



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

**FITOQUÍMICA, QUIMIOSSISTEMÁTICA E BUSCA DE NOVOS  
FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS E ANTILEISHMANIOSES: ESTUDO  
DE *Raputia praetermissa* (RUTACEAE).**

**LISANDRA VIEIRA ROSAS\***

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

**\*BOLSISTA FAPESP**

**São Carlos-SP**

**2005**



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

**FITOQUÍMICA, QUIMIOSSISTEMÁTICA E BUSCA DE NOVOS  
FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS E ANTILEISHMANIOSES: ESTUDO  
DE *Raputia praetermissa* (RUTACEAE).**

**LISANDRA VIEIRA ROSAS**

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

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Fátima das G. F. da Silva**

**\*BOLSISTA FAPESP**

**São Carlos - SP**

**2005**

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

R789fq

Rosas, Lisandra Vieira.

Fitoquímica, quimiosistemática e busca de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses: estudo de *Raputia praetermissa* (Rutaceae) / Lisandra Vieira Rosas. -- São Carlos : UFSCar, 2006.  
280 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Produtos naturais. 2. Chagas, doença de. 3. Leishmaniose. 4. Rutaceae. 5. Raputia. I. Título.

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

**Esta tese é dedicada:**

**Aos membros da minha família, mãe, tias, tios, irmãos e primos, que nos momentos mais difíceis da minha vida sempre estiveram presentes, apoiando-me e incentivando-me.**

**Ao meu Pai que está em algum pedacinho do céu.**

**Aos meus amigos, Francinete, Sâmara, Elba, Simone, Paulinha, Regina e Moacir.**

**A minha amiga Ângela e família, pelo apoio moral, pela moradia e carinho dedicado no momento mais difícil do desenvolvimento desta Tese.**

**A minha amiga Cristina que também me ajudou nos últimos momentos de dificuldades da concretização desta tese.**

**Dedico e Agradeço especialmente a Deus:**



**Pelas dificuldades, pois me deu ânimo para superá-las.**

**Pelas provações, pois através delas pude amadurecer.**

**Pelas doenças, pois me fez ver o quanto sou vulnerável e finita.**

**Pela ausência da família, pois através dela pude ver o quanto ela é importante na minha vida.**

**Pelas lágrimas derramadas, pois elas me tornaram mais forte.**

**Pela solidão sentida, pois me mostrou que na realidade nunca estamos sós.**

**Enfim, por todas as experiências vividas que, indubitavelmente, fizeram-me crescer profissionalmente, moralmente e espiritualmente.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação, ensinamento, compreensão e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar em especial ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Quêzia Bezerra Cass, Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e aos demais professores.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais pelos bons momentos de convivência, carinho, amizade, pelo mútuo respeito e troca de conhecimento.

Aos técnicos e colegas do Laboratório de RMN, Cris, Elisângela, Leila, Lucinéia, Luciana, Paulo e Veio.

Ao Departamento de Física da USP-São Carlos pela realização dos ensaios enzimáticos, especialmente ao Prof. Dr. Glaucius Oliva, Prof. Dr. Otávio Thiemman, Eli Pimenta e colegas que colaboraram para a realização dos ensaios e discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Sérgio Albuquerque e a Mírian do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo ensaio tripanocida.

Ao Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela realização dos ensaios e em especial ao Prof. Dr. Diógenes A. Garcia Cortez e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Piloto Ferreira.

Às secretárias, Cristina, Luciana e Ariane, que sempre nos ajudaram a resolver os problemas burocráticos da Pós-graduação.

À FAPESP, pela bolsa e apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

Esta tese foi concretizada através do apoio de profissionais e instituições sérias que lutam com dificuldades pela evolução da pesquisa no Brasil. A todos, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

I. LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IX
II. LISTAS DE FIGURAS.....	XI
III. LISTA DE TABELAS.....	XXVII
IV. LISTA DE ESQUEMAS.....	XXVIII
V. LISTA DE QUADROS.....	XXVIII
VI. RESUMO.....	XXIX
VII. ABSTRACT.....	XXXI
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. ORDEM SAPINDALES.....	01
1.2. FAMÍLIA RUTACEAE.....	02
1.3. O GÊNERO <i>Raputia</i> .....	07
1.4. A ESPÉCIE: <i>Raputia praetermissa</i> .....	11
1.5. A DOENÇA DE CHAGAS.....	12
1.5.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
1.5.2. A Enzima de <i>T. cruzi</i> : Glicossomal Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (gGAPDH).....	16
1.6. LEISHMANIOSES.....	20
1.6.1. Leishmaniose Visceral.....	21
1.6.2. Leishmaniose cutâneo-mucosa.....	21
1.6.3. A Enzima Alvo Adenina-Fosforribosil-Transferase (APRT).....	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29

<b>3.1. METODOLOGIA QUÍMICA.....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Coleta do Material Botânico.....	29
3.1.2. Preparação dos Extratos.....	29
3.1.3. Fracionamento do Extrato Hexano da Raiz.....	30
3.1.4. Fracionamento do Extrato Diclorometano da Raiz.....	35
3.1.5. Fracionamento do Extrato Metanol da Raiz.....	41
<b>3.2. METODOLOGIA BIOLÓGICA.....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Ensaio Bioquímicos.....	45
3.2.1.1. Teste de Inibição da Atividade da Enzima gGAPDH.....	45
3.2.1.2. Teste de Inibição da Atividade da Enzima APRT.....	47
3.2.2. Ensaio Biológico.....	48
3.2.2.1. Ensaio Tripanocida.....	48
3.2.2.2. Ensaio Leishmanicida.....	49
<b>3.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>50</b>
3.3.1. Suportes para cromatografia.....	50
3.3.2. Solventes.. ..	50
3.3.3. Reveladores.....	51
3.3.4. Outros.....	51
3.3.5. Equipamentos.....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1. Resultados Químicos.....	53
4.1.1. Substâncias isoladas.....	53
4.1.2. Identificação da substância RH-1.....	54
4.1.3. Identificação da substância RH-2.....	70
4.1.4. Identificação da substância RH-3.....	74
4.1.5. Identificação da substância RH-4.....	104
4.1.6. Identificação da substância RH-5.....	113
4.1.7. Identificação da substância RH-6.....	127
4.1.8. Identificação da substância RD-11.....	141
4.1.9. Identificação da substância RD-22ab.....	159
4.1.10. Identificação da substância de RD-42.....	171

<b>4.1.11. Identificação da substância RD-70.....</b>	<b>181</b>
<b>4.1.12. Identificação da substância RD-79.....</b>	<b>188</b>
<b>4.1.13. Identificação da substância RD-91.....</b>	<b>196</b>
<b>4.1.14. Identificação da substância RD-92.....</b>	<b>210</b>
<b>4.1.15. Identificação da substância RD-122.....</b>	<b>221</b>
<b>4.1.16. Identificação da substância RD-350.....</b>	<b>235</b>
<b>4.2. Resultados Biológicos.....</b>	<b>256</b>
<b>4.2.1. Resultados Bioquímicos.....</b>	<b>256</b>
<b>4.2.2. Resultados Leishmanicida e Tripanocida.....</b>	<b>258</b>
<b>5. BIOGÊNESE E DISCUSSÃO QUIMIOSSISTEMÁTICA.....</b>	<b>261</b>
<b>5.1. Alcalóides indólicos.....</b>	<b>261</b>
<b>5.2. Limonóides.....</b>	<b>267</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>270</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>272</b>

## I. LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMP = adenosina-monofosfato

APRT = adenina-fosforribosil-transferase

CC = coluna cromatográfica

CCDC = cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa

CCDA = cromatografia em camada delgada analítica

$\text{CDCl}_3$  = clorofórmio deuterado

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY= “correlation spectroscopy”

d = dubleto

dd = duplo dubleto

ddd = duplo duplo dubleto

DEPT= “distortion less enhancement by polarization transfer”

$\delta$  = deslocamento químico

$\phi$  = diâmetro

g = grama

G3P = gliceraldeído-3-fosfato

GAPDH = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

gNOESY = “gradient nuclear Overhauser effect spectroscopy”

mg = miligrama

h = altura

Hz = hertz

HMBC= “heteronuclear multiple bond correlation”

HSQC= “heteronuclear single quantum correlation”

$\text{IC}_{50}$  = “50% inhibitory concentration”

IE = impacto eletrônico

J = constante de acoplamento

m = multiplete

MHz = megahertz

m/z = relação massa/carga

$\mu\text{L}$  = microlitro

$\mu\text{M}$  = micromolar

OMe = metoxila

RMN  $^1\text{H}$  = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN  $^{13}\text{C}$  = ressonância magnética nuclear de Carbono 13

s = singleto

t = tripleto

$t_r$  = tempo de retenção

$\Delta$  Abs = variação de absorção

$\Delta t$  = variação de tempo

## II. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Alcalóides derivados do ácido antranílico isolados de Rutaceae.....	3
FIGURA 1.2. Substâncias isoladas de Rutaceae.....	4
FIGURA 1.3. Limonóides isolados de Rutaceae.....	5
FIGURA 1.4. Substâncias isoladas de <i>Neoraputia magnifica</i> .....	9
FIGURA 1.5. Substâncias isoladas do gênero <i>Neoraputia</i> .....	10
FIGURA 1.6. Espécie <i>Raputia praetermissa</i> . Fotos do livro: Flora da Reserva Ducke (cedido pelos autores; RIBEIRO <i>et al.</i> , 1999).....	11
FIGURA 1.7. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.	14
FIGURA 1.8. Metabolismo do glicerol e da glicose no glicossomo.....	15
FIGURA 1.9. Estruturas apresentadas no quadro 1.3.....	18
FIGURA 1.9a. Estruturas apresentadas no quadro 1.3.....	19
FIGURA 1.10. Via de recuperação de purinas em células de mamíferos.....	24
FIGURA 1.11. Via de recuperação de purinas em <i>Leishmania</i> .....	25
FIGURA 1.12. Reação catalisada pela APRT em Kinetoplastidas.....	26
FIGURA 1.13. Estruturas apresentadas no quadro 1.4.....	27
FIGURA 4.1. Substâncias isoladas de <i>R. praetermissa</i> .....	53
FIGURA 4.1a. Substâncias isoladas de <i>R. praetermissa</i> (continuação)...	54
FIGURA 4.2. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 5,54 (H-5) e $\delta$ 1,65 (Me-15).....	55
FIGURA 4.3. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,97 (H-3), $\delta$ 1,07 (H-1) e $\delta$ 1,38 (H-2).....	56
FIGURA 4.4. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,97 (H-6) e deslocamentos de hidrogênios e carbonos do primeiro anel de RH-1.....	56
FIGURA 4.5. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,72 (H-9) e $\delta$ 1,21 (Me-14).....	57
FIGURA 4.6. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,36 (H-8) e deslocamentos do segundo anel de RH-1.....	58
FIGURA 4.7. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 0,91 (Me-12) e $\delta$ 2,17 (H-11).....	58

FIGURA 4.8. Esqueleto proposto para a substância RH-1 e respectivos deslocamentos de hidrogênios e carbonos.....	59
FIGURA 4.9. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios das metilas em $\delta$ 0,91 (Me-12) e $\delta$ 1,21 (Me-14).....	59
FIGURA 4.10. Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 5,54 (H-5).....	60
FIGURA 4.11. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios de metilas em $\delta$ 0,79 (Me-13) e $\delta$ 1,65 (Me-15).....	60
FIGURA 4.12. Estrutura proposta para a substância RH-1.....	60
FIGURA 4.13. Espectro de RMN $^1\text{H}$ e ampliação da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	62
FIGURA 4.14. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ e ampliação da substância RH-1 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	63
FIGURA 4.15. Espectro de DEPT $135^\circ$ e ampliação da substância RH-1 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	64
FIGURA 4.16. Experimento de HSQC e ampliação da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	65
FIGURA 4.17. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	66
FIGURA 4.18. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	67
FIGURA 4.19. Experimento de gNOESY da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	68
FIGURA 4.19a. Experimento de gNOESY da substância RH-1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	69
FIGURA 4.20. Estruturas propostas para a mistura RH-2.....	70
FIGURA 4.21. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e ampliação da mistura RH-2 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	71
FIGURA 4.22. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e ampliação da mistura RH-2 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	72
FIGURA 4.23. (a) Cromatograma da mistura RH-2; (b) Espectro de massa do sitosterol; (c) Espectro de massa do estigmasterol; (d) Espectro de massa do campesterol.....	73

FIGURA 4.24. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 5,22...	75
FIGURA 4.25. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 5,22, $\delta$ 4,08, $\delta$ 1,82, e $\delta$ 2,43.....	75
FIGURA 4.26. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,08, $\delta$ 2,43 e $\delta$ 1,82.....	76
FIGURA 4.27. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,59, $\delta$ 6,13 e $\delta$ 6,40.....	76
FIGURA 4.28. Proposta para a unidade alifática.....	77
FIGURA 4.29. Valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico substituído (MAKANGARA <i>et al.</i> , 2004).....	77
FIGURA 4.30. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 8,04 e $\delta$ 7,11 e correlação observada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 7,50.....	78
FIGURA 4.31. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 10,95 (DMSO).....	78
FIGURA 4.32. Comparação dos valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico (MAKANGARA <i>et al.</i> , 2004) com os encontrados para o anel indólico do sistema a.....	79
FIGURA 4.33. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,50, $\delta$ 7,23 e $\delta$ 7,22.....	80
FIGURA 4.34. Comparação dos valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico (MAKANGARA <i>et al.</i> , 2004) com os encontrados para o anel indólico do sistema a.....	80
FIGURA 4.35. Correlação apresentada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 7,30 e comparação dos valores de deslocamentos do sistema b com a literatura.....	81
FIGURA 4.36. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 10,87 (DMSO).....	82
FIGURA 4.37. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,30 e $\delta$ 7,18.....	82
FIGURA 4.38. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,30, $\delta$ 7,18 e $\delta$ 7,50.....	83
FIGURA 4.39. Estrutura proposta para RH-3 e comparação dos seus deslocamentos de carbono com o bisindol Caulindole B.....	84

FIGURA 4.40 Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 4,08 (H-3).....	84
FIGURA 4.41 Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,59 (H-10), $\delta$ 1,82 (H-8) e $\delta$ 1,79 (H-9).....	85
FIGURA 4.42. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 6,50 (H-3'), $\delta$ 5,22 (H-2') e $\delta$ 7,50 (H-4'').....	85
FIGURA 4.43. Estereoquímica proposta para a substância RH-3.....	86
FIGURA 4.44. Proposta de fragmentações para a substância RH-3.....	86
FIGURA 4.45. Proposta de rearranjo para explicar $m/z$ 130.....	87
FIGURA 4.46. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	89
FIGURA 4.46a. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ampliado da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	90
FIGURA 4.46b. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ampliado da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	91
FIGURA 4.47. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	92
FIGURA 4.48. Experimento de HSQC e ampliações da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	93
FIGURA 4.49. Espectro de DEPT $135^\circ$ da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	94
FIGURA 4.50. Experimento de COSY e ampliações da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	95
FIGURA 4.51. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	96
FIGURA 4.51a. Ampliações do experimento de HMBC da substância RH-3 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	97
FIGURA 4.52. Espectro de massas de alta resolução substância RH-3 (EI+).....	98
FIGURA 4.53. Espectro de RMN $^1\text{H}$ e ampliação da substância RH-3 (200 MHz, DMSO).....	99
FIGURA 4.54. Experimento de HMBC da substância RH-3 (400 MHz, DMSO).....	100

FIGURA 4.55. Experimento de gNOESY da substância RH-3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	101
FIGURA 4.55a. Experimento de g-NOESY da substância RH-3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	102
FIGURA 4.55b. Experimento de gNOESY da substância RH-3 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	103
FIGURA 4.56. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 5,47, $\delta$ 6,48 e $\delta$ 1,41.....	104
FIGURA 4.57. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 6,18 (H-5') e $\delta$ 3,75 (MeO-6').....	105
FIGURA 4.58. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,86 (H-3) e $\delta$ 2,50 (H-2).....	105
FIGURA 4.59. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 3,68, $\delta$ 3,71 (MeO-2') e $\delta$ 6,48 (H-4'').....	106
FIGURA 4.60. Comparação dos deslocamentos da substância RH-4 com a literatura.....	106
FIGURA 4.61. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância RH-4 e ampliações (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	108
FIGURA 4.62. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da Substância RH-4 (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	109
FIGURA 4.63. Experimento de HSQC e ampliações da substância RH-4 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	110
FIGURA 4.64. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-4 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	111
FIGURA 4.65. Experimento de HMBC e ampliações da substância RH-4 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	112
FIGURA 4.66. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 6,88...	113
FIGURA 4.67. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,78...	114
FIGURA 4.68. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 2,39...	114

FIGURA 4.69. Acoplamento apresentado no experimento de COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,16.....	115
FIGURA 4.70. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios de metilas em $\delta$ 0,98 e $\delta$ 0,85.....	115
FIGURA 4.71. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênio em $\delta$ 1,19 e $\delta$ 1,74.....	116
FIGURA 4.72. Esqueleto básico proposto para a substância RH-5.....	116
FIGURA 4.73 Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,70 (H-1), $\delta$ 0,85 (Me-13) e $\delta$ 1,78 (Me-15)..	117
FIGURA 4.74 Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,60 (H-2), $\delta$ 1,19 (Me-14) e $\delta$ 0,98 (Me-12).....	117
FIGURA 4.75. Estrutura proposta para a substância RH-5.....	118
FIGURA 4.76. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância RH-5 e ampliações (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	120
FIGURA 4.77. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RH-5 e ampliação (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	121
FIGURA 4.78. Experimento de HSQC da substância RH-5 e ampliação (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	122
FIGURA 4.79. Experimento de COSY da substância RH-5 e ampliação (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	123
FIGURA 4.80. Experimento de HMBC da substância RH-5 e ampliação (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	124
FIGURA 4.81. Experimento de gNOESY da substância RH-5 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	125
FIGURA 4.81a. Experimento de gNOESY da substância RH-5 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	126
FIGURA 4.82. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 5,30 (H-7).....	127
FIGURA 4.83. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,09 (H-6) e $\delta$ 1,72 (H-5).....	128
FIGURA 4.84. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,05 (Me-28) e $\delta$ 1,11 (Me-29).....	128

FIGURA 4.85. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 0,98 (Me-19) e $\delta$ 2,74 (H-5).....	129
FIGURA 4.86. Correlação e acoplamento apresentado nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,50 (H-11).....	129
FIGURA 4.87. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 0,89 (Me-18) e $\delta$ 1,00 (Me-30).....	130
FIGURA 4.88. Acoplamento apresentado no experimento de COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 2,32 (H-17).....	131
FIGURA 4.89 Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os hidrogênios em $\delta$ 1,58 (Me-26), $\delta$ 1,68 (Me-27) e $\delta$ 5,08 (H-24).....	131
FIGURA 4.90. Comparação dos deslocamentos de carbono da substância RH-6 com os de MA <i>et al.</i> (2000).....	132
FIGURA 4.91. Estrutura proposta para a substância RH-6 e seus deslocamentos de hidrogênio.....	132
FIGURA 4.92. Espectro de RMN $^1\text{H}$ e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	134
FIGURA 4.93. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RH-6 e ampliação (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	135
FIGURA 4.93a. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ das ampliações da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	136
FIGURA 4.94. Experimento de HSQC e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	137
FIGURA 4.95. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	138
FIGURA 4.96. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	139
FIGURA 4.96a. Ampliações do experimento de HMBC da substância RH-6 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	140
FIGURA 4.97. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,44 (C-21) e $\delta$ 7,43 (C-23).....	141
FIGURA 4.98. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 5,76 (H-17), $\delta$ 3,64 (H-15) e $\delta$ 1,17 (Me-18).....	142

FIGURA 4.99. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,48 (Me-30), $\delta$ 1,26 (Me-29), $\delta$ 1,10 (Me-28), $\delta$ 4,67 (H-7) e $\delta$ 1,92 (H-6).....	143
FIGURA 4.100. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,94 (H-9) e $\delta$ 2,54 (H-5).....	143
FIGURA 4.101. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,94 (H-9), $\delta$ 4,64 (H-11) e $\delta$ 2,00 (H-12).....	144
FIGURA 4.102. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,12 (H-1), $\delta$ 3,00 (H-2) e $\delta$ 2,71 (H-2).....	145
FIGURA 4.103. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 6,13 (H-19).....	145
FIGURA 4.104. Comparação dos deslocamentos de carbono de RD-11 com da substância lchangina.....	146
FIGURA 4.105. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,48 (Me-30), $\delta$ 1,10 (Me-28) e $\delta$ 6,13 (H-19).....	146
FIGURA 4.106. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,17 (Me-18), $\delta$ 4,64 (H-11) e $\delta$ 4,67 (H-7).....	147
FIGURA 4.107. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,94 (H-9) e $\delta$ 1,26 (Me-29).....	147
FIGURA 4.108. Estrutura proposta para a substância RD-11.....	148
FIGURA 4.109. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância RD-11 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	150
FIGURA 4.110. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância RD-11 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	151
FIGURA 4.111. Espectro de massas da substância RD-11 ( $\text{ES}^-$ ).....	152
FIGURA 4.112. Experimento de HMBC da substância RD-11 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	153
FIGURA 4.113. Experimento de HSQC da substância RD-11 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	154
FIGURA 4.114. Experimento de COSY da substância RD-11 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	155

FIGURA 4.115. Espectro de DEPT da substância RD-11 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	156
FIGURA 4.116. Espectro de gNOESY da substância RD 11 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	157
FIGURA 4.116a. Espectro de gNOESY da substância RD 11 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	158
FIGURA 4.117. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,78 e $\delta$ 10,04.....	159
FIGURA 4.118. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,78 (H-5), $\delta$ 7,49 (H-4), $\delta$ 7,32 (H-2) e $\delta$ 6,72 (H-3).....	160
FIGURA 4.119. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,49 (C-4) e $\delta$ 7,78 (C-5).....	161
FIGURA 4.120. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 8,19 (C-7) e $\delta$ 10,04.....	161
FIGURA 4.121. Estrutura proposta para a substância RD-22ab.....	162
FIGURA 4.122. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	163
FIGURA 4.122a. Espectro de RMN <sup>1</sup> H ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	164
FIGURA 4.123. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	165
FIGURA 4.124. Experimento de HSQC da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	166
FIGURA 4.124a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	167
FIGURA 4.125. Experimento de COSY ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	168
FIGURA 4.126. Experimento de HMBC da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	169
FIGURA 4.126a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	170

FIGURA 4.127. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,07 (H-3') e $\delta$ 7,62 (H-2').....	171
FIGURA 4.128. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,45 (MeO-4), $\delta$ 7,45 (H-6) e $\delta$ 8,27 (H-5).....	172
FIGURA 4.129. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 7,68 (H-7).....	173
FIGURA 4.130. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 8,01 (H-8).....	173
FIGURA 4.131. Estrutura proposta para a substância RD-42 (Dictamina) e seus respectivos deslocamentos químicos.....	174
FIGURA 4.132. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância RD-42 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	175
FIGURA 4.133. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância RD-42 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	176
FIGURA 4.134. Experimento de HSQC da substância RD-42 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	177
FIGURA 4.135. Experimento de COSY da substância RD-42 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	178
FIGURA 4.136. Experimento de HMBC da substância RD-42 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	179
FIGURA 4.137. Espectro de massas da substância RD 42 ( $t_R$ 14,8'), obtido via CG/EM (IE).....	180
FIGURA 4.138. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,65 (C-2') e $\delta$ 7,08 (C-3').....	181
FIGURA 4.139. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,85 (C-5), $\delta$ 7,36 (C-6), $\delta$ 7,06 (C-7), $\delta$ 4,45 (MeO-4) e $\delta$ 4,08 (MeO-8).....	182
FIGURA 4.140. Estrutura proposta para a substância RD-70 e comparação dos valores de deslocamentos de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ com os encontrados na literatura para a $\gamma$ -Fagarina.....	183
FIGURA 4.141. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância RD-70 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	184

FIGURA 4.142. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância RD-70 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	185
FIGURA 4.143. Experimento de HSQC da substância RD-70 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	186
FIGURA 4.144. Experimento de HMBC da substância RD-70 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	187
FIGURA 4.145. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 6,01 (C-3) e $\delta$ 3,91 (MeO-4).....	188
FIGURA 4.146. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,94 (H-5), $\delta$ 7,56 (H-7) e $\delta$ 7,30 (H-8) e $\delta$ 7,21 (H-6).....	189
FIGURA 4.147. Estrutura proposta para a substância RD-79 e valores de RMN $^1\text{H}$ encontrados na literatura para o 1-metil-4-metoxi-2-quinolona.....	189
FIGURA 4.148. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância RD-79 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	191
FIGURA 4.149. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância RD-79 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	192
FIGURA 4.150. Experimento de HSQC da substância RD-79 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	193
FIGURA 4.151. Experimento de HMBC da substância RD-79 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	194
FIGURA 4.152. Experimento de COSY da substância RD-79 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	195
FIGURA 4.153. Valores de deslocamentos da literatura para o anel indólico e comparação com RD-91.....	196
FIGURA 4.154. Correlações apresentadas nos experimentos de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,60 (H-4), $\delta$ 7,37 (H-7) e $\delta$ 7,20 (H-6).....	197
FIGURA 4.155. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,60 (H-4), $\delta$ 7,20 (H-6) e $\delta$ 4,64.....	198
FIGURA 4.156. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 5,12 e $\delta$ 2,28.....	198
FIGURA 4.157. Correlações apresentadas nos experimentos de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,64 (Me) e $\delta$ 1,60 (Me).....	199

FIGURA 4.158. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 4,99 (H-6').....	199
FIGURA 4.159. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,60 (H-4), $\delta$ 7,37 (H-7), $\delta$ 6,53 (H-3), $\delta$ 2,73 (H-3').....	200
FIGURA 4.160. Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 2,73 (H-3').....	201
FIGURA 4.161. Propostas para a estereoquímica da substância RD-91.	201
FIGURA 4.162. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	203
FIGURA 4.163. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	204
FIGURA 4.164. Experimento de HSQC da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	205
FIGURA 4.165. Experimento de COSY da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	206
FIGURA 4.166. Experimento de HMBC da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	207
FIGURA 4.167. Experimento de gNOESY da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	208
FIGURA 4.167a. Experimento de gNOESY da substância RD-91 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	209
FIGURA 4.168. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 2,23 e $\delta$ 2,51 (H-22), $\delta$ 3,92 e $\delta$ 4,45 (H-21).....	211
FIGURA 4.169. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 5,30 (H-15), $\delta$ 1,72 (H-17) e $\delta$ 1,01 (Me-18).....	211
FIGURA 4.170. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 6,45 (H-1), $\delta$ 5,18 (H-7), $\delta$ 1,45 (Me-28), $\delta$ 1,36 (Me-29), $\delta$ 1,27 (Me-19) e $\delta$ 1,17 (Me-30).....	212
FIGURA 4.171. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,45 (Me-28), $\delta$ 1,36 (Me-29) e $\delta$ 1,27 (Me-19).....	213
FIGURA 4.172. Comparação dos valores de deslocamento de RD-92 com a literatura para o acetato de tricocina S13.....	214

FIGURA 4.173. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância RD-92 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	216
FIGURA 4.174. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RD-92 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	217
FIGURA 4.175. Experimento de HSQC da substância RD-92 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	218
FIGURA 4.176. Experimento de COSY da substância RD-92 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	219
FIGURA 4.177. Experimento de HMBC da substância RD-92 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	220
FIGURA 4.178. Valores de deslocamentos da literatura (MAKANGARA <i>et al.</i> , 2004) para o anel indólico e comparação com RD-122.....	221
FIGURA 4.179. Acoplamento e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,50 (H-6) e $\delta$ 7,43 (H-7).....	222
FIGURA 4.180. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,97 (H-4), $\delta$ 7,50 (H-6) e $\delta$ 7,43 (H-7).....	222
FIGURA 4.181. Correlação apresentada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 3,87.....	223
FIGURA 4.182. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 8,04 (H-5'), $\delta$ 6,88 (H-3') e $\delta$ 3,87 (7).....	223
FIGURA 4.183. Estrutura proposta para a substância RD-122.....	224
FIGURA 4.184. Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	226
FIGURA 4.184a Espectro de RMN $^1\text{H}$ ampliado da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	227
FIGURA 4.185. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	228
FIGURA 4.186. Experimento de HSQC da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	229
FIGURA 4.186a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	230
FIGURA 4.187. Experimento de COSY da substância RD-122 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	231

FIGURA 4.187a. Experimento de COSY ampliado da substância RD-122 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	232
FIGURA 4.188. Experimento de HMBC da substância RD-122 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	233
FIGURA 4.188a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-122 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	234
FIGURA 4.189. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 7,39 (H-21), $\delta$ 7,38 (H-23) e $\delta$ 6,29 (H-22).....	235
FIGURA 4.190. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 5,68 (H-17).....	236
FIGURA 4.191. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,06 (Me-18).....	236
FIGURA 4.192. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 4,10 (H-15).....	237
FIGURA 4.193. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,91 e $\delta$ 1,81 (H-12).....	237
FIGURA 4.194. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,54 (H-11) e $\delta$ 2,92 (H-9).....	238
FIGURA 4.195. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 1,28 (Me-30).....	238
FIGURA 4.196. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,81 e 1,54 (H-6) e $\delta$ 2,85 (H-5).....	239
FIGURA 4.197. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,02 (H-1), $\delta$ 2,81 e $\delta$ 2,66 (H-2).....	240
FIGURA 4.198. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em $\delta$ 6,03 (H-19).....	240
FIGURA 4.199. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 1,20 (Me-28) e $\delta$ 0,99 (Me-29).....	241
FIGURA 4.200. Estrutura proposta para a substância RD-350 e comparação dos seus valores de deslocamento de carbono com os de RD-11.....	241

FIGURA 4.201. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 4,54 (H-11) e $\delta$ 2,92 (H-9).....	242
FIGURA 4.202. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em $\delta$ 6,03 (H-19), $\delta$ 1,20 (Me-29) e $\delta$ 0,99 (Me-28).....	242
FIGURA 4.203. Estereoquímica proposta para a substância RD-350.....	243
FIGURA 4.204. Espectro de hidrogênio da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	245
FIGURA 4.204a. Espectro de hidrogênio ampliado da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	246
FIGURA 4.205. Experimento de HSQC da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	247
FIGURA 4.205a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	248
FIGURA 4.206. Experimento de HMBC da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	249
FIGURA 4.206a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	250
FIGURA 4.207. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	251
FIGURA 4.207a. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C ampliado da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	252
FIGURA 4.208. Experimento de COSY da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	253
FIGURA 4.208a. Experimento de COSY ampliação da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	254
FIGURA 4.209. Experimento de gNOESY da substância RD-350 (400 MHz, CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	255
FIGURA 4.210. Substância RD-79 (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).....	256
FIGURA 4.211. Substância RH-3 (5',6'-[5-metil-5(7-indol-5"-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metil prop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol).....	257
FIGURA 4.212. Substância RD-70 ( $\gamma$ -fagarina).....	259
FIGURA 4.213. Substâncias RH-1 (T-cadinol) e RH-5 (3-oxo-cadinol).....	259

FIGURA 5.1. Alcalóide indólico prenilado isolado do gênero <i>Merrilia</i> (KONG, 1987).....	265
FIGURA 5.2. Alcalóides indólicos prenilados isolados do gênero <i>Esenbeckia</i> (JANUÁRIO, 1995; DELLE MONACHE, 1990).....	266

### III. LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Rendimento dos extratos de <i>Raputia praetermissa</i> .....	30
TABELA 4.1. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RH-1 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz e 200).....	61
TABELA 4.2. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RH-3 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	88
TABELA 4.3. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RH-4 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 e 200 MHz ( $^{13}\text{C}$ )).....	107
TABELA 4.4. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RH-5 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 e 200 MHz ( $^{13}\text{C}$ )).....	119
TABELA 4.5. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RH-6 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	133
TABELA 4.6. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-11 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	149
TABELA 4.7. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-22ab ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	162
TABELA 4.8. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-42 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	174
TABELA 4.9. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-70 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	183
TABELA 4.10. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-79 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 200 e 400 MHz).....	190
TABELA 4.11. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-91 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	202
TABELA 4.12. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-92 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	215
TABELA 4.13. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-122 ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , 400 MHz).....	225
TABELA 4.14. Dados dos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância RD-350 ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , $\delta$ , 400 MHz).....	244
TABELA 4.15. Resultados dos ensaios realizados frente às enzimas gGAPDH e APRT.....	258
TABELA 4.16. Resultados dos ensaios <i>in vitro</i> frente às formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e amastigotas de <i>L. braziliensis</i> .....	260

#### IV. LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1. Fracionamento do extrato hexano da raiz de <i>R. praetermissa</i> .....	30
ESQUEMA 3.2. Fracionamento da fração RH(2,3,4).....	31
ESQUEMA 3.3. Fracionamento da fração RH(6,7).....	33
ESQUEMA 3.4. Fracionamento da fração RH8.....	34
ESQUEMA 3.5. Fracionamento do extrato hexano da raiz de <i>R. praetermissa</i> .....	36
ESQUEMA 3.6. Fracionamento da fração RD(2,3)1.....	38
ESQUEMA 3.7. Fracionamento da fração RD(2,3)2.....	39
ESQUEMA 3.8. Fracionamento da fração RD(2,3)3.....	41
ESQUEMA 3.9. Fracionamento do Extrato Metanol (RM).....	42
ESQUEMA 3.10. Fracionamento da fração RM1.1.....	43
ESQUEMA 3.11. Fracionamento da fração RM1.2.....	44
ESQUEMA 5.1. Biogênese do anel indólico (DEWICK, 2001.....	262
ESQUEMA 5.2. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RH-3..	263
ESQUEMA 5.3. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RD-91.....	264
ESQUEMA 5.4. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RD-122.....	265
ESQUEMA 5.5.a Proposta de biogênese para os limonóides RD-11 e RD-350 (parte I).....	268
ESQUEMA 5.5.b Proposta de biogênese para os limonóides RD-11 e RD-350 (parte II).....	269

#### V. LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.1. Algumas classes de substâncias isoladas da família Rutaceae e suas respectivas atividades biológicas.....	6
QUADRO 1.2. Posição hierárquica da espécie <i>R. praetermissa</i> .....	11
QUADRO 1.3. Resultados de substâncias isoladas da Ordem Sapindales e testadas frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> .....	17
QUADRO 1.4. Resultados de substâncias isoladas da Ordem Sapindales e testadas frente à enzima APRT de <i>L. tarentolae</i> .....	27

## VI. RESUMO

**FITOQUÍMICA, QUIMIOSSISTEMÁTICA E BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS E ANTILEISHMANIOSES: ESTUDO DE *Raputia praetermissa* (RUTACEAE)** - *Raputia praetermissa* (Engler) Emmerich é uma arvoreta encontrada somente na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Amazonas, Brasil. O gênero *Raputia* foi originalmente descrito por Engler, onde várias espécies foram incluídas, mas em 1978, Emmerich propôs dividi-lo em três novos gêneros, *Neoraputia*, *Raputiarana* e *Sigmathantus* com o objetivo de acomodar seis espécies, quatro destas pertencentes a *Raputia* (incluída na tribo Cuspariae) e duas que ainda não haviam sido descritas. Atualmente este gênero possui 11 espécies. Não há relatos de estudos fitoquímicos em *Raputia*. Este trabalho descreve o estudo fitoquímico e quimiosistemático e a busca de compostos tripanocida e leishmanicida na raiz de *R. praetermissa*. O estudo fitoquímico envolveu desde a preparação dos extratos brutos, seguidos pelo fracionamento e isolamento dos compostos através de diferentes métodos cromatográficos. As análises espectroscópicas permitiram a identificação de substâncias conhecidas e inéditas. Neste são descritos o isolamento e identificação de dois limonóides inéditos, 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina e 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -óxido-7-deacetoxi-7-hidroxi-ichangina, dois alcalóides indólicos prenilados inéditos, 5-[(3'-dimetilalil-4'-metilideno)-2'-tetraidrofurano-2'-il]-indol e 5-[(4'-carbometoxi)-furano-2'-il]-indol, e um alcalóide bisindol também inédito, 5',6'-[5-metil-5(7-indol-5"-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol, e as substâncias conhecidas, T-cadinol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 3-[2',6'-dimetoxi-6",6"-dimetilpirano(2",3":3',4') fenil] propianato de metila, 3-oxo-T-cadinol, ácido 3-oxotirucala-7,24-dien-21-óico, dictamina,  $\gamma$ -fagarina, 1-metil-4-metoxi-2-quinolona, acetato de tricocina S13, 6-formilindol. Nossos resultados mostram que as classes químicas isoladas são comuns na família Rutaceae, exceto os indólicos prenilados que pertencem a uma nova classe de indólicos. Contudo, todas as substâncias isoladas confirmam o posicionamento de *Raputia* na tribo Cuspariae. Os compostos isolados foram avaliados quanto: a) Atividade biológica *in vitro* contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e amastigotas de *Leishmania braziliensis*; b) Atividade enzimática inibitória em gGAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) do *T. cruzi* e em APRT (adenina-fosforribosil-transferase) de *Leishmania tarentolae*.

Nenhuma das substâncias isoladas foi promissora no teste *in vitro* contra *T. cruzi*. No modelo experimental enzimático (gGAPDH e APRT) nenhum composto mostrou atividade inibitória promissora. Por outro lado, o T-cadinol foi ativo contra *L. braziliensis* resultando em uma DL<sub>50</sub> de 44 µM.

## VII. ABSTRACT

**PHYTOCHEMISTRY, CHEMOSYSTEMATIC AND SEARCHING OF NEW ANTICHAGASIC AND ANTILEISHMANIASIS DRUGS: STUDY OF *Raputia praetermissa* (RUTACEAE).** *Raputia praetermissa* (Engler) Emmerich is a tree found only in the Forest Reserve Adolpho Ducke, Amazonas, Brazil. The genus *Raputia* was originally described by Engler and many species were included in this genus, but in 1978, Emmerich proposed three new genera *Neoraputia*, *Raputiarana* e *Sigmatantus* in order to accommodate six species, four belonging to the genus *Raputia*, which is assigned into the tribe Cuspariae, and two that had not been described yet. From our knowledge no previous phytochemical work has been reported on *Raputia*. Therefore, this study describes phytochemical and chemosystematic investigation and the search of compounds with trypanocidal and leishmanicidal activity from roots of *R. praetermissa*. The phytochemical work involved crude extract preparation, followed by fractionation and isolation of compounds thorough different chromatography methods. Spectroscopic analyses permitted the identification of them and the results showed the presence of new substances in addition to those isolated previously. Here we reported the isolation and identification of the new compounds: two new limonoids, 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihydroxi-7-deoxo-7-acetoxy-ichangin e 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -oxide-7-deacetoxy-7-hidroxy-ichangin, two new prenylated indoles alkaloids, 5-[(3'-dimethylalil-4'-methylidene)-2'-tetrahydrofuran-2'-il]-indol e 5-[(4'-carbomethoxy)-furan-2'-il]-indol and a new bisindol alkaloid, 5',6'-[5-methyl-5(7-indol-5"-il-etene-6,7-diil)-3(1-methylprop-2-en-2-il)]-ciclopentane-5',6'-diil-indol. The following known substances were also obtained: T-cadinol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol, 3-[2',6'-dimethoxy-6",6"-dimethylpyrano(2",3":3',4') phenyl]-methylpropionate, 3-oxo-cadinol, lanosta-7,24-dien-21-oic acid-3-oxo, dictamine,  $\gamma$ -fagarine, 1-methyl-4-methoxy-2-quinolone, tricoccin S13 acetate, 6-formylindol. Our results showed that the chemical classes isolated from *R. praetermissa* roots are common to the Rutaceae family, but the prenylated indol alkaloids are not. These compounds are new classes of prenylated indol alkaloids. However, all isolated compounds confirm the assigned it into the tribe Cuspariae. In addition, the compounds were evaluated for: a) "*in vitro*" biological activity against trypanosomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*; b) enzymatic inhibitory activity on glyceraldehydes-

phosphato-dehidrogenase (gGAPDH) of *T. cruzi* and enzymatic inhibitory activity on adenine-phosphoribosyl-transferase (APRT) of *Leishmania tarentolae*. None of isolated substances were promising against *T. cruzi* *in vitro* test as well as in enzymatic experimental models (gGAPDH e APRT) from which they not showed enzymatic inhibitory activity. Conversely, the T-cadinol was active against *L. braziliensis* and results in DL<sub>50</sub> 44 µM.

## 1. INTRODUÇÃO

Animais, organismos marinhos, microrganismos e vegetais, têm sido utilizados pelo homem, ao longo dos séculos, para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre eles, as espécies vegetais têm se destacado pelo grande potencial farmacológico, visto que, produzem metabólitos secundários que exercem funções específicas, tais como: antialimentares para insetos, atraentes polinizadores, defensores contra a ação de herbívoros e microrganismos, dessa forma, tornam-se fontes alternativas de compostos ativos contra seres patogênicos ao homem, aos animais e plantas (LIMA, 1996; MORALES, 1999).

O Brasil, com uma das maiores biodiversidades do mundo, possuindo cerca de 22% de todas as angiospermas (MAFEZOLI, 2001), precisa explorar de forma racional o potencial dessas plantas na busca de novos fármacos. Considerando-se a diversidade taxonômica da flora brasileira, cogita-se a presença de uma grande diversificação de classes e estruturas de metabólitos secundários.

O estudo quimiosistemático tem mostrado que muitas famílias de plantas estão associadas a classes específicas de substâncias, facilitando assim o rastreamento de substâncias bioativas.

O grupo de Produtos Naturais da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) tem se dedicado ao estudo dos constituintes químicos das espécies vegetais pertencentes à ordem Sapindales, em especial às famílias Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae, visando à quimiotaxonomia e também ao isolamento de substâncias bioativas. Dentro dessa linha de pesquisa, realizou-se o estudo fitoquímico da raiz da *Raputia praetermissa* e a busca de substâncias bioativas.

### 1.1. ORDEM SAPINDALES

A Ordem Sapindales (antiga Rutales) *sensu* Stevens é constituída pelas famílias Anacardiaceae, Bierbersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae (STEVENS, 2003).

O grupo de Produtos Naturais da UFSCar tem revisado a quimiosistemática dessas famílias, tendo como base de estudos os alcalóides do

ácido antranílico, cumarinas e limonóides (SILVA *et al.*, 1984; SILVA *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 1988). Os resultados obtidos têm mostrado uma escassez de estudos em vários gêneros dessas famílias, alguns com dados químicos insuficientes para discussões quimiossistemáticas, e outros, onde há divergências de opiniões com relação aos seus posicionamentos nas respectivas famílias, subfamílias ou tribos (TOMAZELA, 2001, CHASE *et al.*, 1999). Por estes motivos, escolheu-se a espécie vegetal pertencente à família Rutaceae para este estudo.

## 1.2. FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros e 1600 espécies distribuídas nos Trópicos e Subtrópicos. Na região neotropical ocorrem 52 gêneros, dos quais, 33 no Brasil, com centro de diversidade na Amazônia e na mata Atlântica (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Vários representantes dessa família têm valor medicinal e econômico, merecendo destaque os jaborandis (*Pilocarpus* spp.), que fornecem a pilocarpina, utilizada no tratamento de glaucoma e calvície; as espécies do gênero *Citrus* que abastecem o mercado mundial com seus frutos (limão, laranja, tangerina e outros) e óleos essenciais usados em perfumaria; muitos gêneros ainda produzem também madeira de excelente qualidade, como exemplo, no Amazonas utiliza-se a madeira das tamanqueiras (*Zanthoxylum* spp.) na indústria de calçados e de celulose (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Essa família se caracteriza pela diversidade de metabólitos secundários (Figuras 1.1, 1.2 e 1.3) não comuns nas demais famílias da Ordem. Dentre esses metabólitos, os mais representativos são os alcalóides derivados do ácido antranílico (1-12, Figura 1.1), as cumarinas (16-18, Figura 1.2), os flavonóides (19-22, Figura 1.2) e os limonóides (23-28, Figura 1.3).

Alcalóides menos representativos também são encontrados em Rutaceae, tais como, alcalóides derivados da fenilalanina, tirosina, triptofano (13-15, Figura 1.2), histidina e alcalóides com origem biogenética ainda desconhecida (WATERMAN, 1999).

No quadro 1.1, são apresentadas algumas das classes de substâncias isoladas da família Rutaceae e suas atividades biológicas.

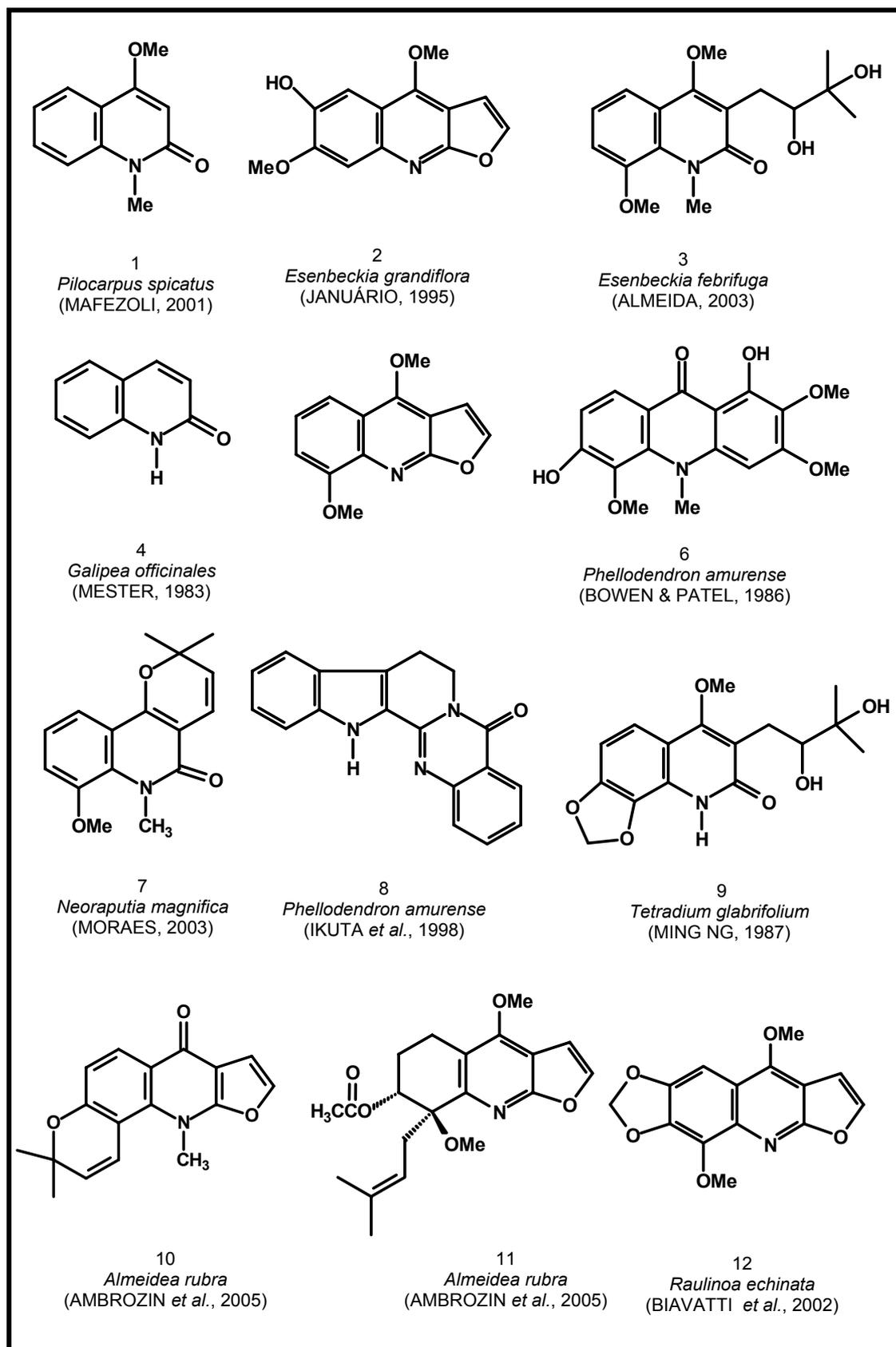


FIGURA 1.1. Alcalóides derivados do ácido antranílico isolados de Rutaceae.

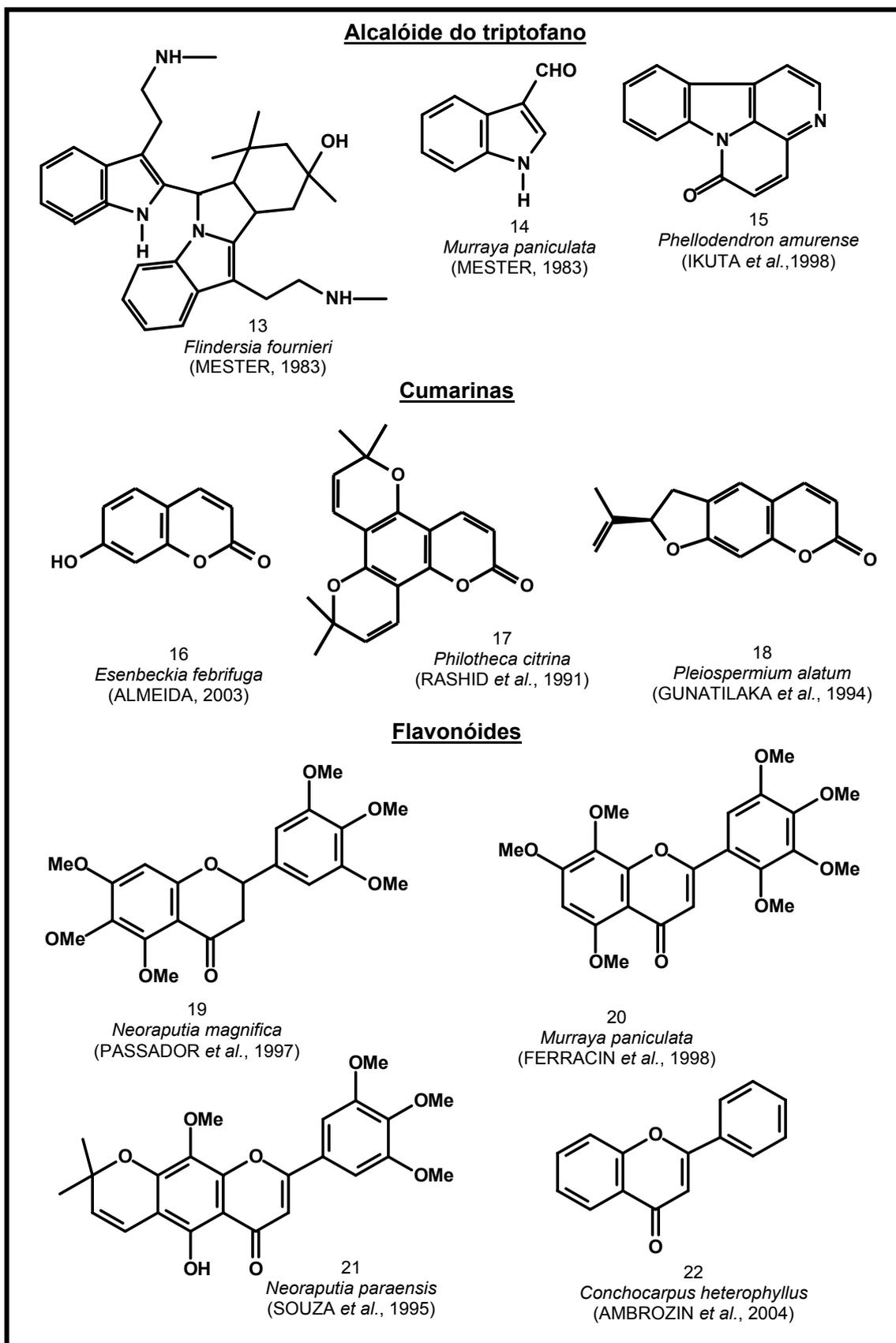


FIGURA 1.2. Substâncias isoladas de Rutaceae.

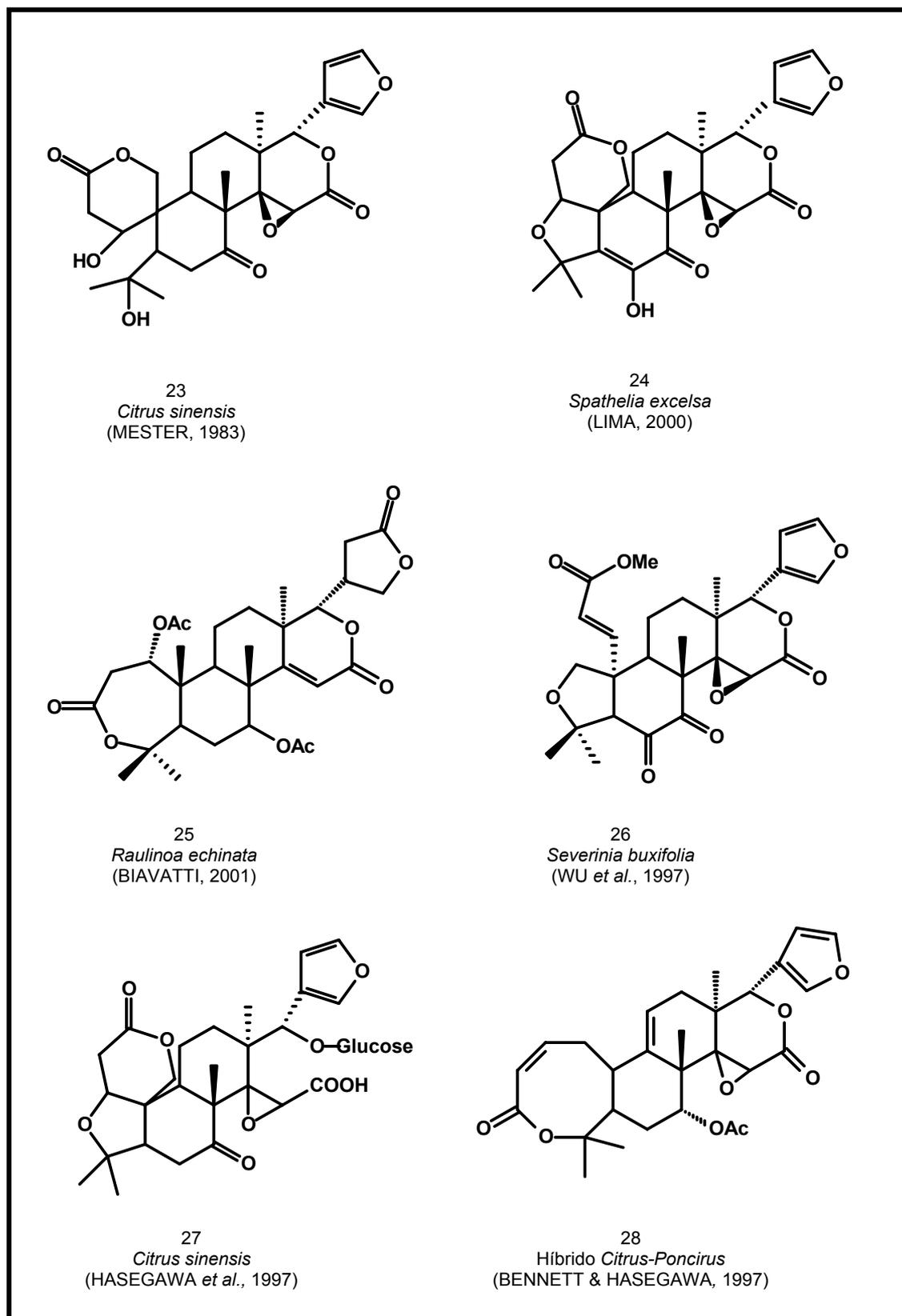


FIGURA 1.3. Limonóides aislados de Rutaceae.

QUADRO 1.1. Algumas classes de substâncias isoladas da família Rutaceae e suas respectivas atividades biológicas.

Classe	Atividade Biológica	Referências
Alcalóides	Antifúngica, anticancerígena, inibidora da acetilcolinesterase, antibacteriana, antitumoral, antitiroidal, hipotensiva, antiinflamatória, atividade inibitória da fosfolipase A <sub>2</sub> (envolvida em processos alérgicos e antiinflamatórios), relaxante muscular, anestésica, antioxidante, inseticida, antimalárica, anticonceptiva, antimutagênica.	(CHAKRABORTY <i>et al.</i> , 1980); (LEWIS, 1983); (KONG <i>et al.</i> , 1985); (KONG <i>et al.</i> , 1986); (PAULINI <i>et al.</i> , 1989); (BRINGMANN <i>et al.</i> , 1998); (ZHAO <i>et al.</i> , 1998); (BONTÉ <i>et al.</i> , 1999); (RAMSEWAK <i>et al.</i> , 1999); (ADDAE-KYEREME <i>et al.</i> , 2001); (FUNAYAMA <i>et al.</i> , 2001b); (MAFEZOLI, 2001); (TACHIBANA <i>et al.</i> , 2001); (MIYAZAWA <i>et al.</i> , 2002); (NAKAHARA <i>et al.</i> , 2002).
Cumarinas	Antibacteriana, anti-HIV, antifúngica, analgésica, diurética, antihelmíntica, anticoagulante, anticancerígena, tripanocida.	(TOWERS <i>et al.</i> , 1981); (LEWIS, 1983); (AFEK <i>et al.</i> , 1986); (GUNATILAKA <i>et al.</i> , 1994); (MAFEZOLI, 2001); (VIEIRA <i>et al.</i> , 2001).
Lignanas	Inibidores de germinação, tripanocida.	(MAFEZOLI, 2001); (BASTOS <i>et al.</i> , 1999).
Limonóides	Antialimentar, antifúngica, Inibidora de crescimento, antibacteriana, antiviral, inibidora da acetilcolinesterase, hipotensiva, Inseticida, antitumoral, anticólera, anticancerígena.	(LEWIS, 1983); (BAGGE, 1998); (ZHAO <i>et al.</i> , 1998); (WADA <i>et al.</i> , 1990); (JAYAPRAKASHA <i>et al.</i> , 1997); (MAFEZOLI, 2001).
Flavonóides	Inibidora da enzima gGAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	(TOMAZELA <i>et al.</i> , 2000); (MORAES <i>et al.</i> , 2003); (AMBROZIN <i>et al.</i> , 2004).

As espécies da família Rutaceae estão distribuídas em várias subfamílias, ENGLER (1931) reconheceu sete subfamílias como pertencentes à Rutaceae: Aurantioideae ou Citroideae, Dictyolomatoideae, Flindersioideae, Rutoideae, Rhabdodendroideae, Spathelioideae e Toddalioideae. Dentre estas, as que se destacam por possuírem maior número de espécies são Aurantioideae, Rutoideae e Toddalioideae (DAGNE *et al.*, 1988). O estudo quimiosistemático tem mostrado que a diversificação dos alcalóides e cumarinas é maior em Rutoideae e Toddalioideae. A similaridade química entre estas duas subfamílias é acentuada, levando SILVA *et al.* (1988) a uní-las em uma única subfamília, Rutoideae. A subfamília Aurantioideae mostra proliferação de cumarinas, flavonóides e limonóides, mas uma escassez em número e diversidade dos alcalóides.

A subfamília Flindersioideae, produz alcalóides derivados do ácido antranílico, cumarinas, flavonóides e limonóides com anéis A, B e D modificados, estes limonóides são característicos de Meliaceae, por este motivo foi incluída no passado na família Meliaceae. Os alcalóides do ácido antranílico não têm sido encontrados em Meliaceae, sugerindo que a Flindersioideae está melhor classificada entre as Rutaceae (CHASE *et al.*, 1999).

Na química da subfamília Rhabdodendroideae são encontrados alcalóides e limonóides típicos de Rutaceae (Ordem Sapindales), contudo a presença de elagitaninos implicou em sua inclusão na Ordem Rosales e exclusão da Ordem Sapindales (CHASE *et al.*, 1999). As subfamílias Spathelioideae e Dictyolomatoideae já foram situadas entre as Simaroubaceae, contudo, a presença de limonóides e alcalóides típicos de Rutaceae reforçam sua retenção nesta última (CHASE *et al.*, 1999; TOMAZELA, 2001).

Entre as tribos da subfamília Rutoideae, apenas a tribo Cusparieae é constituída por gêneros Sul Americanos. Com o objetivo de contribuir com o estudo quimiosistemático da família, propôs-se o estudo fitoquímico de *Raputia praetermissa* pertencente a esta tribo.

### 1.3. O GÊNERO *Raputia*

Aublet, em 1775, estabeleceu o gênero *Raputia* baseado nos caracteres morfológicos de *Raputia aromatica* Aubl. (KALLUNKI, 1990).

De Candolle, em 1822, descreveu uma segunda espécie que chamou de *R. heterophylla*. Anos depois, Bentham e Hooker reconheceram esta espécie como sendo do gênero *Pholidandra* Neck ao invés de *Raputia*. Em 1871, Engler descreveu quatro espécies pertencentes à *Raputia* na flora brasileira (ARRUDA *et al.*, 1991).

Em 1978, Emmerich revisando as espécies descritas como *Raputia*, observou grandes diferenças morfológicas entre as mesmas (KALLUNKI, 1990). Com o objetivo de organizar e estabelecer uma conceituação taxonomicamente homogênea e válida para o gênero mencionado, ela utilizou a espécie *R. aromatica* Aubl. como elemento de comparação em seus estudos e, foi a flor, especificamente, o caráter morfológico mais importante para a organização do gênero. O resultado foi a divisão em mais três novos gêneros: *Neoraputia*, *Raputiarana* e *Sigmatanthus* (KALLUNKI, 1994).

No decorrer de seus estudos, Emmerich observou que um grupo de seis espécies apresentava grande homogeneidade entre seus caracteres morfológicos. Estas espécies foram transferidas para o gênero *Neoraputia*. Destas seis espécies, quatro foram segregadas do gênero *Raputia*: *N. alba* (Ness e Mart) Emmerich M., *N. trifoliata* (Engler) Emmerich, *N. paraensis* (Duck) Emmerich e *N. magnifica* (Engler) Emmerich e, duas foram descritas como novas: *N. saldanhae* Emmerich e *N. cowanii* Emmerich (KALLUNKI, 1994; TOMAZELA, 2001).

O gênero *Neoraputia* tem sido estudado pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, visando utilizar os dados químicos para auxiliar no correto posicionamento das espécies no gênero em questão. Foram isolados, até o momento, basicamente flavonóides polimetoxilados (29-42, Figura 1.4 e 1.5) e mais recentemente alcalóides derivados do ácido antranílico, ambos comuns na família. Apesar dos flavonóides não serem considerados marcadores quimiotaxonômicos, o isolamento destes e também dos alcalóides, confirmam a posição de *Neoraputia* na tribo Cusparieae.

O gênero *Raputia* possui atualmente 11 espécies, predominantemente amazônicas, sendo apenas três de áreas fora da Bacia Amazônica (PIRANI, 2005).

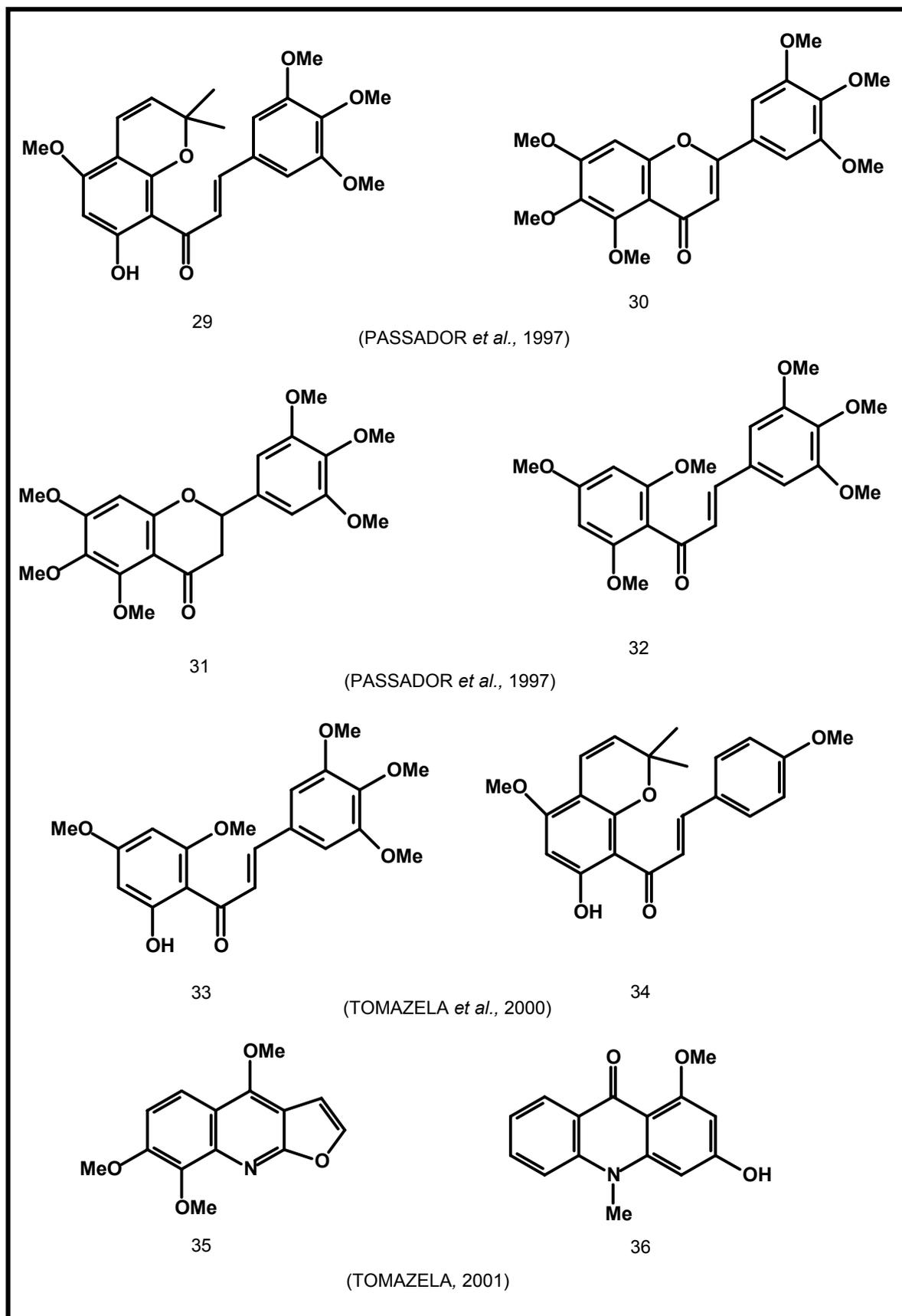
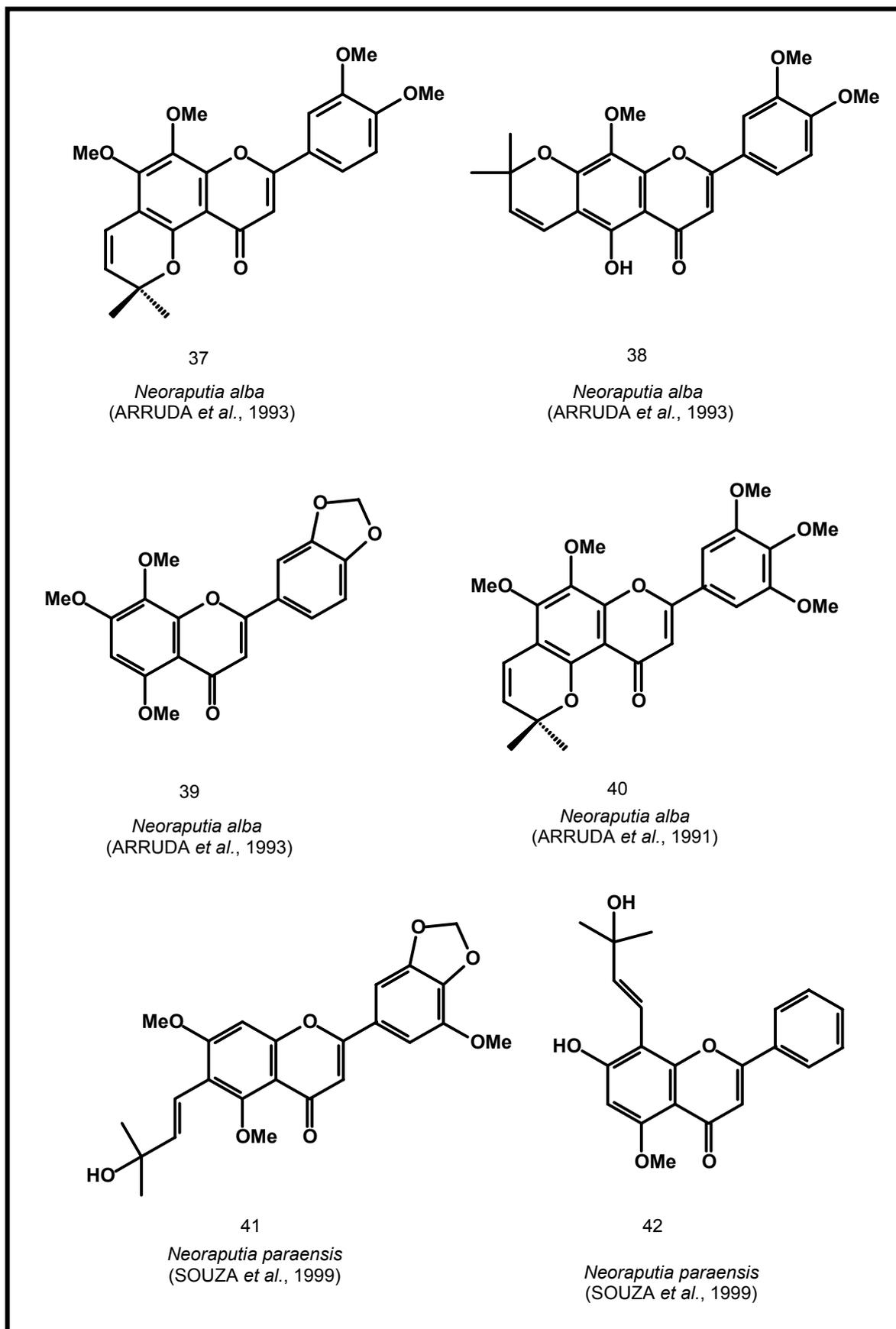


FIGURA 1.4. Substâncias isoladas de *Neoraputia magnifica*.

FIGURA 1.5. Substâncias isoladas do gênero *Neoraputia*.

#### 1.4. A ESPÉCIE: *Raputia praetermissa*

*R. praetermissa* é uma espécie nativa da Amazônia recentemente classificada. É um arbusto ou árvoreta delgada com folhas opostas-cruzadas; pecíolos escurecidos e densamente hirsutos, lâmina elíptica coriácea, conforme figura 1.6.



FIGURA 1.6. Espécie *Raputia praetermissa*. Fotos do livro: Flora da Reserva Ducke (cedido pelos autores; RIBEIRO *et al.*, 1999).

*R. praetermissa* é uma espécie rara, conhecida apenas na coleção-tipo da Reserva Ducke (PIRANI, 2005; RIBEIRO *et al.*, 1999). Até o momento, não havia nenhum estudo químico ou avaliação do seu potencial bioativo, por esta razão, foi necessário um estudo fitoquímico minucioso. No quadro 1.2 é mostrada a posição hierárquica da espécie *R. praetermissa*.

Quadro 1.2. Posição hierárquica da espécie *R. praetermissa*.

Taxonomia	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Sapindales
Família	Rutaceae
Subfamília	Rutoideae
Tribo	Cusparieae
Gênero	<i>Raputia</i>
Espécie	<i>Raputia praetermissa</i>

## 1.5. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta 16-18 milhões de pessoas, principalmente, nas Américas do Sul, Central e também se manifesta em áreas metropolitanas dos Estados Unidos (GELB & HOL, 2002). Segundo MOREL & LAZDINS (2003), cerca de 4,8-5,4 milhões de pessoas apresentam sintomas clínicos, com uma incidência anual de 700.000-800.000 novos casos e 45.000 mortes, devido a problemas cardíacos em decorrência desta doença. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de cinco milhões de pessoas estão infectadas, a maioria vivendo nas grandes cidades (FERREIRA *et al.*, 1997).

O vetor de transmissão é um inseto vulgarmente conhecido como “barbeiro”, que ataca o homem à noite para lhe sugar o sangue, infectando-o através das fezes. Uma vez infectado, o indivíduo passa por três estágios da doença, cada uma com sintomas diferentes (CDC, 2004, HEMONLINE, 2004):

1) Fase aguda ocorre em 1% dos casos, os sintomas mais comuns são olhos inchados, fadiga, febre, perda de apetite, diarreia, vômitos e outros. Em geral os sintomas desaparecem espontaneamente em poucas semanas, porém há casos, principalmente, em crianças, que podem levar à morte, isto só ocorre se estas estiverem com suas imunidades baixas e, se houver, um ataque intensivo do parasita em órgãos e tecidos importantes como coração, fígado e outros;

2) Fase indeterminada ocorre de 8 a 10 semanas depois da infecção, durante este estágio, as pessoas não apresentam sintomas (assintomáticas);

3) Fase crônica se manifesta em 10 a 20 anos depois da infecção. Nesta fase, as pessoas podem desenvolver sintomas mais sérios, tais como, problemas cardíacos, incluindo aumento do coração, além de inchaço nas pernas e corpo, fraqueza, falta de ar. Outro órgão muito afetado é o trato digestivo que pode ter determinadas partes aumentadas resultando em dificuldades para deglutinar. O comprometimento pode vir a acarretar em prisão de ventre que pode durar dias, semanas e até meses, com muito sofrimento para o doente.

Este último estágio de deficiência cardíaca e inflamações gastrointestinais resultam em 10% de casos fatais (VERONESI, 1991, ALVES *et al.*, 2005). Por sua grande difusão e gravidade das manifestações, a doença representa um sério problema sanitário.

Programas de Saúde Pública vêm sendo realizados para erradicação do vetor. Atualmente, este tipo de transmissão está sendo controlada no Brasil (CANESIN & BARRETO, 1999; NETO, 1999; WHO, 1999; DIAS *et al.*, 2002). Apesar da incidência da contaminação ter diminuído, a prevalência da doença de Chagas em nosso meio ainda é alta, por ser uma doença de caráter crônico e evolução lenta (CANESIN & BARRETO, 1999).

Atualmente, devido às migrações populacionais, a transfusão sangüínea passou a representar a via mais importante no surgimento de novos casos em algumas regiões do país (WHO, 1997, 1999; NETO, 1999). Outros meios de transmissão em seres humanos são transplantes, transmissão congênita e oral (PESSOA & MARTINS, 1988; NEVES, 1995; FERREIRA *et al.*, 1997).

Desde a descoberta da doença pelo médico Carlos Chagas em 1909, até os dias atuais, o tratamento da doença continua parcialmente eficaz, os fármacos anti-*T. cruzi* disponíveis apresentam baixa eficácia e alta toxicidade, especialmente, na fase crônica da doença.

Desde 1960, basicamente dois medicamentos têm sido utilizados para o tratamento da doença de Chagas: o nifurtimox (43, Figura 1.7) e o benzonidazol (44, Figura 1.7) (COURA & CASTRO, 2002; RIBEIRO & PILO-VELOSO, 1997; RODRIGUEZ *et al.*, 1998). Estes dois medicamentos ainda estão sob avaliação do xenodiagnóstico (critério parasitológico) e das provas sorodiagnósticas (critério sorológico). Na fase aguda da doença, os critérios de avaliação são concordantes, isto é, dão positivo, indicando cura, ou negativo, indicando fracasso terapêutico. Na fase crônica não há concordância e normalmente um grande número de xenodiagnósticos apresenta-se positivo enquanto os sorodiagnósticos são negativos (DIAS *et al.*, 2004). Ambos os fármacos apresentam efeitos colaterais sérios aos pacientes, o que justifica a busca de novos medicamentos, mais eficazes e menos tóxicos.

Recentemente o alopurinol (45, Figura 1.7), um análogo da hipoxantina, que atua como um substrato alternativo da hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), é incorporado ao RNA. A incorporação levou a formação de um nucleotídeo não-fisiológico, que bloqueia a tradução de proteínas. Este fármaco tem mostrado resultado eficaz, na fase de testes clínicos (COURA & CASTRO, 2002).

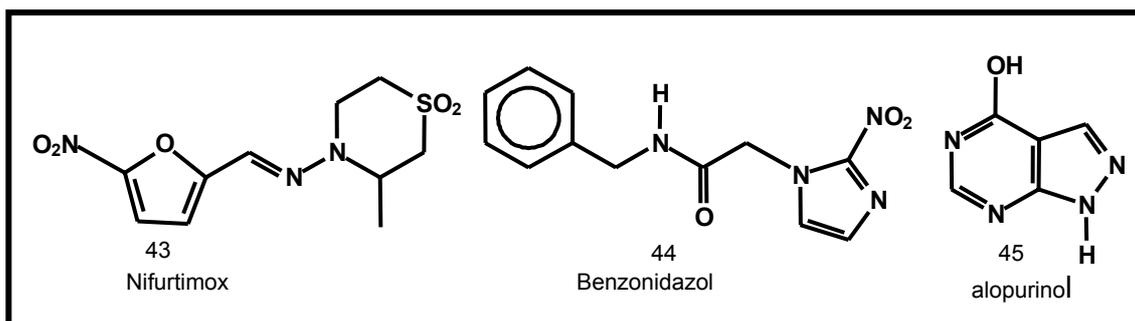


FIGURA 1.7. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.

O desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários pode ser realizado através de “*screening*” de compostos sintéticos ou naturais, ou ainda, a busca de substâncias que interrompam o ciclo biológico do protozoário no ser humano, o que requer o conhecimento do ciclo de vida e dos mecanismos metabólicos do parasita.

### 1.5.1. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, cujo ciclo de vida envolve passagens através de hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo homem) e invertebrados (triatomíneo hematofágo, barbeiro), em uma série de estádios (COURA & CASTRO, 2002), apresenta-se sob três formas distintas: tripomastigotos, epimastigotos e amastigotos.

Tripomastigotos são formas flageladas responsáveis pela infecção e presente no meio circulante. As formas amastigotos são aflageladas, destituídas de movimento, encontrando-se agrupadas formando os chamados ninhos parasitários no interior dos tecidos. Epimastigotos são formas flageladas encontradas na interconversão das formas tripomastigotos e amastigotos (VERONESI, 1991).

Segundo OPPERDOES & BORST (1977), o parasita na forma tripomastigoto apresenta a organela denominada glicossomo, onde são encontradas enzimas envolvidas na degradação da glicose. Foram identificadas nove enzimas no interior do glicossomo, estando sete envolvidas na degradação da glicose e as outras duas na via do glicerol (OPPERDOES & BORST, 1977; CANNATA *et al.*, 1982). O metabolismo da glicose e do glicerol no glicossomo é mostrado na figura 1.8.

Nas formas tripomastigotas, predominantes na corrente sangüínea do hospedeiro mamífero, não existem citocromos e a mitocôndria é muito reduzida, portanto possui a cadeia respiratória suprimida. Assim, o protozoário fica totalmente dependente da via glicolítica como fonte de energia (CLARKSON & BROHN, 1976).

Dentre as enzimas identificadas no glicossomo, a enzima glicolítica gGAPDH de *T. cruzi* é um dos alvos deste estudo.

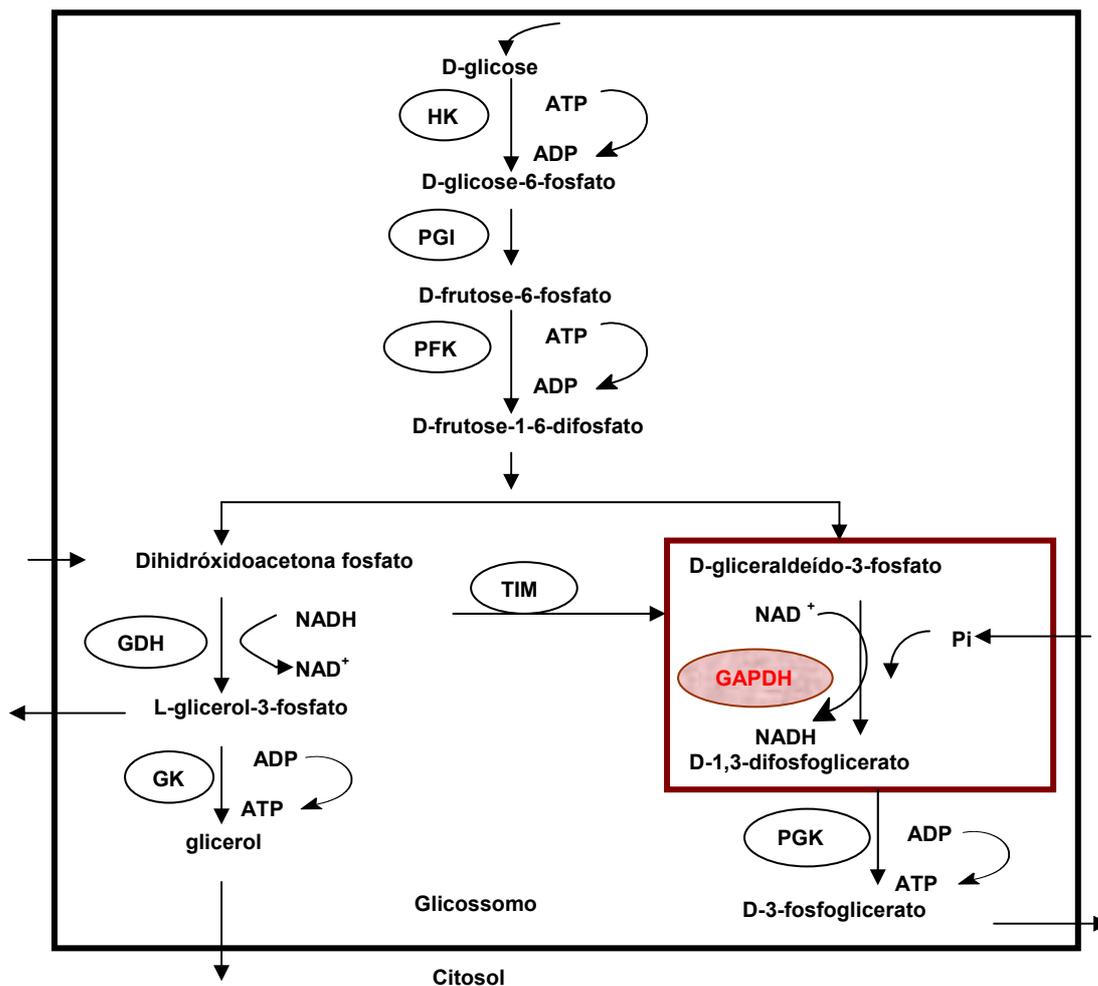


FIGURA 1.8. Metabolismo do glicerol e da glicose no glicossomo\*.

\*Abreviações dos nomes das enzimas: HK, Hexoquinase; PGI, Fosfoglicose isomerase; PFK, 6-Fosfofrutoquinase; GDH, Glicerol 3-fosfato desidrogenase; GK, Glicerol quinase; TIM, Triose fosfato isomerase; GAPDH, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato quinase. Os compostos permeáveis à membrana são mostrados com setas.

A enzima gGAPDH catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeído-3-fosfato em D-1,3-difosfoglicerato na presença de NAD<sup>+</sup> e fosfato inorgânico (LADAME *et al.*, 2001; PAVÃO *et al.*, 2002).

### 1.5.2. A Enzima de *T. cruzi*: Glicossomal Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (gGAPDH)

O estudo detalhado das estruturas das enzimas gGAPDH humana e de *T. brucei* levou a identificação dos sítios de ligação do NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, cofator da GAPDH) e verificação de diferenças importantes nas duas enzimas. As diferenças ocorrem, principalmente, na substituição de resíduos que interagem diretamente com o anel adenosina do NAD<sup>+</sup>, o que levou VERLINDE *et al.* (1994a) a sugerir que compostos contendo anéis de adenosina modificados poderiam ligar-se mais facilmente a gGAPDH de *T. brucei* do que à humana e que poderiam ser utilizados como inibidores da reação. Isto foi confirmado em testes com compostos substituídos nas posições 2-, 8- e 2' do NAD<sup>+</sup> onde foi observada a afinidade da gGAPDH de *T. brucei* por um desses compostos em até 167 vezes mais do que para a adenosina, enquanto para a enzima humana a afinidade é bem menor (VERLINDE *et al.*, 1994b)

A enzima gGAPDH de *T. cruzi* é homóloga a enzima de *T. brucei*, isto sugere que ela pode ser utilizada como um alvo na busca de fármacos contra a doença de Chagas (VERLINDE *et al.*, 1994a).

O uso da enzima gGAPDH no desenvolvimento racional de novos fármacos, baseia-se no fato de que a forma infectante do *T. cruzi* depende exclusivamente da via glicolítica como fonte de energia (SOUZA *et al.*, 1998), logo, compostos que bloqueiem a glicólise podem ser utilizados como fármacos para combater esta doença.

O Laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC/USP, sob coordenação do prof. Dr. Glaucius Oliva, tem se dedicado junto ao Grupo de Produtos Naturais da UFSCar na busca de inibidores específicos que possam ser utilizados como potenciais fármacos antichagásicos. Os resultados obtidos mostram que alguns metabólitos de Rutaceae apresentaram atividade promissora (acima de 50%) no modelo experimental de inibição enzimática na gGAPDH de *T. cruzi*. No quadro 1.3 e figuras 1.9 e 1.9a, são mostrados os resultados obtidos pelo nosso grupo com substâncias testadas frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

QUADRO 1.3. Resultados de substâncias isoladas da Ordem Sapindales e testadas frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

Subst.	Concentração (µM)	Atividade inibitória (%)	IC <sub>50</sub> (µM)	Referência
46	79,5	68	-	(MORAES <i>et al.</i> , 2003)
47	226,2	65	-	
48	128,9 e 257,7	80 e 99	-	(MORAES <i>et al.</i> , 2003); (TOMAZELA <i>et al.</i> , 2000)
49	257,7	100	-	(MORAES <i>et al.</i> , 2003)
50	128,9 e 257,7	94 e 100	-	(MORAES <i>et al.</i> , 2003)
51	119,6 e 239,2	86 e 100	-	
52	239,2	88	-	
53	159,2 e 318,5	91 e 100	-	
54	248,8	88	174	(ALMEIDA, 2003)
55	397	78,3	-	(AMBROZIN, 2004)
56	335,6	95	168	(ALMEIDA, 2003)
57	200,0	72,2	-	(AMBROZIN, 2004)
58	95,5, 159,2 e 318,5	75,1, 97,4 e 99,1	64	(MAFEZOLI, 2001); (VIEIRA, <i>et al.</i> , 2001)
59	-	-	145	(VIEIRA, <i>et al.</i> , 2001)
60	-	-	164	
61	159,2 e 318,5	75,1 e 98,8	-	(MAFEZOLI, 2001)
62	-	-	93	(VIEIRA, <i>et al.</i> , 2001)
63	-	-	123	
64	-	-	130	
65	361,0	8,2	-	(ANDRADE, 2003)
66	502,5	9,3	-	
67	369,0	99		(ALMEIDA, 2003)
68	552,5	10,3		(ANDRADE, 2003)
69	-	-	184	(ROCHA, 2004)
70	-	-	175	

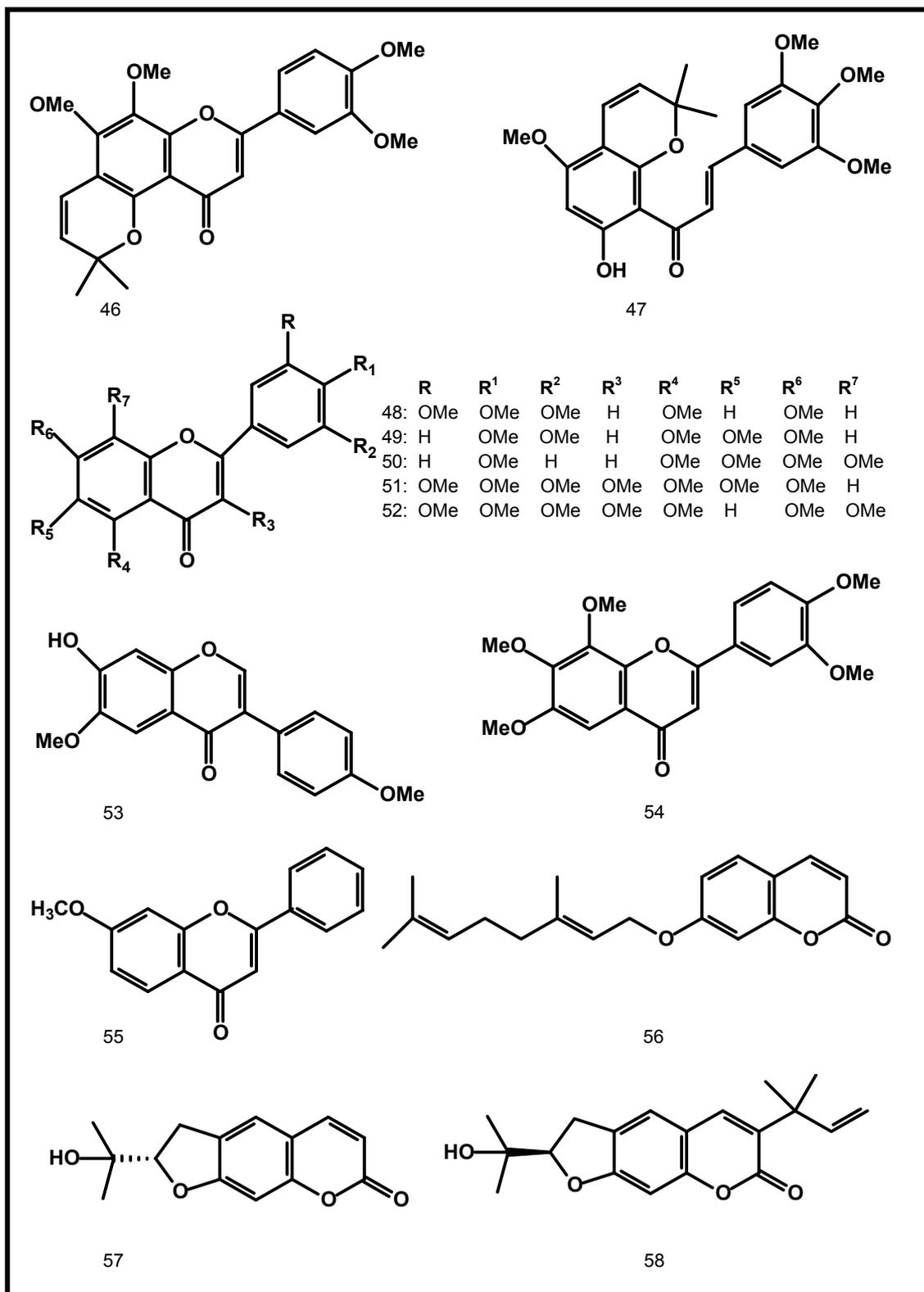


FIGURA 1.9. Estruturas apresentadas no quadro 1.3.

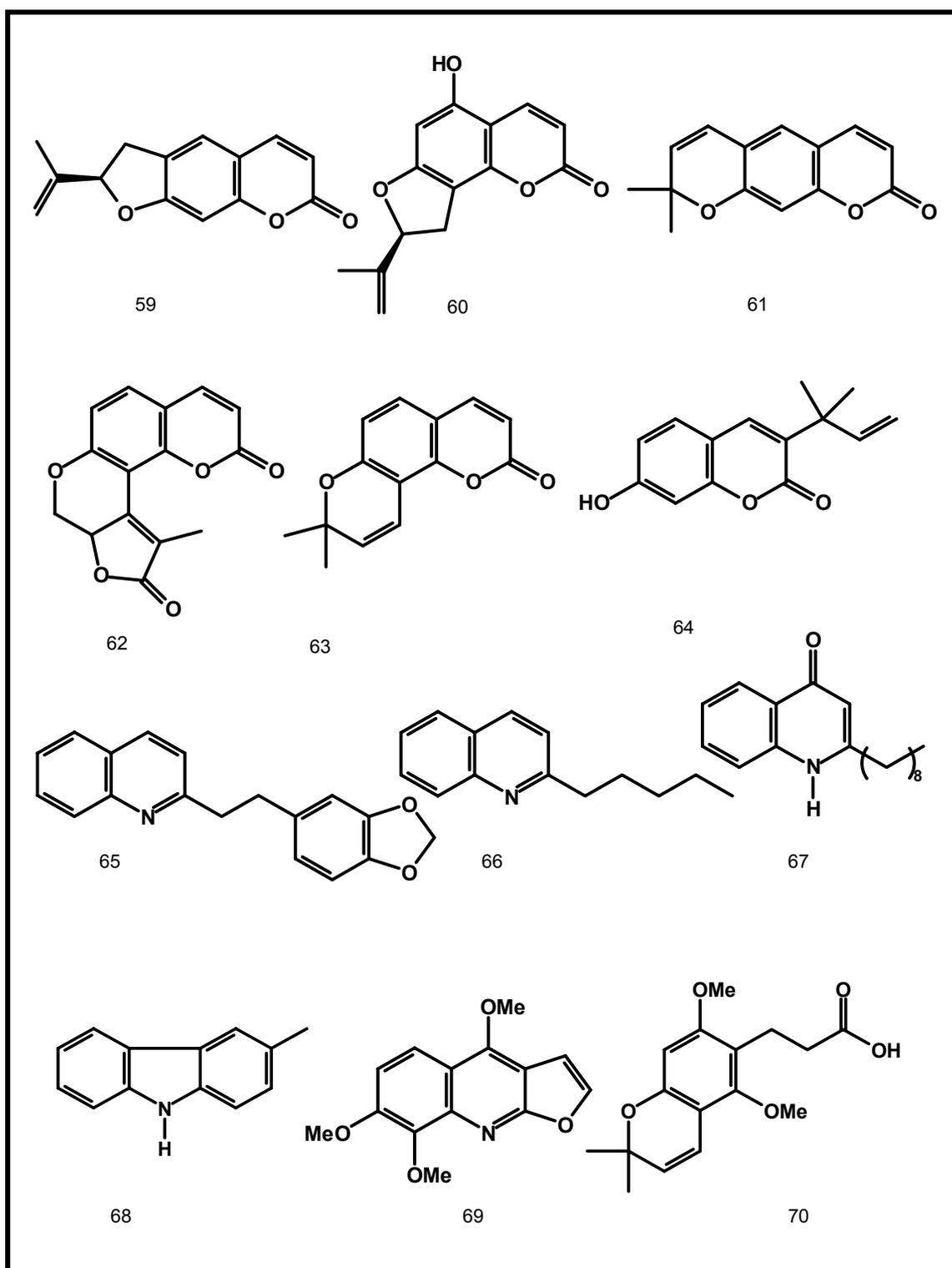


FIGURA 1.9a. Estruturas apresentadas no quadro 1.3.

## 1.6. LEISHMANIOSES

A Leishmaniose é uma doença complexa causada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross (família Trypanosomatidae), possui duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (chamados flebotomíneos) e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, como é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores) (ARAUJO *et al.*, 1998; FUNASA, 2000).

Segundo dados da OMS (WHO, 2002) foram registrados casos em aproximadamente 88 países, com estimativas de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, representando um sério problema de saúde pública em crescente expansão. Anualmente, cerca de 400 mil pessoas são contaminadas no mundo (NEVES, 1995).

As leishmanioses apresentam uma diversidade de sintomas clínicos: cutâneo, cutâneo-mucosa e visceral (SILVA *et al.*, 2002). Quando não tratadas levam à morte, apenas 14% dos indivíduos evoluem para cura espontânea. Os medicamentos utilizados para a terapêutica são os sais minerais e orgânicos de antimônio tri e pentavalentes, o antibiótico anfotericina B, a estilbamidina, pentamidina, miltefosina, pentostan e associações de algumas outras drogas. Entretanto, esses medicamentos são bastante tóxicos (SUNDAR, 2001; KAMINSKY, 2002; COSTA *et al.*, 2001; ESCOBAR *et al.*, 2001; FOURNET *et al.*, 1994). Ultimamente, tem sido observada uma resistência adquirida de algumas espécies de *Leishmania* a alguns dos fármacos utilizados no tratamento (SUNDAR, 2001; CROFT, 2001; GENESTRA *et al.*, 2003).

Atualmente, vêm-se buscando drogas menos tóxicas ao homem e mais efetivas contra esses parasitas. De acordo com AKENDENGUE *et al.* (1999), um grande número de produtos naturais, tais como, cumarinas, chalconas, saponinas, alcalóides 2-aril ou 2-alquil quinolínicos e outros, possuem atividade sobre *Leishmania*, fazendo assim das plantas, uma fonte de busca desses prováveis fármacos.

### 1.6.1. Leishmaniose Visceral

Calazar ou leishmaniose visceral é uma doença causada pelo protozoário da espécie *Leishmania donovani* Laveran, é uma enfermidade infecciosa generalizada e crônica.

A doença é transmitida ao homem pelo inseto vetor pertencente à espécie *Lutzomyia longipalpis* (família: Psychodidae, subfamília: Phlebotaminae), conhecido popularmente como mosquito palha, birigui ou cangalhinha. A fêmea do inseto vetor, infectada no momento em que suga o sangue de um animal contaminado, com o intuito de ingerir sangue para o desenvolvimento de seus ovos, transmite o parasita através de sua saliva quando pica outro animal ou o homem (NEVES, 1995).

Caracteriza-se clinicamente, na maioria dos casos, por febre irregular de longa duração, emagrecimento, queda de pêlos, anemia, pigmentação na pele (conhecida como pele negra), aumento do volume de certos órgãos, principalmente baço e fígado. Pode ocasionar também, sintomas hemorrágicos, aparecimento de tosse seca e sinais característicos de bronquite, ou ainda, edemas nas faces e nos membros. Podemos observar, portanto, que se trata de uma doença grave que quando não tratada, de forma adequada, pode levar à morte.

Os fármacos usados para o tratamento são diamidinas aromáticas e compostos antimoniais pentavalentes (COSTA *et al.*, 2001).

### 1.6.2. Leishmaniose cutâneo-mucosa

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou cutâneo-mucosa é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada pelos protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas; é, primariamente, uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente. O período de incubação da doença no homem é, em média, de dois meses, podendo apresentar períodos mais curtos (duas semanas) e mais longos (dois anos) (FUNASA, 2000).

A LTA, também conhecida como leishmaniose mucocutânea, úlcera de Bauru, ferida brava e outros, distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil

tem sido assinalada em todos os estados, constituindo, portanto, uma das infecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à magnitude da doença, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do doente, com reflexos no campo social e econômico. Nos últimos 15 anos (1985 a 1999) foram registrados no país 388.155 casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana (FUNASA, 2000). Os valores registrados, evidentemente, são inferiores aos reais, considerando as deficiências no sistema de notificação compulsória de doenças transmissíveis e, a assistência médica precária na maior parte das zonas rurais.

São referidas várias formas clínico-epidemiológicas relacionadas a diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania* (FUNASA, 2000):

### ***Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia, particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença se amplia para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás). Seus principais vetores são os *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia). A doença humana é relativamente rara, podendo ocorrer lesão ulcerada, geralmente única. Alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizado por: infiltrações, pápulas e tubérculos, envolvendo extensas áreas cutâneas. Esta forma da doença, até o momento, é apenas controlável, sem ocorrer a cura.

### ***Leishmania (Viannia) guyanensis***

Aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), estendendo-se pelas Guianas, é encontrada principalmente em florestas de terra firme. Os vetores são *Lutzomyia anduzei*, *L. whitmani* e *L. umbratilis*, que é o principal vetor, costuma pousar durante o dia em troncos de árvores e quando perturbado, ataca o homem em grande quantidade. A doença humana, chamada “Pian-bois”, é caracterizada por lesões únicas ou múltiplas. As lesões múltiplas são conseqüências de picadas simultâneas de vários

flebótomos infestados ou secundários a metástases linfáticas. É muito raro o comprometimento mucoso pela *Leishmania guyanensis*. A doença atinge principalmente indivíduos do sexo masculino, jovens e adultos, em fase produtiva, o que caracteriza a ocorrência ocupacional nas frentes de trabalho, penetração em áreas de florestas virgens e exercícios militares.

### ***Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. O único vetor que pode ser individualizado é o *Psychodopigus wellcomei*, encontrado na Serra dos Carajás, tem como hábito picar o homem mesmo durante o dia e apresenta grande atividade na estação das chuvas. Em outras regiões do país, em áreas de colonização antiga, onde o ambiente se encontra profundamente modificado, ainda é a *L. (V.) braziliensis* o agente mais freqüentemente encontrado que, de acordo com a distribuição das diversas espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão, assumiu características epidemiológicas distintas no decorrer do tempo. Crianças e mulheres são atingidas com freqüência. As lesões podem ocorrer em pálpebras ou em áreas normalmente cobertas pelo vestuário, sugerindo que a transmissão com grande freqüência, ocorre no interior das habitações. As populações atingidas são, em geral, de baixo padrão sócio-econômico.

A doença humana é caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos. Outras espécies de *Leishmania* têm sido isoladas de casos humanos, caninos, roedores e marsupiais, de diferentes regiões do Brasil (Bahia, Amazonas, Pará, Rondônia, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo) e apresentam características biológicas e bioquímicas distintas.

Com os avanços recentes nos estudos da bioquímica da *Leishmania*, têm-se conseguido a identificação de novos “alvos” para o desenvolvimento da quimioterapia das leishmanioses. Estas pesquisas envolvem o metabolismo de esteróides ou enzimas, dentre as várias enzimas conhecidas, vem-se trabalhando com a APRT de *Leishmania tarentolae*.

### 1.6.3. A Enzima Alvo Adenina-Fosforribosil-Transferase (APRT)

Os purino nucleotídeos são bases nitrogenadas essenciais para formação de DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico). A biossíntese dos purinos é catalisada pelas enzimas da família das fosforribosil-transferases (PRTases). A maioria dos organismos, incluindo mamíferos, sintetiza adenina nucleotídeos pela via *de novo* e via *de recuperação* (Figura 1.10). Ao contrário, todos os protozoários parasitas examinados, até o momento, são estritamente auxotróficos na aquisição de purino nucleotídeo, devido à ausência do caminho biossintético *de novo*. Da mesma forma, protozoários do gênero *Leishmania* são inteiramente dependente das fosforribosil-transferases (PRTases) no caminho reciclante de purino nucleotídeos pela *via de recuperação* (Figura 1.11), sendo elas: a adenina PRTase (APRT), hipoxantina-guanina PRTase (HGPRT) e xantina PRTase (XPRT) (BERENS *et al.*, 1995; MCGREEVY & MARSDEN, 1986; SOUZA, 1998).

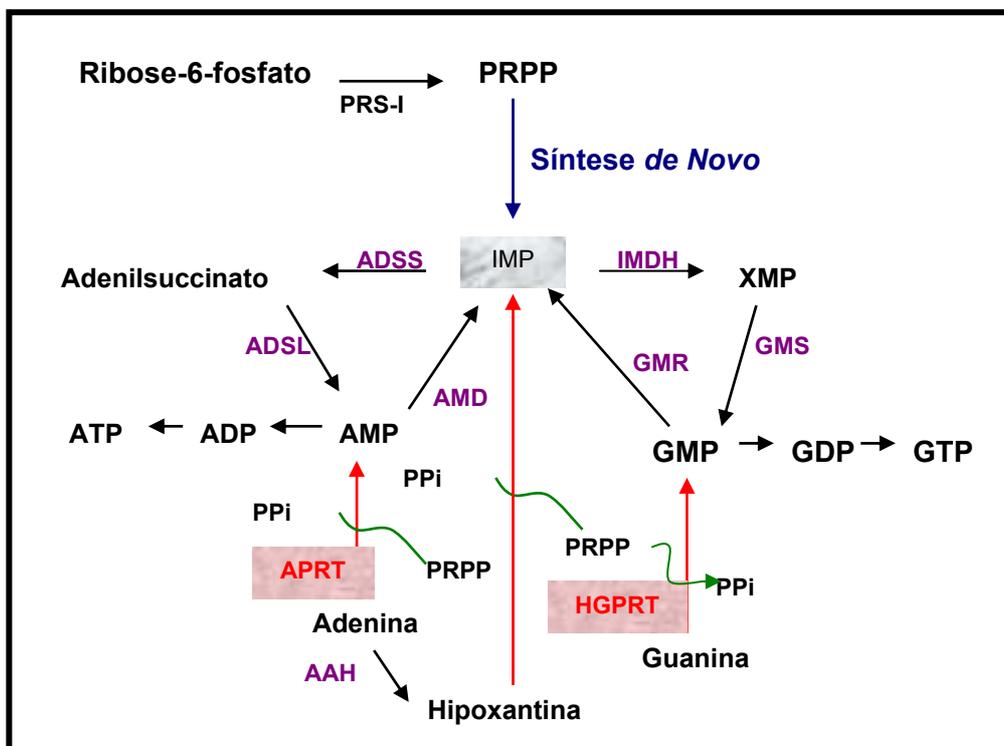


FIGURA 1.10. Via de recuperação de purinas em células de mamíferos\*.

\*Abreviações dos nomes: PRPP, 5-Fosforribosil-1-pirofosfato; IMP, Inosina Monofosfato; AMP, Adenosina Monofosfato; ADSS, Adenilsuccinato sintetase; ADSL, adenilsuccinato liase; Ppi, Pirosofosfato inorgânico; APRT, adenina fosforribosil transferase; IMDh, IMP desidrogenase; XMP, Xantina monofosfato; GMS, Glutamina amidotransferase; GMP, Guanosina Monofosfato; GDP, Guanosina difosfato; GTP, Guanosina trifosfato; HGPRT,

Hipoxantina guanina fosforribosil transferase. A via de síntese *de novo* é apresentada em azul. Os substratos e os produtos das reações são apresentados em preto. As reações catalisadas pelas PRTases: APRT (adenina-fosforribosil-transferase) e HGPRT (hipoxantina-guanina- fosforribosil-transferase) são apresentadas em vermelho. Demais enzimas que participam das reações são apresentadas em violeta. As setas verdes mostram a liberação de pirofosfato (PPi) nas reações catalisadas pelas PRTases.

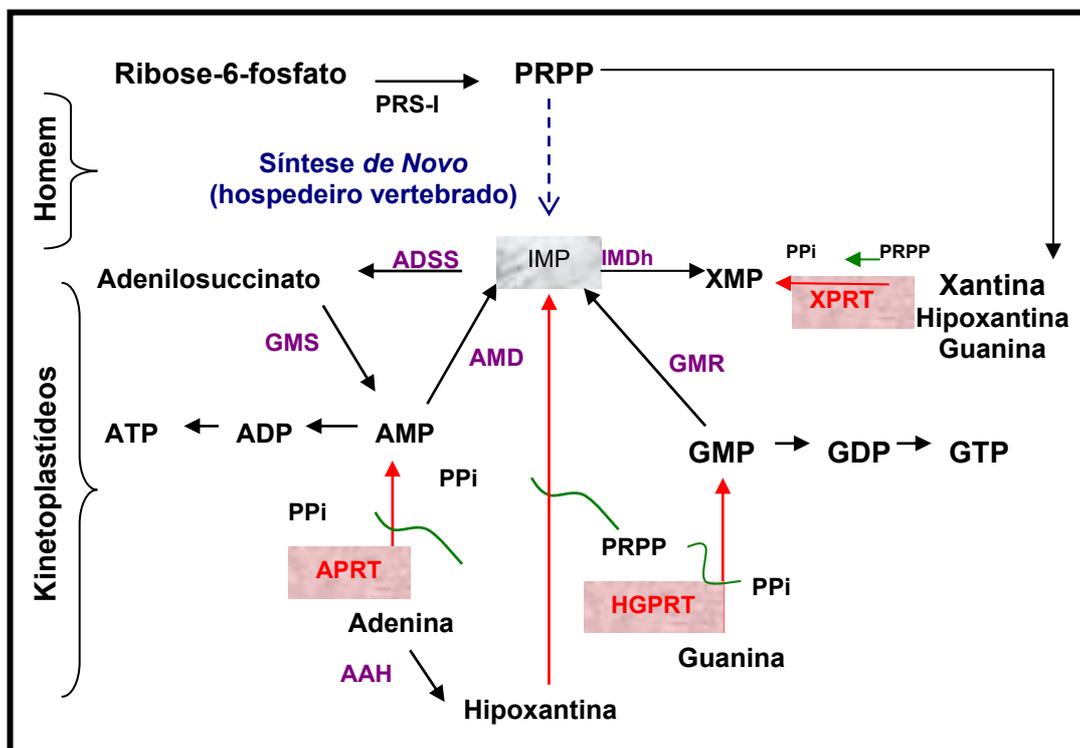


FIGURA 1.11. Via de recuperação de purinas em *Leishmania* \*.

\*Abreviações dos nomes: PRPP, 5-Fosforribosil-1-pirofosfato; IMP, Inosina Monofosfato; AMP, Adenosina Monofosfato; ADSS, Adenilossuccinato sintetase; ADSL, adenilossuccinato liase; Ppi, Pirofosfato inorgânico; APRT, adenina fosforribosil transferase; IMDh, IMP desidrogenase; XMP, Xantina monofosfato; GMS, Glutamina amidotransferase; GMP, Guanosina Monofosfato; GDP, Guanosina difosfato; GTP, Guanosina trifosfato; HGPRT, Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase; XPRT, Xantina-guanina-hipoxantina-fosforribosil transferase. A via de síntese *de novo* é apresentada em azul tracejado. Os substratos e os produtos das reações são apresentados em preto. As reações catalisadas pelas PRTases: APRT (adenina-fosforribosil-transferase), XPRT (xantina-guanina-hipoxantina-fosforribosil transferase), HGPRT (hipoxantina-guanina- fosforribosil-transferase) são apresentadas em vermelho. Demais enzimas que participam das reações são apresentadas em violeta. As setas verdes mostram a liberação de pirofosfato (PPi) nas reações catalisadas pelas PRTases.

As reações de recuperação de purino nucleotídeos catalisadas pelas PRTases são independentes. A exploração dessa via metabólica como alvo para o desenho racional de drogas é dependente de estudos físico-químicos aprofundados das três PRTases envolvidas. As informações obtidas desses estudos podem ser usadas na busca de inibidores específicos para cada uma das enzimas APRT, HGPRT e XPRT. A via de recuperação em parasitas dos gêneros

*Leishmania* é o caminho de suscetibilidade desses organismos a análogos de purino nucleotídeos, um exemplo é o alopurinol, inibidor da Xantina Oxidase, responsável pela conversão dos purino nucleotídeos em ácido úrico. Esse medicamento vem sendo usado clinicamente (fase de teste) no tratamento da leishmaniose cutânea e doença de Chagas (SILVA, 2001).

A APRT, uma das enzimas alvo deste trabalho, catalisa a remoção do grupo pirofosfato (Ppi, 74, Figura 1.12) do PRPP (72, Figura 1.12) e a condensação da ribose à base purínica (adenina, 71, Figura 1.12), em uma reação aparentemente de ataque nucleofílico de 2ª ordem, com a formação de Ppi (74) e de AMP (adenosina-monofosfato, 73, Figura 1.12). O mecanismo de reação permanece praticamente desconhecido (SILVA, 2001; PHILLIPS *et al.*, 1999).

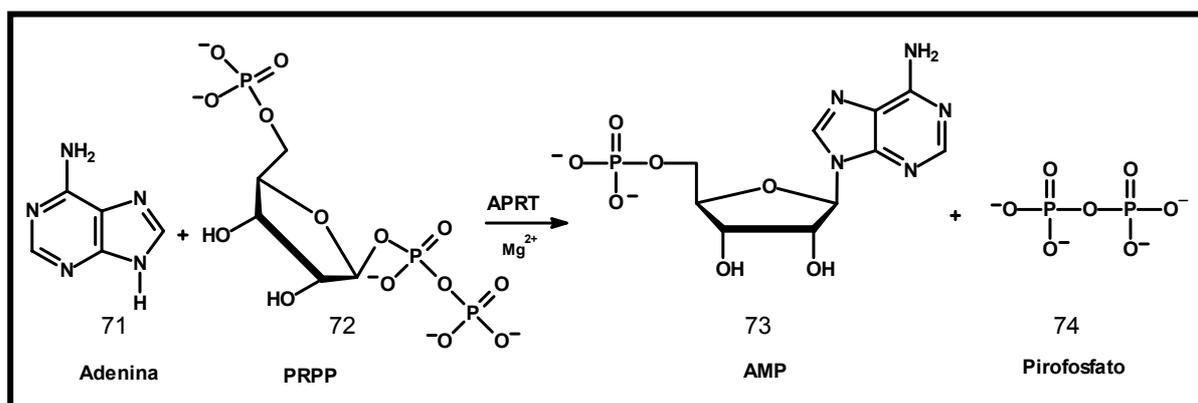


FIGURA 1.12. Reação catalisada pela APRT em Kinetoplastidas.

Assim, a maior promessa para o desenvolvimento racional de novas drogas antiparasitárias baseia-se na exploração dessas diferenças bioquímicas ou metabólicas fundamentais entre o parasita e o hospedeiro, na busca por substâncias inibidoras das enzimas APRT, HGPRT e XPRTases.

São mostrados no quadro 1.4 e na figura 1.13, os resultados obtidos pelo nosso grupo com substâncias testadas frente à enzima APRT de *L. tarentolae*.

QUADRO 1.4. Resultados de substâncias isoladas da Ordem Sapindales e testadas frente à enzima APRT de *L. tarentolae*.

Substâncias	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Atividade inibitória (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Referências
75	105,0	62,6	-	(AMBROZIN, 2004)
76	100,0	55,9	-	
77	41,2	44,6	-	
78	205,8	20,6	-	(ANDRADE, 2003)
79	117,4	19,1	-	
80	276,3	31,8	-	
81	-	-	121	(ROCHA, 2004)
82	-	-	121	
83	-	-	96	

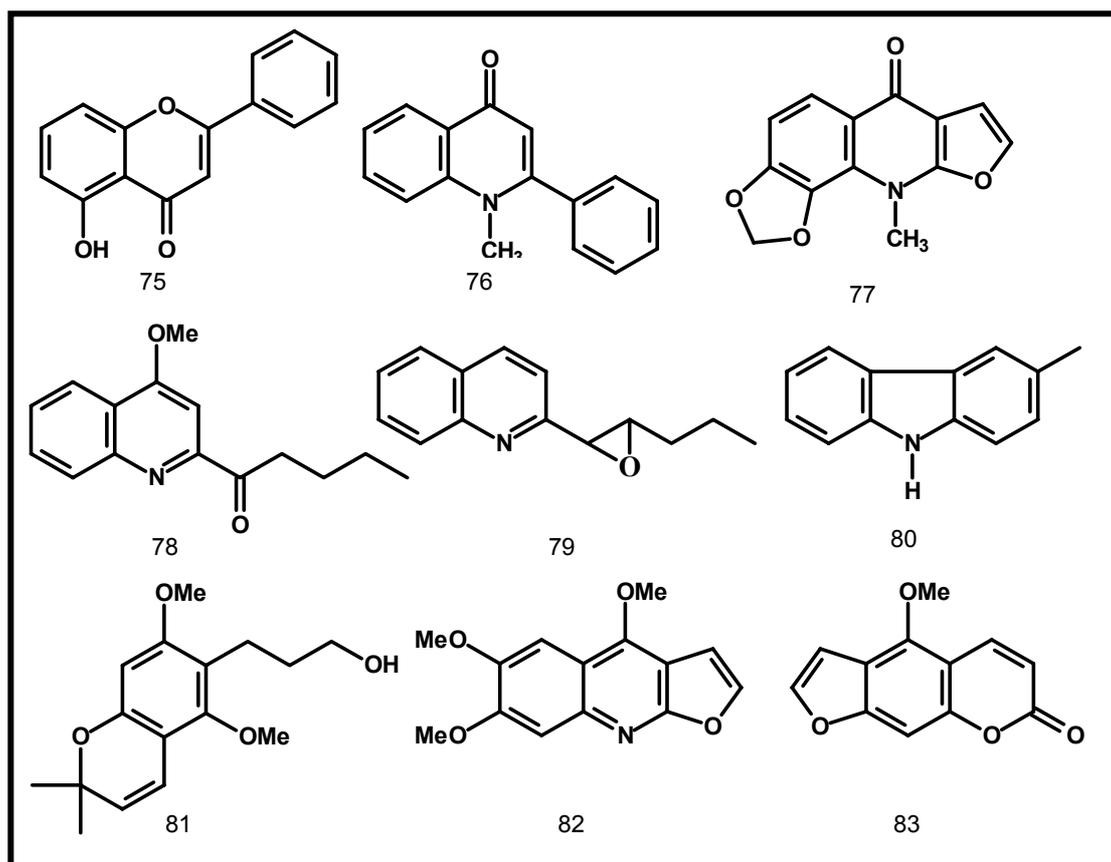


FIGURA 1.13. Estruturas apresentadas no quadro 1.4.

