

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

**TESE DE DOUTORADO**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

**ALCALOIDES E DIIDROCHALCONAS DE *METRODOREA*  
*STIPULARIS*: QUÍMICA E BIOATIVIDADE**

Marcela Carmen de Melo Burger\*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

\*Bolsista FAPESP

SÃO CARLOS - SP

2014



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

**ALCALOIDES E DIIDROCHALCONAS DE *METRODORA*  
*STIPULARIS*: QUÍMICA E BIOATIVIDADE**

Marcela Carmen de Melo Burger\*

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

\*Bolsista FAPESP

SÃO CARLOS - SP

2014

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

B954ad

Burger, Marcela Carmen de Melo.

Alcaloides e diidrochalconas de *Metrodorea stipularis* :  
química e bioatividade / Marcela Carmen de Melo Burger. --  
São Carlos : UFSCar, 2014.  
145 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

1. Alcalóides. 2. Diidrochalconas. 3. Chagas, Doença de.  
4. Malária. 5. Câncer. I. Título.

CDD: 547.72 (20<sup>a</sup>)

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

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Marcela Carmen de Melo Burger**, realizada em 04 de abril de 2014:*



---

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



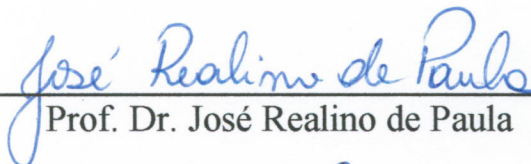
---

Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani



---

Prof. Dr. Rafael Victório Carvalho Guido



---

Prof. Dr. José Realino de Paula



---

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Helena de Melo, sempre presente com as palavras certas nos momentos exatos, por sua força e braveza que me proporcionaram chegar até aqui, e pelo carinho, dedicação, apoio e incentivo, sem ela nada disto seria possível.





## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela orientação, confiança, amizade, ensinamentos e apoio por todos estes anos.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar: doutores João Batista Fernandes, Maria Fátima das G. Fernandes da Silva e Moacir Rossi Forim por toda colaboração e contribuição para minha formação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Karine Le Roch da Universidade da Califórnia Riverside (UCR) pela confiança, orientação e auxílio com os ensaios em *Plasmodium falciparum*. Ao técnico Jacques Prudhomme e aos alunos do Laboratório Le Roch por toda colaboração e paciência, em especial Aster Escalante por todo auxílio e amizade.

Ao Dr. Mario Augusto Isidoro pelo auxílio na realização dos ensaios em cruzaina.

Ao Professor Dr. Javier Alcides Ellena e seu aluno Paulo de Sousa Carvalho Júnior pela realização dos experimentos de difração de raios X.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar, em especial a Luciana Vizonotto pela obtenção de espectros de RMN quando necessário e por todo auxílio e amizade.

A todos os meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais por toda amizade, companheirismo, incentivo, e por tornarem mais fáceis os momentos mais difíceis, nunca faltando um sorriso de apoio ou uma palavra de conforto. Em especial a Monique pelo auxílio nos ensaios com as catepsinas.

À minha mãe, Maria Helena de Melo, por sempre acreditar, pelo amor, conselhos, amizade, apoio e sabedoria. Ao meu irmão, Walter Burger Neto, pelo amor e incentivo de sempre. E ao meu pai, Otávio Marcelo Burger, *in memoriam*, tenho certeza que estaria muito feliz com mais esta vitória.

As madrinhas Rosimeire Isaias Naves, uma segunda mãe, pela força, atenção, amor, confiança e encorajamento que foram fundamentais nesta conquista. Odete Rodrigues de Melo por todo carinho e por estar sempre presente. E Regina Naves Melo, também Waldomiro Correa de Melo Neto, que sempre foram um grande apoio na minha caminhada para essa vitória.

À minha maravilhosa família (tios e primos) por estarem sempre ali, pelo incentivo, colaboração, paciência, compreensão, companheirismo e carinho durante todo este período.

Ao meu noivo, Cleber Eduardo Baptista, eterno amigo, pela compreensão, paciência, dedicação, apoio, confiança, companheirismo e amor que sempre me deram força pra prosseguir.

A todos os meus amigos e colegas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, em especial Silvia, Kenya, Brunna, Francielle e Murilo pelo carinho de sempre e pela grande amizade e companheirismo apesar da distância.

A Deus pela minha existência e por abençoar minha caminhada.

À FAPESP pela bolsa concedida.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	deslocamento químico em partes por milhão
Cat B	catepsina B
Cat L	catepsina L
Cat K	catepsina K
CC	cromatografia de adsorção em coluna
CEC	cromatografia de exclusão em coluna
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.
d	duplete
dd	duplo duplete
dt	duplo tripleto
DMSO	dimetilsulfóxido
HMBC	heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	hertz
J	constante de acoplamento
m	multiplete
$m/z$	relação massa carga
MeOH	metanol
MSCE	extrato etanólico da planta <i>Metrodorea stipularis</i>
MSCEH	partição hexânica de <i>M. stipularis</i>
MSCED	partição diclorometânica de <i>M. stipularis</i>
MSCEA	partição acetato de etila de <i>M. stipularis</i>
MSCEW	partição hidroalcoólica de <i>M. stipularis</i>
Pir-d <sub>5</sub>	piridina deuterada

RMN	ressonância magnética nuclear
RMN $^1\text{H}$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	ressonância magnética nuclear de carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
UV	ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Massas dos extratos brutos obtidos e frações. ....	28
TABELA 4.1 - Dados de RMN da rutaecarpina e da 1-hidroxitrutaecarpina. ....	61
TABELA 4.2 - Dados de RMN das substâncias <b>6</b> e <b>7</b> . ....	74
TABELA 4.3 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C da 3-β-O-β-glucopiranosil sitosterol e dados da literatura. ....	99
TABELA 4.4 - Dados de RMN da substância <b>15</b> . ....	106
TABELA 4.5 - Dados de RMN da substância <b>16</b> . ....	112
TABELA 4.6 - Dados de RMN da substância <b>17</b> . ....	118
TABELA 4.7 - Dados de RMN para a substância <b>18</b> . ....	125
TABELA 4.8 - Porcentagem inibitória dos extratos e frações contra a enzima cruzaina.....	127
TABELA 4.9 - Valores de IC <sub>50</sub> das substâncias na enzima cruzaina. ....	129
TABELA 4.10 - Inibição enzimática das substâncias nas catepsinas B e L (- = sem inibição). ....	131
TABELA 4.11 - Valor de EC <sub>50</sub> das substâncias inibidoras do crescimento de <i>P. falciparum</i> . ....	133

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura da morfina e foto de <i>Papaver somniferum</i> de onde foi isolada. (foto de capa da revista PNAS, 21, 2004). .....	3
FIGURA 1.2 - Alcaloides com propriedades farmacológicas isolados do ópio... 3	3
FIGURA 1.3 - Exemplos de fármacos isolados de plantas..... 4	4
FIGURA 1.4 - Exemplos de fármacos naturais e semissintéticos. .... 5	5
FIGURA 1.5 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de plantas da família Rutaceae..... 8	8
FIGURA 1.6 - Alguns alcaloides acridônicos isolados de <i>S. glutinosa</i> e seus respectivos valores de IC <sub>50</sub> na catepsina V. .... 9	9
FIGURA 1.7 - Metabólitos secundários isolados de <i>M. nigra</i> . .... 12	12
FIGURA 1.8 - Metabólitos secundários isolados de <i>M. flavida</i> . .... 13	13
FIGURA 1.9 - Distribuição mundial de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e do vetor de transmissão entre 2006-2009 (Adaptado de <a href="http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf">http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf</a> )..... 14	14
FIGURA 1.10 - Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas. .... 16	16
FIGURA 1.11- Estrutura do K777 inibidor da enzima cruzaina. .... 18	18
FIGURA 1.12 - Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da malária. ... 20	20
FIGURA 4.1 - Estrutura da dictamina (1)..... 45	45
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da dictamina. .... 46	46
FIGURA 4.3 - Expansão do espectro de gCOSY (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da dictamina. .... 46	46
FIGURA 4.4 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da dictamina.(B) Expansão da região aromática..... 47	47
FIGURA 4.5 - Estrutura da N-metil-4-metoxi-2-quinolona (2). .... 48	48
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da N-metil-4-metoxi-2-quinolona. .... 49	49

FIGURA 4.7 - Estrutura da maculina ( <b>3</b> ).....	49
FIGURA 4.8 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da maculina. ....	50
FIGURA 4.9 - Estrutura da rutaecarpina ( <b>4</b> ).....	51
FIGURA 4.10 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da rutaecarpina. .....	52
FIGURA 4.11 - (A) Correlações mostradas no espectro de gCOSY (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da rutaecarpina.(B) Expansão da região aromática.....	53
FIGURA 4.12 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da rutaecarpina. (B) Expansão da região aromática .....	54
FIGURA 4.13 - Estrutura da 1-hidroxirutaecarpina ( <b>5</b> ).....	55
FIGURA 4.14 - Espectro de RMN (400 MHz, Acetona d- <sub>6</sub> ) da 1-hidroxirutaecarpina.....	56
FIGURA 4.15 - (A) Espectro de correlação gCOSY (400 MHz, Acetona d <sub>6</sub> ) da 1-hidroxirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática.....	57
FIGURA 4.16 - (A) Espectro de correlação HSQC (400 MHz, Acetona d <sub>6</sub> ) da 1-hidroxirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática. ....	58
FIGURA 4.17 - Correlações observadas no espectro de HMBC (400 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da 1-hidroxirutaecarpina. ....	59
FIGURA 4.18 - (A) Espectro de correlação HMBC (400 MHz, acetona d <sub>6</sub> ) da 1-hidroxirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática. ....	60
FIGURA 4.19 - Estrutura da substância <b>6</b> (INÉDITA). ....	62
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>6</b> . ....	62
FIGURA 4.21 - (A) Espectro de gCOSY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>6</b> . (B) Expansão da região aromática. ....	63
FIGURA 4.22 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>6</b> . (B) Expansão da região aromática.....	64
FIGURA 4.23 - Correlações observadas no espectro de HMBC.....	65

FIGURA 4.24 - (A) Espectro de HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>6</b> . (B) Expansão da região aromática. ....	66
FIGURA 4.25 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>6</b> . ....	67
FIGURA 4.26 - Estrutura da substância <b>7</b> (INÉDITA). ....	67
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>7</b> . ....	68
FIGURA 4.28 - (A) Espectro de gCOSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>7</b> . (B) Expansão da região aromática. ....	69
FIGURA 4.29 - (A) Espectro de HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>7</b> . (B) Expansão da região aromática. ....	70
FIGURA 4.30 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância <b>7</b> . .....	71
FIGURA 4.31 - Espectro e expansão do HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>7</b> . ....	72
FIGURA 4.32 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>7</b> . ....	73
FIGURA 4.33 - Proposta da biogênese das substâncias <b>4-7</b> . ....	75
FIGURA 4.34 - Estrutura da heraclenol ( <b>8</b> ). ....	76
FIGURA 4.35 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do heraclenol. ....	77
FIGURA 4.36 - Espectro de correlação HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do heraclenol. .....	78
FIGURA 4.37 - Espectro de correlação gCOSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do heraclenol. ....	79
FIGURA 4.38 - Correlações observadas no espectro de gCOSY de heraclenol.	79
FIGURA 4.39 - Estrutura da feloptorina ( <b>9</b> ). ....	80
FIGURA 4.40 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da feloptorina. .	80
FIGURA 4.41 - Espectro de COSY (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da feloptorina. ....	81
FIGURA 4.42 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da feloptorina. ....	82
FIGURA 4.43 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da feloptorina. ...	82



FIGURA 4.44 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.....	83
FIGURA 4.45 - Estruturas dos isômeros possíveis para a substância <b>10</b> .....	84
FIGURA 4.46 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.....	85
FIGURA 4.47 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.....	86
FIGURA 4.48 - Correlações observadas no espectro de HMBC da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.....	86
FIGURA 4.49 - Estrutura da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina ( <b>10</b> ).....	86
FIGURA 4.50 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da isopimpenilina.....	87
FIGURA 4.51 - Estruturas possíveis para a substância <b>11</b> .....	88
FIGURA 4.52 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da isopimpenilina.....	89
FIGURA 4.53 - Correlações observadas no espectro de HMBC da isopimpenilina.....	89
FIGURA 4.54 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da isopimpenilina.....	90
FIGURA 4.55 - Representação da estrutura da isopimpenilina.....	90
FIGURA 4.56 - Estrutura da isopimpenilina ( <b>11</b> ).....	91
FIGURA 4.57 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, Acetona-d <sub>6</sub> ) da 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina.....	92
FIGURA 4.58 - Isômeros estruturais possíveis para a substância <b>12</b> .....	92
FIGURA 4.59 - Representação da estrutura da 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina.....	93
FIGURA 4.60 - Estrutura da 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina ( <b>12</b> ).....	93

FIGURA 4.61 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da escopoletina. .....	94
FIGURA 4.62 - Estrutura da Escopoletina e da Isoescopoletina.....	95
FIGURA 4.63 - Proposta de fragmentação para diferenciação da escopoletina e isoescopoletina. ....	95
FIGURA 4.64 - Espectro de massas da escopoletina.....	96
FIGURA 4.65 - Estrutura da escopoletina ( <b>13</b> ). ....	96
FIGURA 4.66 - Estrutura da 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glucopiranosil sitosterol ( <b>14</b> ). ....	97
FIGURA 4.67 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Pir- $\text{d}_5$ ) da 3- $\beta$ -O- $\beta$ - glucopiranosil sitosterol. ....	97
FIGURA 4.68 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (400 MHz, Pir- $\text{d}_5$ ) da 3- $\beta$ -O- $\beta$ - glucopiranosil sitosterol. ....	98
FIGURA 4.69 - Estrutura da substância <b>15</b> . ....	100
FIGURA 4.70 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância <b>15</b> . .....	101
FIGURA 4.71 - (A) Espectro de COSY (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância <b>15</b> . ....	102
FIGURA 4.72 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância <b>15</b> . .....	103
FIGURA 4.73 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância <b>15</b> . .....	103
FIGURA 4.74 - (A) Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância <b>15</b> . (B) Expansão da região de hidrogênios metílicos e metilênicos. ....	104
FIGURA 4.75 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>15</b> . ....	105
FIGURA 4.76 - Estrutura da substância <b>16</b> . ....	107
FIGURA 4.77 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>16</b> . .	108
FIGURA 4.78 - Espectro de HSQC (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>16</b> . ....	109
FIGURA 4.79 - Espectro de COSY (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância <b>16</b> . ....	109

FIGURA 4.80 - Espectro de HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>16</b> ....	110
FIGURA 4.81 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância <b>16</b> . .....	110
FIGURA 4.82 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>16</b> .....	111
FIGURA 4.83 - Estrutura da substância <b>17</b> . ....	113
FIGURA 4.84 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>17</b> . ....	114
FIGURA 4.85 - Espectro de COSY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>17</b> .....	115
FIGURA 4.86 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>17</b> .....	116
FIGURA 4.87 - Espectro de HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>17</b> ....	116
FIGURA 4.88 - Correlações observadas no HMBC da substância <b>17</b> . ....	117
FIGURA 4.89 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>17</b> .....	117
FIGURA 4.90 - Estrutura da substância <b>18</b> . ....	119
FIGURA 4.91 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>18</b> . ....	120
FIGURA 4.92 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>18</b> .....	121
FIGURA 4.93 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância <b>18</b> . .....	122
FIGURA 4.94 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>18</b> .....	122
FIGURA 4.95 - Espectro de COSY (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância <b>18</b> .....	123
FIGURA 4.96 - Espectro de massas de alta resolução da substância <b>18</b> .....	124
FIGURA 4.97 - Proposta da biogênese das diidrochalconas isoladas. ....	126
FIGURA 4.98 - Porcentagem de inibição enzimática da cruzaína do extrato etanólico dos caules de <i>M. stipularis</i> (E), da partição diclorometânica do mesmo (MD) e das frações após cromatografia desta partição (100 µg/mL). ....	128
FIGURA 4.99 - Estrutura da rutaecarpina e 1-hidroxi-rutaecarpina e em vermelho a diferença estrutural entre elas.....	130
FIGURA 4.100 - Estrutura da substância <b>6</b> e <b>7</b> e em vermelho a diferença estrutural entre elas.....	130
FIGURA 4.101 - Estrutura das diidrochalconas inibidoras de cat K.....	132

FIGURA 4.102 - Estrutura dos alcaloides que apresentaram significativas inibições no crescimento da estirpe 3D7 de *P. falciparum*..... 133

## **LISTA DE ESQUEMAS**

ESQUEMA 3.1 - Fracionamento do extrato bruto etanólico de <i>M. stipularis</i> . ..	29
ESQUEMA 3.2 - Cromatografia da fração MSCED. ....	30
ESQUEMA 3.3 - Cromatografia da fração MSCED2. ....	31
ESQUEMA 3.4 - Cromatografia da fração MSCED19. ....	32
ESQUEMA 3.5 - Cromatografia da fração MSCED21. ....	33
ESQUEMA 3.6 - Cromatografia da fração MSCED22. ....	34
ESQUEMA 3.7 - Metodologia geral do ensaio enzimático. ....	35

## RESUMO

ALCALOIDES E DIIDROCHALCONAS DE *METRODOREA STIPULARIS*: QUÍMICA E BIOATIVIDADE - Este trabalho baseou-se no estudo bioguiado de cinco plantas (*Galipea jasminiflora*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia grandiflora*, *Metrodorea stipularis* e *Zanthoxylum fagara*) pertencentes a família Rutaceae utilizando como alvo a enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*. A partição diclorometânica dos caules de *M. stipularis* proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico foi a mais ativa e após estudo cromatográfico suas frações apresentaram inibições enzimáticas muito alta. Assim foram todas estudadas cromatograficamente a fim de se isolar os metabólitos secundários responsáveis por esta inibição. Neste estudo isolou-se 18 compostos (7 alcaloides, 6 cumarinas, 1 esteroide, e 4 diidrochalconas), sendo cinco inéditos na literatura até o momento (2 alcaloides e 3 diidrochalconas). Observou-se a presença das diidrochalconas em todas as frações ativas e na enzima alvo cruzaina, as substâncias desta classe de metabolitos foram as que apresentaram as maiores inibições. Estes fatos indicam que elas podem ser as responsáveis pela inibição encontrada nas frações. Devido à similaridade da cruzaina com as catepsinas B e L, os metabolitos isolados foram ensaiados nestas enzimas e quatro alcaloides assim como duas diidrochalconas apresentaram significativa inibição na catepsina B, e duas diidrochalconas na catepsina L. Como plantas desta família são utilizadas pela medicina popular no tratamento de malária, estes compostos foram também ensaiados no *Plasmodium falciparum*, parasita causador da doença e os resultados de duas diidrochalconas foram satisfatórios.

## ABSTRACT

ALKALOIDS AND DIHYDROCHALCONES FROM *METRODOREA STIPULARIS*: CHEMISTRY AND BIOACTIVITY - This work was based on bioactivity-guided study of five plants ( *Galipea jasminiflora* , *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia grandiflora* , *Metrodorea stipularis* and *Zanthoxylum Fagara* ) from Rutaceae family using the enzyme cruzain from *Trypanosoma cruzi* as target. The dichlorometane liquid-liquid partition from stems of *M. stipularis* were the most active one, and after a chromatographic study its fractions showed high enzymatic inhibition, so all fractions were submitted a chromatographic study aiming to isolate the secondary metabolites responsible for this inhibition. A number of compounds were isolated, among them: seven alkaloids , six coumarins, one steroid, and four dihydrochalcones, two alkaloids and three dihydrochalcones have been described for the first time. It was observed the presence of the dihydrochalcones in all active fractions indicating that has of compounds may be responsible for the activity of the extracts against cruzain. Due to the similarity of the cruzain with cathepsins B and L, and to further explore the bioactivity the isolated metabolites were also assayed in these enzymes. Four alkaloids as well two dihydrochalcones showed significant inhibition of cathepsin B, while dihydrochalcones showed to inhibition cathepsin L. Plants of this family are used in folk medicine for the treatment of malaria , so these compounds were also tested against *Plasmodium falciparum* parasite, and good activity was found for two dihydrochalcones.

## SUMÁRIO

1	- INTRODUÇÃO .....	2
1.1	- PRODUTOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE FÁRMACOS .....	2
1.2	- FAMÍLIA RUTACEAE .....	7
1.2.1	- <i>GALIPEA JASMINIFLORA</i> .....	9
1.2.2	- <i>ESENBECKIA FEBRIFUGA</i> .....	10
1.2.3	- <i>ESENBECKIA GRANDIFLORA</i> .....	10
1.2.4	- <i>ZANTHOXYLUM FAGARA</i> .....	11
1.2.5	- <i>METRODOREA STIPULARIS</i> .....	11
1.3	- DOENÇA DE CHAGAS .....	13
1.3.1	- A ENZIMA CRUZAÍNA .....	17
1.4	- MALÁRIA .....	18
1.5	- O CANCER E AS CATEPSINAS .....	21
2	- OBJETIVOS .....	24
2.1	- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
3	- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	26
3.1	- MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.2	- COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	27
3.3	- PREPARO DOS EXTRATOS .....	27
3.4	- ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS .....	29
3.5	- ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	35
3.5.1	- CRUZAÍNA .....	36
3.5.2	- CATEPSINAS .....	36
3.5.3	- ENSAIOS EM <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> .....	37
4	- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	- SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	40
4.2	- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL .....	45
4.2.1	- ALCALOIDES .....	45



4.2.1.1 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA DICTAMINA.....	45
4.2.1.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA N-METIL-4-METOXI-2- QUINOLONA.....	48
4.2.1.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MACULINA.....	49
4.2.1.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA RUTAECARPINA E DA 1-HIDROXIRUTAECARPINA .....	50
4.2.1.5 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS 6 E 7	61
4.2.1.6 - PROPOSTA DA BIOGÊNESE DAS SUBSTÂNCIAS 4-7.....	74
4.2.2 CUMARINAS.....	76
4.2.2.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA HERACLENOL .....	76
4.2.2.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA FELOPTORINA .....	79
4.2.2.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA 5,6-METILENODIOXI- 7,8-DIMETOXICUMARINA .....	83
4.2.2.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA ISOPIMPENILINA .....	87
4.2.2.5 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA 6,7-METILENODIOXI-8- METOXCUMARINA .....	91
4.2.2.6 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA ESCOPOLETINA.....	94
4.2.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO ESTERÓIDE 3-β-O-β- GLUCOPIRANOSIL SITOSTEROL.....	96
4.2.4 - DIIDROCHALCONAS .....	100
4.2.4.1 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 15.....	100
4.2.4.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 16.....	107
4.2.4.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 17.....	112
4.2.4.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 18.....	119
4.2.4.5 - PROPOSTA DA BIOGÊNESE DAS DIIDROCHALCONAS ISOLADAS.....	126
4.3 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	126
4.3.1 - CRUZAÍNA .....	126

4.3.2	- CATEPSINAS .....	131
4.4	- ENSAIO NO <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> .....	132
5	- CONCLUSÃO .....	136
6	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140

# **INTRODUÇÃO**

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - PRODUTOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE FÁRMACOS

As plantas produzem dois grandes grupos de compostos, os metabolitos primários e os metabolitos secundários. O primeiro desempenha funções básicas vitais para elas como os lipídeos, os protídeos e os glicídios, que são produzidos através de rotas biossintéticas, e originam a custos de energia o segundo grupo, os metabolitos secundários (FUMAGALI et al., 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

Os metabolitos secundários não desempenham funções essenciais mas são de grande importância na adaptação das plantas ao meio ambiente, aumentando a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, e geralmente apresentam estruturas complexas, de baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas (SIMÕES *et al.*, 2010).

Estes metabolitos secundários são classificados de acordo com sua rota biossintética, sendo de basicamente três grupos principais, os compostos fenólicos, os terpênicos e esteroides, e os alcaloides. A origem de todos eles pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose seguindo basicamente duas vias, uma pelo intermediário ácido chiquímico e outra pelo acetato. Alguns metabolitos não derivam apenas de uma destas vias mas da combinação delas (FUMAGALI et al., 2008; SIMÕES *et al.*, 2010).

Por milhares de anos as plantas são utilizadas como medicamentos, este uso se iniciou com as formas mais "cruas" como: tinturas, chás, emplastos, pó e outras formulações ervais. Hoje o uso das plantas como medicamento tem envolvido o isolamento do metabolito secundário como princípio ativo. Este processo se iniciou com o isolamento do alcaloide morfina da planta *Papaver somniferum* L. (ópio) (FIGURA 1.1) no inicio do século XIX; e seguiu com o

isolamento de vários outros metabólitos de grande importância farmacológica (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

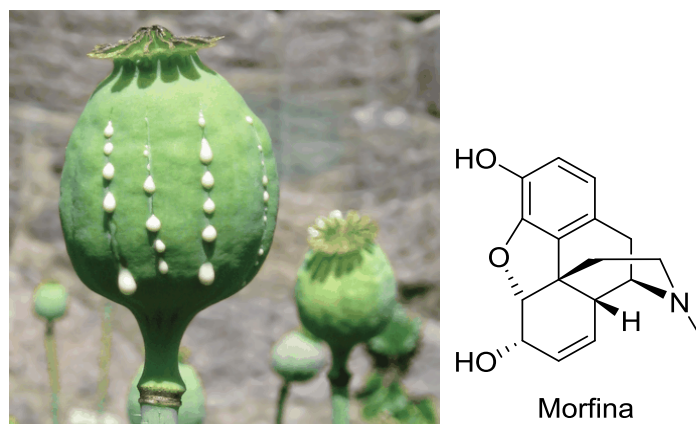


FIGURA 1.1 - Estrutura da morfina e foto de *Papaver somniferum* de onde foi isolada. (foto de capa da revista PNAS, 21, 2004).

O ópio possui também outros alcaloides de grande importância e propriedades farmacológicas interessantes, como a codeína (antitussígeno), a tebaína (antagonista da morfina) e a papaverina (espasmolítico) (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

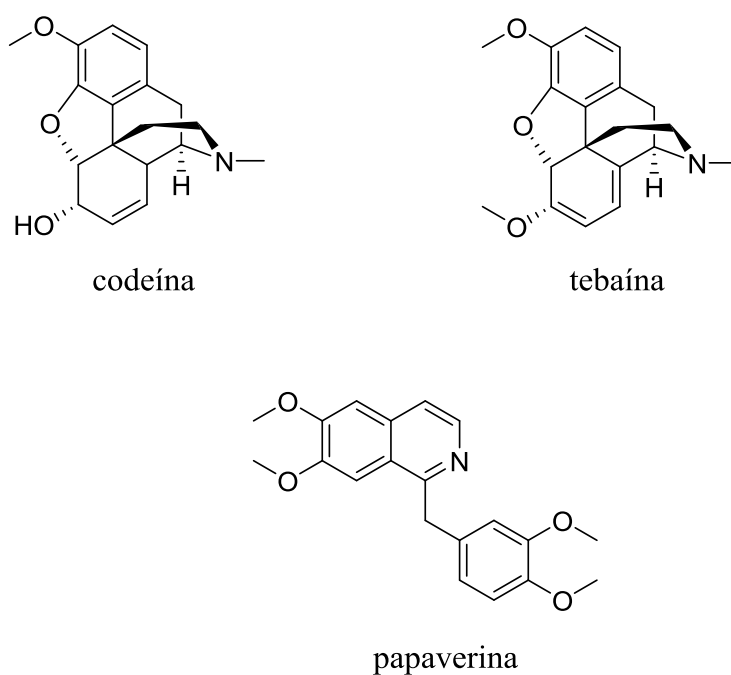


FIGURA 1.2 - Alcaloides com propriedades farmacológicas isolados do ópio.

Dentre outros importantes fármacos oriundos de plantas temos os exemplificados na FIGURA 1.3: a galantamina (1) isolada de *Galanthus woronowii* utilizada no tratamento da doença de Alzheimer; os alcaloides bisindólicos vinblastina (2) e vincristina (3) isolados de *Catharantus roseus* utilizados no tratamento de leucemia, o paclitaxel (4) isolado de *Taxus brevifolia* utilizado no tratamento de câncer de mama e de pulmão e a digitoxigenina isolado de *Digitalis spp.* utilizado como cardiotônico (BALUNAS e KINGHORN, 2005; BARREIRO e FRAGA, 2001; HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

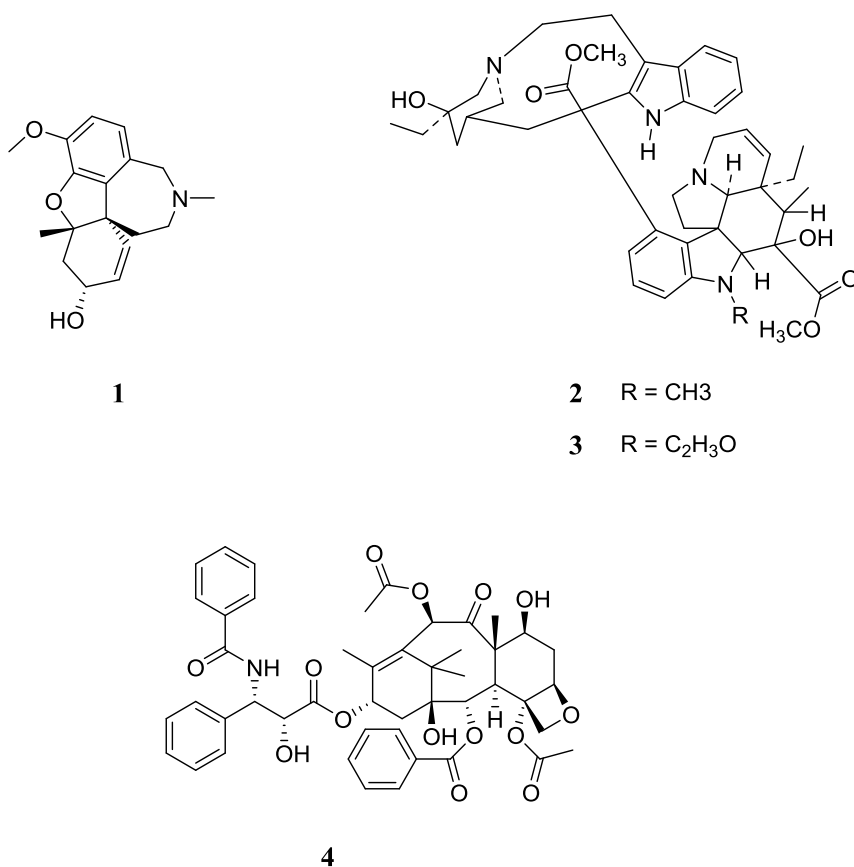


FIGURA 1.3 - Exemplos de fármacos isolados de plantas.

Além disto, as substâncias naturais também são utilizadas como protótipos para modificações estruturais visando a otimização das suas propriedades farmacológicas e bioquímicas, surgindo novas arquiteturas

moleculares semissintéticas utilizadas para diversas patologias, como os exemplificados na FIGURA 1.4, o derivado da vimblastina conhecido como vinorelbina (**5**) utilizado no tratamento de câncer de mama, da mesma forma o topotecano (**6**) derivado da camptotecina (**7**) isolado da planta *Camptotheca acuminata* também utilizado no tratamento de câncer e a cortisona (**8**) derivado da diosgenina (**9**) isolado da *Discorea floribunda* (HOSTETTSMANN *et al.*, 2003).

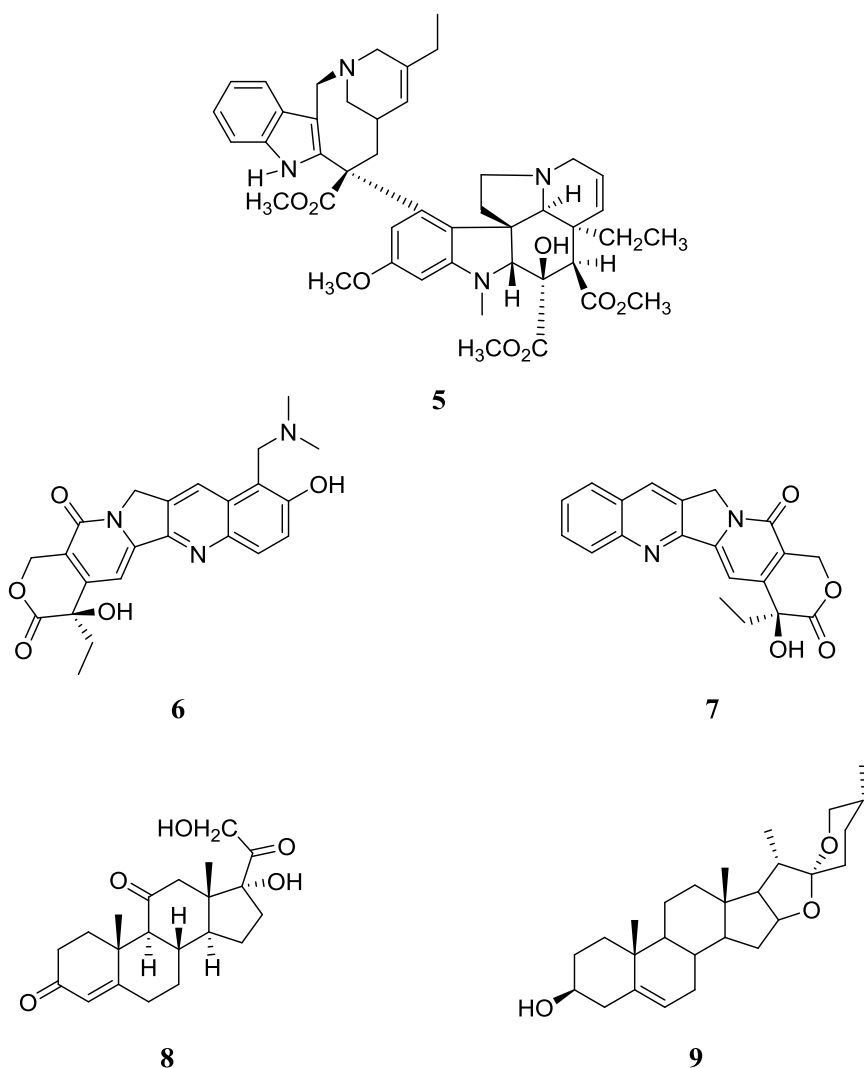


FIGURA 1.4 - Exemplos de fármacos naturais e semissintéticos.

Sendo as plantas fontes de substâncias estruturalmente funcionalizadas, complexas e incomuns e portanto um alvo extremamente atraente para estudos químicos e biológicos, uma das formas racionais no seu estudo na busca por potenciais novos fármacos pode ser através de uma triagem, onde uma grande variedade de extratos é utilizada para testes biológicos específicos a fim de se obter um ou mais metabólitos com potencial farmacológico. (BAKER *et al.*, 2007).

Este processo de obtenção de produtos naturais para um possível protótipo ou material de partida para síntese é, em geral, longo, caro e necessita de várias etapas. Algumas vezes o que se consegue são quantidades extraordinariamente pequenas do composto desejado e ainda este pode ser instável. É muito importante a escolha das técnicas cromatográficas adequadas a serem utilizadas neste caminho, assim como de um alvo biológico específico para a doença que se deseja atingir (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

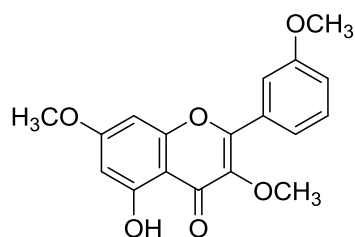
Diante deste contexto, a medicina natural com toda sua tradição é um conceito de mercado, a necessidade exige e a ciência busca a unificação com o que a natureza oferece, assim foi realizado o *screening* dos extratos das folhas e caules de cinco plantas da família Rutaceae utilizando como alvo biológico a enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*. Esta família de plantas já é estudada pelo grupo de pesquisa há vários anos e vem apresentando bons resultados de inibição enzimática frente a cisteíno proteases. Também realizou-se o ensaio dos metabólitos secundários isolados em catepsinas B e L, apresentando esta última identidade de 42,4% com a cruzaina; e em *Plasmodium falciparum*, já que várias plantas da família Rutaceae são utilizadas pela medicina popular para tratamento da malária.



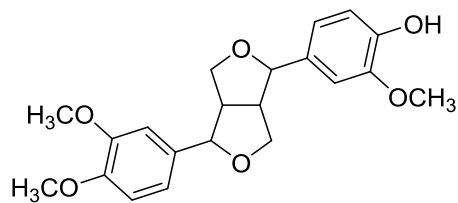
## 1.2 - FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae, pertencente à ordem Sapindales, é composta por aproximadamente 160 gêneros e mais de 1900 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e temperadas. (GROPPO *et al.*, 2008).

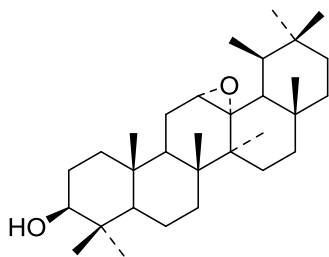
Esta família possui uma composição química bastante diversificada, destacando-se a presença de metabólitos secundários de grande diversidade estrutural, como: alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides, terpenoides e limonoides (FIGURA 1.5). Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica, despertando o interesse cada vez maior na investigação da fitoquímica desta família (WATERMAN & GRUNDON, 1983; WATERMAN, 1999).



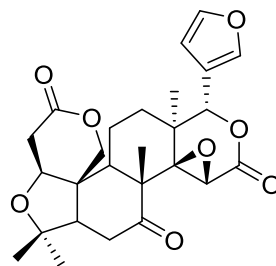
*Bosistoa floydii*  
(AUZI *et al.*, 1997)



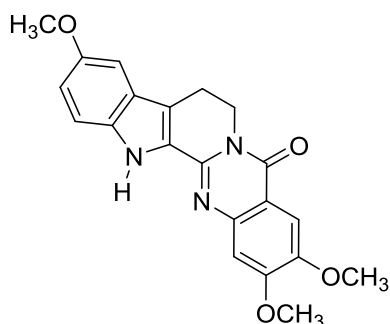
*Magnolia kobus*  
(IIDA *et al.*, 1982)



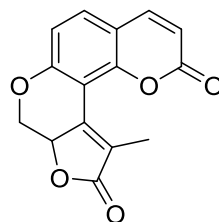
*Esenbeckia grandiflora*  
(JANUÁRIO *et al.*, 2009)



*Euxylophora paraensis*  
(ISIDORO *et al.*, 2012)



*Esenbeckia grandiflora*  
(JANUÁRIO *et al.*, 2009)



*Raiuia resinona*  
(ALBARICI *et al.*, 2010)

FIGURA 1.5 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de plantas da família Rutaceae.

Trabalhos do nosso grupo já apresentaram resultados de atividades antiparasitárias de extratos e substâncias isoladas de plantas da família Rutaceae, como destacado em VIEIRA *et al.* (2001) e PEREIRA *et al.* (2008) que demonstraram a atividade de extratos de plantas bem como de substância isoladas e semissintéticas contra à enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*.

Plantas da família Rutaceae bem como compostos isolados da mesma vêm se apresentando como potenciais inibidores de catepsinas como por

exemplo, alcaloides acridônicos isolados de *Swinglea glutinosa* apresentaram ótimos resultados (FIGURA 1.6) (SEVERINO *et al.*, 2011).

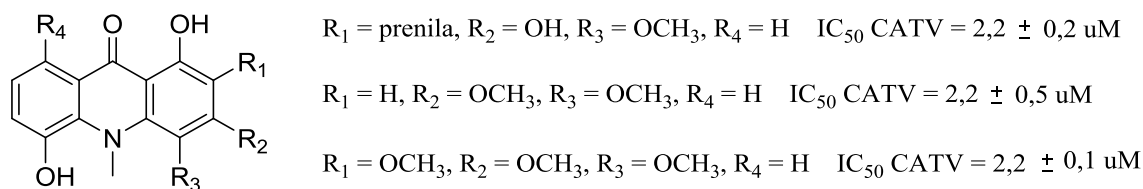


FIGURA 1.6 - Alguns alcaloides acridônicos isolados de *S. glutinosa* e seus respectivos valores de  $\text{IC}_{50}$  na catepsina V.

Como mencionado anteriormente, várias plantas desta família são utilizadas pela medicina popular no tratamento de malária, sendo assim tornou-se extremamente interessante o estudo de inibição do crescimento de *Plasmodium falciparum*, parasita causador da doença, por extratos e metabólitos secundários isolados de Rutaceae.

### 1.2.1 - GALIPEA JASMINIFLORA

Planta neotropical, encontrada no Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Nordeste (Bahia). Conhecida popularmente, dependendo da região, como carrapateiro, três-folhas-do-mato, mamoninha, chupa-ferro, guamixinga, jasmim-do-mato, quina-de-três-folhas, quina-falsa, quina-quina, ticoró e três folhas (PIRANI, 2014a).

Utilizada na medicina popular para dispepsias, infecções, malária, febre, adstringente e antidiarréico. Plantas do gênero apresentaram atividade contra leishmaniose, como por exemplo, o extrato bruto das cascas e raízes de *Galipea longiflora* Krause. Desta planta foram isolados uma série de alcaloides patenteados como chimaninas. Nome dado em homenagem aos índios bolivianos chimanos que utilizavam o pó da casca desta planta como cataplasma

em lesões de leishmania cutânea e com isto entusiasmaram o estudo desta planta por um grupo Frances liderado por Alain Fournet (FOURNET; 1994).

### **1.2.2 - *ESENBECKIA FEBRIFUGA***

Planta encontrada no cerrado e da mata atlântica, encontrada no Nordeste (Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina). Conhecida popularmente, dependendo da região, como laranjeira-do-mato, mamoinha, três-folhas e três-folhas-do-mato (PIRANI, 2014b).

*E. febrifuga* é utilizada na medicina popular contra malária, Dolabela (2008) descreve o isolamento de cumarinas, alcaloides e limonoides, e a atividade antimalárica do extrato etanólico e de alguns compostos isolados desta planta.

### **1.2.3 - *ESENBECKIA GRANDIFLORA***

Planta encontrada na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, encontrada no Norte (Acre, Rondônia), Nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul). Conhecida popularmente, dependendo da região, com chupa-ferro, guaxipita, guaxupita e pitaguará-amarelo (Sudeste e Sul) e como mamonarana (Norte) (PIRANI, 2014c).

Essa planta já foi estudada fitoquimicamente levando ao isolamento de terpenos, cumarinas, e alcaloides (JANUARIO, 2009).

#### **1.2.4 - ZANTHOXYLUM FAGARA**

*Z. fagara* é encontrada na Amazônia, cerrado, mata atlântica e pantanal, encontrada no Norte (Roraima, Rondônia), Nordeste (Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (PIRANI, 2014d).

O gênero *Zanthoxylum* compreende mais de 200 espécies e encontra-se distribuído em todo mundo. Várias espécies são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças cardiovasculares, tuberculose, malária, para aliviar dor de dente e contra mordida de cobra (FACUNDO, 2005).

#### **1.2.5 - METRODOREA STIPULARIS**

*M. stipularis* é uma planta endêmica do Brasil, encontrada no cerrado e mata atlântica, encontrada Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo). É conhecida popularmente, dependendo da região, como arco-de-pipa, laranjeira-do-mato e limoeira-do-mato (Centro-Oeste), caputuna e cataguá (Sudeste) (PIRANI, 2014e).

O gênero *Metrodorea* foi pouco estudado quimicamente, MULLER (1995) descreve metabolitos secundários isolados de *M. nigra* (FIGURA 1.7).

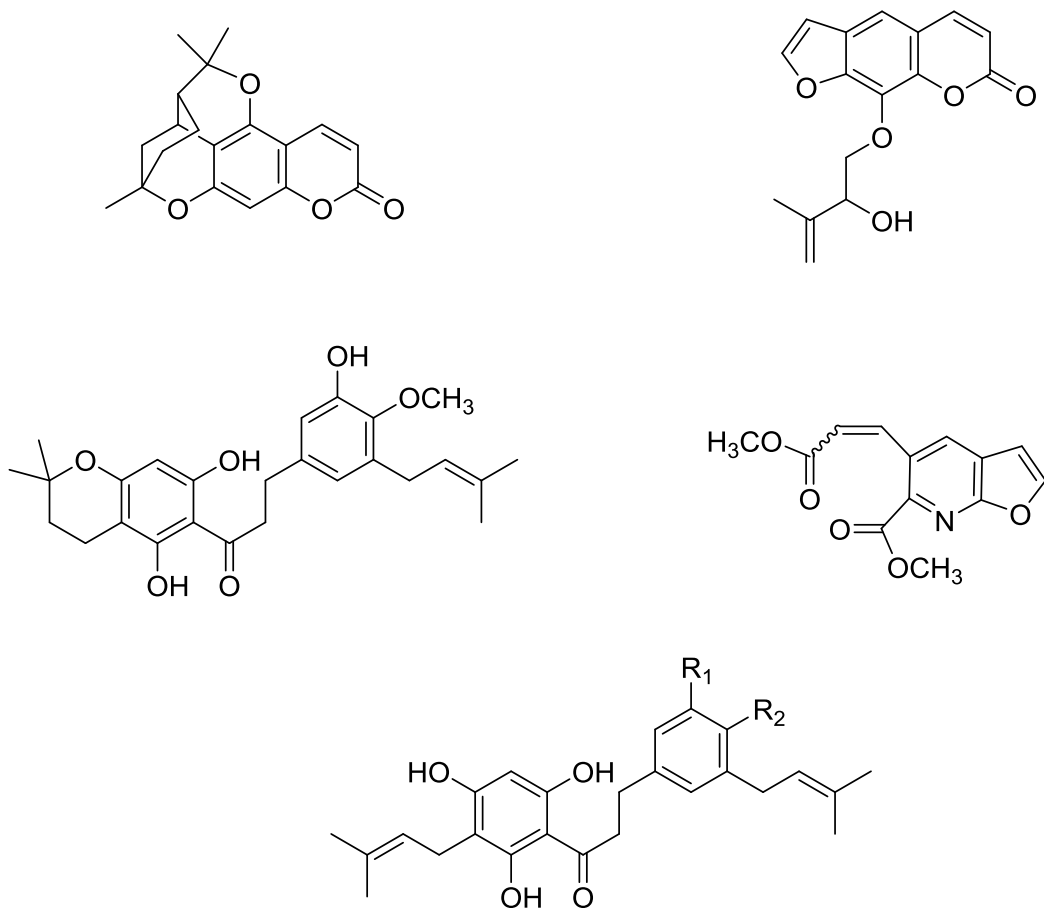


FIGURA 1.7 - Metabólitos secundários isolados de *M. nigra*.

BAETAS (1999) descreve os metabólitos secundários isolados de *M. flavida* mostrados na FIGURA 1.8.

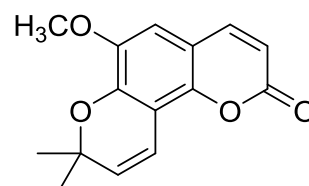
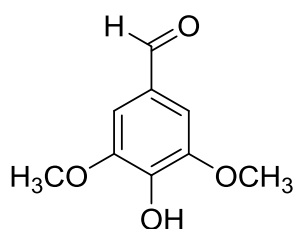
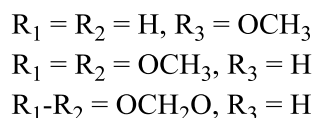
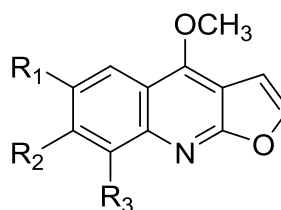
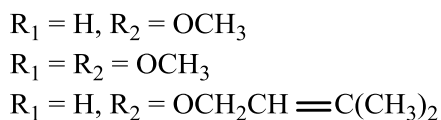
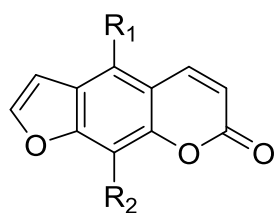


FIGURA 1.8 - Metabólitos secundários isolados de *M. flavida*.

*M. stipularis* ainda não foi estudada quanto à suas possíveis atividades biológicas e também, até o momento, não há registros de metabólitos isolados desta planta.

### 1.3 - DOENÇA DE CHAGAS

Em 1909, o pesquisador brasileiro Carlos Chagas descreveu toda etiologia da doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) (GELB *et al.*, 2002).

