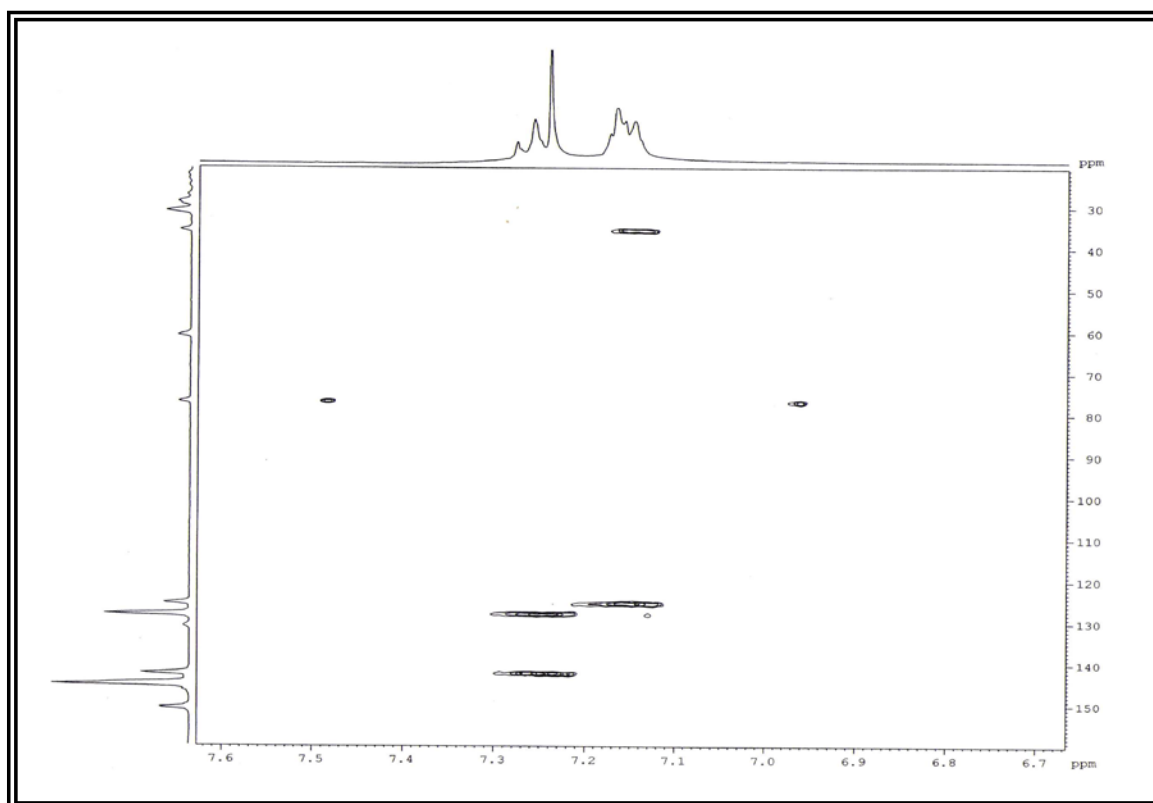


FIGURA 65. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,7 – 7,6;  $\delta_{\text{C}}$  20 – 160)

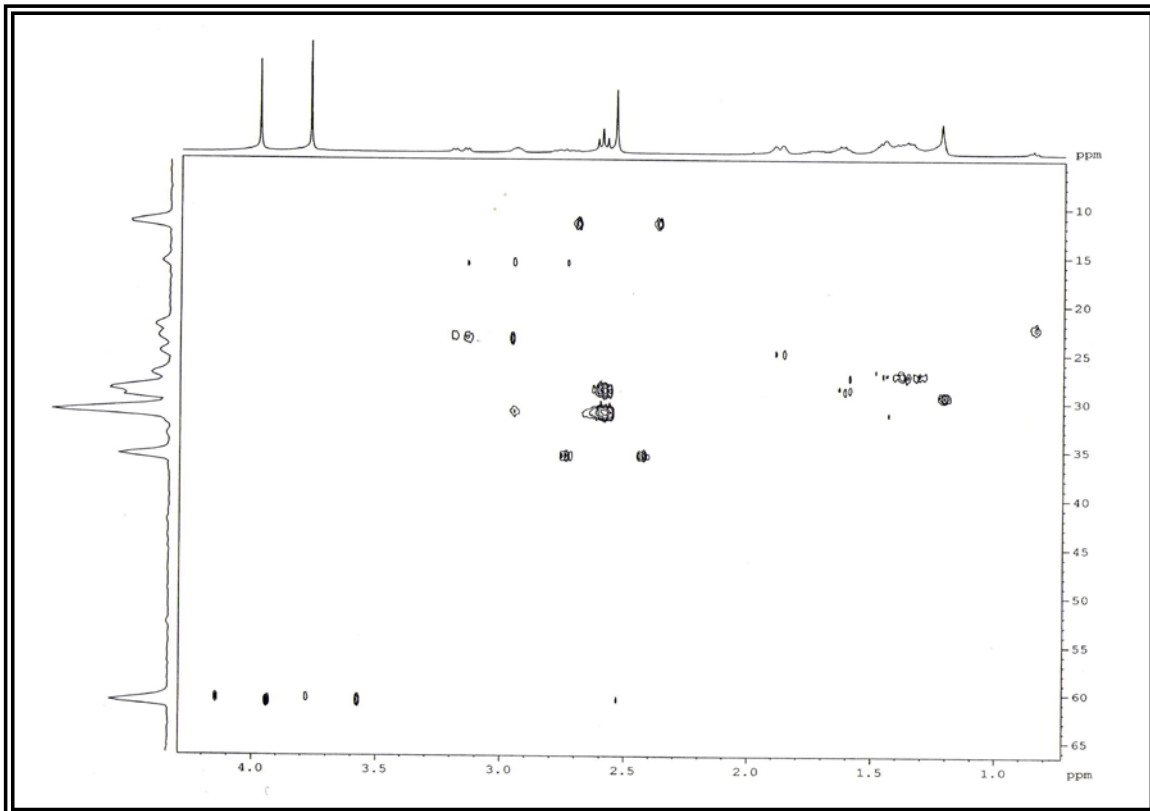


FIGURA 66. Mapa de correlações do HMBC de A6 ( $\delta_H$  0,0 - 4,0;  $\delta_C$  5,0 – 65,0)

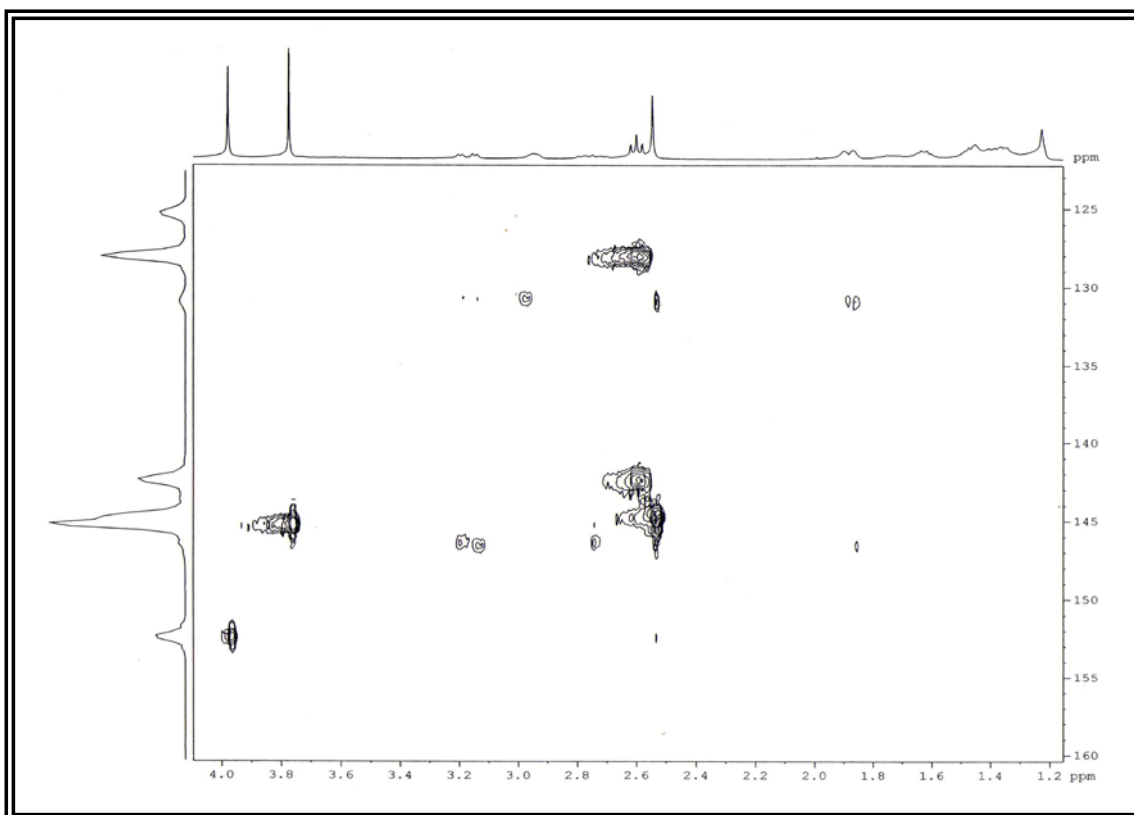
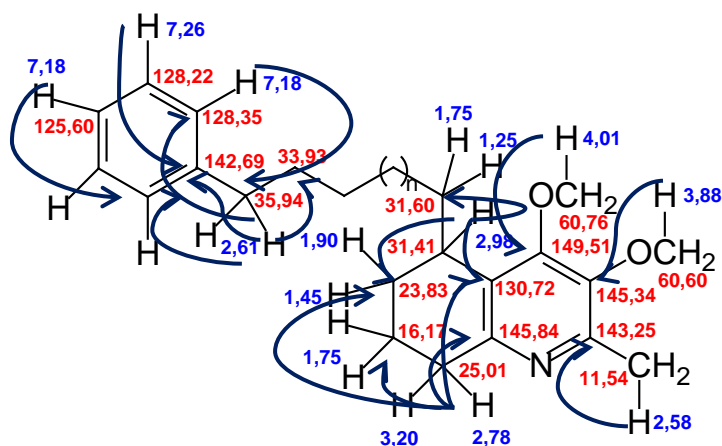
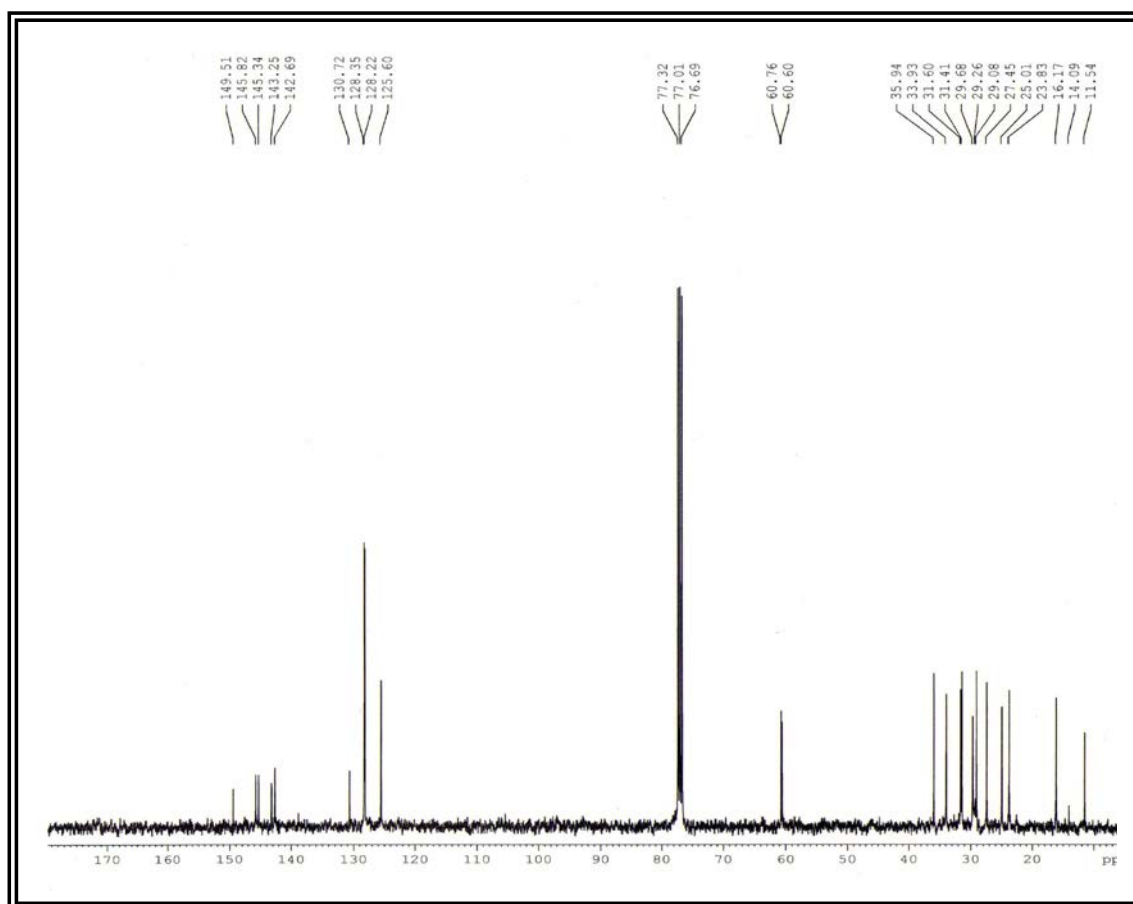


FIGURA 67. Mapa de correlações do HMBC de A-6 ( $\delta_H$  1,2 - 4,0;  $\delta_C$  125 – 160)



Correlações de HMBC de A-6

FIGURA 68. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A6 (BB) ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

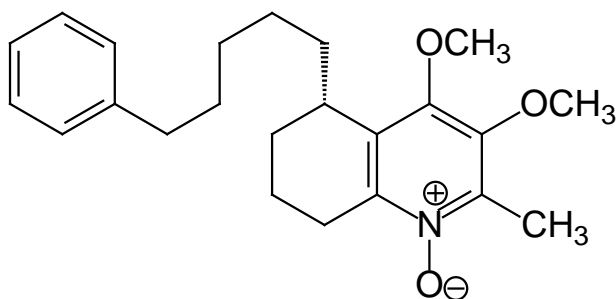
O espectro de massas de A-6 apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  370, não compatível com a estrutura proposta para A6. Acrescentou-se uma unidade a mais de  $\text{CH}_2$  na cadeia lateral, entretanto, a massa ainda excedia dois Daltons. O espectro de massas de alta resolução, apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  370,2425 compatível com a fórmula molecular

$C_{23}H_{31}O_3N$ . A partir deste dado foi possível confirmar a presença de cinco grupos  $CH_2$  na cadeia lateral de A6, idêntico ao número de  $CH_2$  da cadeia lateral de A19 e A2. A massa excedente de 16 daltons foi então inequivocamente atribuída à presença de um oxigênio ligado ao nitrogênio, caracterizando a presença de um *N*-óxido na estrutura de A6.

A confirmação da presença de *N*-óxido na estrutura de A-6 explica satisfatoriamente a desblindagem verificada nos carbonos C-2 e C-10 de A-6, quando comparado com os mesmos valores de  $\delta_C$  para estes carbonos da brachytelona A (A-2), esta deblindagem provavelmente deve-se a carga positiva centrada no átomo de nitrogênio.

Outra diferença observada no espectro de RMN de  $^1H$  de A-6, quando comparado com a brachytelona A, está no deslocamento químico e na multiplicidade dos hidrogênios ligados ao carbono 8. Estes hidrogênios na brachytelona A apresentam-se como multiplete em  $\delta_H$  2,70. Enquanto que em A-6, os hidrogênios metilênicos na posição 8 apresentam deslocamento químico e multiplicidade diferentes. Isso provavelmente ocorre pelo efeito sofrido por estes devido à proximidade do cone de desblindagem da nuvem eletrônica do oxigênio do *N*-óxido. A proximidade espacial de hidrogênios metilênicos a um grupo *N*-óxido pode levar a uma desblindagem de 0,60 ppm para o hidrogênio *pseudo*-equatorial, enquanto que para o hidrogênio *pseudo*-axial, pouca ou nenhuma diferença é observada de acordo com a literatura (FARJADO *et. al.*; 2009).

A partir da análise dos dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (1D e 2D), espectrometria de massas, inclusive espectrometria de massas de alta resolução, a estrutura do alcaloide A-6 foi elucidada e nomeada de brachytelona B, sendo este alcaloide inédito. A configuração do carbono C-5 de A-6 foi atribuída como sendo (*S*), dado o valor de  $[\alpha]_D^{25^\circ} = + 29^\circ$  (*c* 1,5;  $CHCl_3$ ), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (BUSKE *et.al.*; 1999).



**Estrutura da brachytelona B (A-6)**

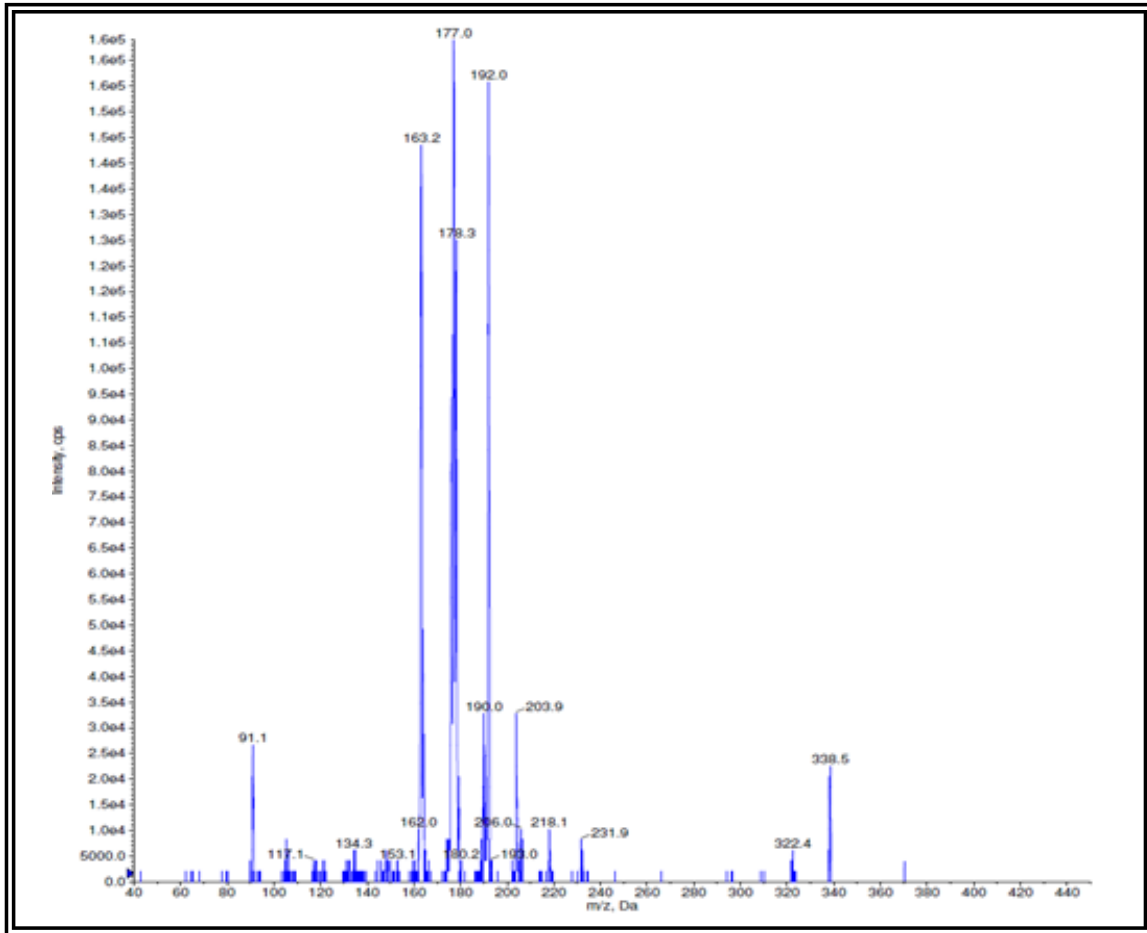


FIGURA 69. Espectro de Massas de A6 (ESI, modo positivo)

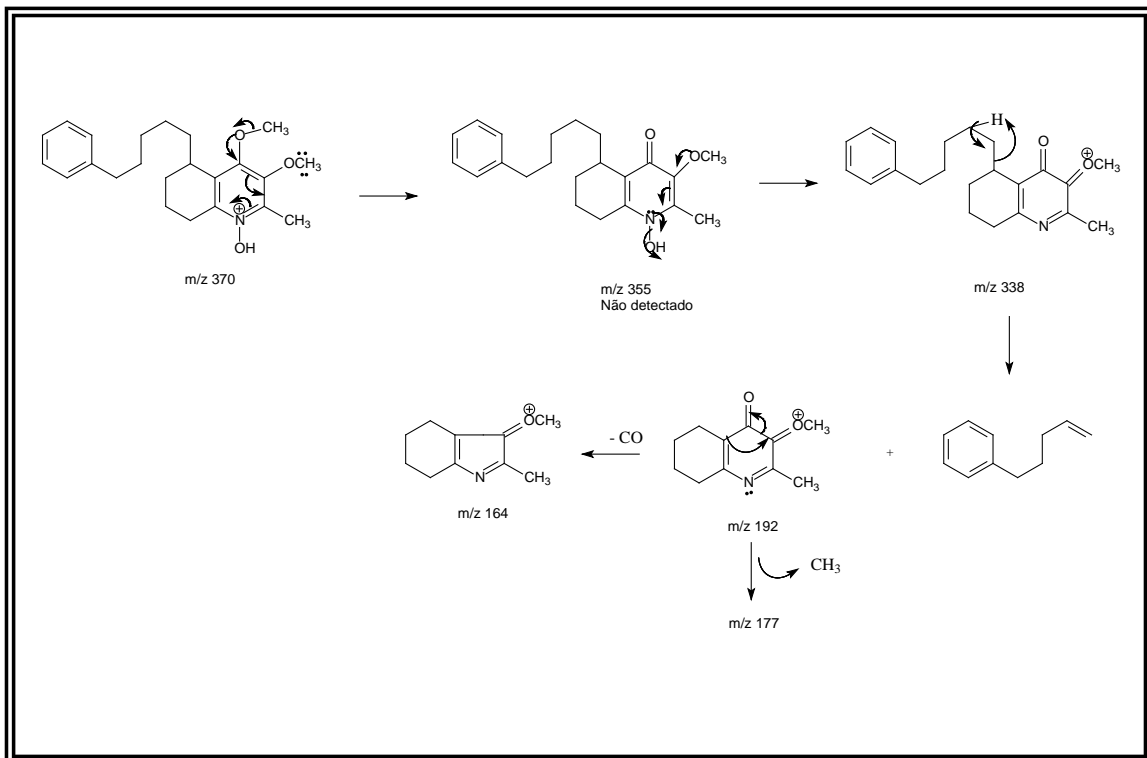


FIGURA 70. Propostas de fragmentação para o alcaloide A6

TABELA 27. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A6

Posição	A-6 ( $\text{CDCl}_3$ )		brachytelona A ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) J (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	143,25	-	138,65
3	-	145,34	-	147,77
4	-	149,51	-	169,90
5	2,98 (m)	31,41	3,03 (m)	31,30
6a	1,90 sobreposto	23,83	1,85 sobreposto	24,27
6b	1,45 (sobreposto)		1,45 (sobreposto)	
7	1,75 e 1,40 (sobreposto)	16,17	1,60 (sobreposto)	16,70
8eq	3,20 (dd; J= 19,6; 6,0)	25,00	-	23,61
8ax	2,78 (ddd; J= 19,6; 10,8; 7,2)			
9	-	130,72	-	128,52
10	-	145,82	-	142,98
11a	1,75 (sobreposto)	31,60	1,75 (sobreposto)	31,55
11b	1,25 (sobreposto)		1,25 (sobreposto)	
12-13	1,25 – 1,85	27,45 – 29,68	1,25 – 1,85	29,20 – 29,60
14	1,60 (sobreposto)	33,93	1,60 (sobreposto)	32,53
15	2,61 (t; 8,0)	35,94	2,60 (t; 8,0)	36,00
1'	-	142,69	-	142,71
2'	7,18 (m)	128,35	7,18 (m)	128,39
3'	7,26 (m)	128,22	7,27 (m)	128,16
4'	7,18 (m)	125,60	7,18 (m)	125,46
5'	7,26 (m)	128,22	7,27 (m)	128,16
6'	7,18 (m)	128,35	7,18 (m)	128,39
2-C- $\text{CH}_3$	2,58 (s)	11,54	2,44 (s)	10,37
3-O- $\text{CH}_3$	3,88 (s)	60,60	3,88 (s)	60,10
4-O- $\text{CH}_3$	4,01	60,76		
N-O $\text{CH}_3$	-	-	3,95 (s)	65,37

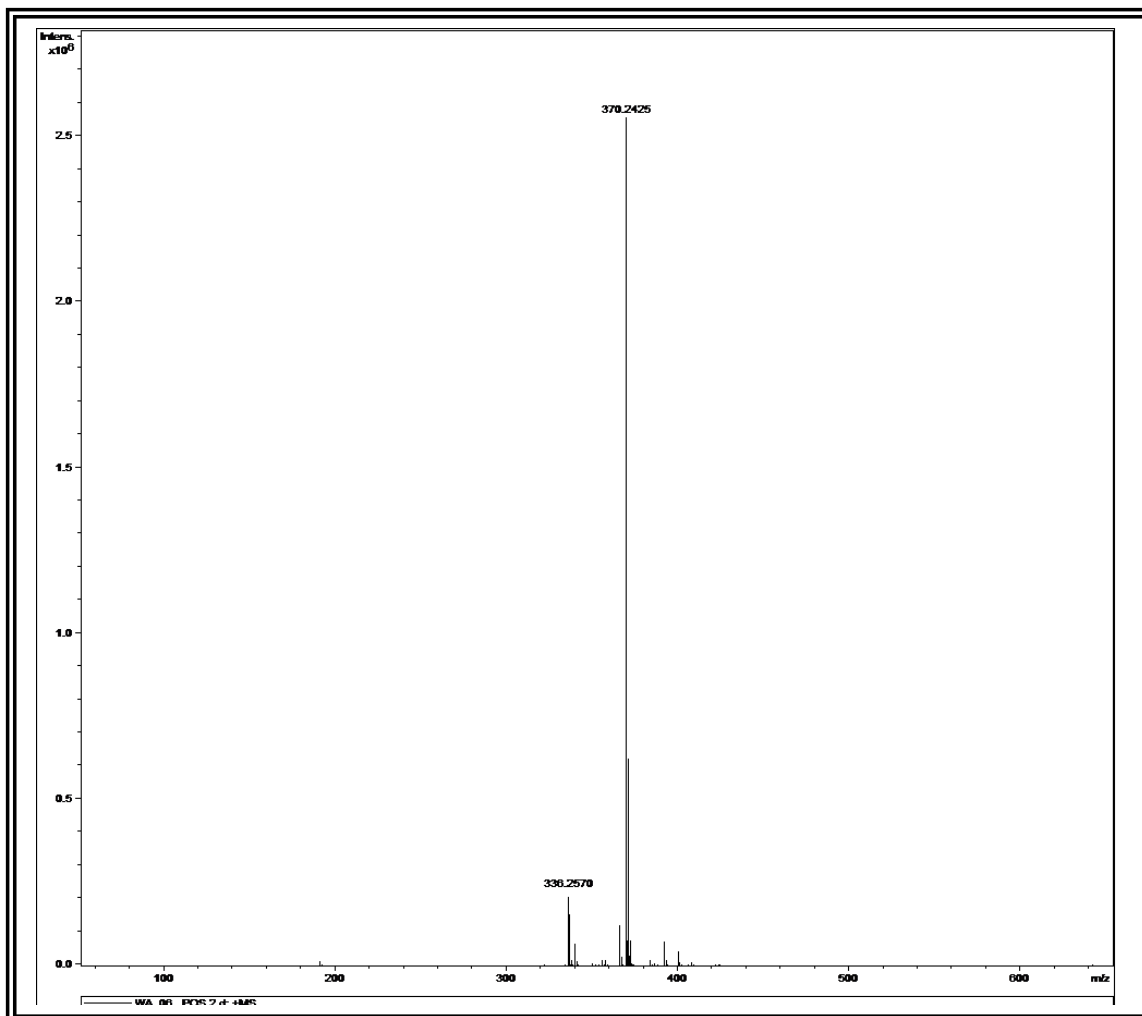


FIGURA 71. Espectro de massas de alta resolução de A6 (ESI, modo positivo).

#### 4.1.7. Elucidação estrutural do alcaloide A5

A substância A5 foi isolada das fases hexânica de raiz e caule de *W. brachypetala*. Esta apresentou-se como um óleo incolor e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A5 apresentou grande semelhança com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcaloide A6. Este apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos anteriormente discutidos, como os sinais integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,80 e 2,48 referentes à metoxila na posição 3 e a metila ligada a carbono  $\text{sp}^2$  na posição 2, respectivamente, e o multiplete em  $\delta$  2,98 característico do hidrogênio H-5. Foi observado neste espectro os mesmos sinais dos hidrogênios H-8a e H-8b do alcaloide A6 em  $\delta$  3,13 (*dd*;  $J = 19,6$  e  $6,0$  Hz) e 2,66 (*ddd*;  $J = 19,6$ ;  $10,8$ ;  $6,0$  Hz), entretanto com uma pequena variação de deslocamento químico. A presença destes sinais análogos aos hidrogênios na posição 8 de A-6, aliado a ausência do sinal de simpleto referente ao N-H do sistema quinolônico, sugeriram a presença de um N-óxido na estrutura de A5.

Observou-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A5 a ausência dos sinais de multiplete referente à fenila terminal, bem como dos hidrogênios metilênicos benzílicos em  $\delta$  2,61 presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A6. Dada à presença do tripleto integrando para três hidrogênios em  $\delta$  0,89 sugeriu-se a presença de uma cadeia alquílica lateral com um grupo metil terminal.

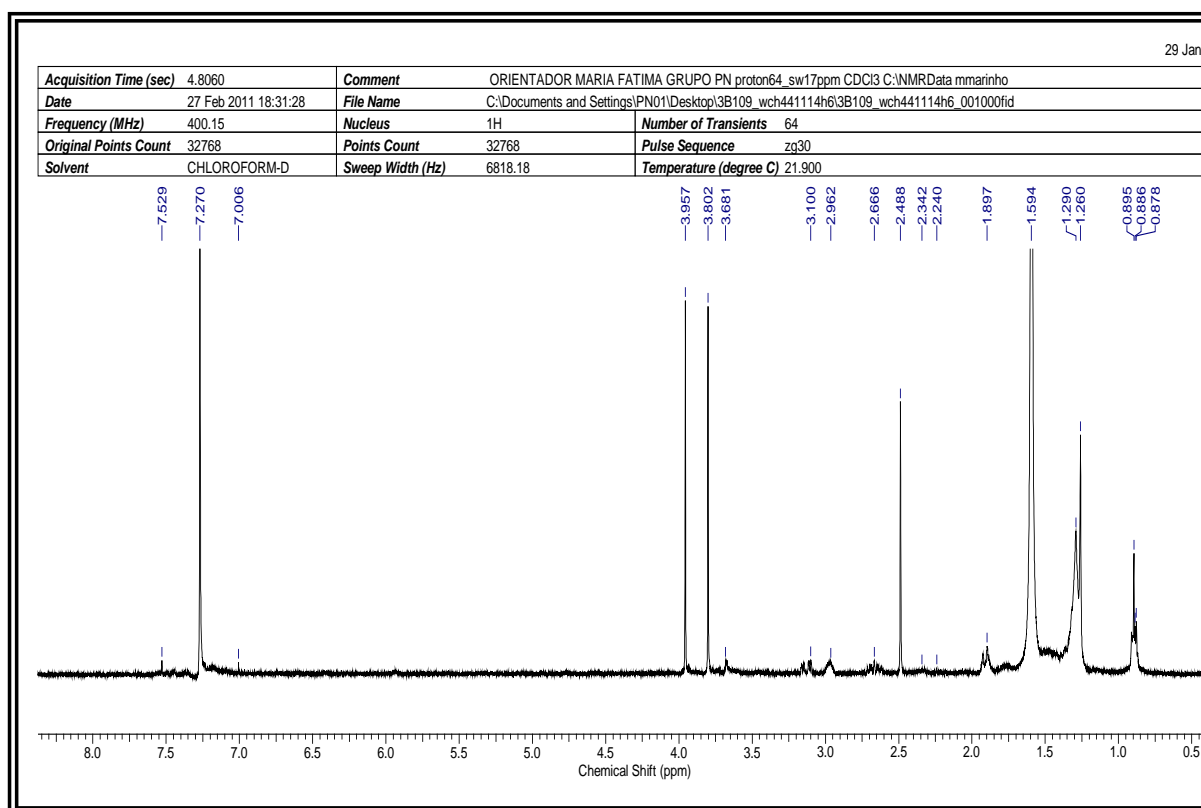


FIGURA 72. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A5 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)



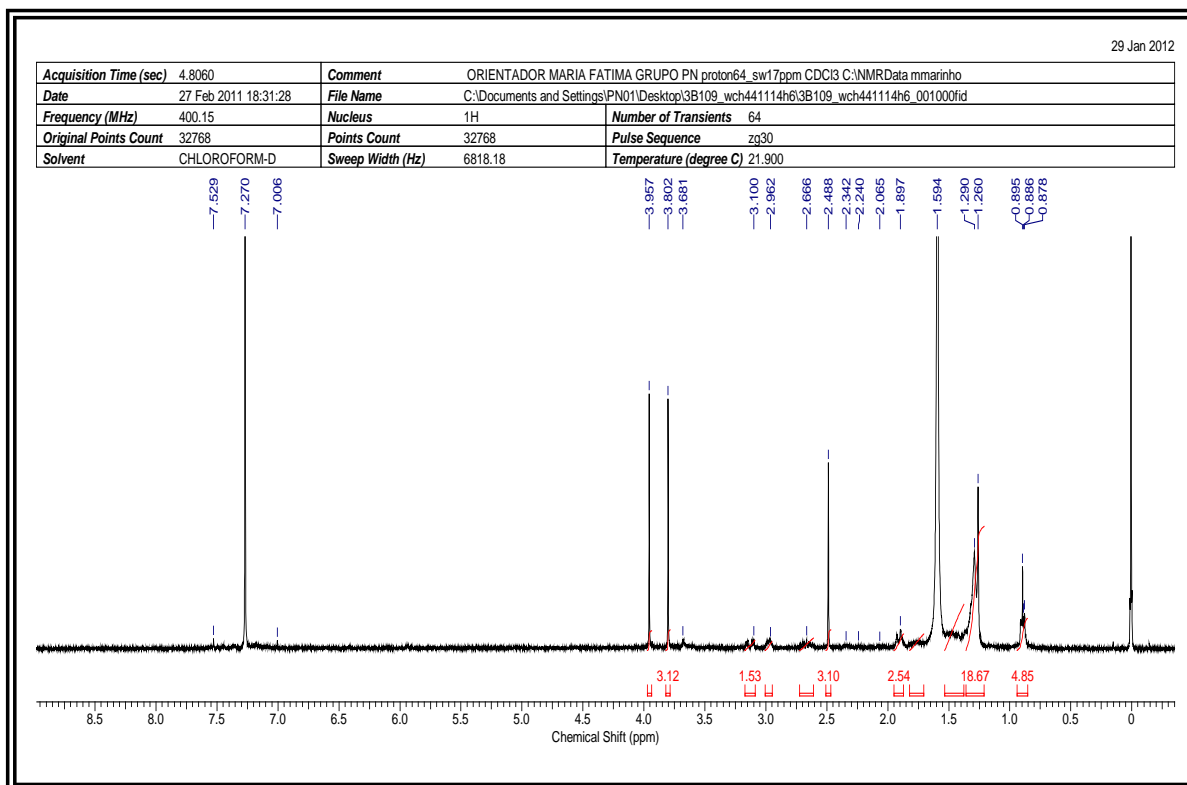


FIGURA 73. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A5 com integração dos sinais

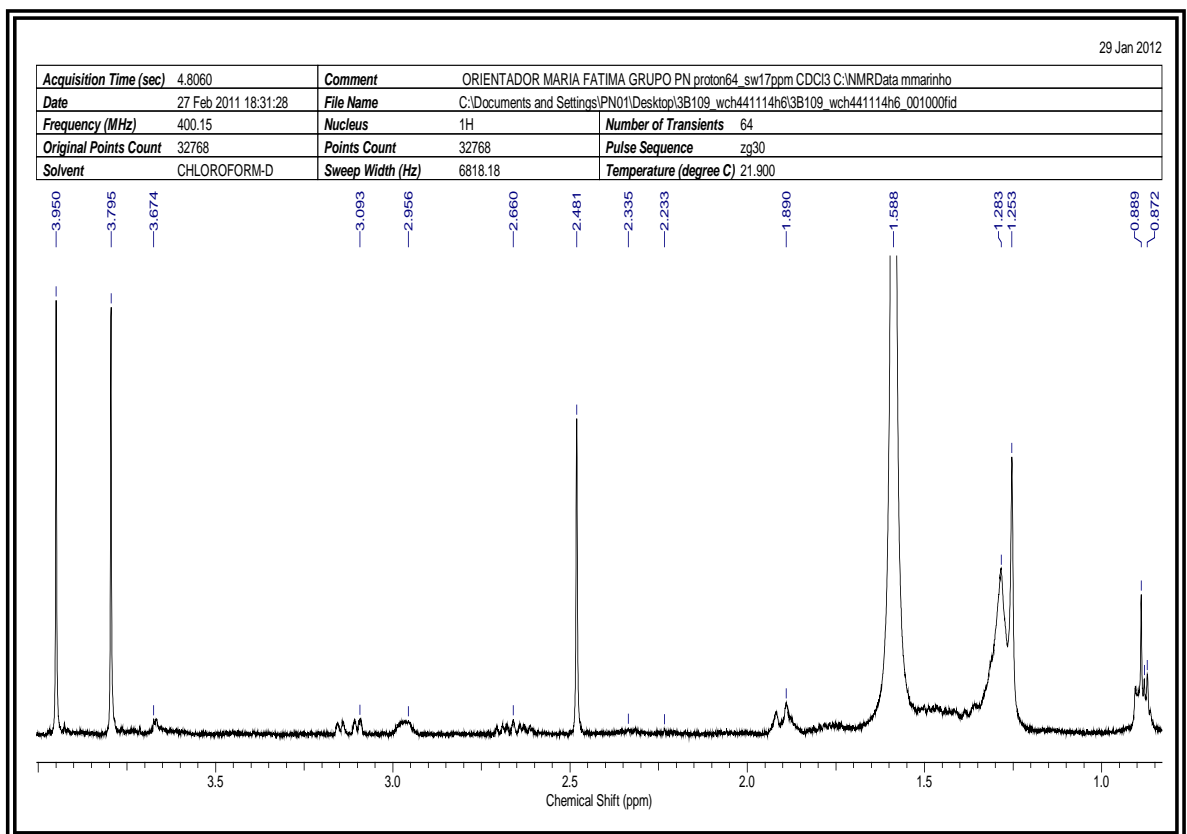


FIGURA 74. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A5 ( $\delta$  0,8 – 4,0)

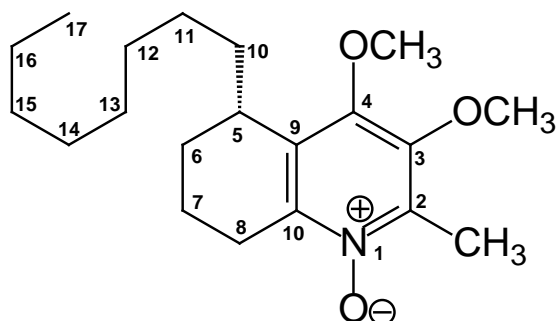
Observou-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A5 um segundo sinal de metoxila em  $\delta$  3,96 atribuído inicialmente a metoxila ligada na posição 4 do núcleo quinolínic devido a grande semelhança com o mesmo espectro de A6 (brachytelona-B).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A5 apresentou sinais de carbono com deslocamentos característicos da brachytelona-B (A6), como o sinal de carbono aromático oxigenado em  $\delta$  149,93 característico do carbono 4 ligado a uma metoxila, o que sugere a ausência da carbonila nesta posição. Observou-se ainda grande semelhança com relação aos valores de  $\delta_{\text{C}}$  referentes ao anel B de A5 com a brachytelona B.

Assim, a partir da comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-5 com os respectivos dados da brachytelona B, foi possível elucidar a estrutura de A-5 como sendo um análogo da brachytelona-B, entretanto com a cadeia alquílica lateral com grupo metil terminal, assim como ocorre nos alcaloides antidesmona (A1), N-metil-antidesmona (A7) e chamaedrona (A3) anteriormente discutidos.

O espectro de massas de A-5 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular em  $m/z$  336 daltons, confirmando a estrutura proposta para A5 como sendo um análogo da brachytelona-B (A-6), cuja cadeia alquílica lateral possui sete grupos  $\text{CH}_2$ , assim como verificado para os alcalóides A1, A7 e A3. O alcaloide A5 é portanto inédito, sendo nomeado de brachytelona C. A estrutura deste alcaloide foi confirmada também por espectrometria de massas de alta resolução (ESI, modo positivo) através do íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}^+]$  em  $m/z$  336,2540 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{N}$ .

A configuração do carbono C-5 de A-6 foi atribuída como sendo (S), dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = + 29^\circ$  ( $c$  1,5;  $\text{CHCl}_3$ ), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (BUSKE *et.al.*; 1999).



**Estrutura da brachytelona C (A-5)**

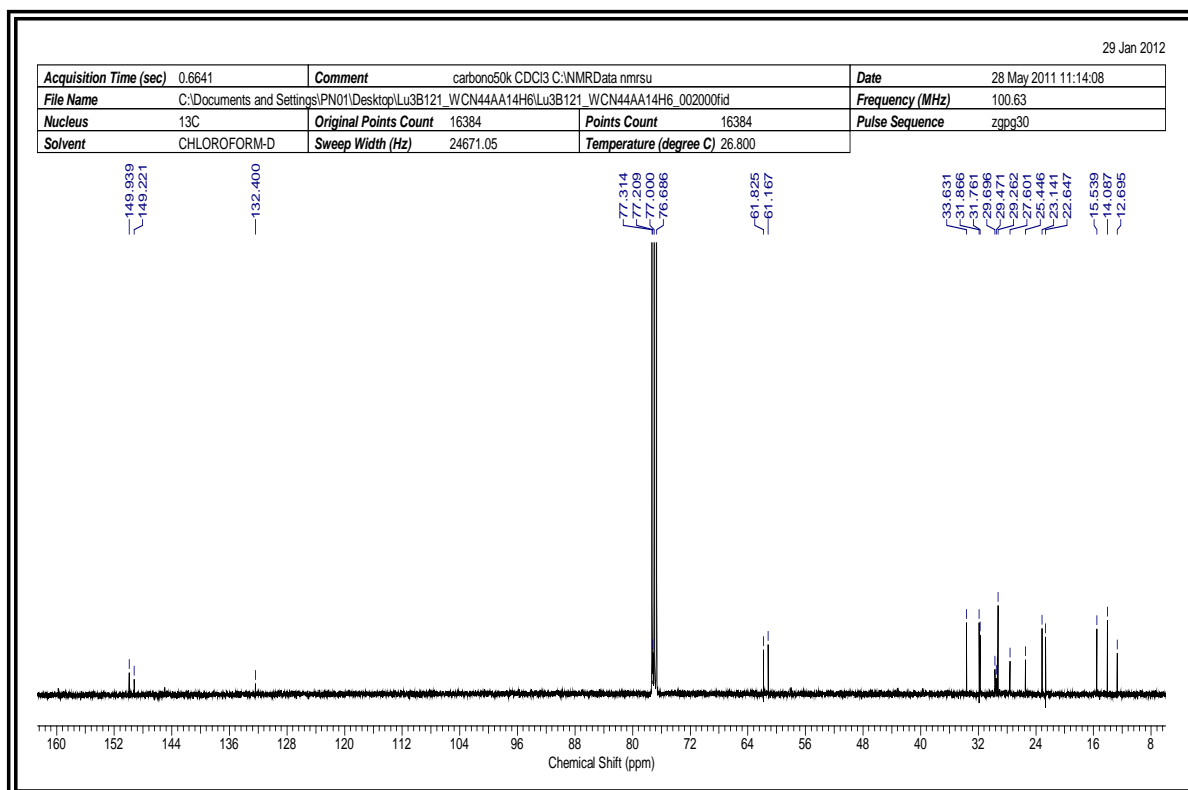


FIGURA 75. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (BB) de A5 (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)

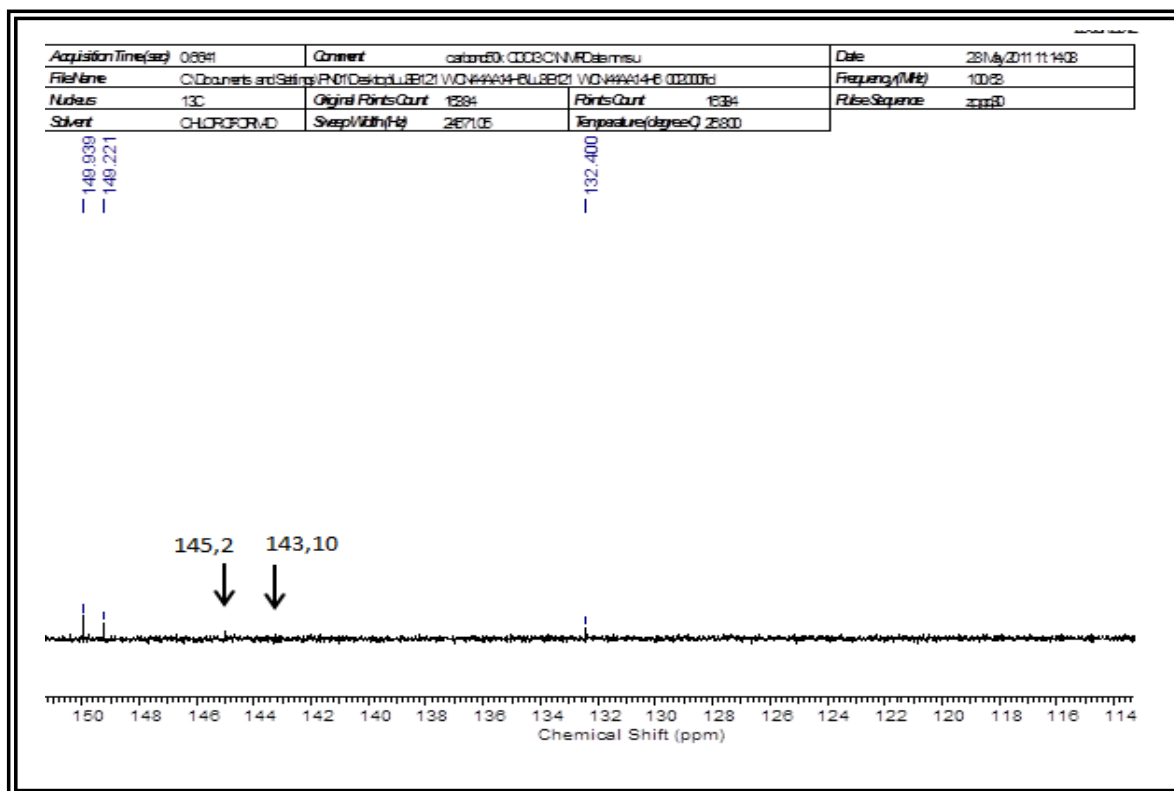


FIGURA 76. Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de A5 (δ 114 – 150)

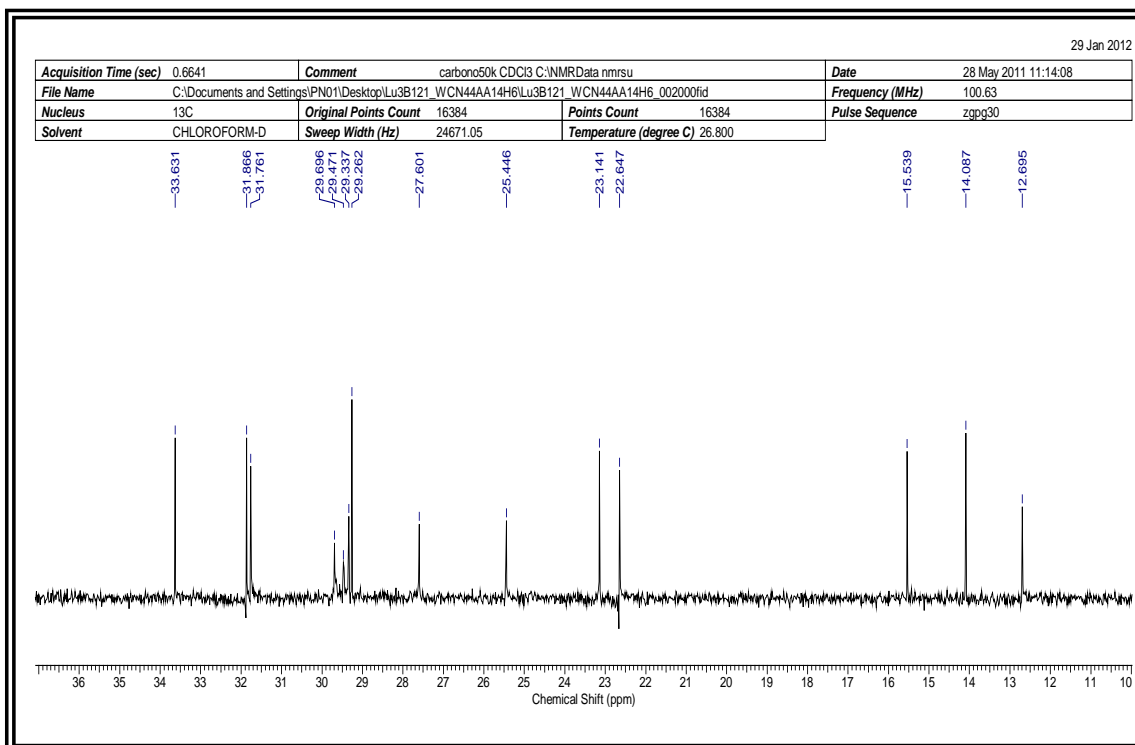


FIGURA 77. Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de A5 (δ 10 – 37)

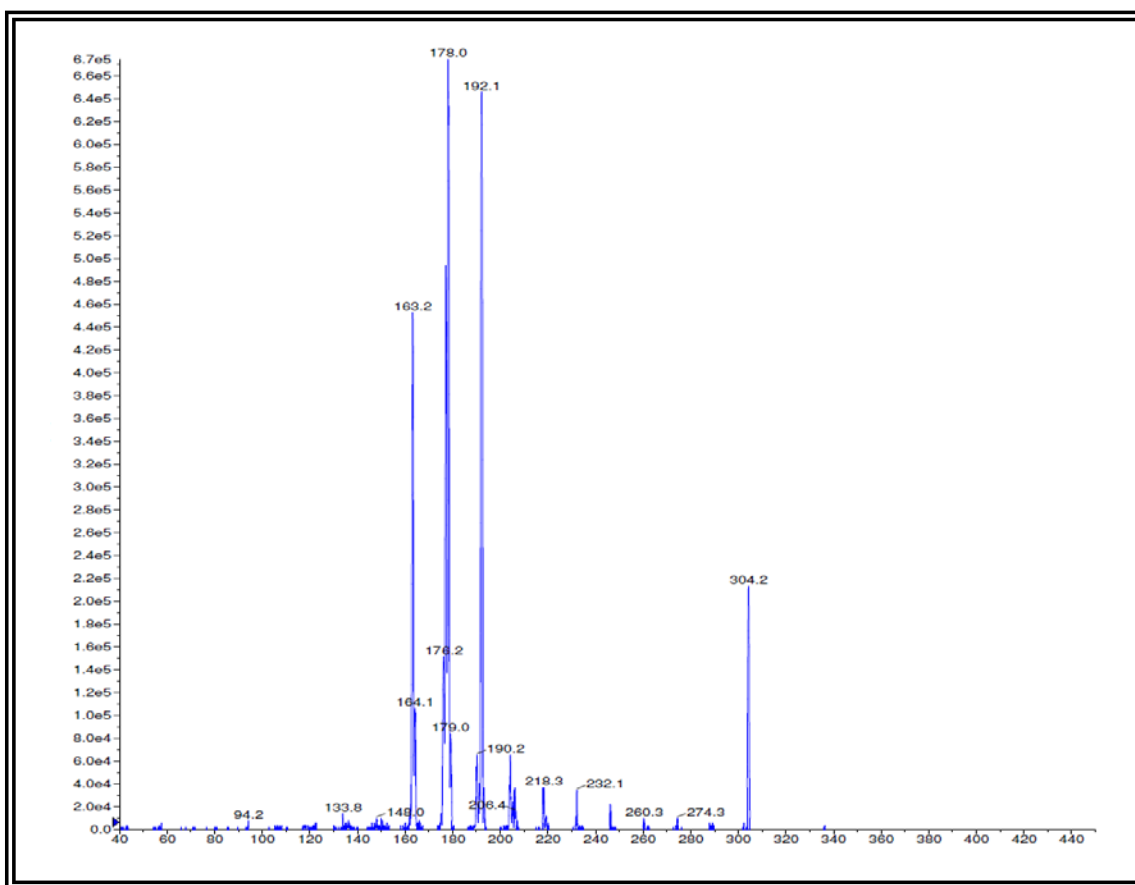


FIGURA 78. Espectro de massas de A5 (ESI, modo positivo)

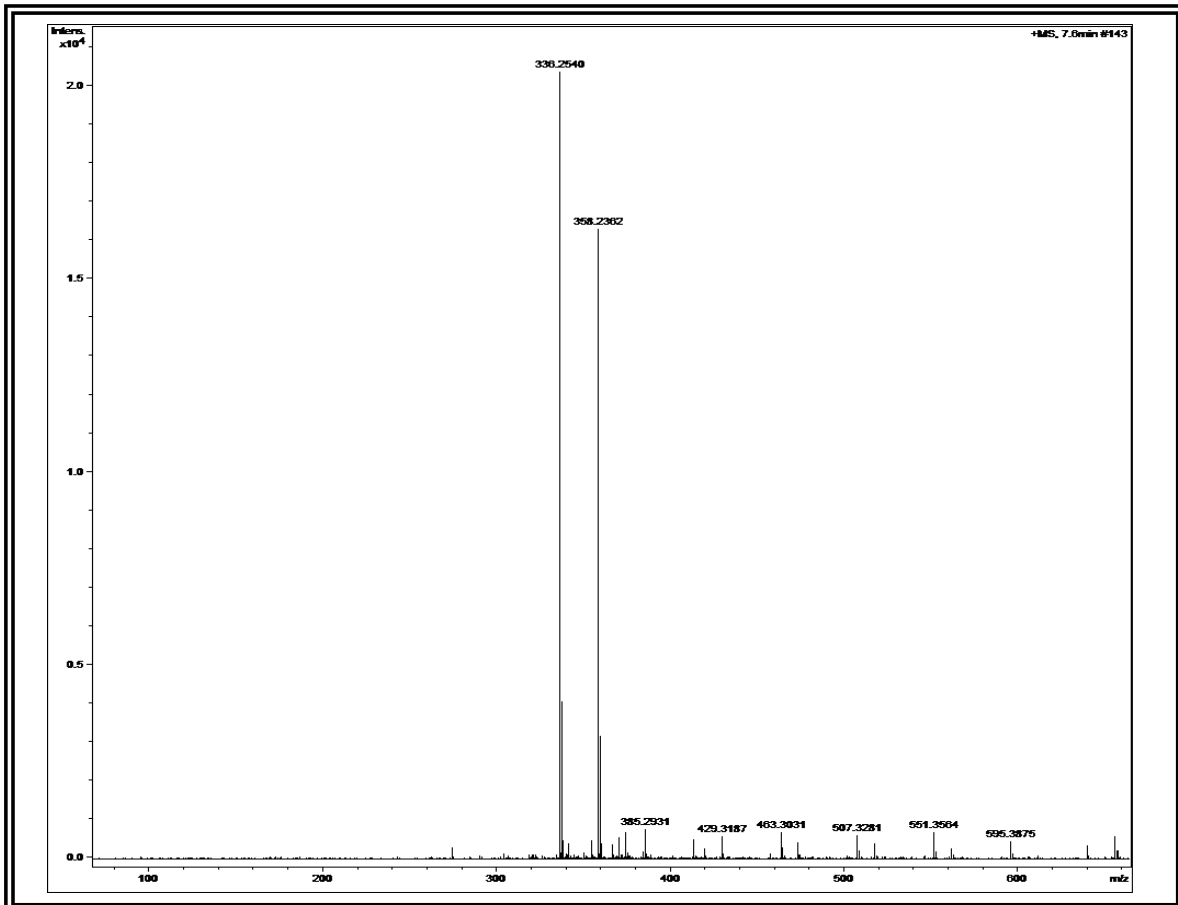


FIGURA 79. Espectro de massas de alta resolução de A5 (ESI, modo positivo)

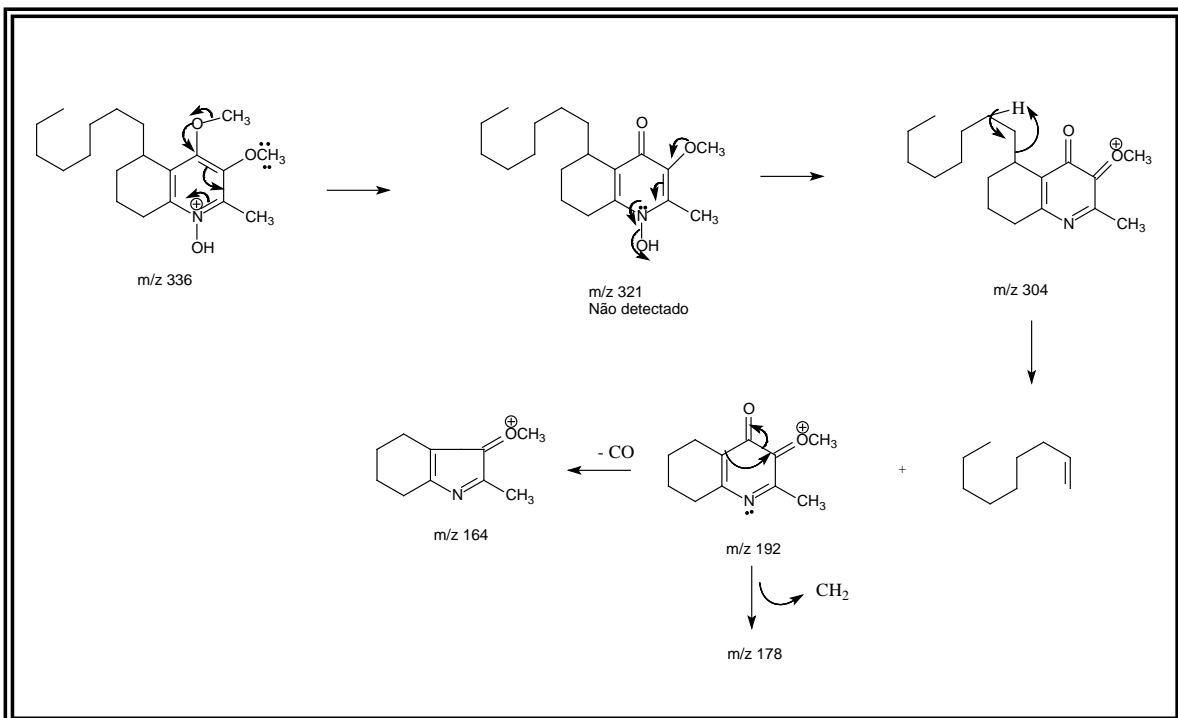


FIGURA 80. Propostas de fragmentação para A5

TABELA 28. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-5

Posição	A-5 ( $\text{CDCl}_3$ )		Brachytelona B ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	143,10	-	143,25
3	-	149,25	-	145,34
4	-	149,96	-	149,51
5	2,98 ( <i>m</i> )	31,79	2,98 ( <i>m</i> )	31,41
6a	1,62 ( <i>m</i> )	23,17	1,45 ( <i>m</i> )	23,83
6b	1,96 ( <i>m</i> )		1,90 ( <i>m</i> )	
7	4,23	15,57	1,40 e 1,75 (sobrepostos)	16,17
8eq	3,13 ( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 19,6; 6,0)	25,47	3,20 ( <i>dd</i> ; <i>J</i> = 19,6; 6,0)	25,01
8ax	2,66 ( <i>ddd</i> ; <i>J</i> = 19,6; 10,8; 7,2)		2,78 ( <i>ddd</i> ; <i>J</i> = 19,6; 10,8; 7,2)	
9	-	132,42	-	130,72
10	-	145,20	-	145,82
11a	1,50 – 1,80 (sobreposto)	31,89	1,75 (sobresposto)	31,60
11b	1,45 (sobreposto)		1,25 (sobreposto)	
12-15	1,25 – 1,80	22,67 – 33,66	1,25 – 1,80	22,20 – 32,51*
16	0,89 ( <i>t</i> ; 7,0)	14,12	0,86 ( <i>t</i> ; 7,0)	14,09*
2-C- $\text{CH}_3$	2,49 ( <i>s</i> )	12,72	2,58 ( <i>s</i> )	11,54
3-O- $\text{CH}_3$	3,80 ( <i>s</i> )	61,20	3,81 ( <i>s</i> )	60,60
4-O- $\text{CH}_3$	3,96 ( <i>s</i> )	61,85	4,01 ( <i>s</i> )	60,76

\*valores comparados com os respectivos valores da chamaedrona relatados na literatura (DIAS *et. al.*; 2007b)

#### 4.1.8. Elucidação estrutural do alcaloide A20

A substância A-20 foi isolada da fase hexânica do caule de *W. brachypetala*. Esta apresentou-se como um óleo amarronzado e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A20 apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos descritos anteriormente, como os sinais de metila em  $\delta$  3,88 e 2,39 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  do anel A quinolônico. Observou-se ainda o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,03 (*m*) referente ao hidrogênio H-5 e os sinais de hidrogênios metilênicos entre  $\delta$  1,20 e 1,85; que, aliado ao sinal de tripleto em  $\delta$  0,87 caracterizaram a presença da cadeia alquílica lateral com grupo metil terminal; além de um sinal de multipletto em  $\delta$  2,66 característico de hidrogênios na posição 8 não substituída, cuja desblindagem deve-se a vizinhança ao sistema aromático. Observou-se ainda neste espectro um sinal adicional de metoxila em  $\delta$  3,96 verificando-se assim grande semelhança entre a estrutura do alcaloide A-20 com o alcaloide brachytelona A (A2).

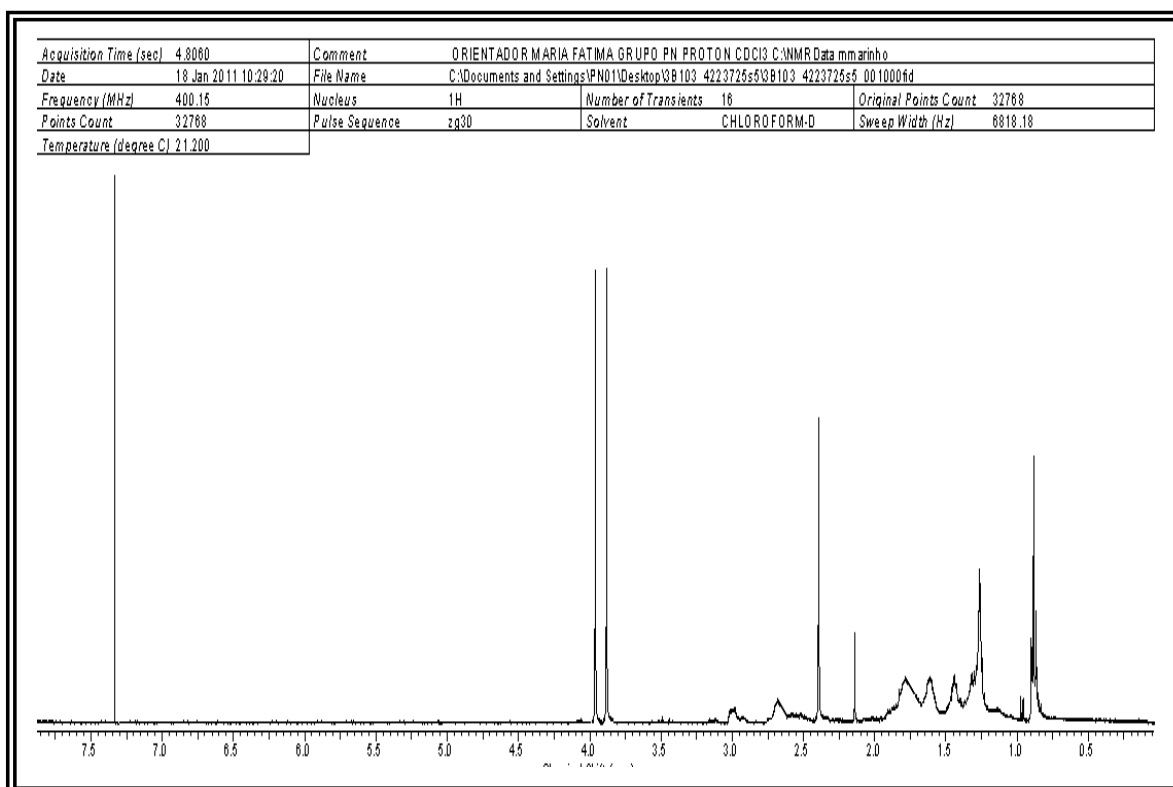
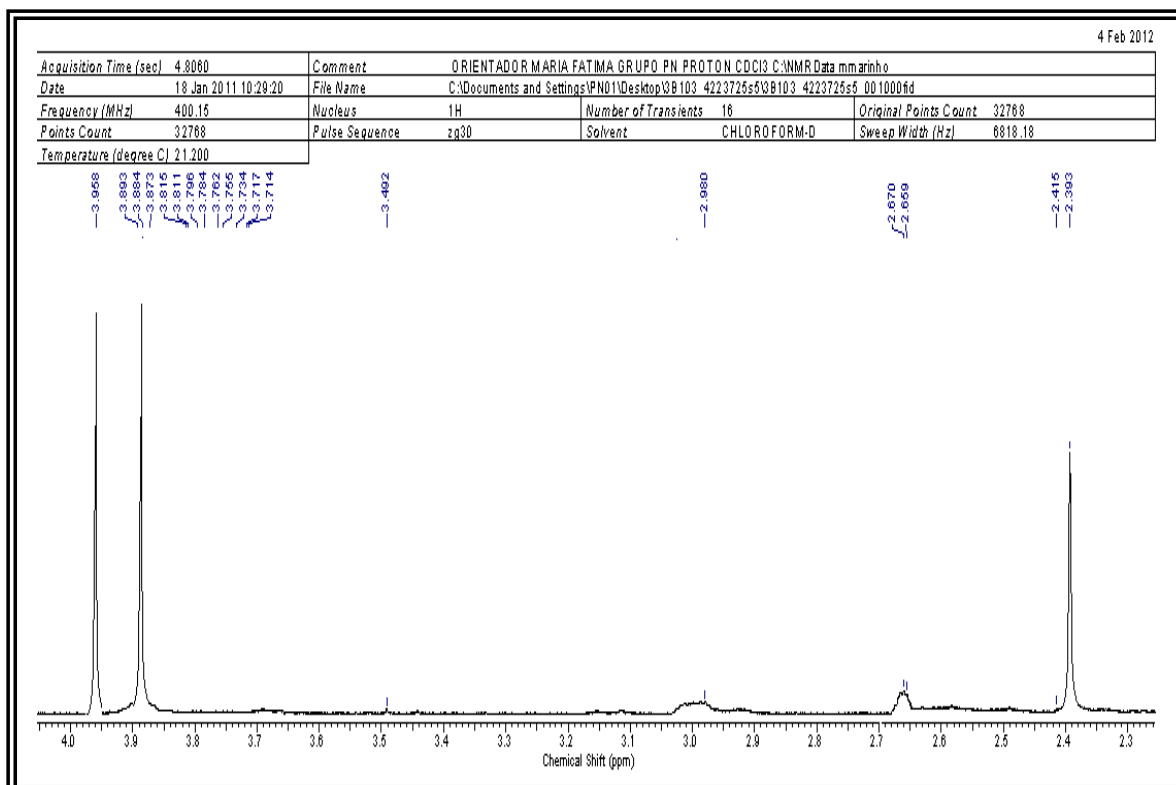
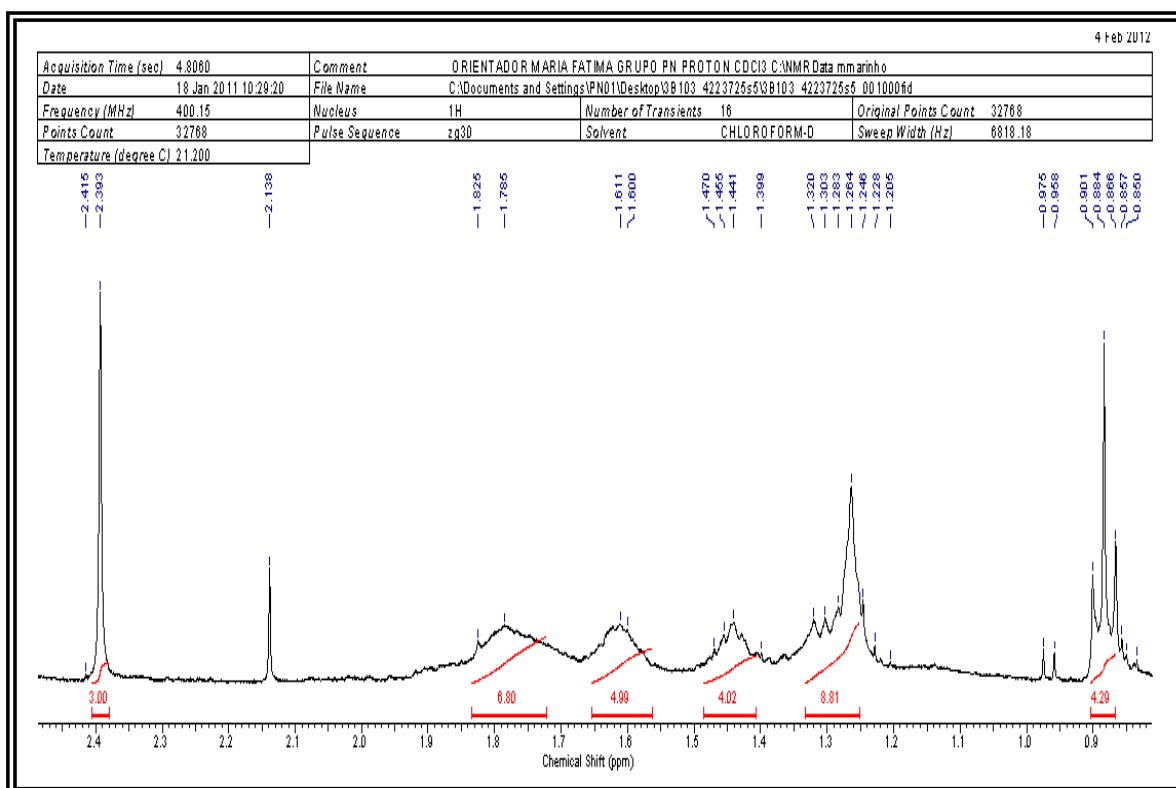


FIGURA 81. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A20 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

FIGURA 82. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A20 ( $\delta$  2,3 – 4,0)FIGURA 83. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A20 ( $\delta$  0,8 – 2,5)

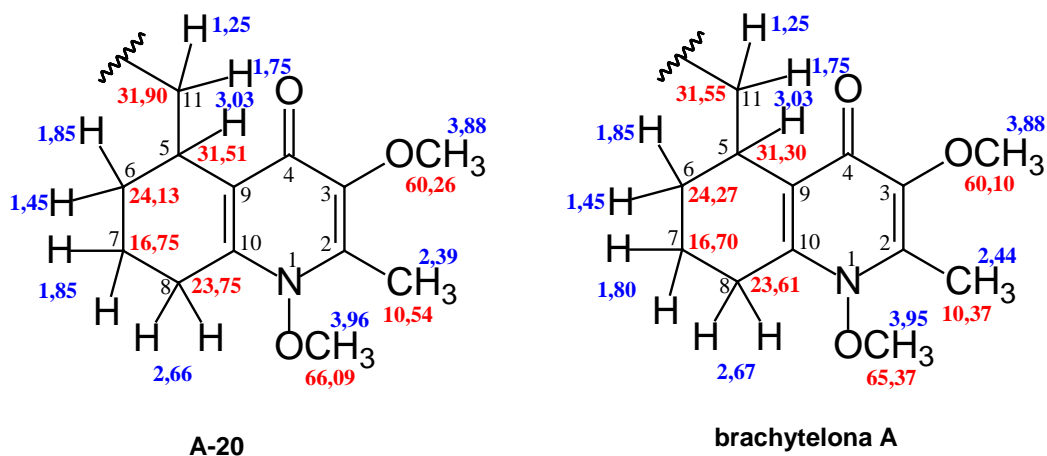


O mapa de correlações do espectro de HSQC apresentou correlações importantes para a elucidação da estrutura de A20. O sinal de metoxila em  $\delta$  3,96 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  66,09 sugerindo tratar-se de uma N-O-metoxila, devido à ausência do sinal de N-H e a alta desblindagem do carbono metoxílico acima de  $\delta$  63,0 como descrito na literatura (RASAKOVA *et. al.*; 1984).

Foi possível observar ainda dois pares de sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos, sendo que os hidrogênios em  $\delta$  1,45 e 1,85 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  24,13, enquanto que os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,25 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  31,90. Comparando esses dados com aqueles referentes ao alcaloide brachytelona A (A2) é possível atribuir estes valores de  $\delta_H$  e  $\delta_C$  às posições 6 e 11 respectivamente.

Outras duas correlações importantes foram verificadas no mapa de correlações do espectro de HSQC de A20. Sinais de hidrogênios sobrepostos em  $\delta$  1,85 correlacionam-se com o sinal de carbono em  $\delta$  16,75, enquanto que o sinal de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,70 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  23,75. Estes sinais são facilmente atribuídos as posições 7 e 8 quando comparados com aqueles referentes carbonos das mesmas posições da estrutura da brachytelona A (A2).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-20 não apresentou os sinais de tripleto em  $\delta$  2,60 referente aos hidrogênios metilênicos benzílicos e os multipletos entre  $\delta$  7,08 – 7,27 referente a fenila terminal verificados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da brachytelona A2, sendo assim possível sugerir que a estrutura A20 é um alcaloide análogo da brachytelona A, cuja única diferença é a presença de um grupo metil terminal na cadeia lateral.



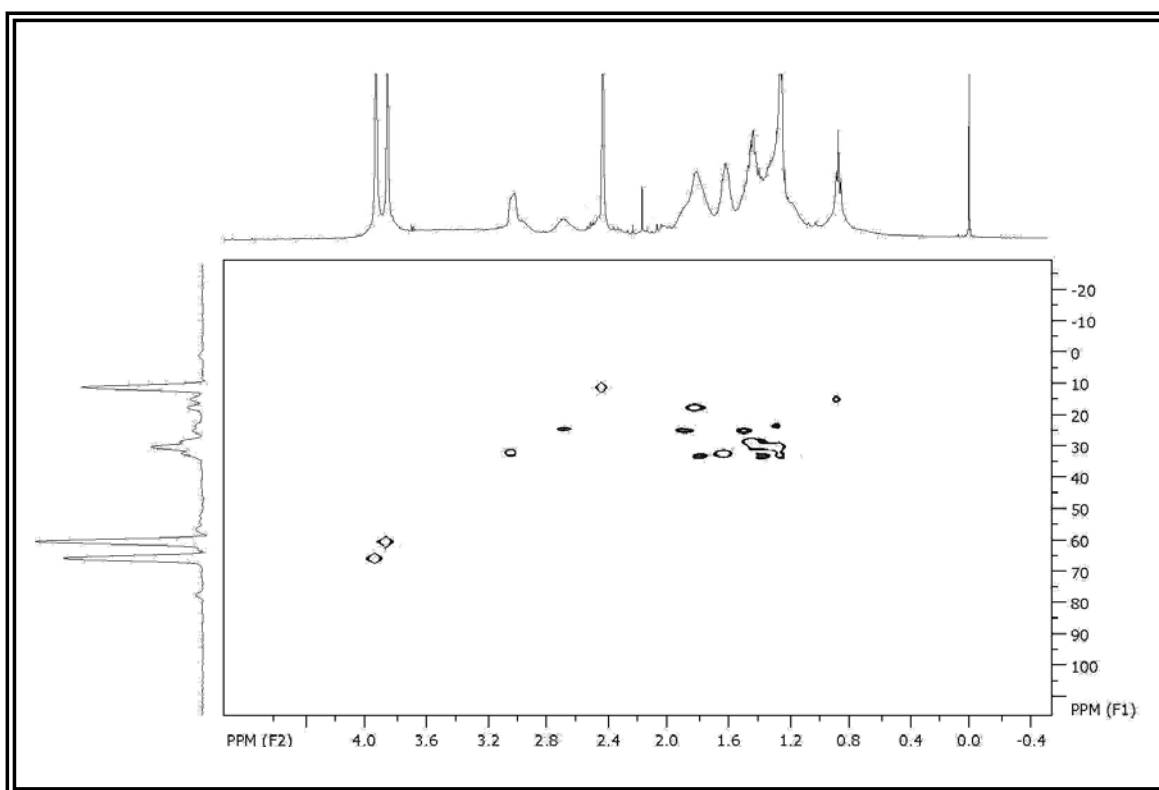
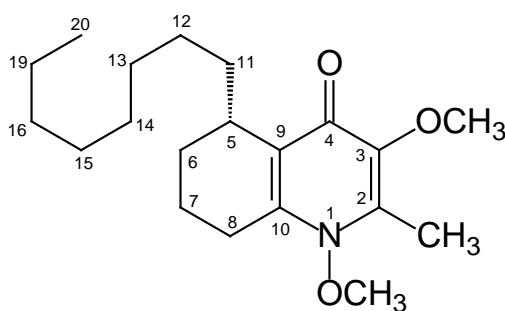


FIGURA 84. Mapa de correlações do HSQC de A20 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

O espectro de massas de A20 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular [M + H]<sup>+</sup> em *m/z* 336 daltons, confirmando a estrutura proposta para A20 com uma cadeia alquílica lateral contendo sete grupos CH<sub>2</sub>, similar aos alcalóides antidesmona (A1), N-metil-antidesmona (A7), chamaedrona (A3) e brachytelona C (A5). A partir da análise de todos os dados espectrais obtidos para A-20 e comparação com os dados espectrais da brachytelona A (A2) foi possível elucidar a estrutura do alcaloide A-20, ao qual por ser inédito foi denominado de brachytelona D. A configuração do carbono C-5 de A-6 foi atribuída como sendo (*S*), dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = +27,5^\circ$  (*c* 1,5; CHCl<sub>3</sub>), quando comparado com a literatura, considerando a antidesmona como modelo (BUSKE *et.al.*; 1999).



Estrutura da brachytelona D (A-20)

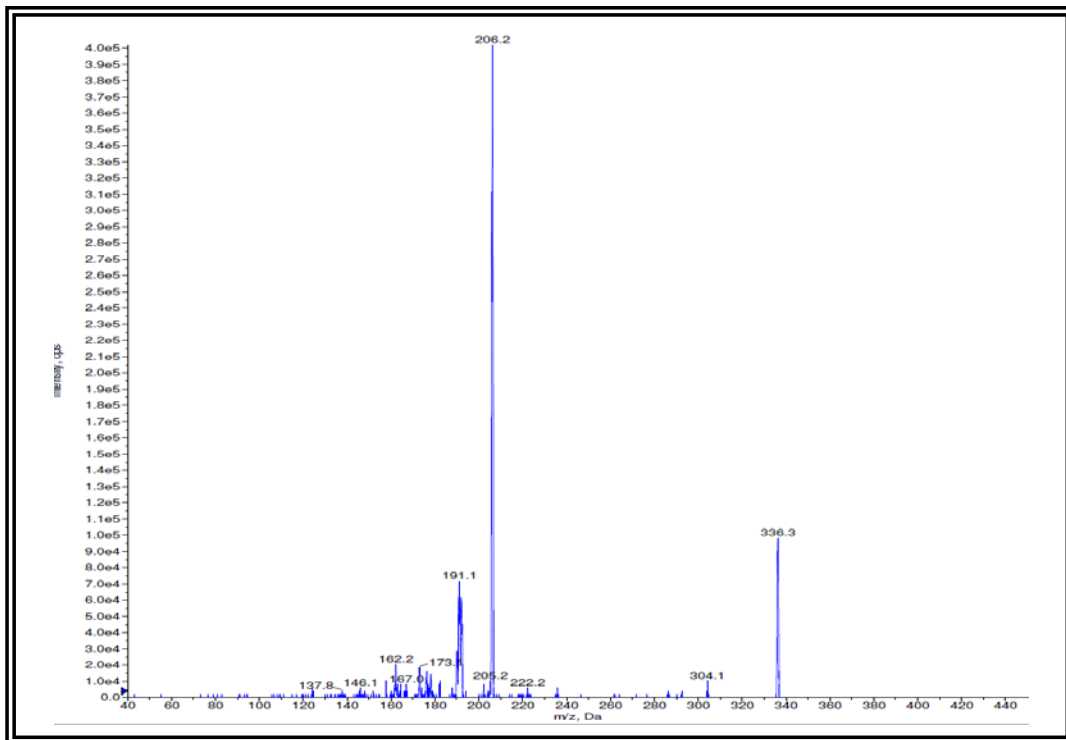


FIGURA 85. Espectro de massas de A20 (ESI, modo positivo)

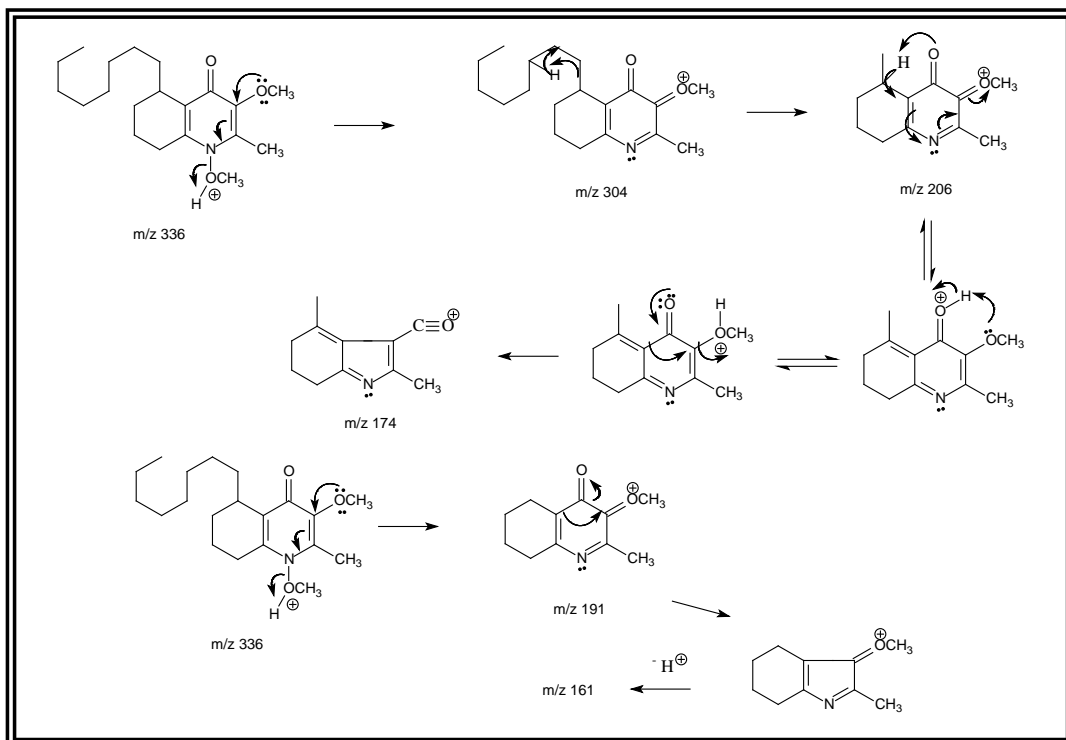


FIGURA 86. Propostas de fragmentação para o alcaloide A20

Uma vez que a estrutura do alcaloide brachytelona D é inédita, foi obtido o espectro de massas de alta resolução (ESI, modo positivo). Este apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[M + H^+]$  em  $m/z$  336,2570 compatível com a fórmula molecular  $C_{20}H_{33}O_3N$ .

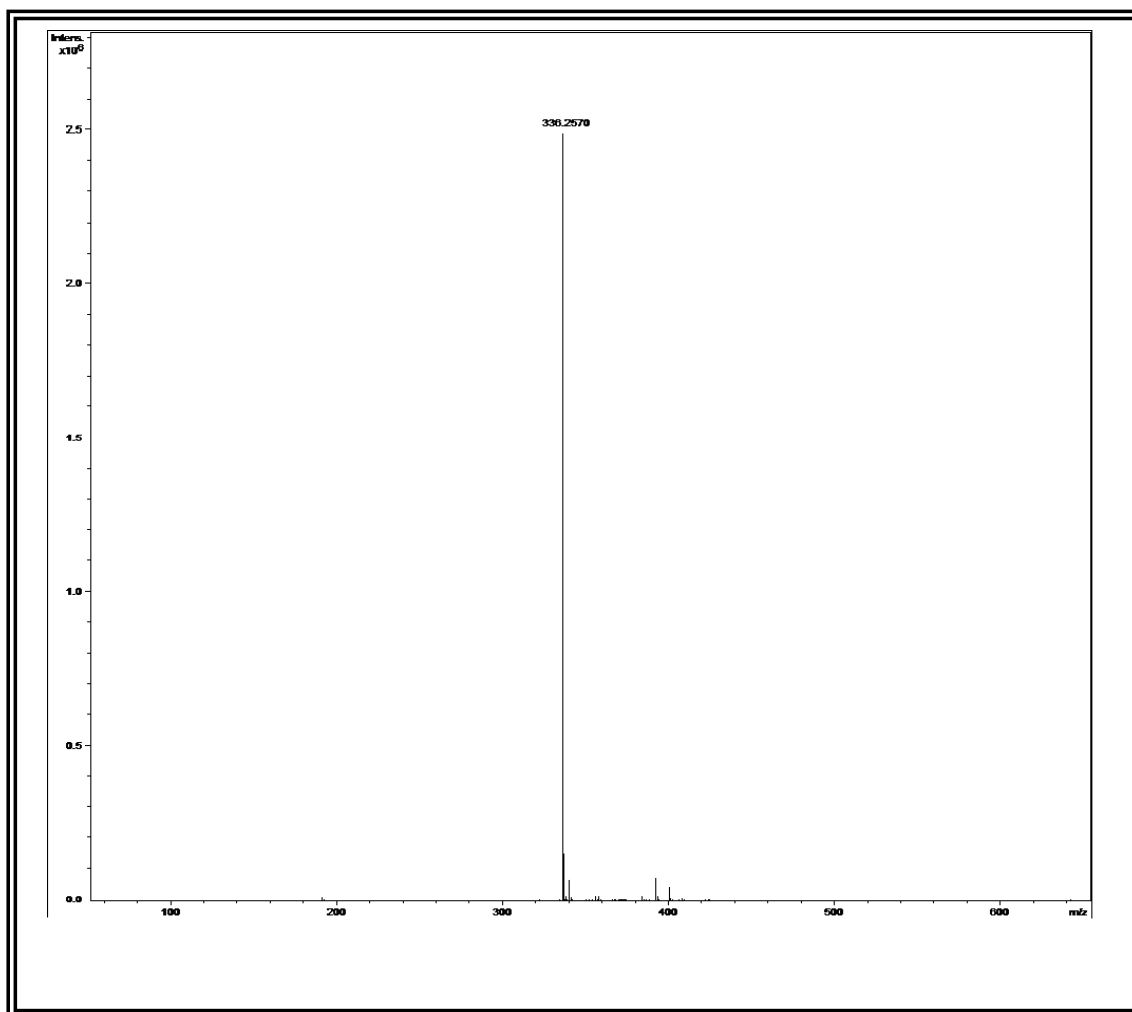


FIGURA 87. Espectro de massas de alta resolução de A20 (ESI, modo positivo)

TABELA 29. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-20

Posição	A-20 (400/100 MHz; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ; $\text{CDCl}_3$ )		A-2 <sup>*1</sup> e A-3 <sup>*2</sup> (400/100 MHz; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ; $\text{CDCl}_3$ )	
	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)
2	-	*	-	138,65
3	-	*	-	147,77
4	-	*	-	169,90
5	3,03 (m)	31,51	3,03 (m)	31,30
6a	1,85 sobreposto	24,13	1,85 sobreposto	24,27
6b	1,45 (sobreposto)		1,45 (sobreposto)	
7	1,85 (sobreposto)	16,70	1,80 (sobreposto)	16,70
8	2,66	23,75	2,67	23,61
9	-	*	-	128,52
10	-	*	-	142,98
11a	1,75 (sobreposto)	31,90	1,75 (sobreposto)	31,55
11b	1,25 (sobreposto)		1,25 (sobreposto)	
12-17	1,25 – 1,85	27,90 – 29,60	1,25 – 1,80	22,20 – 32,51
18	0,87 (t, 7,0) (sobreposto)	14,80	0,87 (t, 7,0) (sobreposto)	14,40
2-C- $\text{CH}_3$	2,39 (s)	10,54	2,44 (s)	10,37
3-O- $\text{CH}_3$	3,88 (s)	60,26	3,88 (s)	60,10
N-O $\text{CH}_3$	3,95 (s)	66,09	3,95 (s)	65,37

<sup>\*1</sup>Comparação com os dados espectrais do alcaloide A-2 (brachytelona A) para as posições de 2 a 11 e para os substituintes. <sup>\*2</sup>Comparação com dados da literatura para a chamedrona (DIAS *et. al.*; 2007b) para as posições de 12 a 18.

#### 4.1.9. Identificação do alcaloide A4

A substância A4 foi isolada da fase hexânica do caule de *W. brachypetala*. Esta apresentou-se como um óleo amarelo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A4 apresentou sinais de hidrogênio característicos dos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente, destacando os sinais integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,88 e 2,38 correspondentes a metoxila na posição 3 e da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  do núcleo quinolônico. Observou-se ainda sinais de multiplete entre  $\delta$  1,25 – 2,10; característicos dos hidrogênios metilênicos de uma cadeia alquílica lateral, além do sinal de tripleto em  $\delta$  0,87 ( $J = 7,0$ ) referente a metila terminal da cadeia, um sinal de multiplete em  $\delta$  2,96 característico do hidrogênio H-5, além de um sinal de multiplete em  $\delta$  4,80 sugerindo tratar se de um hidrogênio oximetínico.

Devido a pouca amostra de A4 isolada não se pôde realizar outros experimentos de RMN. Partiu-se então para a análise do espectro de massas de A-4. Este espectro (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  322. Dada a presença de um hidrogênio oximetínico na molécula de A-4 e o fato de a mesma possuir duas unidades de massa a mais que a antidesmona (A-1), sugeriu-se inicialmente que A4 seria um derivado reduzido de A1 com a presença de uma hidroxila na posição 8.

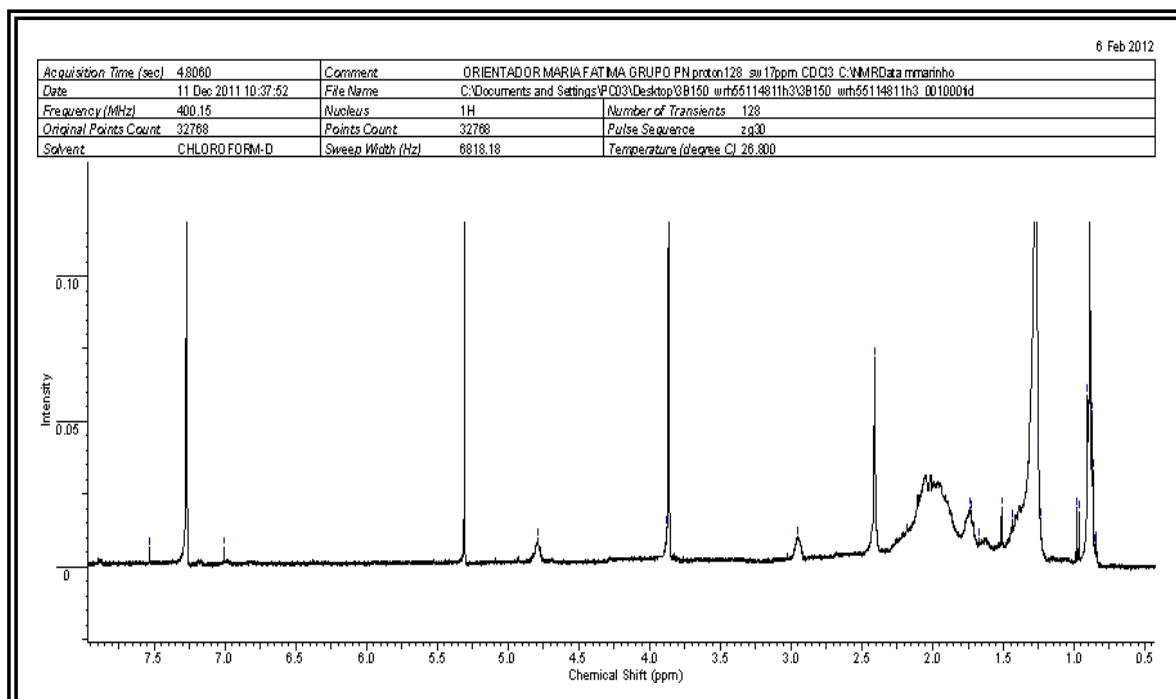


FIGURA 88. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A4. ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

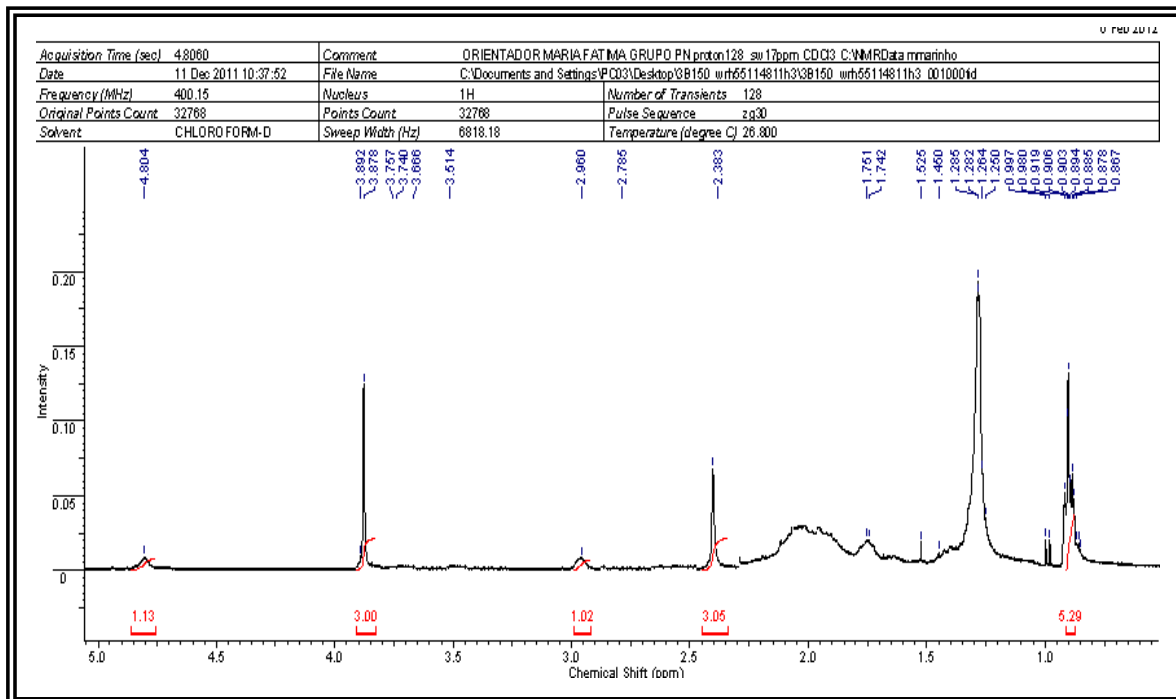


FIGURA 89. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A4 (δ 0,0 – 5,0)

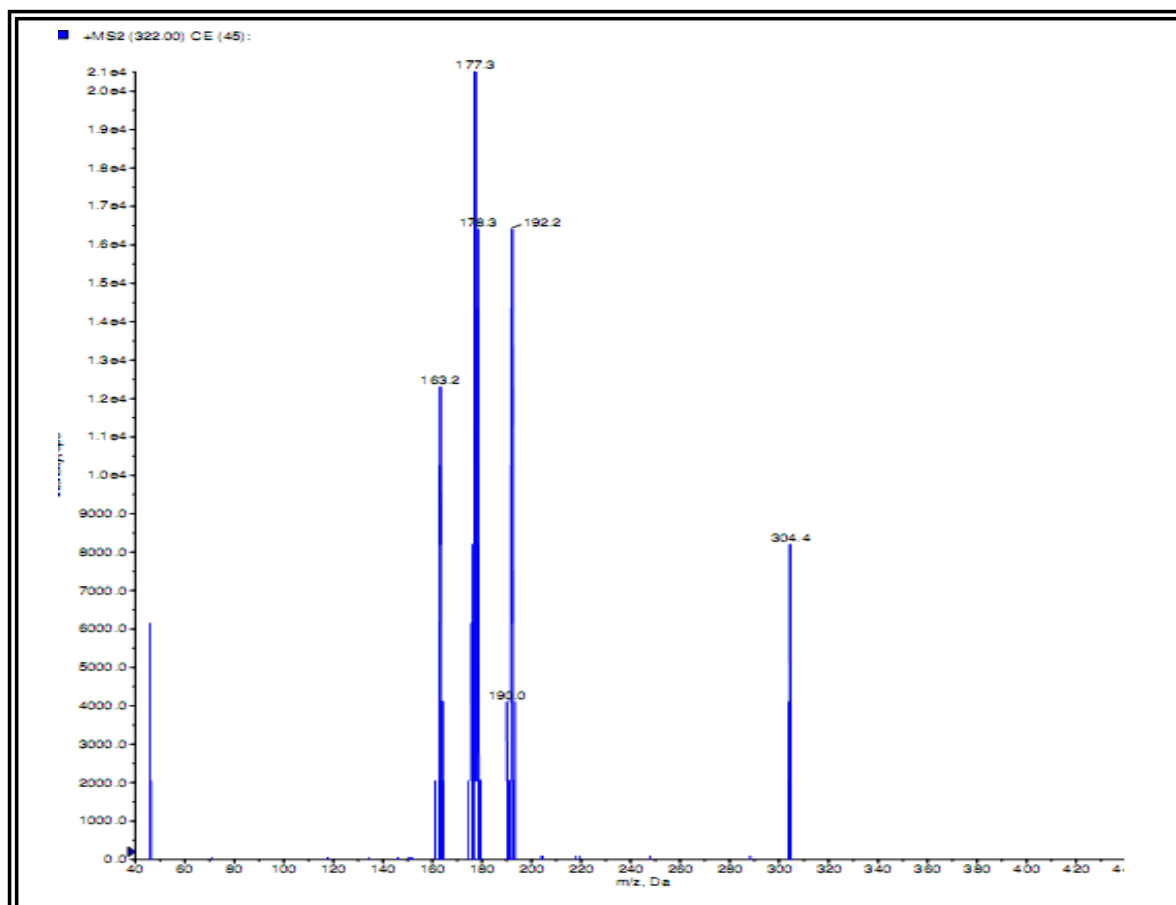


FIGURA 90. Espectro de massas de A4 (ESI, modo positivo)

Através do espectro de massas (ESI, modo positivo) é possível observar um fragmento em  $m/z$  304, referente a uma perda de  $H_2O$ , compatível com a presença de uma hidroxila na estrutura de A-4. Os demais fragmentos em  $m/z$  192, 177 e 163 daltons referem à perda da cadeia lateral a partir de  $m/z$  304, perda de  $C_2H_2$  e de  $CH_2$  a partir do fragmento  $m/z$  192, respectivamente.

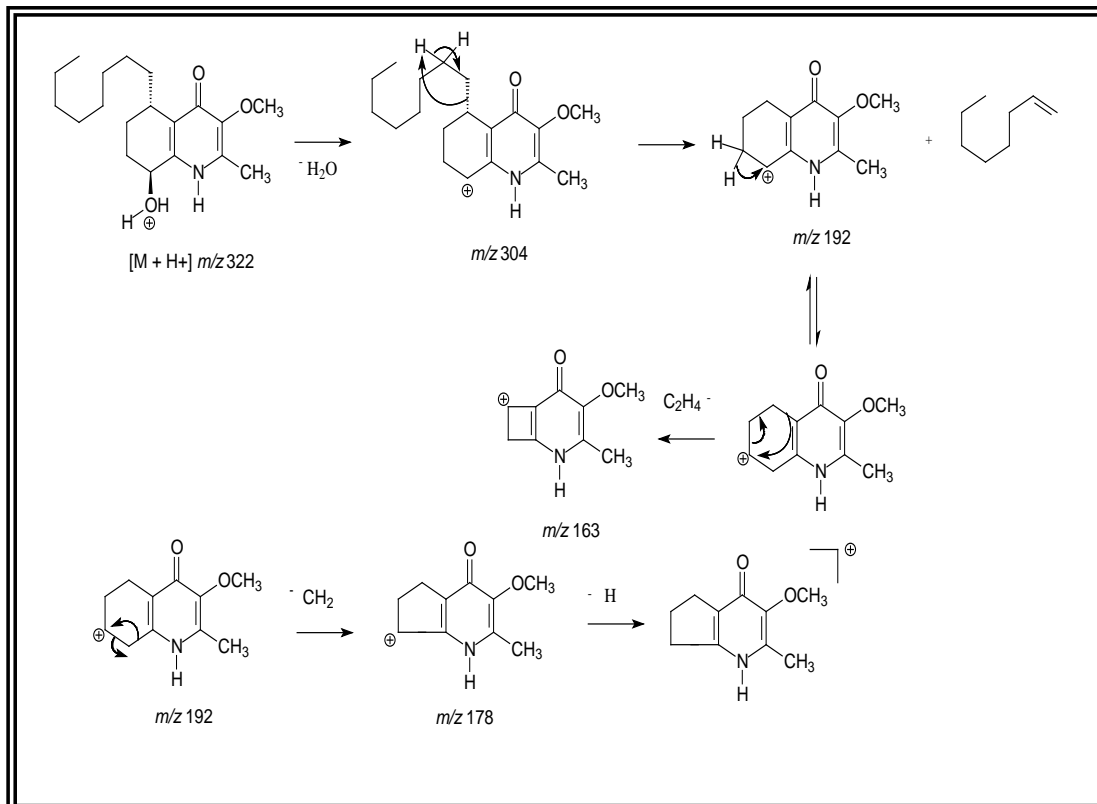
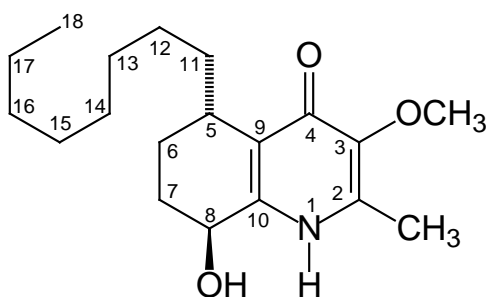


FIGURA 91. Propostas de fragmentação para A4



Através da comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A4 com a literatura (TINTO & BLYDEN, 1991), o alcaloide A4 foi identificado com sendo a hyeronimona, isolada pela primeira vez de *Hyeronima alchorneoides*. O padrão de fragmentação de A4 também foi comparado com a literatura (BUSKE *at. al.*; 2002), confirmando a identificação estrutural inequívoca deste alcaloide. Apesar de não ser um alcaloide inédito, a hyeronimona está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Waltheria* e na família Malvaceae. A estereoquímica do carbono 8 foi dada como sendo (S) dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = +113,5^\circ$  (c 0,06;  $\text{CHCl}_3$ ), quando comparado com a literatura. Acredita-se que a estereoquímica do carbono 5 seja também (S), assim como para os demais alcaloides quinolônicos discutidos, bem como os análogos anteriormente reportados na literatura, provavelmente devido ao processo de biossíntese destes alcaloides e a catalise enzimática específica, como pode-se verificar nas páginas 10 e 11.



**Hyeronimona**

TABELA 30. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A-4

Posição	A4 $\text{CDCl}_3$ 400 MHz	Literatura* $\text{CDCl}_3$ 400 MHz
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) J (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) J (Hz)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	2,96 (s)	2,93 (s)
6	1,60 – 1,95	1,63 – 1,95
7	1,90 – 2,10	1,93 – 2,10
8	4,80	4,81
9	-	-
10	-	-
11	1,25 – 1,75	1,39 – 1,75
12-17	1,25 – 1,60	1,25 – 1,60
18	0,87 (t, 7 Hz)	0,87 (t, 7 Hz)
N-H	NO*	NP*
2-C- $\text{CH}_3$	2,38 (s)	2,39 (s)
3-O $\text{CH}_3$	3,87 (s)	3,75 (s)

\*(TINTO & BLYDEN, 1991). NO (não observado), NP (não observado ou não publicado).

#### 4.1.10. identificação do alcaloide A22

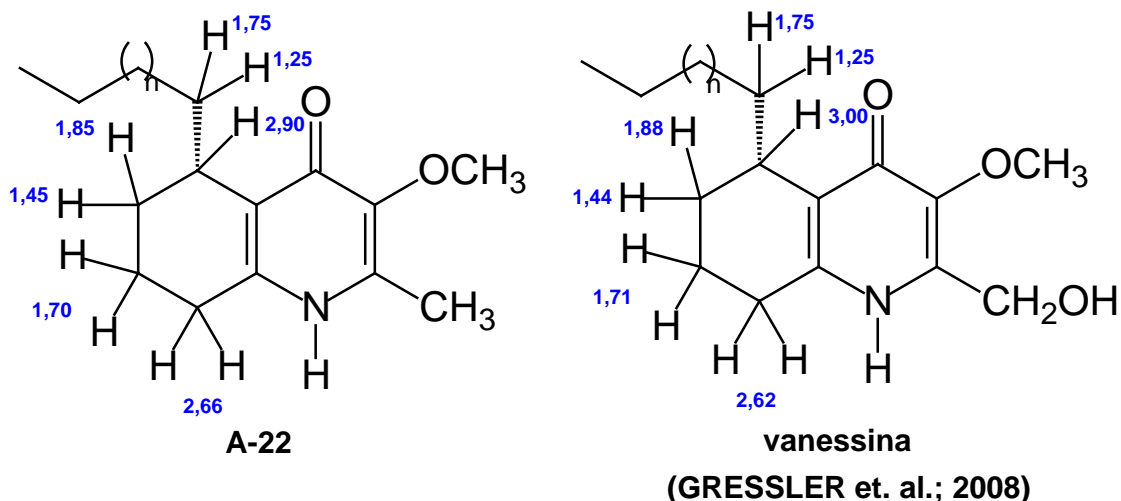
A substância A22 foi isolada da fase hexânica do caule de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff, sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A22 apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente, como os sinais integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,80 e 2,48 referentes à metoxila na posição 3 e à metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  respectivamente, o sinal de multipletos em  $\delta$  2,90 referente ao hidrogênio H-5. Este espectro apresentou ainda os sinais de multipletos entre  $\delta$  1,25 – 1,90 e um tripleto de metila em  $\delta$  0,87 referentes aos hidrogênios metilênicos e a metila terminal, respectivamente, caracterizando assim a presença da cadeia alquímica lateral na estrutura de A22.

Não observou-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-22 sinais de substituintes como hidroxilas, metoxilas etc., sendo assim, foi sugerido inicialmente a presença do núcleo A quinolônico idêntico a antidesmona e o anel B sem substituições.

O modelo mais próximo de alcaloide quinolônico sem substituição no anel A na literatura é o alcaloide vanessina, anteriormente isolado de *Waltheria douradinha* (GRESSLER *et. al.*; 2008), onde, para este, verifica-se que os sinais de hidrogênios metilênicos na posição 8 apresentam deslocamento químico em  $\delta$  2,62. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-22 verificou-se um sinal de multipletos integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  2,66 podendo estes, serem atribuídos a posição 8.

Dada a pouca quantidade deste alcaloide isolado, não foi possível realizar outros experimentos de RMN, entretanto os dados obtidos foram comparados cuidadosamente com aqueles referentes à vanessina, sugerindo grande similaridade entre A22 e a vanessina, com exceção a metila na posição 2, que para este último está oxidada a álcool.



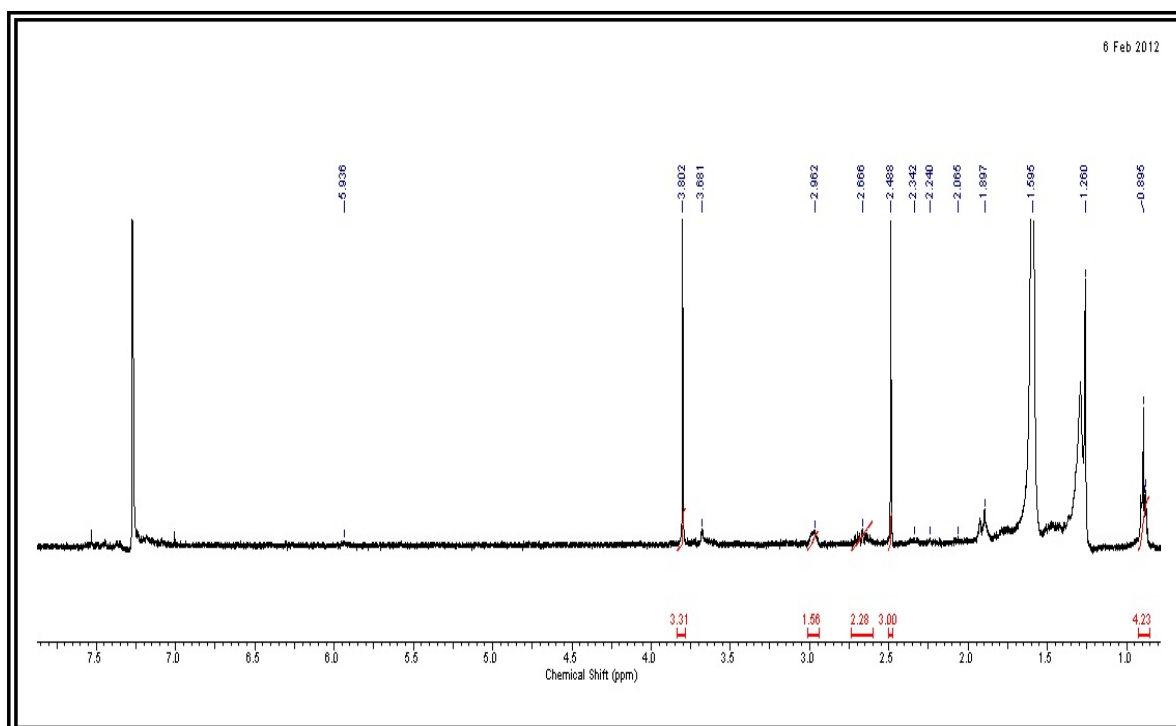


FIGURA 92 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A22 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

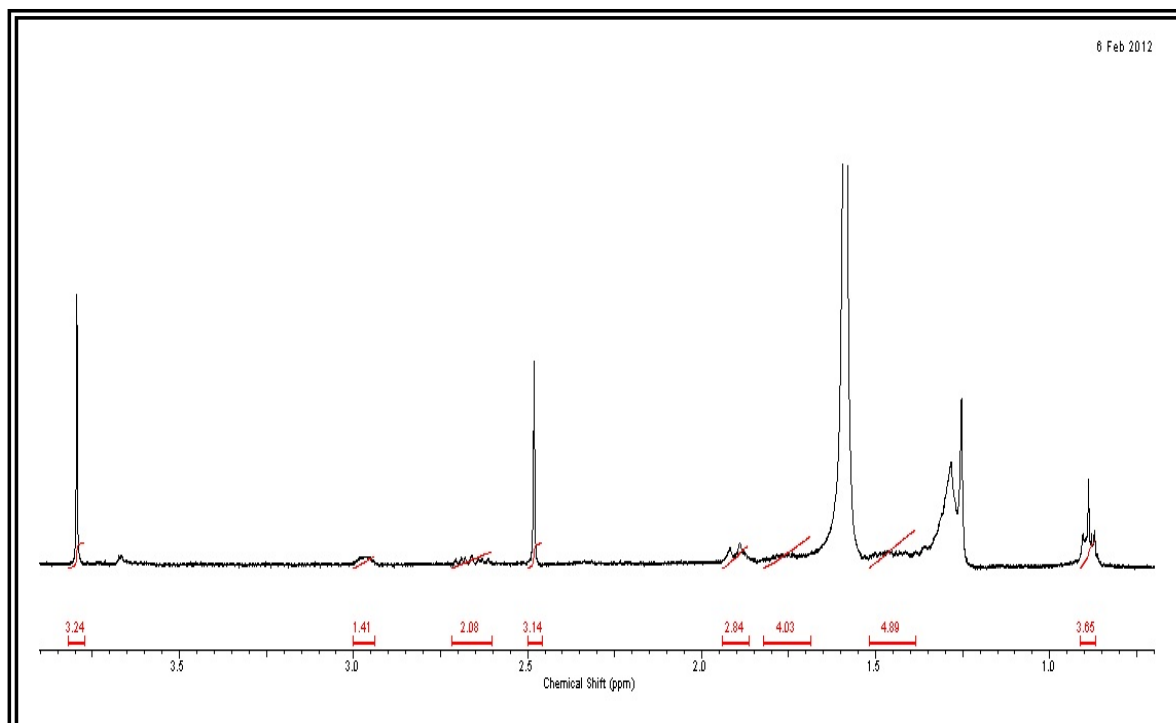
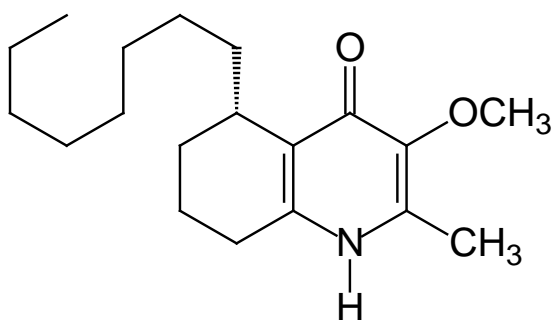


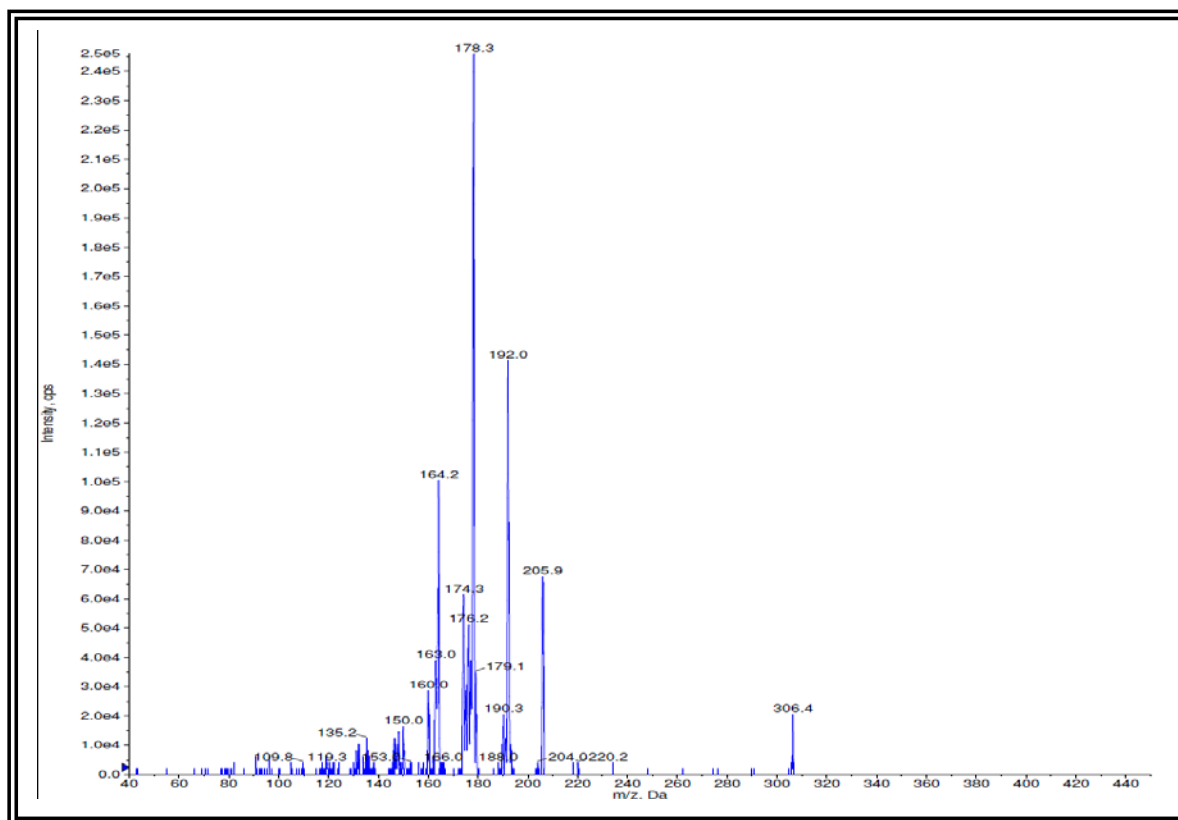
FIGURA 93 – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A22 ( $\delta$  0,5 – 3,3)

O espectro de massas de A22 (ESI, modo positivo) apresentou o íon pseudo-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  306, compatível com a estrutura da 8-desoxi-antidesmona. Verificou-se neste espectro os fragmentos em  $m/z$  206; 192; 178 (pico base) e 164 daltons idênticos a fragmentação proposta por Buske e colaboradores para 8-desóxi-antidesmona (BUSKE *at. al.*; 2002), cujos mecanismos de fragmentação encontram-se na figura 95.

A análise dos dados de RMN de  $^1H$  e do espectro de massas de A-22 e comparação com os dados da literatura (BUSKE *at. al.*; 2002) foram suficientes para propor, de forma inequívoca, que o alcaloide A-22 trata-se da 8-desóxi-antidesmona. Este alcaloide foi identificado de várias espécies dos gêneros *antidesma* e *hyeronima* e está sendo descrito pela primeira vez em Malvaceae.



**Estrutura da 8-desóxi-antidesmona (A-22)**



**FIGURA 94 – Espectro de massas de A22 (ESI, modo positivo)**

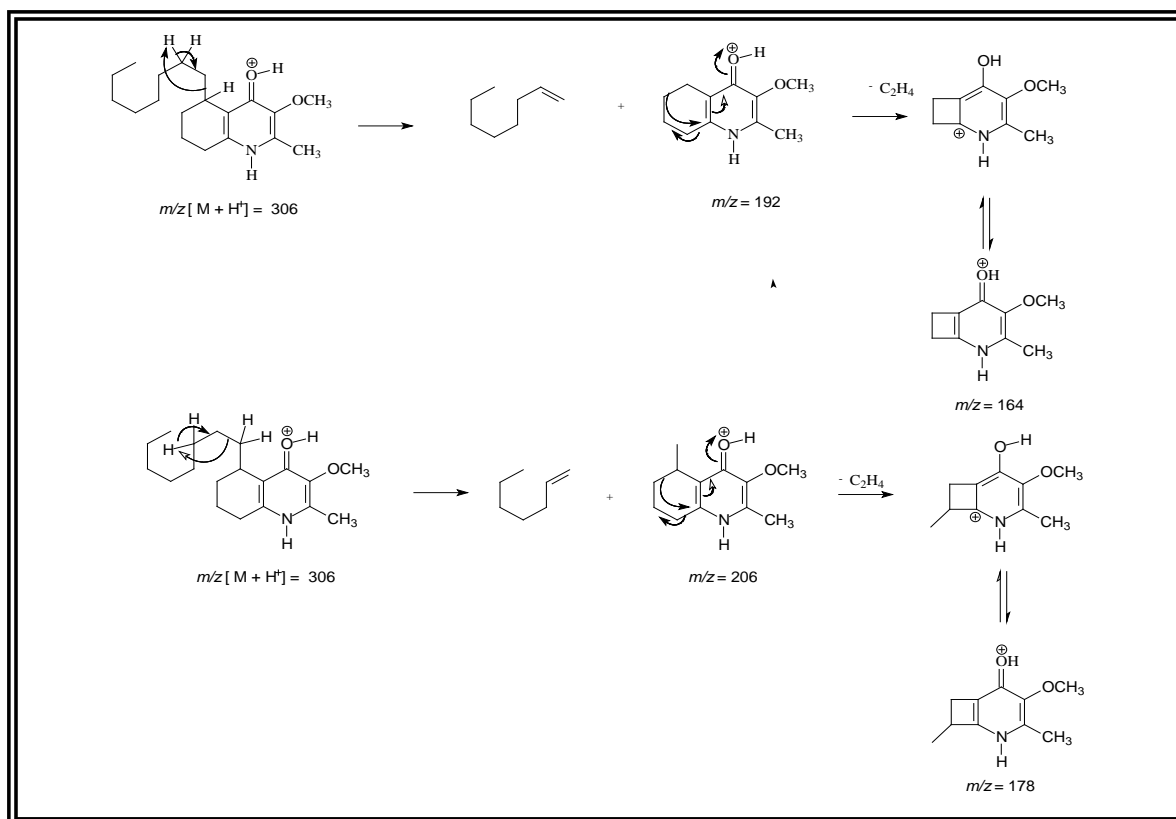


FIGURA 95 – proposta de fragmentação de A22.

TABELA 31. Dados de RMN de  $^1H$  de A22

Posição	A-4 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz $\delta$ $^1H$ J (Hz)	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz $\delta$ $^1H$ J (Hz)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	2,96 ( <i>m</i> )	3,00 ( <i>m</i> )
6	1,45 – 1,85	1,44 – 1,88
7	1,70	1,71
8	2,66	2,62
9	-	-
10	-	-
11	1,25 – 1,75	1,25 – 1,75
12-17	1,25 – 1,60	1,25 – 1,60
18	0,87 ( <i>t</i> , 7 Hz)	0,87 ( <i>t</i> , 7 Hz)
N-H	NO*	NP*
2-C-CH <sub>3</sub>	2,48 ( <i>s</i> )	-
3-OCH <sub>3</sub>	3,80 ( <i>s</i> )	3,75 ( <i>s</i> )

\*(GR  
 ESSL  
 ER  
*et.*  
*al.*;  
 2008)  
 . NO  
 (não  
 obser  
 vado)  
 , NP  
 (não  
 obser  
 vado  
 ou  
 não  
 public  
 ado).

#### 4.1.11. Identificação do alcaloide A-21

A substância A21 foi isolada da fase hexânica do caule de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A21 apresentou sinais característicos dos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente, como os sinais em  $\delta$  3,83 e 2,36 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  respectivamente, além do sinal de multipletto em  $\delta$  2,93 referente ao hidrogênio H-5. Observou-se ainda o sinal de metila em  $\delta$  0,87 ( $t$ ;  $J = 7,0$  Hz) e os sinais entre  $\delta$  1,20-1,80 característicos da cadeia alquílica lateral.

Observou-se ainda neste espectro um sinal de tripleto largo, integrando para um hidrogênio em  $\delta$  4,58; sendo este característico de hidrogênio oxi-metínico e um sinal de metila ligada a heteroátomo em  $\delta$  3,60; atribuído inicialmente como possível substituinte do anel B.

Através do mapa de correlações do espectro de COSY de A21 foi possível observar as conectividades dos hidrogênios na estrutura molecular deste composto. O hidrogênio H-5 apresentou correlação com os sinais de hidrogênios sobrepostos em  $\delta$  1,25 e 1,93. Dado que nos alcaloides quinolônicos discutidos anteriormente foi comum o deslocamento químico de um dos hidrogênios diasterotópicos da posição 11 em  $\delta$  1,25; o sinal de hidrogênio sobreposto em  $\delta$  1,93 foi inicialmente atribuído a um dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos da posição 6. Observou-se ainda neste espectro correlações entre hidrogênios metilênicos sobrepostos entre  $\delta$  1,63 – 2,10 e a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,58 com os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,63 e 2,10.

A análise do mapa de correlações do espectro de HSQC revelou a presença de três grupos de hidrogênios metilênicos diaterotópicos. Os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,25 e 1,75 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  31,85; sendo este atribuído a posição 11 quando comparado com modelos da literatura (DIAS *et. al.*; 2007b; BRINGMAM *et. al.*; 2000). Os sinais de hidrogênios sobrepostos em  $\delta$  1,93 e 2,10 correlacionaram com o sinal de carbono em aproximadamente  $\delta$  24,8; enquanto que os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,63 e 2,10 sobrepostos correlacionaram com o sinal de carbono em aproximadamente  $\delta$  23,00. Estes carbonos foram atribuídos as posições 6 e 7, entretanto sendo possivelmente intercambiáveis.

Observou-se ainda neste espectro a correlação do hidrogênio em  $\delta$  4,58 com o sinal de carbono em  $\delta$  71,83 confirmando que este se tratava de um hidrogênio oximetínico.

