

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

Estudo Fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e Avaliação da Atividade Antiparasitária de Extratos e Substâncias Isoladas

Tatiane Regina Albarici*

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS (área QUÍMICA ORGÂNICA).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
*Bolsista FAPESP

SÃO CARLOS-SP
2006

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

A327ef

Albarici, Tatiane Regina.

Estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas / Tatiane Regina Albarici. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
182 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Química orgânica. 2. Rutacea. 3. Ensaio enzimático.
4. Ensaio biológico. 5. Produtos naturais. I. Título.


CDD: 547 (20^a)

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

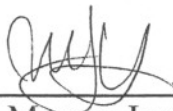
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Tatiane Regina Albarici** realizado em 17 de maio de 2006:*




Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



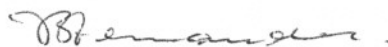
Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro



Prof. Dr. Massuo Jorge Kato



Profa. Dra. Ana Helena Januário



Prof. Dr. João Batista Fernandes

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Fátima e aos meus irmãos Fábio, Felipe e Viviane pelo carinho, apoio e incentivo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela orientação, amizade e ensinamentos.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar Dra Maria Fátima das G. Fernandes da Silva, demais Dr. João Batista Fernandes e Dr. Edson Rodrigues Filho pela colaboração e contribuição na minha formação.

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

Aos professores Dr. Otávio H. Thiemann e Dr. Glaucius Oliva do IFSC-USP pela realização dos ensaios enzimáticos.

Aos Prof. Dr. Sérgio Albuquerque da FCFRP-USP pela realização dos ensaios tripanocidas.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar, em especial para a Luciana e ao Paulo pela obtenção dos espectros de RMN.

A todos os meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais, onde nunca me faltou amizade, companhia, apoio e incentivo.

Aos amigos dos demais laboratórios do DQ-UFSCar pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da Química 98 pela amizade de sempre e companheirismo.

À minha família pelo incentivo constante.

À minha irmã Viviane pela amizade, conselhos e por me apoiar e incentivar sempre.

À FAPESP pela bolsa concedida.

Resumo

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *RAUIA* SP E *CONCHOCARPUS MACROPHYLLUS* (RUTACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS - Este trabalho envolveu estudo fitoquímico de plantas pertencentes à família Rutaceae. Foram testados 16 extratos de plantas pertencentes à família Rutaceae em ensaios sobre as enzimas GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* e sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi* quatro apresentaram atividades satisfatórias em pelo menos um dos ensaios a que foram submetidos. O extrato em éter de petróleo do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCE) e o extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFM) apresentaram 94% e 75% de lise parasitária frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) apresentou 74% de inibição frente à enzima GAPDH e o extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD) apresentou 77% de inibição sobre a enzima APRT. O extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) apresentou resultado próximo ao considerado satisfatório (67,9% de inibição) no ensaio sobre a enzima APRT. O estudo fitoquímico de *Rauia* sp resultou no isolamento de 30 substâncias. Destas, 4 são inéditas na literatura; as cumarinas 3-etilrauiarina e 5-metoxirauarina e os alcalóides 7-hidroxi-8-metoxi-*N*-metilflindersina e 8-hidroxi-*N*-metilflindersina, este último não foi ainda relatado como produto natural e 26 já foram descritas na literatura; as cumarinas murranganona, 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina, isomurranganona, murralongina, murrangatina, munomicrolina, acetato de murrangatina, rauarina, umbeliferona e isoescopoletina, os alcalóides *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona, mirtopsina, dictamina, γ -fagarina, esquimianina, Z-rhoifolinato de dimetila, zantobungeanina, zantodiolina e veprissina, as amidas paprazina e *N*-trans-feruloiltiramina, a flavona 3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi flavona, a lignana siringaresinol, o composto fenólico ácido vanílico e a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. O estudo de *Conchocarpus macrophyllus* resultou no isolamento de 4 substâncias, os alcalóides acridônicos arborinina e metilarborinina e a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Dentre as substâncias que tiveram o potencial biológico avaliado frente a um ou mais ensaios nenhuma apresentou resultado satisfatório.

Abstract

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *RAUIA* SP AND *CONCHOCARPUS MACROPHYLLUS* (RUTACEAE) AND EVALUATION OF ANTIPARASITIC ACTIVITY OF EXTRACTS AND ISOLATED SUBSTANCES– This work involved the study of plant extracts of the Rutaceae species. Among 16 extracts tested in assays carried out with *T. cruzi* gGAPDH and *L. tarentolae* APRT enzymes and trypomastigote forms of *T. cruzi*, four showed significant activities at least in one of them. The petroleum ether extract of stems of *Conchocarpus macrophyllus* (CMCF) and the methanolic extract of leaves of *Rauia* sp (RFM) showed 94% and 75% of parasitic lyses on trypomastigote forms of *T. cruzi*. The methanolic extract of leaves of *Rauia* sp1 (RF1M) showed 74% of inhibition of gGAPDH enzyme and the dichloromethane extract of stems of *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD) showed 74% of inhibition of APRT enzyme. The methanolic extract of leaves of *Rauia* sp1 (RF1M) showed 67,9% of inhibition on the APRT enzyme assay. The phytochemical study of *Rauia* sp allowed the isolation of 30 substances among them 4 are described for the first time, the coumarins 3-ethylrauiarin and 5-methoxyrauiarin and the alkaloids 7-hydroxy-8-methoxy-*N*-methylflindersine and 8-hydroxy-*N*-methylflindersine that is described as a natural product at first time. Among them 26 have already been described in the literature the coumarins murranganone, 7-methoxy-8-(2-acetyloxy-3-methyl-1-oxobut-2-enyl)-coumarin, isomurranganone, murralongin, murrangatin, munomicrolin, murrangatin diacetate, rauianin, umbeliferone e isoescopoletin, the alkaloids *N*-methyl-4-methoxy-2-quinolone, mirtopsine, dictamine, γ -fagarine, skimmianine, *Z*-dimethylrhoifolate, zantobungeanine, zantodioline and veprissine, the amides paprazine and *N-trans*-feruloyltyramine, the flavone 3,7,4'-trimethoxy-5-hydroxyflavone, the lignan siringaresinol, the fenolic compound vanilic acid and the steroids β -sitosterol and stigmasterol. The phytochemical study of *Conchocarpus macrophyllus* allowed the isolation of 4 substances the alkaloids arborinine and methylarborinine and the steroids β -sitosterol and stigmasterol. Among the substances tested in one or more assays none of them showed satisfactory results, leading to conclude that either the active compounds have not been isolated or their activity is related to the combination effects.

Abreviaturas e Símbolos

δ = deslocamento químico em partes por milhão

h= altura

ϕ = diâmetro

$[\alpha]_D$ = rotação ótica específica

AMP = adenosina monofosfato

APRT= enzima adenosina fosforribosiltransferase

CC = cromatografia de adsorção em coluna aberta

CEC = cromatografia de exclusão em coluna aberta

CCDP = cromatografia em camada delgada preparativa

CCDPR = cromatografia em camada delgada preparativa rotativa

CLAE = cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CCDA = cromatografia em camada delgada analítica

$CDCl_3$ = clorofórmio deuterado

CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

DMSO = dimetilsulfóxido

D_2O = água deuterada

DEPT= *distortionless enhancement by polarization transfer*

gGAPDH = Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase

HMBC = *heteronuclear multiple quantum correlation*

HSQC = *heteronuclear single quantum correlation*

Hz = hertz

J = constante de acoplamento

MeOD = metanol deuterado

m/z = relação massa carga

NAD^+ = nicotinamida adenina dinucleotídeo

PNP = purina nucleosídeo fosforilase

RMN= ressonância magnética nuclear

RMN 1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

Tio- NAD^+ = tionicotinamida adenina dinucleotídeo

UV= ultravioleta

Lista de Tabelas

TABELA 5.1-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murranganona	59
TABELA 5.2-Dados de RMN ^1H e de ^{13}C da 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina.	65
TABELA 5.3-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da isomurranganona	73
TABELA 5.4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murralongina.	79
TABELA 5.5-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murrangatina.	82
TABELA 5.6-Dados de RMN de ^1H munomicrolina	84
TABELA 5.7-Dados de RMN ^1H do acetato de murrangatina	86
TABELA 5.8-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da rauianina.	89
TABELA 5.9- Dados RMN ^1H e RMN ^{13}C da rauianina e da 3-etilrauianina	95
TABELA 5.10-Dados de RMN de ^1H da rauianina e da 5-metoxirauianina	97
TABELA 5.11-Dados de RMN ^1H da umbeliferona.	98
TABELA 5.12-Dados de RMN ^1H da isoescopoletina.	100
TABELA 5.13 - Dados de RMN de ^1H da <i>N</i> -metil 4-metoxi-2 quinolona.	106
TABELA 5.14- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da mirtopsina.	112
TABELA 5.15 - Dados de RMN de ^1H da dictamina	113
TABELA 5.16 - Dados de RMN de ^1H da γ -fagarina.	115
TABELA 5.17 - Dados de RMN de ^1H da esquimianina	117
TABELA 5.18 - Dados de RMN de ^1H do Z-rhoifolinato de dimetila	118
TABELA 5.19 - Dados de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 19 e da 8-metoxiflindersina (19^a)	121
TABELA 5.20 - Dados de RMN de ^1H da zantobungeanina.	123
TABELA 5.21-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da zantodiolina	128
TABELA 5.22 - Dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C da 7-hidroxi-8-hidroxi- <i>N</i> -metilflindersina	134
TABELA 5.23 - Dados de RMN de ^1H da veprissina	136
TABELA 5.24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância arborinina	139
TABELA 5.25 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância metilarborinina.	141
TABELA 5.26-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da paprazina	147
TABELA 5.27-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da <i>N-trans</i> -feruloiltiramina	149
TABELA 5.28-Dados de RMN ^1H da 5-hidroxi-3,7,4'-trimetioxiflavona	152
TABELA 5.29-Dados de RMN ^1H e de ^{13}C do siringaresinol	154

TABELA 5.30-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido vanílico	157
TABELA 6.1- Códigos dos extratos	161
TABELA 6.2- Resultados dos testes sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	166
TABELA 6.3- Resultados de inibição da atividade da enzima gGAPDH	168
TABELA 6.4- Resultados de inibição da atividade de APRT	169
TABELA 6.5- Resultados de inibição da atividade de PNP	170

Lista de Figuras

FIGURA 1.1- metabolismo do glicerol no glicosomo	8
FIGURA 1.2- Via de recuperação de purinas em células de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> .	12
FIGURA 1.3- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Rauia resinosa</i>	15
FIGURA 1.4- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Rauia resinosa</i>	16
FIGURA 1.5- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus cuneifolius</i>	17
FIGURA 1.6- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus inopinatus</i>	17
FIGURA 1.7- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus longifolius</i>	18
FIGURA 1.8- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus macrocarpus</i> .	19
FIGURA 1.9- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus heterophyllum</i>	19
FIGURA 1.10- Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Conchocarpus gaudichaudianus</i> .	20
FIGURA 5.1-Região aromática do espectro de RMN ^1H de cumarinas substituídas na posição 8.	55
FIGURA 5.2- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do murranganona.	57
FIGURA 5.3.- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$) do murranganona.	58
FIGURA 5.4-Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do murranganona	58
FIGURA 5.5-Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 2 .	60
FIGURA 5.6-Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 2 .	60
FIGURA 5.7-Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 2	61
FIGURA 5.8- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 2 .	62
FIGURA 5.9- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 2 .	63
FIGURA 5.10- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 2 .	64
FIGURA 5.11-Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 3 .	66
FIGURA 5.12-Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 3 .	67
FIGURA 5.13-	68
FIGURA 5.14- Mapa de contorno de HMBC da substância 3	69
FIGURA 5.15- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 3 .	70
FIGURA 5.16- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 3 .	71

FIGURA 5.17-espectro de massas da substância 3 .	72
FIGURA 5.18-Proposta de fragmentação para a substância 3 .	72
FIGURA 5.19- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	74
FIGURA 5.20- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	74
FIGURA 5.21- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	75
FIGURA 5.22- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	76
FIGURA 5.23- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	77
FIGURA 5.24- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	78
FIGURA 5.25- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 4 .	78
FIGURA 5.26- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da murrangatina.	81
FIGURA 5.27- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da murrangatina.	81
FIGURA 5.28- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da munomicrolina.	84
FIGURA 5.29-Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do acetato de murrangatina.	86
FIGURA 5.30- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da rauianina.	88
FIGURA 5.31- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da rauianina	88
FIGURA 5.32- Espectro de DEPT 135 da rauianina	89
FIGURA 5.33- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 9 .	90
FIGURA 5.34- Espectro de RMN ^1H (50 MHz, CDCl_3) da substância 9 .	91
FIGURA 5.35- Mapa de contorno de HSQC da substância 9 .	92
FIGURA 5.36- Mapa de contorno de HMBC da substância 9 .	93
FIGURA 5.37- Espectro de massas de alta resolução da substância 9 .	94
FIGURA 5.38- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 10	96
FIGURA 5.39- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da umbeliferona.	98
FIGURA 5.40- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 12 .	99
FIGURA 5.41- Espectro de massas da isoescopoletina.	100
FIGURA 5.42- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da <i>N</i> -metil 4-metoxi-2 quinolona.	105
FIGURA 5.43- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da <i>N</i> -metil 4-metoxi-2 quinolona.	106
FIGURA 5.44- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas de MeOD) da substância 14 .	107

FIGURA 5.45- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ +gotas de MeOD) da substância 14	108
FIGURA 5.46- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl ₃ +gotas de MeOD) da substância 14 .	109
FIGURA 5.47- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl ₃ +gotas de MeOD) da substância 14 .	110
FIGURA 5.48- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl ₃ +gotas de MeOD) da substância 14 .	111
FIGURA 5.49- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da dictamina.	113
FIGURA 5.50- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da γ -fagarina.	115
FIGURA 5.51- Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da esquimianina	116
FIGURA 5.52- Espectro de RMN de ¹ H Z-rhoifolato de dimetila	118
FIGURA 5.53- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da 8-hidroxi- <i>N</i> -metil flindersina	119
FIGURA 5.54- Espectro de massas de alta resolução da 8-hidroxi- <i>N</i> -metil flindersina	120
FIGURA 5.55- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da 8-hidroxi- <i>N</i> -metil flindersina	120
FIGURA 5.56- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da zantobumgeanina.	122
FIGURA 5.57- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 21 .	124
FIGURA 5.58.- Espectro de RMN ¹ H (100 MHz, CDCl ₃) da substância 21 .	125
FIGURA 5.59- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl ₃) da substância 21	126
FIGURA 5.60- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl ₃) da substância 21	127
FIGURA 5.61- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 22 .	129
FIGURA 5.62- Espectro de massas de alta resolução da substância 22 .	130
FIGURA 5.63- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 22	130
FIGURA 5.64- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl ₃) da substância 22	131
FIGURA 5.65- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl ₃) da substância 22	132
FIGURA 5.66- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl ₃) da substância 22 .	133
FIGURA 5.67- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 23 .	135
FIGURA 5.68- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) substância 24 .	137
FIGURA 5.69- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 24 .	138
FIGURA 5.70- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da metilarborinina	140
FIGURA 5.71- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, (CD ₃) ₂ CO) substância 26	145

FIGURA 5.72.- Espectro de RMN ^1H (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) substância 26 .	146
FIGURA 5.73- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância 27 .	148
FIGURA 5.74.-Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância 27 .	148
FIGURA 5.75- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 28 .	151
FIGURA 5.76- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) substância 29	153
FIGURA 5.77- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) substância 29 .	154
FIGURA 5.78- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) substância 30 .	156
FIGURA 5.79- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 30	156
FIGURA 5.80- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 31 e 32	158
FIGURA 5.81- Espectro de massas do β -sitosterol	158
FIGURA 5.82- Espectro de massas do estigmasterol	159

Lista de Esquemas

ESQUEMA 3.1- Particionamento do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp.	26
ESQUEMA 3.2- Fracionamento da fração hexânica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp (RCMH)	27
ESQUEMA 3.3- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp (RCMD)	28
ESQUEMA 3.4- Fracionamento da fração RCMD2	29
ESQUEMA 3.5- Fracionamento da fração RCMD3	30
ESQUEMA 3.6- Fracionamento da fração RCMD4	31
ESQUEMA 3.7- Fracionamento da fração RCMD6	32
ESQUEMA 3.8- Particionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp1	33
ESQUEMA 3.9- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp (RF1MD)	34
ESQUEMA 3.10- Fracionamento das frações RF1MD 2, RF1MD 3, RF1MD 4 e RF1MD 5	34
ESQUEMA 3.11- Fracionamento das frações RF1MD 6, RF1MD 7, RF1MD 8 e RF1MD 9	35
ESQUEMA 3.12- Particionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp.	36
ESQUEMA 3.13- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp (RFMD).	37
ESQUEMA 3.14- Fracionamento do extrato diclorometânico do caule da <i>Conchocarpus macrophyllus</i>	38
ESQUEMA 5.1- Proposta biogenética para as substâncias 11 e 12	101
ESQUEMA 5.2- Proposta biogenética para as substâncias 1 , 2 e 3	102
ESQUEMA 5.3- Proposta biogenética para as substâncias 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 e 10 .	103
ESQUEMA 5.4- Proposta biogenética para as substâncias 13 , 14 , 15 , 16 , 17 e 18 .	143
ESQUEMA 5.5- Proposta biogenética para as substâncias 19 , 20 , 21 , 22 e 23 .	144
ESQUEMA 5.6- Proposta biogenética para as substâncias 24 e 25 .	144

Lista de gráficos

GRÁFICO 6.1- Resultados dos testes “ <i>in vitro</i> ” sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	162
GRÁFICO 6.2- Resultados de inibição da atividade da enzima gGAPDH	163
GRAFICO 6.3- Resultados de inibição da atividade de APRT para extratos.	164
GRAFICO 6.4- Resultados de inibição da atividade de APRT para frações	165

Sumário

1- Introdução	1
1.1-Produtos Naturais na Produção de Fármacos	1
1.2- A doença de Chagas	4
1.2.1-Fases da Doença	5
1.2.2-Fármacos Utilizados no Controle da Doença	5
1.2.3- Método para busca de compostos antichagásicos	7
1.3- Leishmaniose	9
1.3.1-Fármacos utilizados no controle da doença	10
1.3.2- Método para busca de compostos antileishmaniose	12
1.4-A Família Rutaceae	13
1.4.1- Características químicas e biológicas da família Rutaceae	13
1.4.2- O gênero <i>Rauia</i>	14
1.4.3- O gênero <i>Conchocarpus</i>	16
2- Objetivos	21
3- Procedimento Experimental	23
3.1- Materiais e Métodos	23
3.2- Equipamentos	24
3.3 Material botânico	25
3.3.1- Obtenção dos extratos	25
3.3.1.1- Particionamento dos extratos brutos	25
3.3.1.2- Estudo fitoquímico do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp	26
3.3.1.2.1- Estudo fitoquímico da fração hexânica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp	26
3.3.1.2.2- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de <i>Rauia</i> sp	27
3.3.1.3- Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp1	32
3.3.1.3.1- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do das folhas de <i>Rauia</i> sp1	33
3.3.1.4- Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de <i>Rauia</i> sp	36
3.3.1.4.1- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do das folhas de <i>Rauia</i> sp	37
3.3.1.5- Estudo fitoquímico do extrato diclorometano do caule da <i>Conchocarpus macrophyllus</i> .	38
3.4- Ensaio Biológicos	39
3.4.1- Ensaio tripanocida “ <i>in vitro</i> ” sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	39

3.4.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>	39
3.4.3- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> (novo protocolo)	41
3.4.4- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> (utilizando Tio-NAD como cofator)	41
3.4.5- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de <i>Leishmania tarentolae</i>	42
4- Substâncias Isoladas	45
5- Determinação estrutural	55
5.1- Cumarinas	55
5.1.1-Determinação Estrutural da Substância 1	56
5.1.2-Determinação Estrutural da Substância 2	59
5.1.3- Determinação Estrutural da Substância 3	66
5.1.4- Determinação Estrutural da Sustância 4	73
5.1.5-Determinação Estrutural da Substância 5	80
5.1.6-Determinação Estrutural da Substância 6	83
5.1.7-Determinação Estrutural da Substância 7	85
5.1.8-Determinação Estrutural da Substância 8	87
5.1.9- Determinação Estrutural da Substância 9	90
5.1.10- Determinação Estrutural da Substância 10	95
5.1.11-Determinação Estrutural da Substância 11	97
5.1.12-Determinação Estrutural da Substância 12	98
5.1.13-Biogênese das cumarinas	100
5.2 - Alcalóides	104
5.2.1-Determinação Estrutural da Substância 13	104
5.2.2-Determinação Estrutural da Substância 14	107
5.2.3-Determinação Estrutural da Substância 15	112
5.2.4-Determinação Estrutural da Substância 16	114
5.2.5-Determinação Estrutural da Substância 17	115
5.2.6-Determinação Estrutural da Substância 18	117
5.2.7- Determinação Estrutural da Substância 19	119
5.2.8- Determinação Estrutural da Substância 20	122
5.2.9- Determinação Estrutural da Substância 21	124
5.2.10- Determinação Estrutural da Substância 22	129
5.2.11- Determinação Estrutural da Substância 23	135
5.2.12- Determinação Estrutural da Substância 24	136

5.2.13- Determinação Estrutural da Substância 25	140
5.2.14- A biogênese dos alcalóides	142
5.3- Amidas	145
5.3.1- Determinação Estrutural da Substância 26	145
5.3.2- Determinação Estrutural da Substância 27	147
5.4- Flavonóide	150
5.4.1- Determinação Estrutural da Substância 28	150
5.5- Lignana	152
5.5.1- Determinação Estrutural da Substância 29	152
5.6- Composto fenólico	155
5.6.1- Determinação Estrutural da Substância 30	155
5.6- Esteróides	157
5.6.1- Determinação Estrutural da Substância 31 e 32	157
6- Atividades Biológicas	161
6.1- Atividades Biológicas dos Extratos Brutos	161
6.1.1- Ensaio tripanocida “ <i>in vitro</i> ” sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	162
6.1.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>	161
6.1.3- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de <i>Leishmania tarentolae</i>	164
6.2- Atividades Biológicas das Frações do extrato diclorometânico do caule de <i>Conchocarpus macrophyllus</i>	164
6.3- Atividades Biológicas das Substâncias puras	165
6.3.1- Ensaio tripanocida “ <i>in vitro</i> ” sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	165
6.3.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>	167
6.3.3- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de <i>Leishmania tarentolae</i>	169
6.3.4- Ensaio de inibição da atividade da enzima PNP purina nucleosídeo fosforilase de <i>Schistosoma mansoni</i>	170
7- Conclusões	173
8- Referências Bibliográficas	175

1- Introdução

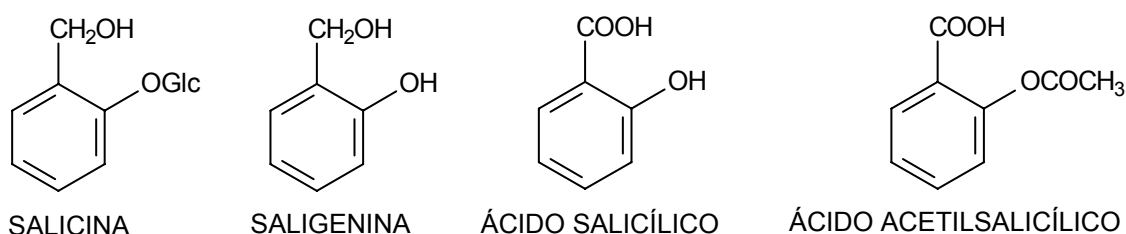
1.1-Produtos Naturais na Produção de Fármacos

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana (RATES, 2001). Uma estreita relação entre o homem e as plantas consideradas curativas sempre existiu em todas as fases de desenvolvimento das várias civilizações (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993).

Os produtos naturais fornecem medicamentos úteis cuja produção na forma sintética é difícil ou muitas vezes inviável economicamente. De fontes naturais também podem ser retirados compostos básicos que modificados tornam-se mais eficazes ou menos tóxicos (ROBBERS *et al.*, 1997).

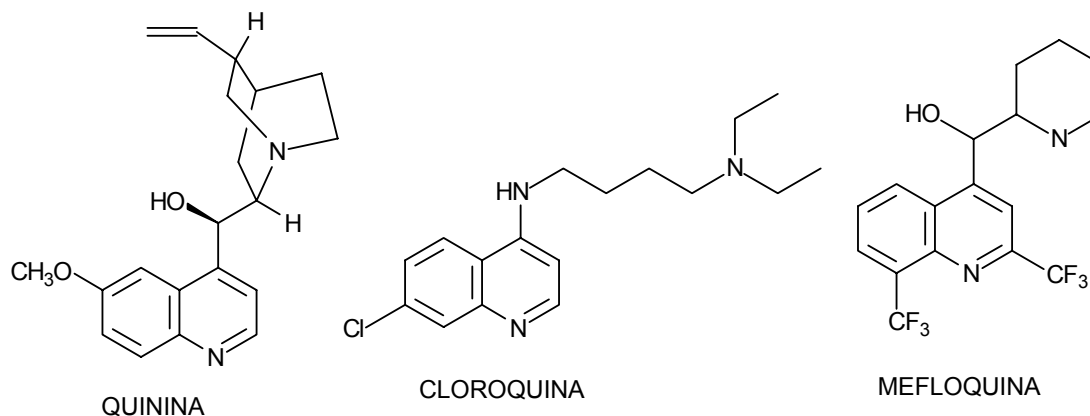
A procura de fármacos através de “screening” de uma grande variedade de vegetais para testes biológicos específicos é uma das formas racionais adotadas para a procura de fármacos de origem vegetal. A busca de substâncias que possam se tornar um fármaco em fontes vegetais difere dos meios sintéticos principalmente pela diversidade molecular e pela funcionalidade biológica (NISBET & MOORE, 1997).

A aspirina ou ácido acetilsalicílico tem sua origem relacionada aos produtos naturais. A salicina e saligenina, derivados do ácido salicílico, isoladas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria* apresentam propriedades antiinflamatórias e analgésicas reconhecidas e deram origem a aspirina. O ácido acetilsalicílico porém, não é encontrado tal qual nessas plantas, trata-se de uma modificação estrutural (HOSTETTMANN *et al.*, 2003; ROBBERS *et al.*, 1997).

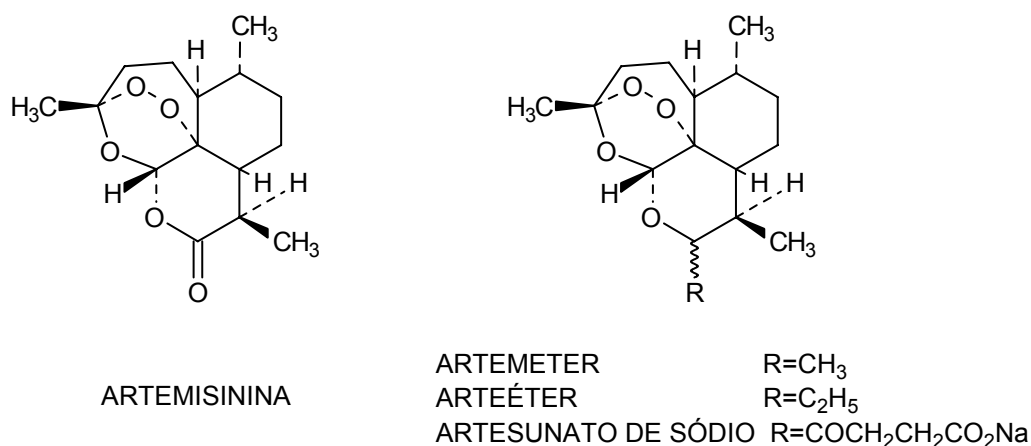


As cascas de algumas espécies de *Cinchona* spp eram utilizadas como antitérmicos. Destas espécies de plantas foi isolada a quinina, um alcalóide utilizado durante muito tempo como antimalárico e que serviu como protótipo para a

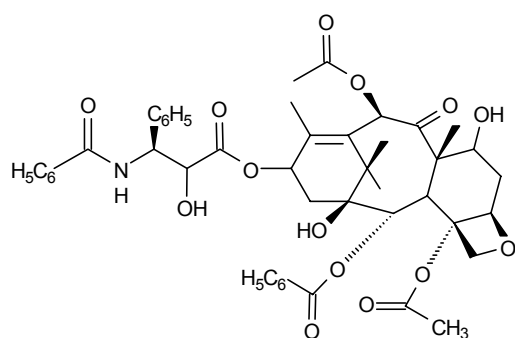
descoberta de derivados antimalariais como a cloroquina e a mefloquina (BARREIRO & FRAGA, 2001).



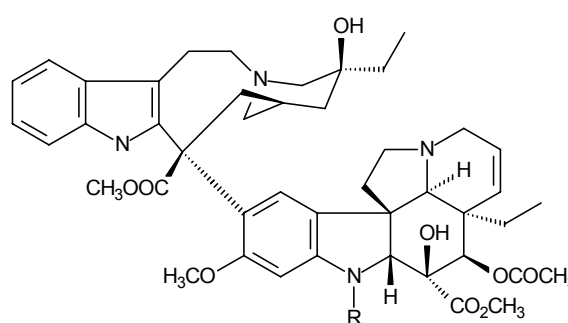
A artemisinina, isolada de *Artemisia annua*, planta utilizada há mais de 2000 anos na China como antipirético e no tratamento de malária, é outro exemplo de composto protótipo natural para antimaláricos. Esse sesquiterpeno apresenta propriedades farmacocinéticas inadequadas ao uso terapêutico e baixa solubilidade motivando a modificação estrutural dessa substância. Dentre os derivados sintetizados o artemeter, arteéter e artesunato de sódio foram aprovados como antimaláricos em vários países (BARREIRO e FRAGA, 2001 e HOSTETTMANN *et al.*, 2003).



Exemplos importantes de fármacos obtidos de plantas são os alcalóides bisindólicos vinblastina e vincristina isolados de *Catharantus roseus* (Apocynaceae) que são utilizados no tratamento de leucemia e o paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia* utilizado no tratamento de câncer de mama e de pulmão (BARREIRO e FRAGA, 2001 e HOSTETTMANN *et al.*, 2003).



TAXOL

R=CH₃ VINBLASTINA
R=CHO VINCRISTINA

Apesar da competição com outros métodos de descoberta de fármacos, produtos naturais ainda fornecem sua considerável contribuição em candidatos a testes clínicos e fármacos (Buttler, 2004).

Aproximadamente 25% dos fármacos prescritos mundialmente são provenientes de plantas. Dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde 11% são de origem vegetal e um número significativo são substâncias sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

Além disso, 119 compostos de origem natural obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas podem ser considerados fármacos importantes e são utilizados na terapia moderna e 74% destes compostos são derivados de plantas (CRAGG *et al.*, 1997).

Estima-se que existam entre 215.000 e 500.000 espécies de angiospermas no mundo. No entanto apenas 15 a 17% de todas as espécies de angiospermas tiveram seu potencial terapêutico estudado em algum alvo de interesse (RATES, 2001; SOEJARTO, 1996).

O Brasil está entre os 12 países com maior biodiversidade. A variedade de espécies de plantas é impressionante e o Brasil é particularmente rico em plantas medicinais. Aproximadamente 22% de todas as angiospermas estão distribuídas na Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado. A exploração racional e a conservação da diversidade biológica é uma questão de prioridade e urgência (BOLZANI *et al.*, 1999).

1.2- A Doença de Chagas

A Doença de Chagas também denominada tripanosomíase americana, foi descrita por CHAGAS (1909), o qual descreveu a infecção humana, a morfologia do parasita na corrente sanguínea, o ciclo do parasita no trato digestivo do vetor a transmissão dos parasitas flagelados que ocorre dos triatomíneos para os vertebrados (WENDEL *et al.*, 1992).

A Organização Mundial da Saúde estima que existam 16 – 18 milhões de pessoas infectadas pela Doença de Chagas, distribuídas entre o México, América Central e América do Sul e que aproximadamente 120 milhões de pessoas vivem em áreas de risco (WHO, 2001).

O agente causador da Doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário da família Trypanosomatidae e da ordem Kinetoplastida, para o qual o ciclo de vida envolve obrigatoriamente a passagem por hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma série de estágios. Ele apresenta-se sob forma flagelada (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota) dependendo do hospedeiro (VERONESSI, 1991; COURA & CASTRO, 2002).

Nos mamíferos as formas amastigotas encontram-se nos tecidos e são capazes de se multiplicar e posteriormente são liberadas no sistema sanguíneo na forma tripomastigota. A forma tripomastigota pode infectar novas células hospedeiras ou ser ingerida por insetos vetores. Quando ingerida pelos insetos vetores, estas formas podem se diferenciar na forma epimastigota, que se multiplica no invertebrado e quando atinge o intestino do inseto se desenvolve em formas tripomastigotas metacíclicas. Quando o inseto suga o sangue do mamífero, ele deposita suas fezes que contém a forma tripomastigota metacíclica que, ao cair no sistema sanguíneo do mamífero invade células hospedeiras na forma amastigota, dando continuidade ao ciclo (COURA & CASTRO, 2002; SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996; GARCIA, 1999).

O transmissor da Doença de Chagas é um inseto da ordem *Hemiptera*, família Reduviidae, subfamília Triatominae geralmente denominado triatomídeo e popularmente conhecido como barbeiro (VERONESSI, 1991).

Com o controle do inseto vetor, alguns países já se declararam livres do vetor da doença (WHO, 2001). É um erro, entretanto, afirmar que a Doença de Chagas está controlada, já que ainda existem focos de transmissão em muitas áreas.

Mesmo em áreas onde foi declarada que a transmissão é nula, há um risco de reincidência dos focos de transmissão devido a diminuição prematura das inspeções epidemiológicas e atividades de vigilância (DIAS *et al.*, 2002).

Além da principal forma de contaminação através do vetor que é responsável por 80% da transmissão, há também a contaminação através da transfusão de sangue contaminado que é responsável por 15% das infecções e por transplante de órgãos. Também podem ocorrer transmissão congênita (5000 novos casos por ano) e via oral através da ingestão de alimentos contaminados (DIAS & SCHOFIELD, 1999 e VERONESSI, 1991). Esta última forma de contaminação é rara, porém, no início de 2005 foi constatada a contaminação através do consumo de caldo de cana em Santa Catarina. Episódios como esse já haviam sido registrados na Amazônia Oriental Brasileira, em Teutônia (Rio Grande do Sul) e em Catolé do Rocha (Paraíba) (Ministério da Saúde, 2005).

1.2.1-Fases da Doença

Quando o indivíduo é infectado ocorre um período de incubação de no mínimo quatro dias e em seguida tem início a fase aguda da doença que raramente é fatal (taxa de mortalidade de 2 a 8%). O parasita invade diferentes células hospedeiras que se rompem, causando uma inflamação nos tecidos, o fígado e o baço apresentam aumento de volume, o coração sofre dilatação global (COURA & CASTRO, 2002; VERONESSI, 1991).

Após a fase aguda ocorre uma forte tendência de imunidade, mas o indivíduo permanece infectado. Posteriormente tem início a fase crônica onde, a maioria dos pacientes desenvolve distúrbios cardíacos, neurológicos e digestivos. (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996; COURA & CASTRO, 2002).

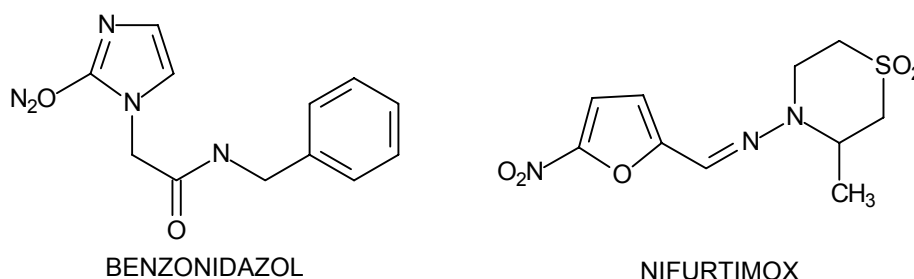
1.2.2-Fármacos Utilizados no Controle da Doença

O Nifurtimox® e o Benzonidazol® são utilizados no tratamento dos pacientes e são capazes de curar 50% das infecções recentes. (WHO, 2002). Porém desde os anos 80 o Nifurtimox teve sua comercialização descontinuada no Brasil, pois ele age via redução do grupo nitro a um radical nitroânion instável que por sua vez reage com oxigênio gerando intermediários altamente reativos. O *T. cruzi* é deficiente na

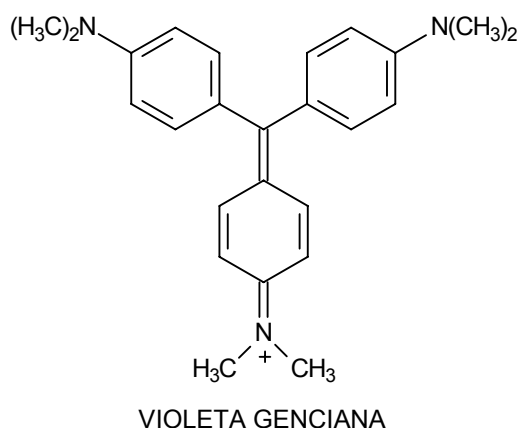
detoxificação de radicais livres, portanto, é suscetível ao ataque destes intermediários. Porém estes intermediários reativos também podem reagir no organismo do hospedeiro causando danos oxidativos (COURA & CASTRO, 2002 e URBINA & DOCAMPO, 2003).

O mecanismo de ação do Benzonidazol parece estar relacionado com a ação em uma via que envolve a ligação covalente de intermediários nitroreduzidos e as macromoléculas do parasita (URBINA & DOCAMPO, 2003).

Tanto o Nifurtimox quanto o Benzonidazol são ineficientes na fase crônica da doença e não produzem a cura parasitológica (DOCAMPO & SCHMUÑIS, 1997). Além disso, ambos produzem efeitos colaterais similares nos pacientes, como febre e alterações neurológicas. Com o Nifurtimox, anorexia, náusea, vômito e perda de peso são mais freqüentes, enquanto reações na pele são mais freqüentes com o Benzonidazol (LUQUETTI *et al.*, 1997; RIVAS *et al.*, 1999).



Para a esterilização do sangue em bancos de sangue a violeta genciana é a única substância utilizada, porém alguns efeitos inconvenientes foram observados: a violeta genciana deve ser adicionada ao sangue 24 horas antes da utilização do mesmo impossibilitando as transfusões emergenciais e o sangue adquire coloração azulada que posteriormente é observada no tecido do transfundido (DIAS & SCHOFIELD, 1999).



Com a ineficácia das substâncias tanto para tratamento de doentes quanto para esterilização do sangue, é necessária a busca de novas substâncias para estes fins. Vários metabolitos de plantas vêm sendo testados contra o *T. cruzi* (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996).

1.2.3- Método para busca de compostos antichagásicos

Uma linha de pesquisa promissora é a busca de compostos que inibam o ciclo biológico do parasita. Deste modo, as enzimas que atuam no metabolismo do parasita são alvos interessantes. OPPERDOES e BORST em 1977 constataram que as formas tripomastigotas (formas presentes na corrente sanguínea do mamífero hospedeiro) de parasitas da família Tripanomastidae possuem uma organela denominada glicosomo onde se encontram nove enzimas envolvidas na glicólise. Sabe-se que o parasita é altamente dependente da glicólise para a formação de ATP (HAMMOND *et al.*, 1985; SOUZA *et al.*, 1998). Já que o parasita é altamente dependente da via glicolítica como fonte de energia, as enzimas envolvidas nesta via são alvos interessantes na busca de compostos que inibam o ciclo biológico do parasita (BAKKER *et al.*, 2000).

Este interesse pelas enzimas da via glicolítica levou à determinação estrutural das enzimas triosefosfato isomerase (TIM) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (WIRENGA *et al.*, 1991; VELLIEUX *et al.*, 1993).

A comparação entre a enzima GAPDH de *T. cruzi* e a GAPDH humana mostrou diferenças significativas em resíduos nos sítios ativos (SOUZA *et al.*, 1998). Além disso, experimentos de inibição da glicólise em eritrócitos humanos mostraram que a inibição da enzima GAPDH em até 95% não leva a sintomas clínicos. Estes fatos sugerem o uso da GAPDH de *T. cruzi* como alvo (BAKKER *et al.*, 1999).

A GAPDH catalisa a reação de fosforilação do gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato.

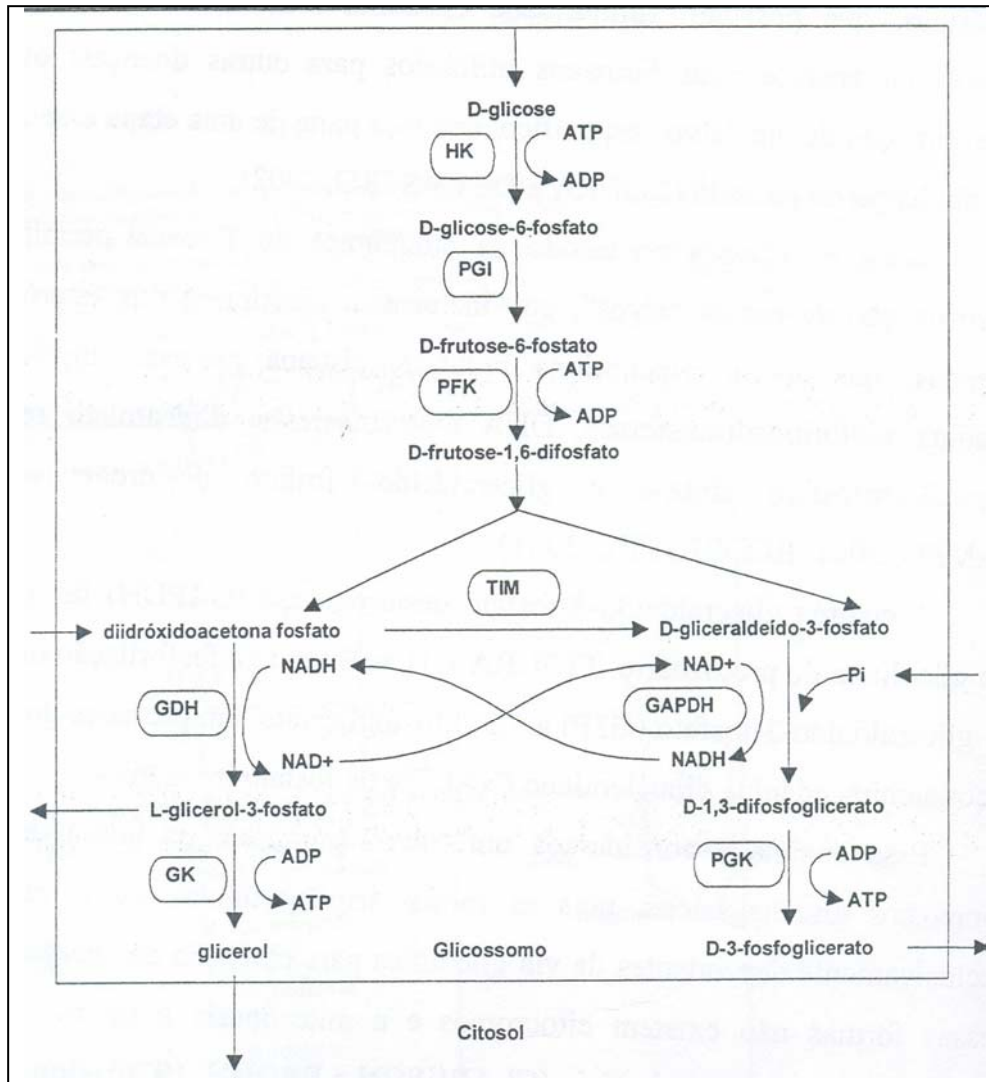


FIGURA 1.1- Metabolismo do glicérol no glicossomo.

* os compostos permeáveis a membrana são mostrados com setas

** HK= hexoquinase; PGI= fosfoglicose isomerase; PFK= 6-fosfofrutoquinase; ALDO= frutosebifosfato aldolase; GDH= glicérol 3-fosfato desidrogenase; GK= glicérol quinase; TIM= triose fosfato isomerase; GAPDH= gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PGK= 3-fosfoglicérolato quinase.

1.3- Leishmaniose

As diferentes formas clínicas de *Leishmania* constituem um grave problema de saúde pública. Leishmaniose é uma doença que afeta 88 países, 90% da leishmaniose visceral ocorre em cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. A incidência anual estimada é de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral. Estima-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (WHO 2001).

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão se dá por insetos hematófagos, denominados flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito palha (BARATA *et al*, 2000).

Durante o ciclo biológico o parasita do gênero *Leishmania* existe em duas formas que se desenvolvem em diferentes hospedeiros: uma forma flagelada extracelular conhecida como promastigota e uma forma intracelular denominada amastigota. A forma que infecta o homem e outros hospedeiros vertebrados é a promastigota, que se encontra no trato digestivo do inseto transmissor da doença. A forma amastigota está localizada no macrófago do hospedeiro. O hospedeiro intermediário é infectado, através da picada do inseto, com a forma promastigota. Posteriormente estas formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro e no interior dos macrófagos mudam para a forma amastigota. A manifestação clínica da doença é resultado da multiplicação das formas amastigotas dentro dos macrófagos (CHAN-BACAB E PEÑHA-RODRIGEZ, 2001).

Segundo a Organização Mundial da saúde, a Leishmaniose pode ser classificada em quatro formas clínicas: leishmaniose visceral ou calazar; leishmaniose cutâneo-mucosa ou leishmaniose tegumentar americana; leishmaniose cutâneo difusa e leishmaniose cutânea ou botão do Oriente (WHO 2001).

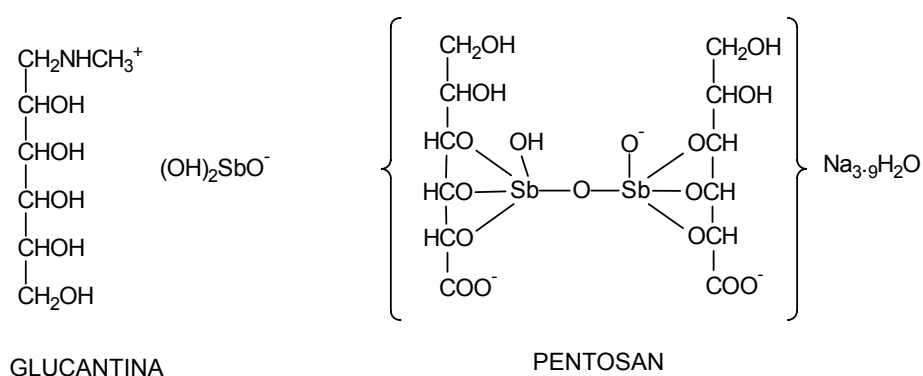
A leishmaniose visceral ou calazar é a forma clínica mais grave da doença (CHAN-BACAB e PEÑHA-RODRIGUEZ, 2001). Este tipo de Leishmaniose é causado pelo protozoário *Leishmania donovani* e pode ser fatal se não tratada. É caracterizada pelos seus efeitos nos órgãos internos, como o fígado, baço e medula óssea. Os sintomas mais frequentes são: anemia, febre constante, perturbações

digestivas, tosse, dores lombares, cefaléia, edemas nos membros e nas faces e hemorragias (VERONESSI 1991).

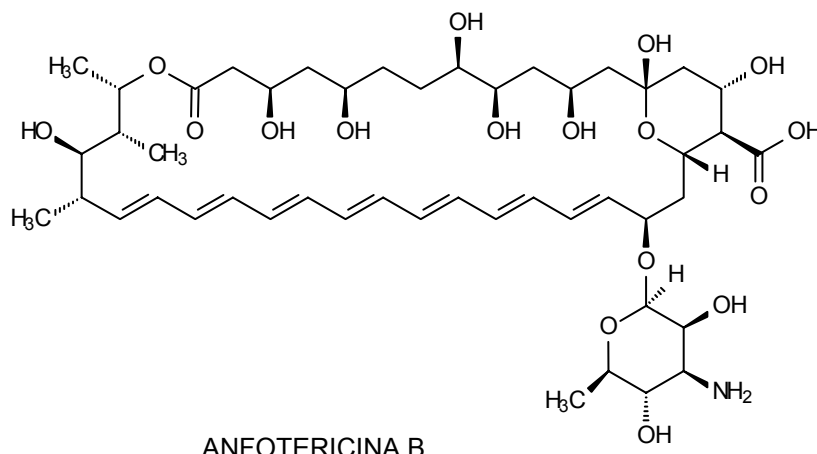
A leishmaniose cutâneo-mucosa, também conhecida como úlcera de Bauru, é uma doença crônica que acomete pele e mucosas, causada pelo protozoário *Leishmania brasiliensis*. Esta doença geralmente resulta em desfiguração facial devido às lesões que ocorrem principalmente no nariz e na boca. A leishmaniose cutâneo difusa caracteriza-se pela presença de nódulos isolados ou agrupados, múltiplas protuberâncias, placas ou alguns casos de lesões verrucosas especialmente na face e na superfície externa dos braços e pernas. A doença é transmitida pelo protozoário *Leishmania mexicana*. A leishmaniose cutânea é causada pelo protozoário *Leishmania tropica* e é a forma menos grave da doença, é geralmente curada espontaneamente (VERONESSI, 1991; CHAN-BACAB e PEÑHA-RODRIGUEZ, 2001).

1.3.1-Fármacos utilizados no controle da doença

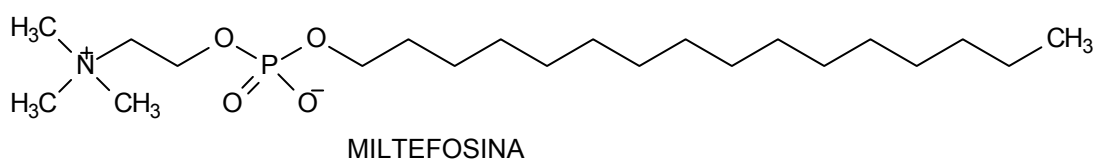
Os principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea são antimoniais como o Pentozan e Glucantina. O mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência no processo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo particularmente as enzimas na glicolise e oxidação de ácidos graxos, reduzindo a geração de ATP e GTP. Entretanto, este tipo de medicamento pode causar efeitos colaterais como problemas gastrointestinais, enrijecimento das juntas e em alguns casos insuficiência renal e hepática. Além disso, é comum o aparecimento de resistência a este tipo de medicamento, o tratamento é longo e tem um alto custo (CHAN-BACAB e PEÑHA-RODRIGUEZ, 2001; KAMINSKY, 2002; GARNIER & CROFT, 2002).



O antibiótico anfotericina B é utilizado no tratamento de Leishmaniose visceral nos casos de resistência aos antimoniais. Seu mecanismo de ação consiste em ligar-se à fração ergosterol da membrana celular do parasita, aumentando sua permeabilidade. Entretanto este fármaco tem seu uso limitado, pois além de 80% dos usuários desenvolverem alterações na função renal, ele depende de administração parenteral (CHAN-BACAB e PENHA-RODRIGUEZ, 2001; BARATA *et al.*, 2000).



A miltefosina, que é um derivado de fosfolípídeo que foi desenvolvido para o tratamento de câncer, se mostrou eficiente em ensaios sobre leishmaniose e está em fase de testes clínicos onde 95% dos pacientes com leishmaniose visceral foram curados na fase III de triagem, na Índia. A vantagem da miltefosina é que ela é um fármaco de administração oral e apresenta a mesma eficácia dos antimoniais. Porém, efeitos colaterais foram observados em 62% dos pacientes. Os efeitos colaterais mais comuns são gastrointestinais, principalmente vômito e diarreia. A miltefosina não pode ser administrada em mulheres grávidas e doses maiores que as doses recomendadas podem levar a morte. Não foi observado o mesmo potencial para o tratamento de leishmaniose cutânea (GARNIER & CRAFT, 2002; KAMINSKY 2002).



1.3.2- Método para busca de compostos antileishmaniose

Um alvo potencial na busca de compostos capazes de interromper o ciclo biológico do parasita no ser humano é a via de obtenção de purino nucleotídeos. A via das bases nitrogenadas purínicas é indispensável para a formação do Ácido desoxirribonucléico (DNA) como também do ácido ribonucléico (RNA). Estas reações são catalisadas por enzimas conhecidas como PRTases (SILVA *et al.*, 2004; Craig III & EAKIN, 1997).

Na maioria dos organismos as purinas e pirimidinas podem ser sintetizadas por duas vias. A primeira envolve dez reações enzimáticas seqüenciais levando à “síntese de novo” dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos a partir de precursores monocleotídicos. A segunda cadeia metabólica, “via de recuperação”, se utiliza dos purinos-nucleotídeos formados (adenina, guanina e/ou hipoxantina) derivados da degradação de ácidos nucleicos ou nucleotídeos livres. Já a sobrevivência do protozoário depende exclusivamente da recuperação de purinas provenientes do hospedeiro (FIGURA 1.2) (SILVA *et al.*, 2004; Craig III & EAKIN, 1997).

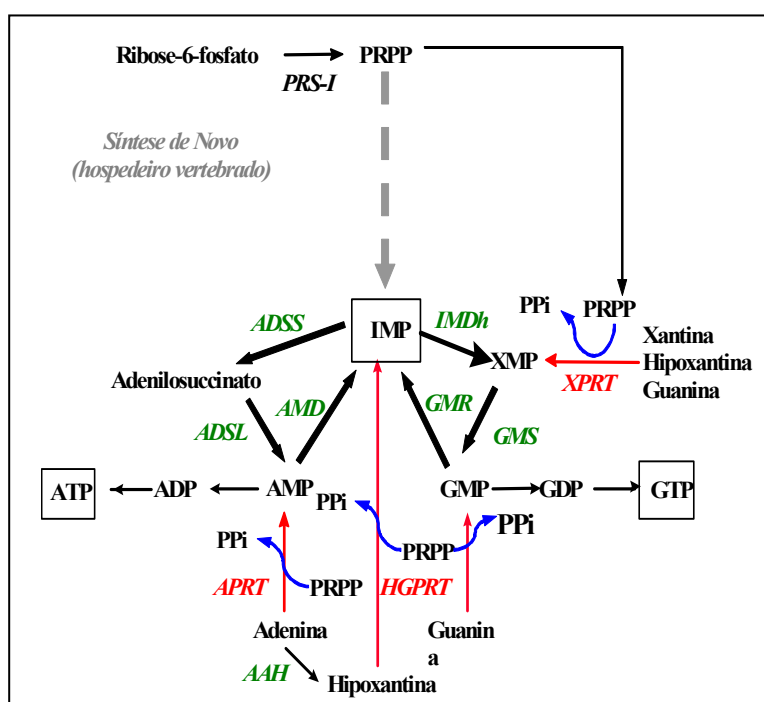


FIGURA 1.2- Via de recuperação de purinas em células de parasitas do gênero *Leishmania*.

A dependência do parasita pela recuperação de purinas provenientes do hospedeiro torna as enzimas PRTases alvos interessantes na busca de compostos que sejam capazes de interromper o ciclo biológico do parasita no ser humano.

A enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT) enzima catalisa a remoção do grupo pirofosfato (PPI) do 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) e a condensação de ribose a base purínica (adenina), formando adenosina monofosfato (AMP) numa reação de substituição nucleofílica SN_2 (NOYES *et al.*, 1997).

1.4- A família Rutaceae

A família Rutaceae é constituída de aproximadamente 150 gêneros e 1600 espécies de árvores e arbustos distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre (WATERMAN & GRUNDON, 1983). No Brasil estão citadas aproximadamente 176 espécies (ALBUQUERQUE, 1968).

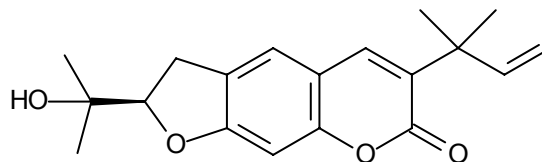
1.4.1- Características químicas e farmacológicas da família Rutaceae

A família Rutaceae é conhecida por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários, destacando-se os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenos e limonóides com largo espectro de atividades biológicas (WATERMAN & GRUNDON, 1983; WATERMAN, 1999).

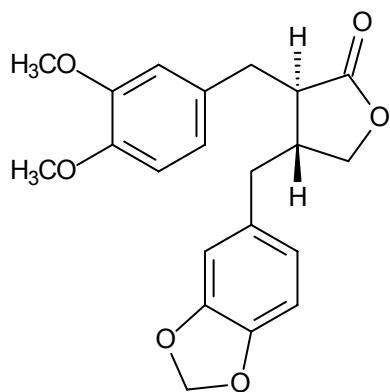
AMBROZIN *et al.* (2004), MAFEZOLI *et al.* (2000) e VIEIRA *et al.* (2001) demonstraram a atividade tripanocida de plantas pertencentes às famílias Rutaceae e Meliaceae.

VIEIRA *et al.* (2001) demonstrou ainda a atividade de extratos de plantas pertencentes às famílias Rutaceae e Meliaceae na enzima GAPDH de *T. cruzi* e neste mesmo trabalho são relatadas as atividades de 13 cumarinas sobre essa enzima onde a substância que apresentou maior atividade foi a chalepina ($IC_{50}=64\mu M$) uma cumarina isolada de *Pilocarpus spicatus* (Rutaceae). Foram descritas ainda atividades significativas da flavona 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (TOMAZELA *et al.* 2000) e de flavonóides polimetoxilados frente a GAPDH (MORAES *et al.*, 2003).

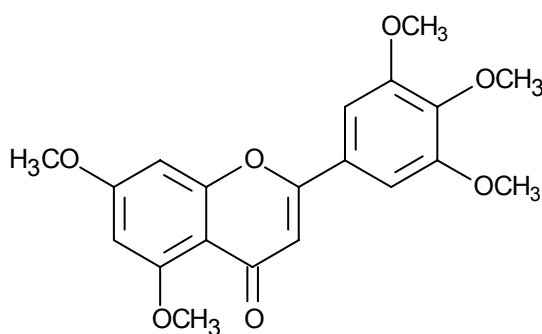
Lignanas isoladas de *Zantoxylum naranjillo* (Rutaceae) mostraram alta atividade tripanocida sendo que o (-)-metilpluviatolídeo foi o mais ativo sobre as formas tripomastigotas *T. cruzi* (BASTOS *et al.*, 1999).



CHALEPINA



(-)-METILPLUVIATOLÍDEO



3',4',5',5',7-PENTAMETOXIFLAVONA

1.4.2- O gênero *Rauia*

O gênero *Rauia* é ainda pouco conhecido com relação ao seu potencial químico. De *Rauia resinosa* foram isoladas cumarinas substituídas nas posições 7 e 8, alcalóides, um esteróide, um flavonol e uma flavona (VELOSO, 1995; VELOSO *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1996). De uma espécie não identificada de *Rauia* foi isolada uma cumarina e quatro alcalóides (FACCHINI, 2005).

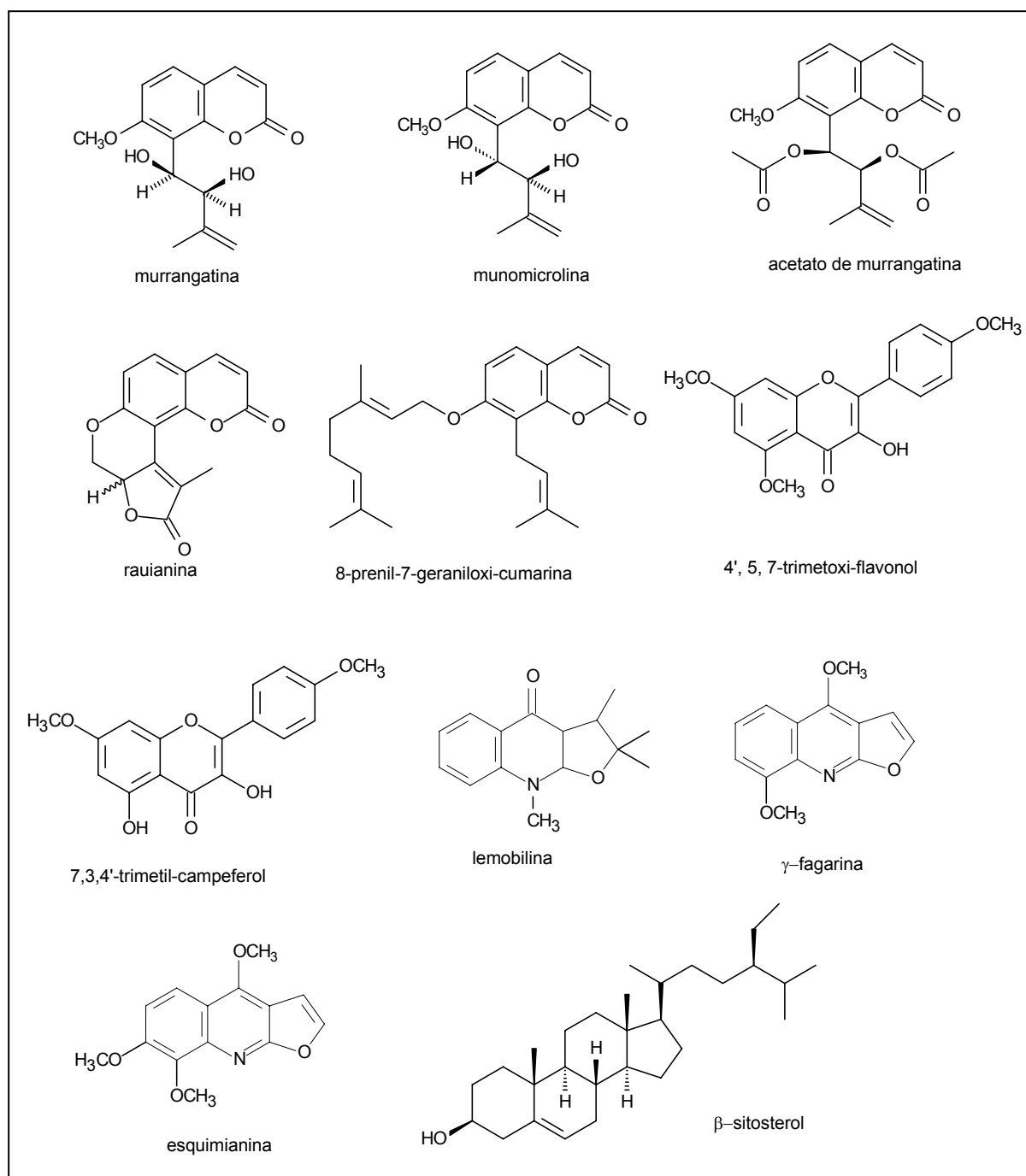


Figura 1.3- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Rauia resinosa*.

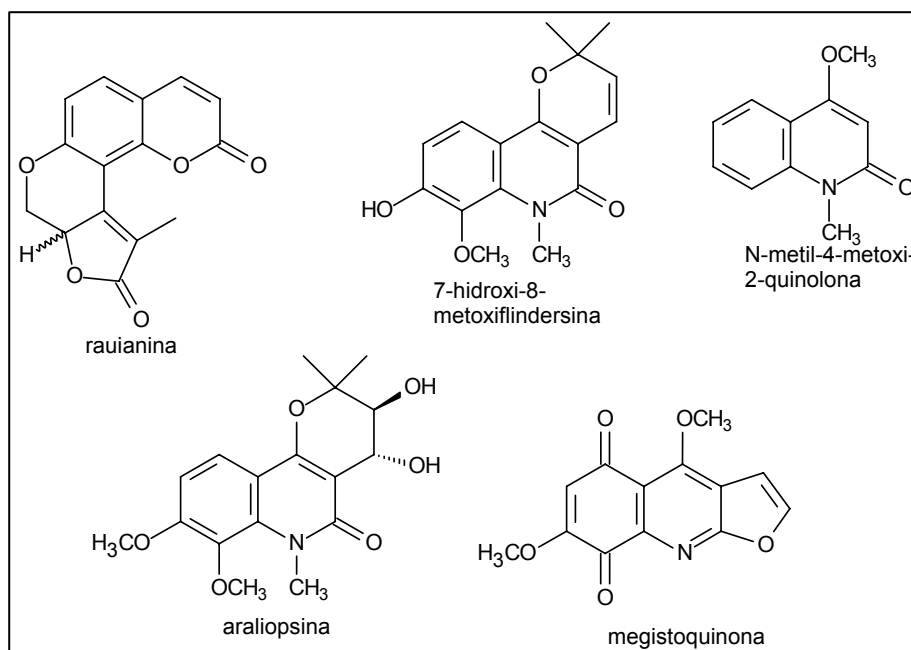
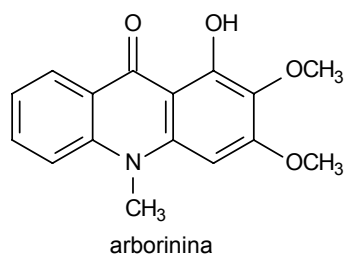


Figura 1.4- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Rauia* sp.

1.4.3- O gênero *Conchocarpus*

Em 1998 KALLUNKI e PIRANI reclassificaram algumas espécies do gênero *Angostura* no gênero *Conchocarpus*. Entre estas espécies encontrava-se a *Angostura macrophylla* que foi reclassificada como *Conchocarpus macrophyllus*.

Várias espécies de *Conchocarpus* já foram estudadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar e várias classes de substâncias foram isoladas. De *Conchocarpus macrophyllus* foi encontrado o relato de apenas uma substância isolada, o alcalóide acridônico conhecido como arborinina (VELOSO, 1995).



O estudo de *Conchocarpus cuneifolius* levou ao isolamento de acetofenonas e flavonóides glicosilados (FIGURA 1.5) (VELOSO, 1995). De *Conchocarpus inopinatus* foram isolados sete alcalóides acridônicos e uma cumarina (MAFEZOLI, 2001) que tem as estruturas químicas representadas na FIGURA 1.6.

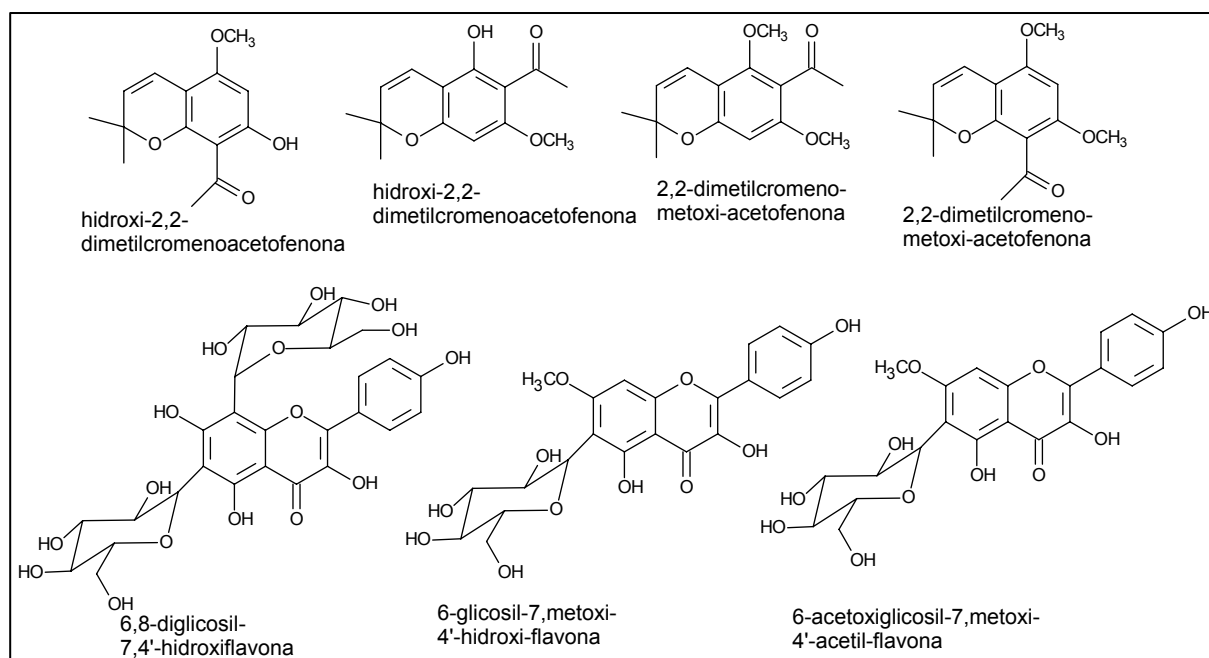


FIGURA 1.5- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus cuneifolius*.

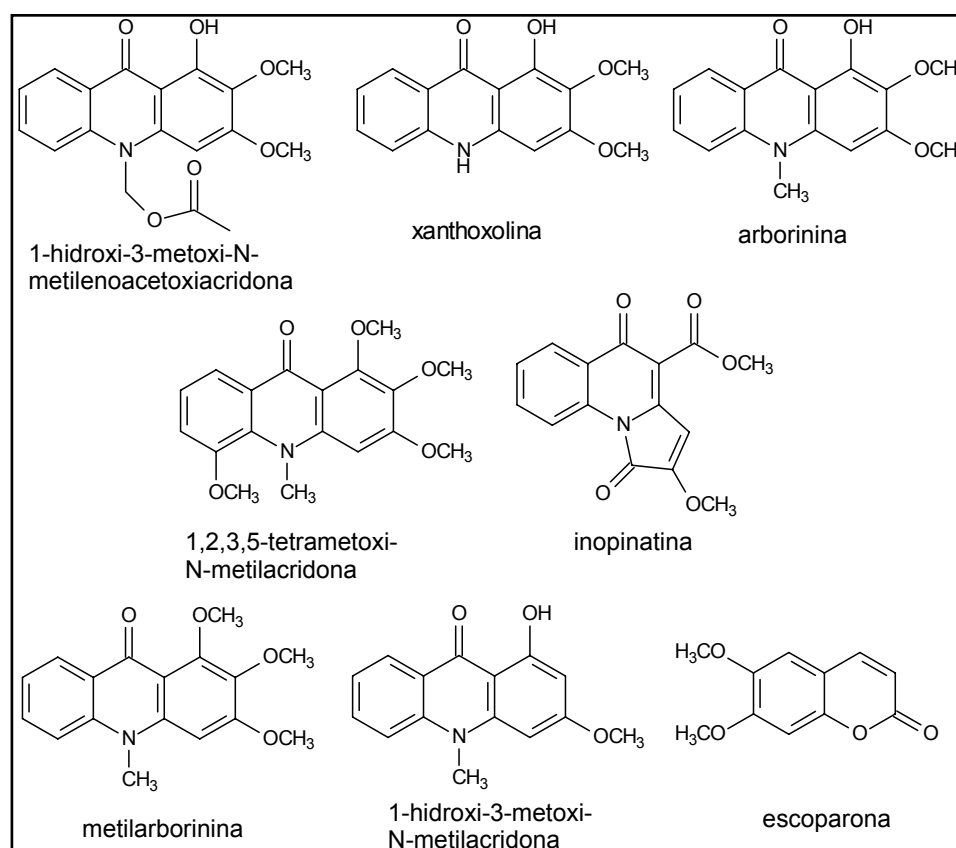


FIGURA 1.6- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus inopinatus*.