Em 2010, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC), de Atlanta nos Estados Unidos, estimou que entre 8 milhões de pessoas foram infectadas pela doença na América Latina, com mais de 100 milhões em área risco, o que leva a 25% da população, principalmente nas Américas do Sul e Central. Estima-se que o prejuízo econômico anual atribuído a esta doença seja

da ordem de 18 bilhões de dólares (FIGURA 1.9) (GELB e HOL, 2002; SAID *et al.*, 2011)

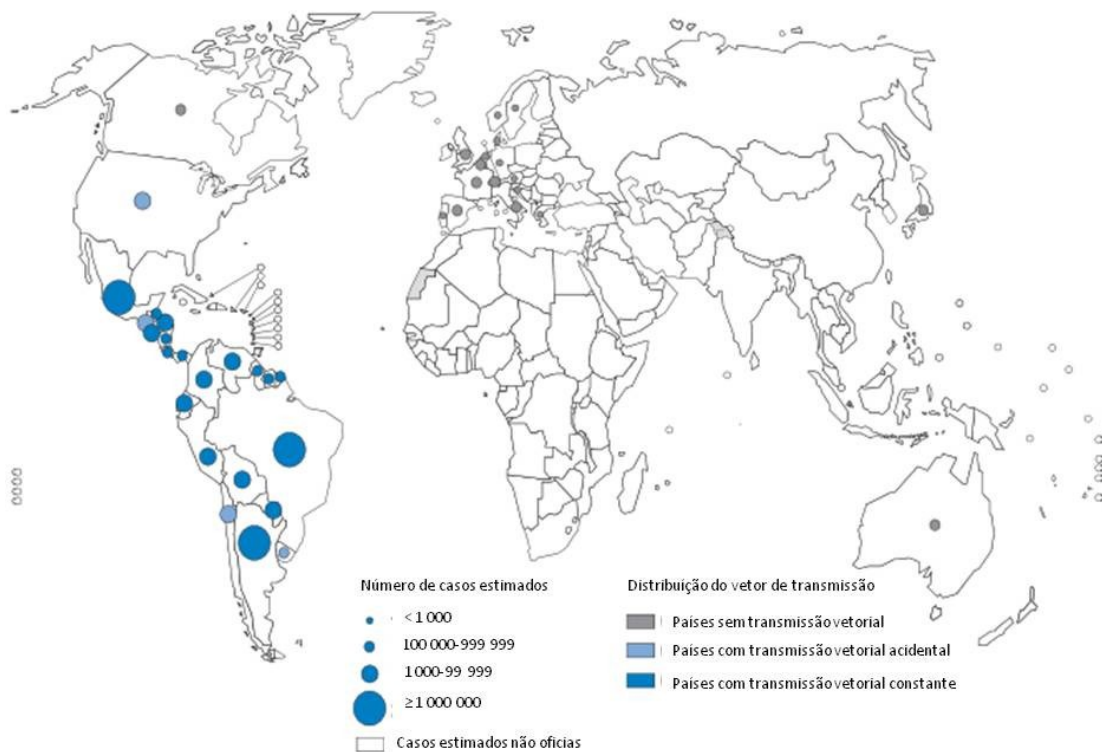


FIGURA 1.9 - Distribuição mundial de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* e do vetor de transmissão entre 2006-2009 (Adaptado de [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf)).

A transmissão ocorre através das fezes da fêmea do vetor “barbeiro” (mosquito da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae), que ataca o homem à noite para lhe sugar o sangue. Os tripomastigotas eliminados nas fezes do vetor, durante ou logo após o hematofagismo, penetram pelo local da picada ocorrendo a contaminação. Em seguida, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que se multiplicam e ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas que lisam a célula entrando na corrente sanguínea. Estes tripomastigotas seguem



pela corrente circulatória atingindo outras células de tecido ou órgão podendo, ser destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro ou ser ingeridos por um novo inseto restaurando o ciclo. (COURA, 2005; TYLER e ENGMAN, 2010).

Portanto, ao longo de seu ciclo vital o agente etiológico da doença, para adaptar-se a diferentes situações bioecológicas, assumindo diferentes formas evolutivas: tripomastigota (forma infectante para os vertebrados), amastigota (forma de replicação celular) e epimastigota (forma de reprodução) (COURA, 2005; BRENER, 1997).

A doença ocorre em duas fases clínicas: aguda e crônica, a primeira tem duração de aproximadamente dois meses, fase de alta parasitemia no sangue. Na maioria dos casos assintomática ou com a presença de sintomas não específicos sendo a doença dificilmente identificada neste estágio; na segunda fase os parasitas atingem os tecidos, principalmente o coração, esôfago e cólon. Diferentes formas clínicas podem ser observadas: forma assintomática - a forma mais frequente - é normalmente encontrado imediatamente após a fase aguda e ao longo da vida, na maioria dos casos; a forma cardíaca ocorre em até 30% dos pacientes, com perturbações do sistema do coração, causando arritmia, perturbações do músculo do coração, insuficiência cardíaca e embolias; a forma de lesões como alargamento do esôfago e do cólon; e uma forma mista (as duas citadas anteriormente) que afeta até 10% dos pacientes (WHO, 2010).

A melhor forma de controle da doença é a prevenção onde a eliminação do inseto vetor pode ser feita por melhorias em condições de habitação, saneamento básico ou por meio de inseticidas. (MOCAYO e ORTIZ, 2006).

O tratamento do ponto de vista sintomático, procura amenizar as diversas manifestações clínicas da doença, como a administração de diuréticos no caso de insuficiência cardíaca congestiva. Do ponto de vista etiológico, ao

longo dos anos, uma grande variedade de substâncias foi investigada com o objetivo de estabelecer uma quimioterapia mais efetiva, os ensaios terapêuticos com nifurtimox foram iniciados em 1965 e com benznidazol em 1971 (FIGURA 1.10), que são, até hoje, os únicos fármacos utilizados, entretanto o primeiro não é comercializado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (FERREIRA, 1990; FAIRLAMB, 1999; CASTRO, 1993).

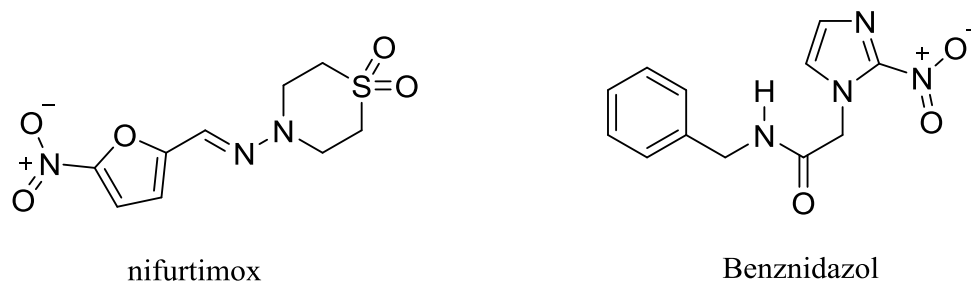


FIGURA 1.10 - Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.

Ambos os fármacos mencionados causam sérios efeitos colaterais, tais como anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatites; além de serem muito pouco eficazes na fase crônica da doença. Como é necessário um alto número de doses e o longo período de administração destes fármacos para a obtenção de sucesso com o tratamento, estes efeitos colaterais são extremamente preocupantes. Portanto, atualmente, o tratamento é mais sintomático do que etiológico (FERREIRA, 1990; FAIRLAMB, 1999; CASTRO, 1993).

Apesar dos esforços na erradicação da ploriferação do *T. cruzi* e na busca de agentes tripanomicidas, esta doença ainda atinge milhões de pessoas na América Latina e grande parte da população está em áreas consideradas de risco. E também, não se tem registro de nenhum outro fármaco desde a introdução do benznidazol e nifurtimox para o tratamento da doença.

Diante deste cenário, é evidente a necessidade da busca de princípios ativos que possam auxiliar na quimioterapia desta doença. Neste aspecto é necessária escolha de alvos apropriados, que devem ser importantes no ciclo da doença. Existem vários mecanismos de ação em estudo para identificação de alvos biomacromoleculares capazes de eliminar o *T. cruzi*. A enzima cruzipáína (cruzaína) é um alvo biológico que se encaixa neste ponto, ela participa da via de digestão proteolítica do parasita, tendo papel essencial no seu processo vital.

### **1.3.1 - A ENZIMA CRUZAÍNA**

Essencial em várias etapas do desenvolvimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi*, a enzima cruzipáína é expressa durante todo o ciclo de vida do parasita. Devido à sua relevância e validação biológica ela está entre os alvos mais estudados para o desenvolvimento de novas quimioterapias antichagásicas com elevado potencial de desenvolvimento clínico.

A enzima cruzipáína (forma expressa recombinantemente), também conhecida como cruzipáína (forma nativa) é uma das principais cisteíno proteases do *T. cruzi*, parasita causador da Doença de Chagas. Ela está ligada a vários processos vitais do parasita, sendo responsável pela maior parte da atividade proteolítica nos estágios do seu ciclo de vida, está envolvida em sua penetração na célula hospedeira e na digestão de hemoglobinas como mecanismo de defesa (URBINA e DOCAMPO, 2003).

A cruzipáína é então uma cisteíno protease da família da papaína, tem basicamente dois domínios, um deles formado predominantemente de  $\alpha$ -hélice e o outro consiste em interações de folhas- $\beta$  antiparalelas, o sítio ativo encontra-se na interface entre os dois domínios, onde está presente a tríade catalítica, resíduos dos aminoácidos Cys25, His159 e Asn175 (SAID, 2011).

ENGEL (1998a; 1998b) evidencia que a inibição desta enzima inativa os estágios extracelular epimastigotas e amastigotas no interior dos macrófagos, indicando um papel enzimático fundamental na sobrevivência do parasita.

A enzima cruzaina é um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos tripanomicidas. Vários estudos envolveram a busca de inibidores e alguns já se mostraram ativos em modelos animais inibindo o ciclo de vida do parasita, como o K777 (FIGURA 1.12), composto que demonstrou atividade potente contra o parasita e que incentiva a continuidade de pesquisas neste fundamento. Desta forma a escolha desta enzima como alvo molecular para doença de Chagas parece muito apropriada (CHOE *et al.*, 2005, SAID, 2011).

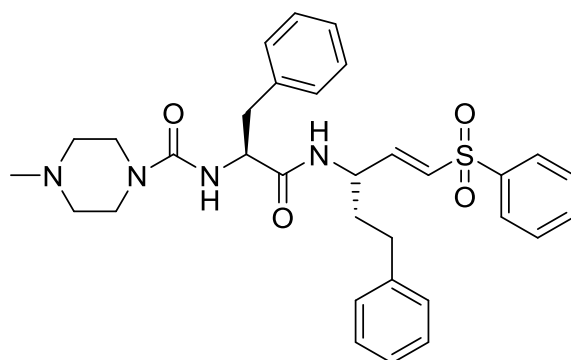


FIGURA 1.11- Estrutura do K777 inibidor da enzima cruzaina.

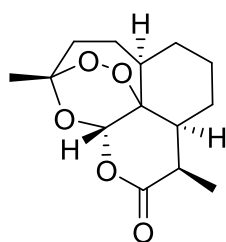
## 1.4 - MALÁRIA

Organização Mundial da Saúde (OMS) informa que 3,4 bilhões de pessoas estão em risco de malária no mundo e que 207 milhões de casos de malária com 627 mil mortes ocorreram no mundo em 2012.

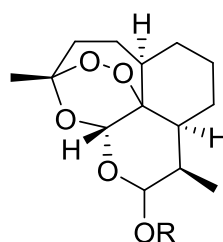
A malária é causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, sendo *P. falciparum* e *P. vivax* os mais importantes, devido ao primeiro causar malária grave levando a morte e o segundo de ampla distribuição porque sobrevive em

altas altitudes e temperaturas mais baixas. A transmissão ocorre pela picada de mosquitos fêmea do gênero *Anopheles* (OMS, 2013).

Para o controle da doença estão envolvidas a parte preventiva como utilização de inseticidas para controle do inseto vetor e quimioprevenção a populações mais vulneráveis, principalmente mulheres grávidas e crianças. Na parte de tratamento em que um rápido diagnóstico é de extrema importância, assim como a escolha do medicamento para cada paciente, são utilizados a artemisina (isolada da planta *Artemisia annua*) e seus derivados arteméter, arteéter e artesunato de sódio, a quinina (isolada da planta *Cinchona spp*) e seus derivados a primaquina, coloroquina e mefloquina (FIGURA 1.13) (OMS, 2013; BARREIRO & FRAGA, 2001).



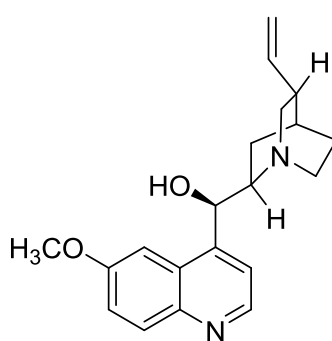
artemisinina



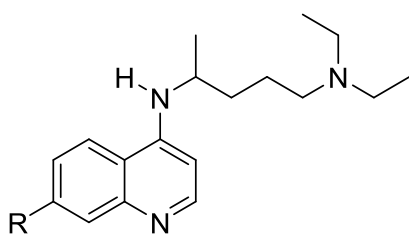
R = CH<sub>3</sub> (artemeter)

R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (arteeter)

R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Na (artesanato de sódio)

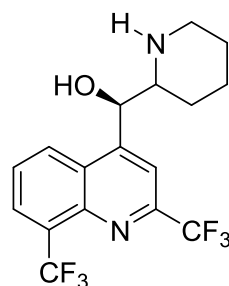


quinina



R = Cl (cloroquina)

R = OCH<sub>3</sub> (primaquina)



mefloquina

FIGURA 1.12 - Estrutura dos fármacos utilizados no tratamento da malária.

A resistência adquirida pelo *Plasmodium falciparum* contra os medicamentos antimaláricos de amplo uso, requer a descoberta de novos fármacos eficientes, preferencialmente sem os efeitos colaterais indesejáveis. Os dois antimaláricos naturais citados, artemisina e quinina, podem ser utilizados

como exemplos marcantes numa demonstração clara do enorme potencial dos produtos naturais como fontes de fármacos e como protótipos para produção de substâncias semissintéticas mais ativas e com efeitos nocivos reduzidos (BRAZ FILHO, 2010).

## **1.5 - O CANCER E AS CATEPSINAS**

As catepsinas são enzimas que estão distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (D e E), serino peptidases (A e G) e cisteíno peptidases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X), sendo estas conhecidas por degradarem aleatoriamente proteínas dentro dos lisossomos. Elas também se acumulam em diferentes organelas e participam de processos celulares mais especializados, estando envolvidas em diversas situações patológicas, como na progressão de tumores malignos e nas metástases, doenças infecciosas, artrite reumatoide, artrose, osteoporose e aterosclerose (TURK *et al.*, 2000; BROMME & KALETA, 2002; SLOANE *et al.*, 1994; FUSETANI *et al.*, 1999; KOMINAMI *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 2009; YASUDA *et al.*, 2005).

Os tumores malignos são, em sua maioria, não encapsulados e invasivos, o que dificulta a sua ressecção cirúrgica. A invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando assim, a oportunidade de disseminação ou metástase. Evidências sugerem que as catepsinas B e L podem facilitar a progressão de tumores. Estudos de expressão destas enzimas em diferentes tipos de câncer revelaram um aumento da expressão destas catepsinas em humanos. (COTRAN *et al.*, 2000; LANKELMA *et al.*, 2010; VASILJEVA, *et al.*, 2007).

Estudos e investigações clínicas verificaram que a catepsina B é um indicador altamente confiável para o diagnóstico e o prognóstico do câncer metastático e invasivo. Sua alta atividade é frequentemente observada em vários tumores, quando se localiza na membrana plasmática das células tumorais para

garantir a degradação da matriz extracelular e lâmina basal nos processos de invasão (COUTO *et al.*, 2007; TALIERI *et al.*, 2004).

HAZEN *et al.* (2000) descreve que a inibição *in vivo* das atividades da catepsina B, retarda o início de crescimento de tumores e diminui o processo de metástase, podendo ser os inibidores desta catepsina potenciais anticancerígenos, principalmente em relação a este grande problema de metástase relacionado a esta doença (FUSETANI *et al.*, 1999).

A catepsina L está envolvida em processos patológicos como reabsorção óssea, metástase e artrite reumatoide. Sua deficiência está associada ao processo de desenvolvimento do câncer de pele e alterações na expressão desta enzima foi observados em tumores ósseos (TURK e GUNCAR, 2003; LETO *et al.*, 2010).

Todas as cisteíno proteases têm em comum o sítio ativo formado pelos resíduos dos aminoácidos cisteína, histidina e glutamina. As enzimas humanas, catepsinas L e B, possuem um alto grau de identidade com a cruzaina, sendo de interesse a avaliação dos compostos isolados, no estudo bioquímico tendo como alvo a cruzaina, também em catepsinas (DARDONVILLE, 2005).



# OBJETIVOS

## 2 - OBJETIVOS

A proposta do trabalho foi realizar o estudo bioguiado de extratos de plantas da família Rutaceae na busca de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade dos compostos isolados nas catepsinas B e L e na inibição do crescimento do parasita *Plasmodium falciparum*.

### 2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- Ensaiar os extratos das diferentes espécies da família Rutaceae na enzima cruzaina de *T. cruzi*;
- Analisar as frações destes extratos promissores visando o isolamento dos metabólitos responsáveis pela inibição enzimática;
- Isolar e identificar estes metabólitos;
- Ensaiar os metabólitos isolados nas catepsinas B e L.
- Ensaiar estes metabólitos na inibição do crescimento do *P. falciparum*.

**PROCEDIMENTOS**  
**EXPERIMENTAIS**

### 3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

##### Métodos Cromatográficos:

Para o fracionamento e isolamento das substâncias presentes nos extratos e frações foram utilizadas várias técnicas cromatográficas:

- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA): fase estacionária: sílica gel com F<sub>254</sub>, em folhas de alumínio da MERK.

- Cromatografia em coluna (CC): fase estacionária sílica gel 60 (70-230 *mesh*) denominada sílica comum e sílica gel 60 (230-400) denominada sílica flash.

- Cromatografia de exclusão em coluna (CEC): Sephadex LH-20 – Amershan Pharmacia Biotech AB.

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Shimadzu LC-10AD (Preparative Liquid Chromatograph), coluna de fase estacionária C-18 ODS Phenomenex (150 x 4,6 mm).

Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM): CG – 17A Shimadzu, GCMS – QP 5000 Shimadzu, Coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm), Ionização por impacto eletrônico.

##### 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:

- Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar;  
- Solventes de grau cromatográfico Tedia utilizados para análises de CLAE e CG-EM.

Solventes deuterados ALDRICH utilizados nas análises espectroscópicas.

#### Equipamentos:

- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos no aparelho Bruker Avance III - 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para o carbono).

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

- 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 e BÜCHI, Rotavapor ELB1, equipado com banho BÜCHI 461 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25.

### **3.2 - COLETA DO MATERIAL VEGETAL**

As diversas espécies, *Esenbeckia febrifuga* (EF), *Galipea jasminiflora* (GJ) e *Metrodorea stipularis* (MS) foram coletadas em 2010 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em São Paulo e as exsicatas lá depositadas sob os números 54741, 49484 e 44005, respectivamente, *Esenbeckia gradiflora* (EG) foi coletada em 2001 na cidade de Antônio João no Mato Grosso do Sul e *Zanthoxylum fagara* (ZF) em 2000 na cidade de Guarapari no Espírito Santo.

### **3.3 - PREPARO DOS EXTRATOS**

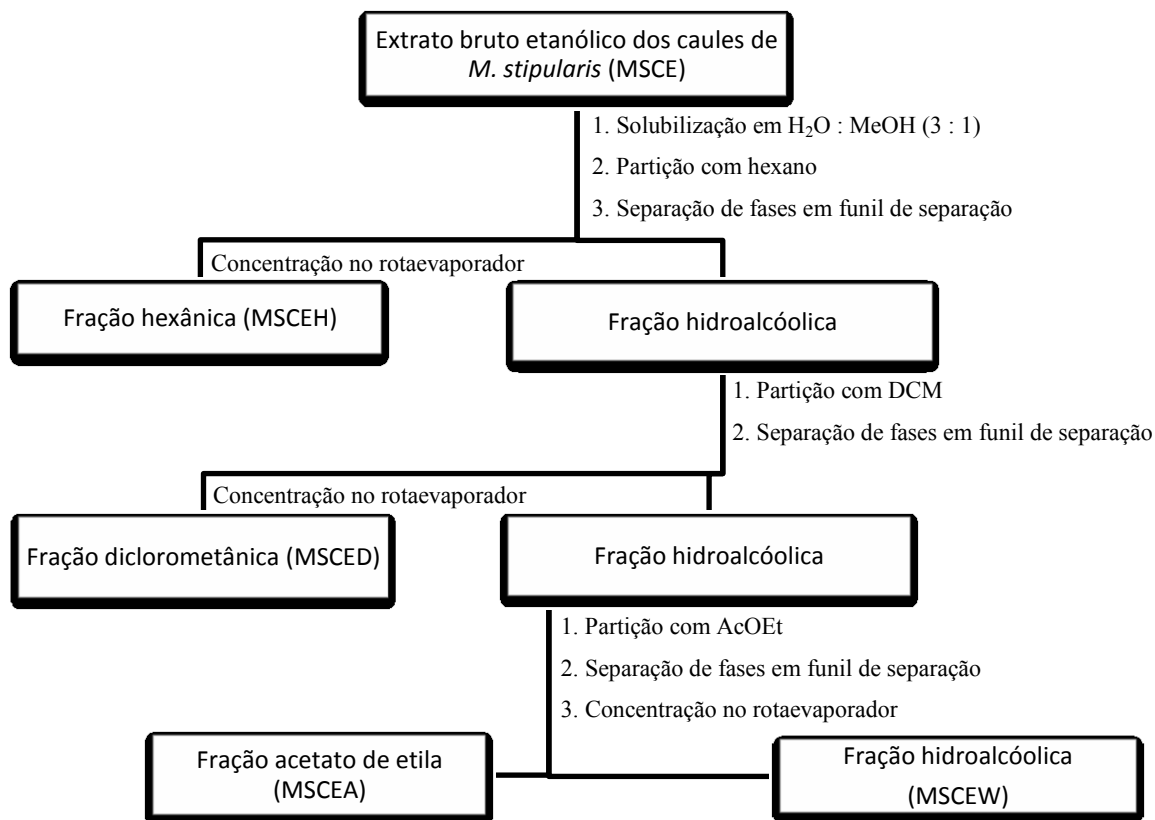
Após serem coletados, caules e folhas foram lavados com água e submetidos à secagem em estufa a 40°C, sob ventilação, por um período de sete dias. Após a secagem estes foram moídos separadamente em moinho de facas e

foram submetidos separadamente à maceração com etanol por quatro vezes com intervalo de 72 horas. A cada intervalo de 72 horas o líquido extraído foi filtrado e posteriormente concentrado sob pressão reduzida, em rota evaporador rotatório (35°C) para a obtenção dos respectivos extratos etanólicos. De *Galipea jasminiflora* também foram coletados os frutos, estes foram extraídos com etanol à frio, depois macerados e extraídos novamente com acetona à frio (massa de todos os extratos estão descrita na TABELA 3.1).

Os extratos brutos foram posteriormente submetidos a partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem de polaridade: hexano (H), diclorometano (D) e acetato de etila (A), após serem solubilizados, separadamente, em uma mistura de água:metanol (3:1), dando origem a cada partição separadamente e uma partição final hidrometanólica (ESQUEMA 3.1), cujas massas obtidas encontram-se na TABELA 3.1.

<b>Plantas</b>	<b>Parte Vegetal</b>	<b>Massa Moída (g)</b>	<b>Massa Extrato Bruto (g)</b>	<b>Massa das Frações (g)</b>				
EF	Caules	400	20	H 2	D 5	A 3	W 8	
	Folhas	400	15	H 3	D 4	A 4	W 6	
EG	Caules	800	35	H 5	D 8	A 10	W 12	
	Folhas	900	45	H 7	D 10	A 13	W 15	
GJ	Caules	400	18	H 2	D 3	A 5	W 8	
	Folhas	350	20	H 2	D 2	A 7	W 8	
	Frutos	50	Etanólico: 4 Acetona: 2	H 0,5 H 0,3	D 0,6 D 0,5	A 1,4 A ---	W 1,5 W 1,2	
MS	Caules	600	30	H 2	D 9	A 11	W 13	
	Folhas	500	25	H 2	D 6	A 8	W 9	
ZF	Caules	300	20	H 2	D 4	A 5	W 10	
	Folhas	450	25	H 4	D 6	A 6	W 9	

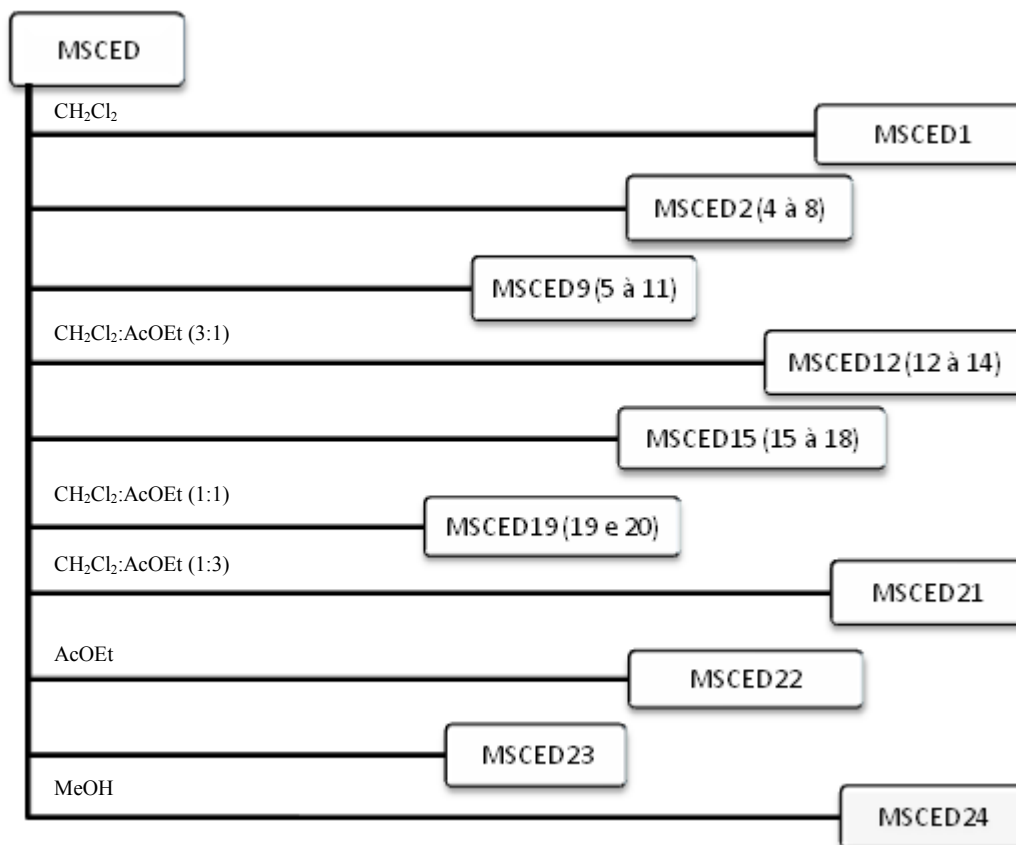
TABELA 3.1 - Massas dos extratos brutos obtidos e frações.



ESQUEMA 3.1 - Fracionamento do extrato bruto etanólico de *M. stipularis*.

### 3.4 - ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

Para realização do estudo bio guiado por atividade, todos os extratos brutos e frações foram submetidos a ensaio frente à enzima cruzaina, a fração com atividade escolhida para iniciar-se o trabalho foi a diclorometânica do caule de *M. stipularis*, que foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi=5\text{cm}$  x  $h=22\text{cm}$ ) gradiente, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e mistura com AcOEt. Após comparação das frações por cromatografia em camada delgada (CCD), estas foram agrupadas e o ensaio foi novamente realizado para prosseguir com o estudo daquelas frações de maior poder inibitório (ESQUEMA 3.2).

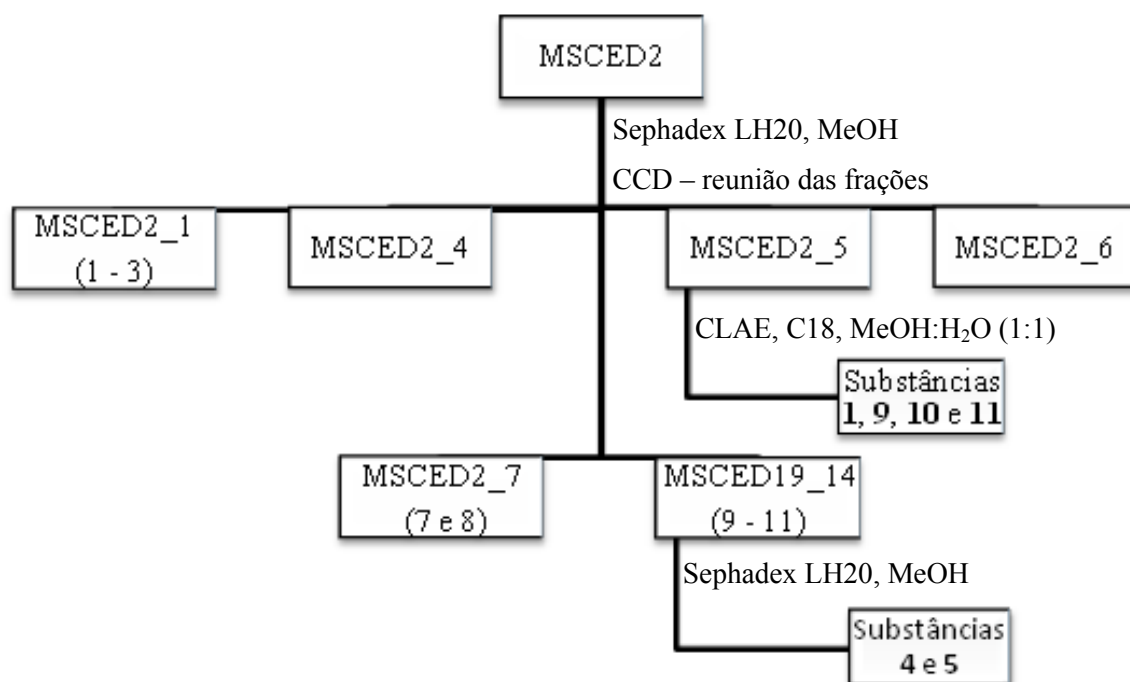


ESQUEMA 3.2 - Cromatografia da fração MSCED.

Praticamente todas as frações apresentaram atividade inibitória enzimática acima de 90% (100 µg/mL) e portanto todas elas foram trabalhadas a fim de se isolar os metabólitos secundários responsáveis pela inibição.

A fração MSCED2 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol. Da fração MD2\_5, isolou-se quatro substâncias (**1**, **9**, **10** e **11**), que foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $C_{18}$  ( $\phi=1\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), fluxo de 4 mL/min. MD2\_9 foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária Sephadex LH20 e como eluente metanol e levou ao isolamento das substâncias **4** e **5** (ESQUEMA 3.3).

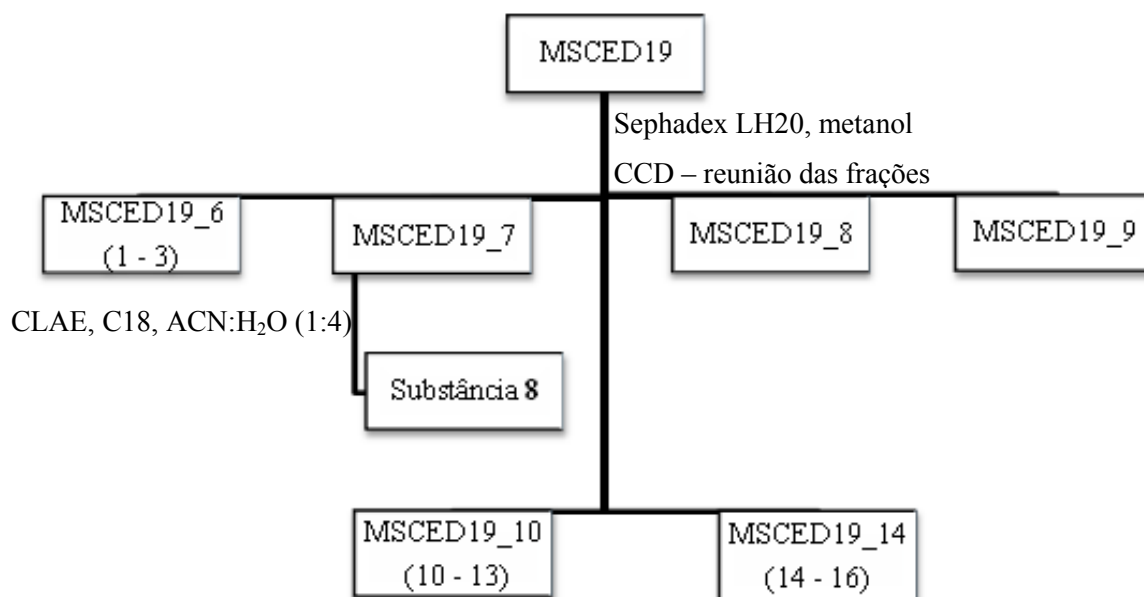




ESQUEMA 3.3 - Cromatografia da fração MSCED2.

A fração MSCED12 e MSCED15 foram submetidas à duas cromatografias em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol, levando ao isolamento das substâncias 6 e 7, respectivamente. MSCED15\_7 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária Sephadex LH20 e como eluente metanol e levou ao isolamento das substância 17.

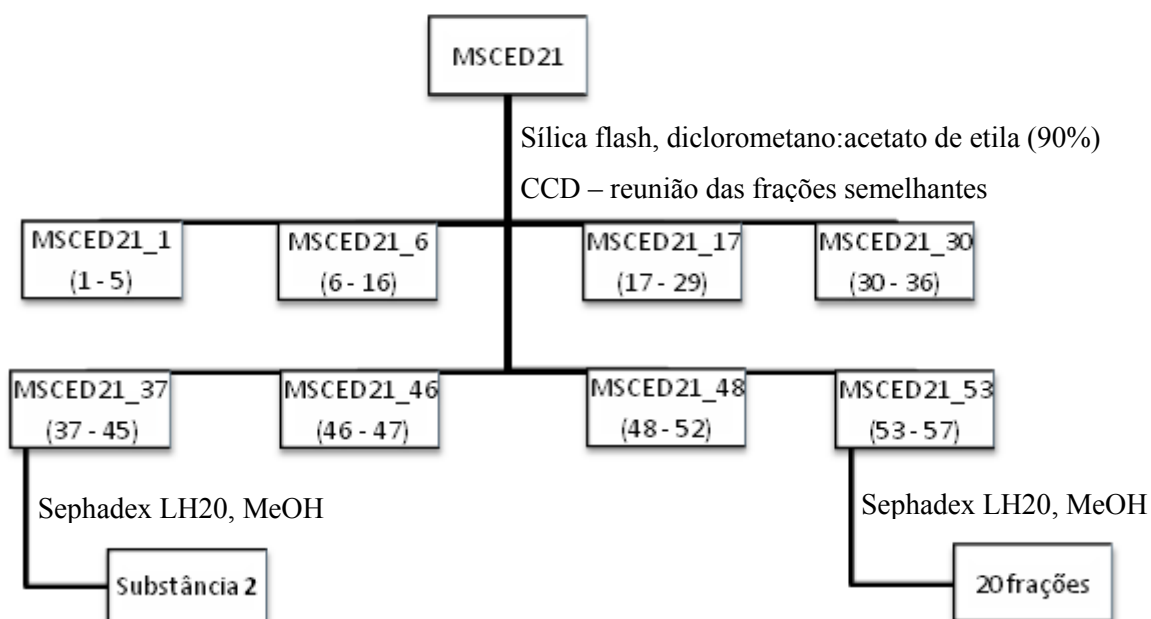
A fração MSCED19 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária Sephadex LH20 e como eluente MeOH. MSCED19\_7, foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $C_{18}$  ( $\varphi=1\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O (1:4), fluxo de 3 mL/min, levando ao isolamento da substância 8 (ESQUEMA 3.4).



ESQUEMA 3.4 - Cromatografia da fração MSCED19.

A fração MSCED20 foi submetida à duas cromatografias em coluna ( $\varphi=2\text{cm} \times h=30\text{cm}$ ) utilizando como fase estacionária Sephadex LH20 e como eluente metanol, e posteriormente foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $C_{18}$  ( $\varphi=1\text{cm} \times h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O (1:4), fluxo de 3 mL/min, levando ao isolamento da substância **8** novamente.

A fração MSCED21 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=3\text{cm} \times h=23\text{cm}$ ), isocrática, utilizando como fase estacionária sílica comum e como fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (9:1), que teve as frações agrupadas após análise por CCD. MSCED21\_37 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm} \times h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol, e levou ao isolamento da substância **2**. A fração MSCED21\_53 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm} \times h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol, dando origem a 20 frações (ESQUEMA 3.5).



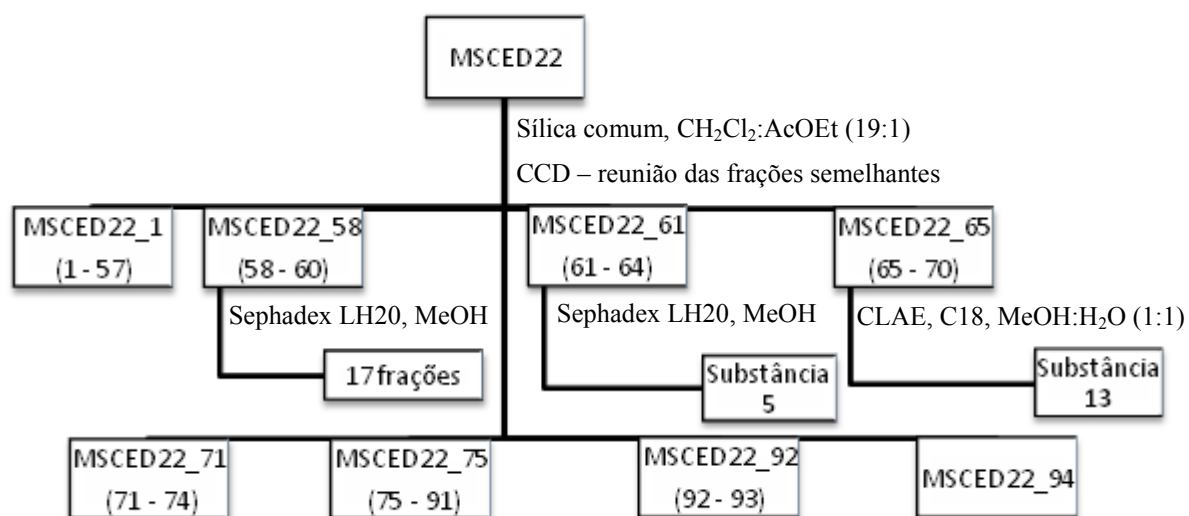
ESQUEMA 3.5 - Cromatografia da fração MSCED21.

A fração MSCED21\_53\_12 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), isocrática, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , esta levou ao isolamento da substância **15** e **16**.

A fração MSCED21\_53\_13 foi submetida primeiramente à cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol, dando origem a 20 frações e a MSCED21\_53\_13\_19 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $\text{C}_{18}$  ( $\varphi=1\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel  $\text{MeOH}:\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5), fluxo de 3,5 mL/min, levando ao isolamento das substâncias **10**, **11** e **18**.

As frações MSCED21\_53\_14 e MSCED21\_53\_15, foram submetidas a cromatografia em coluna ( $\varphi=2\text{cm}$  x  $h=28\text{cm}$ ), isocrática, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (39:1), levando ao isolamento da substância **16**.

A fração MSCED22 (ESQUEMA 3.6) foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi=3,5\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), isocrática, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (19:1), após análise por CCD as frações semelhantes foram agrupadas. A fração MSCEDD22\_58 foi submetida a cromatografia em coluna ( $\phi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ) utilizando como fase estacionária Sephadex e como fase móvel MeOH, foram obtidas 17 frações. MSCED22\_61 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol levando novamente ao isolamento da substância **5**. MSCED22\_65 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $\text{C}_{18}$  ( $\phi=1\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1), fluxo de 3 mL/min levando ao isolamento da substância **13** (ESQUEMA 3.6)



ESQUEMA 3.6 - Cromatografia da fração MSCED22.

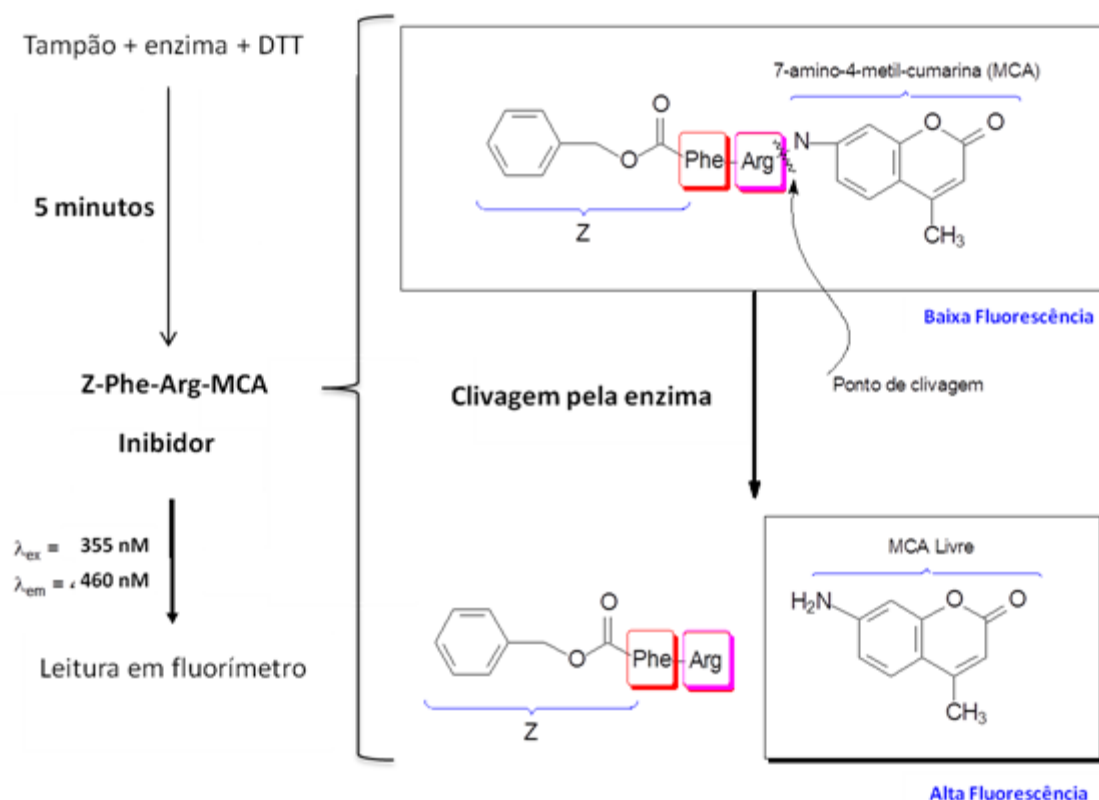
MSCEDD22\_58\_16 foi submetida à cromatografia em coluna ( $\phi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ) isocrática utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (49:1) levando ao isolamento das substância **15**. MSCED22\_58\_17 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando como fase estacionária  $\text{C}_{18}$  ( $\phi=1\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ) e como fase móvel

MeOH:H<sub>2</sub>O (3:2), fluxo de 3 mL/min, levando ao isolamento das substâncias **3**, **10**, **11** e **12**.

A amostra MSCED23 foi submetida à três cromatografias em coluna ( $\phi=2\text{cm}$  x  $h=30\text{cm}$ ), utilizando como fase estacionária sephadex LH20 e como eluente metanol, a primeira levou novamente ao isolamento da substância **14** e após a terceira novamente ao isolamento da substância **6**.

### 3.5 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos realizados foram baseados no ESQUEMA 3.7, no qual a inibição da enzima é observada pelo fato de não haver clivagem do substrato (de baixa fluorescência) e com isso não há formação do fragmento cumarínico de alta fluorescência.



ESQUEMA 3.7 - Metodologia geral do ensaio enzimático.

### 3.5.1 - CRUZAÍNA

O ensaio foi realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com o auxílio do Dr. Mario Augusto Izidoro.

Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Aldrich Chemical Co. e Sigma, e as medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F2500. A atividade inibidora foi medindo-se a hidrólise do substrato, o peptídeo sintético fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC (benziloxycarbonil-fenilalanil-arginina-4-metil-7-coumarilamida). A enzima foi ativada durante 5 min com 5  $\mu$ L de DTT em tampão fosfato de sódio (pH 6,3) a 37 °C, após adicionou-se 2  $\mu$ L do substrato. As experiências foram realizadas em triplicata (em cubetas de quartzo) e o volume final da mistura de reação foi de 1 mL, mantidos sob agitação e com fendas de excitação em 380 nm, e de emissão de 460 nm. Todos os inibidores foram testados em 5 concentrações crescentes para determinação do IC<sub>50</sub>. Os ensaios de controle foram realizadas sem inibidores (controle negativo) e na presença do inibidor irreversível de peptidase de cisteína E-64 (controle positivo). Todos os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear, utilizando o programa GraFit 5.

### 3.5.2 - CATEPSINAS

Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos pela Aldrich Chemical Co. e Sigma, e as medidas cinéticas foram realizadas num fluorímetro Molecular Devices Spectra MAX M3. A atividade inibidora foi medida utilizando o substrato fluorimétrico Z-Phe-Arg-AMC (benziloxycarbonil-fenilalanil-arginina-4-metil-7-coumarilamida) sintético a uma concentração de 185  $\mu$ M para cat B (Km 123  $\mu$ M, de acordo com REN *et al.* (2013) Km 157,5  $\mu$ M) e 10  $\mu$ M para cat L (Km de 1,2  $\mu$ M, de acordo com MASON *et al.* (1985) Km 2,4  $\mu$ M). A enzima foi ativada durante 5 min com DTT e tampão acetato (pH 5,5) a 37 °C, e, em seguida, a mistura de reação foi

incubada durante 5 min com a amostra. As experiências foram realizadas em triplicata (em placas de 96 poços pretas) e o volume final da mistura de reação foi de 200 uL, mantidos sob agitação (excitação 355 nm, e de emissão de 460 nm). Todos os inibidores foram testados contra cat L e cat B a uma concentração inicial de 100 uM. Os ensaios de controle foram realizadas sem inibidores (controle negativo) e na presença do inibidor irreversível a peptidase de cisteína E-64 (controle positivo). Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados por meio de medições de taxas, com pelo menos sete concentrações do inibidor. Todos os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear, utilizando o módulo de cinética enzimática SigmaPlot 12.0.

### **3.5.3 - ENSAIOS EM *PLASMODIUM FALCIPARUM***

O ensaio foi realizado na Universidade da Califórnia de Riverside (UCR) sob supervisão da Prof. Dr. Karine Le Roch.

As cepas 3D7, Dd2 e W2 do parasita *P. falciparum* foram cultivadas em eritrócitos humanos tipo O+ em meio completo (RPMI 1640, 10 mg / mL de gentamicina (Gibco), 1,36 g / L hipoxantina (Acros), 1 M de HEPES (Sigma), 7,5% de bicarbonato de sódio (Gibco), 20% de glicose (MP Biomedical), NaOH a 1 M (Sigma), 20% Albumax (Gibco), 5% de soro humano). As culturas foram mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) para um volume de 10 mL e foram gaseados durante 30 s com um ambiente de 3% de CO<sub>2</sub>, de 1% de O<sub>2</sub>, e 96% de N<sub>2</sub>, em seguida, incubadas a 37°C.

A atividade antimalárica foi determinada utilizando um ensaio de proliferação do parasita com *SYBR* adaptado a partir de SMILKSTEIN *et al.* (2004) e BENNETT *et al.* (2004). Os compostos foram diluídos em meio completo e 40 µL transferidos para placas de ensaio de 96 poços; 80 µL de meio completo com eritrócitos infectados foi dispensado para obter um hematócrito a 2,5% e 0,5% de parasitemia no ensaio. Eritrócitos não infectadas foram

utilizados como controle assim como a substância bromophycolide A. As placas foram incubadas durante 72 horas em um ambiente de baixo teor de oxigênio (96% de N<sub>2</sub>, 3% de CO<sub>2</sub>, de 1% de O<sub>2</sub>) em uma câmara de incubação modular. As placas foram seladas e colocadas em um freezer -80°C durante a noite, em seguida, descongeladas e 120 µL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM de EDTA, 0,08% de Triton X-100, 0,008% de saponina com 0,2 µL / mL Sybr Green) foi distribuído por cada poço e incubados a 37° C no escuro durante 6 horas para diminuir a relação sinal-ruído e então as placas foram lidas com um Molecular Devices SpectraMAX Gêmeos EM excitação 495 nm e emissão de 525 nm. Os dados foram analisados utilizando o Microsoft Excel para Mac, e gráficos foram plotados usando SigmaPlot 10 (Systat).