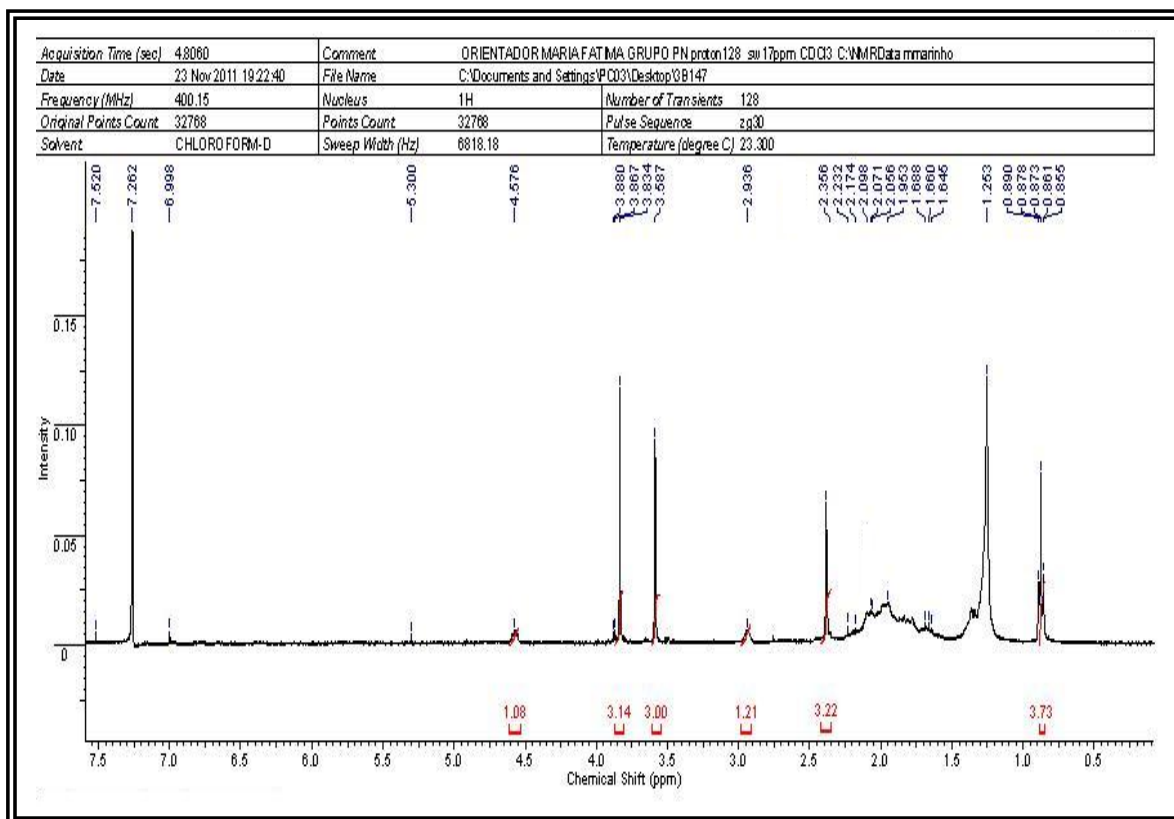


FIGURA 96. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A21 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

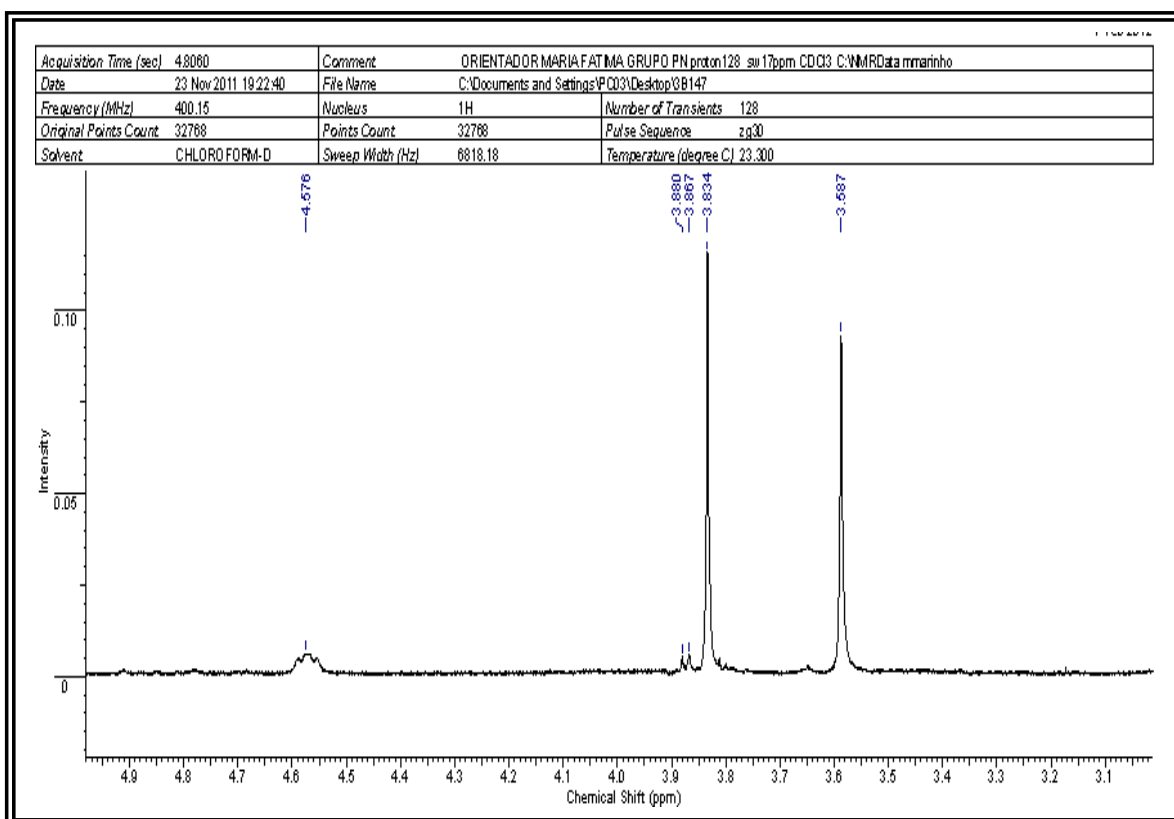


FIGURA 97. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A21 (δ 3,1 – 4,9)

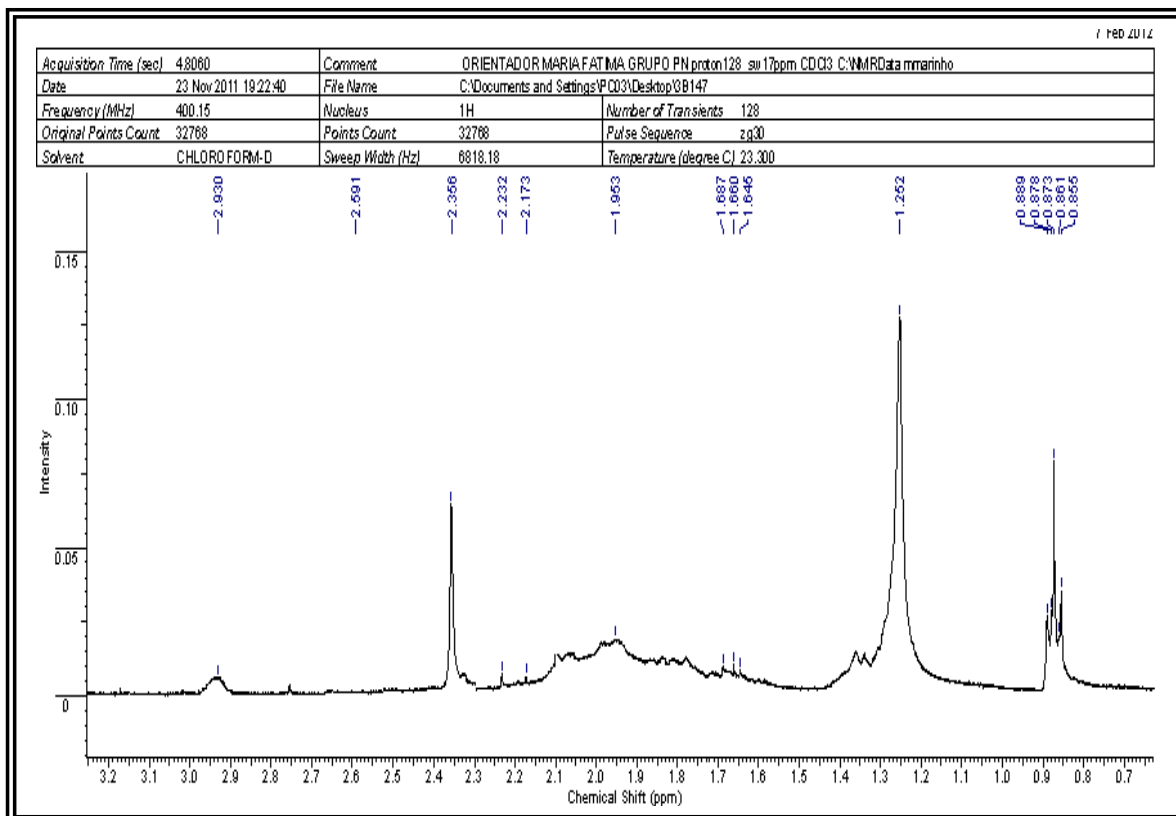


FIGURA 98. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A21 ( $\delta$  0,7 – 3,2)

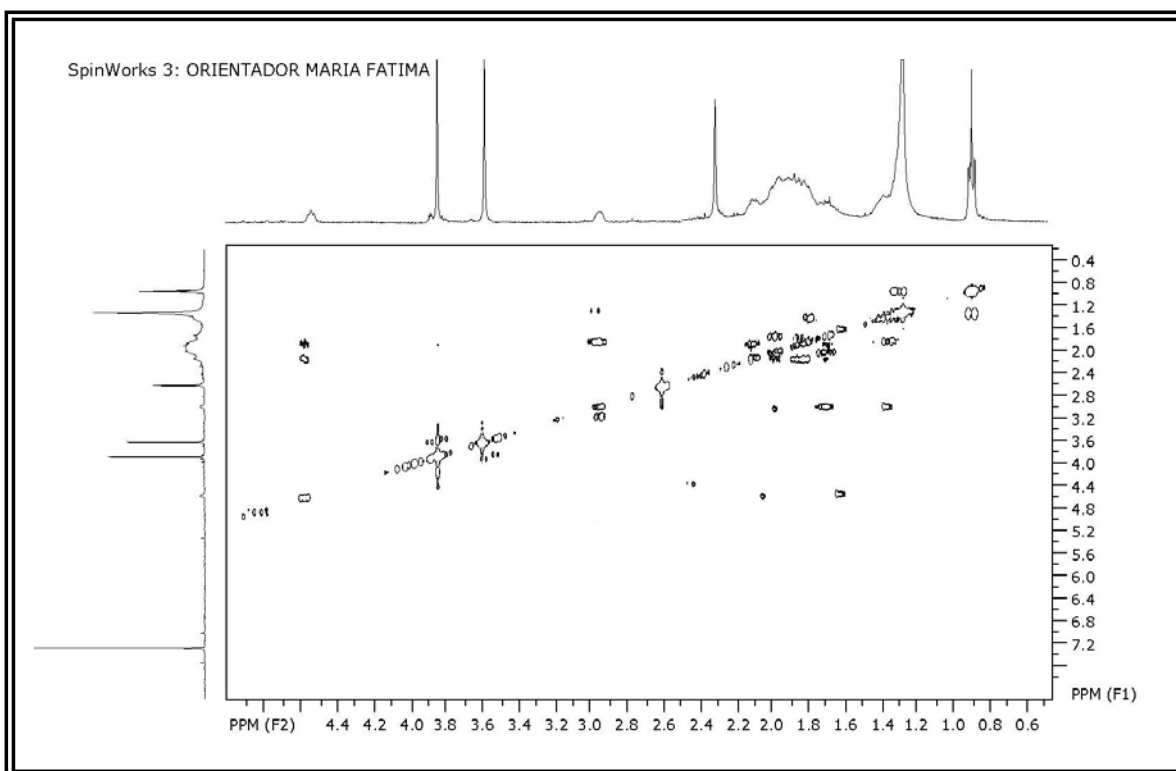


FIGURA 99. Mapa de correlações de  $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  do espectro de COSY de A21 ( $\delta$  0,6 – 5,0)



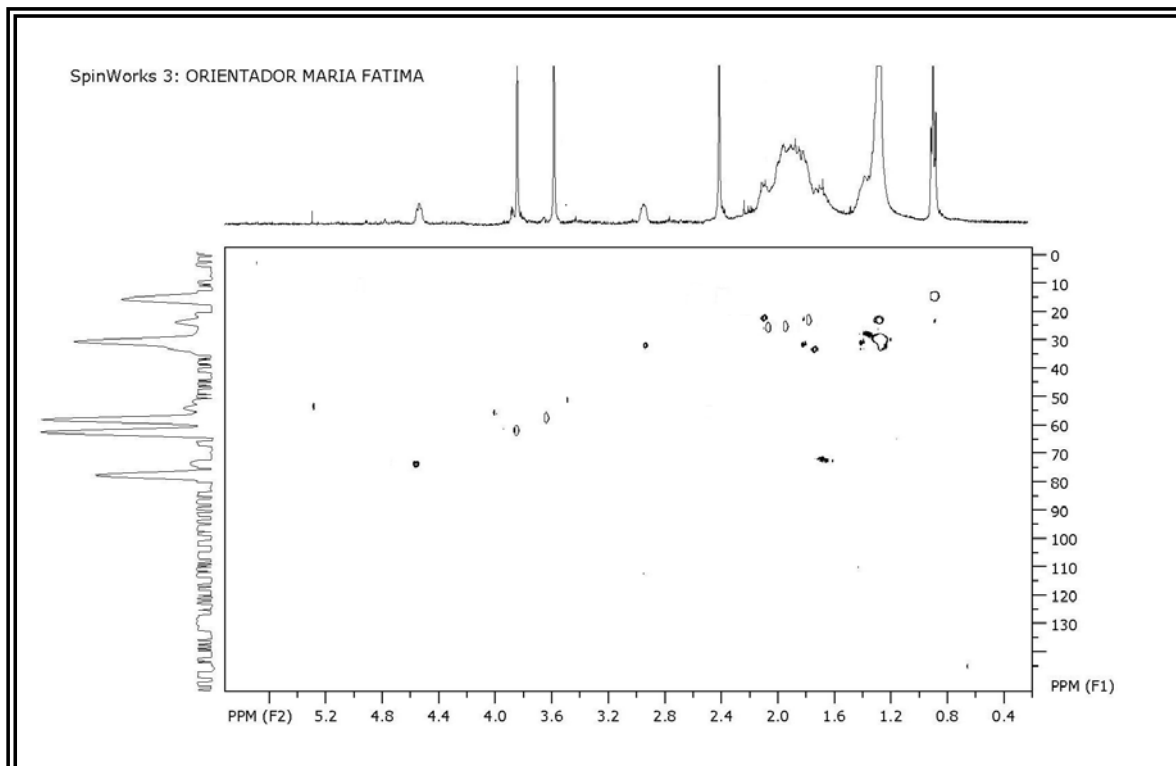
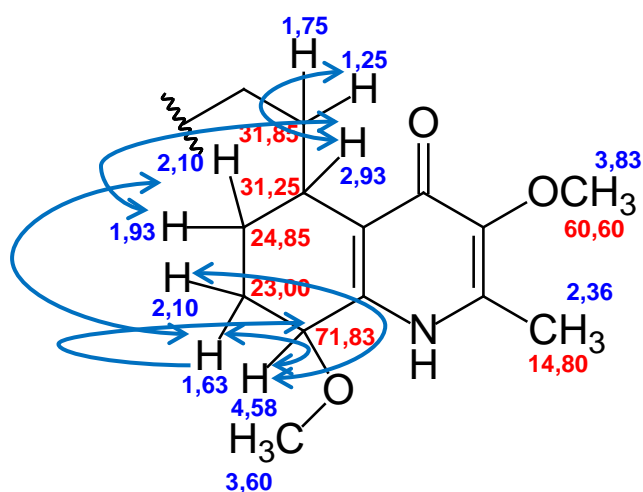


Figura 100. Mapa de correlação do HSQC de A21 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta_{\text{H}}$  0,4 – 5,4)

Através das conectividades dos hidrogênios observadas no espectro de COSY e dos respectivos valores de  $\delta_{\text{C}}$  observados no espectro de HSQC foi possível sugerir que a metoxila em  $\delta$  3,60 estaria ligada na posição 8 do anel B.

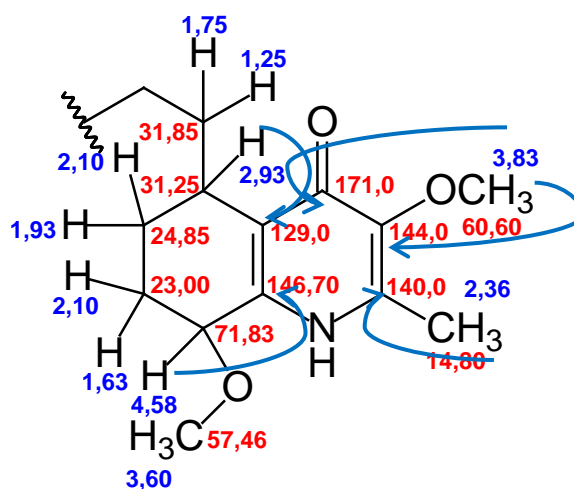


Correlações observadas no Mapa de contorno do COSY de A21

Devido a pouca massa de A21 isolado, o espectro de HMBC apresentou poucas correlações entre sinais de hidrogênio e carbono a múltiplas ligações. Entretanto foi possível confirmar que a metoxila em  $\delta$  3,60 encontra-se na posição 8, devido a correlação observada em  $J$ -2 do hidrogênio oximetínico em  $\delta$  4,58 com o sinal de carbono em  $\delta$  146,70 atribuído a posição 10. O hidrogênio H-5 em  $\delta$  2,96 apresentou correlação em  $J$ -2 com o carbono em  $\delta$  129,00 atribuído a posição 9.

Observou-se ainda correlações em  $J$ -2 entre o sinal da metila em  $\delta$  2,36 com o carbono em  $\delta$  140,00 sendo este atribuído a C-2 e o sinal da metoxila em  $\delta$  3,83 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  144,0 sendo este atribuído a C-3. Uma fraca correlação em  $J$ -3 foi observada entre esta metoxila com o sinal de carbono em  $\delta$  171,28; característico da carbonila do sistema quinolônico.

O espectro de massas de A-21 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  336 daltons, confirmando a estrutura de A21 como sendo um derivado metilado da hyeronimona (A-). Os íons fragmentos de  $m/z$  336 apresentaram-se como os mesmos de A-4, onde a única diferença observada foi na primeira fragmentação com a perda de  $CH_3OH$  ao invés de  $H_2O$ . O número de grupos  $CH_2$  da cadeia lateral foi calculado como sete, idêntico aos alcaloides de cadeia alquílica lateral com grupo metil terminal discutidos anteriormente.



Principais correlações de HMBC

Através da análise dos dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  de A21 e a comparação destes com a literatura (TINTO & BLYDEN, 1991), o alcaloide A21 foi identificado inequivocamente como sendo a metil-hyeronimona, isolado pela primeira vez de *Hyeronima alchorneoides*. Este alcaloide está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Waltheria* e na família Malvaceae. O valor de  $[\alpha]_D^{25} = +102^\circ$  (c 0,06;  $CHCl_3$ ), sugere a mesma estereoquímica da metil-hyeronimona reportada na literatura.

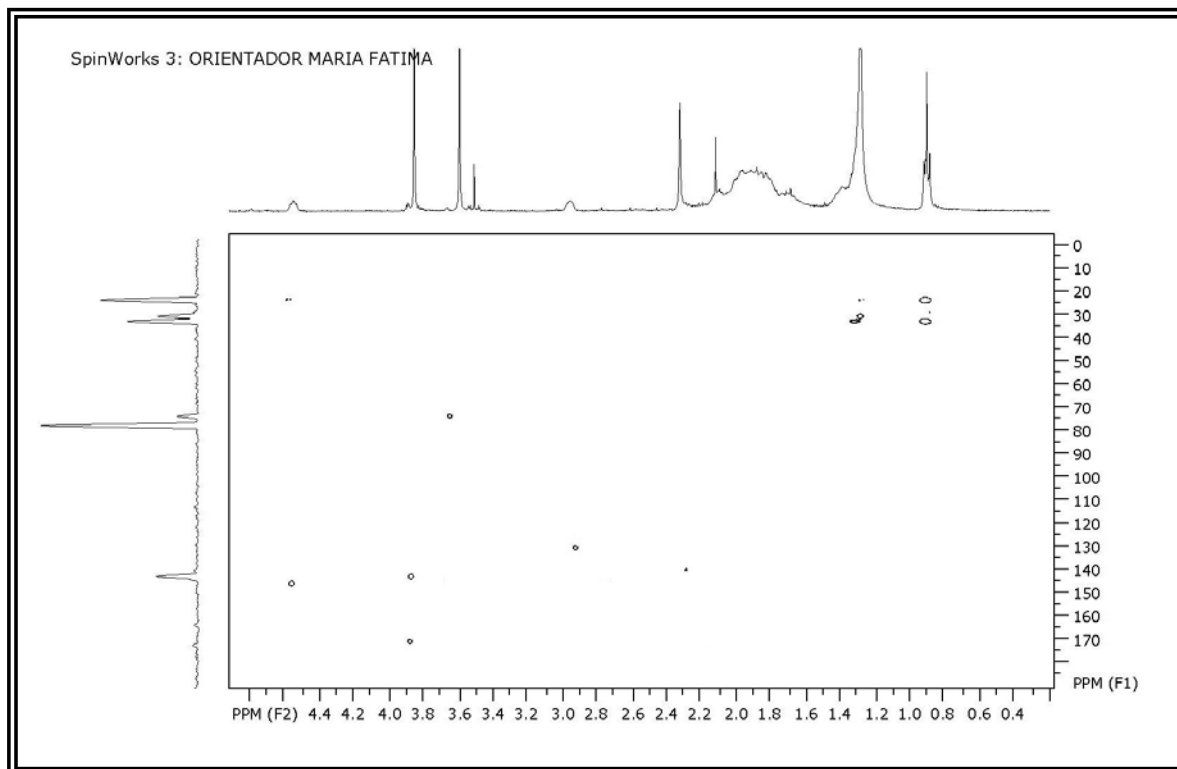
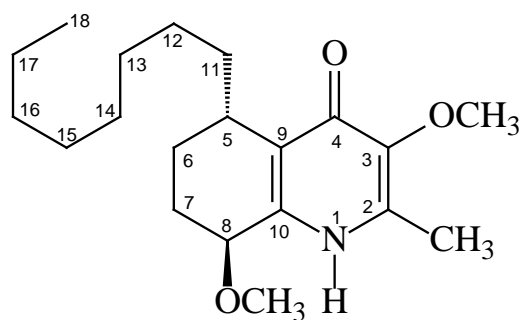


FIGURA 101. Mapa de correlações do espectro de HMBC de A21 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz;  $\delta_{\text{H}}$  0,2 – 4,8;  $\delta_{\text{C}}$  0 – 180)



Estrutura da metil-hyeronimona (A-21)

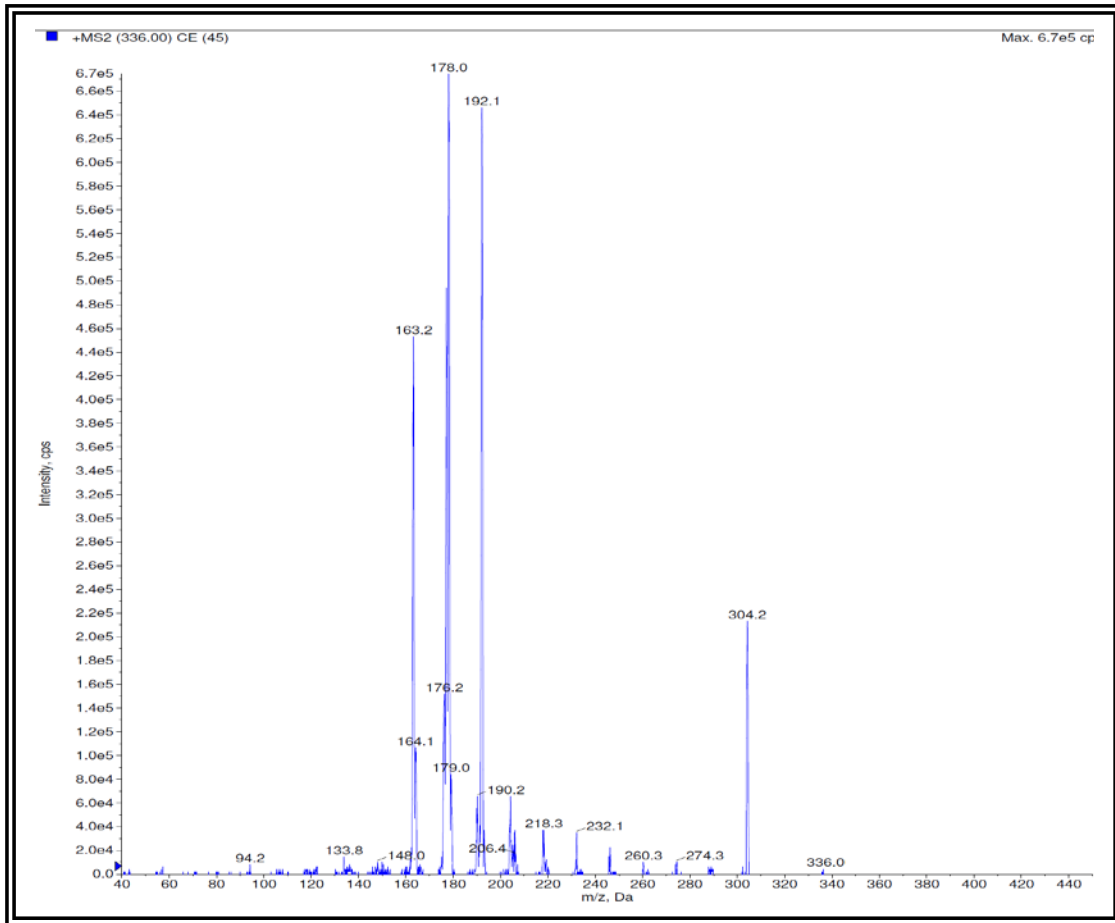


FIGURA 102. Espectro de massas de A-21 (ESI, modo positivo)

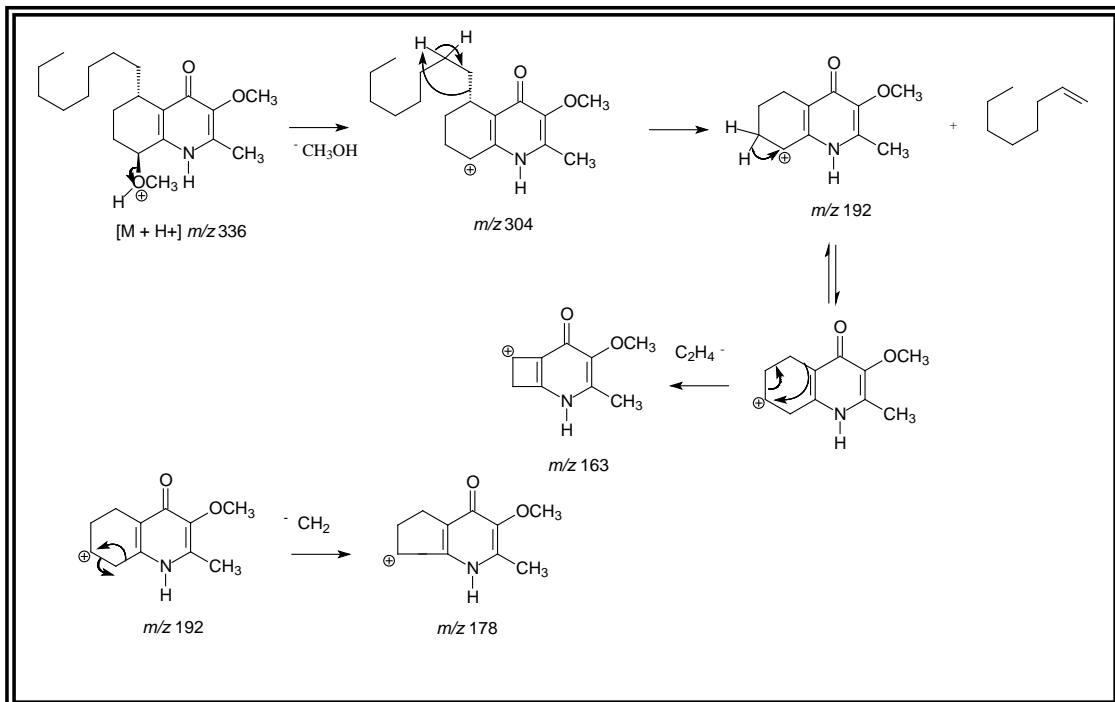


FIGURA 103. Propostas de fragmentação para A21

TABELA 32. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-21

Posição	A21 ( $\text{CDCl}_3$ )		metil-hyeronimona ( $\text{Lit}^{*1}$ ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 500 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 125 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	140,00	-	138,96
3	-	144,00	-	144,95
4	-	171,28	-	171,80
	2,90 ( <i>m</i> )	31,25	2,93 ( <i>m</i> )	31,89
6a	1,62 ( <i>m</i> )	24,85	1,62 ( <i>m</i> )	25,85
6b	1,96 ( <i>m</i> )		1,94 ( <i>m</i> )	
7a	4,23	23,00	1,94 ( <i>m</i> )	23,21
7b	1,69 ( <i>m</i> )		2,10 ( <i>m</i> )	
8	2,14 ( <i>m</i> )	71,83	4,58 ( <i>tl</i> )	72,15
9	-	129,00	-	129,08
10	-	146,72	-	146,0
11a	1,75 (sobreposto)	31,85	1,75 ( <i>m</i> )	31,92
11b	1,25 (sobreposto)		1,25 (sobreposto)	
12-17	1,25 – 1,80	22,20 – 32,0	1,25 – 1,90	22,69 – 32,27
18	0,87 ( <i>t</i> , 7,0)	14,00	0,86 ( <i>t</i> , 7,0)	14,11
2-C- $\text{CH}_3$	2,30 ( <i>s</i> )	14,00	2,34 ( <i>s</i> )	14,05
3-O- $\text{CH}_3$	3,89 ( <i>s</i> )	60,60	3,78 ( <i>s</i> )	59,96
8-O $\text{CH}_3$	3,60 ( <i>s</i> )	57,46	3,60 ( <i>s</i> )	57,46
N-H	NO $^{*2}$	-	NP $^{*2}$	NP $^{*2}$

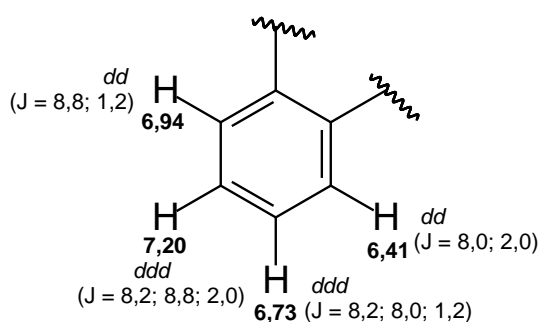
\*<sup>1</sup>(TINTO & BLYDEN, 1991).\*<sup>2</sup>Não publicado ou não observado

#### 4.1.12. Identificação do alcaloide A16

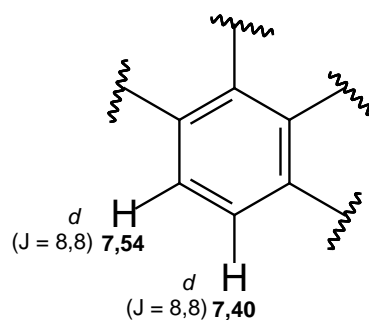
A substância A16 foi isolada das fases diclorometano da raiz e caule e da fase hexânica do caule de *Waltheria brachypetala*. Esta substância apresentou-se como sólido branco amorfo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A16 apresentou sinais de simpletos integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,79 e 2,41 característicos do da metoxila na posição 3 e da metila na posição 2 núcleo quinolônico dos alcaloides anteriormente discutidos. Este espectro apresentou ainda sete sinais com multiplicidades bem definidas na região dos hidrogênios aromáticos, quatro sinais de multipletos entre  $\delta$  2,00 – 2,43, um duplo-duplete em  $\delta$  4,69 ( $J = 2,0; 8,4$ ), dois simpletos em  $\delta$  5,08 e 10,6 e um sinal de simpleto integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,99; sendo este característico de grupo metoxila.

Através da análise das multiplicidades e do cálculo das constantes de acoplamento dos hidrogênios na região dos aromáticos foi possível propor dois sistemas de *spins* de hidrogênios aromáticos na estrutura de A16. No primeiro sistema de *spins* têm-se dois hidrogênios com multiplicidade duplo-duplo-duplete (*ddd*) em  $\delta$  6,73 e  $\delta$  6,20 e dois hidrogênios com multiplicidade duplo-duplete (*dd*), sendo possível propor a presença de um anel aromático orto-di-substituído na estrutura de A16. No segundo sistema de *spins* têm-se dois dupletos em  $\delta$  7,40 e 7,54 com constante de acoplamento de 8,8 Hz sugerindo a presença de um anel aromático orto-tetra-substituído. Para os demais sinais de hidrogênios verificados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-16 não foi possível atribuir correlações de acoplamento via calculo de  $J$ , sendo utilizado assim o mapa de correlações do espectro de COSY.



**Sistema de spins 1**



**Sistema de spins 2**

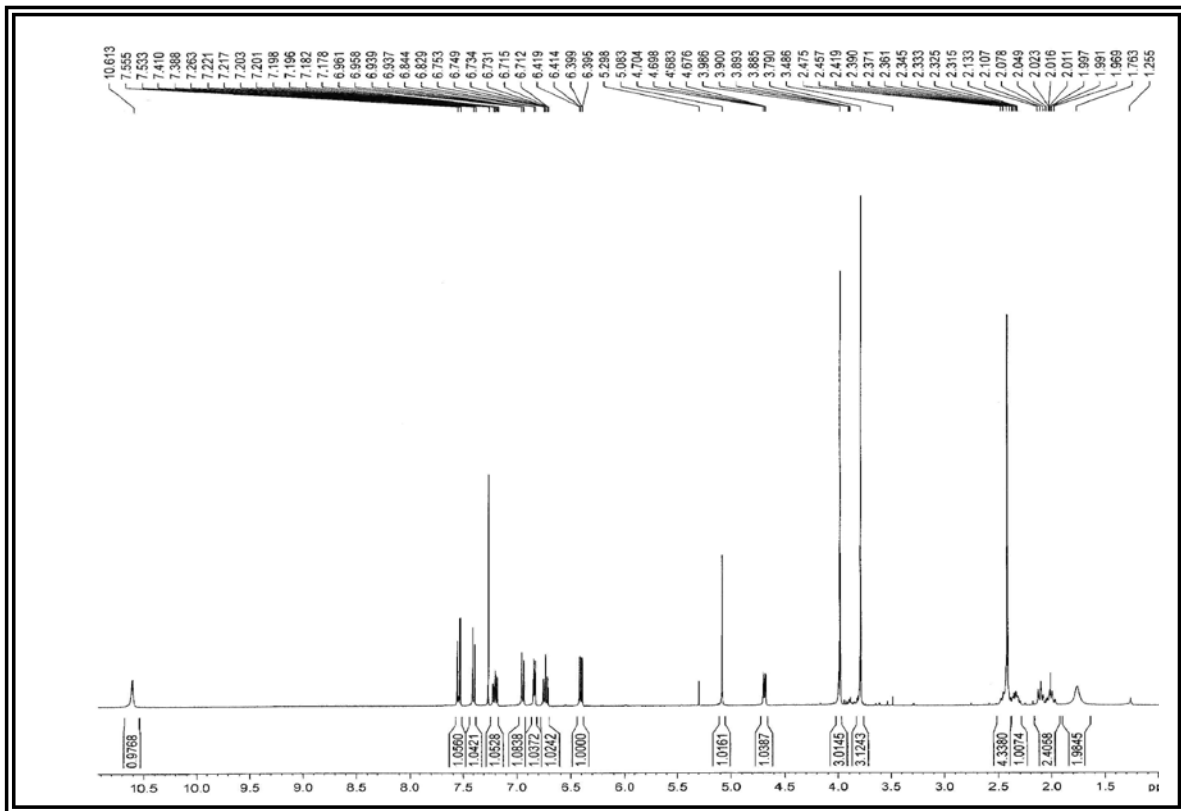


FIGURA 104. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-16 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

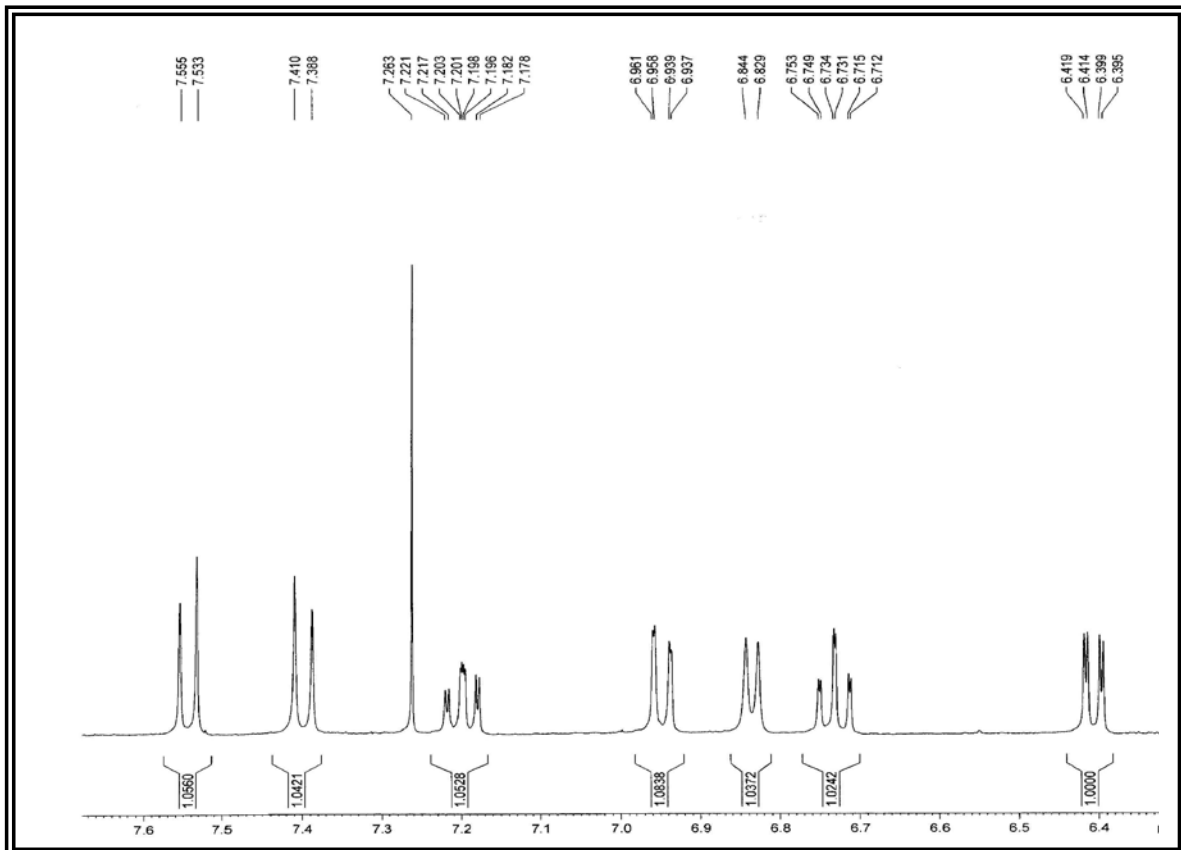


FIGURA 105. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-16 ( $\delta$  6,4 – 7,6)

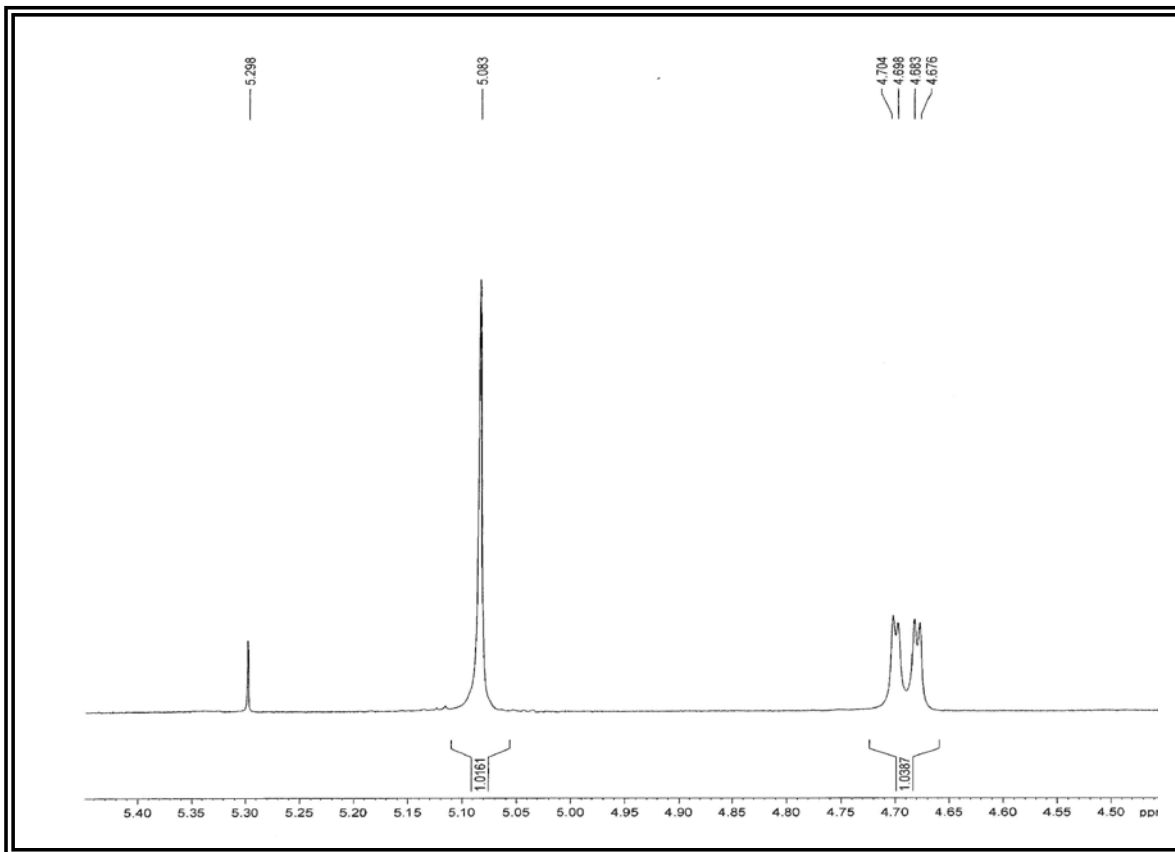


FIGURA 106. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A16 ( $\delta$  4,50 – 5,40)

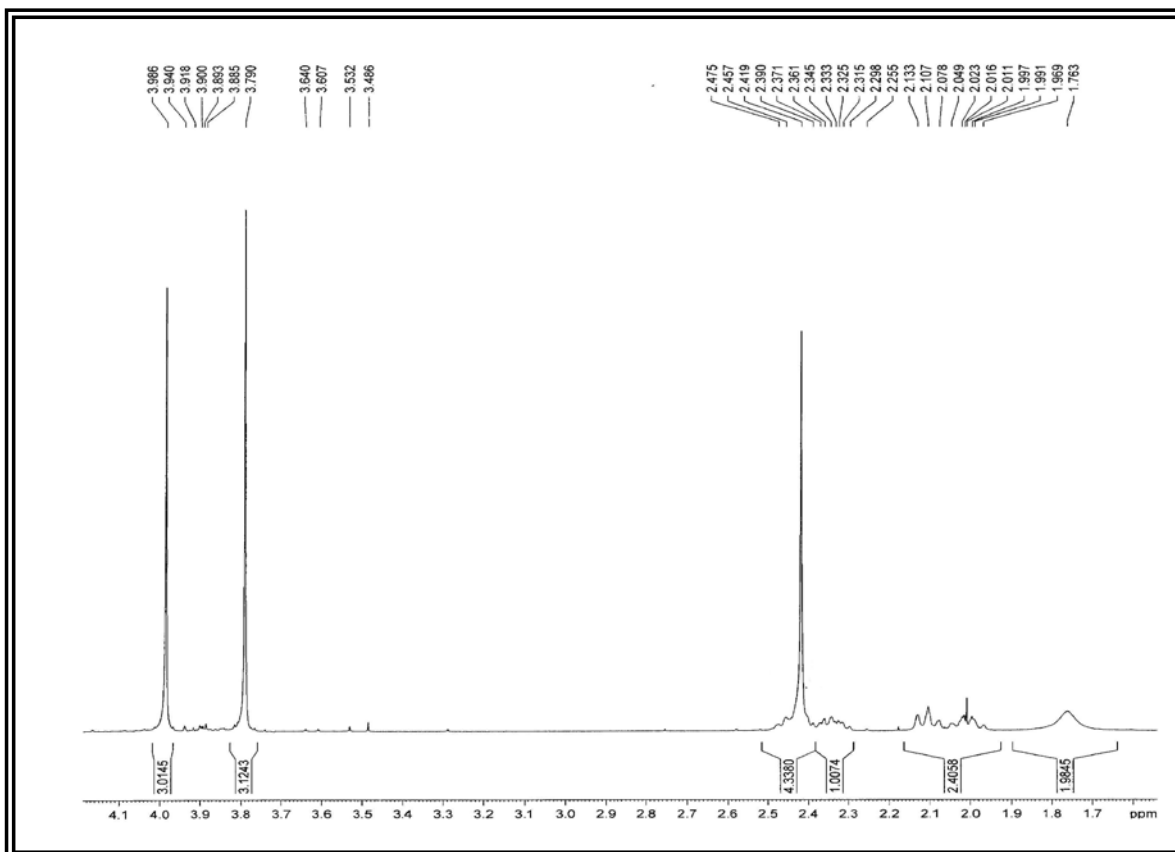


FIGURA 107. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-16 ( $\delta$  1,7 – 4,1)



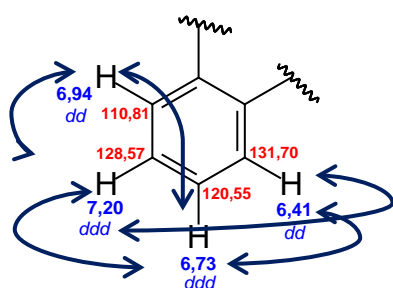
Através da análise do mapa de correlações do espectro de COSY confirmou-se o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos referentes aos sistemas de *spins* 1 e 2 atribuídos a partir dos cálculos de  $J$  e análise das multiplicidades dos sinais. Verificou-se ainda neste espectro um terceiro sistema de *spins* com o acoplamento dos multipletos referentes aos hidrogênios que absorvem em campo alto, sendo que o multipletto referente ao hidrogênio em  $\delta$  2,35 acopla com o dupletto referente ao hidrogênio em  $\delta$  6,84, enquanto que o multipletto referente ao hidrogênio em  $\delta$  2,01 acopla com o duplo-dupletto referente ao sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,69 sugerindo-se que os hidrogênios que absorvem em  $\delta$  6,84 e 4,69 estariam espacialmente separados pelos hidrogênios referentes aos multipletos em campo alto.

Uma maior compreensão da terceira parte da estrutura de A16 deu-se através da análise do mapa de correlações do espectro de HSQC. Através deste foi possível atribuir todos os deslocamentos químicos dos sinais de carbonos hidrogenados. Verificou-se neste espectro que o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,84 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  75,59 descartando-se a possibilidade deste hidrogênio ser aromático, sendo este oxi-metínico; assim como o hidrogênio em  $\delta$  4,69 que correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  80,07.

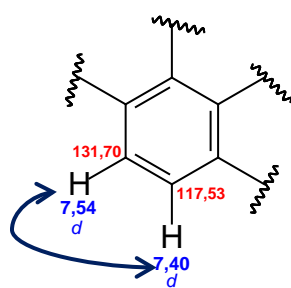
Observou-se ainda neste espectro dois grupos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos. Os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,11 e  $\delta$  2,35 correlacionaram com o sinal de carbono metilênico em  $\delta$  34,08 enquanto que os sinais de hidrogênio em  $\delta$  2,01 e  $\delta$  2,43 correlacionaram com o sinal de carbono metilênico em  $\delta$  22,21.

Não foram observadas correlações com sinais de carbono no espectro de HSQC para os hidrogênios em  $\delta$  5,08 e 10,60 sugerindo a possibilidade de tratar-se de hidroxila e N-H, respectivamente.

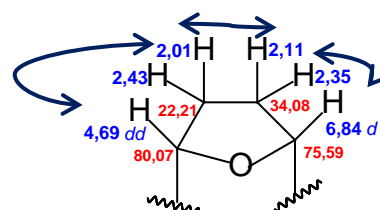
Através da análise conjunta dos espectros de COSY e HSQC foi possível propor uma estrutura parcial para o terceiro sistema de spins, onde os carbonos em  $\delta$  80,07 e 75,59 estariam unidos por uma ponte éter.



Sistema de spins 1



Sistema de spins 2



Sistema de spins 3

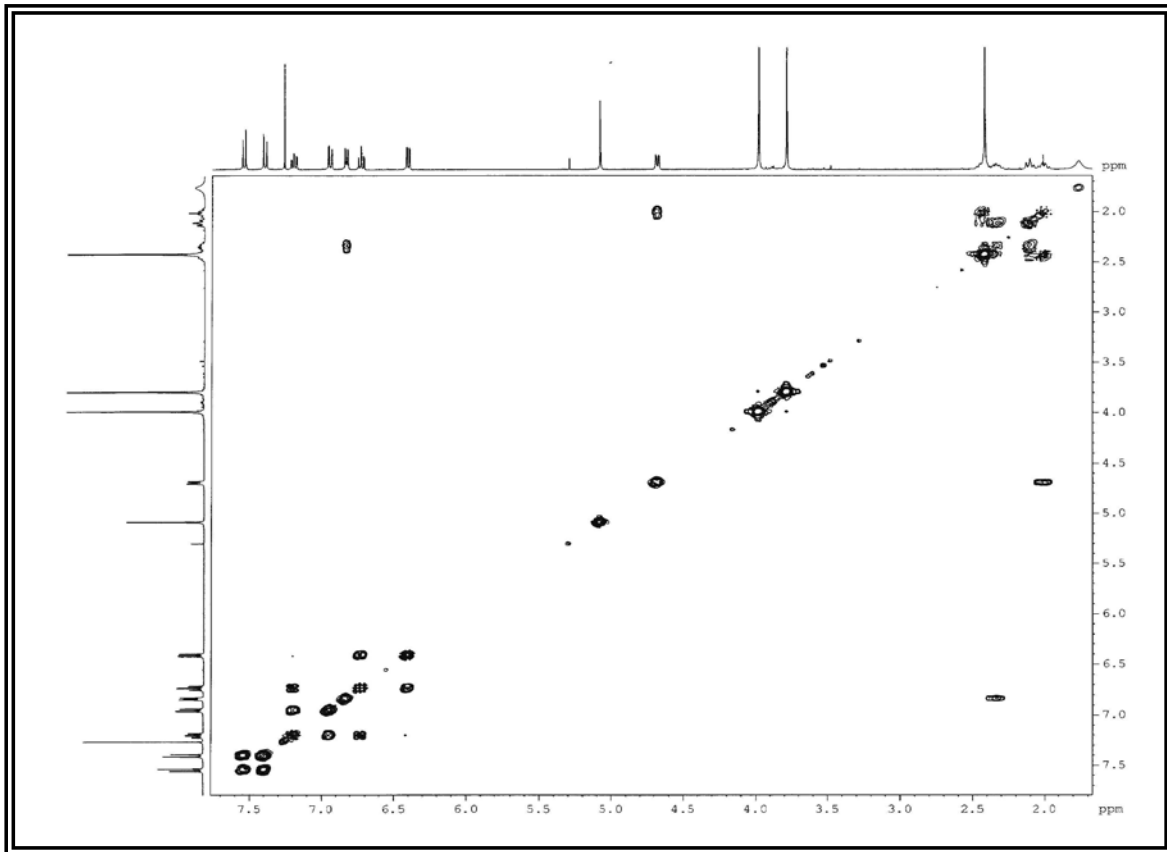


Figura 108. Mapa de correlação do  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A16 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

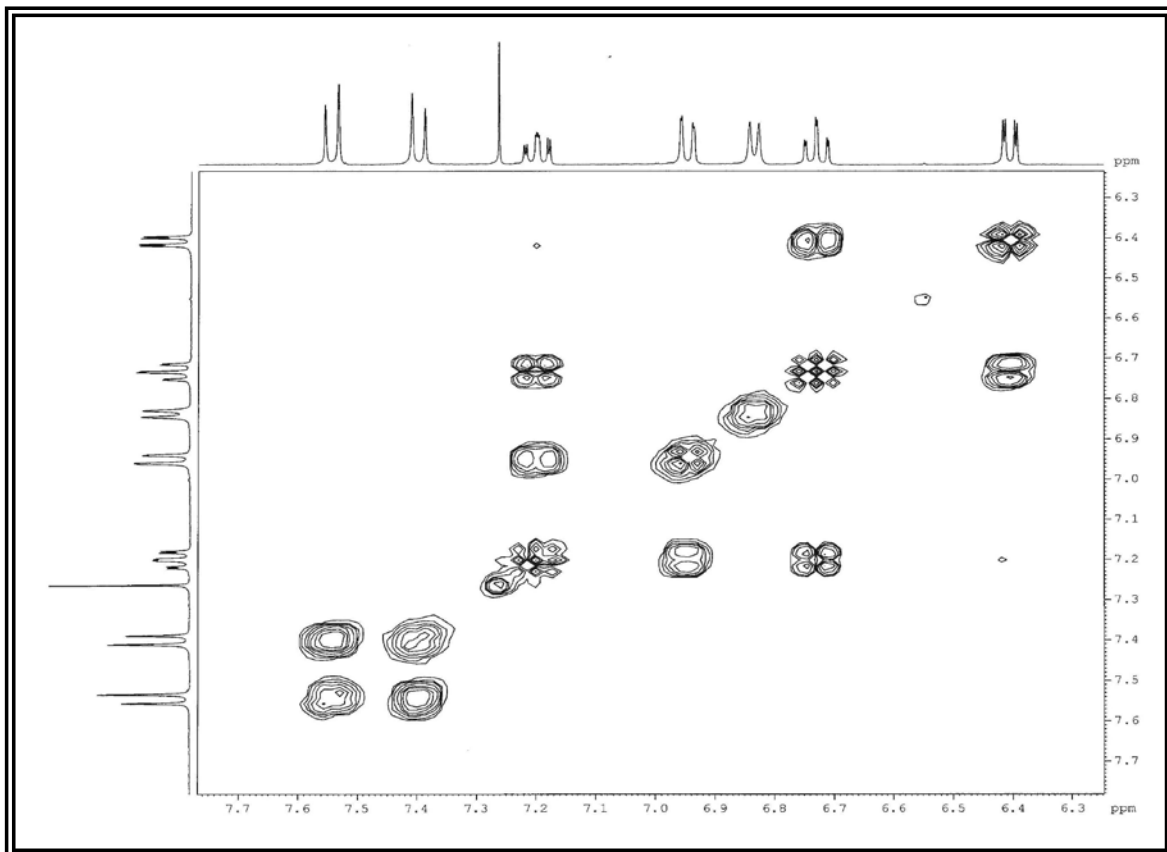


FIGURA 109. Mapa de correlação do  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A16 ( $\delta$  6,3 – 7,7)

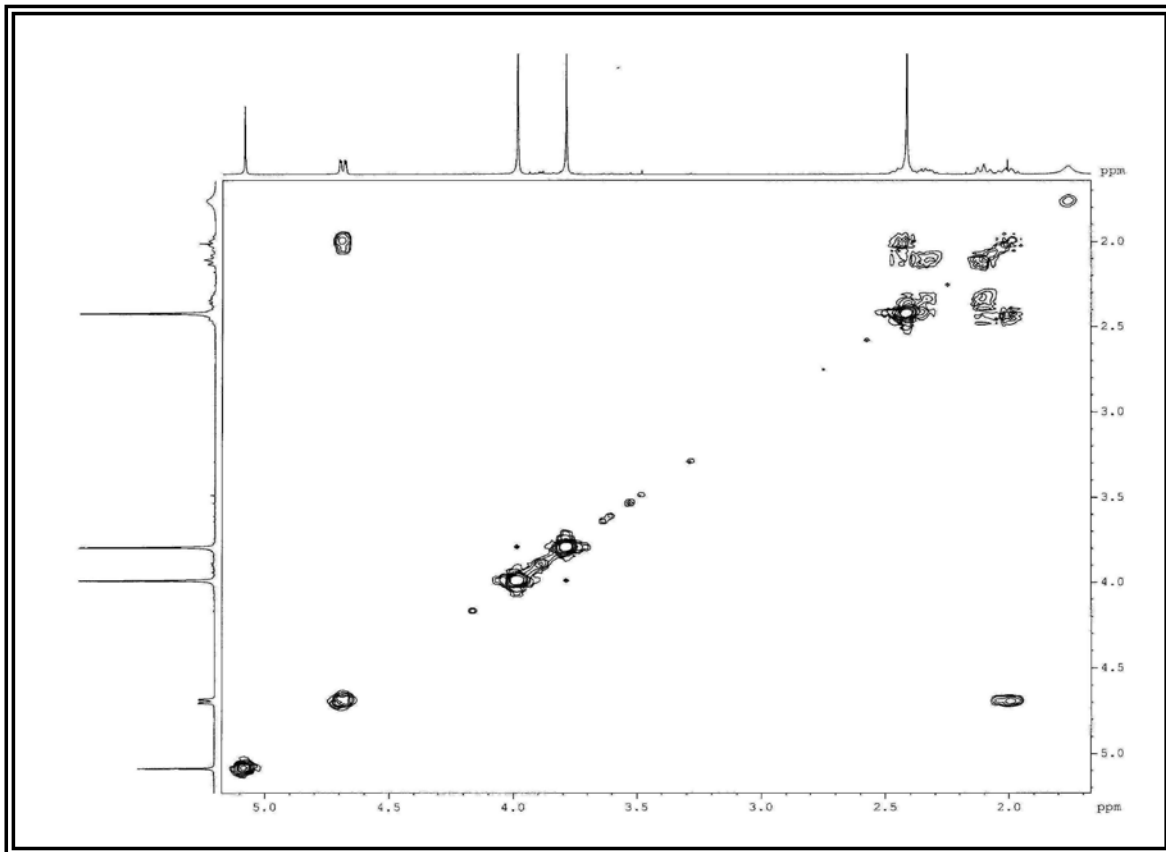


FIGURA 110. Ampliação de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A16 ( $\delta$  1,5 – 5,2)

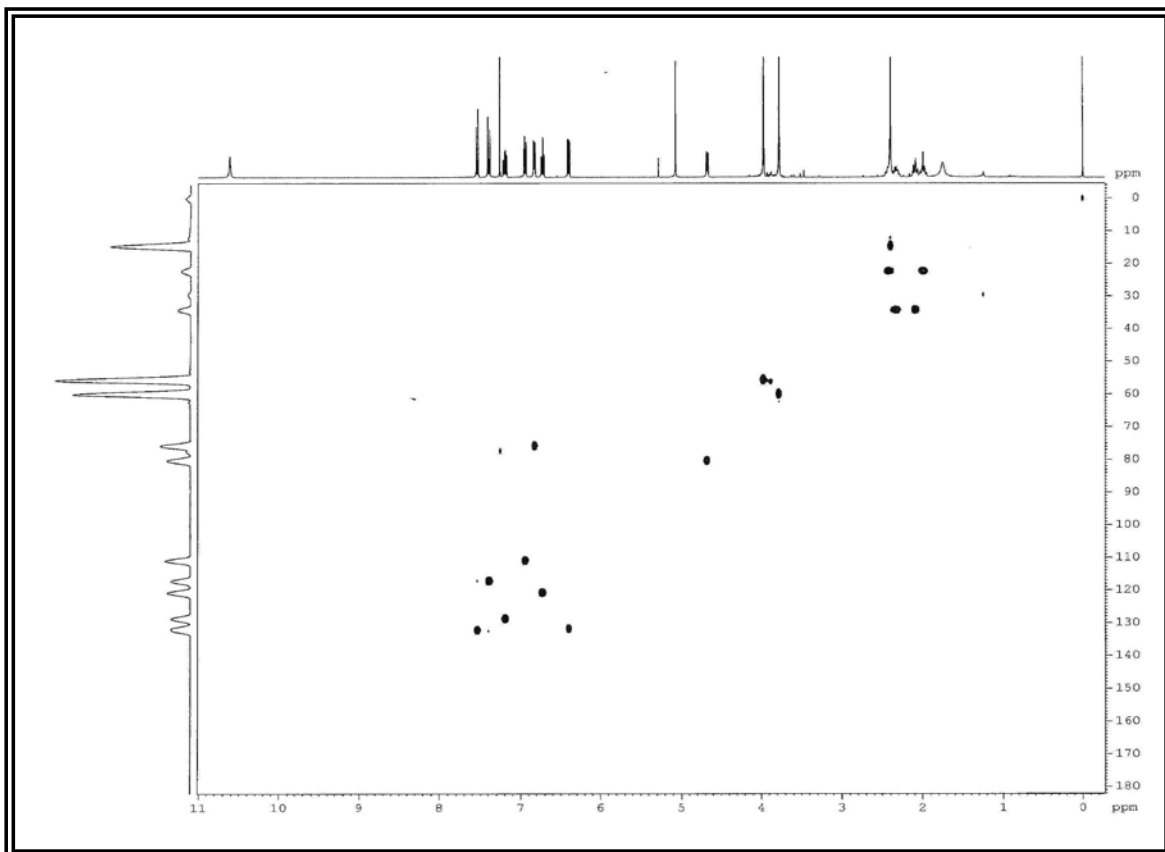


FIGURA 111. Mapa de correlação do HSQC de A16 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

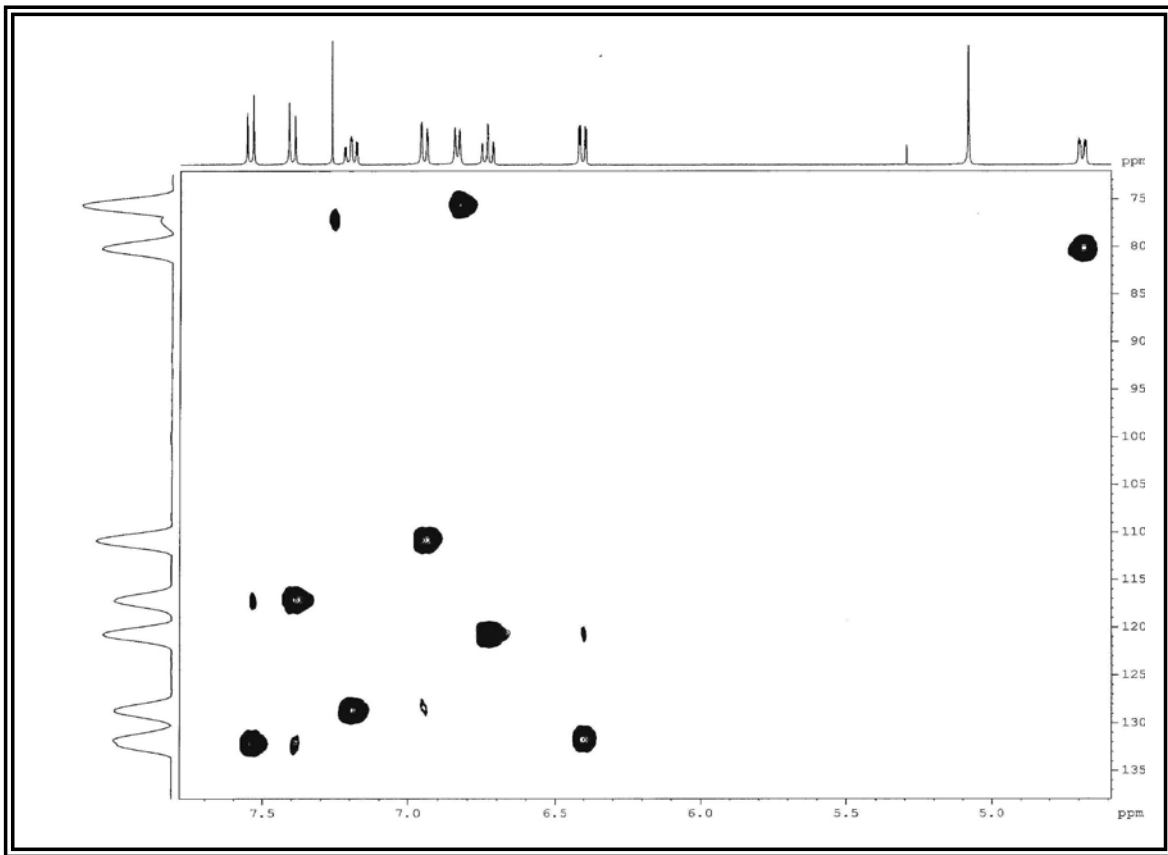


FIGURA 112. Mapa de correlação do HSQC de A-16 ( $\delta_H$  4,5-7,8;  $\delta_C$  75-135)

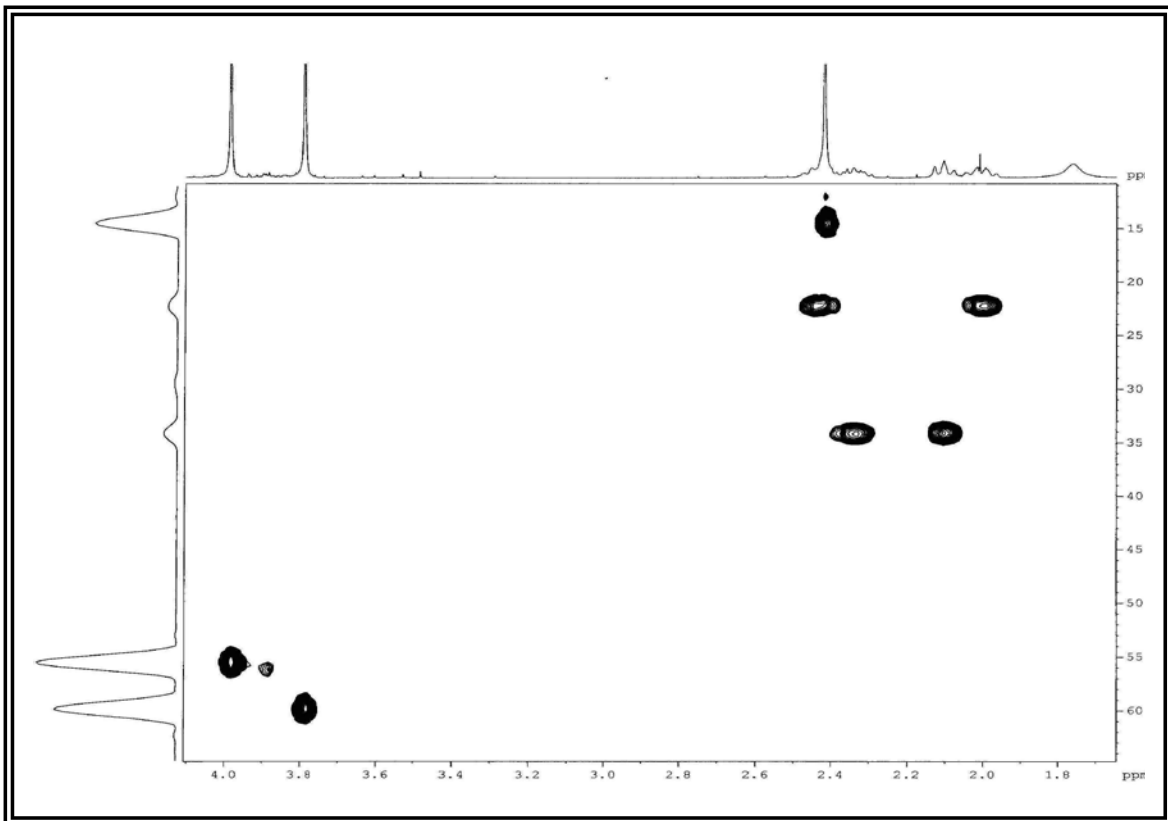


FIGURA 113. Mapa de correlação do espectro de HSQC de A16 ( $\delta_H$  1,0-4,0;  $\delta_C$  10-65)

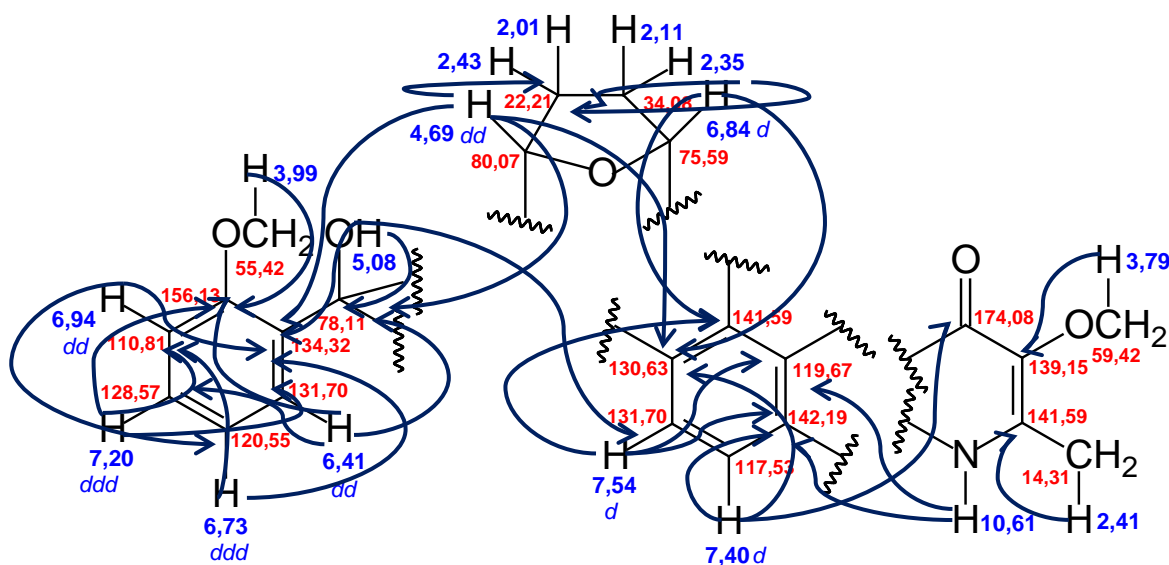
O mapa de correlações do espectro de HMBC de A16 apresentou informações de correlações a *J*-2, *J*-3 e *J*-4 importantes para a identificação da estrutura de A16. Os sinais de hidrogênio em  $\delta$  6,41, 6,94 e 7,20 apresentaram correlação com um sinal de carbono oxigenado em  $\delta$  156,13, e, uma vez que o sinal de metoxila em  $\delta$  3,99 também apresentou correlação com este carbono, verificou-se que no anel aromático orto-di-substituído referente ao sistema de spins 1, uma das substituições é o grupo metoxila.

Neste espectro os sinais de hidrogênio em  $\delta$  6,73 e 6,94 apresentaram correlação com um carbono em  $\delta$  134,32, este último sinal de hidrogênio e um segundo em  $\delta$  6,41 apresentaram correlação com um sinal de carbono oxigenado em  $\delta$  78,11. Dado que o sinal de simpleto em  $\delta$  5,08 também correlacionou-se em *J*-2 com este sinal de carbono foi possível deduzir que o anel aromático orto-di-substituído está ligado a um carbono totalmente substituído hidroxilado.

O sinal de duplete em  $\delta$  7,40 apresentou correlação com dois sinais de carbonos em  $\delta$  130,63 e  $\delta$  142,19 e com um sinal de carbono em  $\delta$  174,08, este característico de carbonila de quinolin-4-onas; já o sinal de duplete em  $\delta$  7,54 apresentou correlação com os sinais de carbonos em  $\delta$  141,19, 119,67 e 142,19 sendo possível atribuir todos os sinais de carbono do anel tetra orto-substituído, outra correlação para este hidrogênio foi verificada com o carbono em  $\delta$  78,11 sugerindo que os dois anéis aromáticos encontram-se ligados ao carbono hidroxilado.

Observou-se ainda correlações importantes dos hidrogênios oxi-metínicos com sinais de carbono no espectro de HMBC. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,84 correlacionou-se com os sinais de carbono em  $\delta$  130,62 e 141,59 do anel tetra-orto-substituído, enquanto que o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,69 apresentou correlação com o carbono do anel orto-di-substituído em  $\delta$  134,32 e com o sinal de carbono do anel tetra-orto-substituído em  $\delta$  130,63. Essas correlações foram importantes para propor que o biciclo com ponte etér encontra-se geminado ao anel aromático tetra-orto-substituído. Outra importante correlação observada para este sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,69 foi com o sinal de carbono hidroxilado em  $\delta$  78,11, o que sugeriu a união das três partes propostas para a estrutura de A-16 através deste carbono.

Correlações importantes foram verificadas para o N-H com os sinais de carbono em  $\delta$  119,67 e 142,19 confirmando de forma inequívoca a estrutura do sistema quinolônico geminado ao anel tetra orto-substituído.



Correlações de HMBC de A16

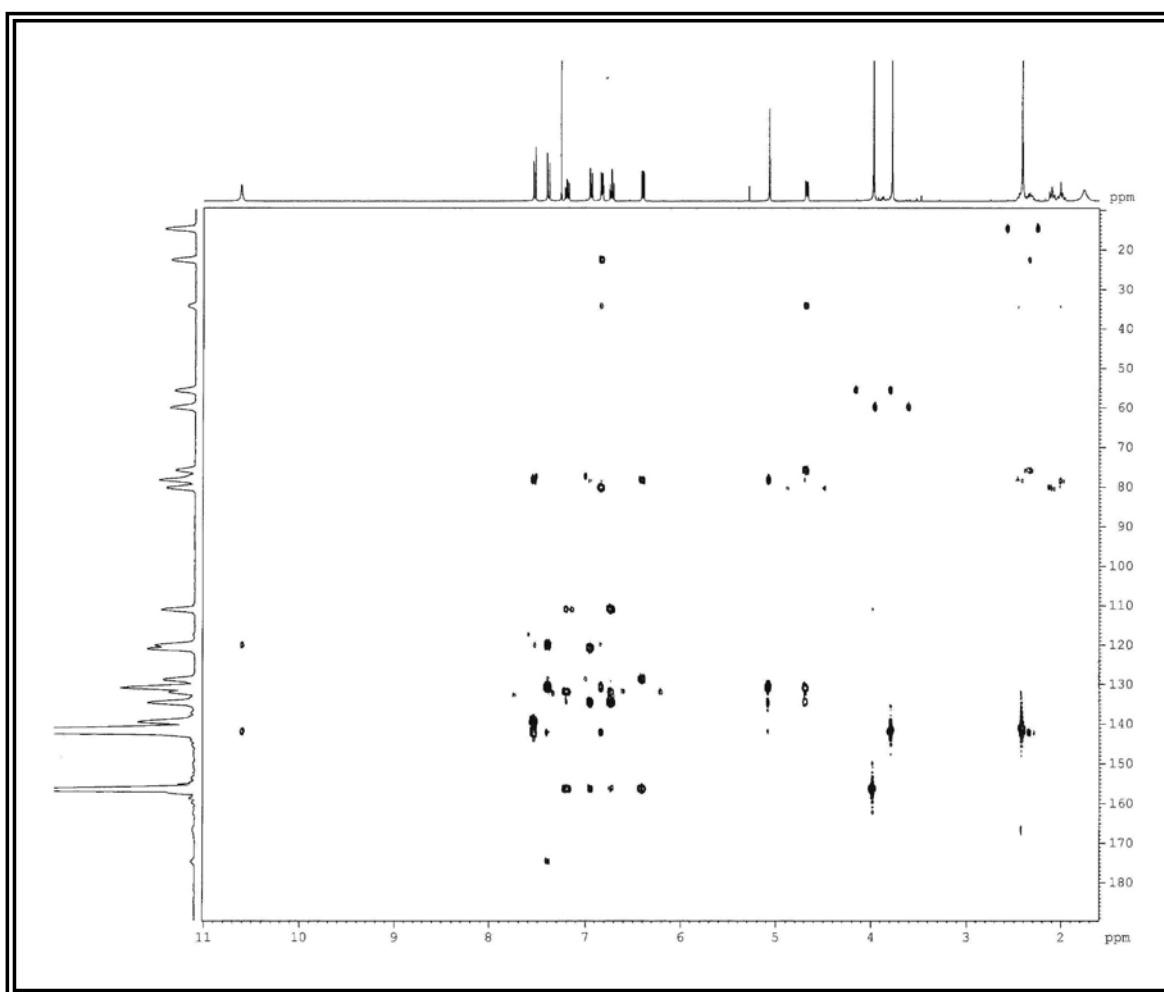


FIGURA 114. Mapa de correlações do espectro de HMBC de A16 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

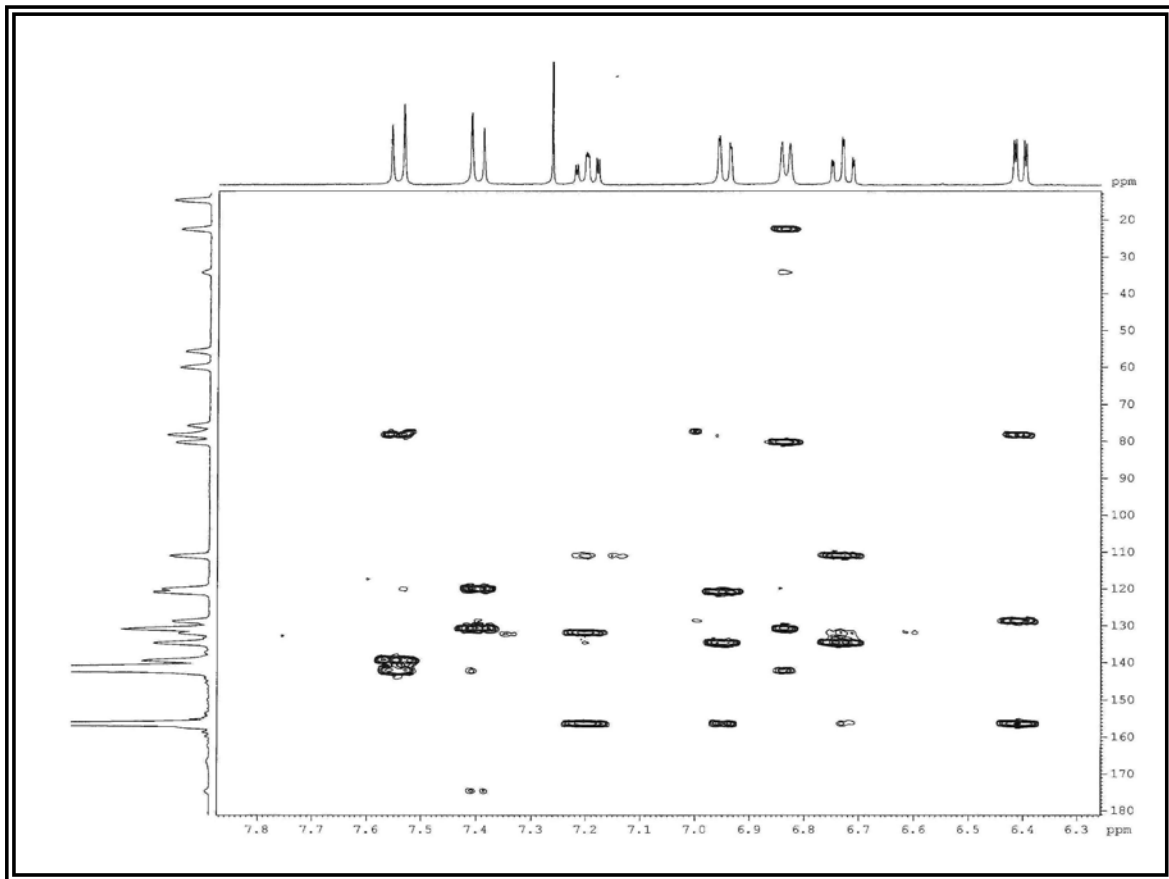


FIGURA 115. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_H$  6,3-7,8;  $\delta_C$  20-180)

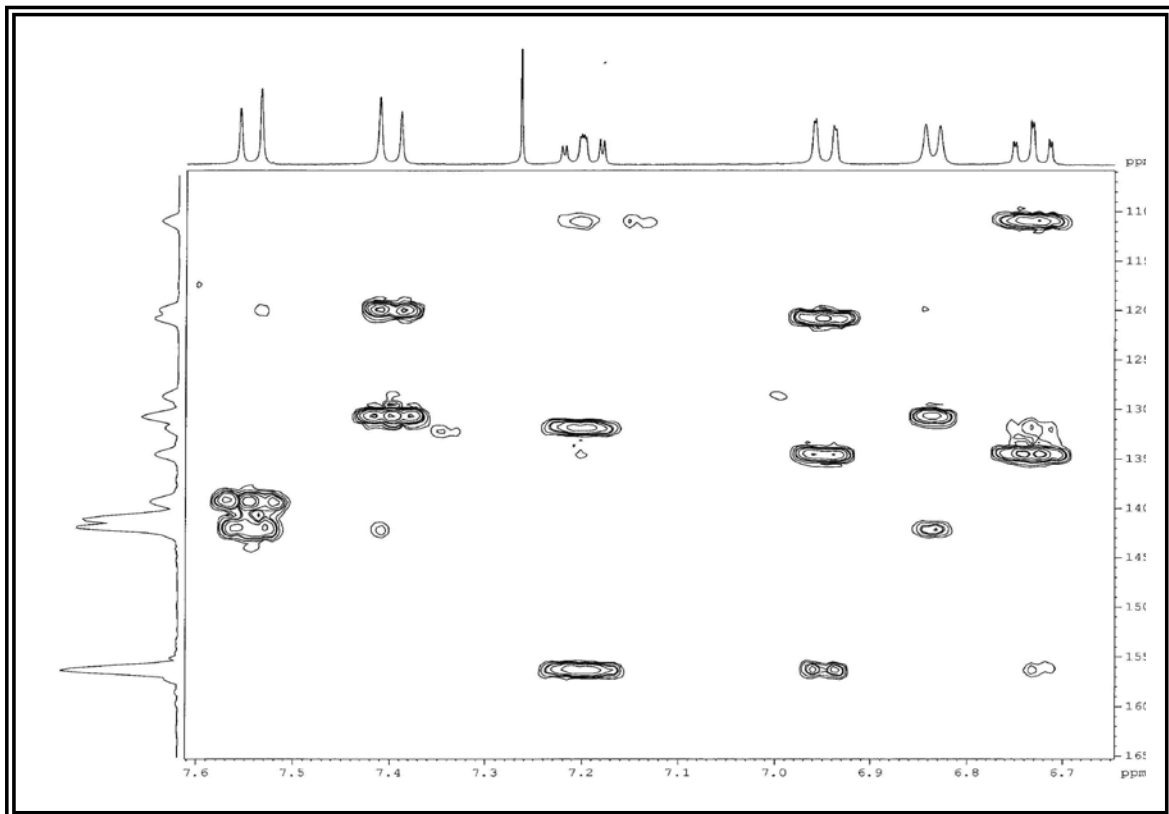


FIGURA 116. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_H$  6,7-7,6;  $\delta_C$  110-165)

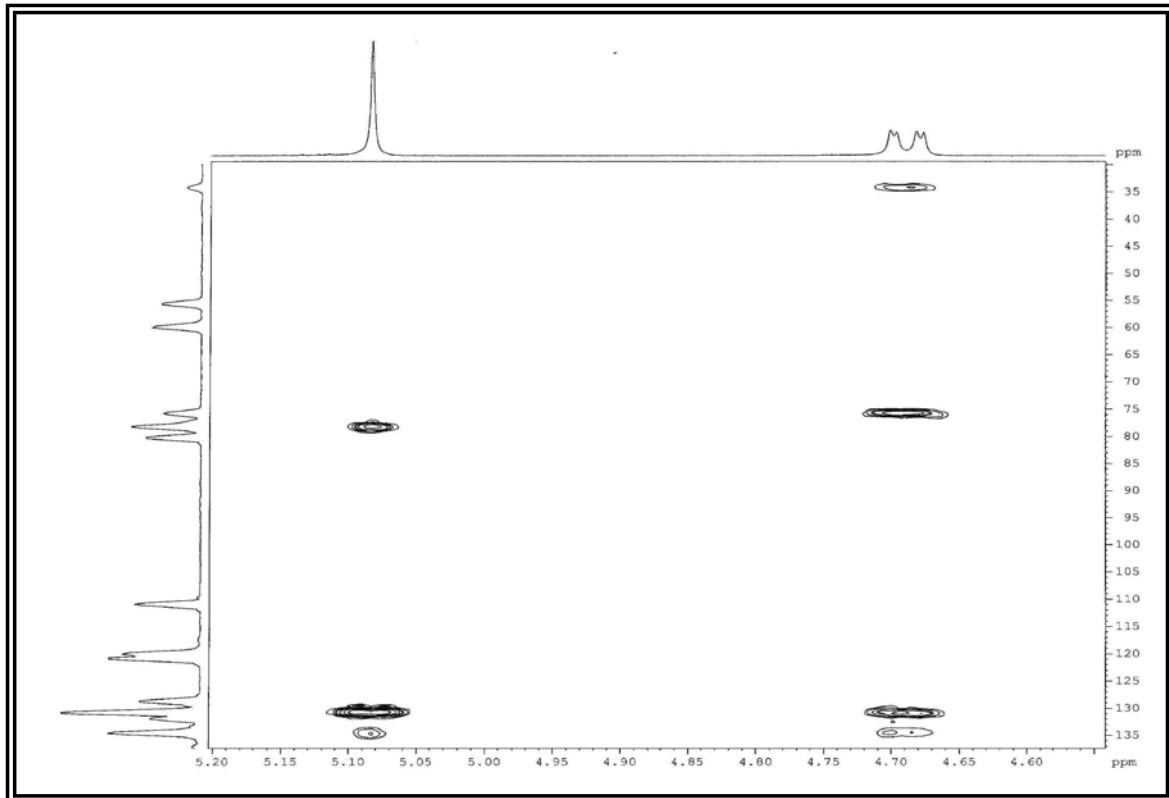


FIGURA 117. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_H$  4,6-5,2;  $\delta_C$  35-135)

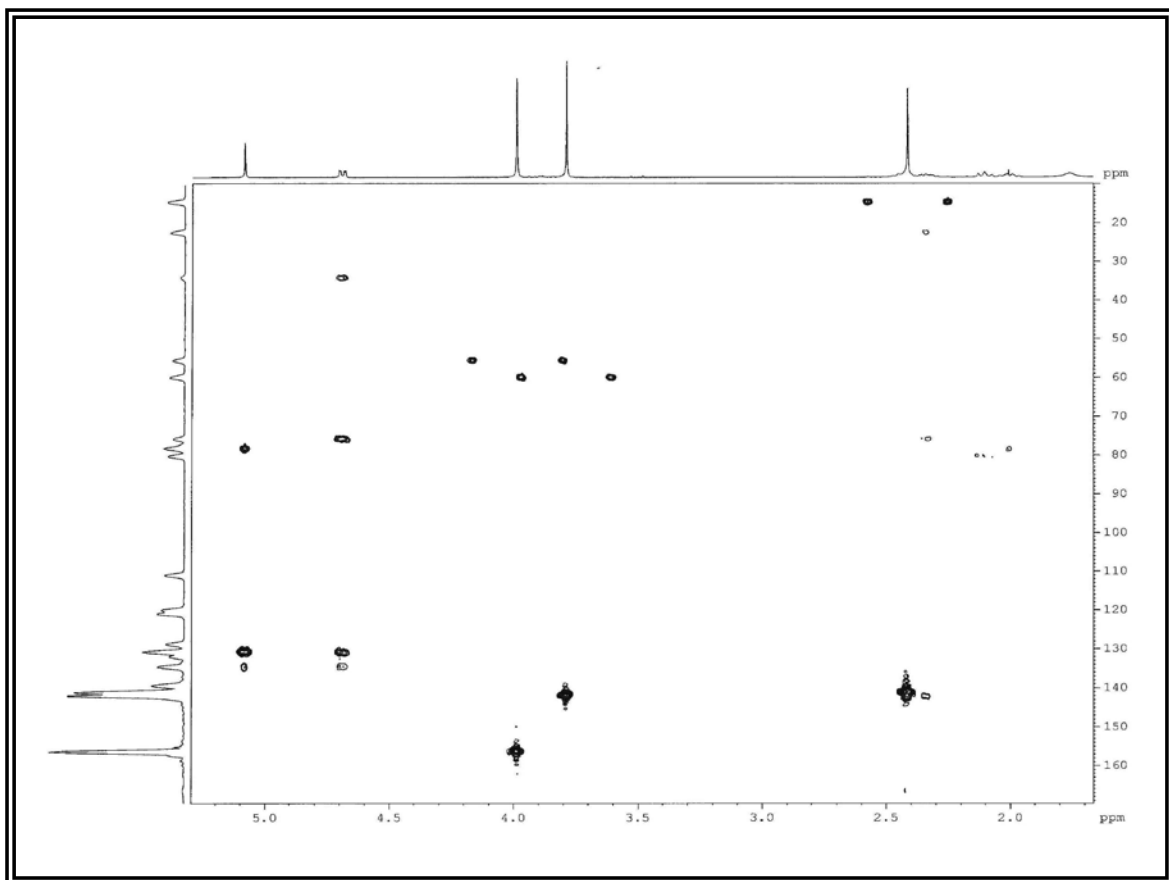


FIGURA 118. Mapa de correlações do HMBC de A16 ( $\delta_H$  1,5-5,3;  $\delta_C$  20-160)



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirmou todos os sinais de carbono da estrutura de A-16 com seus respectivos deslocamentos químicos, enquanto que o espectro de massas de A-16 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  394 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ .

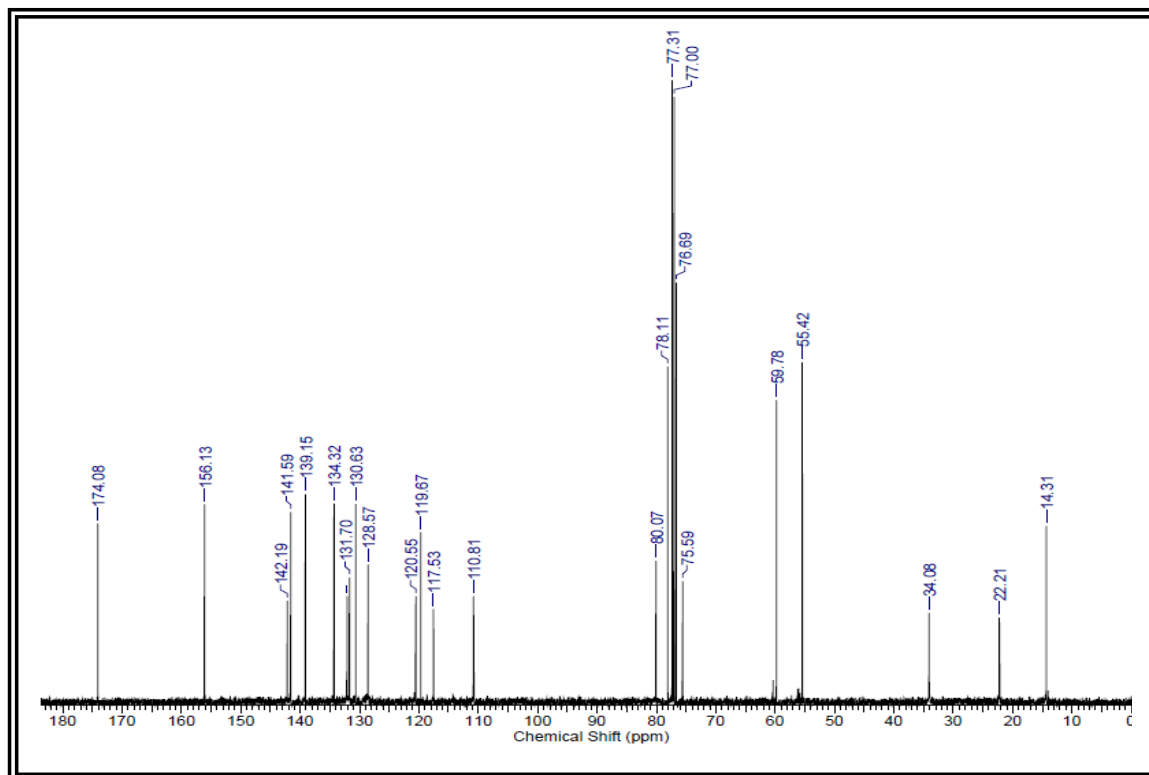


FIGURA 119. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A16 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

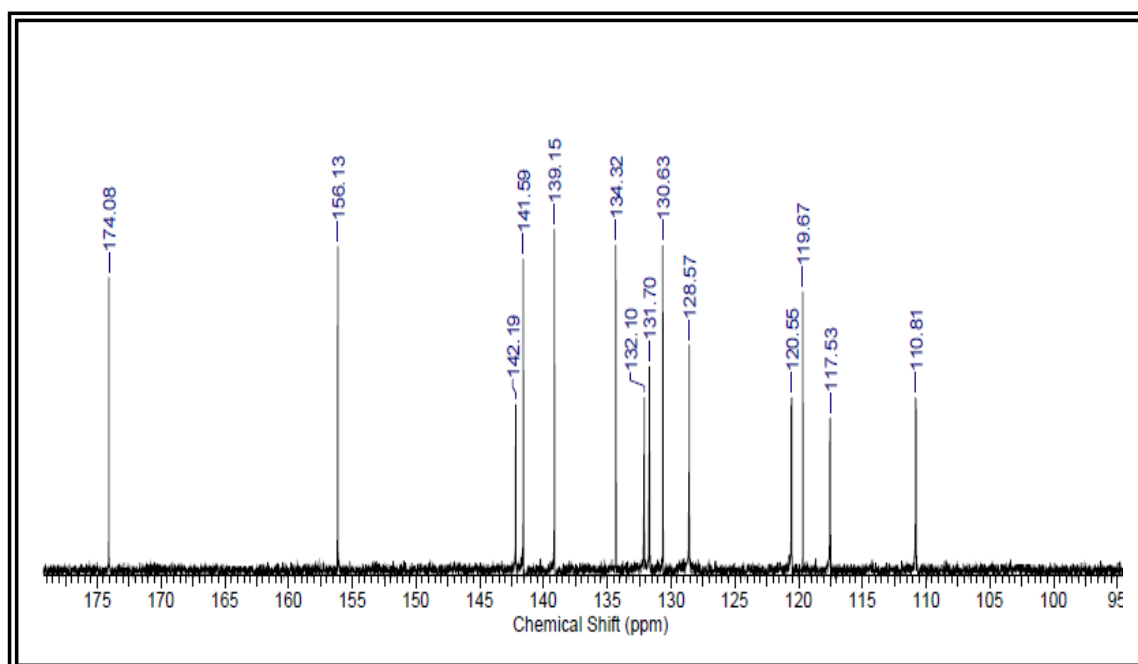


FIGURA 120. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A16 ( $\delta$  95 – 175)

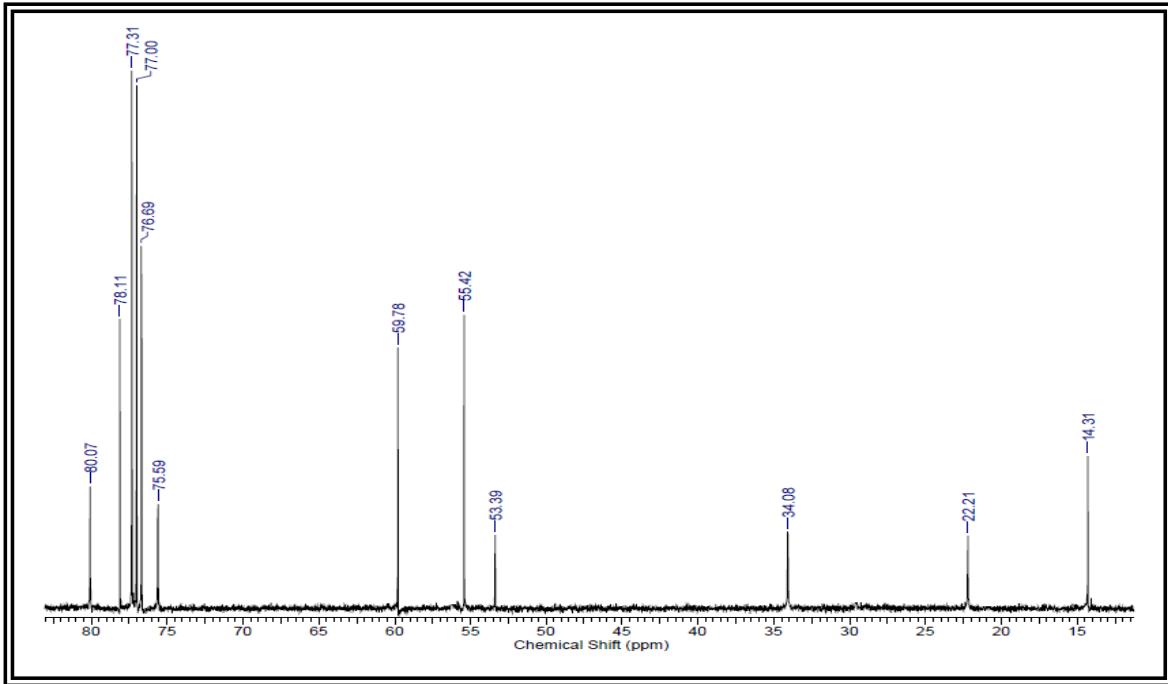


Figura 121. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A-16 ( $\delta$  14 – 81)

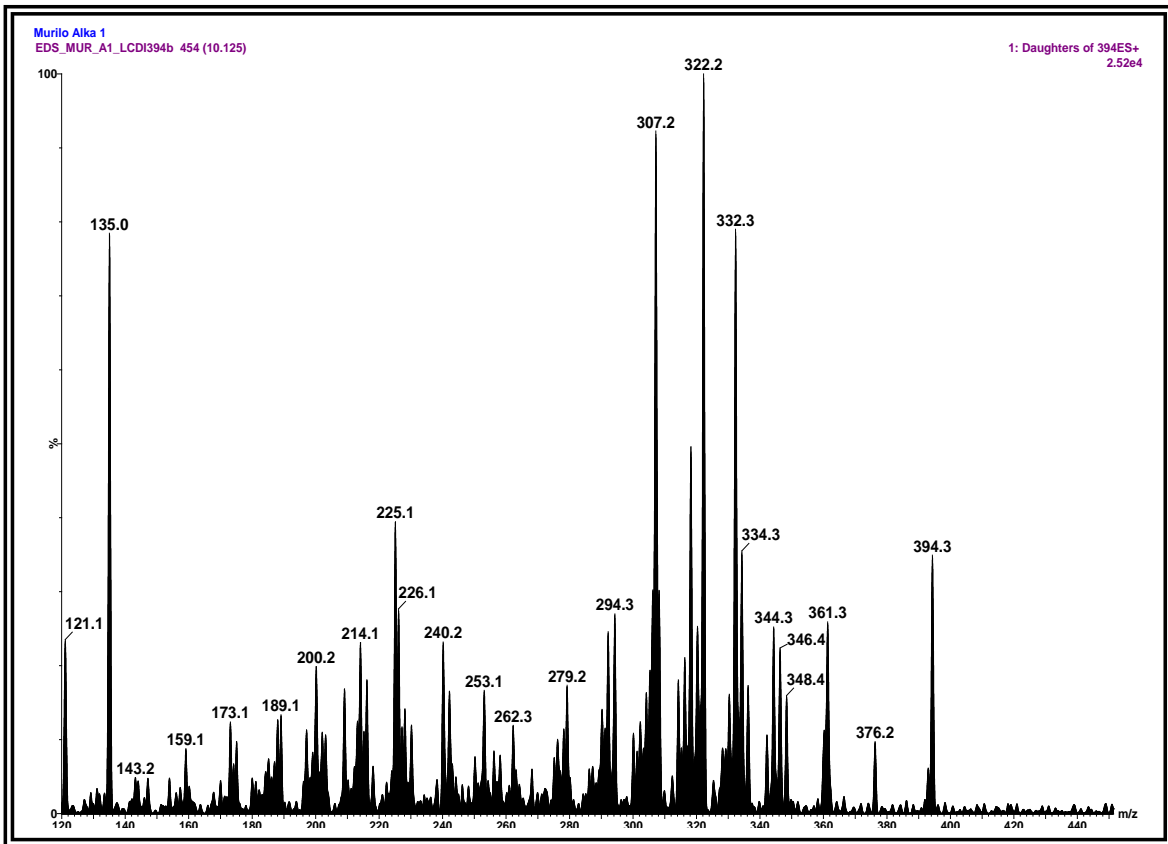
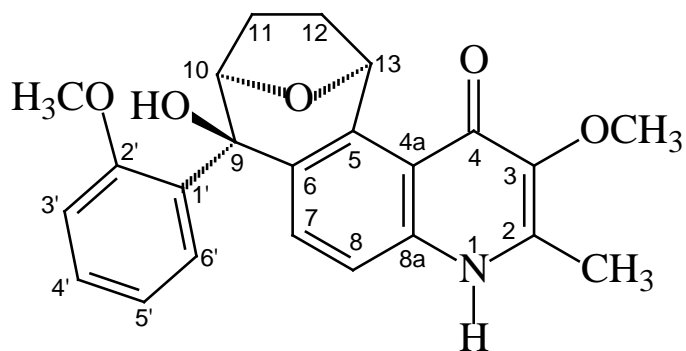


FIGURA 122. Espectro de massas de A16 (ESI, modo positivo)

Através da análise e interpretação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) de A-16 e comparação com dados anteriormente reportados na literatura (HOELZEL *et. al.*, 2005) a substância A-16 foi identificada inequivocamente como sendo o alcaloide waltheriona A. Este alcaloide foi isolado pela primeira vez da espécie *Waltheria douradinha* (HOELZEL *et. al.*, 2005). Posteriormente foi relatado também a ocorrência deste alcaloide nas espécies *Melochia chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007a) e *Melochia odorata* (EMILLE *et. al.*; 2007). Lima e colaboradores já haviam reportado a ocorrência deste alcaloide nas folhas de *W. brachypetala* (LIMA *et. al.*; 2009). A estereoquímica da waltheriona A será discutida no ítem 4.1.20.



**Estrutura da waltheriona A (A-16)**

TABELA 33. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-16

Posição	A-16 ( $\text{CDCl}_3$ )		waltheriona A (Lit <sup>*1</sup> ) ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	141,59	-	141,60
3	-	139,15	-	139,30
4	-	174,08	-	174,40
4a	-	119,67	-	119,80
5	-	141,59	-	141,70
6	-	130,63	-	130,50
7	7,54 ( <i>d</i> ; 8,8)	131,70	7,48 ( <i>d</i> ; 8,2)	131,80
8	7,40 ( <i>d</i> ; 8,8)	117,53	7,41 ( <i>d</i> ; 8,2)	117,40
8a	-	142,19	-	141,80
9	-	78,11	-	77,20
10	4,69 ( <i>dd</i> ; 8,4; 2,0)	80,07	4,61 ( <i>dd</i> ; 7,8; 1,5)	80,16
11a	2,35 ( <i>m</i> )	22,21	2,34 ( <i>m</i> )	21,60
11b	2,11 ( <i>m</i> )		2,10 ( <i>m</i> )	
12a	2,43 ( <i>m</i> )	34,08	2,40 ( <i>m</i> )	33,70
12b	2,01 ( <i>m</i> )		1,99 ( <i>m</i> )	
13	6,84 ( <i>d</i> ; 6,0)	75,59	6,87 ( <i>d</i> ; 8,0)	75,60
1'	-	134,32	-	134,70
2'	-	156,13	-	156,40
3'	6,94 ( <i>dd</i> ; 8,2; 1,2)	110,81	6,94 ( <i>dd</i> ; 8,0; 1,3)	110,80
4'	7,20 ( <i>ddd</i> ; 8,8; 8,2; 2,0)	128,57	7,20 ( <i>ddd</i> ; 8,0; 7,5; 1,5)	128,50
5'	6,73 ( <i>ddd</i> ; 8,8;8,0; 1,2)	120,55	6,70 ( <i>ddd</i> ; 7,6;7,3; 1,5)	120,60
6'	6,41 ( <i>dd</i> ; 8,0;2,0)	131,70	6,29 ( <i>dd</i> ; 7,6;1,5)	131,10
2-C- $\text{CH}_3$	2,40 ( <i>s</i> )	14,31	2,41 ( <i>s</i> )	14,30
3-O- $\text{CH}_3$	3,79 ( <i>s</i> )	59,78	3,75 ( <i>s</i> )	59,20
2'-OCH <sub>3</sub>	3,99 ( <i>s</i> )	55,42	3,97 ( <i>s</i> )	55,40
N-H	10,60	-	12,00	-
9-OH	5,08 ( <i>s</i> )	-	5,10 ( <i>s</i> )	-

\*(HOELZEL *et. al.*; 2005)

#### 4.1.13. Identificação do alcaloide A11

A substância A-11 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *Waltheria brachypetala*. Esta apresentou-se como um sólido branco amorfo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA sugerindo-se a presença de hidrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 apresentou sinais bem semelhantes ao de A-16, com pouca diferença no deslocamento químico dos sinais de hidrogênio. Verificou-se neste espectro sinais de simpleto integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,83 e 2,42 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$ , respectivamente, sendo estes sinais característicos do núcleo quinolônico dos alcaloides discutidos anteriormente.

Na região de hidrogênios aromáticos observou-se grande semelhança com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-16, onde verificou-se sete sinais de hidrogênios, sendo dois dupletos em  $\delta$  7,49 e 7,53 acoplado em orto devido a constante  $J$  de 8 Hz, quatro sinais de hidrogênio entre  $\delta$  6,40 e 7,20 característicos de um anel aromático orto-disubstituído.

Verificou-se ainda neste espectro sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos entre  $\delta$  1,95 e  $\delta$  2,45 e os sinais de hidrogênios oxi-metínicos semelhantes à walthersona-A (A-16) em  $\delta$  6,83 e 4,69; além do sinal de hidrogênio de hidroxila em  $\delta$  5,10.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 não verificou-se o sinal referente ao N-H, enquanto que um sinal adicional de metila ligada a heteroátomo foi observado em  $\delta$  3,70. Devido a ausência do hidrogênio do N-H e a presença adicional da metila em  $\delta$  3,70, sugeriu que este sinal refere-se a uma N-metila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A11 apresentou o sinal de carbonila característico de quinolin-4-ona em  $\delta$  174,28; sinais de carbonos aromáticos, os dois sinais de carbonos metilênicos em  $\delta$  34,28 e 22,41 referentes às posições 11 e 12 respectivamente; além dos sinais de carbono oxi-metínico em  $\delta$  80,27, 78,31 e 75,79 referentes aos carbonos oxigenados do anel biciclo [3.2.1].

Este espectro apresentou ainda um sinal adicional de carbono em  $\delta$  36,12; sendo este característico do carbono do grupo N-metil.

A análise e interpretação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D) e comparação com dados da literatura (LIMA *et. al.*; 2009) permitiram a identificação inequívoca da substância A-11 como sendo o alcaloide N-metil-walthersona A. Este alcaloide já foi anteriormente isolado das folhas de *W. brachypetala*. O valor de  $[\alpha]_D^{25} = -25,0^\circ$  (c 0,01;  $\text{CHCl}_3$ ), sugere a mesma estereoquímica da walthersona A reportada na literatura (HOELZEL *et. al.*; 2005).

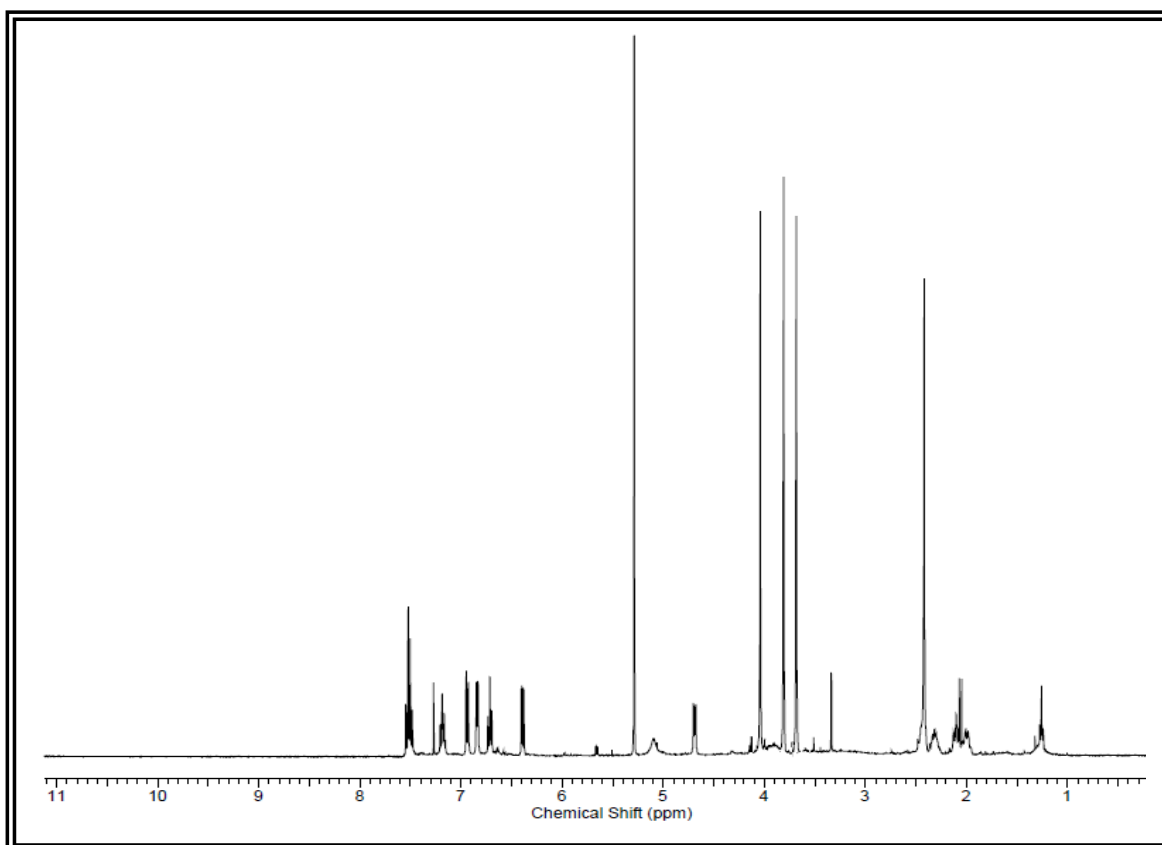


FIGURA 123. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

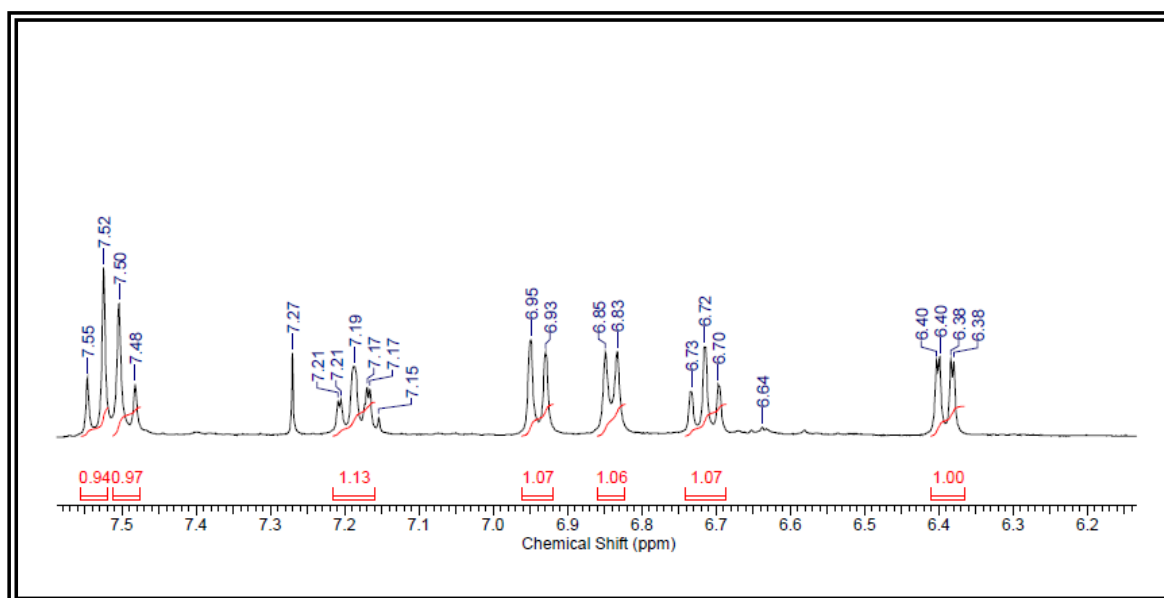


FIGURA 124. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 ( $\delta$  6,2 – 7,6)

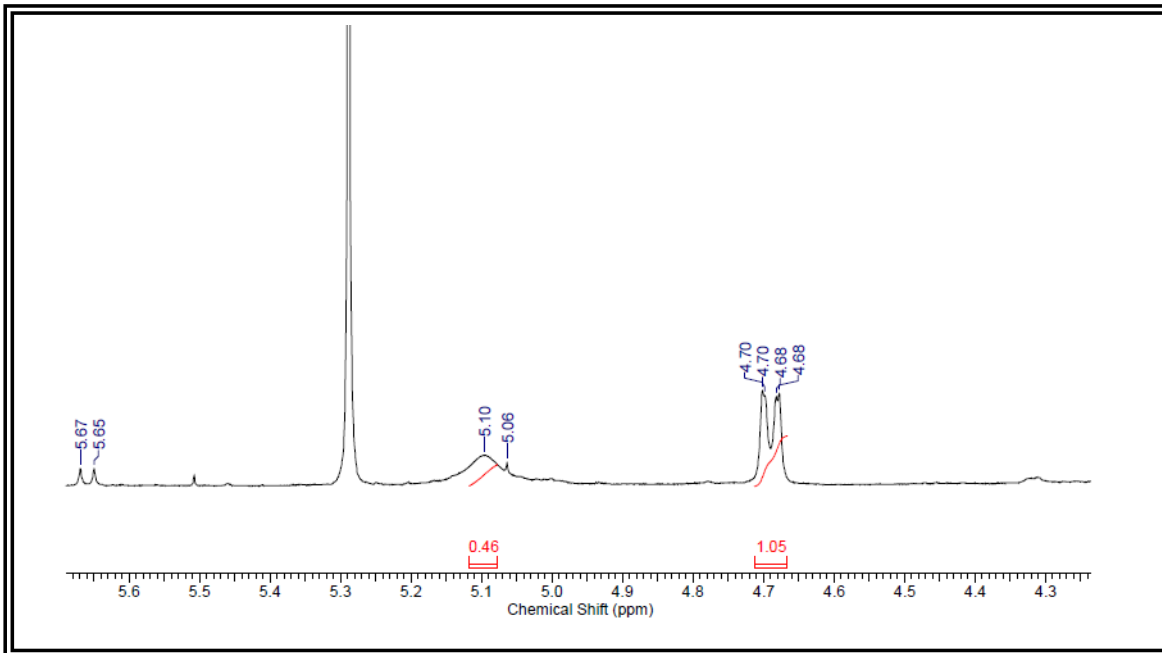


FIGURA 125. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 ( $\delta$  4,3 – 5,6)

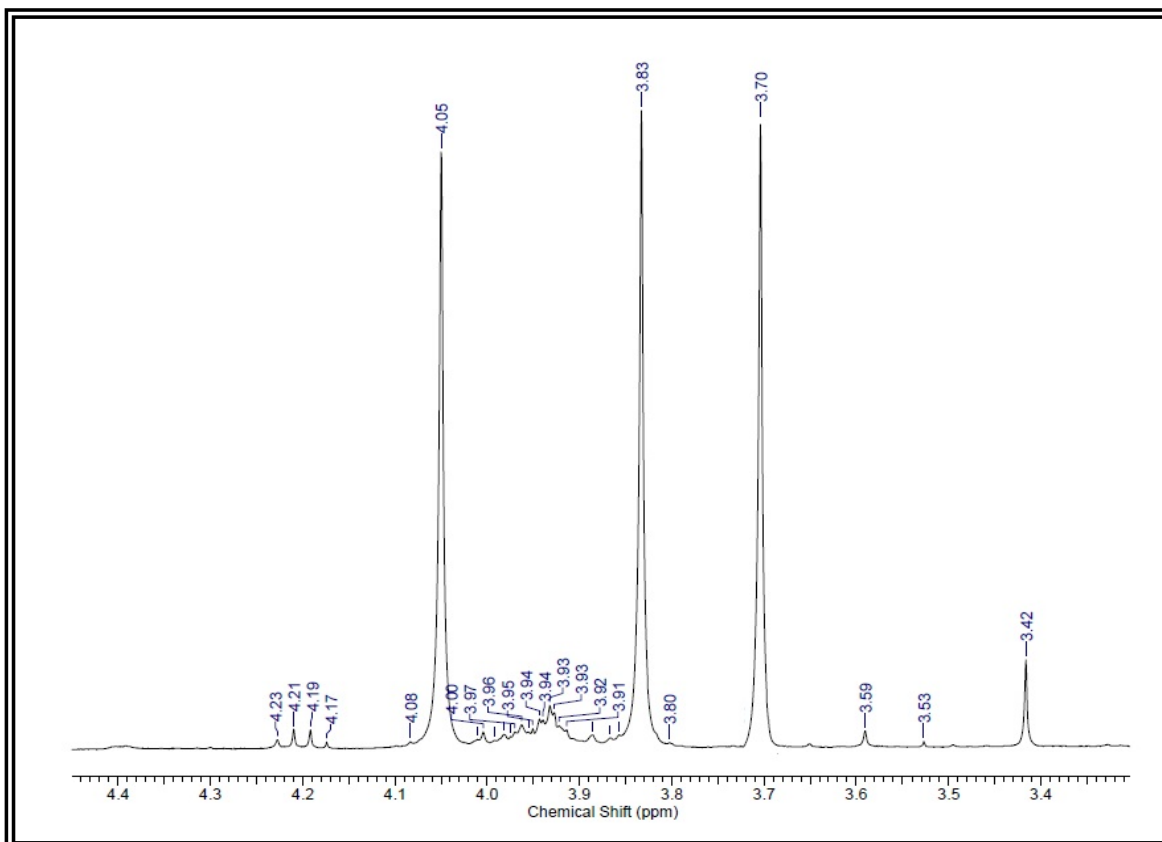


FIGURA 125. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 ( $\delta$  3,4 – 4,4)

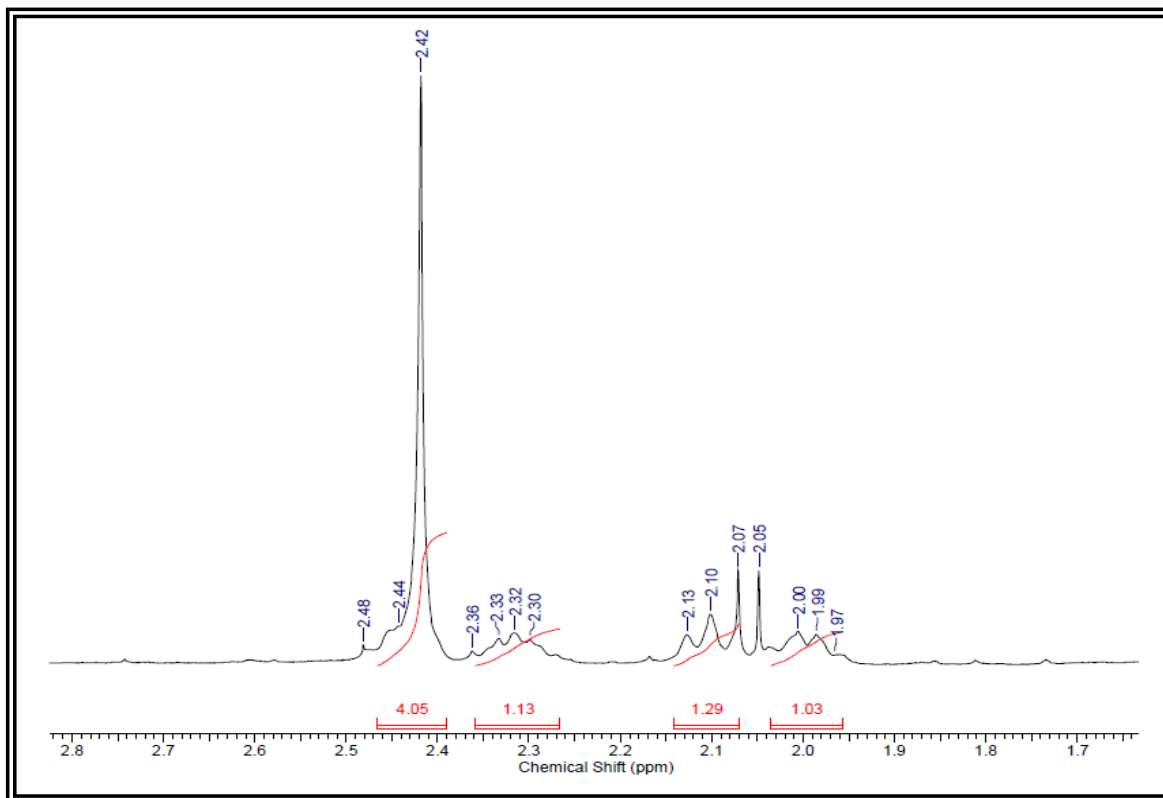


FIGURA 127. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A11 ( $\delta$  1,7 – 2,8)

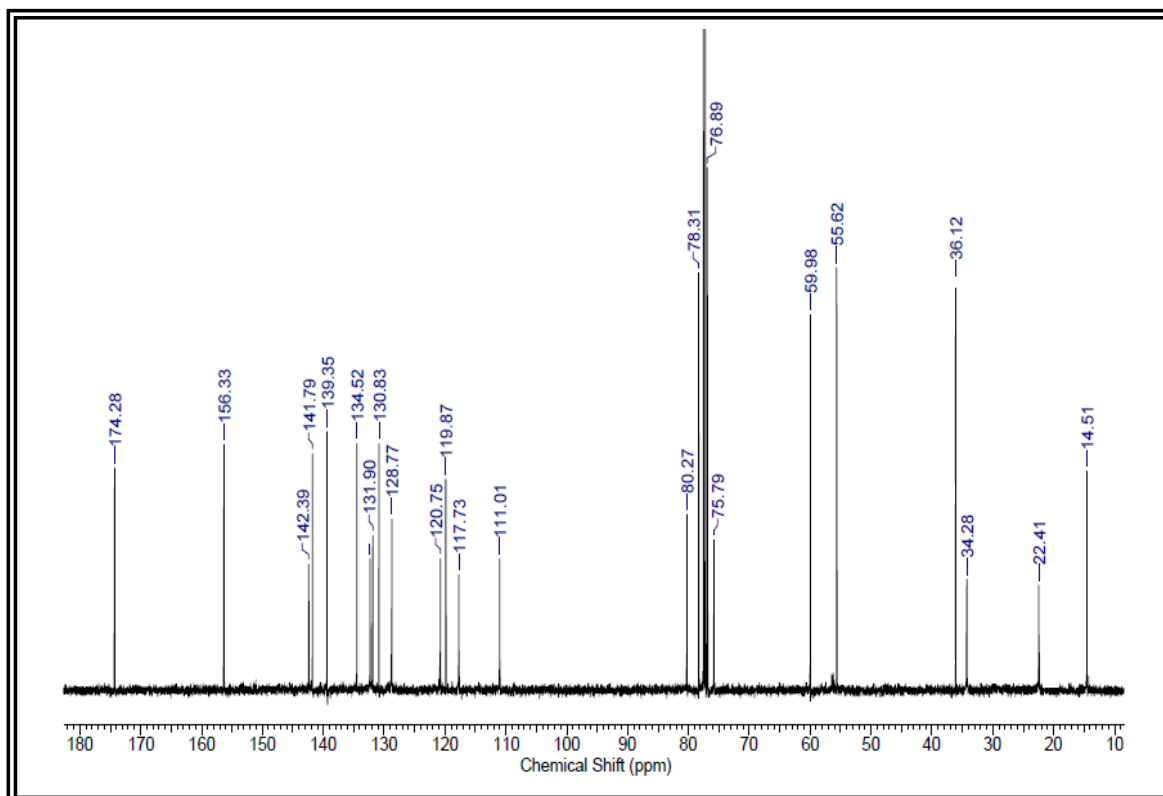


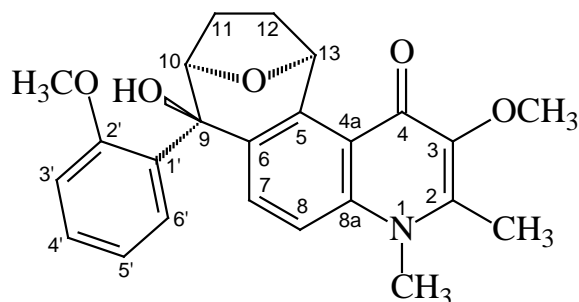
FIGURA 128. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A11 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)



TABELA 34. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A11

Posição	A11 ( $\text{CDCl}_3$ )		waltheriona A (Lit <sup>*1</sup> ) ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ 400 MHz $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$^{13}\text{C}$ 100 MHz $\delta$ (ppm)
2	-	141,79	-	141,60
3	-	139,35	-	139,30
4	-	174,28	-	174,40
4a	-	119,87	-	119,80
5	-	141,79	-	141,70
6	-	130,83	-	130,50
7	7,53 ( <i>d</i> ; 8,0)	131,90	7,48 ( <i>d</i> ; 8,2)	131,80
8	7,49 ( <i>d</i> ; 8,0)	117,73	7,41 ( <i>d</i> ; 8,2)	117,40
8 <sup>a</sup>	-	142,39	-	141,80
9	-	78,31	-	77,20
10	4,69 ( <i>dd</i> ; 7,6; 1,5)	80,27	4,61 ( <i>dd</i> ; 7,8; 1,5)	80,16
11 <sup>a</sup>	2,33 ( <i>m</i> )	22,41	2,34 ( <i>m</i> )	21,60
11b	2,09 ( <i>m</i> )		2,10 ( <i>m</i> )	
12 <sup>a</sup>	2,43 ( <i>m</i> )	34,28	2,40 ( <i>m</i> )	33,70
12b	2,00 ( <i>m</i> )		1,99 ( <i>m</i> )	
13	6,84 ( <i>d</i> ; 6,0)	75,79	6,87 ( <i>d</i> ; 8,0)	75,60
1'	-	134,52	-	134,70
2'	-	156,33	-	156,40
3'	6,94 ( <i>dd</i> ; 8,0; 1,2)	111,01	6,94 ( <i>dd</i> ; 8,0; 1,3)	110,80
4'	7,20 ( <i>t</i> )	128,77	7,20 ( <i>ddd</i> ; 8,0; 7,5; 1,5)	128,50
5'	6,73 ( <i>t</i> )	120,75	6,70 ( <i>ddd</i> ; 7,6; 7,3; 1,5)	120,60
6'	6,41 ( <i>dd</i> ; 8,0; 2,0)	131,70	6,29 ( <i>dd</i> ; 7,6; 1,5)	131,10
2-C- $\text{CH}_3$	2,42 ( <i>s</i> )	14,51	2,41 ( <i>s</i> )	14,30
3-O- $\text{CH}_3$	3,83 ( <i>s</i> )	59,98	3,75 ( <i>s</i> )	59,20
2'-OCH <sub>3</sub>	4,05 ( <i>s</i> )	55,62	3,97 ( <i>s</i> )	55,40
N-H	-	-	12,00	-
N- $\text{CH}_3$	3,70 ( <i>s</i> )	36,12		
9-OH	5,10 ( <i>s</i> )	-	5,10 ( <i>s</i> )	-

\*(LIMA *et. al.*; 2009) e (HOELZEL *et. al.*; 2005)



Estrutura da N-metil waltheriona A

#### 4.1.14. Identificação do alcaloide A14

A substância A14 foi isolada em pequena quantidade (0,85 mg) da raiz de *W. brachypetala*. Esta substância revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A14 apresentou sinais parecidos com os da waltheriona A sugerindo-se semelhança estrutural com este alcaloide, entretanto é nítido no espectro a presença de outras substâncias minoritárias. Este espectro apresentou os dois dupletos acoplado em *orto* ( $J = 8,8$ ) referentes aos hidrogênios nas posições 7 e 8 do esqueleto estrutural da waltheriona-A, entretanto mais desblindados e absorvendo respectivamente em  $\delta$  7,85 (H-7) e  $\delta$  7,65 (H-8). É observado ainda os quatro sinais de hidrogênios aromáticos relativos ao anel orto disubstituído em  $\delta$  6,41 (H-6'), 6,74 (H-5'), 6,98 (H-3') e 7,20 (H-4').