Foram isoladas onze cumarinas e sete alcalóides de *Conchocarpus longifolius* (MAFEZOLI, 2001; FACCHINI, 2005) (FIGURA 1.7) e quatro alcalóides do tipo indoloquinazolina de *Conchocarpus macrocarpus* (VELOSO, 1995) (FIGURA 1.8).

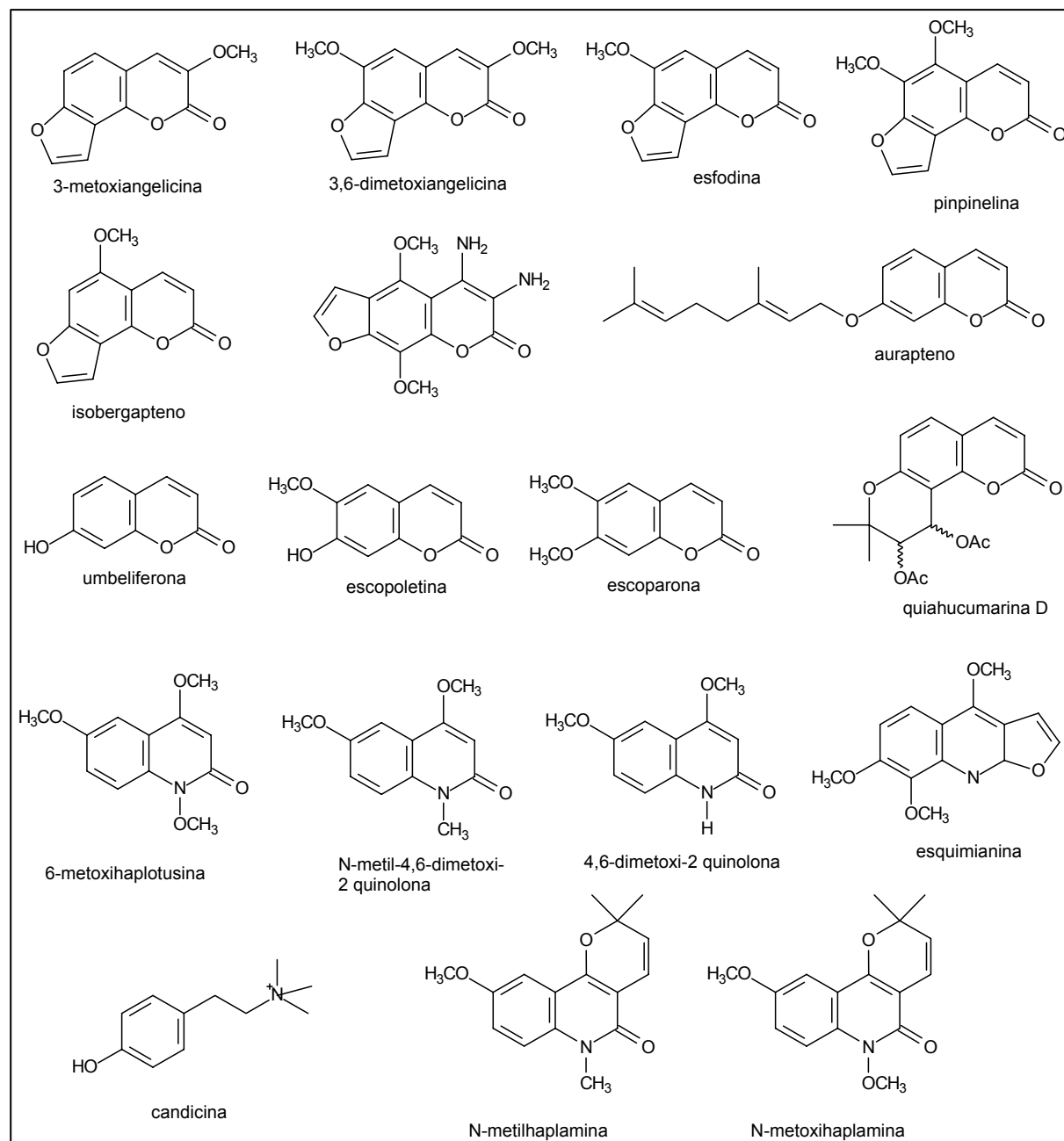


FIGURA 1.7- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus longifolius*.

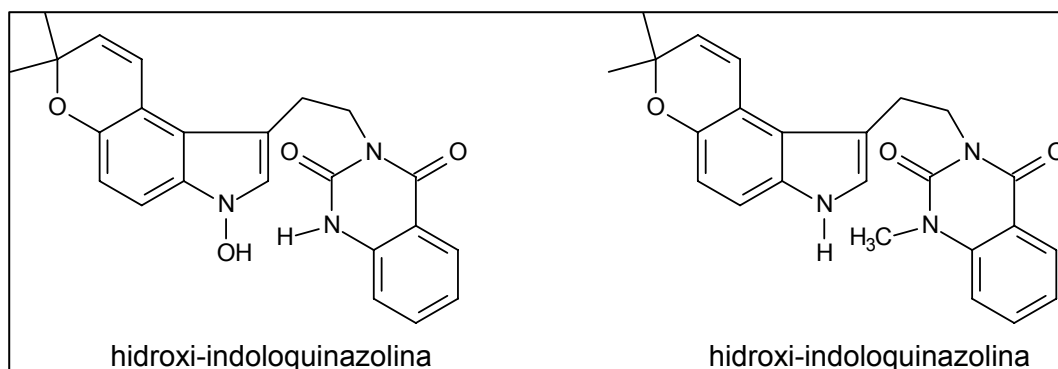


FIGURA 1.8- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus macrocarpus*.

De *Conchocarpus heterophyllum* foram isolados um esteróide, quatro flavonas e dois alcalóides do tipo 4 quinolona (AMBROZIN, 2004) que tem as estruturas químicas representadas na FIGURA 1.9.

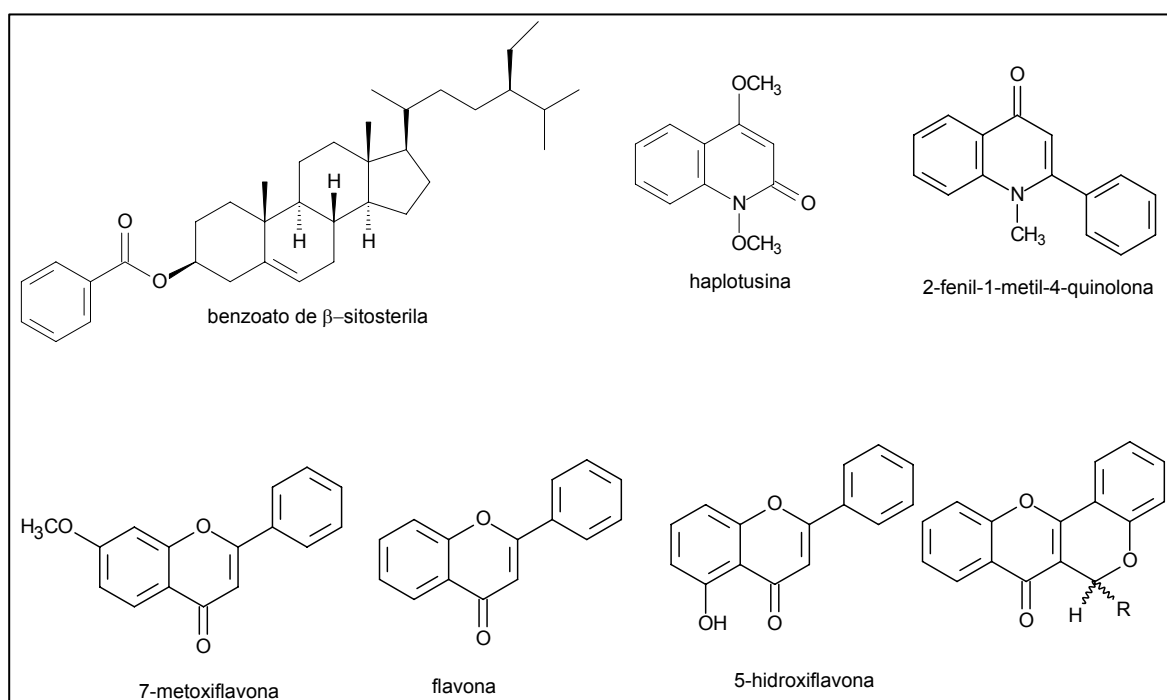


FIGURA 1.9- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllum*.

De *Conchocarpus gaudichaudianus* foram isolados dois alcalóides do tipo indoloquinazolina, aminas e alcalóides quinolônicos (CORTEZ, 2002) que tem as estruturas químicas representadas na FIGURA 1.10.

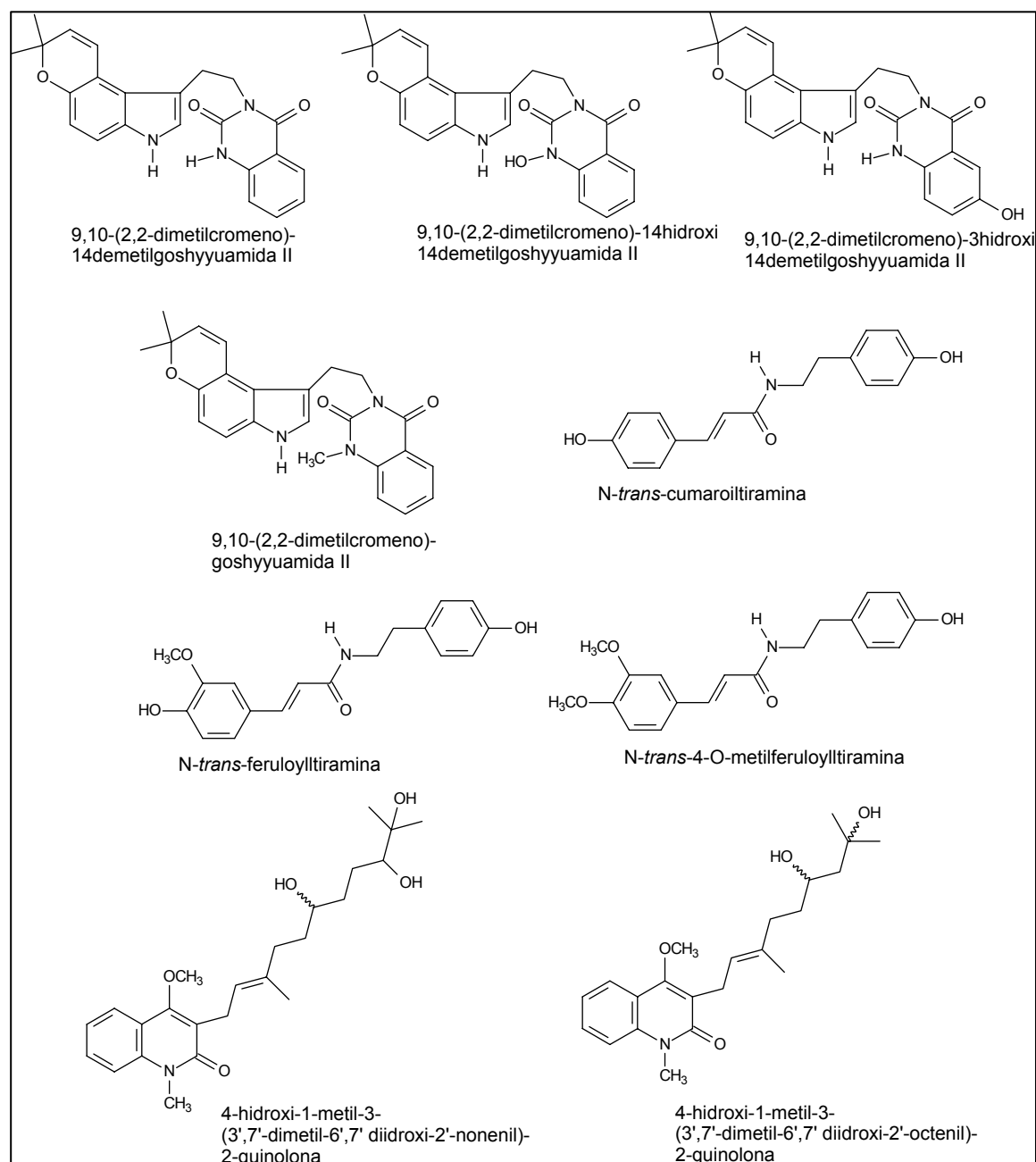


FIGURA 1.10- Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Conchocarpus gaudichaudianus*.

2- Objetivos

A proposta deste trabalho foi o estudo fitoquímico de extratos de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) e a avaliação da atividade antiparasitária dos extratos e das substâncias isoladas, avaliada através de ensaios bioquímicos nas enzimas adenina fosforibosiltransferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* e também através do ensaio biológico *in vitro* sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Outro objetivo foi contribuir para o melhor conhecimento da composição química do gênero *Rauia*.

3- Procedimento Experimental

3.1- Materiais e Métodos

Métodos Cromatográficos

Para o fracionamento das partições e frações foram utilizadas várias técnicas cromatográficas:

- cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC) utilizando como suporte gel de sílica 60 comum (70-230 mesh) e “flash”(230-400 mesh)-Merck;
- cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP); utilizando placas de vidro de 20x20 cm com espessura da camada de 1,5 mm, preparadas no próprio laboratório, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ -Merck, com revelador.
- cromatografia de exclusão em coluna aberta (CEC) utilizando como suporte sephadex LH 20 –Amershan Pharmacia Biotech AB
- cromatografia em camada delgada preparativa rotativa (CCDPR) utilizando placas de vidro de 26 cm de diâmetro com espessura de filme de 1,5 mm, preparadas no próprio laboratório, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ –Merck com revelador ou sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck com revelador e florisil na proporção 1:1.
- cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna empacotada com fase polimérica Shodex GS-310 2G Asahipak, foi realizada no modo preparativo num fluxo de 7 mL/min, a corrida foi acompanhada por detector de UV em dois comprimentos de onda simultaneamente 365 nm e 254 nm, utilizando metanol como fase móvel.
- cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando sílica gel 60 F₂₅₄, em folhas de alumínio da Merck.
- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) coluna capilar DB5 (J&W),(30m x 0.25mm,i.d.0,25), ionização por impacto eletrônico a 70 eV utilizando a seguinte rampa 80(1)/10/250 (20).

Reveladores

Como reveladores para CCDA foram utilizadas solução de vanilina em ácido sulfúrico, reagente de Dragendorff e câmara de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 360 nm.

Para CCDP e CCDPR foi utilizada câmara de radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 360 nm.

Solventes

Foram utilizados solventes comerciais destilados na sala de destilação do DQ-UFSCar, solventes grau HPLC e solventes deuterados para obtenção de espectros de RMN.

3.2- Equipamentos

Equipamentos de CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em equipamento SCL10A *vp* SHIMADZU, utilizando bomba LC 6AD SHIMADZU, detector de ultravioleta modelo SPD 10AV *vp* SHIMADZU e válvula de injeção Rheodyne 7725i.

Equipamento de CCDPR

A cromatografia em camada delgada preparativa rotativa foi realizada em aparelho CROMATOTROM modelo 8924-Harrison Research, utilizando bomba modelo RHSY- Fluid Metering inc.

Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos nos aparelhos ARX 200 MHz e DRX 400 MHz da Bruker.

Equipamento de CG-EM

Os espectros de CG-EM foram obtidos em aparelho CG-EM SHIMADZU modelo QP5000.

Evaporadores rotativos

Os extratos e frações foram evaporados em evaporadores rotativos Buchi modelo Rotavapor R-114, equipados com banhos BÜCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C e BÜCHI, Rotavapor ELB1, equipado com banho BÜCHI 461 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

3.3 Material botânico

O material botânico de procedência variada foi coletado e devidamente identificado pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.3.1- Obtenção dos extratos

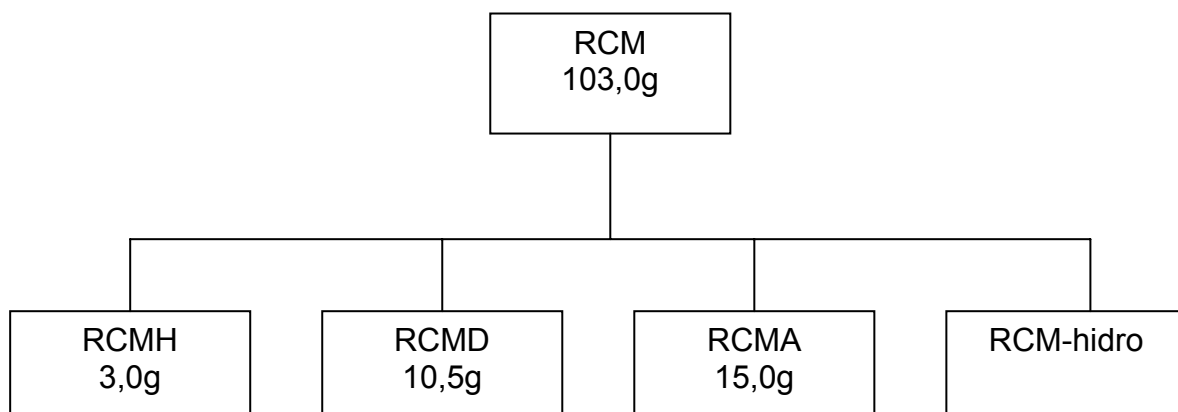
Os extratos das plantas escolhidas já se encontravam preparados e congelados no próprio laboratório. Estes extratos foram preparados a partir da adição de solventes orgânicos ao material vegetal seco e moído. Estes solventes foram adicionados em ordem crescente de polaridade. Para cada solvente adicionado foram feitas 3 extrações num intervalo de no mínimo 2 dias. Os extratos foram concentrados por destilação de solventes sob pressão reduzida.

3.3.1.1- Particionamento dos extratos brutos

Os extratos com atividades biológicas satisfatórias (maiores que 70%) foram suspensos em uma mistura água destilada e 25% de metanol e transferidos para um funil de separação de 1L, em seguida foi adicionado hexano e após agitação e formação de fase a fração hexânica foi separada. Posteriormente, o procedimento foi repetido adicionando diclorometano e acetato de etila respectivamente a fase metanol-água restante. As fases orgânicas obtidas foram concentradas por destilação do solvente sob pressão reduzida em evaporadores rotativos.

3.3.1.2- Estudo fitoquímico do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp

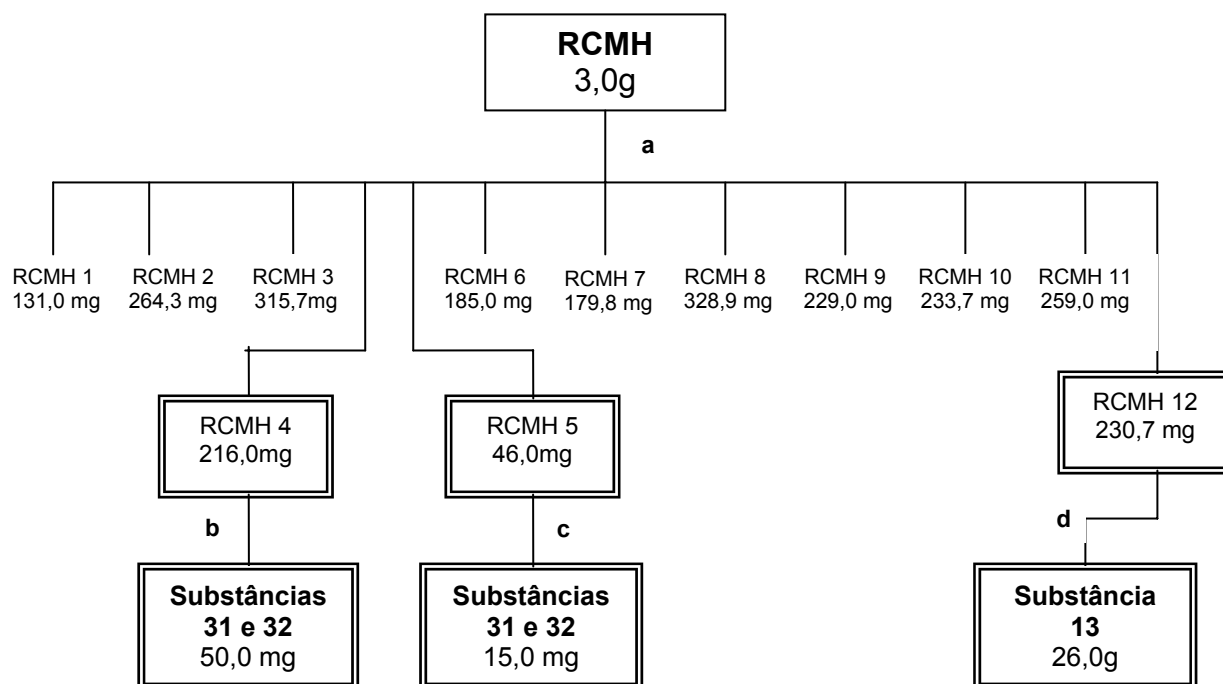
O extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCM) foi submetido à partição líquido-líquido seguindo o procedimento descrito no item anterior, gerando quatro frações: fração hexânica (RCMH), fração diclorometânica (RCMD), fração acetato de etila (RCMA) e fração hidroalcoólica (RCM-hidro) (ESQUEMA 3.1).



ESQUEMA 3.1- Particionamento do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

3.3.1.2.1- Estudo fitoquímico da fração hexânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp

A fração hexânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMH) foi estudada fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento do alcalóide *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (**13**) e da mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (**31+32**). O esquema 3.2 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



(a) CC, $\phi \times h = 4,0 \times 23,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 15% até 100% de acetato de etila.

(b) CC, $\phi \times h = 3,0 \times 40,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 10% até 100% de acetato de etila.

(c) CC, $\phi \times h = 2,5 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 5% até 100% de acetato de etila.

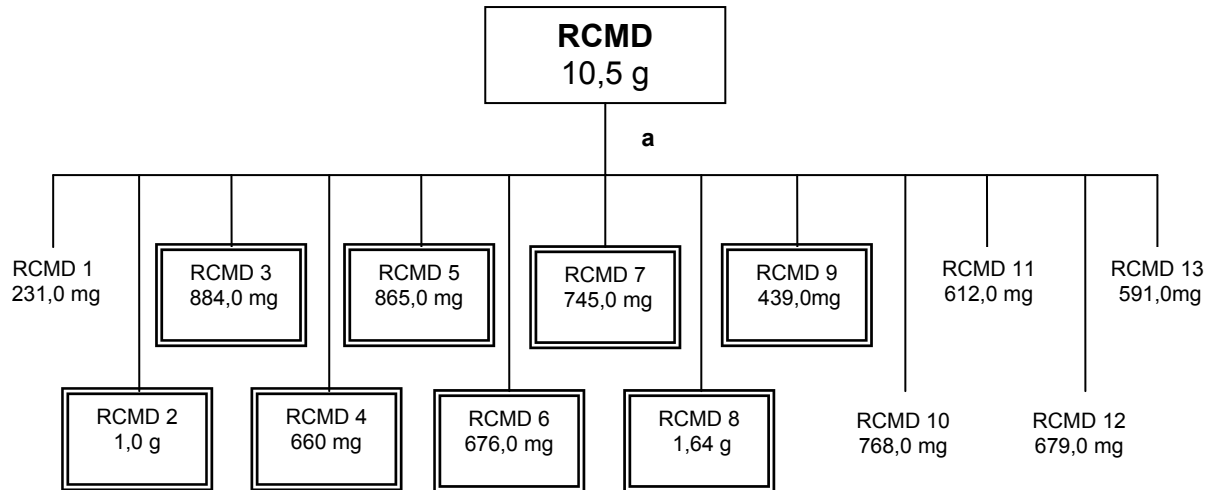
(d) CC, $\phi \times h = 2,5 \times 55,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 50% até 100% de metanol.

ESQUEMA 3.2- Fracionamento da fração hexânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMH).

3.3.1.2.2- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp

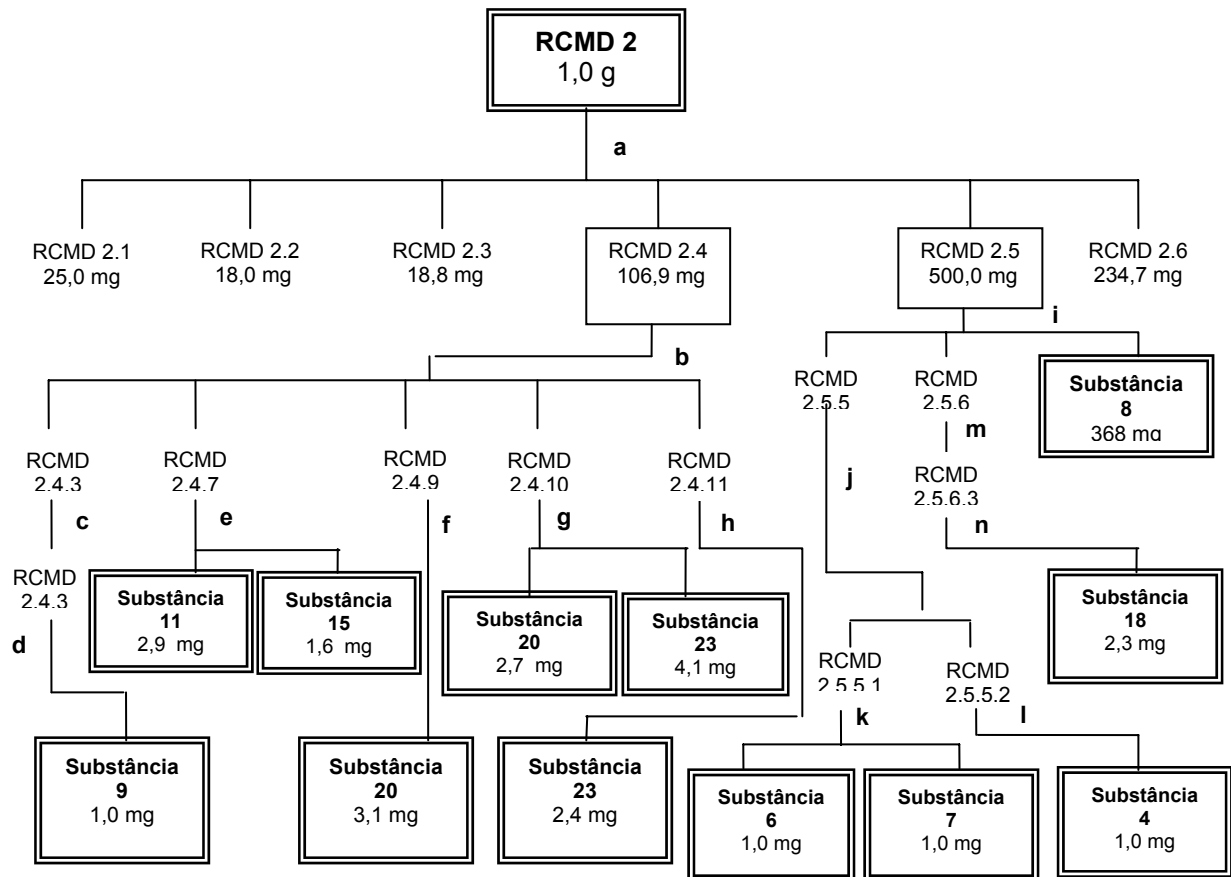
A fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMD) foi estudada fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento das cumarinas murralongina (4), murrangatina (5), munomicrolina (6), acetato de murrangatina (7), rauianina (8), 3-etil rauianina (9) e umbeliferona (11) e dos alcalóides N-metil-4-metoxi-2-quinolona (13), mirtopsina (14), dictamina (15), fagarina (16), esquimianina (17), Z-rhoifolinato de dimetila (18),

8-hidroxi-N-metilflindersina (**19**), zantobungeanina (**20**), zantodiolina (**21**), 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (**22**) e veprissina (**20**). Os esquemas 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7 mostram de forma resumida como este estudo foi realizado.



(a) CC, ϕ xh= 4,2x52,0 cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol a 2% até 100% de metanol.

ESQUEMA 3.3- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp (RCMD).



(a) CC, $\phi_{xh} = 3,5 \times 27,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 5% até 100% de metanol.

(b) CC, $\phi_{xh} = 1,8 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 5% até 100% de metanol.

(c) CCDP, eluente diclorometano e metanol 5%

(d) CLAE, coluna polimérica, eluente metanol, no modo preparativo isocrático, fluxo de 7 mL/min, detector UV $\lambda = 340$ nm e 254 nm.

(e) CCDP, eluente diclorometano e metanol 2%

(f) CCDP, eluente diclorometano e acetato de etila 25%

(g) CCDP, eluente diclorometano

(h) CCDP, eluente diclorometano

(i) CC, $\phi_{xh} = 3,5 \times 30,0$, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até metanol 100%

(j) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1

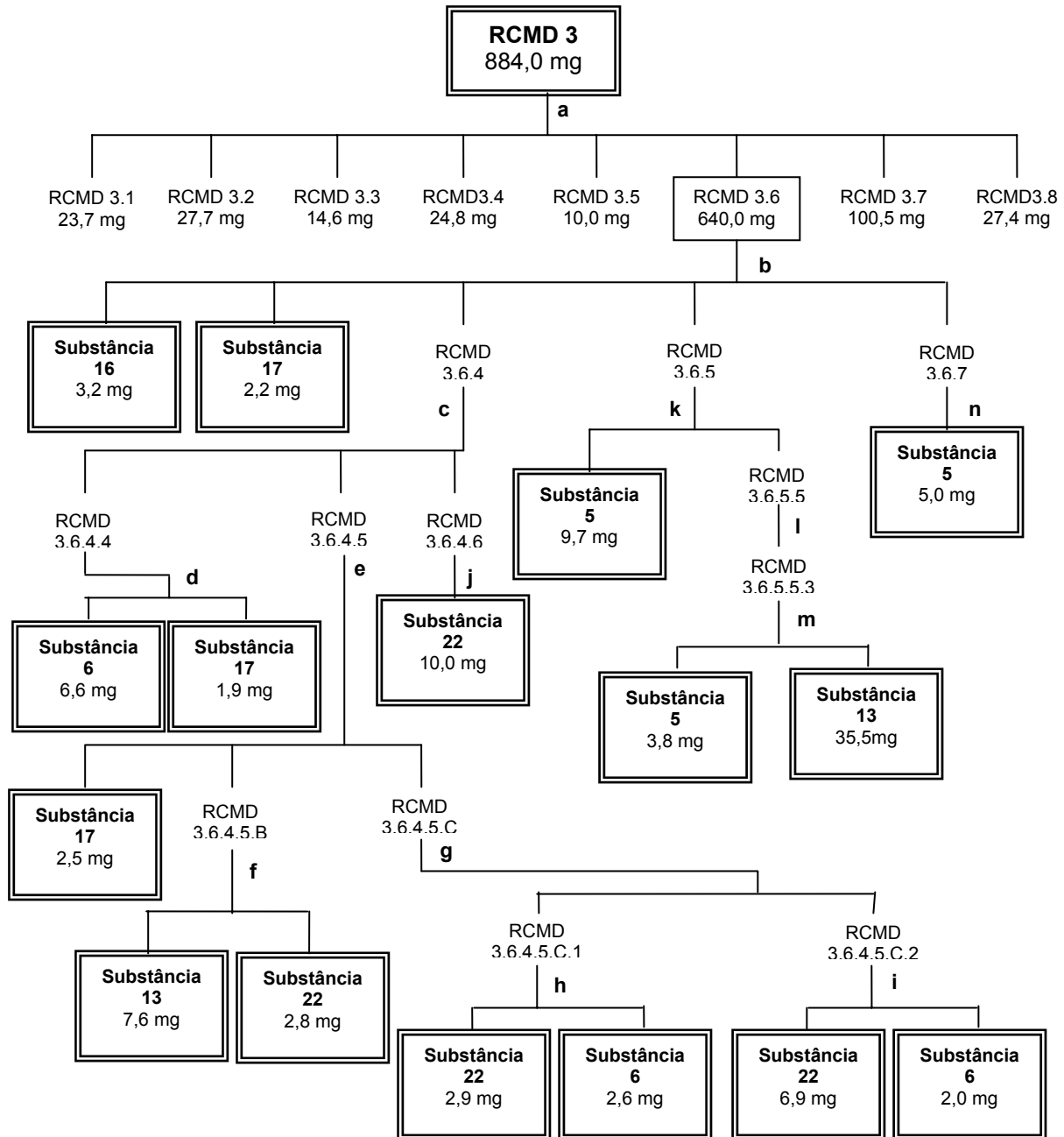
(k) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1

(l) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1

(m) CC, $\phi_{xh} = 1,7 \times 34,5,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e acetato de etilal 6% até 100% de metanol.

(n) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1

ESQUEMA 3.4- Fracionamento da fração RCMD2.



(a) CC, $\phi x h = 4,5 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano diclorometano 50% até metanol 100%

(b) CC, $\phi x h = 4,3 \times 40,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 1% até metanol 100%

(c) CC, $\phi x h = 2,5 \times 27,5$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até metanol 100%

(d) CCDP, eluente diclorometano e metanol 4%

(e) CCDP, eluente diclorometano e metanol 4%

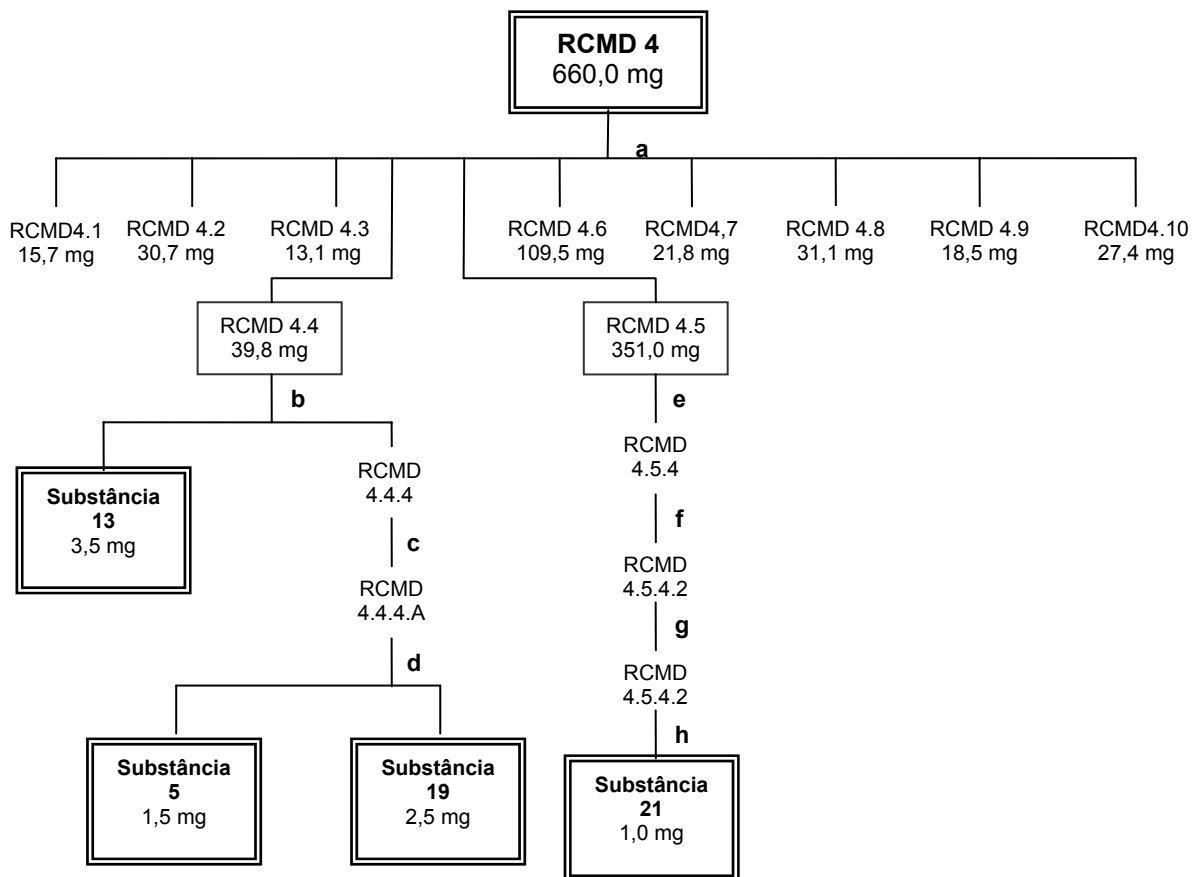
(f) CC, $\phi x h = 1,1 \times 20,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 30% até acetato de etila 100%

(g) CCDP, eluente diclorometano e metanol 4%

(h) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1

- (i) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1
- (j) CC, $\phi \times h = 1,5 \times 25,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 30% até acetato de etila 100%
- (K) CC, $\phi \times h = 2,5 \times 27,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 3% até metanol 100%
- (l) CC, $\phi \times h = 1,4 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 3% até metanol 100%
- (m) CCDP, eluente diclorometano e metanol 2%
- (n) CC, $\phi \times h = 1,5 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 30% até acetato de etila 100%

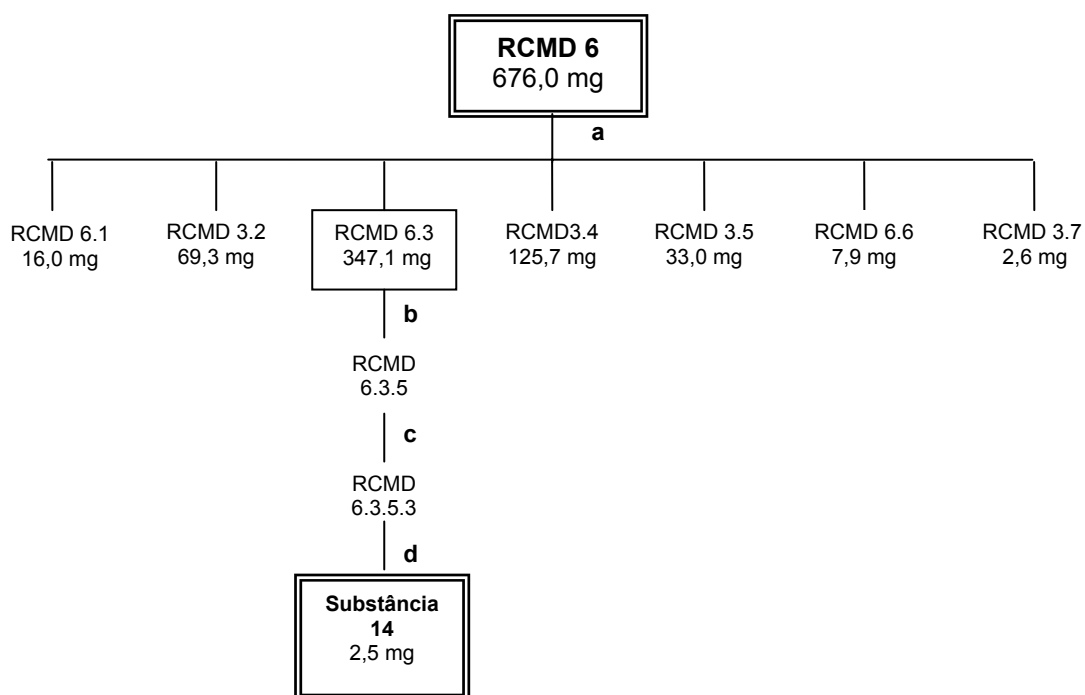
ESQUEMA 3.5- Fracionamento da fração RCMD3.



- (a) CC, $\phi \times h = 4,3 \times 35,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 1% até metanol 100%
- (b) CCDP, eluente diclorometano e metanol 4%
- (c) CCDP, eluente diclorometano e metanol 2%
- (d) CCDP, eluente hexano e acetato de etila na proporção 1:1
- (e) CC, $\phi \times h = 2,3 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 3% até metanol 100%

- (f) CC, $\phi \times h = 1,9 \times 51,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 4% até metanol 100%
- (g) CC, $\phi \times h = 1,8 \times 31,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 1% até metanol 100%
- (h) CCDP, eluente H:A na proporção 1:1

ESQUEMA 3.6- Fracionamento da fração RCMD4



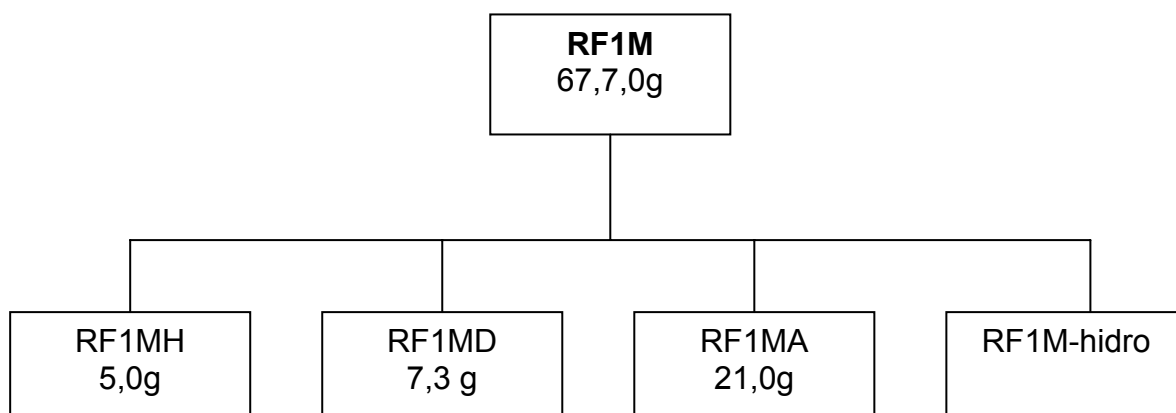
- (a) CEC, $\phi \times h = 3,5 \times 34,0$ cm, sephadex LH 20, eluição isocrática com metanol
- (b) CC, $\phi \times h = 3,5 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 5% até metanol 100%
- (c) CC, $\phi \times h = 1,5 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano e metanol 4% até metanol 100%
- (d) CLAE, coluna polimérica, eluente M, no modo preparativo, fluxo de 7 mL/min, detector UV $\lambda = 340$ nm e 254 nm.

ESQUEMA 3.7- Fracionamento da fração RCMD6.

3.3.1.3- Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1

O extrato metanólico folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) foi submetido a partição líquido-líquido seguindo o procedimento descrito no item anterior, gerando quatro

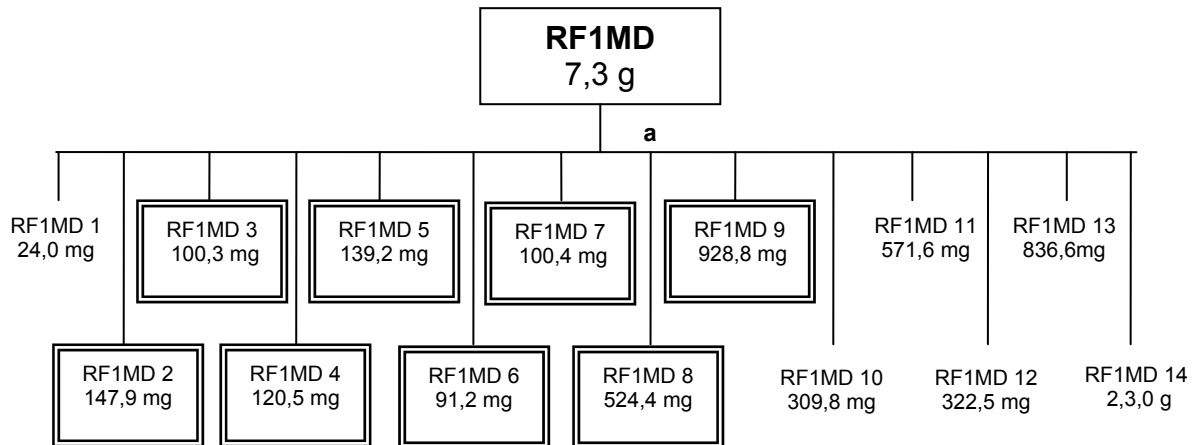
frações: fração hexânica (RF1MH), fração diclorometânica (RF1MD), fração acetato de etila (RF1MA) e fração hidroalcoólica (RF1M-hidro) (ESQUEMA 3.8).



ESQUEMA 3.8- Particionamento do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1.

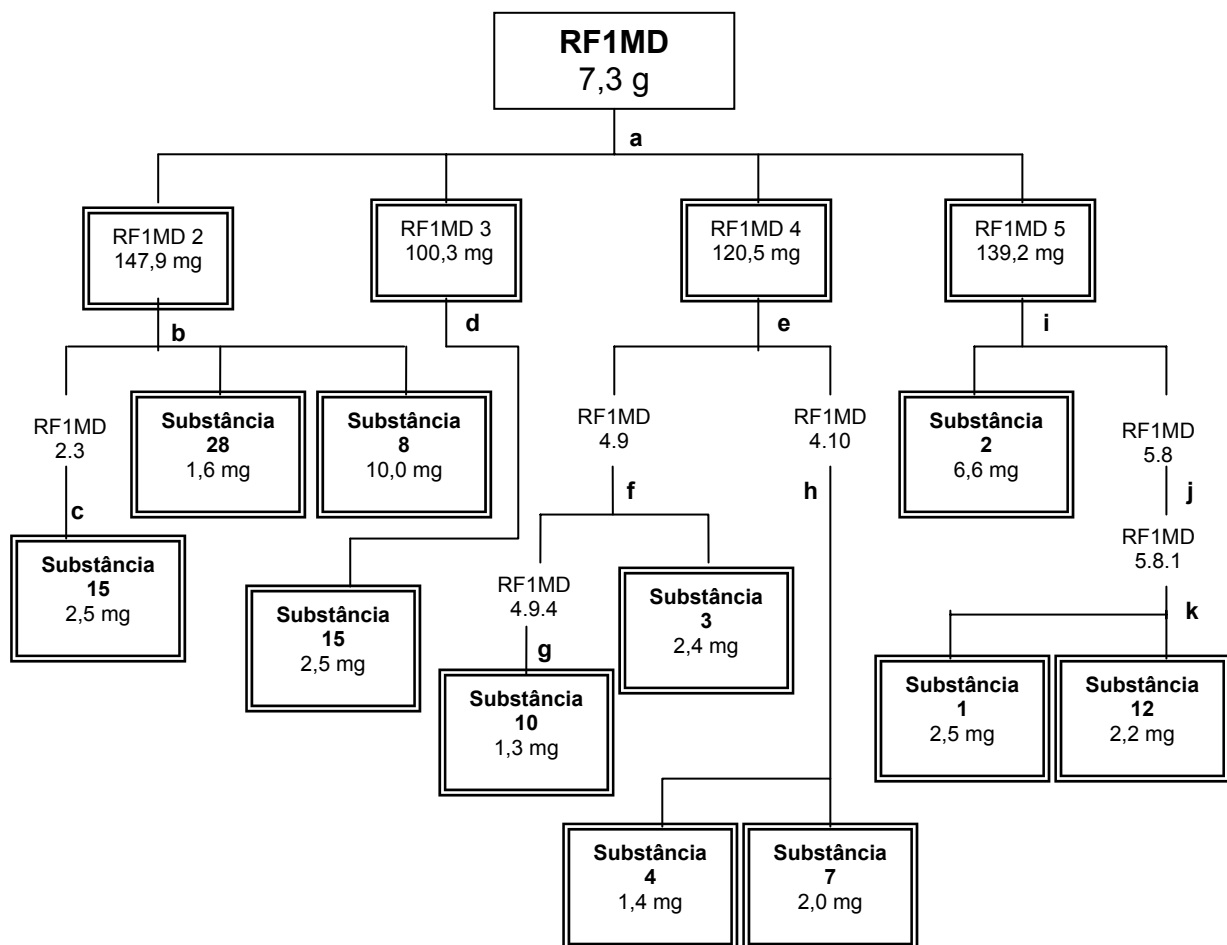
3.3.1.3.1- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do das folhas de *Rauia* sp1

A fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RF1MD) foi estudada fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento das cumarinas murpaniculol (**1**), 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina (**2**), isomurranganona (**3**), murralongina (**4**), murrangatina (**5**), munomicrolina (**6**), acetato de murrangatina (**7**), rauianina (**8**), 5-metoxirauianina (**10**), umbeliferona (**11**) e isoesquimianina (**12**) e do alcalóide dictamina (**15**), das amidas paprazina (**26**) e *N-trans*-feruloiltiramina (**27**), do flavonóide 3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi-flavona (**28**) da lignana siringaresinol (**29**) e do composto fenólico ácido vanílico (**30**). Os esquemas 3.9, 3.10 e 3.11 mostram de forma resumida como este estudo foi realizado.



(a) CC, ϕ xh= 5,3x53,0 cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano 100% até metanol 100%

ESQUEMA 3.9- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RF1MD).

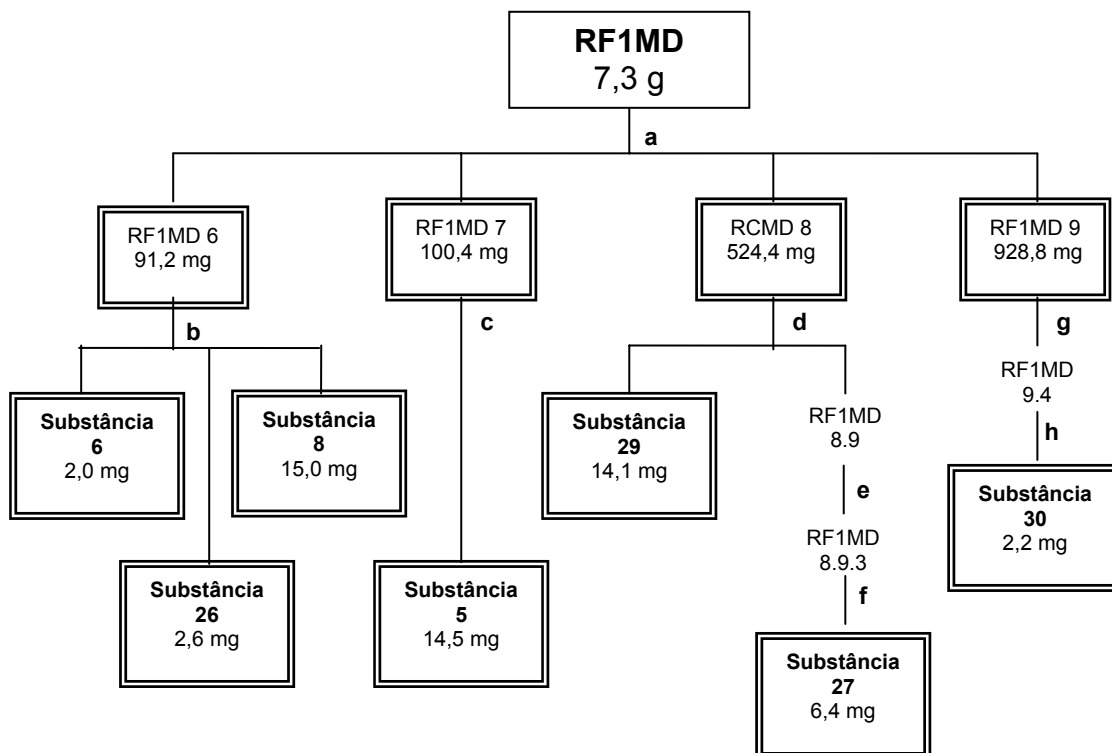


(a) CC, ϕ xh= 5,3x53,0 cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano 100% até metanol 100%

(b) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano 100% até acetato de etila 100%

- (c) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até diclorometano e metanol 50%
- (d) CC, $\phi \times h = 2,3 \times 30,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até metanol 100%
- (e) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até diclorometano e metanol 50%
- (f) CCDP, eluente diclorometano 100%
- (g) CLAE, coluna polimérica, eluente metanol, no modo preparativo, fluxo de 7 mL/min, detector UV $\lambda = 340$ nm e 254 nm.
- (h) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 50% até acetato de etila e metanol 50%
- (i) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano 100% até acetato de etila 100%
- (j) CC, $\phi \times h = 1,5 \times 20,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando hexano e diclorometano 50% até metanol 100%
- (k) CLAE, coluna polimérica, eluente metanol, no modo preparativo, fluxo de 7 mL/min, detector UV $\lambda = 340$ nm e 254 nm.

ESQUEMA 3.10- Fracionamento das frações RF1MD 2, RF1MD 3, RF1MD 4 e RF1MD 5.



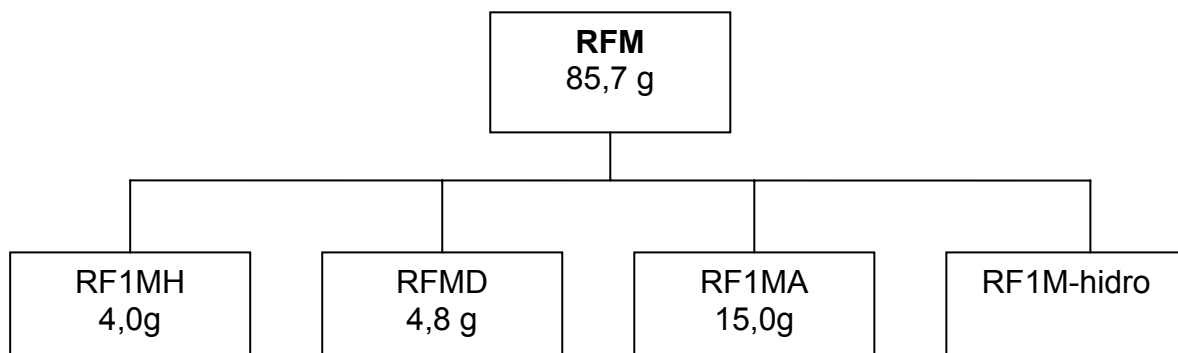
- (a) CC, $\phi \times h = 5,3 \times 53,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano 100% até metanol 100%

- (b) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até diclorometano e metanol 50%
- (c) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até diclorometano e metanol 50%
- (d) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até diclorometano e metanol 50%
- (e) CC, $\phi \times h = 1,2 \times 32,0$ cm, sílica flash, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 50% até metanol 100%
- (f) CCDP, eluente diclorometano 100%
- (g) CC, $d \times h = 5,2 \times 48,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até metanol 100%
- (h) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até diclorometano e metanol 50%

ESQUEMA 3.11- Fracionamento das frações RF1MD 6, RF1MD 7, RF1MD 8 e RF1MD 9.

3.3.1.4- Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp

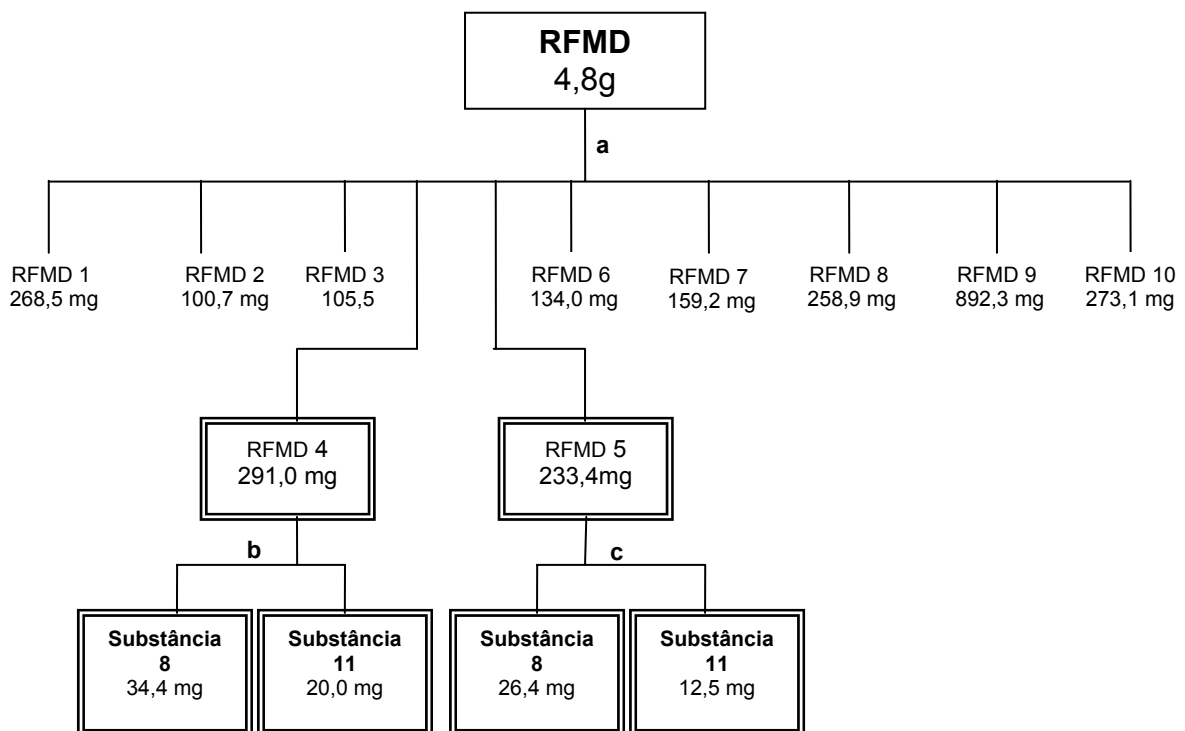
O extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFM) foi submetido à partição líquido-líquido seguindo o procedimento descrito no item anterior, gerando quatro frações: fração hexânica (RFMH), fração diclorometânica (RFMD), fração acetato de etila (RFMA) e fração hidroalcoólica (RFM-hidro) (ESQUEMA 3.12).



ESQUEMA 3.12- Particionamento do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

3.3.1.4.1- Estudo fitoquímico da fração diclorometânica do extrato metanólico do das folhas de *Rauia* sp

A fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFMD) foi estudada quimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento das cumarinas rauianina (**8**) e umbeliferona (**11**). O esquema 3.13 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



(a) CC, $\phi \times h = 5,0 \times 50,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano 100% até metanol 100%

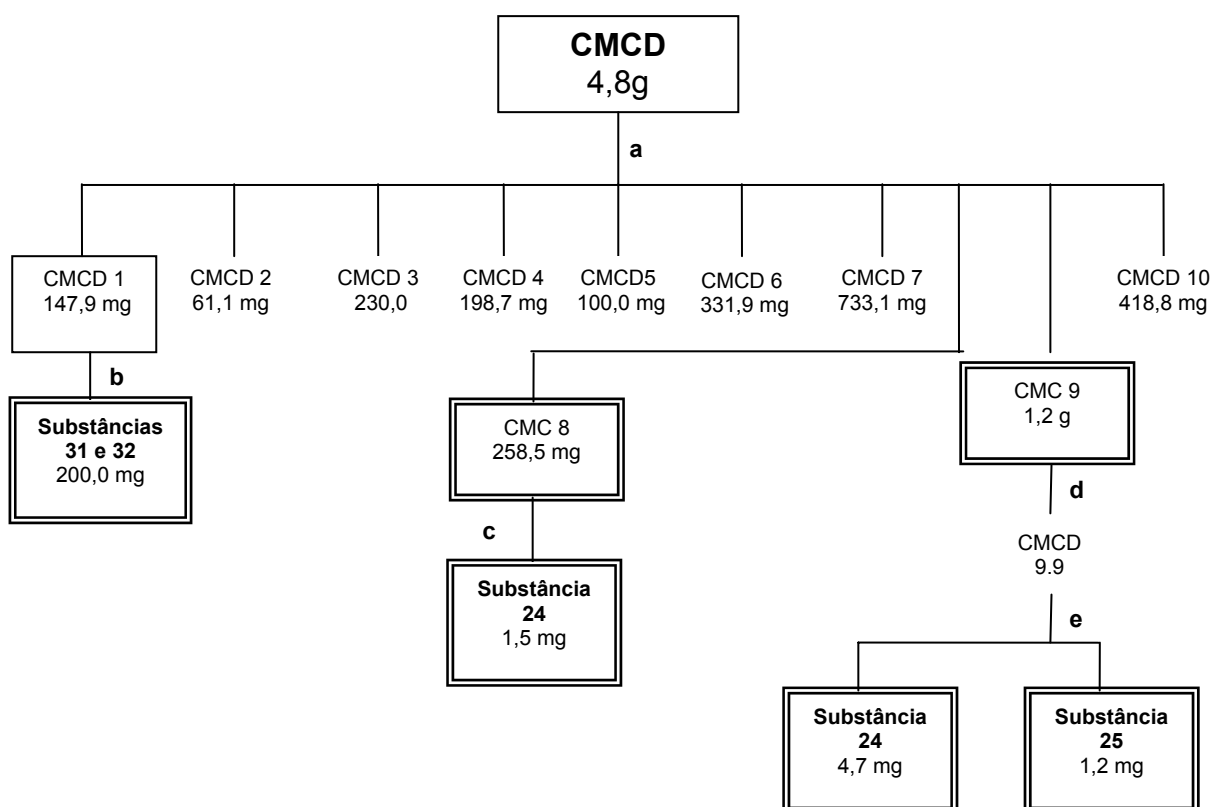
(b) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até diclorometano e metanol 50%

(c) CCDPR, fase estacionária sílica eluição gradiente iniciando com hexano e diclorometano 50% até diclorometano e metanol 50%

ESQUEMA 3.13- Fracionamento da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFMD).

3.3.1.5- Estudo fitoquímico do extrato diclorometano do caule da *Conchocarpus macrophyllus*.

O extrato diclorometanânico do caule da *Conchocarpus macrophyllus* foi estudado fitoquimicamente utilizando diversas técnicas cromatográficas. O fracionamento levou ao isolamento dos alcalóides acridônicos arborinina (**24**) e metilarborinina (**25**). O esquema 3.14 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



(a) CC, $\phi x h = 5,5 \times 35,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano e acetato de etila 10% até metanol 100%

(b) CC, $\phi x h = 3,2 \times 35,0$ cm, sílica comum, eluição gradiente iniciando com hexano 100% até metanol 100%

(c) CCPDR, fase estacionária sílica e florisil eluição gradiente iniciando com diclorometano 100% até diclorometano e metanol 50%

(d) CEC, $\phi x h = 3,5 \times 27,0$ cm, sephadex LH 20, eluição isocrática com metanol e diclorometano 25%

(e) CCDP, eluente diclorometano 100%

ESQUEMA 3.14- Fracionamento do extrato diclorometânico do caule da *Conchocarpus macrophyllus*.

3.4- Ensaios Biológicos

3.4.1- Ensaio tripanocida “*in vitro*” sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

Para a realização do ensaio foi utilizado sangue de camundongos albinos Swiss experimentalmente infectados com a cepa Y do parasita. O sangue dos camundongos foi obtido através de punção cardíaca após sete dias de infecção, onde ocorre o pico de parasitemia. O sangue contaminado foi diluído em sangue de um animal sadio a fim de obter uma concentração de 2×10^6 formas tripomastigotas por mL de sangue. Como anticoagulante foi utilizado citrato de sódio a 3,8% e pH 7,3 na proporção de um volume de citrato para três de sangue infectado. Os extratos e as substâncias puras foram solubilizados em DMSO. Os ensaios foram realizados em microplacas de titulação (96 poços) onde foram colocados o sangue contaminado e os extratos ou substâncias puras solubilizados em DMSO. Em seguida o material foi incubado por um período de 24 horas a 4^oC. Como controle foram utilizados sangue infectado e sangue infectado com adição de 250 ug/ml de violeta genciana. Após o período de incubação o número de parasitas foi determinado colocando-se uma alíquota de 5 μ L de sangue sobre uma lâmina coberta com uma lamínula de 22 x 22 mm e contando-se os parasitas em 50 campos microscópicos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado do ensaio foi expresso em porcentagem de lise parasitária.

Os extratos foram ensaiados numa concentração de 4mg/mL e as substâncias puras nas concentrações de 100, 250 e 500 μ M.

3.4.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*

A enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. A preparação e purificação da mesma são feitas rotineiramente no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos

(IFSC-USP), de acordo com procedimentos estabelecidos por SOUZA *et al.* (1998).

Essa enzima catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-bifosfoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e cofator NAD⁺. Os ensaios de inibição enzimática estão baseados nesta reação, e nestes são feitas medidas espectrofotométricas de NADH formado, durante 30 s a 340 nm.

O teste baseia-se no procedimento desenvolvido por BARBOSA e NAKANO (1987) e descrito por VIEIRA *et al.* (2001). A mistura reacional (1 mL) contém 50 mM de tampão tris-HCl (pH 8,6) com 1mM de β-mercaptoetanol e EDTA, 30 mM de arseniato de sódio, 2,5 mM de NAD⁺, 4-9 µg de gGAPDH e 0,3 mM de G3P (que é adicionado por último).

Para a realização dos ensaios, preparam-se soluções de 1,0 mg/mL dos extratos brutos, frações ou substâncias puras em DMSO, que são adicionadas ao meio reacional descrito. A concentração final de DMSO é de 10%, o que não interfere na atividade da enzima. Sempre são realizados ensaios controle na ausência das substâncias a serem testadas com igual volume de DMSO, que são considerados como "branco". Todas as medidas são feitas em triplicata e a atividade específica da enzima (AE) é calculada através da formula a seguir:

$$AE(U/mg) = \frac{b \cdot V_{cubeta}}{6,22 \cdot V_{enzima} \cdot C_{enzima}}$$

Onde:

b= coeficiente angular de uma reta obtida através da plotagem dos valores de Abs versus t

V_{cubeta} =volume da cubeta em mL

V_{enzima} =volume da enzima na cubeta em mg/ mL

C_{enzima} =concentração da enzima em mg/ mL

ε_{NADH} = 6,22mM⁻¹ cm⁻¹

Após obter os valores de AE do inibidor e do DMSO, a porcentagem de atividade inibitória (% AI), é calculada pela fórmula:

$$\% AI = \left(\frac{AE_{inibidor} - AE_{DMSO}}{AE_{DMSO}} \right) \times 100$$

As medidas do potencial inibitório dos extratos foram realizados na concentração de 200 µg/mL.

3.4.3- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (novo protocolo)

Durante a realização do trabalho as condições do ensaio sobre a enzima gGAPDH foram modificadas, utilizando como tampão o TEA (trietanolamina) garantindo melhor reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados analisados, o pH passou de 8,6 para 7,5 para mimetizar as condições fisiológicas. Neste caso a mistura reacional passou a conter tampão TEA (trietanolamina) pH 7,5 concentração final de 100 mMol/L, 1mM de β-mercaptoetanol e EDTA, 30 mM de arseniato de sódio, NAD concentração final de 400 µMol/L, G3P com concentração final de 600 µM, enzima com concentração final de 13 nMol/L.

Neste caso também são feitas medidas espectrofotométricas de NADH formado durante 30 s, a 340 nm. A porcentagem de atividade inibitória é calculada da mesma forma descrita no item anterior.

As substâncias puras foram testadas na concentração final de 200µM.

3.4.4- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (utilizando Tio-NAD como cofator)

Considerando que várias substâncias apresentam absorção no mesmo comprimento de onda do NADH (340nm) causando interferência na análise uma alternativa adotada foi mudar o cofator da reação. Para isso foi desenvolvido um ensaio utilizando Tio-NAD como cofator. A estrutura do Tio-NAD difere da estrutura do NAD devido a presença de um átomo de enxofre no lugar do oxigênio da amida.

Neste caso a mistura reacional contém tampão TEA (trietanolamina) pH 7,5 concentração final de 100 mMol/L, 1 mM de β -mercaptoetanol e EDTA, 30 mM de arseniato de sódio, Tio-NAD⁺ concentração final de 250 μ Mol/L, G3P com concentração final de 800 μ M, enzima com concentração final de 41 nMol/L.

Neste caso são feitas medidas espectrofotométricas de Tio-NADH formado, durante 30 s a 400 nm. A porcentagem de atividade inibitória é calculada da mesma forma descrita no item anterior.

3.4.5- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*

A enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) foi obtida de *Leishmania tarentolae*. Esta enzima foi isolada de lagartos e não é capaz de infectar seres humanos (CROAN *et al.*, 1997; NOYES *et al.*, 1997). Porém estudos envolvendo sequenciamento do gene de APRT de *Leishmania tarentolae* revelaram grande identidade com a proteína homóloga de *Leishmania donovani* (PHILLIPS, *et al.*, 1999). A identidade de 85% nas seqüências de aminoácidos dessas duas APRTs permite que as estruturas tridimensionais também sejam similares e dessa forma, as informações obtidas com APRT de *L. tarentolae* podem ser usadas na busca de novos fármacos contra a leishmaniose humana.

A APRT é expressa em *Escherichia coli* e purificada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

Ela catalisa a reação nucleofílica entre a adenina e o fosforibosilpirofosfato (PRPP), com a formação de adenosina-monofosfato (AMP). Os ensaios de inibição enzimática estão baseados nesta reação e nestes são feitas as medidas espectrométricas de AMP formado durante 60 s, a 259 nm.