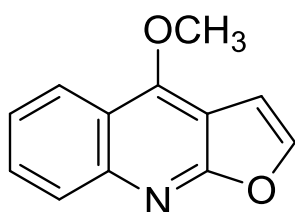
# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Com o estudo bioguiado foram isoladas 18 substâncias, dos caules de *Metrodorea stipularis*, pertencentes a quatro classes (alcaloides, cumarinas, esteroide e diidrochalconas), dentre estes compostos seis são inéditos na literatura até o momento. Para facilitar a determinação estrutural dos metabólitos isolados eles serão descritos por classes.

#### ALCALOIDES



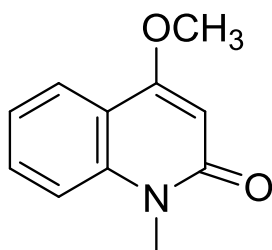
##### **Dictamina (1)**

3 mg

Isolamento: p. 29 e 30

Identificação: p. 44 - 47

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



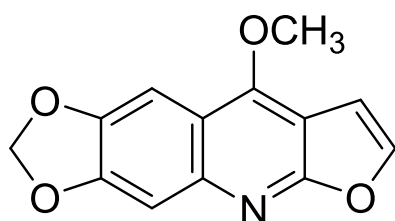
##### **N-metil-4-metóxi-quinolona (2)**

3 mg

Isolamento: p.31 e 32

Identificação: p. 47 e 48

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



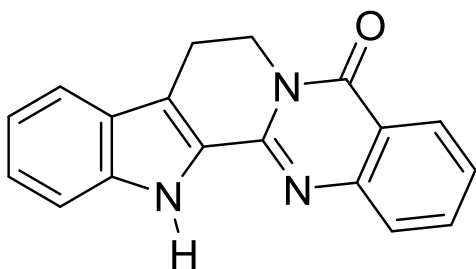
##### **Maculina (3)**

0,8 mg

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 49 e 50

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



**Rutaecarpina (4)**

1,1 mg

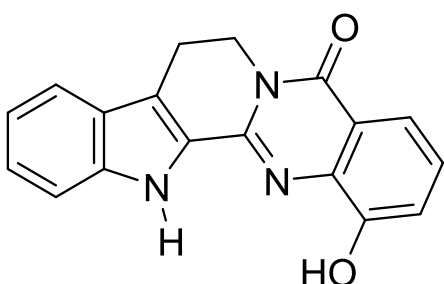
Isolamento: p. 29 e 30

Identificação: p. 50 - 54

Cruzaína:  $IC_{50} = 99,00 \pm 5,64 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CATB} = 30,89 \pm 2,98 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -



**1-hidroxi-rutaecarpina (5)**

2,2 mg

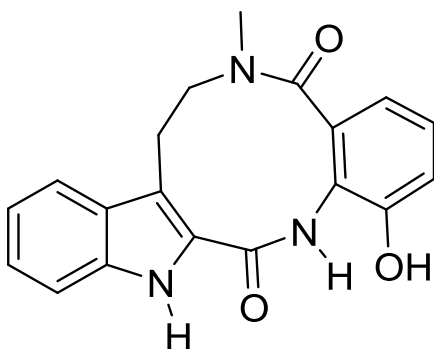
Isolamento: p.29, 30 e 34

Identificação: p. 54 - 58

Cruzaína:  $IC_{50} = 22,00 \pm 0,04 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CATB} = 31,94 \pm 4,86 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -



**Substância 6 (INÉDITA)**

1,1 mg

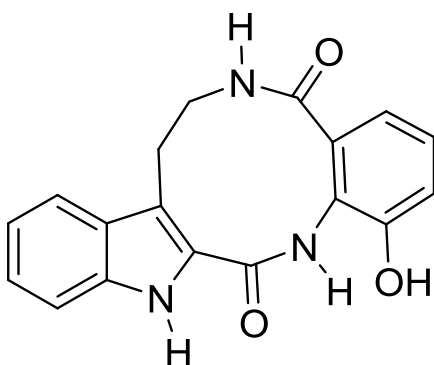
Isolamento: p. 30 e 34

Identificação: p. 59 - 64

Cruzaína:  $IC_{50} = 14,00 \pm 0,97 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT B} = 30,89 \pm 2,98 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -



**Substância 7 (INÉDITA)**

1 mg

Isolamento: p. 30

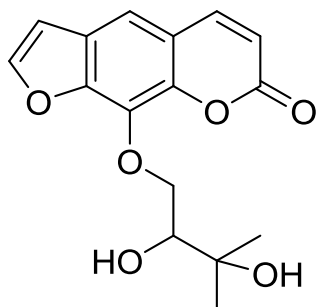
Identificação: p. 64 - 68

Cruzaína:  $IC_{50} = 14,00 \pm 0,97 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT B} = 30,89 \pm 2,98 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -

## CUMARINAS



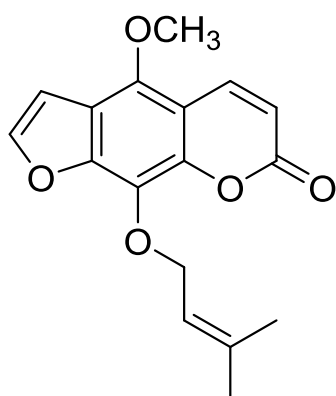
### **Heraclenol (8)**

0,5 mg

Isolamento: p. 30 e 31

Identificação: p. 69 - 72

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



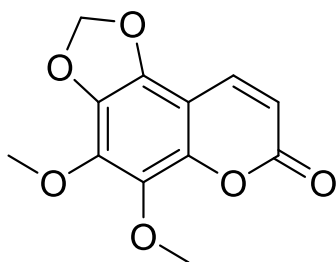
### **Feloptorina (9)**

0,9 mg

Isolamento: p. 29 e 30

Identificação: p. 73 - 76

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



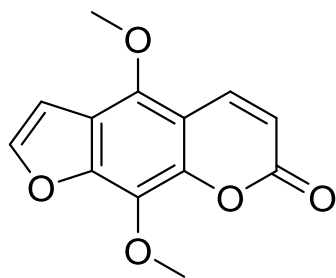
### **5,6-metilenodioxi-7,8-di-metoxicumarina (10)**

3,5 mg

Isolamento: p. 29, 30, 32 e 33

Identificação: p. 77 - 80

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



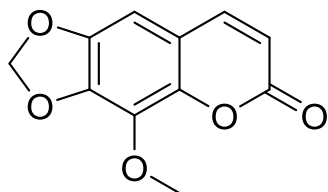
### **Isopimpenilina (11)**

4 mg

Isolamento: p. 29, 30, 32 e 33

Identificação: p. 81 - 85

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



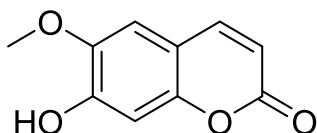
**6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina (12)**

0,6 mg

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 85 - 87

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos



**Escopoletina (13)**

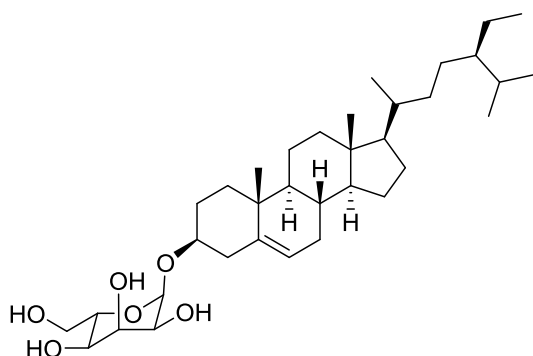
1,5 mg

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 88 - 90

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos

ESTEROIDE



**3-β-O-β-glucopiranosil-sitosterol (14)**

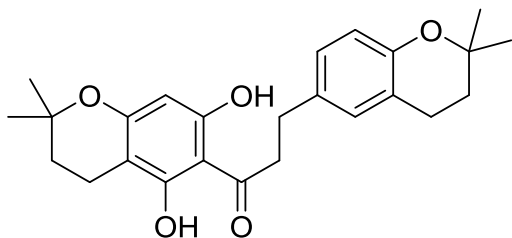
5 mg

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 91 e 92

Não apresentou atividade significativa em nenhum dos alvos

## DIIDROCHALCONAS



### **Substância 15 (INÉDITA)**

2,5 mg

Isolamento: p. 32

Identificação: p. 93 - 98

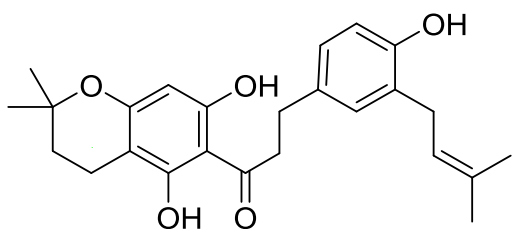
Cruzaína:  $IC_{50} = 21,60 \pm 2,59 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT B} = 14,91 \pm 1,22 \text{ uM}$

*P. falciparum*:  $IC_{50} \text{ 3D7} = 14,4 \pm 0,12 \text{ uM}$

$IC_{50} \text{ Dd2} = 11,7 \pm 0,08 \text{ uM}$

$IC_{50} \text{ W2} = 6,7 \pm 0,05 \text{ uM}$



### **Substância 16 (INÉDITA)**

8 mg

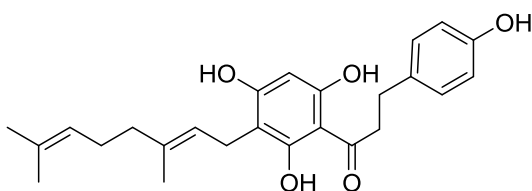
Isolamento: p. 32

Identificação: p. 99 - 103

Cruzaína:  $IC_{50} = 12,00 \pm 0,08 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT L} = 3,27 \pm 0,47 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -



### **Substância 17**

2 mg

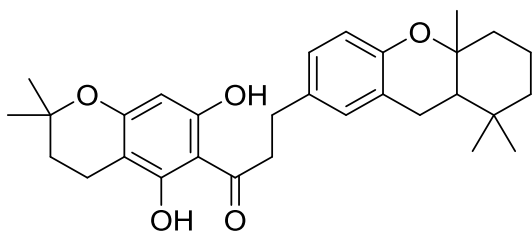
Isolamento: p. 30

Identificação: p. 104 - 108

Cruzaína:  $IC_{50} = 21,60 \pm 2,59 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT L} = 1,01 \pm 0,17 \text{ uM}$

*P. falciparum*: -



### **Substância 18 (INÉDITA)**

2,5 mg

Isolamento: p. 32

Identificação: p. 108 - 113

Cruzaína:  $IC_{50} = 21,60 \pm 2,59 \text{ uM}$

Catepsinas:  $IC_{50} \text{ CAT B} = 14,91 \pm 1,22 \text{ uM}$

*P. falciparum*:  $IC_{50} \text{ 3D7} = 14,4 \pm 0,12 \text{ uM}$

$IC_{50} \text{ Dd2} = 11,7 \pm 0,08 \text{ uM}$

$IC_{50} \text{ W2} = 6,7 \pm 0,05 \text{ uM}$

## 4.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

### 4.2.1 - ALCALOIDES

É um grupo extenso e diverso pode ser classificado de acordo com sua origem biossintética. A maioria das substâncias nitrogenadas que tem origem biossintética dos aminoácidos alifáticos, aromáticos ou do triptofano (LOBO & LOURENÇO, 2007). Foram isolados 7 alcaloides do tipo quinolínico, quinolonico, furoquinolínico, indolopiridoquinazolínico e dois de esqueleto ainda inédito na literatura.

#### 4.2.1.1 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA DICTAMINA

O alcaloide do tipo furoquinolínico, dictamina (FIGURA 4.1), foi isolado da fração MSCED4\_5 como um sólido branco amorfo. Sua elucidação estrutural baseou-se em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, gCOSY e por comparação com dados da literatura (BRAGA, 2005).

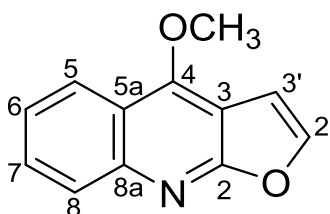


FIGURA 4.1 - Estrutura da dictamina (1).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.2) observou-se sinais de hidrogênios característicos de um anel furano em  $\delta$  7,88 (1H, d,  $J=2,5$  Hz) do H-2' e em  $\delta$  7,42 (1H, d,  $J=2,5$ Hz) do H-3'. Observou-se ainda sinais de quatro hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,25 (1H, dl,  $J=8,5$  Hz) do H-5, em  $\delta$  7,47 (1H, dt,  $J=1,0$  e 8,5 Hz) do H-6, em  $\delta$  7,70 (1H, dt,  $J=1,0$  e 8,5 Hz) do H-7 e em  $\delta$  7,90 (1H, dl,  $J=8,5$  Hz) do H-8, além do sinal em  $\delta$  4,53 (3H, s) referente aos hidrogênios da metoxila.

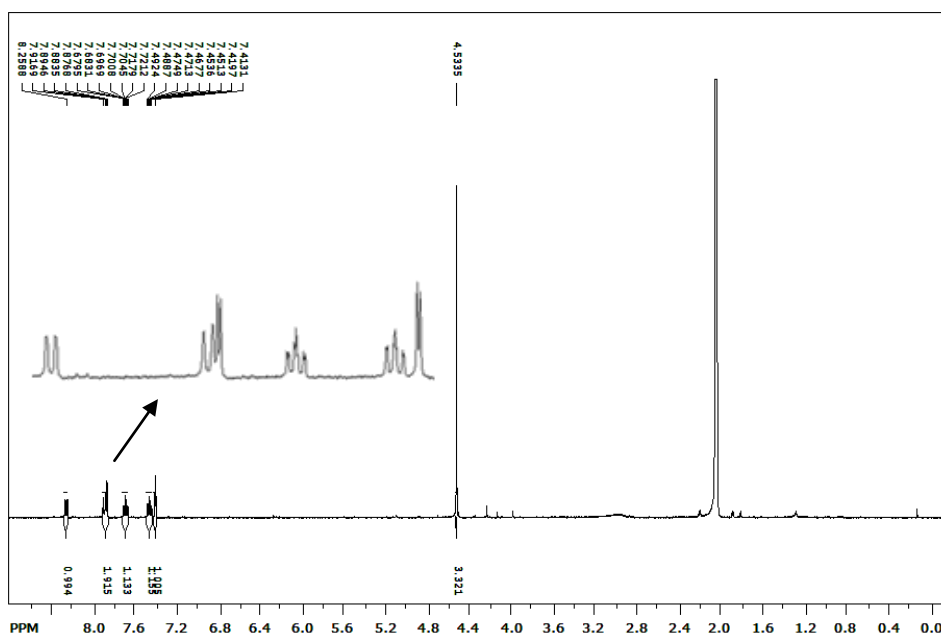


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da dictamina.

No espectro de gCOSY observou-se as correlações entre H-3' e H-2' do anel furano e as correlações entre os hidrogênios aromáticos (FIGURA 4.3).

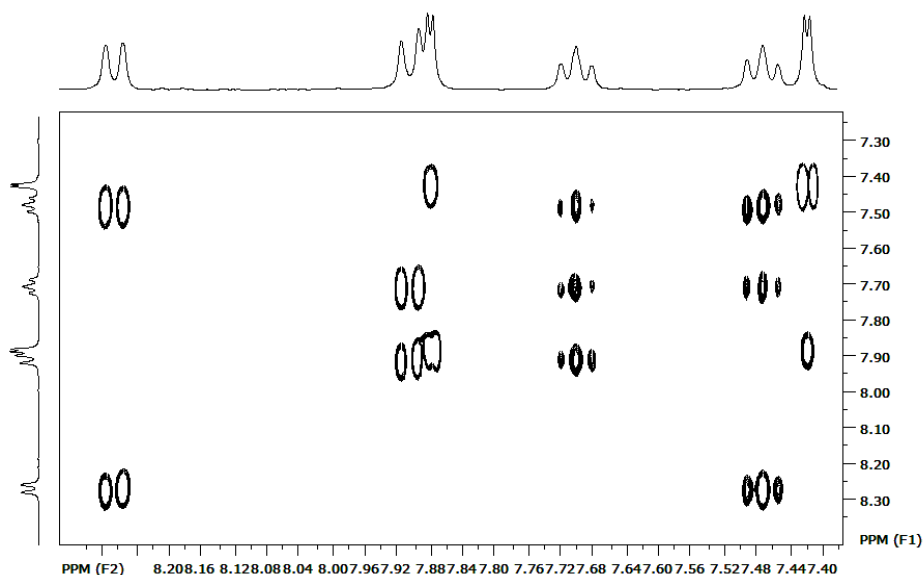


FIGURA 4.3 - Expansão do espectro de gCOSY (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da dictamina.



No espectro de HSQC (FIGURA 4.4) observou-se correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,25 (H-5) com o carbono em  $\delta$  122,1 (C-5), em  $\delta$  7,47 (H-6) com o carbono em  $\delta$  123,5 (C-6), em  $\delta$  7,70 (H-7) com o carbono em  $\delta$  129,0 (C-7), em  $\delta$  7,90 (H-8) com o carbono em  $\delta$  127,6 (C-8), e dos hidrogênios furânicos em  $\delta$  7,88 (H-3') com o carbono em  $\delta$  144,1 (C-3') e em  $\delta$  7,42 (H-2') com o carbono em  $\delta$  105,3 (C-2'). Observou-se ainda a correlação dos hidrogênios da metoxila em  $\delta$  4,53 com o carbono em  $\delta$  58,8.

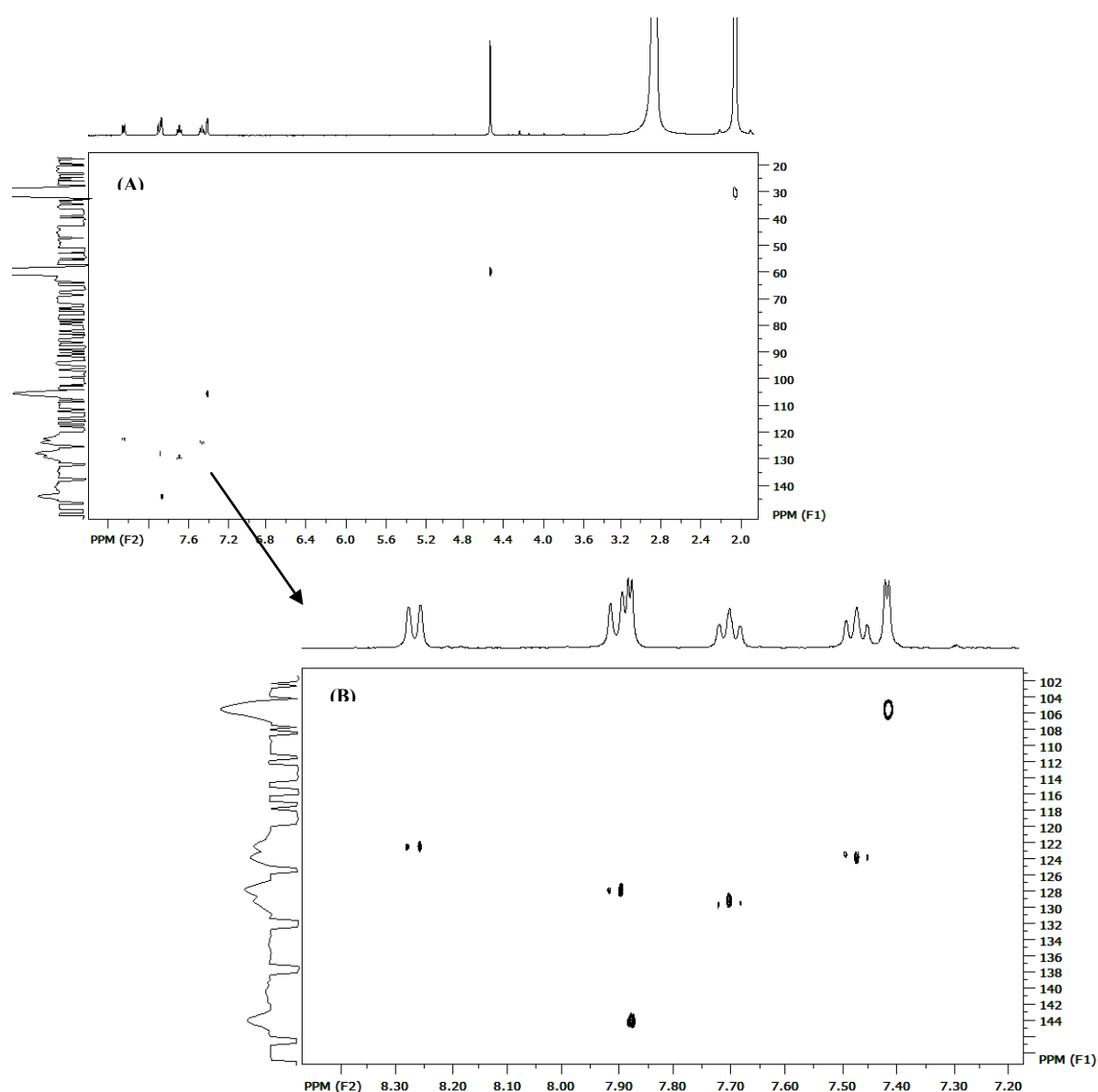


FIGURA 4.4 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da dictamina. (B) Expansão da região aromática

Assim esta substância foi identificada como o alcaloide dictamina (FIGURA 4.1).

#### 4.2.1.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA N-METIL-4-METOXI-2-QUINOLONA

O alcaloide quinolônico *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (FIGURA 4.5) foi isolado da fração MSCED19\_7 como um sólido amarelo amorfo. Sua elucidação estrutural foi baseada em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e por comparação com dados da literatura (NAYAR *et al.*, 1971).

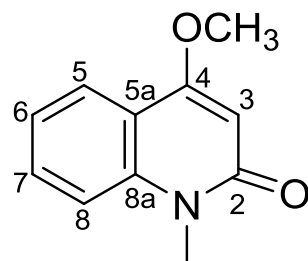


FIGURA 4.5 - Estrutura da *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (2).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.6) revela quatro sinais característicos de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,92 (1H, dd,  $J=7,8$  e  $1,5$  Hz),  $\delta$  7,62 (1H, dt,  $J=9,8$  e  $1,5$  Hz),  $\delta$  7,47 (1H, dl,  $J=8,5$  Hz) e  $\delta$  7,23 (1H, dt,  $J=7,8$  e  $1,5$ Hz). Estes sinais em conjunto com outro em  $\delta$  5,95 (s, 1H) permitem sugerir que esta substância seja um alcaloide 4-R-2-quinolônico (R = substituinte). Outros sinais em  $\delta$  3,99 (s, 3H) e  $\delta$  3,60 (s, 3H) podem ser atribuídos a O-CH<sub>3</sub> e N-CH<sub>3</sub>, respectivamente.

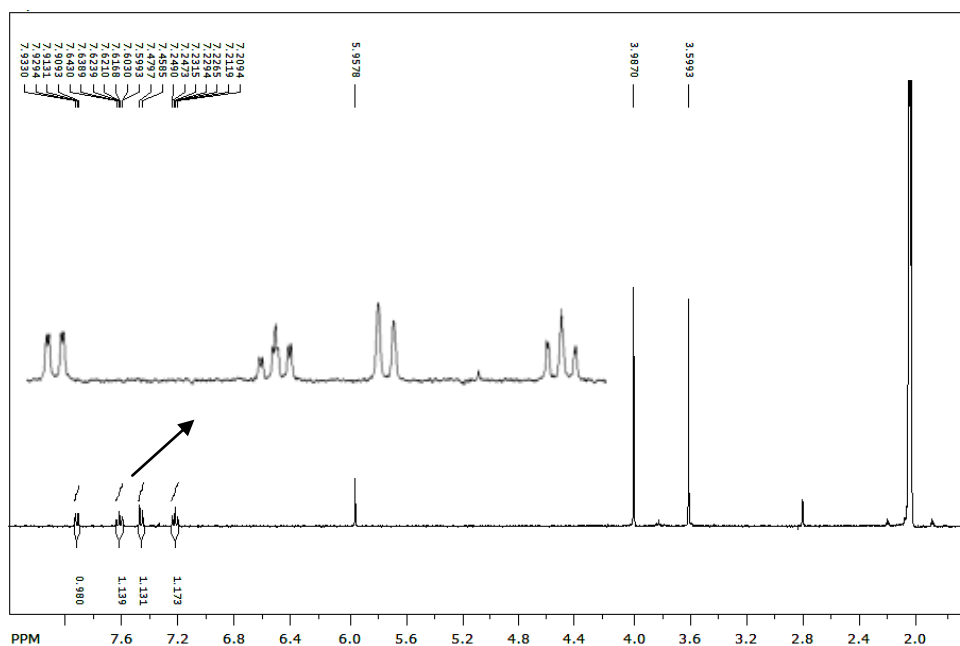


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona.

Assim esta substância foi identificada como o alcaloide *N*-metil-4-metoxi-2-quinolona (FIGURA 4.5).

#### 4.2.1.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MACULINA

A maculina (FIGURA 4.7) foi isolada da fração MSCED22\_58\_17 como um sólido branco amorfo. Sua elucidação estrutural é bastante simples e baseou-se principalmente em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e por comparação com dados da literatura (PUSSET, *et al.*, 1990).

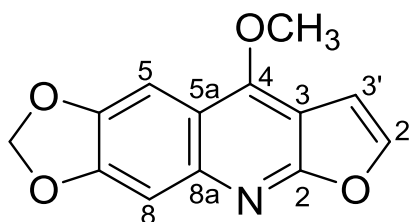


FIGURA 4.7 - Estrutura da maculina (3).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.8) revela sinais característicos de um alcaloide furoquinolínico em  $\delta$  7,46 (1H, d,  $J=0,5$  Hz) e  $\delta$  7,17 (1H, d,  $J=0,5$  Hz) referentes aos H-5 e H-8, respectivamente. Revela ainda um singlete em  $\delta$  6,15 (2H, s) característico de um grupo metilenodioxi. Observa-se também dois dupletos em  $\delta$  7,79 (1H, d,  $J=2,5$  Hz) atribuído ao H-2' e em  $\delta$  7,33 (1H, d,  $J=2,5$  Hz) ao H-3' além do sinal em  $\delta$  4,47 (s, 3H) referente à metoxila, característico de alcaloides 4-metoxifuroquinolínicos, substâncias muito comuns em plantas da família Rutaceae.

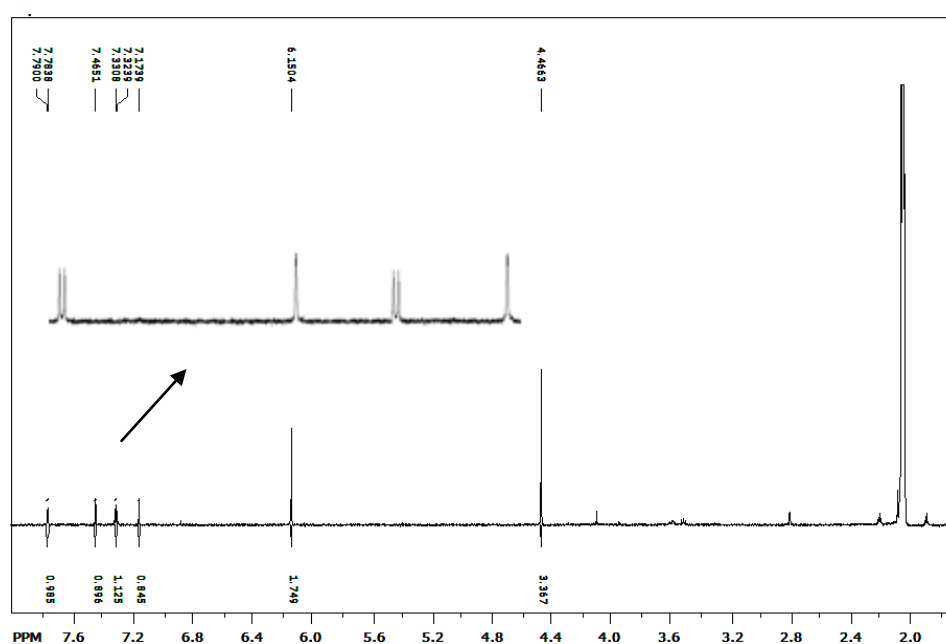


FIGURA 4.8 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da maculina.

Assim esta substância foi identificada como o alcaloide maculina (FIGURA 4.7).

#### 4.2.1.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA RUTAECARPINA E DA 1-HIDROXIRUTAECARPINA

O alcaloide do tipo indolopiridoquinazolínico rutaecarpina (FIGURA 4.9), foi isolado da fração MSCED4\_9 como um sólido branco

amorfo. Sua elucidação estrutural foi baseada em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, gCOSY e por comparação com dados da literatura (RIBEIRO, 2006).

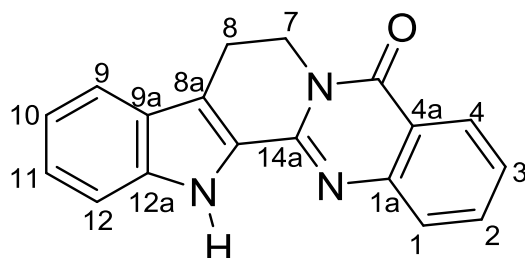


FIGURA 4.9 - Estrutura da rutaecarpina (4).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.10) revelou sinais característicos de um alcaloide indolopiridoquinazolínico, dentre estes foram observados os sinais de hidrogênios desblindados referentes a oito hidrogênios aromáticos, em  $\delta$  7,69 (1H, dt,  $J=1,5$  e 8,0 Hz) do H-9, em  $\delta$  7,13 (1H, dt,  $J=1,5$  e 8,0 Hz) do H-10, em  $\delta$  7,31 (1H, dt,  $J=1,5$  e 8,0 Hz) do H-11, em  $\delta$  7,61 (2H, dl,  $J= 8,0$  Hz) do H-12 e H-1, em  $\delta$  7,75 (1H, dt,  $J= 1,5$  e 8,0 Hz) do H-2, em  $\delta$  7,44 (1H, dt,  $J=1,5$  e 8,0 Hz) do H-3 e em  $\delta$  8,21 (1H, dd,  $J=1,5$  e 8,0 Hz) do H-4, além dos sinais em  $\delta$  4,55 (2H, t,  $J= 6,4$  Hz) de H-7,  $\delta$  3,26 (2H, t,  $J=6,4$  Hz) de H-8.

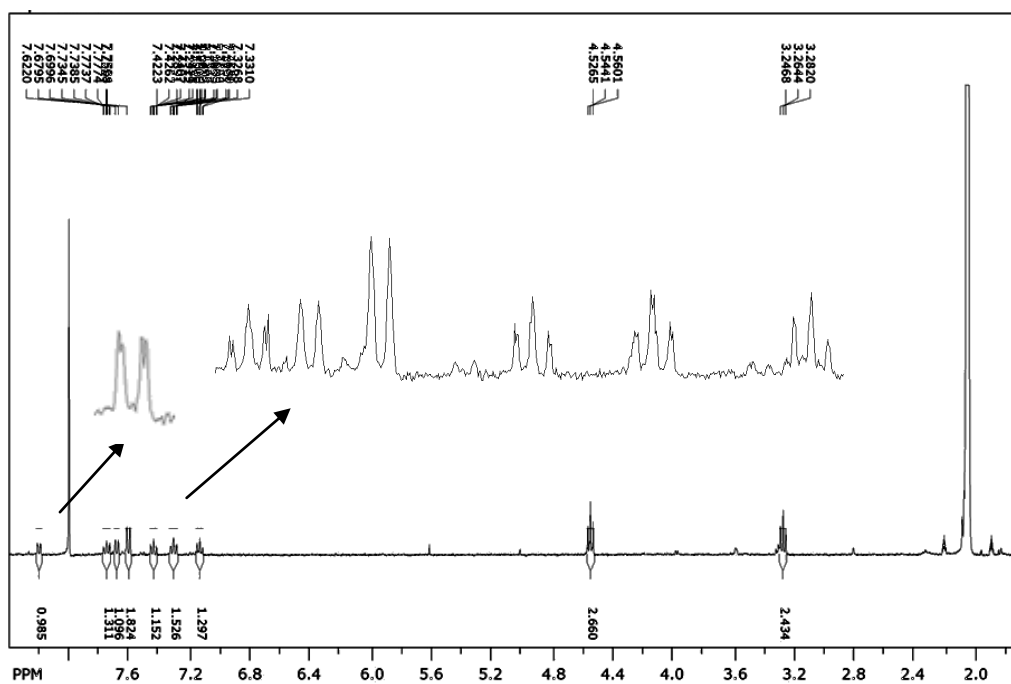


FIGURA 4.10 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da rutaecarpina.

No espectro de gCOSY (FIGURA 4.11) observam-se as correlações entre H-7 e H-8 além das correlações entre os hidrogênios aromáticos.

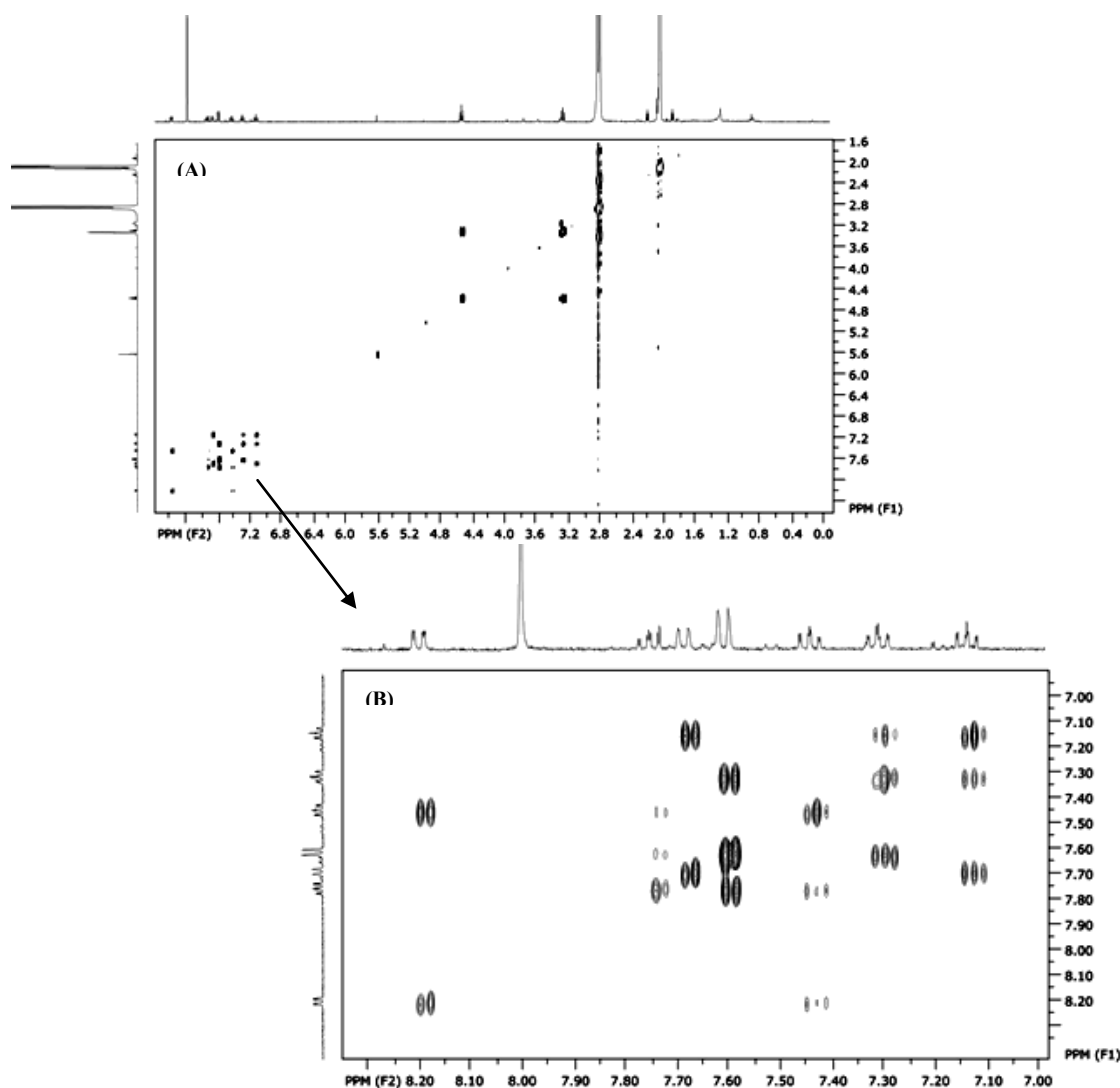


FIGURA 4.11 - (A) Correlações mostradas no espectro de gCOSY (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da rutaecarpina. (B) Expansão da região aromática.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.12) observaram-se correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,69 (H-9) com o carbono em  $\delta$  119,5 (C-9), em  $\delta$  7,13 (H-10) com o carbono em  $\delta$  119,8 (C-10), em  $\delta$  7,31 (H-11) com o carbono em  $\delta$  125,0 (C-11), em  $\delta$  7,61 (H-12 e H-1) com os carbonos em  $\delta$  112,2 (C-12) e em  $\delta$  126,6 (C-1), em  $\delta$  7,75 (H-2) com o carbono em  $\delta$  133,6 (C-2), em  $\delta$  7,44 (H-3) com o carbono em  $\delta$  125,8 (C-3) e em  $\delta$  8,21 (H-4) com o carbono em  $\delta$  126,6 (C-4). Ainda se observaram as correlações entre o

sinal em  $\delta$  4,55 (H-7) com o carbono em  $\delta$  40,6 (C-7) e em  $\delta$  3,26 (H-8) com o carbono em  $\delta$  19,0 (C-8).

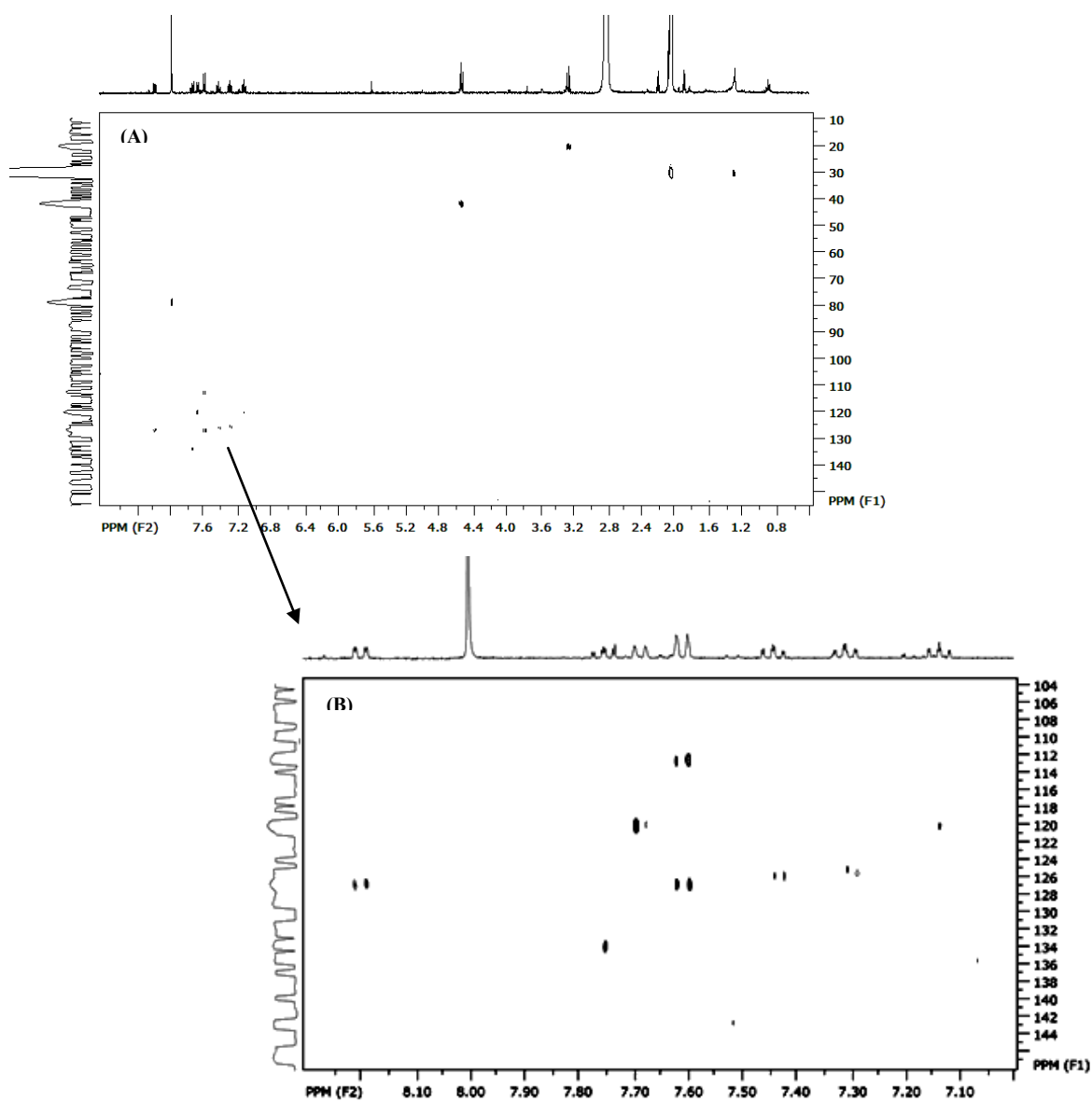


FIGURA 4.12 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da rutaecarpina. (B) Expansão da região aromática

Assim, foi efetuada a identificação desta substância como sendo o alcaloide Rutaecarpina (FIGURA 4.9).



A 1-hidroxitutaecarpina (figura 4.13), outro alcaloide do tipo indolopiridoquinazolinico, tem como única diferença para a rutaecarpina a posição 1 hidroxilada. Foi isolada da fração MSCED4\_9 e MSCED22\_61 e apresentou-se como um sólido amarelo amorfo. Sua elucidação estrutural baseou-se em espectros de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, gCOSY e por comparação com dados da literatura (JANUÁRIO *et al*, 2009).

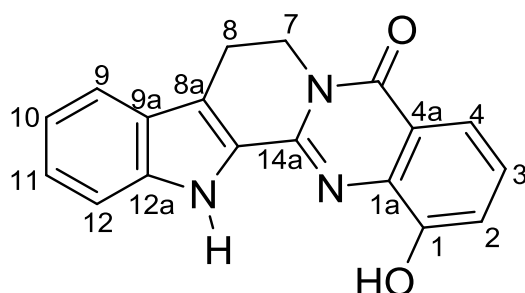


FIGURA 4.13 - Estrutura da 1-hidroxitutaecarpina (5).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.14) revelou sinais característicos de um alcaloide indolopiridoquinazolinico, sinais de hidrogênios desblindados referentes a 7 hidrogênios aromáticos foram observados, em  $\delta$  7,68 (1H, dt,  $J=0,9$  e  $8,4$  Hz) do H-9, em  $\delta$  7,61 (1H, dd,  $J=1,1$  e  $8,1$  Hz) do H-4, em  $\delta$  7,49 (1H, dt,  $J=0,9$  e  $8,4$  Hz) do H-12, em  $\delta$  7,28 (2H, m) do H-3 e H-11, em  $\delta$  7,17 (1H, dd,  $J=1,1$  e  $8,1$ ) do H-2 e em  $\delta$  7,12 (1H, dt,  $J=0,9$  e  $8,4$  Hz) do H-10, além dos sinais em  $\delta$  4,52 (2H, t,  $J=6,6$  Hz) de H-7 e em  $\delta$  3,26 (2H, t,  $J=6,6$  Hz) de H-8.

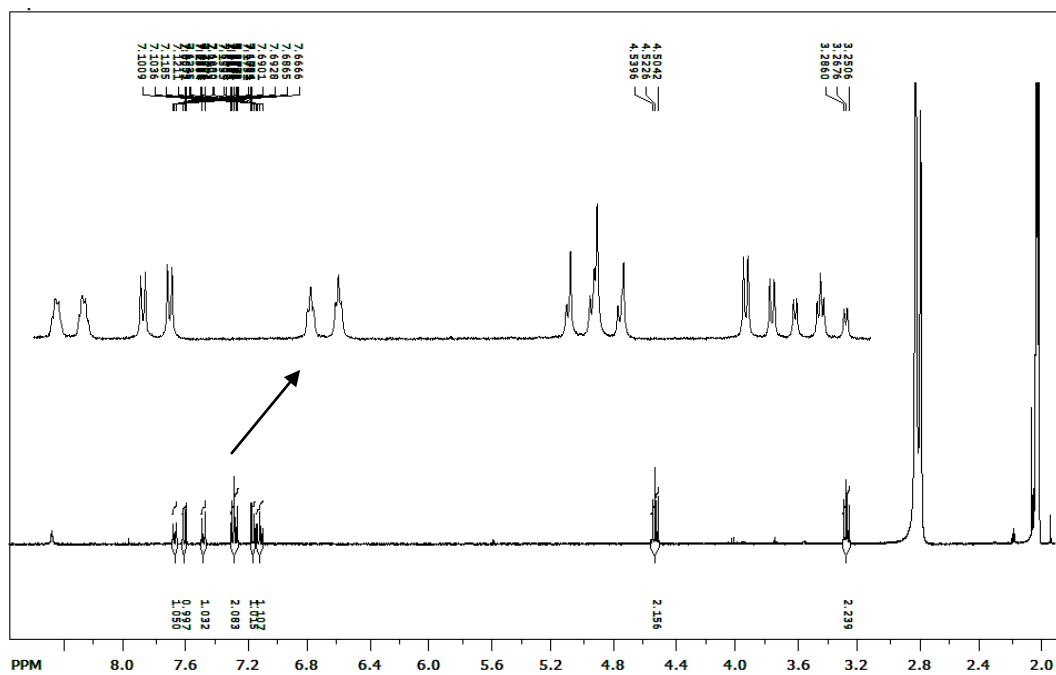


FIGURA 4.14 - Espectro de RMN (400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>) da 1-hidroxitruaetarpina.

No espectro de gCOSY (FIGURA 4.15) observaram-se as correlações entre H-7 e H-8, e as correlações entre os hidrogênios aromáticos.

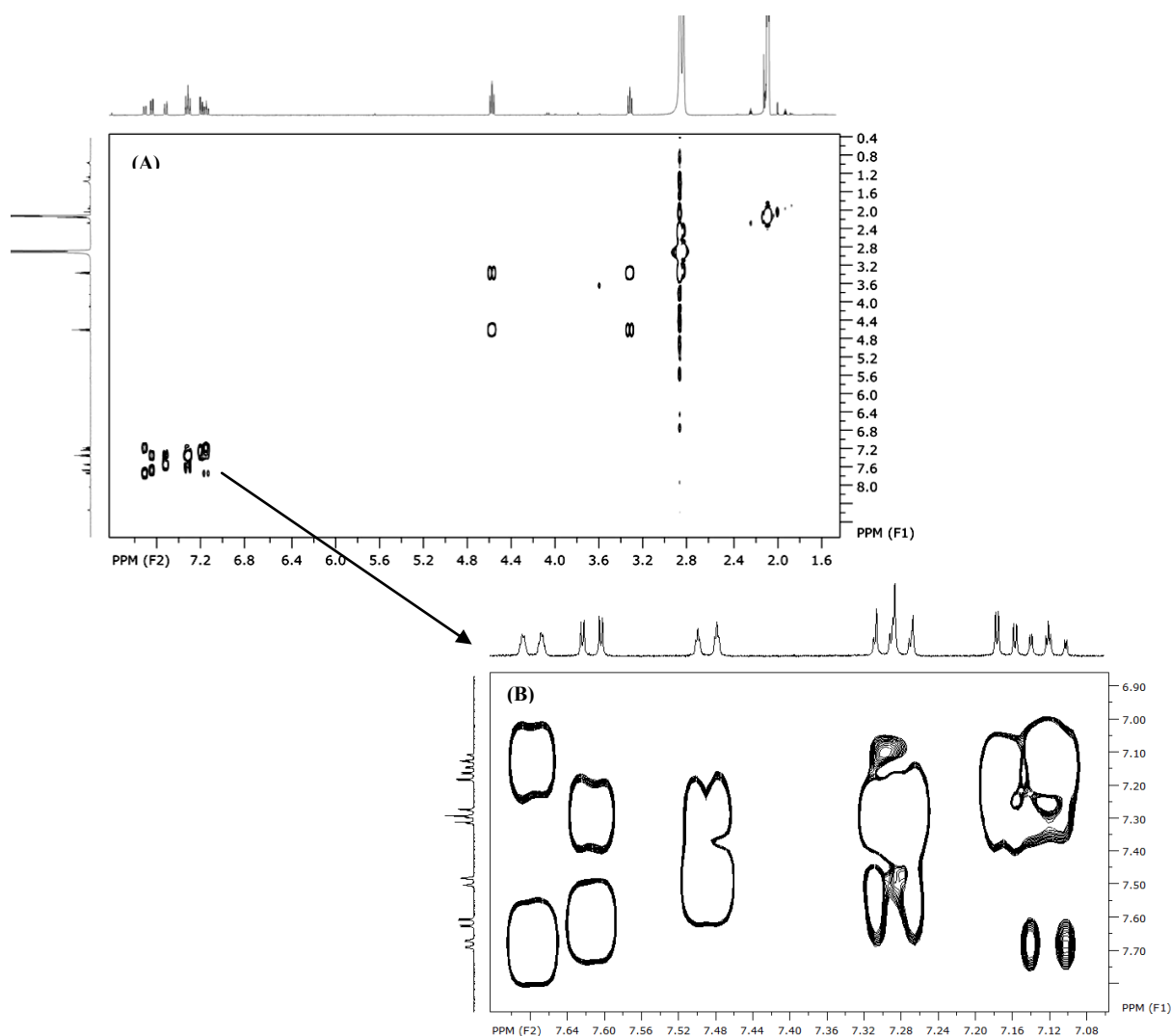


FIGURA 4.15 - (A) Espectro de correlação gCOSY (400 MHz, Acetona  $d_6$ ) da 1-hidroirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.16) observaram-se correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,68 (H-9) com o carbono em  $\delta$  119,8 (C-9), em  $\delta$  7,61 (H-4) com o carbono em  $\delta$  116,8 (C-4), em  $\delta$  7,49 (H-12) com o carbono em  $\delta$  112,0 (C-12), em  $\delta$  7,28 (H-3 e H-11) com o carbono em  $\delta$  126,0 (C-3 e C-11), em  $\delta$  7,17 (H-2) com o carbono em  $\delta$  116,3 (H-2) e em  $\delta$  7,12 (H-10) com o carbono em  $\delta$  120,0 (C-10). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  4,52 (H-7) com o carbono em  $\delta$  41,0 (C-7) e em  $\delta$  3,26 (H8) com o carbono em  $\delta$  19,2 (C-8).