Com relação aos sinais do núcleo quinolônico, observa a ausência do sinal relativo ao N-H e uma desblindagem no sinal da metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$ , no qual a mesma apresenta deslocamento químico em  $\delta$  2,67. A presença de um sinal adicional de metoxila em  $\delta$  4,12 sugeriu a presença de uma metoxila na posição 4 ao invés de uma carbonila. A possibilidade de metilação pela enzima S-adenosil-metionina nesta posição é viável devido ao fato de a waltheriona A existir em duas formas tautoméricas (ceto e enólica), como descrito anteriormente na literatura (HOELZEL *et. al.*; 2005).

Outra evidência da presença da metoxila na posição 4 é a blindagem do hidrogênio H-13 de  $\delta$  6,87 para  $\delta$  6,19. Na estrutura da waltheriona A o hidrogênio H-13 encontra-se no campo de desblindagem da carbonila por efeito anisotrópico.

Hoelzel e colaboradores obtiveram o derivado metilado da waltheriona A com solução etérea de diazometano para comprovar a existência deste alcaloide nas duas formas tautoméricas (HOELZEL *et. al.*; 2005). Já Aurelie-Emile e colaboradores reportaram o isolamento do alcaloide metilado na posição 4 como produto natural a partir das raízes da espécie *Melochia odorata* (EMILE *et. al.*; 2007).

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para A14 foram comparados com a literatura, permitindo a identificação inequívoca deste alcaloide como sendo a 4-O-metil-waltheriona A.

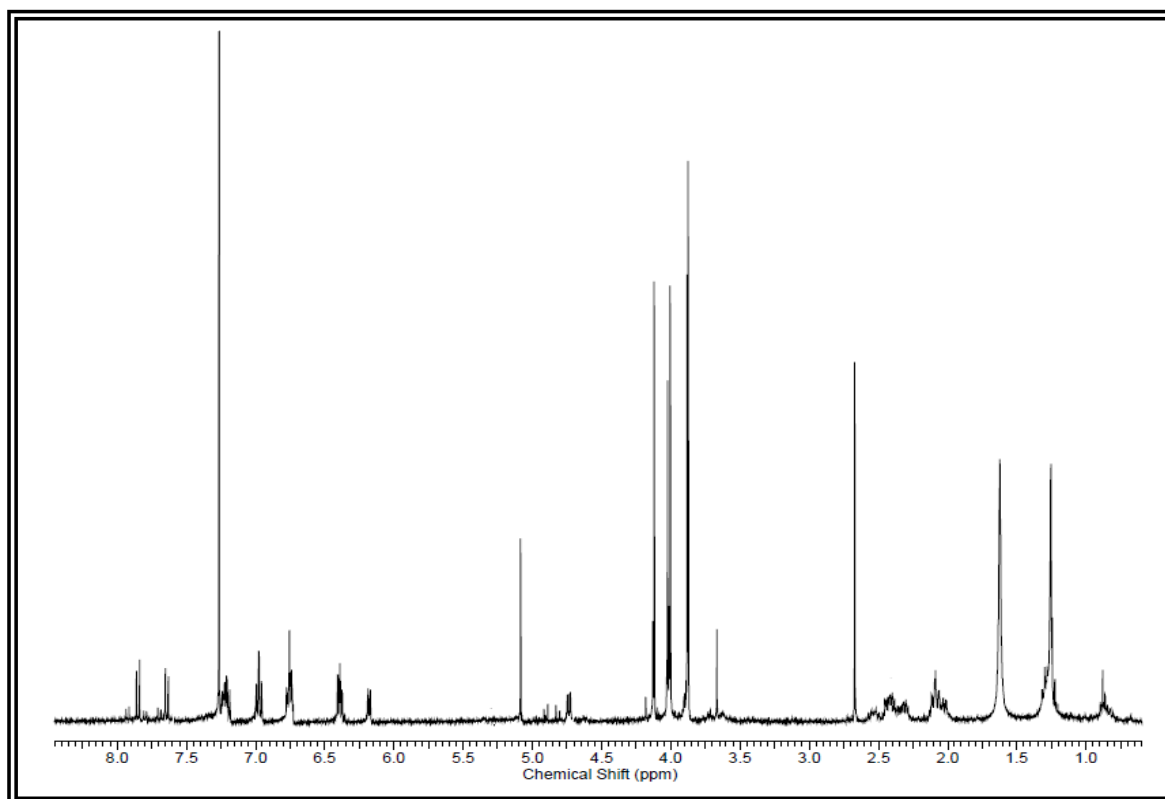


FIGURA 129. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

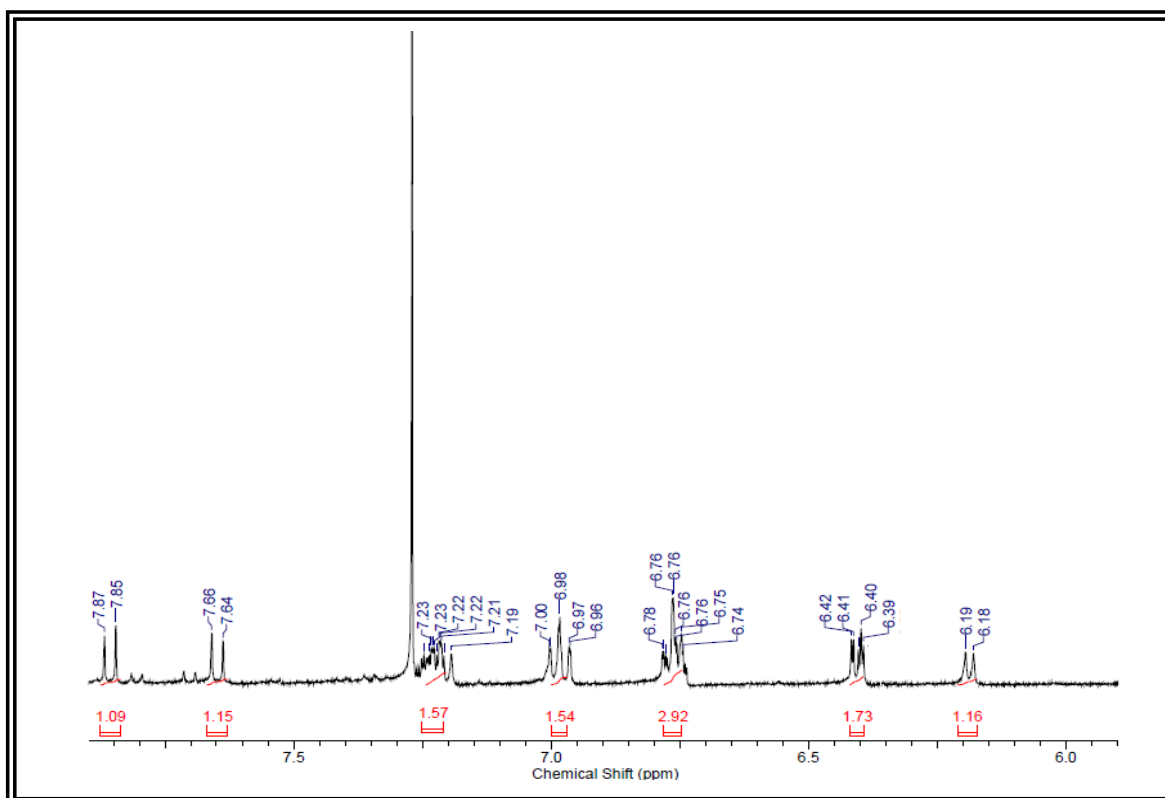


FIGURA 130. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A14 ( $\delta$  6,0 – 7,9)

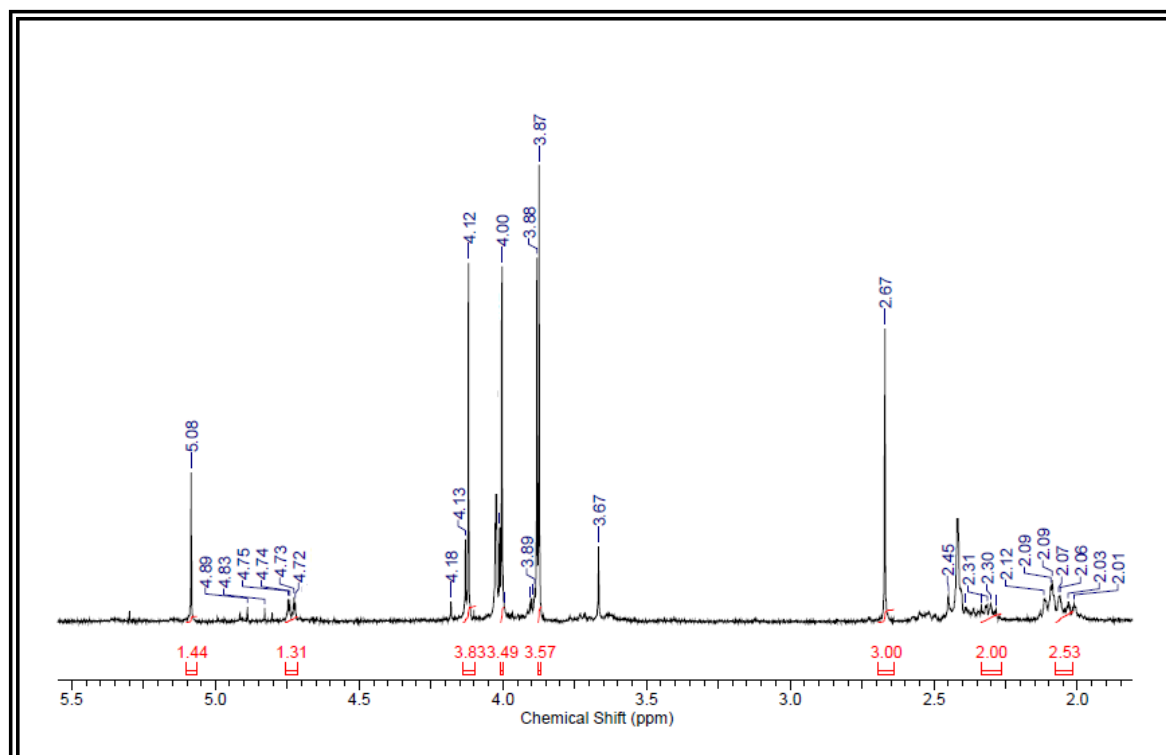
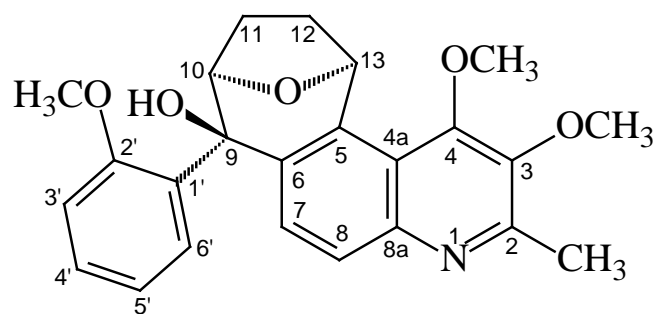


FIGURA 131. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A14 ( $\delta$  1,6 – 5,5)



**Estrutura da 4-O-metil-waltheriona A**

TABELA 35. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A-14

Posição	A14 $\text{CDCl}_3$ 400 MHz	Literatura* $\text{CDCl}_3$ 400 MHz
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) J (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) J (Hz)
7	7,86 (d; 8,25)	7,85 (d; 8,25)
8	7,63 (d; 8,25)	7,60 (d; 8,25)
10	4,73 (dd; 8,0; 1,6)	4,75 (dd; 8,0; 1,8)
11 <sup>a</sup>	2,05 (m)	2,00 (m)
11 <sup>b</sup>	2,48 (m)	2,45 (m)
12 <sup>a</sup>	2,10 (m)	2,17 (m)
12 <sup>b</sup>	2,35 (m)	2,35 (m)
13	6,18 (d; 6,0)	6,18 (d; 8,0)
3'	7,05 (t)	7,05 (dd; 8,0; 1,5)
4'	7,20 (ddd; 8,0; 7,5; 1,5)	7,20 (ddd; 8,0; 7,2; 1,5)
5'	6,75 (ddd; 8,0; 7,5; 1,5)	6,85 (ddd; 8,0; 7,2; 1,5)
6'	6,40 (dd, 7,5; 1,5)	6,30 (dd, 7,5; 1,5)
4-OCH <sub>3</sub>	4,12 (s)	4,10 (s)
3-OCH <sub>3</sub>	3,87 (s)	3,90 (s)
2'-OCH <sub>3</sub>	4,00 (s)	4,00 (s)
2-C-CH <sub>3</sub>	2,67 (s)	2,60 (s)

\*(HO  
ELZE  
L et.  
al.;  
2005)

#### 4.1.15. Identificação do alcaloide A17

A substância A17 foi isolada das fases diclorometano da raiz e do caule de *Waltheria brachypetala*. Esta se apresentou como sólido branco amorfo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

Esta substância apresentou baixa solubilidade em clorofórmio deuterado, de modo que as análises de RMN desta substância foram realizadas com DMSO- $d_6$  e MeOD. O espectro de RMN de  $^1H$  obtido a temperatura ambiente apresenta poucas informações sobre a estrutura de A-17, principalmente com relação aos hidrogênios que absorvem na região dos aromáticos devido à sobreposição dos sinais. Entretanto, observa-se sinais de multipletos entre  $\delta$  1,6 – 2,2 característicos dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos do anel de sete membros, assim como ocorre na estrutura da waltheriona A (A16).

Observou-se ainda neste espectro sinais em  $\delta$  3,73 e 2,35 referente a metoxila na posição 3 e a metila ligada ao carbono C-2  $sp^2$ , respectivamente, confirmando que A17 trata-se de um alcaloide quinolônico, com estrutura possivelmente parecida com a da waltheriona A.

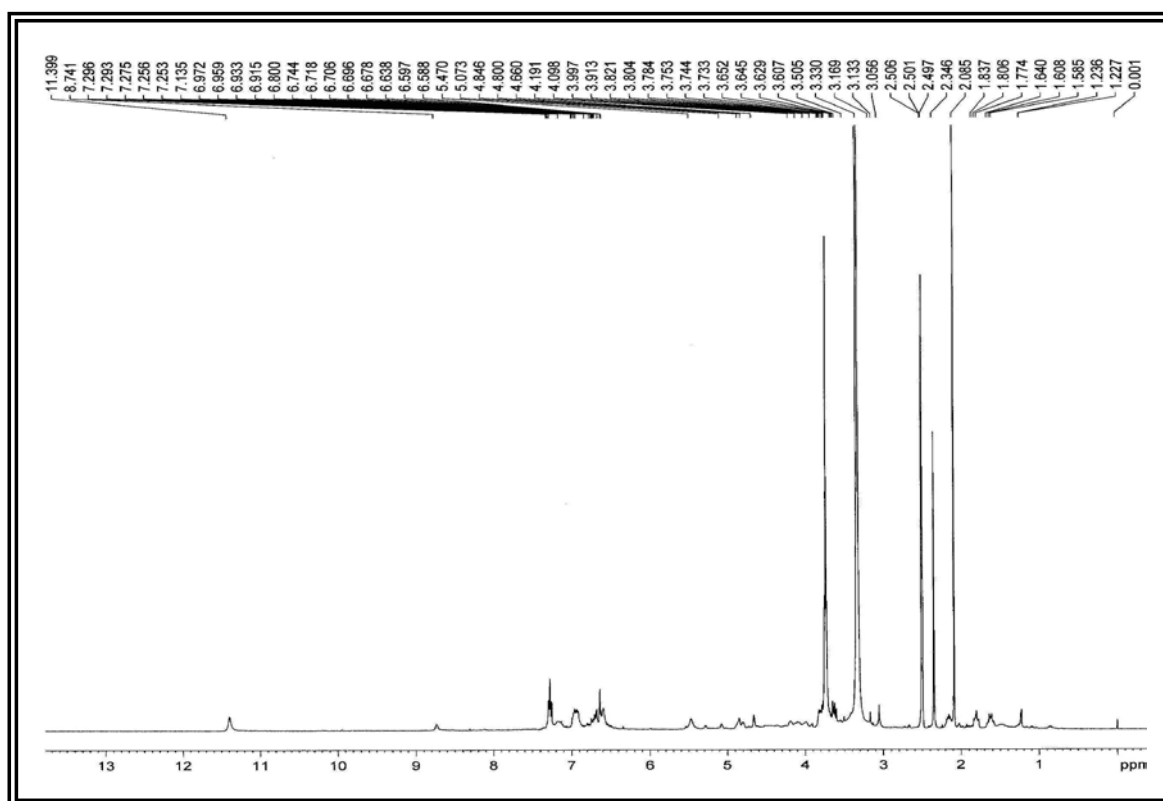


FIGURA 132. Espectro de RMN de  $^1H$  de A17 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 25°C)

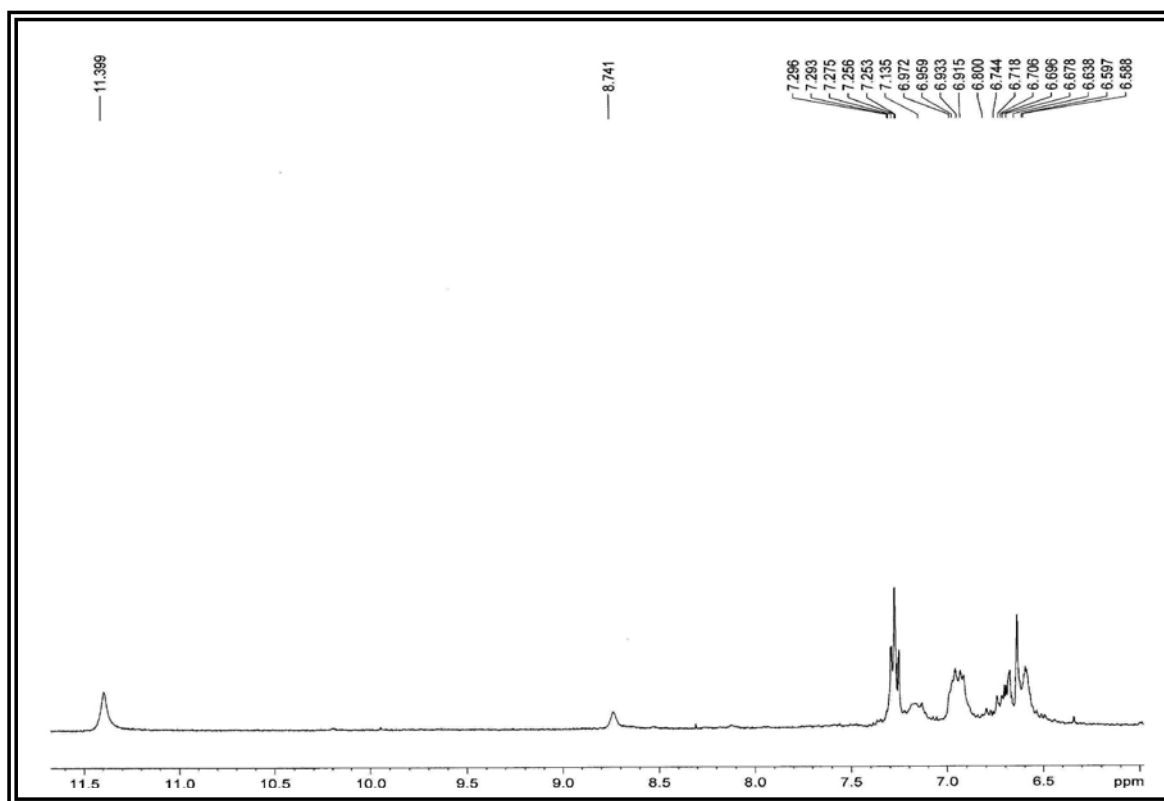


Figura 133. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 ( $\delta$  6,5 -11,5)

Verifica-se neste espectro a possibilidade de A-17 encontrar-se nas formas, ceto e enólica a temperatura ambiente, com predomínio da forma ceto. Isto deve-se a presença dos sinais de simpleto largo em  $\delta$  11,39 e 8,74 referente ao N-H e a hidroxila na posição 4 respectivamente. Hoelzel e colaboradores (HOELZEL *et. al.*; 2005) relataram que a waltheriona-A (A16) também co-existe nas duas formas, ceto e enólica.

Devido à sobreposição de sinais dos hidrogênios aromáticos de A17, o mapa de correlações do espectro de COSY apresenta poucas informações sobre acoplamentos dos hidrogênios aromáticos. Entretanto, é possível observar o acoplamento de hidrogênio sobreposto em  $\delta$  6,60 com um sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,20 (*m*) e de um hidrogênio em  $\delta$  4,50 (*sl*) com um sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,77. Observa-se ainda neste espectro correlações entre os hidrogênios metilênicos diasterotópicos.

Uma vez que o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido a temperatura ambiente apresentou pouca informação a cerca da estrutura de A-7, decidiu-se obter espectros com variação de temperatura, sendo obtidos espectros a 55°C, 70°C e 85°C. Os espectros obtidos a 70°C (A-17 isolado da raiz) e 85°C (A-17 isolado do caule) foram os que apresentaram os sinais mais bem definidos, possibilitando uma melhor análise dos dados.

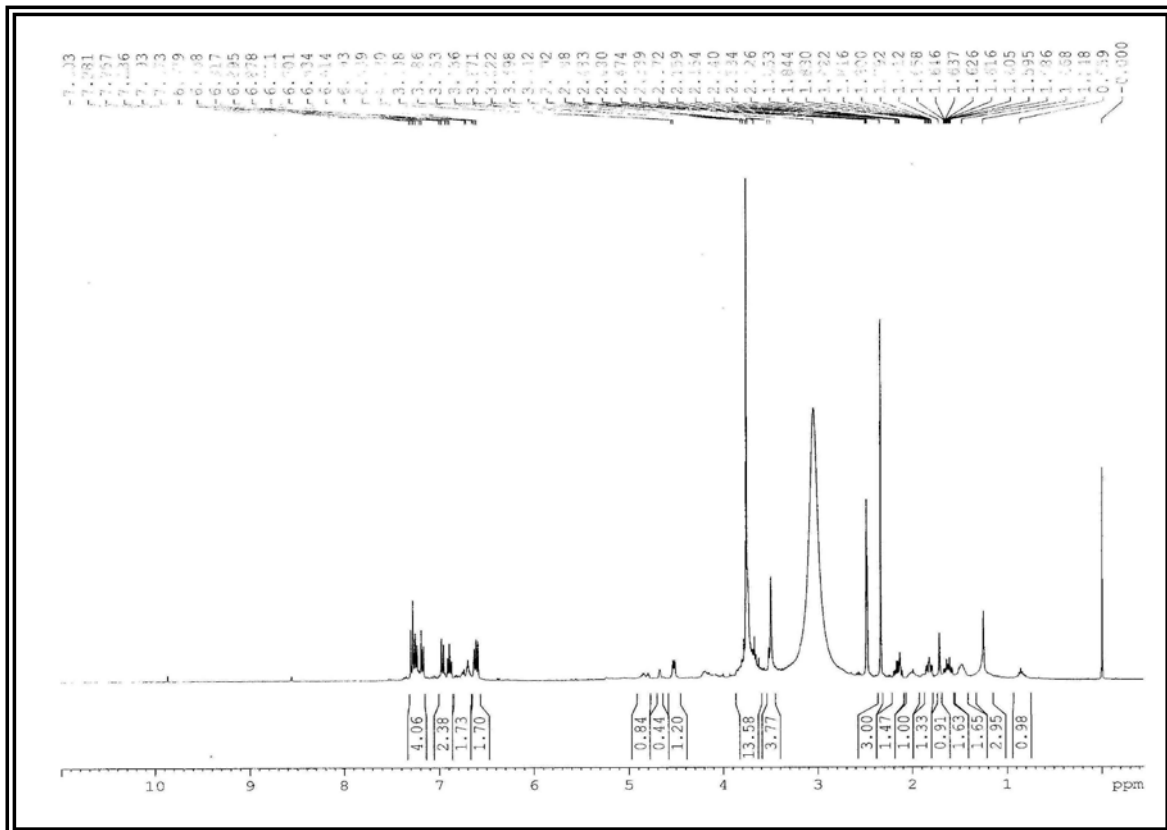


FIGURA 134. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 70°C)

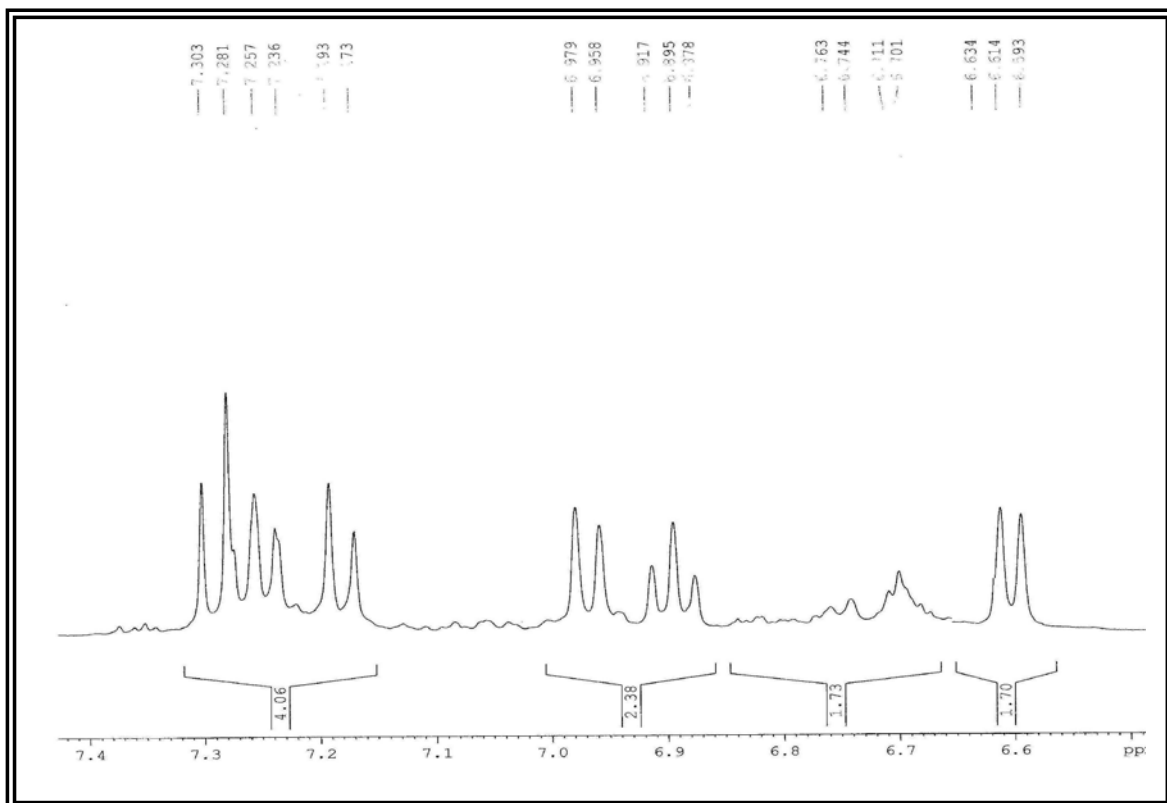


FIGURA 135. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 a 70°C ( $\delta$  6,5 – 7,4)



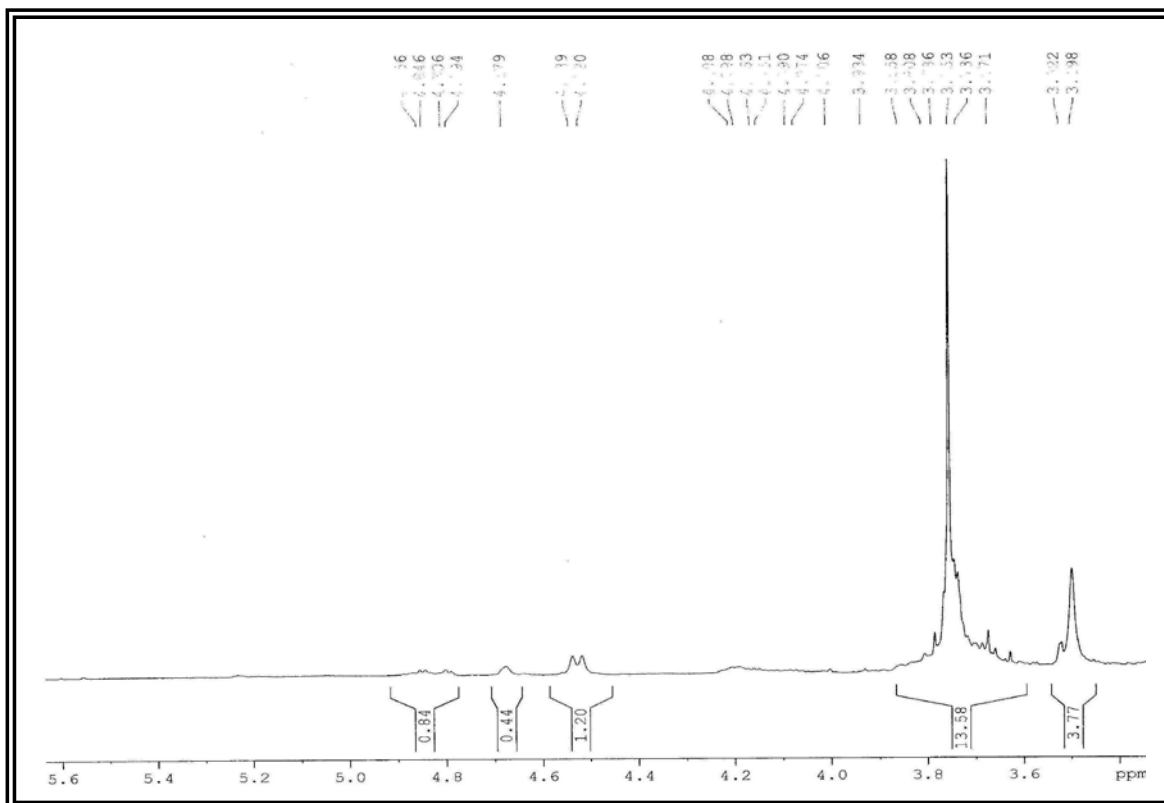


FIGURA 136. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 a 70°C ( $\delta$  3,4 – 5,6)

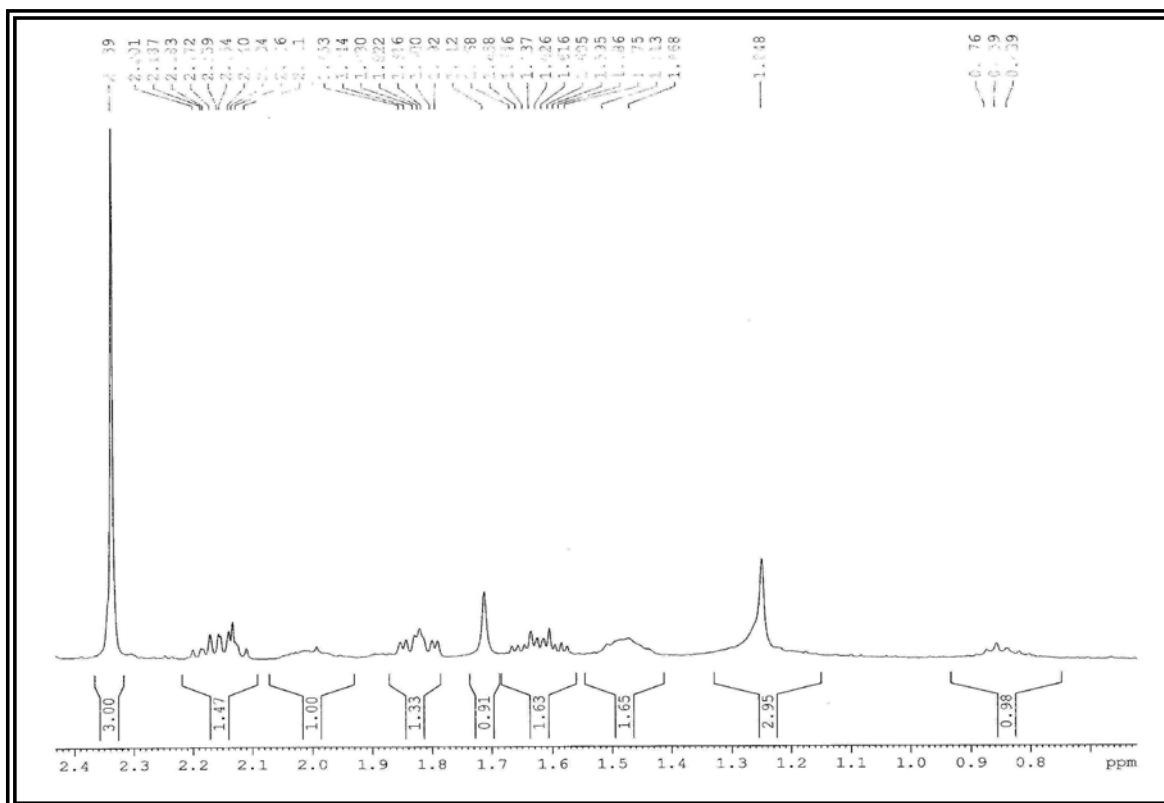


FIGURA 137. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 a 70°C ( $\delta$  0,7 – 2,4)

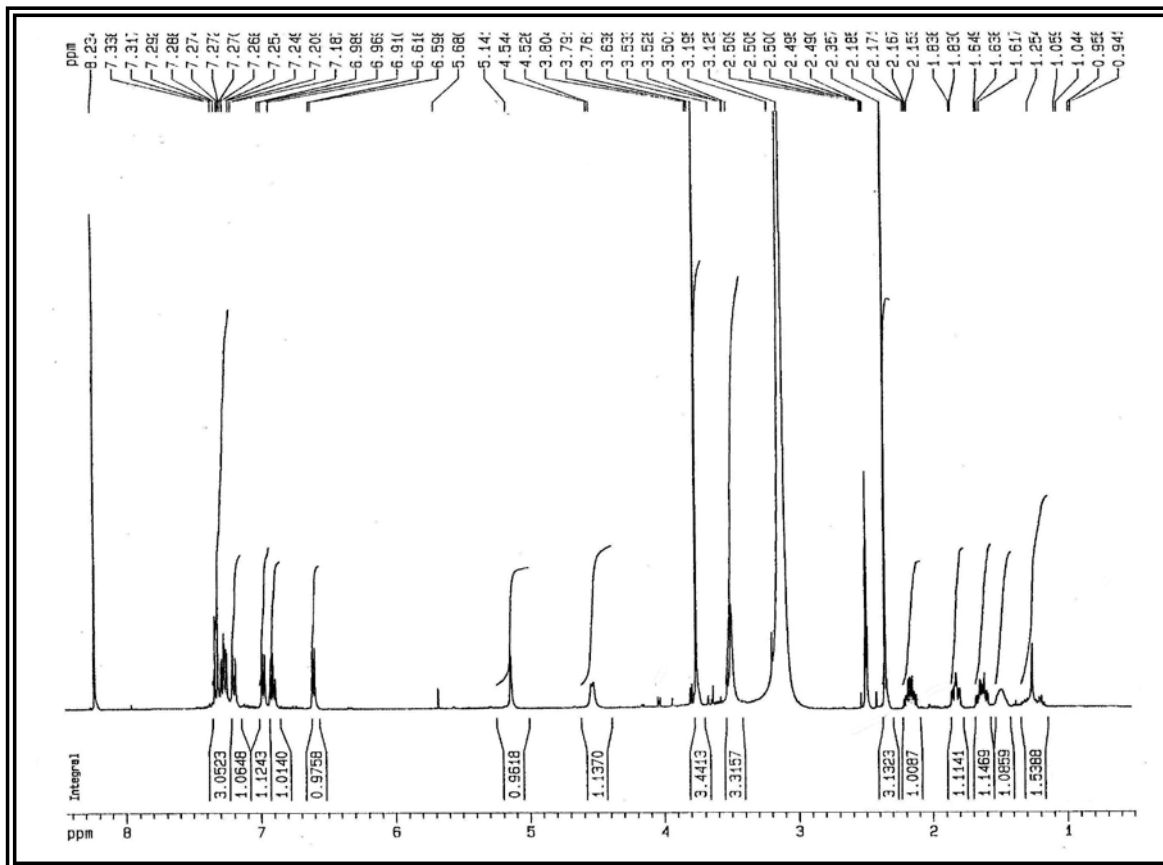


FIGURA 138. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 85°C)

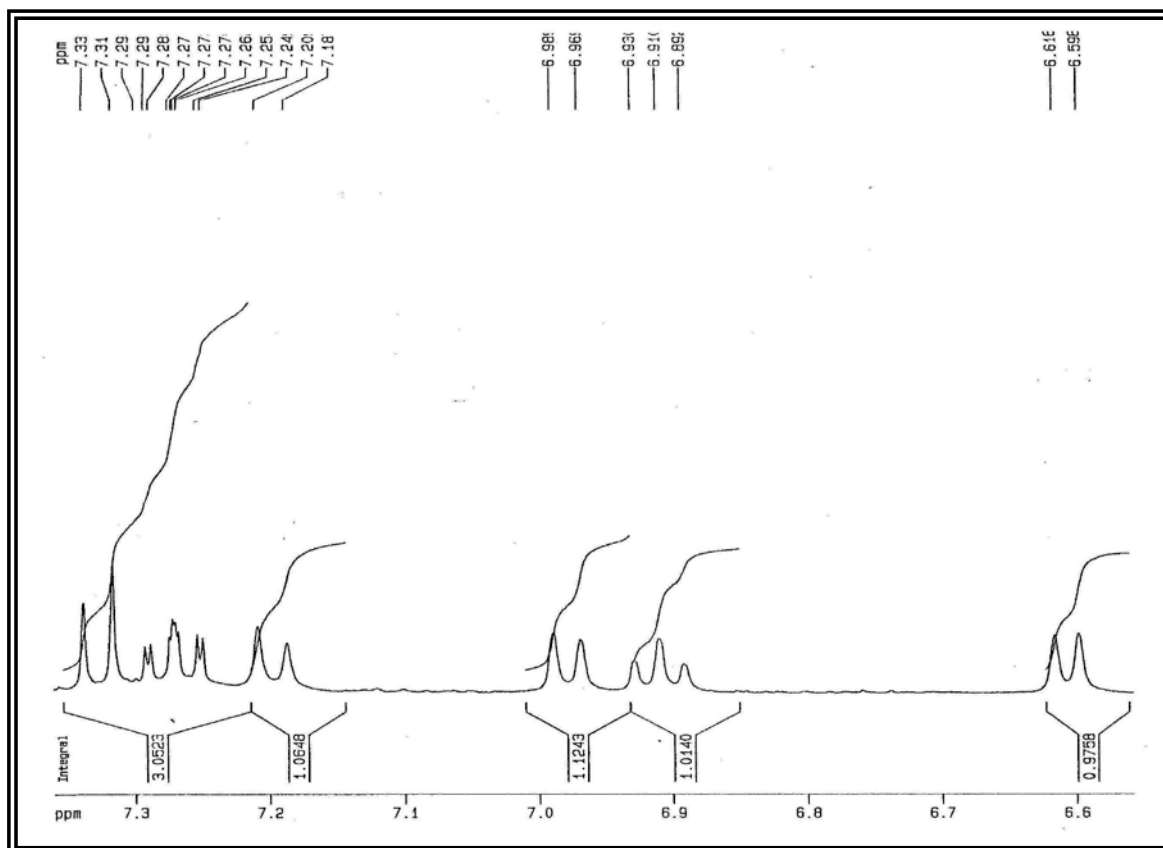


FIGURA 139. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 a 85°C ( $\delta$  6,6 – 7,4)

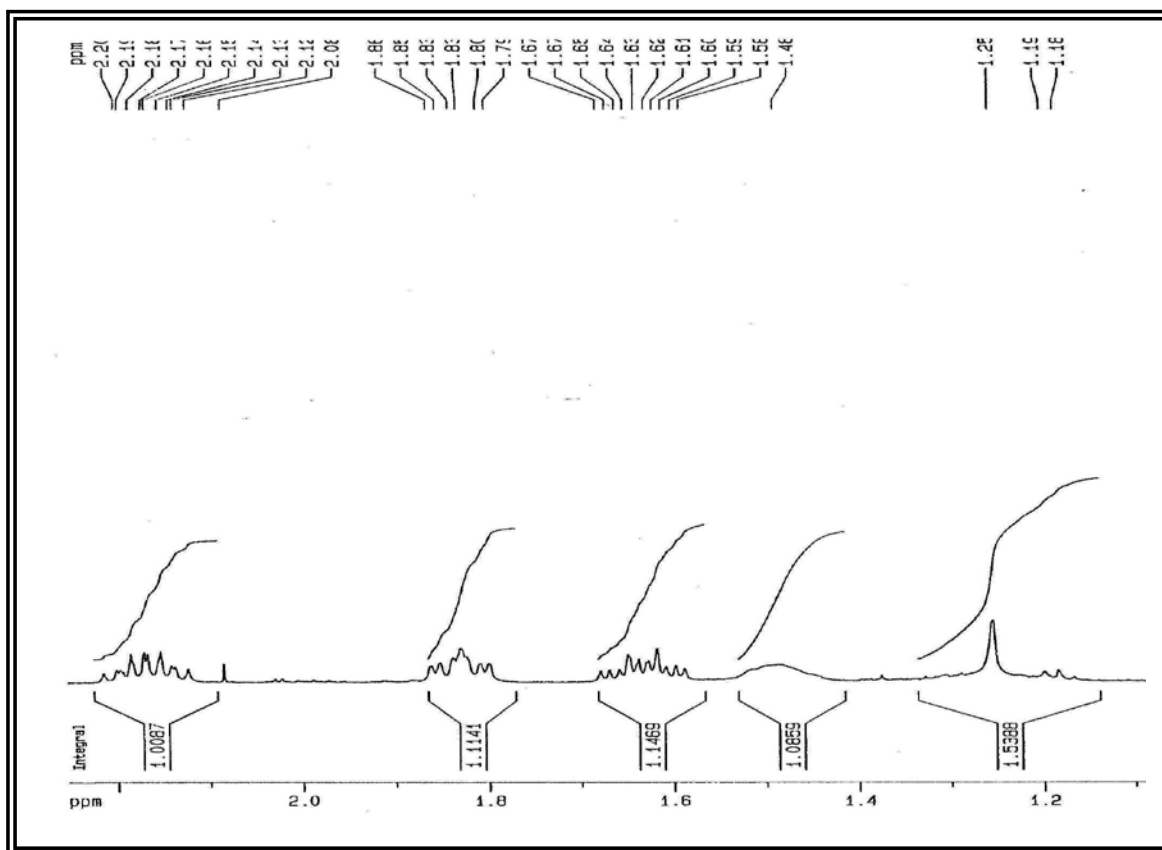


FIGURA 140. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 a  $85^\circ\text{C}$  ( $\delta$  1,1 – 2,2)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 obtido a  $70^\circ\text{C}$  verifica-se um equilíbrio entre as formas ceto e enólica devido à igualdade de intensidade dos sinais de N-H e 4-OH. Neste espectro observa-se mais facilmente as multiplicidades dos hidrogênios metilênicos diaterotópicos, enquanto que os sinais dos hidrogênios aromáticos encontram-se melhor definidos. Observa-se ainda neste espectro o sinal de hidrogênio oxi-metínico em  $\delta$  4,52 ( $d$ ;  $J = 7,6$ ), que foi atribuído ao hidrogênio na posição 10 do anel de sete membros.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A17 obtido a  $85^\circ\text{C}$  observa-se um sinal de simpleto intenso em  $\delta$  8,23 referente a 4-OH sugerindo que nesta temperatura há um predomínio da forma enólica da estrutura de A17. Na região dos hidrogênios aromáticos observa-se dois sinais de dupletos referentes a dois hidrogênios acoplado em orto em  $\delta$  7,29 e 7,18 ( $J = 8,8$  Hz), sendo estes atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, considerando-se então que A-17 possui mesmo esqueleto estrutural da waltheriona A (A16). Observa-se ainda quatro sinais adicionais de hidrogênios aromáticos, possivelmente pertencentes a um sistema aromático orto di-substituído.

É possível observar ainda neste espectro dois simpletos integrando para três hidrogênios, indicando a presença de duas metoxilas na estrutura de A-17, enquanto que no espectro obtido a  $70^\circ\text{C}$  não foi possível sugerir com maior clareza o número de metoxilas presentes na estrutura de A-17.

Devido à dificuldade de realizar experimentos de longa duração a altas temperaturas, realizou-se o experimento de HSQC a temperatura ambiente e este espectro apresentou informações importantes a cerca da estrutura desta substância. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,60 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  73,94 de modo que este hidrogênio foi definido com oxi-metínico. Já o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,50 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  85,12, essas correlações foram importantes para sugerir a existência da ponte éter entre os carbonos 10 e 13 do anel de sete membros, assim como ocorre na estrutura da waltheriona A. Observa-se ainda neste espectro que o sinal de simpleto intenso em  $\delta$  3,75 correlacionou-se com os sinais de carbono em  $\delta$  55,97 e 58,87 confirmando assim a presença de duas metoxilas na estrutura de A-17.

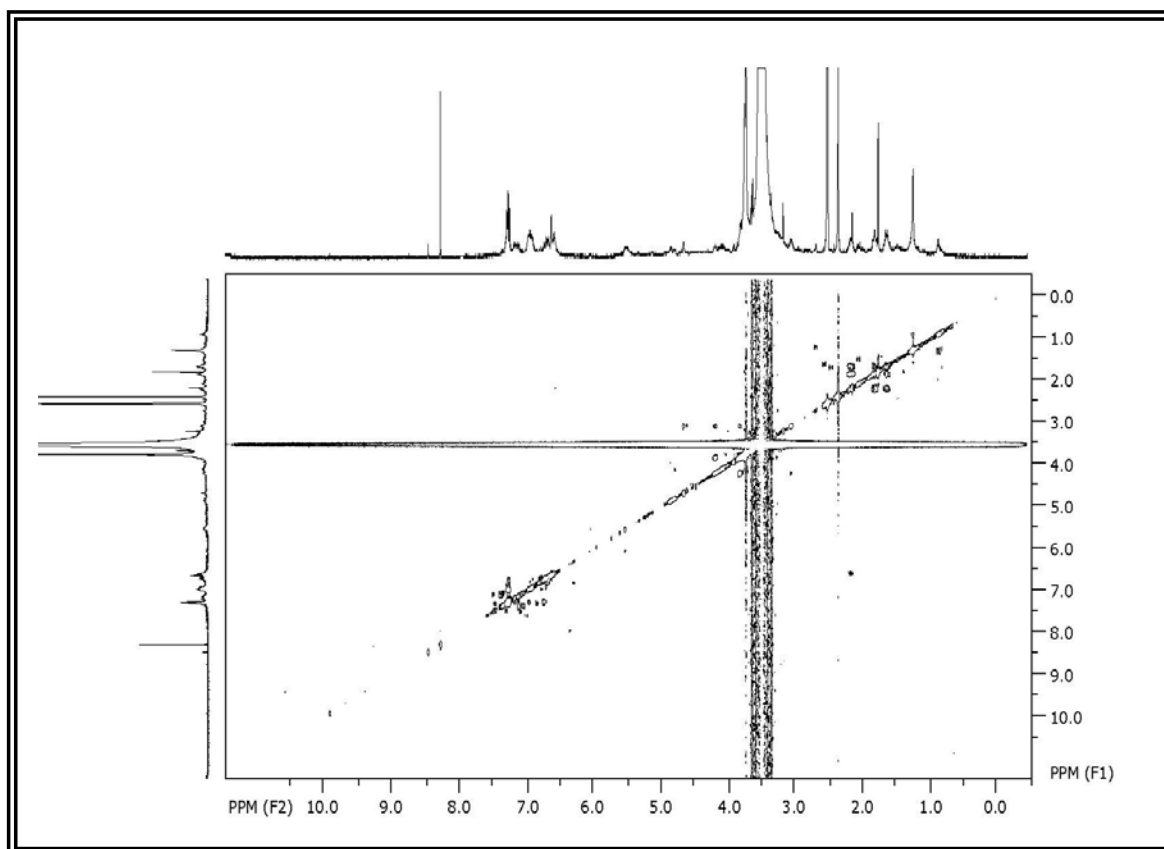


Figura 141. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A17 (400 MHz, DMSO- $d_6$ )

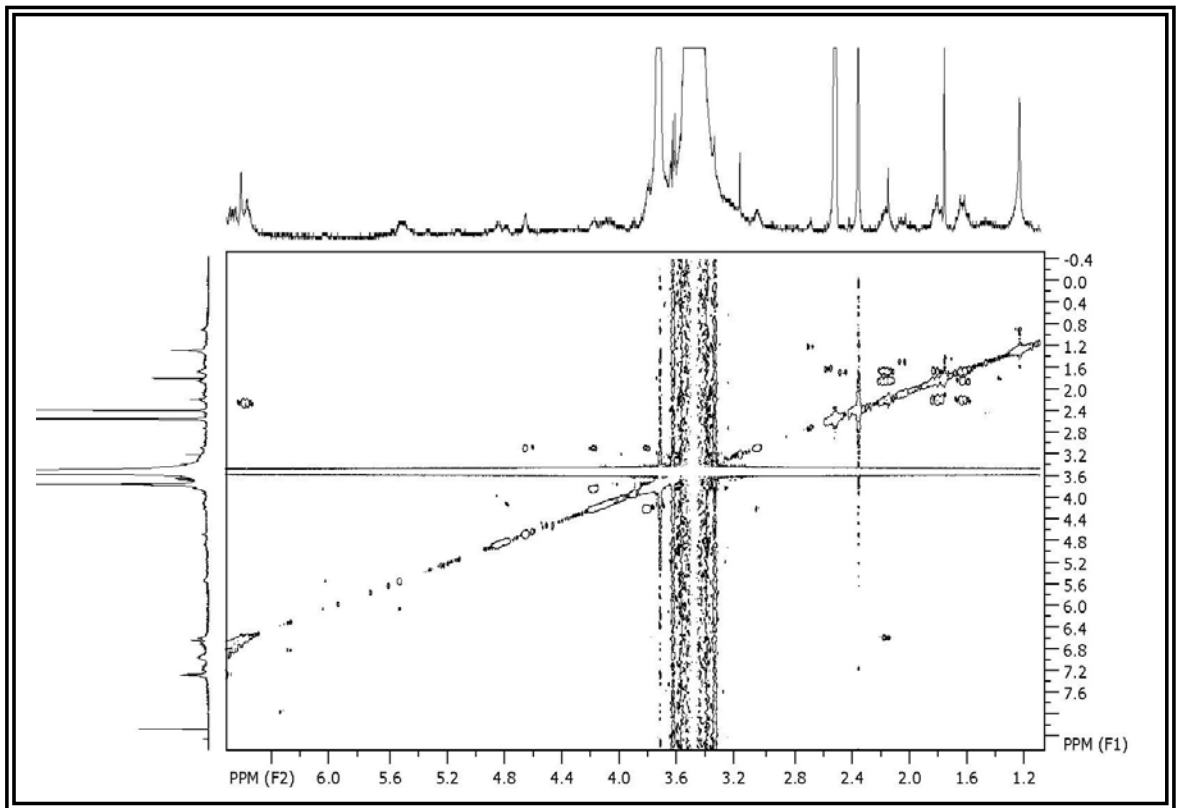


FIGURA 142. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A17 ( $\delta$  1,2 – 6,6)

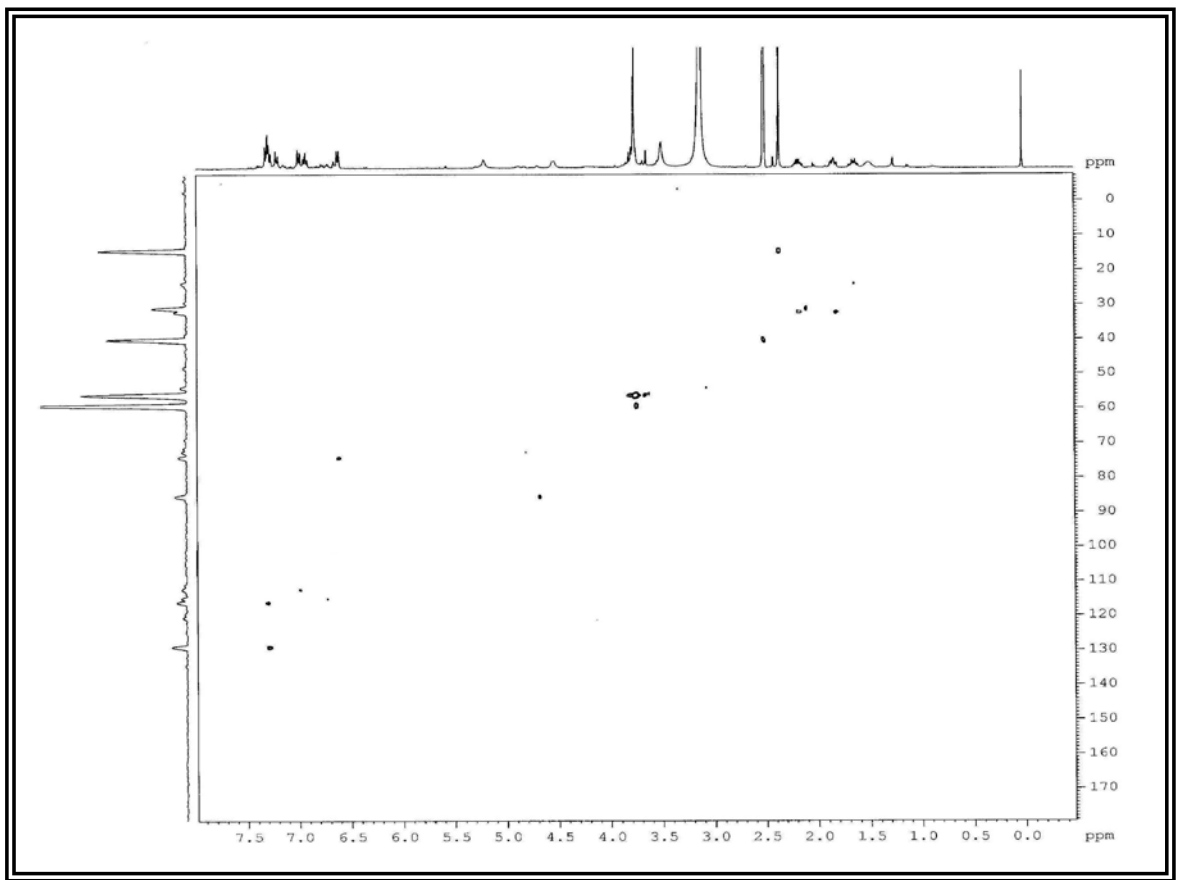


FIGURA 143. Mapa de correlações do espectro de HSQC de A17 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

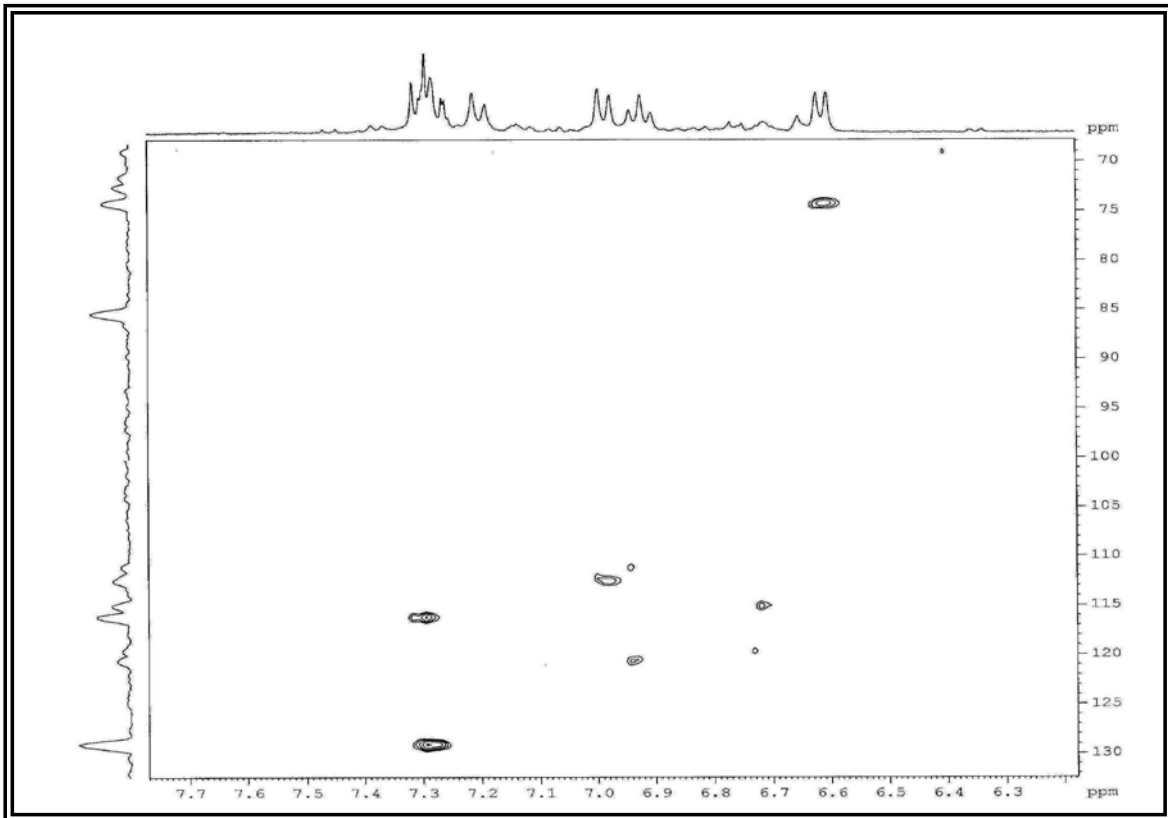


Figura 144. Mapa de correlações do HSQC de A17 ( $\delta_H$  6,2 – 7,7;  $\delta_C$  70 – 130)

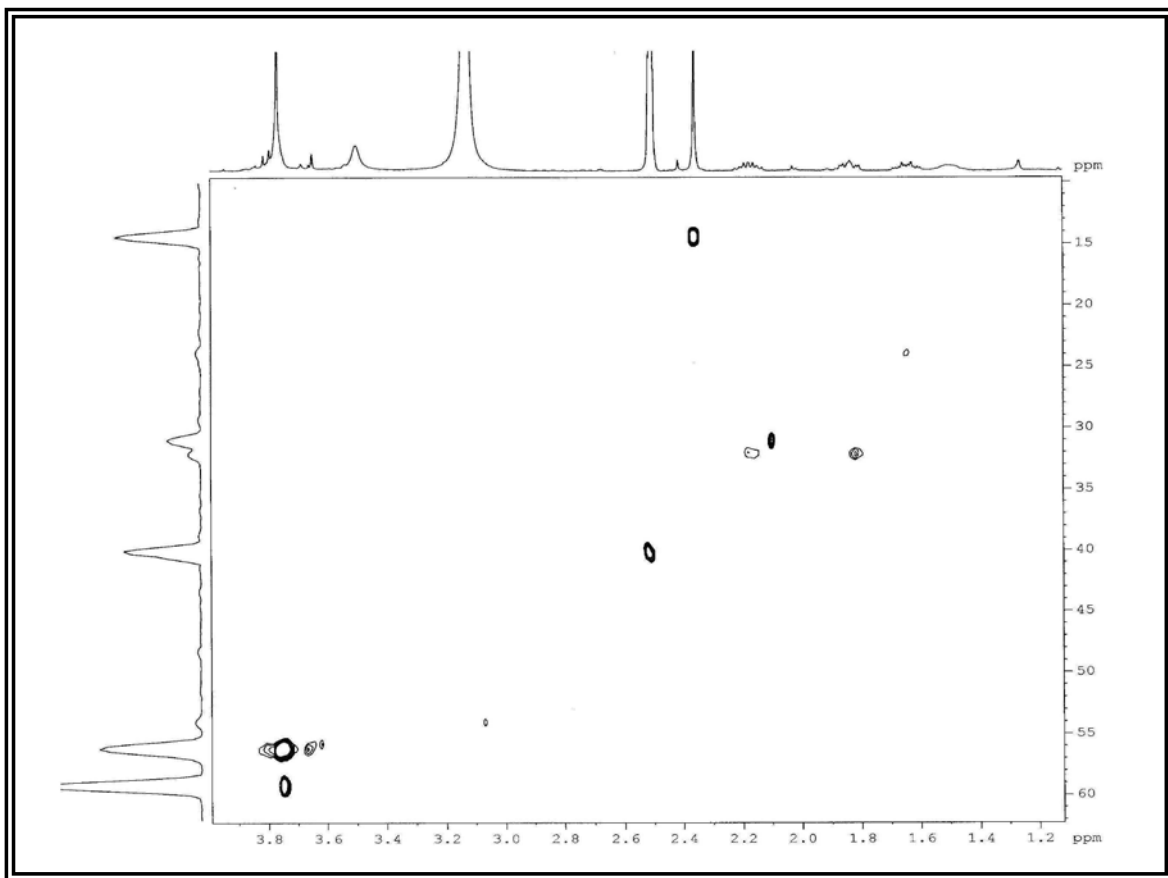
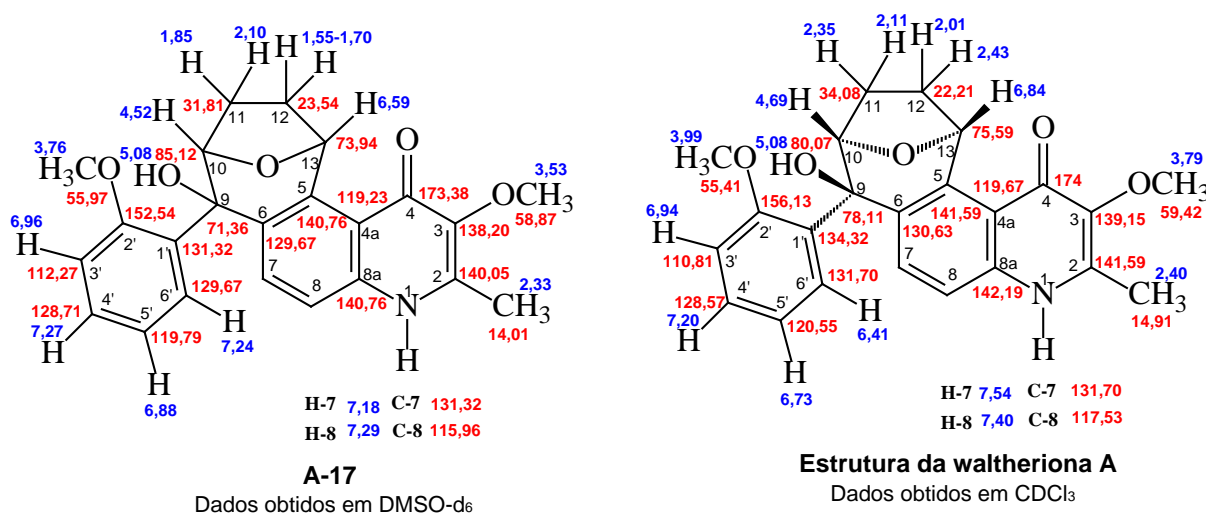


FIGURA 145. Mapa de correlações do HSQC de A-17 ( $\delta_H$  1,2 – 3,8;  $\delta_C$  10 – 60)

Com o objetivo de se obter maiores informações a cerca da estrutura de A17 foram realizados os experimentos de espectrometria de massas (ESI, modo positivo) e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Surpreendentemente, o espectro de massas de A-17 apresentou-se praticamente idêntico ao espectro de massas da waltheriona A (A16). Este apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  394 e, praticamente os mesmos íons fragmentos da waltheriona-A, diferindo pouco com relação à intensidade dos mesmos. Entre estes, observou-se o fragmento em  $m/z$  376 referente à perda de  $\text{H}_2\text{O}$  a partir do íon *pseudo*-molecular, confirmando assim que o simpleto largo observado em  $\delta$  5,14 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $85^\circ\text{C}$ ) trata-se do grupo hidroxila na posição 9.

Através dos dados de espectrometria de massas obtidos para A-17 e as evidências anteriormente discutidas através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), sugeriu-se que a substância A17 é um diastereoisômero da waltheriona A, sendo possível realizar uma atribuição prévia dos valores de deslocamento químico de hidrogênios e carbonos de A-17, comparando-se os dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $85^\circ\text{C}$ ) e  $^{13}\text{C}$  de A-17 com aqueles referentes a waltheriona A, como pode observar-se abaixo.



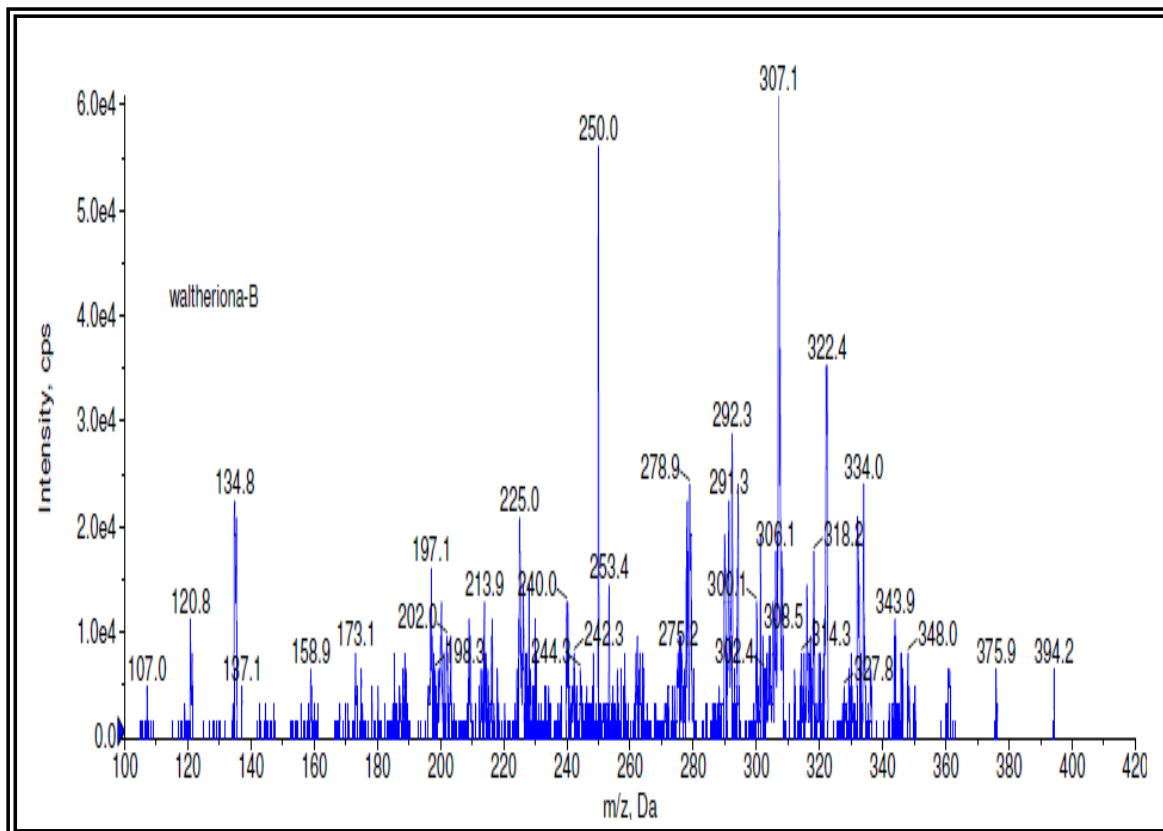


FIGURA 146. Espectro de massas de A17 (ESI, modo positivo)

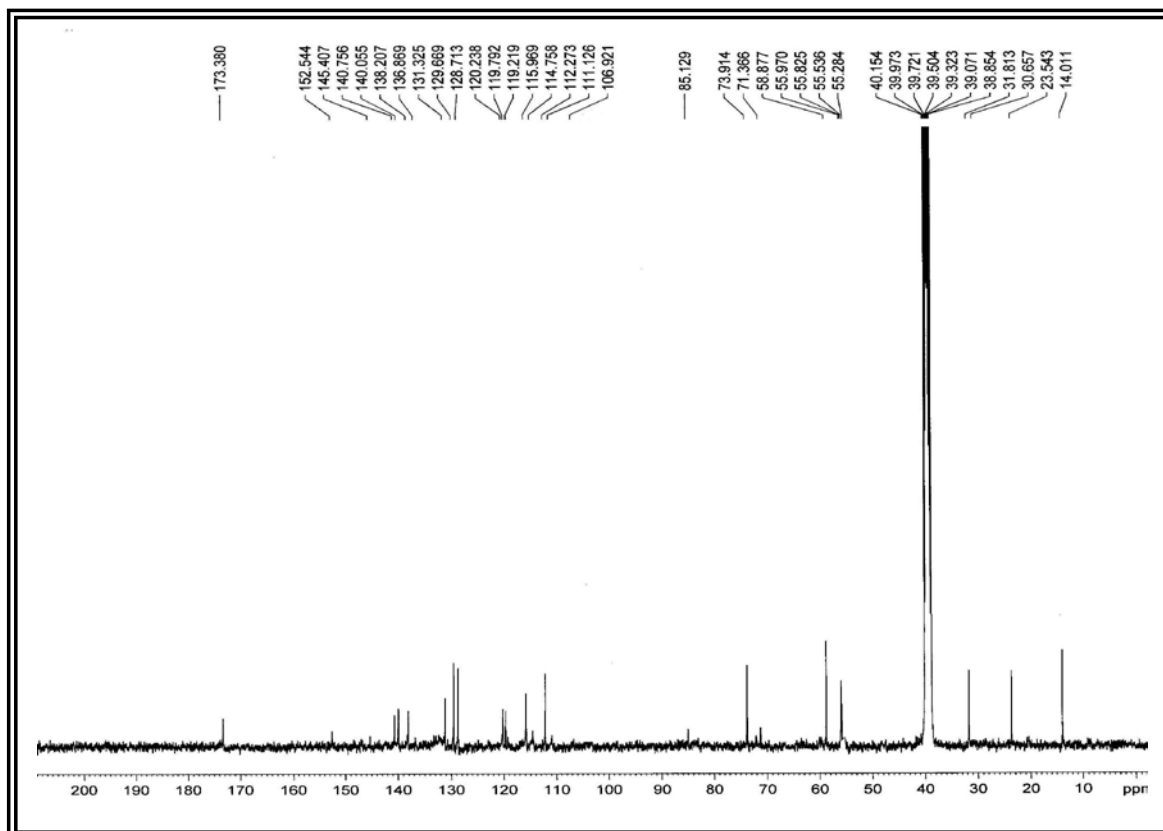


FIGURA 147. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A17 (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)



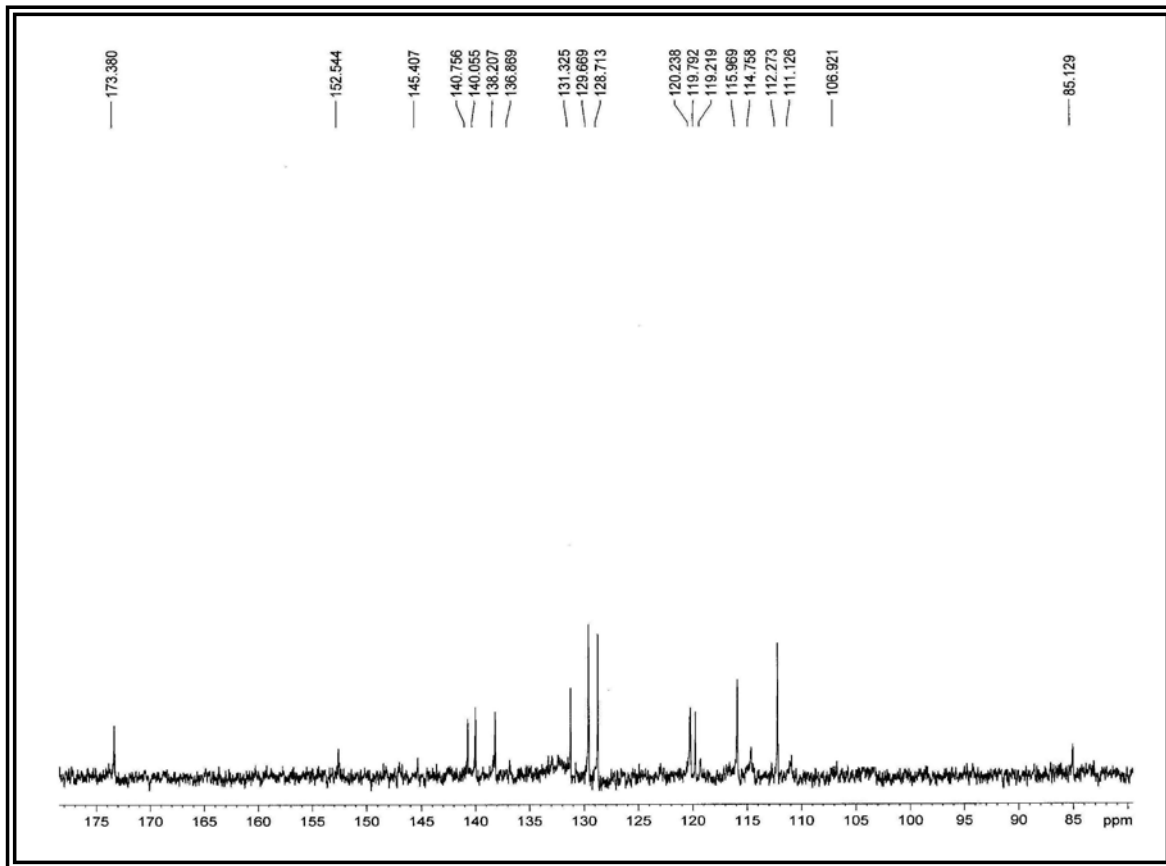


FIGURA 148. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A17 ( $\delta_{\text{C}}$  85 – 175)

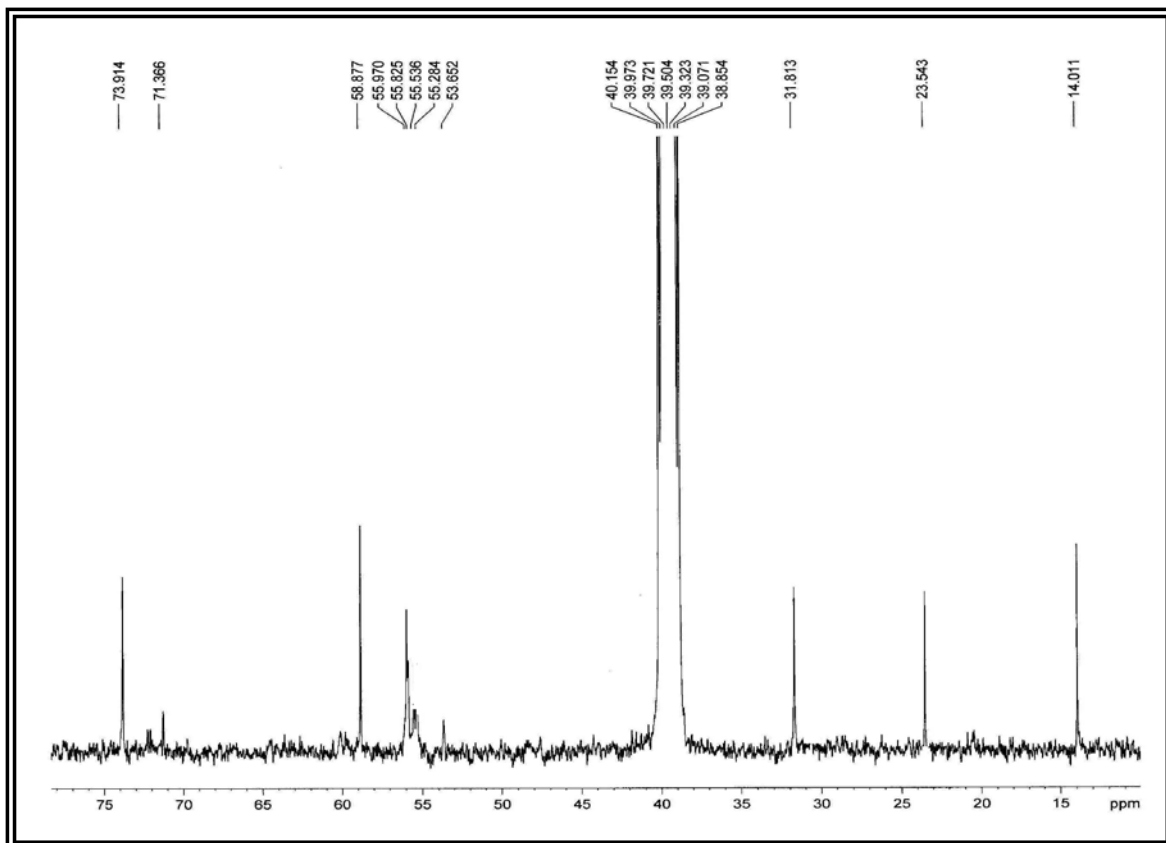


FIGURA 149. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A17 ( $\delta_{\text{C}}$  10 – 78)

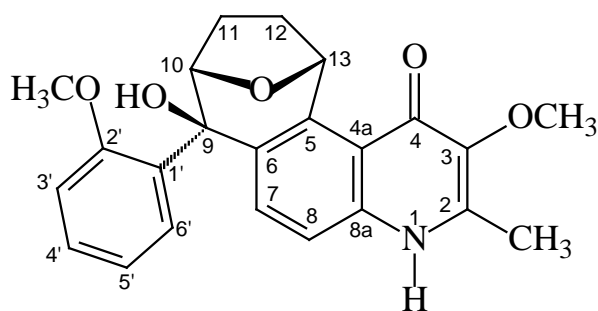
Após a análise e interpretação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e espectrometria de massas foi possível sugerir que A17 é um diastereoisômero da waltheriona-A. Gressler e colaboradores reportaram o isolamento de um diastereoisômero da waltheriona A (A16) do caule de *Waltheria douradinha*. Assim, os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A17 foram cuidadosamente comparados com a literatura (GRESSLER *et. al.*; 2008), permitindo a identificação inequívoca de A17 como sendo o alcaloide waltheriona B, sendo este o segundo relato de ocorrência deste alcaloide na literatura.

A única diferença estrutural entre as waltherionas A e B está na posição espacial da ponte éter entre os carbonos 10 e 13 do anel de sete membros. Enquanto que na waltheriona-A esta ponte éter encontra-se em face  $\alpha$ , na waltheriona-B a ponte éter encontra-se em face  $\beta$ .

Sendo as waltherionas A e B diastereoisômeros, estes dois alcaloides possuem propriedades físico-químicas diferentes, como a solubilidade. Enquanto que a waltheriona A é bem solúvel em solventes de média polaridade como diclorometano e clorofórmio, waltheriona B não é solúvel em solventes de média polaridade, mas possui boa solubilidade em metanol e DMSO.

Destaca-se neste trabalho que a temperatura ambiente a waltheriona-B coexiste em equilíbrio entre as formas ceto e enólica, enquanto que em temperaturas mais elevadas há uma preferência pela forma enólica.

Maiores detalhes a cerca da estereoquímica da waltheriona-B encontram-se no item 4.1.20.



**Estrutura da waltheriona B (A-17)**

TABELA 36. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A17

Posição	A-17* <sup>1</sup>		waltheriona B (Lit* <sup>2</sup> )	
	(400/100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		(400/100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-	140,05	-	139,44
3	-	138,20	-	138,00
4	-	173,38	-	173,04
4 <sup>a</sup>	-	119,23	-	119,54
5	-	131,32	-	131,38
6	-	129,67	-	131,09
7	7,18 ( <i>d</i> ; 8,0)	131,32	7,18 ( <i>d</i> ; 8,2)	131,67
8	7,29 ( <i>d</i> ; 8,0)	115,96	7,31 ( <i>d</i> ; 8,2)	115,51
8 <sup>a</sup>	-	140,76	-	140,58
9	-	71,36	-	72,00
10	4,52 ( <i>d</i> ; 7,6)	85,2	4,52 ( <i>dd</i> ; 7,8; 1,5)	82,84
11 <sup>a</sup>	1,85 ( <i>m</i> )	23,54	1,85 ( <i>m</i> )	23,32
11 <sup>b</sup>	2,10 ( <i>m</i> )		2,16 ( <i>m</i> )	
12 <sup>a</sup>	1,5-1,63 ( <i>m</i> )	31,81	1,5-1,63 ( <i>m</i> )	31,34
12 <sup>b</sup>	1,5-1,63 ( <i>m</i> )		1,5-1,63 ( <i>m</i> )	
13	6,59 ( <i>d</i> ; 8,4)	73,94	6,59 ( <i>d</i> ; 7,2)	73,57
1'	-	131,32	-	131,00
2'	-	152,54	-	156,98
3'	6,96 ( <i>d</i> ; 8,4)	112,27	6,91 ( <i>d</i> ; 8,0)	112,09
4'	7,27 sobreposto	128,71	7,27	128,32
5'	6,88 ( <i>t</i> )	119,79	6,89 ( <i>dd</i> )	119,89
6'	7,24 sobreposto	129,67	7,24	129,24
2-C-CH <sub>3</sub>	2,33 ( <i>s</i> )	14,01	2,35 ( <i>s</i> )	13,51
3-O-CH <sub>3</sub>	3,76 ( <i>s</i> )	58,87	3,79 ( <i>s</i> )	58,52
2'-OCH <sub>3</sub>	3,53 ( <i>s</i> )	55,97	3,53 ( <i>s</i> )	55,12
N-H	-	-	-	-
9-OH	5,14 ( <i>S</i> )	-	5,14 ( <i>S</i> )	-

\*<sup>1</sup>Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido a 85°C. \*<sup>2</sup>(GRESSLER *et. al.*; 2008)

#### 4.1.16. Elucidação estrutural do alcaloide A-15

A substância A-15 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala*, esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-15 obtido em DMSO a temperatura ambiente, apresentou grande semelhança com o espectro da waltheriona B (A17). A região de hidrogênios aromáticos apresentou sinais com multiplicidade bastante confusa, assim como na waltheriona B, entretanto com deslocamentos químicos bastante semelhantes a este último.

Assim como para a waltheriona B, não se observou neste espectro o sinal referente a hidroxila na posição 9 e o sinal referente ao hidrogênio H-10 apresentou-se como um simpleto largo em  $\delta$  4,70. Já os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos (posições 11 e 12) apresentaram-se bastante semelhantes àqueles referentes a waltheriona B. Não se observou no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A-15 os sinais referentes ao N-H e 4-OH que caracterizam o equilíbrio ceto-enólico da waltheriona B, enquanto que um sinal adicional de metila ligada a heteroátomo em  $\delta$  3,63 foi observado, sugerindo-se uma *N*-metilação na estrutura de A-15.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) apresentou sinais de carbono com deslocamentos semelhantes aos observados para a waltheriona B. Um sinal intenso em  $\delta$  36,20 foi observado, confirmando-se a presença de uma *N*-metila na estrutura de A-15.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-15 foram comparados com os da waltheriona B (A-17), de acordo com a literatura (GRESSLER *et. al.*; 2008), permitindo a elucidação estrutural inequívoca de A-15 como sendo o alcaloide *N*-metil-waltheriona B.

Lima e colaboradores já haviam relatado a ocorrência de um derivado *N*-metilado da waltheriona A isolado das folhas de *W. brachypetala* (LIMA *et. al.*; 2009), enquanto que Gressler e colaboradores obtiveram *N*-metil-waltheriona-B através de uma reação de metilação com diazometano, sendo que nesta reação *N*-metil-waltheriona-B foi o produto minoritário, enquanto que 4-*O*-metil-waltheriona-B foi o produto majoritário (GRESSLER *et. al.*; 2008).

Uma vez que *N*-metil-waltheriona B está sendo descrito pela primeira vez como produto natural, obteve-se o espectro de massas de alta resolução, que confirmou a massa molecular de A-17 como sendo  $[\text{M} - \text{H}^+]$   $m/z$  406,1646 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}$ .

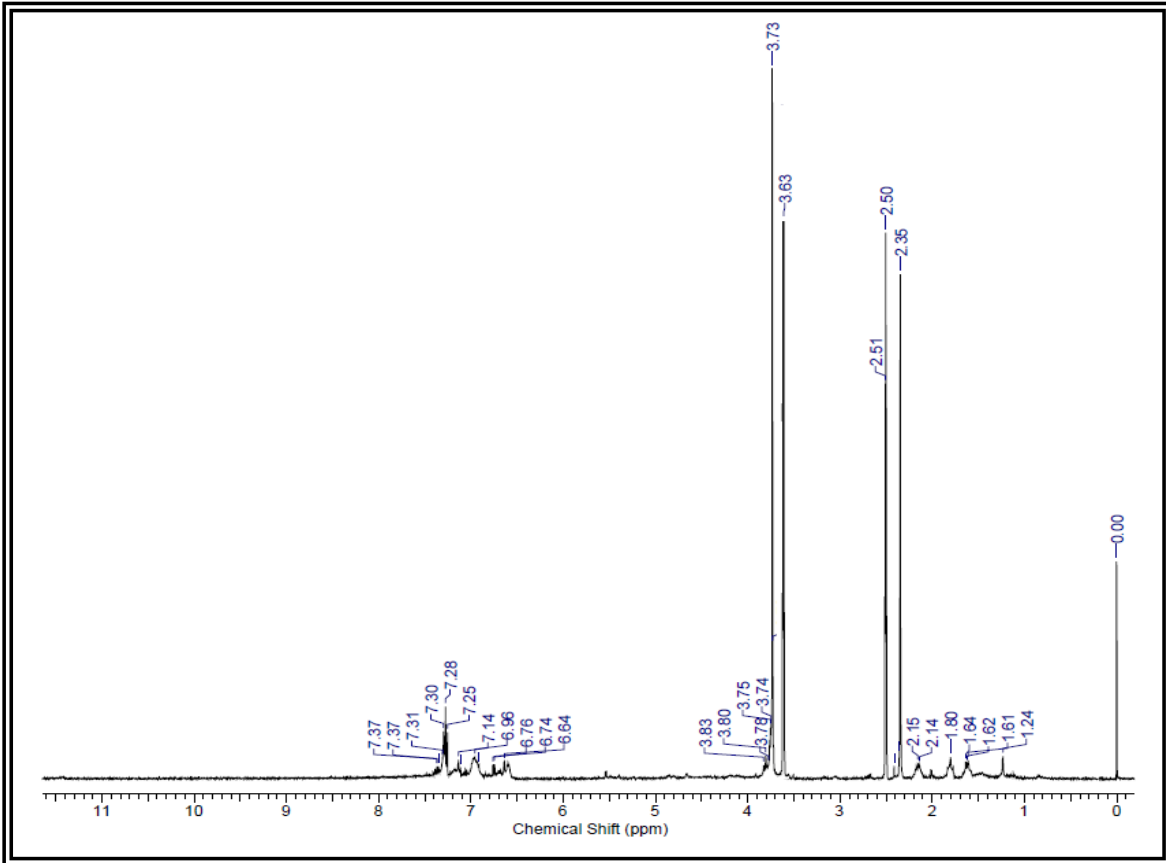


FIGURA 150. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A15 (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz)

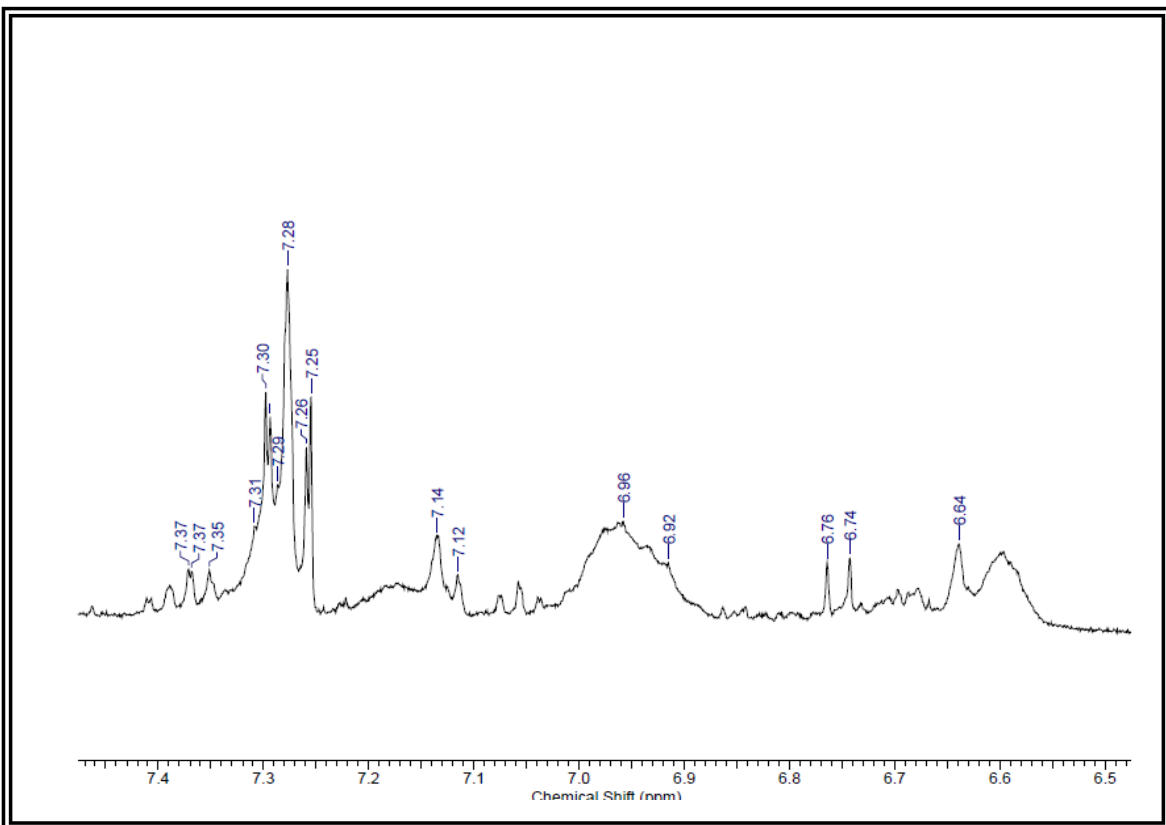


FIGURA 151. Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A15 (δ 6,5 – 7,4)

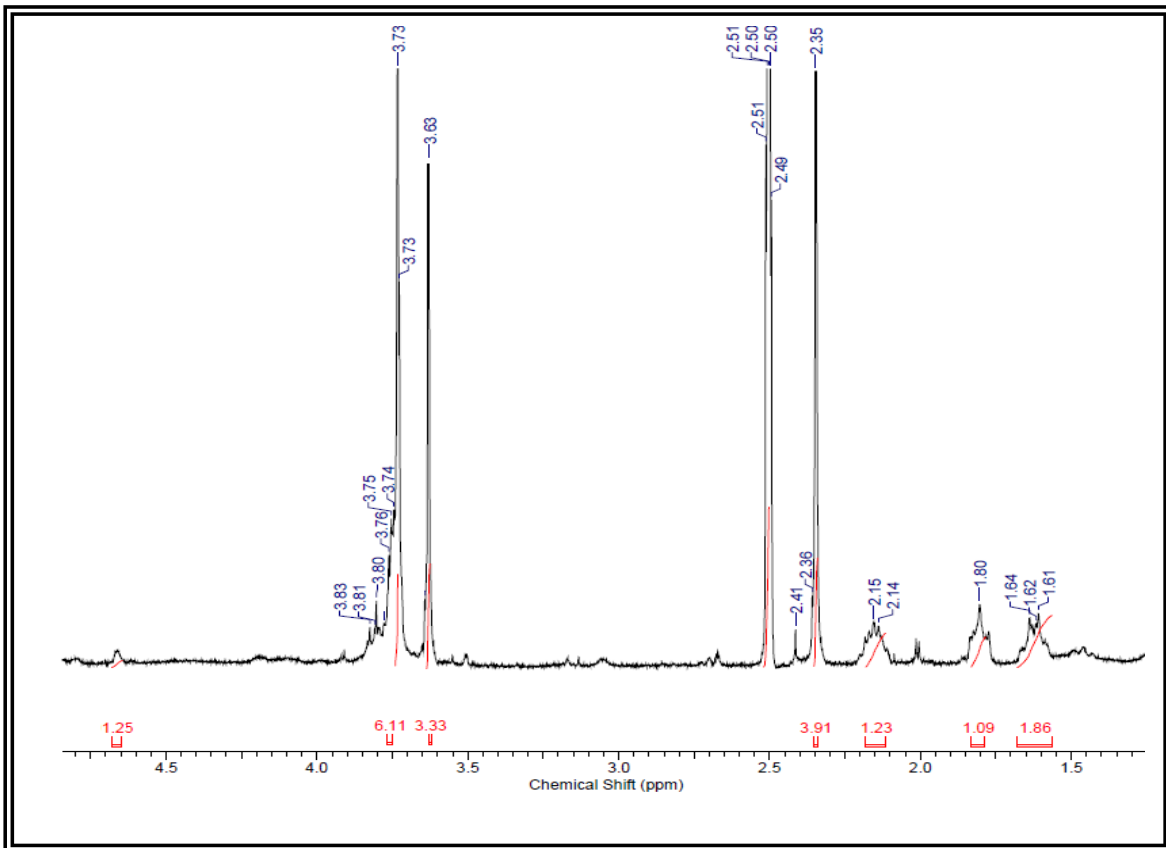


FIGURA 152. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A15 ( $\delta$  1,0 – 5,0)

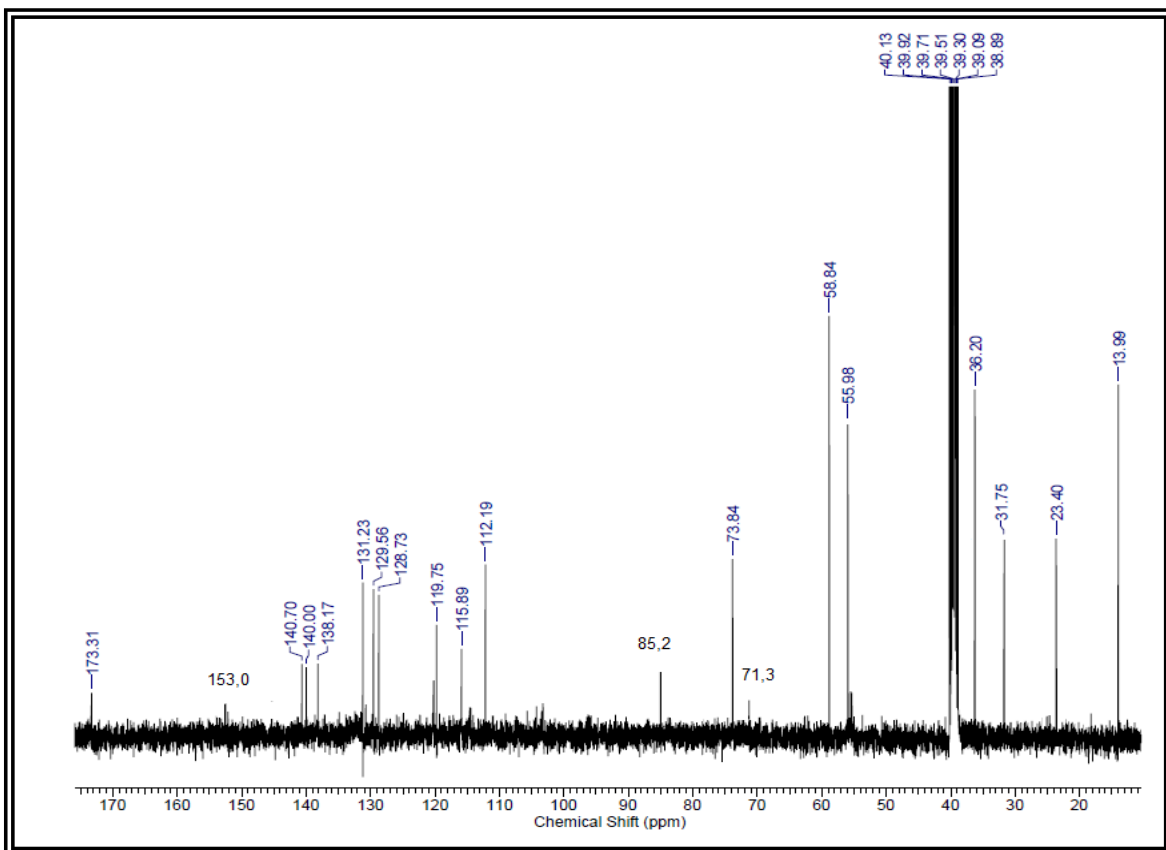


FIGURA 153. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A15 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)

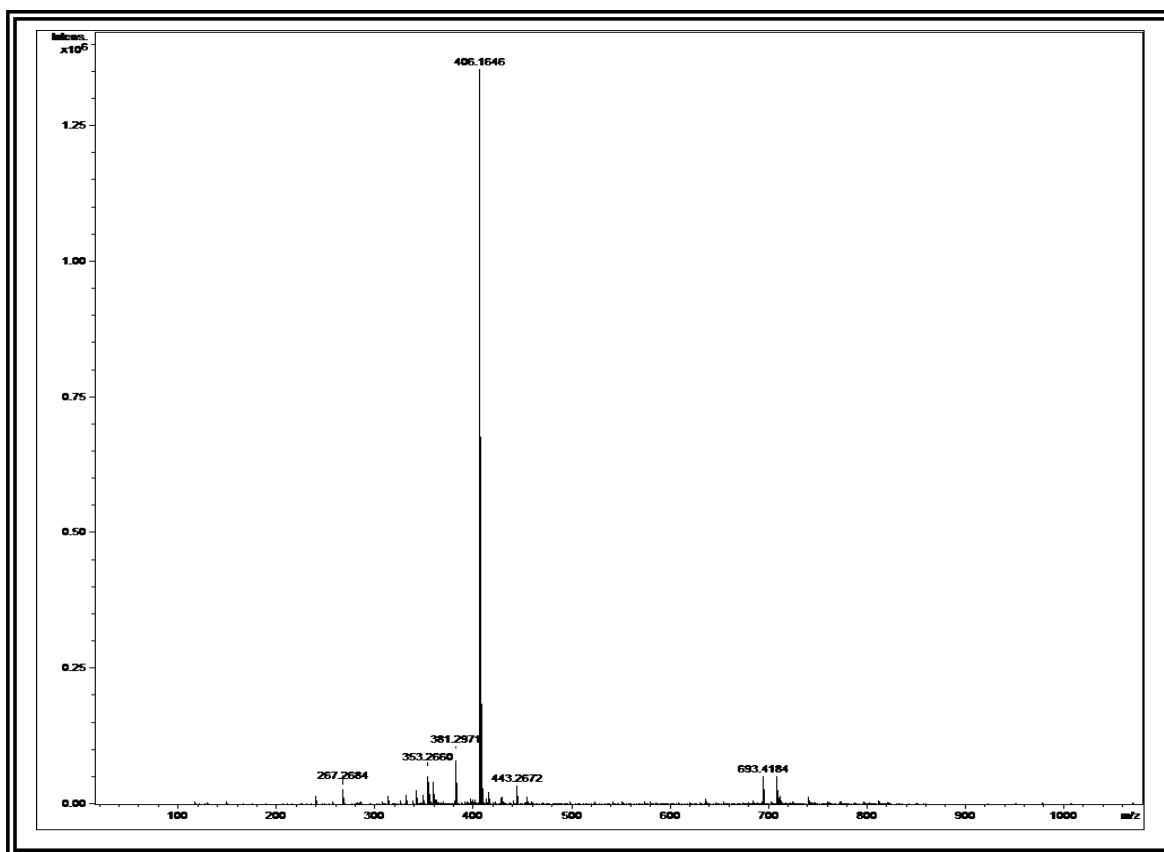
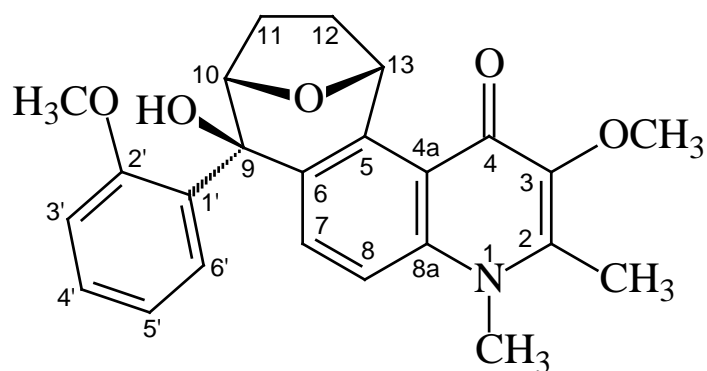


Figura 154. Espectro de massas de alta resolução de A15 (ESI, modo negativo)



**Estrutura da N-metil-waltheriona B**

TABELA 37. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-15

Posição	A-15* <sup>1</sup>		waltheriona B (Lit* <sup>2</sup> )	
	(400/100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		(400/100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-	140,00	-	139,44
3	-	138,17	-	138,00
4	-	173,31	-	173,04
4 <sup>a</sup>	-	119,75	-	119,54
5	-	131,23	-	131,38
6	-	129,56	-	131,09
7	7,24 ( <i>d</i> ; 8,0)	131,23	7,18 ( <i>d</i> ; 8,2)	131,67
8	7,31 ( <i>d</i> ; 8,0)	115,89	7,31 ( <i>d</i> ; 8,2)	115,51
8 <sup>a</sup>	-	140,70	-	140,58
9	-	71,30	-	72,00
10	4,70 ( <i>s</i> )	85,20	4,52 ( <i>dd</i> ; 7,8; 1,5)	82,84
11 <sup>a</sup>	1,85 ( <i>m</i> )	23,40	1,85 ( <i>m</i> )	23,32
11b	2,10 ( <i>m</i> )		2,16 ( <i>m</i> )	
12 <sup>a</sup>	1,5-1,63 ( <i>m</i> )	31,75	1,5-1,63 ( <i>m</i> )	31,34
12b	1,5-1,63 ( <i>m</i> )		1,5-1,63 ( <i>m</i> )	
13	6,60 ( <i>m</i> )	73,84	6,59 ( <i>d</i> ; 7,2)	73,57
1'	-	131,23	-	131,00
2'	-	153,00	-	156,98
3'	6,96 ( <i>m</i> )	112,19	6,91 ( <i>d</i> ; 8,0)	112,09
4'	7,27 sobreposto	128,73	7,27	128,32
5'	6,88 ( <i>m</i> )	119,75	6,89 ( <i>dd</i> )	119,89
6'	7,24 sobreposto	129,56	7,24	129,24
2-C-CH <sub>3</sub>	2,33 ( <i>s</i> )	13,99	2,35 ( <i>s</i> )	13,51
3-O-CH <sub>3</sub>	3,73 ( <i>s</i> )	58,84	3,79 ( <i>s</i> )	58,52
2'-OCH <sub>3</sub>	3,73 ( <i>s</i> )	55,98	3,53 ( <i>s</i> )	55,12
N-CH <sub>3</sub>	3,63 ( <i>s</i> )	36,20	-	-
9-OH	*NO	-	5,14 ( <i>s</i> )	-

\*<sup>1</sup> Espectro obtido a temperatura ambiente. \* Não observado. \*<sup>2</sup> (GRESSLER *et. al.*; 2008)



#### 4.1.17. Elucidação estrutural do alcaloide A12

A substância A12 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A12 apresentou considerada semelhança com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da waltheriona A, diferindo com relação ao sinal do hidrogênio H-8 que se encontra mais blindado e sobreposto ao sinal do hidrogênio H-4', enquanto que o sinal do hidrogênio H-13 encontra-se também mais blindado e sobreposto ao sinal do hidrogênio H-5'. Observa-se ainda neste espectro que os hidrogênios metilênicos diastereotópicos (H-11 e H-12) encontram-se divididos em dois conjuntos de sinais devido à sobreposição destes.

O sinal de simpleto largo em  $\delta$  8,62 foi inicialmente atribuído a hidroxila fenólica na posição 4, sugerindo que na estrutura de A-12, a temperatura ambiente, há uma preferência pela forma enólica; entretanto não descartou-se a possibilidade de tautomerismo.

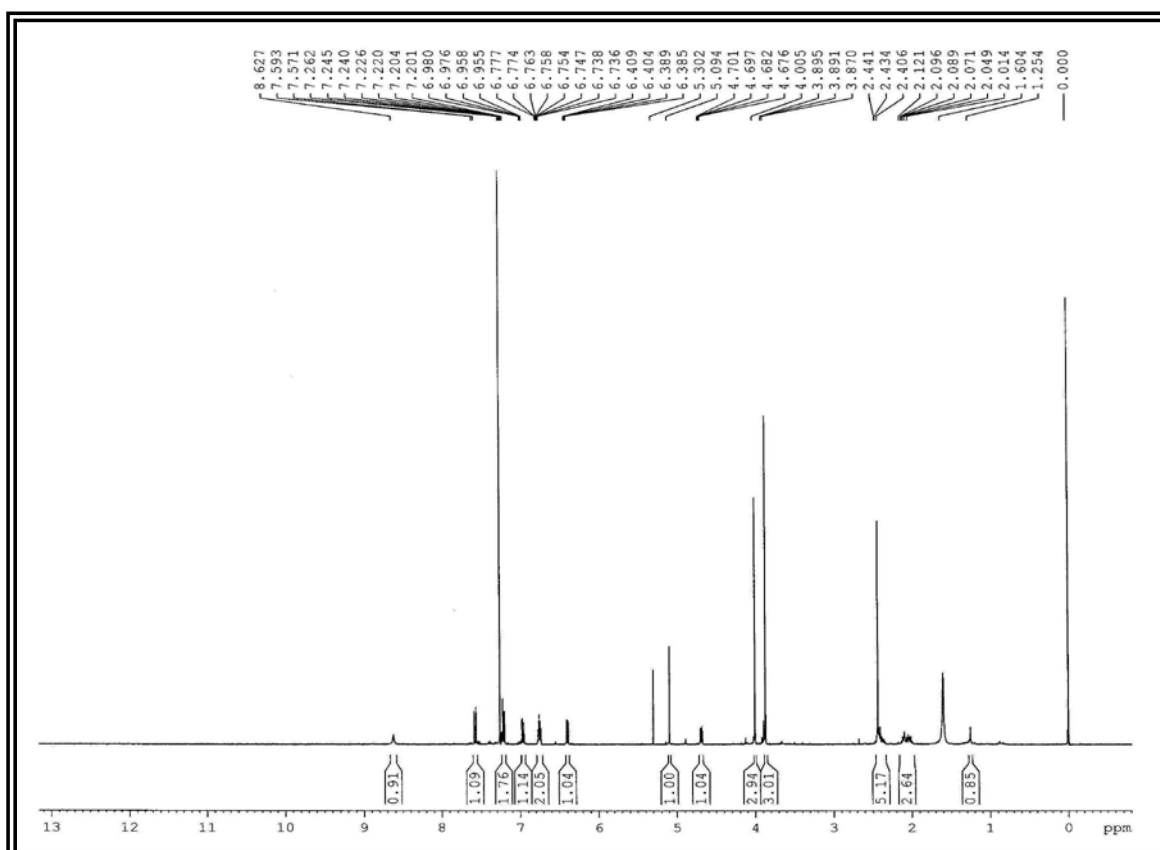


FIGURA 155. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A12 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

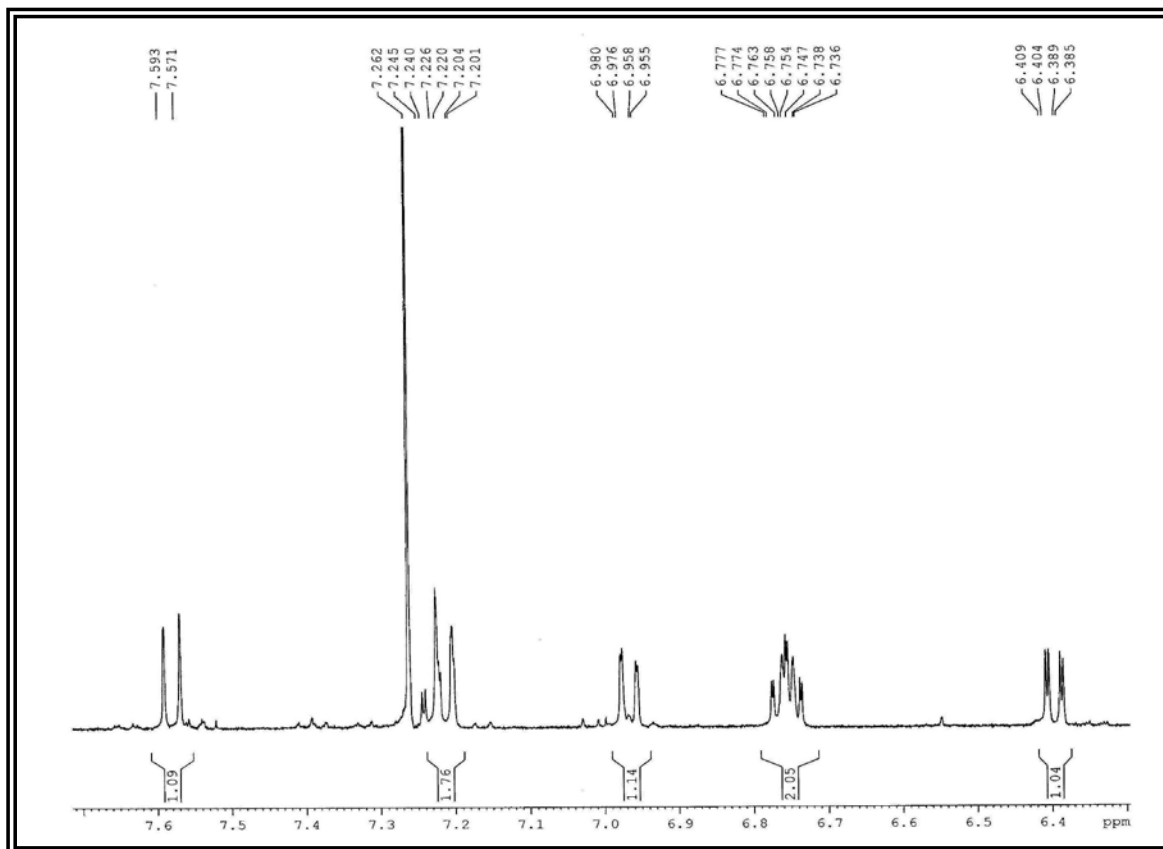


FIGURA 156. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A12 ( $\delta$  6,3 – 7,7)

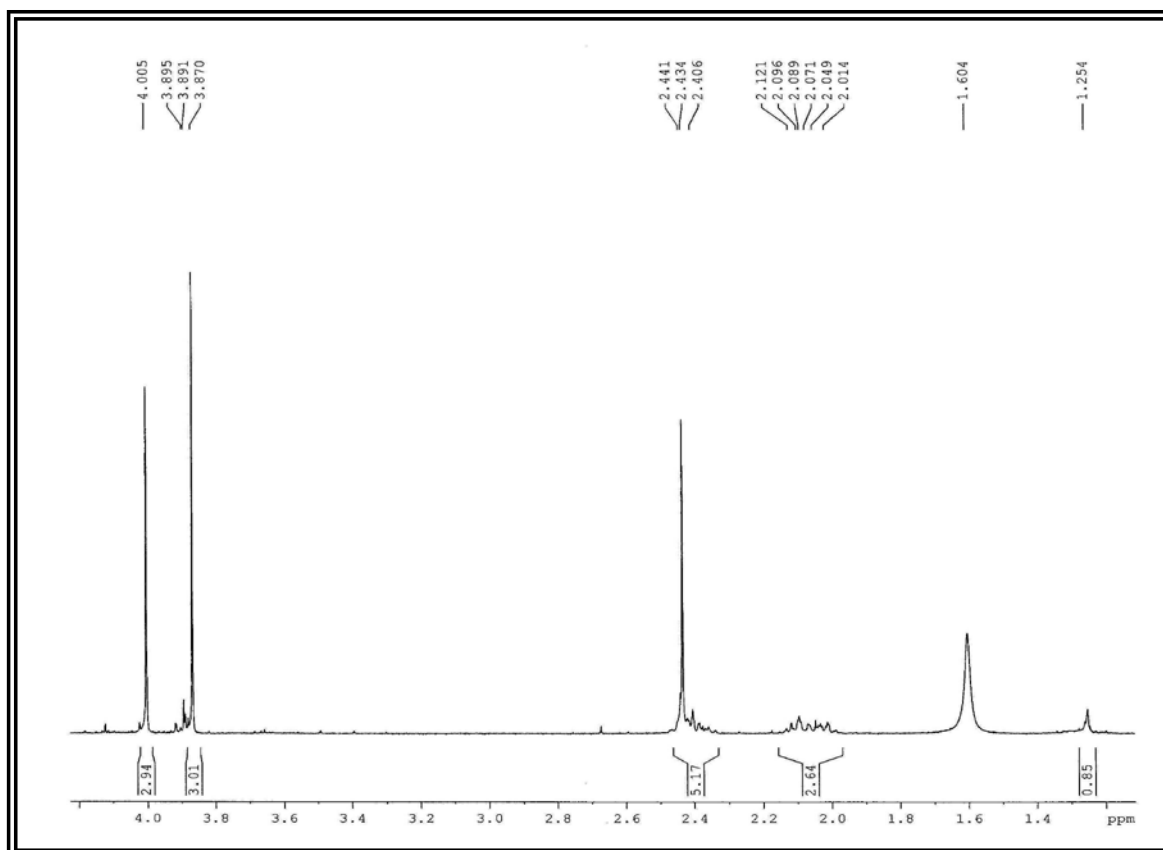


FIGURA 157. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A12 ( $\delta$  1,2 – 4,1)

O mapa de correlações do espectro de COSY de A-12 apresentou as mesmas correlações observadas no espectro de COSY da waltheriona A (A16). Destacando-se a correlação entre o sinal do hidrogênio H-7 em  $\delta$  7,57 com o sinal do hidrogênio H-8 sobreposto em  $\delta$  7,26 e do sinal do hidrogênio H-13 sobreposto em  $\delta$  6,75 com os sinais dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em  $\delta$  2,05 e 2,45; H-12a e H-12b, respectivamente.

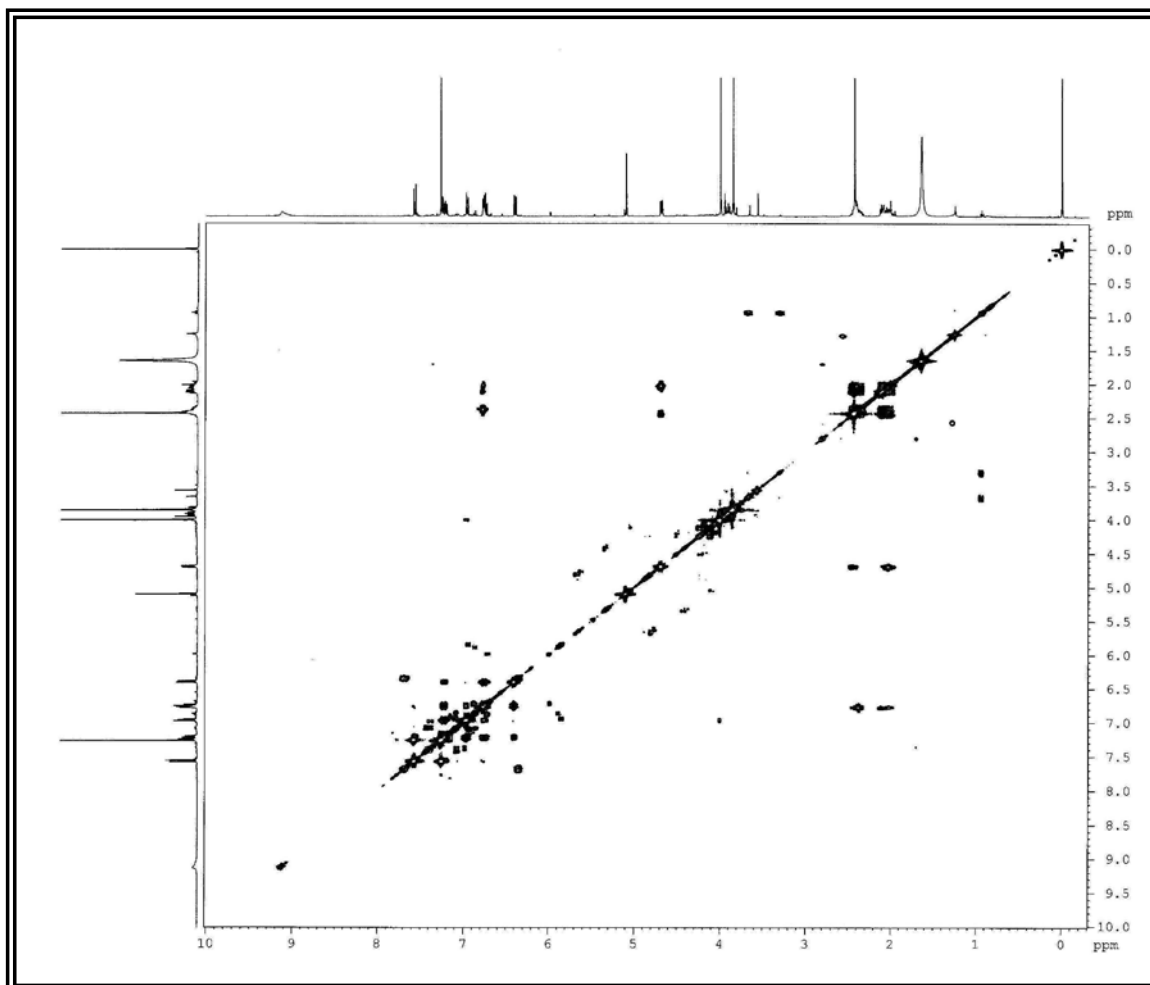


FIGURA 158. Mapa de correlações de <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY de A12 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

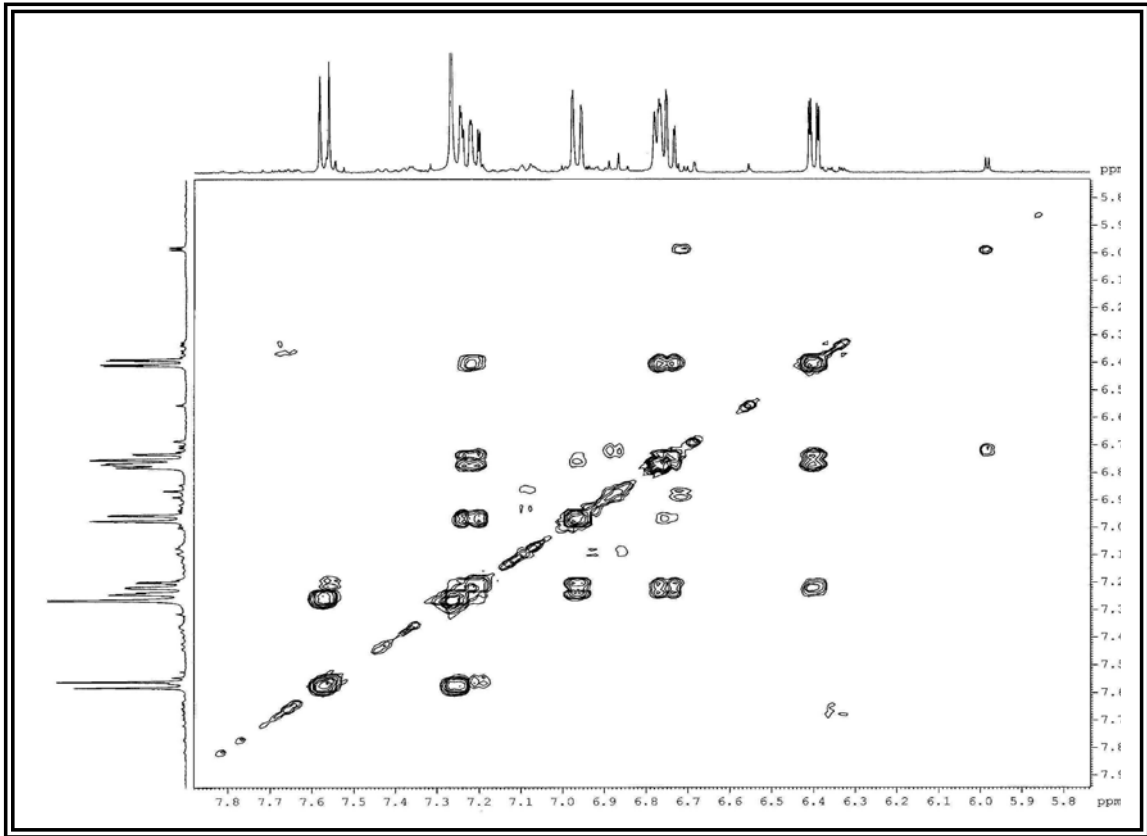


FIGURA 159. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A12 ( $\delta$  5,8 – 7,8)

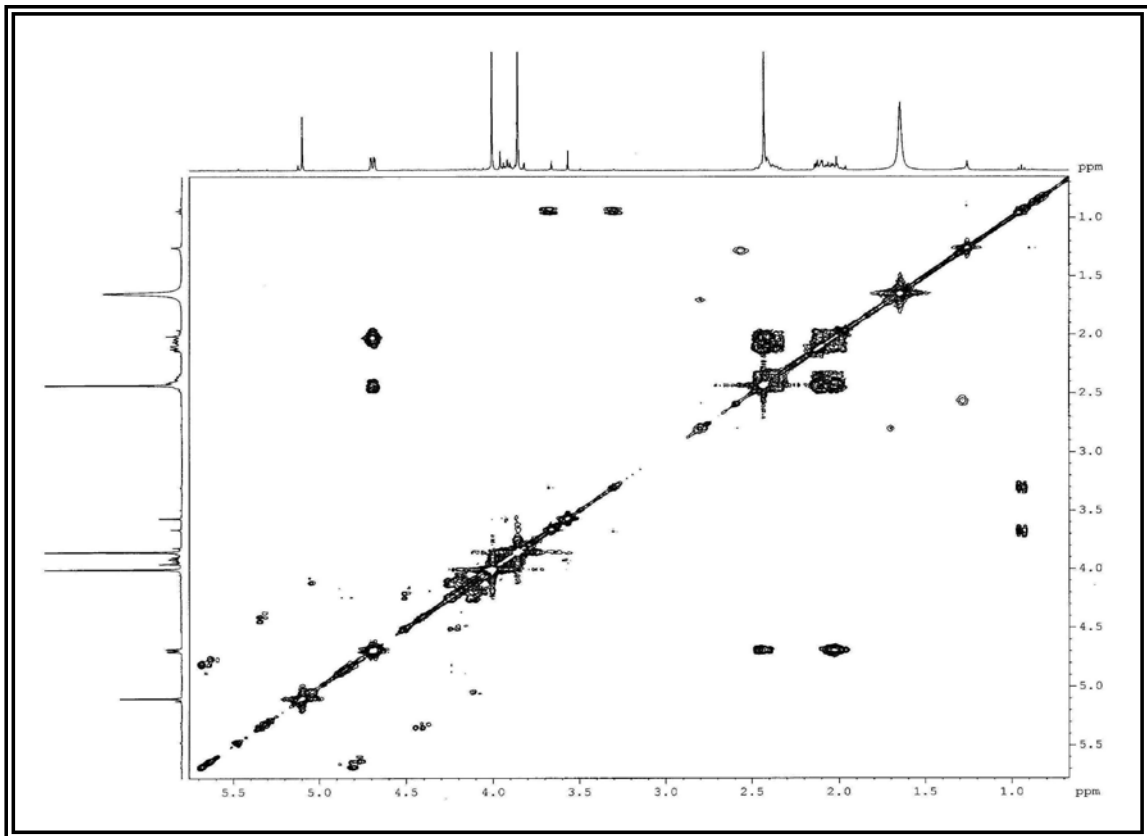


FIGURA 160. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A12 ( $\delta$  5,8 – 7,8)

Através do mapa de correlações do espectro de HSQC de A-12 observou-se as correlações dos sinais de hidrogênio com seus respectivos sinais de carbono ao qual os mesmos estão diretamente ligados, sendo possível observar grande semelhança entre os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados de A-12 com aqueles referentes à walthersonia A (A16).