O ensaio baseia-se no procedimento descrito por TUTTLE e KRENITSKY (1980) com algumas modificações. A mistura reacional (0,5 mL) contém 0,01 mM de adenina, 0,5 mM de PRPP, 5 mM de MgCl₂ e 100 nM de tampão tris-HCl (pH 7,4). Para cada teste são utilizados 475 μ L da mistura reacional e 25 μ L das soluções dos possíveis inibidores.

As medidas foram feitas em triplicata e os valores de absorbância obtidos foram avaliados como anteriormente descrito para a enzima gGAPDH. Entretanto, o valor de ϵ do AMP na fórmula para o cálculo da AE é $1,24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

As medidas do potencial inibitório dos extratos foram realizados na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ e das substâncias em concentrações variadas.

3.4.5- Ensaio de inibição da atividade da enzima PNP purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*

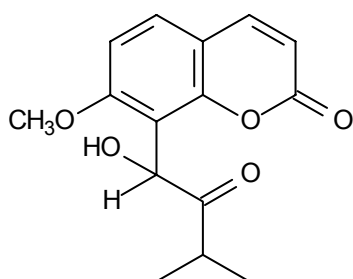
A enzima PNP atua na via de salvação de purinas convertendo inosina a hipoxantina, que é um dos precursores para a formação dos ácidos nucleicos.

A mistura reacional contém 50 mM de tampão fosfato pH 7,4, 100 mM de tampão tris-HCl pH 7,4, $10 \mu\text{M}$ de inosina, xantina oxidase e 12 nM da PNP. As reações foram monitoradas a 293 nm , usando um ensaio padrão combinado.

4- Substâncias Isoladas

O estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* permitiu o isolamento de 32 substâncias pertencentes a diferentes classes, cumarinas, alcalóides, amidas, flavonóides, lignanas, compostos fenólicos e esteróides. Para facilitar a determinação estrutural dos metabólitos isolados, estes serão discutidos por classes.

Cumarinas



Murranganona (1)

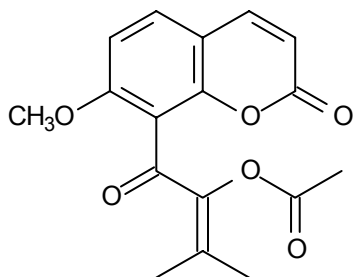
2,5 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 54-57

Atividades Biológicas p. 166 e 168



7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina (2)

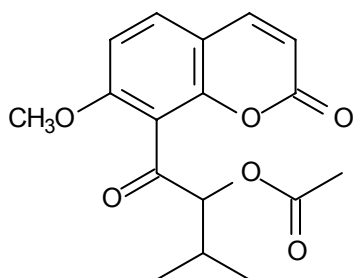
6,6 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 57-63

Atividades Biológicas: p. 166 e 168



Isomurranganona (3)

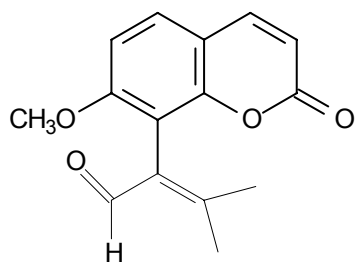
2,4 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 57-63

Atividades Biológicas: p. 166 e 168

**Murralongina (4)**

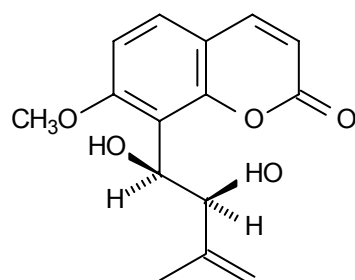
2,4 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1 e caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 29 e 34

Identificação: p.71-77

Atividades Biológicas: p. 166, 167 e 168

**Murrangatina (5)**

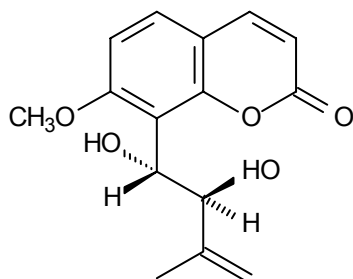
34,5 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp e caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30, 31 e 35

Identificação: p.78-81

Atividades Biológicas: p. 164, 166, 167 e 168

**Munomicrolina (6)**

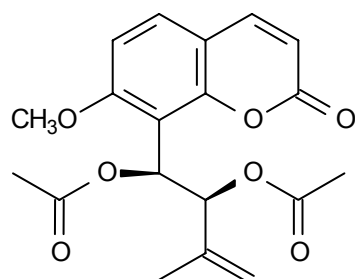
14,2 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp e caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30 e 35

Identificação: p. 81-83

Atividades Biológicas: p. 166, 167 e 168

**Acetato de murrangatina (7)**

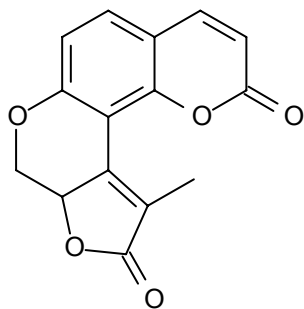
3,0 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 83-84

Atividades Biológicas: p. 166 e 168



Rauianina (8)

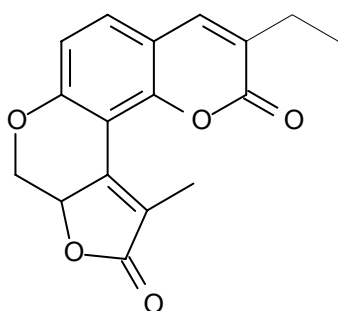
453,8 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1, folhas e caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 34, 35 e 37

Identificação: p. 85-87

Atividades Biológicas: p.164, 166, 168



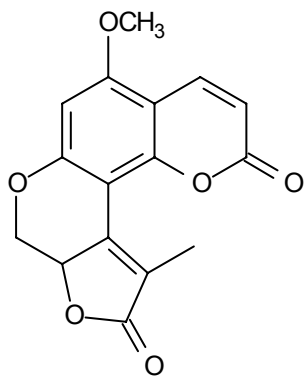
3-Etilrauiianina (9)

1,0 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 29

Identificação: p.88-93



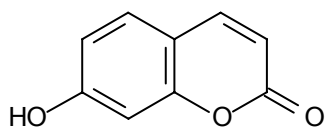
5-Metoxirauianina (10)

1,3 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 93-95



Umbeliferona (11)

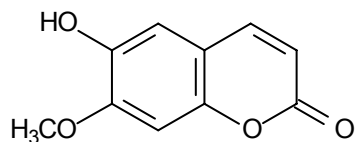
35,4 mg

Procedência: caule e folhas de *Rauia* sp

Isolamento: p. 37

Identificação: p.95-96

Atividades Biológicas: p. 166 e 168



Isoescopoletina (12)

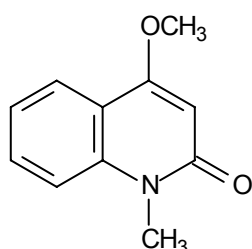
2,2 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p.96-98

Alcalóides



N-Metil-4-metoxi-2-quinolona (13)

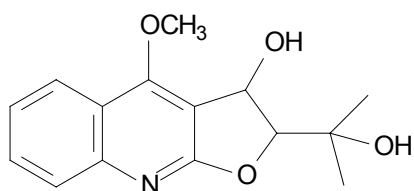
72,6 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p.27, 30 e 31

Identificação: p.102-104

Atividades Biológicas: p. 164, 166, 167 e 168



Mirtopsina (14)

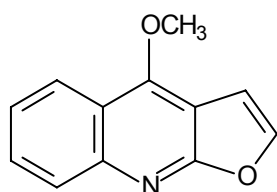
2,5 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 32

Identificação: p. 105-110

Atividades Biológicas: p. 166 e 168



Dictamina (15)

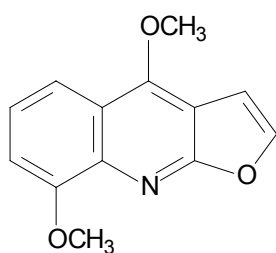
6,6 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p.34

Identificação: p.110-111

Atividades Biológicas: p.164, 166, 167 e 168



γ -Fagarina (16)

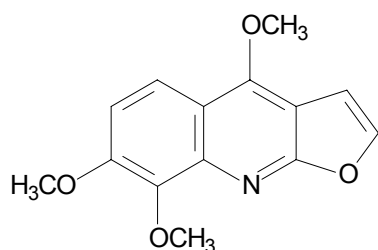
3,2 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30

Identificação: p. 112-113

Atividades Biológicas: p. 164, 166, 167 e 168



Esquimianina (17)

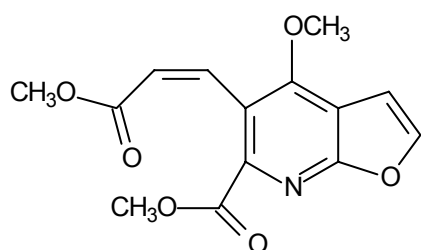
6,6 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30

Identificação: p.113-115

Atividades Biológicas: p. 164, 166, 167 e 168



Z-Rhoifolinato de dimetila (18)

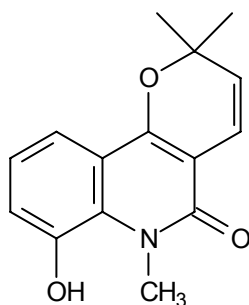
2,3 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30

Identificação: p. 115-116

Atividades Biológicas: p.166 e 168



8-Hidroxi-N-metilflindersina (19)

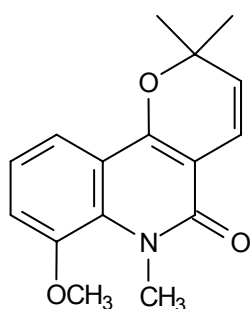
2,5 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p.31

Identificação: p. 117-119

Atividades Biológicas: p. 166 e 168



Zantobungeanina (20)

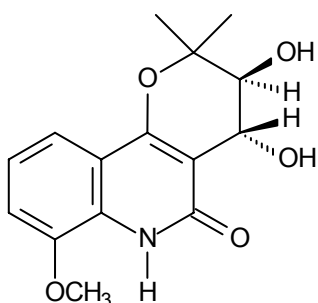
5,8 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 120-121

Atividades Biológicas: p.167



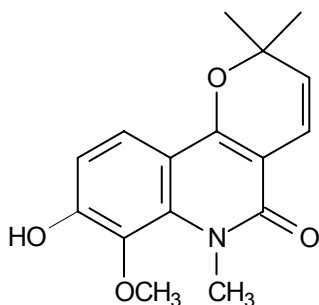
Zantodiolina (21)

1,0 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 31

Identificação: p. 122-126



7-Hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (22)

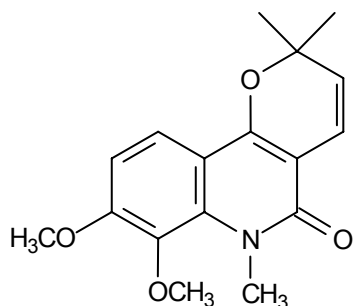
22,6 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 30

Identificação: p. 127-132

Atividades Biológicas: p. 166, 167 e 168



Veprissina (23)

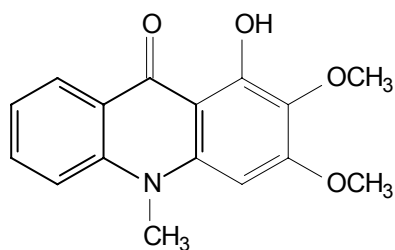
6,5 mg

Procedência: caule de *Rauia* sp

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 133-134

Atividades Biológicas: p. 167



Arborinina (24)

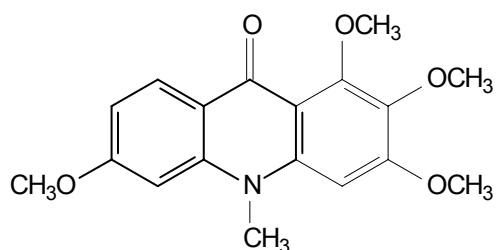
6,2 mg

Procedência: caule de *C. macrophyllus*

Isolamento: p. 38

Identificação: p.134-137

Atividades Biológicas: p.167



Metilarborinina (25)

1,2 mg

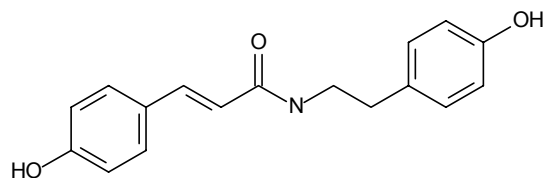
Procedência: caule de *C. macrophyllus*

Isolamento: p. 38

Identificação: p. 138-139

Atividades Biológicas: p.164

Amidas



Paprazina (26)

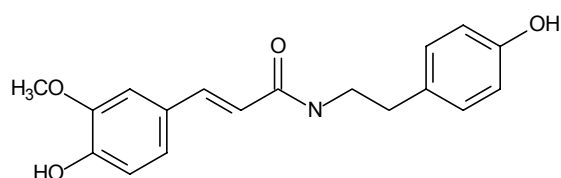
2,6 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 35

Identificação: p. 143-145

Atividades Biológicas: p. 164 e 167



***N-trans* feruloiltiramina (27)**

6,4 mg

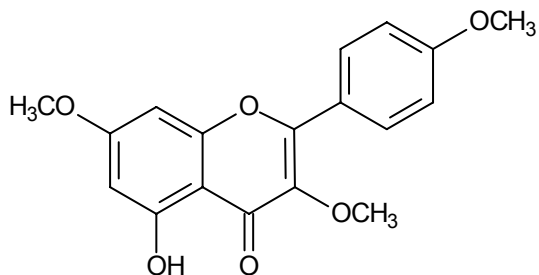
Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p.35

Identificação: p. 145-147

Atividades Biológicas: p. 164 e 167

Flavonóide



3,7,4'-Trimetoxi-5-hidroxi flavona (28)

1,6 mg

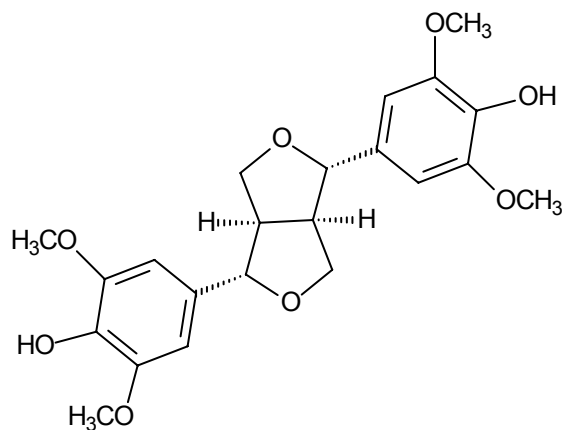
Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 148-150

Atividades Biológicas: p. 166 e 168

Lignana



Siringaresinol (29)

14,1 mg

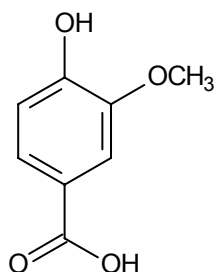
Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 38

Identificação: p.138-139

Atividades Biológicas: p. 164

Composto Fenólico



Ácido vanílico (30)

2,2 mg

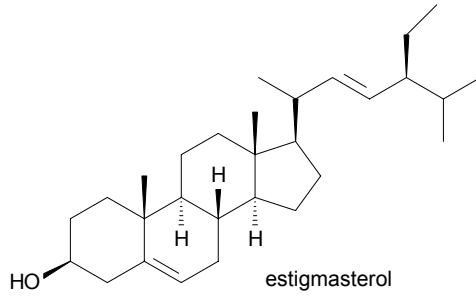
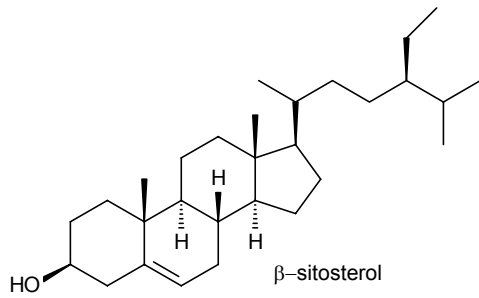
Procedência: folhas de *Rauia* sp1

Isolamento: p. 35

Identificação: p. 145-147

Atividades Biológicas: p. 164 e 167

Esteróides



**Mistura do sitosterol(31) e
estigmasterol (32)**

265 mg

Procedência: folhas de *Rauia* sp e
caule de *C. macrophyllus*

Isolamento: p. 34

Identificação: p.148-150

Atividades Biológicas: p. 166 e 168

5- Determinação estrutural

5.1- Cumarinas

As cumarinas são substâncias amplamente encontradas em plantas. Entretanto, espécies pertencentes às famílias Rutaceae e Umbelliferae representam as fontes mais ricas destes metabólitos, onde ocorrem com grande diversidade estrutural (GRAY & WATERMAN, 1978; ESTÉVEZ-BRAUM & GONZÁLEZ, 1997).

Foram isoladas de *Rauia* sp oito substâncias que apresentaram o mesmo padrão de sinais na região aromática do espectro de RMN ^1H , sendo quatro dubletos integrando para um hidrogênio cada, característicos de sistema AX. Dois deles em δ 6,1-6,4 e δ 7,5-8,3, com constante de acoplamento da ordem de 9,5 Hz, referentes aos hidrogênios nas posições 3 e 4 respectivamente e outros dois com constante de acoplamento da ordem de 8,5 Hz ocorrendo em δ 6,6-6,9 e em δ 7,1-7,5 indicam substituição no carbono 8 (MURRAY *et al.*, 1982).

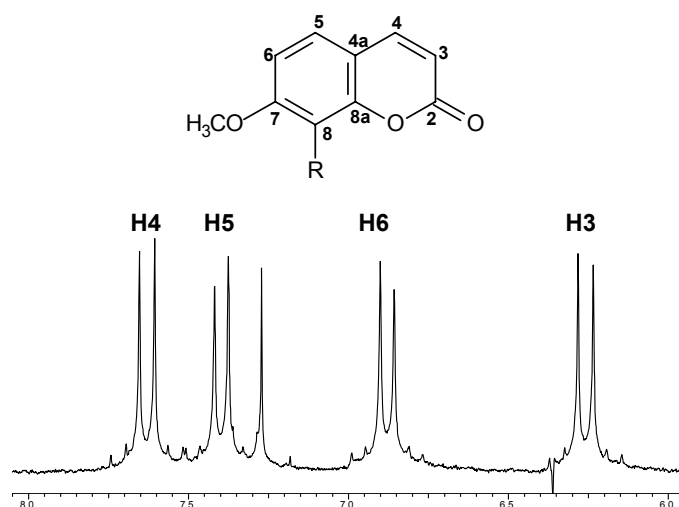


FIGURA 5.1- Região aromática do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de cumarinas substituídas na posição 8.

Os espectros de RMN ^{13}C de cumarinas substituídas nas posição 8 apresentam sinais característicos para o esqueleto cumarínico: δ 160,8-160,0 (C-2); δ 113,6-112,8 (C-3); δ 143,9-143,3 (C-4); δ 113,6-111,8 (C-4a); δ 130-126,6 (C-5); δ 108,1-107,1 (C-6); δ 161,6-159,7 (C-7); δ 116,1-112,1 (C-8); δ 154,7-152,0 (C-8a); δ 56,4-55,8 (C7-OMe) (SUAREZ & MONACHE, 1991).

5.1.1- Determinação Estrutural da Substância 1

A substância **1** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

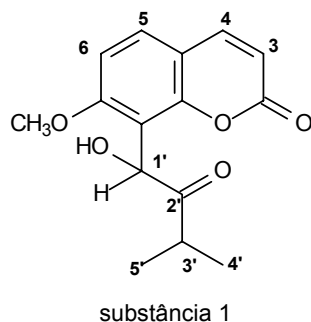
O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **1** (FIGURA 5.2) apresenta quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituído nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) como discutido no item 5.1. Observa-se um singleto integrando para três hidrogênios em δ 3,87 que pode ser atribuído a uma metoxila na posição 7.

O espectro apresenta ainda dois dubletos em δ 5,90 e δ 4,24 (1H, $J=4,9\text{Hz}$). No espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$) da substância **1** (FIGURA 5.3) o sinal em δ 4,24 não é observado indicando a presença de um grupo hidroxila, e observa-se um singleto em δ 5,90 sugerindo que o hidrogênio hidroxílico acopla com o carbinólico.

Observa-se ainda um septupletto em δ 2,61 (1H $J=7,0$ Hz) e dois dubletos integrando para 3 hidrogênios cada, em δ 1,12 ($J=7,0$ Hz) e δ 0,99 ($J=7,0$ Hz), sugerindo a presença de duas metilas ligadas a um CH.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.4) mostra sinais referentes a 15 carbonos. Observa-se os sinais característicos do esqueleto cumarínico substituído nas posições 7 e 8. Observa-se ainda um sinal em δ 212,5 que sugere a presença de uma carbonila no grupo ligado ao carbono 2', um sinal em δ 68,5 confirma a presença carbono carbinólico e os sinais em δ 19,7 e δ 17,9 são atribuídos às metilas.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam a seguinte estrutura para a substância **1**



ITO e colaboradores em 1987 isolaram esta substância que foi chamada de murranganona e apresentou atividade ótica ($[\alpha]_D^{25} = +105,8$ em clorofórmio). Porém em 1989 IMAI e colaboradores isolaram uma substância supostamente idêntica à murranganona, para a qual não foi observada atividade ótica sendo a substância chamada de murpaniculol. A atividade ótica da substância **1** foi medida em diclorometano e o valor encontrado foi de $[\alpha]_D^{25} = +5,5$, portanto a substância **1** possui atividade ótica.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **1** é a cumarina conhecida como murranganona isolada anteriormente de *Murraya exotica* (ITO *et al.*, 1987). Os dados RMN de ^1H (ITO *et al.*, 1987) e de ^{13}C (IMAI *et al.*, 1987), da substância **1**, assim como os dados da literatura estão representados na TABELA 5.1.

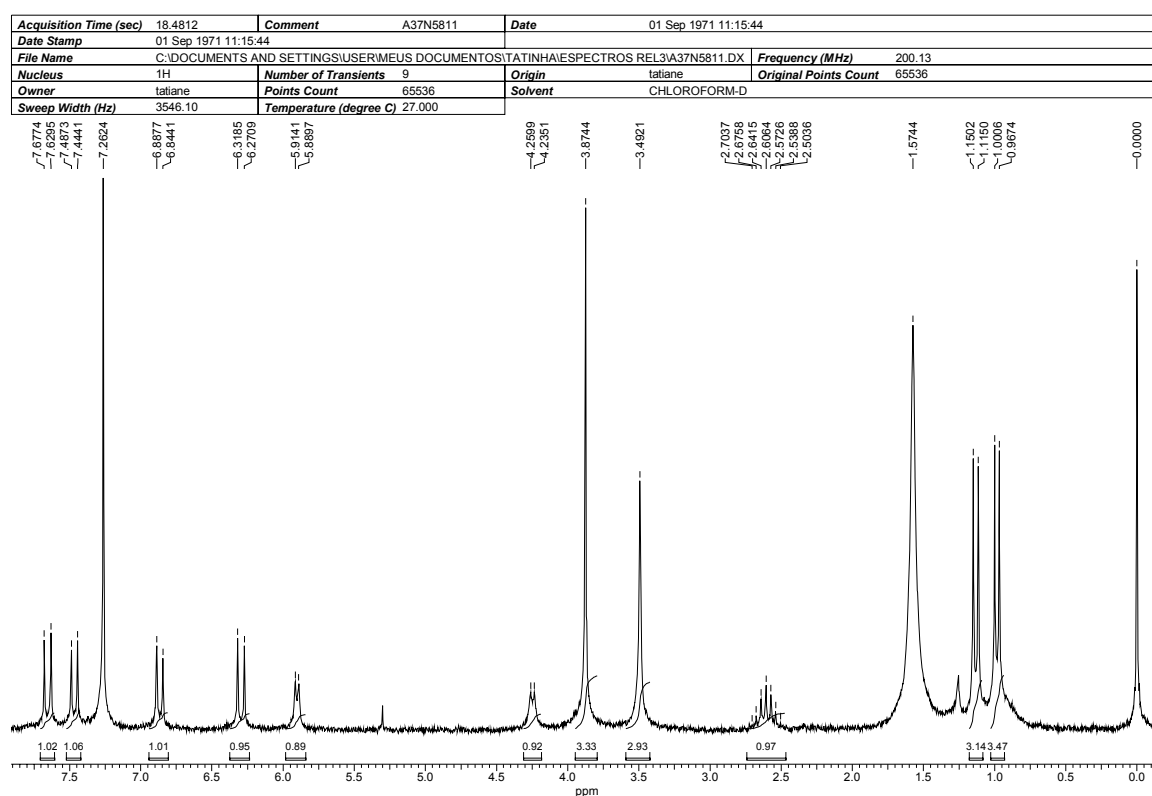


FIGURA 5.2- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da murranganona.

Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A385811H	Date	06 Sep 1971 12:00:48
Date Stamp	06 Sep 1971 12:00:48				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHAI\BACK UP RMN\TATI\RMN\2004\A385811H.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Original Points Count	65536	Owner	italiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Origin	italiane
				Solvent	CHLOROFORM-D

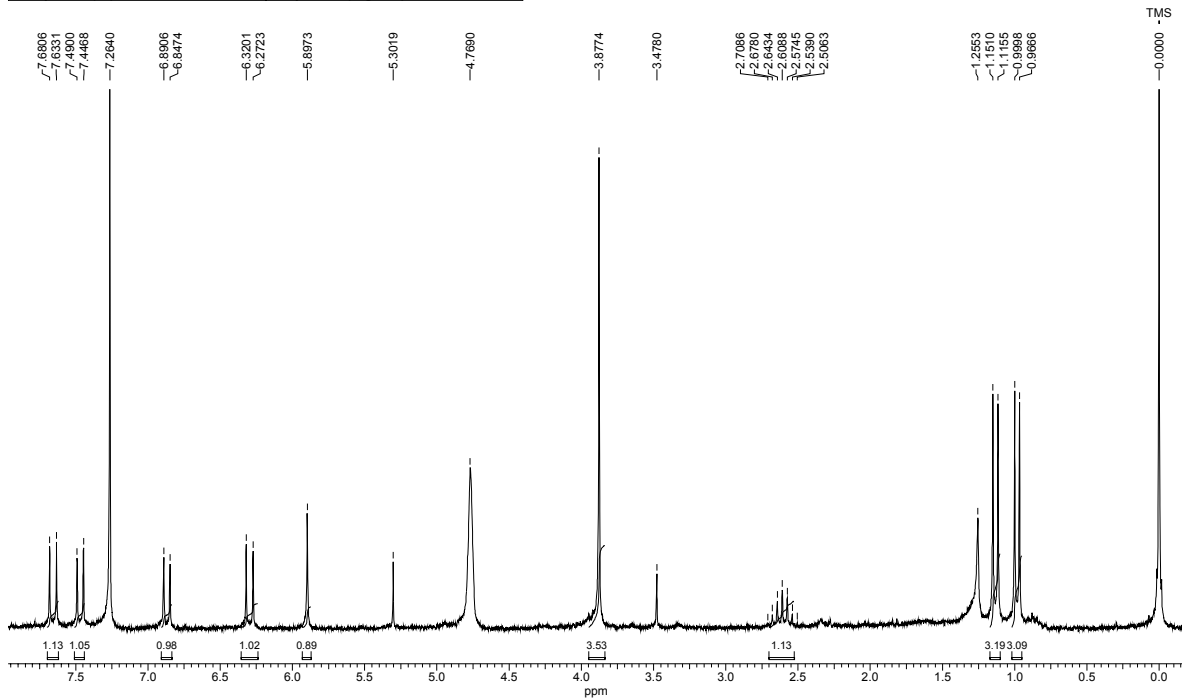


FIGURA 5.3- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + D₂O) da murranganona

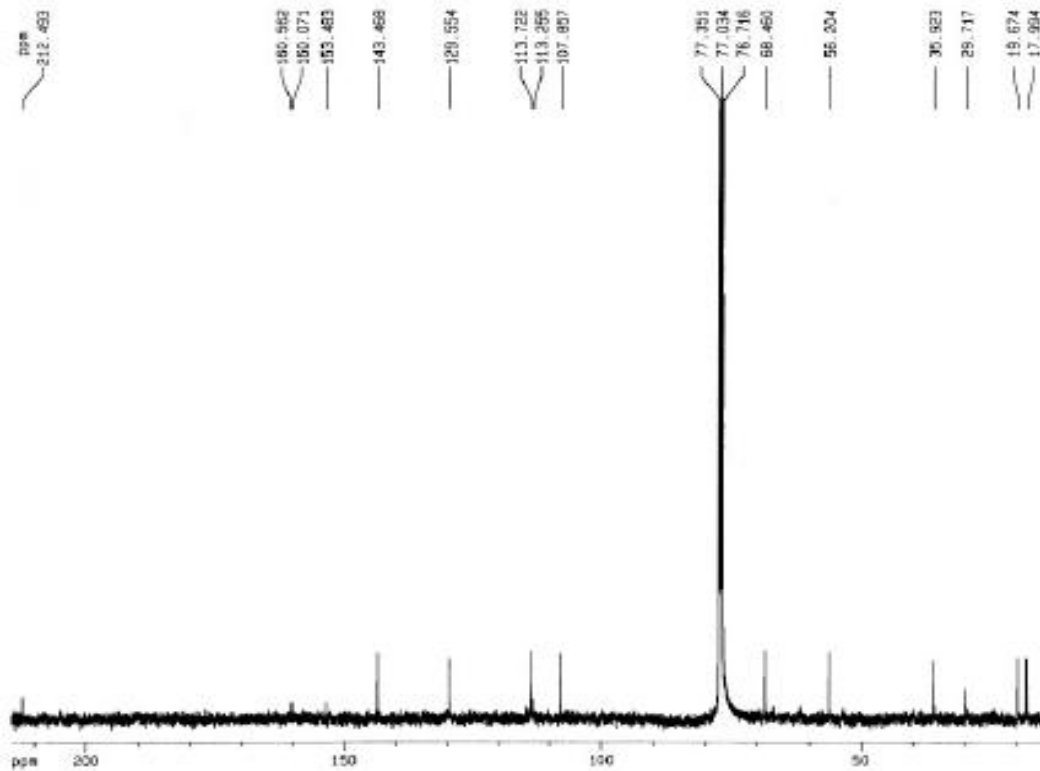


FIGURA 5.4- Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da murranganona.

TABELA 5.1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murranganona

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)	δ_{C} ^(c)	δ_{C} ^(c) (lit)
2			160,6 ou 160,1	160,4 ou 159,9
3	6,29 (d, 9,6 Hz)	6,29 (d, 9,4 Hz)	113,7	113,1 ou 113,3
4	7,65 (d, 9,6 Hz)	7,65 (d, 9,4 Hz)	143,5	143,5
4a			113,2	113,1 ou 113,3
5	7,47 (d, 8,6 Hz)	7,46 (d, 8,7 Hz)	129,6	129,5
6	6,87 (d, 8,6 Hz)	6,86 (d, 8,7 Hz)	107,9	107,8
7			160,6 ou 160,1	160,4 ou 159,9
8			n.o.	114,3
8a			153,5	153,2
1'	5,90 (d, 4,9Hz)	5,90 (d, 5,7Hz)	68,5	68,3
2'			212,5	212,4
3'	2,61(sep, 7,0Hz)	2,61 (quint, 6,7Hz)	35,9	35,7
4'	1,12 (d, 7,0 Hz)	1,13 (d, 6,7 Hz)	18,0 ou 19,7	17,8 ou 19,4
5'	0,99 (d, 7,0 Hz)	0,98 (d, 6,7 Hz)	18,0 ou 19,7	17,8 ou 19,4
OCH₃	3,87 (s)	3,87 (s)	56,2	56,1
OH	4,24 (d, 4,9Hz)	5,23 (d, 5,7Hz)		

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 270MHz; (c) CDCl_3 , 100MHz; n.o.=não observado

5.1.2- Determinação Estrutural da Substância 2

A substância **2** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **2** (FIGURA 5.5) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982), como discutido no item 5.1. Observa-se um singleto integrando para três hidrogênios em δ 3,88 que pode ser atribuído a uma metoxila na posição 7.

O espectro apresenta ainda três singletos, que integram para três hidrogênios cada, em δ 2,27, δ 1,85 e δ 1,81 o que sugere a presença de metilas sobre dupla ligação e/ou metila de grupo acetato.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.6) mostra sinais referentes a 17 carbonos. Além dos sinais característicos do esqueleto cumarínico substituído nas posições 7 e 8, observa-se um sinal em δ 186,2 que sugere a

presença de uma carbonila e um sinal em δ 168,6 que sugere a presença de uma carbonila de éster.

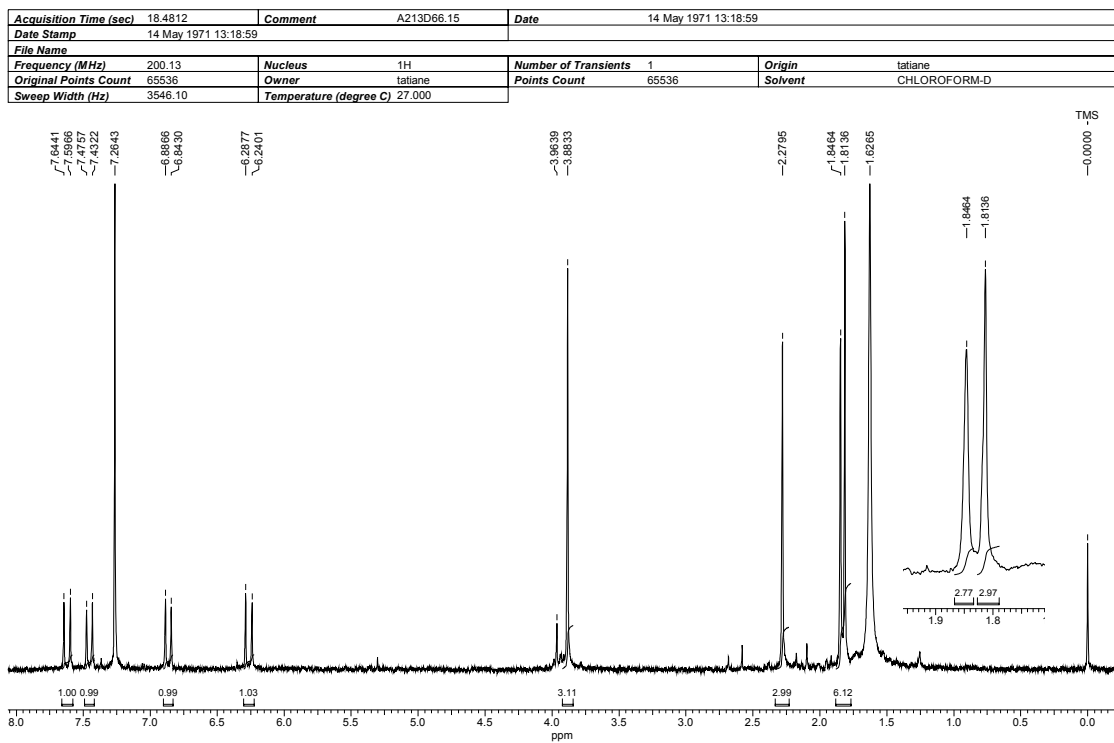


FIGURA 5.5- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **2**.

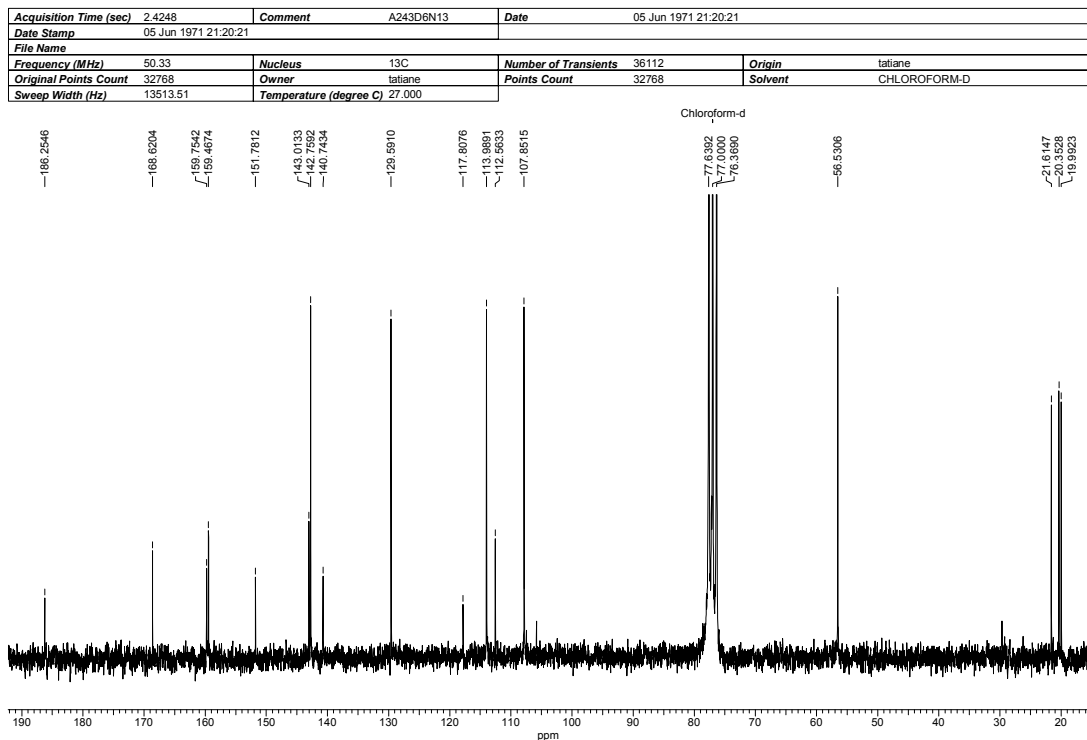


FIGURA 5.6- Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) da substância **2**.

O mapa de contorno de HMBC (FIGURAS 5.7, 5.8 e 5.9) mostra as correlações dos hidrogênios com os carbonos a uma, duas e três ligações.

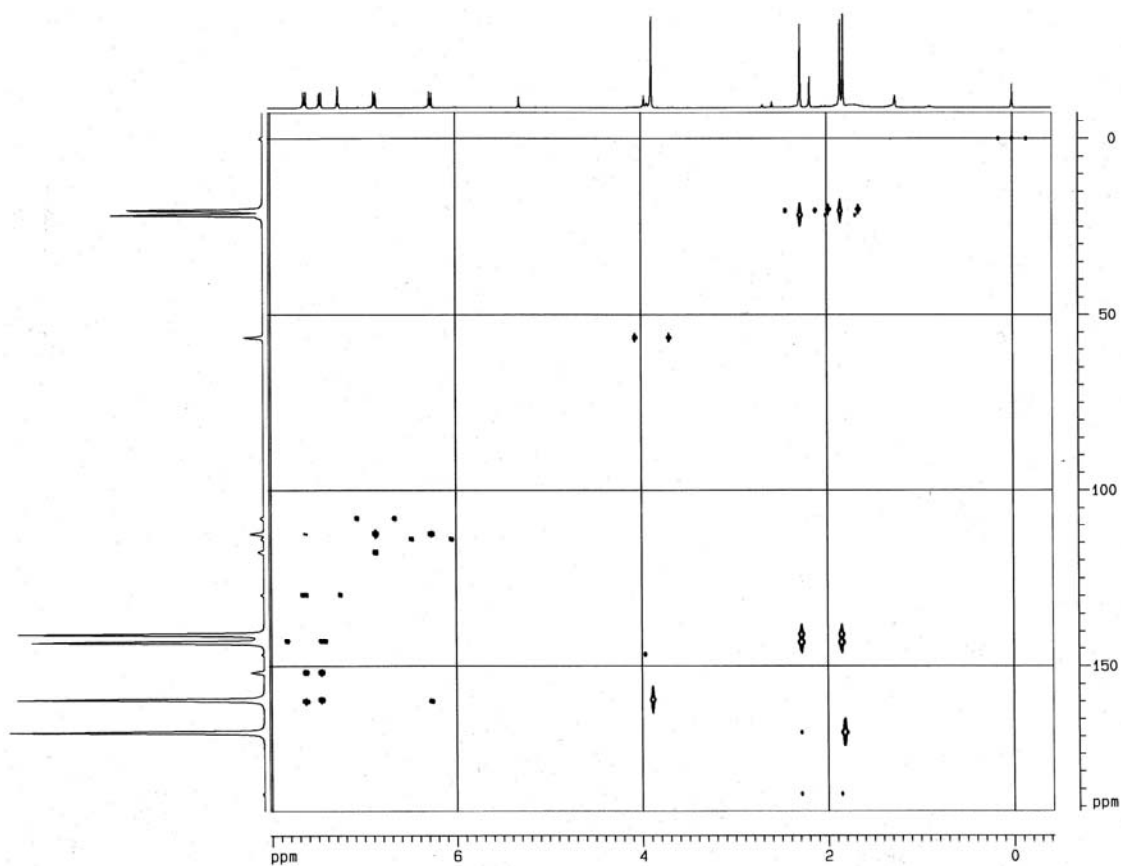


FIGURA 5.7-Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl₃) da substância **2**.

A análise da expansão da região aromática no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.8) mostra as correlações do esqueleto cumarínico.

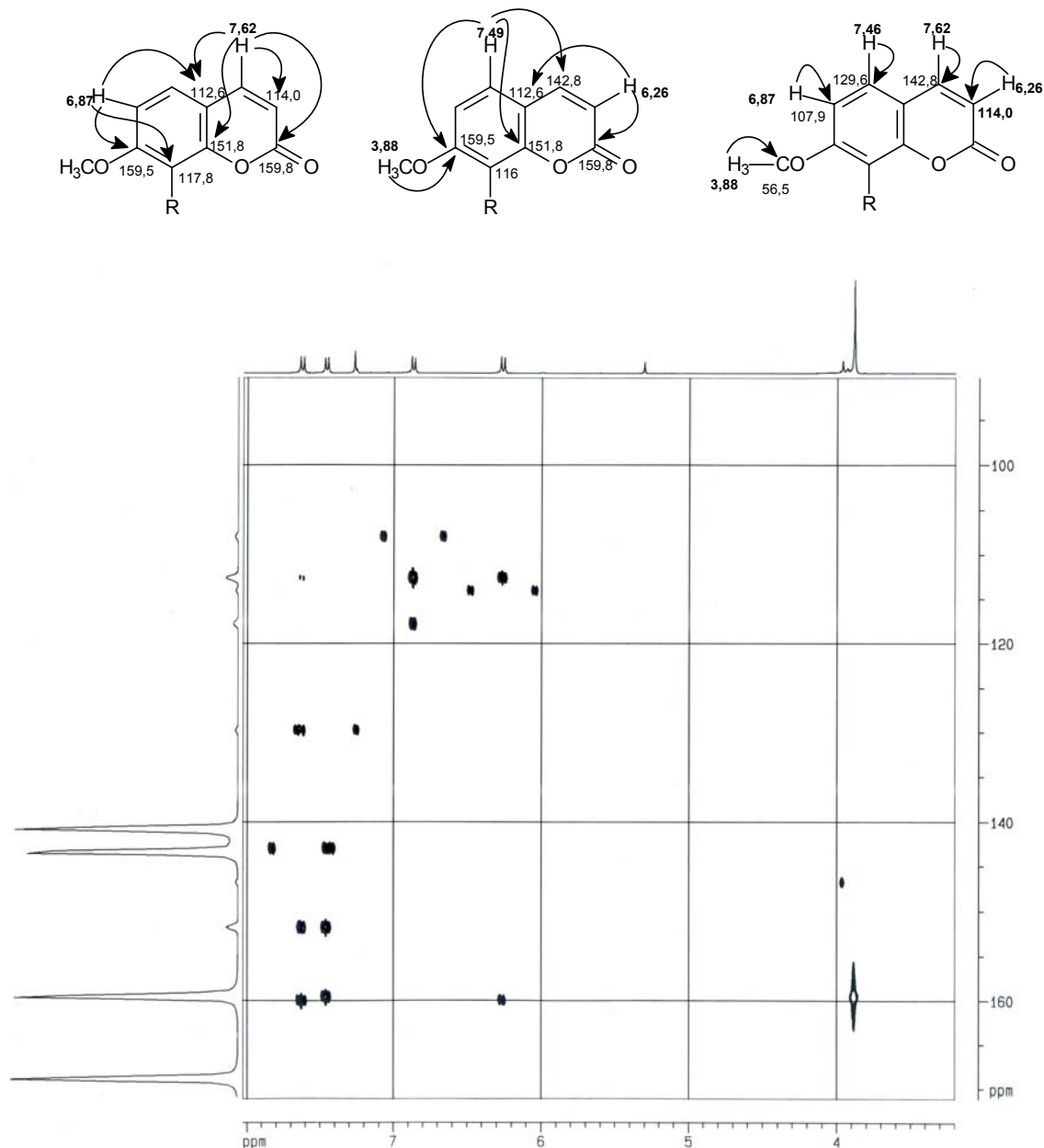


FIGURA 5.8- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância **2**.

A análise da expansão da região das metilas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.9) mostra a correlação dos hidrogênios das metilas com carbonos com sinais entre δ_C 145 e δ_C 190. Através da correlação entre o hidrogênio em δ_H 1,81 e o carbono em δ_C 168,6 foi possível atribuir esta metila ao grupo acetato. Foi observada uma correlação fraca entre o sinal da metila em δ_H 2,28 e a carbonila do éster (δ_C 168,6), indicando que esta metila está na posição *trans* em relação ao grupo acetato. Tanto o sinal em δ_H 2,28 quanto em δ_H 1,85 mostraram correlação com os sinais em δ_C 140,7 e δ_C 143,0 e com a carbonila em δ_C 186,2, portanto a metila com

sinal em δ_H 2,28 se encontra na posição *cis* com relação à carbonila. A presença da carbonila faz com que o sinal da metila na posição *cis* seja mais desblindado (δ_H 2,28) em que a metila na posição *trans* (δ_H 1,85), isso ocorre porque os elétrons π da ligação C=O blindam as zonas cônicas acima e abaixo do plano e desblindam as zonas laterais (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

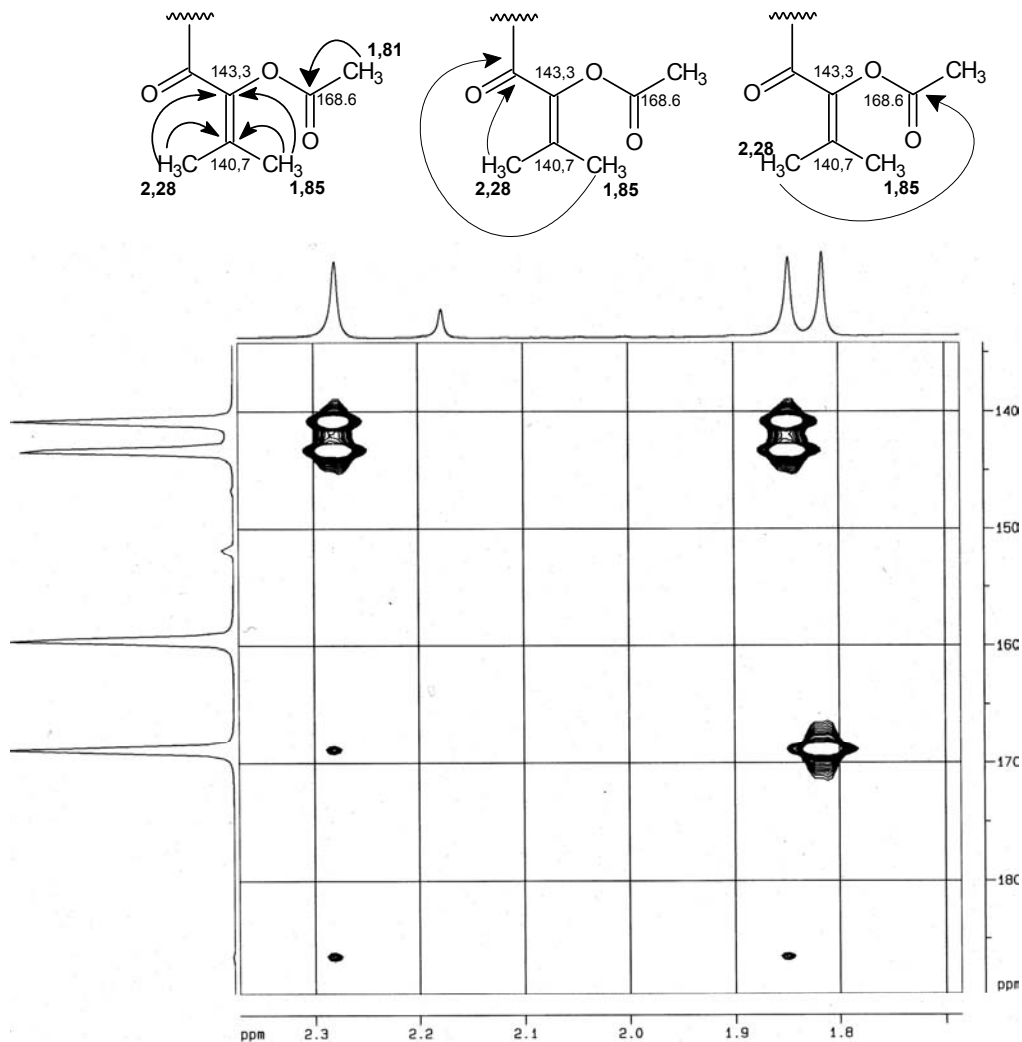


FIGURA 5.9- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 2.

A análise da expansão da região das metilas no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.10) mostra a correlação dos hidrogênios das metilas com carbonos com sinais entre δ_C 10 e δ_C 30. Observam-se as correlações a uma ligação entre o sinal em δ_H 1,82 e δ_C 20,0; δ_H 1,85 e δ_C 21,6 e δ_H 2,28 e δ_C 20,4. Observam-se ainda as correlações a três ligações entre os sinais em δ_H 1,82 e δ_C 20,4 e entre os sinais em δ_H 2,28 e δ_C 21,6 o que confirma que as metilas são geminais.

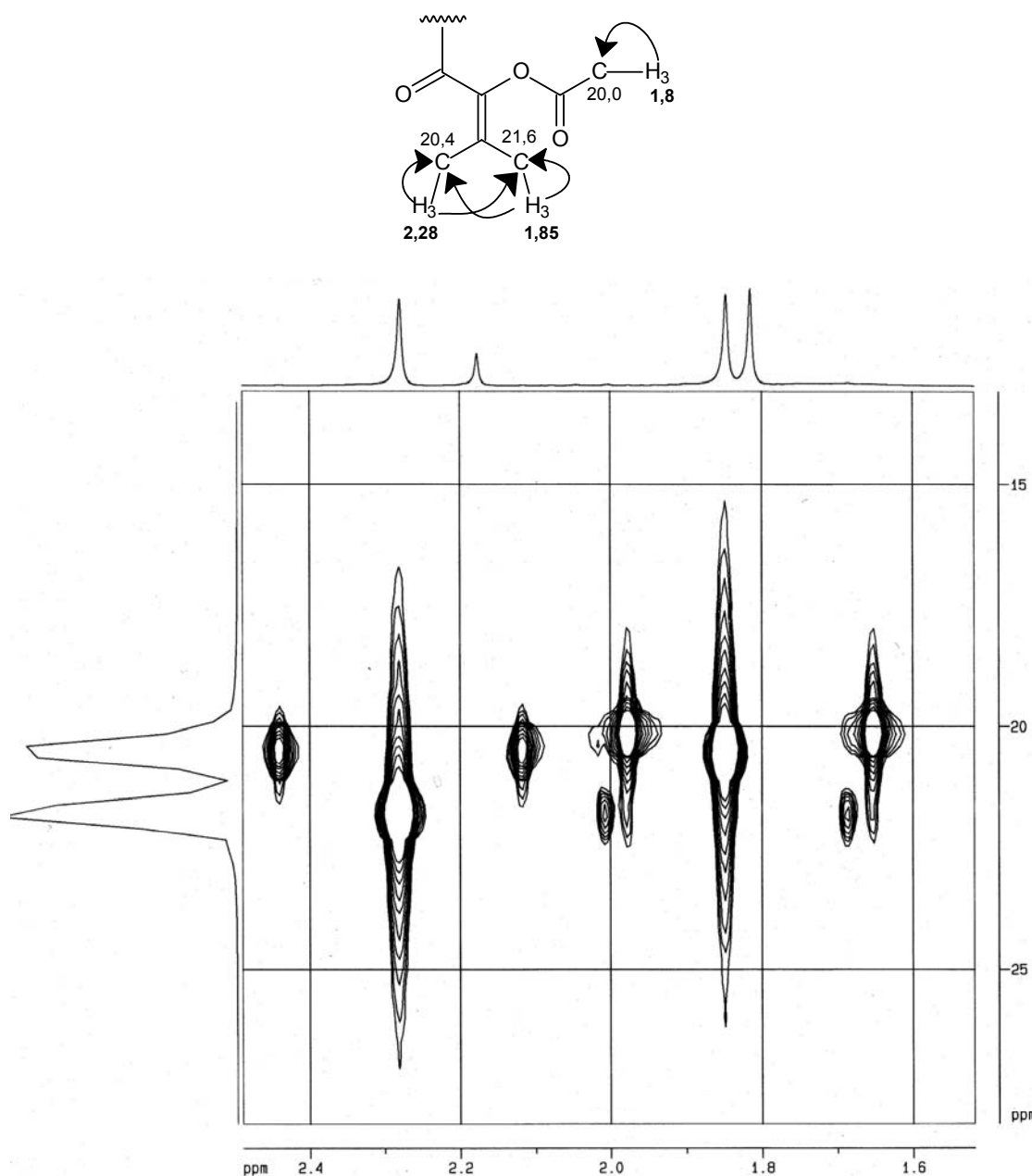
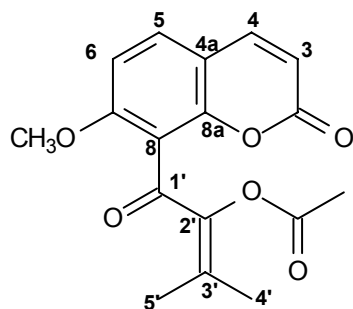


FIGURA 5.10- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância **2**.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **2** é a cumarina conhecida como 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina, isolada anteriormente de *Phebalium ralstonii* (BEVALOTI *et al.*, 1988). Através dos dados de HSQC, HMBC e RMN ¹³C foi possível atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos de todos os carbonos da molécula, uma vez que nos dados da literatura os carbonos com deslocamento químico muito próximos não foram diferenciados. Os dados RMN de ¹H e ¹³C da substância **2** assim como os dados descritos na literatura estão descritos na TABELA 5.2.



7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina

TABELA 5.2- Dados de RMN ^1H e de ^{13}C da 7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)	δ_{C} ^(c)	δ_{C} ^(c) (lit.)
2			159,8	159,7 ou 159,3
3	6,26 (d, 9,5 Hz)	6,26 (d, 9,5 Hz)	114,0	107,9
4	7,62 (d, 9,5 Hz)	7,62 (d, 9,5 Hz)	142,8	142,8
4a			112,6	112,5
5	7,46 (d, 8,7 Hz)	7,45 (d, 8,6 Hz)	129,6	129,6
6	6,87 (d, 8,7 Hz)	6,87 (d, 8,6 Hz)	107,9	113,4
7			159,5	159,7 ou 159,3
8			117,8	117,6
8a			151,8	151,6
1'			186,2	186,2
2'			143,0	142,9 ou 140,7
3'			140,7	142,9 ou 140,7
4'	1,85 s	1,85 ou 2,27 s	21,6	21,5; 20,2 ou 19,9
5'	2,28 s	1,85 ou 2,27 s	20,4	21,5; 20,2 ou 19,9
OCH₃	3,88 s	3,88 s	56,5	56,4
CH₃COO	1,82 s	1,81 s	20,0	21,5; 20,2 ou 19,9
CH₃COO			168,6	168,5

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 250MHz; (c) CDCl_3 , 50MHz; (d) CDCl_3 , 90,56MHz

5.1.3- Determinação Estrutural da Substância 3

A substância **3** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **3** (FIGURA 5.11) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) como discutido no item 5.1. Observa-se um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,90 que pode ser atribuído a uma metoxila na posição 7.

Foi observado ainda um dubleto em δ 5,75 (1H, $J=3,3$ Hz), um duplo septupletto em δ 2,38 (1H, $J= 6,8$ e $3,3$ Hz), um singlete em δ 2,07 (3H), que sugere a presença de uma metila sobre dupla ligação ou metila de grupo acetato e um dubleto em 1,03 (6H, $J=6,8$ Hz) que sugere a presença de duas metilas ligadas a um carbono terciário (CH).

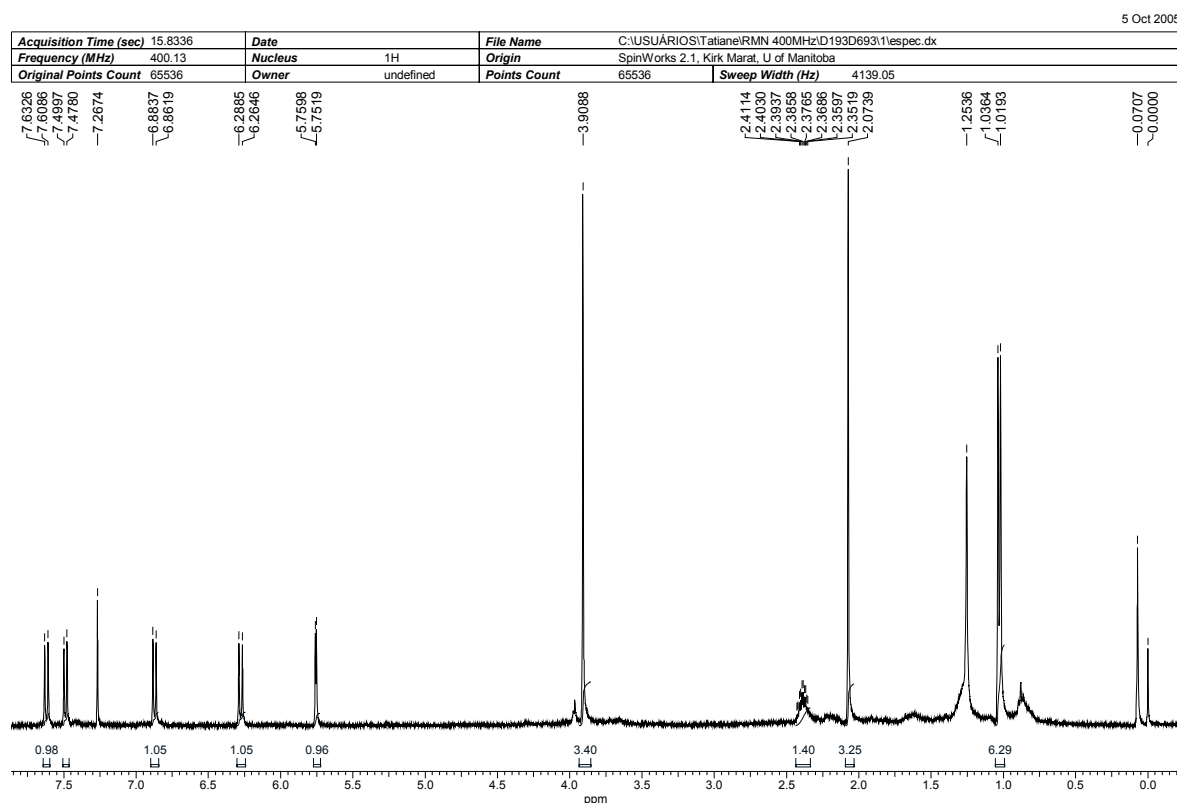


FIGURA 5.11- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.12) mostra sinais referentes a 9 carbonos, porém não foram observados os sinais referentes a carbonos quaternários já que a substância foi isolada em pequena quantidade e o tempo de aquisição de espectro não foi suficiente para que os sinais referentes aos carbonos quaternários fossem adquiridos.

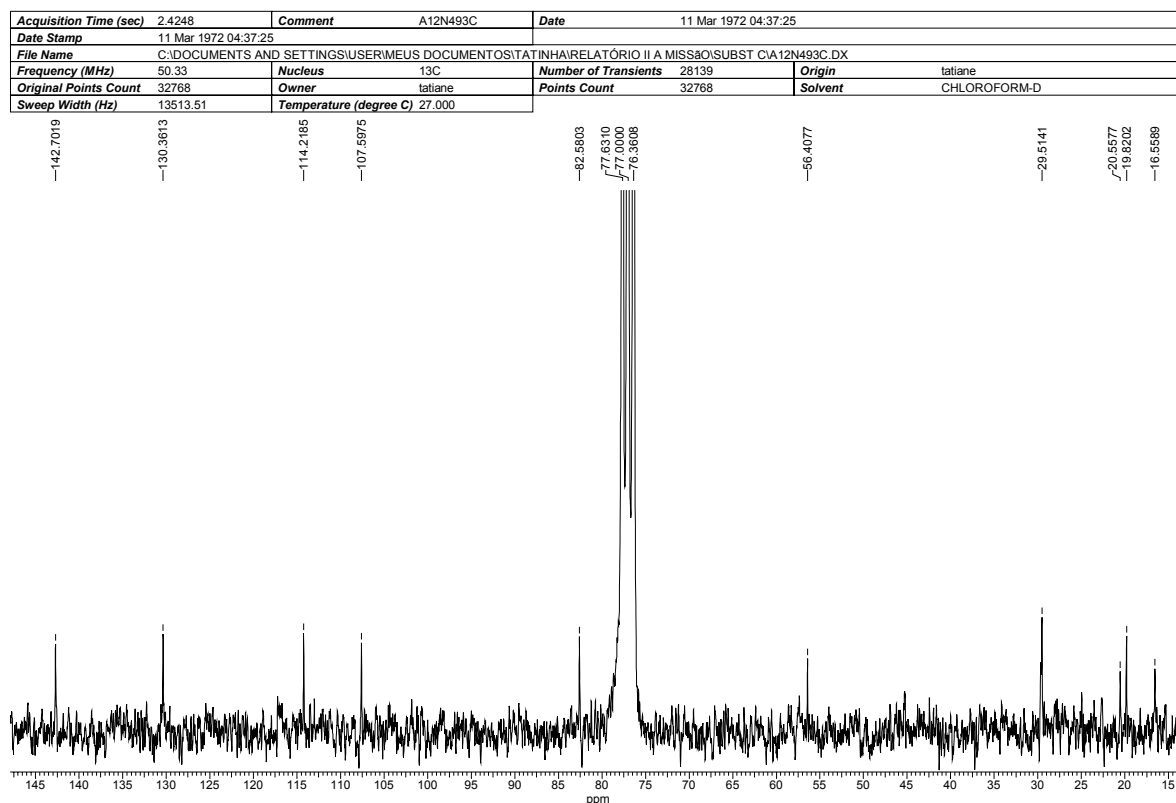


FIGURA 5.12- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **3**.

A análise do mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.13) permitiram que fossem atribuídos os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados.

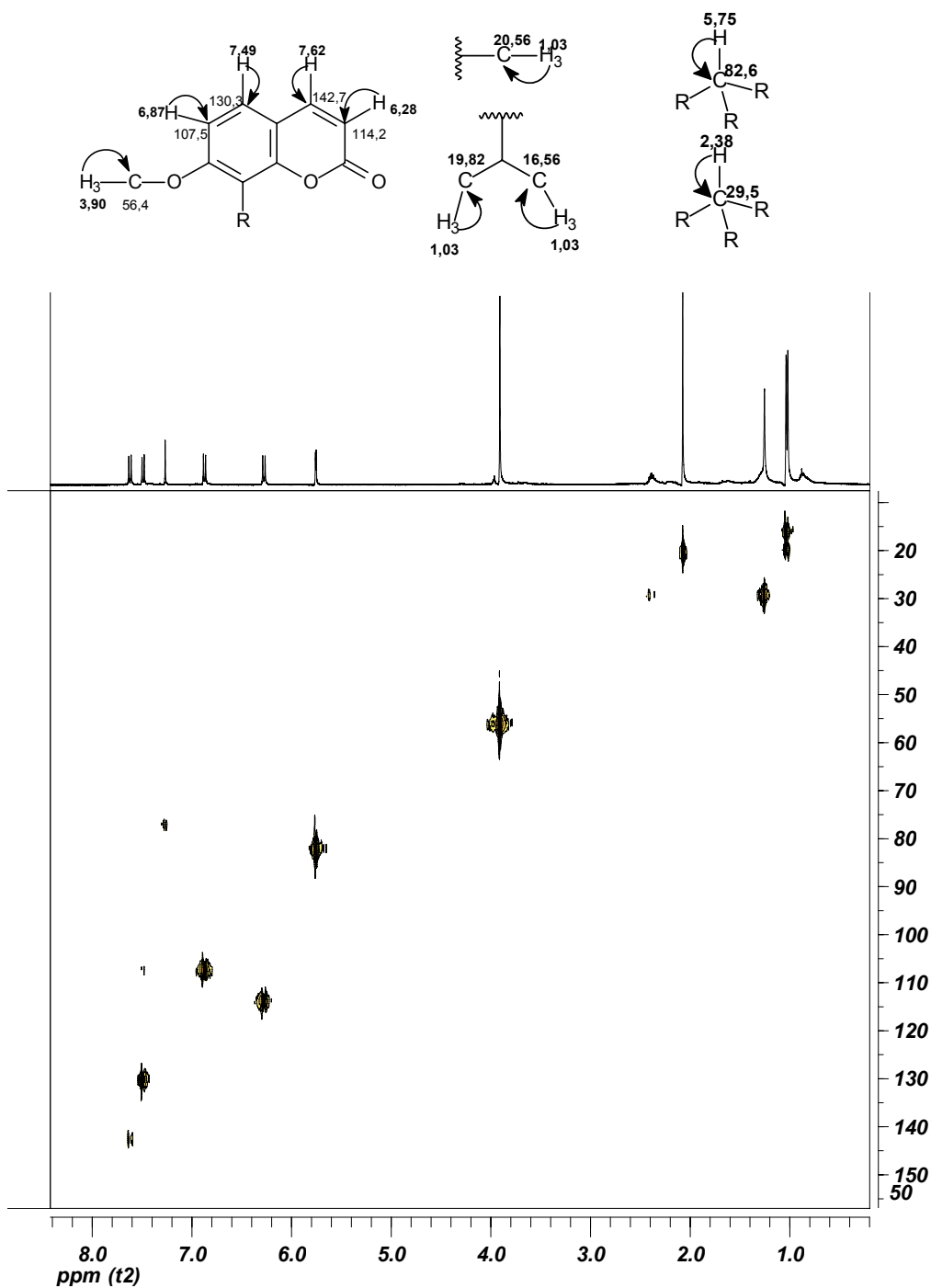


FIGURA 5.13- Mapa de contorno de HSQC da substância 3

Através das projeções dos deslocamentos químicos do espectro de carbono no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.14), que mostra as correlações dos hidrogênios com carbonos a duas e três ligações, foi possível estimar os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários.

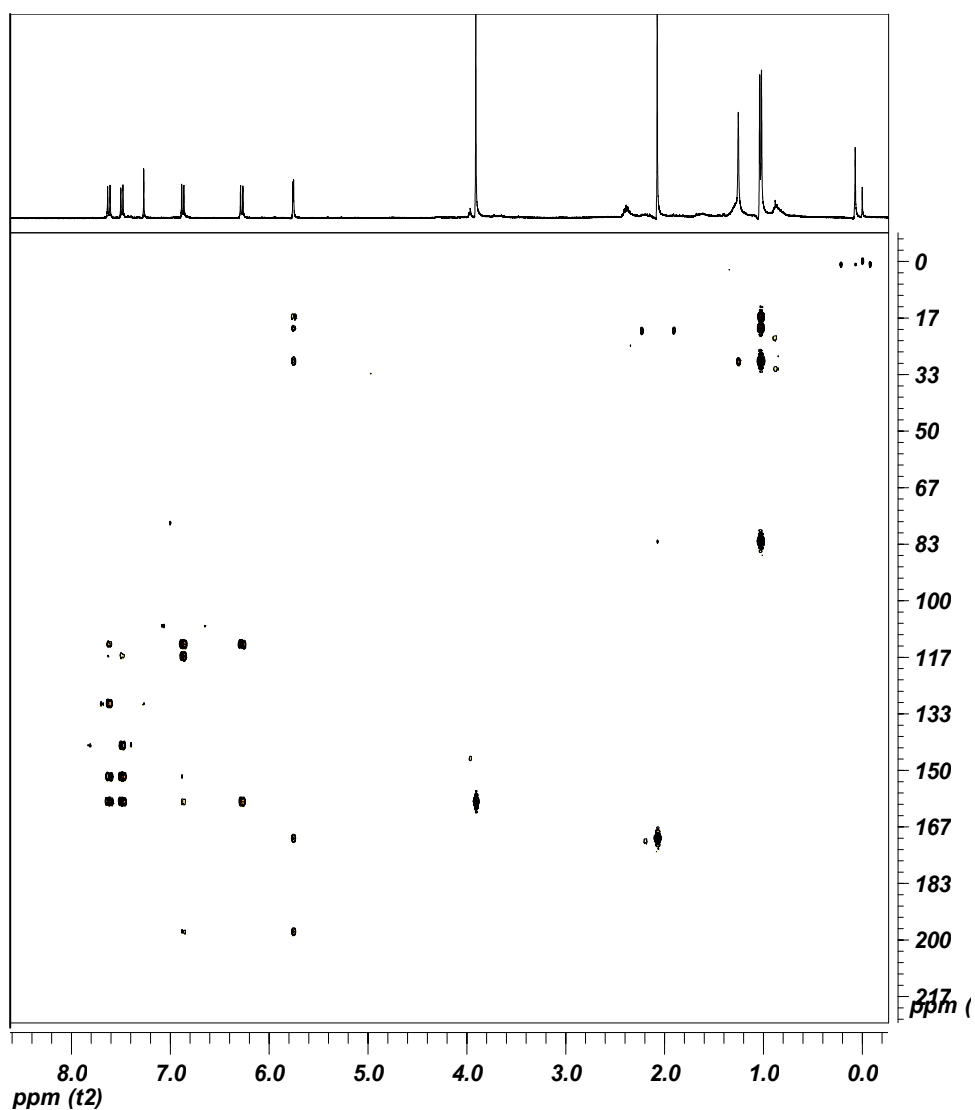


FIGURA 5.14- Mapa de contorno de HMBC da substância **3**

Através da análise da expansão da região de δ_{H} 8,0-3,5 do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.15) é possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos do esqueleto cumarínico.