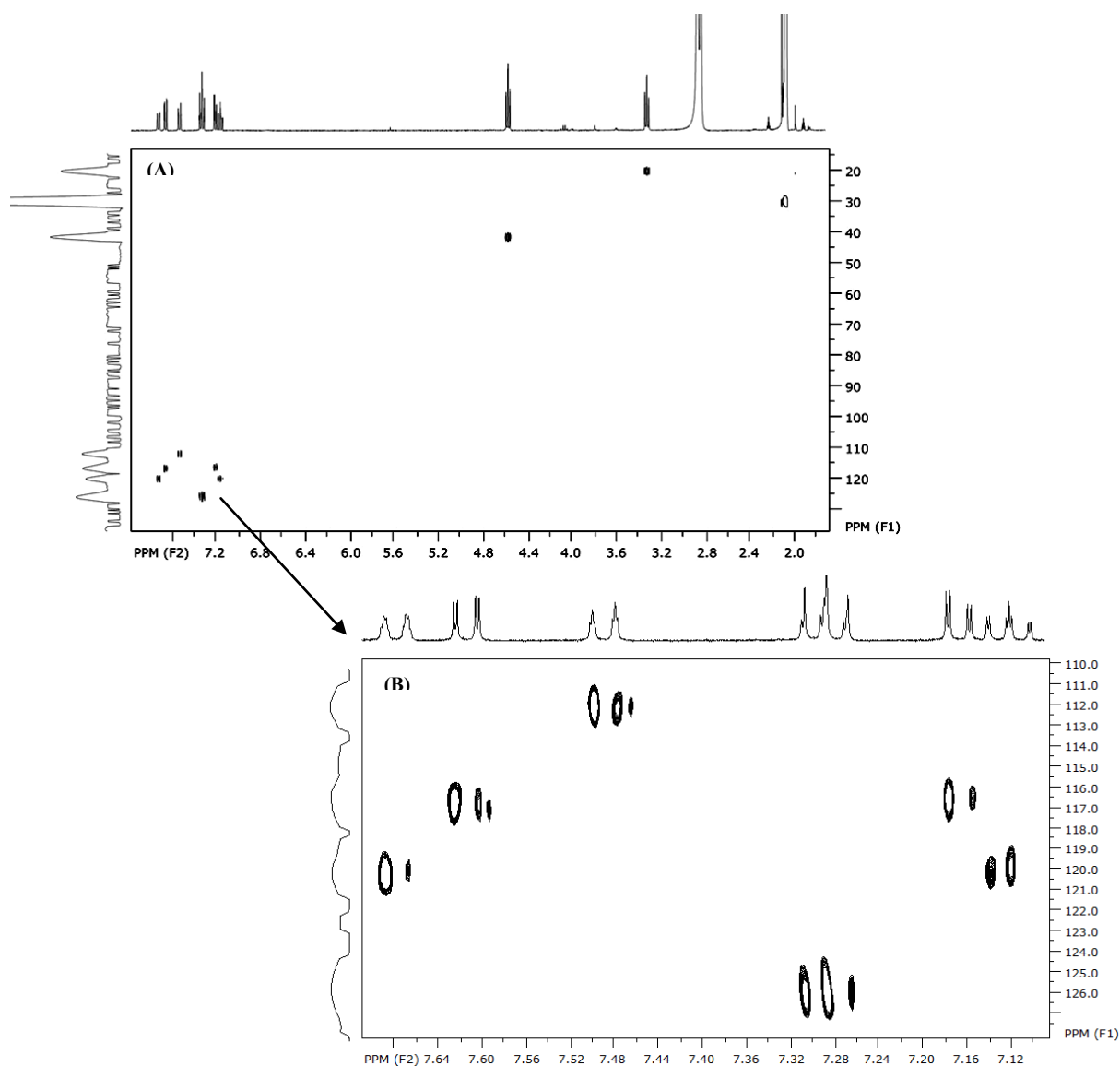


FIGURA 4.16 - (A) Espectro de correlação HSQC (400 MHz, Acetona  $d_6$ ) da 1-hidoxirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática.

As correlações mostradas na FIGURA 4.17 foram observadas no espectro de HMBC (FIGURA 4.18), correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,68 (H-9) com o carbono em  $\delta$  138,8 (C-12a), em  $\delta$  7,61 (H-4) com os carbonos em  $\delta$  116,3 (C-2) e  $\delta$  136,4 (C-1a), em  $\delta$  7,49 (H-12) com os carbonos em  $\delta$  120,0 (C-10) e  $\delta$  125,7 (C-9a), em  $\delta$  7,28 (H-11) com os carbonos em  $\delta$  119,8 (C-9) e em  $\delta$  138,8 (C-12a), em  $\delta$  7,28 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  121,0 (C-4a) e em  $\delta$  152,2 (C-1), em  $\delta$  7,17 (H-2) com os carbonos em  $\delta$  116,8

(C-4) e em  $\delta$  136,4 (C-1a) e o sinal em 7,12 (H-10) com o carbono em  $\delta$  126,0 (C-11). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  4,52 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  19,2 (C-8),  $\delta$  117,8 (C-8a) e  $\delta$  144,3 (C-14a), e entre o sinal em  $\delta$  3,28 (H-8) com o carbono em  $\delta$  41,0 (C-7), em  $\delta$  117,8 (C-8a) e em  $\delta$  125,7 (C-9a).

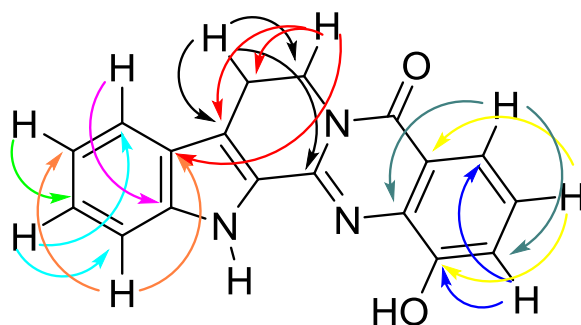


FIGURA 4.17 - Correlações observadas no espectro de HMBC (400 MHz, acetona  $d_6$ ) da 1-hidroxi-rutaecapina.

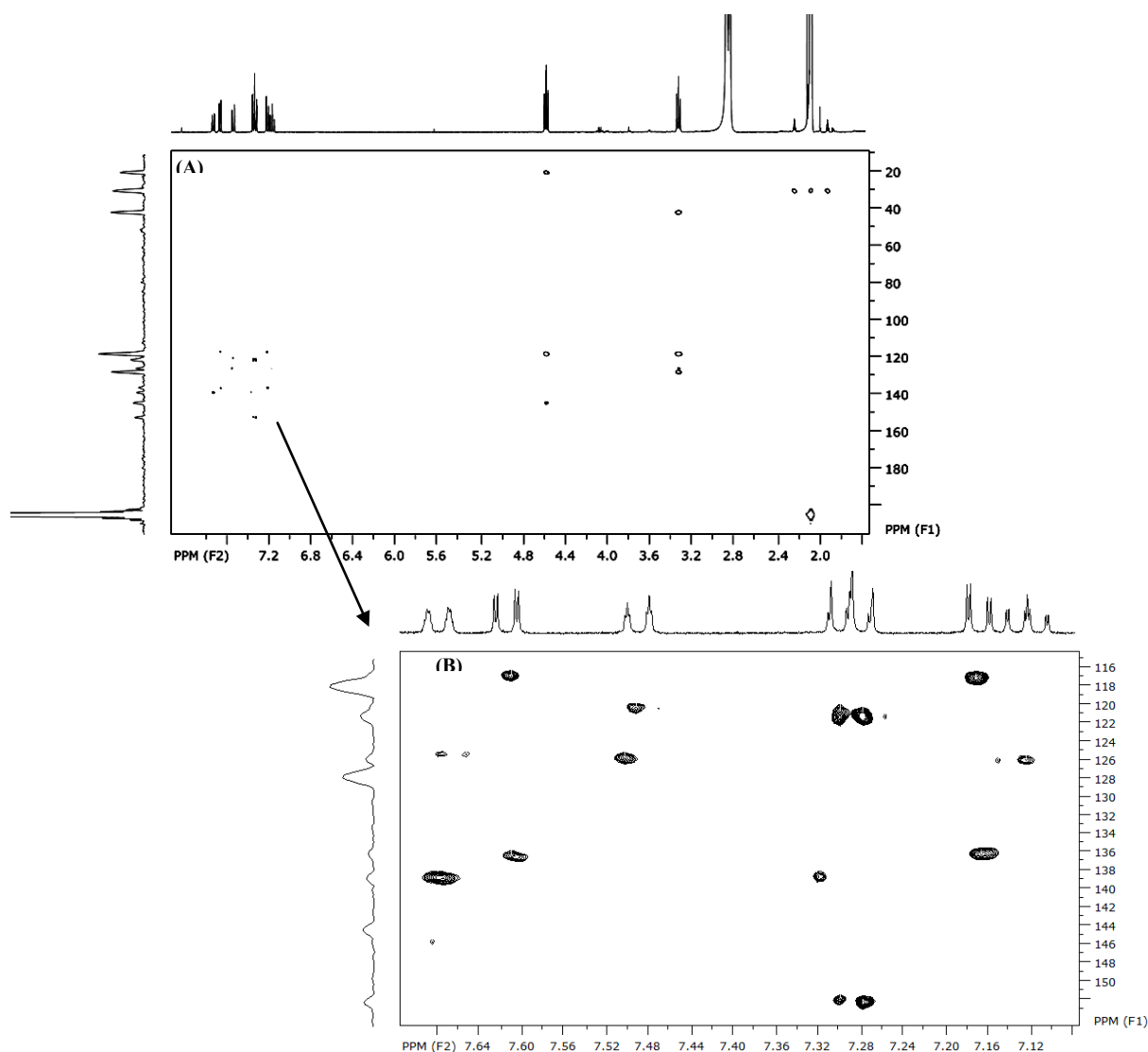


FIGURA 4.18 - (A) Espectro de correlação HMBC (400 MHz, acetona  $d_6$ ) da 1-hidroirutaecarpina. (B) Expansão da região aromática.

Assim identificou-se esta substâncias como a 1-hidroirutaecarpina (FIGURA 4.13).

Portanto a única diferença estrutural entre os alcaloides rutaecarpina (4) e 1-hidroirutaecarpina (5) é a posição 1 de 6 hidroxilada. Os dados de RMN de ambas são mostrados na TABELA 4.1.

	rutaecarpina (4)	1-hidroxitrutaecarpina (5)		
Pos.	$\delta_H^b$ (J em Hz)	$\delta_C^a$ , mult.	$\delta_H^b$ (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	7,61; dl (8,0)	152,2; qC		
1a		136,4; qC		
2	7,75; dt (1,5; 8,0)	116,3; CH	7,17; dd (1,1; 8,1)	1,4
3	7,44; dt (1,5; 8,0)	126,0; CH	7,28; m	
4	8,21; dd (1,5; 8,0)	116,8; CH	7,61; dd (1,1; 8,1)	1a, 2
4a		-; qC		
5		-; qC		
7	4,55; t (6,4)	41,0; CH <sub>2</sub>	4,52; t (6,6)	8, 8a, 9a
8	3,26; t (6,4)	12,2; CH <sub>2</sub>	3,26; t (6,6)	7, 8a, 14
8a		117,8; qC		
9	7,69; dt (1,5; 8,0)	119,8; CH	7,68; dt (0,9; 8,4)	12a
9a		125,7; qC		
10	7,13; dt (1,5; 8,0)	120,0; CH	7,12; dt (0,9; 8,4)	11
11	7,31; dt (1,5; 8,0)	126,0; CH	7,28; m	9, 12
12	7,61; dl (8,0)	112,0; CH	7,49; dt (0,9; 8,4)	10, 12, 9a
12a		138,8; qC		
14		-; qC		
14a		144,3; qC		

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.1 - Dados de RMN da rutaecarpina e da 1-hidroxitrutaecarpina.

#### 4.2.1.5 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

##### 6 E 7

Foram isolados dois alcaloides de dados espectrais de RMN <sup>1</sup>H muito semelhantes às duas substâncias **4** e **5**, porém apresentando diferenças principalmente no deslocamento químico dos hidrogênios H-7 e H-8. A elucidação estrutural de **6** e **7** baseou-se em experimentos de RMN <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC, gCOSY, e EM de alta resolução. Elas serão descritas separadamente por se tratarem de estruturas inéditas com esqueleto também inédito.

A substância **6** (FIGURA 4.19) foi isolada da fração MSCED12 e MSCED23, apresentou-se como um sólido amarelo amorfo.

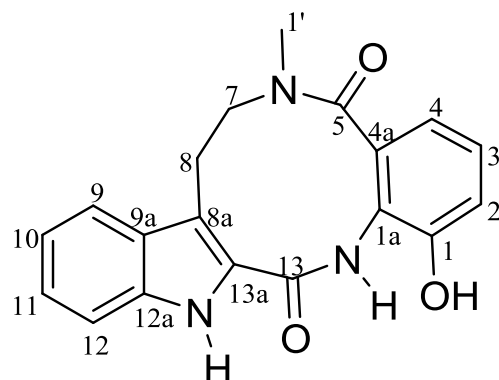


FIGURA 4.19 - Estrutura da substância **6** (INÉDITA).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.20) revelou sinais de hidrogênios desblindados referentes a 7 hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,68 (1H, d,  $J=8,1$  Hz) do H-9, em  $\delta$  7,57 (1H, dd,  $J=1,5$  e  $8,1$  Hz) do H-4, em  $\delta$  7,40 (2H, m) do H-2 e H-12, em  $\delta$  7,20 (2H, m) do H-3 e H-11 e em  $\delta$  7,05 (1H, t,  $J = 8,1$  Hz) do H-10, além dos sinais em  $\delta$  3,92 (2H, t,  $J=7,5$  Hz) de H-7, em  $\delta$  3,70 (2H, t,  $J=7,5$  Hz) de H-8 e em  $\delta$  4,30 (3H, s) de H-1'.

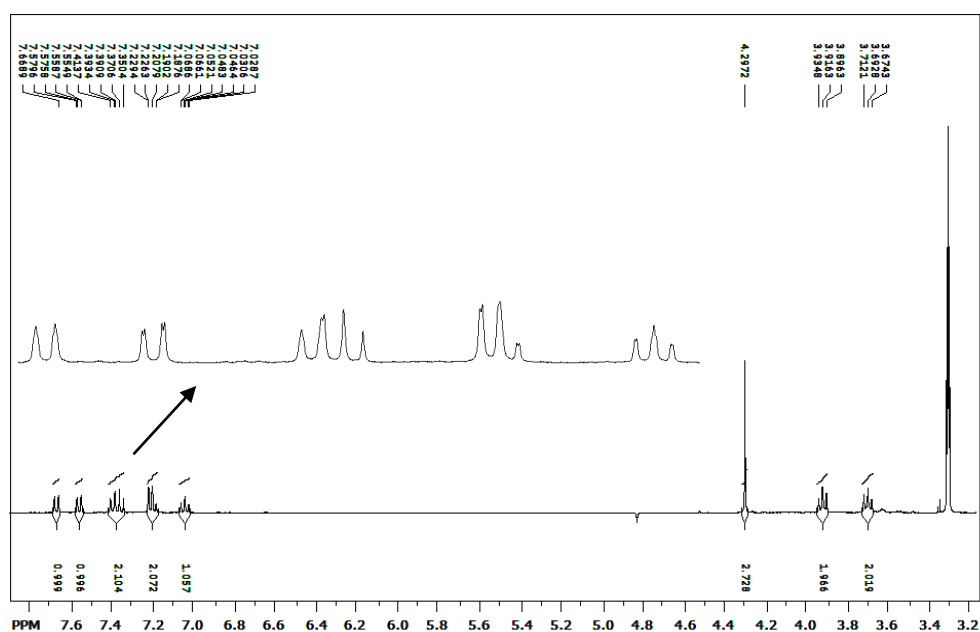


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **6**.



No espectro de gCOSY (FIGURA 4.26) observaram-se as correlações entre H-7 e H-8, e as correlações entre os hidrogênios aromáticos.

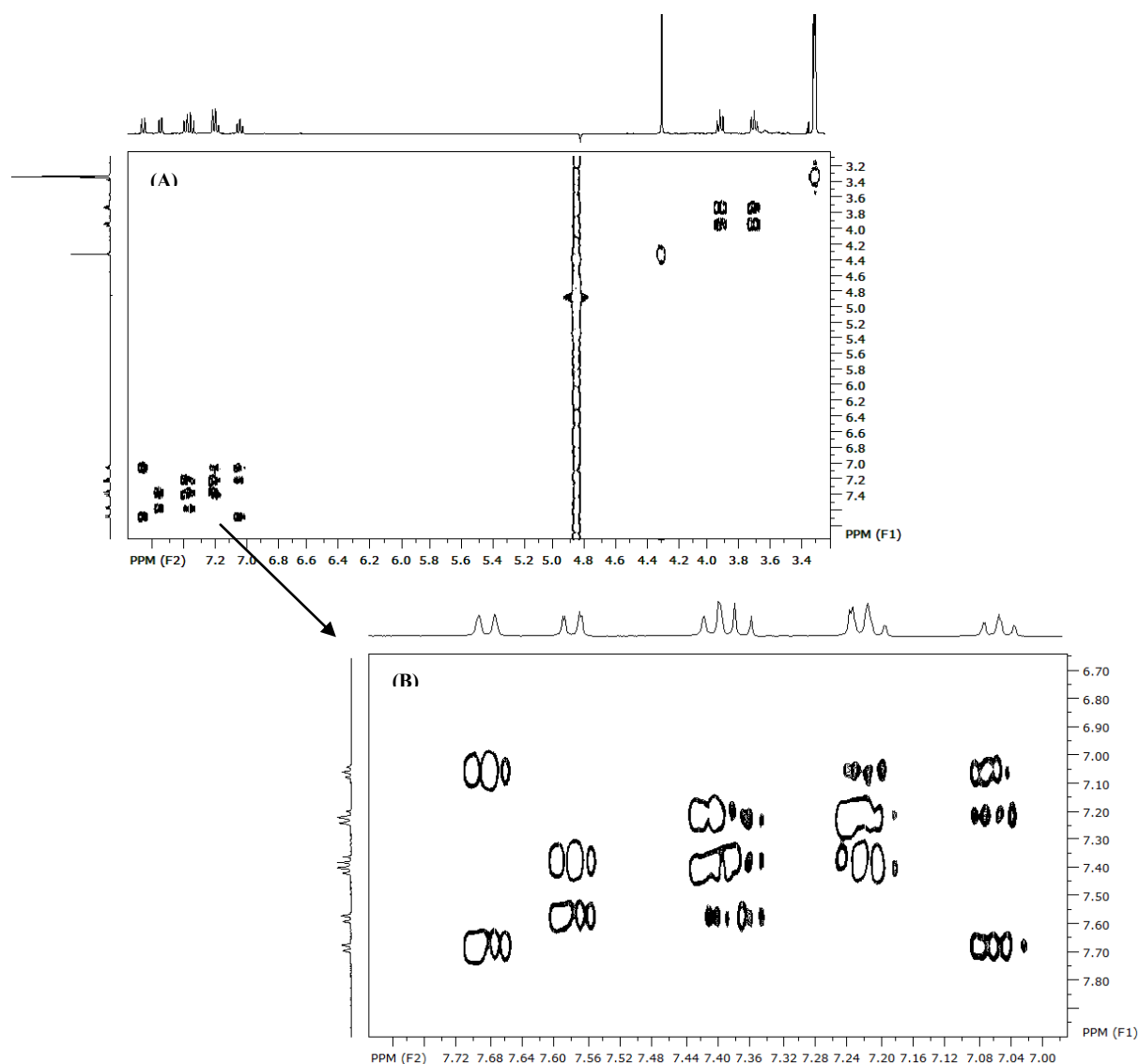


FIGURA 4.21 - (A) Espectro de gCOSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 6. (B) Expansão da região aromática.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.22) observaram-se correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,68 (H-9) com o carbono em  $\delta$  117,7 (C-9), em  $\delta$  7,87 (H-4) com o carbono em  $\delta$  111,5 (C-4), em  $\delta$  7,40 (H-3 e H-12) com o carbono em  $\delta$  125,0 (C-3) e em  $\delta$  109,3 (C-12), em  $\delta$  7,21 (H-2 e

H-11) com o carbono em  $\delta$  113,4 (C-2) e em  $\delta$  122,1 (C-11) e em  $\delta$  7,05 (H-10) com o carbono em  $\delta$  117,2 (C-10). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  3,92 (H-7) com o carbono em  $\delta$  61,0 (C-7), em  $\delta$  3,70 (H-8) com o carbono em  $\delta$  26,8 (C-8) e em  $\delta$  4,30 (H-1') com o carbono em  $\delta$  52,0 (C-1').

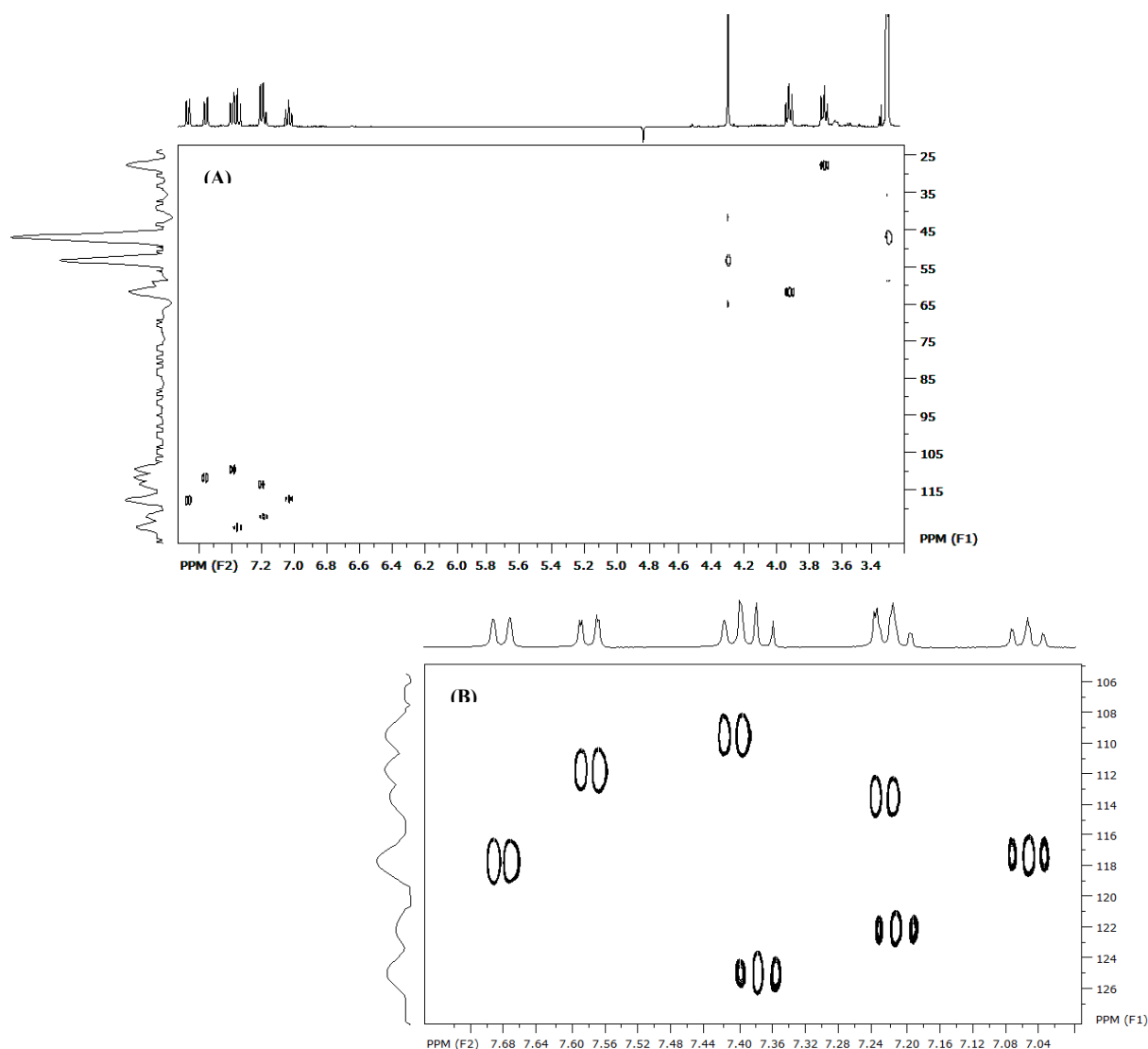


FIGURA 4.22 - (A) Espectro de HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **6**. (B) Expansão da região aromática.

As correlações mostradas na FIGURA 4.23 foram observadas no espectro de HMBC (FIGURA 4.24), entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,68 (H-9) com o carbono em  $\delta$  136,0 (C-12a),  $\delta$  115,7 (C-8a) e  $\delta$  122,1

(C-11); em  $\delta$  7,61 (H-4) com os carbonos em  $\delta$  113,4 (C-2),  $\delta$  126,2 (C-4a),  $\delta$  167,0 (C-5); em  $\delta$  7,49 (H-12) com os carbonos em  $\delta$  117,1 (C-10),  $\delta$  129,0 (C-9a); em  $\delta$  7,20 (H-11) com os carbonos em  $\delta$  117,7 (C-9) e  $\delta$  136,0 (C-12a); em  $\delta$  7,40 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  113,4 (C-2) e em  $\delta$  152,3 (C-1), em  $\delta$  7,20 (H-2) com os carbonos em  $\delta$  152,3 (C-1) e em  $\delta$  141,4 (C-1a) e o sinal em  $\delta$  7,05 (H-10) com o carbono em  $\delta$  109,3 (C-12) e  $\delta$  129,0 (C-9a). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  3,92 (H-7) com o carbonos em  $\delta$  115,7 (C-8a); do sinal em  $\delta$  3,70 (H-8) com o carbono em  $\delta$  61,0 (C-7),  $\delta$  115,7 (C-8a),  $\delta$  129,0 (C-9a) e  $\delta$  131,0 (C-13a); e do sinal em  $\delta$  4,30 (H-1') com o carbono em  $\delta$  167,0 (C-5). Correlações mostradas abaixo:

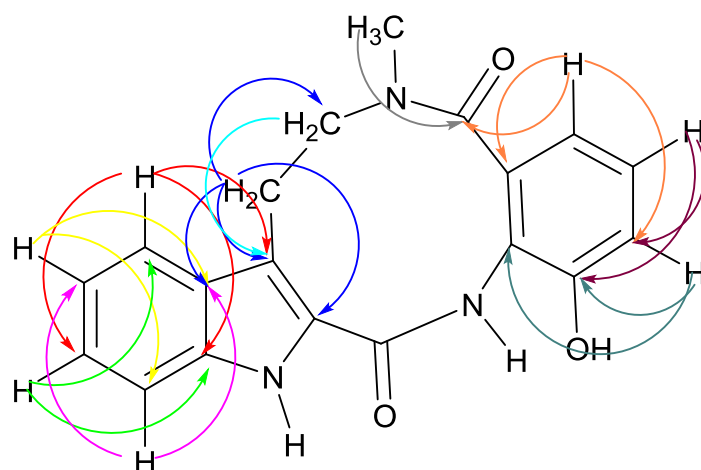


FIGURA 4.23 - Correlações observadas no espectro de HMBC

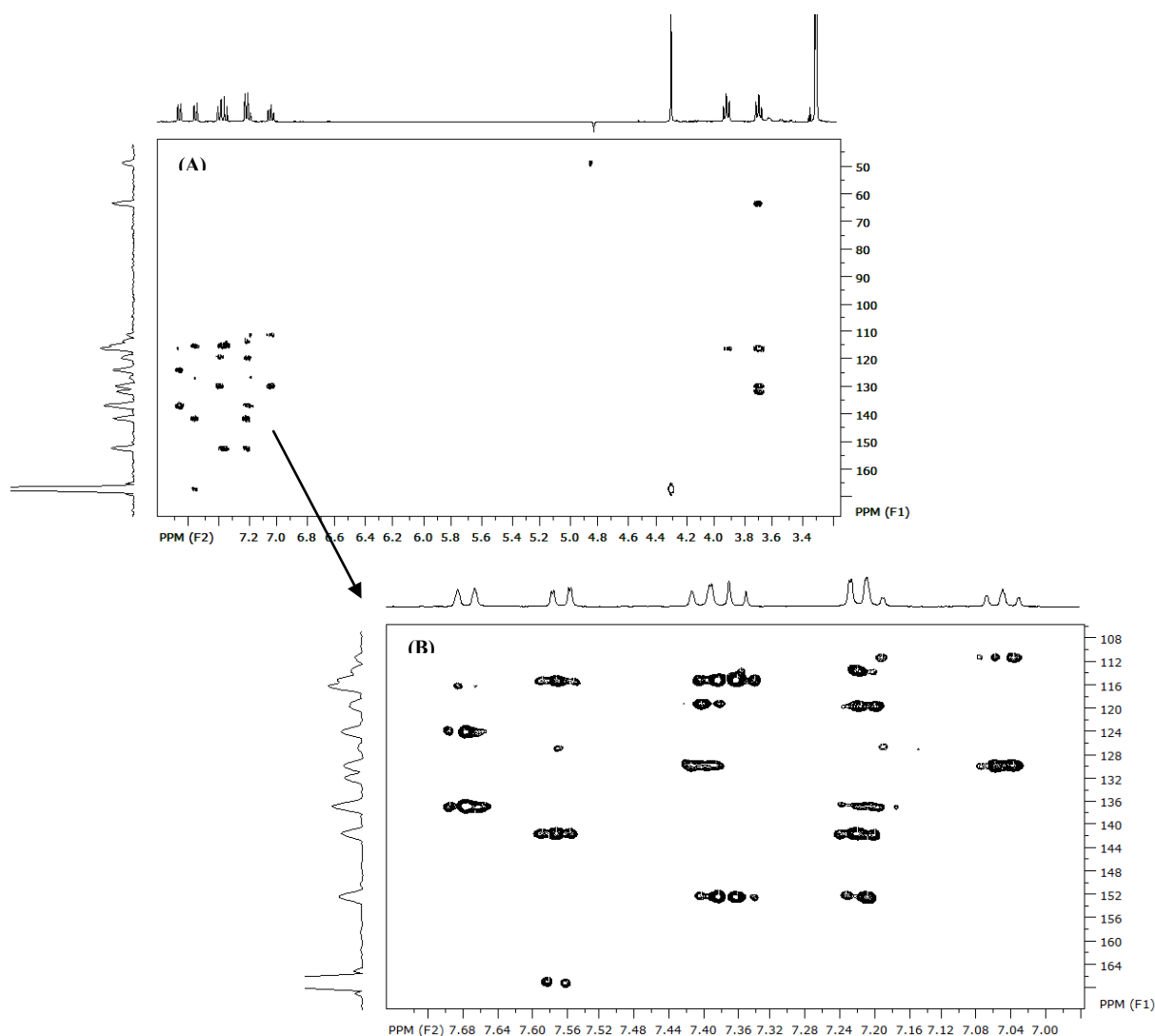


FIGURA 4.24 - (A) Espectro de HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **6**. (B) Expansão da região aromática.

Portanto, através do experimento de HMBC foi possível determinar os valores dos carbonos quaternários da substância **6**, com exceção do C-13.

O espectro de massas (FIGURA 4.25) revelou a massa molar desta substância como 335,3584D o que confirma a fórmula molecular de C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> da estrutura proposta.

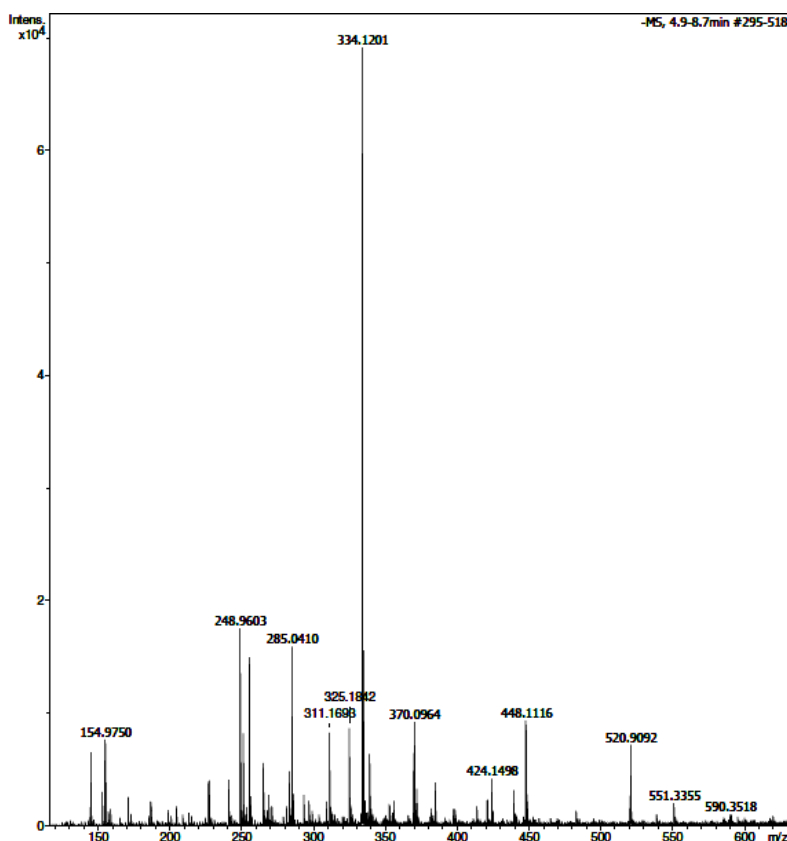


FIGURA 4.25 - Espectro de massas de alta resolução da substância 6.

Diante disto elucidou-se a substância 6 como o alcaloide mostrado na FIGURA 4.19.

A substância 7 (FIGURA 4.26) foi isolada da fração MSCED15, apresentou-se como um sólido amarelo amorfo.

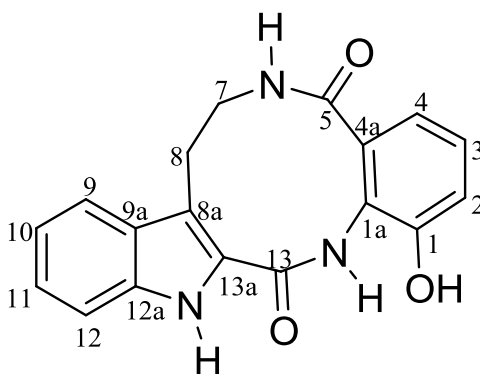


FIGURA 4.26 - Estrutura da substância 7 (INÉDITA).



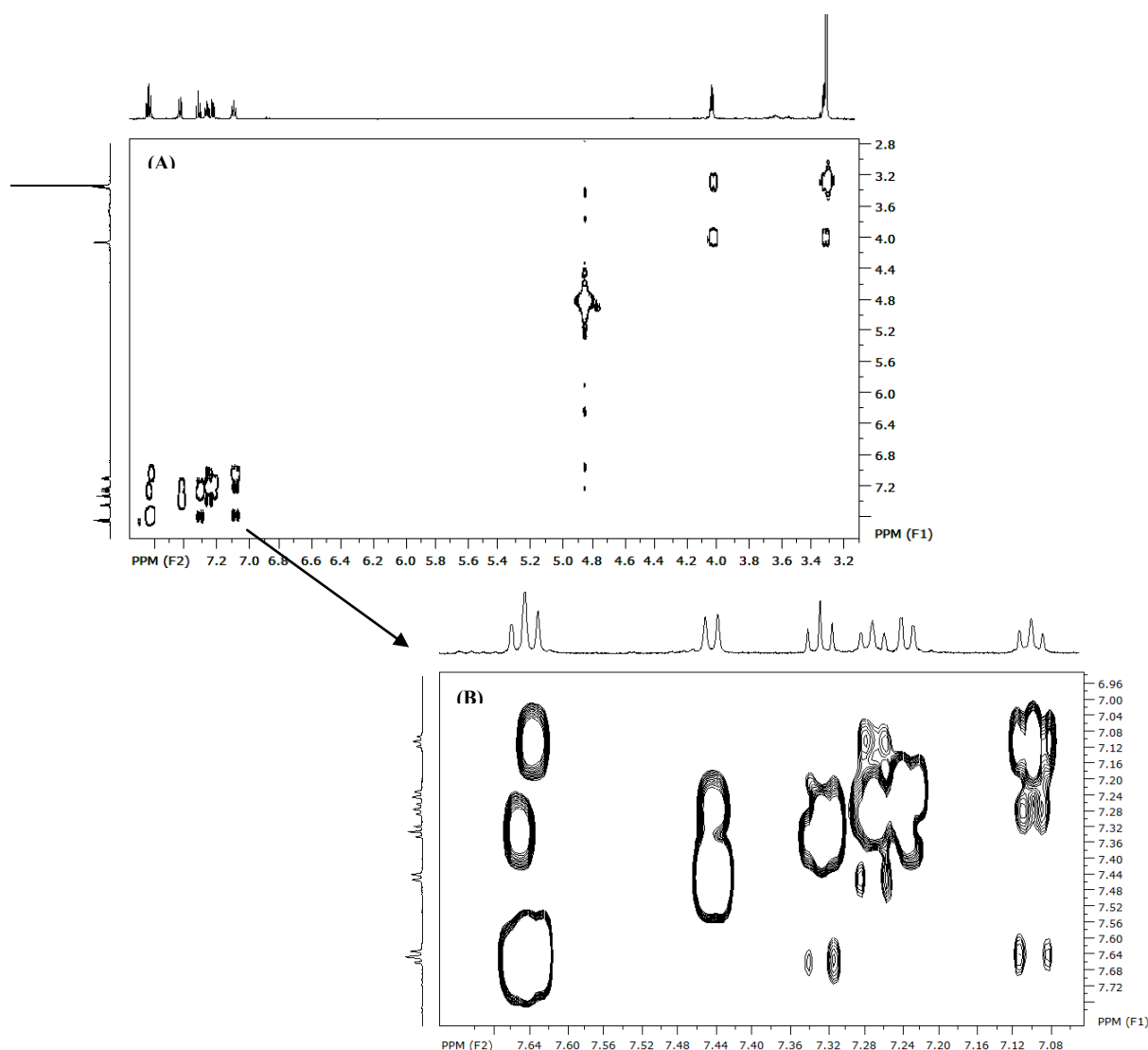


FIGURA 4.28 - (A) Espectro de gCOSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **7**. (B) Expansão da região aromática.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.29) observaram-se correlações entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,64 (H-9) com os carbonos em  $\delta$  118,1 (C-9) e  $\delta$  114,9 (C-4), em  $\delta$  7,44 (H-12) com o carbono em  $\delta$  110,3 (C-12), em  $\delta$  7,33 (H-3) com o carbono em  $\delta$  125,6 (C-3), em  $\delta$  7,27 (H-11) com o carbono em  $\delta$  123,4 (C-11), em  $\delta$  7,23 (H-2) com o carbono em  $\delta$  116,5 (C-2) e em  $\delta$  7,09 (H-10) com o carbono em  $\delta$  118,6 (C-10). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  4,03 (H-7) com o carbono em  $\delta$  61,2 (C-7) e em  $\delta$  3,32 (H-8) com o carbono em  $\delta$  25,8 (C-8).

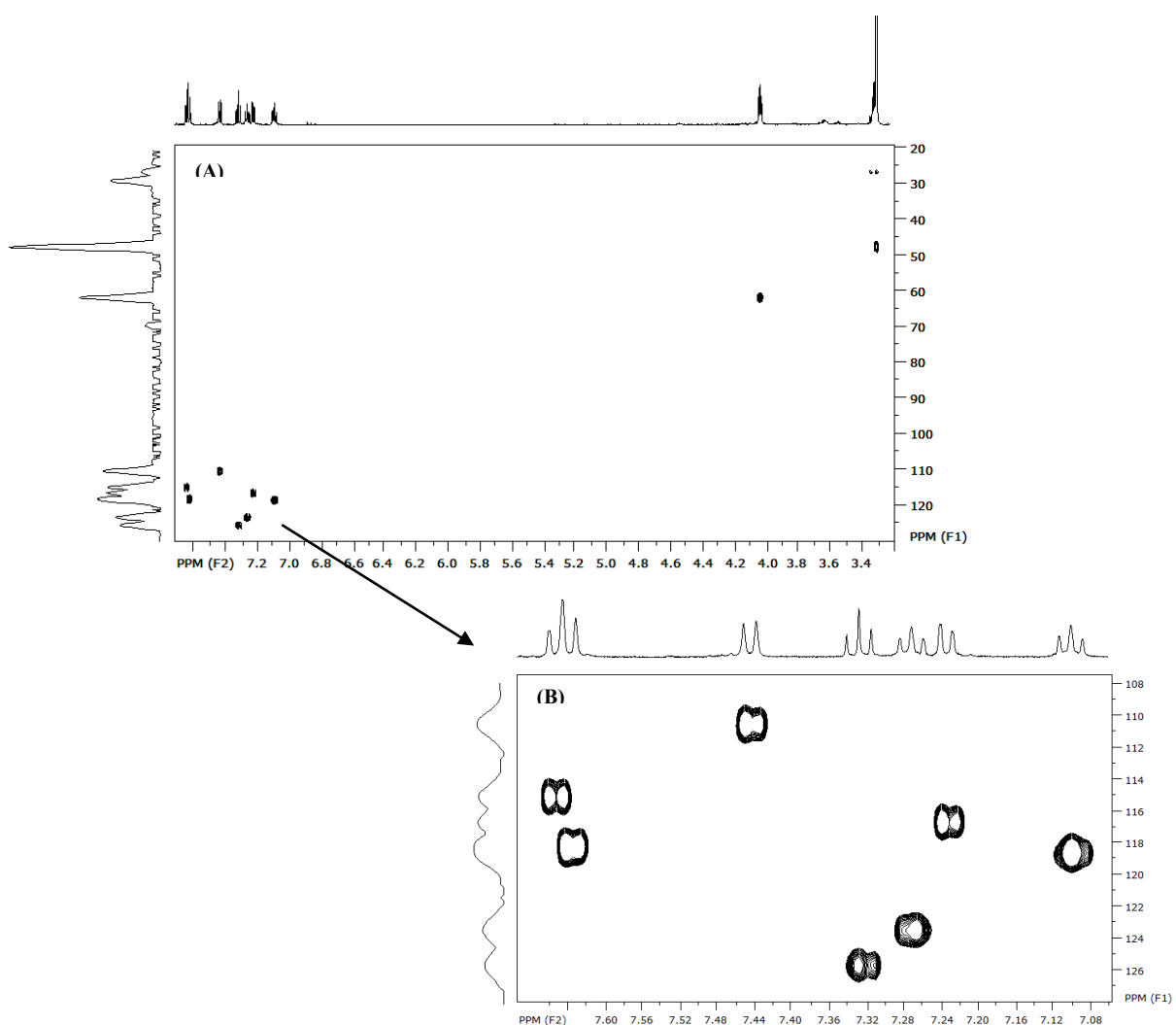


FIGURA 4.29 - (A) Espectro de HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **7**. (B) Expansão da região aromática.

As correlações mostradas na FIGURA 4.30 foram observadas no espectro de HMBC (FIGURA 4.31), entre os sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,64 (H-9) com o carbono em  $\delta$  136,7 (C-12a),  $\delta$  115,5 (C-8a) e  $\delta$  123,4 (C-11); em  $\delta$  7,64 (H-4) com os carbonos em  $\delta$  116,5 (C-2),  $\delta$  138,6 (C-1a),  $\delta$  163,2 (C-5); em  $\delta$  7,44 (H-12) com os carbonos em  $\delta$  118,6 (C-10) e  $\delta$  128,2 (C-9a); em  $\delta$  7,27 (H-11) com os carbonos em  $\delta$  118,1 (C-9) e  $\delta$  136,7 (C-12a); em  $\delta$  7,33 (H-3) com os carbonos em  $\delta$  121,0 (C-4a) e em  $\delta$  152,6 (C-1), em  $\delta$  7,23 (H-2) com os carbonos em  $\delta$  152,6 (C-1),  $\delta$  114,9 (C-4) e em  $\delta$  138,3 (C-1a) e o



sinal em  $\delta$  7,05 (H-10) com o carbono em  $\delta$  110,3 (C-12) e  $\delta$  128,2 (C-9a). Ainda pode-se observar correlações entre o sinal em  $\delta$  4,03 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  25,8 (C-8) e  $\delta$  115,5 (C-8a); e do sinal em  $\delta$  3,32 (H-8) com o carbono em  $\delta$  61,2 (C-7),  $\delta$  115,5 (C-8a) e  $\delta$  128,2 (C-9a).

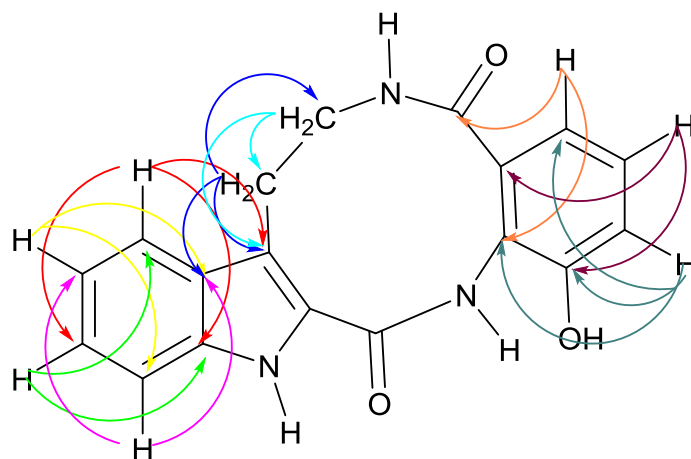


FIGURA 4.30 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância 7.