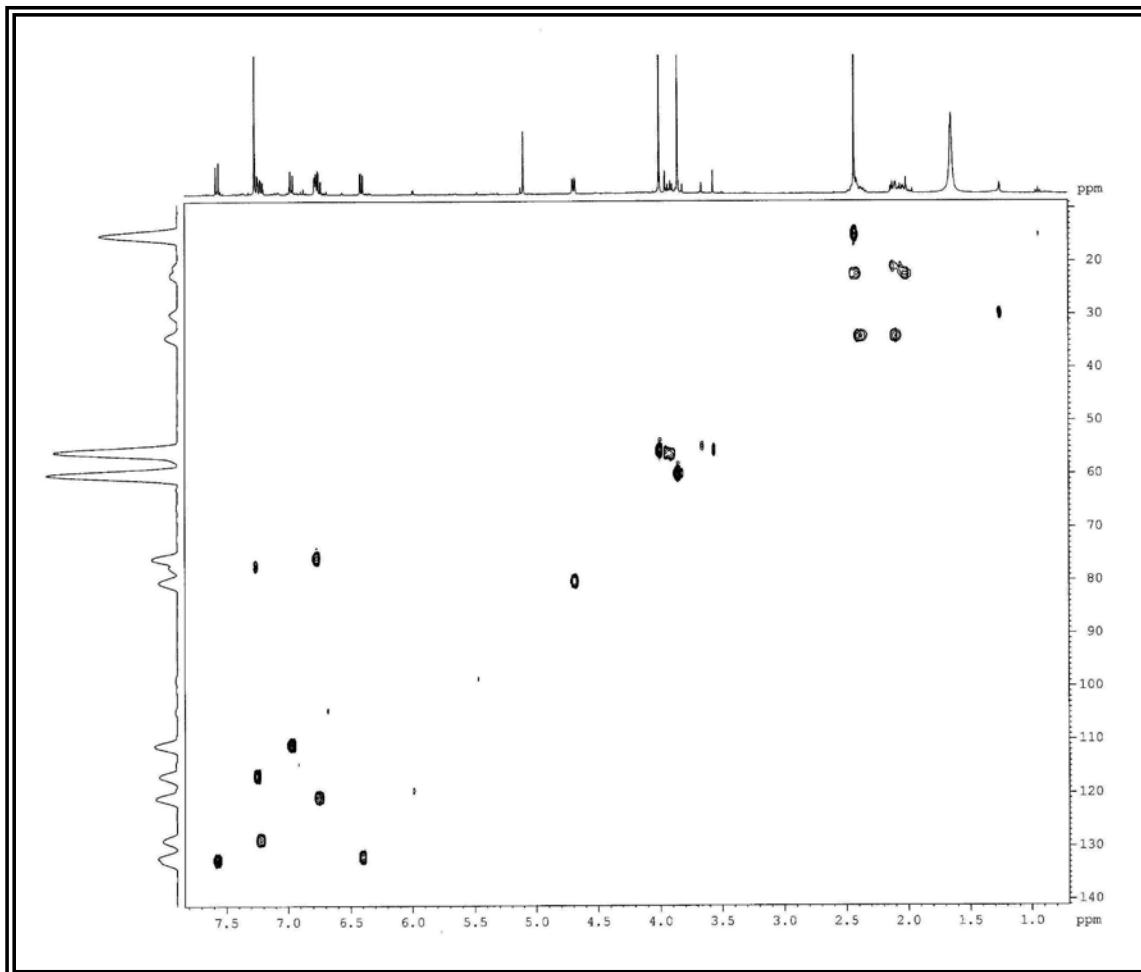


FIGURA 161. Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

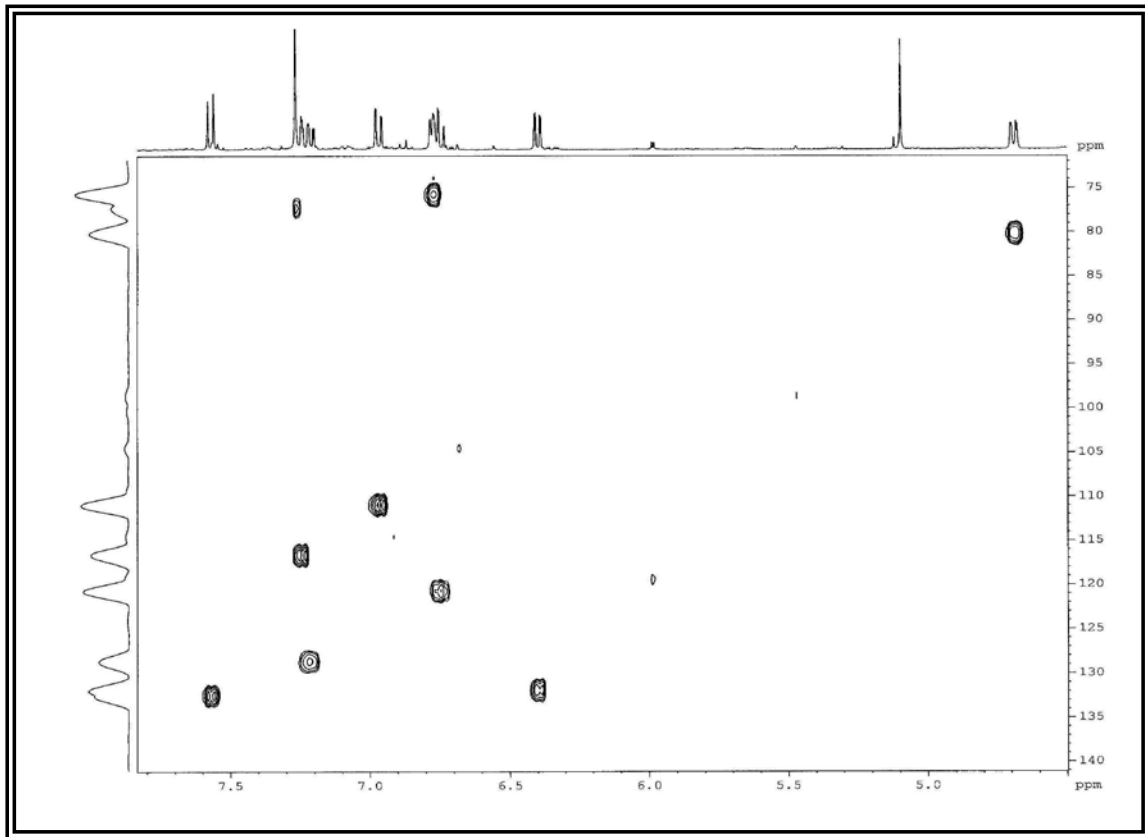


FIGURA 162 Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\delta_H$  5,0 – 7,8;  $\delta_C$  72 – 140)

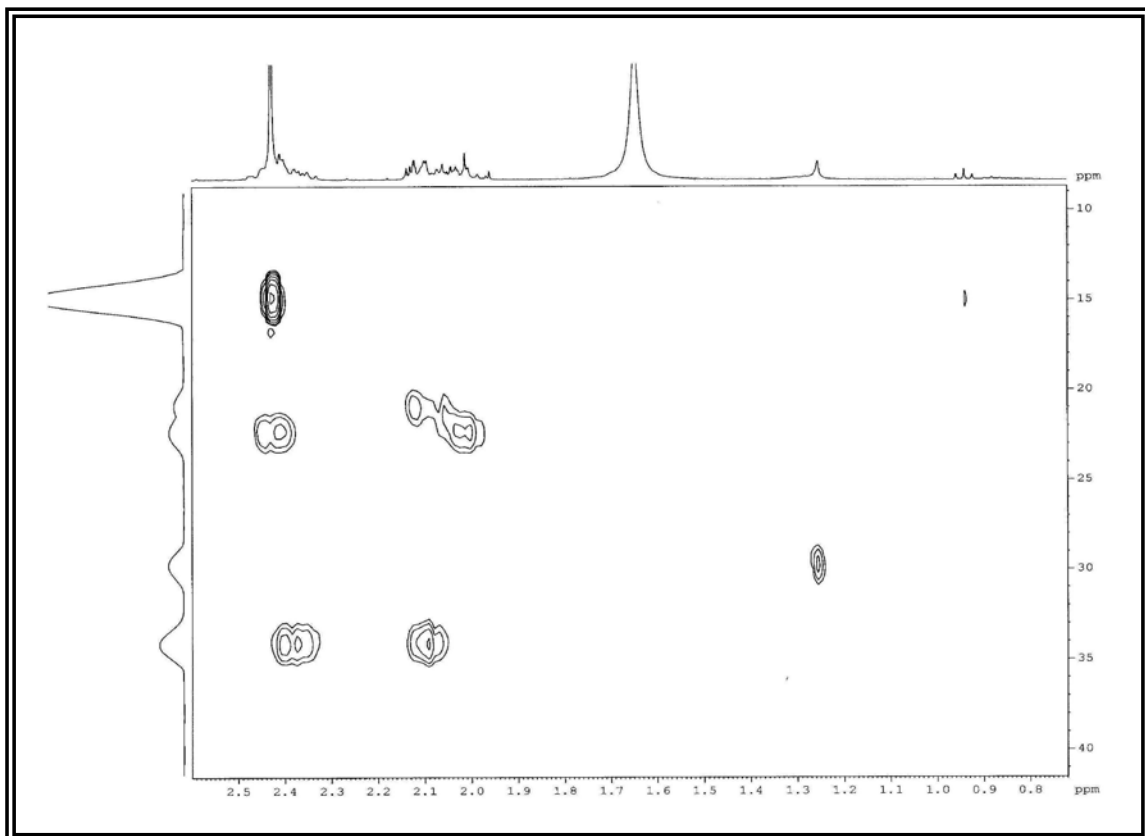


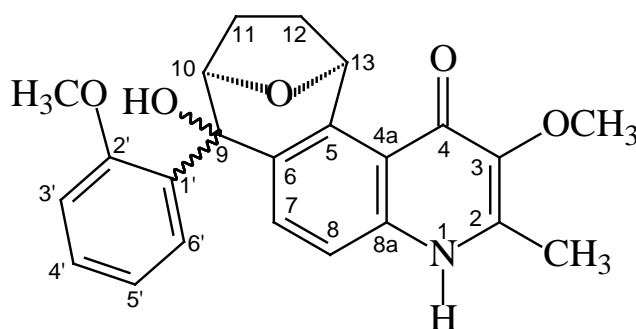
FIGURA 163. Mapa de correlações do HSQC de A12 ( $\delta_H$  0,8 – 2,5;  $\delta_C$  10 – 40)

O mapa de correlações do espectro de HMBC de A12 apresentou correlações semelhantes de hidrogênio e carbono a múltiplas ligações ( $J_{1-4}$ ) com aquelas observadas para a waltheriona A. Estas correlações podem ser observadas na tabela 38.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A12 apresentou 23 sinais de  $^{13}\text{C}$ , indicando que a estrutura de A-12 possui o mesmo número de carbonos da waltheriona A. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentaram-se bastante semelhantes àqueles verificados para a waltheriona A.

A partir da análise e comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-12 e da waltheriona A, pôde-se afirmar inequivocamente que A12 trata-se de outro diastereoisômero da waltheriona A, que neste trabalho está sendo nomeado de waltheriona C. Esta hipótese também foi confirmada através do espectro de massas de alta resolução através do íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  394,1648 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}$ .

A waltheriona C trata-se de um alcaloide inédito. A estereoquímica deste alcaloide será discutida no item 4.1.20.



**Estrutura da waltheriona C (A-12)**

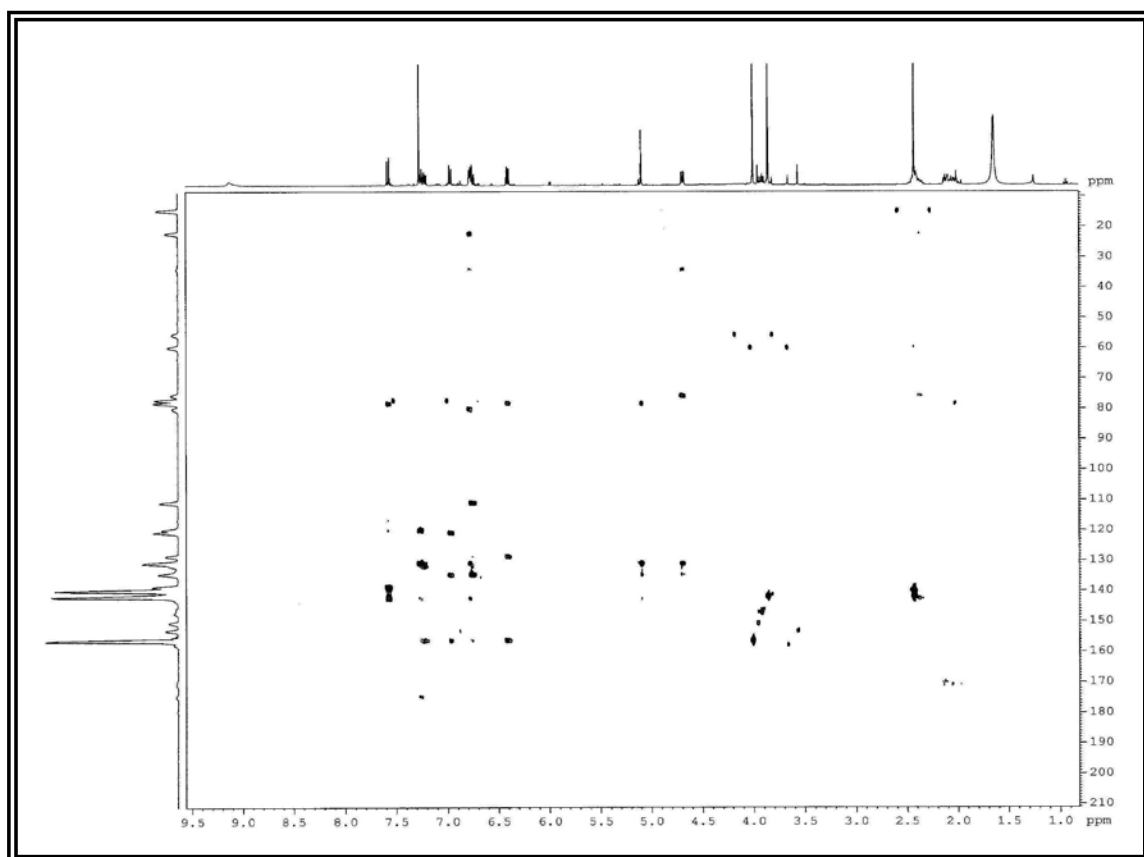


FIGURA 164. Mapa de correlações do HMBC de A12 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

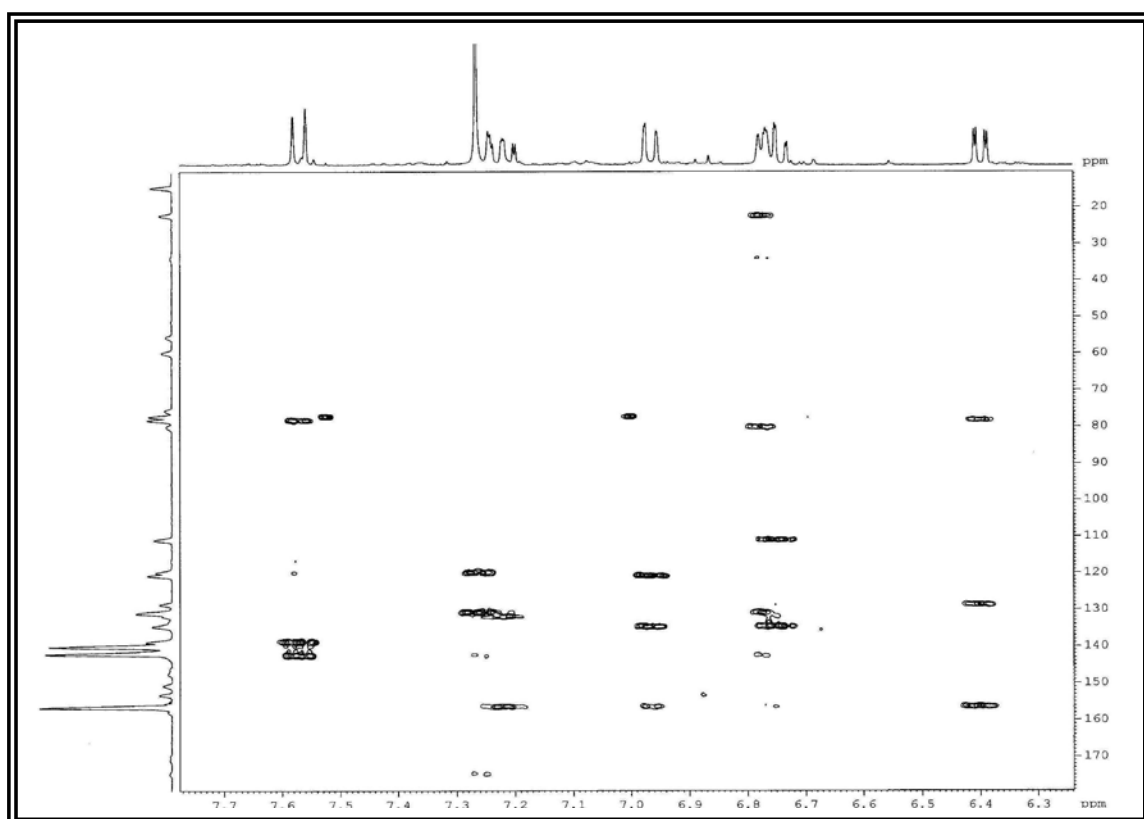


FIGURA 165. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$  6,3 – 7,7;  $\delta_C$  15 – 175)



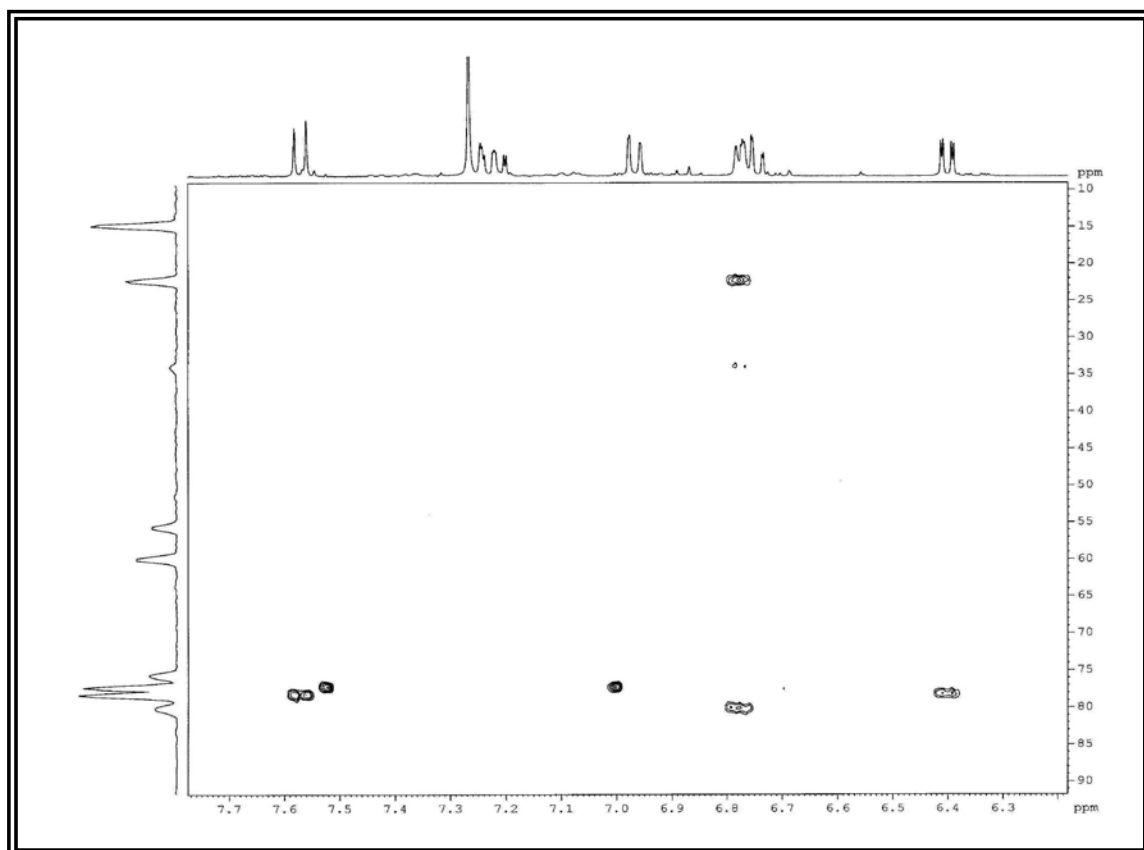


FIGURA 166. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$  6,3 – 7,7;  $\delta_C$  10 – 90)

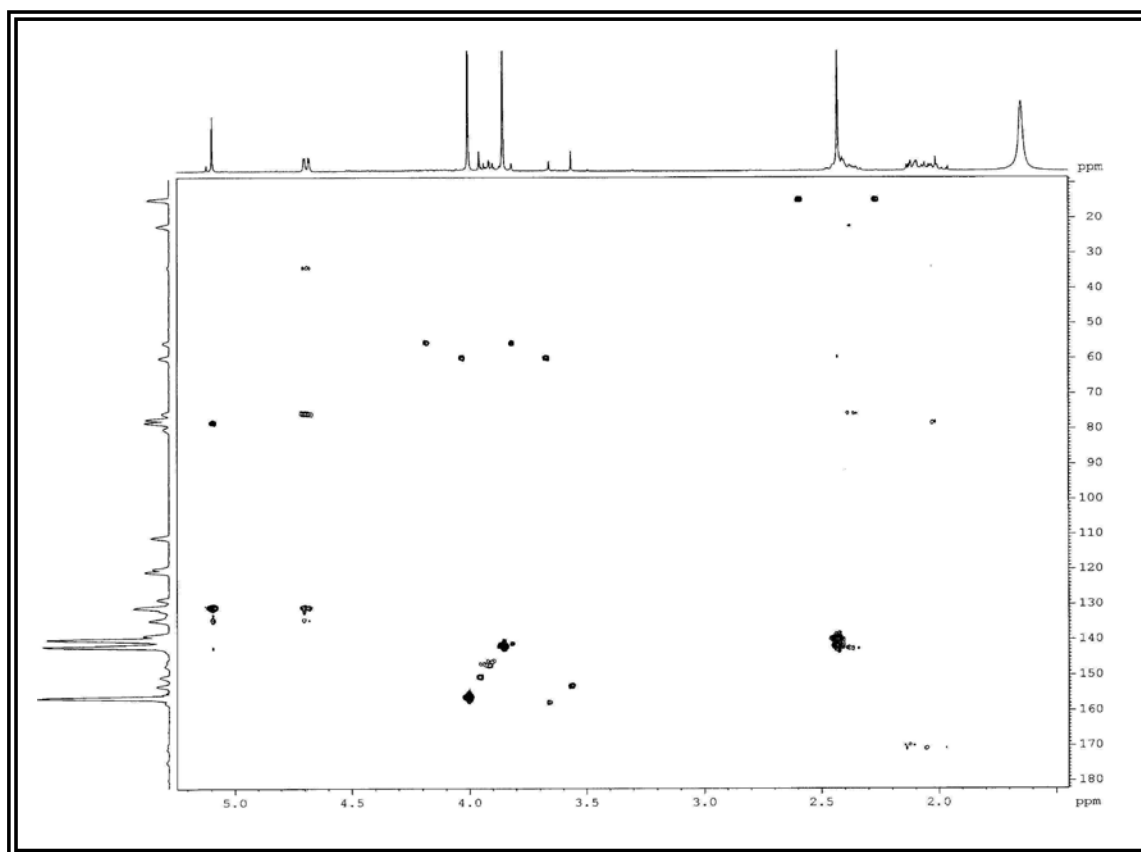


FIGURA 167. Mapa de correlações do HMBC de A12 ( $\delta_H$  1,5 – 5,2;  $\delta_C$  10 – 180)

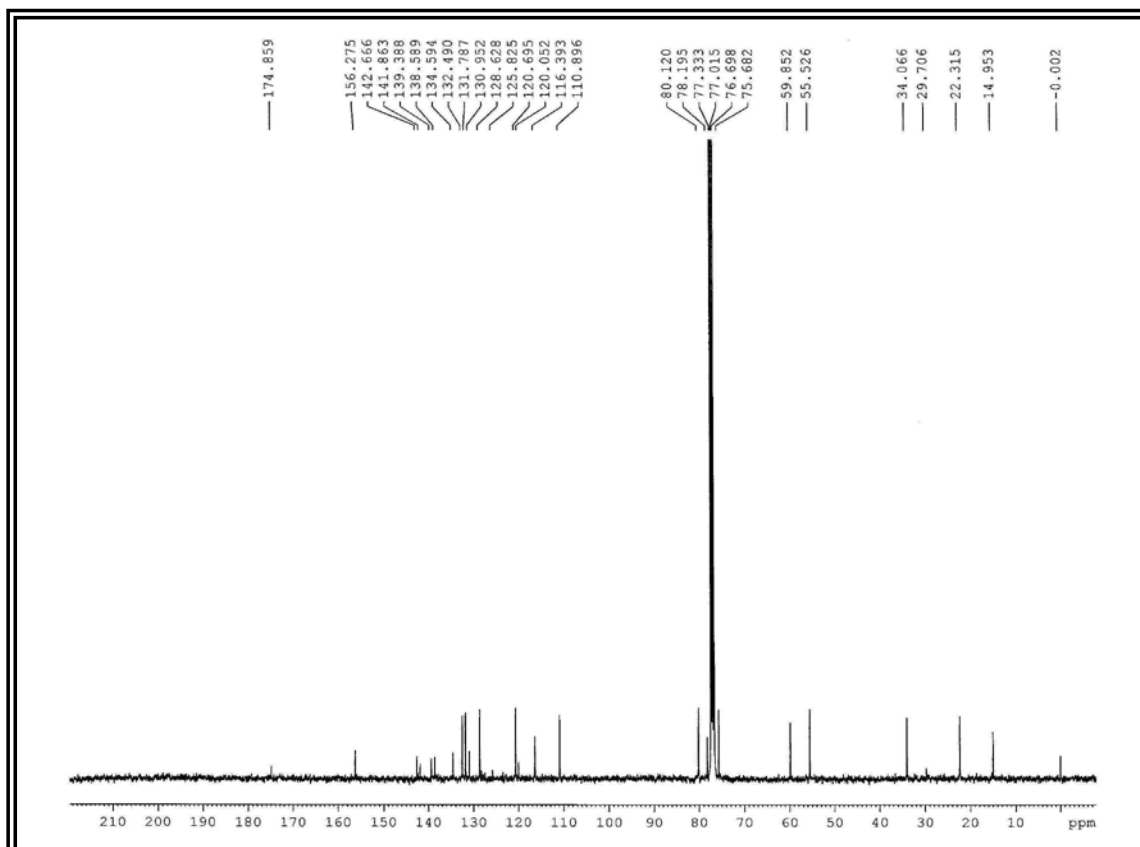


FIGURA 168. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A12 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

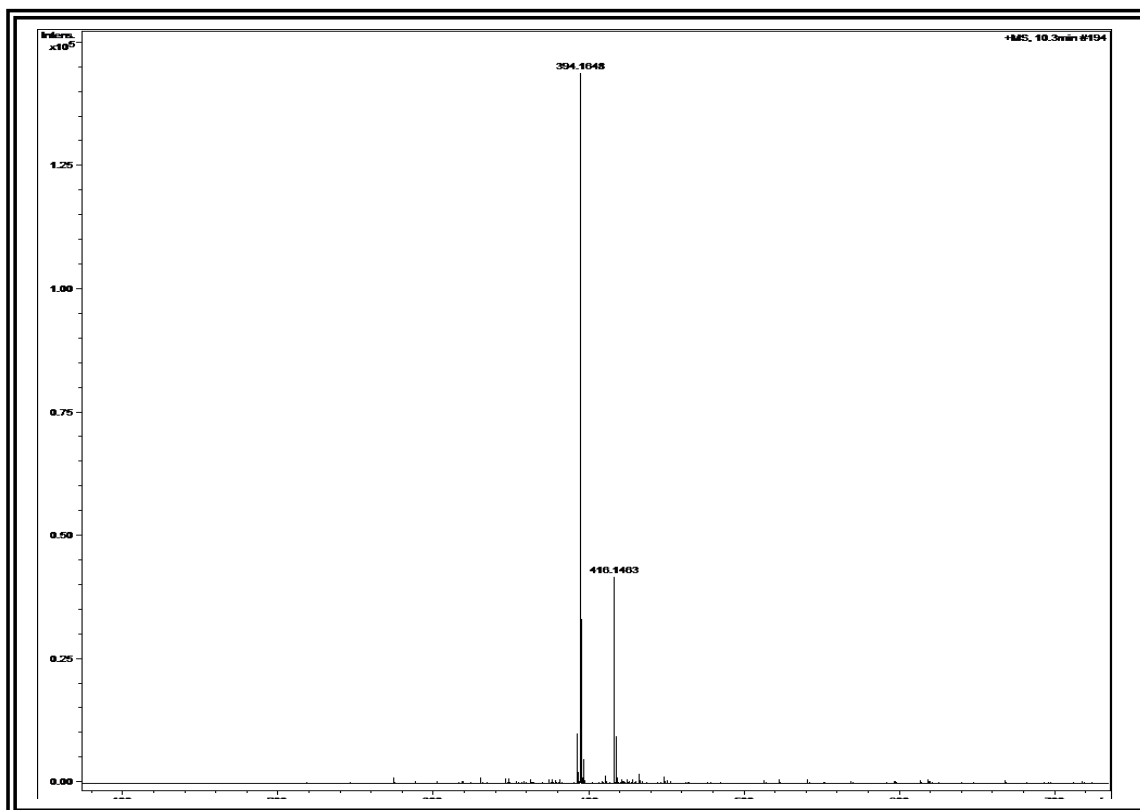


FIGURA 169. Espectro de massas de alta resolução de A12 (ESI, modo positivo)

TABELA 38. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A12

Posição	A-12 (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )			waltheriona A (Lit <sup>*1</sup> ) (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC 400 MHz	$\delta$ $^1\text{H}$
2	-	142,66		-	141,60
3	-	139,38		-	139,30
4	-	174,86		-	174,40
4 <sup>a</sup>	-	120,05		-	119,80
5	-	138,59		-	141,70
6	-	130,95		-	130,50
7	7,57 ( <i>d</i> ; 8,8)	132,49	C-9; C-10; C-5; C-4 <sup>a</sup>	7,48 ( <i>d</i> )	131,80
8	7,26 sobreposto	116,39	C-6, C-4 <sup>a</sup> , C-4	7,41 ( <i>d</i> )	117,40
8 <sup>a</sup>	-	142,39		-	141,80
9	-	78,20		-	77,20
10	4,69 ( <i>dd</i> ; 7,6; 1,5)	80,12	C-9; C-6; C-12; C-1'	4,61 ( <i>dd</i> )	80,16
11 <sup>a</sup>	2,38 ( <i>m</i> )	22,31		2,34 ( <i>m</i> )	21,60
11b	2,10 ( <i>m</i> )			2,10 ( <i>m</i> )	
12 <sup>a</sup>	2,45 ( <i>m</i> )	34,06		2,40 ( <i>m</i> )	33,70
12b	2,05 ( <i>m</i> )			1,99 ( <i>m</i> )	
13	6,75 sobreposto	75,68	C-9; C-10; C-6; C-11	6,87 ( <i>d</i> )	75,60
1'	-	134,59		-	134,70
2'	-	156,28		-	156,40
3'	6,96 ( <i>dd</i> ; 8,8; 1,6)	110,90	C-2'; C-5'; C-1'	6,94 ( <i>dd</i> )	110,80
4'	7,22 sobreposto	128,63	C-2'; C-6'	7,20 ( <i>ddd</i> )	128,50
5'	6,73 sobreposto	120,70	C-1'; C-2'; C-3'	6,70 ( <i>ddd</i> )	120,60
6'	6,40 ( <i>dd</i> ; 8,0;2,0)	131,79	C-9; C-2'; C-4'	6,29 ( <i>dd</i> )	131,10
2-C-CH <sub>3</sub>	2,41 ( <i>s</i> )	14,95	C-2; C-3	2,41 ( <i>s</i> )	14,30
3-O-CH <sub>3</sub>	3,87 ( <i>s</i> )	59,85	C-3	3,75 ( <i>s</i> )	59,20
2'- OCH <sub>3</sub>	4,01 ( <i>s</i> )	55,52	C-2'	3,97 ( <i>s</i> )	55,40
N-H	-	-	-	12,00 ( <i>s</i> )	-
9-OH	5,09 ( <i>s</i> )	-	C-9	5,10 ( <i>s</i> )	-

\* (HOELZEL, *et. al.*; 2005)

#### 4.1.18. Elucidação estrutural do alcaloide A13

A substância A13 foi isolada das fases diclorometano da raiz e do caule de *W. brachypetala*. Esta se apresentou como um sólido branco amorfo e revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 apresentou sinais que permitiram deduzir um esqueleto estrutural parecido ao das waltherionas anteriormente discutido. Observou-se dois sinais de simpletos integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,92 e 2,46 característicos da metoxila na posição 3 e da metila ligado ao carbono C-2  $\text{sp}^2$  do núcleo quinolônico, respectivamente.

Verificou-se ainda neste espectro sinais de hidrogênios metilênicos entre  $\delta$  1,00 e 2,20, que poderiam inicialmente ser atribuídos aos grupos metilênicos diastereotópicos do anel de sete membros. Na região de hidrogênios aromáticos, observou-se um conjunto de sinais característicos de grupo fenila, sendo dois sinais de multipletos em  $\delta$  7,55 e 7,40 integrando para dois hidrogênios cada e um triplo tripleto em  $\delta$  7,32 integrando para um hidrogênio.

Por fim, verificou-se dois dupletos em  $\delta$  7,04 e  $\delta$  7,13 acoplando com constante de orto ( $J = 8,8$  Hz), que poderiam ser atribuídos inicialmente as posições 7 e 8 do anel B e um sinal de duplete em  $\delta$  6,41 ( $J = 6,0$  Hz), ao qual, apenas com a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não é possível sugerir sua posição na estrutura de A13.

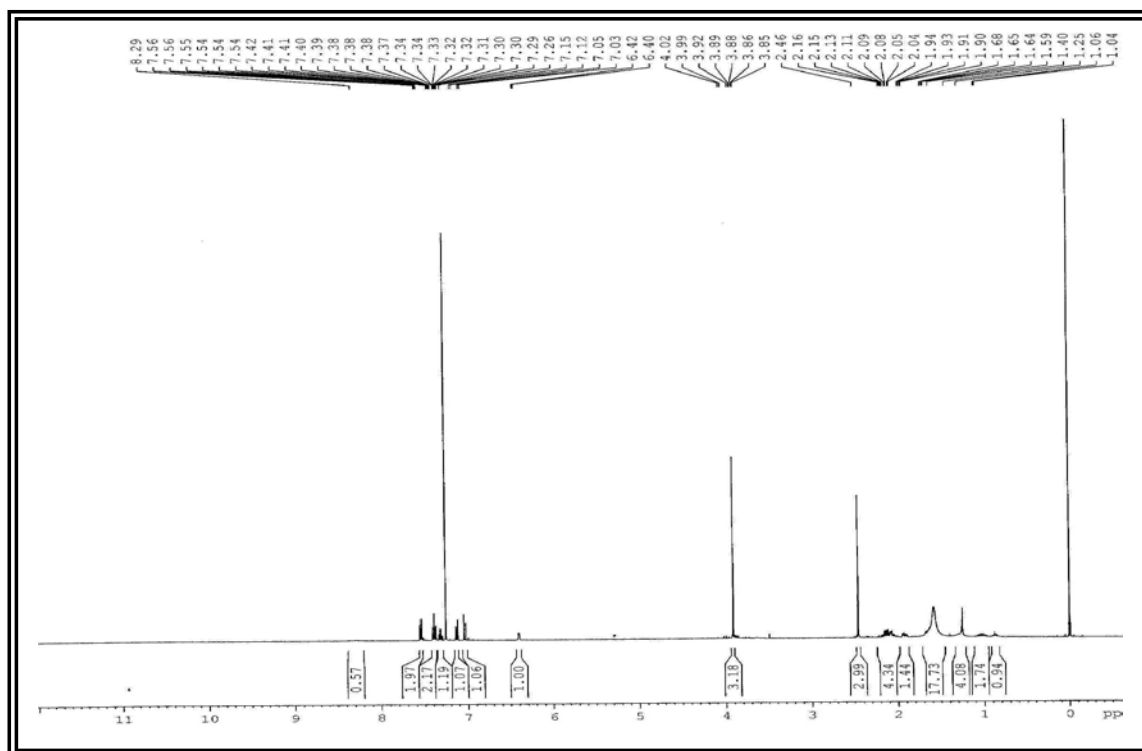


FIGURA 170. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

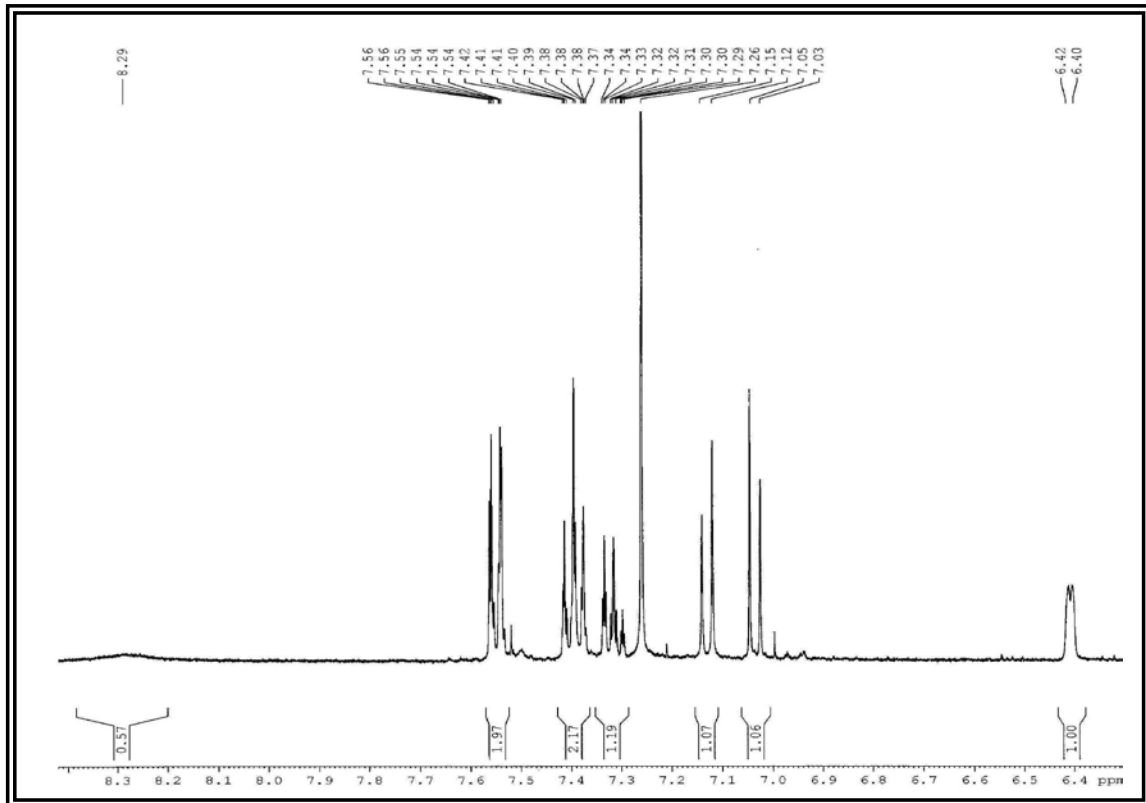


FIGURA 171. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 ( $\delta$  6,3 – 8,4)

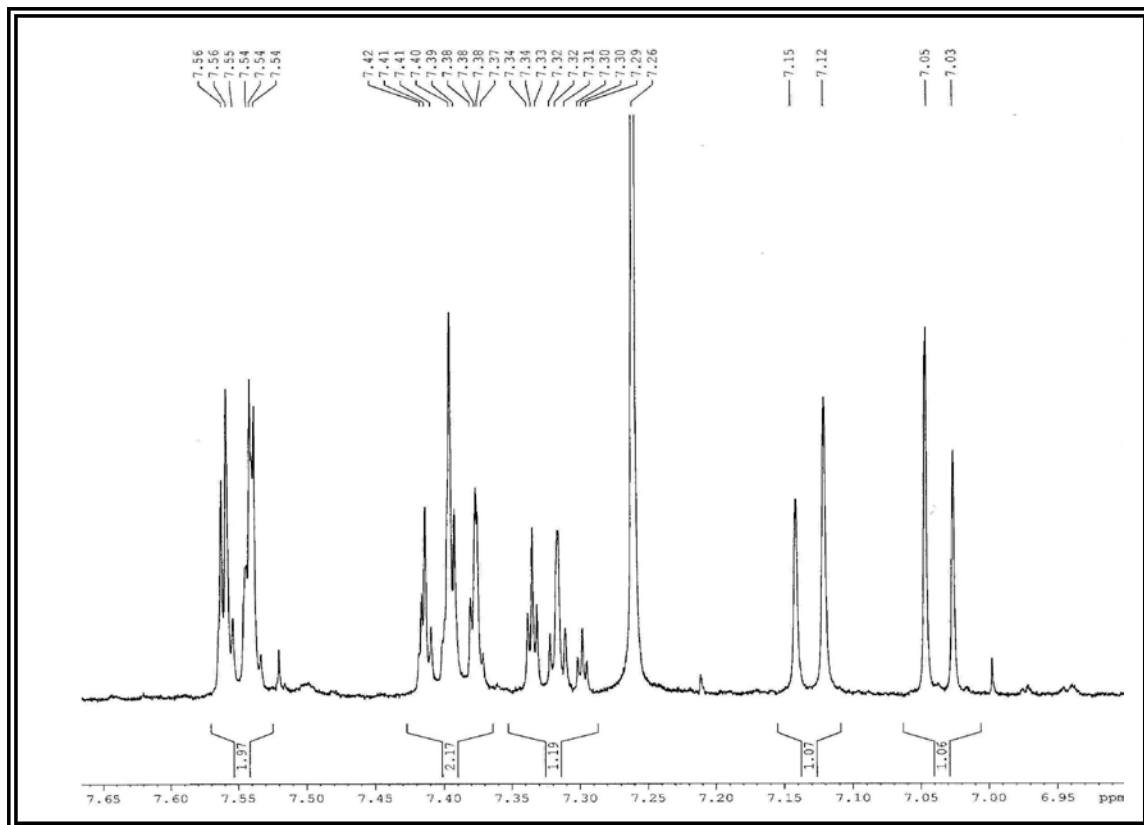


FIGURA 172. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 ( $\delta$  6,95 – 7,65)

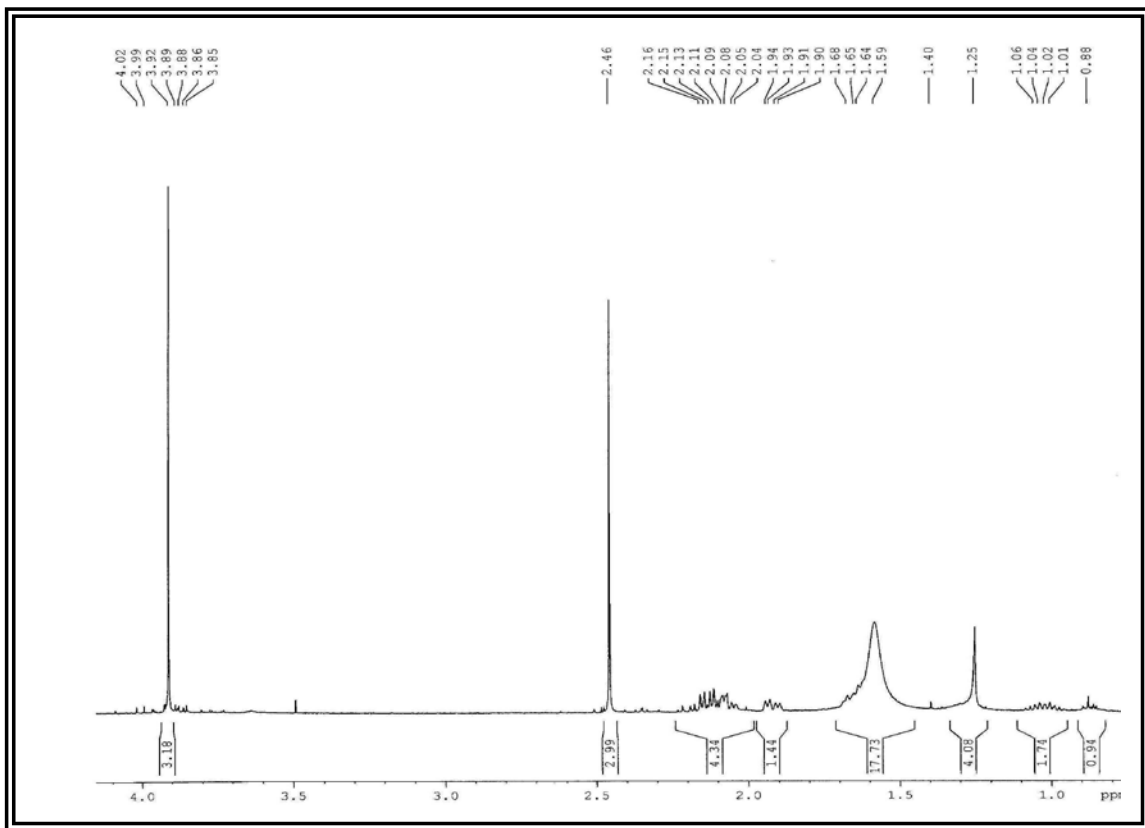


FIGURA 173. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 ( $\delta$  0,8 – 4,1)

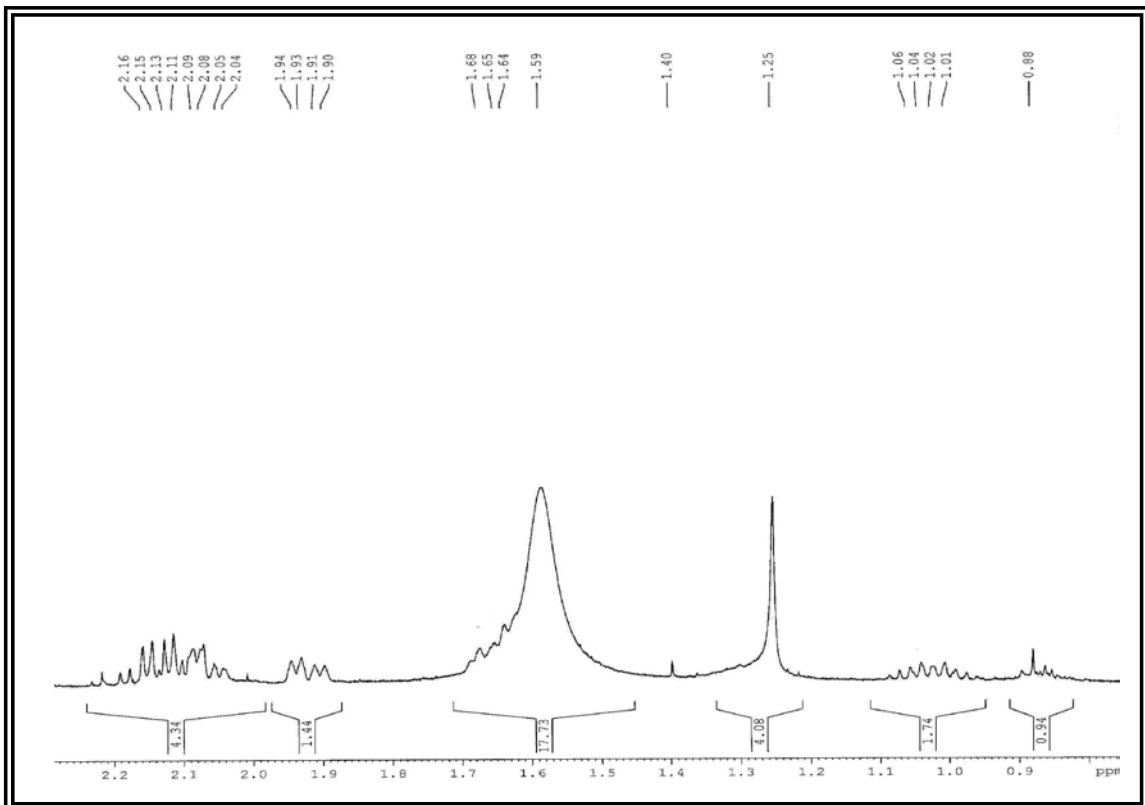


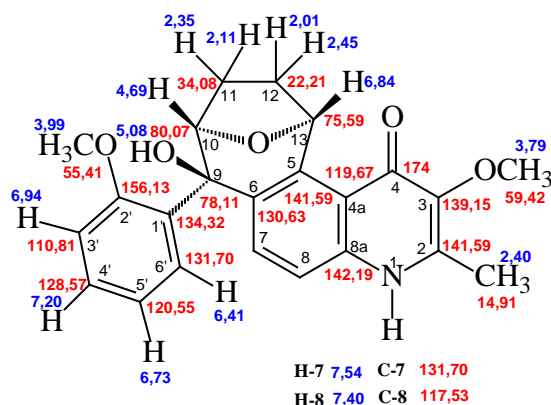
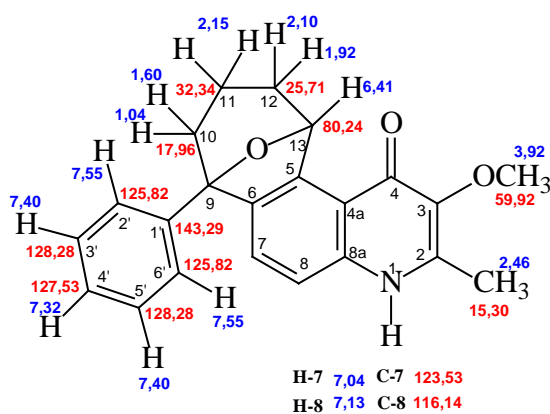
FIGURA 174. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A13 ( $\delta$  0,8 – 2,2)

Através da análise do mapa de correlações do espectro de HSQC de A13 foi possível observar a presença de dois grupos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos, sendo os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,60 e 1,04 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  17,96 e os sinais de hidrogênio em  $\delta$  2,10 e 1,92 correlacionaram com o sinal de carbono em  $\delta$  25,71. Observou-se ainda a correlação de hidrogênios metilênicos não diastereotópicos entre  $\delta$  2,05-2,18 com um sinal de carbono em  $\delta$  32,34. O sinal de duplete em  $\delta$  6,41 correlacionou-se com o sinal de carbono em  $\delta$  80,24; sendo, portanto um hidrogênio oximetínico.

O mapa de correlações do espectro de COSY de A13 apresentou informações importantes sobre a conectividade dos hidrogênios na estrutura deste composto. Foram observados três sistemas de *spins*: no primeiro sistema de *spins* é observada a correlação entre os hidrogênios do anel aromático monossustituído (fenila livre), no segundo sistema de *spins* observa-se o acoplamento dos hidrogênios em  $\delta$  7,04 e 7,13; já no terceiro sistema de *spins* foi observada a conectividade entre o hidrogênio em  $\delta$  6,41 com os hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,10 e 1,92 e conectividades entre os hidrogênios metilênicos.

Ao contrário das estruturas das waltherionas anteriormente discutidas, a estrutura de A13 possui apenas um hidrogênio oximetínico e dada a presença de três grupos de hidrogênios metilênicos, sugeriu-se que na estrutura de A13 existe uma ponte éter entre os carbonos 9 e 13 e não entre os carbonos 10 e 13 como ocorre nas waltherionas A, B e C e seus derivados.

Com base nos dados anteriormente discutidos e tendo a estrutura da waltheriona A como modelo, foi proposta a seguinte estrutura para A-13.



### COSY

H 6,41 ppm → H 1,92 ppm e H 2,10 ppm  
 H 1,92 → H 6,41 ppm; H 2,10 ppm e H 1,04 ppm (acoplamento em W)  
 H 2,10 ppm → H 6,41 ppm; H 1,92 ppm e H 2,15 ppm  
 H 1,04 ppm → H 2,15 ppm; H 1,60 ppm e H 1,92 ppm (acoplamento em W)  
 H 1,60 ppm → H 1,04 ppm e H 2,15 ppm  
 H 2,15 ppm → H 1,04 ppm e H 1,60 ppm  
 H 7,04 ppm → H 7,13 ppm

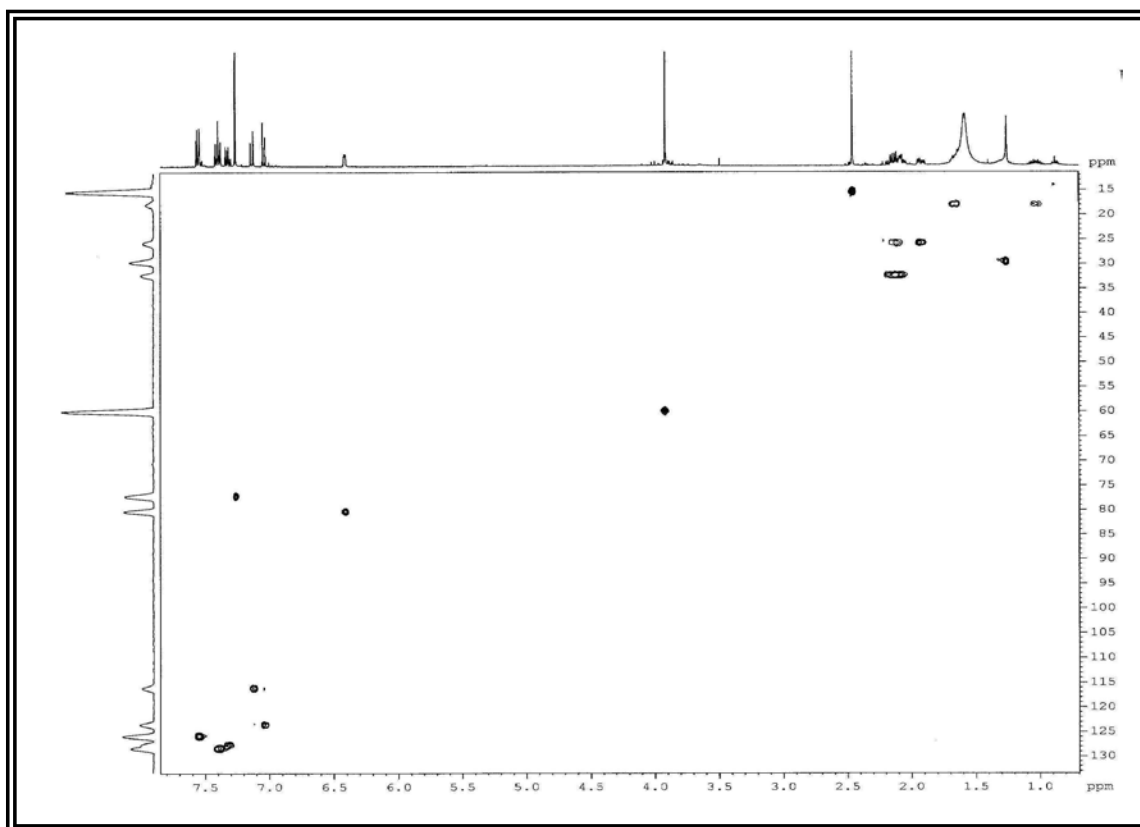


FIGURA 175. Mapa de correlações do HSQC de A13 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

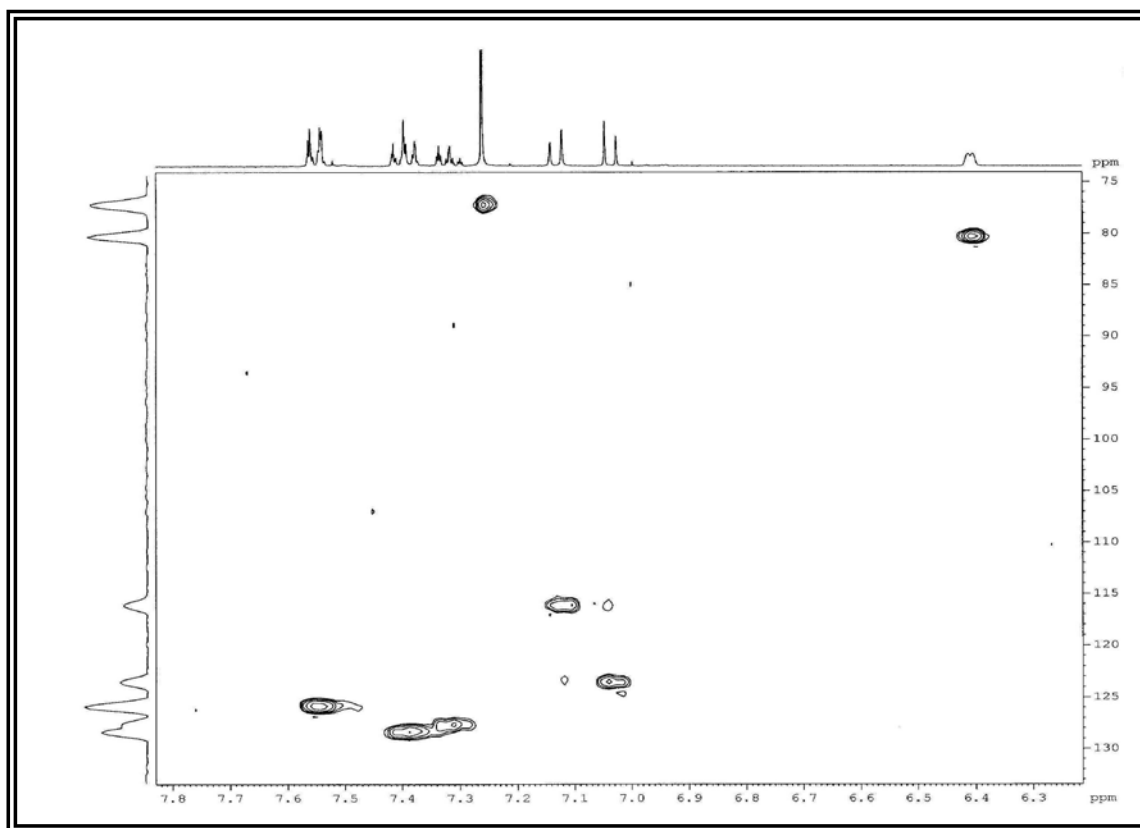


FIGURA 176. Mapa de correlações do HSQC de A13 ( $\delta_H$  6,2 – 7,8;  $\delta_C$  75 – 133)



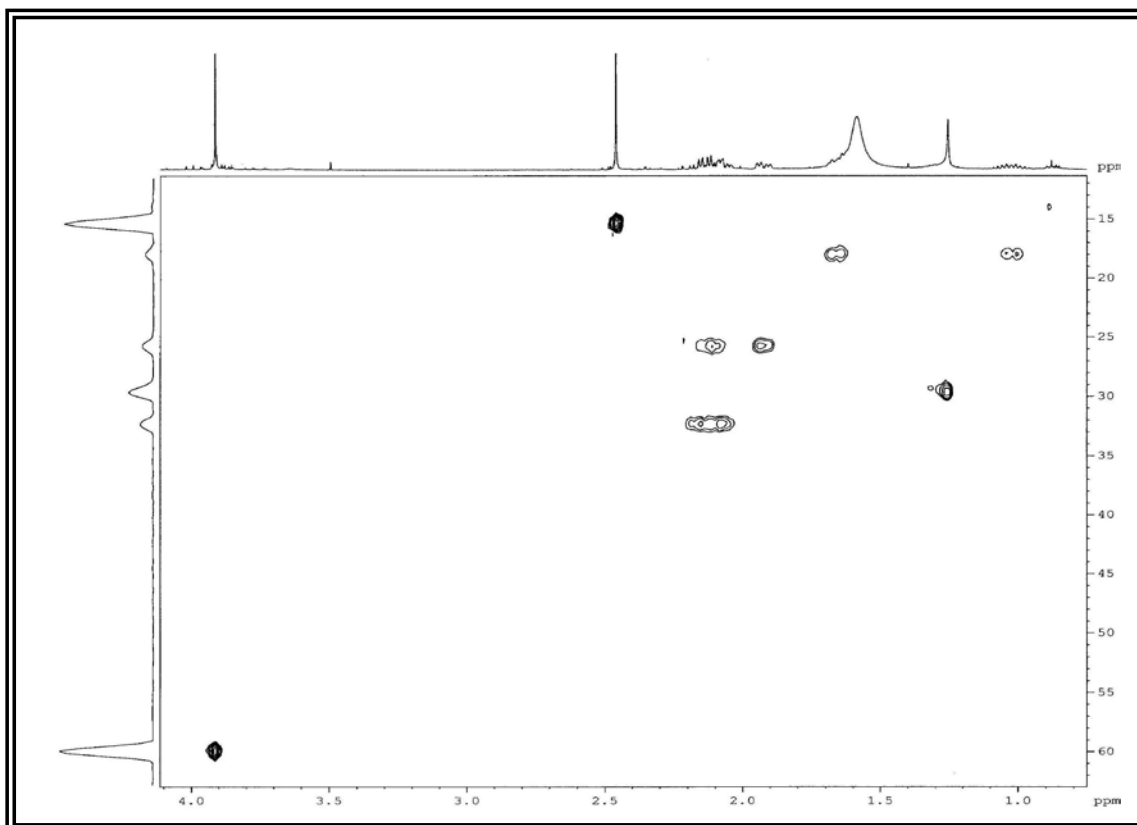


FIGURA 177. Mapa de correlações do HSQC de A13 ( $\delta_H$  0,8 – 4,1;  $\delta_C$  12 – 62)

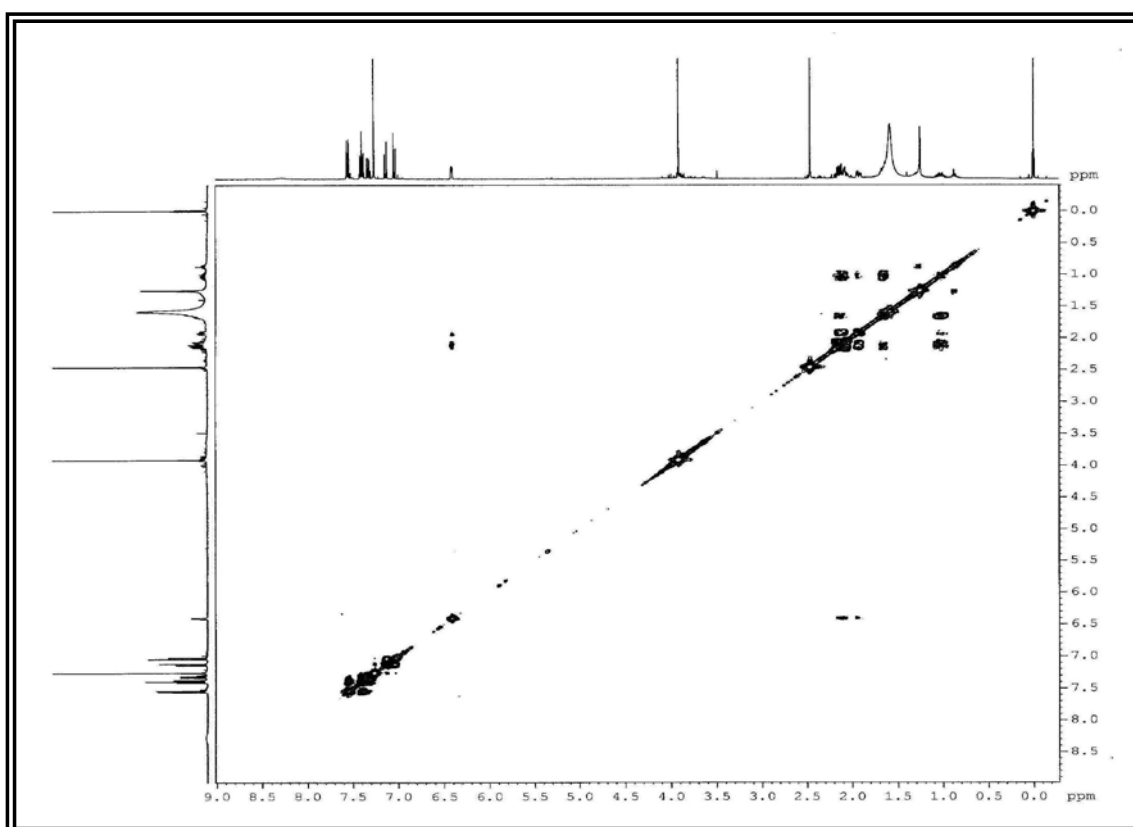


FIGURA 178. Mapa de correlações de  $^1H \times ^1H$  COSY de A13 ( $CDCl_3$ , 400 MHz)

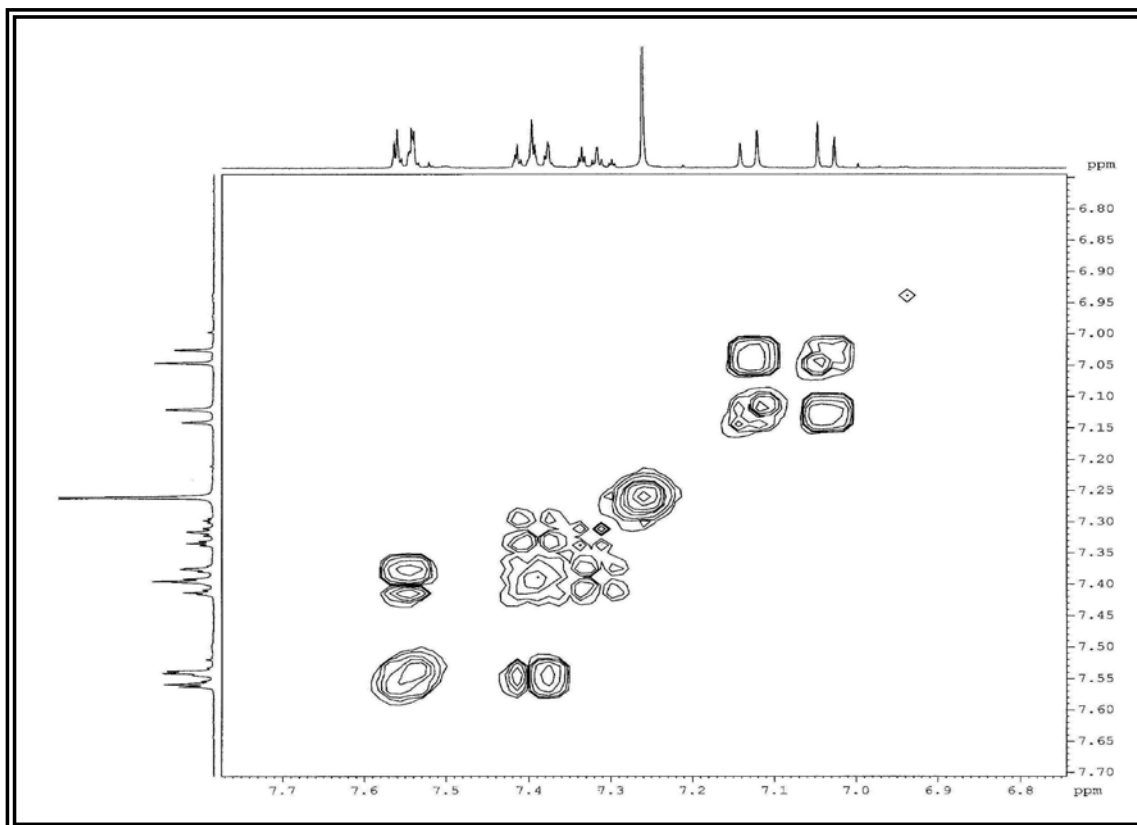


FIGURA 179. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A13 ( $\delta$  6,8 – 7,7)

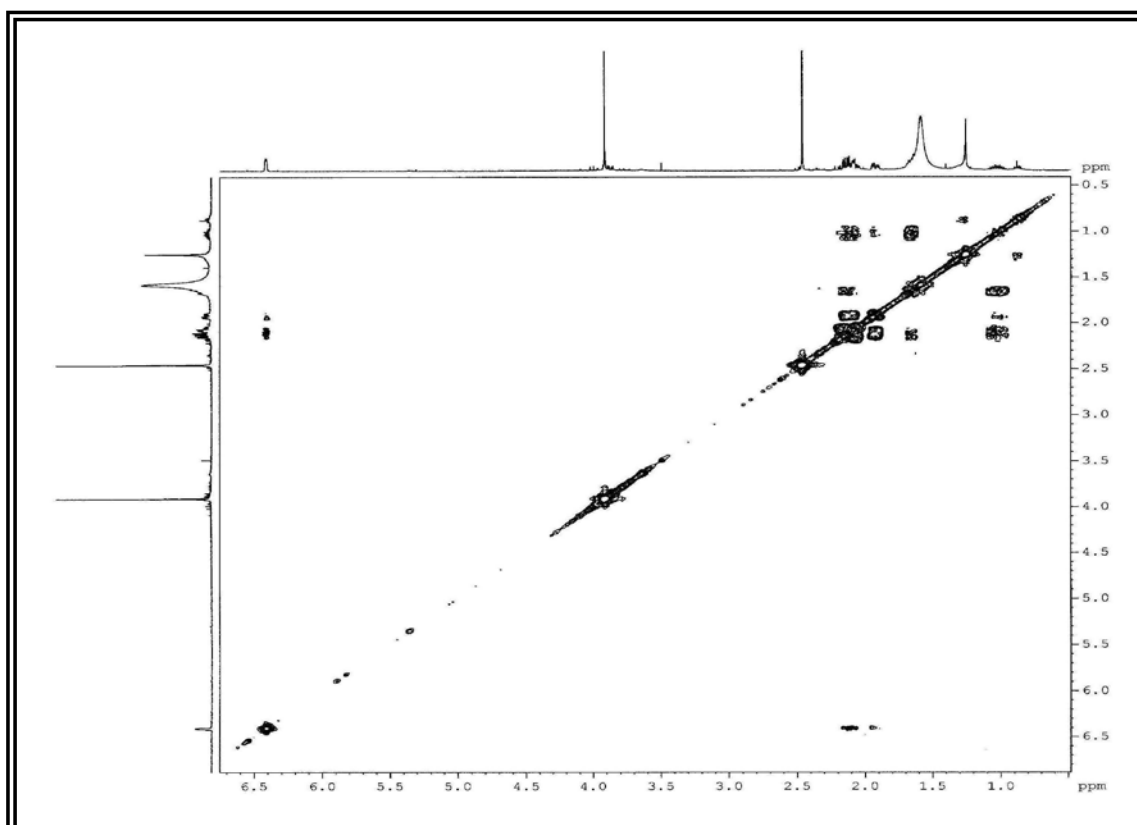


FIGURA 180. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A13 ( $\delta$  0,5 – 6,7)

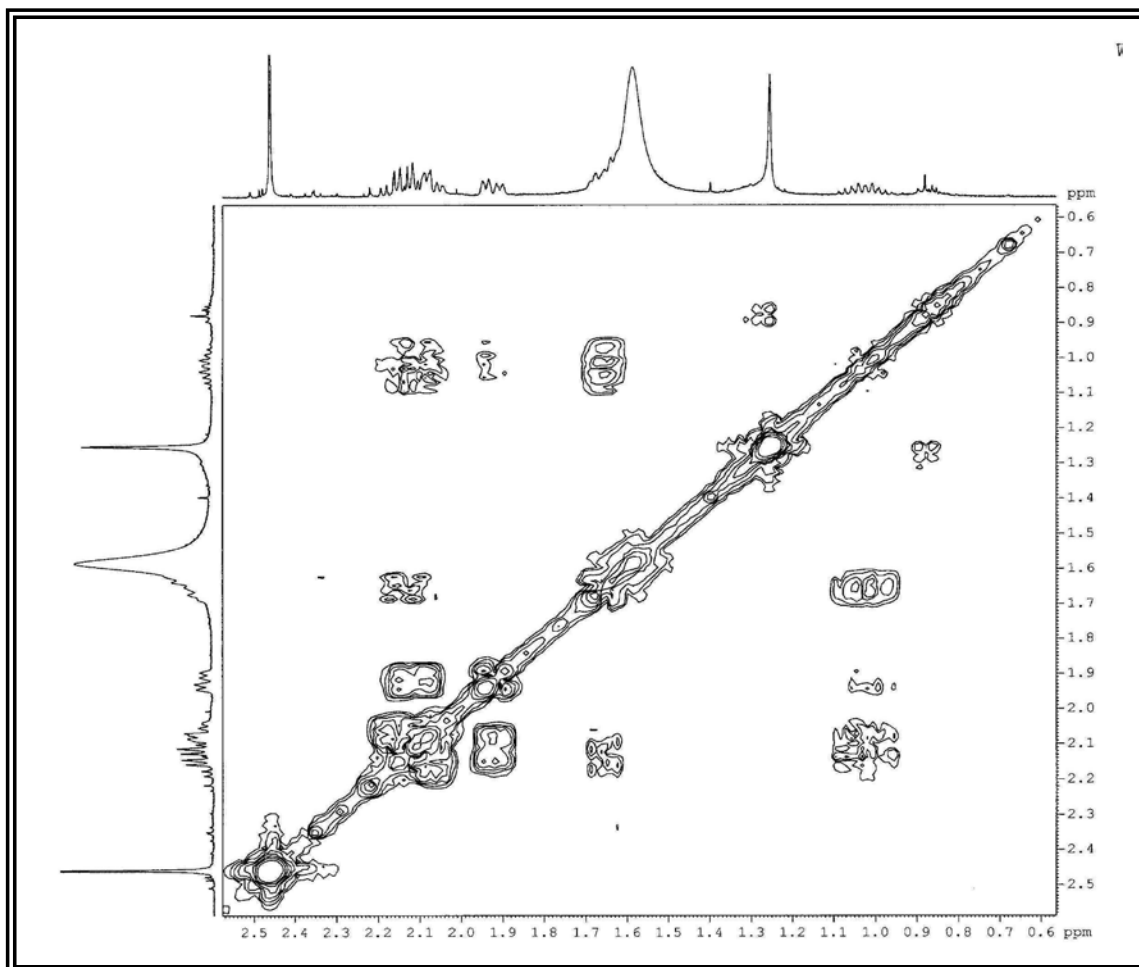
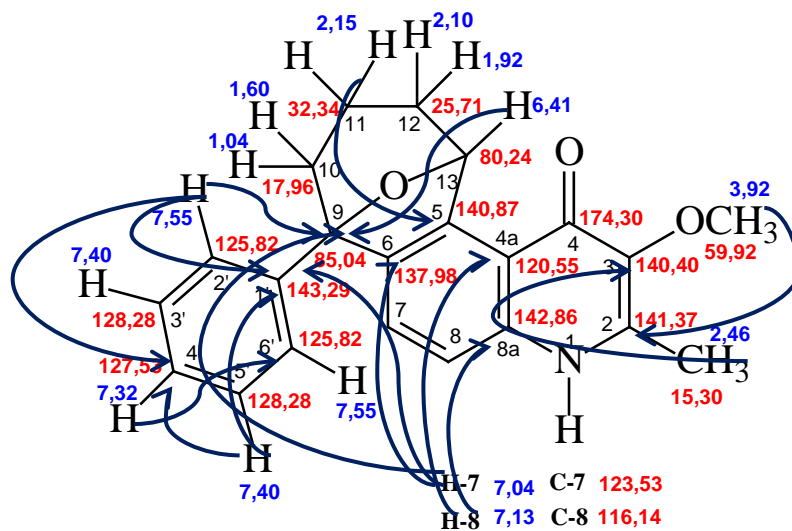


FIGURA 181. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A13 ( $\delta$  0,6 – 2,5)

O mapa de correlações do HMBC de A13 apresentou importantes correlações de sinais de hidrogênio e carbono a múltiplas ligações que corroboraram a proposta apresentada anteriormente para a estrutura de A13. O sinal de duplete em  $\delta$  7,13 correlacionou-se com os sinais de carbono em  $\delta$  142,86 (C-8a) e 120,55 (C-4a), sendo este hidrogênio então atribuído a posição 8. Já o sinal de duplete em  $\delta$  7,04 (H-7) apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  137,98 (C-6), 143,29 (C-1') e com o sinal de carbono oxigenado em  $\delta$  85,04, sendo este atribuído ao carbono oxigenado C-9, confirmando que no biciclo [3.2.1] da estrutura de A13, a ponte éter encontra-se entre os carbonos C-9 e C-13. O sinal de hidrogênio oximetínico em  $\delta$  6,41 (H-13) também apresentou correlação com C-9. As demais correlações observadas no espectro de HMBC encontram-se na tabela 39.



**A-13**  
 Dados obtidos em CDCl<sub>3</sub>  
**Correlações via HMBC de A13**

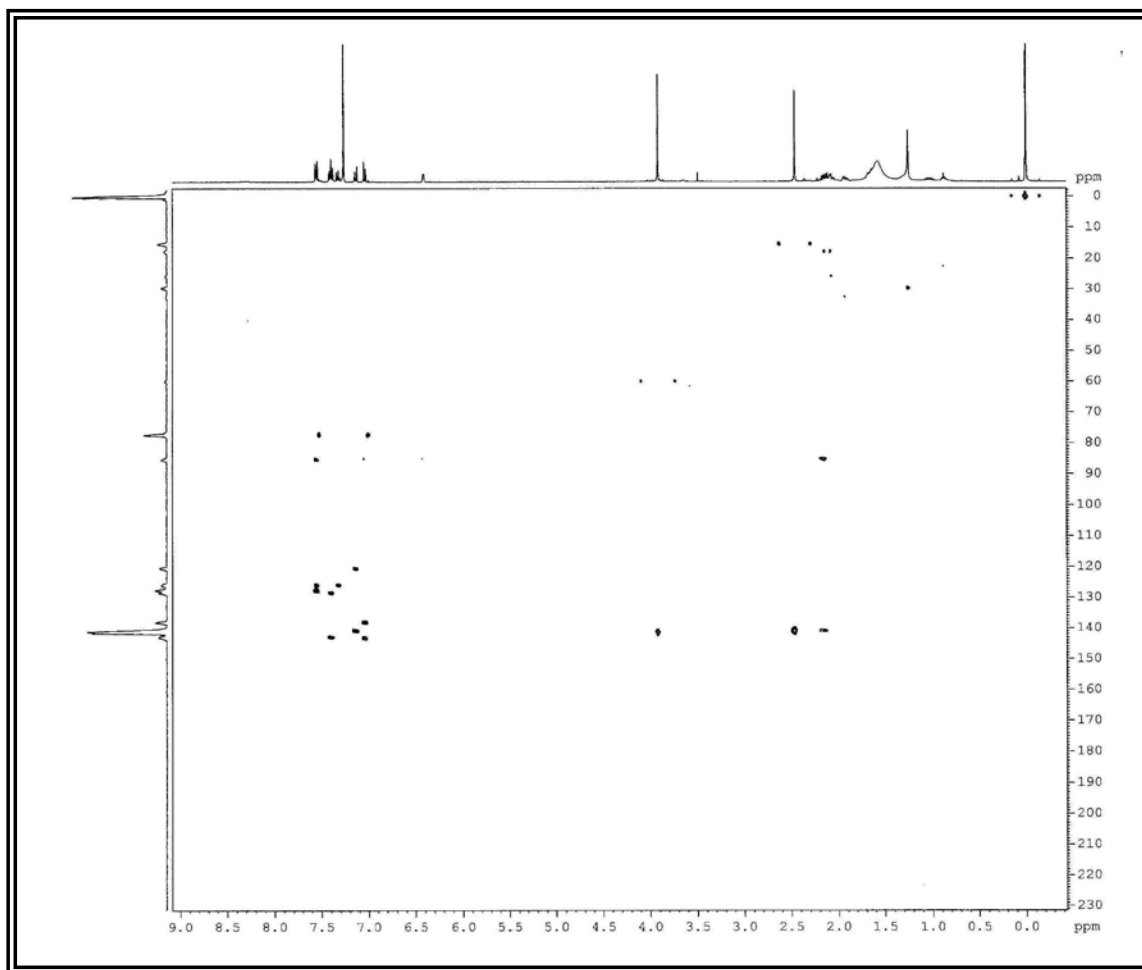


FIGURA 182. Mapa de correlações do HMBC de A13 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

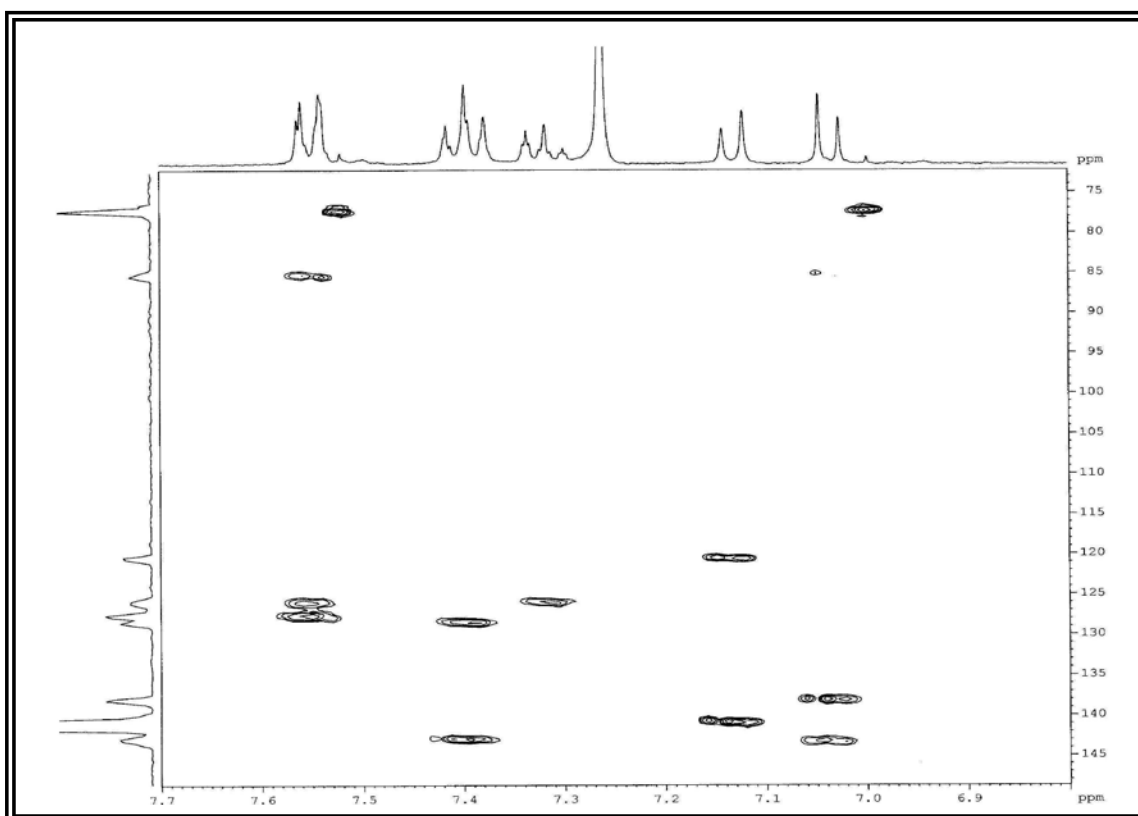


FIGURA 183. Mapa de correlações do HMBC de A13 ( $\delta_H$  6,8 – 7,7;  $\delta_C$  73 – 148)

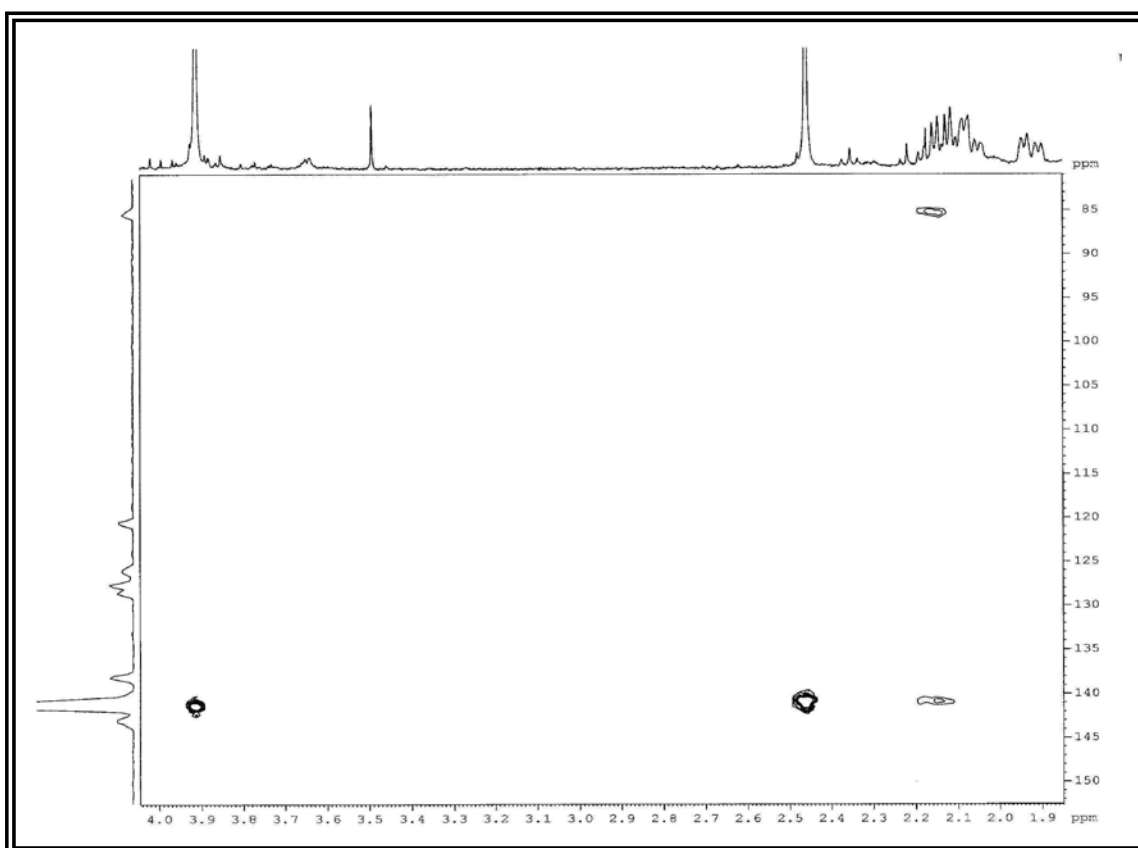


FIGURA 184. Mapa de correlações do HMBC de A13 ( $\delta_H$  1,9 – 4,0;  $\delta_C$  83 – 152)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A13 apresentou 22 sinais de carbono, compatível com a estrutura proposta para este composto, sendo possível, juntamente com a análise dos dados de HSQC e HMBC, atribuir todos os valores de deslocamento químico dos carbonos da estrutura de A13.

O espectro de massas de A-13 (ESI, modo positivo) apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  348 compatível com a estrutura proposta para A13.

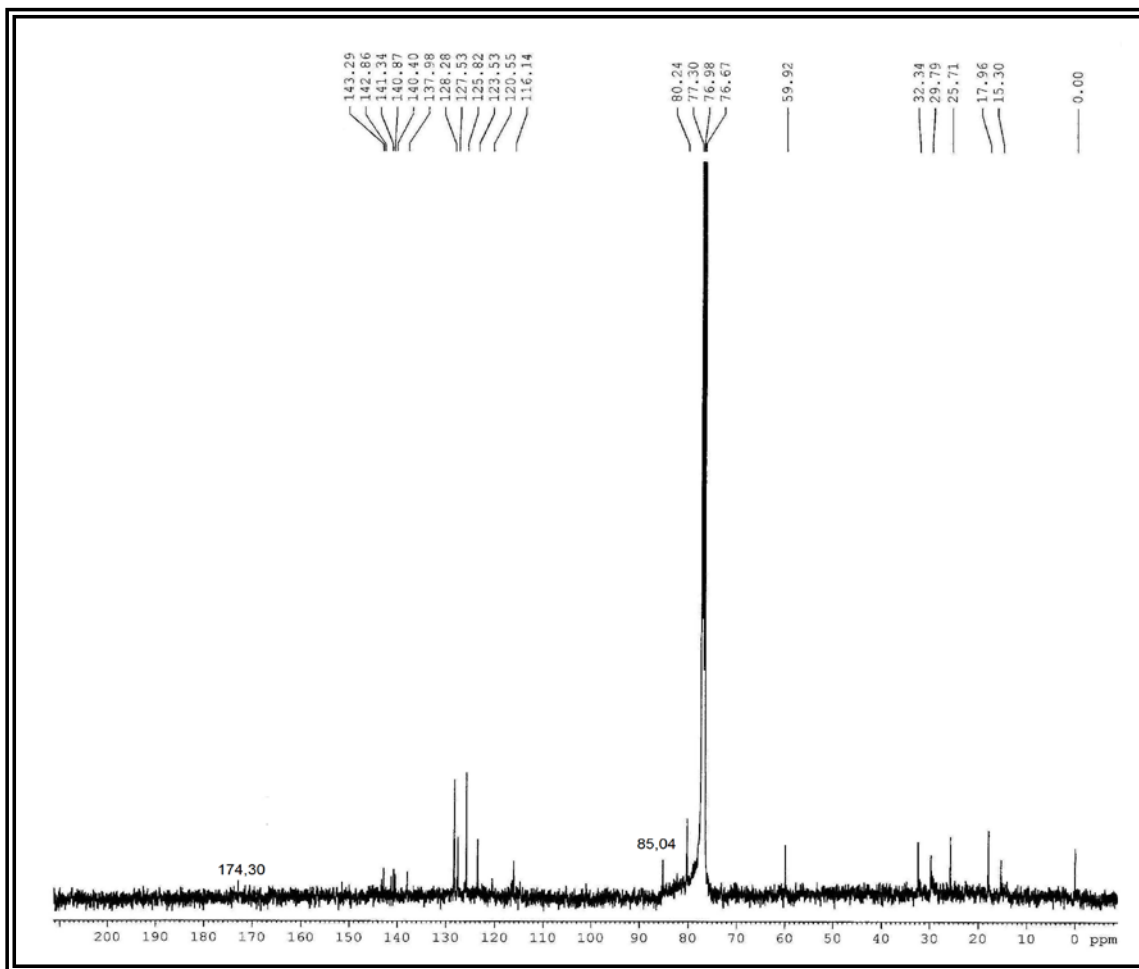


FIGURA 185. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A13 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

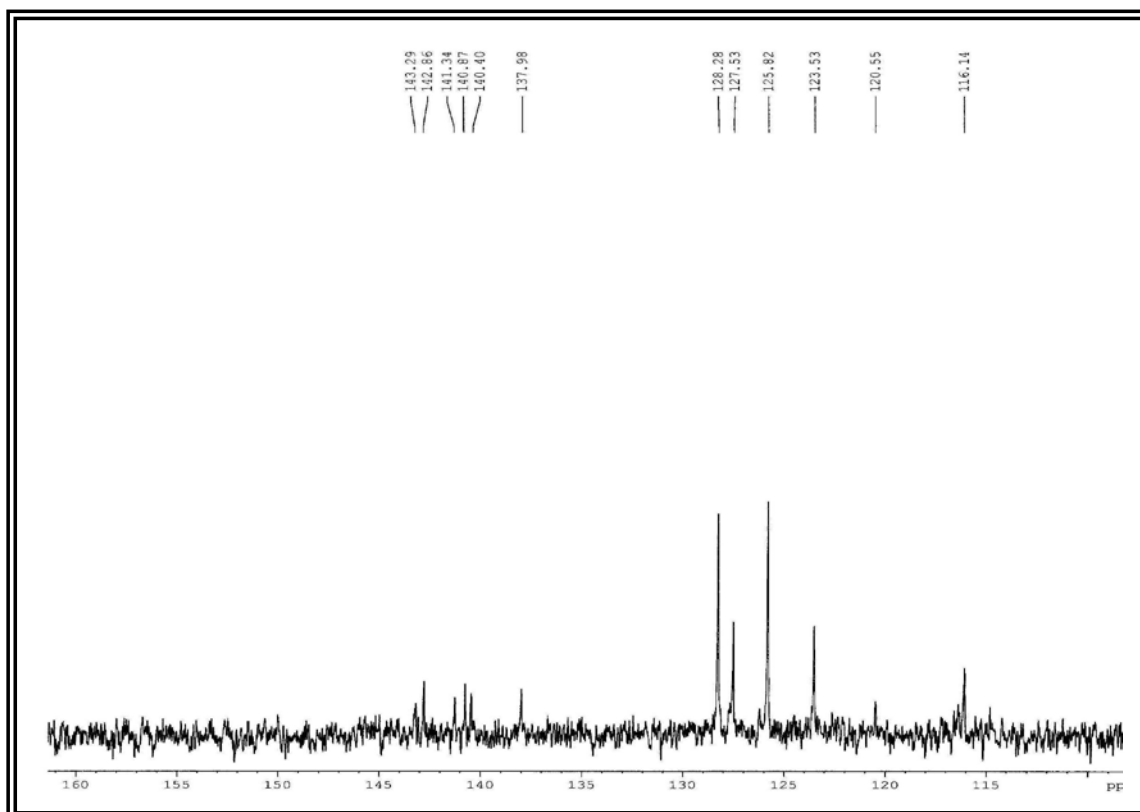


FIGURA 186. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A13 ( $\delta$  110 – 160)

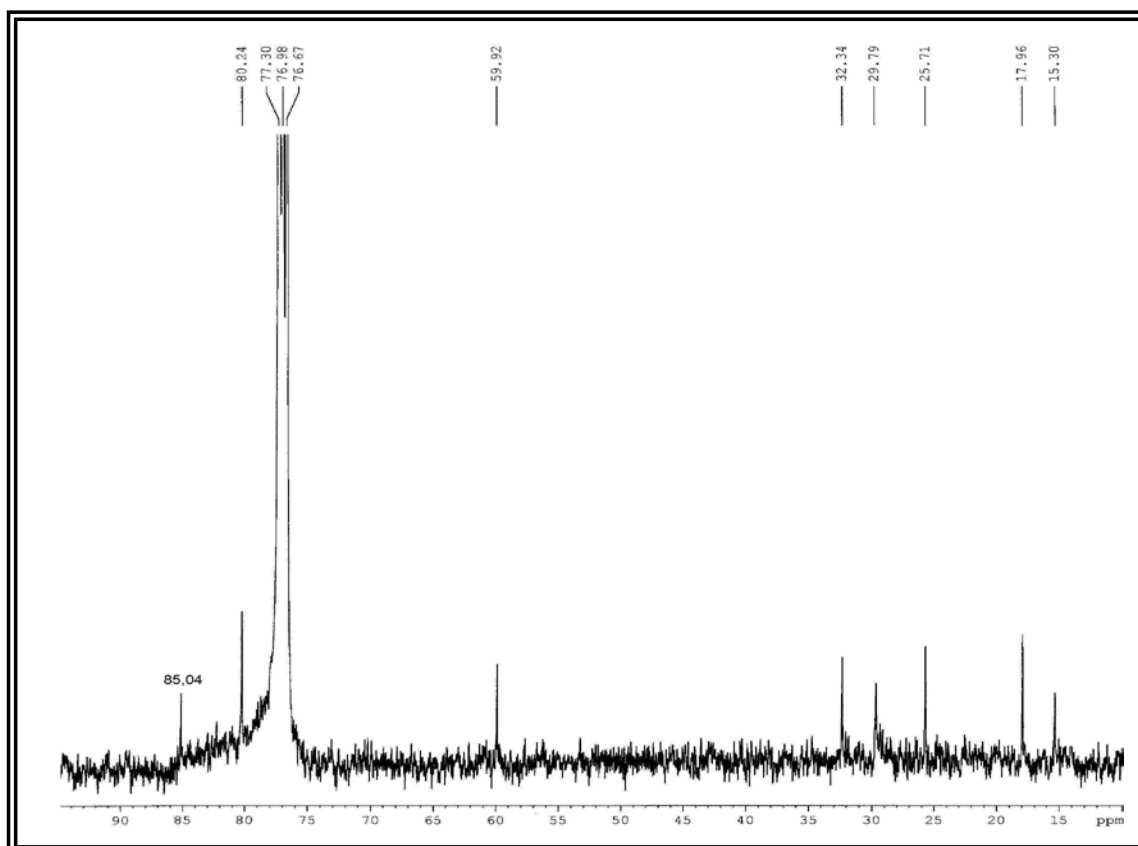


FIGURA 187. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A13 ( $\delta$  10 - 95)

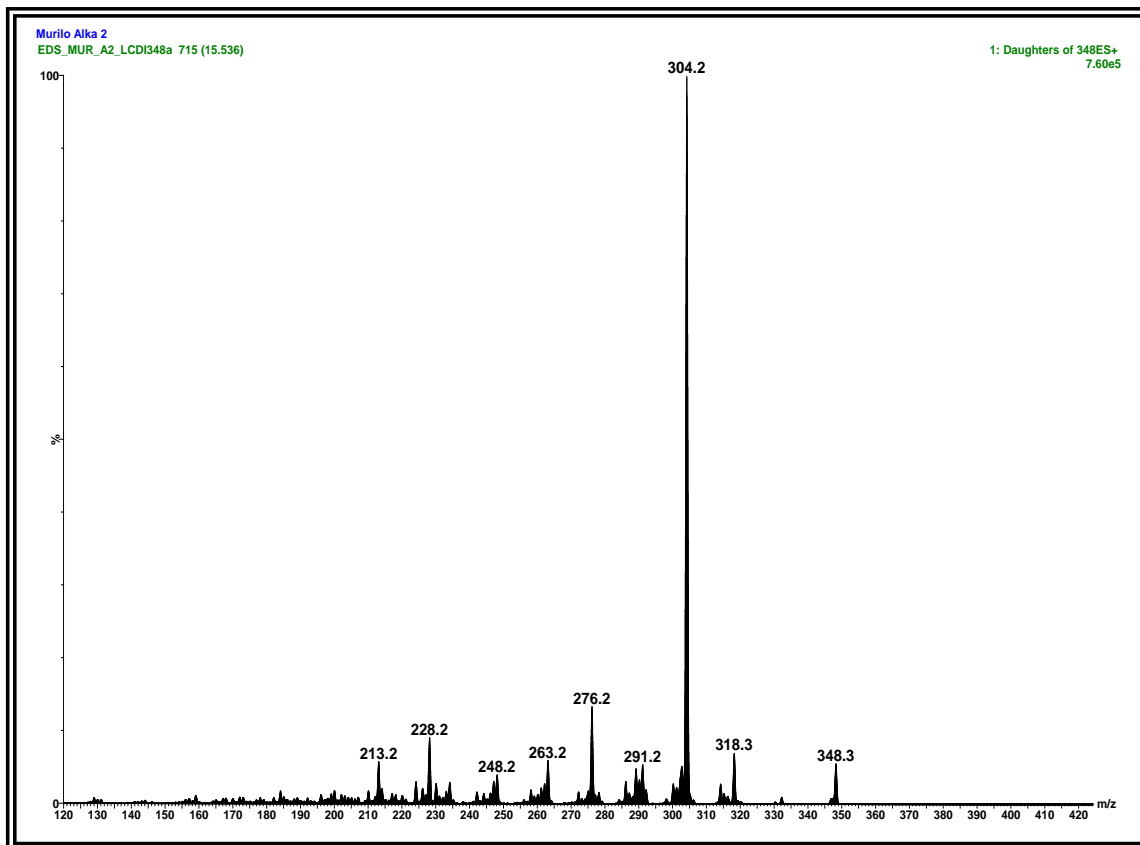


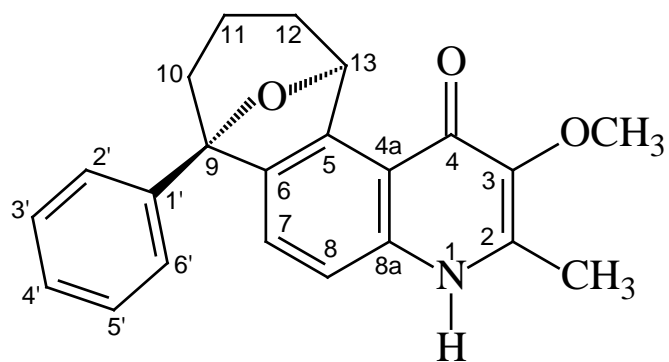
FIGURA 188. Espectro de massas de A13 (ESI, modo positivo)

Através da análise e interpretação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 12D), espectrometria de massas e a comparação com os dados das waltherionas A, B e C e seus derivados anteriormente discutidos, a estrutura de A13 foi elucidada de forma inequívoca, sendo este alcaloide inédito denominado de waltheriona D

Uma vez que a estrutura do alcaloide A13 não foi ainda reportada na literatura, obteve-se o espectro de massas de alta resolução (ESI, modo positivo). Este espectro apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}^+]$  em  $m/z$  348,1594 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}$ .

A estereoquímica da waltheriona-D está discutida no ítem 4.1.20.





Estrutura da waltheriona D (A-13)

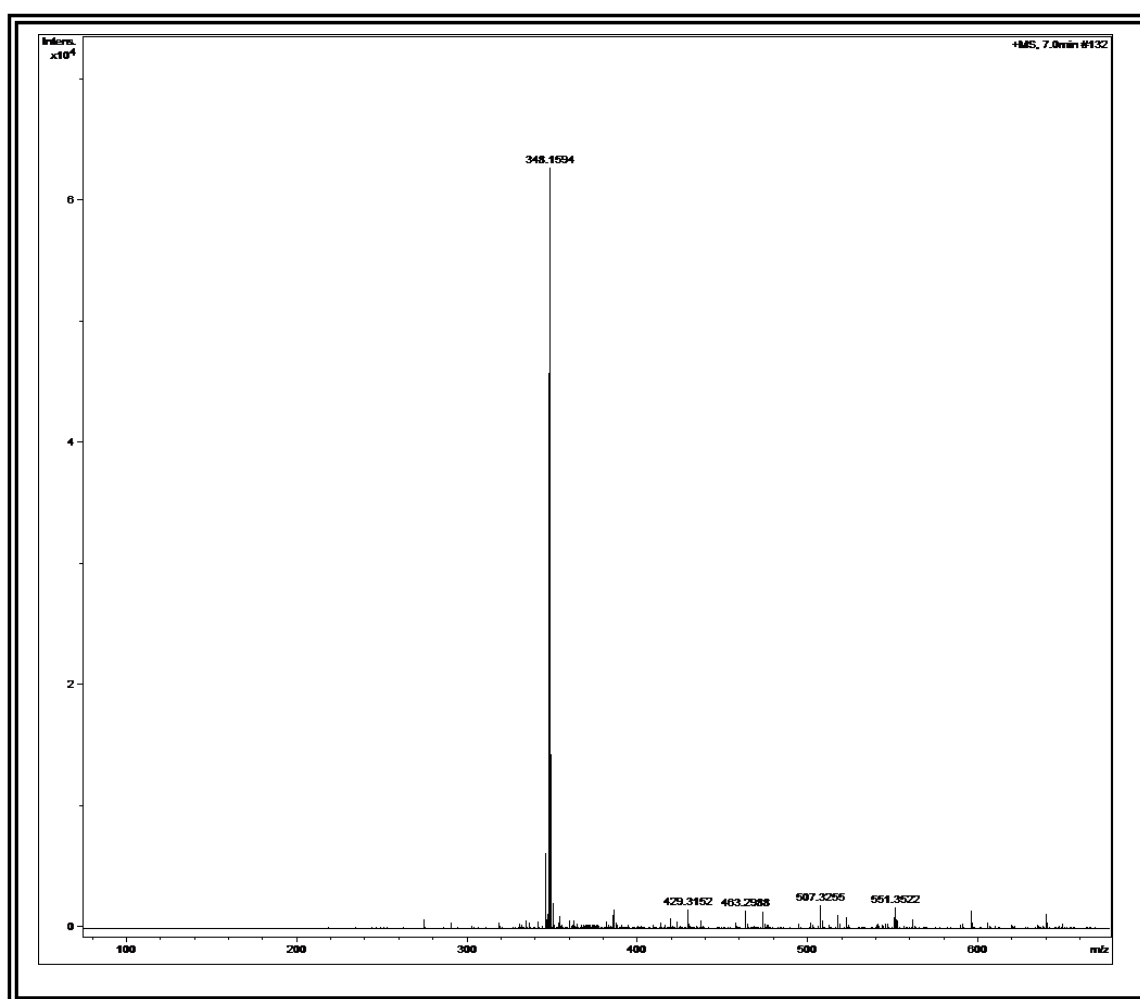


FIGURA 189. Espectro de massas de alta resolução de A13 (ESI, modo positivo)

TABELA 39. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A-13

Posição	A13 (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )			waltheriona A (Lit <sup>*1</sup> ) (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		
	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC 400 MHz	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-	141,37			-	141,60
3	-	140,40			-	139,30
4	-	174,30			-	174,40
4 <sup>a</sup>	-	120,55			-	119,80
5	-	140,87			-	141,70
6	-	137,98			-	130,50
7	7,04 ( <i>d</i> ; 8,8)	123,53	C-9; C-6; C-5; C-1'		7,48 ( <i>d</i> )	131,80
8	7,13 ( <i>d</i> ; 8,8)	116,14	C-8 <sup>a</sup> , C-4 <sup>a</sup>		7,41 ( <i>d</i> )	117,40
8 <sup>a</sup>	-	142,86			-	141,80
9	-	85,04			-	77,20
10 <sup>a</sup>	1,60 ( <i>m</i> )	17,96	C-9; C-5'		4,61 ( <i>dd</i> )	80,16
10b	1,04 ( <i>m</i> )					
11 <sup>a</sup>	2,04 – 2,18 ( <i>m</i> )	32,34	C-5		2,34 ( <i>m</i> )	21,60
11b	2,04 – 2,18 ( <i>m</i> )				2,10 ( <i>m</i> )	
12 <sup>a</sup>	2,10 ( <i>m</i> )	25,71			2,40 ( <i>m</i> )	33,70
12b	1,92 ( <i>m</i> )				1,99 ( <i>m</i> )	
13	6,41 ( <i>d</i> ; 3,0)	80,24	C-9		6,87 ( <i>d</i> )	75,60
1'	-	143,29			-	134,70
2'	7,55 ( <i>m</i> )	125,82	C-1', C-4' e C-9		-	156,40
3'	7,40 ( <i>m</i> )	128,28	C-2'; C-5'; C-1'		6,94 ( <i>dd</i> )	110,80
4'	7,32 ( <i>m</i> )	127,53	C-2'; C-3'		7,20 ( <i>ddd</i> )	128,50
5'	7,40 ( <i>m</i> )	128,28	C-2'; C-5'; C-1'		6,70 ( <i>ddd</i> )	120,60
6'	7,55 ( <i>m</i> )	125,82	C-1', C-4' e C-9		6,29 ( <i>dd</i> )	131,10
2-C-CH <sub>3</sub>	2,46 ( <i>s</i> )	15,30	C-3		2,41 ( <i>s</i> )	14,30
3-O-CH <sub>3</sub>	3,92 ( <i>s</i> )	59,92	C-2'		3,75 ( <i>s</i> )	59,20
2'- OCH <sub>3</sub>	-	-			3,97 ( <i>s</i> )	55,40
N-H	NO <sup>*2</sup>	-	-		12,00 ( <i>s</i> )	-
9-OH	-	-	C-9		5,10 ( <i>s</i> )	-

\*<sup>1</sup>(HOLZEL et. al.; 2005)\*<sup>2</sup>Não observado.

#### 4.1.19. Elucidação estrutural do alcaloide A-18

A substância A-18 foi isolada da raiz de *Waltheria brachypetala* Turcz, esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD sugerindo-se a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A18 apresentou sinais característicos do núcleo quinolônico dos alcaloides anteriormente discutidos, sendo estes, os sinais integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,74 e 2,37 referentes à metoxila na posição 3 e a metila ligada ao carbono C-2  $\text{sp}^2$ , respectivamente, e um sinal de simpleto largo em  $\delta$  11,62 referente ao N-H. Observou-se ainda sinais entre  $\delta$  0,60 – 2,00 característicos dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos do anel de sete membros do esqueleto estrutural das waltherionas.

Na região dos hidrogênios aromáticos verificou-se três sinais de multipletos entre  $\delta$  7,29 – 7,72 característicos de anel aromático monossustituído e dois sinais de dupletos acoplando em orto ( $J = 8,8$  Hz) em  $\delta$  7,42 e 7,34 sobrepostos com sinais do anel aromático monossustituído. Observou-se ainda na região de hidrogênios aromáticos um sinal de duplete em  $\delta$  6,07 ( $J = 3$  Hz). Por fim, verifica-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  um sinal de duplo-duplo-duplete em  $\delta$  4,00 e um duplete em  $\delta$  4,97.

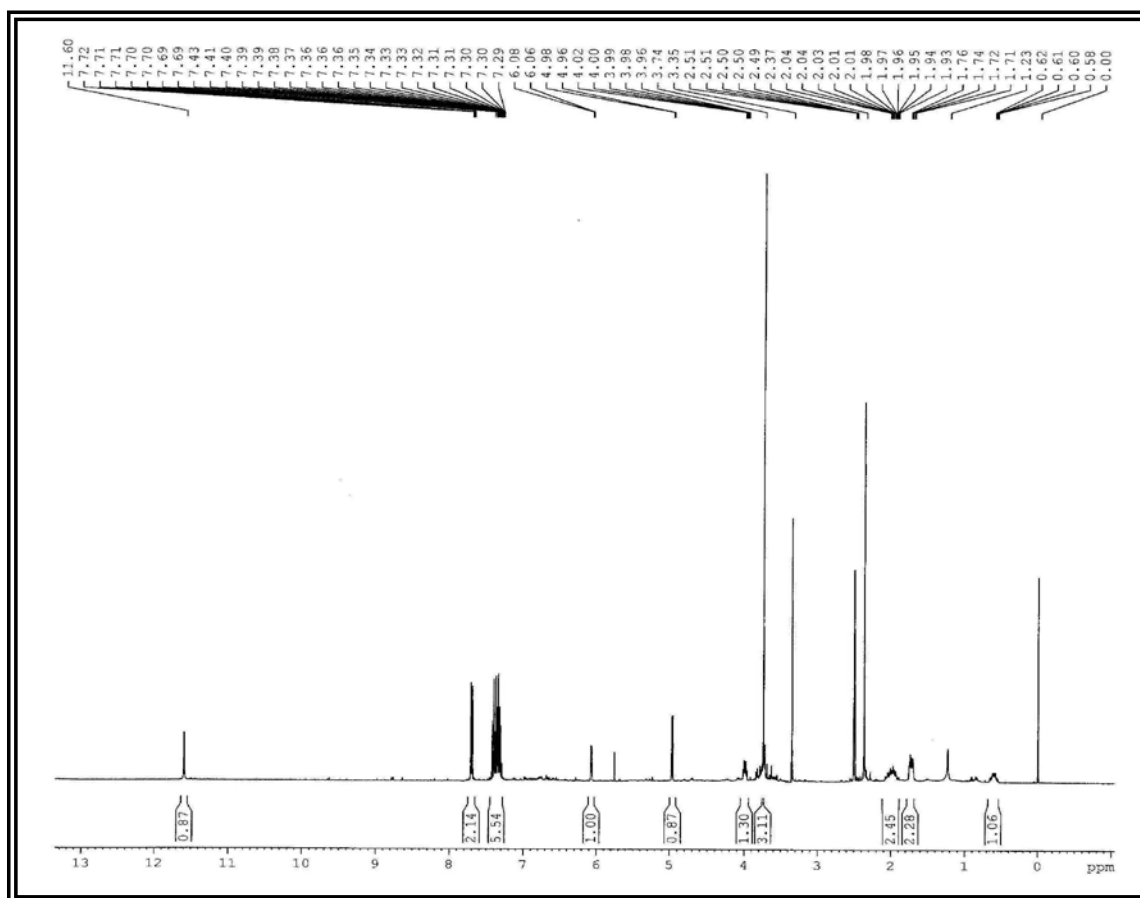


FIGURA 190. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A18 (DMSO- $\text{d}_6$ ; 400 MHz)

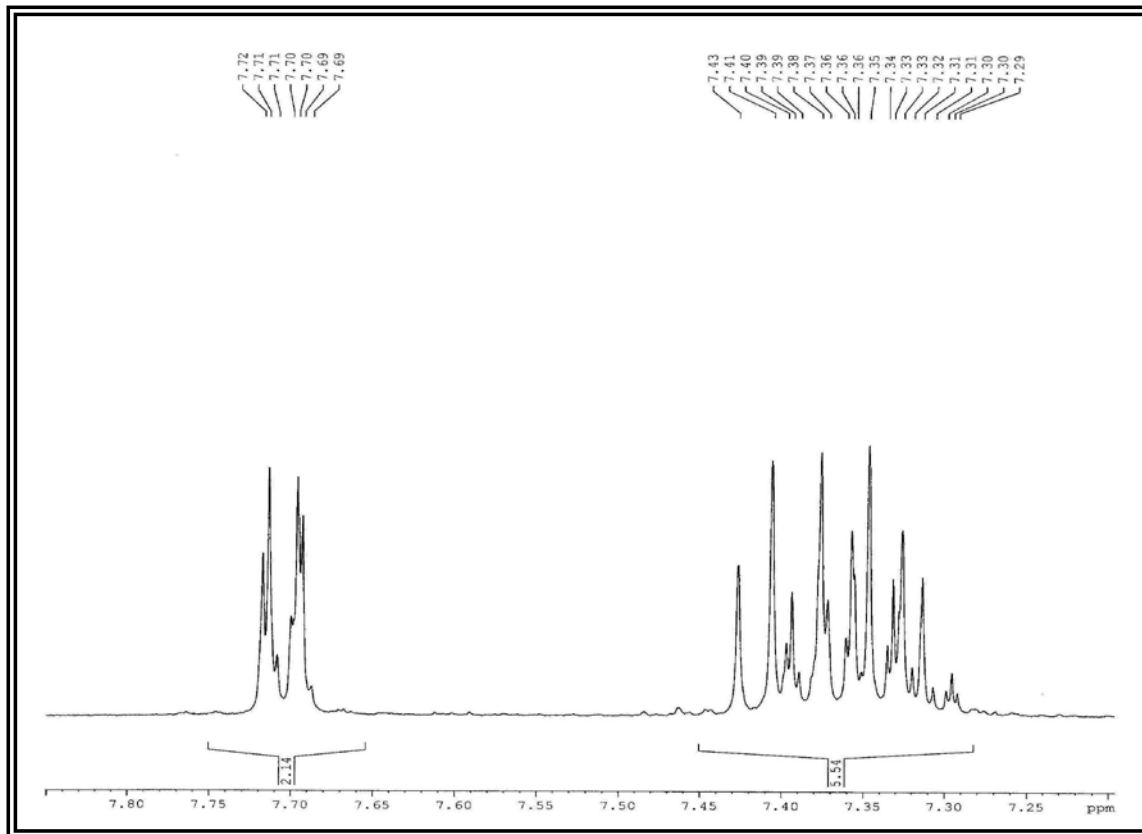


FIGURA 191. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A18 ( $\delta$  7,20 – 7,85)

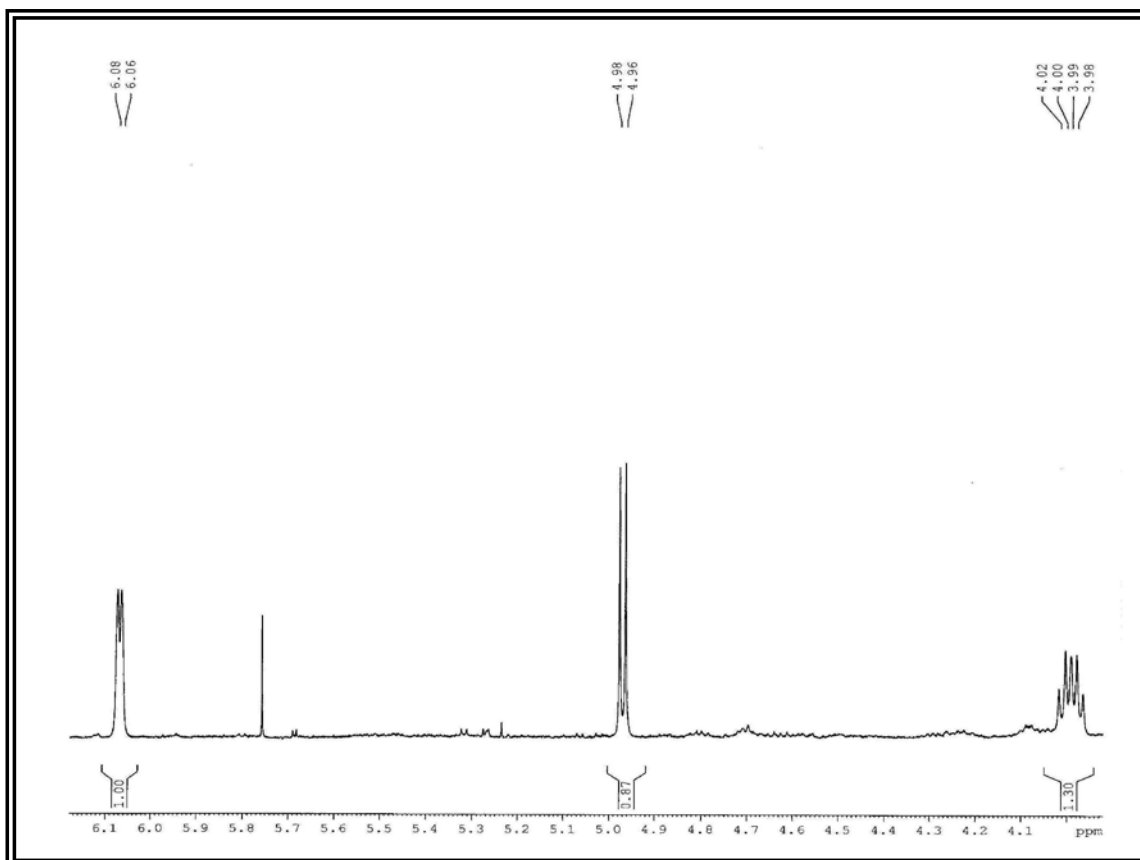


FIGURA 192. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A18 ( $\delta$  4,0 – 6,1)

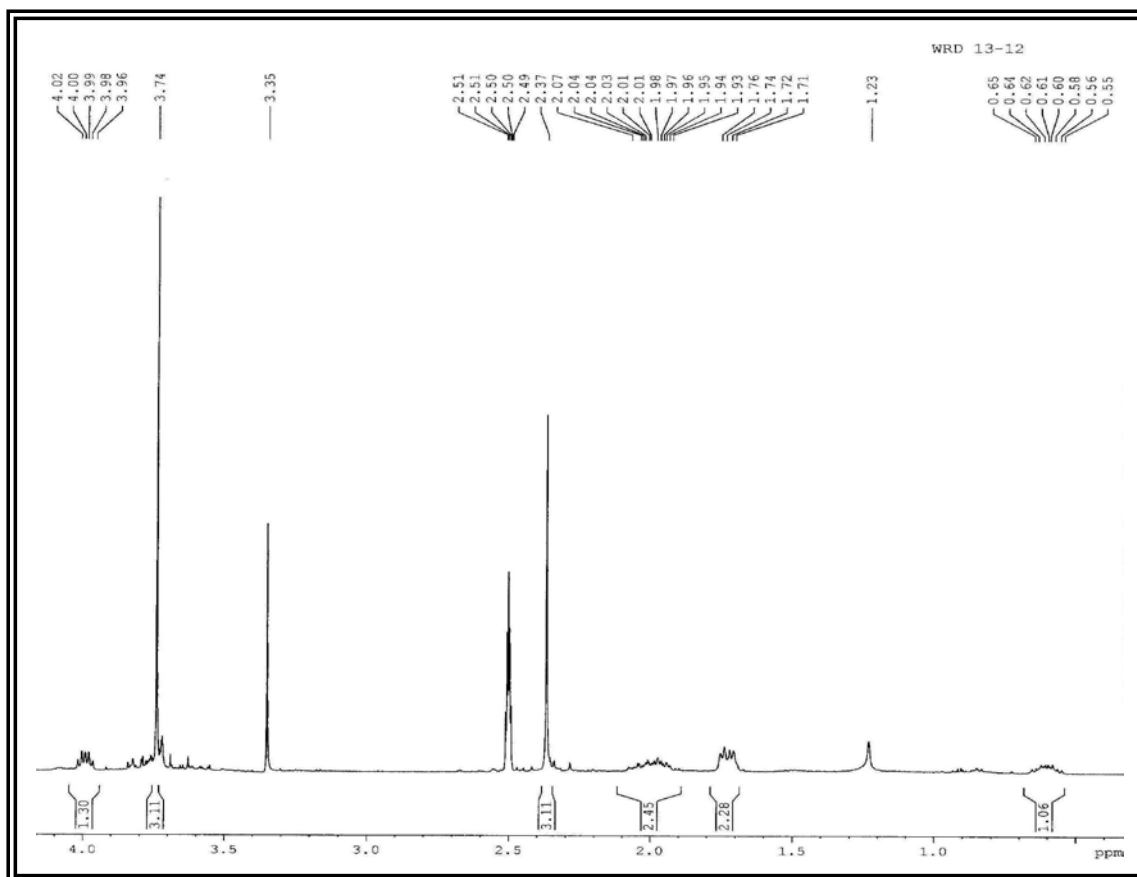


FIGURA 193. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A18 ( $\delta$  0,5 – 4,0)

Através da análise do mapa de correlações do espectro de HSQC de A18 observou-se a correlação dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  6,07 e 4,00 com os sinais de carbono em  $\delta$  77,90 e 68,00; respectivamente, sendo possível concluir que estes hidrogênios são oxi-metínicos. O sinal de duplete referente ao hidrogênio em  $\delta$  4,97 não apresentou correlação com qualquer sinal de carbono neste espectro, sugerindo que este se trata de uma hidroxila.

Observou-se ainda no espectro de HSQC dois grupos de hidrogênios metilênicos diasterotópicos. Os hidrogênios que absorvem em  $\delta$  0,60 e 1,72 estão diretamente ligados ao carbono que absorve em  $\delta$  27,82, enquanto que os hidrogênios que absorvem em  $\delta$  2,00 e 1,72 estão diretamente ligados ao carbono que absorve em  $\delta$  26,26. O sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,72 correlaciona-se com os dois sinais de carbono metilênico, de modo que é possível afirmar, juntamente com a integração dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que este sinal refere-se a dois hidrogênios.

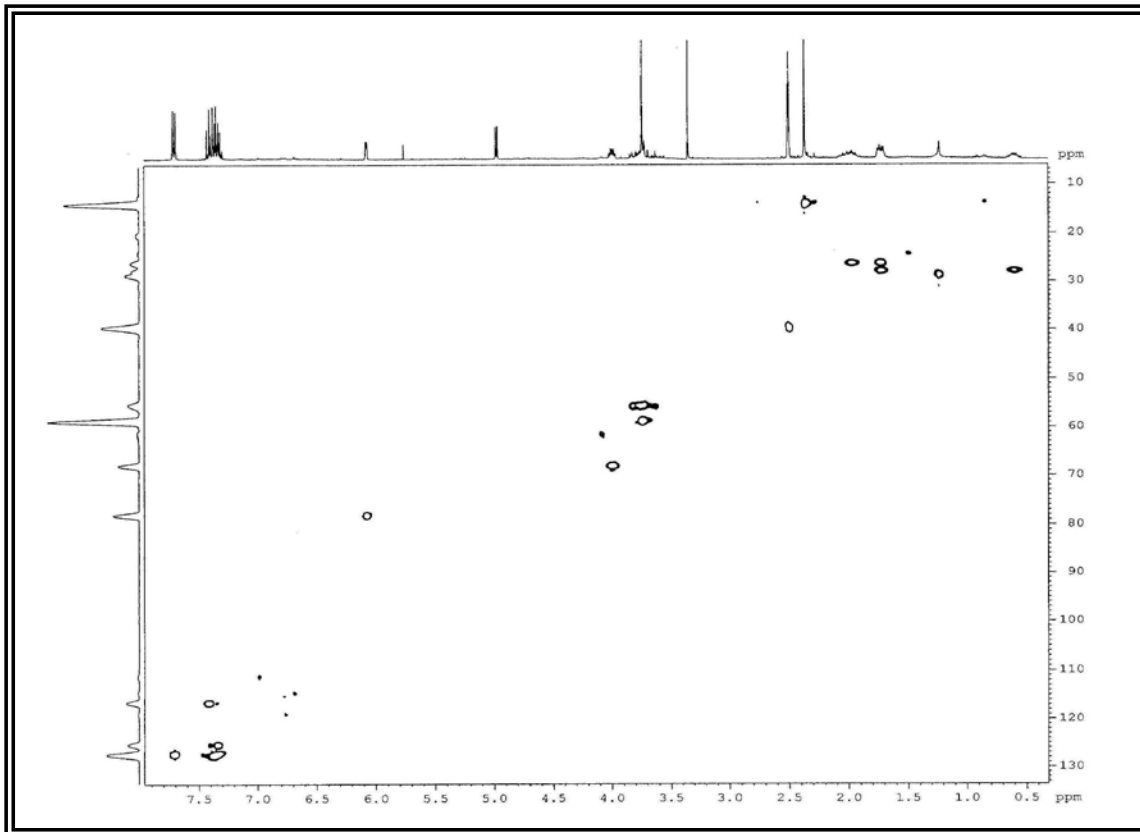


FIGURA 194. Mapa de correlações do HSQC de A18 (DMSO-d<sub>6</sub>; 400 MHz)

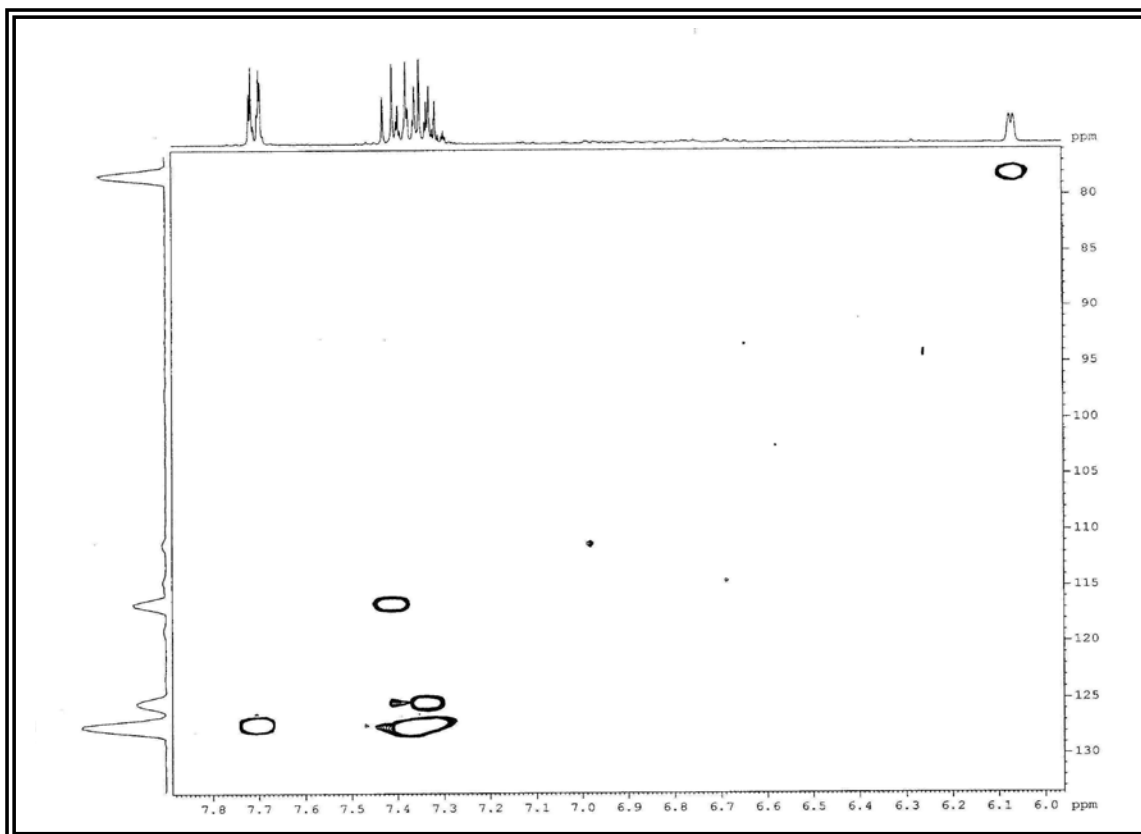


FIGURA 195. Mapa de correlações do HSQC de A18 ( $\delta_H$  6,0 - 7,8;  $\delta_C$  77 - 133)

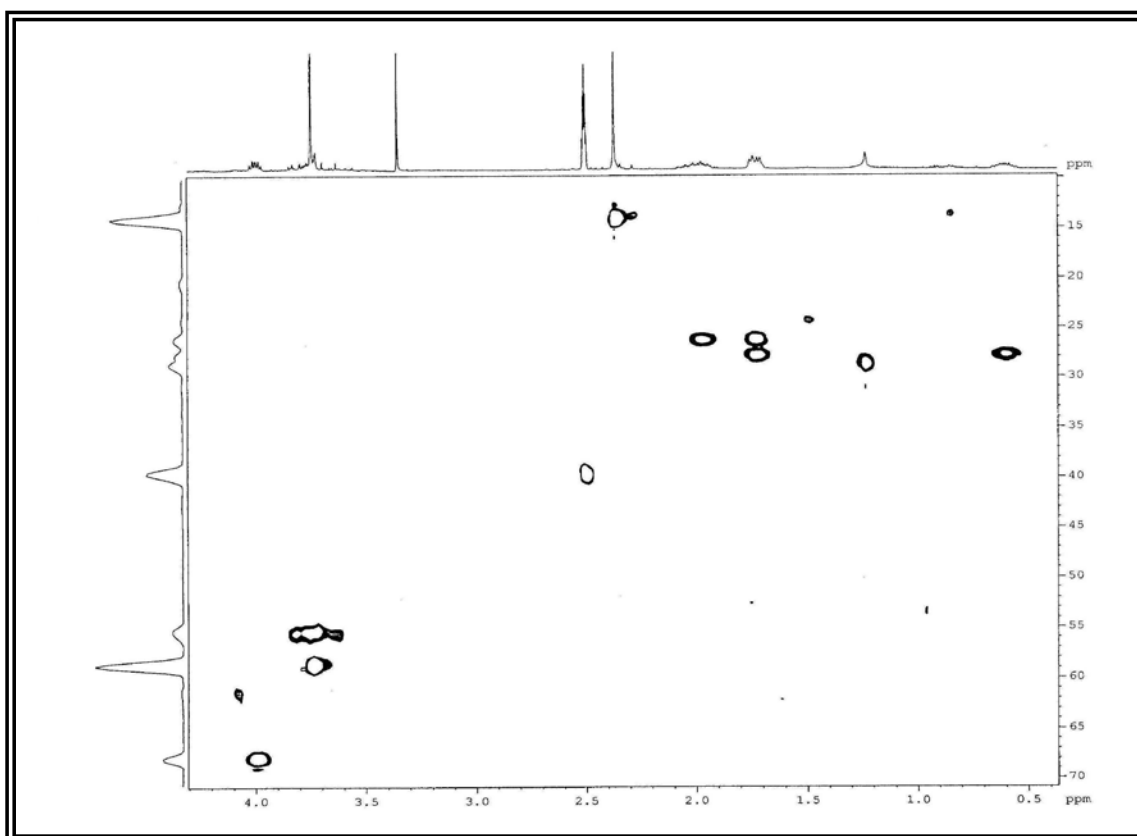


Figura 196. Mapa de correlações do HSQC de A18 ( $\delta_H$  0,5 – 4,3;  $\delta_C$  10 - 70)

Através do espectro de COSY se observou três sistemas de *spins*. No sistema de *spins* 1 verificou-se as correlações entre os hidrogênios do anel aromático monossustituído; no sistema de *spins* 2, observou-se a correlação entre dois hidrogênios aromáticos e no sistema de *spins* 3 verificou-se as correlações entre os hidrogênios metilênicos diasterotópicos e observou-se ainda a correlação entre o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,07 com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,00. Por fim observou-se a correlação do sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,00 com o sinal de hidroxila em  $\delta$  4,97 e com os sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  0,60 e 1,72.