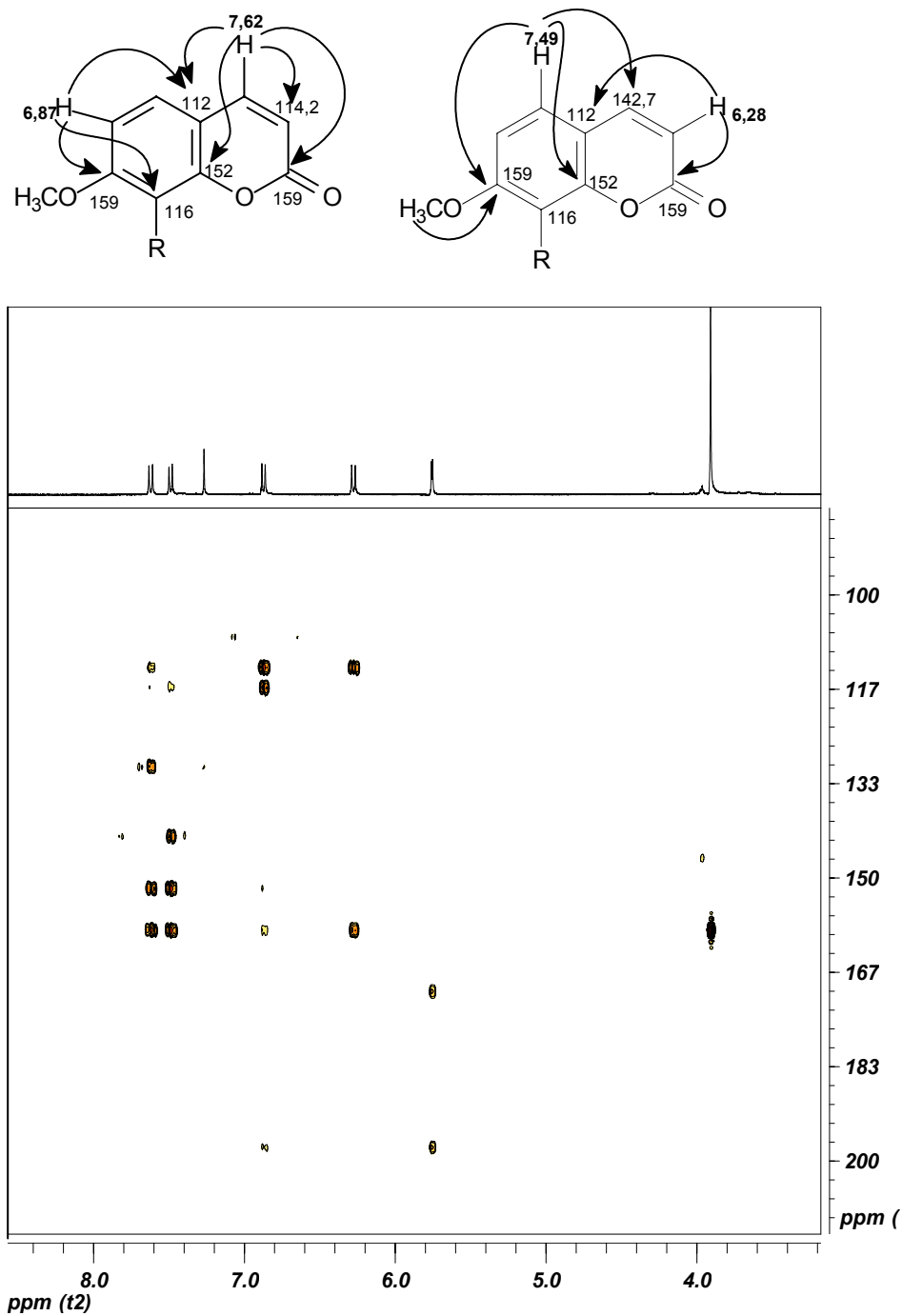


FIGURA 5.15- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância **3**.

Através da análise da expansão da região de δ_{H} 2,50-0 do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.16) é possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos do grupo substituinte na posição 8.

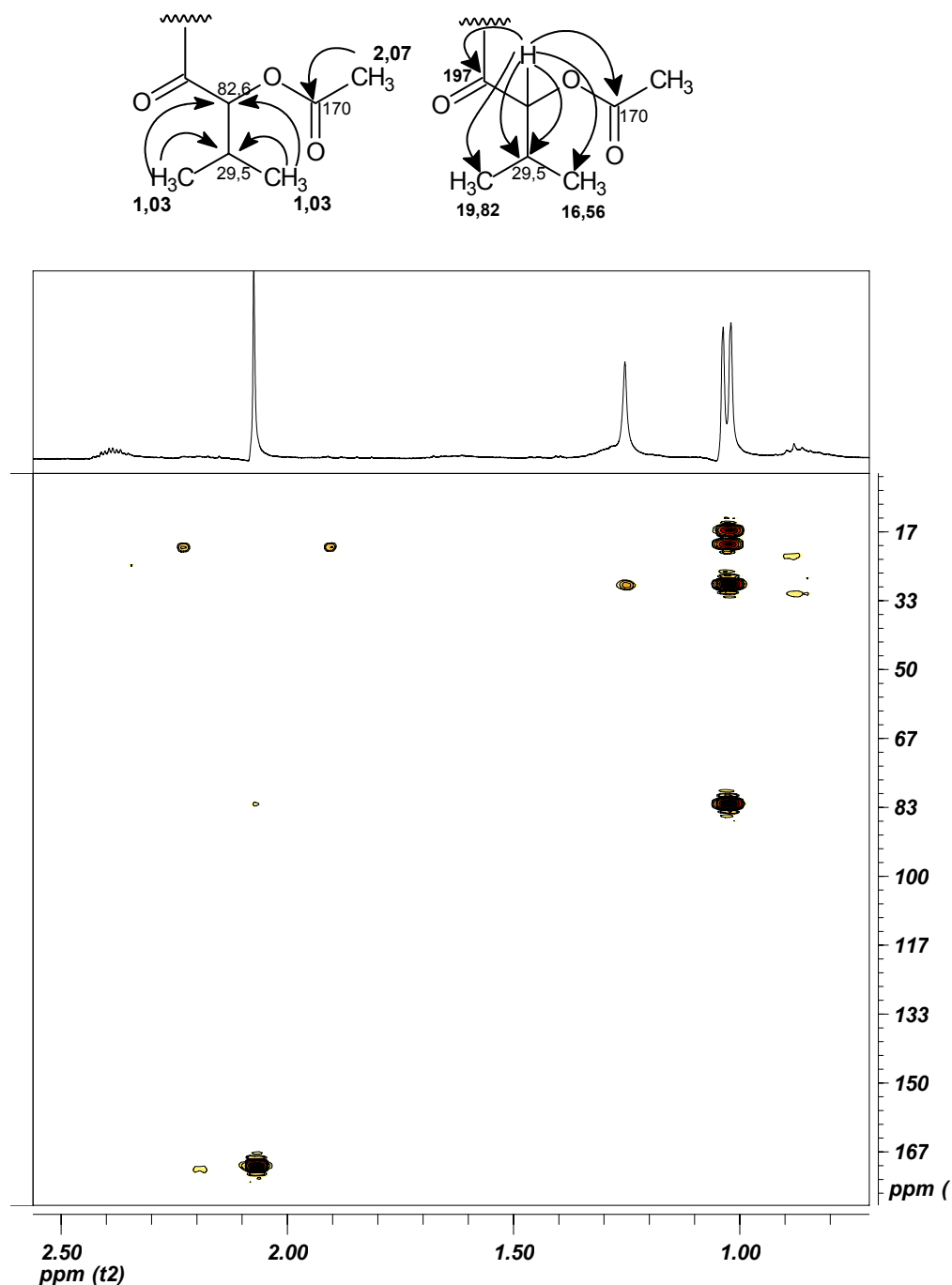


FIGURA 5.16- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância **3**.

O espectro de massas obtido através de CG-EM (FIGURA 5.17) não apresenta o pico do íon molecular. O pico base m/z 203 (100%) é característico de cumarinas substituídas na posição 8, onde a cadeia lateral apresenta uma carbonila na posição 1' e um grupo acetoxi na posição 2' (QUADER *et al.*, 1992) A proposta de fragmentação está descrita na FIGURA 5.18.

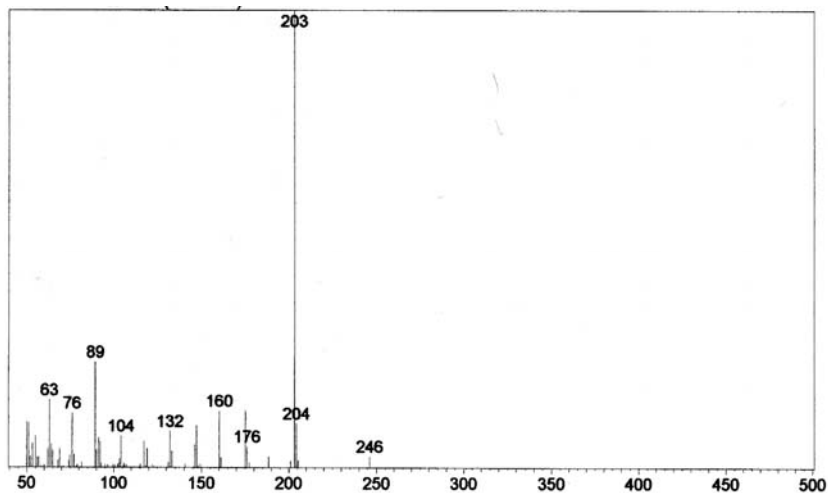


FIGURA 5.17-espectro de massas da substância **3**.

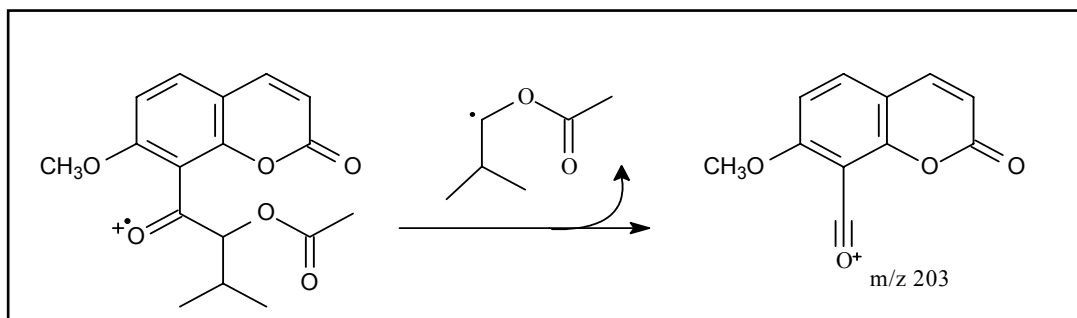


FIGURA 5.18- Proposta de fragmentação para a substância **3**.

A análise dos dados indica que a substância **3** é uma cumarina conhecida como isomurranganona, isolada anteriormente de plantas da espécie *Phebalium* (Rutaceae) (QUADER *et al.*, 1992). Os dados espectroscópicos da isomurranganona não foram encontrados na literatura. A atividade óptica da substância isomurranganona foi medida e o valor encontrado foi de $[\alpha]_D^{25} = +33,3$ em diclorometano.

Os dados RMN de ^1H da isomurranganona estão apresentados na TABELA 4.3.

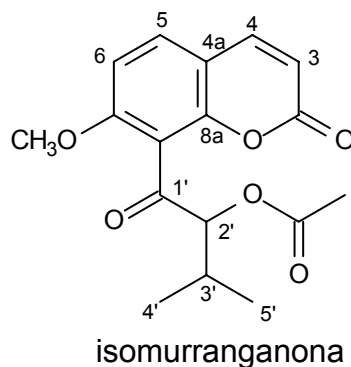


TABELA 5.3- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da isomurranganona

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{C} ^(b)
2		159*
3	6,28 (<i>d</i> , 9,6 Hz)	114,2
4	7,62 (<i>d</i> , 9,6 Hz)	142,7
4a		112*
5	7,49 (<i>d</i> , 8,6 Hz)	130,3
6	6,87 (<i>d</i> , 8,6 Hz)	107,5
7		159*
8		116*
8a		152*
1'		197*
2'	5,75 (<i>d</i> , 3,3 Hz)	82,6
3'	2,38 (<i>dsept</i> , 3,3 Hz)	29,5
4'	1,03	16,5
5'	1,03	19,8
CH₃COO	2,07 (<i>s</i>)	20,5
CH₃C$\bar{\text{O}}$O		170*
OCH₃	3,90 (<i>s</i>)	54,4

(a) CDCl₃, 400MHz; (b) CDCl₃, 50MHz

*valores obtidos através da projeção de carbono do HMBC

5.1.4- Determinação Estrutural da Substância 4

A substância **4** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 e da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) da substância **4** (FIGURA 5.19) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982), como discutido no item 5.1. Observa-se um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,85 que pode ser atribuído a uma metoxila.

Observam-se ainda dois singletos em δ 2,43 (3H) e δ 1,79 (3H) que podem ser atribuídos a duas metilas ligadas a carbono sp^2 e um sinal em δ 10,22 (*s*, 1H) que pode ser atribuído a um hidrogênio de aldeído.

O espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.20) mostra sinais referentes a 15 carbonos. Além dos sinais característicos do esqueleto cumarínico, observa-se um sinal em δ 188,8 que pode ser atribuído a uma carbonila de aldeído e um sinal em δ 56,2 atribuído ao carbono da metoxila na posição 7.

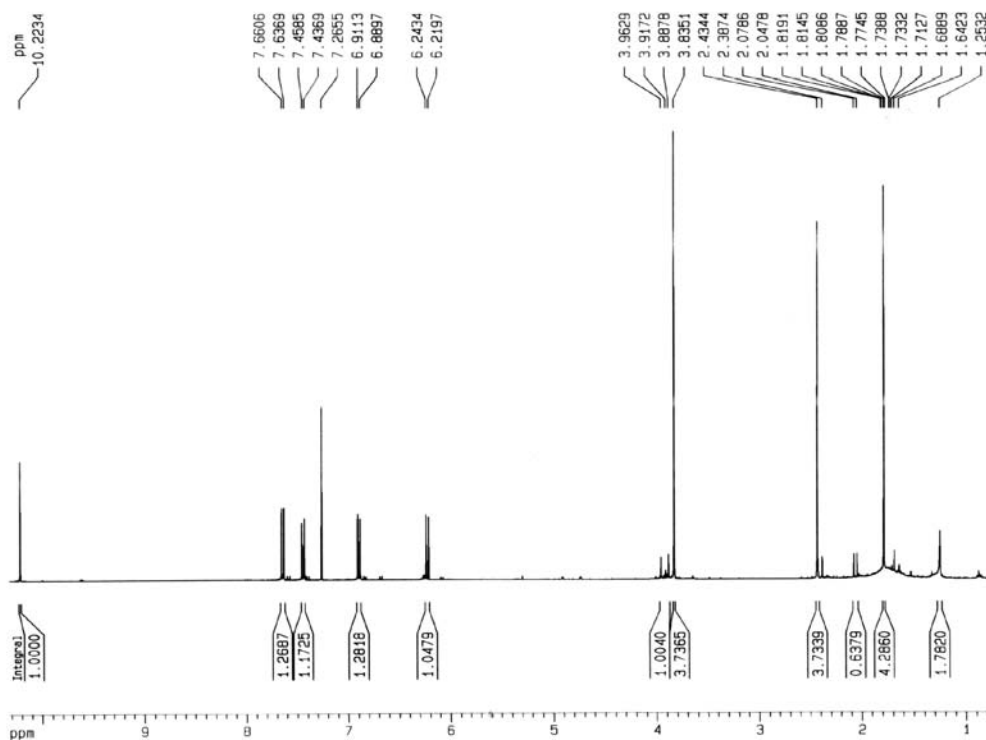


FIGURA 5.19- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância 4.

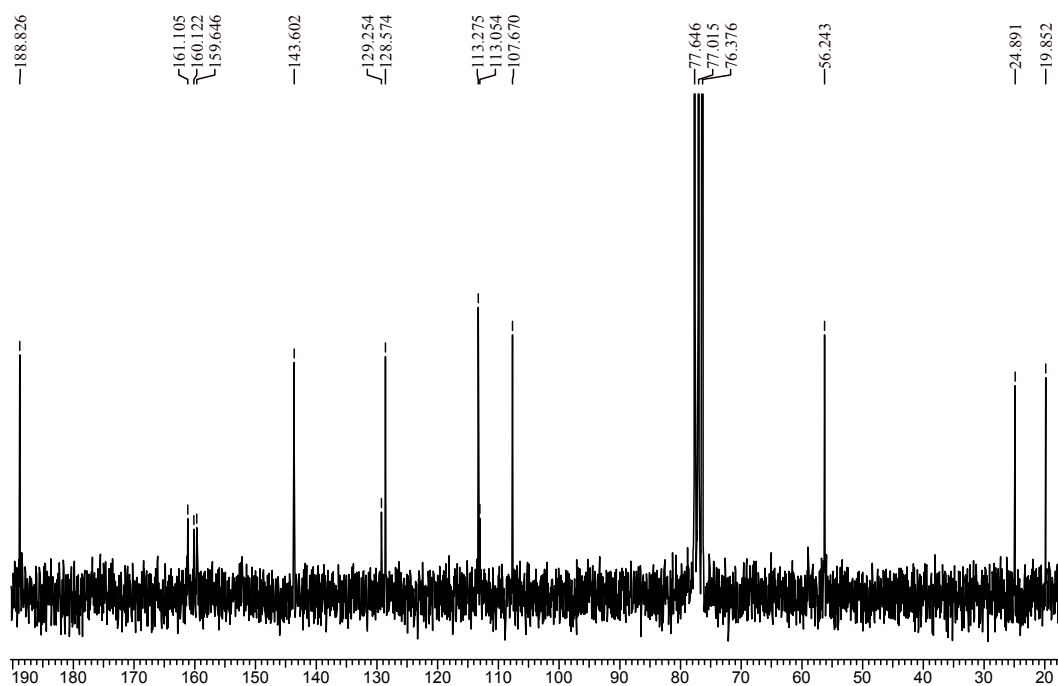


FIGURA 5.20- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 4.

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 5.21) mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos diretamente ligados. Além dos sinais característicos do esqueleto cumarínico, foi observada a correlação entre o sinal em δ_H 10,22 e δ_C 188,8 confirmando a presença de um grupo aldeído, e as correlações dos hidrogênios das metilas em δ_H 1,79 com o carbono em δ_C 24,9 e em δ_H 2,43 com o carbono em δ_C 19,8.

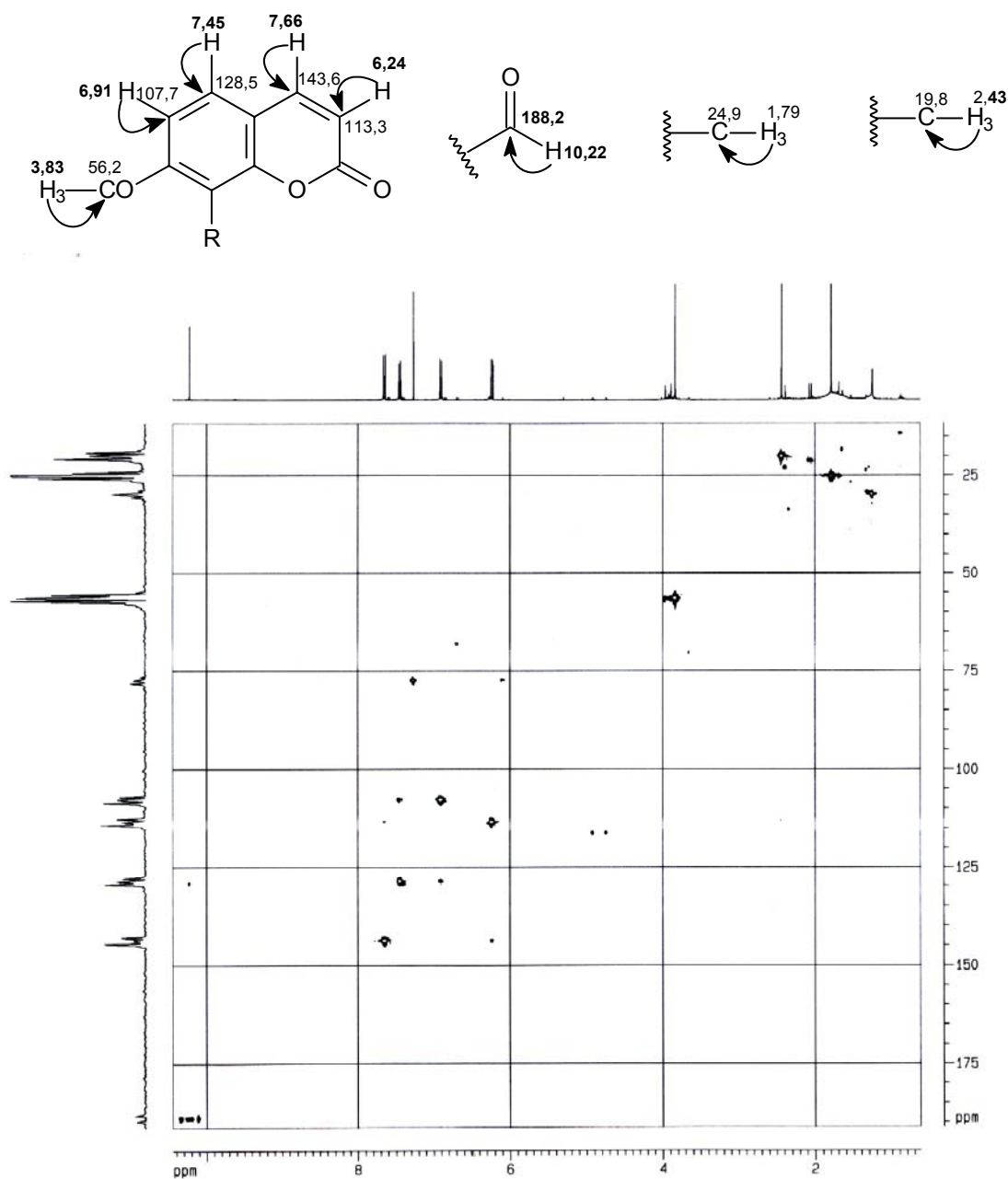


FIGURA 5.21- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl₃) da substância 4.

A análise do mapa de contorno do HMBC (FIGURA 5.22) mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos ligados a duas e três ligações.

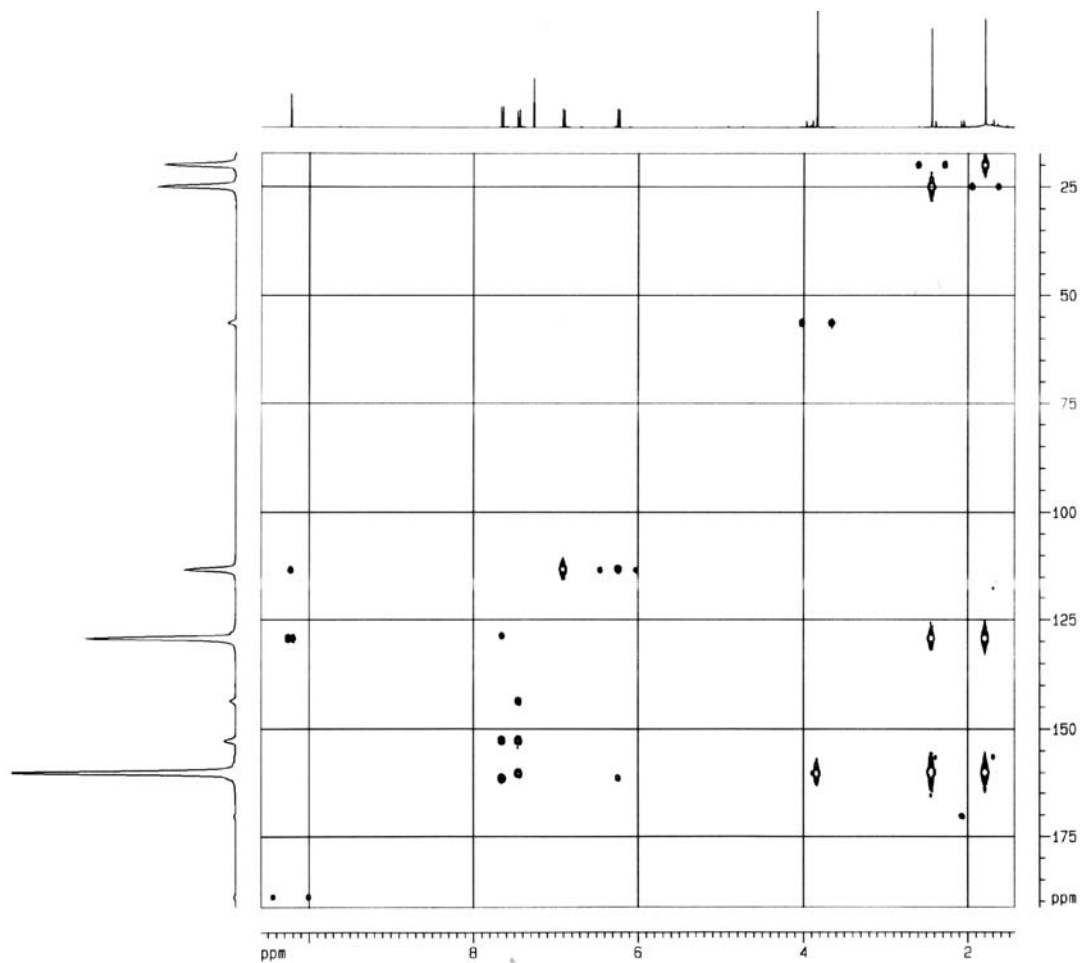


FIGURA 5.22- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

A expansão da região a $\delta_{\text{H}} 10\text{-}6$ do mapa de contorno do HMBC (FIGURA 5.23), além das correlações dos hidrogênios do esqueleto cumarínico, mostra a correlação do hidrogênio do grupo aldeído em $\delta_{\text{H}} 10,22$ com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 129,2$ e $\delta_{\text{C}} 113,0$.

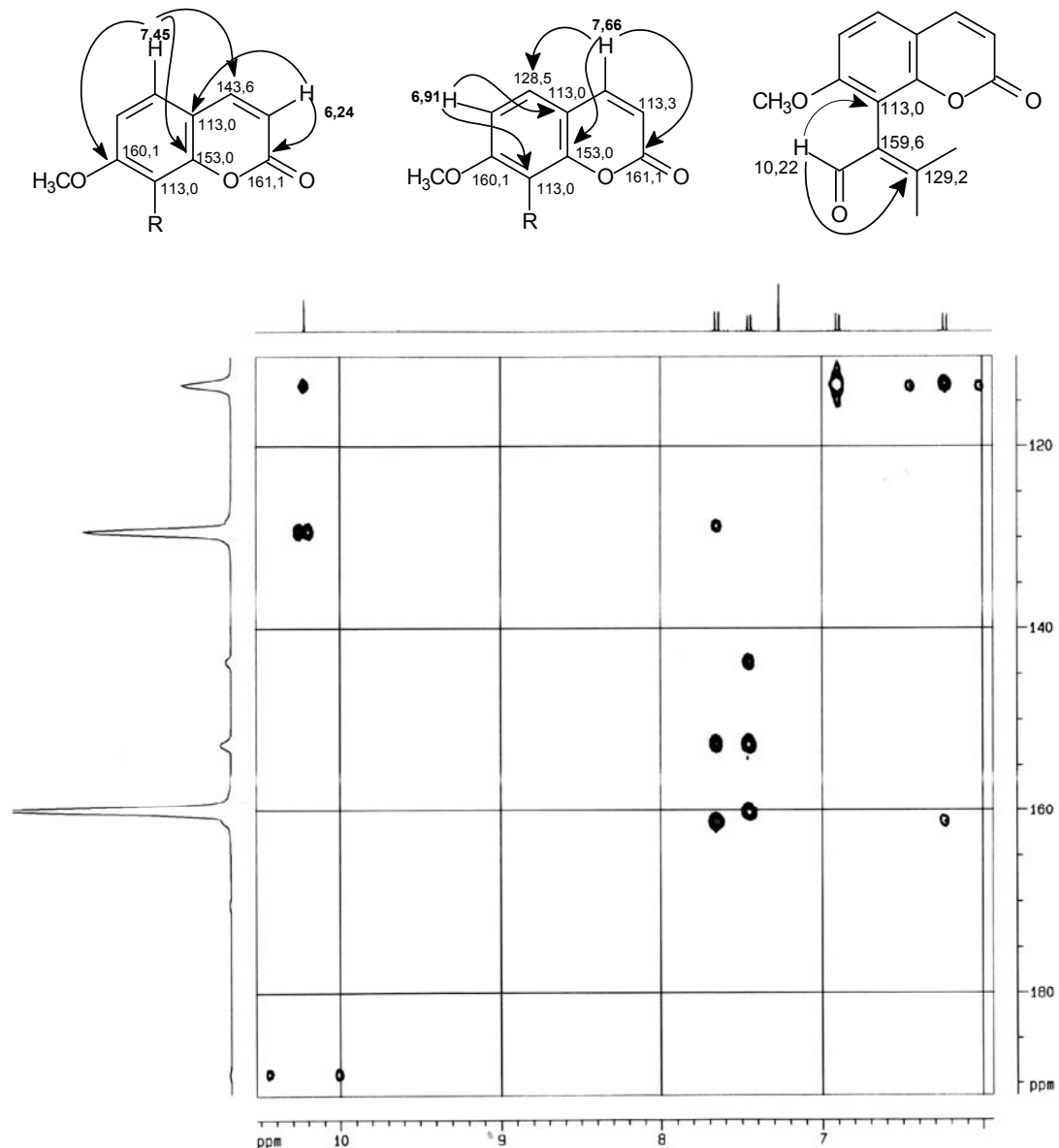


FIGURA 5.23- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl₃) da substância 4.

A expansão da região de δ_{H} 4-1 (FIGURAS 5.24 e 5.25) mostra as correlações dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,79 com o carbono em δ_{C} 129,2 a duas ligações e com os carbonos em δ_{C} 159,6 e 19,8 a três ligações, e as correlações da metila em δ_{H} 2,43 com o carbono em δ_{C} 129,2 a duas ligações e com os carbonos em δ_{C} 159,6 e 24,9 a três ligações. A presença da carbonila faz com que o sinal da metila na posição *cis* seja mais desblindado (δ_{H} 2,28) em que a metila na posição *trans* (δ_{H} 1,85), isso ocorre porque os elétrons π da ligação C=O blinda as zonas cônicas acima e abaixo do plano e desblinda as zonas laterais (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

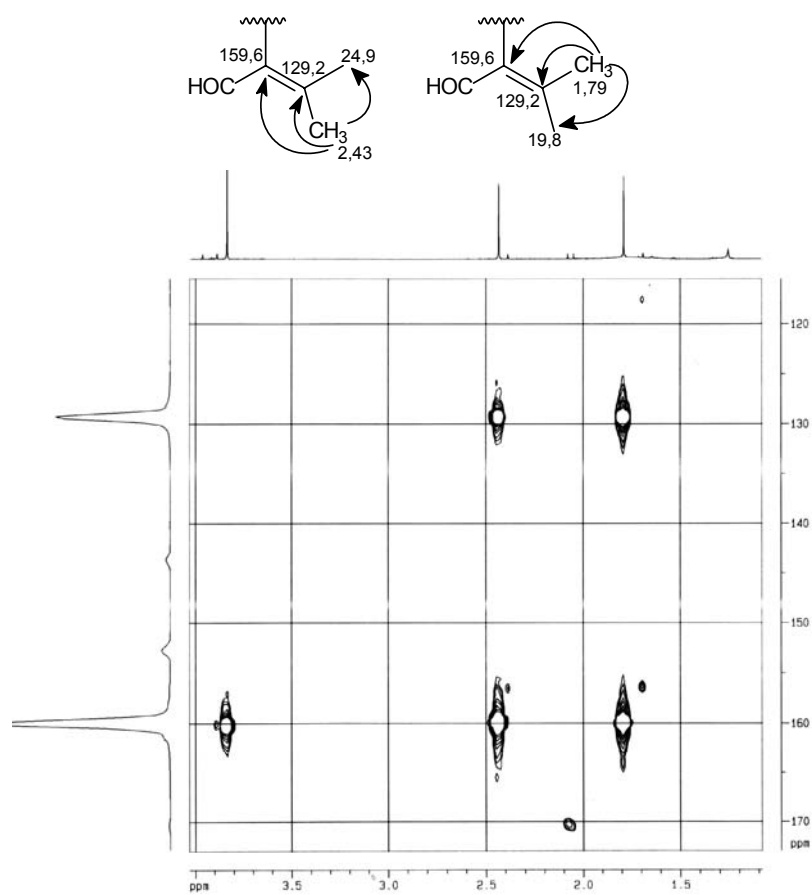


FIGURA 5.24- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

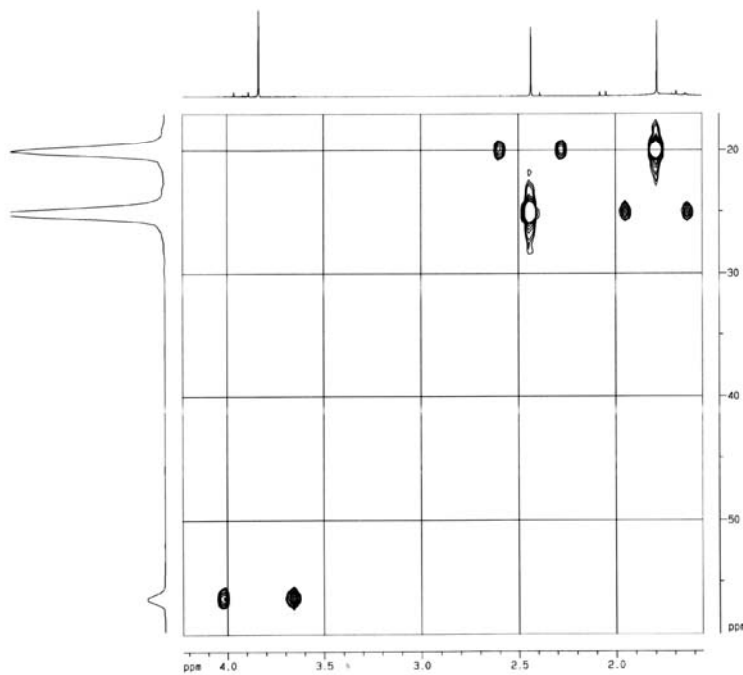


FIGURA 5.25- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância **4**.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **4** é a cumarina conhecida como murralongina isolada anteriormente de *Murraya paniculata* (KINOSHITA *et al.*, 1996) (FURUKAUA *et al.*, 1990) Os dados RMN de ^1H (FURUKAUA *et al.*, 1990) e de ^{13}C (KINOSHITA *et al.*, 1996) da substância **4** assim como os dados da literatura estão representados na TABELA 5.4.

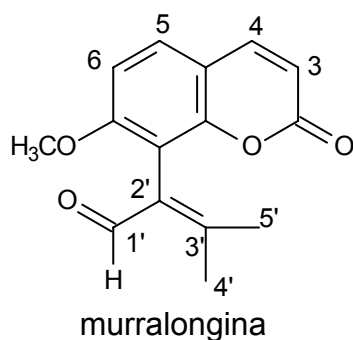


TABELA 5.4- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murralongina.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} (lit.) ^(b)	δ_{C} ^(c)	δ_{C} (lit.) ^(c)
2			161,1	160,9
3	6,24 (d, 9,5 Hz)	6,23 (d, 9,4 Hz)	113,3	112,7
4	7,66 (d, 9,5 Hz)	7,65 (d, 9,4 Hz)	143,6	143,6
4a			113,0	112,7
5	7,45 (d, 8,6 Hz)	7,45 (d, 8,7 Hz)	128,5	128,5
6	6,91 (d, 8,6 Hz)	6,90 (d, 8,7 Hz)	107,7	107,5
7			160,1	159,8
8			113,0	112,7
8a			153	152,2
1'	10,22 s	10,22 s	188,2	188,7
2'			159,6	159,7
3'			129,2	128,9
4'	1,79 s	1,79 s	24,9	24,6
5'	2,43 s	2,43 s	19,8	19,5
O-CH ₃	3,83 s	3,83 s	56,2	56,0

(a) CDCl₃, 400MHz; (b) CDCl₃, 270MHz; (c) CDCl₃, 100MHz

5.1.5- Determinação Estrutural da Substância 5

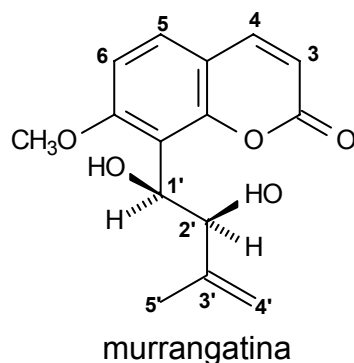
A substância **5** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp e da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **5** (FIGURA 5.26) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) como discutido no item 5.1. Observa-se um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,97 que pode ser atribuído a uma metoxila na posição 7.

O espectro apresenta ainda dois dubletos em δ 5,31 e δ 4,53 (1H, $J= 8,4\text{Hz}$), um multipeto em δ 4,62 (2H), que sugere a presença de um grupo metilênico terminal e um singlete em δ 1,77 (3H), que sugere a presença de uma metila sobre dupla ligação.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 5.27) mostra sinais referentes a 15 carbonos. Além dos sinais característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8, o espectro mostra sinas em δ 78,3 e δ 68,6 que sugerem a presença de dois carbonos carbinólicos e o sinal em δ 17,4 é atribuído a uma metila.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **5** é a cumarina conhecida como murrangatina isolada anteriormente de *Murraya paniculata* (IMAI *et al.*, 1989; KINOSHITA *et al.*, 1996; ITO *et al.*, 1990), *Murraya exotica* (SUAREZ & MONACHE, 1991) e *Rauia resinosa* (VELOSO, 1995). Os dados RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **5** assim como os dados de ^1H (KINOSHITA *et al.* 1989) e de ^{13}C (KINOSHITA *et al.*, 1996) da literatura estão representados na TABELA 5.5.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A293D673	Date	07 Jul 1971 09:51:41
Date Stamp	07 Jul 1971 09:51:41				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\IMEUS\DOCUMENTOS\TATINHA\ESPECTROS REL3\MURRANGATINA\A293D673.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	1
Original Points Count	65536	Owner	tatiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Origin	tatiane
				Solvent	CHLOROFORM-D

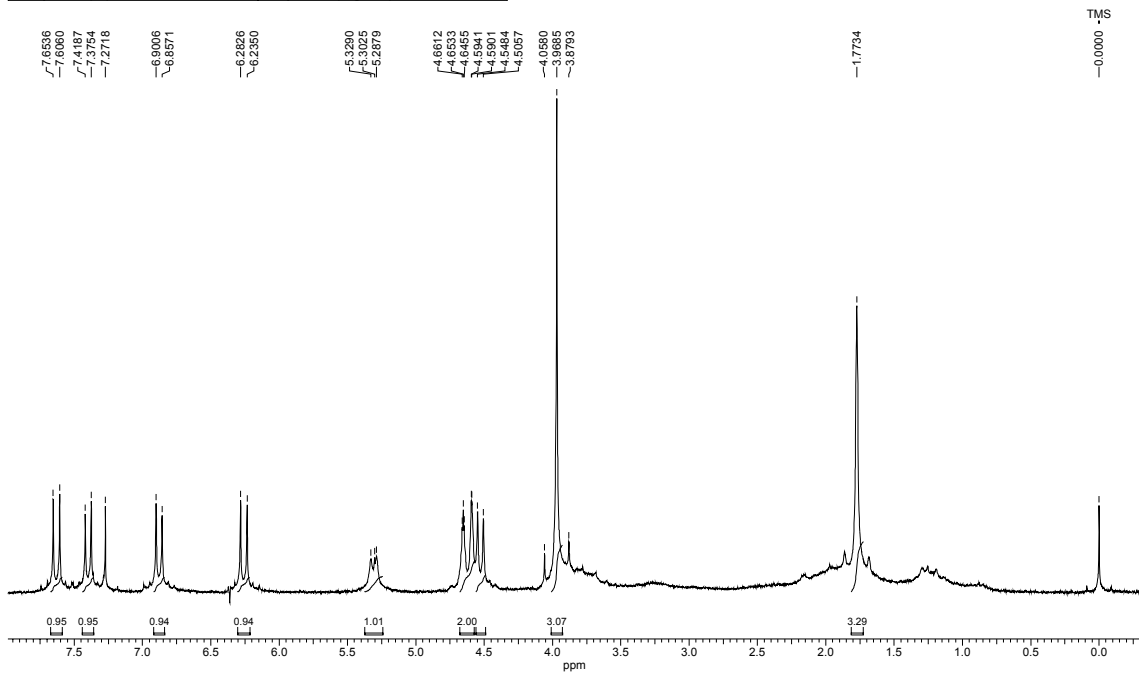


FIGURA 5.26- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da murrangatina.

Acquisition Time (sec)	2.4248	Comment	A31N7.3C	Date	21 Jul 1971 04:12:39
Date Stamp	21 Jul 1971 04:12:39				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\IMEUS\DOCUMENTOS\TATINHA\ESPECTROS REL3\A31N7.3C.DX				
Nucleus	13C	Number of Transients	3653	Origin	tatiane
Owner	tatiane	Points Count	32768	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	13513.51	Temperature (degree C)	27.000	Frequency (MHz)	50.33
				Original Points Count	32768

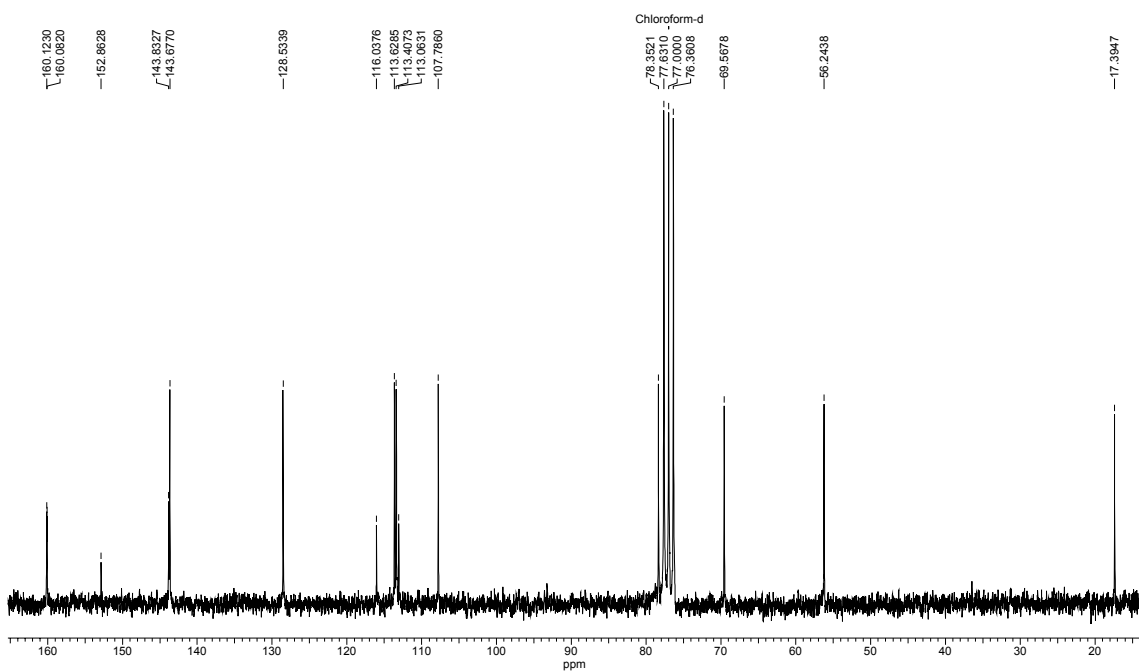


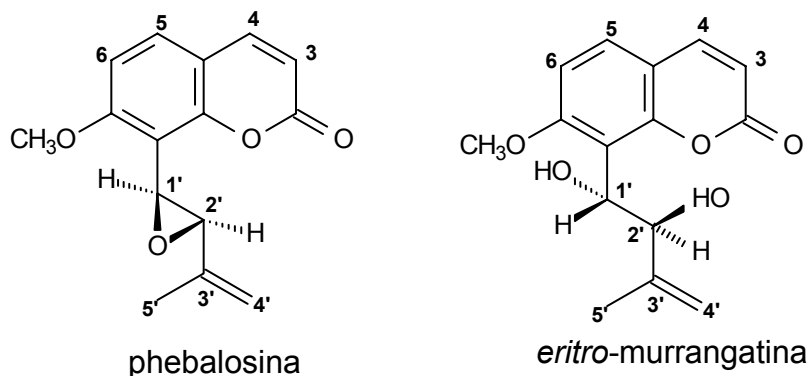
FIGURA 5.27- Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) da murrangatina.

TABELA 5.5- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da murrangatina.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)	δ_{C} ^(c)	δ_{C} ^(c) (lit.)
2			160,1	160,2
3	6,26 (d, 9,5 Hz)	6,24 (d, 9,5 Hz)	113,4	113,4
4	7,63 (d, 9,5 Hz)	7,63 (d, 9,5 Hz)	143,7	143,8
4a			113,1	113,1
5	7,40 (d, 8,7 Hz)	7,40 (d, 8,5 Hz)	128,5	128,6
6	6,88 (d, 8,7 Hz)	6,88 (d, 8,5 Hz)	107,8	107,9
7			160,1	160,2
8			116,0	116,1
8a			152,9	152,9
1'	5,31 (d, 8,4 Hz)	5,30 (d, 8,5 Hz)	69,6	69,6
2'	4,53 (d, 8,4 Hz)	4,57 (d, 8,5 Hz)	78,4	78,4
3'			143,8	143,9
4'	4,63 <i>m</i>	4,60 <i>m</i>	113,6	113,7
5'	1,77 <i>s</i>	1,77 <i>s</i>	17,4	17,4
OCH ₃	3,97 <i>s</i>	3,97 <i>s</i>	56,2	56,3

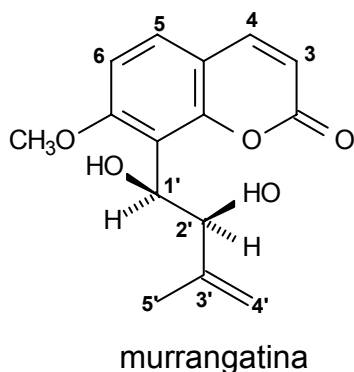
(a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 100MHz; (c) CDCl₃, 50MHz; (d) CDCl₃, 100MHz

A configuração relativa dos carbonos 1' e 2' da murrangatina foi proposta pela primeira vez por Talapata e colaboradores em 1973 que descreveram a abertura do anel oxirano com ácido clorídrico e dioxano com a obtenção do racemato da murrangatina como único produto da reação. Como o valor da constante de acoplamento dos hidrogênios vicinais do anel oxirano da phebalosina é pequeno ($J=2\text{Hz}$) concluiu-se que a estereoquímica relativa da função α -glicol da murrangatina seria *eritro*.



Porém em 1990 ITO e colaboradores publicaram a revisão da proposta estrutural da cadeia lateral da murrangatina. Neste trabalho o tratamento da murrangatina isolada com acetona na presença de ácido *p*-tolueno sulfônico levou a

obtenção do acetonídeo correspondente. Experimentos de NOE deste acetonídeo através da irradiação dos hidrogênios H1' ou H2' não causa efeito no sinal vizinho indicando que estes hidrogênios ocupam planos opostos. Neste caso a estrutura correta para a murrangatina seria aquela em que a estereoquímica da cadeia lateral é *treo*, 1'R 2'R.



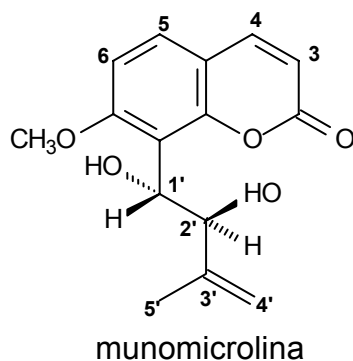
5.1.6- Determinação Estrutural da Substância 6

A substância **6** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp e da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **6** (FIGURA 5.28) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982), como discutido no item 5.1. Observa-se um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,98 que pode ser atribuído a uma metoxila.

Foram observados ainda dois dubletos em δ 5,43 ($J= 7,5$ Hz) e 4,54 ($J= 7,5$ Hz), um singlete largo em 4,99 e um singlete em 1,91 integrando para três hidrogênios.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **6** é um diastereoisomero da murrangatina, a cumarina conhecida como munomicrolina isolada anteriormente de *Murraya paniculata* (ITO *et al.*, 1990), *Murraya exotica* (SUAREZ & MONACHE, 1991), *Micromelum minutum* (DIAS *et al.*, 1984) e *Rauia resinosa* (VELOSO, 1995). Os dados RMN de ^1H da substância **6** assim como os dados da literatura (DIAS *et al.*, 1984) estão representados na TABELA 5.6.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A13364641	Date	15 Mar 1972 03:39:46
Date Stamp	15 Mar 1972 03:39:46				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATIANA\ESPECTROS REL3\MURRANGATINA\A13364641.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	17
Original Points Count	65536	Owner	tatiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

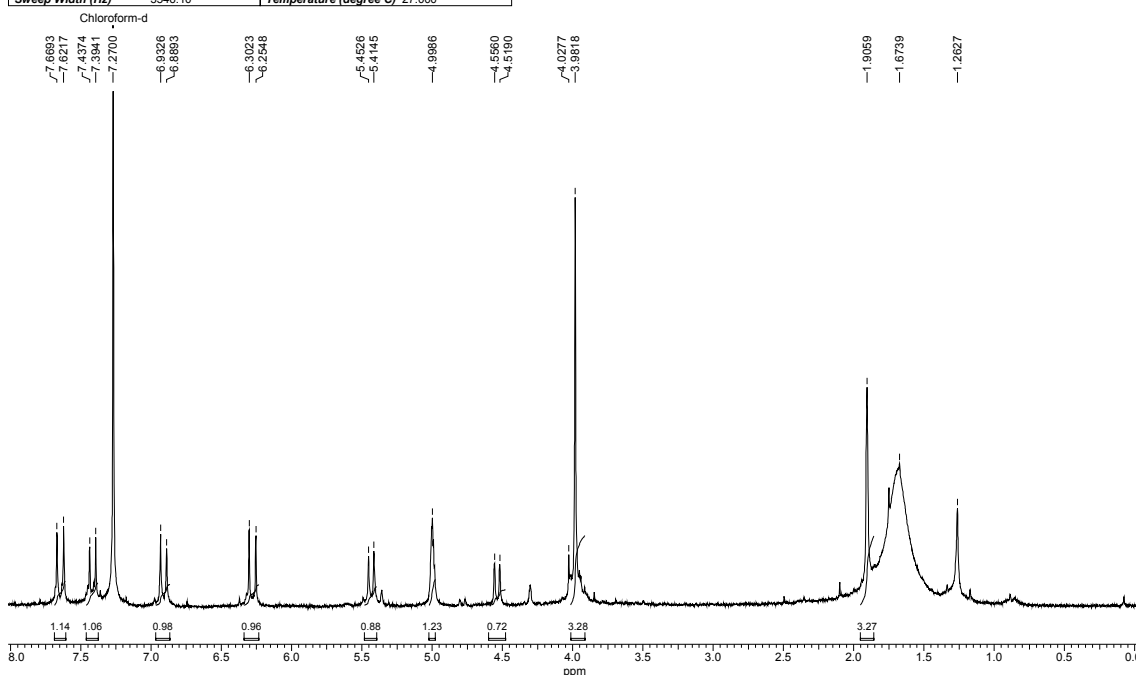

 FIGURA 5.28- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da munomicrolina.

 TABELA 5.6- Dados de RMN de ¹H munomicrolina.

H/C	δ_H ^(a)	δ_H ^(b) (lit.)
3	6,28 (d, 9,5 Hz)	6,26 (d, 10 Hz)
4	7,65 (d, 9,5 Hz)	7,64 (d, 10 Hz)
5	7,42 (d, 8,7 Hz)	7,41 (d, 8 Hz)
6	6,91 (d, 8,7 Hz)	6,90 (d, 8 Hz)
1'	5,43 (d, 7,5 Hz)	5,42 (d, 9 Hz)
2'	4,54 (d, 7,5 Hz)	4,53 (dl, 9 Hz)
4'	4,99 s/	4,99 s/
5'	1,91 s	1,90 s
OCH ₃	3,98 s	3,98 s

 (a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 270MHz

ITO e colaboradores em 1990 também trataram a munomicrolina isolada com acetona na presença de ácido *p*-tolueno sulfônico levando a obtenção do acetonídeo correspondente. Experimentos de NOE deste acetonídeo através da irradiação do hidrogênio H1' causa o aumento de 15,7% no sinal de H2' enquanto a irradiação do hidrogênio H2' causa o aumento de 20% no sinal de H1' demonstrando que estes hidrogênios ocupam o mesmo plano. Neste caso a estrutura correta para a munomicrolina seria aquela em que a estereoquímica da cadeia lateral é *eritro*. 1'R2'S.

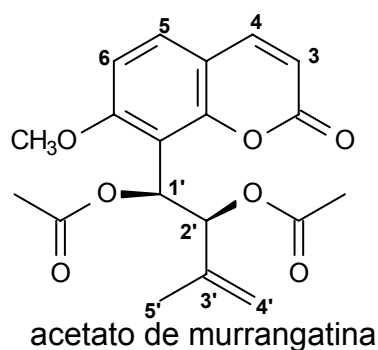
5.1.7- Determinação Estrutural da Substância 7

A substância **7** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp, diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **7** (FIGURA 5.29) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) como discutido no item 5.1. Observa-se um singleto integrando para três hidrogênios em δ 3,96 que pode ser atribuído a uma metoxila na posição 7.

Observam-se ainda dois dubletos em δ 6,69 e 6,09 ($J= 8,8$ Hz), um singleto largo em δ 4,91 (1H) e um tripleto em δ 4,74 (1H, $J=1,5$) e dois singletos em δ 2,08 e δ 2,05 integrando para três hidrogênios cada, que sugerem a presença de metilas de grupo acetato.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **7** é o derivado acetilado da murrangatina, a cumarina conhecida como acetato de murrangatina isolada anteriormente de *Phebalium coxii* (QUADER *et al.*, 1992) e *Rauia resinosa* (VELOSO, 1995). Os dados RMN de ^1H da substância **7** assim como os dados da literatura (DAS *et al.*, 1984) estão representados na TABELA 5.7.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A12AcMur	Date	06 Mar 1972 03:34:15
Date Stamp	06 Mar 1972 03:34:15				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHA\SPECTROS REL\3\ACETATO DE MURRANGATINA\A12ACMUR.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Original Points Count	65536	Owner	tatlane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

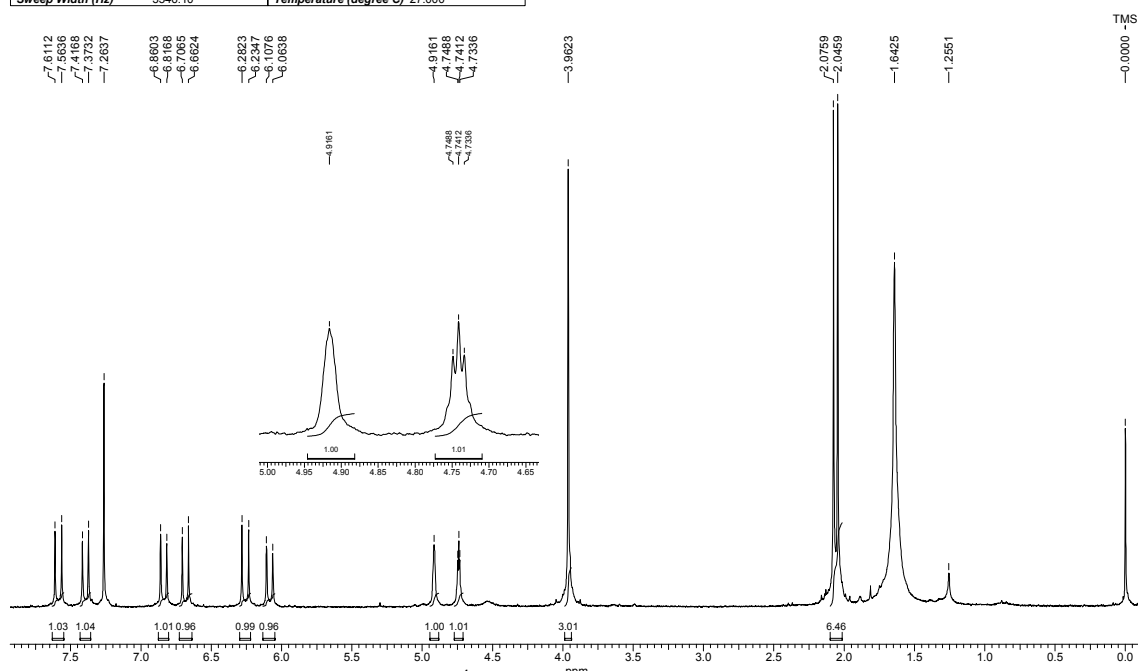

 FIGURA 5.29- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do acetato de murrangatina.

 TABELA 5.7- Dados de RMN ¹H do acetato de murrangatina

H/C	$\delta_H^{(a)}$	$\delta_H^{(b)}$ (lit.)
3	6,26 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	6,25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
4	7,59 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)	7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,5 Hz)
5	7,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	7,39 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)
6	6,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	6,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)
1'	6,69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,68 s
2'	6,09 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,08 s
4'	4,91 (<i>s</i>)	4,92 s
	4,74 (<i>t</i> , 1,5Hz)	4,79 s
5'	1,64 s	1,64 s
OCH ₃	3,97 s	3,97 s
CH ₃ COO	2,08 s	2,07 s
CH ₃ COO	2,05 s	2,04 s

 (a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 270MHz

5.1.8- Determinação Estrutural da Substância 8

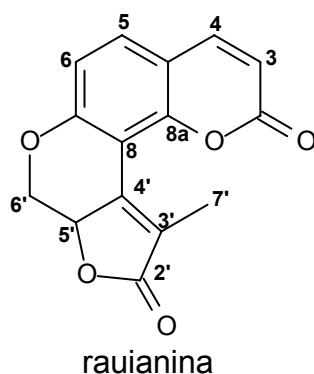
A substância **8** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp e do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **8** (FIGURA 5.30) apresenta os quatro dubletos na região aromática, característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (MURRAY *et al.*, 1982) como discutido no item 5.1.

Foram observados ainda sinais referentes a 6 hidrogênios em δ 5,12 (1H, ddq, $J= 11,8; 6,0$ e $1,7$ Hz), δ 4,86 (1H, dd, $J= 10,2$ e $6,0$ Hz), δ 3,95 (1H, dd, $J= 11,8$ e $10,2$ Hz) e um dubleto em δ 2,34 (3H, $J= 1,7$ Hz). Estes dados e a ausência de sinal em aproximadamente δ 3,96 referente a uma metoxila sugerem que houve ciclização entre os substituintes dos carbonos 7 e 8.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 5.31) mostra 15 sinais e o experimento de DEPT 135 (FIGURA 5.32) mostra a presença de um carbono primário, um carbono secundário, cinco carbonos terciários e oito quaternários. Além dos sinais característicos de esqueleto cumarínico substituídos nas posições 7 e 8 (item 5.1) foi observado um sinal em δ 173,9 que indica a presença de uma carbonila na cadeia carbônica dos substituintes do núcleo cumarínico.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (VELOSO *et al.*, 1997) indicam que a substância **8** é a cumarina conhecida como rauianina isolada anteriormente de *Rauia resinosa* (VELOSO *et al.*, 1997). Os dados RMN de ^1H e ^{13}C da substância **8** assim como os dados da literatura estão representados na TABELA 5.8.



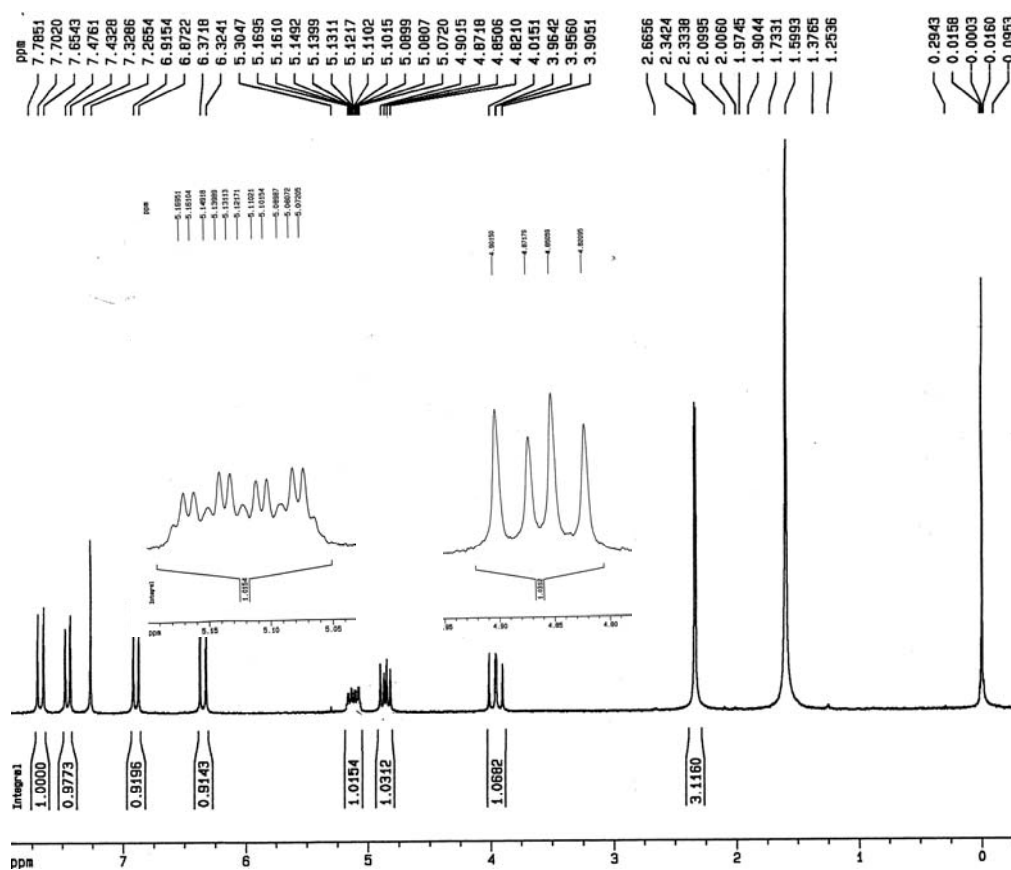


FIGURA 5.30- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da rauianina.

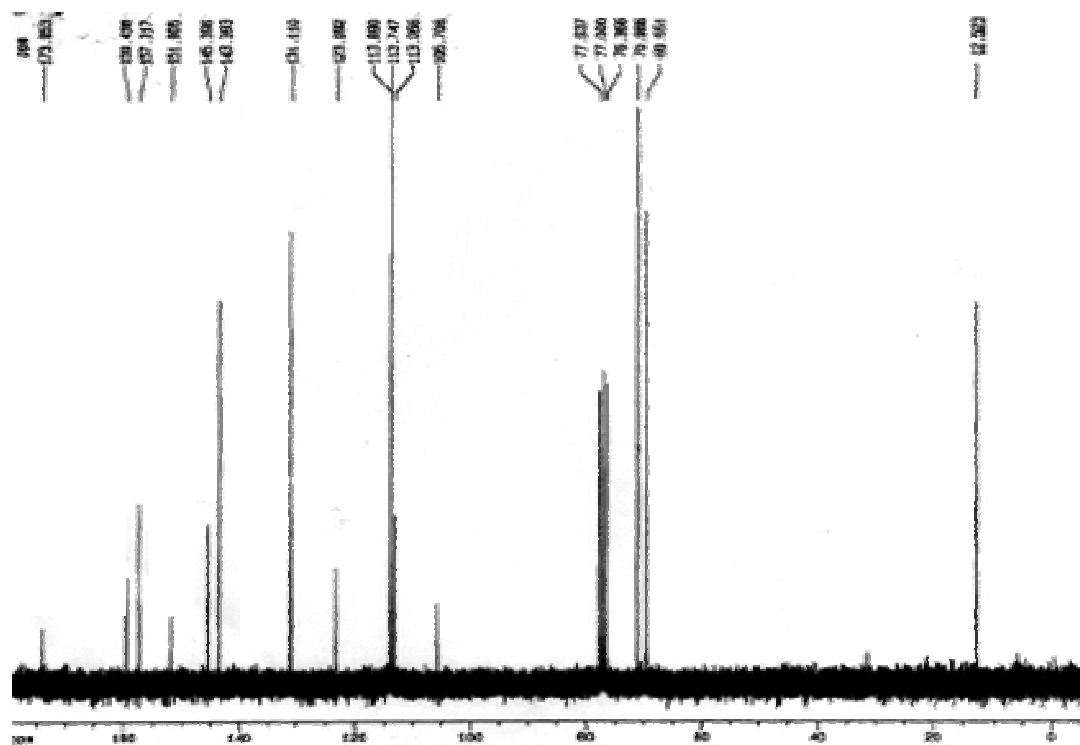


FIGURA 5.31- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da rauianina.

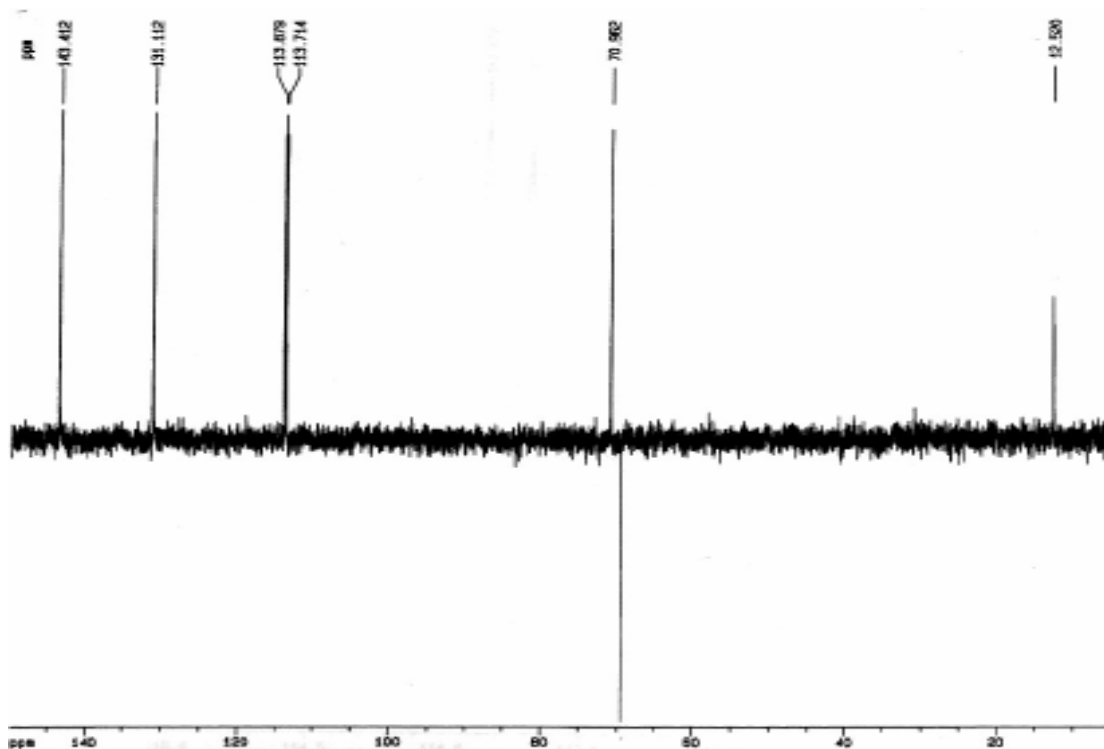


FIGURA 5.32- Espectro de DEPT 135 da rauianina.

TABELA 5.8- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da rauianina.