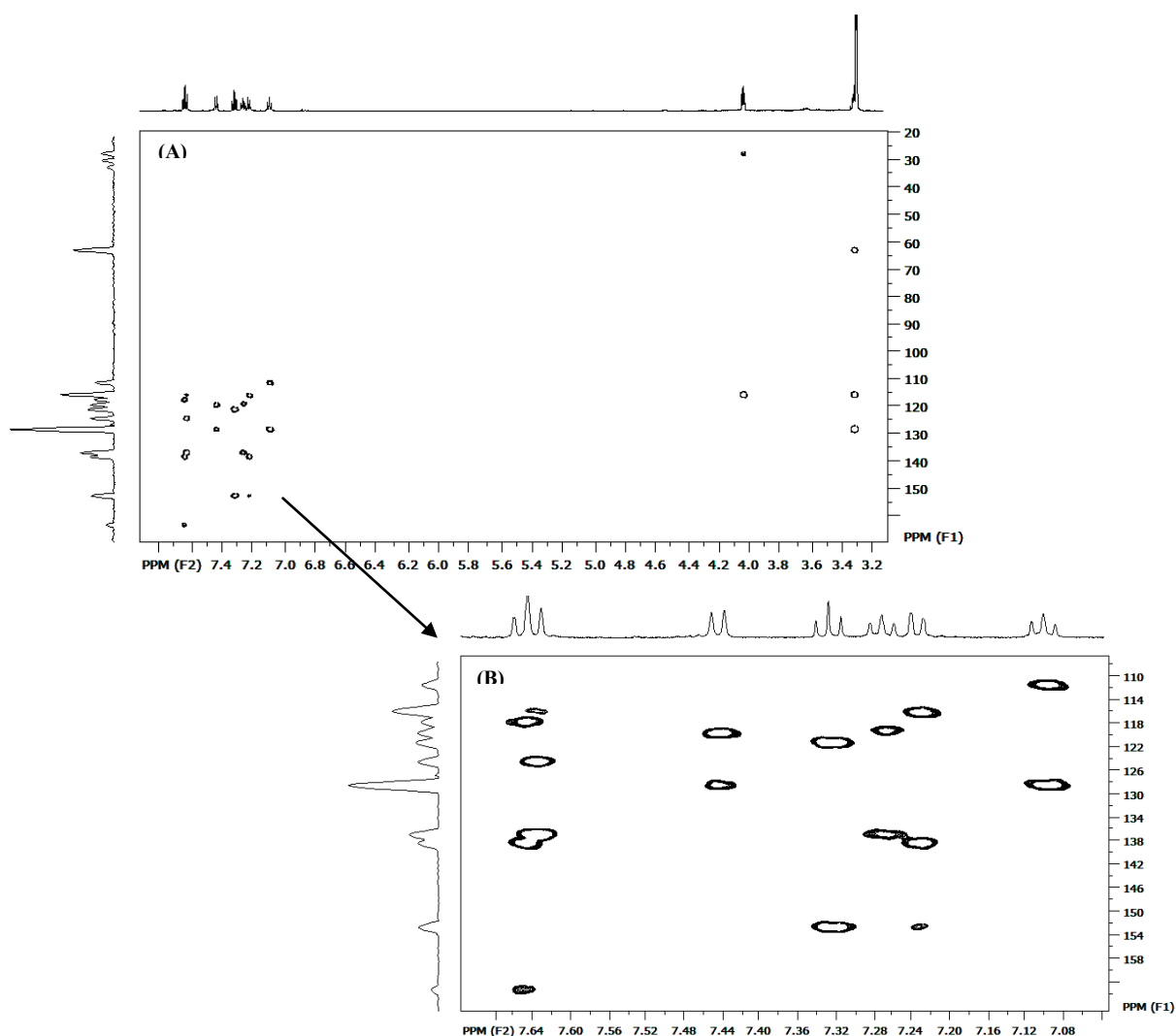


FIGURA 4.31 - Espectro e expansão do HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 7.

Portanto, através do experimento de HMBC foi possível determinar os valores dos carbonos quaternários da substância 7 com exceção do C-13 e do C-13a.

O espectro de massas (FIGURA 4.32) revelou a massa molar desta substância como 321,3318D o que confirma a fórmula molecular de C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> da estrutura proposta

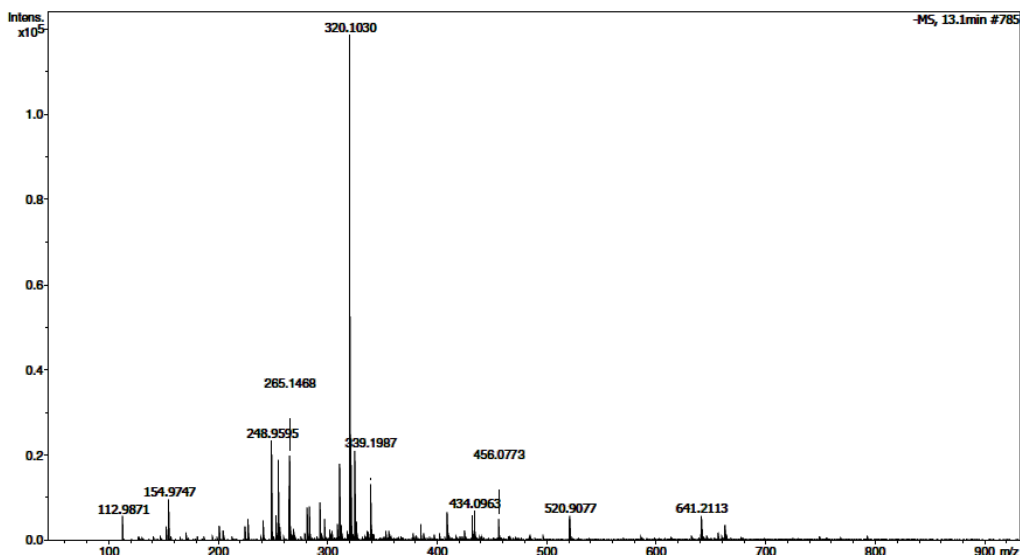


FIGURA 4.32 - Espectro de massas de alta resolução da substância 7.

Diante disto elucidou-se a substância 7 como o alcaloide mostrado na FIGURA 4.26.

Foram elucidadas as substâncias 6 e 7 como dois alcaloides de estrutura inédita e comparando-os observa-se como única diferença entre eles a presença da metila ligada ao átomo de nitrogênio na estrutura da substância 7, os dados de RMN de ambas estão descritos na TABELA 4.2.

Pos.	Substância 6			Substância 7		
	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	152,3; qC			152,6; qC		
1'	52,1; CH <sub>3</sub>	4,30; s	5			
1a	141,4; qC			138,6; qC		
2	113,4; CH	7,40; m	1,1a	116,5; CH	7,23; dd (1,2; 8,2)	1, 1a, 4
3	125,0; CH	7,20; m	1, 2	125,6; CH	7,33; t (8,2)	1, 4a
4	111,6; CH	7,57; dd (1,5; 8,1)	2, 4a, 5	114,9; CH	7,64; dt (1,2; 8,2)	1a, 5
4a	126,2; qC			121,0; qC		
5	167,0; qC			163,2; qC		
7	61,0; CH <sub>2</sub>	3,92; t (7,5)	8a	61,2; CH <sub>2</sub>	4,03; t (7,8)	8, 8a
8	26,8; CH <sub>2</sub>	3,70; t (7,5)	7, 8a,9a, 13a	25,8; CH <sub>2</sub>	3,32; t (7,8)	7, 8a, 9a
8a	115,7; qC			115,5; qC		
9	117,7; CH	7,68; d (8,1)	8a, 11, 12a	118,1; CH	7,64; dt (1,2; 8,2)	8a, 11, 12a
9a	129,0; qC			128,2; qC		
10	117,2; CH	7,05; dt (1,3; 8,1)		118,6; CH	7,09; t (8,2)	
11	122,1; CH	7,20; m	9, 12a	123,4; CH	7,27; dt (1,2; 8,2)	9, 12a
12	112,0; CH	7,40;m	10, 9a	110,3; CH	7,44; d (8,2)	10, 9a
12a	136,0; qC			136,7; qC		
13	-; qC			-; qC		
13a	131,0; qC			-; qC		

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.2 - Dados de RMN das substâncias 6 e 7.

#### 4.2.1.6 - PROPOSTA DA BIOGÊNESE DAS SUBSTÂNCIAS 4-7

Com observações realizadas de Dewick (2009) foi realizada a proposta biogenética das substâncias 4, 5, 6 e 7 (FIGURA 4.33)

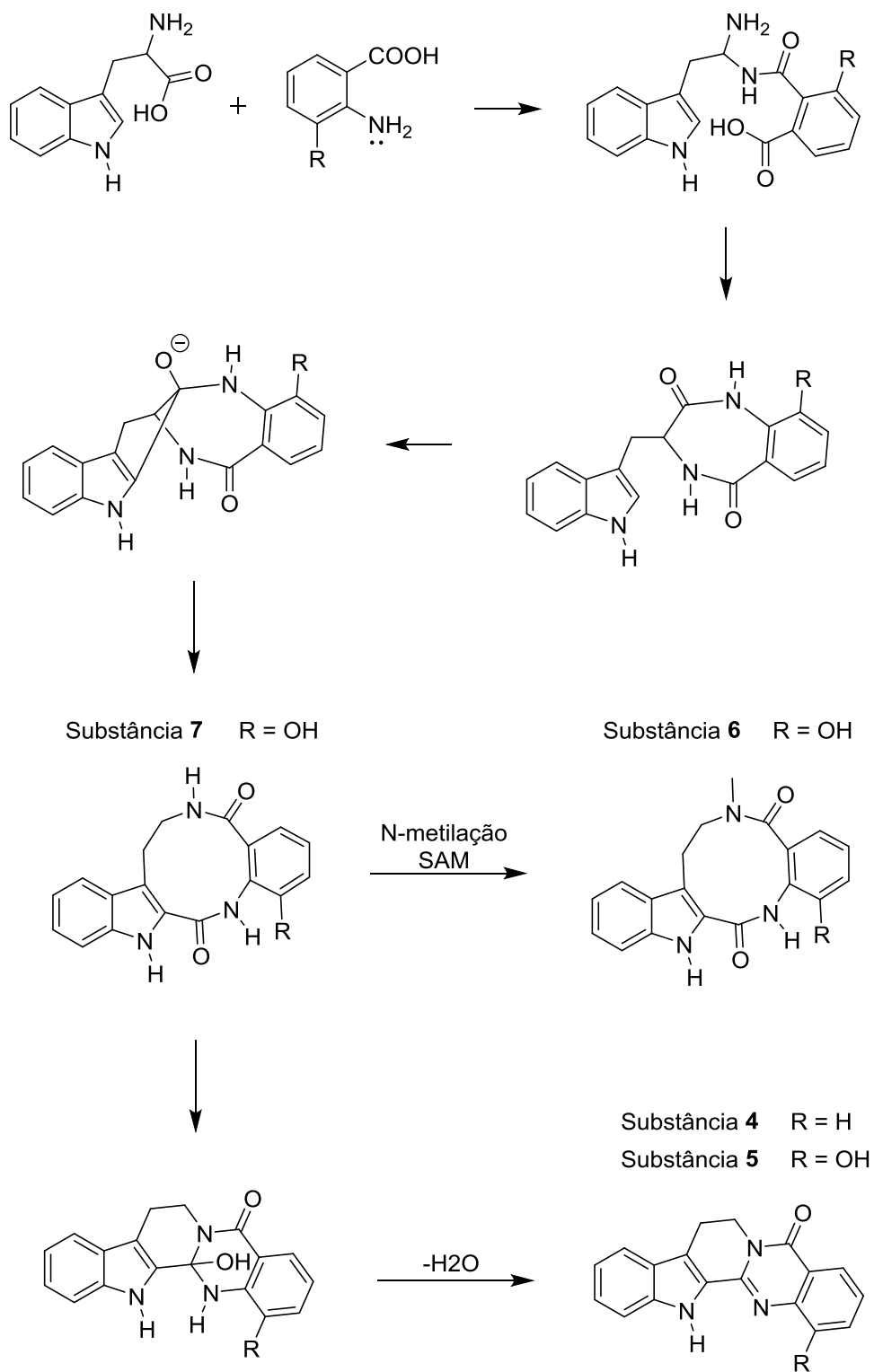


FIGURA 4.33 - Proposta da biogênese das substâncias 4-7

## 4.2.2 CUMARINAS

As cumarinas são derivadas da via do ácido chiquímico pelo metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus principais precursores o ácido p-cumárico. Foram isoladas cumarinas contendo esqueleto básico, além de furano e pirano (LOBO & LOURENÇO, 2007).

### 4.2.2.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA HERACLENOL

A cumarina heraclenol (FIGURA 4.34) foi isolada da fração MSCED21\_37, como um sólido amarelado amorfo. Sua elucidação foi baseada em espectros de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, gCOSY e por comparação com dados da literatura (HARKAR *et al*, 1984).

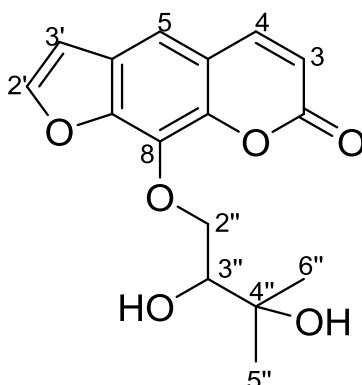


FIGURA 4.34 - Estrutura da heraclenol (8).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.35) revelou sinais característicos do anel lactônico de um esqueleto cumarínico, em  $\delta$  7,78 (1H, d,  $J=9,5$  Hz) e em  $\delta$  6,39 (1H, d,  $J=9,5$  Hz) de H-4 e H-3, respectivamente. Sinais característicos de um anel furano em  $\delta$  7,70 (1H, d,  $J=2,3$  Hz) e em  $\delta$  6,83 (1H, d,  $J=2,3$  Hz) referentes aos H-2' e H-3', respectivamente. Revelou também um sinal em  $\delta$  7,41 (1H, s) referente ao H-5 devido a desblindagem não observada como ocorreria no caso deste sinal ser referente ao H-8. Pode-se observar ainda,

sinais em  $\delta$  4,77 (1H, dd,  $J=10,2$  e  $2,5$  Hz) de H-2''b, em  $\delta$  4,42 (1H, dd,  $J=10,2$  e  $7,7$  Hz) de H-2''a, em  $\delta$  3,88 (1H, dd,  $J=7,7$  e  $2,5$  Hz) de H-3'', e sinais em  $\delta$  1,35 (3H, s) e em  $\delta$  1,31 (3H, s) referentes a duas metilas, estes sinais indicam a presença de um grupo prenila modificado.

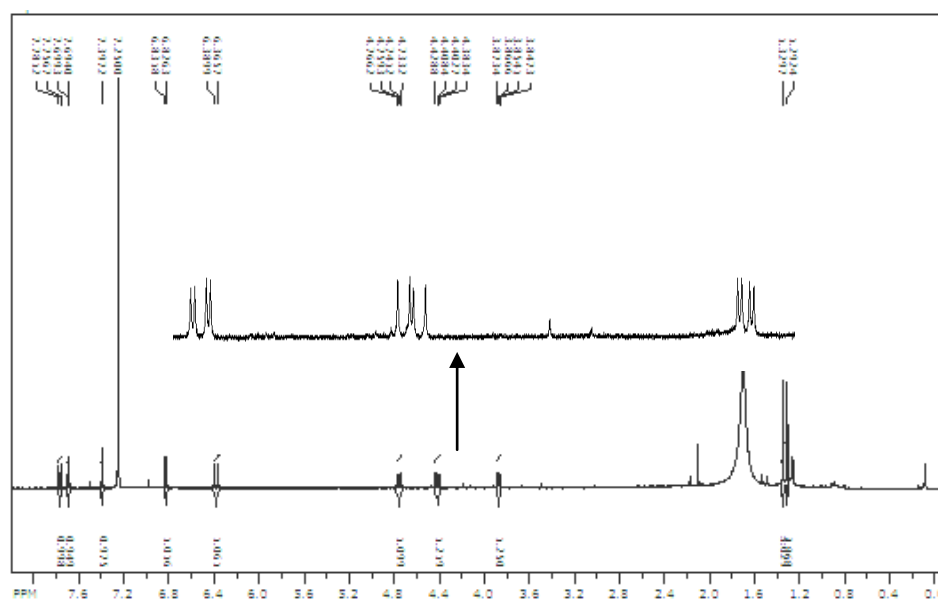


FIGURA 4.35 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do heraclenol.

O deslocamento de H-4 em  $\delta$  7,78 sugere que a posição C-5 não esteja substituída devido ao sinal não desblindado pelo efeito do grupo O-prenila modificado, o que permite dizer que este grupo está posicionado em C-8. Outra observação interessante para este tipo de estrutura é a falta de acoplamentos a longa distância entre H-4, H-3' e H-8 devido a falta deste hidrogênio em H-8, o que é mais uma indicação de que o grupo preniloxila esteja ligado a C-8.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.36) observou-se correlações entre os sinais em  $\delta$  7,70 (H-2') e em  $\delta$  6,83 (H-3') relativos ao anel furano com os carbonos em  $\delta$  146,9 (C-2') e em  $\delta$  107,0 confirmando se tratar de uma furanocumarina. Observou-se também correlações entre os sinais em  $\delta$  7,78 (H-4) e em  $\delta$  6,39 (H-3) relativos ao anel lactônico com os carbonos em  $\delta$  144,0 (C-4) e em  $\delta$  114,7 (C-3) e a correlação do sinal em  $\delta$  7,41 (H-5) com o carbono em

$\delta$  113,7 (C-5). Ainda foi possível observar as correlações entre os sinais em  $\delta$  3,88 (H-3'') com o carbono em  $\delta$  76,0 (C-3''), em  $\delta$  4,77 (H-2''b) e em  $\delta$  4,42 (H-2''a) com o carbono em  $\delta$  75,5 (C-2'') e as correlações dos sinais referentes as metilas em  $\delta$  1,35 e em  $\delta$  1,31 com os carbonos em  $\delta$  26,8 e  $\delta$  25,1, respectivamente.

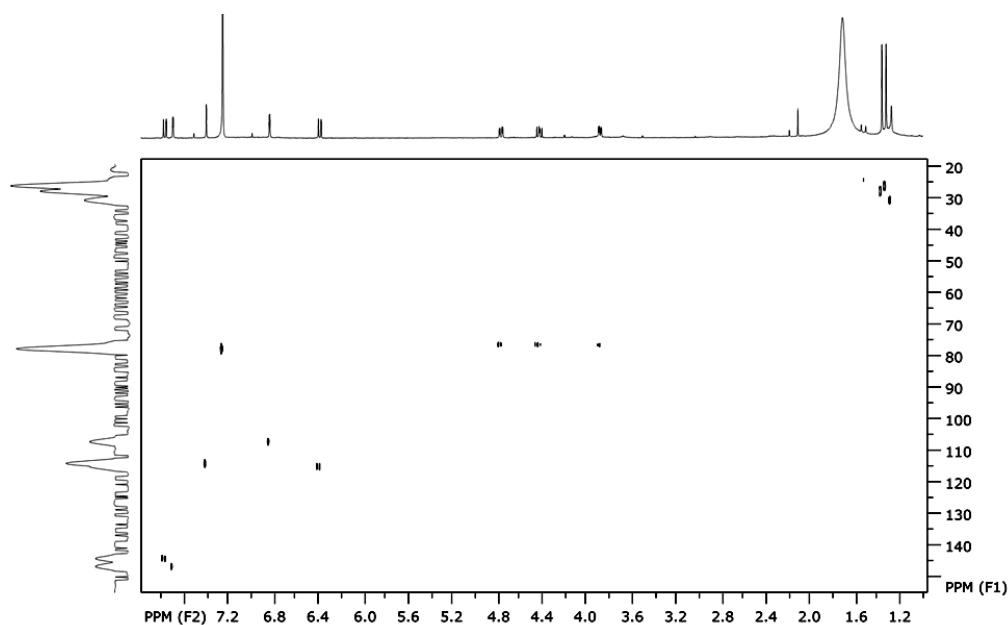


FIGURA 4.36 - Espectro de correlação HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do heraclenol.

No espectro de gCOSY (FIGURA 4.37) observamos as correlações entre H-3 e H-4 referentes ao anel lactônico, entre H-2' e H-3' relativos ao anel furano, e entre H-2''a, H-2''b e H-3'', correlações representadas na FIGURA 4.38.



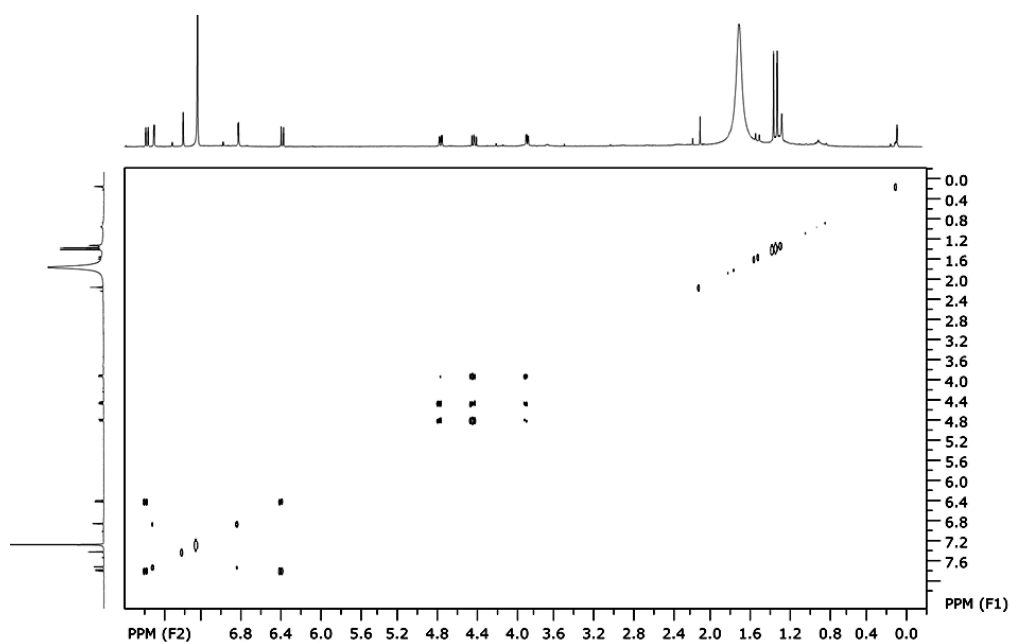


FIGURA 4.37 - Espectro de correlação gCOSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do heraclenol.

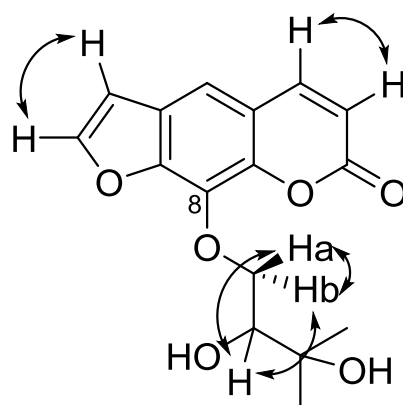


FIGURA 4.38 - Correlações observadas no espectro de gCOSY de heraclenol.

Assim esta substância foi identificada como a cumarina heraclenol mostrada na FIGURA 4.34.

#### 4.2.2.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA FELOPTORINA

A furano cumarina feloptorina (FIGURA 4.39), foi isolada da fração MSCED4\_5 como um sólido amarelo amorfo. Sua elucidação estrutural Baseou-se em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, gCOSY e por comparação com dados da literatura (KANG, 2008).

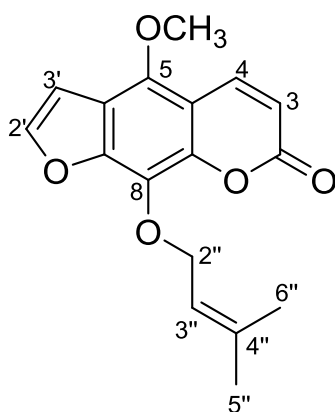


FIGURA 4.39 - Estrutura da feloptorina (9).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.40) observou-se sinais característicos de uma furano cumarina O-alkilada nas posições 5 e 8, além dos sinais em  $\delta$  6,26 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) do H-3, em  $\delta$  8,19 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) do H-4, em  $\delta$  7,90 (1H, d,  $J=2,4$  Hz) do H-2' e em  $\delta$  7,28 (1H, d,  $J=2,4$  Hz) do H-3'. Ainda foram observados sinais de uma metoxila em  $\delta$  4,23 (3H, s), de um grupo prenila em  $\delta$  4,81 (2H, d,  $J=7,1$  Hz) do H-2'', em  $\delta$  5,55 (1H, m) do H-3'' e das duas metilas em  $\delta$  1,62 (3H, s) e em  $\delta$  1,66 (3H, s).

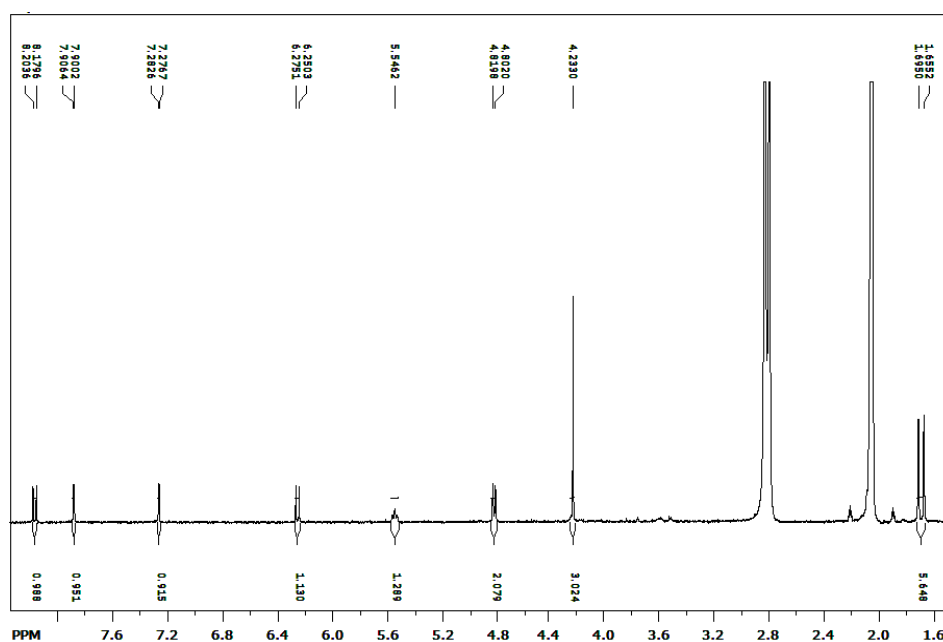


FIGURA 4.40 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da feloptorina.

No espectro de gCOSY (FIGURA 4.41) observou-se as correlações entre H-3 e H-4, H-3' e H-2' e entre os hidrogênios do grupo prenila.

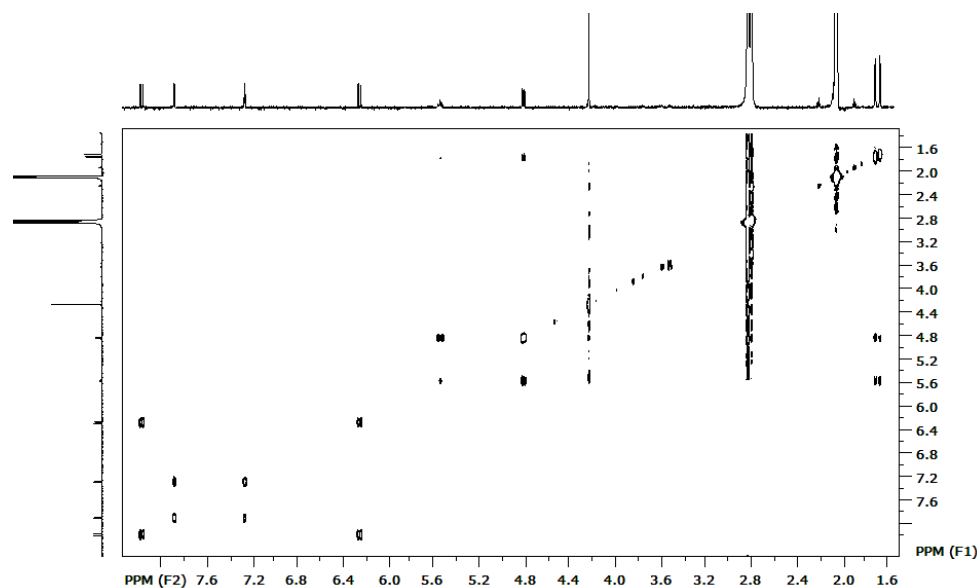


FIGURA 4.41 - Espectro de COSY (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da feloptorina.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.42) observou-se correlações entre os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  6,26 (H-3) com o carbono em  $\delta$  112,3 (C-3), em  $\delta$  8,19 (H-4) com o carbono em  $\delta$  139,4 (C-4), em  $\delta$  7,90 (H-2') com o carbono em  $\delta$  145,5 (C-2'), em  $\delta$  7,28 (H-3') com o carbono em  $\delta$  105,2 (C-3'), em  $\delta$  4,81 (H-2'') com o carbono em  $\delta$  69,3 (C-2'') e das metilas em  $\delta$  1,69 com o carbono em  $\delta$  24,9 e em  $\delta$  1,66 com o carbono em  $\delta$  16,9. Observou-se ainda a correlação dos hidrogênios da metoxila em  $\delta$  4,23 com o carbono em  $\delta$  60,4.

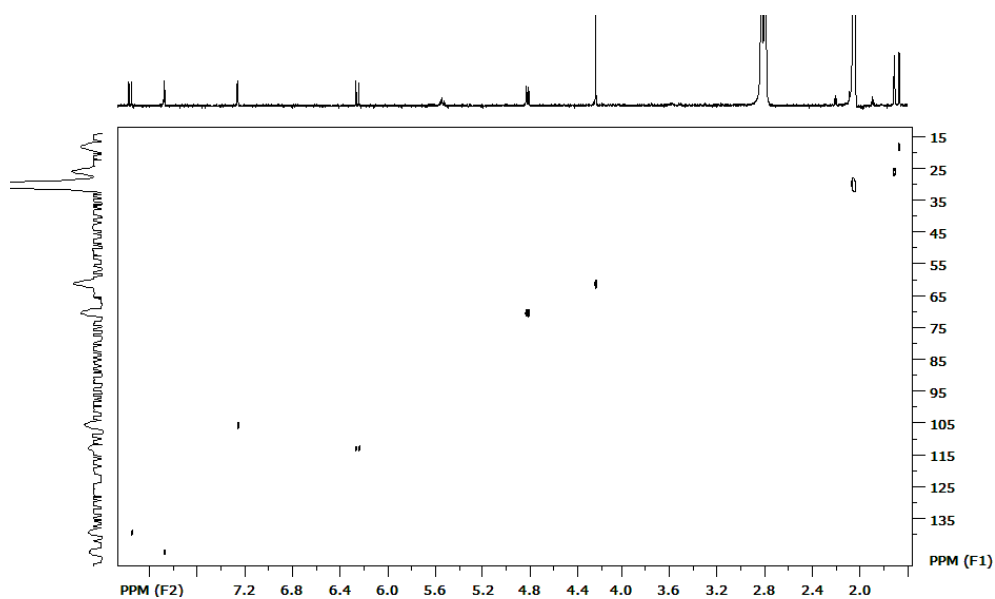


FIGURA 4.42 -Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da feloptorina.

No espectro de HMBC (FIGURA 4.43) não observou-se todas as correlações entre H e C, talvez devido à pequena massa de substância, mas este foi utilizado para confirmação da metoxila na posição 5, através da correlação dos hidrogênios da metoxila e do H-4 com o carbono em  $\delta$  144,6 (C-5).

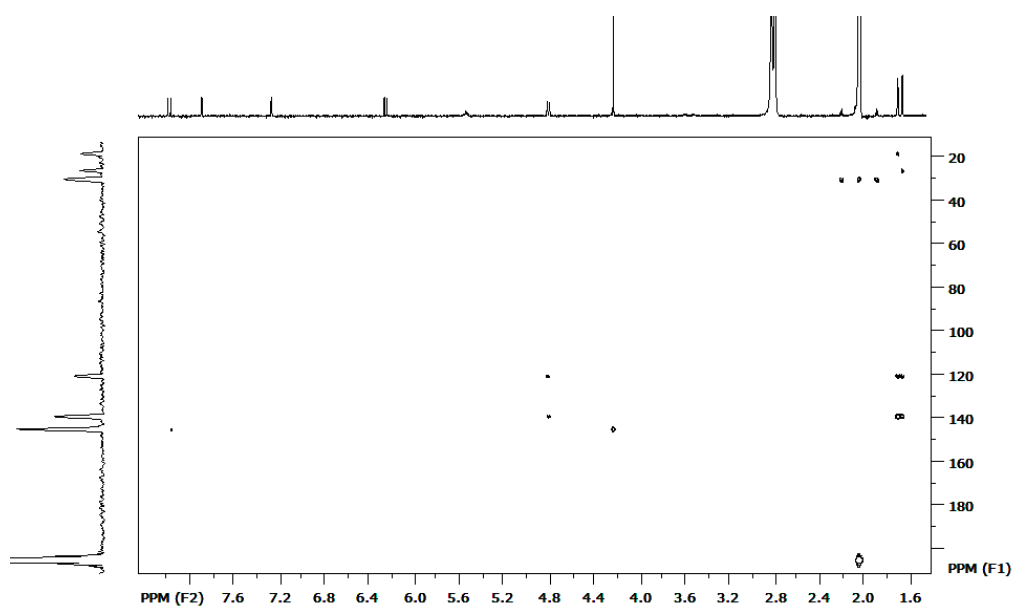


FIGURA 4.43 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da feloptorina.

A cumarina foi então identificada como a feloptorina, mostrada na FIGURA 4.39.

#### 4.2.2.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA 5,6-METILENODIOXI-7,8-DIMETOXICUMARINA

A cumarina 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina foi isolada das frações MSCED4\_5, MSCED53\_13\_19 e MSCED22\_58\_17 como um sólido branco amorfo. Sua elucidação estrutural baseou-se em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, NOE e por comparação com dados da literatura (BAETAS *et al.*, 1999).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.44) revelou sinais característicos de um esqueleto cumarínico em  $\delta$  7,98 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) e em  $\delta$  6,20 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) de H-4 e H-3, respectivamente. Observou-se o sinal dos hidrogênios de um grupo metilenodioxi em  $\delta$  6,14 (2H, s) e os sinais dos hidrogênios de duas metoxilas em  $\delta$  4,06 (3H, s) e em  $\delta$  3,95 (3H, s).

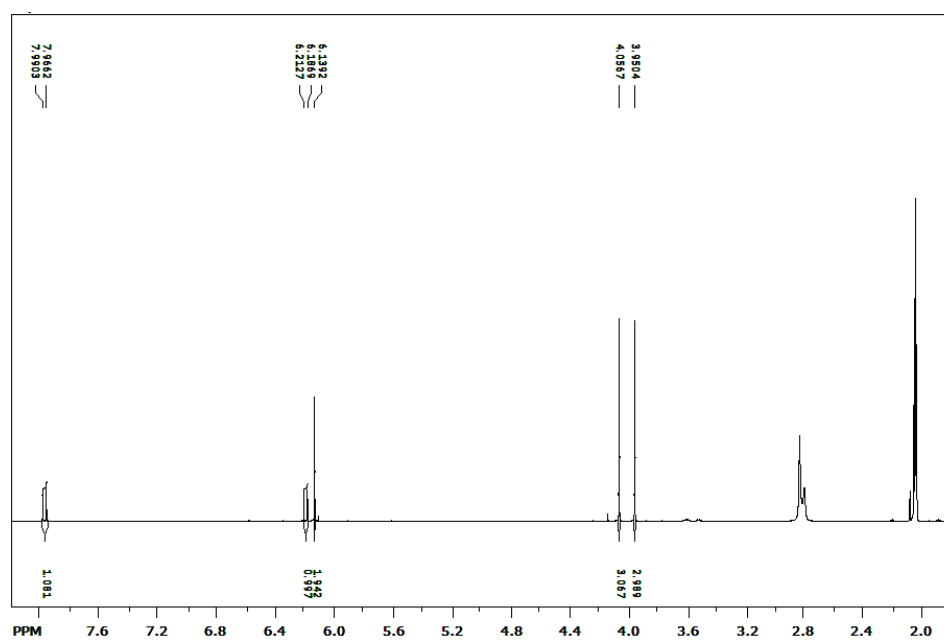


FIGURA 4.44 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.

Por estes dados é possível propor a estrutura de dois isômeros para esta substância (FIGURA 4.45). WU et al. (2001) mostram as interações e incrementos de sinais na substância **10b** ao se fazer o experimento de NOE, ao se irradiar os hidrogênios da metoxila observa-se incremento do sinal dos hidrogênios metilenodioxi e de H-4. Neste caso no espectro de NOE obtido para esta substância tem-se uma indicação da estrutura correta ser a **10a**, pois não se observou incremento ao se irradiar os hidrogênios das metoxilas e também ao se irradiar o H-4 só se observa o incremento no sinal de H-3.

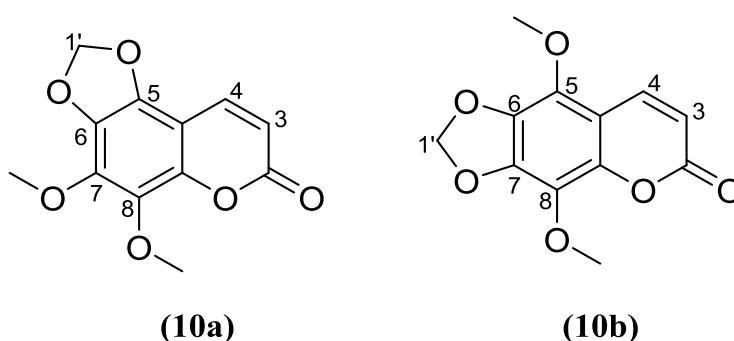


FIGURA 4.45 - Estruturas dos isômeros possíveis para a substância **10**.

No espectro de HSQC (FIGURA 4.46) observou-se correlações entre os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  6,20 (H-3) com o carbono em  $\delta$  138,6 (C-3), em  $\delta$  7,98 (H-4) com o carbono em  $\delta$  111,9 (C-4) e dos hidrogênios do grupo metilenodioxi em  $\delta$  6,14 com o carbono em  $\delta$  102,7. Observou-se ainda as correlações dos hidrogênios das metoxilas em  $\delta$  4,06 e em  $\delta$  3,95 com os carbonos em  $\delta$  59,8 e em  $\delta$  60,4, respectivamente.

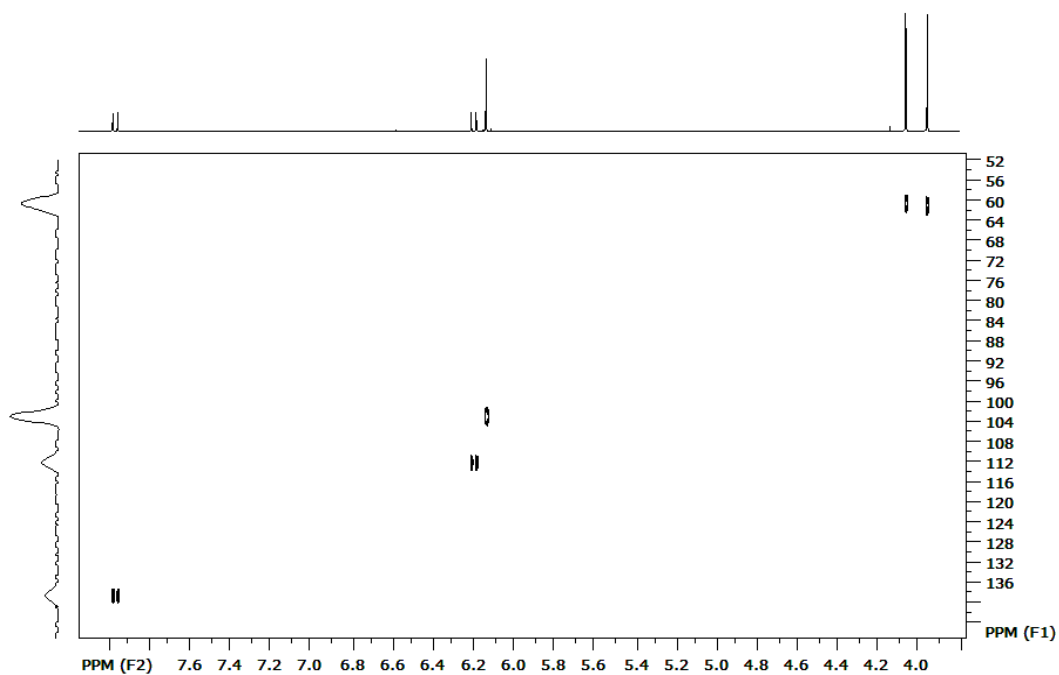


FIGURA 4.46 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da 5,6-metilenodioxi-7,8-dimetoxicumarina.

No espectro de HMBC (FIGURA 4.47) pode-se confirmar a estrutura como a **10a**, pois ao observar as correlações heteronucleares ilustradas na FIGURA 4.48, elas ilustram as correlações de H-4 com C-5 e C-6, onde a correlação é a quatro ligações e na outra possibilidade estrutural esta correlação seria a cinco ligações, de ocorrência muito pouco provável.

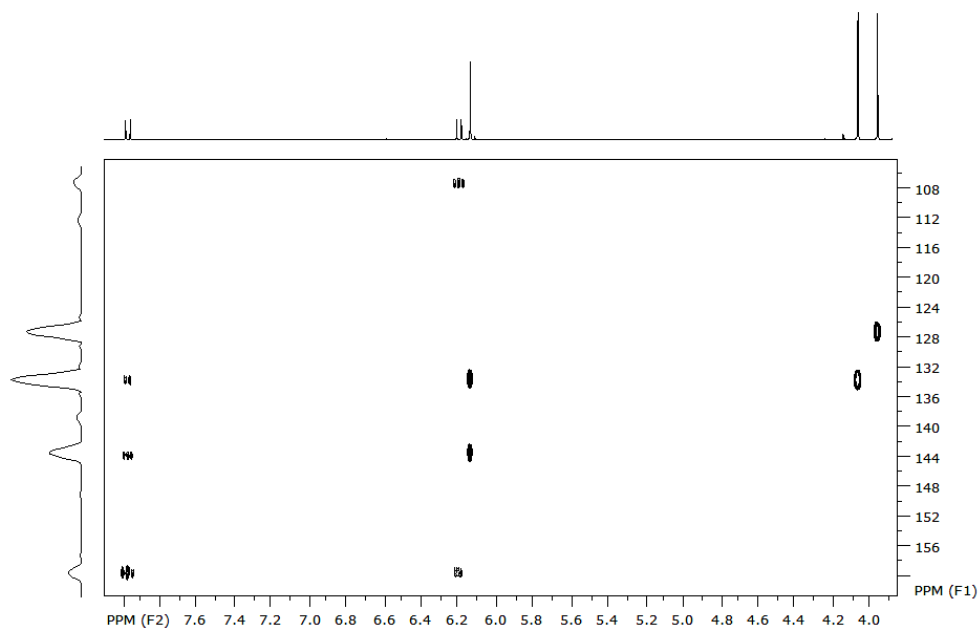


FIGURA 4.47 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina.

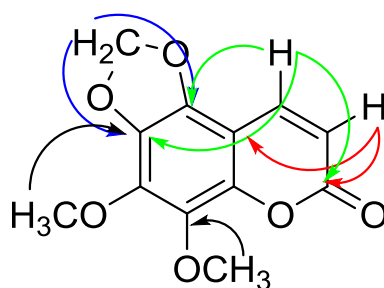


FIGURA 4.48 - Correlações observadas no espectro de HMBC da 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina.

Diante disto, esta cumarina foi identificada como a 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina (FIGURA 4.49).

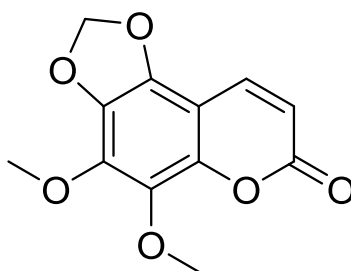


FIGURA 4.49 - Estrutura da 5,6-metilenodioxo-7,8-dimetoxicumarina (10).



#### 4.2.2.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA ISOPIMPENILINA

A cumarina isopimpenilina foi isolada das frações MSCED4\_5, MSCED22\_58\_17 e MSCED53\_13\_19 como um cristal branco. Sua elucidação estrutural baseou-se em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, NOE, difusão por raios X e por comparação com dados da literatura (MIKOLAJCZAK *et al.*, 1988).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.50) revelou sinais característicos do anel de um esqueleto cumarínico em  $\delta$  8,20 (1H, d,  $J=9,8$  Hz) e em  $\delta$  6,27 (1H, d,  $J=9,8$  Hz) de H-4 e H-3, respectivamente. Observou-se os sinais dos hidrogênios de um anel furano em  $\delta$  7,91 (1H, d,  $J=2,3$  Hz) de H-2' e em  $\delta$  7,28 (1H, d,  $J=2,3$  Hz) de H-3'; e os sinais dos hidrogênios de duas metoxilas em  $\delta$  4,23 (3H, s) e em  $\delta$  4,09 (3H, s).

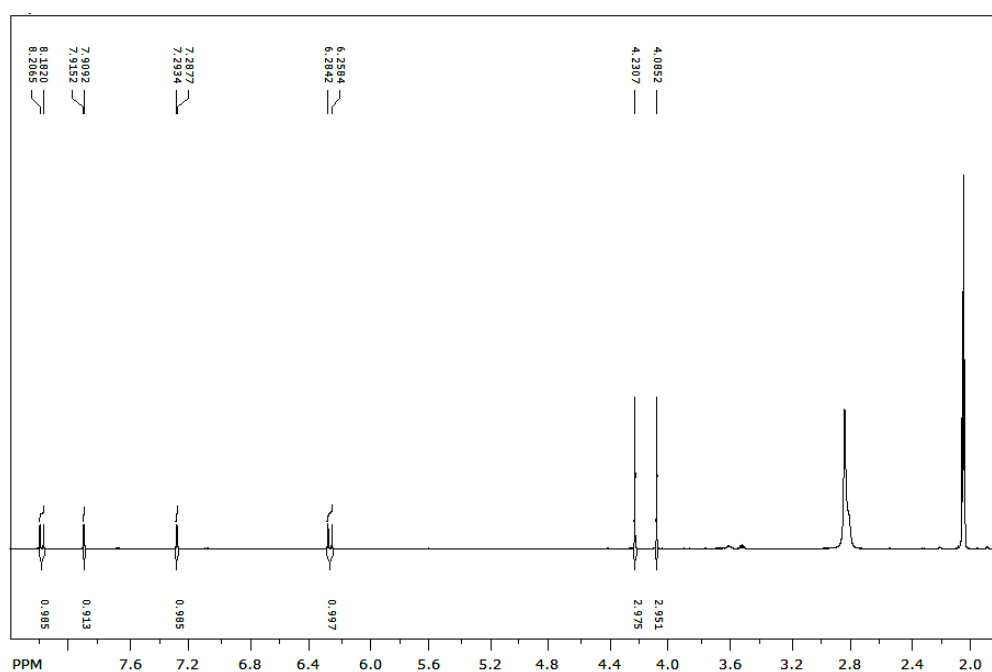


FIGURA 4.50 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da isopimpenilina.

Através dos espectros de RMN não foi possível propor se esta cumarina seria linear (**11a**) ou angular (**11b**) (FIGURA 4.51). Murray & Zacarias (1984) descrevem que os deslocamentos químicos dos grupos metoxilas quando maiores do que  $\delta$  4,15 e coincidentes indicam linearidade nas furanocumarinas e sinais com deslocamentos químicos menores do que  $\delta$  4,15 e diferentes caracterizam furanocumarinas angulares. Neste caso apesar dos sinais das metoxilas terem deslocamentos químicos diferentes, um é menor que 4,15 ppm e o outro maior, não sendo possível definir a estrutura exata.

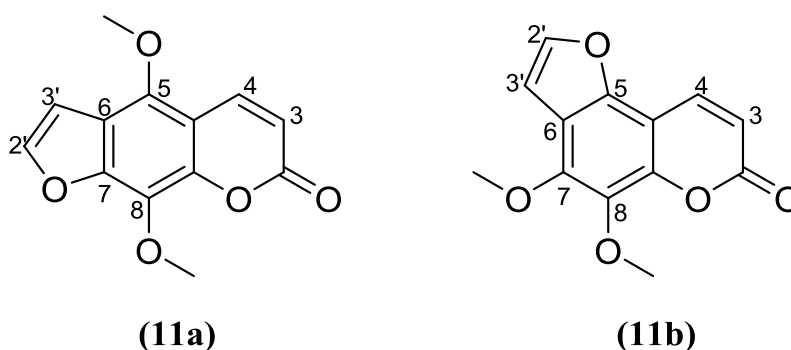


FIGURA 4.51 - Estruturas possíveis para a substância **11**.

Pelo espectro de NOE não se observou incremento no sinal de H-4 ao serem irradiados os sinais das metoxilas. Quando se irradiou o H-4 só se observou o incremento no sinal de H-3, o que pode ser uma indicação de que a substância possui configuração angular (**11b**) e não linear (**11a**).

No espectro de HSQC (FIGURA 4.52) observou-se correlações entre os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  6,27 (H-3) com o carbono em  $\delta$  112,5 (C-3), em  $\delta$  8,20 (H-4) com o carbono em  $\delta$  139,1 (C-4), em  $\delta$  7,91 (H-2') com o carbono em  $\delta$  145,7 (C-2') e em  $\delta$  7,29 (H-3') com o carbono em  $\delta$  105,2 (C-3'). Observou-se ainda correlações dos hidrogênios das metoxilas em  $\delta$  4,09 e em  $\delta$  4,23 com os carbonos em  $\delta$  60,9 e em  $\delta$  60,4, respectivamente.