Dada a correlação do hidrogênio oxi-metínico em  $\delta$  4,00 com o sinal de hidroxila em  $\delta$  4,97 foi possível propor que na estrutura de A18 a ponte éter no anel de sete membros encontra-se entre 9 e 13 e que na posição 10 tem-se uma hidroxila.

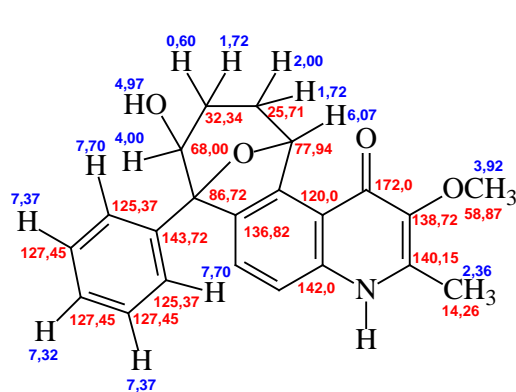
Os dados observados no mapa de correlações do espectro de HMBC foram fundamentais para a elucidação completa da estrutura de A18 quando comparados com os dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  da waltheriona A e da waltheriona D. Neste espectro, as correlações mais importantes observadas foram:

- ✓ O sinal de duplete em  $\delta$  7,42 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  142 (C-8a) e 120 (C-4a), sendo possível atribuir esse hidrogênio a posição 8;
- ✓ O sinal de duplete em  $\delta$  7,34 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  140,15 (C-5) e 86,72 (C-9), sendo possível atribuir esse

hidrogênio a posição 7, bem como confirmar que a ponte éter encontra-se entre os carbonos 9 e 13;

- ✓ O multipletto integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  7,70 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  143,72 (atribuído a C-1') e 86,72 (C-9), sendo este multipletto atribuído aos hidrogênios equivalentes nas posições 2' e 6';
- ✓ O sinal de dupletto em  $\delta$  6,07 referente ao hidrogênio oxi-metínico apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  27,82 (C-11), 86,72 (C-9), 68,0 (C-10) e 140,15 (C-5), sendo esta última correlação importante para confirmar este hidrogênio na posição 13;
- ✓ O sinal de duplo-duplo-dupletto em  $\delta$  4,00 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  86,72 (C-9), 136,82 (atribuído a C-6) e 143,72 (C-1'), confirmando assim que este hidrogênio encontra-se na posição 10;
- ✓ O sinal de hidrogênio hidroxílico em  $\delta$  4,97 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  86,72 (C-9) e 68,0 (C-10) confirmando a hidroxila nesta posição.
- ✓ O sinal de hidrogênio ligado ao nitrogênio em  $\delta$  11,60 apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  142,0 (C-8a), 120,0 (C-4a), 140,15 (C-2) e 138,72 (C-3).

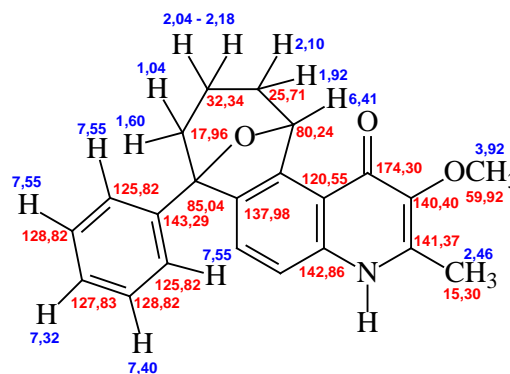
Através da análise conjunta dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A18, foi possível propor que A18 é um derivado da waltheriona D, hidroxilado na posição 10.



H-7 7,34 C-7 125,37  
H-8 7,42 C-8 118,93

#### A-18

Dados obtidos em DMSO- $d_6$



H-7 7,04 C-7 123,53  
H-8 7,13 C-8 116,14

#### waltheriona D

Dados obtidos em CDCl $_3$

### COSY de A18

H 7,32 ppm  $\rightarrow$  H 7,37 ppm  $\rightarrow$  H 7,70 ppm

H 6,07 ppm  $\rightarrow$  H 2,00 ppm

H 2,00 ppm  $\rightarrow$  H 0,60 ppm e H 6,07 ppm

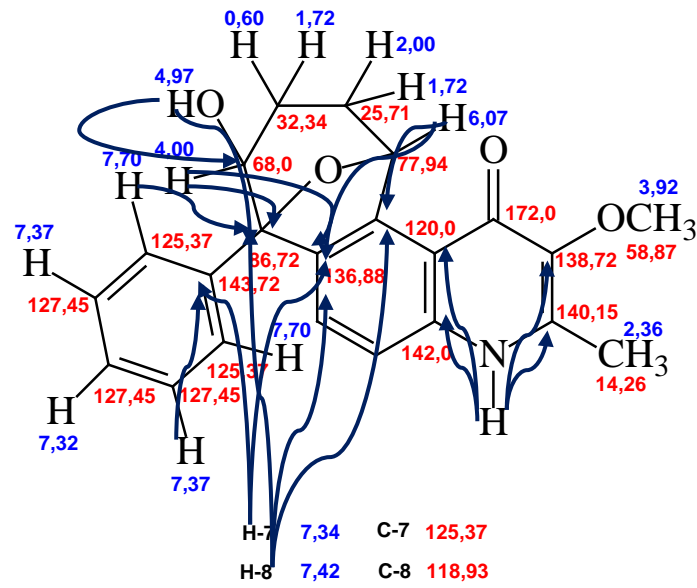
H 0,60 ppm  $\rightarrow$  H 1,72 ppm e H 2,00 ppm

H 1,72 (posição 12)  $\rightarrow$  H 0,60 ppm e H 2,00 ppm

H 1,72 (posição 11)  $\rightarrow$  H 4,00 ppm, H 0,60 ppm e H 2,00 ppm

H 4,00 ppm  $\rightarrow$  H 1,72 ppm (posição 11), H 0,60 ppm e OH 4,97 ppm





Principais correlações via HMBC

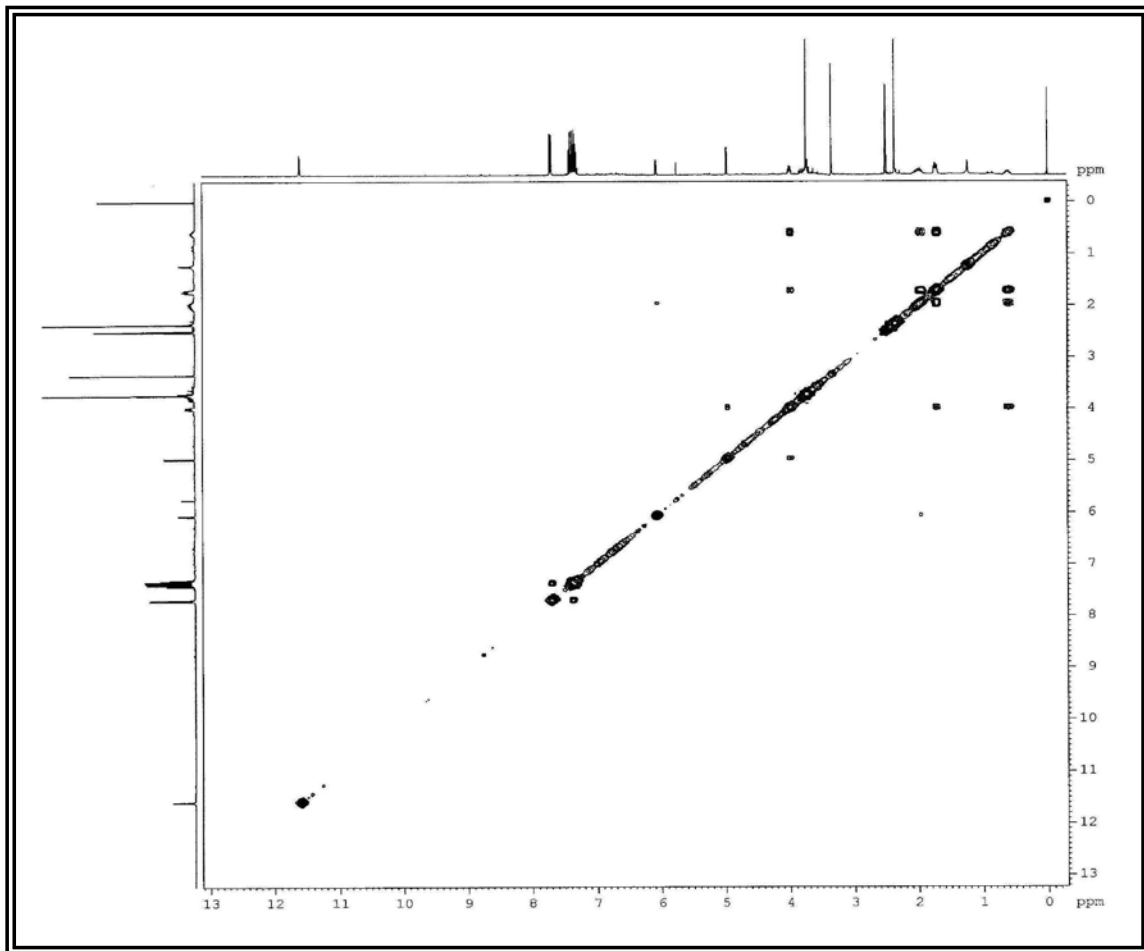


Figura 197. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY de A18 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)

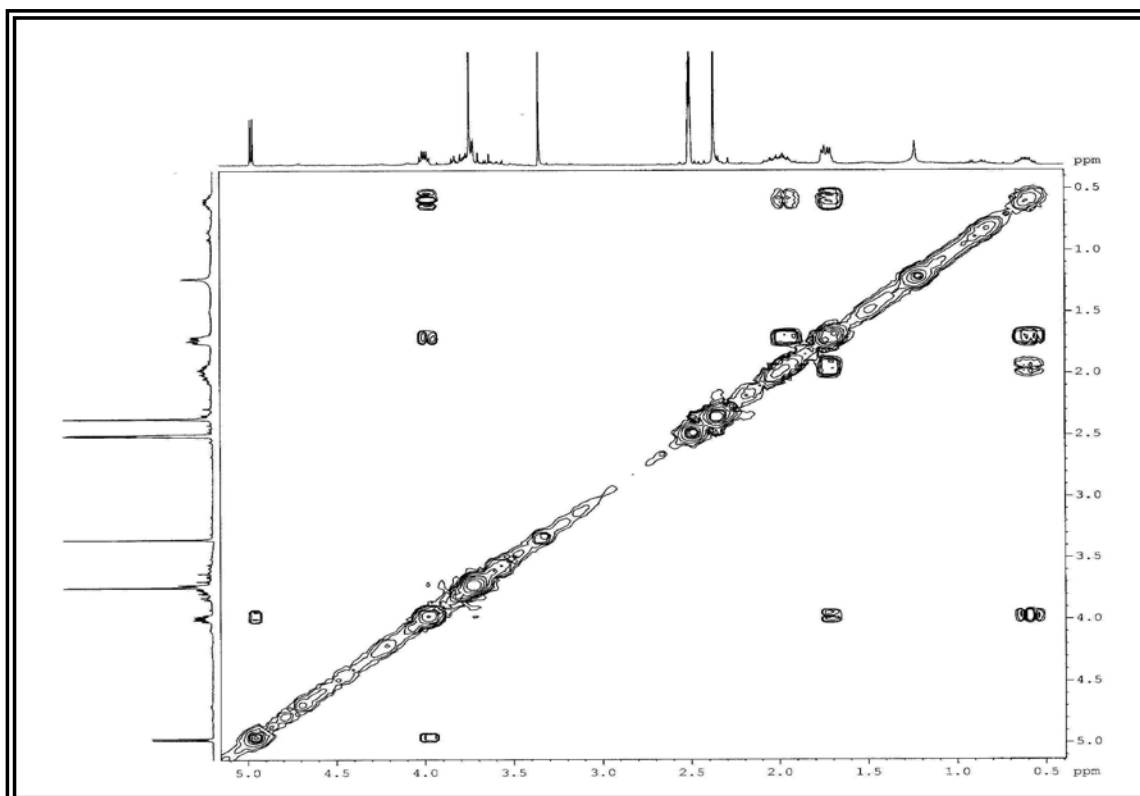


FIGURA 198. Mapa de correlações de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  do COSY de A18 ( $\delta_{\text{H}}$  0,5 – 5,0)

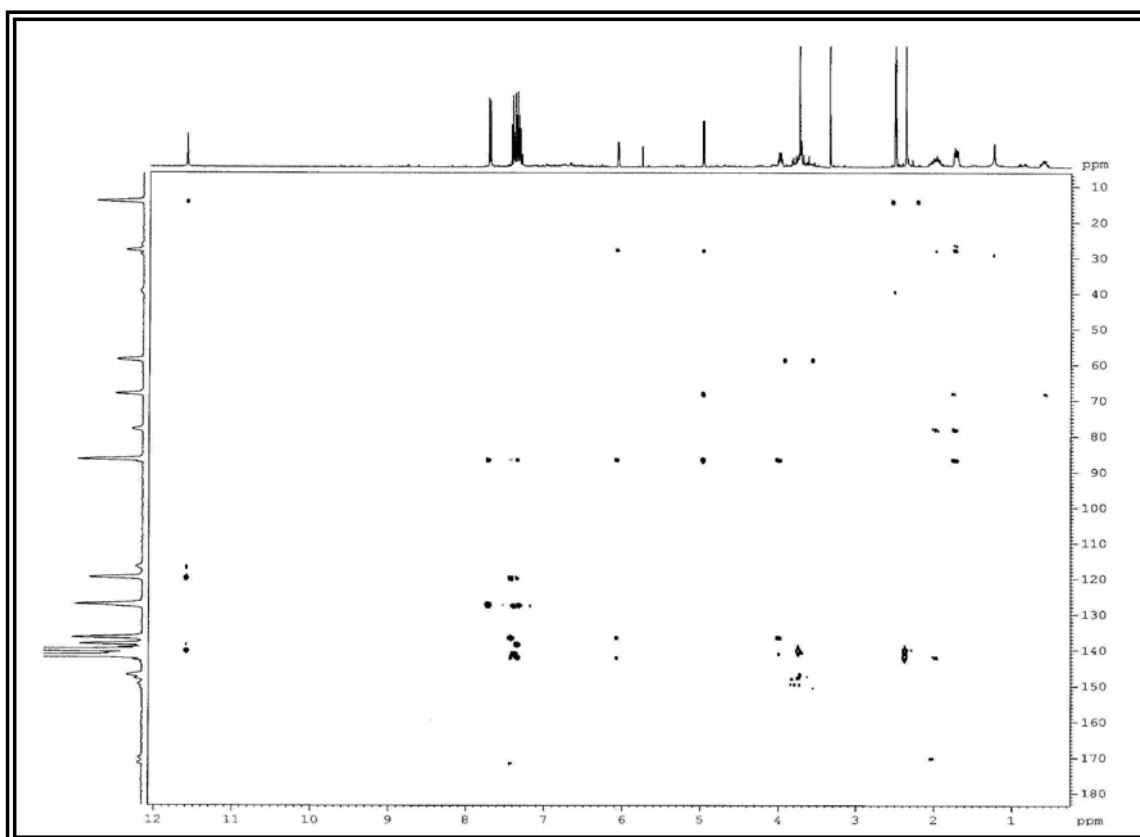


FIGURA 199. Mapa de correlações do HMBC de A18 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)

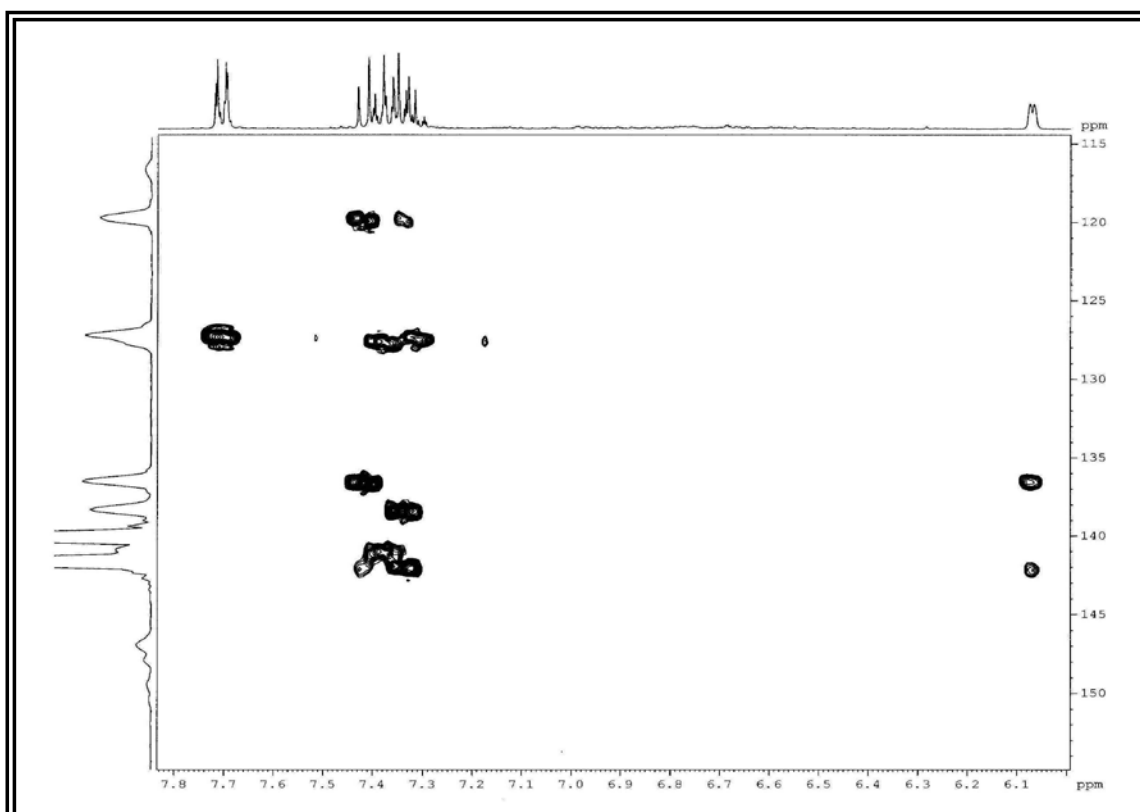


FIGURA 200. Mapa de correlações do HMBC de A18 ( $\delta_H$  6,0 – 7,8;  $\delta_C$  115 – 155)

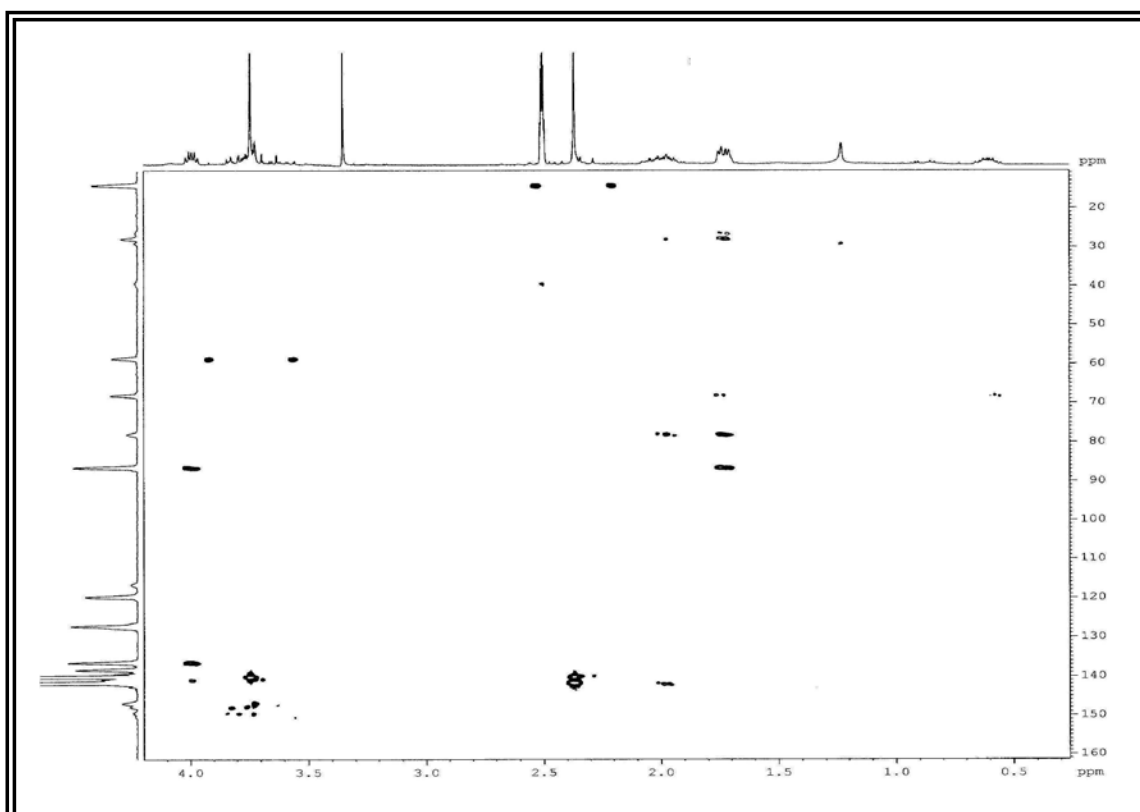


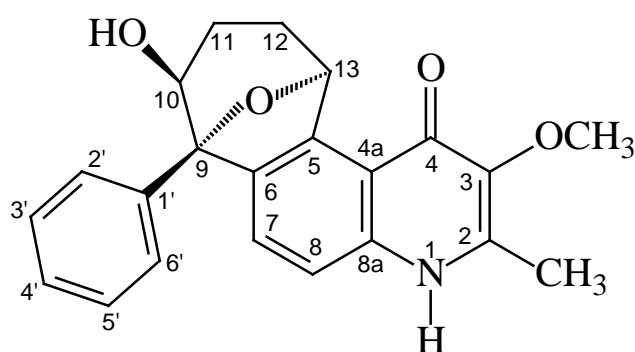
FIGURA 201. Mapa de correlações do HMBC de A18 ( $\delta_H$  0,5 – 4,0;  $\delta_C$  15 – 160)

Com o objetivo de confirmar se os hidrogênios oxi-metínicos H-10 e H-13 estão em relação *syn* ou *anti*, realizou-se o experimento de *g*-NOESY irradiando os respectivos sinais de hidrogênio  $\delta$  4,00 e  $\delta$  6,07 com pulsos de radio frequência para observar incrementos de NOE para estes sinais. Uma vez que esses incrementos não foram observados, e apesar de a ausência de NOE não ser resposta, pode-se sugerir que os hidrogênios H-10 e H-13 estão em relação anti um ao outro. Os incrementos de NOE observados com a irradiação dos demais sinais de hidrogênio de A-18 estão compatíveis com a estrutura proposta.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A18, obtido em MeOD apresentou 20 sinais de carbono, sendo dois destes dobrados, confirmando a presença de 22 carbonos na estrutura de A18. Observou-se diferenças entre os deslocamentos de  $^{13}\text{C}$  obtidos no experimento de RMN de  $^{13}\text{C}$  em MeOD com relação aos deslocamentos obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC em DMSO- $d_6$ , entretanto, foi possível atribuir os dados obtidos em MeOD para todos os carbonos através de comparações.

O espectro de massas de A-18 (ESI, modo positivo) apresentou o pico íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  364 confirmando a estrutura proposta para A18 elucidada exclusivamente por dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D). Assim, com base na análise e interpretação de todos os dados espectrais obtidos foi possível elucidar inequivocamente a estrutura de A18 como sendo um alcalóide quinolônico inédito, este foi nomeado de 10-hidroxi-waltheriona D.

Uma vez que A18 trata-se de uma substância inédita foi obtido o espectro de massas de alta resolução (TOF, modo positivo). Este apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  364,1554 compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}$ . A esterequímica de A-18 está discutida no item 4.1.20.



**Estrutura da 10-hidroxi-waltheriona D**

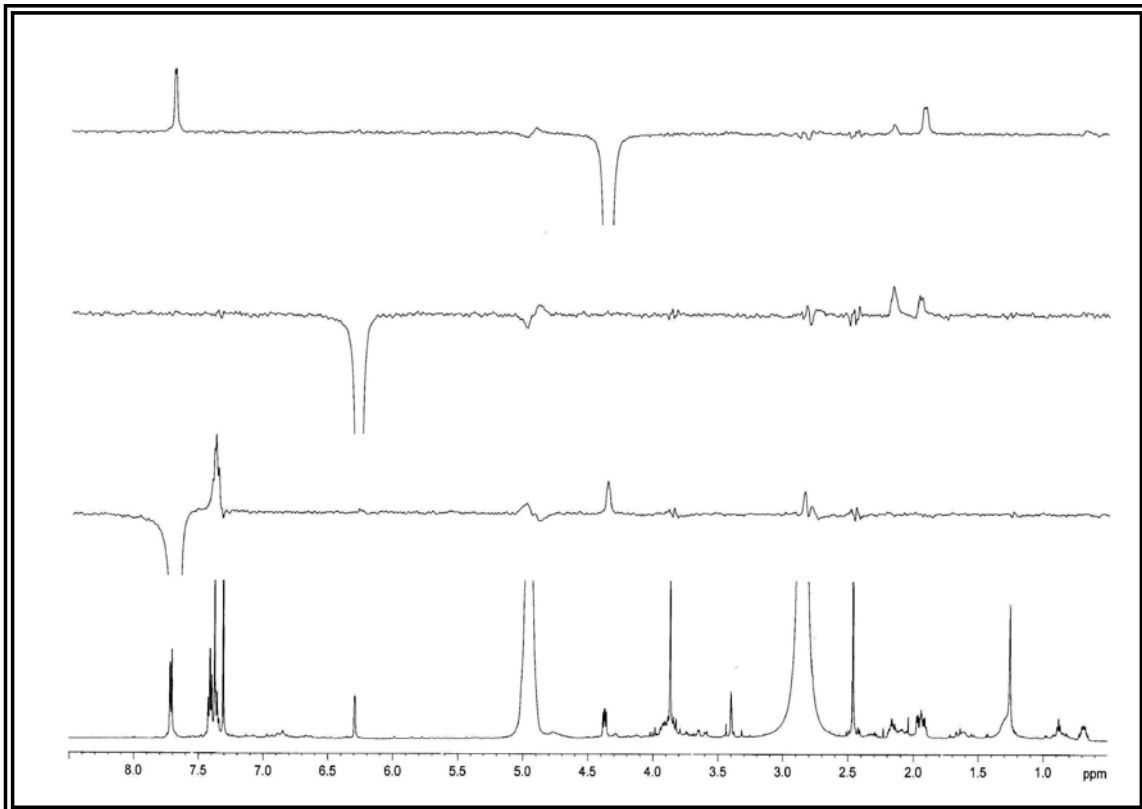


FIGURA 202. Espectro de *g*-NOESY de A18 (MeOD, 600 MHz)

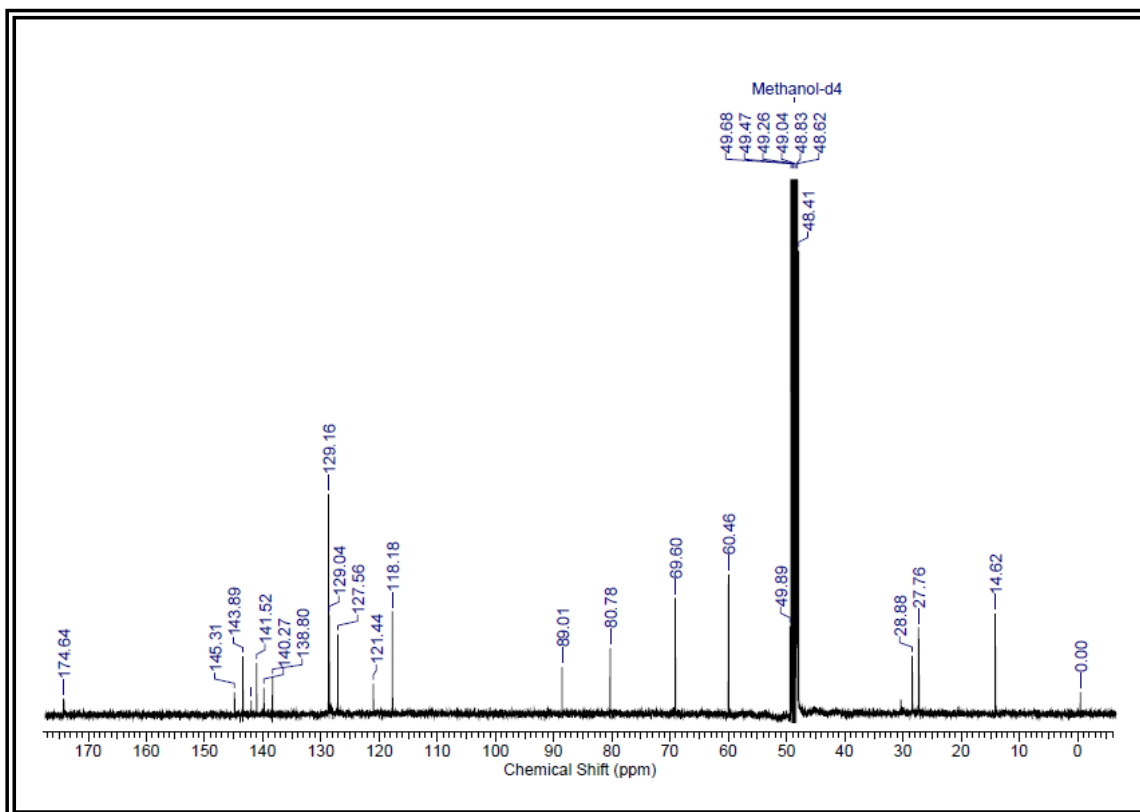


FIGURA 203. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (BB) de A18 (MeOD, 100 MHz)

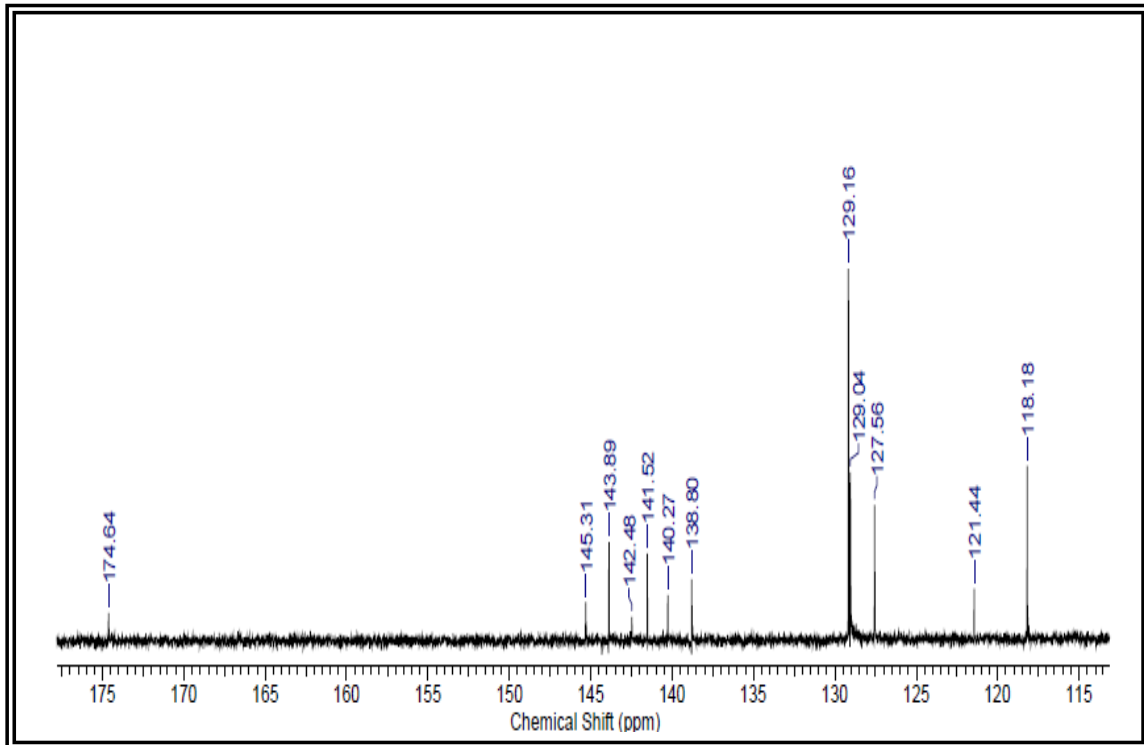


FIGURA 204. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A18 ( $\delta$  115 - 175)

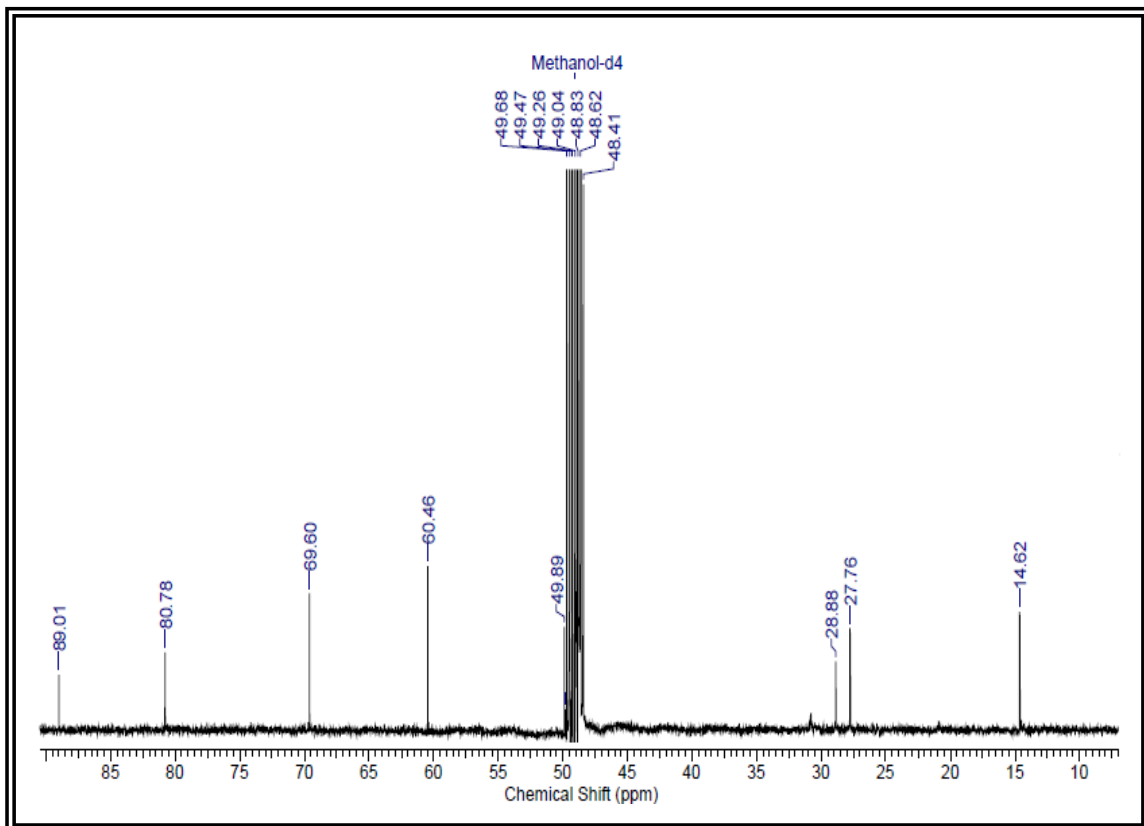


FIGURA 205. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A18 ( $\delta$  10 - 90)

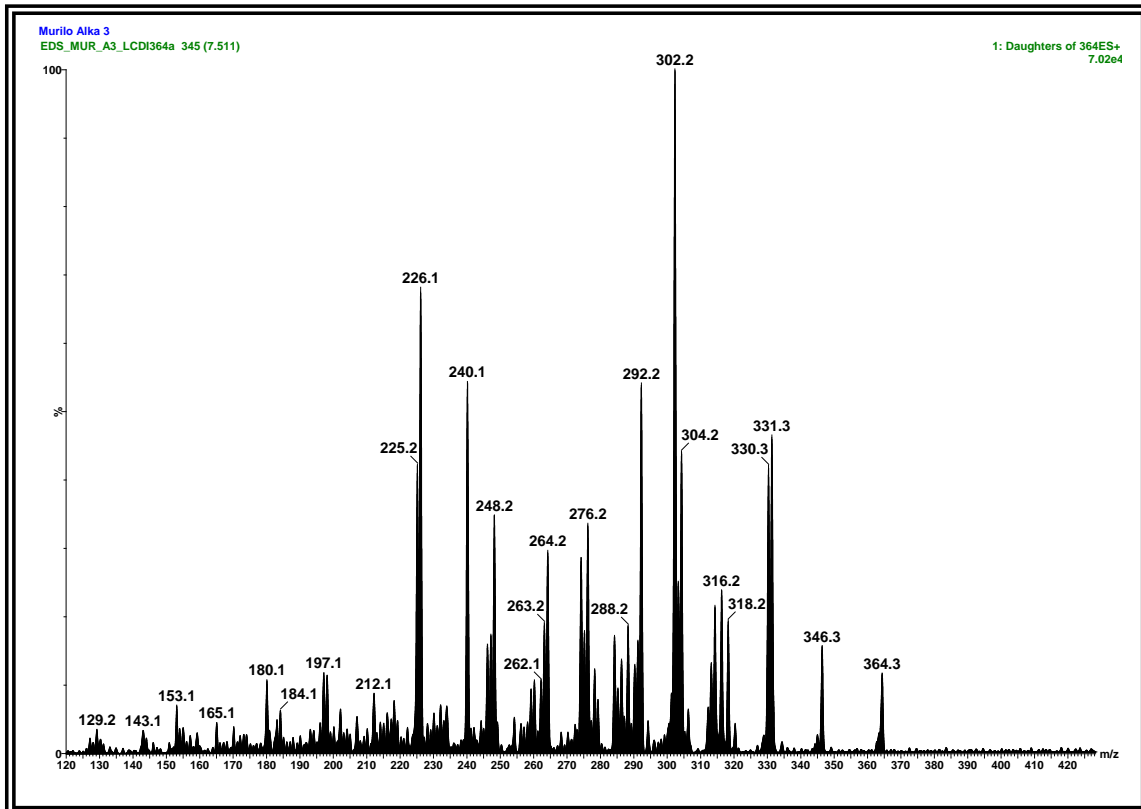


FIGURA 206. Espectro de massas de A18 (ESI, modo positivo)

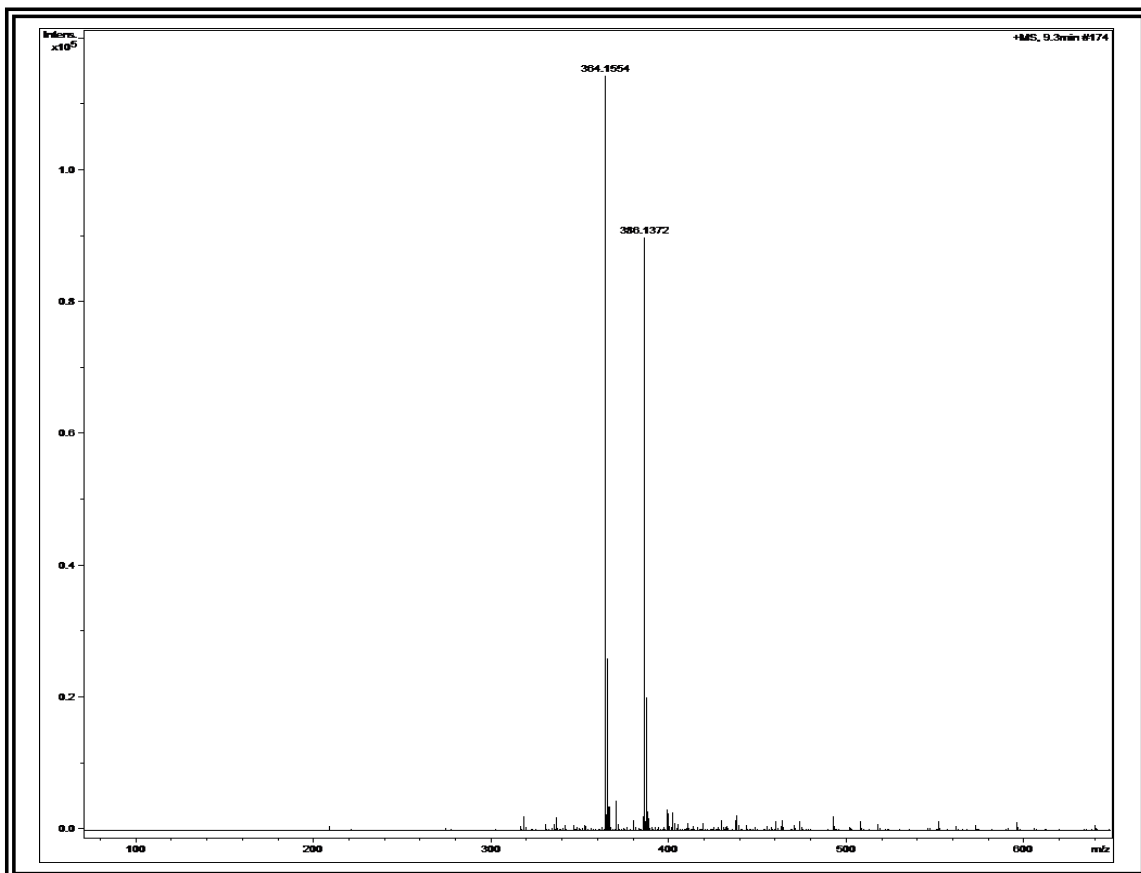


FIGURA 207. Espectro de massas de alta resolução de A18 (ESI, modo positivo)

TABELA 40. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A18

Posição	A18 (400/100 MHz, DMSO- $d_6$ )				waltheriona D (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	H/C	$\delta^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{*1}$ DMSO	$\delta^{13}\text{C}^{*2}$ MeOD	HMBC 400 MHz	$\delta^1\text{H}$
2	-	140,15	141,52		-	141,37
3	-	138,72	140,27		-	140,40
4	-	172,00	174,64		-	174,30
4 <sup>a</sup>	-	120,00	121,44		-	120,55
5	-	140,15	142,44		-	140,87
6	-	136,82	138,80		-	137,98
7	7,34 ( <i>d</i> ; 8,8)	125,37	127,92	C-9; C-6; C-5; C-1'	7,04 ( <i>d</i> )	123,53
8	7,42 ( <i>d</i> ; 8,8)	118,93	118,17	C-8 <sup>a</sup> , C-4 <sup>a</sup>	7,13 ( <i>d</i> )	116,14
8 <sup>a</sup>	-	142,00	143,88		-	142,86
9	-	86,72	88,97		-	85,04
10	4,00 (ddd; 3, 4, 6)	68,00	70,00	C-9; C-5', C-1'	1,60 ( <i>m</i> )	17,96
1,04 ( <i>m</i> )						
11a	1,72 ( <i>m</i> )	27,82	28,88		2,04 – 2,18	32,34
11b	0,60 ( <i>m</i> )				2,04 – 2,18	
12a	2,00 ( <i>m</i> )	26,26	27,75		2,10 ( <i>m</i> )	25,71
12b	1,72 ( <i>m</i> )				1,92 ( <i>m</i> )	
13	6,07 ( <i>d</i> ; 3,0)	77,90	80,78	C-9, C-5, C-6, C-11	6,41 ( <i>d</i> )	80,24
1'	-	143,72	145,31		-	143,29
2'	7,70 ( <i>m</i> )	127,45	129,17	C-1', C-4' e C-9	7,55 ( <i>m</i> )	125,82
3'	7,45 ( <i>m</i> )	127,45	129,04	C-2'; C-5'; C-1'	7,40 ( <i>m</i> )	128,28
4'	7,32 ( <i>m</i> )	125,37	127,56	C-2'; C-3'	7,32 ( <i>m</i> )	127,53
5'	7,45 ( <i>m</i> )	127,45	129,04	C-2'; C-5'; C-1'	7,40 ( <i>m</i> )	128,28
6'	7,70 ( <i>m</i> )	127,45	129,17	C-1', C-4' e C-9	7,50 ( <i>m</i> )	125,82
2-C- CH <sub>3</sub>	2,37 ( <i>s</i> )	14,26	14,58	C-3	2,46 ( <i>s</i> )	15,30
3-O- CH <sub>3</sub>	3,74 ( <i>s</i> )	58,77	60,42	C-2'	3,92 ( <i>s</i> )	59,92
N-H	11,61 ( <i>s</i> )	-	-	C-8 <sup>a</sup> , C-4 <sup>a</sup> , C-2, C-3, C-8	NO* <sup>3</sup>	-
10-OH	4,97 ( <i>d</i> ; J = 4)			C-9, C-10	5,10 ( <i>s</i> )	-

\*<sup>1</sup> Dados obtidos por projeção de HSQC e HMBC em DMSO- $d_6$ . \*<sup>2</sup> Experimento obtido em MeOD\*<sup>3</sup> Não observado



#### 4.1.20. Proposta para configuração absoluta das waltherionas

A estrutura da waltheriona A (A16) foi primeiramente publicada por Hoelzel e colaboradores em 2005. Nesta publicação a estereoquímica da waltheriona A foi definida como sendo (9R, 10S, 13R) com base em cálculos de quânticos Austin Model 1 (AM1) (HOELZEL *et. al.*; 2005). Nesta estrutura a ponte éter entre os carbonos 9 e 13 encontra-se em face  $\alpha$ , enquanto que a fenila ligada ao carbono 9 encontra-se em face  $\alpha$  e a hidroxila em face  $\beta$ .

O mesmo grupo de pesquisa publicou em 2008 a estrutura da waltheriona B como sendo um diastereoisômero da waltheriona A. Através de dados de difração de raios X foi feita a correção da estereoquímica da waltheriona A para (9S, 10R, 13R) onde o único erro estava na configuração no carbono 9 (GRESSLER *et. al.*; 2008).

De acordo com a difração de raios X das waltherionas A e B, a diferença entre as mesmas está na disposição espacial da ponte éter, pois tanto na waltheriona A, quanto na waltheriona B a hidroxila ligada ao carbono 9 encontra-se em face  $\beta$ . A ponte éter na waltheriona A encontra-se em face  $\alpha$  e na waltheriona B encontra-se na face  $\beta$ .

A figura abaixo apresenta as configurações absolutas das waltherionas A e waltheriona B derivatizada de acordo com Gressler e colaboradores (GRESSLER *et. al.*; 2008).

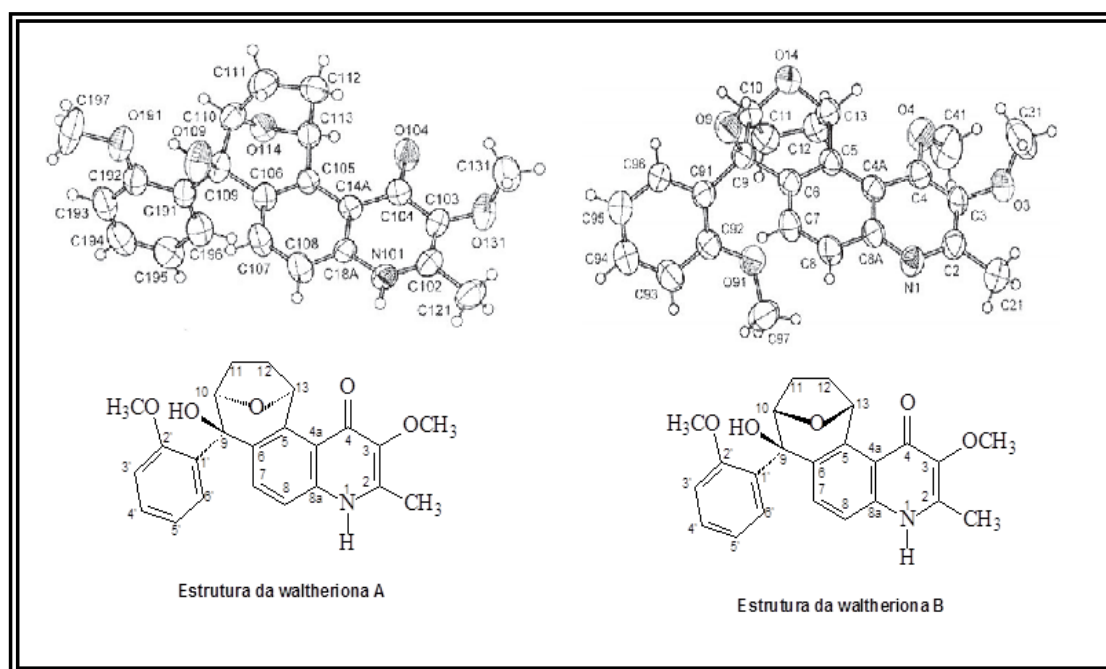


FIGURA 208. Estrutura das waltherionas A e B por difração de raios X  
Retirado de GRESSLER *et. al.*; 2008

A diferenciação entre as waltherionas A e B é fácil devido a grande diferença entre os respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , enquanto que os valores de deslocamento de RMN de  $^{13}\text{C}$  são quase semelhantes. São observadas também diferenças com relação ao ponto de fusão e a rotação específica  $[\alpha\text{-D}]$ . Assim as substâncias de A16 e A177 foram facilmente distinguidas pela estereoquímica, sendo A16 a waltheriona A e A17 a waltheriona B.

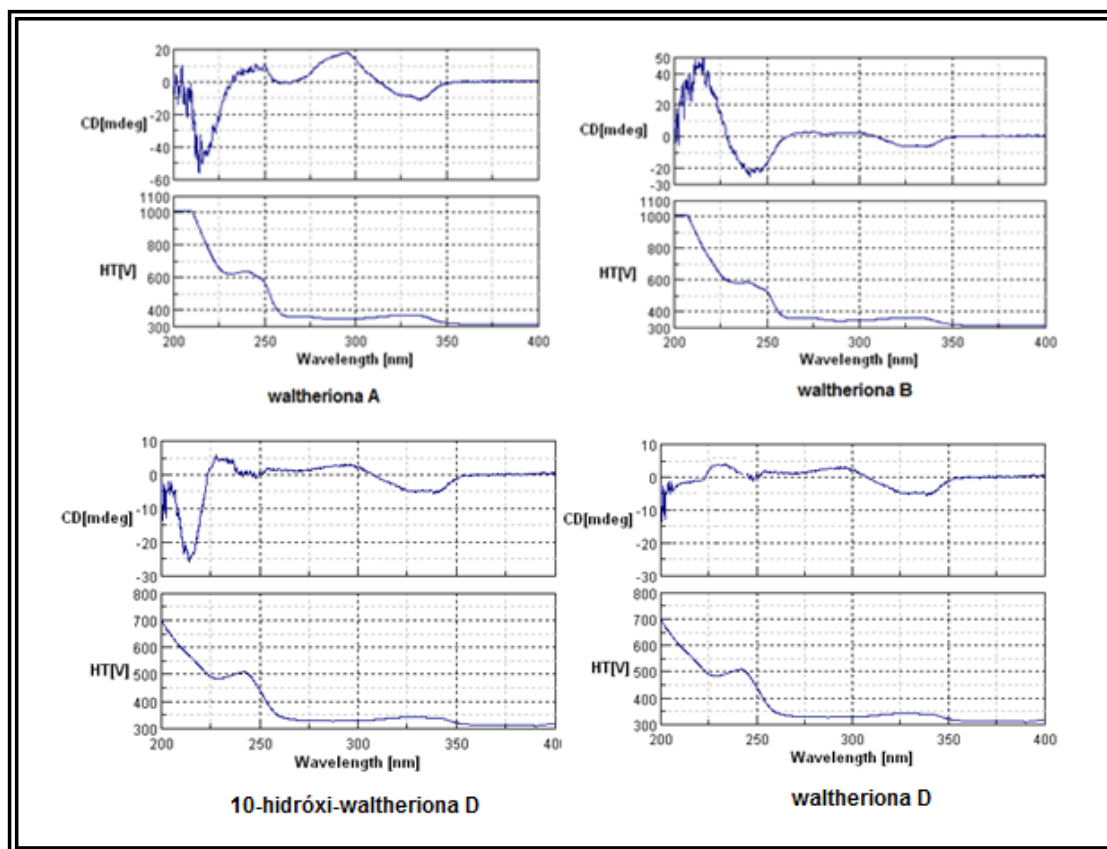


FIGURA 209. Espectros de dicroísmo circular das waltherionas

Comparando-se as curvas de dicroísmo circular das waltherionas A (A16) e B (A17), observa-se para ambas um efeito cóton negativo em 340 nm, possivelmente relacionado ao C-9, onde A16 e A17 possuem a mesma configuração, *R*. Para a waltheriona A observa-se ainda um forte efeito cóton positivo em 280 nm ausente na waltheriona B.

A diferença relativa à configuração nos carbonos 10 e 13 pode ser observada nos comprimentos de onda de 230 nm e 248 nm. Para a waltheriona A que possui configuração nestes dois carbonos como 10*S*, 13*R* observa-se efeito cóton negativo em 230 nm e positivo em 248 nm; enquanto que para a waltheriona B que possui configuração nestes carbonos 10*R*, 13*S* observa-se efeito cóton positivo em 230 nm e negativo em 248 nm. Assim, esses efeitos cóton observados podem estar relacionados a estes carbonos (C-10 e C-13). Portanto as curvas de dicroísmo circular obtidas para as waltherionas A e B estão de acordo com a estereoquímica

destes diastereoisômeros proposta por (GRESSLER et. al; 2008) através de difração de raios X.

A estereoquímica da 10-hidróxi-waltheriona D e da waltheriona D foram propostas com base na comparação das curvas de DC obtidas para estes compostos com aquelas obtidas para as waltherionas A e B.

Observou-se para a 10-hidróxi-waltheriona D um efeito cóton negativo em 340 nm e efeito cóton positivo em 280 nm, similar a waltheriona A, sendo possível sugerir a configuração de C-9 como sendo *R*. Observa-se ainda efeito cóton negativo em 230 nm e positivo em 248 nm, similar a waltheriona A, sendo possível sugerir a configuração dos carbonos C-10 e C-13 como sendo C-10S e C-13R por comparação. Esta configuração está de acordo com a análise do espectro de *g*-NOESY da 10-hidróxi-waltheriona D, onde observou-se a relação *anti* entre os hidrogênios H-10 e H-13.

O espectro de DC da waltheriona D também apresentou efeito cóton negativo em 340 nm e efeito cóton positivo em 280 nm, similar a waltheriona A, sendo possível sugerir a configuração de C-9 como sendo *R*. Já a configuração de C-13 foi sugerida como sendo C-13R, devido ao efeito cóton positivo observado em 248 nm.

O espectro de dicroísmo circular da waltheriona C apresentou forte efeito cóton positivo em 348 nm e um efeito cóton negativo em 280 nm, ao contrário das waltherionas anteriormente discutidas, sendo assim a configuração de C-9 foi sugerida como sendo C-9R. Similarmente a waltheriona B, este espectro apresentou efeito cóton positivo em 230 nm e negativo em 248 nm, sendo as configurações dos carbonos C10 e C-13 definidas como C-10R e C-13S.

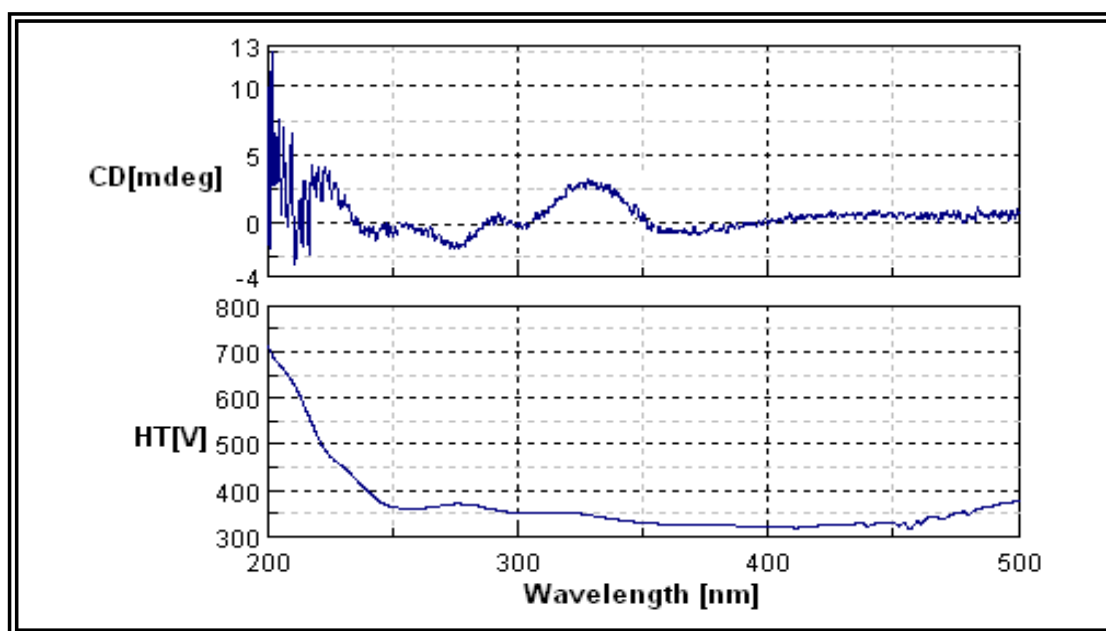


FIGURA 210. Espectro de dicroísmo circular da waltheriona C

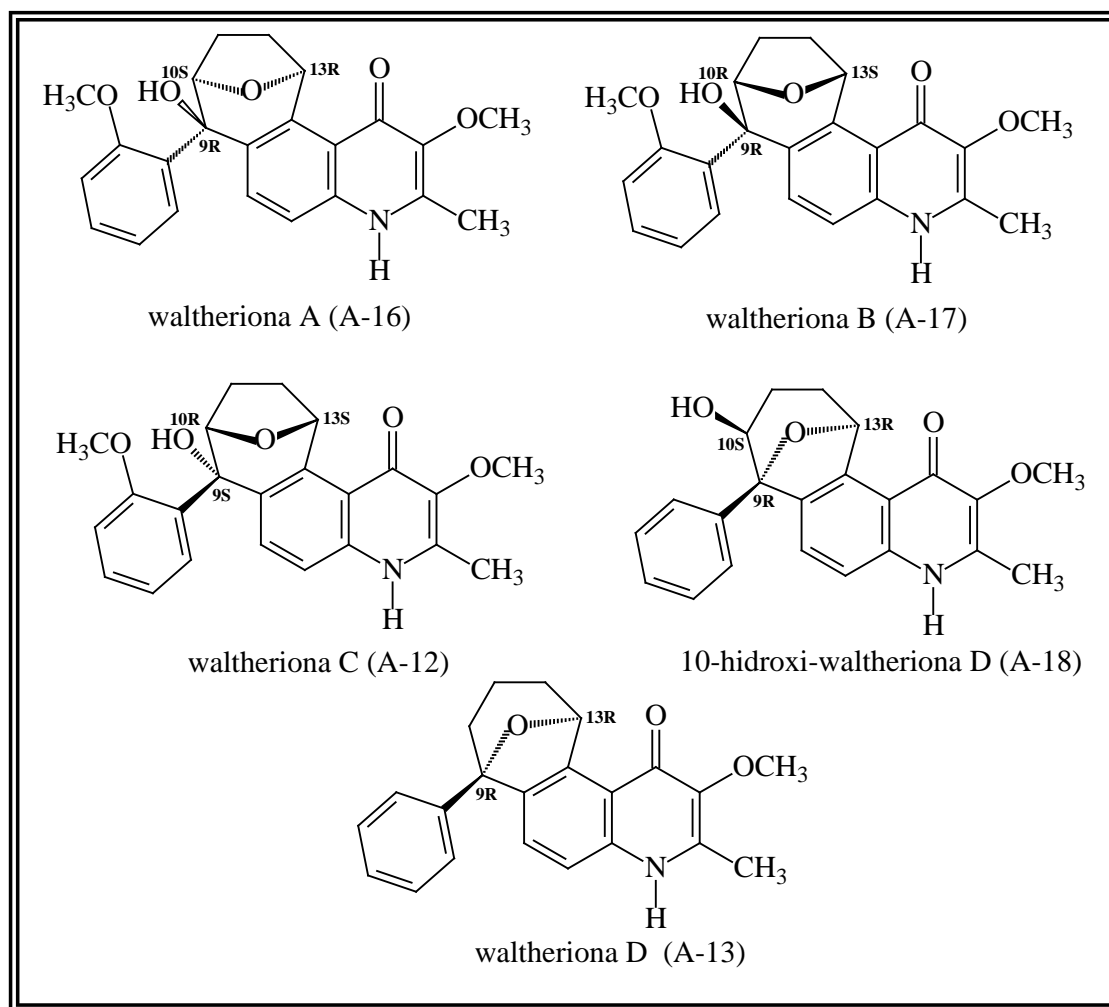


FIGURA 211. waltherionas e suas estereoquímicas

## 4.2. Alcaloides ciclopeptídicos

Os alcaloides ciclopeptídicos A8, A9 e A10 são de ocorrência comum no gênero *Waltheria*, assim como na tribo Hermannieae. Esses alcaloides já foram anteriormente identificados das folhas de *W. brachypetala* (LIMA, 2007) e portanto serão discutidos apenas brevemente neste trabalho.

### 4.2.1. identificação do alcaloide A8

A substância A8 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCDA, sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 01) de A8 apresentou sinais característicos dos alcaloides ciclopeptídicos. Seis grupos metílicos na forma de dupletos com constante de acoplamento de 6,6 Hz são observadas entre  $\delta$  0,70 – 1,30; sendo possível sugerir a presença de três grupos isopropílicos na estrutura de A-08. Observa-se ainda um sinal de simpleto integrando para seis hidrogênios em  $\delta$  2,20 que é característico da unidade N,N-dimetil do aminoácido básico terminal.

Para caracterizar as unidades de aminoácido da estrutura de A8 foi feita uma comparação dos dados de deslocamento químico dos sinais de metila observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A8 com dados de alcaloides ciclopeptídicos relatados na literatura (MOREL *et. al.*; 1998). Sendo assim, os sinais de metila em  $\delta$  0,71 e 0,82 juntamente com o sinal referente a duas metilas em  $\delta$  2,20 caracterizaram a presença do aminoácido básico terminal sendo a N,N-dimetil leucina. Na posição 3 do anel macrocíclico foi caracterizada a presença de  $\beta$ -hidroxi-leucina através dos sinais de metila em  $\delta$  0,97 e 1,28, enquanto que o aminoácido ligado na posição 7 também foi identificado como sendo leucina através dos sinais de metila em  $\delta$  0,90 e  $\delta$  0,95.

Na região entre  $\delta$  4,0 – 5,1 observa-se sinais de característicos de hidrogênios do anel macrocíclico, sendo um multipletto em  $\delta$  4,06 referente ao sinal de hidrogênio na posição 7, um duplo-dupletto em  $\delta$  4,45 ( $J = 4,0$ ; 10,0 Hz) referente ao hidrogênio na posição 4 e um sinal de duplo-dupletto em  $\delta$  5,03 ( $J = 4,0$ ; 7,5 Hz) referente ao hidrogênio oxi-metínico na posição 3.

A unidade de estirilamina foi caracterizada através do sinal de dupletto em  $\delta$  6,36 ( $J = 7,6$ ) referente à H-11 e um duplo-dupletto em  $\delta$  6,63 ( $J = 7,6$ ; 10,0 Hz) referente ao H-10.

Na região dos hidrogênios aromáticos observou-se ainda sinais integrando para quatro hidrogênios entre  $\delta$  7,02 - 7,25 que referem-se aos hidrogênios do anel aromático *p*-di-substituído da unidade de estirilamina. Os sinais de dupletos em  $\delta$  5,76;  $\delta$  6,46 e  $\delta$  7,82 referem-se aos hidrogênios ligados a nitrogênio referentes a H-6, H-9 e H-20, respectivamente e sendo estas atribuições confirmadas através da análise do mapa de correlações do espectro de COSY (ANEXO 02).

O espectro de COSY de A8 apresentou correlações importantes para confirmar a conectividade entre os átomos de hidrogênio, bem como confirmar as respectivas atribuições de deslocamento químico. Neste espectro observou-se um sinal de hidrogênio sobreposto em  $\delta$  1,92 com os sinais de metila em  $\delta$  0,97 e  $\delta$  1,28 e com o sinal de hidrogênio oxi-metínico em  $\delta$  5,03 confirmando o grupo isopropila na posição 3.

Observou-se ainda neste espectro um sistema de spins formado pelos sinais de metila em  $\delta$  0,71 e 0,82 com o sinal de multipeto em  $\delta$  1,27, este sinal correlacionando ainda com um multipeto entre  $\delta$  1,30 - 1,60 e este multipeto com um sinal de duplo-dupeto em  $\delta$  2,79 ( $J = 4,9; 5,1$  Hz) caracterizando a unidade N,N-dimetil-leucina.

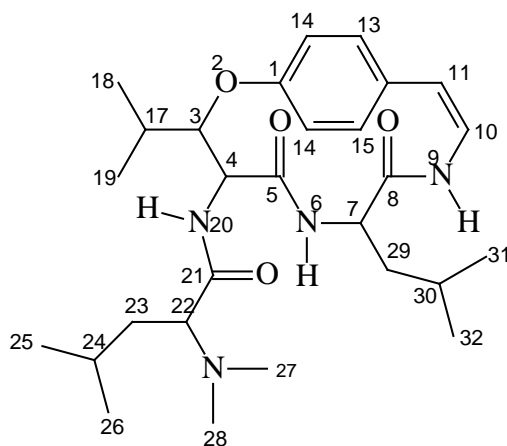
O sinal de multipeto entre  $\delta$  1,32-1,70 apresentou correlação com o sinal de multipeto em  $\delta$  4,06 (H-7) e com um multipeto em  $\delta$  1,78. Uma vez que este multipeto em  $\delta$  1,78 apresentou correlação com os sinais de metila em  $\delta$  0,90 e 0,95 foi possível atribuir esta unidade de leucina ligada na posição 7.

Verificou-se ainda no espectro de COSY a conectividade entre os hidrogênios H-11 e H-10; H-10 e NH-9; H-3 e H-4; H-7 e NH-6 e H-4 com NH-20, bem como as correlações entre os hidrogênios aromáticos.

O espectro de massas de alta resolução de A8 (ESI, modo negativo) (ANEXO 03) apresentou o pico do íon *pseudo*-molecular  $[M - H]^+$  em  $m/z$  572,4972 compatível com a fórmula molecular  $C_{26}H_{43}O_4N_4$ .

A partir da análise dos dados de RMN de  $^1H$ , COSY, espectrometria de massas de alta resolução e a comparação com dados da literatura (MOREL *et. al.*; 1998), o alcaloide ciclopeptídico A-08 foi identificado inequivocamente como sendo a franganina. As estereoquímicas relativas não foram determinadas neste trabalho.

Este alcaloide ciclopeptídico é de ocorrência comum na tribo Hermannieae, sendo considerado um marcador quimiosistemático nos gêneros *Waltheria* e *Melochia*.



**Estrutura da franganina**

TABELA 41. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A-8

Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz
<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)
1	-	-	17	1,92 ( <i>m</i> )	1,92 ( <i>m</i> )
2	-	-	18 (Me)	1,28 ( <i>d</i> ; 6,6)	1,28 ( <i>d</i> ; 6,6)
3	5,03 ( <i>dd</i> ; 4,0; 7,5)	4,99 ( <i>dd</i> ; 4,0; 7,6)	19 (Me)	0,97 ( <i>d</i> ; 6,6)	0,97 ( <i>d</i> ; 6,6)
4	4,45 ( <i>dd</i> ; 4,0; 10)	4,47 ( <i>dd</i> ; 4,0; 10)	20-NH	7,82 ( <i>d</i> ; 10)	7,84 ( <i>d</i> ; 10,1)
5	-	-	21	-	-
6-NH	5,76 ( <i>d</i> ; 7,5)	5,78 ( <i>d</i> ; 7,6)	22	2,79 ( <i>dd</i> ; 4,9; 4,9)	2,81 ( <i>dd</i> ; 4,9; 4,9)
7	4,06 ( <i>m</i> )	4,07 ( <i>m</i> )	23	1,30 – 1,60	1,35 – 1,61
8	-	-	24	1,28 ( <i>m</i> )	1,27 ( <i>m</i> )
9-NH	6,46 ( <i>d</i> ; 10)	6,49 ( <i>d</i> ; 9,9)	25 (Me)	0,71 ( <i>d</i> ; 6,6)	0,71 ( <i>d</i> ; 6,6)
10	6,63 ( <i>dd</i> ; 7,5; 10)	6,67 ( <i>dd</i> ; 7,6; 10)	26 (Me)	0,82 ( <i>d</i> ; 6,6)	0,82 ( <i>d</i> ; 6,6)
11	6,36 ( <i>d</i> ; 7,5)	6,37 ( <i>d</i> ; 7,6)	27 (NMe)	2,20 ( <i>s</i> )	2,22 ( <i>s</i> )
12	-	-	28 (NMe)	2,20 ( <i>s</i> )	2,22 ( <i>s</i> )
13	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	29	1,35 – 1,75	1,35 – 1,75
14	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	30	1,79 ( <i>m</i> )	1,79 ( <i>m</i> )
15	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	31 (Me)	0,95 ( <i>s</i> )	0,95 ( <i>s</i> )
16	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	32 (Me)	0,90 ( <i>s</i> )	0,90 ( <i>s</i> )

(MOREL *et. al.*; 1998)

#### 4.2.2. Identificação do alcaloide ciclopeptídico A9

A substância A9 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD, sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A9 (ANEXO 4) apresentou sinais característicos dos alcaloides ciclopeptídicos, como os sinais em  $\delta$  6,52 (*d*; J = 8,0 Hz) e 6,41 (*dd*; J= 8,0 e 10 Hz) referentes aos hidrogênios olefínicos H-10 e H-11, respectivamente, da unidade de estirilamina do anel macrocíclico, bem como os sinais de dupletos em  $\delta$  6,05 e 6,45 referentes aos hidrogênios ligados a nitrogênio, NH-6 e NH-9, respectivamente. Observou-se ainda neste espectro o sinal referente ao hidrogênio oximetínico H-3 em  $\delta$  4,94 e os sinais de duplo-duplete em  $\delta$  4,47 e multiplete em  $\delta$  4,01 referente aos hidrogênios H-4 e H-7, respectivamente.

Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos da unidade de estirilamina são observados entre  $\delta$  7,02 – 7,26 assim como ocorre na franganina.

As unidades de aminoácidos terminais foram identificadas através de comparação com modelos da literatura (MOREL *et. al.*; 1998). Sendo assim, foi possível identificar o aminoácido leucina através das duas metilas de grupo isopropila em  $\delta$  0,82 e 0,75 (*d*; J = 6,6 Hz), bem como dos sinais de multiplete em  $\delta$  1,78 (H-30) e em  $\delta$  1,25 e 1,64 referentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos na posição 29.

A unidade de  $\beta$ -hidroxi-leucina foi identificada através dos sinais de metila do grupo isopropila em  $\delta$  0,99 e  $\delta$  1,25 e através do multiplete em  $\delta$  2,01 referente ao hidrogênio metínico H-17.

O resíduo de aminoácido básico terminal foi identificado como sendo a isoleucina, dado a presença de um tripleto em  $\delta$  0,90 referente a metila C-25, uma metila duplete em  $\delta$  0,95 referente a posição 26, além de um simpleto integrando para seis hidrogênios em  $\delta$  2,20 referentes aos dois grupos metila ligados ao nitrogênio.

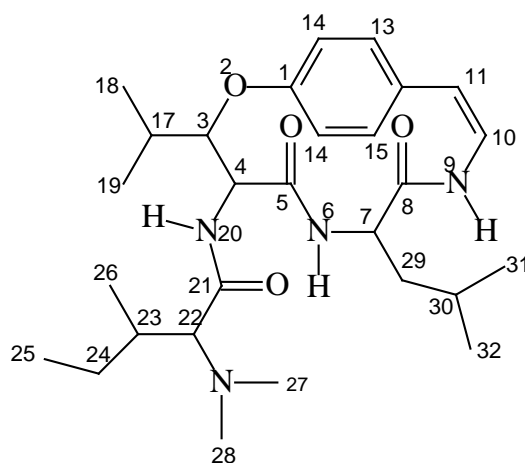
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A9 (ANEXO 5) apresentou 23 sinais de carbono (sendo três dobrados), destacando-se os sinais em  $\delta$  125,94 e 128,23 referentes aos carbonos olefínicos da unidade de estirilamina do anel macrocíclico, os sinais de carbonos dobrados em  $\delta$  129,0 (C-13 e C-16) e 122,0 (C-14 e C-15) referentes as posições equivalentes do anel aromático da estirilamina. A estereoquímica deste composto não foi estudada neste trabalho.

Através da comparação dos dados obtidos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A9 com a literatura (TSCHESCHE *et. al.*; 1968), foi possível identificar inequivocamente A9 como sendo o alcaloide ciclopeptídico frangulanina. Este alcaloide foi isolado pela primeira vez de *Rhamnus frangula* L. (Rhamnaceae). Na tribo Hermannieae encontra-se relato da ocorrência deste alcaloide em *M. odorata* (EMILE *et. al.*, 2007) e das folhas de *W. brachypetala* (LIMA, 2007).



TABELA 42. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A9

Posição	A-8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Posição	A-8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz
<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)
1	-	-	17	2,01 ( <i>m</i> )	2,01 ( <i>m</i> )
2	-	-	18 (Me)	1,25 ( <i>d</i> ; 6,6)	1,26 ( <i>d</i> ; 6,6)
3	4,94 ( <i>dd</i> ; 4,0; 7,6)	4,93 ( <i>dd</i> ; 4,0; 7,6)	19 (Me)	0,99 ( <i>d</i> ; 6,6)	1,01 ( <i>d</i> ; 6,6)
4	4,47 ( <i>dd</i> ; 4,0; 9,9)	4,48 ( <i>dd</i> ; 4,0; 10)	20-NH	7,35 ( <i>d</i> ; 10)	7,25 ( <i>d</i> ; 8,6)
5	-	-	21	-	-
6-NH	6,05 ( <i>d</i> ; 7,5)	6,07 ( <i>d</i> ; 7,4)	22	2,60 ( <i>d</i> ; 4,9)	2,65 ( <i>d</i> ; 4,9)
7	4,01 ( <i>m</i> )	4,02 ( <i>m</i> )	23	1,78 (2H)	1,77 (2H)
8	-	-	24	1,29 – 1,52 ( <i>m</i> )	1,29 – 1,52 ( <i>m</i> )
9-NH	6,45 ( <i>d</i> ; 10)	6,48 ( <i>d</i> ; 10)	25 (Me)	0,95 ( <i>t</i> )	0,95 ( <i>t</i> )
10	6,52 ( <i>dd</i> ; 7,7; 10)	6,56 ( <i>dd</i> ; 7,9; 10)	26 (Me)	0,90 ( <i>d</i> ; 6,6)	0,91 ( <i>d</i> ; 6,6)
11	6,41 ( <i>d</i> ; 7,7)	6,44 ( <i>d</i> ; 7,9)	27 (NMe)	2,20 ( <i>s</i> )	2,18 ( <i>s</i> )
12	-	-	28 (NMe)	2,20 ( <i>s</i> )	2,18 ( <i>s</i> )
13	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	29	1,25 – 1,64	1,25 – 1,64
14	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	30	1,79 ( <i>m</i> )	1,79 ( <i>m</i> )
15	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	31 (Me)	0,75 ( <i>s</i> )	0,75 ( <i>s</i> )
16	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	32 (Me)	0,90 ( <i>s</i> )	0,81 ( <i>s</i> )

\*(TSCHESCHE *et. al.*; 1968)

Estrutura da frangulanina

TABELA 43. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A9

Posição	A9 CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Posição	A9 CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 100 MHz
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	155,81	156,3	17	29,16	29,10
2	-	-	18 (Me)	21,60	21,60
3	81,83	81,70	19 (Me)	15,67	15,30
4	55,53	55,40	20-NH	-	-
5	172,74	172,3	21	172,08	171,40
6-NH	-	-	22	73,40	73,10
7	52,82	52,70	23	33,91	33,90
8	168,80	168,1	24	28,22	28,20
9-NH	-	-	25 (Me)	24,20	24,00
10	125,94	125,9	26 (Me)	15,66	15,00
11	118,23	118,2	27 (NMe)	42,93	42,90
12	131,84	131,7	28 (NMe)	42,93	42,90
13	129,0	129,0	29	40,34	40,30
14	122,0	122,0	30	24,20	24,60
15	122,0	122,0	31 (Me)	23,60	23,50
16	129,0	129,0	32 (Me)	22,70	22,80

\*(TAKAI *et. al.*; 1973) e (TSCHESCHE *et. al.*; 1969)

#### 4.2.3. Identificação do alcaloide ciclopeptídico A10

A substância A10 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala*. Esta revelou positivamente com o reagente de Dragendorff em CCD sugerindo a presença de nitrogênio em sua estrutura molecular.

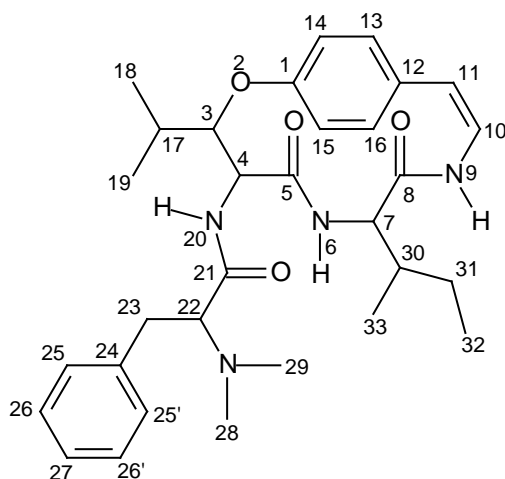
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A10 (ANEXO 7) apresentou sinais característicos dos alcalóides ciclopeptídicos, destacando-se os sinais referentes aos hidrogênios do anel macrocíclico de 14 membros. Observou-se os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos da unidade de estirilamina H-10 e H-11 em  $\delta$  6,64 (*dd*,  $J = 7,5$ ; 10 Hz) e 6,32 (*d*,  $J = 7,5$  Hz), respectivamente. Os sinais referentes aos hidrogênios NH-6 e NH-9 são observados em  $\delta$  5,76 (*d*;  $J = 8,4$ ) e 6,50 (*d*,  $J = 10,0$ ) respectivamente; enquanto que os sinais referentes aos hidrogênios H-3, H-4 e H-7 são observados em  $\delta$  5,00 (*dd*,  $J = 2,0$ ; 8,0 Hz), 4,46 (*dd*,  $J = 2,1$ ; 10,0) e 3,90 (*m*), respectivamente. Já os hidrogênios de hidrogênios aromáticos da unidade de estirilamina são observados entre  $\delta$  7,02-7,26.

Através de comparação com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de A8 (franganina) e A9 (frangulanina), verificou-se que A10 possui a unidade de aminoácido leucina na posição 3, através dos valores de deslocamento das metilas dupletos de grupo isopropila em  $\delta$  1,28 e 1,02 ( $J = 6,6$  Hz) e do multipletto referente

ao H-17 em  $\delta$  1,91. A unidade de isoleucina na posição 7 foi observada a partir dos sinais de metila duplete em 0,40 (d,  $J = 6,8$ ) e uma metila tripleto  $\delta$  0,70, bem como através dos hidrogênios metilênicos diasterotópicos em  $\delta$  0,70 e 1,00 referente a (H-31' e H-31'').

A unidade de aminoácido terminal foi identificada como sendo fenilalanina devido aos sinais de multiplete na região dos hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  7,02 – 7,27 e dos sinais de hidrogênios benzílicos entre  $\delta$  2,80 - 3,20. As metilas ligados ao nitrogênio da unidade de fenilalanina são verificadas como um simpleto em  $\delta$  2,20.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A10 (ANEXO 8) apresenta sinais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos das unidades de fenilalanina e estililamina, além dos demais sinais de carbono referentes aos carbonos do anel macrocíclico de 14 membros e das unidades de leucina e isoleucina. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A-10 foram cuidadosamente comparados com os da literatura para a adoutina Y' (PAIS *et. al.*; 1968), de modo que A-10 foi identificado inequivocamente como sendo este alcaloide. A estereoquímica deste composto não foi estudada neste trabalho.



**Estrutura da Adoutina Y'**

TABELA 44. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de A10

Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 400 MHz
<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	<i>H</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>J</i> (Hz)
1	-	-	17	1,91 ( <i>m</i> )	1,95 ( <i>m</i> )
2	-	-	18 (Me)	1,28 ( <i>d</i> ; 6,6)	1,28 ( <i>d</i> ; 6,6)
3	5,00 ( <i>dd</i> ; 2,0; 8,0)	5,01 ( <i>dd</i> ; 2,1; 8,0)	19 (Me)	1,02 ( <i>d</i> ; 6,6)	1,02 ( <i>d</i> ; 6,6)
4	4,46 ( <i>dd</i> ; 2,1; 10)	4,47 ( <i>dd</i> ; 2,1; 10)	20-NH	7,75 ( <i>d</i> ; 10)	7,77 ( <i>d</i> ; 10)
5	-	-	21	-	-
6-NH	5,76 ( <i>d</i> ; 8,4)	5,78 ( <i>d</i> ; 8,4)	22	3,10 ( <i>m</i> )	3,11 ( <i>m</i> )
7	3,90 ( <i>m</i> )	3,91 ( <i>dd</i> ; 3,6; 8,4)	23 e 23'	2,80/3,20 ( <i>m</i> )	2,84/3,19 ( <i>m</i> )
8	-	-	24	-	-
9-NH	6,50 ( <i>d</i> ; 10)	6,52 ( <i>d</i> ; 9,6)	25 e 25'	7,03 – 7,26	7,03 – 7,26
10	6,32 ( <i>d</i> ; 7,5)	6,35 ( <i>d</i> ; 7,6)	26 e 26'	7,03 – 7,26	7,03 – 7,26
11	6,64 ( <i>dd</i> ; 7,5; 10)	6,65 ( <i>dd</i> ; 7,6; 9,6)	27	7,03 – 7,26	7,03 – 7,26
12	-	-	28 (NMe)	2,26 ( <i>s</i> )	2,28 ( <i>s</i> )
13	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	29 (NMe)	2,26 ( <i>s</i> )	2,28 ( <i>s</i> )
14	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	30	2,03 ( <i>m</i> )	2,05 ( <i>m</i> )
15	7,16 – 7,26	7,16 – 7,26	31	0,68/2,01	0,68/2,01
16	7,03 – 7,15	7,03 – 7,15	32 (Me)	0,70 ( <i>s</i> )	0,69 ( <i>s</i> )
			33 (Me)	0,40 ( <i>s</i> )	0,39 ( <i>s</i> )

\*(PAIS *et. al.*; 1968)

TABELA 45. Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de A11

Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Posição	A8 CDCl <sub>3</sub> 100 MHz	Literatura* CDCl <sub>3</sub> 100 MHz
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	155,83	155,8	17	29,33	29,30
2	-	-	18 (Me)	20,50	20,30
3	81,84	81,30	19 (Me)	15,55	15,40
4	55,25	55,20	21	172,30	172,7
5	172,75	172,0	22	70,76	70,80
6-NH	-	-	23	29,94	29,90
7	59,50	59,50	24	140,28	140,2
8	166,79	166,80	25 e 25'	126,0	126,0
9-NH	-	-	26 e 26'	128,0	128,0
10	125,63	125,5	27	129,0	129,0
11	115,93	115,9	28 (NMe)	41,95	41,80
12	131,8	131,8	29 (NMe)	41,95	41,80
13	131,8	131,8	30	34,53	34,50
14	122,8	122,8	31	23,60	23,60
15	122,8	122,8	32 (Me)	12,00	11,90
16	131,8	131,8	33 (Me)	15,67	15,60

\*(PAIS *et. al.*; 1968)

### 4.3. Constituintes fenólicos

Da raiz e caule de *W. brachypetala* Turcz foram isolados constituintes fenólicos como flavonoides e um derivado do ácido quínico, todos com distribuição em espécies de várias famílias no reino vegetal, inclusive na tribo Hermannieae. Uma vez que estes compostos são bem relatados na literatura, estes serão apenas brevemente discutidos neste trabalho.

#### 4.3.1. Identificação do flavonóide F-1

A substância F-1 foi isolada da fase acetato de etila do caule de *W. brachypetala* como um sólido amarelo. Esta revelou em tom de amarelo intenso com cloreto de alumínio em CCD sugerindo tratar-se de uma substância fenólica.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F-1 (ANEXO 9) apresentou sinais característicos dos flavonoides. Observou-se neste espectro dois sinais de dupletos em  $\delta$  6,13 e 6,30 com constante de acoplamento de 2,1 Hz característicos dos hidrogênios acoplado em meta característico do anel A dos flavonoides.

Verificou-se ainda neste espectro quatro sinais de duplos tripletos integrando cada um para dois hidrogênios e com a maior constante de acoplamento 9,0 Hz,

sugerindo a presença de dois anéis aromáticos *p*-di-substituídos na estrutura de F-1. Dada a presença de dois sinais de dupletos de hidrogênios olefínicos  $\alpha,\beta$  carbonílicos em  $\delta$  6,07 e 7,40 com constante de acoplamento de 15,60 Hz, sugeriu-se a presença de uma unidade *trans-p*-cumaroila na estrutura de F-1.

Este espectro apresentou ainda sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados entre  $\delta$  3,4 – 4,4, que, aliado ao sinal de duplete em  $\delta$  5,24 (*d*; 7,4 Hz, hidrogênio anomérico) sugeriu-se a presença de um O- $\beta$ -glicosídeo na estrutura de F-1. O mapa de correlações do espectro de COSY de F-1 (ANEXO 10) apresentou cinco sistemas de spins de acordo com os cálculos das constantes de acoplamento a partir da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

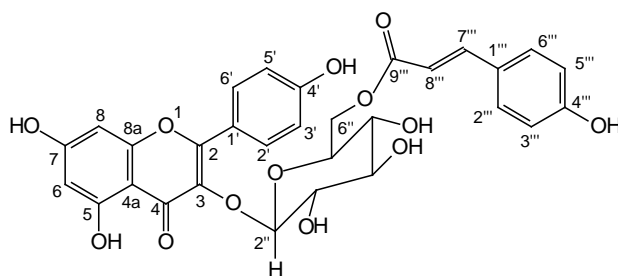
Através do mapa de correlações do espectro de HSQC de F-1 (ANEXO 11) foi possível atribuir todos os valores de deslocamento químicos dos carbonos hidrogenados facilitando a análise do espectro de HMBC.

O mapa de correlações do espectro de HMBC (ANEXO 12) apresentou importantes correlações de sinais de hidrogênio com carbonos a múltiplas ligações ( $J_{1-3}$ ). O sinal de hidrogênio em  $\delta$  8,0 (2H) apresentou importante correlação com o sinal de carbono em  $\delta$  158,0 (C-2), enquanto que o sinal integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  6,81 apresentou importante correlação com o sinal de carbono fenólico em  $\delta$  161, sendo possível atribuir estes sinais ao anel B *p*-*di*-substituído do flavonóide.

Observou-se ainda no espectro de HMBC de F-1 que o sinal em  $\delta$  7,30 (2H) apresentou correlação com o sinal de carbono olefínico  $\beta$ -carbonílico em  $\delta$  146,69; enquanto que o sinal integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  6,80 apresentou correlação com o sinal de carbono fenólico em  $\delta$  161,31. Dado o acoplamento spin-spin entre estes dois sinais de hidrogênios foi possível caracterizar a unidade de *trans-p*-cumaroila atribuindo-se todos os sinais de deslocamento químico dos carbonos. O sinal de hidrogênio anomérico em  $\delta$  5,24 apresentou correlação no HMBC com o sinal de carbono em  $\delta$  135,33 característico do carbono C-3 dos flavonóis (HARBORNE, 1998), sendo possível atribuir a  $\beta$ -D-glucopiranosose ligada ao carbono C-3 da unidade aglicona do kaempferol, quando comparado com dados anteriormente relatados na literatura.

Ainda de acordo com a literatura (HARBORNE, 1988) o deslocamento do carbono C-6'' da unidade de glucose, apresenta deslocamento químico na faixa de  $\delta$  60,50 – 62,00, uma desblindagem deste carbono é sugestiva de uma possível esterificação nesta posição; sendo assim, foi possível sugerir que a unidade de *trans-p*-cumaroila encontra-se esterificada com a hidroxila da glucose na posição 6.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de F-1 (ANEXO 13) foi obtido de modo a comparar os dados obtidos com modelos da literatura. Sendo assim, através da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de F-1 e comparação com a literatura (CORNELIUS *et al.*, 2004), o flavonóide F-1 foi identificado inequivocamente como sendo o tilirosídeo.



Estrutura do tilirosídeo

TABELA 46. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de F-1

Posição	F-1 (400/100 MHz, MeOD)		tilirosídeo (Lit <sup>*2</sup> ) (300/75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		
	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-	-	158,56	-	156,50
3	-	-	135,33	-	133,15
4	-	-	179,57	-	178,00
4a	-	-	105,72	-	104,80
5	-	-	161,66	-	162,65
6	6,13 (d; 2,1)	100,16	6,48 (d; 2,1)	99,93	99,93
7	-	166,93	-	165,25	165,25
8	6,30 (d; 2,1)	94,99	6,75 (d; 2,1)	94,85	94,85
8a	-	159,49	-	158,00	158,00
1'	-	122,87	-	122,64	122,64
2'/6'	8,00 (d; 9,0)	132,34	8,35 (d; 9,0)	131,20	131,20
3'/5'	6,81 (d; 9,0)	116,18	7,23 (d; 9,0)	116,10	116,10
4'	-	161,66	-	161,25	161,25
1''	5,24 (d; 7,4)	104,16	5,84 (d; 7,2)	102,02	102,02
2'' a 5''	3,40 – 4,30	75,86; 78,15; 71,86; 75,94	3,30 – 4,00	75,71; 77,96; 71,60; 75,71	75,71; 77,96; 71,60; 75,71
6''	4,19/4,30	64,45	Não especifica	63,43	63,43
1'''	-	127,23	-	126,00	126,00
2'''/6'''	7,30 (d; 9,0)	131,32	7,47 (d; 8,7)	131,45	131,45
3'''/5'''	6,80 (d; 9,0)	116,93	7,12 (d; 8,7)	116,80	116,80
4'''	-	161,31	-	160,02	160,02
7'''	7,40 (d; 15,6)	146,69	7,28 (d; 15,6)	145,52	145,52
8'''	6,07 (d; 15,6)	114,88	6,48 (d; 15,6)	114,00	114,00
9'''	-	168,93	-	167,20	167,20

\* (CORNELIUS *et. al.*, 2004)

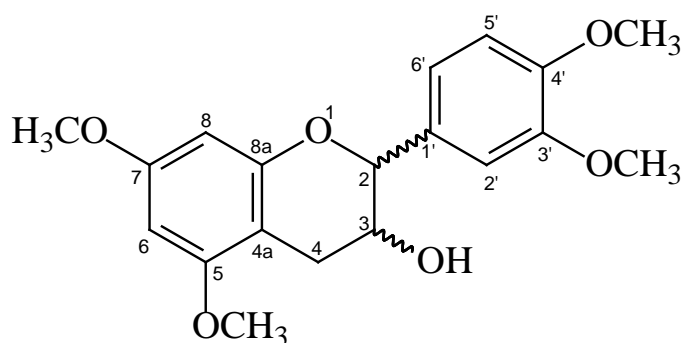
### 4.3.2. Identificação do Flavan-3-ol C-1

A substância C-1 foi isolada da fase hexânica da raiz de *Waltheria brachypetala* Turcz. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta substância apresentou sinais característicos dos flavonoides, destacando-se os sinais de dupletos em  $\delta$  6,05 e 6,13 ( $J = 2,4$  Hz), característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A dos flavonóides, oriundo da rota biossintética do acetato. Observou-se ainda neste espectro três sinais adicionais em  $\delta$  6,85 ( $d$ ;  $J = 8,0$ ), 6,98 ( $dd$ ;  $J = 8,0$  e  $1,2$  Hz) e 6,99 ( $d$ ;  $J = 1,2$  Hz) característicos do anel B dos flavonoides com substituição nas posições 3' e 4'.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-1 (ANEXO 14) apresentou dois sinais de hidrogênios oximetínicos em  $\delta$  4,90 ( $s$ ) e 4,22 ( $m$ ), sugerindo-se então a ausência da ligação dupla entre as posições 2 e 3 do anel C. Dois sinais de duplos-dupletos são observados em  $\delta$  2,85 e 2,86; estes referem-se aos hidrogênios na posição 4 caracterizando a ausência da carbonila nesta posição e sugerindo-se que este flavonóide trata-se de um flavan-3-ol. Por fim, são verificados quatro sinais de simpletos integrando para três hidrogênios, caracterizando metoxilação em quatro posições oxigenadas da catequina.

Os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados foram atribuídos através do espectro de HSQC (ANEXO 15). Através do deste espectro foi possível atribuir os demais sinais de carbonos totalmente substituídos e atribuir inequivocamente às posições das metoxilas.

Através da análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com a literatura (NAHRTEDT, 1987) foi possível identificar de forma inequívoca a substância C-1 como sendo 5,7, 3', 4'-tetra-metoxi-catequina. Uma vez que o valor de  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c$  1,5; MeOH), sugeriu-se a mistura racêmica dos enantiômeros 2 *R/S* 3 *R/S*.



Estrutura da 5,7, 3', 4'-tetra-metoxi-catequina



TABELA 47. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de C-1

Posição		C-1 $\text{CDCl}_3$ 400/100 MHz		Posição		Literatura* <sup>2</sup> $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 400/100 MHz	
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ <sup>*1</sup>	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$		
1	-	-	1				
2	4,90 (sl)	78,06	2	4,54 (d; 7,8)	82,90		
3	4,22 (m)	66,48	3	3,98 (m)	68,50		
4'	2,85 (dd, 16; 8,0)	27,92	4	2,52 (dd, 16; 8,0)	28,50		
4''	2,86 (dd, 16; 5,4)			2,86 (dd, 16; 5,4)	28,50		
4a	-	100,29	4a	-	100,90		
5	-	159,74	5	-	157,90		
6	6,05 (d; 2,4)	92,12	6	6,02 (d; 2,4)	96,40		
7	6,13 (d; 2,4)	158,98	7	5,87 (d; 2,4)	157,60		
8	-	93,64	8	-	95,60		
8a	-	154,04	8a	-	156,90		
1'	-	130,68	1'	-	132,60		
2'	6,99 (d; 1,2)	109,60	2'	6,77 (d; 1,2)	120,1		
3'	-	149,10	3'	-	146,20		
4'	-	149,10	4'	-	146,20		
5'	6,85 (d; 8,0)	111,50	5'	6,87 (d; 8,0)	116,20		
6'	6,98 (dd, 8,0; 1,2)	118,53	6'	6,72 (dd, 8,0; 1,2)	120,00		
5-OCH <sub>3</sub>	3,83 (s)	56,00	5-OCH <sub>3</sub>		-		
7-OCH <sub>3</sub>	3,85 (s)	56,00	7-OCH <sub>3</sub>		-		
3'-OCH <sub>3</sub>	3,71 (s)	56,00	3'-OCH <sub>3</sub>		-		
4'-OCH <sub>3</sub>	3,73 (S)	56,00	4'-OCH <sub>3</sub>		-		

\*<sup>1</sup> Dados obtidos através da análise dos espectros de HSQC e HNMBC.

\*<sup>2</sup> (NAHRTEDT, 1987), dados referentes a ent-catequina.

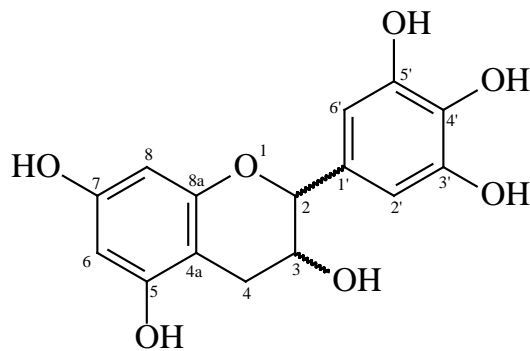
### 4.3.3. Identificação do Flavan-3-ol C-2

A substância C-2 foi isolada da fase diclorometano da raiz de *W. brachypetala* Turcz. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-2 (ANEXO 17) apresentou sinais característicos do anel C de flavan-3-ol, destacando-se os sinais de hidrogênios oximetínicos em  $\delta$  4,56 (*d*; 7,52 Hz) e 4,07 (*ddd*; 5,01; 8,0; 7,52 Hz) referentes aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente e os sinais de duplo-duplete em  $\delta$  2,53 ( $J = 8,0; 16,0$  Hz) e  $\delta$  2,84 ( $J = 5,0; 16,0$  Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos H-4a e H-4b, caracterizando a ausência da carbonila nesta posição.

Observou-se ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-2 dois dupletos com constante de acoplamento *meta* ( $J = 2,5$  Hz) em  $\delta$  5,98 e 5,86 atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Por fim, observou-se um sinal de simpleto integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  6,44 caracterizando oxigenações no anel B nas posições 3', 4' e 5'.

Através do mapa de correlações do espectro de HSQC de C-2 (ANEXO 18) foi possível atribuir os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados e através do espectro de HMBC (ANEXO 19) foi possível atribuir os sinais dos carbonos totalmente substituídos (com exceção de C-5 e C-7) através de correlações entre sinais de hidrogênio e carbono a múltiplas ligações ( $J_{1-3}$ ).

Através da análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e comparação com a literatura (NAHRTEDT, 1987) foi possível identificar de forma inequívoca a substância C-2 como sendo a galocatequina. Dado o valor de  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  ( $c$  1,5; MeOH), sugeriu-se a mistura racêmica dos enantiômeros 2 *R/S* 3 *R/S*.



Estrutura da galocatequina

TABELA 48. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de C-2

Posição	C-2 MeOD 400/100 MHz		Posição	Literatura* <sup>2</sup> MeOD 400/100 MHz	
	H/C	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)		$\delta$ <sup>13</sup> C* <sup>1</sup> (ppm)	H/C
1	-	-	1	-	-
2	4,56 (d; 7,5)	81,29	2	4,55 (d; 7,6)	81,30
3	4,07 (ddd; 5,0; 8,0; 7,5)	67,24	3	4,07 (ddd; 5,1; 8,0; 7,6)	67,20
4'	2,84 (dd, 5,0; 16,0)	26,59	4'	2,85 (dd; 5,0; 16,0)	26,60
4''	2,53 (dd, 8,0; 16,0)		4''	2,55 (dd; 8,0; 16,0)	26,60
4 <sup>a</sup>	-	100,65	4 <sup>a</sup>	-	100,70
5	-	ND* <sup>3</sup>	5	-	159,00
6	5,98 (d; 2,5)	95,16	6	5,99 (d; 2,5)	95,00
7	5,96 (d; 2,5)	ND* <sup>3</sup>	7	-	159,00
8	-	93,83	8	5,97 (d; 2,5)	94,00
8 <sup>a</sup>	-	156,93	8 <sup>a</sup>	-	157,00
1'	-	133,77	1'	-	134,00
2'	6,44 (s)	105,61	2'	6,45 (s)	105,50
3'	-	146,75	3'	-	147,00
4'	-	146,75	4'	-	147,00
5'	-	146,75	5'	-	147,00
6'	6,44 (s)	105,61	6'	6,45 (s)	105,50

\*<sup>1</sup> Dados obtidos através da análise dos espectros de HSQC e HNMBC.\*<sup>2</sup> (NAHRTEDT, 1987).\*<sup>3</sup> Valor não encontrado ou não determinado.

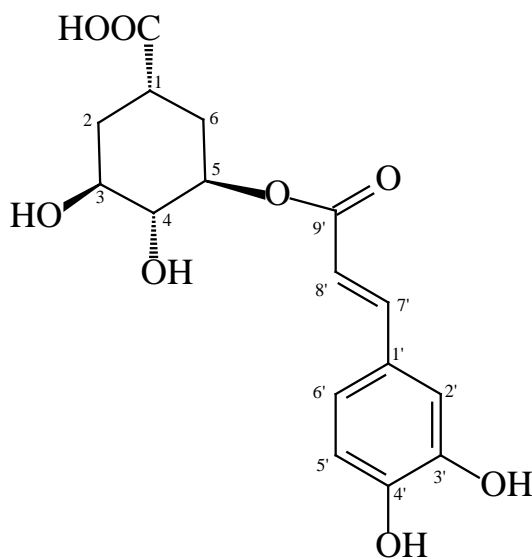
#### 4.3.4. Identificação do derivado de ácido quínico Q-1

A substância Q-1 foi isolada da fase diclorometano do caule de *W. brachypetala*. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Q-1 (ANEXO 20) apresentou sinais característicos de uma unidade de cafeoíla, destacando-se os sinais referentes a dois dupletos com constante de acoplamento *trans* ( $J = 15,8$  Hz) em  $\delta$  6,22 e 7,45 característicos de hidrogênios olefínicos  $\alpha,\beta$  carboxílicos, além de três sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,77 (*d*;  $J = 8,4$  Hz), 6,97 (*dd*;  $J = 1,8$ ; 8,4 Hz) e 7,08 (*d*;  $J = 1,8$ ) cujas multiplicidades caracterizam o anel aromático com orto-di-substituição, sendo possível identificar a unidade de ácido cafeico.

Observou-se ainda neste espectro sinais característicos do ácido quínico, como o multiplete em  $\delta$  5,15 do hidrogênio oxi-metínico na posição um ao qual encontra-se ligado a um grupo ácido carboxílico. Verifica-se os sinais de hidrogênios oxi-metínicos em  $\delta$  3,94 (*d*;  $J = 2,8$  Hz) e 3,50 (*dd*;  $J = 2,8$ ; 11,2 Hz) referentes as posições 3 e 4, além de sinais de hidrogênios metilênicos diasterotópicos entre  $\delta$  1,65 – 2,02 característicos dos hidrogênios nas posições 2 e 6 vizinhas a centros estereogênicos.

Através do mapa de correlações do espectro de HSQC de Q-1 (ANEXO 21) foi possível atribuir os valores de deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados, enquanto que a análise do espectro de HMBC (ANEXO 22) foi fundamental para atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos totalmente substituídos e localizar inequivocamente a esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico na posição 5, devido a correlação de H-5 com o sinal de carboxila conjugada em  $\delta$  168.

A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e a comparação destes com dados previamente reportados na literatura (VALENTE, 2003) foram suficientes para propor que Q-1 trata-se do ácido 5-O-cafeoil-quínico (ácido clorogênico).



Estrutura do ácido clorogênico

TABELA 49. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de Q-1

Posição		Q-1 MeOD 400/100 MHz		Literatura* <sup>2</sup> MeOD 400/100 MHz	
H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^{*1}$ (ppm)	H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	78,70	1	-	79,90
2	1,65 / 2,02 (m)	39,70	2	1,96 / 2,05	40,20
3	3,94 (d; 2,8)	73,00	3	4,26 (d)	73,80
4	3,50 (dd; 2,8; 11,2)	75,00	4	3,87 (d)	75,90
5	5,15 (m)	73,00	5	5,33 (m)	74,20
6	1,83 (m)	41,40	6	2,15 (m)	41,40
9'	-	168,0	9'	-	172,0
8'	6,22 (d; 15,7)	116,3	8'	6,34 (d)	117,8
7'	7,45 (d; 15,7)	146,5	7'	7,60 (d)	149,2
1'	-	128,0	1'	-	130,1
2'	7,08 (d; 1,8)	116,4	2'	7,15 (d)	118,2
3'	-	147,8	3'	-	147,4
4'	-	150,5	4'	-	150,2
5'	6,77 (d; 8,4)	117,9	5'	6,91 (d)	119,3
6'	6,97 dd (8,4; 1,8)	123,0	6'	7,06 (dd)	125,7

\*<sup>1</sup> Dados atribuídos via HSQC e HMBC. \*<sup>2</sup> (VALENTE, 2003).

#### 4.4. Triterpenos e Esteróides

Os triterpenos e esteroides isolados da raiz e caule de *W. brachypetala* são comumente encontrados em plantas, portanto serão discutidos apenas brevemente neste trabalho. As identificações destes compostos foram facilitadas através da comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com a literatura, sendo utilizado (MAHATO & KUNDU, 2004) para a identificação dos triterpenos e (RICCA & NICOTRA, 1978) para a identificação dos esteroides.

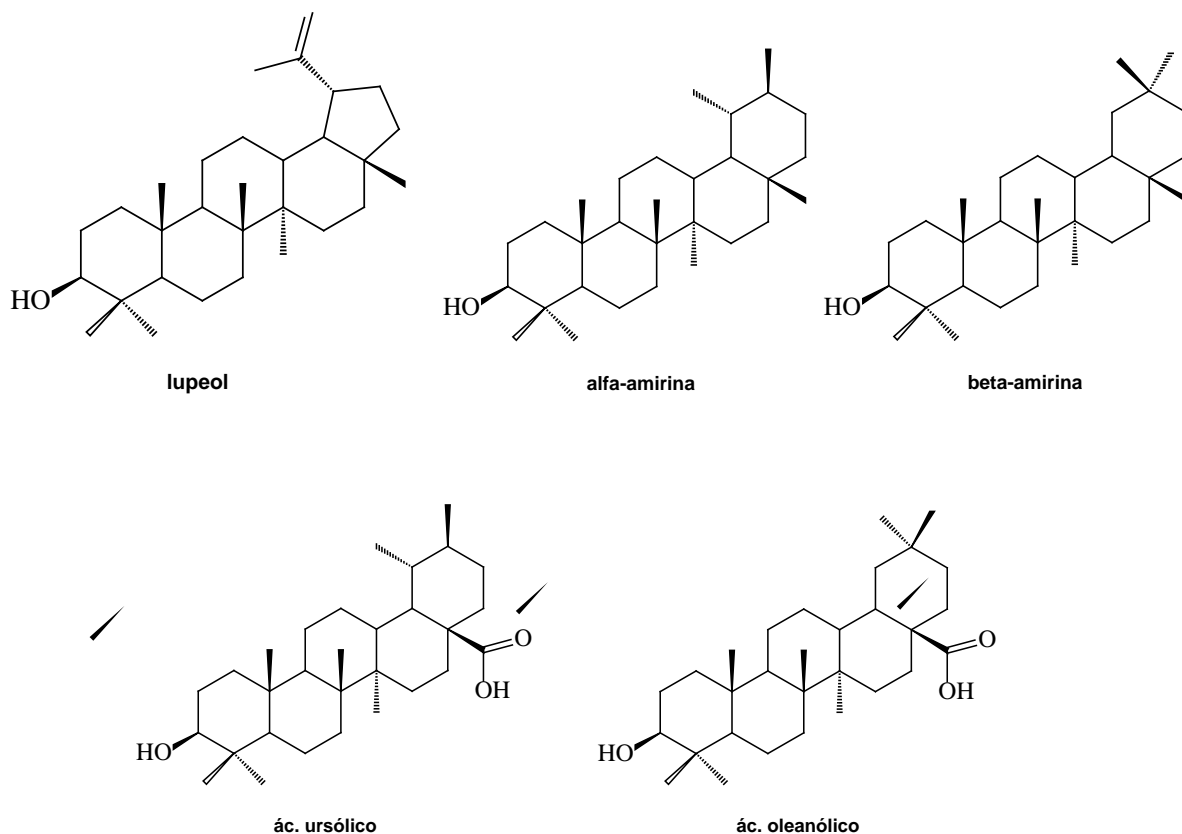
##### 4.4.1. identificação da mistura de triterpenos T-1, T-2 e T-3 e da mistura dos triterpenos T-4 e T-5

A mistura das substâncias T-1, T-2 e T-3 e a mistura das substâncias T-4 e T-5 foi obtida da fase hexânica da raiz de *W. brachypetala*. Estes se apresentaram em CCDA como uma mancha de coloração roxa quando revelado com o reagente de Liebermann-Burchard, sugerindo tratar-se de esteroides ou triterpenos.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de T-1 a T-3 (ANEXO 23) apresentou sinais característicos de metilas e hidrogênios metínicos e metilênicos de triterpenos. Destando-se ainda sinais de hidrogênios oxi-metínicos característicos da posição 3 em  $\delta$  3,18 – 3,21 (2H) e 3,60 e sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  4,55 e 4,66 referentes ao esqueleto lupano;  $\delta$  5,10 e 5,16 referentes aos esqueletos ursano e oleanano.

Através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ANEXO 24) foi possível verificar a mistura de três triterpenos. Os sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  150,90 e 109,30 foram atribuídos ao triterpeno lupano; os sinais em  $\delta$  121,88 e 145,15 foram atribuídos ao triterpeno ursano, enquanto que os sinais em  $\delta$  124,37 e 139,53 foram atribuídos ao triterpeno oleanano. A comparação de todos os valores de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  foram comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) levando a identificação inequívoca da mistura de lupeol (T-1),  $\alpha$ -amirina (T-2) e  $\beta$ -amirina (T-3).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura dos triterpenos T-4 e T-5 apresentou sinais característicos dos triterpenos, como os sinais de metilas, multipletos referentes a hidrogênios metínicos e metilênicos, e dois sinais de hidrogênios oximetínicos entre  $\delta$  3,18 – 3,21. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ANEXO 25) apresentou sinais de carbonos olefínicos semelhantes aos da  $\alpha$  e  $\beta$  amirina e devido à presença de dois sinais de carbono carboxílico em  $\delta$  179,96 e 180,24 foi possível sugerir a mistura dos ácidos ursólico e oleanólico, tal identificação foi inequívoca após comparação de todos os valores de deslocamento de  $^{13}\text{C}$  com a literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).



#### 4.4.2. Identificação da mistura de esteroides E-1 e E-2 e do esteroide E-3

A mistura das substâncias E-1 e E-2 foi isolada das fases hexânica do caule e raiz de *W. brachypetala*. Estas revelaram em tom róseo em CCDA utilizando-se como revelador o reagente de Liebermann-Burchard, sugerindo tratar-se de esteroides ou triterpenos. A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para esta mistura e a comparação com a literatura (RICCA & NICOTRA, 1978) permitiram a identificação inequívoca da mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol.

A substância E-3 foi isolada das fases hexânica do caule e raiz de *W. brachypetala*. Esta revelou em tom róseo em CCDA utilizando-se como revelador o reagente de Liebermann-Burchard, sugerindo tratar-se de esteroide ou triterpeno. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desta substância apresentou sinais semelhantes ao do sitosterol, com exceção da presença de sinais de hidrogênios oxi-metínicos e de um sinal de hidrogênio anomérico em  $\delta$  5,35. A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de E-3 com a literatura (RICCA & NICOTRA, 1978) permitiram a identificação inequívoca desta substância como sendo o esteroide 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol.

## 4.5. Cumarino-lignanas

### 4.5.1. Identificação da cumarino-lignana CL-1

A substância CL-1 foi isolada das fases diclorometano da raiz e caule de *W. brachypetala*. Esta substância quando revelada em CCD nos comprimentos de onda de 245 nm e 365 nm apresentou coloração azul intenso e azul celeste intenso, sugerindo a presença de um cromóforo cumarínico em sua estrutura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1 (ANEXO 30) apresentou dois sinais de dupletos em  $\delta$  6,33 e 7,96 com constante de acoplamento de 9,6 Hz característicos dos hidrogênios olefínicos de lactona  $\alpha,\beta$  insaturada presente na estrutura das cumarinas. Na região de hidrogênios aromáticos observou-se ainda um sinal de simpleto em  $\delta$  6,91 e três sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,76 (*d*;  $J = 7,6$  Hz), 6,87 (*dd*;  $J = 7,6$  e 1,6 Hz) e 7,03 (*d*;  $J = 1,6$  Hz), cujas multiplicidades e constantes de acoplamento sugerem uma segunda parte da molécula de CL-1 caracterizada pela presença de uma fenila *meta-para*-trisubstituída.

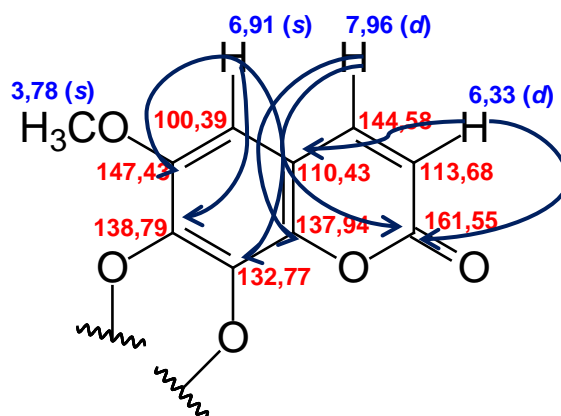
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1 apresentou ainda quatro sinais de hidrogênios oxi-metínicos em  $\delta$  4,99 (*d*;  $J = 8,0$  Hz),  $\delta$  4,34 (m),  $\delta$  3,65 (*dd*;  $J = 12,4$  e 2,0 Hz) e 3,36 (suprimido no espectro). Além de dois sinais de metoxilas em  $\delta$  3,78 e  $\delta$  3,79.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em duas dimensões foi fundamental para uma maior compreensão da estrutura de CL-1, para tanto se considerou primeiramente as duas partes da estrutura de CL-1 separadamente.

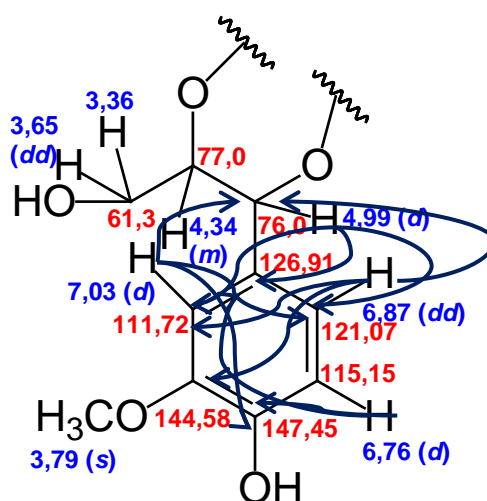
Através da análise dos espectros de HSQC (ANEXO 31) e HMBC (ANEXO 32) foi possível sugerir a estrutura da porção cumarínica da estrutura de CL-1. No espectro de HSQC observou-se a correlação entre os hidrogênios em  $\delta$  7,96, 6,33 e 6,91 com os sinais de carbono em  $\delta$  144,58, 113,68 e 100,39 respectivamente.

No espectro de HMBC o sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,96 apresentou correlação com o sinal de carbono carboxílico  $\alpha,\beta$  insaturado da lactona em  $\delta$  161,55 e com o sinal de carbono em  $\delta$  100,39 ao qual está ligado o hidrogênio em  $\delta$  6,91; além de uma correlação com sinal de carbono em  $\delta$  137,94 característico do carbono C-10 das cumarinas. Já o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,33 também apresentou correlação com o sinal de carbono da carboxila  $\alpha,\beta$  insaturada além de uma correlação com um sinal de carbono quaternário em  $\delta$  110,43, sendo este característico do carbono C-9 das cumarinas. Por fim, o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,91 apresentou correlação com três sinais de carbonos aromáticos oxigenados em  $\delta$  147,43;  $\delta$  138,79 e  $\delta$  132,27 sendo possível sugerir a estrutura da porção cumarínica da estrutura de CL-1 como:





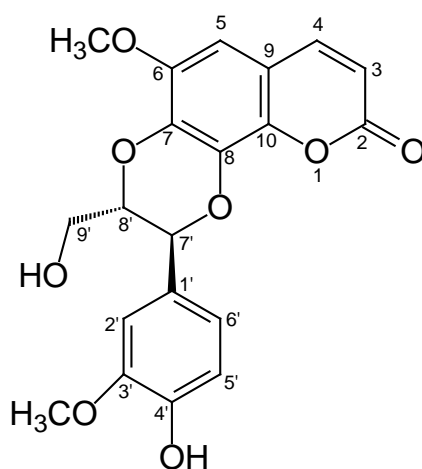
Através da análise dos espectros de HSQC e HMBC foi possível sugerir que a segunda porção da estrutura de CL-1 trata-se de uma unidade de derivado de fenilpropanóide, sendo confirmada a unidade fenil *meta-para*-trissubstituída. Esta encontra-se diretamente ligada a uma unidade dC-3 onde os três carbonos são oxigenados, sugestão essa confirmada devido a correlação dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  7,03 e  $\delta$  6,87 com o sinal de carbono oxigenado em  $\delta$  76,00. Através do espectro de HSQC é confirmado que os hidrogênios em  $\delta$  3,36 e 3,65 são metilênicos diasterotópicos e que o sinal em  $\delta$  3,36 foi suprimido na obtenção do espectro devido a proximidade com o sinal de água residual do solvente deuterado DMSO- $d_6$ .



A união das propostas para as duas partes da estrutura de CL-1 é compatível com a estrutura de uma classe de metabólitos conhecida na literatura como cumarino-lignananas. Esta classe de compostos não é de ocorrência comum, sendo restrita a algumas famílias vegetais e possuindo maior ocorrência em Euphorbiaceae (CHENG *et. al.*; 2007)

Na estrutura de CL-1 a relação entre os hidrogênios oximetínicos em  $\delta$  4,99 e 4,34 é *trans* dada a constante de acoplamento entre estes de 8,0 Hz e comparação com modelos anteriormente relatados na literatura (ZHANG *et. al.*; 2008).

Através da análise e interpretação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CL-1 e comparação com dados relatados na literatura (ZHANG *et. al.*; 2008), a substância CL-1 foi identificada como sendo a cumarino-lignana cleomicina A. Assim como reportado por (ZHANG *et. al.*; 2008) a cleomicina A isolada de *W. brachypetala* foi obtida como uma mistura dos enantiômeros 7' (R/S), 8' (R/S) devido ao valor de  $[\alpha]_D^{25^\circ} = 0^\circ$  (c 1,5; MeOH). Este é o primeiro relato de ocorrência desta classe de compostos no gênero *Waltheria*. Entretanto, para a tribo Hermannieae encontra-se um relato de ocorrência da cumarino-lignana propacina isolada de *Melochia chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007a).



Estrutura da Cleomicina A

TABELA 50. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CL-1

Posição		CL-1 DMSO-d <sub>6</sub> 400/100 MHz		Posição		Literatura* <sup>2</sup> DMSO-d <sub>6</sub> 400/100 MHz	
H/C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ * <sup>1</sup>	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$		
1	-	-	1	-	-		
2	-	161,55	2	-	160,10		
3	6,33 ( <i>d</i> ; 9,6)	113,68	3	6,30 ( <i>d</i> )	113,00		
4	7,96 ( <i>d</i> ; 9,6)	144,58	4	7,94 ( <i>d</i> )	144,80		
5	6,91 ( <i>s</i> )	100,39	5	6,92 ( <i>d</i> )	100,90		
6	-	147,43	6	-	145,20		
7	-	138,79	7	-	138,00		
8	-	132,27	8	-	131,80		
9	-	110,43	9	-	111,10		
10	-	137,94	10	-	136,80		
1'	-	126,91	1'	-	125,80		
2'	7,03 ( <i>d</i> ; 1,6)	111,72	2'	7,02 ( <i>d</i> )	108,70		
3'	-	144,58	3'	-	145,70		
4'	-	147,43	4'	-	147,00		
5'	6,76 ( <i>d</i> ; 7,6)	115,15	5'	6,75 ( <i>d</i> )	116,00		
6'	6,87 ( <i>dd</i> ; 7,6; 1,6)	121,07	6'	6,86 ( <i>d</i> )	121,20		
7'	4,99 ( <i>d</i> ; 8,0)	76,00	7'	4,90 ( <i>d</i> )	75,90		
8'	4,34 ( <i>m</i> )	77,00	8'	4,26 ( <i>m</i> )	78,30		
9'a	3,65 ( <i>dd</i> ; 12,4; 2,0)	61,30	9'a	3,62 ( <i>dd</i> )	59,80		
9'b	3,36		9'b	3,37 ( <i>dd</i> )	59,80		
6-OCH <sub>3</sub>	3,78 ( <i>s</i> )	56,44	6-OCH <sub>3</sub>	3,79	55,90		
3'-OCH <sub>3</sub>	3,79 ( <i>s</i> )	60,90	3'-OCH <sub>3</sub>	3,80	59,60		

\*<sup>1</sup> Valores obtidos através de projeção dos experimentos de HSQC e HMBC.

\*<sup>2</sup> (ZHANG *et. al.*; 2008).

#### 4.5.2. Identificação da cumarino-lignana CL-2

A substância CL-2 foi isolada da fase diclorometano do caule de *W. brachypetala*. Esta substância quando revelada em CCD nos comprimentos de onda de 245 nm e 365 nm apresentou coloração azul intenso e azul celeste intenso, sugerindo a presença de um cromóforo cumarínico em sua estrutura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-2 (ANEXO 37) apresentou grande semelhança com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1, sugerindo que CL-1 trata-se de uma cumarino-lignana análoga de CL-1. Observou-se neste espectro dois dupletos em  $\delta$  6,35 e 7,98 com constante de acoplamento de 9,6 Hz referente aos hidrogênios olefínicos H-3 e H-4 do núcleo cumarínico e um sinal de simpleto em  $\delta$  6,96 referente ao hidrogênio H-5, sendo possível afirmar que na estrutura de CL-1 tem-se o mesmo padrão da porção cumarínica verificada na estrutura de CL-1 e confirmada através das correlações observadas dos hidrogênios via HSQC (ANEXO 38) e HMBC (ANEXO 39).

Verificou-se ainda neste espectro os sinais referentes aos hidrogênios da unidade de fenil-propano, sendo que os sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,26 (*d*;  $J = 1,6$  Hz);  $\delta$  7,06 (*dd*;  $J = 1,6$  e 7,6 Hz) e  $\delta$  7,16 (*d*;  $J = 7,6$  Hz) confirmaram a unidade fenil *meta-para*-trisubstituída assim como na estrutura de CL-1. Os sinais dos hidrogênios oxi-metínicos em  $\delta$  5,16 (*d*;  $J = 8,0$ );  $\delta$  4,74 (*m*);  $\delta$  4,21 (*dd*) e  $\delta$  4,03 (*dd*) confirmaram a oxigenação em todos os carbonos da unidade C-3 da porção fenil-propanóide.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-2 apresentou, assim como para CL-1, dois sinais de metoxilas em  $\delta$  3,79 e 3,78. Mas diferentemente de CL-1, este espectro apresentou dois sinais adicionais de metila em  $\delta$  2,26 e 2,01 característicos de metila de grupo acetato, sugerindo que as hidroxilas nas posições 4' e 9' encontram-se acetiladas. Esse sugestão é confirmada através do experimento de HMBC através da correlação de ambas com sinais de carbono carboxílico de éster em  $\delta$  167,0 e 168,0 e explica a desblindagem observada para os hidrogênios H-9'a e H-9'b quando comparado com o deslocamento destes mesmos hidrogênios para CL-1.

Através da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CL-2 e comparação com a literatura (ZHANG *et. al.*; 2008), a substância CL-2 foi identificada inequivocamente como sendo a diacetil-cleomicina A. Assim como para CL-1 a relação entre os hidrogênios oximetínicos em H-7' e H-8' é *trans* dada a constante de acoplamento entre estes de 8,0 Hz e comparação com modelos anteriormente relatados na literatura (ZHANG *et. al.*; 2008).

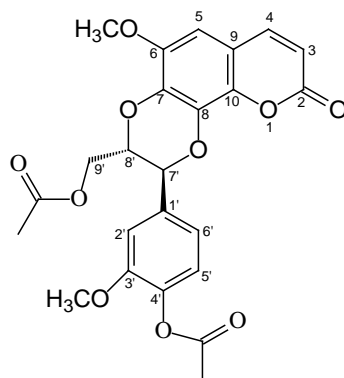
Assim como reportado por (ZHANG *et. al.*; 2008) a diacetil-cleomicina A isolada de *W. brachypetala* foi obtida como uma mistura dos enantiômeros 7' (R/S), 8' (R/S) devido ao valor de  $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$  (*c* 1,5; MeOH).

TABELA 51. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de CL-2

Posição	CL-2 DMSO- $d_6$ 400/100 MHz		Posição	Literatura* <sup>2</sup> DMSO- $d_6$ 400/100 MHz	
	H/C	$\delta$ $^1\text{H}$		$\delta$ $^{13}\text{C}$ * <sup>1</sup>	H/C
1	-	-	1	-	-
2	-	159,00	2	-	159,00
3	6,35 ( <i>d</i> ; 9,6)	113,00	3	6,33 ( <i>d</i> )	113,00
4	7,98 ( <i>d</i> ; 9,6)	144,31	4	7,96 ( <i>d</i> )	144,00
5	6,96 ( <i>s</i> )	100,68	5	6,90 ( <i>d</i> )	100,70
6	-	147,50	6	-	145,00
7	-	139,00	7	-	139,50
8	-	132,00	8	-	132,40
9	-	111,00	9	-	111,70
10	-	138,00	10	-	138,00
1'	-	126,00	1'	-	126,40
2'	7,26 ( <i>d</i> ; 1,6)	111,72	2'	7,24 ( <i>d</i> )	111,00
3'	-	144,00	3'	-	144,40
4'	-	151,00	4'	-	152,00
5'	7,06 ( <i>d</i> ; 7,6)	122,50	5'	6,73 ( <i>d</i> )	122,00
6'	7,16 ( <i>dd</i> ; 7,6; 1,6)	119,93	6'	6,84 ( <i>d</i> )	119,00
7'	5,26 ( <i>d</i> ; 8,0)	75,33	7'	4,90 ( <i>d</i> )	75,50
8'	4,74 ( <i>m</i> )	73,75	8'	4,22 ( <i>m</i> )	74,50
9'a	4,21 ( <i>dd</i> ; 12,4; 2,0)	61,90	9'a	3,63 ( <i>dd</i> )	62,00
9'b	4,03		9'b	3,35 ( <i>dd</i> )	
6-OCH <sub>3</sub>	3,78 ( <i>s</i> )	55,58	6-OCH <sub>3</sub>	3,79	55,90
3'-OCH <sub>3</sub>	3,79 ( <i>s</i> )	55,58	3'-OCH <sub>3</sub>	3,80	56,00
OCCH <sub>3</sub>	-	168 e 169	OCCH <sub>3</sub>	-	168 e 169
OCCH <sub>3</sub>	2,26 e 2,01 ( <i>s</i> )	19,7 e 19,9	OCCH <sub>3</sub>	2,26 e 2,0	19,7 - 19,9

\*<sup>1</sup> Valores obtidos através de projeção dos experimentos de HSQC e HMBC.