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (lit.)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$ (lit.)
2			159,4	159,5
3	6,35 (d, 9,6 Hz)	6,35 (d, 9,6 Hz)	113,7	113,6
4	7,68 (d, 9,6 Hz)	7,73 (d, 9,6 Hz)	143,4	143,5
4a			113,1	113,0
5	7,45 (d, 8,6 Hz)	7,50 (d, 8,6 Hz)	131,1	131,2
6	6,89 (d, 8,6 Hz)	6,92 (d, 8,6 Hz)	113,9	113,9
7			157,3	157,3
8			105,7	105,6
8a			151,3	151,7
2'			173,9	174,0
3'			145,3	145,3
4'			123,1	122,9
5'	5,12 (ddq, 11,8; 6,0 e 1,7 Hz)	5,15 (ddq, 11,8; 6,0; 1,7 Hz)	71,0	71,0
6'	4,86 (dd, 10,2; 6,0 Hz) 3,95 (dd, 11,8; 10,2 Hz)	4,85 (dd, 10,3; 6,0 Hz) 3,95 (dd, 11,8; 10,3 Hz)	69,5	69,5
7'	2,34 (d, J= 1,7 Hz)	2,32 (d, 1,7)	12,5	12,5

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 50MHz

5.1.9- Determinação Estrutural da Substância 9

A substância **9** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **9** (FIGURA 5.33) mostra várias semelhanças com o espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da cumarina rauianina (FIGURA 5.30). Assim como no espectro de RMN ^1H da rauianina o espectro de RMN ^1H da substância **9** apresenta 4 sinais referentes a 6 hidrogênios, um duplo duplo quadruplo em δ 5,11 (1H, $J= 11,8; 6,0$ e $1,6$ Hz), um duplo dubleto em δ 4,83 (1H, $J= 10,1$ e $6,0$ Hz), um duplo dubleto em δ 3,95 (1H, $J= 11,8$ e $10,3$ Hz) e um dubleto em δ 2,34 (3H, $J= 1,6\text{Hz}$). Estes dados sugerem que houve ciclização entre os substituintes dos carbonos 7 e 8, assim como no caso da rauianina. Observam-se ainda dois dubletos em δ 7,41 e δ 6,87 (1H, $J= 8,6$ Hz) que podem ser atribuídos aos hidrogênios nas posições 5 e 6 respectivamente.

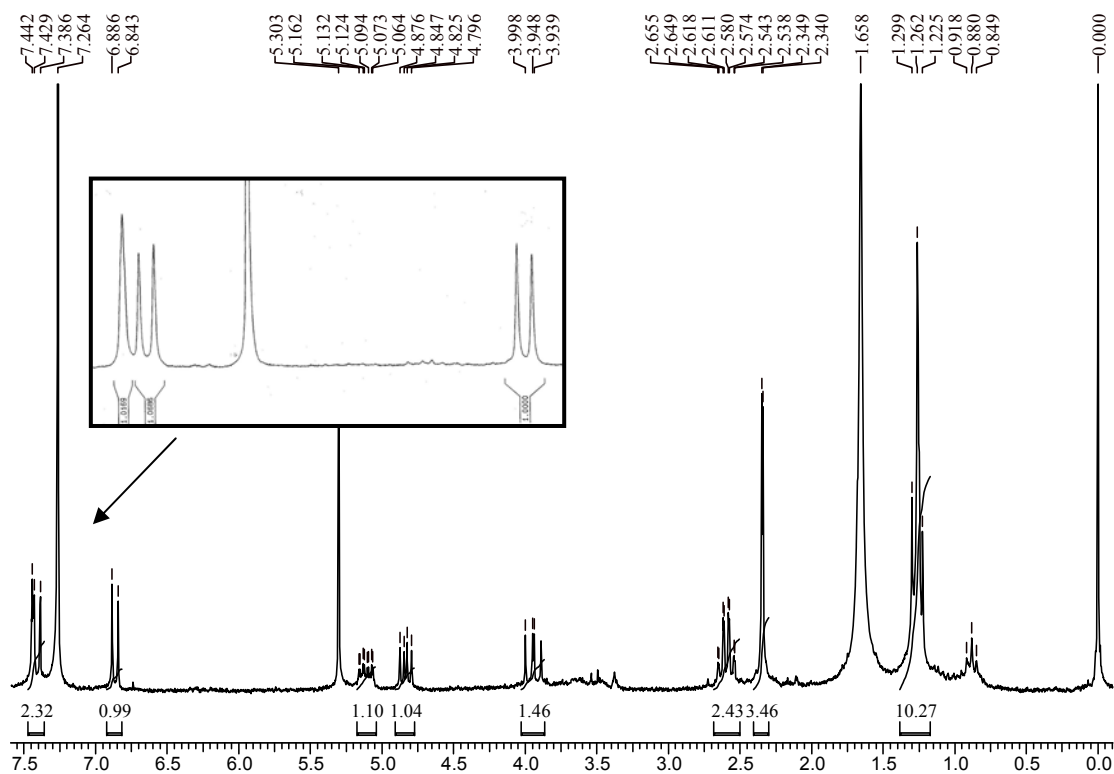


FIGURA 5.33- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

Os dados de RMN ^1H da substância **9** difere dos dados da rauianina devido à ausência de dois dubletos em δ 6,25 e em δ 7,73 e a presença de um singlete em δ 7,44, sugerindo que a substância **4** é um derivado da rauianina contendo um

substituinte adicional no carbono 3. Observa-se ainda a presença de um quadrupletto em δ 2,60 ($J=7,5\text{Hz}$) integrando para dois hidrogênios e de um tripleto em δ 1,26 ($J=7,5\text{Hz}$) integrando para três hidrogênios sugerindo a presença de um grupamento etila.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.34) mostra sinais referentes a 12 carbonos, porém não foram observados os sinais referentes a carbonos quaternários já que a substância foi isolada em pequena quantidade e o tempo de aquisição de espectro não foi suficiente para que os sinais referentes aos carbonos quaternários fossem adquiridos.

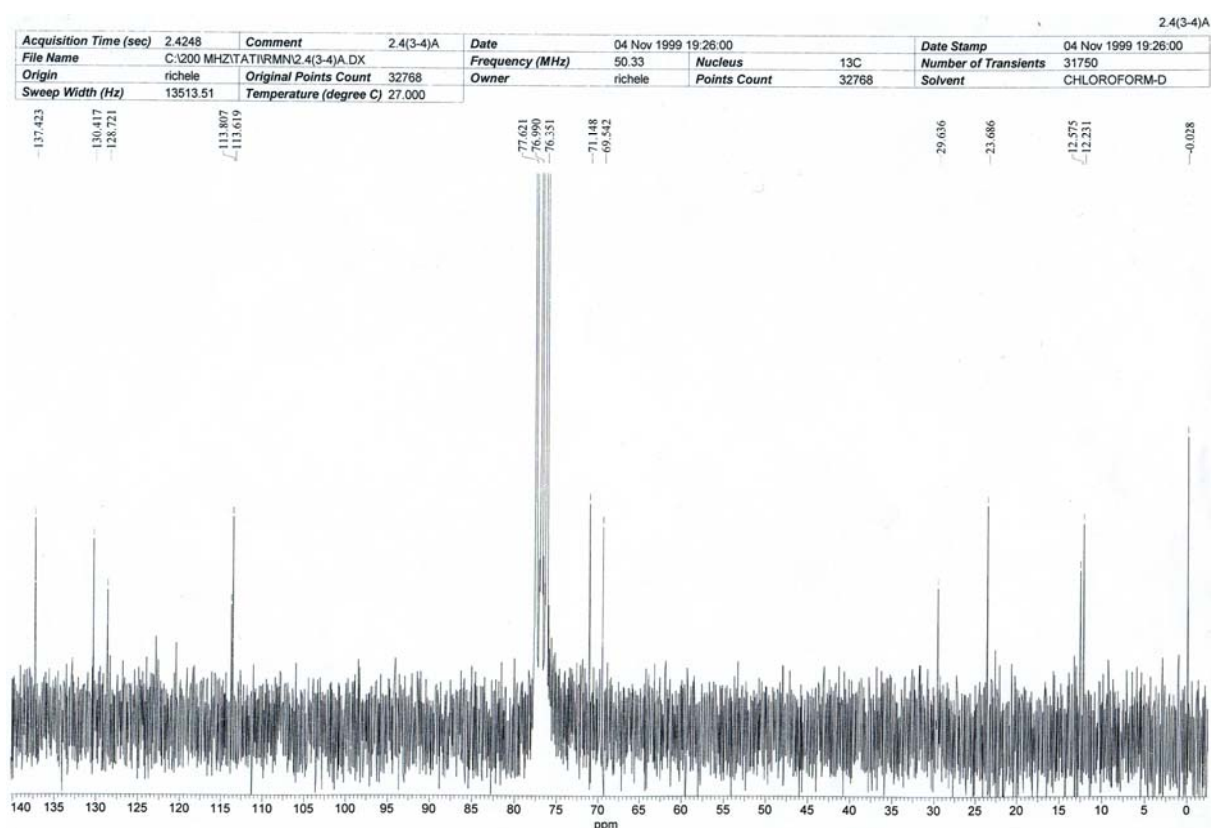


FIGURA 5.34- Espectro de RMN ^1H (50 MHz, CDCl_3) da substância **9**.

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 5.35) mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos diretamente ligados. Além dos sinais característicos do esqueleto cumarínico, foi observada a correlação entre o sinal em δ_{H} 5,11 e δ_{C} 71,1, dos sinais em δ_{H} 4,83 e δ_{H} 3,95 com o sinal em δ_{C} 69,5 e do sinal em δ_{H} 2,34 com o sinal em δ_{C} 12,6. Foram observadas ainda as correlações entre o sinal em δ_{H} 2,60 e sinal em δ_{C} 23,7 e entre o sinal em δ_{H} 1,26 e sinal em δ_{C} 12,2.

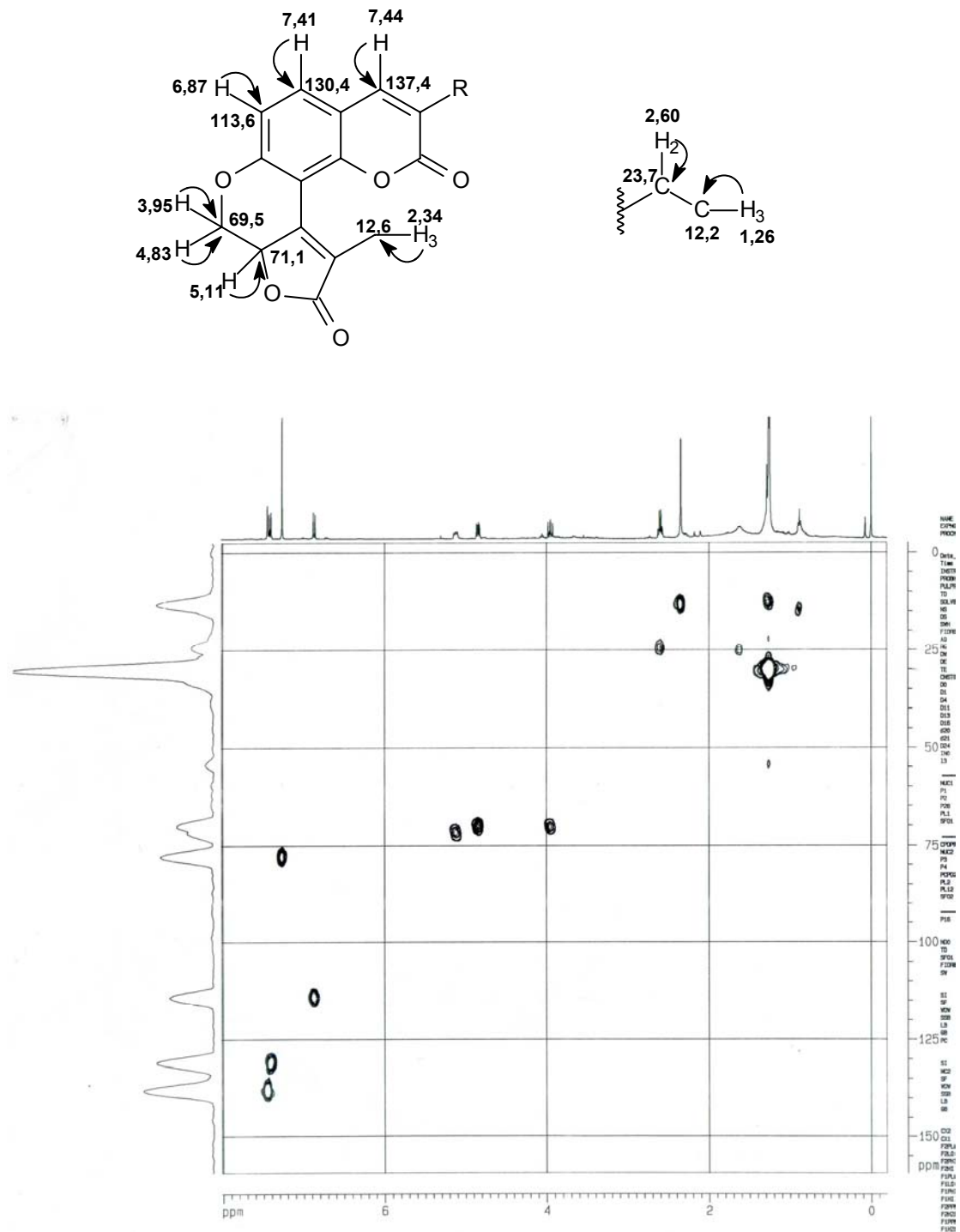


FIGURA 5.35- Mapa de contorno de HSQC da substância 9.

Através das projeções dos deslocamentos químicos do espectro de carbono no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.36), que mostra as correlações dos hidrogênios com carbonos a duas e três ligações, foi possível obter os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários.

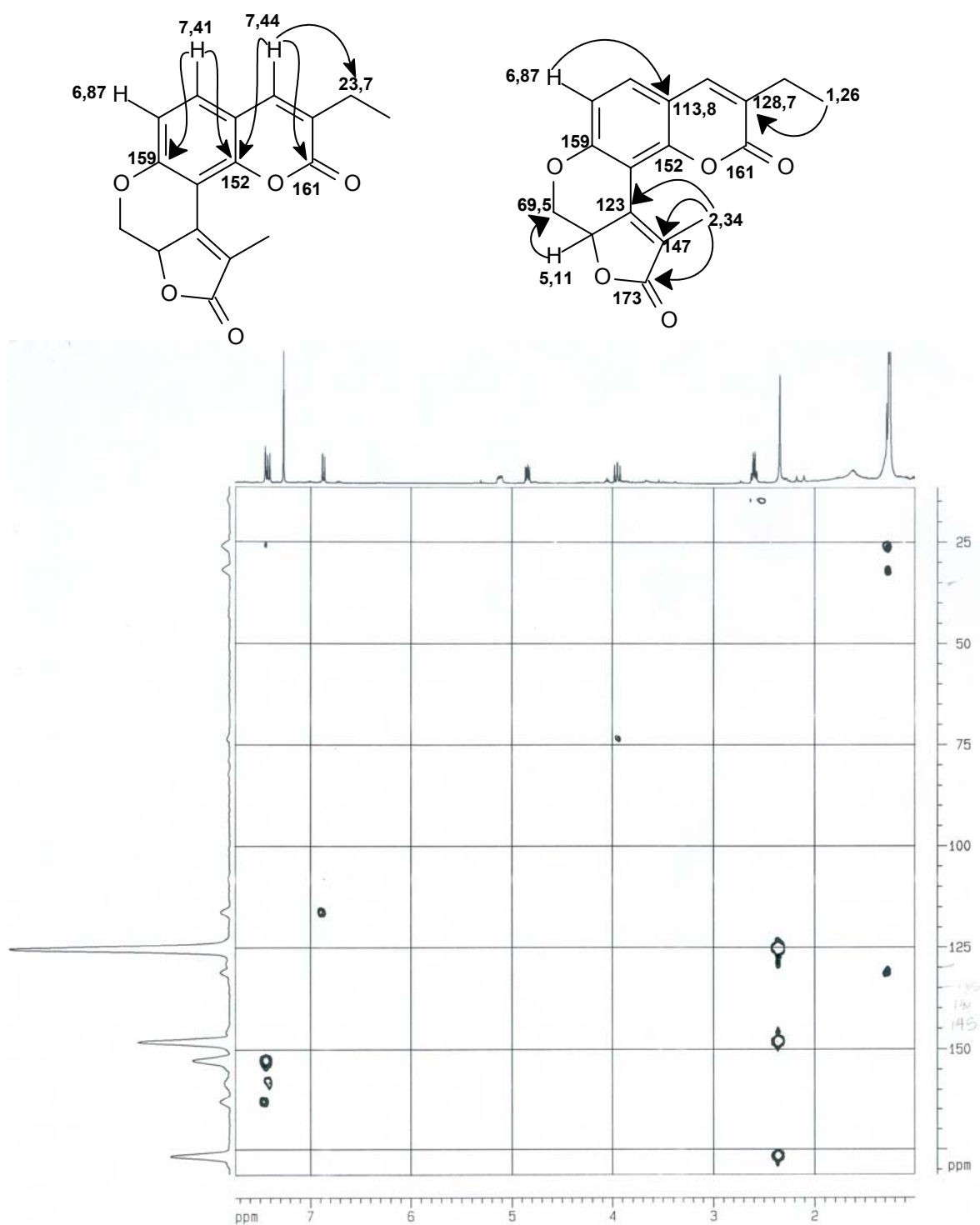


FIGURA 5.36- Mapa de contorno de HMBC da substância 9.

O espectro de massas de alta resolução da substância **9** (FIGURA 5.37) mostra o pico do íon molecular com m/z 298,08450 (100%) que está de acordo com a fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_5$, o valor calculado é m/z 298,08412.

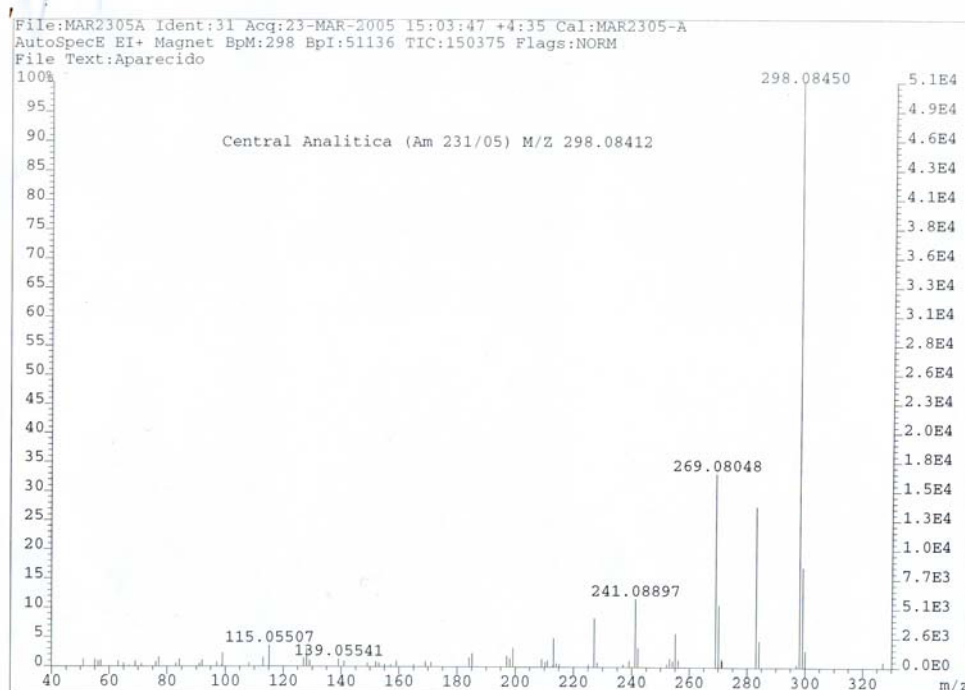


FIGURA 5.37- Espectro de massas de alta resolução da substância **9**.

A análise dos dados de RMN 1H da substância **9** e a comparação com os dados da rauianina (VELOSO *et al.*, 1997) indicam que a substância **9** é a cumarina 3-etilrauianina inédita na literatura. Os dados RMN de 1H da rauianina e da 3-etilrauianina estão representados na TABELA 5.9.

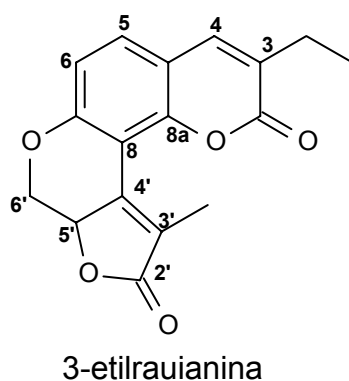


TABELA 5.9- Dados RMN ^1H e RMN ^{13}C da rauianina e da 3-etilrauianina

	rauianina		3-etil rauianina	
	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$
2		159,5		161*
3	6,35 (d, 9,6 Hz)	113,6	-	128,7
4	7,73 (d, 9,6 Hz)	143,5	7,44 (1H, s)	137,4
4a		113,0		113,8
5	7,50 (d, 8,6 Hz)	131,2	7,41(d, 8,6 Hz)	130,4
6	6,92 (d, 8,6 Hz)	113,9	6,87 (d, 8,6 Hz)	113,6
7		157,3		158*
8		105,6		
8a		151,7		152*
2'		174,0		173*
3'		145,3		147*
4'		122,9		123*
5'	5,15 (ddq, 11,8; 6,0; 1,7 Hz)	71,0	5,11(ddq, 11,8; 6,0; 1,6 Hz)	71,1
6'	4,85 (dd, 10,3; 6,0 Hz) 3,95 (dd, 11,8; 10,3 Hz)	69,5	4,83 (dd, 10,1; 6,0 Hz) 3,95 (dd, 11,8; 10,1 Hz)	69,5
7'	2,32 (d, 1,7 Hz)	12,5	2,34 (d, 1,6 Hz)	12,6
1''	-	-	2,60(q, 7,0 Hz)	23,7
2''	-	-	1,26 (t, 7,0 Hz)	12,2

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 50MHz

*valores obtidos através da projeção de carbono do HMBC

5.1.10- Determinação Estrutural da Substância 10

A substância **10** foi isolada da fração diclorometânica do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **10** (FIGURA 5.38) mostra várias semelhanças com o espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da cumarina rauianina (FIGURA 5.30). Assim como no espectro de RMN ^1H da rauianina o espectro de RMN ^1H da substância **10** apresenta 4 sinais referentes a 6 hidrogênios em δ 5,00 (1H, ddq, $J = 11,9; 6,0$ e $1,3$ Hz), δ 4,75 (1H, dd, $J = 10,0$ e $6,0$ Hz), δ 3,87 (1H, dd, $J = 11,9$ e $10,0$ Hz) e um duplete em δ 2,24 (3H, $J = 1,3$ Hz). Estes dados sugerem que houve ciclização entre os substituintes dos carbonos 7 e 8, assim como no caso da rauianina. Observam-se ainda dois dubletos em δ 7,94 e δ

6,19 (1H, $J= 9,6$ Hz) que podem ser atribuídos aos hidrogênios nas posições 4 e 3 respectivamente.

O espectro de RMN ^1H da substância **10** difere dos dados da rauianina devido a ausência dois dubletos em δ 7,50 e em δ 6,92 e a presença de um singlete em δ 6,26 (1H) que sugere a presença de um substituinte na posição 5. Observa-se ainda um singlete em δ 3,87 (3H) sugerindo a presença de um grupo metoxila.

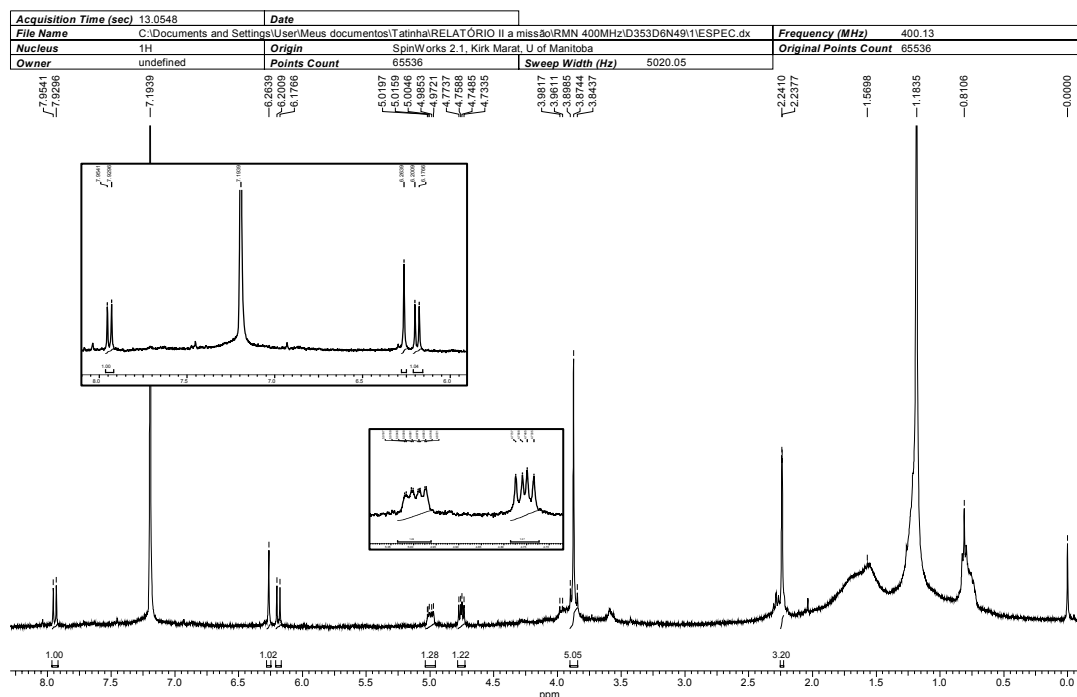
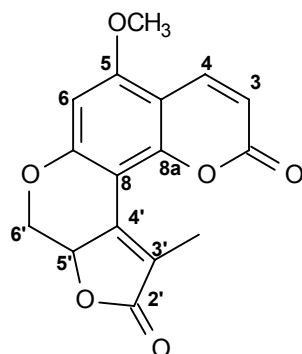


FIGURA 5.38- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **10**

A análise dos dados de RMN ^1H da substância **10** e a comparação com os dados da rauianina (VELOSO *et al.*, 1997) indicam que a substância **10** é a cumarina 5-metoxi rauianina inédita na literatura. Os dados RMN de ^1H da rauianina e da 5-metoxi rauianina estão representados na TABELA 5.10.



5-metoxirauianina

TABELA 5.10- Dados de RMN de ^1H da rauianina e da 5-metoxi rauianina

H	δ_{H}	
	rauianina ^(a)	5-metoxirauianina ^(b)
3	6,35 (d, 9,6 Hz)	6,19 (d, 9,7 Hz)
4	7,73 (d, 9,6 Hz)	7,94 (d, 9,7 Hz)
5	7,50 (d, 8,6 Hz)	-
6	6,92 (d, 8,6 Hz)	6,26 (1H, s)
5'	5,15 (ddq, 11,8; 6,0; 1,7 Hz)	5,00(ddq, 11,9; 6,0; 1,3 Hz)
6'	4,85 (dd, 10,3; 6,0 Hz)	4,75 (dd, 10,0; 6,0 Hz)
	3,95 (dd, 11,8; 10,3 Hz)	3,87 (dd, 11,9; 10,0 Hz)
7'	2,32 (d, 1,7)	2,24 (d, 1,3)
OCH ₃	-	3,87

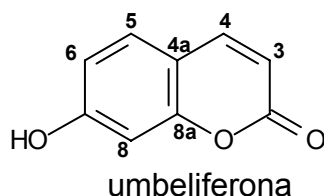
(a) CDCl₃, 200MHz

5.1.11- Determinação Estrutural da Substância 11

A substância **11** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da substância **11** (FIGURA 5.39) apresenta os dois dubletos na região dos hidrogênios aromáticos em δ 6,17 e δ 7,84 (1H, $J= 9,5$ Hz) característicos dos hidrogênios 3 e 4 de esqueleto cumarínico (MURRAY *et al.*, 1982). O espectro apresenta ainda um dubleto em δ 7,44 (1H, $J= 8,5$ Hz), um duplo dubleto em δ 6,78 (1H, $J= 8,5$ e 2,3 Hz) e um dubleto em δ 6,70 (1H, $J= 2,3$ Hz) indicando benzênico 1,2,4-substituído. A ausência de um singlete em aproximadamente δ 3,96 indica a ausência da metoxila na posição 7 e sugere a presença de um grupo hidroxila nesta posição.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **11** é a 7-hidroxicumarina, comumente conhecida como umbeliferona, amplamente encontrada em plantas da família Rutaceae. Os dados RMN de ^1H da substância **11** assim como os dados descritos na literatura (KONG *et al.*, 1996) estão descritos na TABELA 5.11.



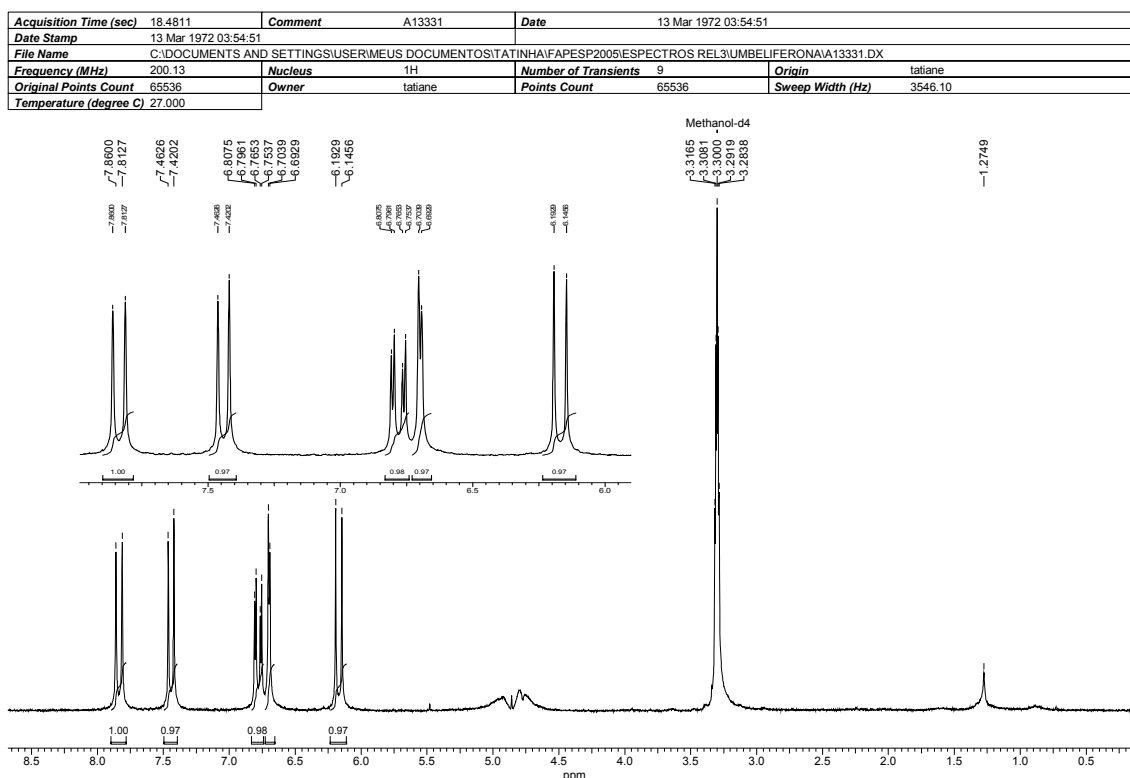

 FIGURA 5.39- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da umbeliferona.

 TABELA 5.11- Dados de RMN ¹H da umbeliferona.

H/C	$\delta_H^{(a)}$	$\delta_H^{(b)}$ (lit.)
3	6,17 (d, 9,5 Hz)	6,10 (d, 9,5 Hz)
4	7,84 (d, 9,5 Hz)	7,79 (d, 9,5 Hz)
5	7,44 (d, 8,5 Hz)	7,42 (d, 8,4 Hz)
6	6,78 (dd, 8,5 e 2,3 Hz)	6,77 (dd, 8,4 e 2,2 Hz)
8	6,70 (d, 2,3Hz)	6,71 (d, 2,2Hz)

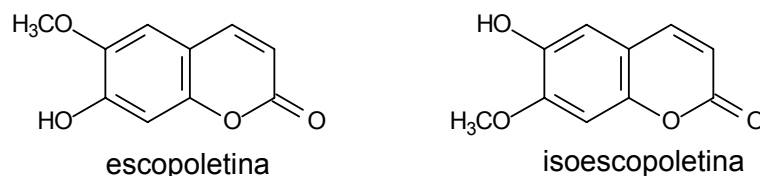
(a) MeOD, 200MHz; (b) DMSO, 400MHz

5.1.12- Determinação Estrutural da Substância 12

A substância **12** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauíia* sp1.

O espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **12** (FIGURA 5.40) apresenta dois dupletos na região dos hidrogênios aromáticos em δ 6,27 e δ 7,60 (1H, J = 9,5 Hz) característicos dos hidrogênios 3 e 4 de esqueleto cumarínico (MURRAY *et al.*, 1982). O espectro apresenta ainda dois singletos em δ 6,92 (1H) e δ 6,25 (1H) sugerindo um anel aromático 1,2,4,5 substituído. A presença de apenas um singlete em δ 3,96 indica a presença de uma metoxila, sugerindo que uma das

posições tem uma hidroxila como substituinte. Deste modo duas estruturas podem ser propostas a 7-hidroxi-6-metoxicumarina vulgarmente denominada escopoletina ou o seu isômero a 6-hidroxi-7-metoxicumarina vulgarmente denominada isoescopoletina.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A37N5812	Date	01 Sep 1971 11:21:22
Date Stamp	01 Sep 1971 11:21:22				
File Name					
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	1H	Number of Transients	17
Original Points Count	65536	Owner	tatiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Origin	tatiane
				Solvent	CHLOROFORM-D

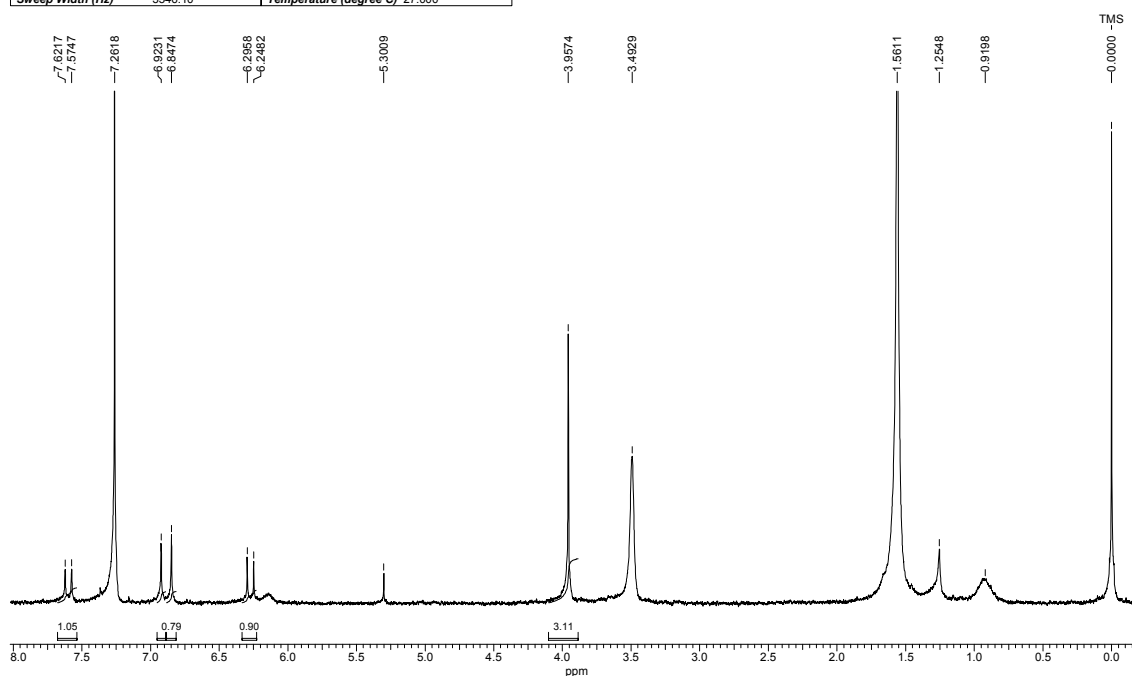
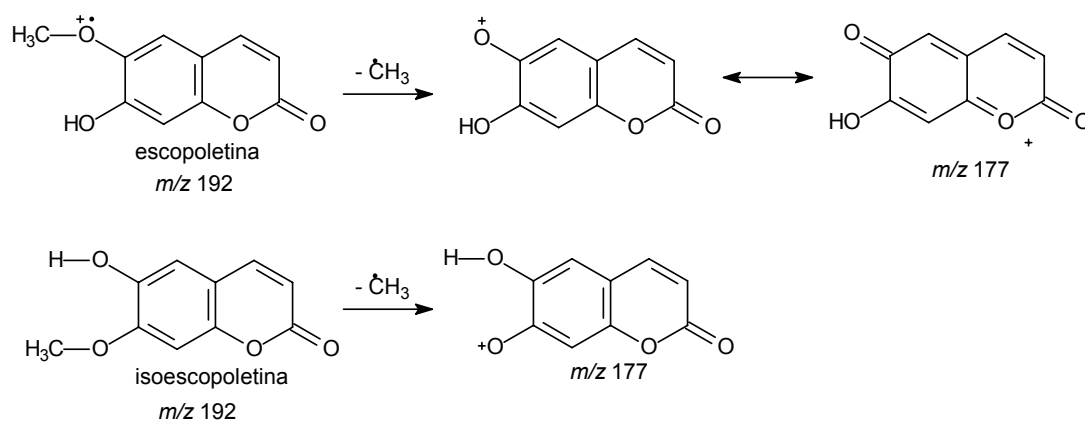


FIGURA 5.40- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **12**.

A distinção dos isômeros foi feita com base na análise do espectro de massas da substância **12** (FIGURA 5.41), onde a escopoletina apresenta um sinal $m/z=177$, cuja abundância relativa é em torno de 70%, ao passo que seu isômero pode apresentar o mesmo pico, no entanto com uma intensidade não tão alta. Isso ocorre pelo fato de que o íon formado pela escopoletina pode ser mais estabilizado do que o formado pela isoescopoletina (SALLES, 1995).



A análise do espectro de massas obtido mostra o pico $m/z=177$ com intensidade de 16% o que indica que a substância **12** é a isoescopoletina, amplamente encontrada em plantas da família Rutaceae. Os dados RMN de ^1H da substância **15** assim como os dados descritos na literatura (RAZDAN *et al.*, 1987) estão descritos na TABELA 5.12.

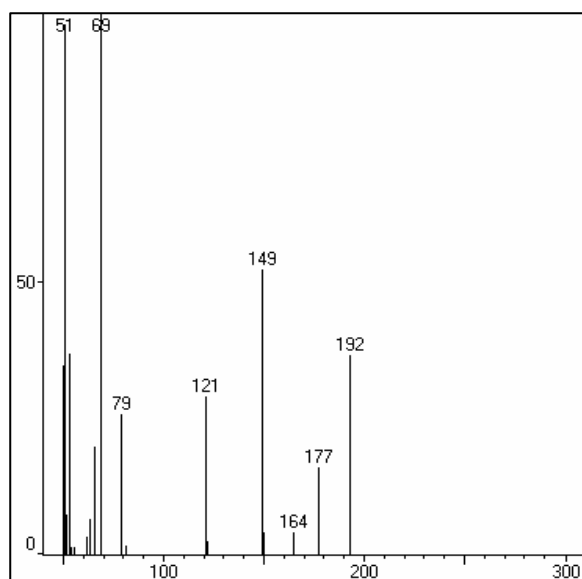


FIGURA 5.41- Espectro de massas da isoescopoletina.

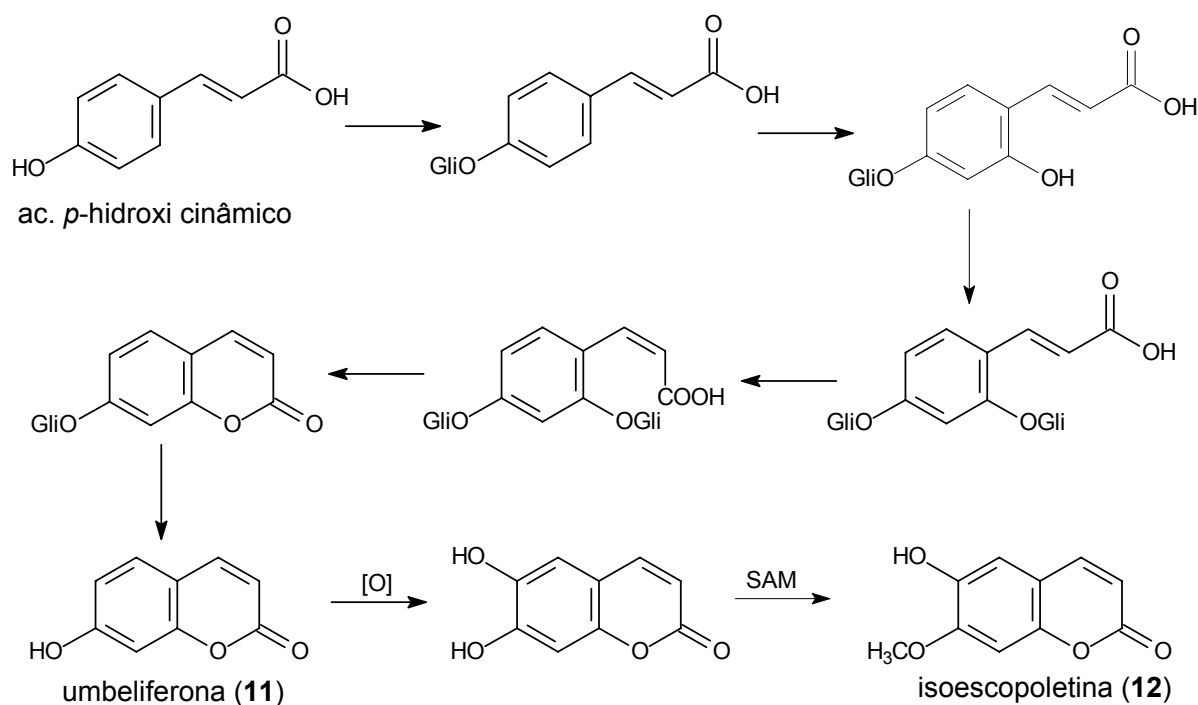
TABELA 5.12- Dados de RMN ^1H da isoescopoletina.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)
3	6,27 (<i>d</i> , 9,5 Hz)	6,11 (<i>d</i> , 9,3 Hz)
4	7,60 (<i>d</i> , 9,5 Hz)	7,82 (<i>d</i> , 9,3 Hz)
5	6,92 (<i>s</i>)	7,12 (<i>s</i>)
8	6,25 (<i>s</i>)	6,72 (<i>s</i>)
OCH₃	3,96 (<i>s</i>)	3,18 (<i>s</i>)

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) C_6D_6 , 60MHz

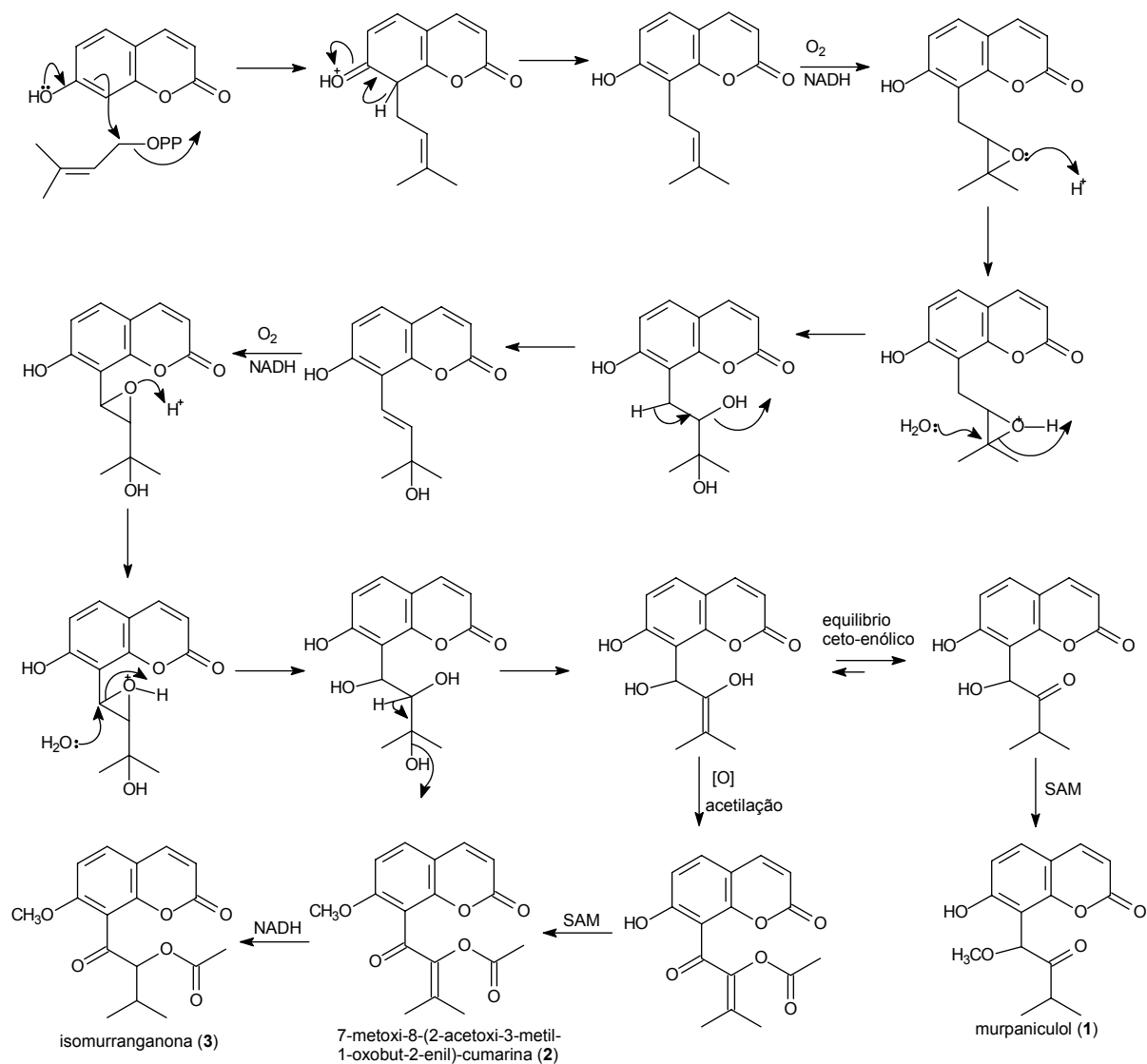
5.1.13- Biogênese das cumarinas

As cumarinas têm sua origem biossintética no ácido *p*-hidroxi-cinâmico (*p*-cumárico). Inicialmente ocorre a glicosilação da hidroxila em *para* com posterior oxidação na posição *orto* a cadeia lateral, seguida da glicosilação da hidroxila nesta posição. Ocorre então a isomerização da dupla ligação da cadeia lateral e uma lactonização levando a formação da umbeliferona (**11**). A oxidação com posterior metilação na posição 6 da umbeliferona leva a formação da isoescopoletina (**12**).

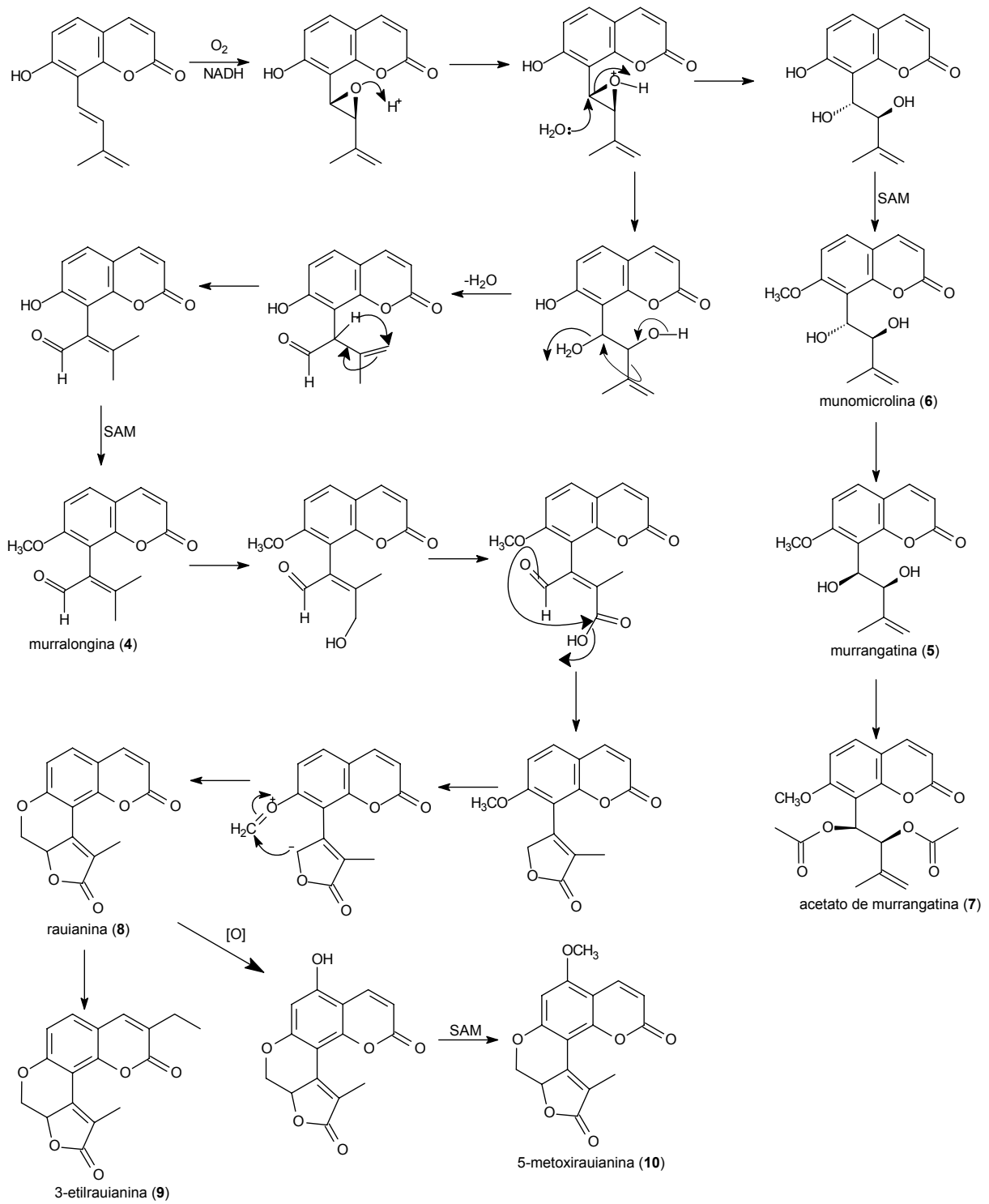


ESQUEMA 5.1- Proposta biogênica para as substâncias **11** e **12**.

O esqueleto mais simples é o da umbeliferona, sendo que a maior característica de diversificação das cumarinas simples nas famílias Rutaceae e Umbelliferae envolve a incorporação de unidades de prenila. As prenilações nas posições 6 e 8 são comuns devido a presença da hidroxila na posição 7, que é um grupo orientador *orto*. Uma vez incorporado ao esqueleto cumarínico o grupo prenila pode sofrer um grande número de modificações secundárias, geralmente iniciadas com a epoxidação da dupla ligação (GRAY & WATERMAN, 1978).



ESQUEMA 5.2- Proposta biogénica para as substâncias 1, 2 e 3.



ESQUEMA 5.3- Proposta biogenética para as substâncias 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

5.2- Alcalóides

Os alcalóides constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES *et al.*, 2001). Devido à diversidade estrutural dos alcalóides a classificação mais prática para estas substâncias é de acordo com a biossíntese. Os alcalóides relatados na ordem Rutales são derivados do ácido antranílico, triptofano, fenilalanina, histidina, ácido nicotínico, ornitina ou lisina e em alguns casos, eles são derivados de dois precursores (WATERMAN & GRUNDON, 1983).

Há mais de 470 alcalóides estruturalmente conhecidos isolados de espécies pertencentes a ordem Rutales (WATERMAN & GRUNDON, 1983). Os alcalóides derivados do ácido antranílico têm distribuição restrita fora da família Rutaceae, atuando como marcador quimiotaxonômico desta família (WATERMAN, 1975). Neste trabalho foram isolados 13 alcalóides derivados do ácido antranílico.

5.2.1- Determinação Estrutural da Substância 13

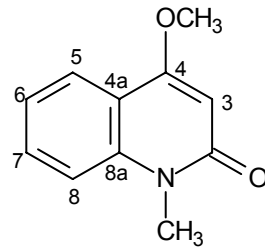
A substância **13** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **13** (FIGURA 5.42) mostra um singlete δ 6,12 característico de alcalóides quinolínicos. O espectro mostra também um duplo duplete em δ 7,80 (1H, $J= 8,0$ e 1,2 Hz), um duplo duplo duplete em δ 7,60 (1H, $J= 8,2$; 7,1 e 1,2 Hz), um duplete largo em δ 7,37 (1H, $J=8,2$ Hz), e um duplo duplo duplete em δ 7,25 (1H, $J= 8,0$; 7,1 e 1,2 Hz) sugerindo a presença de um anel aromático *orto* dissustituído. O singlete em δ 3,70 (3H) é característico de uma metoxila na posição 4 de alcalóides quinolínicos e singletos em δ 3,97 pode ser atribuído a uma metila ligada a um nitrogênio.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.43) mostra sinais referentes a 11 carbonos os sinais em δ 55,8 e δ 29,0 confirmam a presença de uma metoxila e de uma metila ligada a um nitrogênio, respectivamente.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **13** é o alcalóide quinolínico conhecido como *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona, que é amplamente distribuído em plantas da família Rutaceae. Os dados

RMN ^1H e de RMN ^{13}C da substância **13** assim como os dados da literatura (MAFEZOLI, 2001) estão representados na TABELA 5.13.



N-metil-4-metoxi-2-quinolona

Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A13364643	Date	15 Mar 1972 03:51:49
Date Stamp	15 Mar 1972 03:51:49				
File Name					
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	8
Original Points Count	65536	Owner	taliane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

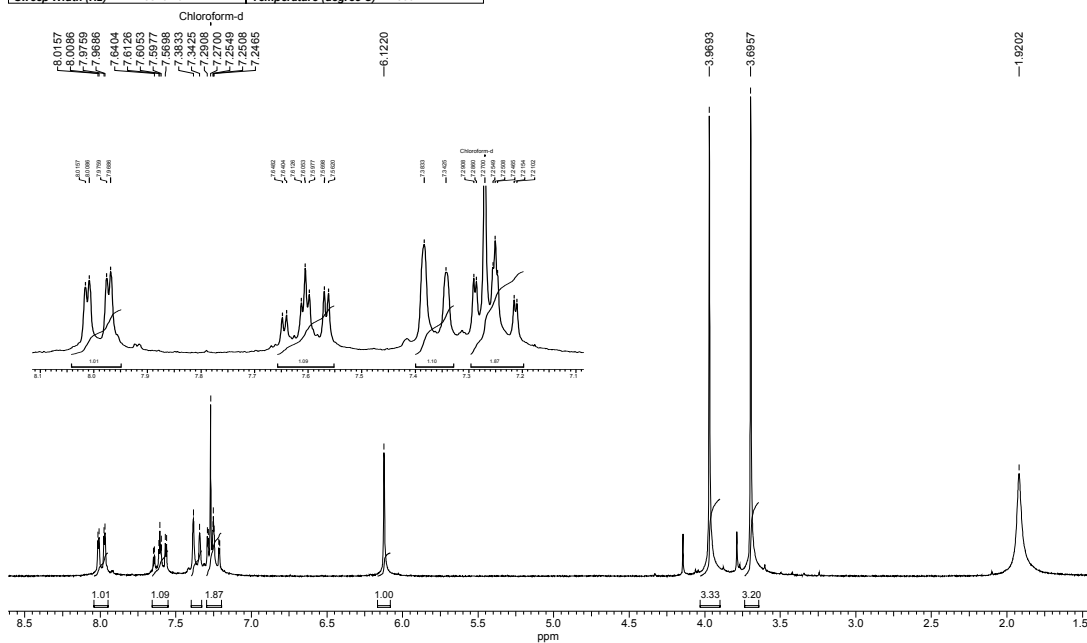


FIGURA 5.42- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da *N*-metil 4-metoxi-2-quinolona.

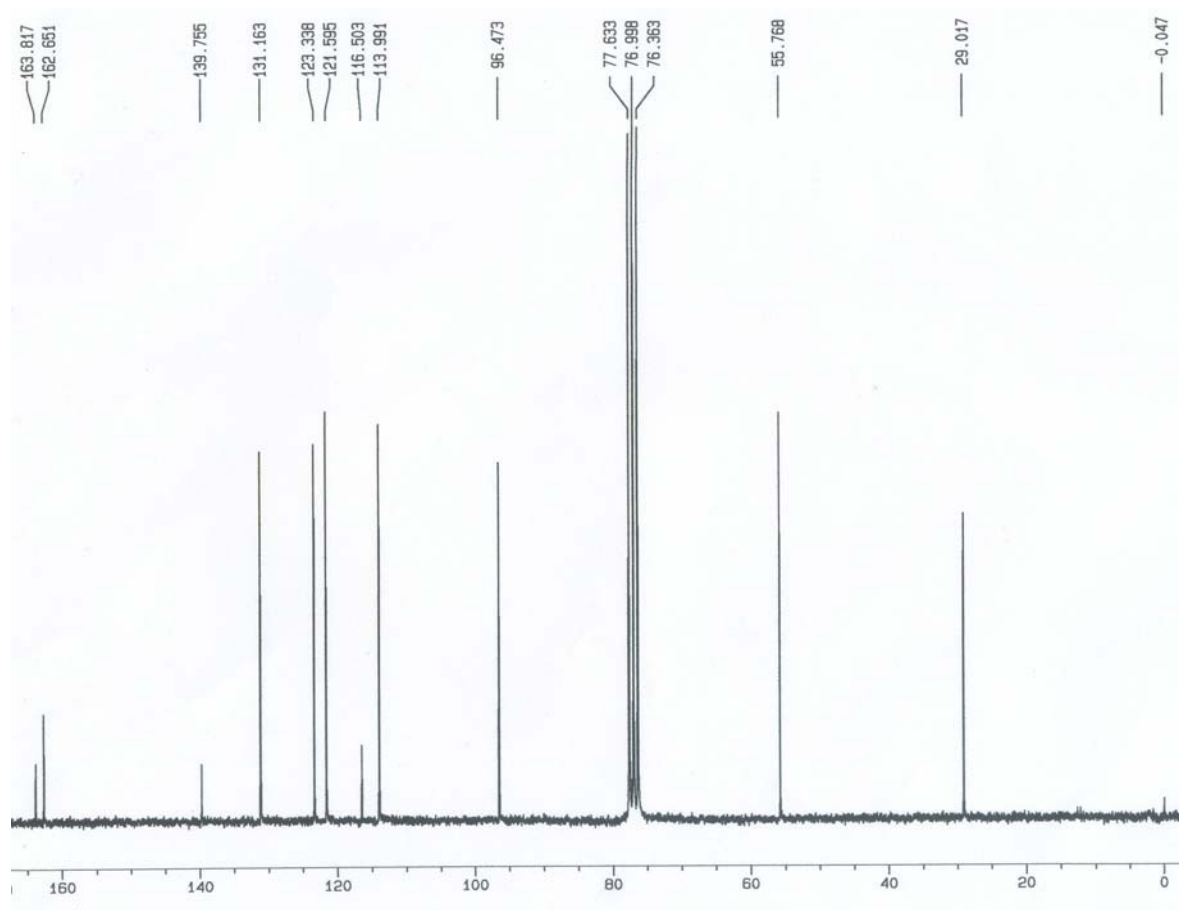


FIGURA 5.43- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da *N*-metil 4-metoxi-2 quinolona.

TABELA 5.13- Dados de RMN de ^1H da *N*-metil 4-metoxi-2 quinolona.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)	δ_{C} ^(c)	δ_{C} ^(d) (lit)
2			163,8	163,8
3	6,12 s	6,05 s	96,5	96,5
4			162,7	162,7
4a			116,5	116,5
5	7,98(dd, 8,0 e 1,2 Hz)	7,97 (dd, 8,0 e 1,5 Hz)	123,3	123,4
6	7,25 (ddd, 8,0; 7,1 e 1,2 Hz)	7,22 (ddd, 8,0; 7,1 e 1,0 Hz)	121,6	121,7
7	7,60 (ddd, 8,2; 7,1 e 1,2 Hz)	7,57 (ddd, 8,6; 7,1 e 1,5 Hz)	131,2	131,2
8	7,37(dl, 8,2 Hz)	7,33 (dl, 8,6 Hz)	114,0	114,1
8a			139,8	139,8
NCH ₃	3,97 s	3,95 s	29,0	29,1
OCH ₃	3,70 s	3,68 s	55,7	55,8

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 400MHz; (c) CDCl_3 , 50MHz; (d) CDCl_3 , 100MHz

5.2.2- Determinação Estrutural da Substância 14

A substância **14** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) da substância **14** (FIGURA 5.44) apresenta dois dubletos em δ 5,60 e δ 4,41 ($J=2,8$ Hz) que sugerem a presença de um anel furano reduzido e com substituintes nas posições 2' e 3'. A presença de um singlete em δ 4,48 (3H) sugere a presença de uma metoxila. O espectro mostra também um dubleto largo em δ 8,06 (1H, $J= 8,0$ Hz), um dubleto largo em δ 7,62 (1H, $J=8,0$ Hz), um duplo duplo dubleto em δ 7,57 (1H, $J= 8,0$; 6,7 e 1,3 Hz) e um duplo duplo dubleto em δ 7,30 (1H, $J= 8,0$; 6,7 e 1,3 Hz) sugerindo a presença de um anel aromático *orto* dissustituído.

Observam-se ainda dois singletos em δ 1,31 e δ 1,30 que integram para três hidrogênios cada e sugerem a presença de duas metilas

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) (FIGURA 5.45) mostra sinais referentes a 15 carbonos.

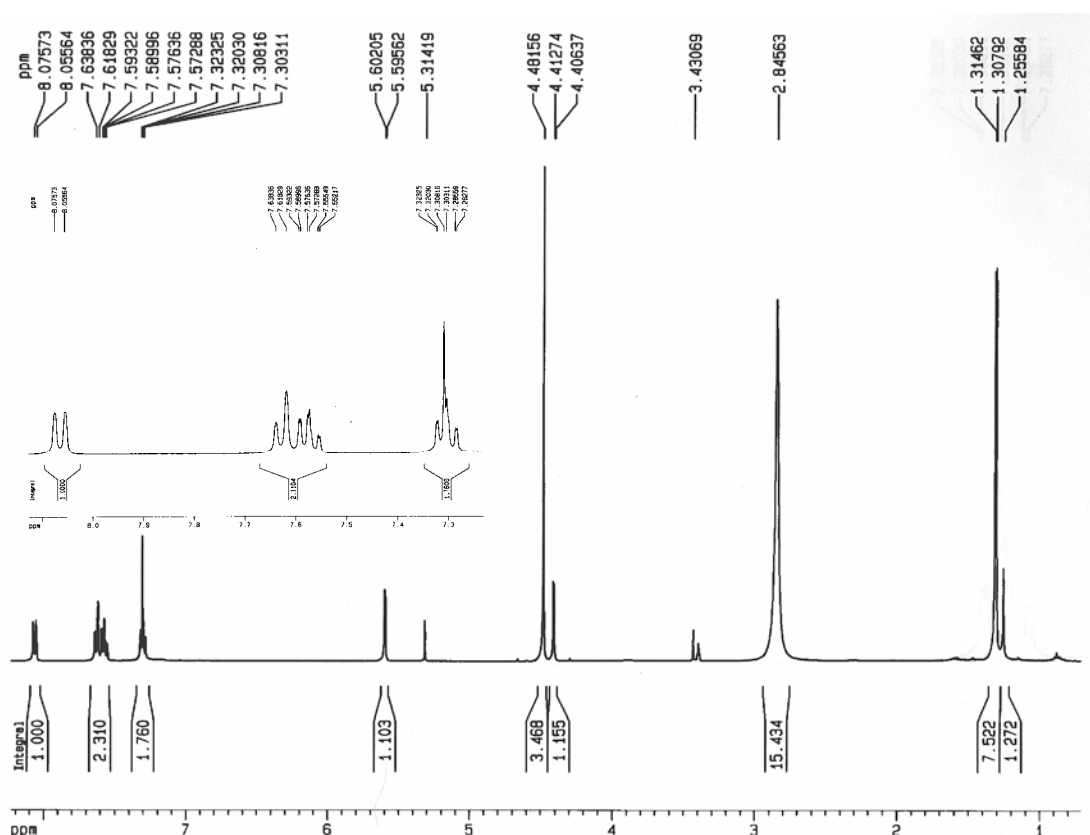


FIGURA 5.44- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas de MeOD) da substância **14**.

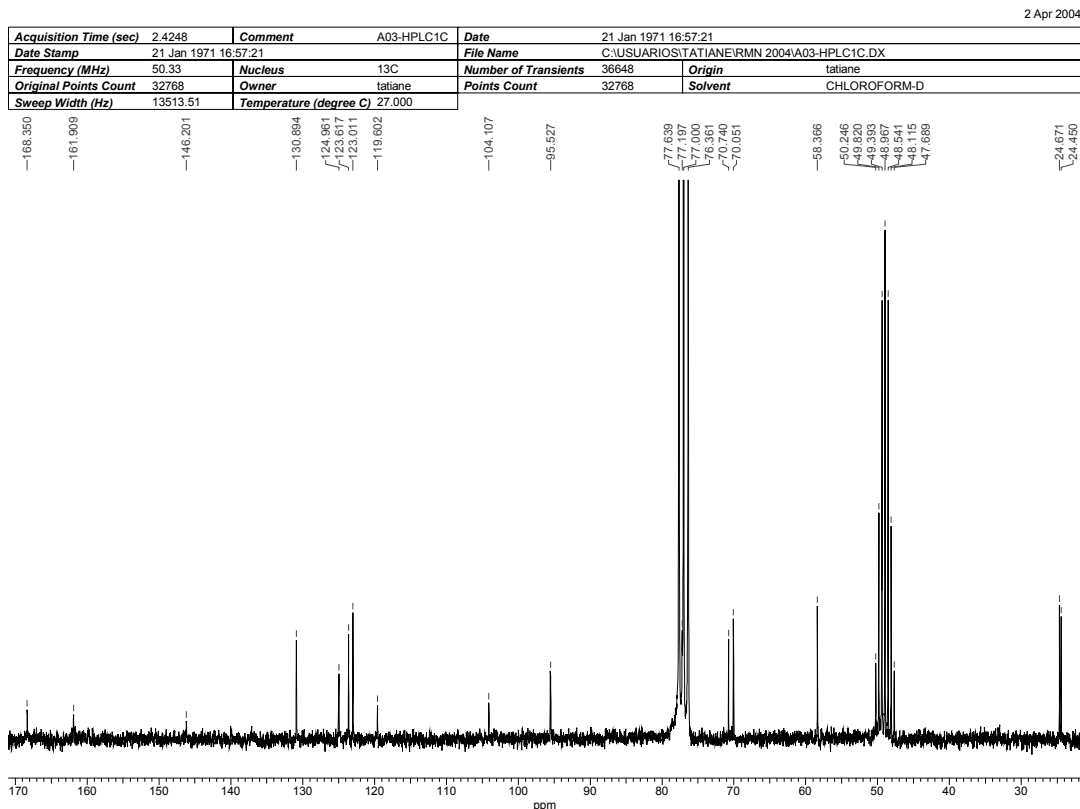


FIGURA 5.45- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 + gotas de MeOD) da substância **14**.

A análise do mapa de contorno do HSQC (FIGURA 5.46) mostra as correlações dos sinais dos hidrogênios com os sinais dos carbonos diretamente ligados a eles, porém as correlações dos hidrogênios das metilas com os carbonos correspondentes não foram conclusivas.

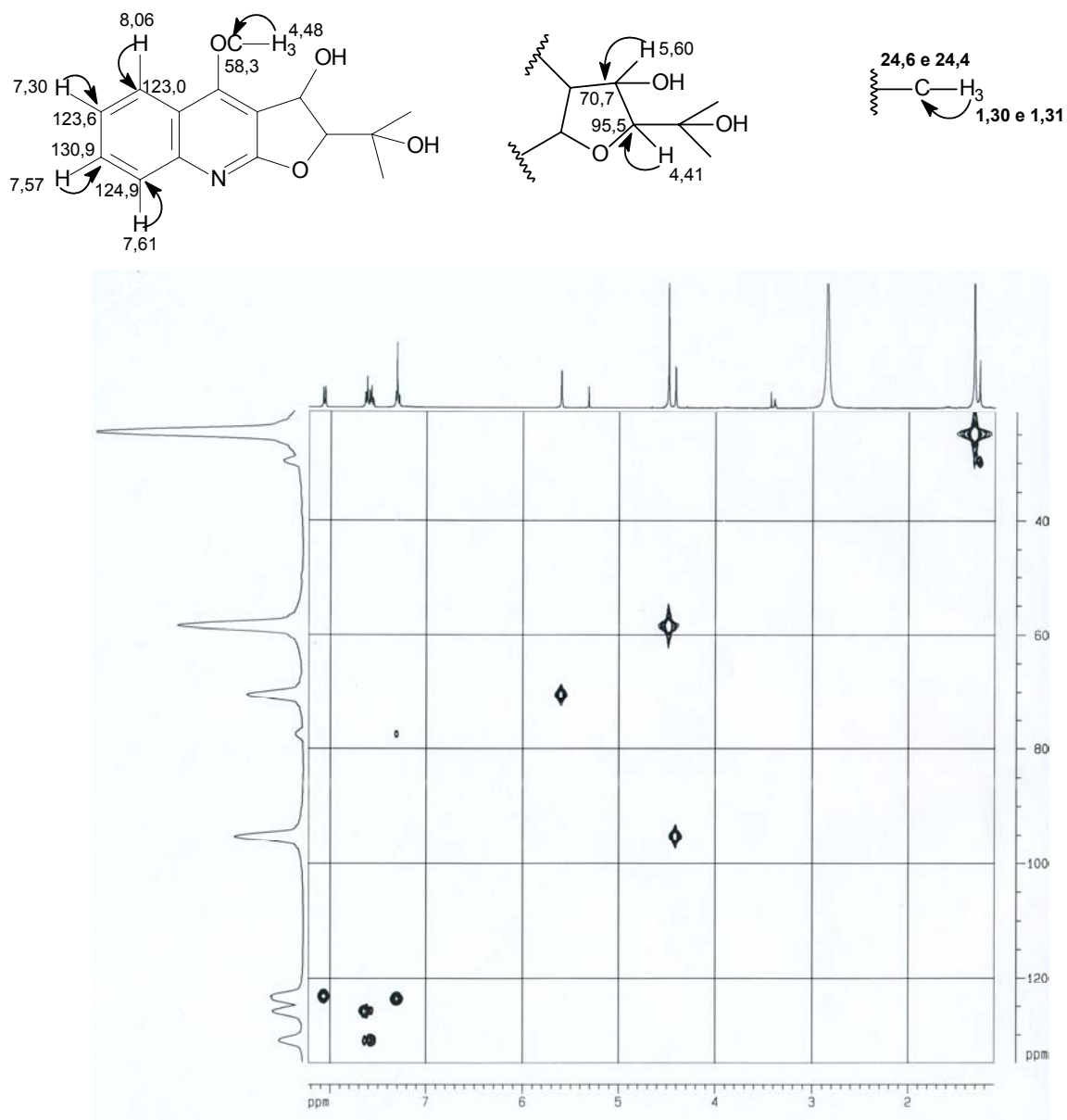


FIGURA 5.46- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3 + gotas de MeOD) da substância **14**.