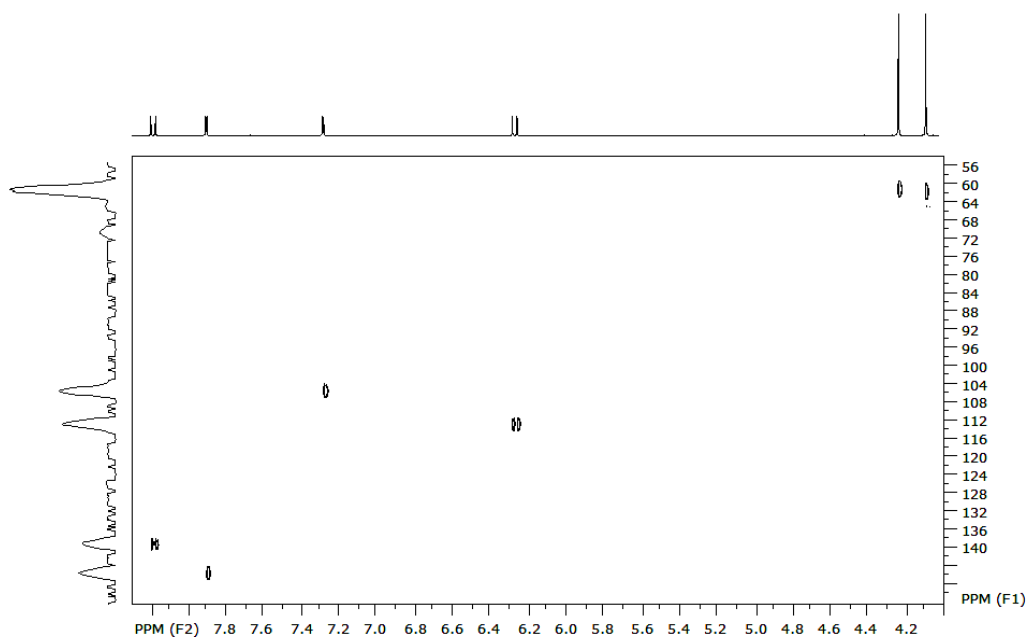


FIGURA 4.52 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da isopimpinilina.

As correlações mostradas na FIGURA 4.53 foram observadas no espectro de HMBC (FIGURA 4.54), a correlação entre H-4 e C-5 indica que a estrutura correta é de configuração linear (**11a**) pois caso a configuração fosse angular (**11b**) a correlação seria entre H-4 e C-7, ou seja, a cinco ligações o que é de ocorrência muito pouco provável.

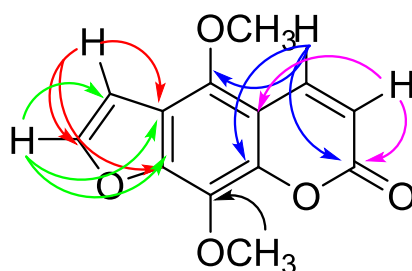


FIGURA 4.53 - Correlações observadas no espectro de HMBC da isopimpinilina.

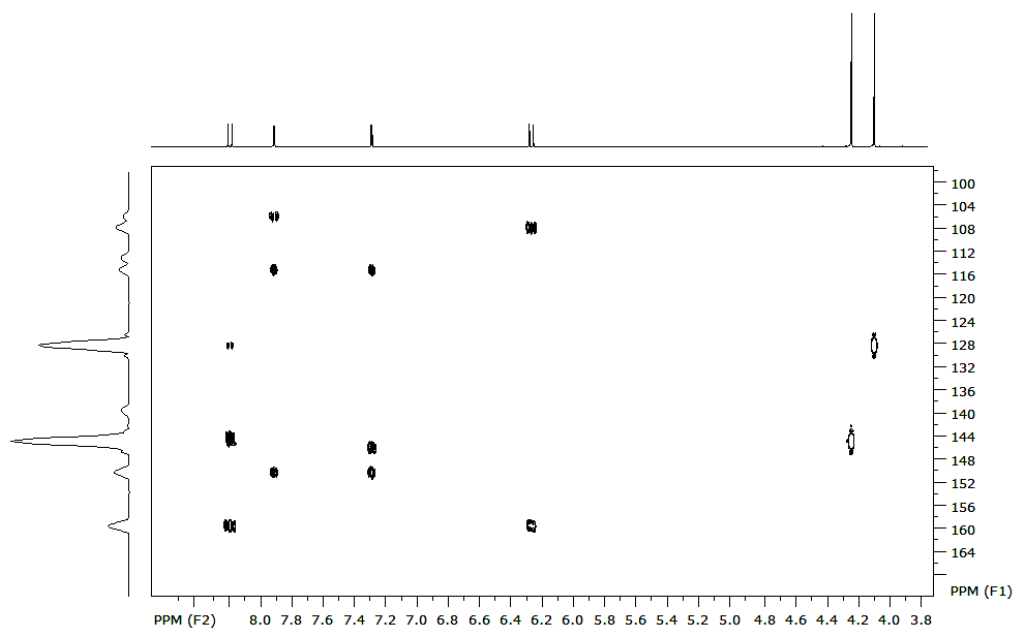


FIGURA 4.54 - Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da isopimpenilina.

Para confirmação desta estrutura foi realizado um experimento de difração de raios X, a representação da estrutura é mostrada na FIGURA 4.55.

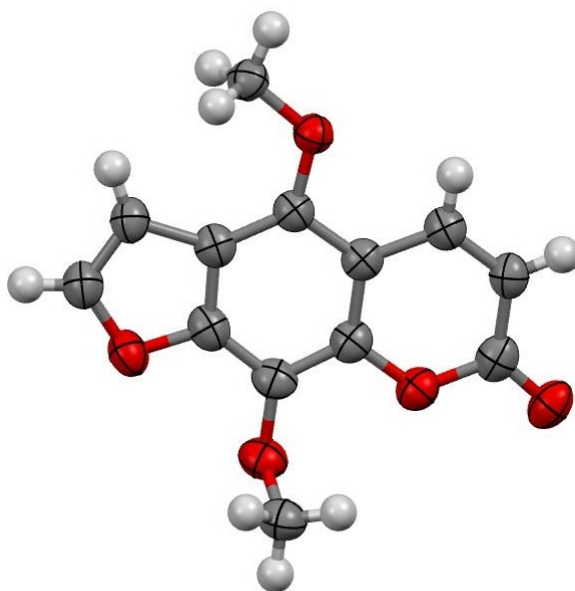


FIGURA 4.55 - Representação da estrutura da isopimpenilina.

Diante disto, foi elucidada esta substâncias como a isopimpenilina (FIGURA 4.56)

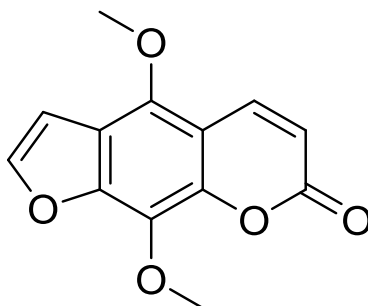


FIGURA 4.56 - Estrutura da isopimpenilina (11).

#### 4.2.2.5 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA 6,7-METILENODIOXI-8-METOXICUMARINA

A substância **12**, 6,7-metileneodioxo-8-metoxicumarina, foi isolada das frações MSCED22\_58\_17 como um cristal branco. Sua elucidação estrutural foi baseada em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , NOE, difração por raios X e por comparação com dados da literatura (SARKER *et al.*, 1994).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.57) revelou sinais característicos do anel de um esqueleto cumarínico em  $\delta$  7,84 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) e em  $\delta$  6,25 (1H, d,  $J=9,7$  Hz) de H-4 e H-3, respectivamente. Observou-se ainda o sinal dos hidrogênios de um grupo metilenoedioxi em  $\delta$  6,13 (2H, s), o sinal de um hidrogênio aromático em  $\delta$  6,83 (1H, s) referente ao H-5 e de uma metoxila em  $\delta$  4,05 (3H, s).

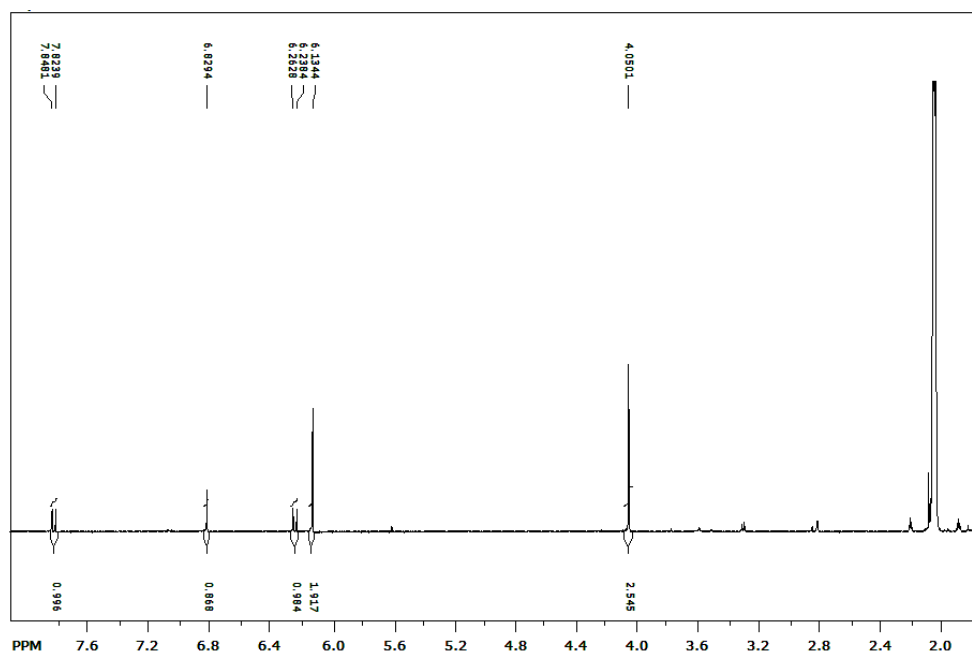


FIGURA 4.57 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da 6,7-metilenedioxi-8-metoxicumarina.

Com estes dados tem-se a possibilidade de três isômeros possíveis para esta substância que estão ilustradas na FIGURA 4.58.

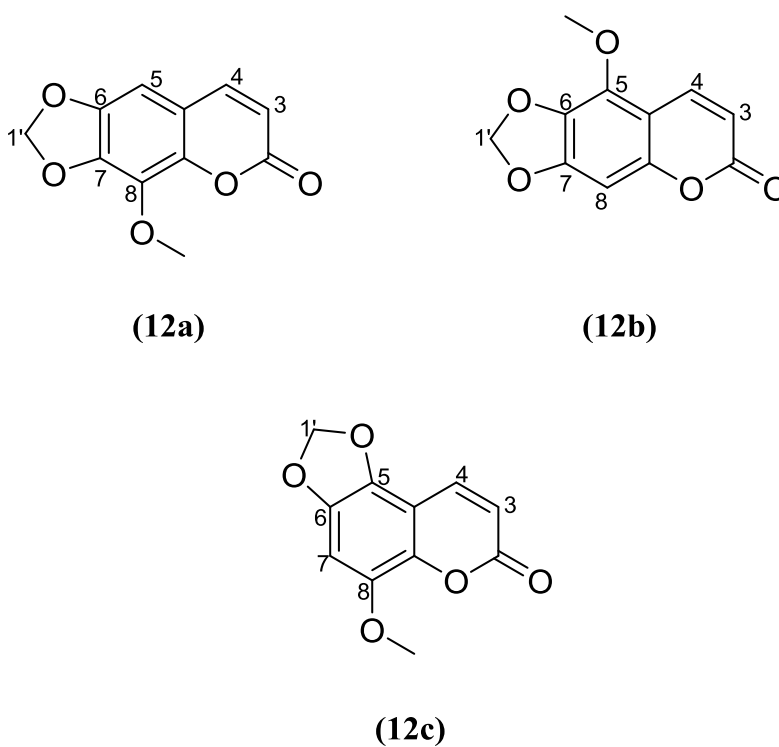


FIGURA 4.58 - Isômeros estruturais possíveis para a substância 12.

Pelo experimento de NOE não se observou incremento de sinal ao se irradiar o H-4 e os hidrogênios da metoxila. De acordo com WU (2001) pode-se obter o incremento dos sinais dos hidrogênios metilenoedioxi e de H-4 ao se irradiar os hidrogênios da metoxila. Assim pode-se supor que a estrutura correta seja a **12c**, devido a não observação dos incrementos sugeridos, embora esta seja um evidência indireta.

Por cristalização foi possível obter um nanocristal e por difração de raios X pode-se propor a estrutura inequívoca para esta substância (FIGURA 4.59).

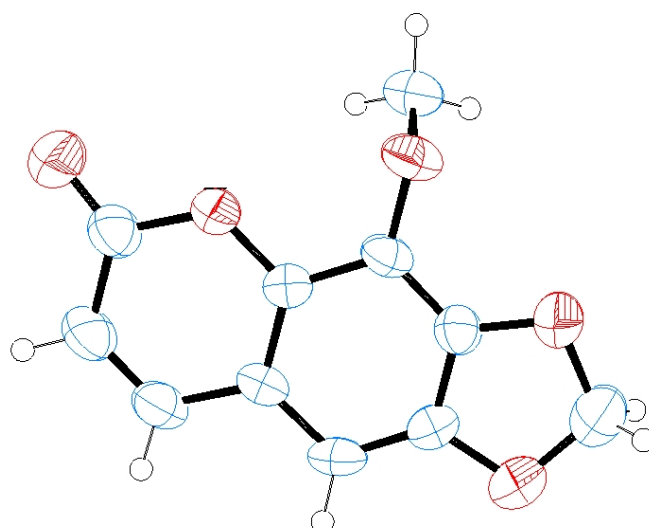


FIGURA 4.59 - Representação da estrutura da 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina.

Portanto a substância pode ser elucidada como a 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina (FIGURA 4.60)

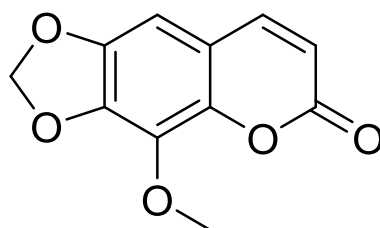


FIGURA 4.60 - Estrutura da 6,7-metileneodioxi-8-metoxicumarina (**12**).

#### 4.2.2.6 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA ESCOPOLETINA

A cumarina escopoletina foi isolada da fração MSCED22\_65 como um sólido branco amorfo. Sua elucidação estrutural baseou-se em espectros de RMN  $^1\text{H}$ , CG-MS e dados da literatura (RAZDAM, 1987).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.61) revelou sinais característicos do anel de um esqueleto cumarínico, em  $\delta$  7,80 (1H, d,  $J=9,4$  Hz) e em  $\delta$  6,16 (1H, d,  $J=9,4$  Hz) de H-4 e H-3, respectivamente. Outros sinais foram também observados em  $\delta$  7,18 (1H, s) de H-5 e em característico  $\delta$  6,78 (1H, s) de H-8 e ainda um sinal em  $\delta$  3,90 (3H, s) indicando a presença de uma metoxila.

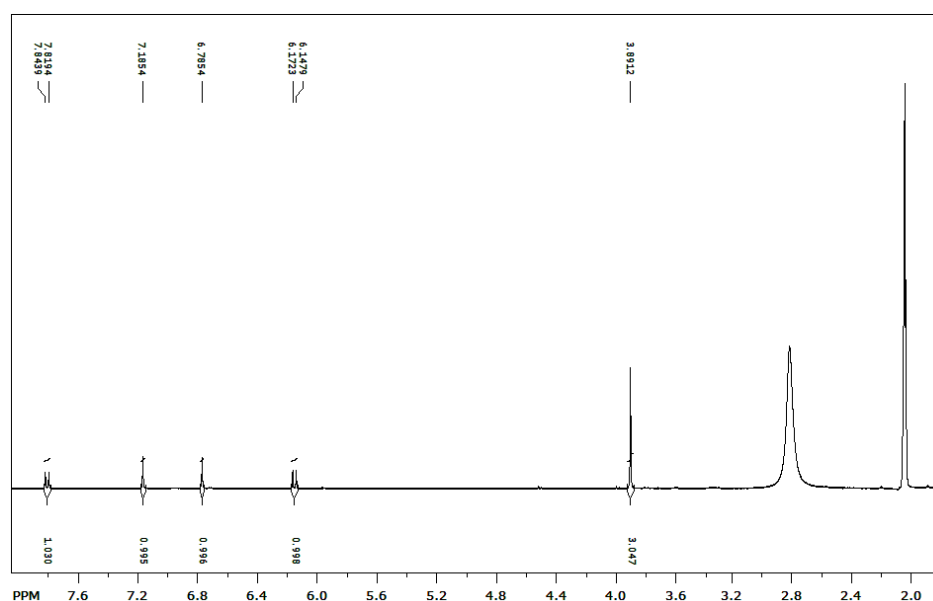


FIGURA 4.61 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da escopoletina.

Dois isômeros puderam ser propostos o 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina) e o 6-hidroxi-7-metoxicumarina (isoescopoletina) (FIGURA 4.62).



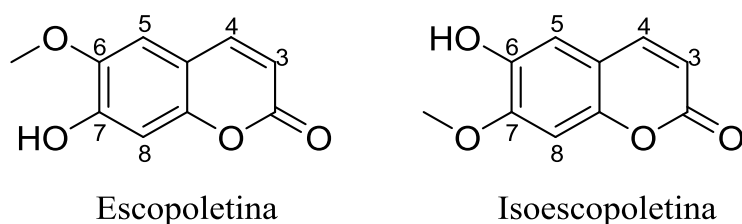


FIGURA 4.62 - Estrutura da Escopoletina e da Isoescopoletina.

A distinção dos isômeros pode ser efetuada através da análise do espectro de massas, onde a escopoletina apresenta um sinal  $m/z = 177$ , cuja abundância relativa é em torno de 60-70%, e o seu isômero isoescopoletina apresenta o mesmo pico, mas com uma intensidade em torno de 16%. Isso ocorre porque o íon formado pela escopoletina pode ser mais estabilizado do que o formado pela isoescopoletina (SALLES, 1995) (FIGURA 4.63).

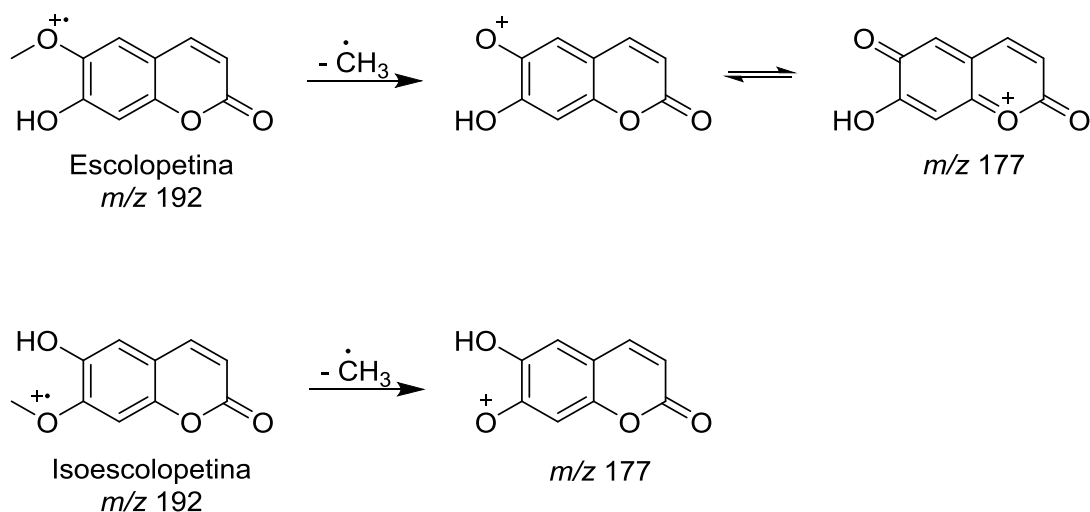


FIGURA 4.63 - Proposta de fragmentação para diferenciação da escopoletina e isoescopoletina.

No espectro de massas (FIGURA 4.64) observou-se o pico em 192  $m/z$  que é do íon molecular coerente com a massa molecular da substância proposta. Identificou-se a substância escopoletina pois observou-se o pico em 177  $m/z$  com intensidade relativa de 62%. Devido a maior estabilidade do

fragmento iônico por conjugação dos pares eletrônicos do oxigênio e das ligações  $\pi$ , aparecendo com maior intensidade.

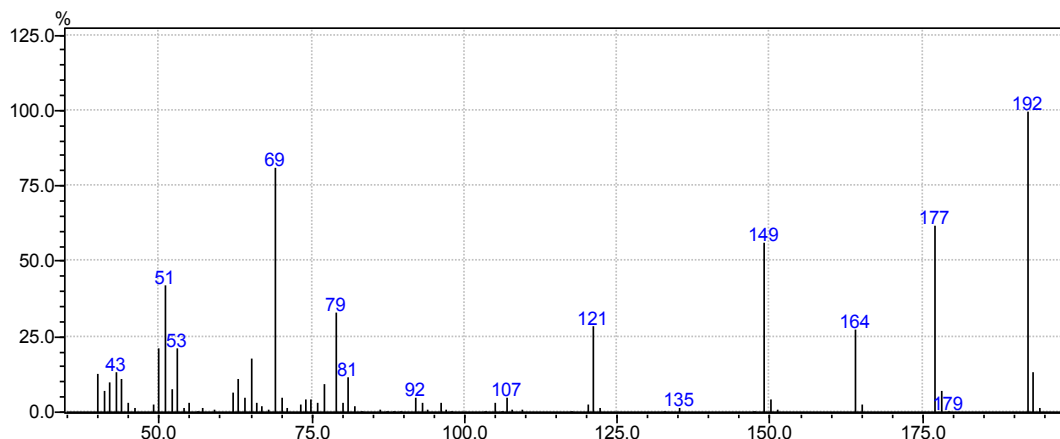


FIGURA 4.64 - Espectro de massas da escopoletina.

Assim foi efetuada a elucidação estrutural desta substância como a escopoletina (FIGURA 4.65).

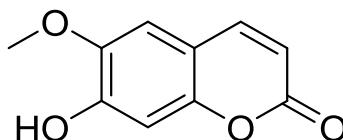


FIGURA 4.65 - Estrutura da escopoletina (13).

### 4.2.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO ESTERÓIDE 3- $\beta$ -O- $\beta$ -GLUCOPIRANOSIL SITOSTEROL

O esteroide 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glucopiranosil sitosterol (FIGURA 4.66) foi isolado das frações MSCED24 como um cristal branco amorfo. Sua elucidação estrutural foi baseada em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e por comparação com dados da literatura (SAKAKIBARA *et al.*, 1983).

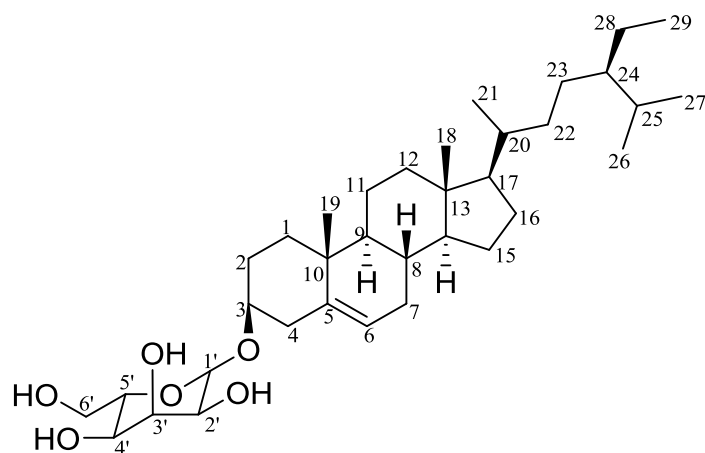


FIGURA 4.66 - Estrutura da 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glucopiranosil sitosterol (**14**).

Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.67) e de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.68) observou-se os sinais em  $\delta$  4,57 (1H, dd,  $J= 11,6$  e  $2,4$  Hz) e em  $\delta$  102,4 correspondentes ao H-1' e ao carbono anomérico. Sinais de hidrogênios carbinólicos entre  $\delta$  3,90-5,05 também foram observados. Observou-se ainda sinais nas regiões de 0,66 e 2,76 indicando a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos característicos de um esqueleto esteroidal.

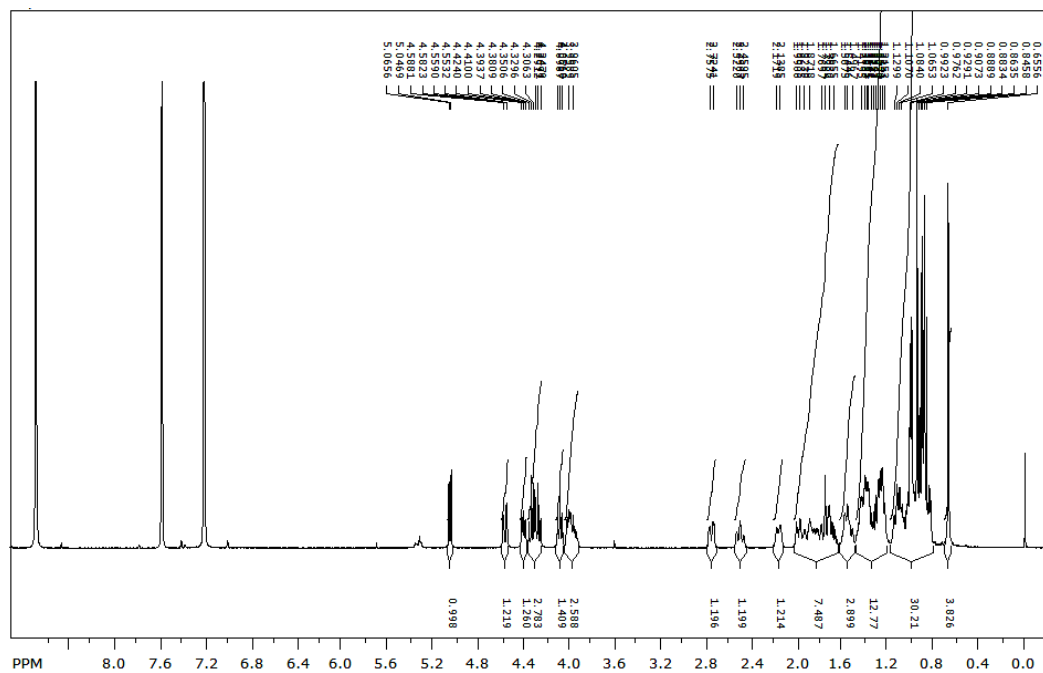


FIGURA 4.67 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Pir- $d_5$ ) da 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glucopiranosil sitosterol.

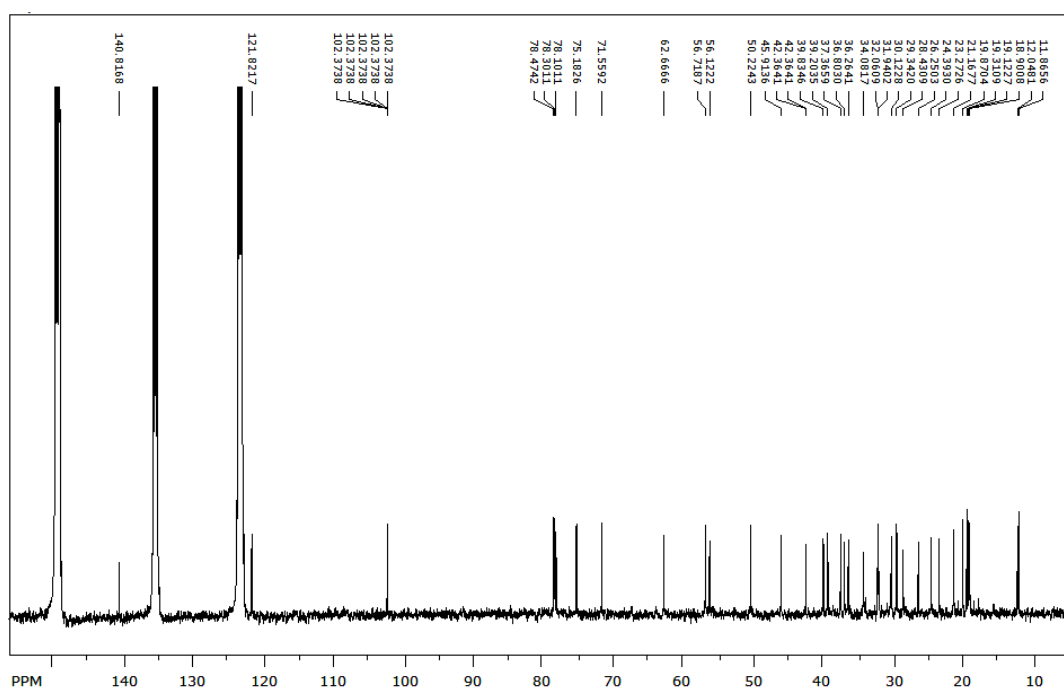


FIGURA 4.68 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz, Pir- $\text{d}_5$ ) da 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glucopiranosil sitosterol.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  confirma os carbonos referentes a estrutura proposta e está de acordo com os dados da literatura (SAKAKIBARA et al., 1983) (TABELA 4.3)

Pos.	Substância 18	SAKAKIRA <i>et al.</i> (1983)
	$\delta_C^a$	$\delta_C^b$
1	37,4	37,5
2	30,1	30,2
3	78,5	78,5
4	39,8	40,0
5	140,8	140,9
6	121,8	121,8
7	32,1	32,1
8	32,0	32,1
9	50,2	50,3
10	36,8	36,9
11	21,2	21,3
12	39,2	39,3
13	42,4	42,5
14	56,7	56,9
15	24,4	24,5
16	28,4	28,6
17	56,1	56,3
18	11,8	12,0
19	19,3	19,4
20	36,3	36,4
21	18,9	19,1
22	34,1	34,3
23	26,2	26,5
24	45,9	46,1
25	29,3	29,5
26	19,1	19,2
27	19,8	20,0
28	23,3	23,4
29	12,0	12,2

<sup>a</sup> 100 MHz, piridina d<sub>5</sub>. <sup>b</sup> 50 MHz, Piridina d<sub>5</sub>.

TABELA 4.3 - Dados de RMN <sup>13</sup>C da 3-β-O-β-glucopiranosil sitosterol e dados da literatura.

## 4.2.4 - DIIDROCHALCONAS

As diidrochalconas são substâncias pouco descritas na literatura, podem ser obtidas por biossíntese mista envolvendo partes provenientes da via do acetato e do chiquimato (LOBO & LOURENÇO, 2007). Foram isoladas 4 diidrochalconas, todas inéditas até o momento.

### 4.2.4.1 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA

#### 15

A substância **15** (FIGURA 4.69) foi isolada da fração MSCED22\_58\_16 como um sólido amarelo amorfo, sendo esta inédita na literatura até o momento. Sua elucidação estrutural foi realizada com base nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, gCOSY e EM de alta resolução.

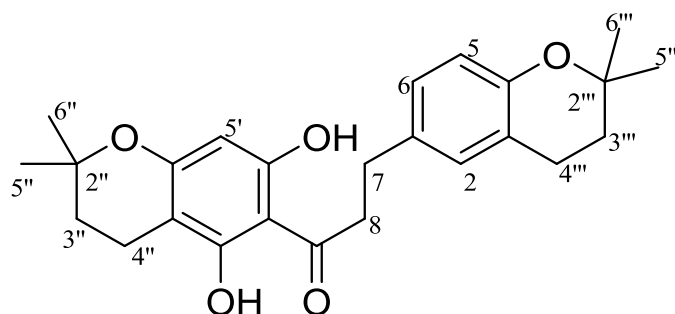


FIGURA 4.69 - Estrutura da substância **15**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.70) revelou sinais característico de uma diidrochalcona em  $\delta$  2,83 (2H) e  $\delta$  3,30 (2H, t,  $J = 7,2$ ) referentes aos H-7 e H-8, respectivamente. Revelou ainda sinais em  $\delta$  5,92 (1H, s) característico de um hidrogênio de um anel aromático pentassubstituído, em  $\delta$  6,91 (2H, m) referente ao H-2 e H-6 e em  $\delta$  6,56 (1H, d,  $J = 8,8$ ) referente ao H-5 caracterizando um anel aromático trissubstituído. Também observou-se sinais característicos de dois anéis dimetilpirano em  $\delta$  1,76 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz) de H-3'', em  $\delta$  2,53 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz) de H-4'', em  $\delta$  1,73 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz) de H-

3''' e em  $\delta$  2,69 (2H, t, J = 6,8 Hz) de H-4'''. Além do sinal em  $\delta$  13,63 característico de hidroxila quelada, e os sinais das metilas em  $\delta$  1,22 (H-5''' e H-6''') e em  $\delta$  1,33 (H-5'' e H-6'').

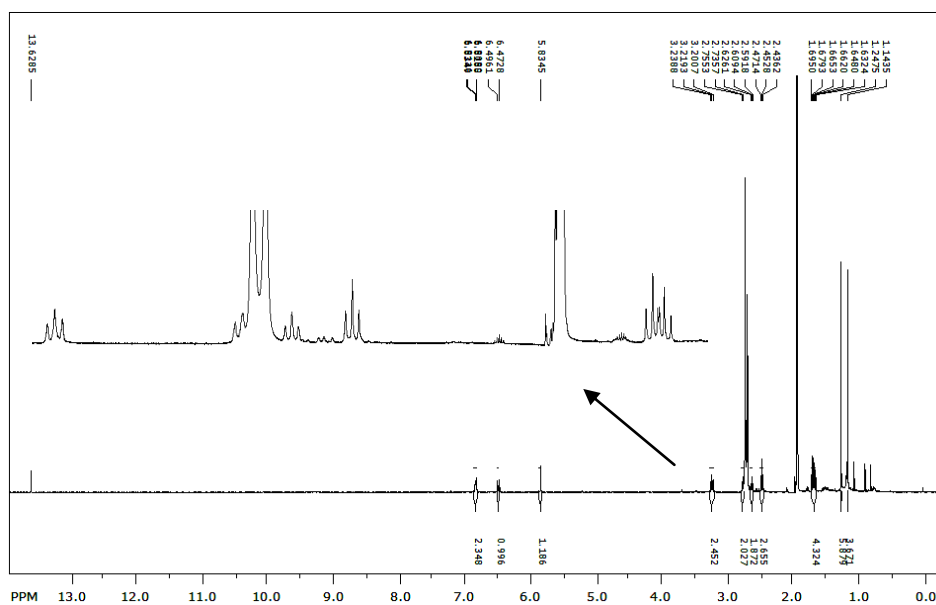


FIGURA 4.70 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância **15**.

O espectro de COSY (FIGURA 4.71) mostrou a correlação entre H-7 e H-8, H-3'' e H-4'', H-3''' e H-4'''.

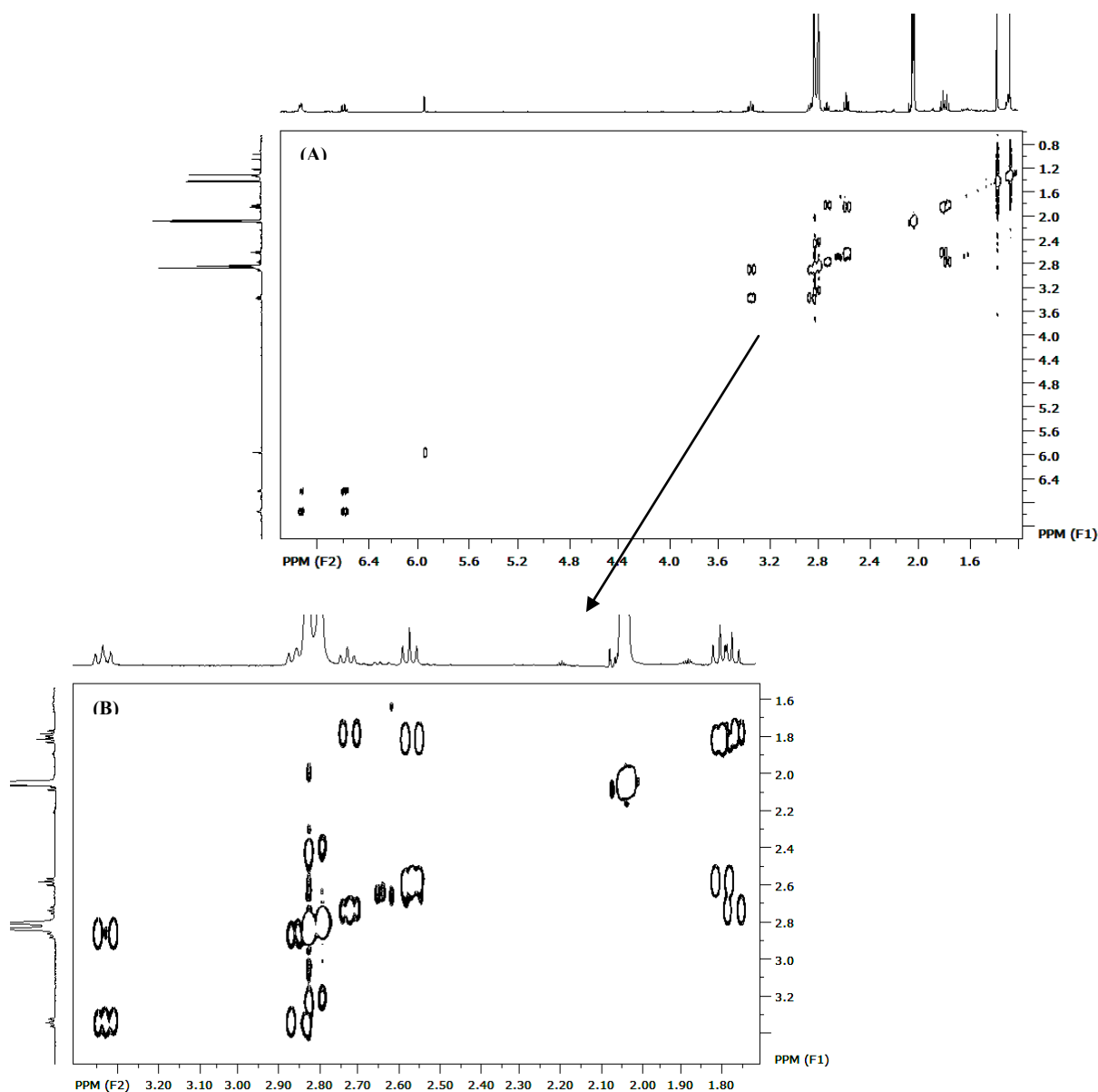


FIGURA 4.71 - (A) Espectro de COSY (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) da substância **15**.

(B) Expansão da região de hidrogênio metílico e metilênico.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos foi realizada através da análise dos espectros de HSQC e HMBC. No espectro de HSQC (FIGURA 4.72) observou-se a correlação de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos em  $\delta$ 126,8 de C-2, em 116,8 de C-5, em 128,1 de C-6, em 29,7 de C-7, em  $\delta$  45,5 de C-8, em  $\delta$  94,6 de C-5', em  $\delta$  31,2 de C-3'', em  $\delta$  16,2 de C-4'', em  $\delta$  32,42 de C-3''', em  $\delta$  22,1 de C-4''' e das quatro metilas em  $\delta$  25,5.



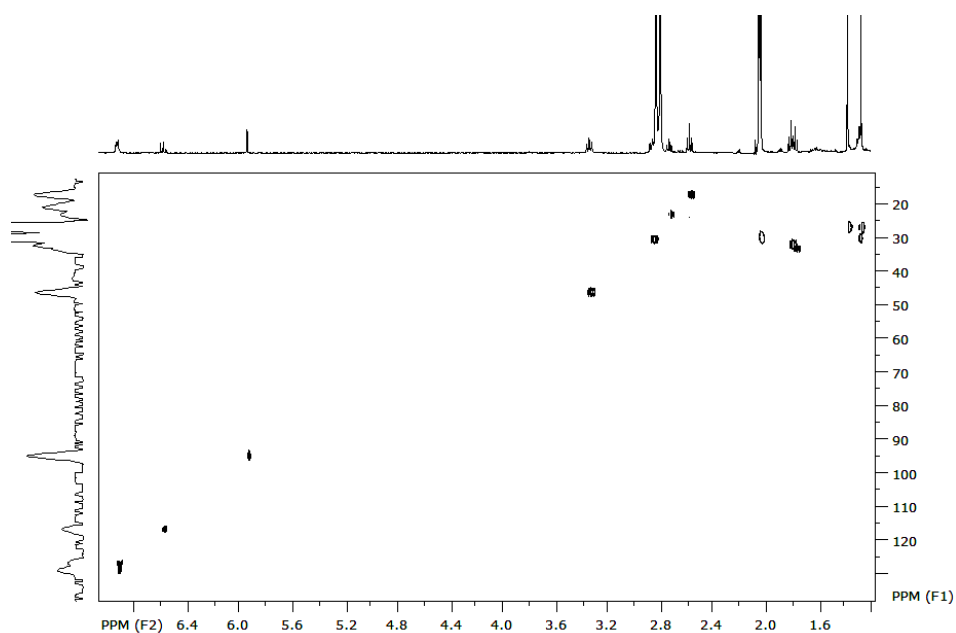


FIGURA 4.72 - Espectro de HSQC (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da substância **15**.

As correlações mostradas na FIGURA 4.73 foram observadas no espectro de HMBC (FIGURA 4.74).

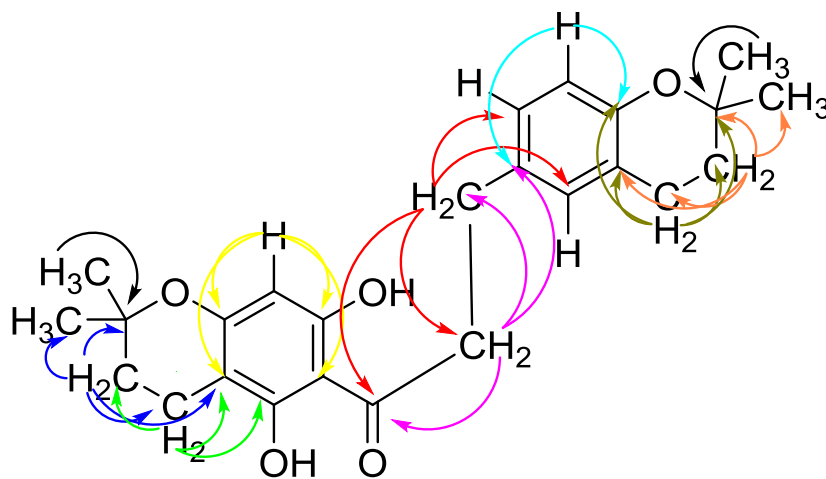


FIGURA 4.73 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **15**.

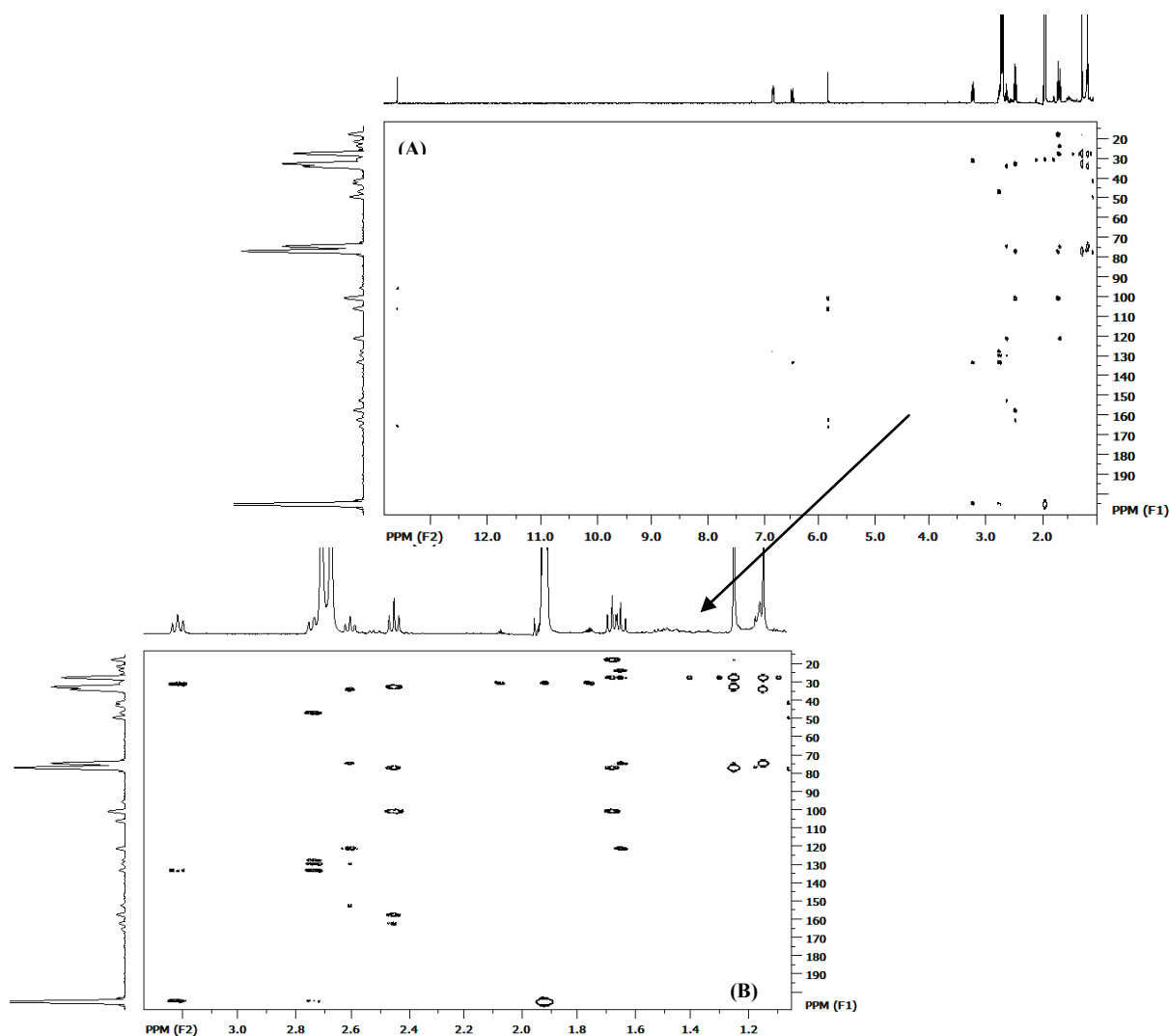


FIGURA 4.74 - (A) Espectro de HMBC (400 MHz, Acetona- $d_6$ ) da substância **15**. (B) Expansão da região de hidrogênios metílicos e metilênicos.

Portanto, com os deslocamentos químicos dos carbonos obtidos das correlações observadas no HMBC pode-se definir os sinais dos carbonos quaternários em  $\delta$  132,2 de C-1, em 151,9 de C-4, em 120,0 de C-3, em  $\delta$  204,7 de C-9, em  $\delta$  104,8 de C-1', em  $\delta$  157,0 de C-2', em  $\delta$  100,0 de C-3', em  $\delta$  162,2 de C-4', em  $\delta$  165,5 de C-6', em 75,6 de C-2'', em 31,2 de C-3'', em  $\delta$  16,2 de C-4'', em  $\delta$  73,2 de C-2''', em  $\delta$  32,4 de C-3''' e em  $\delta$  22,1 de C-4'''.

O espectro de massas (FIGURA 4.75) revelou a massa molar desta substância como 410,5051D o que confirma a fórmula molecular de  $C_{25}H_{30}O_5$  da estrutura proposta.

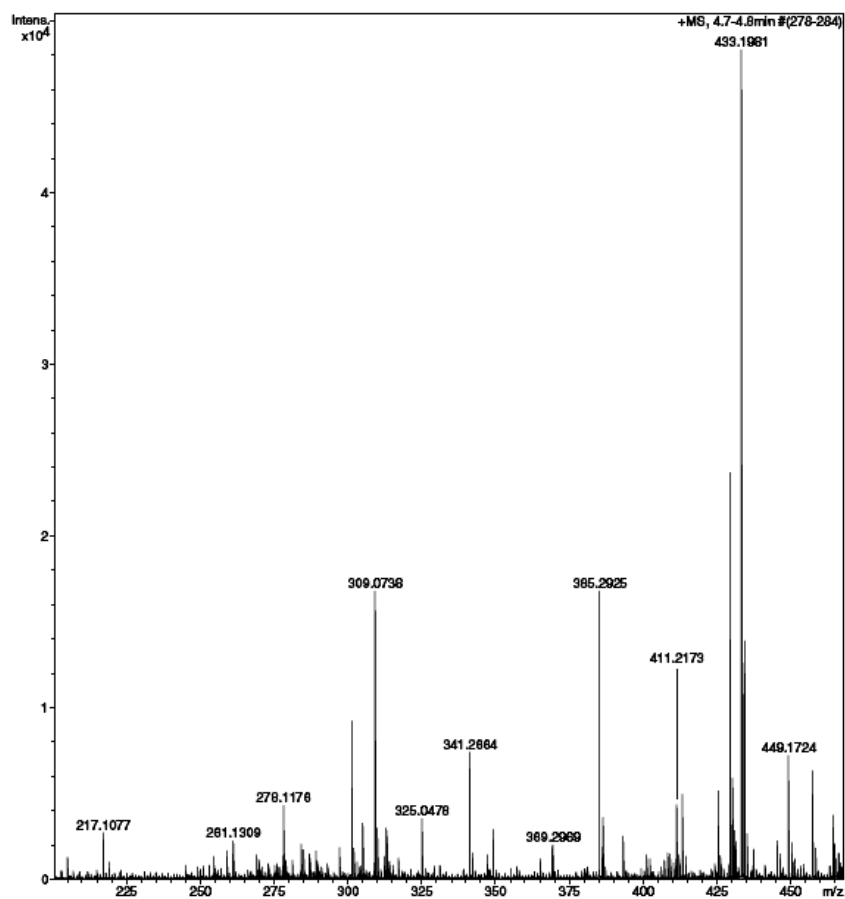


FIGURA 4.75 - Espectro de massas de alta resolução da substância **15**.