\*<sup>2</sup> (ZHANG *et. al.*; 2008).



Estrutura da diacetil-cleomicina A

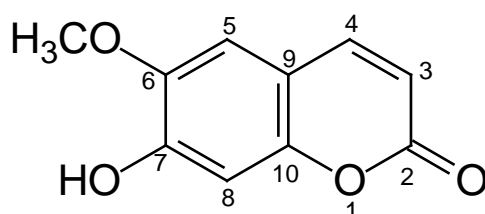
## 4.6. Cumarina

### 4.6.1. Identificação da cumarina C-1

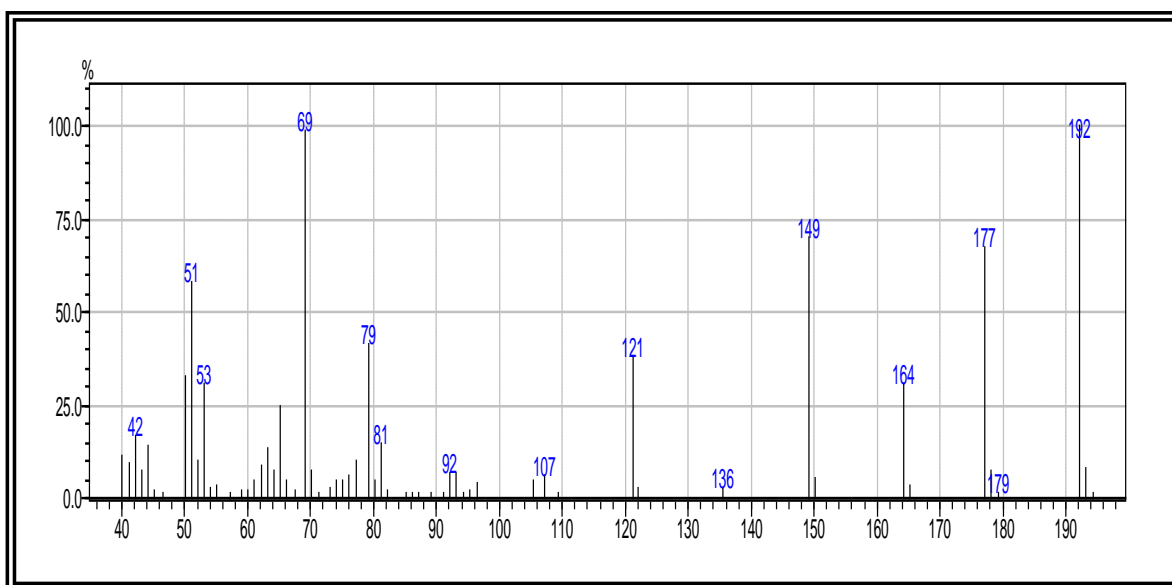
A substância C-1 foi isolada da fase diclorometano do caule de *W. brachypetala*. Esta substância quando revelada em CCD nos comprimentos de onda de 245 nm e 365 nm apresentou coloração azul intenso e azul celeste intenso, sugerindo a presença de um cromóforo cumarínico em sua estrutura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-1 (ANEXO 43) apresentou dois sinais de dupletos em  $\delta$  6,27 e 7,96 com constante de acoplamento de 9,6 Hz característicos dos hidrogênios H-3 e H-4 das cumarinas. Observou-se ainda neste espectro dois sinais de simpletos em  $\delta$  6,85 e 6,92 sugerindo-se a relação *para* entre estes no anel B da cumarina. Por fim, verifica-se um sinal de metoxila em  $\delta$  3,96 e hidroxila em  $\delta$  6,18; sendo estes os substituintes do anel B cumarínico. O espectro de massas de C-1 (EI) apresentou o íon molecular em  $m/z$  192.

A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e EM e comparação com dados da literatura (MULLER, 1994) foram suficientes para identificar inequivocamente a substância C-1 como sendo a cumarina escopoletina.



**Estrutura da escopoletina**



**FIGURA 212. Espectro de Massas de C-1 (EI, 70 eV)**

## 5. Busca de intermediários de biogênese por HPLC-UV-MS/MS

Como visto na revisão de literatura deste capítulo, o primeiro alcaloide quinolônico reportado em espécies da tribo Hermannieae (Malvaceae) foi a melochinona (**17**), isolada de *Melochia tomentosa*, em estudos realizados por Kapadia e colaboradores (KAPADIA *et. al.*; 1975). Nesta publicação os autores reconhecem a biossíntese não usual deste alcaloide devido à presença de um anel de sete membros geminado ao sistema quinolônico. Além do mais, os mesmos não conseguiram explicar satisfatoriamente a presença de metila ligada ao sistema quinolônico, atribuindo assim a presença desta à união de uma unidade de antranil-CoA com metil piruvato e um derivado da paracoteína, como citado anteriormente na página 9.

O mesmo grupo de pesquisa publicou em seguida a estrutura da melovinona (**18**), como um análogo de cadeia aberta da melochinona (KAPADIA *et. al.*; 1978). Posteriormente foi publicada a estrutura da melochininona (**21**) de *Melochia pyramidata* (ARRIAGA *et. al.*; 1981). Na década de 1990 foram publicadas as estruturas dos alcaloides quinolônicos hyeronimona (**A4**), a partir de *Hyeronima alcorneoides* (TINTO *et. al.*; 1991) e antidesmona (**22**), a partir de *antidesma membranaceum* (BUSKE *et. al.*; 1999), todos estes apresentam no núcleo quinolônico uma metila na posição 2 e uma metoxila na posição 3, assim como nos alcaloides **17**, **18** e **21**.

Neste momento é possível sugerir algo em comum na biogênese destes alcaloides dada as similaridades estruturais encontradas. Como visto no item de revisão da literatura, Brigmann e colaboradores estudaram a biossíntese da antidesmona em culturas de células de *Antidesma membranaceum* através de experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados e descobriram que a antidesmona é biossintetizada através do aminoácido glicina e de uma cadeia C-16 policetílica, sendo que a metila na posição 2 é originária da glicina e a metoxila na posição 3 vem de uma metilação via SAM. A proposta para essa biogênese encontra-se nas páginas 10 e 11 desta tese.

Como visto no item de identificação e elucidação estrutural deste capítulo, a partir de raiz e caule de *W. brachypetala* foram isolados vários alcaloides quinolônicos, entre estes alguns análogos da antidesmona; análogos da melochinona, como as waltherionas e os alcaloides aril-alquila-quinolonas também análogos destes alcaloides anteriormente citados.

Se considerarmos atentamente as estruturas da waltheriona A (**A16**), w-antidesmona (**A19**) e antidesmona (**A1**) verificamos, na estrutura da w-antidesmona (**A-19**), que o número de carbonos entre o grupo fenil e o anel B da quinolona é igual a cinco, mesmo número de carbonos entre os anéis B e C da waltheriona-A (**A16**). Ou seja, é possível propor com clareza neste trabalho que a w-antidesmona (**A19**) e a waltheriona A (**A16**) podem vir da mesma via biogênica, podendo agora estender esta afirmação para a antidesmona e seus análogos.

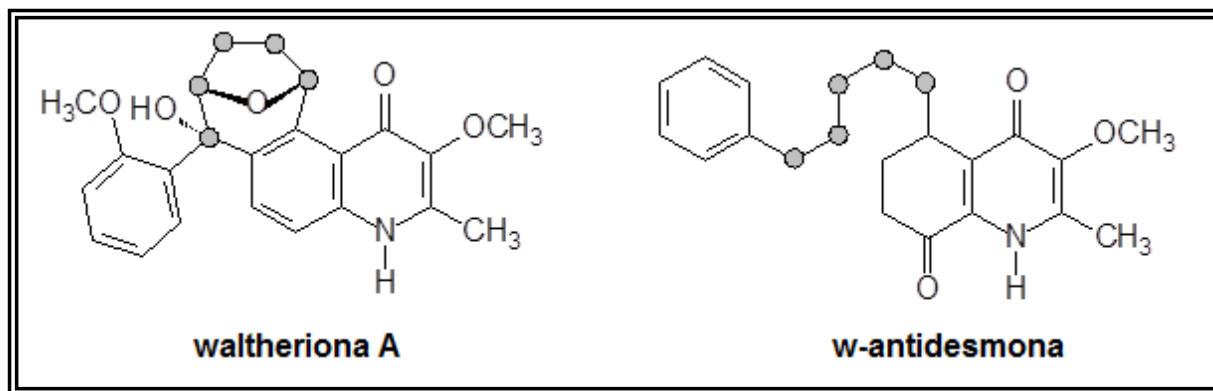


FIGURA 213. Alcaloides walteriona A e walteriantidesmona

Enquanto a antidesmona é biossintetizada a partir de glicina e cadeia policetídica C-16, neste trabalho sugerimos que walteriona A (**A16**) e walteriantidesmona (**A19**) e seus análogos são biossintetizados a partir de glicina e cadeia policetídica C-20. Na próxima figura é dada uma sugestão de biogênese da walteriona A, continuando o raciocínio desenvolvido nas páginas 10 e 11 deste capítulo.

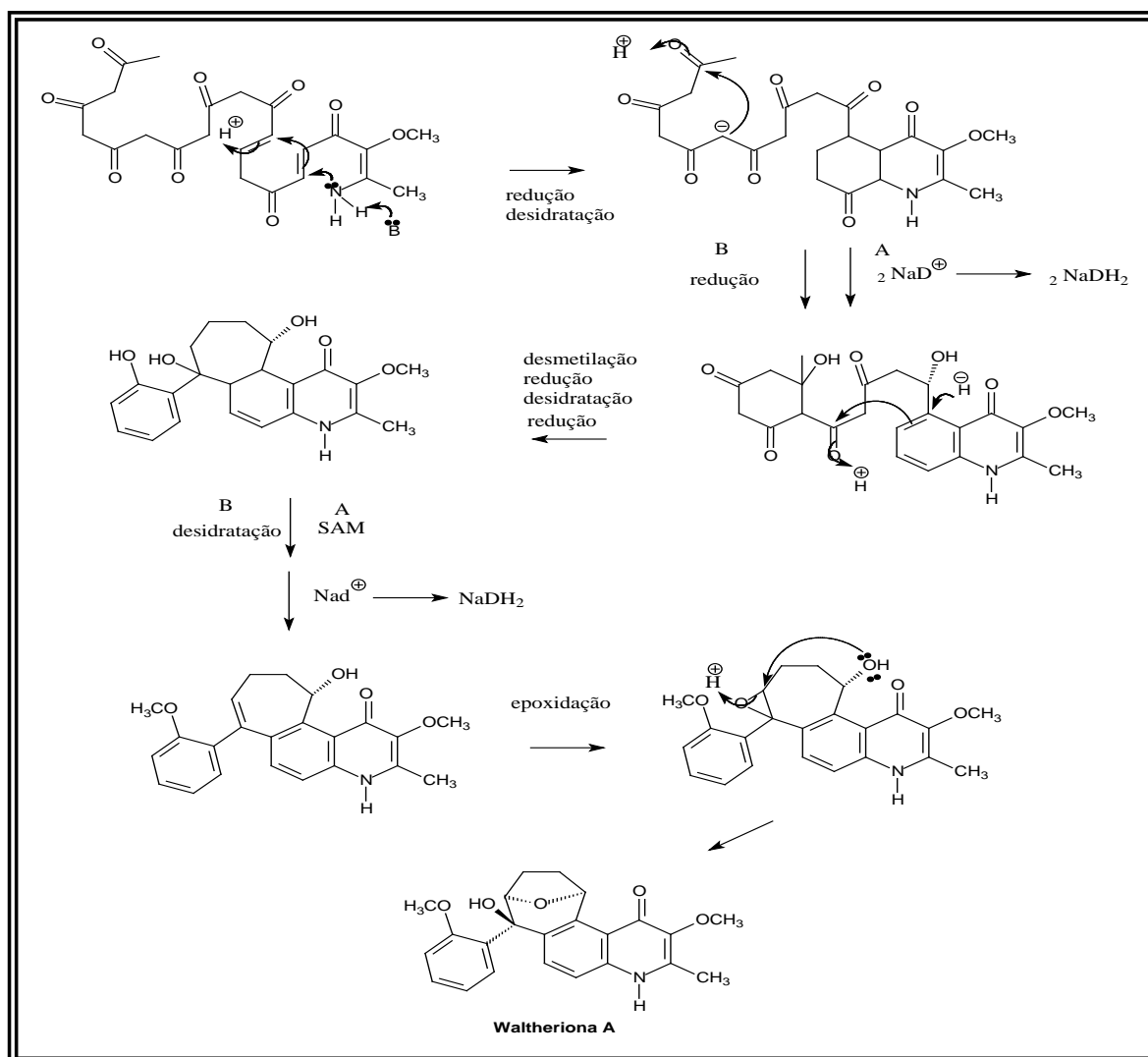


FIGURA 214. Proposta para a biogênese da walteriona A



No item de identificação e elucidação estrutural dos alcaloides quinolônicos isolados de *W. brachypetala* foi visto que dois novos análogos da waltheriona A (**A16**) foram isolados, a waltheriona D (**A13**) e a 10-hidroxi-waltheriona D (**A18**). Nestes dois novos alcaloides, a ponte éter no biciclo [3.2.1] encontra-se entre os carbonos 9 e 13, diferentemente das waltherionas A (**A16**), B (**A17**) e C (**A12**) onde esta ponte éter encontra-se entre os carbonos 10 e 13.

É possível sugerir um precursor comum para as waltherionas A, B e C e a 10-hidroxi-waltheriona D. Considerando que a posição 13 é originalmente oxigenada devido à biossíntese via cadeia policetílica. Considerando a melochinona um precursor comum das waltherionas, poderíamos ter durante o processo de biogênese uma epoxidação da ligação dupla entre C-9 e C-10 e uma hidroxila na posição 13.

A abertura do epóxido através do ataque nucleofílico da hidroxila (C13-OH) poderia ocorrer em ambas faces ( $\alpha$  e  $\beta$ ) nas posições 9 ou 10. O ataque da hidroxila na posição 10 leva a formação das waltherionas A e B, enquanto que o ataque na posição 9 leva a formação da 10-hidroxi-waltheriona D.

Já para a waltheriona D o intermediário mais próximo poderia ser a melochinona, hidroxilada na posição 13, onde, o rompimento da dupla ligação para a captura de um hidrogênio ( $H^+$ ) levaria à formação do carbocátion mais estável na posição 9 que em seguida sofreria ataque nucleofílico pela hidroxila em C-13. A mesma ponte éter poderia ser esperada através de um processo concertado.

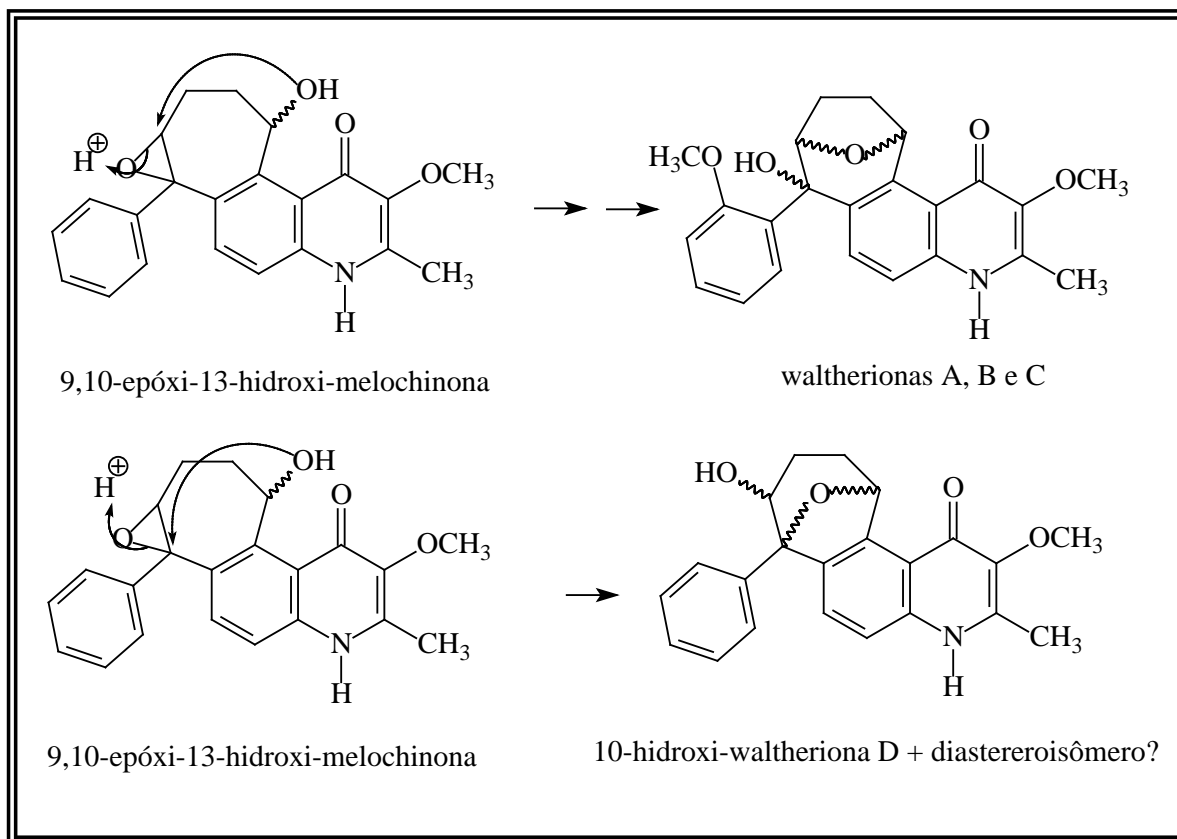


FIGURA 215. Possível intermediário 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochinona

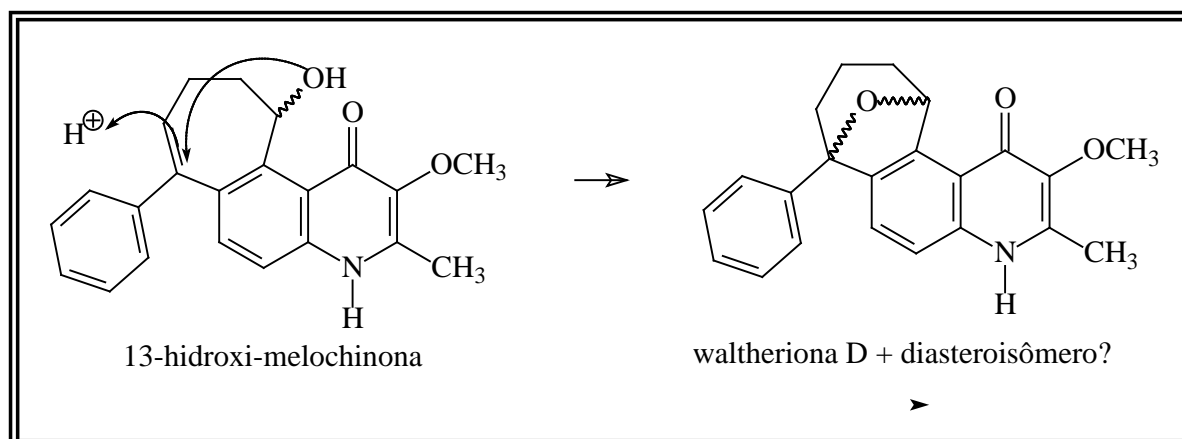


FIGURA 216. Possível intermediário 13-hidroxi-melochinona

A fim de verificar a existência dos intermediários 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochinona e 13-hidroxi-melochinona foi realizado um estudo via HPLC-UV-MS-MS da fase diclorometano do caule de *W. brachypetala*, visando buscar os íons *pseudo*-moleculares  $[M + H]^+$   $m/z$  364 para 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochina e  $m/z$  348 para 13-hidroxi-melochina.

O modo de ionização utilizado foi eletrospray (ESI) no modo positivo. Primeiramente foi realizado um estudo via HPLC-UV no comprimento de onda de 254 nm, visando obter a melhor separação das bandas cromatográficas. Posteriormente foi realizado um *full-scan* no espectrômetro de massas a fim de verificar a presença destes íons *pseudo*-moleculares. Em seguida foi escolhido o modo íon selecionado no HPLC-DAD-MS/MS para obtenção dos íons produtos referentes às bandas selecionadas, após da otimização das condições para a análise no espectrômetro de massas.

Além dos íons *pseudo*-moleculares dos intermediários, também foram monitorados aqueles referentes às walterionas A (**A16**), B (**A17**), D (**A13**); 10-hidróxi-walteriona-D (**A18**). Foi também monitorado o íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$   $m/z$  332 para verificar a possibilidade da presença do precursor comum melochinona (**17**) na fase orgânica analisada.

A fase hexânica do caule de *W. brachypetala* também foi estudada via HPLC-UV-MS-MS. Neste estudo, o intuito foi buscar possíveis outros alcaloides aril-alquila-quinolonas ou alquila-quinolonas que pudessem trazer informações relevantes, não só com relação a biogênese, mas também aquelas relacionadas a quimiossistemática.

Os alcaloides alquila-quinolin-4-onas análogos da antidesmona são marcadores quimiossistemáticos da tribo Antidesmeae (família Phyllantaceae), sendo encontrados em espécies dos gêneros *Antidesma* e *Hyeronima*.

Buske e colaboradores (BUSKE *et. al.*; 2000) realizaram um estudo quimiotaxonômico de espécies de *Antidesma* e *Hyeronima* via HPLC-MS/MS

visando à identificação de alcaloides derivados da antidesmona (**A1**). Neste estudo verificou-se o padrão de fragmentação da cadeia lateral destes alcaloides com a técnica de ionização eletrospray (ESI), sendo que para todos observou-se a quebra da cadeia entre C-5 e C-9 e entre C-9 e C-10. Esses mecanismos de fragmentação estão esquematizados no item de identificação e determinação estrutural deste capítulo.

### 5.1. Identificação dos alcaloides da fase WCD por HPLC-MS/MS (ESI, modo positivo)

O cromatograma de íons totais selecionados apresentou oito picos cromatográficos de interesse. Para cada um desses picos cromatográficos foi obtido o espectro de íons produtos e as substâncias foram identificadas através dos seus padrões de fragmentação.

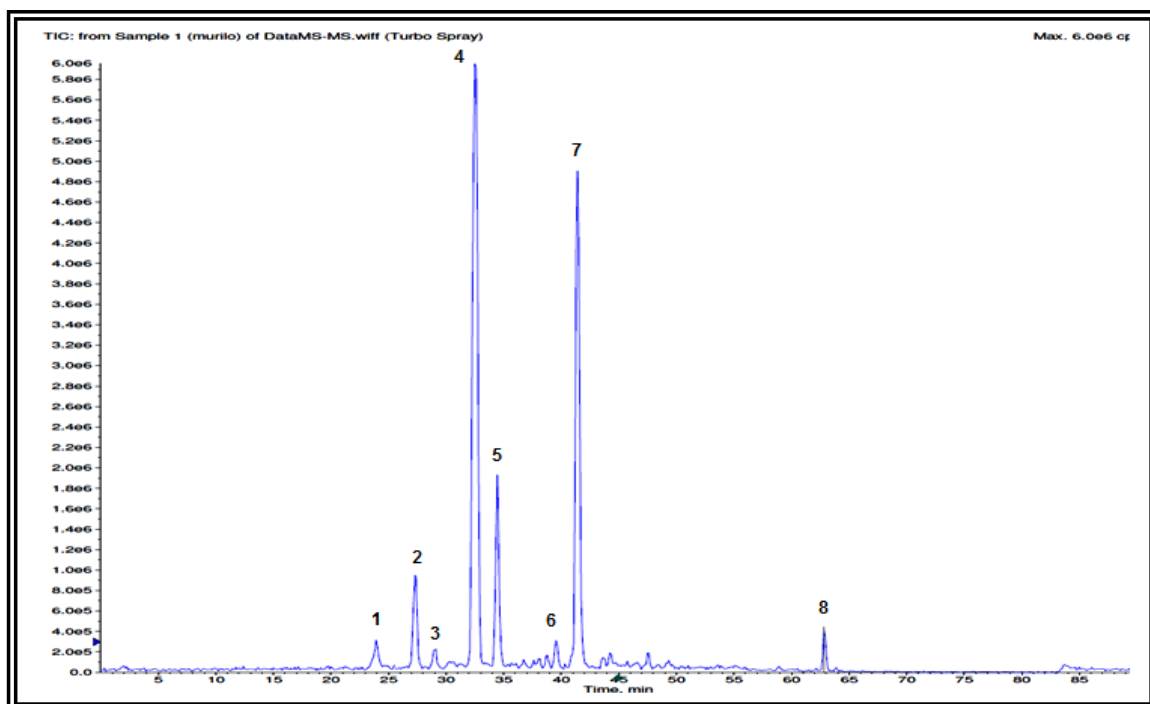


FIGURA 217. Cromatograma de íons totais selecionados de WCD

#### 5.1.1. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 1, 2 e 3

Os picos cromatográficos 1, 2 e 3 apresentaram o íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$   $m/z$  364. O pico 2 (tempo de retenção 34,08 min) apresentou espectro de íons produtos praticamente idêntico ao da 10-hidroxi-waltheriona D, obtido também por ESI no modo positivo por inserção direta, sendo assim possível identificar o alcaloide referente ao pico 2 como sendo 10-hidroxi-waltheriona-D (**A13**).

O pico cromatográfico **3** (tempo de retenção 39,29 min) também apresentou o pico do íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$   $m/z$  364. Apesar de o espectro de massas deste alcaloide ter apresentado menos fragmentações, os principais fragmentos foram bastante parecidos, inclusive em proporção de intensidade, com aqueles da 10-hidroxi-waltheriona D, sugerindo que esta substância trata-se de um diastereoisômero desse alcaloide.

O pico cromatográfico **1** também apresentou íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$   $m/z$  364, entretanto o espectro de íons produtos não é idêntico ao da 10-hidroxi-waltheriona-D (**A18**). Apesar de este ter apresentado poucas fragmentações foi possível propor que esta substância trata-se do intermediário 9,10-epóxi-13-hidróxi-melochinona (**A23**).

A primeira fragmentação do alcaloide 9,10-epóxi-13-hidróxi-melochinona é a perda de  $H_2O$  gerando o íon  $m/z$  346, a perda de CO no núcleo A gera o íon fragmento  $m/z$  318. Um rearranjo de hidrogênio para a formação de uma carbonila no anel de sete membros e a posterior perda de CO, leva a formação do íon o fragmento  $m/z$  290. A partir do íon  $m/z$  318, a perda de fenila e CO gera o fragmento  $m/z$  214. Já o íon fragmento  $m/z$  105 vem provavelmente da fenila mais uma unidade de CO.

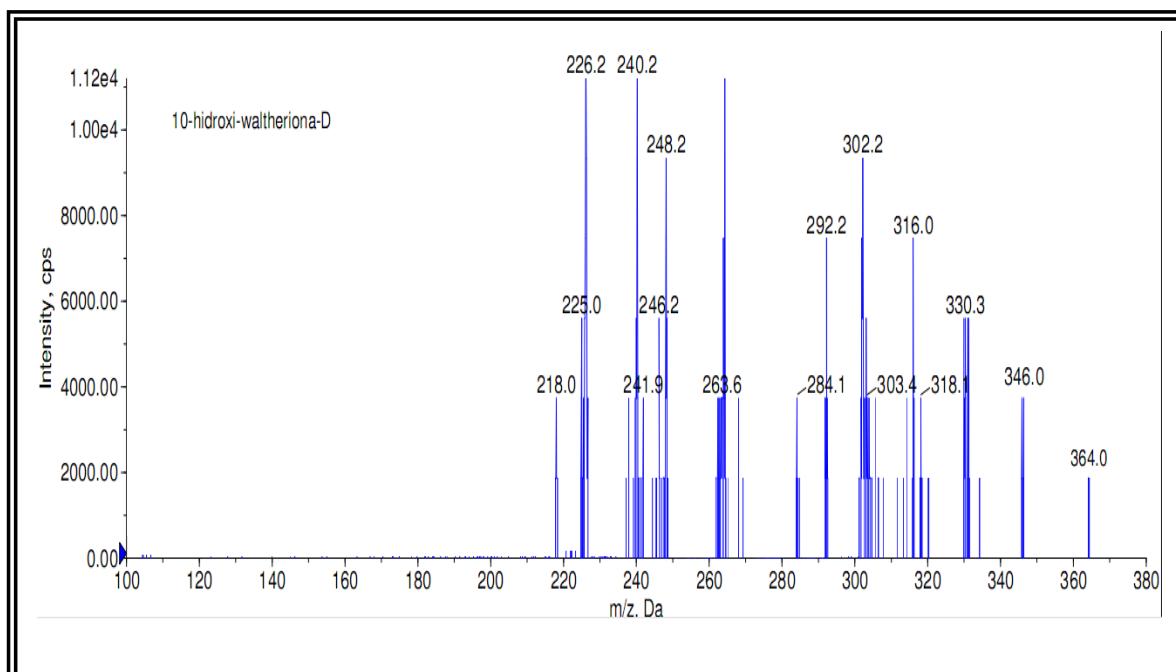


FIGURA 218. Espectro de massas referente ao pico 2 (TR = 34,08 min)

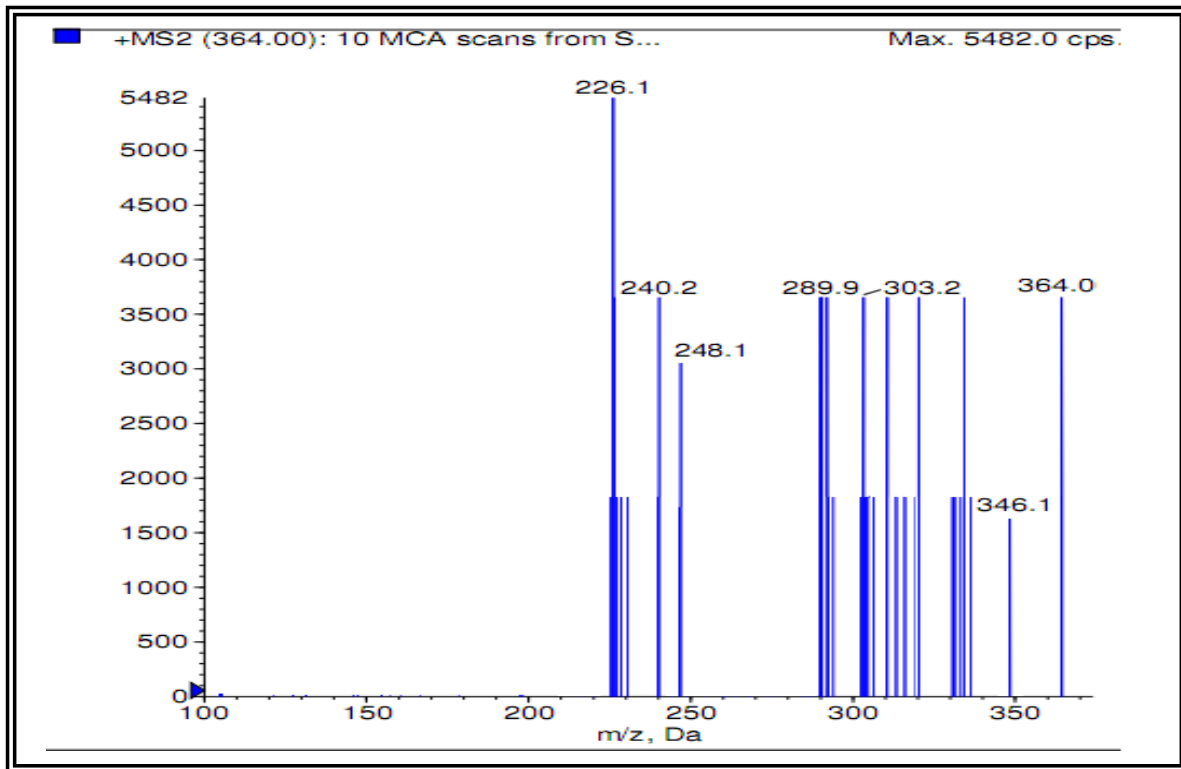


FIGURA 219. Espectro de massas referente ao pico 3 (TR = 39,29 min)

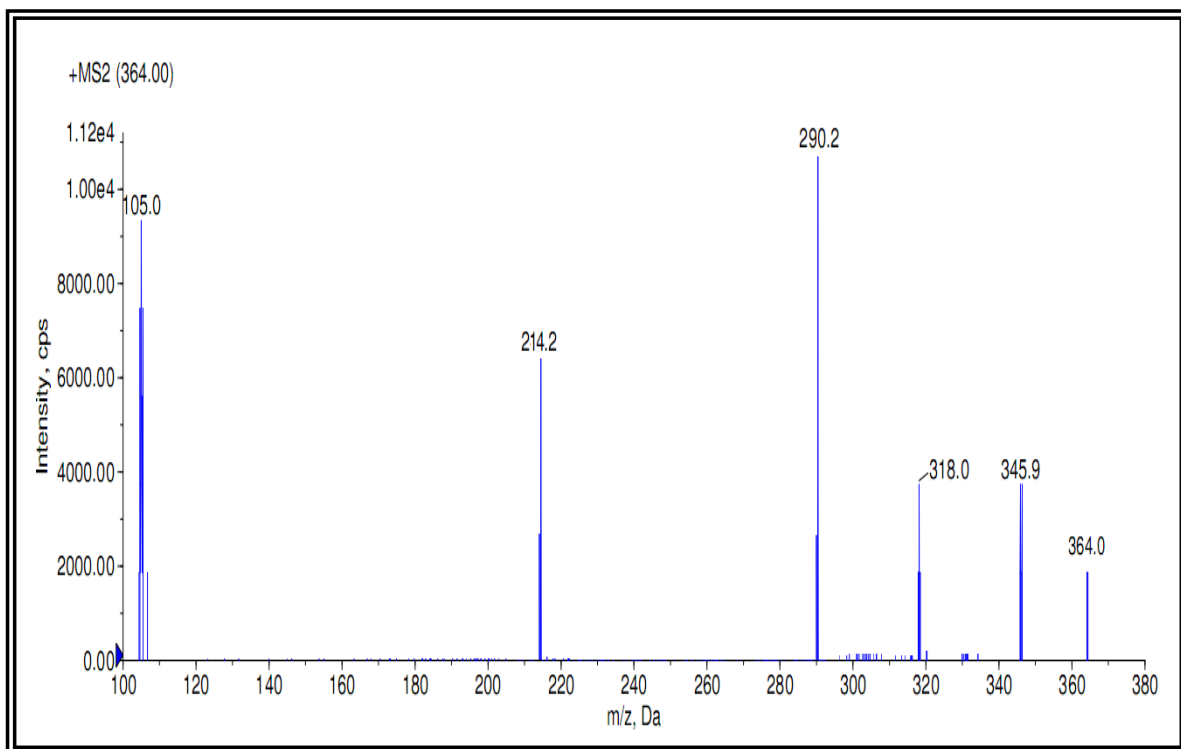


FIGURA 220. Espectro de massas referente ao pico 1 (TR = 32,53 min)

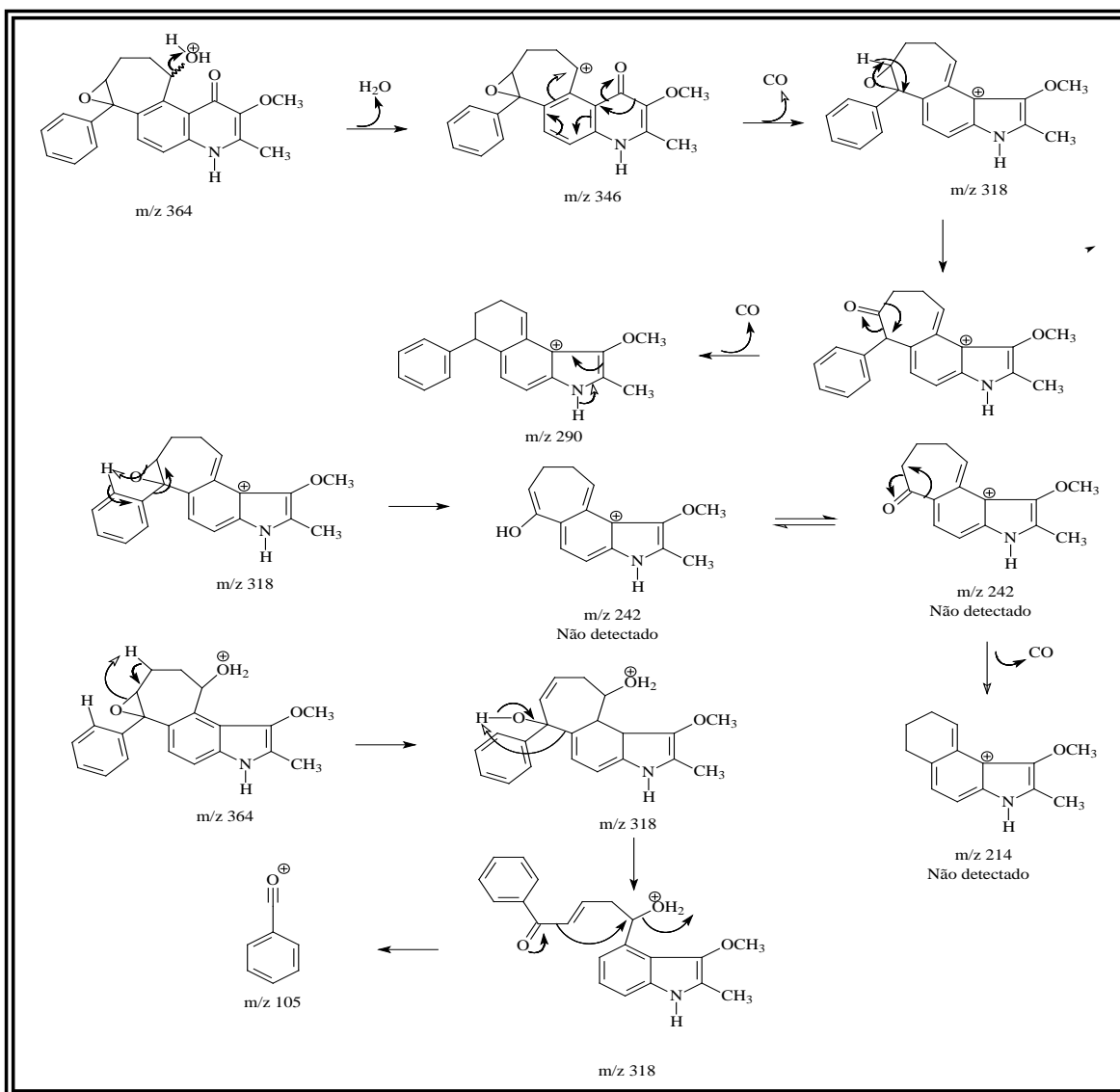
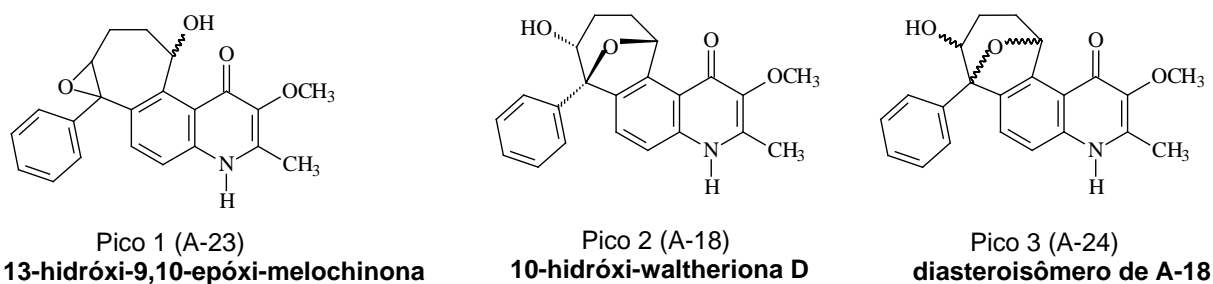


FIGURA 221. Proposta de fragmentação de 9,10-epóxi-13-hidroxi-melochinona



### 5.1.2. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 4 - 7

Os picos cromatográficos **4** e **5** apresentaram íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  394, os espectros de massas de MS-2 de **4** e **5** apresentaram padrão de fragmentação bem semelhante. Através da comparação com os espectros de massas de MS-2 das waltherionas A (**A16**) e B (**A17**) foi possível identificar inequivocamente as substâncias referentes aos picos **4** e **5** como sendo waltheriona A (pico 4) e waltheriona B (pico 5).

Os picos **6** e **7** também apresentaram o mesmo íon *pseudo*-molecular, sendo para estes  $[M + H]^+$   $m/z$  348, entretanto com diferente fragmentos. O pico **7** foi facilmente identificado como sendo a walteriona D (**A13**), após a comparação do espectro de MS-2 obtido para **7** e o espectro de fragmentação de **A13** obtido por inserção direta deste composto puro.

A substância referente ao pico 6 foi identificada como sendo a 13-hidróxi-melochinona (**A25**), sendo este o intermediário de biogênese mais próximo da walteriona D. O espectro de MS-2 da 13-hidróxi-melochinona (**A25**) apresentou um íon fragmento importante em  $m/z$  330 referente a perda de água, confirmando a presença da hidroxila em sua estrutura. As demais fragmentações apresentaram padrão parecido ao da 9,10-epóxi-13-hidróxi-melochinona, com a perda de CO, do grupo fenila.

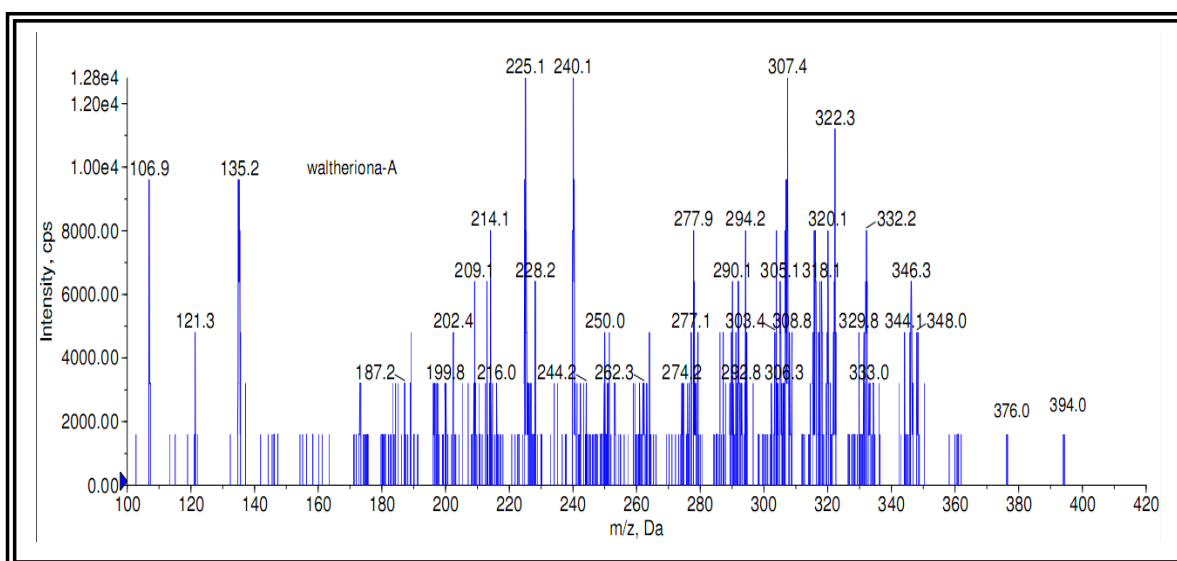


FIGURA 222. Espectro de massas Pico 4 (TR = 41,36 min)

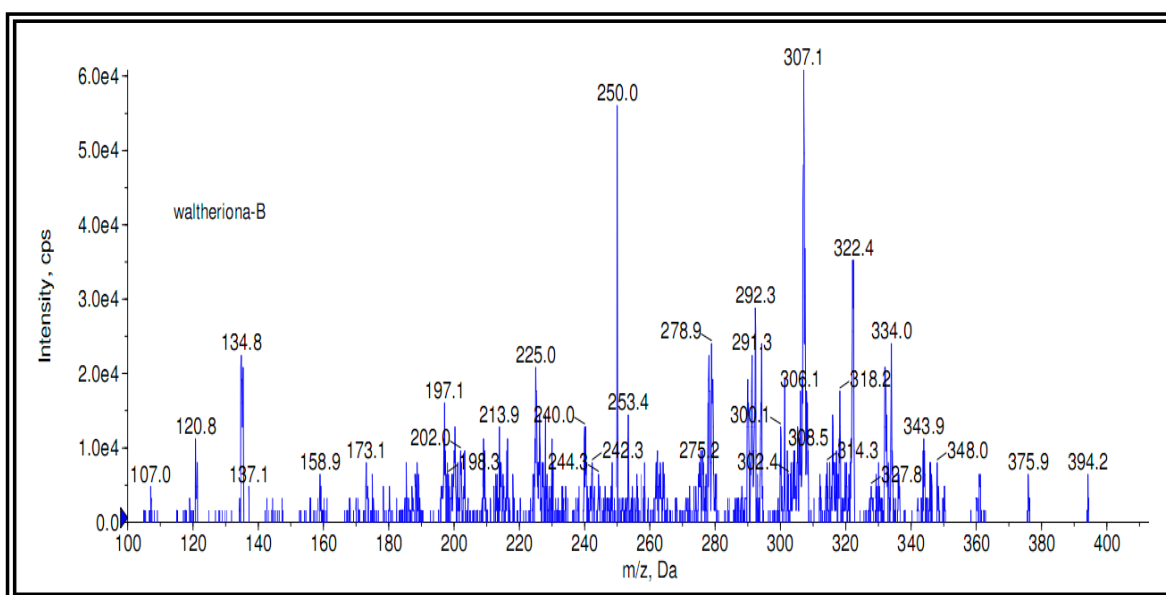


FIGURA 223. Espectro de massas Pico 5 (TR = 43,00 min)

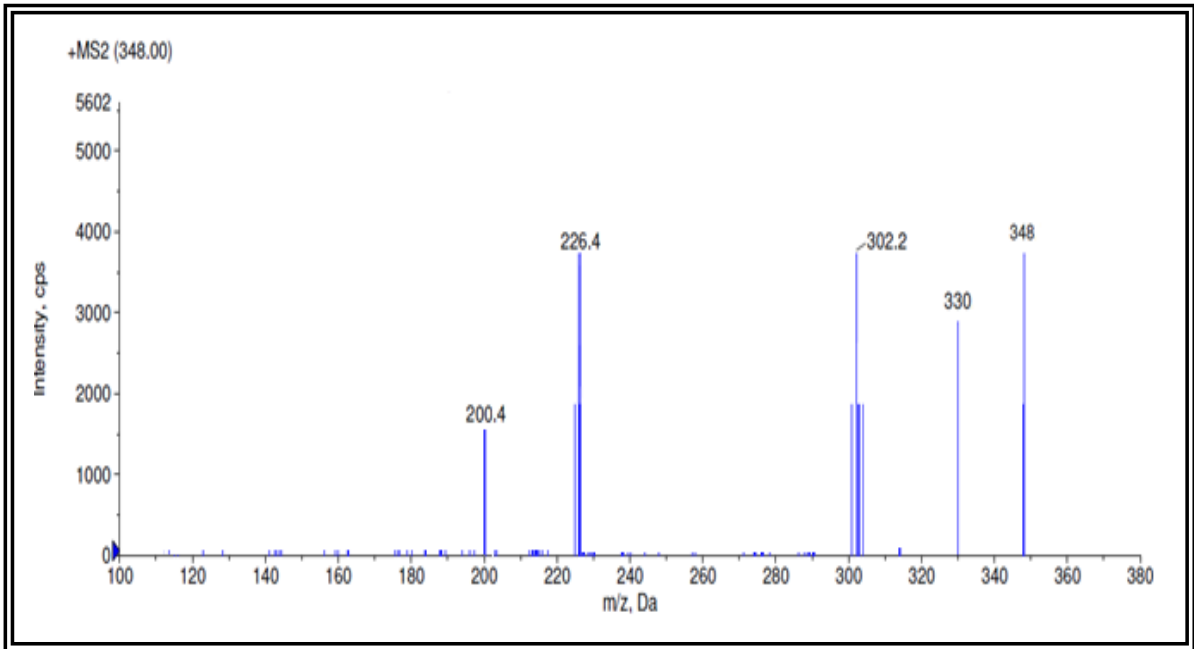


FIGURA 224. Espectro de massas Pico 6 (TR = 50,54 min)

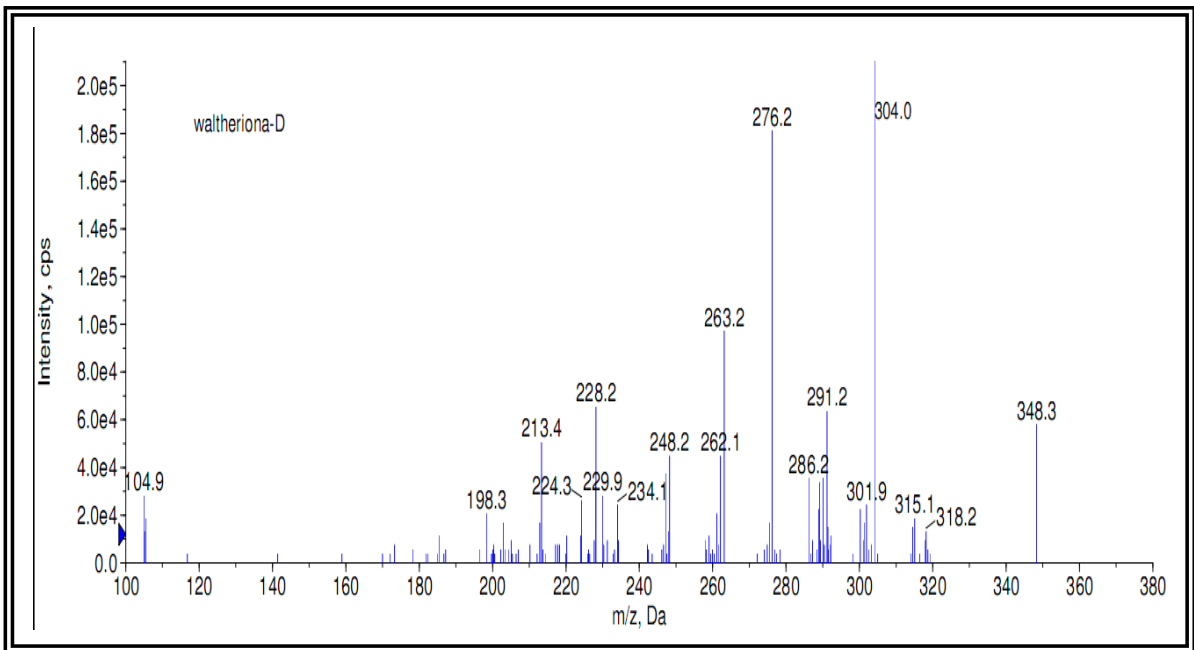


FIGURA 225. Espectro de massas pico 7 (TR = 51,51 min)



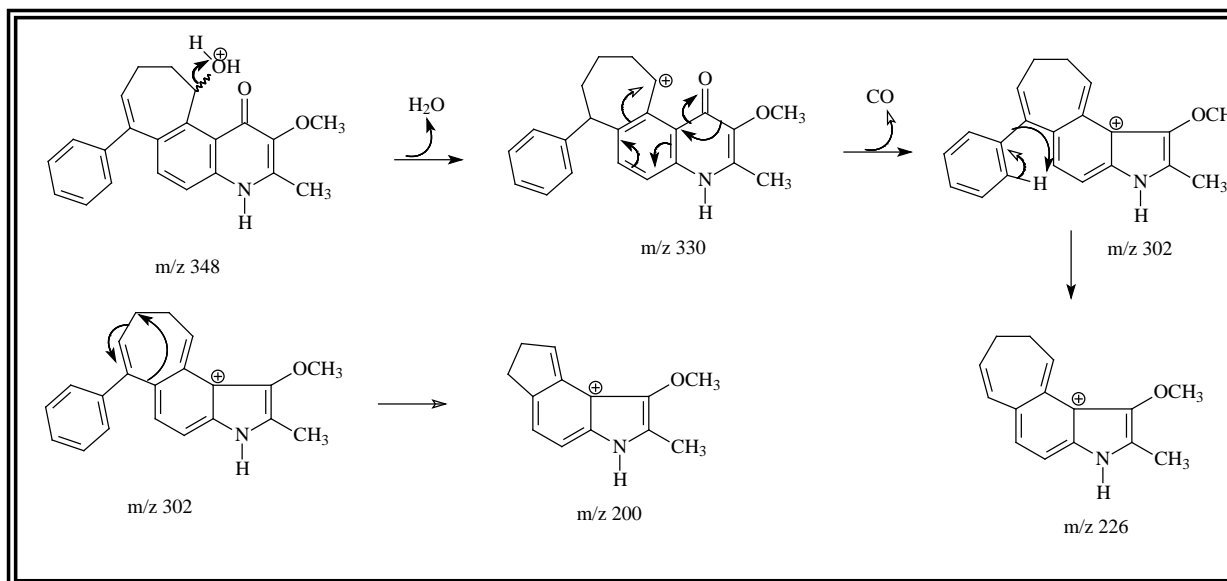
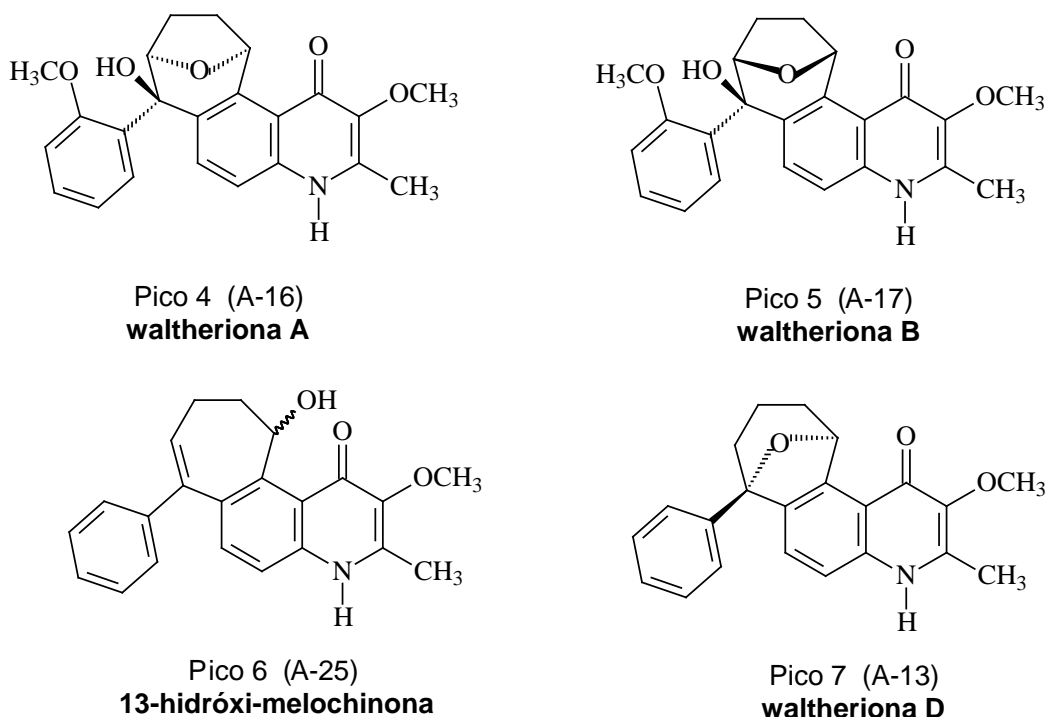


FIGURA 226. Proposta de fragmentação da 13-hidroxi-melochinona (A-25) (pico 6)



### 5.1.3. Identificação do alcaloide referente ao pico 8

O pico cromatográfico **8** observado do tempo de retenção de 52,30 min, apresentou pico do íon *pseudo*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  em  $m/z$  332. Através do espectro de íons produtos MS-2, foi possível identificar que a substância referente a este pico é a melochinona (**A26**). Este espectro apresentou um padrão de fragmentação semelhante ao da 10-hidróxi-melochinona com a perda de  $\text{CO}$  no núcleo A e perda da fenila. Observou-se também a formação de anel de cinco membros com a perda de uma unidade de fenil-CH.

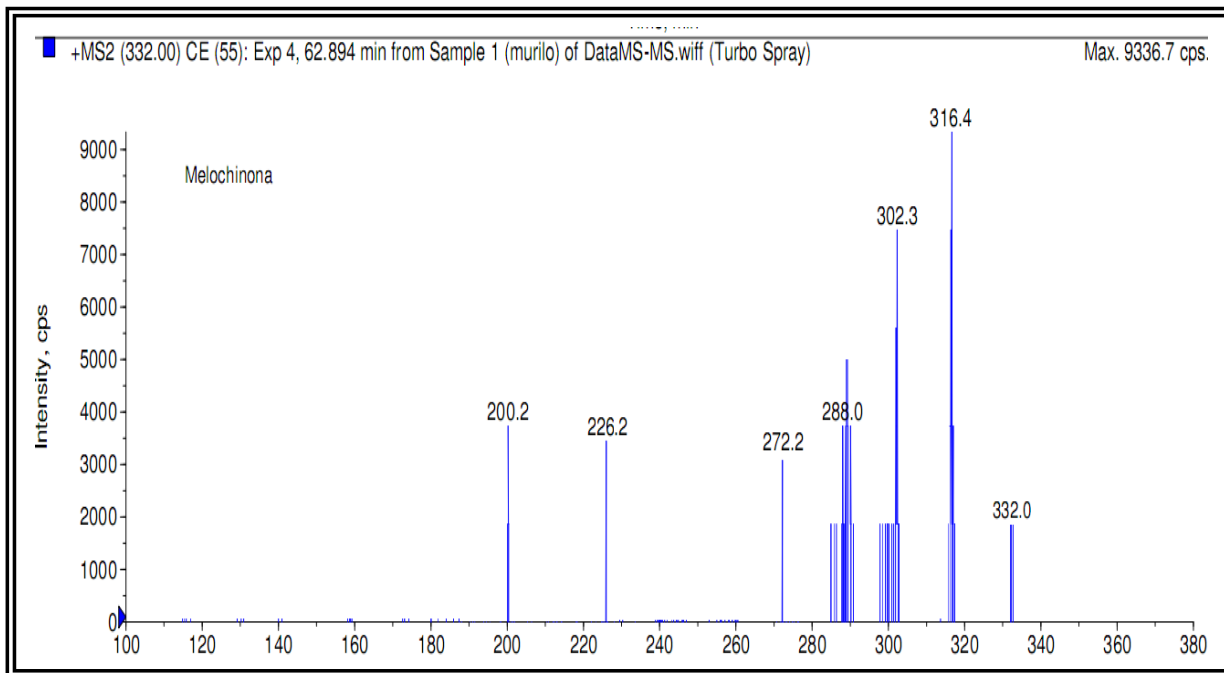


FIGURA 227. Espectro de massas referente ao pico 8 (TR = 63,0 min)

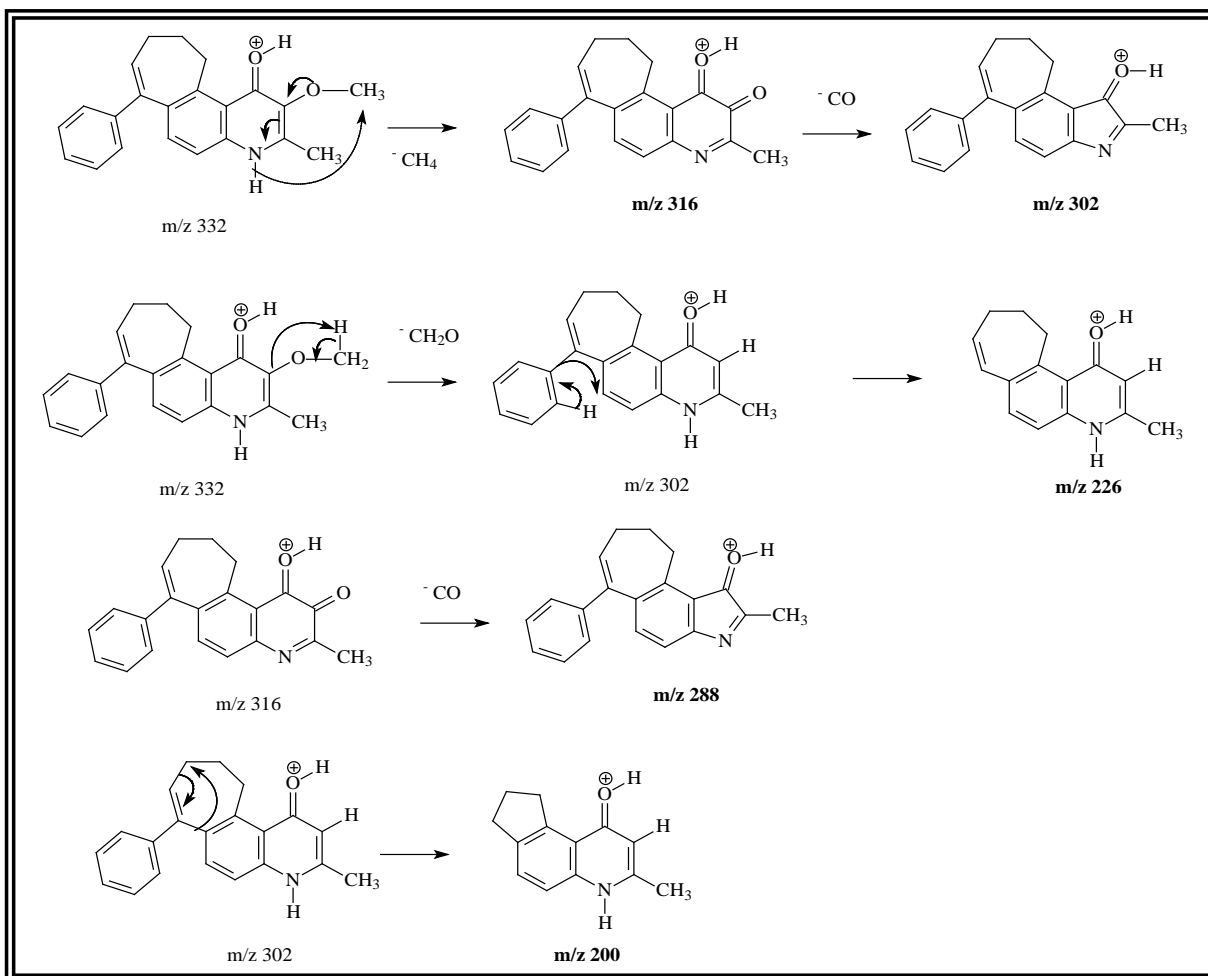


FIGURA 228. Proposta de fragmentação da melochinona (A26) (pico 8)

## 5.2. Identificação dos alcaloides da fase hexânica do caule (WCH) por HPLC-MS/MS (ESI, modo positivo)

O cromatograma de íons totais selecionados de WCH apresentou dezessete picos cromatográficos de interesse. Para cada um desses picos cromatográficos foi obtido o espectro de íons filhos e as substâncias foram identificadas através dos seus padrões de fragmentação, bem como através da comparação entre os espectros de massas anteriormente obtidos via ESI (modo positivo) por inserção direta dos padrões puros.

Para os alcaloides aquil-quinolonas e aril-aquil-quinolonas, a fragmentação ocorre inicialmente na cadeia lateral. Esta pode quebrar entre os carbonos C<sub>5</sub> – C<sub>9</sub> e C<sub>9</sub> – C<sub>10</sub>. Propostas de fragmentação para estes alcaloides estão apresentadas no item determinação estrutural.

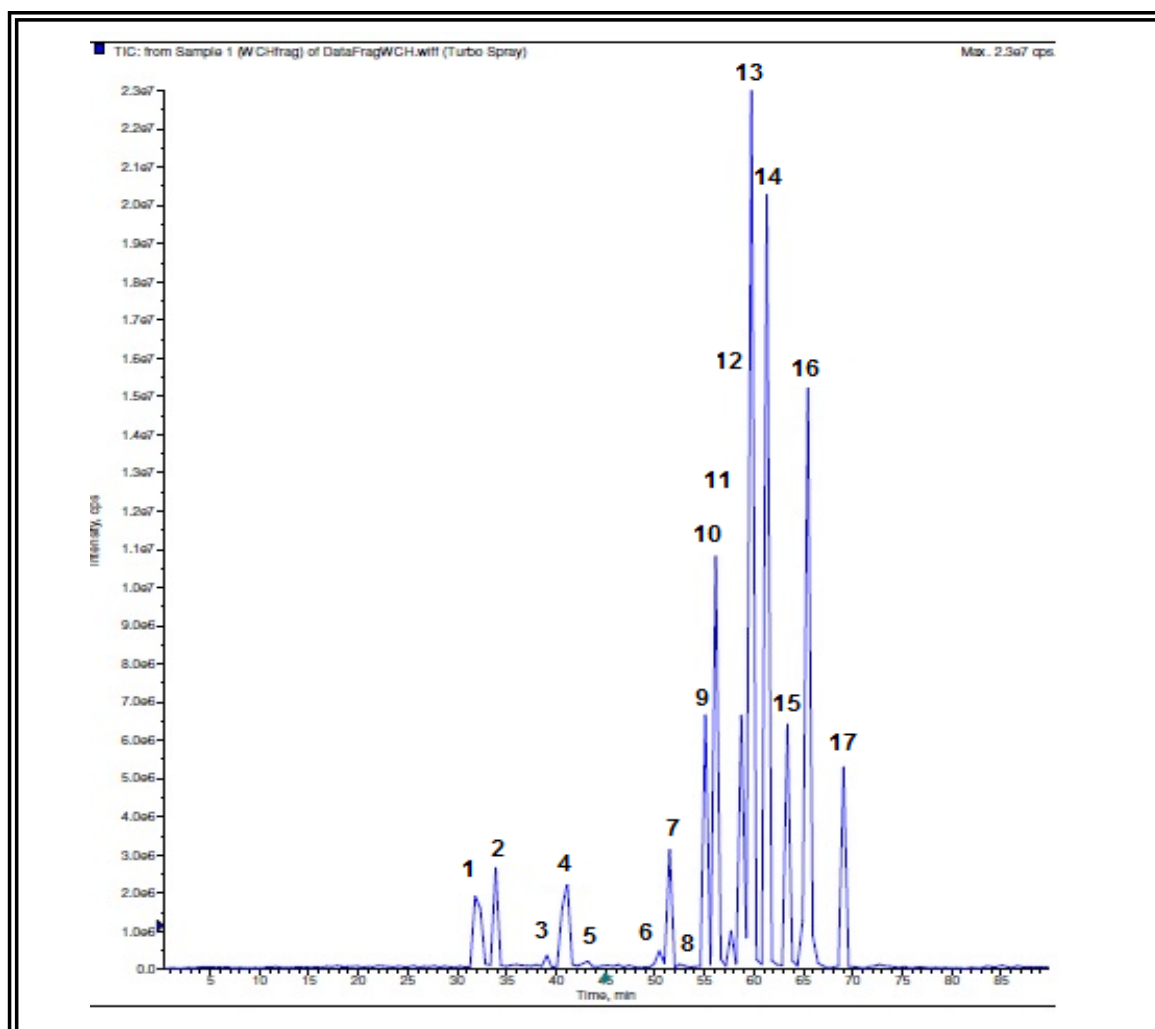


FIGURA 229. Cromatograma de íons totais selecionados de WCH

### 5.2.1. Identificação dos alcaloides referentes aos picos 1 – 5

Os espectros de massas (MS-2) referentes aos picos **1** e **2** apresentaram íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  394. Estes foram posteriormente identificados como sendo as waltherionas A (**A16**) e B (**A17**) inequivocamente através da comparação de seus espectros de massas com os respectivos espectros dos padrões.

Os espectros de massas referentes aos picos de **3** a **4** apresentaram o mesmo valor de íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  348. Os alcaloides referentes aos picos **3** e **5** foram facilmente identificados como sendo 13-hidróxi-melochinona e waltheriona-D, respectivamente, após comparação com espectros destes padrões.

O pico **5** apresentou no seu espectro de massas um padrão de fragmentação bem parecido com aquele verificado para a waltheriona D (**A13**), porém este não fragmentou tanto quanto a waltheriona D. Ainda assim é possível sugerir que **5** trate-se de um diastereoisômero da waltheriona D, ao qual, neste trabalho será chamado de waltheriona E (**A26**). Esta constatação confirma que na biogênese das waltherionas a formação da ponte éter pode ocorrer em ambas faces  $\alpha$  e  $\beta$ .

Devido a pouca quantidade da fase WCD, a waltheriona E foi apenas detectada por HPLC-MS/MS.

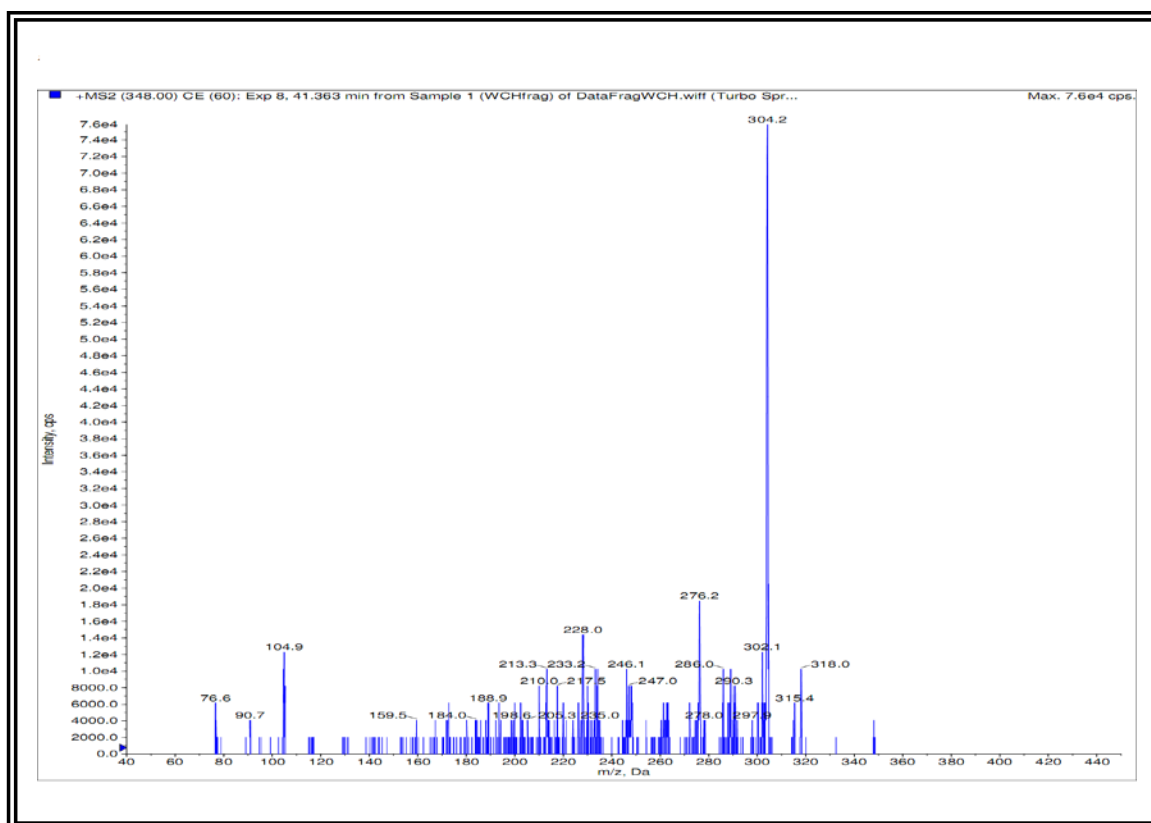


FIGURA 230. Espectro de massas referente ao pico 5 (TR = 41,36 min)

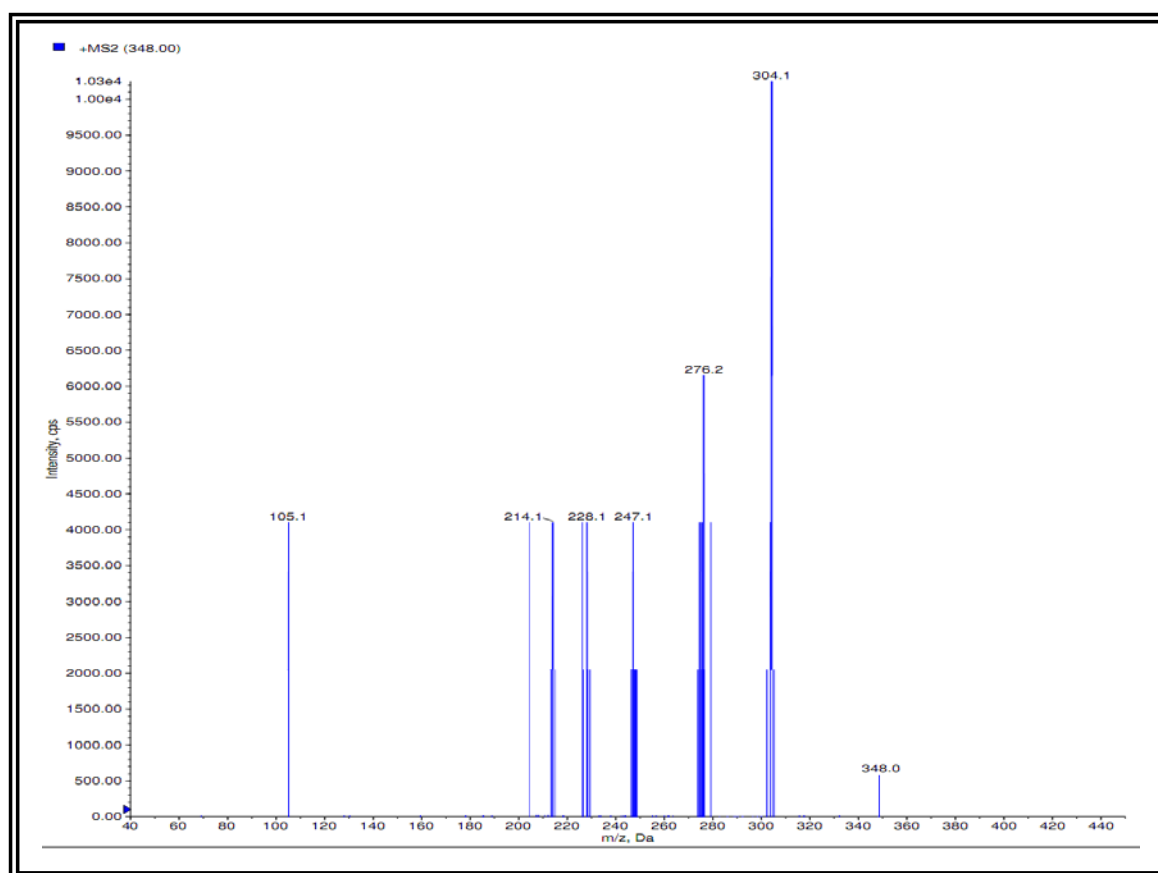
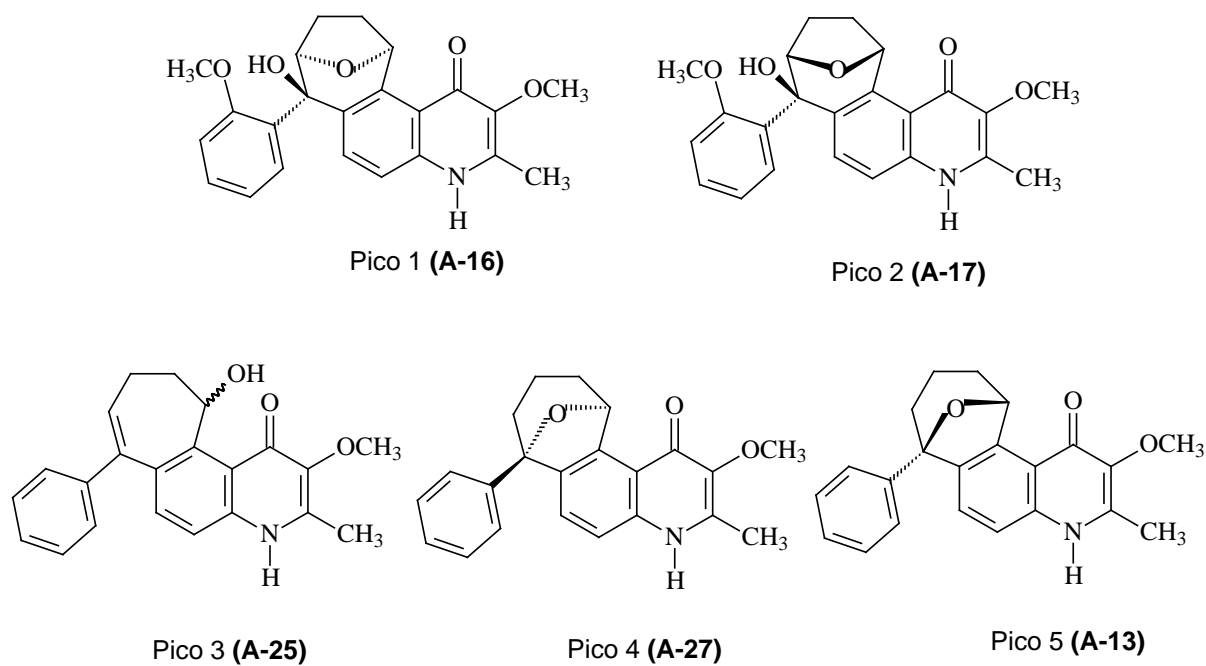


FIGURA 231. Espectro de massas referente ao pico 5 (TR = 43,0 min)



### 5.2.2. Identificação dos alcaloides de 6 a 17

Os alcaloides referentes aos picos de 6 a 17 foram identificados como sendo alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolínicos, de acordo com o quadro abaixo. Aqui será dado ênfase na discussão da identificação dos alcaloides não isolados a partir dos métodos cromatográficos empregados neste trabalho, sendo estes a w-hyeronimona (pico 7) e vanessina (pico 9).

Pico cromatográfico	Tempo de Retenção (min)	$m/z$ [M + H <sup>+</sup> ]	Substância identificada
6	50,54	322	hyeronimona
7	51,61	356	w-hyeronimona
8	52,30	370	brachytelona B
9	56,23	322	vanessina
10	56,13	320	antidesmona
11	57,72	336	brachytelona C
12	58,88	306	desoxi-antidesmona
13	59,79	336	chamaedrona
14	63,44	370	brachytelona A
15	65,48	336	metil-hyeronimona
16	65,58	354	waltheriantidesmona
17	69,10	336	brachytelona D

QUADRO 14. Alcaloides identificados 6 – 17

O espectro de massas referente ao pico **7** apresentou o íon *pseudo*-molecular [M + H]<sup>+</sup> em  $m/z$  356. Observou-se neste espectro um íon fragmento em  $m/z$  338 caracterizando da perda de H<sub>2</sub>O a partir do íon molecular. Os íons fragmento em  $m/z$  206 e  $m/z$  192 referem-se à quebra da cadeia aril-C<sub>5</sub> nas posições (C<sub>5</sub> – C<sub>9</sub>) e (C<sub>9</sub> – C<sub>10</sub>). Por fim, o íon fragmento em  $m/z$  178 é resultante da perda de CH<sub>2</sub> a partir de  $m/z$  192, assim como ocorre na fragmentação da hyeronimona. Assim, a substância referente ao pico **7** foi identificada como sendo um alcaloide aril-alquil-quinolin-4-ona análogo a hyeronimona. Neste trabalho nomeou-se este alcaloide como w-hyeronimona (**A28**). Não há relatos anteriores na literatura acerca deste alcaloide, sendo este inédito.

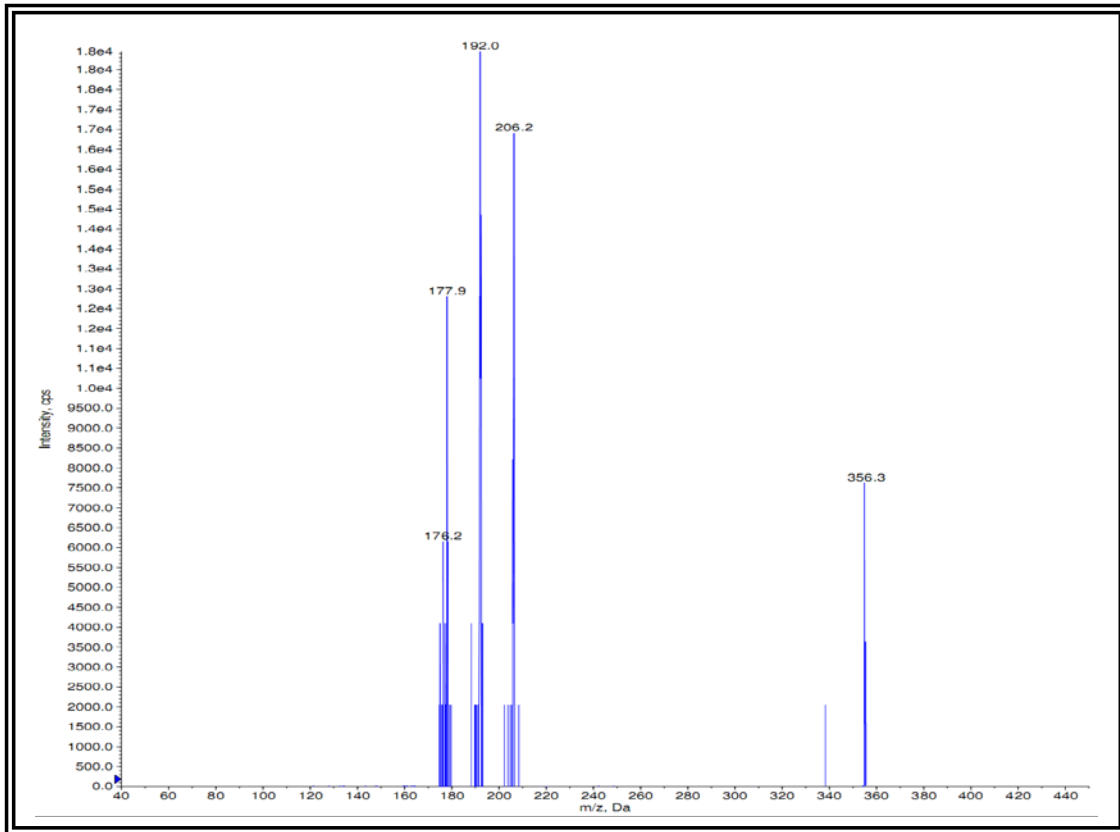


FIGURA 232. Espectro de massas referente ao pico 7 (TR = 51,61)

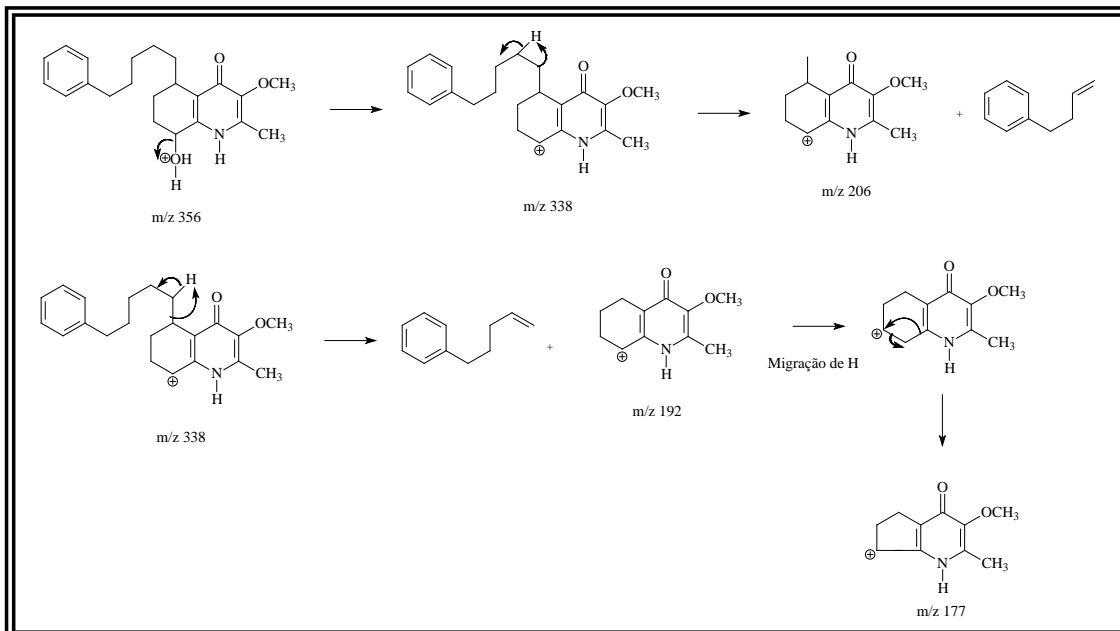


FIGURA 233. Propostas de fragmentação para w-hyeronimona (A28) (pico 7)

O espectro de massas referente ao pico **9** apresentou o íon *pseudo*-molecular  $[M + H]^+$  em  $m/z$  322. Observou-se neste espectro um íon fragmento em  $m/z$  304 caracterizando a perda de  $H_2O$  a partir do íon *pseudo*-molecular. O íon fragmento em  $m/z$  192 referem-se à quebra da cadeia alquílica na posição ( $C_5 - C_9$ ). A formação do anel de quatro membros a partir do anel B, característica comum das fragmentações dos alcaloides alquila-quinolonas reportados neste trabalho, é observada com a perda neutra de etileno, levando a formação do íon fragmento em  $m/z$  164 a partir de  $m/z$  192. O último fragmento  $m/z$  177 é resultante da perda da metila ligada ao oxigênio na posição 3. Assim, a substância referente ao pico **7** foi identificada como sendo o alcaloide alquil-quinolin-4-ona vanessina (**A29**). Este alcaloide não foi isolado neste trabalho pelas técnicas cromatográficas utilizadas.

A vanessina foi isolada anteriormente do caule de *Waltheria douradinha* (GRESSLER *et. al.*; 2008), sendo este o segundo relato de ocorrência deste alcaloide.

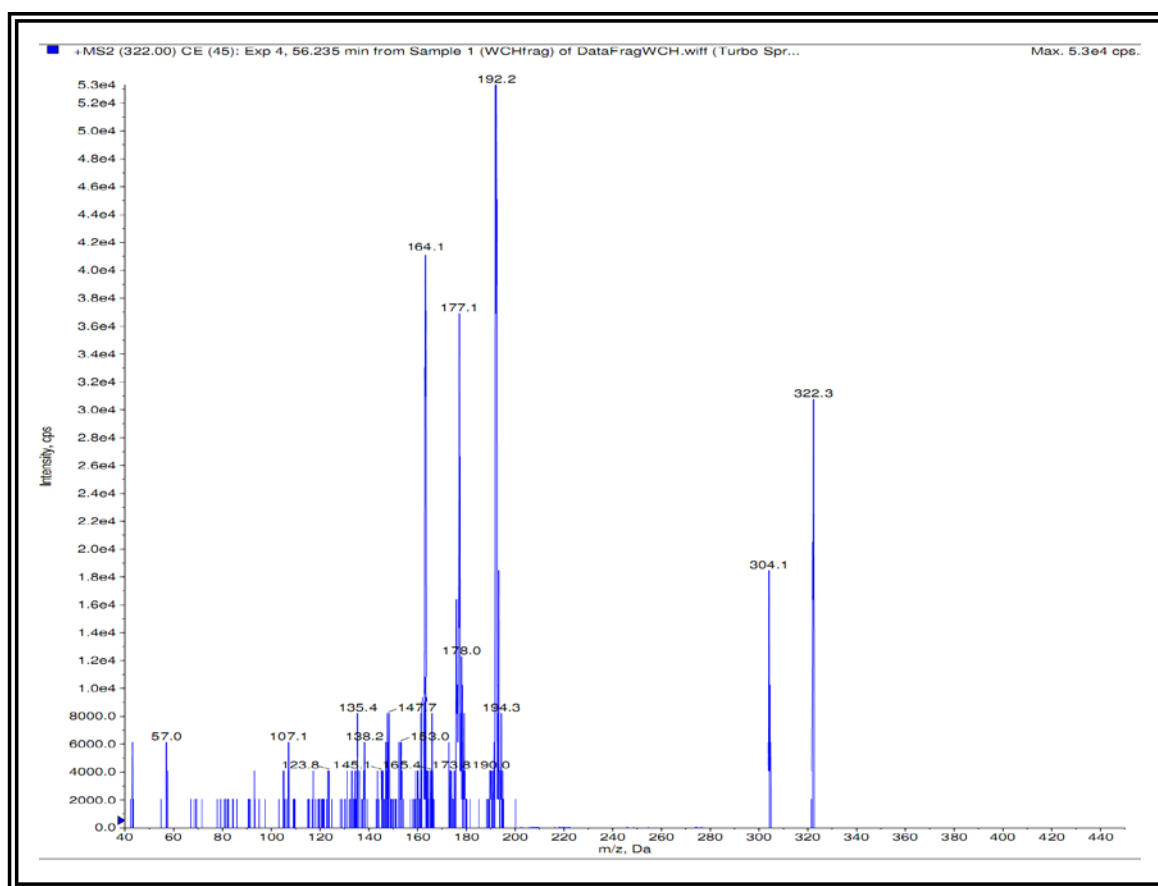


FIGURA 234. Espectro de massas referente ao pico 9 (TR = 56,23 min)



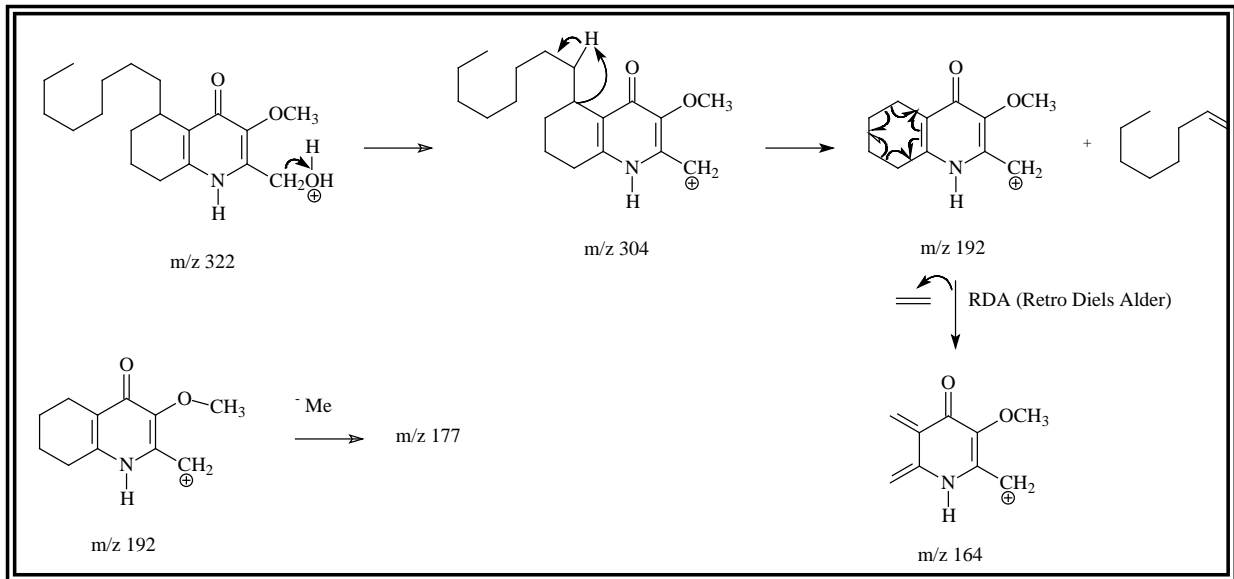


FIGURA 235. Propostas de fragmentação para a vanessina (A-29) (pico 9)

A seguir são apresentados os espectros de massas referentes aos demais picos cromatográficos observados no cromatograma de íons totais da fase WCH correspondentes aos alcaloides isolados e que já tiveram sua identificação / elucidação estrutural discutida.

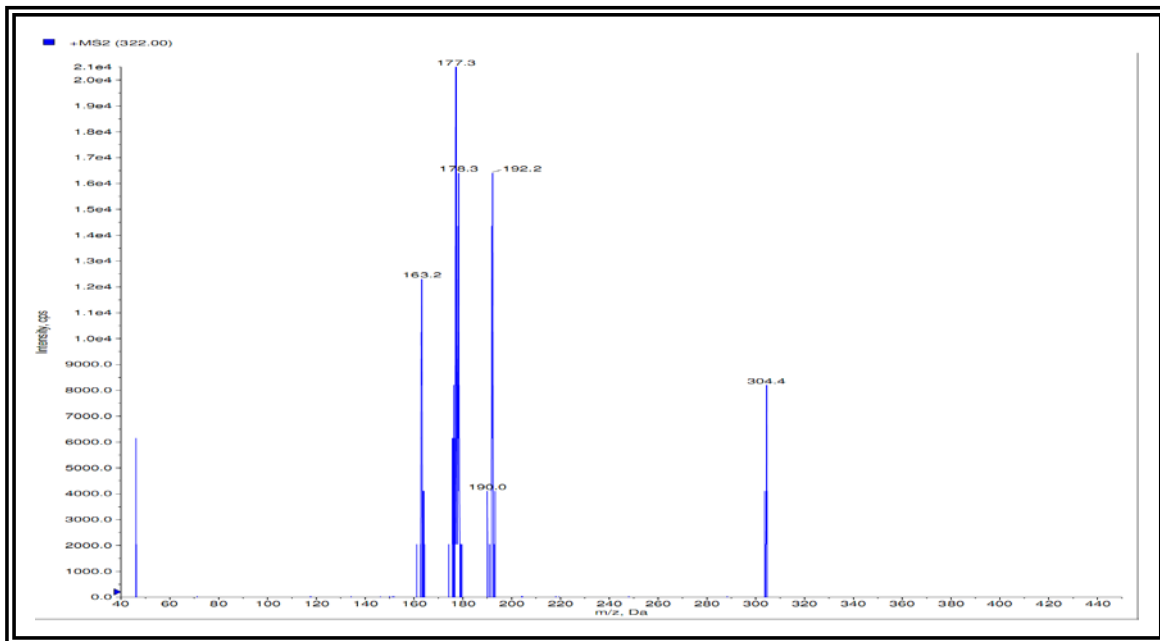


FIGURA 236. Espectro de massas referente ao pico 6 (hyeronimona)

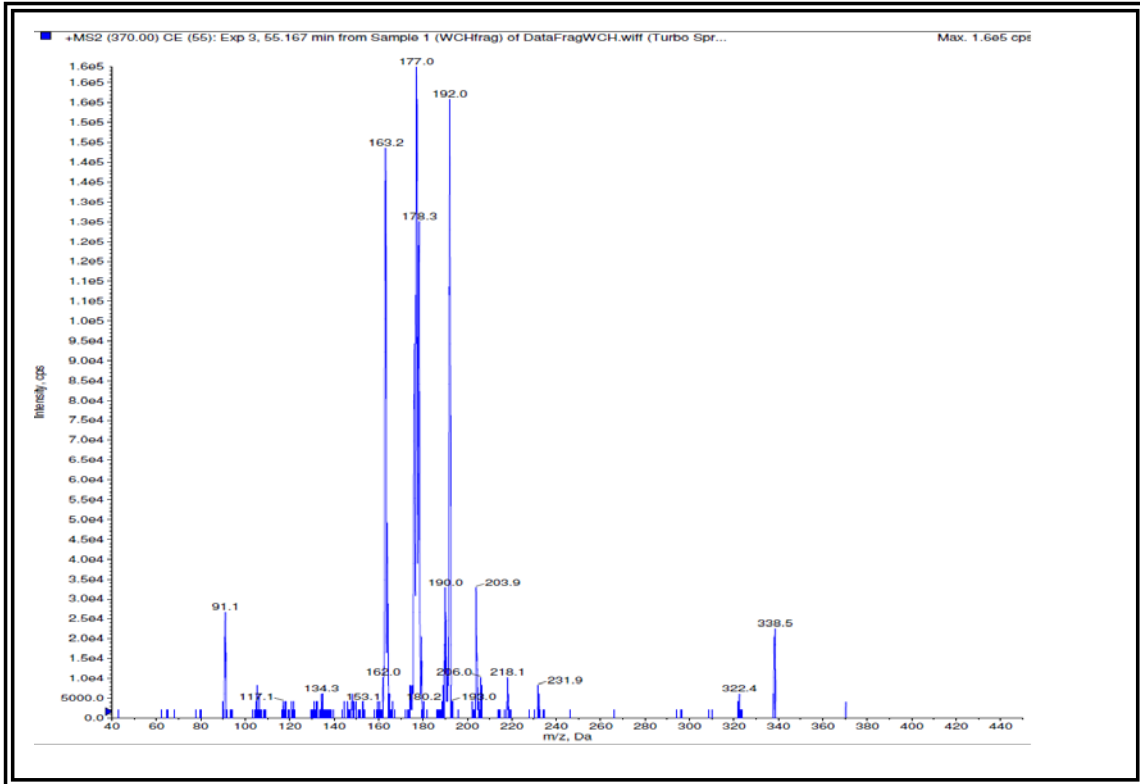


FIGURA 237. Espectro de massas referente ao pico 8 (brachytelona B)

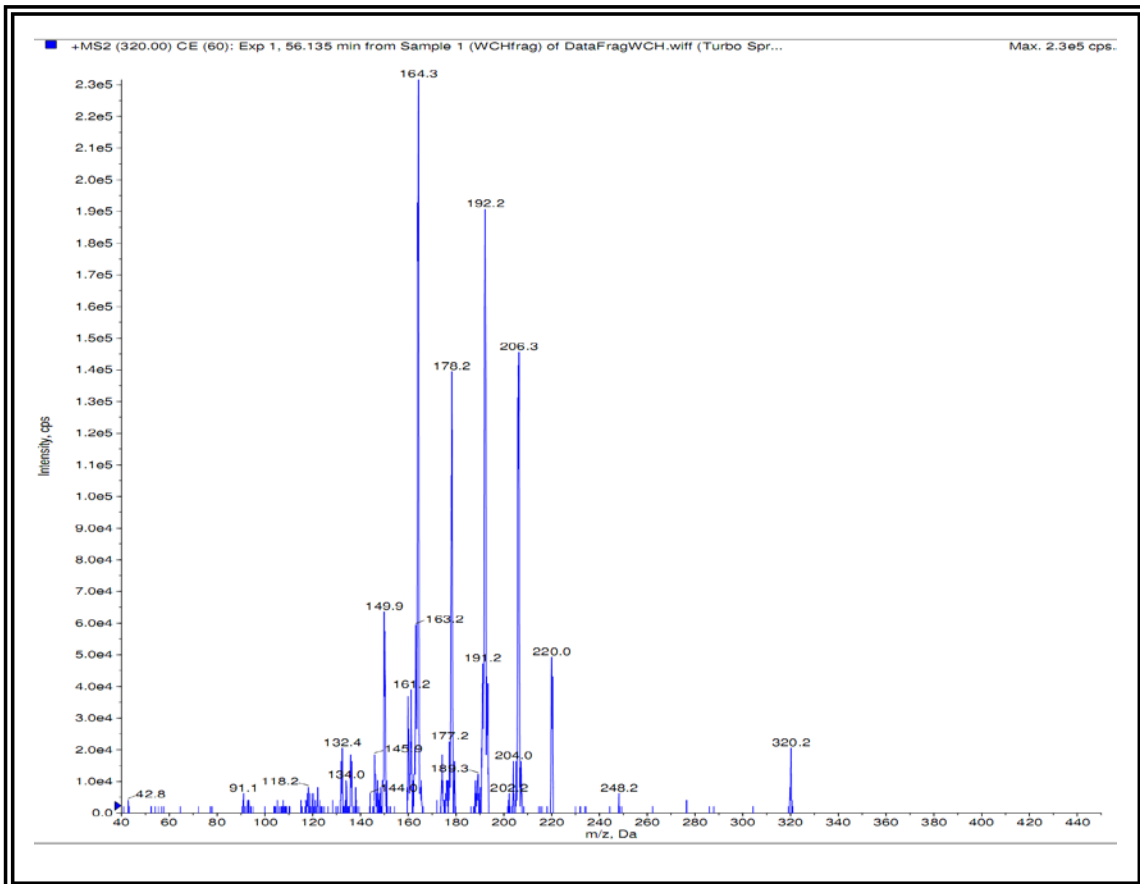


FIGURA 238. Espectro de massas referente ao pico 10 (antidesmona)

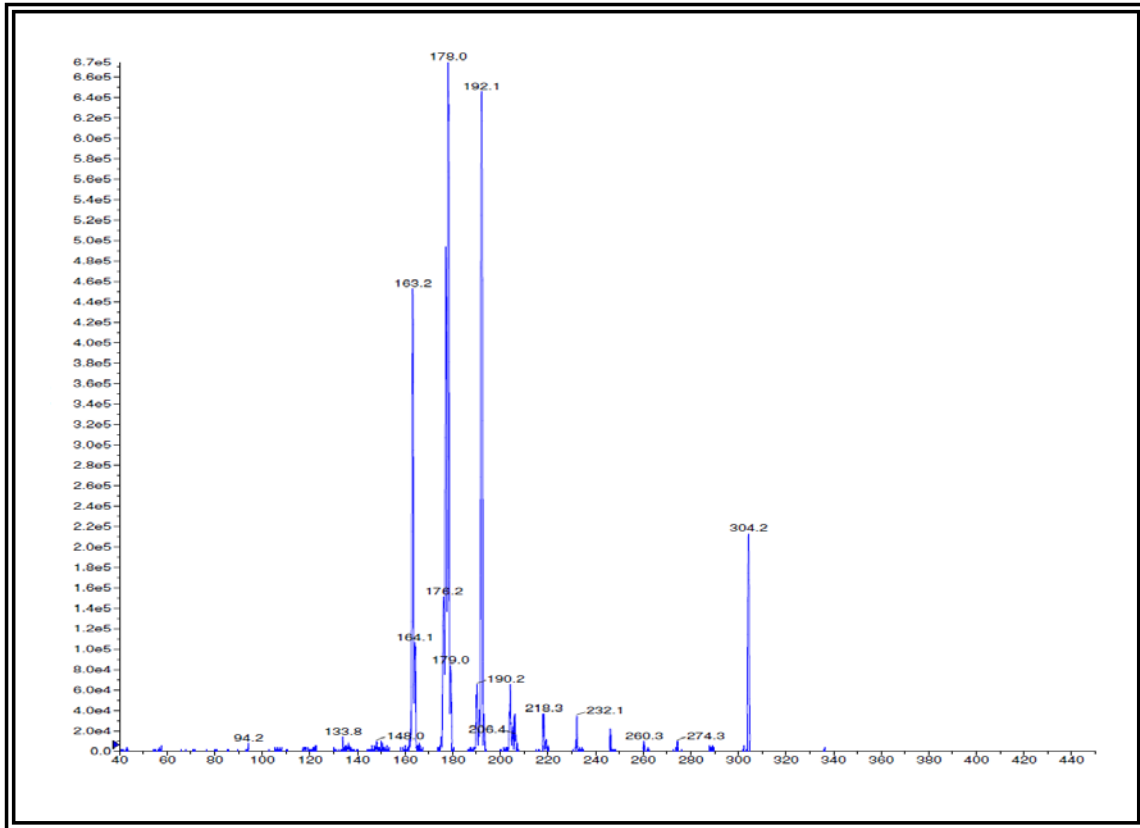


FIGURA 239. Espectro de massas referente ao pico 11 (brachytelona C)

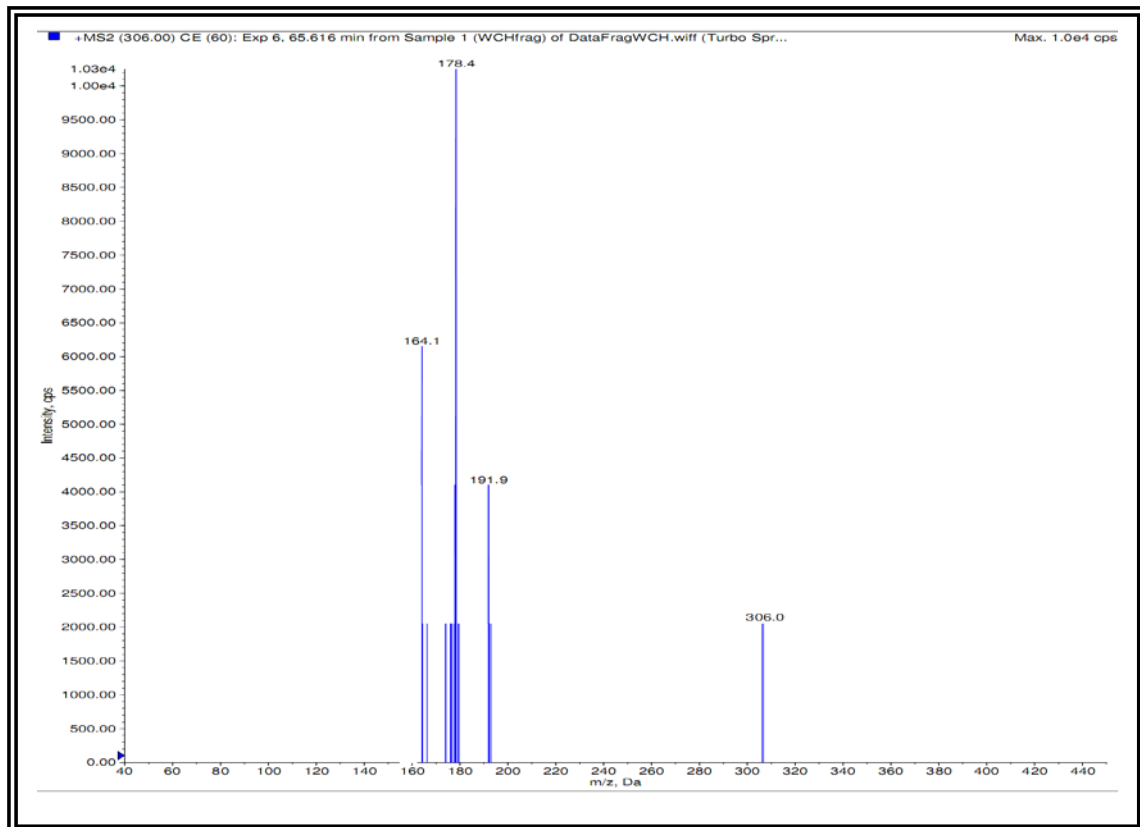


FIGURA 240. Espectro de massas referente ao pico 12 (desóxi-antidesmona)

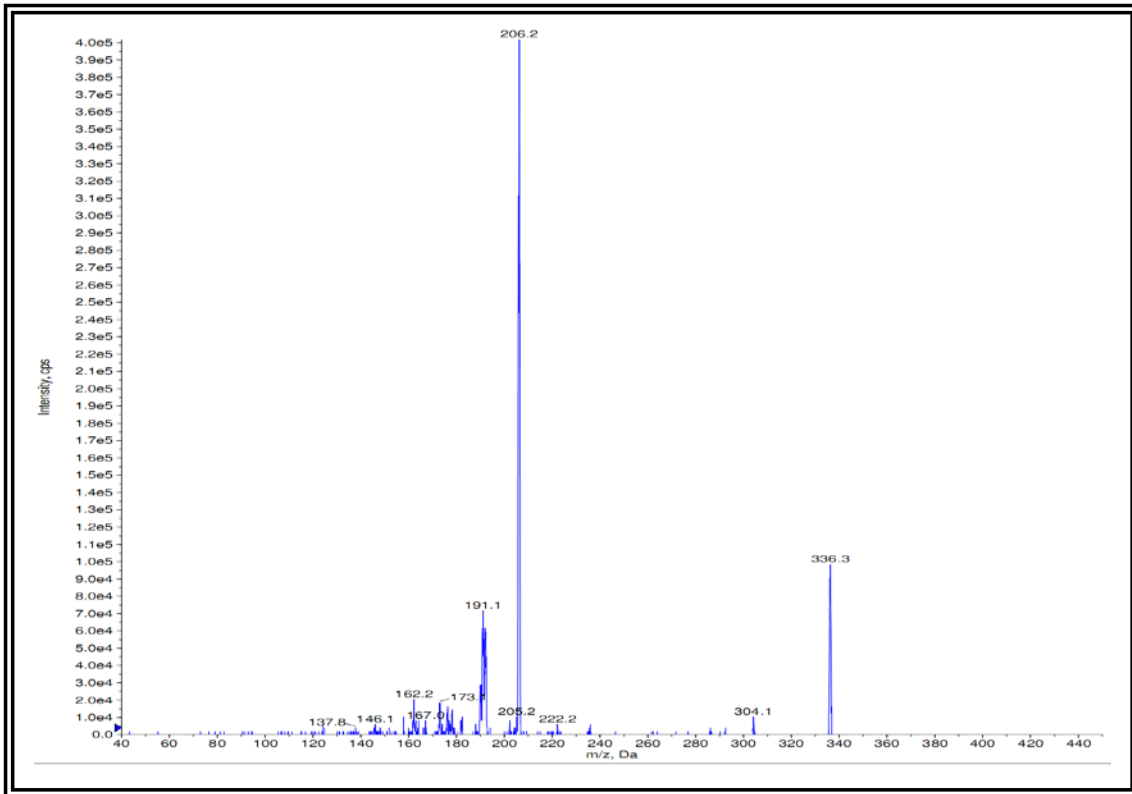


FIGURA 241. Espectro de massas referente ao pico 13 (chamaedrona)

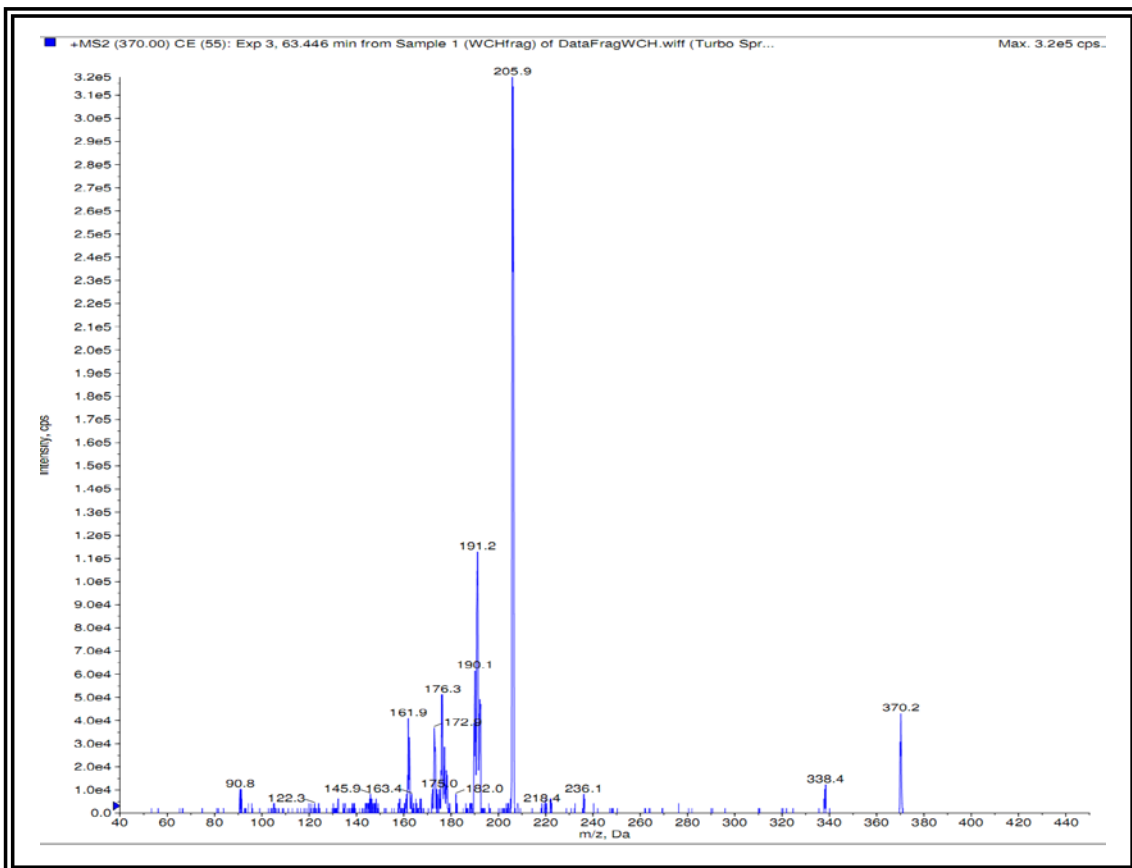


FIGURA 242. Espectro de massas referente ao pico 14 (brachytelona A)

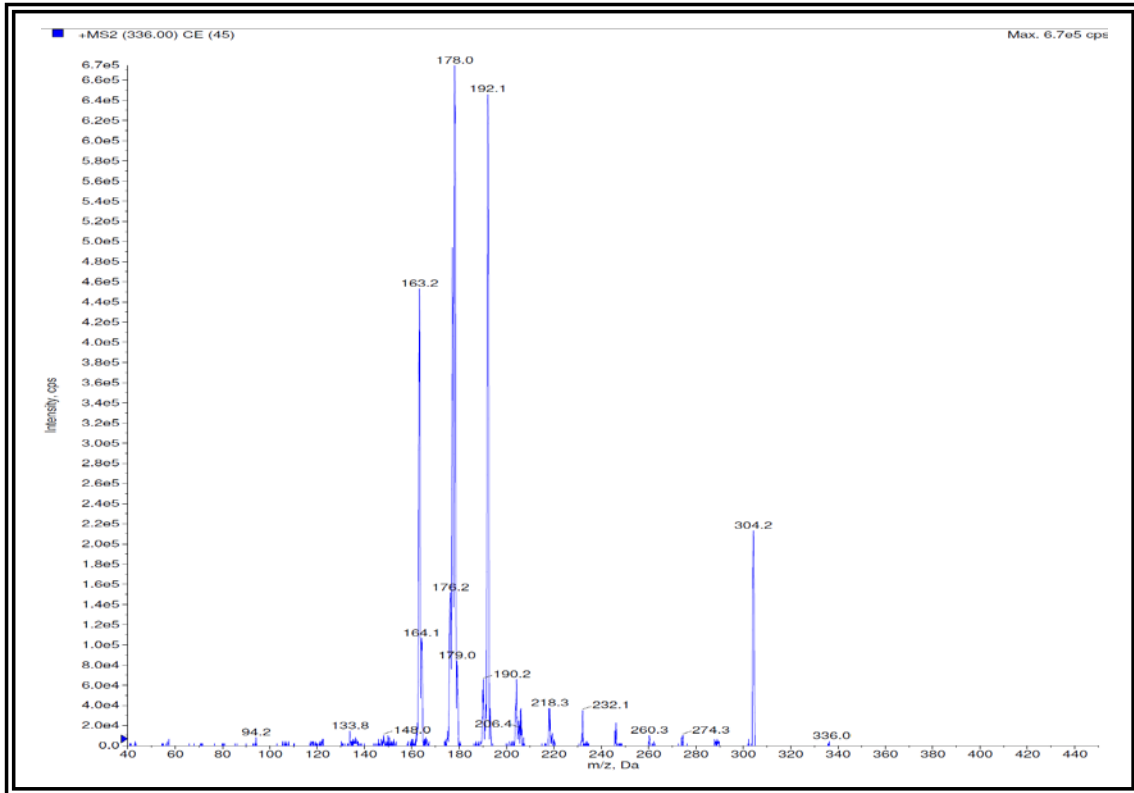


FIGURA 243. Espectro de massas referente ao pico 15 (metil-heronimona)

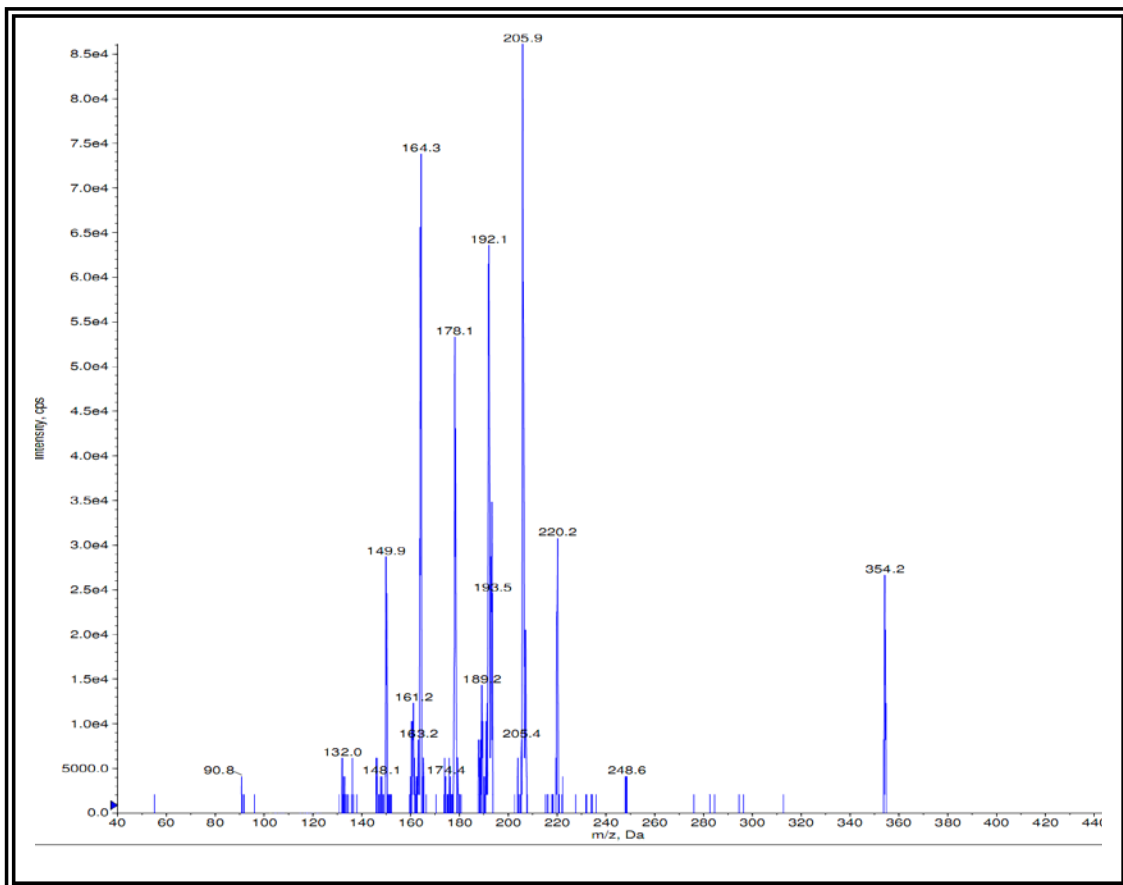


FIGURA 244. Espectro de massas referente ao pico 16 (w-antidesmona)

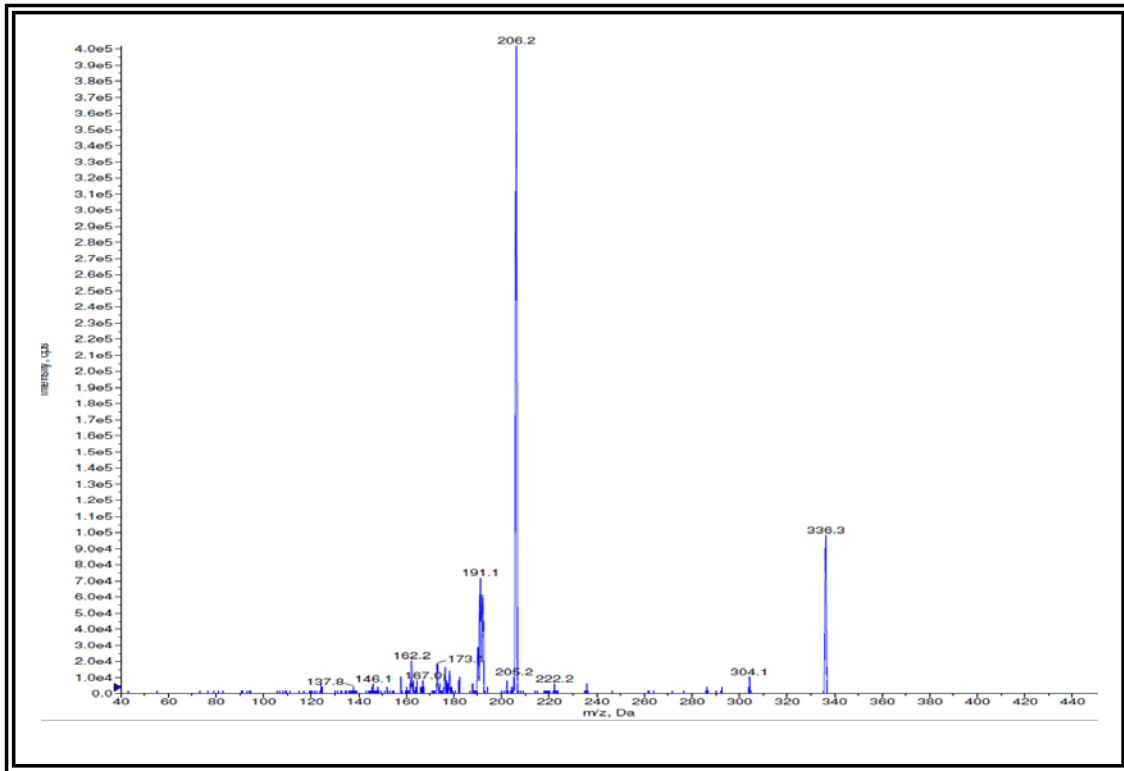
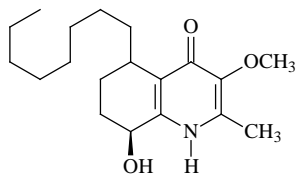
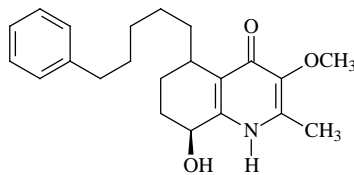


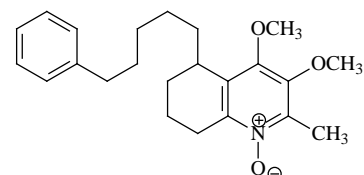
FIGURA 245. Espectro de massas referente ao pico 17 (brachytelona D)



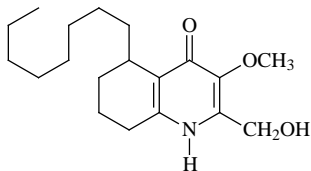
Pico 6 (A-4)



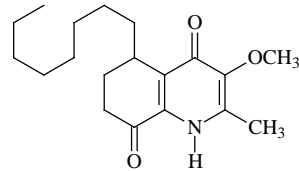
Pico 7 (A-28)



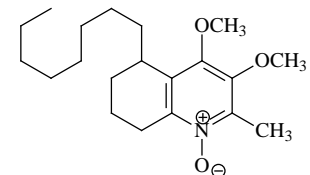
Pico 8 (A-6)



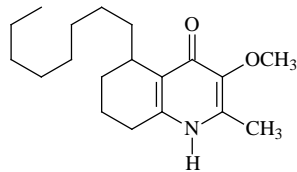
Pico 9 (A-29)



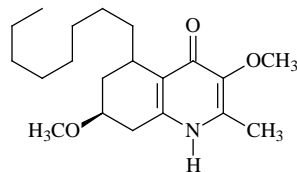
Pico 10 (A-1)



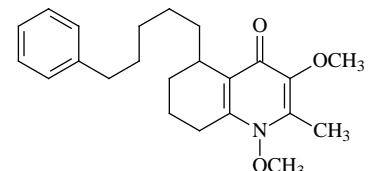
Pico 11 (A-5)



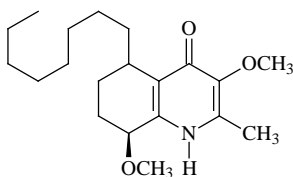
Pico 12 (A-22)



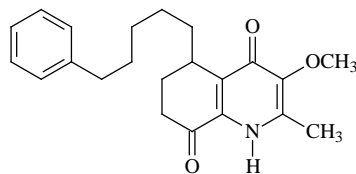
Pico 13 (A-3)



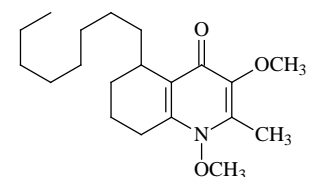
Pico 14 (A-2)



Pico 15 (A-21)



Pico 16 (A-19)



Pico 17 (A-20)

## 6. Significância quimiosistemática

Como visto anteriormente na revisão da literatura, os primeiros estudos químicos de espécies dos gêneros *Waltheria* e *Melochia* apontavam os alcaloides ciclopeptídicos como marcadores quimiosistemáticos para estes dois gêneros, sendo de ocorrência comum os alcaloides adoutina X (1), Y (2), Z (3) e Y' (4), scutianina B (7), franganina (5) e frangulanina (6).

Entretanto após o isolamento dos alcaloides melochinona (17) de *M. tomentosa* e melochininona (21) de *M. pyramidata*, ambos na década de 1970, poderia-se sugerir a presença destes alcaloides quinolônicos como marcadores quimiotaxonômicos diferenciais entre *Waltheria* e *Melochia*.

Brigmann e colaboradores após estudarem a biossíntese do alcaloide antidesmona (22) a partir de culturas de células de *Antidesma membranaceum*, sugeriram que a melochininona (21) poderia ser um precursor comum da antidesmona e que a melochinona (22) teria parte da sua estrutura com biogênese análoga a antidesmona (BRINGMANN *et. al.*; 2000).

Em 2005, Hoelzel e colaboradores reportaram o isolamento do alcaloide quinolônico waltheriona A, a partir de *W. douradinha*, sendo este também com um anel de sete membros geminado ao sistema aromático, abrindo caminho para novas evidências quimiosistemáticas dentro da tribo Hermannieae (HOELZEL *et. al.*; 2005)

O isolamento do alcaloide antidesmona de *M. chamaedrys* (DIAS *et. al.*; 2007b) e *W. douradinha* (GRESSLER *et. al.*; 2008) abriram caminho para a discussão em quimiosistemática abordada neste trabalho e contemplada pelos objetivos específicos propostos.

Neste momento é válido ressaltar a hipótese de uma possível semelhança evolutiva entre os gêneros *Waltheria* e *Melochia* com espécies da tribo Antidesmeae (família Phyllantaceae, ex. Euphorbiaceae), citando *Antidesma* e *Hyeronima*, devido ao fato de que estes quatro gêneros possuem relatos de ocorrência do alcaloide antidesmona (22), um marcador quimiosistemático da tribo Antidesmeae (BUSKE *et. al.*; 2002).