## 2. OBJETIVOS

- Fazer o estudo fitoquímico das raízes de *Raputia praetermissa* (Engler) Emmerich;
  
- Procurar metabólitos secundários que possam ser usados para um posicionamento quimiosistemático definitivo do gênero *Raputia*, e assim, compreender a razão da separação do gênero *Neoraputia* de *Raputia*;
  
- Avaliar as substâncias isoladas quanto à atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* com o propósito de obter novos fármacos;
  
- Avaliar as substâncias isoladas quanto à atividade inibidora frente às enzimas APRT de *Leishmania tarentolae* e gGAPDH de *Trypanosoma cruzi* com o fim de se obter potenciais inibidores enzimáticos.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em conjunto com os Laboratórios de Cristalografia de Proteínas e Biologia Molecular do IFSC/USP, Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP e Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

#### 3.1. METODOLOGIA QUÍMICA

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

##### 3.1.1. Coleta do Material Botânico

O material foi adquirido na Reserva Florestal Ducke–INPA, situada no km 26 da estrada Manaus–Itacoatiara. A coleta foi realizada em Latitude de 2° 53' S, Longitude 59° 58' E, Altitude - 9.999 m, próximo ao Igarapé do Tinga. Foram coletadas raízes, caules e folhas de *Raputia praetermissa* em Janeiro de 2001. A exsicata estéril foi identificada por comparação com a exsicata INPA: 189865, pela botânica Maria de Fátima Figueiredo Melo do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA).

##### 3.1.2. Preparação dos Extratos

As amostras coletadas foram limpas, separadas em raízes, caules e folhas; desidratadas à temperatura ambiente (28 °C) durante duas semanas e em seguida foram moídas.

Na preparação dos extratos da raiz, caule e folha de *Raputia praetermissa* foram utilizados 1,74 kg, 4,40 kg e 0,59 kg do material seco, respectivamente. Foram extraídos a frio com solventes hexano, diclorometano,

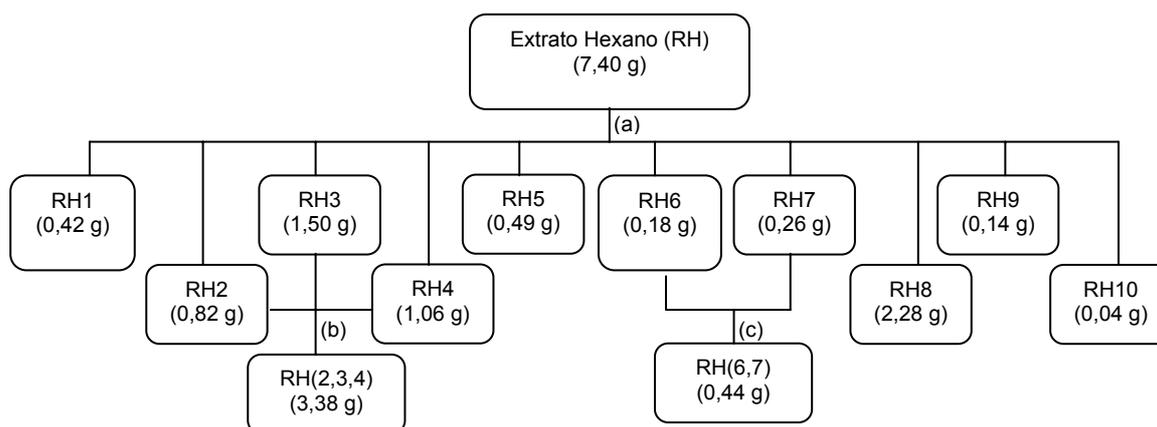
metanol e hidroalcoólico (metanol/água (1:1)), em ordem crescente de polaridade, durante três dias, três vezes consecutivas para cada solvente. Somente o extrato hidroalcoólico da raiz foi liofilizado.

TABELA 3.1. Rendimento dos extratos de *Raputia praetermissa*

Material coletado	Peso seco (kg)	Extratos obtidos			
		Hexano	Diclorometano	Metanol	Hidroalcoólico
Raiz	1,74	7,40 g	38,00 g	25,31 g	14,37 g
Caule	4,40	13,52 g	84,19 g	81,49 g	-
Folha	0,59	4,45 g	23,70 g	20,40 g	-

### 3.1.3. Fracionamento do Extrato Hexano da Raiz

O trabalho foi iniciado com o fracionamento do extrato em hexano da raiz de *Raputia praetermissa* que foi submetido à cromatografia a vácuo conforme esquema 3.1. Foram obtidas 10 frações que foram analisadas via cromatografia em camada delgada. Após revelação em U.V. e em vanilina ácida, foi percebida a presença de manchas intensas vermelhas em quase todas as frações.



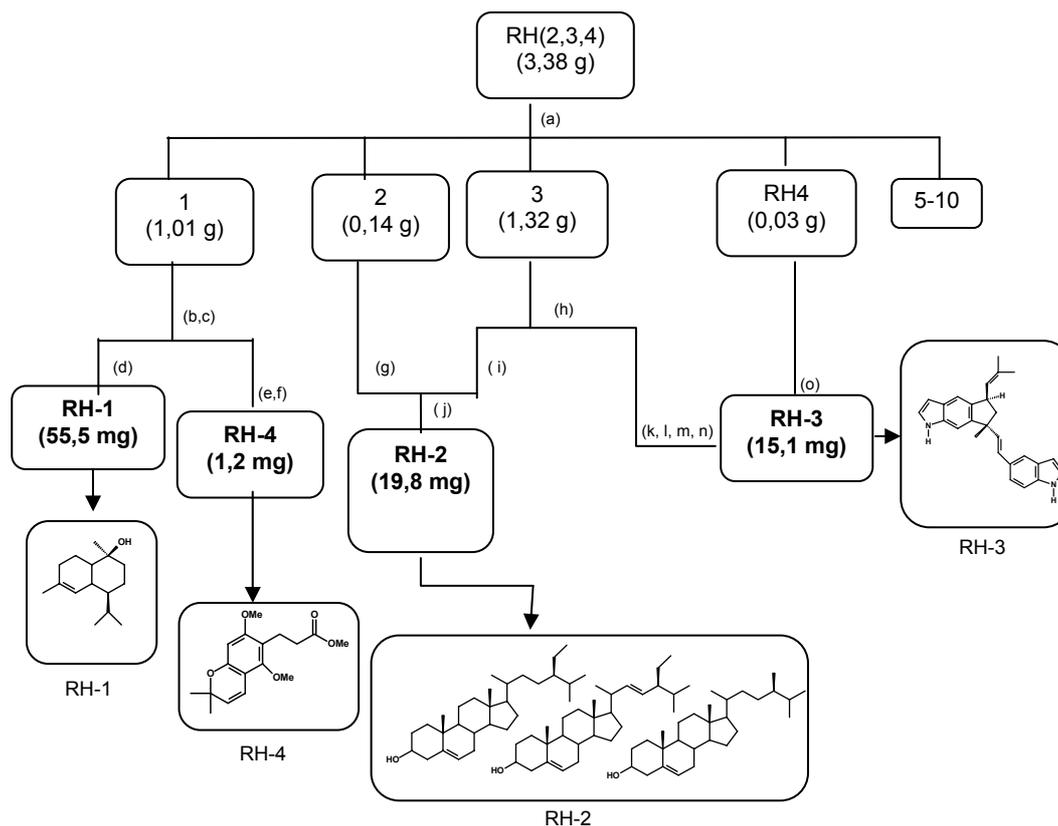
ESQUEMA 3.1. Fracionamento do extrato hexano da raiz de *R. praetermissa*.

(a) CC,  $\phi \times h = 5,0 \times 23,0$  cm, sílica gel 60 (70-230 mesh), eluente: hexano; hexano:diclorometano (9:1), (7:3), (1:1), (4:6), (1:9); diclorometano; diclorometano: metanol (1:1) e metanol.

(b) A fração 2,3 e 4 foram reunidas.

(c) A fração 6 e 7 foram reunidas.

A fração RH(2,3,4) foi analisada através de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) onde foi verificada a presença de sinais entre  $\delta$  8,00 e  $\delta$  7,00 que indicaram a presença de hidrogênios aromáticos. Foi analisada também por CCDC, quando revelada em vanilina ácida, apresentou mancha de cor vermelha intensa e como havia quantidade para ser trabalhada, começou-se então o fracionamento (Esquema 3.2).

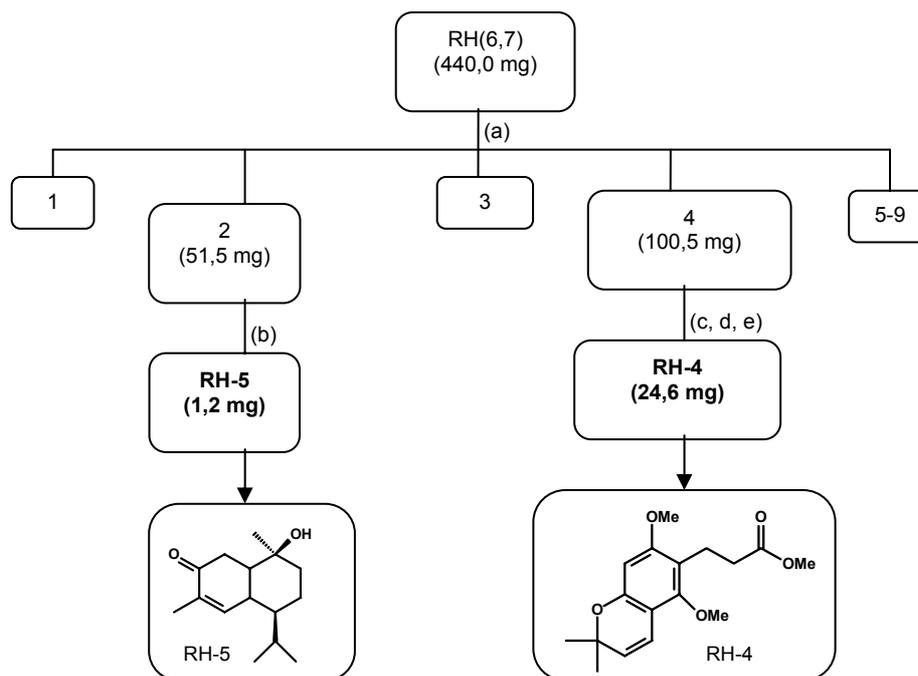


ESQUEMA 3.2. Fracionamento da fração RH(2,3,4).

- (a) CC,  $\phi \times h = 4,5 \times 54,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1), (8:2), (1:1); acetato de etila; acetato de etila:metanol (9:1), (8:2), (1:1); metanol. Foram obtidas 10 frações, das quais as frações 1, 2, 3 e 4 foram refracionadas.
- (b) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 22,5$  cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 7,5 cm de florissil (60-100 mesh), eluente: hexano; hexano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 10 frações das quais a fração 3 foi refracionada.
- (c) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 20,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (95:5), (9:1), (7:3); acetato de etila; metanol. Obteve-se 4 frações. Das quais as frações 2 e 3 foram trabalhadas, (d) e (e) respectivamente.
- (d) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (9:1), resultou na substância **RH-1** (55,5 mg), sem pigmento.
- (e) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (9:1), resultou em 6 frações. A fração 3 foi novamente trabalhada.

- (f) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila:acetonitrila (9:0,9:0,1), resultou na substância **RH-4**.
- (g) CC,  $\phi$  x h = 2,5 x 30 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano (9,5:0,5), (9:1), (8:2), (1:1); diclorometano; diclorometano:acetato de etila (9:1), (7:3); acetato de etila; metanol. Foram obtidas 10 frações, das quais a fração 5 é uma mistura de esteróides, foi reunida com os esteróides de (i).
- (h) CC,  $\phi$  x h = 4,0 x 22,5 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano; hexano:acetato de etila (95:5), (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1); acetato de etila e metanol. Foram obtidas 9 frações, as frações 4 e 6 foram novamente fracionadas (i) e (k), respectivamente.
- (i) CC,  $\phi$  x h = 1,0 x 24,0 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano: acetona (9:0,5:0,5), (9:1,5:0,5), (7:2,5:0,5), (7:2:1), (6:2:2); diclorometano; metanol. Foram obtidas 7 frações, a fração 2,3, mistura de esteróides, foi reunida com esteróide de (g) e novamente trabalhada (j).
- (j) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (9:1), resultou na mistura esteroideal **RH-2**.
- (k) CC,  $\phi$  x h = 2,0 x 18,5 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano: acetona (9:0,5:0,5), (8:1:1), (7:2:1); diclorometano; diclorometano:acetona (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetona; metanol. Foram obtidas 6 frações.
- (l) CC,  $\phi$  x h = 3,0 x 30,0 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano: acetona (9:0,8:0,2), (9:0,5:0,5), (9:1:1), (8:1:1), (7:2:1); diclorometano; diclorometano:acetona (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetona; metanol. Foram obtidas 7 frações.
- (m) CC,  $\phi$  x h = 3,0 x 21,0 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila: (9:1), (8:2), (7:3); acetato de etila; acetato de etila:acetona (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetona; metanol. Foram obtidas 5 frações.
- (n) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (7:3), resultou na substância **RH-3**.
- (o) CC,  $\phi$  x h = 1,5 x 36,0 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano; hexano:acetato de etila (95:5), (9:1), (8:2), (1:1); acetato de etila e metanol. Foram obtidas 12 frações, a fração 4 é o alcalóide **RH-3**. A substância RH-3, cada vez que se fazia um experimento na tentativa de elucidação estrutural, sua solubilidade também diminuía até que não se conseguiu mais solubilizar, havendo então a necessidade de buscá-la em outras frações. O que foi feito no decorrer do projeto.

A fração RH(6,7), esquema 3.1, foi analisada via RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) e foi observada a presença de sinais de hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  8,00 e  $\delta$  7,00. Esta fração foi estudada, conforme esquema 3.3.

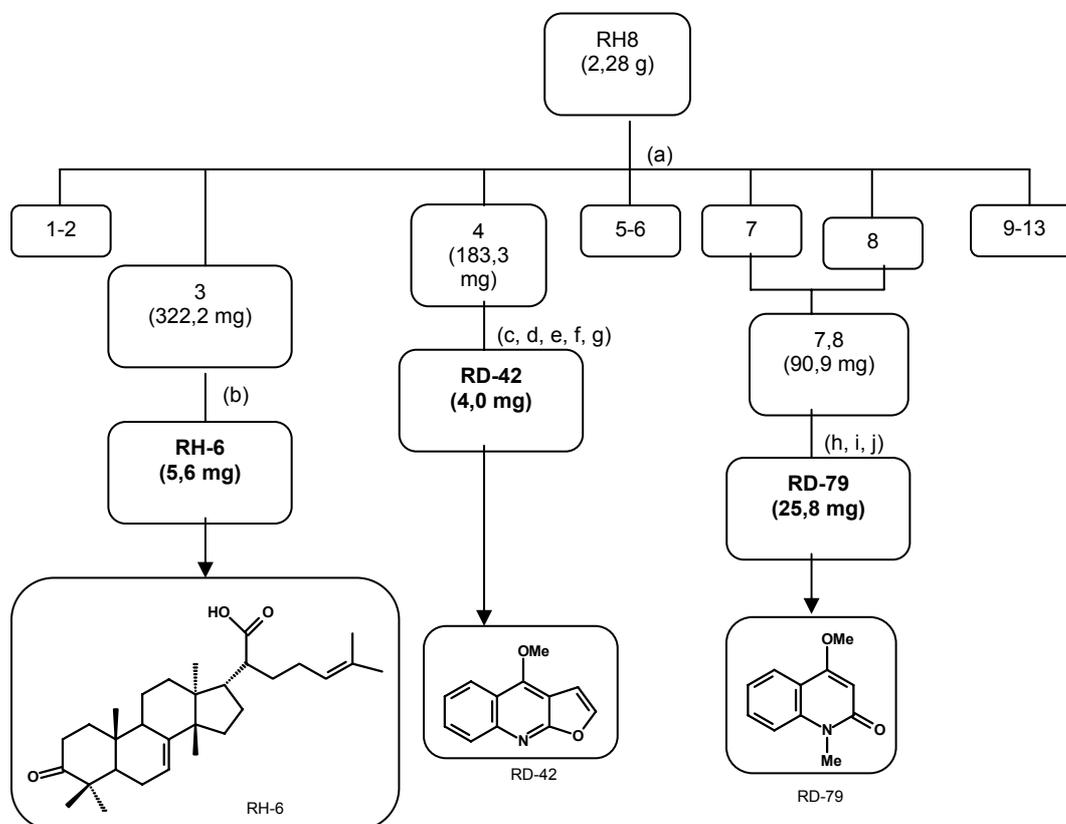


ESQUEMA 3.3. Fracionamento da fração RH(6,7).

- (a) Cromatotron, placa de sílica 1,0 mm de espessura,  $\phi = 14,4$  cm, eluente: hexano:acetato de etila (9,8:0,2), (9,5:0,5); (9,2:0,8); (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetato de etila, metanol. Foram obtidas 9 frações que foram novamente trabalhadas.
- (c) Cromatotron, placa de sílica e florissil 1,0 mm de espessura,  $\phi = 14,4$  cm, eluente: hexano:acetato de etila (9,9:0,1), (9,7:0,3), (9,5:0,5), (9:1), (8:2), (8,5:1,5), (7:3), (1:1); acetato de etila, metanol. Foram obtidas 8 frações, a fração 2 deu origem a **RH-5**.
- (d) CC,  $\phi \times h = 1,5 \times 16,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano (9:1), (8:2), (7:3); diclorometano; diclorometano:acetona (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetona; metanol. Foram obtidas 6 frações, a fração 4 foi novamente trabalhada.
- (e) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 20,0$  cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florissil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetonitrila (8,0:1,8:0,2), (7,0:2,8:0,2), (6,0:3,8:0,2); diclorometano; diclorometano:acetonitrila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1); acetonitrila; metanol. Foram obtidas 7 frações, das quais a fração 5 foi novamente trabalhada.
- (f) Cromatotron, placa de sílica e florissil 1,0 mm de espessura,  $\phi = 14,4$  cm, eluente: hexano:acetato de etila (9,9:0,1); (9,7:0,3); (9,5:0,5); (9:1), (8:2), (8,5:1,5), (7:3), (1:1), acetato de etila; metanol. Foram obtidas 8 frações, uma delas deu origem ao **RH-4**, com maior grau de pureza e em maior quantidade que o encontrado no esquema 3.2.

A fração RH8 (Esquema 3.1) foi analisada através de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz), onde foi verificada a presença de sinais de alcalóides indólicos e furoquinolínicos. Foram realizados vários fracionamentos e, destas frações, foi conseguido o isolamento em pequenas quantidades de dois indólicos que, após serem realizados os espectros de hidrogênio, não solubilizaram mais em nenhum dos solventes deuterados disponíveis. Infelizmente o RMN de hidrogênio não foi suficiente para determinação das estruturas. Foram também isolados e

identificados alcalóides furoquinolínicos, 2-quinolona e um triterpeno tirucalano, conforme esquema 3.4.



ESQUEMA 3.4. Fracionamento da fração RH8.

- (a) CC,  $\phi \times h = 5,0 \times 19,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (8:1,5:0,5), (7:2:1), (1:1:1); diclorometano, diclorometano:acetona (1:1); acetona; metanol. Foram obtidas 13 frações, das quais as frações 3, 4, (7,8) foram submetidas a outros fracionamentos (b), (c-g), (h-j), respectivamente.
- (b) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 14,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5), (8:1,5:0,5), (7:2,5:0,5); (7:2:1); diclorometano, diclorometano:acetona (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações, das quais a fração 3 foi chamada de **RH-6**.
- (c) CC,  $\phi \times h = 2,5 \times 28,0$  cm, 22,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 6,0 cm de florissil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano (9:1); hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5), (8:1:1), (7:2:1), (6:3:1); diclorometano, diclorometano:acetona (1:1); metanol. Foram obtidas 10 frações.
- (d) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 20,0$  cm, 11,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 9,0 cm de florissil (60-100 mesh), eluente: hexano; hexano:diclorometano (9:1); hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5), (8:1:1); diclorometano:metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações.
- (e) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 20,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano: diclorometano:acetato de etila (7:2,5:0,5); metanol. Obteve-se 3 frações.
- (f) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 14,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (7:3), (6:4), (1:1); acetato de etila, metanol. Obteve-se 5 frações.

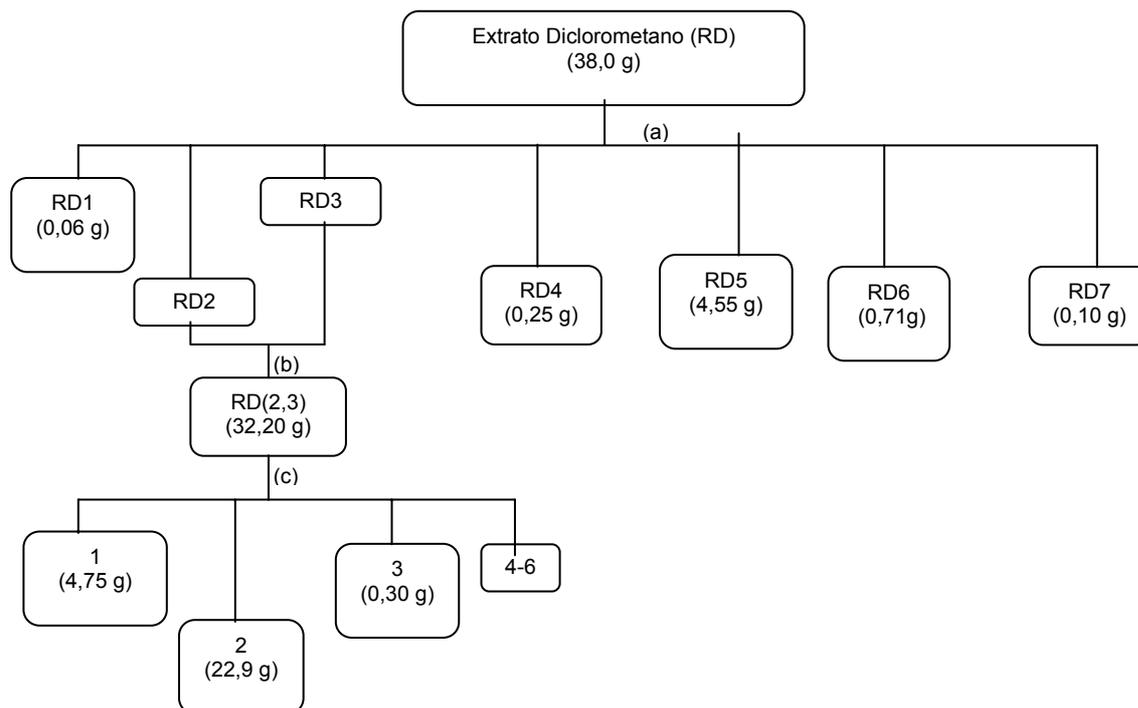
- (g) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:diclorometano:acetona (7:2,5:0,5), que resultou na substância **RD-42** (4,0 mg), esta já havia sido isolada do extrato diclorometano.
- (h) CC,  $\phi$  x h = 2,0 x 23 cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 8,0 cm de florissil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano (9:1); hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5); (8:1,5:0,5), (7:2:1); diclorometano:acetona (1:1); metanol. Foram obtidas 7 frações.
- (i) CC,  $\phi$  x h = 1,0 x 20,5 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (9:0,9:0,1); hexano:diclorometano:acetona (9:0,8:0,2); hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5); hexano:diclorometano:acetona (8:1:1); diclorometano: metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 6 frações.
- (j) CC,  $\phi$  x h = 2,0 x 15 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (8:1,5:0,5), (7:2,5:0,5), (6:3,5:0,5), (5:4:1); diclorometano; metanol (1:1). Foram obtidas 5 frações, das quais uma resultou em **RD-79**.

Todas as frações do extrato hexano em quantidade acima de 100 mg foram estudadas, isto representa 90% do total das frações (Esquema 3.1). Foram isoladas somente deste extrato nove substâncias puras e uma mistura de três esteróides, das puras somente sete foram identificadas, devido ao problema mencionado com a solubilidade e três foram identificadas em mistura.

#### 3.1.4. Fracionamento do Extrato Diclorometano da Raiz

O extrato diclorometano da raiz (38,0 g) de *Raputia praetermissa* foi submetido à cromatografia a vácuo, conforme esquema 3.5. Foram obtidas 7 frações que foram analisadas via cromatografia em camada delgada. Foi verificado que seus constituintes eluíam satisfatoriamente a baixa e média polaridade. Após revelação em U.V. e em vanilina ácida, percebeu-se a presença de uma mancha intensa vermelha em algumas frações como já havia sido visto no extrato hexano.

A fração RD(2,3) foi escolhida para ser fracionada devido à quantidade apresentada e também, quando analisada via CCDC, apresentava manchas vermelhas intensas (provavelmente alcalóides indólicos). Foi também feito o espectro de RMN  $^1\text{H}$  que mostrou sinais de hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  8,00-7,00 e sinais largos de pequena intensidade característicos de hidrogênios ligados a nitrogênio (de anel indólico) em  $\delta$  10,00 e 8,00. O fracionamento de RD(2,3) foi realizado conforme esquema 3.5.



ESQUEMA 3.5. Fracionamento do extrato hexano da raiz de *R. praetermissa*.

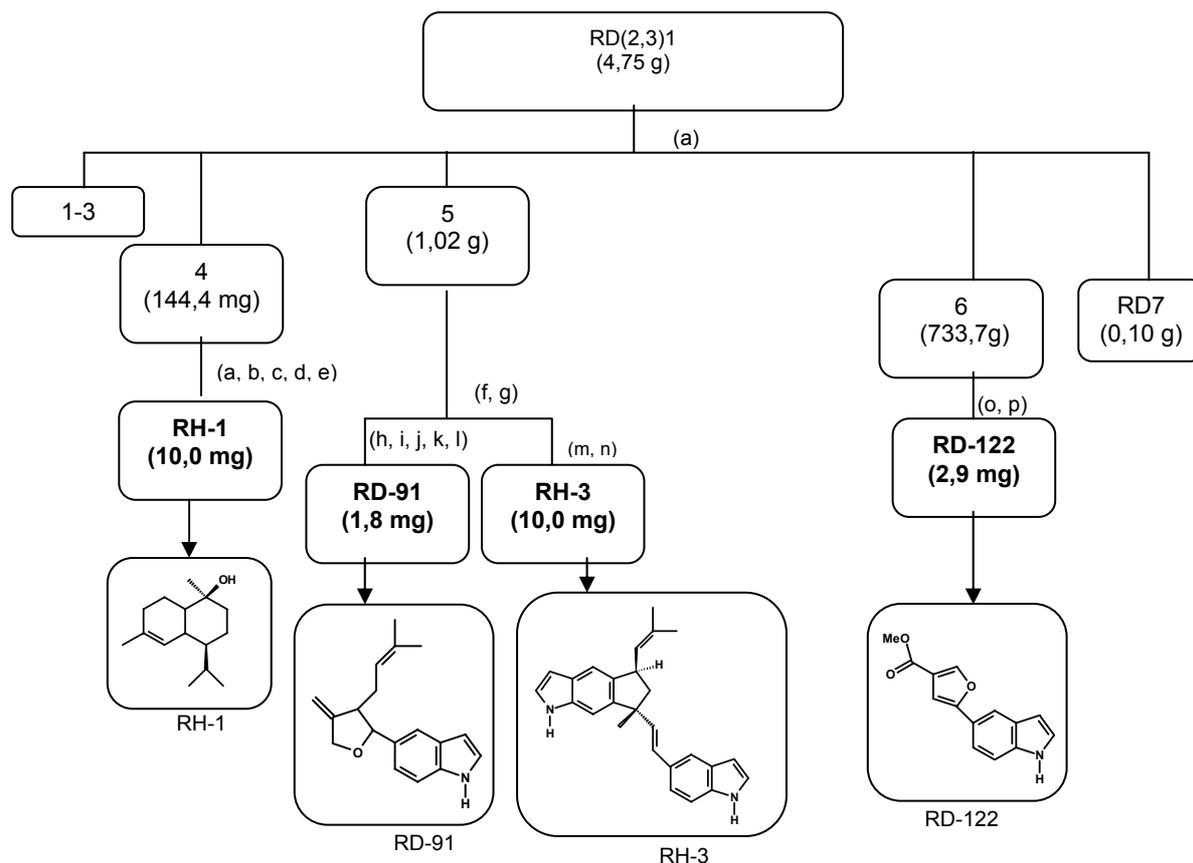
- (a) O extrato diclorometano foi submetido à cromatografia em coluna,  $\phi \times h = 8 \times 18$  cm, sílica gel 60 (70-230 mesh), eluente: hexano, hexano:diclorometano (1:1), dicloro, diclorometano:metanol (1:1), metanol e metanol/água (1:1). Foram obtidas sete frações (RD1-7).
- (b) As frações 2 e 3, foram analisadas via CCDC e verificou-se que poderiam ser reunidas.
- (c) CC,  $\phi \times h = 7,0 \times 17,0$  cm, sílica gel 60 (70-230 mesh), eluente: hexano:diclorometano (8:2), (1:1); diclorometano; acetato de etila; acetona e metanol, obteve-se 6 frações.

Nesta etapa do desenvolvimento do trabalho, começou-se a ter dificuldade para se trabalhar com as frações do extrato diclorometano devido principalmente:

- a) O extrato possuía vários pigmentos que ao passarem pela sílica obstruíam a coluna impedindo a passagem das outras substâncias. Isto foi resolvido colocando-se o florissil em contato direto com a amostra e não mais com a sílica gel 60 (230-400 mesh). O florissil retinha os pigmentos permitindo a passagem das outras substâncias.
- b) O florissil resolveu o problema da obstrução da coluna, porém havia outros pigmentos que sempre estavam junto às amostras isoladas, mas não atrapalhavam na determinação estrutural, contudo, para os testes biológicos

- necessitava-se da amostra pura. Conseguiu-se separar estes pigmentos usando sephadex, CLAE (polimérica) e cromatotron (placa de sílica e florisil).
- c) Outro problema encontrado foi que inicialmente algumas amostras solubilizavam em  $\text{CDCl}_3$ , porém no decorrer do processo de purificação e identificação, elas deixavam de ser solúveis neste solvente ou em qualquer outro solvente usado, tornando-se insolúveis. A explicação suposta para este problema, foi que os pigmentos poderiam estar formando complexos com as substâncias tornando-as insolúveis. Foi observado que este problema acontecia somente com os alcalóides indólicos, as outras classes de substâncias não sofriam interferência em sua solubilidade na presença dos pigmentos. A solução foi buscar os indólicos em outras frações, entretanto, o único indólico puro (sem pigmentos) isolado foi o **RH-3** (isolado de vários extratos e frações no decorrer do projeto).

A fração RD(2,3)1 foi escolhida para ser trabalhada em razão da quantidade razoável (4,75 g) e, também, após a análise em CCDC, verificou-se a possível presença de alcalóides indólicos, o que foi confirmado no RMN  $^1\text{H}$  e, como havia necessidade de isolamento de uma maior quantidade do bisindol (RH-3) para se fazer os experimentos bidimensionais, iniciou-se por ela (Esquema 3.6). Foram isoladas da fração RD(2,3)1 quatro substâncias: o sesquiterpeno cadinano **RH-1** e o alcalóide indólico **RH-3**, ambos já haviam sido isolados no esquema 3.2 (fracionamento de RH(2,3,4) do extrato hexano), os alcalóides indólicos **RD-91** e **RD-122** que ainda não haviam sido isolados.

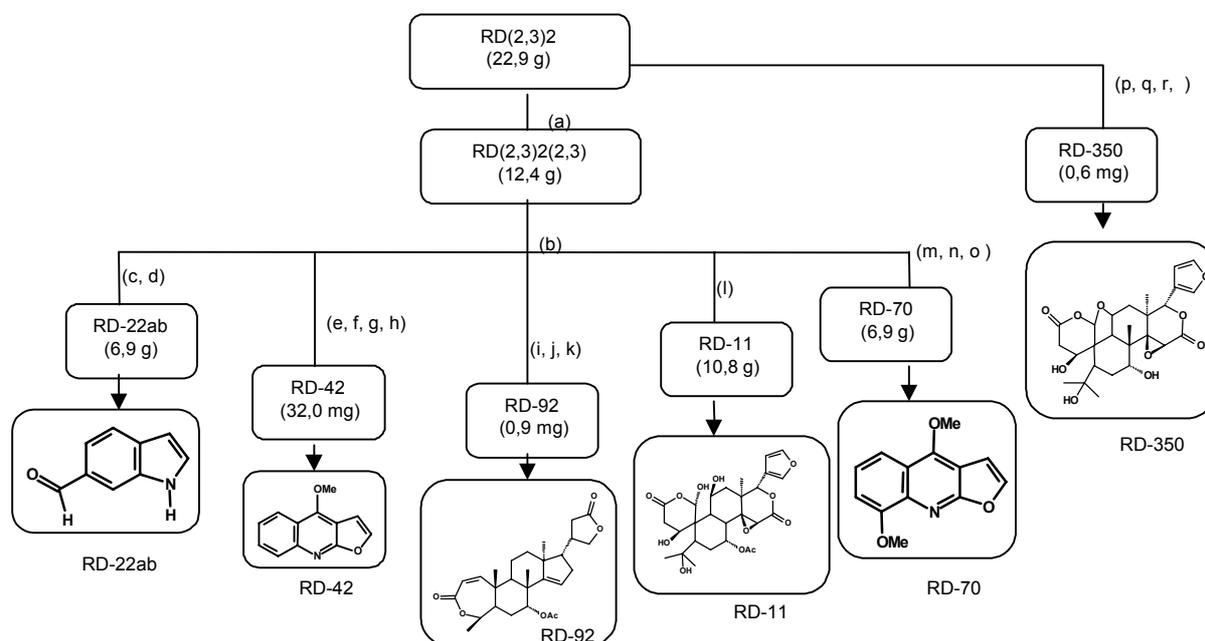


ESQUEMA 3.6. Fracionamento da fração RD(2,3)1.

- (a) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 20,0$  cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1), obteve-se 7 frações.
- (b) CC,  $\phi \times h = 2,5 \times 15,0$  cm, 10,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), hexano:acetato de etila (1:1), acetato de etila e metanol, obteve-se 6 frações.
- (c) CC,  $\phi \times h = 2,0 \times 18,5$  cm, 12,5 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 6,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (9:0,5:0,5), (8,5:1:0,5); diclorometano; diclorometano:acetona (7:2,5:0,5), (1:1); metanol, obteve-se 4 frações.
- (d) CC,  $\phi \times h = 2,0 \times 28,5$  cm, 24,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,5 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1), (7:3), (6:4), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), metanol, obteve-se 3 frações.
- (e) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (9:1), desta isolou-se o **RH-1**.
- (f) CC,  $\phi \times h = 4,0 \times 28,5$  cm, 24,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,5 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (8:2), (7:3), (1:1), (6:4); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol, obteve-se 7 frações.
- (g) CC,  $\phi \times h = 4,5 \times 19,0$  cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (7:2,5:0,5), (7:2:1), diclorometano, diclorometano:acetona (7:3), (1:1); metanol, obteve-se 6 frações, das quais 1 e 2 foram fracionadas, (h-l) e (m-n), respectivamente.
- (h) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 15,0$  cm, 10,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetonitrila (8:1,5:0,5), (7:2,5:0,5), (6:3,5:0,5), diclorometano, diclorometano:acetonitrila (7:3), (1:1); metanol, obteve-se 6 frações.
- (i) CC,  $\phi \times h = 2,0 \times 15,0$  cm, 10,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florisil

- (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano (8:2), (7:3), (6:4), diclorometano, diclorometano:metanol (7:3), (1:1); metanol, obteve-se 8 frações.
- (j) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (1:1), obteve-se 5 frações, destas a fração 3, foi novamente submetida a CCDP.
- (k) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila:acetonitrila (6:3:1), obteve-se 4 frações, a fração b foi submetida a CLAE.
- (l) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano, fluxo: 3 mL/min. O fracionamento resultou em **RD-91**.
- (m) CC,  $\phi$  x h = 3,0 x 28,5 cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (8:2), (7:3), (1:1), (6:4); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol, obteve-se 11 frações.
- (n) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano:metanol (1:1), fluxo: 3 mL/min. O fracionamento resultou no isolamento de **RH-3**.
- (o) CC,  $\phi$  x h = 3,0 x 19,5 cm, 15,5 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,0 cm de florisil (60-100 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (7:2,5:0,5), (7:2:1); diclorometano:acetona (7:3), (1:1); metanol, obteve-se 4 frações.
- (p) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (7:3). Resultou em **RD-122**.

A fração RD(2,3)2 foi analisada via RMN  $^1\text{H}$  onde foi verificada a presença de sinais na região de aromáticos e sinais de terpenóides. Ela foi trabalhada conforme esquema 3.7. Foram isolados desta, alcalóides indólicos, furoquinolínicos e limonóides.

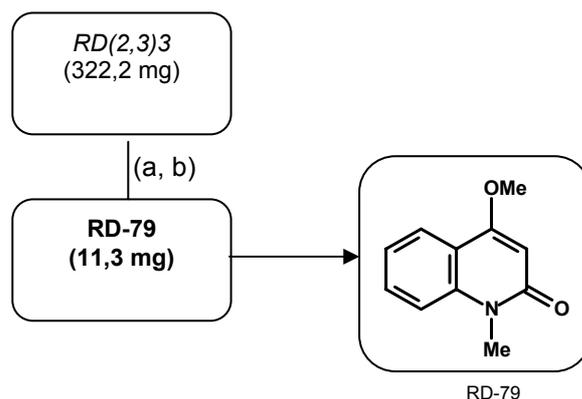


ESQUEMA 3.7. Fracionamento da fração RD(2,3)2.

- (a) CC,  $\phi$  x h = 8,0 x 17,0 cm, sílica gel 60 (70-230 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1), hexano:acetato de etila (8:2), hexano:acetato de etila (7:3), hexano:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), obteve-se 10 frações.
- (b) CC,  $\phi$  x h = 5,5 x 18,0 cm, sílica gel 60 (70-230 mesh), eluente: hexano:diclorometano:acetona (7:2,5:0,5); diclorometano; diclorometano:acetona (7:3),

- (1:1); metanol, obteve-se 5 frações.
- (c) CC,  $\phi \times h = 5,0 \times 12,0$  cm, 8,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,0 cm de florissil, eluente: hexano:diclorometano (7:3), (6:4); diclorometano:metanol (1:1); metanol, obteve-se 6 frações.
- (d) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (7:3), desta isolou-se o **RD-22ab**.
- (e) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 23,0$  cm, 20,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 3,0 cm de florissil, eluente: hexano:diclorometano:acetona (8:1,5:0,5), (7:2:1), (6:3:1), (4:5:1), diclorometano, diclorometano:acetona (9:1), (7:3), (1:1); metanol, obteve-se 6 frações.
- (f) CC,  $\phi \times h = 2,0 \times 20,0$  cm, 15,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 5,0 cm de florissil, eluente: hexano:diclorometano (9:1), (7:3), (1:1); diclorometano; metanol, obteve-se 6 frações.
- (g) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 18,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: diclorometano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), metanol, obteve-se 5 frações.
- (h) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 25,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: diclorometano:acetato de etila (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), obteve-se 5 frações, que resultou em **RD-42**.
- (i) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 18,0$  cm, 14,0 cm de sílica gel 60 (230-400 mesh) e 4,0 cm de florissil, eluente: diclorometano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol, obteve-se 9 frações.
- (j) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 35,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: diclorometano:acetato de etila (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1), metanol, obteve-se 5 frações.
- (k) Sephadex LH-20, eluente: diclorometano:metanol (1:1), 3 frações. Resultou em **RD-92**.
- (l) CC,  $\phi \times h = 5,0 \times 20,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:diclorometano (9:1), (8:2); (7:3), (1:1), metanol, obteve-se 6 frações, uma delas precipitou o **RD-11**.
- (m) CC,  $\phi \times h = 1,5 \times 31,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: diclorometano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol. Obteve-se 5 frações.
- (n) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano, fluxo: 3 mL/min.
- (o) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano:metanol (1:1), fluxo: 3 mL/min. Resultou em **RD-70**.
- (p) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano:metanol (1:1), fluxo: 3 mL/min.
- (q) Chromatotron, sílica e florissil, 1MM, hexano:acetato de etila:acetonitrila (9:0,:0,5), hexano:acetato de etila:acetonitrila (8:1,5:0,5), hexano:acetato de etila:acetonitrila (7:2,5:0,5), hexano:acetato de etila:acetonitrila (6:3,5:0,5), acetato de etila, metanol.
- (r) Chromatotron, sílica e florissil, 1MM, hexano:acetato de etila:acetonitrila (9:0,6:0,4), hexano:acetato de etila:acetonitrila (8:1,6:0,4), hexano:acetato de etila:acetonitrila (7:2,6:0,4), hexano:acetato de etila:acetonitrila (6:3,6:0,4), hexano:acetato de etila:acetonitrila (5:4,6:0,4), acetato de etila:acetonitrila. Resultou em **RD-350**.

A fração RD(2,3)3 mostrou no RMN  $^1\text{H}$  sinal na região de aromáticos, trabalhou-se conforme esquema 3.8. Foi isolado o alcalóide 2-quinolona **RD-79**.



ESQUEMA 3.8. Fracionamento da fração RD(2,3)3.

- (a) CC,  $\phi \times h = 1,5 \times 31,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: diclorometano:acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1), acetato de etila, obteve-se 5 frações.
- (b) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano:metanol (1:1), fluxo: 3 mL/min. Resultou em **RD-79**.

Do extrato diclorometano foram estudadas cerca de 95% de todas as frações (Esquema 3.5), de todos os extratos este foi o mais estudado por mostrar no RMN  $^1\text{H}$  sinais que poderiam ser de alcalóides indólicos, esta classe em especial nos interessava bastante pela sua contribuição na quimiosistemática do gênero, já que os alcalóides indólicos não são comuns na família.

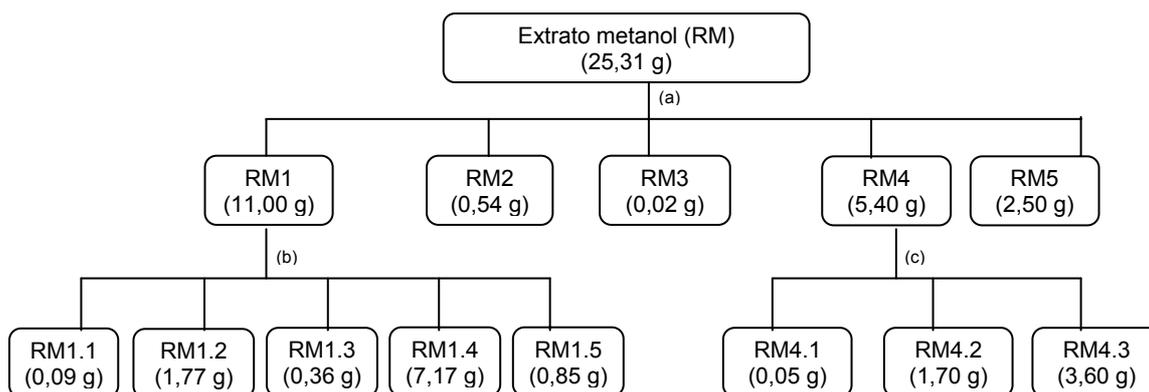
Em várias frações desse extrato, detectou-se a presença de alcalóides indólicos, em quantidade tão pequena, que não foi possível o isolamento. Além disso, tinha uma alta concentração de pigmentos, o que dificultava o isolamento, pois não se conseguia trabalhá-lo devido à ausência de solubilidade. No total, foram isoladas nove substâncias, sendo três limonóides, dois alcalóides furoquinolínicos, três alcalóides indólicos e um alcalóide 2-quinolona.

### 3.1.5. Fracionamento do Extrato Metanol da Raiz

O extrato metanol da raiz (25,31 g) de *R. praetermissa* foi submetido a coluna cromatográfica a vácuo, conforme esquema 3.9. Foram obtidas 5 frações que foram analisadas via CCDC, onde se verificou que seus constituintes eluíam com solventes de média e alta polaridade. Constatou-se a presença de alcalóides através da revelação em Dragendorff.

A fração RM1 foi escolhida para ser fracionada devido à quantidade de material e também por apresentar sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  na região de

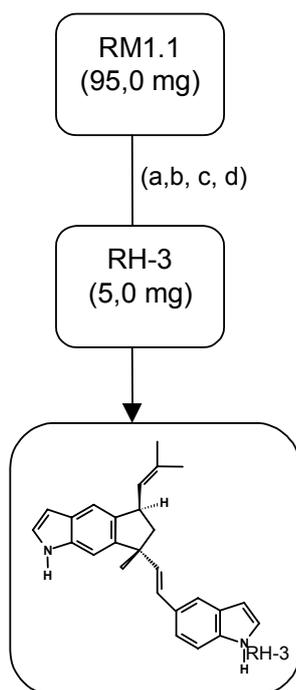
aromáticos, além de sinais largos de pequena intensidade, já visto em outros extratos, que indicavam a possível presença de alcalóides, isto foi confirmado com a revelação das placas em Dragendorff. Foram escolhidas para se trabalhar as frações RM1.1, RM1.2 e RM1.4, o critério de escolha das frações foi baseado nas placas cromatográficas e também em seus respectivos RMN de  $^1\text{H}$ .



ESQUEMA 3.9. Fracionamento do Extrato Metanol (RM).

- (a) CC,  $\phi \times h = 7,0 \times 17,0$  cm, Celulose (~20 micron, Aldrich), eluente: diclorometano; diclorometano:acetato de etila (1:1); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações, das quais as frações 1 e 4 foram inicialmente fracionadas.
- (b) CC,  $\phi \times h = 7,0 \times 15,0$  cm, Celulose (~20 micron, Aldrich), eluente: diclorometano; diclorometano:acetato de etila (1:1); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações, das quais as frações 1, 2 e 4 foram refracionadas.
- (c) CC,  $\phi \times h = 4,5 \times 54,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: acetato de etila:metanol (95:5); acetato de etila:metanol (9:1); acetato de etila:metanol (7:3); acetato de etila:metanol (1:1); acetato de etila:metanol (3:7); metanol. A coluna foi previamente desativada com metanol. Foram obtidas 3 frações, das quais a fração 2 foi novamente fracionada sem sucesso quanto ao isolamento de substância pura.

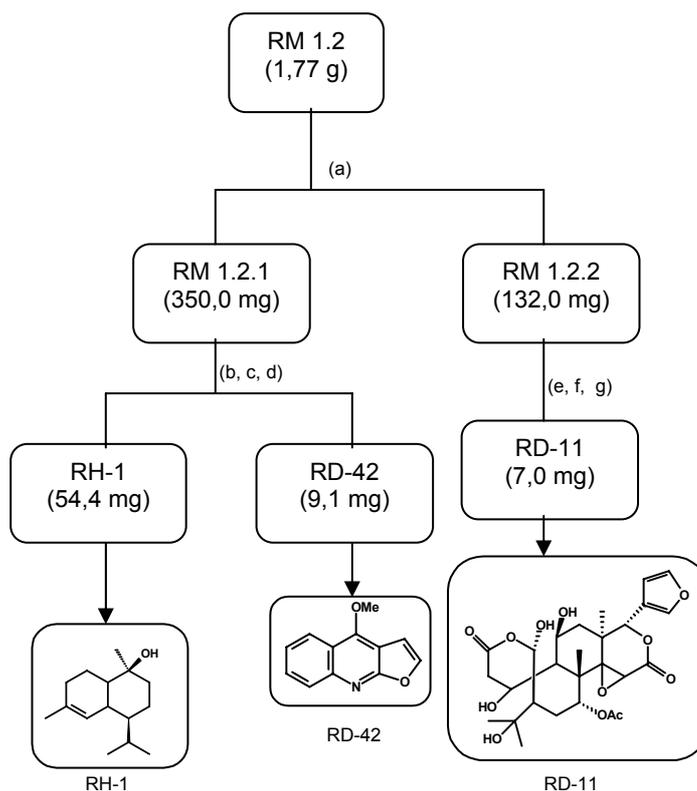
A fração RM1.1 (95,0 mg) passou por alguns fracionamentos conforme esquema 3.10, que resultou no isolamento do alcalóide indólico RH-3, o qual já havia sido isolado nos extratos hexano e diclorometano.



ESQUEMA 3.10. Fracionamento da fração RM1.1.

- (a) CC,  $\phi \times h = 2,5 \times 23,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (8:2); hexano:acetato de etila (6:4); acetato de etila; metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações, das quais as frações 1 e 2 foram trabalhadas.
- (b) CC,  $\phi \times h = 2,5 \times 17,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (95:5), sistema isocrático. Foram obtidas 3 frações.
- (c) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:acetato de etila (8:2), resultou em 4 frações. A fração RM1.1.2.a foi novamente fracionada.
- (d) CLAE, polimérica preparativa, eluente: diclorometano:metanol (1:1), fluxo: 5 mL/min. Esta resultou em 4 frações das quais uma originou a substância **RH-3** (5,0 mg), que já havia sido isolado nos extratos anteriores.

A fração RM1.2 (1,77 g) foi escolhida para ser fracionada devido à quantidade razoável e também quando foi analisada via RMN de  $^1\text{H}$ , apresentou sinais na região dos aromáticos, o que levou a crer que nesta poderia se encontrar mais alcalóides. Além disso, foi verificada também a presença de sinais típicos de limonóides em  $\delta$  7,44,  $\delta$  7,43 e  $\delta$  6,31 (sinais do anel furano), além de sinais metilênicos entre  $\delta$  2,00-1,00. O resultado do fracionamento foi o isolamento de três substâncias, conforme esquema 3.11.



ESQUEMA 3.11. Fracionamento da fração RM1.2.

- (a) CC,  $\phi \times h = 4,0 \times 22,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (1:1); hexano:acetato de etila (4:6); hexano:acetato de etila (2:8); hexano:acetato de etila (1:9); acetato de etila; acetato de etila:metanol (1:1); metanol. Foram obtidas 5 frações, das quais as frações 1, 2, 3, 4 foram trabalhadas.
- (b) CC,  $\phi \times h = 3,0 \times 17,0$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (9:1); hexano:acetato de etila (8,8:0,2); hexano:acetato de etila (8:2); hexano:acetato de etila (6:4); hexano:acetato de etila (1:9); acetato de etila; acetato de etila:metanol (9:1); acetato de etila:metanol (7:3); metanol. Foram obtidas 7 frações, que foram analisadas por ressonância de hidrogênio, destas a fração 1, apresentou sinais de sesquiterpeno cadinano; a fração 2, mostrou sinais de esteróides; e a fração 4, apresentou sinais de alcalóides, provavelmente furanoquinolínico. Foi obtida a substância **RD-42**.
- (c) Sephadex LH-20, eluente: diclorometano:metanol (1:1), 4 frações. Das quais se trabalhou a fração 3 (15,4 mg).
- (d) CC,  $\phi \times h = 1,0 \times 16,5$  cm, sílica gel 60 (230-400 mesh), eluente: hexano:acetato de etila (98:2); hexano:acetato de etila (91:9); hexano:acetato de etila (9:1). Foram obtidas 4 frações, das quais a fração 2, deu origem ao **RH-1**, que já havia sido isolado e determinado sua estrutura.
- (e) Sephadex LH-20, eluente: diclorometano:metanol (1:1), foram obtidas 6 frações. Trabalhou-se a fração 2.
- (f) Sephadex LH-20, eluente: diclorometano:metanol (1:1), foram obtidas 2 frações. Trabalhou-se a fração 1.
- (g) CCDP, 0,5 mm, 20 x 20, eluente: hexano:isopropanol (7:3), resultou em 3 frações, deu origem limonóide **RD-11**.

A fração RM4 (5,40 g), segundo seu espectro de hidrogênio, era composta basicamente de açúcares ou substâncias glicosiladas. Resultados promissores de inibição enzimática com certo tipo de açúcares vinham sendo observados pelo nosso grupo, por esta razão, resolveu-se trabalhá-la. Esta fração foi submetida a vários fracionamentos em celulose e sephadex, o resultado destes fracionamentos foram enviados para os ensaios de inibição, não se obteve resultados significativos nos ensaios de inibição enzimática. Por este motivo, deixou-se para uma próxima oportunidade o estudo desta fração.

Do extrato em metanol foram trabalhadas apenas as frações mostradas, não se isolou nenhuma substância diferente em relação aos outros extratos, talvez por ser este o último extrato estudado, não tenha sido suficientemente trabalhado.

Os extratos do caule e folha estão sendo trabalhados pelo aluno de doutorado Thiago A. M. Veiga, do grupo de Produtos Naturais da UFSCar, dando assim continuidade a este estudo.

## **3.2. METODOLOGIA BIOLÓGICA**

Aqui são apresentadas as metodologias dos ensaios bioquímicos (inibição enzimática) e ensaios biológicos (tripanocida e leishmanicida).

### **3.2.1. Ensaios Bioquímicos**

Os ensaios bioquímicos realizados frente às enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Molecular do IFSC/USP, sob coordenação do prof. Dr. Glaucius Oliva.

#### **3.2.1.1. Teste de Inibição da Atividade da Enzima gGAPDH**

A enzima glicolítica Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e  $\text{NAD}^+$  como cofator; esta é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. O

isolamento e a purificação da enzima são realizados de acordo com os procedimentos estabelecidos por SOUZA *et al.* (1998) no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo.

Os ensaios de atividade foram realizados de acordo com modificações (VIEIRA *et al.*, 2001) de um procedimento previamente descrito por BARBOSA & NAKANO (1987). A inibição da atividade da enzima é feita pela medida espectrofotométrica de NADH formado em 30 segundos a 340 nm. As misturas reacionais contêm (volume final de 1,0 mL): 50 mM de tampão Tris-HCl pH 8,6 com 1 mM de EDTA e 1mM de beta-mercaptoetanol, 30 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de NAD, 0,3 mM de G3P e 4-9 µg de proteína. Para testar a inibição da enzima são preparadas soluções de substâncias puras em DMSO (1,0 mg/mL), que são adicionadas ao meio reacional, fornecendo concentrações finais variadas entre 200 e 100 a 5 µg/mL do material a ser testado. Ensaio controle são feitos na ausência das substâncias, mas com adição de igual volume de DMSO. O DMSO é o solvente utilizado para solubilizar as amostras, devido sua interferência na atividade da enzima ser mínima. Todas as medidas são feitas em triplicatas e considera-se o valor da média. O resultado da reação enzimática foi acompanhado espectrofotometricamente a 340 nm, foi obtido pela diferença de absorbância entre os tempos  $t = 30s$  e  $t = 0s$  (não necessariamente 30s, os valores aceitos são somente os que estão na faixa onde se obtém a reta). Com o valor desta diferença de absorbância, pode-se calcular a atividade específica da enzima, conforme mostrado na seqüência:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\left( \frac{\Delta \text{ Abs}}{\Delta t} \right) \times \text{vol. da cubeta}}{\epsilon \text{NADH} \times \text{vol. de enzima} \times [\text{enzima}]}$$

**Onde:**  $\Delta t = 0,5 \text{ min.}$ ; vol. da cubeta = 0,5 mL;  $\epsilon \text{NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; vol. de enzima = 0,0025 mL; [enzima] = 0,3 mg/mL.

$$\text{Atividade inibitória} = \left( \frac{\text{U/mg substância} - \text{U/mg controle}}{\text{U/mg controle}} \right) \times 100$$

### 3.2.1.2. Teste de Inibição da Atividade da Enzima APRT

A enzima APRT foi obtida de *L. tarentolae* devido sua incapacidade de infectar seres humanos (CROAN *et al.*, 1997; NOYES *et al.*, 1997). Essa mudança foi possível em consequência de estudos envolvendo seqüenciamento do gene de APRT de *L. tarentolae* que revelaram grande similaridade com o gene da proteína homóloga de *L. donovani* (PHILLIPIS *et al.*, 1999). A similaridade de 85% nas seqüências de aminoácidos dessas duas APRTs permite inferir que as informações obtidas com a APRT de *L. tarentolae* possam ser utilizadas na busca de novos fármacos contra a Leishmaniose Visceral.

A enzima adenina fosforribosiltransferase (APRT) catalisa a reação nucleofílica entre a adenina e o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), com a formação de adenosina-monofosfato (AMP). A enzima é expressa em *Escherichia coli* e purificada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Molecular do IFSC-USP. Os ensaios de inibição enzimática são feitos de acordo com procedimento descrito por TUTTLE e KRENITSKY (1980), com algumas modificações. A mistura reacional contém: 0,01 mM de Adenina, 0,5 mM de PRPP, 5 mg de MgCl<sub>2</sub> e tampão Tris 100 mM, pH 7,4. Para o teste de inibição da enzima são utilizadas 475 µL da mistura reacional e 25 µL das soluções candidatas a possíveis inibidores, fazendo com que a concentração final da substância pura seja de 100 µg/mL. A atividade da enzima pura é 0.001168 mM de AMP formado por mg/min. As medidas são feitas em triplicata e o cálculo é feito através da fórmula:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\left( \frac{\Delta \text{ Abs}}{\Delta t} \right) \times \text{vol. da cubeta}}{\epsilon_{\text{AMP}} \times \text{vol. de enzima} \times [\text{enzima}]}$$

**Onde:**  $\Delta t = 1 \text{ min.}$ ; vol. da cubeta = 0,5 mL;  $\epsilon_{\text{AMP}} = 1,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; vol. de enzima = 0,0025 mL; [enzima] = 0,9 mg/mL.

$$\text{Atividade inibitória} = \left( \frac{\text{U/mg substância} - \text{U/mg controle}}{\text{U/mg controle}} \right) \times 100$$

### 3.2.2. Ensaio Biológico

O ensaio tripanocida foi realizado pelo Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

O ensaio leishmanicida foi realizado no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob a supervisão da Prof. Dr. Diógenes A. Garcia Cortez.

#### 3.2.2.1. Ensaio Tripanocida

O ensaio frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizado de acordo com o procedimento descrito por VIEIRA *et al.*, (2001). As substâncias puras foram submetidas ao teste tripanocida *in vitro* (sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*), usando sangue infectado com a cepa Y do parasita. A cepa em questão foi obtida de um caso humano da doença de Chagas e vem sendo mantida por passagens sucessivas em camundongos. Os testes foram realizados usando sangue de ratos albinos Suiços infectados com a cepa Y do parasita, obtido no pico da parasitemia (7<sup>o</sup> dia da infecção), por meio de punção cardíaca. O sangue foi diluído com sangue normal para dar uma concentração em torno de  $2 \times 10^{-5}$  formas tripomastigotas/mL.

As amostras das substâncias foram dissolvidas em DMSO, obtendo-se uma concentração de 25 mg/mL. Alíquotas das substâncias foram adicionadas ao sangue infectado, obtendo-se concentrações: 100, 250 e 500 mg/mL. As placas foram incubadas a 4 °C por 24 h e o número de parasitas foi determinado de acordo com BRENER (1962). Foi utilizado como controle sangue infectado, sem nenhuma adição de extratos ou frações, contendo a quantidade de DMSO equivalente as amostras e sangue infectado contendo violeta de genciana na concentração de 250 mg/mL. O bioensaio foi realizado em triplicata.

### 3.2.2.2. Ensaio Leishmanicida

As substâncias puras (em quantidades) foram submetidas ao teste Leishmanicida *in vitro* sob as formas promastigotas da *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR1987/M11272). Estas formas foram obtidas através do isolamento dos protozoários de lesões desenvolvidas nas patas de Hamster infectados previamente. Posterior ao isolamento, os protozoários foram inoculados em meio de cultura Schneider's Drosophila Medium suplementado com soro bovino 10%, mantidos a 26°C em estufa de BOD.

Após 72 horas (fase logarítmica de crescimento) transfere-se a cultura de modo asséptico para um tubo de centrifuga de 10 mL. Centrifuga-se por 10 minutos a 2.500 rpm e separa-se o sobrenadante. Conta-se o *pellet* com 1 mL do sobrenadante (se necessário diluir para contagem) em dois campos, com 16 quadrados na câmara de Neubauer, em seguida, calcula-se o volume de cultura necessário para perfazer 9 mL (96 poços) na concentração parasitária de  $4 \cdot 10^6$  promastigotas/mL.

Segundo o protocolo utilizado na Fundação Oswaldo Cruz (FERREIRA *et al.*, 2004) é colocado 100  $\mu$ L de sobrenadante em todos os poços (placa de Elisa, 96 poços), no primeiro coloca-se 200  $\mu$ L (sendo a partir deste as diluições seriadas). Retira-se 6,4  $\mu$ L de sobrenadante no primeiro poço, homogeneiza-se bem. Retira-se em seguida 100  $\mu$ L do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente até atingir o último. Despreza-se do último poço 100  $\mu$ L. Adiciona-se em seguida 100  $\mu$ L do meio com o *Leishmania* na concentração parasitária de  $4 \cdot 10^6$  promastigotas /mL. Incuba-se a 25 °C em uma BOD. As substâncias foram testadas em 12 concentrações, 160  $\mu$ g/mL, 80  $\mu$ g/mL, 40  $\mu$ g/mL, 20  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 2,5  $\mu$ g/mL, 1,25  $\mu$ g/mL, 0,625  $\mu$ g/mL, 0,31  $\mu$ g/mL, e 0,15  $\mu$ g/mL. O teste é feito em triplicata. O cálculo da  $DL_{50}$  é feito através dos valores estabelecidos em gráfico, onde se mede o valor em cm a partir da ordenada até a máxima concentração efetuada, que foi de 320  $\mu$ g/mL, dividido pelo valor em cm do ponto onde a curva de crescimento cruza a concentração de 50% de inibição.

### 3.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

#### 3.3.1. Suportes para Cromatografia

- Sílica gel 60 GF<sub>254</sub>–MERCK–cromatografia em camada delgada comparativa;

- Sílica gel 60 (70-230 mesh)–MERCK–cromatografia em coluna;

- Sílica gel 60 (230-400 mesh)–MERCK–cromatografia em coluna;

- Sílica gel 60 PF<sub>254</sub>–MERCK–cromatografia em camada delgada preparativa;

- Florisil (60-100 mesh)- Mallinckrodt;

- Sephadex LH-20 da Amersham Pharmacia Biotech AB;

- Celulose Cristalina da Merck;

- Placas comerciais (20 x 5 cm ou 20 x 20 cm) da Macherey-Nagel GmbH & Co, com 0,25 mm de sílica gel 60 com indicador UV<sub>254</sub>;

- Cromatofolhas (sílica gel 60 F<sub>254</sub>,  $\phi = 0,2$  mm) da Merck.

#### 3.3.2. Solventes

- Solventes destilados no DQ- UFSCar:

- Acetato de etila

- Acetona

- Clorofórmio

- Diclorometano

- Hexano

- Metanol

- Solventes deuterados da Aldrich e Merck:

- Acetona

- Benzeno

- Clorofórmio

- Diclorometano

- DMSO

- Metanol
- Piridina
  
- Solventes grau cromatográfico da Aldrich, Merck e outros:
  - Acetonitrila
  - Acetato de etila
  - Diclorometano
  - Hexano
  - Metanol
  - Tolueno

### 3.3.3. Reveladores

- Reagente de Dragendorff;
- Solução de Vanilina ácida (WAGNER *et al.*, 1984);
- Câmara de Luz UV ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm);
- Câmara de Iodo.

### 3.3.4. Outros

- Pipeta automática-Pipetman P- Gilson, modelo VS, vol. 200-1000  $\mu$ L
- Filtro para CLAE, Phenomenex AFO-0415.2NY
- Meios usados para realização dos ensaios biológicos:
  - Meio Scheneider
  - Meio Insect

### 3.3.5. EQUIPAMENTOS

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

- Espectrofotômetro de UV
  - Hewlett Packard/8452A – DQ/UFSCar
  
- CLAE
  - LC-6AD- Shimadzu (Liquid chromatograph); detector, SPD 10 AV vp – Shimadzu (UV-vis); controladora, SCL-10A– Shimadzu (System controller); coluna polimérica preparativa Shodex Asahipak
  
- CG/EM
  - Shimadzu QP5000- DQUFSCar, coluna, DB-5 poli (5% difenil, 95% dimetilsiloxano), (15 m; 0,25 mm D.I.; 0,25 µm de filme). Ionização por impacto eletrônico a 70 e.V.
  
- Evaporadores
  - Buchi modelo ELB – 131, banho Buchi modelo B-480 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.
  - Buchi modelo R-114- banho Buchi modelo B-480 e circulador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.
  
- Espectrômetro de massas
  - Espectrômetro de ESI-EM/EM: Micromass Platform II, DQ-UFSCar

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados abaixo estão divididos em duas partes, a primeira trata-se dos resultados químicos e a segunda dos resultados biológicos.

### 4.1. Resultados Químicos

#### 4.1.1. Substâncias isoladas

As estruturas das substâncias isoladas da raiz de *R. praetermissa* são mostradas nas figuras 4.1 e 4.1a.

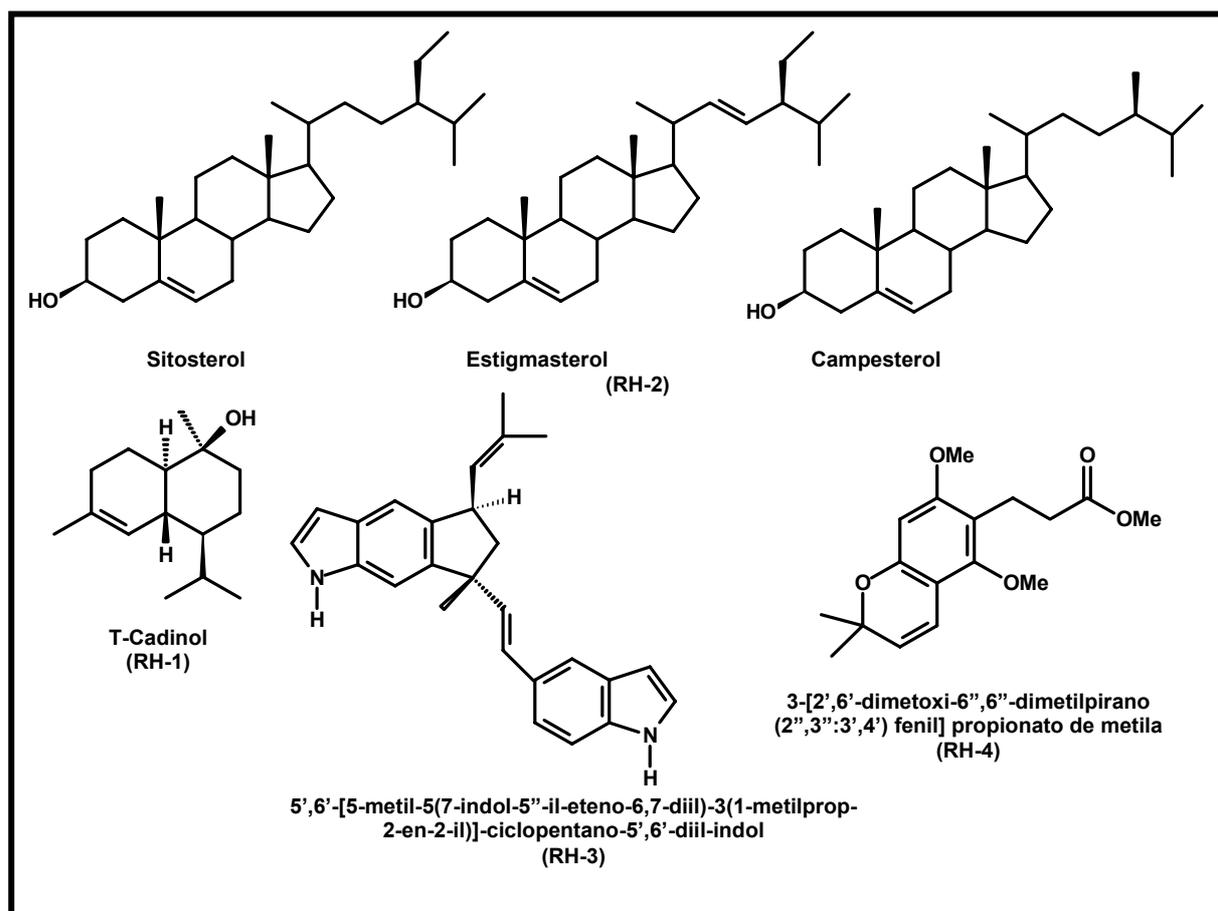


FIGURA 4.1. Substâncias isoladas de *R. praetermissa*.

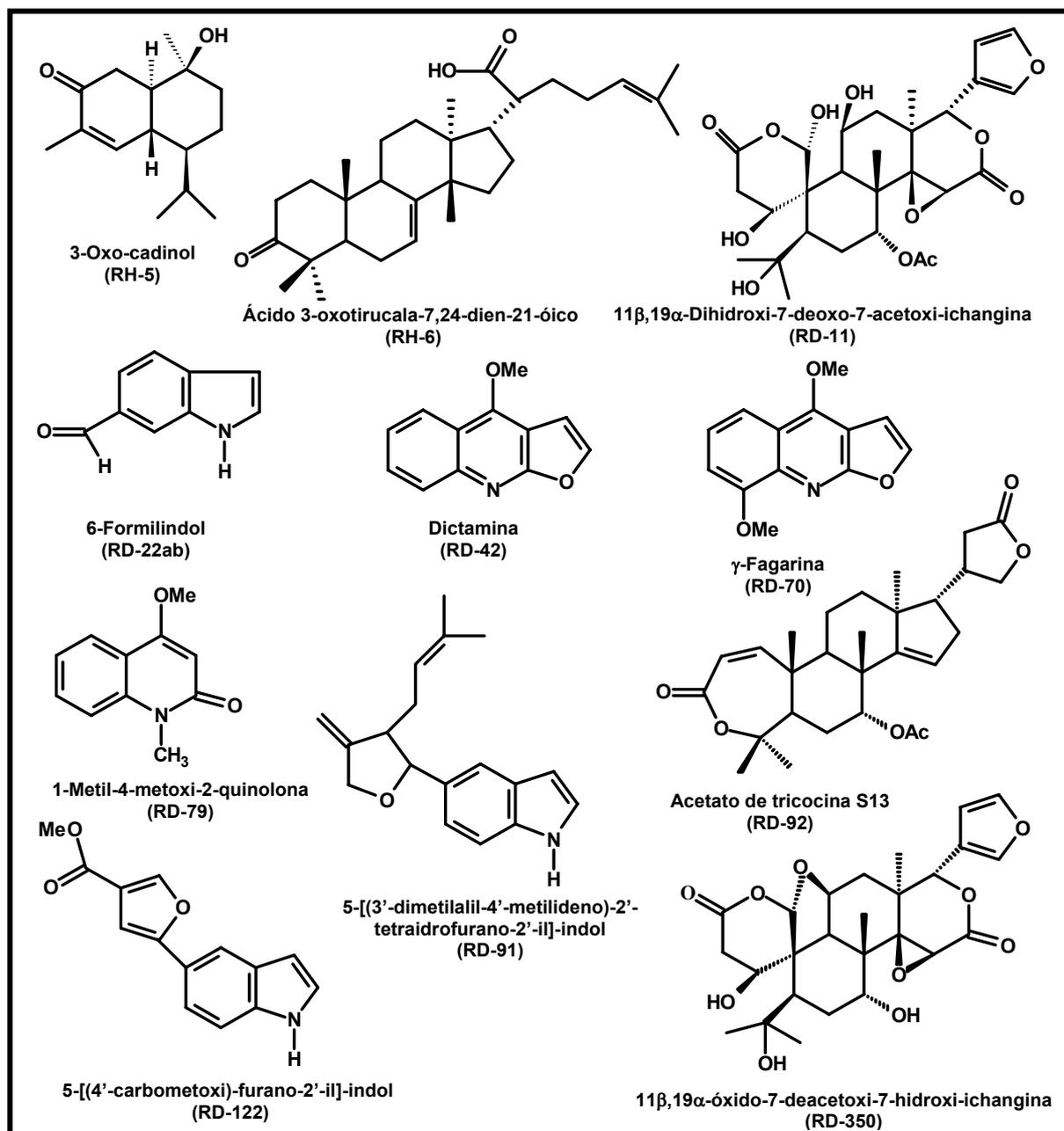


FIGURA 4.1a. Substâncias isoladas de *R. praetermissa* (continuação).

#### 4.1.2. Identificação da substância RH-1

A substância RH-1, foi isolada dos extratos hexano e diclorometano da raiz de *R. praetermissa* como um óleo amarelo. Quando revelada em vanilina apresenta coloração violeta e fluorescência sob radiação U.V.

O espectro de hidrogênio (Figura 4.13, Tabela 4.1) mostrou sinais em  $\delta$  5,54 de hidrogênio olefínico e de hidrogênios de metilas entre  $\delta$  0,79-1,65. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.14, Tabela 4.1), o qual apresentou sinais de

carbonos olefínicos em  $\delta$  134,0 e  $\delta$  122,6, e sinal de carbono carbinólico em  $\delta$  70,5. O espectro de DEPT (Figura 4.15) mostrou quatro sinais de  $\text{CH}_2$ , cinco sinais de  $\text{CH}$  e quatro sinais de  $\text{CH}_3$ . O padrão característico do espectro de hidrogênio e os sinais dos carbonos em  $\delta$  134,0 e  $\delta$  122,6 sugeriram esqueleto sesquiterpênico do tipo cadinano.

O sinal do hidrogênio (Figura 4.13, Tabela 4.1) em  $\delta$  5,54 sl, no experimento de HSQC (Figura 4.16), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  122,6 (CH), no experimento de HMBC (Figura 4.2, Figura 4.17) apresentou correlações com  $\delta$  37,6 (CH),  $\delta$  47,9 (CH) e  $\delta$  23,6 (Me), e no experimento de COSY (Figura 4.18) mostrou acoplamento com  $\delta$  1,65 (Me). O deslocamento em  $\delta$  5,54 foi atribuído ao H-5. O carbono em  $\delta$  23,6 (Me), no experimento de HSQC, apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  1,65 s, este hidrogênio mostrou correlações via HMBC (Figura 4.2, Figura 4.17) com  $\delta$  134,0 ( $\text{sp}^2$ ),  $\delta$  122,6 (C-5) e  $\delta$  30,8 ( $\text{CH}_2$ ), estas correlações sugeriram ser a Me-15. O sinal de carbono em  $\delta$  134,0 foi atribuído ao C-4, conforme figura 4.2.

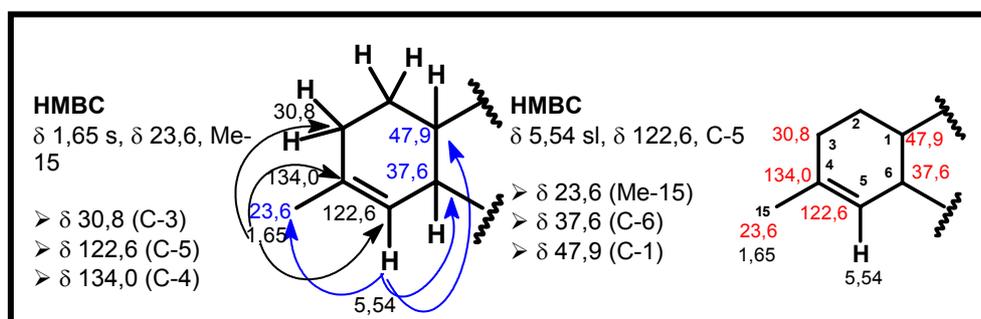


FIGURA 4.2. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,54 (H-5) e  $\delta$  1,65 (Me-15).

O sinal do carbono em  $\delta$  30,8 ( $\text{CH}_2$ ) apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  1,97 m, este hidrogênio mostrou correlações no HMBC (Figura 4.3, Figura 4.17) com  $\delta$  122,6 (C-5),  $\delta$  134,0 (C-4) e  $\delta$  47,9 (CH) sendo atribuído ao C-3. O sinal do carbono em  $\delta$  47,9 (CH) mostrou correlações com os hidrogênios em  $\delta$  5,54 (H-5) e  $\delta$  1,97 (H-3) sugerindo ser este o C-1. O sinal de H-1 ( $\delta$  1,07 m) apresentou uma única correlação com  $\delta$  22,5 ( $\text{CH}_2$ ). O sinal de carbono em  $\delta$  22,5 ( $\text{CH}_2$ ), via HSQC (Figura 4.16), apareceu ligado aos hidrogênios em  $\delta$  1,90 m e 1,38 m. Estes hidrogênios foram atribuídos ao H-2 e pelo experimento de HMBC (Figura 4.3,

Figura 4.17), verificou-se correlações com  $\delta$  30,8 (C-3),  $\delta$  47,9 (C-1) e  $\delta$  134,0 (C-4) (Figura 4.3), esta última correlação confirmou a atribuição ao H-2.

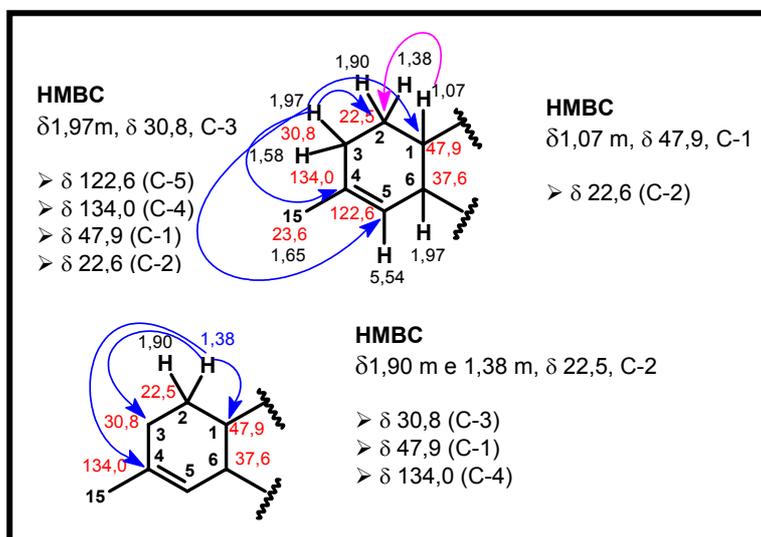


FIGURA 4.3. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,97 (H-3),  $\delta$  1,07 (H-1) e  $\delta$  1,38 (H-2).

O sinal em  $\delta$  1,97 m (Figura 4.4) que apresentou correlações com  $\delta$  122,6 (C-5),  $\delta$  47,9 (C-1) e  $\delta$  134,0 foi atribuído ao H-6, este via HSQC, apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  37,6 (C-6), este carbono no HMBC mostrou correlação com H-5 ( $\delta$  5,54).

Até o momento, conseguiu-se o fechamento de apenas um anel de RH-1 (Figura 4.4).

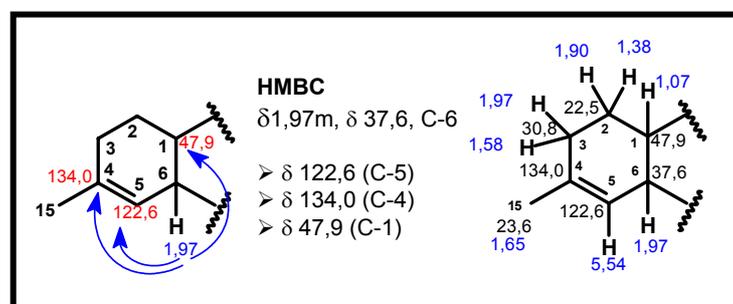


FIGURA 4.4. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,97 (H-6) e deslocamentos de hidrogênios e carbonos do primeiro anel de RH-1.

Esse primeiro anel foi fechado através das correlações discutidas anteriormente, porém nenhum hidrogênio deste mostrou correlação com um segundo anel, logo, foi necessário recomeçar a identificação por outro sinal da molécula. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.13) foi observado a presença de uma metila em  $\delta$  1,21 s, este via HSQC (Figura 4.16) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  28,4 e, no HMBC (Figura 4.5, Figura 4.17), verificou-se correlações com  $\delta$  40,3 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  47,9 (C-1) e  $\delta$  70,5 (quaternário). A correlação com o carbono em  $\delta$  47,9 (C-1), sugeriu que, o deslocamento em  $\delta$  1,21, seja a Me-14. O carbono carbinólico em  $\delta$  70,5 foi atribuído ao C-10. Logo, o carbono em  $\delta$  40,3 ( $\delta$  1,72 m e  $\delta$  1,39 m) foi atribuído ao C-9. No experimento de HMBC (Figura 4.5, Figura 4.17) foi observado as correlações dos hidrogênios de H-9 com  $\delta$  19,7 ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  70,5 (C-10) e  $\delta$  47,9 (C-1), a correlação com C-1 confirmou a atribuição ao H-9.

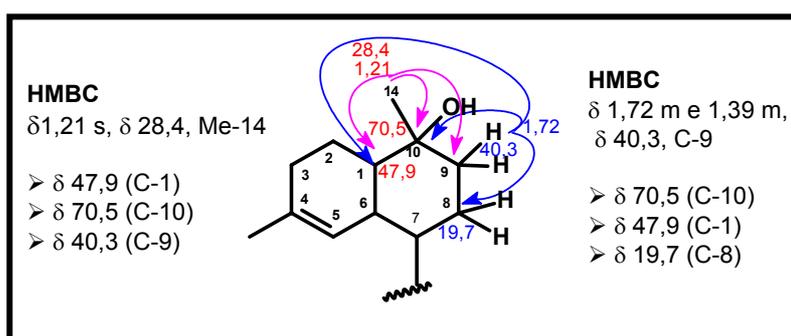


FIGURA 4.5. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,72 (H-9) e  $\delta$  1,21 (Me-14).

O carbono em  $\delta$  19,7 ( $\text{CH}_2$ ) foi atribuído ao C-8, este via HSQC (Figura 4.16) apareceu ligado aos hidrogênios em  $\delta$  1,45 m e  $\delta$  1,36 m e, via HMBC (Figura 4.6, Figura 4.17) mostrou correlações com  $\delta$  40,3 (C-9) e  $\delta$  46,6 (CH). Este último sinal de carbono via HSQC (Figura 4.16) apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  1,00 m que foi atribuído ao C-7. Com os dados acima discutidos foi fechado o segundo anel de RH-1 (Figura 4.6).

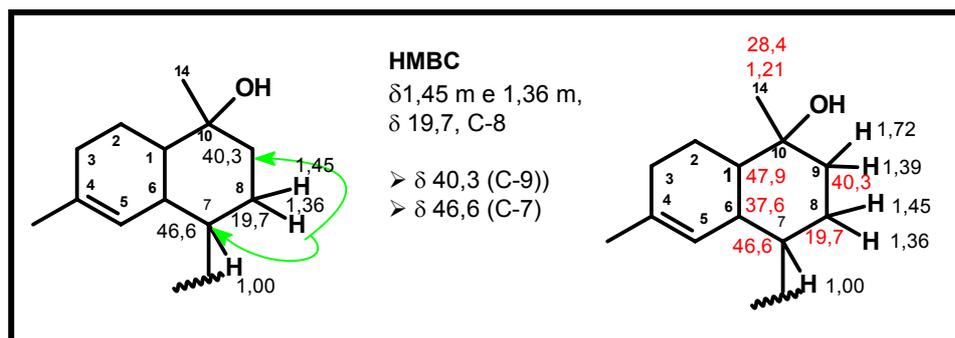


FIGURA 4.6. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,36 (H-8) e deslocamentos do segundo anel de RH-1.

O segundo anel foi fechado, o H-7 não apresentou nenhuma correlação, para dar continuidade à determinação estrutural, então, partiu-se novamente de um outro sinal de hidrogênio em  $\delta$  0,91 d ( $J = 6,9$  Hz,  $\delta$  21,3) que foi atribuído a Me-12. No experimento de HMBC (Figura 4.7, Figura 4.17), observou-se as correlações de  $\delta$  0,91 com  $\delta$  15,1 (Me),  $\delta$  26,1 (CH) e  $\delta$  46,6 (C-7). O carbono em  $\delta$  15,1 ( $\delta$  0,79) foi atribuído a Me-13. O sinal em 26,1 ( $\delta$  2,17) foi atribuído ao H-11. No experimento de COSY (Figura 4.18) foi verificado os acoplamentos de  $\delta$  2,17 (H-11) com  $\delta$  0,79 (Me-13) e  $\delta$  0,91 (Me-12) e, no HMBC (Figura 4.7, Figura 4.17) foi observado correlações com  $\delta$  15,1,  $\delta$  21,3 e  $\delta$  46,6.

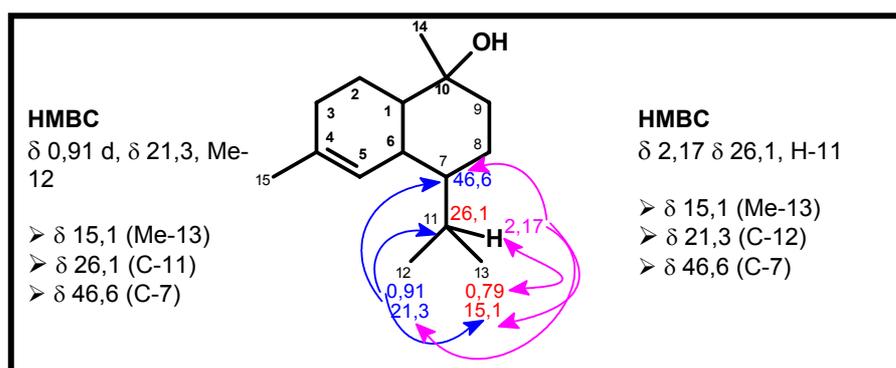


FIGURA 4.7. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  0,91 (Me-12) e  $\delta$  2,17 (H-11).

Através da análise de todos os experimentos, concluiu-se que a substância RH-1 (Figura 4.8) era um sesquiterpeno cadinol. Quando se comparou os dados de ressonância obtidos com os de APPENDINO *et al.* (1997), verificou-se que os valores eram coincidentes com os da substância T-cadinol, conforme pode ser visto na tabela 4.1.

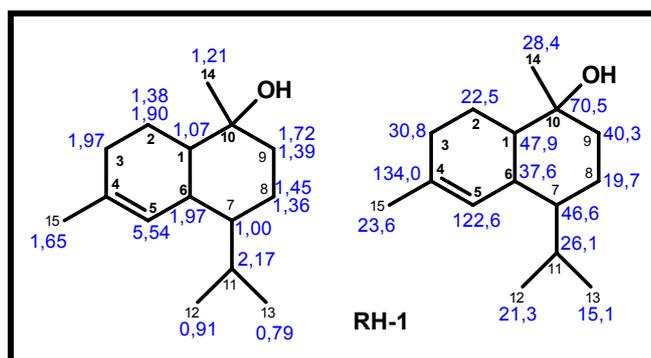


FIGURA 4.8. Esqueleto proposto para a substância RH-1 e respectivos deslocamentos de hidrogênios e carbonos.

Apesar dos valores semelhantes, decidiu-se fazer, ainda, o experimento de gNOESY (Figura 4.19, 4.19a) para confirmar sua estereoquímica. Os resultados obtidos para o gNOESY são mostrados nas figuras 4.9, 4.10 e 4.11.

O hidrogênio em  $\delta$  1,21 (Me-14, Figura 4.9) ao ser irradiado causou nOe em  $\delta$  1,90 (H-2),  $\delta$  1,72 (H-9),  $\delta$  1,39 (H-9) e  $\delta$  1,07 (H-1), este último nOe sugeriu que a Me-14 e H-1 se encontram no mesmo plano da molécula, conforme visto na figura 4.9.

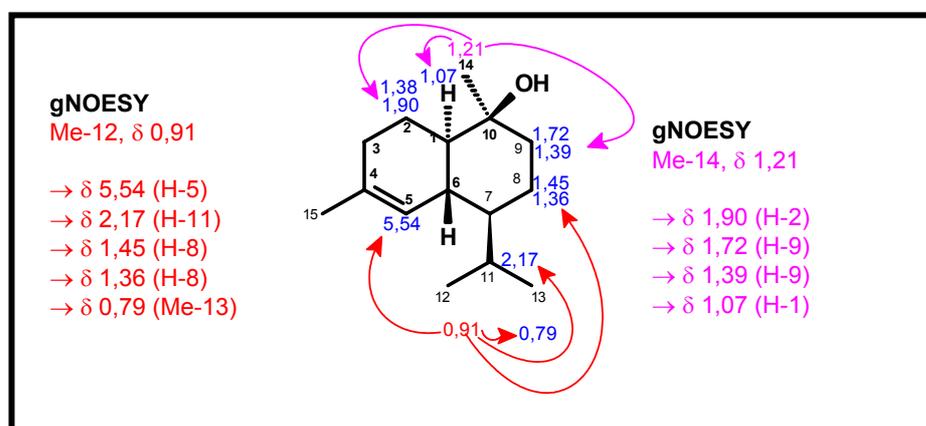


FIGURA 4.9. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios das metilas em  $\delta$  0,91 (Me-12) e  $\delta$  1,21 (Me-14).

Foi irradiado o sinal do hidrogênio em  $\delta$  5,54 (Figura 4.10), o mesmo causou nOe em  $\delta$  1,65 (Me-15),  $\delta$  1,97 (H-6) e  $\delta$  2,17 (H-11).

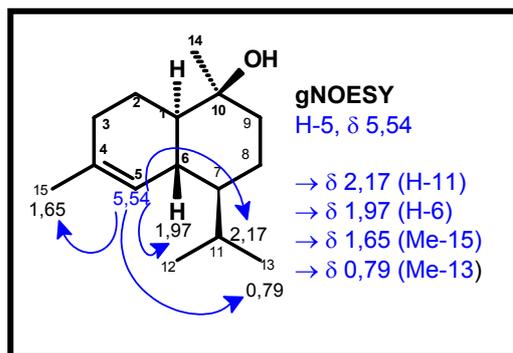


FIGURA 4.10. Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,54 (H-5).

Outros sinais foram irradiados (Figura 4.11): a Me-15 causou nOe em  $\delta$  5,54 (H-5) e  $\delta$  1,97 (H-6); a Me-13 causou nOe em  $\delta$  5,54 (H-5),  $\delta$  2,17 (H-11),  $\delta$  1,97 (H-6),  $\delta$  1,36 (H-8) e  $\delta$  0,91 (Me-12).

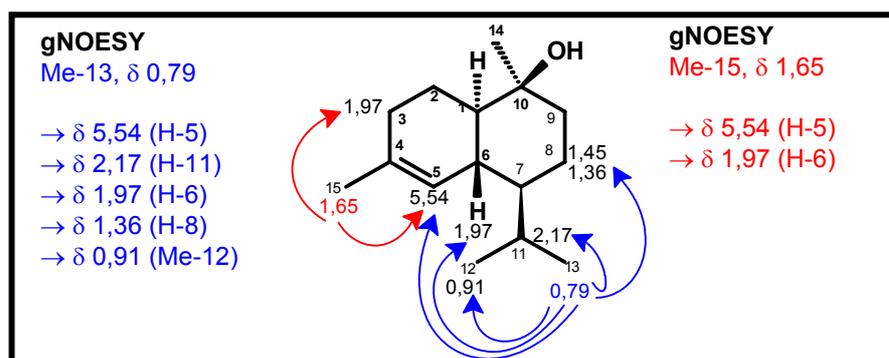


FIGURA 4.11. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios de metilas em  $\delta$  0,79 (Me-13) e  $\delta$  1,65 (Me-15).

Os resultados obtidos através dos experimentos de gNOESY (Figura 4.19, 4.19a) foram concordantes com a estereoquímica proposta na literatura (Figura 4.12). A substância **RH-1** é o sesquiterpeno conhecido como **T-cadinol** (Figura 4.12). No *Chemical Abstract* o T-cadinol possui o número de registro 5937-11-1.

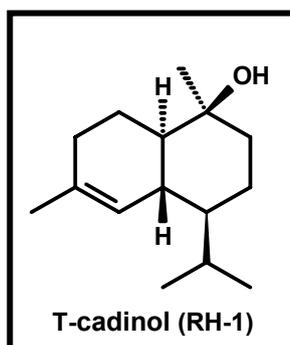


FIGURA 4.12. Estrutura proposta para a substância RH-1.

TABELA 4.1. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RH-1 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 e 200 MHz)

H/C	RH-1		*Literatura
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	1,07 m	47,9	47,9
2	1,90 m e 1,38 m	22,5	22,6
3	1,97 m	30,8	30,9
4		134,0	134,3
5	5,54 sl	122,6	122,6
6	1,97 m	37,6	37,7
7	1,00 m	46,6	46,6
8	1,36 m	19,7	19,8
9	1,72 m e 1,39 m	40,3	40,3
10		70,5	70,7
11	2,17 m	26,0	26,1
12	0,91 d ( $J= 6,9$ Hz)	21,3	21,4
13	0,79 d ( $J= 6,9$ Hz)	15,1	15,2
14	1,21 s	28,4	28,4
15	1,65 s	23,6	23,7

\* APPENDINO (1997), Solvente:  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz).

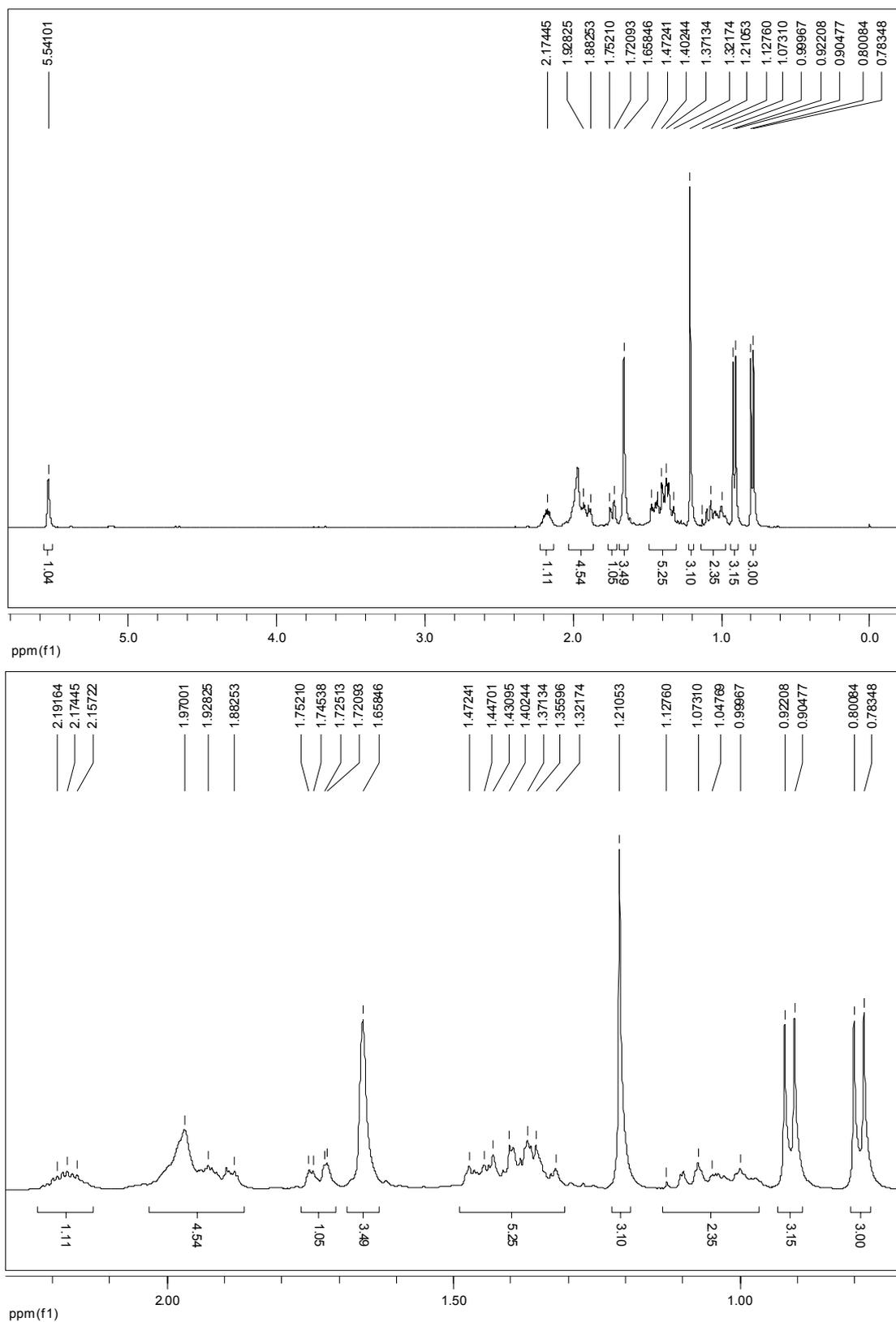


FIGURA 4.13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e ampliação da substância RH-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

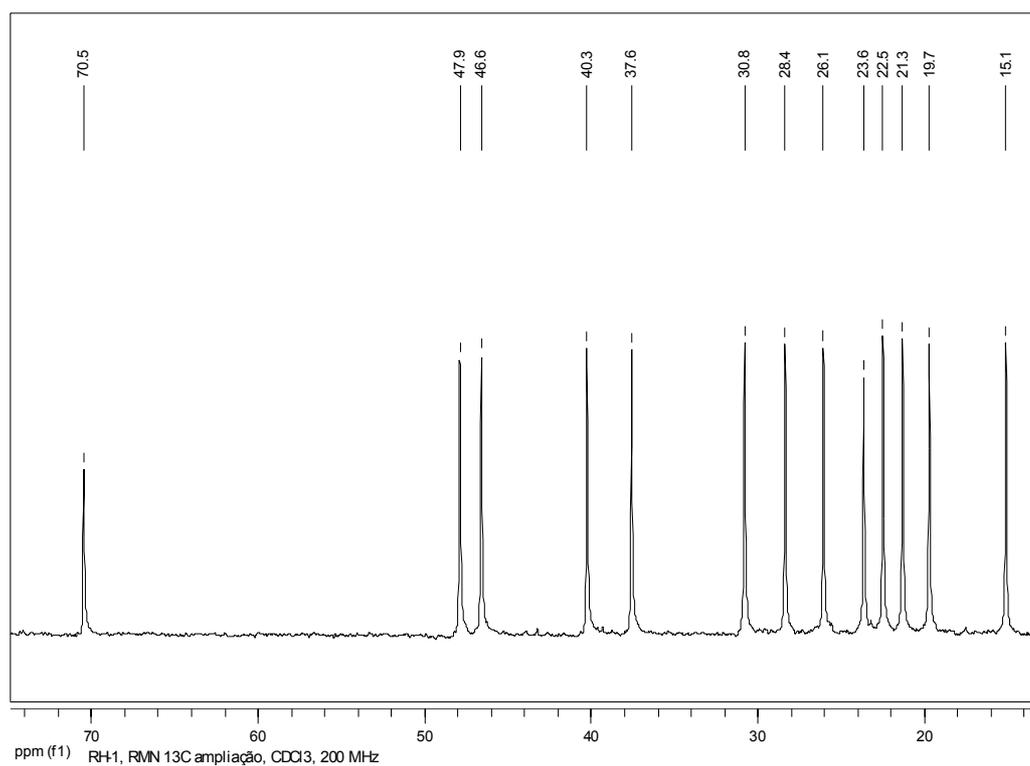
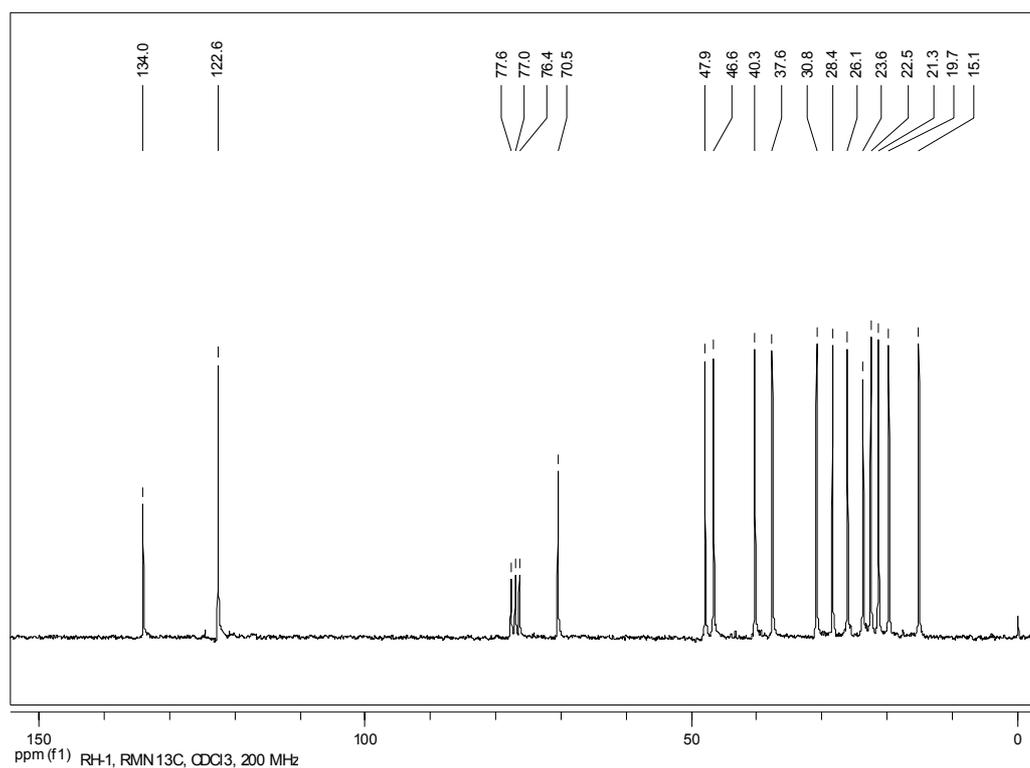


FIGURA 4.14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e ampliação da substância RH-1 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

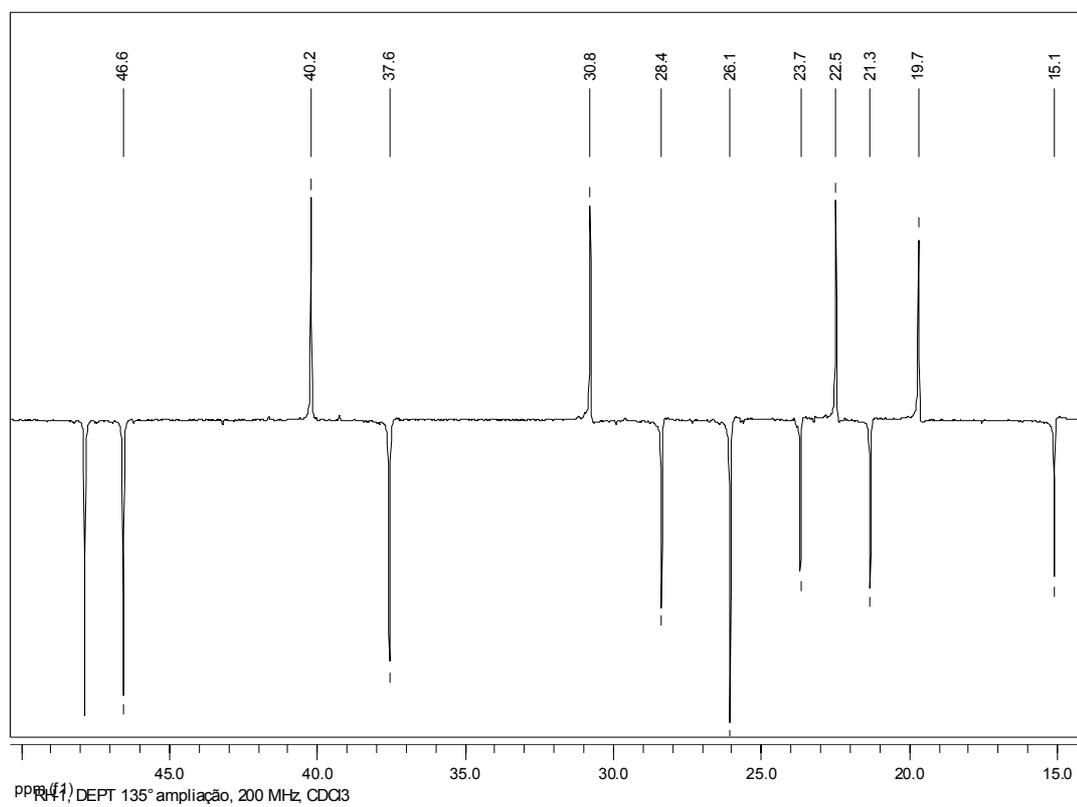
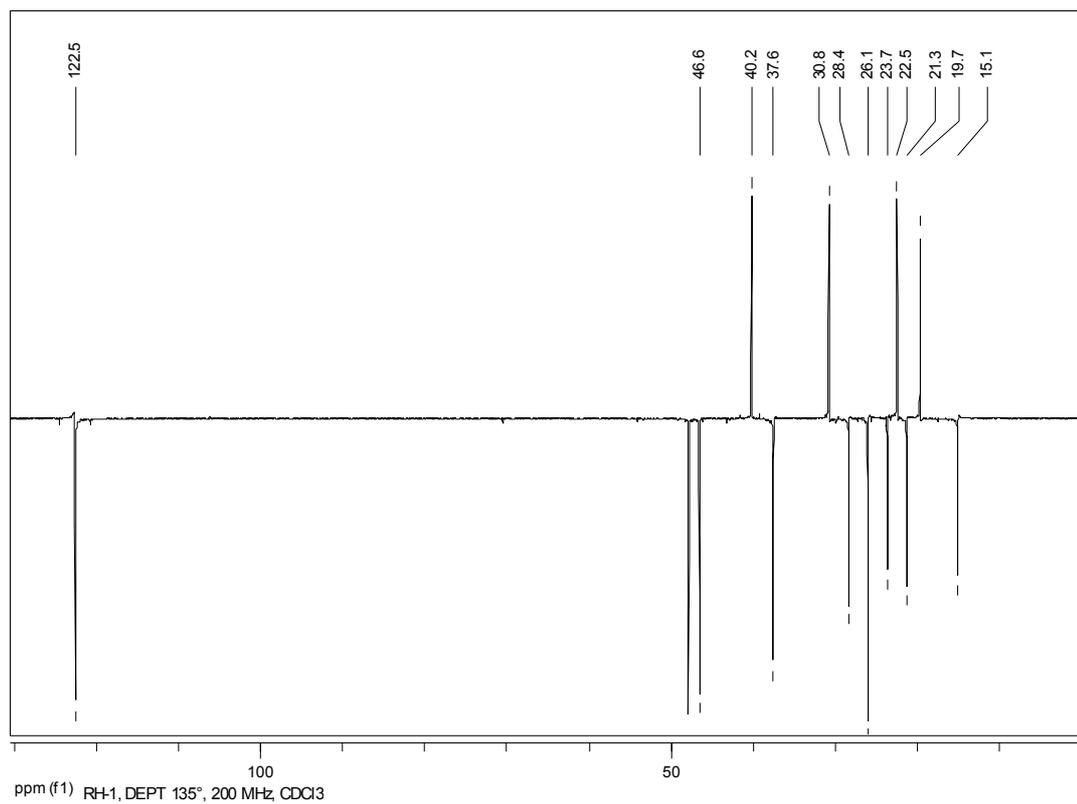


FIGURA 4.15. Espectro de DEPT 135° e ampliação da substância RH-1 (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

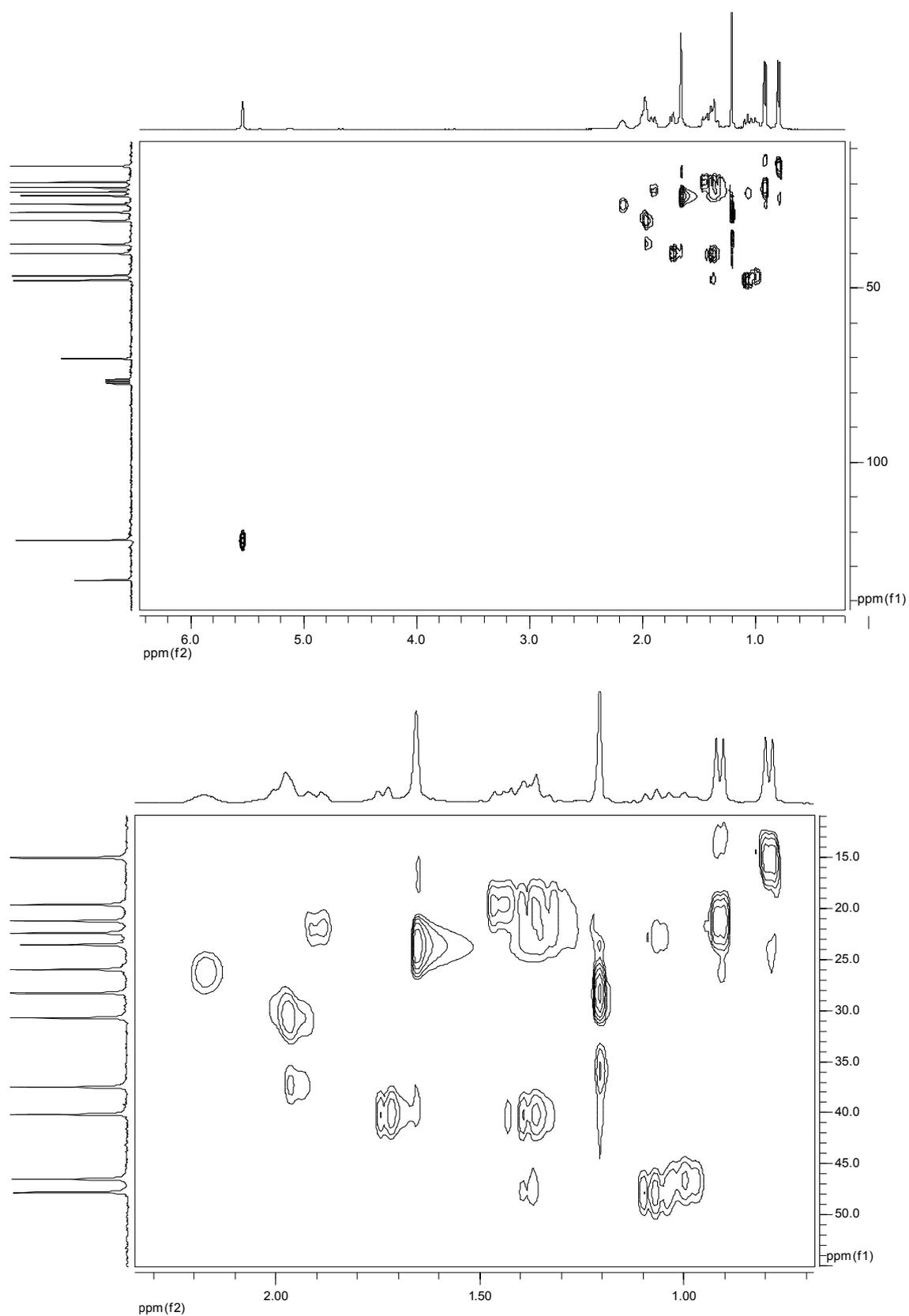


FIGURA 4.16. Experimento de HSQC e ampliação da substância RH-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

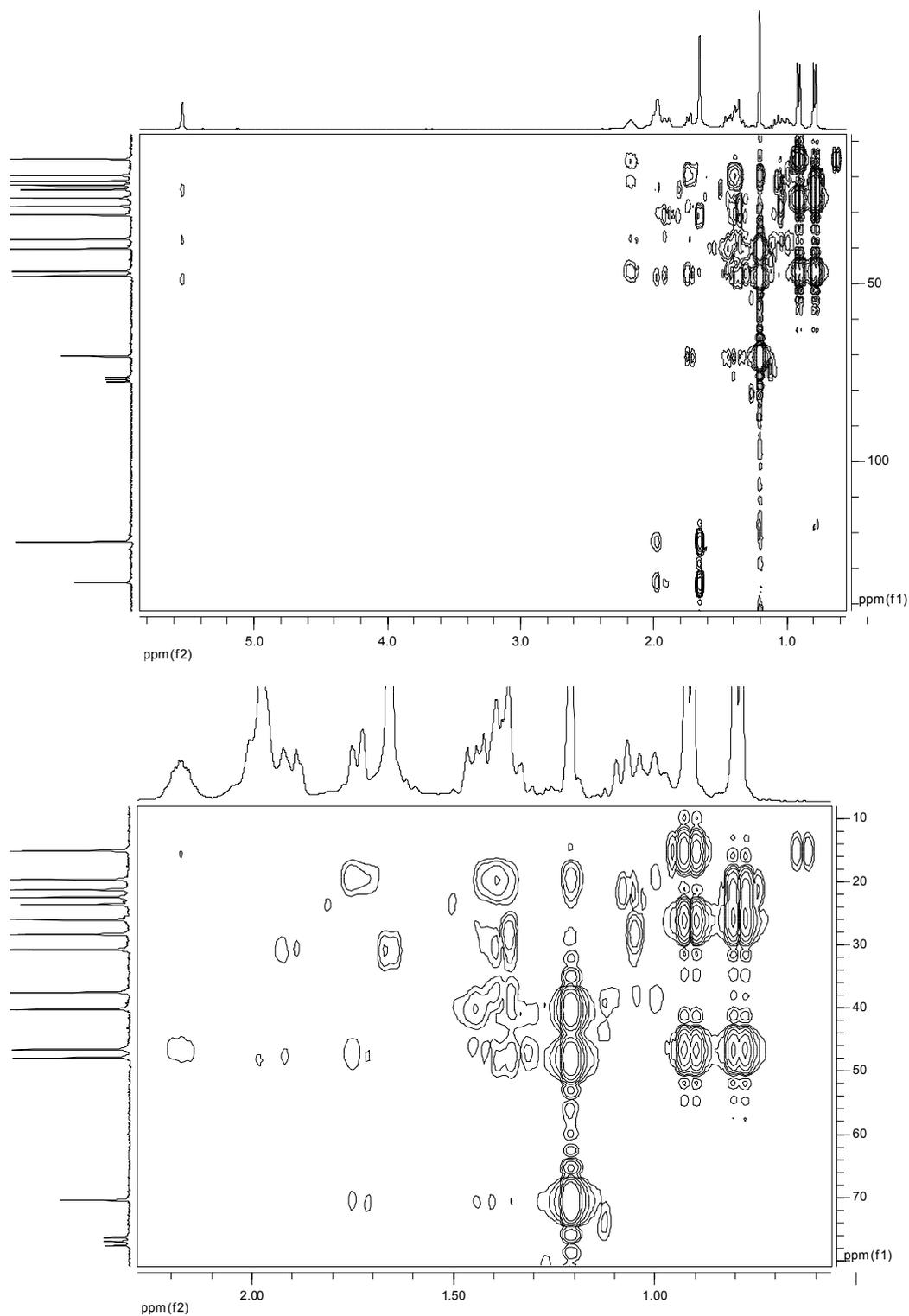


FIGURA 4.17. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

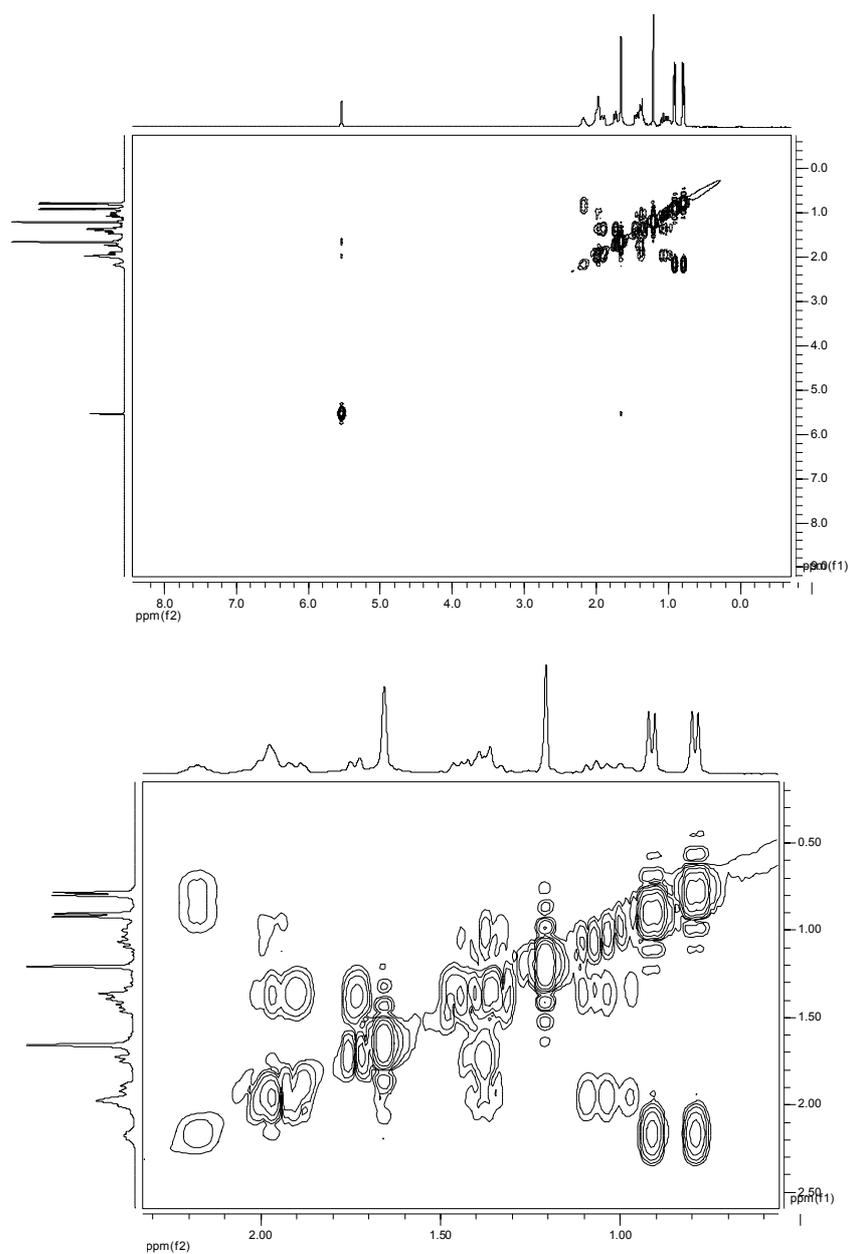


FIGURA 4.18. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

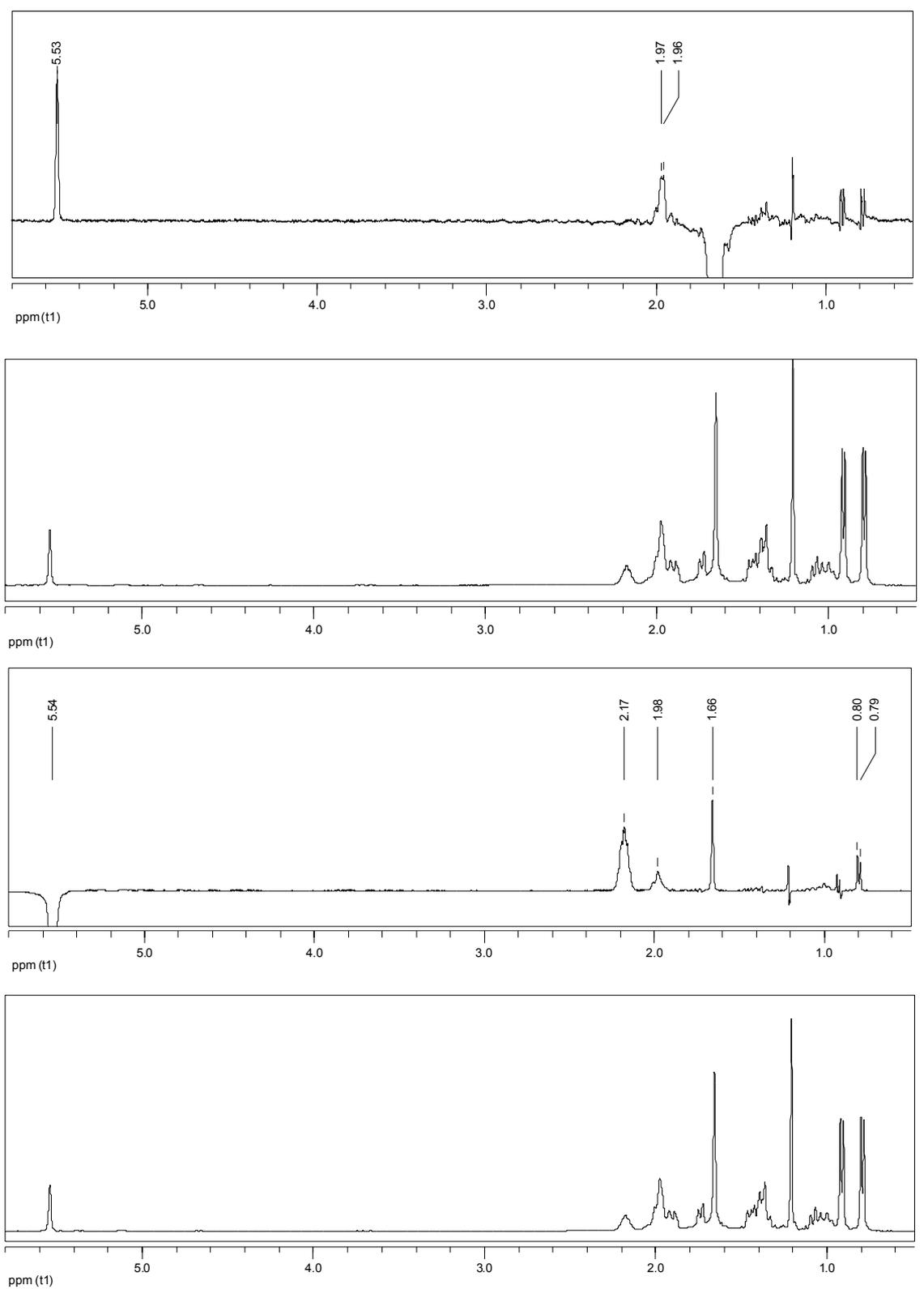


FIGURA 4.19. Experimento de gNOESY da substância RH-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

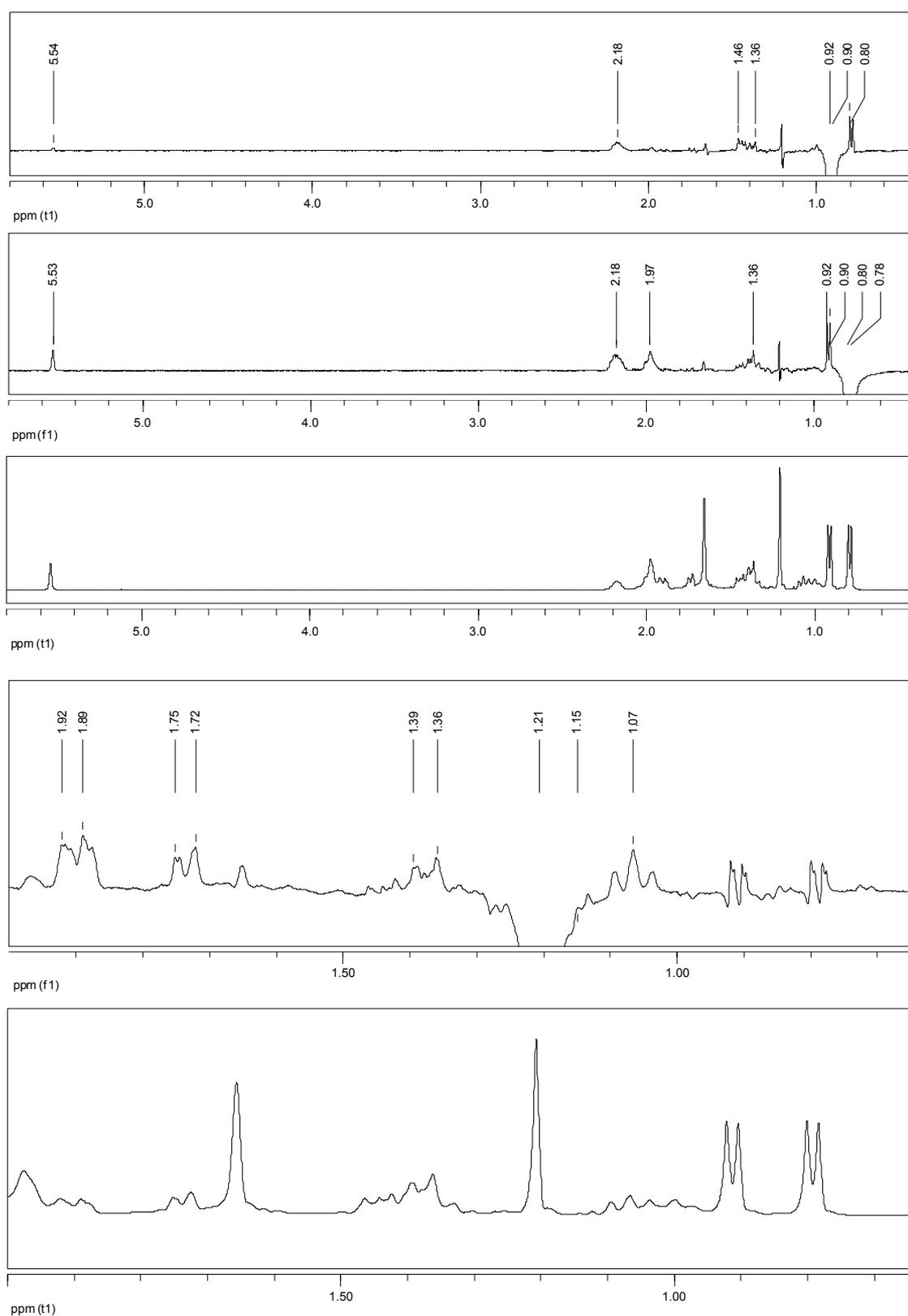


FIGURA 4.19a. Experimento de gNOESY da substância RH-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

### 4.1.3. Identificação da substância RH-2

A fração RH-2 foi separada do extrato hexano da raiz em mistura. Ela foi identificada através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.21), que apresentou duplete largo em  $\delta$  5,33 ( $J= 5,0$  Hz) e um multiplete em  $\delta$  3,52 característicos dos hidrogênios H-6 e H-3 dos esqueletos esteroidais (sitosterol, estigmasterol e campesterol); foi observado também sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,07 dd ( $J= 8,0$  e  $15,4$  Hz) e  $\delta$  5,12 dd ( $J= 8,1$  e  $15,1$  Hz) que sugeriram à presença do estigmasterol, e ainda, um grande número de sinais congestionados na região de  $\delta$  0,68 a  $\delta$  2,31 referentes a vários grupos de hidrogênios metílicos e metilênicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. O sitosterol e o campesterol possuem cadeias laterais praticamente idênticas, portanto, não há como diferenciá-los com um simples espectro de hidrogênio.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostrou (Figura 4.22) sinais em  $\delta$  140,7 e  $\delta$  121,7 (C-5 e C-6) referentes ao sitosterol, estigmasterol e campesterol, e sinal em  $\delta$  129,3 e  $\delta$  138,3 (C-23 e C-22) do estigmasterol.