Com os dados discutidos foi possível propor a estrutura da substância **12** como a diidrochalcona mostrada na FIGURA 4.69, que está sendo descrita pela primeira vez. Seus dados de RMN são mostrados na TABELA 4.4.

Substância 15			
Pos.	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	132,2; qC		
2	126,8; CH	6,91; m	
3	120,0; qC		
4	151,9; qC		
5	116,8; CH	6,56; d (8,8)	1, 4
6	128,1; CH	6,93; m	
7	29,7; CH <sub>2</sub>	2,83; m	2, 6, 8, 9
8	45,5; CH <sub>2</sub>	3,30; t (7,2)	1, 7, 9
9	204,7; qC		
1'	104,8; qC		
2'	157,0; qC		
3'	100,0; qC		
4'	162,2; qC		
5'	94,5; CH	5,92; s	1', 3', 4', 6'
6'	165,5; qC		
2''	75,6; qC		
3''	31,2; CH <sub>2</sub>	1,76; t (6,8)	3', 2'', 4'', 5''
4''	16,2; CH <sub>2</sub>	2,53; t (6,8)	2', 3', 3''
5''	25,5; CH <sub>3</sub>	1,22; s	2''
6''	25,5; CH <sub>3</sub>	1,22; s	2''
2'''	73,2; qC		
3'''	32,4; CH <sub>2</sub>	2,69; t (6,8)	3, 2''', 4''', 5'''
4'''	22,1; CH <sub>2</sub>	2,69; t (6,8)	3, 4, 2''', 3'''
5'''	25,5; CH <sub>3</sub>	1,33; s	2'''
6'''	25,5; CH <sub>3</sub>	1,33; s	2'''

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.4 - Dados de RMN da substância 15.

#### 4.2.4.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA

### 16

A substância **16** (FIGURA 4.76) foi isolada da fração MSCED22\_53\_14 e MSCED22\_53\_15 como um sólido amarelo amorfo, sendo esta inédita na literatura até o momento. Sua elucidação estrutural foi baseada nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e EM de alta resolução.

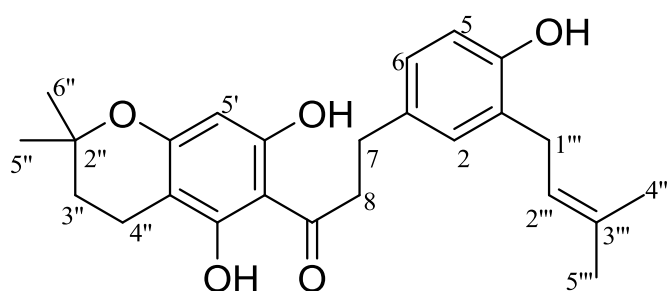


FIGURA 4.76 - Estrutura da substância **16**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.77) revelou sinais característicos de uma diidrochalcona em  $\delta$  2,82 (2H, t,  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta$  3,25 (2H, m) referentes aos H-7 e H-8, respectivamente. Revelou ainda sinais em  $\delta$  5,87 (1H, s) característico de um hidrogênio de um anel aromático pentassubstituído, em  $\delta$  6,83 (1H, dd,  $J = 1,7$  e 8,0 Hz) referente ao H-6, em  $\delta$  6,87 (1H, d,  $J = 1,7$  Hz) de H-2 e em  $\delta$  6,64 (1H, dl,  $J = 8,0$ ) de H-5 que caracterizam um anel aromático trissubstituído. Também observou-se sinais característicos de um anel 2,2-dimetilpirano em  $\delta$  1,76 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz) de H-3'', em  $\delta$  2,55 (2H, t,  $J = 6,6$  Hz) de H-2'', e das duas metilas em  $\delta$  1,33 (6H, s) de H-5'' e H-6''. Além dos sinais de um grupo prenila em  $\delta$  3,25 (2H, m) de H-1''', em  $\delta$  5,28 (1H, m) de H-2''' e das metilas em  $\delta$  1,33 (6H, s) de H-5'' e H-6'' e 1,68 (3H, s) e  $\delta$  1,69 (3H, s) de H-4''' e H-5'''.

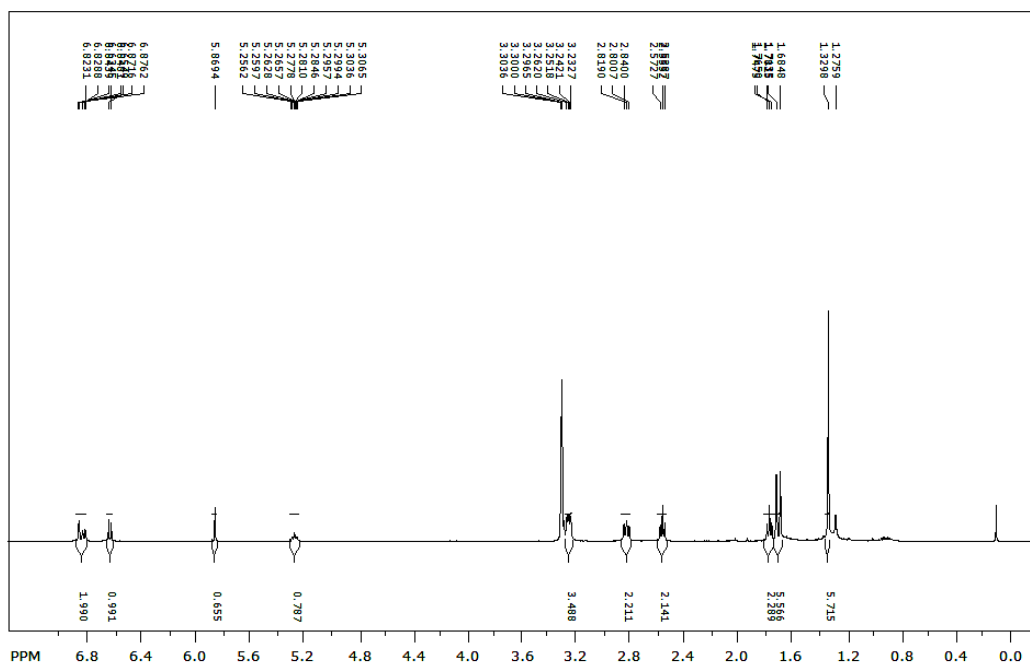


FIGURA 4.77 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **16**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos foi realizada através da análises dos espectros de HSQC e HMBC. No espectro de HSQC (FIGURA 4.78) observou-se a correlação de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos em  $\delta$  128,7 de C-2, em  $\delta$  114,3 de C-5, em  $\delta$  125,9 de C-6, em  $\delta$  30,2 de C-7, em  $\delta$  45,5 de C-8, em  $\delta$  94,1 de C-5', em  $\delta$  31,3 de C-3'', em  $\delta$  15,9 de C-4'', em  $\delta$  27,7 de C-1''', em  $\delta$  122,6 de C-2''', e sinais referentes as metilas em  $\delta$  25,0 de C-5'' e C-6'', e em  $\delta$  16,4 e  $\delta$  25,5 de C-4''' e C-5'''.

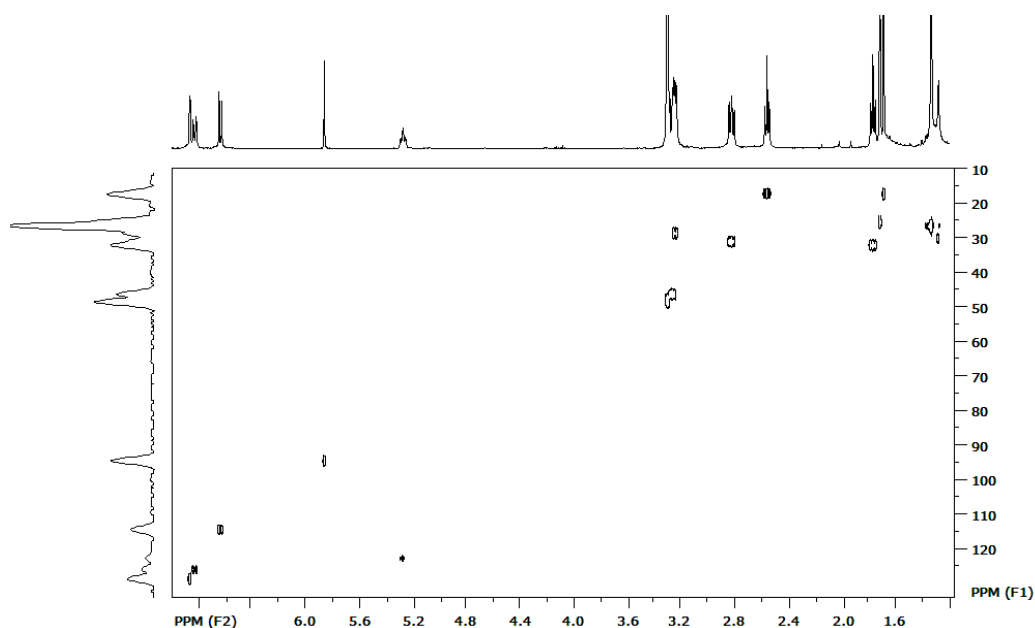


FIGURA 4.78 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **16**.

O espectro de COSY (FIGURA 4.79) mostrou a correlação entre os hidrogênios H-5 e H-6, H-7 e H-8, H-3" e H-4".

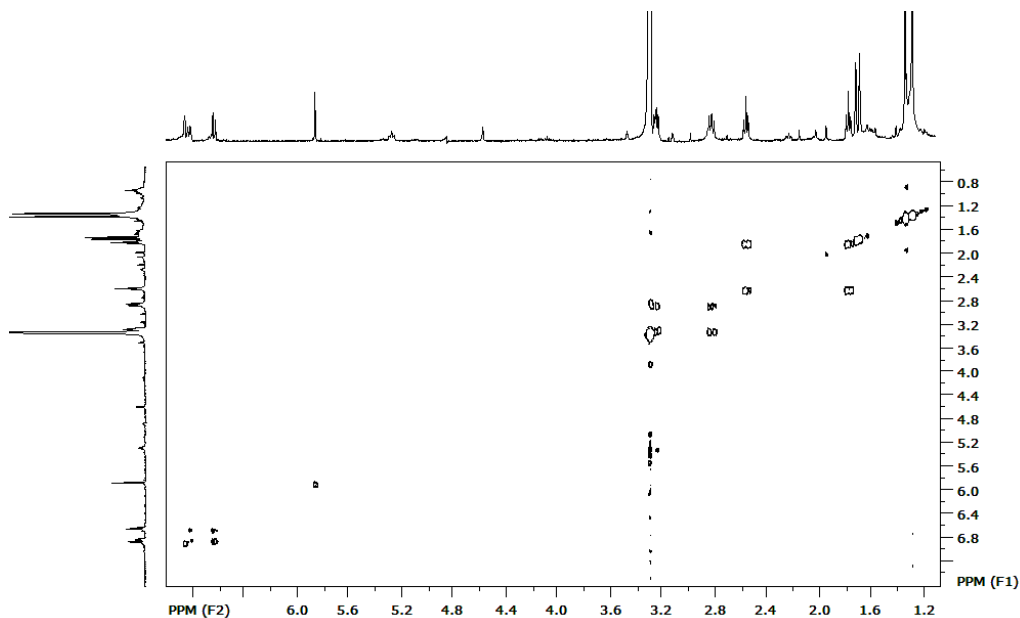


FIGURA 4.79 - Espectro de COSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **16**.

No espectro de HMBC (FIGURA 4.80) observou-se as correlações entre os carbonos e hidrogênios como indicado na FIGURA 4.81:

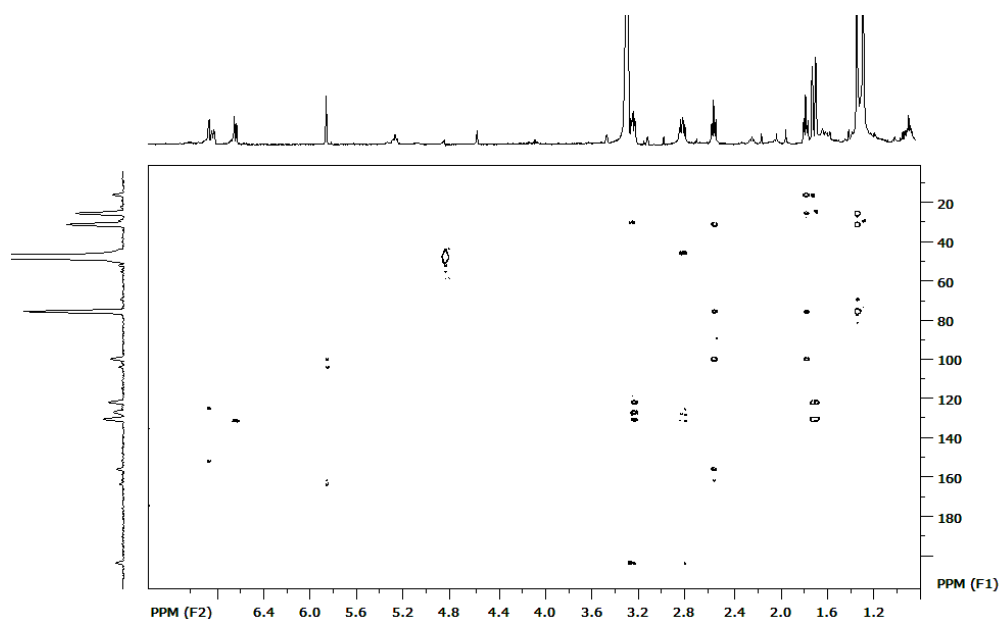


FIGURA 4.80 - Espectro de HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **16**.

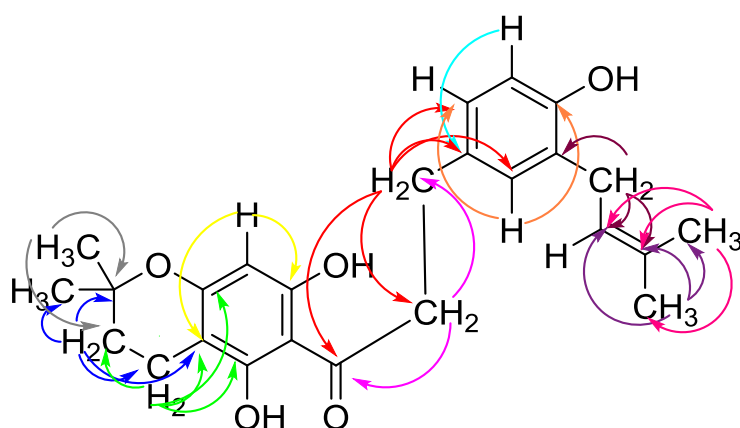


FIGURA 4.81 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **16**.

Ainda com uma inspeção minuciosa do HMBC permitiu determinar os deslocamentos químicos dos carbonos e definir os sinais dos carbonos quaternários em  $\delta$  132,2 de C-1, em 152,0 de C-4, em 126,0 de C-3, em  $\delta$  204,0 de C-9, em  $\delta$  162,0 de C-2', em  $\delta$  100,0 de C-3', em  $\delta$  156,0 de C-4', em  $\delta$  164,0 de C-6', em 75,6 de C-2'', e em  $\delta$  131,4 de C-3'''.

O espectro de massas (FIGURA 4.82) revelou a massa molar desta substância como 410,5051D o que confirma a fórmula molecular de C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> da estrutura proposta. Observa-se ainda no espectro de massas a presença de um



pico em 843,3949D devido a formação de um dímero pela interação do íon aduto e uma molécula neutra.

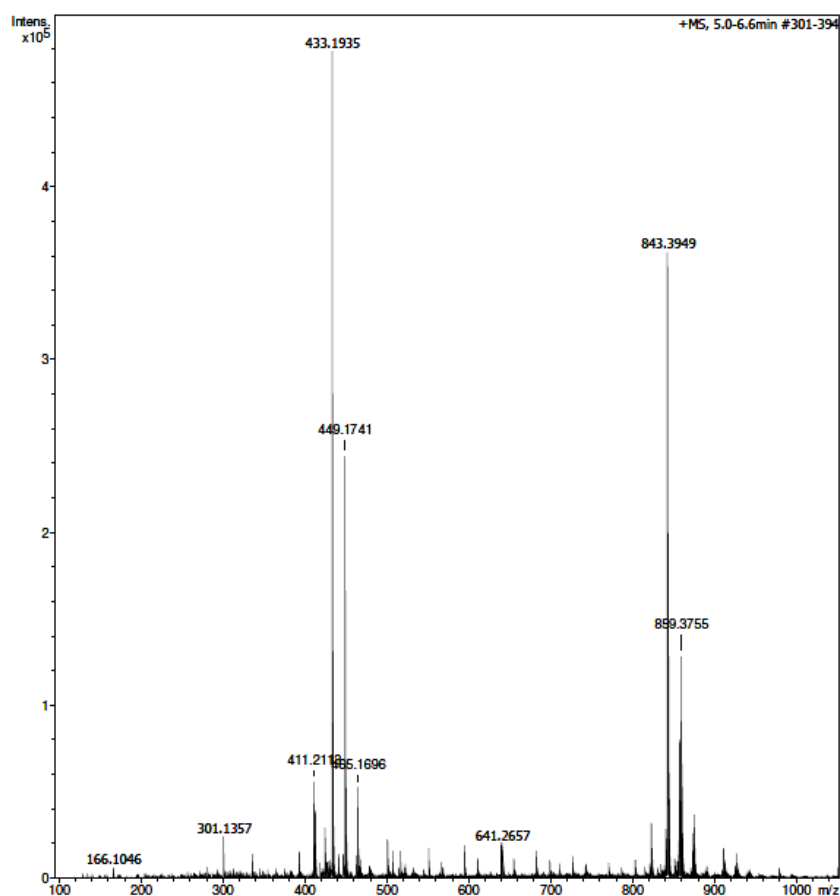


FIGURA 4.82 - Espectro de massas de alta resolução da substância **16**.

A análise conjunta dos dados obtidos para esta substância levou à proposta da estrutura mostrada na FIGURA 4.76. Seus dados de RMN estão descritos na TABELA 4.5.

Substância 16			
Pos.	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	132,2; qC		
2	128,7; CH	6,87; d (1,7)	6,4
3	126,0; qC		
4	152,0; qC		
5	114,3; CH	6,64; dl (8,0)	1
6	125,9; CH	6,83; dd (1,7; 8,0)	
7	30,2; CH <sub>2</sub>	2,82; t (8,4)	1,2, 6, 8, 9
8	45,5; CH <sub>2</sub>	3,25; m	7, 9
9	204,0; qC		
1'	-; qC		
2'	162,0; qC		
3'	100,0; qC		
4'	156,0; qC		
5'	94,1; CH	5,87; s	3', 6'
6'	164,0; qC		
2''	75,6; qC		
3''	31,3; CH <sub>2</sub>	1,76; t (6,6)	3, 2'', 4'', 5'', 6''
4''	15,9; CH <sub>2</sub>	2,55; t (6,6)	2, 3, 4, 3''
5'' e 6''	25,0; CH <sub>3</sub>	1,33; s	2'', 4''
1'''	27,7; qC	3,25; m	3, 2''', 3'''
2'''	122,6; CH <sub>2</sub>	5,28; m	
3'''	131,4; qC		
4'''	16,4; CH <sub>3</sub>	1,68; s	2''', 3''', 5'''
5'''	25,5; CH <sub>3</sub>	1,69; s	2''', 3''', 4'''

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).  
<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.5 - Dados de RMN da substância 16.

#### 4.2.4.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA

### 17

A substância 17 (FIGURA 4.83) foi isolada da fração MSCED22\_53\_14 e MSCED22\_53\_15 como um sólido amarelo amorfo. Sua

elucidação estrutural baseou-se nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY e EM de alta resolução.

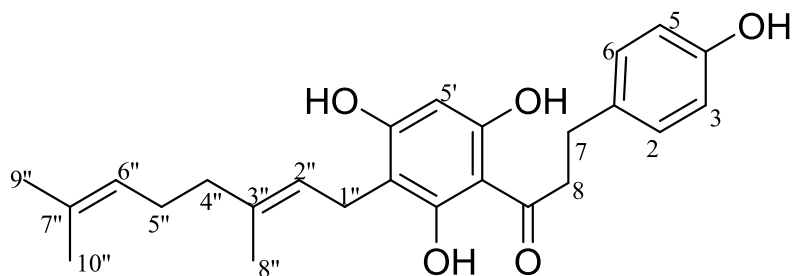


FIGURA 4.83 - Estrutura da substância 17.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.84) revelou sinais característicos de uma diidrochalcona em  $\delta$  2,84 (2H, t,  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta$  3,25 (2H, t,  $J = 8,4$  Hz) referentes aos H-7 e H-8, respectivamente. Revelou ainda sinais em  $\delta$  5,89 (1H, s) característico de um hidrogênio de um anel aromático penta substituído, e dois dupletos em  $\delta$  6,68 (2H, d,  $J = 8,6$  Hz) referente ao H-2 e H-6 e em  $\delta$  7,03 (2H, d,  $J = 8,6$  Hz) de H-3 e H-5 que caracterizam um anel aromático para substituído. Também observou-se sinais característicos de um grupo geranila em  $\delta$  3,18 (2H, m) de H-1'', em  $\delta$  5,17 (2H, m) de H-2'',  $\delta$  2,03 (2H, t,  $J = 6,9$ ) de H-4'', em  $\delta$  1,93 (2H, t,  $J = 6,9$ ) de H-5'', em  $\delta$  5,05 (2H, m) de H-6'' e das metilas em  $\delta$  1,73 (3H, s) de H-8'', em  $\delta$  1,54 (3H,s) e  $\delta$  1,60 (3H,s) de H-9'' e H-10''.

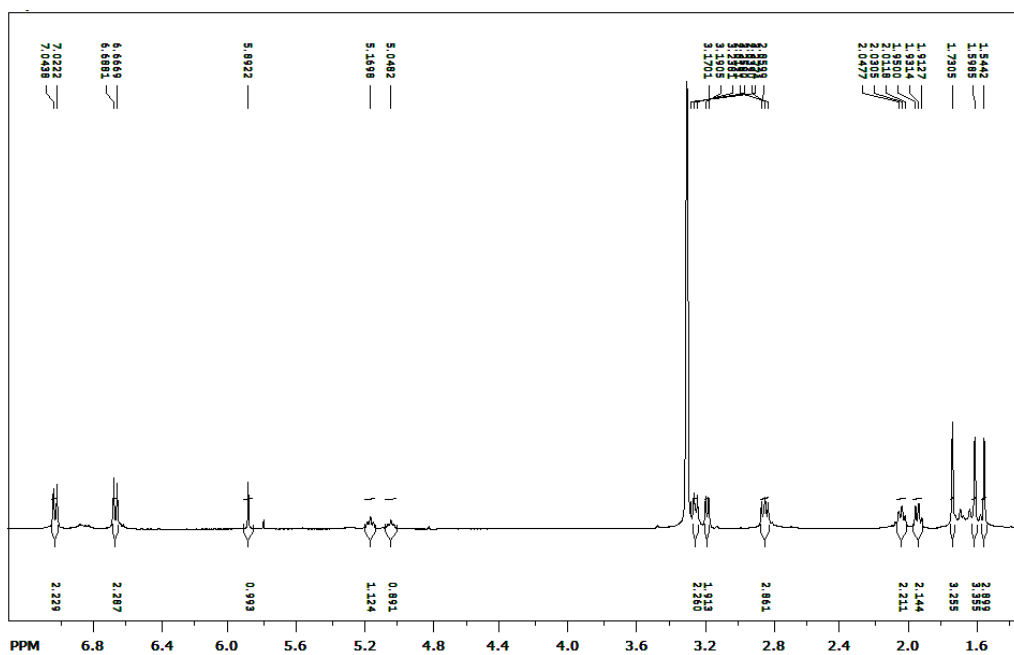


FIGURA 4.84 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **17**.

O espectro de COSY (FIGURA 4.85) mostrou a correlação entre H-3 e H-5 equivalentes com H2 e H6 também equivalentes, entre H-7 e H-8, H-1" e H-2", H-4" e H-5" e as correlações a longa distância devido a presença das duplas ligações entre H-2" e H-8" e entre H-6" e os hidrogênios das metilas (H-9" e H-10").

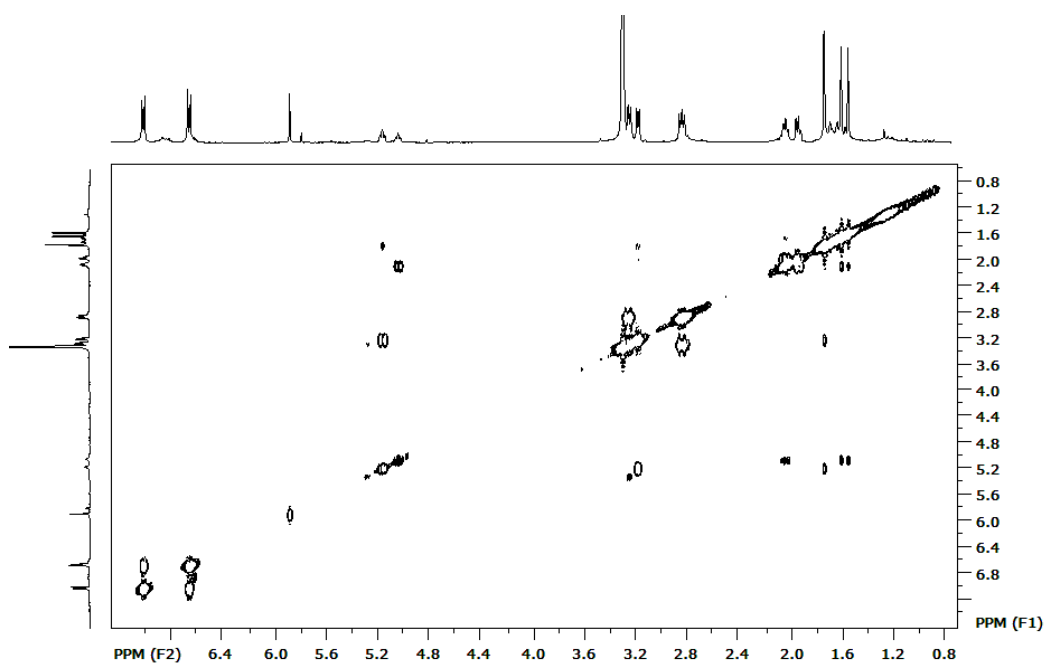


FIGURA 4.85 - Espectro de COSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **17**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos foi realizada através da análise dos espectros de HSQC e HMBC. Através do espectro de HSQC (FIGURA 4.86) observou-se a correlação de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos em  $\delta$  116,0 de C-2 e C-6, em 130,2 de C-3 e C-5, em 31,6 de C-7, em  $\delta$  47,4 de C-8, em  $\delta$  94,9 de C-5', em  $\delta$  21,8 de C-1'', em  $\delta$  124,7 de C-2'', em  $\delta$  27,7 de C-4'', em  $\delta$  40,7 de C-5'', em  $\delta$  125,3 de C-6'', em  $\delta$  16,1 de C-8'' e em  $\delta$  17,4 e  $\delta$  25,4 de C-9'' e C-10''.

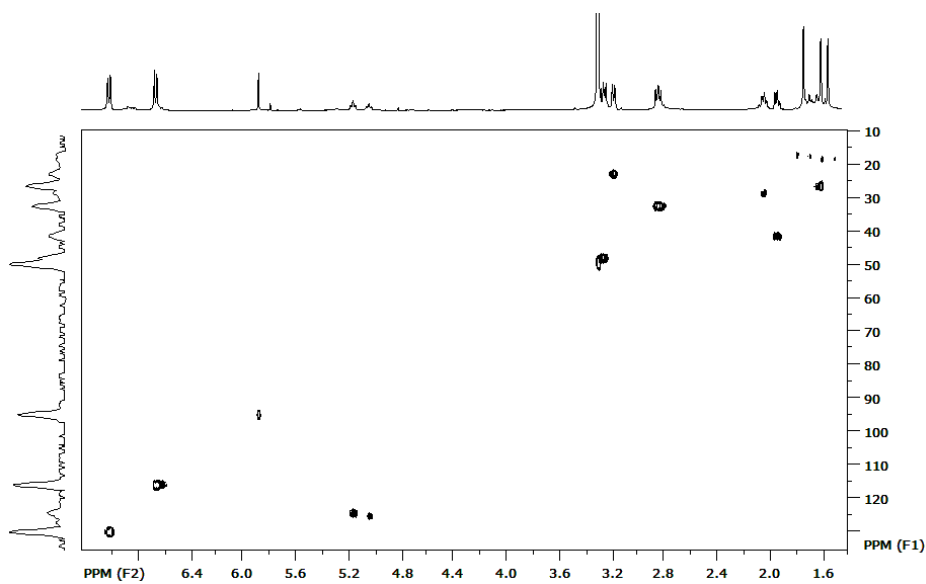


FIGURA 4.86 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **17**.

No espectro de HMBC (FIGURA 4.87) observou-se as correlações entre carbonos e hidrogênios como indicado na FIGURA 4.88.

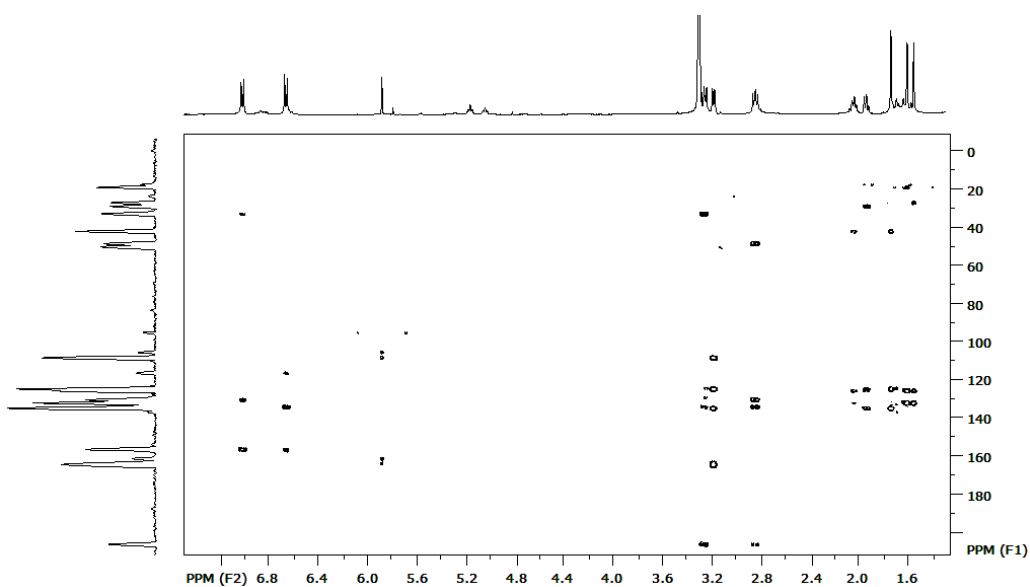


FIGURA 4.87 - Espectro de HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **17**.

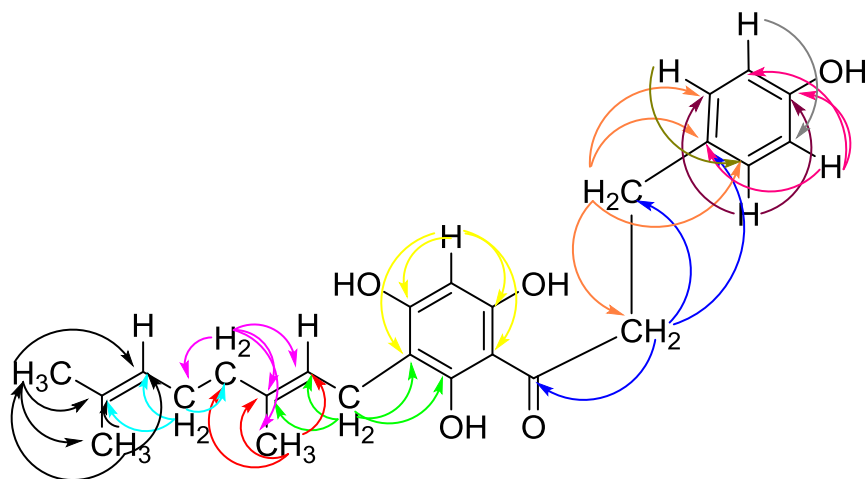


FIGURA 4.88 - Correlações observadas no HMBC da substância 17.

Assim uma inspeção minuciosa do HMBC permitiu determinar os deslocamentos químicos e pode-se definir os sinais dos carbonos quaternários em  $\delta$  133,2 de C-1, em 156,0 de C-4, em  $\delta$  205,0 de C-9, em  $\delta$  150,0 de C-1', em  $\delta$  164,0 de C-2', em  $\delta$  107,0 de C-3', em  $\delta$  161,0 de C-4', em  $\delta$  163,0 de C-6', em 134,6 de C-3'', e em  $\delta$  131,4 de C-7'''.

O espectro de massas (FIGURA 4.89) revelou a massa molar desta substância como 410,5051D o que confirma a fórmula molecular de  $C_{25}H_{30}O_5$  da estrutura proposta.

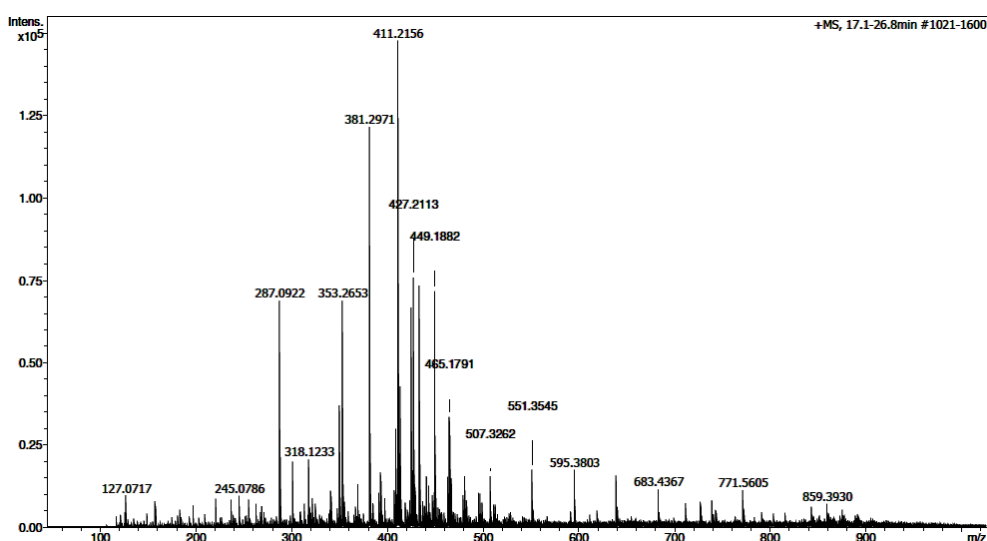


FIGURA 4.89 - Espectro de massas de alta resolução da substância 17.

Com os dados discutidos foi possível propor a estrutura de uma diidrochalcona para a substância **17** (FIGURA 4.83). Seus dados de RMN estão descritos na TABELA 4.6.

Substância 17			
Pos.	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	133,2; qC		
2	116,0; CH	6,68; d (8,6)	4, 6, 7
3	130,2; CH	7,03; d (8,6)	1, 4, 5
4	156,0; qC		
5	130,2; CH	7,03; d (8,6)	1, 3, 4
6	116,0; CH	6,68; d (8,6)	2, 4, 7
7	31,6; CH <sub>2</sub>	2,84; t (8,4)	1,2, 6, 8
8	47,4; CH <sub>2</sub>	3,25; t (8,4)	1,7, 9
9	205,0; qC		
1'	104,0; qC		
2'	164,0; qC		
3'	107,0; qC		
4'	161,0; qC		
5'	94,9; CH	5,87; s	1', 3',4', 6'
6'	163,0; qC		
1"	21,8; CH <sub>2</sub>	3,18; m	2, 3, 2", 3"
2"	124,7; CH	5,17; m	
3"	134,6; qC		
4"	27,7; CH <sub>2</sub>	2,03; t (6,9)	2", 3", 5", 8"
5"	40,7; CH <sub>2</sub>	1,93; t (6,9)	4", 6", 7"
6"	125,3; CH	5,05; m	
7"	131,4; qC		
8"	16,1; CH <sub>3</sub>	1,73; s	2", 3", 4"
9"	17,4; CH <sub>3</sub>	1,54; s	6", 7", 10"
10"	25,4; CH <sub>3</sub>	1,60; s	6", 7", 9"

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.6 - Dados de RMN da substância **17**.



#### 4.2.4.4 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA

### 18

A substância **18** (FIGURA 90) foi isolada da fração MSCED53\_13\_19 como um sólido amarelo amorfo, sendo esta inédita na literatura até o momento, sua elucidação estrutural foi baseada em dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, gCOSY, e EM de alta resolução.

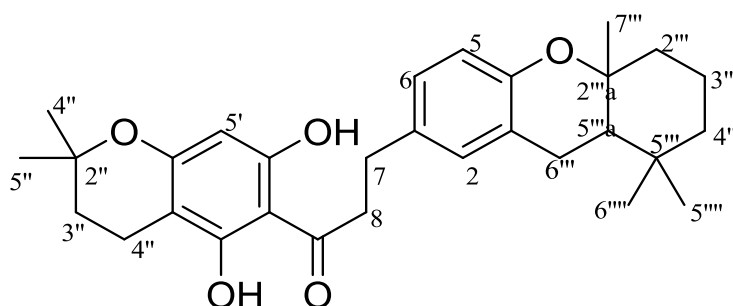


FIGURA 4.90 - Estrutura da substância **18**.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.91) revelou sinais característicos de uma diidrochalcona em  $\delta$  2,85 (2H, t,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  3,28 referentes aos H-7 e H-8, respectivamente. Revelou ainda sinais em  $\delta$  5,87 (1H, s) característico de um hidrogênio de um anel aromático pentassubstituído (H5'), sinais em  $\delta$  6,82 (2H, m) referente ao H-2 e H-6 e em  $\delta$  6,57 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz) referente ao H-5 que caracterizam um anel aromático trissubstituído, como já encontrados para outras substâncias descritas anteriormente. Também observou-se sinais característicos de dois anéis piranos, em  $\delta$  1,77 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz) de H-3'', em  $\delta$  2,56 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz) de H-4'', em  $\delta$  1,65 (1H, m) de H-5a''', em  $\delta$  2,64 (2H, m) de H-6''', em  $\delta$  1,48 (2H, m) de H-2''', em  $\delta$  1,63 (2H, m) de H-3''', em  $\delta$  1,58 (1H, m) e  $\delta$  1,90 (1H, m) referentes a H-4'''. Além dos sinais dos hidrogênios das metilas em  $\delta$  1,34 (6H, s) de H-5'' e H-6'', em  $\delta$  1,18 (3H, s),  $\delta$  0,93 (3H, s) e  $\delta$  1,01 (3H, s) de H-7''', H-8'' e H-9''', respectivamente.

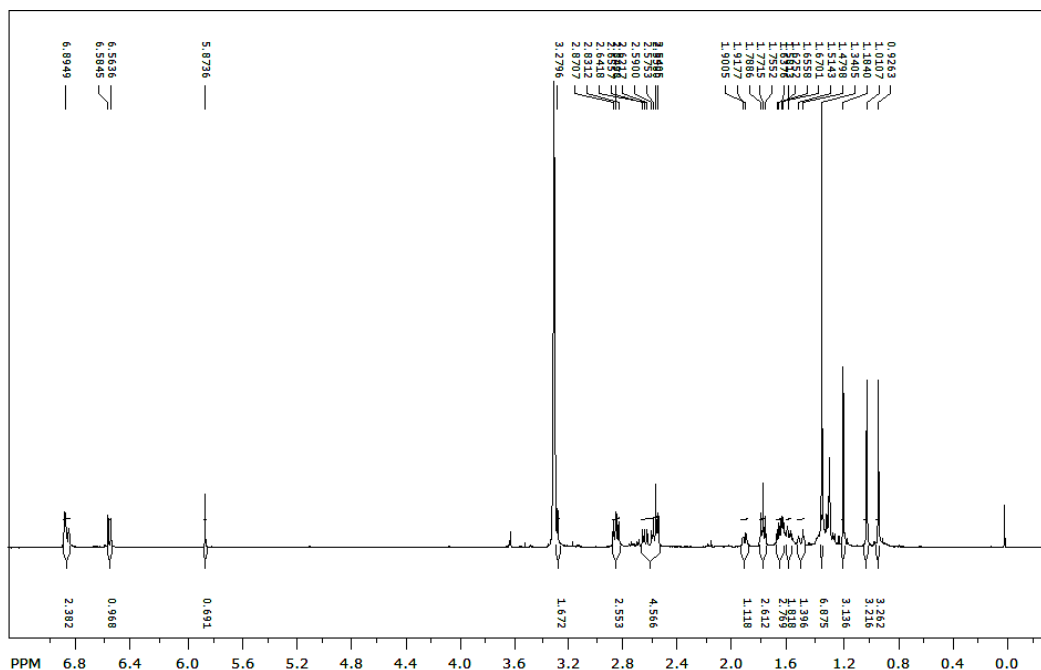


FIGURA 4.91 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **18**.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos foi realizada através da análise dos espectros de HSQC e HMBC. Através do espectro de HSQC (FIGURA 4.92) observou-se a correlação de todos os hidrogênios com os seus respectivos carbonos em  $\delta$  129,4 de C-6, em 116,0 de C-5, em 126,6 de C-2, em 30,0 de C-7, em  $\delta$  45,4 de C-8, em  $\delta$  94,0 de C-5', em  $\delta$  31,2 de C-3'', em  $\delta$  16,2 de C-4'', em  $\delta$  48,0 de C-5'''a, em  $\delta$  23,0 de C-6''', em  $\delta$  41,2 de C-2''', em  $\delta$  19,5 de C-3''', em  $\delta$  39,5 de C-4''', e sinais referentes as cinco metilas em  $\delta$  25,0 e  $\delta$  41,0 de C-5'' e C-6'', em  $\delta$  18,5 de C-7''' e em  $\delta$  31,0 e  $\delta$  33,1 de C-9''' e C-8''', respectivamente.

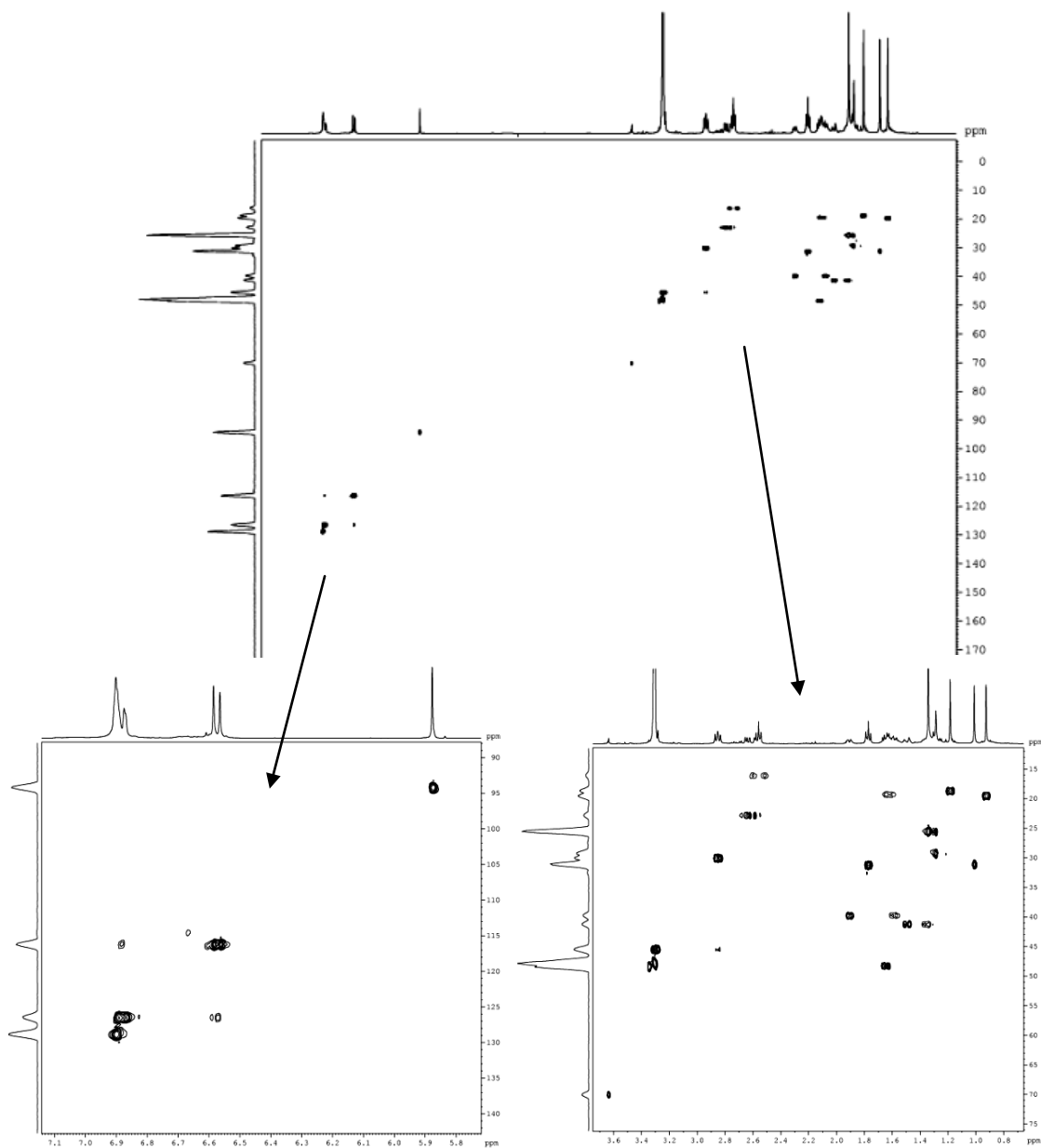


FIGURA 4.92 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **18**.

As correlações mostradas na FIGURA 4.93 foram observadas no HMBC (FIGURA 4.94).

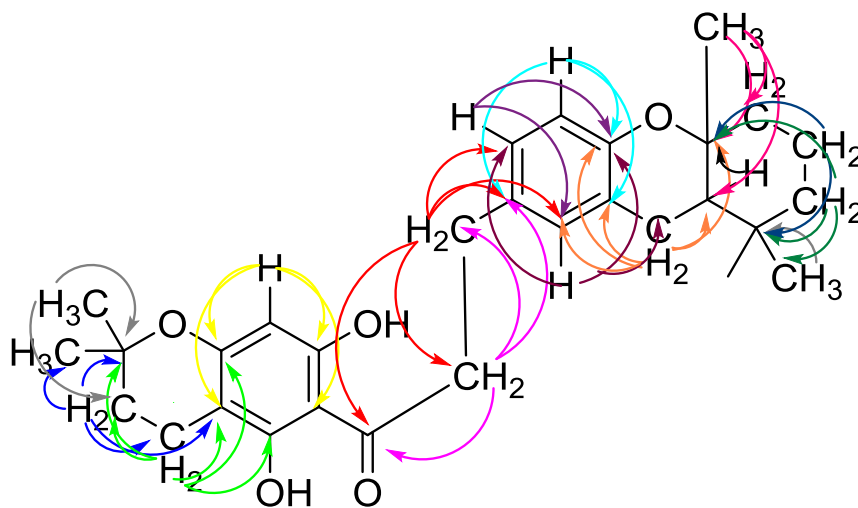


FIGURA 4.93 - Correlações observadas no espectro de HMBC da substância **18**.