Neste trabalho foi possível contribuir com o conhecimento quimiosistemático da tribo Hermannieae. A espécie *Waltheria brachypetala* também é biossintetizadora do alcaloide antidesmona (22) e de vários outros análogos, o que aumenta as evidências de uma semelhança evolutiva entre as tribos Hermannieae (Malvaceae) e Antidesmeae (Phyllantaceae).

Além do alcaloide waltheriona A (A16), cuja ocorrência já havia sido reportada também para o gênero *Melochia* (EMILLE *et. al.*; 2007) e (DIAS *et. al.*; 2007a), outros análogos como as waltherionas B (A17), C (A12), D (A13) e 10-hidróxi-waltheriona D (A18) foram isolados a partir de *W. brachypetala*, sendo possível afirmar que, pelo menos a waltheriona A é um marcador quimiosistemático para a tribo Hermannieae. Entretanto não se descarta a possível ocorrência das demais “waltherionas” em ambos os gêneros.

Vale ainda destacar neste trabalho a identificação do alcaloide melochinona (**A26**), confirmando que este é um precursor das waltherionas e um possível precursor comum da antidesmona.

Entre os alcaloides alquil-quinolonas destaca-se a antidesmona (**A1**) com ocorrência comum entre os gêneros *Waltheria* e *Melochia* a partir dos últimos estudos químicos reportados na literatura. Entretanto, outros derivados da antidesmona como desóxi-antidesmona (**A22**), hyeronimona (**A4**), metil-hyeronimona (**A21**) e N-metil-antidesmona (**A7**) também são de ocorrência comum na tribo Antidesmeae, também foram isolados de *W. brachypetala* apontando maiores evidências de semelhanças evolutivas entre o gênero *Waltheria* e a tribo Antidesmeae (Phyllantaceae).

Além da antidesmona, outro alcaloide alquil-quinolônico comum entre os gêneros *Waltheria* e *Melochia* parece ser a chamaedrona (**A3**), até o momento não reportada em Antidesmeae.

Uma nova classe de alcaloides aril-alquil-quinolonas foi estruturalmente elucidada neste trabalho. Sendo para esta classe isolados três alcaloides: brachytelona A (**A2**) e B (**A6**) e w-antidesmona (**A19**), e outro identificado por espectrometria de massas, a w-hyeronimona (**A28**). Entretanto, apenas com o estudo de *W. brachypetala* não é possível afirmar que estes alcaloides são exclusivos desta planta ou que estes podem diferenciar quimicamente os gêneros *Waltheria* e *Melochia*.

O isolamento de cumarino-lignanas a partir de *W. brachypetala* é um resultado importante a ser considerado, uma vez que, esta classe de metabólitos secundários já havia sido reportado anteriormente para *M. chamaedrys* (DIAS, *et. al.*; 2007a). Além do mais, cumarino-lignanas são de ocorrência comum no gênero *Antidesma* (CHENG *et. al.*; 2007).

Sendo assim, é possível neste momento, considerar que além dos alcaloides ciclopeptídicos e quinolônicos, as cumarino-lignanas também são metabólitos de importância quimiosistemática dentro da tribo Hermannieae. Além disso, essa classe de metabólitos também reforça a hipótese de semelhança evolutiva entre espécies das tribos Hermannieae e Antidesmeae.

A química da tribo Hermannieae mostra-se bastante diferente das outras tribos da família Malvaceae. Entretanto, apenas com base nos resultados de fitoquímica, não é possível propor qualquer reclassificação da tribo Hermannieae dentro da família Malvaceae, ou até mesmo, propor uma mudança de classificação para a família Phyllantaceae, haja visto a necessidade de se considerar as características morfológicas e filo-genéticas dos gêneros pertencentes a estas tribos. Mas não descarta-se a semelhança co-evolutiva entre estas duas tribos.





## **PARTE II**

### **Atividades Anticolinesterase e Antifúngica**

Este capítulo está dividido em:

- ✓ Revisão da literatura;
- ✓ Procedimentos Experimentais;
- ✓ Objetivos
- ✓ Resultados e discussões:

## 1. Revisão da Literatura

### 1.1. A enzima Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima envolvida no controle da concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh) que está diretamente ligado às sinapses colinérgicas. A acetilcolina é fundamental na transmissão de impulsos nervosos que estão associados ao controle motor e cognitivo nos seres humanos, entretanto, a sua ação é devidamente controlada pela acetilcolinesterase, proporcionando o devido funcionamento do sistema nervoso colinérgico (DVIR *et. al.*; 2010).

Em termos químicos, a ação da acetilcolinesterase está relacionada com a quebra da ligação entre os grupos acetil e colina, levando a uma diminuição na transmissão dos impulsos nervosos do sistema colinérgico.

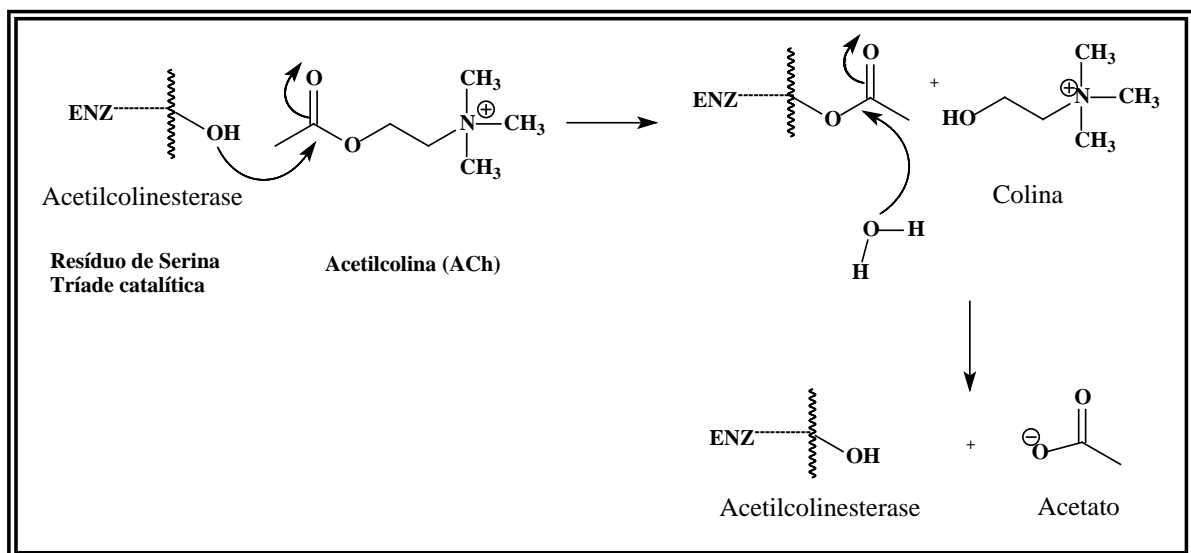


FIGURA 1. Hidrólise da acetilcolina promovida pela AChE

Entretanto, altos níveis de AChE podem levar a um desequilíbrio da concentração de acetilcolina nas fendas sinápticas e conseqüentemente da transmissão dos impulsos nervosos acarretando sérios danos nos seres humanos, como a disfunção motora e de cognição. Entre as deficiências de cognição podem-se citar sintomas iniciais como: perda da atenção, até os sintomas mais graves como perda da memória, demência e a chamada Doença de Alzheimer (DA) (FRANCIS *et. al.*; 1999).

Os inibidores da AChE (IAChE) têm sido usados no tratamento de várias desordens neuromusculares e têm fornecido a primeira geração de drogas para o tratamento da doença de Alzheimer, sendo a maioria destes, produtos naturais ou protótipos de produtos naturais (FRAGA *et. al.*; 2004).

A Doença de Alzheimer (DA) é causada devido a uma diminuição da concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas fendas sinápticas, que leva a um desequilíbrio nas neurotransmissões colinérgicas corticais ocasionando os sintomas da DA, tais como: depressão, perda de funções motoras e de cognição, esquecimento e demência. Tais sintomas causam enorme impacto ao indivíduo, família, sociedade e aos sistemas de saúde (FRANCIS *et. al.*; 1999). O tratamento da doença envolve cuidados familiares, que na maioria das vezes acarreta um enorme estresse emocional, psicológico e financeiro às famílias, uma vez que o tratamento medicamentoso é caro e o paciente perde progressivamente sua memória, esquecendo-se dos seus familiares.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a expectativa de vida dos brasileiros passou de 69,3 anos em 1997 para 72,7 anos em 2007. A melhora na expectativa de vida e a diminuição nas taxas de mortalidade foram responsáveis por um aumento considerável no número de idosos no Brasil, sendo que os maiores de 60 anos somam cerca de 10,5% da população, o que representa cerca de 20 milhões de pessoas. O envelhecimento da população proporciona o aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas, entre estas as demências, sendo a Doença de Alzheimer a causa mais frequente (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default.shtm>, acesso em 12 de janeiro de 2012).

Ainda segundo o IBGE, estima-se a prevalência de DA no Brasil em cerca 1,5 milhões de pessoas, com incidência de mil novos casos por ano, o que representa um alarme aos serviços de saúde e a sociedade como um todo, uma vez que o tratamento medicamentoso é caro e o acompanhamento familiar é essencial e geralmente acompanhado de grande estresse emocional (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativaalzheimer/default.shtm>, acesso em 12 de janeiro de 2012).

Foram realizados diversos ensaios clínicos com os IChE no tratamento da DA, sendo a fisostigmina (1) um dos primeiros fármacos sintéticos testados e disponibilizados no mercado. A tacrina (2) foi a primeira droga a ser testada e clinicamente usada. Essa droga foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1993 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1994. O grande inconveniente dessa droga é a complexa posologia de quatro tomadas diárias e a toxicidade hepática, que fez com que ela caísse em desuso a partir do surgimento dos IChE de gerações mais novas (FRAGA *et. al.*; 2004).

O donepezil (3) foi o segundo IChE a surgir. Foi aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000. Essa droga tem como vantagem a posologia cômoda de uma vez ao dia, porém, como tem uma meia-vida muito longa, que pode chegar a até 73 horas, isso é apontado como desvantagem, assim como toda droga de meia-vida longa usada em paciente idoso (YUKI *et. al.*; 2000).

A rivastigmina (**4**), terceira droga da classe, tornou-se disponível na Europa em 1997 e, em 1998, foi liberada pela ANVISA, sendo liberada pela FDA apenas em 2000. Essa droga tem uma vantagem adicional, pois ela inibe também a butirilcolinesterase (BuChE). Acredita-se que, à medida que a DA evolui, maior é a participação da BuChE na degradação enzimática da acetilcolina na fenda sináptica (YUKI *et. al.*; 2000).

A galantamina (**5**) é a droga mais recente desse grupo, aprovada pela FDA e pela ANVISA em 2001, sendo esta um alcalóide isolado de várias espécies de plantas da família Amarillidaceae. A galantamina tem um efeito adicional, que é a atividade moduladora alostérica sobre os receptores nicotínicos, possibilitando o aumento da transmissão colinérgica e um possível efeito neuroprotetor questionável (KARASOVA *et. al.*; 2000).

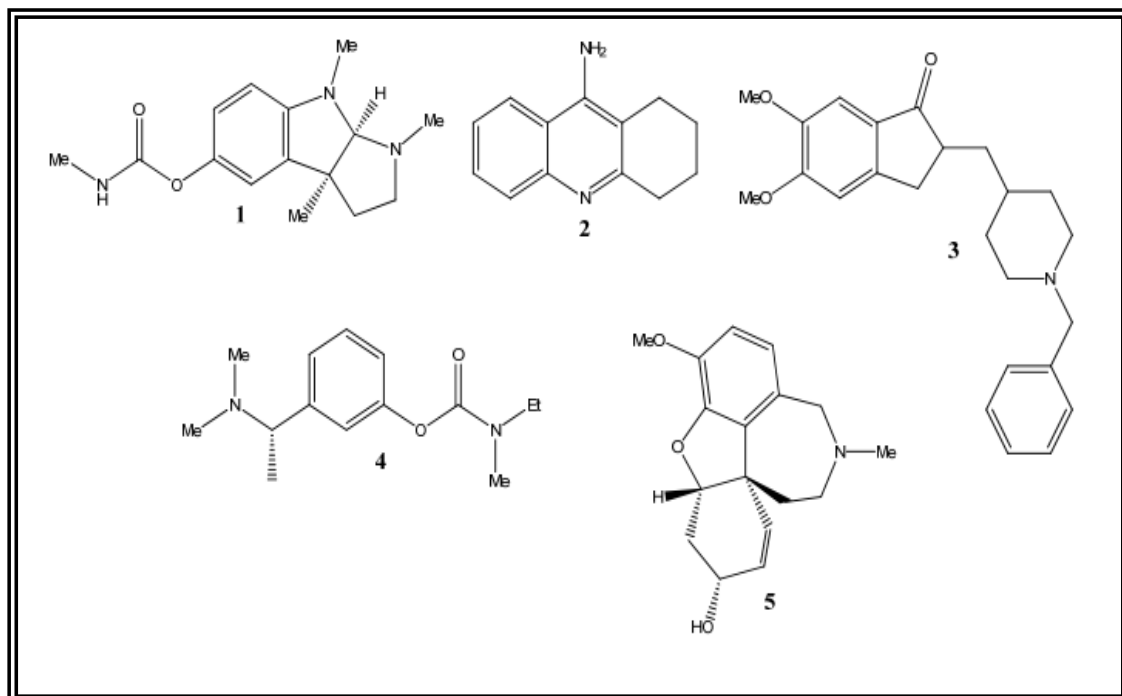


FIGURA 2. Inibidores da AChE disponíveis no mercado farmacêutico

Atualmente destaca-se o alcaloide huperzina A (**6**) isolado da planta medicinal chinesa *Huperzia serrata*, como promessa no tratamento da doença de Alzheimer, como inibidor reversível da AChE. Nos Estados Unidos, a Huperzina A foi liberada pela FDA para ser comercializada em 2011, em substituição ao donopesil e a tacrina, devido aos efeitos colaterais provocados por estes dois fármacos.

Lima e colaboradores relataram a atividade anticolinesterase eritrocitária de alcaloides isolados das folhas de *Waltheria brachypetala* e verificaram uma atividade significativa e a nível do fármaco fisostigmina (LIMA *et. al.*; 2009). Dada a utilização popular do chá de raízes de *W. brachypetala* para o tratamento de sintomas de

perda de memória, cognição e atenção, torna-se relevante a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase a partir desta planta.

Uma vez que os principais inibidores da enzima AChE disponíveis no mercado pertencem à classe dos alcalóides, muitos pesquisadores têm focado sua atenção no estudo de plantas visando a obtenção de alcalóides inéditos que possam servir de fármaco ou como um protótipo de fármaco inibidor desta enzima. Isto é evidenciado quando verifica-se os artigos publicados referente a busca de novos protótipos de IChE, a maioria destes mantém o foco na busca por novos alcalóides, sendo a família Amarillidaceae a mais estudada, uma vez que os alcalóides desta família possuem similaridade estrutural a galantamina (ANDRADE *et. al.*; 2005) (TREVISAN *et. al.*; 2003) (VIEGAS JR *et. al.*; 2005) (SERRANO *et. al.*; 2010) (VAN DE MEENT *et. al.*; 2010).

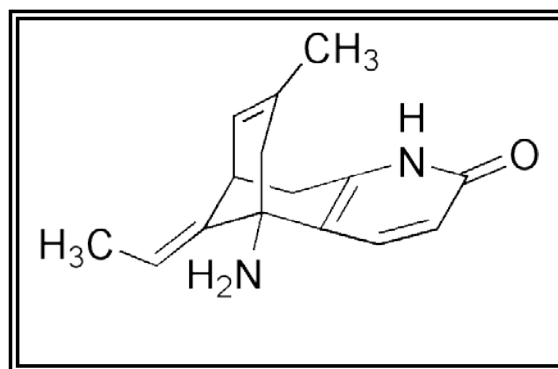


FIGURA 3. Alcaloide huperzina A (6)

## 1.2. O fungo *Guignardia citricarpa* e a Mancha Preta do Citros (MPC)

A Mancha Preta do Citros (MPC) é uma doença citrícola caracterizada pela presença de pintas pretas na casca do fruto, com distribuição uniforme, que causam, além da depreciação estética do fruto, causa a queda prematura destes prejudicando a sua produção (KLOTZ, 1978) (SPÓSITO, 2003). Esta doença atinge principalmente as laranjas doces, limoeiros, tangerinas e suas variedades (RODRIGUES *et. al.*; 2007).

O agente causador da MPC é o fungo *Guignardia citricarpa*, sendo este relatado pela primeira vez por (MACALPINE, 1899) sendo inicialmente caracterizado pela sua forma assexuada, designada por *Phyllosticta citricarpa*. Kiely descobriu a fase sexuada deste fungo caracterizando-o como *Guignardia citricarpa* (GLIENKE-BLANKO *et. al.*; 2002).

O primeiro relato da MPC foi na Austrália em 1895, sendo posteriormente verificado na África do Sul em 1925 e no Brasil em 1940, sendo que o Brasil possui condições climáticas favoráveis ao estabelecimento da doença, tendo se verificado casos em estados da região sul e até mesmo na região norte, no estado do Amazonas (FEICHTENBERGER *et. al.*; 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e maior exportador de sucos de laranja do mundo, sendo assim, doenças de citros como a MPC são de grande relevância econômica. A MPC é considerada como uma praga quarentenária A-1 na Europa e Estados Unidos, assim, quando é detectado na alfândega de países da União Européia apenas um fruto com MPC, todos os demais frutos são devolvidos, o que representa uma enorme perda ao setor de produção de citros do Brasil. A figura 4 apresenta os sintomas de frutos de citros infectados por *G. citricarpa* e com sintomas de MPC.

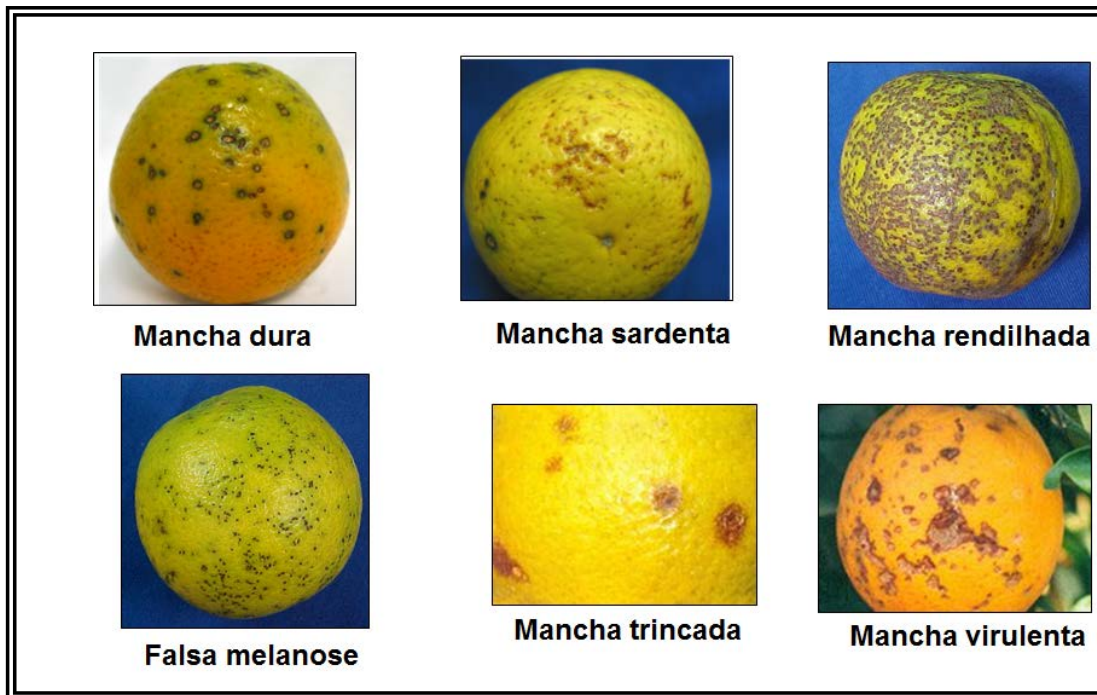
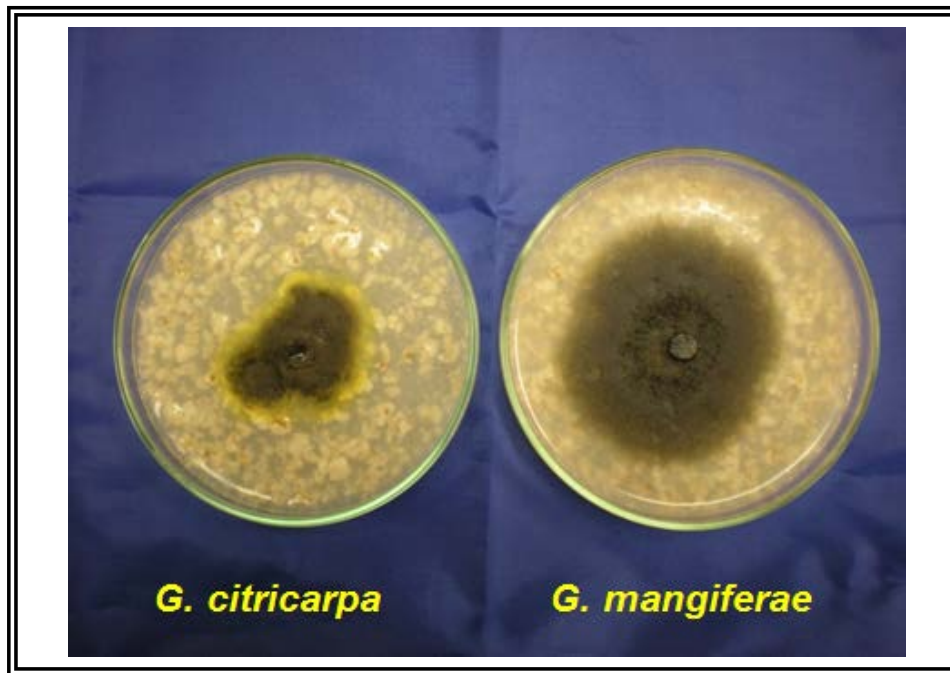


Figura adaptada de (FREITAS, 2009)

FIGURA 4. Sintomas da MPC

Em citros, é possível encontrar duas espécies de fungo do gênero *Guignardia*, *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, sendo o segundo não fito-patogênico. A diferenciação entre ambos pode ser realizada por análise morfológica e por análise de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Em meio aveia, *G. citricarpa* é caracterizada pela formação de um alo amarelo, ausente em *G. mangiferae*, como pode-se observar na figura 5 (TOFFANO, 2009).

A infecção de citros por *G. citricarpa* ocorre por disseminação de esporos deste fungo entre partes da planta através de agentes físicos, como vento e chuvas. Ao encontrar condições climáticas favoráveis ocorre a germinação dos esporos, seguido com a formação do tubo germinativo e dos apressórios, essas estruturas favorecem a penetração dos conídios (fase evolutiva de *G. citricarpa*) nos tecidos vegetais levando posteriormente a formação da massa micelial e desenvolvimento do fungo nos tecidos da planta, posteriormente aparecem os primeiros sintomas da MPC (MATOS-JÚNIOR *et. al.*; 2005).



Autori  
a de  
Leon  
ardo  
Toffa  
no e  
Evan  
dro  
Prieto

FIGURA 5. *G. citricarpa* e *G. mangiferae* em meio aveia

No Brasil o controle da MPC tem sido realizado através de cobre e fungicidas protetores baseados neste metal, ditiocarbamatos e fungicidas sistêmicos (como os benzimidazois) em combinação ou não e associados ou não a óleos minerais e vegetais (GOES, 2002).

Entretanto, o uso de fungicidas sintéticos têm preocupado o Ministério da Agricultura do Brasil dado ao real efeito tóxico destes compostos a saúde humana, bem como os efeitos ambientais de bioacumulação destes em importantes ecossistemas. Recentemente, o fungicida comercial mais utilizado no Brasil para o controle da MPC, o carbendazin foi retirado do mercado devido a estudos que demonstraram o potencial efeito carcinogênico deste composto em baixas concentrações em linhagens de células humanas.

Assim, a busca por produtos naturais com potencial efeito fungitóxico sobre *G. citricarpa* tem grande importância, haja vista a relevância econômica da MPC, bem como a necessidade de fungicidas que sejam menos agressivos ao homem e ao meio ambiente.

O grupo de pesquisa de Produtos Naturais da UFSCar tem reunido esforços na busca de produtos naturais com atividade fungitóxica sobre *G. citricarpa*. Tanto nos estudos realizados por PASQUALOTO (2011) e FREITAS (2009) visando a busca por produtos naturais fungitóxicos a *G. citricarpa* a partir de plantas do gênero *Hortia* (Rutaceae) apontaram o alcaloide 4-metoxi-N-metil-2-quinolona como a substância mais potente, inibindo cerca de 45% o crescimento micelial, 98% a germinação de esporos e 91% a formação de apressórios. Já CERQUEIRA (2011) verificou que entre as substâncias isoladas de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae), o triterpeno 3- $\beta$ -hidroxi-glutin-5-eno foi a substância que apresentou melhor resultado de fungitoxicidade, inibindo cerca de 40% o crescimento micelial e 90% a germinação de esporos e formação de apressórios. Todos os compostos citados foram testados na concentração de 100  $\mu$ g/ml.



### 1.3. Plantas como fonte de agentes antifúngicos

As plantas estão a todo o momento tentando sobreviver a diversas condições ambientais adversas, como as próprias condições climáticas e suas variações, mudanças ambientais causadas por ações antrópicas, bem como de condições adversas devido ao ataque constante por animais, insetos e microorganismos (PALOMBO *et. al.*; 2001).

Uma das formas de defesa que as plantas possuem diante de todas as adversidades do seu meio ambiente é através do seu metabolismo secundário, onde, através deste, uma planta pode produzir substâncias tóxicas contra agentes patógenos. Neste sentido, plantas medicinais têm sido fonte de uma grande variedade de substâncias por muitos séculos, sendo utilizados tanto seus extratos brutos padronizados como substâncias puras (JONES *et. al.*; 2006).

Plantas do gênero *Waltheria* são comumente utilizadas na medicina popular como antifúngicos (HOELZEL *et. al.*; 2005). Destaca-se aqui as folhas de *Waltheria brachypetala* Turcz, as quais são utilizadas na fabricação de sabões anti-sépticos, e durante muitos anos foram utilizadas para prevenir infecções nos umbigos de recém nascidos.

O grupo de pesquisa do professor Ademir Farias Morel da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) estudou durante cerca de uma década a planta medicinal *Waltheria douradinha* Saint. Hillare visando a busca de alcaloides com possível atividade anti-microbiana, na tentativa de justificar o intenso uso desta planta na medicina popular do Rio Grande do Sul. Estes estudos levaram ao isolamento de vários alcaloides desta espécie, entretanto estes alcaloides não apresentaram atividade anti-microbiana relevante nas bactérias testadas, valendo ressaltar que nestes estudos nenhum alcaloide isolado foi testado contra fungos (GRESSLER *et. al.*; 2008).

Emille e colaboradores isolaram de *Melochia odorata* os alcaloides frangulanina e waltheriona A através de um estudo químico bio-guiado, sendo relatado uma considerável atividade antifúngica destes alcaloides contra fungos patógenos humanos (EMILLE *et. al.*; 2008)

## 2. Objetivos

Considerando o uso popular de *Waltheria brachypetala* Turcz na medicina popular para o tratamento de perda de memória e melhoria da cognição e como agente anti-fúngico, constituem-se como objetivos desta segunda parte do trabalho:

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade anticolinesterase e antifúngica de extratos e substâncias puras do caule e da raiz de *Waltheria brachypetala* Turcz.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase de extratos e substâncias puras do caule e da raiz de *W. brachypetala*;
- ✓ Calcular os valores de IC<sub>50</sub> para as substâncias com atividade inibitória da AChE igual ou superior a 80%;
- ✓ Avaliar a atividade fungi-tóxica dos extratos e alcaloides isolados de *W. brachypetala* com relação a inibição do crescimento micelial, inibição da germinação de esporos e inibição da formação de apressórios do fungo *Guignardia citricarpa*;
- ✓ Determinar o DL<sub>50</sub> dos alcaloides com atividade igual ou superior a 90%; com relação à inibição de *G. citricarpa*;
- ✓ Contribuir para o conhecimento do potencial biológico desta espécie.

### 3. Procedimentos Experimentais

#### 3.1. Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase

Os ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase foram realizados no Laboratório de Fotoquímica e Química Inorgânica Biológica (LAFIB) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos sob a orientação da professora Dra Rose Maria Carlos.

Este ensaio baseou-se no protocolo de Ellmann (ELLMANN *et. al.*; 1961), onde foram realizadas algumas adaptações. Assim, foram preparadas duas soluções tampões Tris-HCl pH 8,0. A solução tampão A foi preparada adicionando-se 6,700g de Tris-HCl a 700 ml de água destilada, com posterior adição de HCl (1M) até que o pH da solução decrescesse até 8,0. Posteriormente foi adicionado 0,292 g de NaCl e 0,203 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  e completado o volume para 1 litro com água destilada.

A solução tampão B foi preparada adicionando-se BSA (Albumina de Sangue Bovino) em 100 ml da solução tampão A até a concentração de 50  $\mu M$ . Em seguida foram pesados 0,00345g do reagente colorimétrico DTNB e adicionados a um balão volumétrico de 50 ml, sendo posteriormente adicionados 10 ml da solução tampão B e completado o volume com a solução tampão A, formando-se assim a solução C.

Cada substância teve sua massa pesada de acordo com a concentração testada, sendo pesada em um ependorff e solubilizada com 100  $\mu L$  de metanol (grau HPLC) e completado com a solução estoque A até 1 ml.

Em dois ependorffs separados e mantidos em gelo picado foram mantidos a enzima AChE liofilizada em 1 ml da solução A (5U) e o substrato iodeto de acetiltiocolina em diferentes concentrações que variaram de 5 a 100  $\mu M$  em 1 ml de solução tampão A.

Em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico foram adicionados 2,90 ml da solução C (com o DTNB), 100  $\mu l$  do composto a ser testado e 15  $\mu l$  de enzima. Após a adição da enzima foram cronometrados 14 min e 30 segundos, onde neste intervalo foi realizada a leitura do branco em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm. Assim que completou 14 min e 30 seg foram adicionados 100  $\mu L$  de iodeto de acetiltiocolina com homogenização na cubeta e após 30 seg da adição foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, utilizando o modo de avaliação cinético.

Este mesmo procedimento foi realizado com o branco (metanol) afim de subtrair as absorbâncias do metanol e do composto testado, afim de subtrair o efeito do solvente utilizado. Como controle positivo foi utilizado o fármaco tacrina.

A atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase é medida pela diminuição da absorbância da banda em 412 nm que é resultante da reação da

colina com o reagente colorimétrico DTNB, que produz um ânion estável de coloração amarela e que absorve no comprimento de onda de 412 nm.

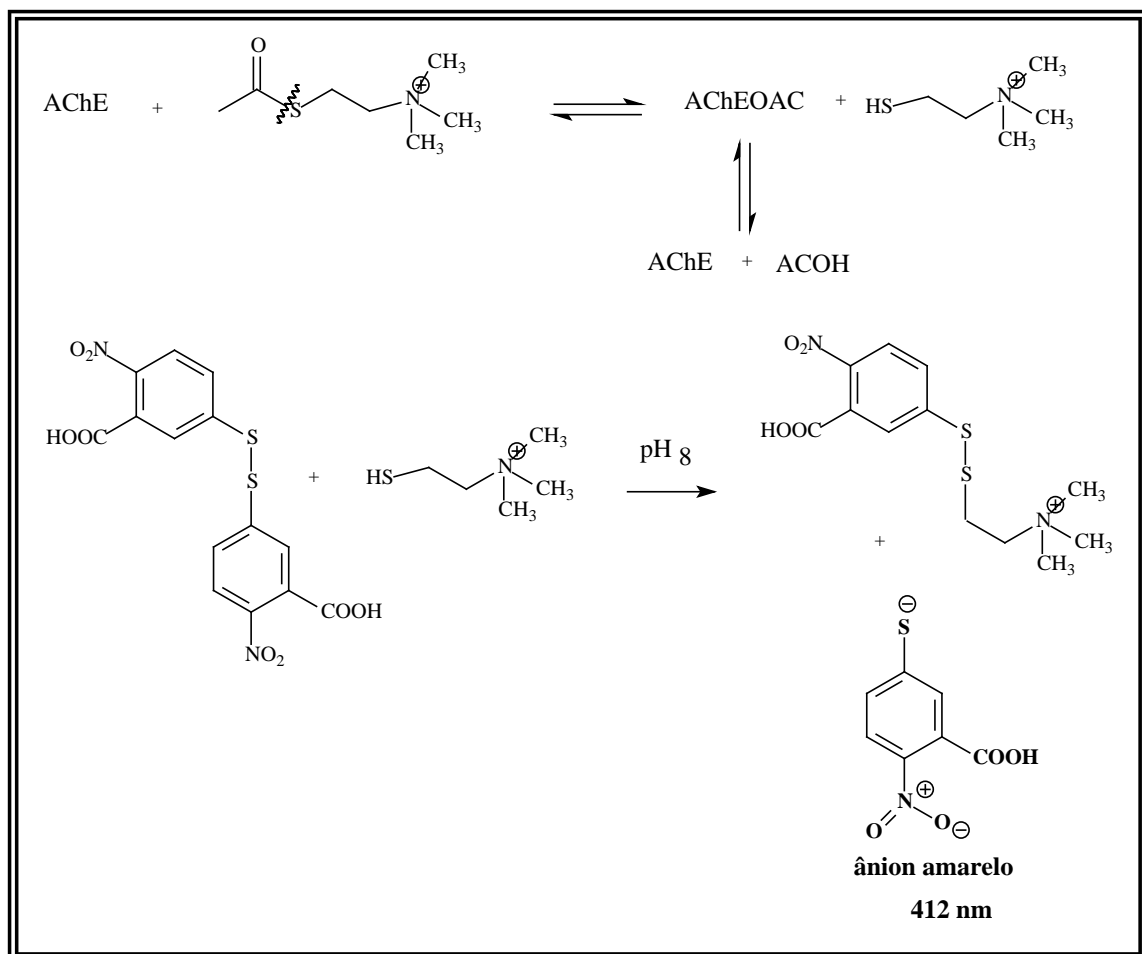


FIGURA 6. Princípio químico do ensaio de Ellmann

### 3.2. Ensaio de inibição do crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*

O ensaio de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* foi realizado no laboratório de bioensaios do grupo de pesquisa em produtos naturais da UFSCar, sob a supervisão do Dr. Leonardo Toffano.

Para este teste foram pesados 2,43 gramas de meio BDA sólido com posterior adição e homogeneização em 60 ml de água destilada para posterior autoclavagem a 120°C (1 atm) por 20 minutos. Após este período esperou-se o meio líquido atingir uma temperatura próxima de 60°C, cada amostra previamente dissolvida em 250 µl de DMSO foram adicionadas ao meio. Posteriormente 12,5 mL de meio BDA líquido fundente foram vertidos em placas de petri também autoclavadas ( $h = 15$  cm;  $d = 7$  cm), sendo este procedimento realizado em capela de fluxo laminar para evitar qualquer tipo de contaminação das placas.

Após a solidificação do meio de cultura nas placas de petri, foram adicionados discos de micélio (0,5 cm de diâmetro) no centro de cada placa. Estas foram então fechadas e identificadas e mantidas em BOD (25°C, fotoperíodo de 12 horas). Para cada amostra, portanto foi realizado o experimento em quintuplicata, inclusive para o controle positivo (carbendazin) e controle negativo (DMSO).

A avaliação da inibição do crescimento micelial foi realizada através de medidas radiais da massa micelial, para cada placa, sendo posteriormente calculadas médias e desvios padrões.

### 3.3. Ensaio de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios

Para a realização deste ensaio uma suspensão de esporos foi obtida do fungo cultivado em meio BDA, sendo obtidos  $10^5$  esporos/ml após contagem com auxílio de microscópio óptico e utilizando-se câmara de Neubauer. Em seguida, 40  $\mu$ L da suspensão de esporos foi vertida em placa de poliestireno, em quadruplicata na mesma placa) e adicionada a cada um 40  $\mu$ L da amostra em cada concentração desejada. As placas de poliestireno foram então fechadas, identificadas e mantidas em BOD por 24 h (25°C, fotoperíodo de 12h). Esse procedimento foi realizado com o controle negativo (DMSO) e controle positivo (carbendazin). Após o período de 24 horas, os esporos germinados e apressórios formados foram contados com auxílio de microscópio óptico em câmara de Neubauer.

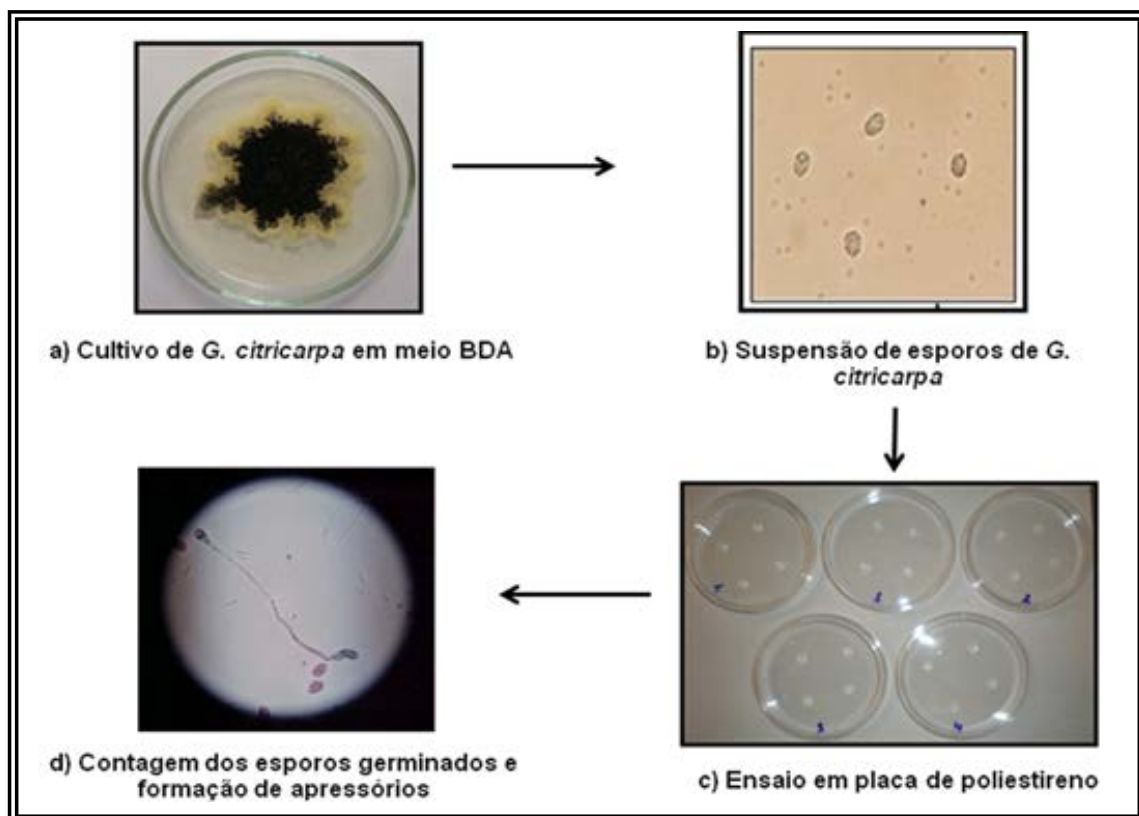


FIGURA 7. Esquema do ensaio de inibição da germinação e da formação de apressórios de *G. citricarpa*

### 3.4. Materiais e Métodos

#### 3.4.1. Materiais e reagentes

- ❖ BDA comercial da acumedia;
- ❖ H<sub>2</sub>O destilada;
- ❖ DMSO grau HPLC, da TEDIA Brazil;
- ❖ DTNB
- ❖ BSA
- ❖ Acetilcolina
- ❖ Enzima acetilcolinesterase de *electrophorus electricus*
- ❖ Lactofenol;
- ❖ Etanol 70%;
- ❖ Placas de Petri ( $\Phi = 9$  cm) e de ( $\Phi = 7$  cm);
- ❖ Placas de poliestireno;
- ❖ Eppendorf BD (1,5 mL);
- ❖ Pipetas volumétricas;
- ❖ Lamínula (18 x 18 mm) (0.13-0.17MM);
- ❖ Paquímetro;
- ❖ Alça de Drigalski;
- ❖ Filme PVC transparente;
- ❖ Câmara de Neubauer New Optik (0,002 mm<sup>2</sup>/0,100 mm);
- ❖ Cubeta de 1c de caminho ótico

#### 3.4.2. Equipamentos

- ❖ Câmara de fluxo laminar Veco VL FS-12M;
- ❖ Estufa com fotoperíodo e termoperíodo / B.O.D Eletrolab;
- ❖ Autoclave vertical Phoenix AV 75;
- ❖ Microscópio óptico (até 1000 x) L 2000A;
- ❖ Balança analítica Modelo AND202.
- ❖ Espectrofotômetro UV-vis DR 5000, Labstore

## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

#### 4.1.1. Atividade de inibição da enzima AChE pelos extratos de *W. brachypetala*

As fases orgânicas obtidas através de partição líquido-líquido do extrato etanólico da raiz e do caule de *W. brachypetala* foram testadas frente à inibição da enzima acetilcolinesterase nas concentrações de 250 e 125 µg/mL.

Como se pode observar no gráfico abaixo, na concentração de 250 µg/ml, tanto as fases em hexano da raiz e caule (WRH e WCH), quanto as fases em diclorometano da raiz e caule (WRD e WCD) apresentaram 100% de inibição da enzima AChE. Já as fases em acetato de etila destas duas partes da planta (WRA e WCA) não apresentaram atividade significativa, inibindo pouco a enzima. Neste teste a tacrina (10 µM) foi utilizada como controle

Uma vez que as fases WRA e WCA apresentaram coloração bastante avermelhada, o que sugere a presença de taninos, possivelmente, a pouca atividade destas fases orgânicas pode estar associadas à presença de taninos, uma vez que é relatado na literatura que taninos têm propriedade de degenerar proteínas.

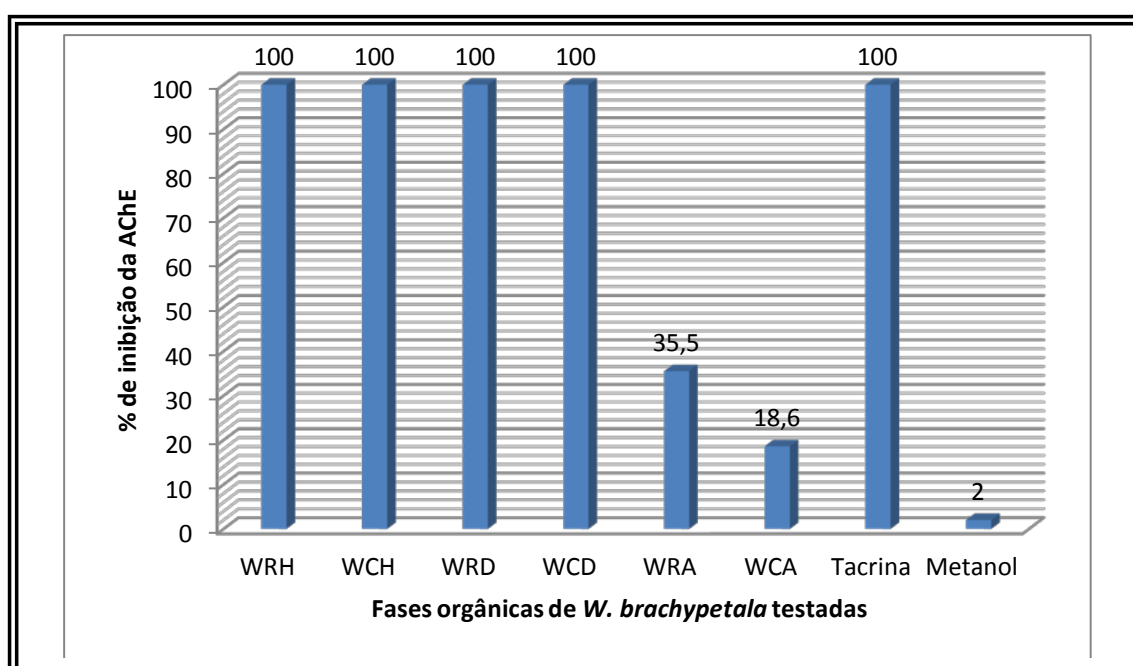


GRÁFICO 1. Porcentagem de inibição da enzima AChE pelas fases orgânicas de raiz e caule de *W. brachypetala* (250 µg/mL).

Na concentração de 125 µg/mL observou-se uma diminuição da atividade de inibição da AChE para todas as fases orgânicas testadas. A diminuição mais significativa ocorreu com as fases WRH e WRD, sendo assim, as fases em hexano (WCH) e diclorometano (WCD) foram as que apresentaram maior potencial de

inibição frente a esta enzima. Estes resultados são bastante relevantes uma vez que na maioria dos artigos com abordagem sobre atividade de extratos frente a AChE, os testes são realizados em concentrações de 500 µg/mL a 1,00 mg/mL.

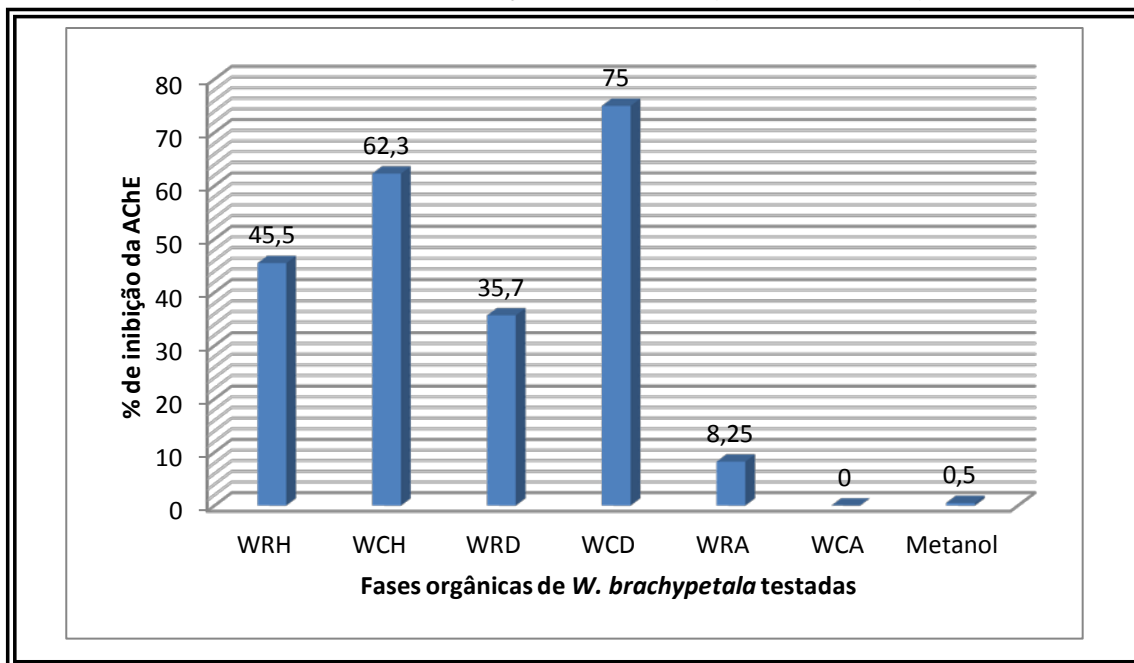


GRÁFICO 2. Porcentagem de inibição da enzima AChE por fases orgânicas de raiz e caule de *W. brachypetala* (125 µg/ml)

#### 4.1.2. Atividade de inibição da AChE pelos alcaloides aril-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos

As fases WRH e WCH apresentaram como alcaloides majoritários as quinolin-4-onas das classes aril-alquil-quinolonas e alquil-quinolonas. Todos os alcaloides testados tiveram relevantes atividades frente à inibição da enzima, sendo possível atribuir a atividade inibitória das fases WRH e WCH à presença destes alcaloides. Destaca-se que os alcaloides aril-alquila-quinolonas brachytelona A (A2), brachytelona B (A6) e w-antidesmona (A19) foram os que apresentaram as melhores atividades, inibindo a enzima acetilcolinesterase em 88,04%; 91,05% e 93,0% respectivamente a 100 µM. Esses resultados sugerem que a presença do grupo fenila terminal aumenta a atividade dos alcaloides.

Comparando as atividades da antidesmona (A1) e da hyeronimona (A4), verifica-se que a antidesmona é cerca de 10% mais ativa. Dado que a única diferença entre estes dois alcaloides é que na hyeronimona a carbonila na posição 8 encontra-se reduzida a hidroxila, é possível inferir que a presença da carbonila na posição 8 também aumenta a atividade do alcaloide frente a inibição da enzima AChE.

Apesar de a w-antidesmona (A19) ter apresentado melhor atividade de inibição da AChE na concentração de 100 µM, a brachytelona B (A6) foi o alcaloide que apresentou melhor valor de IC<sub>50</sub>, respectivamente 9,8 (± 0,4) µM.



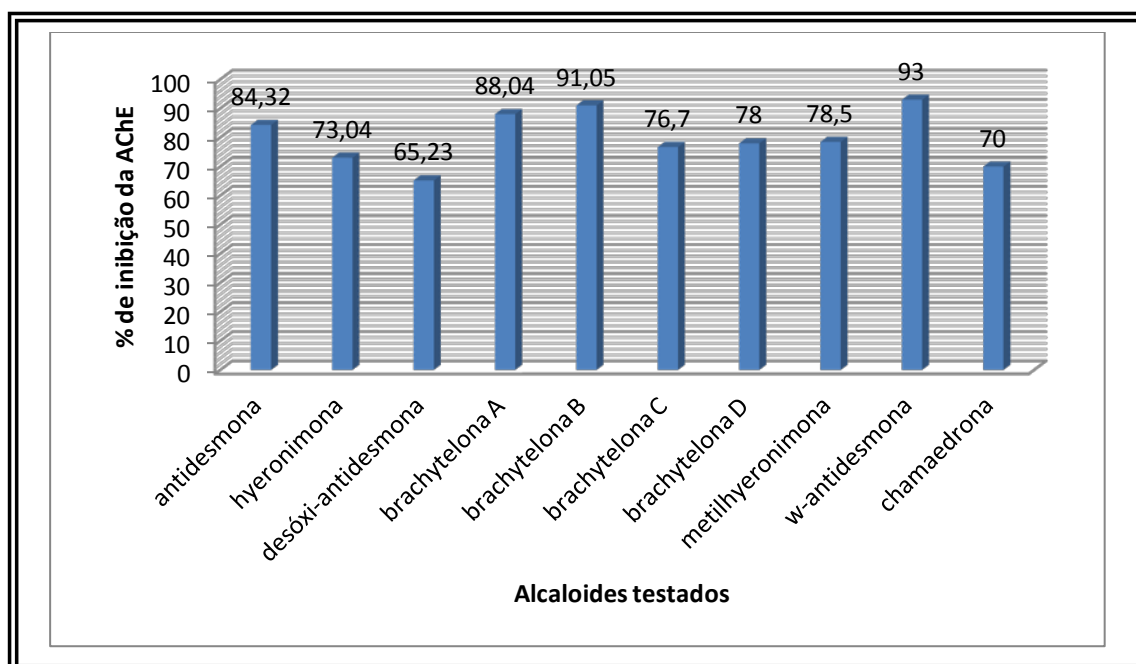


Gráfico 3. Porcentagem de inibição da AChE pelos alcaloides aril-alquil-quinolônicos e alquil-quinolônicos testados (100  $\mu\text{M}$ )

QUADRO 1. Valores de  $\text{IC}_{50}$  para os alcaloides com atividade IChE  $\geq 80\%$

Alcaloide	% de IChE 100 $\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
w-antidesmona (A-19)	93,00	$16,8 \pm 0,3$
brachytelona A (A-2)	88,04	$28,75 \pm 0,3$
brachytelona B (A-6)	91,05	$9,8 \pm 0,4$
antidesmona (A-1)	84,32	$55,6 \pm 0,2$

#### 4.1.3. Atividade de inibição da AChE pelas waltherionas

As fases WRD e WCD apresentaram como alcaloides quinolônicos majoritários as waltherionas. Apenas os alcaloides waltheriona B (A17), N-metil-waltheriona B (A15) e waltheriona C (A12) apresentaram baixa atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase. Entretanto esses resultados são interessantes, uma vez que as waltherionas A (A16), B (A15) e C (A12) são diastereoisômeros, o que significa que o sítio da enzima que interage com esses alcaloides possui uma determinada estereoespecificidade.

Dentre as waltherionas testadas, a 10-hidróxi-waltheriona D (A18) foi a que apresentou melhor atividade de inibição da enzima AChE, inibindo 87,14% a atividade desta enzima na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Comparando-se as estruturas

das waltherionas A (A16) e D (A13), observa-se que além da metoxilação na posição 2', presente na waltheriona A e ausente na waltheriona D, a ponte éter no biciclo [3.2.1] para a waltheriona A localiza-se entre os carbonos 10 e 13, enquanto que na waltheriona D esta ponte éter localiza-se entre os carbonos 9 e 13.

Assim é possível considerar que a maior atividade da waltheriona D (A13) e da 10-hidroxi-waltheriona D (A18) com relação a waltheriona A (A16) pode estar relacionada a presença da ponte éter entre os carbonos 9-13, o que aumenta a atividade de inibição.

Apesar das waltherionas A, D e 10-hidróxi-waltheriona D apresentarem significantes valores de inibição da enzima AChE na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , os valores de  $\text{IC}_{50}$  são relativamente altos, principalmente quando se compara com outras substâncias naturais que têm sido reportadas com relevante atividade sobre esta enzima.

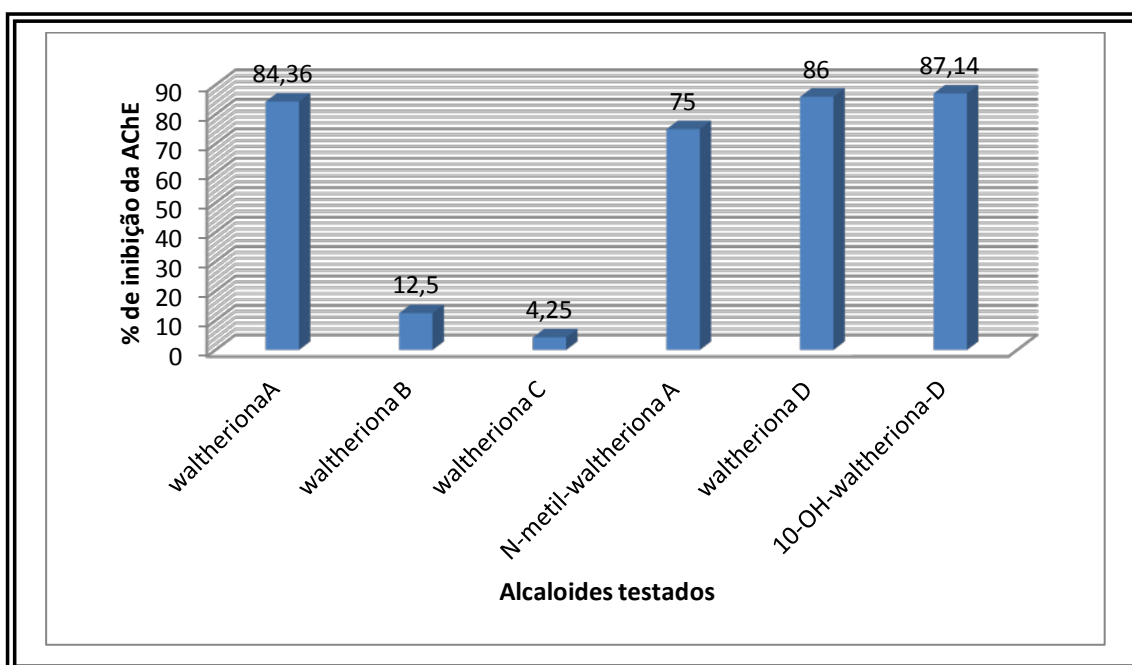


Gráfico 4. Porcentagem de inibição da AChE pelas waltherionas testadas (100  $\mu\text{M}$ )

QUADRO 2. Valores de  $\text{IC}_{50}$  para as waltherionas com atividade IACHe  $\geq 80\%$

Alcaloide	% de IACHe 100 $\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
waltheriona A (A-16)	84,36	$70,5 \pm 0,25$
waltheriona D (A-13)	88,04	$42,0 \pm 0,25$
10-hidróxi-waltheriona D (A-18)	91,05	$37,5 \pm 0,25$

#### 4.1.4. Atividade de inibição da AChE pelos alcaloides ciclopeptídicos e cumarino-lignanas

Alcaloides ciclopeptídicos foram isolados da fase diclorometano da raiz (WRD), enquanto que as cumarino-lignanas foram isoladas principalmente da fase diclorometano do caule (WCD). Os três alcaloides ciclopeptídicos isolados e testados não apresentaram atividade significativa de inibição da AChE, já as cumarino-lignanas apresentaram os melhores resultados, inclusive mostraram-se melhores protótipos que os alcaloides quinolônicos. A cleomicina A (CL-1) apresentou 96,5 % de inibição da AChE (100  $\mu$ M), enquanto que a diacetil-cleomicina A (CL-2) apresentou 93,5% de inibição. Os valores de IC<sub>50</sub> para estas duas substâncias foram bastante significativos; 6,75 ( $\pm$  0,30)  $\mu$ M para a cleomicina A e 8,00 ( $\pm$  0,30)  $\mu$ M para a diacetil-cleomicina A.

Entretanto, como visto no ítem de identificação estrutural destas cumarino-lignanas (capítulo 1), a cleomicina A e a diacetil-cleomicina A foram isoladas como mistura racêmica. Faz-se necessário portanto a separação destes enantiômeros e a realização de novos testes de inibição da AChE com estes, para se saber qual enantiômero possui atividade.

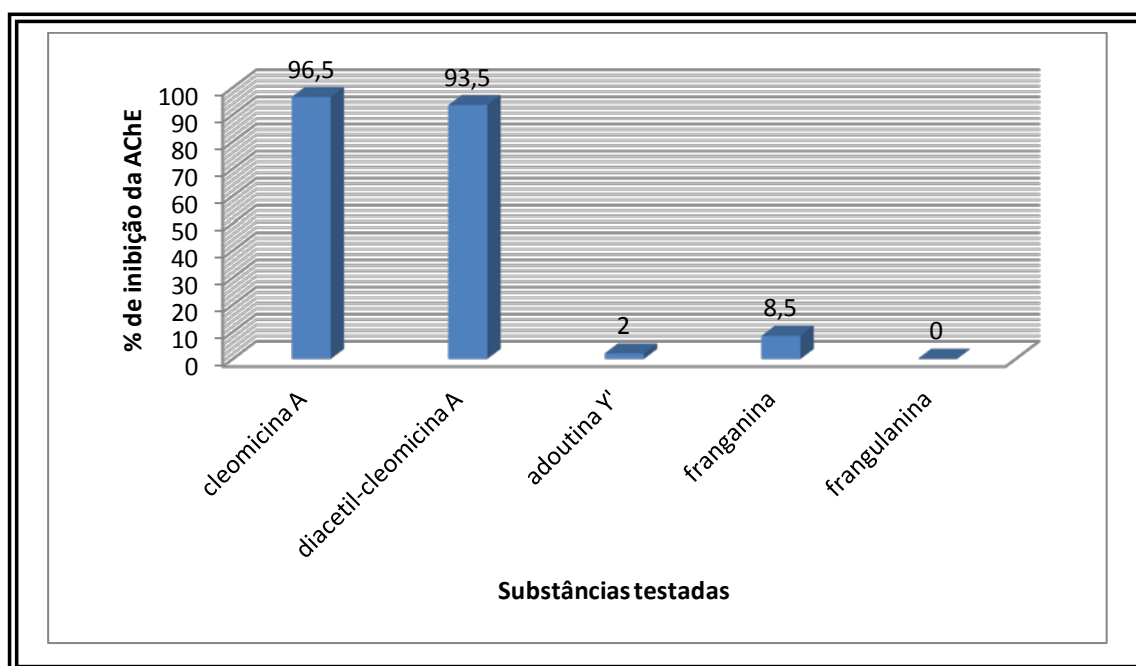


Gráfico 5. Porcentagem de inibição da AChE por alcaloides ciclopeptídicos e cumarino-lignanas (100  $\mu$ M)

## 4.2. Atividade fungitóxica dos alcaloides quinolônicos sobre o fungo *Guignardia citricarpa*

### 4.2.1. Efeito das fases obtidas do extrato etanólico do caule de *W. brachypetala* sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa*

As fases em hexano (WCH), diclorometano (WCD) e acetato de etila (WCA) obtidas do extrato etanólico do caule (WCE) de *W. brachypetala* tiveram suas atividades testadas com relação a inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* (gráfico 6).

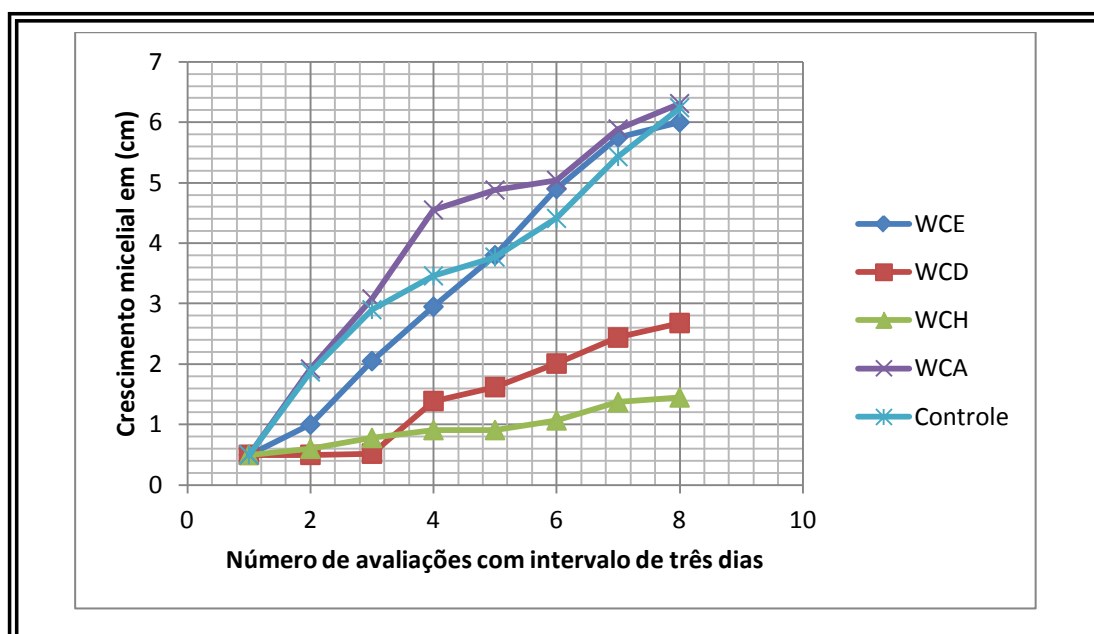


Gráfico 6. Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* por WCH, WCD e WCA

Através deste gráfico é possível observar que a fase WCA em nenhuma das avaliações apresentou qualquer atividade de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*, sendo que no final das oito avaliações verificou-se que esta fase promoveu o crescimento do fungo quando comparado ao controle. Já o extrato etanólico bruto do caule apresentou pouca atividade de inibição.

A fase WCH apresentou efeito fungistático sobre o fungo durante a maior parte do período de avaliação. Verifica-se para esta fase que o fungo começa a crescer após o segundo dia, entretanto a fase WCH mantém efeito fungistático entre o décimo segundo e o décimo oitavo dia, apresentando melhor atividade de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*.

A fase WCD apresentou efeito fungistático até o nono dia de avaliação, após este período o fungo apresentou reação de crescimento, entretanto menor que o controle (DMSO + meio de cultura). O gráfico 7 apresenta o efeito de inibição das

fases WCH, WCD, WCA e do extrato bruto etanólico WCE em termos de porcentagem de inibição, onde verifica-se que as fases WCH e WCD apresentaram os melhores resultados; 83,45 % e 62,02 %, respectivamente.

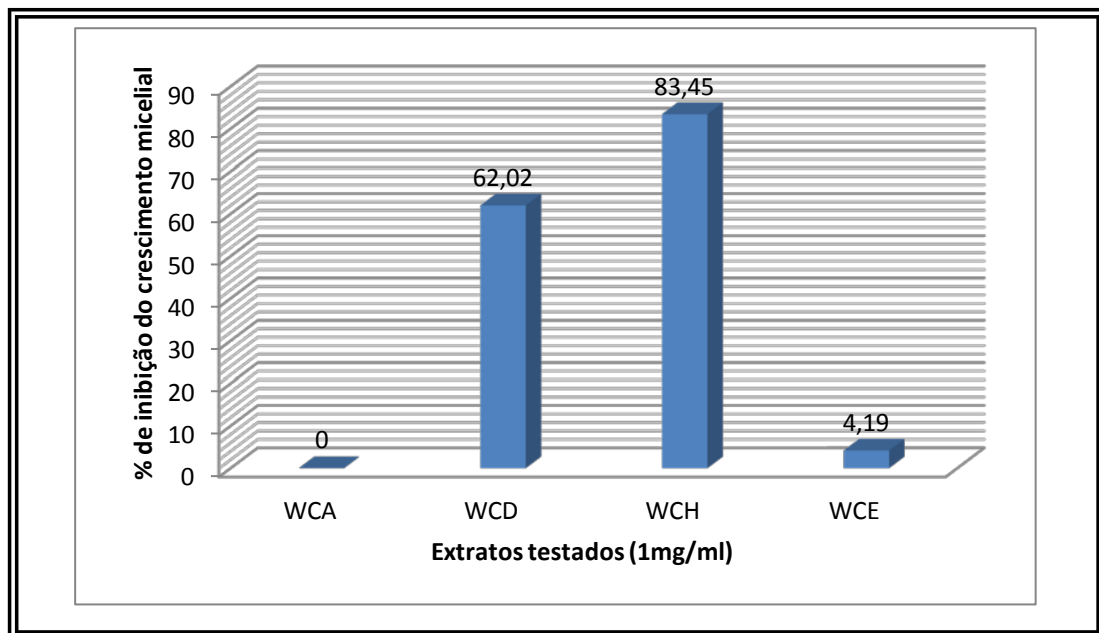


Gráfico 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* por WCA, WCD, WCH e WCE.

#### 4.2.2. Efeito dos das fases WCH, WCD e WCA sobre a germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

Como visto no item de revisão bibliográfica deste capítulo, o meio de infecção do hospedeiro pelo fungo *Guignardia citricarpa* é através dos conídios com os esporos germinados e com os apressórios formados. Assim, um fungicida que possa promover a inibição da germinação de esporos e da formação de apressórios possui uma ação eficaz no controle da MPC. Desta forma, avaliou-se o efeito das fases WCH, WCD e WCA de *W. brachypetala* sobre a inibição da germinação de esporos e inibição da formação de apressórios de *G. citricarpa*, tendo como base a quantidade de  $100 \times 10^5$  esporos.

Como pode-se observar no gráfico 8 a fase WCH foi a que apresentou melhores resultados, inibindo em 47,5% a germinação de esporos e 51,73% a formação de apressórios.

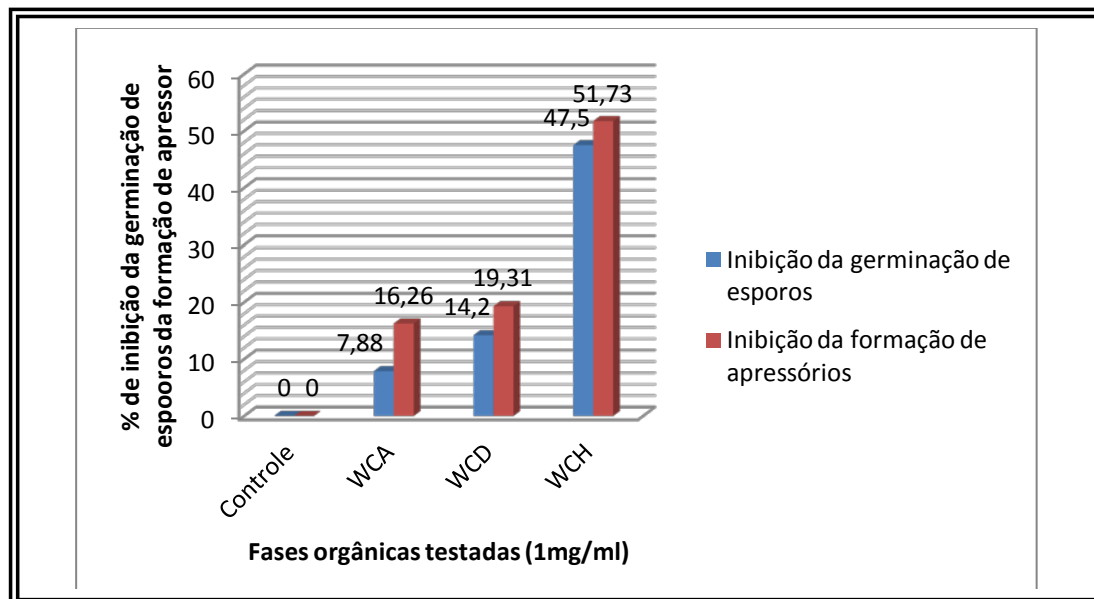


Gráfico 8. Efeito das fases WCA, WCD e WCH sobre a germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

#### 4.1.3. Efeito dos alcaloides alquila-quinolonas e aril-alquila-quinolonas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

A fase WCH foi a que apresentou melhores resultados de atividade de inibição do crescimento micelial, inibição da germinação de esporos e inibição da formação de apressórios de *G. citricarpa*. Como visto no capítulo I, a fase WCH, assim como WRH, apresentou como principais constituintes químicos os alcaloides alquila-quinolonas e aril-alquila-quinolonas. Sendo assim, cinco destes alcaloides tiveram as suas atividades testadas. Infelizmente, só foi possível testar estes alcaloides, pois os demais não possuíam massas suficientes para todos os testes.

Com relação à inibição do crescimento micelial, como pode ser observado no gráfico 9, todos os alcaloides testados apresentaram excelente atividade de inibição na concentração de 100 µg/mL.

O alcaloide brachytelona A (A2) impediu qualquer crescimento do fungo ao longo dos 21 dias de avaliação, enquanto que os demais alcaloides, apesar de não inibirem completamente o crescimento micelial do fungo, apresentaram atividade fungistática durante na maior parte dos intervalos de tempo.

Pode-se então inferir que a atividade de inibição do fungo pela fase WCH deve-se a presença dos alcaloides alquila-quinolônicos e aril-alquila-quinolônicos. Os alcaloides alquila-quinolônicos apresentaram efeitos de inibição muito semelhantes. Entre os alcaloides aril-alquila-quinolônicos a brachytelona B (A6) apresentou-se menos eficaz.

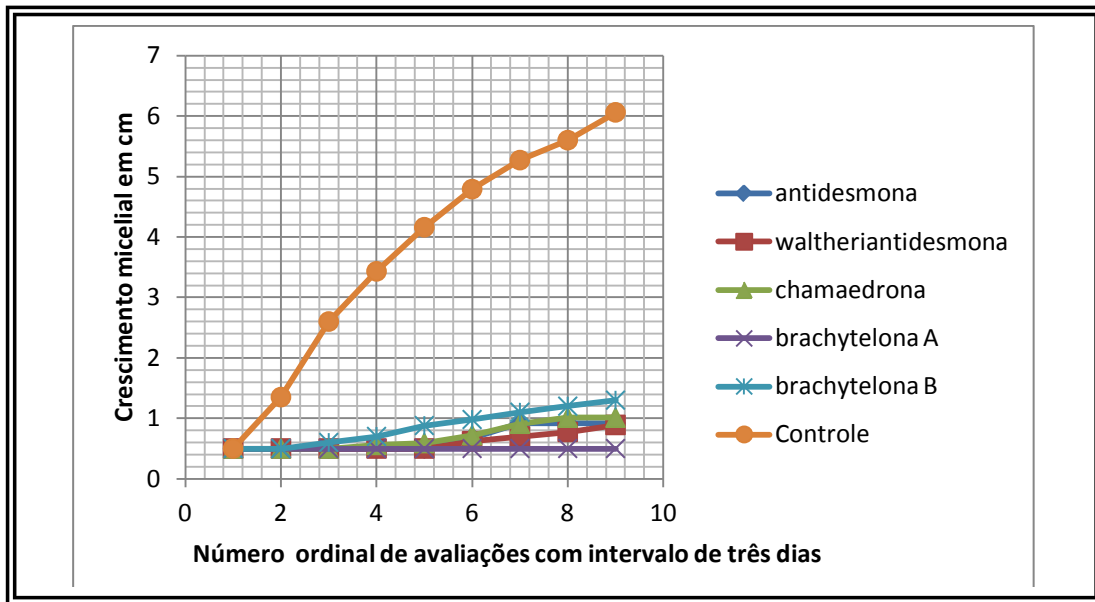


Gráfico 9. Efeito de alcaloides alquil-quinolônicos e alquil-aril-quinolônicos sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa* na concentração de 100 µg/mL

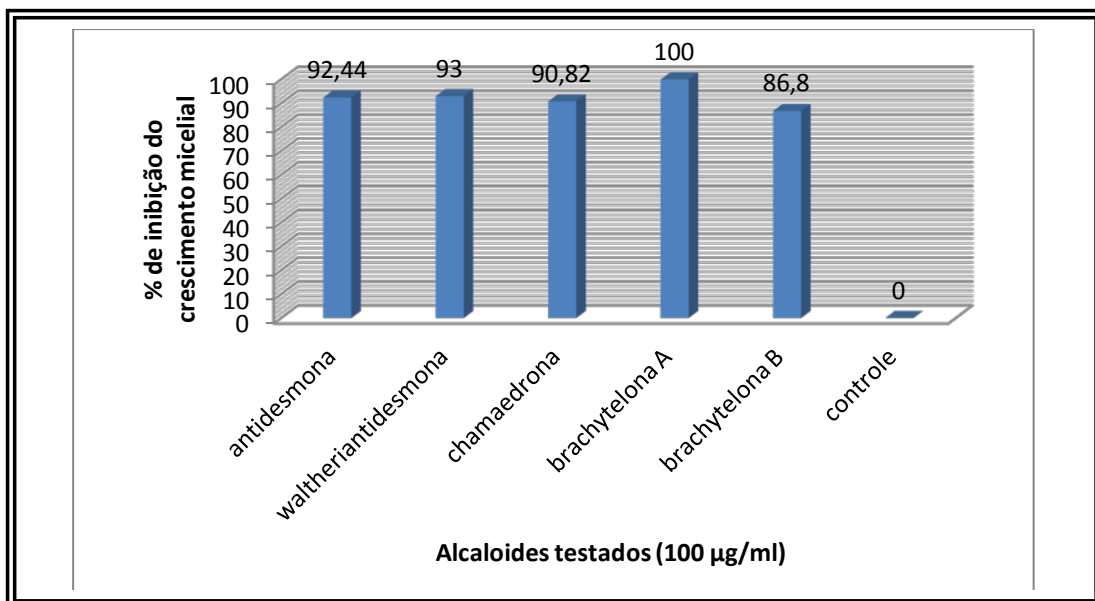


Gráfico 10. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos

Com relação à germinação de esporos e formação de apressórios todos os alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos apresentaram resultados excelentes. Os alcaloides antidesmona e brachytelona A inibiram em 100% tanto a germinação quanto a formação de apressórios na concentração de 100 µg/mL. Apenas a brachytelona B (A6) apresentou inibições abaixo de 90%.

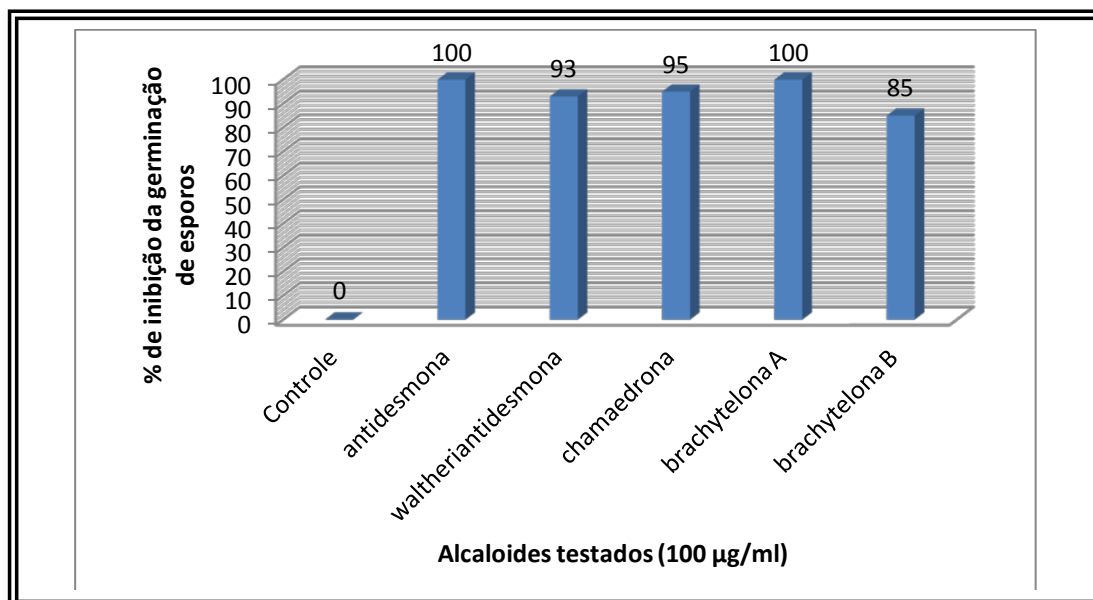


Gráfico 11. Porcentagem de inibição da germinação de esporos de *G. citricarpa* pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos

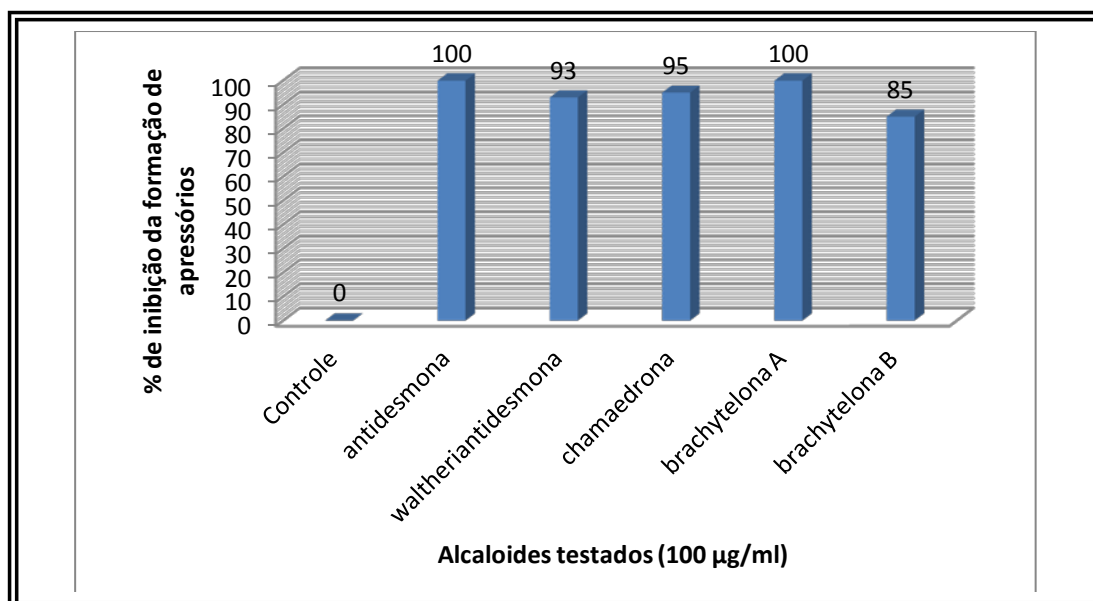


Gráfico 12. Porcentagem de inibição da formação de apressórios de *G. citricarpa* pelos alcaloides alquil-quinolônicos e aril-alquil-quinolônicos



#### 4.1.4. Efeito das waltherionas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

Apesar de a fase WCD não ter apresentado resultado relevante sobre a inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*, esta fase inibiu em 62% o crescimento micelial deste fungo. Uma vez que a fase WCD, assim como WRD apresentou como alcaloides principais as waltherionas, estes alcaloides tiveram suas atividades testadas.

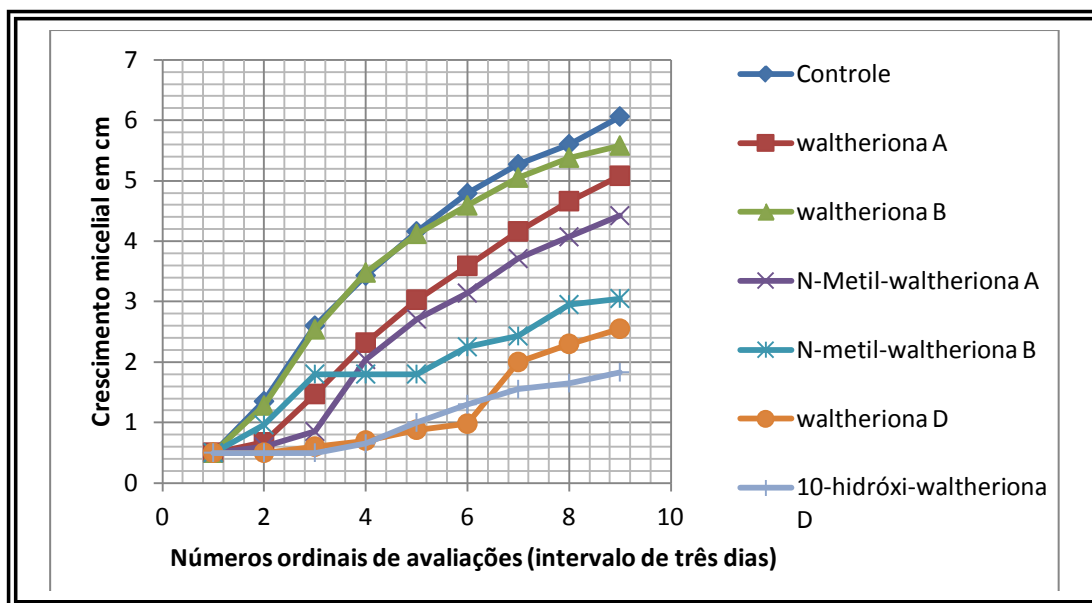


Gráfico 13. Efeito das waltherionas sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa* na concentração de 100 µg/ml

Como se pode observar no gráfico 12 os alcaloides waltheriona A (A16), waltheriona B (A17) e *N*-metil-waltheriona A (A11) não apresentaram efeito relevante sobre o crescimento micelial de *G. citricarpa*. O alcaloide *N*-metil-waltheriona B (A-15) conseguiu manter um efeito fungistático sobre *G. citricarpa* entre o sexto e o décimo segundo dia de avaliação, bem como nos três dias finais, isso demonstra que este alcaloide possui um efeito fungistático periódico sobre o fungo.

Entre as waltherionas testadas merece destaque a waltheriona D (A13) e a 10-hidróxi-waltheriona D (A18). Estes dois alcaloides apresentaram efeito significativo sobre o crescimento de *G. citricarpa*, inibindo em 63% e 72,5% o crescimento micelial do fungo. Estes dois alcaloides apresentaram potencial efeito fungistático entre até o décimo segundo dia de avaliação.

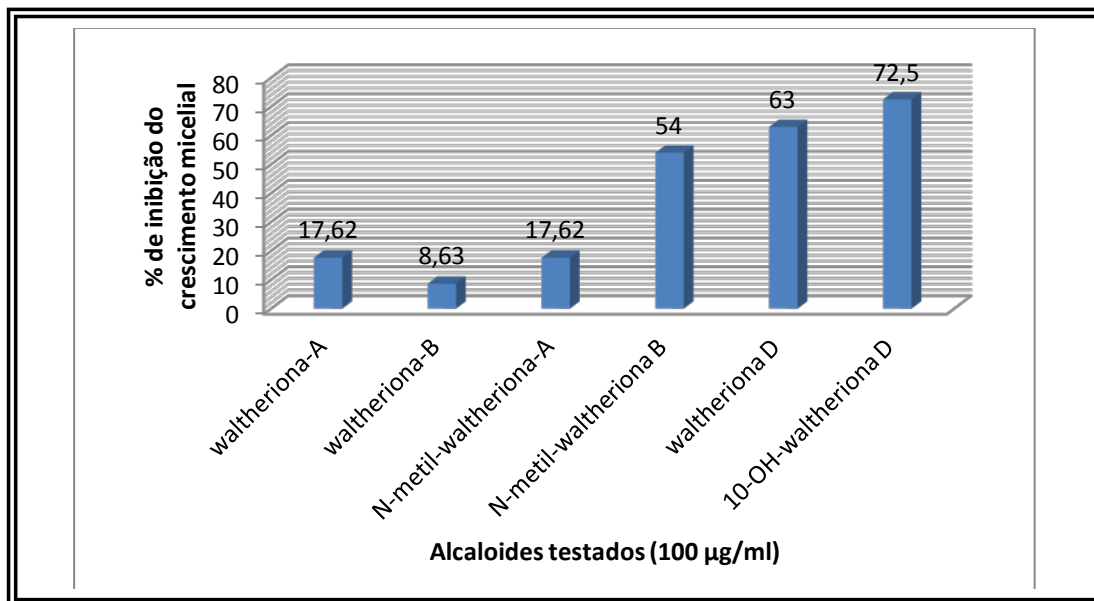


Gráfico 14. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* pelas walterionas

Com relação à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios os alcaloides *N*-metil-walteriona B (A15), walteriona D (A13) e 10-hidróxi-walteriona D (A18) foram os que apresentam os melhores resultados, destacando-se a 10-hidróxi-walteriona D (A18) que inibiu a germinação de esporos e a formação de apressórios em 83,34% e 87,5% respectivamente.

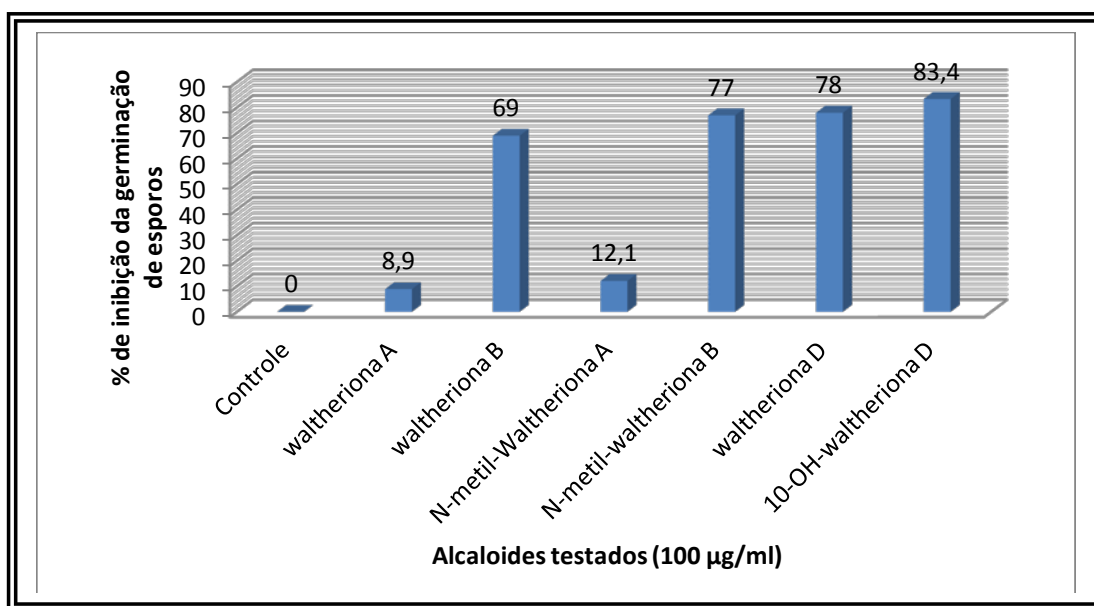


Gráfico 15. Porcentagem de inibição da germinação de esporos de *G. citricarpa* pelas walterionas

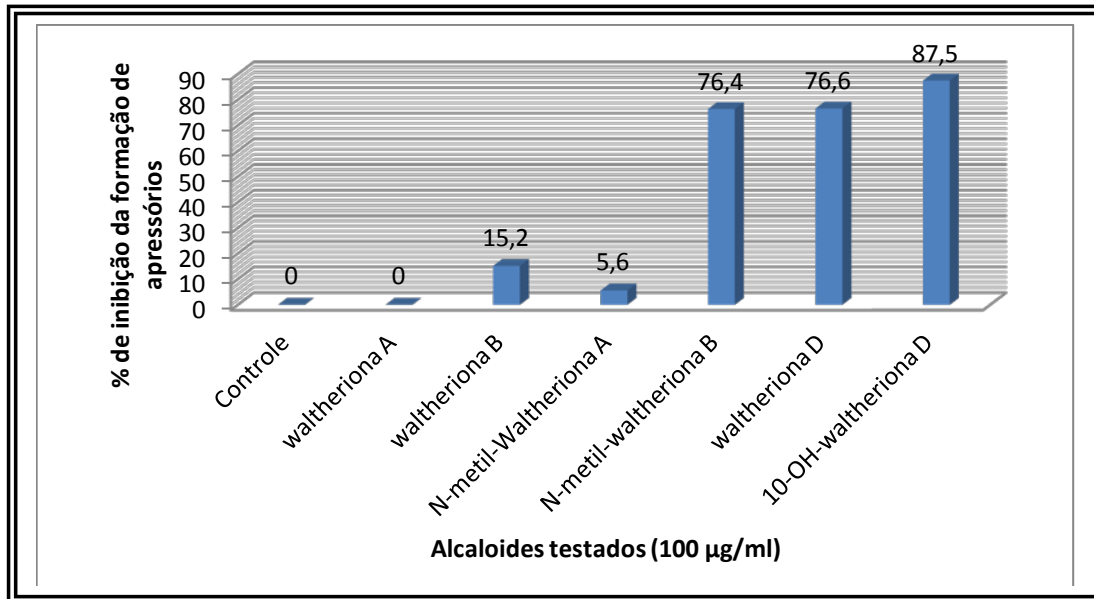


Gráfico 16. Porcentagem de inibição da formação de apressórios de *G. citricarpa* pelas waltherionas

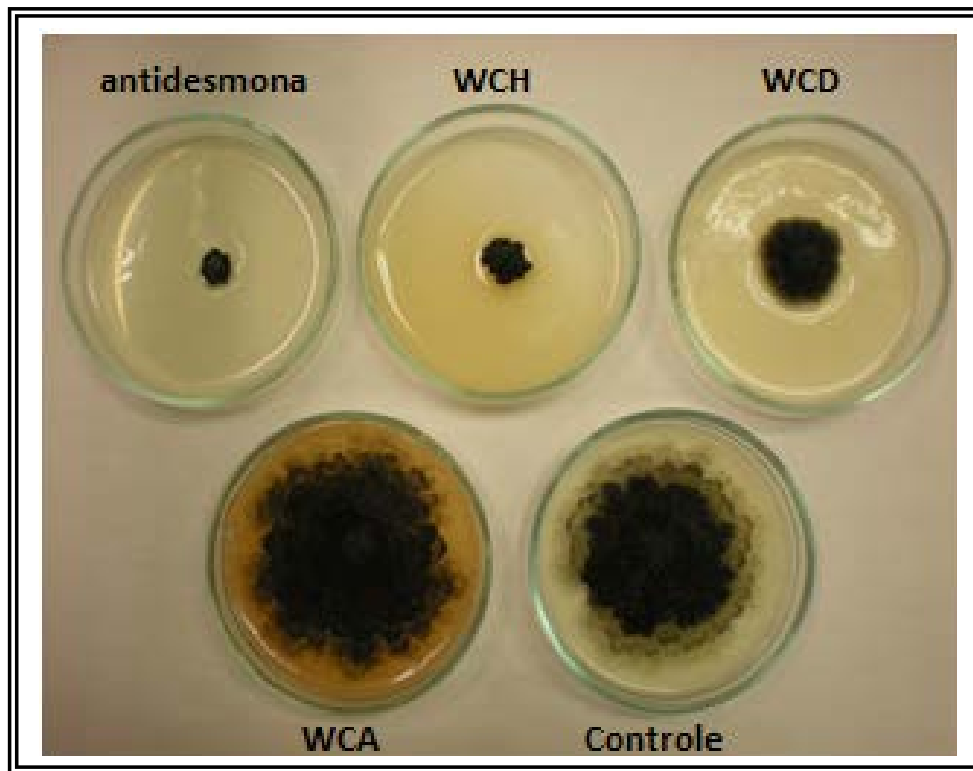


FIGURA 8. Foto da Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* por fases orgânicas, controle e alcaloide antidesmona (A1)

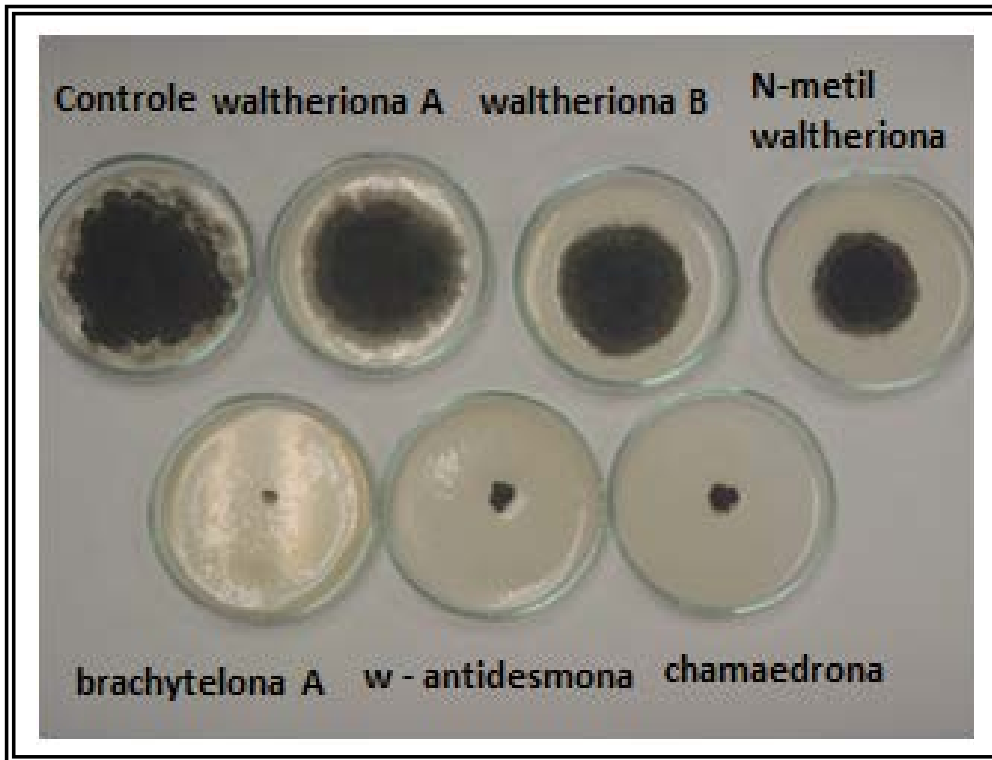


FIGURA 9. Foto da Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* por controle, waltheriona A, waltheriona B, N-metil-waltheriona A, brachytelona A, waltheriantidesmona e chamaedrona

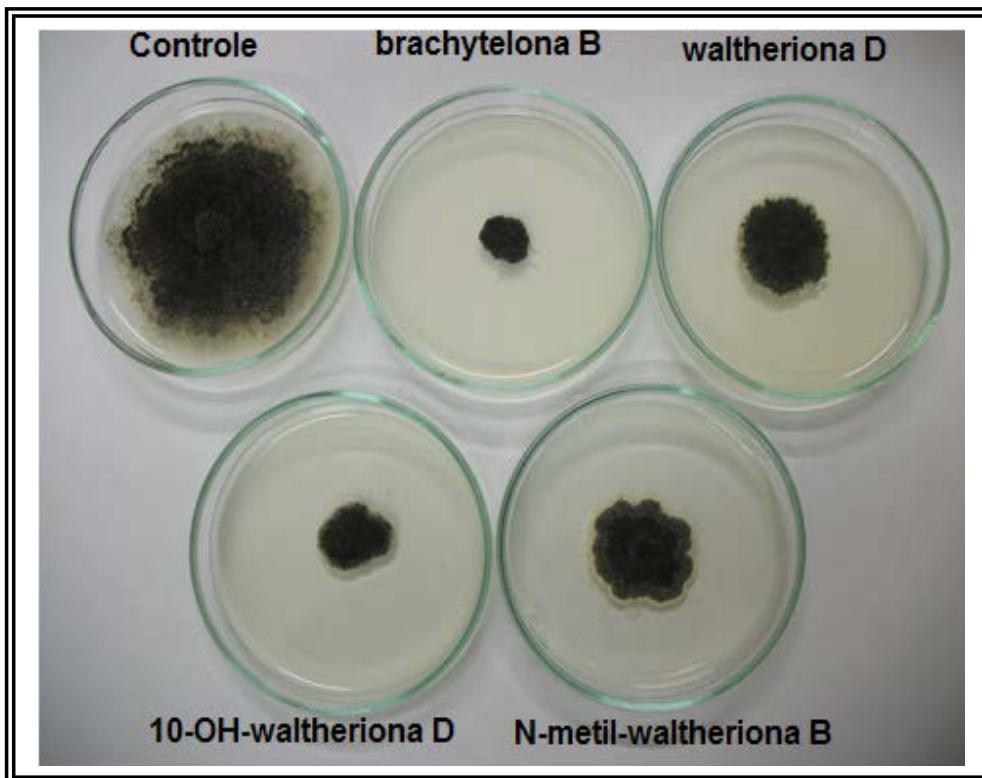


FIGURA 10. Foto da Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* por controle, brachytelona B, waltheriona D, 10-hidróxi-waltheriona e N-metil-waltheriona B

#### 4.1.5. Efeito dos alcaloides alquil-quinolonas e aril-alquil-quinolonas sobre o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa* em diferentes concentrações: cálculos de $IC_{50}$

Os alcaloides aril-alquil-quinolônicos brachytelona A (A2) e w-antidesmona (A-19) e os alcaloides alquil-quinolin-4-onas antidesmona (A1) e chamaedrona (A3) tiveram suas atividades avaliadas sobre a inibição do crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa* em triplicata para cada uma das seguintes concentrações (50; 25; 10; 5; 1; 0,5)  $\mu\text{g/mL}$ .

O objetivo foi avaliar o potencial destes alcaloides em baixas concentrações. Na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ , estes alcaloides foram comparados com o fungicida comercial mais utilizado para o controle da MPC, o carbendazin. A escolha desta concentração deve se ao fato de o carbendazin ser utilizado na agricultura na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Com relação ao efeito destes alcaloides a menores concentrações sobre o crescimento micelial, todos apresentaram excelentes valores de  $IC_{50}$ , destacando-se que o alcaloide brachetelona A (A2) foi o que apresentou menor valor de 0,75 ( $\pm 0,02$ )  $\mu\text{g/mL}$ .

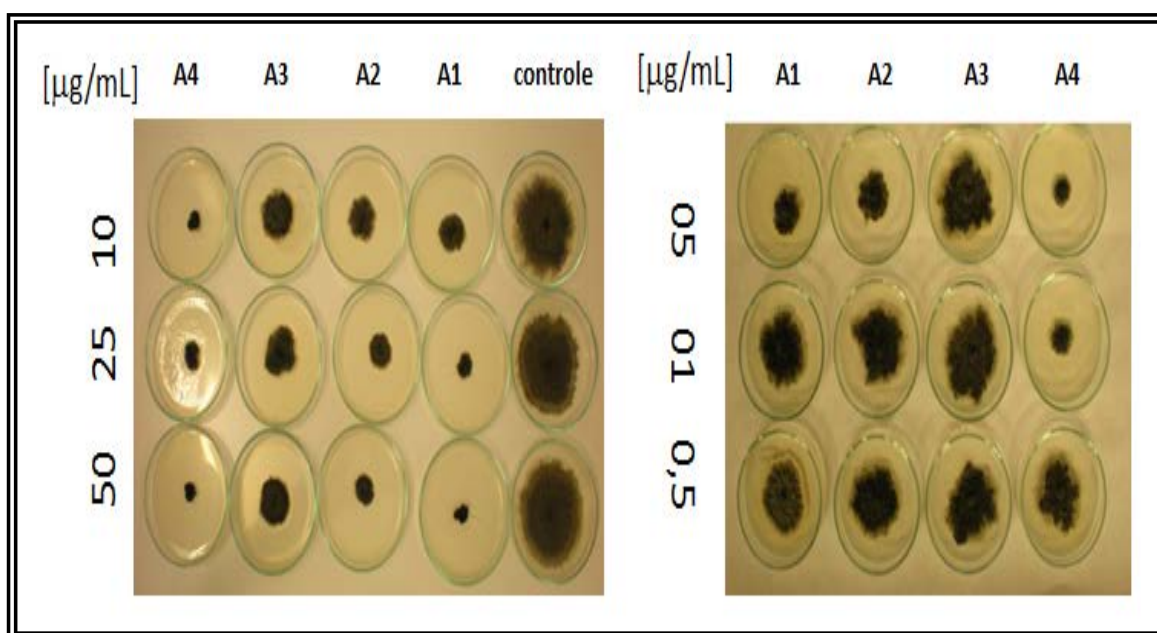


FIGURA 11. Foto da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* pelos alcaloides: A1 (antidesmona), A2 (walthierantidesmona), A3 (chamaedrona) e A4 (brachytelona A)

QUADRO 3. Valores de IC<sub>50</sub> dos alcaloides antidesmona, waltheriantidesmona, chamaedrona e brachytelona A sobre a inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*

Alcaloide	Código	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
antidesmona	A1	6,5 (± 0,02)
w-antidesmona	A2	6,75 (± 0,02)
chamaedrona	A3	20,0 (± 0,05)
brachytelona A	A4	0,75 (± 0,005)

Com relação à inibição da germinação de esporos e formação de apressórios, os quatro alcaloides também mostraram-se bastante potentes, destacando-se que a brachytelona A apresentou inibições de 100% até a concentração de 0,5 µg/ml, sendo, portanto, o alcaloide mais potente para o controle do fungo *Guignardia citricarpa*.

QUADRO 4. Valores de IC<sub>50</sub> dos alcaloides antidesmona, waltheriantidesmona, chamaedrona e brachytelona A sobre a inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*

Alcaloide	Inibição da germinação de esporos IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Inibição da formação de apressórios IC <sub>50</sub> (µg/ml)
antidesmona	8,0 (± 0,02)	6,6 (± 0,02)
w-antidesmona	0,8 (± 0,005)	0,5 (± 0,005)
chamaedrona	5,0 (± 0,02)	5,0 (± 0,02)
brachytelona A	<< 0,5 (Não determinado)	<< 0,5 (Não determinado)

Os quatro alcaloides e o fungicida comercial carbendazin tiveram seus efeitos testados, na concentração de 5 µg/ml, sobre a o crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios de *G. citricarpa*.

Os quatro alcaloides testados mostraram-se mais ativos que o carbendazin com relação à inibição do crescimento micelial, destacando-se a brachytelona A que foi 4,26 vezes mais potente que o carbendazin. Já a chamaedrona apresentou uma inibição muito próxima deste fungicida comercial, enquanto que antidesmona e waltheriantidesmona foram 2,73 e 2,65 vezes mais potentes que o carbendazin, respectivamente.

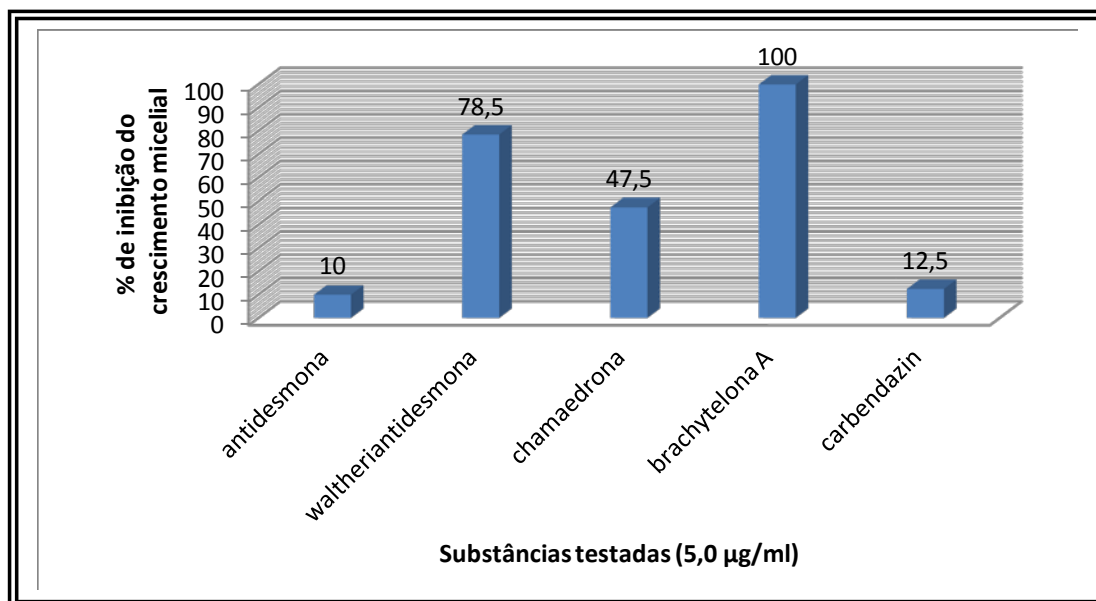


GRÁFICO 17. Comparação da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* dos alcaloides com o carbendazin

Com relação à inibição da germinação de esporos e da formação de apressórios apenas a antidesmona apresentou-se menos potente que o carbendazin. Destaca-se os alcaloides aril-alquil-quinolin-4-onas com excelente potencial nesta concentração, como pode ser observado no gráfico 16.

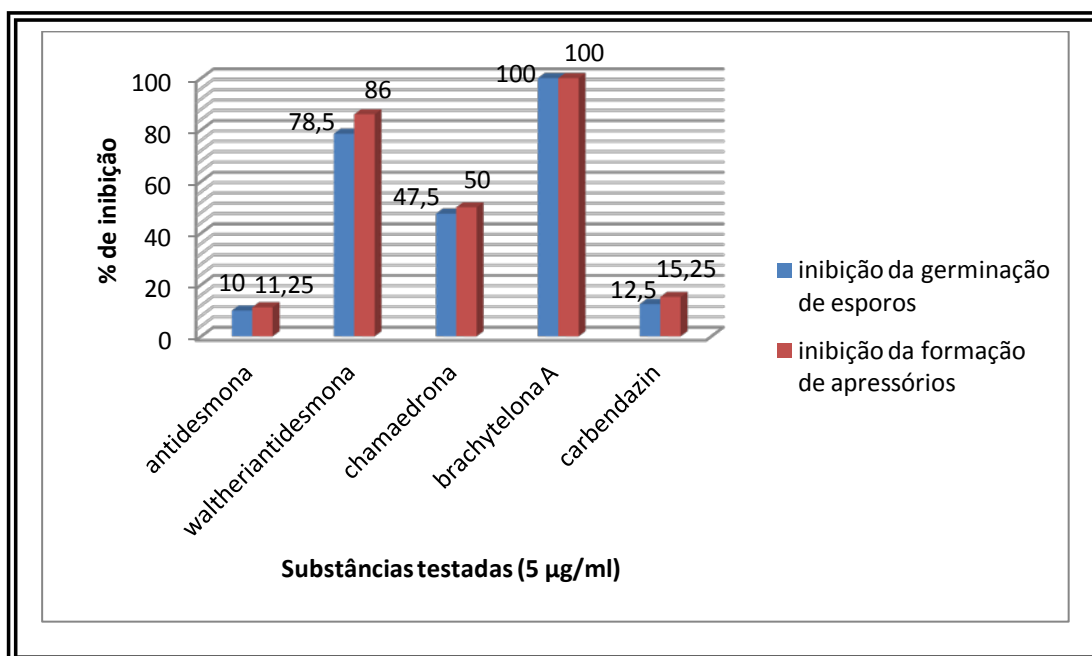


GRÁFICO 18. Comparação da inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* dos alcaloides com o carbendazin

Comparando-se os três parâmetros avaliados para a ação fungitóxica sobre *Guignardia citricarpa* e a comparação dos resultados entre os alcaloides e o carbendazin, pode se afirmar que os alcaloides aril-alquil-quinolin-4-onas: brachytelona A e waltheriantidesmona são os melhores protótipos de agentes fungitóxicos sobre *G. citricarpa*, inclusive com ação mais potente que o fungicida comercial mais utilizado no tratamento da MPC, o carbendazin.



## Considerações Finais

A investigação química de raízes e caule da planta medicinal *Waltheria brachypetala* Turcz proporcionou, através de métodos cromatográficos usuais, o isolamento de dezenove alcaloides quinolônicos, sendo dez anteriormente descritos na literatura: antidesmona, N-metil-antidesmona, chamaedrona, desóxi-antidesmona, hyeronimona, metil-hyeronimona, waltheriona A, waltheriona B, N-metil-waltheriona A, 4-O-metil-waltheriona A e nove inéditos: waltheriantidesmona, brachytelona A, brachytelona B, brachytelona C, brachytelona D, waltheriona C, N-metil-waltheriona B, waltheriona D e 10-hidróxi-waltheriona D.

A partir da técnica de HPLC-MS/MS foram identificados os alcaloides melochinona, vanessina e três ainda não reportados na literatura: 13-hidróxi-melochinona, 9,10-epóxi-13-hidróxi-melochinona e waltheriahyeronimona.

O isolamento e identificação destes alcaloides a partir de *W. brachypetala* representa um avanço no conhecimento da significância quimiosistemática destes para a tribo Hermannieae (Malvaceae), bem como para o conhecimento a cerca da biogênese destes alcaloides, a saber:

- ✓ O alcaloide quinolônico análogo da melochinona, a waltheriona A já foi anteriormente descrito em espécies de *Waltheria* e *Melochia*, sendo assim potencial marcador quimiotaxonômico para a tribo Hermannieae;
- ✓ Dois diastereoisômeros da waltheriona A foram isolados de *W. brachypetala*, as waltherionas B e C. A waltheriona B foi primeiramente reportada em *Waltheria douradinha* e Waltheriona C está sendo descrita pela primeira vez. A ocorrência natural destes diastereoisômeros sugere uma etapa final não enzimaticamente específica na biogênese destes alcaloides.
- ✓ A identificação do alcaloide 9,10-epóxi-13-hidróxi-melochinona via HPLC-MS/MS confirma este como possível intermediário de biogênese mais próximo das waltherionas A, B e C e do novo alcaloide 10-hidroxi-waltheriona D, onde para as waltherionas A, B e C a abertura do epóxido ocorre com ataque nucleofílico da hidroxila na posição 10, enquanto que para a 10-hidróxi-waltheriona D o ataque nucleofílico da hidroxila ocorre na posição 9.
- ✓ O novo alcaloide waltheriona D pode ter como intermediário a 13-hidroxi-melochinona, identificada neste trabalho via HPLC-MS/MS;
- ✓ O isolamento da antidesmona e seus derivados alquil-quinolonas confirma a hipótese levantada por Bringmann e colaboradores de que a melochinona é um precursor comum da antidesmona e derivados. A partir do isolamento destes alcaloides alquil-quinolonas é possível sugerir uma possível semelhança evolutiva entre espécies das tribos Hermannieae (Malvaceae) e Antidesmeae (Phyllantaceae, ex. Euphorbiaceae);
- ✓ Uma nova classe de alcaloides aril-alquil-quinolínicos está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho. Sendo isolados três alcaloides desta classe:



### Referências

AHSAN, M.; GRAY, A. I.; LEACH, G.; WATERMANN, P. "Acridone and quinolone alkaloids from *Boronia lanceolata*". *Phytochemistry*, **36** (3): 1606, 1993.

ARRIAGA, G. F. J.; BORGES DEL CASTILLO, J.; VASQUEZ BUENO, P.; PORTILLO DE RIVAS, R. M. "Two alkaloids from *Melochia pyramidata* L". *Boletín de la Sociedad Química del Perú*, **49** (3), 180, 1981.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. C.; RESENDE, C. M.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, E. R. "Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miens that inhibit acetylcholinesterase enzyme". *Bio-organic and Medicinal Chemistry*, **13**, 4092, 2005.

BARREIROS, M.; DAVID, J. P. ; DAVID, J. M.; SÁ, M. S. ; COSTA, J. F. O. ; ALMEIDA, M. Z. ; LOPES, L. M. X. ; SANT'ANA, A. E. G. "Ryanodane diterpenes from *Erythroxylum* species". *Phytochemistry*, **68**, 1735, 2007.

BHAKUNI, R. S.; SHUKLA, Y. N.; THAKUR, R. S. "Chemical constituents of *Melochia corchorifolia* Linn". *Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **26** (12), 1161, 1986.

BHAKUNI, R. S.; SHUKLA, Y. N.; THAKUR, R. S. "Melochicorine, a pseudooxindole alkaloid from *Melochia corchorifolia*". *Phytochemistry*, **30** (9), 3159, 1991.

BRINGMANN, G., SCHLAUER, J., RISCHER, H., WOHLFARTH, M., MUEHLBCHER, J., BUSKE, A., PORZEL, A., SCHIMIDT, J., ADAN, G. "Revised structure of antidesmone: an unusual alkaloid from *Antidesma* plants". *Tetrahedron*, **56**, 2000a.

BRINGMANN, G., RISCHER, H., WOHLFARTH, M., SCHLAUER. "Biosynthesis of antidesmone in cell cultures of *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae): An unprecedented class of glycine-derived alkaloids". *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9905, 2000b.

BORGES-DEL-CASTILLO, J.; RODRIGUEZ-UBIS, J. C.; VASQUEZ-BUENO, P.; JOSEPH-NATHAN, P. "Triterpenoids of *Melochia pyramidata*". *Journal of Chemical Research*, **5**, 130, 1983.

BUSKE, A., SCHIMIDT, J., BRINGMANN, G., ADAN, G., BUSEMANN, S., MUEHLBCHER, J., PORZEL, A. "Antidesmone, a novel type isoquinoline alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae)". *Tetrahedron*, **55**, 1079, 1999.

BUSKE, A., SCHIMIDT, J., HOFFMANN, P. "Chemotaxonomy of the tribe Antidesmeae (Euphorbiaceae): antidesmone and related compounds". *Phytochemistry*, **60**, 489, 2002.

CERQUEIRA, C. A. "Estudo fitoquímico e quimiosistemático de espécies de *Galipea* e *Swinglea* (Rutaceae) e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados". Programa de Pós-graduação em Química UFSCar. Dissertação de Mestrado, 2011.

CHEN, Y. C. & CHENG, M. J. "Coumarinolignans from the Root of Formosan *Antidesma pentandrum* var. *barbatum*". *Helvetica chimica acta*, **8** (11), 2805, 2007.

CORNELIUS, M. T. F.; ALVES, C. C. F.; SILVA, T. M. S.; ALVES, K. Z.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F. "Solasonin and flavonoids isolated from *Solanum crinitum*". *Rev. Bras. Farm.* **85**, 57, 2004.

DA SILVA, M. F.; SOARES, M. S.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. "Alkyl, aryl, alkylarylquinoline, and related alkaloids". *Alkaloids Chem. Biol.*, **64**, 139, 2007.

DEWICK, M. P. *Natural Products: a biosynthetic approach*. 3<sup>rd</sup> ed. Ed. Wiley, 2009.

DIAS, G. C. D.; MOREL, A. F.; GRESSLER, V.; HOENZEL, S. C. S. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. "Alkaloids from *Melochia chamaedrys*". *Planta Medica*, **73** (3), 289, 2007b.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L.; SUSSMAN, J. L. "Acetylcholinesterase: From 3D Structure to the function". *Chemical-biological Interactions* (in press), 2010.

DIAS, G. C. D.; MOREL, A. F.; GRESSLER, V.; HOENZEL, S. C. S. M.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. "Constituents of the roots of *Melochia chamaedrys*". *Phytochemistry*, **68**, 668, 2007b.

ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE R. M. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochem Pharmacol*, **7**, 88, 1961.

EL-SEEDI, H. R.; ZAHRA, M. H.; GORANSSON, U.; VERPOORTE, R. Cyclopeptidealkaloids. *Phytochemistry Reviews*, **6** (1) : 143, 2007.

EMILE, A.; WAIKEDRE, J.; HERRENKNECHT, C.; FOURNEAU, C.; GANTIER, J-C; HNAWIA, E.; CABALION, P.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. "Bioassay-guided isolation of antifungal alkaloids from *Melochia odorata*". *Phytochemical Research*. **21**, 398, 2007.

FARJADO, V.; ARAYA, M.; CUADRA, P.; OYARZUN, A.; GALLARDO, A.; CUETO, M.; DIAS-MARRERO, A. R.; DARIAS, J.; VILLARROEL, L.; A'LVARES, C. A.; MORA-PEREZ, Y.; JOSEPH-NATHAN, P. "Pronuciferine N-oxide, a proaporphine N-oxide alkaloid from *Berberis celetiooides*". *J. Nat. Prod.*, **72**, 1355, 2009.

FEICHTENBERGER E.; BALDASSARI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. In: Kimati, H.; Amorin, L. Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (eds). *Manual de fitopatologia*. Ceres, São Paulo, **2**, p. 239-269, 2005.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. "Produtos naturais com candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer". *Química Nova*, **27**, 655, 2004.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAP, M.; WILCOCK, G. K. "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress". *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, **66**, 137, 1999.

FREITAS, S. L.; "Estudo quimiosistemático de espécies de *Hortia* (Rutaceae) e busca de fungicidas a *Guignardia citricarpa*". Programa de Pós-graduação em Química UFSCar. Dissertação de Mestrado em Química, 2010.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. "Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants". *Genet. Mol. Biol.*, **25** : 255, 2002.

GOES, A. "Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*". *Summa Phytopathol.*, **28** : 09, 2002.

GOLDBERG, A.; "The genus *Melochia* L". *Contr. U.S. Nat. Herb.* **34** (5) : 191, 1967.

GRESSLER, V.; STUKER, C. V.; DIAS, G. O.; DALCOL, I. I.; BURROW, R. A.; SHIMIDT, J.; WESSJOHAN, L.; MOREL, A. F. "Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*". *Phytochemistry*, **69** (4) : 994, 2008.

GUNASEGARAN, R.; KOTIYAL, J. P.; NAIR, A. G. R. "Kaempferol-3-O-galactoside from leaves of *Melochia umbellata* and *Eriolaena hookeriana*". *Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **19** : 9, 821, 1980.

HARBORNE, J. B. *The Flavonoids: advances in research since 1988*. Ed. Chapman and Hall, Ed. 6, New York, 1988.

HOELZEL, S. C. S. M.; MOREL, A. F.; VIEIRA, E. R.; GIACOMELLI, S. R.; DALCOL, I. I., ZANATTA, N. "An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*", **66** : 1163, 2005.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. "The plant immune system". *Nature*, **44** : 323, 2006.

KAN-FAN, C.; DAS, B. C.; BOITEAU, P.; POTIER, P. "Alkaloides de *Vespris ampody* (Rutacées)". *Phytochemistry*, **9** : 1283, 1970.

KAPADIA, J.G.; Paul, B.D.; SILVERTON, J.V.; Fales, H.M.; SOKOLOSKI, E.A.; "Melochinone, a novel quinolinone from *Melochia tomentosa*". *Journal of the American Chemical Society* , **12** : 6814, 1975.

KAPADIA, G.J., SHUKLA, Y.N., BASAC, S.P.; "Melovinone, an open chain analogue of melochinone from *Melochia tomentosa*". *Phytochemistry*, **17** : 1444, 1978.

KAPADIA, G. J.; SHUKLA, Y. N.; BASAK, S. P.; SOKOLOSKI, E. A.; FALES, H. M. "The melosatins, a novel class of alkaloids from *Melochia tomentosa*". *Tetrahedron*, **36** : 17, 2441, 1980.

KAPADIA, G. J.; SHUKLA, Y. N. "Melosatin D: a new isatin alkaloid from *Melochia tomentosa* roots". *Planta Medica*, **59** :6, 568, 1993.

KARASOVA, KASSA, J.; YOUNG-SIK, J.; Kamil, M.; MIROSLAV, P.; KAMIL, K. "Effect of Several New and Currently Available Oxime Cholinesterase Reactivators on Tabun-intoxicated Rats". *International Journal of Molecular Sciences*. **9**, 2243, 2008.

KASAKOVA, D. M.; BESSANOVA, I. A.; YUNOSOV, S. Y. "Components of *Haplodium obtusifolium*". *Khim. Prir. Soedin*, **5** : 635, 1984.

KLOTZ, L.J. "Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard". The citrus industry. Riverside: University of California, **4**, p.1-66.,1978.

KOSTOVA, I. IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; KLAIBER, I. "Alkaloids and coumarins from *Ruta graveolens*". *Monatshefte fur chemie chemical monthly*, **130**, 703 : 1999.

KUBITZKI & BAYER. Malvaceae. *Fam. Gen. Vasc. Plants*, p. 225, 2003.

LIMA, M. M. C. *Alcaloides, cumarinas, flavonoides e terpenóides de Waltheria brachypetala Turcz.: Uma contribuição a quimiosistemática de Hermannieae (Sterculiaceae)*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química. UFBA. 121 p. 2007.

LIMA, M.M.; LÓPES, J. A.; DAVID, J. M.; SILVA, E. P.; GIULIETTI, A. M.; DE QUEIROZ, L. P.; DAVID, J. P. "Acethylcolinesterase activity of alkaloids from the leaves of *Waltheria brachypetala*". *Planta Medica*, **75**, 335, 2009.

MACEDO, J. F.; MARTINS, R. P. "Potencial da erva daninha *Waltheria americana* (Sterculiaceae) no manejo integrado de pragas e polinizadores: visitas de abelhas e vespas". *An. Soc. Entomol. Bras.*, **27** (1) : 182, 1998.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. "13C NMR Spectra of Pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features". *Phytochemistry*, **37** : 1517, 1994.

MAHESH, S. "Antimicrobial Activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens". *World Journal of Agricultural Sciences*, **4** : 839, 2008.

MATOS-JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU JÚNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p. 929.

MEDINA, E.; SPITELLER, G. "Structure of melochinine, a new type of a pyridone alkaloid from *Melochia pyramidata* L. (Sterculiaceae)". *Chemische Berichte*, **112** (1) : 376, 1979.

MOREL, A. F.; FLACH, A.; ZANATTA, N.; ETHUR, E. M.; MOSTARDEIRO M. A.; GEHRKE I. T. S. "A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*". *Tetrahedron Letters*, **40** : 9205, 1999a.

MOREL, A. F.; GEHRKE I. T. S; MOSTARDEIRO M. A.; ETHUR, E. M.; ZANATTA, N.; MACHADO, E. C. S. "Cyclopeptide alkaloids from the bark of *Waltheria douradinha*". *Phytochemistry*, **51** : 473, 1999b.

MULLER, A. H.; Constituintes químicos de *Metrodorea* e *Pilocarpus*: contribuição a quimiosistemática de Pilocarpinae. Tese de Doutorado em Química (UFSCAR), 1994.

NAHRTEDT, A.; PROKSCH, P.; CONN, E. E. Dhurrin. "(-) – catequin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*". *Phytochemistry*, **26** : 1546, 1987.

NAIR, A. G. R.; RAMESH, P.; SUBRAMANIAN, S. S.; JOSHI, B. S. "Melocorin - a new herbacetin glucuronide from *Melochia corchorifolia*". *Indian Journal of Chemistry. Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, **15** (11) : 1045, 1977.

OLIVA, A.; MEEPAGALA, K. M.; WEDGE, D. E.; HARRIES, D.; HALE, A. L.; ALIOTTA G.; DUKE, S. O. "Natural fungicides of *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolinone alkaloid". *J. Agric. Food. Chem.* **51** : 890, 2003.

OGBEDE, O. N.; EGUAVOEN, O. I.; PARVEZ, M. "Chemical studies in the anthocyanins of the flowers of local plants". *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **8** (4) : 545, 1986.

PAIS, M.; MAINIL, J.; GOUTAREL, R. "The adouetins X, Y, and Z, alkaloids of *Waltheria Americana*". *Ann. Pharm. Franc.*, **21** : 139, 1963.

PAIS, M.; MARCHAND, J.; JARREAU, F. X.; GOUTAREL, R. "Peptide alkaloids: Structures of adouetines X, Y, Y', and Z, the alkaloids of *Waltheria americana* (Sterculiaceae)". *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **3** : 1145, 1968.

PERVEEN, A., GAFSTROM, E., EL-GHAZALY, G. World Pollen and Spore Flora Malvaceae Adams. and subfamilies: Grewioideae, Tilioideae, Brownlowioideae, *Grana*, **43**, 129, 2004.

PETRUS, A. J. A. "Polyphenolic components of *Waltheria indica*". *Fitoterapia*, **61** (4) : 371, 1990.

RAGASA, C. Y.; CRUZ, C. A.; CHIONG, I. D.; TADA, M.; RIDEOUT, J.A. "Antifungal flavonoids from *Waltheria Americana*". *Philippine Journal of Science*, **3** : 243, 1997.



RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. "Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- $\alpha$  and IL-12 in activated macrophages". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **28** (5) : 912-915, 2005.

REISCH, J.; ROZSA, Z.; SZENDREI, K.; KOROSI, J. "2-(n-undecyl)-chinolon-(4) aus den bluten von *Ptelea trifoliata* und den wurzeln von *Ruta graveolens*". *Phytochemistry*, **14** (3) : 840, 1975.

RICCA, S.; NICOTRA, F. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some phytosterols. *Gazeta chimica Italiana*, **108**, p. 713, 1978.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. "Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*". *Pesq. Agropec. Bras.*, **42** : 323, 2007.

SEVERINO, V. P. "Estudo químico de plantas do gênero *Hortia* (Rutaceae) e do fungo *Guignardia citricarpa* e avaliação de seus potenciais efeitos biológicos". Programa de Pós-graduação em Química UFSCar. Tese de Doutorado. 2011

PIZZOLATTI, M. G.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; Nat. Prod. Res. 2004, 18, 433.

SABA, M. D.; SANTOS, F. A. R. "Morfologia polínica de Sterculiaceae das dunas do Abaeté, Salvador-BA". *Revista de Ciências Biológicas da UEFS*, **3** : 109, 2003.

SABA, M. D. Morfologia polínica de Malvaceae: implicações taxonômicas e filogenéticas. *Tese de doutorado em botânica* (UEFS). PDF disponível on-line em [http://www2.uefs.br/ppgbot/pdf\\_dissertacoes\\_teses/doutorado/2007/marileidesaba.pdf](http://www2.uefs.br/ppgbot/pdf_dissertacoes_teses/doutorado/2007/marileidesaba.pdf), acesso em 17 de dezembro de 2011.