Na análise por CG/EM, foram observados três picos no cromatograma (Figura 4.23 (a)) que indicaram a presença de três substâncias. Os padrões de fragmentações mostraram-se compatíveis com os dados da literatura para as substâncias: **sitosterol** (Figura 4.20), pico do íon molecular  $m/z$  414 Da [ $\text{M}^+$ ] (Figura 4.23 (b)), **estigmasterol** (Figura 4.20), pico do íon molecular  $m/z$  412 Da [ $\text{M}^+$ ] (Figura 4.23 (c)) e **campesterol** (Figura 4.20), pico do íon molecular  $m/z$  400 Da [ $\text{M}^+$ ] (Figura 4.23 (d)).

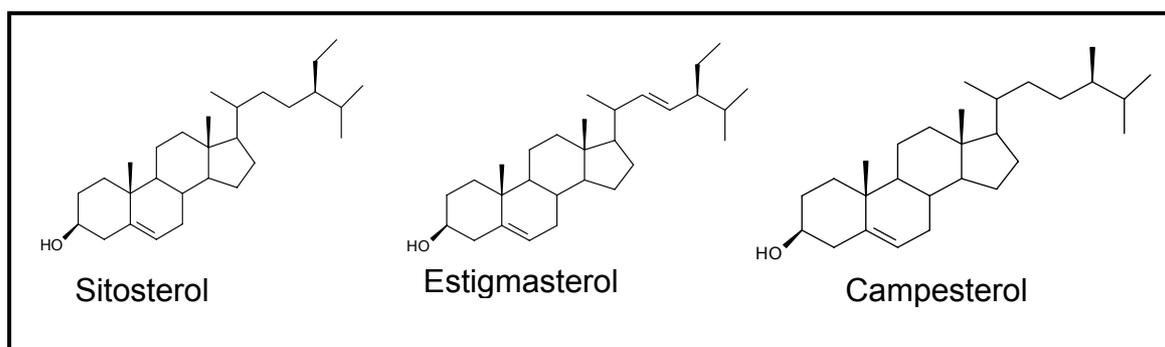


FIGURA 4.20. Estruturas propostas para a mistura RH-2.

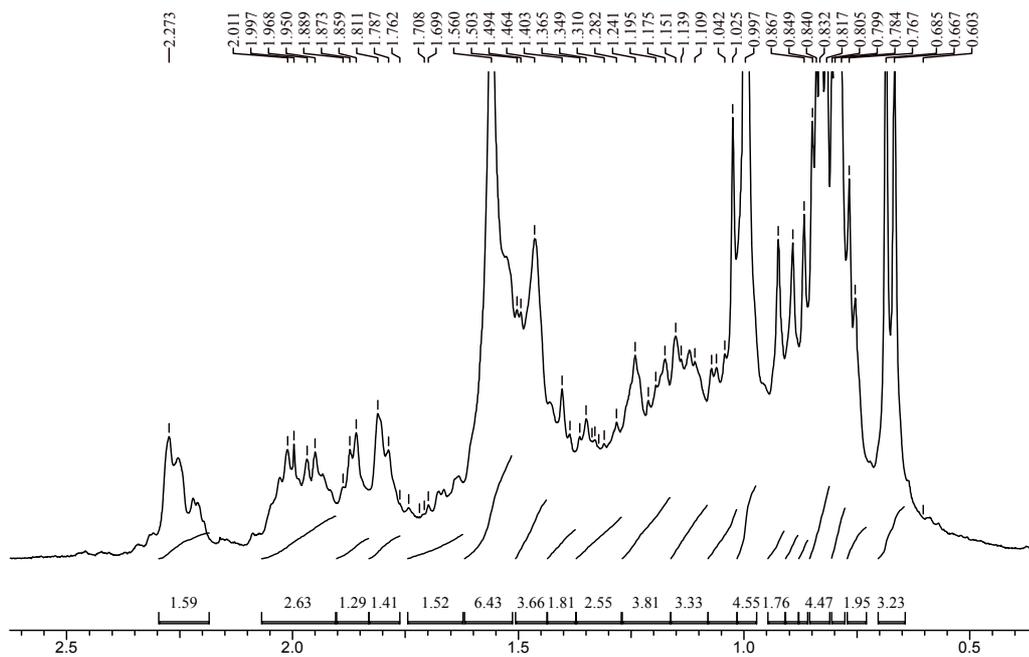
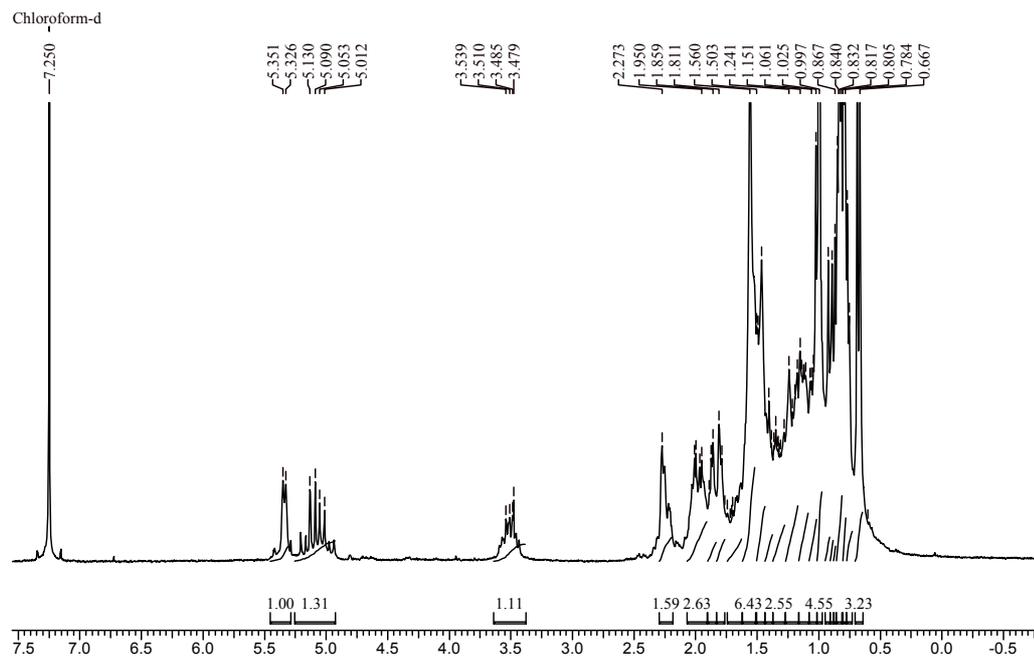


FIGURA 4.21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e ampliação da mistura RH-2 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

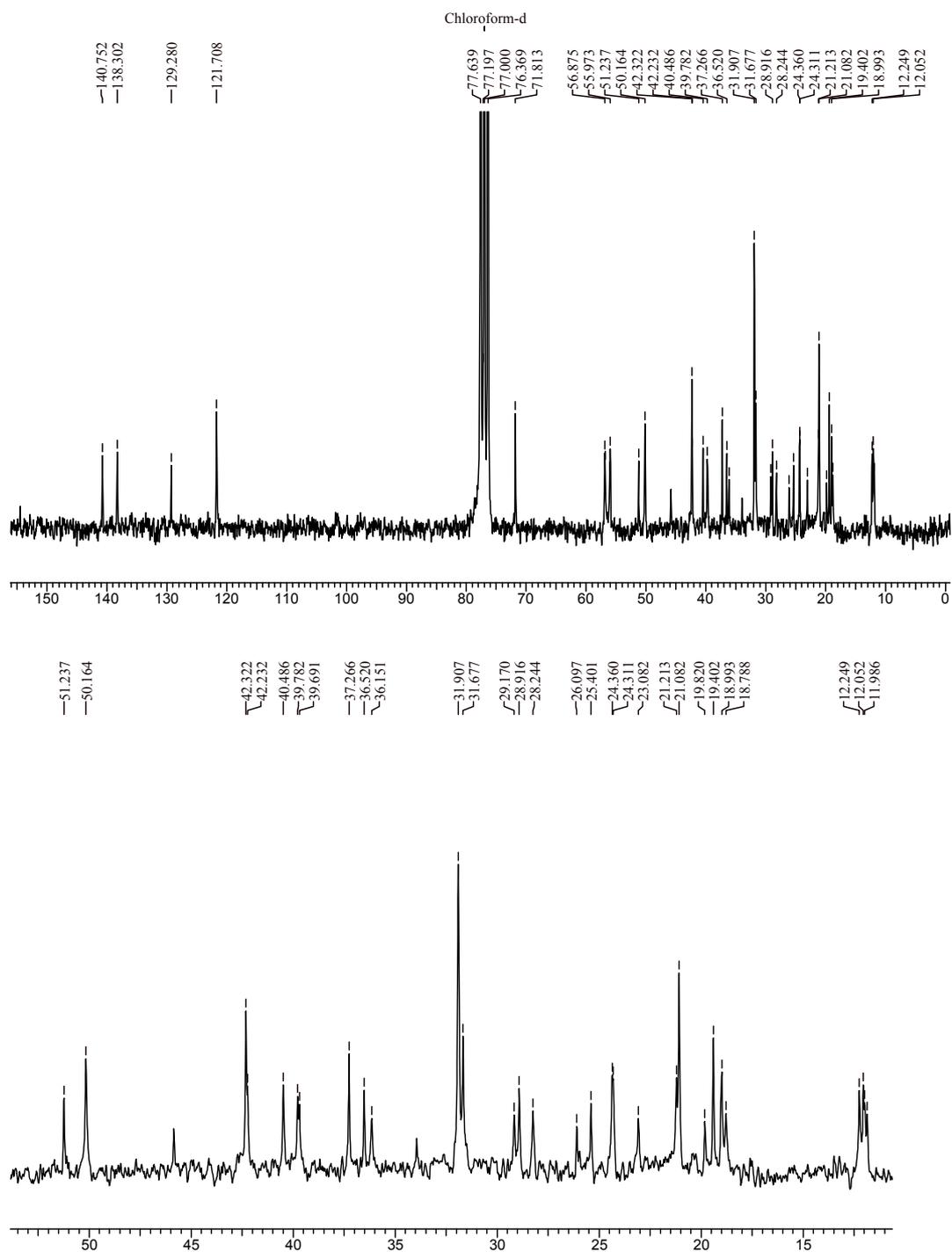


FIGURA 4.22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e ampliação da mistura RH-2 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

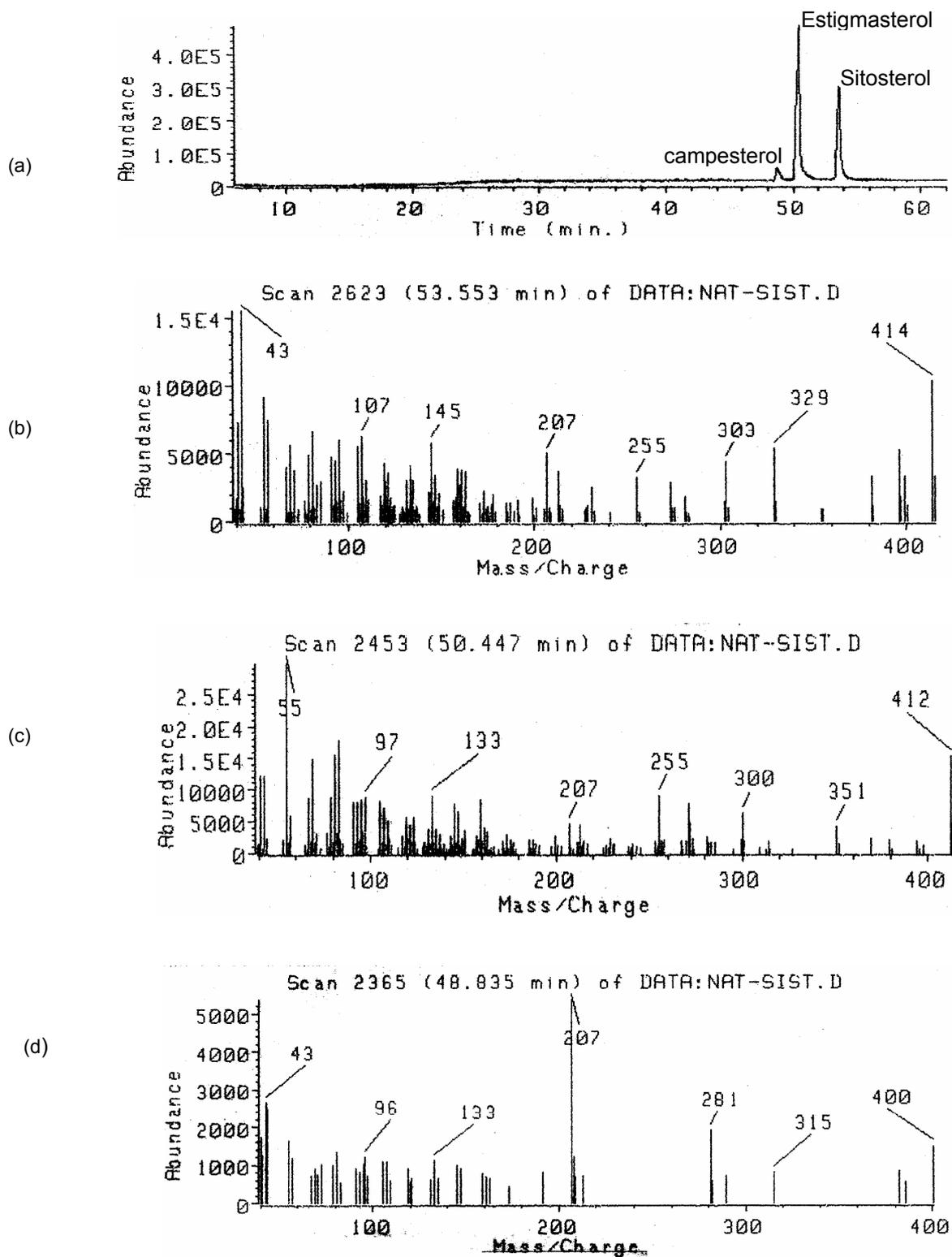


FIGURA 4.23. (a) Cromatograma da mistura RH-2; (b) Espectro de massa do sitosterol; (c) Espectro de massa do estigmasterol; (d) Espectro de massa do campesterol.

#### 4.1.4. Identificação da substância RH-3

A substância RH-3 foi isolada dos extratos hexano, diclorometano e metanol. Inicialmente foi caracterizada como um sólido vermelho, onde, posteriormente, foi verificado que se tratava da substância RH-3 e de um pigmento vermelho que sempre a acompanhava. Aparentemente, a substância RH-3 e o pigmento vermelho formavam um complexo insolúvel. Foi conseguida a purificação da mesma, trabalhando-se com várias frações, e somente, após várias tentativas, a substância RH-3 foi isolada como um líquido viscoso amarelo, a qual revelada em vanilina ácida mostrou uma mancha de cor vermelha intensa.

Essa substância apresentou em seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais congestionados na região dos aromáticos, isto dificultava bastante às atribuições. Na tentativa de se obter melhor resolução do espectro, foram realizados vários experimentos, utilizando outros solventes deuterados, tais como, piridina, benzeno e DMSO, sendo o último, o que apresentou o melhor resultado na separação dos sinais dos hidrogênios ligados aos nitrogênios. Foram realizados outros experimentos que infelizmente não apresentaram bons resultados (ex.: HMBC N-H), porém, aqui só são mostrados os espectros e experimentos de RMN que realmente contribuíram na determinação estrutural.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.46, 4.46a, 4.46b, Tabela 4.2) desta substância mostrou sinais de hidrogênios ligados a nitrogênio em  $\delta$  8,04 e 8,00. Foi observado sinais de três metilas em  $\delta$  1,82,  $\delta$  1,79, e  $\delta$  1,59; sinais de hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  7,50-6,50; sinais de hidrogênios olefínicos entre  $\delta$  6,13-5,22. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.47, Tabela 4.2) foi observado sinais de carbonos metílicos em  $\delta$  18,3,  $\delta$  25,9 e  $\delta$  27,1; sinais de carbonos em  $\delta$  102,3 e 102,7, estes últimos sinais sugeriram deslocamentos de C-3 característicos do anel indol, em consequência destes últimos deslocamentos de carbono e do perfil característico do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , sugeriu-se a presença de dois esqueletos indólicos na molécula, provavelmente um dímero ou um bisindol.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.46b, Tabela 4.2) da substância RH-3 mostrou sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,22 dt ( $J = 1,3$  e  $9,0$  Hz), este, via HSQC (Figura 4.48), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  128,5 e pelo DEPT (Figura 4.49) é um CH. Este sinal, na realidade, deveria ser um duplo multipeto, pois via COSY (Figura 4.50) acoplou com duas metilas vinílicas em  $\delta$  1,82 e 1,79 que pelo HSQC (Figura

4.48) corresponderam aos carbonos em  $\delta$  25,9 e  $\delta$  18,3, respectivamente. Pelo experimento de HMBC (Figura 4.51 e 4.51a, Figura 4.24), confirmaram-se as correlações de  $\delta$  5,22 com  $\delta$  25,9 (Me) e  $\delta$  18,3 (Me), sugerindo uma parte da estrutura conforme figura 4.24:

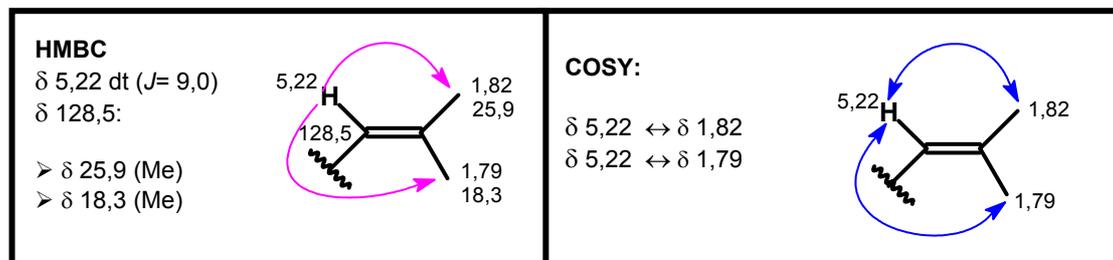


FIGURA 4.24. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,22.

O sinal em  $\delta$  5,22 acoplou também via COSY (Figura 4.25, Figura 4.50) com  $\delta$  4,08 m e pelo HSQC (Figura 4.48) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  40,7 (CH). O sinal em  $\delta$  4,08 acoplou, via COSY, com  $\delta$  1,82 (coalecendo com a metila, deveria ser dd) e  $\delta$  2,43 dd ( $J = 12,1$  e  $6,8$  Hz), ambos ligados ao carbono em  $\delta$  50,0; observou-se também no COSY, o acoplamento entre eles mesmos ( $\delta$  1,82 e  $\delta$  2,43). Chegou-se então em outra parte da substância, conforme figura 4.25.

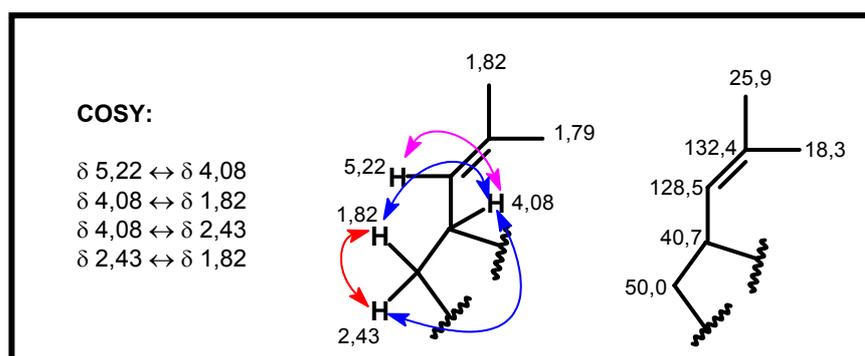


FIGURA 4.25. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,22,  $\delta$  4,08,  $\delta$  1,82 e  $\delta$  2,43.

O sinal em  $\delta$  4,08 (CH) correlacionou, via HMBC (Figura 4.26, Figura 4.51), com um sinal de carbono em  $\delta$  139,4 ( $sp^2$ ). O sinal em  $\delta$  2,43 ( $CH_2$ ) também

correlacionou, via HMBC (Figura 4.26, Figura 4.51 e 4.51a), com o mesmo carbono em  $\delta$  139,4 e com outro em  $\delta$  144,3 ( $sp^2$ ). Observou-se ainda, a correlação do sinal em  $\delta$  1,82 ( $CH_2$ ) com  $\delta$  48,5 (quaternário), conforme mostrado na figura 4.26.

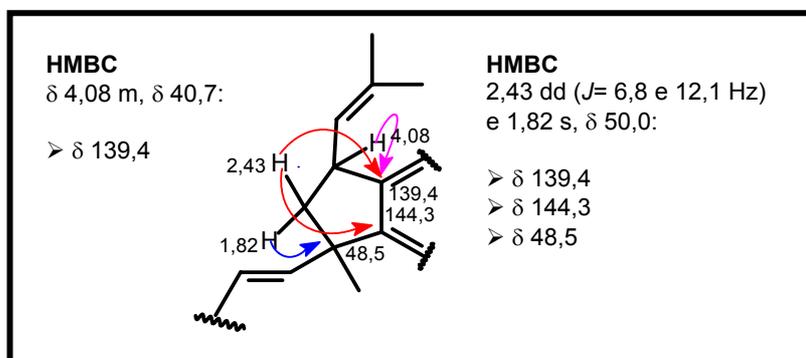


FIGURA 4.26. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,08,  $\delta$  2,43 e  $\delta$  1,82.

Foi verificada a presença de uma terceira metila em  $\delta$  1,59 ( $\delta$  27,1, Figura 4.27) que apresentou correlações com  $\delta$  144,3 ( $sp^2$ ),  $\delta$  136,0 (CH),  $\delta$  48,5 (q) e  $\delta$  50,0 ( $CH_2$ ). O sinal em  $\delta$  136,0 (CH), via HSQC (Figura 4.48), apareceu ligado em  $\delta$  6,40 d ( $J = 15,9$  Hz), este último sinal de hidrogênio acoplou, via COSY (Figura 4.50), com outro sinal em  $\delta$  6,13 d ( $J = 15,9$  Hz), esta constante sugeriu uma ligação dupla E. O sinal em  $\delta$  6,40 apresentou correlações, via HMBC (Figuras 4.51 e 4.51a), com  $\delta$  48,5 (q), 129,8 ( $sp^2$ ),  $\delta$  144,3 ( $sp^2$ ) e  $\delta$  27,1 (Me). O sinal em  $\delta$  6,13 mostrou correlações com  $\delta$  48,5 (q) e  $\delta$  118,7 (CH), conforme observado na figura 4.27:

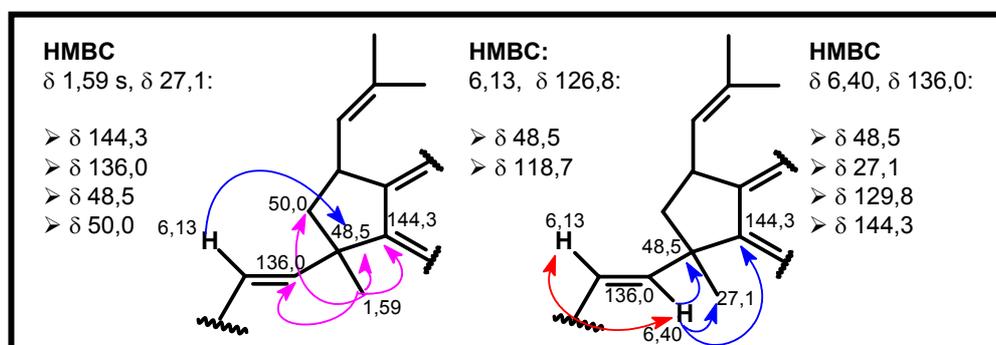


FIGURA 4.27. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,59,  $\delta$  6,13 e  $\delta$  6,40

A unidade alifática da molécula, figura 4.28, foi determinada através dos espectros de RMN 1D e experimentos de 2D, porém, muitos sinais de hidrogênios e carbonos ainda precisavam ser atribuídos.

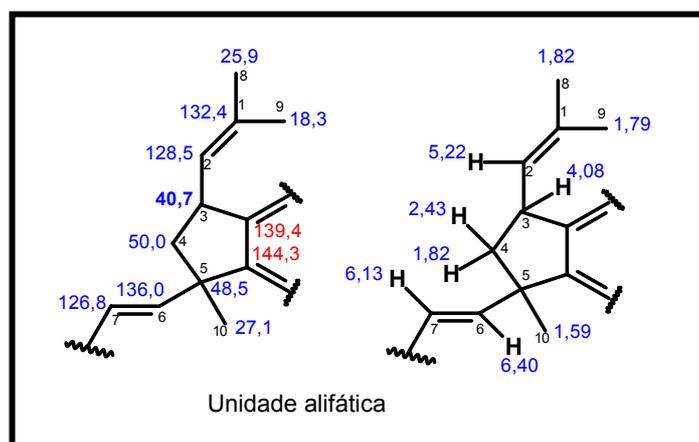


FIGURA 4.28. Proposta para a unidade alifática.

Foi suposto pelo número de carbonos e pela massa (Figura 4.52)  $m/z$  366 Da ( $IE^+$ ) que esta substância fosse um bisindol, foram comparados então os dados obtidos com os da literatura (MAKANGARA *et al.*, 2004) para um anel indólico substituído (Figura 4.29), com base nesta comparação foi sugerida a presença de dois sistemas indólicos, o primeiro foi chamado de **sistema a** e o outro de **sistema b**.

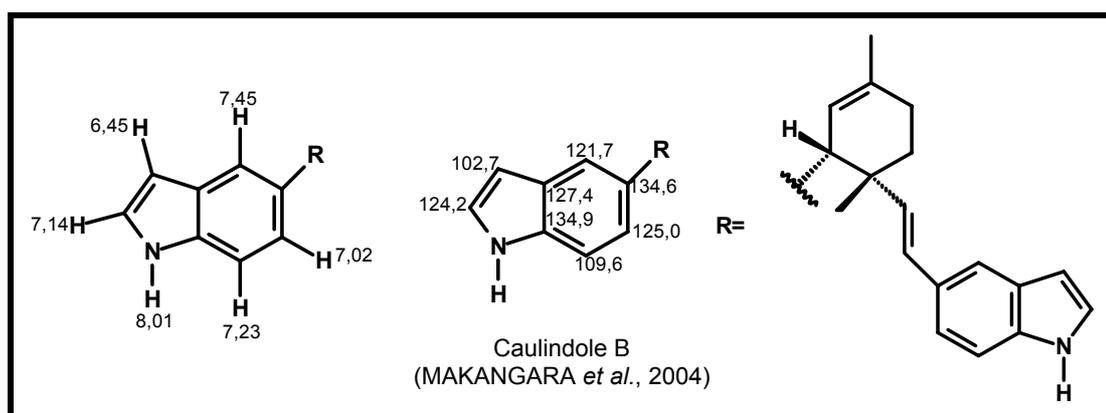


FIGURA 4.29. Valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico substituído (MAKANGARA *et al.*, 2004).

Para o  **sistema a** , o experimento de COSY (Figura 4.30, Figura 4.50) mostrou acoplamento de  $\delta_{\text{NH}}$  8,04 si com  $\delta$  7,11 (dd,  $J = 2,5$  e  $3,0$  Hz) e  $\delta$  6,44 (ddd,  $J = 3,0, 2,5$  e  $1,0$  Hz); ainda no COSY, observou-se também  $\delta$  7,11 acoplado com  $\delta$  6,44. O sinal de  $\delta$  7,11, atribuído ao H-2'', via HSQC (Figura 4.48), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  124,4. O sinal em  $\delta$  6,44 foi atribuído ao H-3'', via HSQC, apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  102,7. Um outro sinal em  $\delta$  7,50 (d,  $J = 0,7$  Hz,  $\delta$  118,7) apresentou no HMBC (Figura 4.30, Figuras 4.51 e 4.51a) correlação com  $\delta$  102,7, sugerindo ser este o H-4''.

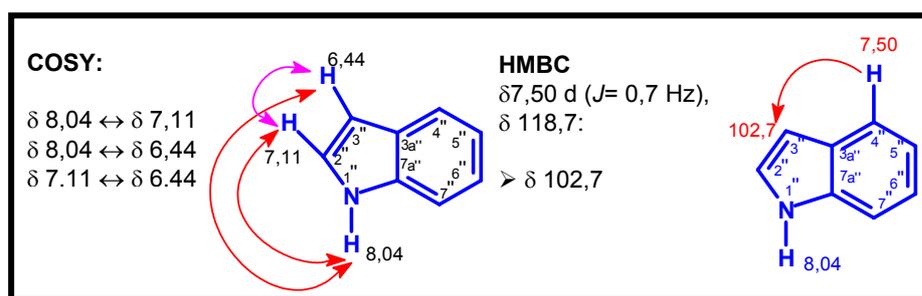


FIGURA 4.30. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  8,04 e  $\delta$  7,11 e correlação observada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,50.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.53) e experimentos 2D em DMSO foram feitos visando obter os sinais de N-H e suas correlações no HMBC (Figura 4.54). Foi observado com este experimento dois sinais distintos em  $\delta$  10,95 e  $\delta$  10,87, sendo o primeiro atribuído ao N-H do  **sistema a**  que correspondeu ao deslocamento em  $\delta$  8,04 no  $\text{CDCl}_3$ . O sinal em  $\delta$  10,95 apresentou correlação, via HMBC (Figura 4.31, Figura 4.54), com os carbonos em  $\delta$  135,1 ( $\text{sp}^2$ ), 128,0 ( $\text{sp}^2$ ) e  $\delta$  102,7 (CH) (valores dos deslocamentos de carbonos em  $\text{CDCl}_3$ ).

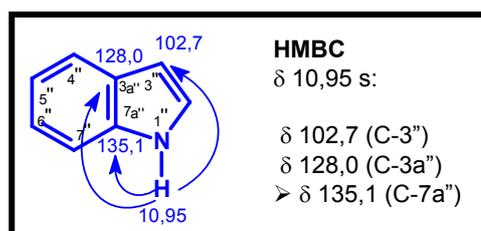


FIGURA 4.31. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  10,95 (DMSO).

Através dos espectros e experimentos feitos em  $\text{CDCl}_3$  e DMSO, pôde-se atribuir os valores dos hidrogênios e carbonos para H-2'' e H-3'', assim como os valores de carbono ao C-3a'' e C-7a'', figura 4.32. As atribuições aqui feitas são próximas aos valores da literatura para o anel indólico.

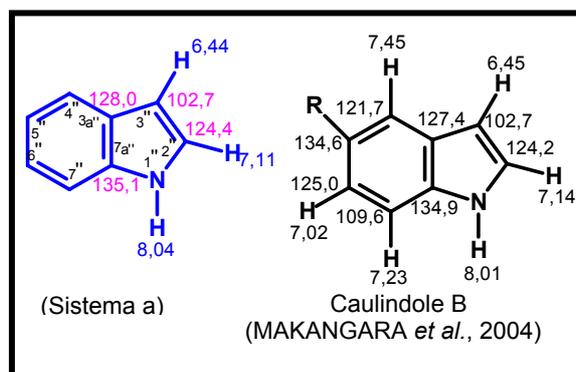


FIGURA 4.32. Comparação dos valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico (MAKANGARA *et al.*, 2004) com os encontrados para o anel indólico do sistema a.

O sinal em  $\delta$  7,50, d ( $J = 0,7$  Hz) foi atribuído ao H-4'', este é um duplete com constante pequena, logo, foi necessário um substituinte em C-5''. O sinal em  $\delta$  7,50 apresentou também no HMBC (Figura 4.33, Figura 4.51) correlações com  $\delta$  120,4 (CH), 126,8 (CH), 129,8 ( $\text{sp}^2$ ) e  $\delta$  135,1 ( $\text{sp}^2$ ). No experimento de COSY (Figura 4.50), o sinal de H-4'' mostrou acoplamento com dois sinais em  $\delta$  7,22 (d,  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta$  7,23 (d,  $J = 8,4$  Hz). Estes últimos sinais no experimento de HMBC (Figura 4.33, Figuras 4.51 e 4.51a) mostraram as seguintes correlações:  $\delta$  7,23 ( $\delta$  120,4) com  $\delta$  118,7 e  $\delta$  135,1; o sinal em  $\delta$  7,22 ( $\delta$  110,9) com  $\delta$  128,0 e  $\delta$  129,8. O sinal em  $\delta$  118,7 correspondeu ao C-4'', cuja atribuição já foi discutida. As correlações observadas (Figura 4.33) para o sinal em  $\delta$  7,23 ( $\delta$  120,4) permitiram a atribuição deste ao H-6''. O sinal em  $\delta$  128,0 foi atribuído ao C-3a'', portanto, a correlação do sinal em  $\delta$  7,22 com  $\delta$  128,0, permitiu atribuí-lo ao H-7''. Assim, até o momento foram feitas as atribuições mostradas na figura 4.33:

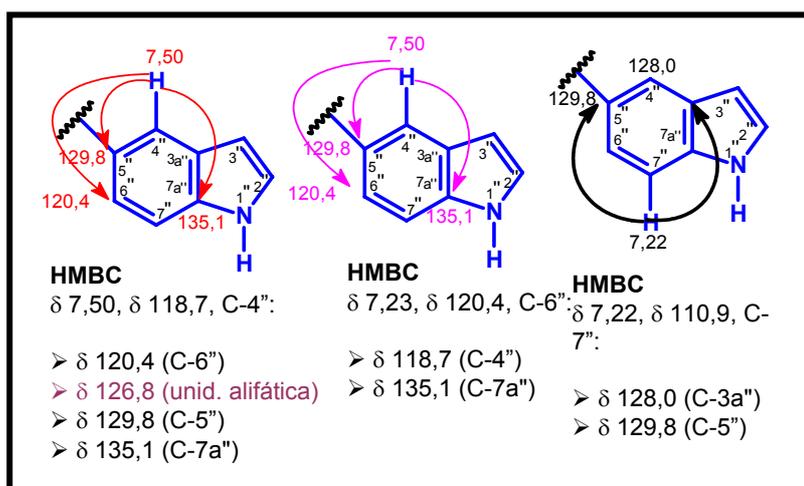


FIGURA 4.33. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,50,  $\delta$  7,23 e  $\delta$  7,22.

As correlações do sinal de H-4'' com aqueles de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  120,4 e  $\delta$  135,1 e, de H-6'' com  $\delta$  135,1, confirmaram as atribuições ao C-6'' e C-7a'' (Figura 4.33). O sinal de H-4'' e o sinal de H-7'' correlacionaram, via HMBC (Figura 4.33, Figuras 4.51 e 4.51a), com um sinal em  $\delta$  129,8 ( $\text{sp}^2$ ), este último sinal foi atribuído ao C-5''. Portanto, a primeira unidade indólica é mostrada na figura 4.34.

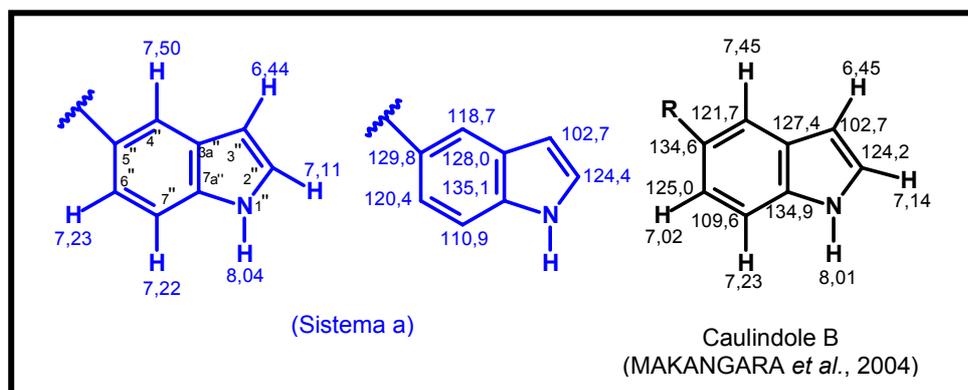


FIGURA 4.34. Comparação dos valores de deslocamentos de hidrogênios e carbonos de um anel indólico (MAKANGARA *et al.*, 2004) com os encontrados para o anel indólico do sistema a.

Considerando-se a primeira unidade indólica, conseguiu-se entender no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.46a) os sinais em  $\delta$  7,23 e  $\delta$  7,22 (d,  $J = 8,4$  Hz), estes sinais, na realidade, referiram-se a dois dupletos, com constante  $J = 8,4$  Hz, um com sinais entre  $\delta$  7,23-7,21, correspondendo a um sinal médio em  $\delta$  7,22.

O outro dubleto compreende o sinal entre  $\delta$  7,24-7,22, correspondendo a um sinal médio em  $\delta$  7,23. Os valores de deslocamentos atribuídos, até aquele momento, foram próximos ao sistema indólico encontrados na literatura (figura 4.34).

Para o **sistema b**, o espectro de hidrogênio (Figura 4.46) mostrou sinais em  $\delta$  8,00 sl (junto ao  $\delta$  8,04),  $\delta$  7,14 (dd,  $J = 2,5$  e  $3,2$  Hz, CH) e  $\delta$  6,50 (ddd,  $J = 3,2, 2,5$  e  $1,0$  Hz, CH), estes foram atribuídos a H-1', H-2' e H-3', respectivamente. No experimento de HSQC (Figura 4.48), o sinal em  $\delta$  7,14 apareceu ligado ao  $\delta$  123,8 e o sinal em  $\delta$  6,50 ao  $\delta$  102,3. Nenhum destes sinais apresentou correlação no HMBC. Um sinal em  $\delta$  7,30 (t,  $J = 0,7$  Hz,  $\delta$  115,4) apresentou correlação via HMBC (Figura 4.35, Figura 4.51) com  $\delta$  102,3, sugerindo ser este o H-4':

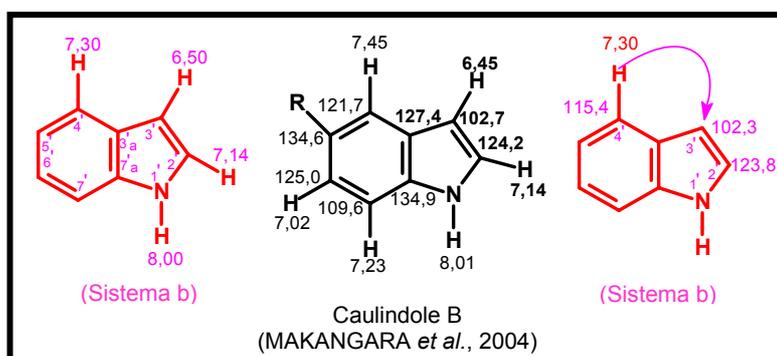


FIGURA 4.35. Correlação apresentada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,30 e comparação dos valores de deslocamentos do sistema b com a literatura.

O espectro de hidrogênio e o experimento de HMBC feitos em DMSO (Figura 4.53 e Figura 4.54) permitiram observar a separação dos dois sinais de N-H de forma distinta e, através do experimento de HMBC (Figura 4.36, Figura 4.54), foi verificado que o sinal em  $\delta$  10,87 ( $\delta$  8,00 em  $\text{CDCl}_3$ ) correlacionava-se com  $\delta$  135,5 ( $\text{sp}^2$ ), 127,3 ( $\text{sp}^2$ ) e  $\delta$  102,3 (CH) (valores de deslocamento dos carbonos em  $\text{CDCl}_3$ ).

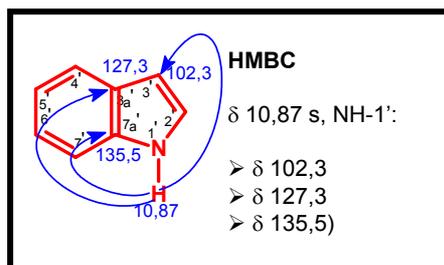


FIGURA 4.36. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  10,87 (DMSO).

O sinal em  $\delta$  7,18 (Figura 4.37) mostrou correlação (Figuras 4.51 e 4.51a) com  $\delta$  127,3 (C-3a), sugerindo ser o H-7'. No experimento de HSQC (Figura 4.48), o sinal do H-7' apareceu ligado ao  $\delta$  105,8. O sinal em  $\delta$  7,30 (H-4', Figura 4.46a) era um tripleto com constante pequena ( $J = 0,7$  Hz) e o H-7' ( $\delta$  7,18) um singlete largo, estas multiplicidades implicaram em substituição em C-5' e C-6'. O sinal em  $\delta$  7,30 mostrou também correlações (Figura 4.37, Figuras 4.51 e 4.51a) com  $\delta$  135,5 (C-7'a), 144,3 e  $\delta$  40,7 (unidade alifática). O sinal de H-7' (Figura 4.37) ainda mostrou correlações (Figura 4.51 e 4.51a) com  $\delta$  139,4 e  $\delta$  48,5 (unidade alifática).

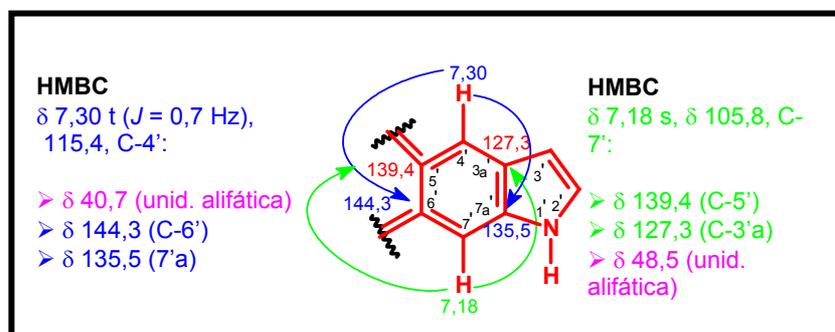


FIGURA 4.37. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,30 e  $\delta$  7,18.

Até esta parte da discussão estrutural, tinham-se duas unidades indólicas e uma alifática, como mostrado na figura 4.38. O sinal de H-4" ( $\delta$  7,50, sistema a, Figura 4.38) correlacionou com o carbono em  $\delta$  126,8 (unidade alifática), esta correlação permitiu a união de C-5" ( $\delta$  129,8, sistema a) com  $\delta$  126,8 (C-7, unidade alifática), conforme visto na figura 4.38. A correlação de H-7' ( $\delta$  7,18, sistema b) com o sinal em  $\delta$  48,5 (C-5, unidade alifática) permitiu a atribuição do

carbono em  $\delta$  144,3 ao C-6' (Figura 4.38). Isto explicaria a correlação de H-4' com  $\delta$  144,3 (Figura 4.37). O sinal de H-4' ( $\delta$  7,30, sistema b, Figura 4.38) correlacionou também com  $\delta$  40,7 (C-3, unidade alifática), esta correlação implicou na atribuição do carbono em  $\delta$  139,4 ao C-5'. Esta atribuição também explicaria a correlação de H-7' com  $\delta$  139,4 (Figura 4.37).

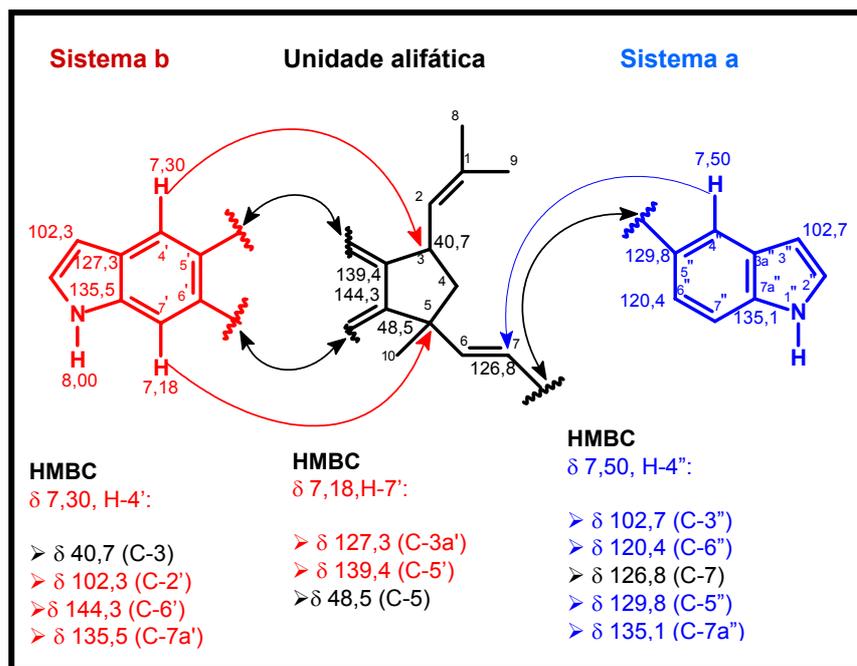


FIGURA 4.38. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,30,  $\delta$  7,18 e  $\delta$  7,50.

A substância RH-3 foi determinada pela análise dos espectros de 1D e 2D e também por comparação com o bisindol caulindole B (MAKANGARA *et al.*, 2004). Assim, para o composto RH-3, foi proposta a estrutura mostrada na figura 4.39.

Na tentativa de propor a estereoquímica de RH-3, foi realizado o experimento de gNOESY (Figuras 4.55, 4.55a e 4.55b). Nas figuras 4.40, 4.41 e 4.42 são mostrados os resultados das irradiações.

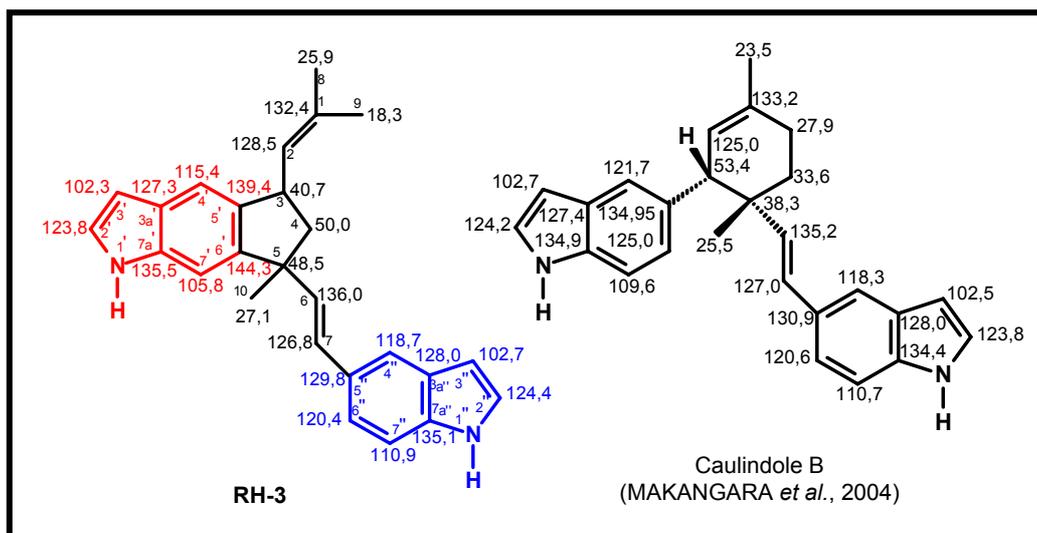


FIGURA 4.39. Estrutura proposta para RH-3 e comparação dos seus deslocamentos de carbono com o bisindol Caulindole B.

O sinal em  $\delta$  4,08 (H-3, Figura 4.40) causou nOe em  $\delta$  6,40 (H-6) e  $\delta$  6,13 (H-7), estas correlações implicaram que todos estes sinais encontravam-se no mesmo lado do plano, por conseqüência a Me-10 ( $\delta$  1,59) estaria no plano oposto, *anti* em relação a  $\delta$  4,08 (H-3).

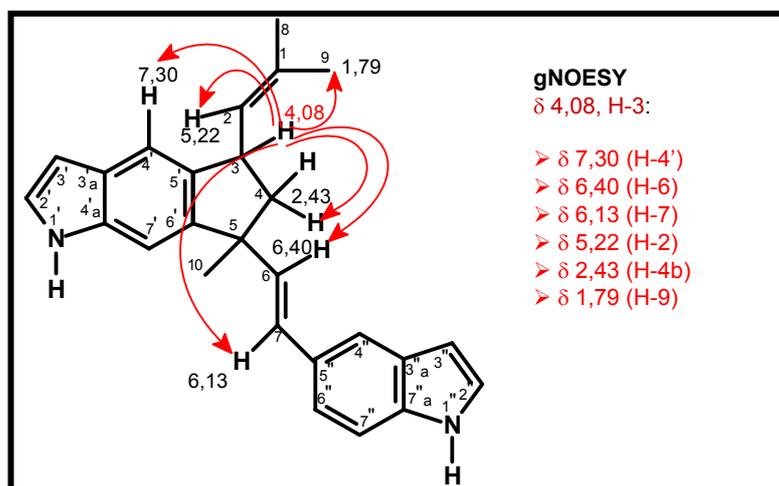


FIGURA 4.40 Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,08 (H-3).

A Me-10 ( $\delta$  1,59) foi irradiada causando nOe em apenas um dos hidrogênios de H-4 que foi chamado de H-4a ( $\delta$  1,82) enquanto o H-3 ( $\delta$  4,08) causou nOe em H-4b ( $\delta$  2,43), isto também sugeriu que ambos (Me-10 e H-3) estão em posição *anti*, figura 4.41.

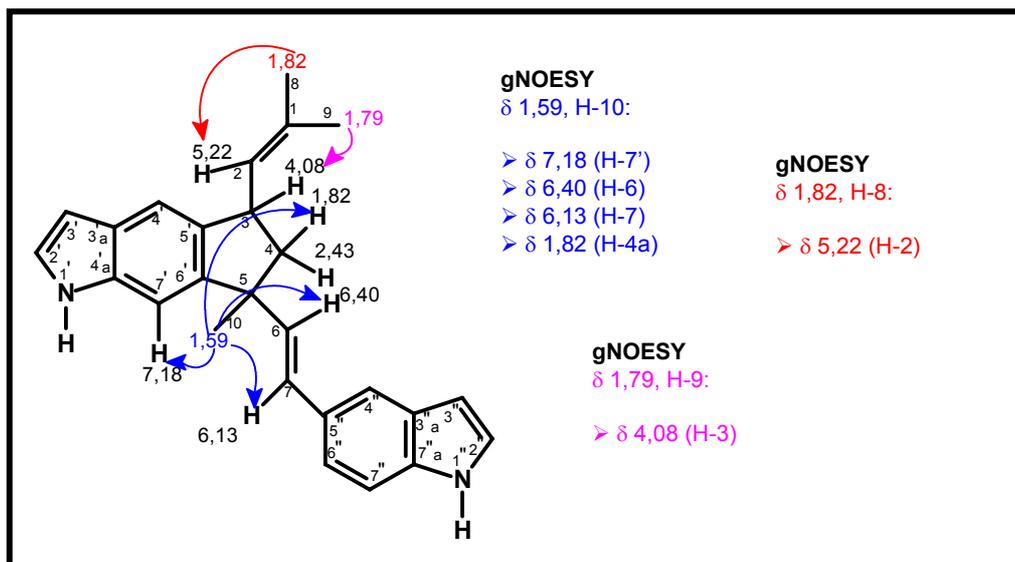


FIGURA 4.41 Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,59 (H-10),  $\delta$  1,82 (H-8) e  $\delta$  1,79 (H-9).

O sinal irradiado em  $\delta$  5,22 (H-2, Figura 4.42.) causou nOe em  $\delta$  7,30 (H-4') e  $\delta$  1,82 (Me-8). Esta última correlação indicou que  $\delta$  5,22 estava em posição Z em relação à  $\delta$  1,82. O sinal irradiado em  $\delta$  1,82 (Me-8) causou nOe em  $\delta$  5,22 (H-2), confirmando a posição de ambos no mesmo lado do plano (Figura 4.43).

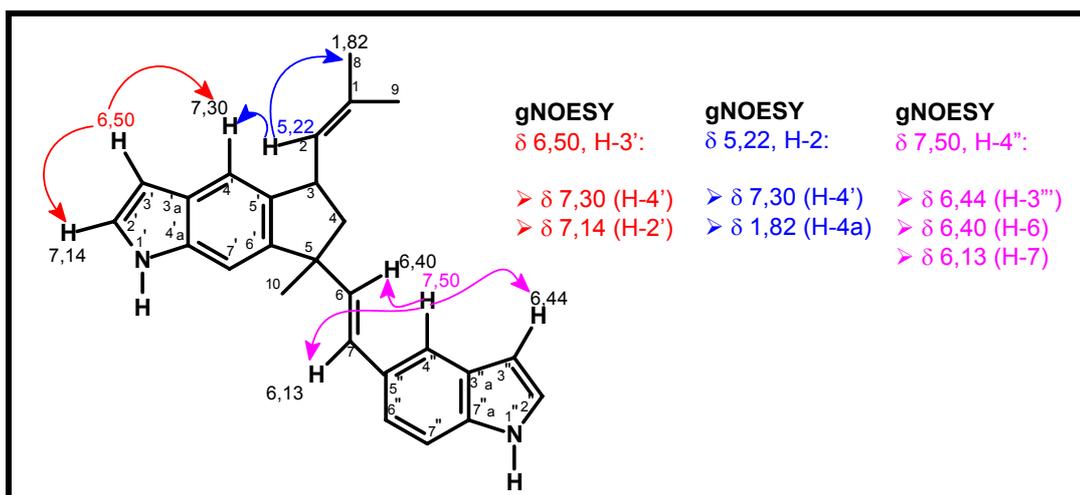


FIGURA 4.42. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,50 (H-3'),  $\delta$  5,22 (H-2') e  $\delta$  7,50 (H-4'').

Com a análise dos experimentos de gNOESY, sugeriu-se a estereoquímica mostrada na figura 4.43:

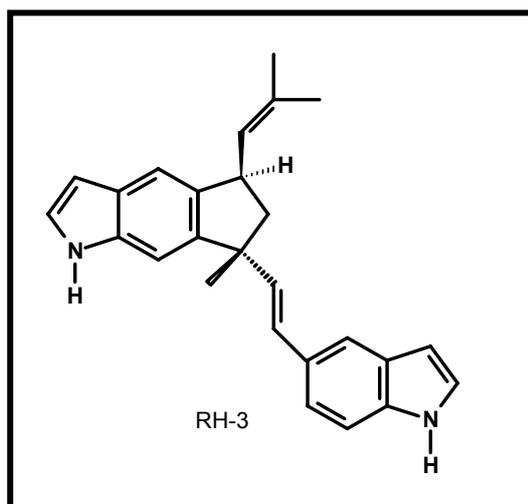


FIGURA 4.43. Estereoquímica proposta para a substância RH-3.

Segundo levantamento realizado no *Chemical Abstract*, a substância RH-3 é inédita, logo, denominou-se de **5',6'-[5-metil-5(7-indol-5''-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol**. A análise do espectro de massas de alta resolução (Figura 4.52) mostrou o pico do íon molecular  $m/z$  366 (37,5 %), confirmando a fórmula molecular  $C_{26}H_{26}N_2$  para o bisindol. As propostas de fragmentações para a substância RH-3 são mostradas nas figuras 4.44 e 4.45.

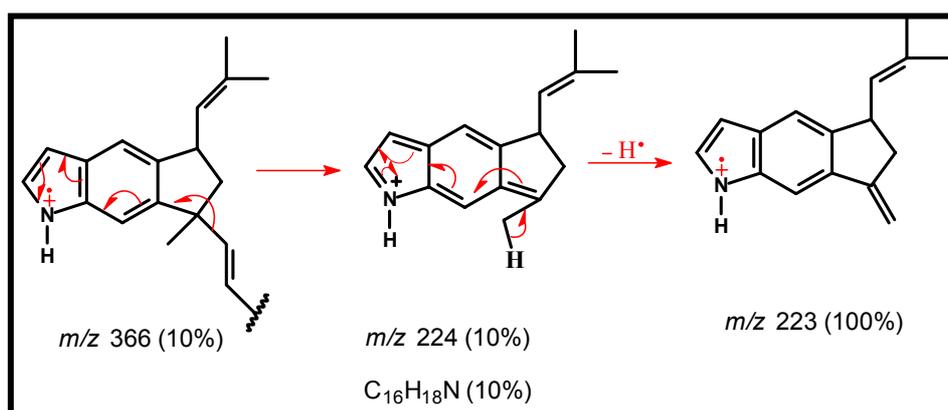


FIGURA 4.44. Proposta de fragmentações para a substância RH-3.

Rearranjo na molécula também pode ter acontecido, o que explicaria  $m/z$  130, figura 4.45.

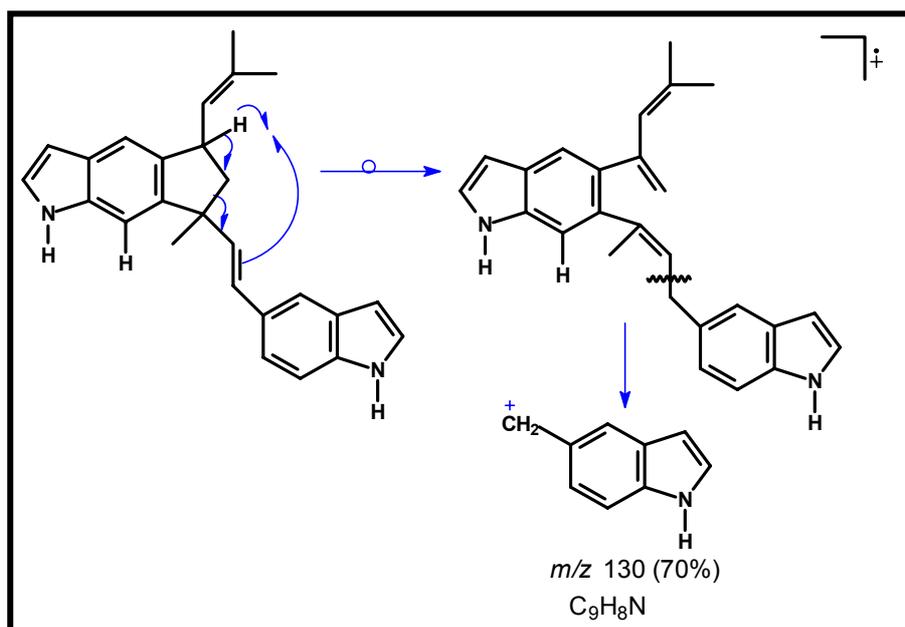
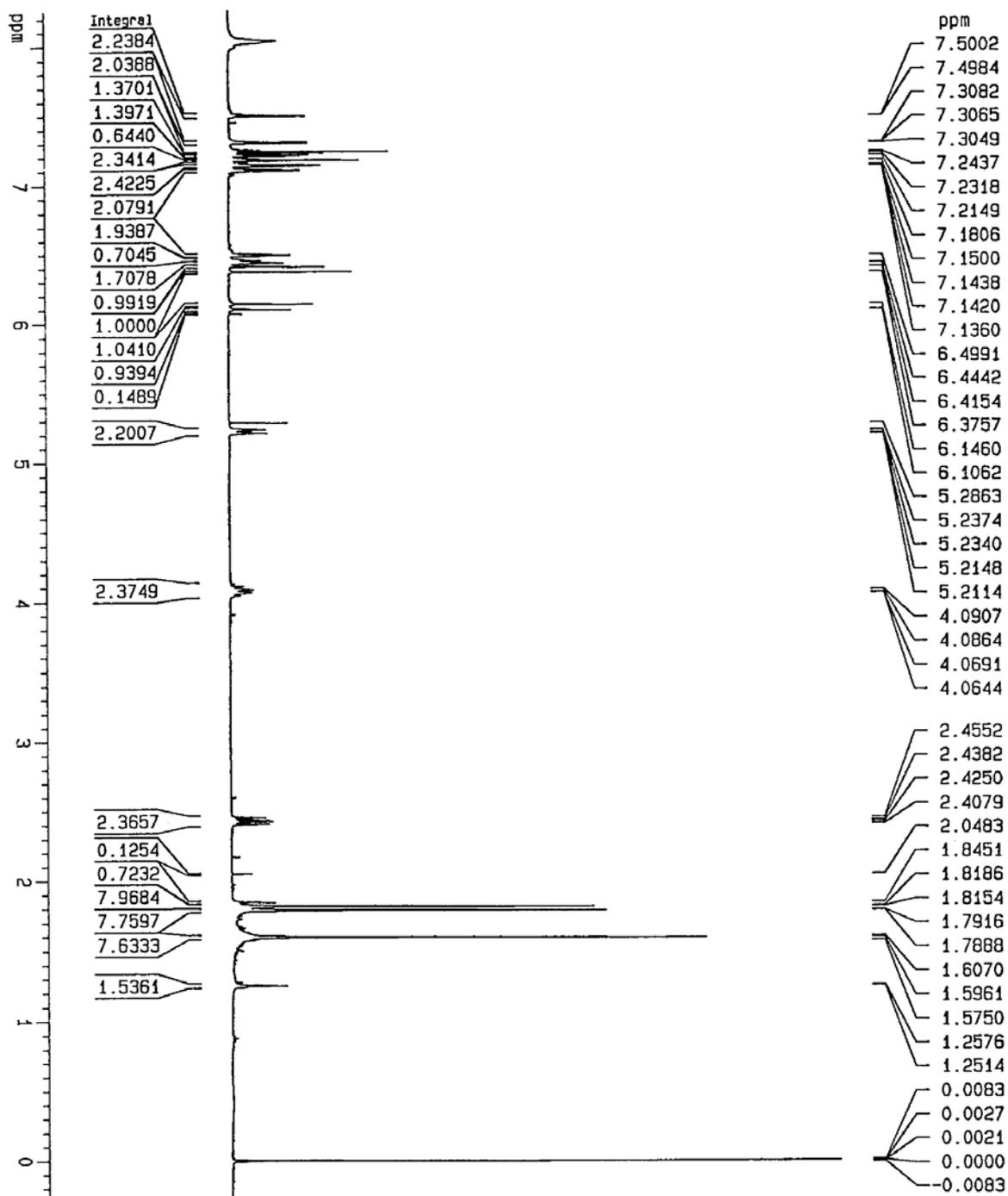


FIGURA 4.45. Proposta de rearranjo para explicar  $m/z$  130.

TABELA 4.2. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RH-3 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/ C/ N	RH-3	Literatura*		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	132,4	-	133,2
2	5,22 dt ( $J = 9,0$ Hz)	128,5	5,52 sl	125,0
3	4,08 m	40,7	3,36 m	53,4
4	1,82 s e 2,43 dd ( $J = 6,8$ e 12,1 Hz)	50,0	-	38,2
5	-	48,5	1,55 m e 1,85 m	33,6
6	6,40 d ( $J = 15,9$ Hz)	136,0	2,10 m e 2,25 m	27,9
7	6,13 d ( $J = 15,9$ Hz)	126,8	6,12 d (16,3)	135,2
8	1,82 s	25,9	6,23 d (16,3)	127,0
9	1,79 s	18,3	1,81 s	23,5
10	1,59 s	27,1	1,20 s	25,5
1'	8,00 sl	-	8,01 sl	-
2'	7,14 dd ( $J = 2,5$ e 3,2 Hz)	123,8	7,14 sl	124,2
3'	6,50 ddd ( $J = 1,0, 2,5$ e 3,2 Hz)	102,3	6,45 ml	102,7
3'a	-	127,3	-	127,4
4'	7,30 t ( $J = 0,7$ Hz)	115,4	7,45 s	121,7
5'	-	139,4	-	134,6
6'	-	144,3	7,02 dd ( $J = 8,4$ e 1,5 Hz)	125,0
7'	7,18 s	105,8	7,23 d ( $J = 8,4$ Hz)	109,6
7'a	-	135,5	-	134,9
1''	8,04 sl	-	8,01 sl	-
2''	7,11 dd ( $J = 2,5$ e 3,0 Hz)	124,4	7,14 sl	123,8
3''	6,44 ddd ( $J = 1,0, 2,5,$ e 3,0 Hz)	102,7	6,49 ml	102,5
3''a	-	128,0	-	128,0
4''	7,50 d ( $J = 0,7$ Hz)	118,7	7,41 s	118,3
5''	-	129,8	-	130,9
6''	7,23 d ( $J = 8,4$ Hz)	120,4	7,07 dd ( $J = 8,5$ e 1,5 Hz)	120,6
7''	7,22 d ( $J = 8,4$ Hz)	110,9	7,22 d ( $J = 8,5$ Hz)	110,7
7''a	-	135,1	-	134,4

\*MAKANGARA *et al.*, (2004), Solvente: NÃO CITADO

FIGURA 4.46. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

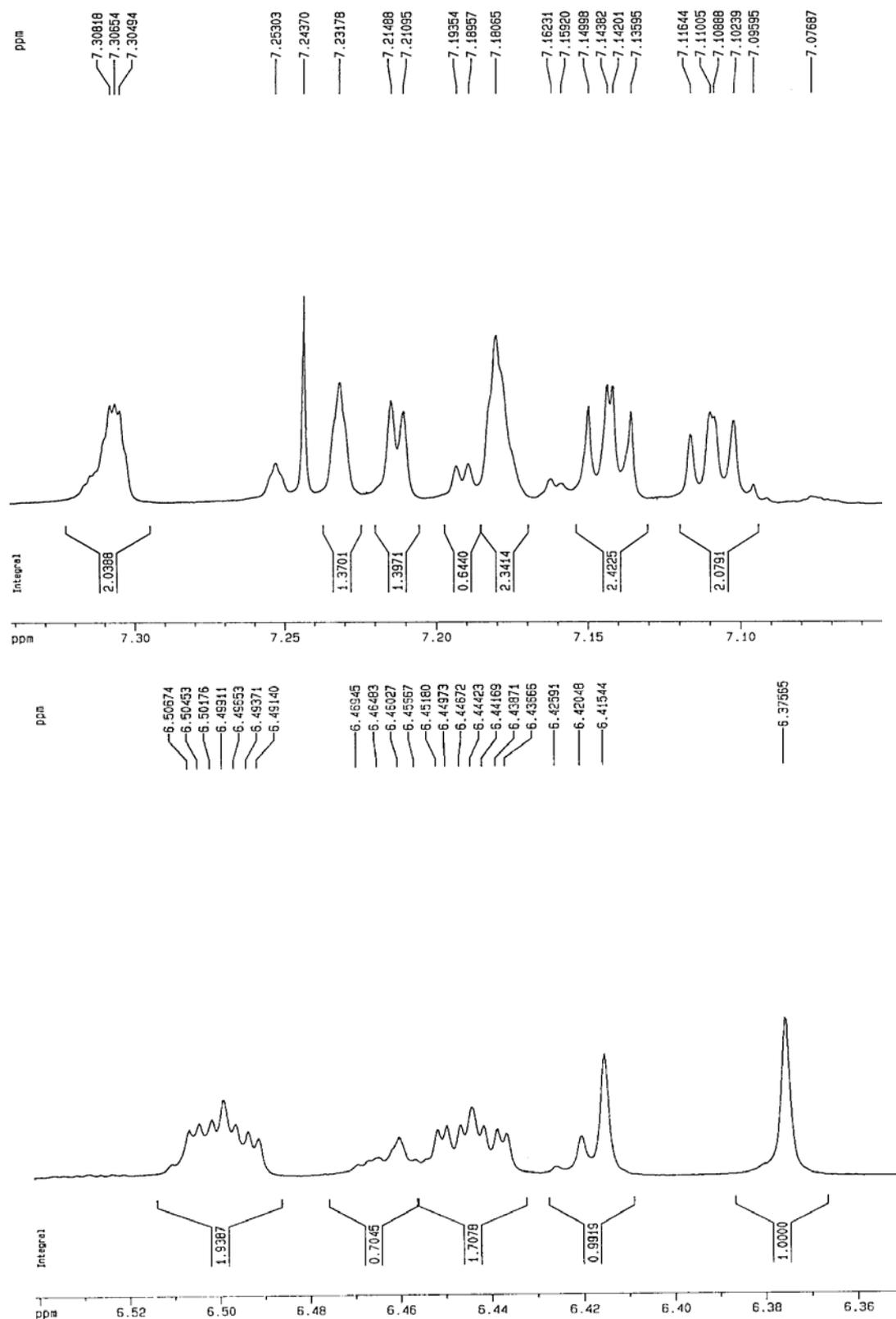


FIGURA 4.46a. Espectro de RMN <sup>1</sup>H ampliado da substância RH-3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

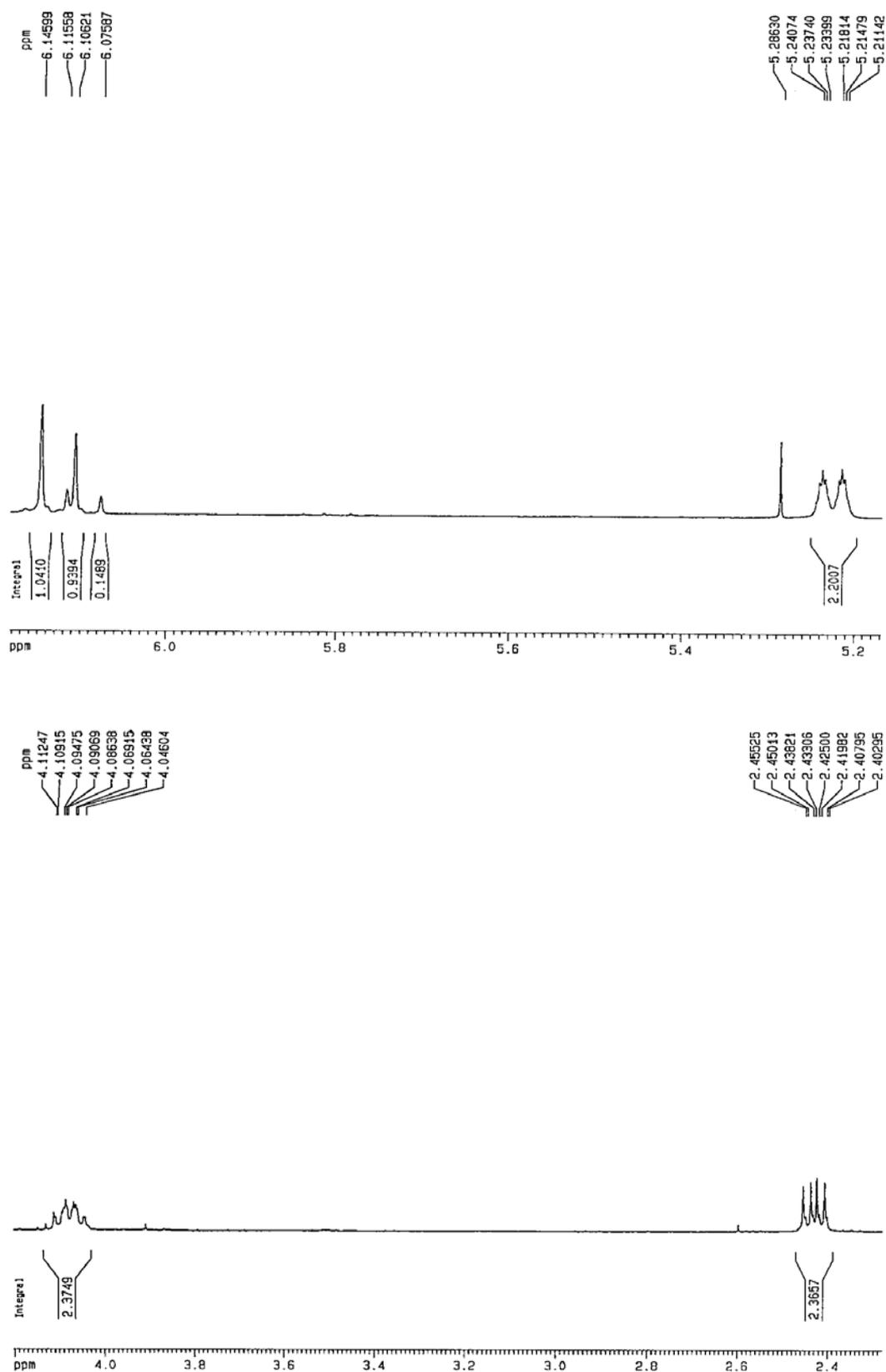


FIGURA 4.46b. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

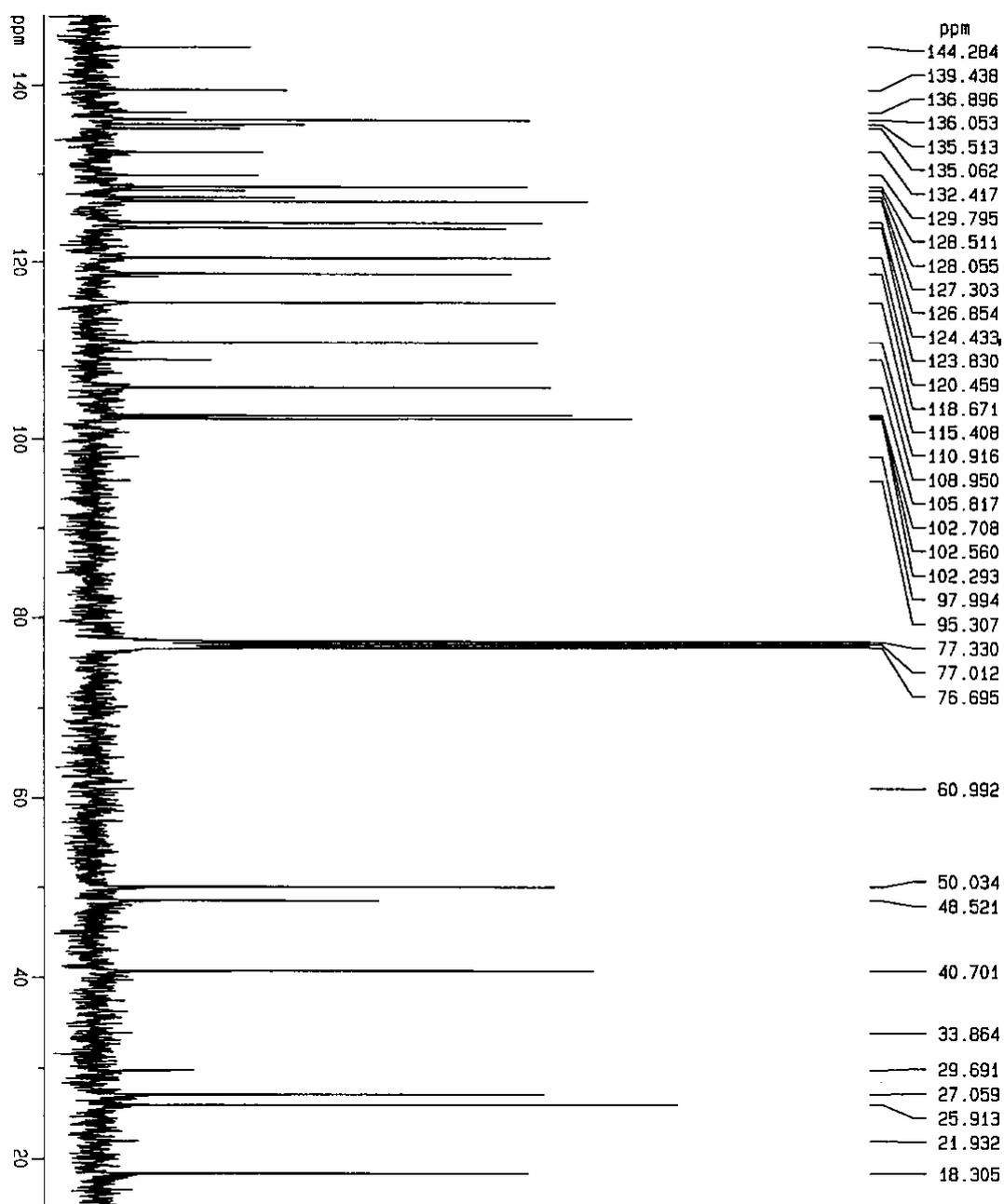


FIGURA 4.47. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

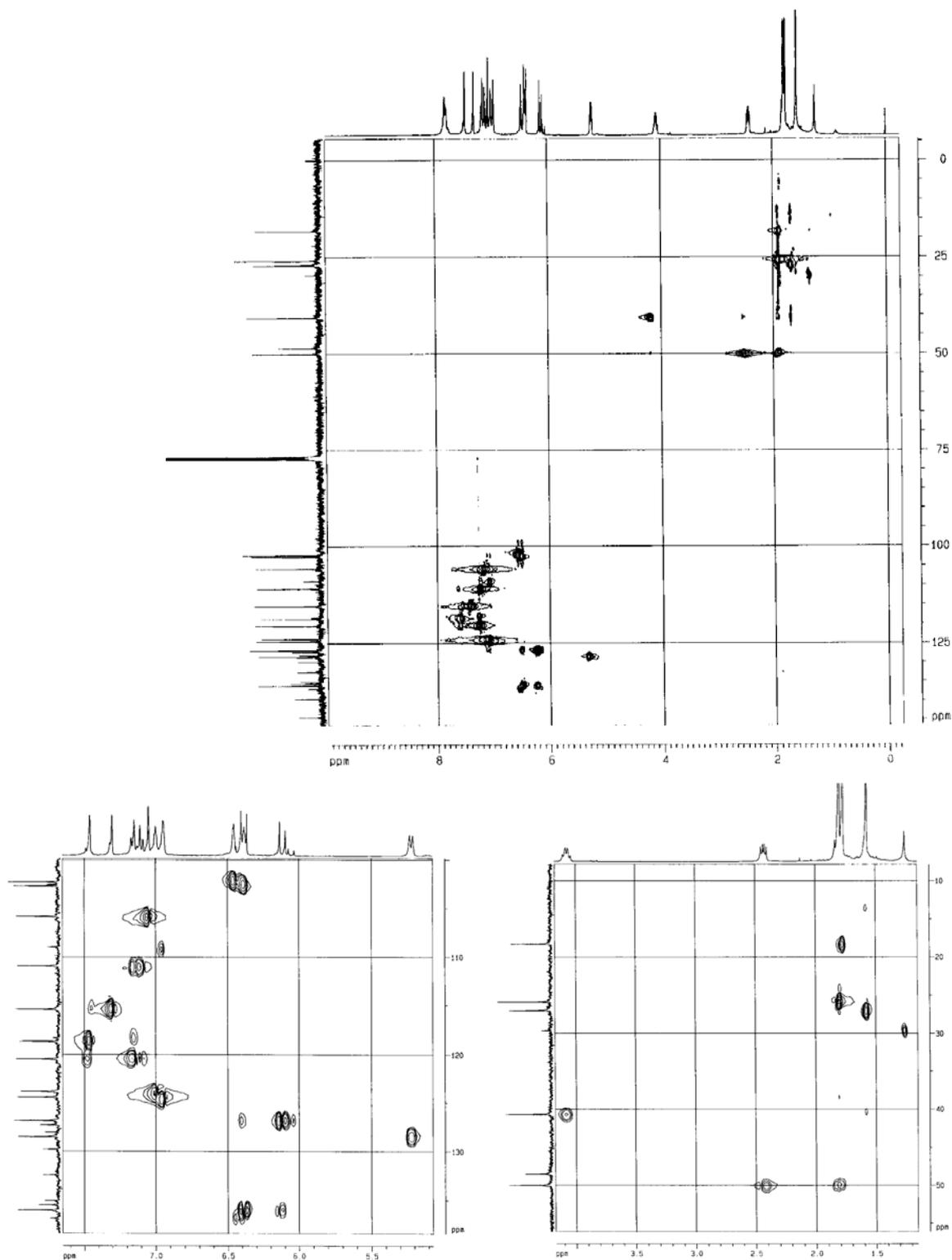


FIGURA 4.48. Experimento de HSQC e ampliações da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

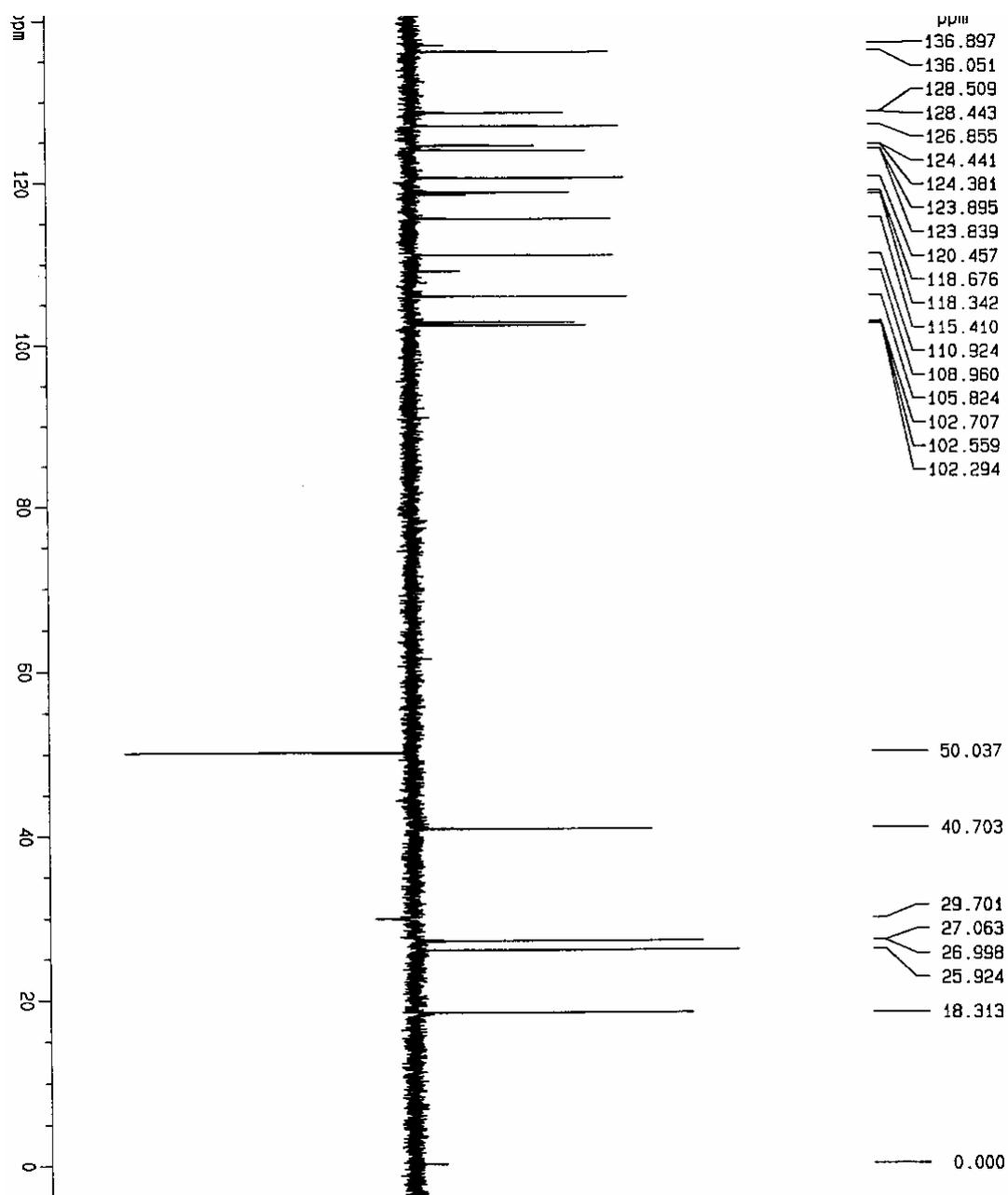


FIGURA 4.49. Espectro de DEPT 135° da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

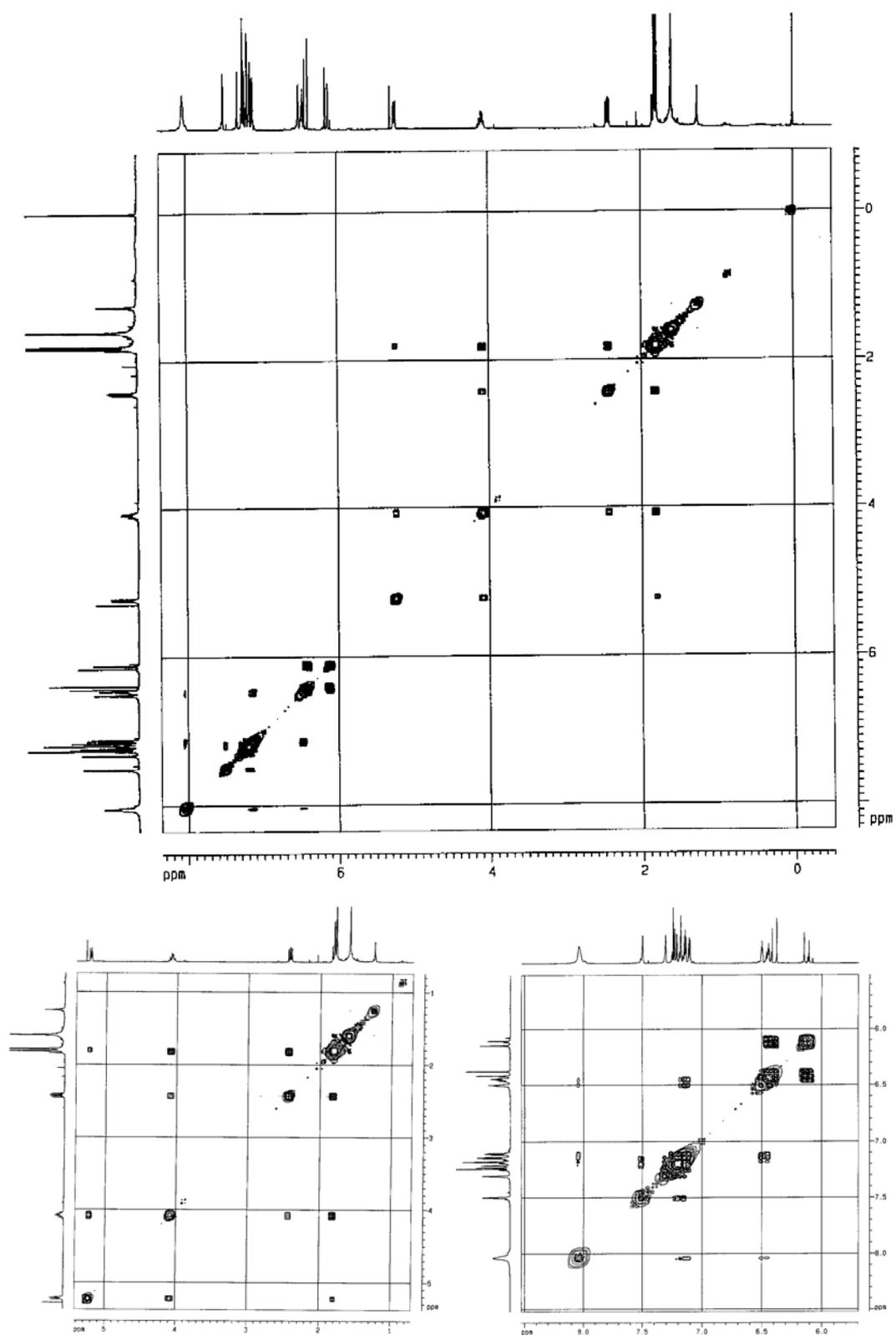


FIGURA 4.50. Experimento de COSY e ampliações da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

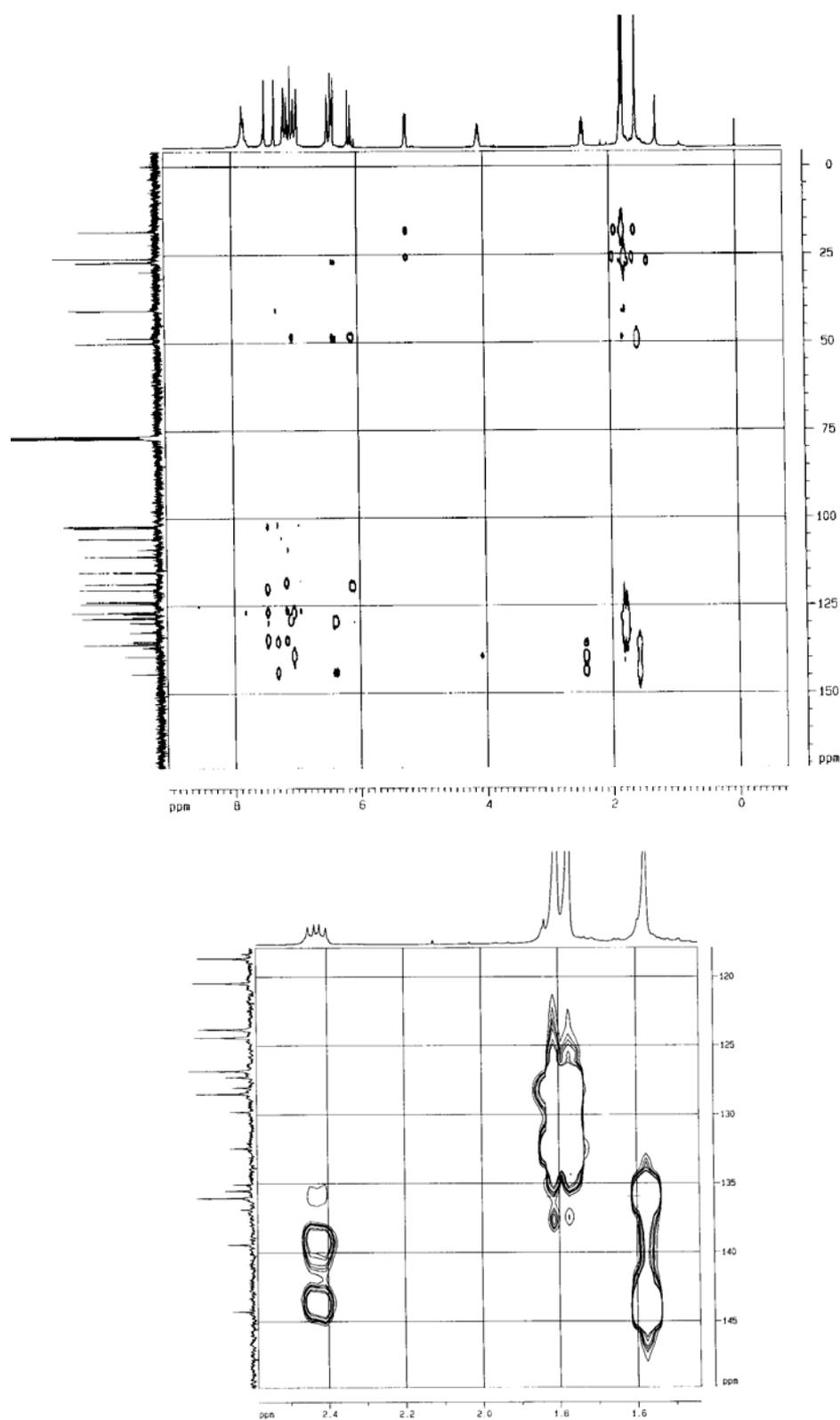


FIGURA 4.51. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

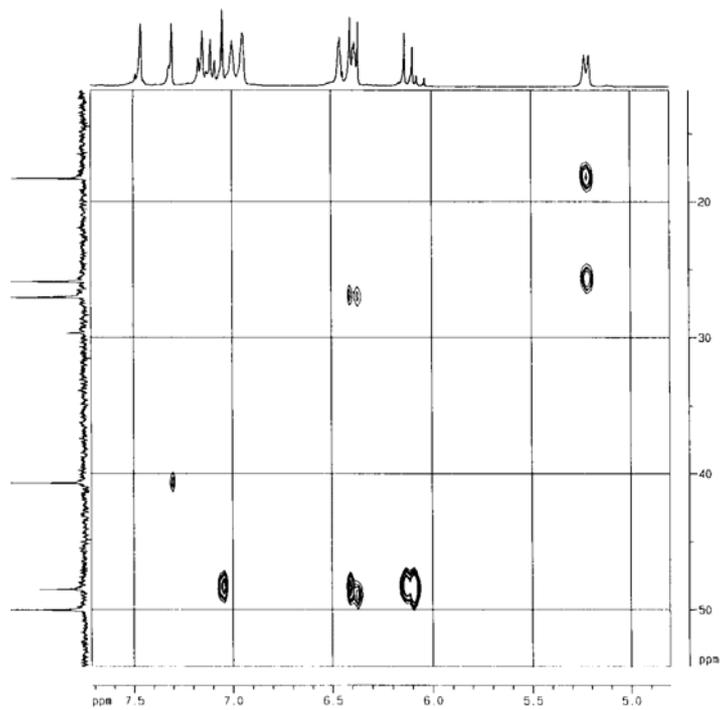
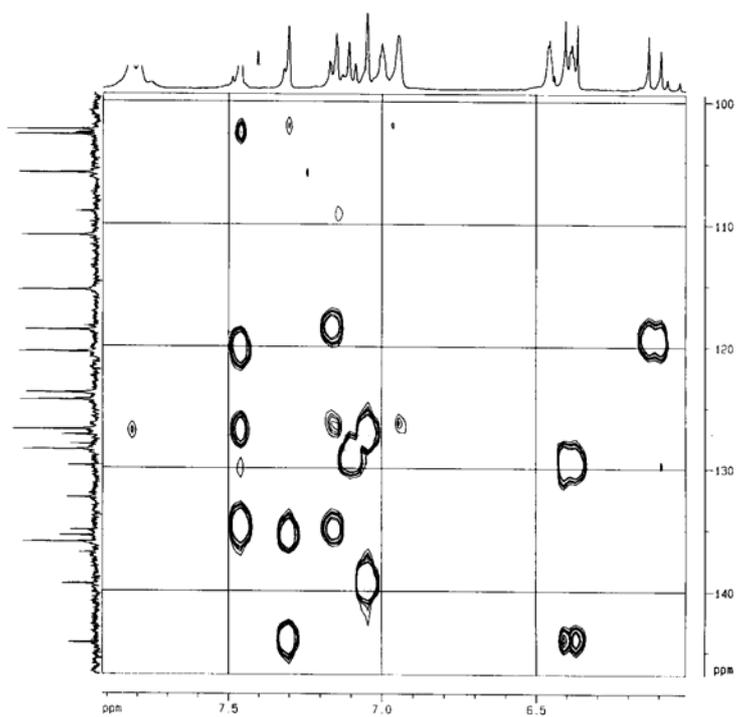


FIGURA 4.51a. Ampliações do experimento de HMBC da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

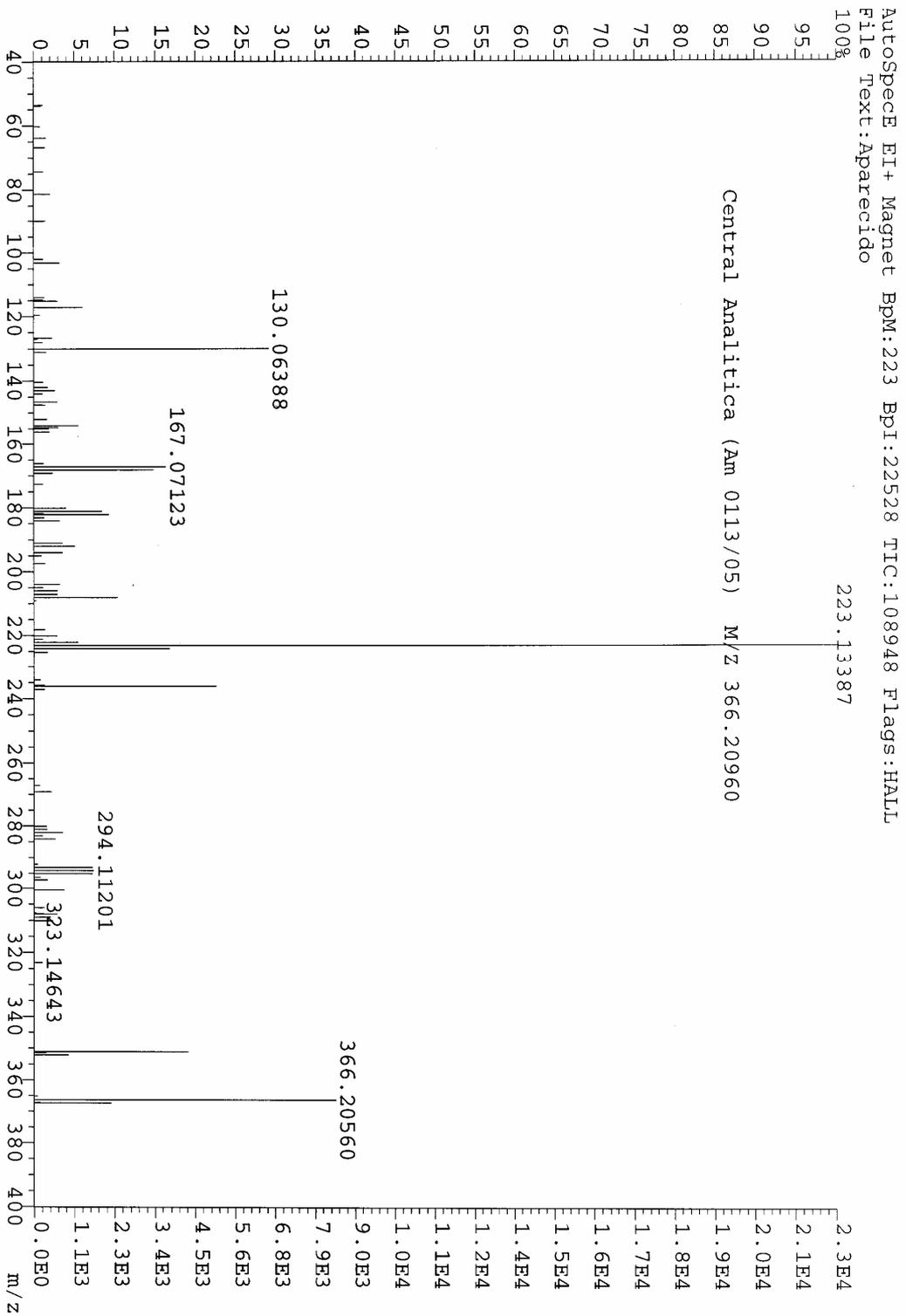


FIGURA 4.52. Espectro de massas de alta resolução substância RH-3 (EI+).

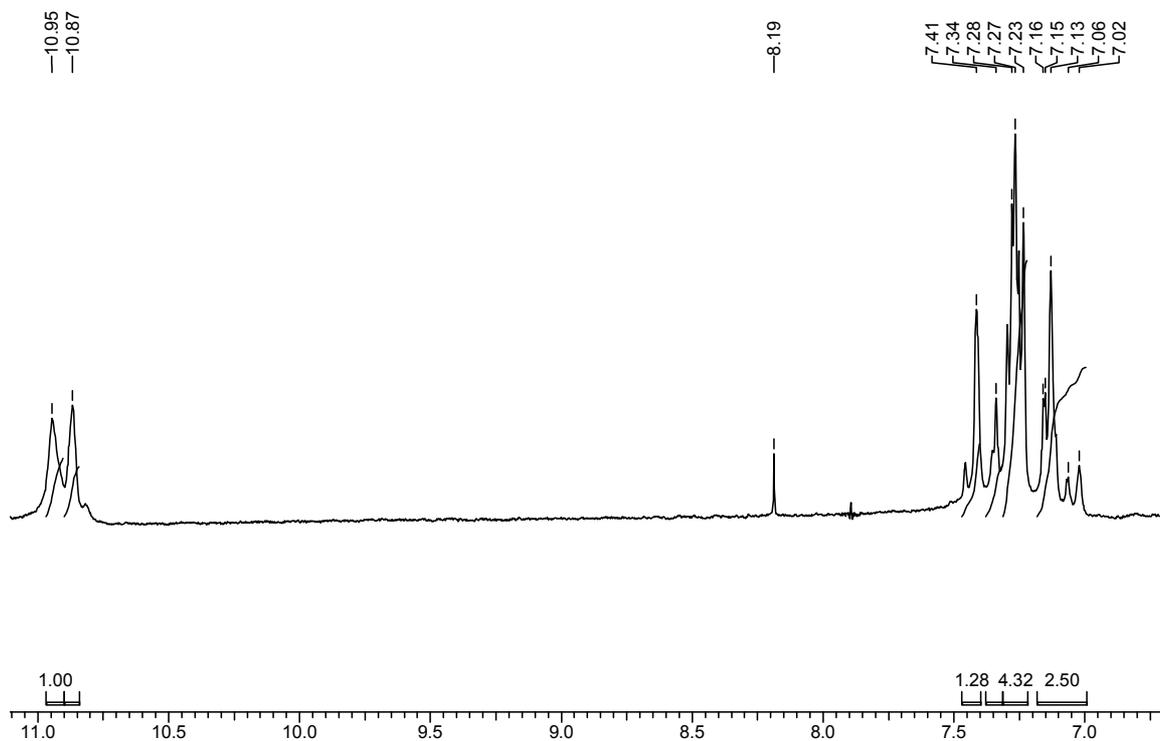
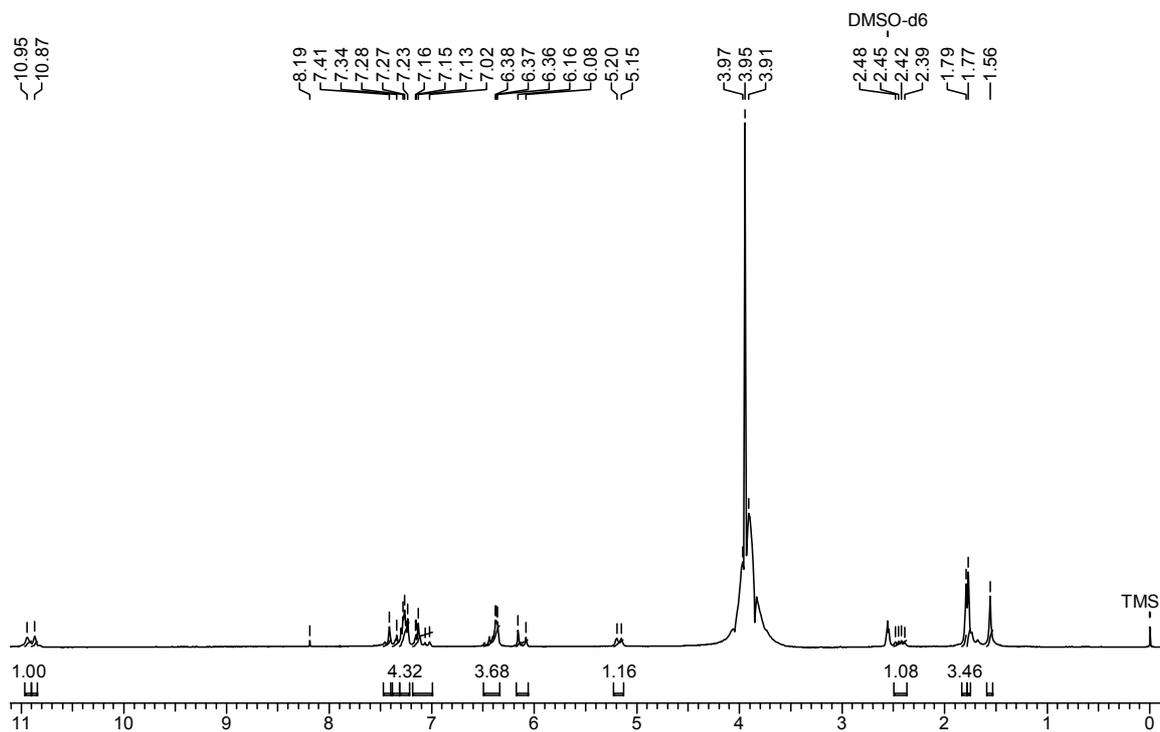


FIGURA 4.53. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e ampliação da substância RH-3 (200 MHz, DMSO).

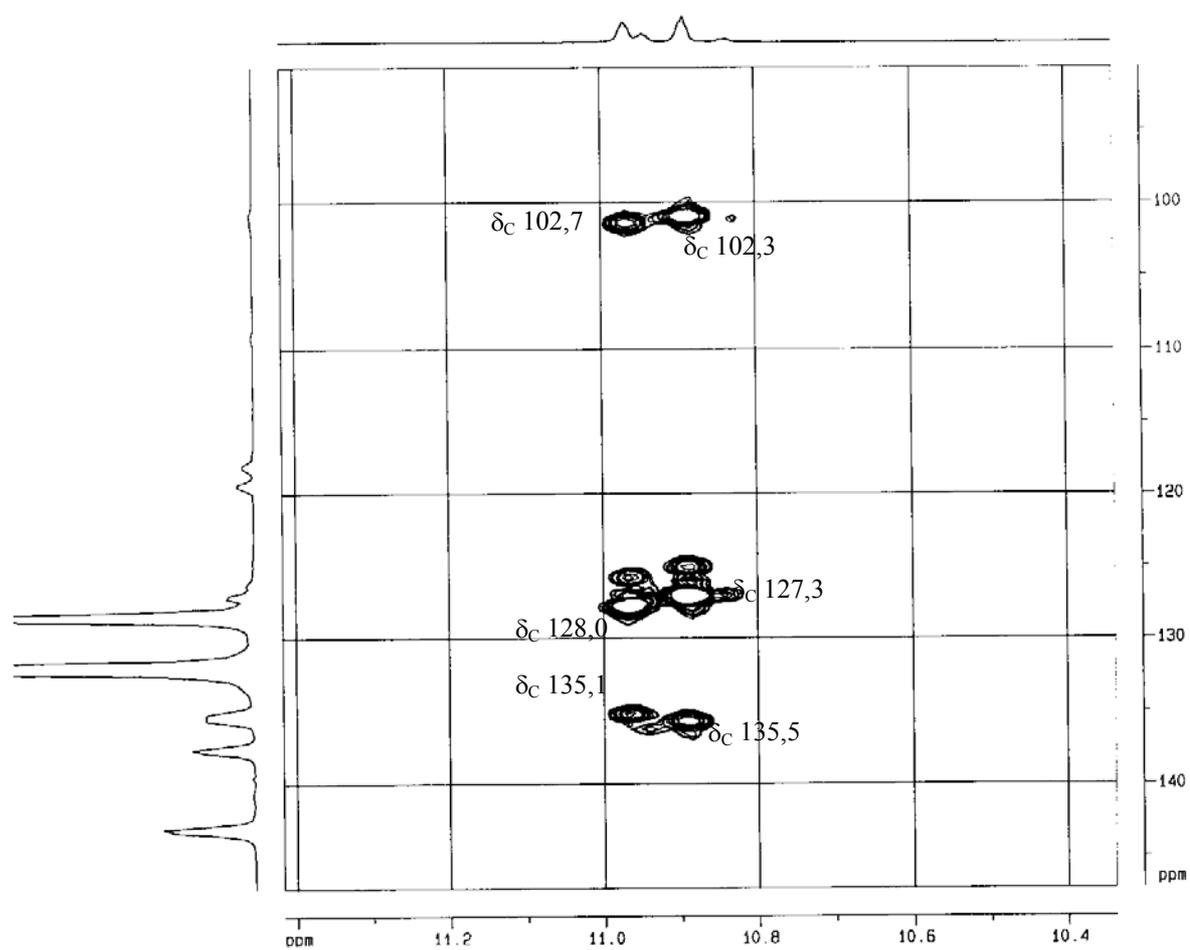


FIGURA 4.54. Experimento de HMBC da substância RH-3 (400 MHz, DMSO).