A análise do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.47) mostra as correlações entre os hidrogênios e os carbonos a três ligações e com estas informações foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos do anel furano reduzido.

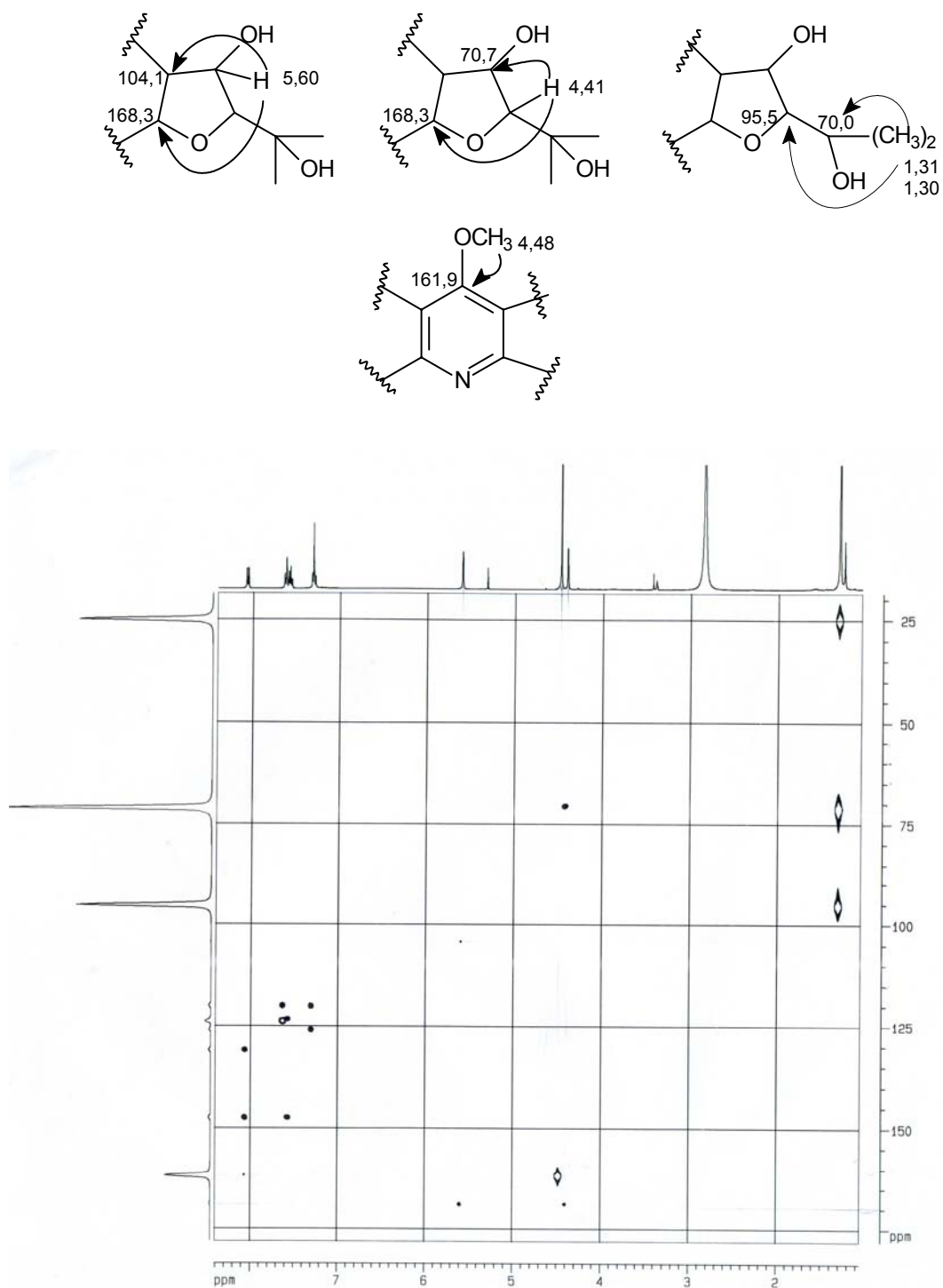


FIGURA 5.47- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl₃ + gotas de MeOD) da substância **14**.

Através da análise da ampliação da região aromática no mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.48) foram atribuídos os valores do deslocamento químico para os carbonos do anel aromático.

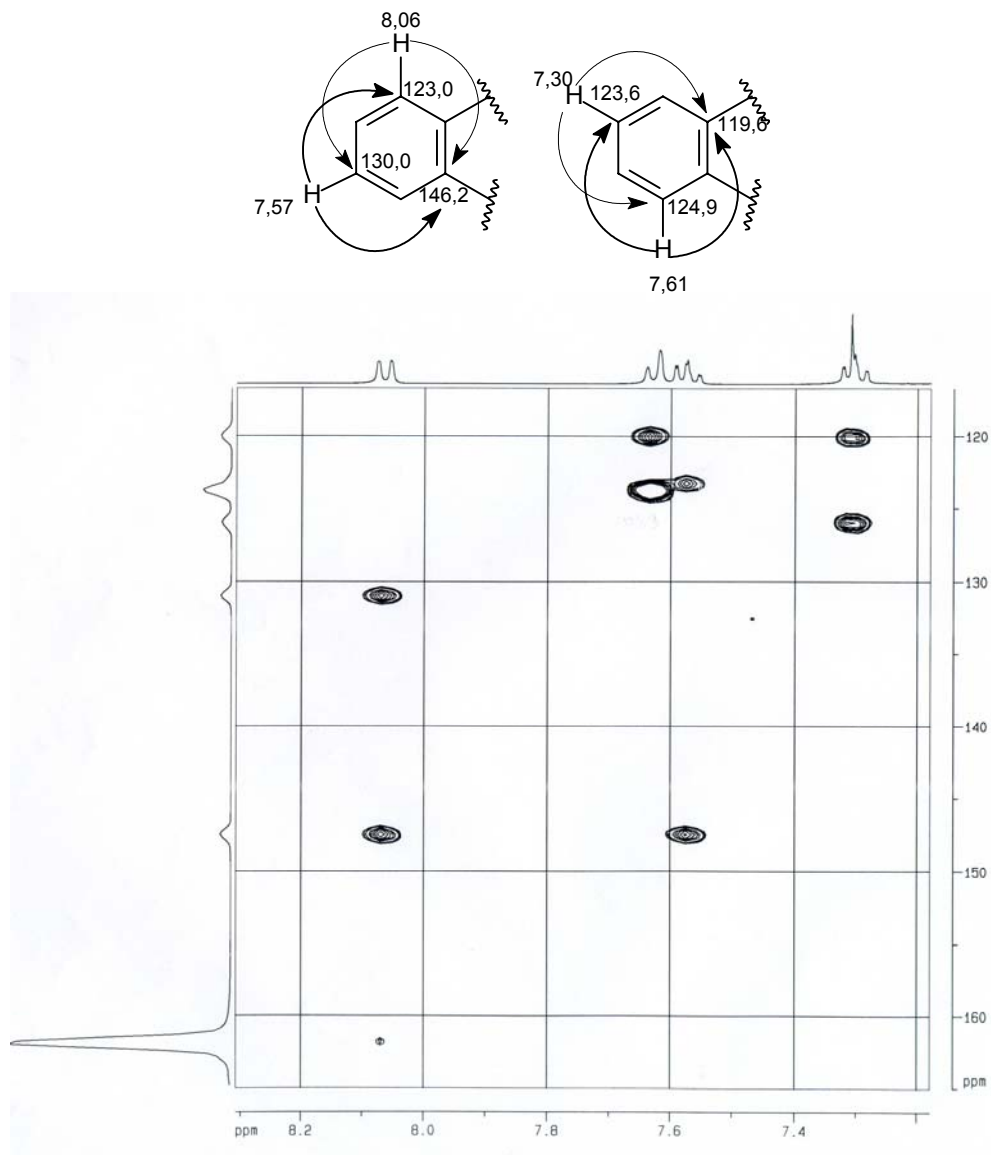


FIGURA 5.48- Extensão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3 + gotas de MeOD) da substância **14**.

A análise dos dados indica que a substância **14** é o alcalóide conhecido como mirtopsina, isolado anteriormente de *Myrtopsis macrocarpa* (HIFNAWY *et al.*, 1977) e de *Dutailleya baudouinii* (MUYARD *et al.*, 1992). Os dados espectroscópicos da mirtopsina não foram encontrados na literatura. Os dados RMN de ^1H e da substância **7** estão representados na TABELA 5.17.

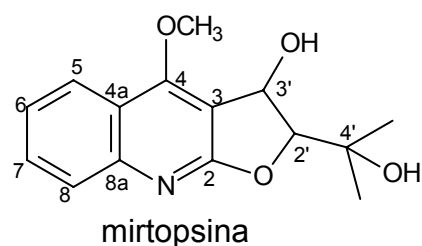


TABELA 5.14- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da mirtopsina.

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$
2		168,3
3		104,1
4		161,9
4a		119,6
5	8,06 (<i>dl</i> , 8,0Hz)	123,0
6	7,30 (<i>ddd</i> , 8,0; 6,7; 1,3Hz)	123,3
7	7,57 (<i>ddd</i> , 8,0; 6,7; 1,3Hz)	130,0
8	7,62 (<i>dl</i> , 8,0Hz)	124,9
8a		146,2
2'	4,41(<i>d</i> , 2,8Hz)	95,5
3'	5,60 (<i>d</i> , 2,8Hz)	70,7
4'		70,0
CH₃	1,31 (<i>s</i>)	24,6
	1,30 (<i>s</i>)	24,4
OCH₃	4,48 (<i>s</i>)	58,3

(a) CDCl_3 + gotas de MeOD, 400MHz; (b) CDCl_3 + gotas de MeOD, 50MHz

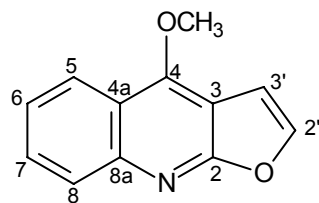
5.2.3- Determinação Estrutural da Substância 15

A substância **15** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN H^1 (200 MHz, CDCl_3) da substância **15** (FIGURA 5.49) apresenta dois dubletos em δ 7,59 e δ 7,05 ($J=2,8$ Hz) que sugerem a presença de um anel furano, a presença de um singlete em δ 4,47 (3H) é característico de uma metoxila na posição 4 de alcalóides furoquinolínicos. O espectro mostra também um duplo dubleto em δ 8,29 (1H, $J= 8,5$ e 1,2 Hz), um dubleto largo em δ 8,01 (1H, $J=8,5$ Hz), um duplo duplo dubleto em δ 7,69 (1H, $J= 8,5$; 6,8 e 1,2 Hz) e um duplo duplo dubleto em δ 7,69 (1H, $J= 8,5$; 6,8 e 1,2 Hz) sugerindo a presença de um anel aromático *orto* dissubstituído.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (PUSSET *et al.*, 1991) indicam que a substância **15** é o alcalóide furoquinolínico conhecido como dictamina que é amplamente distribuído em plantas da família Rutaceae. Os dados

RMN de ^1H e da substância **15** assim como os dados da literatura (PUSSET *et al.*, 1991) estão representados na TABELA 5.15.



dictamina

Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A34N232	Date	12 Aug 1971 11:18:39
Date Stamp	12 Aug 1971 11:18:39				
File Name					
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	17
Original Points Count	65536	Owner	tatlane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Origin	tatlane
				Solvent	CHLOROFORM-D

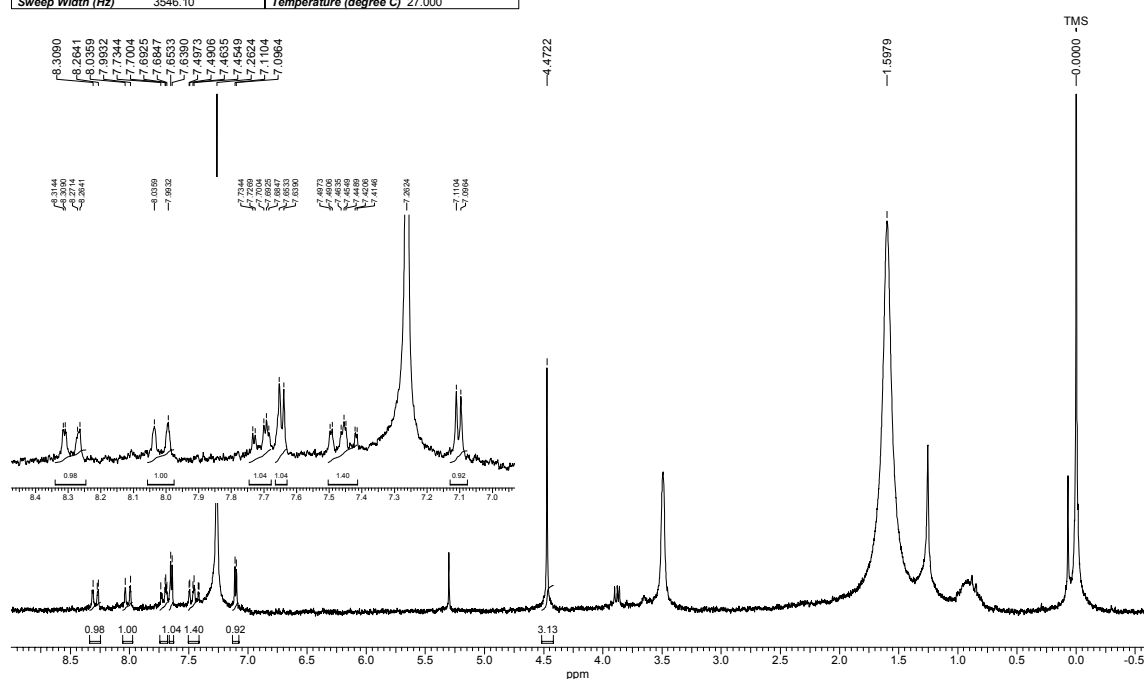


FIGURA 5.49- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da dictamina.

TABELA 5.15- Dados de RMN de ^1H da dictamina.

H	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (lit.)
5	8,29 (<i>dd</i> , 8,5 e 1,2 Hz)	8,27 (<i>dd</i> , 8,4 e 1,7 Hz)
6	7,45 (<i>ddd</i> , 8,5; 6,8 e 1,2 Hz)	7,45 (<i>ddd</i> , 8,4; 8,4 e 1,7 Hz)
7	7,69 (<i>ddd</i> , 8,5; 6,8 e 1,2 Hz)	7,68 (<i>ddd</i> , 8,4; 8,4 e 1,4 Hz)
8	8,01 (<i>dl</i> , 2,8 Hz)	8,01 (<i>dd</i> , 8,4 e 1,4 Hz)
2'	7,64 (<i>d</i> , 2,8 Hz)	7,69 (<i>d</i> , 2,8 Hz)
3'	7,10 (<i>d</i> , 2,8 Hz)	7,08 (<i>d</i> , 2,8 Hz)
4-OCH₃	4,47 s	4,45 s

(a) CDCl_3 , 200MHz

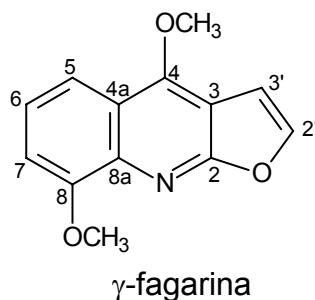
5.2.4-Determinação Estrutural da Substância 16

A substância **16** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **16** (FIGURA 5.50) apresenta dois dubletos em δ 7,65 e δ 7,09 ($J=2,8$ Hz) que sugerem a presença de um anel furano, a presença de um singlete em δ 4,46 (3H) é característico de uma metoxila na posição 4 de alcalóides furoquinolínicos .

O espectro mostra também um duplo dubleto em δ 7,86 (1H, $J= 8,5$ e $1,2$ Hz), um tripleto em δ 7,37 (1H, $J=8,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,07 (1H, $J= 8,5$ e $1,2$ Hz) sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído. Observa-se ainda um singlete em δ 4,09 (3H) sugerindo a presença de uma metoxila.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (CUCA *et al.*, 1998) indicam que a substância **16** é o alcalóide furoquinolínico conhecido como γ -fagarina que é amplamente distribuído em plantas da família Rutaceae. Os dados RMN de ^1H e da substância **16** assim como os dados da literatura (CUCA *et al.*, 1998) estão representados na TABELA 5.16.



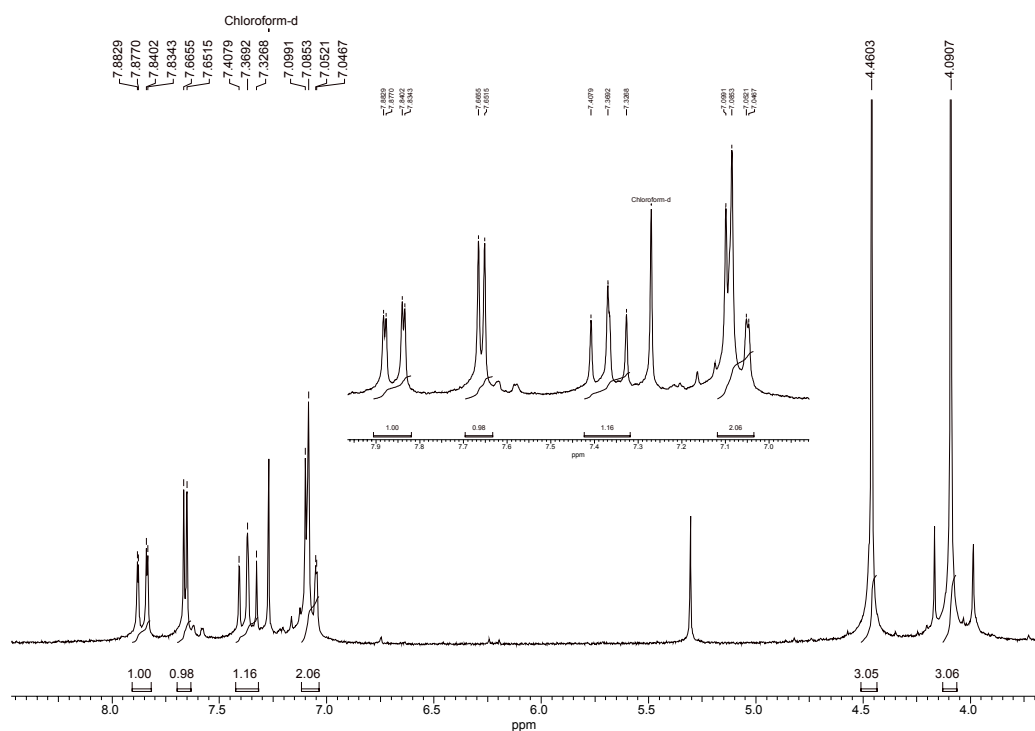


FIGURA 5.50- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da γ -fagarina.

TABELA 5.16- Dados de RMN de ^1H da γ -fagarina.

H	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)
5	7,86 (dd, 8,5 e 1,2 Hz)	7,85 (dl, 8,5 Hz)
6	7,37 (t, 8,5)	7,34 (ddd, 8,5; 7,8 e 0,9 Hz)
7	7,07 (dd, 8,5 e 1,2 Hz)	7,07 (dl, 7,8 Hz)
2'	7,65 (d, 2,8 Hz)	7,65 (d, 2,8 Hz)
3'	7,09 (d, 2,8 Hz)	7,09 (d, 2,8 Hz)
4-OCH ₃	4,46 s	4,44 s
OCH ₃	4,09 s	4,07 s

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 300MHz

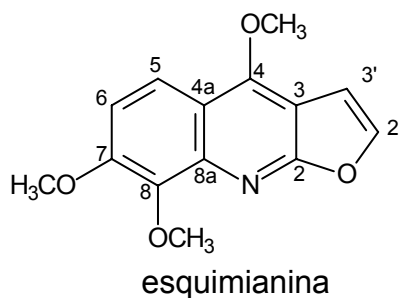
5.2.5- Determinação Estrutural da Substância 17

A substância **17** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **17** (FIGURA 5.51) apresenta quatro dubletos na região aromática. Dois deles em δ 7,59 e δ 7,05 ($J=2,8$ Hz) que sugere a presença de um anel furano. Os dubletos em δ 8,03 e δ 7,24 ($J=9,4$ Hz) sugerem a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*. O singlete em δ 4,44 (3H) é característico de uma metoxila na posição 4 de alcalóides

furoquinolínicos. O espectro mostra também dois singletos em δ 4,12 e δ 4,03 integrando para três hidrogênios cada indicando a presença de duas metoxilas.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (ROBERTSON, 1963) indicam que a substância **17** é o alcalóide furoquinolínico conhecido como esquimianina, que é amplamente distribuído em plantas da família Rutaceae. Os dados RMN de ^1H e da substância 14 assim como os dados da literatura (AHOND *et al.*, 1978) estão representados na TABELA 5.17.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A12esqui	Date	06 Mar 1972 04:12:41
Date Stamp	06 Mar 1972 04:12:41				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHA\SPECTROS REL\3ESQUIMIANINA\12ESQUI.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	^1H	Number of Transients	7
Original Points Count	85536	Owner	Italiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Origin	italiane
				Solvent	CHLOROFORM-D

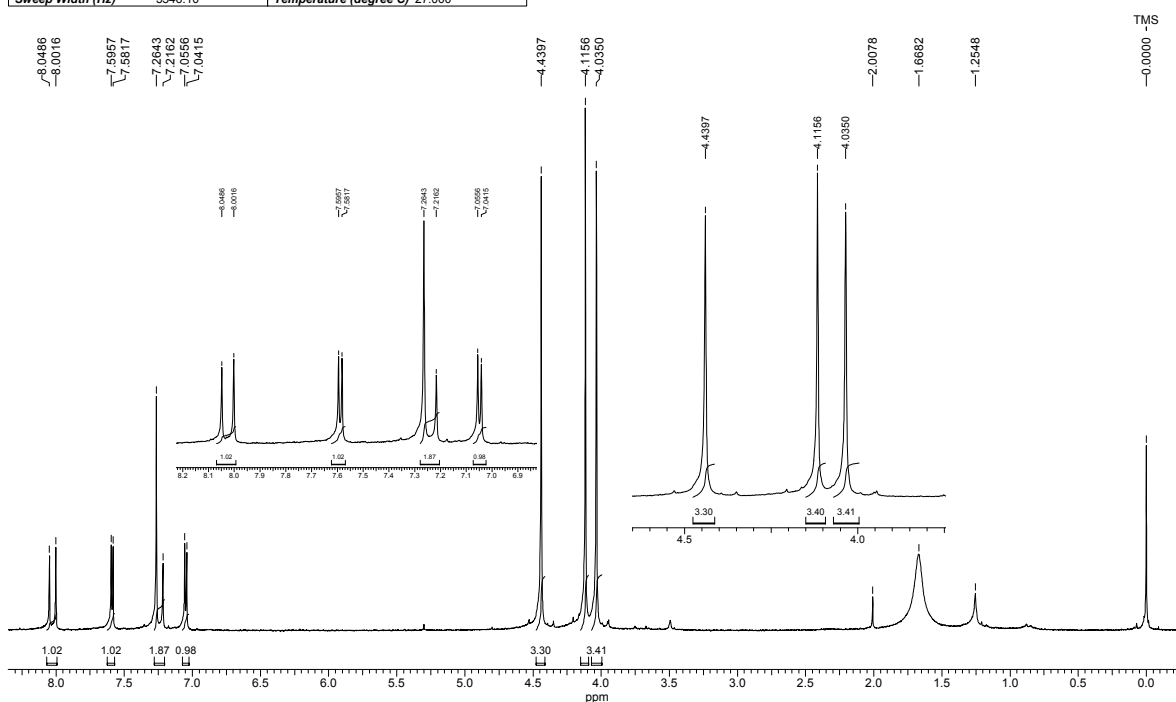


FIGURA 5.51- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da esquimianina

TABELA 5.17- Dados de RMN de ^1H da esquimianina.

H	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)
5	8,03 (d, 9,4 Hz)	8,03 (d, 9,0 Hz)
6	7,24 (d, 9,4 Hz)	7,23 (d, 9,0 Hz)
2'	7,59 (d, 2,8 Hz)	7,58 (d, 2,5 Hz)
3'	7,05 (d, 2,8 Hz)	7,05 (d, 2,5 Hz)
4-OCH ₃	4,44 s	4,46 s
7-OCH ₃	4,04 s	4,07 s
8-OCH ₃	4,12 s	4,16 s

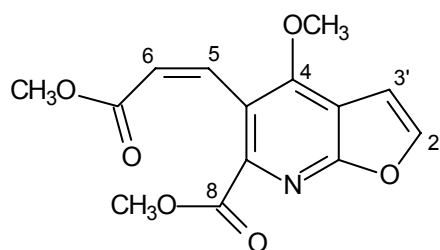
(a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 60MHz

5.2.6- Determinação Estrutural da Substância 18

A substância **18** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN H¹ (200 MHz, CDCl₃) da substância **18** (FIGURA 5.52) apresenta quatro dubletos na região aromática. Dois deles em δ 7,72 e δ 7,03 ($J=2,6$ Hz) sugerem a presença de um anel furano. Os dubletos em δ 7,26 e δ 6,16 ($J=11,8$ Hz) sugerem a presença de uma dupla ligação conjugada a uma carbonila, e a constante de acoplamento 11,8 Hz sugere a estereoquímica Z para a dupla ligação. Na região alifática observam-se três singletos integrando para três hidrogênios em δ 4,24; δ 3,94 e δ 3,57 que sugerem a presença de três metoxilas.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (ARRUDA *et al.*, 1992) indicam que a substância **18** é o alcalóide secofuroquinolínico, conhecido como Z-rhoifolinato de dimetila, isolado anteriormente de *Zanthoxylum rhoifolium* (ARRUDA *et al.*, 1992) e *Metrodorea nigra* (MÜLLER *et al.*, 1995). Os dados RMN de ^1H da substância **18** assim como os dados da literatura (ARRUDA *et al.*, 1992) estão representados na TABELA 5.18.



Z-rhoifolinato de dimetila

Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A213D6EH1	Date	14 May 1971 13:32:43
Date Stamp	14 May 1971 13:32:43				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHA\SPECTROS REL3\RHOIFOLINATO\A213D6EH1.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Original Points Count	65536	Owner	tatlane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

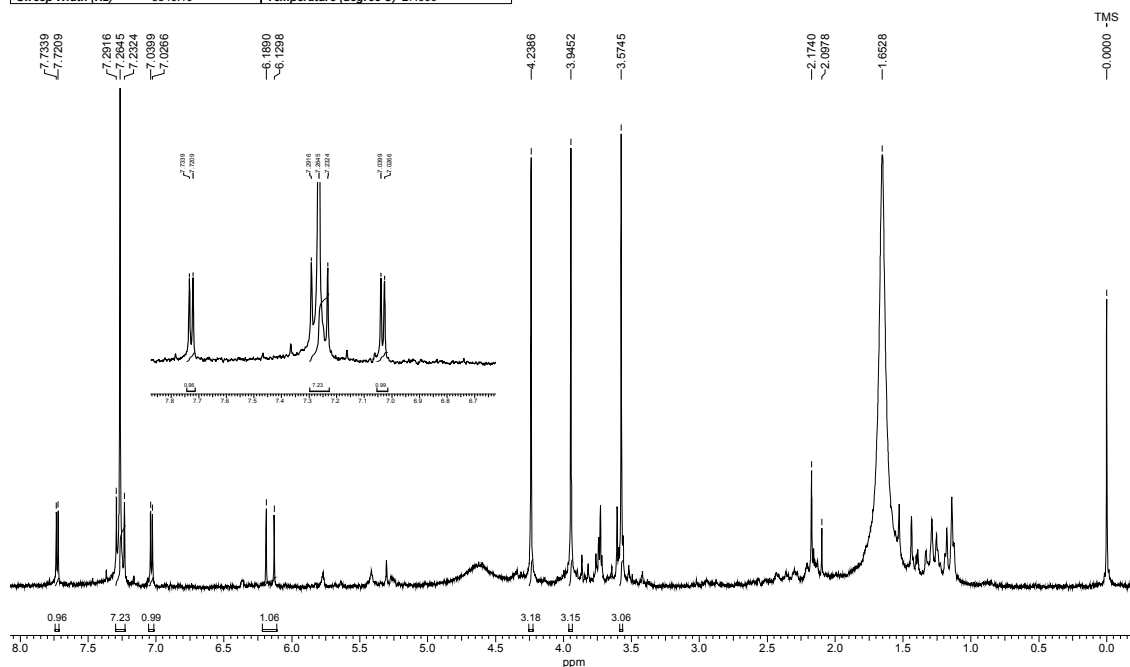


FIGURA 5.52- Espectro de RMN de ¹H Z-rhoifolinato de dimetila

TABELA 5.18- Dados de RMN de ¹H do Z-rhoifolinato de dimetila

H	δ_H (a)	δ_H (a) (lit.)
5	7,26 (1H, 11,8 Hz)	7,26 (1H, 11,8 Hz)
6	6,16 (1H, 11,8 Hz)	6,16 (1H, 11,8 Hz)
2'	7,72 (1H, 2,6 Hz)	7,72 (1H, 2,6 Hz)
3'	7,03 (1H, 2,6 Hz)	7,03 (1H, 2,6 Hz)
4-OCH₃	4,24	4,24
7-CO₂CH₃	3,57	3,57
8-CO₂CH₃	3,94	3,94

(a) CDCl₃, 200MHz

5.2.7- Determinação Estrutural da Substância 19

A substância **19** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN¹H (200MHz, CDCl₃) da substância **19** (FIGURA 5.53) apresenta dois dubletos em δ 6,74 e δ 5,53 (H, $J=9,9$ Hz) e um singleto em δ 1,50 (6H) que sugerem a presença de um anel 2,2 dimetilcromeno. A região aromática do espectro mostra ainda um duplo dubleto em δ 7,52 (1H, $J= 7,6$ e 1,7 Hz), um triplete em δ 7,05 (1H, $J= 7,6$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,13 (1H, $J= 7,6$ e 1,7Hz), sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído. Um singleto em δ 4,0 (3H) sugere a presença de uma metila ligada a heteroátomo (N ou O).

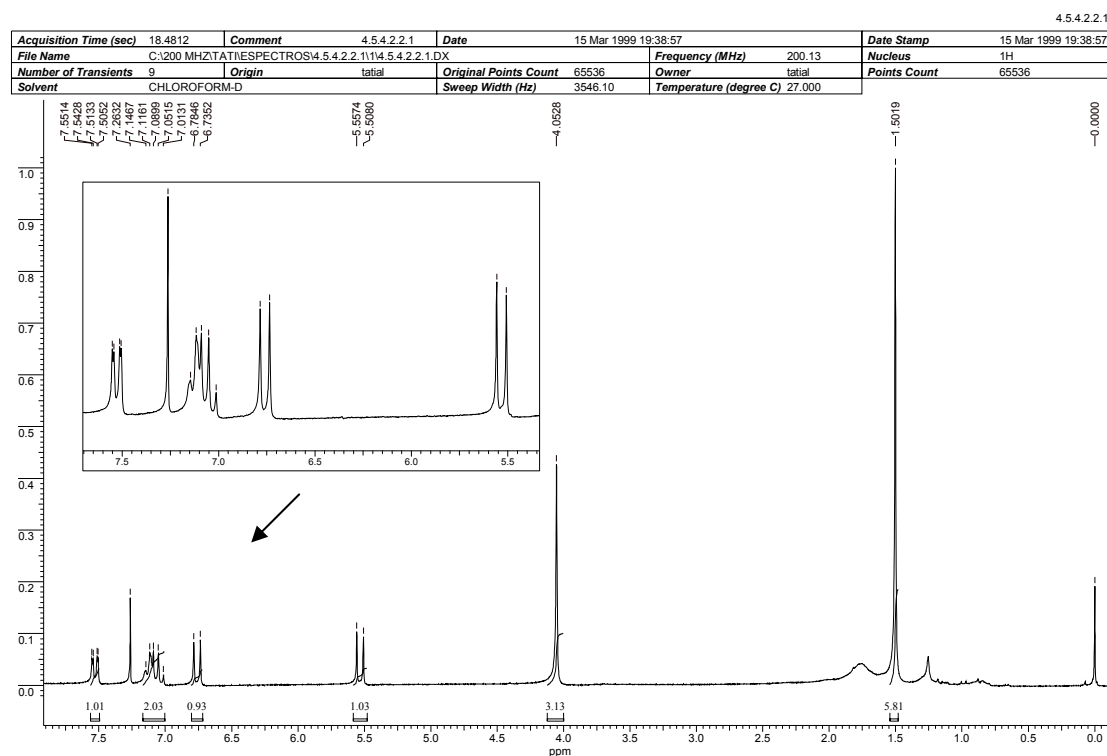


FIGURA 5.53- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da 8-hidroxi-N-metil flindersina.

O espectro de massas de alta resolução da substância **19** (FIGURA 5.54) mostra o pico do íon molecular com m/z 257,10107 (30,01%), que está de acordo com a fórmula molecular C₁₅H₁₅NO₃ o valor calculado é m/z 259,12084. O pico base tem m/z 242 (100%) e é gerado através da perda de uma metila.



FIGURA 5.54- Espectro de massas de alta resolução da 8-hidroxi-N-metil flindersina.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.55) mostra um sinal em δ 162,6 referente a um carbono carbonílico, além de um sinal de carbono carbinólico em δ 78,8 e um sinal em δ 28,2 referente às metilas geminais do cromeno. A ausência de um sinal próximo a δ 56,0 descarta a possibilidade da presença de uma metoxila na estrutura e o sinal em δ 35,3 confirma a existência de uma metila ligada a nitrogênio.

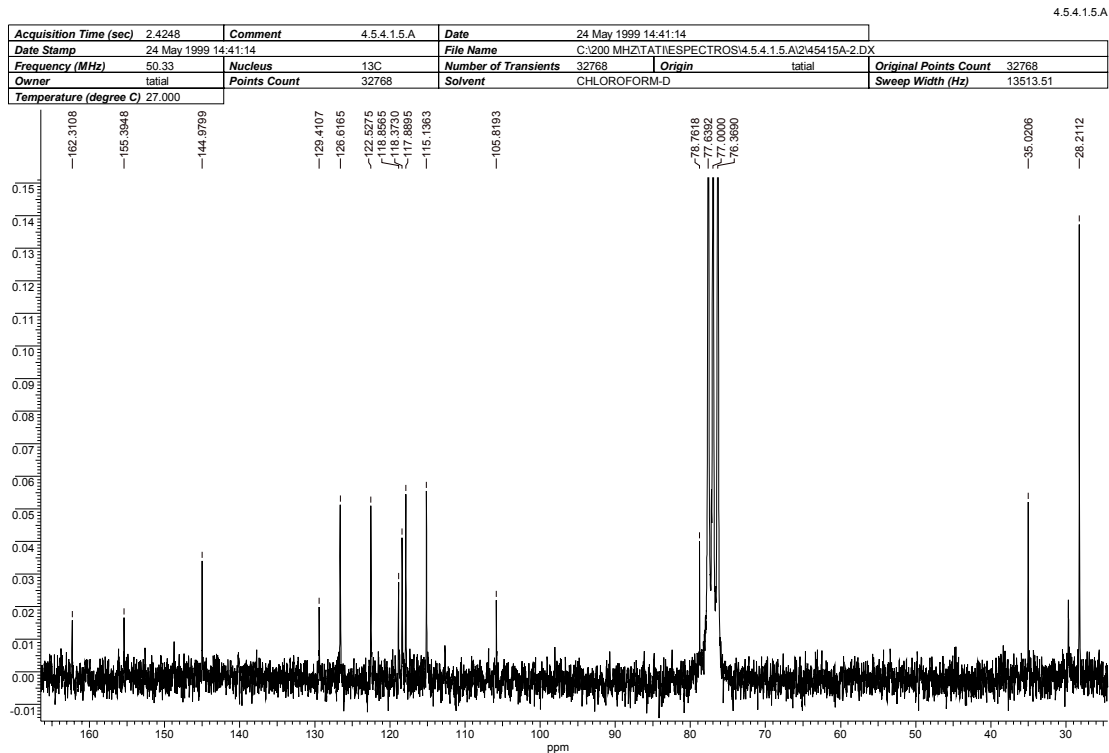


FIGURA 5.55- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da 8-hidroxi-N-metil flindersina.

A análise dos dados e as comparações com os dados da literatura da 8 metoxiflindersina (HOHLEMWERGER, 2002) indicam que a substância 5 é o alcalóide piranoquinolônico 8-hidroxi-*N*-metilflindersina. Na literatura há relato da síntese desta substância, porém este alcalóide não foi isolado de fontes naturais. Os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C da substância **19** e da 8-metoxiflindersina (**19A**) estão representas na TABELA 5.19.

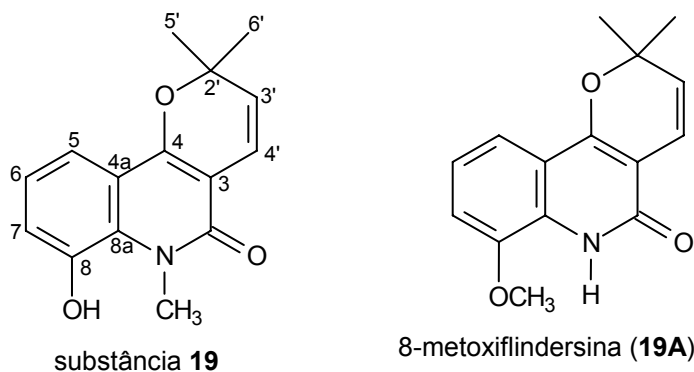


TABELA 5.19- Dados de RMN ^1H e de ^{13}C da substância **19** e da 8-metoxiflindersina (**19A**)

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (19)	$\delta_{\text{H}}^{(b)}$ (19A)	$\delta_{\text{C}}^{(c)}$ (19)	$\delta_{\text{C}}^{(c)}$ (19A)
2			162,3	160,4
3			105,8	106,7
4			155,4	157,4
4a			118,8	115,9
5	7,52 (<i>dd</i> , 7,8 e 1,7Hz)	7,47 (<i>dd</i> , 8,1 e 1,0Hz)	118,4	114,5
6	7,05 (<i>t</i> , 7,8 Hz)	7,11 (<i>t</i> , 8,1)	122,5	121,6
7	7,05 (<i>dd</i> , 7,8 e 1,7Hz)	6,95 (<i>dd</i> , 8,1 e 1,0Hz)	115,7	110,2
8			145,0	145,5
8a			129,4	128,1
2'			78,7	79,0
3'	5,54 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	5,53 (<i>d</i> , 10,0 Hz)	126,6	126,2
4'	6,75 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	6,70 (<i>d</i> , 10,0 Hz)	117,9	117,1
2'(CH₃)₂	1,50 (<i>s</i>)	1,52 (<i>s</i>)	28,2	28,2
O-CH₃	-	3,96 (<i>s</i>)	-	56,0
N-CH₃	4,05 (<i>s</i>)	-	35,3	
N-H	-	8,88 (<i>s</i>)		

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 300MHz; (c) CDCl_3 , 50MHz

5.2.8- Determinação Estrutural da Substância 20

A substância **20** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da substância **20** (FIGURA 5.56) mostra várias semelhanças com o espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da substância **19** (FIGURA 5.53).

Assim como no espectro de RMN ^1H da substância **19** foram observados dois dubletos em δ 6,75 e δ 5,54 (H, $J=9,9\text{Hz}$) e um singleto em δ 1,50 (6H) que sugerem a presença de um anel 2,2 dimetilcromeno e na região aromática dois duplos dubletos em δ 7,60 (1H, $J=7,8$ e $1,7\text{Hz}$) e δ 7,05 (1H, $J=7,8$ e $1,7\text{Hz}$) e um tripleto em δ 7,15 (1H, $J=7,8\text{Hz}$) sugerindo a presença de um anel tri substituído. Porém o espectro de RMN ^1H da substância **20** apresenta também dois singletos em δ 3,92 (3H) e δ 3,89 (3H) que podem ser atribuídos a metilas ligadas a heteroátomos enquanto que para a substância **19** apenas um singleto é observado em δ 4,0 (3H).

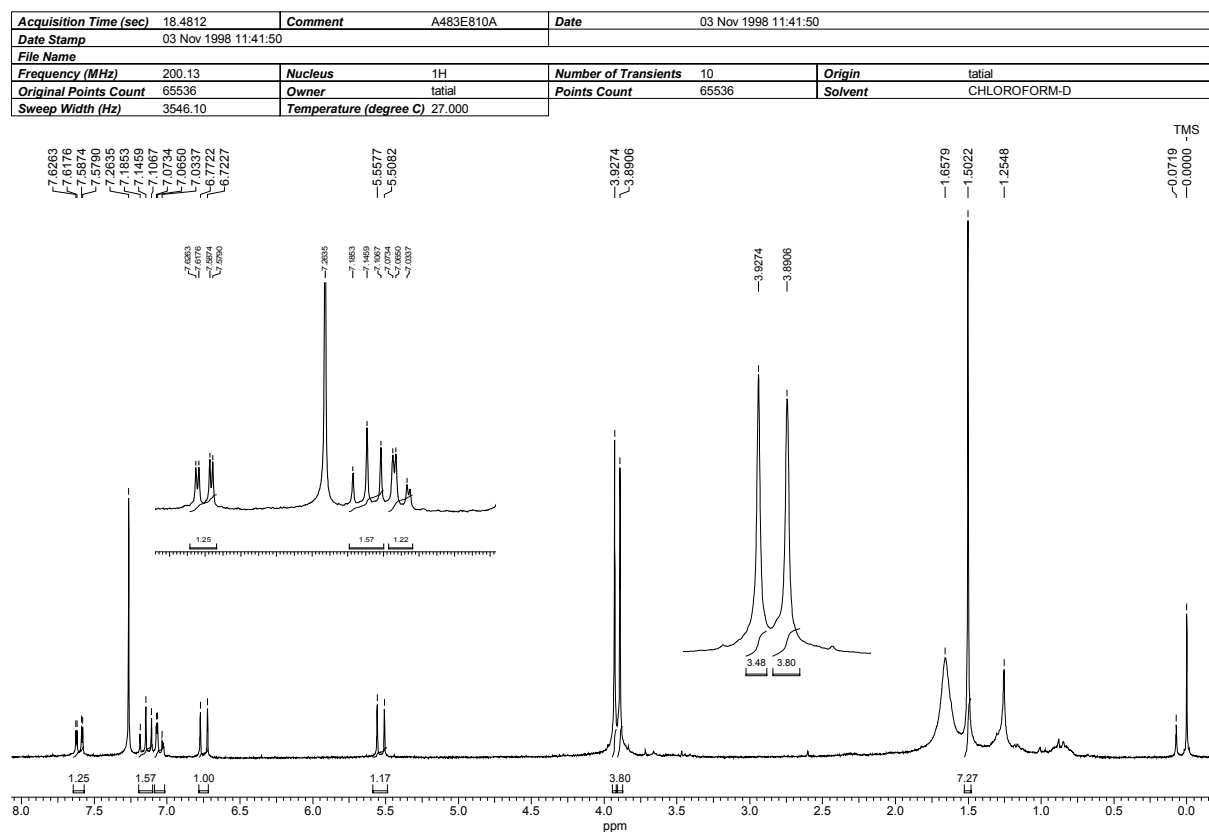


FIGURA 5.56- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da zantobumgeanina.

A análise dos dados da substância **20** e a comparação com os dados substância **19** e da literatura indicam (CAMPBELL *et al.*, 1990) que a substância **20** é o alcalóide conhecido como zantobungeanina, isolado anteriormente de plantas do gênero *Agathosma* (Rutaceae) (CAMPBELL *et al.*, 1990), de *Zanthoxylum bungeanum* e de *Zanthoxylum simulans* (WATERMAN & GRUNDON, 1983). Os dados de RMN¹H da substância **20** assim como os dados da literatura (CAMPBELL *et al.*, 1990) estão apresentados na TABELA 5.20.

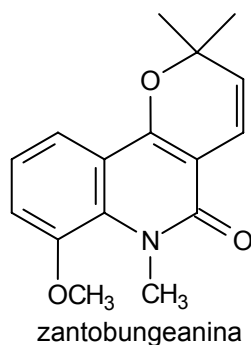


TABELA 5.20 - Dados de RMN de ¹H da zantobungeanina.

H	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (lit.)
5	7,60 (<i>dd</i> , 7,8 e 1,7Hz)	7,59 (<i>dd</i> , 9,0 e 2,8Hz)
6	7,15 (<i>t</i> , 7,8 Hz)	7,12 (<i>dd</i> , 9,0 e 2,8Hz)
7	7,05 (<i>dd</i> , 7,8 e 1,7 Hz)	6,97 (<i>dd</i> , 9,0 e 2,8Hz)
3'	5,54 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	5,55 (<i>d</i> , 11,0 Hz)
4'	6,75 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	6,76 (<i>d</i> , 11,0 Hz)
1'(CH₃)₂	1,50 (<i>s</i>)	1,52 (<i>s</i>)
O-CH₃	3,93 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i>)
N-CH₃	3,89 (<i>s</i>)	3,68 (<i>s</i>)

(a) CDCl₃, 200MHz

5.2.9- Determinação Estrutural da Substância 21

A substância **21** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) da substância **21** (FIGURA 5.57) apresenta dois dubletos, em δ 7,61 e δ 7,09 (1H, $J= 7,9$ Hz) e um tripleto em δ 7,20 (1H, $J= 7,9\text{Hz}$) na região aromática sugerindo a presença de um anel aromático 1, 2, 3-substituído. Observa-se a presença de dois dubletos em δ 4,74 e δ 3,82 (1H, $J= 7,5$ Hz), além de dois singletos em δ 3,92 e δ 3,90 (3H) que indicam dois grupos metilas ligados a heteroátomos (N ou O). Dois singletos em δ 1,61 e δ 1,30 (3H) podem ser atribuídos a dois grupos metilas. A análise do espectro de RMN ^1H sugere que a substância **21** é um alcalóide piranoquinolônico com anel pirano reduzido.

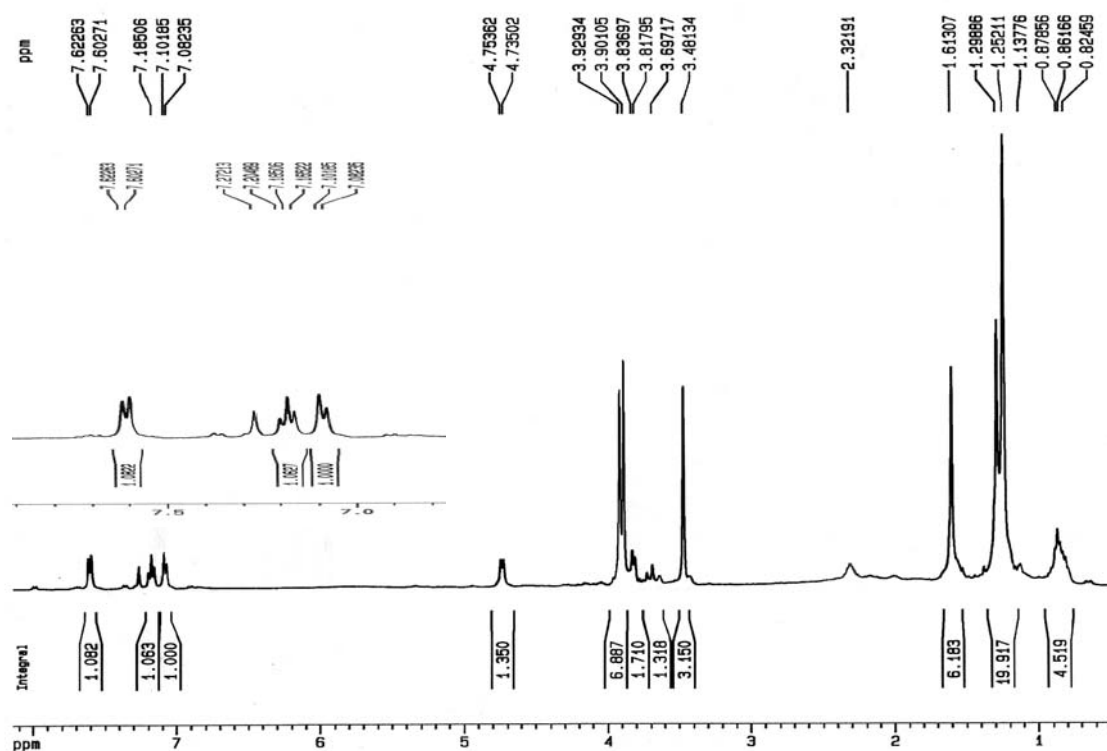
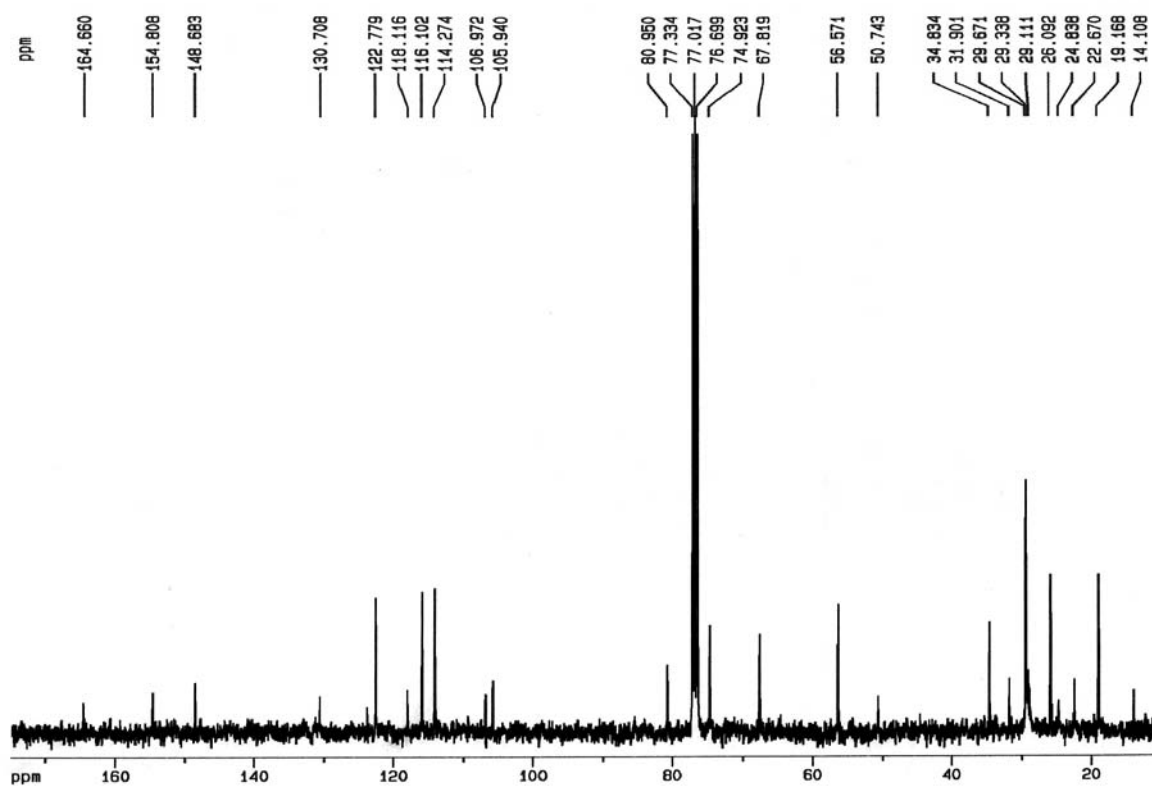


FIGURA 5.57- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) da substância **21**.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) (FIGURA 5.58) mostra os sinais referentes a 16 carbonos, sendo os sinais em δ 34,8 e δ 56,5 característicos de metila ligada a N e a O, respectivamente e o sinal em δ 164,6

característico da carbonila na posição 2. Observam-se ainda os sinais em δ 24,8 e δ 19,2 que podem ser atribuídos a duas metilas.



5.58- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) da substância **21**.

A análise do mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) (FIGURA 5.59) mostra a correlações dos hidrogênios com os carbonos diretamente ligados o que possibilitou atribuir corretamente os valores das metila ligada ao O e a metila ligada ao N.

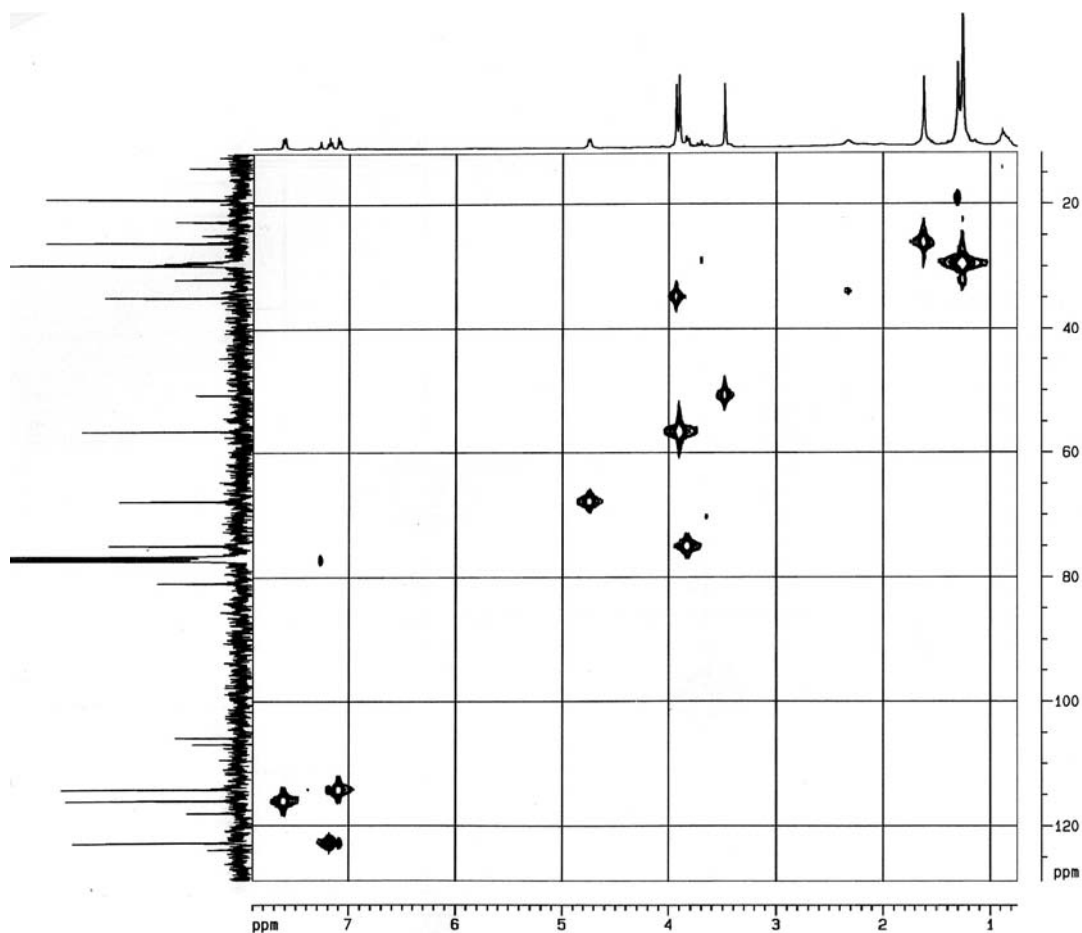
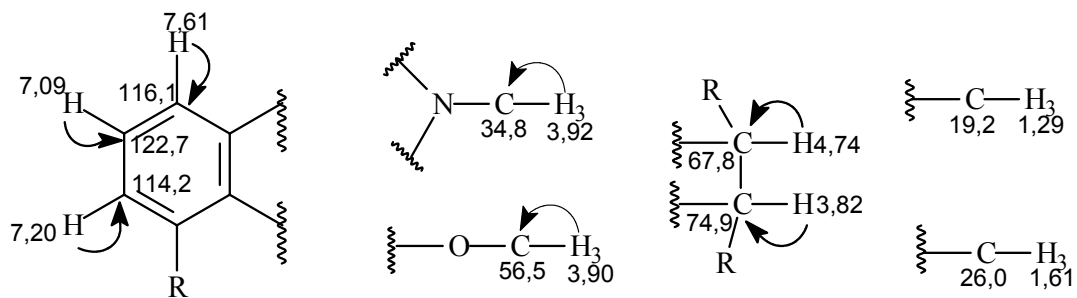


FIGURA 5.59- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD) da substância **21**

Através da análise da expansão do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.60) que mostra as correlações dos hidrogênios com carbonos a duas e três ligações, foi possível elucidar a estrutura da molécula e determinar as posições exatas dos substituintes.

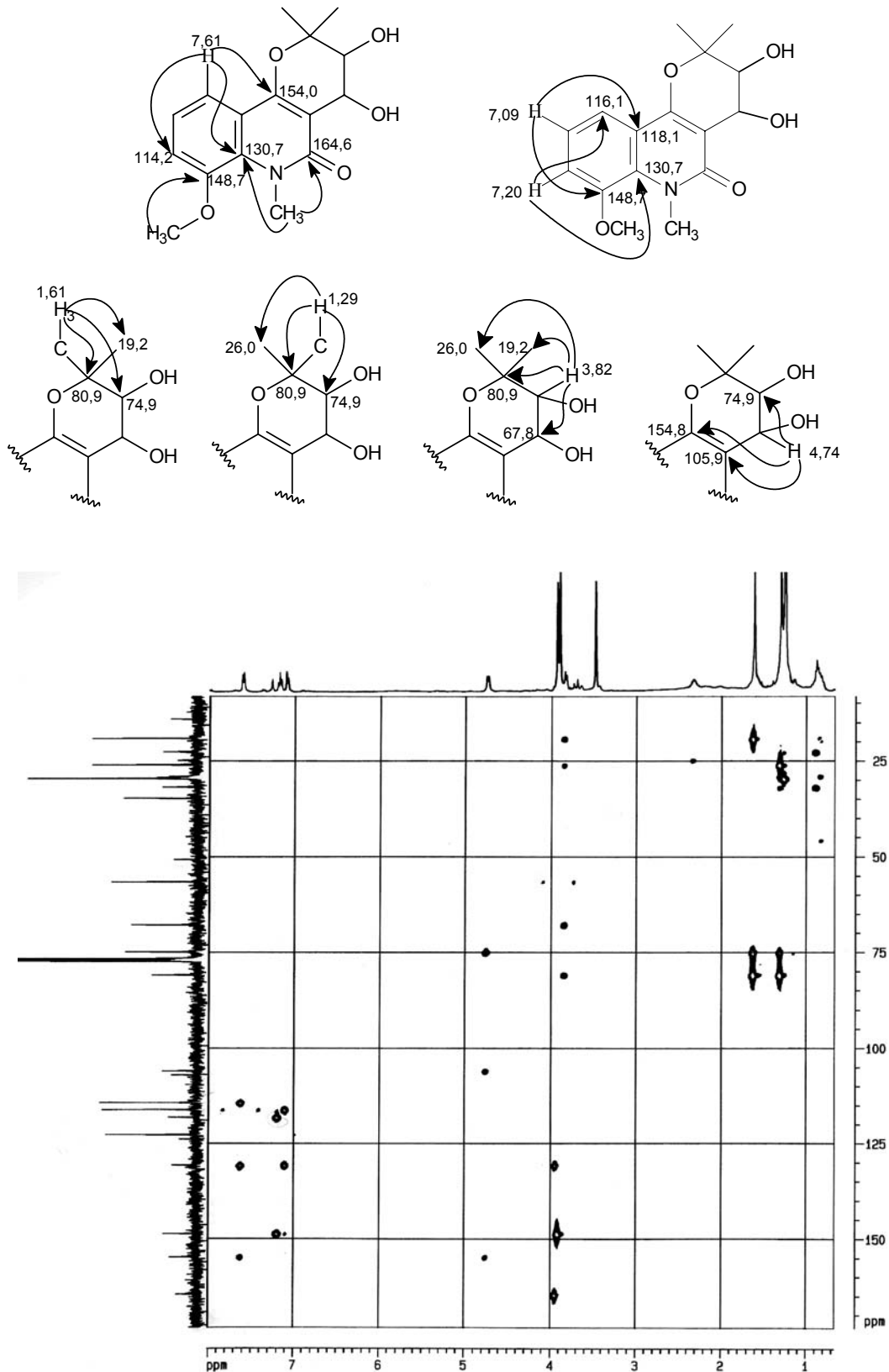
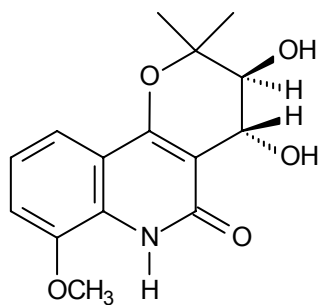


FIGURA 5.60- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância 21

A constante de acoplamento $J=7,5\text{Hz}$ entre os hidrogênios nas posições 3' (δ 3,82) e 4' (δ 4,74) sugere a configuração relativa *trans* para o sistema diol.

A análise dos dados e a comparação com dados de RMN de ^1H da literatura indicam que a substância **21** é o alcalóide conhecido como zantodiolina isolada anteriormente de *Zanthoxylum simulanus* (Rutaceae) (CHEN *et al.*, 1997). Os dados RMN de ^1H da substância **21** assim como os dados da literatura (CHEN *et al.*, 1997) estão representados na TABELA 5.21.



zantodiolina

TABELA 5.21- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da zantodiolina

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(b) (lit.)	δ_{C} ^(c)
2			164,6
3			105,9
4			154,8
4a			118,1
5	7,61 (<i>d</i> , 7,9 Hz)	7,62 (<i>dd</i> , 8,0 e 1,4 Hz)	116,1
6	7,20 (<i>t</i> , 7,9 Hz)	7,19 (<i>t</i> , 8,0 Hz)	122,7
7	7,09 (<i>d</i> , 7,9 Hz)	7,09 (<i>dd</i> , 8,0 e 1,4 Hz)	114,2
8			148,0
8a			130,7
2'(CH₃)₂			80,9
3'	3,82 (<i>d</i> , 7,5Hz)	3,83 (<i>d</i> , 7,8Hz)	74,9
4'	4,74 (<i>d</i> , 7,5Hz)	4,73 (<i>d</i> , 7,8Hz)	67,8
2'	1,61	1,62	26,0
6'	1,29	1,30	19,2
NCH₃	3,92	3,93	34,8
OCH₃	3,90	3,90	56,6

(a) CDCl_3 + gotas MeOD, 200MHz; (b) CDCl_3 , 400MHz; (c) CDCl_3 + gotas MeOD, 50MHz

5.2.10- Determinação Estrutural da Substância 22

A substância **22** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN¹H (200MHz, CDCl₃) da substância **22** (FIGURA 5.61) apresenta dois dubletos em δ 6,72 e 5,49 (H, $J=9,9$ Hz) e um singleto em δ 1,50 (6H) que sugerem a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno. O espectro apresenta também dois singletos em δ 3,90 (3H) e 3,74 (3H) que podem ser atribuídos a metilas ligadas a heteroátomos (N ou O).

A região aromática do espectro apresenta dois dubletos em δ 7,69 e 6,91 (1H, $J= 8,7$ Hz) que sugerem a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*.

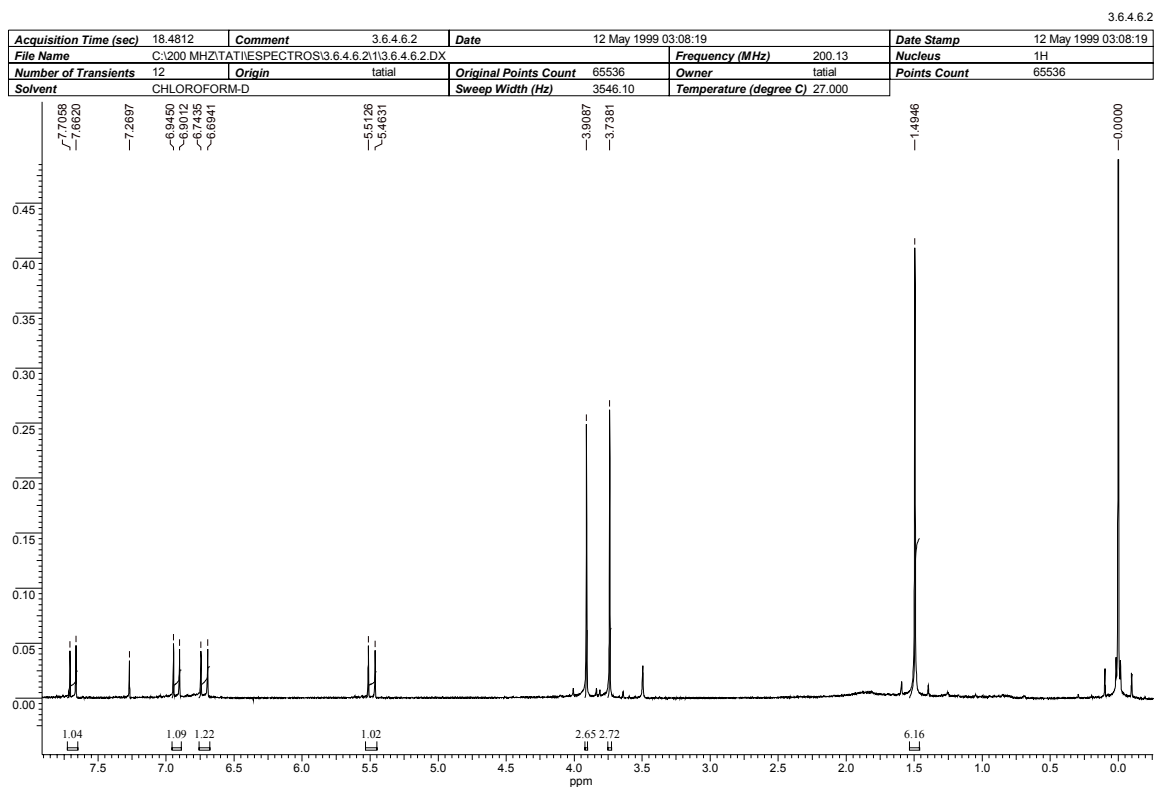


FIGURA 5.61- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **22**.

O espectro de massas de alta resolução da substância **22** (FIGURA 5.61) mostra o pico do íon molecular com m/z 287,11464 (31,11%), que está de acordo com a fórmula molecular C₁₆H₁₇NO₄. O pico base tem m/z 272 (100%) e é gerado através da perda de uma metila.

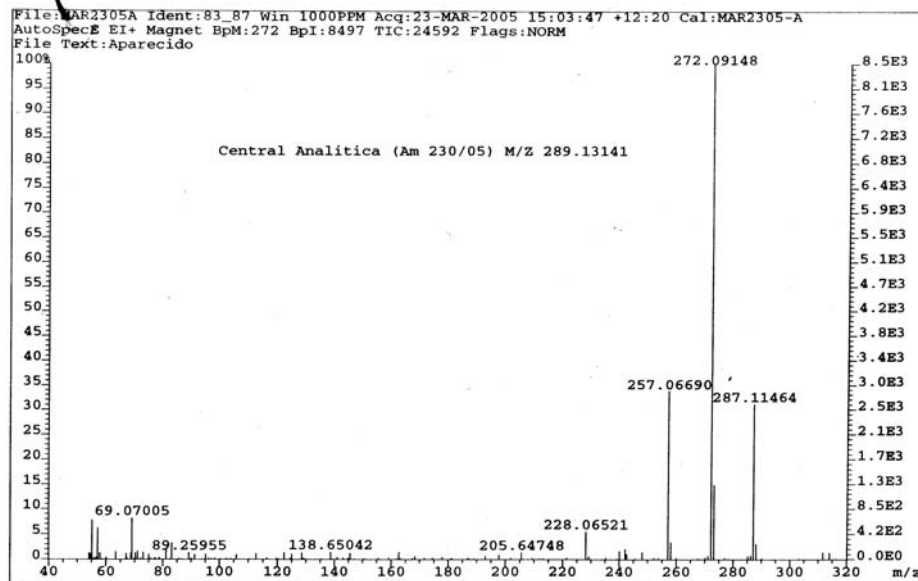


FIGURA 5.62- Espectro de massas de alta resolução da substância **22**.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.63) mostra um sinal em $\delta 162,3$ referente a um carbono carbonílico, além de um sinal de carbono carbinólico em $\delta 78,7$ e um sinal em $\delta 28,2$ referente as metilas geminais do cromeno. Os sinais em $\delta 62,2$ e em $\delta 35,3$ indicam a presença de uma metoxila de uma metila ligada a nitrogênio respectivamente. O deslocamento químico do carbono da metoxila ($\delta 62,2$) indica a presença de grupos substituintes nas posições *orto*.