SARTOR, C. F. P.; SILVA, M. F. G. F. da; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; CORTEZ, D. A. G. "Alkaloids from *Dyctiolum vandelianum*: their chemosystematic significance. *Phytochemistry*", **63** : 185, 2003.

SERRANO, M. A. R. *et al.* "Acetylcholinesterase Inhibitory Pyridine Alkaloids of the Leaves of *Senna multijuga*". *J. Nat. Prod.* **73** : 482, 2010.

SHUKLA, Y. N.; SOKOLOSKI, E. A.; FALES, H. M.; KAPADIA, G. J. "8-methoxy-7,8-dimethylenedioxicoumarin from *Melochia tomentosa*". *Phytochemistry*, **15** (11) : 1788, 1976.

SOARES, F. P.; RONCONI, C. A. V.; DA CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Da Silva, M. S.; Braz-Filho, R. "Four known triterpenoids isolated from three Brazilian plants:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift assignments". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **36** (8) : 608, 1998.

SPÓSITO, M.B. Dinâmica temporal e espacial da mancha-preta (Guignardia citricarpa) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. 2003. 112p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TAIA, W. K. "General View of Malvaceae Juss. S.L. and Taxonomic Revision of Genus Abutilon Mill. in Saudi Arabia". *JKAU : Sci.* **21** (2) : 349, 2009.

TSCHESCHE, R.; REUTEL, I. "Aukaloide aus Sterculiacen, I: Uber peptidealkaloide aus *Melochia corchorifolia*". *Tetrahedron Letters*, **9** (35) : 3817, 1968.

TOUATI, D.; ULUBELEN, A. "Alkaloids from *Ruta Montana*". *Phytochemistry*, **53** (2) : 277, 2000.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, K.; VERPOORT, R. "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer's disease". *Química Nova*, **26** (1) : 301, 2003.

TRIPATHI, R. C.; PANDEY, M. B.; SINGH, S.; PANDEY, V. B. "Antifungal flavonoids from *Melochia corchorifolia*". *Journal of Indian Chemical Society*, **87** (4) : 511, 2010.

Tinto, W. F.; Blyden, G.; Reynolds, W. F.; McLean, S. J. *J. Nat. Prod.* 1991, **54**, 1309-1313.

VAN DE MEENT, M.; RHEE, K.; VERPOORT, R. "Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*". *Natural Products Research.*, **24** : 222-225, 2010.

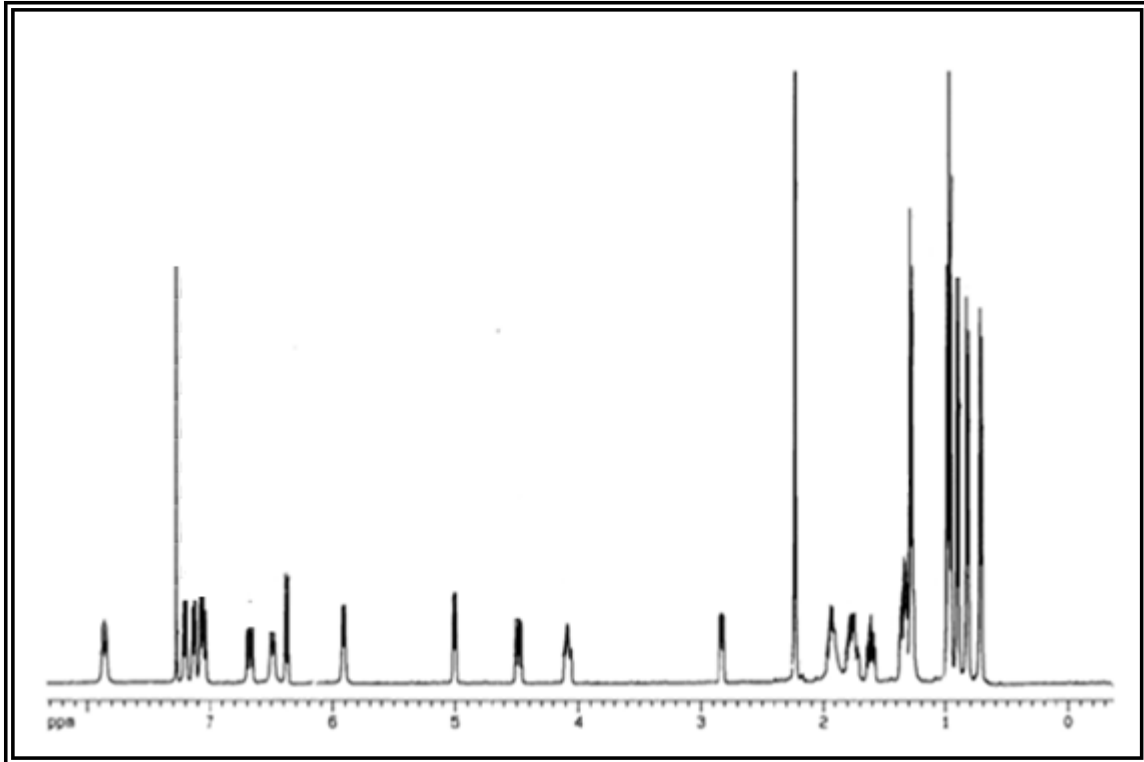
VIEGAS JR *et al.* "New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids". *Bio-organic and Medicinal chemistry*, **13** : 4184, 2005.

VALENTE, A. M. M. P. "Análise de componentes fixos em produtos de *Coffea arábica* e de seus produtos de fermentação". São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química. Dissertação de Mestrado, p. 189, 2003.

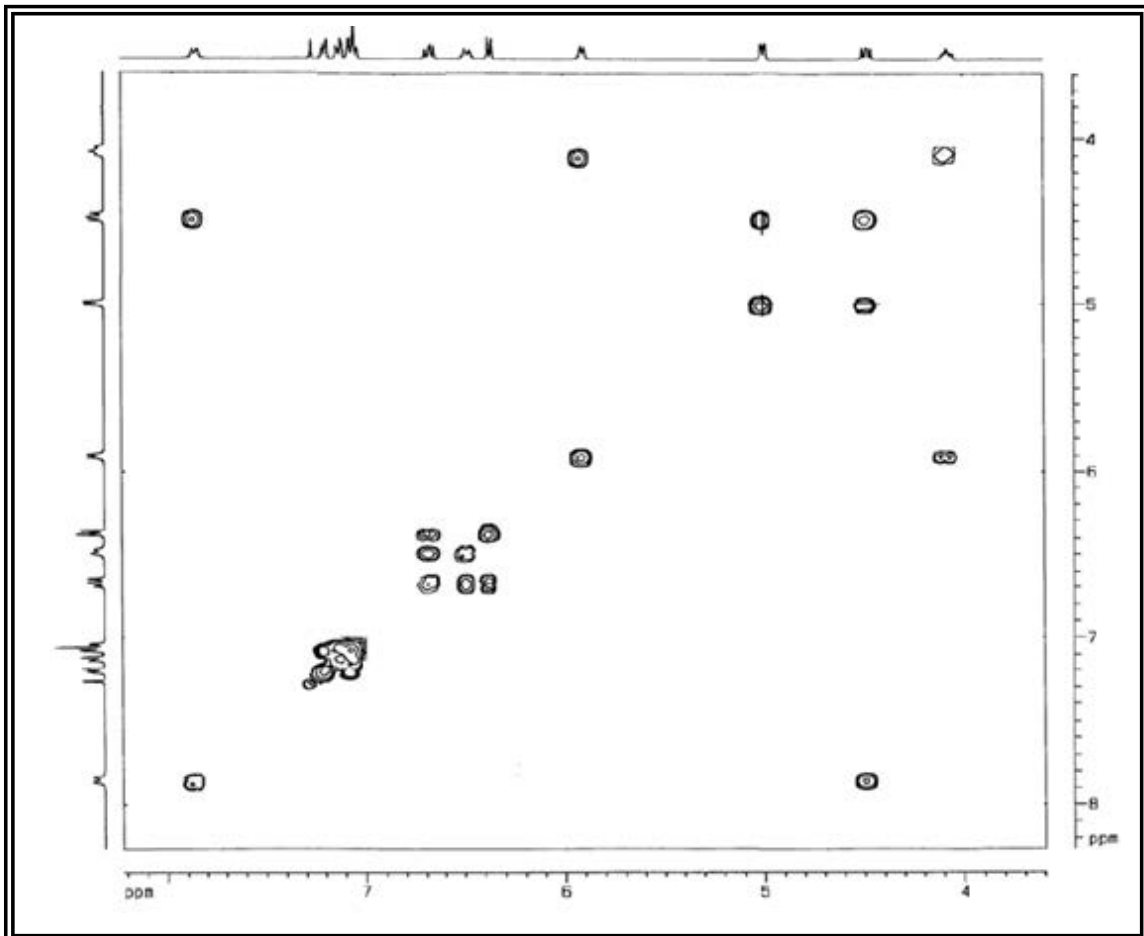
YUKI, T.T; TOSHIKI, K.; MITSUHIRO, S.; HIROSHI, K.; TETSUHIRO, N.; HASHIRO, S.; TAKESHI, F.; SUSUMU, O.; AKINORI, A. "Neuroprotective effects of galanthamine and tacrine against glutamate neurotoxicity". *European Journal of Pharmacology*, **549**, 19, 2000.

ZHANG, P. C.; LIU, J.; FENG, Z.; XU, J. "New Hepatoprotective Coumarinolignoids from *Mallotus apelta*". *Chemistry and Biodiversity*, **5** : 591, 2008.

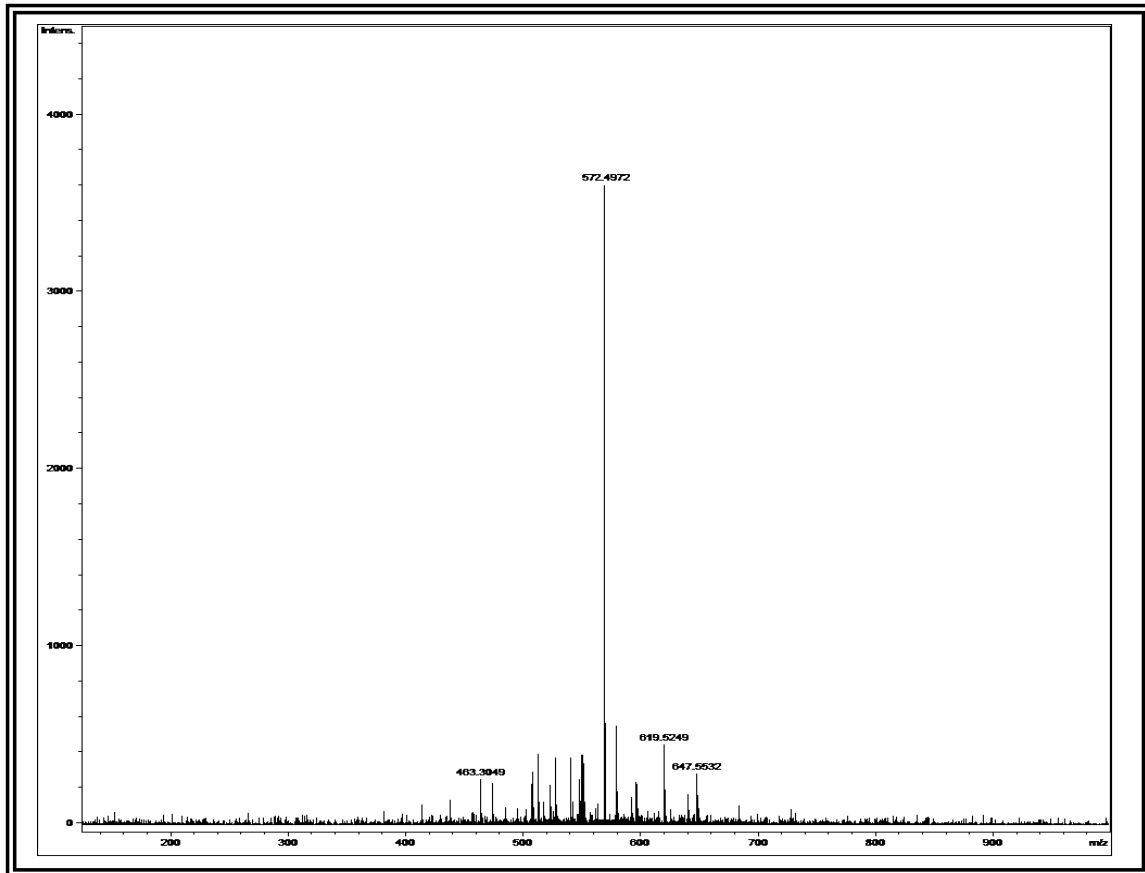
# Apêndice



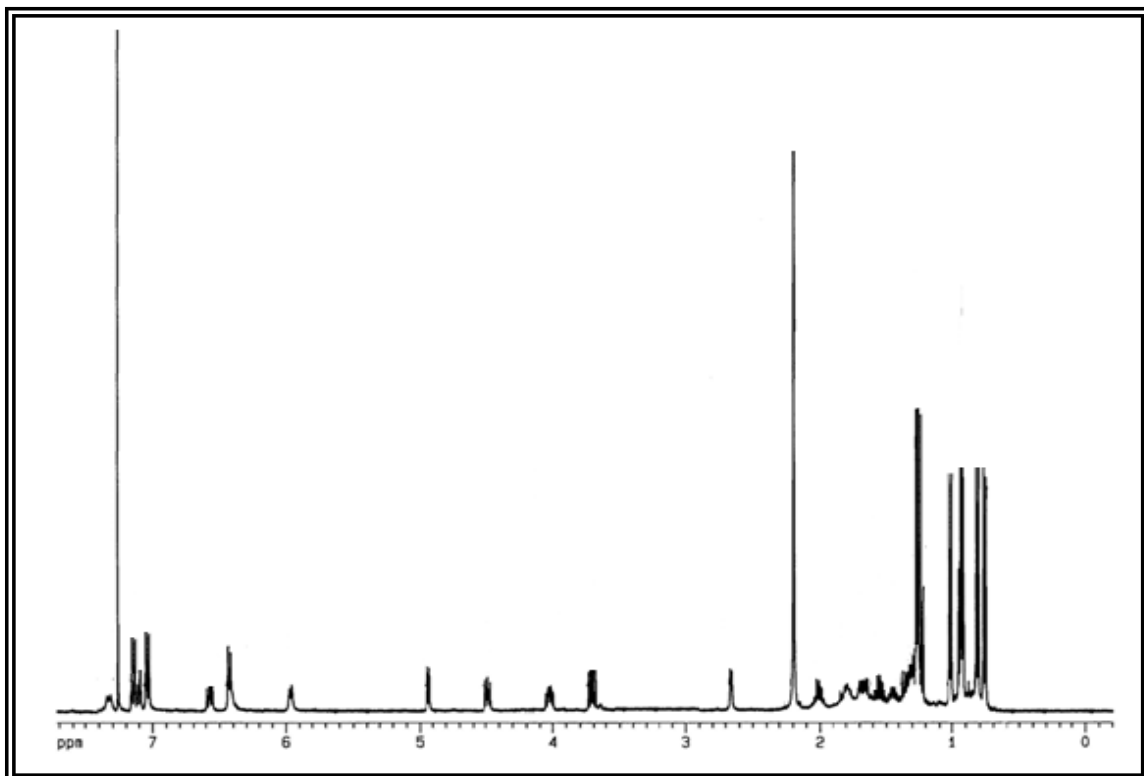
ANEXO 1. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A8 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



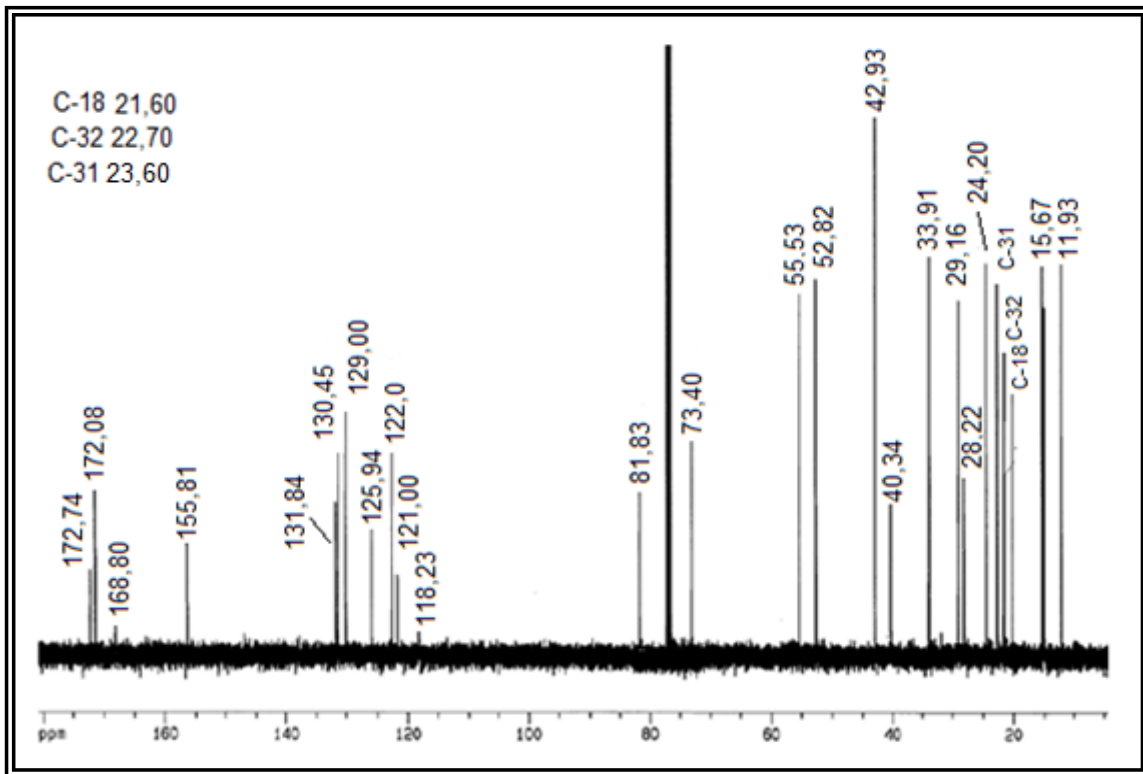
ANEXO 2. Mapa de correlações do espectro de COSY de A-08 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



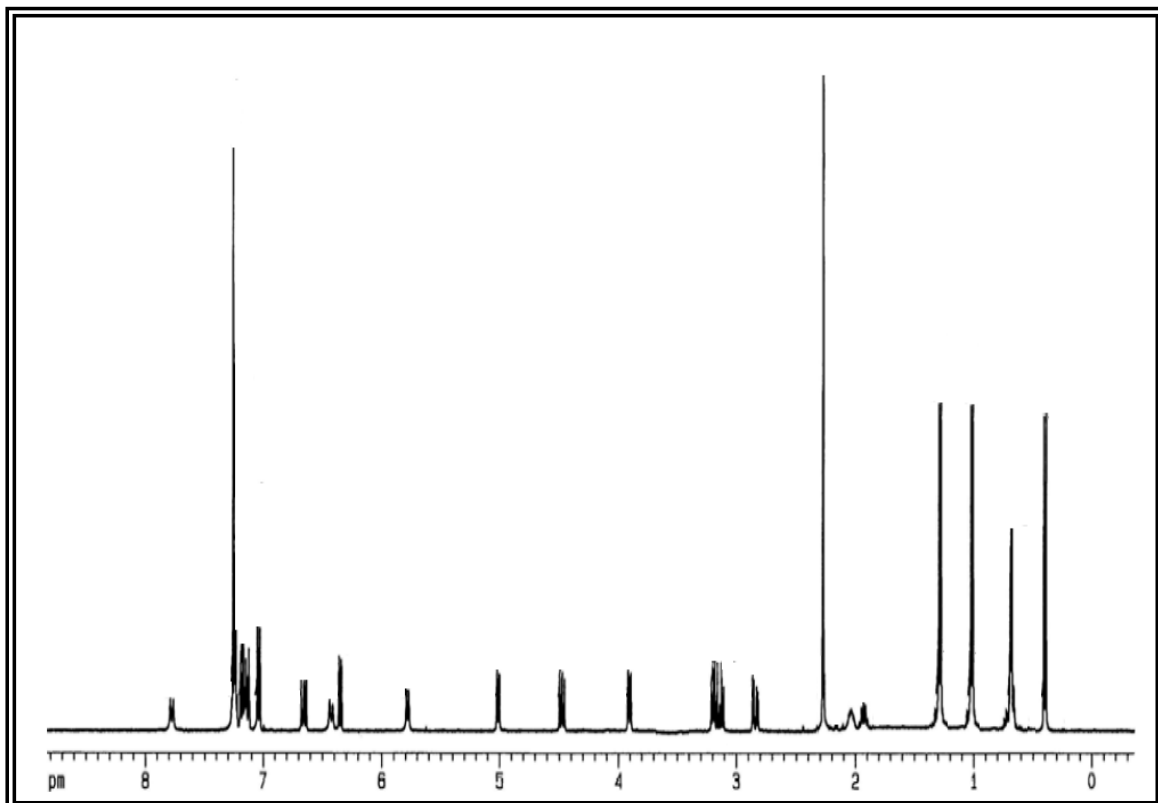
ANEXO 3. Espectro de massas de alta resolução de A8 (ESI, modo negativo)



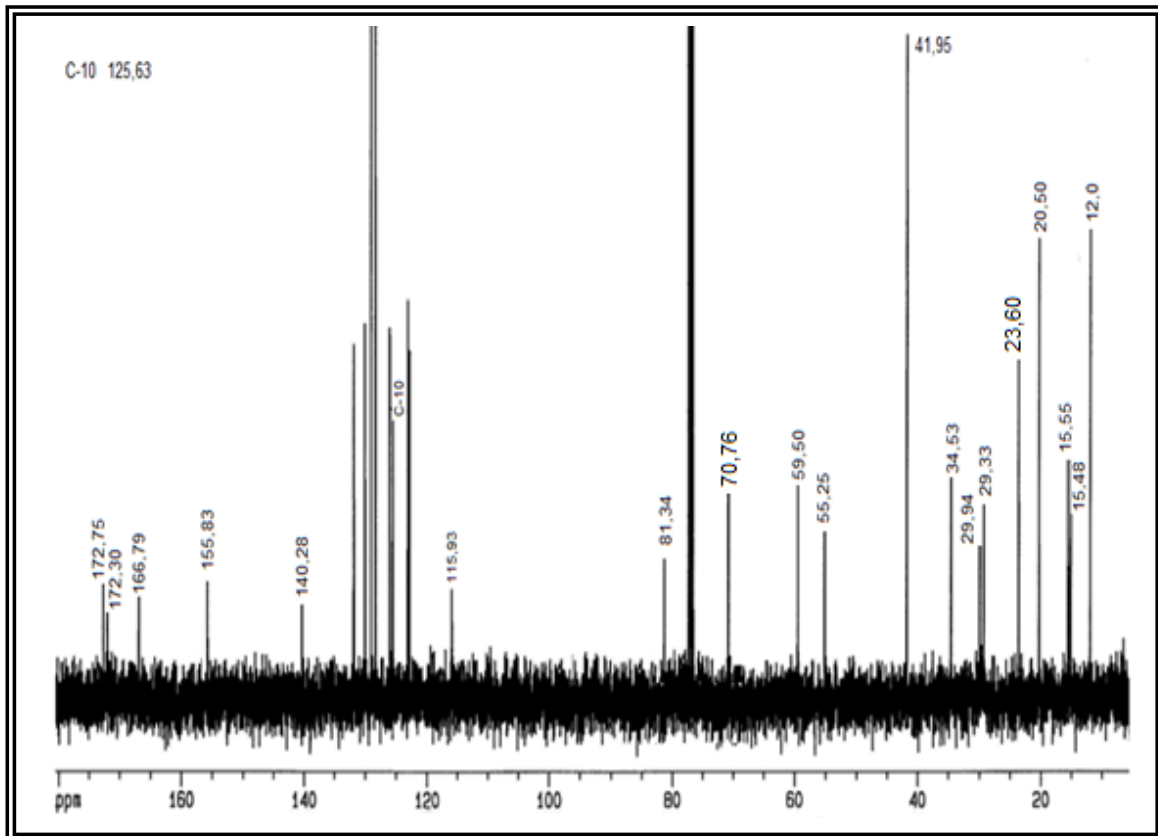
ANEXO 4. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de A9 (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)



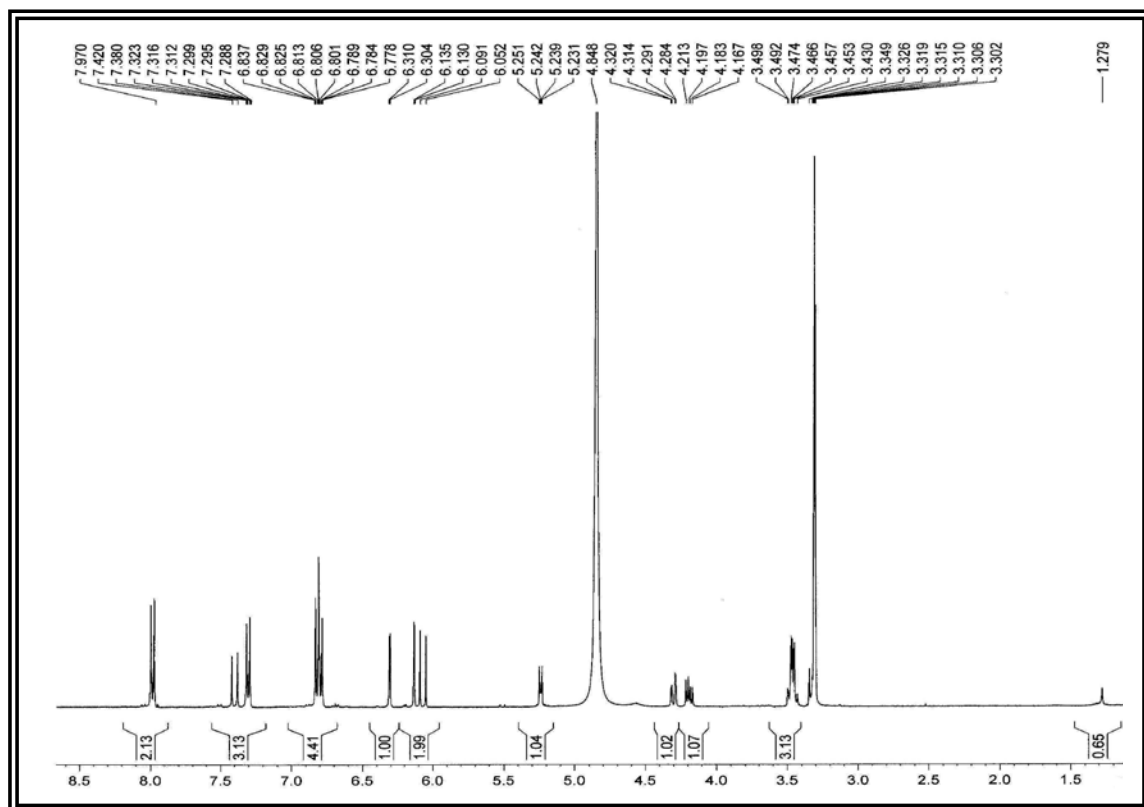
ANEXO 6. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A9 ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 MHz)



ANEXO 7. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de A10 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

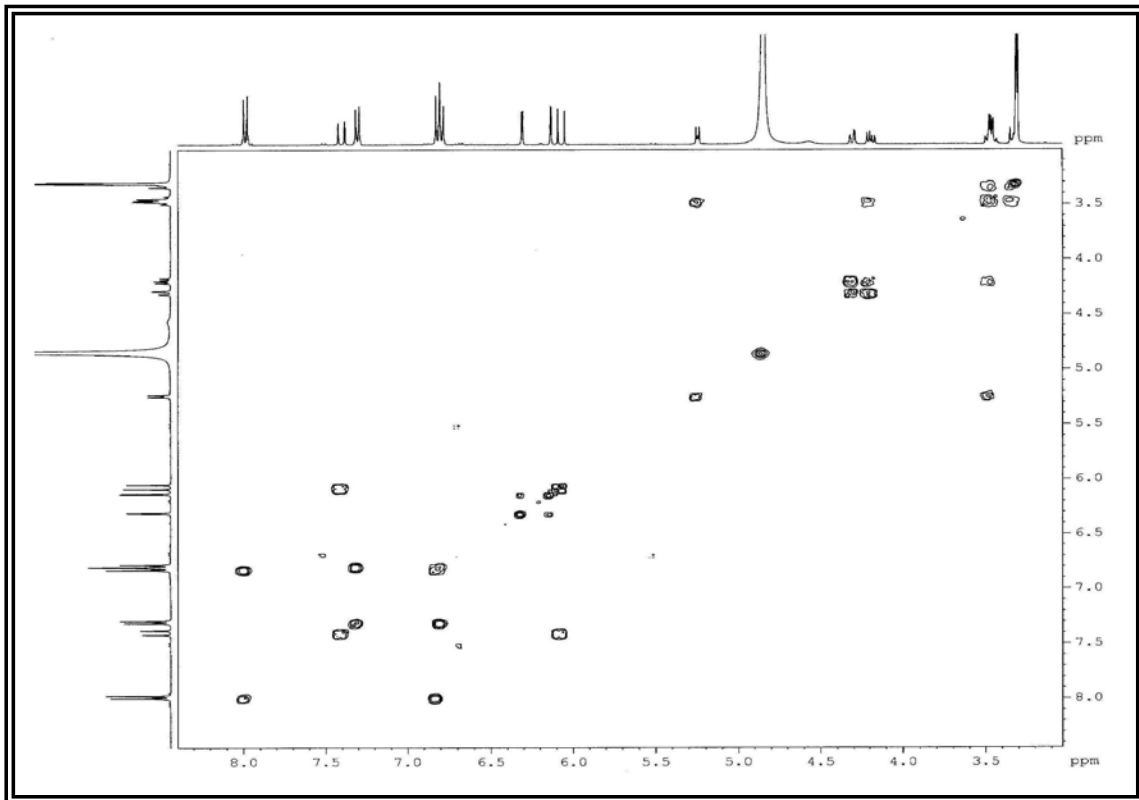


ANEXO 8. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de A10 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

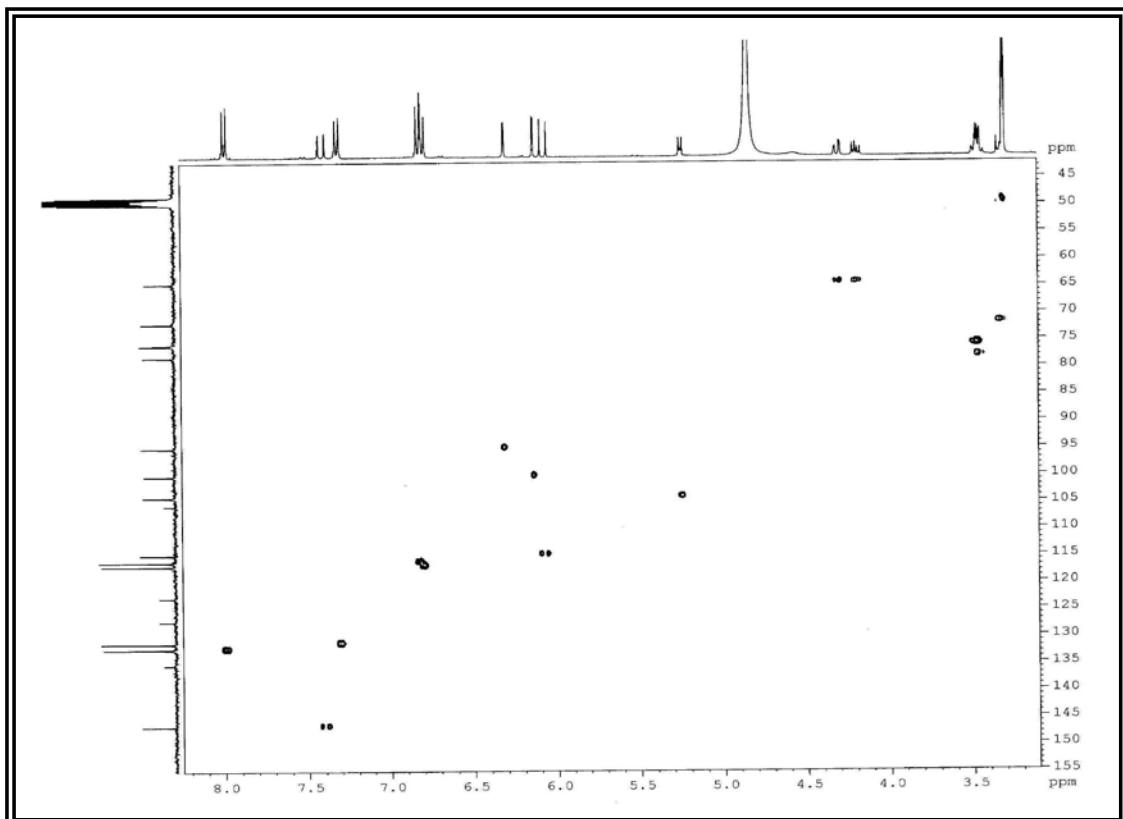


ANEXO 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F-1 (400 MHz, MeOD)

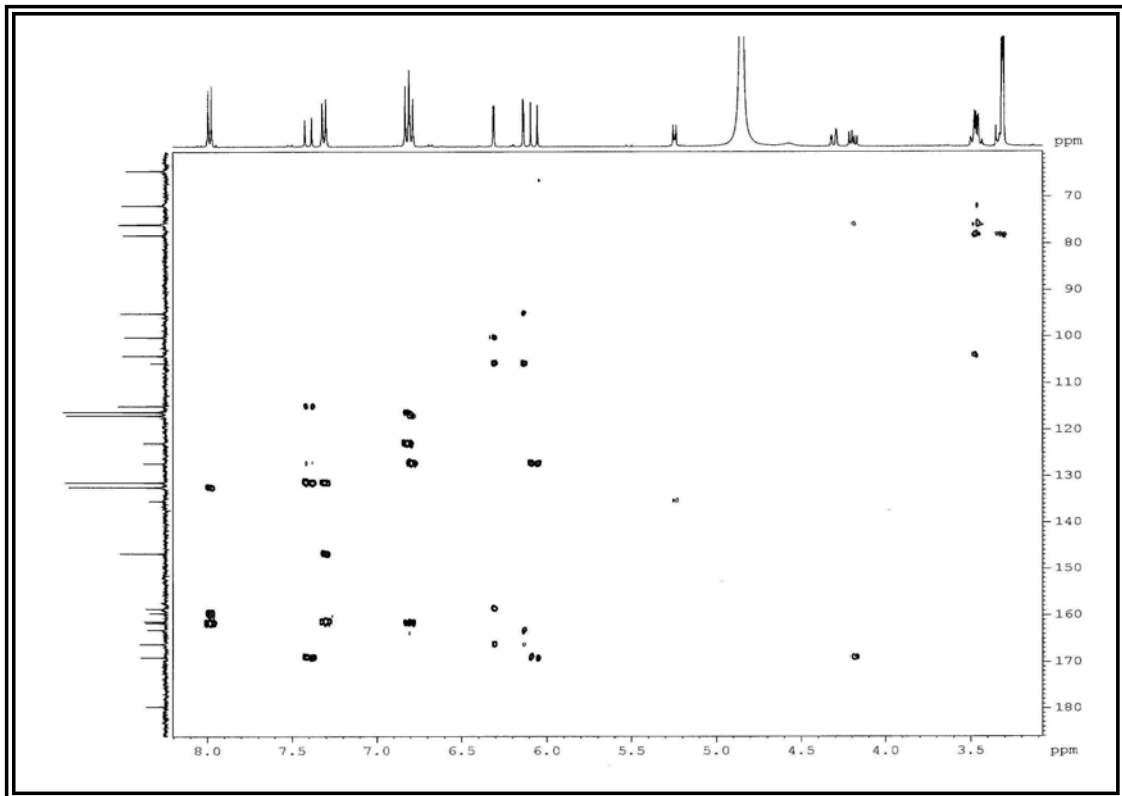




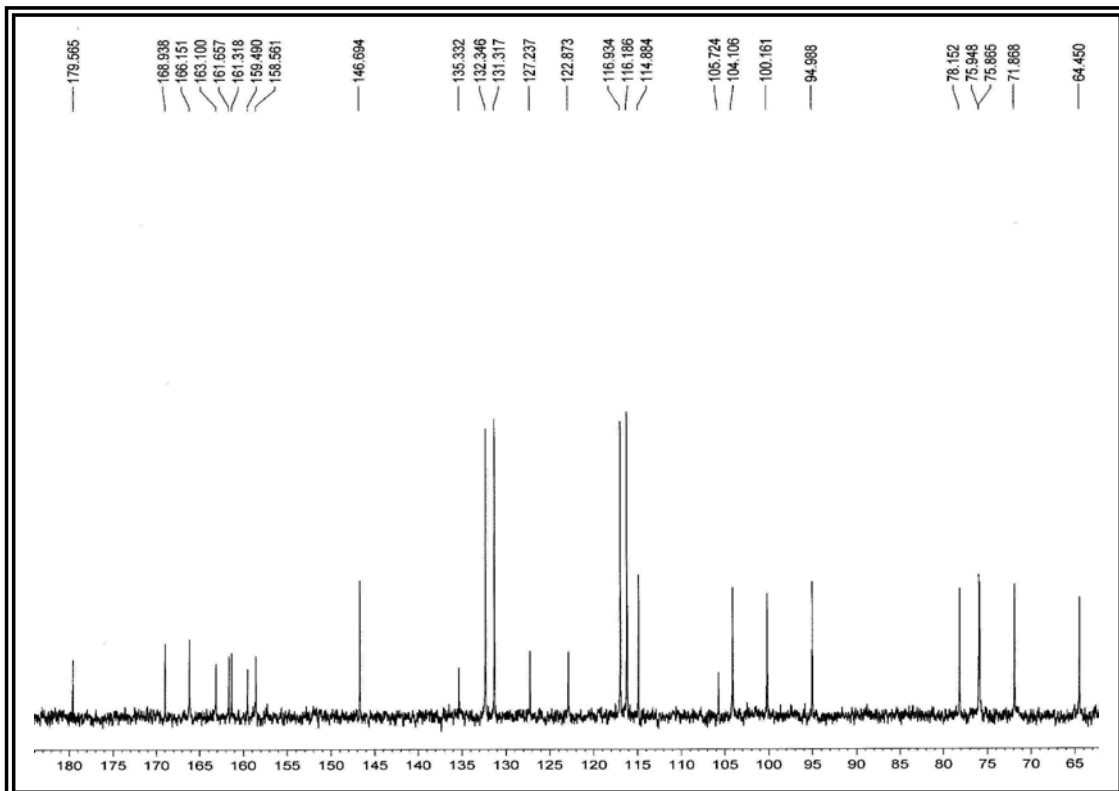
ANEXO 10. Mapa de correlações do espectro de COSY de F-1 (400 MHz, MeOD)



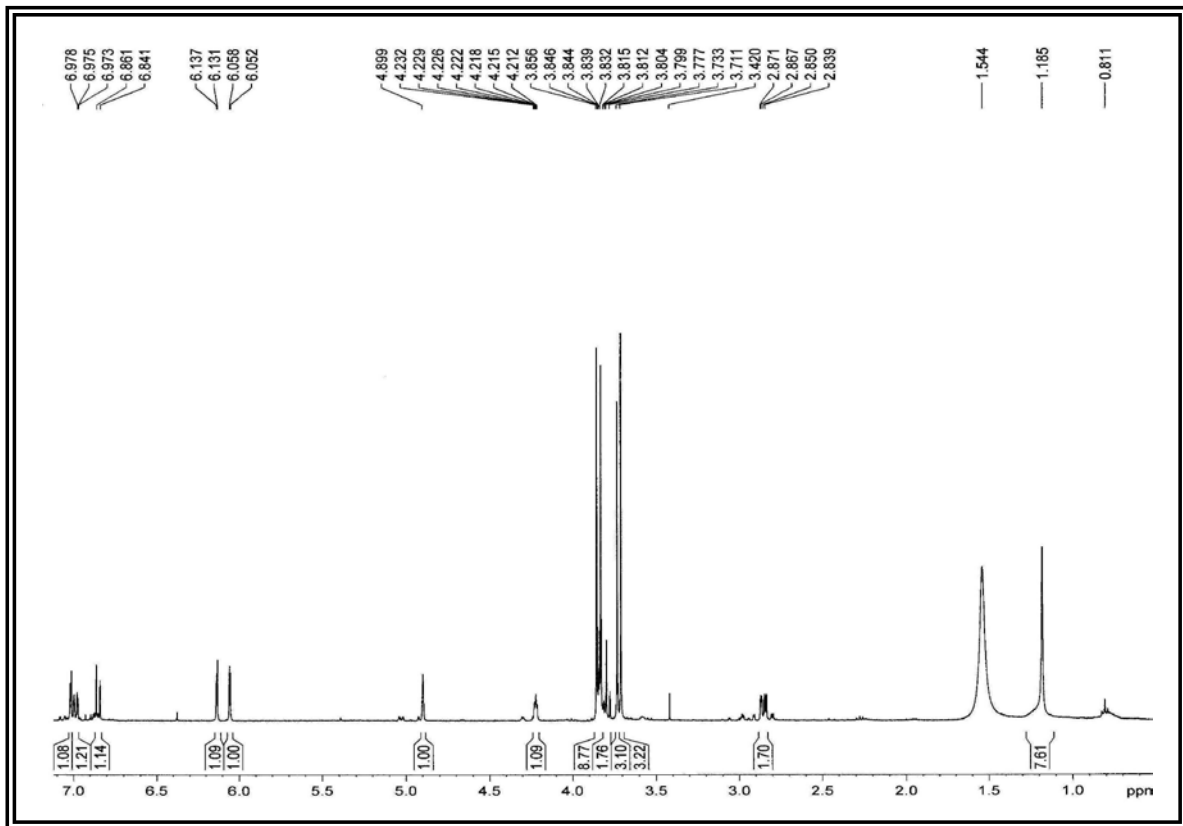
ANEXO 11. Mapa de correlações do espectro de HSQC de F-1 (400 MHz)



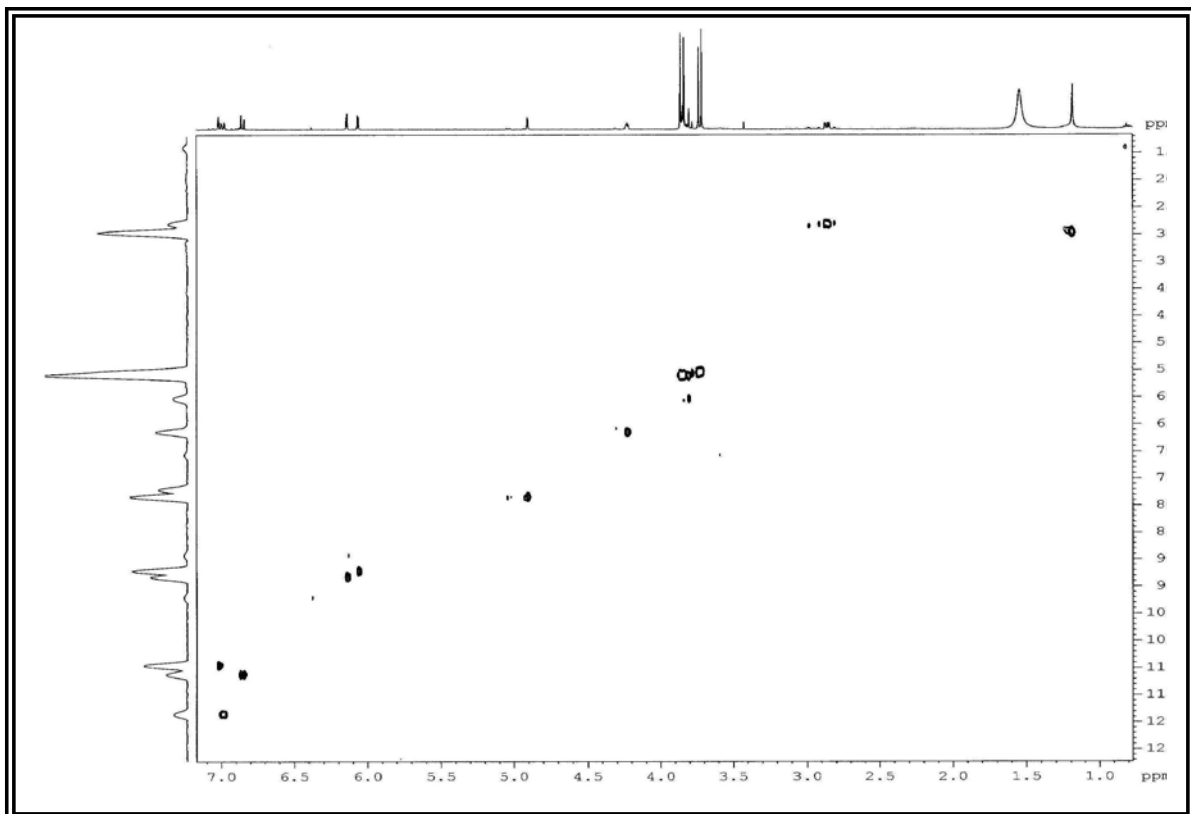
ANEXO 12. Mapa de correlações do espectro de HMBC de F-1 (400 MHz)



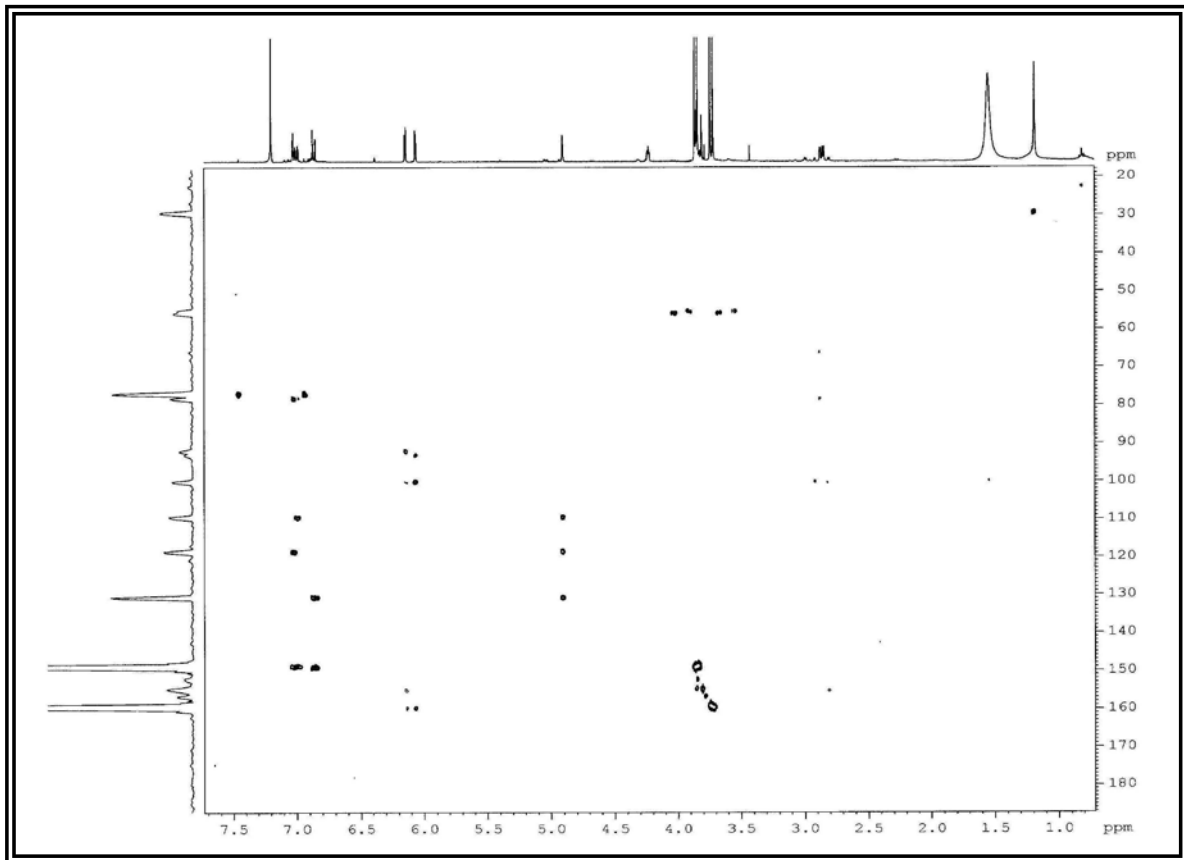
ANEXO 13. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) de F-1 (100 MHz)



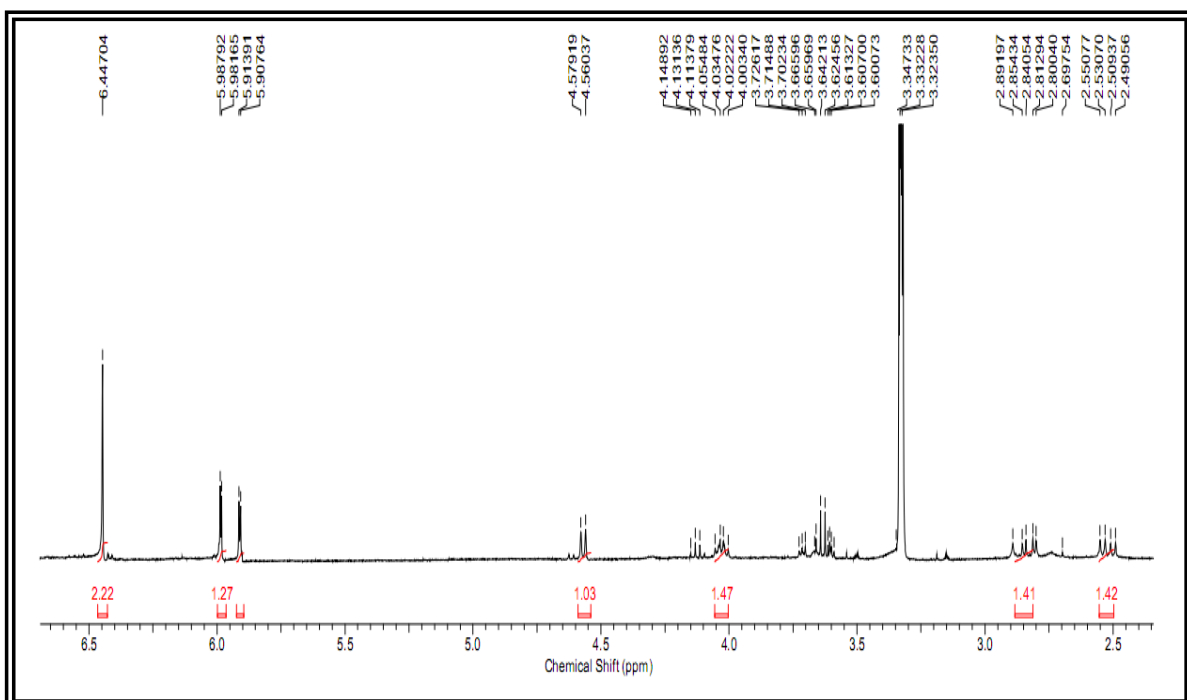
ANEXO 14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



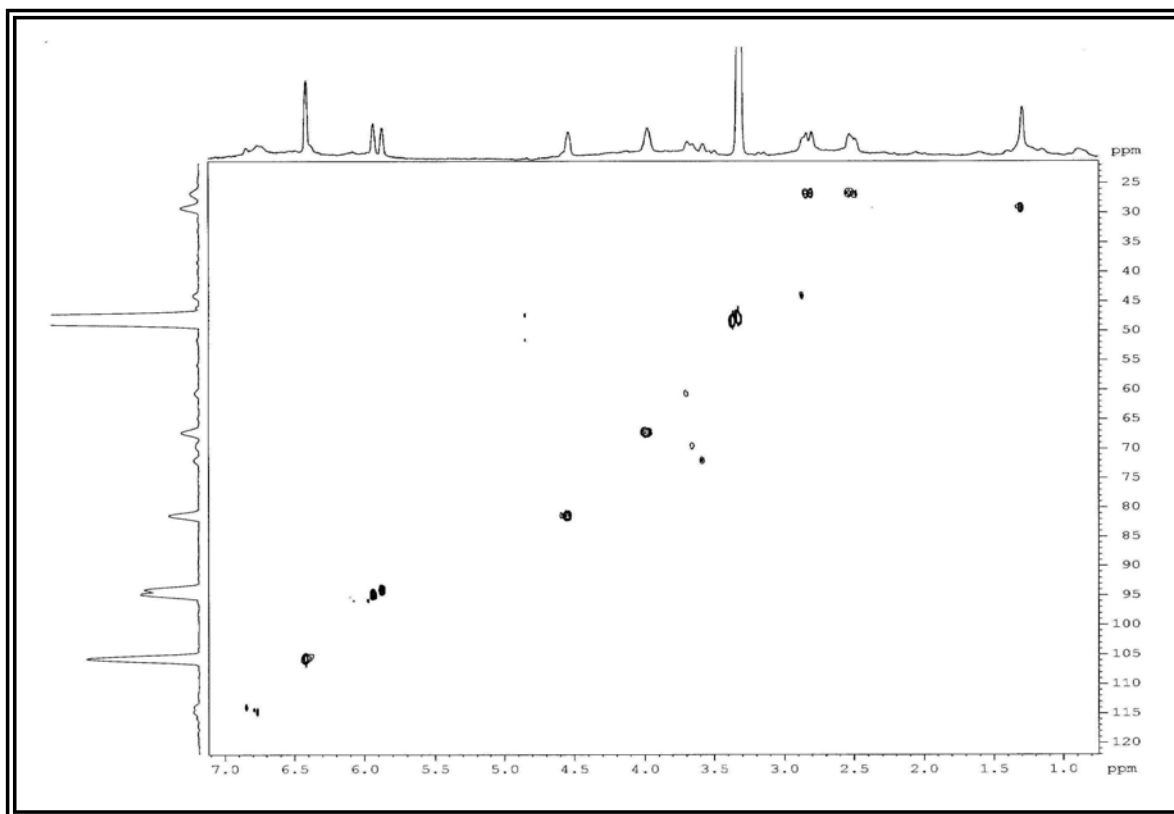
ANEXO 15. Mapa de correlações do espectro de HSQC de C-1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)



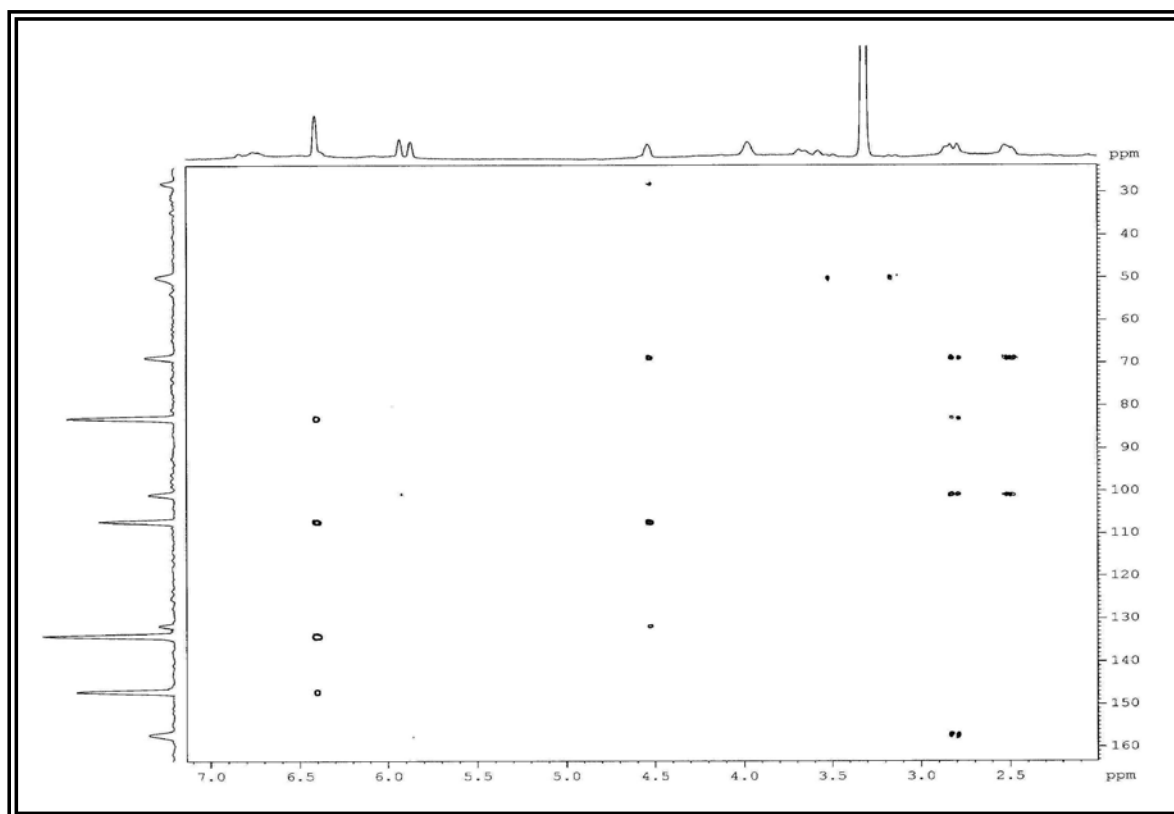
ANEXO 16. Espectro de HMBC de C-1 ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)



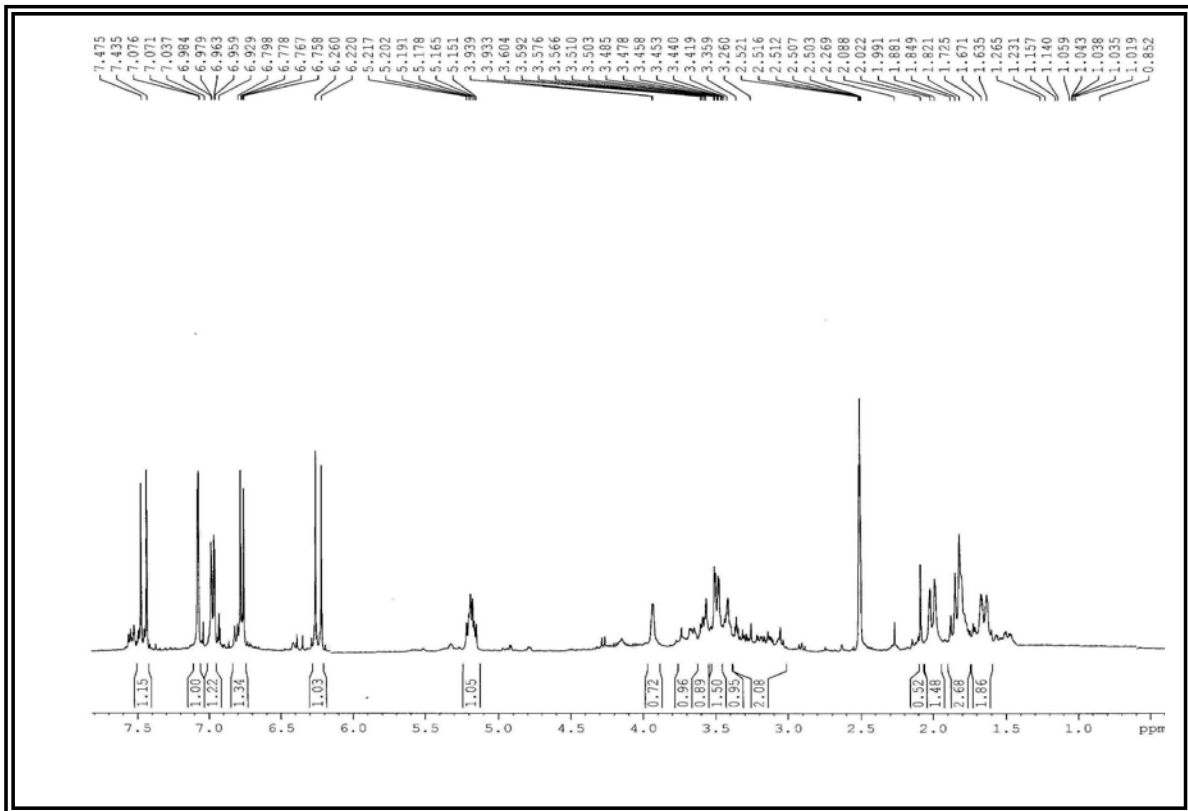
ANEXO 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de C-2 (400 MHz, MeOD)



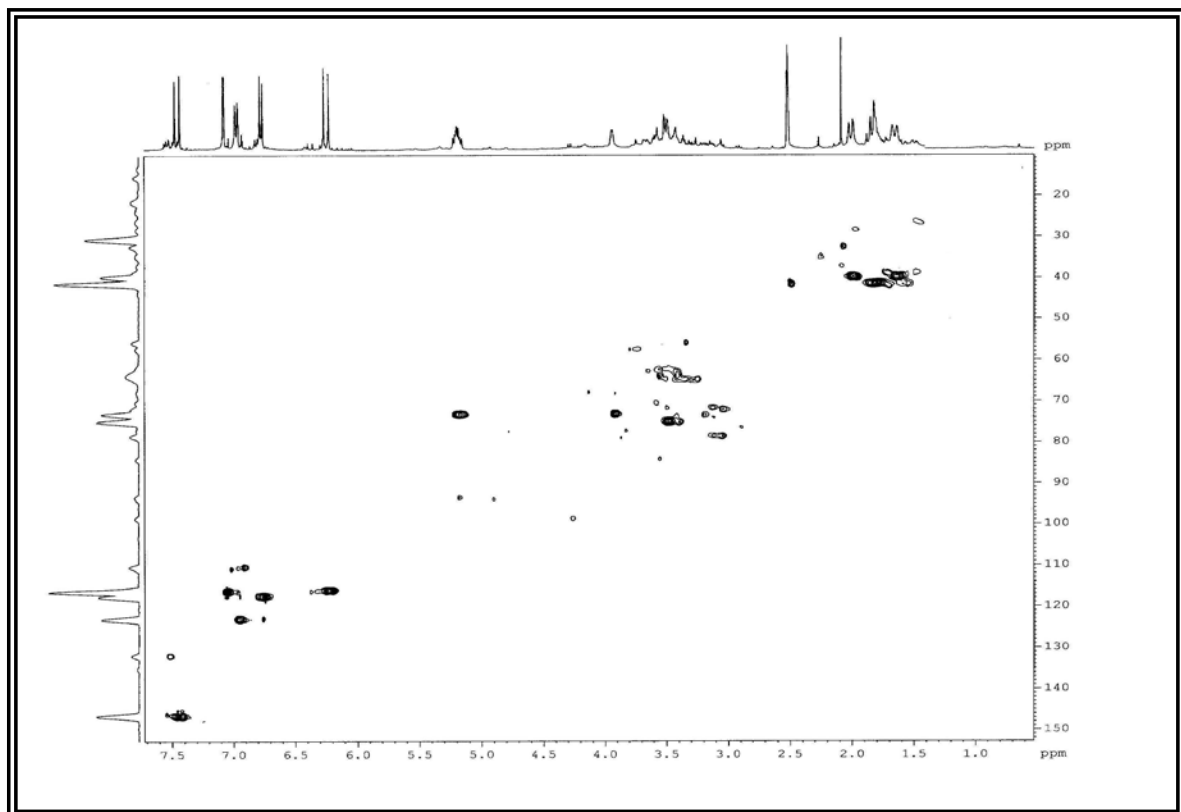
ANEXO 18. Mapa de correlações do espectro de HSQC de C-2 (MeOD; 400 MHz)



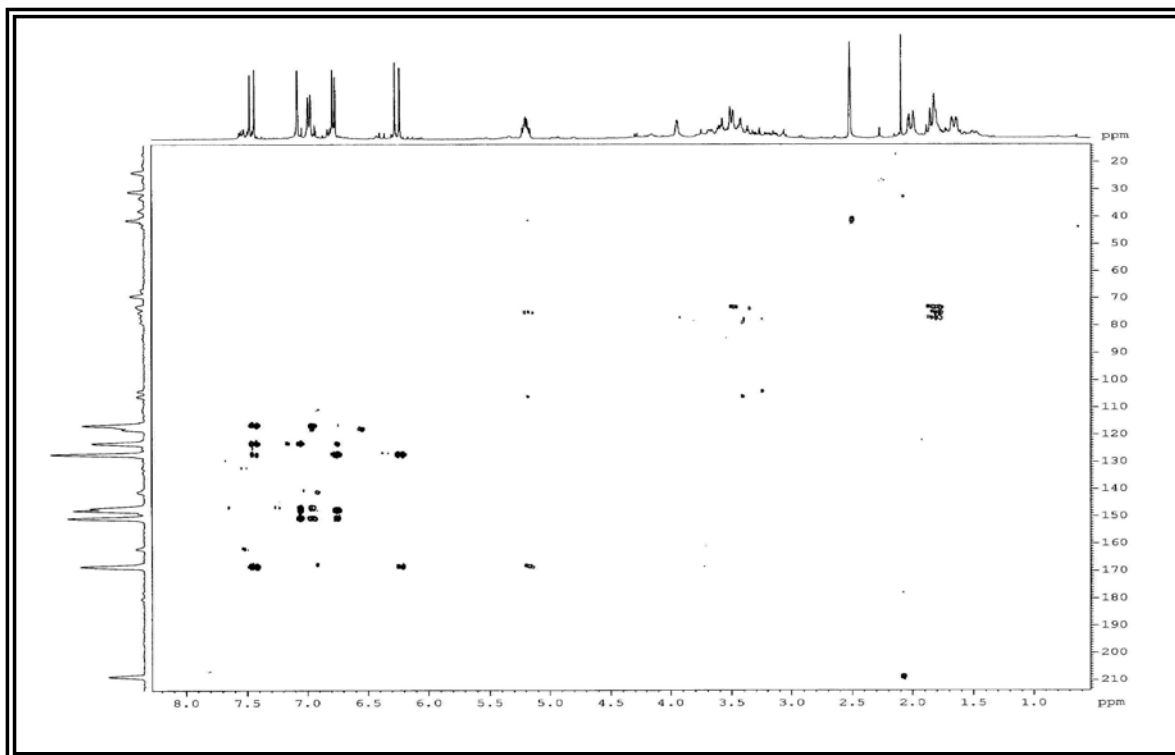
ANEXO 19. Mapa de correlações do espectro de HMBC de C-2 (MeOD; 400 MHz)



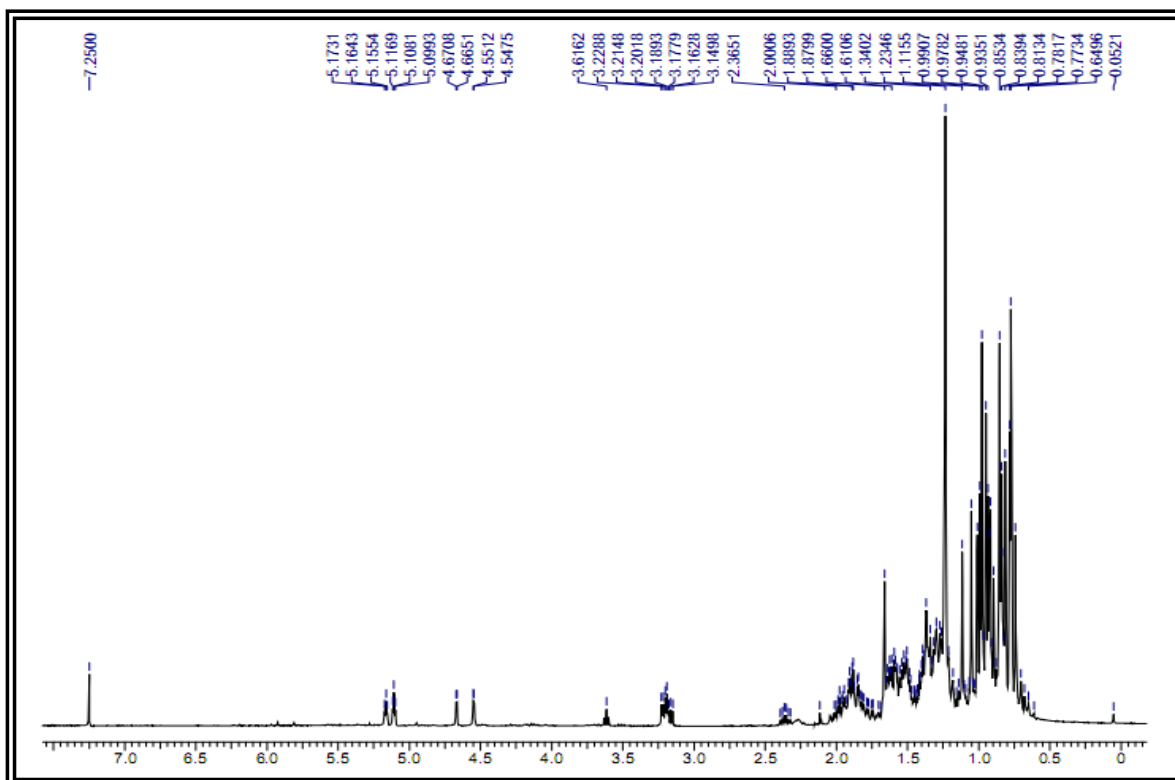
ANEXO 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Q-1 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)



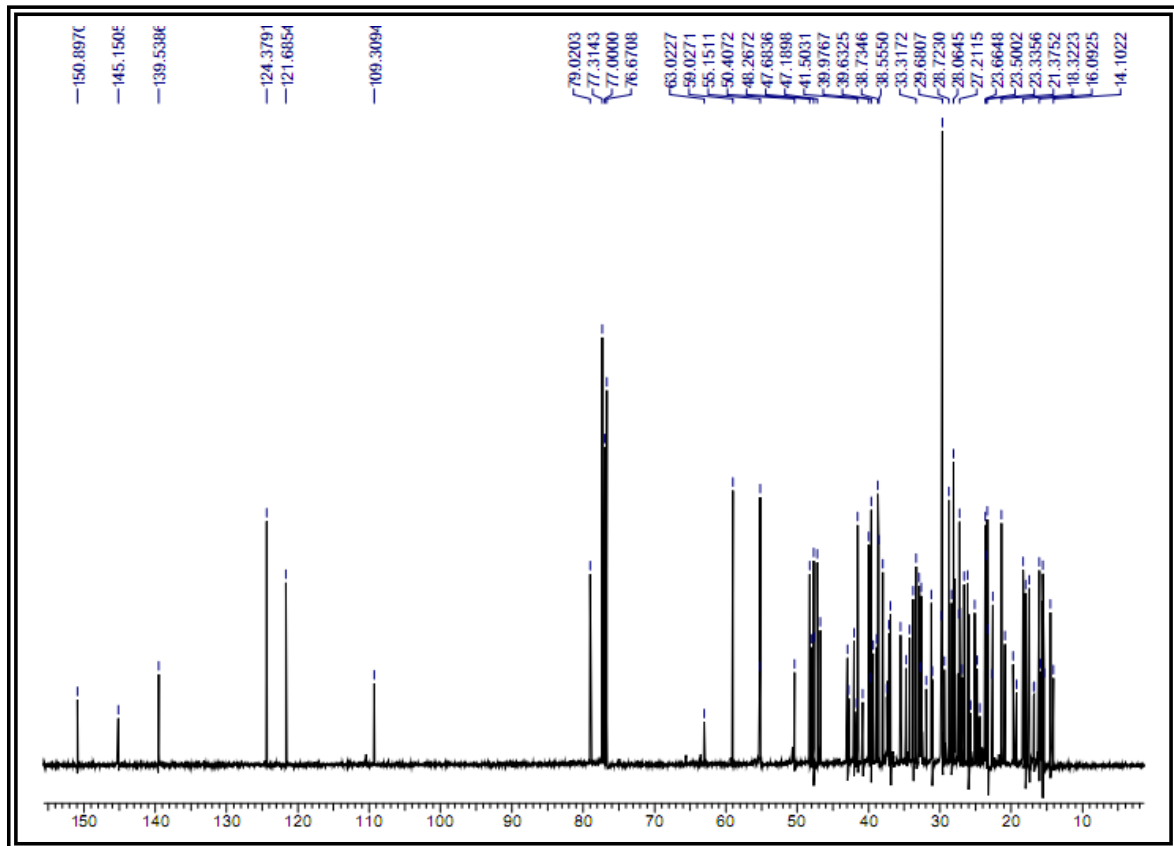
ANEXO 21. Espectro de HSQC de Q-1 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)



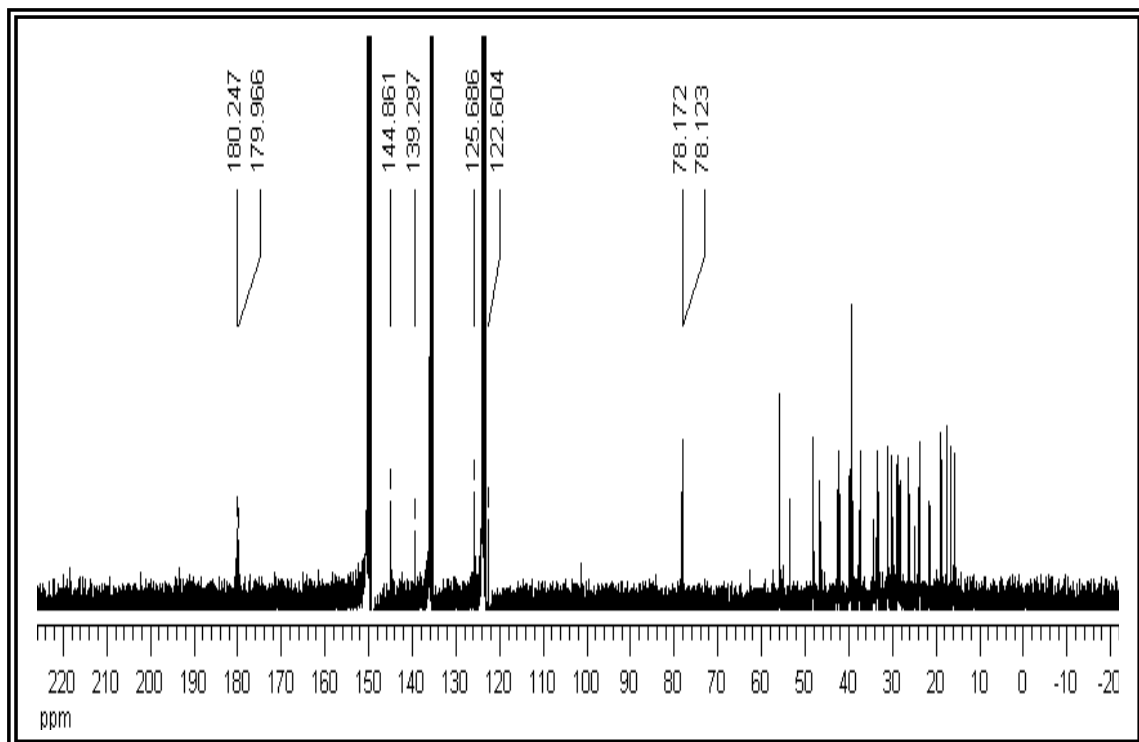
ANEXO 22. Espectro de HMBC de Q-1 (DMSO-d<sub>6</sub>; 400 MHz)



ANEXO 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura de T-1, T-2 e T-3 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

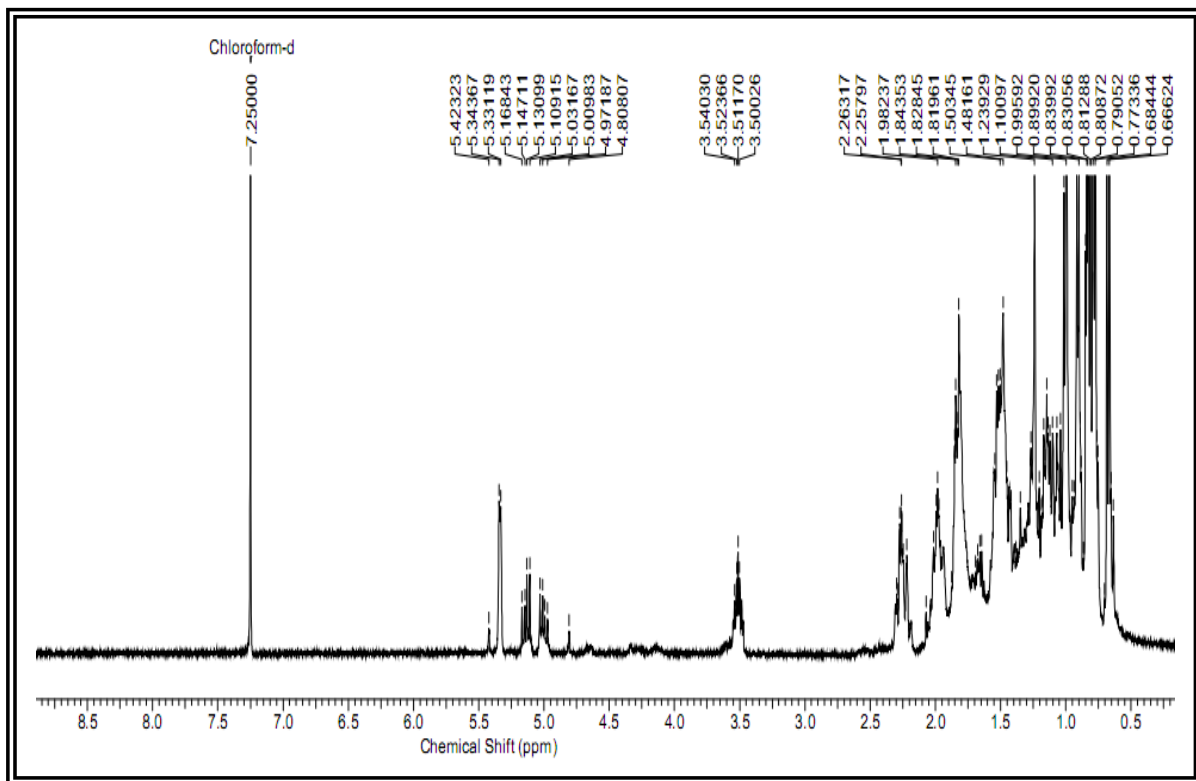


ANEXO 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) da mistura de T-1, T-2 e T-3 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

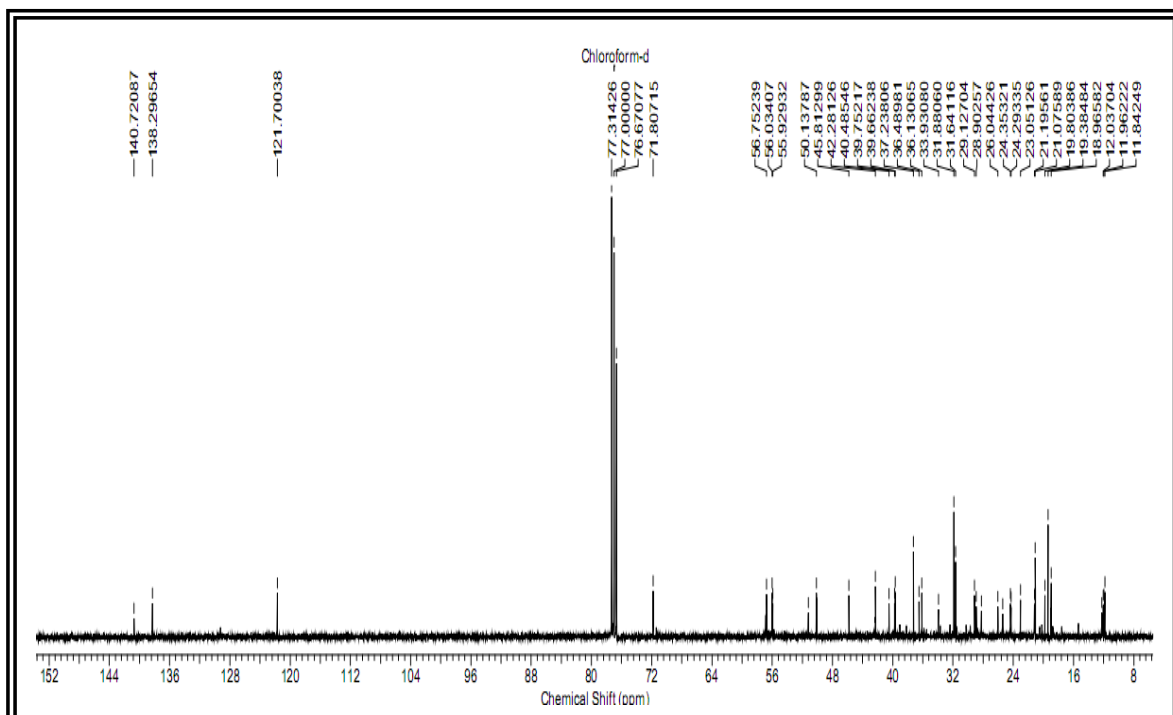


ANEXO 25. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) da mistura de T-4 e T-5 ( $\text{Pyr-d}_5$ , 100 MHz)

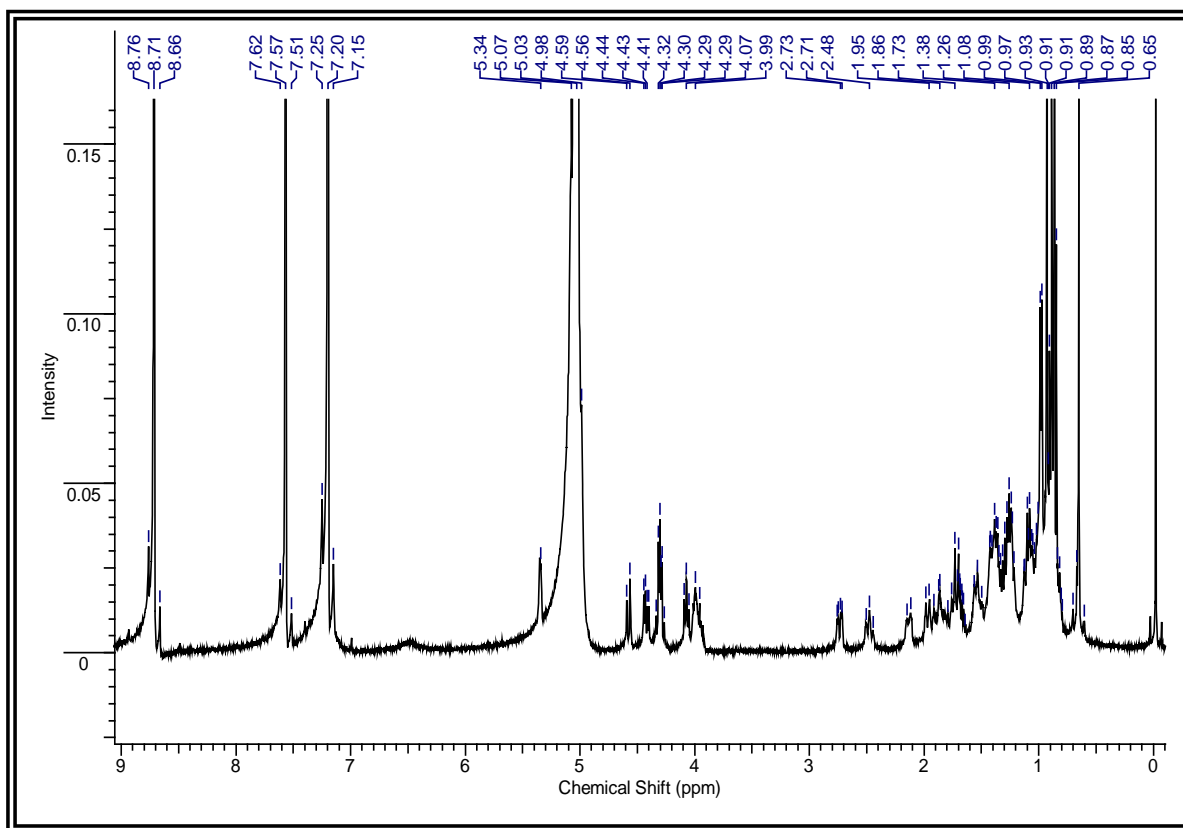




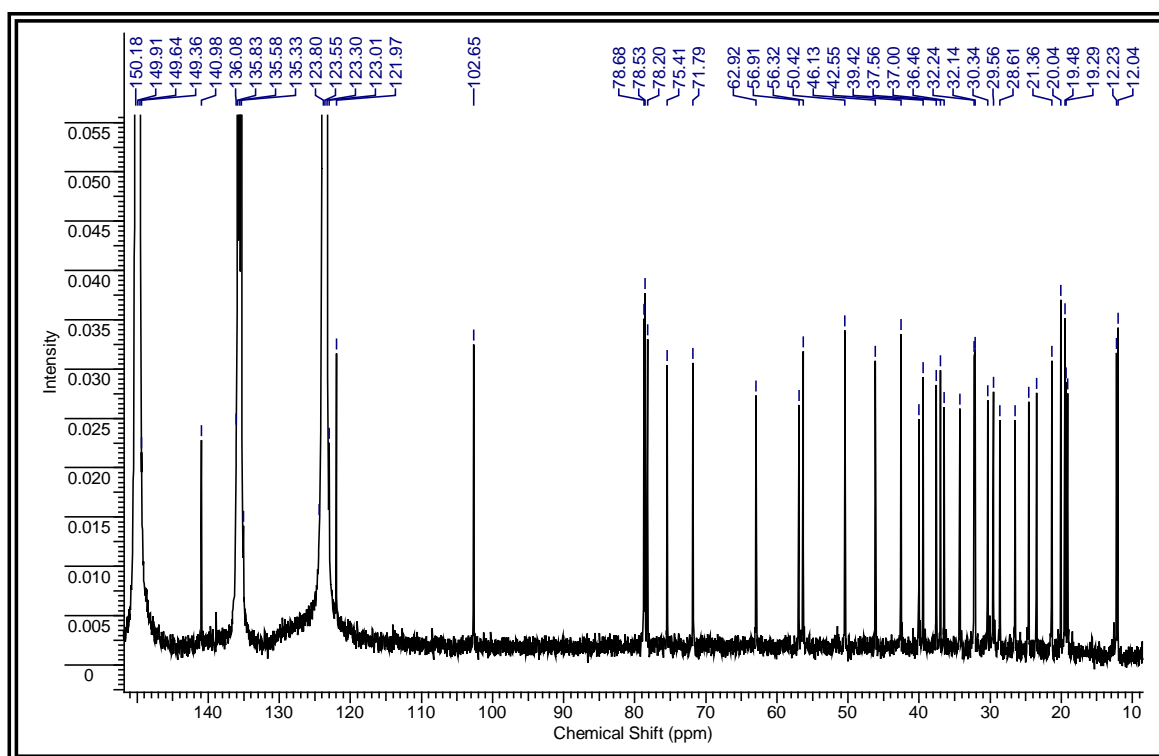
ANEXO 26. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de E-1 e E-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



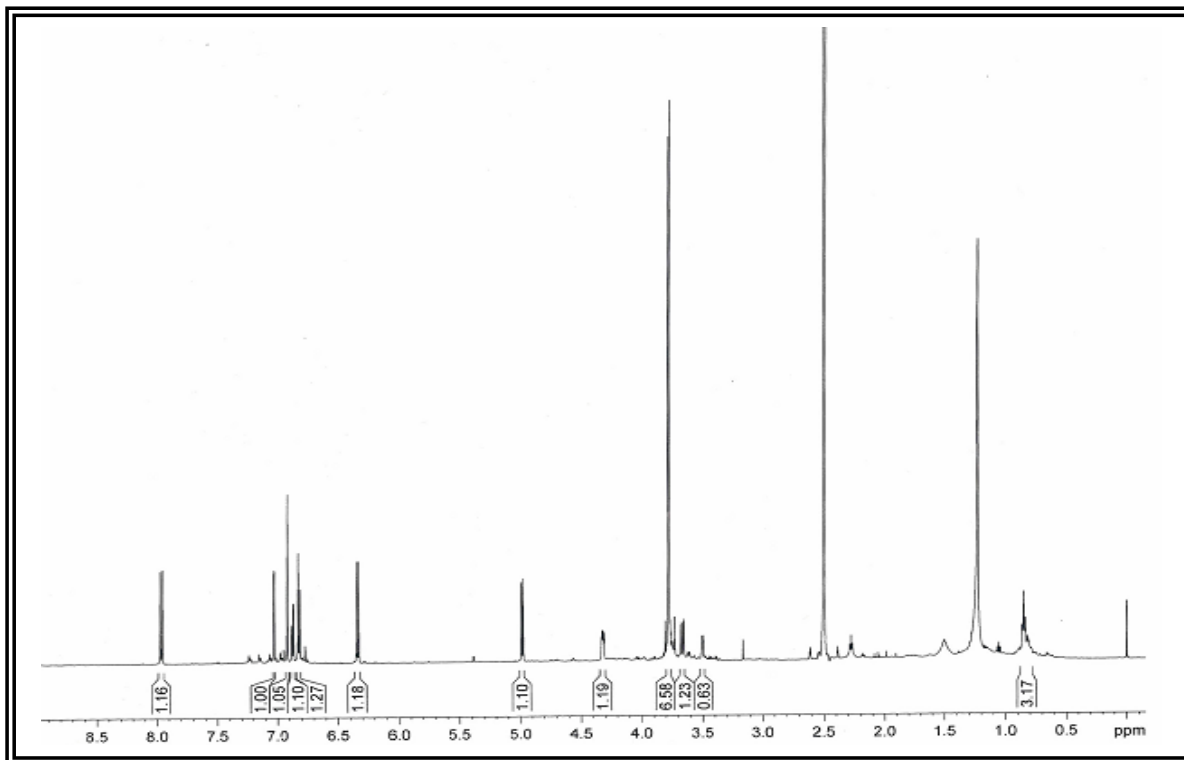
ANEXO 27. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (BB) da mistura de E-1 e E-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



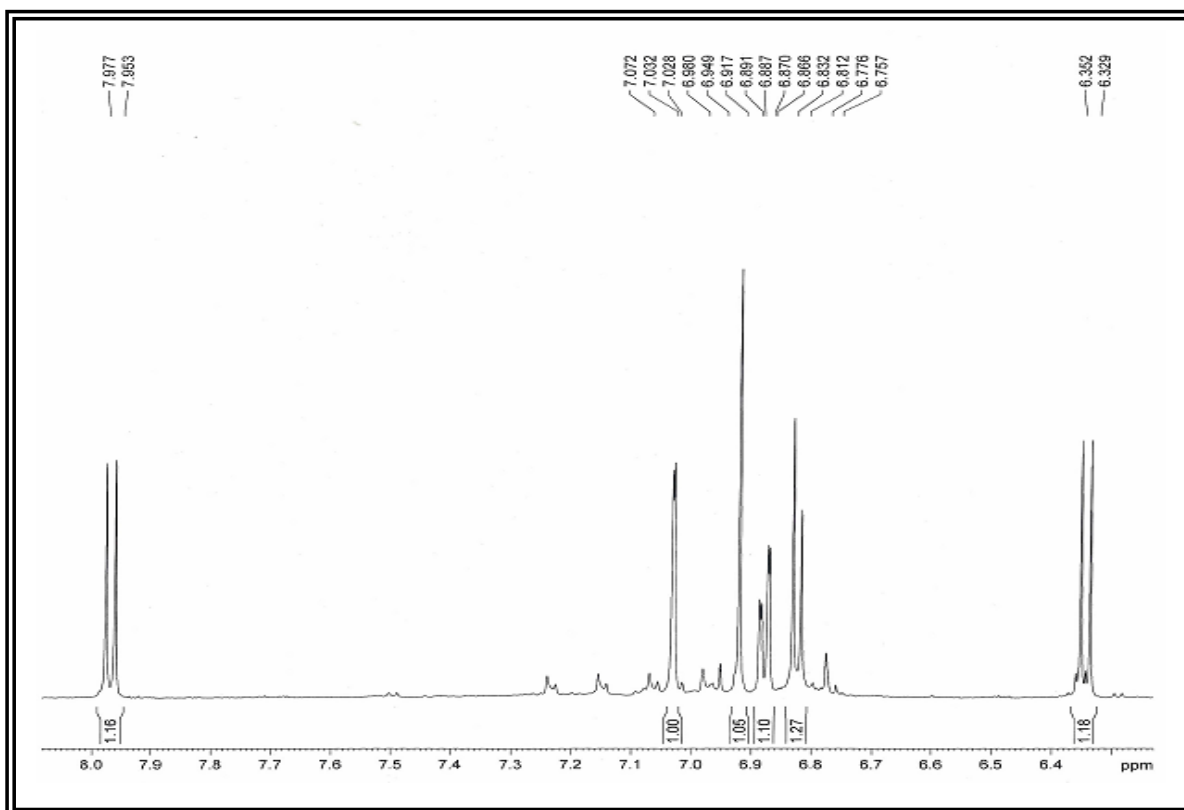
ANEXO 29. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de E-3 (Pyr-d<sub>5</sub>; 400 MHz)



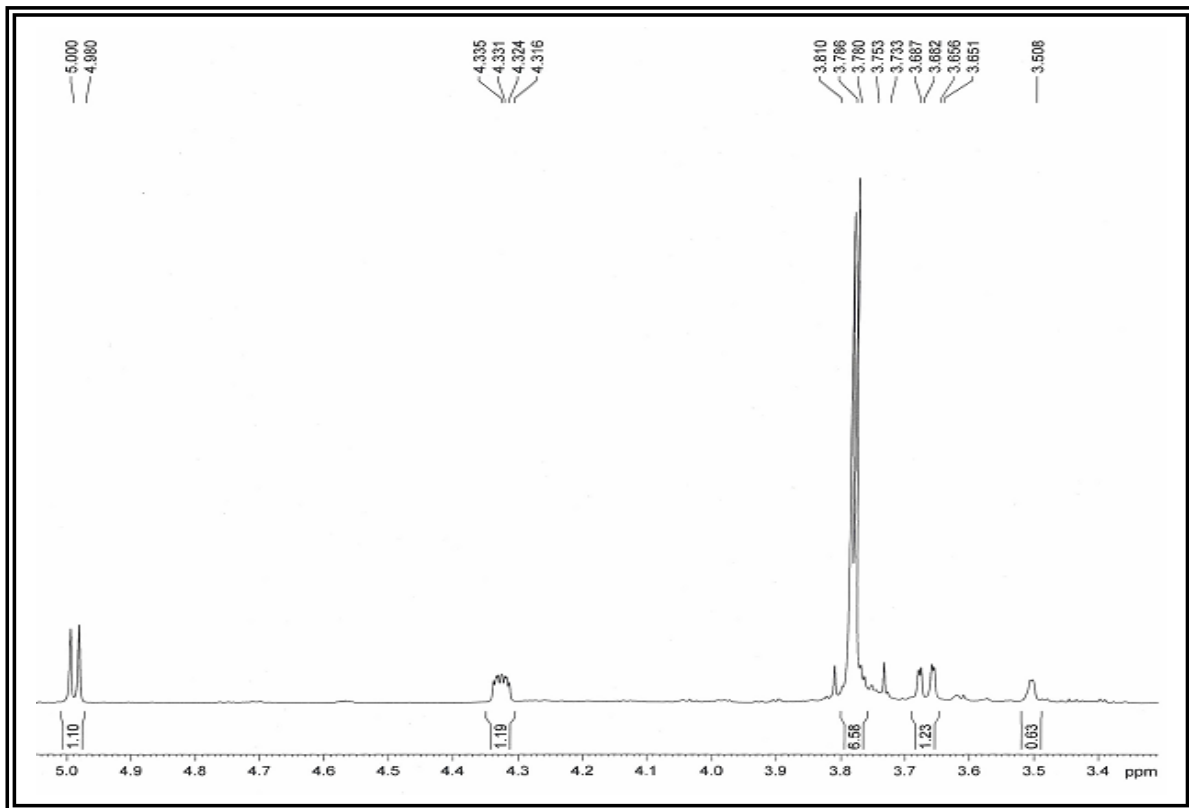
ANEXO 30. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (BB) de E-3 (Pyr-d<sub>5</sub>; 100 MHz)



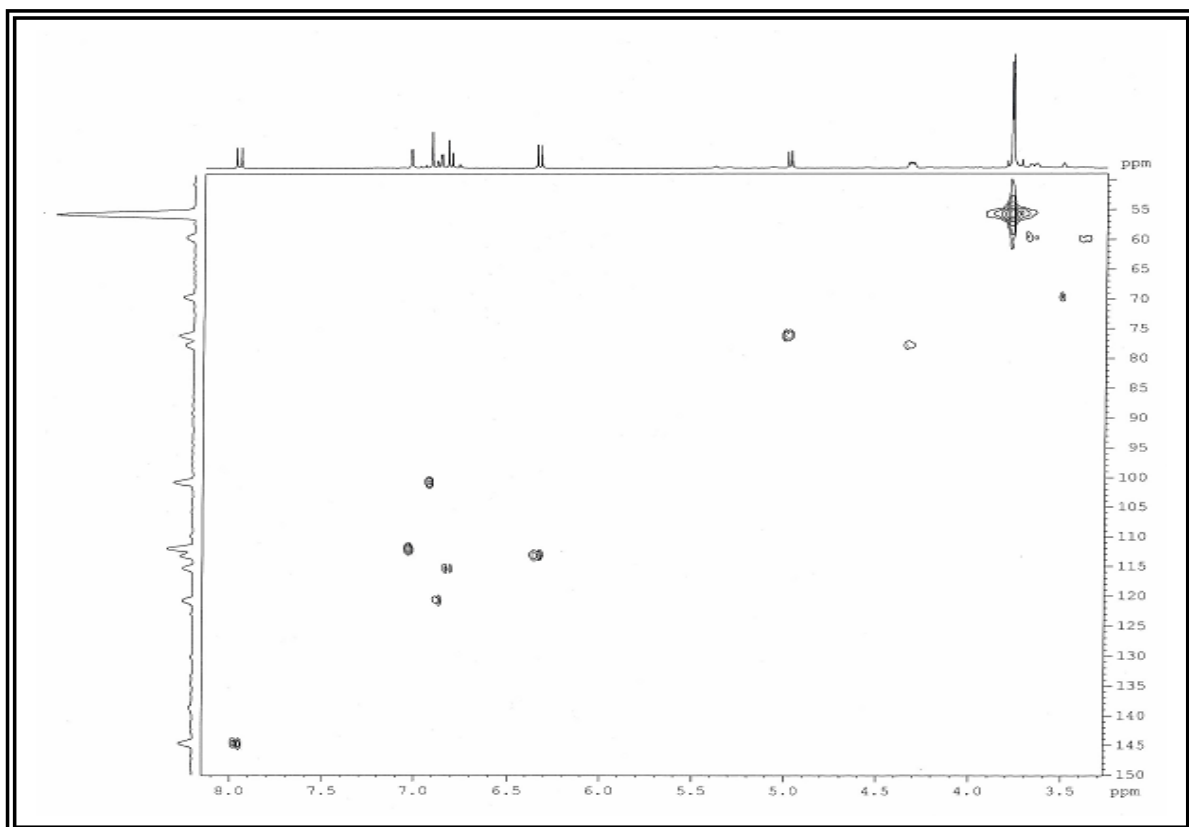
ANEXO 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1 (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)



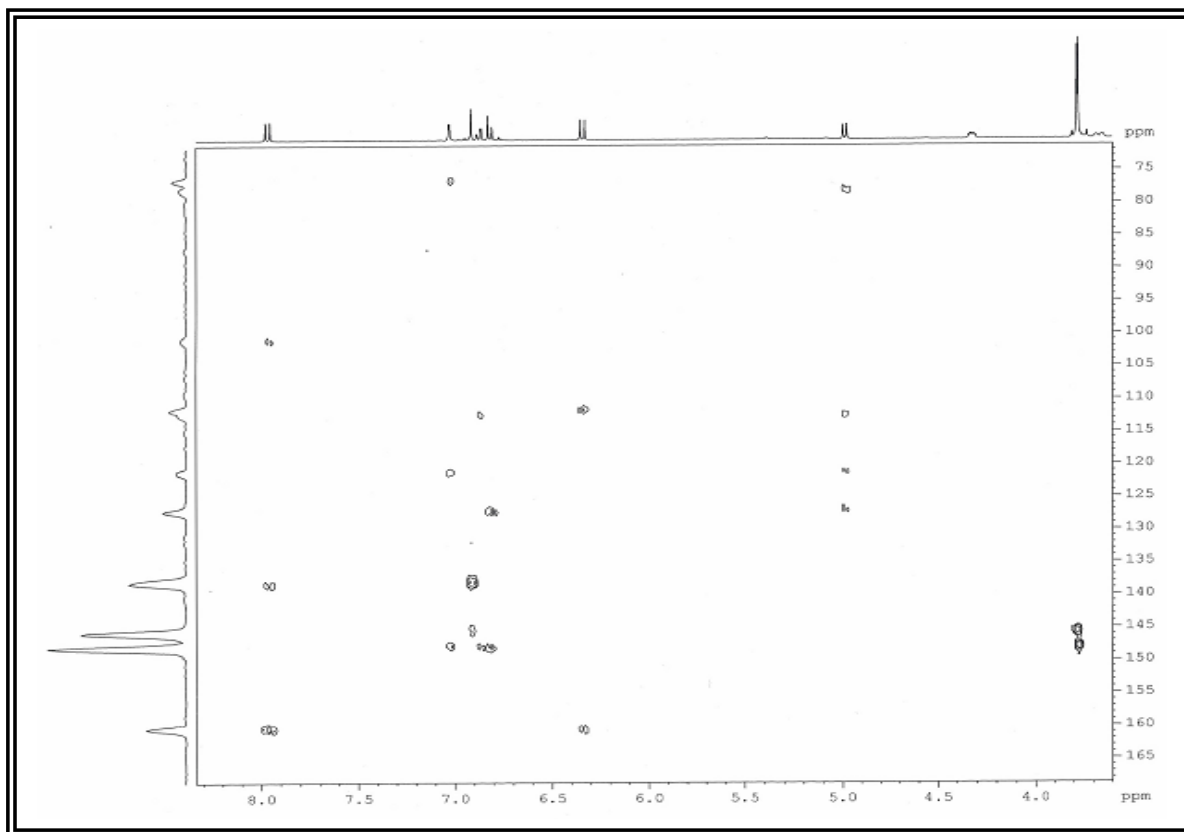
ANEXO 32. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1 ( $\delta$  6,3 – 8,0)



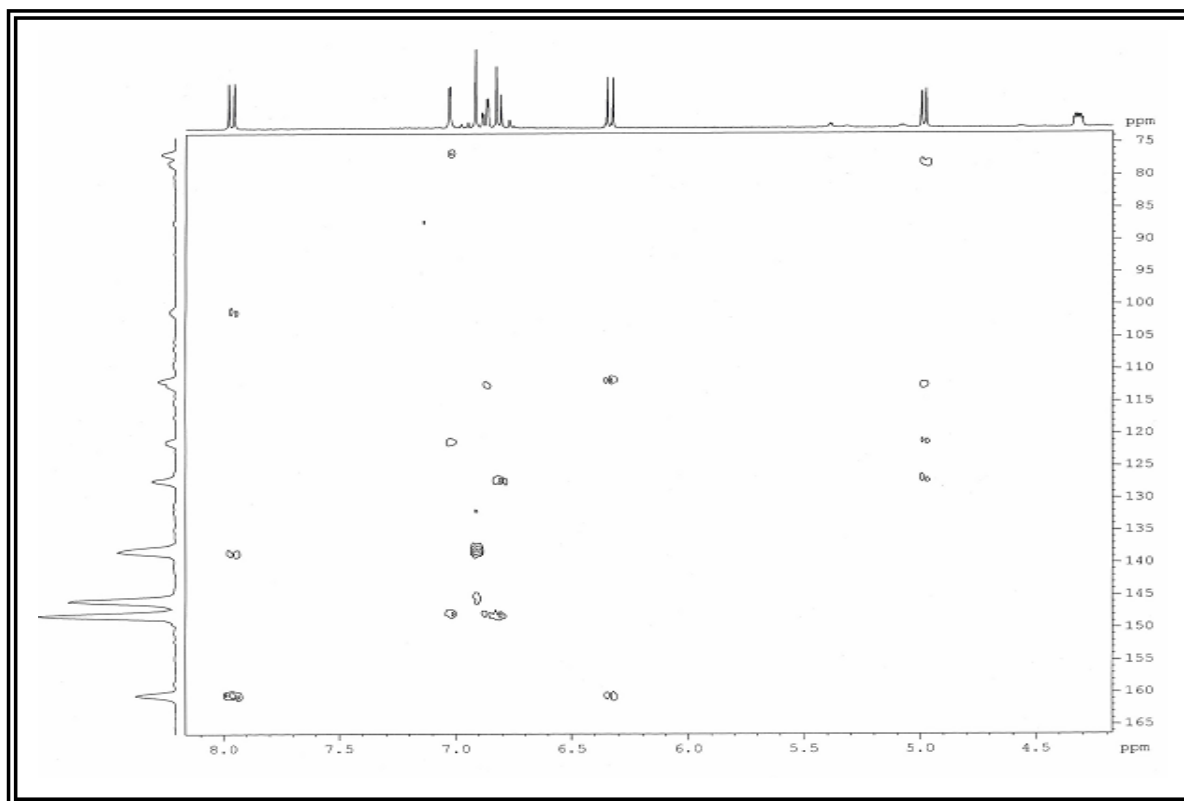
ANEXO 33. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-1 ( $\delta$  3,4 – 5,0)



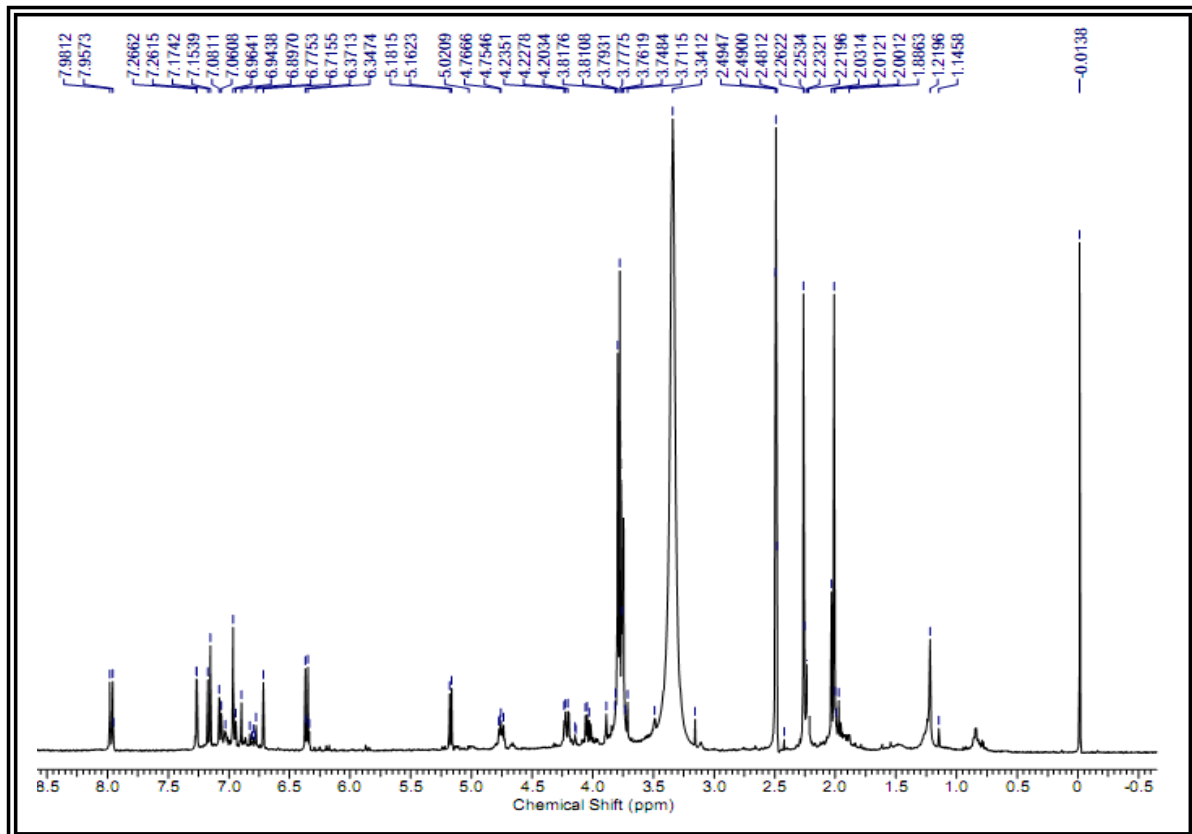
ANEXO 34. Espectro de HSQC de CL-1 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)



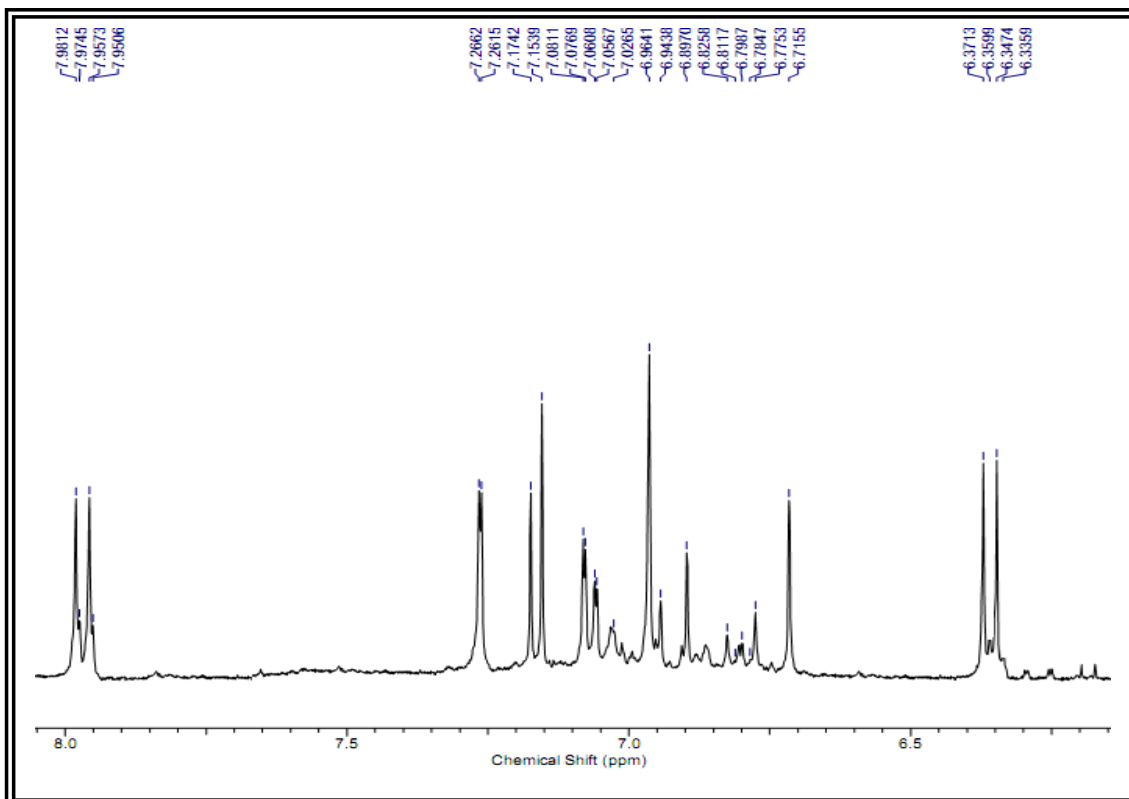
ANEXO 35. Espectro de HMBC de CL-1 (DMSO-d<sub>6</sub>; 400 MHz)



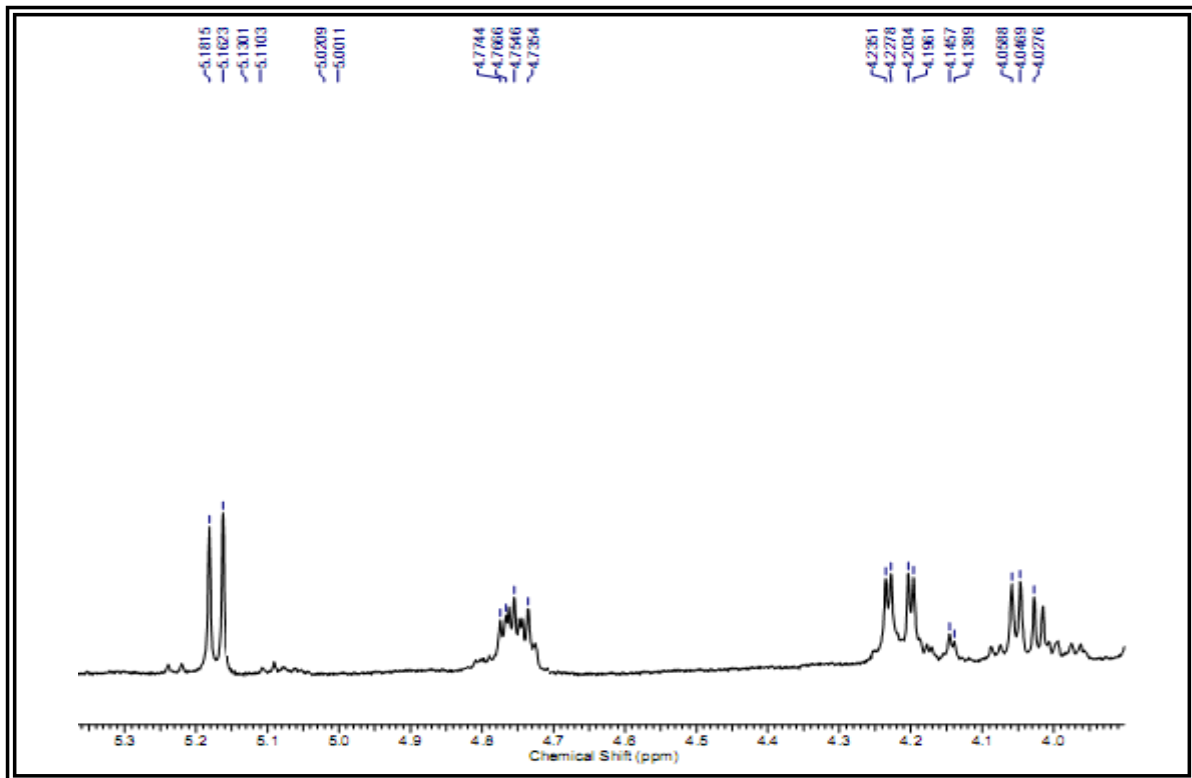
ANEXO 36. Ampliação do espectro de HMBC de CL-1 ( $\delta_H$  4,3 – 8,0;  $\delta_C$  75 – 165)



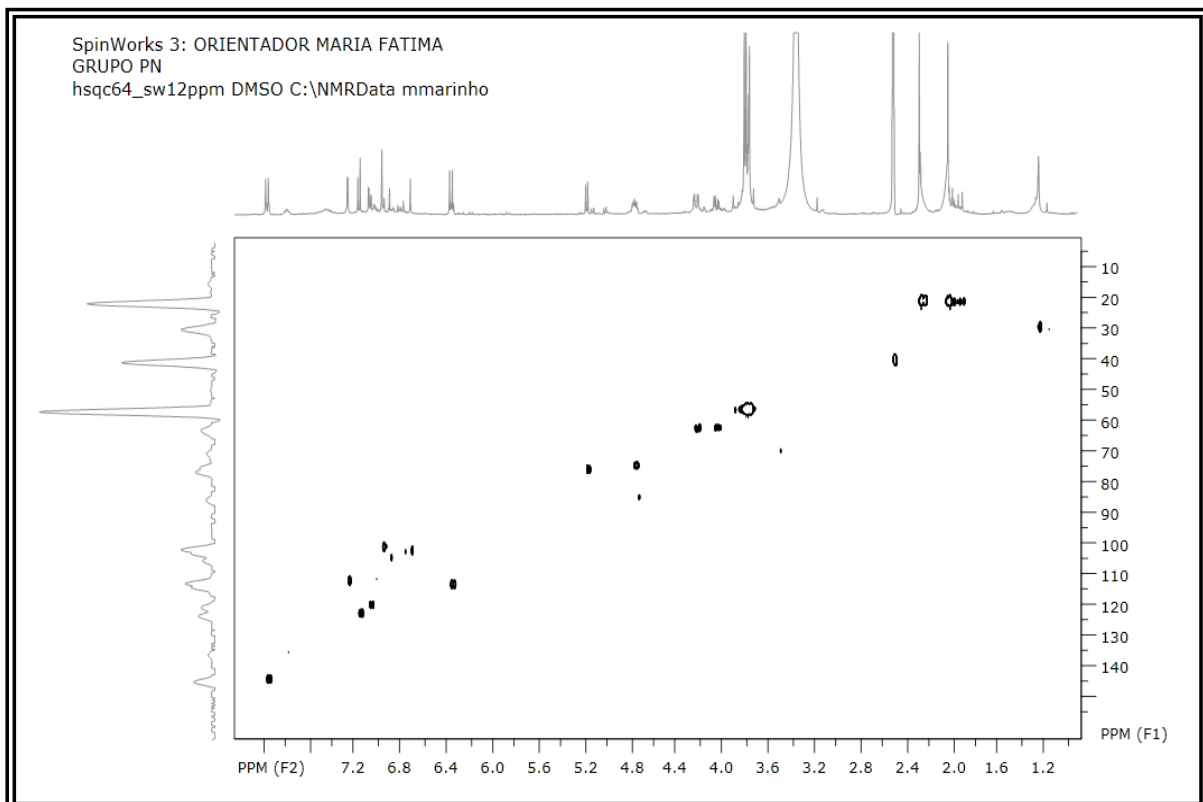
ANEXO 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-2 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)



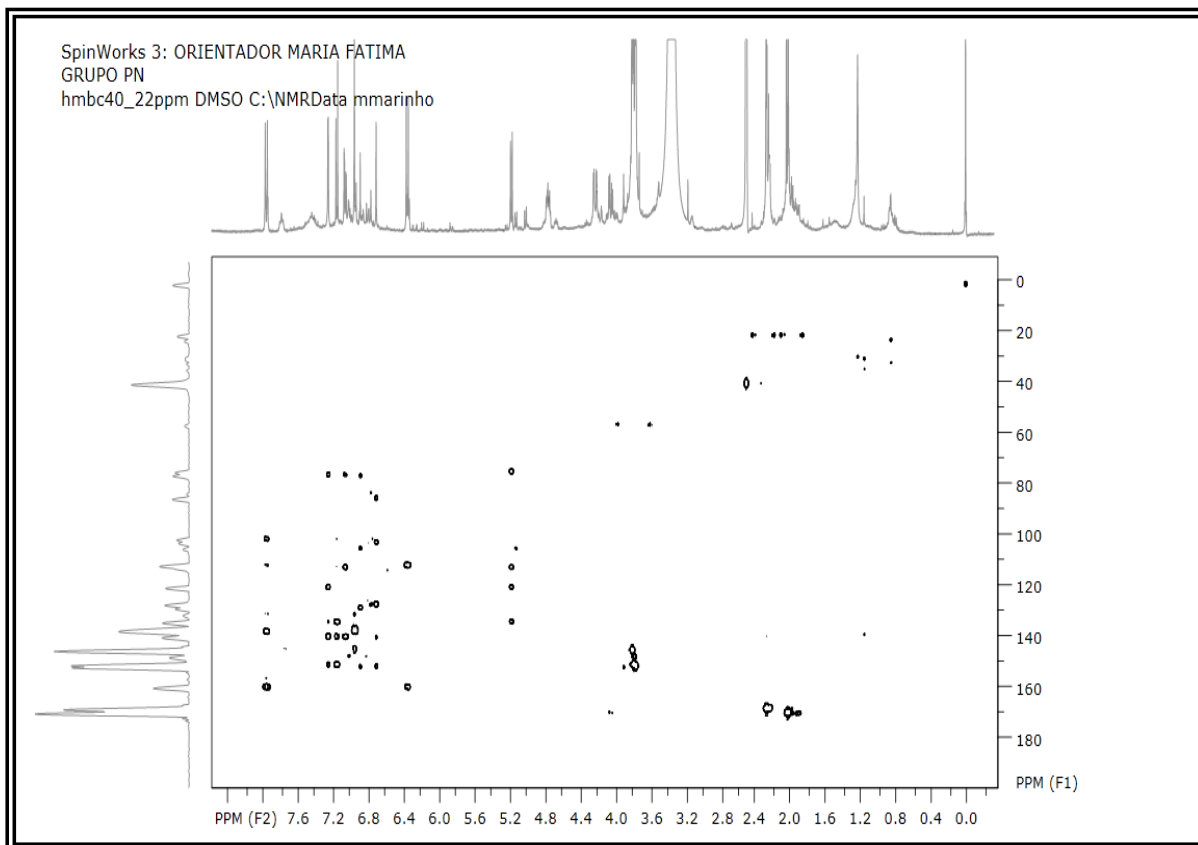
ANEXO 38. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-2



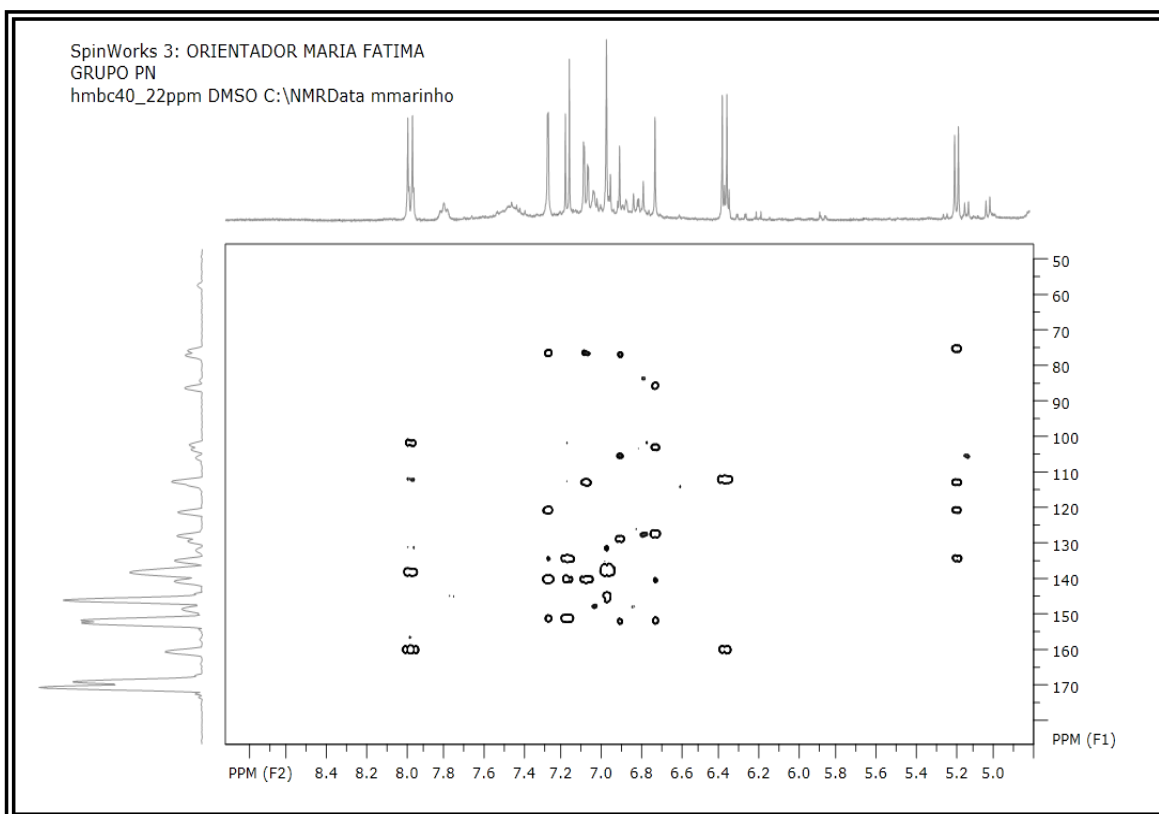
ANEXO 39. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de CL-2



ANEXO 40. Espectro de HSQC de CL-2 (DMSO- $d_6$ ; 400 MHz)

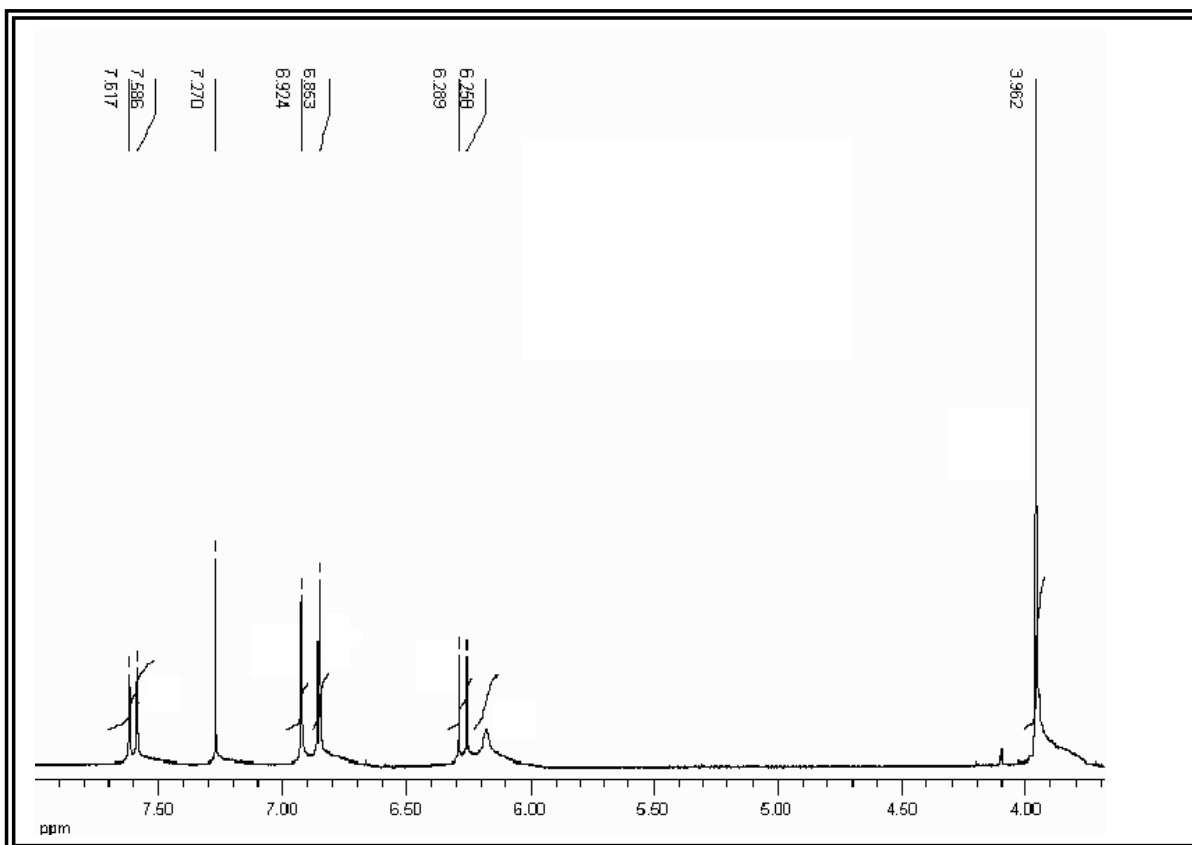


ANEXO 41. Espectro de HMBC de CL-2 (DMSO-d<sub>6</sub>; 400 MHz)



ANEXO 42. Ampliação do espectro de HMBC de CL-2 ( $\delta_H$  4,8 – 8,6;  $\delta_C$  50 – 180)





ANEXO 43. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de C-1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)