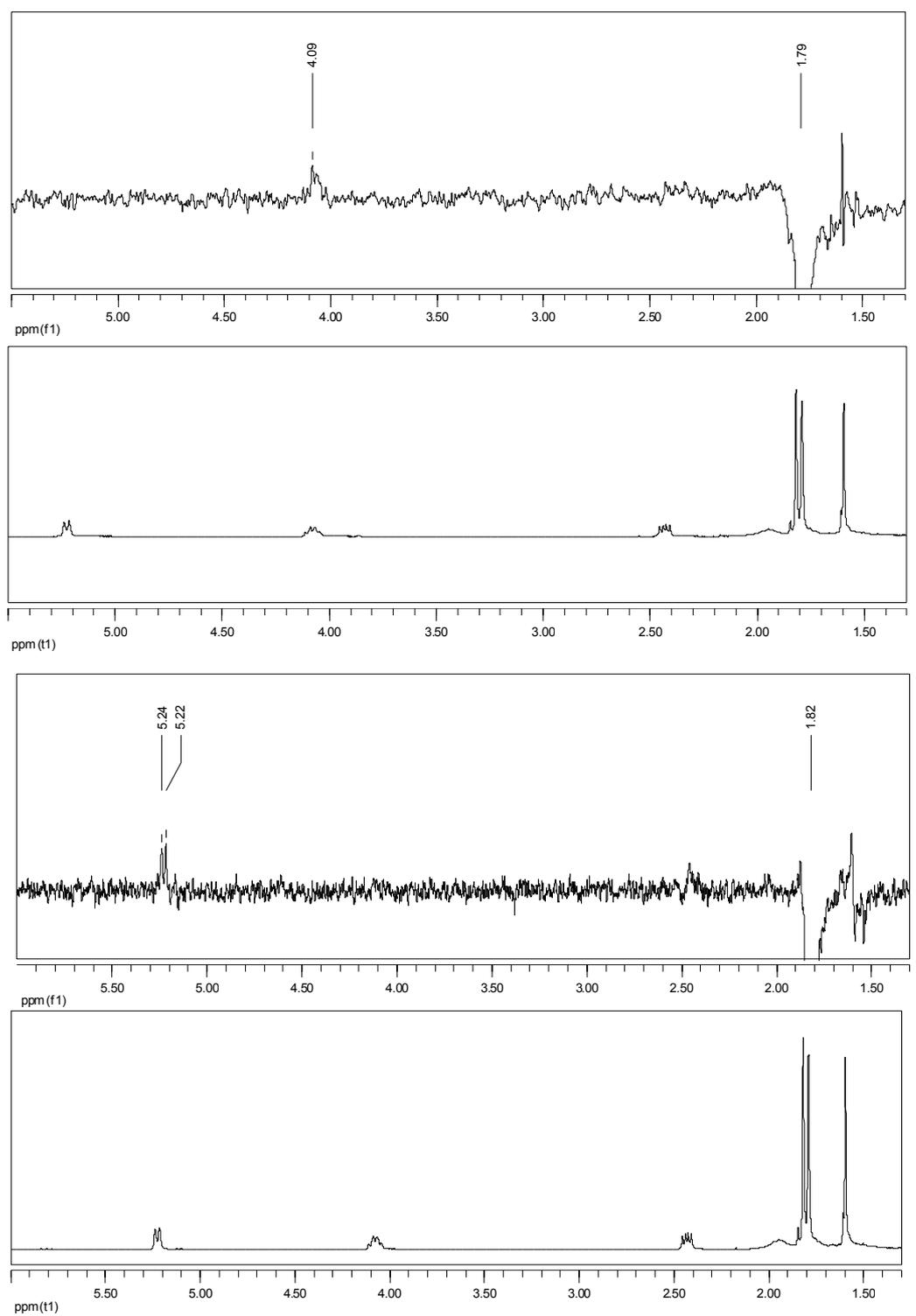
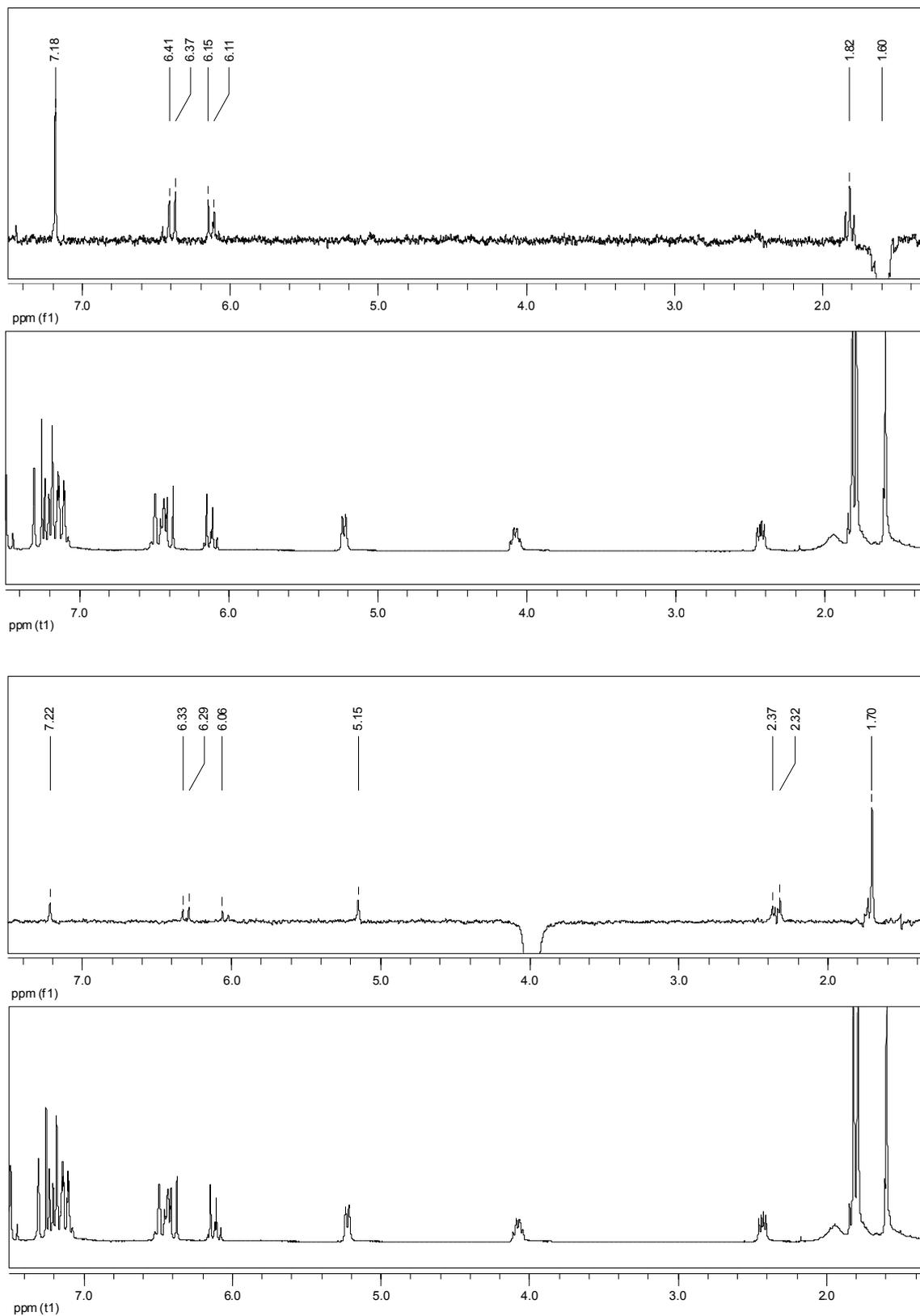


FIGURA 4.55. Experimento de gNOESY da substância RH-3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

FIGURA 4.55a. Experimento de g-NOESY da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

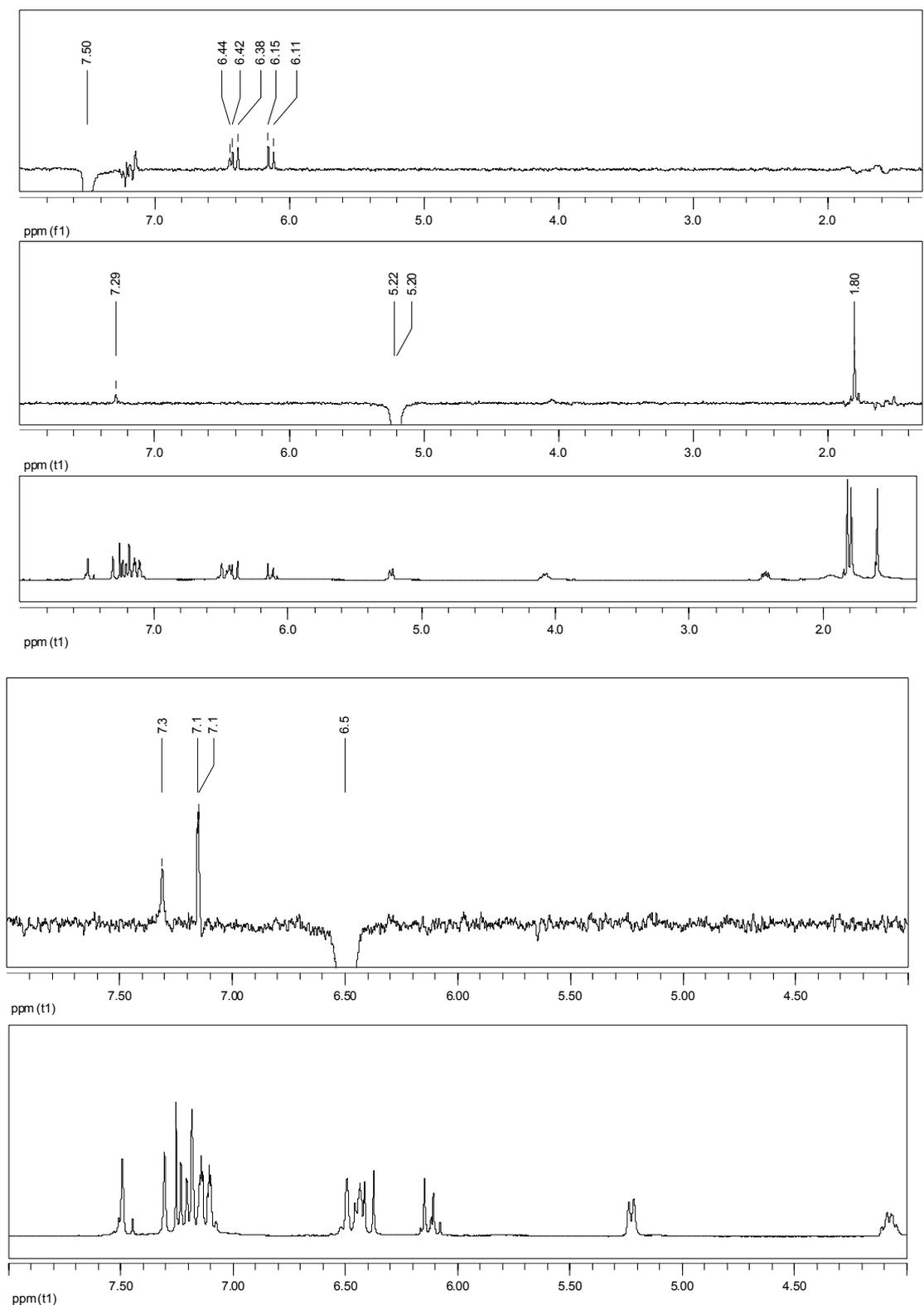


FIGURA 4.55b. Experimento de gNOESY da substância RH-3 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.5. Identificação da substância RH-4

A substância RH-4 foi isolada como cristal branco dos extratos hexano e diclorometano da raiz de *R. praetermissa*. Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.61) mostrou sinais referentes à hidrogênios característicos de anel cromeno em  $\delta$  6,48 d ( $J = 9,8$  Hz) e  $\delta$  5,47 d ( $J = 9,8$  Hz), e outro sinal singlete em  $\delta$  6,18. Apresentou também três metoxilas em  $\delta$  3,75,  $\delta$  3,71 e  $\delta$  3,68. Foi verificada a presença de sinais de hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,88-2,47 e metílicos em  $\delta$  1,41 s. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.62) mostrou sinais de 16 carbonos, sendo em  $\delta$  76,0,  $\delta$  62,3,  $\delta$  55,5 e  $\delta$  51,4 sinais de carbonos oxigenados e outro sinal em  $\delta$  174,0 provavelmente de carboxila de éster.

O sinal do hidrogênio (Figura 4.61, Tabela 4.3) em  $\delta$  6,48 d ( $J = 9,8$  Hz) que via HSQC (Figura 4.63) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  117,3, apresentou no experimento de COSY (Figura 4.64) acoplamento com  $\delta$  5,47 d ( $J = 9,8$  Hz;  $\delta$  127,1). No experimento de HMBC (Figura 4.65) foi observado o sinal em  $\delta$  6,48 correlacionando com  $\delta$  76,0,  $\delta$  155,1 e  $\delta$  153,0, e o sinal em  $\delta$  5,47, correlacionando com  $\delta$  76,0,  $\delta$  107,7 e  $\delta$  27,7. O sinal do carbono em  $\delta$  27,1 (dois carbonos coalecendo) apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  1,41 (integrado para seis hidrogênios) que sugeriu a presença de duas metilas. No experimento de HMBC, as metilas em  $\delta$  1,41 apresentaram correlações com  $\delta$  27,7,  $\delta$  76,0 e  $\delta$  127,1. As correlações são mostradas na figura 4.56.

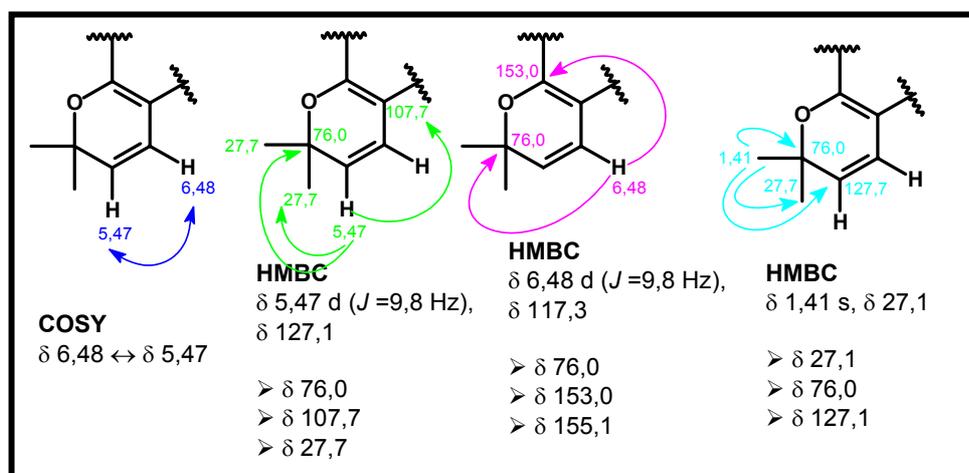


FIGURA 4.56. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,47,  $\delta$  6,48 e  $\delta$  1,41.

O sinal em  $\delta$  6,18 s ( $\delta$  95,9) mostrou correlação com  $\delta$  107,7,  $\delta$  113,4,  $\delta$  153,0 e  $\delta$  158,8. O carbono em  $\delta$  158,8 no experimento de HMBC (Figura 4.57, Figura 4.65) mostrou ainda correlação com os hidrogênios em  $\delta$  3,75 s (OMe) e  $\delta$  2,86 t ( $J = 8,5$  Hz, CH<sub>2</sub>). O sinal em  $\delta$  3,75 ( $\delta$  55,5) foi atribuído MeO-6' e o carbono em  $\delta$  158,8 foi atribuído ao C-6', conforme visto na figura 4.57.

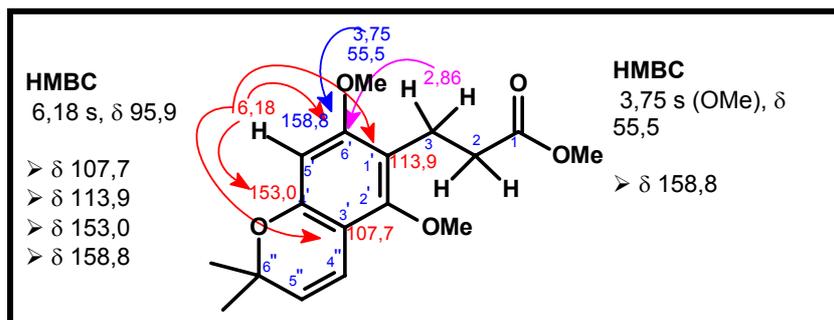


FIGURA 4.57. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,18 (H-5') e  $\delta$  3,75 (MeO-6').

O sinal em  $\delta$  2,86 t ( $J = 8,5$  Hz) que via HSQC (Figura 4.63) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  19,0, mostrou no experimento de COSY (Figura 4.64) acoplamento com  $\delta$  2,50 t ( $J = 8,5$  Hz,  $\delta$  34,0). No HMBC (Figura 4.58, Figura 4.65), verificou-se a correlação de  $\delta$  2,86 com  $\delta$  34,0,  $\delta$  113,9,  $\delta$  155,1,  $\delta$  158,8 e  $\delta$  174,0; e de  $\delta$  2,50 com  $\delta$  19,0,  $\delta$  113,9 e  $\delta$  174,0, conforme figura 4.58.

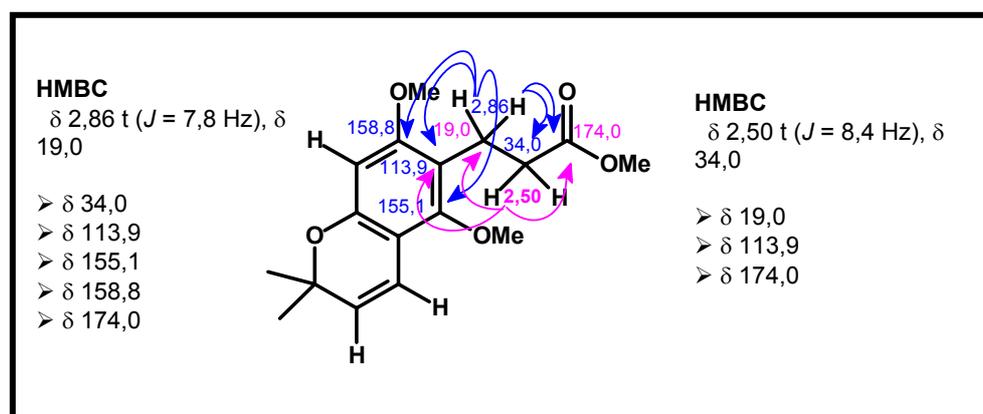


FIGURA 4.58. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,86 (H-3) e  $\delta$  2,50 (H-2).

O sinal em  $\delta$  3,68 s ( $\delta$  51,4), atribuído a um grupo carbometoxi, apresentou via HMBC (Figura 4.59 e Figura 4.65) correlação com  $\delta$  174,0 (C-1).

Outra metoxila em  $\delta$  3,71 s apareceu ligada ao carbono em  $\delta$  62,3 via experimento de HSQC. Esta foi atribuída a MeO-2' devido a correlação com  $\delta$  155,1 (C-2'). Este último sinal de carbono também apresentou correlações com os hidrogênios em  $\delta$  6,48 e  $\delta$  2,86, estas duas últimas correlações confirmaram sua atribuição ao C-2' (Figura 4.59).

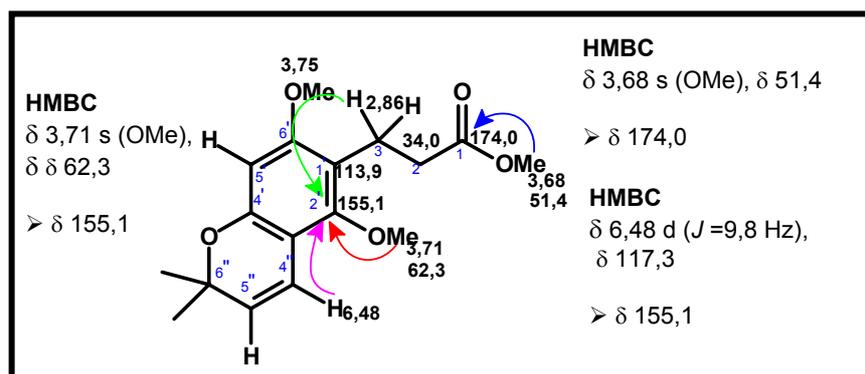


FIGURA 4.59. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  3,68,  $\delta$  3,71 (MeO-2') e  $\delta$  6,48 (H-4'').

Com os resultados obtidos pelos experimentos de RMN 1D e 2D e comparação com a literatura (VIEIRA *et al.*, 1980), foi verificado que a substância RH-4 (Figura 4.60) é o conhecido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4') fenil] propionato de metila, registrado no *Chemical Abstract* com o número 57601-63-5. Esta substância foi isolada recentemente dos gêneros *Adiscanthus* (ROCHA, 2004) e *Hortia* (SUAREZ *et al.*, 2002).

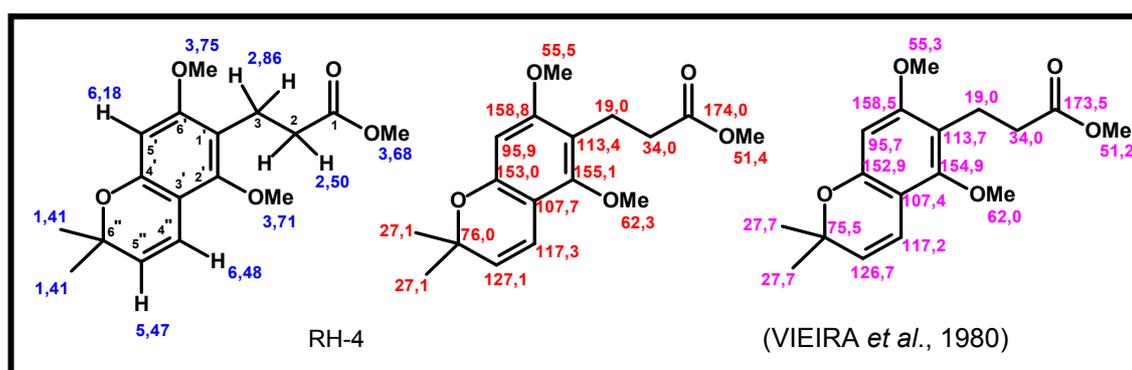


FIGURA 4.60. Comparação dos deslocamentos da substância RH-4 com a literatura.

TABELA 4.3. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RH-4 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 e 200 MHz ( $^{13}\text{C}$ )).

H/C	RH-4		Literatura*	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
MeO-1	3,68 s	51,4		51,2
1		174,0		173,5
2	2,50 t ( $J = 8,5$ Hz)	34,0		34,0
3	2,86 t ( $J = 8,5$ Hz)	19,0		19,0
1'		113,9		113,7
2'		155,1		154,9
MeO-2'	3,71 s	62,3		62,0
3'		107,7		107,4
4'		153,0		152,9
5'	6,18 s	95,9	6,18	95,7
6'		158,8		158,5
MeO-6'	3,75 s	55,5		55,3
4''	6,48 d ( $J = 9,8$ Hz)	117,3	6,48	117,2
5''	5,47 d ( $J = 9,8$ Hz)	127,1	5,45	126,7
6''		76,0		75,5
2Me-6''	1,41s	27,1	1,38	27,7

\*VIEIRA *et al.*, (1980), Solvente: não informado

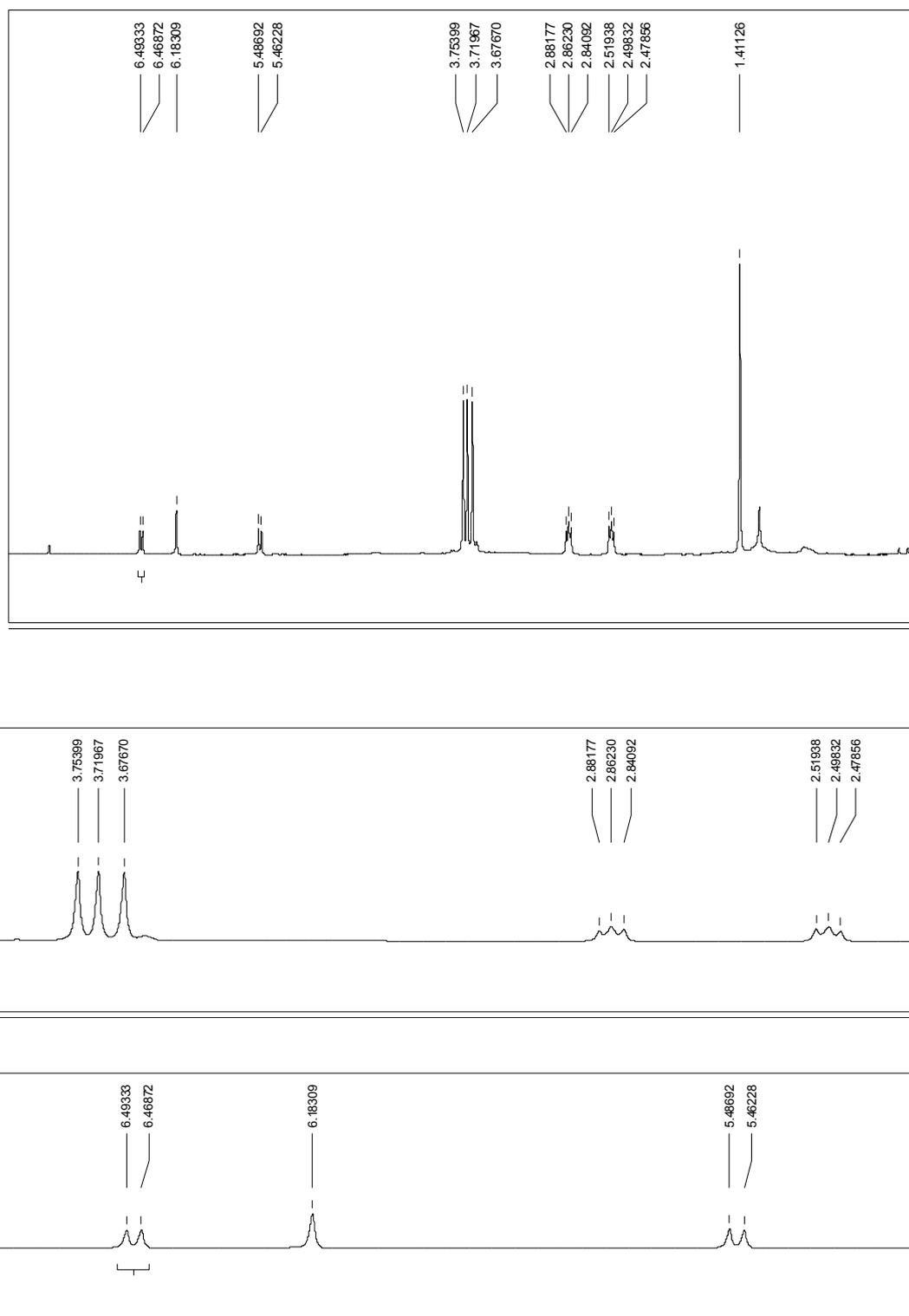
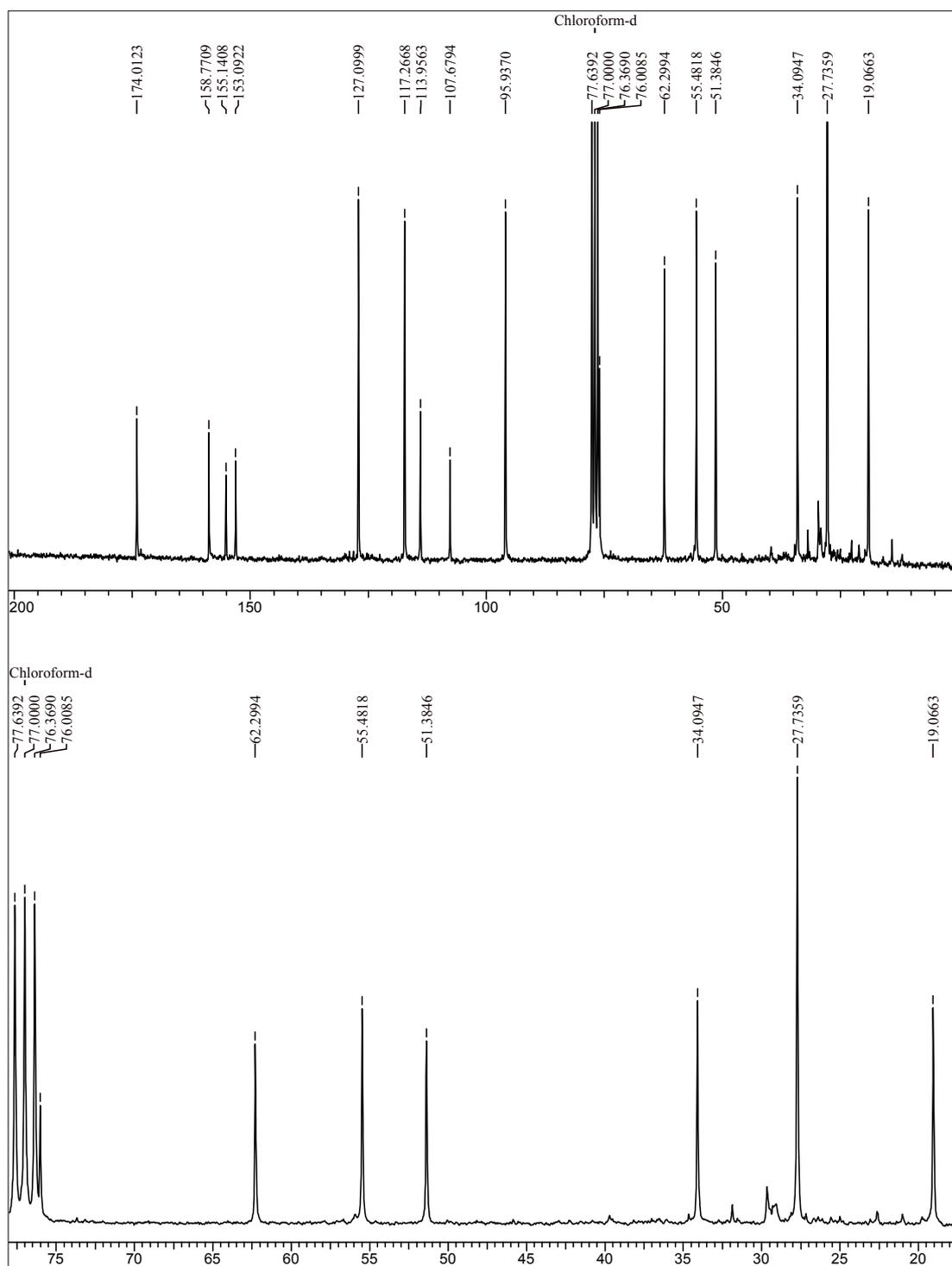


FIGURA 4.61. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância RH-4 e ampliações (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.62. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Substância RH-4 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

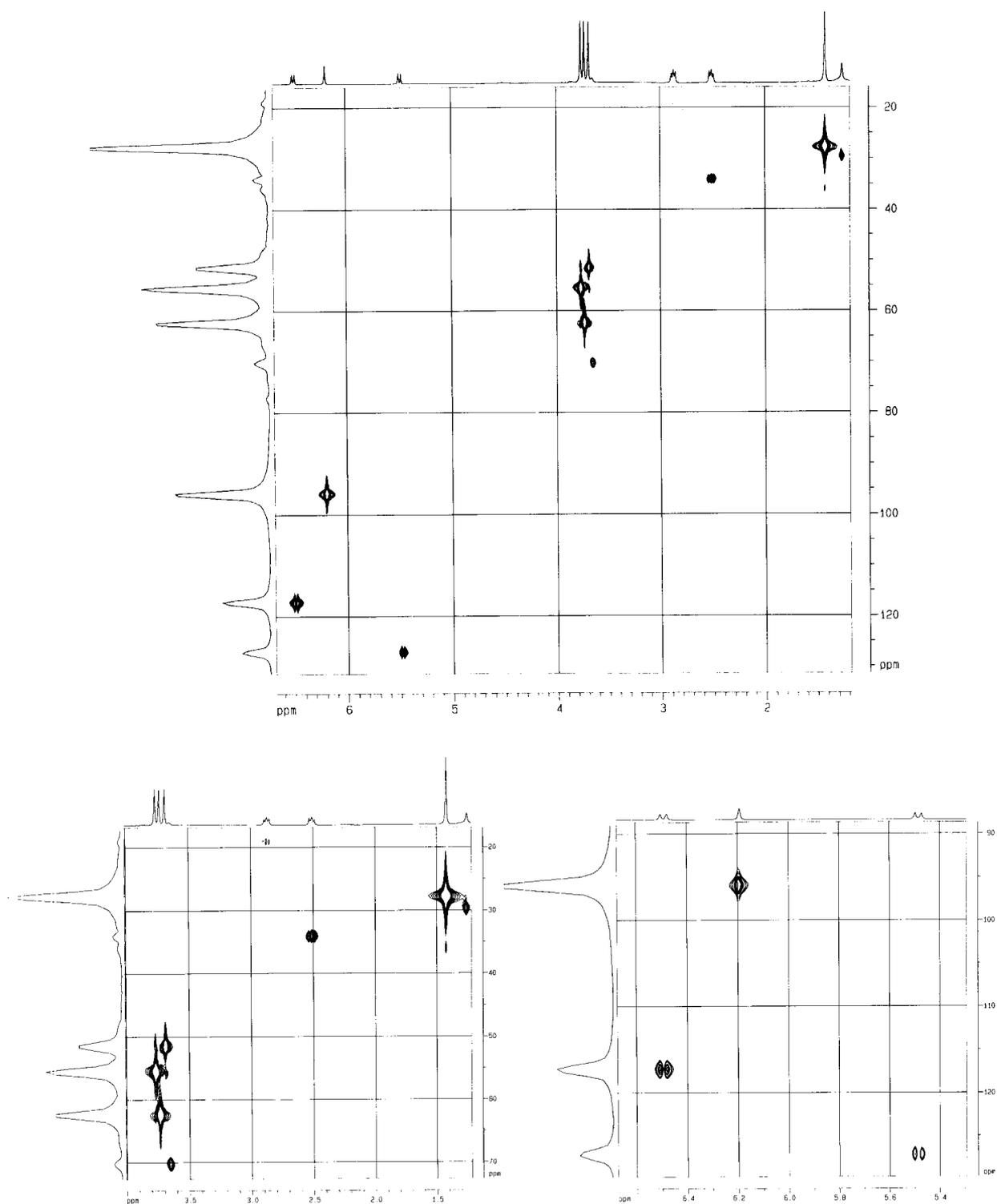


FIGURA 4.63. Experimento de HSQC e ampliações da substância RH-4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

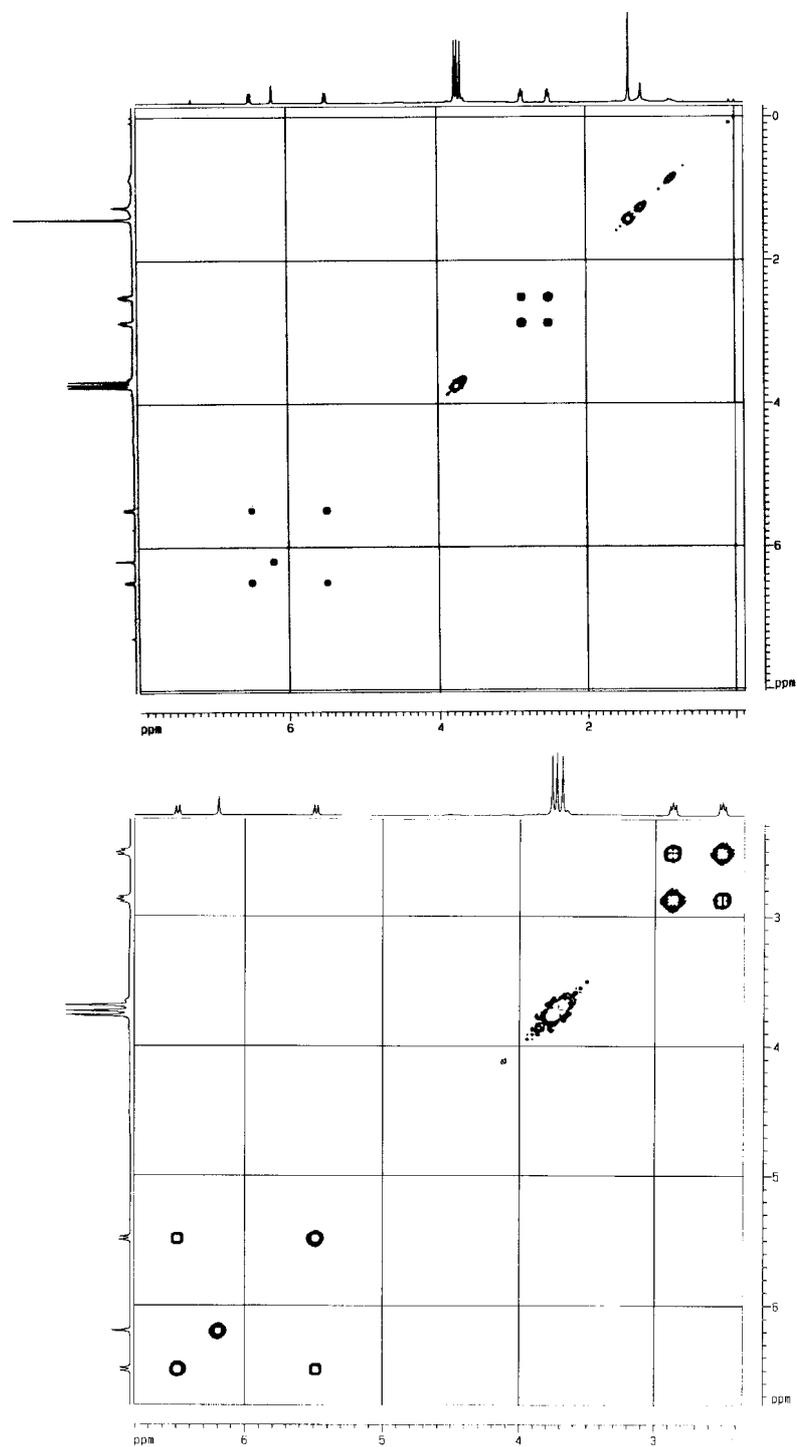


FIGURA 4.64. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

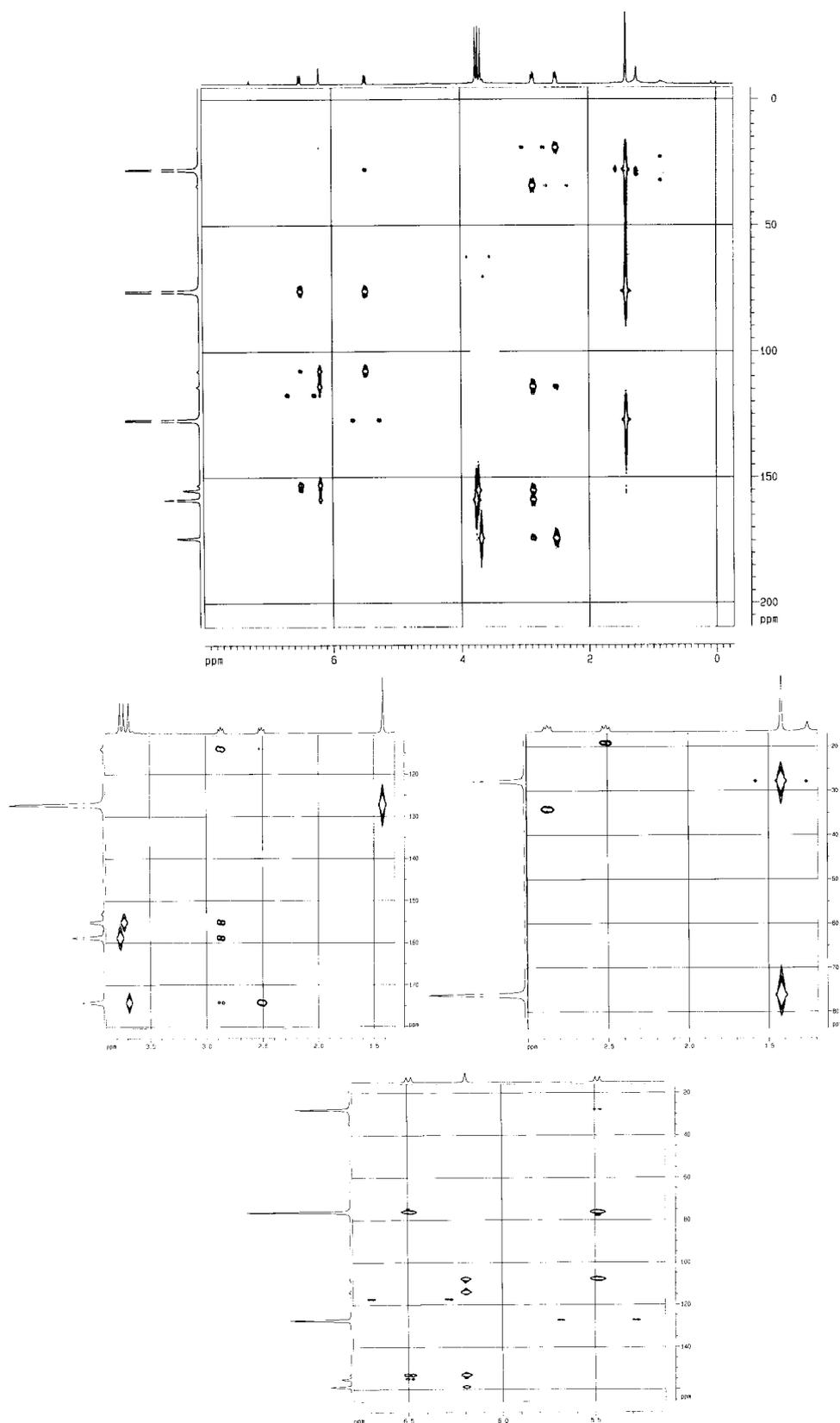


FIGURA 4.65. Experimento de HMBC e ampliações da substância RH-4 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.6. Identificação da substância RH-5

A substância RH-5 foi isolada dos extratos hexano e diclorometano, em pequenas quantidades como um óleo amarelo. O espectro de hidrogênio (Figura 4.76, Tabela 4.4) mostrou sinal em  $\delta$  6,88 sl de hidrogênio olefínico, sinais de quatro metilas em  $\delta$  0,85 d ( $J = 6,9$  Hz),  $\delta$  0,98 d ( $J = 6,9$  Hz),  $\delta$  1,19 s e  $\delta$  1,78 dl ( $J = 1,5$  Hz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.77, Tabela 4.4) foi observado sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  146,9 e  $\delta$  135,0, sinal de carbonila em  $\delta$  200,5 e outro de carbono carbinólico em  $\delta$  70,0. O total de carbonos apresentados pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  foi de 15 carbonos.

O sinal de um hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,88 sl (Figura 4.76, Tabela 4.4), via HSQC (Figura 4.78), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  146,9; o mesmo hidrogênio apresentou, no experimento de COSY (Figura 4.79), acoplamento com outro sinal em  $\delta$  1,78 dl ( $J = 1,5$  Hz); no experimento de HMBC (Figura 4.80) mostrou correlações com  $\delta$  15,7,  $\delta$  49,9 e  $\delta$  200,5, conforme figura 4.66. O hidrogênio em  $\delta$  6,88 foi atribuído ao H-5. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de RH-5 apresentou semelhança com a substância RH-1 identificada como T-cadinol, porém o sinal correspondente ao H-5 da substância RH-5 mostrou sinal desblindado em  $\delta$  6,88 s, indicando que em sua vizinhança estaria a carbonila observada no espectro de carbono (Figura 4.77), isto foi confirmado pela correlação de  $\delta$  6,88 com  $\delta$  200,5 (Figura 4.66), este carbono foi então atribuído ao C-3. Outro sinal que apresentou correlação com H-5 foi o carbono em  $\delta$  49,9 que foi atribuído ao C-1 ( $\delta$  1,70 m).

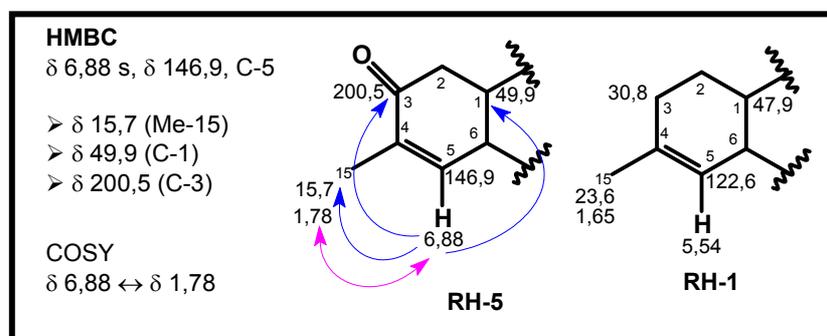


FIGURA 4.66. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,88.

O sinal em  $\delta$  1,78 dl ( $J = 15,7$ , Me) apresentou acoplamento, via COSY (Figura 4.79, Figura 4.67), com  $\delta$  6,88 sl (H-5), sendo atribuído a Me-15; este sinal apresentou ainda correlações com  $\delta$  135,0 (C-4),  $\delta$  146,9 (C-5) e  $\delta$  200,5 (C-3), estas duas últimas correlações confirmam a atribuição a Me-15 (Figura 4.67).

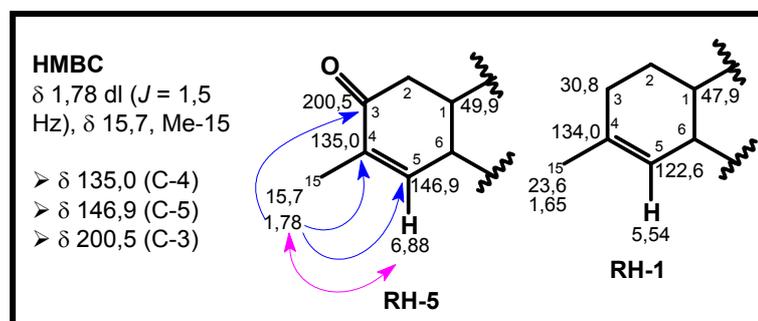


FIGURA 4.67. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,78.

O sinal do carbono em  $\delta$  200,5 mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,39 m que, via HSQC (Figura 4.78), apareceu ligado ao sinal de carbono em  $\delta$  38,8, este hidrogênio, no experimento de COSY (Figura 4.79), mostrou acoplamento com os hidrogênios em  $\delta$  2,60 dd ( $J = 3,5$  e  $16,4$  Hz, H-2) e  $\delta$  1,70 m (H-1); no experimento de HMBC (Figura 4.80) foi observado a correlação de  $\delta$  2,39 com  $\delta$  49,9 (C-1) e  $\delta$  200,5 (C-3), conforme figura 4.68. O sinal em  $\delta$  2,39 apresentou no HSQC (Figura 4.78) uma ligação com outro carbono em  $\delta$  38,4, que foi atribuído ao H-6. Até o momento, fechou-se apenas um anel conforme figura 4.68.

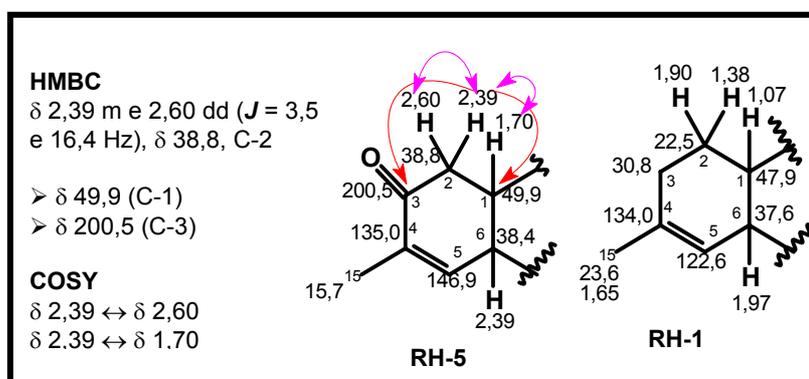


FIGURA 4.68. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,39.

A ausência das correlações de H-1, H-2, H-5 e H-6 com o outro anel, interrompeu a determinação neste ponto da molécula, no entanto, um dos hidrogênios em  $\delta$  2,39 m apresentou, no experimento de COSY (Figura 4.79), correlação com um sinal em  $\delta$  1,16 m. Logo, deduz-se que o deslocamento em  $\delta$  2,39 não poderia ser de H-2, devido a longa distância dele com o H-7 ( $\delta$  1,16), então, como observado na figura 4.69, este acoplamento deve ser de H-6 com H-7.

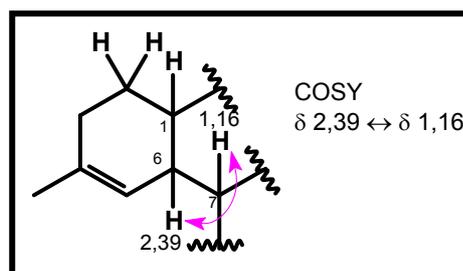


FIGURA 4.69. Acoplamento apresentado no experimento de COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,16.

O sinal da metila em  $\delta$  0,85 d ( $J = 6,9$  Hz) mostrou, no HMBC (Figura 4.80), correlações com os carbonos em  $\delta$  21,2,  $\delta$  26,3 e  $\delta$  44,9 (C-7), devido esta última correlação e comparação com RH-1, atribuiu-se  $\delta$  0,85 ( $\delta$  15,3) a Me-13 (Figura 4.70). O outro sinal de metila em  $\delta$  0,98 ( $\delta$  21,2) mostrou correlação com  $\delta$  15,3 (Me-13),  $\delta$  26,3 e  $\delta$  44,9 (C-7), o sinal em  $\delta$  0,98 foi atribuído a Me-12 (Figura 4.70, Figura 4.80); ambas as Me-12 e 13 mostraram correlação com um sinal em  $\delta$  26,3 ( $\delta$  2,26 m) que só pode ser o C-11.

Com as discussões realizadas acima, pôde-se propor mais uma parte da molécula (Figura 4.70):

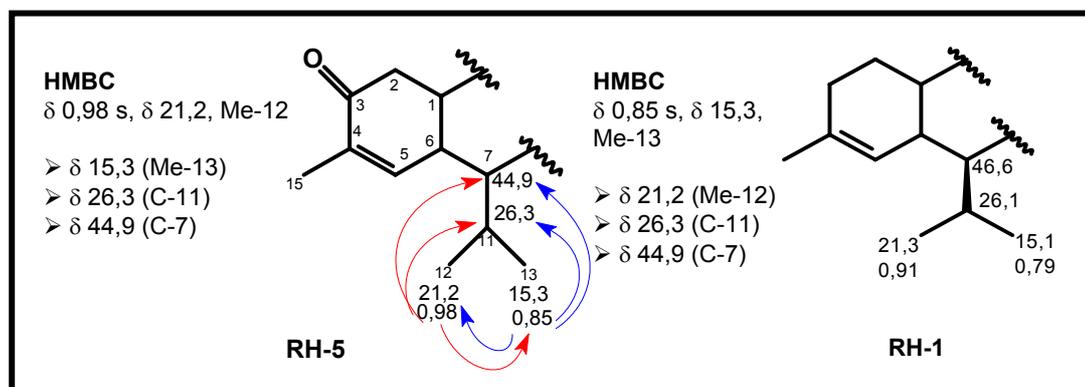


FIGURA 4.70. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios de metilas em  $\delta$  0,98 e  $\delta$  0,85.

O sinal da metila em  $\delta$  1,19 s ( $\delta$  27,9) apresentou, no experimento de HMBC (Figura 4.80), correlações com  $\delta$  39,8,  $\delta$  49,9 (C-1) e  $\delta$  70,0 (C-10). As correlações de  $\delta$  1,19 com C-1 e C-10 sugeriram que esta era a Me-14, pôr conseqüência, o carbono em  $\delta$  39,8 só poderia ser o C-9 que, via HSQC (Figura 4.78), apareceu ligado a dois hidrogênios em  $\delta$  1,46 m e  $\delta$  1,74 m. No COSY (Figura 4.79), confirmou-se o acoplamento entre eles mesmos. No experimento de HMBC (Figura 4.80) somente o sinal em  $\delta$  1,74 apresentou correlação com  $\delta$  44,9 (C-7), conforme figura 4.71.

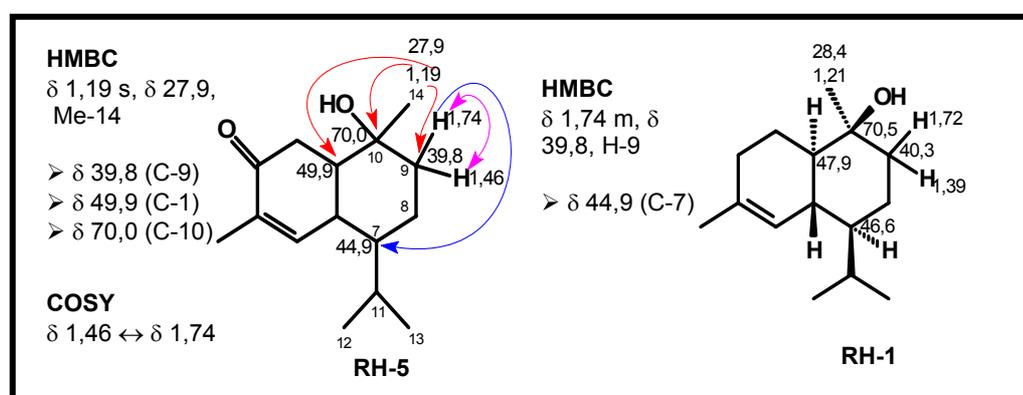


FIGURA 4.71. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,19 e  $\delta$  1,74.

No HSQC (Figura 4.78), verificou-se que o hidrogênio em  $\delta$  1,46 m estava ligado ao carbono em  $\delta$  19,5 ( $\delta$  1,52 m e  $\delta$  1,46 m), a atribuição deste ao C-8 foi feita por comparação com RH-1. Até o momento, a proposta sugerida é mostrada na figura 4.72.

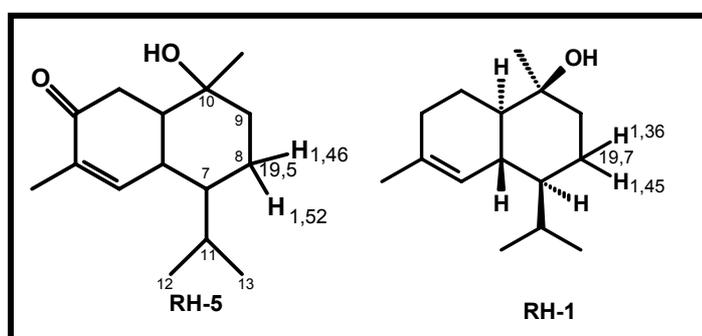


FIGURA 4.72. Esqueleto básico proposto para a substância RH-5.

Foi realizado o experimento de gNOESY (Figura 4.81 e 4.81a) e o resultado obtido é mostrado nas figuras 4.73 e 4.74. O sinal irradiado em  $\delta$  1,70 (Figura 4.73) causou nOe nos hidrogênios em  $\delta$  2,60 (H-2),  $\delta$  2,39 (H-2) e  $\delta$  1,16 (H-7), esta última irradiação sugeriu que H-1 e H-7 estão no mesmo plano da molécula.

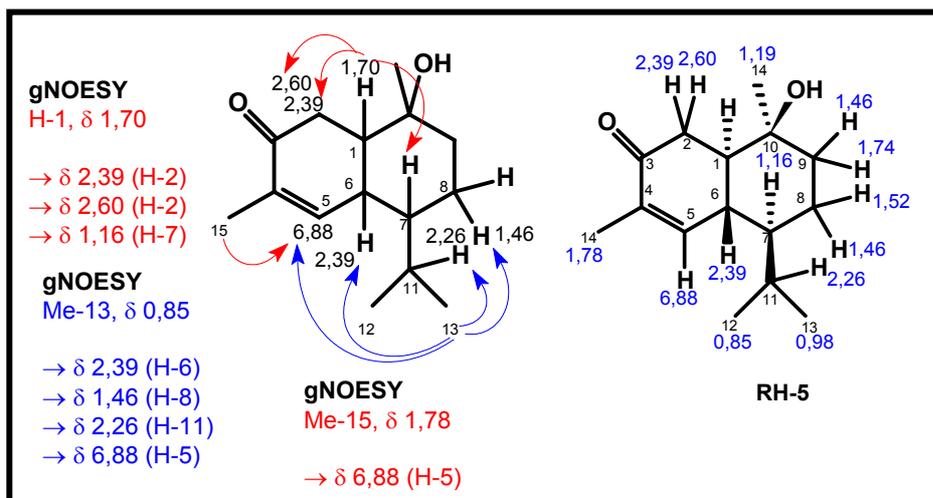


FIGURA 4.73 Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,70 (H-1),  $\delta$  0,85 (Me-13) e  $\delta$  1,78 (Me-15).

O sinal em  $\delta$  2,60 (Figura 4.74), ao ser irradiado, causou nOe em  $\delta$  2,39 (H-2),  $\delta$  1,70 (H-1)  $\delta$  1,19 (Me-14) e  $\delta$  6,88 (H-5); O hidrogênio irradiado em  $\delta$  0,98 (Me-12) causou nOe em  $\delta$  2,26 (H-11) e  $\delta$  1,46 (H-8); e o sinal irradiado em  $\delta$  1,19 (Me-14, Figura 4.74) causou nOe em  $\delta$  1,74 (H-9) e  $\delta$  2,60 (H-2).

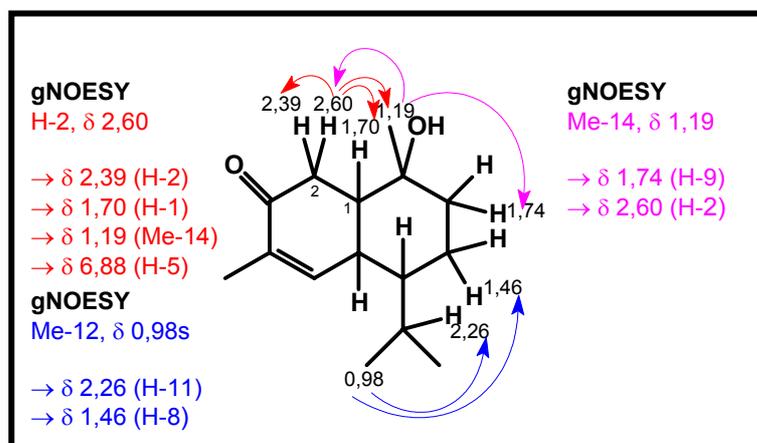


FIGURA 4.74 Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,60 (H-2),  $\delta$  1,19 (Me-14) e  $\delta$  0,98 (Me-12).

A análise dos dados espectrais uni e bidimensionais, levou a identificação da substância RH-5 como 3-oxo-T-cadinol (Figura 4.75). Esta substância é bem conhecida e, segundo levantamento no *Chemical Abstract*, é encontrada na literatura como produto natural e de síntese (ZYGMUNT *et al.*, 1993; TABER *et al.*, 1996; HE *et al.*, 1997). RH-5 é registrada no *Chemical Abstract* com o número de 53402-16-7.

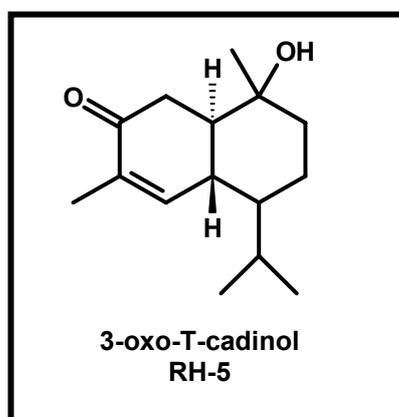


FIGURA 4.75. Estrutura proposta para a substância RH-5.

TABELA 4.4. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RH-5 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 e 200 MHz (C))

H/C	RH-5		RH-1*	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	1,70 m	49,9	1,07 m	47,9
2	2,60 dd ( $J = 3,5$ e $16,4$ Hz) e 2,39 m	38,8	1,90 m e 1,38 m	22,5
3		200,5	1,97 m	30,8
4		135,0		134,0
5	6,88 sl	146,9	5,54 sl	122,6
6	2,39 m	38,4	1,97 m	37,6
7	1,16 m	44,9	1,00 m	46,6
8	1,46 m e 1,52 m	19,5	1,36 m	19,7
9	1,46 m e 1,74 m	39,8	1,72 m e 1,39 m	40,3
10		70,0		70,5
11	2,26 m	26,3	2,17 m	26,0
12	0,98 d ( $J = 6,9$ Hz)	21,2	0,91 d ( $J = 6,9$ Hz)	21,3
13	0,85 d ( $J = 6,9$ Hz)	15,3	0,79 d ( $J = 6,9$ Hz)	15,1
14	1,19 s	27,9	1,21 s	28,4
15	1,78 dl ( $J = 1,5$ Hz)	15,7	1,65 s	23,6

- ROSAS (2005), RH-1, RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz); RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz).

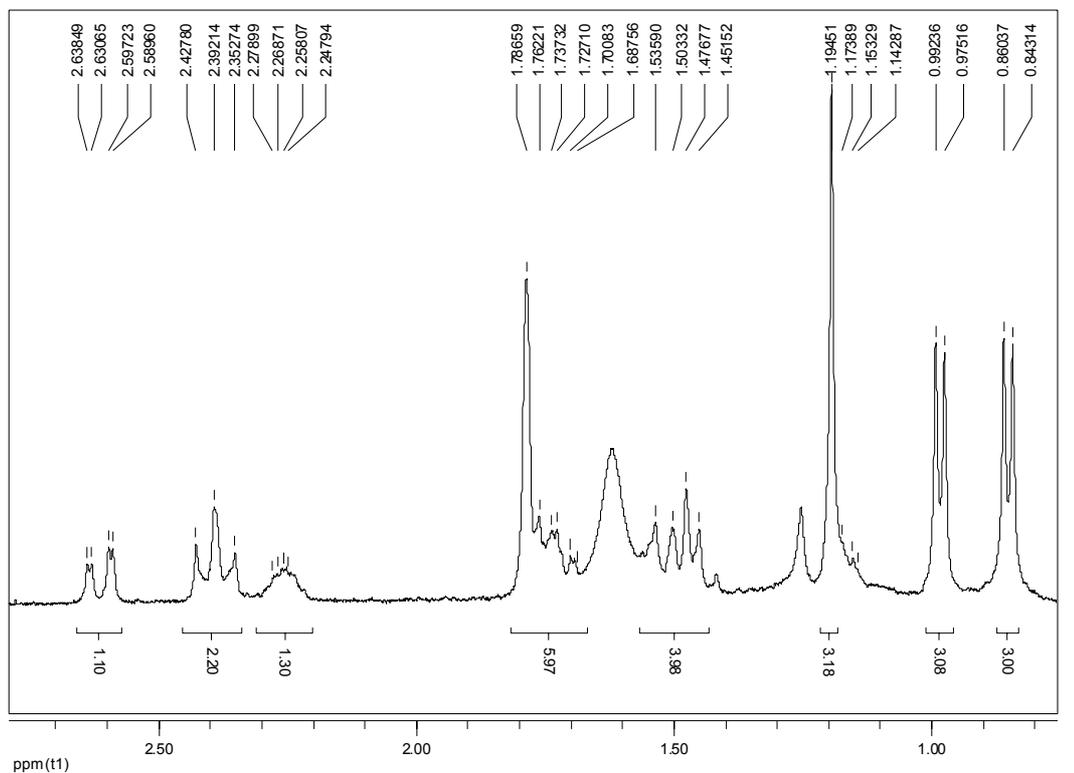
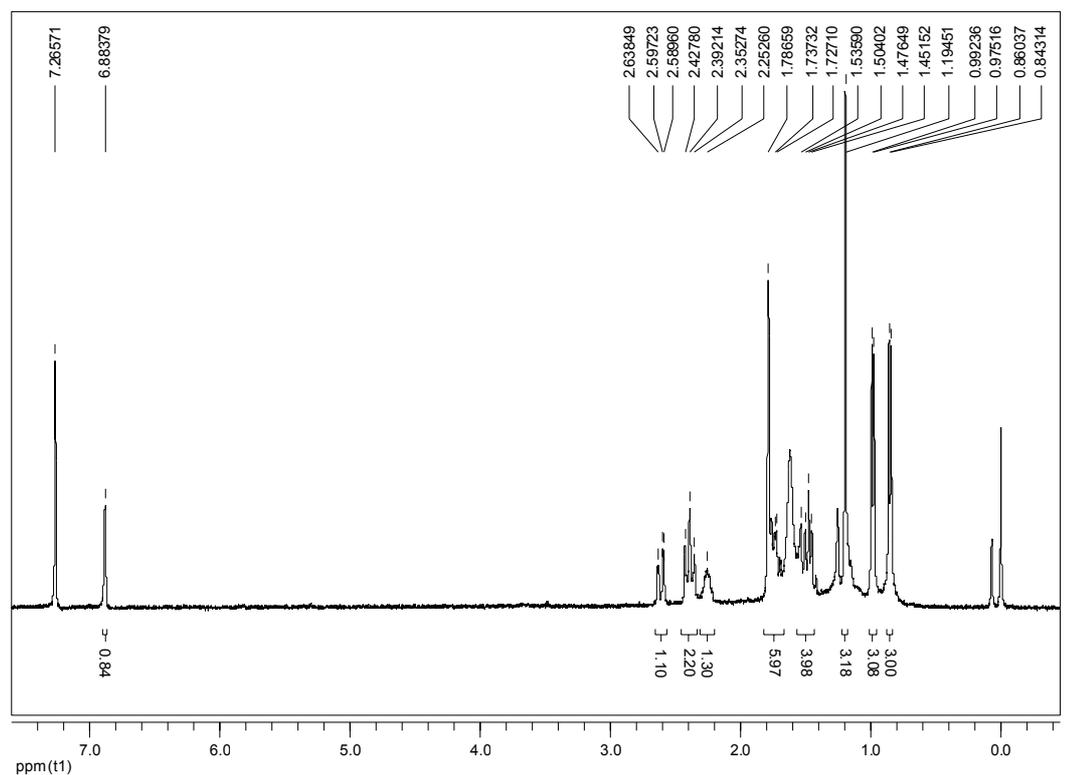


FIGURA 4.76. Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância RH-5 e ampliações (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

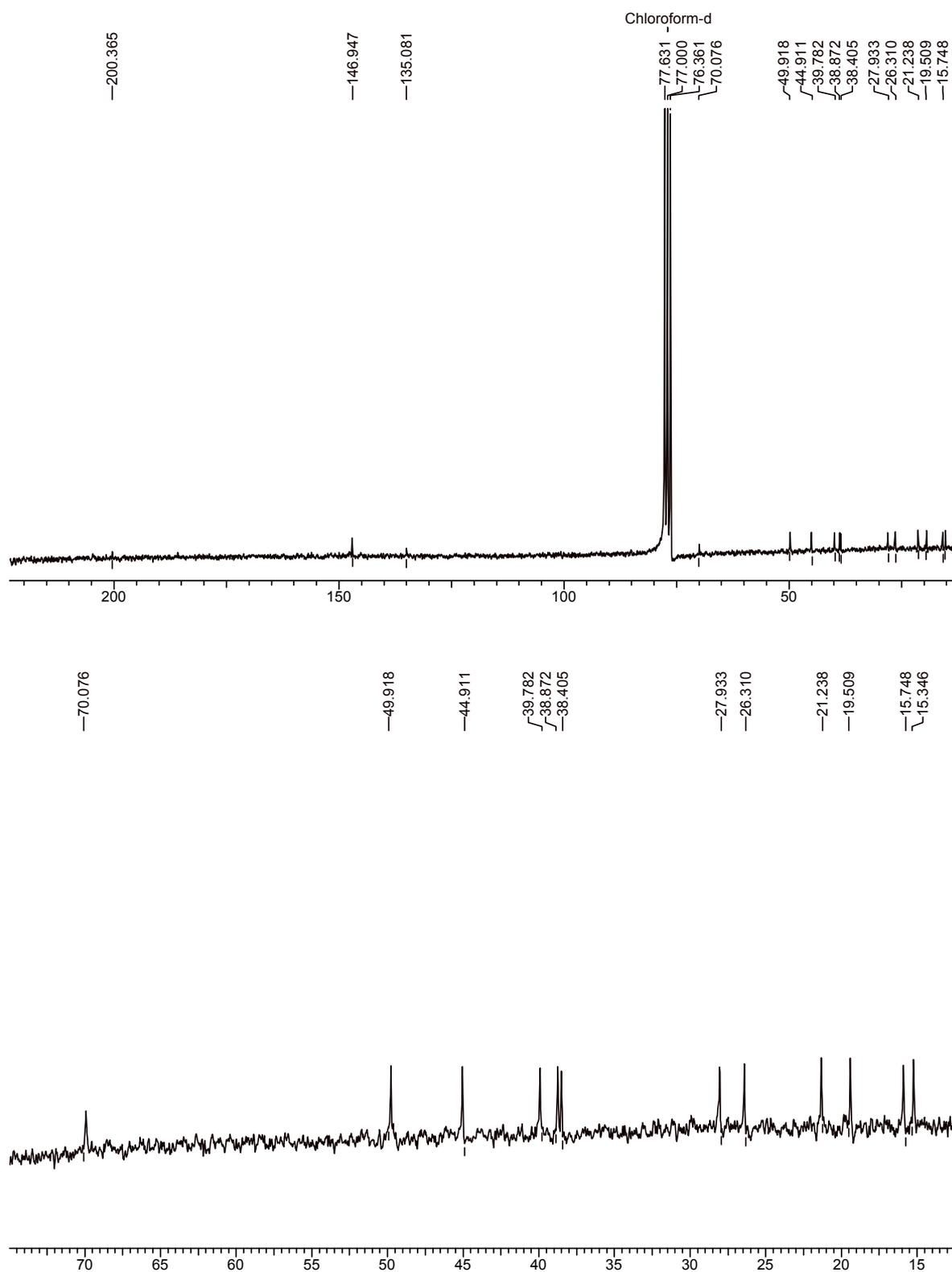


FIGURA 4.77. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RH-5 e ampliação (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

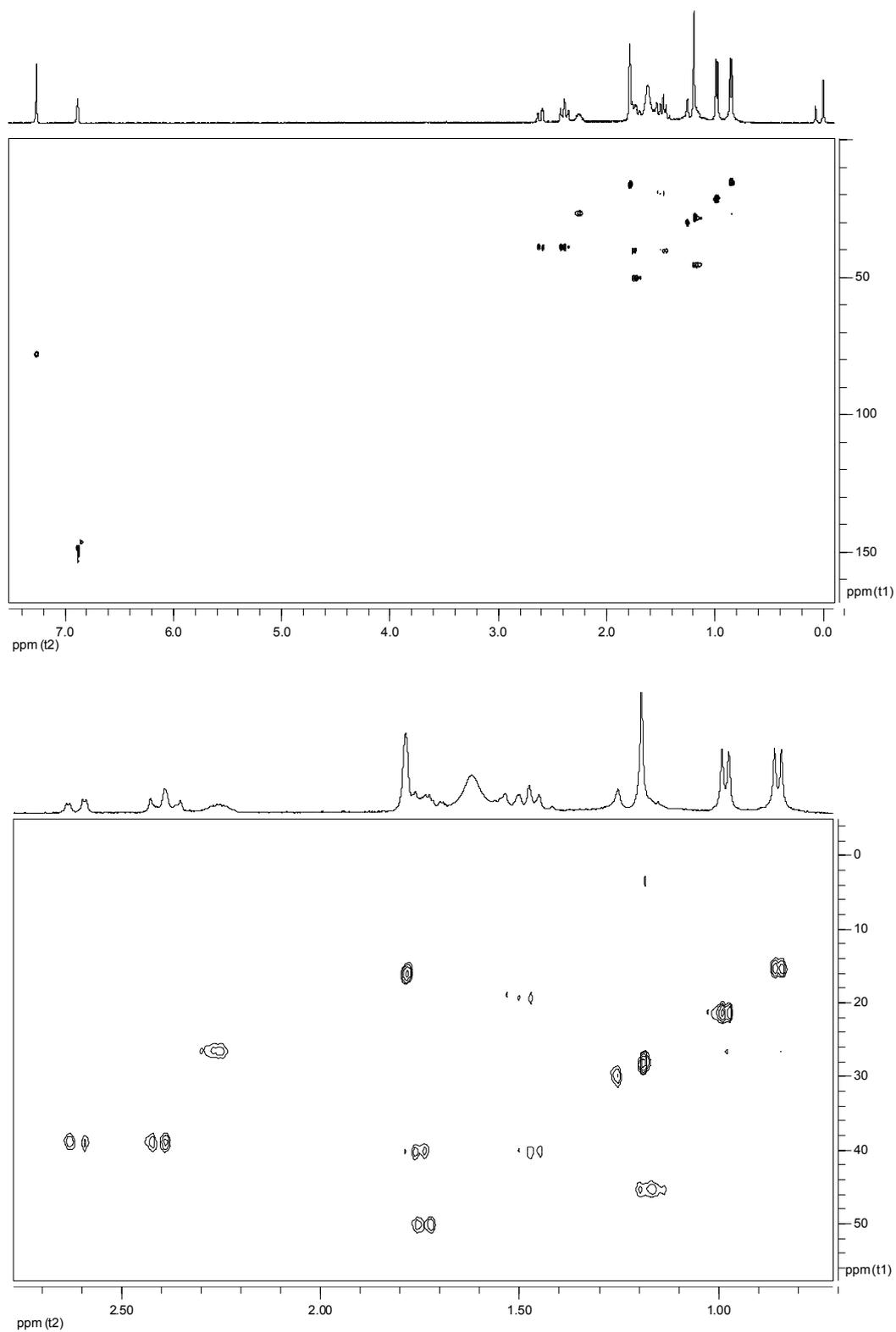


FIGURA 4.78. Experimento de HSQC da substância RH-5 e ampliação (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

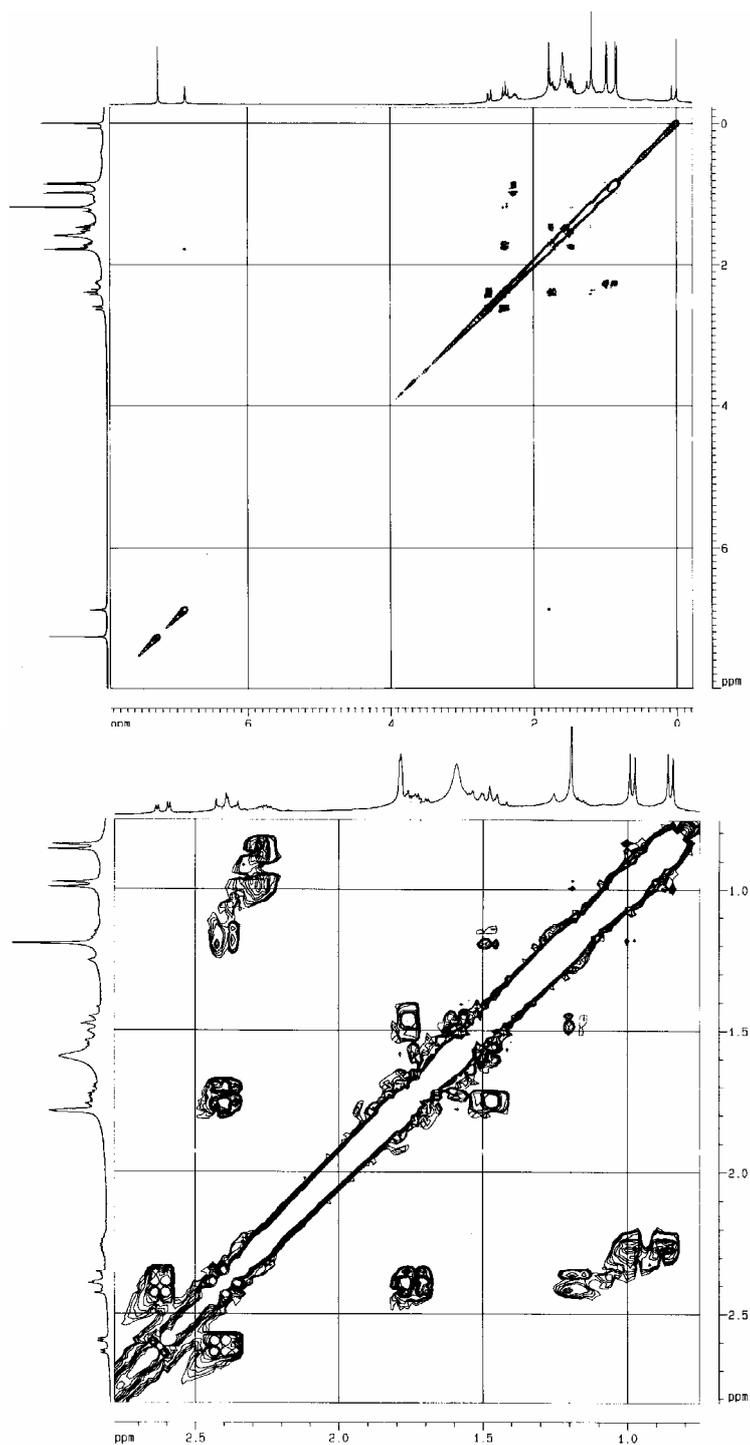


FIGURA 4.79. Experimento de COSY da substância RH-5 e ampliação (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

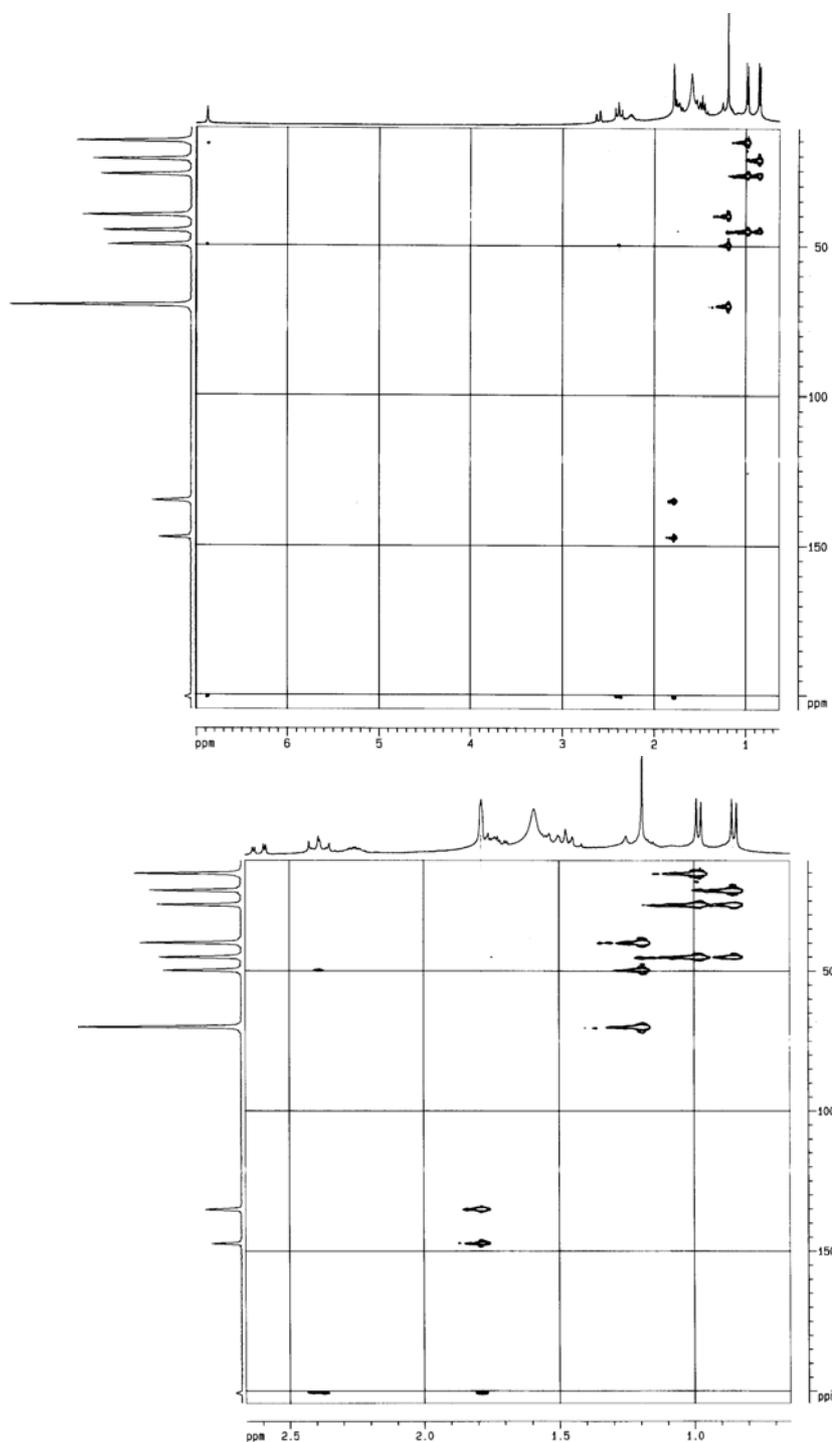
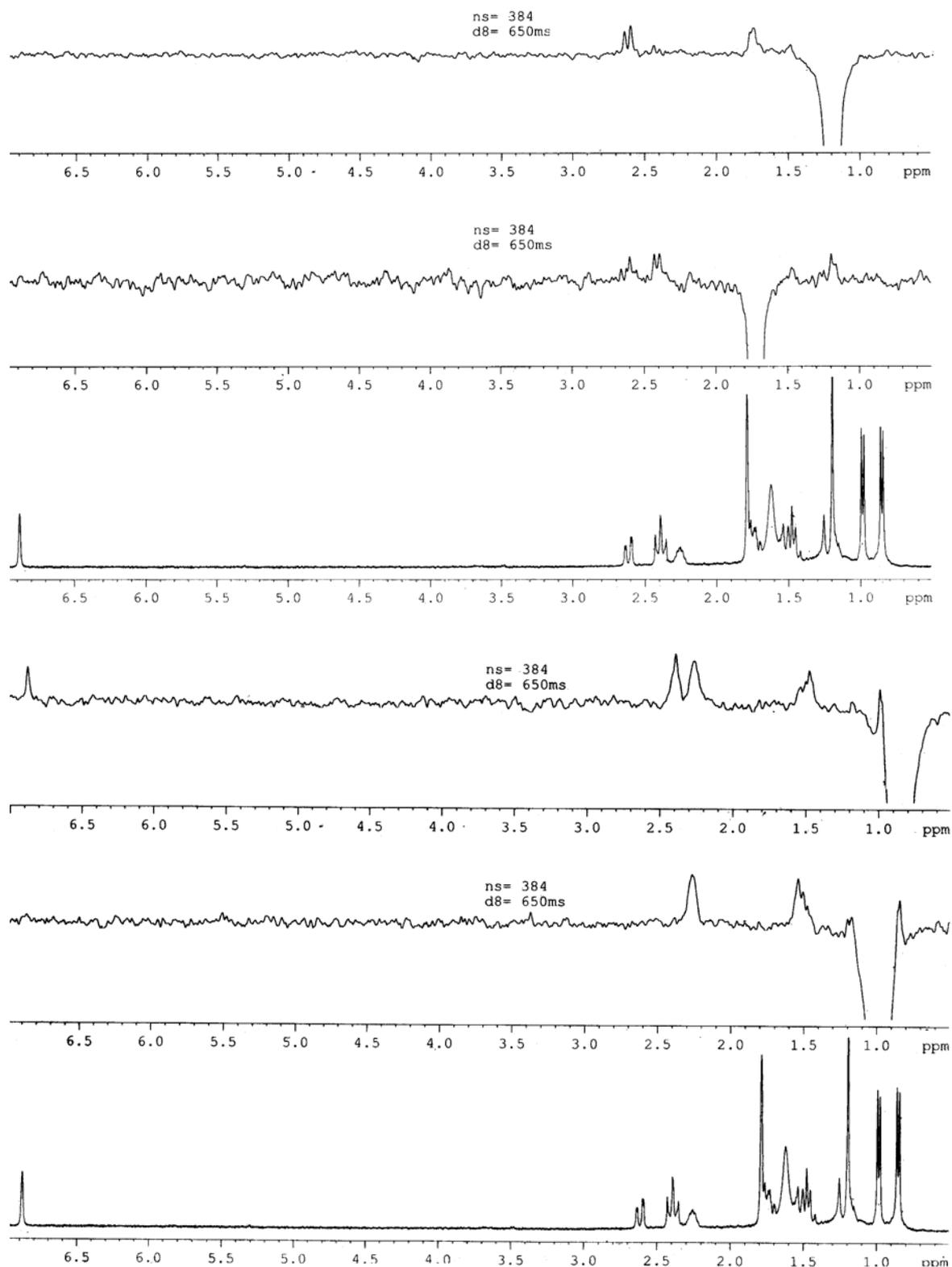


FIGURA 4.80. Experimento de HMBC da substância RH-5 e ampliação (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.81. Experimento de gNOESY da substância RH-5 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

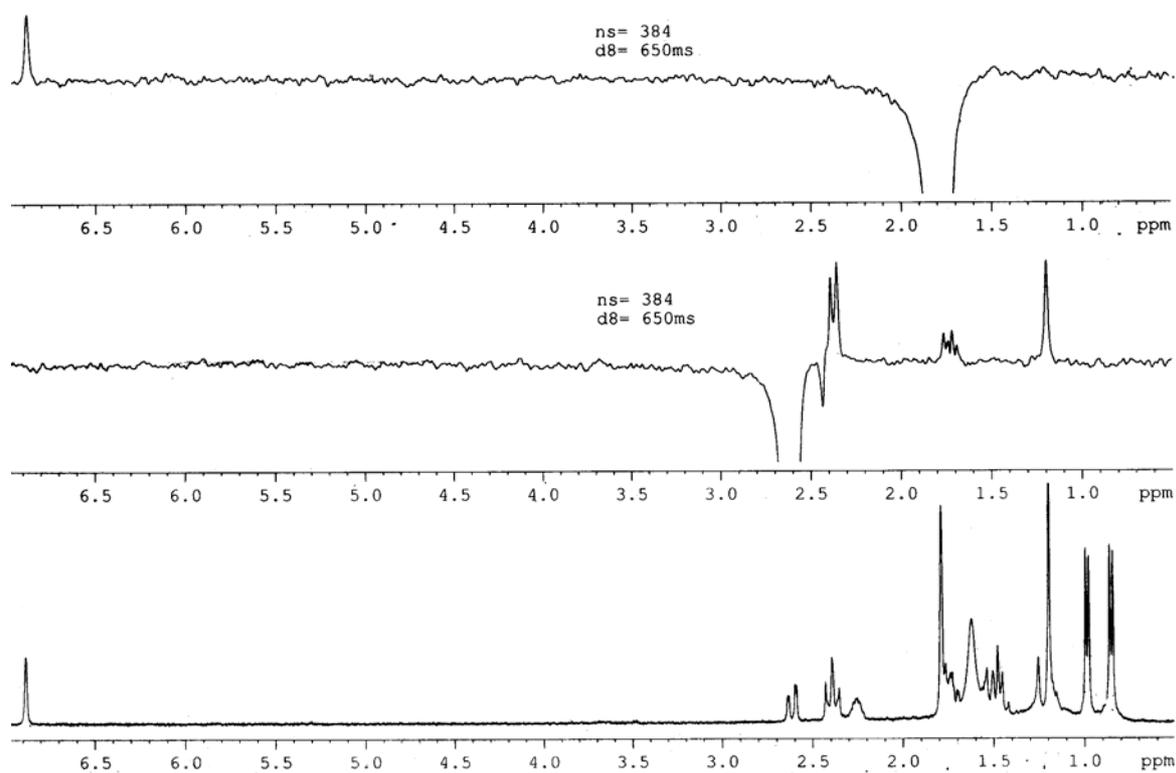


FIGURA 4.81a. Experimento de gNOESY da substância RH-5 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.7. Identificação da substância RH-6

A substância RH-6 foi isolada do extrato hexano como cristal agulha. No seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.92, Tabela 4.5), observou-se sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,30 d ( $J = 2,9$  Hz) e  $\delta$  5,08 m, sinais de sete metilas entre  $\delta$  1,58-0,89. No espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.93 e 4.93a, Tabela 4.5), verificou-se a presença de sinais de carbonos olefínicos entre  $\delta$  145,4-118,2, carbonos de carbonilas em  $\delta$  216,9 e  $\delta$  181,8, apresentou no total 30 carbonos, provavelmente triterpeno.

O sinal em  $\delta$  5,30 d ( $J = 2,9$  Hz) mostrou, no HSQC (Figura 4.94), ligação com o carbono em  $\delta$  118,2, no experimento de COSY (Figura 4.95), foi verificado acoplamento com o hidrogênio em  $\delta$  2,09 m e via HMBC (Figura 4.96, 4.96a) foi observado correlações com  $\delta$  48,1 e  $\delta$  52,3 (Figura 4.82). O deslocamento em  $\delta$  118,2 ( $\delta$  5,30) foi atribuído ao C-7, que é valor de deslocamento característico de uma classe de triterpeno denominado tirucalano.

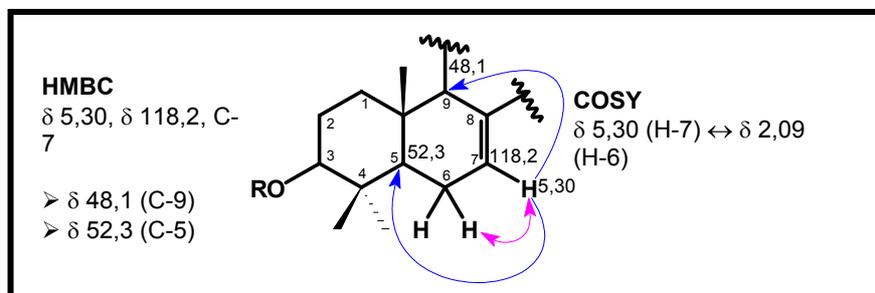


FIGURA 4.82. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,30 (H-7).

O sinal em  $\delta$  2,09 m ( $\delta$  24,3) acoplou com H-7, como visto no COSY (Figura 4.95), este foi então atribuído ao H-6; no experimento de HMBC (Figura 4.96, 4.96a) foram observadas correlações com  $\delta$  118,2 (C-7) e 145,4 (C-8). No experimento de COSY (Figura 4.95) foi observado H-6 acoplado com um sinal em  $\delta$  1,72 d ( $J = 8,3$  Hz;  $\delta$  52,3), este último sinal de hidrogênio foi atribuído ao H-5. Foi confirmada a atribuição de H-5 através das correlações observadas no HMBC de  $\delta$  1,72 com  $\delta$  12,7 (Me-19),  $\delta$  21,5 (Me-29),  $\delta$  24,5 (Me-28),  $\delta$  34,8 (C-10) e  $\delta$  47,9 (C-4) (Figura 4.83).

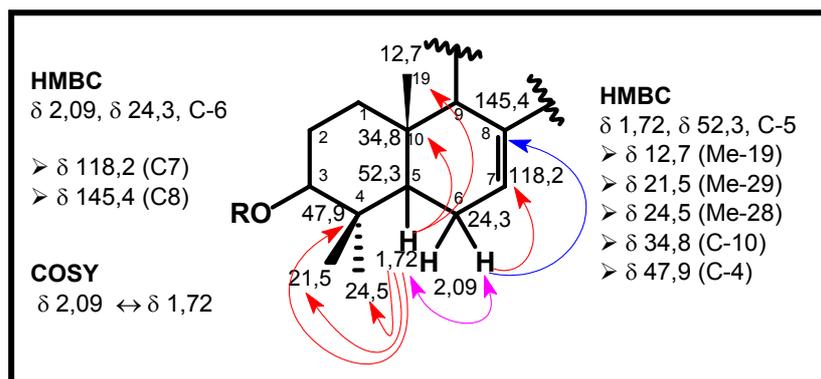


FIGURA 4.83. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,09 (H-6) e  $\delta$  1,72 (H-5).

A Me-28,  $\delta$  24,5 ( $\delta$  1,05 s), apresentou correlação com  $\delta$  21,5 (Me-29),  $\delta$  47,9 (C-4),  $\delta$  52,3 (C-5) e  $\delta$  216,9 (Figura 4.84). A Me-29,  $\delta$  21,5 ( $\delta$  1,11 s), mostrou correlação no HMBC (Figura 4.96, 4.96a) com  $\delta$  24,5 (Me-28),  $\delta$  47,9 (C-4),  $\delta$  52,3 (C-5) e  $\delta$  216,9 (Figura 4.84). Ambas as metilas apresentaram correlação com uma carbonila em  $\delta$  216,9 que foi atribuída ao C-3.

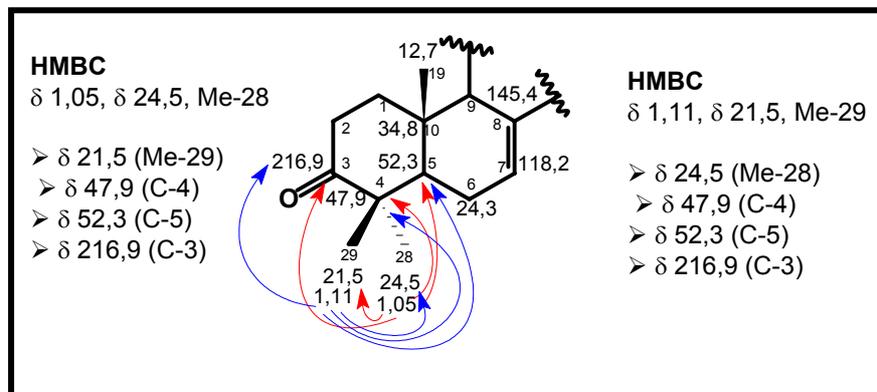


FIGURA 4.84. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,05 (Me-28) e  $\delta$  1,11 (Me-29).

A Me-19 ( $\delta$  0,98) apresentou correlações com  $\delta$  34,8 (C-10),  $\delta$  38,6,  $\delta$  48,1 e  $\delta$  52,3 (C-5) (Figura 4.85). O sinal do carbono em  $\delta$  38,6 ( $\delta$  1,94 m e  $\delta$  1,43 m) por ter apresentado correlação com a Me-19 e ser um CH<sub>2</sub>, foi atribuído ao C-1. No COSY (Figura 4.95) foi observado o acoplamento de H-1 ( $\delta$  1,43) com  $\delta$  2,74 ddd ( $J$  = 5,4, 14,5 e 20,0 Hz), que foi atribuído ao H-2. O sinal em  $\delta$  2,74, via HSQC, apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  35,0, este último também apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  2,24 m. No COSY foi confirmado o acoplamento entre  $\delta$  2,74 m e  $\delta$

2,24 m (Figura 4.85); no HMBC (Figura 4.96, 4.96a) foi observado correlações de H-2 com  $\delta$  38,6 (C-1) e  $\delta$  216,9 (C-3).

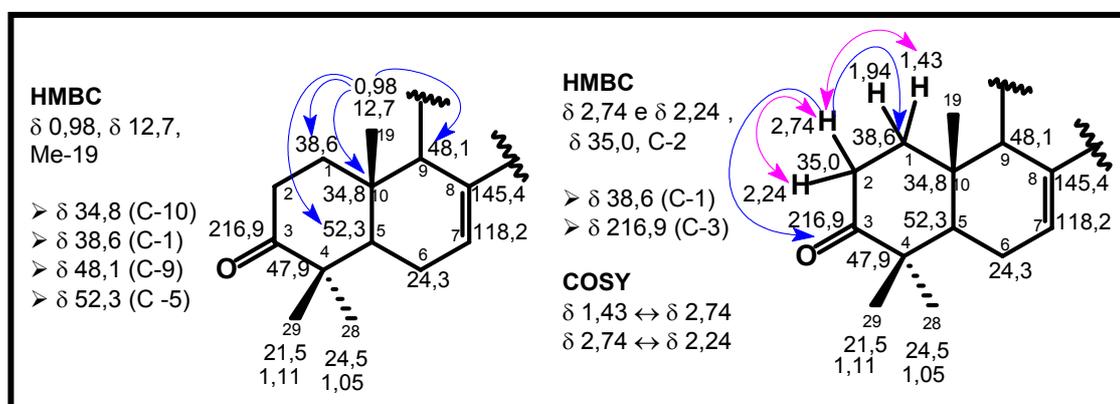


FIGURA 4.85. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  0,98 (Me-19) e  $\delta$  2,74 (H-5).

O carbono em  $\delta$  48,1 apresentou correlação com a Me-19 ( $\delta$  0,98) e com H-7 ( $\delta$  5,30), em consequência destas correlações, este só poderia ser o C-9 que, no HSQC (Figura 4.94), apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  2,32 m. O experimento de COSY (Figura 4.95) mostrou acoplamento com o hidrogênio em  $\delta$  1,50 m ( $\delta$  17,8) que foi atribuído ao H-11, este último hidrogênio apresentou correlação com  $\delta$  145,4 (C-8), conforme figura 4.86.

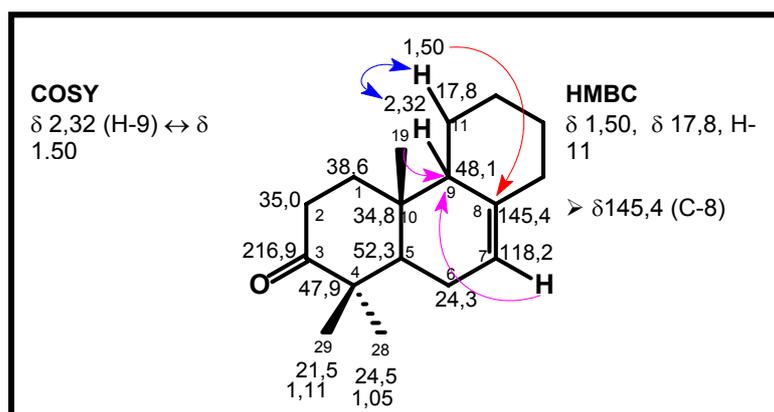


FIGURA 4.86. Correlação e acoplamento apresentado nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,50 (H-11).

O sinal da metila em  $\delta$  1,00 ( $\delta$  27,4) mostrou correlação com  $\delta$  145,4 (C-8),  $\delta$  33,5 (C-15),  $\delta$  43,3 (C-13) e  $\delta$  51,0 (C-14) (Figura 4.87, Figura 4.96, 4.96a), foi atribuído a Me-30. Uma outra metila em  $\delta$  0,89 ( $\delta$  21,7) mostrou correlação com

$\delta$  30,0 (C-12),  $\delta$  43,3 (C-13),  $\delta$  51,0 (C-14), foi atribuída a Me-18 (Figura 4.87). O carbono em  $\delta$  30,0 foi atribuído ao C-12 devido à correlação com os hidrogênios da Me-18. No experimento de HSQC (Figura 4.94) foi verificado que C-12 estava ligado aos hidrogênios em  $\delta$  1,49 m e  $\delta$  1,78 m e no experimento de COSY foi observado apenas acoplamento entre eles mesmos. O carbono em  $\delta$  33,5 foi atribuído ao C-15 em virtude da correlação com os hidrogênios da Me-30 (Figura 4.87). No HSQC (Figura 4.94) foi observado a ligação de C-15 com os hidrogênios em  $\delta$  1,52 m. As correlações até o momento discutidas podem ser observadas na figura 4.87.

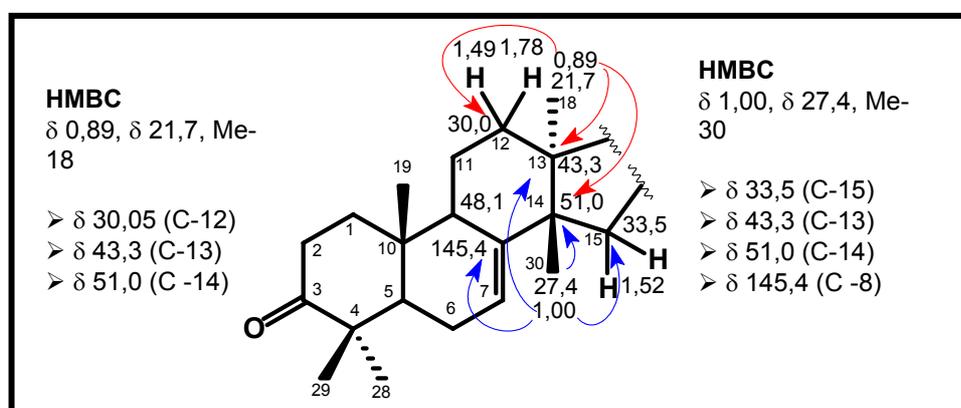


FIGURA 4.87. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  0,89 (Me-18) e  $\delta$  1,00 (Me-30).

No experimento de HMBC, não foi possível observar correlações do anel D com a cadeia lateral, mas o COSY (Figura 4.88, Figura 4.95) mostrou acoplamento de  $\delta$  2,07 m com  $\delta$  2,32. O primeiro sinal de hidrogênio foi atribuído ao H-17 ( $\delta$  49,8) e o segundo ao H-20 ( $\delta$  47,2). Para o H-16 foi atribuído o valor de deslocamento em  $\delta$  1,32 m e 2,04 m (27,1); para o H-21 foi atribuído o carbono em  $\delta$  181,8; para o H-22 foram atribuídos os hidrogênios em  $\delta$  1,53 ( $\delta$  32,3), todas estas atribuições foram feitas em comparação com a literatura (MA *et al.*, 2000).

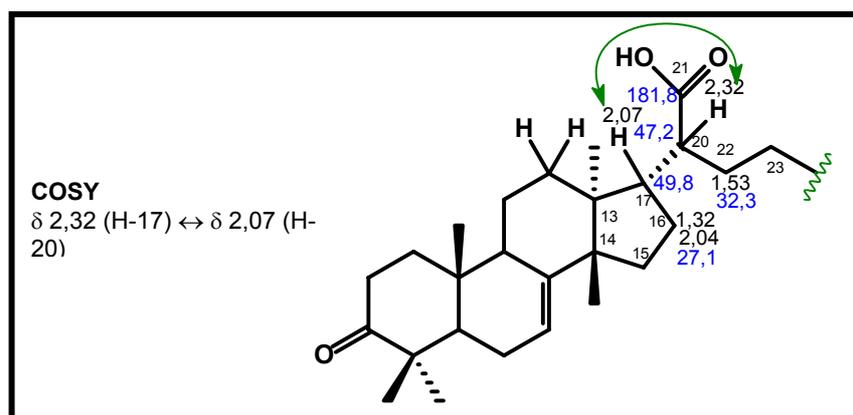


FIGURA 4.88. Acoplamento apresentado no experimento de COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,32 (H-17).

A metila em  $\delta$  1,58 ( $\delta$  17,6) mostrou correlações, via HMBC (Figura 4.96, 4.96a), com  $\delta$  132,3 (C-25),  $\delta$  123,5 (C-24) e  $\delta$  25,7 (Me-27), ela foi atribuída a Me-26 (Figura 4.89). A Me-27,  $\delta$  25,7 ( $\delta$  1,68) mostrou correlações com  $\delta$  132,3 (C-25), 123,5 (C-24) e 17,6 (Me-26) (Figura 4.89). O hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,08 m foi atribuído ao C-24, o experimento de HMBC mostrou para  $\delta$  5,08 correlações com  $\delta$  17,6 (Me-26) e  $\delta$  25,7 (Me-27), estas duas correlações confirmam a atribuição de  $\delta$  5,08 ao H-24. No experimento de COSY (Figura 4.95), observou-se o acoplamento de H-24 com o sinal em  $\delta$  1,97 ( $\delta$  26,0) que foi atribuído ao H-23, o experimento de HMBC (Figura 4.96, 4.96a) mostrou correlação com  $\delta$  123,5 e  $\delta$  132,3. No momento, pôde-se determinar apenas uma parte da cadeia lateral do triterpeno, conforme figura 89:

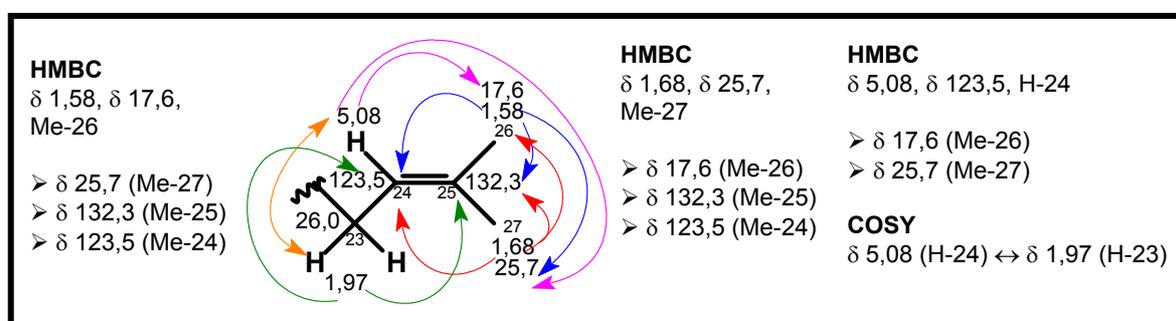


FIGURA 4.89 Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os hidrogênios em  $\delta$  1,58 (Me-26),  $\delta$  1,68 (Me-27) e  $\delta$  5,08 (H-24).

Com base nos dados de RMN uni e bidimensionais e em comparação com os dados de carbono (Figura 4.90) da literatura (MA *et al.*, 2000) foi proposta para a substância RH-6, a estrutura já conhecida, o ácido 3-oxotirucala-7,24-dien-21-óico (Figura 4.91), com número de registro no *Chemical Abstract* de 82464-35-5.

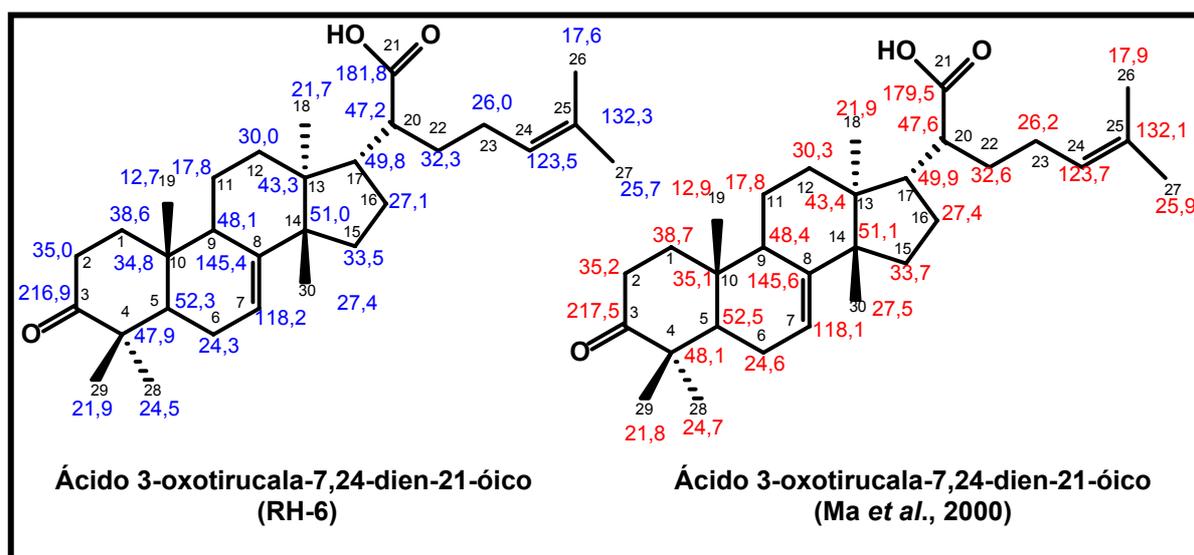


FIGURA 4.90. Comparação dos deslocamentos de carbono da substância RH-6 com os de MA *et al.* (2000).

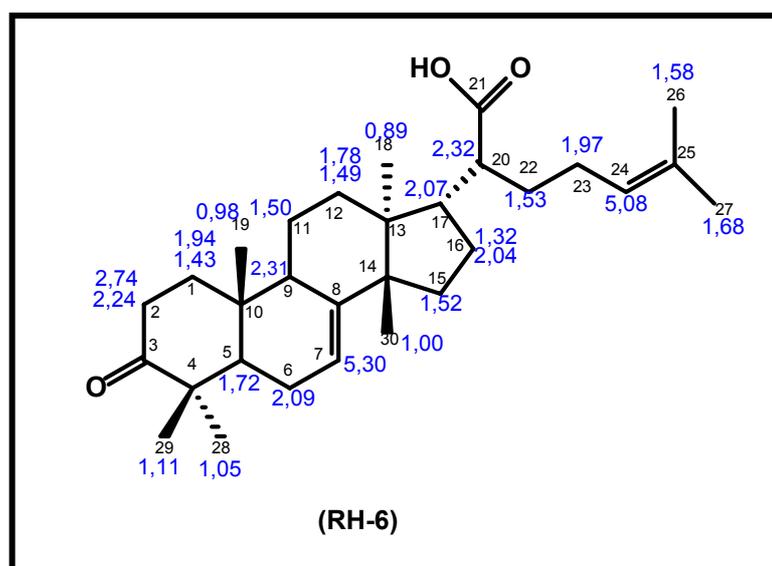


FIGURA 4.91. Estrutura proposta para a substância RH-6 e seus deslocamentos de hidrogênio.

TABELA 4.5. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RH-6 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz).

H/C	RH-6		Literatura
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
1	1,43 m e 1,94 m	38,6	38,7
2	2,24 m e 2,74 ddd( $J = 5,4, 14,5$ e $20,0$ )	35,0	35,2
3		216,9	217,5
4		47,9	48,1
5	1,72 d ( $J = 8,3$ Hz)	52,3	52,5
6	2,09 m	24,3	24,6
7	5,30 d ( $J = 2,9$ Hz)	118,2	118,1
8		145,4	145,6
9	2,31 m	48,1	48,4
10		34,8	35,1
11	1,50 m	17,8	17,8
12	1,49 m e 1,78 m	30,0	30,3
13		43,3	43,4
14		51,0	51,1
15	1,52 m	33,5	33,7
16	1,32 m e 2,04 m	27,1	27,4
17	2,07	49,8	49,9
Me-18	0,89 s	21,7	21,9
Me-19	0,98 s	12,7	12,9
20	2,32	47,2	47,6
21		181,8	179,5
22	1,53 m	32,3	32,6
23	1,97 m	26,0	26,2
24	5,08 m	123,5	123,7
25		132,3	132,1
Me-26	1,58 sl	17,6	17,9
Me-27	1,68 sl	25,7	25,9
Me-28	1,05 s	24,5	24,7
Me-29	1,11 s	21,9	21,8
Me-30	1,00 s	27,4	27,5

\*MA *et al.* (2000), Solvente:  $\text{CDCl}_3 - \text{CD}_3\text{OD}$  (8:1) (75 MHz).

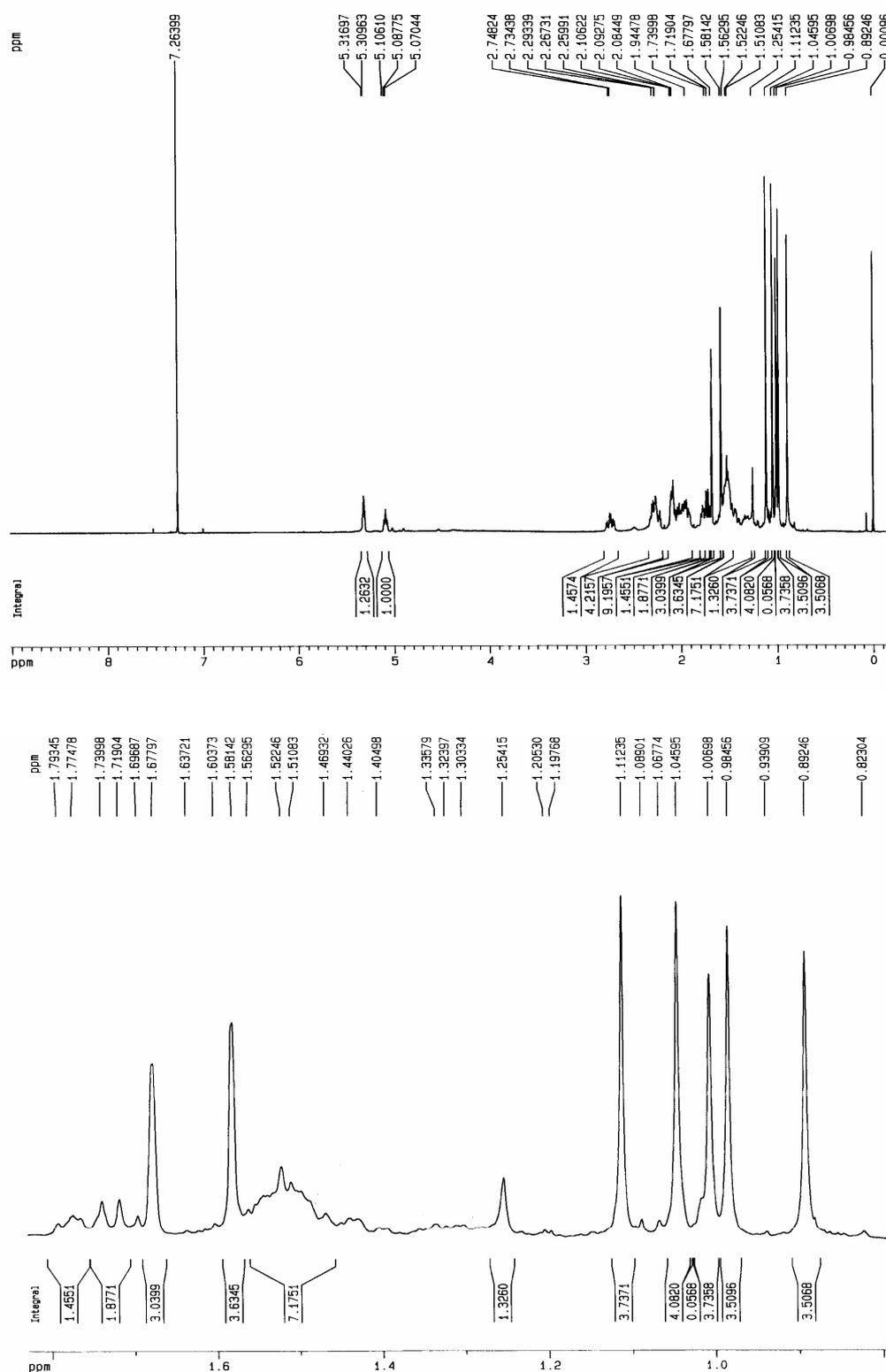


FIGURA 4.92. Espectro de RMN <sup>1</sup>H e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, CDC<sub>3</sub>).