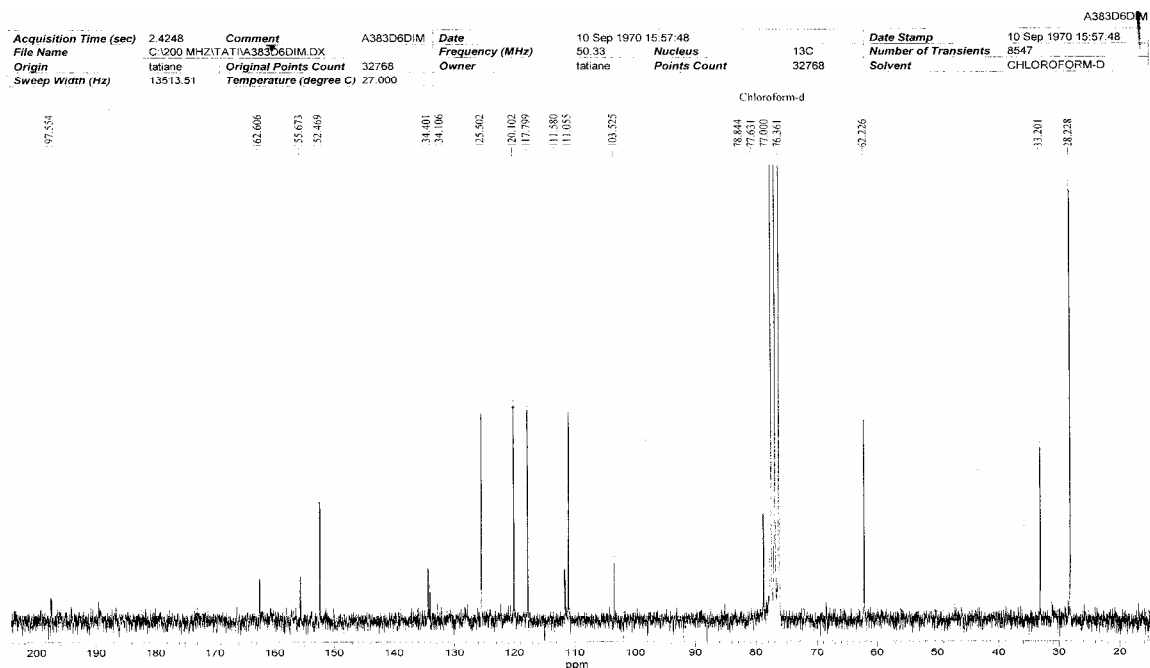


FIGURA 5.63- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **22**.

A análise do mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.64) mostra as correlações dos hidrogênios com os carbonos diretamente ligados desse modo foi possível atribuir corretamente os valores das metila ligada ao O e a metila ligada ao N.

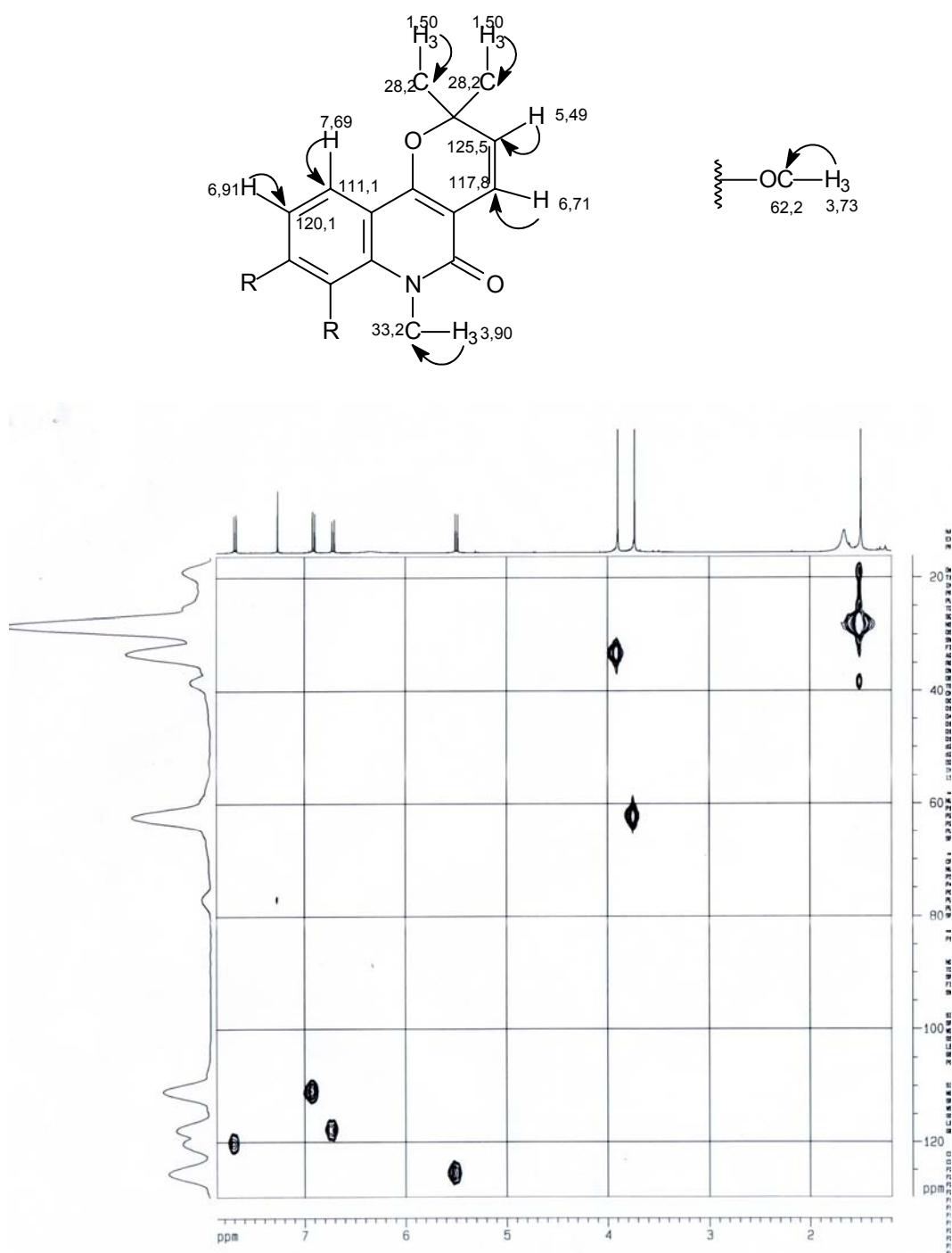


FIGURA 5.64- Mapa de contorno de HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância **22**

O mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.65) mostra as correlações dos hidrogênios com carbonos a duas e três ligações, foi possível observar as correlações entre das metilas com os carbonos a duas e três ligações.

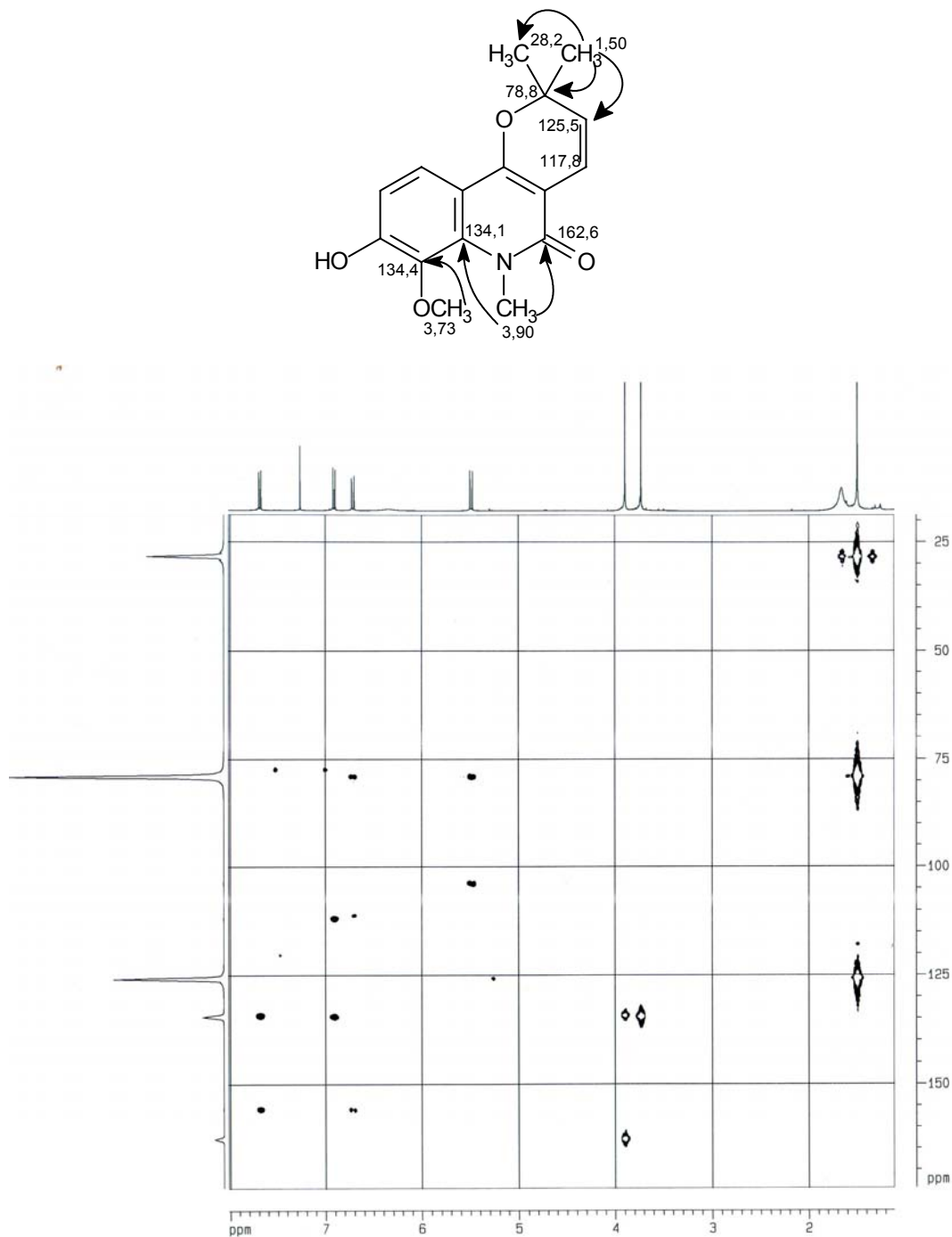


FIGURA 5.65- Mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl₃) da substância **22**.

A análise da expansão da região aromática do mapa de contorno de HMBC (FIGURA 5.66) foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático e do anel cromeno e determinar as posições exatas dos substituintes.

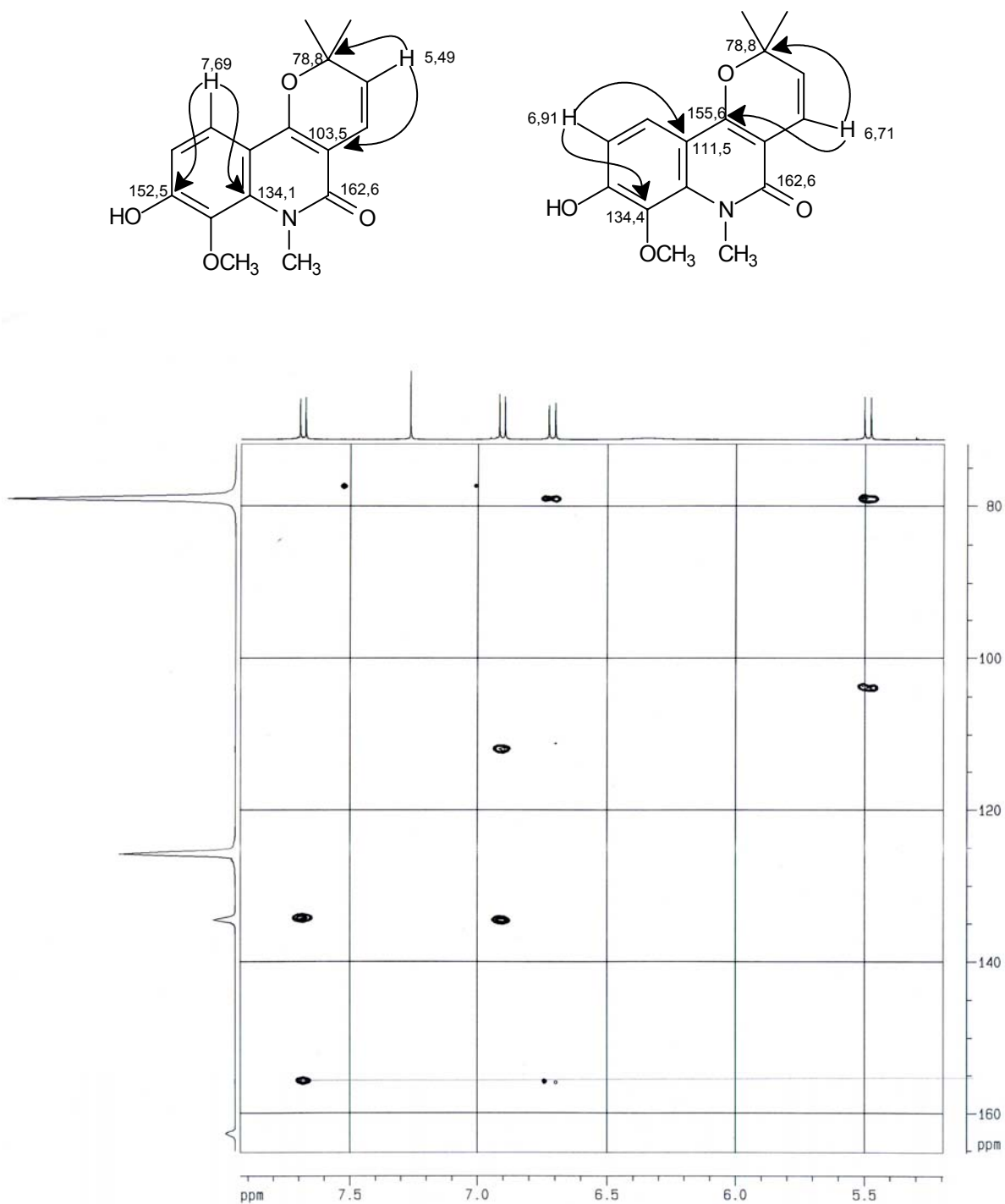
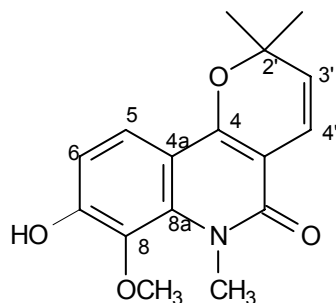


FIGURA 5.66- Expansão do mapa de contorno de HMBC (100 MHz, CDCl_3) da substância **22**.

A análise dos dados indica que a substância **22** é o alcalóide piranoquinolônico 7-hidroxi-8-metoxi-*N*-metilflindersina inédito na literatura. Os dados RMN de ^1H da substância **22** estão representados na TABELA 5.22.



7-hidroxi-8-metoxi-*N*-metilflindersin.

5.22- Dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C da 7-hidroxi-8-metoxi-*N*-metilflindersina

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (19)	$\delta_{\text{C}}^{(c)}$
2		162,6
3		103,5
4		155,6
4a		111,5
5	7,69 (<i>d</i> , 8,8 Hz)	111,1
6	6,91 (<i>d</i> , 8,8 Hz)	120,1
7		152,5
8		134,4
8a		134,1
2'		78,8
3'	5,49 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	125,5
4'	6,71 (<i>d</i> , 9,9 Hz)	117,8
2'(CH₃)₂	1,50 (<i>s</i>)	28,2
O-CH₃	3,73 (<i>s</i>)	62,2
N-CH₃	3,90 (<i>s</i>)	33,2

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 50MHz

5.2.11- Determinação Estrutural da Substância 23

A substância **23** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da substância **23** (FIGURA 5.67) mostra várias semelhanças com o espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da substância **22** (FIGURA 5.66).

Assim como no espectro de RMN ^1H da substância **22** foram observados dois dubletos em δ 6,73 e δ 5,49 (H, $J=9,9\text{Hz}$) e um singlete em δ 1,49 (6H) que sugerem a presença de um anel 2,2 dimetilcromeno e na região aromática dois dubletos em δ 7,71 (1H, $J=8,9\text{Hz}$) e δ 6,88 (1H, $J=8,9\text{Hz}$) que sugerem a presença de dois hidrogênios aromáticos em relação *orto*. Porém o espectro de RMN ^1H da substância **23** apresenta também três singletos em δ 3,97 (3H), 3,92 (3H) e 3,78 (3H) que podem ser atribuídos a metilas ligadas a heteroátomos enquanto que para a substância **22** apenas dois singletos em δ 3,90 (3H) e 3,73 (3H) são observados.

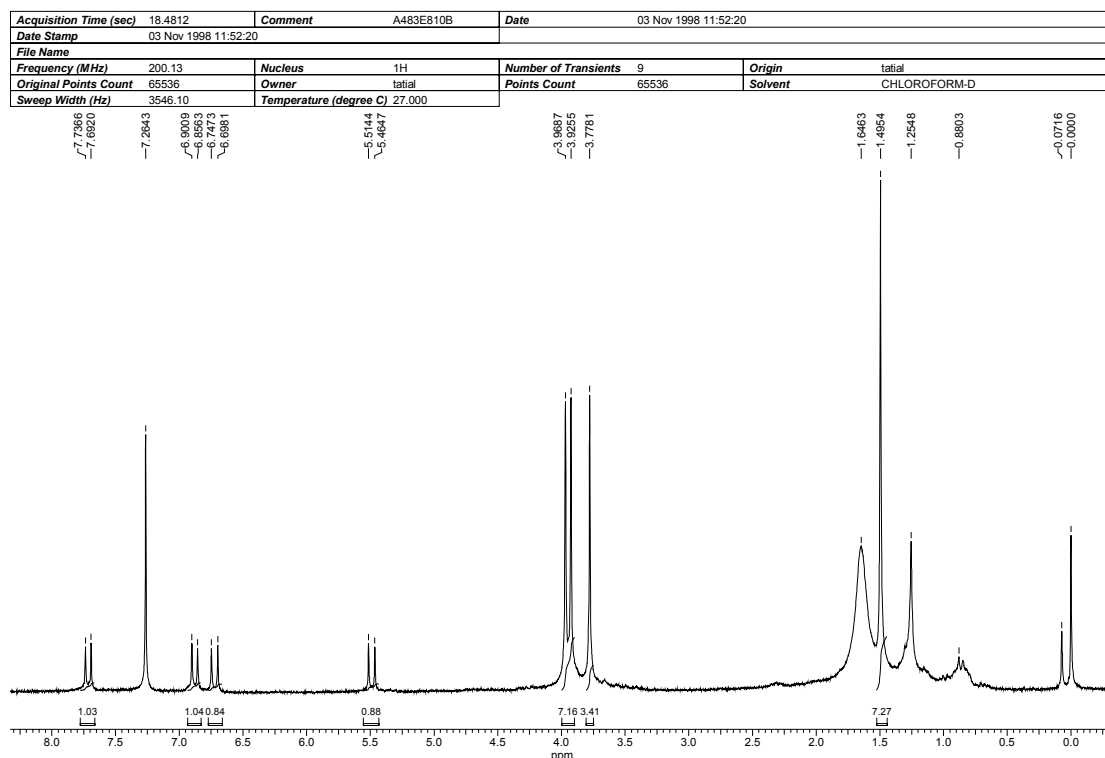
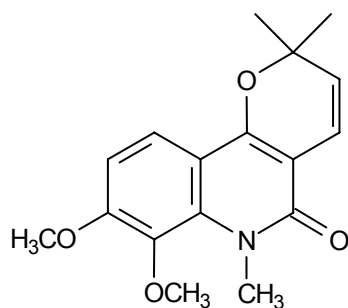


FIGURA 5.67- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **23**.

A análise dos dados da substância **23** e a comparação com os dados substância **22** e da literatura indicam (CAMPBELL *et al.*, 1990) que a substância **23** é o alcalóide conhecido como veprissina isolado anteriormente *Vepris louisii* (Rutaceae) (AYAFOR *et al.*, 1980) e de *Oricia gabonenses* (Rutaceae) (KALID & WATERMAN, 1981). Os dados de RMN¹H da substância **23** assim como os dados da literatura (AYAFOR *et al.*, 1980) estão apresentados na TABELA 5.23.



veprissina

TABELA 5.23- Dados de RMN de ¹H da veprissina

H	$\delta_H^{(a)}$	$\delta_H^{(a)}$ (lit.)
5	7,71 (<i>d</i> , 8,9Hz)	7,69 (<i>d</i> , 8Hz)
6	6,88 (<i>d</i> , 8,9Hz)	6,85 (<i>d</i> , 8Hz)
2'	5,49 (<i>d</i> , 9,9Hz)	5,46 (<i>d</i> , 10Hz)
3'	6,73 (<i>d</i> , 9,9Hz)	6,73 (<i>d</i> , 10Hz)
1'(CH₃)₂	1,49 (s)	1,52 (s)
7-O-CH₃	3,92 (s)	3,92 (s)
8-O-CH₃	3,97 (s)	3,95 (s)
N-CH₃	3,78 (s)	3,76 (s)

(a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 90MHz

5.2.12- Determinação Estrutural da Substância 24

A substância **24** foi isolada do extrato diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus*.

O espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **24** (FIGURA 5.68) mostra um singleto em δ 14,7 integrando para um hidrogênio, o que sugere a presença de uma hidroxila quelada. Na região aromática foram observados sinais

referentes a cinco hidrogênios. Um duplo dubleto em 8,42 δ (1H, J = 8,0 e 1,6 Hz), um duplo duplo dubleto em δ 7,68 (1H, J = 8,6; 7,0 e 1,6 Hz), um dubleto largo em δ 7,46 (1H, J = 8,6Hz) e em δ 7,25 um duplo duplo dubleto (1H, J = 8,0; 7,0 e 0.8 Hz) sugerem um anel aromático *orto* dissustituído. Um singlete em δ 6,29 sugere um anel aromático pentasustituído. Os singletos em δ 3,97, δ 3,87 e δ 3,80, todos integrando para três hidrogênios, sugerem a presença de três metilas ligadas a heteroátomos (N ou O). Estes sinais são característicos de esqueleto acridônico (MAFEZOLI, 2001).

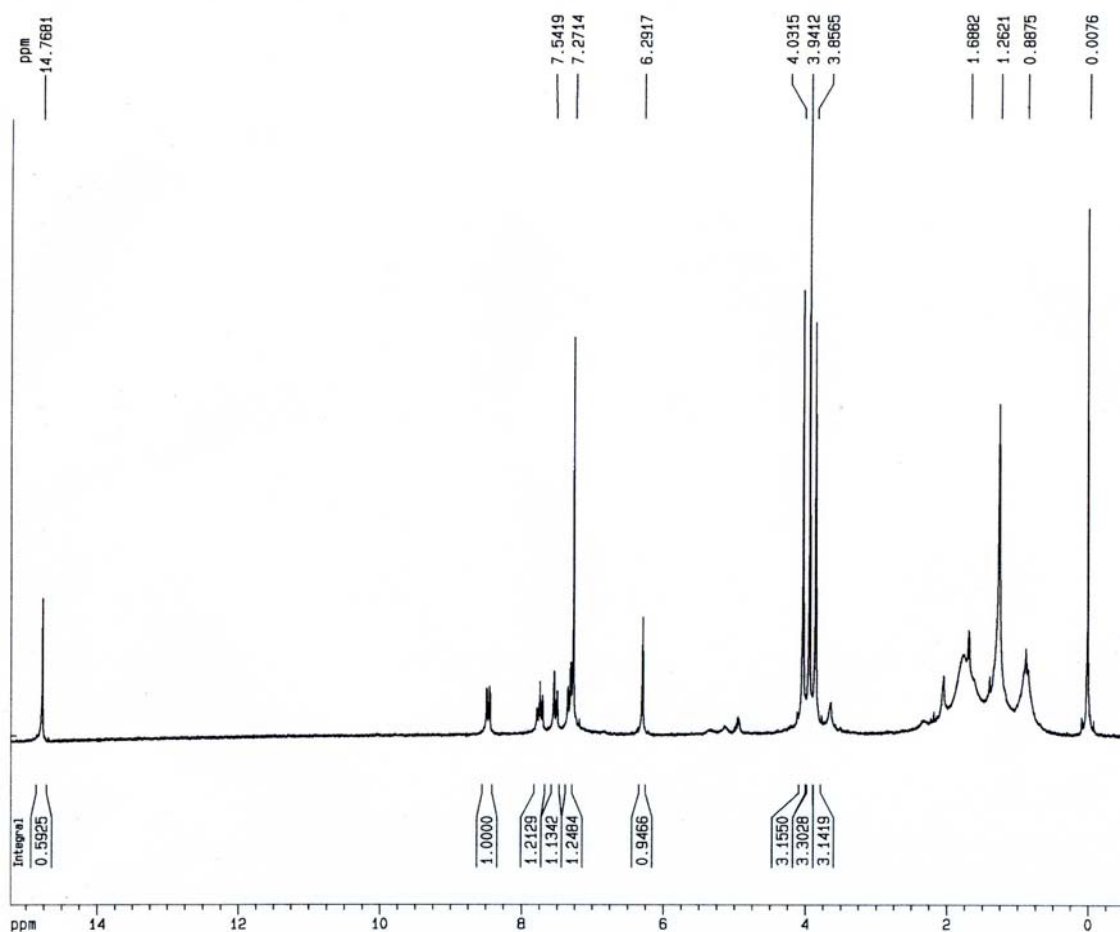


FIGURA 5.68- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) substância **24**.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.69) mostra 15 sinais, o sinal em 180,9 δ pode ser atribuído a uma carbonila. O espectro mostra também dois sinais referentes a metoxilas em δ 60,8 e δ 56,0 sendo que os sinais entre δ 59,6 e δ 62,1 são característicos de metoxilas com grupos adjacentes nas posições *orto* (FURUKAWA *et al.*, 1983). O sinal em δ 34,1 é atribuído a uma metila ligada a nitrogênio.

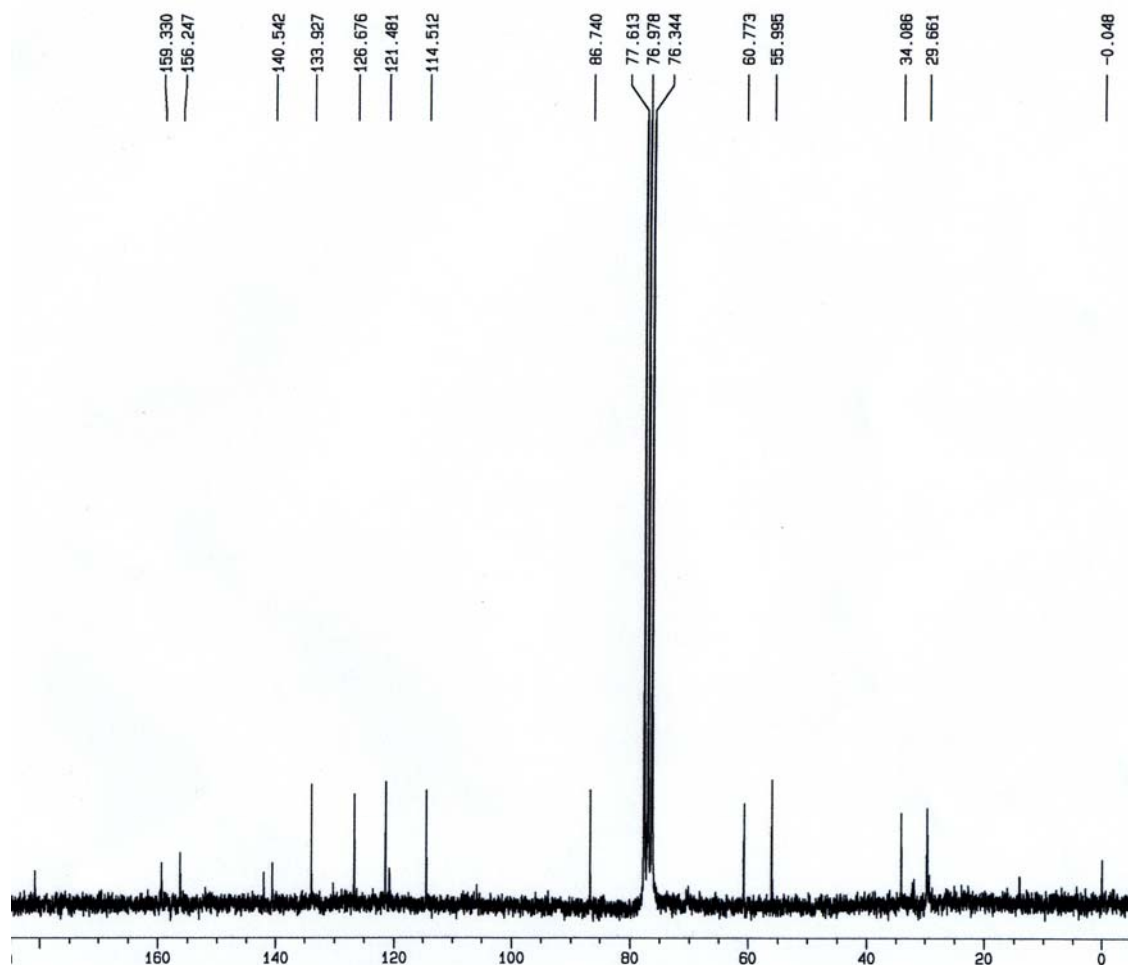


FIGURA 5.69- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **24**.

A análise dos dados e as comparações com a literatura indicam que a substância **24** é o alcalóide acridônico conhecido como arborinina isolado anteriormente de *Glycosmis binocularis* (Rutaceae) (BOWEN *et al.*, 1978), *Glycosmis mauritiana* (Rutaceae) (RASTOR *et al.*, 1980), *Ruta graveolens* (Rutaceae) (BERGENTHAL *et al.*, 1979) e *Almeidea rubra* (Rutaceae) (AMBROZIN *et al.*, 2005). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **24**, assim como os dados de RMN ^1H

(MAFEZOLI, 2001) RMN ^{13}C (BERGENTHAL *et al.*, 1979) da literatura estão representados na TABELA 5.24.

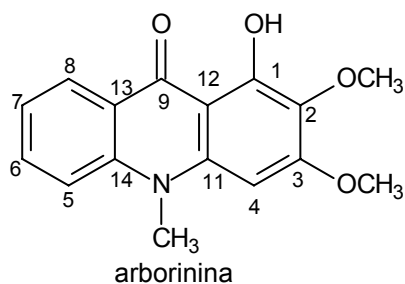


TABELA 5.24- Dados de RMN ^1H e ^{13}C da arborinina.

H/C	δ_{H} (a)	δ_{H} (lit.) (a)	δ_{C} (b)	δ_{C} (lit.) (b)
1			156,2	155,7
2			129,9	129,9
3			159,3	159,1
4	6,29 s	6,18 s	86,7	86,7
5	7,46 (dl, 8,6 Hz)	7,45 (dl, 8,7 Hz)	114,5	114,5
6	7,68 (ddd, 8,6; 7,0 e 1,6 Hz)	7,68 (ddd, 8,7; 7,0 e 1,7 Hz)	133,9	133,7
7	7,25 (ddd, 8,0; 7,0 e 0,8 Hz)	7,24 (ddd, 8,0; 7,0 e 0,8 Hz)	121,4	121,2
8	8,42 (dd, 8,0 e 1,6 Hz)	8,34 (dd, 8,0 e 1,7 Hz)	126,7	126,0
9			180,9	180,4
11			140,6	140,1
12			105,3	105,3
13			120,8	120,3
14			142,0	141,6
2-O-CH ₃	3,87 s	3,91 s	60,8	60,6
3-O-CH ₃	3,97 s	3,99 s	56,0	55,8
N-CH ₃	3,80 s	3,77 s	34,1	33,8
OH	14,72 s	14,75 s		

(a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 50MHz

5.2.13- Determinação Estrutural da Substância 25

A substância **25** foi isolada do extrato diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus*.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **25** (FIGURA 5.70) apresenta muitas semelhanças com o com o espectro de RMN ^1H da arborinina (FIGURA 5.68).

Na região aromática um duplo duplo em δ 8,51 (1H, J = 8,0 e 1,6 Hz), um duplo duplo duplo em δ 7,76 (1H, J = 8,6; 7,0 e 1,6 Hz), um duplo largo em δ 7,55 (1H, J = 8,6Hz) e em δ 7,35 um duplo duplo duplo (1H, J = 8,0; 7,0 e 0.8 Hz) , sugerem um anel aromático *orto* dissubstituído. Um singlete em δ 6,33 sugere um anel aromático pentasubstituído.

Porém, a ausência do singlete em δ 14,7 e a presença de quatro singletos em δ 4,05, δ 3,95, δ 3,89 e δ 3,50, todos integrando para três hidrogênios sugerem a presença de quatro metilas ligadas a heteroátomos (N ou O), ou seja, o hidrogênio da hidroxila na posição 1 da arborinina foi substituído por uma metila.

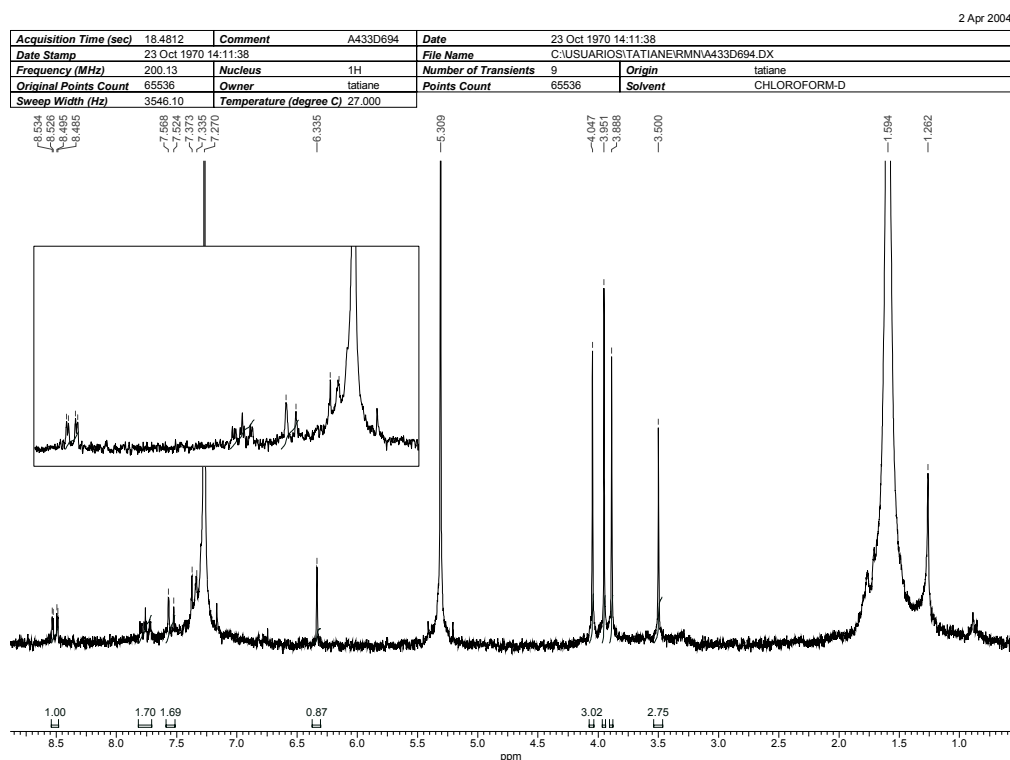


FIGURA 5.70- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da metilarborinina

Portanto os dados sugerem que a substância **25** é o alcalóide acridônico conhecido como metilarborinina.

A análise dos dados e as comparações com os dados da arborinina sugerem que a substância **25** é o alcalóide acridônico conhecido como metilarborinina isolado anteriormente de *Conchocarpus inopinatus* (MAFEZOLI, 2001) e *Conchocarpus macrophyllus* (Rutaceae) (VELOSO, 1995) Os dados de RMN ^1H da substância **24**, assim como os dados da literatura (MAFEZOLI, 2001) estão representados na TABELA 5.25.

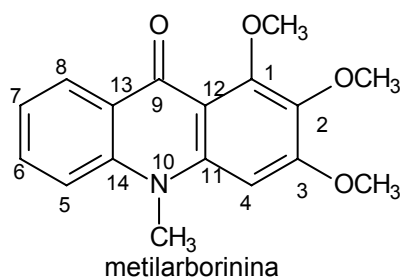


TABELA 5.25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C da metilarborinina

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} (lit.) ^(b)
4	6,29 s	6,18 s
5	7,55 (dl, 8,6 Hz)	7,31 (dl, 8,6 Hz)
6	7,76 (ddd, 8,6; 7,0 e 1,6 Hz)	7,56 (ddd, 8,7; 7,0 e 1,7 Hz)
7	7,35 (ddd, 8,0; 7,0 e 0,8 Hz)	7,19 (ddd, 8,0; 7,0 e 0,9 Hz)
8	8,51 (dd, 8,0 e 1,6 Hz)	8,44 (ddd, 8,0 e 1,7 e 0,4 Hz)
1-O-CH ₃	4,05 s	4,03 s
2-O-CH ₃	3,95 s	3,98s
3-O-CH ₃	3,89 s	3,90 s
N-CH ₃	3,50 s	3,70 s

(a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 400MHz

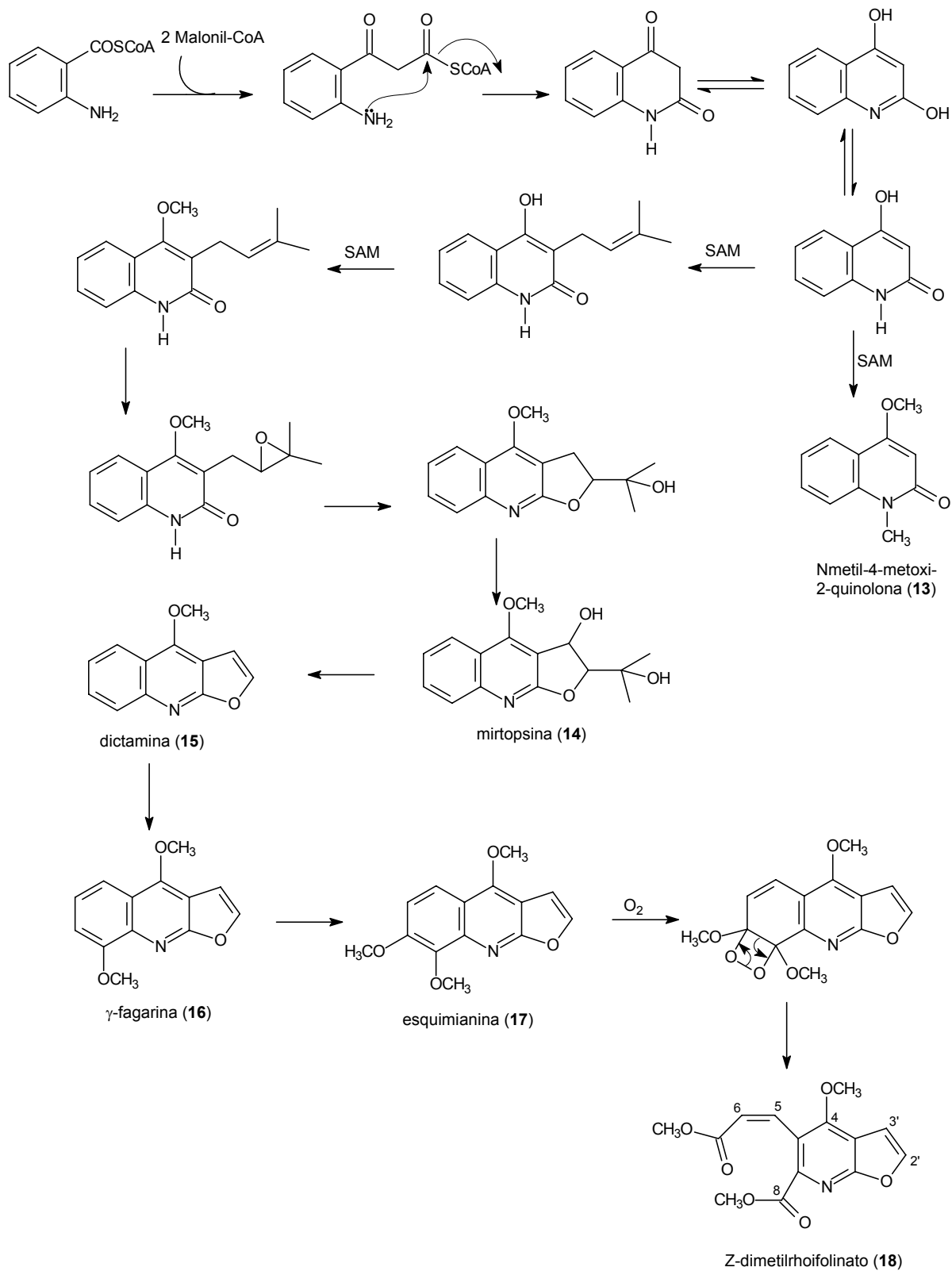
5.2.14- A Biogênese dos Alcalóides

Os alcalóides isolados têm sua origem biossintética no ácido antranílico. Inicialmente ocorre a condensação da ácido antranílico com unidades do malonil-CoA.

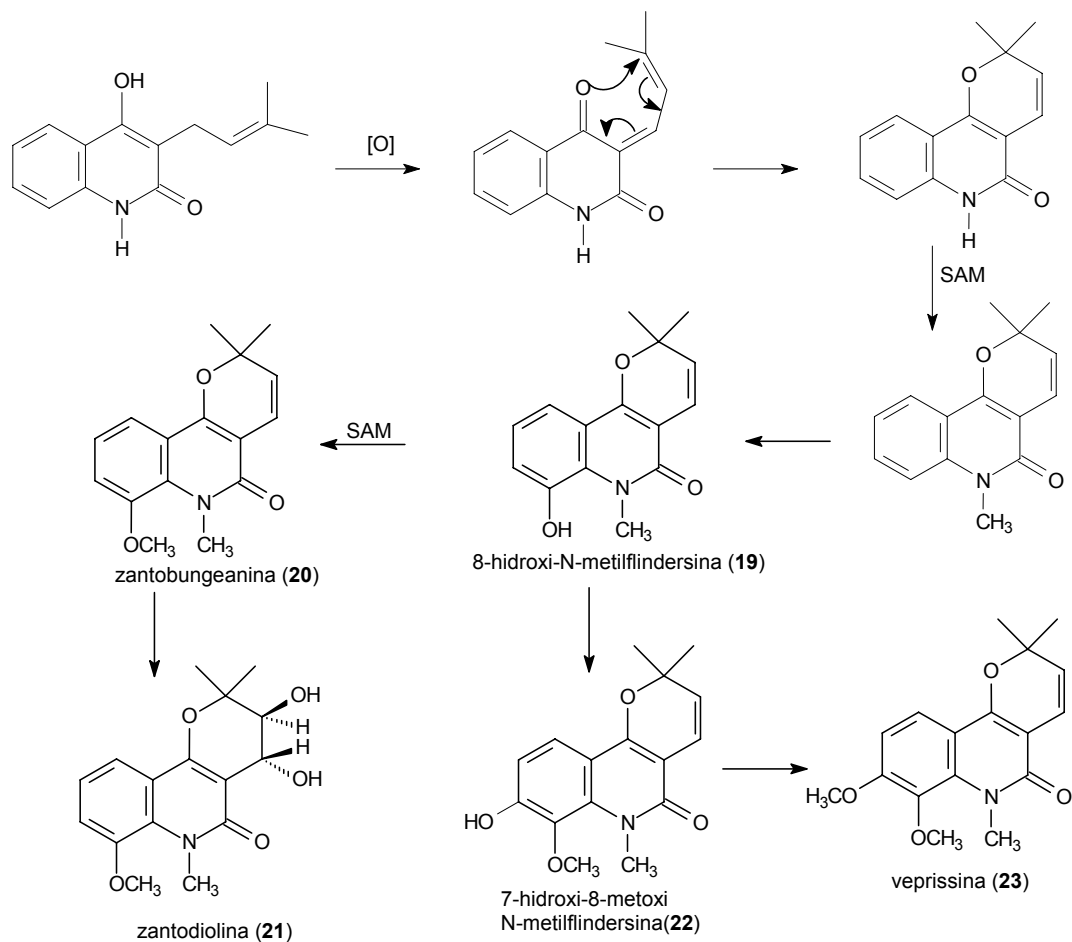
A incorporação de duas unidades de malonil-CoA leva a formação do esqueleto quinolínico normalmente em forma de 2 quinolona. Os esqueletos tipo 2 quinolona podem incorporar unidades de prenila através de adição nucleofílica na posição 3. A molécula formada pode sofrer ciclização com o oxigênio na posição 2 levando a formação dos alcalóides diidrofuroquinolínicos e através da perda da cadeia isopropil leva a formação dos alcalóides furoquinolínicos (WATERMAN, 1975; DEWICK, 2004) (ESQUEMA 5.4).

A ciclização da prenila incorporada na posição 3 com o oxigênio na posição 4 leva a formação dos alcalóides piranoquinolínicos (WATERMAN, 1975) (ESQUEMA 5.4).

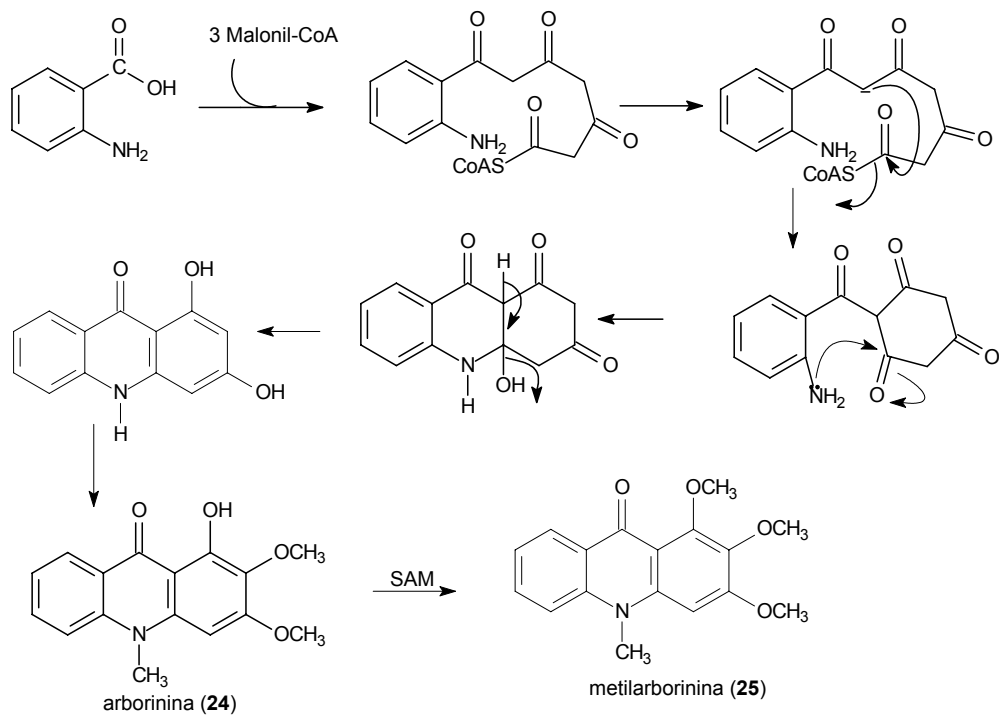
A incorporação de três unidades de malonil-CoA ao ácido antranílico com posterior reação de Claisen e ataque do par de elétrons do nitrogênio a carbonila levando a formação do núcleo acridônico (WATERMAN, 1975; DEWICK, 2004) (ESQUEMA 5.5).



ESQUEMA 5.4- Proposta biogenética para as substâncias 13, 14, 15, 16, 17 e 18.



ESQUEMA 5.5- Proposta biogênica para as substâncias 19, 20, 21, 22 e 23.



ESQUEMA 5.6- Proposta biogênica para as substâncias 24 e 25.

5.3- Amidas

5.3.1- Determinação Estrutural da Substância 26

A substância **26** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância **26** (FIGURA 5.71) mostra dois dubletos em δ 7,58 e δ 6,49 (1H, $J= 15,6$ Hz), característico de hidrogênios olefínicos em relação *trans*, quatro dubletos em δ 7,84 e δ 6,87 (2H, $J= 8,4$ Hz) e em δ 7,18 e δ 6,97 (2H, $J= 8,6$ Hz) que sugerem a presença de dois anéis aromáticos *para* substituídos em sistemas de acoplamento de spins AA'XX'. Observa-se ainda um quadrupletto em δ 3,46 (2H, $J= 7,5$ Hz) e um triplete em δ 2,77 (2H, $J= 7,5$ Hz) sugerindo a presença de hidrogênios metilênicos vicinais.

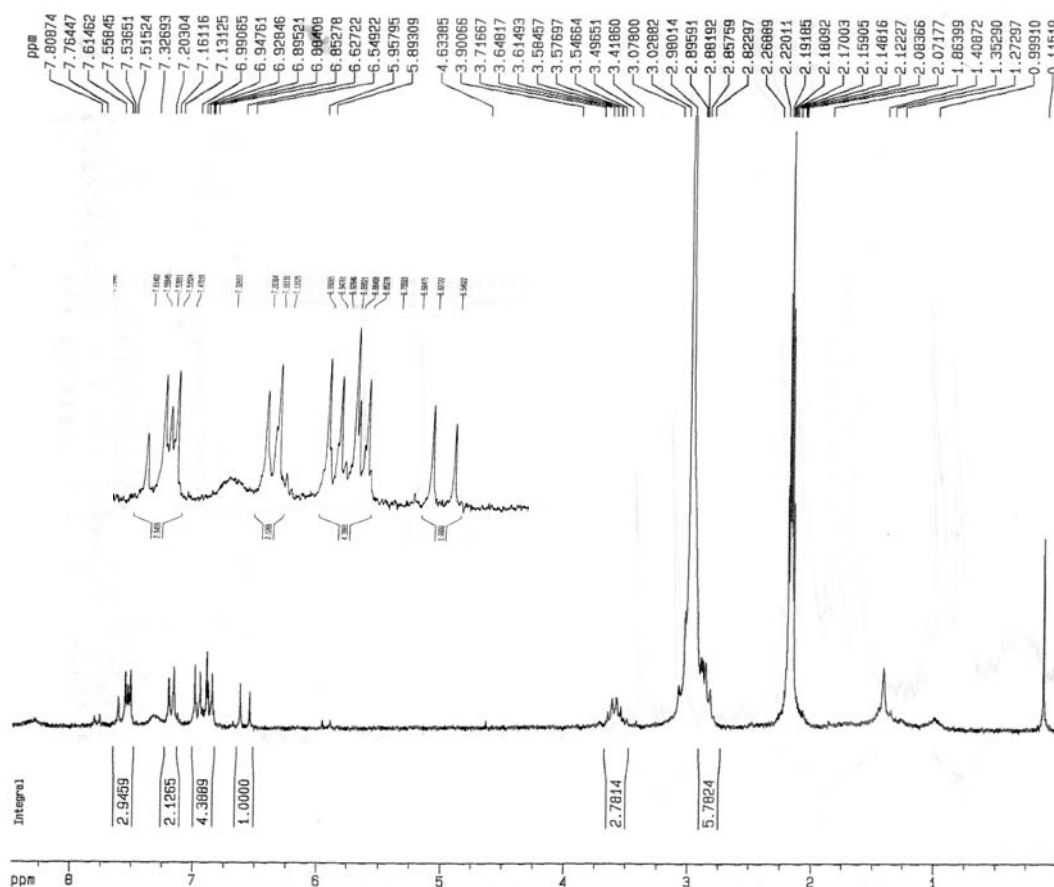


FIGURA 5.71- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) substância **26**.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (FIGURA 5.72) mostra 13 sinais sendo que os sinais em δ 130,50; δ 130,07; δ 116,56 e δ 116,07 são referentes a dois carbonos equivalentes cada. Observa-se também um sinal em δ 166,34 que sugere a presença de uma carbonila.

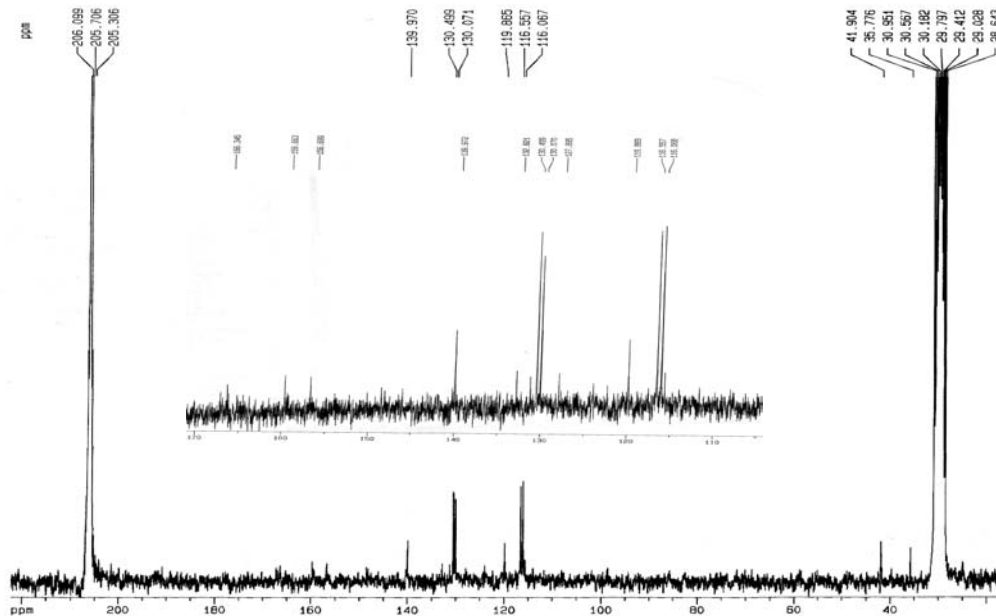


FIGURA 5.72.- Espectro de RMN ^1H (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) substância **26**.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **26** é uma amida conhecida como paprazina, isolada anteriormente de *Fumaria indica* (Fumariaceae) (RAHMAN *et al.*, 1992), *Ravenia infelix* (Rutaceae) (ANDRADE, 2003) e *Almeidea coerulea* (AMBROZIN, 2004). Os dados RMN de ^1H da substância **26** assim como os dados da literatura (AMBROZIN, 2004) estão representados na TABELA 5.26.

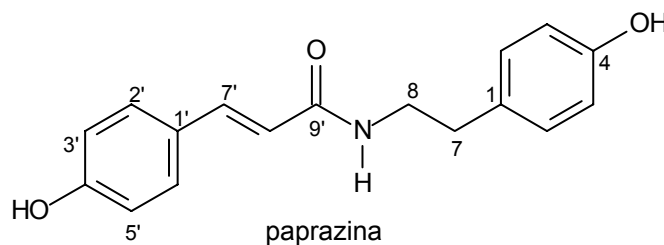


TABELA 5.26-Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da paprazina

H/C	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (lit.)	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$	$\delta_{\text{C}}^{(b)}$ (lit.)
1'			127,8	125,89
2'/6'	7,54 (d, 8,4 Hz)	7,38 (d, 8,3 Hz)	130,50	129,10
3'/5'	6,87 (d, 8,4 Hz)	6,69 (d, 8,3 Hz)	116,56	115,68
4'			159,66	158,73
7'	7,58 (d, 15,6 Hz)	7,31 (d, 15,7 Hz)	139,97	138,49
8'	6,59 d (d, 15,6 Hz)	6,39 (d, 15,7 Hz)		118,72
9'			166,34	165,23
1			132,8	129,49
2/6	7,18 (d, 8,4 Hz)	7,01 (d, 8,1 Hz)	130,07	129,40
3/5	6,97 (d, 8,4 Hz)	6,68 (d, 8,1 Hz)	116,07	115,06
4			156,70	155,57
7	2,88 (t, 7,5 Hz)	2,64 (t, 7,1 Hz)	35,77	34,41
8	3,58 (t, 7,5 Hz)	3,31 (t, 7,1 Hz)	41,90	40,75

(a) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 200MHz; (b) DMSO, 400MHz; (c) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 50MHz; DMSO, 100MHz

5.3.2- Determinação Estrutural da Substância 27

A substância **27** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância **27** (FIGURA 5.73) assim como o espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da paprazina (FIGURA 5.71) mostra dois dubletos característico de hidrogênios olefínicos em relação *trans* em δ 7,45 e δ 6,50 (1H, $J= 15,6$ Hz), um quadrupletto em δ 3,46 (2H, $J= 7,5$ Hz) e um tripleto em δ 2,77 (2H, $J= 7,5$ Hz) sugerindo a presença de hidrogênios metilênicos vicinais.

Observam-se ainda dois dubletos em δ 7,08 e δ 6,76 (1H, $J= 8,4$ Hz) que sugerem a presença de um anel aromático *para* substituído. O espectro mostra também um dubleto em δ 7,16 (2H, $J= 1,8$ Hz), um duplo dubleto δ 6,50 (1H, $J= 8,1$ e 1,8 Hz) e um dubleto em δ 6,83 (1H, $J= 8,1$ Hz) que sugere a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Observa-se ainda um singleto em δ 3,84 (3H) indicando a presença de um grupo metila ligado a N ou O.

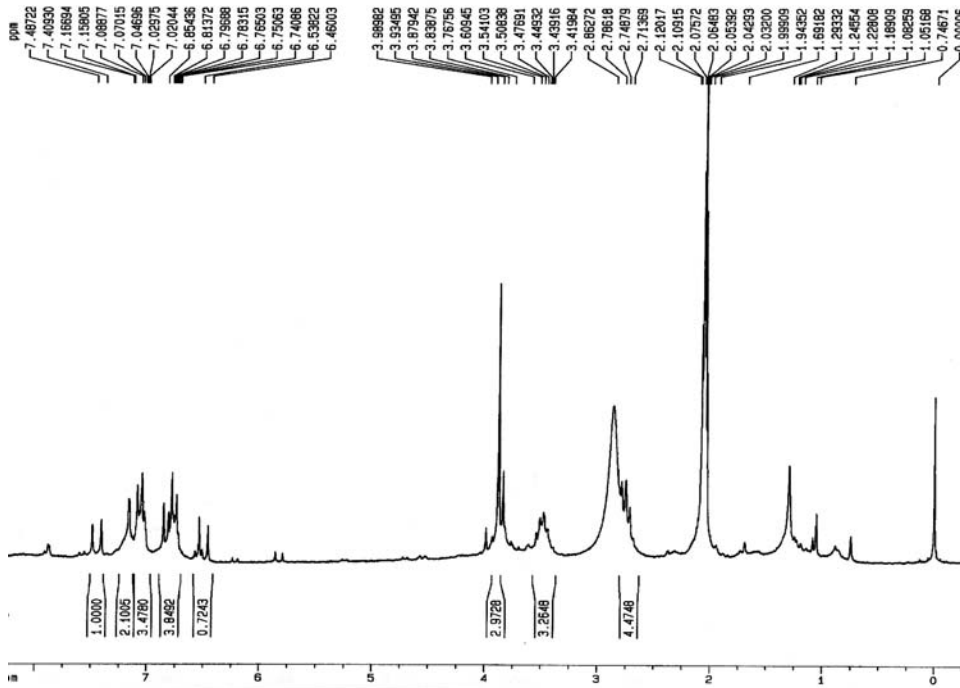


FIGURA 5.73- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância **27**.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) (FIGURA 5.74) mostra 15 sinais sendo que os sinais em δ 129,7 e δ 115,48 são referentes a dois carbonos equivalentes cada. Observa-se também um sinal em δ 166,6, que sugere a presença e uma carbonila Um sinal em δ 55,87 que confirma a presença de um grupo metila ligada a O.

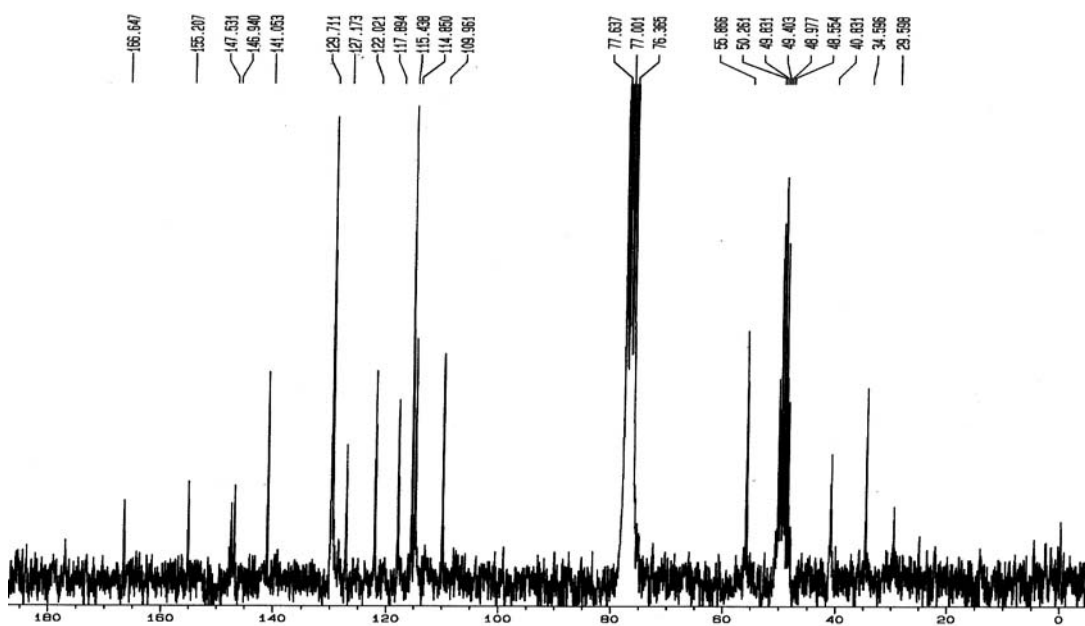


FIGURA 5.74- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da substância **27**.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **27** é uma amida conhecida como *N-trans* feruloiltiramina isolada anteriormente de *Balanites aegyptiaca* (Zygophyllaceae) (SARKER *et al.*, 2000), *Ravenia infelix* (Rutaceae) (ANDRADE, 2003) e *Almeidea coerulea* (AMBROZIN, 2004). Os dados RMN de ^1H e ^{13}C da substância **27** assim como os dados da literatura (AMBROZIN, 2004) estão representados na TABELA 5.27.

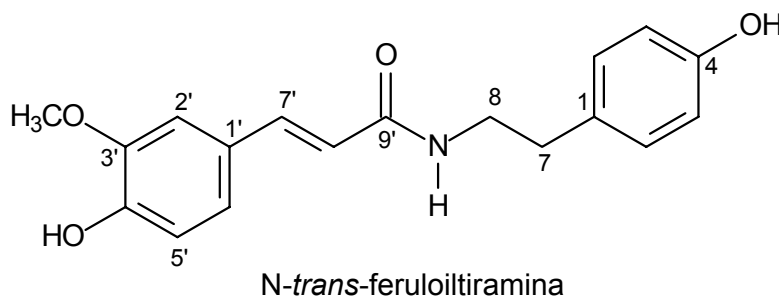


TABELA 5.27- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da *N-trans* feruloiltiramina

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(a) (lit.)	δ_{C} ^(b)	δ_{C} ^(b) (lit.)
1'			127,17	126,46
2'	7,16 (<i>d</i> , 1,8 Hz)	7,10 <i>sl</i>	109,96	110,80
3'			146,94	147,85
4'			147,53	148,27
5'	6,83 (<i>d</i> , 8,1 Hz)	6,79 <i>d</i> (<i>J</i> =8,1 Hz)	114,85	115,69
6'	7,04 (<i>dd</i> , 8,1 e 1,8 Hz)	6,98 (<i>dd</i> , 8,1 e 1,8 Hz)	122,02	121,56
7'	7,45 (<i>d</i> , 15,6 Hz)	7,30 (<i>d</i> , 15,7 Hz)	141,05	138,95
8'	6,50 (<i>d</i> , 15,6 Hz)	6,42 (<i>d</i> , 15,7 Hz)	117,89	119,04
9'			166,65	165,40
1			-	129,56
2/6	7,08 (<i>d</i> , 8,4 Hz)	7,01 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	129,71	129,50
3/5	6,76 (<i>d</i> , 8,4 Hz)	6,68 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	115,44	115,15
4			155,21	155,66
7	2,77 (<i>t</i> , 7,5 Hz)	2,64 (<i>t</i> , 7,5 Hz)	34,60	34,46
8	3,48 (<i>q</i> , 7,5 Hz)	3,32 (<i>tl</i> , 7,5 Hz)	40,83	40,72
OMe		3,79 <i>s</i>	55,87	55,56

(a) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 200MHz; (b) DMSO, 400MHz; (c) $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 50MHz; DMSO, 100MHz

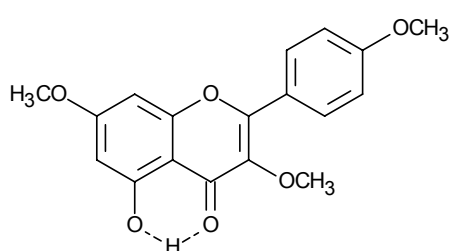
5.4- Flavonóide

5.4.1- Determinação Estrutural da Substância 28

A substância **28** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1.

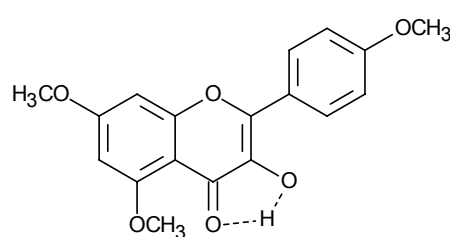
O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **28** (FIGURA 5.75) mostra um singlete em δ 12,66 que integra para um hidrogênio sugerindo a presença de uma hidroxila fenólica quelada. Na região dos hidrogênios aromáticos observa-se dois dubletos, em δ 8,08 (2H, $J = 9,1$ Hz), δ 7,03 (2H, $J = 9,1$ Hz), indicando a presença de hidrogênios equivalentes e conseqüentemente simetria na molécula. Observa-se também dois dubletos em δ 6,45 e δ 6,36 (1H, $J = 2,2$ Hz), indicando que estes hidrogênios se encontram na posição *meta*. Observam-se ainda a presença de três sinais integrando para três hidrogênios cada em δ 3,90; δ 3,88 e δ 3,86 indicando a presença de três grupos metoxila.

Considerando que a substância **28** apresenta estrutura do tipo flavona ou flavonol a ausência de um singlete na região entre δ 6,30 e δ 6,60 sugere a presença de um substituinte na posição 3, portanto a hidroxila pode estar ligada na posição 3 ou 5, o que possibilita a proposta de duas estruturas.



3, 7, 4'-trimetoxi-5-hidroxi-flavona

(I)



5, 7, 4'-trimetoxi-3-hidroxi-flavona

(II)

Quando a hidroxila está ligada a C3 (II) o deslocamento químico do hidrogênio quelado é de aproximadamente δ 10 enquanto o deslocamento químico do hidrogênio da hidroxila ligada a C5 é maior que δ 10 (RAMACHANDRAN & SIVAKUMAR, 1992; ROSSI *et al.*, 1997), portanto a substância **28** tem a hidroxila ligada a C5.

Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A10N22	Date	24 Feb 1972 03:53:24
Date Stamp	24 Feb 1972 03:53:24				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USERMEUS\DOCUMENTOS\TATINHA\SPECTROS REL\3\FLAVONA\A10N22.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	16
Original Points Count	65536	Owner	tatlane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.10	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

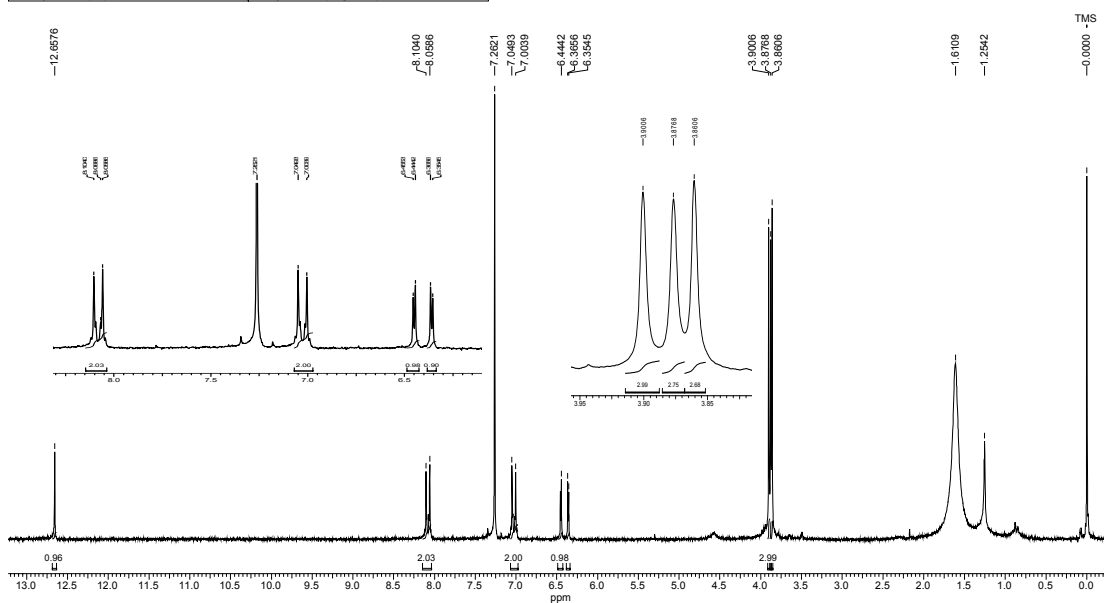
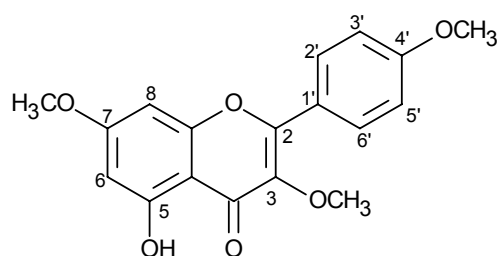


FIGURA 5.75- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância **28**.