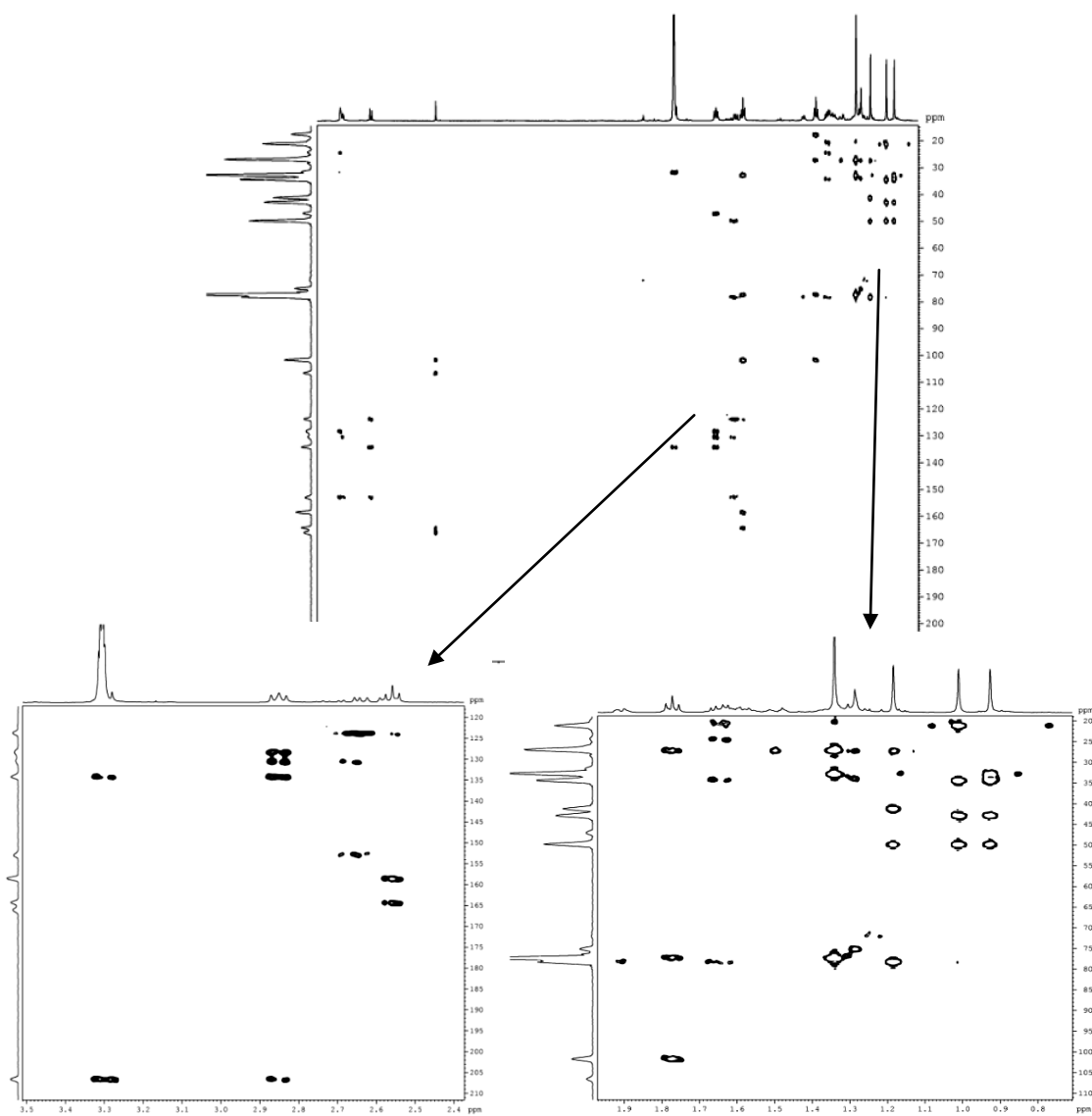


FIGURA 4.94 - Espectro de HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **18**.

Através das correlações obtidas para os carbonos e hidrogênios por HMBC pode-se definir o deslocamento químico dos carbonos quaternários em  $\delta$  132,2 de C-1, em 120,0 de C-3, em 151,9 de C-4, em  $\delta$  204,7 de C-9, em  $\delta$  104,8 de C-1', em  $\delta$  162,2 de C-4', em  $\delta$  100,0 de C-3', em  $\delta$  164,5 de C-6', em  $\delta$  157,0 de C-2' em 75,6 de C-2'', em  $\delta$  22,1 de C-5''', em  $\delta$  75,0 de C-2'''a.

O espectro de COSY (FIGURA 4.95) mostrou a correlação entre H-7 e H-8, H-3'' e H-4'', H-2''', H-3''' e H-4''.

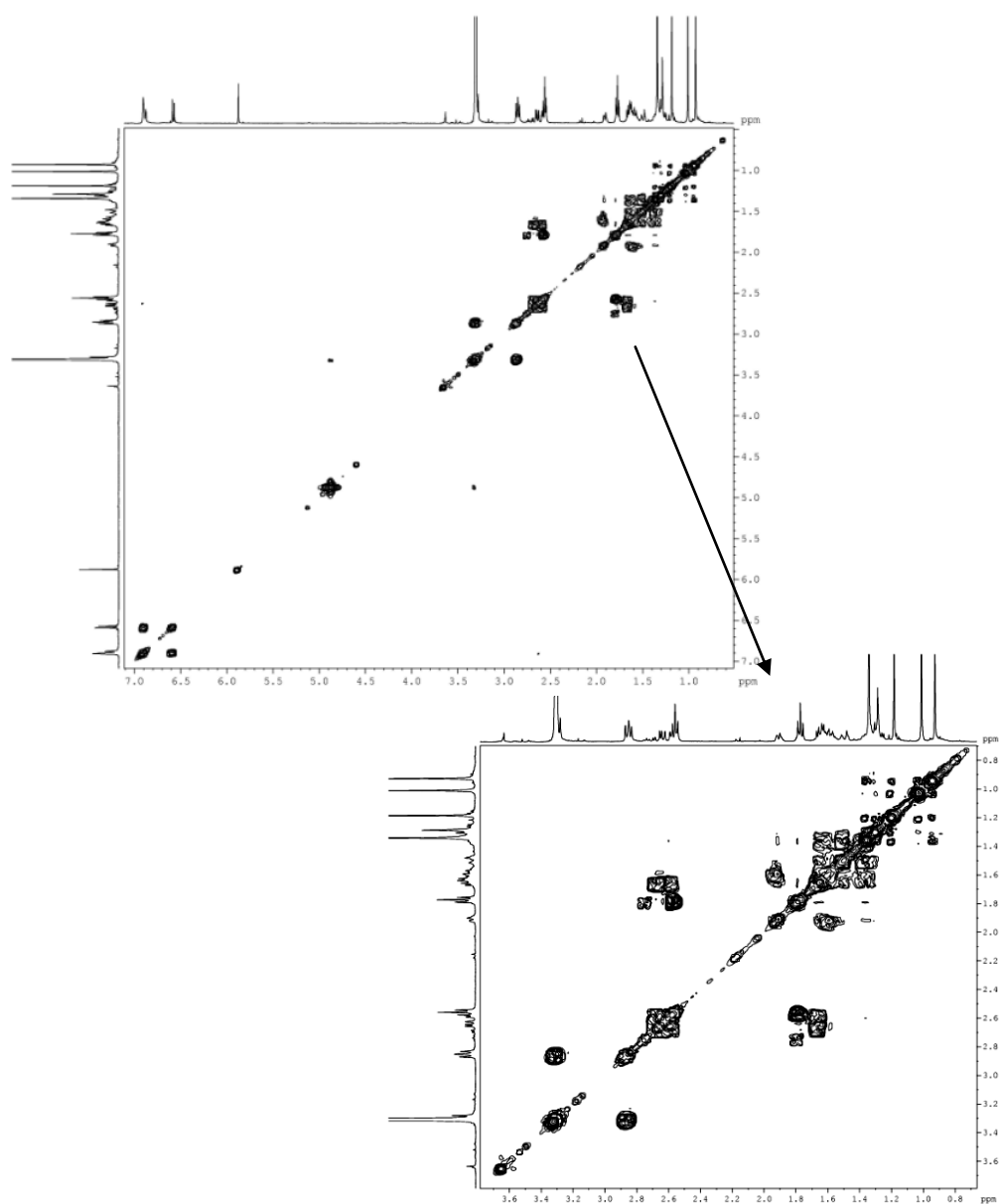


FIGURA 4.95 - Espectro de COSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **18**.

O espectro de massas (FIGURA 4.96) revelou a massa molar desta substância como 478,6225D o que confirma a fórmula molecular de  $C_{30}H_{38}O_5$  da estrutura proposta. Observa-se ainda no espectro de massas a presença de um pico em 980,6357D devido a formação de um dímero pela interação do íon aduto e uma molécula neutra.

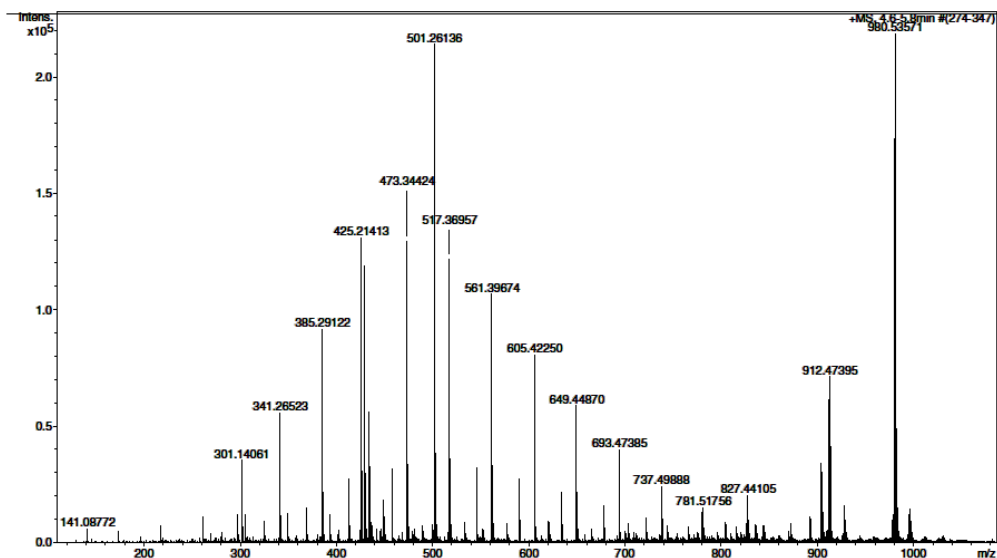


FIGURA 4.96 - Espectro de massas de alta resolução da substância **18**.

Com os dados discutidos foi possível propor a estrutura da diidrochalcona mostrada na FIGURA 4.90 para a substância **13**. E seus dados de RMNS estão descritos na TABELA 4.7.

Substância 18			
Pos.	$\delta_C$ , <sup>a</sup> mult.	$\delta_H$ <sup>b</sup> (J em Hz)	HMBC <sup>a,b</sup>
1	132,2; qC		
2	126,6; CH	6,89; m	4, 6, 6'''
3	120,0; qC		
4	151,9; qC		
5	116,0; CH	6,57; d (8,5)	1, 3, 4
6	129,4; CH	6,89; m	2, 4
7	30,0; CH <sub>2</sub>	2,85; t (8,3)	1, 2, 6, 8, 9
8	45,4; CH <sub>2</sub>	3,28	1,7, 9
9	204,7; qC		
1'	104,8; qC		
2'	157,0; qC		
3'	100,0; qC		
4'	162,2; qC		
5'	94,0; CH	5,87; s	1', 3',4', 6'
6'	164,5; qC		
2''	75,6; qC		
3''	31,2; CH <sub>2</sub>	1,77; t (6,8)	3', 2'', 4'' 5'', 6''
4''	16,2; CH <sub>2</sub>	2,56; t (6,8)	2', 3', 4', 2'', 3''
5''	25,0; CH <sub>3</sub>	1,34; s	2'', 6'', 3'''
6''	41,0; CH <sub>3</sub>	1,34; s	2'', 5'', 3'''
2'''	41,2; CH <sub>2</sub>	1,48; m	
3'''	19,5; CH <sub>2</sub>	1,63; m	2a'''; 5'''
4'''	39,5; CH <sub>2</sub>	1,58 e 1,90; m	9', 2a''''', 5'''
5'''	22,1; qC		
6'''	23,0; CH <sub>2</sub>	2,64; m	2, 4, 3', 2a''', 5a'''
2a'''	75,0; qC		
5a'''	48,0; CH	1,65; m	2a'''
7'''	18,5; CH <sub>3</sub>	1,18; s	2''', 2a''', 5a'''
8'''	33,1; CH <sub>3</sub>	0,93; s	2''', 9''', 5a'''
9'''	31,0; CH <sub>3</sub>	1,01; s	2''', 3''', 5''', 8''', 5a'''

<sup>a</sup> Valores de <sup>13</sup>C obtidos através das projeções dos experimentos de HSQC e HMBC (100 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

<sup>b</sup>(400 MHz, Acetona d<sub>6</sub>).

TABELA 4.7 - Dados de RMN para a substância 18.

## 4.2.4.5 - PROPOSTA DA BIOGENÊSE DAS DIIDRO-CHALCONAS ISOLADAS

De acordo com Dewick (2009) foi realizada a proposta biogenética das diidrochalconas isoladas (FIGURA 4.97).

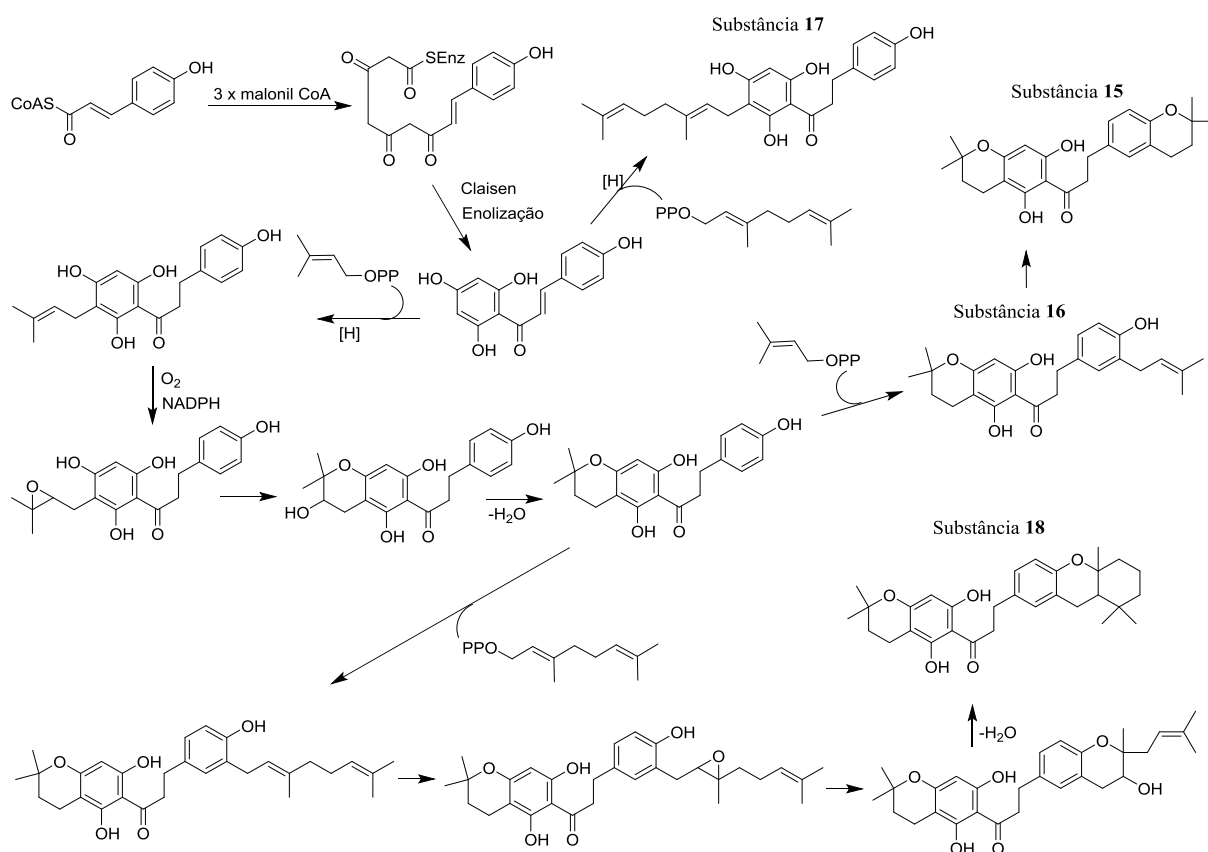


FIGURA 4.97 - Proposta da biogênese das diidrochalconas isoladas.

## 4.3 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS

### 4.3.1 - CRUZAÍNA

Os extratos etanólicos e as frações das plantas foram ensaiados na cruzaína e os resultados de inibição enzimática estão descritos na TABELA 4.8.



<b>Extrato (% de inibição)</b>	<b>Partição</b>	<b>Código</b>	<b>% de inibição (100 µg/mL)</b>
<b>MSFE 76%</b>	Hexano	MSFEH	40 ± 3
	Diclorometano	MSFED	52 ± 3
	Acetato de etila	MSFEA	25 ± 1
	Hidroalcoólica	MSFEW	9 ± 2
<b>MSCE 52%</b>	Hexano	MSCEH	47 ± 1
	Diclorometano	MSCED	<b>79 ± 1</b>
	Acetato de etila	MSCEA	20 ± 3
	Hidroalcoólica	MSCEW	23 ± 1
<b>EGFE 61%</b>	Hexano	EGFEH	49 ± 4
	Diclorometano	EGFED	74 ± 2
	Acetato de etila	EGFEA	39 ± 1
	Hidroalcoólica	EGFEW	23 ± 2
<b>EGCE 60%</b>	Hexano	EGCEH	50 ± 2
	Diclorometano	EGCED	44 ± 4
	Acetato de etila	EGCEA	40 ± 1
	Hidroalcoólica	EGCEW	30 ± 6
<b>EFFE 35%</b>	Hexano	EFFEH	35 ± 3
	Diclorometano	EFFED	25 ± 7
	Acetato de etila	EFFEA	39 ± 1
	Hidroalcoólica	EFFEW	12 ± 1
<b>EFCE 20%</b>	Hexano	EFCEH	41 ± 4
	Diclorometano	EFCED	38 ± 3
	Acetato de etila	EFCEA	14 ± 5
	Hidroalcoólica	EFCEW	11 ± 2
<b>ZFCE 32%</b>	Hexano	ZFCEH	23 ± 3
	Diclorometano	ZFCED	48 ± 3
	Acetato de etila	ZFCEA	22 ± 4
	Hidroalcoólica	ZFCEW	9 ± 1
<b>GJFE 47%</b>	Hexano	GJFEH	42 ± 3
	Diclorometano	GJFED	45 ± 5
	Acetato de etila	GJFEA	16 ± 1
	Hidroalcoólica	GJFEW	16 ± 2
<b>GJCE 31%</b>	Hexano	GJCEH	64 ± 4
	Diclorometano	GJCED	34 ± 4
	Acetato de etila	GJCEA	17 ± 4
	Hidroalcoólica	GJCEW	9 ± 4
<b>GJFrE 28%</b>	Hexano	GJFrEH	41 ± 4
	Diclorometano	GJFrED	67 ± 2
	Acetato de etila	GJFrEA	15 ± 4
	Hidroalcoólica	GJFrEW	12 ± 5

TABELA 4.8 - Porcentagem inibitória dos extratos e frações contra a enzima cruzaína.

Entre os 50 extratos e frações ensaiadas, a fração diclorometânica proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *M. stipularis* foi a que apresentou maior atividade inibitória enzimática, assim esta

fração (MSCED) foi submetida a cromatografia e as frações provenientes foram novamente ensaiadas (FIGURA 4.98). Praticamente todas apresentaram inibição enzimática acima de 90%, assim todas estas foram estudadas cromatograficamente visando o isolamento dos metabolitos responsáveis por esta inibição.

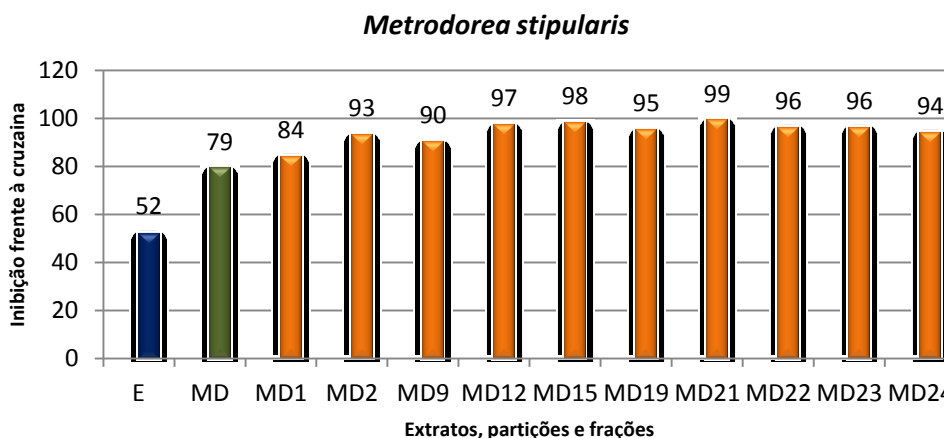


FIGURA 4.98 - Porcentagem de inibição enzimática da cruzaina do extrato etanólico dos caules de *M. stipularis* (E), da partição diclorometânica do mesmo (MD) e das frações após cromatografia desta partição (100 µg/mL).

Como discutido anteriormente, foram isoladas 18 substâncias, sendo 6 inéditas na literatura até o momento, apenas as cumarinas não foram testadas, pois absorvem no mesmo comprimento de onda (380 nm) do ensaio, fato que leva a um resultado falso negativo, as outras substâncias foram ensaiadas e os valores de IC<sub>50</sub> das que apresentaram inibição enzimática significativa estão descritos na TABELA 4.9.

Substâncias	IC <sub>50</sub> (μM)
4	99 ± 6
5	22 ± 1
6	28 ± 2
7	74 ± 3
15	22 ± 3
16	12 ± 1
17	8 ± 1
18	9 ± 2

TABELA 4.9 - Valores de IC<sub>50</sub> das substâncias na enzima cruzaina.

Apesar de não terem sido isoladas de todas as frações trabalhadas, a presença das diidrochalconas foi observada, através de espectros de RMN <sup>1</sup>H, em praticamente todas as frações ativas, e pode-se propor que a inibição enzimática observada para estas frações se deve à presença desta classe de substâncias. Como pode ser notado pelo resultado de inibição enzimática que apresentou, IC<sub>50</sub> entre 7,70 e 21,80 μM. Não há relatos de atividade enzimática em cruzaina para esta classe de substância, assim como de estudos relacionados à doença de Chagas.

Os alcaloides também apresentaram resultados interessantes, o alcaloide 1-hidroxitutaecarpina (**5**) apresentou IC<sub>50</sub> de 22 μM enquanto a rutaecarpina (**4**) apresentou IC<sub>50</sub> = 99 μM, indicando que a hidroxila, única diferença estrutural entre elas, pode ser a responsável pelo aumento da inibição enzimática, devido a interações por ligações de hidrogênio com o alvo, indicando a importância deste tipo de grupo nesta posição (FIGURA 4.99).

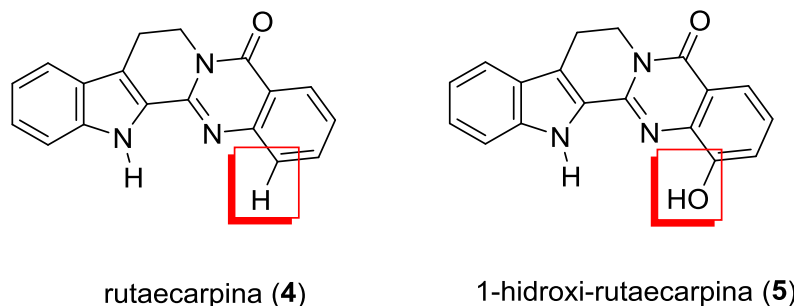


FIGURA 4.99 - Estrutura da rutaecarpina e 1-hidroxi-rutaecarpina e em vermelho a diferença estrutural entre elas.

Comportamento semelhante pode ser observado com as substâncias **6** e **7**. Estes alcaloides apresentaram  $IC_{50}$  de 28  $\mu M$  e 74  $\mu M$ , respectivamente; sendo que a única diferença estrutural entre eles é a presença da metila ligada ao átomo de nitrogênio. Assim pode-se concluir que o aumento de inibição enzimática esteja relacionada com este grupo funcional com caráter hidrofóbico nesta posição (FIGURA 4.100).

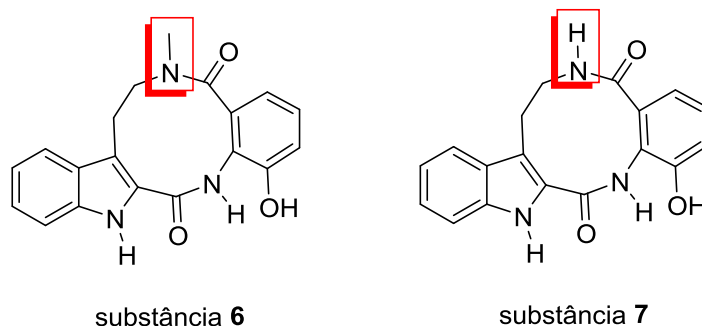


FIGURA 4.100 - Estrutura da substância **6** e **7** e em vermelho a diferença estrutural entre elas.

Da mesma forma não há relatos de atividade enzimática de alcaloides na enzima cruzaina, mas existem estudos desta classe de compostos em estudos fenotípicos relacionados a esta doença. Como RIBEIRO *et al* (2004) que descreve a atividade inibitória das formas amastigotas e epimastigotas do parasita *T. cruzi* pelo alcaloide piperina e derivados.

### 4.3.2 - CATEPSINAS

As substâncias foram ensaiadas nas catepsinas B e L a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ , as cumarinas não foram testadas devido ao mesmo motivo citado no ensaio com a cruzaina. Para aquelas que apresentaram inibição enzimática, superior a 75%, foram calculados os valores de  $\text{IC}_{50}$  (TABELA 4.10).

Substâncias	Inibição a 100 $\mu\text{M}$ (catepsina B)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (catepsina B)	Inibição a 100 $\mu\text{M}$ (catepsina L)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (catepsina L)
4	96	$30,89 \pm 2,98$	61	-
5	90	$31,94 \pm 4,86$	54	-
6	100	$14,00 \pm 0,97$	70	-
7	93	$31,50 \pm 3,81$	38	-
15	77	$14,91 \pm 1,22$	70	-
16	68	-	92	$3,27 \pm 0,47$
17	-	-	91	$1,01 \pm 0,17$
18	81	$8,50 \pm 0,78$	49	-

TABELA 4.10 - Inibição enzimática das substâncias nas catepsinas B e L (- = sem inibição).

Entre os alcaloides, as substâncias 4-7, apresentaram resultados significativos de inibição na cat B, principalmente a substância 6 cujo  $\text{IC}_{50}$  foi de 14  $\mu\text{M}$ , e da mesma forma como no caso da cruzaina, pode indicar que a metila ligada ao átomo de nitrogênio esteja relacionada à atividade. Também é interessante salientar que os dados sugerem uma boa seletividade, pois estes alcaloides não apresentaram inibição significativa, superior a 75%, na cat L.

As substâncias 15 e 18, da classe das diidrochalconas, apresentaram resultados de inibição enzimática na cat B com  $\text{IC}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$ , e não inibiram significativamente, inibição superior a 75%, a cat L; enquanto as substâncias 16 e 17, pertencente a mesma classe, apresentaram um resultado excelente de inibição enzimática na cat L com  $\text{IC}_{50}$  de 3,27  $\mu\text{M}$  e 1,01  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e, da mesma forma, não apresentaram inibição significativa na cat B, indicando uma boa seletividade destes compostos.

É interessante resaltar que diidrochalconas já se apresentaram potentes inibidoras de cat K, PATIL *et al.* (2002) descreveu a inibição enzimática desta enzima pelas substâncias AC-5-1 e cicloaltilisina 6 (FIGURA 4.101), que apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 170 nM e de 98 nM, respectivamente.

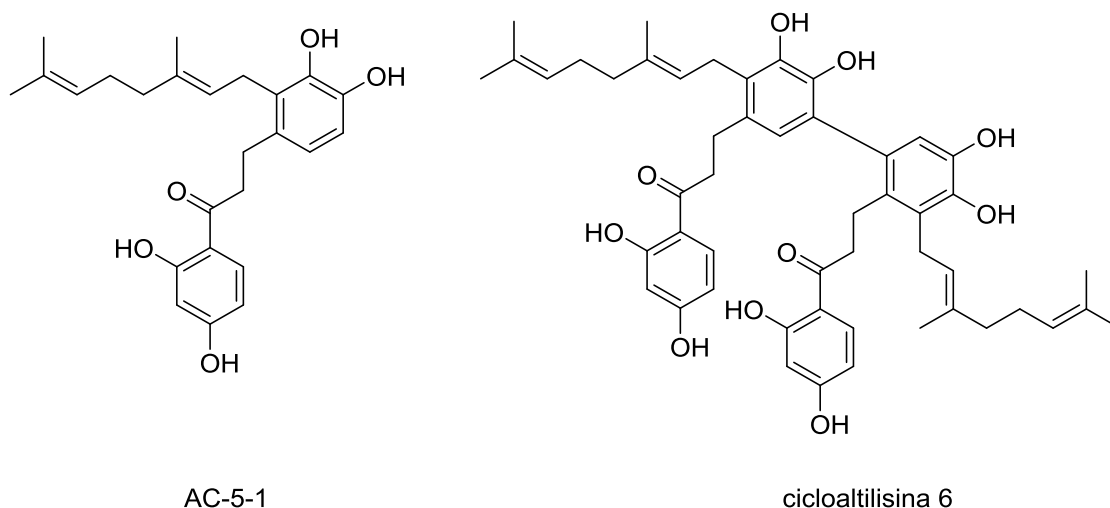


FIGURA 4.101 - Estrutura das diidrochalconas inibidoras de cat K.

Levando em conta a observação da grande seletividade e dos bons resultados de inibições enzimáticas encontradas, principalmente das substâncias **16** e **17** na cat L e das substâncias **6**, **15** e **18** nas cat B, os resultados obtidos com este ensaio foram excelentes, indicando que estas substâncias podem ser utilizadas como protótipos para inibidores mais eficazes que possam ser de interesse na quimioterapia do câncer.

#### 4.4 - ENSAIO NO *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Todas as substâncias isoladas foram ensaiadas contra as cepas 3D7 (sensível a todos os fármacos), Dd2 (resistente a cloroquina) e W2 (modesta resistência a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*.

LEVRIER *et al.* (2013) descreveu significativas inibições do crescimento da cepa 3D7 de *P. falciparum* utilizando os alcaloides mostrados na FIGURA 4.102, mas os alcaloides isolados de *M. stipularis* não apresentaram inibições significativas do crescimento do parasita em nenhuma estirpe estudada.

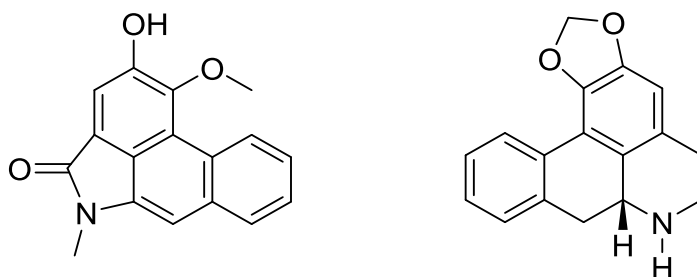


FIGURA 4.102 - Estrutura dos alcaloides que apresentaram significativas inibições no crescimento da estirpe 3D7 de *P. falciparum*.

Apenas as substâncias **15** e **18**, da classe das diidrochalconas, ainda não descritas na literatura em relação a inibição do crescimento deste parasita, foram as que inibiram significativamente as três cepas. Seus valores de EC<sub>50</sub> estão descritos na TABELA 4.11.

Cepas	EC <sub>50</sub> (µM) Substância 15	EC <sub>50</sub> (µM) Substância 18	EC <sub>50</sub> (µM) Controle (BrA)
3D7	14,4	17,7	0,6
Dd2	11,7	12,4	0,06
W2	6,7	8,5	0,05

TABELA 4.11 - Valor de EC<sub>50</sub> das substâncias inibidoras do crescimento de *P. falciparum*.

Os resultados obtidos neste experimento podem não refletir o valor real de inibição, uma vez que se detectou que a cepa 3D7 utilizada estava mais resistente. Em experimentos anteriores do laboratório, os valores de EC<sub>50</sub> encontrados para o inibidor padrão positivo, bromofacolida A, era 0,05 µM, enquanto que para o experimento cujos dados encontram-se na tabela 4.11, o

valor encontrado foi de 0,6 uM para este padrão. Isto sugere que a cepa estava em torno de 10 vezes mais resistente e provavelmente os valores de  $EC_{50}$  listados na tabela sejam 10 vezes menores.

Os resultados foram bem interessantes se tratando de substâncias inéditas e que apresentaram valores de  $EC_{50}$  relativamente baixos, sendo um indício de que esta classe de compostos pode ser estudada mais profundamente a fim de se obter compostos que possam inibir mais fortemente o crescimento deste parasita.



# **CONCLUSÃO**

## 5 - CONCLUSÃO

A realização deste trabalho trouxe resultados inéditos e satisfatórios tanto no âmbito da química quanto da bioquímica e biologia.

O resultado de isolamento e elucidação estrutural de várias substâncias discutidos são de grande relevância, em se tratando de uma planta ainda não descrita na literatura. Assim os novos dados acrescentam informações a composição química e a bioatividade de 18 substâncias isoladas de *Metrodorea stipularis*. Do ponto de vista químico as substâncias isoladas são típicas da família Rutaceae, assim como o isolamento de diidrochalconas só é relatado na literatura para esta família na espécie *Metrodorea nigra*.

O caule da planta trabalhada mostrou uma composição rica em cumarinas, alcaloides e diidrochalconas. Foram isoladas dezoito substâncias sendo cinco delas inéditas na literatura até o momento. Três pertencentes à classe das diidrochalconas (substâncias **15**, **16** e **18**), classe muito pouco descritas na literatura e dois alcaloides (substâncias **6** e **7**) de esqueleto inédito.

Outro ineditismo do trabalho é o estudo biomonitorado de *M. stipularis* e seus metabolitos na enzima cruzaina, cujos resultados foram relevantes, as diidrochalconas apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 7,7 µM e 21,8 µM. A presença desta classe é observada em todas as frações ativas indicando a ligação desta com a inibição enzimática encontrada na partição diclorometânica trabalhada.

As substâncias isoladas apresentaram atividades significativas frente às catepsinas B e L, além de boa seletividade, o que as caracteriza como bons protótipos para estudos posteriores.

O estudo destes compostos na inibição do crescimento do parasita *Plasmodium falciparum*, também ainda não está descrito na literatura e apresentou resultados interessantes, sendo as substâncias **15** e **18**, da classe das diidrochalconas, as que apresentaram inibição significativa.

Portanto, estes ensaios realizados levaram à descoberta de substâncias com potencial inibitório em diferentes alvos e que poderão ser utilizadas como protótipos para desenvolvimentos posteriores. Desta forma abre-se mais uma possibilidade para a obtenção de inibidores mais potentes que possam ser aprimorados visando a obtenção de novos fármacos para o tratamento de doenças como: doença de Chagas, câncer e malária.



**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARICI, T. R.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. "Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae)". *Quim. Nova*, **33**:2130-2134, 2010.
- AUZI, A. A.; HARLEY, T. G. e WATERMAN, P. G. "Distribution of flavonoids, alkaloids, acetophenones and phloroglucinols in the genus *Bosistoa* (Rutaceae)". *Biochem. Syst. Ecol.*, **25**:611-617, 1997.
- BAETAS, A. C. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. "Coumarins and alkaloids from the stems of *Metrodorea flavida*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **10**:181-183, 1999.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. "The value of natural products to future pharmaceutical discovery". *Nat. Prod. Rep.*, **24**:1225-1244, 2007.
- BALUNAS M.J. e KINGHORN A.D. "Drug discovery from medicinal plants". *Life Sciences*, **78**:431-441, 2005.
- BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A. M. "Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos". Artmed, 2001.
- BENNETT, T. N.; PAGUIO, M.; GLIGORIJEVIC, B.; SEUDIEU, C.; KOSAR, A. D.; DAVIDSON, E.; ROEPE, P. D. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**:1807-1810, 2004.
- BRAGA, P. A. C. "Estudo fitoquímico de espécies de *Hortia* (Rutaceae), importância quimiosistemática e atividades biológicas dos constituintes isolados". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 269 p.
- BRAZ FILHO, R. "Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente". *Quim. Nova*, **33**:229-239, 2010.
- BRENER, Z. "*Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Dias J. C. P.; Coura, J. R., Clínica e terapêutica da Doença de Chagas. Um manual prático para a Clínica geral, Fio Cruz, Rio de Janeiro, 25-31, 1997.
- BROMME, D.; KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 99-110, 2002.
- CASTRO, S. L. "The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update on drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*." *Acta Tropica*, **53**:83-98, 1993.
- CHOE, Y.; BRINEN, L. S.; PRICE, M. S.; ENGEL, J. C.; LANGE, M.; GRISOSTOMI, C.; WESTON, S. G.; PALLAI, P. V.; CHENG, H.; HARDY, L. W.; HARTSOUGH, D. S.; McMAKIN, M.; TILTON, R. F.; BALDINO, C. M. & CRAIK, C. S. "Development of  $\alpha$ -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicates in Chagas disease". *Bioorg. Med. Chem.*, **14**:2141-2156, 2005.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. "Neoplasia: Patologia estrutural e funcional". 6 ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 233-295, 2000.

COURA, J. R. "Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias". Guanabara, **1**:557-677, 2005.

COUTO, E. L.; TERSARIOL, I. L. S.; PINHA, M. A. S.; SIMOES, C. A. "Cathepsin B and Heparanase activity and expression in head and neck squamous cell carcinoma". *Oral Oncol. Suppl.*, **2**:96, 2007.

DARDONVILLE, C. "Recent advances in antitrypanosomal chemotherapy: patent literature 2002-2004". *Expert Opin. Ther. Pat.*, **15**:1241; 2005.

DOLABELA M. F.; OLIVEIRA S. G.; NASCIMENTO J. M.; PERES J. M.; WAGNER H.; PÓVOA M. M.; DE OLIVEIRA A. B. "In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon". *Phytomed.*, **15**:367-372, 2008.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H.; "Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection". *J. Exp. Med.*, **188**:725; 1998a.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; BAINTON D.F.; MCKERROW, J. H. "Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*". *J. Cell Sci.* **111**:597-606 1998b.

FACUNDO, V. A.; DA SILVEIRA, A. S. P.; BRAZ FILHO, R.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. "CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN". *Quim. Nova*, **28**:224-225, 2005.

FAIRLAMB, A. H. "Future prospects for the chemotherapy of Chagas disease", *Medicina (Buenos Aires)*, **2**:179-182, 1999.

FERREIRA S. H.; BARATA L. E. S.; SALLES S. L. M.; QUEIROZ S. R. R. "Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil". Academia Brasileira de Ciências. São Paulo, 1990.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. "Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis". *Phytother. Res.*, **8**:174-178, 1994.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. "Produção de metabolitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*". *Rev. bras. farmacogn.*, **18**:627-641, 2008.

FUSETANI, N.; FUJITA, M.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S. "Tokaramide A, a new cathepsin B inhibitor from the marine sponge *Theonella aft. Mirabilis*". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**:3397-3402, 1999.

GELB, M. H. e HOL, W. G. J. "Drugs to combat tropical protozoan parasites". *Science*, **297**:343-344, 2002.

GROPPO, M., PIRANI, J. R., SALATINO, M. L. F., BLANCO, S. R., KALLUNKI, J. A. "Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA". *Am J. Bot.* **95**:985-1005, 2008.

HARKAR, S.; RAZDAN, T. K.; WAIGHT, E. S. "Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*", *Phytochemistry*, **23**: 419-426, 1984.

HAZEN, L. G. M.; BLEEKER, F. E.; LAURITZEN, B.; BAHNS, S.; SONG, J.; JONKER, A.; DRIEL, B. E. M. V.; LYON, H.; HANSEN, U.; KOHLER, A.; NOORDEN, C. J. F. V. "Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer." *J. Histochem. Cytochem.* **48**: 1421-1430, 2000.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores". EdUFSCar, São Carlos, 2003.

IIDA, T.; NAKANO, M.; ITO, K. "Hydroperoxy sesquiterpene and lignan constituents of *Magnolia kobus*." *Phytochemistry*, **21**:673-675, 1982.

ISIDORO, M. M.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; ARRUDA, A. C.; SILVA, S. C. " Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)". *Quim. Nova*, **35**:2119-2124, 2012.

JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; SILVA, J. J. B.; CONSERVA, L. M. "Alcaloides  $\beta$ -indolopiridoquinazolinicos de *Esenbeckia grandiflora* MART. (RUTACEAE)". *Quim. Nova*, **32**:2034-2038, 2009.

KANG, J., ZHOU, L., SUN, J., HAN, J., GUO, D. "Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahurica* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique". *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **47**, 778-785, 2008.

KOMINAMI, E.; KUNIO, I.; KATUNUMA, N. "Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular-dystrophy". *Am. J. Pathol.*, **127**: 461-466, 1997.

LANKELMA, J.M; VOOREND, D. M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; VAN DER SPEK, A. H.; DE PORTO, A. P.; VAN ROOIJEN, G.; VAN NOORDEN, C. J. "Cathepsin L, target in cancer treatment?". *Life Sci.*, **86**: 225-233, 2010.

LETO, G.; SEPPORTA, M. V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C.; TUMMINELLO, F. M. "Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications". *J. Biol. Chem.*, **391**: 655-664, 2010.

LEVRIER, C.; BALASTRIER, M.; BEATTIE, K. D.; CARROLL, A. R.; MARTIN, F.; CHOUMUENWAI, V.; DAVIS, R. A. " Pyridocoumarin, aristolactam and aporphine alkaloids from the Australian rainforest plant *Goniothalamus australis*". *Phytochemistry* **86**:121-126, 2013.

LOBO, A. M.; LORENÇO, A. M. "Biossíntese de produtos naturais". IST, Lisboa, 2007.



MASON, R. W.; GREEN, G. D. J.; BARRETT, A. J. "Human liver cathepsin L". *Biochem. J.*, 226-233, 1985.

MIKOLAJACZAK, K. L.; WEISLEDER, D.; PARKANYL, L.; CLARDY, J. *J. Nat. Prod.*, **51**:606, 1988.

MONCAYO, A. e ORTIZ, Y. M. I.; "An update on Chagas disease (human american trypanosomiasis)". *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **100**:663-677, 2006.

MULLER, A. D.; VIEIRA P. C.; DA SILVA M. F. DAS G. F.; FERNANDES J. B. "Dihydrochalcones, coumarins and alkaloids from *Metrodorea nigra*". *Phytochemistry*, **40**:1797-1800, 1995.

MURRAY, R. D. H.; ZACARIAS, J. D. "A simple method for differentiating between angular linear 5-methoxyfuranocoumarins". *Phytochemistry*, **23**:697-699, 1984.

NAYAR, M.N.S.; SUTAR, C.V.; BHAN, M.K. "Alkaloids of the stem bark of *Hesperethysa crenulata*". *Phytochemistry*, **10**:2843-2844, 1971.

OMS, Organização Mundial de Saúde. *World malaria report*, 2013. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013)>. Acesso em 24 Fev. 2014.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K. "A new dimeric dihydrochalcone and a new prenylated flavone from the bud covers of *Artocarpus altilis*: potent inhibitors of cathepsin K". *J. Nat. Prod.*, **65**, 624-627, 2002.

PEREIRA, J. M.; SEVERINO, R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNADES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. ZOTTIS, A.; ANDRICUPULO, A. D.; OLIVA, G.; CORRÊA, A. G. "Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*". *Bioorg. Med. Chem.*, **16**:8889-8895, 2008.

PIRANI, J. R. "Galipea in lista de espécies da flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB746>>. Acesso em: 23 Jan. 2014a.

PIRANI, J. R. "Esenbeckia in lista de espécies da flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB583>>. Acesso em: 23 Jan. 2014b.

PIRANI, J. R. "Esenbeckia in lista de espécies da flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB589>>. Acesso em: 23 Jan. 2014c.

PIRANI, J. R. "Zanthoxylum in lista de espécies da flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1104>>. Acesso em: 23 Jan. 2014d.

PIRANI, J. R. "Metrodorea in Lista de espécies da flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB823>>. Acesso em: 23 Jan. 2014e.

PUSSET, J.; LOPEZ, J.L.; PAIS, M.; NEIRABEYEH, M.A.; VEILLON, J.M. "Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*". *Planta Med.*, **57**:153-155, 1990.

RAZDAN, T. K.; QUADRI, B.; HARKAR, S. e WAIGHT, E. S. "Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*". *Phytochemistry*. **26**:2063-2069, 1987.

REN, X. F.; LI, H. W.; FANG, X.; WU, Y.; WANG, L.; ZOU, S. "High selective azadipeptide nitrile inhibitors for cathepsin K: design, synthesis and activity assay". *Org. Biomol. Chem.*, **11**:1143, 2013.

RIBEIRO, A. B. "Fitoquímica do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* e da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae) e biossíntese de cumarinas preniladas, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2006. Tese de Doutorado, 262 p.

SAID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, L. S.; MCKERROW, J. H. "Cruzain: the path from target validation to the clinic". *Adv. Exp. Med. Biol.*, **712**:100-115, 2011.

SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H. & OHKI, T. "6 $\beta$ -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus*". *Phytochemistry*, **22**:2553, 1983.

SALLES, L. V. O. "Evolução de Limonóides em Meliaceae e Estudo Fitoquímico de *Khaya senegalensis* (Meliaceae)" Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, Tese de Doutorado, 1995.

SARKER, S. D.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G.; ARMSTROG, J. A. "Coumarins from *Asterolasia trymalioides*". *J. Nat. Prod.* **57**:1549-1551, 1994.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BROMME, D.; M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D.; VIEIRA, P. C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V". *Bioorg. Med. Chem.*, **19**:1477–1481, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. "Farmacognosia: da planta ao medicamento". 6 ed., UFSC, Florianópolis, 2010.

SLOANE, B.F.; MOIN, K.; LAH, T. "Biochemical and molecular aspects of selected cancers". *Academic Press*, San Diego, 411-466, 1994.

SMILKSTEIN, M.; SRIWILAIJAROEN, N.; KELLY, J. X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1803-1806, 2004.

TALIERI, M.; PAPADOPOULOU, S.; SCORILAS, A.; XYNOPOULOS, D.; ARNOGIANAKI, N.; PLATANIOTIS, G.; YOTIS, J.; AGNANTI, N. "Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of coloretal adenoma to carcinoma". *Cancer Lett.*, **205**:97-106, 2004.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". *Biochem. Biophys. Acta*, **1477**: 98-111, 2000.

TURK, D. e GUNCAR, G.; "Lysosomal cysteine protease (cathepsins): promising drug targets". *Acta Crys.*, **59**:203-213, 2003.

TYLER, K. M. e ENGMAN, D. M. "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited". *Int. J. Parasitol.*, **31**:472; 2001.

URBINA, J. C. e DOCAMPO, R. "Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances". *Trends Parasitol.*, **19**:495-501, 2003.

VASILJEVA, T.; REINHECKEL, C.; PETERS D.; TURK, V.; TURK, B. "Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets". *Curr. Pharm. Des.*, **13**: 387-403, 2007

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBURQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVAO, F. "Strategies for isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales". *Pure Appl. Chem.*, **73**(3)617-622, 2001.

WATERMAN, P. G. e GRUNDON, M. F. "Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales". *Academic Press*, 465, Londres, 1983.

WATERMAN, P. G. "The chemical systematic of alkaloid: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer". *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**:395-406, 1999.

WIGGERS, H. J. Integração de métodos *in silico* e *in vitro* para o planejamento de inibidores da enzima cruzaina. São Carlos, Programa de pós graduação em química - USP, 2011. Tese de doutorado, 14 p.

WHO "Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases". Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas, Genebra, 2010. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/)>. Acesso em: 24 fev. 2014.

WU, T.S., TSANG, Z.J., WU, P.L., LIN, F.W., LI, C.Y., TENG, C.M., LEE, K.H. "New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaries*". *Bioorg. Med. Chem.*, **9**:77-83, 2001.

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BROMME, D.; "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for design of new therapeutics". *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57**: 973-993, 2005.

ZHAO, Q.; JIA, Y.; XIAO, Y. "Cathepsin K: A therapeutic target for bone diseases". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**: 721-723, 2009.