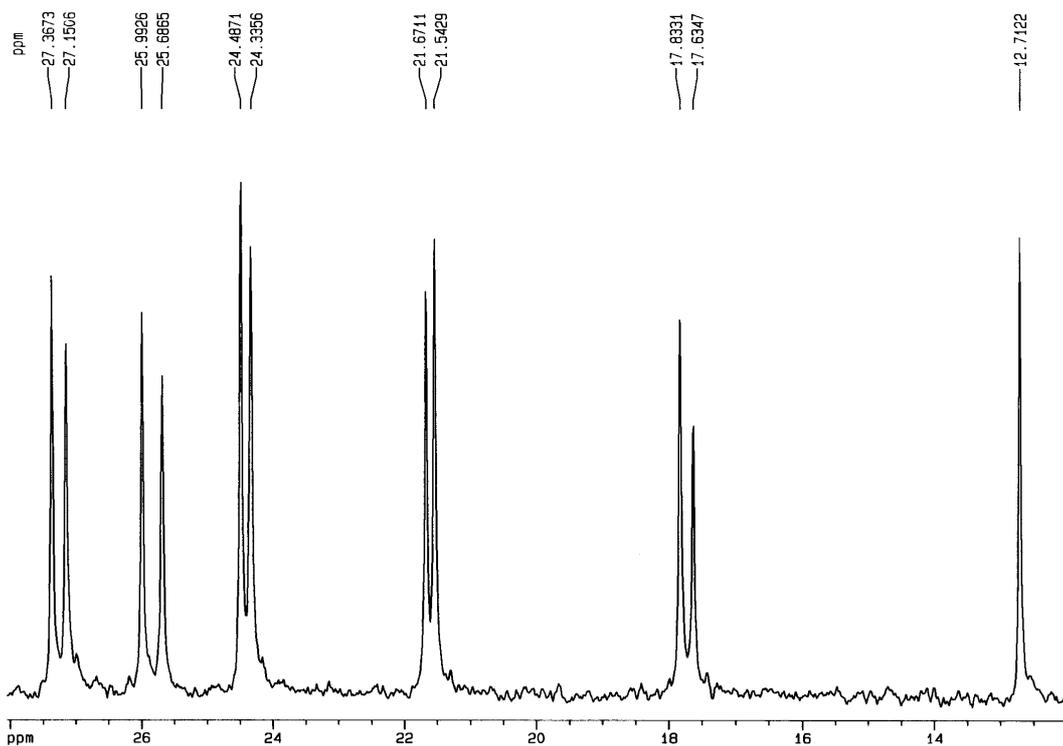
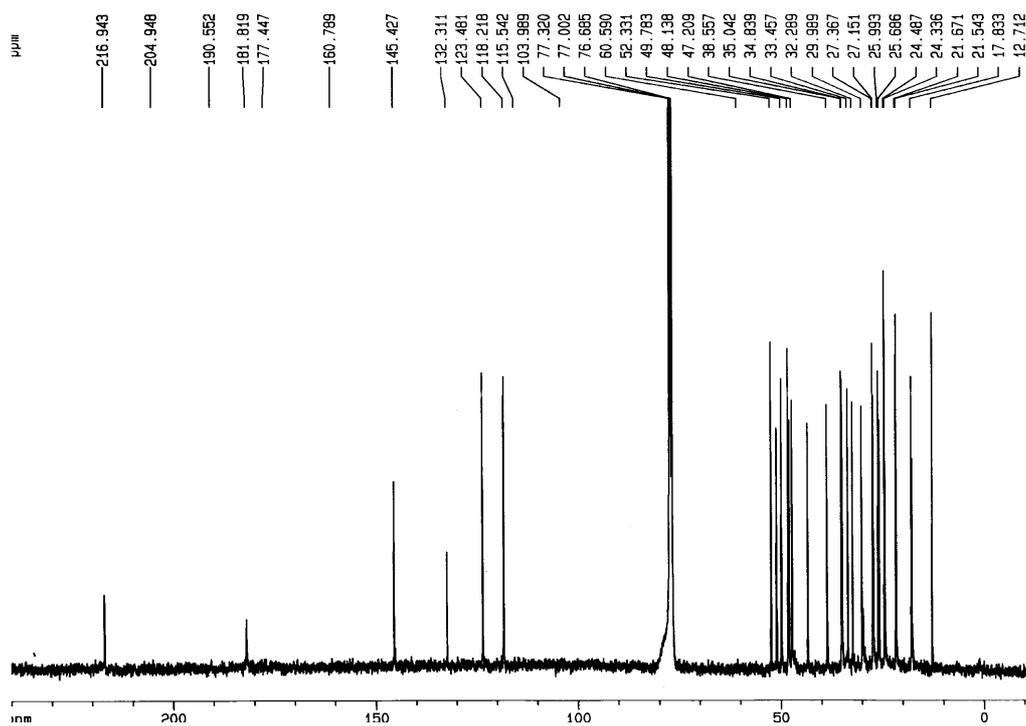


FIGURA 4.93. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RH-6 e ampliação (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

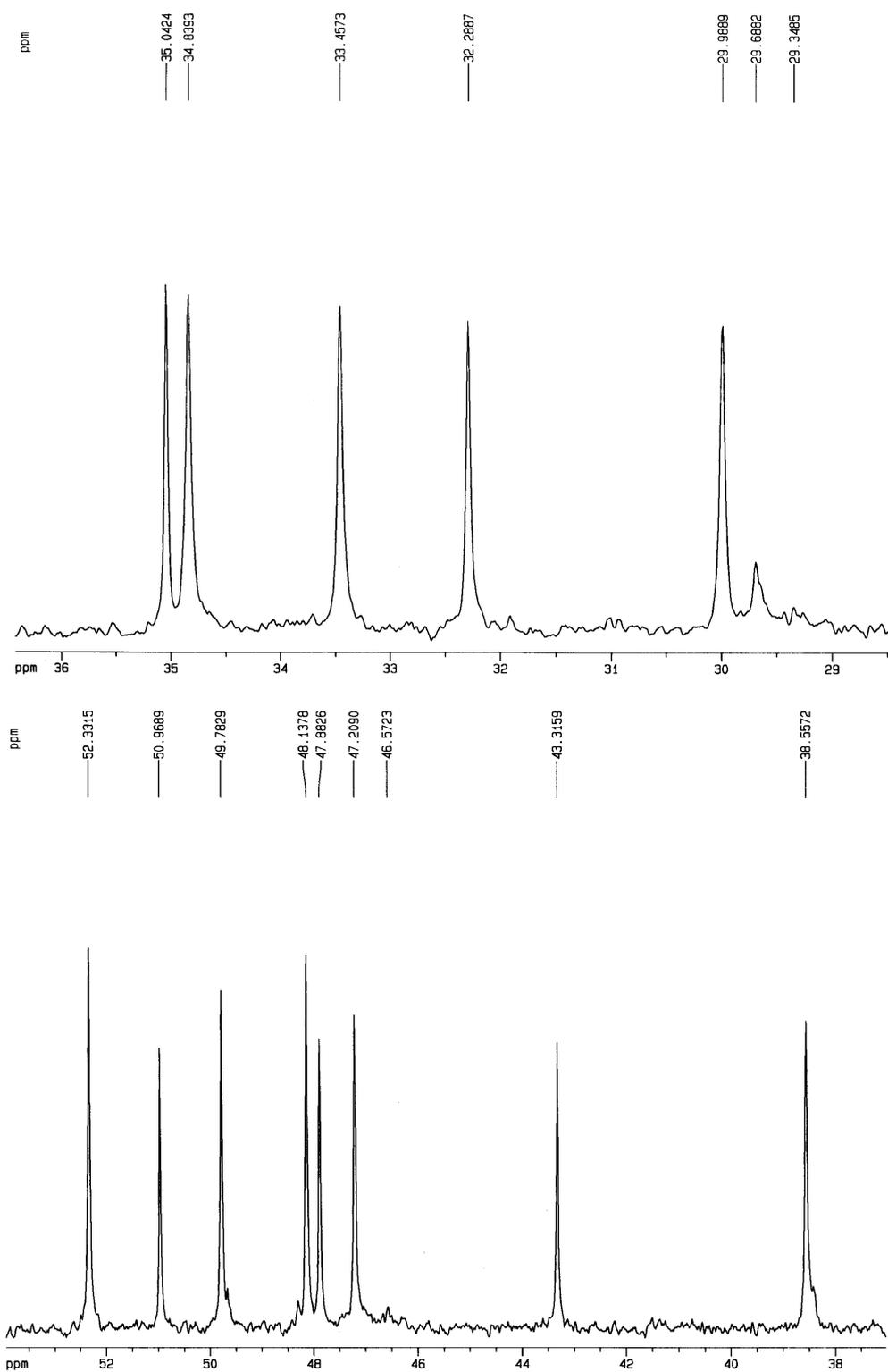


FIGURA 4.93a. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  das ampliações da substância RH-6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

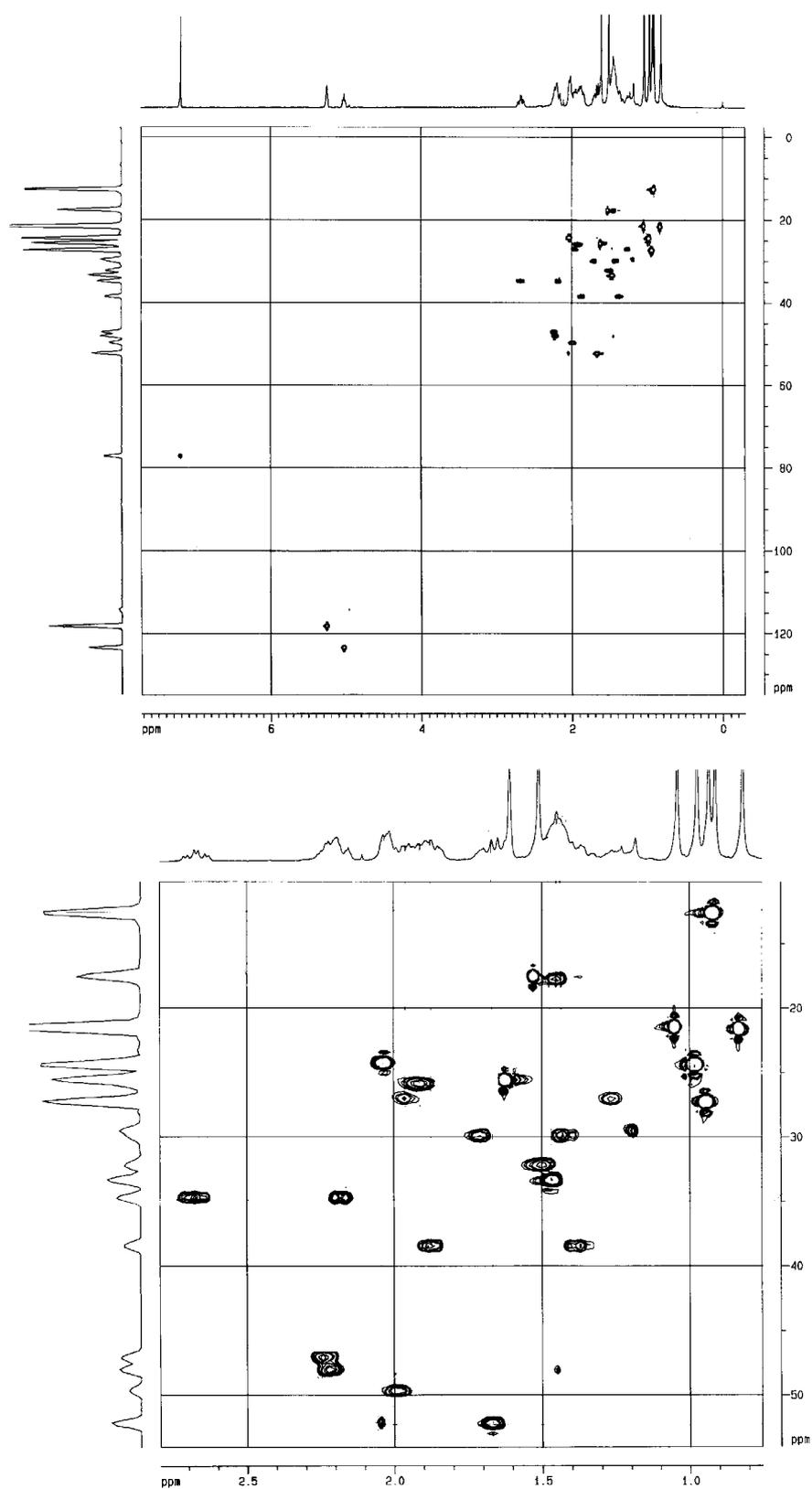


FIGURA 4.94. Experimento de HSQC e ampliação da substância RH-6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

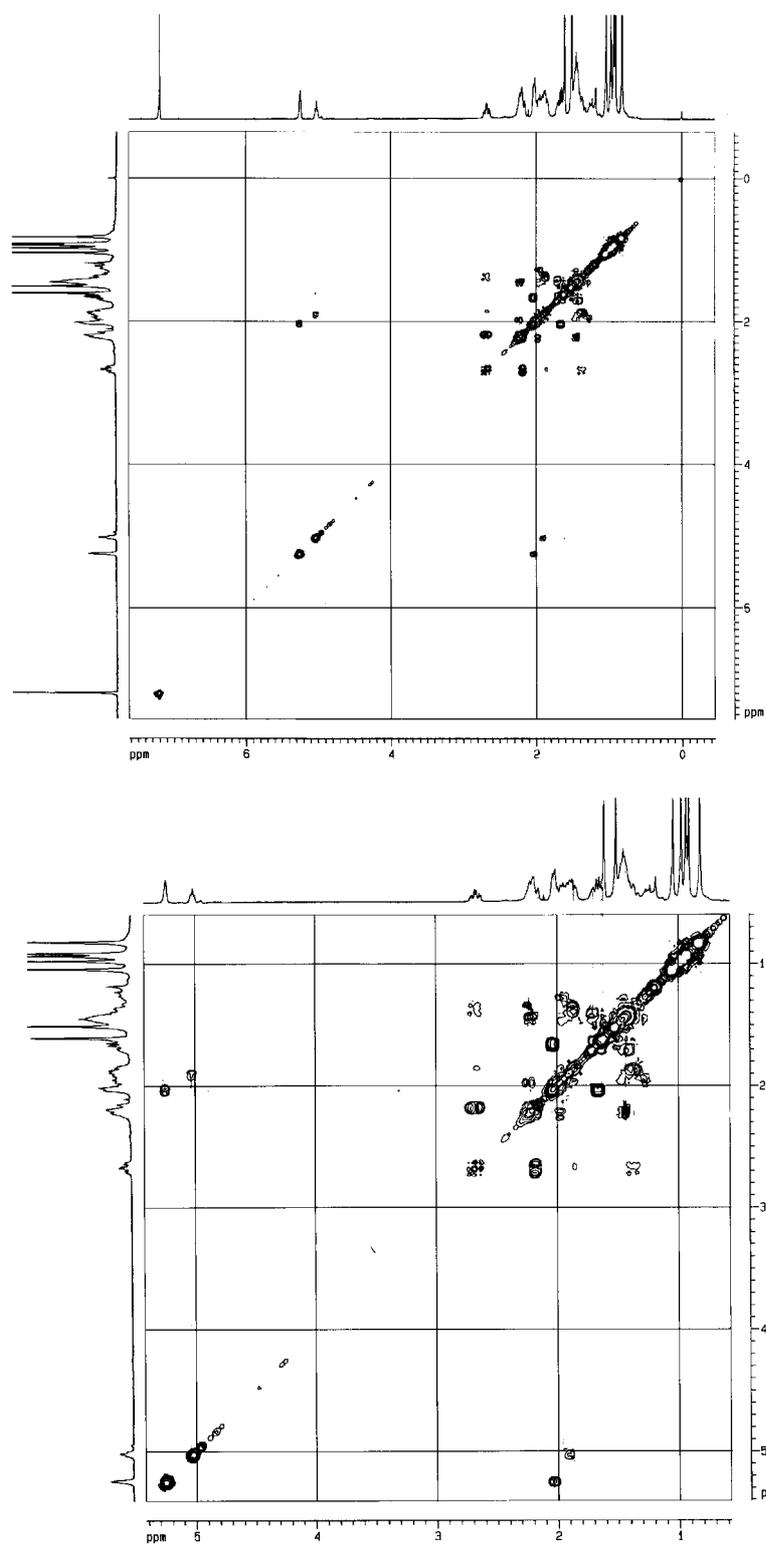


FIGURA 4.95. Experimento de COSY e ampliação da substância RH-6 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

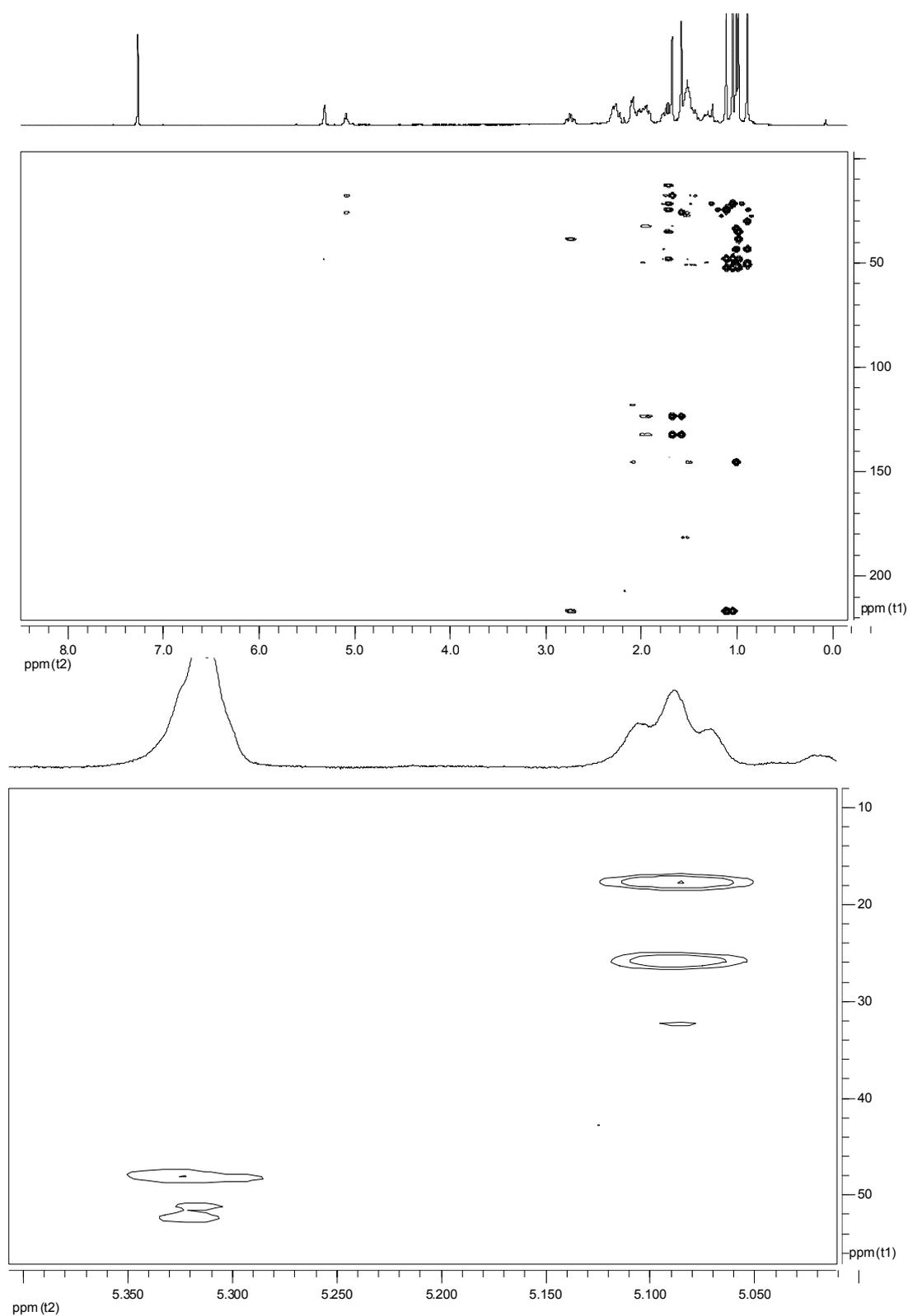


FIGURA 4.96. Experimento de HMBC e ampliação da substância RH-6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

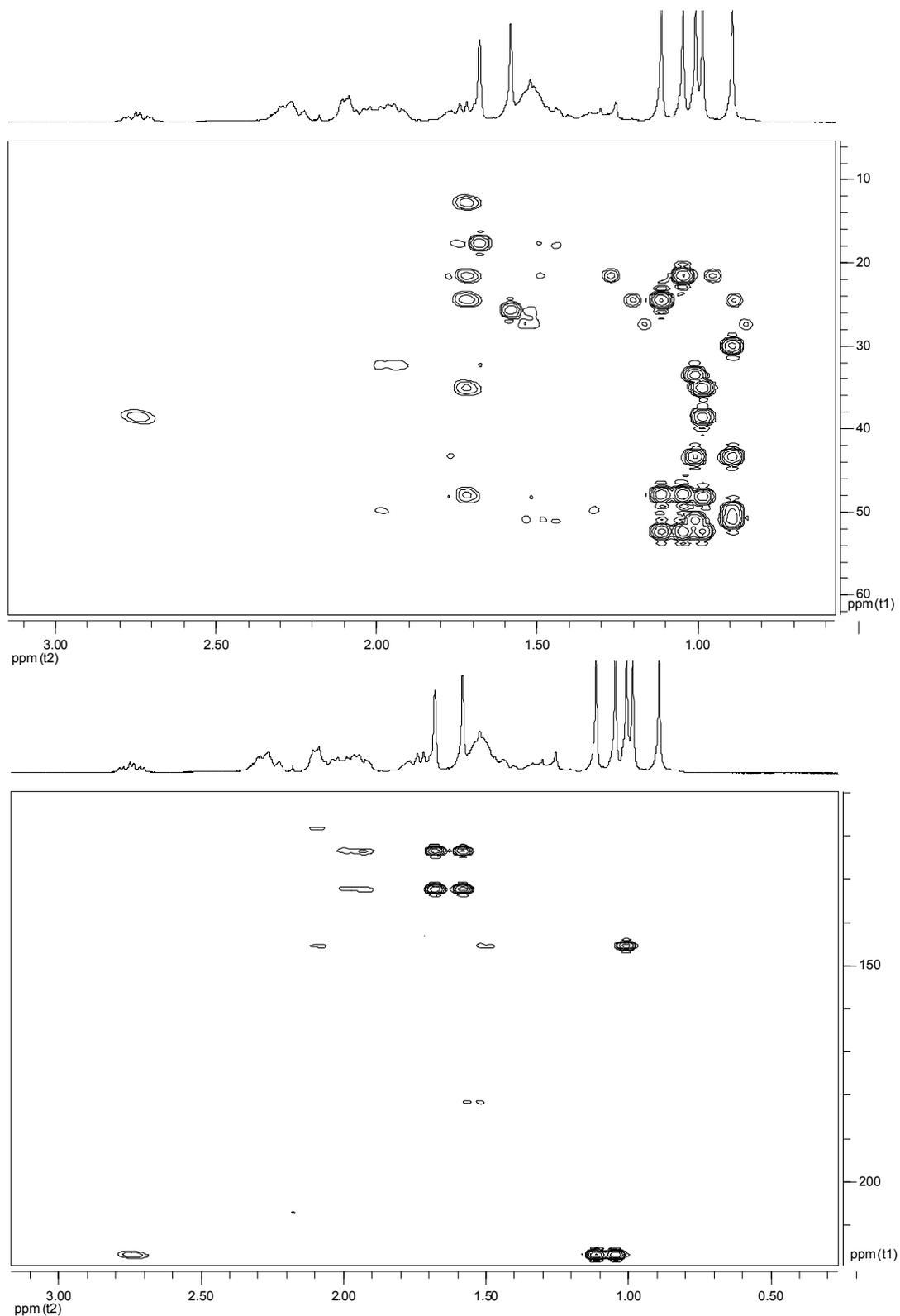


FIGURA 4.96a. Ampliações do experimento de HMBC da substância RH-6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.8. Identificação da substância RD-11

A substância RD 11 foi obtida do extrato diclorometano e metanol da raiz de *R. praetermissa*, como cristal agulha branco. Ao ser revelado em vanilina apresentou cor verde escuro. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.109, Tabela 4.6), revelou a presença de quatro metilas entre  $\delta$  1,10 e  $\delta$  1,48, sinais para o anel furano em  $\delta$  7,44,  $\delta$  7,43 e  $\delta$  6,31, e sinal de grupo metila de acetato em  $\delta$  2,16.

No espectro de carbono de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.110, Tabela 4.6), foi observado sinais para carbonos de lactonas e grupo acetato em  $\delta$  166,8,  $\delta$  167,8 e 169,6 e carbonos oxigenados em  $\delta$  58,9,  $\delta$  69,5,  $\delta$  70,8,  $\delta$  73,9,  $\delta$  77,5,  $\delta$  78,8 e  $\delta$  79,5.

Foram analisados os sinais apresentados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.109),  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.110) e Massas (Figura 4.111), e neste último foi observado o pico [M-H] com  $m/z$  564 Daltons, que implica em uma fórmula molecular de  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{12}$ . Com base na fórmula molecular e no perfil do espectro de hidrogênio foi sugerida a possibilidade de um limonóide. O experimento de HMBC (Figura 4.112) revelou as correlações de H-21 ( $\delta$  7,44,  $\delta$  141,3) com C-22 ( $\delta$  109,5) e C-20 ( $\delta$  119,8); de H-23 ( $\delta$  7,43,  $\delta$  143,4) com C-22, C-20 e C-21, conforme mostra a figura 4.97.

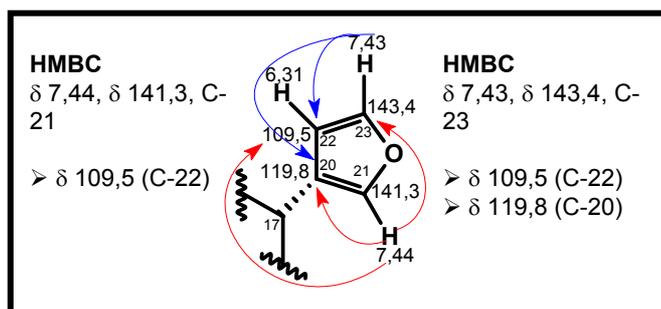


FIGURA 4.97. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,44 (C-21) e  $\delta$  7,43 (C-23).

O sinal em  $\delta$  5,76 foi atribuído a H-17, no HSQC (Figura 4.113) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  77,5. No experimento de HMBC (Figura 4.98, Figura 4.112), o H-17 apresentou correlações com a Me-18 ( $\delta$  18,8), C-13 ( $\delta$  39,8), C-14 ( $\delta$  69,5), C-22, C-20 e C-21. O sinal da Me-18 ( $\delta$  1,17,  $\delta$  18,8) correlacionou no HMBC com C-12 ( $\delta$  31,6), C-13 ( $\delta$  39,8), C-14 ( $\delta$  69,5) e C-17 ( $\delta$  77,5), conforme

figura 4.98. Foi analisado também o espectro de carbono (Figura 4.113, Tabela 4.6) e foi observado um sinal em  $\delta$  58,9 que via HSQC, apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  3,64 s, estes valores de deslocamentos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) levaram-nos a supor a presença de epóxido. Segundo o HMBC (Figura 4.112), o sinal em  $\delta$  3,64 (Figura 4.98) correlacionou com  $\delta$  166,8. O valor deste último deslocamento de carbono e o do H-17 ( $\delta$  5,76) sugeriu-nos a presença de lactona no anel D. O valor de deslocamento em  $\delta$  166,8 foi atribuído ao C-16 e o em  $\delta$  58,9 foi atribuído ao C-15, como visto na figura 4.98.

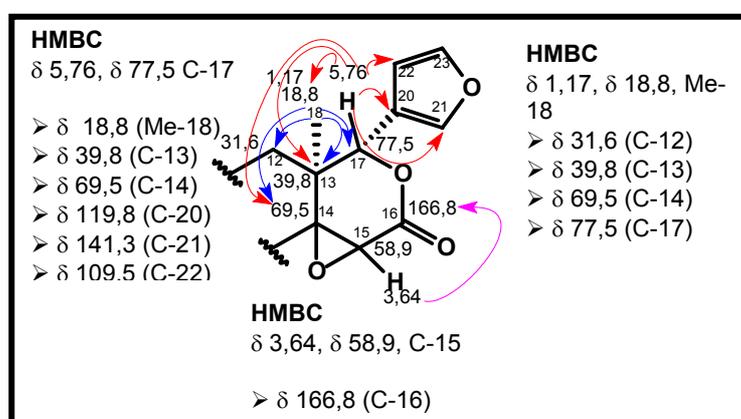


FIGURA 4.98. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,76 (H-17),  $\delta$  3,64 (H-15) e  $\delta$  1,17 (Me-18).

A Me-30 ( $\delta$  1,48,  $\delta$  22,4, Figura 4.99) mostrou via HMBC (Figura 4.112) correlações com C-8 ( $\delta$  41,3), C-9 ( $\delta$  47,8), C-7 ( $\delta$  70,8), C-14 ( $\delta$  69,5), estas duas últimas correlações garantiram que o sinal em  $\delta$  1,48 s correspondia a Me-30. Com base no conhecimento da biosíntese dos limonóides, sabe-se que eles são oxigenados em C-7, atribuiu-se por consequência o valor do deslocamento em  $\delta$  70,8 ao C-7. O deslocamento em  $\delta$  4,67 m (H-7) sugeriu função éster. O sinal de H-7 (Figura 4.99) não apresentou correlação no HMBC, porém no COSY (Figura 4.114) foi verificado que acoplou com outro sinal em  $\delta$  1,92 m, o qual pelo HSQC (Figura 4.113) e DEPT (Figura 4.115) era um  $\text{CH}_2$  ( $\delta$  23,7), logo, este sinal foi atribuído ao H-6. Foi observado pelo COSY (Figura 4.114) que H-6 (Figura 4.99) acoplou com o sinal em  $\delta$  2,54 dd ( $J = 5,9$  e  $12,5$  Hz), o qual via HSQC correspondeu ao deslocamento em  $\delta$  49,5 (CH no DEPT), este foi atribuído a C-5. O HMBC mostrou C-5 correlacionando com o hidrogênio de duas metilas. A Me-29

( $\delta$  1,26,  $\delta$  28,3) correlacionou via HMBC com C-4 ( $\delta$  79,5), Me-28 ( $\delta$  22,3) e C-5 ( $\delta$  49,5); a Me-28 mostrou correlação com a Me-29, C-5 e C4, conforme mostrada na figura 4.99.

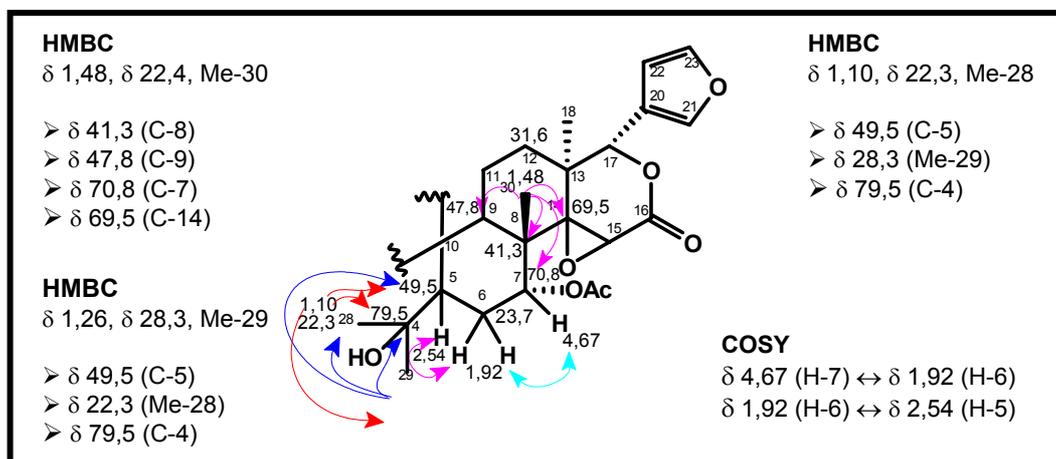


FIGURA 4.99. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,48 (Me-30),  $\delta$  1,26 (Me-29),  $\delta$  1,10 (Me-28),  $\delta$  4,67 (H-7) e  $\delta$  1,92 (H-6).

O sinal em  $\delta$  79,5 sugeriu a existência de um oxigênio em C-4 que indicou anel A-seco. O sinal do carbono em  $\delta$  51,3, o qual correlacionou com H-5 ( $\delta$  2,54), foi atribuído ao C-10. Outro sinal em  $\delta$  2,94 d ( $J = 4,5$  Hz, Figura 4.100) correlacionou com  $\delta$  51,3 (C-10), C-14 ( $\delta$  69,5), C-8 ( $\delta$  41,3), C-1 ( $\delta$  78,8) e C-19 ( $\delta$  102,8), sugerindo ser este o H-9.

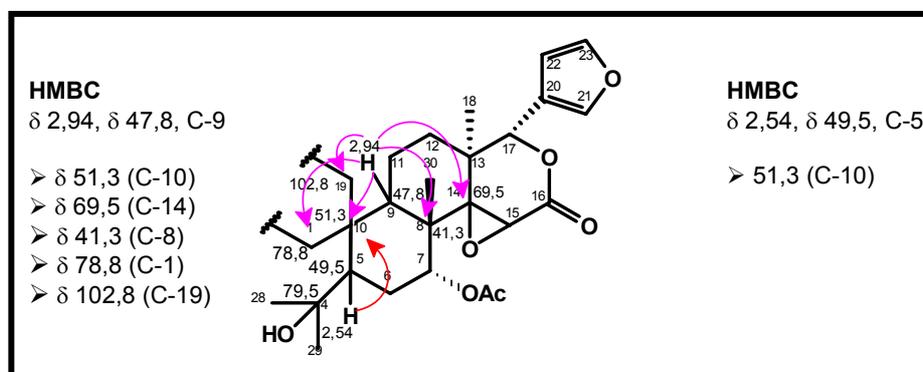


FIGURA 4.100. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,94 (H-9) e  $\delta$  2,54 (H-5).

Com a análise do experimento de COSY (Figura 4.101, Figura 4.114), foi verificado que H-9 ( $\delta$  2,94) acoplou com um sinal em  $\delta$  4,64 m ( $\delta$  73,9), que foi atribuído ao H-11. Este último acoplou com um CH<sub>2</sub> em  $\delta$  2,00 d ( $J = 8,0$  Hz) que no HSQC apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  31,6, este já havia sido atribuído ao C-12 devido a correlação com a Me-18. Como C-11 tem deslocamento em  $\delta$  73,9, sugeriu-se adicionar uma hidroxila nesta posição.

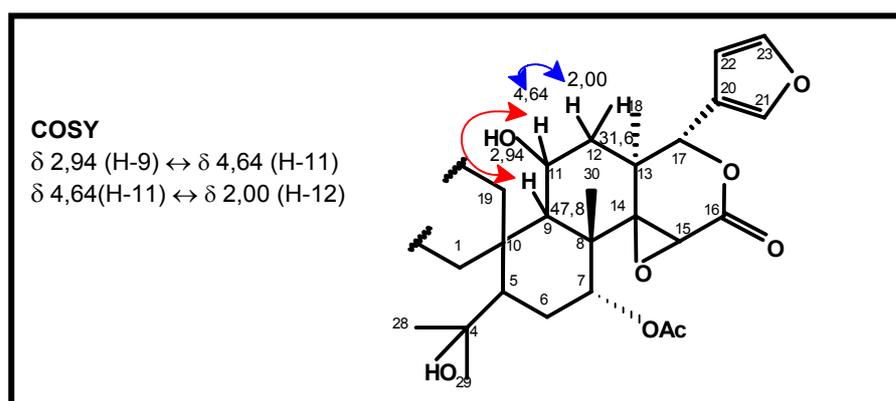


FIGURA 4.101. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,94 (H-9),  $\delta$  4,64 (H-11) e  $\delta$  2,00 (H-12).

O carbono em  $\delta$  78,8 (C-1), via experimento de HSQC (Figura 4.113), correspondeu ao sinal em  $\delta$  4,12 e, via COSY (Figura 4.102, Figura 4.114), mostrou acoplamento com H-2. Os sinais em  $\delta$  2,71 e  $\delta$  3,00 acoplaram-se entre eles. No experimento de HMBC (Figura 4.102, Figura 4.112), o sinal em  $\delta$  3,00 não mostrou correlação, porém o sinal em  $\delta$  2,71 mostrou correlação com um sinal de lactona em  $\delta$  167,8. Estas correlações sugeriram uma hidroxila localizada em C-1 ( $\delta$  78,8), uma lactona em C-3 (167,8), e os sinais em  $\delta$  3,00 e  $\delta$  2,71 foram atribuídos ao H-2 ( $\delta$  35,8), conforme mostrado na figura 4.102.

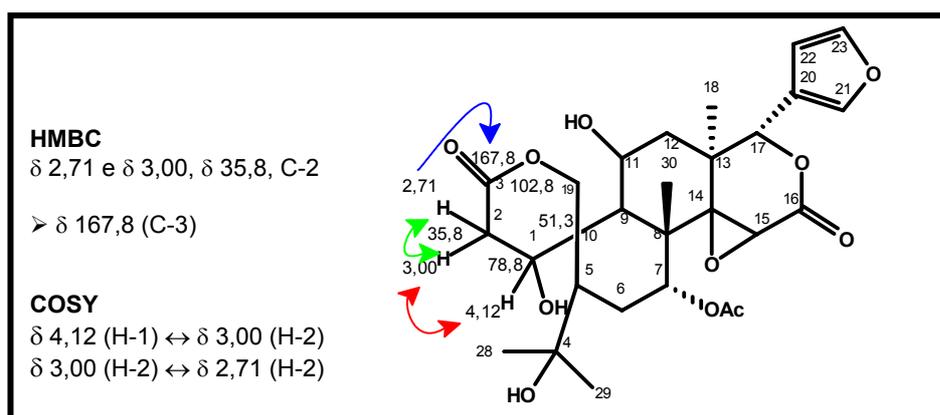


FIGURA 4.102. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,12 (H-1),  $\delta$  3,00 (H-2) e  $\delta$  2,71 (H-2).

O sinal em  $\delta$  102,8 era um CH (Figura 4.115) e como não foi observado sinal de carbono olefínico correspondente, ele deve ser um hemiacetal. O hidrogênio correspondente a este sinal via HSQC foi encontrado em  $\delta$  6,13, logo os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  só podem pertencer a C-19, isto explicaria as correlações de H-19 (Figura 4.103) com a lactona em  $\delta$  167,8 (C-3) e com o carbono carbinólico em  $\delta$  78,8 (C-1).

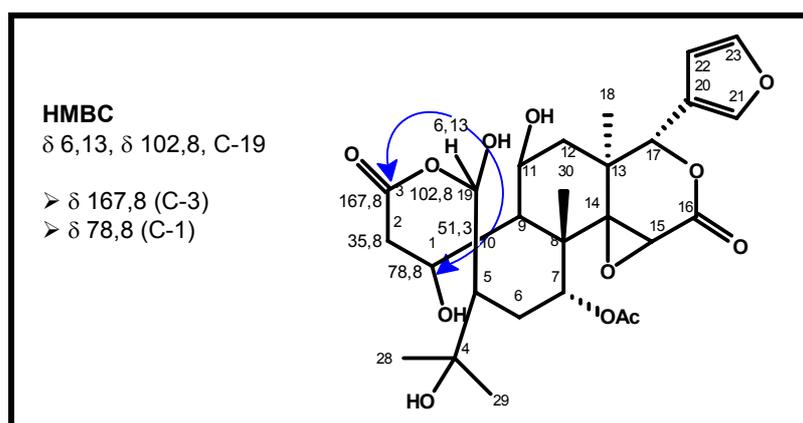


FIGURA 4.103. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,13 (H-19).

A substância RD-11 apresentou esqueleto básico de uma substância isolada de *Citrus* conhecida como ichangina (BENNET & HASEGAWA, 1980), conforme visto na figura 4.104.

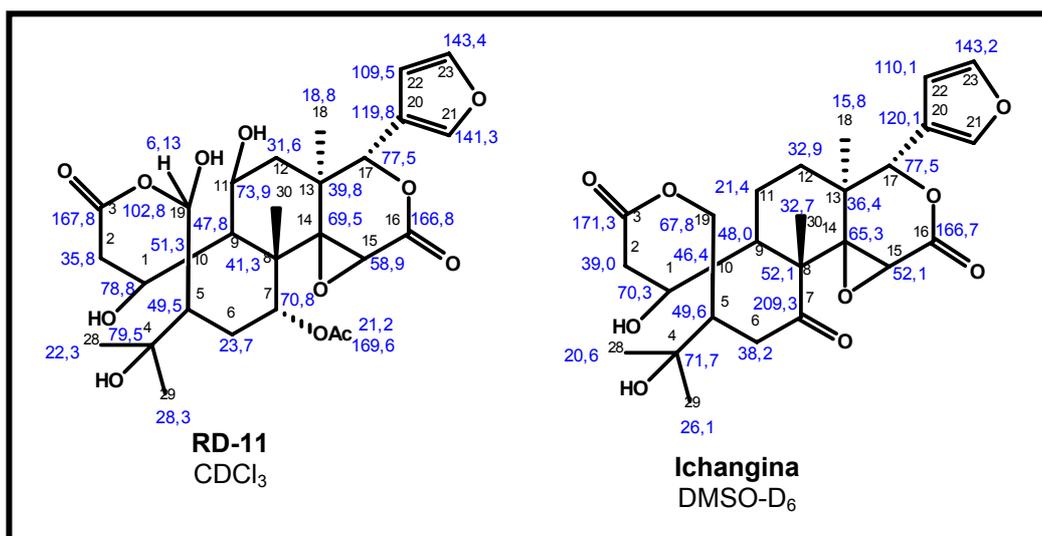


FIGURA 4.104. Comparação dos deslocamentos de carbono de RD-11 com da substância Ichangina.

A estereoquímica da substância foi sugerida com base nos experimentos de gNOESY (Figura 4.116), a estereoquímica dos centros não discutidos foi baseada na biosíntese dos limonóides. A Me-30 ( $\delta$  1,48) que pela biosíntese encontra-se em  $\beta$ , causou nOe em H-19 ( $\delta$  6,19), sugerindo que ambos estão do mesmo lado do plano, conseqüentemente, o anel espiro precisa estar em  $\beta$  (entre H-10 e H-19). Logo, entre H-10 e H-1 o anel espiro estaria em  $\alpha$ . A Me-28 causou nOe em H-19, isto sugeriu C-4 também em  $\beta$ , conforme figura 4.105.

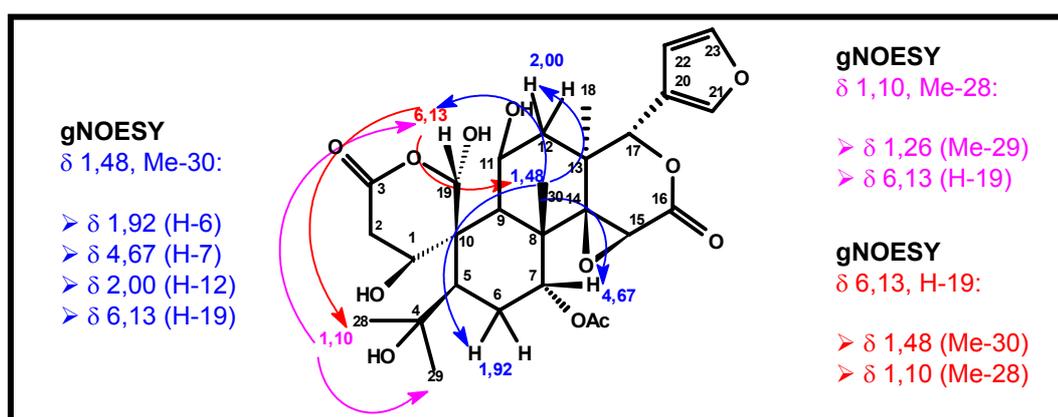


FIGURA 4.105. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,48 (Me-30),  $\delta$  1,10 (Me-28) e  $\delta$  6,13 (H-19).

A Me-18 ( $\delta$  1,17) causou nOe em  $\delta$  2,94 (H-9),  $\delta$  4,64 (H-11) e  $\delta$  3,64 (H-15) sugerindo que estes estão todos no mesmo plano, como pela biosíntese a

Me-18 esta em  $\alpha$ , isto implica que H-9, H-11 e H-15 também estão em  $\alpha$ , conforme visto na figura 4.106. Ao se irradiar o H-11 ( $\delta$  4,64), irradiou-se também o H-7 ( $\delta$  4,67). O H-11 causou nOe na Me-18, confirmando sua estereoquímica em  $\alpha$ . O H-7 causou nOe na Me-30, confirmando sua posição em  $\beta$ .

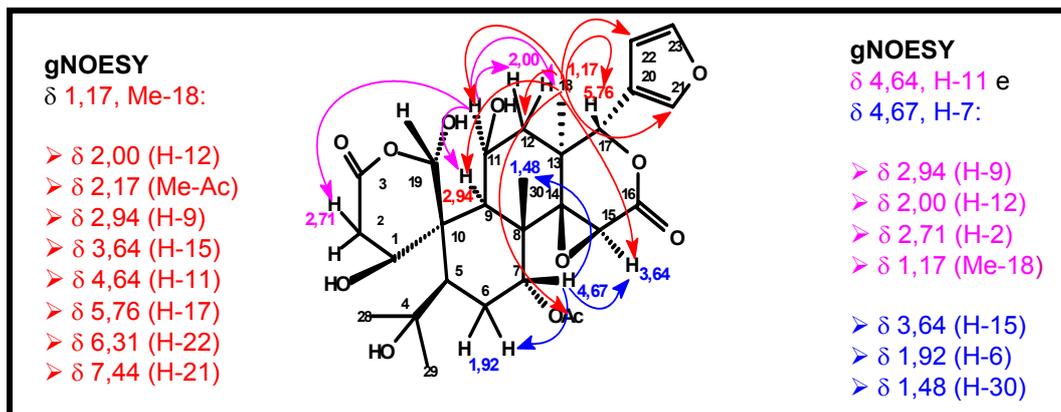


FIGURA 4.106. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,17 (Me-18),  $\delta$  4,64 (H-11) e  $\delta$  4,67 (H-7).

O sinal em  $\delta$  2,94 (H-9) causou nOe em H-1 ( $\delta$  4,12), H-11 ( $\delta$  4,64) e Me-18 ( $\delta$  1,17), confirmando que todos estão em posição  $\alpha$ , conforme figura 4.107.

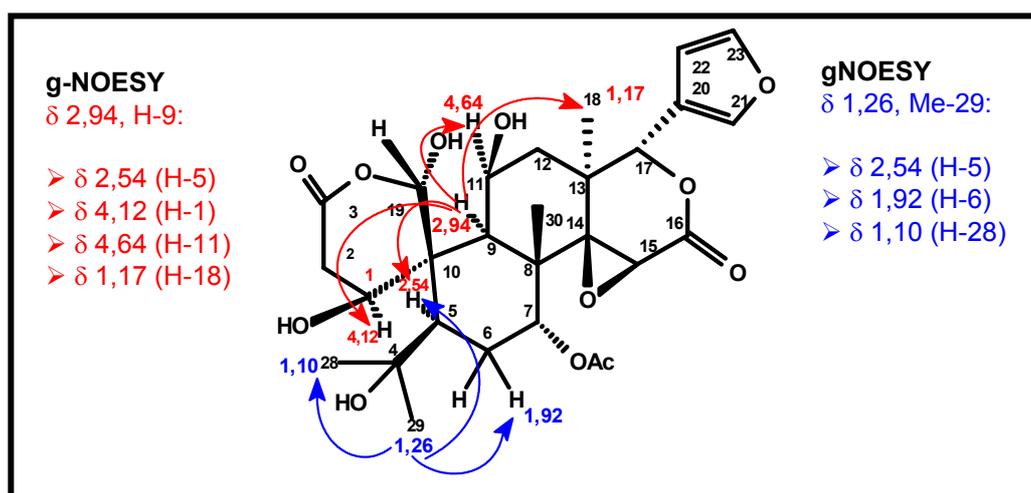


FIGURA 4.107. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,94 (H-9) e  $\delta$  1,26 (Me-29).

Com base nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, Massas, experimentos de HMBC, COSY, HSQC e gNOESY, propôs-se a estrutura mostrada na figura 4.108.

Segundo levantamento realizado no *Chemical Abstract*, a substância RD-11 é inédita, logo, denominou-se de **11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -diidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina**.

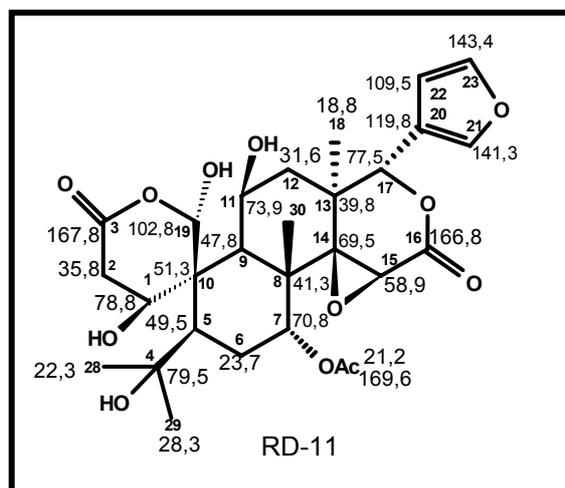


FIGURA 4.108. Estrutura proposta para a substância RD-11.

TABELA 4.6. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-11 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C	RD-11	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4,12 sl	78,8
2	2,71 dd ( $J= 1,6; 17,0$ Hz) e 3,00 dd (3,5 e 17,0)	35,8
3		167,8
4		79,5
5	2,54 dd ( $J= 5,9; 12,5$ Hz)	49,5
6	1,92 m	23,7
7	4,67 sl	70,8
8		41,3
9	2,94 d ( $J= 4,5$ Hz)	47,8
10		51,3
11	4,64 m	73,9
12	2,00 d ( $J= 8,0$ Hz)	31,6
13		39,8
14		69,5
15	3,64 s	58,9
16		166,8
17	5,76 s	77,5
18	1,17 s	18,8
19	6,13 s	102,8
20		119,8
21	7,44 sl	141,3
22	6,31 sl	109,5
23	7,43 d ( $J= 1,8$ Hz)	143,4
28	1,10 s	22,3
29	1,26 s	28,3
30	1,48 s	22,4
7-OAc	2,17	169,6 e 21,2

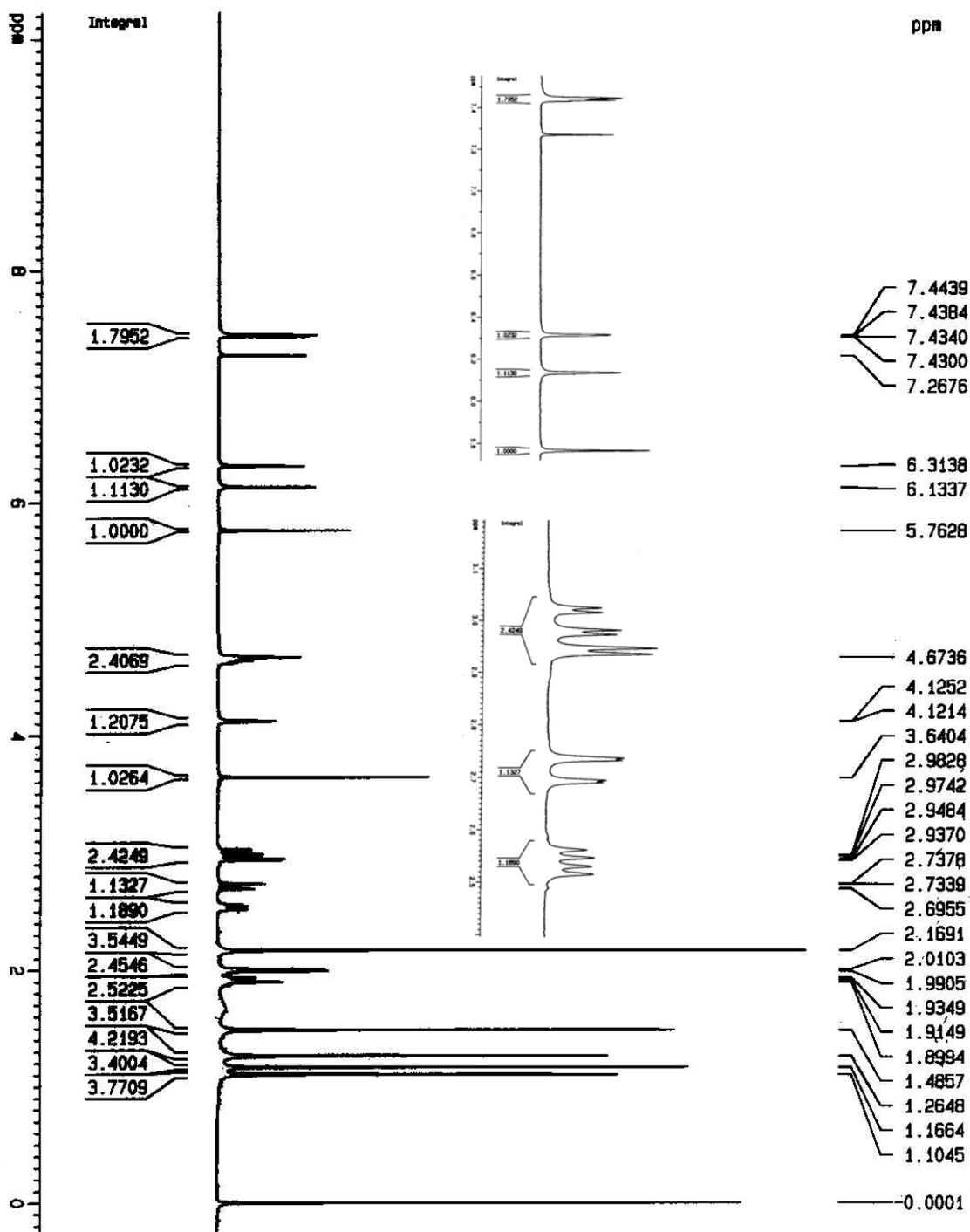


FIGURA 4.109. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância RD-11 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

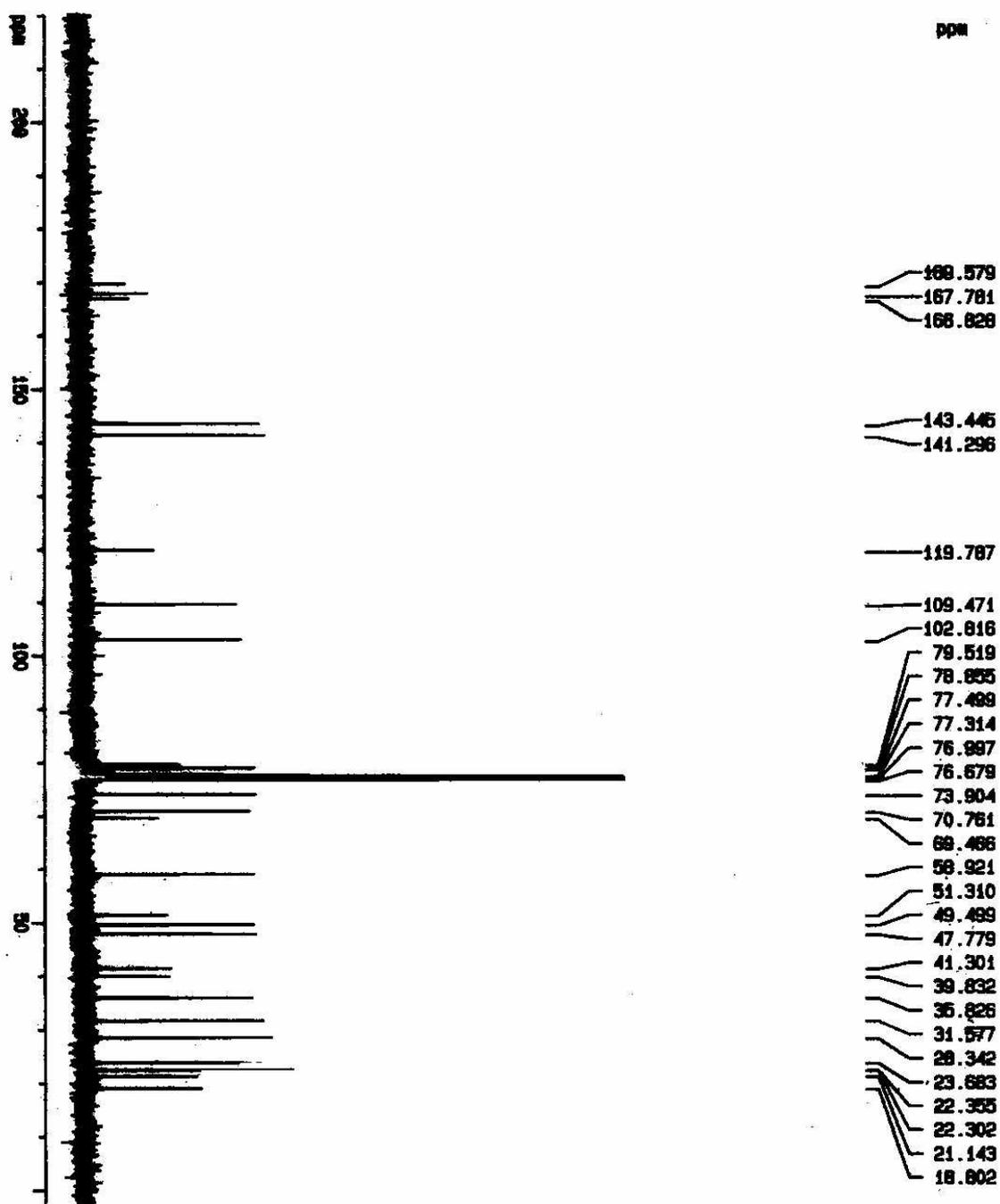


FIGURA 4.110. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância RD-11 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

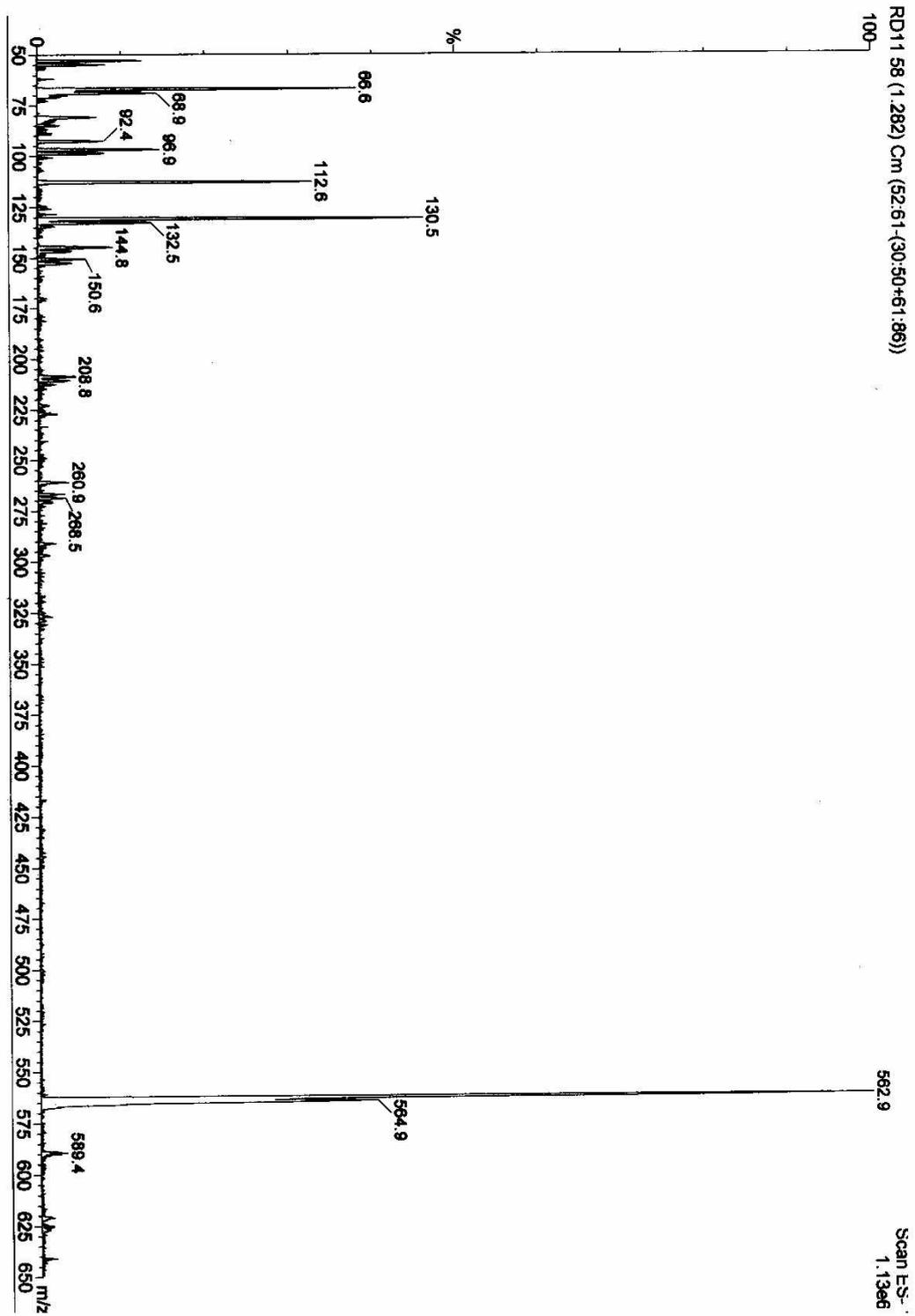


FIGURA 4.111. Espectro de massas da substância RD-11 (ES<sup>-</sup>).

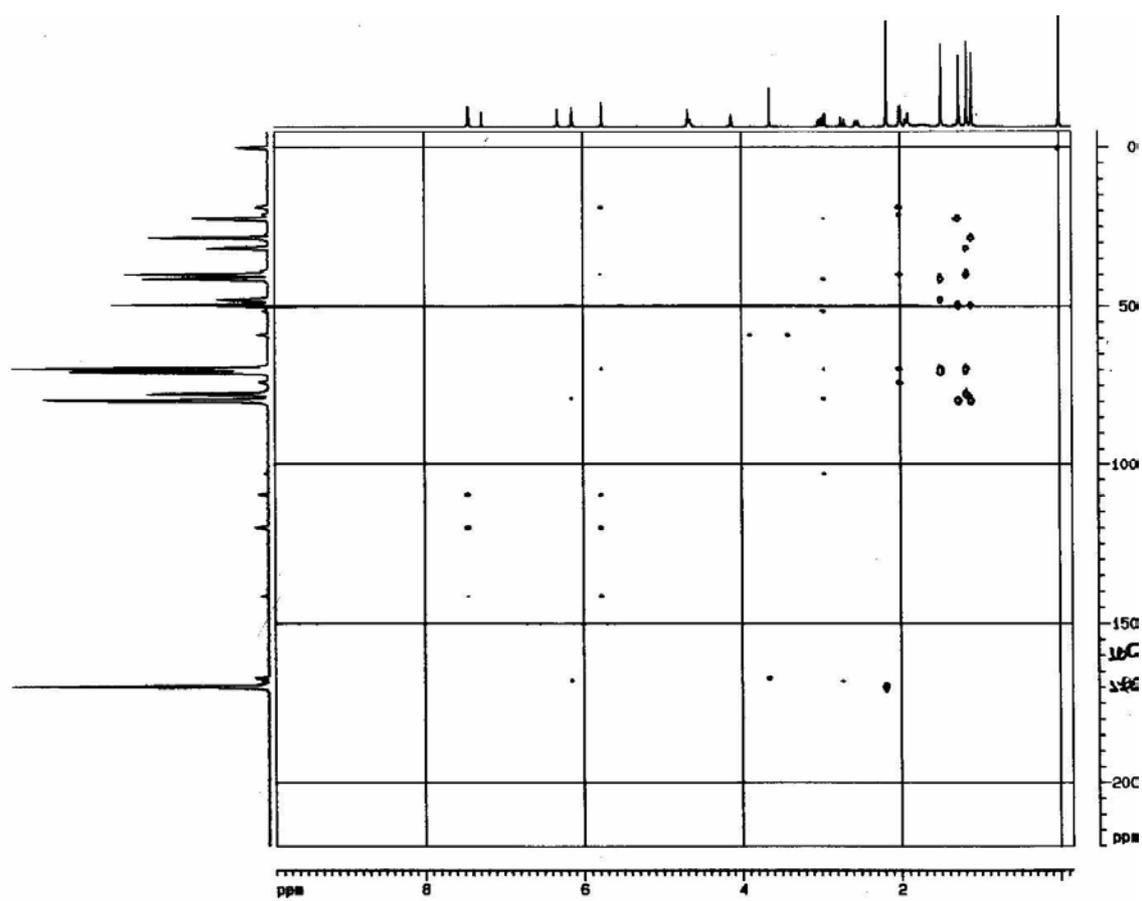


FIGURA 4.112. Experimento de HMBC da substância RD-11 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



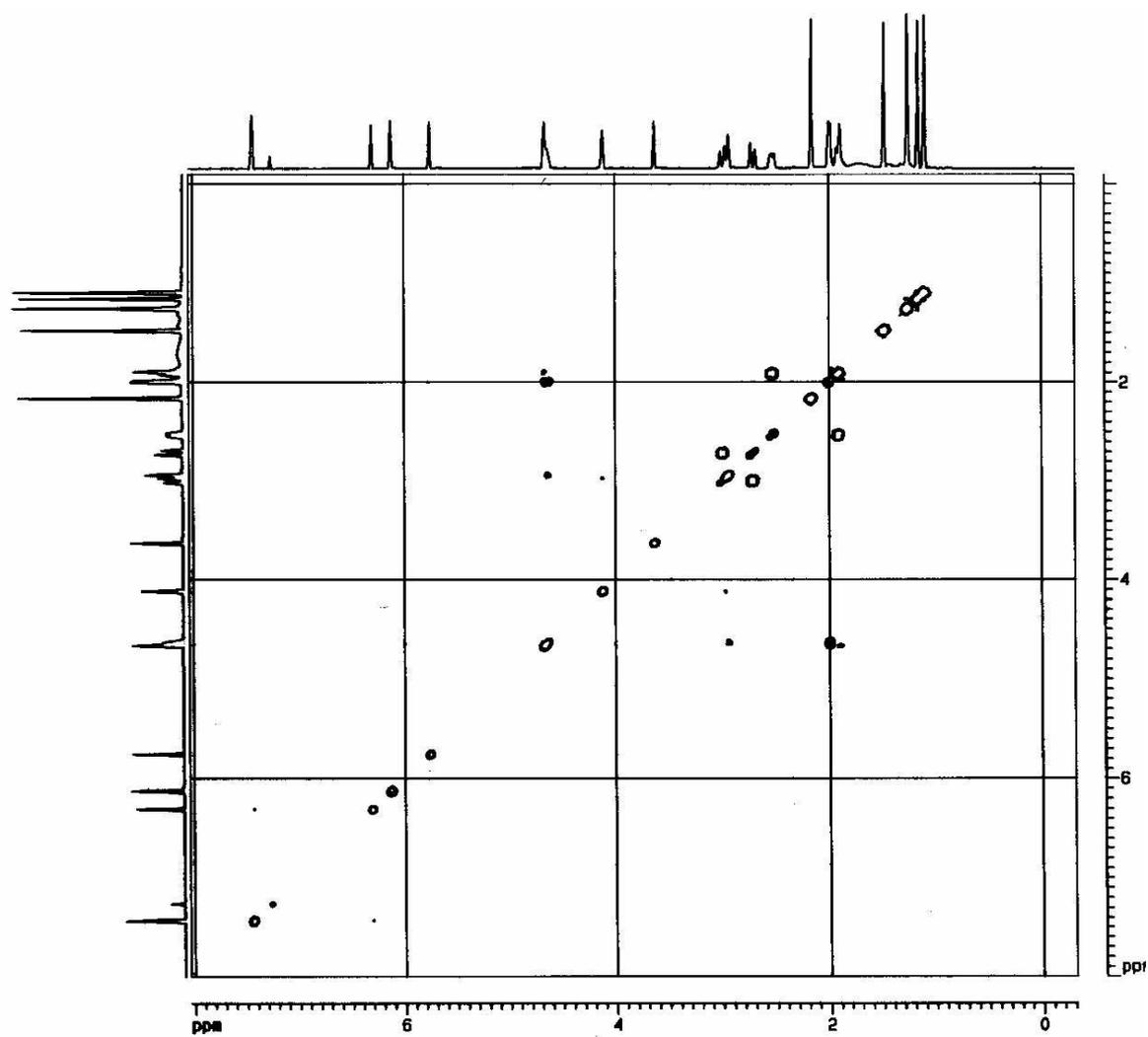


FIGURA 4.114. Experimento de COSY da substância RD-11 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

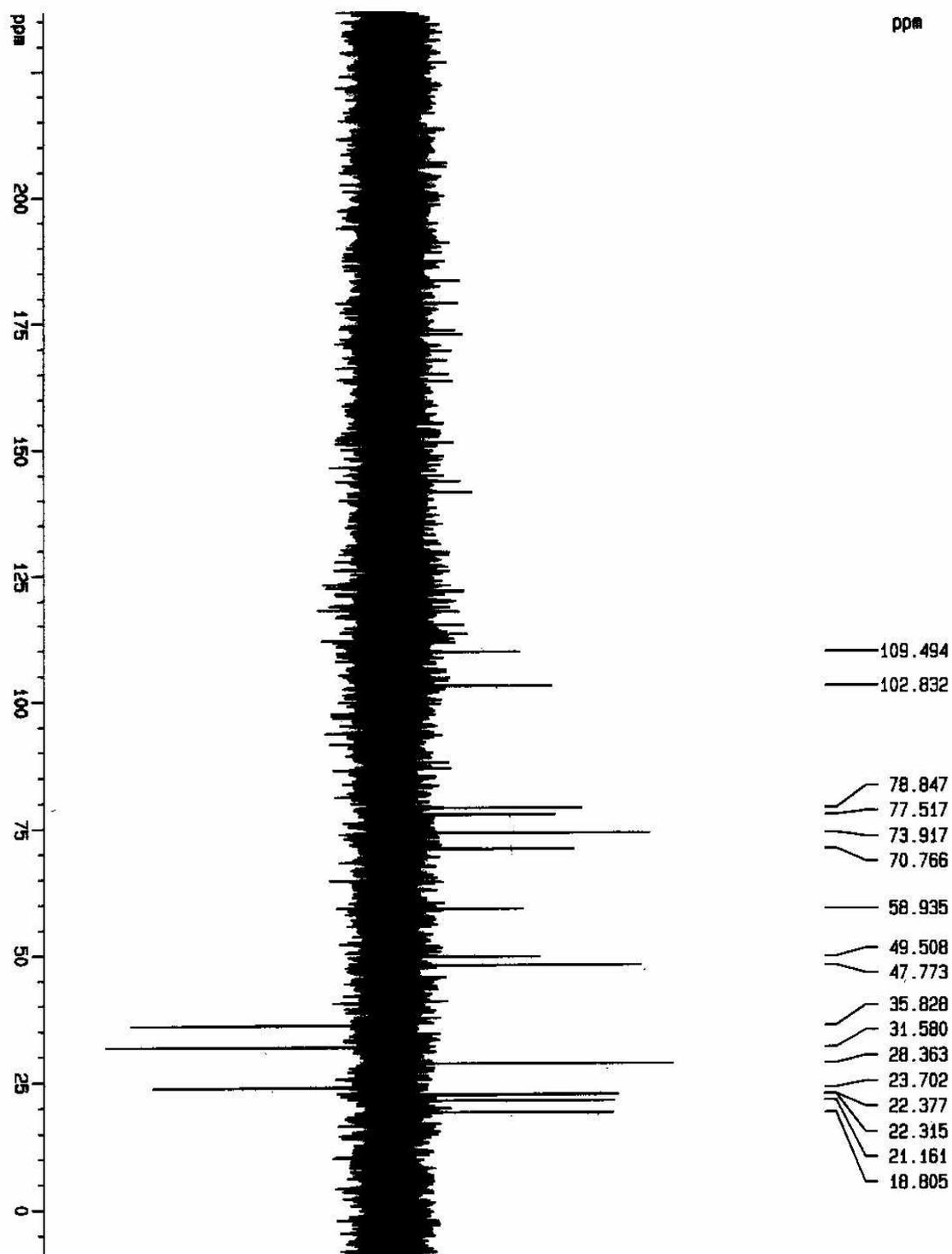
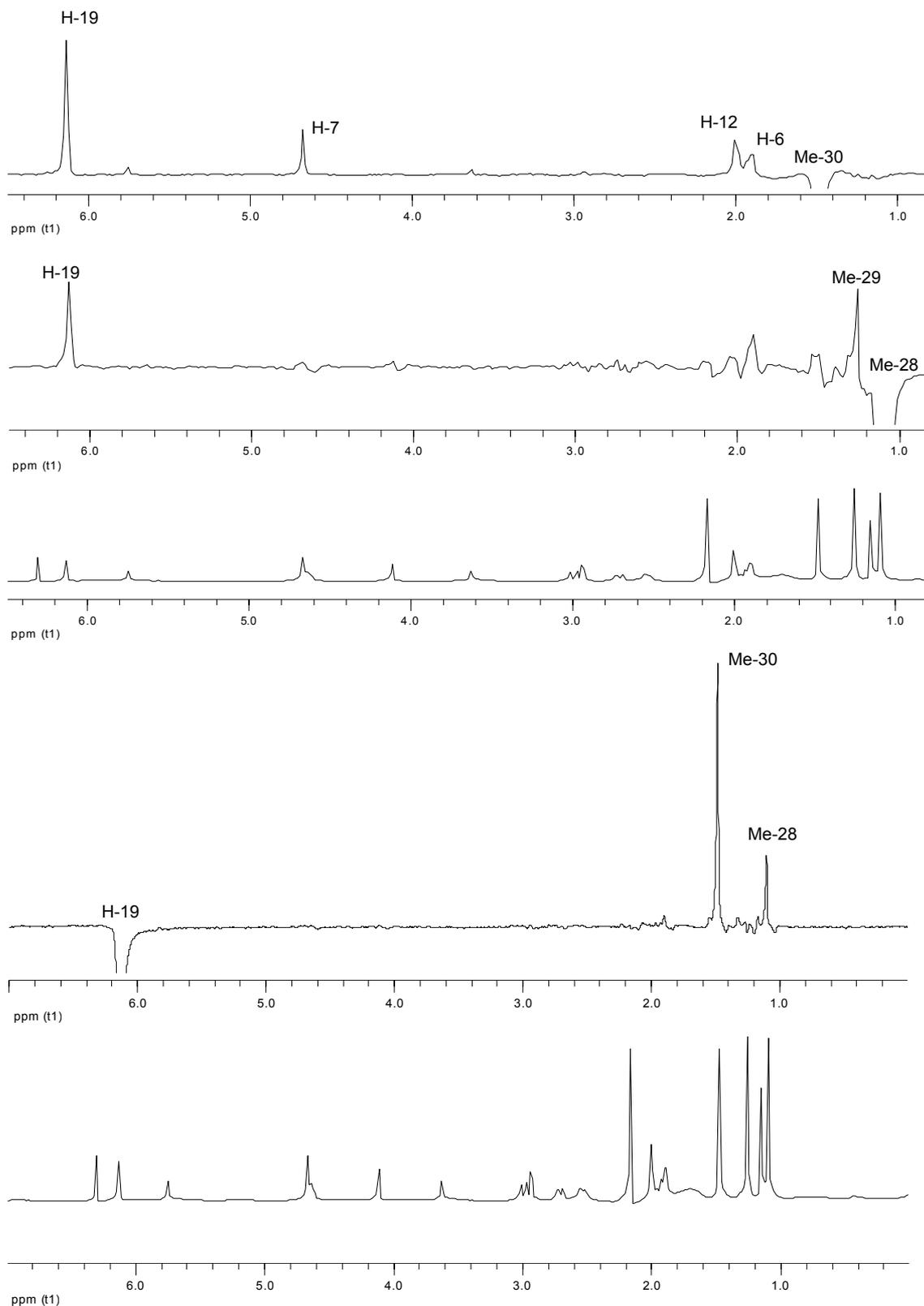


FIGURA 4.115. Espectro de DEPT da substância RD-11 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.116. Espectro de gNOESY da substância RD 11 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

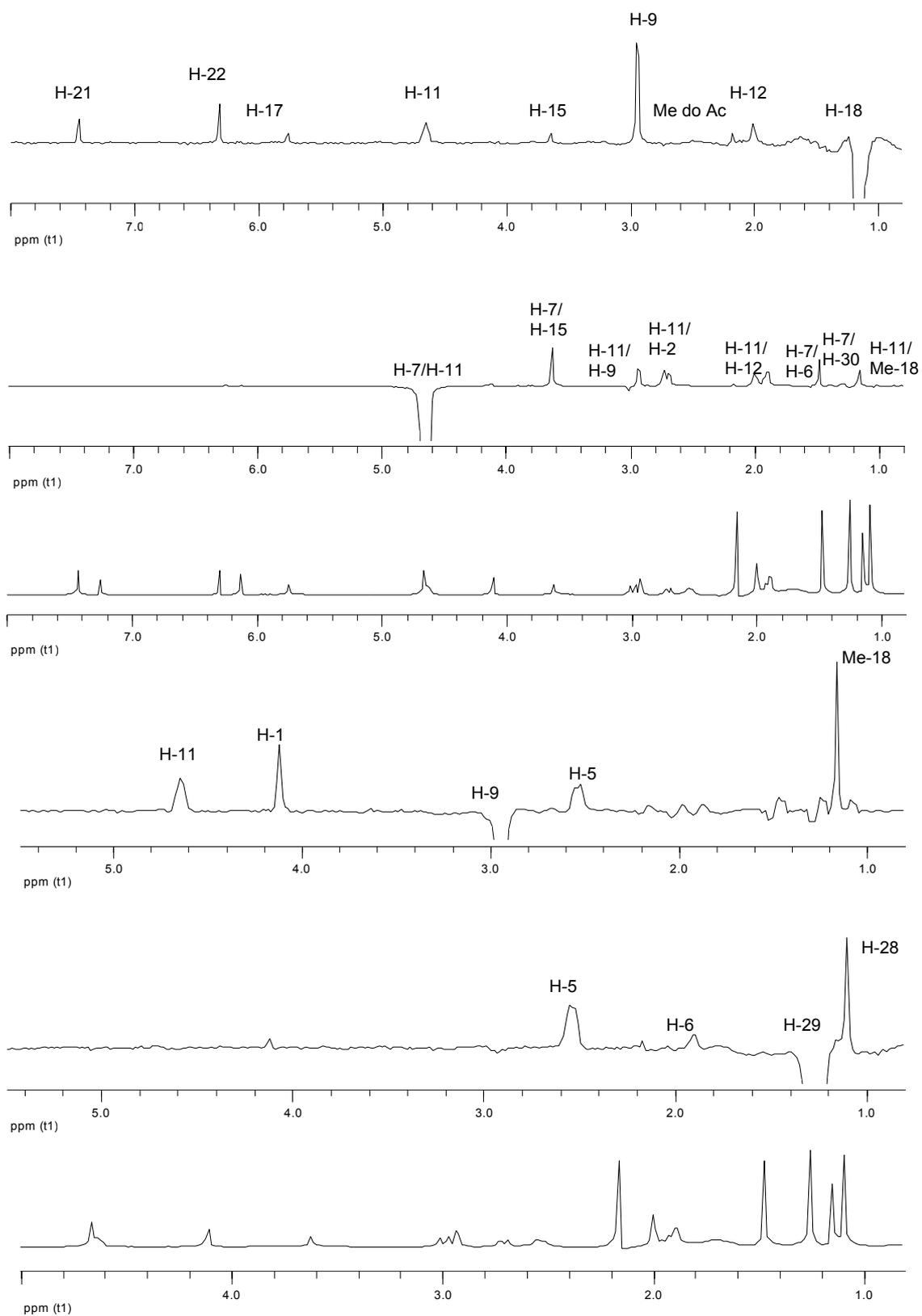


FIGURA 4.116a. Espectro de gNOESY da substância RD 11 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.9. Identificação da substância RD-22ab

A substância em questão foi encontrada inicialmente como um sólido vermelho devido à presença de pigmento já encontrado em outras amostras. Ela foi isolada em pequena quantidade no extrato diclorometano. Quando revelada em vanilina apresentou cor vermelha intensa. Seu espectro de hidrogênio (Figura 4.122 e 4.122a, Tabela 4.7) mostrou sinal em  $\delta$  10,04 sl; sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,19-6,72 m, e um sinal largo em  $\delta$  8,43 que pode ser de um hidrogênio ligado a um nitrogênio. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.123) apresentou sinais em  $\delta$  192,5,  $\delta$  129,9,  $\delta$  126,3,  $\delta$  125,9,  $\delta$  122,4,  $\delta$  111,6 e  $\delta$  104,6.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.122) foi observado sinal em  $\delta$  10,04 sl que via HSQC (Figura 4.124) apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  192,5, provavelmente um aldeído. Um outro sinal em  $\delta$  7,78 (dd,  $J = 8,5$  e  $1,5$  Hz) via HSQC (Figura 4.124a) apareceu ligado ao sinal em  $\delta$  122,4, no experimento de COSY (Figura 4.117, Figura 4.125), este sinal mostrou acoplamento com outro em  $\delta$  8,19, que por sua vez é um sinal complexo parecendo um tripleto com  $J = 0,75$  Hz, porém ao ser observado com atenção é nítida a existência de mais duas linhas, o que poderia ser um dd; via HSQC (Figura 4.124a) este sinal ( $\delta$  8,19) apareceu ligado ao  $\delta$  126,3. O valor da constante pequena indicou que os sinais em  $\delta$  7,78 e  $\delta$  8,19 estavam em posição meta um em relação ao outro. O valor do deslocamento em  $\delta$  8,19 sugeriu estar este em posição "orto" ao grupo carbonila. O experimento de HMBC (Figura 4.126, 4.126a) mostrou correlações do sinal do aldeído em  $\delta$  10,04 com  $\delta$  122,4 e  $\delta$  129,9, conforme figura 4.117.

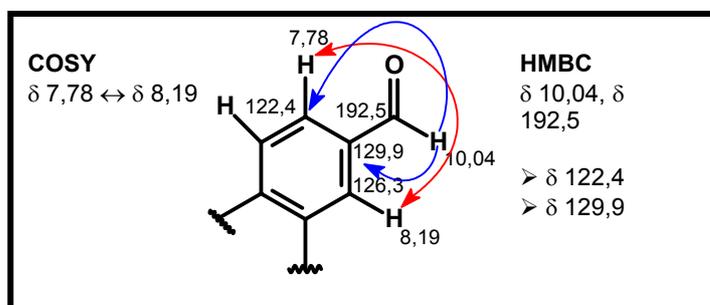


FIGURA 4.117. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,78 e  $\delta$  10,04.

O sinal em  $\delta$  7,78 (Figura 4.118, H-5) mostrou acoplamento via COSY (Figura 4.125) com  $\delta$  7,49 (dd,  $J = 8,4$  e  $0,7$  Hz), via HSQC (Figura 4.124a) este último hidrogênio apareceu ligado ao carbono  $\delta$  111,6 que foi atribuído ao C-4. O sinal em  $\delta$  7,49 (Figura 4.118) mostrou acoplamento no experimento de COSY com o sinal complexo em  $\delta$  6,72 ( $\delta$  104,6), este último sinal de hidrogênio pode ser visto no espectro de hidrogênio figura 4.122a. O sinal em  $\delta$  6,72 apresentou todas as suas constantes muito pequenas indicando acoplamento à longa distância. Na análise do experimento de COSY foi observado o sinal em  $\delta$  6,72 (Figura 4.118) acoplado com outro em  $\delta$  7,32 (dd,  $J = 2,4$  e  $3,2$  Hz). No experimento de HSQC, verificou-se que este último sinal de hidrogênio apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  125,9. O sinal em  $\delta$  6,72 foi atribuído ao C-3 e o em  $\delta$  7,32 foi ao C-2, conforme figura 4.118.

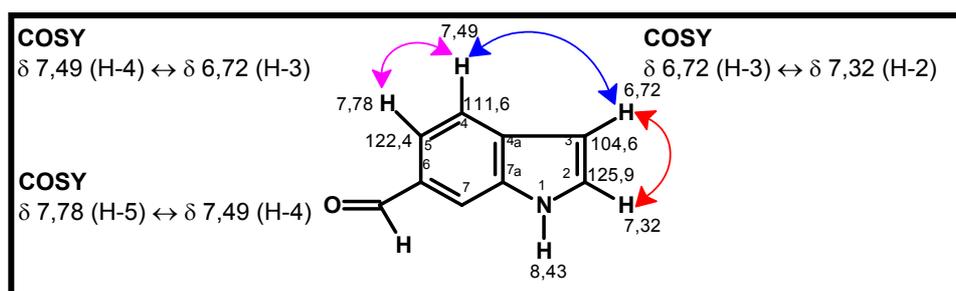


FIGURA 4.118. Acoplamentos apresentados no experimento de COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,78 (H-5),  $\delta$  7,49 (H-4),  $\delta$  7,32 (H-2) e  $\delta$  6,72 (H-3).

Os sinais em  $\delta$  6,72 e  $\delta$  7,32 sugeriram a presença de um segundo anel junto ao benzaldeído, provavelmente um anel contendo um nitrogênio já que apareceu um sinal singleto pequeno e largo em  $\delta$  8,43. Isto poderia explicar o acoplamento à longa distância. Concluiu-se que esta substância tratava-se de um outro indol, porém bem mais simples que o bisindol (RH-3).

No HMBC (Figura 4.126a) foi verificada a presença da correlação de  $\delta$  7,49 (H-4, Figura 4.119) com um sinal em  $\delta$  128,0 e  $\delta$  129,9. Foi observada também a correlação de  $\delta$  7,78 (H-5) com  $\delta$  126,3 e  $\delta$  139,0.

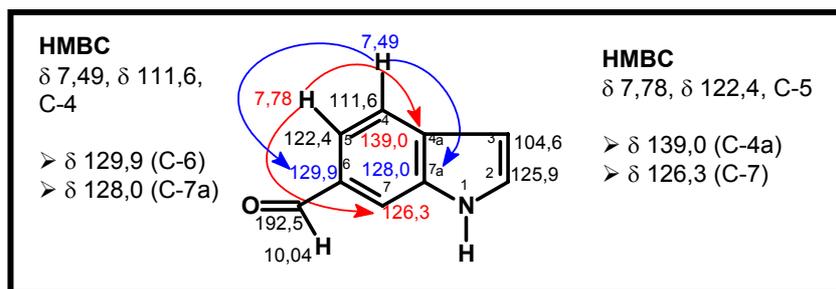


FIGURA 4.119. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,49 (C-4) e  $\delta$  7,78 (C-5).

Outras correlações observadas no HMBC (Figura 4.126) foram em  $\delta$  8,19 (H-7) com  $\delta$  122,4,  $\delta$  192,5,  $\delta$  139,0; e de  $\delta$  10,04 com  $\delta$  122,4 e  $\delta$  129,9, conforme visto na figura 4.120.

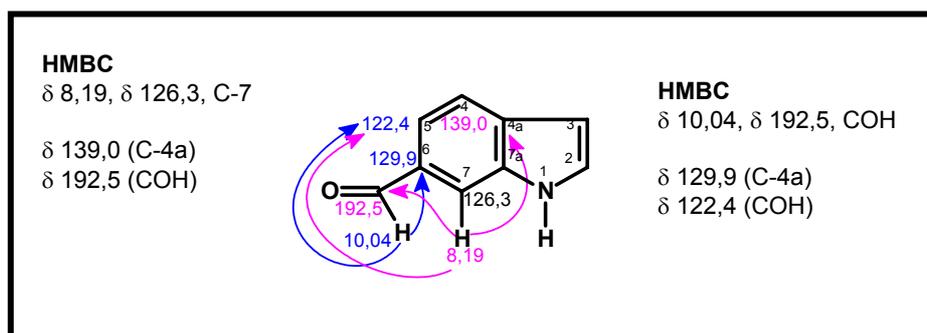


FIGURA 4.120. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  8,19 (C-7) e  $\delta$  10,04.

A ausência de correlação no HMBC para os sinais em  $\delta$  6,72 e  $\delta$  7,32 complicou a justificativa de um anel indol, porém com base no espectro e suas multiplicidades, e a experiência anterior com o bisindol, continuou-se a propor a existência de um anel indol. O espectro de carbono também não apresentou os carbonos quaternários, estes foram observados no experimento de HMBC.

Com base nos dados de RMN uni e bidimensionais acima discutidos, propôs-se à substância 6-formilindol (Figura 4.121), com registro no *Chemical Abstract* de 1196-70-9, é também conhecida como 1H-indol-6-carbaldeído. Pelo levantamento feito no *Chemical Abstract* foi constatado que RD-22ab é uma substância conhecida, encontrada tanto como produto natural como sintético, inclusive pode ser encontrada em catálogos (Aldrich, PolyOrganix Product List, Asta

Tech Product List, e etc.) para venda, sendo muito utilizada para sínteses de outros produtos.

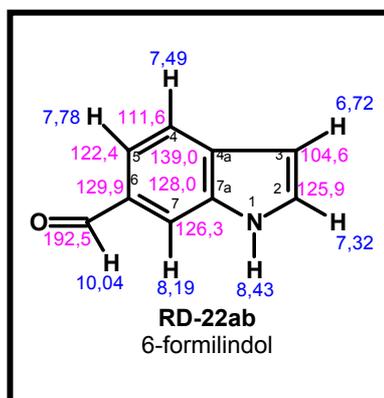


FIGURA 4.121. Estrutura proposta para a substância RD-22ab.

TABELA 4.7. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-22ab ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C	RD-22ab	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	8,43 s	-
2	7,32 dd ( $J = 2,4$ e $3,2$ Hz)	125,9
3	6,72 ddd ( $J = 2,4, 3,2$ e $1,0$ Hz)	104,6
4	7,49 dd ( $J = 8,4$ e $1,0$ Hz)	116,6
4a	-	139,0
5	7,78 dd ( $J = 8,4$ e $1,5$ Hz)	122,4
6	-	129,9
7	8,19 ddd ( $J = 1,5, 0,75$ e $0,75$ Hz)	126,3
1'	10,04 sl	192,5

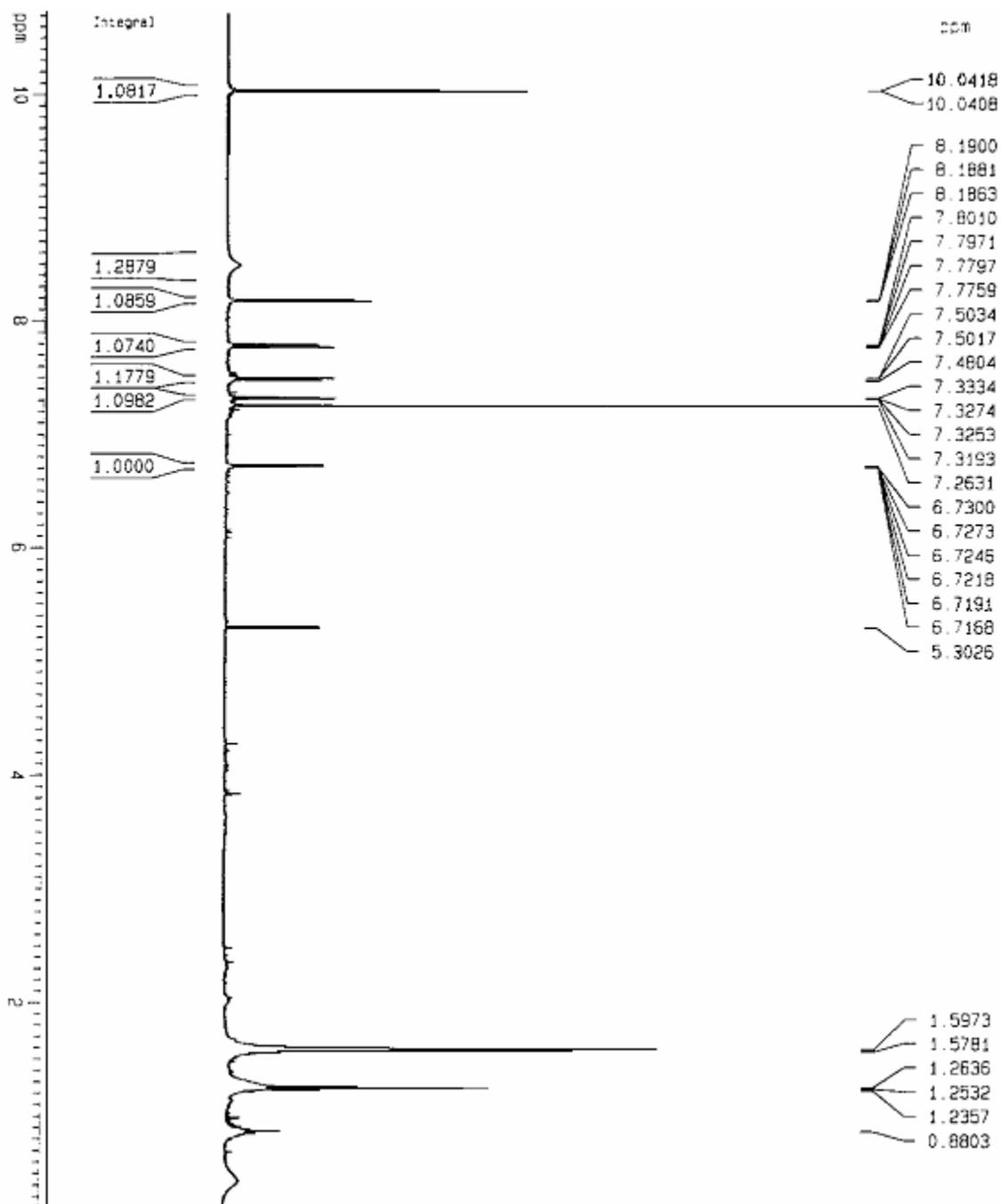


FIGURA 4.122. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

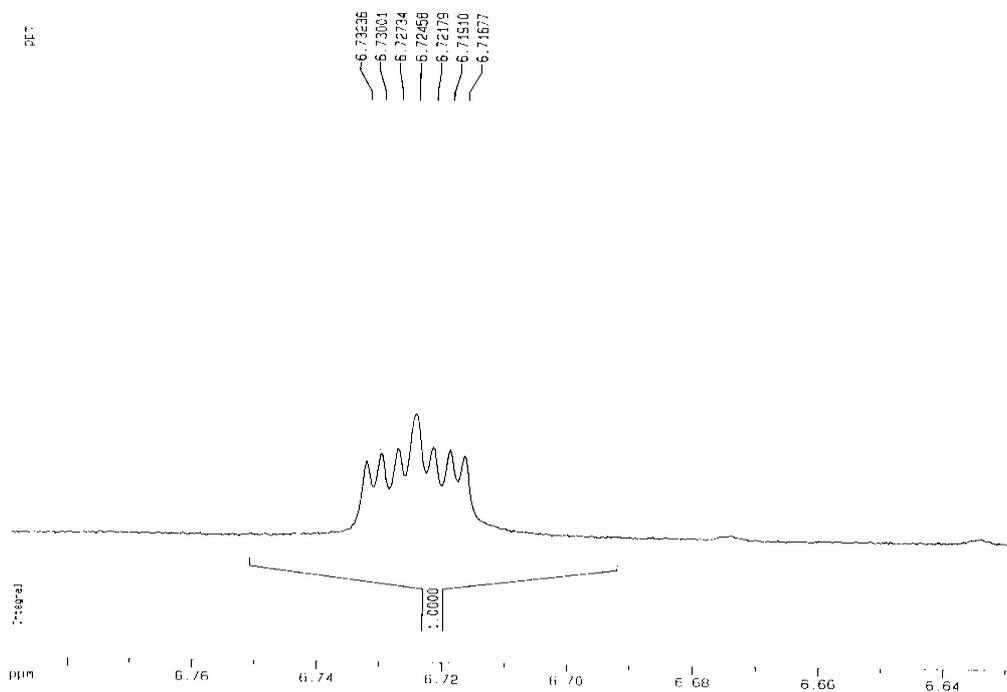
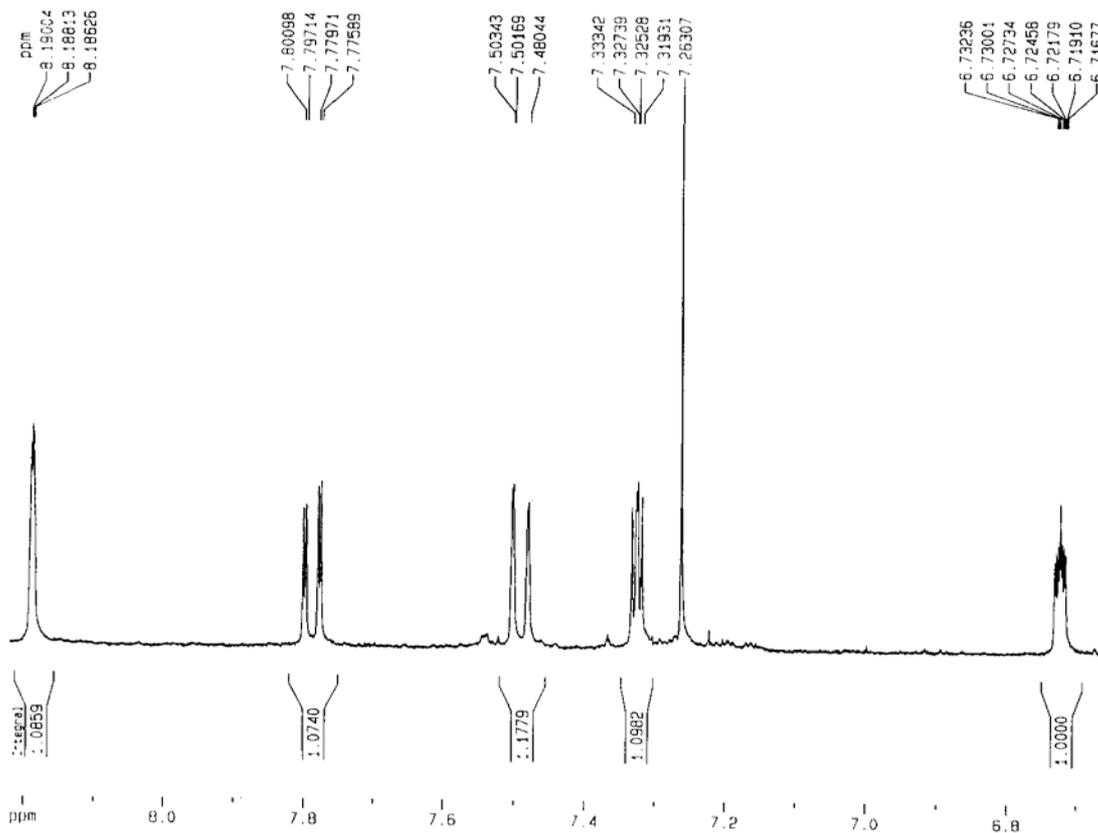


FIGURA 4.122a. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

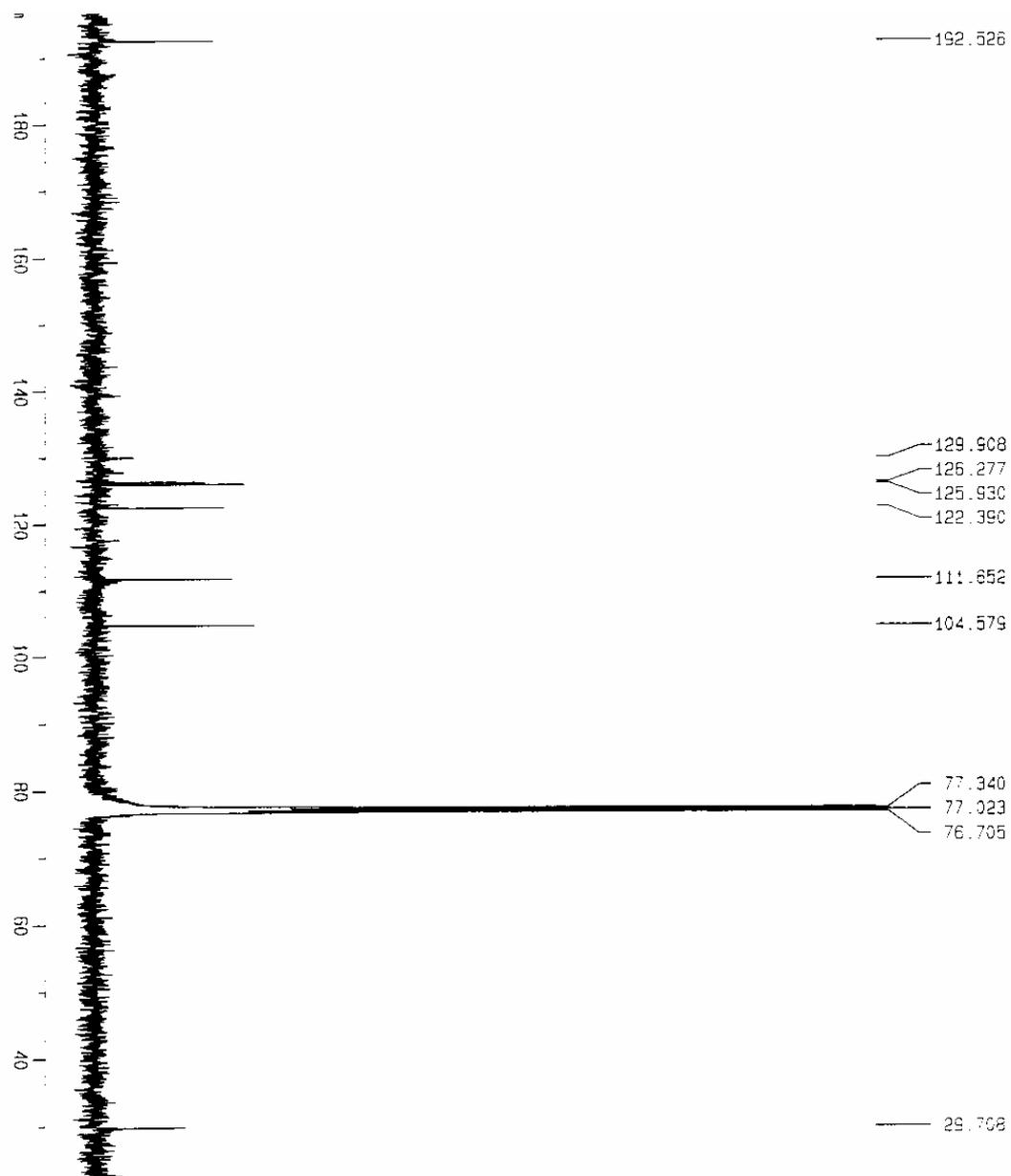


FIGURA 4.123. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

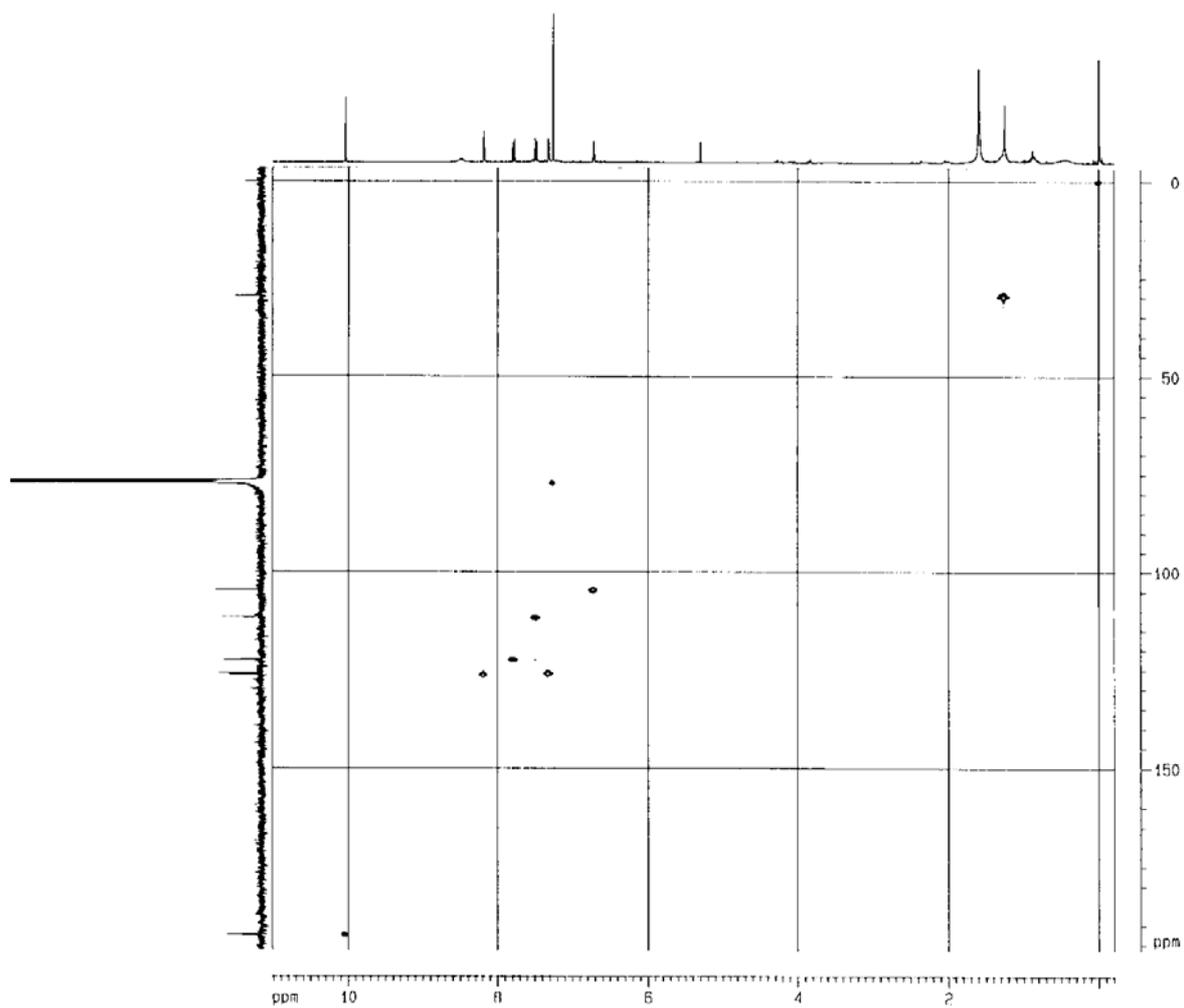


FIGURA 4.124. Experimento de HSQC da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

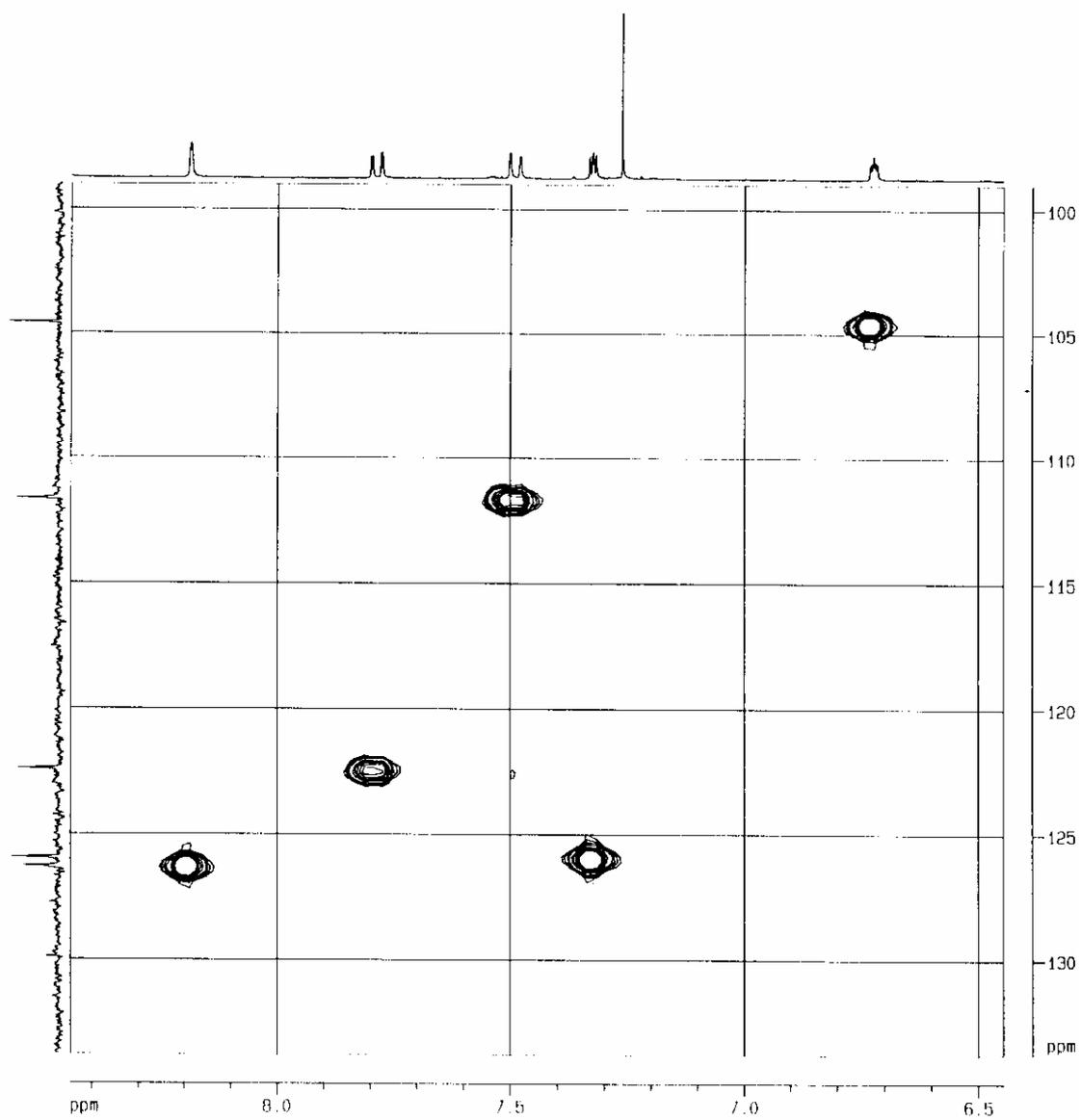


FIGURA 4.124a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

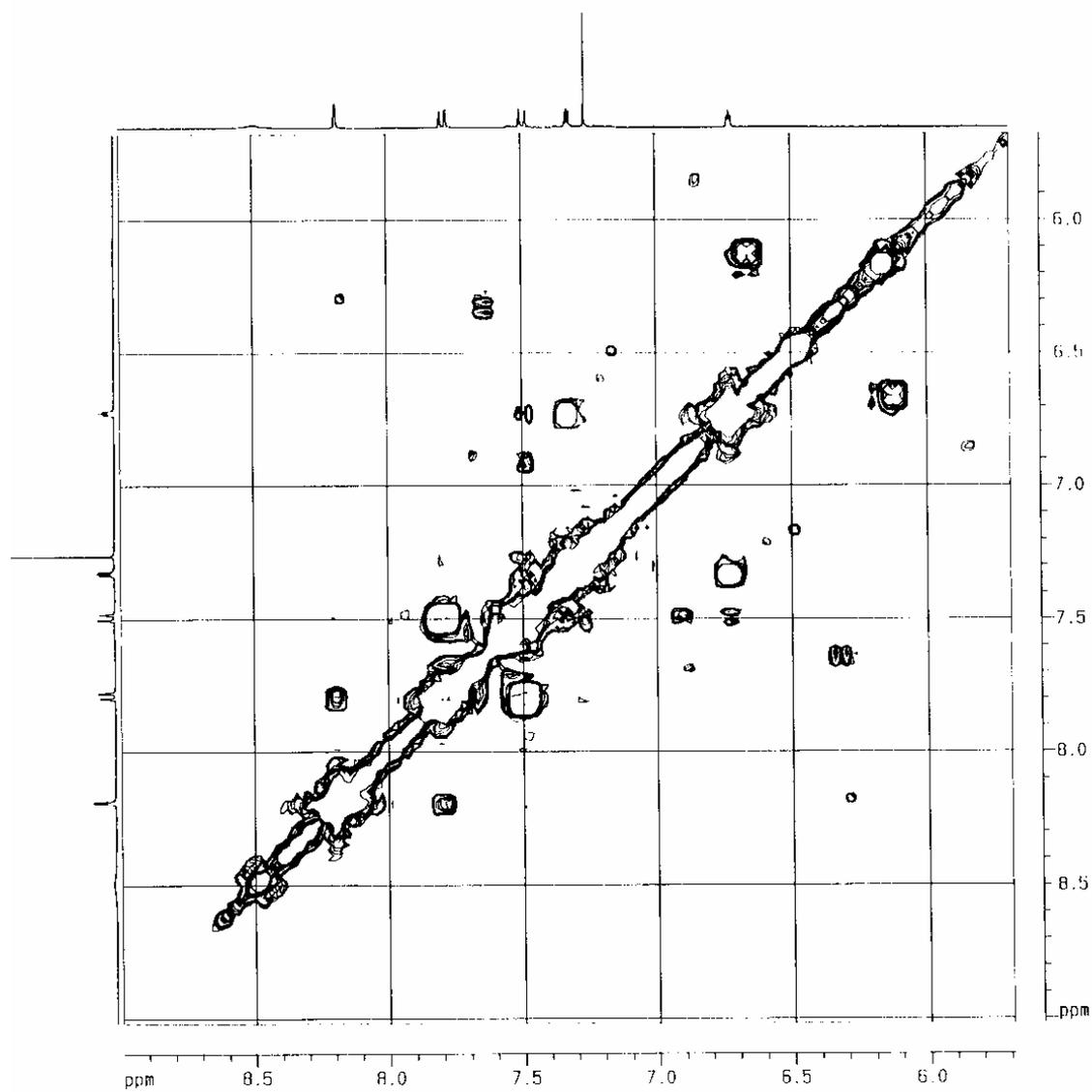


FIGURA 4.125. Experimento de COSY ampliado da substância RD-22ab (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

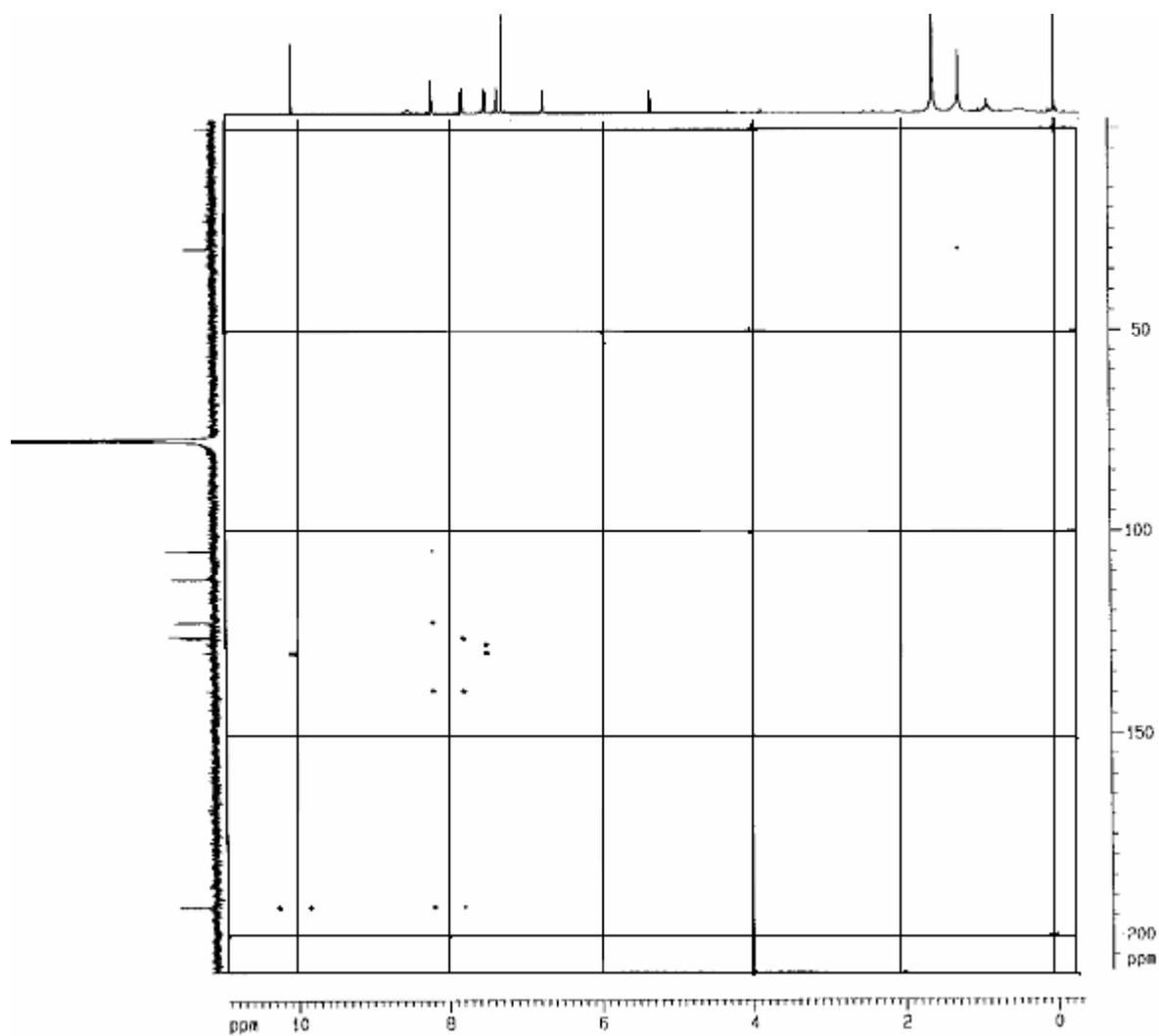


FIGURA 4.126. Experimento de HMBC da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

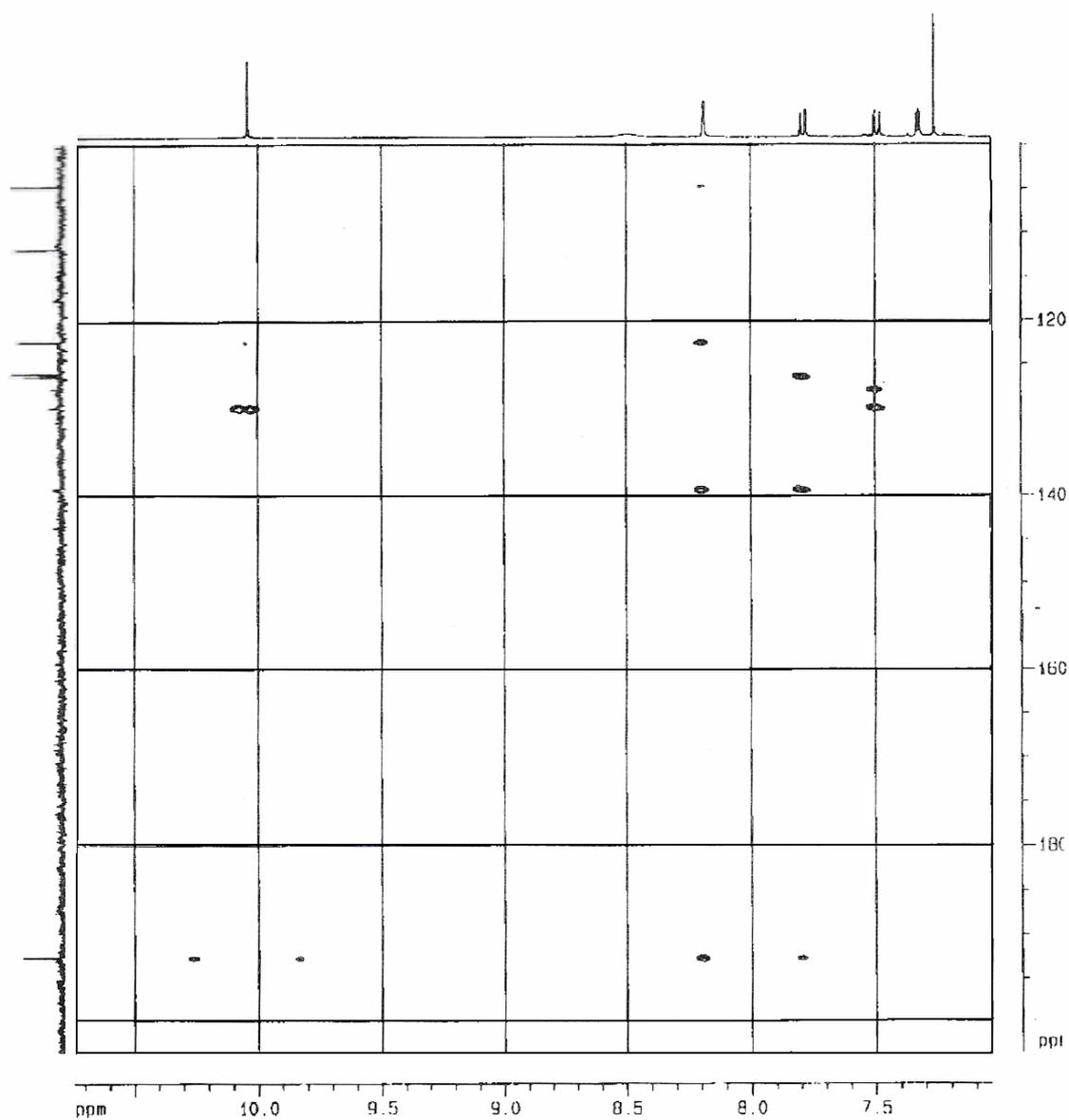


FIGURA 4.126a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-22ab (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.10. Identificação da substância de RD-42

A substância RD-42 foi isolada como cristal branco, quando se revelou em Dragendorff, apresentou cor laranja. Foram observados, no seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.132, Tabela 4.8), sinais típicos de anel furano em  $\delta$  7,07 d ( $J = 2,7$  Hz) e  $\delta$  7,62 d ( $J = 2,7$  Hz). Outro sinal observado foi em  $\delta$  4,45 s (grupo metoxila), característico de alcalóides furanoquinolínicos comuns na família Rutaceae. Apresentou também sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,27 d ( $J = 8,4$  Hz),  $\delta$  8,01 d ( $J = 8,5$  Hz),  $\delta$  7,68 ddd ( $J = 1,4, 6,8, \text{ e } 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,45 ddd ( $J = 1,0, 6,9, \text{ e } 8,0$  Hz). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.133, Tabela 4.8) apresentou sinal de carbono de metoxila em  $\delta$  58,7 e sinais de carbonos aromáticos totalizando 12 carbonos.

O sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,62 d ( $J = 2,7$  Hz), via HSQC (Figura 4.134), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  143,6, apresentou no experimento de COSY (Figura 4.127, Figura 4.135) acoplamento com o hidrogênio em  $\delta$  7,07 d ( $J = 2,7$  Hz). No experimento de HMBC (Figura 4.136), o sinal em  $\delta$  7,62 (Figura 4.127) apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  103,5 ( $\text{sp}^2$ ),  $\delta$  104,7 (CH) e  $\delta$  163,9 ( $\text{sp}^2$ ), esse hidrogênio foi atribuído ao H-2'. O sinal em  $\delta$  7,07 ( $\delta$  104,7) mostrou também correlações com os carbonos em  $\delta$  103,5 ( $\text{sp}^2$ ),  $\delta$  163,9 ( $\text{sp}^2$ ) e  $\delta$  143,6 (CH), esse hidrogênio foi atribuído ao H-3'. Com base nestas correlações foram atribuídos alguns deslocamentos conforme mostrado na figura 4.127:

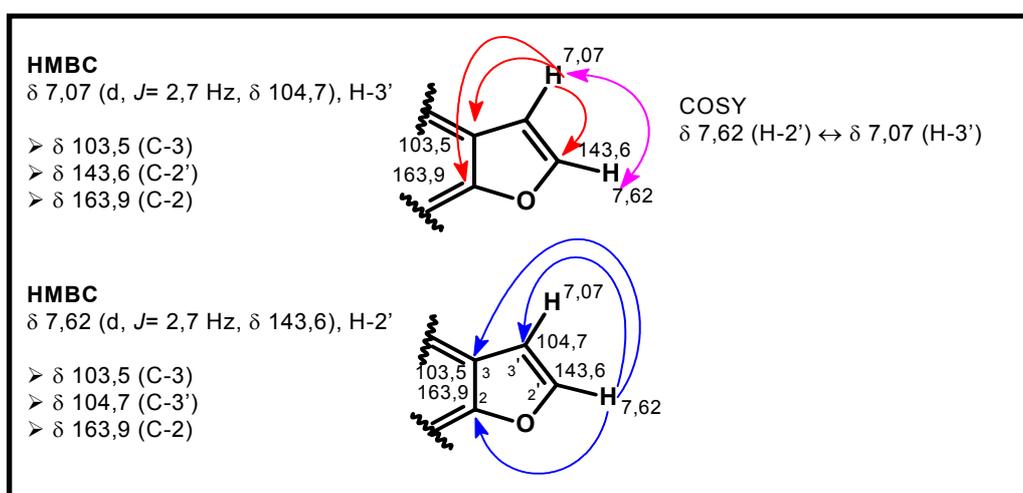


FIGURA 4.127. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,07 (H-3') e  $\delta$  7,62 (H-2').

O sinal em  $\delta$  4,45 s ( $\delta$  59,0, Figura 4.128), característico de metoxila de alcalóide do tipo furanoquinoliníco, mostrou correlação com o carbono em  $\delta$  156,9, o qual foi atribuído ao C-4. O carbono em  $\delta$  156,9 apresentou, via HMBC (Figura 4.128, Figura 4.136), correlação com outro hidrogênio em  $\delta$  8,27 d ( $J = 8,4$  Hz,  $\delta$  122,4). Foram verificadas ainda no HMBC, as correlações de  $\delta$  8,27 com os carbonos em  $\delta$  129,6 e  $\delta$  145,7. No experimento de COSY (Figura 4.135), foi observado o sinal em  $\delta$  8,27 (Figura 4.128) acoplando com  $\delta$  7,45 ddd ( $J = 1,0, 6,9$ , e  $8,0$  Hz), sendo o primeiro deslocamento atribuído ao H-5 e o segundo ao H-6 respectivamente. O H-6 (Figura 4.128) mostrou no HMBC correlações com  $\delta$  118,7 (C-4a),  $\delta$  127,8 (C-8) e  $\delta$  129,6 (C-7), estas correlações confirmam sua atribuição, como pode ser visto na figura 4.128.

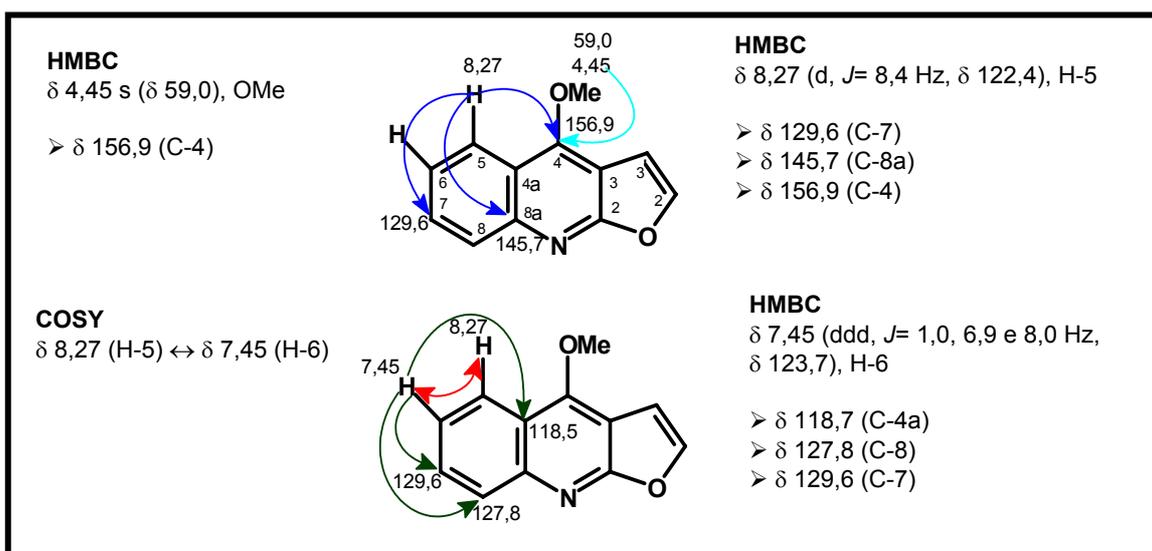


FIGURA 4.128. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,45 (MeO-4),  $\delta$  7,45 (H-6) e  $\delta$  8,27 (H-5).

O sinal do RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.132) em  $\delta$  7,68 ddd ( $J = 1,4, 6,8, 8,3$  Hz,  $\delta$  129,6) mostrou correlações com  $\delta$  122,4 (C-5) e  $\delta$  145,7 (C-8a), esse sinal de hidrogênio foi atribuído ao H-7. No experimento de COSY (Figura 4.135), foi observado acoplamento de H-6 ( $\delta$  7,45) com H-7 ( $\delta$  7,68), este acoplamento confirmou a atribuição de  $\delta$  7,68 ao H-7, conforme visto na figura 4.129.

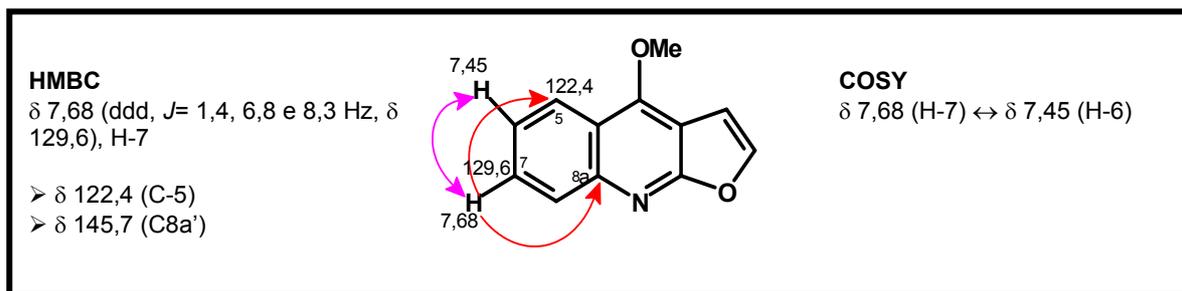


FIGURA 4.129. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  7,68 (H-7).

O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,01 ( $\delta$  127,8) foi atribuído ao H-8 devido ao acoplamento com H-7. No experimento de HMBC (Figura 4.136), foram verificadas as correlações de  $\delta$  8,01 (Figura 4.130) com  $\delta$  118,7 (C-4a) e  $\delta$  123,7 (C-6), estas correlações confirmaram a atribuição ao H-8, conforme figura 4.130.

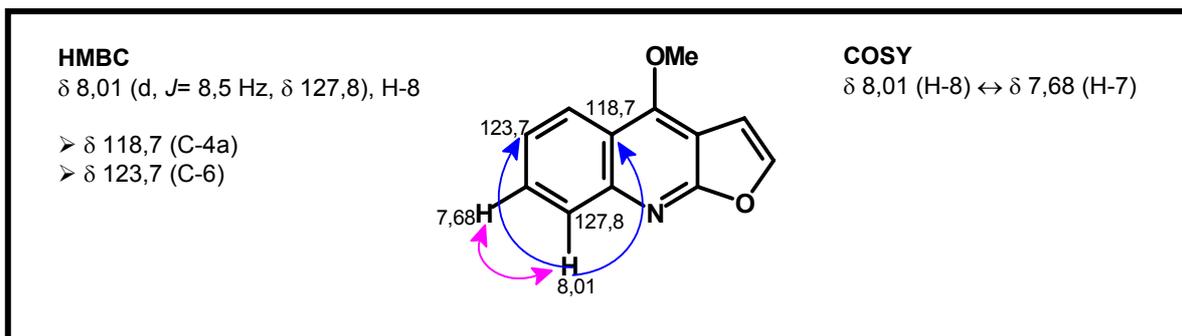


FIGURA 4.130. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  8,01 (H-8).

A substância RD-42 foi submetida ao CG-EM (Figura 4.137) que mostrou o pico do íon molecular 199 Daltons. Através da análise dos espectros de 1D e 2D, CG-EM e comparação com os dados da literatura (MAFEZOLI, 2001), chegou-se ao alcalóide Furo[2,3-b]quinolina-4-metoxi conhecido também como Dictamina (Figura 4.131), registrada no *Chemical Abstract* com o número 484-29-7.

De acordo com levantamento realizado no *Chemical Abstract*, a substância RD-42 é encontrada para venda em vários catálogos (ChemDiv, Inc. Product Library, MicroSource Products List, e etc), é um produto natural utilizado para vários fins, tendo registros inclusive de patentes.

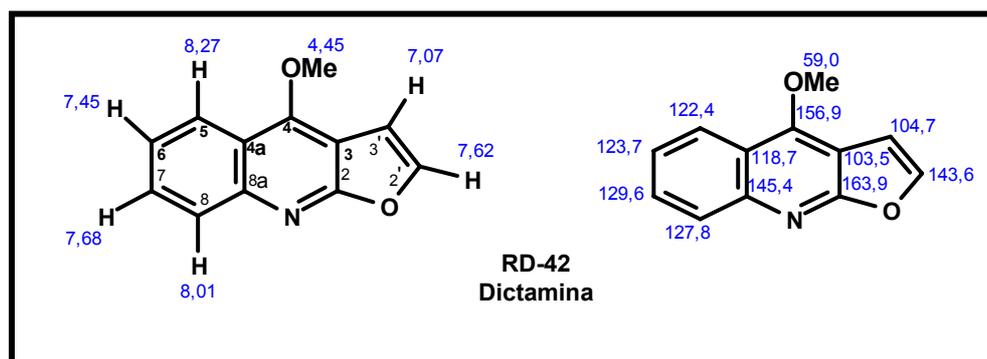
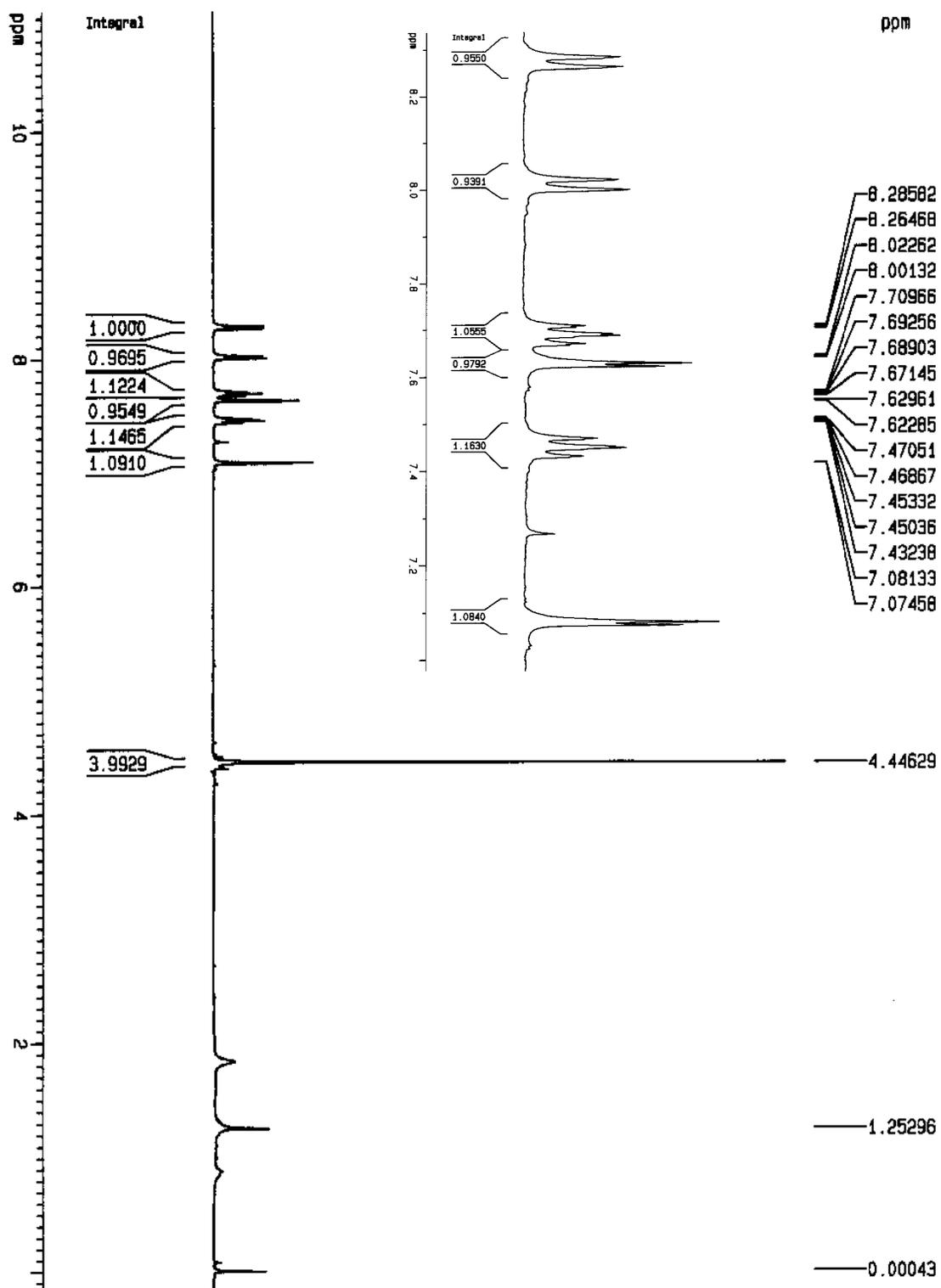


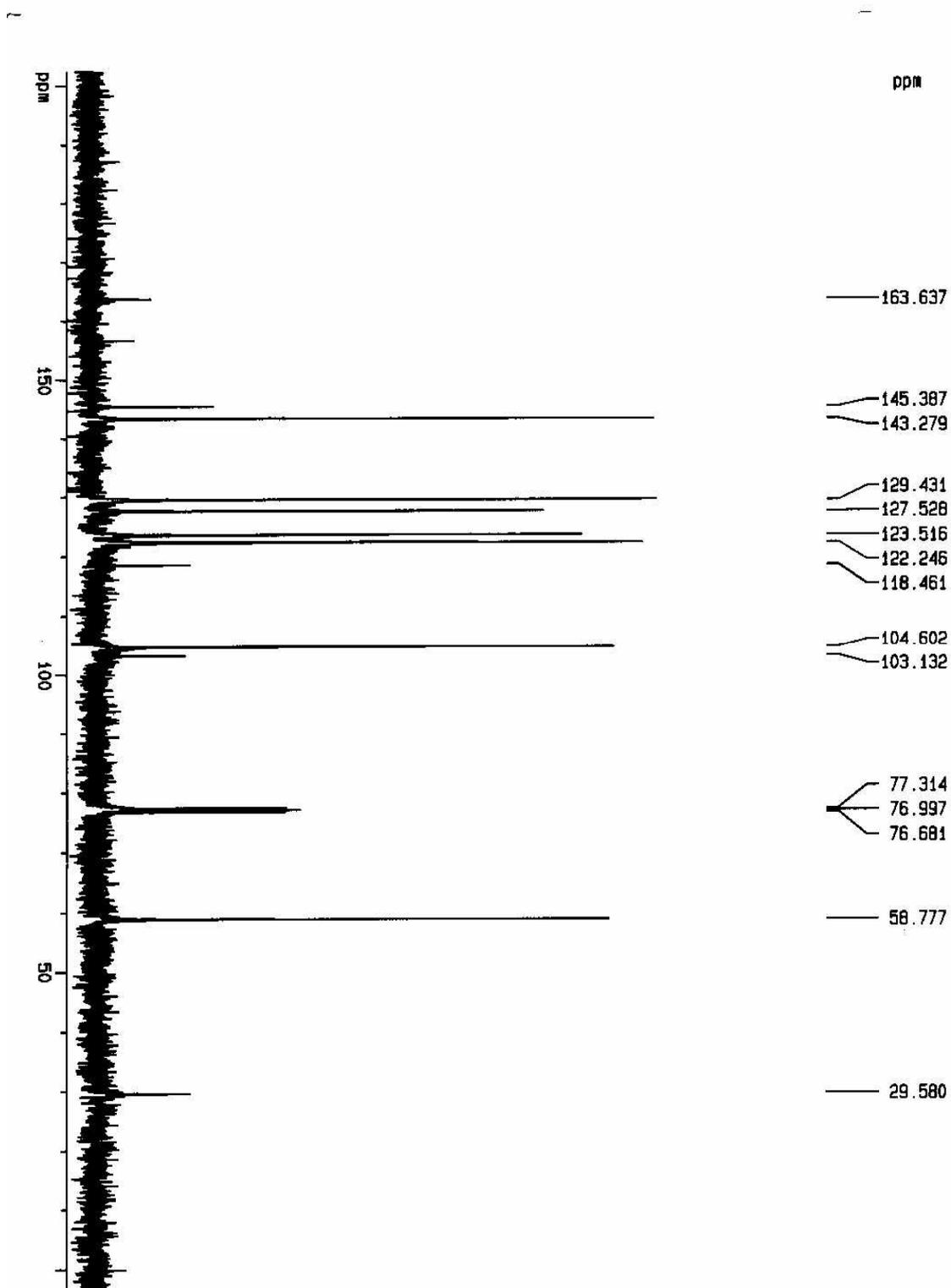
FIGURA 4.131. Estrutura proposta para a substância RD-42 (Dictamina) e seus respectivos deslocamentos químicos.

TABELA 4.8. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-42 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz).

H/C	RD-42		LITERATURA*	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{**}$
2'	7,62 d ( $J = 2,7$ Hz)	143,6	7,64 d ( $J = 2,8$ Hz)	-
3'	7,07 d ( $J = 2,7$ Hz)	104,7	7,10 d ( $J = 2,7$ Hz)	-
2	-	163,9	-	-
3	-	103,5	-	-
4	-	156,9	-	-
4a	-	118,7	-	-
5	8,27 d ( $J = 8,4$ Hz)	122,4	8,29 ddd ( $J = 0,6, 1,2, 8,5$ Hz)	-
6	7,45 ddd ( $J = 1,0, 6,9, 8,0$ Hz)	123,7	7,46 ddd ( $J = 1,5, 6,8, 8,4$ Hz)	-
7	7,68 ddd ( $J = 1,3, 6,8, 8,3$ Hz)	129,6	7,69 ddd ( $J = 1,5, 6,8, 8,4$ Hz)	-
8	8,01 d ( $J = 8,5$ Hz)	127,8	8,01 ddd ( $J = 0,6, 1,2, 8,5$ Hz)	-
8a	-	145,7	-	-
OMe	4,45 s	59,0	4,47 s	-

\* MAFEZOLI, (2001), Solvente:  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz; \*\* Não relatado na literatura mencionada.

FIGURA 4.132. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância RD-42 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.133. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância RD-42 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

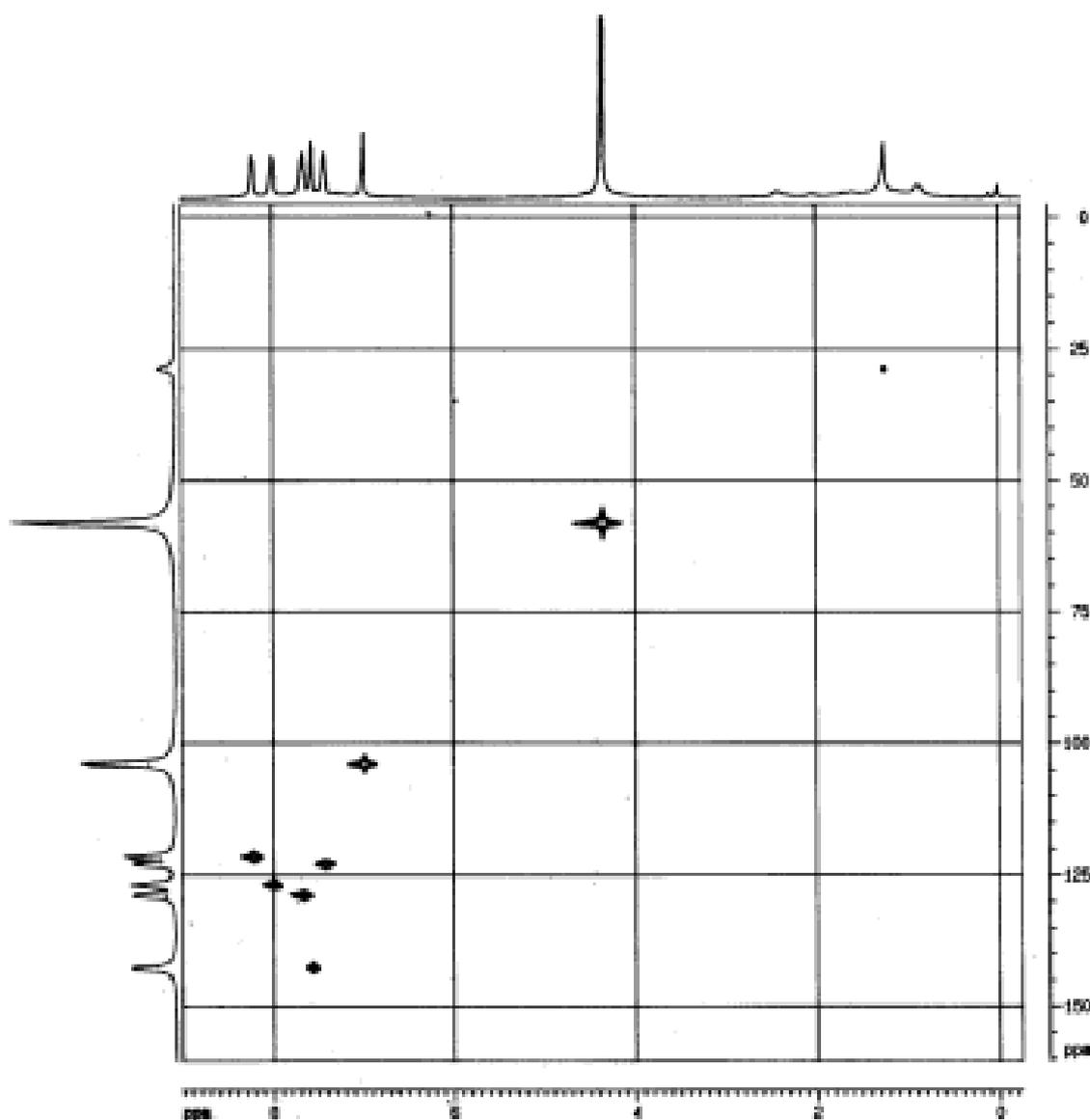


FIGURA 4.134. Experimento de HSQC da substância RD-42 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

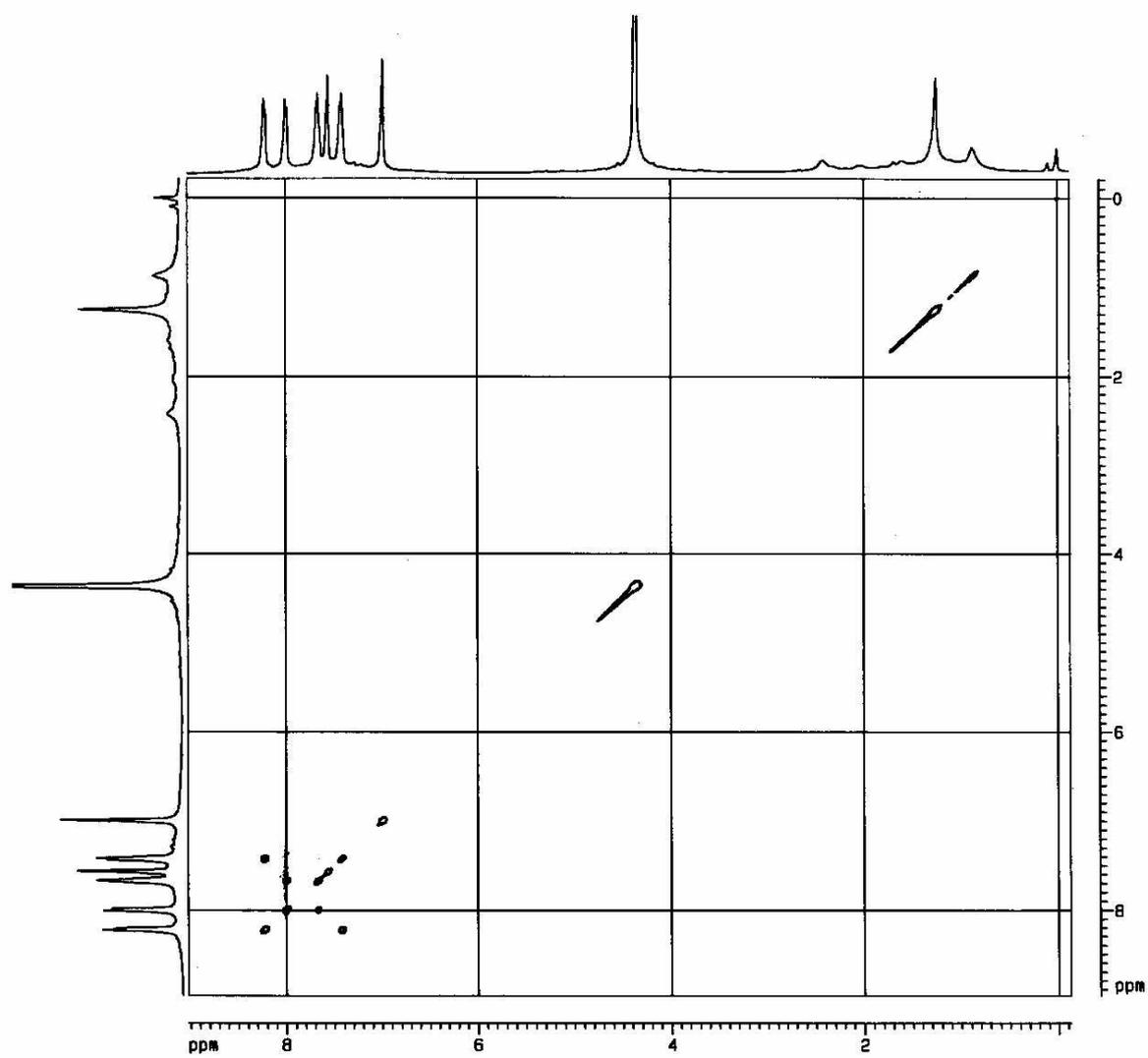


FIGURA 4.135. Experimento de COSY da substância RD-42 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

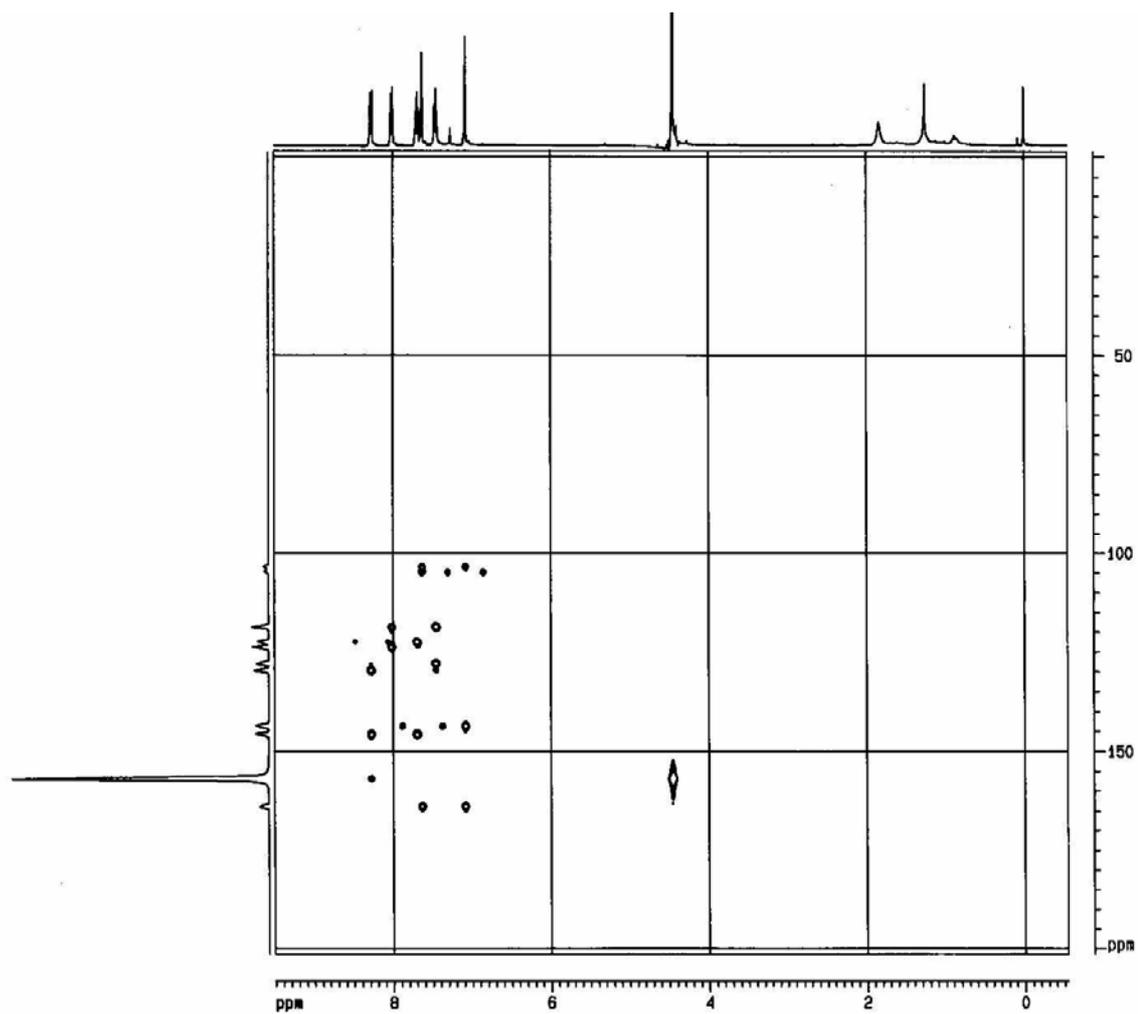


FIGURA 4.136. Experimento de HMBC da substância RD-42 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

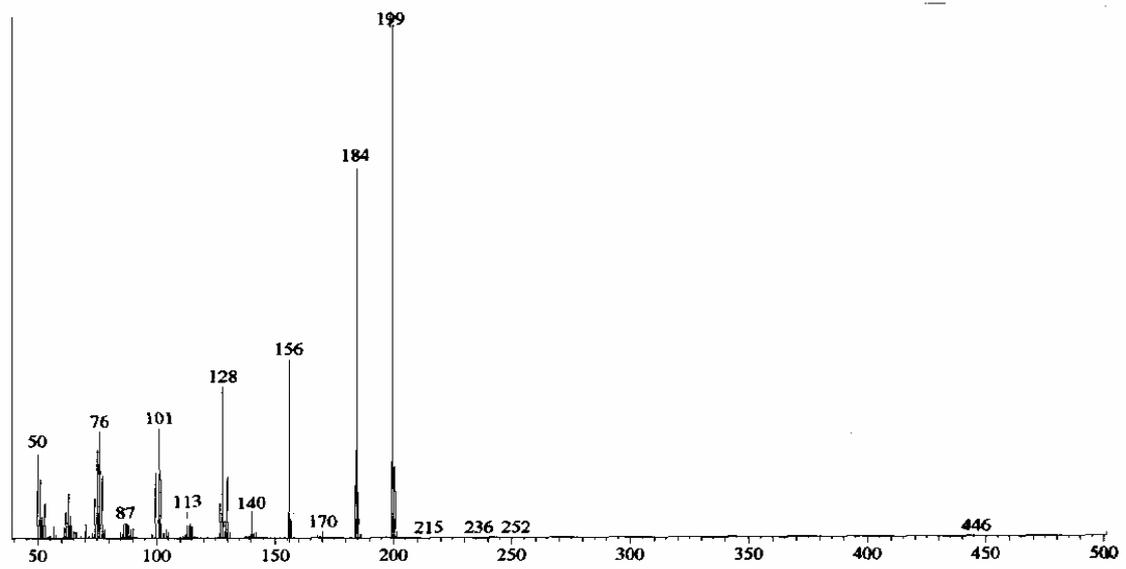


FIGURA 4.137. Espectro de massas da substância RD 42 ( $t_R$  14,8'), obtido via CG/EM (IE).

#### 4.1.11. Identificação da substância RD-70

A substância RD-70 mostrou fluorescência sob a luz UV e coloração alaranjada quando revelada em reagente de Dragendorff, indicando um alcalóide.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.141, Tabela 4.9) de RD-70 apresentou sinais em  $\delta$  7,65 d ( $J = 2,8$  Hz) e  $\delta$  7,08 d ( $J = 2,8$  Hz) característicos de hidrogênios de anel furano dissustituído, também, foi observado sinal de uma metoxila em  $\delta$  4,45, característico de alcalóides furanoquinolinicos. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.142, Tabela 4.9) mostrou sinais de duas metoxilas em  $\delta$  59,0 e  $\delta$  55,9, além de carbonos aromáticos.

O sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,65 d ( $J = 2,8$  Hz) apareceu ligado, via HSQC (Figura 4.143), ao carbono em  $\delta$  143,9. Foi Verificado, no HMBC (Figura 4.138, Figura 4.144), as correlações deste hidrogênio com os carbonos em  $\delta$  104,5 (C-3'), 104,4 (C-3) e 163,2 (C-2), o hidrogênio em  $\delta$  7,65 foi atribuído ao H-2'. Outro sinal em  $\delta$  7,08 d ( $J = 2,8$  Hz,  $\delta$  104,5) mostrou correlações com  $\delta$  104,4 (C-3),  $\delta$  143,9 (C-2') e  $\delta$  163,2 (C-2), este foi atribuído a H-3'. No momento, fecharam-se as atribuições para o anel furano, conforme figura 4.138.

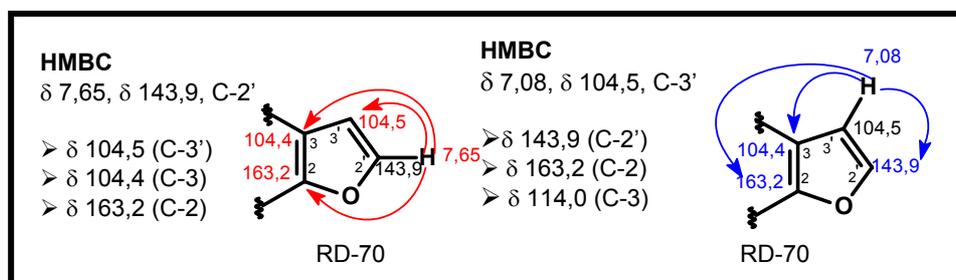


FIGURA 4.138. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,65 (C-2') e  $\delta$  7,08 (C-3').

O sinal da metoxila em  $\delta$  4,45 s (4-OMe,  $\delta$  59,0) apresentou correlação com  $\delta$  156,9, este último carbono foi atribuído ao C-4. O sinal de hidrogênio aromático em  $\delta$  7,85 dd ( $J = 8,5$  e  $1,0$  Hz), com constantes típicas de substituições “orto” e “meta”, no HSQC (Figura 4.143), apareceu ligado, em  $\delta$  114,0, ainda apresentou correlações no HMBC (Figura 4.139, Figura 4.144) com  $\delta$  156,9 (C-4),  $\delta$  137,5 (C-8a) e  $\delta$  107,7 (C-7). O sinal em  $\delta$  7,85 por apresentar correlação com C-4, só poderia ser o H-5. Outro hidrogênio aromático em  $\delta$  7,36 t ( $J = 7,8$  Hz,

$\delta$  123,4) mostrou correlações, no HMBC (Figura 4.144), com  $\delta$  107,7 (C-7),  $\delta$  119,7 (C-4a) e  $\delta$  154,6 (C-8), o sinal em  $\delta$  7,36 foi atribuído ao H-6, conforme figura 4.139.

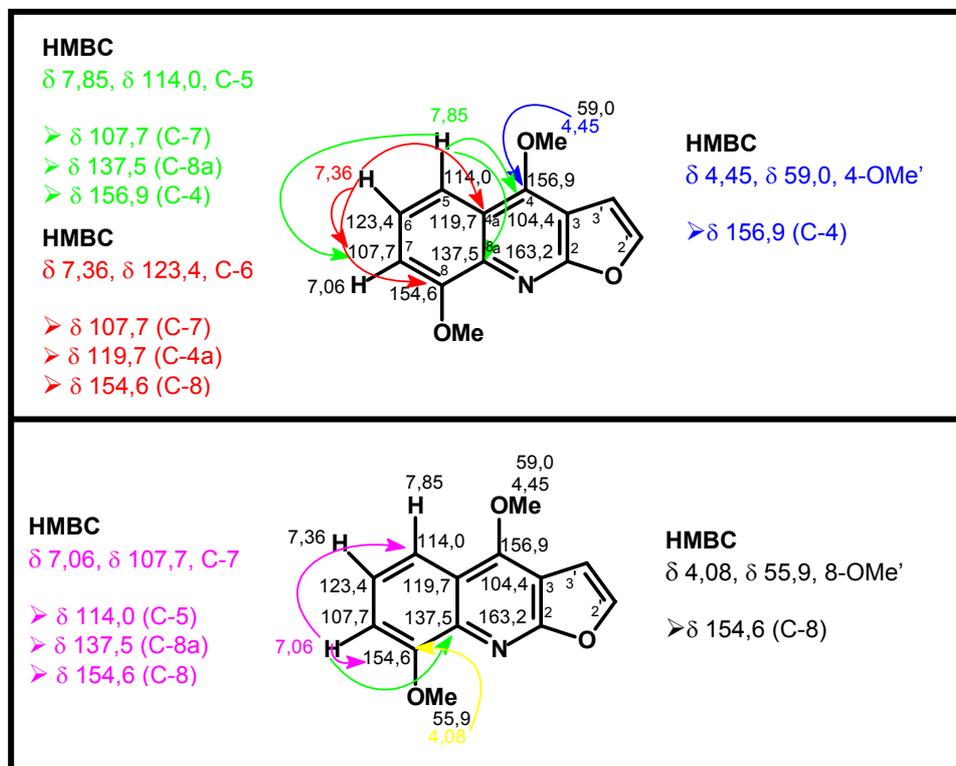


FIGURA 4.139. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,85 (C-5),  $\delta$  7,36 (C-6),  $\delta$  7,06 (C-7),  $\delta$  4,45 (MeO-4) e  $\delta$  4,08 (MeO-8).

O sinal em  $\delta$  7,06 t ( $J = 7,8$  Hz,  $\delta$  107,7) apresentou correlações com  $\delta$  114,0 (C-5),  $\delta$  137,5 (C-8a) e  $\delta$  154,6 (C-8), esse hidrogênio foi atribuído ao H-7 (Figura 4.139). A metoxila em  $\delta$  4,08 ( $\delta$  55,9) apresentou correlação com  $\delta$  154,6, este carbono foi atribuído ao C-8, conforme visto na figura 4.139.

Pela análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais e comparação com a literatura (CUCA *et al.*, 1998), chegou-se à identificação da substância conhecida como  $\gamma$ -Fagarina (Figura 4.140), registrada no *Chemical Abstract* com o número 50816-61-0.

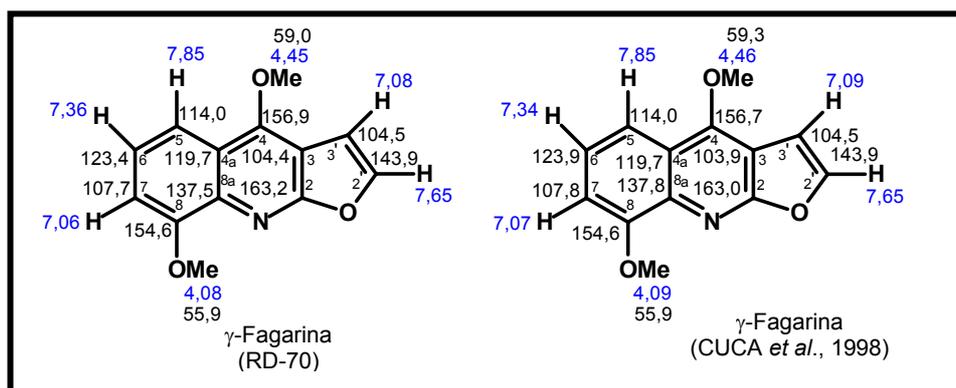
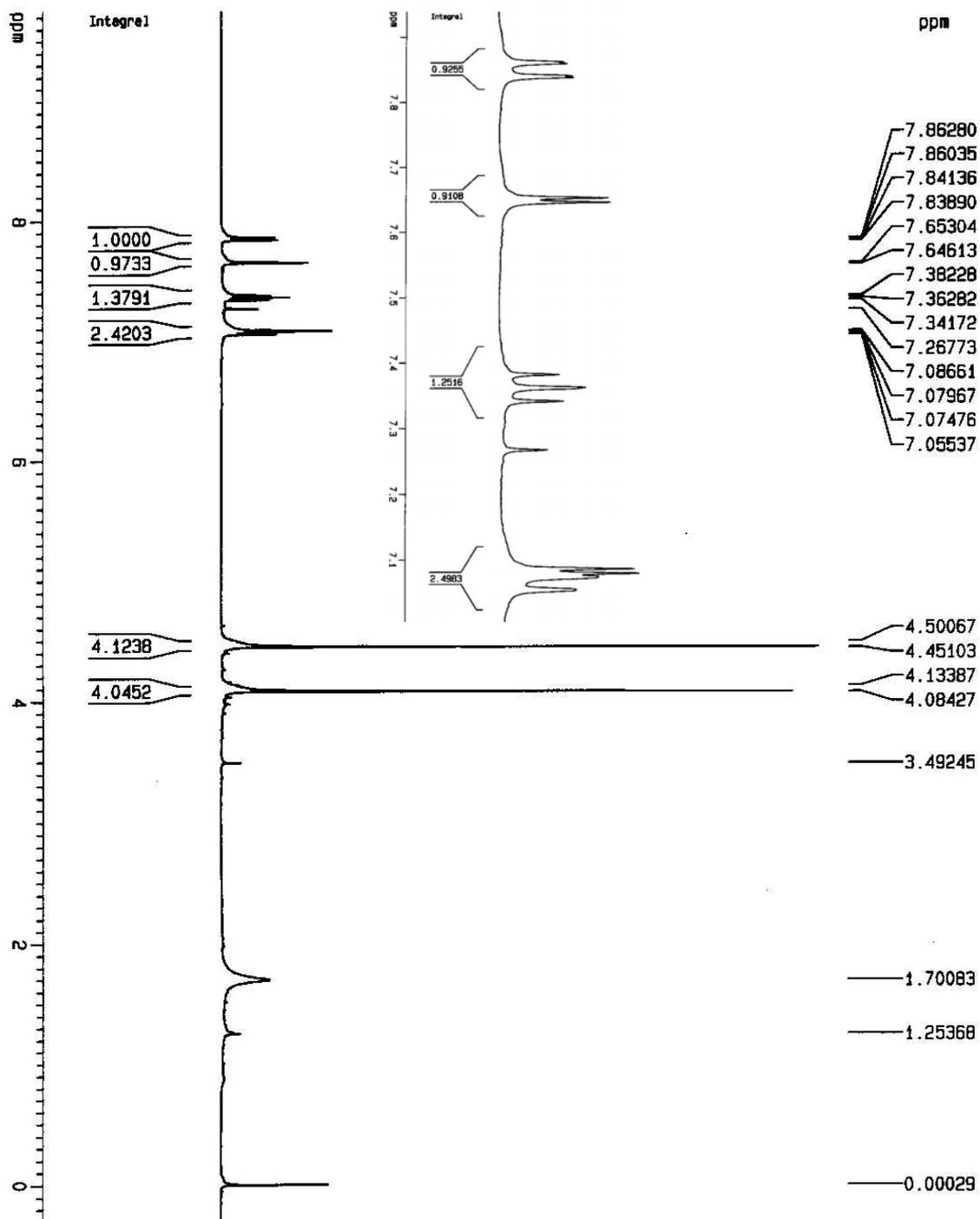


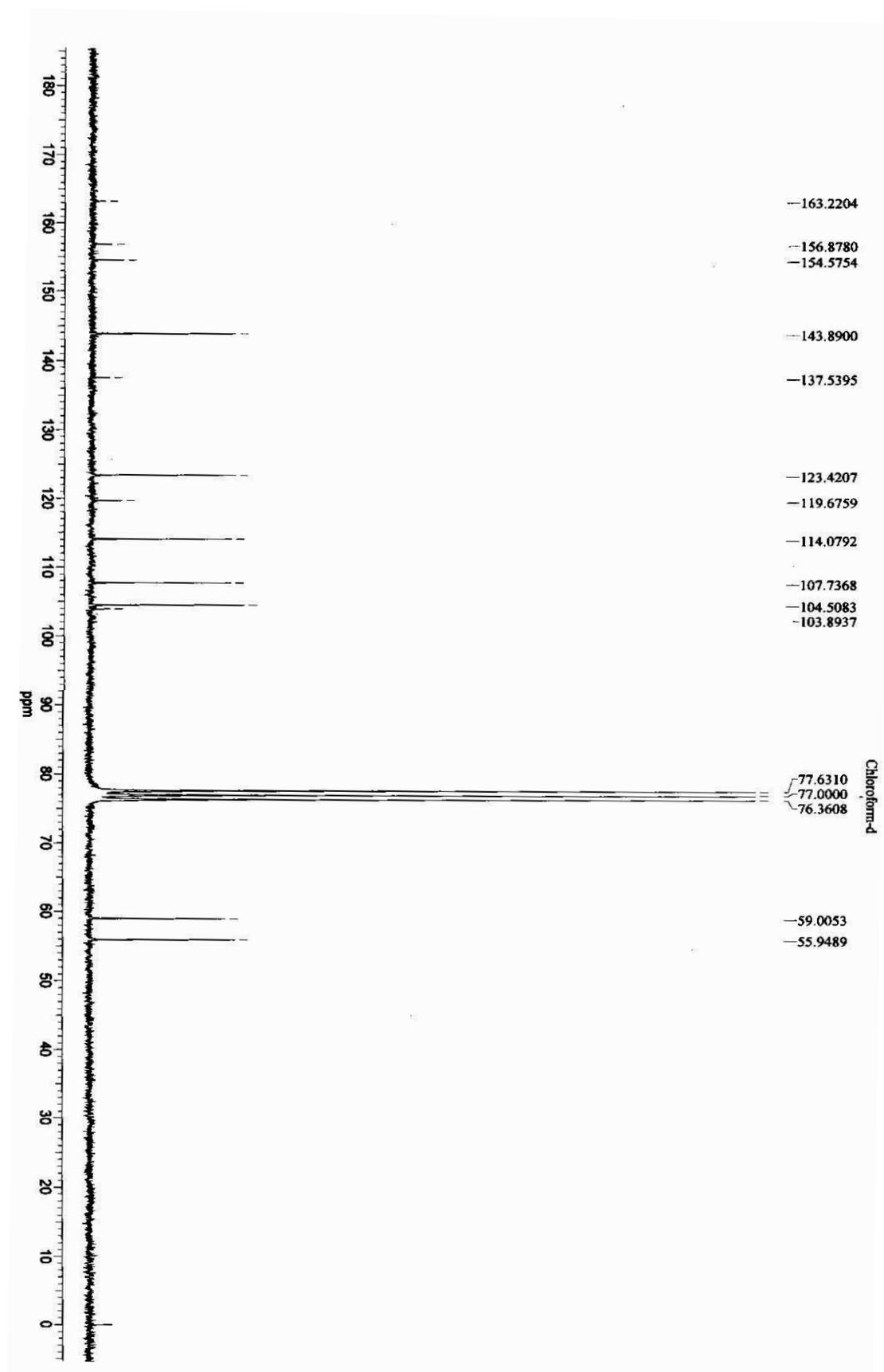
FIGURA 4.140. Estrutura proposta para a substância RD-70 e comparação dos valores de deslocamentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os encontrados na literatura para a  $\gamma$ -Fagarina.

TABELA 4.9. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-70 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C	RD-70		LITERATURA*	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{**}$
2'	7,65 d ( $J = 2,8$ Hz)	143,9	7,65 d ( $J = 2,8$ Hz)	143,9
3'	7,08 d ( $J = 2,8$ Hz)	104,5	7,09 d ( $J = 2,8$ Hz)	104,5
2		163,2	-	163,0
3		104,4	-	103,9
4		156,9	-	156,7
4a		119,7	-	119,7
5	7,85 dd ( $J = 8,5$ e $1,0$ Hz)	114,0	7,85 dl ( $J = 8,5$ Hz)	114,0
6	7,36 t ( $J = 7,8$ Hz)	123,4	7,34 ddd ( $J = 0,9, 7,8, 8,5$ Hz)	123,9
7	7,06 t ( $J = 7,8$ Hz)	107,7	7,07 dl ( $J = 7,8$ Hz)	107,8
8		154,6	-	154,6
8a		137,5	-	137,8
4-OMe	4,45 s	59,0	4,44 s	59,3
8-OMe	4,08 s	55,9	4,07	55,9

\* CUCA *et al.*, (1998), Solvente:  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ )

FIGURA 4.141. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância RD-70 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.142. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância RD-70 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

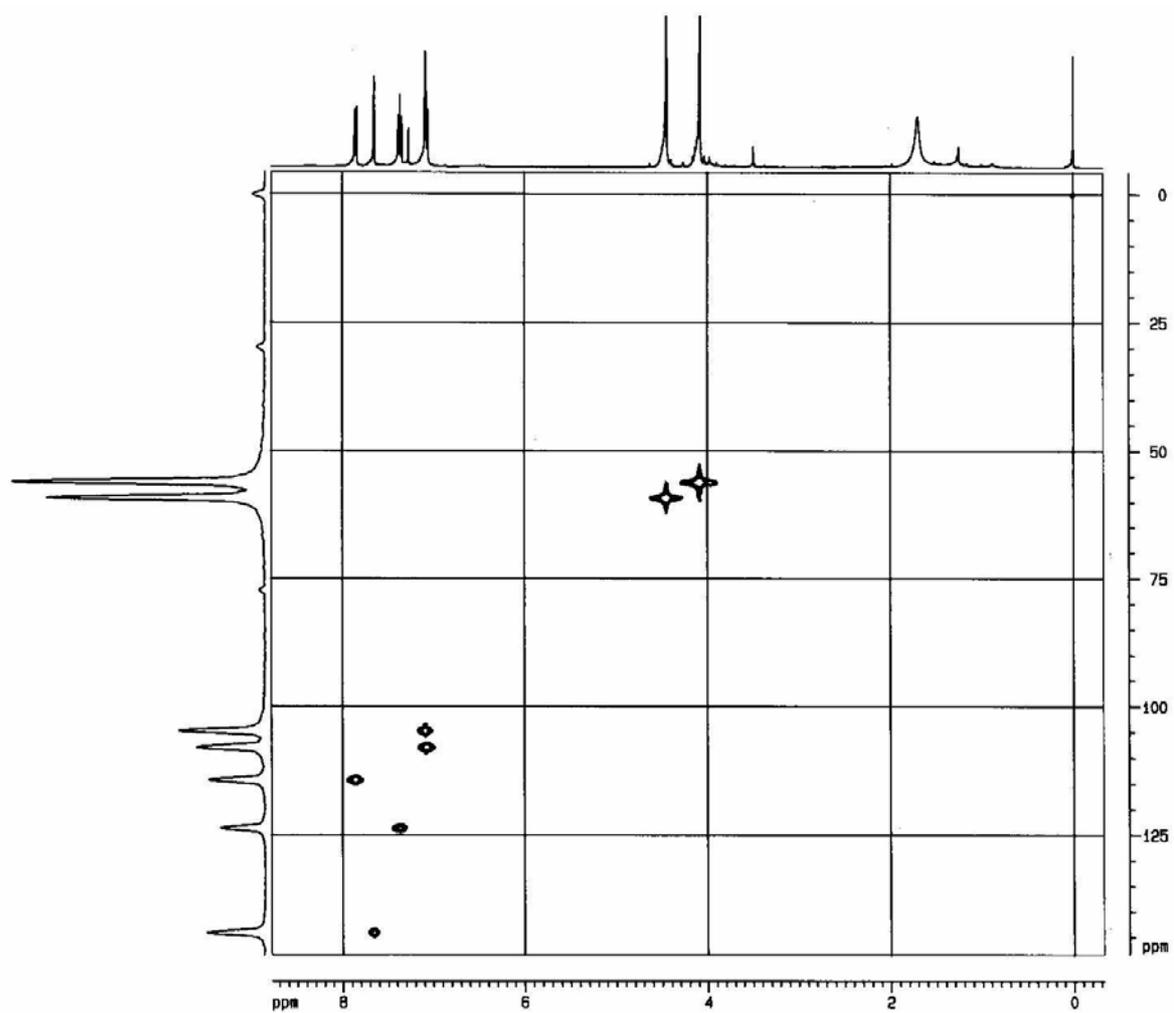


FIGURA 4.143. Experimento de HSQC da substância RD-70 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

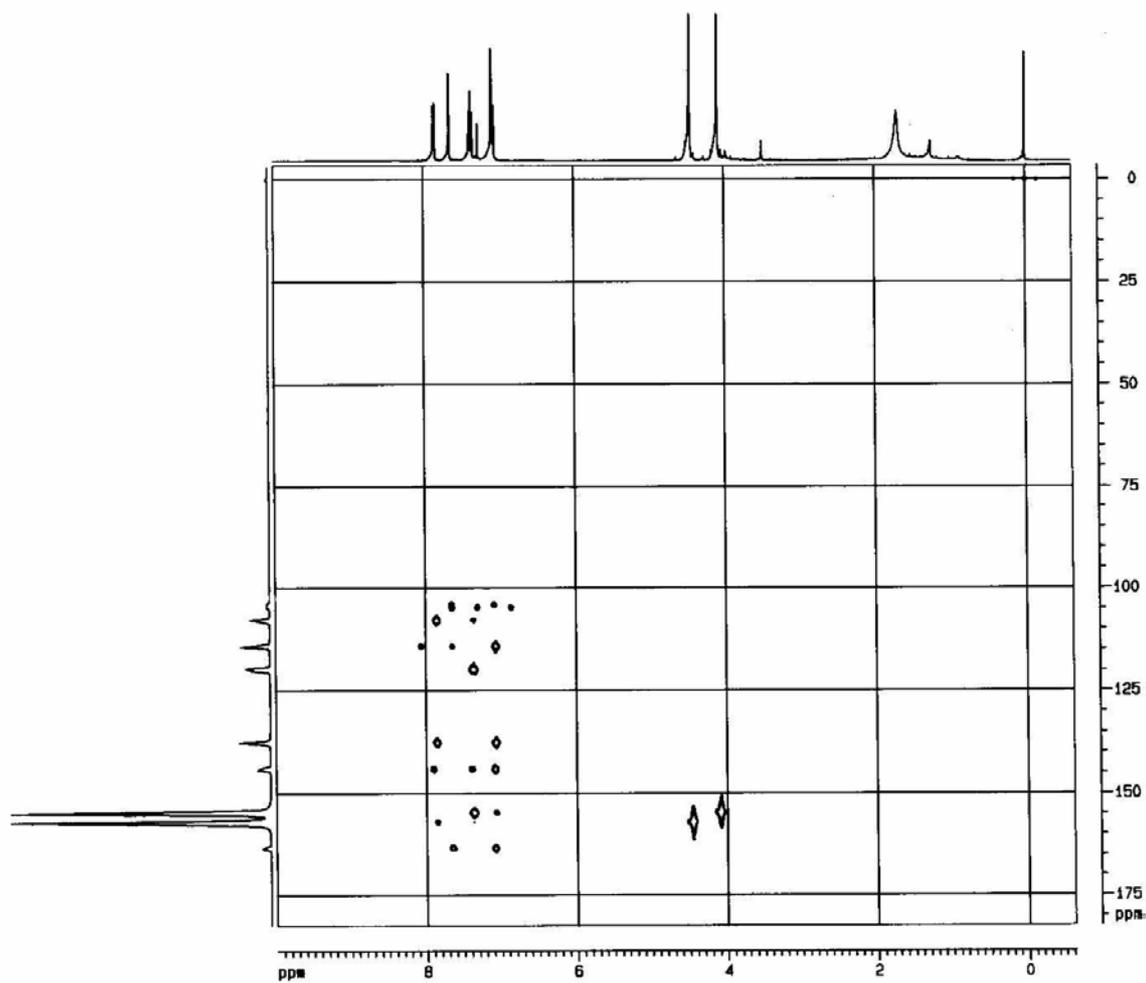


FIGURA 4.144. Experimento de HMBC da substância RD-70 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.12. Identificação da substância RD-79

A substância RD-79 foi isolada do extrato diclorometano da raiz, é um alcalóide 2-quinolona de ocorrência freqüente entre as Rutaceae, e foi, recentemente, isolado das espécies *Pilocarpus riedelianus* (GUERREIRO, 2000) e *P. spicatus* (MAFEZOLI, 2001).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.148, Tabela 4.10) mostrou sinais em  $\delta$  7,94 dd ( $J= 1,5$  e  $8,0$ , H-5),  $\delta$  7,21 dd, ( $J= 1,6$ ,  $7,2$  e  $8,0$ , H-6),  $\delta$  7,56 ddd ( $J= 1,6$ ,  $7,1$  e  $8,6$ , H-7) e  $\delta$  7,30 d ( $J= 8,3$ , H-8), todos estes sinais acoplaram entre si, conforme constantes de acoplamento, e indicaram a presença de um anel aromático orto-dissubstituído. Foi verificada também a presença de sinais singletos em  $\delta$  3,62 e  $\delta$  3,91. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.149, Tabela 4.10) apresentou sinais de carbonos olefinicos em  $\delta$  162,4 e  $\delta$  96,1.

O sinal em  $\delta$  6,01 s apareceu no experimento de HSQC (Figura 4.150) ligado ao carbono em  $\delta$  96,1; no experimento de HMBC (Figura 4.145, Figura 4.151) mostrou correlações com  $\delta$  162,4 e  $\delta$  116,2 (C-4a), em consequência destas correlações, o sinal em  $\delta$  6,01 foi atribuído ao H-3 de um alcalóide 2-quinolona. O carbono em  $\delta$  162,4 mostrou correlação no HMBC com um sinal em  $\delta$  3,91 (4-OMe), este carbono foi atribuído ao C-4, conforme figura 4.145.

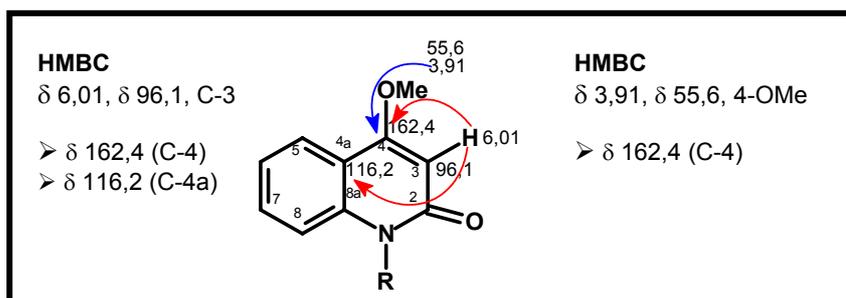


FIGURA 4.145. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,01 (C-3) e  $\delta$  3,91 (MeO-4).

O carbono em  $\delta$  116,2 (Figura 4.146, Figura 4.151) apresentou no HMBC correlação com outro hidrogênio em  $\delta$  7,21 ( $\delta$  121,4); este último apresentou, no COSY (Figura 4.146, Figura 4.152), acoplamentos com  $\delta$  7,94 ( $\delta$  123,1) e com  $\delta$  7,56 ( $\delta$  131,0), foram atribuídos então:  $\delta$  7,21 ao H-6,  $\delta$  7,94 ao H-5 e  $\delta$  7,56 ao H-7.

Foi observado também no COSY (Figura 4.152) o acoplamento de H-7 com  $\delta$  7,30, este foi atribuído ao H-8, como visto na figura 4.146.

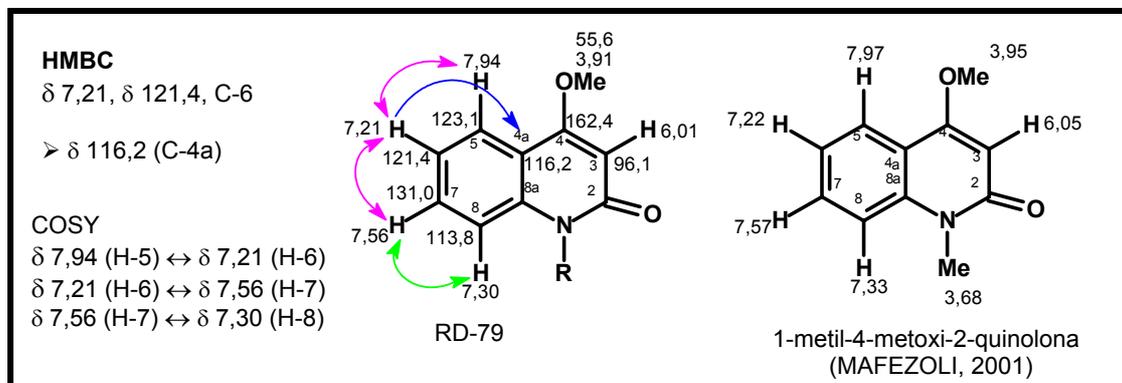


FIGURA 4.146. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,94 (H-5),  $\delta$  7,56 (H-7) e  $\delta$  7,30 (H-8) e  $\delta$  7,21 (H-6).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 4.149, Tabela 4.10) apresentou sinal em  $\delta$  163,6 que foi atribuído ao C-2. No experimento de HMBC (Figura 4.147, Figura 4.151), foi observado um sinal em  $\delta$  3,62 ( $\delta$  28,8, N-CH<sub>3</sub>) correlacionando com  $\delta$  163,6 (C-2) e 139,4, este último carbono foi atribuído ao C-8a. Através da análise dos espectros e comparação com a literatura (MAFEZOLI, 2001), chegou-se a identificação da substância RD-79 como sendo 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (Figura 4.147).

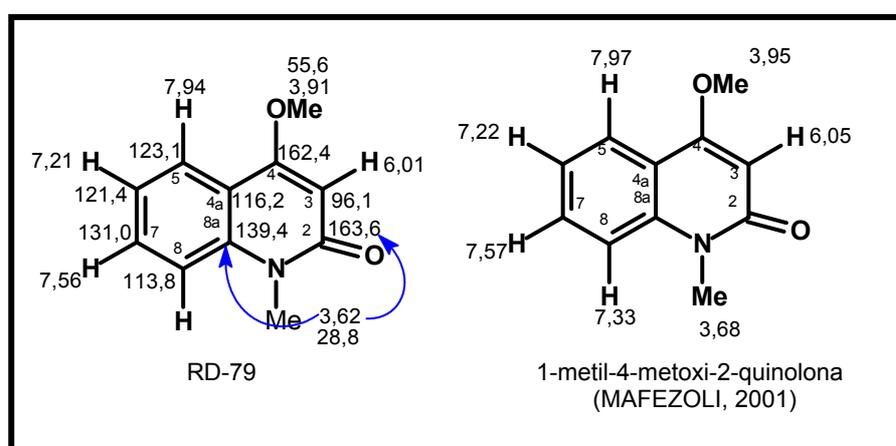
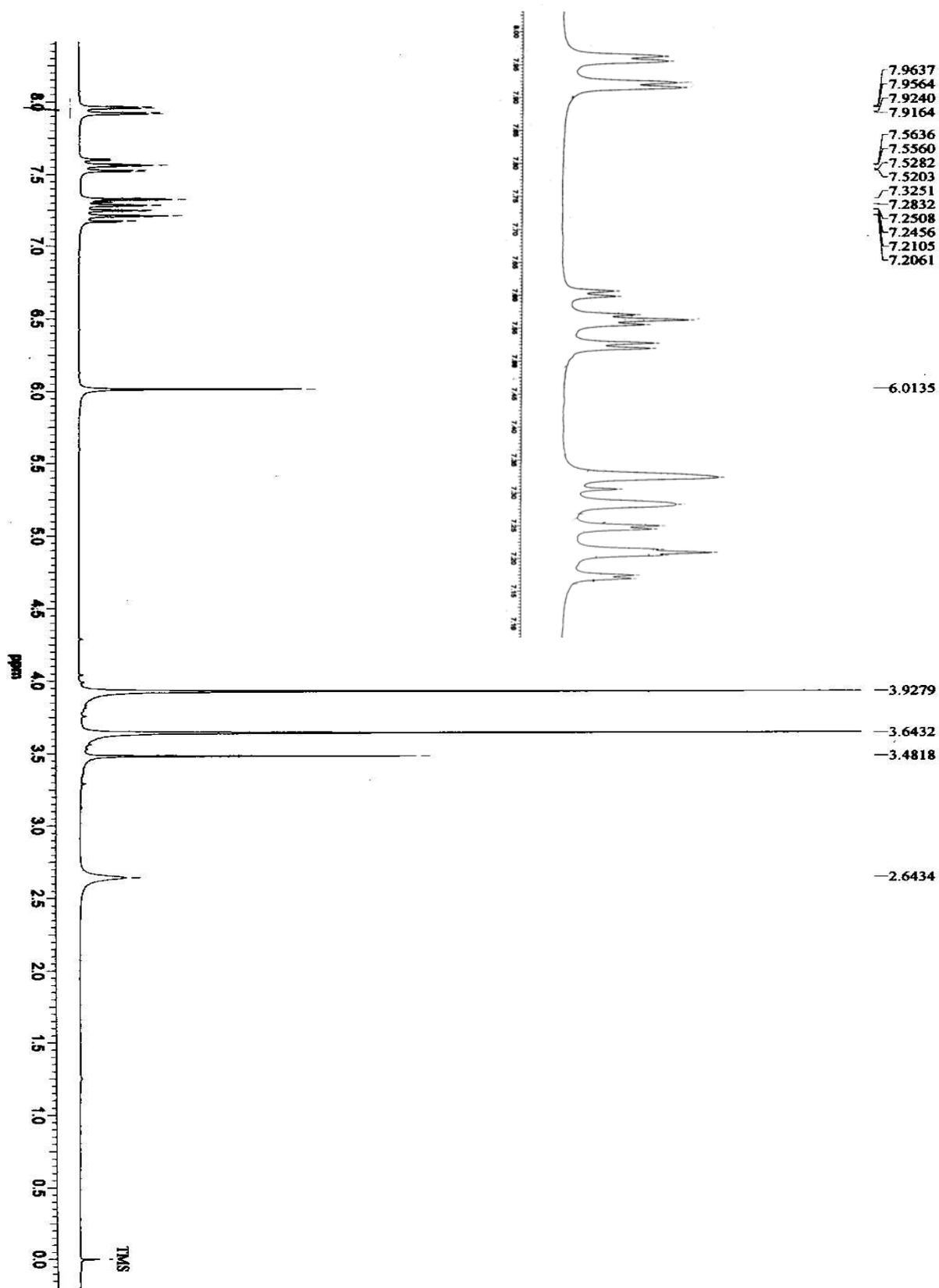


FIGURA 4.147. Estrutura proposta para a substância RD-79 e valores de RMN <sup>1</sup>H encontrados na literatura para o 1-metil-4-metoxi-2-quinolona.

TABELA 4.10. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-79 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 200 e 400 MHz).

H/C	RD 79		*Literatura
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
2	-	163,6	-
3	6,01 s	96,1	6,05 s
4	-	162,4	-
4a	-	116,2	-
5	7,94 dd ( $J= 8,0; 1,5$ Hz)	123,1	7,97 dd ( $J= 8,0; 1,5$ Hz)
6	7,21 ddd ( $J= 8,0; 7,1; 1,0$ Hz)	121,4	7,22 ddd ( $J= 8,0, 7,1$ e $1,0$ Hz)
7	7,56 ddd ( $J= 8,6; 7,1; 1,5$ Hz)	131,0	7,57 ddd ( $J= 8,6, 7,1$ e $1,5$ Hz)
8	7,30 d ( $J= 8,6$ Hz)	139,4	7,33 dl ( $J= 8,6$ Hz)
8a	-	113,8	-
$\text{OCH}_3$	3,91 s	55,6	3,95 s
$\text{NCH}_3$	3,62 s	28,8	3,68 s

\*MAFEZOLI (2001), Solvente:  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz);

FIGURA 4.148. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância RD-79 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

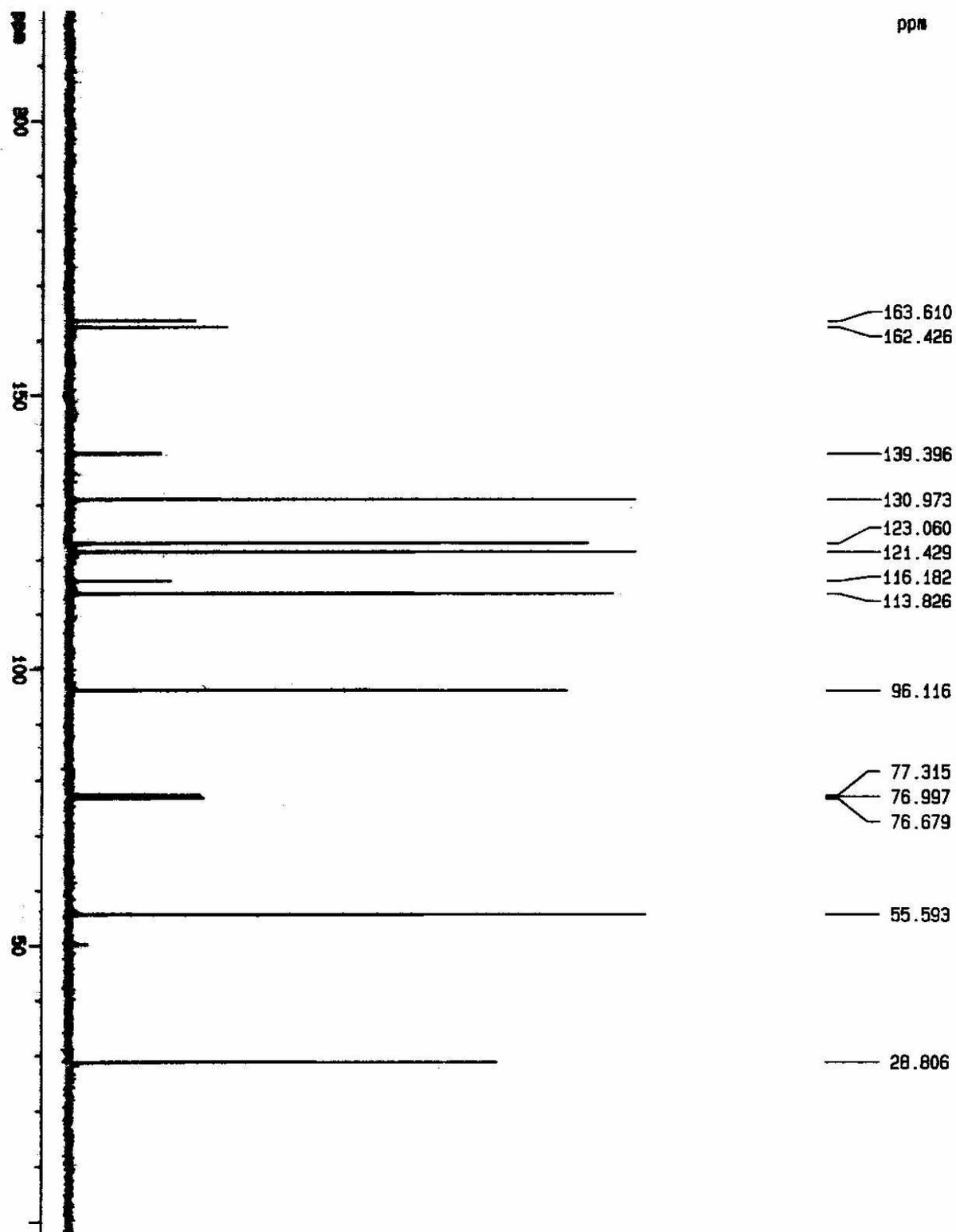


FIGURA 4.149. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância RD-79 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

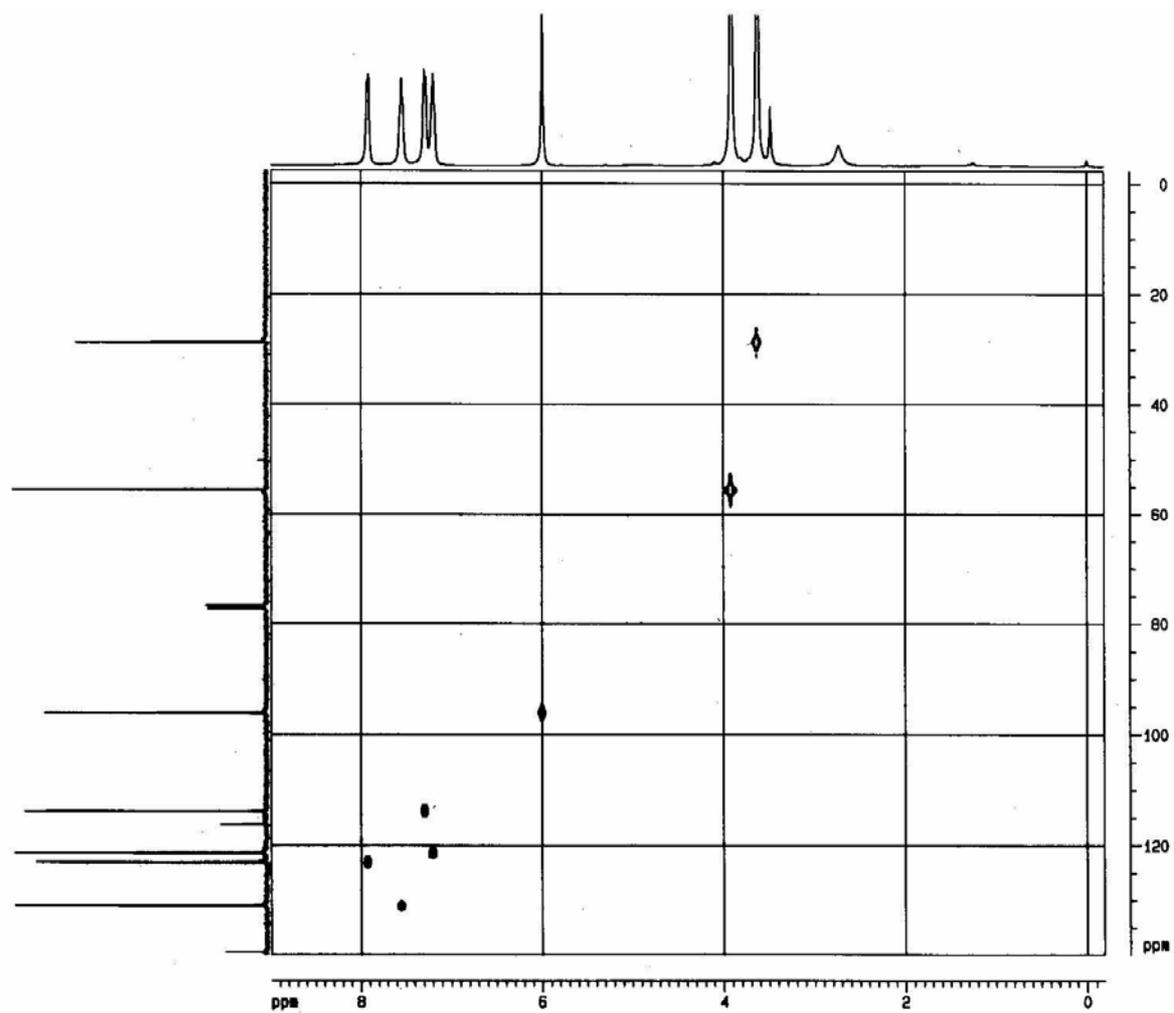
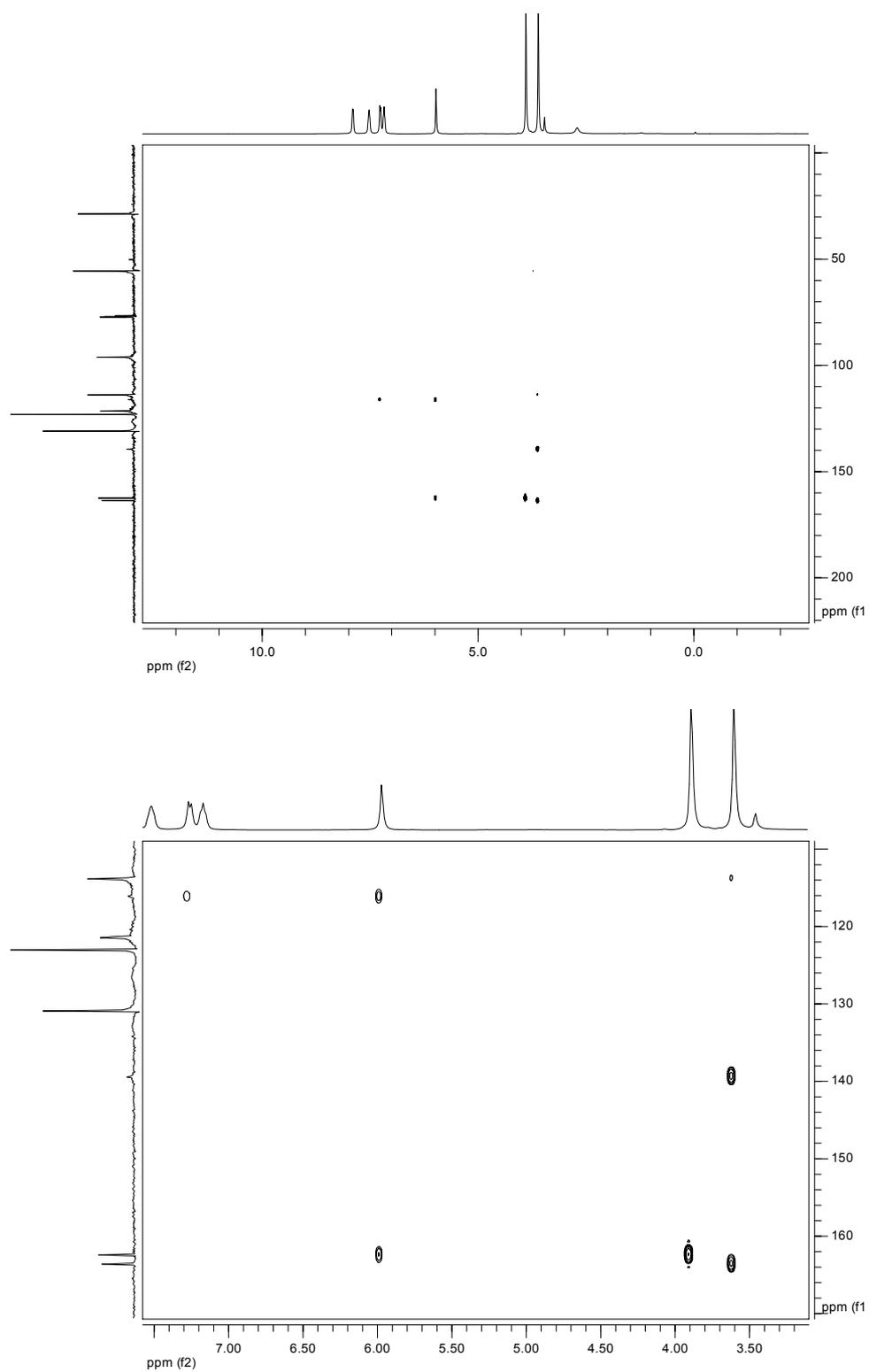


FIGURA 4.150. Experimento de HSQC da substância RD-79 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

FIGURA 4.151. Experimento de HMBC da substância RD-79 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

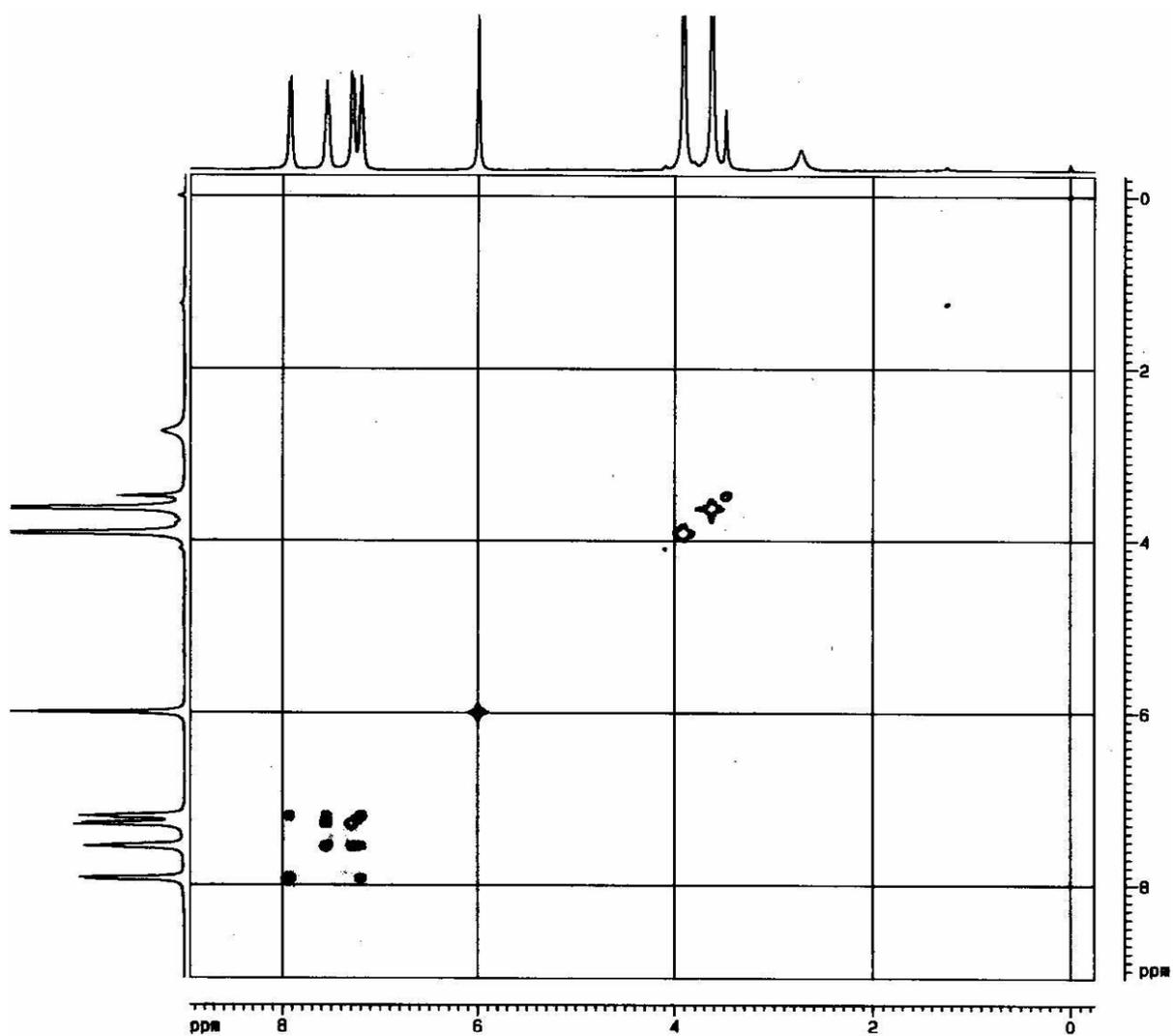


FIGURA 4.152. Experimento de COSY da substância RD-79 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.13. Identificação da substância RD-91

A substância RD-91 foi isolada do extrato diclorometano como um sólido vermelho, a cor é devido à presença do pigmento. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.162, Tabela 4.11) mostrou sinal na região de aromáticos entre  $\delta$  7,19- $\delta$  7,60; foi observado ainda sinal típico de hidrogênio ligado a nitrogênio em  $\delta$  8,15 sl, que sugeriu a presença de anel indol, o que foi confirmado pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.163, Tabela 4.11), que mostrou sinal do carbono C-3 ( $\delta$  102,8) de um anel indol. Foi observada também a presença de carbonos carbinólicos em  $\delta$  71,5 e  $\delta$  86,6.

O sinal em  $\delta$  6,53 m que, via HSQC (Figura 4.164), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  102,8, mostrou acoplamento no experimento de COSY (Figura 4.165) com o sinal em  $\delta$  7,19 (provavelmente um duplete com  $J = 3,3$  Hz), a multiplicidade deste sinal não ficou muito clara por coalecer com  $\delta$  7,20 dd ( $J = 8,5$  e  $2,0$  Hz). No experimento de HSQC, o sinal em  $\delta$  7,19 apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  124,4. No experimento de HMBC (Figura 4.166) não foi visto nenhuma correlação. A comparação dos dados da literatura para um anel indólico com os encontrados para RD-91 levou as atribuições mostradas na figura 4.153.

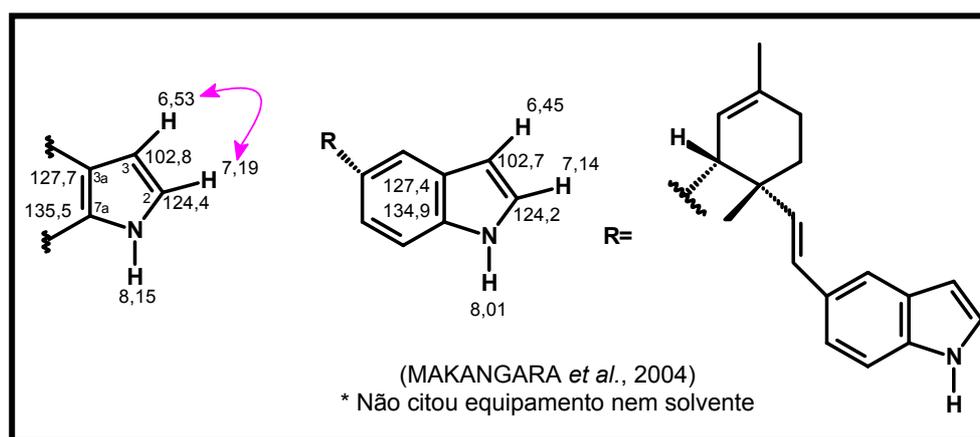


FIGURA 4.153. Valores de deslocamentos da literatura para o anel indólico e comparação com RD-91.

O sinal em  $\delta$  7,20 dd ( $J = 8,5$  e  $2,0$  Hz,  $\delta$  121,0) apresentou duas constantes de acoplamento que sugeriram substituição “orto” e “para”. No HMBC (Figura 4.154, Figura 4.166), foi observado para o sinal em  $\delta$  7,20 (Figura 4.154)

correlações com  $\delta$  86,8,  $\delta$  119,1 (C-4) e  $\delta$  135,5 (C-7a). O sinal em  $\delta$  7,60, um dubleto com constante  $J = 0,8$  Hz, quando observado com atenção no equipamento, foi verificado que sua multiplicidade poderia ser um dd, porém, foi detectada somente uma constante. No experimento de HMBC (Figura 4.166), foi observado as correlações do sinal em  $\delta$  7,60 ( $\delta$  119,1) com  $\delta$  86,8,  $\delta$  102,8 (C-3),  $\delta$  121,0 (C-6) e  $\delta$  135,5 (C-7a), a correlação com C-3 garante sua posição em H-4. Outro sinal em  $\delta$  7,37 d ( $J = 8,5$  Hz), no experimento de HMBC, mostrou correlações com  $\delta$  127,7 (C-3-a) e  $\delta$  132,7 (C-5). Com base nas correlações discutidas foram atribuídos os valores de H-6, H-4 e H-7, conforme figura 4.154.

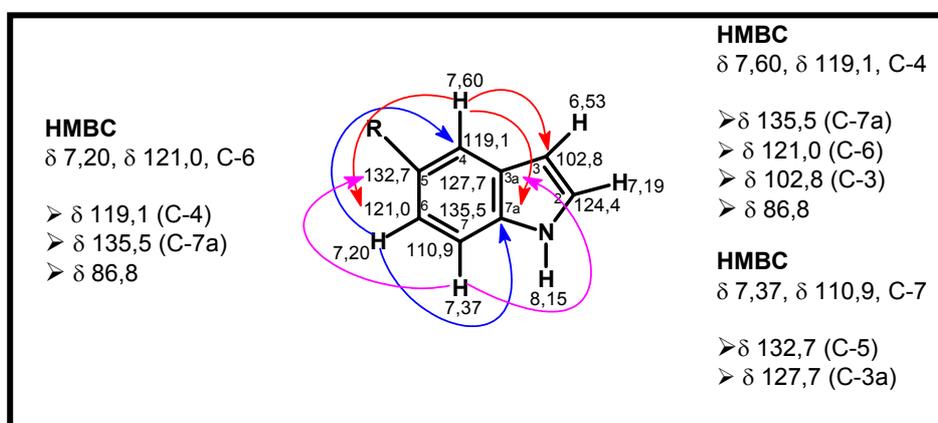


FIGURA 4.154. Correlações apresentadas nos experimentos de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,60 (H-4),  $\delta$  7,37 (H-7) e  $\delta$  7,20 (H-6).

O hidrogênio em  $\delta$  4,64 coaleceu com outro em  $\delta$  4,67 (Figura 4.162), no experimento de HSQC (Figura 4.164), foi observado o primeiro sinal ligado ao carbono em  $\delta$  86,8 e o segundo apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  71,5 (estas atribuições foram possíveis somente após observação no equipamento). No COSY (Figura 4.165), o sinal em  $\delta$  4,64 m acoplou com  $\delta$  2,73 m ( $\delta$  51,6) e no HMBC (Figura 4.166) correlacionou com  $\delta$  121,0 (C-6),  $\delta$  119,1 (C-4) e  $\delta$  29,0, conforme figura 4.155.

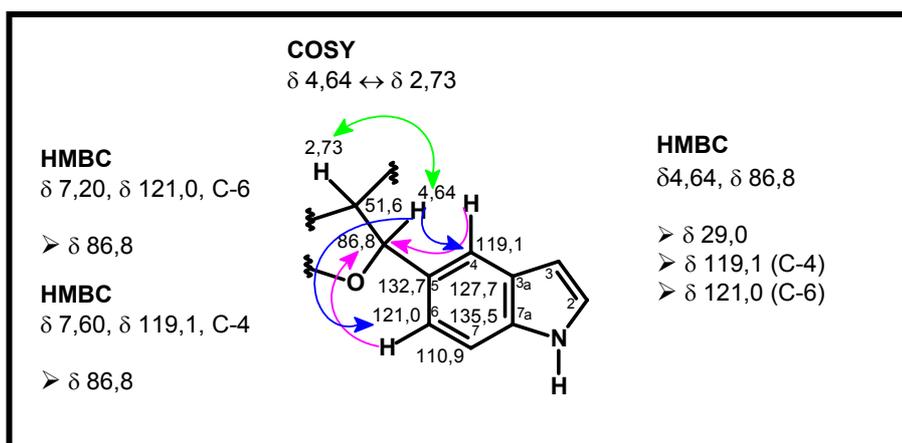


FIGURA 4.155. Correlações e acoplamento apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta 7,60$  (H-4),  $\delta 7,20$  (H-6) e  $\delta 4,64$ .

O sinal em com  $\delta 2,73$  ( $\delta 51,6$ ) mostrou acoplamento no COSY (Figura 4.165) com  $\delta 2,28$  m ( $\delta 29,0$ ) e no HMBC, não apresentou correlação. Foi observado no COSY, o acoplamento do sinal em  $\delta 2,28$  m com  $\delta 5,12$  m ( $\delta 121,7$ ). No experimento de HMBC (Figura 4.166), o sinal em  $\delta 2,28$  (Figura 4.156) mostrou correlações com  $\delta 51,6$ ,  $\delta 121,7$ ,  $\delta 86,8$  e  $\delta 132,7$ . O hidrogênio em  $\delta 5,12$  mostrou correlações com  $\delta 18,1$ ,  $\delta 25,7$  e  $\delta 29,0$ . No COSY, foi observado acoplamento de  $\delta 5,12$  com  $\delta 1,64$ . Este último sinal, via HSQC (Figura 4.164), apareceu ligado ao carbono da metila em  $\delta 25,7$ , o outro carbono de metila em  $\delta 18,1$  s apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta 1,60$  s.

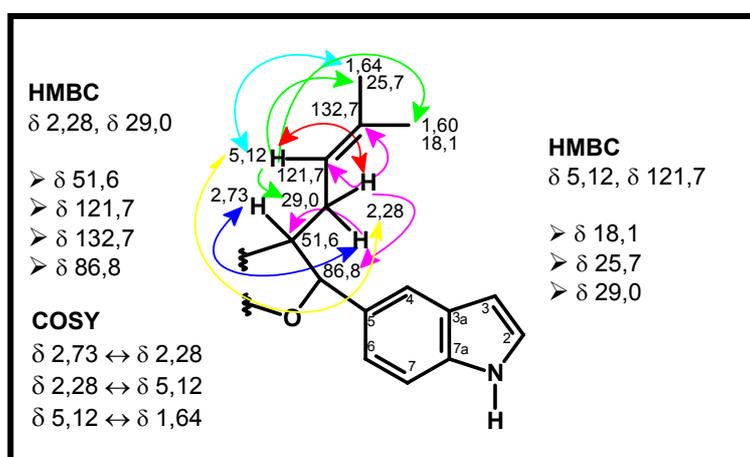


FIGURA 4.156. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para o sinal de hidrogênio em  $\delta 5,12$  e  $\delta 2,28$ .

A Me em  $\delta$  1,64 ( $\delta$  25,7) mostrou correlações (Figura 4.166) com  $\delta$  18,0,  $\delta$  121,7 e  $\delta$  132,7. A Me em  $\delta$  1,60 ( $\delta$  18,1) mostrou correlações com 25,7,  $\delta$  121,7 e 132,7. As atribuições dos valores de deslocamentos das metilas podem ser vistas na figura 4.157.

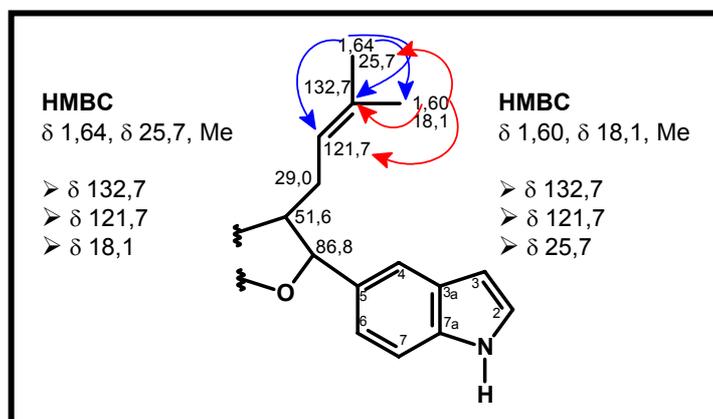


FIGURA 4.157. Correlações apresentadas nos experimentos de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,64 (Me) e  $\delta$  1,60 (Me).

O sinal de um hidrogênio olefínico em  $\delta$  4,99 (103,6) mostrou correlações no HMBC (Figura 4.166) com  $\delta$  51,6 e  $\delta$  71,5. O sinal em  $\delta$  51,6 já havia sido atribuído ao C-3' e o sinal em  $\delta$  71,5 ( $\delta$  4,67 e  $\delta$  4,44) foi atribuído ao C-5', conforme mostrado na figura 4.158.

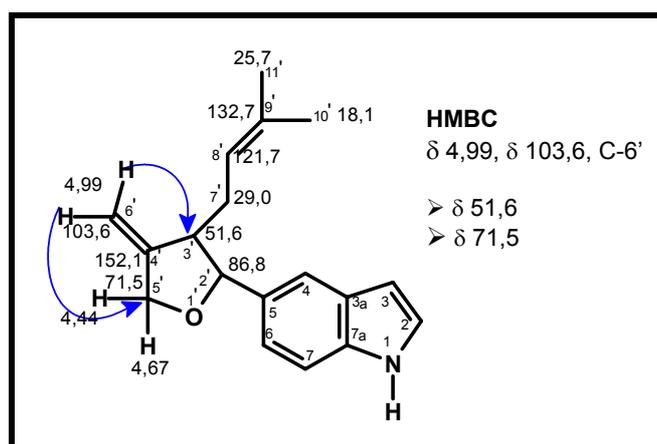


FIGURA 4.158. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,99 (H-6').

As correlações discutidas mostraram a presença de duas prenilas ligadas entre si, sendo uma oxigenada (sinais de carbonos em  $\delta$  71,5 e  $\delta$  86,8). O

sinal em  $\delta$  71,5 foi atribuído ao C-5' e o sinal em  $\delta$  86,8 foi atribuído ao C-2', esta última atribuição foi confirmada pelas correlações de C-2' com H-4 ( $\delta$  7,60), H-6 ( $\delta$  7,20) e H-7' ( $\delta$  2,28). Na tentativa da determinação da estereoquímica da molécula e da confirmação da posição do substituinte foi feito o experimento de gNOESY (Figura 4.167 e 4.167a).

O sinal em  $\delta$  7,60 (Figura 4.159) ao ser irradiado causou nOe em H-3 ( $\delta$  6,53) e H-2' ( $\delta$  4,64), o primeiro confirmou a atribuição de  $\delta$  7,60 para H-4 e o segundo apenas confirmou o posicionamento do substituinte no anel indólico. Através da irradiação do hidrogênio em  $\delta$  6,53 (H-3), pôde-se observar nOe com  $\delta$  7,19 (H-2) e  $\delta$  7,60 (H-4), que concretizou a atribuição de  $\delta$  7,60 ao H-4. Outro sinal irradiado foi  $\delta$  7,37 (H-7) que causou nOe em  $\delta$  7,20, confirmando a atribuição deste sinal a H-6, conforme figura 4.159.

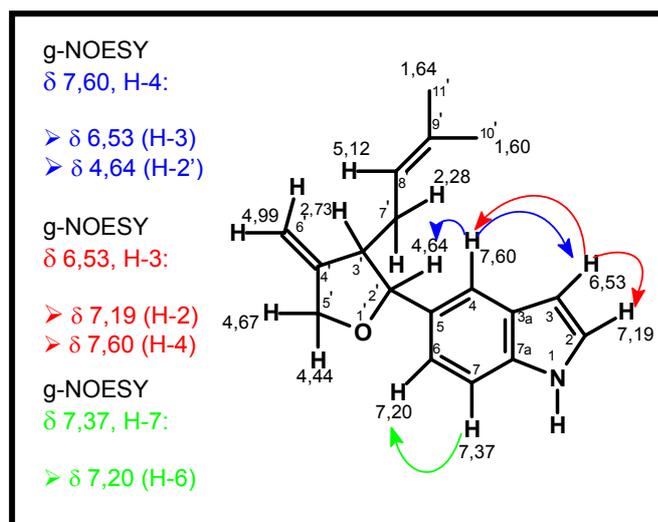


FIGURA 4.159. Irradiações apresentadas no experimento de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,60 (H-4),  $\delta$  7,37 (H-7),  $\delta$  6,53 (H-3),  $\delta$  2,73 (H-3').

O sinal em  $\delta$  2,73 (H-3') foi irradiado e causou nOe em  $\delta$  5,12 (H-8'),  $\delta$  2,28 (H-7'),  $\delta$  4,99 (H-6'),  $\delta$  7,20 (H-6) e  $\delta$  7,60 (H-4), os dois últimos nOe só poderiam ser visualizados se a estrutura proposta tivesse o H-3' anti em relação ao H-2' (Figura 4.160).

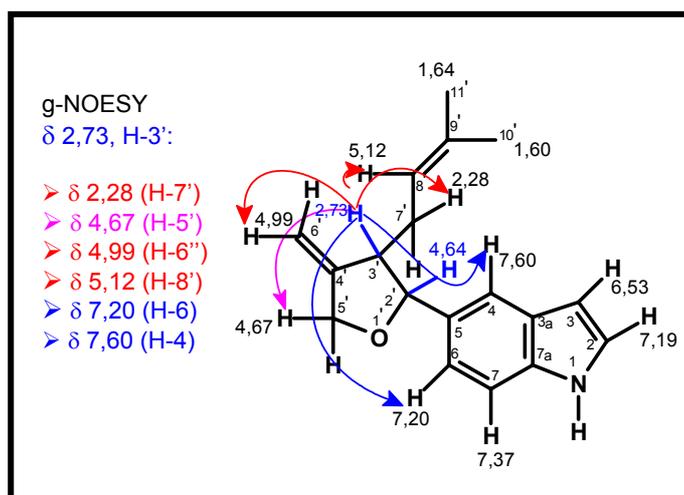


FIGURA 4.160. Irradiação apresentada no experimento de gNOESY para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,73 (H-3').

O H-3' (Figura 4.160) causou nOe também em  $\delta$  4,64 (H-2') ou  $\delta$  4,67 (H-5'), como estes dois coaleceram, tornou-se difícil distinguir no gNOESY quem apresentou nOe, mas analisando as possíveis estereoquímicas e baseada no nOe detectado de H-3' com o H-4 e H-6, sugeriu-se que o nOe foi de H-5' ( $\delta$  4,67). Esta conclusão restringiu a estereoquímica a apenas duas propostas, conforme mostra a figura 4.161. Com estes dados não foi possível definir quais das duas propostas condizem com a estereoquímica verdadeira.

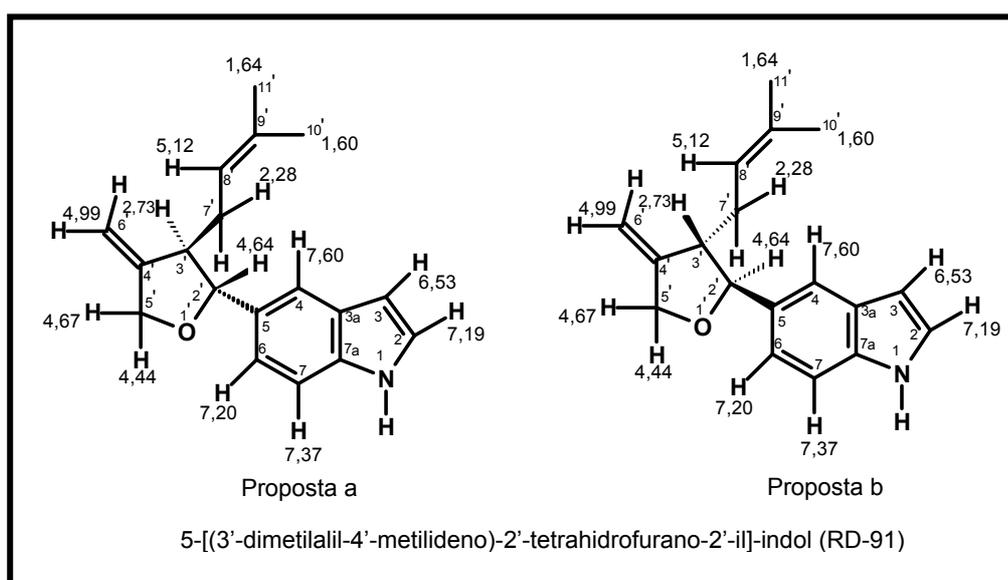


FIGURA 4.161. Propostas para a estereoquímica da substância RD-91.

A substância RD-91 foi identificada com base nos dados espectrais de 1D e 2D e também utilizando modelo na literatura para o anel indol (MAKANGARA *et al.*, 2004). De acordo com levantamento realizado no *Chemical Abstract*, a substância RD-91 é **inédita** (independente da estereoquímica). Foi proposta a denominação de **5-[(3'-dimetilalil-4'-metilideno)-2'-il]-indol**.