A análise dos dados obtidos e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **28** é a flavona conhecida como 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona isolada anteriormente de *Aniba* sp (Bignoniaceae) (ROSSI *et al.*, 1997), *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) (DREYER, 1968) e *Rauia resinosa* (OLIVEIRA, 1996). Os dados RMN de ¹H da substância **28** assim como os dados descritos na literatura estão descritos na TABELA 5.28.



3, 7, 4'-trimetoxi-5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona

TABELA 5.28- Dados de RMN ^1H da 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona

H	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$	$\delta_{\text{H}}^{(a)}$ (lit.)
6	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,33 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
8	6,45 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,45 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
2'	8,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)	8,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)
3'	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)	7,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)
5'	7,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)	7,00 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)
6'	8,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)	8,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)
OH	12,66 s	12,60 s
OMe	3,90 s	3,84 s
	3,88 s	
	3,86 s	

(a) CDCl_3 , 200MHz

5.5- Lignana

5.5.1- Determinação Estrutural da Substância 29

A substância **29** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **29** (FIGURA 5.76) mostra um singleto em δ 6,59 que integra para quatro hidrogênios, um singleto largo em δ 5,51 que integra para dois hidrogênios sugerindo a presença de duas hidroxilas ligadas a anel aromático e um dubleto em δ 4,73 (2H, *J*=4,3 Hz). Observam-se também um multipletto em δ 4,28 (2H), um singleto em δ 3,90 integrando para 12 hidrogênios indicando a presença de quatro metoxilas, um multipletto entre δ 4,0 e δ 3,8 (2H) e um multipletto em δ 3,07 (2H).

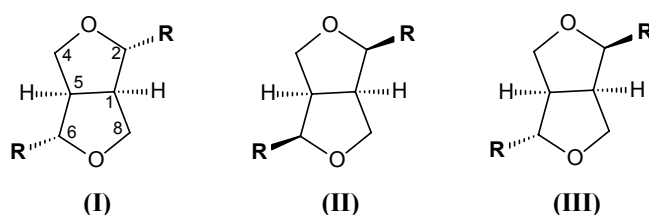
O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.77) indicou a presença de 10 sinais. Esta informação associada aos valores das integrais no espectro de RMN ^1H indica que a molécula possui um plano de simetria.

Os dados obtidos indicam que a substância **29** é uma lignana furofurânica. As lignanas furofurânicas apresentam três diastereoisômeros possíveis: diequatorial (I), diaxial (II) e axial/equatorial (III) (DIKEY, 1958).

O diastereoisômero axial/equatorial (III) pode ser diferenciado dos outros dois (I e II). Em I e II os hidrogênios benzílicos (H2 e H6) são equivalentes portanto

observa-se normalmente um único dubleto entre δ 4,98 e δ 4,67 enquanto em III observa-se um sinal próximo a δ 4,85 e outro próximo a δ 4,4.

A distinção entre os diastereoisômeros I e II pode ser feita através dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 4 e 8. Nos compostos com configuração diequatorial (I) os sinais de H4 e H8 são observados entre δ 3,75 e δ 4,70 enquanto que na série diaxial (II) os sinais de H4 e H8 são observados entre δ 4,18 e δ 4,43 e entre δ 3,80 e δ 4,08 (GARNIER *et al.*, 1975; PELTER *et al.*, 1976; DICKEY, 1975 e AHAMED *et al.*, 2002).



A análise dos dados obtidos e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **29** é lignana furofurânica conhecida como siringaresinol ou liriioresinol B isolada anteriormente de *Bulbophyllum vaginatum* (Orchidaceae) (LEONG *et al.*, 1999), *Vinca minor* (Apocynaceae) (GARNIER *et al.*, 1975) e *Pilocarpus grandiflorus* (SOUZA, 2003). Os dados RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **29** assim como os dados descritos na literatura (LEONG *et al.*, 1999) estão descritos na TABELA 5.29.

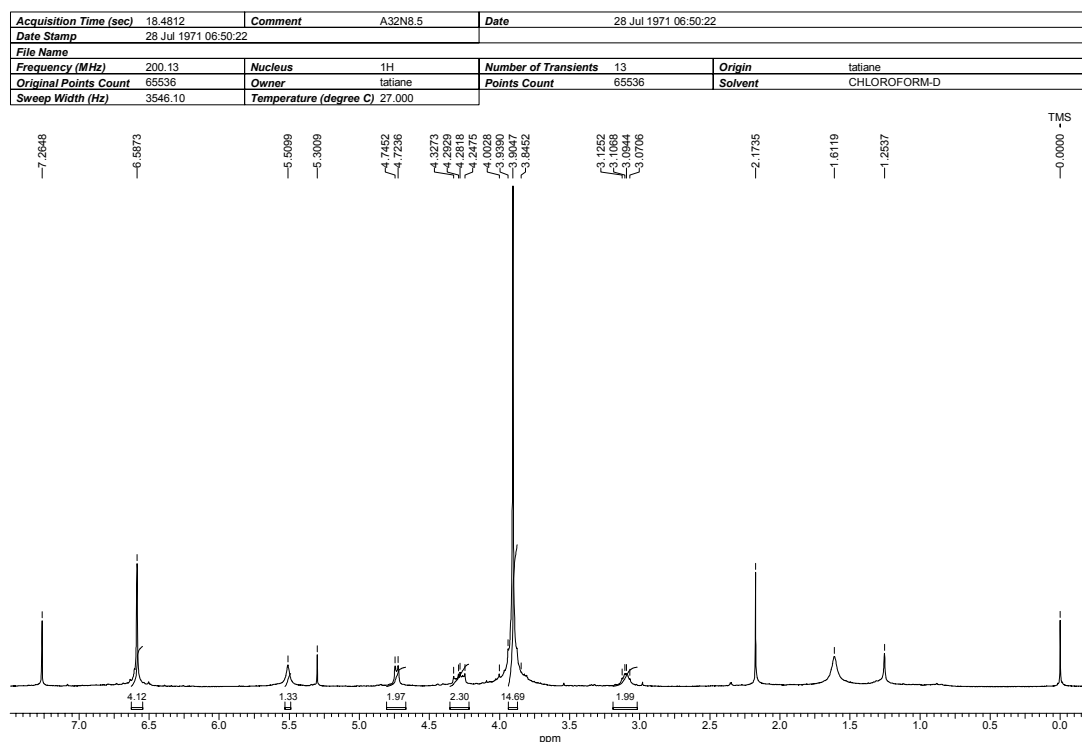
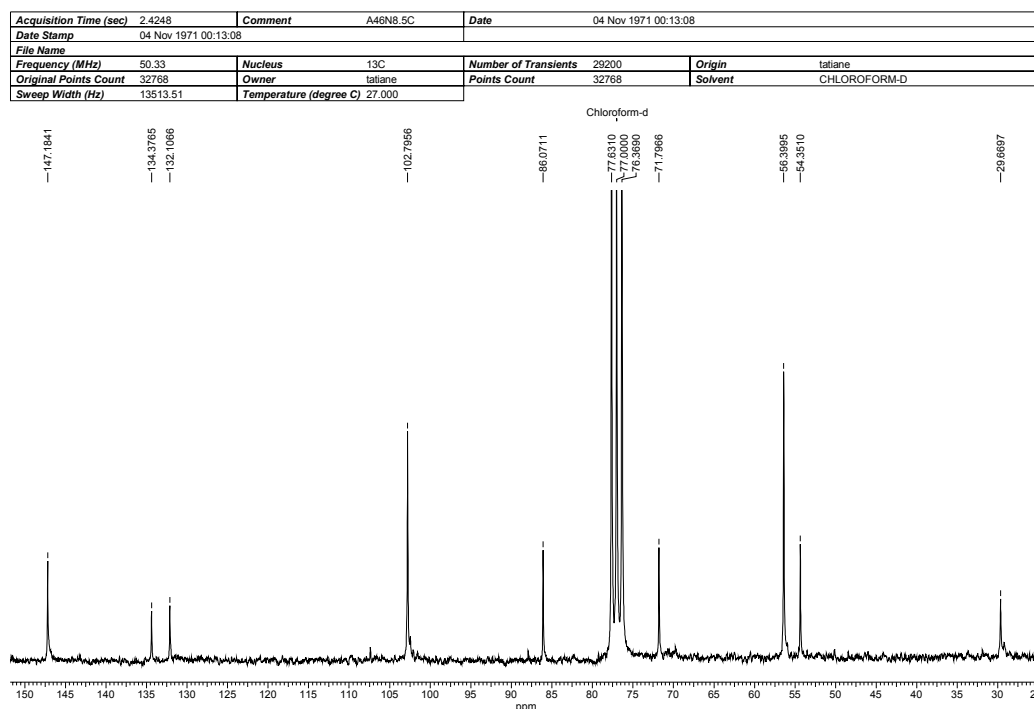
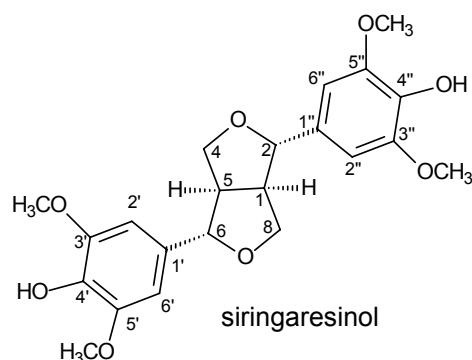


FIGURA 5.76- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) substância **29**.


 FIGURA 5.77- Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) substância **29**.

 TABELA 5.29- Dados de RMN ¹H e de ¹³C do siringaresinol.

H/C	$\delta_H^{(a)}$	$\delta_H^{(b)}$ (lit.)	$\delta_C^{(c)}$	$\delta_C^{(d)}$ (lit.)
1/5	3,07(m)	3,09(2H, m)	54,3	54,4
2/6	4,73 (d, 4,3 Hz)	4,73 (d, 4,2 Hz)	86,1	86,1
4e/8e	4,28 (2H, m)	4,28 (dd, 9,0 e 6,8 Hz)	71,8	71,8
4a/8a	4,0-3,7 (2H, m)	4,28 (dd, 9,0 e 3,8 Hz)		
1'/1''			132,1	132,1
2'/2'' e 6'/6''	6,59 (s)	6,58 (s)	102,7	102,8
3'/3''			147,1	147,2
4'/4''			134,3	134,4
5'/5''			147,2	147,2
OCH₃	3,90 (s)	3,90 (s)	56,4	56,4

 (a) CDCl₃, 200MHz; (b) CDCl₃, 300MHz; (c) CDCl₃, 50MHz; (d) CDCl₃, 75MHz

5.6- Composto fenólico

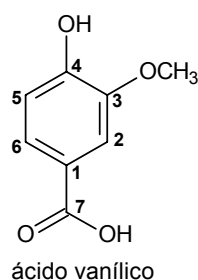
5.6.1- Determinação Estrutural da Substância 30

A substância **30** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **30** (FIGURA 5.78) mostra tres sinais integrando para um hidrogênio cada na região aromática. Um duplo dubleto em δ 7,65 ($J= 8,2$ e $1,6$ Hz), um dubleto em δ 7,57 ($J= 1,6$ Hz) e um dubleto em δ 6,92 ($J= 8,2$ Hz). Observa-se também um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,87 que pode ser atribuído a uma metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (FIGURA 5.79) mostra sinais referentes a 8 carbonos. O sinal em δ 168,9 sugere a presença de uma carbonila.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (SAKUSHIMA *et al.*, 1995 e SOUZA, 2003) indicam que a substância **30** é um composto fenólico conhecido como ácido vanílico, que é amplamente distribuído no reino vegetal. Os dados RMN de ^1H e ^{13}C da substância **30** assim como os dados de RMN de ^1H (SOUZA, 2003) e ^{13}C (SAKUSHIMA *et al.*, 1995) da literatura estão representados na TABELA 5.30.



Acquisition Time (sec)	18.4812	Comment	A38N935	Date	09 Sep 1971 08:51:44
Date Stamp	09 Sep 1971 08:51:44				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHA\BACK UP RMN\TATIRMN\2004\A38N935.DX				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	9
Original Points Count	65536	Owner	tatiane	Points Count	65536
Sweep Width (Hz)	3546.08	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

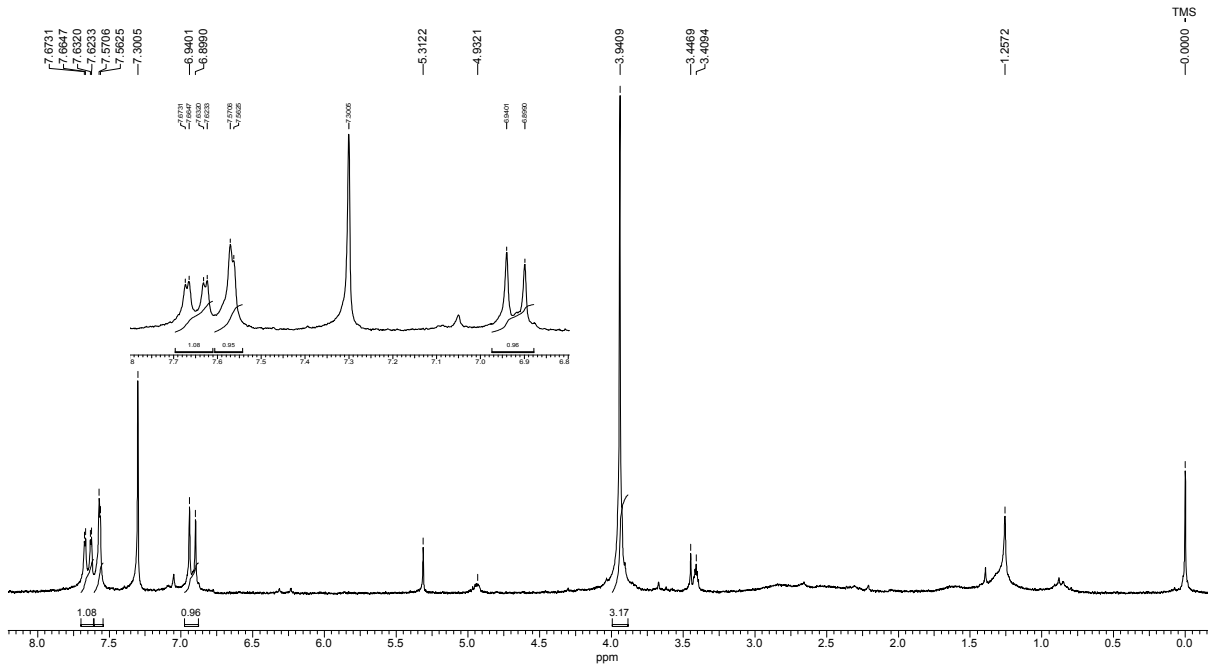


FIGURA 5.78- Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) substância **30**.

Acquisition Time (sec)	2.4248	Comment	A41N943C	Date	27 Sep 1971 11:15:48
Date Stamp	27 Sep 1971 11:15:48				
File Name	C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\USER\MEUS DOCUMENTOS\TATINHA\BACK UP RMN\TATIRMN\2004\A41N943C.DX				
Frequency (MHz)	50.33	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	32635
Original Points Count	32768	Owner	tatiane	Points Count	32768
Sweep Width (Hz)	13513.51	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	CHLOROFORM-D

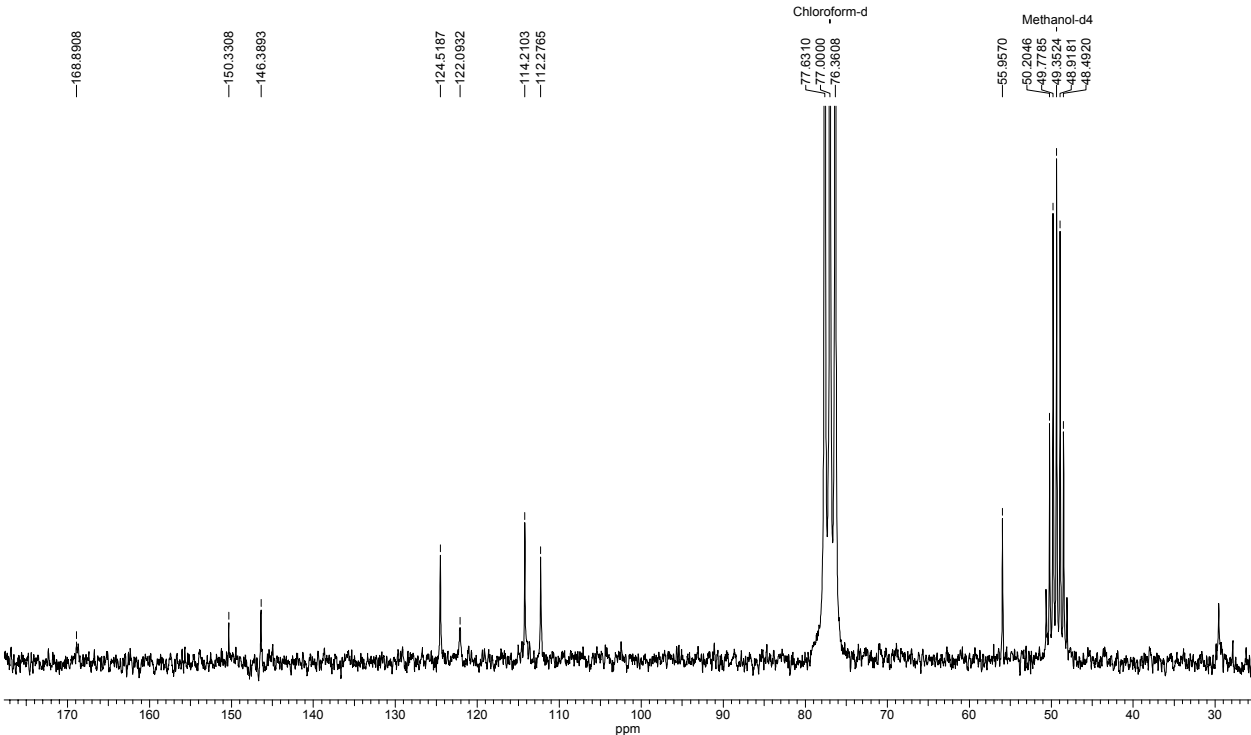


FIGURA 5.79- Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) da substância **30**.

TABELA 5.30-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido vanílico.

H/C	δ_{H} ^(a)	δ_{H} ^(a) (lit.)	δ_{C} ^(b)	δ_{C} ^(c) (lit.)
1			122,1	123,1
2	7,57 (d, 1,8Hz)	7,58 (d, 1,8Hz)	112,2	113,9
3			146,3	148,6
4			150,3	152,6
5	6,92 (d, 8,2Hz)	6,96 (d, 8,3Hz)	114,2	115,9
6	7,65(dd, 8,2; 1,8Hz)	7,70 (dd, 8,3; 1,8Hz)	124,5	125,3
7			168,9	170,0
OCH₃	3,96 (s)	3,94 (s)	55,9	56,4

(a) CDCl_3 , 200MHz; (b) CDCl_3 , 50MHz; (c) CDCl_3 , 100MHz

5.6- Esteróides

5.6.1- Determinação Estrutural da Substância 31 e 32

A mistura das substâncias **31** e **32** foi isolada da fração hexano do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 e do e extrato diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus*.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias **31** e **32** (FIGURA 5.80), apresenta um dubleto largo em δ 5,35 ($J=4,5\text{Hz}$) referente ao H-6 e um multipeto em δ 3,52 referente ao hidrogênio H-3. O espectro apresentou também dois duplos dubletos em δ 5,16 ($J=8,1$ e $15,6\text{Hz}$) e δ 5,02 ($J=8,1$ e $15,6\text{Hz}$) indicou a presença do estigmasterol. Foram observados ainda onze sinais entre δ 0,68 e 1,00 sugeriu a presença de mais um esteróide na mistura. Para a confirmação dos compostos presentes na mistura na mistura foi realizado o experimento de CG/MS.

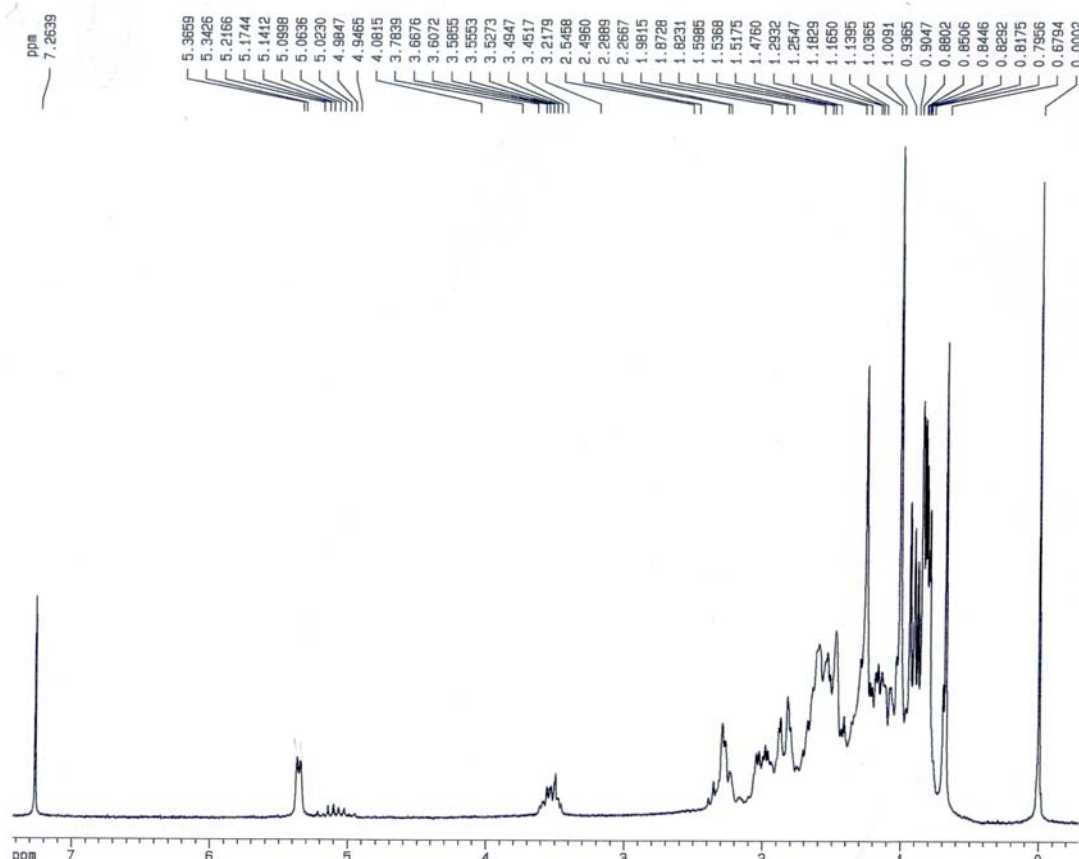


FIGURA 5.80- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias **31** e **32**

Nos espectros de massas observa-se os picos dos íons moleculares com m/z 414 e 412 Daltons que são compatíveis com as formulas moleculares $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ e $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$, referentes ao β -sitosterol e ao estigmasterol respectivamente.

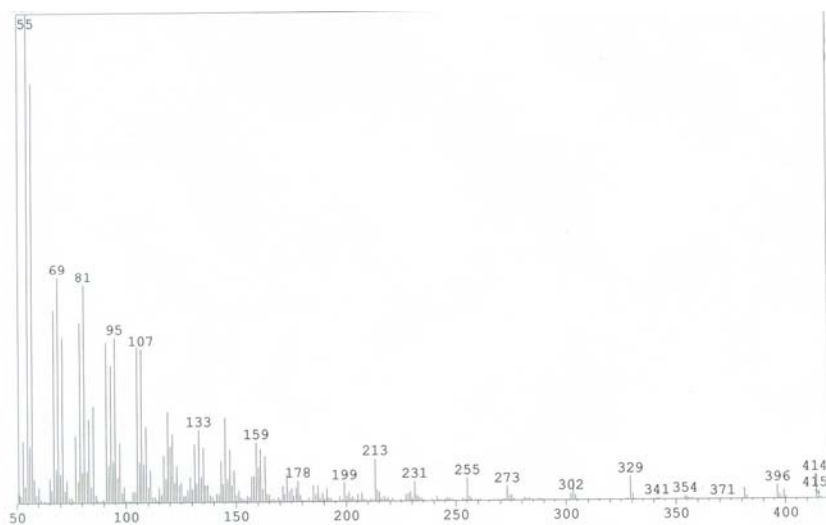


FIGURA 5.81- Espectro de massas do β -sitosterol

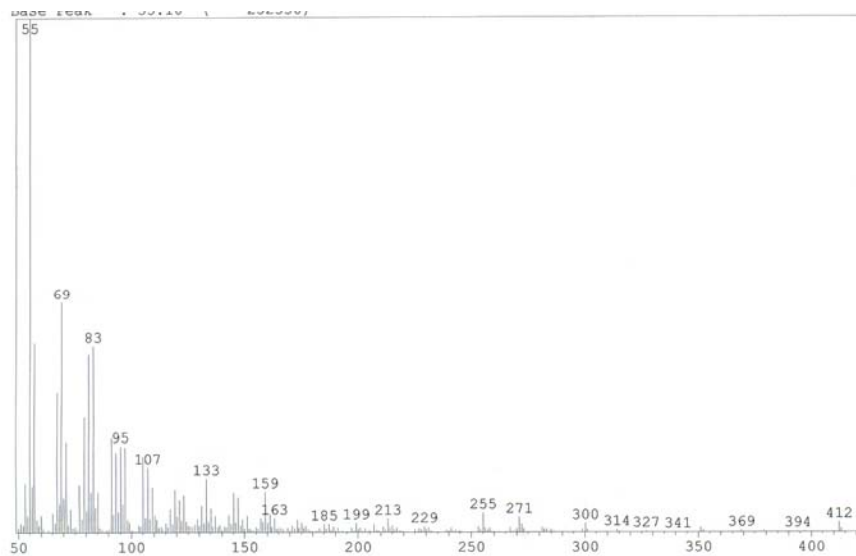
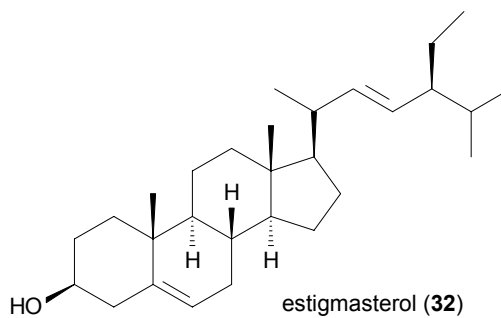
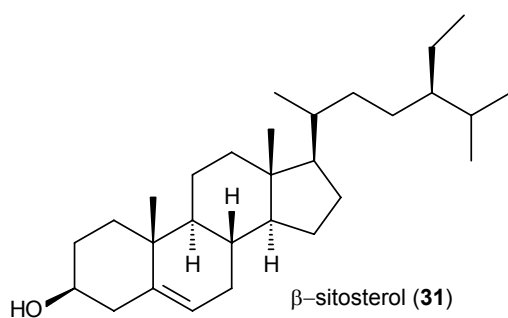


FIGURA 5.82- Espectro de massas do estigmasterol.



6- Atividades Biológicas

6.1- Atividades Biológicas dos Extratos Brutos

Para o estudo foram escolhidas seis plantas da família Rutaceae. Foram utilizados os extratos de caule e folhas num total de 16 extratos brutos. Os extratos foram identificados por códigos que estão representados na TABELA 6.1.

TABELA 6.1- Códigos dos extratos.

código do extrato	Planta	Parte da planta	Extrato
CAFD	Cusparia anã	Folhas	Diclorometano
CAFM		Folhas	Metanol
CGCH	Cusparia Est. Grosso	Caule	Hexano
CGCM		Caule	Metanol
CGCD		Caule	Diclorometano
CGFE		Folhas	Éter de Petróleo
CMCD	<i>Conchocarpus macrophyllus</i>	Caule	Diclorometano
CMCF		Caule	Éter de Petróleo
CMFM		Folhas	Metanol
CMFE		Folhas	Éter de Petróleo
CJCH	Cusparia João Grandão	Caule	Hexano
CJFD		Folhas	Diclorometano
CJFE		Folhas	Éter de Petróleo
RCM	<i>Rauia</i> sp	Caule	Metanol
RFM		Folhas	Metanol
RF1M	<i>Rauia</i> sp 1	Folhas	Metanol

Os extratos das plantas escolhidas foram testados nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* e nas enzimas gGAPDH de *T. cruzi* e APRT de *Leishmania tarentolae*. Os extratos que mostraram atividade satisfatória (lise parasitária ou inibição superior a 70%) em um ou mais ensaios foram particionados.

6.1.1- Ensaio tripanocida “*in vitro*” sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

Os extratos brutos foram testados sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.1 na página 39 e os resultados obtidos estão representados no GRÁFICO 6.1. Foram considerados ativos os extratos com porcentagem de lise parasitária superior a 70%.

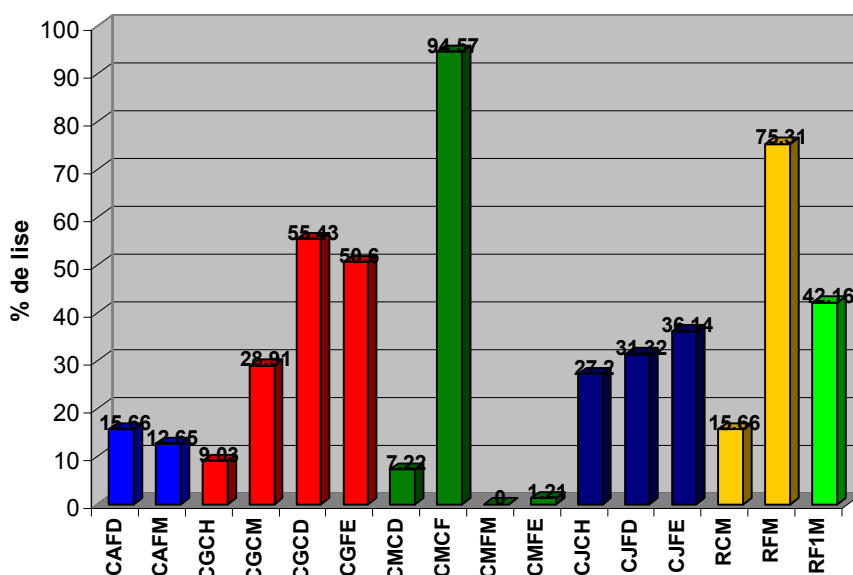


GRÁFICO 6.1- Resultados dos testes “*in vitro*” sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

Os resultados dos ensaios mostram que dos 16 extratos avaliados apenas o extrato éter de petróleo do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCE) e o extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFM), que apresentaram 94,6% e 75,3% de lise parasitária foram considerados ativos sobre as forma tripomastigotas de *T. cruzi*.

6.1.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (gGAPDH)

Os extratos brutos foram testados na enzima gGAPDH de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.2 nas páginas 39, 40 e 41 e os resultados obtidos estão representados no GRÁFICO 6.2. Foram considerados ativos os extratos com porcentagem de lise parasitária superior a 70%.

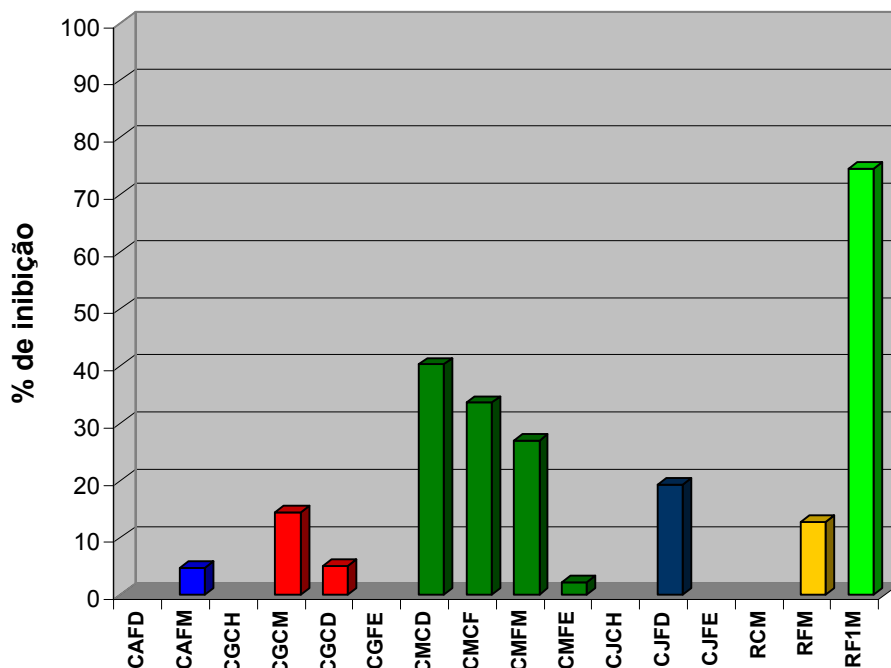


GRÁFICO 6.2- Resultados de inibição da atividade da enzima gGAPDH

Os resultados dos ensaios mostram que dos 16 extratos avaliados apenas o extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) apresentou inibição satisfatória (74,6% de inibição). As porcentagens de inibição da atividade enzimática referentes aos extratos CAFD, CGCH, CGFE, CJCH e CJFE não puderam ser calculados, estes extratos apresentaram turvação durante os ensaios e/ou apresentaram absorção no comprimento de onda utilizado no ensaio impossibilitando assim o cálculo da atividade inibitória.

6.1.3- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*

Os extratos brutos foram testados frente à enzima APRT de *Leishmania tarentolae* de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.5 na página 42 e os resultados obtidos estão representados no GRÁFICO 6.3. Foram considerados ativos os extratos com porcentagem de lise parasitária superior a 70%.

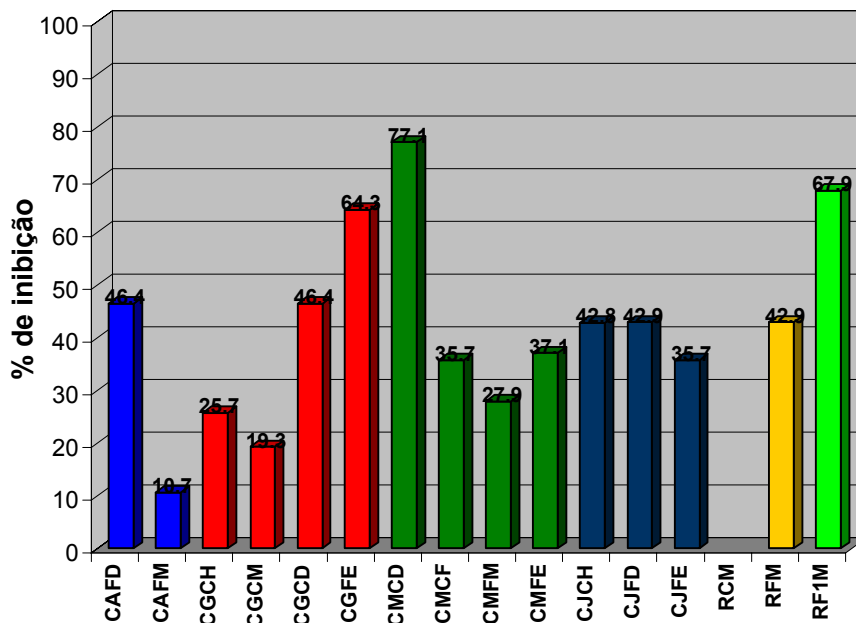


GRAFICO 6.3- Resultados de inibição da atividade de APRT para os extratos.

Os resultados dos ensaios mostram que dos 16 extratos avaliados apenas o extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD) apresentou porcentagem de inibição satisfatória (77,1%), porém o extrato éter de petróleo das folhas de *Cusparia* est. grosso (CGFE) e o extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) apresentaram resultados próximos ao considerado satisfatório (64,3% e 67,9% respectivamente).

6.2- Atividades Biológicas das Frações do extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus macrophyllus*

O fracionamento do extrato diclorometânico do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD) que apresentou 77% de inibição sobre a enzima APRT de

acordo com o procedimento descrito no item 3.3.1.5 nas páginas 38 e 39 levou a obtenção de 10 frações. As frações obtidas foram submetidas ao ensaio sobre a enzima APRT e os resultados obtidos estão representados no GRÁFICO 6.4.

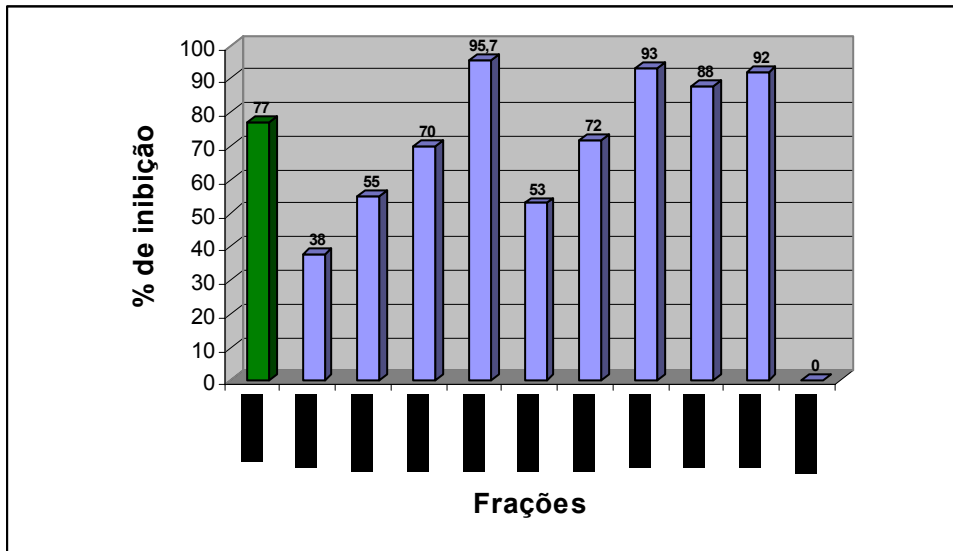


GRAFICO 6.4- Resultados de inibição da atividade de APRT para frações.

Os resultados dos ensaios mostram que frações apresentaram aumento da porcentagem de inibição quando comparado com o extrato de origem. As frações CMCD 4, CMCD 7 e CMCD 9 apresentaram inibição maior que 90%

A porcentagem de inibição da atividade enzimática referente à fração CMCD 10 não pode ser calculada uma vez que esta fração apresentou turvação durante o ensaio.

6.3- Atividades Biológicas das Substâncias puras

6.3.1- Ensaio tripanocida “*in vitro*” sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

As substâncias isoladas foram submetidas a ensaio sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.1 na página 39. As concentrações utilizadas para o ensaio foram 100, 250 e 500 μM e os resultados obtidos estão representados TABELA 6.2.

TABELA 6.2- Resultados dos testes sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.

substância	Isolada do extrato	Conc. (µg/ml)	% de lise parasitária
murrangatina (5)	RCM e RF1M	100	18,0
		250	26,1
		500	44,4
rauiantina (8)	RCM, RFM e RF1M	100	25,4
		250	32,5
		500	47,8
<i>N</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona (13)	RCM	100	0
		250	21,7
		500	20,5
dictamina (15)*	RCM	100	16,7
		250	17,6
		500	28,7
γ -fagarina (16)*	RCM	100	26,3
		250	33,5
		500	75,0
esquimianina (17)	RCM	100	0
		250	17,9
		500	34,3
arborinina (24)*	CMCD	100	24,0
		250	42,4
		500	58,0
metilarborinina (25)*	CMCD	100	35,6
		250	46,4
		500	63,2
paprazina (26)**	RF1M	100	24,5
		250	37,9
		500	45,1
<i>N</i> -trans-feruloiltiramina (27)**	RF1M	100	9,4
		250	28,1
		500	69,2
sitosterol e estigmasterol (31 + 32)*	CMCD e RCM	100	19,1
		250	20,9
		500	40,0

* substâncias testadas por MAFEZOLI (2001)

** substâncias testadas por AMBROZIN (2004)

A comparação dos resultados representados na TABELA 6.2 mostra que as substâncias com maiores atividades são a rauianina (**8**) que apresentou 47,8% de lise parasitária a uma concentração de 1,8 mM, a γ -fagarina (**16**) apresentou 75,0% de lise parasitária na concentração de 2,2 mM, a arborinina (**24**) apresentou 58% de lise parasitária a uma concentração de 1,8 mM e a *N-trans*-feruloiltiramina (**27**) apresentou 69,2% de lise parasitária a uma concentração de 1,6mM. Porém as substâncias apresentaram resultados pouco significativos frente as formas tripomastigotas, principalmente quando comparadas ao controle positivo, a violeta genciana que apresenta IC₅₀ de 0,083 mM e o (-)-metilpluviatolídeo que apresentou 99% de lise parasitária na concentração de 67,5 μ M (BASTOS *et al.* , 1999).

6.3.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima gGAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*

As substâncias isoladas foram submetidas a ensaio sobre a enzima gGAPDH de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.3 pagina 41.

Como citado no item 3.4.3, no ensaio sobre a enzima gGAPDH a avaliação da inibição da enzima utiliza NAD⁺ como cofator é acompanhada através da formação de NADH, que absorve no comprimento de onda 340 nm. Porém, várias substâncias apresentam absorção no mesmo comprimento de onda ocorrendo interferência na análise. As amostras que apresentam mais de 30% de absorção molecular relativo ao NADH ($\lambda=340$ nm) não puderam ser avaliadas neste comprimento de onda. Uma alternativa é ensaiar estas substâncias utilizando Tio- NAD⁺ como cofator, como descrito no item 3.4.4 páginas 41 e 42 e acompanhando a formação do Tio-NADH no comprimento de onda de 400 nm.

Das substâncias analisadas, apenas a mirtopsina (**14**), a dictamina (**15**) e a γ -fagarina (**16**) utilizaram NAD⁺ como cofator, de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.3, as demais substâncias foram analisadas utilizando Tio- NAD⁺ como cofator de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.4 . Os resultados obtidos estão representados na TABELA 6.3. As substâncias foram testadas na concentração de 200 μ M.

TABELA 6.3- Resultados de inibição da atividade da enzima gGAPDH

substância	Isolada do extrato	Conc. (μM)	% inibição
murranganona (1)	RF1M	200	7
7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina (2)	RF1M	200	7
isomurranganona (3)	RF1M	200	3
murralongina (4)	RCM e RF1M	200	1
murrangatina (5)	RCM e RF1M	200	0
munomicrolina (6)	RCM e RF1M	200	1
acetato de murrangatina (7)	RCM	200	2
rauianina (8)	RCM, RFM e RF1M	200	8
umbeliferona (11)	RCM, RFM e RF1M	200	3
<i>N</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona (13)	RCM	200	0
mirtopsina (14)	RCM	200	0
dictamina (15)	RCM	200	4
γ -fagarina (16)	RCM	200	10
esquimianina (17)	RCM	200	16
<i>Z</i> -rhoifolinato de dimetila (18)	RCM	200	5
8-hidroxi- <i>N</i> -metilflindersina (19)	RCM	200	4
7-hidroxi-8-metoxi- <i>N</i> -metilflindersina (22)	RCM	200	0
3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxiflavona (28)	RF1M	200	9
siringaresinol (29)	RF1M	200	6
ácido vanílico (30)	RF1M	200	0

Os resultados apresentados na TABELA 6.3 mostram que todas as substâncias ensaiadas mostraram porcentagem de inibição menor ou igual a 16% ou seja, nenhuma das substâncias testadas apresentou atividade significativa frente gGAPDH, mesmo as substâncias provenientes extrato metanólico das folhas de *Rauia sp1* (16) que apresentou 74, 5% de inibição na enzima gGAPDH.

6.3.3- Ensaio de inibição da atividade de APRT Adenina Fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*

As substâncias isoladas foram submetidas a ensaio sobre a enzima APRT de *Leishmania tarentolae* de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.5 nas páginas 42 e 43 e os resultados obtidos estão representados na TABELA 6.4. As substâncias foram testadas em concentrações variadas.

TABELA 6.4- Resultados de inibição da atividade de APRT.

substância	Isolada do extrato	Conc. (μM)	% inibição
murralongina (4)	RCM e RF1M	100	45,8
murrangatina (5)	RCM e RF1M	181	12
munomicrolina (6)	RCM e RF1M	181	12
rauiantina (8)	RCM, RFM e RF1M	185	28,0
N-metil-4-metoxi-2-quinolona (13)	RCM	264	20,4
dictamina (15)**	RCM	251	1,6
γ -fagarina (16)	RCM	100	0
esquimianina (17)	RCM	193	32,1
zantobungeanina (20)	RCM	92	25,7
7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (22)	RCM	174	18,8
veprissina (23)	RCM	166	23,4
arborinina (24)**	CMCD	35,1	16,6
paprazina (26)**	RF1M	177	19,8
N-trans-feruloiltiramina (27)**	RF1M	158	9,9

Os resultados representados na TABELA 6.4 mostram que dentre as substâncias testadas a murralongina (4) foi a que apresentou maior atividade 45,8% na concentração de 100 μM . A arborinina (24) isolada da fração 9 extrato diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD 9) que apresentou 92% de inibição frente a enzima APRT apresentou 16,6% de inibição na concentração de 35,1 μM

6.3.2- Ensaio de inibição da atividade da enzima PNP purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*

As substâncias isoladas foram submetidas a ensaio na enzima PNP de *Schistosoma mansoni* de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.6 na página 43 e os resultados obtidos estão representados na TABELA 6.5. As substâncias foram testadas a 200 μ M.

TABELA 6.5- Resultados de inibição da atividade de PNP.

substância	Isolada do extrato	Conc. (μ M)	% inibição
murranganona (1)	16	200	38,1
7-metoxi-8-(2-acetoxi-3-metil-1-oxobut-2-enil)-cumarina (2)	16	200	39,1
isomurranganona (3)	16	200	49,8
murralongina (4)	14 e 16	200	36,1
murrangatina (5)	14 e 16	200	38,1
munomicrolina (6)	14 e 16	200	46,4
acetato de murrangatina (7)	14	200	31,0
rauianina (8)	14, 15 e 16	200	abs
umbeliferona (11)	14, 15 e 16	200	81,5
N-metil-4-metoxi-2-quinolona (13)	14	200	37,6
mirtopsina (14)	14	200	32,8
dictamina (15)	14	200	abs
γ -fagarina (16)	14	200	32,7
esquimianina (17)	14	200	59,7
Z-rhoifolinato de dimetila (18)	14	200	34,6
8-hidroxi-N-metilflindersina (19)	14	200	34,6
7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (22)	14	200	30,1
3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi flavona (28)	16	200	29,9
siringaresinol (29)	16	200	abs
ácido vanílico (30)	16	200	abs

Os resultados dos ensaios (TABELA 6.4) mostram que dentre as substâncias testadas a umbeliferona (**11**) foi a que apresentou maior atividade de inibição (81,5%). A cumarina isomurranganona apresentou 49,8% de inibição na enzima PNP.

A cumarina murrangatina (**5**) inibiu a atividade enzimática de PNP em 38,1%, enquanto que seu diastereoisômero munomicrolina (**6**) apresentou 46,4% de inibição. Dentre os alcalóides furoquinolínicos a γ -fagarina (**16**) apresentou 32,7 % de inibição enquanto que a esquimianina (**17**), que possui uma metoxila a mais em sua estrutura, apresentou 59,7% de inibição. Embora os resultados acima tenham sido apresentados em uma única concentração, já é possível ter uma idéia do comportamento inibitório dessas substâncias frente à enzima PNP.

As substâncias rauianina (**8**), dictamina (**15**), siringaresinol (**29**) e ácido vanílico (**30**) apresentaram absorção no comprimento de onda do ensaio (293nm).

7- Conclusões

O estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus* resultou no isolamento de 32 substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários como cumarinas, alcalóides, amidas, lignana, flavonóide e composto fenólico.

Das 30 substâncias isoladas de *Rauia* sp, são inéditas na literatura as cumarinas 3-etilrauiianina (**9**) e 5-metoxirauianina (**10**) e os alcalóides 8-hidroxi-N-metilflindersina (**19**) e 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (**22**), o que contribui para o conhecimento do perfil químico do gênero. O estudo do caule desta planta mostrou que o mesmo é rico em cumarinas preniladas na posição 8 onde a prenila sofreu diversas modificações estruturais. Dentre estas cumarinas destaca-se a rauianina (**8**), que possui um esqueleto incomum com um anel dihidropirano e uma γ -lactona condensados. Além disso, o caule se mostrou rico em alcalóides derivados do ácido antranílico, como os alcalóides tipo quinolona, furoquinolínicos, dihidrofuroquinolínico, piranoquinolonicos, dihidropiranoquinolonicos. O estudo das folhas mostrou uma maior diversidade das classes de metabólitos encontrados. Além das cumarinas e alcalóides foram encontradas duas amidas, uma flavona, uma lignana e um composto fenólico.

O estudo fitoquímico de *Conchocarpus macrophyllus* levou ao isolamento do alcalóide acridônico metilarborinina (**25**) e da mistura dos esteróides sitosterol (**31**) e estigmasterol (**32**), além da arborinina (**24**) única substância descrita anteriormente nesta espécie.

O estudo fitoquímico de *Rauia* sp e *Conchocarpus macrophyllus*, biomonitorado por

Dos 16 extratos testados frente aos ensaios bioquímicos sobre as enzimas GAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* e ensaio biológico sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*, apenas quatro apresentaram atividades satisfatórias em pelo menos um dos ensaios a que foram submetidos. O extrato éter de petróleo do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCF) e o extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp (RFM) apresentaram 94% e 75% de lise sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 (RF1M) apresentou 74% de inibição na enzima GAPDH e o extrato diclorometânico do caule de

Conchocarpus macrophyllus (CMCD) apresentou 77% de inibição na enzima APRT. O extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp-nova (RF1M) apresentou resultados próximos ao considerado satisfatórios (67,9% de inibição) na a enzima APRT.

Do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp que apresentou 74,5% de lise parasitária frente forma tripomastigota de *T. cruzi* foi isolada a cumarina rauianina que apresentou lise parasitária de 47,76% a 500 µg/ml.

O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Rauia* sp1 que apresentou 74,5% de inibição na enzima GAPDH não levou ao isolamento de substâncias com atividade inibitória significativa nesta enzima.

O fracionamento do extrato diclorometano do caule de *Conchocarpus macrophyllus* (CMCD) que apresentou 77% de inibição frente a enzima APRT levou ao isolamento de dois alcalóides acridônicos destes apenas a arborinina (**24**) foi testada e não apresentou atividade significativa frente a APRT (16,6% na concentração de 35,1µM).

Comparando-se os resultados das atividades dos extratos brutos com os obtidos para as substâncias puras pode-se concluir que ou algumas substâncias mais ativas não foram isoladas neste estudo ou a atividade depende de uma combinação de efeitos entre estas substâncias.

8- Referências Bibliográficas

- AHMED, A. A.; MAHMOUD, A. A.; ALI, E. T.; TZAKOU, O.; COULADIS, M.; MABRY, T. J.; GÁTI, T. e TÓTH, G. "Two highly oxygenated eudesmanes and 10 lignans from *Achillea holosericea*". *Phytochemistry*, **52**: 851-856, 2002.
- AHOND, A.; PICOT, F.; POTIER, P.; POUPAT, C. e SÉVENET, T. "Alkaloids from *Melicope leratii*". *Phytochemistry*, **17**: 166-167, 1978.
- ALBUQUERQUE, B. W.P. "Rutaceae do Estado da Guanabara". *An. Acad. Brasil. Cienc.*, **40**(4):499-530,1968.
- 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 Antichagásicos e Antileishmanioses". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de Doutorado.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M.F. das G. F.; ALBUQUERQUE, S. "Trypanocidal Activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99** (2): 227-231, 2004.
- ANDRADE, M. R. "Alcalóides de Rutaceae: Química e Atividade Biológica". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2004. Tese de Doutorado.
- ARRUDA, M. S. P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C; SILVA, M.F.G.F. e PIRANI, J. R. "Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A New Secofuroquinoline Alkaloid". *Biochem. Syst. Ecol.* **20**(2): 173-178, 1992.
- BAKKER, B. M., WESTERHOFF, H. V., OPPERDOES, F. R., MICHELS, P. A. M. "Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs". *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**: 1-10, 2000.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINDE, A.; CROFT, S.L. "Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues". *Phytochemistry*, **55**: 589-595, 2000.
- BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. "Química Medicinal- As bases moleculares da Ação dos Fármacos". ARTMED Editora, 2001
- BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. "Evaluation of the Trypanocidal Activity of Lignans Isolated from the Leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Planta Med.*, **65**: 541-544, 1999.
- BERGENTAL, D., MESTER, I., RÓZSA,Zs., REISH, J. "¹³C-NMR-Spectren Einiger Acidon-Alkaloide". *Phytochemistry* **18**: 161-163, 1979.
- BEVALOT, F.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I. e WATERMAN, P. G. "Coumarins from Three *Phebalium* Species". *Biochem. Syst. Ecol.* **16**(7/8): 631-633, 1988.

- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.; LOPES, M.N. "Search for Antifungal and Anticancer Compounds from Native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest". *An. Acad. Bras. Ci.* **71** (2): 181-189, 1999.
- BOWEN, I.H.; PERERAK, P. W. C.; LEWIS, J. R. "Alkaloids of leaves of *Glycosmis bilocularis*". *Phytochemistry* **17** : 2125-2127, 1978.
- BUTLER, M.S. "The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery". *J. Nat. Prod.*, **67**, 2141-2153, 2004.
- CAMPBELL, W. E.; DAVIDOWITZ, B.; JACKSON, G. W. "Quinoline Alkaloid from an *Agathosma* species" *Phytochemistry* **29** (4) : 1303-1306, 1990.
- CHAGAS, C. "Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1**: 159-218, 1909.
- CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. "Plant natural products with leishmanicidal activity". *Nat. Prod. Rep.*, **18**: 674-688, 2001.
- CHEM, I.; TSAI, I.; TENG, C.; CHEN, J.; CHANG, Y.; KO, F.; LU, M.C.; PEZZUTO, J.M. "Piranoquinoline Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*". *Phytochemistry*, **46** (3): 525-529, 1997.
- CORTEZ, L. E. R. "Estudo Fitoquímico de *Conchocarpus gaudichaudianus* subsp. *Bahiensis* e *Almeidea coerulea*. A busca de compostos biologicamente ativos". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química- UFSCar, 2002. Tese de Doutorado.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. "A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (1): 3-24, 2002.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. "Natural Products in Drug Discovery and Development". *J. Nat. Prod.*, **60**: 52-60, 1997.
- CRAIG III, S. P., EAKIN, A. E. "Purine salvage enzymes of parasites as targets for structure-based inhibitor design". *Parasitol. Today*, **13** (6): 238-241, 1997.
- CUCA, S, MARTINEZ, V. J. C.; MONACHE, F. D. "Alcalóides presentes em *Hortia colombiana*". *Rev. Col. Quim.*, **27** (1): 23-30, 1998.
- DAS, S.; BARUAH, H.R.; SHARMA, R.P.; BARUA, J. N.; KULANTHAIVEL, P. e HERTZ, W. "7-methoxycoumarins from *Micromelum minutum*". *Phytochemistry*, **23** (10): 2317-2321, 1984.
- DEWICK, P. M. "Medicinal Natural products: a Biosynthetic Approach" England, John Wiley & Sons, 2004.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. "The Impact of Chagas Control in Latin America - A Review". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (5): 603-612, 2002.

- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. "The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (suppl.I):103-121, 1999.
- DIKEY, E. E. " Liriodendrin, a New Lignan Diglucoside from the Inner Bark of Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.)". *J. Org. Chem.*, **23** (2): 179-184, 1958.
- DOCAMPO, R.; SCHMUÑIS, G.A. "Sterol Biosynthesis Inhibitors: Potential Chemotherapeutics against Chagas Disease". *Parasitol. Today*, **13** (4): 129-130, 1997.
- DREYER, D. L. "Kaempferol Methyl Ethers from Flowers of *Dodonaea viscosa*". *Rev. Latinoamer. Quím.* **9**,97-98, 1978.
- ESTÉVEZ-BRAUN, A.; GONZÁLEZ, A. G. "Coumarins". *Nat. Prod. Rep.* **14** (5): 465-475, 1997.
- FACCHINI, P. H. "Estudo Fitoquímico Biomonitorado Viisando o Controle de Formigas e Microorganismos". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2005. Tese de Doutorado.
- FURUKAWA, H., YOGO, M., WU, T.S. "Acridone Alkaloids. X. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Acridone Alkaloids". *Chem. Pharm. Bull.* **31**(9): 3084-3090, 1983.
- GARCIA, E.S.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. "Biological Factors Involving *Trypanosoma cruzi* Life Cycle in the Invertebrate Vector, *Rhodnius prolixus*". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (Suppl.I): 213-216, 1999.
- GARNIER, J.; KUNESCH, N.; SIOU, E.; POISSON, J.; KUNESCH, G. e KOCH, M. "Etude des Cultures de Tissus de *Vinca minor* Isolement D'un Lignane, le Lirioresinol B". *Phytochemistry* **14**, 1385-1387, 1975.
- GARNIER, T.; CROFT, S.L. "Topical treatment for cutaneous leishmaniasis". *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **3** (4): 538-541, 2002
- GOTTLIEB, O. & KAPLAN, M. A. "Das plantas medicinais aos fármacos naturais" *Ciência Hoje*, **15** (89), 51-555, 1993.
- GRAY, A.I.; WATERMAN, P. G. "Review. Coumarins in Rutaceae". *Phytochemistry*, **17**: 845-863, 1978.
- HAMMOND, D. J., AMAN, R. A., WANG, C. C. "The role of compartmentation and glycerol kinase in the synthesis of ATP within the glycosome of *Trypanosoma brucei*". *J. Biol. Chem.*, **260**: 5646-5654, 1985.
- HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. "Alcalóides: generalidades e aspectos básicos" IN *FARMACOGNOSIA da Planta ao Medicamento*, Editora UFSC, 3ª ed, cap 29, 651, 2001.

- HIFNAWY, M. S., VAQUETTE, J., SÉVENET, T., POUSET, J. L., CAVÉ, A. "Produits Neutres et Alcalóides de *Myrtopsis macrocarpa*, *M. myrtoidea*, *M. novae-caledoniae* et *M. selligii*". *Phytochemistry*, **16** :1035-1039, 1977.
- HOHLLEMWERGER, S. V. A. "2-quinolonas de *Andreadoxa flava* (Kallunki) Uma Nova Espécie de Rutaceae da Bahia – Brasil". Salvador, Programa de Pós Graduação em Química – UFMB, 2002. Dissertação de Mestrado.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F. & VIEIRA, P. C. "*Princípios Ativos de Plantas Superiores*". EdUFSCar, 1^aed, p 9-36, 2003.
- IMAI, F.; KINOSHITA T. e SANKAWA, U. "Constituents of the Leaves of *Murraya paniculata* Collected in Taiwan". *Chem. Pharm. Bull.* **37** (2):358-362, 1989.
- ITO, C.; FURUKAWA, H. "Constituents of *Murraya exotica* L. Structure Elucidation of New Coumarins". *Chem. Pharm. Bull.* **35** (10):4277-4285, 1987.
- ITO, C.; FURUKAWA, H.; ISHII, H.; ISHIKAWA, T. e HAGINIWA, J. "The Chemical Composition of *Murraya paniculata*. The Structure of Five New Coumarins and One Alkaloid and the Stereochemistry of Murrangatin and Related Coumarins". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**:2047-2055, 1990.
- KALID, S. A.; WATERMAN, P. G. "Alkaloids from Steam Barks of *Orcia renieri* and *Orcia gabonensis*". *Phytochemistry* **20** (12):2761-2763, 1977.
- KALLUNKI, J.;PIRANI, J. R."Synopsis of *Angostura* Roem. & Schult.and *Conchocarpus* J. C. Mikan (Rutaceae)". *Kew Bull.* **53**:257-334,1998.
- KAMINSKY, R. "Miltefosine Zentaris". *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **3**(4): 550-553, 2002.
- KINOSHITA, T.; WU, J. B.; HO, F. C., "The Isolation of a Prenylcoumarin from *Murraya paniculata* and their Biogenetic Significance". *Phytochemistry* **28**: (1), 147-151, 1989.
- KINOSHITA, T.; TATARA, S.; HO, F. C.; SANKAWA, U. "3-Prenylindoles of *Murraya paniculata* Chemotaxonomic Significance from var. *omphalocarpa*". *Phytochemistry* **43** (1), 125-128, 1996.
- KONG, L. Y.; Li, Y.; Min, Z.D.; Li, X. e ZHU, T. R. " Coumarins from *Peucedanum praeruptorum*". *Phytochemistry*, **41** (5): 1423-1426, 1996.
- LEONG, Y.W.; HARRISON, L. J. e POWELL, A. D. "Phenanthrene and other aromatic constituents of *Bulbophyllum vaginatum*". *Phytochemistry*, **50**; 1237-1241, 1999.
- LUQUETTI, A. O.;FRAGATA, A. A .F.; PRATA, A.; RASSI, A.; GONTIJO, E. D.; FERREIRA, H. O.; CANÇADO, J. R.; COURA, J. R.; ANDRADE, S. G.; MACEDO, V.; NETO, V. A.; OLIVEIRA, W. J.; BRENER, Z. "Etiological Treatment for Chagas Disease". *Parasitol. Today*, **13** (4): 127-128, 1997.

- MAFEZOLI, J. "Atividade Tripanocida e antimicrobiana de plantas da Família Rutaceae". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de Doutorado.
- MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. "In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*". *J. Ethnopharmacol.* **73**: 335-340, 2000.
- MORAES, V. R. de S., TOMAZELA, D. M., FERRACIN, R. J., GARCIA, C. F., SANNOMIYA, M., SORIANO, M. del P. C., SILVA, M. G. F., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., RODRIGUES-FILHO, E., 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)". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**(3): 360-387, 2003.
- MÜLLER, A. H.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. "Dihydrochalcones, Coumarins and Alkaloids from *Metrodorea nigra*". *Phytochemistry* **40** (6): 1797-1800, 1995.
- MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J. e BROWN, S. A. "The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry". 1^a ed. London, John Wiley & Sons, 1982, p 36.
- MUYARD, F.; BEVALOT, F.; LAUD, B. e VAQUETTE, J. "Alkaloids from Stem Bark of *Dutaillyea baudouinii*". *Phytochemistry*, **31** (3), 1087-1089, 1992.
- NISBEST, L. J.; MOORE, M. "Will natural products remain an important source of drug research for the future?". *Curr Opin. Biotechnol.*, **8** (6): 708-712, 1997.
- OLIVEIRA, D.J. "Constituintes químicos de *Rauia resinosa*" Belém, Programa de Pós Graduação em Química de Produtos Naturais - UFPA, 1996. Dissertação de Mestrado.
- OPPERDOES, F. R.; BORST, P. "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome". *FEBS Lett.*, **80**, 360-364, 1977.
- PELTER, A.; WARD, R. S.; RAO, E. V. e SASTRY, K. V. "Revised Structures for Pluviatilol, Methyl Pluviatilol and Xanthoxylol- General Methods for the Assignment of Stereochemistry to 2,6-Diaryl- 3,7-Dioxabicyclo[3.3.0]octane Lignans". *Tetrahedron*, **32**:2783-2788, 1976.
- PUSSET, J.; LOPEZ, J. L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M. A. e VEILLON, J. M. "Isolation and 2D NMR Studies of Alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*". *Planta Med.* **57**:153-155, 1991.

- QUADER, M. A.; EL-TURB, J. A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I. e WATERMAN, P. G. "Coumarins and Their Taxonomic Value in the Genus *Phebalium*". *Phytochemistry* **31** (9), 3083-3089, 1992.
- RAHMAN, A.; BHATTI, M. K.; AKTAR, F; CHOUDHARY, M.I.; "Alkaloids of *Fumaria indica*". *Phytochemistry*, **31** (8): 2869-2872, 1992.
- RAMACHANDRAN NAIR, A. G. e SIVAKUMAR, R. "Non –identity of Hortensin from *Millingtonia hortensis* with 3, 4'-Dihydroxy-6,7-Dimethoxyflavone". *Phytochemistry* **31** (2):671-673, 1992.
- RASTOGI, K.; KAPIL, R. S.; POPLI, S. P. "New Alkaloid from *Glycosmis mauritiana*". *Phytochemistry* **19**: 945-948, 1980.
- RATES, S.M.K. "Plants as source of drugs". *Toxicon*, **39**: 603-613, 2001.
- RAZDAN, T. K.; QUADRI, B.; HARKAR, S. e Waight, E. S. "Chromones and Coumarins from *Skimmia laureola*". *Phytochemistry* **26** (7): 2063-2069, 1987.
- RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; MORELLO, A.; REPETTO Y. "Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes". *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **122**: 27-31, 1999.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. "Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology" Baltimore: Willians & Wilkins, 1997.
- ROBERTSON, A. V. "The Proton Magnetic Resonance of Furoquinoline Alkaloid and Related Compound". *Aust. J. Chem.*, **45** (6): 1263-1269, 1997.
- ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M. e MAIA, J. G. S. "Neolignans, Styrylpyrones and Flavonoids from na *Aniba* Species". *Phytochemistry* **45** (6): 1263-1269, 1997.
- SAKUSHIMA, A.; COSKUN, M e MAOKA, T. "Hydroxybenzoic Acids from *Boreava orientalis*". *Phytochemistry* **40** (1), 257-261, 1995.
- SALLES, L. V. O. "Evolução de Limonóides em Meliaceae e Estudo Fitoquímico de *Khaya senegalensis* (Meliaceae)" Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar 1995. Tese de Doutorado
- SARKER, S. D.; BARTHOLOMEW, B. NASH, R. J. "Alkaloids of *Balanites aegyptiaca*". *Fitoterapia*, **31** (8), 2869-2872, 1992.
- SILVA, M. "Estudo de Biologia Molecular e Estrutural da Enzima Adenina Fosforibosiltransferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*". São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – USP, 2001. Dissertação de Mestrado.
- SILVA, M.; SILVA, C. H. T. P., IULEK, J.; THIEMANN, O. H. "Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania tarentolae* potential implications for APRT catalytic mechanism". *Biochem. Bioph. Acta*, **1696**: 31-39, 2004.

- SILVERSTEIN, R. M. e WEBSTER, F. X. "Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos" 6ª ed, John Wiley & Sons, 145-146, 2000.
- SOEJARTO, D.D. "Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field". *J. Ethnopharmacol.* **51**: 1-15, 1996.
- SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, A.P.U.; GUIMARÃES, B.G.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. "Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design". *FEBS Letters*, **424**: 131-135, 1998.
- SOUZA, R. J. "Estudos de *Pilocarpus grandiflorus*, *Hyparrhenia rufa* e *Pennicetum purpureum* relacionados as formigas cortadeiras e seu fungo simbionte". Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar 2003. Tese de Doutorado
- SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B.K. "Plant Metabolites Active against *Trypanosoma cruzi*". *Planta Med.*, **62**: 98-105, 1996.
- SUAREZ, L. E. C. E MONACHE, F. D. "Constituents of *Murraya exotica* adapted in Colombia" *Rev. Latinoamer. Quim.* **22**(1): 38-40,1991.
- TOMAZELA, D.M.; PUPO, M.T.; PASSADOR, E.A.P.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES, E.F.; OLIVA, G.; PIRANI, J.R. "Pyranochalcones and a flavone from *Neoraputia magnífica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities". *Phytochemistry*, **55**: 643-651, 2000.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances". *Trends Parasitol.*, **19** (11):495-501, 2003.
- VELLIEUX, F. M. D.; HAJDU, J.; VERLINDE, C. L. M.J.; GROENDIJK, H.; READ, R. J.; GREENHOUGH, T. J.; CAMPBELL, J. W.; KALIK, K. H.; LITTLECHILD, J. A.; WATSON, H. C.; HOL, W. G. J. "Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (6): 2355-2359, 1993.
- VELOZO, E. S. "Fitoquímica comparada dos gêneros *Angostura*, *Almeidea* e *Rauia* (Rutaceae)" São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química- UFSCar, 1995. Tese de Doutorado.
- VELOZO, E. S., OLIVEIRA, D. J., ARRUDA, A. C., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., SILVA, M. G. F., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SPECTOR, J. "Rauianin, a new cumarin from *Rauia resinosa*." *Nat. Prod. Letters*, **9**: 237-244, 1997.
- 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". *Med. Chem.*, **37** (2): 3605-3613,1994.

- VERONESSI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 8^a ed., 1991.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO M.T.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVAO, F. "Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales". *Pure Appl. Chem.*, **73** (3): 617-622, 2001.
- WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. "Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine", cap. 8, 135, 1992.
- WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M. F. "Alkaloids of the Rutaceae: Their Distribution and Systematic Significance". *Biochem. Syst. Ecol.* **3**(7/8): 149-180, 1975.
- WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M. F."Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Academic Press, London, 1983.
- WHO, "Strategic Direction for Research – Chagas Disease", *Tropical Disease Research*, Genova, World Health Organization, 1-6, 2002.
- WHO, "Strategic Direction for Research – Leishmaniasis", *Tropical Disease Research*, Genova, World Health Organization, 1-6, 2002.
- WIRENGA, R. K.; NOBLE, M. E. M.; VRIEND, G.; NAUCHE, S.; HOL, W. G. J. "Refined 1.83 Å Structure of Trypanosomal Triosephosphate Isomerase Crystallized in the Presence of 2-4 Ammonium Sulphate: A Comparison with Structure of the Trypanosomal Triosephosphate Isomerase-Glycerol-3 phosphate Complex". *J. Mol. Biol.*, **220** (4), 995-1015, 1991