TABELA 4.11. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-91 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C/N	RD-91	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	8,15 sl	-
2	7,19 d (J = 3,3 Hz)	124,4
3	6,53 m	102,8
3a	-	127,7
4	7,60 d (J = 0,8 Hz)	119,1
5	-	132,7
6	7,20 dd (J = 8,5 e 2,0 Hz).	121,0
7	7,37 d (J = 8,5 Hz)	110,9
7a	-	135,5
2'	4,64 m	86,6
3'	2,73 m	51,6
4'	-	152,1
5'	4,67 m e 4,44 m	71,5
6'	4,99 m	103,6
7'	2,28 m	29,0
8'	5,12 m	121,7
9'	-	132,7
10'	1,60 s	18,1
11'	1,64 s	25,7

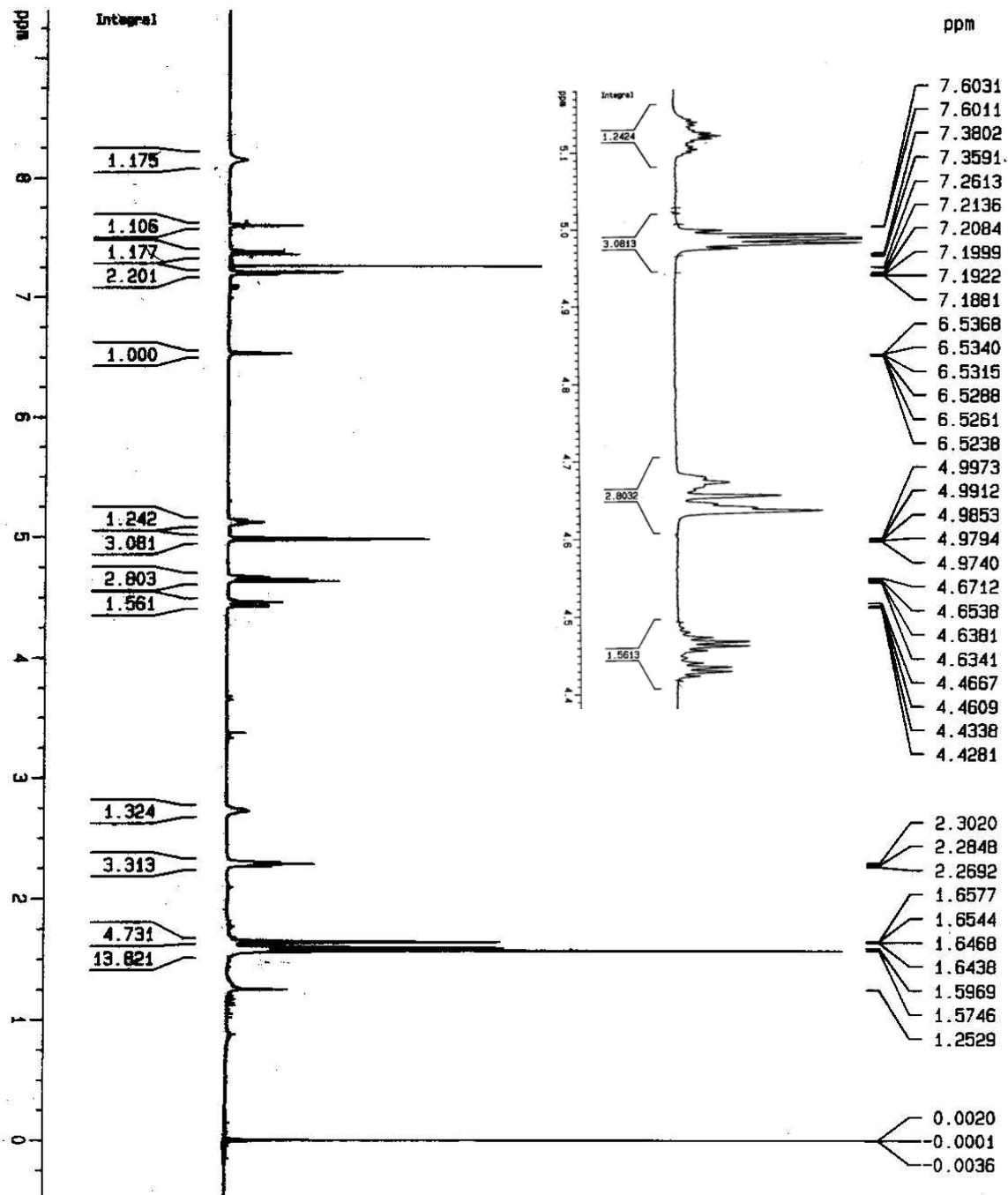


FIGURA 4.162. Espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância RD-91 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

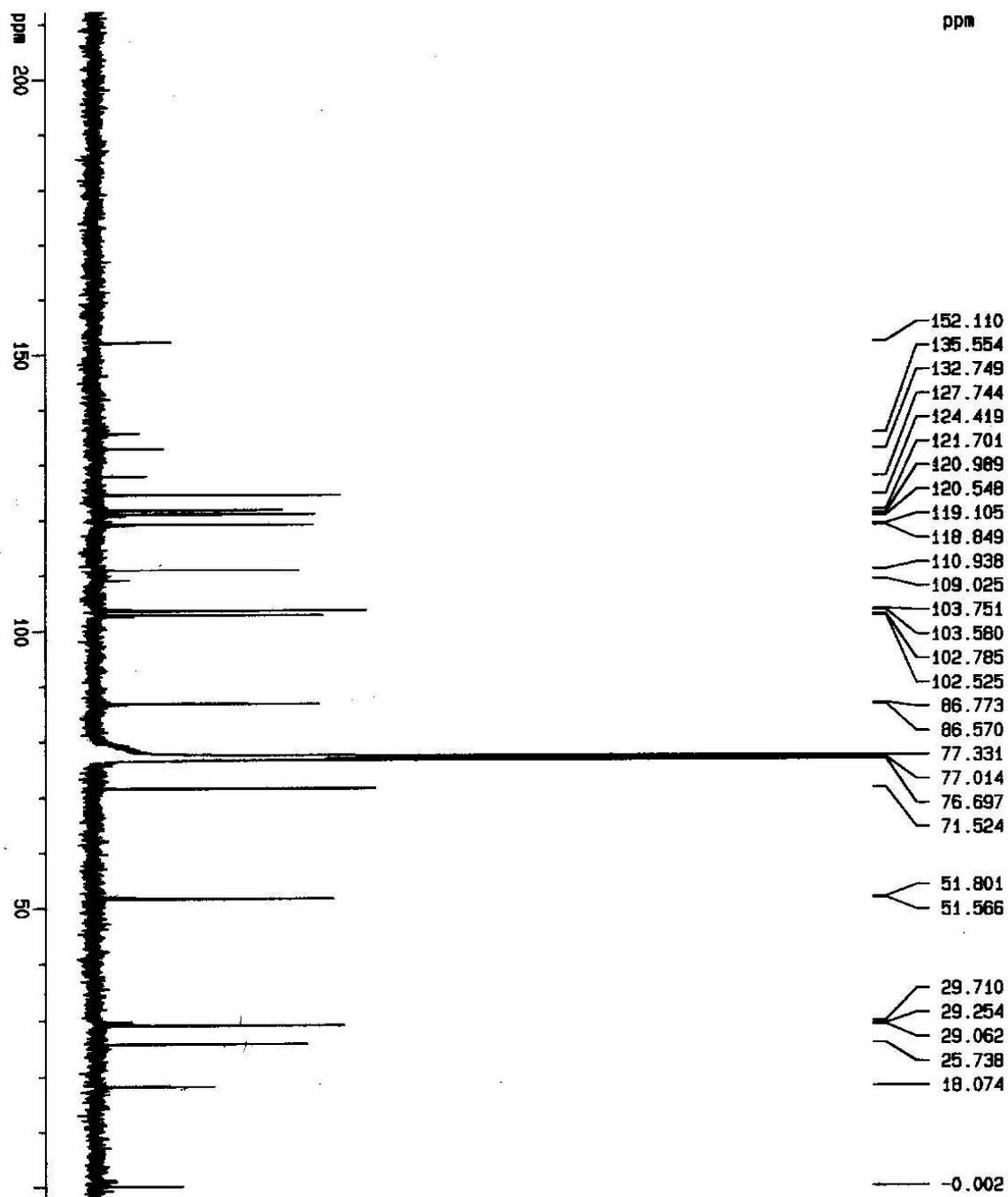


FIGURA 4.163. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RD-91 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

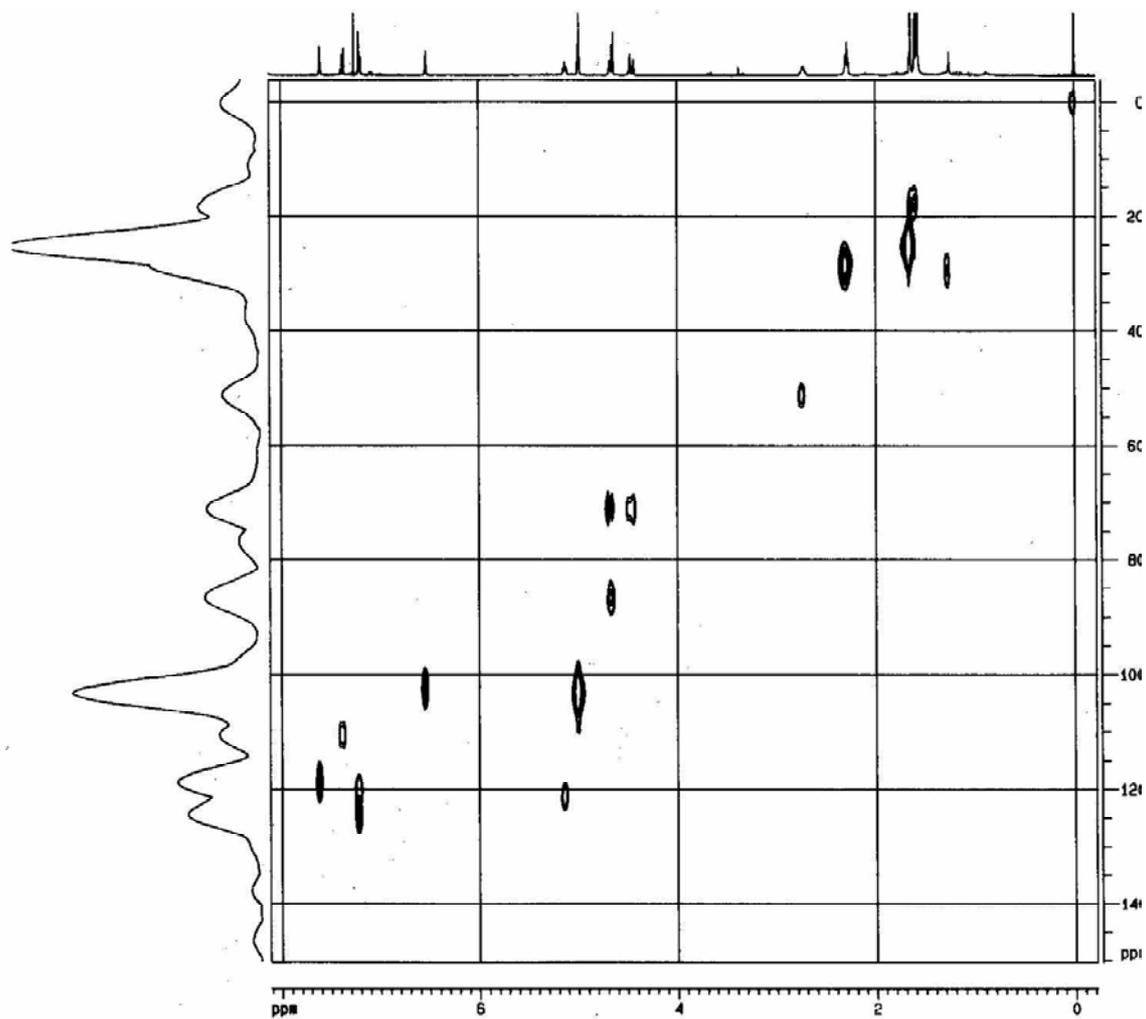


FIGURA 4.164. Experimento de HSQC da substância RD-91 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

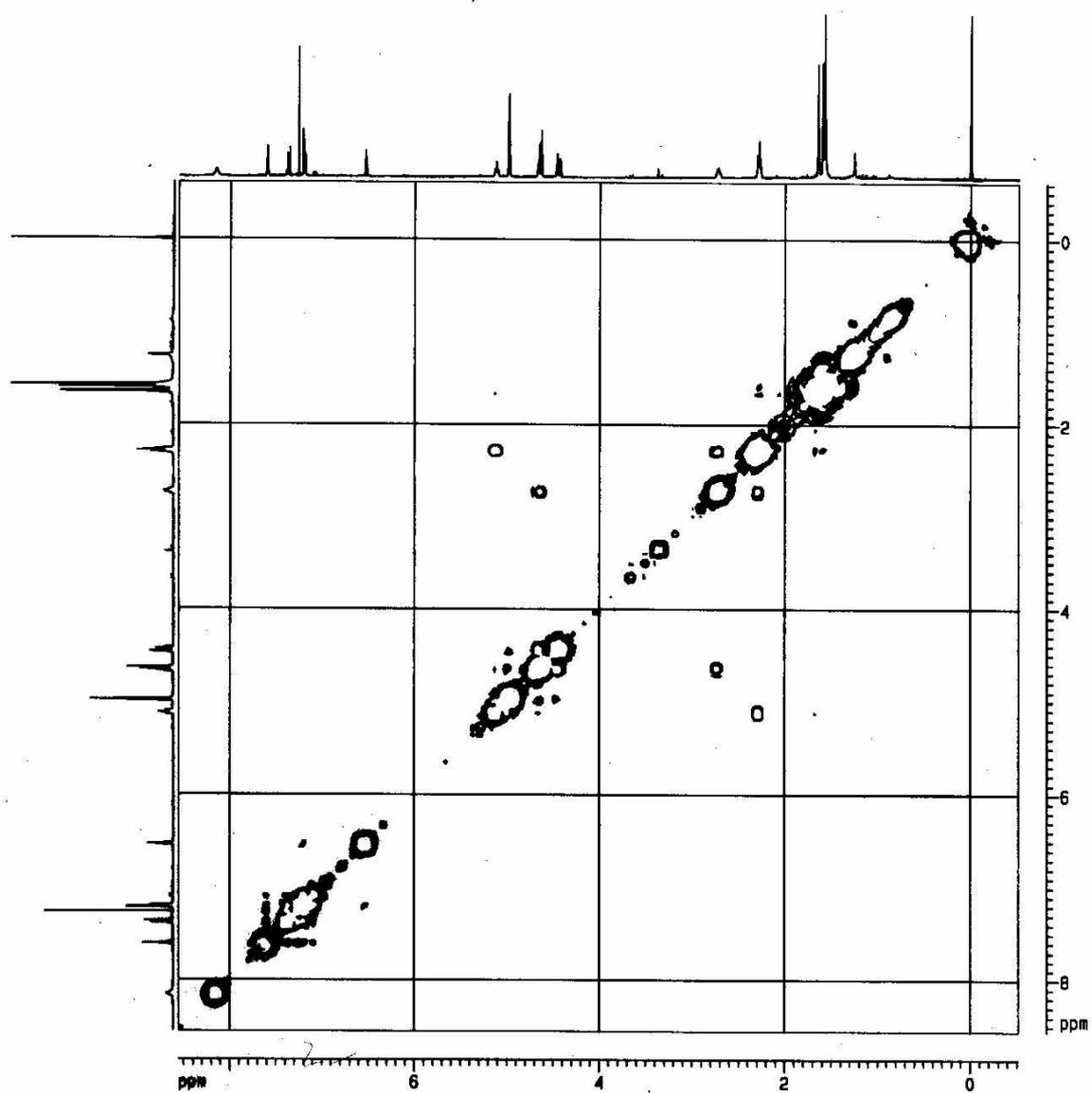


FIGURA 4.165. Experimento de COSY da substância RD-91 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

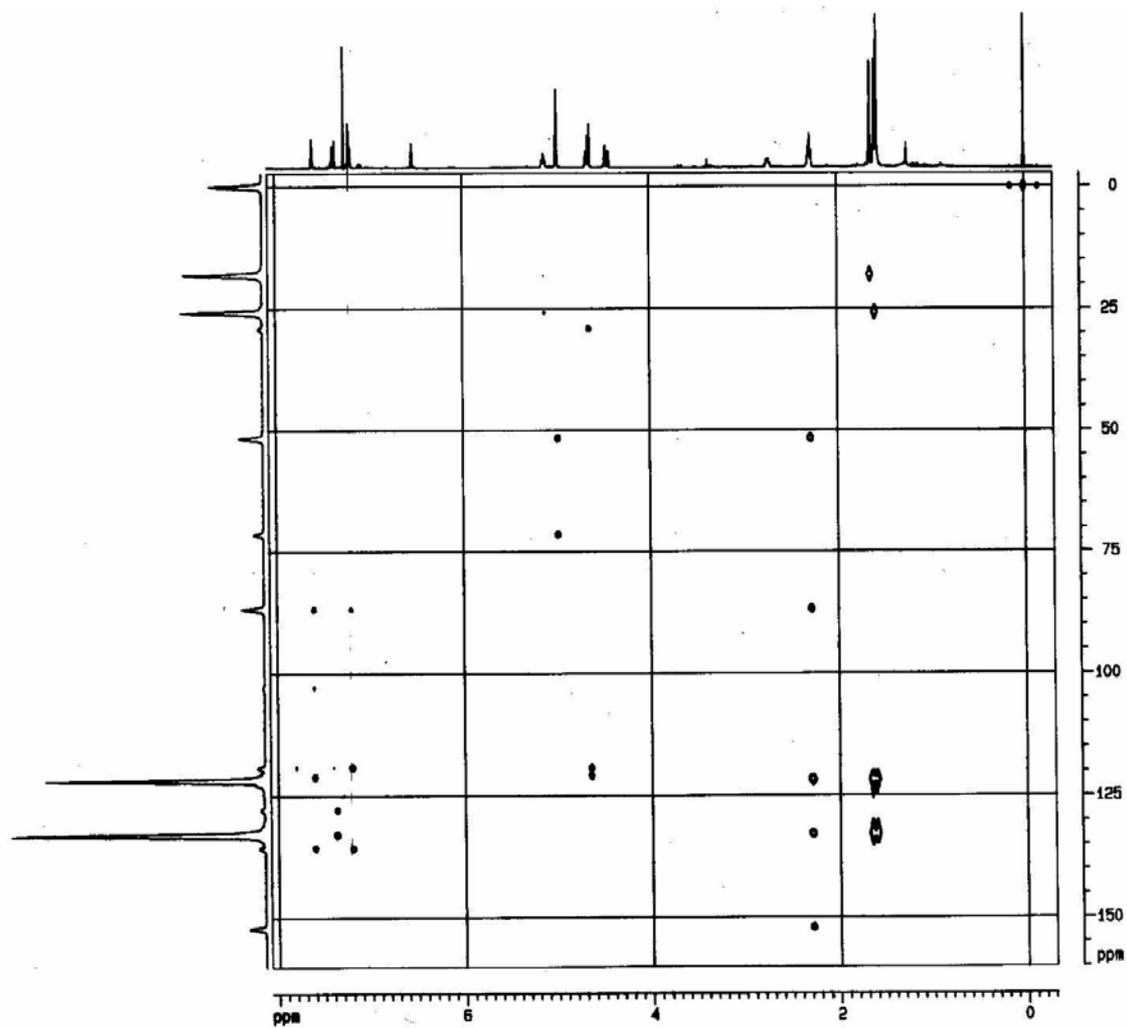


FIGURA 4.166. Experimento de HMBC da substância RD-91 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

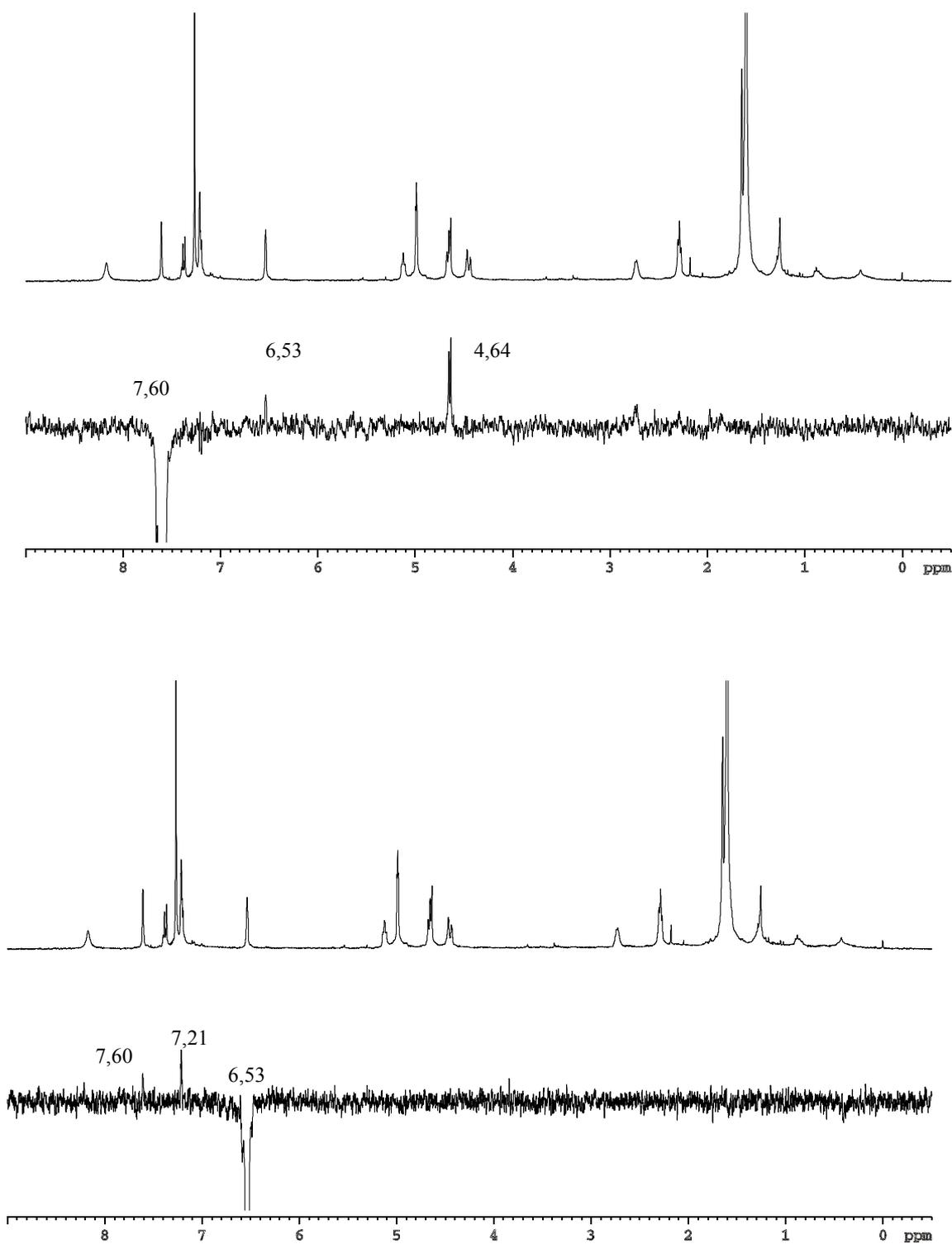
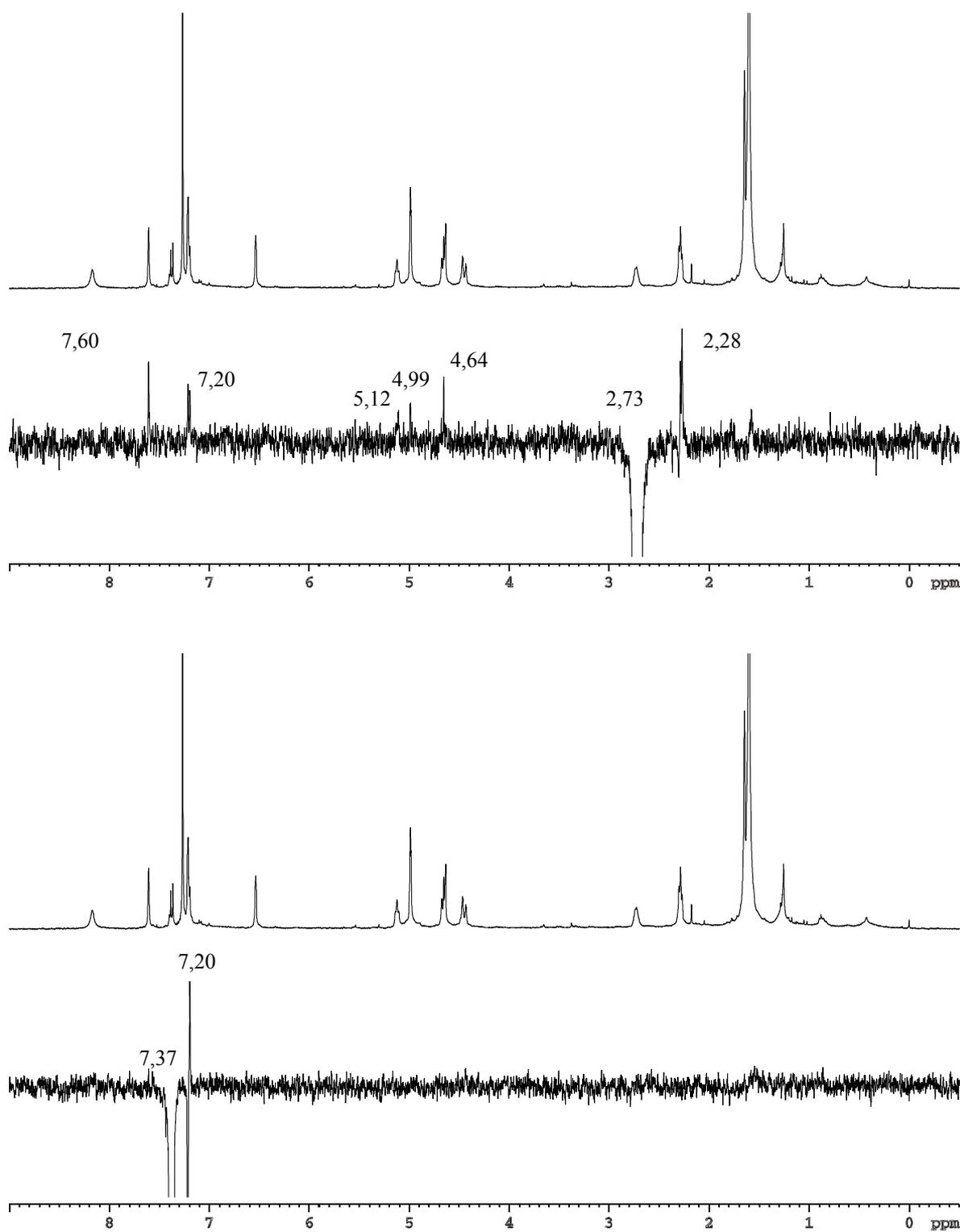


FIGURA 4.167. Experimento de gNOESY da substância RD-91 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

FIGURA 4.167a. Experimento de gNOESY da substância RD-91 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.1.14. Identificação da substância RD-92

A substância RD-92 foi isolada do extrato diclorometano da raiz de *R. praetermissa*, como um cristal agulha. Ao ser revelado com vanilina ácida apresentou uma mancha de cor azul escura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.173, Tabela 4.12) apresentou sinais de ressonância para seis metilas entre  $\delta$  1,01- $\delta$  1,98, sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,45 d ( $J= 12,3$  Hz),  $\delta$  5,89 d ( $J= 12,3$  Hz) e  $\delta$  5,30 t ( $J= 1,4$  Hz). O sinal desblindado para uma metila em  $\delta$  1,98 sugeriu a presença de um grupo acetato. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4.12, Figura 4.174) apresentou sinais de duas lactonas em  $\delta$  176,5 e  $\delta$  167,5.

Após análises dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi verificada a possibilidade de este ser um limonóide (devido o perfil dos sinais apresentados e também por ter apresentado somente 28 carbonos). Foram procurados então os sinais característicos dos hidrogênios do anel furano, porém foi verificada a ausência dos mesmos, o que sugeriu modificação no anel furano.

No experimento de HSQC (Figura 4.175) foram observados os sinais de hidrogênios carbinólicos em  $\delta$  3,92 t ( $J = 7,7$  Hz) e  $\delta$  4,45 t ( $J = 7,7$  Hz) ligados ao carbono em  $\delta$  72,4, estes foram atribuídos ao H-21 de um anel furano modificado. No experimento de COSY (Figura 4.176) foi observado acoplamento entre eles mesmo. No experimento de HMBC (Figura 4.177) foi observado à correlação do sinal em  $\delta$  3,92 com  $\delta$  58,2 (atribuído ao C-17). Os sinais em  $\delta$  2,23 m e  $\delta$  2,51 m apareceram ligados ao carbono em  $\delta$  34,1 (C-22). O COSY também mostrou correlação entre os mesmos sinais, já no HMBC foi verificada a correlação com  $\delta$  176,5 (C-23) para ambos os sinais e para  $\delta$  2,51 uma outra correlação com  $\delta$  72,4 (C-21), o valor do deslocamento para o C-23 foi característico de lactona. O sinal do carbono em  $\delta$  37,4 foi atribuído a C-20 que segundo o HSQC correspondeu ao sinal de hidrogênio em  $\delta$  2,71. Todas as correlações e acoplamentos discutidos podem ser vistas na figura 4.168.

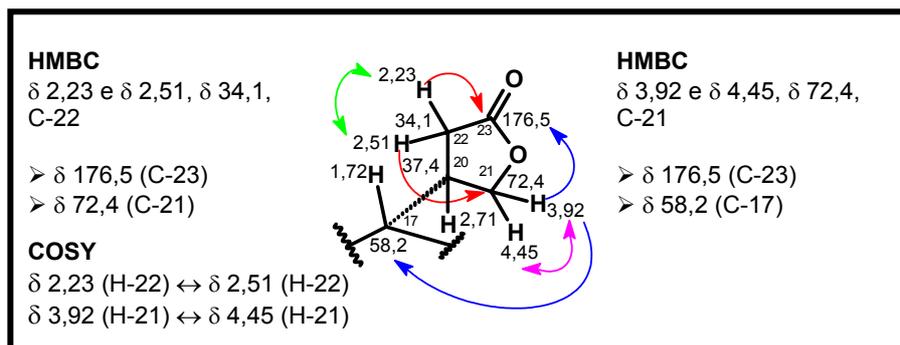


FIGURA 4.168. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  2,23 e  $\delta$  2,51 (H-22),  $\delta$  3,92 e  $\delta$  4,45 (H-21).

O valor do deslocamento de H-17 m ( $\delta$  1,72) sugeriu ausência de sinal de lactona para o anel D, este seria anel de cinco com função epóxido ou ligação dupla, como é comum em limonóides desta família. Na ausência de sinal para epóxido, pôde-se então colocar uma ligação dupla no anel entre C-14 ( $\delta$  158,2) e C-15 ( $\delta$  119,4), em conseqüência, o sinal do hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,30 foi atribuído ao H-15, este apresentou correlação no HMBC (Figura 4.177) com  $\delta$  46,4 (C-13). O sinal em C-13 apresentou correlações, no HMBC (Figura 4.169, Figura 4.177), com os hidrogênios da Me-18 ( $\delta$  1,01) e H-15 ( $\delta$  5,30). No experimento de COSY (Figura 4.176), o H-17 apresentou acoplamento com H-16 ( $\delta$  2,05 e 2,21), conforme visto na figura 4.169.

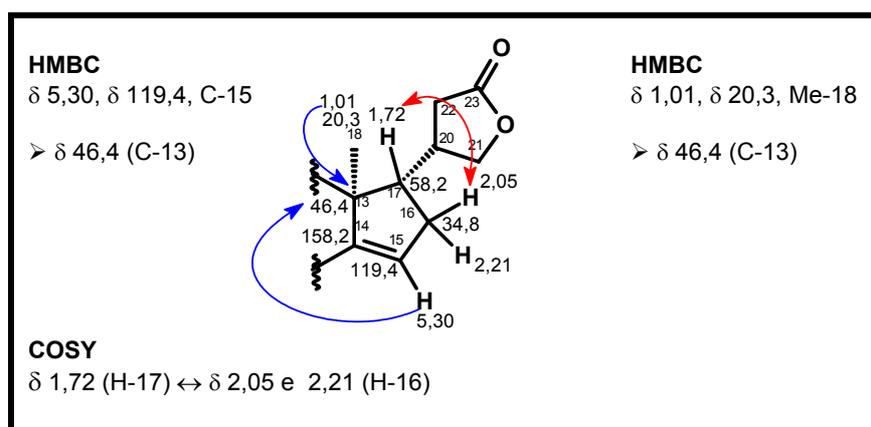


FIGURA 4.169. Correlações e acoplamentos apresentados nos experimentos de HMBC e COSY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  5,30 (H-15),  $\delta$  1,72 (H-17) e  $\delta$  1,01 (Me-18).

O sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,17 s (Figura 4.170) correspondeu a Me-30 ( $\delta$  27,1), esta apresentou correlações no HMBC (Figura 4.177) com o carbono olefínico em  $\delta$  158,2 (C-14), com os sinais em  $\delta$  74,2 (C-7),  $\delta$  42,2 (C-8) e  $\delta$  40,8 (C-9). O sinal em  $\delta$  74,2 sugeriu carbono oxigenado em C-7. O sinal de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.173) para H-7 em  $\delta$  5,18 t ( $J = 2,8$  Hz) indicou substituição em C-7 por um grupo retirador de elétrons. Como foi visto uma metila desblindada em  $\delta$  1,98 s (Me,  $\delta$  21,2), foi proposto à presença de um grupo acila esterificando o oxigênio ( $\delta$  170,0). Na região de  $\delta$  1,87 m o HSQC (Figura 4.175) indicou dois sinais de carbonos para este sinal, um em  $\delta$  18,0 atribuído ao C-11 e outro em  $\delta$  27,3, atribuído ao C-6, estas atribuições foram feitas por comparação com dados da literatura (KISHI *et al.*, 1992). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  2,49 m ( $\delta$  49,2) foi atribuído ao C-5, este carbono apresentou correlações no HMBC (Figura 4.177) com H-7 ( $\delta$  5,18), com outras três metilas em  $\delta$  1,27 (Me-19),  $\delta$  1,36 (Me-29) e  $\delta$  1,45 (Me-28), e ainda com H-1 ( $\delta$  6,45). Todas estas correlações podem ser observadas na figura 4.170.

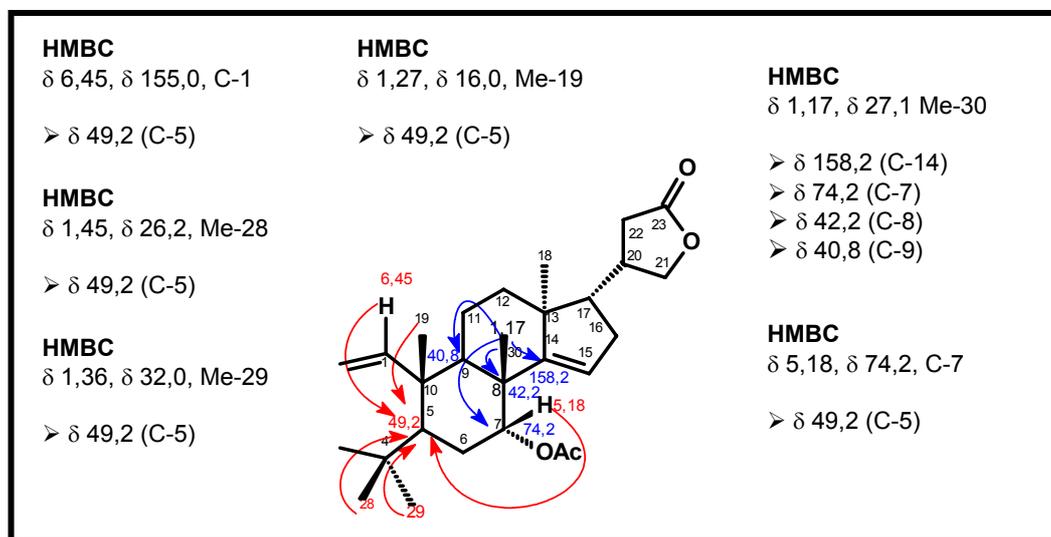


FIGURA 4.170. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,45 (H-1),  $\delta$  5,18 (H-7),  $\delta$  1,45 (Me-28),  $\delta$  1,36 (Me-29),  $\delta$  1,27 (Me-19) e  $\delta$  1,17 (Me-30).

O sinal de ressonância em  $\delta$  1,27 s (Me-19,  $\delta$  16,0) apresentou correlações, via HMBC (Figura 4.177), com  $\delta$  49,2 (C-5),  $\delta$  40,8 (C-9) e  $\delta$  44,1 (C-10), conforme mostrado na figura 4.171. A metila em  $\delta$  1,36 s (Me-29,  $\delta$  32,0)

mostrou correlações no experimento de HMBC com  $\delta$  84,8 (C-4),  $\delta$  49,2 (C-5) e  $\delta$  26,2 (Me-28). O sinal em  $\delta$  1,45 s (Me-28) mostrou correlações, via HMBC (Figura 4.177), com  $\delta$  84,8 (C-4),  $\delta$  49,2 (C-5) e  $\delta$  32,0 (Me-29). O deslocamento de carbono em  $\delta$  84,8 indicou a presença de oxigênio e como havia a existência de um outro sinal em  $\delta$  167,5 (C-3), foi proposta a presença de uma lactona no anel A, o primeiro carbono foi atribuído ao C-4 e o segundo ao C-3. Os sinais olefínicos em  $\delta$  6,45 d ( $J = 12,3$  Hz) foram atribuídos ao H-1 (C-1,  $\delta$  119,9) e  $\delta$  5,90 d ( $J = 12,3$  Hz) ao H-2 (C-2,  $\delta$  155,1), os valores destes deslocamentos são justificados pela conjugação com o éster. Os valores de deslocamentos discutidos e suas atribuições são mostrados na figura 4.171.

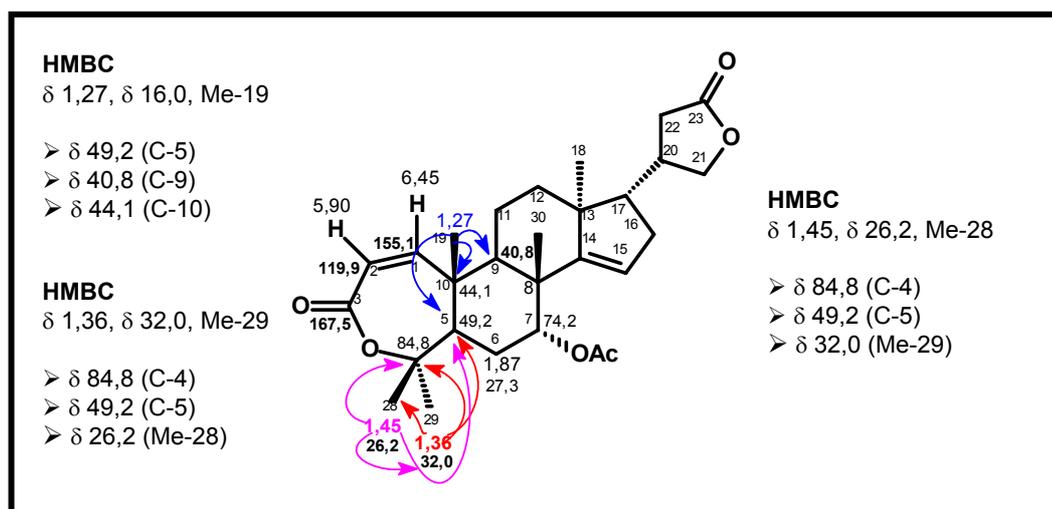


FIGURA 4.171. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,45 (Me-28),  $\delta$  1,36 (Me-29) e  $\delta$  1,27 (Me-19).

A análise dos dados de RMN uni e bidimensionais da substância RD-92 e comparação com a literatura (KISHI *et al.*, 1992), levou a identificação do limonóide: acetato de tricocina S13. Pelo levantamento realizado no *Chemical Abstract* esta é uma substância conhecida, mas não é comercializada, foi registrada com o número 70142-93-7.

A comparação dos deslocamentos de carbonos encontrados para a substância RD-92 e para a literatura (KISHI *et al.*, 1992) é mostrada na figura 4.172.



TABELA 4.12. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-92 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz).

H/C	RD-92		Literatura*
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	6,45 d ( $J= 12,3$ Hz)	155,0	155,1
2	5,89 d ( $J= 12,3$ Hz)	119,9	119,9
3		167,5	167,5
4		84,8	84,7
5	2,49 m	49,2	49,2
6	1,87 m	27,3	27,3
7	5,18 tl ( $J= 2,18$ Hz)	74,2	74,2
8		42,2	42,2
9	2,23 m	40,8	40,8
10		44,1	44,1
11	1,87	18,0	18,2
12	1,57 m e 1,74 m	34,0	34,0
13		46,4	46,4
14		158,2	158,1
15	5,30 t ( $J= 1,4$ Hz)	119,4	119,4
16	2,05 m e 2,21 m	34,8	34,8
17	1,72 m	58,2	58,1
18	1,01 s	20,3	20,3
19	1,27 s	16,0	16,0
20	2,71 m	37,4	37,4
21	3,92 t ( $J= 7,7$ Hz) e 4,45 t ( $J= 7,7$ Hz)	72,4	72,4
22	2,51 m e 2, 23 m	34,1	34,1
23		176,5	176,5
28	1,45 s	26,2	26,2
29	1,36 s	32,0	32,0
30	1,17 s	27,1	27,0
7-OAc	1,98 s	21,2 e 170,0	21,1 e 170,1

\* KISHI *et al.* (1992), Solvente:  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).

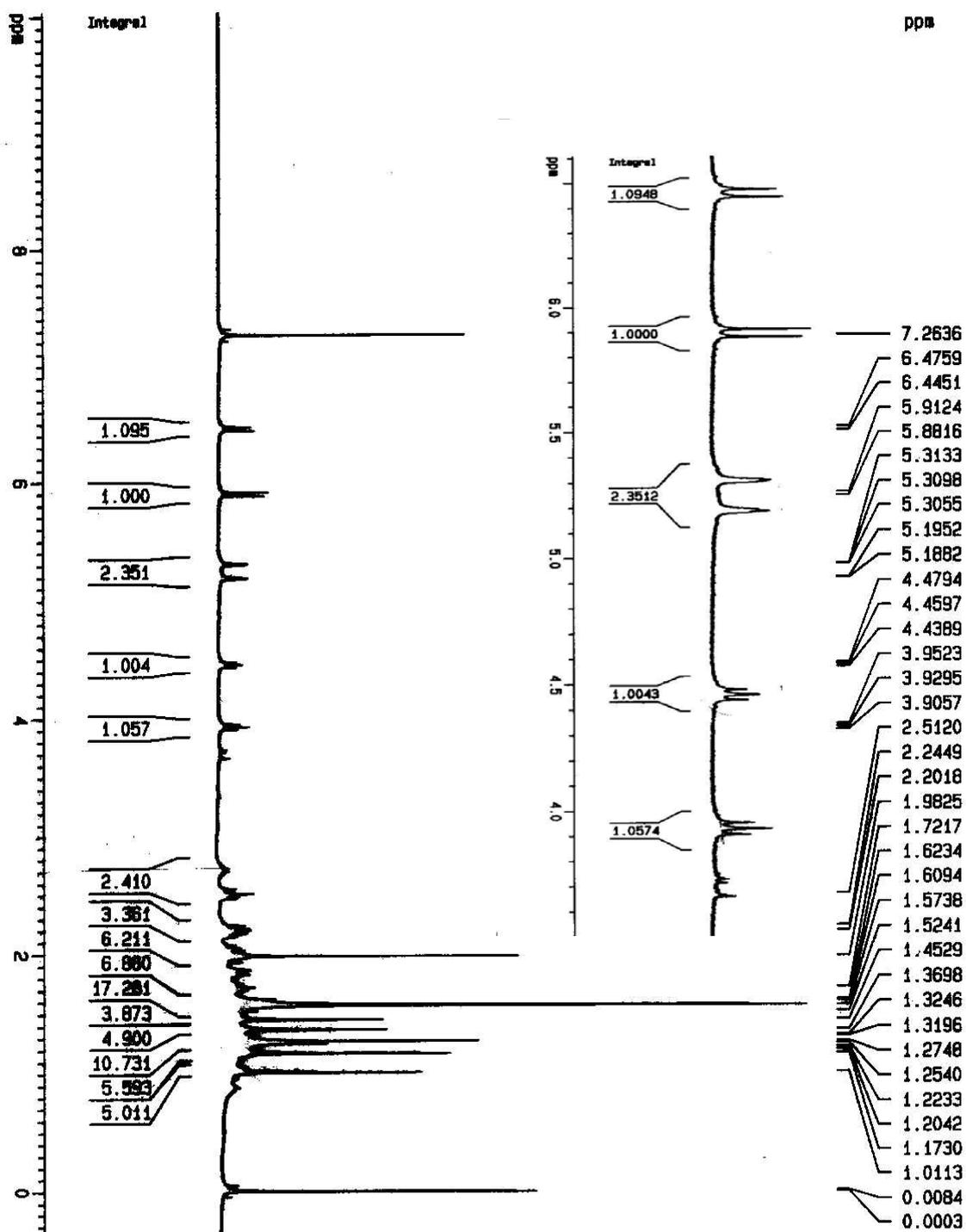


FIGURA 4.173. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância RD-92 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

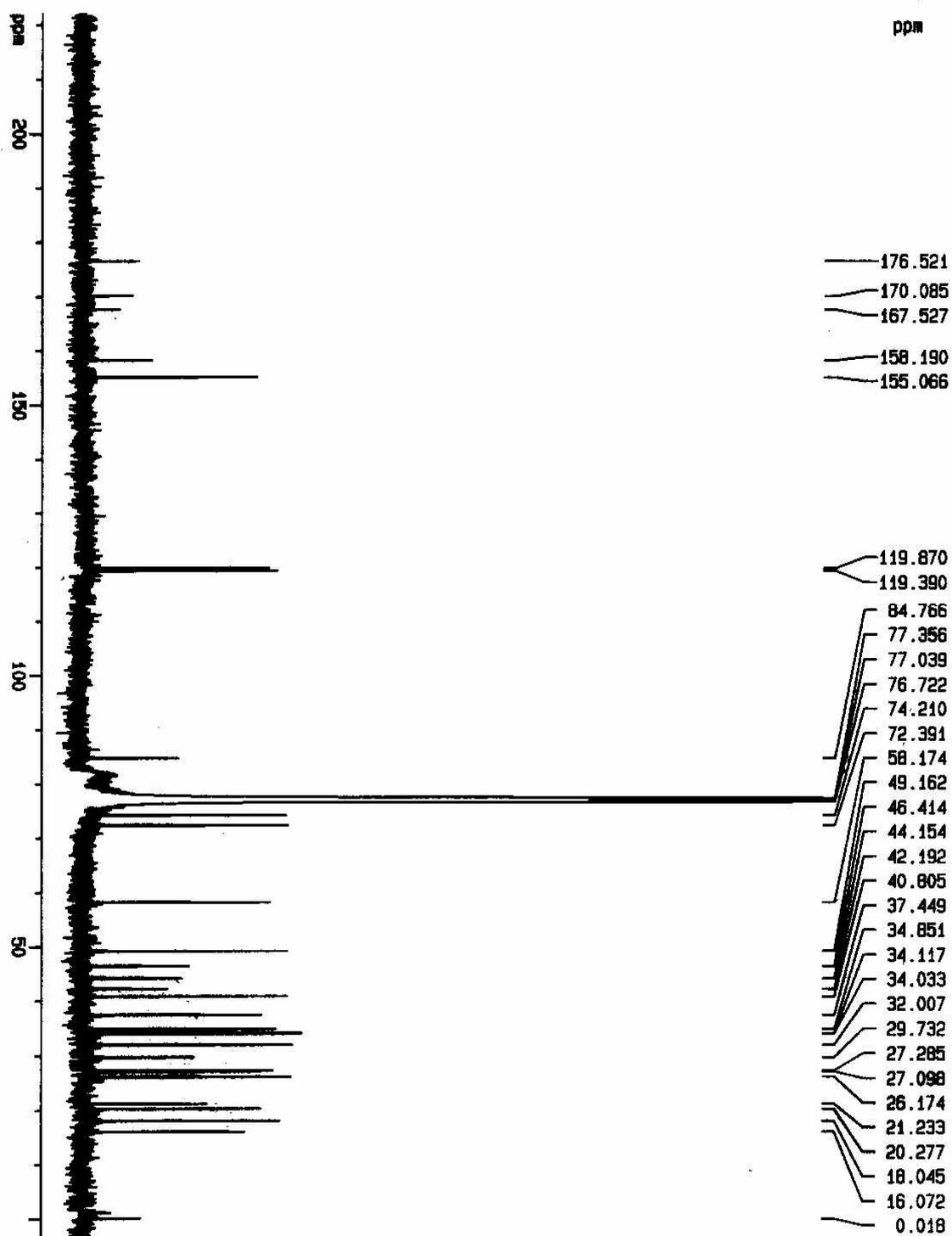


FIGURA 4.174. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RD-92 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

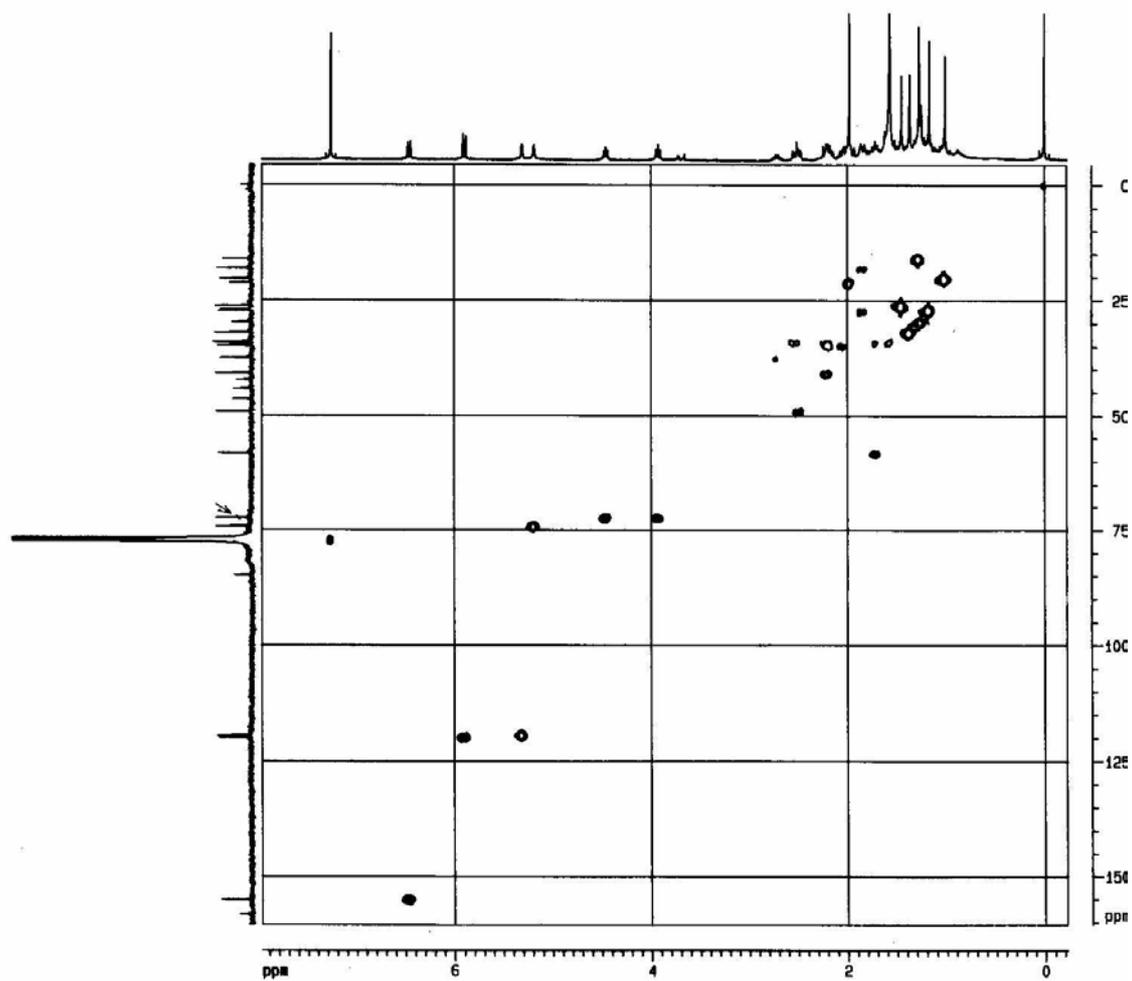


FIGURA 4.175. Experimento de HSQC da substância RD-92 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

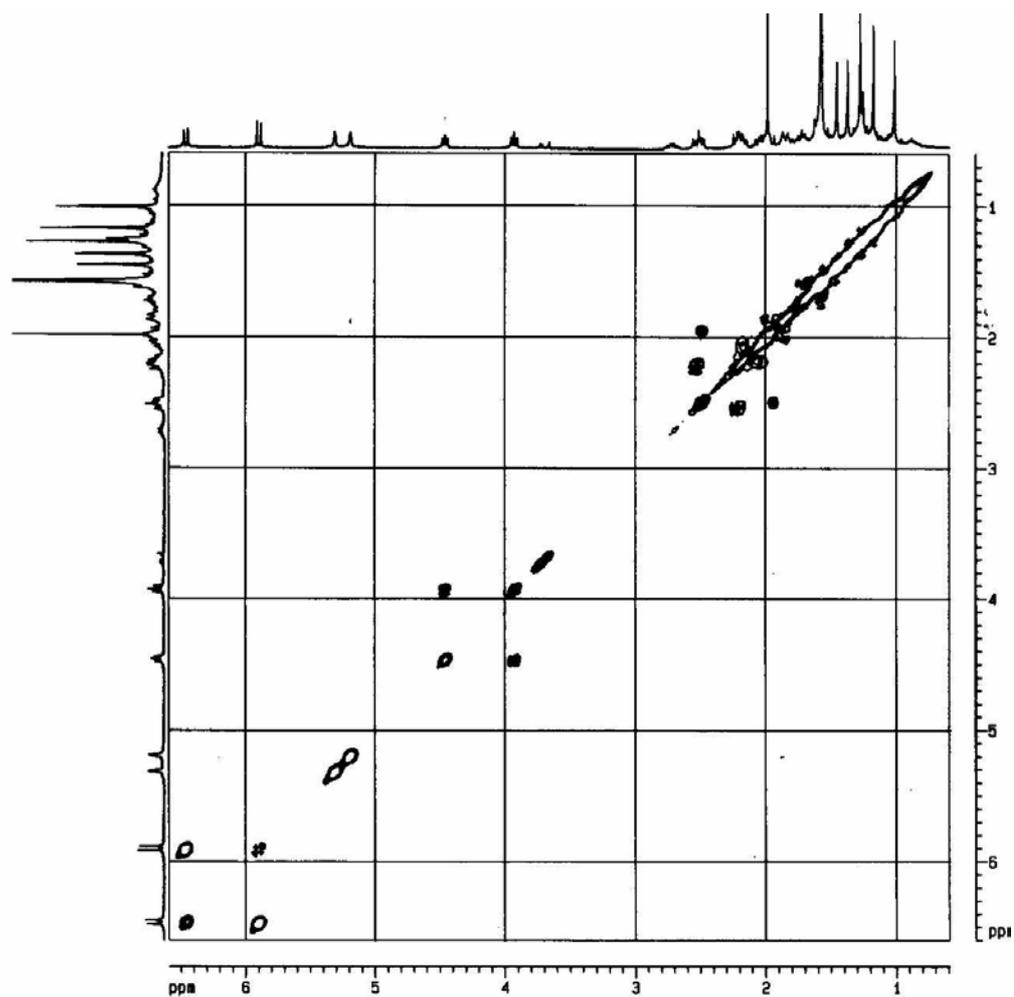


FIGURA 4.176. Experimento de COSY da substância RD-92 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

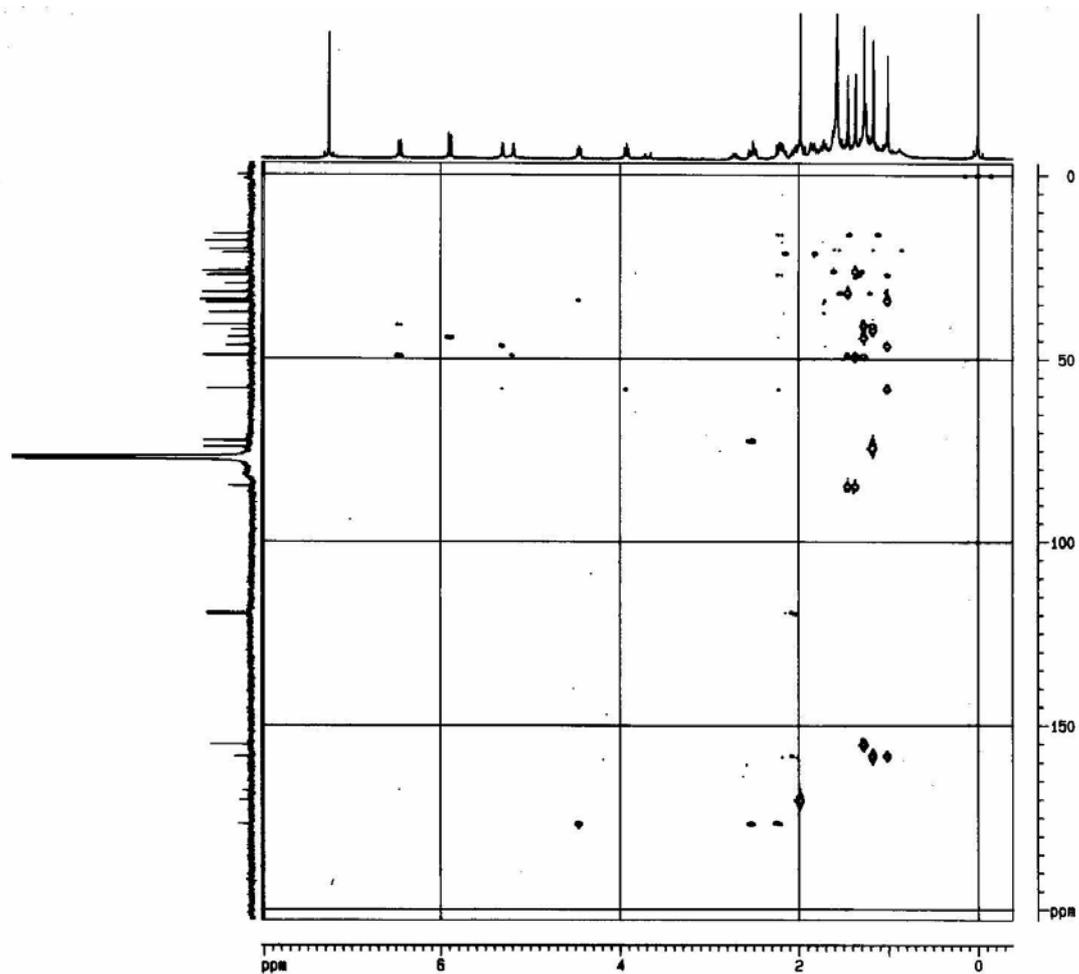


FIGURA 4.177. Experimento de HMBC da substância RD-92 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.15. Identificação da substância RD-122

A substância RD-122 foi isolada do extrato diclorometano, em seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.184e 4.184a, Tabela 4.13) apresentou sinais na região de aromáticos entre  $\delta$  8,04 -  $\delta$  6,55 e um sinal singlete largo em  $\delta$  9,85. O espectro de carbono  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.185) mostrou sinais de carbono em  $\delta$  146,3,  $\delta$  125,6,  $\delta$  118,6,  $\delta$  116,6,  $\delta$  111,7,  $\delta$  102,3,  $\delta$  102,4 e  $\delta$  51,7 (OMe).

O sinal em  $\delta$  9,85 si era de um hidrogênio ligado a um nitrogênio (sinal largo), outro sinal em  $\delta$  7,25 (dd,  $J = 1,2$  e  $2,0$  Hz), via HSQC (Figura 4.186, 4.186a), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  125,5 e um sinal em  $\delta$  6,55 (tl,  $J = 2,0$  Hz), via HSQC, apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  102,4. No experimento de COSY (Figura 4.187, 4.187a), foi observado o acoplamento do sinal em  $\delta$  9,85 com  $\delta$  7,25. Este último mostrou acoplamento via COSY com  $\delta$  6,55. O sinal em  $\delta$  6,55 (HSQC,  $\delta$  102,4, H-3) não apresentou correlação no HMBC. O sinal em  $\delta$  7,25 foi atribuído ao H-2, apresentando correlações via HMBC (Figura 4.188, 4.188a) com os carbonos em  $\delta$  102,4,  $\delta$  128,0 e  $\delta$  136,0. Estas correlações, por comparação com os dados da literatura para um anel indol, foram atribuídas aos carbonos de RD-122 conforme mostrado na figura 4.178.

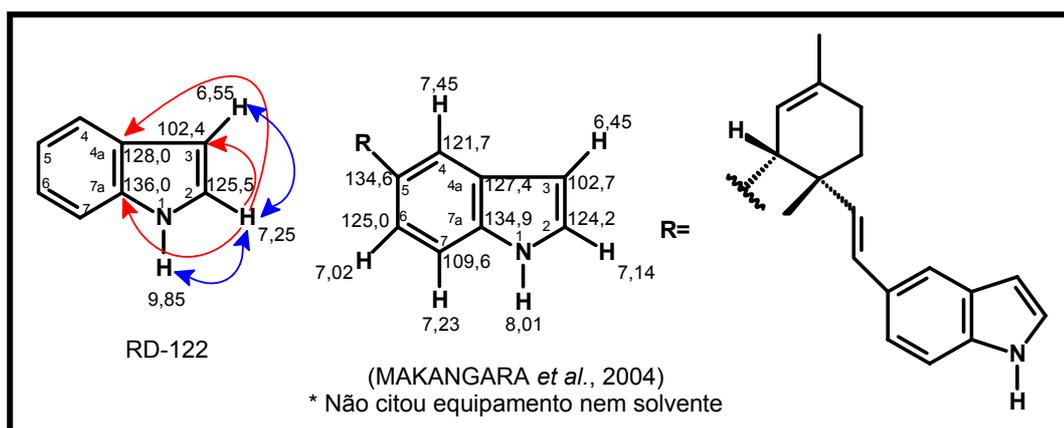


FIGURA 4.178. Valores de deslocamentos da literatura (MAKANGARA *et al.*, 2004) para o anel indólico e comparação com RD-122.

O sinal em  $\delta$  7,43 ( $\delta$  111,7) dubleto ( $J = 8,5$  Hz) apresentou constante de acoplamento típica de hidrogênio aromático “orto” substituído. Este mostrou correlação (Figura 4.188 e 4.188a) com o sinal em  $\delta$  128,0 (C-4a), sendo atribuído ao hidrogênio H-7. O sinal em  $\delta$  7,43 (Figura 4.179) acoplou, via COSY (Figura

4.187a), com  $\delta$  7,50 (dd,  $J = 8,5$  e  $1,6$  Hz,  $\delta$  118,6), este acoplamento permitiu a atribuição de  $\delta$  7,50 ao H-6. Foram observadas ainda as seguintes correlações (Figura 4.179, Figura 4.188a) para os sinais em:  $\delta$  7,43 (H-7) com  $\delta$  123,0;  $\delta$  7,50 (H-6) com  $\delta$  116,6,  $\delta$  156,0 e  $\delta$  136,0 (H-7a), a correlação, com este último sinal, confirmou a atribuição ao H-6. As multiplicidades dos sinais de H-6 e H-7 indicaram que C-5 possuía um substituinte. No HSQC (Figura 4.186a), o sinal em  $\delta$  7,97 si correspondeu ao sinal de carbono em  $\delta$  116,6, ele foi atribuído ao H-4, conforme figura 4.179.

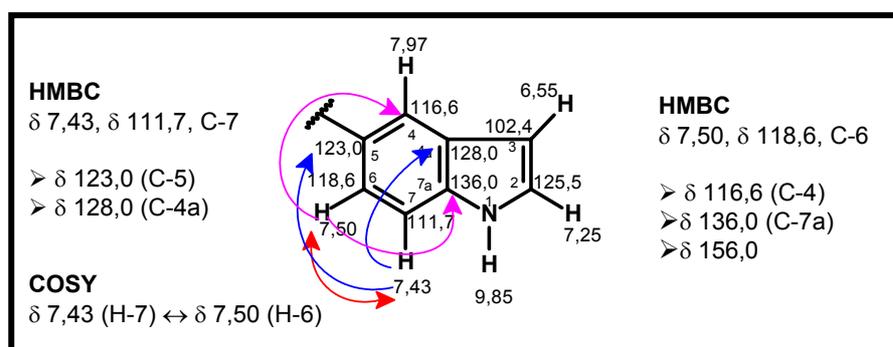


FIGURA 4.179. Acoplamento e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,50 (H-6) e  $\delta$  7,43 (H-7).

O H-7 mostrou correlação (Figura 4.180, Figura 4.188a) com o sinal em  $\delta$  123,0, este carbono foi atribuído ao C-5. O sinal em H-4 ( $\delta$  7,97) mostrou correlações com  $\delta$  118,6 (C-6),  $\delta$  136,0 (C-7a) e  $\delta$  156,0, este último ainda não foi atribuído. As correlações de H-6 e H-4 com  $\delta$  156,0 sugeriram a presença de um substituinte em C-5, conforme visto na figura 4.180.

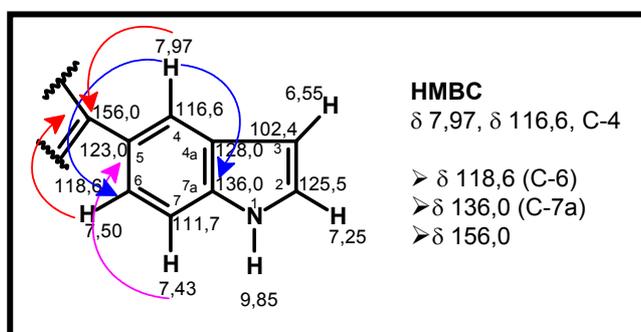


FIGURA 4.180. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,97 (H-4),  $\delta$  7,50 (H-6) e  $\delta$  7,43 (H-7).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.184 e 4.184a) mostrou três sinais em  $\delta$  8,04 (s,  $\delta$  146,3),  $\delta$  6,88 (s,  $\delta$  102,3) e  $\delta$  3,87 ( $\delta$  51,8). O sinal em  $\delta$  3,87 correlacionou com  $\delta$  165,0, esta correlação sugeriu a presença de um grupo carbometoxi, figura 4.181. O deslocamento em  $\delta$  8,04 (s) sugeriu uma ligação dupla trisubstituída conjugada com o grupo carbometoxi.

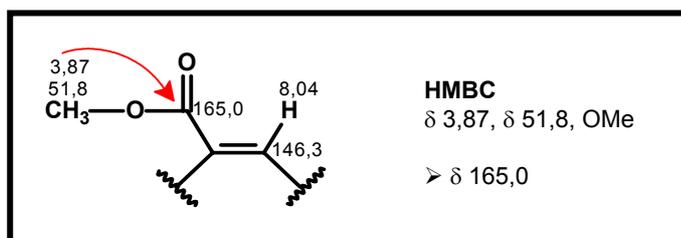


FIGURA 4.181. Correlação apresentada no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3,87.

O sinal singlete em  $\delta$  6,88 sugeriu a presença de mais uma ligação dupla trisubstituída. Levando-se em consideração os cinco carbonos quaternários que foram observados no experimento de HMBC (não observados no espectro de carbono) e ainda a experiência obtida com o bisindol, suspeitou-se da presença de uma unidade prenil ligada ao C-5 do sistema indol, a qual constituía um anel furano, o que explicaria a desproteção para os carbonos em  $\delta$  156,0 (C-2') e  $\delta$  146,3 (C-5'). Assim sendo, o hidrogênio em  $\delta$  8,04 (Figura 4.182) foi atribuído ao H-5' ( $\delta$  146,3), o mesmo correlacionou, via HMBC (Figura 4.182, Figura 4.188 e 4.188a), com  $\delta$  102,3, 121,0 (H-4') e  $\delta$  156,0 (C-2'). O sinal em  $\delta$  6,88 (s,  $\delta$  102,3) foi atribuído ao H-3', este correlacionou com  $\delta$  146,3 (C-5') e  $\delta$  156,0 (C-2'). Lembrando-se que tanto H-6 quanto H-4 correlacionaram com  $\delta$  156,0.

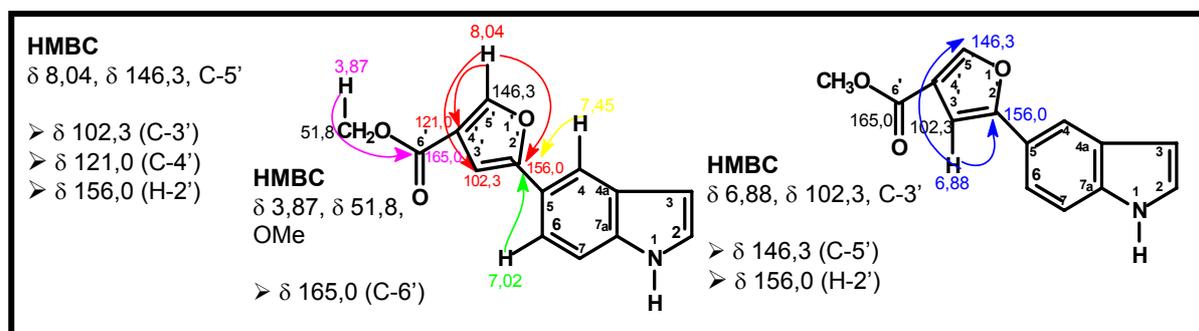


FIGURA 4.182. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  8,04 (H-5'),  $\delta$  6,88 (H-3') e  $\delta$  3,87 (OMe).

Com os dados obtidos no RMN uni e bidimensional e a comparação com os valores de deslocamentos encontrados na literatura para o anel indol (MAKANGARA *et al.*, 2004), foi proposta para substância RD-122 a estrutura mostrada na figura 4.183, a qual foi chamada de **5-[(4'-carbometoxi)-furano-2'-il]-indol**. De acordo com o levantamento realizado no *Chemical Abstract* esta substância é inédita.

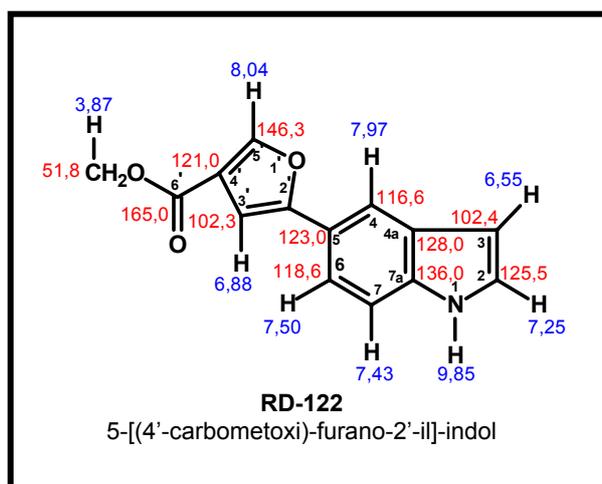


FIGURA 4.183. Estrutura proposta para a substância RD-122.

TABELA 4.13. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-122 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C	RD-122	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	9,85 sl	-
2	7,25 dd ( $J = 1,2$ e $2,0$ Hz)	125,5
3	6,55 (tl, $J = 2,0$ Hz)	102,4
4	7,97 (sl)	116,6
4a	-	128,0
5	-	123,0
6	7,50 (dd, $J = 8,5$ e $1,6$ Hz)	118,6
7	7,43 (d, $J = 8,5$ Hz)	111,7
7a	-	136,0
1'	-	-
2'	-	156,0
3'	6,88 s	102,3
4'	-	121,0
5'	8,04 s	146,3
6'	-	165,0
7'	3,87 s	51,8

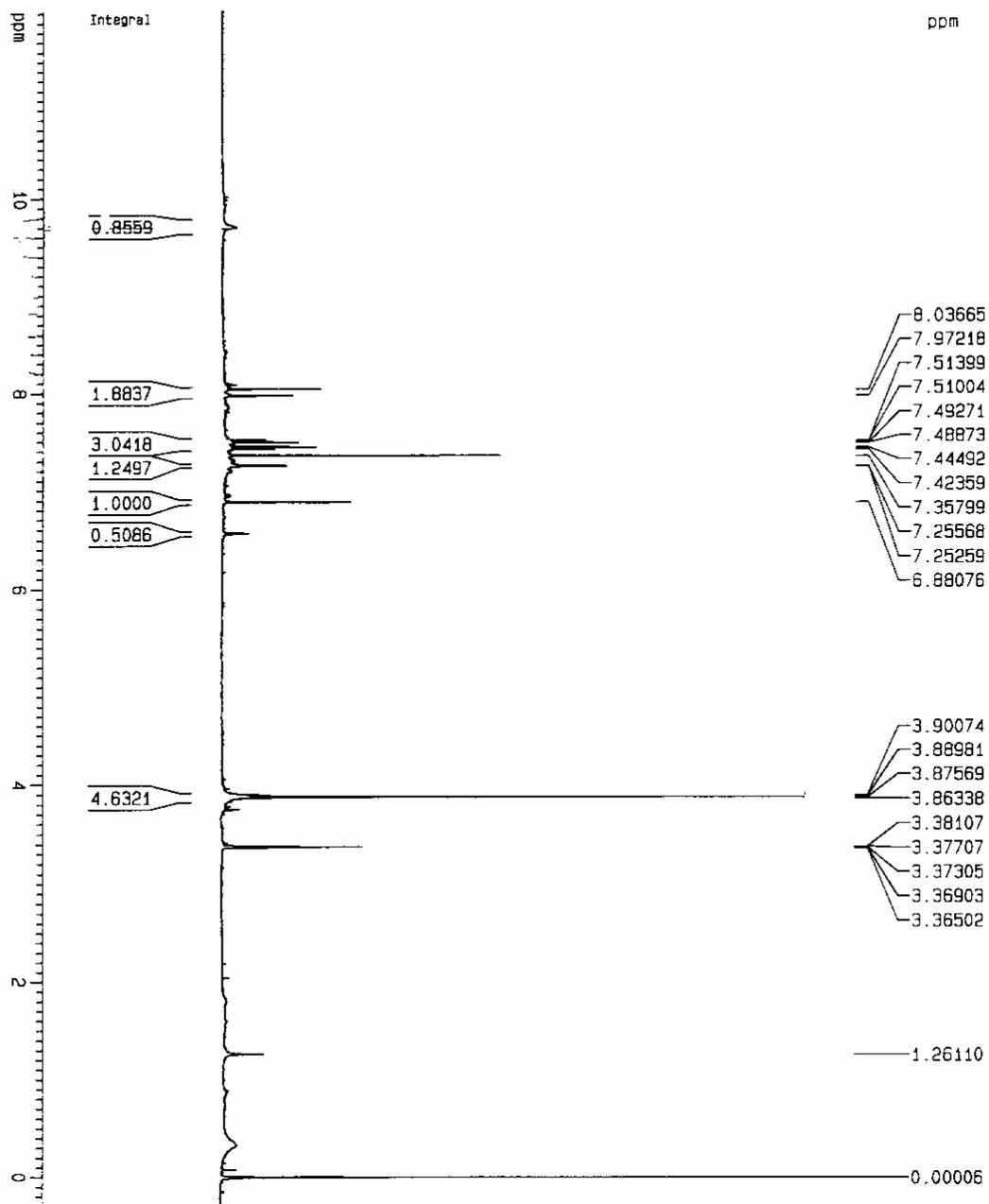


FIGURA 4.184. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância RD-122 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

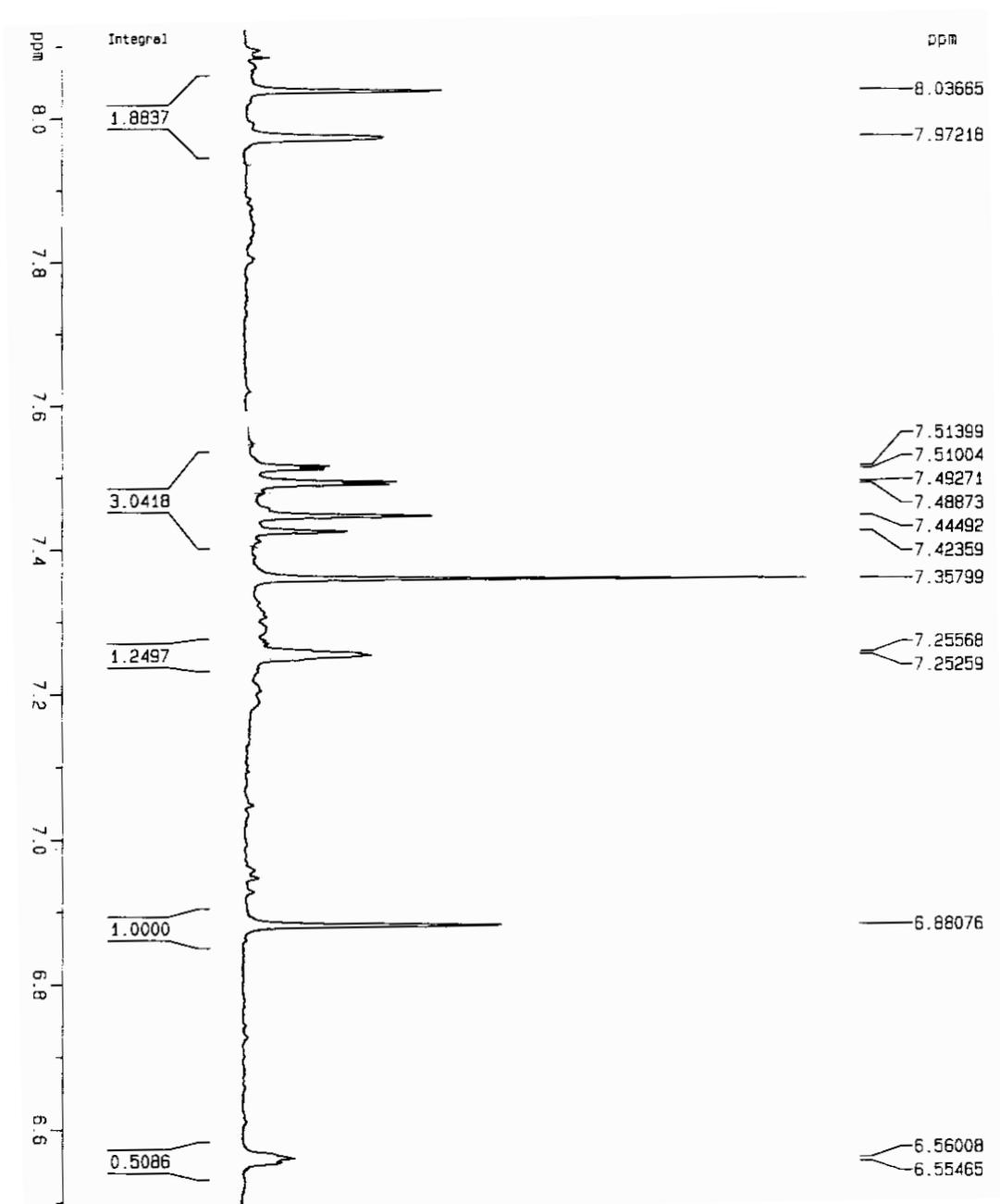


FIGURA 4.184a Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ampliado da substância RD-122 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

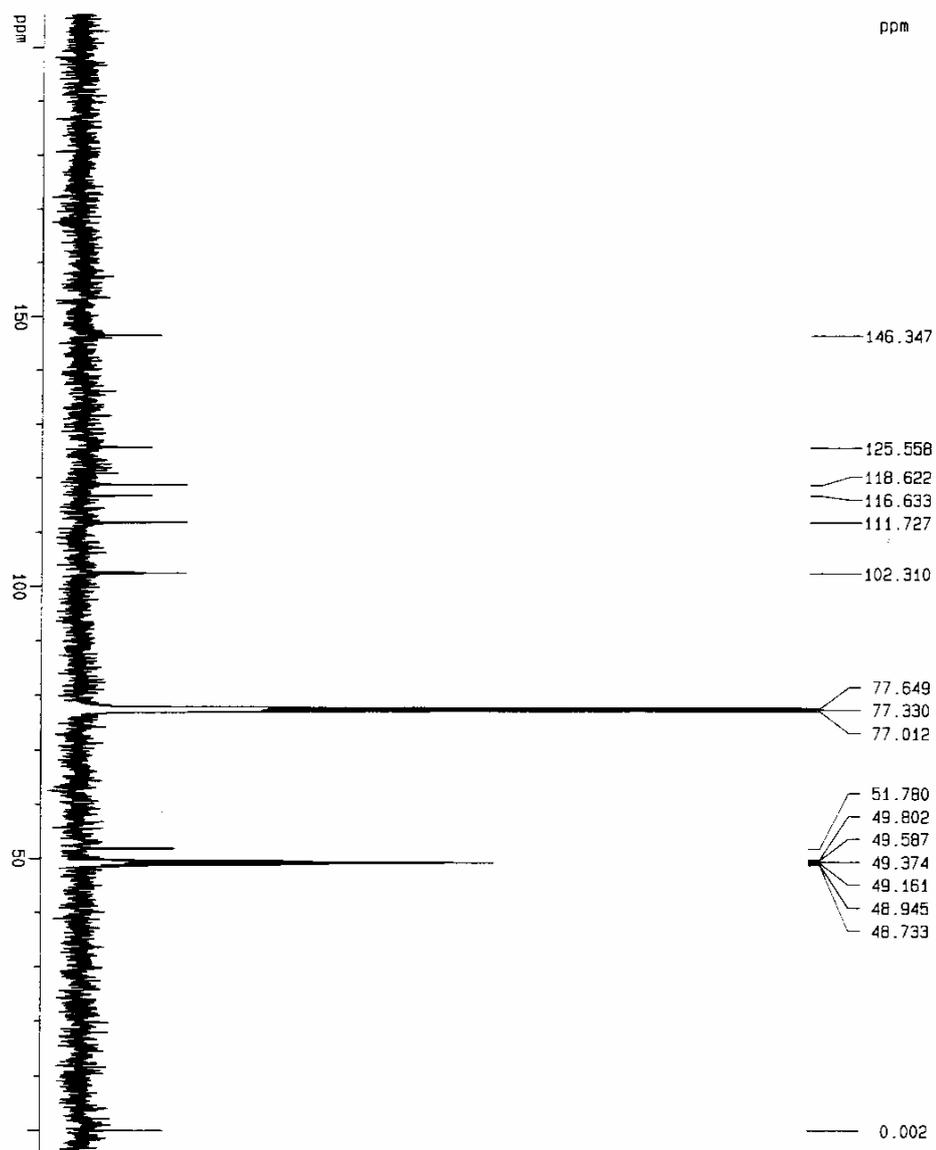


FIGURA 4.185. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância RD-122 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

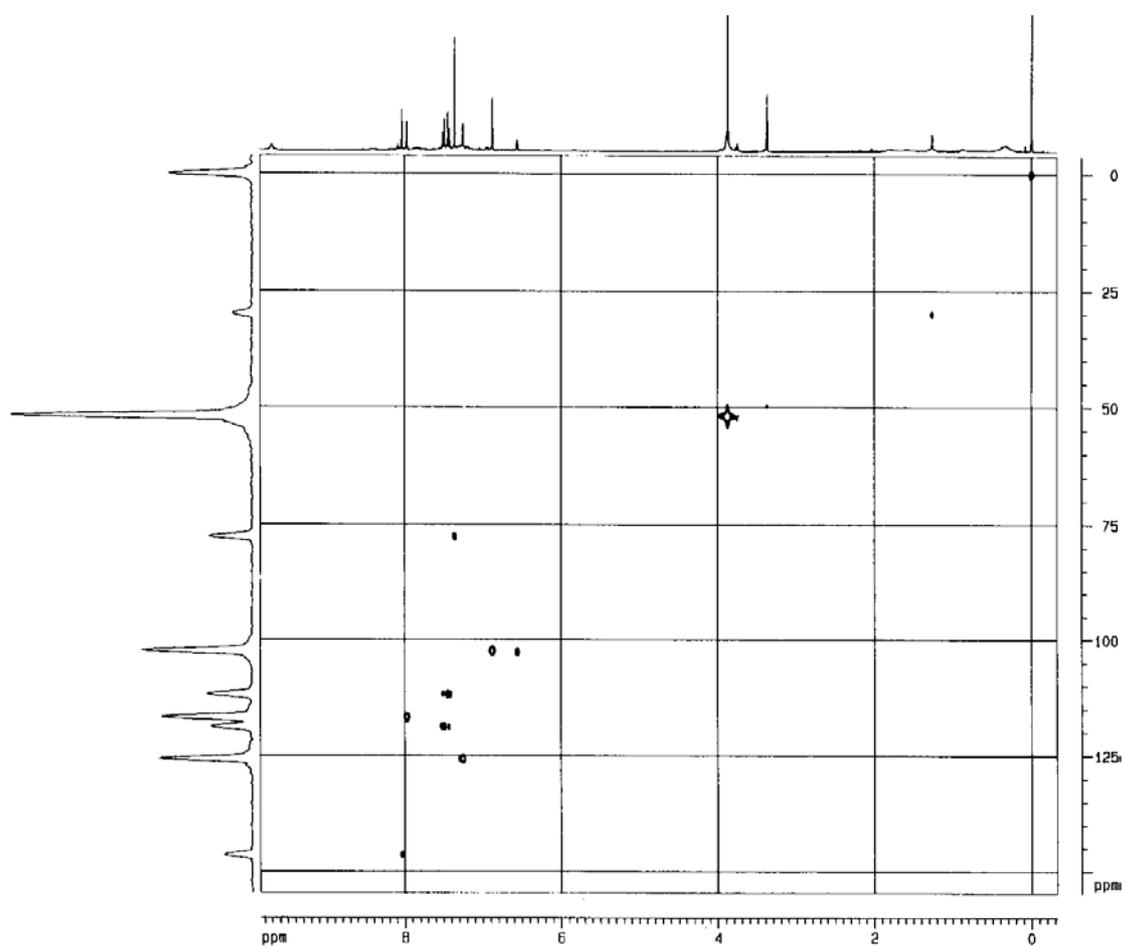


FIGURA 4.186. Experimento de HSQC da substância RD-122 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

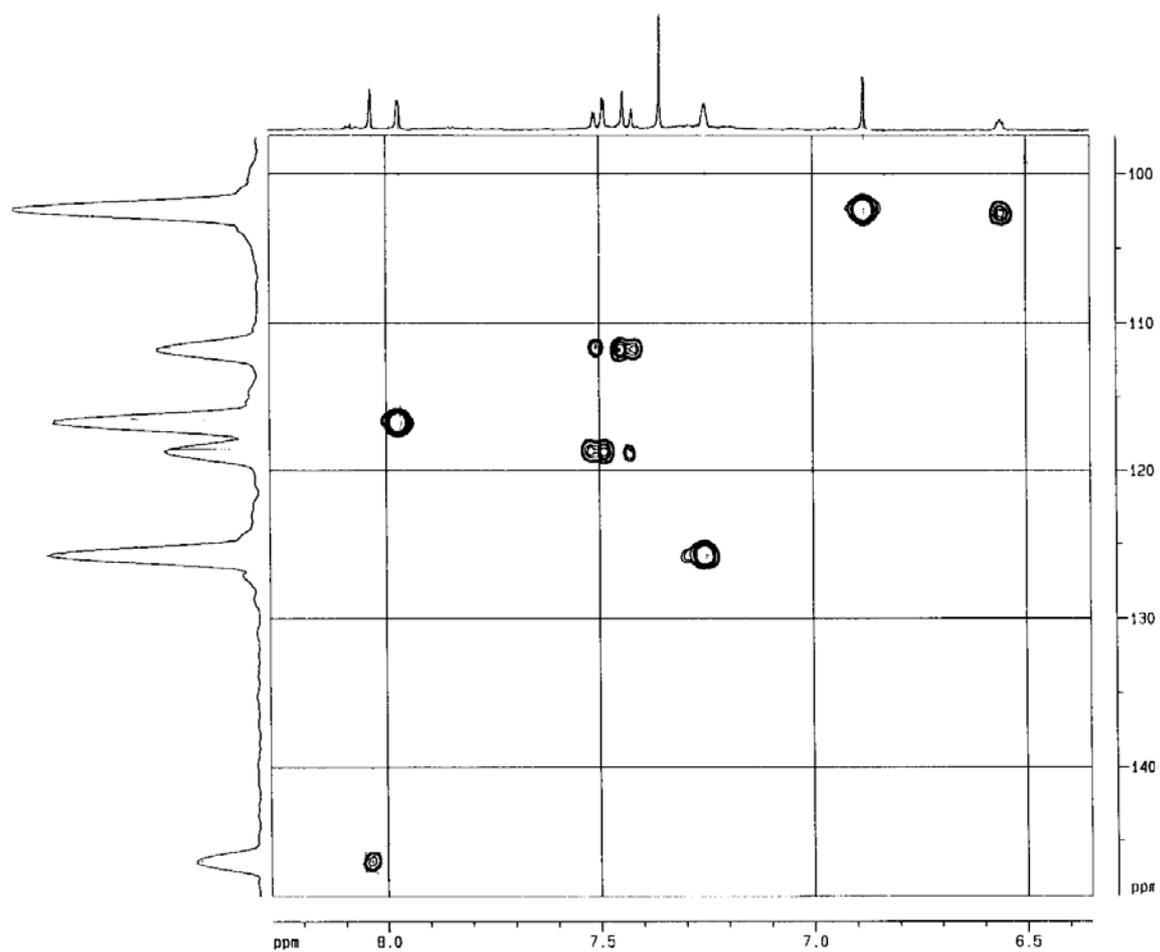


FIGURA 4.186a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-122 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

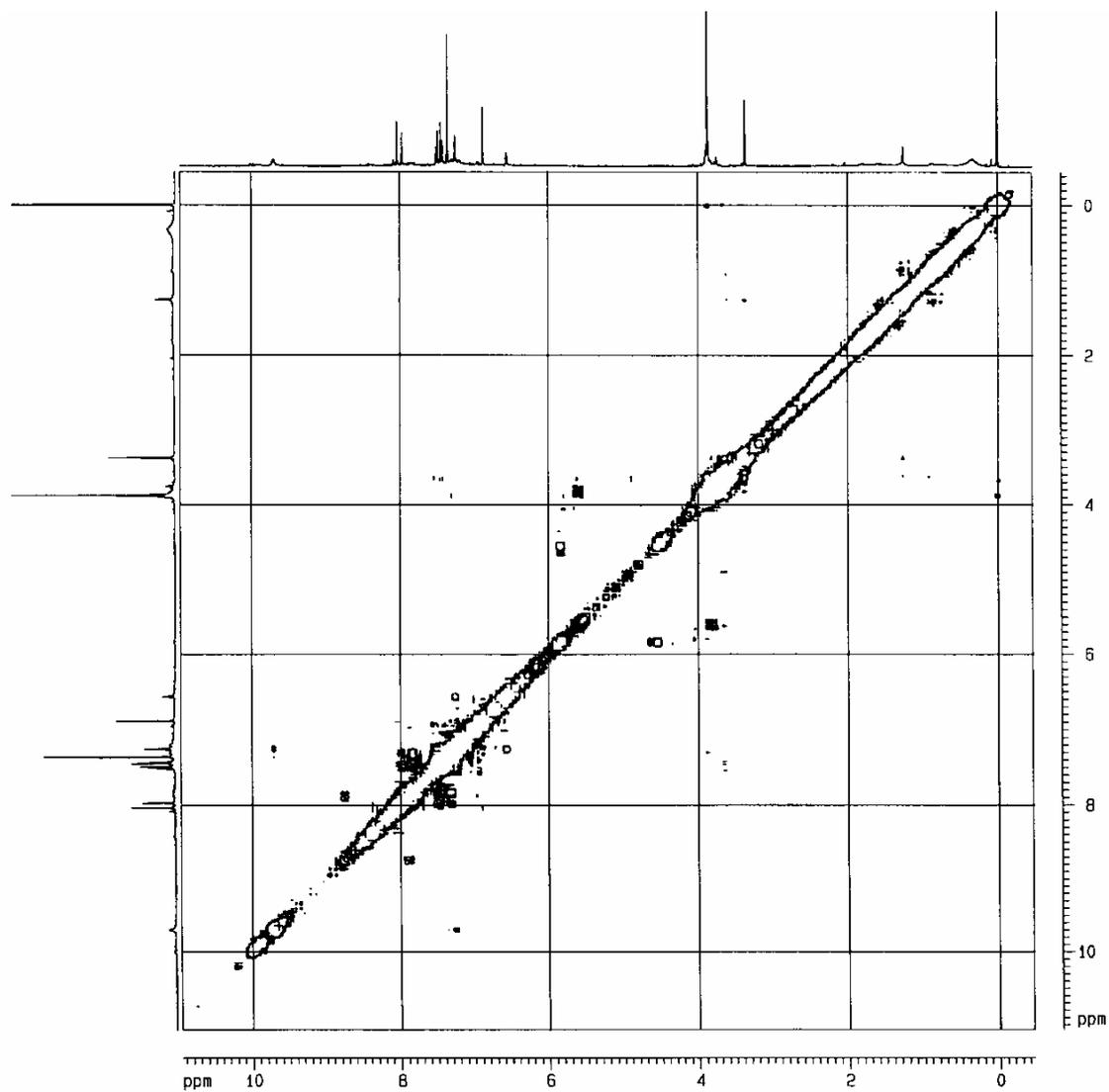


FIGURA 4.187. Experimento de COSY da substância RD-122 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

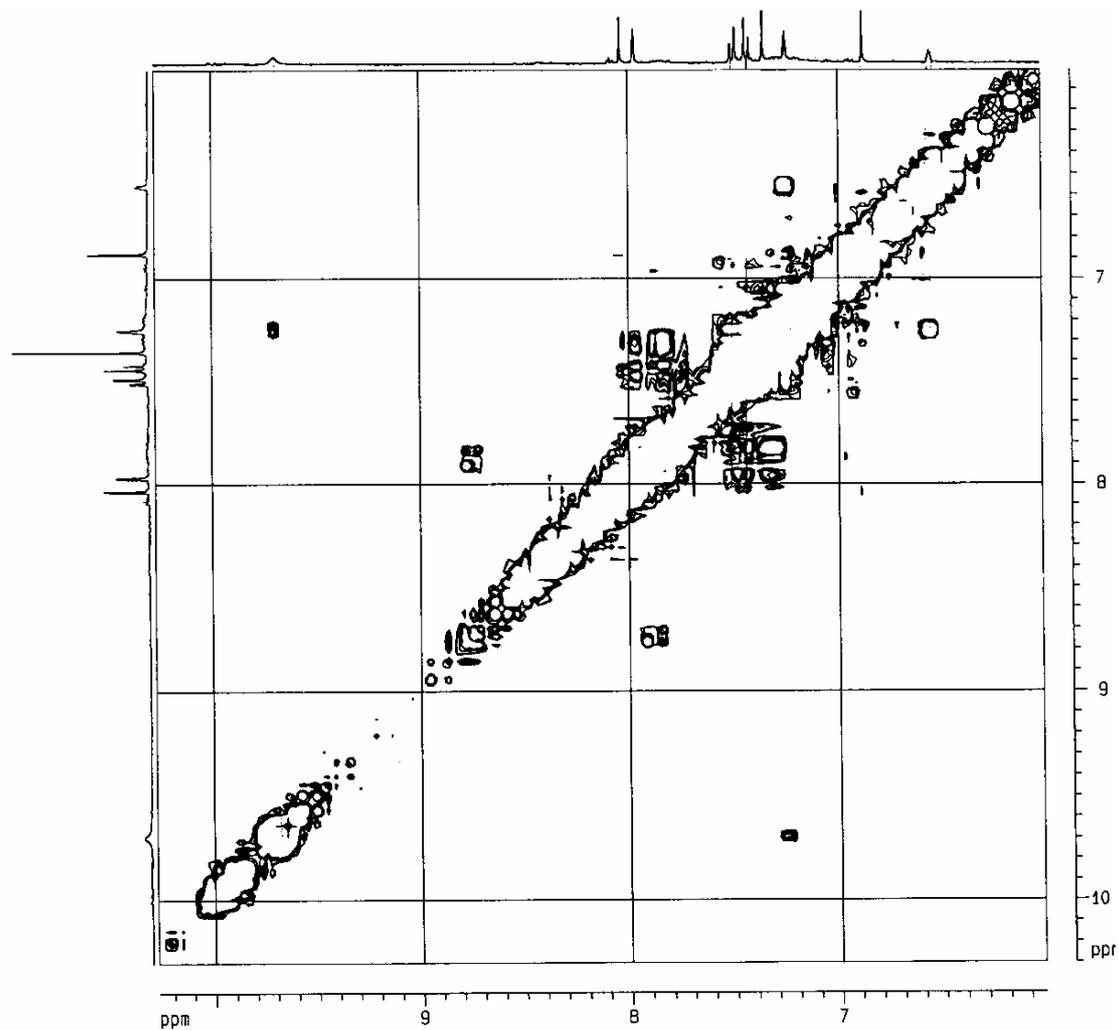


FIGURA 4.187a. Experimento de COSY ampliado da substância RD-122 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

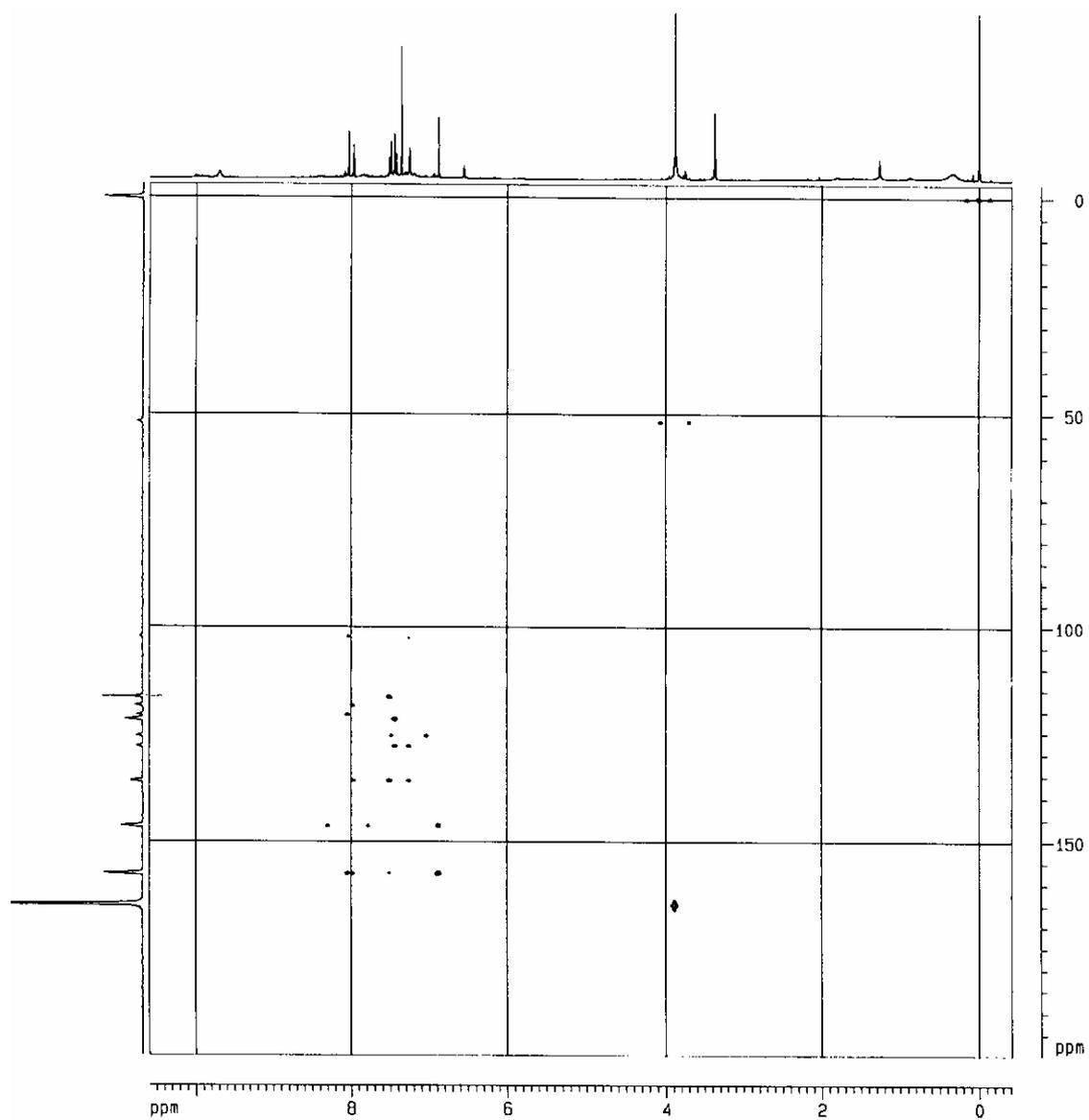


FIGURA 4.188. Experimento de HMBC da substância RD-122 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

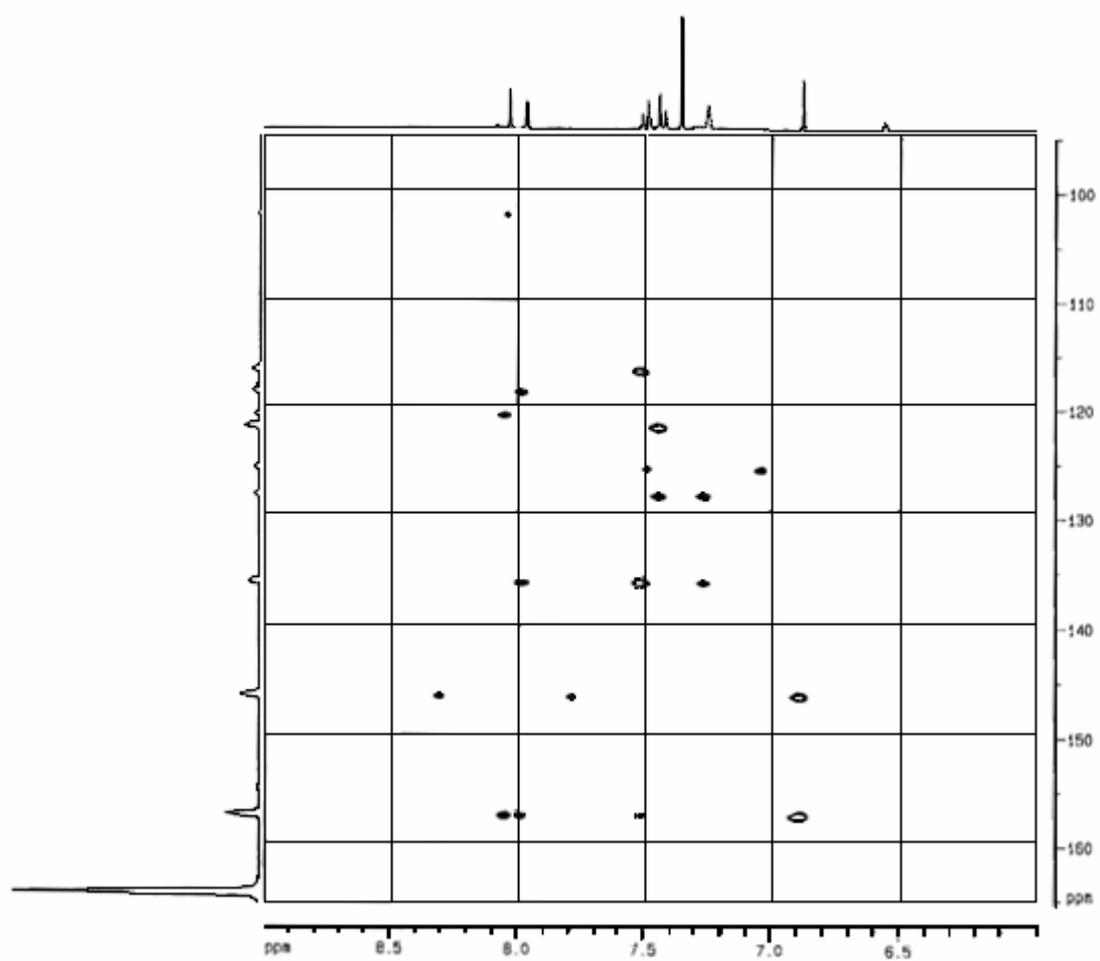


FIGURA 4.188a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-122 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.16. Identificação da substância RD-350

O Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.204, Tabela 4.14) revelou sinais em  $\delta$  7,39 s e  $\delta$  7,38 s referentes aos sinais de H-21 e H-23 de um anel furano, respectivamente. O experimento de HSQC (Figura 4.205) mostrou que o sinal em  $\delta$  7,39 apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  142,1 e  $\delta$  7,38 em  $\delta$  144,1. Pelo experimento de HMBC (Figura 4.206) foram observadas as correlações de  $\delta$  7,39 com  $\delta$  110,3,  $\delta$  121,0 e  $\delta$  144,1 (C-23); e de  $\delta$  7,38 com  $\delta$  110,3,  $\delta$  121,0 e  $\delta$  142,1 (C-21); ainda, via HMBC, foi observado que ambos os sinais ( $\delta$  7,39 e  $\delta$  7,38) correlacionam com um carbono (Figura 4.207) em  $\delta$  110,3, este via HSQC apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  6,29 t ( $J= 1,3$  Hz), logo, este sinal em  $\delta$  6,29 só poderia ser o H-22. Os sinais de H-21 e H-23 também correlacionaram com outro sinal em  $\delta$  121,0 (carbono quaternário), que foi atribuído ao C-20. Todas as atribuições discutidas até o momento são mostradas na figura 4.189.

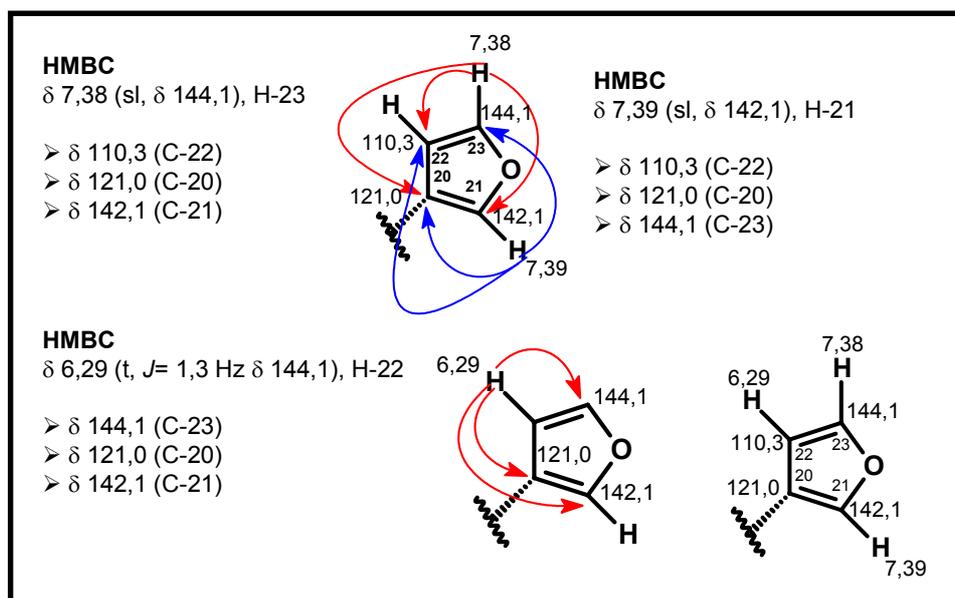


FIGURA 4.189. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  7,39 (H-21),  $\delta$  7,38 (H-23) e  $\delta$  6,29 (H-22).

No experimento de COSY (Figura 4.208), foi verificado que o sinal em  $\delta$  7,39 (H-21) acoplou com os sinais em  $\delta$  6,29 (H-22) e  $\delta$  5,68 s. Este último, via HSQC (Figura 4.205), apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  78,7 e via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a) foi observado as correlações de  $\delta$  5,68 com  $\delta$  110,3 (C-22),  $\delta$  121,0

(C-20),  $\delta$  142,1 (C-21),  $\delta$  70,7,  $\delta$  40,2 e  $\delta$  19,1. O sinal em  $\delta$  5,68 foi atribuído ao H-17, conforme mostrado na figura 4.190.

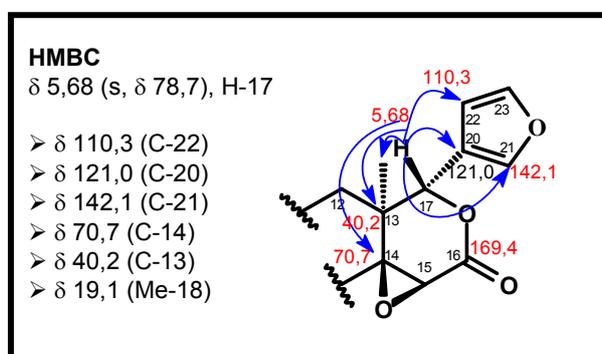


FIGURA 4.190. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  5,68 (H-17).

O sinal em  $\delta$  19,1 ( $\delta$  1,06 s) foi atribuído a Me-18 devido à correlação com H-17. Pelo experimento de HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), observaram-se as seguintes correlações: o sinal em  $\delta$  1,06 com  $\delta$  70,7,  $\delta$  78,7 (C-17),  $\delta$  40,2 (C-13) e  $\delta$  32,4 (C-12).

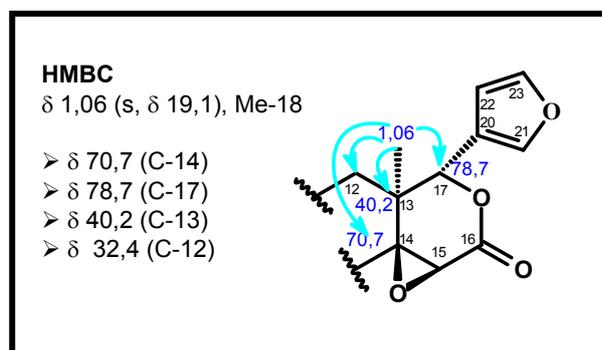


FIGURA 4.191. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,06 (Me-18).

Ambos os sinais em  $\delta$  5,68 (H-17) e  $\delta$  1,06 (Me-18) apresentaram correlação com um carbono em  $\delta$  70,7 (q) que só poderia ser o C-14, como este era um carbinólico, foi proposto um epóxido em C-14 e C-15. Isto foi confirmado por um sinal em  $\delta$  4,10 (s,  $\delta$  60,6), que foi atribuído ao H-15, e de acordo com o HMBC (Figura 4.206 e 4.206a) apresentou correlação com  $\delta$  70,7 e  $\delta$  169,4, este último

sugeriu a presença de uma lactona no anel D, que foi atribuída ao C-16, conforme mostrado na figura 4.192.

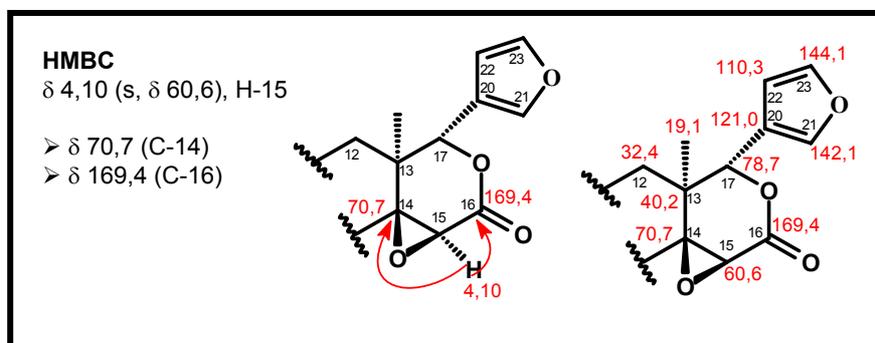


FIGURA 4.192. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4,10 (H-15).

O carbono em  $\delta$  32,4 foi atribuído ao C-12 e via HSQC (Figura 4.205 e 4.205a) apresentou acoplamento com os hidrogênios em  $\delta$  1,91 m e  $\delta$  1,81 m. No experimento de HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), foi verificada a correlação de H-12 (Figura 4.193) com  $\delta$  19,1 (Me-18),  $\delta$  40,2 (C-13),  $\delta$  47,2,  $\delta$  70,7 (C-14) e  $\delta$  75,2.

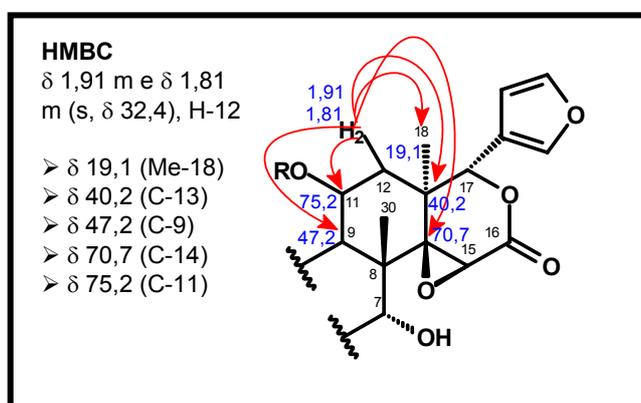


FIGURA 4.193. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,91 e  $\delta$  1,81 (H-12).

O carbono carbinólico em  $\delta$  75,2, via HSQC (Figura 4.205 e 4.205a), apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  4,54 m. Verificou-se no HMBC (Figura 4.206 e 4.206a) a correlação deste com 42,9 (C-8). No experimento de COSY (Figura 4.208 e 4.208a), observou-se o acoplamento de  $\delta$  4,54 (Figura 4.194) com H-12 ( $\delta$  1,91 e  $\delta$  1,81), logo, o sinal em  $\delta$  4,54 foi atribuído ao C-11. No COSY, observou-se H-11 ( $\delta$  4,54) acoplado com  $\delta$  2,92 (d,  $J$  = 4,6 Hz), este sinal via HSQC apareceu ligado

ao carbono em  $\delta$  47,2, este foi atribuído ao C-9. No HMBC, o sinal em  $\delta$  2,92 (H-9) apresentou correlação com  $\delta$  104,9,  $\delta$  79,4,  $\delta$  70,7 (C-14),  $\delta$  52,4 (C-10),  $\delta$  42,9 (C-8) e  $\delta$  22,9, conforme figura 4.194.

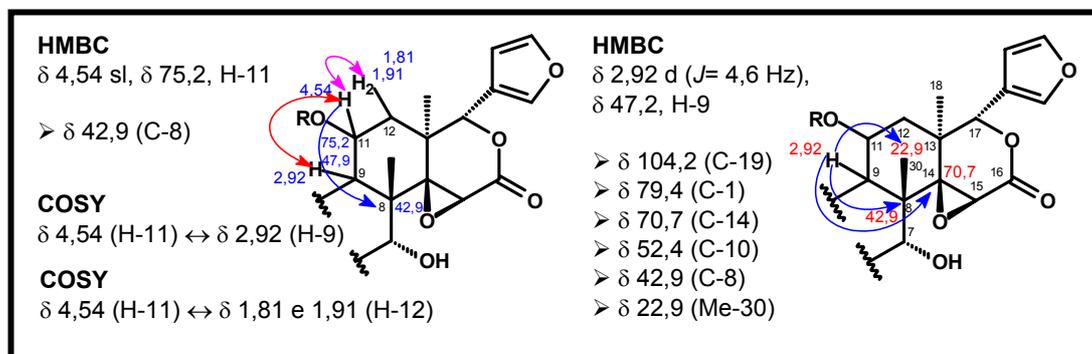


FIGURA 4.194. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,54 (H-11) e  $\delta$  2,92 (H-9).

O sinal em  $\delta$  22,9, via HSQC (Figura 4.205 e 4.205a), apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  1,28, este foi atribuído a Me-30 que, via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), apresentou correlação com  $\delta$  70,7 (C-14),  $\delta$  68,4,  $\delta$  47,2 (C-9),  $\delta$  42,9. As correlações de  $\delta$  1,28 com os sinais em  $\delta$  47,2 (C-9) e  $\delta$  70,7 (C-14) ratificaram que esta era a Me-30. Estas correlações podem ser vistas na figura 4.195.

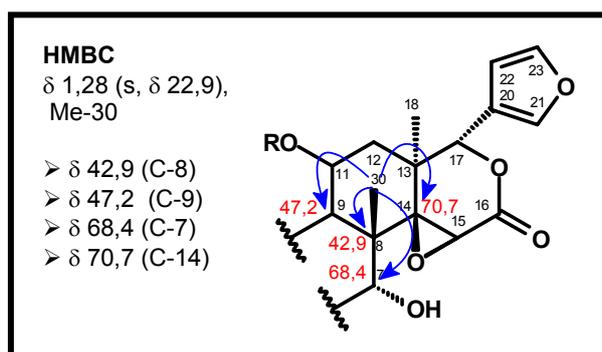


FIGURA 4.195. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,28 (Me-30).

O carbono em  $\delta$  68,4 correlacionou, via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), com  $\delta$  1,28 (Me-30), e como é de conhecimento, pela rota biossintética, todo limonóide é oxigenado em C-7, logo, o carbono em  $\delta$  68,4 foi atribuído ao C-7. No experimento de HSQC (Figura 4.205 e 4.205a), o C-7 apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  3,52 m, este deslocamento sugeriu hidroxila nesta posição (Figura

4.196). No HMBC, não foi observado correlação para H-7, porém, via COSY (Figura 4.208 e 4.208a), foram observados acoplamentos com  $\delta$  1,81 (m) e 1,54 dt ( $J = 4,0$  e 8,0 Hz) e via HSQC (Figura 4.205 e 4.205a), estes últimos sinais de hidrogênios apareceram ligados ao carbono em  $\delta$  27,3, que foi atribuído ao C-6. Os hidrogênios de H-6, via COSY (Figura 4.208 e 4.208a), acoplaram com um sinal em  $\delta$  2,85 dd ( $J = 3,7$  e 14,5 Hz,  $\delta$  48,6), este último ( $\delta$  2,85) foi atribuído ao H-5. O sinal de H-6 ( $\delta$  1,81 e  $\delta$  1,54), via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), correlacionou com  $\delta$  42,9 (C-8),  $\delta$  48,6 (C-5),  $\delta$  52,4 (C-10) e  $\delta$  68,4 (C-7) e o sinal de H-5 correlacionou com  $\delta$  104,2,  $\delta$  79,4, e 52,4 (C-10). Sendo assim, até o momento, conseguiu-se fechar o anel B. As correlações e atribuições podem ser vista na figura 4.196.

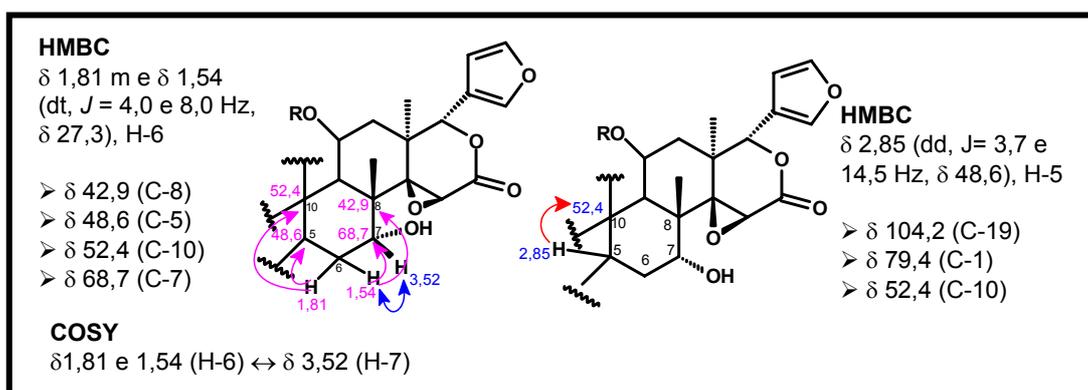


FIGURA 4.196. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,81 e 1,54 (H-6) e  $\delta$  2,85 (H-5).

Os hidrogênios H-5 e H-9, via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a), apresentaram correlação com um carbono em  $\delta$  79,4, este correspondeu ao sinal em  $\delta$  4,02 sl via HSQC (Figura 4.205 e 4.205a), e pelo valor do deslocamento, sugeriu-se a presença de uma hidroxila, o sinal do carbono em  $\delta$  79,4 foi atribuído ao C-1. O sinal em  $\delta$  4,02 sl, via COSY (Figura 4.208 e 4.208a), acoplou com dois sinais em  $\delta$  2,81 dd ( $J = 3,5$  Hz e 17,1 Hz) e  $\delta$  2,66 dd ( $J = 1,6$  e 15,5 Hz), estes foram atribuídos ao H-2 que via HSQC apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  36,6. No experimento de HMBC, os hidrogênios H-1 e H-2 apresentaram correlação com uma lactona em  $\delta$  170,6 que foi atribuída ao C-3, conforme mostrado na figura 4.197.

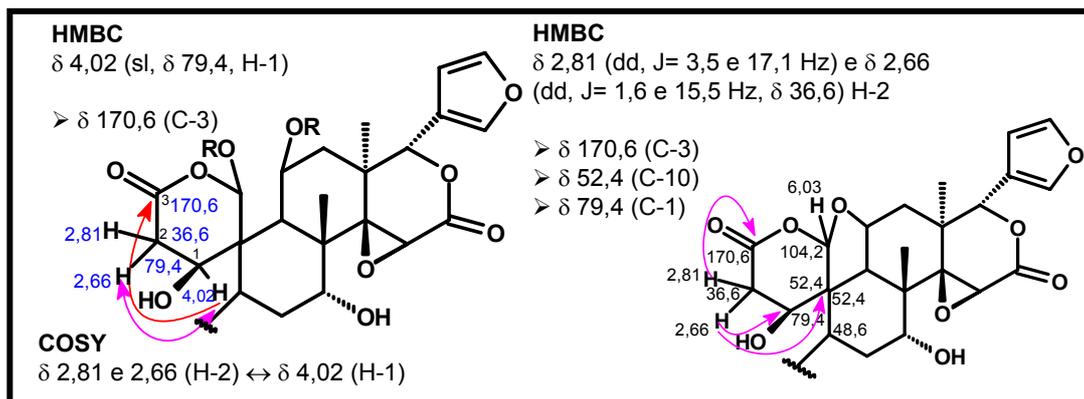


FIGURA 4.197. Acoplamentos e correlações apresentadas nos experimentos de COSY e HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,02 (H-1),  $\delta$  2,81 e  $\delta$  2,66 (H-2).

O H-5 e o H-9 também apresentaram correlação em comum com o carbono em  $\delta$  104,2, este sinal apareceu ligado ao hidrogênio em  $\delta$  6,03 que foi atribuído ao H-19, esta atribuição explicaria a correlação de H-19 com a lactona em  $\delta$  170,6 (C-3) e com o carbono carbinólico em 79,4 (C-1). O H-19 apresentou ainda correlações com  $\delta$  47,2 (C-9),  $\delta$  52,4 (C-10) e  $\delta$  75,3 (C-11). O único modo de H-19 ter mostrado correlação com C-11, seria no caso do fechamento do anel entre C-19 e C-11. Com base em toda a discussão das correlações, chegou-se a estrutura parcial de RD-350, conforme mostrada na figura 4.198.

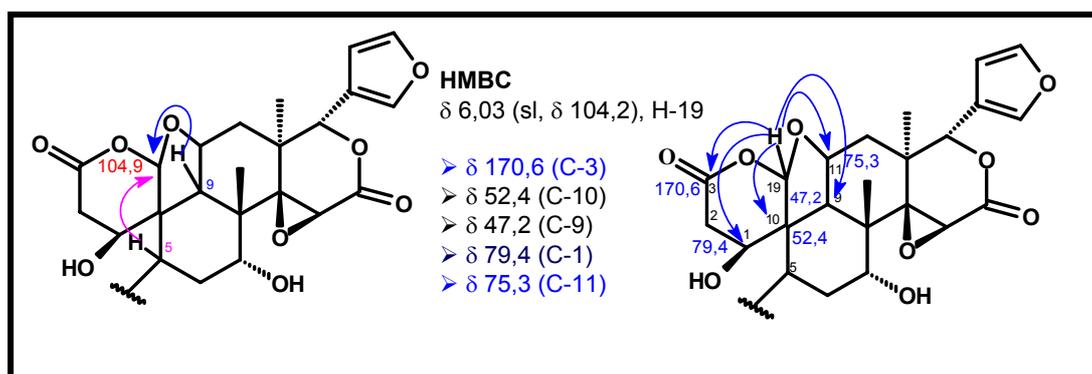


FIGURA 4.198. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para o sinal de hidrogênio em  $\delta$  6,03 (H-19).

O sinal de hidrogênio em  $\delta$  1,20 s apareceu ligado ao carbono em  $\delta$  28,4 e o sinal em  $\delta$  0,99 s ao carbono em  $\delta$  22,9, ambos correlacionaram via HMBC (Figura 4.206 e 4.206a) com  $\delta$  48,6 (C-5), portanto, eles só poderiam ser atribuídos as Me-29 e Me-28. O sinal em  $\delta$  0,99 ( $\delta$  22,9, Me-28) correlacionou com os sinais em  $\delta$  28,4 (Me-29) e  $\delta$  80,6. O sinal em  $\delta$  1,20 s correlacionou com  $\delta$  22,9 (Me-28) e

com um sinal em  $\delta$  80,6, este último foi atribuído ao C-4. Todas as correlações discutidas são apresentadas na figura 4.199.

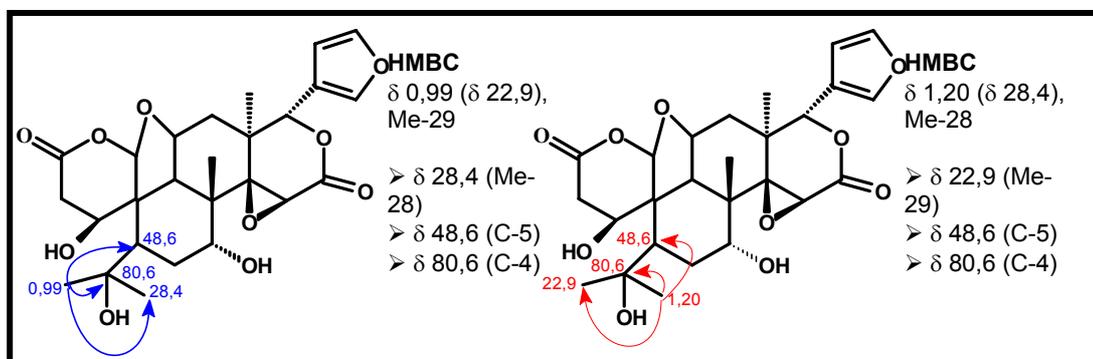


FIGURA 4.199. Correlações apresentadas no experimento de HMBC para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1,20 (Me-28) e  $\delta$  0,99 (Me-29).

Com os dados obtidos no RMN uni e bidimensional para RD-350 e a comparação desses resultados com os encontrados para RD-11, foi proposta a substância mostrada na figura 4.200.

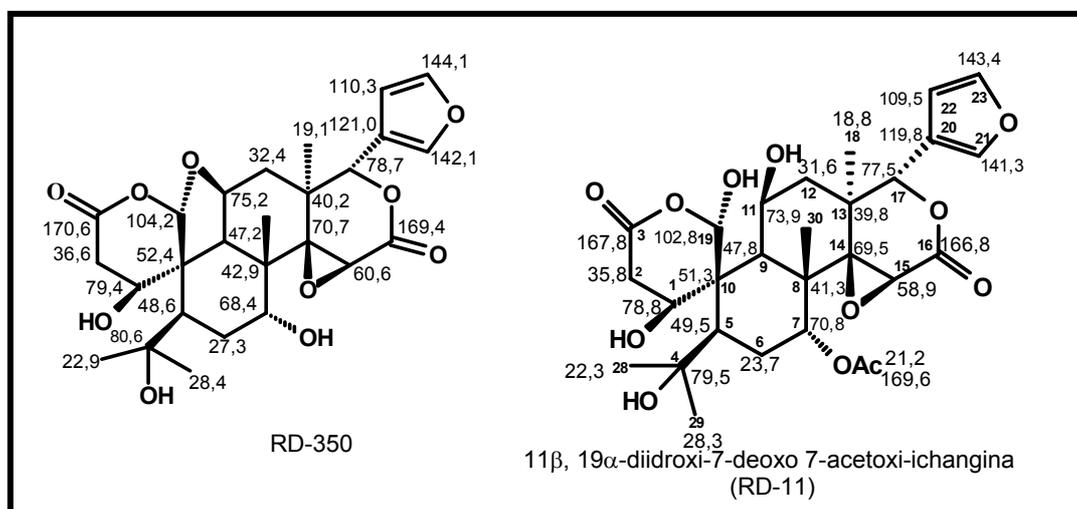


FIGURA 4.200. Estrutura proposta para a substância RD-350 e comparação dos seus valores de deslocamento de carbono com os de RD-11.

Para confirmação da estereoquímica da substância RD-350 foi realizado os experimentos de gNOESY (Figura 4.209), mostrados nas figuras 4.201 e 4.202. O hidrogênio em  $\delta$  4,54 (H-11), ao ser irradiado, causou nOe em  $\delta$  2,92 (H-9),  $\delta$  2,66 (H-2),  $\delta$  1,81 (H-12) e  $\delta$  1,06 (Me-18); a estereoquímica da Me-18 pela biosíntese é  $\alpha$ , por conseqüência, H-11 e H-9 também estão em  $\alpha$ , conforme

mostrado na figura 4.201. O H-9, ao ser irradiado, causou nOe em  $\delta$  1,06 (Me-18), confirmando estereoquímica em  $\alpha$ .

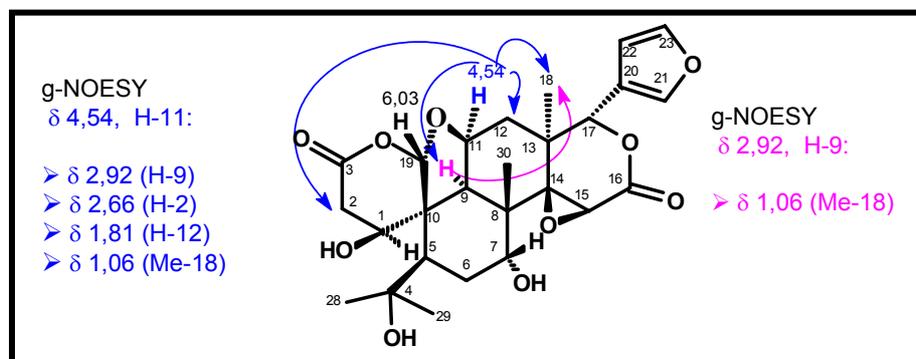


FIGURA 4.201. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,54 (H-11) e  $\delta$  2,92 (H-9).

Conforme observado no experimento de gNOESY (FIGURA 4.209), o sinal em  $\delta$  6,03 (H-19) causou nOe em  $\delta$  1,28 (Me-30) e  $\delta$  1,99 (Me-28). Sabe-se que pela biosíntese dos limonóides, a Me-30 estará sempre em posição  $\beta$ , portanto, o nOe observado de H-19 com a Me-30 sugeriu que tanto  $\delta$  1,28 quanto  $\delta$  6,03 estavam no mesmo plano, por conseqüência, o anel espiro precisava estar em  $\beta$  entre H-10 e H-19. A Me-28 causou nOe em H-19, isto sugeriu que C-4 também encontrava-se em  $\beta$ , conforme visto na figura 4.202.

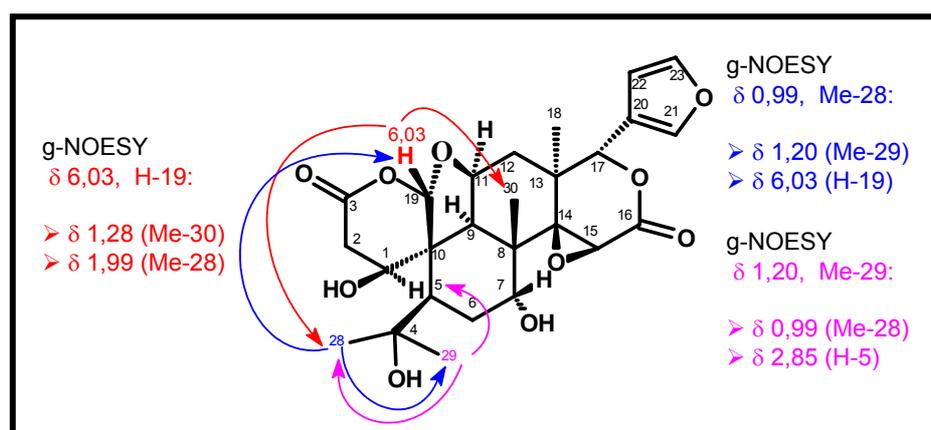


FIGURA 4.202. Irradiações apresentadas nos experimentos de gNOESY para os sinais de hidrogênios em  $\delta$  6,03 (H-19),  $\delta$  1,20 (Me-29) e  $\delta$  0,99 (Me-28).

Com base nas discussões de todos os experimentos de gNOESY foi proposta para a substância RD-350, a estereoquímica mostrada na figura 4.203, e

a estereoquímica dos seus centros não discutidos foi baseada na biosíntese dos limonóides.

Segundo o levantamento realizado no *Chemical Abstract*, não há registro da RD-350, logo, esta substância é **inédita**, sendo denominada de **11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -óxido-7-deacetoxi-7-hidroxi-ichangina**.

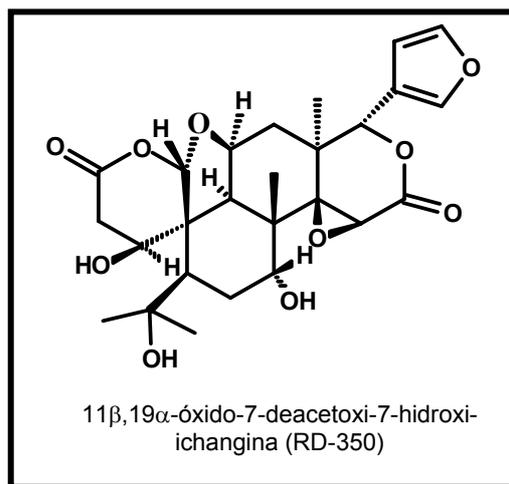


FIGURA 4.203. Estereoquímica proposta para a substância RD-350.

TABELA 4.14. Dados dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância RD-350 ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\delta$ , 400 MHz)

H/C	RD-350	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4,02 sl	79,4
2	2,81 dd ( $J= 3,5$ e $17,1$ Hz) e 2,66 dd ( $J= 1,6$ e $15,5$ )	36,6
3		170,6
4		80,6
5	2,85 dd ( $J= 3,7$ e $14,5$ Hz)	48,6
6	1,81 m e 1,54 dt ( $J= 4,0$ e $8,0$ Hz)	27,3
7	3,52 m	68,7
8		42,9
9	2,92 d ( $J= 4,6$ Hz)	47,2
10		52,4
11	4,54 m	75,3
12	1,91 m e 1,81 m	32,4
13		40,2
14		70,7
15	4,10 s	60,6
16		169,4
17	5,68 s	78,7
18	1,06 s	19,1
19	6,03 sl	104,2
20		121,0
21	7,39 sl	142,1
22	6,29 t ( $J=$	110,3
23	7,38 sl	144,1
28	0,99 s	22,9
29	1,20 s	28,4
30	1,28 s	22,9

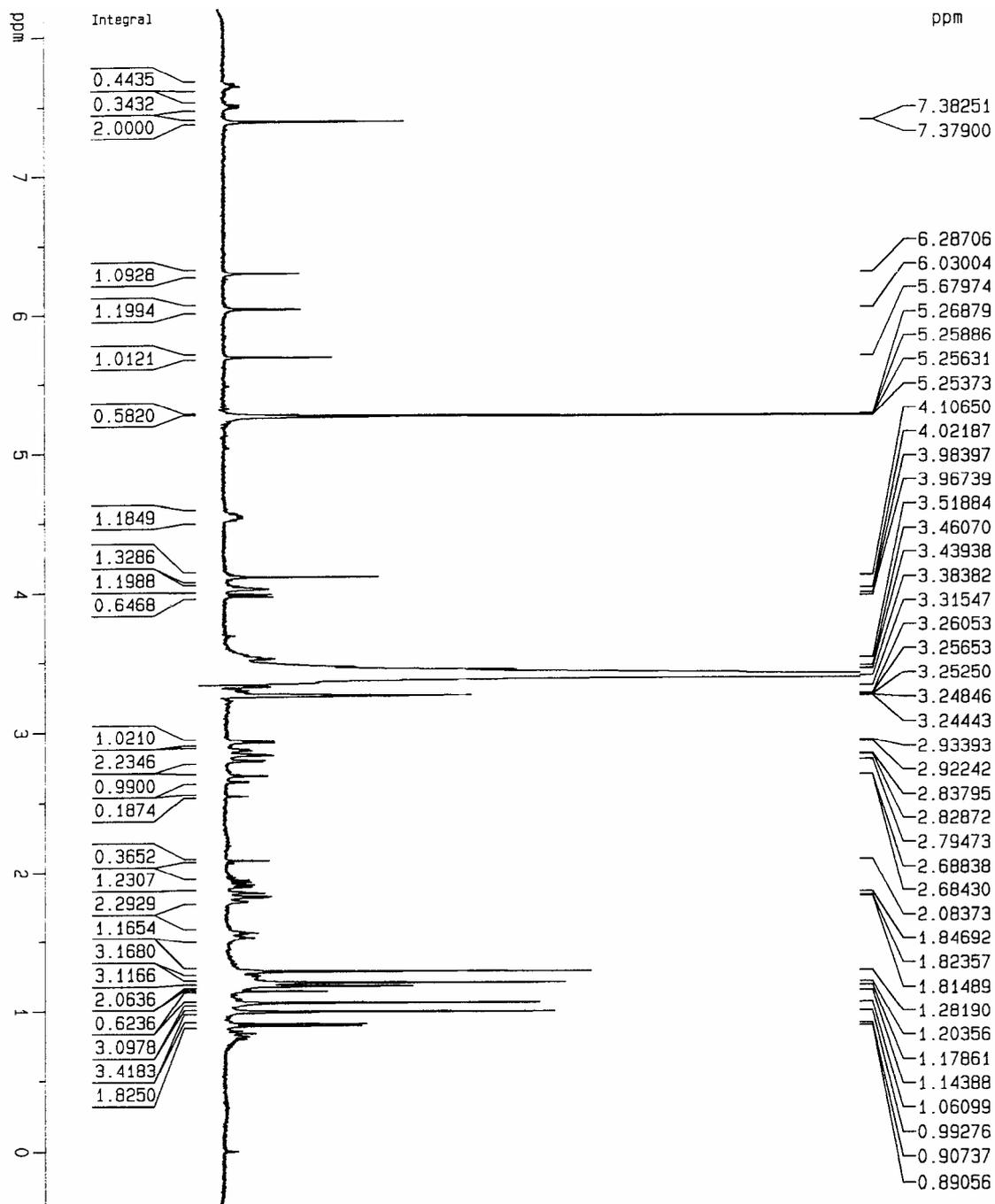


FIGURA 4.204. Espectro de hidrogênio da substância RD-350 (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

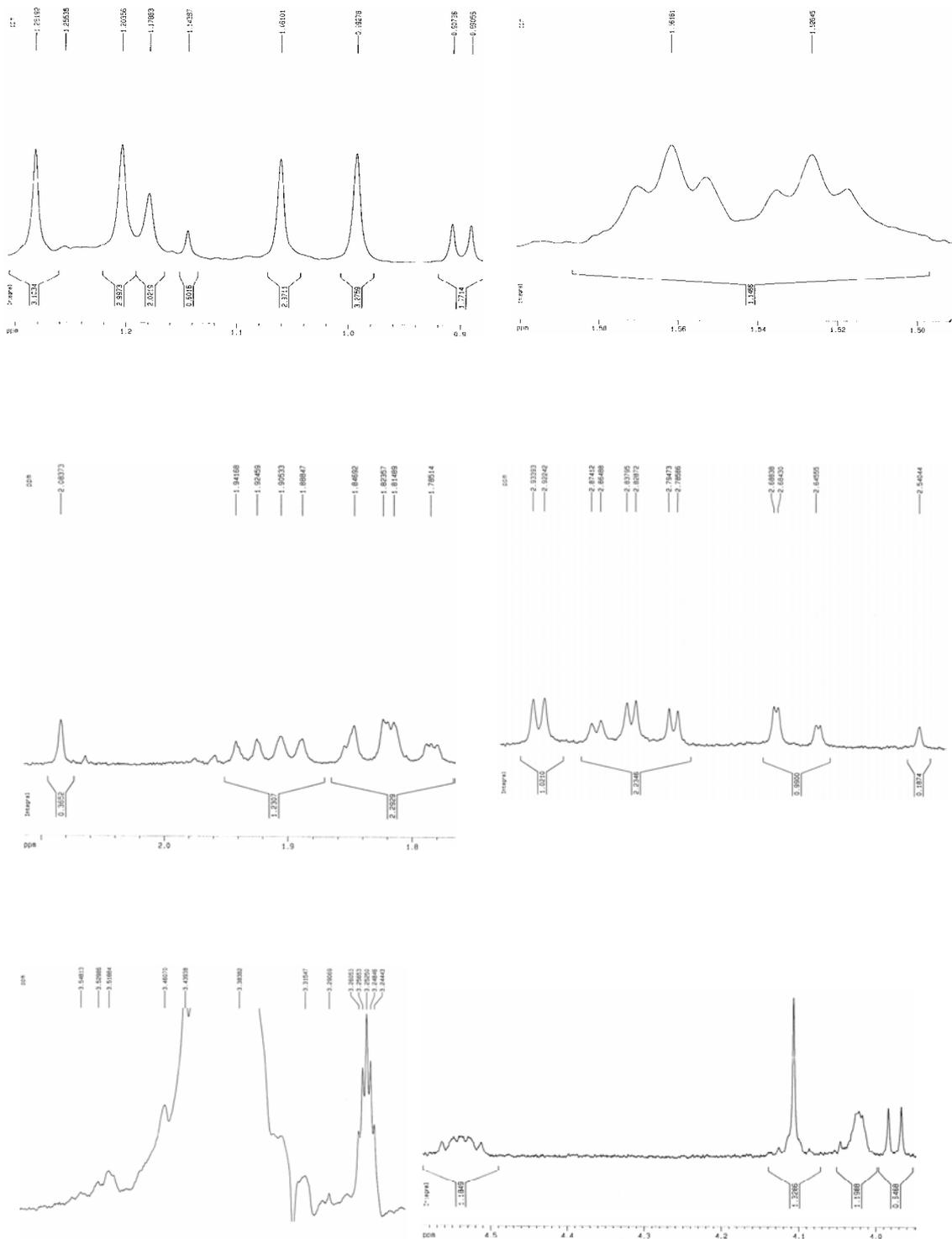


FIGURA 4.204a. Espectro de hidrogênio ampliado da substância RD-350 (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

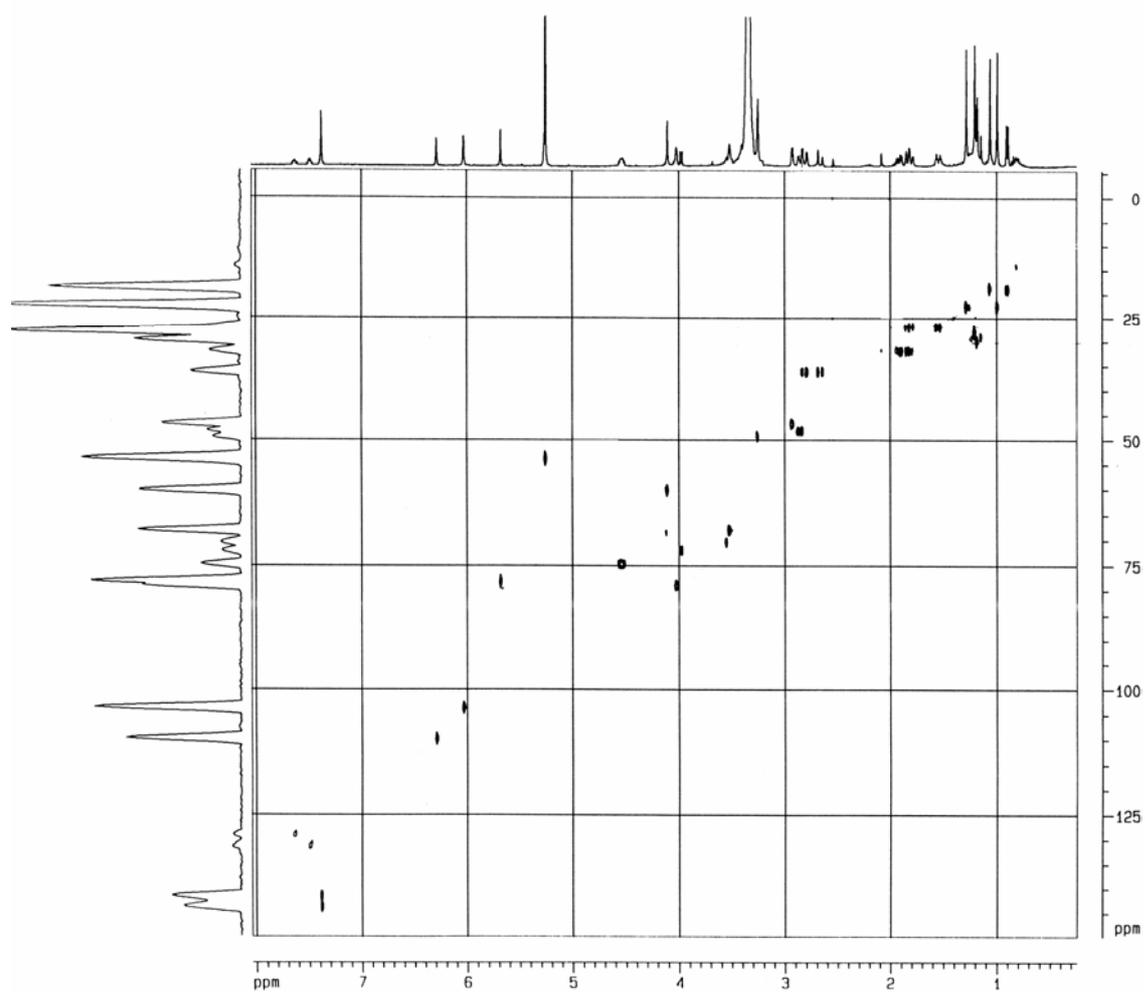


FIGURA 4.205. Experimento de HSQC da substância RD-350 (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ).

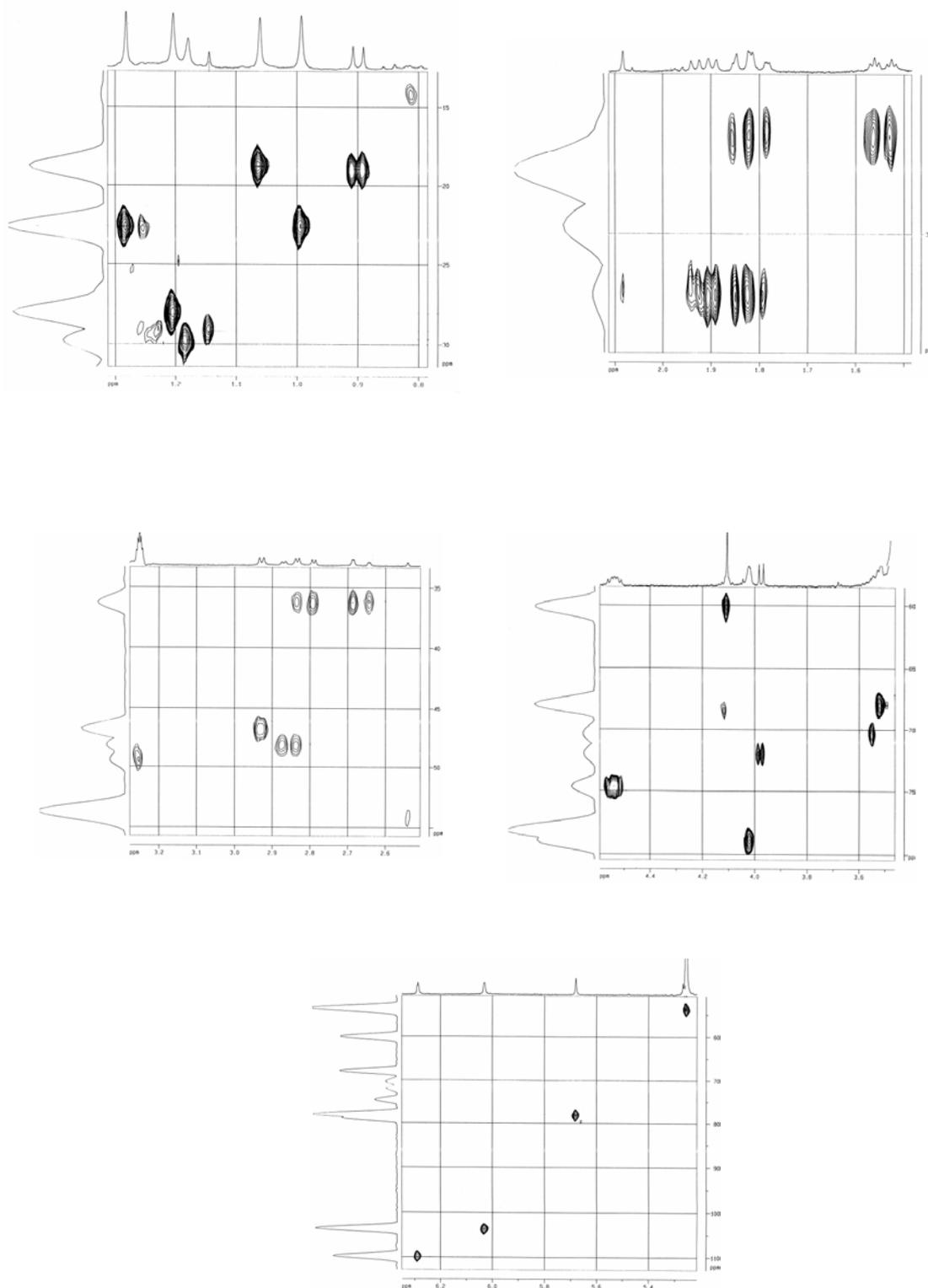


FIGURA 4.205a. Experimento de HSQC ampliado da substância RD-350 (400 MHz,  $CD_2Cl_2$ ).

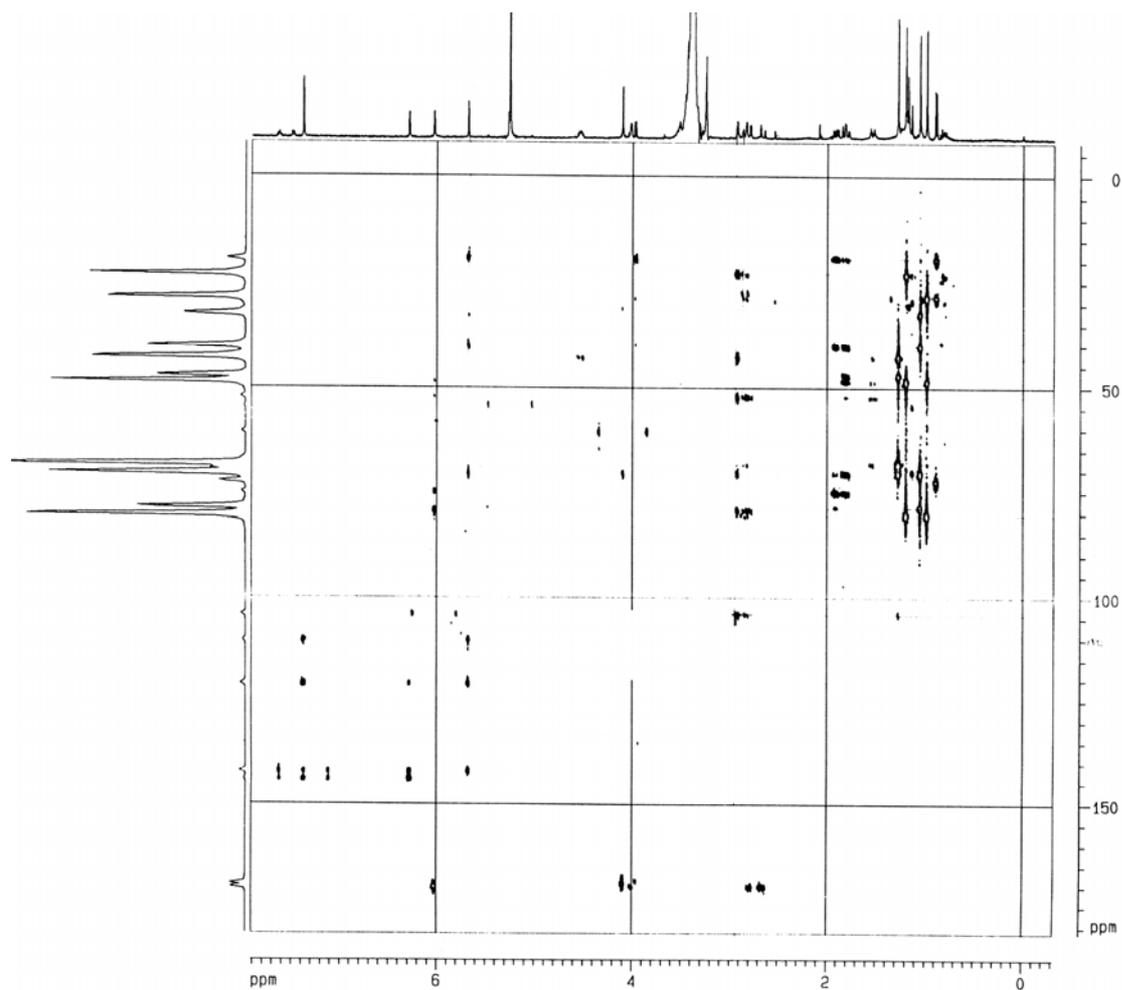


FIGURA 4.206. Experimento de HMBC da substância RD-350 (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

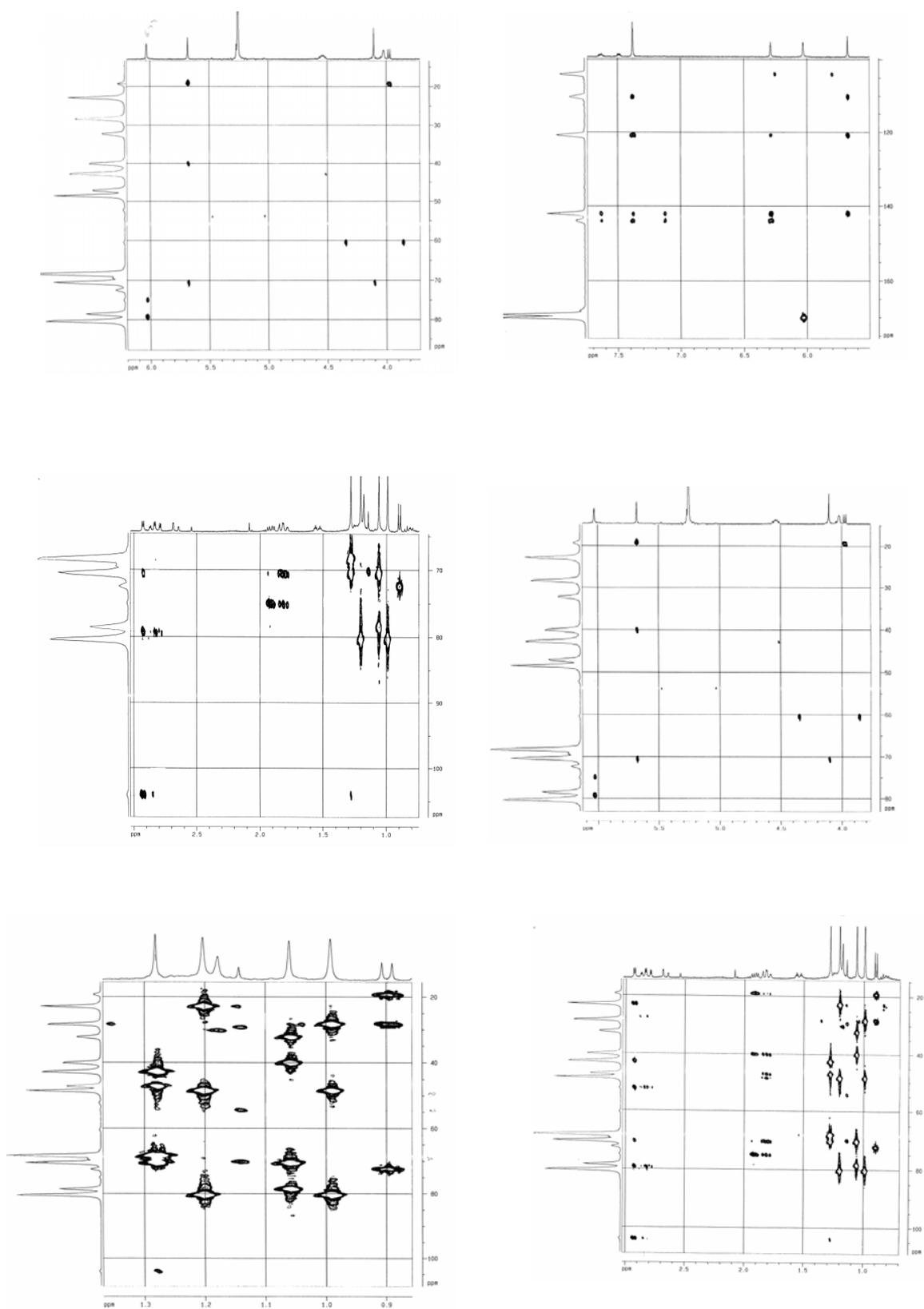


FIGURA 4.206a. Experimento de HMBC ampliado da substância RD-350 (400 MHz,  $CD_2Cl_2$ ).

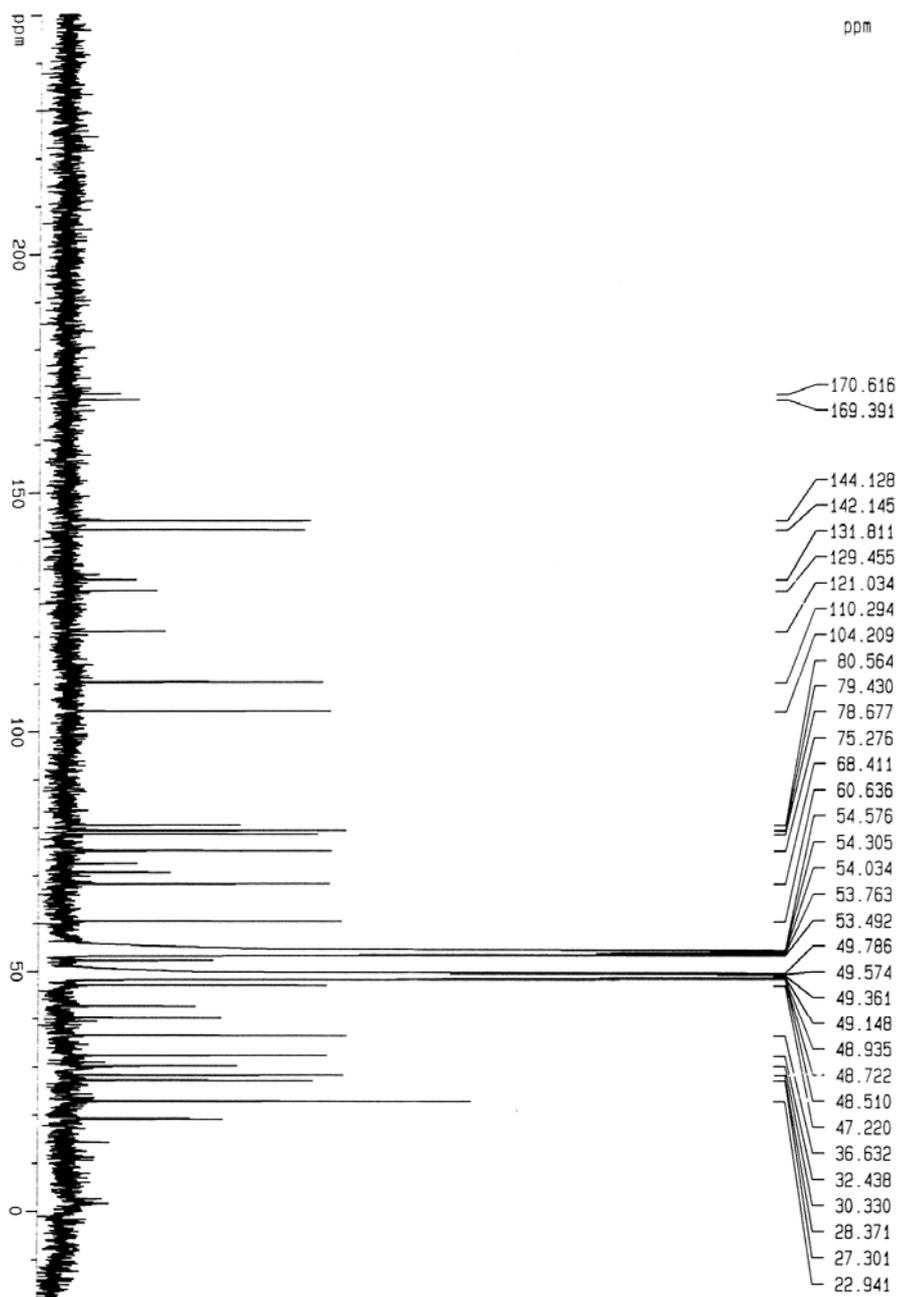


FIGURA 4.207. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância RD-350 (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ).

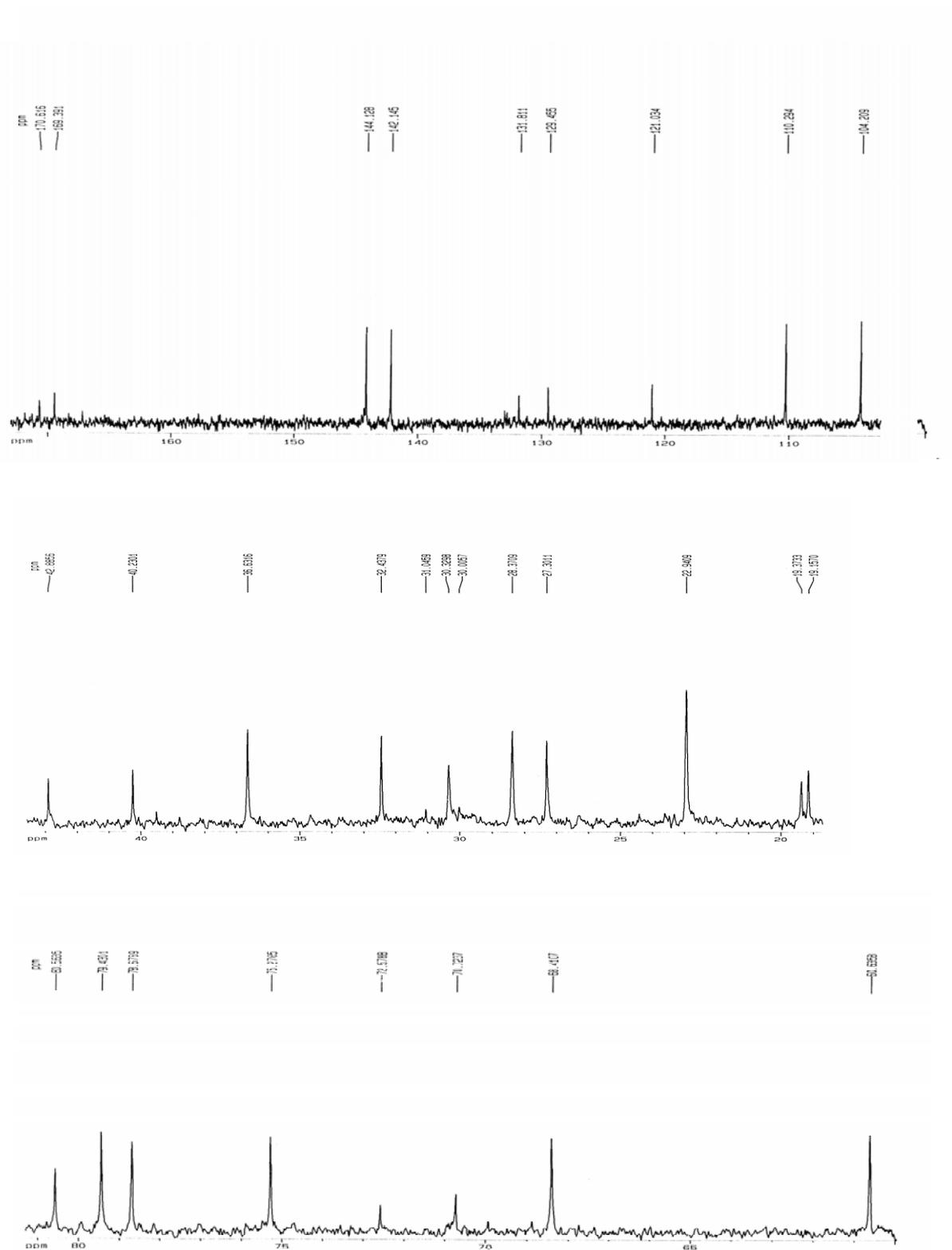


FIGURA 4.207a. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ampliado da substância RD-350 (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ).

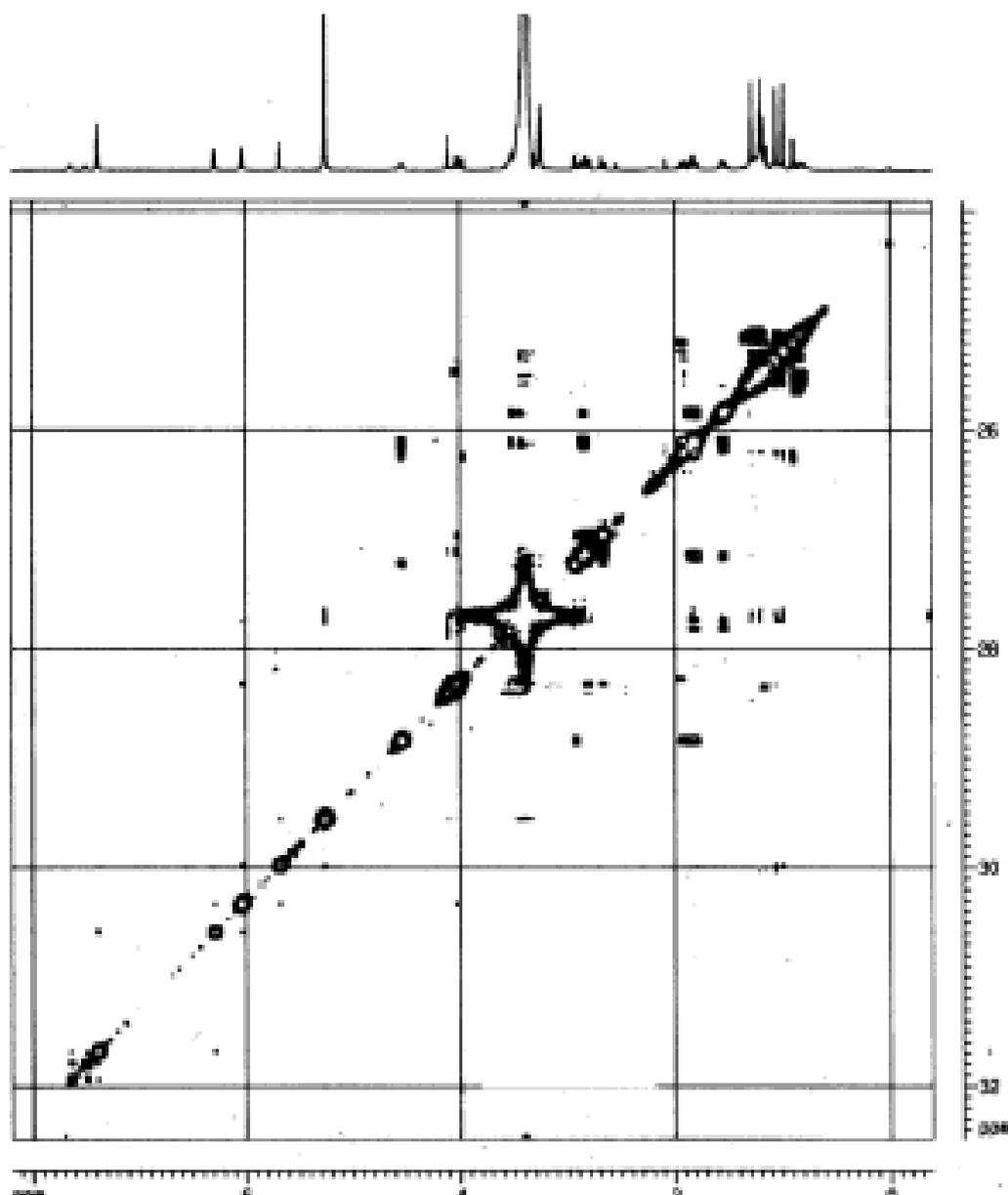


FIGURA 4.208. Experimento de COSY da substância RD-350 (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

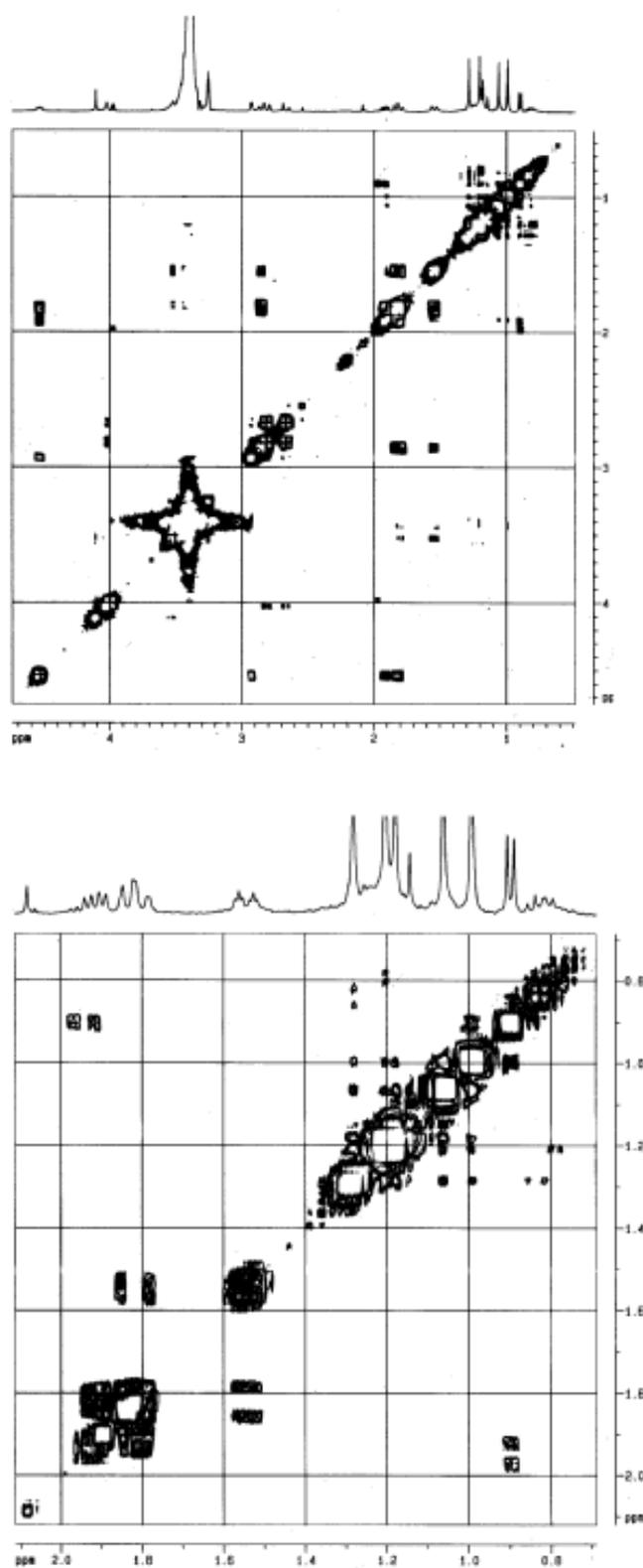


FIGURA 4.208a. Experimento de COSY ampliação da substância RD-350 (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

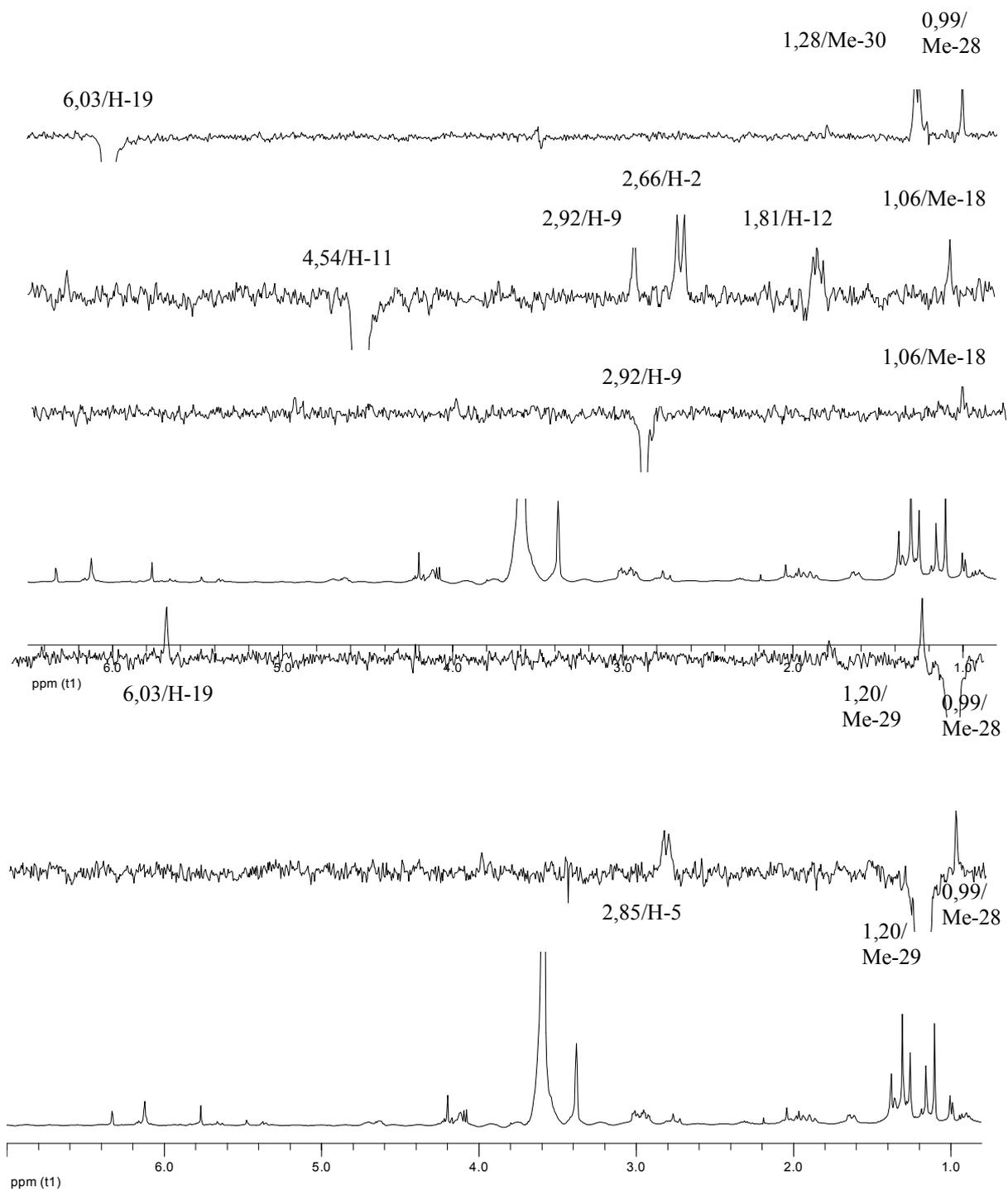


FIGURA 4.209. Experimento de gNOESY da substância RD-350 (400 MHz,  $CD_2Cl_2$ ).

## 4.2. Resultados Biológicos

As substâncias puras e obtidas em quantidade foram submetidas a dois tipos de ensaios biológicos: os bioquímicos, realizados frente às enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae*, e os ensaios *in vitro* feitos sobre as formas tripomastigostas de *T. cruzi* e amastigotas de *L. braziliensis*. Abaixo são discutidos os resultados de cada ensaio.

### 4.2.1. Resultados Bioquímicos

No decorrer da realização dos ensaios enzimáticos, alguns problemas foram detectados que dificultavam ou impediam as substâncias de serem ensaiadas:

- As substâncias testadas absorviam na região de leitura dos ensaios;
- Não foram testadas pela falta de solubilidade no tampão (precipitavam);
- Ausência de uma metodologia alternativa disponível para ensaiar estas substâncias.

Os resultados obtidos com as substâncias testadas frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi* não foram relevantes (Tabela 4.15). A substância RD-79, figura 4.120, foi a que apresentou melhor resultado, 40,6 % de inibição em uma concentração alta de 529,1  $\mu\text{M}$ . Quando esta foi ensaiada frente à enzima APRT, apresentou problema de absorção na região de leitura, não sendo confiáveis seus resultados.

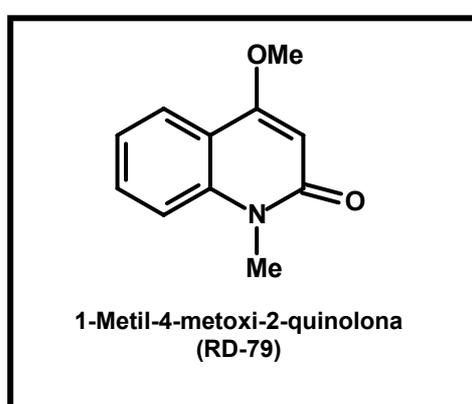


FIGURA 4.210. Substância RD-79 (1-Metil-4-metoxi-2-quinolona).

Os resultados obtidos com a enzima APRT de *L. tarentolae* também não foram expressivos. A substância RH-3, figura 4.211, foi a que apresentou o melhor resultado 60,8% (136,6  $\mu$ M). Quando esta foi ensaiada frente à gGAPDH não apresentou inibição enzimática.

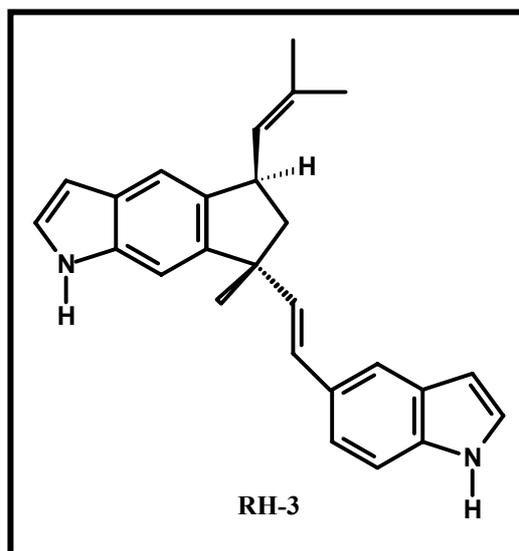


FIGURA 4.211. Substância RH-3 (5',6'-[5-metil-5(7-indol-5"-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metil prop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol).

Um fato importante observado é a relevância do grau de pureza para os ensaios biológicos. A pureza da amostra é importante tanto para se obter resultados confiáveis quanto para a reprodutibilidade dos resultados. Um exemplo foi à amostra RH-3, a primeira vez que ela foi submetida ao ensaio na APRT ela apresentou 41,8 % de inibição na concentração de 136,6  $\mu$ M, este resultado foi da amostra mais o pigmento. Quando o pigmento foi retirado à amostra passou a apresentar um aumento de 11% na sua atividade, aparentemente pode não ser tão importante, mas dependendo da impureza contida na amostra, esta pode mascarar um resultado tanto positivo quanto negativo, observou-se isso com outras amostras que foram submetidas ao ensaio com quantidades pequenas de impurezas.

TABELA 4.15. Resultados dos ensaios realizados frente às enzimas gGAPDH e APRT.

Substância	Percentagem de inibição		APRT	gGAPDH
	APRT	GAPDH	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
RH-1	1,0 % 225,2 µM	0,0 %	-	-
RH-2	10,5 % 100,0 µg/mL	13,1 % 100,0 µg/mL	-	-
RH-3	60,8 % 136,6 µM	0%	-	-
RH-4	-	-	208,0 µM *	144,0 µM *
RH-5	-	-	-	-
RH-6	-	-	-	-
RD-11	11,0 % 88,6 µM	0,0%	-	-
RD-22ab	-	-	-	-
RD-42	-	-	262,0 µM*	198,0 µM*
RD-70	-	-	151,0 µM**	205,0 µM*
RD-79	-	40,6 % 529,1 µM	-	-
RD-91	-	-	-	-
RD-92	-	-	-	-
RD-122	-	-	-	-
RD-350	-	-	-	-

\*(ROCHA, 2004), \*\*(ALMEIDA, 2003).

#### 4.2.2. Resultados Leishmanicida e Tripanocida

Os ensaios leishmanicida e tripanocida também apresentaram problemas para sua realização:

a) A demora na realização do ensaio tripanocida tornou-se um problema devido a grande fila de espera.

b) O ensaio leishmanicida passou por mudanças no protocolo prejudicando assim o andamento do ensaio, além de problemas com contaminação devido à falta de energia (apagão todos os dias por algumas horas durante vários meses).

Os resultados do ensaio tripanocida não foram expressivos como pode ser observado na tabela 4.16. Das substâncias testadas somente RD-70, figura 4.212, apresentou lise parasitária de 60,9 % em concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  (ROCHA, 2004).

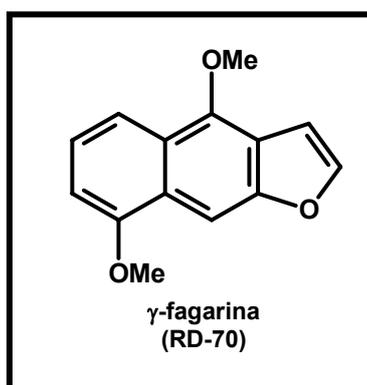


FIGURA 4.212. Substância RD-70 ( $\gamma$ -fagarina).

No ensaio leishmanicida (Tabela 4.16) somente a substância RH-1, figura 4.213, apresentou resultado significativo, 100% de lise em uma concentração de 160  $\mu\text{g/mL}$  ( $\text{DL}_{50}$  44  $\mu\text{M}$ ). A substância RH-5, figura 4.213, também foi testada, porém não apresentou resultado expressivo (11% em concentração de 320  $\mu\text{g/mL}$ ).

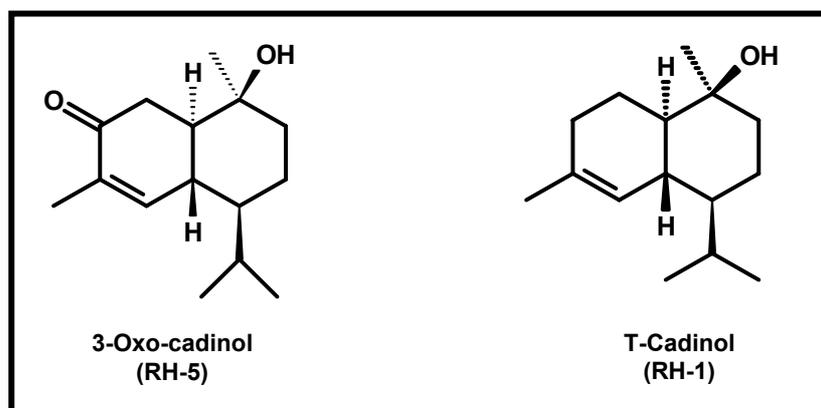


FIGURA 4.213. Substâncias RH-1 (T-cadinol) e RH-5 (3-oxo-cadinol).

TABELA 4.16. Resultados dos ensaios *in vitro* frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* e amastigotas de *L. braziliensis*.

Subst.	Percentagem de lise parasitária		<i>L. braziliensis</i> DL <sub>50</sub>
	<i>T. cruzi</i>	<i>L. braziliensis</i>	
	6,2 % (100 µg/mL )		
RH-1	21,7 % (250 µg/mL) 31,8 % (500 µg/mL)	100 % (160 µg/mL)	44,0 µM
RH-2	-	-	-
RH-3	-	9,6 % (320 µg/mL)	-
	17,8% (100 µg/mL )*		
RH-4	21,5 % (250 µg/mL)* 29,4 % (500 µg/mL)*	-	-
RH-5	-	11,0 % (320 µg/mL)	-
RH-6	-	-	-
	10,8% (100 µg/mL )		
RD-11	34,8 % (250 µg/mL) 44,1 % (500 µg/mL)	10,0 % (320 µg/mL)	-
RD-22ab	-	-	-
	11,6 % (100 µg/mL )		
RD-42	22,5 % (250 µg/mL) 59,7 % (500 µg/mL)	-	-
	21,4 % (100 µg/mL )*		
RD-70	33,1 % (250 µg/mL) * 60,9 % (500 µg/mL) *	-	-
	17,0 % (100 µg/mL )		
RD-79	31,8 % (250 µg/mL) 38,0 % (500 µg/mL)	15,0% (160 µg/mL) 42,5 % (320 µg/mL)	-
RD-91	-	-	-
RD-92	-	-	-
RD-122	-	-	-
RD-350	-	-	-

\*(ROCHA, 2004).

## 5. BIOGÊNESE E DISCUSSÃO QUIMIOSSISTEMÁTICA

Neste capítulo são propostas as biogêneses das substâncias novas e uma pequena discussão sobre a quimiotaxonomia do gênero *Raputia* baseada nas substâncias encontradas em *R. praetermissa*.

### 5.1. ALCALÓIDES INDÓLICOS

A ordem Sapindales, consoante a nova classificação de STEVENS (2003), é constituída pelas famílias Anacardiaceae, Bierbersteiniaceae, Burseraceae, Kirkiaceae, Meliaceae, Nitrariaceae Rutaceae, Simaroubaceae, Sapindaceae. Os alcalóides não têm sido relatados nesta ordem exceto nas famílias Rutaceae, Meliaceae e Simaroubaceae.

Na família Rutaceae são encontradas uma diversidade de alcalóides classificados em cinco diferentes tipos:

- a) Alcalóides derivados do ácido antranílico (Figura 1.1, Capítulo 1);
- b) Alcalóides derivados do triptofano (Figura 1.2, Capítulo 1);
- c) Alcalóides derivados da fenilalanina e/ou tirosina;
- d) Alcalóides derivados de outros aminoácidos;
- e) Miscelânea de aminas e amidas.

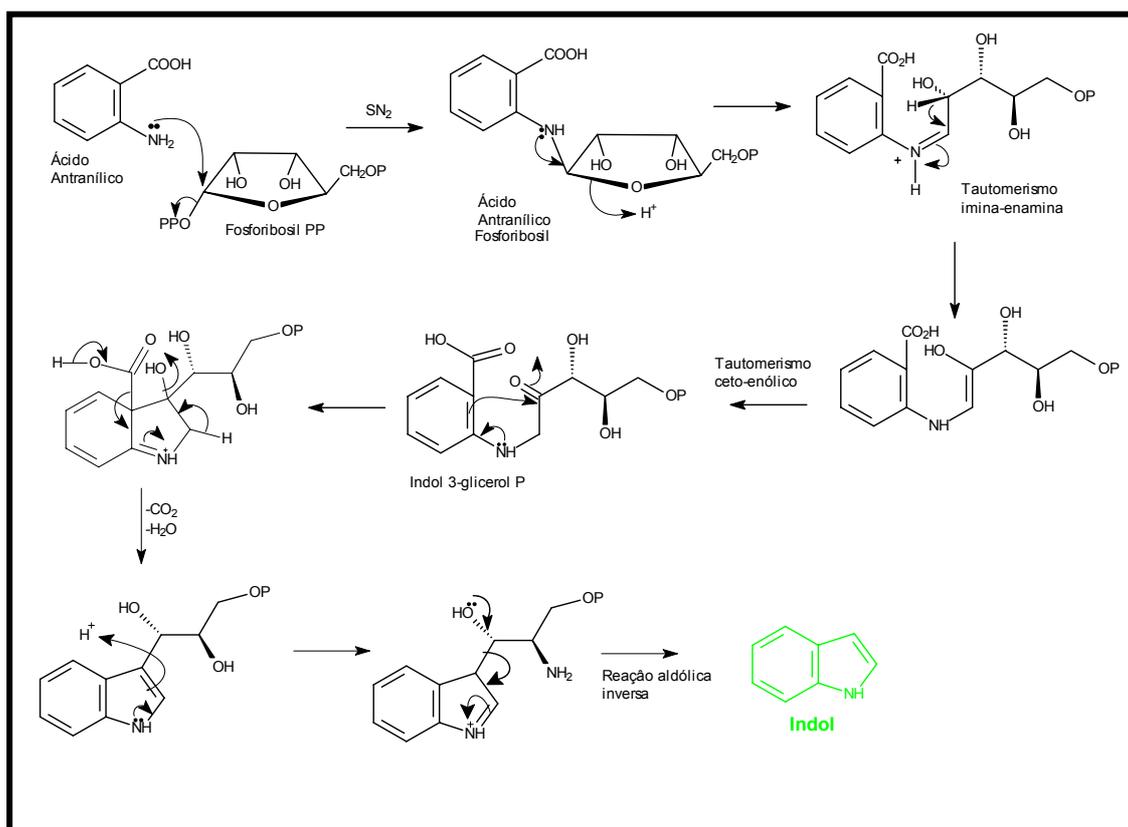
Os alcalóides derivados do ácido antranílico são considerados marcadores quimiotaxinômicos das Rutaceae, principalmente os furanoquinolínicos que são de ocorrência comum em vários gêneros.

O gênero *Raputia* foi recentemente reorganizado e hoje são conhecidas 11 espécies (PIRANI, 2005), destas somente a *Raputia praetermissa* (raiz) foi estudada do ponto de vista fitoquímico. Foram encontrados basicamente sesquiterpenos, limonóides com esqueletos A e D modificados e alcalóides, conforme visto na figura 4.1 e 4.1a do capítulo 4. Os alcalóides encontrados em *Raputia* foram os derivados do ácido antranílico (alcalóides furanoquinolínicos e 2-quinolonas) e os alcalóides indólicos (Figura 4.1 e 4.1a do capítulo 4).

Os alcalóides indólicos, de acordo com a biosíntese encontrada na literatura (DEWICK, 2001; WATERMAN, 1983), são derivados do triptofano. Entretanto, este trabalho propõe que os alcalóides indólicos isolados da *Raputia praetermissa* pertençam a uma nova classe de indólicos, cuja biogênese proposta

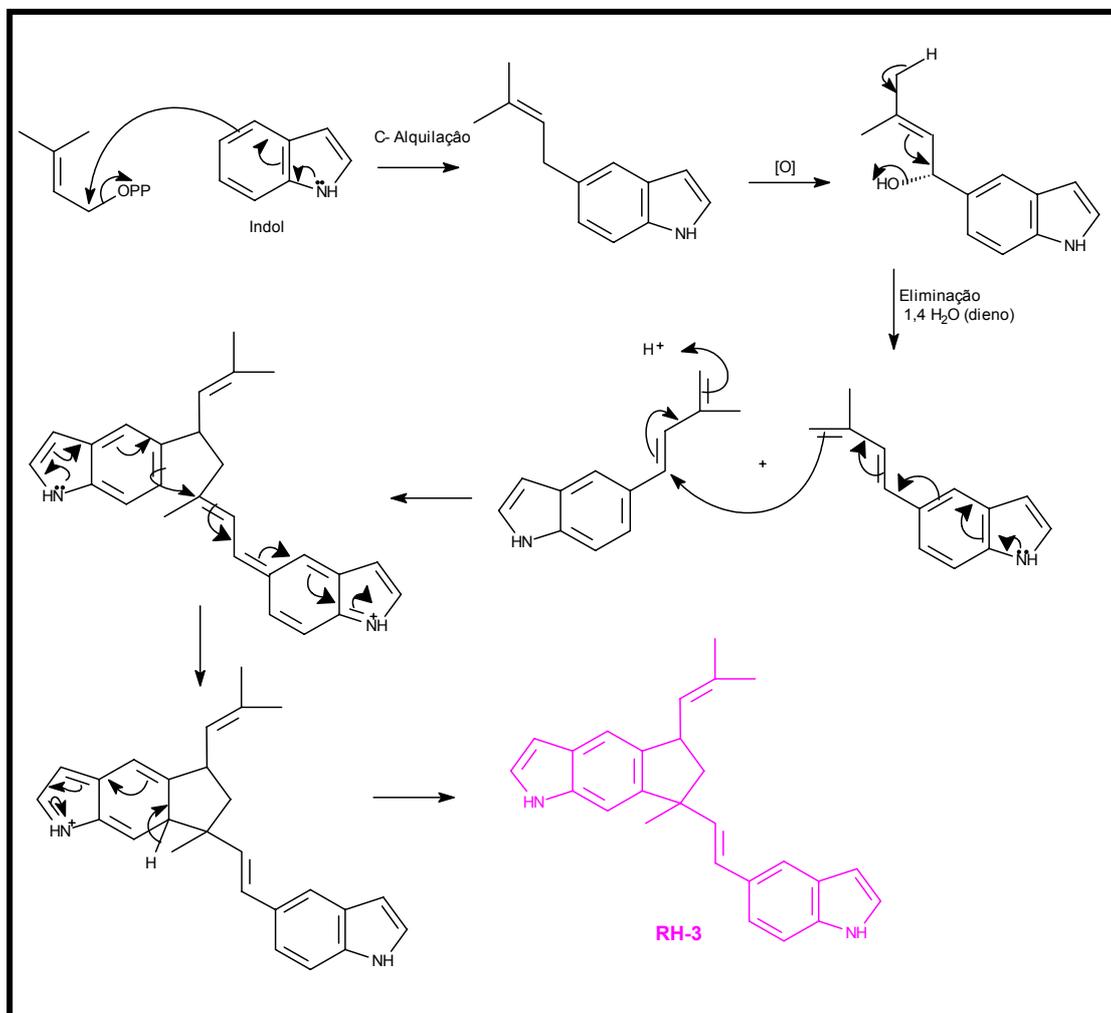
(Esquema 5.1) sugere que a produção destes por esta espécie siga até a formação do sistema indol, não havendo a incorporação da L-serina formando o L-triptofano, como ocorre na biosíntese de DEWICK (2001) e WATERMAN (1983). Seguindo esse caminho biogênético proposto a planta economizaria energia, pois não formaria o triptofano para depois então degradá-lo até chegar às substâncias referidas.

O anel indólico é formado em uma seqüência de reações complexas, das quais o mecanismo ainda não se conhece em detalhes, mas é do conhecimento geral que ele se forma pela incorporação de dois carbonos de fosforribosil pirofosfato. A perda dos carbonos ribosil acontece através da reação aldólica inversa, formando-se o sistema indol (Esquema 5.1). A biogênese dos alcalóides indólicos **inéditos** são mostradas nos esquemas 5.2, 5.3 e 5.4.



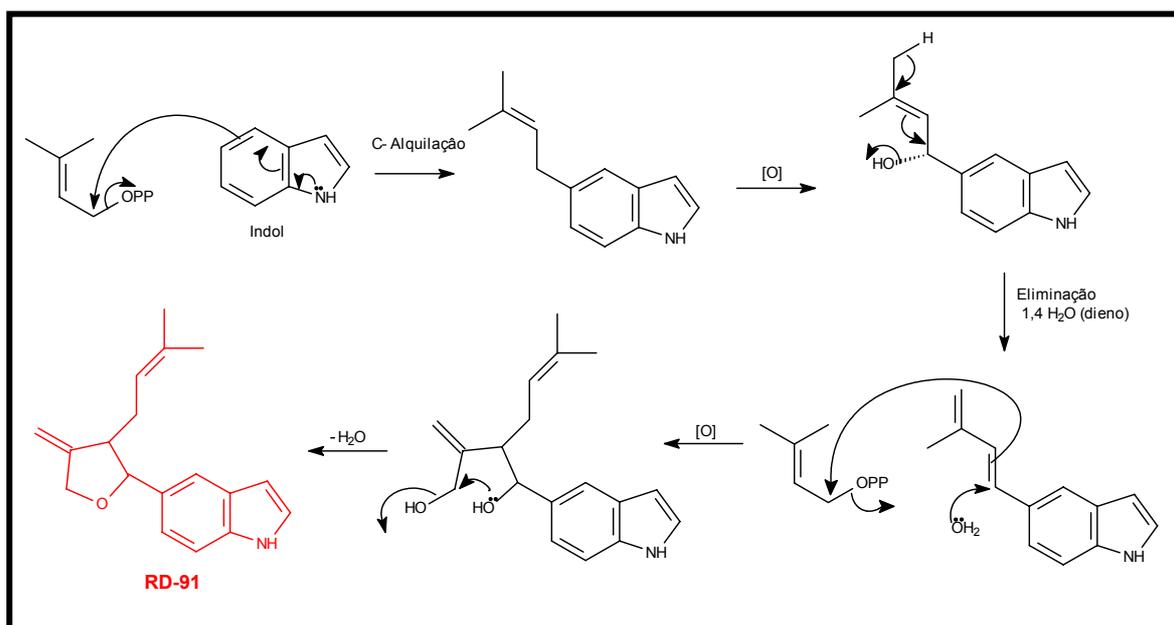
ESQUEMA 5.1. Biogênese modificada do anel indólico (DEWICK, 2001).

A proposta de biogênese para a substância RH-3 (esquema 5.2) sugeriu prenilação de dois anéis indólicos, seguido de adição nucleofílica de um dos anéis indólicos, formando o bisindol.



ESQUEMA 5.2. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RH-3.

A biogênese do alcalóide indólico RD-91 é mostrada no esquema 5.3. A proposta sugeriu prenilação de um anel indólico, seguida de oxidação e eliminação, ocorrendo uma nova prenilação, seguida de oxidação e fechamento de um anel dihidrofurano, formando o RD-91.

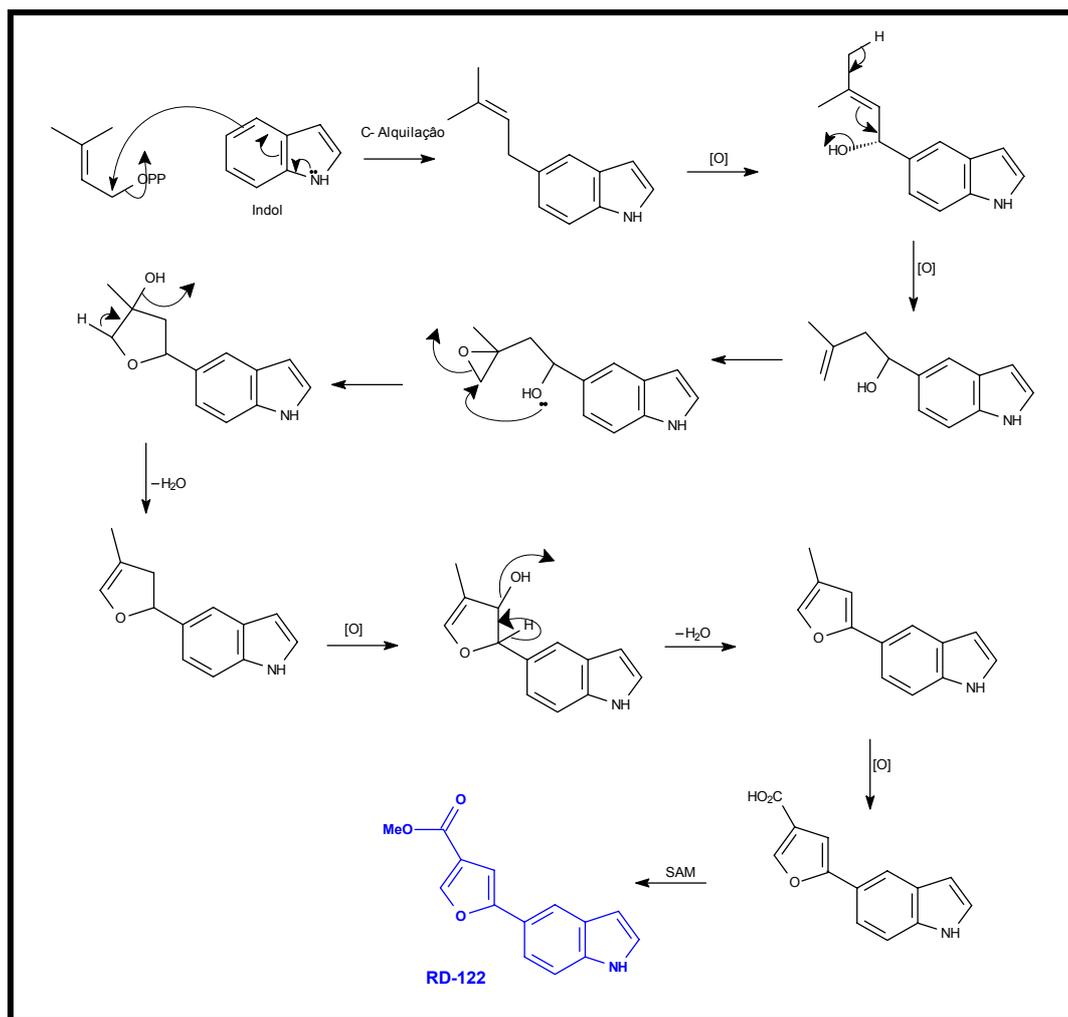


ESQUEMA 5.3. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RD-91.

A proposta de biogênese para o alcalóide indólico RD-122 é mostrada no esquema 5.4. A proposta para a formação de RD-122 começou com a prenilação do anel seguida de oxidação, fechamento do anel dihidrofurano e formação do anel furano, seguida de oxidações e *O*-metilação.

Segundo levantamento realizado no *Chemical Abstract* apenas dois gêneros em Rutaceae ocorrem este tipo de alcalóide indólico prenilado, *Merrilia* e *Esenbeckia*. O gênero *Esenbeckia* pertence à subfamília Rutoideae, tribo Cuspariae, o gênero *Raputia* também pertence a esta tribo (*sensu* ENGLER, 1931). O *Esenbeckia* tem como principais constituintes alcalóides furanoquinolínicos, 2-quinolonas, limonóides, furano cumarinas e alcalóides indólicos prenilados (JANUÁRIO, 1995; DELLE MONACHE, 1990). O gênero *Merrilia sensu* ENGLER (1931) pertence à subfamília Aurantioideae ou Citroideae *sensu* CHASE (1999).

Os alcalóides indólicos prenilados isolados tanto do gênero *Merrilia* quanto de *Esenbeckia* são alcalóides do ponto de vista biogenéticos bem menos elaborados que os de *Raputia*, conforme figuras 5.1 e 5.2. Os alcalóides isolados de *Raputia* confirmam o correto posicionamento deste gênero na tribo Cuspariae.



ESQUEMA 5.4. Proposta de biogênese para o alcalóide indólico RD-122.

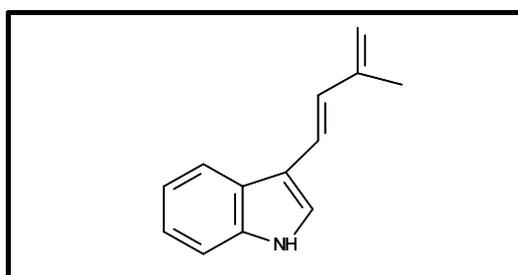


FIGURA 5.1. Alcalóide indólico prenilado isolado do gênero *Merrilia* (KONG, 1987).

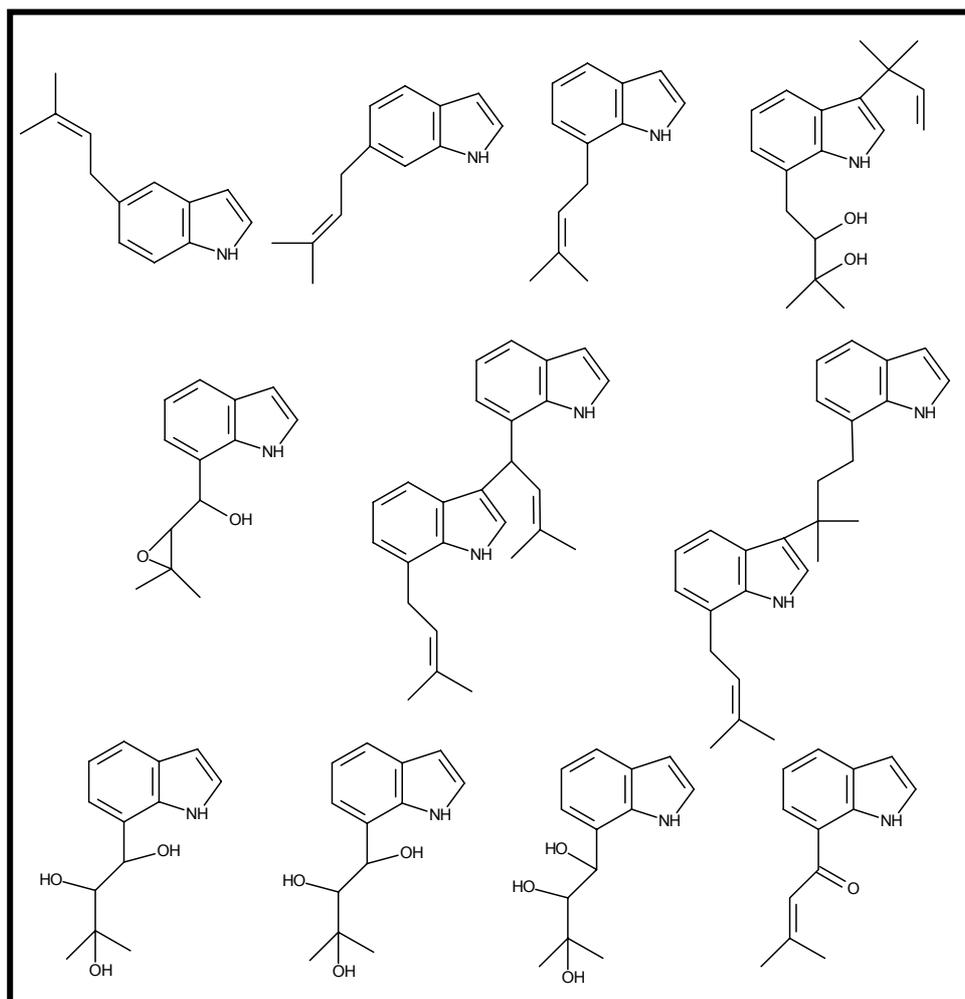


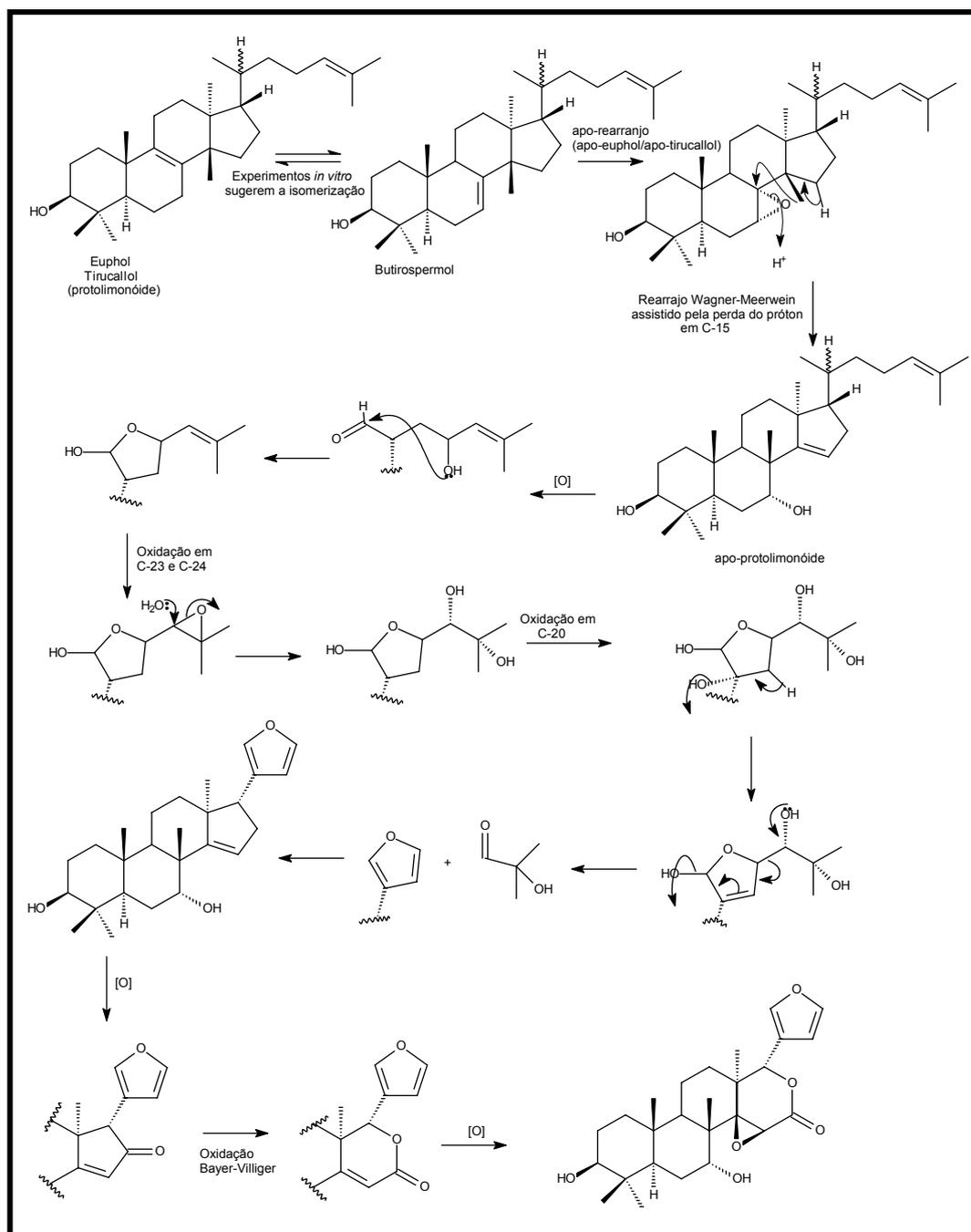
FIGURA 5.2. Alcalóides indólicos prenilados isolados do gênero *Esenbeckia* (JANUÁRIO, 1995; DELLE MONACHE, 1990).

## 5.2. LIMONÓIDES

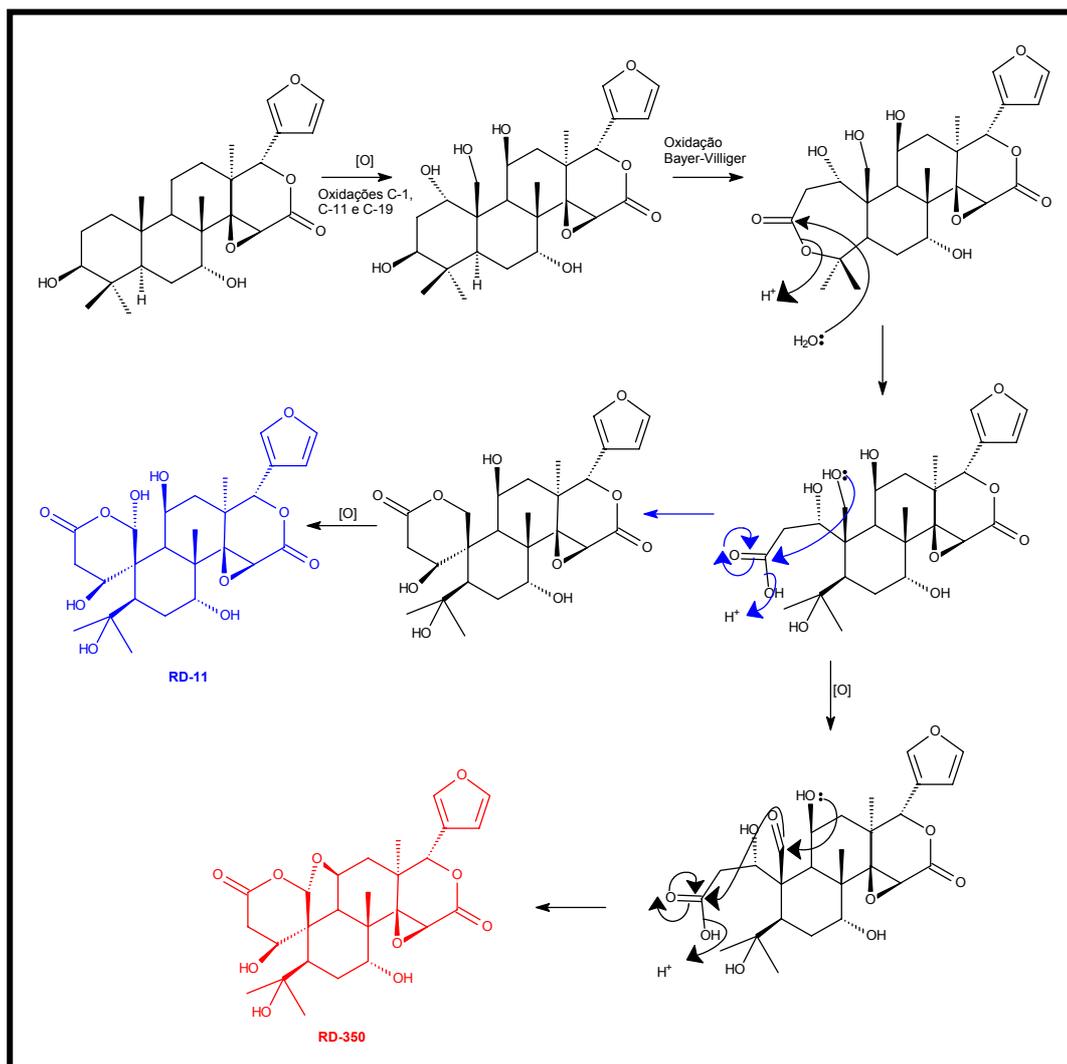
Os esqueletos dos limonóides encontrados em *Raputia* possuem anel A e D modificados, o que é comum nas Rutaceae, porém, o esqueleto básico desses limonóides só foi encontrado no gênero *Citrus*, sendo a **ichangina** o único representante (Figura 4.104, Capítulo 4). Neste estudo foram encontrados mais duas estruturas com este tipo de esqueleto, a RD-11 e a RD-350 (Figuras 4.104 e 4.203, Capítulo 4). A biogênese proposta para estas estruturas é encontrada nos esquemas 5.5a e 5.5b.

No gênero *Raputia* também foram encontrados alcalóides indólicos prenilados. Este tipo de esqueleto indólico também foi encontrado em *Merrilia* (Figura 5.1). Os alcalóides indólicos prenilados e os limonóides modificados encontrados em *Raputia* possuem os mesmos esqueletos básicos dos encontrados em *Merrilia* e *Citrus*. A comparação dos metabólitos de *Raputia* com o alcalóide indólico de *Merrilia* e o limonóide de *Citrus*, conferem a afinidade de *Raputia* (subfamília Rutoideae) a subfamília Aurantioideae (*Merrilia* e *Citrus*).

A diversidade de metabólitos encontrados em *Raputia*, tais como sesquiterpenos do tipo cadinano, alcalóides derivados do ácido antranílico e limonóides com esqueletos A e D modificados, reforça o posicionamento de *Raputia* na tribo Cuspariae.



ESQUEMA 5.5a. Proposta de biogênese para os limonóides RD-11 e RD 350 (parte I).



ESQUEMA 5.5b. Proposta de biogênese para os limonóides RD-11 e RD 350 (parte II).

## 6. CONCLUSÕES

✓ O estudo fitoquímico da raiz da *Raputia praetemissa* (Rutaceae) resultou no isolamento e identificação dos sesquiterpenos do tipo cadinano (T-cadinol e 3-oxo-cadinol), esteróides (estigmasterol, sitosterol e campesterol), derivado do ácido cinâmico (3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano (2'',3'':3',4') fenil] propionato de metila), triterpeno do tipo tirucalano (ácido 3-oxotirucala-7,24-dien-21-óico), alcalóides furanoquinolínicos (dictamina e  $\gamma$ -fagarina), alcalóide 2-quinolona (1-metil-4-metoxi-2-quinolona), alcalóides indólicos (5',6'-[5-metil-5(7-indol-5''-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol, 6-formilindol, 5-[(4'-carbometoxi)-furano-2'-il]-indol e 5-[(3'-dimetilalil-4'-metilideno)-2'-tetraidrofurano-2'-il]-indol) e limonóides (11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -óxido-7-deacetoxi-7-hidroxi-ichangina, 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina e acetato de tricocina S13) com esqueletos A e D modificados (Figuras 4.1 e 4.1a, Capítulo 4).

✓ Das substâncias acima citadas cinco são **inéditas**, sendo três alcalóides indólicos prenilados (5',6'-[5-metil-5(7-indol-5''-il-eteno-6,7-diil)-3(1-metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol, 5-[(4'-carbometoxi)-furano-2'-il]-indol e 5-[(3'-dimetilalil-4'-metilideno)-2'-tetraidrofurano-2'-il]-indol) e dois limonóides (11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -óxido-7-deacetoxi-7-hidroxi-ichangina e 11 $\beta$ ,19 $\alpha$ -dihidroxi-7-deoxo-7-acetoxi-ichangina) (Figuras 4.1 e 4.1a., Capítulo 4).

✓ As classes das substâncias encontradas, atingiram a expectativa do esperado para Rutaceae. Embora, os alcalóides indólicos prenilados tenham sido isolados dos gêneros *Merrilia* e *Esenbeckia*, eles não são comuns na família Rutaceae. Os gêneros *Esenbeckia* e *Raputia* pertencem à tribo Cuspariae (subfamília Rutoideae); o isolamento dos alcalóides indólicos prenilados em ambos os gêneros, assim como, alcalóides furanoquinolínicos e limonóides de *Raputia*, reforçam o correto posicionamento do gênero *Raputia* na tribo Cuspariae.

✓ Para o estudo quimiosistemático, os alcalóides indólicos prenilados encontrados em *Raputia* têm grande relevância, pois podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, além disso, sob o ponto de vista biogenético, estes alcalóides são mais elaborados que os encontrados em *Merrilia* e *Esenbeckia*. Foi proposta, inclusive, uma modificação na biogênese dos

alcalóides indólicos prenilados de *Raputia*, nesta não há a formação do triptofano (Esquema 5.1, Capítulo 5).

✓ Os resultados fitoquímicos, também, confirmam a correta separação entre os gêneros *Raputia* e *Neoraputia*, uma vez que não foram encontrados flavonóides polimetoxilados em *R. praetermissa* comuns no gênero *Neoraputia*.

✓ As substâncias avaliadas quanto à atividade leishmanicida não resultaram em atividade promissora (< 70%), exceto o sesquiterpeno T-cadinol (Figura 4.213, Capítulo 4), que apresentou uma DL<sub>50</sub> de 44,0 µM.

✓ Das substâncias avaliadas quanto à atividade tripanocida *in vitro*, a que apresentou melhor resultado, foi o alcalóide γ-fagarina (Figura 4.212, Capítulo 4), lise parasitária de 60,9 % em 500 µg/mL, as demais substâncias testadas mostraram resultados irrelevantes (< 70%).

✓ Dos resultados obtidos com o modelo experimental de inibição enzimática para a APRT de *L. tarentolae*, a substância 5',6'-[5-metil-5(7-indol-5"-il-eten-6,7-diil)-3(1-metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol (Figura 4.211, Capítulo 4) foi a que apresentou melhor resultado, 60,8 % em uma concentração de 136,6 µM. As outras substâncias não mostraram resultados expressivos (< 70%).

✓ Das substâncias ensaiadas quanto à atividade inibidora da enzima gGAPDH de *T. cruzi*, a que apresentou melhor resultado, foi a substância 1-metil-4-metoxi-2-quinolona (Figura 4.210, Capítulo 4), mostrando atividade inibitória de 40,6 % em uma concentração de 529,1 µM, as demais substâncias testadas não apresentaram resultados significantes (< 70%).

✓ O estudo fitoquímico de *R. praetermissa* não forneceu novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses, mas permitiu a descoberta de um novo esqueleto de alcalóide indólico prenilado, o qual, indubitavelmente, contribuirá bastante ao estudo quimiosistemático do gênero *Raputia*. Ademais, os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos e biológicos (*in vitro*), mesmo não sendo expressivos, representam importantes dados, pois as substâncias, que apresentaram alguma atividade, podem ser modificadas estruturalmente com escopo de aumentar a atividade, e assim, obter-se o fármaco desejado. Os resultados dos ensaios, também, mostraram que as Rutaceae podem ser fontes de potenciais fármacos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADDAE-KYEREME, J.; CROFT, S.L.; KENDRICK, H.; WRIGHT, C.W. "Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; in vivo antimalarial activity of pleiocarpine". *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 99-103, 2001.
- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A.; CARMELY, S. "6,7-Dimethoxycoumarin, a *Citrus* phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*". *Phytochemistry*, **25**(8): 1855-1856, 1986.
- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. "Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products". *Parasite*, **6**(1): 3-8, 1999.
- ALMEIDA, A.L.C. de. *Potencial de Esenbeckia febrifuga e Zanthoxylum riedelianum como Fontes de Substâncias para o Controle de Doença de Chagas e Leishmanioses*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2003. Tese de doutorado, 219p.
- ALVES, M.J.M., SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W. Sobre o ciclo de vida do *trypanosoma cruzi* em células de vertebrado. Disponível em: <<http://www.sbpz.org.br/hm/portugues.doc>>. Acesso em: 22 fev. 2005.
- AMBROZIN, A.R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S. "Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**: 1-5, 2004.
- AMBROZIN, A.R.P. *Estudo Fitoquímico de Plantas das Famílias Rutaceae e Meliaceae Visando o Isolamento de Substâncias Protótipos para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Antichagasicos e Antileishmanioses*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 241p.
- AMBROZIN, A.R.P.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ELLENA, J.A.; ALBUQUERQUE, S. "New pyrone and quinoline alkaloid from *Almeidea rubra* and thier trypanocidal activity". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16**(3a): 434-439. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=SO103-50532005000300018&script=sci\\_arttext...](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=SO103-50532005000300018&script=sci_arttext...)>. Acessado em: 25 julho 2005.
- ANDRADE, M.R. de. *Estudo Químico e Biológico de Galipea bracteata e Ravenia infelix (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2003. Tese de doutorado, 200p.
- APPENDINO, G.; JAKUPOVIC, J.; JAKUPOVIC, S. "Sesquiterpenoids from *Pallenis spinosa*". *Phytochemistry*, **46**(6): 1039-1043, 1997.
- ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. "Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*". *Phytochemistry*, **49**(3): 751-754, 1998.
- ARRUDA, A.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; FRANCISCO, R.H.P.; RODRIGUES, A.M.G.D.; LECHAT, J.R. "Two pyrano flavones from *Neoraputia alba*". *Phytochemistry*, **30**(9): 3157-3159, 1991.
- ARRUDA, A.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. "Further pyrano flavones from *Neoraputia alba*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **4**: 80-83, 1993.
- BAGGE, DAVID. "Limonoids: pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae. Disponível em:

- <[http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_1998/begge.htm](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/begge.htm)>. Acessado em: 27 maio 2005. 1998.
- BARBOSA, V. M. & NAKANO, M. "Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas* sp. 1. Purification and properties of the enzyme". *Comp. Biochem. Phys. B*, **88**(2): 563-568, 1987.
- BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. "Evaluation of trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Planta Medica*, **65**:541-544, 1999.
- BENNETT, R.D.; HASEGAWA, S. "7 $\alpha$ -oxygenated limonoids from the Rutaceae". *Phytochemistry*, **21**(9): 2417-19, 1980.
- BENNETT, R.D.; HASEGAWA, S. "Isolimononic acid, a new citrus limonoid". *Phytochemistry*, **19**(11): 2349-2354, 1997.
- BERENS, R.L.; KRUG, E.C. "Purine and Pyrimidine metabolism". IN: *Biochemistry of Parasitic Organism and its Molecular Foundations*. MARR, J.J. & MULLER, M. (Eds). Academic Press, 1995. p. 89-117.
- BIAVATTI, M.W. *Química e Bioatividade de Raulinoa echinata (Rutaceae), Espécie Endêmica do Vale do Itajaí-SC*. São Carlos, Programa de pós-graduação em química - UFSCar, 2001. Tese de doutorado, 248 p.
- BIAVATTI, M.W.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VICTOR, S.R.; PAGNOCCA, F.C.; ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I.; ZUCKERMAN-SCHPECTOR. "Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **13**(1): 66-70, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=SO103-50532002000100010&script=sci\\_arttext...](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=SO103-50532002000100010&script=sci_arttext...)>. Acessado em: 25 julho 2005.
- BONTÉ, F.; DUMAS, M.; SAUNOIS, A.; MEYBECK, A. "Phospholipase A<sub>2</sub> inhibition by alkaloid compounds from *Phellodendron amurense* Bark". *Pharmaceutical Biology*, **37**(1): 77-79, 1999.
- BOWEN, I.H.; PATEL, Y.N. "Acridone alkaloids from *Pleiospermium alatum* (Rutaceae)". *Phytochemistry*, **25**(2): 429-431, 1986.
- BRENER, Z. "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **4**(6): 389-396, 1962.
- BRINGMANN, G.; LEDERMANN, A.; HOLENS, J.; KAO, M-T.; BUSSE, U.; WU, H.G.; FRANÇOIS, GUIDO. "Antiplasmodial activity of mono- and dimeric carbazoles". *Planta Medica*, **64**: 54-57, 1998.
- CANESIN, M.F.; BARRETO, A.C.P. Tratamento etiológico da doença de Chagas: mito ou realidade?. Disponível em: <<http://www.Socesp.org.br/revista/v7n2/588.htm>>. Acessado em: 05 jan. 1999.
- CANNATA, J. B., VALLE, E., DOCAMPO, R., CAZULLO, J. J. "Subcellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **6** (3): 151-160, 1982.
- CDC. Chagas Disease. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factshtchagasdisease.htm>>. Acessado em: 12 dez. 2004.
- CHASE, M.W.; MORTON, C.M.; KALLUNKI, J.A. "Phylogenetic Relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of subfamilies using evidence from *RBCl* and *ATPB* sequence variation". *American Journal of Botany* **86**(8): 1191-1199, 1999.

- CHAKRABORTY, D.P. "Some aspects of the carbazole alkaloids". *Planta Medica*, **39**(2): 97-111, 1980.
- CLARKSON, A. B. & BROHN, F. H. "Trypanosomiasis: approach to chemotherapy by inhibition of carbohydrate catabolism". *Science*, **194**(4261): 204-206, 1976.
- COSTA, M.C.A.; FREITAS, L.C.G.; BARATA, L.E.S.; TAKANATA, Y. "Structure activity relationship between calculated molecular properties and biological activities against *Leishmania donovani* of the natural neolignan analogues studied with pattern recognition techniques: a possible explanation for the activity/inactivity some neolignans". *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **543**: 147-156, 2001.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. "A critical review on Chagas disease chemotherapy". *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(1): 3-24, 2002.
- CROAN, D. G.; MORRISON, D. A. & ELLIS, J. T. "Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **89**(2): 149-159, 1997.
- CROFT, S.L. "Monitoring drug resistance in leishmaniasis". *Tropical Medicine and International Health*, **6**(11): 899-905, 2001.
- CUCA S., L. E.; MARTINEZ V., J. C. & MONACHE, F. D. "Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*". *Revista Colombiana de Quimica*, **27**(1): 23-30, 1998.
- DAGNE, E.; YENESEW, A.; WATERMAN. P.G.; GRAY, A.I. "The chemical systematic of the Rutaceae, subfamily Toddaliodeae, in Africa". *Biochemical Systematics and Ecology*, **16**(2): 179-188, 1988.
- DELLE MONACHE, F.; DI BENEDITO, R. "*Esenbeckia leiocarpa*: IIª Further components". *Gazetta Chimica Italiana*, **120**: 387-389, 1990.
- DEWICK, P.M. Medicinal Natural products: a biosynthetic approach. 2ª ed. England John Wiley & Sons Ltda (Eds). 2001. p. 128. ISBN 0471-496405.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. "The impact of Chagas disease control in Latin America- a Review". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(5): 603-612, 2002.
- DIAS, J.C.P.; PASSOS, A.D.C.; PRATA, A.; OSTERMAYER, A.L.; COURA, J.R.; VINHAES, M.C.; MACEDO, V.O.; LINS. Doença de Chagas Aguda- Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN), 2004.
- ESCOBAR P.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L. "Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), amBisome, and sodium stilboglucuronate (pentostam) against *Leishmania donovani* in Immunodeficient scid mice". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**(6): 1872-1875, 2001.
- ENGLER, A. Rutaceae. In: *Dienatürlichen Pflanzenfamilien*. Engler, H.G.A. & Prantl, K.A. (Eds). Ed.2, 19A, 1931. p.187-359.
- FERRACIN, R.J.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. "Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*". *Phytochemistry*, **47**(3): 393-396, 1998.
- FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L.H.B. OLIVEIRA, A.J. B. "Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**(3): 325-327, 2004.
- FERREIRA, S.F.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; DIAS, J.C.P.; OSTERMAYER, A.L. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, 1997. p.1175-1213.

- FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS, M. H.; MAYRAGUE, J.; MOSKOWITZ, H.; CAVÉ, A. & HOCQUEMILLER, R. "The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **33**(3): 537-544, 1994.
- FUNASA. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Coordenação de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional de Saúde-Ministério da Saúde, 2000, 62p.
- FUNAYAMA, S.; TANAKA, R.; NOSHITA, T.; MORI, T.; KASHIWAGURA, T.; MURATA, K. "Rat small intestine muscle relaxation alkaloids from *Orixa japonica* leaves". *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **24**(1): 100-102, 2001a.
- FUNAYAMA, S.; MURATA, K.; NOSHITA, T. "Quinoline alkaloids of *Orixa japonica*". *Heterocycles*, **54**(2): 1139-1148, 2001b.
- GELB, M.H.; HOL, W.G.J. "Drugs to combat tropical protozoan parasites". *Science*, **297**: 343-344, 2002. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org).
- GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; VIGNÓLIO-ALVES, L.; LEON, L.L. "Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigote and axenic amastigotes". *Nitric Oxide*, **8**:1-6, 2003.
- GUERREIRO, G. Estudo fitoquímico de *Pilocarpus riedelianus* e sua ação sobre diferentes microorganismos. Dissertação Mestrado, UFSCar, São Carlos, SP. 117p, 2001.
- GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I.; WIJERATNE, E.M.K.; BANDARA, B.M.R.; HOFMANN, G.A.; JOHNSON, R.K. "Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae". *Journal of Natural Products*, **57**(4): 518-520, 1994.
- HASEGAWA, S.; SUHAYDA, C.G.; HSU, W.-J.; ROBERTSON, G.H. "Purification of limonoid glucosyltransferases from navel orange albedo tissues". *Phytochemistry*, **46**(1): 33-37, 1997.
- HE, KAN; ZENG, LU; SHI, GUOEN; ZHAO, GENG-XIAN; KOZLOWSKI, JOHN F.; MCLAUGHLIN, JERRY L. "Bioactive Compounds from *Taiwania cryptomerioides*". *Journal of Natural Products*, **60**(1): 38-40, 1997.
- HEMOnline. Doença de Chagas - Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. Disponível em: <<http://www.hemonline.com.br/chagas.htm>>. acessado em: 23 dez. 2004.
- IKUTA, A.; NAKAMURA, T.; URABE, H. "Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues". *Phytochemistry*, **48**(2): 285-291, 1998.
- JANUÁRIO, A.H. *Estudo Fitoquímico de Esenbeckia grandiflora e Almeidea rubra (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de pós-graduação em química - UFSCar, 1995. Tese de doutorado, 200 p.
- JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; PEREIRA, J.; SAKARIAH, K.K. "Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae". *Phytochemistry*, **44**(5): 843-846, 1997.
- KALLUNKI, J.A. "An Emended Description of and New Combinations in *Raputia Aubl.* (Cuspariinae, Rutaceae)". *Brittonia*, **42**(3): 175-177, 1990.
- KALLUNKI, J.A. "Revision of *Raputia Aubl.* (Cuspariinae, Rutaceae)". *Brittonia*, **46**(4): 279-295, 1994.
- KAMINSKY, R. "Miltefosine Zentaris". *Current Opinion in Investigational Drugs*, **3**(4): 550-554, 2002.

- KISHI, K.; YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S. "Limonoids and protolimonoids from the fruits of *Phellodendron amurense*". *Phytochemistry*, 31: 1335-1338, 1992.
- KONG, Y-C; BUT, P.P-H.; CHANG, H-T.; KAN, W-S. "A case study on the multi-disciplinary investigation on Yehchukene, the anti-implantation agent of *Murraya paniculata*". *Fitoterapia*, 57(6): 387-396, 1986.
- KONG, Y-C; CHENG, K-F.; CAMBIE, R.C.; WATERMAN, P.G. "Yuehchukene: a novel indole alkaloid with anti-implantation activity". *Journal Chemical Society, Chemical Communication*, 2: 47-48, 1985.
- KONG, Y-C; BUT, P.P-H.; CHANG, H-T.; KAN, W-S.; NG, K-H.; CHENG, K.F.; CHANG, K-L.; WONGA, K.M.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. The biochemical systematics of *Merrilia*; in relation to *Murraya*, the Clauseanae and Aurantioideae. *Biochemical ad Systematics and Ecology*, 16(1): 47-50, 1987.
- LADAME, S.; BARDET, M.; PÉRIÉ, J.; WILLSON, M. "Selective inhibition of *Trypanosoma brucei* GAPDH by 1,3-biphospho-D-glyceric Acid (1,3-diPG) Analogues". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9: 773-783, 2001.
- LEWIS, J.R. "Biological activity of some Rutaceous compounds". IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P.G. & GRUNDON, M.F. (Eds). London, Academic Press, 1983. p. 301-318.
- LIMA, J.E.S de. *Química e Atividade Antimicrobiana de Pilocarpus riedelianus (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 1996. Tese de doutorado, 229p.
- LIMA, M. da P. *Investigação fitoquímica e quimiosistemática de *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, *Crepidospermum rhoifolium*, *Dacryodes sp. (Burseraceae)* e *Spathelia excelsa (Rutaceae)**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2000. Tese de doutorado, 349p.
- MA, C-H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKUDA, H.; QIAO, J-C.; YU, H-L. "Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the Wood of *Xanthoceras sorbifolia*". *Journal of Natural Products*, 63: 238-242, 2000.
- MAFEZOLI, J. *Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae*. São Carlos, Programa de pós-graduação em química - UFSCar, 2001. Tese de doutorado, 240p.
- MCGREEVY PB & MARSDEN PD. *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. New York, Plenum Press, 1986. v.1, p. 115-127.
- MAKANGARA, J.J.; HENRY, L.; JONKER, S.A.; NKUNYA, M.H.H. "The caulindoles: dimeric prenylindoles from *Isolona cauliflora*". *Phytochemistry*, 65: 227-232, 2004.
- MESTER, I. "Structural Diversity and Distribution of alkaloids in Rutales". IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. WATERMAN, P.G. & GRUNDON, M.F. (Eds). London, Academic Press, 1983. p. 31-96.
- MING NG, K.; BUT, P.P-H.; GRAY, A.I.; HARTLEY, T.G.; KONG, Y-C; WATERMAN, P.G. "The biochemical systematic of *Tetradium*, *Euodia* and *Melicope* and their significance in the Rutaceae". *Biochemical Systematic Ecology*, 15 (5): 587-593, 1987.
- MIYAZAWA, M.; FUJOKA, J.; ISHIKAWA, Y. "Insecticidal compounds from *Phellodendron amurense* active against *Drosophila melanogaster*". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 830-833, 2002.
- MORAES, V.R.S., TOMAZELA, D.M.; FERRACIN, R.J.; GARCIA, C.F.; SANNOMYA, M.; SORIANO, M.P.C.; SILVA, M.F.G.F.da.; RODRIGUES-Fo., E.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; PIMENTA, E.F.; SOUZA, D.H.F.; OLIVA, G. "Enzymatic inhibition studies

- of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae)". *Journal of Brazilian Chemical Society*, **14**(3): 380-387, 2003.
- MORALES, E.A.V. "Amazônia: no caminho do desenvolvimento sustentável". *Biotecnologia*, **8**: 4-7, 1999.
- MOREL, C.M.; LAZDINS, J.; Chagas disease. *Nature Reviews*, **1**: 15, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/reviews/micro>>. Acessado em: 25 maio 2005.
- NAKAHARA, K.; TRAKOONTIVAKORN, G.; ALZOREKY, N.S.; ONO, H.; ONISIKAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M. "Antimutagenicity of some edible Thai plants, and a Bioactive Carbazole alkaloid, mahanine, isolated from *Micromelum minutum*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 4796-4802, 2002.
- NETO, E.C. "Doenças de Chagas: novos conhecimentos na patogênese da doença de Chagas". *Biotecnologia*, **9**: 20-22, 1999.
- NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. Ed. 9ª ed., São Paulo, Atheneu, 1995. 513 p.
- NOYES, H. A.; ARANA, B. A.; CHANCE, M. L. & MAINGON, R. "The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania* Endotrypanum clade". *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44**(5): 511-517, 1997.
- OPPERDOES, F. R.; BORST, P. "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome". *FEBS Letter.*, **80**, 360-364, 1977.
- PASSADOR, E.A.P.; SILVA, M.F.G.F.da.; RODRIGUES-Fo., E.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PIRANI, J.R. "A pyrano chalcone and a flavanone from *Neoraputia magnifica*". *Phytochemistry*, **45**(7): 1533-1537, 1997.
- PAULINI, H.; WAIBEL, R.; SCHIMMER, O. "Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae". *Mutation Research*, **227**: 179-186, 1989.
- PAVÃO, F.; CASTILHO, M.S.; PUPO, M.T.; DIAS, R.L.A.; CORREA, A.G.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G. "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution". *FEBS Letters*, **520**: 13-17, 2002.
- PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica*. 11ª edição. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1988. 872 p.
- PHILLIPS, C. L.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G. & HILL, C. P. "Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*". *Embo. Journal*, **18**(13): 3533-3545, 1999.
- PIRANI, J.R. "Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae". *Rodriguesia*, **56** (86): 189-204, 2005.
- RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M., DEWITT, D.L.; NITISS, J.L. "Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 444-447, 1999.
- RASHID, M.A.; ARMSTRONG, J.A.; GRAY, A.I.; WATERMANN, P.G. "Pyranocoumarins as chemotaxonomic markers in *Eriostemon coccineus* and *Philothea citrina*". *Phytochemistry*, **30**(12): 4033-4035, 1991.
- RIBEIRO, A.; PILO-VELOSO, D. "Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*". *Journal Natural Products*, **60**: 836-838, 1997.
- RIBEIRO, J.E.L. da S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTIN, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A. da S.; BRITO, J. M. de; SOUZA, M.A.D. de; MARTINS, L.H.P.;

- LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E. da C.; SILVA, C.F. da; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. 1ª ed. Manaus, DFID, 1999. 816 p.
- ROCHA, W.C. Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 221p.
- RODRIGUEZ, J.B.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R.; WIMMER, Z.; GROS, E.G. "Growth inhibitory effect of juvenile hormone analogues on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*". *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**:3257-3260, 1998.
- SILVA, F.E.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; BRAZ, V.R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L.; ECHEVARRIA, A. "Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **37**: 979-984, 2002.
- SILVA, M. "Estudos de biologia molecular e estrutural da enzima adenina fosforribosil transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - IQSC-USP, 2001. Dissertação de Mestrado.
- SILVA, M.F. DAS G.F. DA; GOTTLIEB, O.R.; DREYER, D.L., "Evolution of limonoids in the Meliaceae". *Biochemical Systematic and Ecology*, **12**: 299-310, 1984.
- SILVA, M.F. DAS G.F. DA; GOTTLIEB, O.R. "Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales. *Biochemical Systematic and Ecology*", **15**: 85-103, 1987.
- SILVA, M.F. DAS G.F. DA; GOTTLIEB, O.R.; EHRENDORFER, F., "Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". *Plant. Syst. Evol.* **161**: 97-134, 1988.
- SOUZA, D.H.F.; GARRAT, R.C.; ARAÚJO, A.P.U.; GUIMARÃES, B.G. "*Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design". *FEBS Letters*, **424**: 131-135, 1998.
- SOUZA, J.P.I.; ARRUDA, A.C.; ARRUDA, M.S.P. "Highly methoxilated flavones from *Neoraputia paraensis*". *Fitoterapia*, **56**(5): 465-466, 1995.
- SOUZA, J.P.I.; ARRUDA, A.C.; MUNOZ, G.D.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H. "Prenylated flavones from *Neoraputia paraensis*". *Phytochemistry*, **52**: 1705-1709, 1999.
- STEVENS, P.F. New Botanic Classification. Disponível em: [www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/sapindalesesweb.htm](http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/sapindalesesweb.htm). Acessado em: 12 de jun. 2003.
- SUAREZ, L.E.C.; MENICHINI, F.; DELLE MONACHE, F. "Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*". *Journal Brazilian Chemical Society*, **13**(3): 339-344, 2002.
- SUNDAR, S. "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis". *Tropical Medicine and International Health*, **6**(11): 849-854, 2001.
- TABER, DOUGLASS F.; CHRISTOS, THOMAS E.; HODGE, C. NICHOLAS. "Cyclohexenone Annelation by Alkylidene C-H Insertion: Synthesis of Oxo-T-

- cadinol". *Journal of Organic Chemistry*, **61**(6): 2081-4, 1996
- TACHIBANA, Y.; KIKUZAKI, H.; LAJIS, N.H.; NAKATANI, N. antioxidant activity of carbazoles from *Murraya koenigii* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 5589-5594, 2001.
- TOMAZELA, D.M. *Estudo fitoquímico de Neoraputia magnifica e Neoraputia paraensis e suas substâncias ativas frente a enzima Gliceraldeído-3fosfato-desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2001. Tese de Doutorado, 199 p.
- TOMAZELA, D.M.; PUPO, M.T.; PASSADOR, E.A.P.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES-Fo, E.R.; OLIVA, G.; PIRANI, J.R. "Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal gliceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase-inhibitory activities". *Phytochemistry*, **55**: 643-651, 2000.
- TOWERS, G.H.N.; GRAHAM, E.A.; SPENSER, I.D.; ABRAMOWSKI, Z. "Phototoxic furanoquinolines of the Rutaceae". *Planta Medica*, **41**: 136-142, 1981.
- TUTTLE, J. V. & KRENITSKY, T. A. "Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*". *J. Biol. Chem.*, **255**(3): 909-916, 1980.
- VERLINDE, C. L. M. J., MERRIT, T. E. A., VAN DEN AKKER, F., KIM, H., FEIL, I., DELBONI, L. F., MAMDE, S. C., SARFATY, S., PETRA, P. H., HOL, W. G. J. "Protein crystallography and infectious diseases". *Protein Science*, **3** (10): 1670-1686, 1994b.
- VERLINDE, C. L. M. J., CALLENS, M., VAN CALENBERGH, S., VAN AERSCHOT, A., HERDEWIJN, P., HANNAERT, V., MICHELS, P. A. M., OPPERDOES, F. R., HOL, W. G. J. "Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness". *J. Med. Chem.*, **37** (2): 3605-3613, 1994a.
- VERONESI, R., *Doenças Infeciosas e Parasitárias*. 8°ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, p. 674-705.
- VIEIRA, P.C.; ALVARENGA, M.A. de; GOTTLIEB, O.R.; NAZARE, M. de; MACDOUGALL, V.; REIS, F.A.M. "Structural confirmation of dihydrocinnamic acids from *Adiscanthus fusciclorus* by <sup>13</sup>C NMR". *Phytochemistry*, **19**: 472-473, 1980.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M.T.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. "Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales". *Pure Appl. Chem.*, **73**(3): 617-622, 2001.
- WADA, K.; YAGI, M.; MATSUMURA, A.; SASAKI, K.; SAKATA, M.; HAGA, M. "Isolation of limonin and obacunone from *Phellodendri cortex* shorten the sleeping time induced in mice by  $\alpha$ -chloralose-urethane". *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **38**(8) 2332-2334, 1990.
- WAGNER, H.; BLOOT, S.; ZGAINSKI, E.M. *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag-Berlin, 1984. 304 p.
- WATERMANN, P.G. The chemical systematic of alkaloids: A review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**: 395-406, 1999.
- WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M.F. IN: *Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales*. London, Academic Press, 1983.

- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, Venezuela, 1999. *Weekly epidemiological Record*, **74**: 290, 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acessado em: 13 jan. 2002.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: interruption of transmission. *Weekly epidemiological Record*, **72**: 1-8, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acessado em 13 jan. 2002.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tropical disease research. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acessado em 02 dez. 2002.
- WU, T.S.; LEU, Y.L.; CHAN, Y.Y., WU, P.L.; KUOH, C.S.; WU, S.J.; WANG, Y. "Tetranortriterpenoid insect antifeedants from *Severinia buxifolia*". *Phytochemistry*, **45**(7): 1393-1398, 1997.
- ZHAO, W.; WOLFENDER, J-L.; HOSTETTMAN, K.; XU, R.; QIN, G. "Antifungal alkaloids and limonoid derivatives from *Dictamnus dasycarpus*". *Phytochemistry*, **47**(1): 7-11, 1998.
- ZYGMUNT, P. M.; LARSSON, B.; STERNER, O.; VINGE, E.; HOEGESTAETT, E. D. "Calcium antagonistic properties of the sesquiterpene T-cadinol and related substances: structure-activity studies". *Pharmacology & Toxicology*, **73**(1): 3-9, 1993.